



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Η Επίδραση Αλληλεπιδρουσών Πρωτεϊνών του Παράγοντα SAFB
(Scaffold Attachment Factor B) στη Λειτουργία του**

Παπαθανασίου Μαρία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γεωργιάτσου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας- Μοριακής Βιολογίας, Επιβλέπουσα
 - Μυλωνής Ηλίας, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
 - Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

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

Λάρισα, Οκτώβριος, 2014



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
The Effect of SAFB (Scaffold Attachment Factor) Interacting Proteins on its
Function

By
Papathanassiou Maria

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Georgatsou Heleni, Associate Professor, Biochemistry- Molecular Biology, Supervisor
 - Mylonis Ilias, Assistant Professor, Biochemistry
 - Germenis Anastasios, Professor, Laboratory Immunology

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

Larissa , October, 2014

Στην αδερφή μου, Έρη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Κλινικές εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής”, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιοχημείας- Μοριακής Βιολογίας, κας Γεωργάτσου Ελένης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας- Μοριακής Βιολογίας, Γεωργάτσου Ελένη, για τη δυνατότητα που μου παρείχε να μνηθώ στα μονοπάτια της μοριακής βιολογίας και βιοχημείας, όπως και για τη συνεχή υποστήριξη και ορθή καθοδήγησή της, τόσο στην παρούσα εργασία, όσο και καθ’ όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Σίμο Γεώργιο, για τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Βιοχημείας καθώς και για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Γερμενή που δέχτηκε να γίνει μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Επίσης, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Μυλωνή Ηλία, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Υποψήφια Διδάκτωρ Δρακούλη Σωτηρία για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά της. Καθ’ όλη τη διάρκεια της μέχρι τώρα ερευνητικής μου δραστηριότητας υπήρξε δίπλα μου τις στιγμές που τη χρειάστηκα προσφέροντάς μου την πολύτιμη βοήθειά της. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες, Κούρτη Μαρία, Ριμενίδη Γεωργία και Πάγγου Ευανθία και τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Μπεφάνη Χριστίνα για την βοήθεια και τη στήριξή τους, καθώς και τους συμφοιτητές μου Μπαρού Ζωή και Γραμματικόπουλο Αλέξανδρο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος στο εργαστήριο. Νιώθω ιδιαίτερα ευτυχής που μου δόθηκε η ευκαιρία στα πρώτα αυτά στάδια της δραστηριότητάς

μου σε εργαστηριακό χώρο, να γνωρίσω τόσο αξιόλογους ανθρώπους.

Τέλος, θα ήθελα πάνω απ' όλα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη συνεχή οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν, όπως και τους πραγματικούς μου φίλους Έρη Παπαθανασίου, Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου, Rajesh Jagirdar, Γεωργία Φοδελιανάκη, Αγγελική Καραγιώτα, Γρηγόρη Ζαχαράτο και Μαρία Παππά, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε εύκολη και δύσκολη στιγμή αυτής της πορείας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|--------|
| 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | σελ.9 |
| 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | σελ.12 |
| 2.1. Ανακάλυψη και χαρακτηρισμός της πυρηνικής πρωτεΐνης πρόσδεσης στην πυρηνική μήτρα Scaffold Attachment Factor B1..... | σελ.12 |
| 2.2. Οι λειτουργίες της πυρηνικής πρωτεΐνης SAFB1..... | σελ.12 |
| 2.3. Ο SAFB2 (Scaffold Attachment Factor B2) είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας των πυρηνικών πρωτεϊνών πρόσδεσης στην πυρηνική μήτρα SAFBs..... | σελ.14 |
| 2.3.1. Ομολογία της δομής των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 σε πρωτεϊνικό και νουκλεοτιδικό επίπεδο..... | σελ.14 |
| 2.4. Ο μηχανισμός συγκαταστολής των πυρηνικών υποδοχέων από τις πρωτεΐνες SAFB1 και SAFB2..... | σελ.15 |
| 2.4.1. Ο μηχανισμός συγκαταστολής του υποδοχέα των οιστρογόνων ER από τους SAFB1 και SAFB2..... | σελ.15 |
| 2.4.2. Ο SAFB1 είναι γενικός συγκαταστολέας των πυρηνικών υποδοχέων..... | σελ.17 |
| 2.4.3. Ο μηχανισμός συγκαταστολής του υποδοχέα των ανδρογόνων AR από το SAFB1..... | σελ.17 |
| 2.5. Οι πρωτεΐνες SAFB1 και SAFB2 αλληλεπιδρούν με πληθώρα πρωτεϊνών στον πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου..... | σελ.18 |
| 2.5.1. Οι πρωτεΐνες SAFB1 και SAFB2 αλληλεπιδρούν με την κινάση σερίνης-θρεονίνης SRPK1..... | σελ.19 |
| 2.6. Η εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη ERH και ο ρόλος της σε πυρηνικές λειτουργίες..... | σελ.20 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | σελ.21 |
| 3.1. Τεχνικές Κατεργασίας DNA..... | σελ.21 |
| 3.1.1. Πλασμιδιακές Κατασκευές..... | σελ.21 |
| 3.1.2. Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης..... | σελ.22 |
| 3.1.3. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες..... | σελ.22 |
| 3.1.4. Δημιουργία αμβλέων άκρων τμημάτων DNA..... | σελ.22 |
| 3.1.5. Αντίδραση λιγάσης..... | σελ.23 |
| 3.1.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης..... | σελ.23 |
| 3.1.7. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης..... | σελ.24 |
| 3.1.8. Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA..... | σελ.24 |
| 3.1.9. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)..... | σελ.24 |
| 3.1.10. Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη..... | σελ.25 |

| | |
|--|--------|
| 3.2. Πειραματικές Τεχνικές Κατεργασίας Βακτηριακών Κυττάρων..... | σελ.25 |
| 3.2.1. Βακτηριακά στελέχη..... | σελ.25 |
| 3.2.2. Παρασκευή βακτηρίων <i>E.Coli</i> δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA..... | σελ.25 |
| 3.2.3. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων..... | σελ.26 |
| 3.2.4. Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (mini preparation)..... | σελ.27 |
| 3.2.5. Μεσαίας κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση του Midi Kit Qiagen..... | σελ.27 |
| 3.3. Πειραματικές Τεχνικές Κατεργασίας και Μελέτης Ευκαρυωτικών Κυττάρων..... | σελ.28 |
| 3.3.1. Ευκαρυωτικές καλλιέργειες..... | σελ.28 |
| 3.3.2. Θρυψινοποίηση κυττάρων..... | σελ.29 |
| 3.3.3. Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια εξωγενούς προέλευσης με κατιονικό αντιδραστήριο PEI..... | σελ.30 |
| 3.3.4. Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια εξωγενούς προέλευσης με κατιονικό αντιδραστήριο Turbofect..... | σελ.30 |
| 3.3.5. Κατεργασία ορού βοός (FBS) με μίγμα δεξτράνης και ενεργού άνθρακα..... | σελ.31 |
| 3.3.6. Δοκιμασία λουσιφεράσης με χρήση του Dual-Luciferase® Reporter Assay System της Promega..... | σελ.31 |
| 3.3.7. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western..... | σελ.31 |
| 3.3.8. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού..... | σελ.33 |
| 3.3.9. Μικροσκοπία φθορισμού..... | σελ.34 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | σελ.35 |
| 4.1. Προσδιορισμός των πειραματικών συνθηκών για τη βέλτιστη συγκαταστολή του ER από το SAFB1 σε κύτταρα MCF-7..... | σελ.35 |
| 4.2. Προσδιορισμός των πειραματικών συνθηκών για τη βέλτιστη συγκαταστολή του ER από το SAFB2 σε κύτταρα MCF-7..... | σελ.37 |
| 4.3. Μελέτη της επίδρασης της SRPK1 στη δράση συγκαταστολής του SAFB1 στον ER σε κύτταρα MCF-7..... | σελ.39 |
| 4.4. Κλωνοποίηση του γονιδίου της SRPK1 πλήρους μήκους στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP3..... | σελ.41 |
| 4.5. Κλωνοποίηση του γονιδίου της ERH πλήρους μήκους στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP3..... | σελ.45 |
| 4.6. Μελέτη της επίδρασης της ERH στη δράση συγκαταστολής του SAFB1 και SAFB2 στον ER σε κύτταρα MCF-7..... | σελ.50 |

| |
|----------------------------|
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.53 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.56 |

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεΐνες πρόσδεσης στην πυρηνική μήτρα SAFB (Scaffold Attachment Factor B) είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες όπως η μεταγραφή, το μάτισμα και γενικά η ωρίμανση του mRNA, η επιδιόρθωση του DNA και η οργάνωση της χρωματίνης. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση πρωτεϊνών που έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα SAFB1 στη λειτουργία του, καθώς και σε αυτή του ομολόγου του SAFB2.

Οι αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ήταν η SRPK1 (Serine- Arginine Protein Kinase 1) και η ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue), για τις οποίες έχει βρεθεί στο εργαστήριο Βιοχημείας ότι αλληλεπιδρούν με το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1, με την τεχνική του συστήματος των δύο υβριδίων στο *Saccharomyces cerevisiae* [25], [9], (αδημοσίευτα δεδομένα).

Δεδομένου ότι η πιο γνωστή και καλά μελετημένη λειτουργία των πρωτεϊνών SAFB είναι η δράση τους ως συγκαταστολείς του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER- Estrogen Receptor), στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκαν οι κατάλληλες συνθήκες κάτω από τις οποίες οι δύο παράγοντες ασκούν τη μεγαλύτερη καταστολική τους δράση στη μικρότερη ποσότητα, σε κύτταρα που εκφράζουν ενδογενώς τον ER. Οι ποσότητες που προσδιορίστηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη της επίδρασης των μορίων SRPK1 και ERH στη λειτουργία των SAFB1 και SAFB2 ως συγκαταστολείς του ER.

Έχει δειχθεί ότι η SRPK1 αλληλεπιδρά με τους SAFB1 και SAFB2 in vitro και in vivo και ότι οι δύο παράγοντες προσδένονται με διαφορετική συγγένεια στην κινάση [9]. Έτσι, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της SRPK1 στη λειτουργία του SAFB1, ως συγκαταστολέα του ER. Λόγω ιδιαίτερων αποτελεσμάτων των πειραμάτων κρίθηκε απαραίτητο να κλωνοποιηθεί η SRPK1 σε καινούριο πλασμιακό φορέα, καταλληλότερο για το συγκεκριμένο πείραμα, προσπάθεια που όμως απέτυχε. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται και συζητούνται.

Επιπλέον, το εργαστήριό μας έχει δείξει, με τη μέθοδο του συστήματος των δύο υβριδίων στο *Saccharomyces cerevisiae* ότι η πρωτεΐνη ERH αλληλεπιδρά με τον SAFB1, αλλά όχι με τον SAFB2. Αντίθετα, σε in vitro πειράματα, η πρωτεΐνη ERH προσδένεται στο καρβοξυτελικό τμήμα και των δύο πρωτεϊνών, όταν αυτές είναι βακτηριακά εκφραζόμενες (αδημοσίευτα δεδομένα). Έτσι, το cDNA της ανθρώπινης ERH κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης θηλαστικών και επιβεβαιώθηκε η έκφρασή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και με πειράματα φθορισμού. Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της ERH στη λειτουργία των SAFB1 και SAFB2 ως συγκαταστολείς του ER. Τα

αποτελέσματα δείχνουν ότι η ERH αναιρεί την κατασταλτική δράση του SAFB1 στη μεταγραφική δραστηρότητα του ER, αλλά όχι εκείνη του SAFB2. Η διάκριση αυτή μπορεί να οφείλεται σε κάποια πιθανή τροποποίηση στο καρβοξυτελικό άκρο του SAFB2.

ABSTRACT

The nuclear matrix proteins SAFB (Scaffold Attachment Protein B) are multifunctional proteins involved in cellular processes such as transcription, RNA splicing and processing, DNA repair and chromatin organization. The aim of the work presented was to study the effect of SAFB1 interacting proteins on its function, as well as on the function of its homologue, SAFB2.

The proteins studied were SRPK1 (Serine-Arginine Protein Kinase 1) and ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue) which were found in the Laboratory of Biochemistry to interact with SAFB1 with the method of two hybrid in *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) [25], [9], (unpublished results).

Since the ER (Estrogen Receptor) co-repressor activity of the SAFB proteins is one of their most established functions, in the present study we first determined the conditions under which the two factors exert their full repression activity in cells endogenously expressing the ER. The minimal quantities determined were used to study the effect of SRPK1 and ERH on the co-repressor activity of SAFB1 and SAFB2.

It has been shown that SRPK1 interacts with SAFB1 and SAFB2 *in vitro* and *in vivo* with different affinity (stronger for SAFB1) [9]. In the present study the effect of SRPK1 was examined on the co-repressor activity of SAFB1. Due to inconclusive experimental results it was decided that it was necessary that SRPK1 should be cloned in a more appropriate plasmid vector for the specific experiment, a process which did not result to the desirable outcome. These results are described and discussed.

Our lab has additionally shown that ERH interacts with SAFB1 in Sc, but not with SAFB2, with the two hybrid system. On the contrary, in *in vitro* experiments, ERH binds to the carboxy-terminal part of both bacterially expressed proteins (unpublished results). Consequently, the ERH cDNA was sub-cloned in a mammalian expression vector and its expression and localization in cultured cells was verified by Western blot experiments and fluorescence. Subsequently, the effect of ERH was examined on the co-repressor activity of SAFB1 and SAFB2. Our results show that ERH alleviates the repressor activity of SAFB1 on the ER, but not that of SAFB2. We hypothesize that this distinction might be due to a post-translational modification taking place at the carboxy-terminal end of SAFB2.

2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Ανακάλυψη και χαρακτηρισμός του παράγοντα πρόσδεσης στην πυρηνική μήτρα Scaffold Attachment Factor B1 (SAFB1)

Οι παράγοντες πρόσδεσης στο ικρίωμα ή πυρηνική μήτρα είναι πρωτεΐνες που απαντώνται σε αυτό το δίκτυο πρωτεϊνών και DNA και συμβάλλουν στην οργάνωση της χρωματίνης σε διακριτές τοπολογικές περιοχές. Η πρωτεΐνη SAFB1 (Scaffold Attachment Factor B1) απομονώθηκε ως μία τέτοια πρωτεΐνη, με βάση την ιδιότητά της να αναγνωρίζει και να προσδέεται σε περιοχές S/MARs (Scaffold/ Matrix Attachment Regions) του DNA και αποτελεί μέλος μιας οικογένειας αποκλειστικά πυρηνικών πρωτεϊνών, των οποίων η ονομασία καθορίστηκε με βάση την αφθονία της ποσότητάς τους κατά την απομόνωση, συνεπώς ονομάστηκαν SAFA-D [1]

Παράλληλα, η ίδια πρωτεΐνη χαρακτηρίστηκε από μια δεύτερη ομάδα [2] ως πρωτεΐνη που προσδέεται στον υποκινητή του γονιδίου hsp27, μειώνοντας της μεταγραφική του ενεργότητα.

Ο SAFB1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, γεγονός που επαληθεύτηκε μέσω της ανίχνευσης του mRNA του, σε ίδια επίπεδα για όλους τους κυτταρικούς τύπους και ιστούς που εξετάστηκαν [1], αλλά και καθ'όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του ποντικού [13].

2.2 Η δομή και οι λειτουργίες της πυρηνικής πρωτεΐνης SAFB1

Από τη δομή της πρωτεΐνης προκύπτει ότι ο SAFB1 μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές και συγκεκριμένα, πυρηνικές λειτουργίες. Το μέγεθος του mRNA του είναι 2748 ζεύγη βάσεων και το μέγεθος της πρωτεΐνης 915 αμινοξέα [2]. Η πρωτεΐνη αποτελείται από διακριτές περιοχές, οι οποίες μπορούν να επιτελέσουν διαφορετικές λειτουργίες. Η αναγνώριση της λειτουργίας αυτών των περιοχών προέκυψε από τους ρόλους που επιτελούν παρόμοιες περιοχές σε άλλες πρωτεΐνες [3]. Συγκεκριμένα, στο αμινοτελικό της άκρο εντοπίζεται ένα SAF-box, δηλαδή μια περιοχή που προσδέεται στο DNA (εικόνα 1). Το μοτίβο αυτής της περιοχής πιστεύεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην οργάνωση της χρωματίνης και συγκεκριμένα στην οργάνωση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών της πυρηνικής μήτρας και των περιοχών S/MARS [1]. Στην κεντρική περιοχή, υπάρχει μια περιοχή πρόσδεσης στο RNA (RRM), η οποία απαντάται σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ωρίμανση του RNA. Ακολουθεί το σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (NLS) [3]. Τέλος, το καρβοξυτελικό της άκρο περιέχει μια περιοχή πλούσια σε γλουταμινικό/αργινίνες και μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνες. Παρατηρείται ότι οι περισσότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του SAFB1 συμβαίνουν με αυτήν την περιοχή.

Η σημαντικότερη και καλύτερα μελετημένη λειτουργία του SAFB1 είναι αυτή ως καταστολέας του υποδοχέα των οιστρογόνων. Ο υποδοχέας των οιστρογόνων είναι μέλος μιας υπερικογένειας πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων. Τα οιστρογόνα προσδένονται στον υποδοχέα ER (Estrogen Receptor), με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η διαμόρφωσή του και να ομοδιμερίζεται. Στη συνέχεια, προσδένεται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA, τα στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Response Elements, ERE), μεταβάλλοντας τη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων στόχων του. Η δράση του ER είναι περίπλοκη, αφού περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή του με άλλα μόρια που ονομάζονται συμπαραγόντες [6]. Συγκεκριμένα, ο ER αλληλεπιδρά με παράγοντες που ενισχύουν τη δράση του και ονομάζονται συνενεργοποιητές, αλλά και με άλλους, όπως ο N-CoR, που καταστέλλουν τη δράση του και ονομάζονται συνκαταστολείς. Η έρευνα των Oesterreich et al., 2000 επιβεβαίωσε την αλληλεπίδραση του SAFB1 με τον ER με πειράματα *in vitro*, αλλά και μέσα σε κύτταρα, παρουσία και απουσία του προσδέτη του, της οιστραδιόλης (E_2). Στη συνέχεια, παρατήρησαν τη μεταβολή στη μεταγραφική ενεργότητα του ER μετά από υπερέκφραση του SAFB1, παρουσία και απουσία E_2 , διαπιστώνοντας ότι η μεταγραφική ενεργότητα του ER μειώνονταν ανάλογα με την αύξηση των ποσοτήτων του SAFB1.

Ήδη από την ανακάλυψή του, ο SAFB1 είχε συνδεθεί με τη μεταγραφή και το μάτισμα του mRNA. Η ομάδα του Nayler, δείχνει ότι μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II, όπως και με παράγοντες ματίσματος *in vitro* και ότι ο SAFB1 μαζί με τον παράγοντα ματίσματος SRp30c σχηματίζουν σύμπλοκο με τα στοιχεία S/MARs. Περαιτέρω, με πειράματα σε κυτταρικές καλλιέργειες δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση του SAFB1 με πρωτεΐνες SR επηρεάζει την επιλογή του σημείου κοπής κατά το μάτισμα, εμπλέκοντας έτσι το SAFB1 στη διεργασία του ματίσματος [4]. Η ικανότητα αλληλεπίδρασης του SAFB1 με παράγοντες ματίσματος και η πιθανή εμπλοκή του σε αυτή τη διαδικασία ενισχύεται με την έρευνα των Tsianou et al., 2009 που ταυτοποιούν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με την κινάση SRPK1 (Serine- Arginine Protein Kinase) *in vitro* και *in vivo*, δείχνοντας επιπρόσθετα ότι το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η αναστολή της δράσης της κινάσης [5]. Τέλος, ο SAFB1, μέσω των αλληλεπιδράσεών του με επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA, φαίνεται να εμπλέκεται έμμεσα στην οργάνωση της χρωματίνης [18].

Τέλος, η εμπλοκή του SAFB1 στον καρκίνο του μαστού είναι εμφανής από τις μελέτες του εργαστηρίου Steffi Oesterreich [19], όπου έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του SAFB1 είναι χαμηλά σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του μαστού, συνδέοντας έτσι τα χαμηλά του επίπεδα με επιθετικότερους όγκους και μειωμένη επιβίωση των ασθενών και ονοματίζοντας το SAFB1 ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά με την

ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου. Ιδιαίτερα σε στρεσογόνες συνθήκες, όπου τα επίπεδα της p53 αυξάνονται στον πυρήνα, παρατηρήθηκε ο συνεντοπισμός της με το SAFB1, επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδρασή τους *in vitro* και *in vivo*, επισφραγίζοντας αυτή την αλληλεπίδραση με την παρατήρηση της καταστολής της δράσης της p53 από το SAFB1 [20].

2.3 Άλλα μέλη της οικογένειας SAFB.

Η έρευνα των Oesterreich et al., 2003 χρησιμοποίησε και χαρακτήρισε το ομόλογο του SAFB1, KIAA00138 [8], όπου κατοχυρώθηκε η ονομασία SAFB2 [3]. Οι δύο πρωτεΐνες είναι κατά 74% ομόλογες σε αμινοξικό επίπεδο [21].

Ο SAFB2 εξετάστηκε πειραματικά σχετικά με την αλληλεπίδρασή του με τον ER. Οι *in vitro* και *in vivo* πειραματικές διαδικασίες έδειξαν ότι ο SAFB2, όπως και ο SAFB1 αλληλεπιδρούν με τον ER και ότι η υπερέκφραση του SAFB2 καταστέλλει τη μεταγραφική του ενεργότητα [3].

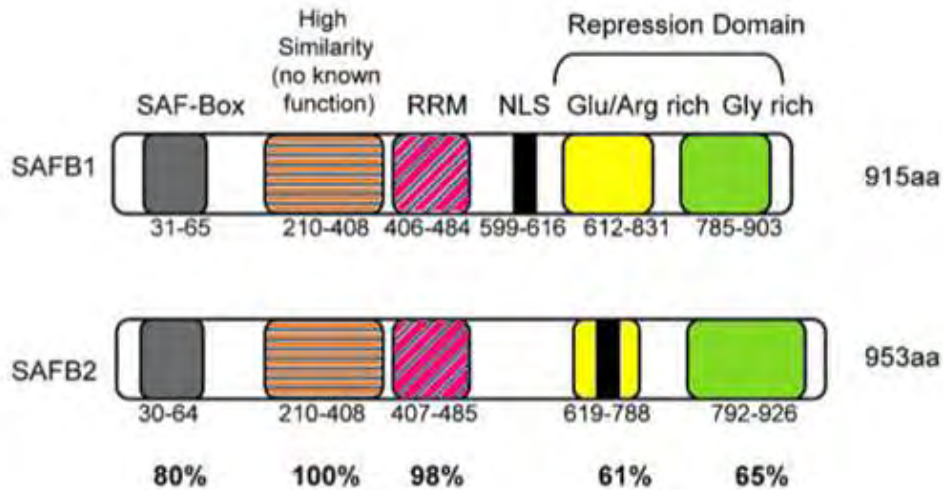
Το 2007 ανακαλύφθηκε το τρίτο μέλος της οικογένειας των SAFB, ο SLTM (SAF-like transcription modulator) [22] με 34% συνολική ομολογία με τον SAFB1. Το μήκος του mRNA του ανέρχεται στα 3105 ζεύγη βάσεων και η πρωτεΐνη αποτελείται από 1034 αμινοξέα, εμφανώς μεγαλύτερη από του SAFB1. Αποτελείται από ένα SAF-box στο καρβοξυτελικό της άκρο, με ομολογία 60% με το SAFB1, και ένα RRM με ομολογία 70% με το SAFB1. Εντοπίζεται στον πυρήνα, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι λειτουργίες των δύο πρωτεϊνών μπορεί να όμοιάζουν.

Σε αυτή τη μελέτη θα ασχοληθούμε με τους καλύτερα χαρακτηρισμένους SAFB1 και SAFB2.

2.3.1 Η δομή των SAFB1 και SAFB2 σε πρωτεϊνικό και νουκλεοτιδικό επίπεδο

Δομικά, οι πρωτεΐνες SAFB1 και SAFB2 εμφανίζουν μεγάλη ομολογία (εικόνα 1). Παρόλο που ο SAFB2 είναι μεγαλύτερος κατά 38 αμινοξέα, εμφανίζει τις ίδιες δομικές περιοχές με το SAFB1. Συγκεκριμένα και οι δύο πρωτεΐνες έχουν ίδιου μεγέθους μοτίβο SAF-box στο αμινοτελικό τους άκρο με ομολογία 80%, που ακολουθείται από μια περιοχή άγνωστης λειτουργίας και εμφανίζει 100% ομολογία σε αμινοξικό και νουκλεοτιδικό επίπεδο. Ακολουθεί η περιοχή πρόσδεσης στο RNA (RRM), ομολογίας 98%. Το σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (NLS) για τον SAFB1 εντοπίζεται μετά το RRM του, ενώ για το SAFB2 το NLS του βρίσκεται στην καρβοξυτελική του περιοχή. Στην καρβοξυτελική περιοχή και των δυο πρωτεϊνών συναντάμε μια περιοχή πλούσια σε γλουταμινικό/αργινίνες (Glu/Arg rich), η οποία έχει μεγαλύτερη έκταση στο SAFB1, με ομολογία 61% και μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνες (Gly rich) που είναι περισσότερο εκτεταμένη στο SAFB2, με ομολογία 65%. Οι δύο τελευταίες περιοχές αποτελούν την περιοχή αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες και στο σύνολό τους

αποτελούν την περιοχή που περιέχει την συνκαταστολική δράση, για τον ER, των SAFB1 και SAFB2. Συνολικά, παρατηρούμε ότι οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ομολογία τους στο αμινοτελικό τους άκρο και την κεντρική περιοχή, ενώ η ομολογία της καρβοξυτελικής τους περιοχής είναι συγκριτικά μειωμένη, χωρίς να μειώνεται κάτω από το 60% [3].



Εικόνα 1. Garee and Osterreich, 2010. Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2. Οι περιοχές ομολογίας τους φαίνονται με το ίδιο χρώμα, συνοδευόμενες από το ποσοστό ομολογίας και την έκταση της αντίστοιχης περιοχής.

Σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, τα γονίδια των SAFB1 και SAFB2 χαρτογραφήθηκαν στο ίδιο χρωμόσωμα, 19p13.3, απέχοντας μόνο 490 ζεύγη βάσεων [9]. Μελέτες της ομάδας Townson έδειξαν ότι τα δύο γονίδια εμφανίζουν ανάλογες συχνότητες έκφρασης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, υποδεικνύοντας ότι τα δύο γονίδια ρυθμίζονται παράλληλα. Στη συνέχεια, δείχτηκε ότι η περιοχή μεταξύ των δύο γονιδίων, ιδιαίτερα πλούσια σε G-C, παρόλο που δεν έχει TATA-box (απαραίτητο για την εκκίνηση της μεταγραφής), λειτουργεί ως εκκινήτης διπλής κατεύθυνσης (5'-3' και 3'-5') που περιέχει θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων.

2.4 Ο μηχανισμός συγκαταστολής των πυρηνικών υποδοχέων από τους SAFB1 και SAFB2

2.4.1 Ο μηχανισμός συγκαταστολής του ER από τους SAFB1 και SAFB2

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι SAFB1 και SAFB2 καταστέλλουν τη μεταγραφική δράση του ER, αλληλεπιδρώντας με αυτόν [3], [6]. Κύτταρα HepG2, τα οποία δε διαθέτουν τον ενδογενή ER, διαμολύνθηκαν με κατασκευασμένο γονίδιο αναφοράς για δοκιμασία λουσιφεράσης, διαθέτοντας ένα στοιχείο απόκρισης στα οιστρογόνα (ERE)-tk-luciferase και τον εξωγενή ER. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επίσης με τον εξωγενή SAFB1 σε αυξανόμενες ποσότητες. Απουσία του ER, η προσθήκη της οιστραδιόλης στα κύτταρα δεν είχε καμία επίδραση στη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου αναφοράς. Μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με τον ER και παρουσία οιστραδιόλης, η μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου αναφοράς αυξήθηκε σε σχέση

με την προηγούμενη συνθήκη. Τέλος, συνδιαμόλυνση των κυττάρων με τον ER και αυξανόμενες ποσότητες SAFB1 είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του ER, εξαρτώμενη από την αύξηση της ποσότητας του SAFB1.

Ο μηχανισμός με τον οποίο θεωρούνταν ότι οι SAFB1/2 καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα των οιστρογόνων ER ήταν μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης μαζί του με την καρβοξυτελική τους περιοχή, παρουσία ή απουσία προσδέματος και παρεμπόδιση της πρόσδεσης του ER στα στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (estrogen response elements, ERE). Στη συνέχεια, η ομάδα της Oesterreich έδειξε ότι παρά την πρόσδεση του SAFB1 στον ER, ο δεύτερος διατηρούσε την ικανότητα πρόσδεσής του στα ERE, συνεπώς εξετάστηκε ένα εναλλακτικό μοντέλο για το μηχανισμό καταστολής των SAFB1/2[6]. Επιπλέον, προτάθηκε ότι οι SAFB1/2 χρειάζονται τη δράση των απακετυλασών των ιστονών (HDACs) για να ασκήσουν την καταστολική τους δράση, δείχνοντας ότι παρουσία αναστολέων των HDACs η καρβοξυτελική περιοχή των SAFB1 έχανε μερικώς την καταστολική της δράση [12]. Όμως, χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων, δε βρήκαν κάποια απευθείας αλληλεπίδραση της καταστολικής περιοχής των SAFB1/2 με σύμπλοκα των HDACs, οπότε έγινε η υπόθεση ότι οι SAFB1/2 αλληλεπιδρούν έμμεσα με τις HDACs, παρά άμεσα [6]. Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι ο, ήδη γνωστός, συγκαταστολέας του ER, N-CoR, δρα ως μεσολαβητής μεταξύ του SAFB1 και της HDAC3 [10]. Η δράση του N-CoR ως συγκαταστολέας του υποδοχέα των οιστρογόνων έγκειται στη στρατολόγηση των HDACs ή των συμπλόκων τους σε υποκινητές, ώστε να τροποποιήσουν τοπικά τη χρωματίνη με ανασταλτικό τρόπο, που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή. Οι Jiang et al., αναφέρουν ότι ο N-CoR αλληλεπιδρά απευθείας με την καρβοξυτελική, κατασταλτική περιοχή του SAFB1, αλλά και συνεντοπίζεται μαζί του μερικώς. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η καταστολική δράση του SAFB1 μειώθηκε απουσία του N-CoR, προτείνοντας ότι η καταστολική του ικανότητα οφείλεται μερικώς στη δράση των HDACs μέσω του N-CoR.

Επιπλέον, οι Garee and Oesterreich πρόσθεσαν ακόμη μία παράμετρο στο μηχανισμό καταστολής των SAFB1/2, εξετάζοντας εάν οι πρωτεΐνες σουμοϋλώνονται και ποιες είναι οι συνέπειες αυτής της τροποποίησης. Η σουμοϋλίωση είναι μία τροποποίηση που μοιάζει με αυτή της ουβικιτινίωσης και σχετίζεται με τις διάφορες δράσεις στις λειτουργίες των σουμοϋλιωμένων μορίων. Αρχικά, έδειξαν ότι και οι δύο παράγοντες SAFB1 σουμοϋλιώνονται και ότι οι θέσεις σουμοϋλίωσης του SAFB1 εντοπίζονται στις λυσίνες 231 και 294 (K231, K294) στην περιοχή άγνωστης, μέχρι τώρα, λειτουργίας με 100% ομολογία σε αμινοξικό και νουκλεοτιδικό επίπεδο με το SAFB2, εμφανίζοντας το μοτίβο σουμοϋλίωσης ΨKXE (υδρόφοβο αμινοξύ, λυσίνη, οποιοδήποτε αμινοξύ, γλουταμικό). Επιπλέον και οι δύο παράγοντες ρυθμίζονται από τα μόρια SUMO1 και SUMO2/3. Για να διαπιστωθεί εάν η σουμοϋλίωση του

SAFB1 παίζει κάποιο ρόλο στην καταστολική του δράση, κύτταρα MCF7 και HEK293T εξετάστηκαν ως προς την καταστολική δράση του SAFB1 στον ERα, αφού διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που έφεραν τον αγρίου τύπου SAFB1 και την ίδια πρωτεΐνη, όπου οι δύο λυσίνες είχαν μεταλλαχθεί. Διαπιστώθηκε ότι ενώ ο SAFB1 αγρίου τύπου εμφάνιζε την τυπική του καταστολική δράση, το μετάλλαγμα του την είχε χάσει εντελώς, συνδέοντας έτσι τη σουμοϋλίωση του SAFB1 με την καταστολική του ενεργότητα. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, εξετάστηκε κατά πόσο ο SAFB1 αλληλεπιδρά με τον N-CoR και την HDAC3 όταν σουμοϋλιώνεται και παρατήρησαν ότι τα μεταλλάγματα του SAFB1 στις λυσίνες 231 και 294 έδειχναν μειωμένη αλληλεπίδραση με την HDAC3 [23].

Τέλος, άλλη μία μελέτη εξετάζει την καταστολική δράση των SAFB1 και SAFB2 στον ERα υπό τη σκοπιά της κινητικότητάς του στον πυρήνα. Κάνοντας πειράματα με την τεχνική FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), διαπίστωσαν ότι κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ SAFB1- ERα και SAFB2-ERα, η κινητικότητα του ERα στον πυρήνα ήταν μειωμένη. Επιπρόσθετα, η δράση των SAFB1 και SAFB2 ως ταυτόχρονοι συγκαταστολείς του υποδοχέα των οιστρογόνων είναι συνεργιστική, μειώνοντας την κινητικότητα του ERα ακόμη περισσότερο [24].

2.4.2 Ο SAFB1 είναι γενικός συγκαταστολέας των πυρηνικών υποδοχέων

Η καρβοξυτελική περιοχή του SAFB1 έχει χαρακτηριστεί ως περιοχή καταστολής, αφού είναι υπεύθυνη για την καταστολική δράση του SAFB1 στον ERα [14]. Η περιοχή έχει ένα μεγάλο ποσοστό φορτισμένων αμινοξέων που ευνοεί την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες που μέχρι πρόσφατα δεν ήταν γνωστό ότι μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με τους SAFB1/2. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η έρευνα της ομάδας Debril, οι οποίοι απομόνωσαν τον ανθρώπινο SAFB1 ως ρυθμιστή του PPAR γ . Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν in vivo και στη συνέχεια έδειξαν ότι ο SAFB1 μειώνει τη μεταγραφική του ενεργότητα. Η ομάδα επέκτεινε το ερώτημα της αλληλεπίδρασης και σε άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, όπως οι FXRα (Farnesoid X Receptor α), hVDR (human Vitamin D Receptor), mSF1 (mouse Steroidogenic Factor 1) και hLRH1 (human Liver Receptor Homolog 1), όπου διαπιστώθηκε το αναμενόμενο αποτέλεσμα για τους προαναφερόμενους πυρηνικούς υποδοχείς, προτείνοντας ότι ο SAFB1 είναι γενικός καταστολέας της μεταγραφής [13].

2.4.3 Ο μηχανισμός συγκαταστολής του υποδοχέα των ανδρογόνων AR από τον SAFB1

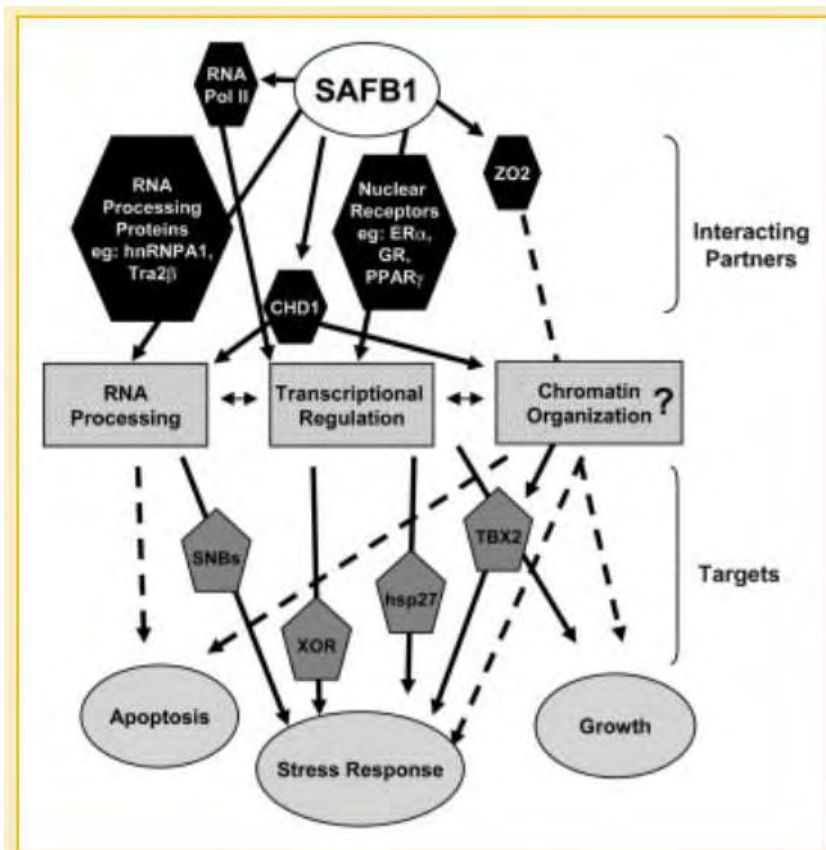
Μία πρόσφατη μελέτη εξετάζει την πιθανή δράση του SAFB1 στον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) [15]. Ακολουθώντας τα πειράματα των Debril et al.[13], έδειξαν ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά με τον AR και ότι μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα, μέσα από πειράματα δοκιμασίας λουσιφεράσης με τον υποκινητή του γονιδίου PSA (Prostate Specific

Antigen). Στη συνέχεια, μελέτησαν το μηχανισμό της καταστολής του AR, ο οποίος ομοιάζει με αυτόν του ER. Ο SAFB1 αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική του περιοχή με ένα συγκαταστολέα του AR με, την κινάση σερίνης-θρεονίνης MST1, η οποία φαίνεται να φωσφορυλιώνει τον SAFB1 στην κεντρική του περιοχή και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης στρατολογείται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του AR.

Αυτό που είναι ενδιαφέρον στο συγκεκριμένο εύρημα είναι ότι ο SAFB1, μαζί με την MST1 δημιουργούν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του AR, στρατολογώντας πρωτεΐνες του επιγενετικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα, μία μεθυλτρανσφεράση του συμπλόκου PRC (Polycomb Repressive Complex) μαζί με δύο ακόμη μόρια του ίδιου συμπλόκου, παρέχοντας επιπλέον ενδείξεις ότι ο SAFB1 εμπλέκεται σε περίπλοκες πυρηνικές διεργασίες, όπως η οργάνωση της χρωματίνης, σε επιγενετικό επίπεδο [15].

2.5 Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους παράγοντες SAFB1 και SAFB2

Ο SAFB1, όντας μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη, αλληλεπιδρά με μια πληθώρα άλλων πρωτεϊνών, κυρίως με το καρβοξυτελικό του άκρο. Η λίστα των αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνει πρωτεΐνες όπως πυρηνικούς υποδοχείς, πρωτεΐνες επεξεργασίας του mRNA (hnRNPs, Tra2β1, T-STAR) καθώς και άλλες όπως την CHD1 (Chromodomain Helicase DNA-binding 1), την πρωτεΐνη στεγανών συνδέσεων ZO2, το μεταγραφικό παράγοντα c-Jun και επιγενετικούς παράγοντες. Σε αυτή τη λίστα προστίθενται συνεχώς πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορες πυρηνικές διαδικασίες (απόκριση στο στρες, στη βλάβη του DNA, στην απόπτωση κ.α.) [21]



Εικόνα 2. Garee and Osterreich, 2010. Ο SAFB1, ως πολυλειτουργική πρωτεΐνη, αλληλεπιδρά με πολλές κατηγορίες πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε πυρηνικές διεργασίες και με τη σειρά τους οδηγούν σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες. Τα εξάγωνα απεικονίζουν κατηγορίες πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά ο SAFB1, ενώ τα ορθογώνια απεικονίζουν τις λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται οι αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες. Τα πεντάγωνα δείχνουν πρωτεΐνες στόχους των προαναφερμένων λειτουργιών, ενώ τα οβάλ δείχνουν τις κυτταρικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν αυτές οι πρωτεΐνες στόχοι. Τα έντονα βέλη απεικονίζουν ήδη γνωστές σχέσεις μορίων ενώ τα διακεκομμένα δείχνουν πιθανές σχέσεις.

2.5.1 Οι πρωτεΐνες SAFB1 και SAFB2 αλληλεπιδρούν με την κινάση σερίνης-θρεονίνης SRPK1

Τα μέλη μίας οικογένειας κινασών σερίνης-θρεονίνης (SRPKs, Serine- Arginine Protein Kinases) εμπλέκονται σε πολύ σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Οι SRPKs, συγκεκριμένα, φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης σε περιοχές πλούσιες σε επαναλήψεις σερίνης/αργινίνης, γνωστές ως περιοχές RS (RS domains). Οι πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχές RS απαντώνται ευρέως σε κάθε κύτταρο και είναι απαραίτητες κυρίως για το μάτισμα, το εναλλακτικό μάτισμα, την επεξεργασία του πρώιμου mRNA, την έξοδο των ώριμων μεταγράφων από τον πυρήνα, αλλά και άλλες διεργασίες άγνωστες μέχρι πρότινος. Έτσι, οι SRPKs εκτός από το μάτισμα, εμπλέκονται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως φαίνεται από τα ποικίλα υποστρώματά τους και τις συνεχώς ανακαλυπτόμενες αλληλεπιδράσεις τους [30]

Στο Εργαστήριο Βιοχημείας έχει περιγραφεί η αλληλεπίδραση SRPK1/SAFB [25], η οποία ισχύει και για τα δύο ομόλογα, αλλά με διαφορετική ισχύ (ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το SAFB1, απ' ότι με το SAFB2). Έχει δειχθεί ότι οι δύο πρωτεΐνες, αν και έχουν διαφορετική

υποκυτταρική κατανομή (η SRPK1 είναι κυρίως κυτταροπλασματική, ενώ ο SAFB1 αποκλειστικά πυρηνικός), συνευρίσκονται σε σύμπλοκα και ενδοκυττάρια [5]. Φαίνεται, μάλιστα, ότι όταν οι SAFBs αλληλεπιδρούν με την SRPK1, καταστέλλουν τη δράση της, ανάλογα με την ισχύ της αλληλεπίδρασης.

2.5.2 Η εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue) και ο ρόλος της σε πυρηνικές λειτουργίες

Μία άλλη πρωτεΐνη, της οποίας η αλληλεπίδραση μελετάται με το SAFB, είναι η ERH. Η ERH είναι μία πάρα πολύ συντηρημένη πρωτεΐνη, μήκους 104 αμινοξέων. Ορθολογία της απαντούνται από τα πρωτόζωα ως και τα θηλαστικά. Η αμινοξική της ακολουθία είναι ταυτόσημη για τον άνθρωπο και τον *Xenopus*, ενώ η ανθρώπινη ERH διαφέρει μόνο κατά ένα αμινοξύ από αυτή της *Drosophila*. Επίσης, η δομή της είναι μοναδική, χωρίς να εμφανίζει κάποια ομοιότητα με δομές άλλων γνωστών μορίων.

Ο ρόλος της ERH δεν είναι γνωστός, αλλά σταδιακά ανακαλύπτονται αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες, εμπλέκοντάς την σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Για παράδειγμα, πιστεύεται ότι η ERH μπορεί να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, καθώς στον *Xenopus* βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την DCoH (Dimerisation Cofactor of HNF-1) και να αναστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα HNF1 που αυτή ρυθμίζει. [26].

Ένας άλλος προτεινόμενος ρόλος της ERH, που πρόσφατα άρχισε να εξιχνιάζεται, είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της μίτωσης. Δύο ανεξάρτητα εργαστήρια έδειξαν ότι η ERH είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης [29] [28].

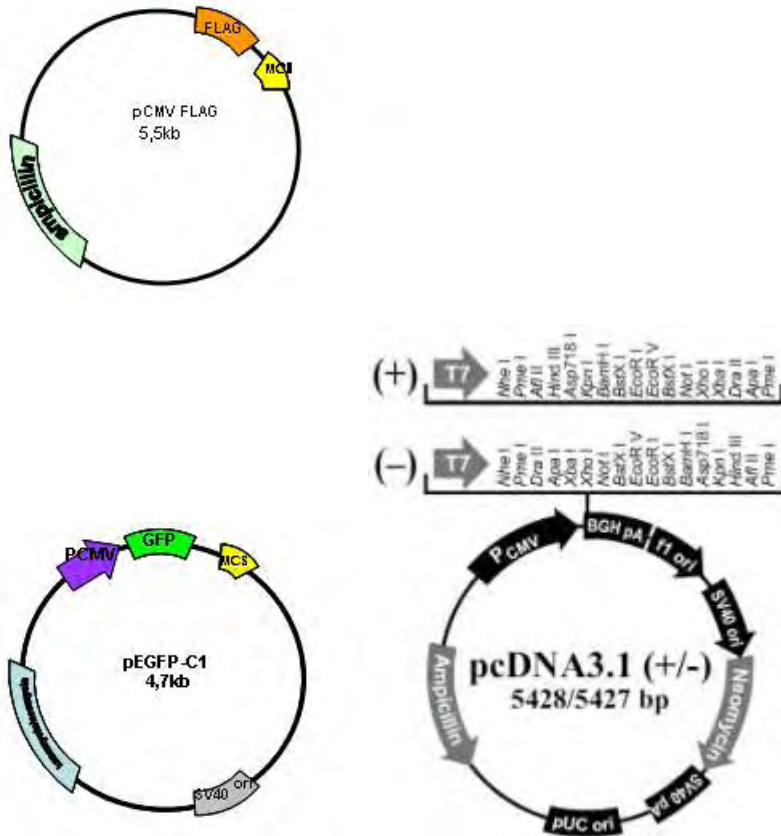
Το εργαστήριό μας χρησιμοποίησε το σύστημα δύο υβριδίων για να βρει πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το SAFB1 και ανάμεσα σε αυτές εντοπίστηκε και η ERH (αδημοσίευτα δεδομένα), με το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ότι διακρίνει μεταξύ των SAFB1 και SAFB2. Ενώ η αλληλεπίδρασή της με το SAFB1 είναι δυνατή, δεν παρατηρείται καμία αλληλεπίδραση με το SAFB2.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ DNA

3.1.1 Πλασμίδια

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνονται παρακάτω χωρίς το ένθεμά τους.



- 1) pCMV-FLAG-2: επιτρέπει την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών ως πρωτεΐνες σύντηξης στο N-τελικό τους άκρο με την ακολουθία Met-FLAG (Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). Η μεταγραφή των τμημάτων DNA καθοδηγείται από τη ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού.
- 2) pcDNA3.1: επιτρέπει την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών λόγω του υποκινητή του ιού CMV που διαθέτει.
- 3) pEGFP-C1: Ο συγκεκριμένος φορέας δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV που περιέχει. Επίσης περιέχει τη φθορίζουσα GFP πρωτεΐνη στην 5' περιοχή του MCS και γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη.

- 4) pRenilla: Όταν αυτός ο φορέας εισάγεται στα κύτταρα, οδηγεί σε συνεχή έκφραση της λουσιφεράσης της Renilla και λειτουργεί ως έκφραση ελέγχου της διαμόλυνσης κυττάρων. Χρησιμοποιείται στην ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3.1.2 Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις έπειτα από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και να συνδέεται με ένα νέο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία. Τα βακτηριακά στελέχη έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν έναν αριθμό πλασμιδίων, που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό, παρέχοντας τη δυνατότητα της ανάπτυξης και επιλογής των κυττάρων που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο.

3.1.3 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 25 μl:

- 0,5-1 μg DNA
- 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος συμβατό για το ένζυμο που θα χρησιμοποιηθεί
- 0,5-1 unit κατάλληλου ενζύμου (1 unit ενζύμου αντιστοιχεί στην ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1μg DNA)
- αποστειρωμένο και δις απεσταγμένο H₂O (ddH₂O), μέχρι πληρώσεως τελικού όγκου.
- Επώαση διαλύματος αντίδρασης για τουλάχιστον μία ώρα σε θερμοκρασία κατάλληλη για κάθε ένζυμο.

3.1.4 Δημιουργία αμβλέων άκρων τμημάτων DNA

Κατά την κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς απαιτείται η συμβατότητα των άκρων του πλασμιδίου και του επιθυμητού τμήματος DNA, όπου παρέχεται η επιλογή δημιουργίας αμβλέων άκρων στα δύο τμήματα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή αυτών των άκρων είναι DNA πολυμεράσες με δράση 5'-3' πολυμερασών ή 3'-5' εξωνουκλεασών. Στην παρούσα εργασία δημιουργούνται αμβλέα άκρα από ένα 5' προεξέχον άκρο. Οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες αντίδρασής τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

| Τύπος Πολυμεράσεως | Klenow Fragment | T4 HF DNA Polymerase | T4 DNA Polymerase |
|--------------------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| DNA (μg) | 10 | 10 | 3 |
| Buffer | 10 μl NEB 3 | 10 μl NEB 3 | 5 μl NEB 3 |
| dNTPs (mM) | 2 | 2 | 4 |
| Ενζυμο | 2 | 2 | 2 |
| Νερό (μl) | 84 | 84 | 40,8 |
| Συνθήκες Αντίδρασης | 30°C/15' | R.T./15' | 11°C/20' |
| Συνθήκες Απενεργοποίησης | 75°C/10' | 70°C/10' | 72°C/10' |

3.1.5 Αντίδραση λιγάσης

Για την αντίδραση της λιγάσης, χρησιμοποιείται

- Πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα σε μοριακή αναλογία 1 /3 ή 1/5
- 2,5 Units λιγάσης T4 (5 Unit/μl)
- 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης
- ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μl.

Το μείγμα επωάζεται ολονύκτια στους 16°C.

3.1.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Στο εργαστήριο χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης 1% για το διαχωρισμό δειγμάτων DNA μεγέθους 500- 7000 ζευγών βάσεων. Για μικρότερα τμήματα χρησιμοποιούνται πηκτές μεγαλύτερης πυκνότητας προσαρμοσμένες στο αρχικό πρωτόκολλο.

Παρασκευή πηκτής 1% :

- Προστίθεται 1% αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA)
- Θέρμανση στους 100⁰ C
- Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος μειωθεί προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μg/ml)
- Το διάλυμα αγαρόζης αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να πολυμεριστεί σε πηκτή
- Προστίθεται διάλυμα TAE στη συσκευή ώστε να καλυφθεί η πηκτή.
- Τα δείγματα DNA που θα ηλεκτροφορηθούν αναμιγνύονται με μίγμα χρωστικών: (5% γλυκερόλη, 0,42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,42% μπλε του ξυλενίου)
- Τα δείγματα τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής και ηλεκτροφορούνται σε 100 V για 20 λεπτά τουλάχιστον

- Η πηκτή παρατηρείται κάτω από λάμπα UV ή στη συσκευή εμφάνισης.

3.1.7 Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

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

- Αποκόπτεται το επιθυμητό τμήμα της πηκτής με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Το τμήμα θερμαίνεται στους 50°C, με τρεις όγκους διαλύματος QG, ώσπου να διαλυθεί η πηκτή.
- Προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης σε σχέση με τη μάζα της πηκτής και μεταφέρεται σε ειδική στήλη (silica gel) για την πρόσδεση του DNA στο φίλτρο.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για ένα λεπτό.
- Προστίθενται 500 μl διαλύματος PE και φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για ένα λεπτό.
- Το δείγμα επωάζεται σε 20 μl ddH₂O για 5 λεπτά και φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για ένα λεπτό.
- Το δείγμα επωάζεται για δεύτερη φορά σε 30 μl ddH₂O για 5 λεπτά και φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για ένα λεπτό.

3.1.8 Προσδιορισμός συγκέντρωσης DNA

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

3.1.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου της ERH έγινε PCR με τις παρακάτω συνθήκες:

- 1^ο Στάδιο, T = 94°C, 5 λεπτά
- 2^ο Στάδιο (29 επαναλήψεις τριών κύκλων)
- 1^{ος} Κύκλος, T = 95°C, 30 δευτερόλεπτα
- 2^{ος} Κύκλος, T = 56°C, 30 δευτερόλεπτα
- 3^{ος} Κύκλος T = 72°C, 30 δευτερόλεπτα
- 3^ο Στάδιο T = 75°C, 5 λεπτά
- 4^ο Στάδιο T = 4°C,

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

Νοηματικός εκκινητής: 5'-TTGAATTCGATGTCTCACACCATTTTG-3'

Αντινοηματικός Εκκινητής: 5'-TTGGATCCTTATTTCCCAGCCTGTTG-3'

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν για τα άκρα του cDNA της ανθρώπινης ERH διαθέτοντας μία θέση για το ένζυμο EcoRI στον νοηματικό εκκινητή και μία θέση για το ένζυμο BamHI για τον αντινοηματικό εκκινητή.

3.1.10 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

- Προστίθεται οξικό νάτριο (CH₃COONa) 3M , pH 5,1 στο 1/10 του όγκου του δείγματος
- Προστίθεται παγωμένη αιθανόλη 100%, σε αναλογία όγκων 1 προς 2,7
- Το δείγμα επωάζεται στους -20°C για 20-30 λεπτά
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 14000 rpm στους 4°C
- Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλένεται με 100 μl 70% αιθανόλη
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για ελάχιστα δευτερόλεπτα
- Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει
- Το ίζημα αναδιαλύεται σε 30 μl ddH₂O

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.2.1 Βακτηριακά στελέχη

Για όλες τις κλωνοποιήσεις χρησιμοποιούνται τα βακτηριακά στελέχη TOP 10, τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.

3.2.2 Παρασκευή βακτηρίων *E. Coli* δεκτικών στην εισαγωγή πλασμιδιακού DNA

Προετοιμασία:

Επιλέγεται μια αποικία από πιάτο ή λαμβάνεται ποσότητα από το διάλυμα αποθήκευσης βακτηρίων με γλυκερόλη (glycerol stock), που βρίσκεται στους -80°C και εμβολιάζεται σε καλλιέργεια 5mL θρεπτικού υλικού TYM (στην οποία έχει προστεθεί 5 μl Streptomycin 100 μg/μl). Αναδεύεται 16 ώρες περίπου (O/N, overnight) στους 37°C.

Διαδικασία:

- Προστίθεται 3 ml θρεπτικό TYM, χωρίς αντιβιοτικά και σε αυτή την ποσότητα εμβολιάζονται 150 μl από την ολονύκτια καλλιέργεια.
- Η καλλιέργεια επωάζεται στον αναδευτήρα για περίπου 3 ώρες στους 37°C.

- Αφαιρούνται 250 μl από την καλλιέργειά και εμβολιάζονται σε κωνική φιάλη με 50 ml θρεπτικό TYM. Αναδεύονται στους 37°C.
- Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, μετράται η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm, ώσπου να φτάσει περίπου στο 0,35-0,36.
- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 5 λεπτά.
- Το ίζημα αναδιαλύεται 25 ml διαλύματος TFB-I.
- Το επαναιώρημα επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Το επαναιώρημα φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 5 λεπτά.
- Το ίζημα αναδιαλύεται το ίζημα σε 25 ml TFB-II.
- Το επαναιώρημα επωάζεται για 1 ώρα σε πάγο.
- Η καλλιέργεια μοιράζεται σε σωληνάκια μικροφυγοκέντρου (eppendorf) ανά 100 μl και μεταφέρεται στους -80°C.

Παρατείθεται πίνακας με τις συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν:

| TYM | TFB-I | TFB-II |
|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| 2% Bacto Tryptone | 30 mM KOAc (CH ₃ COOK) | 10 mM MOPS |
| 0,5% Yeast Extract | 50 mM MnCl ₂ | 75 mM CaCl ₂ |
| 0,1 M NaCl | 100 mM KCl | 10 mM KCl |
| 10 mM MgSO ₄ | 10 mM CaCl ₂ | 20% Glycerol |
| | 15% Glycerol | pH = 7 |
| | pH = 7 | Διατηρείται στην κατάψυξη |

3.2.3 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

- Προστίθεται ποσότητα πλασμιδίου που αντιστοιχεί στα ng που θα μετασηματίσουν 100 μl κυττάρων Top 10.
- Το πλασμίδιο και τα κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά σε πάγο.
- Στη συνέχεια επωάζονται στους 42°C για 1 λεπτό.
- Προστίθενται 500 μl θρεπτικού υλικού LB και επωάζονται στους 37 °C για 45 λεπτά.
- Φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 1 λεπτό.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl θρεπτικού υλικού.
- Το αιώρημα επιστρώνεται σε βακτηριακά τρυβλία με το αντιβιοτικό επιλογής που φέρει το πλασμίδιο που προσλαμβάνεται.

3.2.4 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση (mini preparation)

- Καλλιέργεια μικρής ποσότητας εμβολιάζεται σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB με αντίστοιχο αντιβιοτικό επιλογής και επωάζεται ολονύκτια στους 37 °C σε αναδευτήρα.
- 1,5 ml καλλιέργειας μεταφέρεται σε σωληνάκια μικροφυγοκέντρου (eppendorf).
- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 13500 rpm για 2 λεπτά.
- Απορίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλυτοποιείται με πρόσθεση 50 μl διαλύματος P1 + RNase της Qiagen.
- Προστίθενται 100 μl διαλύματος TENS και αναδεύονται για 1 λεπτό.
- Προστίθενται 100 μl 3M CH₃COONa.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13500 rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι.
- Προστίθενται 2,7 του όγκου του υπερκειμένου 100% αιθανόλη και επωάζονται στους -20 °C για 20 λεπτά.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 14000 rpm για 15 λεπτά.
- Απορίπτεται το υπερκείμενο .
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 25 μl νερού.

| Διάλυμα TENS | Διάλυμα TE |
|----------------|-------------------|
| 0,1 N NaOH | 10 mM Tris pH 7,5 |
| 0,5% SDS in TE | 1 mM EDTA |

3.2.5 Μεσαίας κλίμακας απομόνωση DNA με χρήση του Midi Kit Qiagen.

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

- Εμβολιάζεται ποσότητα αποικίας σε 100 ml θρεπτικού υλικού LB, με αντιβιοτικό επιλογής.
- Η καλλιέργεια επωάζεται ολονύκτια στους 37 °C σε αναδευτήρα.
- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 15 λεπτά.
- Απορίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλυτοποιείται σε 8 ml διαλύματος αιώρησης (RES).
- Προστίθενται 8 ml διαλύματος λύσης (LYS) και ανακινούνται.
- Επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προστίθενται 8 ml διαλύματος εξουδετέρωσης (NEU) και ανακινούνται.

- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 15 λεπτά.
- Η στήλη έκλουσης εξισορροπείται με 12 ml διαλύματος εξισορόπησης (EQU).
- Το υπερκείμενο αποχύνεται κυκλικά στη στήλη.
- Προστίθενται 5 ml διαλύματος εξισορόπησης (EQU) στη στήλη.
- Αφαιρείται το πώμα και προστίθενται 8 ml διαλύματος πλύσης (WASH).
- Η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου και προστίθενται 5 ml διαλύματος έκλουσης (ELU).
- Προστίθενται 3,5 ml ισοπροπανόλης και ανακινούνται σε vortex.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 30 λεπτά.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 2 ml 70% αιθανόλης.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 5 λεπτά.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται γρήγορα με ολοκληρωτική αφαίρεση υπερκειμένου.
- Αναδιαλυτοποιείται το ίζημα σε 100-150 μl νερό.

3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.3.1 Ευκαρυωτικές Καλλιέργειες

| Θρεπτικό Υλικό | DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) |
|--|--|
| Χρωστική phenol red | |
| L- glutamine 2 mM | |
| Sodium Pyruvate (100 mM) | |
| Penicillin | |
| Streptomycin | |
| FBS (Foetal Bovine Serum) 10% (v/v) | |

| |
|--|
| Διάλυμα Έκπλυσης PBS (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, ελλειματικό σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+}, pH 7.2) |
| 40 gr NaCl |
| 1 gr KCl |
| 7,2 gr $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ |
| 1,2 gr KH_2PO_4 |

| |
|--------------------------|
| LB (1lt) |
| 10 gr Bacto Tryptone |
| 5 gr Yeast Extract |
| 5 gr NaCl |
| 20 gr Agar (για τρυβλία) |

3.3.2 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Η διαδικασία της θρυψινοποίησης, αποκόλληση κυττάρων από το ταπήτιο των σκευών κυτταρικής καλλιέργειας, επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (PAA) 0.05%/0.02% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ελλειματικό σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} .

Διασικασία:

- Το υγρό θρεπτικό υλικό στο οποίο είναι επωασμένα τα κύτταρα απορροφάται με γυάλινη πιπέτα.
- Ξεπλένεται το τρυβλίο με 3 ml PBS και το απορροφάται ξανά με γυάλινη πιπέτα.
- Προστίθεται 1 ml Trypsin/EDTA και επωάζεται στον κλίβανο για 1 λεπτό.
- Προστίθεται υγρό θρεπτικό DMEM και διασπείρεται σε όλο το τρυβλίο για να συλλεχθούν όλα τα κύτταρα.
- Το αιώρημα φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 5 λεπτά
- Το ίζημα επαναιωρείται σε όγκο ανάλογο της αραιώσης που απαιτείται
- 1ml του εναιωρήματος των κυττάρων εμβολιάζεται σε νέο τρυβλίο που περιέχει 7 ml υγρό θρεπτικό DMEM.

3.3.3 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια με κατιονικό αντιδραστήριο PEI (Polyethylenimine)

Την προηγούμενη μέρα της διαμόλυνσης, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και σε κάθε πηγαδάκι εμβολιάζονται 100.000 κύτταρα.

- Μίγμα διαμόλυνσης για πλάκες καλλιέργειας κυττάρων τύπου 12 οπών:
 - 50μl DMEM (-/-) (χωρίς FBS)
 - 2 μg συνολικού DNA
 - 4 μg PEI
- Το μίγμα επωάζεται για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 450 μl DMEM 5% FBS στο μίγμα
- Τα πηγαδάκια ξεπλένονται 2 φορές με 1 ml PBS
- Προστίθενται 500 μl από το μίγμα διαμόλυνσης στο πηγαδάκι
- Τα κύτταρα επωάζονται με το μίγμα διαμόλυνσης για 2 ώρες στους 37°C
- Τα πηγαδάκια ξεπλένονται 3 φορές με 1 ml PBS
- Προστίθεται 1ml πλήρες DMEM ανά πηγαδάκι
- Οι πλάκες επωάζονται ολονύκτια

3.3.4 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμίδια με κατιονικό αντιδραστήριο TurboFect

Την προηγούμενη μέρα της διαμόλυνσης, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και σε κάθε οπή εμβολιάζονται 100.000 κύτταρα.

- Μίγμα διαμόλυνσης για πλάκες καλλιέργειας κυττάρων τύπου 12-well:
 - 100μl DMEM (-/-) (χωρίς FBS)
 - 2 μg συνολικού DNA
 - 3 μl TurboFect
- Το μίγμα επωάζεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 400 μl DMEM 5% FBS στο μίγμα
- Απορροφάται το θρεπτικό υλικό από τα πηγαδάκια
- Προσθέτονται 500 μl μίγματος διαμόλυνσης
- Τα κύτταρα επωάζονται με το μίγμα για 4 ώρες
- Το μίγμα απορροφάται με πιπέτα
- Προστίθεται 1 ml πλήρες DMEM ανά πηγαδάκι
- Οι πλάκες επωάζονται ολονύκτια

3.3.5 Κατεργασία ορού βοός (FBS) με μίγμα δεξτράνης και ενεργού άνθρακα

- Κατασκευάζονται 500 ml 10mM Tris-HCl, 7,4
- Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 1,25 gr δεξτράνης
- Μετά τη διάλυσή της προστίθενται 12,5 gr ενεργού άνθρακα
- Το διάλυμα αναδεύεται υπό ψύξη για 1 ώρα
- Σε σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml, αποχύνονται 10 ml του παραπάνω διαλύματος ενώ είναι παγωμένο και υπό ανάδευση
- Τα σωληνάκια φυγοκεντρώνονται στις 5000 g για 20 λεπτά στους 4°C και αποχύνεται το υπερκείμενο
- Στα μισά σωληνάκια αποχύνεται ο ορός βοός, ενώ τα άλλα μισά φυλάσσονται
- Τα σωληνάκια με τον ορό αναδεύονται για μισή ώρα στους 56 °C
- Τα σωληνάκια με τον ορό φυγοκεντρώνονται στα 5000 g για 20 λεπτά στους 4°C
- Το υπερκείμενο αποχύνεται στα αποθηκευμένα σωληνάκια
- Τα νέα σωληνάκια αναδεύονται για μισή ώρα στους 56 °C
- Τα σωληνάκια φυγοκεντρώνονται στα 5000 g για 20 λεπτά στους 4°C
- Ο επεξεργασμένος ορός φιλτράρεται δύο φορές πριν τη χρήση

3.3.6 Δοκιμασία λουσιφεράσης με χρήση του Dual-Luciferase® Reporter Assay System,

Promega

- Σε σωληνάκια μικροφυγοκέντρου (eppendorf) τοποθετούνται 20 μl διαλύματος LAR
- Τα κύτταρα ξεπλένονται μία φορά με PBS 1x
- Τα κύτταρα λύνονται με προσθήκη 150 μl Passive Lysis Buffer 1x ανά πηγαδάκι
- Ακολούθως ανακινούνται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε σωληνάκια μικροφυγοκέντρου (eppendorf)
- Στο σωληνάκι που περιέχει LAR προστίθενται 20 μl εκχυλίσματος και μετράται η τιμή της λουσιφεράσης στο λουμινόμετρο
- Στο ίδιο σωληνάκι προστίθενται 10 μl διαλύματος stop & glo 1x και μετράται η τιμή της Renilla στο λουμινόμετρο

3.3.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western

| Πήκτωμα επιστοιβάξης pH 6.8 | Πήκτωμα διαχωρισμού pH 8.8 |
|-----------------------------|----------------------------|
| 4,5% ακρυλαμίδιο:bis | 8-12% ακρυλαμίδιου:bis |
| 0.1% SDS | 0.1% SDS |
| 0.125 M Tris-Cl | 0.375 M Tris-Cl |
| 2 mM EDTA | 2 mM EDTA |
| 0.08% APS | 0.08% APS |
| 0.04% TEMED | 0.04% TEMED |

| Διάλυμα δοχείων ηλεκτροφόρησης | Διάλυμα επιφόρτωσης δειγμάτων |
|--------------------------------|------------------------------------|
| 50 mM Tris | 62,5 mM |
| 0.38 M γλυκίνη | Tris-HCl pH 6,8 |
| 2 mM EDTA | 2,3% SDS |
| 0.1% SDS, pH 8.9 | 10% γλυκερόλη |
| | 0,05% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης |
| | 25 mM DTT |

| Διάλυμα χρώσης πρωτεϊνών | Διάλυμα αποχρωματισμού |
|-------------------------------------|------------------------|
| 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-25 | 30% αιθανόλη |
| 50% αιθανόλη | 10% οξικό οξύ |
| 10% οξικό οξύ | |

- Η ηλεκτροφόρηση της πηκτής γίνεται κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 30 mA για 30-60 λεπτά
- Η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης όπου και ανακινείται για διάστημα 30 λεπτών
- Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται με ανακίνηση σε διάλυμα αποχρωματισμού

Μεταφορά υγρής φάσης:

- Στη συσκευή μεταφοράς Transport Electrophoration Unit της Hoefer, η οποία είναι γεμάτη με το διάλυμα μεταφοράς τοποθετούνται 3 χαρτιά Whatmann, η μεμβράνη μεταφοράς, η πηκτή που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες και επιπλέον 3 χαρτιά Whatmann και δημιουργείται «σάντουιτς» για τη μεταφορά των πρωτεϊνών.
- Οι πρωτεΐνες ηλεκτρομεταφέρονται για 1,5 ώρες στα 400 mA
- Μετά την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη χρωματίζεται προσωρινά με τη χρωστική Ponceau S 0,2% για τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών
- Η μεμβράνη αποχρωματίζεται με PBS

| |
|---------------------------------|
| Διάλυμα Μεταφοράς (Tris Borate) |
| 125 mM Tris Borate (pH 8,5) |
| 0,2% SDS |
| 0,5 mM DTT |

Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

- Η μεμβράνη στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες ξεπλένεται με PBS
- Η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα με το διάλυμα μπλοκαρίσματος
- Η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές για 5 λεπτά με PBS
- Η μεμβράνη επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή όλη νύχτα στους 4°C με το 1^ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS)
- Η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές x 5 λεπτά με PBS
- Η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα με 2^ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε PBS)
- Η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές x 5 λεπτά με PBS
- Η μεμβράνη εμφανίζεται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας:
- -Προτίθενται 30 μl 3% H₂O₂ και 100 μl διαλύματος κουμαρικού οξέος σε 10 ml διαλύματος λουμινόλης
- -Η μεμβράνη επωάζεται με το παραπάνω μείγμα για 1 λεπτό
- -Η μεμβράνη στεγνώνεται και τοποθετείται στην ειδική υποδοχή της συσκευής εμφάνισης.

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

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

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

3.3.8 Μικροσκοπία Ανοσοφθορισμού

Διαδικασία

- Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος τα κύτταρα μοιράζονται σε πιάτα των 6 οπών, στα οποία έχουν τοποθετηθεί καλυπτρίδες. (Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται 400.000 κύτταρα, ώστε κατά την έναρξη του πειράματος να καλύπτουν το 60-70% της επιφάνεια.).
- Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πλένονται με κρύο 1x PBS.
- Τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 1x PBS και 3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά και πλένονται με κρύο 1x PBS 2 φορές από 5 λεπτά.
- Τα κύτταρα επωάζονται για 15 λεπτά με 1x PBS και 1% Triton X-100 στους 4°C ή 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές)
- Τα πηγαδάκια πλένονται με κρύο 1x PBS. Στη συνέχεια, γίνεται μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στις καλυπτρίδες με PBS-0,1% Tween 20 – 3% BSA στους 4°C ολονύκτια.

- Την επόμενη μέρα οι καλυπτρίδες σηκώνονται, στεγνώνονται καλά και τοποθετούνται σε στεγνό πιάτο οπών.
- Προστίθεται το πρώτο αντίσωμα σε PBS-Tween 1% BSA για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για όλη τη νύχτα στους 4°C.
- Το πρώτο αντίσωμα απομακρύνεται με 3 διαδοχικές πλύσεις 1x PBS-0,1% Tween-1% BSA.
- Προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα 1/50 σε PBS-0,1% Tween-1% BSA για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου ή παραπάνω στους 4°C.
- Το δεύτερο αντίσωμα απομακρύνεται με 3 διαδοχικές πλύσεις με 1x PBS-0.1% Tween-1% BSA.
- Οι καλυπτρίδες με νερό, στεγνώνονται σε χαρτί και τοποθετούνται ανάποδα σε αντικειμενοφόρο πλάκα με 2 μl vectashield
- Για να παρατηρηθούν οι πυρήνες, στην αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθεται 1% 4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλιο (DAPI), το οποίο δεσμεύεται στη χρωματίνη και φθορίζει εκπέμποντας στη μπλε περιοχή του φάσματος.

3.3.9 Μικροσκοπία φθορισμού

Διαδικασία

- Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος τα κύτταρα μοιράζονται σε πιάτα 6 οπών, στα οποία έχουν τοποθετηθεί καλυπτρίδες. (Σε κάθε οπή τοποθετούνται 400.000 κύτταρα, ώστε κατά την έναρξη του πειράματος να καλύπτουν το 60-70% της επιφάνεια.).
- Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πλένονται με κρύο 1x PBS.
- Τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 1x PBS ,3% φορμαλδεύδη για 5 λεπτά και πλένονται με κρύο 1x PBS 2 φορές από 5 λεπτά.
- Η φορμαλδεύδη απομακρύνεται με διαδοχικές πλύσεις με PBS και H₂O.
- Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάποδα σε αντικειμενοφόρο με 2 μl vectashield.
- Για να παρατηρηθούν οι πυρήνες, στην αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθεται 1% 4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλιο (DAPI), το οποίο δεσμεύεται στη χρωματίνη και φθορίζει εκπέμποντας στη μπλε περιοχή του φάσματος.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Προσδιορισμός των πειραματικών συνθηκών για τη βέλτιστη συγκαταστολή του ER από το SAFB1 σε κύτταρα MCF-7

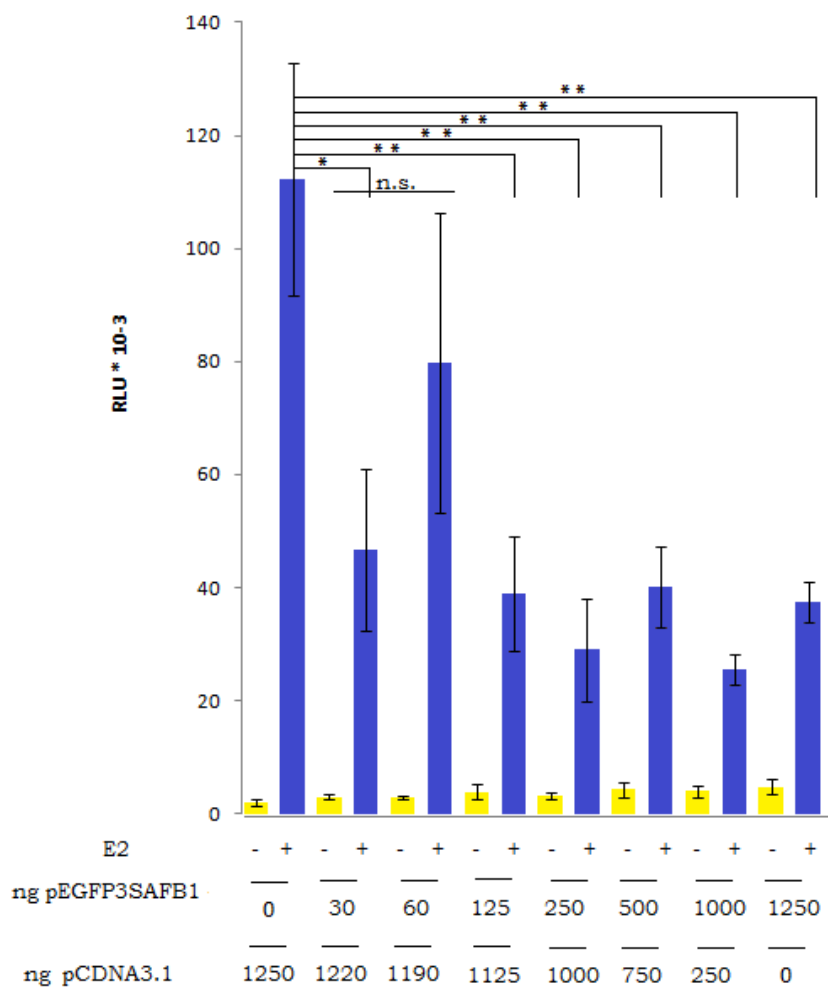
Ο SAFB1, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον ER και ότι καταστέλλει τη δράση του με δοσοεξαρτώμενο τρόπο [6]. Στη δική μας εργασία έχουμε στόχο να προσδιορίσουμε την ελάχιστη ποσότητα SAFB1 για τη βέλτιστη συγκαταστολή του ER, στο λειτουργικό σύστημα που χρησιμοποιούμε. Σε αυτήν την ποσότητα, μπορούμε να ελέγξουμε την επίδραση μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτόν, στη λειτουργία του (όπως οι πρωτεΐνες SRPK1 και ERH).

Το σύστημα μελέτης της συγκαταστολικής δράσης του SAFB1 διεξάγεται σε κύτταρα MCF-7. Αυτή η κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων του μαστού έχει το πλεονέκτημα να διαθέτει εγγενώς τον ER. Το γεγονός αυτό διευκολύνει τη μελέτη μας, αποφεύγοντας το ρίσκο της διαμόλυνσης των κυττάρων με πολλά και διαφορετικά πλασμίδια (σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τον ER πρέπει να τα διαμολύνουμε με ένα ακόμη πλασμίδιο που τον εκφράζει), αλλά ακόμη σημαντικότερα, μας παρέχει μία εικόνα για την πραγματικότητα των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του κυττάρου. Χρησιμοποιήσαμε το πλασμίδιο αναφοράς pGL2-3xERE-TATA-luc, με τρία στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (3xERE), στα οποία προσδένεται ο ER, για να υπολογίσουμε τη μεταγραφική του ενεργότητα με δοκιμασία λουσιφεράσης.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται αρχικά σε πλήρες θρεπτικό DMEM (παράγραφος 4.3.1). Στη συνέχεια το θρεπτικό αντικαθίσταται με DMEM χωρίς τη χρωστική phenol red, στο οποίο έχει προστεθεί ορός βοός κατεργασμένος με δεξτράνη και ενεργό άνθρακα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.3.5. Το τροποποιημένο θρεπτικό υλικό προτιμάται, ώστε να αποφεύγεται η παρουσία έστω και ελάχιστων ποσοτήτων οιστρογόνων στο μέσο ή άλλων αγωνιστών/ανταγωνιστών τους που μπορούν να επηρεάσουν το πείραμα. Την τρίτη ημέρα από την αλλαγή θρεπτικού, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε πλάκες τύπου 12 οπών, εμβολιάζοντας 100.000 κύτταρα ανά οπή και αφήνονται να επωαστούν για 24 ώρες. Χρησιμοποιούνται τα πλασμίδια pGL2-3xERE-TATA-luc, το πλασμίδιο έκφρασης του SAFB1, pEGFP3SAFB1, ο πλασμιδιακός φορέας του SAFB1, pCDNA3.1 και το δεύτερο πλασμίδιο αναφοράς για τη μέτρηση της απόδοσης της διαμόλυνσης, pRenilla. Τα κύτταρα διαμολύνονται με το συνδυασμό πλασμιδίων που αντιστοιχεί στην εκάστοτε συνθήκη. Η διαμόλυνση των κυττάρων γίνεται με κατιονικό αντιδραστήριο PEI, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.3.3. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες και στη συνέχεια προστίθεται οιστραδιόλη στις μισές οπές σε συγκέντρωση 10^{-8} M, ενώ στις άλλες μισές προστίθεται αιθανόλη, η οποία είναι ο διαλύτης της

οιστραδιόλης. Οι ποσότητες του πλασμιδίου pEGFP3SAFB1 με τις οποίες διαμολύνονται τα κύτταρα είναι 30, 60, 125, 250, 500, 1000 και 1250 ng, συμπληρώντας με την αντίστοιχη ποσότητα του πλασμιδιακού του φορέα, ώστε να πληρείται πάντα η συνθήκη των 1250 ng που αποτελεί τη μέγιστη ποσότητα πλασμιδίου pEGFP3SAFB1 που μπορεί να προστεθεί στο σύστημά μας. Η ανάλυση της συγκαταστολικής δράσης του SAFB1 γίνεται με τη δοκιμασία της λουσιφεράσης, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.3.6.

Τα αποτελέσματα που φαίνονται στην εικόνα 3 αποτελούν συγχώνευση δύο πειραμάτων. Σε κάθε πείραμα, οι τιμές προκύπτουν από 3 επαναλήψεις.



Εικόνα 3. Δοσοεξαρτώμενη συγκαταστολή του SAFB1 στον ER σε κύτταρα MCF-7

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3, οι κίτρινες στήλες αντιπροσωπεύουν όλες τις συνθήκες απουσίας οιστραδιόλης και οι μπλε στήλες αντιπροσωπεύουν τις συνθήκες στις οποίες προστέθηκε οιστραδιόλη (E₂). Στο πείραμά μας φαίνεται καθαρά η επαγωγή της δράσης του ER

από την E₂. Η καταστολή της μεταγραφικής δράσης του ER από το SAFB1 φαίνεται ήδη από πολύ μικρές ποσότητες, αλλά είναι ασταθής. Σε ποσότητες μεγαλύτερες των 125 ng SAFB1 παρατηρείται σταθεροποίηση της βέλτιστης καταστολής του, με μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του ER κατά περίπου 70%. Μετά τα 125 ng παρατηρήθηκε κορεσμός της καταστολικής δράσης του SAFB1. Συνολικά, ο SAFB1 απαιτείται σε μικρές ποσότητες για να ασκήσει τη δράση συγκαταστολής στον ER και από αυτά τα ευρήματα αποφασίστηκε ότι η ποσότητα του SAFB1 που θα χρησιμοποιείται στα επόμενα πειράματα είναι αυτή των 250 ng.

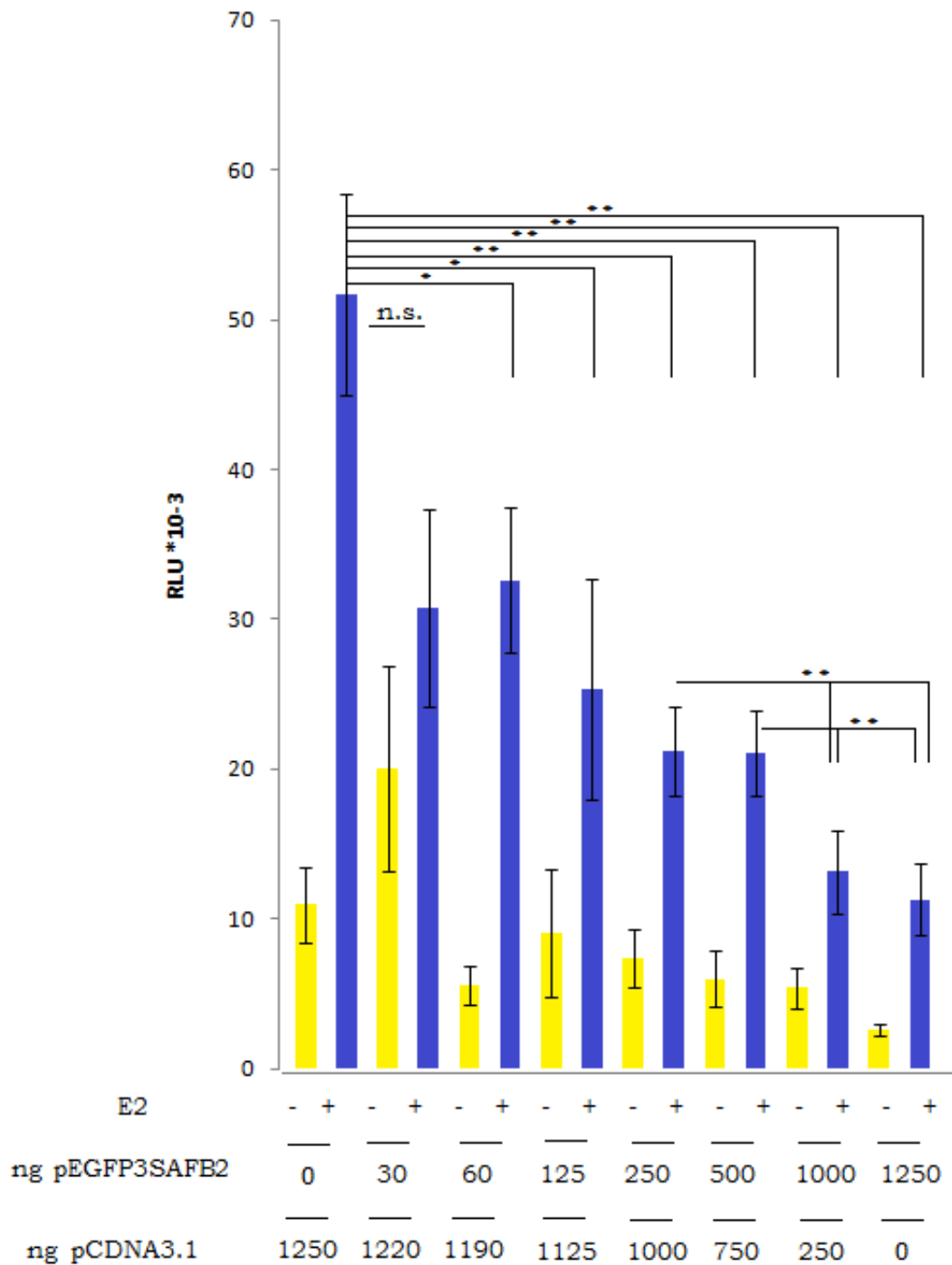
4.2 Προσδιορισμός των πειραματικών συνθηκών για τη βέλτιστη συγκαταστολή του ER από το SAFB2 σε κύτταρα MCF-7

Παρομοίως, θελήσαμε να μελετήσουμε τη δόσοεξαρτώμενη συγκαταστολική δράση του SAFB2 στον ER και να προσδιορίσουμε την ελάχιστη ποσότητα βέλτιστης συγκαταστολής του.

Η διαδικασία καλλιέργειας των κυττάρων είναι ίδια με αυτή του κεφαλαίου 5.1. Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε αυτή τη φορά με το κατιονικό αντιδραστήριο TurboFect, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.3.4. Τα πλασμίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν το πλασμίδιο αναφοράς pGL2-3xERE-TATA-luc, το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο του SAFB2 pEGFP3SAFB2, ο πλασμιδιακός φορέας του SAFB2, pCDNA3.1 και το δεύτερο πλασμίδιο αναφοράς για τη μέτρηση της απόδοσης της διαμόλυνσης, pRenilla. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το συνδυασμό πλασμιδίων που αντιστοιχεί στην εκάστοτε συνθήκη.

Οι ποσότητες SAFB2 με τις οποίες διαμολύνθηκαν τα κύτταρα είναι 30, 60, 125, 250, 500, 1000 και 1250 ng, συμπληρώνοντας με την αντίστοιχη ποσότητα του πλασμιδιακού του φορέα ώστε να πληρείται πάντα η συνθήκη των 1250 ng που αποτελεί τη μέγιστη ποσότητα πλασμιδίου pEGFP3SAFB2 που μπορεί να προστεθεί στο σύστημά μας. Η ανάλυση της συγκαταστολικής δράσης του SAFB2 γίνεται με τη δοκιμασία της λουσιφεράσης, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.3.6.

Τα αποτελέσματα της εικόνας 4 αποτελούν συγχώνευση δύο πειραμάτων. Σε κάθε πείραμα, οι τιμές προκύπτουν από 3 επαναλήψεις.



Εικόνα 4. Δοσοεξαρτώμενη συγκαταστολή του SAFB2 στον ER σε κύτταρα MCF-7

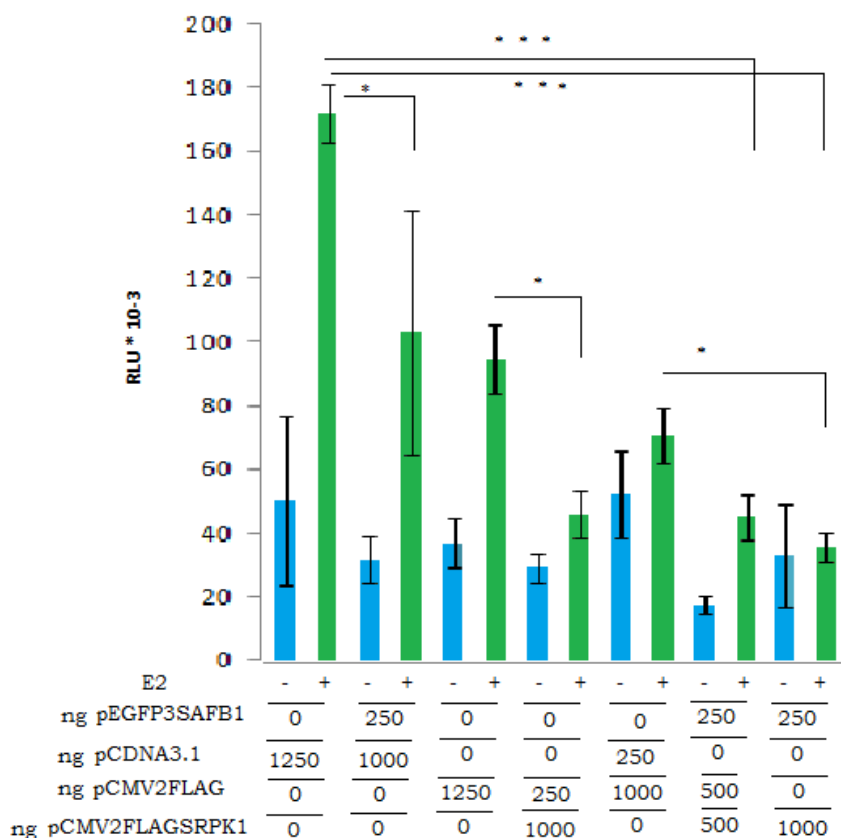
Η δράση της συγκαταστολής ξεκινάει από την ποσότητα των 125 ng, η οποία ενισχύεται καθώς αυξάνονται οι ποσότητες της πρωτεΐνης. Η μέγιστη καταστολή, η οποία φαίνεται να σταθεροποιείται σε ποσότητες από 1000 ng pEGFP3SAFB2 και άνω, μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του ER κατά περίπου 75%. Έτσι τα 1000 ng είναι και η ποσότητα που θα χρησιμοποιείται στα επόμενα πειράματα.

4.3 Μελέτη της επίδρασης της SRPK1 στη δράση συγκαταστολής του SAFB1 στον ER σε κύτταρα MCF-7

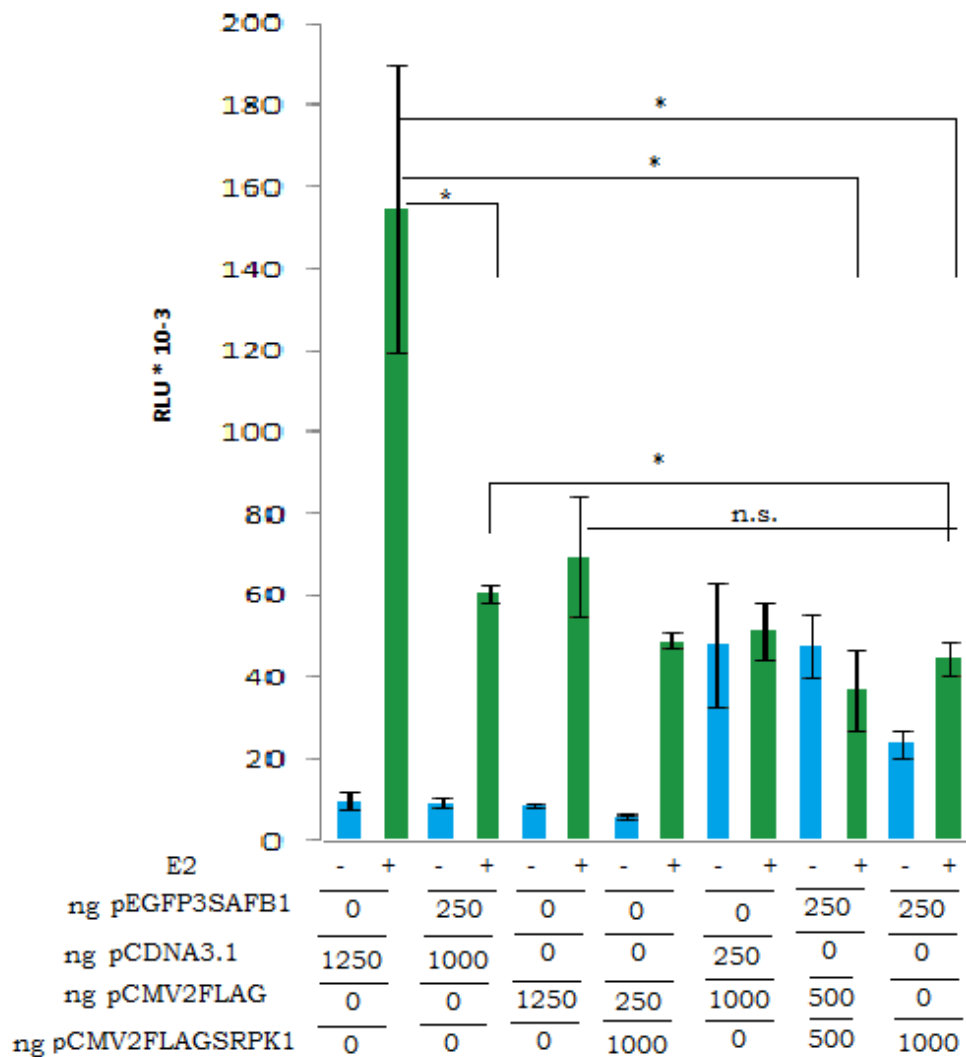
Από το εργαστήριό μας έχει δειχθεί ότι η SRPK1 αλληλεπιδρά με τους SAFB1 και SAFB2, με το καρβοξυτελικό τους άκρο [6]. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο ερώτημα αν η αλληλεπίδραση μεταξύ της SRPK1 και των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 έχει κάποια επίδραση στη καταστολική τους δράση στον ER.

Αφού προσδιορίστηκε η μικρότερη ποσότητα SAFB1 που απαιτείται για την πλήρη καταστολή της δράσης του ER στο σύστημά μας, θελήσαμε να εξετάσουμε την επίδραση της SRPK1 στη λειτουργία του SAFB1 στο συγκεκριμένο σύστημα.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 5.1 και διαμολύνθηκαν με τα επιθυμητά πλασμίδια έγινε με το αντιδραστήριο TurboFect, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.4. Τα πλασμίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι το πλασμίδιο αναφοράς pGL2-3xERE-TATA-luc, το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της SRPK1, pCMVFLAGSRPK1, τον πλασμιδιακό φορέα της SRPK1, pCMVFLAG και το δεύτερο πλασμίδιο αναφοράς για τη μέτρηση της απόδοσης της διαμόλυνσης, pRenilla. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το συνδυασμό πλασμιδίων που αντιστοιχεί στην εκάστοτε συνθήκη. Οι εικόνες 5 και 6 απεικονίζουν τα δύο πειράματα που διεξήχθησαν. Σε κάθε πείραμα, οι τιμές προκύπτουν από 3 επαναλήψεις.



Εικόνα 5. Η δράση της SRPK1 στη συγκαταστολική δράση του SAFB1



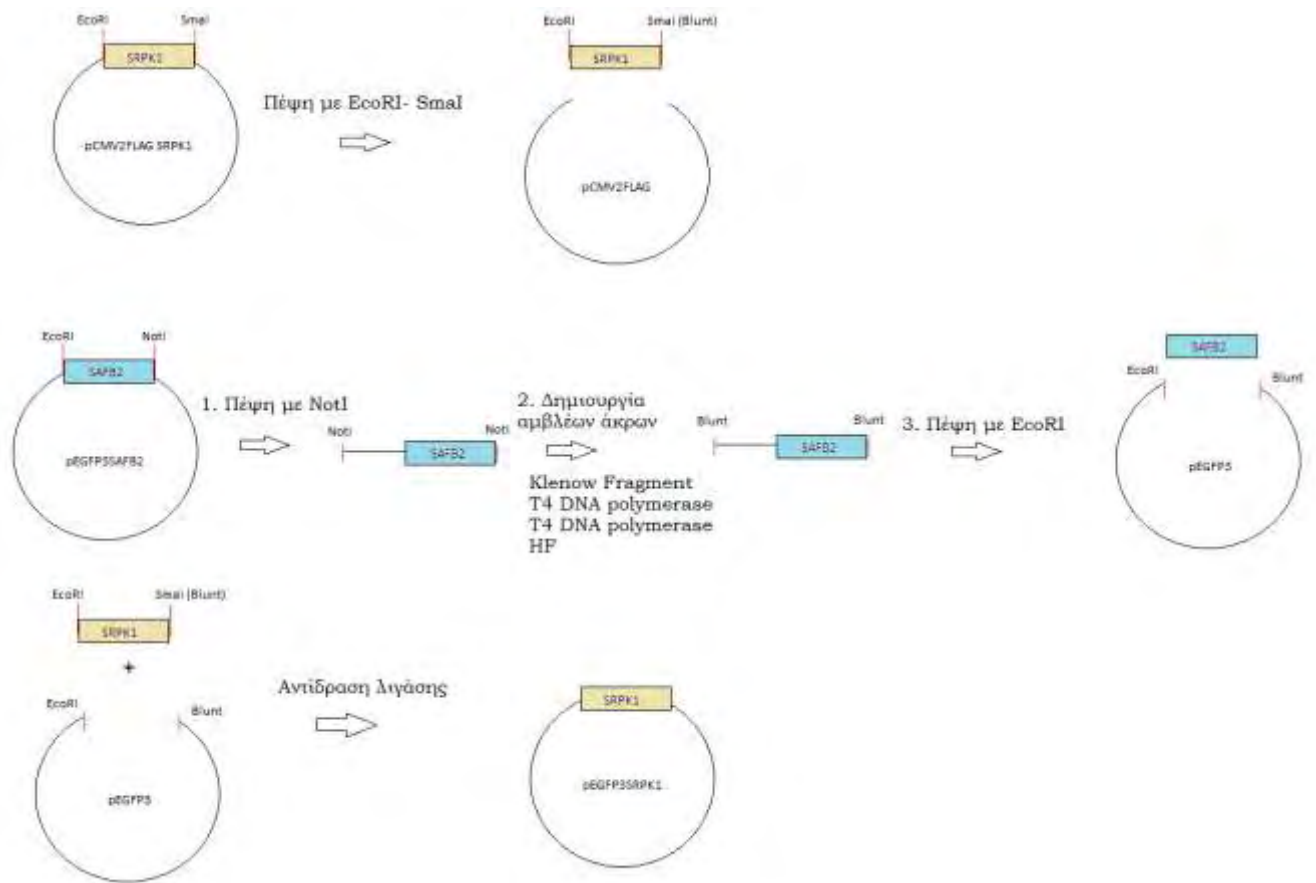
Εικόνα 6. Η δράση της SRPK1στη συγκατασταστική δράση του SAFB1

Στο συγκεκριμένο πείραμα, η επαγωγή της οιστραδιόλης έγινε σε φυσιολογικά επίπεδα και ο SAFB1 κατέστειλε τον ER κατά 40%. Όταν προστέθηκε SRPK1 μαζί με το SAFB1, η δράση του ER φαίνεται ότι μειώθηκε περισσότερο. Το αποτέλεσμα αυτό, όμως, δεν είναι δυνατό να αξιολογηθεί διότι η ίδια η SRPK1 φαίνεται να προκαλεί καταστολή, αυτόνομα (απουσία SAFB1), στη δράση του ER. Ακόμη και αυτό το αποτέλεσμα είναι αμφισβητούμενο λόγω του γεγονότος ότι ο φορέας έκφρασης της SRPK1, pCMV2FLAG, προκαλεί, όταν τα κύτταρα διαμολύνονται με αυτόν, μείωση της δράσης του ER κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες. Η πτώση αυτή φάνηκε και στα δύο πειράματα που εκπονήθηκαν κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες (εικόνες 5 και 6).

4.4 Κλωνοποίηση του γονιδίου της SRPK1 πλήρους μήκους στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP3

Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματα, έγινε προσπάθεια να κλωνοποιηθεί η SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP3, ώστε να μοιράζεται τον ίδιο φορέα με τους SAFB1 και SAFB2. Με αυτόν τον τρόπο δε θα παρατηρηθεί η πιθανή κατασταλτική δράση του προηγούμενου πλασμιδιακού φορέα της SRPK1.

Για την κλωνοποίηση της SRPK1 στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα με τις πρωτεΐνες SAFB, επιλέχθηκε το πλασμίδιο pEGFP3SAFB2. Το σκεπτικό της διαδικασίας περιλαμβάνει την εξαγωγή του cDNA της SRPK1 από τον φορέα pCMV-2 FLAG με πένυεις περιοριστικών ενδονουκλεασών στα δύο άκρα της, με ένζυμα κατάλληλα γι' αυτά (εικόνα 7). Στη συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και απομόνωση της ζώνης που αντιστοιχεί στην SRPK1 με καθαρισμό του τμήματος από την πηκτή. Παράλληλα ο SAFB2 πέπτεται με τις επιθυμητές περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ο πλασμιδιακός του φορέας απομονώνεται από πηκτή αгарόζης με την ίδια διαδικασία που απομονώθηκε η SRPK1. Τέλος, το ένθεμα, η SRPK1 και ο πλασμιδιακός φορέας, pEGFP3, ενώνονται σε ένα νέο πλασμίδιο, το pEGFP3SRPK1, με αντίδραση λιγάσης.

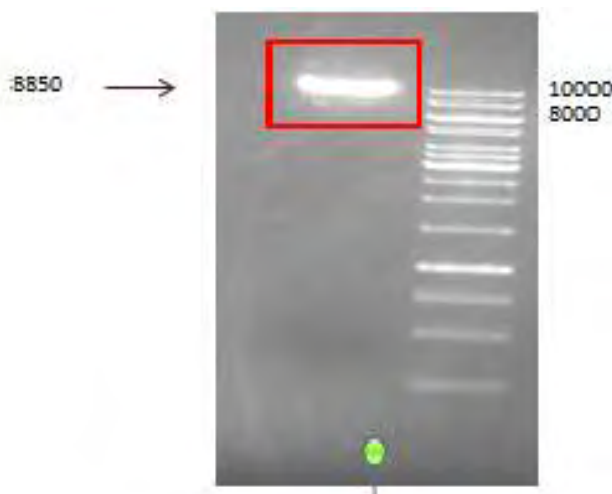


Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της κλωνοποίησης της SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP3.

Για την επίτευξη αυτής της κλωνοποίησης απαιτείται τα δύο μόρια να έχουν συμπληρωματικά άκρα, ώστε να μπορέσει ο πλασμιδιακός φορέας να προσλάβει το ένθεμα και κατά την αντίδραση λιγάσης να συνδεθούν μεταξύ τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η SRPK1 είχε εισαχθεί με άκρα EcoRI-BamHI, ενώ ο SAFB2 έχει εισαχθεί σε άκρα EcoRI-NotI, συνεπώς το ένα άκρο των μορίων δεν είναι συμβατό. Στον πλασμιδιακό φορέα της SRPK1, μετά τη θέση της EcoRI, υπάρχει η θέση για την περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI, που αφήνει αμβλύ άκρο μετά την πέψη.

Στον πλασμιδιακό φορέα του SAFB2 δεν υπάρχει κάποια θέση για το ένζυμο SmaI και γι' αυτό το άκρο της θέσης NotI έπρεπε να μετατραπεί σε αμβλύ. Δεδομένου ότι η NotI αφήνει ένα 5' προεξέχον άκρο, η επεξεργασία του γίνεται με πολυμεράση, η οποία θα αντιγράψει το προεξέχον άκρο με τη συμπληρωματική αλυσίδα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του επιθυμητού αμβλέως άκρου.

Συγκεκριμένα, ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP3 πέπτεται με NotI, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.1.3. Στη συνέχεια ηλεκτροφορεύεται σε πηκτή αгарόζης, σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 4.1.6 για να διαγνωστεί αν το μόριο πέπτεται πλήρως.

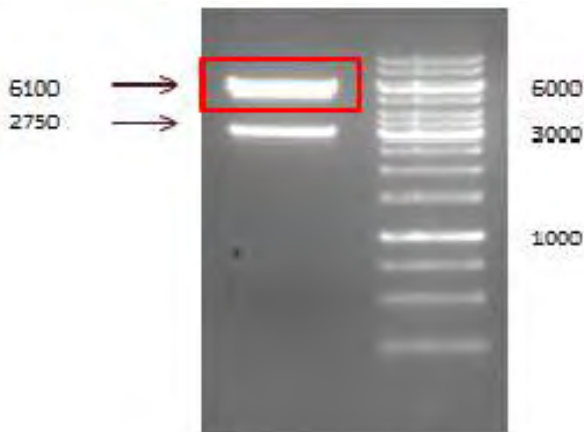


Εικόνα 8. Πέψη του pEGFP3SAFB2 με NotI

Όπως φαίνεται στην εικόνα 8, η αναμενόμενη εικόνα είναι μία ζώνη στα 8850 ζεύγη βάσεων και περιλαμβάνει τον pEGFP3SAFB2, μετά την πέψη με τη NotI, η οποία είναι μοναδική για το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Στη συγκεκριμένη εικόνα υπάρχει μία ζώνη μεταξύ των 8000 και 10000 ζευγών βάσεων, χωρίς κανένα παραπροϊόν, οπότε συμπαίρνεται ότι το μόριο έχει κοπεί πλήρως.

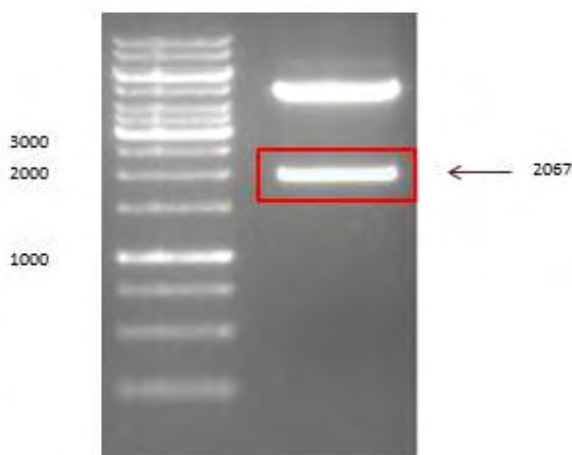
Στη συνέχεια, ακολουθεί η δημιουργία αμβλέων άκρων, χρησιμοποιώντας το ένζυμο Klenow fragment, σύμφωνα με την παράγραφο 4.1.4. Επειδή δεν υπάρχει κάποιος τρόπος να ελεγχθεί αν η αντίδραση αυτή γίνεται σωστά, το πείραμα προχωρεί, πέπτοντας το πλασμίδιο pEGFP3SAFB2 με το ένζυμο EcoRI για να κοπεί το ένα άκρο του SAFB2, ώστε να μπορεί να

ξεχωρίσει το ένθεμα από τον φορέα και για να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα ως προς το ένα άκρο της SRPK1. Τέλος, στο διάλυμα προστείνεται 1unit αλκαλικής φωσφατάσης CIP για μία ώρα, για να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση. Η θέση της EcoRI είναι μοναδική γι' αυτό το πλασμίδιο και η αναμενόμενη εικόνα είναι δύο ζώνες, η πρώτη στα 6100 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχεί στο φορέα και μία δεύτερη στα 2750 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχεί στο μήκος του γονιδίου του SAFB2. (εικόνα 9) Στη συνέχεια, η ζώνη του φορέα απομονώνεται και καθαρίζεται από την πηκτή σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 4.1.7.



Εικόνα 9. Πέψη του κατεργασμένου pEGFPSAFB2 με EcoRI

Για να απομονωθεί η SRPK1 από τον pCMVFLAG, γίνεται πέψη του πλασμιδίου με τα ένζυμα EcoRI-SmaI, σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 4.1.3 και ηλεκτροφορεύεται σε πηκτή αγαρόζης. Και οι δύο θέσεις για τις παραπάνω περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι μοναδικές στο πλασμίδιο, οπότε η αναμενόμενη εικόνα είναι δύο ζώνες, αυτή του φορέα στα 4700 ζεύγη βάσεων και αυτή της SRPK1 στα 2000 ζεύγη βάσεων (εικόνα 10).



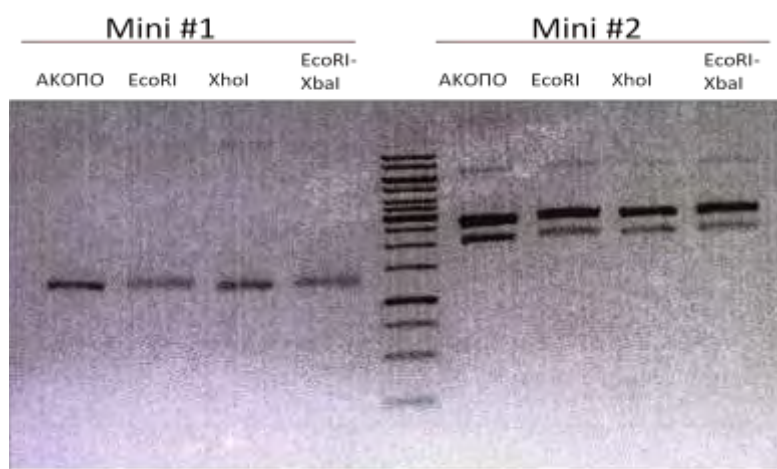
Εικόνα 10. Πέψη του pCMVFLAGSRPK1 με EcoRI-SmaI

Η ζώνη που αντιστοιχεί στην SRPK1 απομονώνεται και καθαρίζεται από την πηκτή σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.1.7.

Στη συνέχεια, 2 μl από το φορέα και το ένθεμα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης και ποσοτικοποιούνται, ώστε να υπολογιστούν οι ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση λιγάσης. Η αντίδραση λιγάσης γίνεται σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 4.1.5.

Για να διαπιστωθεί εάν από την αντίδραση λιγάσης προκύπτει το αναμενόμενο πλασμίδιο, τα περιεχόμενα της αντίδρασης λιγάσης μετασχηματίζονται σε κύτταρα Top 10, με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.3 και επιστρώνονται σε τρυβλίο με αντιβιοτικό επιλογής αμικικιλίνη. Μετά από 24 ώρες, τα τρυβλία εξετάζονται για αποικίες, οι οποίες αποκολλούνται από το τρυβλίο και το DNA τους απομονώνεται σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 4.2.4. Τέλος, το απομονωμένο προϊόν υπόκειται σε πέψη με διαγνωστικά περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης.

Συγκεκριμένα, στην πρώτη απόπειρα κλωνοποίησης, μετά την αντίδραση λιγάσης και το μετασχηματισμό των κυττάρων υπήρχαν μόνο δύο αποικίες, οι οποίες αποκολλήθηκαν και από αυτές απομονώθηκε το DNA τους. Οι διαγνωστικές πέψεις που έγιναν και για τις δύο αποικίες περιλαμβάνουν τα ένζυμα EcoRI, όπου αναμένεται μία ζώνη στα 8000 ζεύγη βάσεων, XhoI, όπου αναμένονται δύο ζώνες στα 7900 και 300 ζεύγη βάσεων και τέλος EcoRI-XbaI, όπου αναμένονται δύο ζώνες στα 6100 και στα 2065 ζεύγη βάσεων (εικόνα 11).



Εικόνα 11 Πέψεις των αποικιών που απομονώθηκαν μετά την κλωνοποίηση της SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP

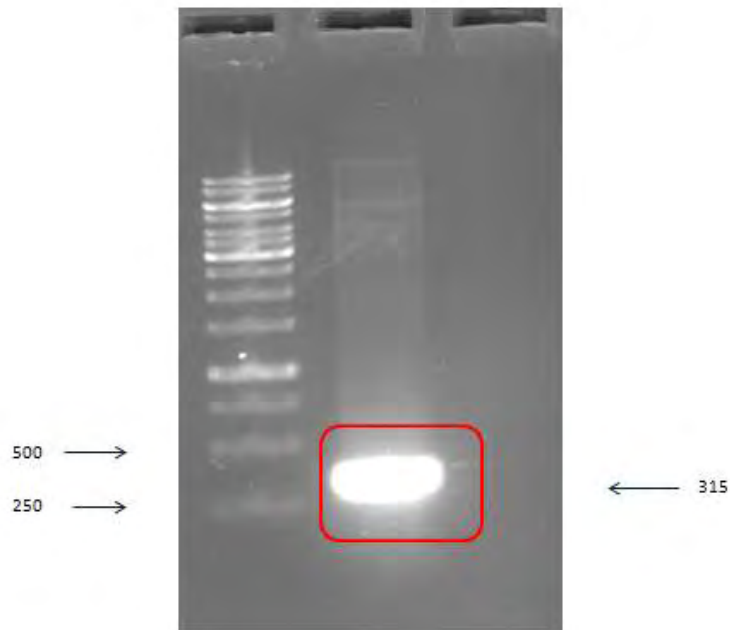
Καμία από τις αποικίες δεν εμφάνισε την αναμενόμενη εικόνα. Μιας και το μόνο στάδιο που δε μπορεί να ελεγχθεί είναι αυτό της δημιουργίας των αμβλέων άκρων, υποθέσαμε ότι το ένζυμο που δε δούλεψε είναι η Klenow fragment. Η διαδικασία της κλωνοποίησης επαναλήφθηκε, χρησιμοποιώντας τη DNA πολυμεράση του φάγου T4. Η δεύτερη κλωνοποίηση απέδωσε δύο αποικίες, που όμως καμία δεν έφερε το επιθυμητό πλασμίδιο. Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε και μια τρίτη φορά, χρησιμοποιώντας την πολυμεράση του φάγου T4 High Fidelity της εταιρίας BioLabs, χωρίς να αποδώσει καμία αποικία. Οι διαδικασίες δημιουργίας αμβλέων άκρων έγιναν σύμφωνα με τις συνθήκες της παραγράφου 4.1.4.

Η συγκεκριμένη κλωνοποίηση είναι μία δύσκολη κλωνοποίηση όπου ένα ένθεμα μεγάλου μήκους, όπως η SRPK1 κλωνοποιείται σε ένα φορέα τρεις φορές μεγαλύτερο του. Επειδή δεν υπάρχει απλός τρόπος ελέγχου για τις συγκεκριμένες διαδικασίες και λόγω περιορισμένου πειραματικού χρόνου, η κλωνοποίηση της SRPK1 στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP3 εγκαταλείφθηκε.

4.5 Κλωνοποίηση του cDNA της ERH πλήρους μήκους στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1

Σε παλαιότερα πειράματα που διεξήχθησαν στο εργαστήριο, αναζητούνταν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους SAFB1 και SAFB2 με το σύστημα των δύο υβριδίων στον *Saccharomyces cerevisiae*. Μία από τις πρωτεΐνες που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το SAFB1 ήταν και η ERH, η οποία όμως δε βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το SAFB2. Αντίθετα, σε *in vitro* πειράματα, η πρωτεΐνη ERH προσδένεται στο καρβοξυτελικό τμήμα και των δύο πρωτεϊνών, όταν αυτές είναι βακτηριακά εκφραζόμενες (αδημοσίευτα δεδομένα). Σε αυτή τη μελέτη εξετάζεται η επίδραση της ERH στη λειτουργία των SAFB1 και SAFB2 και η πιθανή διάκρισή της μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων.

Θελήσαμε να εξετάσουμε την επίδραση της ERH στη συγκατασταλτική δράση του SAFB1 και του SAFB2. Το μόνο διαθέσιμο πλασμίδιο στο Εργαστήριο Βιοχημείας που διαθέτει το πλήρες μήκος του cDNA της ανθρώπινης ERH είναι το pET24b+ERH. Επειδή ο πλασμιδιακός φορέας pET24b+ είναι κατάλληλος για βακτηριακή έκφραση, αλλά όχι για έκφραση σε ευκαρυωτικά κύτταρα, το cDNA της ERH έπρεπε να κλωνοποιηθεί σε φορέα έκφρασης για κύτταρα θηλαστικών. Έτσι, το cDNA της ERH απομονώθηκε με PCR σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 4.1.9, με τη χρήση εκκινητών που αναφέρονται στην ίδια παράγραφο, ώστε στη συνέχεια να κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος είναι 315 ζεύγη βάσεων. Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, μικρή ποσότητα προϊόντος ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης, για την επιβεβαίωση του μοριακού του βάρους (εικόνα 12).



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ταυτοποίηση του cDNA της ανθρώπινης ERH

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης καθαρίστηκε από τυχόν κατάλοιπα της αντίδρασης με κατακρήμνιση με αιθανόλη, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.1.10 .

Στη συνέχεια, έγινε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pEGFP3 με τα ένζυμα EcoRI και BamHI (η ERH έχει κλωνοποιηθεί με άκρα για τα συγκεκριμένα ένζυμα) (παράγραφος 4.1.3) δημιουργώντας συμπληρωματικά άκρα προς το ένθεμα και στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (παράγραφος 4.1.6), από όπου απομονώθηκε και καθαρίστηκε (παράγραφος

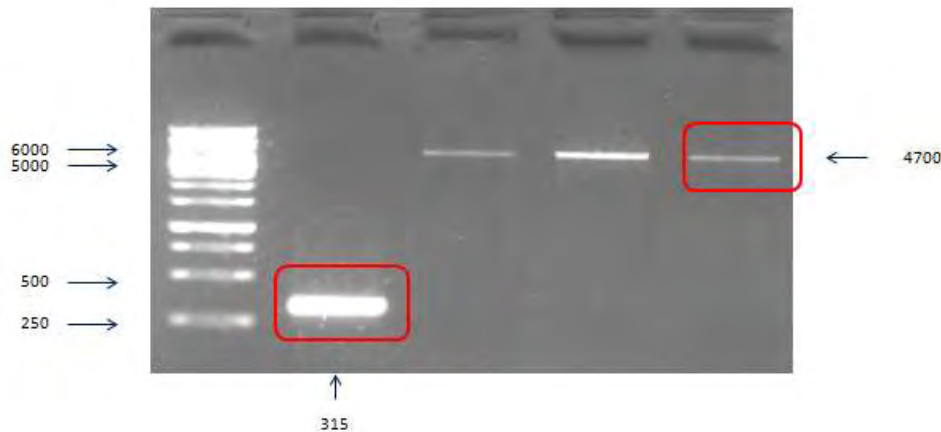


4.1.7).

Εικόνα 13. Πέψη του pEGFP3 με EcoRI-BamHI

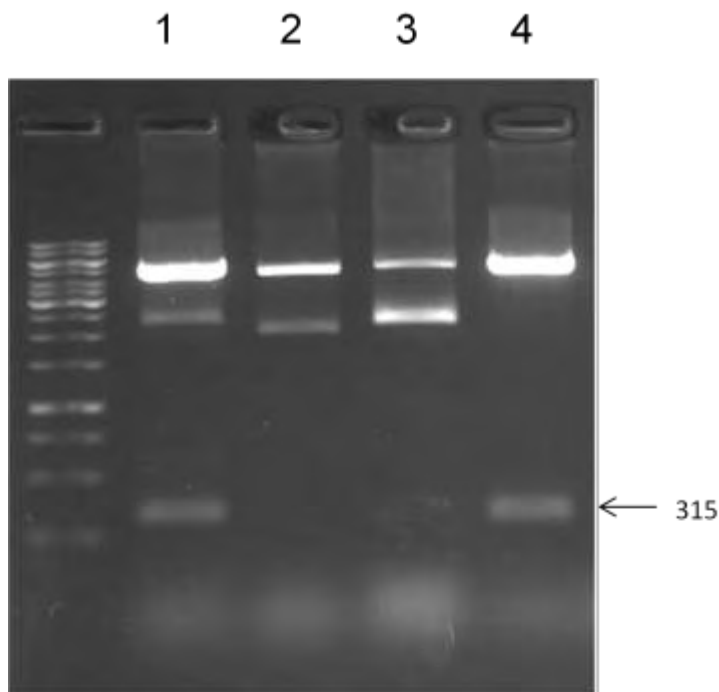
Πριν την αντίδραση λιγάσης έγινε ποσοτικοποίηση του ενθέματος και του φορέα, με τη ζώνη που αντιστοιχεί στο φορέα να εμφανίζεται στα 4700 ζεύγη βάσεων και τη ζώνη του

ενθέματος να εμφανίζεται στα 315 ζεύγη βάσεων (εικόνα 14). Η αντίδραση λιγάσης γίνεται σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 4.1.5.



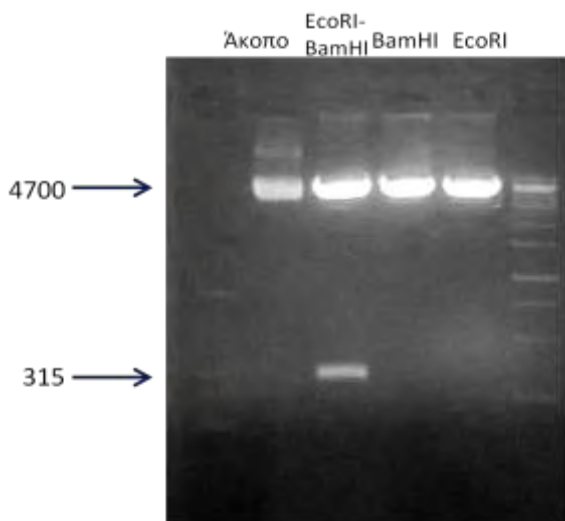
Εικόνα 14. Ποσοτικοποίηση της ERH και το pEGFP3 για την αντίδραση λιγάσης

Για να διαπιστωθεί εάν από την αντίδραση λιγάσης προκύπτει το αναμενόμενο πλασμίδιο, τα περιεχόμενα αντίδρασης της λιγάσης μετασχηματίστηκαν σε κύτταρα Top 10, με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.3 και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με αντιβιοτικό επιλογής την καναμυκίνη. Μετά από 24 ώρες τα τρυβλία εξετάστηκαν για αποικίες, οι οποίες αποκολλούνται από το τρυβλίο και το DNA τους απομονώθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία της παραγράφου 4.2.4. Τέλος, το απομονωμένο προϊόν υπέστη πέψη με τα διαγνωστικά περιοριστικά ένζυμα EcoRI και BamHI και ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης. Η αναμενόμενη εικόνα μιας επιτυχημένης πρόσληψης πλασμιδίου θα εμφανίζει δύο ζώνες, μία στα 5400 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP3 και μία στα 315 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχεί στην ERH. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, οι αποικίες 1 και 4 περιέχουν το αναμενόμενο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.



Εικόνα 15. Πέψεις των αποικιών που απομονώθηκαν με τα ένζυμα EcoRI- BamHI μετά την κλωνοποίηση της ERH στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP3 με EcoRI-BamHI

Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της κλωνοποίησης επιλέγεται μία θετική αποικία και το DNA της απομονώνεται με μεσαίας κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.5. Τέλος, για να επιβεβαιωθεί το μοριακό βάρος του πλασμιδίου έγινε πέψη με τα ένζυμα EcoRI και BamHI και ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης, αναμένοντας δύο ζώνες, στα 4700 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1 και μία στα 315 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχεί στην ERH (εικόνα 16).

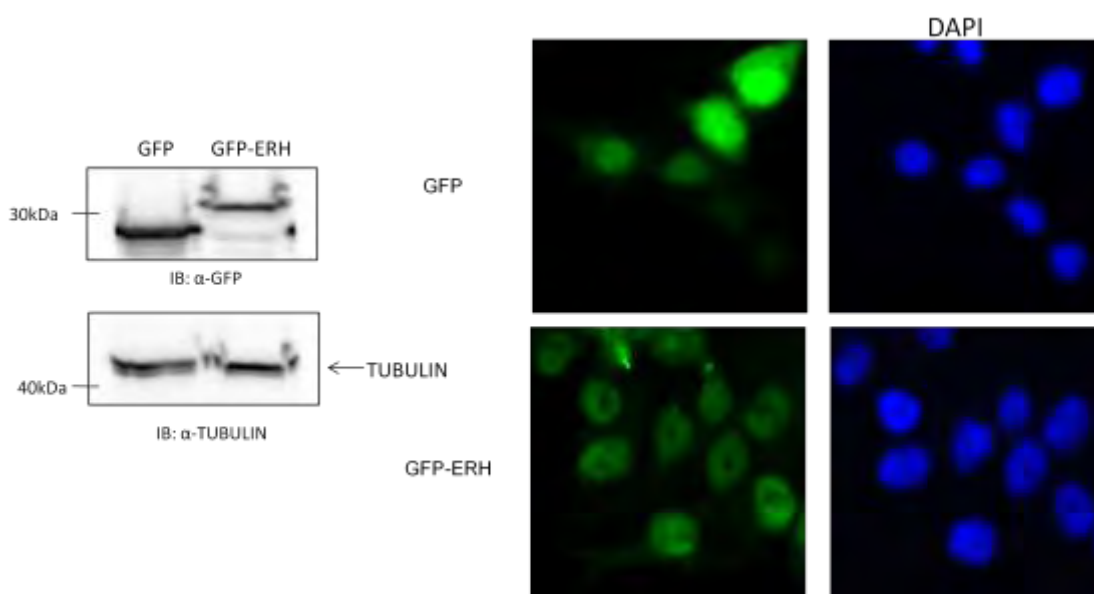


Εικόνα 16. Διαγνωστικές πέψεις της αποικίας που επιλέχθηκε μετά από καθαρισμό DNA μεσαίας κλίμακας.

Εφόσον η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής, αποκτήσαμε το πλασμίδιο pEGFP3ERH, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων και περαιτέρω μελέτες σε αυτά.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι το νέο κατασκευασθέν πλασμίδιο εκφράζεται σε ευκαρυωτικά κύτταρα, κύτταρα HEK293T διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα της ERH pEGFP-1C και pEGFP-1CERH με κατιονικό αντιδραστήριο PEI, σύμφωνα με την παράγραφο 4.3.3. Στο τρυβλίο προστίθενται καλυπτρίδες, για να αναπτυχθούν τα κύτταρα επάνω τους. Μετά από 24 ώρες, οι καλυπτρίδες απομακρύνονται από το τρυβλίο για να υποβληθούν σε μικροσκοπία φθορισμού (παράγραφος 4.3.9). Τα υπόλοιπα κύτταρα λύνονται, για να παρασκευαστεί πρωτεϊνικό εκχύλισμα από αυτά και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και ανοσοαποτυπώνονται κατά Western (παράγραφος 4.3.7).

Τα λύματα των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pEGFP-C1 και pEGFP-C1ERH ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδιου και στη συνέχεια επώαστηκαν με αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης GFP και κατά της τουμπουλίνης, ως ένδειξη ότι τα δείγματα ισοφορτώθηκαν. Στο δείγμα που διαμολύνθηκε με το πλασμίδιο pEGFP-C1, που είναι ο πλασμιδιακός φορέας της ERH και εκφράζεται η πρωτεΐνη GFP αναμένεται μία ζώνη 25 kDa, όσο και το μέγεθος της πρωτεΐνης GFP. Στο δείγμα που διαμολύνθηκε με το πλασμίδιο pEGFP-C1ERH εκφράστηκε η συντηγμένη ERH με τη GFP και αναμένεται μία ζώνη στα 37-40 kDa, όσο το μέγεθος της ERH μαζί με τη GFP. Στην εικόνα 17, η ζώνη για τη GFP είναι στα 25 kDa και για τη GFPERH στα 37 kDa, που επιβεβαιώνει την έκφραση της ERH σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η υποκυτταρική κατανομή της ERH είναι κυρίως πυρηνική. Η ERH είναι άφθονη στον πυρήνα, από όπου αποκλείεται από τους πυρηνίσκους, ενώ μικρή ποσότητά της εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 17).



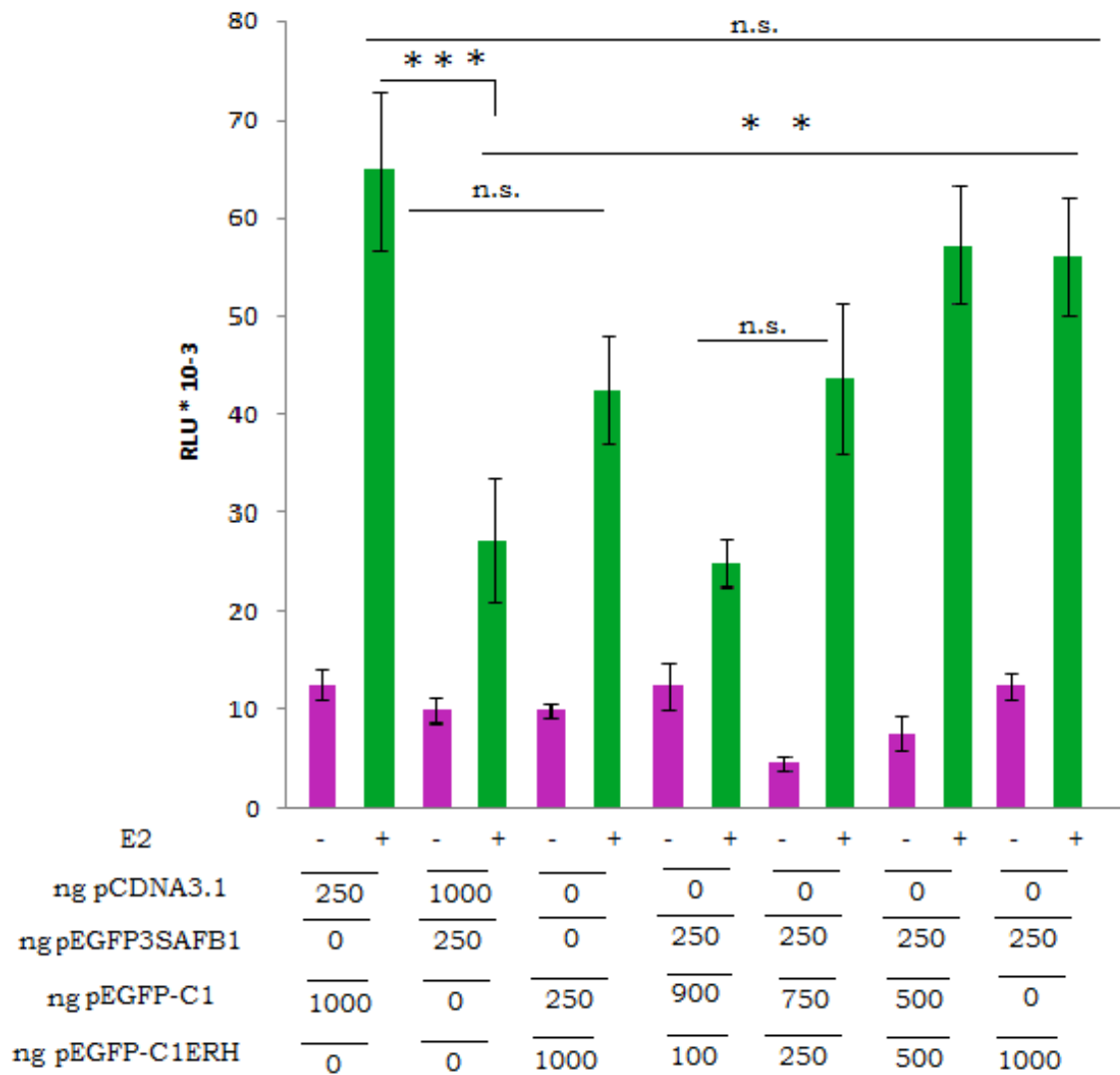
Εικόνα 17.Φθορισμός (δεξιά) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (αριστερά) των πλασμιδίων pEGFP-C1 και pEGFP-C1ERH σε κύτταρα HEK293T.

4.6 Μελέτη της επίδρασης της ERH στη δράση συγκαταστολής του SAFB1 και SAFB2 στον ER σε κύτταρα MCF-7

Εφόσον επιβεβαιώθηκε ότι η GFPERH εκφράζεται από το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που κατασκευάστηκε και εντοπίζεται στον πυρήνα, εξετάστηκε η επίδρασή της στην συγκαταστολική δράση των SAFB1 και SAFB2, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.1. Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε με το κατιονικό αντιδραστήριο PEI, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.3.3. Τα πλασμίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι το πλασμίδιο αναφοράς pGL2-3xERE-TATA-luc, τα πλασμίδια pEGFPSAFB2, pEGFPSAFB1, pEGFP3ERH, οι πλασμιδιακοί φορείς pCDNA3.1 και pEGFP3 1 και το δεύτερο πλασμίδιο αναφοράς για τη μέτρηση της απόδοσης της διαμόλυνσης, pRenilla. Τα κύτταρα διαμολύνονται με το συνδυασμό πλασμιδίων που αντιστοιχεί στην εκάστοτε συνθήκη.

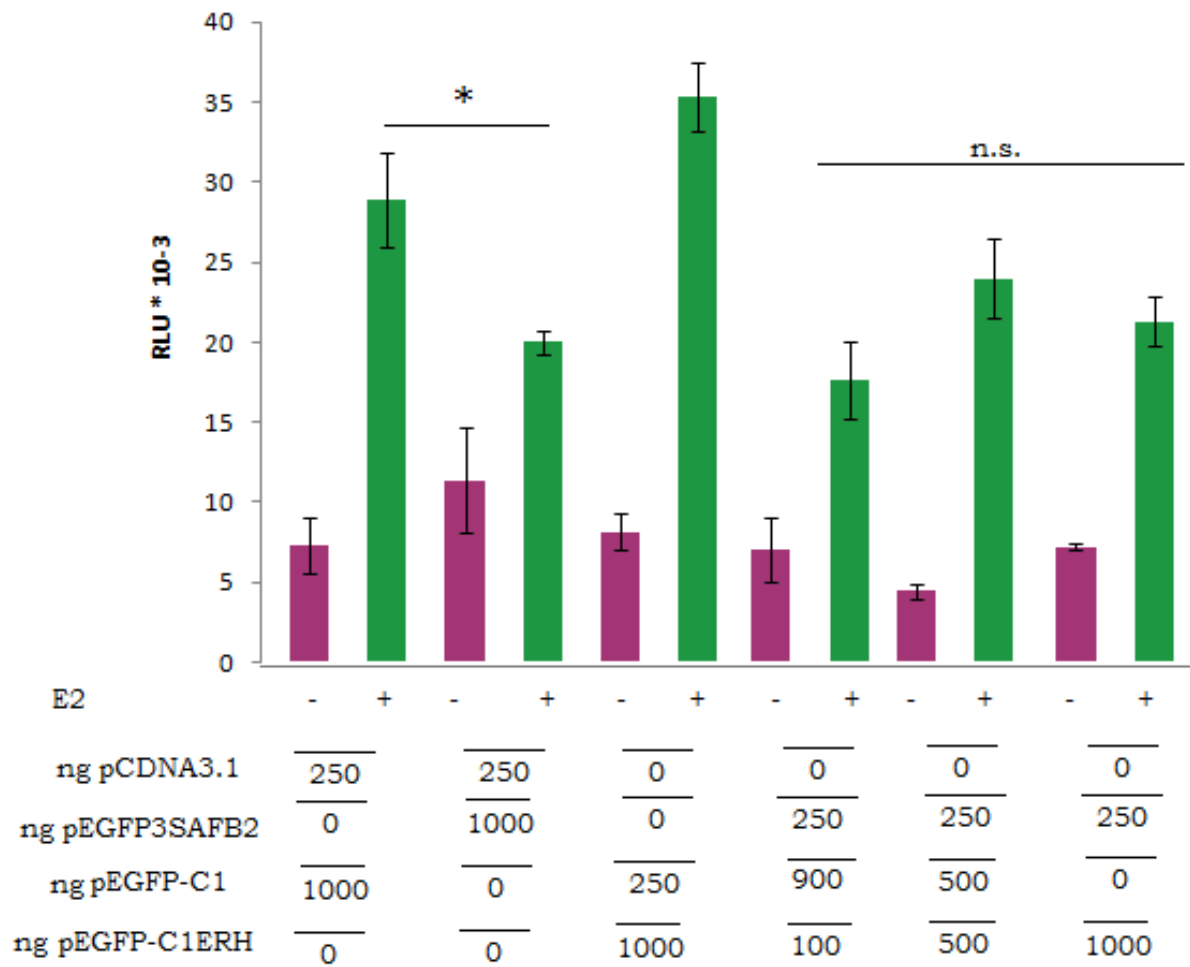
Οι ποσότητες ERH με τις οποίες διαμολύνονται τα κύτταρα είναι 100, 250, 500 και 1000 ng, συμπληρώνοντας με την αντίστοιχη ποσότητα του πλασμιδιακού του φορέα ώστε να πληρείται πάντα η συνθήκη των 1250 ng που αποτελεί τη μέγιστη ποσότητα πλασμιδίου pEGFP3SAFB1/2 που μπορεί να προστεθεί στο σύστημά μας. Η ανάλυση της συγκαταστολικής δράσης των SAFB1 και SAFB2 γίνεται με τη δοκιμασία της λουσιφεράσης, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.3.6.

Οι εικόνες 18 και 19 απεικονίζουν τη δράση της ERH στους SAFB1 και SAFB2. Σε κάθε πείραμα, οι τιμές προκύπτουν από 3 επαναλήψεις.



Εικόνα 18. Δοσοεξαρτώμενη επίδραση της ERH στη συγκαταστολική δράση του SAFB1

Η εικόνα 18 δείχνει ότι η συγκαταστολική δράση του SAFB1, παρουσία της ERH χάνεται και μάλιστα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ενώ σε μικρές ποσότητες της pEGFP-C1ERH η δράση του pEGFP3SAFB1 φαίνεται να παραμένει η ίδια, όσο αυξάνεται η ποσότητα της pEGFP-C1ERH στο κύτταρο, τόσο περισσότερο χάνεται και η συγκαταστολική δράση του SAFB1, φτάνοντας σε κορεσμό στα 500ng ERH. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα συνδιαμολούνονται με pEGFP-C1ERH και pEGFP3SAFB2 δεν παρατηρείται καμία μεταβολή της συγκαταστολικής δράσης του SAFB2, παρέχοντας επιπλέον ενδείξεις για τη μη αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο (εικόνα 19).



Εικόνα 19. Επίδραση της ERH στη συγκαταστολική δράση του SAFB2

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρωτεΐνες SAFB είναι δύο αποκλειστικά πυρηνικές, πολυλειτουργικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες όπως η μεταγραφή, το μάτισμα και η επεξεργασία του RNA και η οργάνωση της χρωματίνης σε ανώτερες δομές. Στο Εργαστήριο Βιοχημείας, έχει δειχθεί με το σύστημα των δύο υβριδίων στο *Saccharomyces cerevisiae* ότι η SRPK1 (Serine-Threonine Protein Kinase 1) αλληλεπιδρά με το SAFB1 και το SAFB2 (ισχυρότερα με το SAFB1). Αναζητώντας πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους παράγοντες SAFB απομονώθηκε η ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue) ως αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη του SAFB1, αλλά όχι του SAFB2 στο σύστημα των δύο υβριδίων στο *Saccharomyces cerevisiae*. Επιπλέον, η ERH αλληλεπιδρά *in vitro* και με τους δύο παράγοντες SAFB.

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά προσδιορίστηκαν οι ποσότητες βέλτιστης συγκαταστολής των SAFB1 και SAFB2 στον ER, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, ο SAFB1 καταστέλει τον ER κατά περίπου 70%, ιδιαίτερα σε ποσότητες μεγαλύτερες από 125 ng, ενώ ο SAFB2 καταστέλει τον ER κατά περίπου 75% σε ποσότητες μεγαλύτερες των 1000 ng. Για να μελετηθεί η επίδραση των πρωτεϊνών SRPK1 και ERH στους παράγοντες SAFB, επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν οι ποσότητες των 250 ng για το SAFB1 και των 1000 ng για το SAFB2.

Και οι δύο παράγοντες, SAFB1 και SAFB2, προκαλούν, κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες, καταστολή κατά 70-75%. Χρειάζεται, όμως, τουλάχιστον πενταπλάσια αποσότητα SAFB2 για να επιτευχθεί η πλήρης καταστολική δράση πάνω στον ER (1000ng SAFB2, έναντι 125-250 ng SAFB1). Η διαφορά της δράσης συγκαταστολής των δύο πρωτεϊνών, πιθανόν να έγκειται στην υποπυρηνική τους κατανομή: ο SAFB1 σχηματίζει κυρίως μονομερή, ομοδιμερή και ετεροδιμερή με τον SAFB2 και βρίσκεται σε μικρά σύμπλοκα μέσα στον πυρήνα. Αντίθετα, ο SAFB2 βρίσκεται σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα μεγάλης μοριακής μάζας, που περιέχουν διάφορες πρωτεΐνες επιπλέον του SAFB1, μέσα στον πυρήνα του κυττάρου [29]. Είναι, έτσι, πιθανόν ο SAFB1 να είναι πιο άμεσα διαθέσιμος απ' ότι ο SAFB2, για να αλληλεπιδράσει με τον ER, ειδικά κάτω από τις συνθήκες του πειράματός μας.

Για τη μελέτη της επίδρασης της SRPK1 (Serine-Threonine Protein Kinase 1) στην καταστολική δράση του SAFB1, κύτταρα MCF-7 διαμολύνθηκαν με ποσότητες 500 και 1000 ng SRPK1 μαζί με την ποσότητα των 250 ng SAFB1 και μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργότητα του ER με δοκιμασία λουσιφεράσης. Η προσθήκη του πλασμιδιακού φορέα της SRPK1, pCMV2FLAG προκάλούσε τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του ER, χωρίς να μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Επομένως, έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης της SRPK1 στο φορέα pEGFP3, που είναι και ο πλασμιδιακός φορέας των SAFB1 και SAFB2, ύστερα από

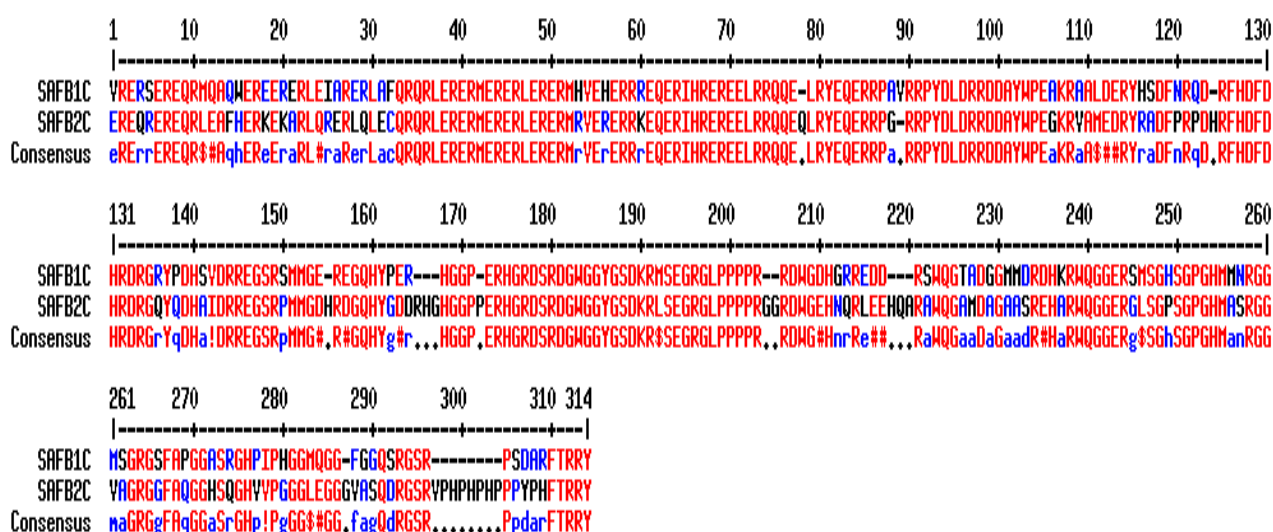
κατεργασία των άκρων του για τη δημιουργία αμβλέων άκρων. Η κλωνοποίηση δεν πέτυχε, αλλά η επίτευξή της αποτελεί μελλοντικό στόχο του εργαστηρίου.

Επιπλέον, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση της ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue) στην καταστολική δράση των παραγόντων SAFB στον ER. Πρώτα, η ERH κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών, pEGFP-C1 και επιβεβαιώθηκε η έκφρασή της με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και πειράματα φθορισμού. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες 100, 250, 500 και 1000 ng ERH και 250 ng SAFB1 και 100 500 και 1000 ng ERH και 1000 ng SAFB2, όπου διαπιστώθηκε ότι η ERH αποκαταστέλει τη δράση του SAFB1 δόσοεξαρτώμενα, αλλά δεν έχει επίδραση στη δράση του SAFB2.

Κατά τη μελέτη της επίδρασης της SRPK1 στην καταστολική δράση του SAFB1, η αδυναμία εξαγωγής συμπεράσματος προκύπτει από την υποκυτταρική κατανομή της SRPK1 και του SAFB1. Η πρώτη είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, με μικρά ποσοστά της στον πυρήνα, ενώ ο SAFB1 είναι μία αποκλειστικά πυρηνική πρωτεΐνη. Παρόλο που έχει δειχθεί ότι οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στον πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου [5], δε σημαίνει απαραίτητα ότι η αλληλεπίδρασή τους θα έχει κάποιο αποτέλεσμα στη δράση του SAFB1 ως συγκαταστολέας του ER, αλλά μπορεί ο ρόλος της να είναι έμμεσος και να αφορά κάποια άλλη διεργασία.

Τέλος, θελήσαμε να εξετάσουμε τη δράση της ERH στη λειτουργία του SAFB1 και να δούμε τη διάκρισή της μεταξύ των SAFB1 και SAFB2. Η ERH είναι μια ενδιαφέρουσα πρωτεΐνη, επειδή στο Εργαστήριο Βιοχημείας έχει βρεθεί ότι στο σύστημα των δύο υβριδίων αλληλεπιδρά μόνο με το SAFB1 και όχι με το SAFB2. Σε πειράματα που οι πρωτεΐνες προέρχονταν από βακτηριακά εκχυλίσματα, έχει δειχθεί ότι η ERH προσδέεται στο καρβοξυτελικό άκρο και των δύο παραγόντων SAFB. Η υποκυτταρική κατανομή της ERH ταιριάζει αρκετά με αυτή των SAFB1 και SAFB2, γεγονός που συνάδει στην πιθανή αλληλεπίδραση μαζί τους. Οι μετρήσεις λουσιφεράσης έδειξαν ότι η ERH αποκαταστέλει τη δράση του SAFB1 μόνο και όχι του SAFB2. Συνολικά, τα αποτελέσματα του εργαστηρίου προτείνουν ότι η διάκριση αυτή στην αλληλεπίδραση της ERH με τους SAFB1 και SAFB2 έγκειται στις πιθανές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στις πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στα βακτηριακά κύτταρα, που δεν υπάρχουν αυτές οι περίπλοκες τροποποιήσεις, η ERH είχε την ικανότητα να αλληλεπιδράσει και με τους δύο παράγοντες SAFB, γεγονός που δε συνέβη στα πειράματα που διεξήχθησαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συνεπώς, αυτή η διάκριση της ERH μας παρείχε την πληροφορία ότι το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB2 υπόκειται σε κάποιου είδους τροποποίηση.

Η καρβοξυτελική περιοχή των παραγόντων SAFB εμφανίζει τη μικρότερη ομολογία μεταξύ των περιοχών τους και αυτό οφείλεται σε κάποιες διαφοροποιήσεις στην έκταση και την απόσταση των δύο επιμέρους περιοχών τους (R/E rich, Gly rich), όπως φαίνεται στην εικόνα 20. Οι διαφορές των δύο παραγόντων σε αυτή τους την περιοχή μπορεί να καθιστούν το SAFB2 ικανό να τροποποιηθεί με φωσφορυλίωση, ουβικιτινιλίωση ή ακετυλίωση. Έτσι, το είδος και το μέγεθος των αλληλεπιδράσεων του SAFB2 μπορούν να τον διαφοροποιούν από αυτές του SAFB1, ανακαλύπτοντας στην πορεία διαφορετικά γονίδια στόχους που μπορεί να ρυθμίζει μέσω των αλληλεπιδράσεών του, ακόμη και διαφορετικές, αλλά εξίσου σημαντικές διεργασίες που μπορεί να ρυθμίζει, ανεξάρτητα από την παρουσία του SAFB1 και των κοινών τους ρόλων. Μελλοντικός στόχος είναι να προσδιοριστούν οι τροποποιήσιμες θέσεις και να εξεταστεί πώς μία τροποποίηση επηρεάζει την ικανότητα αλληλεπίδρασης του μορίου με άλλες πρωτεΐνες.



Εικόνα 20. Οι διαφορές στην αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου των παραγόντων SAFB1 και SAFB2.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Renz A. and Fackelmayer F.O. (1996), Purification and molecular cloning of the Scaffold Attachment Factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR DNA. *Nuc. Acids Res.*, Vol. 24, No. 5
- [2] Oesterreich et al (1997), Novel Nuclear Matrix Protein HET Binds to and Influences the Activity of the HSP27 promoter in Human Breast Cancer Cells, *J. Cell Bioch.* 67 : 275- 286, 1997
- [3] Townson et al (2003), SAFB2, a New Scaffold Attachment Factor Homolog and Oestrogen Receptor Corepressor, *JBC*, Vol 278, No 22, pp 20059- 20068
- [4] Nayler O. et al (1998), SAFB protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements, *Nucleic Acids Res.*, 26, 3542- 3549, 1998
- [5] Tsianou D. et al (2009), The enzymatic activity of SR protein kinases 1 and 1^α is negatively affected by interaction with scaffold attachment factors B1 and 2, *The FEBS Journal*
- [6] Oesterreich et al (2000), Tamoxifen-Bound Estrogen Receptor (ER) Strongly Interacts with the Nuclear Matrix Protein HET/SAF-B, a Novel Inhibitor of ER-Mediated Transactivation, *Mol. Endocr.*
- [7] Townson SM et al (2004), Structure-Function Analysis of the Estrogen Receptor α Corepressor Scaffold Attachment Factor B-1, *JBC*, Vol 279, No 25, pp 26074 – 26081
- [8] Nagase T et al (1995), Prediction of coding sequences of unidentified human genes IV. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0121-KIAA0160) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1, *DNA Res.*, 2, 167-174, 199-210
- [9] DuPont BR et al (1997), Assignment of SAFB encoding Hsp27 ERE-TATA binding protein (HET)/scaffold attachment factor B (SAF-B) to human chromosome 19 band p13, *Cytogenet. Cell. Genet.* 79, 284-285
- [10] Oesterreich S. et al (2005), Scaffold Attachment Factor SAFB1 Suppresses Estrogen Receptor – Mediated Transcription in Part via Interaction with Nuclear Receptor Corepressor, *Mol. Endocrinol.*, 20 (2) : 311-320
- [11] Hong EA et al (2012), SAFB1- and SAFB2- mediated transcriptional repression: relevance to cancer, *Biochem. Society Trans.*, Vol 40, part 4
- [12] Jiang S. et al (2006), Scaffold Attachment Factor SAFB1 Suppresses Estrogen Receptor α -Mediated Transcription in Part via Interaction with Nuclear Receptor Corepressor, *Mol. Endocrinol.*, 20 (2): 311-320

- [13] Debril MB et al (2005), Scaffold attachment factor B1 directly interacts with nuclear receptors in living cells and represses transcriptional activity, *J. Mol. Endocrinol.*, 35, 503-507
- [14] Townson SM et al (2004), Structure- Function Analysis of the Estrogen Receptor α Corepressor Scaffold Attachment Factor-B1: Identification of a potent transcriptional repression domain, *J. Biol. Chem.*, 279: 26074-26081
- [15] Mukhopadhyay et al (2013), Scaffold attachment factor B1 regulates the androgen receptor in concert with the growth inhibitory kinase MST1 and the methyltransferase EZH2, *Oncogene*, 1-11
- [16] Hammerich-Hille S. et al (2010), SAFB1 mediates repression of immune regulators and apoptotic genes in breast cancer cells, *J. Biol Chem*, 285: 3608-2616
- [17] Dobrzycka A.M. et al (2003), Estrogen receptor corepressors- a role in human breast cancer? *Endocrin. Rel Cancer*, 10: 517-536
- [18] Altmeyer M. et al (2013), The Chromatin Scaffold Protein SAFB1 Renders Chromatin Permissive for DNA Damage Signaling, *Mol Cell* 52, 206-220
- [19] Hammerich-Hille S. et al. (2010), Low SAFB levels are associated with worse outcome in breast cancer patients, *Breast Cancer Res Treat*, 121: 503-509
- [20] Peidis P. et al. (2010), SAFB1 interacts with and suppresses the transcriptional activity of p53, *FEBS Letters*
- [21] Garee JP et al. (2010), SAFB1's Multiple Functions in Biological Control- Lots still to be done!, *J Cell Biochem*, 109:312-319
- [22] Chan CW (2007), A novel member of the SAF (scaffold attachment factor)- box protein family inhibits gene expression and induces apoptosis, *Biochem. J.* 407, 355-362
- [23] Garee JP et al. (2011), Co- repressor activity of scaffold attachment factor B1 requires sumoylation, *Bioch and Bioph Res Comm* 408, 516-522
- [24] Hashimoto et al. (2012), Scaffold Attachment Factor B (SAFB) Cooperatively Inhibit the Intranuclear Function of ER α , *J Cell Bioch* 113: 3039-3050
- [25] Nikolakaki et al. (2001), Cloning and Characterization of an Alternatively Spliced Form of SR Protein Kinase 1 That Interacts Specifically with Scaffold Attachment Factor-B, *J. Biol. Chem.*, 276:40175-40182
- [26] Pogge von Strandmann E. et al. (2001), ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue), a Conserved Factor Identical between Frog and Human, Is a Transcriptional Repressor, *Biol. Chem.*, 382: 1379-1385

- [27] Amente S. et al. (2005), Identification of proteins interacting with the RNAPII FCP1 phosphatase: FCP1 forms a complex with arginine methyltransferase PRMT5 and it is a substrate for PRMT5- mediated methylation, *FEBS Letters* 579, 683-689
- [28] Weng M.T. et al. (2012), Evolutionarily conserved protein ERH controls CENP-E mRNA splicing and is required for the survival of KRAS mutant cancer cells, *PNAS*, E3659-E3667
- [29] Sergeant K. et al. (2007), Alternative RNA splicing complexes containing the scaffold attachment factor SAFB2, *J Cell Sci* 120, 309-319
- [30] Giannakouros et al. (2011), Serine- Arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence, *FEBS J.*, 278: 570-586