

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΙΜΟΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ
ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ»**

ΣΩΤΗΡΙΑ ΔΡΑΚΟΥΛΗ

Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Σίμος

Διδακτορική Διατριβή

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ
ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ»**

υπό

ΣΩΤΗΡΙΑΣ Γ. ΔΡΑΚΟΥΛΗ

Χημικός

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα, 2017

© 2017 Σωτηρία Δρακούλη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (4^η/15-02-2017 ΓΣΕΣ):

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Ελένη Γεωργιάτσου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Γεώργιος Σίμος
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ελένη Νικολακάκη
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Αναστάσιος Γερμενής
Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Σπυρίδων Γεωργιάτος
Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Βαθμίδα, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Παναγιώτης Λιάκος
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ηλίας Μυλωνής
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στη γιαγιά μου...

Στο σύζυγό μου Σωτήρη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέπουσα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας κα Ελένη Γεωργιάτσου την οποία αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ανάθεση της διατριβής. Θα ήθελα όμως να την ευχαριστήσω από βάθους καρδιάς για την στήριξη, την καθοδήγηση, την βοήθεια και την εμπιστοσύνη, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Η συνεργασία μαζί της με βοήθησε να πιστέψω στον εαυτό μου. Μου ενέπνευσε την διάθεση εκμάθησης με σχεδόν μητρικό τρόπο και διαμόρφωσε ταυτόχρονα χαρακτήρα και συνείδηση επιστήμονος.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας, Καθηγητή Βιοχημείας και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Γ. Σίμο για τις πολύτιμες συμβουλές και ιδέες καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της διδακτορικής διατριβής. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ασφάλεια και τη φροντίδα που παρέχει στο Εργαστήριο Βιοχημείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ελένη Νικολακάκη για την άμεση βοήθεια και συνεργασία που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Ηλία Μυλωνή, γιατί η συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής ήταν καθοριστική και στο πρακτικό κομμάτι ως συνεργάτης αλλά κυρίως στο ψυχολογικό ως φίλος. Η ηρεμία του, η μεθοδικότητα και η υπομονή του στην επίλυση πολλών προβλημάτων αποτελεί παράδειγμα προς μίμηση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας κ. Π. Λιάκο, τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Α. Τσακάλωφ, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας κ. Ευφροσύνη Παρασκευά και την Λέκτορα Κυτταρικής Βιοχημείας κ. Γ. Χαχάμη για την άψογη συνεργασία, την άμεση βοήθεια και τις χρήσιμες παρατηρήσεις όλων αυτών των χρόνων.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητές κ. Α. Γερμενή και κ. Σ. Γεωργάτο, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους και τον χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διατριβής μου.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία μόνο ευχάριστες στιγμές μπορώ να θυμηθώ! Για το άψογο συναδελφικό περιβάλλον και την υποστήριξη που εισέπραξα όλα αυτά τα χρόνια τους οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ! Οι σχέσεις που ανέπτυξα στο εργαστήριο Βιοχημείας νομίζω ότι θα με συντροφεύουν από εδώ και πέρα στη ζωή μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου γιατί είναι πάντα δίπλα μου με αγάπη.....!

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύζυγό μου Σωτήρη για την υπομονή αλλά και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς μοιραζόταν κάθε στιγμή όλες τις αγωνίες και τις ανησυχίες μου, μην απουσιάζοντας από το πλευρό μου ούτε λεπτό.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο: Δρακούλη
Όνομα: Σωτηρία
Όνομα Πατρός: Γεώργιος
Ημερομηνία Γέννησης: 16/11/1986
E-mail: sodrakouli@med.uth.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

Φεβρουάριος 2012 - σήμερα: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σεπτέμβριος 2009 - Ιούνιο 2011: Εκπόνηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο Πρόγραμμα " Εφαρμοσμένης Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας" του Τμήματος Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών.

14 Ιουλίου 2011: Απονομή Μεταπτυχιακού Διπλώματος με βαθμό 9,13 (Άριστα).

Σεπτέμβριος 2004 - Σεπτέμβριος 2009: Φοίτηση στο Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών.

2 Δεκεμβρίου 2009: Απονομή Πτυχίου Χημείας με βαθμό 6,88 (Λίαν Καλώς).

ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Σχολείο: Ελληνογαλλική Σχολή Αγ. Παρασκευής
Περίοδος: 1998-2004

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ / ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

Φεβρουάριος 2012 - τώρα: Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΘΕΜΑ: «ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ»

Επιβλέπων: Αν. Καθηγήτρια κα. Γεωργιάτσου Ελένη

Σεπτέμβριος 2009 – Ιούνιο 2011: Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Οργανικής Χημείας Βιοχημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών.

ΘΕΜΑ: «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ ΤΟΥ ΣΕ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΡΙΝΙΚΟΥ ΠΟΛΥΠΟΔΑ»

Επιβλέπων: Αν. Καθηγητής κ. Αλετράς Αλέξιος

Σεπτέμβριος 2007 – Σεπτέμβριος 2009: Εκπόνηση Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Οργανικής Χημείας Βιοχημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών.

ΘΕΜΑ: «ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΟΣΩΜΑΤΟΣ ΑΥΞΑΝΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ MMP-1 ΚΑΙ MMP-3 ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ IL-6, TIMP-1 ΚΑΙ COLL-I ΣΕ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΡΙΝΙΚΟΥ ΠΟΛΥΠΟΔΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

Επιβλέπων: Αν. Καθηγητής κ. Αλετράς Αλέξιος

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

Φεβρουάριος 2013 – Σεπτέμβριος 2015: Απασχόληση ως Βιοχημικός-Ερευνήτρια σε σύμβαση έργου στο ερευνητικό πρόγραμμα «ΘΑΛΗΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ – Εγγενώς εύκαμπτες πυρηνικές πρωτεΐνες (εεπ): μια ολοκληρωμένη ανάλυση της δομής και της λειτουργίας τους σε πραγματικό χρόνο και κυτταρικές συνθήκες με συνδυασμό τεχνολογιών αιχμή»

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Σπυρίδων Γεωργάτος

Απρίλιος 2011 – Ιούνιος 2011: Εκπαίδευση προπτυχιακών φοιτητών σε εργαστηριακές ασκήσεις Βιοχημείας, Ενζυμολογίας Κλινικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, με σύμβαση επικουρικού έργου με το Πανεπιστήμιο Πατρών.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

Υπεύθυνος προπτυχιακών διπλωματικών εργασιών προπτυχιακών φοιτητών (2 εργασίες).

Υπεύθυνος μεταπτυχιακών διπλωματικών εργασιών μεταπτυχιακών φοιτητών (4 εργασίες).

ΒΡΑΒΕΙΑ

Βραβείο καλύτερης εργασίας στο 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ομάδας Έρευνας συνδετικού ιστού και Εξωκυττάριου Χώρου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας για την επιστημονική εργασία: S.D. Athanassiou, S. Drakouli, Th. Stathas, S. Naxakis, E. Giannopoulou and A. J. Aletras (2009) Proteasome inhibitors enhance the production of metalloproteinases MMP-1 and MMP-3 and inhibit the production of IL-6, TIMP-1 and type-I collagen by nasal polyps fibroblasts. *10th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Book of Abstracts*, p.36. (10-11 July, Patras)

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Stathas T, Athanassiou SD, Drakouli S, Giannopoulou E, Mastronikolis NS, Naxakis S and Aletras A.J. (2012) MIF attenuates the suppressive effect of dexamethasone on IL-6 production by nasal polyp, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013 Jun;17(11):1455-66.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Drakouli S., Papathanassiou M., Lyberopoulou A., Mylonis I., Georgatsou E. (2016) Novel ERH-SAFB1/2 interaction corroborates their role in splicing. Hellenic Society

of Biochemistry & Molecular Biology, Proceedings of the 67th meeting. (25-27 November, Ioannina).

Trilivas I., Drakouli S., Pharmakakis N. and Aletras A.J. (2012) The UV radiation suppresses the proteasome expression in human pterygium fibroblasts. *45th Panhellenic Ophthalmological Congress, Book of Abstracts*, p.66. (24-27 May, Chalkidiki)

S.D. Athanassiou, S. Drakouli, Th. Stathas, S. Naxakis, E. Giannopoulou and A.J.Aletras (2009) Proteasome inhibitors enhance the production of metalloproteinases MMP-1 and MMP-3 and inhibit the production of IL-6, TIMP-1 and type-I collagen by nasal polyps fibroblasts. *10th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology, Book of Abstracts*, p.36. (10-11 July, Patras)

ANAPTHMENEΣ ANAKOINΩΣΕΙΣ ΣΕ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΕΛΠΙΑ

Taze C., Drakouli S., Georgatsou E. (2016) The interaction of Scaffold Attachment Factors B1 and 2 (SAFB1/2) with SR Protein Kinase 1 (SRPK1). Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Proceedings of the 67th meeting. (25-27 November, Ioannina).

Drakouli S., Kourti M., Simos G. and Georgatsou E. (2015) The effect of hypoxia on the expression of the nuclear matrix proteins SAFB1 and SAFB2. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Proceedings of the 66th meeting. (11-13 December, Athens)

Drakouli S., Papathanassiou M., Tsianou D., Lyberopoulou A., Georgatsou E. (2014) The SAFB Homologs, SAFB1 and SAFB2, functionally distinguished by their ability to interact with protein ERH. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Proceedings of the 65th meeting, Abstracts P 150. (28-30 November, Thessaloniki)

Kourti M., Drakouli S., Georgatsou E. and Simos G. (2014) The effect of hypoxia or/and glucose deprivation on the expression and localization of nuclear intrinsically disordered proteins. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Proceedings of the 65th meeting, Abstracts P 141. (28-30 November, Thessaloniki)

Drakouli S., Papathanassiou M., Tsianou D., Lyberopoulou A., Georgatsou E. (2014) ERH structurally differentiates between the highly homologous SAFB1 and SAFB2 proteins. VIEWS INTO NUCLEAR FUNCTION Workshop including practical sessions on live-cell imaging 2014 Abstract book p.56 (11-13 September, Patras)

Drakouli S., Mylonis I., Nikolakaki E., Giannakouros T., Georgatsou E. (2013) Intracellular localization of Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1) under different metabolic stimuli. Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, Proceedings of the 64th meeting, Newsletter, 59, 198. (6-8 December, Athens)

Trilivas I., Drakouli S., Pharmakakis N. and Aletras A.J. (2012) The UV radiation suppresses the proteasome expression in human pterygium fibroblasts. *Hellenic Society of biochemistry & molecular biology, Proceedings of the 63th meeting, Newsletter*, 58, 95. (9-11 November, Heraklio)

Drakouli S., Athanasiou S.D., Stathas Th., Naxakis S., Giannopoulou E., Aletras A. J. (2012) Proteasome inhibitors enhance the expression of proteasome subunits in nasal

polyps fibroblasts. *1st Scientific Meeting of Research Network. Biochemical and Biotechnological Applications: Pharmacotargeting of diseases and applications of biocompatible materials in medicine, Proceedings and Program*, p.4. (5 November, Patras)

Drakouli S., Athanasiou S.D., Stathas Th., Naxakis S., Giannopoulou E., Aletras A. J. (2010) Proteasome inhibitors enhance the expression of matrix metalloproteinase-1 and -3 in nasal polyps fibroblasts via reactive oxygen species and AP-1 activation. *1st Scientific Meeting of Research Network. Biochemical and Biotechnological Applications: Pharmacotargeting of diseases and applications of biocompatible materials in medicine, Proceedings and Program*, p.6. (5 November, Patras)

Drakouli S., Athanasiou S.D., Stathas Th., Naxakis S., Giannopoulou E., Aletras A. J. (2010) Proteasome inhibitors enhance the expression of proteasome subunits in nasal polyps fibroblasts. *Hellenic Society of biochemistry & molecular biology, Proceedings of the 61th meeting, Newsletter*, 56, 59. (15-17 October, Alexandroupoli)

Drakouli S., Athanasiou S.D., Stathas Th., Naxakis S., Giannopoulou E., Aletras A. J. (2009) Proteasome inhibitors enhance the expression of matrix metalloproteinase-1 and -3 in nasal polyps fibroblasts via reactive oxygen species and AP-1 activation. *Hellenic Society of biochemistry & molecular biology, Proceedings of the 60th meeting, Newsletter*, 55, 95. (20-22 November, Athens)

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

S. Drakouli, S.D. Athanasiou, Th. Stathas, S. Naxakis, E. Giannopoulou and A. J. Aletras (2009) Proteasome inhibitors enhance the production of metalloproteinases MMP-1 and MMP-3 and inhibit the production of IL-6, TIMP-1 and type-I collagen by nasal polyps fibroblasts. 1^o Γάλλο-Ελληνικό Διεθνές Συνέδριο Ωτορινολαρυγγολογίας Χειρουργικής Κεφαλής και Τραχήλου-Πρόοδοι στην Ωτορινο-λαρυγγολογία. (29-31 Μαΐου, Κέρκυρα)

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Drakouli S., Papatheanassiou M., Tsianou D., Lyberopoulou A., Georgatsou E. (2015) A functional distinction between SAFB1 and SAFB2 via their distal GLY/ARG rich C-terminal domain *The FEBS Journal Abstract Book of the FEBS-EMBO Congress*. 2015, Suppl. 1, 282,p. 84. (4-9 July, Berlin, Germany) FEBS BURSARY

Drakouli S., Papatheanassiou M., Tsianou D., Lyberopoulou A., Georgatsou E. (2014) ERH structurally differentiates between the highly homologous SAFB1 and SAFB2 proteins *The FEBS Journal Abstract Book of the FEBS-EMBO Congress*. 2014, Suppl. 1, 281,p. 706. (30 August-4 September, Paris, France) FEBS BURSARY

Drakouli S., Mylonis I., Nikolakaki E., Giannakouros T., Georgatsou E. (2014) Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1) is resilient to nuclear translocation under different metabolic stimuli. *The FEBS Journal Abstract Book of the FEBS-EMBO Congress*. 2014, Suppl. 1, 281,p. 598. (30 August-4 September, Paris, France) FEBS-EMBO BURSARY

Athanasiou SD, Drakouli S, Stathas T., Naxakis S, Giannopoulou E, Aletras A. J. (2010) Study of proteasome implication in TGF- β_1 and IGF-I effects on the

production of IL-6, TIMP-1 and type I collagen by nasal polyps fibroblasts. *XXIIst Federation of European Connective Tissue Societies Meeting, Book of Abstracts*, p 81. (3-7 July, Davos, Switzerland)

Drakouli S, Athanasiou SD, Stathas Th, Naxakis S, Giannopoulou E, Aletras A.J. (2010) Proteasome inhibitors enhance the expression of matrix metalloproteinase-1 and -3 in nasal polyps fibroblasts via reactive oxygen species and AP-1 activation. *XXIIst Federation of European Connective Tissue Societies Meeting, Book of Abstracts*, p 87. (3-7 July, Davos, Switzerland)

Drakouli S, Athanasiou SD, Stathas Th, Naxakis S, Giannopoulou E, Aletras A.J. (2010) Proteasome inhibitors enhance the expression of proteasome subunits in nasal polyps fibroblasts. *XXIIst Federation of European Connective Tissue Societies Meeting, Book of Abstracts*, p 81. (3-7 July, Davos, Switzerland)

S.D. Athanasiou, S. Drakouli, Th. Stathas, S. Naxakis, E. Giannopoulou and A. J. Aletras (2009) Proteasome inhibitors enhance the production of metalloproteinases MMP-1 and MMP-3 and inhibit the production of IL-6, TIMP-1 and type-I collagen by nasal polyps fibroblasts. FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets. (11-16 July, Patras, Greece)

S.D. Athanasiou, S. Drakouli, Th. Stathas, S. Naxakis, E. Giannopoulou and A. J. Aletras (2009) Proteasome inhibitors enhance the production of metalloproteinases MMP-1 and MMP-3 and inhibit the production of IL-6, TIMP-1 and type-I collagen by nasal polyps fibroblasts. *The FEBS Journal - Late Abstract Book of the 34nd FEBS Congress*. (4-9 July, Prague, Czech Republic)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΠΙΜΟΡΦΩΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

Συμμετοχή στο Workshop VIEWS INTO NUCLEAR FUNCTION, Πάτρα 11-13 Σεπτεμβρίου 2014 για επιμόρφωση σε θέματα εξελιγμένων τεχνικών συνεστιακής μικροσκοπίας. Συμμετοχή και με αναρτημένη ανακοίνωση:

Drakouli S., Papathanassiou M., Tsianou D., Lyberopoulou A., Georgatsou E. (2014) ERH structurally differentiates between the highly homologous SAFB1 and SAFB2 proteins.

ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Άριστη γνώση Αγγλικών – PROFICIENCY (Michigan)

Καλή γνώση Γαλλικών – A1-6 και B2

Κάτοχος ECDL Core Certificate Syllabus Version 4.0: Windows XP, Word, Excel, Access, PowerPoint, Internet & Outlook, Βασικές Έννοιες της Πληροφορικής

Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ
ΑΛΛΕΣ ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ»**

υπό

ΣΩΤΗΡΙΑΣ Γ. ΔΡΑΚΟΥΛΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ελένη Γεωργιάτσου** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπουσα**)
2. **Δρ. Γεώργιος Σίμος** Καθηγητής Βιοχημείας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Ελένη Νικολακάκη** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο παράγοντας SAFB1 (Scaffold Attachment Factor B) είναι πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας και απομονώθηκε πριν από είκοσι περίπου χρόνια με βάση το χαρακτηριστικό του να προσδένεται σε στοιχεία S/MAR (Scaffold/Matrix Attachment Region) του DNA. Ο SAFB1 με τον εξελικτικά συγγενή του SAFB2, έχουν μεταξύ τους ομολογία 74% και αποτελούν αντικείμενο έρευνας της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Αποτελούνται από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, SAF-box στο αμινοτελικό τους άκρο, την περιοχή δέσμευσης με το RNA, RRM, ενώ στο καρβοξυτελικό τους άκρο έχουν μια περιοχή πλούσια σε επαναλήψεις Arg-Glu (R/E) που ακολουθείται από μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα Arg και Gly (R, G), υπεύθυνη για τις γνωστές ως τώρα πρωτεϊνικές τους αλληλεπιδράσεις.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής εξετάστηκε η ικανότητα πρόσδεσης των SAFB στη χρωματίνη μέσω της αμινοτελικής τους περιοχής, υπό την επίδραση δυο μεταβολικών στρεσογόνων συνθηκών, της υποξίας και της στέρησης γλυκόζης. Για κάθε συνθήκη εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο συνθήκες δεν επηρεάζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους αλλά τα πρωτεϊνικά επίπεδά τους. Συγκεκριμένα, η υποξία αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2 όχι όμως στο επίπεδο της μεταγραφής και με μηχανισμό ανεξάρτητο των μεταγραφικών παραγόντων HIFs (Hypoxia-inducible factors), αλλά προκαλώντας αύξηση του διαλυτού κλάσματός τους στο πυρηνόπλασμα. Επίσης η υποξία δεν επηρέασε την δράση τους ως συγκαταστολείς της μεταγραφικής ενεργότητας του ER α (Estrogen Receptor α). Αντίθετα, η στέρηση γλυκόζης φάνηκε να μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2, χωρίς όμως να αποκλείεται αυτό να συμβαίνει στο επίπεδο της μεταγραφής.

Στο δεύτερο μέρος διερευνήθηκαν οι λειτουργίες των SAFB μέσω δύο αλληλεπιδράσεων που έχουν βρεθεί στο εργαστήριο Βιοχημείας και συμβαίνουν με το καρβοξυτελικό τους άκρο.

Η πρώτη αλληλεπίδραση είναι με την κινάση SRPK1 (Serine/Arginine Protein Kinase 1). Καταρχάς εξετάστηκε δομικά, όπου με πειράματα χρωματογραφίας αγγιστείας εντοπίστηκε για πρώτη φορά, ότι τα 180 C-τελικά αμινοξέα της SRPK1(473-655) είναι ικανά και απαραίτητα για την αλληλεπίδραση της με τον SAFB1. Επίσης, διερευνήθηκε λειτουργικά, μέσω εύρεσης συνθηκών όπου τα δύο

μόρια SAFB και SRPK1, τα οποία κατά τ' άλλα έχουν διαφορετικές υποκυτταρικές κατανομές, είναι πιθανόν να βρεθούν σε κοινό υποκυτταρικό εντοπισμό. Εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK1 υπό την επίδραση της υποξίας, του οσμωτικού στρες, της στέρησης αμινοξέων και της στέρησης γλυκόζης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι καμία από τις τέσσερις συνθήκες δεν ήταν ικανή να μεταβάλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1, ενώ μόνο οι συνθήκες του οσμωτικού στρες και της στέρησης γλυκόζης προκάλεσαν μια υποκυτταρική μετατόπιση της SRPK1, σε διακριτές πυρηνικές δομές.

Η δεύτερη αλληλεπίδραση που εξετάστηκε ήταν με την πρωτεΐνη ERH (Enhancer of Rudimentary Homologue), η οποία εμπλέκεται σε ποικίλες βασικές κυτταρικές διεργασίες μεταξύ των οποίων και το μάτισμα. Με πειράματα ανοσοκατακρήμινσης και χρωματογραφίας αγκιστείας βρέθηκε ότι η ERH αλληλεπιδρά άμεσα μέσα σε κύτταρα θηλαστικών μέσω των 205 καρβοξυτελικών αμινοξικών καταλοίπων των SAFB, ενώ από πειράματα ανοσοφθορισμού και βιοχημικής κλασμάτωσης δείχθηκε ότι οι δυο πρωτεΐνες συν-εντοπίζονται στην πυρηνική μήτρα. Τέλος, η ERH δεν μεταβάλλει τη λειτουργία των SAFB1/2 ως συγκαταστολείς του υποδοχέα των οιστρογόνων ERα αλλά αναιρεί την καταστολή που προκαλούν στην ενζυμική δράση της SRPK1, λογικό επακόλουθο του γεγονότος ότι SRPK1 και ERH προσδένονται στην ίδια επικράτεια των SAFB1/2.

Συνολικά τα παραπάνω ευρήματα θα βοηθήσουν στην εμβάθυνση και την κατανόηση των λειτουργιών των SAFB1/2 και των μοριακών παρτενέρ τους, οι οποίοι εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η οργάνωση της χρωματίνης, ο μεταβολισμός του RNA και η μεταγραφή.

ABSTRACT

SAFB1 (Scaffold Attachment Factor) is a nuclear matrix protein isolated approximately twenty years ago, based on its ability to bind to scaffold/matrix attachment regions (S/MARs) on DNA. SAFB1 shares 74% homology with SAFB2, its closest evolutionary relative. The two proteins are the subject of the present thesis. Their structural domains consist of a Scaffold Attachment Factor-box (SAF-box) that interacts with S/MARs at the N-terminus, a RNA-Recognition Motif (RRM), and a glutamic acid/arginine-rich (RE) and glycine/arginine-rich (RG) region at the C-terminus that are responsible for most of their known protein-protein interactions.

The first part of this thesis concerns the investigation of the ability of SAFBs to bind to chromatin, (due to their N-terminal region) under the effect of two metabolic stress conditions, hypoxia and glucose deprivation. For each condition, the protein levels as well as their sub-cellular localization were studied. The results show that neither glucose deprivation nor hypoxia alter their sub-cellular localization but affect SAFB1 and SAFB2 protein levels. More specifically, SAFB1 and SAFB2 expression levels significantly increased under hypoxia. This induction is not transcriptional and is independent of the major mediators of the hypoxic response, the HIF (Hypoxia-inducible factor) proteins. It seems that the increase happens due to the translocation of SAFB1/2 from the chromatin-bound fraction to the nucleoplasm. Moreover, hypoxia does not affect the SAFB1/2 co-repressor activity on ER α . On the contrary, glucose deprivation decreases the expression levels of SAFB1/2, but it is not clear whether this change happens at the transcriptional level.

The second part of the thesis concerns the investigation of SAFB function through two interactions which have been discovered in the laboratory of Biochemistry and both take place at the distal C-terminal RG-rich region of SAFB.

The first interaction is between SAFB and Serine Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1). First, the interaction of SAFB1 with SRPK1 was examined structurally. Using in vitro binding assays, it was found that SRPK1 interacts with SAFB1/2 via its C-terminal domain (473-655). Since SRPK1 is mostly cytoplasmic whereas SAFB is nuclear, we investigated the conditions under which both proteins might reside in the nucleus. The protein levels as well as the sub-cellular localization of SRPK1 were studied under hypoxia, osmotic stress, amino acid deprivation and glucose deprivation. None of these conditions altered the protein levels of SRPK1. However,

under osmotic stress and glucose deprivation, a low range reorganization and translocation of SRPK1 in discrete nuclear structures was detected.

The second interaction that was scrutinized was between SAFB and ERH, a protein involved in multiple basic cellular mechanisms, including splicing. Immunoprecipitation experiments and pull down assays show that ERH interacts directly with the C-terminal RG rich region of SAFB1/2 in the nucleus. Immunofluorescence experiments and subcellular fractionation revealed that SAFB-ERH co-localizes in the insoluble nuclear fraction. Finally, functional analyses suggests that the SAFB/ERH interaction does not affect SAFB1/2 function in transcription (as Estrogen Receptor α (ER α) co-repressors) but reverses the inhibition exerted by SAFB1/2 on SRPK1 activity, a consequence of SRPK1 and ERH binding on a common domain on SAFB1/2.

Overall, this study provides a better understanding of the functions of SAFB1 and SAFB2, since these proteins and their partners are involved in basic cellular activities such as chromatin organization, RNA metabolism and transcription.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	14
ABSTRACT	16
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
A.1 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	23
A.1.1. Ο ΠΥΡΗΝΑΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	23
A.1.2. ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΗΤΡΑ (NUCLEAR MATRIX)	24
A.1.3. ΠΕΡΙΟΧΕΣ S/MARs (SCAFFOLD/MATRIX ATTACHMENT REGIONS)	26
A.1.4. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ	27
A.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΣΤΟ ΙΚΡΙΩΜΑ B, SCAFFOLD ATTACHMENT FACTOR-B (SAF-B)	29
A.2.1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ SAFB	29
A.2.2. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ SAFB	30
A.2.3. ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ SAFB	31
A.2.3.1. Φωσφορυλίωση	31
A.2.3.2. Σουμοϋλίωση	32
A.2.3.3. Ουβικιτινίλιωση	32
A.2.3.4. Πολύ-ADP-Ριβοζυλίωση	33
A.2.4. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ SAFB1 ΚΑΙ SAFB2 ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥΣ	33
A.2.4.1. Οργάνωση της χρωματίνης	33
A.2.4.2. Μεταβολισμός του RNA	34
A.2.4.3. Ρύθμιση της μεταγραφής	36
A.2.5. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ SAFB	39
A.2.6. Η ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ SAFB ΣΕ ΣΤΡΕΣΣΟΓΟΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	40
A.2.7. ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΕΜΠΛΟΚΗΣ ΤΩΝ SAFB	40
A.2.8. SAFB ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	41
A.3 ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ (SERINE/ARGININE PROTEIN KINASES, SRPKS)	43
A.3.1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ SRPK	43
A.3.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ SRPK1	44
A.3.3. ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΗΣ SRPK1 ΚΑΙ ΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥΣ	47
A.3.3.1. Πρωτεΐνες SR	47
A.3.3.2. Ο υποδοχέας της λαμίνης B (Lamin B Receptor, LBR)	48
A.3.3.3. Άλλα υποστρώματα της SRPK1	49
A.3.4. ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ SRPK1	49
A.3.5. SRPK1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	52
A.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ERH (ENHANCER OF RUDIMENTARY HOMOLOGUE)	54
	18

A.4.1. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΗ	54
A.4.2. ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΗ	55
A.4.3. ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΡΗ	56
A.4.3.1. Φωσφορυλίωση	56
A.4.3.2. Ουβικιτινιλίωση	57
A.4.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ ΕΡΗ	57
A.4.4.1. Ο ρόλος της ΕΡΗ στη μεταγραφή	57
A.4.4.2. Ο ρόλος της ΕΡΗ στον κυτταρικό κύκλο	58
A.4.4.3. Ο ρόλος της ΕΡΗ στο μάτισμα	59
A.4.5. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΗ	60
A.4.6. ΕΡΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	61
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	62
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	64
Γ.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	64
Γ.1.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	64
Γ.1.2. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	67
Γ.1.3. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ PCR	68
Γ.1.4. ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	69
Γ.1.5. ΑΠΟΦΩΣΦΟΥΡΙΩΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	69
Γ.1.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	70
Γ.1.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	70
Γ.1.8. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ	71
Γ.1.9. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ (COMPETENT) ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ	71
Γ.1.10. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ E. COLI TOP10 ΚΑΙ BL21RIL	72
Γ.1.11. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (SEQUENCING)	73
Γ.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	74
Γ.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MINI PREPARATION) ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ	74
Γ.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MINI PREPARATION) ΜΕ ΤΟ QIAGEN MIDI KIT	75
Γ.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ	75
Γ.3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	75
Γ.3.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>S. CEREVISIAE</i> ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	76
Γ.4 ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	78
Γ.4.1. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ IPTG	78
Γ.4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	79
Γ.4.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΕΠΙΤΟΠΟ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ	80
Γ.4.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΕΠΙΤΟΠΟ ΙΣΤΙΔΙΝΩΝ	81
Γ.5 ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ	82
Γ.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ	83
Γ.7 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ	83
Γ.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	85

Γ.8.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE	85
Γ.8.2. ΧΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΜΕ COOMASSIE BRILLIANT BLUE	86
Γ.8.3. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN BLOTTING)	87
Γ.8.4. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	88
Γ.9 ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>IN VITRO</i>	88
Γ.10 ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ	89
Γ.11 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	90
Γ.11.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	90
Γ.11.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	90
Γ.11.3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DMEM), ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	90
Γ.11.4. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΑΝΕΝΑΡΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	91
Γ.12 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	92
Γ.13 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	92
Γ.14 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ siRNA	94
Γ.15 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ	95
Γ.16 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	96
Γ.17 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΜΜΕΣΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	97
Γ.17.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ IMAGEJ	100
Γ.18 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Α (ERα)	100
Γ.19 ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ DNA	101
<u>Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	<u>102</u>
Δ.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ SAFB1/2 ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	102
Δ.1.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ	102
Δ.1.1.1. Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών SAFB1/2.	102
Δ.1.1.2. Πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2.	103
Δ.1.1.3. Επίδραση των HIF-1α και HIF-2α στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2.	106
Δ.1.1.4. Διερεύνηση του μεταγραφικού μηχανισμού στην επαγωγή των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1/2.	108
Δ.1.1.5. Έλεγχος διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των SAFB1/2.	109
Δ.1.1.6. Έλεγχος της κατασταλτικής δράσης των SAFB1/2 στην μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα των οιστρογόνων ERα.	113
Δ.1.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΕΡΗΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ	117
Δ.1.2.1. Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών SAFB1/2.	117
	20

Δ.1.2.2. Πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2.	117
Δ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SAFB1 ΜΕ ΤΗΝ ΚΙΝΑΣΗ SRPK1	119
Δ.2.1. ΕΥΡΕΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ SRPK1 ΜΕ ΤΟΝ SAFB1 <i>IN VITRO</i>	119
Δ.2.1.1. Κατασκευή βακτηριακών φορέων έκφρασης του His-ΔS-SRPK1 καθώς και της πλήρους μεγέθους His-SRPK1.	120
Δ.2.1.2. Κατασκευή βακτηριακών φορέων έκφρασης του His-SCt-SRPK1 καθώς και του His-Nt-SRPK1.	121
Δ.2.1.3. Έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών His-Nt-SRPK1, His-SCt-SRPK1, His-ΔS-SRPK1, His-SRPK1 και GST-SAFB1C σε βακτήρια.	123
Δ.2.1.4. <i>In vitro</i> αλληλεπίδραση των τμημάτων της SRPK1 με τον GST- SAFB1ΔARE.	125
Δ.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ SRPK1 ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	128
Δ.2.2.1. Επίδραση υποξίας.	128
Δ.2.2.2. Επίδραση οσμωτικού στρες.	129
Δ.2.2.3. Επίδραση στέρησης αμινοξέων.	130
Δ.2.2.4. Επίδραση στέρησης γλυκόζης.	132
Δ.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SAFB1/2 ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ERH	133
Δ.3.1. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ	134
Δ.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΑ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	136
Δ.3.2.1. Ανοσοκατακρήμνιση των εξωγενών SAFB1/2.	136
Δ.3.2.2. Ανοσοκατακρήμνιση των ενδογενών SAFB1/2.	138
Δ.3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ <i>IN VITRO</i>	139
Δ.3.3.1. Επαγωγή και καθαρισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης His-ERH.	139
Δ.3.3.2. Επαγωγή και καθαρισμός των χιμαιρικών πρωτεϊνών GST-SAFB1C και GST-SAFB2C.	140
Δ.3.3.3. <i>In vitro</i> αλληλεπίδραση της His-ERH με τους SAFB1 και SAFB2.	141
Δ.3.4. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ SAFB-ERH	143
Δ.3.4.1. Κατασκευή του πλασμιδίου pFlag-CMV-2-ERH.	143
Δ.3.4.2. Εντοπισμός των ενδογενών και των εξωγενών συμπλόκων SAFB/ERH με μικροσκοπία φθορισμού.	146
Δ.3.4.3. Υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών SAFB και ERH με τη μέθοδο της βιοχημικής κλασμάτωσης.	150
Δ.3.5. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SAFB-ERH	152
Δ.3.5.1. Επίδραση της πρωτεΐνης ERH στην κατασταλτική δράση των SAFB1/2 στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα	152

Δ.3.5.2. Επίδραση της πρωτεΐνης ERH στην κατασταλτική δράση των SAFB1/2 στην ενζυμική δράση της SRPK1	155
---	-----

<u>E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	<u>160</u>
---------------------------	-------------------

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	<u>168</u>
----------------------------	-------------------

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

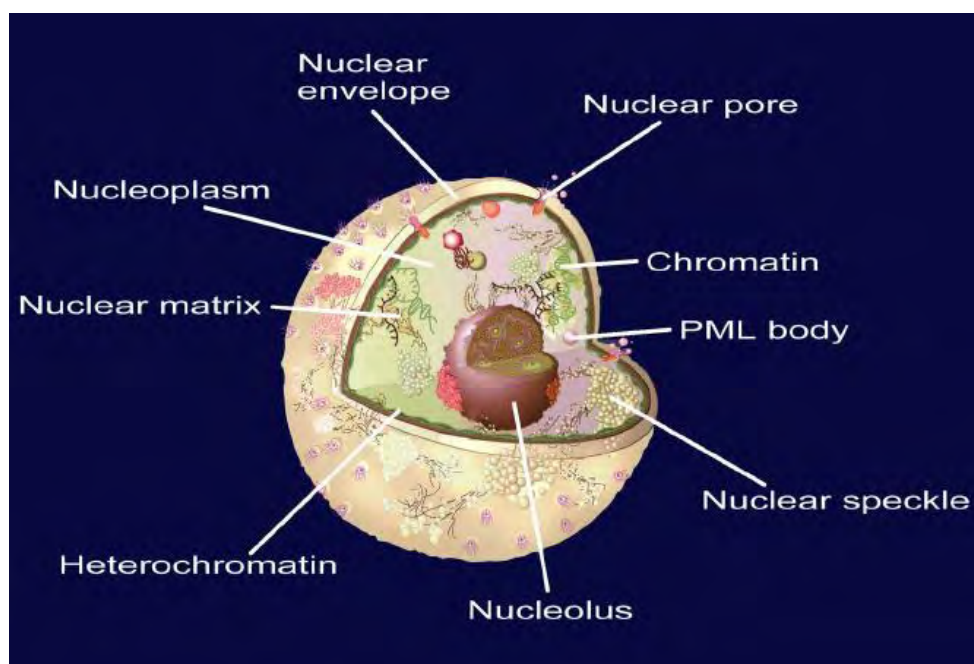
Οι κύριες λειτουργίες του πυρήνα, όπως είναι η αντιγραφή, η μεταγραφή, το μάτισμα του πρώιμου RNA και η συγκρότηση των ριβοσωμάτων έχουν μελετηθεί εκτενώς με βιοχημικές, γενετικές και μοριακές μεθόδους. Ένα μεγάλο εύρος πληροφοριών σχετικά με το μοριακό τους μηχανισμό είναι διαθέσιμο. Αντίθετα, λίγα είναι γνωστά για το πώς αυτές οι διαδικασίες είναι χωροταξικά και χρονικά συντονισμένες. Η γνώση της αρχιτεκτονικής του πυρήνα φαίνεται να είναι η απάντηση για την διερεύνηση της οργάνωσης του γονιδιώματος, των διεργασιών του πυρήνα και της σωστής γονιδιακής έκφρασης.

A.1.1. Ο ΠΥΡΗΝΑΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Ο πυρήνας περιέχει το γονιδίωμα του κυττάρου και διαθέτει ξεχωριστές δομές οι οποίες όμως δεν οριοθετούνται από μεμβράνες. Οι κύριες δομές που συγκροτούν τον πυρήνα είναι ο πυρηνικός φάκελος που αποτελείται από την εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη, οι πυρηνικοί πόροι και η πυρηνική μήτρα (η οποία αποτελείται από το πυρηνικό έλασμα και την εσωτερική πυρηνική μήτρα) (Εικόνα 1). Από βιβλιογραφικά δεδομένα με πειράματα μικροσκοπίας είναι γνωστό ότι η χρωματίνη του μεσοφασικού κυττάρου χωρίζεται σε δύο τύπους, την ευχρωματίνη (Euchromatin, EC), η οποία είναι αποσυμπυκνωμένη και μεταγραφικά ενεργή και την ετεροχρωματίνη (Heterochromatin, HC), η οποία χαρακτηρίζεται από έντονη συσπείρωση και γι' αυτό τον λόγο είναι και μεταγραφικά ανενεργή [1]. Η EC καταλαμβάνει τον εσωτερικό χώρο του πυρήνα, ενώ η HC βρίσκεται κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια και στους πυρηνίσκους [2-4]. Η HC σε απόκριση σε κάποιο ερέθισμα μπορεί να αποσυμπυκνωθεί και να μεταγραφεί. Τέλος, είναι γνωστό ότι τα ενεργά γονίδια συναθροίζονται με παράγοντες της μεταγραφής και του ματίσματος σε «μεταγραφικά εργοστάσια» [5-8].

Το ερώτημα για το πώς θα μπορούσε να οργανωθεί το πλήθος των πυρηνικών διεργασιών στον πυρηνικό χώρο, οδήγησε στην πρόταση ότι η αρχιτεκτονική και η δυναμική ισορροπία μεταξύ των δομών του πυρήνα, οργανώνεται από ένα πυρηνικό ικρίωμα, το οποίο λειτουργεί όπως ο κυτταροσκελετός στο κυτταρόπλασμα [1]. Αν

και η ύπαρξη του πυρηνικού ικριώματος είναι αμφιλεγόμενη, υπάρχουν πειραματικές παρατηρήσεις που στηρίζουν την ύπαρξή του [9, 10].



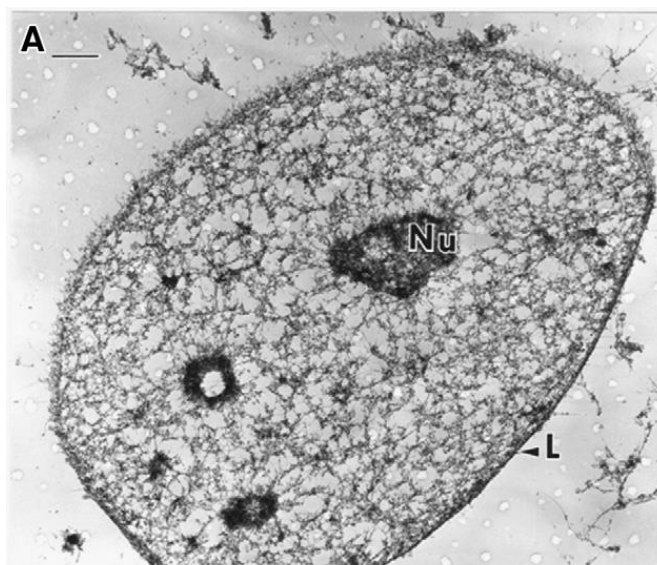
Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα των υποδομών του πυρήνα. Απεικονίζονται η χρωματίνη (Chromatin), η ετεροχρωματίνη (Heterochromatin), ο πυρηνικός φάκελος (Nuclear envelope), η πυρηνική μήτρα (Nuclear Matrix), το συγκρότημα των πυρηνικών πόρων (Nuclear pore), οι πυρηνικές κηλίδες (Nuclear speckle), ο πυρηνίσκος (Nucleolus), το πυρηνόπλασμα (Nucleoplasm) και τα σωμάτια PML (PML body) [11].

A.1.2. ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΗΤΡΑ (Nuclear Matrix)

Η πυρηνική μήτρα ή πυρηνικός σκελετός ή πυρηνικό ικρίωμα ορίστηκε από τους Berezney και Coffey, ως μια δομή του πυρήνα με μεταβλητές λειτουργικές και δομικές ιδιότητες που σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία και την οργάνωση του γονιδιώματος στον πυρήνα [12-14]. Έχει υπολογιστεί ότι το 85-95% της σύστασής της είναι ριβονουκλεοπρωτεΐνες και το 5-15% νουκλεϊνικά οξέα. Η πυρηνική μήτρα αποτελείται από το πυρηνικό έλασμα και την εσωτερική πυρηνική μήτρα η οποία περιλαμβάνει τα κεντρικά νημάτια, το διάχυτο σκελετό, τον πυρηνίσκο και τα πυρηνικά σωμάτια [14].

Η δομή της πυρηνικής μήτρας έχει παρατηρηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Εικόνα 2), το οποίο αποτελεί την σημαντικότερη απόδειξη ύπαρξης της [9, 15], ενώ ο δεύτερος είναι με τη βιοχημική

μέθοδο της κλασμάτωσης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα τα οποία χρησιμοποιούν διαλύματα υψηλών συγκενρώσεων αλάτων και ιοντικών απορρυπαντικών που ως στόχο είχαν την παραλαβή, στο τελικό στάδιο, του εμπλουτισμένου κλάσματος της πυρηνικής μήτρας [16]. Εν συντομία, το αδιάλυτο αυτό κλάσμα της πυρηνικής μήτρας που παραλαμβάνεται εμπεριέχει τις πρωτεΐνες που συνθέτουν την πυρηνική μήτρα, καθώς και πρωτεΐνες που συνθέτουν τους πυρηνίσκους, τα πυρηνικά σωματίδια και παράγοντες μεταγραφής, ενώ έχουν απομακρυνθεί οι διαλυτές πρωτεΐνες και τα χρωματινικά στοιχεία [16]. Σε αντίθεση με ό,τι μπορεί να φαίνεται από την εικόνα του μικροσκοπίου (Εικόνα 2), η πυρηνική μήτρα δεν είναι ένας άκαμπτος, αμετάβλητος σκελετός, αλλά μια ιδιαίτερα δυναμική δομή ικριώματος [9, 10]. Έχει περιγραφεί καλύτερα από τον Dr. Coffey ως ένα δυναμικό σφουγγάρι με ανοιχτά διαμερίσματα ώστε να εξυπηρετεί την ελεύθερη διάχυση στο πυρηνόπλασμα [17]



Εικόνα 2: Η δομή της πυρηνικής μήτρας με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (A) Απεικόνιση της πυρηνικής μήτρας που περιλαμβάνει το πυρηνικό έλασμα (L) και ένα δίκτυο ινιδίων που συνδέεται με το πυρηνικό έλασμα και διανέμεται σε όλο τον πυρήνα. Nu: πυρηνίσκος [18].

Γνωστές πρωτεΐνες που ανιχνεύονται και χρησιμοποιούνται ως δείκτες του πυρηνικού ικριώματος είναι οι πρωτεΐνες NuMa (Nuclear Mitotic Apparatus), η οικογένεια των ετερόλογων πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεΐνινασών (hnRNPs) και οι λαμίνες [9].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σημαντικό ποσοστό των πρωτεϊνών της πυρηνικής μήτρας είναι ιστο- και κυτταρο-ειδικές, οι οποίες υφίστανται αλλαγές που σχετίζονται με τον καρκίνο και τη διαφοροποίηση [17]. Σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις, έχειδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας είναι μια πολύτιμη πηγή βιοδεικτών για την πρόγνωση του καρκίνου [19, 20]. Παράδειγμα τέτοιας πρωτεΐνης είναι ο SATB1 (Special AT-rich sequence-Binding protein-1), ο οποίος σε βιβλιογραφικά δεδομένα έχει βρεθεί ότι επαναπρογραμματίζει την μεταγραφή μεγάλου αριθμού γονιδίων σε όγκους του καρκίνου του μαστού, προάγοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση [21]. Επίσης, έχουν εντοπιστεί διαφορές στην πρωτεϊνική σύσταση της πυρηνικής μήτρας μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων [22]. Τέλος, έχειδειχθεί ότι η πυρηνική μήτρα συμβάλλει στον καθορισμό της υποπυρηνικής κατανομής των μεταγραφικών παραγόντων, στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης και στη διαδικασία της επεξεργασίας του νεοσυντιθέμενου RNA.

Συνοψίζοντας, η πυρηνική μήτρα φαίνεται να ενορχηστρώνει τη σωστή χωροχρονική αρχιτεκτονική στον πυρήνα του κυττάρου και έτσι να εμπλέκεται σχεδόν σε όλους τους μηχανισμούς του πυρήνα.

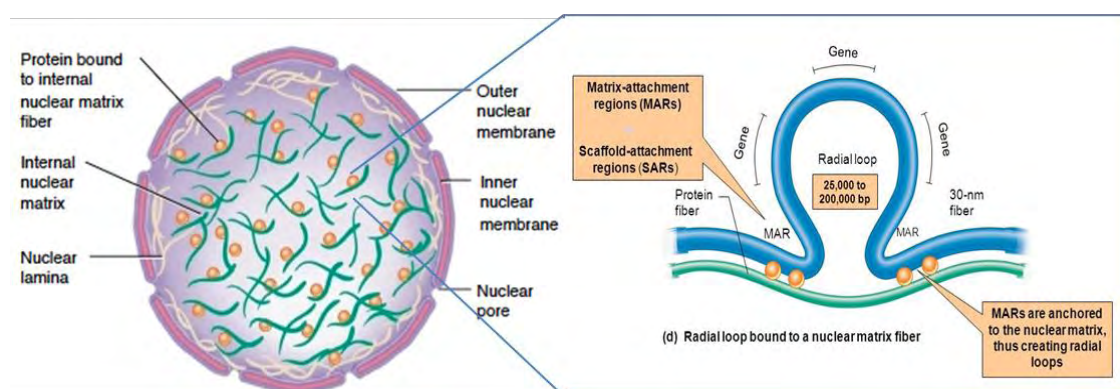
A.1.3. ΠΕΡΙΟΧΕΣ S/MARs (Scaffold/Matrix Attachment Regions)

Η πυρηνική μήτρα σχηματίζει ένα τρισδιάστατο δίκτυο πάνω στο οποίο είναι προσκολλημένη η οργανωμένη χρωματίνη, υπό τη μορφή «θηλιών». Η αλληλεπίδραση μεταξύ της χρωματίνης και της πυρηνικής μήτρας πιστεύεται ότι συμβαίνει σε ειδικές θέσεις στη βάση των θηλιών της χρωματίνης, μήκους 300-3000bp, οι οποίες ονομάζονται περιοχές προσάρτησης της μήτρας ή του ικριώματος (S/MARs) (Εικόνα 3) [23].

Η πρόβλεψη της αλληλουχίας των S/MARs περιοχών είναι απροσδόκητα δύσκολη καθώς δεν έχει βρεθεί κανένα πρότυπο ή μοτίβο αλληλουχίας DNA. Η εύρεση ενός τέτοιου μοτίβου θα ήταν πολύ βοηθητική, καθώς αυτές οι περιοχές ενώνουν τα γονίδια με την πυρηνική μήτρα, αλλάζοντας σημαντικά την μεταγραφή τους [24]. Αυτό που είναι γνωστό είναι ότι η σύστασή τους είναι πλούσια σε AT, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 65%. Άλλα κοινά χαρακτηριστικά των S/MAR περιοχών είναι ότι: α) εμπεριέχουν ή γειτονεύουν με περιοχές έναρξης της μεταγραφής, β) αποτελούν θέσεις δέσμευσης ομοιωτικών πρωτεϊνών γ) εμπεριέχουν αλληλουχίες

κοπής ή δέσμησης από τις τοποϊσομεράσες I και II και δ) εμπεριέχουν αλληλουχίες δέσμησης παραγόντων μεταγραφής.

Οι περιοχές S/MAR, έχουν χαρακτηριστεί ως τα σύνορα μεταξύ των λειτουργικών δομών της χρωματίνης [25, 26]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι με την χωροταξική τοποθέτησή τους μπορεί να αντισταθμίζουν την ενίσχυση της χρωματίνης που μπορεί να έχει συμβεί από μεθυλώσεις ή ακετυλώσεις των ιστονών, λειτουργώντας έτσι ως μονωτές [27]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην τοποθέτηση των χρωμοσωμικών περιοχών [25, 28].



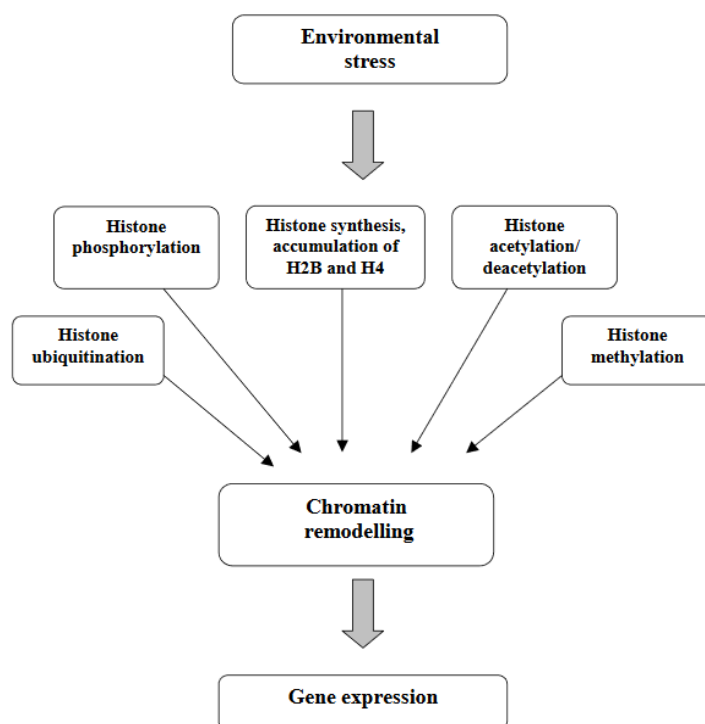
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του πυρήνα με έμφαση στην πυρηνική μήτρα και στις περιοχές S/MARs. Μεγένθυση της σχηματικής απεικόνισης μιας θηλιάς της χρωματίνης που προσκολλάται με τις περιοχές S/MARs στα ινίδια της πυρηνικής μήτρας. Με πορτοκαλί σφαίρα απεικονίζονται οι πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας που προσδένονται στις περιοχές S/MARs (<https://www.slideshare.net/AnilBatta/chromosome-48269543>).

Αρκετές πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας προσδένονται στις περιοχές S/MAR (Εικόνα 3). Τρία χαρακτηριστικά παραδείγματα πρωτεϊνών είναι ο SATB1, ο SAF-A (Scaffold Attachment Factor A) και ο SAF-B (Scaffold Attachment Factor B), οι οποίες είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη μεταγραφή και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [29-31].

A.1.4. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ

Ο όρος «επιγενετικό» αναφέρεται σε μια κληρονομική αλλαγή στο φαινότυπο που δεν περιλαμβάνει μια αλλαγή στην καθ' αυτή αλληλουχία του DNA. Ως εκ τούτου, οι τροποποιήσεις των ιστονών αναφέρονται ως επιγενετικές. Η ανενεργή και η ενεργή χρωματίνη μπορεί να καθοριστεί μοριακά από την παρουσία συγκεκριμένων

μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών. Οι ιστόνες μπορούν να μεθυλιωθούν σε αργινίνες ή λυσίνες, να φωσφορυλιωθούν σε σερίνες, να ακετυλιωθούν σε λυσίνες, να ουβικιτινιλιωθούν και να ADP-ριβοζυλιωθούν. Εκτός από τα ένζυμα που προσθέτουν τις τροποποιήσεις υπάρχουν και τα αντίστοιχα ένζυμα που τις αφαιρούν. Όλες αυτές οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να επηρεάσουν την δομή τη χρωματίνης, τις επαφές των διαφορετικών ιστονών καθώς και τις επαφές μεταξύ των ιστονών και του DNA. Επιπλέον, η τεράστια συνδυαστική δυνατότητα αυτών των τροποποιήσεων μπορεί να διαβαστεί από πρωτεΐνες που δεσμεύονται στις τροποποιημένες επιφάνειες. Όλο αυτό το δίκτυο μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων και επαφών είναι η βάση του «κώδικα» των ιστονών, όπως αποκαλείται [32, 33]. Η ικανότητα του κώδικα των ιστονών να υποδεικνύει το περιβάλλον της χρωματίνης, του επιτρέπει να ρυθμίζει τις πυρηνικές διεργασίες, όπως είναι η αντιγραφή, η μεταγραφή, η επιδιόρθωση του DNA, και η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων [32]. Τέλος, είναι γνωστό ότι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών συμβαίνουν υπό την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών αλλαγών και στρεσογόνων συνθηκών, οι οποίες ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση αλλά και την μεταγραφή διαφόρων ενζύμων και πρωτεϊνών (Εικόνα 4) [34].



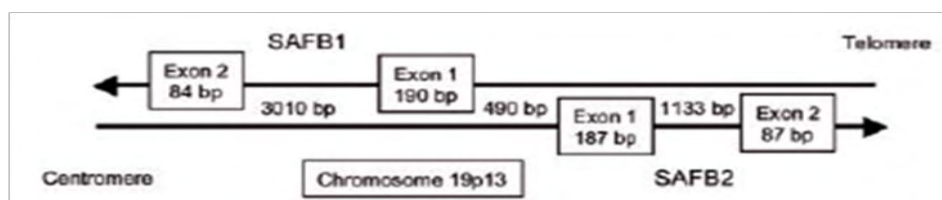
Εικόνα 4: Υπόδειγμα της επίδρασης του περιβαλλοντικού στρες στον κώδικα των ιστονών και κατ' επέκταση στη γονιδιακή έκφραση [34].

A.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΣΤΟ ΙΚΡΙΩΜΑ Β, SCAFFOLD ATTACHMENT FACTOR-B (SAF-B)

A.2.1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ SAFB

Η οικογένεια των πρωτεϊνών SAFB αποτελείται από 3 μέλη: Τον SAFB1, ο οποίος είναι ο καλύτερα μελετημένος, τον SAFB2 και τον SLTM (SAFB-like transcription modulator) ή SAFB3. Η πρωτεΐνη SAFB1 απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1996, με βάση την ιδιότητά της να προσδένεται στις S/MAR (scaffold/matrix attachment regions) περιοχές, ως πρωτεΐνη SAFB. Κάποια από τα πρώτα χαρακτηριστικά της ήταν ότι αποτελείται από δύο βασικές περιοχές τις οποίες ενώνει μία όξινη περιοχή και ότι το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι 8,8 [35]. Ανεξάρτητα, την ίδια σχεδόν περίοδο, μια άλλη ερευνητική ομάδα, ονόμασε την πρωτεΐνη SAF-B πρωτεΐνη HET (Hsp27 ERE TATA-binding) με βάση την ικανότητά δέσμευσης της στον υποκινητή του γονιδίου της hsp27 (heat shock protein 27) [36] και μια τρίτη ερευνητική ομάδα την ονόμασε HAP (hnRNP A1 associated protein), λόγω αλληλεπίδρασης της με την πρωτεΐνη hnRNPA1[37]. Μετά τον εντοπισμό του δεύτερου μέλους της οικογένειας, του SAFB2, η αρχική ονοματολογία της πρωτεΐνης SAFB/HET/HAP αντικαταστάθηκε από το SAFB1. Το τρίτο μέλος της οικογένειας, ο SLTM ή SAFB3, χαρακτηρίστηκε από την ανασταλτική επίδρασή του στην γονιδιακή μεταγραφή που σχετίζεται με την επαγωγή της απόπτωσης [38].

Οι SAFB1 και SAFB2 κωδικοποιούνται από δύο ξεχωριστά γονίδια, που βρίσκονται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 19p13.3. Τα δύο γονίδια βρίσκονται σε διάταξη «κεφαλή με κεφαλή» και χωρίζονται από μια μικρή αλληλουχία περίπου 490bp, η οποία λειτουργεί ως κοινός υποκινητής αμφίδρομης κατεύθυνσης [39] (Εικόνα 5). Το τρίτο γονίδιο στην οικογένεια, το οποίο κωδικοποιεί τον SLTM με την πιο μακρινή συγγένεια (περίπου 35%), βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15q22.1 [38].

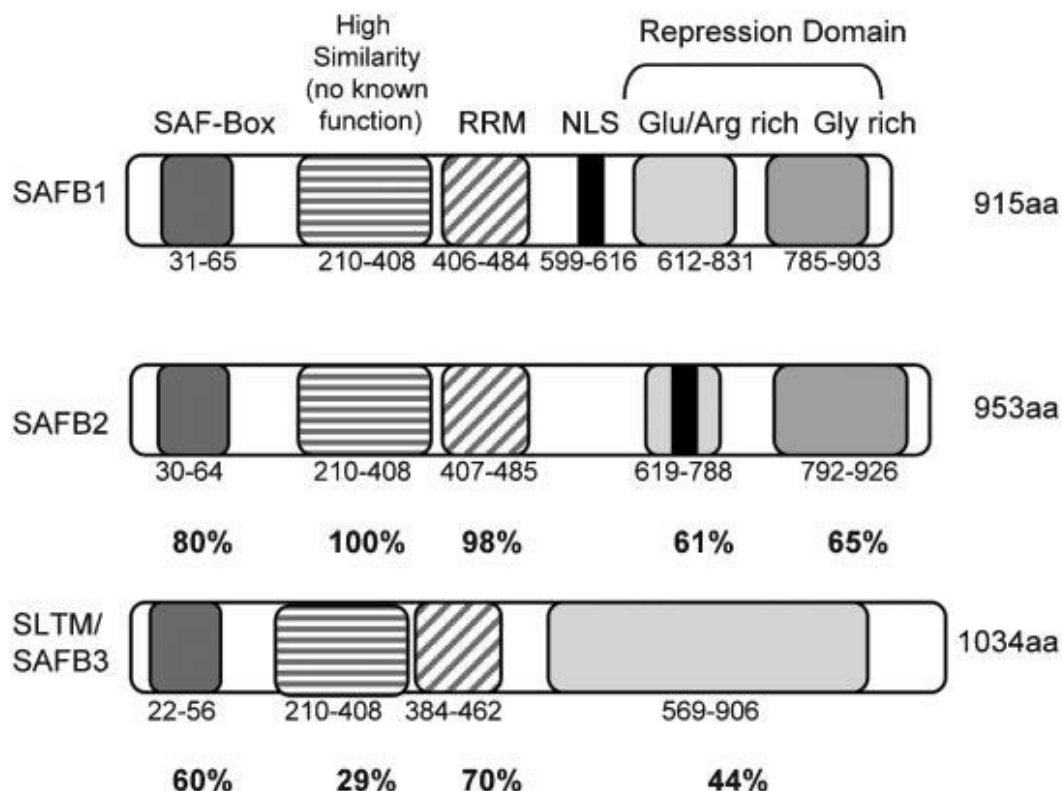


Εικόνα 5: Διάταξη των SAFB1 και SAFB2 στο χρωμόσωμα 19p13 στον άνθρωπο. Τα γονίδια του SAFB1 και του SAFB2 βρίσκονται σε διάταξη «κεφαλή με κεφαλή» στο χρωμόσωμα 19p13 και χωρίζονται από έναν κοινό υποκινητή αμφίδρομης κατεύθυνσης 490bp. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής [39].

A.2.2. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ SAFB

Οι παράγοντες SAFB είναι μεγάλες πρωτεΐνες (> 100kDa) που αποτελούνται από περιοχές εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των μελών της (περίπου 75% συνολικά μεταξύ SAFB1 και SAFB2) [40, 41] (Εικόνα 6). Από προβλέψεις της δευτεροταγούς δομής του SAFB1, φαίνεται να αποτελείται κυρίως από α έλικες και πολύ λίγες β-πτυχώσεις μικρού μήκους [35].

Το αμινοτελικό τους άκρο περιέχει μια συντηρημένη περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση των πρωτεϊνών στις S/MAR περιοχές του DNA [42] η οποία ονομάζεται SAF-box (Scaffold Attachment Factor -box) και παρουσιάζει ποσοστό ομολογίας 80% μεταξύ του SAFB1 και του SAFB2. Η περιοχή αυτή είναι μικρή και απαντάται συχνά σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην οργάνωση της χρωματίνης και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [43]. Ακολουθεί, μια περιοχή 100% ομόλογη μεταξύ του SAFB1 και του SAFB2 περίπου 200 αμινοξέων (210-408), στην οποία δεν έχει αποδοθεί συγκεκριμένη λειτουργία. Η κεντρική περιοχή περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης (RNA Binding Domain) ή αναγνώρισης του RNA (RNA Recognition Motif) και το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές. Η μια είναι πλούσια σε διπεπτίδια αργινίνης/γλουταμινικού οξέος (R/E), η οποία εμπεριέχει μια αλληλουχία 73 αμινοξέων (655-728) με πολύ μεγάλο ποσοστό ομοιότητας μεταξύ του SAFB1 και του SAFB2 και η άλλη είναι μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα αργινίνης και γλυκίνης (R, G), η οποία φαίνεται να παρουσιάζει μια "εγγενώς εύκαμπτη δομή" [35]. Η περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα R και G, περιέχει μοτίβα τύπου RGG/RG τα οποία μπορεί να αποτελούν στόχο μεθυλίωσης, αν και για τους SAFB κάτι τέτοιο δεν είναι γνωστό. Επίσης η περιοχή αυτή με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ικανή να δεσμεύσει μόρια RNA [44, 45]. Το καρβοξυτελικό άκρο των SAFB1 και SAFB2 εμπλέκεται στις περισσότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις τους και έχει δράση ισχυρού μεταγραφικού καταστολέα [46].



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2. Απεικονίζονται οι συντηρημένες επικράτειες μεταξύ των μελών της οικογένειας SAFB και το ποσοστό ομολογίας [40].

A.2.3. ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ SAFB

Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις πραγματοποιούνται από ένζυμα που προσθέτουν ή αφαιρούν λειτουργικές ομάδες σε συγκεκριμένα αμινοξέα, ως απόκριση των ερεθισμάτων και των απαιτήσεων προσαρμογής στις αλλαγές του κυτταρικού περιβάλλοντος. Επομένως, συμβάλλουν στην κυτταρική σηματοδότηση, στη δημιουργία πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, στον κυτταρικό εντοπισμό, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, κ.α. [47]. Παρ'όλο το μέγεθός τους, ο αριθμός των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που έχει περιγραφεί και μελετηθεί για τον SAFB1 και SAFB2 είναι περιορισμένος.

A.2.3.1. Φωσφορυλίωση

Βρέθηκε ότι ο SAFB1 φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα σερίνης *in vitro*, από την κινάση των SR πρωτεϊνών CDC like kinase 2 (CLK2), γεγονός που τον εμπλέκει στις διεργασίες ματίσματος [31]. Πιο πρόσφατα βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την

κινάση Serine/threonine-protein kinase 4 (MST1/STK4), η οποία εντοπίζεται στα στοιχεία απόκρισης σε ανδρογόνα καταστέλλοντας τη μεταγραφική δράση του υποδοχέα των ανδρικών, Androgen Receptor (AR). Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στην περιοχή 260–600 του SAFB1 [48]. Δεν είναι γνωστό κατά πόσον αυτές οι τροποποιήσεις λαμβάνουν χώρα *in vivo*.

A.2.3.2. Σουμοϋλίωση

Μια μεταμεταφραστική τροποποίηση είναι η σουμοϋλίωση των καταλοίπων λυσίνης 231 και λυσίνης 294 του SAFB1, με κυρίαρχη θέση τη δεύτερη. Τα δύο αυτά κατάλοιπα βρίσκονται στην 100% ομόλογη περιοχή του SAFB1 και του SAFB2, στην οποία δεν έχει αποδοθεί κάποια συγκεκριμένη λειτουργία. Η τροποποίησή αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζει ούτε τη σταθερότητα αλλά ούτε και τον υποκυτταρικό εντοπισμό του SAFB1, αλλά φαίνεται να μειώνει σημαντικά την αλληλεπίδραση του με την αποακετυλάση των ιστονών 3 (Histone deacetylase 3, HDAC3). Τέλος, η τροποποίηση αυτή φαίνεται να συνδέεται με την δράση του SAFB1 ως μεταγραφικού καταστολέα, καθώς στοχευμένη μεταλλαξιγένεση των καταλοίπων λυσίνης σε αργινίνη, οδηγεί στην κατάργηση της παραπάνω δράσης του [49]. Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι η σουμοϋλίωση του SAFB1 από την πρωτεΐνη SUMO-1 (Small Ubiquitin-like MOdifier) ενισχύει την δέσμευση της RNA πολυμεράσης II (RNAPII) στους υποκινητές ριβοσωμικών πρωτεϊνών, διευκολύνοντας την έναρξη της μεταγραφής και των διεργασιών του ματίσματος, [50] υποστηρίζοντας περαιτέρω τη λειτουργία του SAFB ως αρχιτεκτονικού παράγοντα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

A.2.3.3. Ουβικιτινίωση

Ως υπόστρωμα ουβικιτινίωσης έχει βρεθεί μόνο ο SAFB2 (χωρίς να έχει εξεταστεί ο SAFB1), από ένα σταθερό ετεροδιμερές σύμπλοκο της πρωτεΐνης BRCA1 (Breast Cancer 1) με την BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1) που έχει δράση λιγάσης E3. Αντίθετα με τις περισσότερες λιγάσες ουβικιτίνης, η ουβικιτινίωση από το σύμπλοκο BRCA1/BARD1 δεν οδηγεί την πρωτεΐνη στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Η συγκεκριμένη μεταμεταφραστική τροποποίηση έχει αναφερθεί ότι είναι σημαντική για την απόκριση του κυττάρου σε βλάβες του DNA (DDR, DNA Damage Response) [51]. Στη συγκεκριμένη εργασία φαίνεται ότι η BRCA1 προκαλεί την ουβικιτινίωση του SAFB2 επάγοντας την αύξηση των

πρωτεϊνικών του επιπέδων, η οποία στη συνέχεια μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της BARD1, δημιουργώντας έναν κύκλο ανάδρασης [52].

A.2.3.4. Πολύ-ADP-Ριβοζυλίωση

Η πολυμεράση της πολυ-ADP-ριβόζης (PARP) είναι ένα ένζυμο που έχει καθοριστικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA. Η δράση αυτού του ενζύμου είναι εξαιρετικά υψηλή στα καρκινικά κύτταρα. Η διαδικασία της πολυ-ADP-ριβοζυλίωσης ιστονών αλλά και άλλων πρωτεϊνών αποτελεί μια από τις πρώτες αντιδράσεις του κυττάρου ως απόκριση στο DDR [53]. Δείχθηκε ότι ο SAFB1 είναι μία από τις πρωτεΐνες που υπόκεινται σε πολυ-ADP-ριβοζυλίωση στην περιοχή 785-915 ως απόκριση σε γενετοξικό στρες [54].

A.2.4. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ SAFB1 ΚΑΙ SAFB2 ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥΣ

Η μεγάλη ομολογία που παρουσιάζουν οι κοινές επικράτειες μεταξύ των μελών της οικογένειας SAFB, οδηγεί στην ύπαρξη κοινών λειτουργιών, ιδιαιτέρως μεταξύ του SAFB1 και του SAFB2. Ωστόσο, οι διαθέσιμες πληροφορίες από τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη λειτουργία του SAFB2 είναι περιορισμένες και για την λειτουργία του SLTM ακόμα λιγότερες, ο οποίος δεν αποτελεί κομμάτι της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Γι' αυτό το λόγο οι ρόλοι των μελών της οικογένειας SAF-B (SAFB1 και SAFB2) θα συζητηθούν κυρίως με βάση το καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος της, τον SAFB1.

A.2.4.1. Οργάνωση της χρωματίνης

Ο ρόλος των πρωτεϊνών SAF-B στην οργάνωση της χρωματίνης, τους έχει αποδοθεί με βάση την ικανότητα τους να προσδένονται σε S/MAR περιοχές του DNA, οι οποίες διαμεσολαβούν στη δέσμευση της χρωματίνης με την πυρηνική μήτρα [35, 36] (Εικόνα 7, μονοπάτι Α). Οι πλούσιες σε αλληλουχίες AT, S/MAR περιοχές, συμβάλλουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στην εξέλιξη διαφόρων νόσων συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου [31, 55]. Πρόσφατα, με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης δείχθηκε ότι ο SAFB1, αλλά και ο SAFB2, βρίσκονται στους υποκινητές διαφόρων γονιδίων, μεταξύ αυτών και των ιστονών [56]. Στο ρόλο του SAFB1 ως αρχιτεκτονική πρωτεΐνη της χρωματίνης

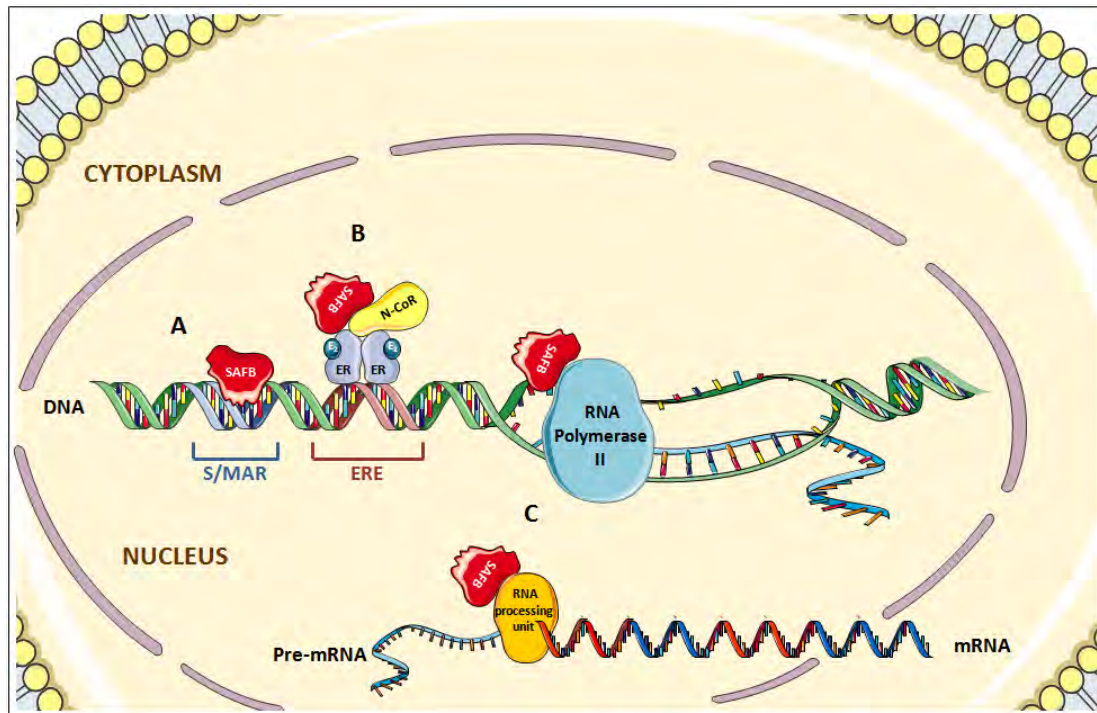
συνηγορούν και παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία ο SAFB1 αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου με την πρωτεΐνη CHD1 (Chromodomain protein), η οποία προσδένεται επίσης σε στοιχεία S/MAR και θεωρείται ότι συμβάλλει στην οργάνωση της χρωματίνης [57]. Πρόσφατα, επιβεβαιώθηκε και ο ρυθμιστικός ρόλος του SAFB1 στη δράση του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR). Είναι ενδιαφέρον ότι ο SAFB1, όταν φωσφορυλιωθεί από την MST1, συμμετέχει σε πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του AR, στρατολογώντας έτσι πρωτεΐνες του επιγενετικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα, μαζί με τον SAFB1 στρατολογούνται μία μεθυλοτρανσφεράση και δύο ακόμη μόρια του συμπλόκου PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), παρέχοντας επιπλέον ενδείξεις ότι ο SAFB1 εμπλέκεται σε επιγενετικούς κατασταλτικούς μηχανισμούς τροποποίησης της χρωματίνης [48]. Επιπλέον, η αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη MyoD φαίνεται να τον καθιστά σημαντικό για την ενεργοποίηση γονιδίων κατά τη διαφοροποίηση των μυοκυττάρων, και πάλι μέσω τροποποίησης της χρωματίνης [58]. Τέλος, του έχει αποδοθεί σημαντική συμμετοχή στην απάντηση του κυττάρου στο DDR, μέσω αλληλεπίδρασής του με την χρωματίνη με την ακραία καρβοξυτελική περιοχή του (785-915), με στόχο την αναδιαμόρφωσή της [54].

A.2.4.2. Μεταβολισμός του RNA

Τα στάδια του μεταβολισμού του RNA είναι η ωρίμανση του pre-mRNA, το μάτισμα, η σταθερότητά του και η εξαγωγή του από τον πυρήνα, καθώς και η μετάφρασή του. Ο SAFB1 φαίνεται να εμπλέκεται στα διάφορα στάδια ωρίμανσης του mRNA μέσω αλληλεπιδράσεων του με διάφορες πρωτεΐνες (Εικόνα 7, μονοπάτι C). Οι πρώτες αλληλεπιδράσεις του SAFB1 που ανιχνεύθηκαν μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων, ήταν με την καρβοξυτελική περιοχή της RNA πολυμεράσης II και με ένα υποσύνολο SR πρωτεϊνών και παραγόντων ματίσματος [31]. Το γεγονός αυτό πρότεινε την εμπλοκή του SAFB1 ως μοριακή βάση για τη συναρμολόγηση ενός συμπλέγματος που ενώνει τη χρωματίνη μέσω των περιοχών S/MAR με την μεταγραφή και την επεξεργασία του πρώιμου mRNA [31]. Ο SAFB1 έχει ταξινομηθεί ως νέο μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών hnRNPs με βάση την περιοχή δέσμευσης του RNA (RRM) η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των πρωτεϊνών hnRNPs [37]. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του SAFB1 και μιας σειράς

δεσμευτικών πρωτεϊνών του RNA (RNA-binding proteins) συμπεριλαμβανομένων των hnRNP A1, hnRNP D, hnRNP G, SRrp86 και SAM68, αποτελούν σημαντική ένδειξη της εμπλοκής του SAFB1 στη διαδικασία του ματίσματος [37, 59-61]. Έχει δειχθεί συγκεκριμένα ότι ο SAFB1 και ο SAFB2 είναι ικανοί να ρυθμίζουν το εναλλακτικό μάτισμα της πρωτεΐνης Tra2β (Transformer 2 Protein Homolog Beta) και να έχουν κυρίαρχο ρόλο στο σχηματισμό συμπλοκών του εναλλακτικού ματίσματος [61]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες SAFB1/2 αλληλεπιδρούν με τις κινάσες SRPK1/1a *in vitro* και *in vivo* και καταστέλλουν τη δράση τους [62, 63]. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι η ισχύς της αλληλεπίδρασης καθορίζει και την ισχύ της αναστολής καθώς έχει δειχθεί ότι αυτή διαφοροποιείται ανάμεσα στους δύο παράγοντες και τις δύο κινάσες, δεδομένου ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά και αναστέλλει και τις δύο κινάσες, SRPK1/1a ενώ ο SAFB2 αλληλεπιδρά και αναστέλλει μόνο την SRPK1, επηρεάζοντας έτσι την διεργασία του εναλλακτικού ματίσματος [63]. Ολοκληρώνοντας, πολύ λίγες μελέτες είχαν γίνει ως τώρα για την RRM περιοχή των SAFB1 και SAFB2. Τα τελευταία χρόνια όμως, έχει δειχθεί ότι ο SAFB1 μέσω αυτής της περιοχής, προσδένεται άμεσα σε μη κωδικοποιούντα RNA (non-coding RNA, ncRNA) [64]. Ο όρος ncRNA χρησιμοποιείται συνήθως για RNA τα οποία δεν κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη, αλλά ελέγχουν λειτουργίες όπως η γονιδιακή έκφραση, συμπεριλαμβανομένης της οργάνωσης της χρωματίνης, της μεταγραφής και του ματίσματος [65]. Με βάση το παραπάνω εύρημα έχει προταθεί ότι οι SAFB, μέσω της δέσμευσής τους με την RRM περιοχή σε μακρά μη κωδικοποιούντα RNA (long non-coding RNA, lncRNA) στρατολογούν άλλα μόρια που ρυθμίζουν την μεταγραφή και σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης [66]. Επίσης έχει βρεθεί ότι ο SAFB1 συνδέεται και εντός εξονίων, ρυθμίζοντας το εναλλακτικό μάτισμα και κατ' επέκταση την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Τα γονίδια που έχουν βρεθεί ως τώρα σχετίζονται με τη λειτουργία των νευρώνων [67]. Τέλος έχει βρεθεί ότι ο SAFB1 δεσμεύεται και σε 3' και 5' μη μεταφρασμένες περιοχές (UTRs, Untranslated Regions) των mRNA.

Συμπερασματικά, οι SAFB1/2, φαίνεται να ρυθμίζουν τον μεταβολισμό του RNA, ουσιαστικά αλλά και να αποτελούν το σύνδεσμο μεταξύ της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, της μεταγραφής και της επεξεργασίας του RNA.



Εικόνα 7: Απεικόνιση των τριών γνωστών λειτουργιών του SAFB1 και SAFB2 σε κυτταρικό επίπεδο. (A) Αναπαριστά τη δέσμευσή τους στις περιοχές S/MARs. (B) Αναπαριστά τη λειτουργία τους στη ρύθμιση των γονιδίων που διαμεσολαβείται από την άμεση στρατολόγησή τους στην περιοχή των υποκινητών ή την έμμεση αλληλεπίδρασή τους με παράγοντες μεταγραφής. (C) Αντιπροσωπεύει την αλληλεπίδρασή τους με διάφορες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις διεργασίες στο RNA που κατά συνέπεια ρυθμίζουν το μάτισμα και το μεταβολισμό του RNA [68].

A.2.4.3. Ρύθμιση της μεταγραφής

Η καλύτερα χαρακτηρισμένη λειτουργία των SAFB είναι η ικανότητά τους να ρυθμίζουν την μεταγραφή είτε μέσω της άμεσης πρόσδεσής τους σε υποκινητές γονιδίων, είτε έμμεσα, αλληλεπιδρώντας με παράγοντες μεταγραφής [68] (Εικόνα 7, μονοπάτι B).

Η ερευνητική ομάδα της Dr Oesterreich ήταν η πρώτη που παρατήρησε την ικανότητα του SAFB1 να δεσμεύεται άμεσα στον υποκινητή του γονιδίου της Hsp27 και να μειώνει σημαντικά την δράση του σε διάφορες κυτταρικές σειρές, καρκίνου του μαστού [36]. Η ύπαρξη στοιχείων απόκρισης στα οιστρογόνα (ERE, Estrogen Response Elements), στον υποκινητή της Hsp27, οδήγησε στο εύρημα ότι ο SAFB1 συνδέεται με τον υποδοχέα των οιστρογόνων. Οι μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι ο SAFB1 συνδέεται και καταστέλλει τη δράση του υποδοχέα των οιστρογόνων α (ER α , Estrogen Receptor α) [46, 69, 70]. Πιο συγκεκριμένα, η ίδια ερευνητική ομάδα

έδειξε ότι ο SAFB1 δρά ως συγκαταστολέας του ERα μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοχή EID1 (ER interacting domain 1) του υποδοχέα. Όμως, ενώ ο SAFB1 εκδηλώνει την κατασταλτική του δράση μέσω της καρβοξυτελικής του περιοχής, φαίνεται να αλληλεπιδρά ισχυρότερα μέσω του τμήματος που περιλαμβάνει τα αμινοξικά κατάλοιπα 426-600 [46]. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί και για τον SAFB2, γι' αυτό και οι δύο έχουν χαρακτηριστεί ως συγκαταστολείς του ERα [39]. Αναφέρονται ως συγκαταστολείς καθώς έχει βρεθεί ότι ο NCoR (Nuclear Hormone Receptor Corepressor), ο οποίος έχει χαρακτηριστεί ως συγκαταστολέας του ERα, αλληλεπιδρά άμεσα με το καρβοξυτελικό άκρο των SAFB1/2 και η απουσία του μειώνει την κατασταλτική δράση τους. Μάλιστα έχει δειχθεί ότι ο SAFB1 συνυπάρχει σε λειτουργικά σύμπλοκα με τον NCoR, διαμεσολαβώντας στην ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του με την HDAC3. Αυτή η παρατήρηση υπέδειξε ότι η ικανότητα καταστολής των SAFB1/2 σχετίζεται εν μέρει με HDAC-εξαρτώμενη δράση, διαμεσολαβούμενη όμως από τον NCoR [71]. Είναι ενδιαφέρον ότι μελέτες από άλλη ομάδα πάνω στη συγκεκριμένη λειτουργία, με την τεχνική μικροσκοπίας της δοκιμασίας επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP), πρότειναν ότι η συγκαταστολή του ERα από τους SAFB1/2, παρουσία 17β-οιστραδιόλης (E2), είναι αποτέλεσμα της μειωμένης ενδοπυρηνικής κινητικότητας του ERα, λόγω της έμμεσης πρόσδεσής του στην πυρηνική μήτρα μέσω των SAFB1/2 [72].

Η δράση του SAFB1 ως συγκαταστολέας δεν περιορίζεται μόνο στον ERα. Έχει δειχθεί ότι ο SAFB1, κυρίως με το καρβοξυτελικό του άκρο, αλληλεπιδρά και καταστέλλει την δράση μεγάλου αριθμού πυρηνικών υποδοχέων, ανεξάρτητα από την παρουσία προσδέτη, όπως οι: PPAPα, PPAPβ, PPAPγ (Perixisome Proliferator Activated Receptor), FXRα (Farsenoid X Receptor), RORα 1 (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor), VDR (Vitamin D Receptor), SF-1 (Steroidogenic factor), LHR-1 (Luteinizing Hormone Receptor) [73]. Ως συνέχεια των παραπάνω ευρημάτων, πρόσφατα βρέθηκε, με πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου PSA (Prostate Specific Antigen), ότι ο SAFB1 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των ανδρογόνων, AR και μειώνει τη μεταγραφική του ενεργότητα. Πιο συγκεκριμένα ο SAFB1 αλληλεπιδρά μέσω της καρβοξυτελικής περιοχής του, με ένα συν-καταστολέα του AR, την κινάση MST1, η οποία φωσφορυλιώνει τον SAFB1 και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης ο SAFB1 στρατολογείται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Τέλος, έχει βρεθεί ότι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53

αλληλεπιδρά με τον SAFB1 μέσω της καρβοξυτελικής περιοχής του. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι, παρουσία της 5-φθοροουρακίλης (5-FU), ο SAFB1 συνεντοπίζεται με την p53 στην πυρηνική μήτρα και καταστέλλει τη μεταγραφική της δράση [74]. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι ο SAFB1 επηρεάζει πολλαπλούς στόχους, μάλλον στο περιβάλλον μιας οργανωμένης χρωματινικής δομής και ως εκ τούτου, η απώλεια της δραστηριότητας του SAFB1 θα μπορούσε να οδηγήσει σε παρεκκλίνουσα σηματοδότηση πολλών μονοπατιών του κυττάρου.

Όπως αναφέρθηκε αρχικά, ο SAFB1 φαίνεται να επηρεάζει και με έμμεσο τρόπο την μεταγραφή των πυρηνικών υποδοχέων. Πιο συγκεκριμένα καταστέλλει την έκφραση της XOR (Xanthine Oxidoreductase), μέσω αλληλεπίδρασης με την Ku86 και την BRG1, μια πρωτεΐνη που επηρεάζει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων αλλάζοντας την δομή της χρωματίνης [75]. Σχεδόν παράλληλα, μια άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι ο SAFB1 επηρεάζει την έκφραση του SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c) δια μέσου της πρωτεΐνης RBMX (X chromosome linked RNA Binding Motif protein). Σε αντίθεση με την προηγούμενα αναφερθείσα δράση του, σ' αυτή την περίπτωση φαίνεται να δρα αυξάνοντας την έκφραση του γονιδίου της SREBP-1c [76]. Τέλος, με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) σε υποκινητές γονιδίων, κυττάρων MCF-7 (ChIP-on-chip μικροσυστοιχιών), ανιχνεύθηκε η σύνδεση του SAFB1 σε 541 υποκινητές. Όμως δεν υπήρξε σημαντική επικάλυψη μεταξύ των 541 υποκινητών, με αυτών που τροποποιήθηκαν αποσιωπώντας τον SAFB1, υποδεικνύοντας και πάλι ότι μεγάλο μέρος της γονιδιακής ρύθμισης ήταν έμμεση [56].

Συμπερασματικά από όλα τα παραπάνω, οι παράγοντες SAFB φαίνεται να εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως είναι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, οι διεργασίες του ματίσματος και η μεταγραφή, διαμέσω διαφόρων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Επομένως μπορούν να χαρακτηριστούν ως πολυλειτουργικές πρωτεΐνες, με σημαντική συμμετοχή στην εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου.

A.2.5. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ SAFB

Τα γονίδια του *SAFB1* και *SAFB2* εκφράζονται σε όλα τα σπονδυλωτά. Ένα μοναδικό γονίδιο SAFB εκφράζεται επίσης στη *Drosophila* και στο νηματοσκώληκα *C. Elegans*, όχι όμως στη ζύμη, τα φυτά, τα βακτήρια και τα πρωτόζωα [39, 77].

Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι, τόσο ο *SAFB1* όσο και ο *SAFB2* εκφράζονται στα ανώτερα θηλαστικά σε όλους τους ιστούς με υψηλά επίπεδα έκφρασης στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στο ανοσοποιητικό [39, 78]. Η έκφραση των δύο πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε επίσης σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές σειρές κυρίως του μαστού (MCF-7BK, MDA-MB-231, T47D και ZR75), στην μυελοβλαστική κυτταρική σειρά KG-1 καθώς και στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και 3T3-L1 [39, 73, 78]. Στα κύτταρα Sertoli στους όρχεις, ο *SAFB2* έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τον *SAFB1* [61].

Όσον αφορά στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, αρχικά είχεδειχθεί ότι ο *SAFB1* εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα, αποκλειόμενος από τους πυρηνίσκους, ενώ ο *SAFB2* και στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα [39]. Τρία χρόνια αργότερα, έρευνα κυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών *SAFB1* και *SAFB2* σε κύτταρα HeLa και HEK 293 έδειξε ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός και των δύο πρωτεϊνών είναι αποκλειστικά πυρηνικός [61]. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα HeLa οι *SAFB1/2* εντοπίζονται συγκεντρωμένοι σε πυρηνικές κηλίδες, ενώ στα κύτταρα HEK 293 οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν μια πιο διάχυτη υποκυτταρική κατανομή στον πυρήνα. Τέλος, στην ίδια δημοσίευση [61] προτείνεται ότι ο *SAFB2* σχηματίζει σταθερά μεγάλα σύμπλοκα (μέχρι και 670kDA σε μέγεθος) με τον *SAFB1* καθώς και με ρυθμιστές ματίσματος, όπως οι Sam68, T-Star και hnRPN, ενώ αντίθετα ο *SAFB1* εντοπίζεται κυρίως ως μονομερής πρωτεΐνη ή σε μικρότερα σύμπλοκα (όπου βρίσκεται και ο μεταγραφικός παράγοντας TAF_{II}15). [61]. Φαίνεται λοιπόν ότι ενώ και οι δύο παράγοντες είναι πυρηνικοί με κοινές δομικές περιοχές, έχουν διαφορετικές μοριακές και λειτουργικές ιδιότητες, οι οποίες ακόμα παραμένουν άγνωστες [61]. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι ο *SAFB1* απαιτείται για την φυσιολογική ανάπτυξη του ποντικού, η οποία όμως δεν αναπληρώνεται απουσία έκφρασης του *SAFB1* σε «knockout» ποντίκια με φυσιολογική έκφραση του *SAFB2*, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο *SAFB2* δεν μπορεί να “αντικαταστήσει” τον *SAFB1* [79].

Τέλος, οι πρωτεΐνες SAFB έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην απόπτωση. Με πειράματα ανοσοφθορισμού έχειδειχθεί ότι επάγοντας την απόπτωση με σταυροσπορίνη (STA, staurosporine), ο *SAFB1* εντοπίζεται αρχικά και στους

πυρηνίσκους και στη συνέχεια εντοπίζεται σε περιπυρηνισκικές δομές δακτυλίου. Αυτή η υποπυρηνική μετατόπιση του SAFB1 δεν φαίνεται να οφείλεται στις περιοχές δέσμευσης με το DNA και το RNA , αλλά σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν με το καρβοξυτελικό του άκρο [80].

A.2.6. Η ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ SAFB ΣΕ ΣΤΡΕΣΣΟΓΟΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Κατά την απόκριση του κυττάρου σε συνθήκες στρες ενεργοποιείται η μεταγραφή μιας μικρής ομάδας πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsps, Heat shock proteins). Κατά την απόκριση του κυττάρου σε θερμικό στρες πραγματοποιείται ο σχηματισμός ειδικών δομών που αποκαλούνται πυρηνικά σωμάτια του στρες (nSBs, nuclear stress bodies). Είναι γνωστό ότι ο παράγοντας Hsf 1 συγκεντρώνεται σε αυτές τις δομές και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας ανίχνευσής τους [81]. Άλλη γνωστή πρωτεΐνη που συσσωρεύεται στα nSBs και χρησιμοποιείται για την διάκριση τους είναι η Sam68 [82-84].

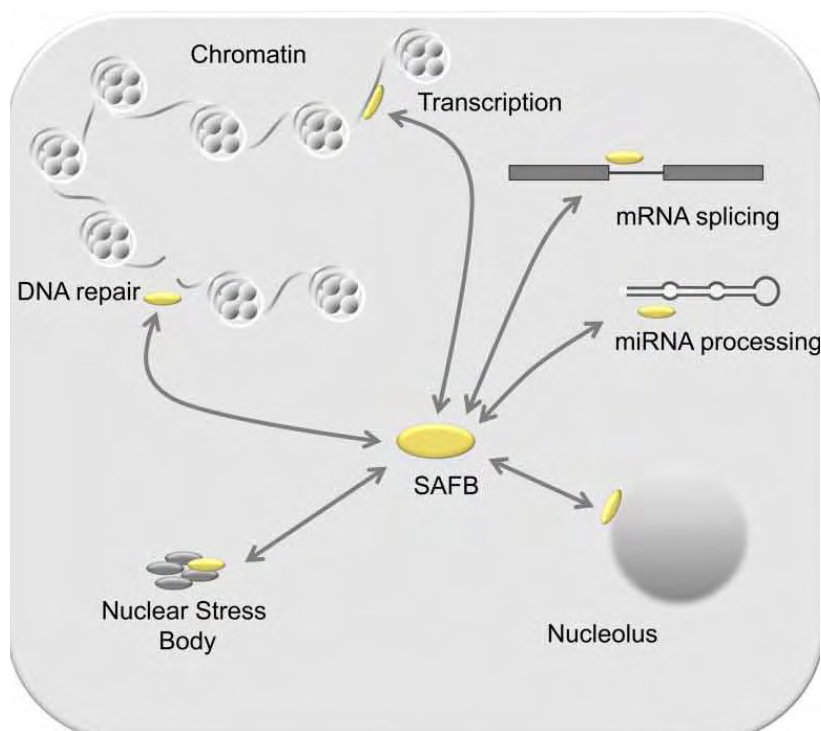
Η αρχική αναγνώριση του SAFB1 ως ρυθμιστή της πρωτεΐνης Hsp27 οδήγησε στην πιθανή σύνδεση του SAFB1 και της απόκρισης του κυττάρου σε στρεσογόνες συνθήκες. Ο SAFB1, ως πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας, υπό φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζεται κυρίως στα ινίδια της χρωματίνης, ενώ υπό την επίδραση θερμικού σοκ, μετατοπίζεται στα nSBs, συνεντοπιζόμενος με τον HSF1 και την Sam68 [37, 83, 84]. Η μετατόπιση του SAFB1 στα nSBs οφείλεται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με την R/E περιοχή του [84].

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με βιβλιογραφικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι το θερμικό στρες ελαττώνει την μεταγραφή των περισσότερων γονιδίων και αναστέλλει την ωρίμανση του mRNA στα κύτταρα [83], φαίνεται ότι ο SAFB1 κατέχει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυττάρου σε κάποια είδη στρες, χωρίς όμως αυτό να έχει διερευνηθεί περαιτέρω.

A.2.7. ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΕΜΠΛΟΚΗΣ ΤΩΝ SAFB

Με βάση όλα τα παραπάνω οι πρωτεΐνες SAFB, έχουν χαρακτηριστεί δικαίως ως πολυλειτουργικές πρωτεΐνες, καθώς φαίνεται να σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, τη ρύθμιση της μεταγραφής και των διεργασιών του μεταβολισμού του RNA, πιθανότατα αποτελώντας έναν συνδετικό κρίκο μεταξύ

τους. Τέλος, φαίνεται να εμπλέκονται στην απόκριση του κυττάρου σε στρεσογόνες συνθήκες, στη διαδικασία της απόπτωσης και της επιδιόρθωσης του DNA (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Παρηληπτική απεικόνιση των διεργασιών στις οποίες πιθανόν να εμπλέκονται οι πρωτεΐνες SAFB [66].

A.2.8. SAFB ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Από τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα λίγα είναι γνωστά για τον ρόλο των SAFB σε παθολογικές καταστάσεις. Υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών SAFB και του καρκίνου του μαστού που πηγάζει πρωτίστως από τον ρόλο τους ως μεταγραφικοί καταστολείς του ERα και δευτερευόντως από την αλληλεπίδρασή τους με άλλες βασικές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην ογκογένεση.

Λειτουργικές και κλινικές μελέτες παρέχουν ισχυρές αποδείξεις που εμπλέκουν τις πρωτεΐνες SAFB στον καρκίνο του μαστού [68]. Ο SAFB1 ανιχνεύθηκε με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε οκτώ διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και τα πρωτεϊνικά του επίπεδα στο κύτταρο φαίνεται να συσχετίζονται αντίστροφα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [85]. Πιο συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε η έκφραση του σε 61 πρωτογενείς καρκινικούς ιστούς του μαστού, αποκαλύπτοντας ένα μεγάλο εύρος επιπέδων έκφρασης, με σημαντικό

εύρημα την απουσία του SAFB1 στο 16% των όγκων. Η υψηλή έκφραση του SAFB1 σε ιστούς αλλά και σε κύτταρα συσχετίστηκε με την ύπαρξη ενός μικρού κλάσματος εξ' αυτών να βρίσκεται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου και να παρουσιάζουν ανευπλοειδία, χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν τα καρκινικά κύτταρα [85]. Από την άλλη πλευρά, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του SAFB1 σε επιθετικούς τύπους καρκίνου του μαστού συσχετίστηκαν με την αρνητική πορεία των ασθενών στην εξέλιξη της νόσου [86]. Επιπλέον, σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού (MEF, Mouse Embryonic Fibroblasts) έχειδειχθεί ότι η απαλοιφή του γονιδίου *SAFB1* οδηγεί στην ανάπτυξη σημαντικών χαρακτηριστικών καρκινογένεσης, όπως είναι η αθανατοποίηση, η αναστολή της γήρανσης και ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων [87]. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η ισορροπία των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών SAFB είναι σημαντική στην ογκογένεση στο μαστό.

Η χαμηλή έκφραση των πρωτεϊνών SAFB θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα των υψηλών ποσοστών εμφάνισης απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH, Loss Of Heterozygosity) στο χρωμοσωμικό τόπο 19p13, όπου, όπως είναι γνωστό, εδράζουν σε κοντινή απόσταση τα γονίδια του *SAFB1* και του *SAFB2* [88]. Το ποσοστό LOH σε αυτό το τόπο έχει περιγραφεί ως μία από τις υψηλότερες περιοχές LOH στο γονιδίωμα του καρκίνου του μαστού, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες SAFB θα μπορούσαν να έχουν ρόλο ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών [89]. Ωστόσο, έρευνες έδειξαν ότι ο SAFB1 δεν εμπλέκεται στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, αλλά φαίνεται να είναι σημαντικός σε σποραδικούς τύπους καρκίνου του μαστού [90]. Παρ' όλα αυτά, η κακή πρόγνωση και τα επίπεδα των SAFB δεν σχετίζονται με ασθενείς που ήταν σε φαρμακευτική αγωγή με ταμοξιφαίνη, υποστηρίζοντας ότι ο συσχετισμός των SAFB με τον καρκίνο του μαστού δεν αφορά την σχέση τους με τον ERα, αλλά με κάποια άλλη λειτουργία τους.

Τέλος, ο SAFB1 έχει βρεθεί να σχετίζεται και με άλλους τύπους καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος του προστάτη, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αλλά και σε εγκεφαλικές μεταστάσεις [48, 90, 91].

A.3 ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ (SERINE/ARGININE PROTEIN KINASES, SRPKS)

A.3.1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ SRPK

Οι κινάσες σερίνης/αργινίνης αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματά τους σε κατάλοιπα σερίνης επαναλαμβανομένων διπεπτιδίων αργινίνης/σερίνης (R/S). Κατέχουν σημαντικό ρόλο στις διεργασίες του κυττάρου όπως είναι η ρύθμιση του ματίσματος του mRNA, γι' αυτό και έχουν διατηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο. Το πρώτο μέλος αυτής της οικογένειας, η ανθρώπινη SRPK1, απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε από την εργαστηριακή ομάδα του Dr. Fu πριν 20 περίπου χρόνια, με βάση την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει διπεπτίδια αργινίνης/σερίνης που εμπεριέχονται στην αμινοξική αλληλουχία των παραγόντων ματίσματος SR ή αλλιώς πρωτεϊνών SR (SR splicing factors, (SRSFs) ή SR proteins) [92, 93].

Η SRPK1 είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας και αποτελείται από 655 αμινοξικά κατάλοιπα. Το γονίδιο της βρίσκεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 6p21.2-p21.3 [94]. Εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους όρχεις αλλά και σε άλλους ιστούς σε μικρότερο βαθμό, όπως είναι το πάγκρεας, ο θύμος αδένας, ο σκελετικός μυς και η καρδιά [62, 95]. Κοινά γνωρίσματα των μελών της οικογένειας είναι η μεγάλη ομολογία που παρουσιάζουν στην πρωτοταγή τους δομή καθώς και η εξειδίκευση απέναντι στα υποστρώματά τους. Επιπλέον, το καταλυτικό τους κέντρο, αντίθετα από τα μέλη της υπεροικογένειας κινασών στην οποία ανήκει η οικογένεια SRPK, κατανέμεται σε δύο ξεχωριστές καταλυτικές δομικές επικράτειες (την αμινο και την καρβοξυτελική) οι οποίες χωρίζονται μεταξύ τους από μια "ενδιάμεση" περιοχή (spacer domain).

Η SRPK1a αποτελεί προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την SRPK1 και αποτελείται από 826 αμινοξικά κατάλοιπα. Στο αμινοτελικό της άκρο, ανάμεσα στα αμινοξέα λυσίνης 4 (Lys4) και βαλίνης 5 (Val5) της SRPK1, περιέχει μια επιπρόσθετη αλληλουχία 171 αμινοξέων. Τα εμβόλιμα αυτά 171 αμινοξέα εμπεριέχουν μια πλούσια αλληλουχία σε προλίνες, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις της SRPK1a με άλλες πρωτεΐνες και τα οποία την διαφοροποιούν από την SRPK1 [62]. Η SRPK1a παρουσιάζει πρακτικά την ίδια έκφραση στους ιστούς με την SRPK1[62].

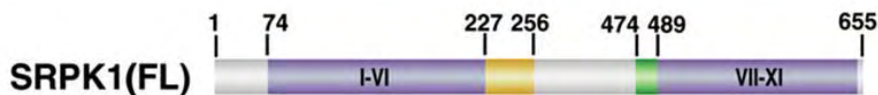
Η SRPK2 κλωνοποιήθηκε τέσσερα χρόνια αργότερα από την SRPK1 και κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q22-q31.1. Αποτελείται από 686 αμινοξέα και διαφέρει από την SRPK1 λόγω της ύπαρξης μιας πλούσιας σε προλίνες αλληλουχίας στο αμινοτελικό της άκρο, η οποία μπορεί να εξυπηρετεί την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες και μίας όξινης περιοχής που βρίσκεται στην ενδιάμεση περιοχή. Η έκφρασή της διαφέρει από αυτή της SRPK1, καθώς φαίνεται πιο περιορισμένη. Εκφράζεται περισσότερο στον εγκέφαλο και στους όρχεις, λιγότερο στην καρδιά και στον σκελετικό μυ και εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης στον πνεύμονα, το ήπαρ και το νεφρό [95, 96]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στη διαδικασία της απόπτωσης μέσω αλληλεπίδρασης της με τον προαποπτωτικό παράγοντα acinus, φωσφορυλιώνοντας την πλούσια σε R/S περιοχή του [97].

Η SRPK3 ανακαλύφθηκε στο ποντίκι πριν 10 περίπου χρόνια. Το συνολικό της μέγεθος είναι 566 αμινοξέα και διαφέρει από την SRPK1 και την SRPK2 στην ενδιάμεση περιοχή και στο αμινοτελικό της άκρο, στο οποίο εμπεριέχεται μια πλούσια περιοχή σε σερίνες. Η έκφραση της φαίνεται να είναι ιστοειδική, καθώς εκφράζεται στην καρδιά και στους σκελετικούς μύς κατέχοντας ρόλο ρυθμιστικό στην φυσιολογική ανάπτυξη και στην ομοιοστασία τους [98]. Η ύπαρξη του ορθόλογου της SRPK3 στον άνθρωπο έχει επιβεβαιωθεί, όμως κανένα βιβλιογραφικό δεδομένο για την δράση και την έκφρασή της δεν είναι γνωστό [99].

Από βιβλιογραφικά δεδομένα είναι γνωστό ότι και οι τέσσερις κινάσες εμφανίζουν παρόμοια ενζυμική δράση καθώς έχει δειχθεί ότι μπορούν να φωσφορυλιώσουν τα γνωστά υποστρώματα τους, όπως είναι ο παράγοντας SF2/ASF και ο LBR [95, 96, 98, 100].

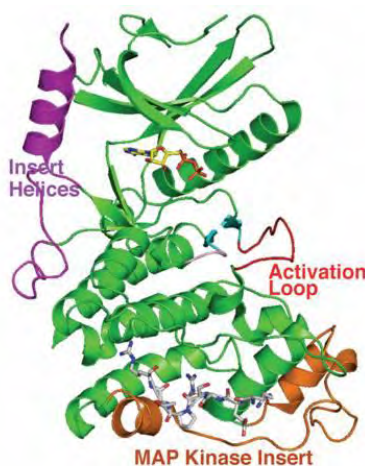
A.3.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ SRPK1

Στα θηλαστικά, οι κινάσες της συγκεκριμένης οικογένειας παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομολογία στην πρωτοταγή δομή τους. Το καταλυτικό κέντρο κατανέμεται σε δύο δομικές επικράτειες (kinase domains) (80-256) και (474-655), οι οποίες διαχωρίζονται από την ενδιάμεση περιοχή περίπου 220 αμινοξέων (256-475), (Εικόνα 9) [101].



Εικόνα 9: Δομικά χαρακτηριστικά της SRPK1. Οι δύο καταλυτικές περιοχές φαίνονται με μωβ. Η ενδιάμεση περιοχή αρχίζει από το αμινοξικό κατάλοιπο 257 και τελειώνει στο αμινοξικό κατάλοιπο 475 [101].

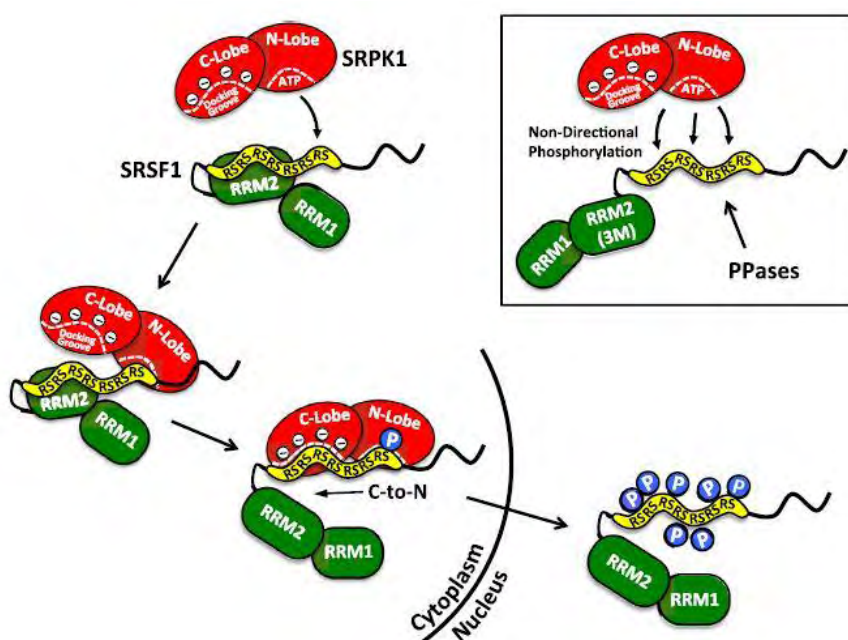
Μελέτες πάνω στη δομή της SRPK1 έδειξαν ότι το καταλυτικό της κέντρο αναδιπλώνεται σε μια δίλοβη διαμόρφωση, η οποία είναι χαρακτηριστική και σε άλλες κινάσες. Ο μικρός λοβός, ο οποίος σχηματίζεται από την αμινοτελική επικράτεια, είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του ATP (80-109) (βρόγχος ενεργοποίησης) και αποτελείται από β-ελάσματα. Ο μεγάλος λοβός σχηματίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο, διαθέτει τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση του υποστρώματος (βρόγχος κατάλυσης) και αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Η ενδιάμεση περιοχή περιέχει μικρές ελικοειδείς δομές. Από βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι το αμινοτελικό άκρο (1-74) καθώς και η ενδιάμεση περιοχή της κινάσης δεν επηρεάζουν την ενζυμική της δράση, αφού η κινάση παραμένει δραστική και μετά την απαλοιφή τους [102]. Ο μεγάλος λοβός περιέχει μια αλληλουχία γνωστή ως αλληλουχία MAPK (MAPK insert), η οποία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό μιας αύλακας αγκυροβόλησης (docking groove) στην οποία προσδέεται το υπόστρωμα (Εικόνα 10) [103].



Εικόνα 10: Δομικά χαρακτηριστικά της SRPK1. Διάγραμμα τύπου κορδέλας του συμπλόκου SRPK1, ATP κι ενός μικρού πεπτιδίου-υποστρώματος (RRRERSPTR). Το πεπτίδιο δεσμεύεται κοντά στην αλληλουχία MAPK. Από την SRPK1 λείπει ένα μέρος της αμινοτελικής περιοχής (1-41) και της συνδετικής αλληλουχίας (256-473) [103].

Κοινό χαρακτηριστικό της οικογένειας κινασών σερίνης/θρεονίνης είναι ότι η ενζυμική τους δράση είναι συστατική είναι δηλαδή συνεχώς ενεργές να φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματά τους. Συνεπώς η SRPK1 είναι συνεχώς ενεργή, χωρίς να απαιτείται πρώτα η φωσφορυλίωσή της, όπως συμβαίνει με τις περισσότερες οικογένειες κινασών. Με τη χρήση δομικών, βιοχημικών αλλά και υπολογιστικών προσεγγίσεων για την διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού κατάλυσης της SRPK1, φάνηκε ότι η σωστή διαμόρφωση της SRPK1 ώστε να είναι ενζυμικά ενεργή, δεν βασίζεται σε κανέναν γνωστό μηχανισμό σταθεροποίησης. Προτάθηκε λοιπόν ότι το δίκτυο των επαφών μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της είναι αυτό που προδιαθέτει την κινάση σε μια ενεργή διαμόρφωση. Ένα σημαντικό εύρημα ήταν ότι η SRPK1 συνέχιζε να είναι ενεργή ακόμα και μετά από μεταλλάξεις σε κρίσιμες περιοχές. Συνοπτικά, η SRPK1 οργανώνεται σε τέτοια σταθερή και δραστική διαμόρφωση, ώστε να φωσφορυλιώνει ένα μεγάλο αριθμό καταλοίπων σερίνης σε κάθε υπόστρωμα της [101]. Από παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα ήταν γνωστό ότι οι κινάσες αυτής της οικογένειας φωσφορυλιώνουν πολλαπλές σερίνες στις R/S περιοχές των υποστρωμάτων τους με διαδοχικό τρόπο, αφού πρώτα αναγνωρίσουν φωσφοσερίνες, οι οποίες βρίσκονται σε P-2 θέση από τη σερίνη που θα φωσφορυλιώσουνε. Αδιευκρίνιστο έχει παραμείνει μέχρι τώρα το πώς η SRPK1 αναγνωρίζει το υπόστρωμά της και πώς πραγματοποιείται η πρώτη φωσφορυλίωση. Οι πιθανοί τρόποι που έχουν προταθεί είναι είτε α) από κάποια άλλη κινάση, αφήνοντας την SRPK1 να συνεχίσει μετά β) από την ίδια την SRPK1 αλλά με μικρή αποτελεσματικότητα [104, 105]. Για τον μηχανισμό δράσης της SRPK1, τουλάχιστον για τα κύρια υποστρώματά της όπως είναι οι παράγοντες ματίσματος, σε παλαιά βιβλιογραφικά δεδομένα έχει δειχθεί ότι αναγνωρίζουν πιθανώς την RRM περιοχή τους, γεγονός που βοηθάει στη σωστή τοποθέτηση της RS περιοχής στο καταλυτικό κέντρο επάγοντας έτσι την φωσφορυλίωση τους. Για τον παράγοντα ASF/SF2/SRSF1 έχει βρεθεί η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την αύλακα αγκυροβόλησης η οποία βρίσκεται ακριβώς μετά από την RRM περιοχή του και πριν την περιοχή φωσφορυλίωσης [102]. Σε πολύ πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι ο μηχανισμός της φωσφορυλίωσης που καταλύεται από την SRPK1 βασίζεται στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης SRSF1. Συγκεκριμένα έδειξαν ότι λόγω διαμόρφωσης, η RRM περιοχή του SRSF1 βρίσκεται σε στενή επαφή με τα 4 πρώτα διπεπτίδια της RS περιοχής του, αφήνοντας τα υπόλοιπα εύκολα προσβάσιμα να αναγνωριστούν ως θέσεις φωσφορυλίωσης από την SRPK1. Μόλις η SRPK1 αρχίσει να φωσφορυλιώνει

το τελευταίο διπεπτίδιο RS από την καρβοξυτελική περιοχή του SRSF1, τότε η επαφή της RRM περιοχής του χαλαρώνει και ταυτόχρονα ευνοείται η σταθεροποίηση του SRSF1 στην περιοχή της αύλακας αγκυροβόλησης της SRPK1 προωθώντας την αποτελεσματική φωσφορυλίωση και των άλλων διπεπτιδίων RS με φορά προς το αμινοτελικό του άκρο (Εικόνα 11). [106].



Εικόνα 11: Μοντέλο για την κατευθυνόμενη φωσφορυλίωση του SRSF1 από την SRPK1 με σκοπό την είσοδο του στον πυρήνα. [106]

A.3.3. ΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΗΣ SRPK1 ΚΑΙ ΟΙ ΡΟΛΟΙ ΤΟΥΣ

A.3.3.1. Πρωτεΐνες SR

Το πιο καλά χαρακτηρισμένο υπόστρωμα των κινασών σερίνης/θρεονίνης αποτελούν οι πρωτεΐνες SR. Στο αμινοτελικό τους άκρο περιέχουν συνήθως μια ή δύο περιοχές RRM και στο καρβοξυτελικό τους επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια RS. Εντοπίζονται και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα καθώς έχουν την ικανότητα να μετακινούνται μεταξύ των δυο υποκυτταρικών διαμερισμάτων [107]. Είναι γνωστό από βιβλιογραφικά δεδομένα ότι οι πρωτεΐνες SR παίζουν σημαντικό ρόλο στο μάτισμα. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών SR αποτελεί την βασική τους ρύθμιση σε μεταμεταφραστικό επίπεδο και επηρεάζει πολλές λειτουργίες τους όπως είναι: η μετατόπισή τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, η συγκρότηση και η

ενεργοποίηση του συμπλόκου ματίσματος, η περαιτέρω ρύθμιση τους από άλλες κινάσες, η επιλογή των θέσεων ματίσματος καθώς και η απόκριση του κυττάρου σε συνθήκες στρες [102, 108-111].

A.3.3.2. Ο υποδοχέας της λαμίνης B (Lamin B Receptor, LBR)

Ο υποδοχέας της λαμίνης B, είναι μια πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Κύριοι ρόλοι του είναι η πρόσδεση της ετεροχρωματίνης στην πυρηνική περιφέρεια [112], η συμπύκνωση της χρωματίνης και τέλος η εμπλοκή του στην μεταγραφή έχοντας κατασταλατικό ρόλο [113].

Ο LBR αποτελείται από ένα διαμεμβρανικό τμήμα οκτώ υδρόφοβων περιοχών που διαπερνούν την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, και δυο περιοχές, το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο που εκτείνονται προς το πυρηνόπλασμα. Το αμινοτελικό του τμήμα περιέχει δύο σφαιρικές περιοχές, όπως αποκαλούνται (globular I and globular II domain), που ενώνονται από μια περιοχή άρθρωσης (hinge region) [114, 115]. Η περιοχή άρθρωσης περιέχει ένα NLS το οποίο απαιτείται για την αλληλεπίδραση με την ιμφορτίνη β [116], και μια περιοχή RS [117]. Ολόκληρο το αμινοτελικό άκρο απαιτείται για την αλληλεπίδραση του LBR με τη λαμίνη B [118]. Και οι δύο σφαιρικές περιοχές αλλά και η περιοχή διπεπτιδίων RS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA [118, 119] και με ιστόνες [120-122]. Μόνο η σφαιρική επικράτεια II αλληλεπιδρά με την HP-1 [115, 123]. Η φωσφορυλίωση των διπεπτιδίων RS από την SRPK1 αλλά και από άλλες κινάσες προωθεί τις αλληλεπιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω [117, 122, 124-128]. Σε πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η μη ισορροπημένη φωσφορυλίωση του LBR από την SRPK1, SRPK2 αλλά και την Cyclin-Dependent Kinase (CDK), λόγω απουσίας μιας πρωτεΐνης των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων, οδηγεί στην διατάραξη του πυρηνικού εντοπισμού του LBR. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην έλλειψη συντονισμού πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων, θέτοντας σε κίνδυνο την ακεραιότητα του πυρήνα [129]. Συνοψίζοντας από όλα τα παραπάνω, η φωσφορυλίωση του αμινοτελικού άκρου του LBR φαίνεται να κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στη σύνδεση της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης με πρωτεΐνες του πυρηνικού σκελετού, στη σωστή λειτουργία των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων αλλά και στις αλληλεπιδράσεις της χρωματίνης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τη συμβολή του σε σημαντικές διεργασίες του κυττάρου.

A.3.3.3. Άλλα υποστρώματα της SRPK1

Όλες οι πρωτεΐνες που περιέχουν στην αλληλουχία τους επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια SR μπορούν υπό κατάλληλες συνθήκες να αποτελούν εν δυνάμει υποστρώματα της SRPK1.

Χαρακτηριστική τέτοια πρωτεΐνη είναι η πρωταμίνη 1. Ο ρόλος των πρωταμινών είναι η αντικατάσταση των ιστονών κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης [130]. Η φωσφορυλίωση της πρωταμίνης 1 από την SRPK1 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή της με τον LBR [131]. Τέλος προτείνεται ότι η φωσφορυλίωση των πρωταμινών διευκολύνει την σωστή πρόσδεση τους στο DNA [95]. Ένα άλλο υπόστρωμα της SRPK1 είναι ο PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια συν-ενεργοποιητών, PGC-1. Η οικογένεια αυτή διαμεσολαβεί στη ρύθμιση διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών. Πιο συγκεκριμένα έχειδειχθεί ότι κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης, των λιπιδίων και της ομοιοστασίας της ενέργειας, λειτουργίες η διαταραχή των οποίων είναι υπεύθυνη για μεταβολικές ασθένειες όπως είναι ο διαβήτης, η παχυσαρκία και η καρδιομυοπάθεια [99].

A.3.4. ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ SRPK1

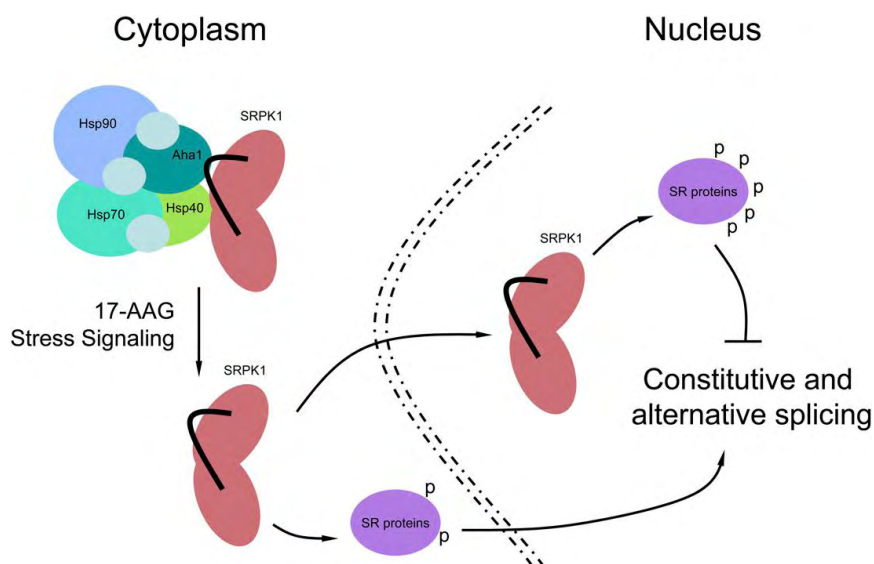
Η SRPK1 είναι μια μόνιμα ενεργή κινάση και η ρύθμισή της δεν είναι γνωστή.

Ο πιο πιθανός τρόπος ρύθμισής της είναι μέσω του υποκυτταρικού της εντοπισμού. Είναι γνωστό ότι η SRPK1 είναι κυρίως κυτταροπλασματική και λιγότερο πυρηνική [132]. Από πειράματα βιοχημικής κλασμάτωσης έχειδειχθεί ότι τα ποσοστά της SRPK1 κατανέμονται ως εξής: ~50% στο κυτταρόπλασμα, ~40% στο κλάσμα του πυρηνοπλάσματος και ~10% στο κλάσμα της πυρηνικής μήτρας [63].

Η παρουσία της SRPK1 στο κυτταρόπλασμα με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, οφείλεται στην ενδιάμεση περιοχή, καθώς έχειδειχθεί ότι αφαιρώντας την, η SRPK1 να μην εξακολουθεί να είναι καταλυτικά ενεργή, αλλά μετατοπίζεται στον πυρήνα. Επιπλέον, η μετατόπιση της SRPK1 δεν οφείλεται ούτε σε παθητική διάχυση, καθώς το μέγεθος της μεταλλαγμένης μορφής από την οποία απουσιάζει η ενδιάμεση περιοχή είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων, ούτε σε κάποιο σήμα πυρηνικού εντοπισμού που υπάρχει στην

αλληλουχία της, αλλά ούτε και στην ύπαρξη σήματος πυρηνικής εξαγωγής στην αλληλουχία της ενδιάμεσης περιοχής [132]. Η ενδιάμεση περιοχή αγκυροβολεί την SRPK1 στο κυτταρόπλασμα μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, επιτρέποντας έναν συγκεκριμένο αριθμό μορίων της να μετατοπίζεται στον πυρήνα μέσω πιθανής αλληλεπίδρασης με τα υποστρώματά της. Επομένως η μετατόπιση της SRPK1 πρέπει να συμβαίνει υπό την επίδραση κάποιου ερεθίσματος, έτσι ώστε η φωσφορυλίωση-αποφωσφορυλίωση των παραγόντων μείωσης να βρίσκεται σε ισορροπία ανάλογα με τις απαιτήσεις του κυττάρου.

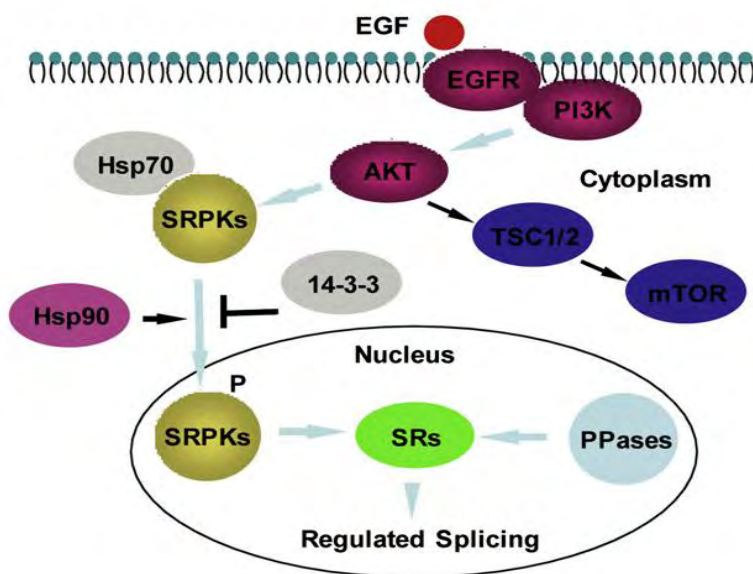
Είναι γνωστό ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK1 αλλάζει ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, καθώς έχει δειχθεί ότι στη μεσόφαση και λίγο πριν τη μίτωση αρχίζει να συσσωρεύεται στον πυρήνα [132]. Η αλληλεπίδραση με συγκεκριμένη ομάδα μοριακών συνοδών πρωτεϊνών αλλά και η επίδραση στρεσογόνων συνθηκών αποτελούν πιθανούς τρόπους μετατόπισής της στον πυρήνα (Εικόνα 12). Συγκεκριμένα, η SRPK1 είναι αγκυροβολημένη στο κυτταρόπλασμα μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης της ενδιάμεσης περιοχής της με την Aha1 και την Hsp40, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την Hsp70 και Hsp90. Παρουσία του αναστολέα της Hsp90, παράγωγο της γελνταμικίνης, 17-AAG, αλλά και υπό την επίδραση οσμωτικού σοκ παρατηρήθηκε μετατόπιση της SRPK1 στον πυρήνα [111].



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των μοριακών συνοδών στην υποκυτταρική κατανομή της SRPK1 στον πυρήνα, στη φωσφορυλίωση των SR πρωτεϊνών και στο μείωμα του πρώιμου-mRNA [111]

Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού του υποδοχέα EGFR παρουσία του προσδέτη του, EGF (Epidermal Growth Factor) προκαλεί μερική μετατόπιση της SRPK1 στον πυρήνα (Εικόνα 13). Συγκεκριμένα έδειξε ότι η ενεργοποιημένη (μέσω του συγκεκριμένου μονοπατιού) κινάση Akt αλληλεπιδρά με την SRPK1 και προκαλεί την αυτοφωσφορυλίωση της στα κατάλοιπα θρεονίνη 326 (Thr326) και σερίνη 587 (Ser587). Παρουσία του EGF η σύνδεση της SRPK1 με την Hsp70 μειώνεται και αυξάνεται η δέσμευσή της με την Hsp90, η οποία μεταφέρει την SRPK1 στον πυρήνα. Ενώ παράλληλα ο παράγοντας 14-3-3 λειτουργεί ως εξισορροπητικό στοιχείο συγκρατώντας την SRPK1 στο κυτταρόπλασμα, αποφεύγοντας έτσι την υπερβολική συσσώρευση της στον πυρήνα [133].

Από πολύ πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν τη σχέση δομής-λειτουργίας της SRPK1, φαίνεται ότι η τοπολογία των δισουλφιδικών δεσμών της μπορεί να είναι καθοριστική για τον εντοπισμό και την λειτουργία της [134].

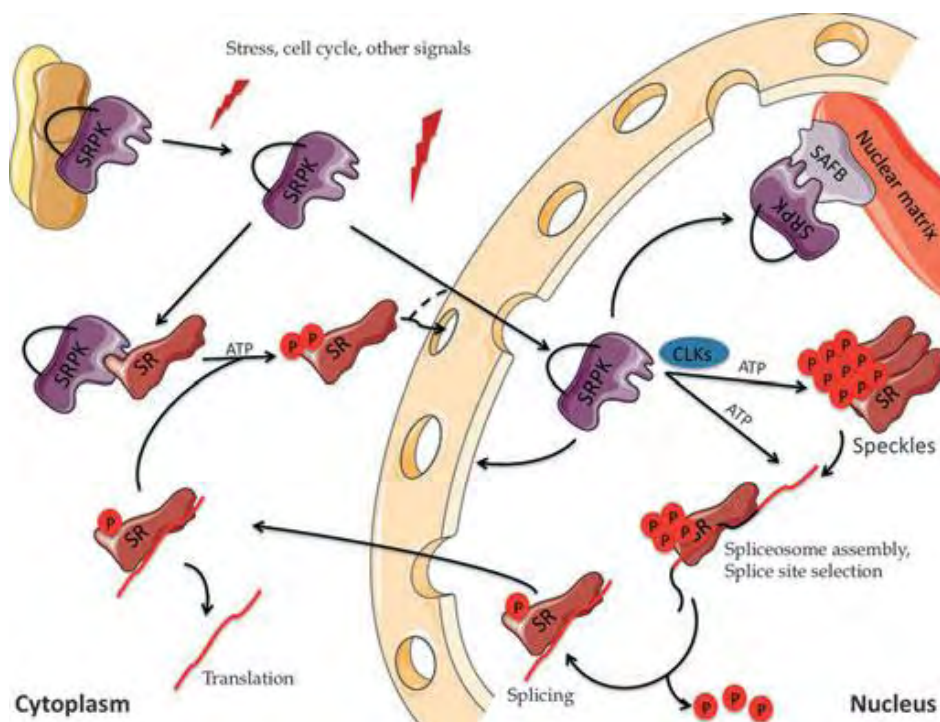


Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού του EGF μέσω του άξονα Akt-SRPK1-SR, που ρυθμίζει την διεργασία του εναλλακτικού ματίσματος στον πυρήνα. [133]

Επίσης, είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση της SRPK1 από την κινάση καζείνης CK2, *in vitro*, στα κατάλοιπα σερίνη 51 (Ser51) και σερίνη 555 (Ser555) φαίνεται να ρυθμίζει τη δράση της. Η φωσφορυλίωση αυτή αυξάνει την ενεργότητα

του ενζύμου περίπου 6 φορές αλλά δεν είναι γνωστό αν συμβαίνει *in vivo* και αν προκαλεί κάποια αλλαγή στον υποκυτταρικό εντοπισμό της [135].

Συνοπτικά στην εικόνα 14, φαίνονται τα ερεθίσματα ενεργοποίησης και οι τρόποι ρύθμισης της SRPK1, στη βασική της λειτουργία, το μάτισμα.

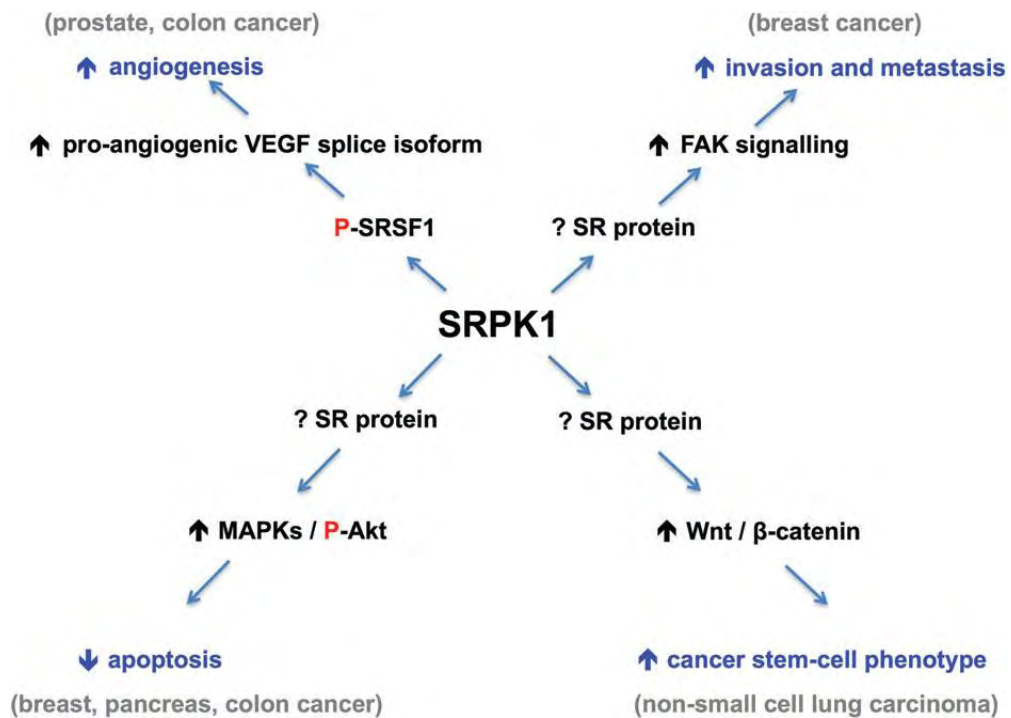


Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης της SRPK1 και της λειτουργίας της στην ωρίμανση του mRNA [99].

A.3.5. SRPK1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η έκφραση της SRPK1 από πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα έχει βρεθεί ιδιαίτερα αυξημένη σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του προστάτη, στον καρκίνο του μαστού, στον καρκίνο του πνεύμονα και στο γλοιώμα [136-138]. Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι υπερεκφράζεται και σε έναν τύπο καρκίνου του πνεύμονα (non-small cell lung carcinoma) [139]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή της SRPK1 έχει αντικαρκινική δράση, και ως εκ τούτου η SRPK1 έχει γίνει ένας νέος υποψήφιος στόχος αντικαρκινικής θεραπείας [140]. Είναι ενδιαφέρον από την άποψη του μοριακού μηχανισμού, ότι η SRPK1 φαίνεται να δρα ετερογενώς, καθώς έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει πληθώρα διαδικασιών σε διάφορες μορφές καρκίνου. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι στον καρκίνο του προστάτη και του παχέος εντέρου επηρεάζει την αγγειογένεση, ενώ στον καρκίνο του μαστού τις διαδικασίες της απόπτωσης [141] και τέλος στον καρκίνο του μαστού έχει συσχετιστεί η έκφρασή

της με την μετάσταση σε συγκεκριμένα όργανα όπως είναι οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος [142]. Συμπερασματικά είναι πιθανό η SRPK1 να ενεργοποιεί διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου, καταλήγοντας έτσι να επηρεάζονται διάφορες κυτταρικές διεργασίες (Εικόνα 15). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να συμβαίνει λόγω της φωσφορυλίωσης διαφορετικών πρωτεϊνών SR, η οποία μπορεί να είναι ιστοειδική και κυτταροειδική σε κάθε τύπο καρκίνου [139].



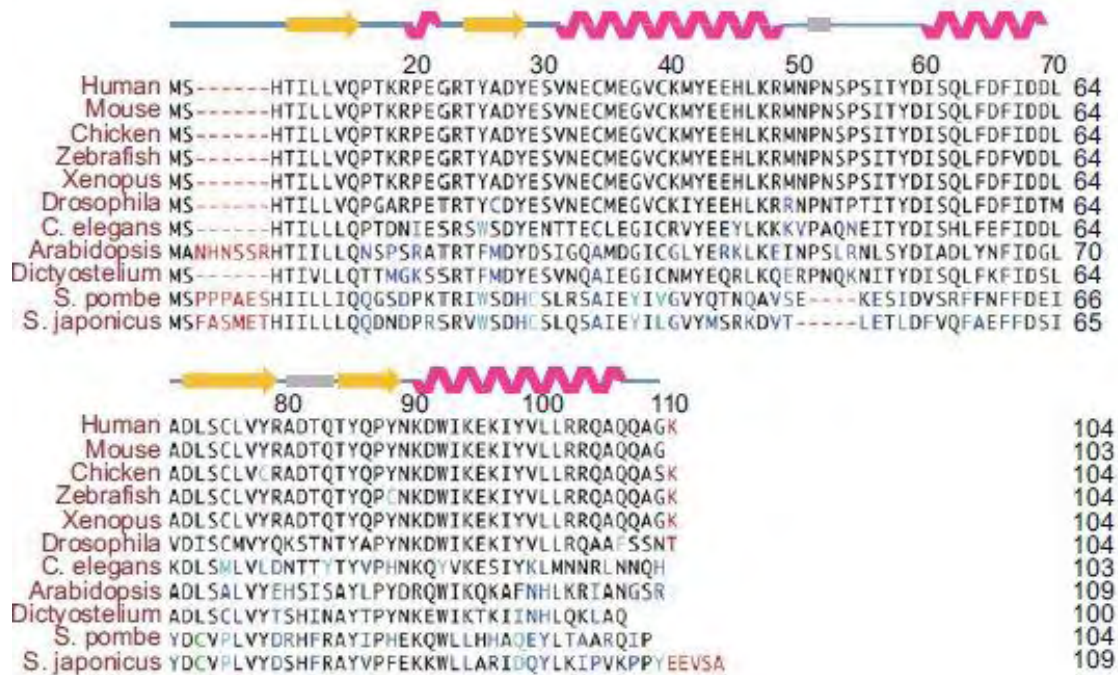
Εικόνα 15: Απεικόνιση των πλειοτροπικών επιδράσεων της SRPK1 σε διάφορους καρκίνους. Ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου η SRPK1 ρυθμίζει διαφορετικές κυτταρικές ιδιότητες. P δηλώνει φωσφορυλίωση.

A.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ERH (ENHANCER OF RUDIMENTARY HOMOLOGUE)

A.4.1. ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ERH

Η πρωτεΐνη ERH ανακαλύφθηκε πριν είκοσι περίπου χρόνια από την εργαστηριακή ομάδα του Dr. Tsubota, στην *Drosophila*. Συγκεκριμένα, το γονίδιο, *e(r)*, (*enhancer of rudimentary*), το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ER, κλωνοποιήθηκε σε μια προσπάθεια απομόνωσης γονιδίων που αλληλεπιδρούν με το γονίδιο *r*, (*rudimentary*), μέσω της διαδικασίας της γενετικής διαλογής φαινοτύπων στη *Drosophila melanogaster*. Το γονίδιο *r* κωδικοποιεί τα πρώτα τρία ένζυμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού των πυριμιδινών. Μεταλλάξεις των γονιδίων *r* έχουν χαρακτηριστικό φαινότυπο κολοβών φτερών, ενώ μετάλλαξη του *e(r)* ενισχύει κι άλλο τον φαινότυπο αυτό, υποδηλώνοντας ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης των πυριμιδινών [143].

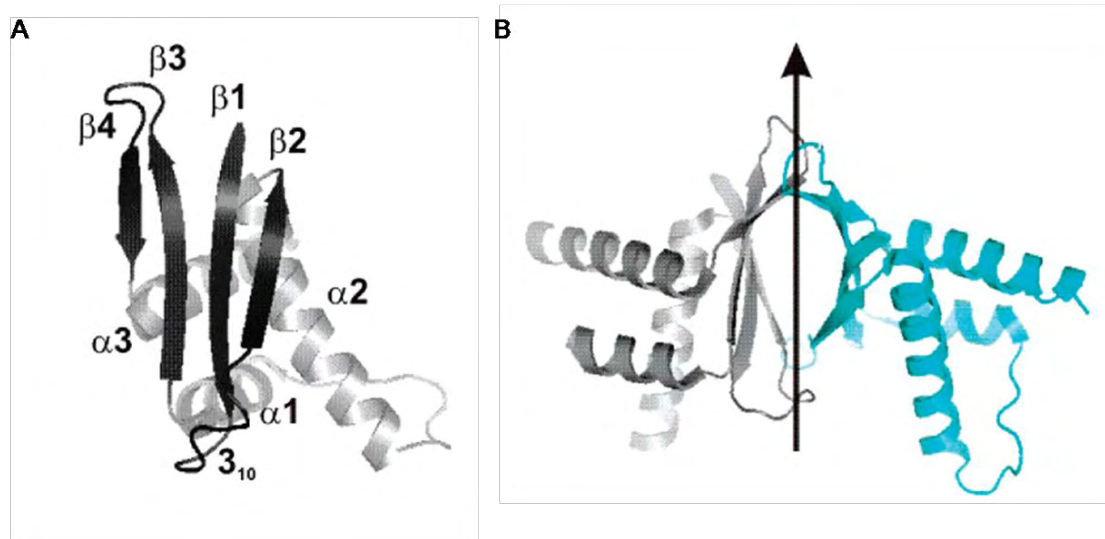
Τα ομόλογα του ER (ERHs) είναι εξαιρετικά συντηρημένες πρωτεΐνες μεταξύ των σπονδυλωτών, ασπόνδυλων και φυτών (Εικόνα 16). Εξελικτικά ανιχνεύονται στον σχιζοσακχαρομύκητα συμπεριλαμβανομένου του *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) και του *Schizosaccharomyces japonicas*, όχι όμως στον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* [144]. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη ERH παρουσιάζει 100% ομολογία με την πρωτεΐνη του *Xenopus* και του ποντικού, ενώ παρουσιάζει 80% με αυτήν του *Dyctyostelium* και 74% με του φυτού *Arabidopsis*. Αυτή η υψηλού βαθμού συντήρηση μεταξύ των ειδών δηλώνει έμμεσα την εμπλοκή της σε απαραίτητες λειτουργίες του κυττάρου, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. [145-148]. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης ERH είναι το μικρό της μοριακό βάρος, μόλις 12kDa (104 αμινοξέα).



Εικόνα 16: Απεικόνιση της ομόλογης αλληλουχίας της πρωτεΐνης ERH μεταξύ των ειδών. Η δευτεροταγής δομή, των α-ελίκων και των β-πτυχώσεων, η οποία αντιστοιχεί στην ανθρώπινη πρωτεΐνη ERH εμφανίζεται από πάνω [149].

A.4.2. ΔΟΜΗ ΤΗΣ ERH

Η δομή της ERH αναλύθηκε πριν 10 χρόνια με κρυσταλλογραφία. Πρόκειται για μια πρωτότυπη τριτοταγή δομή, η οποία δεν έχει απαντηθεί σε άλλη πρωτεΐνη. Αποτελείται από 4 αντι-παράλληλες αλυσίδες, οι οποίες δημιουργούν β-πτυχωτή επιφάνεια με 3 έλικες τοποθετημένες σε μια πλευρά της επιφάνειάς της (Εικόνα 17). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις βάσει δομικών και πειραματικών δεδομένων για τη λειτουργία της ERH ως διμερές [145, 150-152]. Ο διμερισμός των δύο μονομερών μορίων ERH φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω των β-πτυχώσεων [150].



Εικόνα 17: Αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της ERH [149]. (A) Απεικόνιση του μονομερούς της ERH. (B) Απεικόνιση του διμερούς της ERH, τα μονομερή (γαλάζιο και μαύρο) συνδέονται μέσω των β-πτυχώσεων [150].

A.4.3. ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ERH

Από τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, λίγα είναι γνωστά για την ρύθμιση της ERH μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων. Δυο είναι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που έχουν αναφερθεί: α) η φωσφορυλίωση δύο καταλοίπων, της ομόλογης ανθρώπινης ERH, στην *Drosophila* και β) η πιθανή ουβικιτινίωση δύο καταλοίπων της, μέσω πρόβλεψης από προγράμματα βιοπληροφορικής.

A.4.3.1. Φωσφορυλίωση

Από δοκιμές φωσφορυλίωσης *in vitro* δύο είναι οι θέσεις φωσφορυλίωσης της ERH στην *Drosophila* από την κινάση της καζεΐνης 2 (Casein Kinase 2, CK2). Το πρώτο κατάλοιπο είναι η θρεονίνη 18 (T18) και το δεύτερο είναι η σερίνη 24 (S24). Το ερώτημα αν η CK2 φωσφορυλιώνει την ERH σε κύτταρα θηλαστικών παραμένει να διαλευκανθεί, αν και δεδομένα φασματομετρίας μάζας έχουν αναδείξει την S24 ως την επικρατέστερη θέση φωσφορυλίωσης στην ανθρώπινη ERH. Τέλος, τα κατάλοιπα T18 και S24 φαίνεται με βάση την κρυσταλλική δομή να είναι εκτεθειμένα στην εξωτερική πλευρά, επιτρέποντας την πρόσβαση για φωσφορυλίωση από την κινάση CK2 [146, 149, 153].

A.4.3.2. Ουβικιτινιλίωση

Τα δύο πιθανά κατάλοιπα ουβικιτινιλίωσης που έχουν βρεθεί είναι η λυσίνη 41 (K41) και η λυσίνη 90 (K90). Τίποτα όμως δεν έχει αναφερθεί ή έχει μελετηθεί περαιτέρω [149].

A.4.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ ERH

Ο ρόλος της ERH στις διεργασίες του κυττάρου έχει αρχίσει να ανακαλύπτεται τα τελευταία χρόνια. Αρχικά, φαινόταν να εμπλέκεται μέσω των αλληλεπιδράσεων της στην μεταγραφή. Τα τελευταία όμως χρόνια έχουν βρεθεί νέοι ρόλοι που την εμπλέκουν στο μάτισμα, στον κυτταρικό κύκλο και στο DDR, οι οποίοι φαίνεται να είναι και οι επικρατέστεροι.

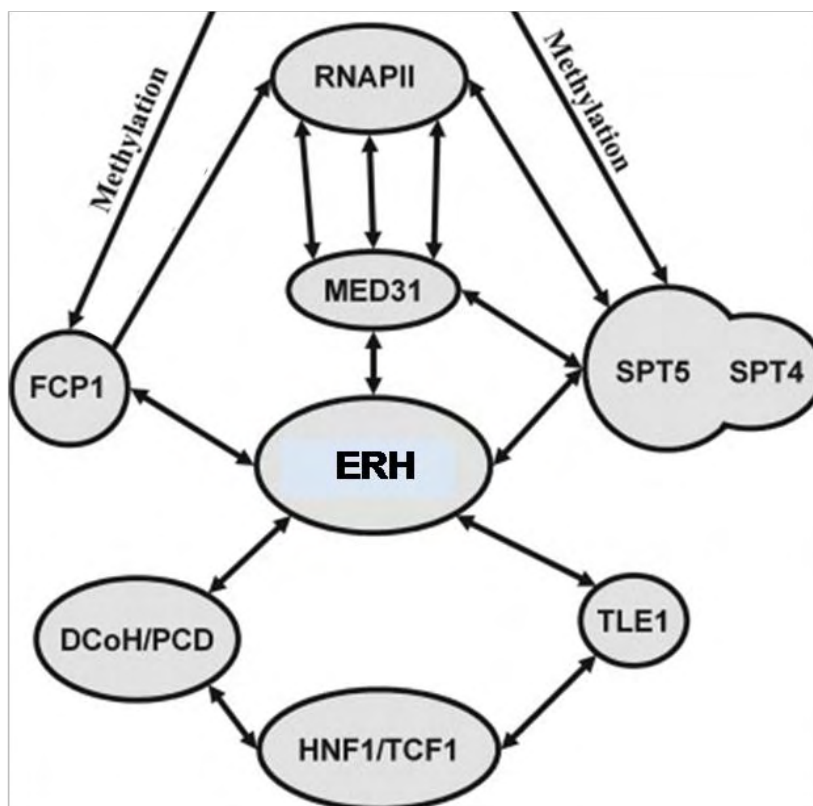
A.4.4.1. Ο ρόλος της ERH στη μεταγραφή

Η ERH για πρώτη φορά βρέθηκε να εμπλέκεται στην μεταγραφή από την ομάδα του Dr. Rogge von Strandmann. Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι η πρωτεΐνη ERH του Xenopus (XERH), αλληλεπιδρά με τον συν-ενεργοποιητή του ιστοειδικού μεταγραφικού παράγοντα HNF-1 (Hepatocyte Nuclear Factor-1), pterin-4a-carbinolamine dehydratase (DCoH/PCD) καταστέλλοντας την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του [148] (Εικόνα 18). Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η ERH λειτουργεί ως γενικός καταστολέας της μεταγραφής, έχοντας κυτταροειδική δράση.

Επόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα δύο ξεχωριστών ερευνητικών ομάδων, έδειξαν ότι η ERH συμβάλλει στην μεταγραφική επιμήκυνση. Συγκεκριμένα, η ERH βρέθηκε να αλληλεπιδρά με δυο παράγοντες επιμήκυνσης της μεταγραφής. Ο πρώτος είναι η φωσφατάση της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II (FCP1), και ο δεύτερος είναι ο μεταγραφικός καταστολέας SPT5 [148, 154, 155]. Οι δύο παράγοντες αποτελούν υποστρώματα της μεθυλοτρανσφεράσης PRMT5 και η ERH έχει βρεθεί να συγκατακρημνίζεται με αυτές τις πρωτεΐνες ως σύμπλοκο. Ωστόσο, δεν είναι σαφές αν η σύνδεση της επηρεάζει τη λειτουργία των FCP1 και SPT5 ή αν η ERH μέσω της αλληλεπίδρασης, ρυθμίζει άμεσα την δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης II (Εικόνα 18).

Τέλος, μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων μεγάλης κλίμακας στο σακχαρομύκητα η ERH βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη MED31, η οποία αποτελεί υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II, καθώς και με έναν παράγοντα της

πυρηνικής μήτρας, τον TLE1, ο οποίος έχει αναφερθεί ως καταστολέας της μεταγραφής [151, 156, 157] (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ERH που σχετίζονται με τον ρόλο της στην μεταγραφή [151].

A.4.4.2. Ο ρόλος της ERH στον κυτταρικό κύκλο

Πρώτη ένδειξη για την εμπλοκή της ERH στον κυτταρικό κύκλο αποτέλεσε η εύρεση της ρύθμισής της από την κινάση CKII, η οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σ' αυτή την λειτουργία.

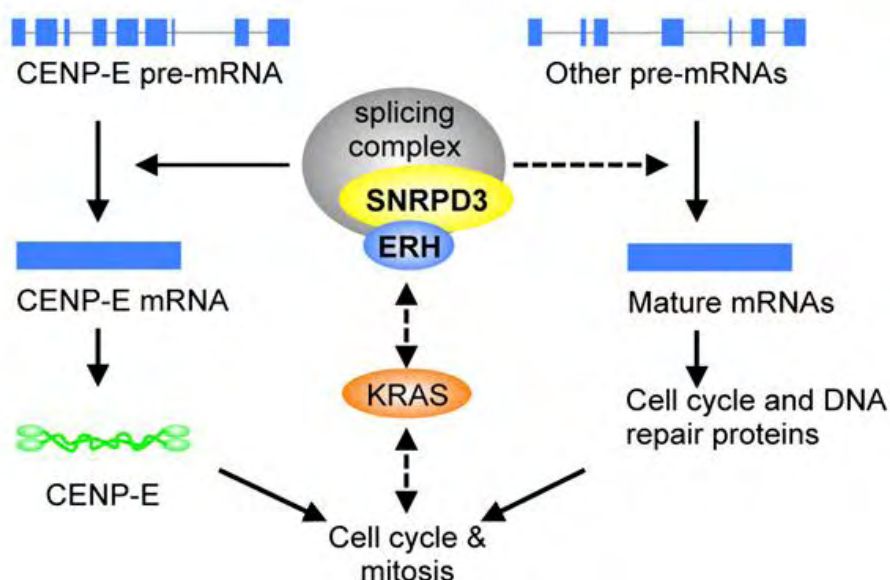
Σε επόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα η ERH βρέθηκε να αλληλεπιδρά *in vitro* με τον παράγοντα PDIP46/SKAR και την Ciz1 [158, 159]. Ο παράγοντας PDIP46/SKAR αλληλεπιδρά με την υπομονάδα p50 της πολυμεράσης δ του DNA και την ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 κινάση 1 (S6K1) και είναι παράγοντας του κυτταρικού κύκλου, ενώ η Ciz1 είναι μια πρωτεΐνη που κατέχει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο και στην αντιγραφή του DNA μέσω αλληλεπίδρασής της με τον αναστολέα από κυκλίνες εξαρτώμενων κινασών p21 (Cyclin-dependent kinase, CDK p21^{cip/waf1}) και τις κυκλίνες E και A [160, 161].

Σε πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα από δυο ανεξάρτητες εργαστηριακές ομάδες ανακαλύφθηκε ότι στα κύτταρα των θηλαστικών, η ERH είναι απαραίτητη για το σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης [162, 163]. Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση της ERH οδήγησε στην συγκράτηση των κυττάρων στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου και στη μη σωστή συγκρότηση των χρωμοσωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτό οφείλεται στη μείωση των επιπέδων των mRNA και της έκφρασης της πρωτεΐνης CENP-E, καθώς η αποσίωπηση της ERH δεν φάνηκε να επηρεάζει άλλες μιτωτικές πρωτεΐνες. Η CENP-E είναι μια κινεσίνη πολύ σημαντική για τη σωστή κίνηση των χρωμοσωμάτων και την επιμήκυνση της ατράκτου κατά τη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου. Τέλος, η ERH φαίνεται να επηρεάζει και άλλα γονίδια του κυτταρικού κύκλου αλλά και της απόκρισης του κυττάρου σε βλάβες του DNA [163]. Συνοψίζοντας, τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η ERH απαιτείται για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και ειδικότερα για τον σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

A.4.4.3. Ο ρόλος της ERH στο μάτισμα

Για τον ρόλο της ERH στο μάτισμα τίποτα δεν ήταν γνωστό, μέχρι που η ερευνητική ομάδα που συσχέτισε την ERH με την CENP-E βρήκε ότι η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της CENP-E, οφείλεται στο ελαττωματικό μάτισμα των mRNA της (Εικόνα 19). Αρχικά, με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης απέτυχαν να εντοπίσουν την ERH στον υποκινητή του γονιδίου της CENP-E, συμπεραίνοντας ότι η ρύθμισή της δεν συμβαίνει στο επίπεδο της μεταγραφής. Στη συνέχεια, με πειράματα SILAC (Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture) ταυτοποίησαν την πρωτεΐνη small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 (SNRPD3), η οποία είναι υπομονάδα του συμπλόκου Sm πρωτεϊνών, ως μια νέα πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με την ERH. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι η ERH δεσμεύεται στους βασικούς παράγοντες ματίσματος, μέσω αλληλεπιδράσής της με το σύμπλοκο Sm. Τέλος συνδυάζοντας αυτά τα δύο ευρήματα και εξετάζοντας το εναλλακτικό μάτισμα της CENP-E, αποσιωπώντας είτε την ERH είτε την SNRPD3 έδειξαν ότι η ERH ελέγχει το εναλλακτικό μάτισμα της CENP-E, μέσω αλληλεπιδράσής της με την SNRPD3 [163]. Τέλος, η ίδια ομάδα διαπίστωσε ότι η αποσιώπηση της ERH επηρεάζει το μάτισμα ενός μικρού αριθμού γονιδίων, που

εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και μια πληθώρα γονιδίων που σχετίζονται με το DDR σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος [164]. Την εμπλοκή της ERH στο DDR, μέσω της ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος mRNA γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση του κυττάρου σε βλάβες του DNA, επιβεβαίωσε και δεύτερη ερευνητική ομάδα [165].



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας της ERH στο μάτισμα του mRNA [163]. Η ERH φαίνεται να ελέγχει το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA της CENP-E και πιθανώς και άλλων γονίδια του κυτταρικού κύκλου και του DDR. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν λειτουργικές συνδέσεις με ασαφή μοριακά βήματα που χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση [163].

A.4.5. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ERH

Το γονίδιο της ανθρώπινης ERH βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14q24.1. Η ERH εκφράζεται συνεχώς σε όλους τους ιστούς και ο κυτταρικός εντοπισμός της είναι κυτταροπλασματικός αλλά και πυρηνικός, αποκλειόμενος από τους πυρηνίσκους. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η ERH διανέμεται σε όλο το κύτταρο, αλλά εξαιρείται από τη χρωματίνη [158, 159, 163, 166]. Από την ερευνητική ομάδα του Dr. Kozlowski, έγινε μια προσπάθεια συσχέτισης της δομής με τη λειτουργία της ERH και με τον κυτταρικό της εντοπισμό. Έδειξαν με σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων ότι ο υποπυρηνικός εντοπισμός της ERH μεταβάλλεται μεταξύ συγκεκριμένων πυρηνικών δομών (πυρηνικά κοκκία ή σημεία αντιγραφής) ανάλογα με την πρωτεΐνη παρτενέρ [166]. Από την ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της, δεν φάνηκε να περιέχει κανένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Σε πολύ πρόσφατα

βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι τα 24 πρώτα αμινοξικά κατάλοιπά της είναι υπεύθυνα για τον πυρηνικό εντοπισμό της [167]. Επίσης έδειξαν ότι η ERH της *Drosophila* αλληλεπιδρά με την RPS3 και την RPL19, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και το DDR, μέσω αυτών των 24 αμινοξέων. Συμπερασματικά, προτείνουν ότι ο εντοπισμός της ERH στον πυρήνα διαμεσολαβείται από την δέσμευσή της σε πρωτεΐνες που διαθέτουν σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν σημαντικές πυρηνικές λειτουργίες της ERH.

A.4.6. ERH ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Τα επίπεδα έκφρασης της ERH έχουν βρεθεί αυξημένα σε πολλά είδη καρκίνων. Βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι η ERH είναι υπερεκφρασμένη σε κακοήθεις όγκους του μαστού αλλά και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε καρκίνους των ωοθηκών [168]. Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι η ERH κατέχει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση καρκινικών κυττάρων παγκρέατος, μαστού και ωοθηκών [169]. Τέλος, η έκφραση της ERH έχει βρεθεί ιδιαίτερος αυξημένη σε καρκινικούς ιστούς ηπατοκαρκινώματος [164]. Συνοπτικά, η ERH θα μπορούσε να είναι ένας πολλά υποσχόμενος προγνωστικό δείκτης ή/και φαρμακευτικός στόχος για τον καρκίνο.

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο παράγοντας SAFB1 είναι μία πρωτεΐνη της πυρηνικής μήτρας που ανακαλύφθηκε πριν από περίπου είκοσι χρόνια ως πρωτεΐνη προσδεδεμένη σε στοιχεία S/MAR (Scaffold/Matrix Attachment Region) του DNA, τα οποία αποτελούν δομικά στοιχεία για την οργάνωση της χρωματίνης σε μια ανώτερη τάξη δομής. Αποτελεί μέλος μιας οικογένειας τριών πυρηνικών πρωτεϊνών και είναι η καλύτερα μελετημένη. Ο SAFB1 και ο εξελικτικά συγγενής του SAFB2, έχουν μεταξύ τους ομολογία 74% και αποτελούν αντικείμενο έρευνας της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Αποτελούνται από διακριτές δομικές επικράτειες όπως είναι η περιοχή πρόσδεσης στο DNA, SAF-box στο αμινοτελικό τους άκρο, η περιοχή δέσμευσης με το RNA, RRM, ενώ στο καρβοξυτελικό τους άκρο έχουν μια περιοχή πλούσια σε επαναλήψεις Arg-Glu (R/E) που ακολουθείται από μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα Arg και Gly (R, G).

Οι παράγοντες SAFB και πιο συγκεκριμένα ο SAFB1 έχει χαρακτηριστεί ως μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη. Μέσω πρόσδεσης στα στοιχεία S/MAR, με το αμινοτελικό του άκρο αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην οργάνωσή της και άρα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, ενώ με το καρβοξυτελικό άκρο αλληλεπιδρά με πληθώρα πρωτεϊνών, επηρεάζοντας βασικές κυτταρικές λειτουργίες.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εμβάθυνση και η καλύτερη κατανόηση των λειτουργιών των SAFB1 και SAFB2 μέσω δύο βασικών στόχων. Πρώτο στόχο αποτέλεσε η διερεύνηση των ιδιοτήτων των SAFB1/2 υπό την επίδραση στρεσογόνων συνθηκών, καθώς είναι γνωστό ότι κάποιες σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Δεύτερο στόχο αποτέλεσε η διερεύνηση των λειτουργιών των SAFB μέσω δύο αλληλεπιδράσεων τους που συμβαίνουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο και ήταν υπό μελέτη στο Εργαστήριο Βιοχημείας. Η πρώτη αλληλεπίδραση αφορούσε την κινάση SRPK1, της οποίας η αλληλεπίδραση με τους SAFB1/2 έχει βρεθεί ότι καταστέλλει τη δράση της. Μελετήθηκε καταρχήν δομικά με σκοπό να βρεθεί η περιοχή της SRPK1 που αλληλεπιδρά με τον SAFB1, αλλά και λειτουργικά, με σκοπό να βρεθούν συνθήκες όπου τα δύο μόρια SAFB και SRPK1, τα οποία κατά τ' άλλα έχουν διαφορετικές υποκυτταρικές κατανομές, μπορεί να βρίσκονται σε κοινά σύμπλοκα. Η δεύτερη αλληλεπίδραση που μελετήθηκε ήταν με την πρωτεΐνη ERH, μια καθόλου καλά χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη, της οποίας η

αλληλεπίδραση είχε μόλις ανιχνευθεί στο εργαστήριο Βιοχημείας μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων στον *Saccharomyces Cerevisiae*. Σκοπός ήταν να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση σε κύτταρα θηλαστικών, να διευκρινιστεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός των συμπλόκων SAFB-ERH, καθώς και να ερμηνευθεί η βιολογική σημασία των αλληλεπιδράσεων, με απώτερο στόχο την διερεύνηση των μηχανισμών δράσης των SAFB1 και SAFB2.

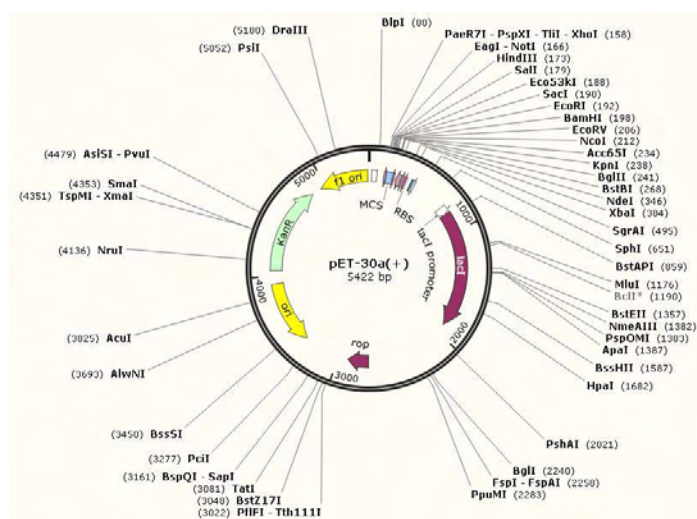
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Γ.1.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

➤ pET-30a (Novagen)

Χρησιμοποιείται για την υπερέκφραση κλωνοποιημένων πρωτεϊνών σε προκαρυωτικά κύτταρα, σε σύντηξη στο αμινοτελικό τους άκρο με έξι κατάλοιπα ιστιδινών. Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Εικόνα 20). Στον φορέα αυτό κλωνοποιήθηκαν τα παρακάτω cDNA της SRPK1: η πλήρους μεγέθους SRPK1 (1-655), το τμήμα 1-256, το τμήμα 256-655 και τέλος το τμήμα 1-256,473-655.

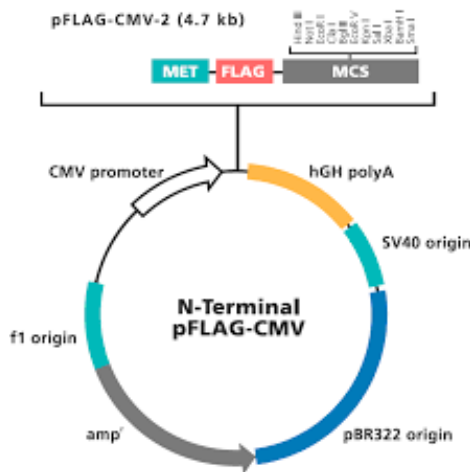


Εικόνα 20: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pET-30a

Ο πλασμιδιακός φορέας pET-24b έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με τον pET-30a. Το πλασμίδιο pET24b-NHis-ERH (1-104) παραχωρήθηκε ευγενικά από τον Dr Robert B. Rose [150].

➤ pFlag-CMVTM-2 (Sigma)

Φέρει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV, παρέχοντας τη δυνατότητα έκφρασης πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Επιτρέπει την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων ως πρωτεΐνες σύντηξης στο αμινοτελικό τους άκρο με την ακολουθία Met-Flag (Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη (Εικόνα 21). Στον φορέα αυτό κλωνοποιήθηκε το cDNA της πρωτεΐνης ERH.

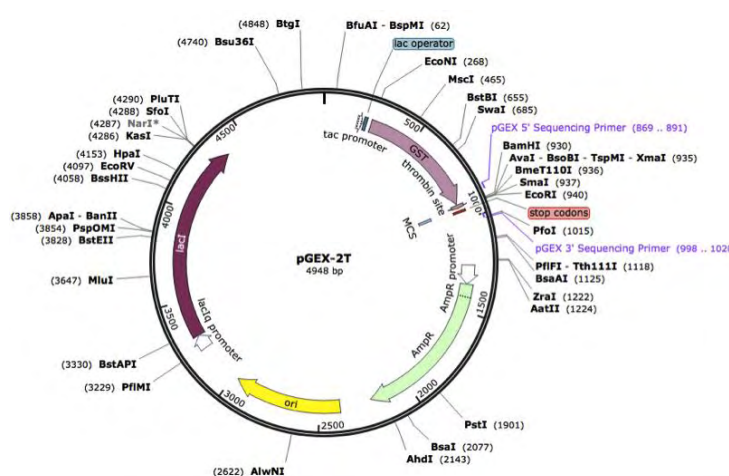


Εικόνα 21: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pFlag-CMVTM-2

➤ pGEX-2T (Amersham Pharmacia)

Περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί την μεταφορά της γλουταθειόνης (GST) στο 5' άκρο της περιοχής πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS), παρέχοντας τη δυνατότητα υπερέκφρασης των κλωνοποιημένων πρωτεϊνών σε σύντηξη με την GST, σε προκαρυωτικά κύτταρα (Εικόνα 22).

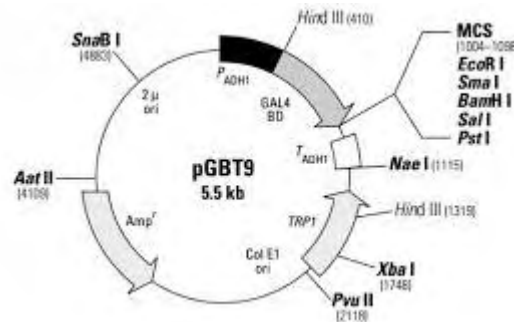
Οι πλασμιδιακοί φορείς pGEX-2T-SRPK1, pGEX-2T-ΔSSRPK1, pGEX-2T/LBRNt (1-205) [62] μας παραχωρήθηκαν ευγενικά από την κα Νικολακάκη Ελένη (Αναπ. Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΑΠΘ). Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-2TK/SAFB1C (αμινοξέα 623-915) [46], παραχωρήθηκε ευγενικά από την Δρ Steffi Oesterreich. Οι πλασμιδιακοί φορείς pGEX-4T1/SAFB1CΔRE (710-915) και pGEX-4T1/SAFB2C (641-915) κατασκευάστηκαν σε προηγούμενη εργασία του Εργαστηρίου της Βιοχημείας [63].



Εικόνα 22: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pGEX-2T.

➤ pGBT9 (Clontech)

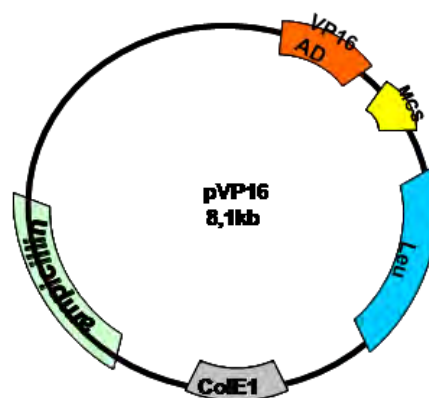
Περιέχει την περιοχή σύνδεσης με το DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 σε συνέχεια με την MCS. Προσδίδει με μετασχηματισμό του σε κύτταρα σακχαρομύκητα πρωτοτροφία για το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Trp) (Εικόνα 23). Στον φορέα αυτό είναι κλωνοποιημένο το τμήμα 550-931 της πρωτεΐνης του SAFB1 αρουραίου rSAF-B-PC, καθώς και το τμήμα 549-953 της ανθρώπινης πρωτεΐνης του SAFB2.



Εικόνα 23: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pGBT9.

➤ pVP16

Περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα VP16 σε συνέχεια με την περιοχή MCS. Προσδίδει με μετασχηματισμό του σε κύτταρα σακχαρομύκητα πρωτοτροφία για το αμινοξύ λευκίνη (Leu) (Εικόνα 24). Στον φορέα αυτό είναι κλωνοποιημένες οι δυο λείες της ERH μεγέθους 1-100 και 1-104.

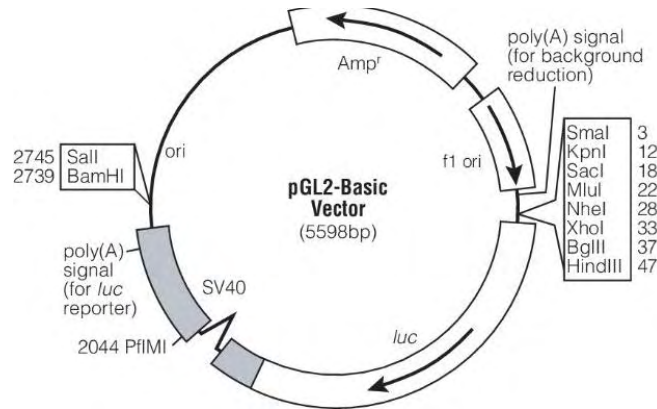


Εικόνα 24: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pVP16

➤ pGL2-3xERE-TATA-Luc

Φέρει τον υποκινητή του ιού SV40 και περιέχει 3 επαναλήψεις των στοιχείων απόκρισης σε οιστρογόνα (Estrogen Response Elements), στη θέση

της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BglII. Φέρει τα χαρακτηριστικά του πλασμιδιακού φορέα pGL2-Basic (Εικόνα 25). Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα των οιστρογόνων α (ER α). Παραχωρήθηκε από την κα Π. Μουτσάτσου, Καθηγήτρια, Ιατρικής Σχολής Αθηνών.



Εικόνα 25: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pGL2-Basic.

Οι πλασμιδιακοί φορείς pEGFP-pcDNA3/SAFB1 και pEGFP-pcDNA3/SAFB2 (πλήρους μεγέθους) έχουν παραχωρηθεί ευγενικά από τον Δρ Elliot [61].

Γ.1.2. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

➤ TOP10 (InVitrogen)

Χρησιμοποιούνται για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.

➤ BL21 RIL (Stratagene)

Χρησιμοποιούνται για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη χλωροφαινικόλη. Επιτρέπουν την έκφραση υψηλών επιπέδων tRNA που είναι σπάνια στα βακτήρια (αργινίνης, λευκίνης και ισολευκίνης) μέσω του πλασμιδίου RIL.

Γ.1.3. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕ PCR

Στην παρούσα εργασία ενισχύθηκε το αμινοτελικό άκρο της SRPK1, Nt-SRPK1 (1-256) και το καρβοξυτελικό άκρο με την ενδιάμεση περιοχή της SRPK1, SCt-SRPK1 (256-655).

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

-νοηματικός εκκινητής(sense primer):

5-NtSRPK1:[5'-TTGAATTCATGGAGCGGAAAGTG-3']

-αντινοηματικός εκκινητής (antisense primer):

3-NtSRPK1:[5'-TTGTCTGACTGGGGAGCAGTACTG-3']

-νοηματικός εκκινητής(sense primer):

spacerctSRPK1F:[5'- TT-GAA-TTC-CCA-GCT-GAC-AAA-ATG-TCA -3']

-αντινοηματικός εκκινητής (antisense primer):

spacerctSRPK1R:[5'- T-TGT-CGA-CGA-GTT-AAG-CCA-AGG-GTG -3']

Η ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων έγινε στην εταιρεία MWG.

Για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών αρχικά χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση, ενώ για την τελική ενίσχυση των τμημάτων χρησιμοποιήθηκε η Vent πολυμεράση στις ίδιες συνθήκες, λόγω της μεγαλύτερης πιστότητας και του μικρότερου ποσοστού λάθους στην προσθήκη νουκλεοτιδίων.

Το μίγμα της αντίδρασης περιέχει:

- 100ng εκμαγείο DNA
- 1X Thermopol Buffer
- 10mM από κάθε dNTP
- 2 unit Vent ή Taq Πολυμεράση
- 25pmoles/μl νοηματικού εκκινητή
- 25pmoles/μl αντινοηματικού εκκινητή
- δις απεσταγμένο αποστειρωμένο H₂O (ddH₂O) συμπληρώνεται, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μl

Οι συνθήκες αντίδρασης ήταν:

- 5 min → 94°C Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 30sec → 94°C Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 30 sec → 52°C Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση

- 1 min → 72°C Επιμήκυνση

Αριθμός κύκλων 30

- 5min → 72°C Τελική επιμήκυνση

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη βοήθεια του PCR clean kit της εταιρίας Qiagen ακολουθώντας την πειραματική διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Γ.1.4. ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Τη διαδικασία πέψης του DNA σε μικρότερα τμήματα πραγματοποιούν τα ένζυμα, περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και ανάλογα με την ενεργότητα (Unit/μl) τους καθορίζεται και η ποσότητα που χρησιμοποιείται σε μια αντίδραση πέψης.

Η πέψη με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκε:

- 1) για τον έλεγχο του μεγέθους των κομματιών DNA που κλωνοποιήθηκαν και τον σωστό προσανατολισμό τους
 - 2) για την απομόνωση συγκεκριμένων κομματιών που προορίζονται για κλωνοποίηση.
- 1 unit ενζύμου αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1μg DNA σε όγκο αντίδρασης 50μl σε μια ώρα και σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Αντίδραση πέψης:

- 1μg πλασμιδιακού DNA
- 1 Unit του αντίστοιχου ενζύμου
- 1X κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που ορίζεται για κάθε ένζυμο από την εταιρεία παρασκευής.
- Αποστειρωμένο ddH₂O συμπληρώνεται, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μl.
- Η επώαση γίνεται για τουλάχιστον 1-2 ώρες στην καθορισμένη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία.

Γ.1.5. ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Η αποφωσφορυλίωση γίνεται με τη χρήση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης CIP (New England BioLabs), με στόχο την αφαίρεση της 5'

φωσφορικής ομάδας από μονόκλωνα ή δίκλωνα τμήματα DNA (κυρίως πλασμίδια) μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού, εμποδίζοντας την επανασύνδεσή του.

Πειραματική διαδικασία:

- Προσθέτουμε στο μίγμα της πέψης των 20μl, 30 Units αλκαλικής φωσφατάσης (CIP) 10000 Unit/ml (New England Biolabs).
- Επώαζουμε για 1 ώρα στους 37⁰C.

Απενεργοποιούμε τη CIP με επώαση στους 75⁰C, 10 λεπτά.

Γ.1.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Με την ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και ο καθαρισμός τους. Η πιο συνήθης συγκέντρωση αγαρόζης που χρησιμοποιείται είναι η 1% καθώς είναι ιδανική για το διαχωρισμό κομματιών DNA από 500 βάσεις έως 7000 βάσεις.

Παρασκευή πηκτής 1%:

- Προστίθεται 1% αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (4 mM Tris-οξικό, 1 mM EDTA).
- Ακολουθεί θέρμανση στους 100⁰ C,
- Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (0,5μg/ml), όταν η θερμοκρασία του διαλύματος μειωθεί.
- Αποχύνεται το διάλυμα αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- 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 τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής και η ηλεκτροφορούνται σε 100 V για 20 λεπτά τουλάχιστον.

Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και την ιδιότητα να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα. Με αυτό τον τρόπο ανιχνεύονται τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή.

Γ.1.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen. Η διαδικασία που ακολουθείται

είναι αυτή που προτείνεται από την εταιρία, χρησιμοποιώντας όλα τα αντιδραστήρια που παρέχει το kit.

Πειραματική διαδικασία:

- Αφαιρείται το κομμάτι αγαρόζης που περιέχει το προς απομόνωση DNA από την πηκτή με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Θερμαίνεται μετά από προσθήκη διαλύματος QG στους 50⁰ C για 10 λεπτά, προκειμένου να απομονωθεί το DNA.
- Προστίθεται ισοπροπανόλη και το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη (silica gel) στην οποία το DNA δεσμεύεται κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας και pH 7,5.
- Πλένεται η στήλη με διάλυμα PE για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων συστατικών στη στήλη.
- Εκλύεται το δεσμευμένο DNA στη στήλη με 30μl αποστειρωμένο ddH₂O σε pH 8.

Γ.1.8. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ

Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται με την DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4, η οποία καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3' υδροξυλικών και 5' φωσφορικών άκρων. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η σύνδεση μεταξύ 2 τμημάτων δίκλωνου DNA με την προϋπόθεση ότι έχουν συμπληρωματικά ή τυφλά 3' και 5' άκρα.

Αντίδραση λιγάσης:

- Προσθήκη πλασμιδιακού φορέος και ενθέματος σε μοριακή αναλογία 1/1, 1/3 ή 1/5
- 2,5 Units λιγάσης T4 (5 Unit/μl, New England Biolabs)
- 1 X ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης
- Αποστειρωμένο ddH₂O, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μl.

Το μίγμα επωάζεται ολονύχτια στους 16⁰C.

Γ.1.9. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ (Competent) ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

- Εμβολιάζουμε 5ml θρεπτικού υλικού TYM παρουσία αντιβιοτικού επιλογής, με μια αποικία από πιάτο ή από διάλυμα αποθήκευσης βακτηρίων με γλυκερόλη (glycerol stock) που βρίσκεται στους -80⁰C.

- Επωάζουμε, ολονύχτια, στους 37⁰C, υπό ανάδευση.
- Παίρνουμε 30ml από την O/N καλλιέργεια και τα προσθέτουμε σε 3ml φρέσκου TYM θρεπτικού υλικού (αραίωση 1:100), παρουσία αντιβιοτικού και τα αφήνουμε να επωαστούν με ανάδευση στους 37⁰C για 2-3 ώρες.
- Προσθέτουμε 250ml από την καλλιέργεια σε 50ml TYM χωρίς αντιβιοτικά (αραίωση 1:250) και επωάζουμε με ανάδευση στους 37⁰C μέχρι να μεγαλώσουν και να φτάσουν OD_{600nm}=0,350-0,400.
- Φυγοκεντρούμε στα 3000 rpm για 5 λεπτά, στους 4⁰C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και το ίζημα των βακτηρίων το επαναιωρούμε σε 25ml (μισό του αρχικού όγκου καλλιέργειας) TFB-I διάλυμα.
- Επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και το ίζημα των βακτηρίων το επαναιωρούμε σε 2ml (1:25 του αρχικού όγκου καλλιέργειας) TFB-II διάλυμα.
- Επωάζουμε για 60 λεπτά στον πάγο.
- Προχωρούμε στο μετασχηματισμό των βακτηρίων ή
- Αποθηκεύουμε σε δείγματα όγκου 100μl σε σωλήνες μικροφυγόκεντρου (τύπου erpendorf) στους -80⁰C.

Stock διαλύματα(1M)

TYM	TFB-I	TFB-II
2% Tryptone	30 mM 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 7.0	pH 7.0
αποστείρωση	αποστείρωση	Filter sterile

Γ.1.10. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ E. Coli Top10 και BL21RIL

Διαδικασία μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων E.coli με το κατάλληλο πλασμιδιακό DNA:

- Προσθέτουμε 100ng/μl ή 20μl από την αντίδραση λιγάσης σε κύτταρα δεκτικά για μετασχηματισμό.
- Τοποθετούμε τους σωλήνες στους 42⁰C για 2 λεπτά, για την πρόκληση θερμικού σοκ.

- Προσθέτουμε 700ml θρεπτικού LB (Luria Broth) χωρίς αντιβιοτικά.
- Επιάζουμε για 45 λεπτά, στους 37°C.
- Φυγοκεντρούμε στα 4000 x g για 1 λεπτό.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε τα κύτταρα στα τελευταία 100μl.
- Επιστρώνουμε σε τρυβλία με κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής.

Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών: Αμπικιλίνη, τελική συγκέντρωση 100μg/ml, Καναμικίνη, τελική συγκέντρωση 100μg/ml, χλωραμφαινικόλη, τελική συγκέντρωση 34 μg/ml.

Παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου LB (1 Λίτρο):

- Ζυγίζουμε 5g Yeast Extract, 10g Tryptone και 5g NaCl.
- Διαλύουμε σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό σε δοχείο ζέσεως.
- Μοιράζουμε σε μπουκάλια τύπου Pyrex.
- Αποστειρώνουμε σε αυτόκαυστο.

Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου LB (1 Λίτρο)

- Ζυγίζουμε 5g Yeast Extract, 10g Tryptone, 5g NaCl και 20g Agar.
- Διαλύουμε σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό σε δοχείο ζέσεως.
- Μοιράζουμε σε μπουκάλια τύπου Pyrex.
- Αποστειρώνουμε σε αυτόκαυστο.
- Προσθέτουμε το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής λίγο πριν την πήξη του διαλύματος.
- Επιστρώνουμε σε τρυβλία υπολογίζοντας περίπου 25-30ml για κάθε τρυβλίο.

Γ.1.11. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (Sequencing)

Η αλληλούχιση της πλασμιδιακής κατασκευής pFlag-CMV-2-ERH πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Eurofins Genomics.

Γ.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Γ.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (Mini Preparation) ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ

- Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα, προσθέτουμε 3mL θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής και το εμβολιάζουμε με μια αποικία μετασηματισμένων κυττάρων TOP10.
- Επιάζουμε ολονύχτια, στους 37⁰C, υπό συνεχή ανάδευση.
- Συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 13.500rpm για 2 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 300μL TENS και αναδεύουμε σε κυκλοτερή αναδευτήρα (vortex).
- Προσθέτουμε 150μL 3M Οξικού Νατρίου (CH₃COONa) pH 5,2 και αναδεύουμε έντονα.
- Φυγοκεντρούμε στις 13.500rpm για 5 λεπτά και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούργιο σωληνάκι μικροφυγοκέντρου (1,5 mL).
- Προσθέτουμε 2,7 x V υπερκειμένου 100% αιθανόλη, αναδεύουμε και ψύχουμε στους -20⁰C για 30 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στις 13.500rpm για 15 λεπτά και απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
- Προσθέτουμε 500μL 70% αιθανόλη και φυγοκεντρούμε στις 13.500rpm για 10 λεπτά.
- Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στις 13.500rpm για 1 λεπτό.
- Απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, στεγνώνουμε το ίζημα και επαναδιαλύουμε σε 25-30μl αποστειρωμένο ddH₂O.

Διάλυμα TENS

0,1N NaOH
0,5% SDS σε TE

Διάλυμα TE

10mM Tris pH 7,5
1mM EDTA

Γ.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΑΙΜΑΚΑΣ (Mini Preparation) ΜΕ ΤΟ QIAGEN MIDI KIT

- Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη, προσθέτουμε 100mL θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής και το εμβολιάζουμε με την καλλιέργεια μετασηματισμένων κυττάρων Top10.
- Επιάζουμε ολονύχτια, στους 37⁰C, υπό συνεχή ανάδευση.
- Συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 15 λεπτά, στους 4⁰C.
- Ακολουθείτε η πειραματική διαδικασία απομόνωσης με βάση το εγχειρίδιο του κατασκευαστή (Qiagen).

Γ.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ

Η μέθοδος των δύο υβριδίων είναι μία τεχνική κατάλληλη για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Χρησιμοποιεί δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια τα οποία μετασηματίζουν το κατάλληλο στέλεχος *S. cerevisiae* που περιέχει ενσωματωμένα στο γονιδίωμα του γονίδια αναφοράς των οποίων η μεταγραφή καταλήγει σε απλές και εύκολα παρατηρούμενες αλλαγές φαινοτύπου. Το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος («δόλωμα», όπως αποκαλείται) είναι κλωνοποιημένο σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA [DNA Binding Domain (BD)] του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (πλασμίδιο-δόλωμα). Μία βιβλιοθήκη cDNA είναι κλωνοποιημένη σε σύντηξη με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής [Activation Domain (AD)] του ιού VP16 (πλασμίδια-λείες). Τυχόν αλληλεπίδραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών που παράγονται από τα δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια έχει σαν αποτέλεσμα την προσέγγιση της περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής (AD) (που φέρεται από την χιμαιρική πρωτεΐνη «λεία») στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (BD) (που φέρεται από την πρωτεΐνη «δόλωμα») με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων αναφοράς που φέρουν στον υποκινητή τους τις αλληλουχίες αναγνώρισης από τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4.

Γ.3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Το στέλεχος του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε είναι:

➤ **PJ69-4A**

Περιέχει ενσωματωμένα στο γονιδίωμά του τα γονίδια αναφοράς LacZ, ADE2 και HIS3 των οποίων ο υποκινητής περιλαμβάνει θέσεις δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.

Γ.3.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *S. Cerevisiae* ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

- Επιάζουμε 2-5ml υγρής καλλιέργειας με το επιθυμητό στέλεχος *S.c.* στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο SC (Synthetic Complete) στους 30⁰C όλη νύχτα.
- Φωτομετρούμε την καλλιέργεια στα 600 nm και μεταφέρουμε ποσότητα αυτής σε 50 ml θρεπτικού YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose).
 - έτσι ώστε η απορρόφηση OD_{600nm} να είναι 0,200.
 - Επιάζουμε σε αναδευτήρα στους 30⁰C έως ότου η απορρόφηση να φτάσει περίπου στο 0,800 (θέλουμε μετά από δύο διπλασιασμούς, η καλλιέργεια να βρίσκεται ακόμη σε λογαριθμική φάση, OD<1).
 - Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά ,στις 1.000rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
 - Αιωρούμε τα κύτταρα σε 25ml δις απεσταγμένο αποστειρωμένο H₂O και ξαναφυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
 - Επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 1ml CH₃COOLi 0,1M.
 - Φυγοκεντρούμε για 15 δευτερόλεπτα στις 13.500rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
 - Επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 0,5ml CH₃COOLi 0,1M και μεταφέρουμε από 150μl αιωρήματος σε σωληνάκια μικροφυγοκέντρου.
 - Φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
 - Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με την σειρά που δίνεται, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 360μl:
 - -240μl 50% (w/v) PEG 3350
 - -36μl CH₃COOLi 1M
 - -50μl DNA από σπέρμα σολομού 2mg/ml (το οποίο πρώτα έχουμε θερμάνει στους 100⁰ C για τουλάχιστον 10 λεπτά).
 - -xμl από κάθε πλασμιδιακό DNA (από 0,1-10 μg)
 - -34-xμl αποστειρωμένου ddH₂O
 - Αναδεύουμε το μίγμα έως ότου τα κύτταρα αιωρηθούν καλά.
 - Επιάζουμε για 40 λεπτά στους 42⁰C.

- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 13.500rpm για 15 δευτερόλεπτα. Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 200μl αποστειρωμένου ddH₂O.
- Απλώνουμε το αιώρημα σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο επιλογής και επωάζουμε για στους 30°C.

Υγρά θρεπτικά υλικά

YPD

Για 1 λίτρο

10 g Bacto-Yeast extract

20 g Bacto-peptone

20g glucose

SC

Για 1 λίτρο

1.7 g YNB-AA/AS

0.5 g CSM-AA

5 g (NH₄)₂SO₄

20g glucose

pH 5.5 (350μl NaOH 5N)

Στερεά θρεπτικά υλικά

Για την παρασκευή στερεών θρεπτικών υλικών προστίθεται άγαρ σε συγκέντρωση 2% (20 gr/l). Ο όγκος που υπολογίζεται για κάθε τρυβλίο είναι 25-30 ml.

Το υγρό θρεπτικό μέσο SC (Synthetic Complete) μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη κυττάρων ζύμης που δεν έχουν διατροφικές ανάγκες (δεν παρουσιάζουν δηλαδή αυξοτροφία). Πιο συχνά όμως χρησιμοποιείται ως το βασικό θρεπτικό υλικό στο οποίο προστίθενται άλλα διατροφικά συμπληρώματα

Σε περιπτώσεις που τα κύτταρα που μεγαλώνουν έχουν διατροφικές ανάγκες και με βάση αυτές θέλουμε να προχωρήσουμε στην επιλογή, τότε στο θρεπτικό υλικό μπορεί να προστεθούν τα εξής: Ade, Ura, Trp, His, Leu, Lys σε τελικές συγκεντρώσεις 1x. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αποθήκευσης έχουν ως εξής:

Ade	166x	0.170 g/ 50 ml
Ura	100x	0.112 g/ 50 ml
Trp	100x	0.560 g/ 50 ml
His	330x	1.048 g/ 50ml
Leu	90x	1.180 g/ 50ml
Lys	100x	0.250 g/ 50ml

Γ.4 ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Γ.4.1. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ IPTG

Τα γονίδια των πρωτεϊνών που πρόκειται να εκφραστούν βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση διότι η παραπάνω περιοχή του χειριστή καταστέλλεται από μια πρωτεΐνη «καταστολέα» που εκφράζεται από το lacI γονίδιο και η οποία δεν επιτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Η ελεγχόμενη ενεργοποίηση των κλωνοποιημένων γονιδίων επιτυγχάνεται μέσω της προσθήκης λακτόζης ή χημικών αναλόγων της (π.χ. IPTG), τα οποία αναστέλλουν τον καταστολέα επάγοντας έτσι την έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Πειραματική διαδικασία:

- Εμβολιάζουμε 50ml υγρού θρεπτικού LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού, με μια αποικία από το κατάλληλο τρυβλίο που περιέχει βακτηριακές αποικίες.
 - Επωάζουμε ολονύχτια στους 37⁰C, υπό συνεχή ανάδευση.
 - Μεταφέρουμε κατάλληλη ποσότητα από την παραπάνω καλλιέργεια σε 400ml θρεπτικού υλικού LB παρουσία ίδιου αντιβιοτικού, ώστε η νέα καλλιέργεια να ξεκινήσει από OD=0,05-0,07 περίπου.
 - Επωάζουμε την καλλιέργεια στους 37⁰C με συνεχή ανάδευση έως ότου η καλλιέργεια φτάσει σε OD=0,4.
 - Προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα IPTG στην καλλιέργεια, σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες.
 - Επωάζουμε στις ώρες και στην θερμοκρασία που έχουν βρεθεί ότι είναι οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής (Πίνακας 1).
 - Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια στα 4.000xg, στους 4⁰C για 15 λεπτά.
 - Αφαιρούμε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό.
 - Ξεπλένουμε το ίζημα των κυττάρων με απεσταγμένο H₂O (καλή επαναιώρηση).
 - Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια στα 4.000xg στους 4⁰C για 15 λεπτά.
 - Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
 - Αποθηκεύουμε το ίζημα των κυττάρων στους -20⁰C για όσο χρειαστεί ή συνεχίζουμε με τη βακτηριακή λύση των κυττάρων.

*Τα κύτταρα στα βήματα 7-10 πρέπει να κρατούνται σε πάγο.

Πίνακας 1: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή των παρακάτω πρωτεϊνών.

Υπερεκφρασμένη Πρωτεΐνη	Θερμοκρασία (°C)	Ώρες (h)	Συγκέντρωση IPTG (mM)
His-ERH	30	4	0,4
His-SRPK1	28	3	0,2
His-ΔS-SRPK1	28	3	0,2
His-Nt-SRPK1	28	2	0,2
His-SCt-SRPK1	28	3	0,2

Γ.4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

- Παίρνουμε το ίζημα των κυττάρων μετά την επαγωγή και το επαναιωρούμε σε κατάλληλο διάλυμα λύσης (Πίνακας 2) (ίζημα κυττάρων από 400ml αρχικής καλλιέργειας επαναιωρείται σε 8ml διαλύματος).
 - Λύνουμε τα κύτταρα με τη χρήση της συσκευής υπερήχων (10 παλμοί διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 50 δευτερολέπτων).
 - Φυγοκεντρούμε το παραπάνω εκχύλισμα μετά τους υπερήχους στα 10.000xg για 30 λεπτά.
 - Διαχωρίζουμε το διαλυτό (υπερκείμενο) από το αδιάλυτο (ίζημα) κλάσμα.
 - Για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιούμε το διαλυτό κλάσμα
Σε όλη τη διαδικασία τα κύτταρα πρέπει να διατηρούνται σε πάγο και οι φυγοκεντρήσεις να γίνονται στους 4°C.
- Για τον έλεγχο της όλης διαδικασίας κρατάμε 100μl δείγματος από όλες τις φάσεις (εκχύλισμα μετά τους υπερήχους –συνολικό ομογενοποίηση-, διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα).

Πίνακας 2: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την λύση των βακτηριακών κυττάρων.

Υπερεκφρασμένη Πρωτεΐνη	Διάλυμα Λύσης
His-ERH	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM μιδαζόλιο,

	0,1mM PMSF pH 8
His-SRPK1	8,1mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47mM KH ₂ PO ₄ , 138mM NaCl, 2,67mM KCl, 1% Triton X100, 10% γκυκερόλη, 1 mM PMSF pH 7,4
His-ΔS-SRPK1	8,1mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47mM KH ₂ PO ₄ , 138mM NaCl, 2,67mM KCl, 1% Triton X100, 10% γκυκερόλη, 1 mM PMSF pH 7,4
His-Nt-SRPK1	50mM Tris-Cl, 100mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 0,2% Triton X100, 1mM PMSF και 1mM DTT pH 8
His-SCt-SRPK1	50mM Tris-Cl, 100mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 0,2% Triton X100, 1mM PMSF και 1mM DTT pH 8

Γ.4.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΕΠΙΤΟΠΟ ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών που περιέχουν έναν επίτοπο που κωδικοποιεί για την μεταφορά της γλουταθειόνης (GST). Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης σύντηξης με την GST γίνεται με στήλη αχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθλωμένη σε αδρανές υλικό (σεφαρόζη). Η έκλυση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με την προσθήκη διαλύματος γλουταθειόνης σε περίσσεια. Η διαδικασία αυτή, επιτρέπει την εύκολη και ποσοτική ανάκτηση της πρωτεΐνης από τη στήλη και επίσης με το πλεονέκτημα ότι γίνεται σε πολύ ήπιες συνθήκες χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αλλαγών στη δομή και τη δράση της πρωτεΐνης σύντηξης.

- Χρησιμοποιούμε για τον καθαρισμό το διαλυτό κλάσμα από την κατεργασία των βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή.
- Εξισορροπούμε σφαιρίδια GSH-Sepharose (Macherey-Nagel) (~250μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 400ml καλλιέργειας) στο διάλυμα λύσης των κυττάρων.
- Επωάζουμε το διαλυτό κλάσμα με τα σφαιρίδια GSH Sepharose για 1 ώρα στους 4⁰C, υπό συνεχή ανάδευση.
- Φυγοκεντρούμε στα 3000xg για 2 λεπτά.
- Αφαιρούμε το κλάσμα με τις πρωτεΐνες που δεν έχουν δεσμευτεί στη στήλη (Flow Through).

- Πλένουμε τη στήλη με 3 x 8ml διάλυμα λύσης.
- Φυγοκεντρούμε μετά από κάθε πλύση στις ίδιες συνθήκες και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.

- Πραγματοποιούμε έκλυση των πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στα σφαιρίδια με 0,5-1 ml διάλυμα έκλυσης (10mM γλουταθειόνης, 50mM Tris-HCl pH 8,0), ύστερα από 5 λεπτά επώαση.

- Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία της έκλυσης άλλη μια φορά.
- Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -80°C υπό την παρουσία 10% γλυκερόλης.

Η διαδικασία πρέπει να γίνει στους 4°C και οι πρωτεΐνες να διατηρούνται στον πάγο. Για να ελέγξουμε όλα τα στάδια του καθαρισμού κρατάμε 100μl δείγματος από τα στάδια πριν και μετά την επώαση με τα σωματίδια καθώς και από τα στάδια των πλυσιμάτων και της έκλυσης.

Αναλύουμε 50μl από τα παραπάνω δείγματα σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Χρησιμοποιούνται 5μl για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Γ.4.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΕΠΙΤΟΠΟ ΙΣΤΙΔΙΝΩΝ

Η μέθοδος αυτή απομόνωσης στηρίζεται στην αρχή της χρωματογραφίας αγγιστείας μέσω ακινητοποιημένων μετάλλων (IMAC-immobilized metal affinity chromatography). Σε αгарόζη ακινητοποιείται η χηλική ένωση NTA (νιτριλοτριοξικό οξύ) η οποία δεσμεύει ιόντα νικελίου. Τα ιόντα αυτά έχουν την τάση να συνδέονται με τους δακτυλίους των καταλοίπων ιστιδίνης.

Έτσι είναι δυνατή η παραγωγή χιμαιρικών His-πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν εύκολα να δεσμευτούν σε μια στήλη Ni-NTA σύμφωνα με τον παρακάτω τρόπο. Η έκλυση της πρωτεΐνης από το υλικό χρωματογραφίας γίνεται με τη βοήθεια ιμιδαζολίου, το οποίο είναι δομικά παρόμοιο με το κατάλοιπο ιστιδίνης.

- Χρησιμοποιούμε για τον καθαρισμό το διαλυτό κλάσμα από την κατεργασία των βακτηριακών κυττάρων μετά την επαγωγή.

- Εξισορροπούμε σφαιρίδια (Qiagen) (~250μl σφαιριδίων για υλικό που προέρχεται από 400ml καλλιέργειας) στο διάλυμα λύσης των κυττάρων.

- Επιάζουμε το διαλυτό κλάσμα με τα σφαιρίδια Ni-NTA για 1 ώρα στους 4°C , υπό συνεχή ανάδευση.

- Φυγοκεντρούμε στα 3000xg για 2 λεπτά.

- Αφαιρούμε το κλάσμα με τις πρωτεΐνες που δεν έχουν δεσμευτεί στη στήλη (Flow Through).

- Πλένουμε τη στήλη με 3 x 8ml διάλυμα λύσης, προσθέτοντας όμως στην πρώτη πλύση 20mM ιμιδαζόλιο και στη δεύτερη πλύση 50mM για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων πρωτεϊνών.

- Φυγοκεντρούμε μετά από κάθε πλύση στις ίδιες συνθήκες και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.

- Πραγματοποιούμε έκλυση των πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στα σφαιρίδια με 0,5-1 ml διάλυμα λύσης με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου 250mM, ύστερα από 5 λεπτά επώαση.

- Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία της έκλυσης άλλη μια φορά.

- Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -80°C υπό την παρουσία 10% γλυκερόλης.

Η διαδικασία πρέπει να γίνει στους 4°C και οι πρωτεΐνες να διατηρούνται στον πάγο. Για να ελέγξουμε όλα τα στάδια του καθαρισμού κρατάμε 100μl δείγματος από τα στάδια πριν και μετά την επώαση με τα σωματίδια καθώς και από τα στάδια των πλυσιμάτων και της έκλυσης.

Αναλύουμε 50μl από τα παραπάνω δείγματα σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Χρησιμοποιούνται 5μl για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Γ.5 ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ

Η αρχή της μεθόδου είναι η μετακίνηση μορίων μεταξύ δύο διαλυμάτων μέσω ημιδιαπερατής μεμβράνης έως ότου εξισωθούν οι συγκεντρώσεις τους.

- Το δείγμα τοποθετείται σε ημιδιαπερατή μεμβράνη (Spectra-Por MWCO6000-8000 της Spectrum).

- Η μεμβράνη με το δείγμα εισάγονται στη συνέχεια στο διάλυμα διαπίδυσης, το οποίο είναι PBS (8,1mM Na_2HPO_4 , 1,47mM KH_2PO_4 , 138mM NaCl , 2,67mM KCl , pH 7,4) σε όγκο περίπου 100 φορές περισσότερο από τον συνολικό όγκο δείγματος που έχει εισαχθεί στην μεμβράνη διαπίδυσης.

- Το δείγμα επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος για 16 ώρες στους 4°C .

- Το δείγμα συλλέγεται από το εσωτερικό της μεμβράνης και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 10000xg στους 4°C , για την απομάκρυνση τυχόν ιζήματος.

Γ.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (τροποποιημένη από τον Bearden). Η μέθοδος Bradford βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie brilliant blue G-250 σε όξινο περιβάλλον.

Πειραματική Διαδικασία:

- Αναμιγνύουμε το αντιδραστήριο Bradford (διάλυμα φωσφορικού οξέος, μεθανόλης και χρωστική Coomassie brilliant blue G250 (Biorad)) σε αναλογία 1:4 με H₂O, σε τελικό όγκο 1ml.
- Προσθέτουμε 5μl από το πρωτεϊνικό δείγμα.
- Μετράμε την απορρόφηση στα 595nm.

Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με πρωτεΐνη αναφοράς, γνωστής συγκέντρωσης, την αλβουμίνη (BSA).

Γ.7 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ

Τα πειράματα χρωματογραφίας αγκιστείας επιτρέπουν τη διερεύνηση της ικανότητας πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η τεχνική στηρίζεται στη δυνατότητα καθήλωσης διαφόρων πρωτεϊνών σύντηξης (π.χ. με επιτόπους GST ή 6xHis) στα σφαιρίδια των αντίστοιχων στηλών χρωματογραφίας (γλουταθειόνη-σεφαρόζη, Ni-NTA) με τις οποίες παρουσιάζουν αγκιστεία. Οι καθηλωμένες πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύσουν άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες παρουσιάζουν αγκιστεία και οι οποίες είτε βρίσκονται σε καθαρή μορφή, είτε περιέχονται σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Ο έλεγχος της σύνδεσης επιτυγχάνεται με ανάλυση των καθηλωμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα.

Δοκιμασία συγκατακρήμνισης με μέσο καθήλωσης την στήλη GST:

- Εξισορροπούμε 25μl σφαιριδίων GSH σε διάλυμα 1x PBS, 10mM EDTA pH 8, 0.1mM PMSF με τρεις διαδοχικές πλύσεις, στους 4⁰C, υπό συνεχή ανάδευση, σε τελικό όγκο 1ml.

- Προσθέτουμε προς δέσμευση με την GSH των σφαιριδίων της στήλης, 10μg GST ή 10μg GST-SAFB1C ή 10μg GST-SAFB2C ή 10μg GST-SAFB1CΔRE παρουσία του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση, στους 4⁰C για 1 ώρα.

- Φυγοκεντρούμε στα 4.000xg και απομακρύνουμε το υπερκείμενο της στήλης.

- Πλένουμε τα σφαιρίδια 3 φορές με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, στους 4⁰C.

- Αραιώνουμε 10μg από την πρωτεΐνη His-ERH στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, και επωάζουμε τα σφαιρίδια με τις προσκολλημένες πρωτεΐνες, υπό συνεχή ανάδευση, στους 4⁰C για 3 ώρες.

- Φυγοκεντρούμε στα 4.000xg και απομακρύνουμε το υπερκείμενο της στήλης.

- Πλένουμε τα σφαιρίδια 3 φορές με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, στους 4⁰C.

- Απομακρύνουμε όλο το υγρό.

- Εκλούουμε τις δεσμευμένες πρωτεΐνες από τα σφαιρίδια με προσθήκη 30μl διαλύματος έκλουσης (10mM γλουταθειόνης, 50mM Tris-HCl pH 8,0), ύστερα από 5 λεπτά επώαση ή με προσθήκη 30μl διαλύματος LB 2x χωρίς DTT.

- Στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθενται 25mM DTT ακολουθεί θέρμανση στους 95⁰C για 5 λεπτά και ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με το κατάλληλο αντίσωμα.

Δοκιμασία συγκατακρήμνισης με μέσο καθήλωσης τα σφαιρίδια Ni-NTA:

- Εξισορροπούμε 25μl σφαιριδίων Ni-NTA σε διάλυμα 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 0.1mM PMSF και 10mM ιμιδαζόλιο με τρεις διαδοχικές πλύσεις, στους 4⁰C, υπό συνεχή ανάδευση, σε τελικό όγκο 1ml.

- Προσθέτουμε προς δέσμευση με τα σφαιρίδια Ni-NTA, 10μg His-ERH στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, υπό συνεχή ανάδευση, στους 4⁰C για 1 ώρα.

- Φυγοκεντρούμε στα 4.000xg και απομακρύνουμε το υπερκείμενο της στήλης.

- Πλένουμε τα σφαιρίδια 3 φορές με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, στους 4⁰C.

- Αραιώνουμε 10μg GST ή 10μg GST-SAFB1C ή 10μg GST-SAFB2C ή 10μg GST-SAFB1CΔRE, στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, και επωάζουμε τα σφαιρίδια με την προσκολλημένη πρωτεΐνη, υπό συνεχή ανάδευση, στους 4⁰C για 3 ώρες.

- Φυγοκεντρούμε στα 4.000xg και απομακρύνουμε το υπερκείμενο της στήλης.
- Πλένουμε τα σφαιρίδια 3 φορές, για 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, στους 4°C με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, προσθέτοντας όμως στην πρώτη πλύση 20mM ιμιδαζόλιο και στη δεύτερη πλύση 50mM για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων πρωτεϊνών.

- Απομακρύνουμε όλο το υγρό.

- Εκλούουμε τις δεσμευμένες πρωτεΐνες από τα σφαιρίδια με προσθήκη 30μl διαλύματος ιμιδαζολίου 250mM, ύστερα από 5 λεπτά επώαση ή με προσθήκη 30μl διαλύματος LB 2x χωρίς DTT.

Στα δείγματα των πρωτεϊνών προστίθενται 25mM DTT ακολουθεί θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά και ανάλυση με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με το κατάλληλο αντίσωμα.

Γ.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Γ.8.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος πραγματοποιείται καθώς οι πρωτεΐνες, ως φορτισμένα μόρια, κινούνται διαμέσου των πόρων μίας πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα βασικά συστατικά της μεθόδου είναι μια ασυνεχής πηκτή πολυακρυλαμίδιου και το άλας νατρίου του θειϊκού δωδεκυλίου (SDS) που δρα ως αποδιατακτικό μέσο. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο το οποίο είναι σταθερό ανά μονάδα μάζας κι έτσι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού τους βάρους. Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιούνται οι συσκευές Hoeffeur και Biorad.

Παρασκευή των:

Πήκτωμα επιστοιβαξης

4,5% ακρυλαμίδιο:bis

0.1% SDS,

0.125 M Tris-Cl pH 6.8,

2 mM EDTA

για τον πολυμερισμό

Πήκτωμα διαχωρισμού

8-12% ακρυλαμίδιου:bis

0.1% SDS

0.375 M Tris-Cl pH 8.8

2 mM EDTA

για τον πολυμερισμό

0.08% APS
0.04% TEMED

0.04% APS
0.02% TEMED

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης

50 mM Tris-Cl
0.38 M γλυκίνη
2 mM EDTA
0.1% SDS, pH 8.3

Τα δείγματα πριν εισαχθούν στο πήκτωμα επιστοίβαξης διαλύονται στο διάλυμα επιφόρτωσης των δειγμάτων, Laemli Buffer 4x. Ακολουθεί βρασμός για 3-5 λεπτά στους 95⁰C. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V.

Διάλυμα επιφόρτωσης, Laemli Buffer 4x

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8
2,3% SDS
10% γλυκερόλη
0,05% (w/v) μπλέ της βρωμοφαινόλης
25 mM DTT)

Γ.8.2. ΧΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΜΕ COOMASSIE BRILLIANT BLUE

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή:

- βάφεται με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση.
- Αποχρωματίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση.
- Επιάζεται σε νερό για 10 λεπτά, όπου και διατηρείται για λίγο καιρό.

Διάλυμα Coomassie Brilliant Blue

0,1% Coomassie Brilliant Blue R-25
50% μεθανόλη
10% οξικό οξύ

Διάλυμα αποχρωματισμού

20% μεθανόλη
10% οξικό οξύ

Γ.8.3. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN BLOTTING)

- Επωάζουμε την πηκτή μαζί με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και 4 διηθητικά χαρτιά σε διάλυμα Tris-Borate 1x pH 8,5 για 10 λεπτά.

- Τοποθετούμε στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, Biorad) τα παραπάνω υλικά με την εξής σειρά: τα δύο διηθητικά χαρτιά, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, την πηκτή και τέλος τα άλλα δύο διηθητικά χαρτιά.

- Αφαιρούμε με προσοχή τυχόν φυσαλίδες που μπορεί να έχουν σχηματιστεί.

- Ρυθμίζουμε τη συσκευή στα 10V για 70 λεπτά, όπου και πραγματοποιείται η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη.

- Εμβαπτίζουμε την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, για ~2 λεπτά σε διάλυμα Ponceau S (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ), προς χρωματισμό των πρωτεϊνών.

- Ξεπλένουμε με H₂O για μεγαλύτερη ευκρίνεια των ζωνών.

- Ξεπλένουμε με PBS-0,1% Tween 20, υπό συνεχή ανάδευση ~10 λεπτά, έως τον πλήρη αποχρωματισμό της μεμβράνης.

- Επωάζουμε τη μεμβράνη για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη σε PBS-0,1% Tween 20).

- Ξεπλένουμε 3 φορές x 5 λεπτά σε PBS-0,1% Tween 20.

- Επωάζουμε ολονύκτια 4°C, υπό συνεχή ανάδευση με το 1^ο αντίσωμα (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε 5% γάλα σκόνη σε PBS-0,1% Tween 20)

- Ξεπλένουμε 3 x 5 λεπτά σε PBS-0,1% Tween 20.

- Επωάζουμε για 1 ώρα με 2^ο αντίσωμα (συζευγμένο με υπεροξειδάση, έναντι της IgG από κουνέλι ή ποντίκι) (Santa Cruz) (αραιωμένο σε κατάλληλη συγκέντρωση σε 5% γάλα σκόνη σε PBS-0,1% Tween 20)

- Εμφανίζουμε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας:

- Προσθήκη 30μl 3% H₂O₂ και 100μl διαλύματος κουμαρικού οξέος (6,8mM σε DMSO) σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1,25mM σε 0,1M Tris-Cl pH 8,5).

- Επώαση της μεμβράνης με το παραπάνω μείγμα για 1 λεπτό.

Η λήψη εικόνων πραγματοποιείται στη συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων με το λογισμικό πρόγραμμα Alliance Software.

PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,4 Tris-Borate pH 8,5 (10x)

138mM NaCl	125mM Tris
2,67mM KCl	0,2% SDS
8,1mM Na ₂ HPO ₄	0,5 mM DTT το pH ρυθμίζεται με
1,47mM KH ₂ PO ₄	άλας βορικού οξέος
PBS-Tween20	
0,1% Tween 20 σε διάλυμα PBS	

Γ.8.4. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Πίνακας 3: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοοποτύπωση στα διάφορα πειράματα. Απεικονίζεται η προέλευση των αντισωμάτων, η αραίωση που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η εταιρία από την οποία προμηθεύτηκαν.

Πρώτα αντισώματα	Προέλευση	Αραίωση	Εταιρεία
αντι-SAFB1	κουνέλι	1:1.000	Bethyl
αντι-SAFB2	κουνέλι	1:2.000	Bethyl
αντι-HIF-1α	κουνέλι	1:1.000	Εργαστήριο Βιοχημείας [171]
αντι-SRPK1	ποντίκι	1:1.000	BD Transduction Laboratories
αντι-ERH	ποντίκι	1:200	Santa Cruz Biotechnology
αντι-HIF-2α	κουνέλι	1:750	Novus Biologicals
αντι-GFP	κουνέλι	1:5.000	Παραχωρήθηκε από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα
αντι-Flag M5	ποντίκι	1:10.000	Sigma
αντι-penta His	ποντίκι	1:3000	Qiagen
αντι-GST	κουνέλι	1:10.000	Amersham Biosciences
αντι-LaminB	κουνέλι	1:500	Santa Cruz Biotechnology
αντι-Histone 3	κουνέλι	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology
αντι-Actin	ποντίκι	1:5.000	Cell Signalling
αντι-Tubulin	ποντίκι	1:10.000	Cell Signalling
αντι-pSR πρωτεΐνες	ποντίκι	-	Παραχωρήθηκε από το Τμήμα Βιοχημείας, ΑΠΘ [95, 100]
αντι- α/β Tubulin	κουνέλι	1:10.000	Cell Signalling

Γ.9 ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ IN VITRO

Η ανίχνευση της ύπαρξης δράσης κινάσης στηρίζεται στην επώαση μικρών ποσοτήτων των κυτταρικών εκχυλισμάτων ή της κινάσης, με ένα κατάλληλο υπόστρωμα. Για την περίπτωση της δραστηριότητας RS κινάσης χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα της λαμίνης Β (GST-NtLBR)

βακτηριακά εκφρασμένο ως πρωτεΐνη σύντηξης με τη GST, καθώς περιέχει έξι επαναλαμβανόμενα διπεπίδια RS στο μόριο του. Ως δότης φωσφορικών χρησιμοποιείται το $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP και ως κινάση η βακτηριακά εκφρασμένη GST-SRPK1.

Το μίγμα επώασης επίσης περιλαμβάνει: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 0.6 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP και 25 μM ψυχρό ATP. Ο τελικός όγκος επώασης είναι 25 μl και ρυθμίζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ddH₂O. Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 30° C. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 50 mM DTT και διάλυμα επιφόρτωσης των δειγμάτων που χρησιμοποιείται στην SDS ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά και ηλεκτροφορούνται.

Ακολουθεί βαφή της πηκτής με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 και αποχρωματισμός της. Στη συνέχεια γίνεται ξήρανση της πηκτής, αυτοραδιογραφία και κοπή των ζωνών της πηκτής που αντιστοιχούν στο μοριακό βάρος του υποστρώματος σε συμφωνία και με τις ζώνες που εμφανίζονται στο film (X-Omat S film, Kodak) της αυτοραδιογραφίας. Ακολουθεί η μέτρηση των ραδιενεργών ζωνών σε σπινθηριστή Wallac 1409 (Liquid Scintillation Counter).

Γ.10 ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα του ακτινογραφικού film, να προσβάλλεται από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία του ισότοπου που χρησιμοποιείται για την επισήμανση των διάφορων μορίων.

Πειραματική διαδικασία:

- Τοποθετούμε το στερεωμένο πήκτωμα για 20 λεπτά σε νερό ώστε να ξεπλυθεί, υπό ανάδευση.
- Τοποθετούμε το πήκτωμα σε χαρτί Whatman 3MM και ξηραίνουμε υπό την παρουσία κενού σε ειδική συσκευή για ~1 ώρα.
- Τοποθετούμε το πήκτωμα σε επαφή με το φιλμ σε φωτοπολλαπλασιαστικούς θαλάμους, η οποία διατηρείται στους -80°C. Ο χρόνος έκθεσης ποικίλλει.

Η εμφάνιση και στερέωση του film (X-Omat S film, Kodak) γίνεται με εμφάνιση υπό ανακίνηση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak) και στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak).

Γ.11 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Γ.11.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές:

- MCF-7: κύτταρα ανθρώπινου αδenoκαρκινώματος μαστού.
- HeLa: ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας.
- Huh7: κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος.

Γ.11.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της εταιρίας Gibco ή Biosera το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 100 U/ml των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C σε 5% CO₂.

Για τη συνθήκη της στέρησης γλυκόζης τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο το οποίο φτιάχτηκε και αποστειρώθηκε στο εργαστήριο [172].

Περιέχει: 145mM NaCl, 5,4mM KCl, 1,4mM CaCl₂, 1,4mM MgSO₄, 25mM NaHCO₃, 0,2mM NaH₂PO₄, 10mM HEPES pH 7,4 και προσθήκη 12,6mg/l αργινίνης, 2,4mg/l κυστεΐνης, 29,2mg/l γλουταμίνη, 4,2mg/l ιστιδίνη, 5,2mg/l ισολευκίνη, 5,2mg/l λευκίνη, 7,3mg/l λυσίνη, 1,5mg/l μεθειονίνη, 4,8mg/l θρεονίνη, 1,0mg/l τρυπτοφάνη, 3,6mg/l τυροσίνη, 4,6mg/l βαλίνη), απουσία γλυκόζης, στο οποίο προστέθηκε 10% FBS μετά από διαπίδυση, καθώς και 100 U/ml των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

Η δημιουργία εποξικών συνθηκών πραγματοποιήθηκε με επώαση των κυττάρων σε 1% O₂, σε ειδικό θάλαμο υποξίας (IN VIVO₂ 200, RUSKINN Life Sciences).

Γ.11.3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DMEM), ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Κατεργασία ορού βοός (DCC, Dextran charcoal stripped, FBS), ώστε να μην περιέχει λιπόφιλους παράγοντες που να προσομοιάζουν στην οιστραδιόλη ή άλλες ορμόνες, για να μην μπορούν να προσδεθούν στο υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα) των κυττάρων MCF-7, λειτουργώντας ως οιστρογόνα (Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε πρωτόκολλο του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας, της Ιατρικής Σχολής Αθηνών).

Σε 500ml θρεπτικού υλικού, χωρίς ερυθρό της φαινόλης (phenol red free), υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (Gibco Cat no 31053), προσθέτω 5ml Sodium Pyruvate 100mM (Gibco Cat no 11360-039) και 10 ml L-Γλουταμίνη (L-Glutamine), κατάλληλη για καλλιέργειες κυττάρων. Αφού αφαιρέσω 50 ml θρεπτικό υλικό προσθέτω 50ml DCC-FBS.

Πειραματική διαδικασία DCC-FBS:

- Σε 500ml διαλύματος 10mM Tris-Cl pH 7,4 προσθέτουμε 1,25g δεξτράνης (Dextran) και αναδεύουμε μέχρι την πλήρη διάλυσή του.
- Προσθέτουμε 12.5g ενεργό άνθρακα και αναδεύουμε για 1ώρα στους 4⁰C.
- Σε 2 σωλήνες των 50ml βάζουμε με ογκομετρημένο σιφώνι 10ml από το παραπάνω διάλυμα ενώ βρίσκεται υπό ανάδευση στους 4⁰C.
- Φυγοκεντρούμε στα 5.000xg για 20 λεπτά στους 4⁰C.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και από τους 2 σωλήνες. Τον έναν τον φυλάμε με το ίζημα στους 4⁰C, ενώ στον άλλο προσθέτουμε 50ml FBS.
- Αναδεύουμε σε υδατόλουτρο στους 56⁰C, για 30 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στα 5.000xg για 20 λεπτά στους 4⁰C.
- Αποχύνουμε το FBS στον σωλήνα με το ίζημα που φυλούσαμε στους 4⁰C.
- Αναδεύουμε σε υδατόλουτρο στους 56⁰C, για 30 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στα 5.000xg για 20 λεπτά στους 4⁰C.
- Φιλτράρουμε τον DCC-FBS 2 φορές και τον αποθηκεύουμε στους -20⁰C.

Γ.11.4. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΑΝΕΝΑΡΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Διαδικασία παγώματος:

- Ξεπλένουμε τα προσκολλημένα σε τρυβλίο κύτταρα με κρύο PBS.
- Προσθέτουμε 1ml 0.2% τρυψίνης σε PBS και επωάζουμε το τρυβλίο για 5 λεπτά στους 37⁰C για να αποκολληθούν τα κύτταρα.
- Φυγοκεντρούμε στα 2.500xg, για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 1ml θρεπτικού μέσου ψύξης (10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), 40 % FBS, 50 % DMEM).
- Μεταφέρουμε σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes, Greiner).
- Ψύχουμε σταδιακά και τέλος αποθηκεύουμε σε υγρό άζωτο (-196⁰C).

Διαδικασία επανέναρξης καλλιέργειών:

- Ξεπαγώνουμε άμεσα τα κύτταρα με θέρμανση στους 37⁰C
- Προσθέτουμε τα κύτταρα στάγδην σε 10ml θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχε 10% FBS (στην περίπτωση των κυττάρων MCF-7 το θρεπτικό υλικό περιέχει 20% FBS)
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στα 2.500xg, για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Επαναιωρούμε το ίζημα των κυττάρων σε 10ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρουμε σε φλάσκα ή τρυβλίο, για περαιτέρω επώαση στους 37⁰C σε 5% CO₂.

Γ.12 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών με τη χρήση μη λιπιδικού πολυμερούς. Το DNA εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενός ιζήματος που σχηματίζεται με το διάλυμα ενός μη λιπιδικού πολυμερούς, το οποίο προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια.

Πειραματική διαδικασία:

- Προετοιμάζουμε το ίζημα σε αναλογία DNA: μέσο διαμόλυνσης PEI (Polyethylenimine, Πολυαιθυλεναμίνη) 1:2 σε σωληνάκι με θρεπτικό υλικό DMEM, απουσία FBS και αντιβιοτικών. Η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA τροποποιείται ανάλογα με τη διάμετρο του πιάτου από 1μg έως 8μg για πλάκες 24 πηγαδιών και πιάτα 10cm, αντίστοιχα.
- Επωάζουμε για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε στο παραπάνω μίγμα DMEM με 5% FBS.
- Πλένουμε τα κύτταρα 2 φορές με ψυχρό PBS.
- Προσθέτουμε στάγδην το μίγμα πάνω στα κύτταρα.
- Επωάζουμε για 2 ώρες στους 37⁰C, 5% CO₂.
- Αντικαθιστούμε με DMEM 10% FBS και επωάζουμε τα κύτταρα για 16 ώρες στους 37⁰C, 5% CO₂.

Γ.13 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Για την παρασκευή εκχυλίσματος ολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα ακολουθήθηκαν τρεις διαδικασίες.

Πρώτη πειραματική διαδικασία με διάλυμα λύσης, **Lysis Buffer** (Εικόνα 26):

- Πλένουμε τα κύτταρα 3x με κρύο PBS.
- Προσθέτουμε σε 10cm πιάτο 150μl Lysis Buffer και αποξύνουμε το τρυβλίο με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων.
- Συλλέγουμε το λύμα σε σωληνάκι των 1,5 ml.
- Επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο.
- Ανακινούμε για 7 δευτερόλεπτα (vortex) και συνεχίζουμε την επώαση για άλλα 10 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στα 12.000xg για 15 λεπτά στους 4⁰C.
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε σωληνάκι των 1,5 ml.
- Προσθέτουμε διάλυμα επιφόρτωσης, θερμαίνουμε στους 95⁰C για 5 λεπτά.

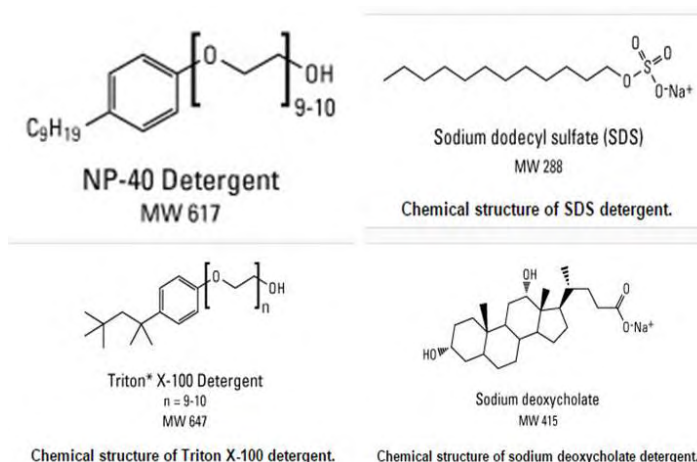
Δεύτερη πειραματική διαδικασία, με διάλυμα λύσης, **Ripa Buffer** (Εικόνα 26):

- Πλένουμε τα κύτταρα 3x με κρύο PBS.
- Προσθέτουμε σε 10cm πιάτο 150μl Ripa Buffer και αποξύνουμε το τρυβλίο με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων.
- Συλλέγουμε το λύμα σε σωληνάκι των 1,5 ml.
- Επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο.
- Ανακινούμε για 7 δευτερόλεπτα (vortex) και συνεχίζουμε την επώαση για άλλα 10 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στα 12.000xg για 15 λεπτά στους 4⁰C.
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε σωληνάκι των 1,5 ml.
- Προσθέτουμε διάλυμα επιφόρτωσης, θερμαίνουμε στους 95⁰C για 5 λεπτά.

Τρίτη πειραματική διαδικασία, με διάλυμα επιφόρτωσης 2x, **Laemli Buffer 2x**:

- Πλένουμε τα κύτταρα 3x με κρύο PBS.
- Αποξύνουμε το τρυβλίο με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων.
- Συλλέγουμε το λύμα σε σωληνάκι των 1,5 ml, ογκομετρούμε και προσθέτουμε ίσο όγκο Laemli Buffer 2x.
- Πραγματοποιούμε υπέρηχους στην ειδική συσκευή (3 παλμοί διάρκειας 2 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις των 10 δευτερολέπτων).
- Θερμαίνουμε στους 95⁰C, για 5 λεπτά.

A)



B)

	Ripa Buffer
Lysis Buffer	20mM Tris pH 7,5
25mM Tris pH 7,5	150mM NaCl
150mM NaCl	1mM EDTA
1mM MgCl ₂	0,5% w/v NP-40
1% w/v Triton-X	0,5% w/v NaDeoxycholate
0,2 mM PMSF	0,1% w/v SDS
	0,2 mM PMSF

Εικόνα 26: A) Απεικόνιση των χημικών δομών των ιοντικών και μη ιοντικών απορρυπαντικών. B) Σύσταση των διαλυμάτων λύσης Lysis Buffer και Ripa Buffer.

Γ.14 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ siRNA

Για την αποσιώπηση της έκφρασης των HIF-1α και ERH ακολουθήθηκε η μέθοδο εγκλεισμού σε λιποσώματα με τη χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 RNAiMAX (Invitrogen).

Πειραματική διαδικασία:

- Προσθέτουμε 50μl DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά σε δύο σωλήνες.
- Προσθέτουμε στον πρώτο σωλήνα το siRNA και στον δεύτερο 1.5μl του αντιδραστηρίου 2000 RNAiMAX
- Ανακινούμε καλά (όχι vortex) και επωάζουμε για 5 λεπτά.
- Ενώνουμε τα περιεχόμενα των δύο σωλήνων και επωάζουμε 30 λεπτά.
- Πλένουμε τα κύτταρα 2 φορές με ψυχρό PBS.
- Προσθέτουμε 400μl DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά στα κύτταρα και στάγδην το περιεχόμενο του σωλήνα.

- Επωάζουμε για 4 ώρες στους 37°C, 5% CO₂.
- Αντικαθιστούμε με DMEM, 10% FBS και επωάζουμε τα κύτταρα για τουλάχιστον 16 ώρες στους 37°C, 5% CO₂.

Ως αρνητικό δείγμα siRNA χρησιμοποιήθηκε και στις δύο περιπτώσεις το AllStars-siRNA (Qiagen), το οποίο δεν παρουσιάζει ομολογία με κανένα γνωστό γονίδιο θηλαστικών.

Για την αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-1α χρησιμοποιήθηκε το siRNA Hs-HIF1A HP validated siRNA (Qiagen).

Για την αποσιώπηση της έκφρασης της ERH χρησιμοποιήθηκε siMAX siRNA ERH validated siRNA (Eurofins Genomics).

Γ.15 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Με την τεχνική αυτή πραγματοποιείται η απομόνωση μιας πρωτεΐνης από εκχυλίσματα κυττάρων με τη χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι της εν λόγω πρωτεΐνης. Μαζί με την απομονωθείσα πρωτεΐνη συγκατακρημνίζονται και οι πρωτεΐνες που είναι δεσμευμένες πάνω της, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο μια γενική εικόνα των αλληλεπιδράσεων στο φυσιολογικό περιβάλλον του κυττάρου.

Πειραματική διαδικασία:

- Επωάζουμε το κυτταρικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, το οποίο έχει προέλθει ύστερα από λύση των κυττάρων με IP Buffer, με 1μg αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχου (π.χ. αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-GFP) για 2 ώρες στους 4 °C, υπό συνεχή ανάδευση.

- Παράλληλα προετοιμάζουμε τα σφαιρίδια Σεφαρόζης-πρωτεΐνης A : σε erppendorf προσθέτουμε 20-25μl σφαιριδίων (για κάθε αντίδραση) και ακολουθούν πλύσεις αυτών: προσθέτουμε 500μl IP Buffer, αναδεύουμε στον αναδευτήρα και μετά αναδεύουμε για 10 λεπτά στους 4⁰C, φυγοκεντρούμε στις 4.000rpm για 30 δευτερόλεπτα και αποχύνουμε το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνουμε την παραπάνω διαδικασία άλλες δύο φορές.

- Προσθέτουμε στο erppendorf που περιέχει τα σφαιρίδια το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που περιέχει και το αντίσωμα συνδεδεμένο με την επιθυμητή πρωτεΐνη και επωάζουμε 4 ώρες στους 4⁰C, υπό συνεχή ανάδευση.

- Πραγματοποιούμε δύο πλύσεις όπως παραπάνω και μια πλύση με IP Buffer χωρίς Triton-X.

- Μετά το τέλος της τρίτης πλύσης απομακρύνουμε με σύριγγα ινσουλίνης όλο το υγρό.

- Προσθέτουμε 40μl διάλυμα επιφόρτωσης (Laemli Buffer) 2x χωρίς DTT, κατευθείαν στα σφαιρίδια, αναδεύουμε (vortex) για 1 λεπτό, επωάζουμε για 1 λεπτό και φυγοκεντρούμε στις 13.500rpm για 1 λεπτό.

- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με ειδικό ακροφύσιο (tips), προσθέτουμε 3 μl διαλύματος επιφόρτωσης 4x, χωρίς DTT και 2 μl DTT 1M. Αποθηκεύουμε στους -20°C.

Διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (IP Buffer):, 50 mM Hepes, pH 7.6, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5μM pepstatin και 10μM leupeptin.

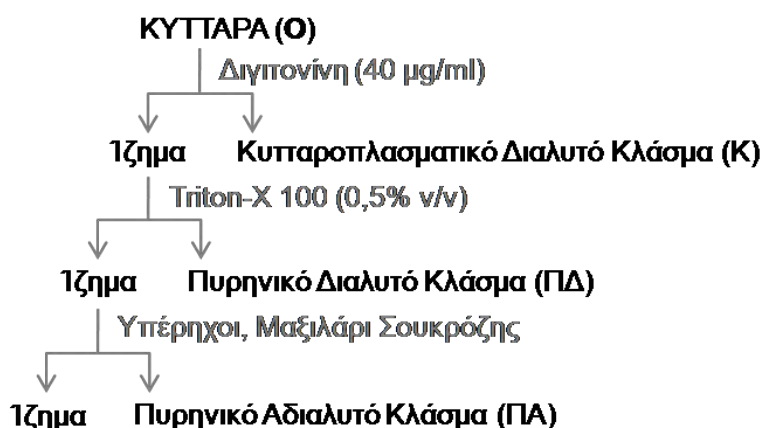
Γ.16 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Πειραματική διαδικασία (Εικόνα 27) [173, 174]:

- Πλένουμε τα κύτταρα 3x με κρύο PBS.
- Προσθέτουμε σε 10cm πιάτο 500μl RSB-100 Buffer, διγιτονίνη 40μg/ml.
- Αποξύνουμε το τρυβλίο με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων.
- Συλλέγουμε το λύμα σε σωληνάκι των 1,5 ml. Κρατάω 50μl σε δεύτερο σωληνάκι (Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα, Ο), στο οποίο προσθέτω 2x Laemli Buffer.
 - Επωάζουμε για 5 λεπτά στον πάγο.
 - Φυγοκεντρούμε στα 2.000xg για 8 λεπτά στους 4°C.
 - Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε σωληνάκι των 1,5 ml (Κυτταροπλασματικό διαλυτό κλάσμα, Κ).
 - Επαναιωρούμε το ίζημα σε 500μl RSB-100 Buffer/ 0,5% Triton X 100.
 - Επωάζουμε για 5 λεπτά στον πάγο.
 - Φυγοκεντρούμε στα 2.000xg για 8 λεπτά στους 4°C.
 - Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε σωληνάκι των 1,5 ml (Πυρηνικό διαλυτό κλάσμα, ΠΔ).
 - Επαναιωρούμε το ίζημα σε 250μl RSB-100 Buffer/ 0,5% Triton X 100.
 - Πραγματοποιούμε υπερήχους 2 φορές των 2 δευτερολέπτων.

- Περνάμε το υπερκείμενο σε 250μl σουκρόζης 30% σε RSB-100 Buffer.
- Φυγοκεντρούμε στα 4.000xg για 15 λεπτά στους 4⁰C.
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε σωληνάκι των 1,5 ml (Πυρηνικό αδιάλυτο κλάσμα, ΠΑ).
- Προσθέτω σε όλα τα κλάσματα διάλυμα επιφόρτωσης, θερμαίνουμε στους 95⁰C για 5 λεπτά.

RSB-100: 10mM Tris-Cl pH 7,4, 100mM NaCl, 2,5mM MgCl₂, 5mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 5μM pepstatin και 10μM leupeptin.



Εικόνα 27: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση, της διαδικασίας, της βιοχημικής κλασμάτωσης.

Γ.17 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΜΜΕΣΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Με την τεχνική αυτή εντοπίζουμε ενδοκυττάρια τις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Στη μικροσκοπία φθορισμού δεν είναι απαραίτητη η χρήση αντισωμάτων καθώς είναι δυνατός ο ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών, οι οποίες είναι σε σύντηξη με φθορίζουσες ουσίες όπως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP). Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό εκτός από το πρώτο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, χρησιμοποιείται και ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει μια φθορίζουσα ομάδα. Και στις δύο περιπτώσεις ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Πειραματική διαδικασία έμμεσου ανοσοφθορισμού:

- Μια μέρα πριν την έναρξη του πειράματος μοιράζουμε τα κύτταρα σε πιάτα ή πλάκες, στα οποία έχουν τοποθετηθεί καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm (την ημέρα του πειράματος τα κύτταρα πρέπει να καλύπτουν το 60-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας).

- Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πλένουμε με κρύο 1x PBS.

- Μονιμοποιούμε τα κύτταρα με 1x PBS/3% φορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (για τον ενδογενή ανοσοφθορισμό της SRPK1 τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 1x PBS/4% πάρα-φορμαλδεΰδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ για τον ενδογενή ανοσοφθορισμό της ERH τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 1x PBS/4% παραφορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Πλένουμε με κρύο 1x PBS 3 φορές, για 5 λεπτά.

- Αφήνουμε τα κύτταρα για 15 λεπτά με 1x PBS/1% Triton X-100 στους 4°C, προκειμένου να γίνει διάνοιξη των μεμβρανών των κυττάρων (για τον ενδογενή ανοσοφθορισμό της ERH η διάνοιξη έγινε με 1x PBS/0,5% Triton X-100 για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου).

- Πλένουμε με κρύο 1x PBS/0,1% Tween 20, 3 φορές, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Κορένουμε τις μη ειδικές θέσεις στις καλυπτρίδες με PBS/0,1% Tween 20/1% BSA στους 4°C για όλη τη νύχτα ή για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

- Προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα σε PBS/0,1% Tween 20/1% BSA (Πίνακας 4).

- Απομακρύνουμε το πρώτο αντίσωμα με 3 διαδοχικές πλύσεις 1x PBS/0,1% Tween 20.

- Προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα (έναντι της IgG κουνελιού ή ποντικού συνδεδεμένο με κάποια φθορίζουσα ομάδα) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) σε αραιώση 1:500 σε PBS/0,1% Tween 20/1% BSA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

- Απομακρύνουμε το δεύτερο αντίσωμα με 3 διαδοχικές πλύσεις με 1x PBS/0.1% Tween 20.

- Ακολουθεί μια πλύση με PBS και άλλη μια τελική με H₂O, στεγνώνουμε τις καλυπτρίδες σε χαρτί και τις τοποθετούμε ανάποδα σε αντικειμενοφόρο πλάκα με

5μl υλικό σταθεροποίησης (Vectashield, Vector laboratories ή Mowiol), το οποίο περιέχει και την φθορίζουσα ουσία DAPI (4',6-διάμινο-2-φαινυλινδολη). Η οποία έχει την δυνατότητα να προσδένεται στο DNA και φθορίζοντας να διακρίνονται οι πυρήνες των κυττάρων.

Πίνακας 4: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Απεικονίζεται η προέλευση των αντισωμάτων, η αραίωση που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι ώρες επώασης.

1 ^ο Αντίσωμα	Ωρες επώασης	Αραίωση
αντι-HIF-1α (κουνέλι)	16 ώρες (ολονύκτια)	1:1000
αντι-SAFB1(κουνέλι)	16 ώρες (ολονύκτια)	1:1000
αντι-SAFB2(κουνέλι)	16 ώρες (ολονύκτια)	1:2000
αντι-SRPK1(ποντίκι)	1 ώρα ή 16 ώρες (ολονύκτια)	1:300 1:1000
αντι-ERH(ποντίκι)	16 ώρες (ολονύκτια)	1:20
αντι-Flag(ποντίκι)	1 ώρα	1:10000

Πειραματική διαδικασία φθορισμού:

- Ακολουθούμε τη διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού και μετά την μονιμοποίηση μεταβαίνουμε κατευθείαν στο βήμα των τελικών πλύσεων.
- Πλένουμε με κρύο 1x PBS 3 φορές, για 5 λεπτά και μια με H₂O.
- Τοποθετούμε τις καλυπτρίδες ανάποδα σε αντικειμενοφόρο με 5μl υλικό σταθεροποίησης (Vectashield, Vector laboratories ή Mowiol), το οποίο περιέχει και DAPI.

Οι φωτογραφίες μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού συλλέχθηκαν με το μικροσκόπιο Zeiss AxioPlan Imager.Z2 εξοπλισμένο με κάμερα AxioCam MRm και αντικειμενικό φακό 40x ή καταδυτικό φακό100x, με φίλτρα για DAPI, για εκπομπή στα 488nm και για εκπομπή στα 546nm.Επίσης, σε ορισμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το συν-εστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 εξοπλισμένο με καταδυτικό φακό 63x, του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Πατρών.

Γ.17.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ IMAGEJ

Για την ανάλυση των σημάτων ανοσοφθορισμού των πρωτεϊνών SAFB και ERH και του συνεντοπισμού τους χρησιμοποιήθηκαν τα πρόσθετα (plugin) του προγράμματος ImageJ [175]. Ο έλεγχος της συνεπικάλυψης των δύο σημάτων φθορισμού (σε διαφορετικά κανάλια εκπομπής) εκφράστηκε με βάση τους συντελεστές συνεντοπισμού Pearson, Manders και σαν ένα διάγραμμα διασποράς (scatter plot) που προέκυψαν από την ανάλυση. Ο συντελεστής Pearson είναι ένας ποιοτικός δείκτης της αλληλοεπικάλυψης των δύο σημάτων φθορισμού και η αριθμητική τιμή του κυμαίνεται από -1 έως +1 (-1: Αρνητική επικάλυψη, 0: Τυχαία επικάλυψη, +1: Θετική επικάλυψη). Ο συντελεστής Manders αποτελεί μια επέκταση του συντελεστή Pearson και εκφράζει ποσοτικά το ποσοστό επικάλυψης των σημάτων φθορισμού και η τιμή του κυμαίνεται από το 0 έως το +1 (π.χ. η τιμή=0,5 δείχνει ότι τα δύο διαφορετικά σήματα φθορισμού επικαλύπτονται σε ποσοστό 50%). Τα πρόσθετα εργαλεία (plugin) του ImageJ που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Colocalization Threshold και JACoP αφού εφαρμόστηκε η μέθοδος Costes για την κανονικοποίηση της ανάλυσης (Costes' automatic threshold). Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως περιοχή ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI) η περιοχή του πυρήνα των κυττάρων για ένα σύνολο 15 κυττάρων από δύο διαφορετικά πειράματα ανά συνθήκη.

Γ.18 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ α (ER α)

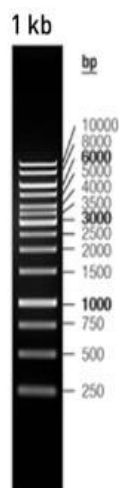
Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξειδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg^{2+} , παράγοντας φώς το οποίο μπορεί να μετρηθεί σε λουμινόμετρο. Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα των οιστρογόνων ER α σε κύτταρα MCF-7, τα οποία τον εκφράζουν ενδογενώς. Για όλα τα πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ερυθρό της φαινόλης (phenol red), με 10% DCC-FBS και αντιβιοτικά στους 37°C, 5%CO₂. Σαν πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το pGL2-3xERE-TATA-Luc και σαν πλασμίδιο μάρτυρας το pCI-Renilla το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση από τον

οργανισμό *Renilla reniformis* [46]. Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συνθήκη για κάθε πείραμα έγινε με τη μέθοδο που χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο PEI. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την διαμόλυνση τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 24 ώρες με 10^{-8} M οιστραδιόλη (E2).

Πειραματική διαδικασία:

- Τα κύτταρα λύθηκαν με 100-150μl διαλύματος λύσης (περιέχεται στο luciferase assaysystem kit της Promega).
- Επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση.
- Τα εκχυλίσματα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000xg για 1 λεπτό.
- Τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου.
- 20μl από το υπερκείμενο των κυττάρων αναμίχθηκε με 20μl του διαλύματος της λουσιφερίνης (του luciferase assay reagent, Promega) και το φως που παρήχθη μετρήθηκε σε λουμινόμετρο. Για την μέτρηση της ενεργότητας του γονιδίου μάρτυρα 10μl από το διάλυμα stop & glo (του luciferase assay reagent, Promega) προστέθηκαν στο ίδιο σωληνάκι και το φως που παρήχθη μετρήθηκε ξανά στο λουμινόμετρο.

Γ.19 ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ DNA



Εικόνα 28: Μάρτυρας μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (Thermo Scientific) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

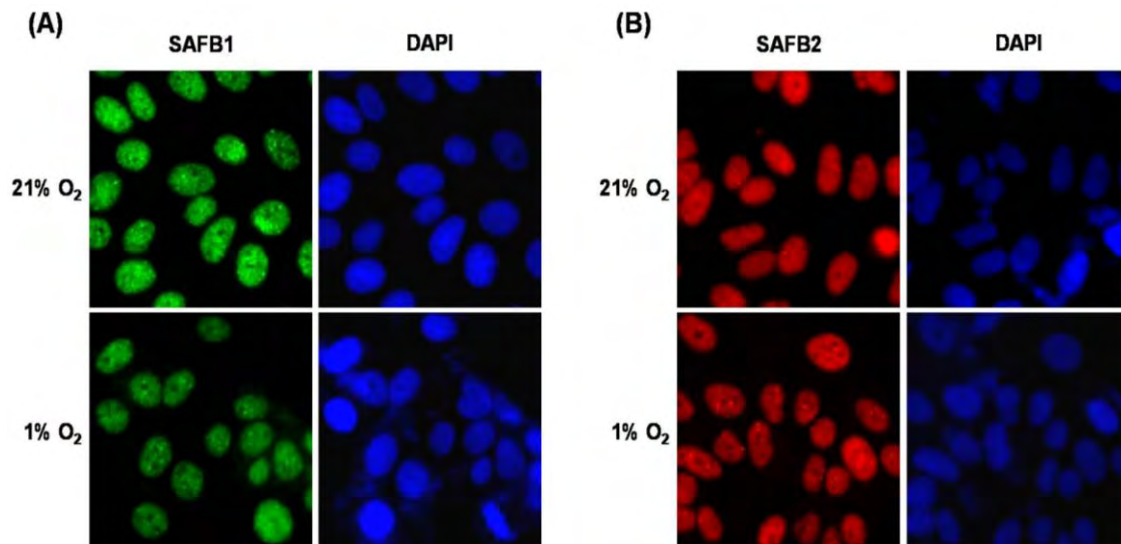
Δ.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ SAFB1/2 ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή οι παράγοντες SAFB έχουν σαν κοινό γνώρισμα τον εντοπισμό τους στην πυρηνική μήτρα, μέσω της ικανότητά τους να δεσμεύονται στις περιοχές S/MAR του DNA, αποτελώντας δομικά στοιχεία για την οργάνωση της χρωματίνης σε μια δομή ανώτερης τάξης. Σε πρόσφατα αλλά και παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα κυρίως του SAFB1, του έχει αποδοθεί ο ρόλος της αρχιτεκτονικής πρωτεΐνης της χρωματίνης. Είναι γνωστό ότι κάτω από στρεσογόνες συνθήκες η οργάνωση της χρωματίνης αλλάζει, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην γενωμική σταθερότητα του κυττάρου. Ο SAFB1 έχει μελετηθεί μόνο κάτω από την επίδραση θερμικού σοκ, όπου παρατηρήθηκε η υποπυρηνική μετακίνηση του σε δομές που ονομάζονται stress-induced sub-nuclear bodies (SNBs) [83, 84]. Κρίθηκε λοιπόν σκόπιμη η μελέτη των παραγόντων SAFB ως απόκριση σε μεταβολικές στρεσογόνες συνθήκες, όπως είναι η υποξία και η στέρηση γλυκόζης. Επιλέχθηκαν αυτές οι συνθήκες καθώς είναι γνωστό ότι η ομοιοστασία της ενέργειας όσο και η ομοιοστασία του οξυγόνου του κυττάρου, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις ομοιοπολικές τροποποιήσεις των ιστονών συνεπώς και της διαμόρφωσης της χρωματίνης (εισαγωγή παράγραφος A.1.4.).

Δ.1.1. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΞΙΑΣ

Δ.1.1.1. Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών SAFB1/2.

Κύτταρα MCF-7 καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές συνθήκες (1% O₂) για 24 ώρες, και ύστερα από την μονιμοποίηση τους σε καλυπτρίδες, ακολούθησε μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με την χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης του SAFB1 και του SAFB2, αντίστοιχα, όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι (Y&M), παράγραφος Γ.17.

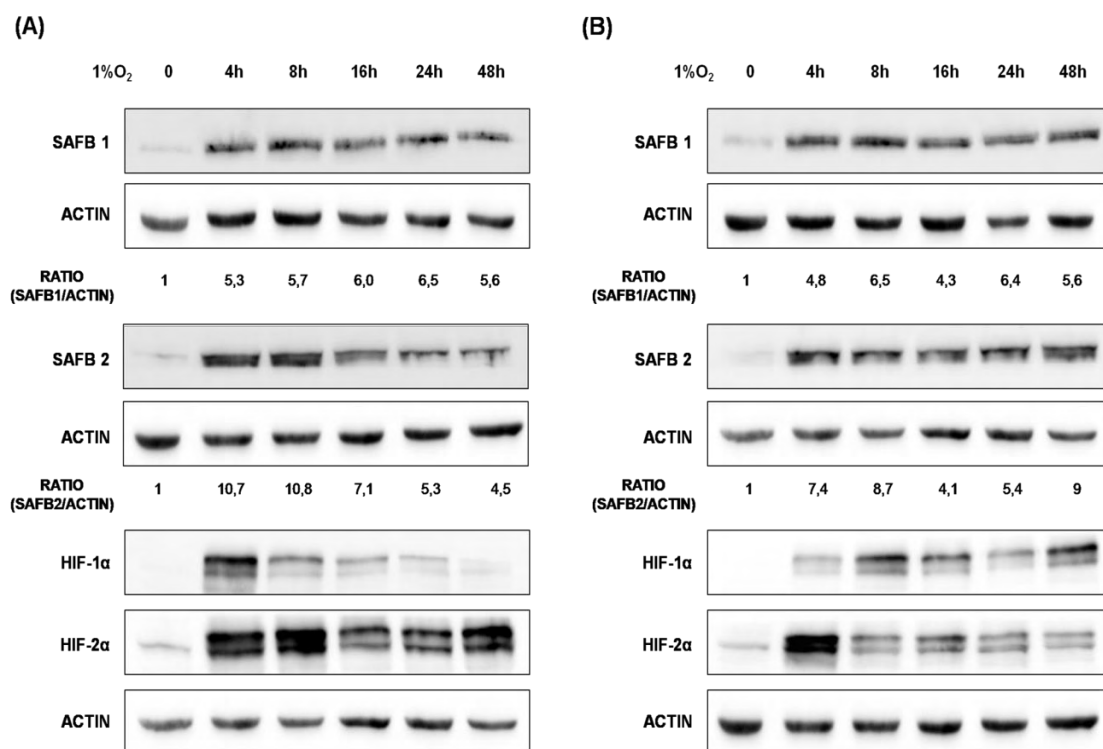


Εικόνα 29: Επίδραση της υποξίας στον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2, σε κύτταρα MCF-7. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές (1% O₂) συνθήκες, για 24 ώρες και ακολούθησε η διαδικασία έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των ενδογενών SAFB1 (A) και SAFB2 (B) με ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1 και αντι-SAFB2. Για την ανίχνευση των πυρήνων, έγινε χρώση του DNA με DAPI.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 29, ο κυτταρικός εντοπισμός των SAFB1/2 δεν μεταβάλλεται στην υποξία, καθώς αυτός παραμένει αποκλειστικά πυρηνικός, με κάποιες διακριτές κοκκιώδεις δομές, όπως και στη νορμοξία.

Δ.1.1.2. Πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2.

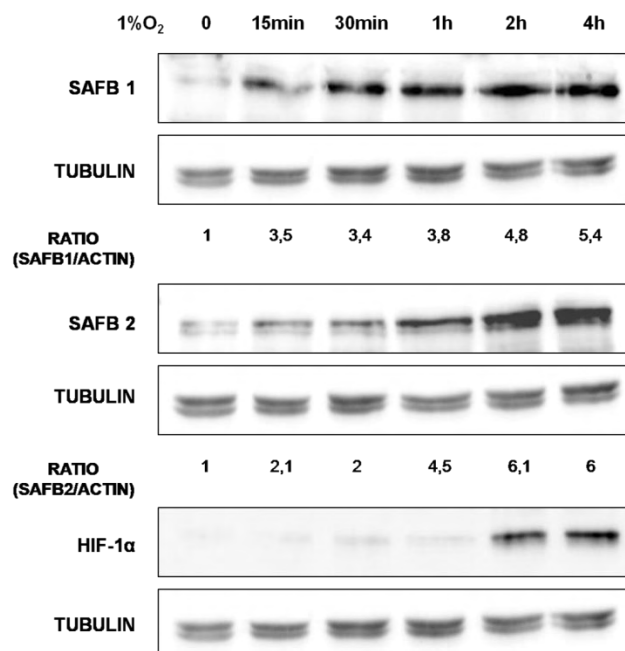
Μελετήθηκαν στη συνέχεια τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1 και SAFB2 υπό την χρονοεξαρτώμενη επίδραση της υποξίας (1% O₂). Για το σκοπό αυτό, καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7) αλλά και καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa) επώαστηκαν για 0, 4, 8, 16, 24 και 48 ώρες, σε 1% O₂. Για την λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης το οποίο περιείχε το μη ιοντικό απορρυπαντικό Triton-X 100, σε συγκέντρωση 1% v/v (Lysis Buffer), όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.13. Στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν τα ποσά των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με την χρήση αντισωμάτων αντι-SAFB1 και αντι-SAFB2.



Εικόνα 30: Επίδραση της υποξίας για 0-48 ώρες στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών SAFB1/2. Κύτταρα MCF-7 (A) και κύτταρα HeLa (B) επώαστηκαν για 48 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες (21% O₂) και για 0-48 ώρες σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-HIF-1α, αντι-HIF-2α και αντι-Actin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 30, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του SAFB1 αλλά και του SAFB2 ήδη στις 4 ώρες υποξίας και στις δύο κυτταρικές σειρές, MCF-7 (A) και HeLa (B). Η αύξηση παρέμεινε στα ίδια επίπεδα έως και τις 48 ώρες υποξίας. Ως μάρτυρας υποξίας χρησιμοποιήθηκε η ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων των HIF-1α και HIF-2α, οι οποίοι είναι οι κύριοι μεταφραστικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την προσαρμογή του κυττάρου σε χαμηλές συγκεντρώσεις O₂. Όπως φαίνονται στην εικόνα εκφράζονται και επάγονται και στις δύο κυτταρικές σειρές. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η αύξηση των επιπέδων των SAFB1/2 δεν είναι κυτταροειδική. Για την υπόλοιπη μελέτη επιλέχθηκαν τα κύτταρα MCF-7, καθώς οι παράγοντες SAFB έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, κυρίως σε κύτταρα καρκίνου του μαστού.

Προκειμένου να εντοπιστεί με περισσότερη ακρίβεια η χρονική στιγμή κατά την οποία αρχίζει η επαγωγή, κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 0, 15, 30 λεπτά, 1, 2 και 4 ώρες σε 1% O₂ και λύθηκαν όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

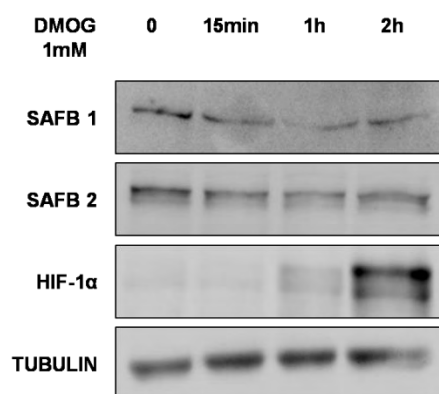


Εικόνα 31: Επίδραση της υποξίας για 0-4 ώρες στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών SAFB1/2. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 4 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες (21% O₂) και για 0-4 ώρες σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-HIF-1α και αντι-Tubulin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του SAFB1 και SAFB2 παρατηρήθηκε ήδη από τα 15 λεπτά υποξίας. Έπειτα από 4 ώρες επώασης σε 1% O₂ δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων τους (Εικόνα 31). Η επαγωγή του SAFB2 φαίνεται να είναι πιο σταδιακή. Το αποτέλεσμα αυτό, δείχνει άμεση απόκριση και για τις δύο πρωτεΐνες, σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου.

Δ.1.1.3. Επίδραση των HIF-1α και HIF-2α στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2.

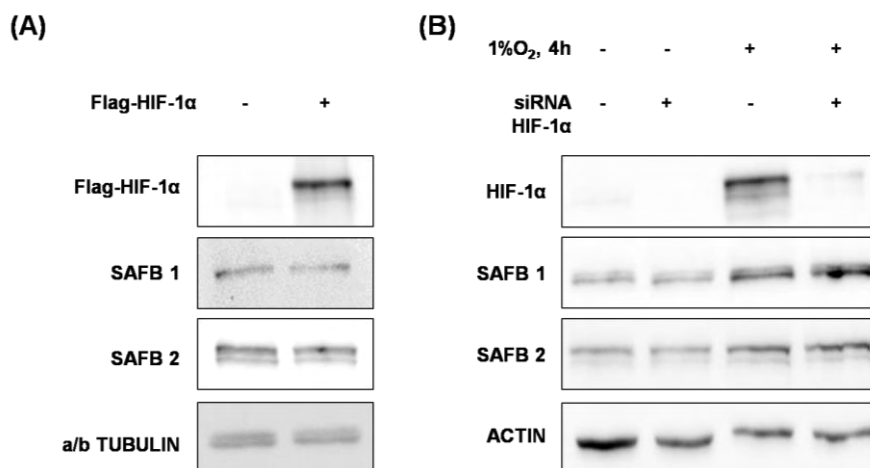
Διερευνήθηκε αρχικά η συμμετοχή των HIF στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1/2, με το χημικό “μιμητή της υποξίας” dimethyloxalylglycine (DMOG), έναν ανασταλτικό παράγοντα των προλυλο-υδροξυλασών (PHDs), οι οποίες υδροξυλιώνουν τον HIF-1α και τον HIF-2α προκαλώντας την επαγωγή τους. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν με 1 mM DMOG για 0, 15 λεπτά, 1 και 2 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1, SAFB2 και του HIF1α μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.



Εικόνα 32: Επίδραση του DMOG, για 0-2 ώρες στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών SAFB1/2. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν απουσία ή παρουσία 1mM DMOG για 0-2 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-HIF-1α και αντι-Tubulin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή παρουσία του DMOG στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1 και SAFB2, γεγονός που δηλώνει πως οι παρατηρούμενες μεταβολές στην υποξία είναι ανεξάρτητες της δράσης των PHDs (Εικόνα 32).

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν ο HIF-1α εμπλέκεται άμεσα στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1 και SAFB2. Σε κύτταρα MCF-7 υπερεκφράστηκε ο Flag-HIF-1α και μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των παραγόντων SAFB, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.

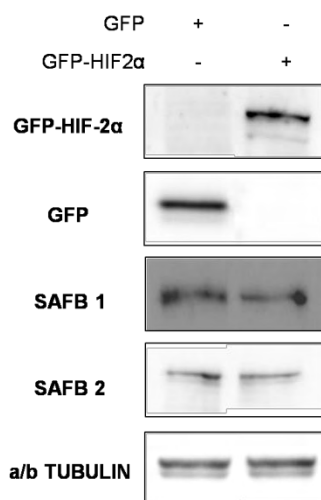


Εικόνα 33: Επίδραση της υπερέκφρασης του Flag-HIF-1α και της αποσιώπησης του HIF-1α στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1 και SAFB2. Α) Κύτταρα MCF7 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA3.1-Flag και pcDNA3.1-Flag-HIF-1α και επωάστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Β) Κύτταρα MCF-7 διαμολύνθηκαν με το siRNA μάρτυρα ή με το siRNA για τον HIF-1α (10nM) και 24 ώρες μετά επωάστηκαν για 4 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές συνθήκες (1% O₂). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-HIF-1α, αντι-a/b Tubulin και αντι-Actin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 33 δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2 παρουσία του υπερεκφρασμένου HIF-1α.

Για την επιβεβαίωση του παραπάνω αποτελέσματος, έγιναν πειράματα αποσιώπησης της έκφρασης του HIF-1α με siRNA σε κύτταρα MCF-7, τα οποία επωάστηκαν σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές συνθήκες (1% O₂), για 4 ώρες. Τα αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α δεν εμπλέκεται άμεσα στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1/2, καθώς η αποσιώπησή του δεν μετέβαλε τα πρωτεϊνικά επίπεδα τους.

Τέλος, επειδή τα κύτταρα MCF-7 εκφράζουν και τον HIF-2α, διερευνήθηκε το ενδεχόμενο της εμπλοκής του HIF-2α στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1 και SAFB2. Κύτταρα MCF-7 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει τον HIF-2α σε σύντηξη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP.



Εικόνα 34: Επίδραση της υπερέκφρασης του GFP-HIF-2α στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1 και SAFB2. Κύτταρα MCF-7 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pEGFP-C1 ή pEGFP-C1-HIF2α και επώαστηκαν για 24 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-GFP και αντι-a/b Tubulin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

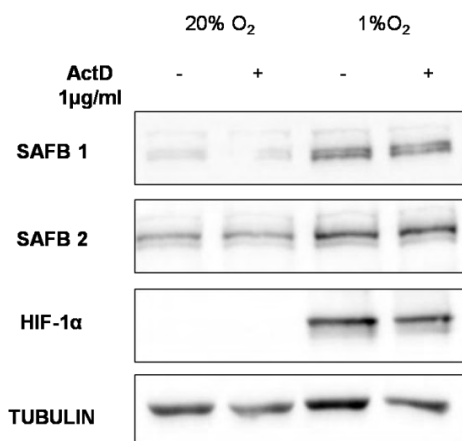
Όπως φαίνεται στην εικόνα 34, ο υπερεκφρασμένος GFP-HIF-2α δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2.

Συμπερασματικά, η παρατηρούμενη άμεση μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1/2, υπό την επίδραση της υποξίας είναι ανεξάρτητη των HIF-1α και HIF-2α

Δ.1.1.4. Διερεύνηση του μεταγραφικού μηχανισμού στην επαγωγή των πρωτεϊνικών επιπέδων των SAFB1/2.

Με σκοπό να διερευνηθεί αν η αύξηση που παρατηρείται, αν και ανεξάρτητη των HIFs, συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο χρησιμοποιήθηκε ένας γνωστός αναστολέας του μηχανισμού της μεταγραφής, η ακτινομυκίνη D (ActD). Κύτταρα MCF-7 προ-επώαστηκαν για 30 λεπτά με 1 μg/ml ActD και ακολούθησε επώαση σε φυσιολογικές ή υποξικές συνθήκες, για 8 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1, SAFB2 και HIF1α μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η παρουσία του αναστολέα της μεταγραφής δεν επηρέασε τα επίπεδα του HIF-1α όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά ούτε και τα επίπεδα των SAFB1 και SAFB2 (Εικόνα 35).

Συνεπώς, η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του SAFB1 και SAFB2 σε συνθήκες υποξίας δεν συμβαίνει στο επίπεδο της μεταγραφής των mRNA τους, γεγονός που συνηγορείται από την χρονικά γρήγορη επαγωγή τους.



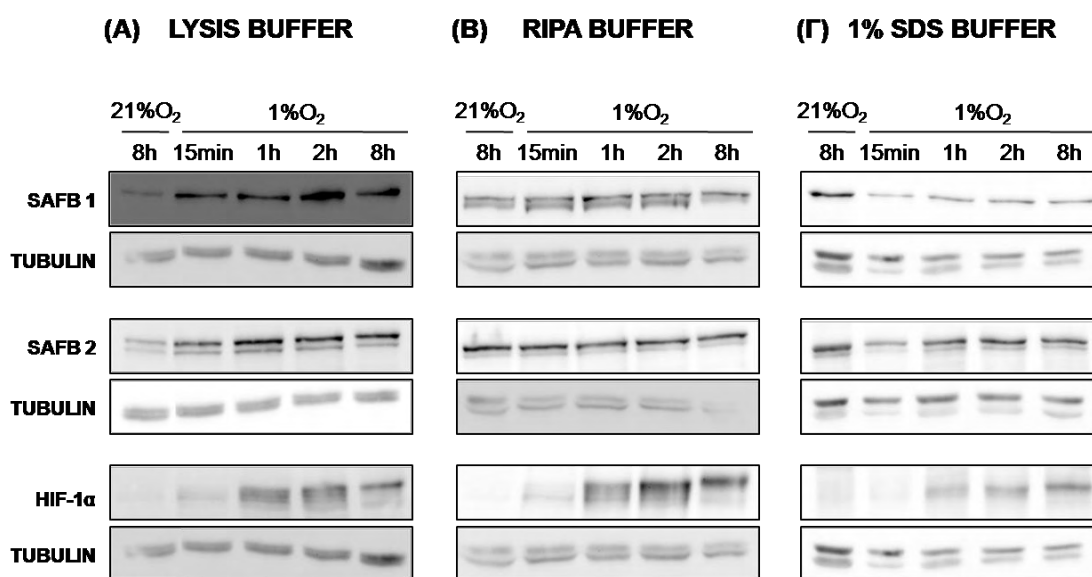
Εικόνα 35: Επίδραση του αναστολέα της μεταγραφής ακτινομυκίνη D (ActD), στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών SAFB1/2, ύστερα από επώαση στην υποξία. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν απουσία ή παρουσία 1μg/ml ActD για 30 λεπτά και στη συνέχεια για 8 ώρες, σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές συνθήκες (1% O₂). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-HIF-1α και αντι-Tubulin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Δ.1.1.5. Έλεγχος διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των SAFB1/2.

Δεδομένου ότι οι SAFB1/2 είναι πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας και η παρατηρούμενη αλλαγή συμβαίνει σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, εξετάσαμε κατά πόσον η υποξία επηρεάζει μια κύρια ιδιότητά τους, την προσκόλληση τους στον πυρηνικό σκελετό μέσω της δέσμευσής τους στις S/MAR περιοχές.

Διερευνήθηκε το ενδεχόμενο, η αύξηση στην υποξία να οφείλεται σε αύξηση του διαλυτού κλάσματος των SAFB, λόγω μετατόπισής τους από το ισχυρά συνδεδεμένο κλάσμα τους με τον πυρηνικό σκελετό στο διαλυτό πυρηνικό κλάσμα, το πυρηνόπλασμα. Προκειμένου να διευκρινιστεί αυτός ο μηχανισμός πραγματοποιήθηκαν αρχικά συγκριτικά πειράματα ταυτόχρονης λύσης κυττάρων MCF-7, στα ίδια χρονικά διαστήματα επώασης τους στην υποξία με τρεις διαφορετικούς τρόπους, όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.13. Πρώτος τρόπος ήταν το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιούταν στις μέχρι στιγμής κατεργασίες

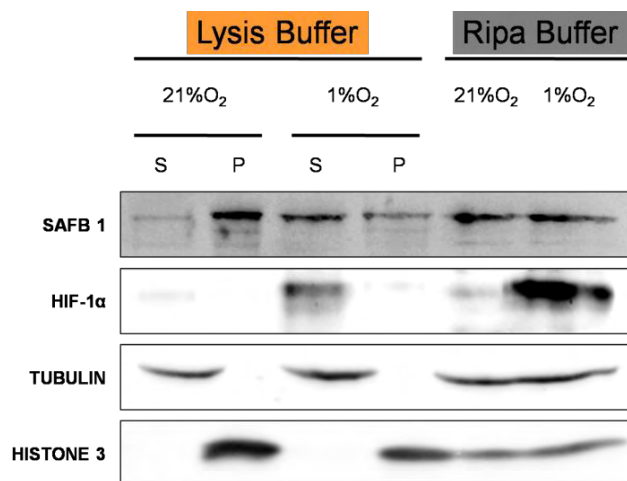
των κυττάρων και το οποίο περιέχει το μη ιοντικό απορρυπαντικό, Triton-X 100 1% (Lysis Buffer). Το διάλυμα αυτό αποτελεί έναν ήπιο τρόπο λύσης του κυττάρου λόγω του ήπιου απορρυπαντικού που περιέχει. Με το Triton-X 100 επιτυγχάνεται η λύση του κυττάρου χωρίς όμως την πλήρη αποδιάταξη των ισχυρών ιοντικών συμπλόκων και την διαλυτοποίηση πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης, της πυρηνικής μήτρας και της χρωματίνης γεγονός που συντελεί στην μειωμένη απόδοση πυρηνικών πρωτεϊνών. Δεύτερος τρόπος ήταν με την χρήση διαλύματος που περιέχει ένα μη ιοντικό και δύο ιοντικά απορρυπαντικά 0,5% NP-40, 0,5% NaDeoxycholate, 0,1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), (Ripa Buffer). Τρίτος τρόπος ήταν με τη λύση των κυττάρων κατευθείαν σε Laemli Buffer 2x, ώστε η τελική συγκέντρωση του SDS να είναι 1%. Με τους δύο τελευταίους τρόπους στο ολικό εκχύλισμα των κυττάρων εμπεριέχονται εκτός από τις διαλυτές πρωτεΐνες του κυττάρου και οι μη διαλυτές πυρηνικές πρωτεΐνες καθώς επιτυγχάνεται η διαλυτοποίησή τους, αλλά και εξαλείφονται οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 36: Έλεγχος τριών διαφορετικών τρόπων λύσης και συλλογής κυτταρικών εκχυλισμάτων, στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ενδογενών SAFB1/2, ύστερα από επώαση στην υποξία για 0-8 ώρες. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 8 ώρες σε φυσιολογικές συνθήκες (21% O₂) και για 0-8 ώρες σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με Α) Lysis Buffer, Β) RIPA Buffer και Γ) Laemli Buffer τελικής συγκέντρωσης 1% SDS Buffer. Στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-HIF-1α και αντι-Tubulin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 36, ενώ παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αύξηση των SAFB1/2 ήδη από τα 15 λεπτά επώασης στην υποξία ύστερα από τη λύση των κυττάρων με Lysis Buffer (εικόνα 36 A), δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2 όταν τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν ύστερα από τη λύση των κυττάρων με Ripa Buffer (εικόνα 36 B) ή Laemli Buffer (εικόνα 36 Γ). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μάρτυρα της υποξίας, HIF-1α, φαίνεται να αυξάνονται χρονοεξαρτώμενα, χωρίς να επηρεάζονται από τον διαφορετικό τρόπο λύσης των κυττάρων, όπως ήταν αναμενόμενο.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η υπόθεση της αύξησης του διαλυτού κλάσματος των SAFB1/2 στην υποξία πραγματοποιήθηκαν πειράματα, στα οποία κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν σε φυσιολογικές και υποξικές συνθήκες για 4 ώρες και τα επίπεδα των SAFB1/2 ανιχνεύθηκαν στο διαλυτό αλλά και στο αδιάλυτο κλάσμα. Τα κύτταρα λύθηκαν με Lysis Buffer και το αδιάλυτο μέρος των κυτταρικών εκχυλισμάτων που απέμεινε μετά την φυγοκέντρηση που πραγματοποιείται για τη συλλογή του διαλυτού κλάσματος επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 2x Laemli Buffer (Y&M, παράγραφος Γ.13). Το αδιάλυτο αυτό κλάσμα, περιέχει χρωματίνη και πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας, καθώς βιοχημικά η πυρηνική μήτρα έχει οριστεί ως το δίκτυο πρωτεϊνών και RNA που παραμένει αδιάλυτο έπειτα από την κατεργασία με μη ιοντικά απορρυπαντικά, διαλύματα αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και DNase I. Ταυτόχρονα, κύτταρα τα οποία επώαστηκαν για 4 ώρες στην υποξία, λύθηκαν με Ripa Buffer και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας των μη μεταβαλλόμενων πρωτεϊνικών επιπέδων του SAFB1 στην υποξία συγκριτικά με την νορμοξία, όπως φάνηκε στα παραπάνω αποτελέσματα των πειραμάτων ελέγχου του διαλυτού και του αδιάλυτου κλάσματος, εικόνα 36 B. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1, SAFB2, HIF1α, τουμπουλίνης και ιστόνης 3 μελετήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Η ιστόνη 3 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας πυρηνικών αδιάλυτων πρωτεϊνών της χρωματίνης, η οποία είναι γνωστό ότι σε ήπιες συνθήκες λύσης των κυττάρων παραμένει αδιάλυτη. Ο HIF-1α χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας υποξίας αλλά και ως μάρτυρας διαλυτού πυρηνικού κλάσματος και τέλος η τουμπουλίνη των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων δείχνει σε κάθε περίπτωση ότι τα αντίστοιχα κλάσματα είναι ισοφορτωμένα στην ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 37: Κατανομή της πρωτεΐνης SAFB1 στο διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα του κυττάρου, ύστερα από επώαση στην υποξία. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 4 ώρες σε φυσιολογικές (21% O₂) και σε υποξικές συνθήκες (1% O₂). Τα κύτταρα λύθηκαν είτε με Lysis Buffer είτε με Ripa Buffer. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-HIF-1α, αντι-Tubulin και αντι-Histone 3, όπως σημειώνονται στην εικόνα. S: το ολικό διαλυτό κυτταρικό εκχύλισμα και P: το επαναδιαλυτοποιημένο ίζημα ύστερα από λύση των κυττάρων με Lysis Buffer.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 37 η ιστόνη 3 ανιχνεύεται όπως ήταν αναμενόμενο στα εκχυλίσματα κυττάρων που λύθηκαν με Ripa Buffer. Απουσιάζει όμως από τις διαλυτές πρωτεΐνες (S) και ανιχνεύεται μόνο στις μη διαλυτές πυρηνικές πρωτεΐνες (P) κυττάρων που λύθηκαν με Lysis Buffer, αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει ότι οι πυρηνικές πρωτεΐνες της χρωματίνης, όπως η ιστόνη 3, είναι δυσδιάλυτες σε μη ιοντικά απορρυπαντικά. Σε κύτταρα τα οποία λύθηκαν με Ripa Buffer ενώ είχαν επωαστεί σε φυσιολογικές και εποξικές συνθήκες για 4 ώρες, ανιχνεύθηκε η τουμπουλίνη, καθώς και ο μάρτυρας της υποξίας HIF-1α και δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή των SAFB1/2, όπως ήταν αναμενόμενο. Στην περίπτωση κυττάρων που λύθηκαν με Lysis Buffer στις ίδιες συνθήκες ανοσοανιχνεύθηκε στο διαλυτό ολικό κυτταρικό εκχύλισμα, η τουμπουλίνη και ο HIF-1α ως διαλυτή πρωτεΐνη του πυρηνοπλάσματος. Τέλος, παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αύξηση στην υποξία στα πρωτεϊνικά επίπεδα του SAFB1, στο κλάσμα που εμπεριέχονται όλες οι διαλυτές πρωτεΐνες των ολικών εκχυλισμάτων (S) με ταυτόχρονη μείωση στο κλάσμα που εμπεριέχονται όλες οι πρωτεΐνες της χρωματίνης και της πυρηνικής μήτρας (P).

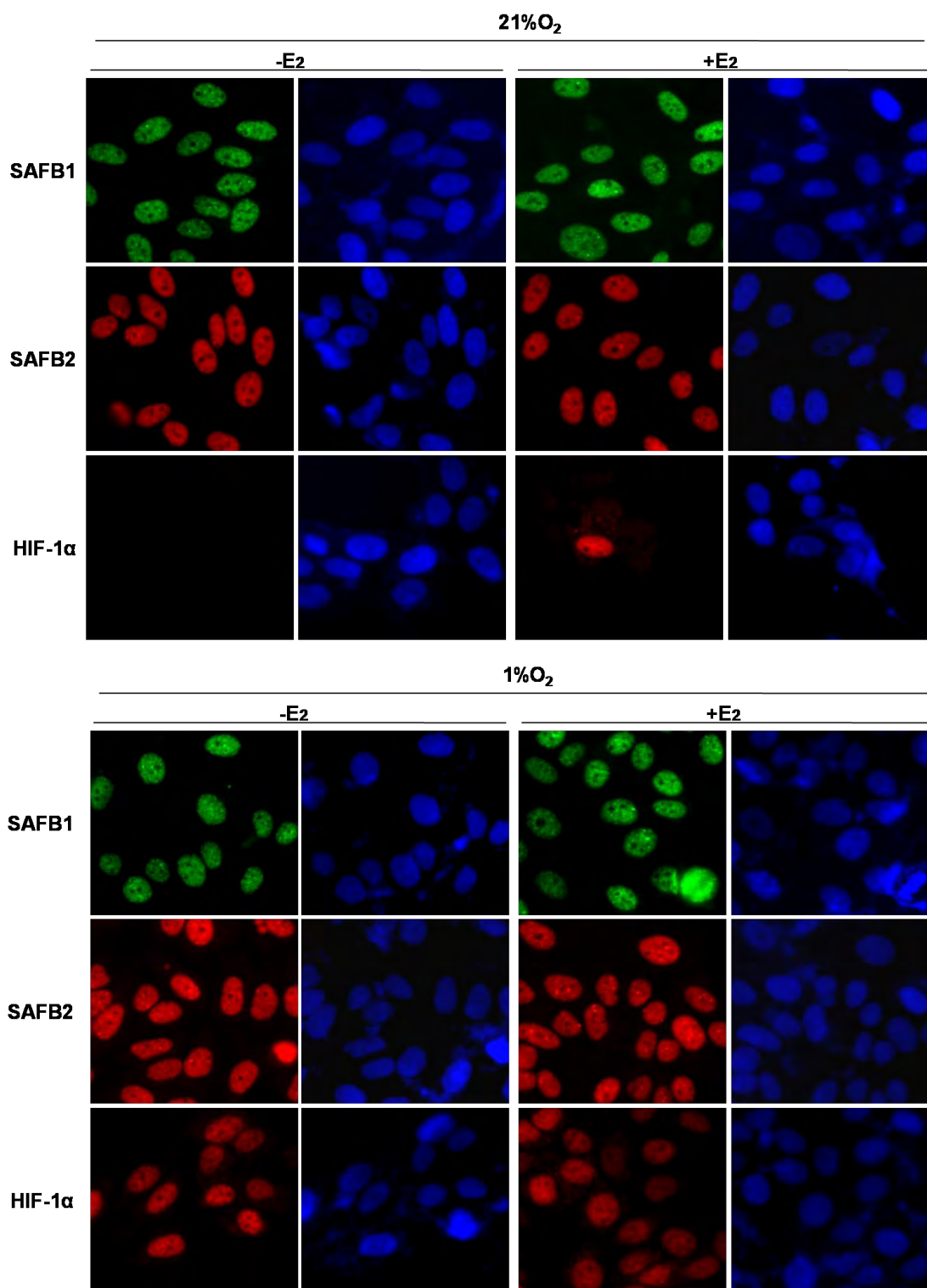
Το αποτέλεσμα αυτό συνηγορεί στην υπόθεση της αύξησης του διαλυτού κλάσματος του SAFB1 σε υποξικές συνθήκες, λόγω μετατόπισής του στο πυρηνόπλασμα.

Δ.1.1.6. Έλεγχος της κατασταλτικής δράσης των SAFB1/2 στην μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα των οιστρογόνων ERα.

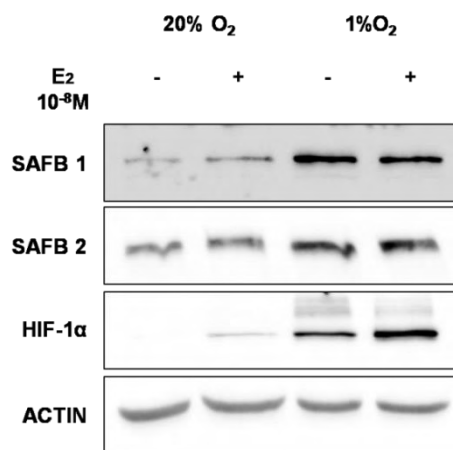
Δεδομένου ότι η υποξία επιδρά στους SAFB1/2 αυξάνοντας την μετατόπισή του στο πυρηνόπλασμα, διερευνήθηκε κατά πόσον αυτό το φαινόμενο έχει αντίκτυπο σε μία από τις καλύτερα περιγραμμένες ιδιότητές τους, τη συγκαταστολή του ERα (εισαγωγή παράγραφος Α.2.4.3).

Εφόσον δεν είναι γνωστό από βιβλιογραφικές πηγές, διερευνήθηκε καταρχήν κατά πόσον η E2 επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό ή τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2, σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες.

Κύτταρα MCF-7 επώστηκαν για 24 ώρες απουσία και παρουσία 10⁻⁸ M E2 σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές συνθήκες (1% O₂). Μελετήθηκαν παράλληλα τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1, SAFB2 και του HIF1α με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης ύστερα από λύση των κυττάρων με Lysis Buffer, καθώς και ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με την χρήση των ειδικών αντισωμάτων.



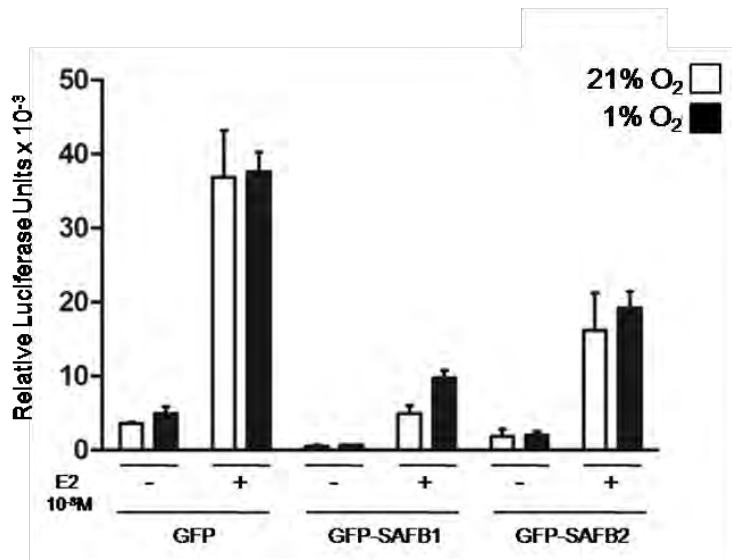
Εικόνα 38: Επίδραση της οιστραδιόλης (E2) για 24 ώρες σε φυσιολογικές ή υποξικές συνθήκες στον υποπυρηνικό εντοπισμό των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2, σε κύτταρα MCF-7. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 24 ώρες απουσία και παρουσία 10^{-8} M οιστραδιόλης (E2) σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Ακολούθησε η διαδικασία έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του ενδογενούς SAFB1 και του ενδογενούς SAFB2 με ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1 και αντι-SAFB2. Για την ανίχνευση των πυρήνων, έγινε χρώση του DNA με DAPI.



Εικόνα 39: Επίδραση της οιστραδιόλης για 24 ώρες σε φυσιολογικές ή υποξικές συνθήκες στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών SAFB1/2, σε κύτταρα MCF-7. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 24 ώρες απουσία και παρουσία 10⁻⁸ M οιστραδιόλης (E2) σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτόπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-HIF-1α και αντι-Actin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Όπως φαίνεται στις εικόνες 38 και 39, ο υποκυτταρικός εντοπισμός αλλά και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1 και SAFB2 δεν μεταβλήθηκαν παρουσία οιστραδιόλης σε φυσιολογικές ή υποξικές συνθήκες. Η προσθήκη της οιστραδιόλης φαίνεται να επάγει τον HIF-1α στην νορμοξία αλλά και την υποξία, σύμφωνα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό (εικόνα 38) αλλά και τα πρωτεϊνικά επίπεδά του (εικόνα 39), αποτέλεσμα που είναι βιβλιογραφικά γνωστό [176].

Στη συνέχεια, κύτταρα MCF-7 συνδιαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς 3xERE-TATA-Luc και pCI-Renilla μαζί με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα που εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP ή τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα που εκφράζει τον SAFB1 ή τον SAFB2 σε σύντηξη με την GFP. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 24 ώρες παρουσία ή απουσία 10⁻⁸ M οιστραδιόλης, σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές συνθήκες (1% O₂). Ακολούθησε λύση των κυττάρων και μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του ERα όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.18. Υπενθυμίζεται ότι τα κύτταρα MCF-7 εκφράζουν τον υποδοχέα ERα ενδογενώς.



Εικόνα 40: Επίδραση της υποξίας στη λειτουργική δράση των SAFB1 και SAFB2. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των ERE (estrogen response elements) σε συνδιαμολυσμένα κύτταρα MCF7 με το πλασμίδιο αναφοράς 3X ERE-TATA-Luc και τα πλασμίδια pEGFP-SAFB1 ή pEGFP-SAFB2, τα οποία επώαστηκαν για 24 ώρες παρουσία ή απουσία 10⁻⁸M οιστραδιόλης (E2), σε φυσιολογικές (20% O₂) ή υποξικές συνθήκες (1% O₂). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρων 6 τιμών από 2 ανεξάρτητα πειράματα. Στην εικόνα παρουσιάζεται με μπάρες το τυπικό σφάλμα.

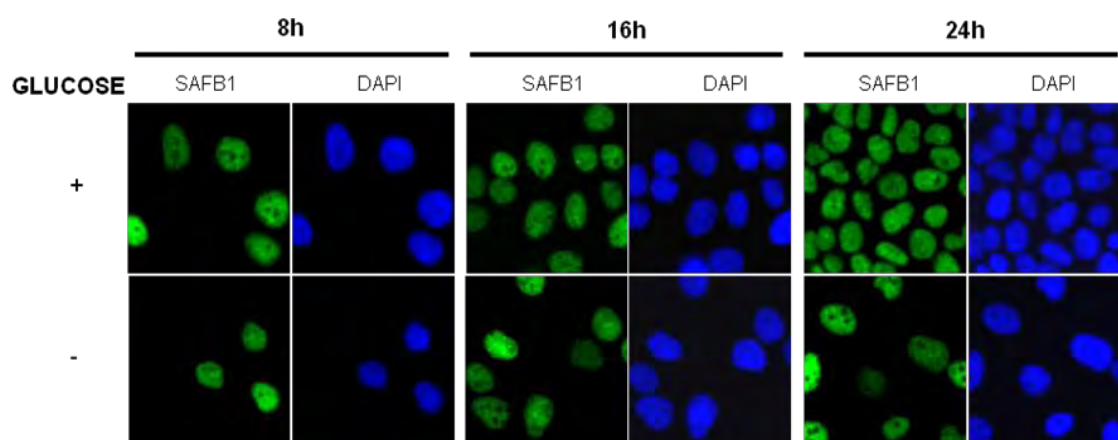
Από τα αποτελέσματα αρχικά φαίνεται η επαγωγή που προκαλεί η οιστραδιόλη στη μεταγραφική ενεργότητα του ERα, η οποία είναι πρακτικά ίδια σε φυσιολογικές και υποξικές συνθήκες, με μη στατιστικά σημαντική διαφορά. Στη συνέχεια φαίνεται ότι οι υπερεκφρασμένοι SAFB1 και SAFB2 δρουν με παρόμοιο τρόπο, σε φυσιολογικές και υποξικές συνθήκες, καθώς η καταστολή που προκαλούν είναι ιδίου ποσοστού και μη στατιστικά σημαντική. Συμπερασματικά, η υποξία δεν φαίνεται να επηρεάζει την δράση τους ως συγκαταστολείς του ERα (Εικόνα 40).

Συνοπτικά από τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα, προκύπτει ότι η υποξία προκαλεί πολύ γρήγορη αύξηση του διαλυτού πυρηνικού κλάσματος των SAFB1 και του SAFB2, ανεξάρτητη των μεταγραφικών παραγόντων HIFs. Αυτή η αύξηση δεν φαίνεται να επηρεάζει την καταστολή που προκαλούν οι SAFB1/2 στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα.

Δ.1.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΕΡΗΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Δ.1.2.1. Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών SAFB1/2.

Διερευνήθηκε η επίδραση της στέρησης γλυκόζης, από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας των κυττάρων στον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης του SAFB1. Κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7) καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες στέρησης γλυκόζης για 8, 16 και 24 ώρες. Ακολούθησε μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με την χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του SAFB1.



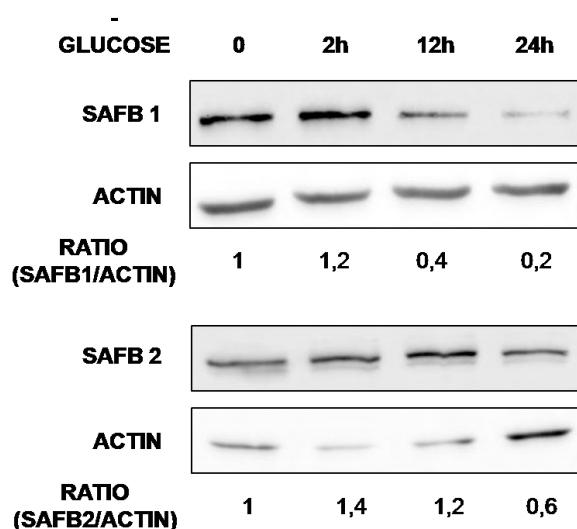
Εικόνα 41: Επίδραση της στέρησης γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας στον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης SAFB1, σε κύτταρα Huh7. Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες στέρησης γλυκόζης, για 8, 16 και 24 ώρες. Ακολούθησε η διαδικασία έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του ενδογενούς SAFB1 με ειδικό αντίσωμα αντι-SAFB1. Για την ανίχνευση των πυρήνων, έγινε χρώση του DNA με DAPI.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 41, ο κυτταρικός εντοπισμός του SAFB1 δεν μεταβάλλεται απουσία γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο, καθώς αυτός παραμένει κυτταρικός, με κάποιες διακριτές κοκκιώδεις δομές, όπως και παρουσία γλυκόζης.

Δ.1.2.2. Πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2.

Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 0, 2, 12 και 24 ώρες, σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσιάζει η γλυκόζη. Για την λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα λύσης, Lysis Buffer και στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν τα

ποσά των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με την χρήση των ειδικών αντισωμάτων.



Εικόνα 42: Επίδραση της στέρησης γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας για 0-24 ώρες στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενδογενών SAFB1/2, σε κύτταρα HeLa. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 24 ώρες παρουσία γλυκόζης και για 8, 12 και 24 ώρες απουσία γλυκόζης. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2 και αντι-Actin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 42, παρατηρήθηκε σημαντική χρονοεξαρτώμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του SAFB1 από τις 12 ώρες επώασης σε θρεπτικό υλικό από το οποίο απουσιάζει η γλυκόζη, η οποία φαίνεται να φτάνει σε ποσοστό μείωσης 80% στις 24 ώρες. Στην περίπτωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του SAFB2 παρατηρείται μείωση μόνο στις 24 ώρες σε ποσοστό 60%. Έτσι ο SAFB1 φαίνεται να αποκρίνεται νωρίτερα στην απουσία γλυκόζης απ' ό τι ο SAFB2.

Συνοπτικά από τα μέχρι στιγμή αποτελέσματα, προκύπτει ότι η στέρηση γλυκόζης δεν προκαλεί μεταβολή στον υποκυτταρικό εντοπισμό των SAFB1/2 αλλά μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδά τους.

Ανακεφαλαιώνοντας τα αποτελέσματα του πρώτου μέρους (Ενότητα αποτελεσμάτων Δ.1), φαίνεται ότι οι δύο συνθήκες επηρεάζουν τους SAFB1/2 με διαφορετικό τρόπο. Η υποξία φαίνεται να προκαλεί αύξηση του διαλυτού κλάσματος των SAFB1/2, μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου των μεταγραφικών παραγόντων

HIFs, που πιθανόν όμως να σχετίζεται με την ιδιότητά τους να αλληλεπιδρούν με το πυρηνικό κριώμα και πιθανόν με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης σε συνθήκες υποξίας. Αντίθετα, η στέρηση γλυκόζης φαίνεται να μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2, χωρίς όμως να αποκλείεται αυτό να συμβαίνει στο επίπεδο της μεταγραφής.

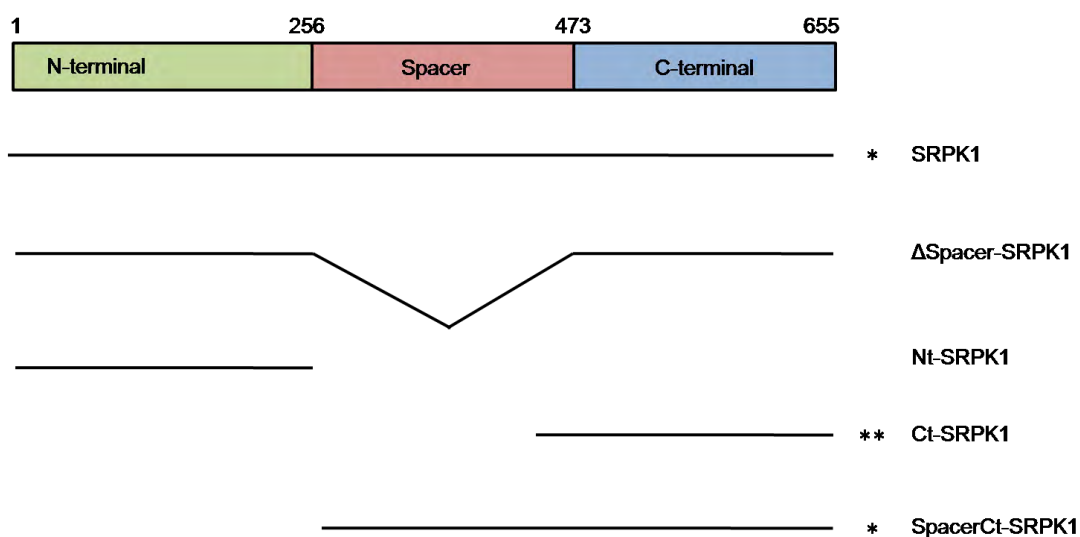
Α.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SAFB1 ΜΕ ΤΗΝ ΚΙΝΑΣΗ SRPK1

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή ο SAFB1 έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με αρκετές πρωτεΐνες. Οι περισσότερες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν με τη συμμετοχή του καρβοξυτελικού του άκρου. Μια από αυτές, βρέθηκε στο εργαστήριο της Βιοχημείας και είναι με την κινάση, SRPK1. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί καταστολή της ενζυμικής δράσης της κινάσης, χωρίς να είναι γνωστό κάτω από ποιές ακριβώς συνθήκες συμβαίνει και σε τι εξυπηρετεί το κύτταρο. Η ενεργότητα των SRPKs είναι συστατική και αντίθετα με άλλες ομάδες κινασών, η δομή τους είναι τέτοια ώστε να είναι δύσκολη η απενεργοποίηση τους με απλές ομοιοπολικές ή αλλοστερικές μετατροπές. Επίσης έχει βρεθεί ότι ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός είναι σημαντικός για τη λειτουργία τους. Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω τις λειτουργίες των SAFB μέσω του μηχανισμού αυτής της αλληλεπίδρασης τέθηκαν δύο στόχοι. Πρώτος στόχος ήταν να αποσαφηνιστεί η δομική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, με την εύρεση της μικρότερης περιοχής της SRPK1 που ενέχεται στην αλληλεπίδραση με τον SAFB1. Δεύτερος στόχος ήταν να διερευνηθεί η βιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών και κυρίως να βρεθεί η στρεσογόνο συνθήκη που θα ισχυροποιήσει την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Γι' αυτό το σκοπό εξετάστηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1 υπό τη επίδραση διαφόρων στρες.

Α.2.1. ΕΥΡΕΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ SRPK1 ΜΕ ΤΟΝ SAFB1 *IN VITRO*

Με σκοπό την εύρεση της περιοχής αλληλεπίδρασης της κινάσης SRPK1 με τον SAFB1, πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρωματογραφίας αγχιστείας. Χρησιμοποιήθηκαν το απομονωμένο από βακτηριακά κύτταρα καρβοξυτελικό τμήμα

του SAFB1, από το οποίο απουσιάζει η περιοχή πλούσια σε διπεπτίδια αργινίνης-γλουταμινικό (RE) και εμπεριέχει μόνο την περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα αργινίνης και γλυκίνης περιοχή (RG), σε σύντηξη με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (GST-SAFB1CΔRE) και επιλεγμένα τμήματα της SRPK1 σε σύντηξη με 6 ιστιδίνες. Τα τμήματα αυτά απεικονίζονται στην εικόνα 43:

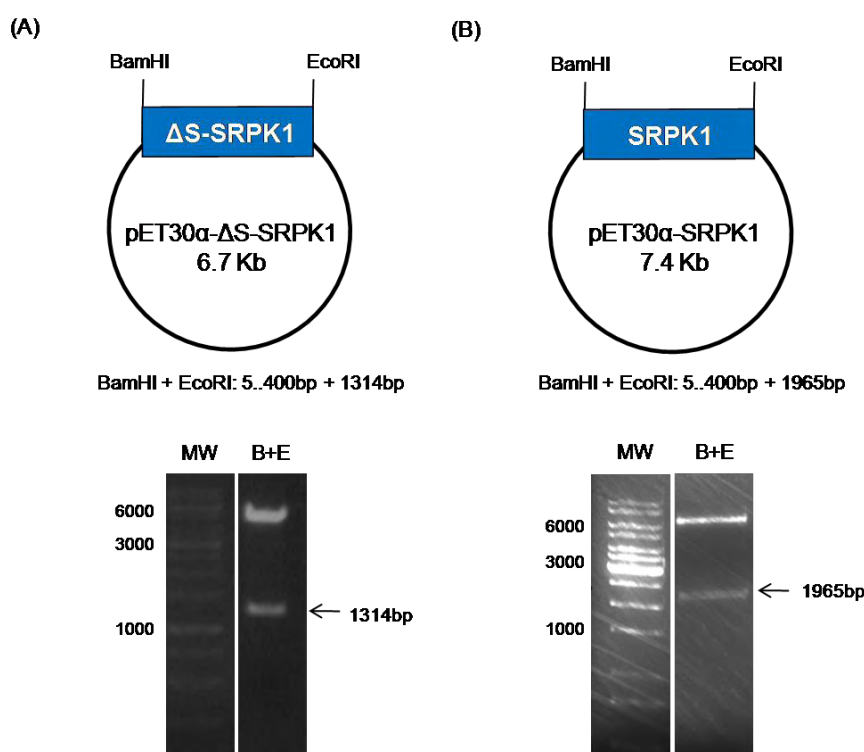


Εικόνα 43: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων της SRPK1 που κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pET30a. Στην εικόνα απεικονίζεται η πλήρους μεγέθους SRPK1 και τα τμήματα που κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν και παραλήφθηκε το διαλυτό τους κλάσμα. *: τμήματα που κατασκευάστηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας X. Ταζέ 2017, **: κατασκευή που δεν αναφέρεται περαιτέρω, καθώς δεν παράγαγε διαλυτή πρωτεΐνη. Αποτέλεσμα αυτού ήταν η δημιουργία της κατασκευής SpacerCt-SRPK1 (X. Ταζέ 2017).

Δ.2.1.1. Κατασκευή βακτηριακών φορέων έκφρασης του His-ΔS-SRPK1 καθώς και της πλήρους μεγέθους His-SRPK1.

Για την δημιουργία των His-ΔS-SRPK1 και His-SRPK1 υποκλωνοποιήθηκε το cDNA τους από τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 στον pET30a, με στόχο την έκφραση των πλασμιδίων σε βακτηριακά κύτταρα σε σύντηξη, στο αμινοτελικό τους άκρο, με 6 ιστιδίνες, όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.1. Το cDNA τους κλωνοποιήθηκε ως ένθεμα στις θέσεις BamHI-EcoRI. Ακολούθησε μικρής ή μεσαίας κλίμακας απομόνωση DNA της επιλεγμένης θετικής αποικίας και τα νέα πλασμίδια ελέγχθηκαν με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για την ορθότητα της πλασμιδιακής κατασκευής. Όπως φαίνεται στην εικόνα 44, επιβεβαιώνεται η σωστή κατασκευή και

των δύο ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, καθώς παρουσιάζουν ένθεμα σωστού μεγέθους. Για το πλασμίδιο pET30α-ΔS-SRPK1 το ένθεμα είναι 1314bp ενώ για το πλασμίδιο pET30α- SRPK1 το ένθεμα είναι 1965bp.



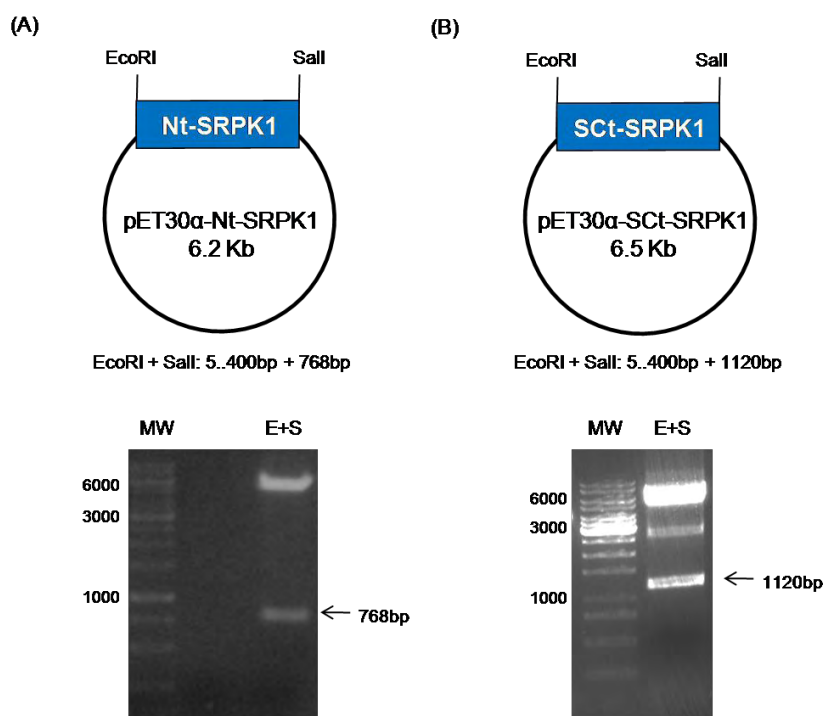
Εικόνα 44: Κατασκευή και έλεγχος των πλασμιδίων pET30α-ΔS-SRPK1 και pET30α-SRPK1.

(A) Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδίου pET30α-ΔS-SRPK1 με τη θέση πέψης των αναγραφόμενων ενζύμων περιορισμού (πάνω) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% με τα τμήματα DNA που προέκυψαν μετά από πέψη με τα αναγραφόμενα ένζυμα (κάτω). (B) Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδίου pET30α-SRPK1 με τη θέση πέψης των αναγραφόμενων ενζύμων περιορισμού (πάνω) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% με τα τμήματα DNA που προέκυψαν μετά από πέψη με τα αναγραφόμενα ένζυμα (κάτω).

Δ.2.1.2. Κατασκευή βακτηριακών φορέων έκφρασης του His-SCt-SRPK1 καθώς και του His-Nt-SRPK1.

Δημιουργήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη His-SCt-SRPK1 και την His-Nt-SRPK1. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν κοινή και για τις δυο πλασμιδιακές κατασκευές. Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) όπου σαν εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pFlag-CMV-2-SRPK1. Για την His-SCt-SRPK1 ως νοηματικός εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο spacerctSRPK1F και ως αντινοηματικός ο spacerctSRPK1R ενώ για την His-Nt-SRPK1 ως νοηματικός

εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο 5-NtSRPK1 και ως αντινοσηματικός ο 3-NtSRPK1. Τα αντίστοιχα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν, απομονώθηκαν από πηκτή αγαρόζης 1% και επώαστηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI-SalI. Παράλληλα επώαστηκε και ο πλασμιδιακός φορέας pET30α με τα ίδια ένζυμα, ώστε να καταστεί κατάλληλος φορέας για την κλωνοποίηση του ενθέματος. Ακολούθησε αντίδραση λιγάσης, μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* Top10 και απομόνωση μικρής κλίμακας DNA περίπου 10 αποικιών. Ύστερα από πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού επιλέχθηκαν οι αποικίες που περιείχαν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Μια από αυτές χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση μεσαίας ή μικρής κλίμακας DNA και ελέγχθηκε, ύστερα από πέψη με EcoRI-SalI, για την ορθότητα της. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες περιγράφονται στα Υ&Μ, παράγραφος Γ.1 και Γ.2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 45, επιβεβαιώνεται η σωστή κατασκευή και των δύο ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, καθώς παρουσιάζουν ένθεμα σωστού μεγέθους. Για το πλασμίδιο pET30α-Nt-SRPK1 το ένθεμα είναι 768bp ενώ για το πλασμίδιο pET30α-SCt-SRPK1 το ένθεμα είναι 1112bp.

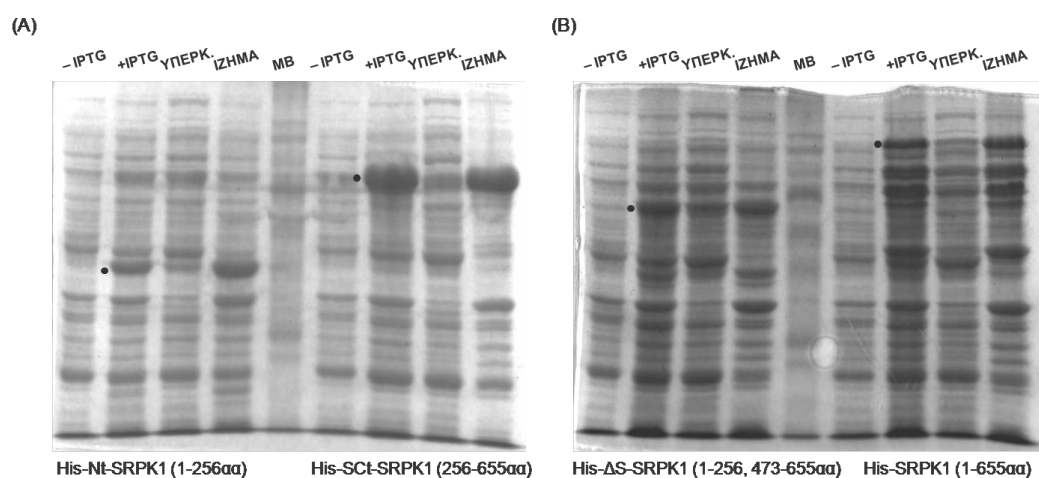


Εικόνα 45: Κατασκευή και έλεγχος των πλασμιδίων pET30α-Nt-SRPK1 και pET30α-SCt-SRPK1. (A) Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδίου pET30α-Nt-SRPK1 με τη θέση πέψης των αναγραφόμενων ενζύμων περιορισμού (πάνω) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% με τα τμήματα DNA που προέκυψαν μετά από πέψη με τα αναγραφόμενα ένζυμα (κάτω). (B) Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδίου pET30α-SCt-SRPK1 με τη θέση πέψης των αναγραφόμενων ενζύμων

περιορισμού (πάνω) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% με τα τμήματα DNA που προέκυψαν μετά από πέψη με τα αναγραφόμενα ένζυμα (κάτω).

Α.2.1.3. Έκφραση των χμαιοικόν πρωτεϊνών His-Nt-SRPK1, His-SCt-SRPK1, His-ΔS-SRPK1, His-SRPK1 και GST-SAFB1C σε βακτήρια.

Κατάλληλα στελέχη *E. coli* (BL21-RIL) μετασχηματίστηκαν με τα ακόλουθα πλασμίδια pET30α-Nt-SRPK1, pET30α-SCt-SRPK1, pET30α-ΔS-SRPK1 και pET30α-SRPK1, προκειμένου να εκφραστούν οι αντίστοιχες πρωτεΐνες. Ακολούθησε η επαγωγή των χμαιοικόν πρωτεϊνών με IPTG και η λύση των βακτηριακών κυττάρων. Για κάθε μια επιβεβαιώθηκε στα βακτηριακά εκχυλίσματα των κυττάρων η παρουσία της στο αναμενόμενο μοριακό βάρος και έγιναν προσπάθειες καθαρισμού. Αποδείχθηκε ότι η διαλυτότητα σχεδόν όλων ήταν πολύ μικρή και γι' αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες επαγωγής και λύσης των κυττάρων. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά στα Y&M, καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες, οι οποίες επιλέχθηκαν για κάθε μια πρωτεΐνη (παράγραφος Γ.4). Τελικά στο πείραμα χρωματογραφίας αχιστείας χρησιμοποιήθηκε το ολικό βακτηριακό εκχύλισμα του διαλυτού βακτηριακού κλάσματος για κάθε πρωτεΐνη αντίστοιχα, προκειμένου τα αποτελέσματα της σύνδεσης με τον SAFB1 να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Στην εικόνα 46 φαίνεται η χρώση με Coomassie που ακολούθησε μετά την επαγωγή και την παραλαβή του διαλυτού κυτταρικού κλάσματος, των παραπάνω βακτηριακά εκφρασμένων πρωτεϊνών.

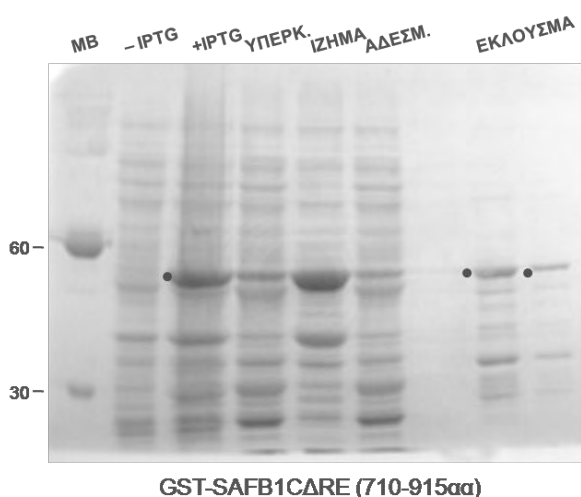


Εικόνα 46: Επαγωγή και καθαρισμός των χμαιοικόν πρωτεϊνών His-Nt-SRPK1, His-SCt-SRPK1, His-ΔS-SRPK1 και His-SRPK1. Κύτταρα *E.coli* που περιείχαν τα πλασμίδια για την

έκφραση των πρωτεϊνών (A) His-Nt-SRPK1, His-SCt-SRPK1 και (B) His-ΔS-SRPK1 His-SRPK1, επώαστηκαν απουσία ή παρουσία IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μαζί με το ίζημα και το διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο) των κυττάρων που εκφράζουν τις παραπάνω πρωτεΐνες, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie. Οι κουκίδες δείχνουν την θέση της χμιαρικής πρωτεΐνης.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 46, και οι τέσσερις χμιαρικές πρωτεΐνες His-Nt-SRPK1, His-SCt-SRPK1, His-ΔS-SRPK1 και His-SRPK1, εκφράζονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη ~40kDa, ~70kDa, ~70kDa και ~110kDa, αντίστοιχα.

Ο GST-SAFB1CΔRE υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε όπως περιγράφεται [63]. Στην εικόνα 47 φαίνεται ενδεικτικά η χρώση με Coomassie.

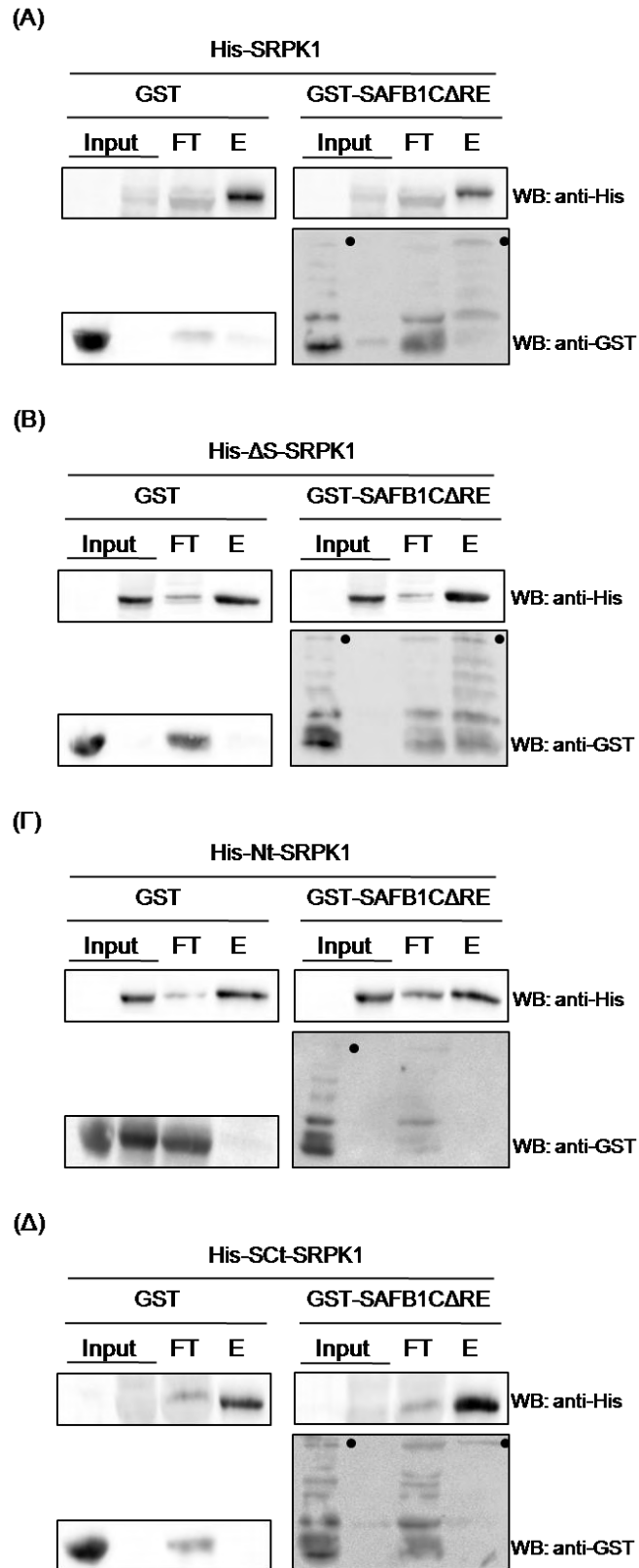


Εικόνα 47: Επαγωγή και καθαρισμός της χμιαρικής πρωτεΐνης GST-SAFB1CΔRE. Κύτταρα *E.coli* που περιείχαν το πλασμίδιο για την έκφραση της GST-SAB1CΔRE, επώαστηκαν απουσία ή παρουσία IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μαζί με το ίζημα και το διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο) των κυττάρων που εκφράζουν τις παραπάνω πρωτεΐνες, καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα και το έκλουσμα της στήλης GSH-Sepharose, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie. Οι κουκίδες δείχνουν την θέση των χμιαρικών πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν σε μάρτυρες μοριακών βαρών σε kDa.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 47, η χμιαρική πρωτεΐνη GST-SAFB1CΔRE, εκφράζεται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος ~49kDa. Η πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη σημειώνεται με μαύρη κουκίδα, ενώ οι υπόλοιπες ζώνες αντιπροσωπεύουν προϊόντα πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης.

Δ.2.1.4. *In vitro* αλληλεπίδραση των τμημάτων της SRPK1 με τον GST-SAFB1CΔRE.

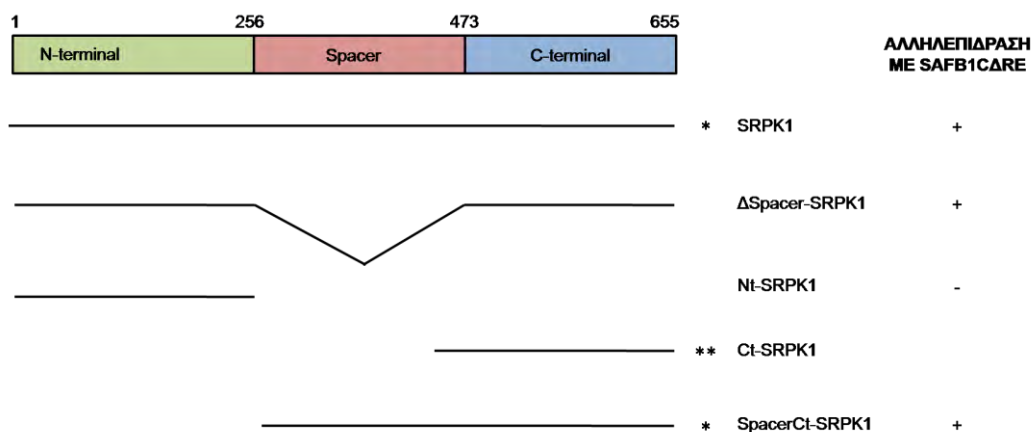
Πραγματοποιήθηκε πείραμα χρωματογραφίας αγκιστείας, στο οποίο μέρος του διαλυτού κλάσματος των βακτηριακά εκφρασμένων His-Nt-SRPK1, His-SCt-SRPK1, His-ΔS-SRPK1 και His-SRPK1 επώαστηκε με 30μg καθαρής πρωτεΐνης GST-SAFB1CΔRE και GST (αρνητικός μάρτυρας) για 1h υπό ανάδευση. Στη συνέχεια επώαστηκαν σε εξισορροπημένες στήλες νικελίου για 1h υπό ανάδευση στους 4⁰C. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση των αντισωμάτων anti-GST και anti-His.



Εικόνα 48: *In vitro* αλληλεπίδραση των βακτηριακά εκφρασμένων His-Nt-SRPK1, His-SCT-SRPK1, His- Δ S-SRPK1 και His-SRPK1 με τον βακτηριακά εκφρασμένο GST-SAFB1 Δ RE. Χρωματογραφία αγκιστείας των προ-επωασμένων (A) His-SRPK1, (B) His- Δ S-SRPK1, (Γ) His-Nt-SRPK1, (Δ) His-SCT-SRPK1 με την απομονωμένη πρωτεΐνη GST-SAFB1 Δ RE και στη συνέχεια

προσκολλημένων σε στήλες νικελίου (Ni-NTA). Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα αντι-GST και αντ-His. Το εισαγόμενο κλάσμα (INPUT) αντιπροσωπεύει το 1/20 της ποσότητας των παραπάνω πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν ενώ, το αδέσμευτο κλάσμα (FT) που απεικονίζεται αποτελεί το 1/50 της ποσότητας που δεν κατακρατήθηκε από την στήλη. E: το εκλουσμένο κλάσμα από τη στήλη. Με μαύρες κουκίδες φαίνονται οι πλήρους μεγέθους πρωτεΐνες.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 48, η GST δεν φαίνεται να ανιχνεύεται σε κανένα εκλουσμα από τις βακτηριακά εκφρασμένες πρωτεΐνες His-Nt-SRPK1, His-SCt-SRPK1, His-ΔS-SRPK1 και His-SRPK1 που είχαν προσκολληθεί στη στήλη νικελίου δείχνοντας ότι η αλληλεπίδραση είναι ειδική. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο GST-SAFB1CΔRE προσκολλάται στην πλήρους μεγέθους SRPK1 (His-SRPK1) όπως και στην SRPK1 (His-ΔS-SRPK1) από την οποία απουσιάζει η ενδιάμεση περιοχή, όπως φαίνεται στην εικόνα 48A και 48B, αντίστοιχα. Ο GST-SAFB1CΔRE δεν προσκολλάται στο αμινοτελικό άκρο της SRPK1 (His-Nt-SRPK1) (εικόνα 48Γ), αλλά αντίθετα συνεκλύεται με το καρβοξυτελικό άκρο της SRPK1 (His-SCt-SRPK1) (εικόνα 48Δ). Στην εικόνα 49 απεικονίζονται συγκεντρωτικά τα τμήματα τα οποία αλληλεπιδρούν με τον GST-SAFB1CΔRE.



Εικόνα 49: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων της SRPK1 που κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pET30a. Στην τελευταία στήλη με το σύμβολο + έχουν σημειωθεί τα τμήματα της SRPK1, τα οποία αλληλεπιδρούν με τον GST-SAFB1CΔRE ενώ με - τα τμήματα που δεν αλληλεπιδρούν σύμφωνα με το πείραμα χρωματογραφίας αγχιστείας. *: τμήματα που κατασκευάστηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας X. Ταζέ 2017, **: κατασκευή που δεν αναφέρεται περαιτέρω, καθώς δεν παρήγαγε διαλυτή πρωτεΐνη. Αποτέλεσμα αυτού ήταν η δημιουργία της κατασκευής SpacerCt-SRPK1 (X. Ταζέ 2017).

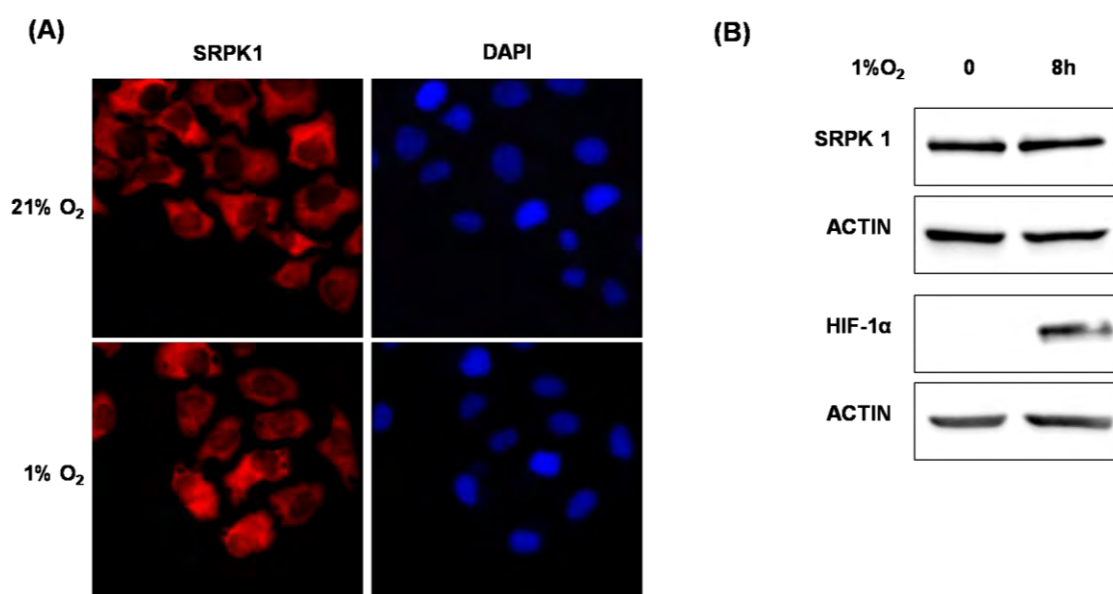
Δεδομένου ότι ο GST-SAFB1CΔRE αλληλεπιδρά με την His-ΔS-SRPK1 από την οποία απουσιάζει η ενδιάμεση περιοχή, τότε η αλληλεπίδραση με το καρβοξυτελικό άκρο της SRPK1 δεν οφείλεται την ενδιάμεση περιοχή. Άρα η αλληλεπίδραση της SRPK1 με το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 εντοπίζεται στα 182 καρβοξυτελικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης της SRPK1.

Μέρος των αποτελεσμάτων της παραγράφου Δ.2.1 πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Χρύσα Ταζέ, στα πλαίσια διπλωματικής Μεταπτυχιακού του ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής.» (Χ. Ταζέ 2017).

Δ.2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ SRPK1 ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΤΡΕΣΟΓΟΝΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Δ.2.2.1. Επίδραση υποξίας.

Ως πρώτη στρεσογόνος συνθήκη διερευνήθηκε η επίδραση της υποξίας στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές (21% O₂) και υποξικές συνθήκες (1% O₂) για 8 ώρες. Ακολούθησε μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού και έλεγχος της έκφρασης της SRPK1 με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με την χρήση ειδικού αντισώματος.



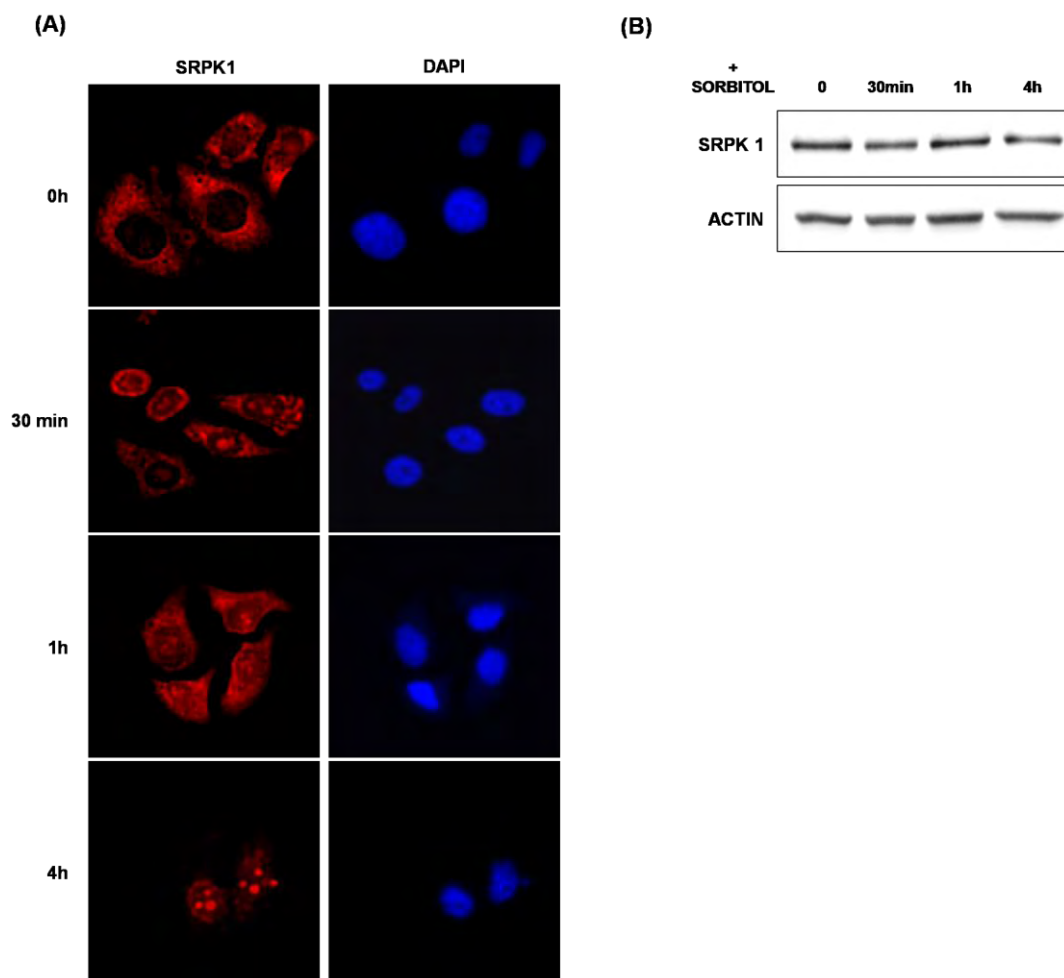
Εικόνα 50: Επίδραση της υποξίας στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν σε φυσιολογικές (21% O₂) ή υποξικές (1% O₂) συνθήκες, για 8

ώρες. (Α) Υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK1 μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού, με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της SRPK1 (Β) Ανοσοαποτύπωση κατά Western ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων και ανίχνευση της SRPK1, του HIF-1α και της ακτίνης, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 50, η επίδραση της υποξίας δεν προκαλεί μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1 αλλά ούτε και στον υποκυτταρικό εντοπισμό της καθώς αυτή παραμένει κυρίως κυτταροπλασματική, όπως και στη φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου.

Δ.2.2.2. Επίδραση οσμωτικού στρες.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης σορβιτόλης, για την πρόκληση οσμωτικού στρες, στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν απουσία και παρουσία 0,6 M σορβιτόλης, για 30 λεπτά, 1, και 4 ώρες. Ακολούθησε μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού και έλεγχος της έκφρασης της SRPK1 με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με την χρήση ειδικού αντισώματος.



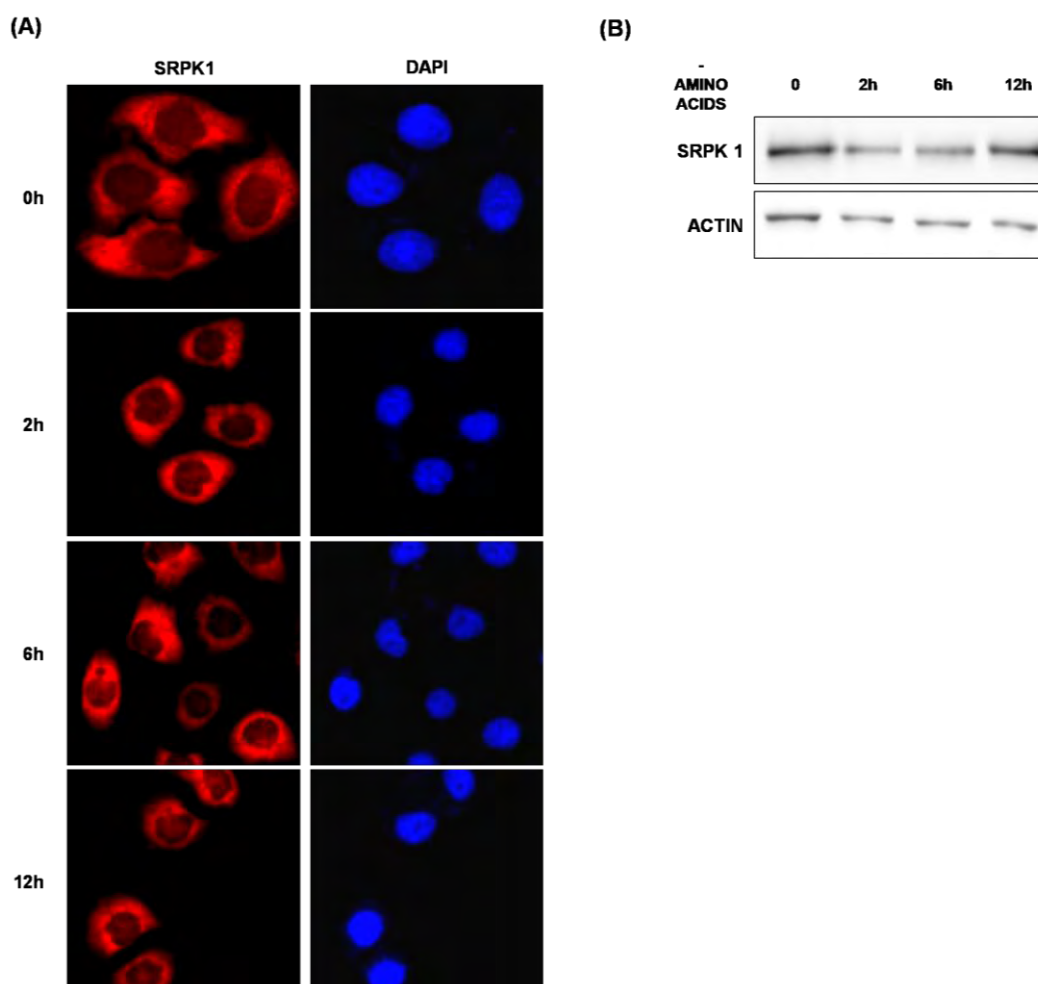
Εικόνα 51: Επίδραση οσμωτικού στρες στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν απουσία και παρουσία 0,6M σορβιτόλης, για 30 λεπτά, 1 και 4 ώρες. (A) Υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK1 μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού, με τη χρήση ειδικού αντισώματος (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων και ανίχνευση της SRPK1 και της ακτίνης, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, όπως σημειώνονται στην εικόνα.

Η παρουσία της σορβιτόλης, από τα 30 λεπτά επώασης, φαίνεται να προκαλεί αναδιοργάνωση της SRPK1 σε διακριτές πυρηνικές δομές, ενώ δεν φαίνεται να προκαλεί κάποια αυξομείωση στα πρωτεϊνικά της επίπεδα (Εικόνα 51).

Δ.2.2.3. Επίδραση στέρησης αμινοξέων.

Ως τρίτη στρεσογόνο συνθήκη, διερευνήθηκε η επίδραση στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1, της στέρησης αμινοξέων από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, η οποία προκαλεί μεταβολικό

στρες. Κύτταρα HeLa καλλιιεργήθηκαν παρουσία και απουσία αμινοξέων, για 2, 6, και 12 ώρες από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Ακολούθησε μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού και έλεγχος της έκφρασης της SRPK1 με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με την χρήση ειδικού αντισώματος.

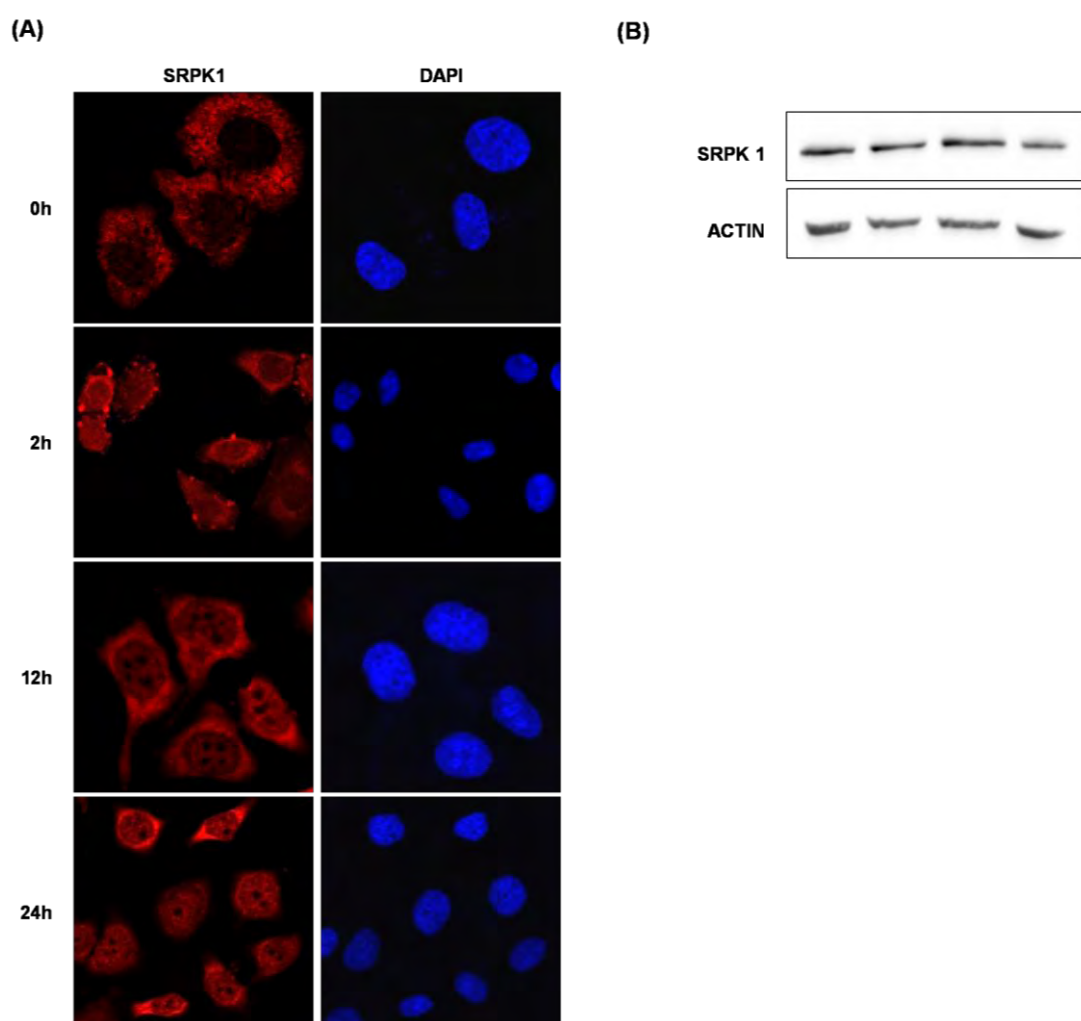


Εικόνα 52: Επίδραση στέρησης αμινοξέων στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν παρουσία και απουσία αμινοξέων από το θρεπτικό μέσο των κυττάρων για 2, 6 και 12 ώρες. (A) Υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK1 μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού, με τη χρήση ειδικού αντισώματος (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων και ανίχνευση της SRPK1 και της ακτίνης, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, όπως σημειώνονται στην εικόνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 52, μετά από επώαση κυττάρων HeLa, σε θρεπτικό μέσο το οποίο στερείται αμινοξέων, ο υποκυτταρικός εντοπισμός καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1, παρέμειναν πρακτικά αμετάβλητα.

Δ.2.2.4. Επίδραση στέρησης γλυκόζης.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η στέρηση γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων, προκαλώντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα ένα διαφορετικό μεταβολικό στρες από τη στέρηση των αμινοξέων. Διερευνήθηκε και πάλι ο υποκυτταρικός εντοπισμός και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1 σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία γλυκόζης, για 2, 12, και 24 ώρες από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Ακολούθησε μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού και έλεγχος της έκφρασης της SRPK1 με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, με την χρήση ειδικού αντισώματος.



Εικόνα 53: Επίδραση στέρησης γλυκόζης στον υποκυτταρικό εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1. Κύτταρα HeLa επώαστηκαν παρουσία και απουσία γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο των κυττάρων για 2, 12 και 24 ώρες. (A) Υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK1 μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση ειδικού αντισώματος, με συνεστιακό μικροσκόπιο (B)

Ανοσοαποτόπωση κατά Western ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων και ανίχνευση της SRPK1 και της ακτίνης, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, όπως σημειώνονται στην εικόνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 53, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1 παρέμειναν αμετάβλητα σε όλες τις συνθήκες στέρησης γλυκόζης. Αντίθετα, οι δύο ώρες στέρησης γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας των κυττάρων προκάλεσαν, σε έναν σημαντικό πληθυσμό των κυττάρων, την συγκρότηση της SRPK1 σε μεγάλες κυκλικές δομές, οι οποίες εντοπίζονται γύρω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι 12 ώρες στέρησης γλυκόζης φαίνεται να μετατοπίζουν την SRPK1 στον πυρήνα, αποκλειόμενη από τους πυρηνίσκους, προσομοιάζοντας την χρώση των πυρήνων με DAPI. Τέλος, παρατείνοντας την επώαση των κυττάρων στις 24 ώρες στέρησης γλυκόζης ο υποκυτταρικός εντοπισμός της SRPK1 δεν μεταβάλλεται συγκριτικά με τις 12 ώρες.

Συνοψίζοντας, από τις στρεσογόνες συνθήκες που δοκιμάστηκαν στα κύτταρα η συνθήκη του οσμωτικού στρες και η συνθήκη της στέρησης γλυκόζης προκάλεσαν την υποκυτταρική μετατόπιση της SRPKs με διαφορετικό τρόπο η κάθε μια, ενώ καμία συνθήκη δεν μετέβαλλε τα πρωτεϊνικά επίπεδά της.

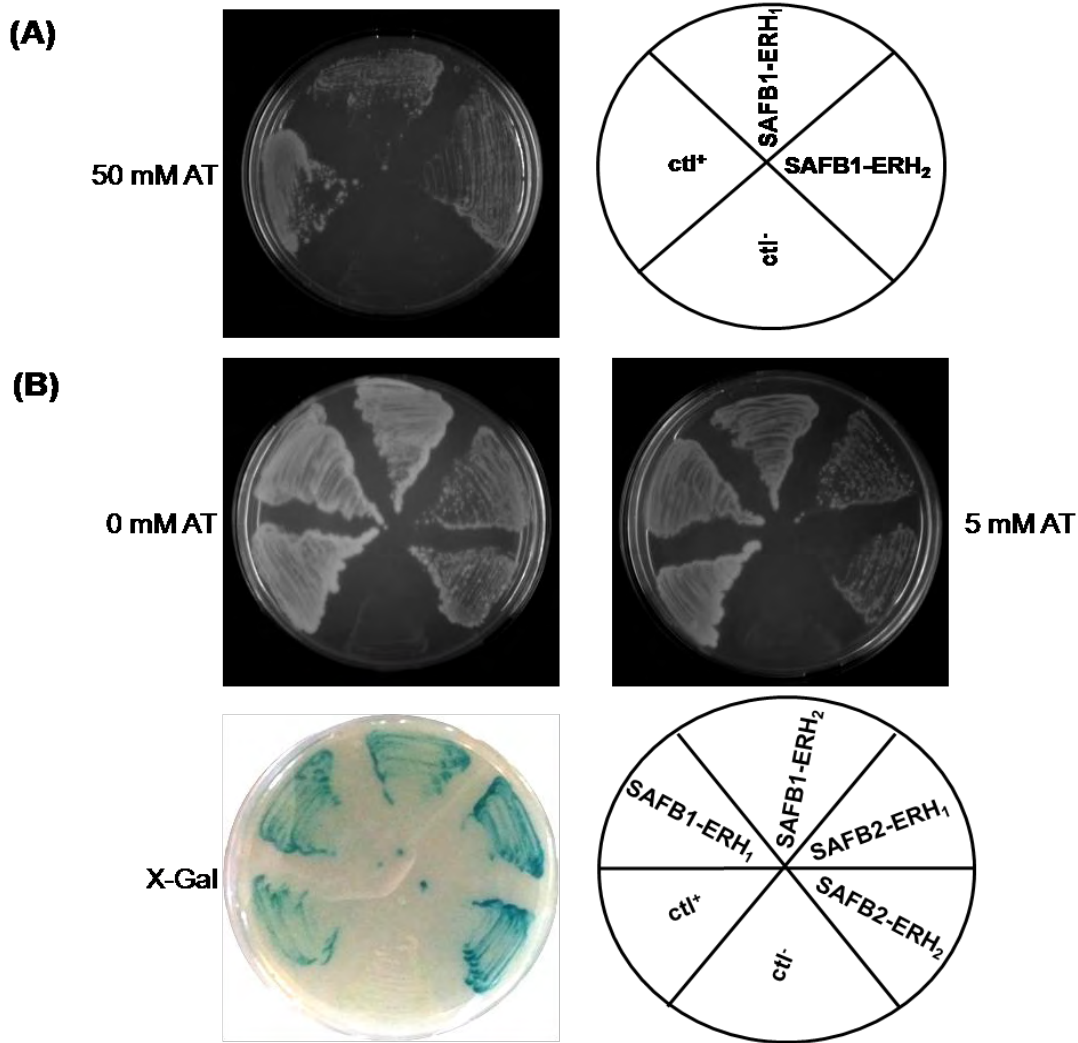
Δ.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SAFB1/2 ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ERH

Σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου Βιοχημείας εφαρμόστηκε το σύστημα των δύο υβριδίων χρησιμοποιώντας ως "δόλωμα" το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 αρουραίου και ως "λείες" βιβλιοθήκη εμβρύου ποντικού 9.5 και 10.5 ημερών. Στόχος ήταν η εύρεση νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του SAFB1 και κατ' επέκταση η διερεύνηση των λειτουργικών ιδιοτήτων του. Από αυτά τα πειράματα, βρέθηκε να αλληλεπιδρούν ισχυρά με το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB1 δύο λείες που κωδικοποιούσαν την πρωτεΐνη ERH. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα και το αντίστοιχο τμήμα της ανθρώπινης πρωτεΐνης του SAFB2, ώστε να εξεταστεί αν και ο SAFB2 αλληλεπιδρά με την ERH. Στόχο αποτέλεσε η περαιτέρω διερεύνηση αυτών των αποτελεσμάτων, καθώς η πρωτεΐνη ERH είναι μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα πρωτεΐνη, όχι μόνο επειδή είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών αλλά και γιατί από τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα δεν έχει βρεθεί να

σχετίζεται άμεσα με κάποιον συγκεκριμένο μηχανισμό του κυττάρου, παρά την εμπλοκή της σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες.

Δ.3.1. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πείραμα επιβεβαίωσης της αλληλεπίδρασης SAFB-ERH σε κύτταρα σακχαρομύκητα όπως περιγράφεται στα Υ&Μ, παράγραφος Γ.3.2.. Τα κύτταρα του στελέχους PJ69-4A του σακχαρομύκητα *S. Cerevisiae* μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο δόλωμα δηλαδή το καρβοξυτελικό τμήμα του SAFB1 ή το καρβοξυτελικό τμήμα του SAFB2 και τις δύο λείες που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη ERH, αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά επιστρώθηκαν σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Όταν η λεία (pVP16-ERH₁ ή pVP16-ERH₂) αλληλεπιδράσει με το δόλωμα (pGBT9-SAFB1 ή pGBT9-SAFB2C) λόγω αγγιστείας, τότε η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής θα προσεγγίσει την περιοχή πρόσδεσης του DNA και θα ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς. Έτσι, ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου HIS3 σε θρεπτικό υλικό από το οποίο απουσίαζε η ιστιδίνη καθώς και σε θρεπτικό υλικό παρουσία του συναγωνιστικού αναστολέα του μονοπατιού της σύνθεσης της ιστιδίνης, αμινομεθυλοτριαζόλης (AT). Τέλος ελέγχθηκε και το γονίδιο αναφοράς β-γαλακτοσιδάση (LacZ), σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιείχε Xgal.



Εικόνα 54: Αλληλεπίδραση του καρβοξυτελικού άκρου του SAFB1 και του SAFB2 με την πρωτεΐνη ERH σε κύτταρα σακχαρομύκητα. (A) Το στέλεχος *S. Cerevisiae* PJ69-4A μετασχηματίστηκε με τα ακόλουθα πλασμίδια: *ctI*⁻: pGBT9 and pVP16 (αρνητικός μάρτυρας), *ctI*⁺:pGBT9-SRPK1aNt (1-176) και pVP16-SAFB1(585-720) (θετικός μάρτυρας), SAFB1-ERH₁: pGBT9-SAFB1(550-931) και pVP16-ERH (1-100), SAFB1-ERH₂: pGBT9-SAFB1 και pVP16-ERH (1-104). Τα κύτταρα επιστρώθηκαν με τη ίδια σειρά σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο επιλογής SC Trp⁻, Leu⁻, Ade⁻, His⁻ και 50 mM AT. (B) Το στέλεχος *S. Cerevisiae* PJ69-4A μετασχηματίστηκε με τα πλασμίδια όπως περιγράφονται στο (A) με την προσθήκη του SAFB2-ERH₁: pGBT9-SAFB2C (549-953) και pVP16-ERH (1-100) και SAFB2-ERH₂: pGBT9-SAFB2C και pVP16-ERH(1-104). Τα κύτταρα επιστρώθηκαν με τη ίδια σειρά σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο επιλογής SC Trp⁻, Leu⁻, Ade⁻, His⁻ και 0 mM AT (πάνω αριστερά), ή 5 mM AT (πάνω δεξιά), και SC Trp⁻, Leu⁻ και X-Gal (κάτω αριστερά).

Όπως φαίνεται από τον φαινότυπο των κυττάρων του σακχαρομύκητα τα οποία επιβιώνουν σε θρεπτικό μέσο επιλογής SC παρουσία 50mM AT (εικόνα 54 A),

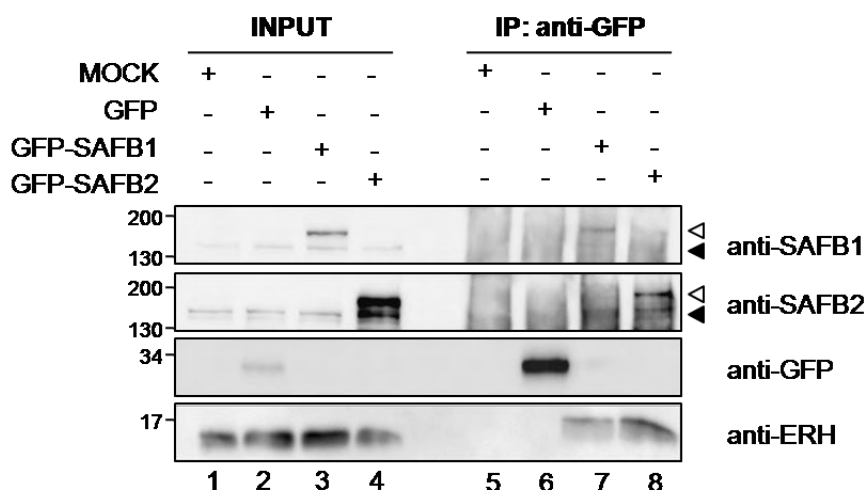
ο SAFB1 αλληλεπιδρά ισχυρά με την ERH. Στην εικόνα 54 Β φαίνεται ότι και το καρβοξυτελικό άκρο του SAFB2 όπως αυτό του SAFB1 αλληλεπιδρά με την ERH, αφού τα κύτταρα του σακχαρομύκητα α) επιβιώνουν σε θρεπτικό μέσο επιλογής SC απουσία HIS και παρουσία 5mM AT και β) αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το υπόστρωμα X-gal, το οποίο υδρολυόμενο από την παραγόμενη β-γαλακτοσιδάση, δίνει αποικίες μπλε χρώματος.

Δ.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΑ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Η ERH ανιχνεύθηκε ως μια καινούργια πρωτεϊνική αλληλεπίδραση του SAFB1 και του SAFB2, *in vivo* σε κύτταρα σακχαρομύκητα. Απαραίτητο επόμενο βήμα ήταν να αποδειχθεί ότι το σύμπλοκο ανιχνεύεται και σε κύτταρα θηλαστικών.

Δ.3.2.1. Ανοσοκατακρήμνιση των εξωγενών SAFB1/2.

Προκειμένου να ανιχνεύσουμε την αλληλεπίδραση SAFB-ERH σε κύτταρα θηλαστικών, αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης εξωγενών SAFB1 και SAFB2 όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.15. Κύτταρα MCF-7, διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν την GFP, τον GFP-SAFB1, τον GFP-SAFB2 ή χωρίς τη προσθήκη πλασμιδίου (MOCK-εικόνα 55). Μετά την πάροδο 24 ωρών, έγινε λύση των κυττάρων και τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι της GFP και καθηλώθηκαν σε σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων και ανοσοαποτύπωση κατά Western, με τη χρήση των ειδικών αντισωμάτων anti-SAFB1, anti-SAFB2 και anti-ERH.

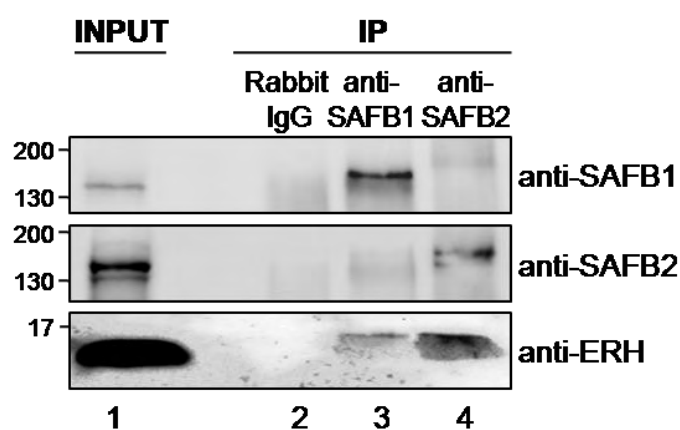


Εικόνα 55: Αλληλεπίδραση των GFP-SAFB1 και GFP-SAFB2 με την ενδογενή ERH. Κύτταρα MCF-7 υπέστησαν παροδική διαμόλυνση χωρίς την προσθήκη πλασμιδιακού φορέα (MOCK) ή με την προσθήκη πλασμιδίων που εκφράζουν την GFP, τον GFP-SAFB1 και τον GFP-SAFB2, όπως απεικονίζεται. Το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα επώαστηκε με αντίσωμα anti-GFP και σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A για την ανοσοκατακρήμιση (IP). Το 1/30 των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (INPUT) (διαδρομή 1-4) και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) (διαδρομή 5-8) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα anti-SAFB1, anti-SAFB2, anti-GFP και anti-ERH, όπως σημειώνονται στην εικόνα. Τα λευκά βέλη δείχνουν την θέση των εξωγενών SAFB1 ή SAFB2 και τα μαύρα των ενδογενών SAFB1 ή SAFB2, αντίστοιχα. Τα μοριακά βάρη των ενδογενών SAFB1, SAFB2 ERH και GFP είναι ~130kDa, ~135kDa και ~12kDa αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα στην εικόνα 55, φαίνεται ότι η GFP, ο GFP-SAFB1 καθώς και ο GFP-SAFB2 ανοσοκατακρημνίζονται από το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα με το αντίσωμα έναντι της GFP (διαδρομές 7,8), καθώς ανιχνεύονται και στο εισαγόμενο κλάσμα των ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων στο ίδιο μοριακό βάρος, με τη χρήση των ειδικών αντισωμάτων (διαδρομές 2-4). Η ενδογενής ERH συγκατακρημνίζεται τόσο με τον GFP-SAFB1 όσο και με τον GFP-SAFB2 (διαδρομή 7,8), καθώς ανιχνεύεται στο ίδιο μοριακό βάρος με την ενδογενή ERH των εισαγόμενων κλασμάτων (διαδρομές 1-4). Η σύνδεση αυτή είναι ειδική δεδομένου ότι δεν ανιχνεύεται πρωτεΐνη ERH στην περίπτωση επιμόλυνσης των κυττάρων με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα που εκφράζει μόνο την GFP, καθώς και στην περίπτωση των κυττάρων, τα οποία δεν εκφράζουν εξωγενώς καμία πρωτεΐνη. (διαδρομές 5,6).

Δ.3.2.2. Ανοσοκατακρήμιση των ενδογενών SAFB1/2.

Επόμενος στόχος ήταν να διερευνηθεί κατά πόσον τα σύμπλοκα SAFB/ERH που με τα προηγούμενα πειράματα δείξαμε ότι είναι δυνατόν να δημιουργηθούν σε κύτταρα θηλαστικών υπάρχουν και φυσιολογικά. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμισης των ενδογενών πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων MCF-7 και ανιχνεύθηκε η παρουσία της ERH στα κατακρημνίσματα, όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.15.



Εικόνα 56: Αλληλεπίδραση των ενδογενών SAFB1 και SAFB2 με την πρωτεΐνη ERH. Τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων MCF-7 υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι SAFB1 ή SAFB2 ή με IgG κουνελιού ως αρνητικός μάρτυρας. Το 1/30 των συνολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων (INPUT) (διαδρομή 1) και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) (διαδρομή 2-4) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα αντι-SAFB1, αντι-SAFB2 και αντι-ERH, όπως σημειώνονται στην εικόνα.

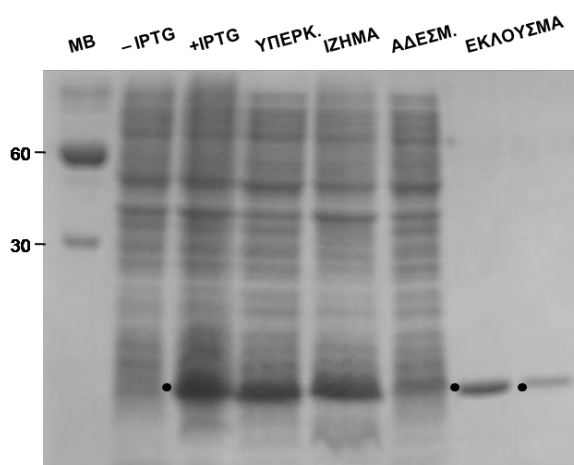
Όπως φαίνεται στην εικόνα 56, οι ενδογενείς SAFB1 και SAFB2 ανοσοκατακρημνίζονται σε ικανοποιητική ποσότητα. Στη συνέχεια φαίνεται από την ανοσοανίχνευση ότι η ενδογενής ERH συγκατακρημνίζεται με τους ενδογενείς SAFB1 και SAFB2. (διαδρομή 3,4). Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ERH βρίσκεται σε σύμπλοκα και με τον SAFB1 αλλά και με τον SAFB2, σε κύτταρα θηλαστικών.

Δ.3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ *IN VITRO*

Με σκοπό να αποκλείσουμε την ύπαρξη κάποιας τρίτης πρωτεΐνης η οποία θα μπορούσε μέσα στα κύτταρα να γεφυρώνει την αλληλεπίδραση SAFB-ERH πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρωματογραφίας αγκιστείας με καθαρισμένη την πλήρους μεγέθους ERH και τα καρβοξυτελικά τμήματα των πρωτεϊνών SAFB1 και SAFB2.

Δ.3.3.1. Επαγωγή και καθαρισμός της χμιαρικής πρωτεΐνης His-ERH.

Η πλήρους μεγέθους ERH είναι κλωνοποιημένη στον πλασμιδιακό φορέα pET24b που είναι φορέας έκφρασης της πρωτεΐνης σε σύντηξη με έξι ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο. Κατάλληλα στελέχη *E. coli* (BL21-RIL) μετασηματίστηκαν με το παραπάνω πλασμίδιο και έγινε επαγωγή της χμιαρικής πρωτεΐνης His-ERH με IPTG. Ακολούθησε λύση των κυττάρων, ειδική κατεργασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων και καθαρισμός της πρωτεΐνης μέσω στήλης νικελίου (Ni-NTA), όπως παρατίθεται αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι. Στην εικόνα 57 φαίνεται η χρώση με Coomassie που ακολούθησε.

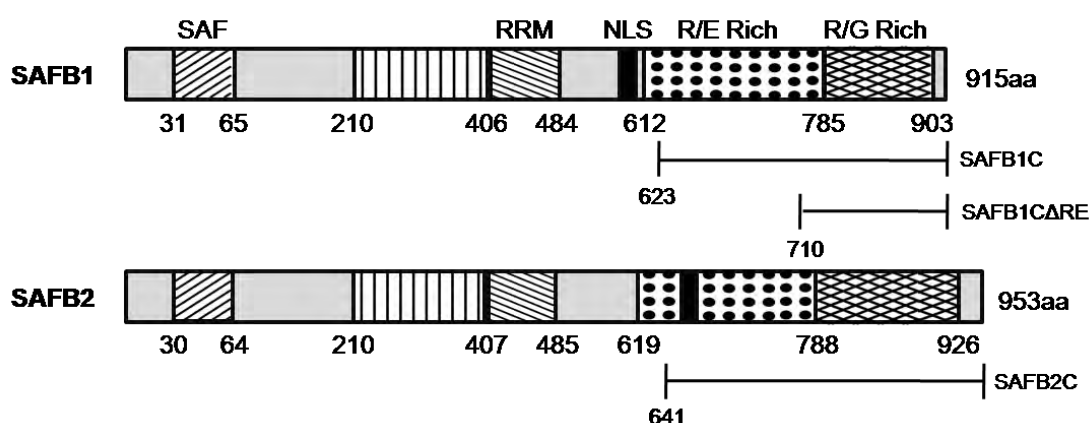


Εικόνα 57: Επαγωγή και καθαρισμός της χμιαρικής πρωτεΐνης His-ERH. Κύτταρα *E.coli* που περιείχαν το πλασμίδιο για την έκφραση της πρωτεΐνης His-ERH επώαστηκαν απουσία ή παρουσία IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μαζί με το ίζημα και το διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο) των κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη His-ERH καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα και το έκλουσμα της στήλης νικελίου (Ni-NTA), αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie. Οι κουκίδες δείχνουν την θέση της χμιαρικής πρωτεΐνης και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν σε μάρτυρες μοριακών βαρών σε kDa.

Η χμαιοική πρωτεΐνη είναι αρκετά διαλυτή και τα επίπεδα ανάκτησης, ύστερα από έκλυση από τη στήλη νικελίου, ικανοποιητικά. Τα δύο εκλούσματα ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο Bradford. Η πρωτεΐνη HiS-ERH ανιχνεύεται στο αναμενόμενο μοριακό βάρος ~12kDa.

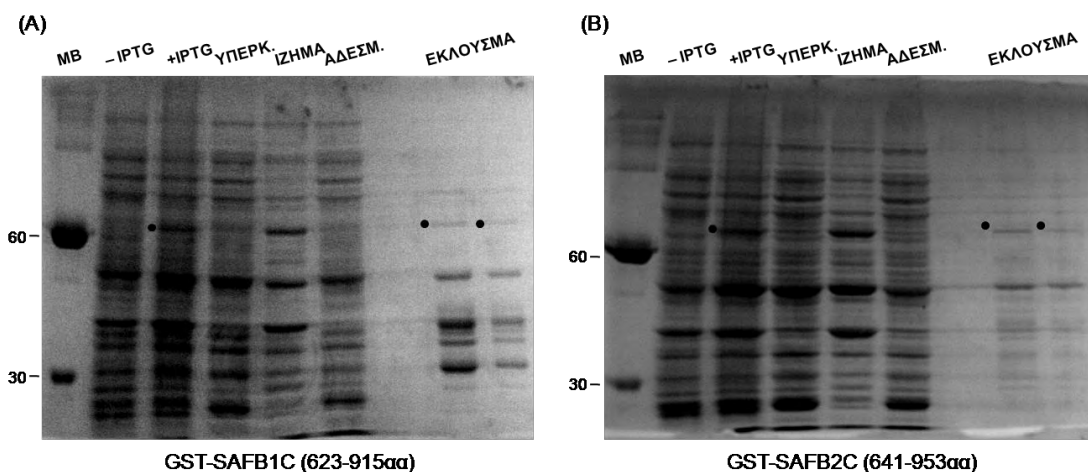
Δ.3.3.2. Επαγωγή και καθαρισμός των χμαιοικών πρωτεϊνών GST-SAFB1C και GST-SAFB2C.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα πειράματα χρωματογραφίας αγγιστείας, υπερεκφράστηκαν σε σύντηξη με την τραιοφεράση της γλουταθειόνης, GST και απομονώθηκαν από στήλη γλουταθειόνης τα ακόλουθα τμήματα του SAFB1 και SAFB2 (Εικόνα 58):



Εικόνα 58: Σχηματική απεικόνιση του πλήρους μεγέθους SAFB1 και SAFB2 καθώς και των μικρότερων τμημάτων που κατασκευάστηκαν σε σύντηξη με τη GST. Στην εικόνα απεικονίζονται ο πλήρους μεγέθους SAFB1 και SAFB2 καθώς και τα αντίστοιχα μικρότερα τμήματα τους που κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν και απομονώθηκαν σε σύντηξη με τη GST, με σημασμένες τις διάφορες δομικές περιοχές τους.

Στην εικόνα 59 φαίνεται ενδεικτικά η χρώση με Coomassie που ακολούθησε ύστερα από την επαγωγή και απομόνωση των πρωτεϊνών GST-SAFB1C και GST-SAFB2C, όπως περιγράφεται [63], ενώ το τμήμα GST-SAFB1CΔRE έχει αναλυθεί στην παράγραφο των αποτελεσμάτων Δ.2.1.3.

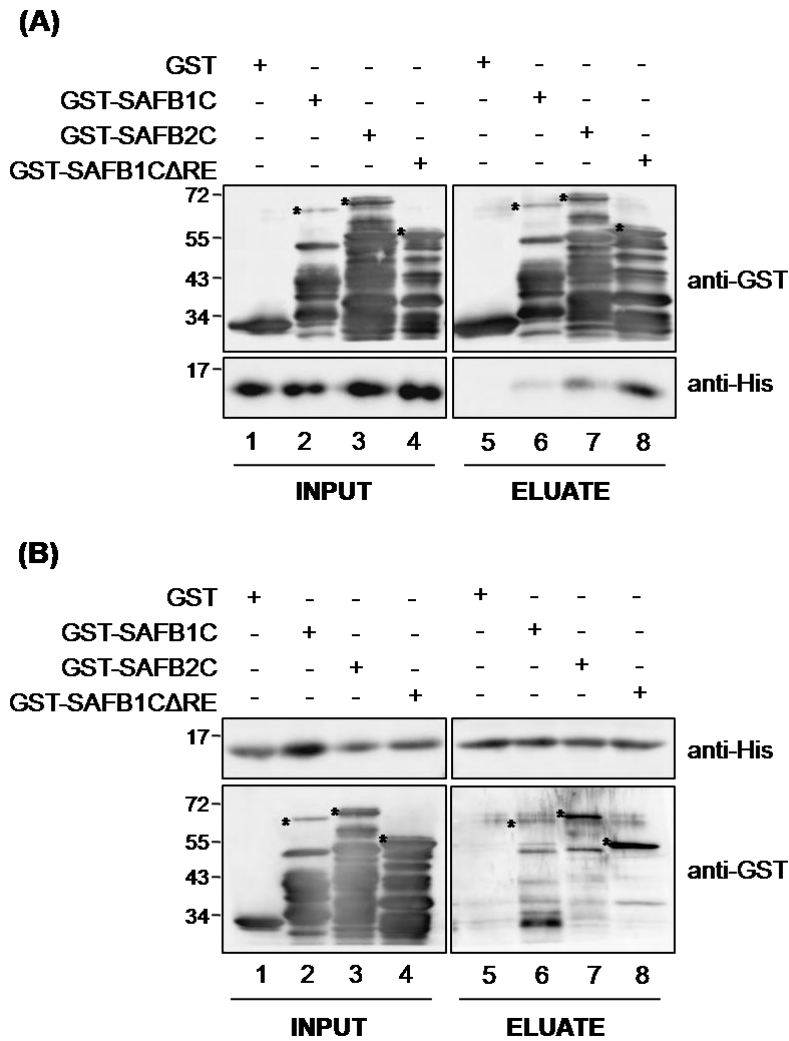


Εικόνα 59: Επαγωγή και καθαρισμός των χμαιοικόν πρωτεϊνών GST-SAFB1C και GST-SAFB2C. Κύτταρα *E.coli* που περιείχαν τα πλασμίδια για την έκφραση των GST-SAFB1C και GST-SAFB2C, επώαστηκαν απουσία ή παρουσία IPTG. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μαζί με το ίζημα και το διαλυτό κλάσμα (υπερκείμενο) των κυττάρων που εκφράζουν τις παραπάνω πρωτεΐνες, καθώς και το αδέσμευτο κλάσμα και το έκλουσμα της στήλης GSH-Sepharose, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie. Οι κουκίδες δείχνουν την θέση των χμαιοικόν πρωτεϊνών και οι αριθμοί αριστερά αντιστοιχούν σε μάρτυρες μοριακών βαρών σε kDa.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 59, οι δύο χμαιοικές πρωτεΐνες GST-SAFB1C και GST-SAFB2C, εκφράζονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη ~58kDa και ~60kDa. Οι πλήρους μεγέθους πρωτεΐνες σημειώνονται με μαύρες κουκίδες, ενώ οι υπόλοιπες ζώνες αντιπροσωπεύουν προϊόντα πρωτεόλυσης των δυο πρωτεϊνών.

Δ.3.3.3. *In vitro* αλληλεπίδραση της His-ERH με τους SAFB1 και SAFB2.

Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα χρωματογραφίας αγκιστείας, όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.7. Στο πρώτο πείραμα περίπου 10μg GST, GST-SAFB1C, GST-SAFB2C και GST-SAFB1CΔRE, καθηλωμένα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης μέσω του επιτόπου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, επώαστηκαν αντίστοιχα με 10μg καθαρής His-ERH. Ενώ αντίστροφα, στο δεύτερο πείραμα, 10μg καθηλωμένης His-ERH σε σφαιρίδια νικελίου μέσω του επιτόπου των έξι ιστιδινών, επώαστηκαν με 10μg GST, GST-SAFB1C, GST-SAFB2C και GST-SAFB1CΔRE αντίστοιχα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων από τα σφαιρίδια και ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση των αντισωμάτων anti-GST και anti-His και στις δύο περιπτώσεις.



Εικόνα 60: In vitro αλληλεπίδραση της πλήρους μεγέθους His-ERH με τα καρβοξυτελικά τμήματα του SAFB1 και του SAFB2. (A) Χρωματογραφία αγκιστείας των καθηλωμένων πρωτεϊνών σε στήλη GSH-Sepharose, GST-SAFB1C (~58kDa), GST-SAFB2C (~60kDa), GSTSAFB1 Δ RE (~49kDa) ή GST επωασμένες με την βακτηριακά εκφρασμένη πρωτεΐνη His-ERH (~12kDa). (B) Χρωματογραφία αγκιστείας της καθηλωμένης πρωτεΐνης σε στήλη νικελίου (Ni-NTA) His-ERH επωασμένης με τις βακτηριακά εκφρασμένες πρωτεΐνες GST-SAFB1C, GST-SAFB2C, GSTSAFB1 Δ RE ή GST. Έγινε ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση με αντίσωμα anti-GST και anti-His, όπως σημειώνονται στην εικόνα, σε κάθε περίπτωση. Το εισαγόμενο κλάσμα (INPUT) (διαδρομή 1-4) αντιπροσωπεύει το 1/10 της ποσότητας των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν, όπως απεικονίζονται σε κάθε περίπτωση και τα εκλουσμένα κλάσματα (ELUATES) (διαδρομή 5-8) Με αστερίσκους σημειώνονται οι πρωτεΐνες πλήρους μεγέθους.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 60A, η πρωτεΐνη His-ERH κατακρατείται από τα επωασμένα με τους GST-SAFB1C, GST-SAFB2C και GST-SAFB1 Δ RE σφαιρίδια γλουταθειόνης (διαδρομές 6-8A), σε αντίθεση με τα σφαιρίδια που περιέχουν μόνο

την πρωτεΐνη GST (διαδρομή 5A), στα οποία η πρωτεΐνη ERH δεν ανιχνεύεται καθόλου. Ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και στο αντίστροφο πείραμα (Εικόνα 60B), καθώς οι GST-SAFB1C, GST-SAFB2C και GST-SAFB1CΔRE κατακρατούνται από τα επωασμένα με την His-ERH σφαιρίδια νικελίου (διαδρομές 6-8B), σε αντίθεση με την πρωτεΐνη της GST η οποία δεν ανιχνεύεται (διαδρομή 5B).

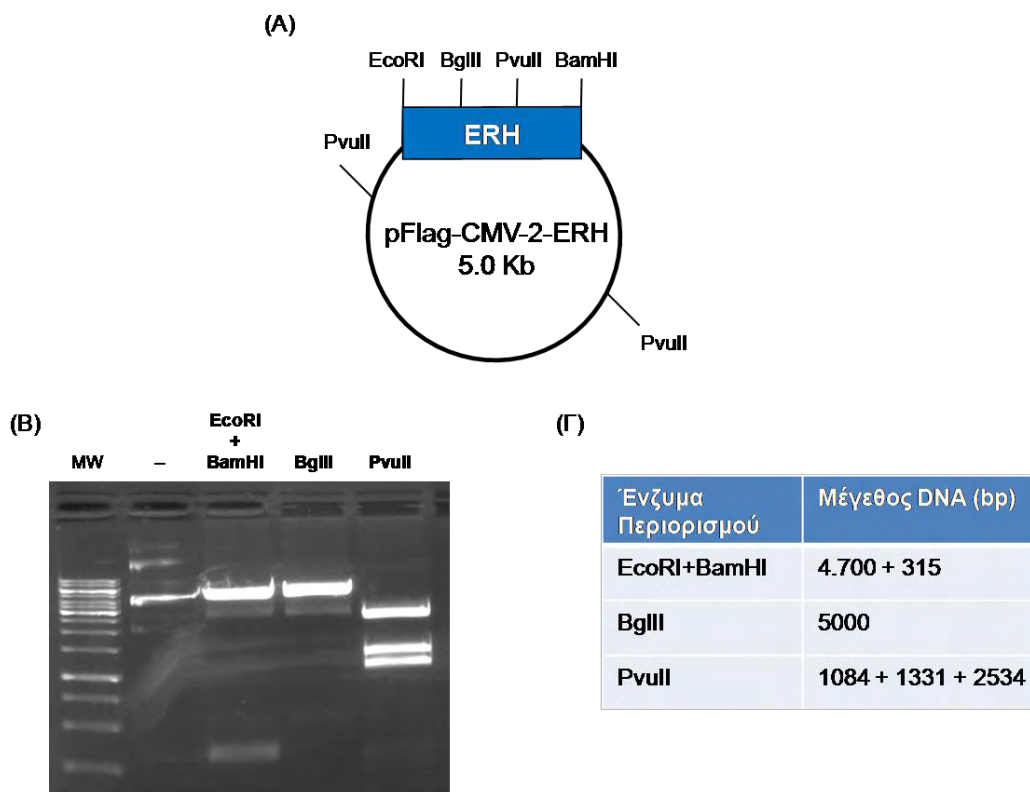
Από το παραπάνω πείραμα συμπεραίνουμε ότι η ERH αλληλεπιδρά άμεσα με τον SAFB1 και τον SAFB2 μέσω του καρβοξυτελικού τους άκρου. Επιπλέον εντοπίσαμε την περιοχή αλληλεπίδρασης του SAFB1/2 με την ERH στα 205 τελευταία πλούσια σε R/G αμινοξικά κατάλοιπά τους, εικόνα 60 (διαδρομή 8A και διαδρομή 6 και 8B). Υπενθυμίζεται ότι η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση των SAFB1/2 με την κινάση SRPK1.

Δ.3.4. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ SAFB-ERH

Επιβεβαιώσαμε ότι η ERH αλληλεπιδρά άμεσα με τα 205 καρβοξυτελικά αμινοξικά κατάλοιπα του SAFB1 και του SAFB2 σε κύτταρα θηλαστικών. Επόμενος στόχος ήταν να διερευνηθεί ο κυτταρικός εντοπισμός των συμπλόκων αυτών. Χρησιμοποιήσαμε δύο τεχνικές, την μικροσκοπία φθορισμού και την βιοχημική κλασμάτωση.

Δ.3.4.1. Κατασκευή του πλασμιδίου pFlag-CMV-2-ERH.

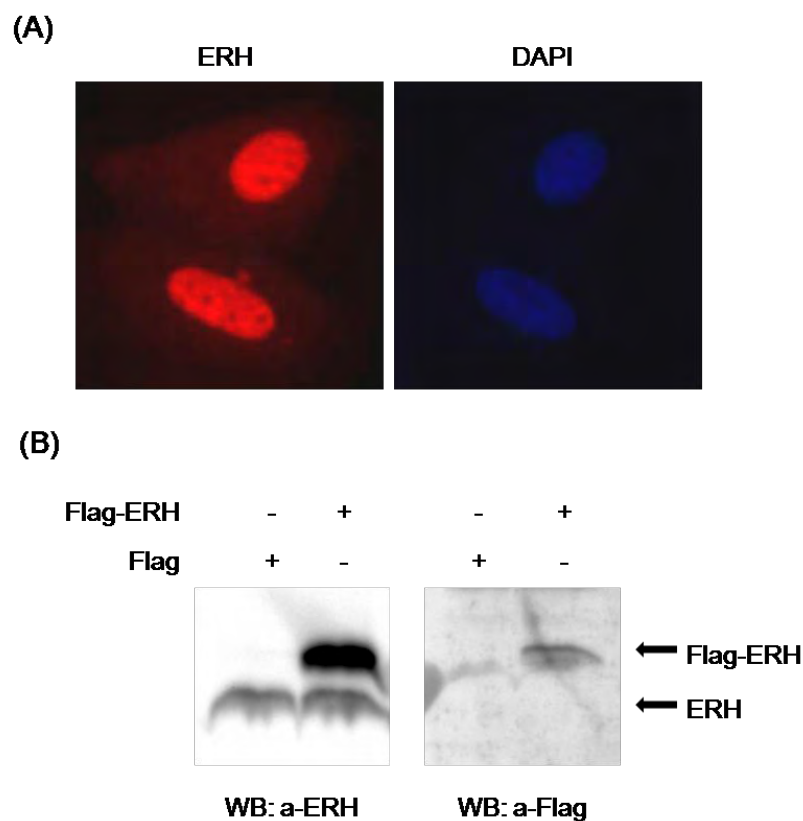
Πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του cDNA της ERH στον πλασμιδιακό φορέα pFlag-CMV-2, με στόχο την έκφραση της ERH σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag, σε κύτταρα θηλαστικών. Επομένως, η ERH ανιχνεύεται με τη χρήση αντισώματος έναντι του επιτόπου Flag, καθώς εκφράζεται σε σύντηξη μαζί του στο αμινοτελικό της άκρο. Λόγω του μικρού μεγέθους του επιτόπου Flag, δεν επηρεάζεται η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης ERH, γεγονός που είναι πολύ σημαντικό καθώς το μέγεθός της είναι μόλις 12kDa. Το cDNA της κλωνοποιήθηκε ως ένθεμα στις θέσεις BamHI-EcoRI. Το νέο πλασμίδιο ελέγχθηκε με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για την ορθότητα της πλασμιδιακής κατασκευής. Ο πίνακας της εικόνας εμπεριέχει τα αναμενόμενα μεγέθη των τμημάτων του DNA, ύστερα από τις κατάλληλες πέψεις.



Εικόνα 61: Κατασκευή και έλεγχος του πλασμιδίου pFlag-CMV-2-ERH. (A) Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδίου με τις θέσεις πέσης των επιλεγμένων ενζύμων περιορισμού. (B) Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1 % και (Γ) Συγκεντρωτικός πίνακας των τμημάτων DNA, τα οποία προέκυψαν μετά τις πέψεις με τα αναγραφόμενα επιλεγμένα ένζυμα περιορισμού.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 61, επιβεβαιώνεται η ορθότητα της πλασμιδιακής κατασκευής από τα αναμενόμενα μεγέθη των τμημάτων του DNA που εμφανίζονται στην πηκτή αγαρόζης. Η πλασμιδιακή κατασκευή ελέγχθηκε και με την τεχνική της αλληλούχισης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πείραμα ελέγχου του σωστού υπόκυτταρικού εντοπισμού και πρωτεϊνικής έκφρασης της χμαιρικής πρωτεΐνης Flag-ERH σε σύγκριση με την ενδογενή ERH. Κύτταρα MCF-7 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pFlag-CMV-2-ERH και τον άδειο πλασμιδιακό φορέα. Ακολούθησε μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού και έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης της Flag-ERH με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, ύστερα από λύση των κυττάρων, με την χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του επιτόπου Flag αλλά και της πρωτεΐνης ERH.

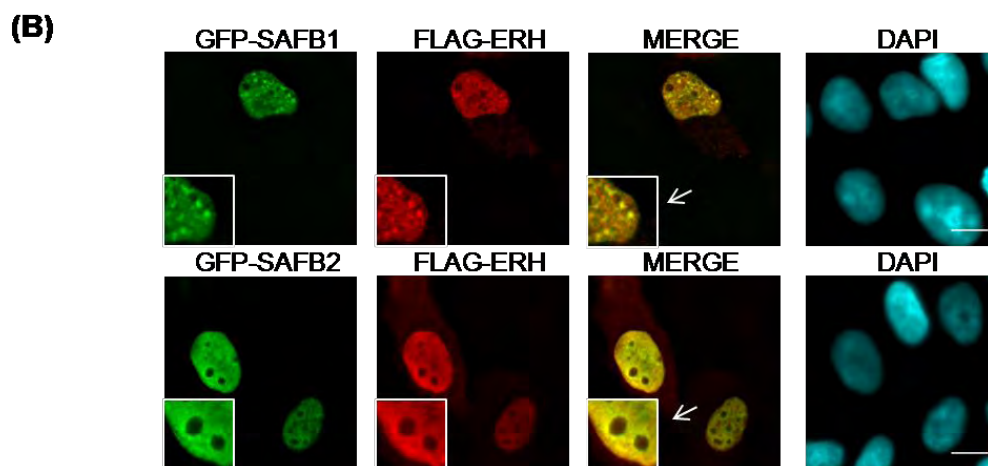
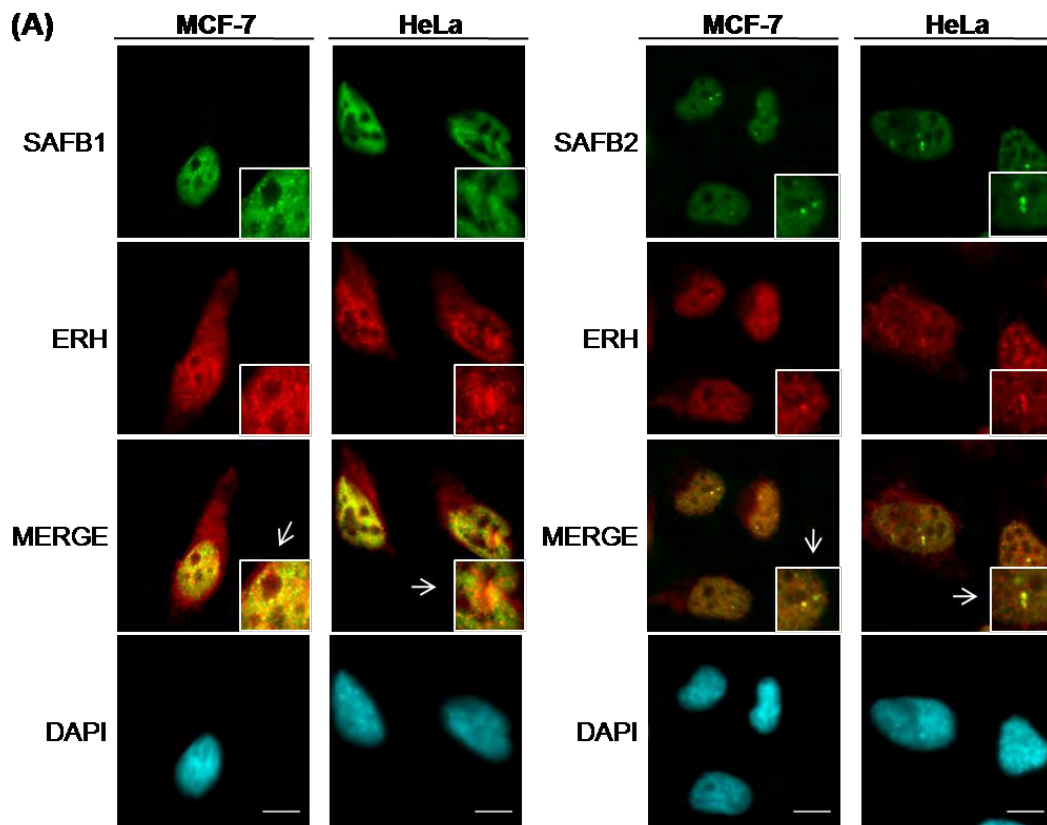


Εικόνα 62: Έλεγχος σωστού υποκυτταρικού εντοπισμού και πρωτεϊνικής έκφρασης της χμιαϊρικής πρωτεΐνης **Flag-ERH**. (A) Υποκυτταρικός εντοπισμός της Flag-ERH μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού, με τη χρήση ειδικού αντισώματος αντι-Flag. Για την ανίχνευση των πυρήνων, έγινε χρώση του DNA με DAPI. (B) Ανοσοαποτύπωση κατά Western της εξωγενούς και της ενδογενούς εκφρασμένης ERH, ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, αντι-ERH και αντι-Flag, όπως σημειώνονται στην εικόνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 62A, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της Flag-ERH είναι πυρηνικός, αλλά και κυτταροπλασματικός, συμβαδίζοντας απόλυτα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της ενδογενούς ERH. Όσον αφορά στον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων, α) το ειδικό αντίσωμα της ERH αναγνωρίζει και την υπερεκφρασμένη και β) το αντίσωμα έναντι του επιτόπου Flag ανιχνεύει την εξωγενώς εκφρασμένη ERH στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (εικόνα 62B). Επομένως, το πλασμίδιο pFlag-CMV-2-ERH κρίνεται σωστό για την έκφραση της πρωτεΐνης ERH, σε κύτταρα θηλαστικών.

Δ.3.4.2. Εντοπισμός των ενδογενών και των εξωγενών συμπλόκων SAFB/ERH με μικροσκοπία φθορισμού.

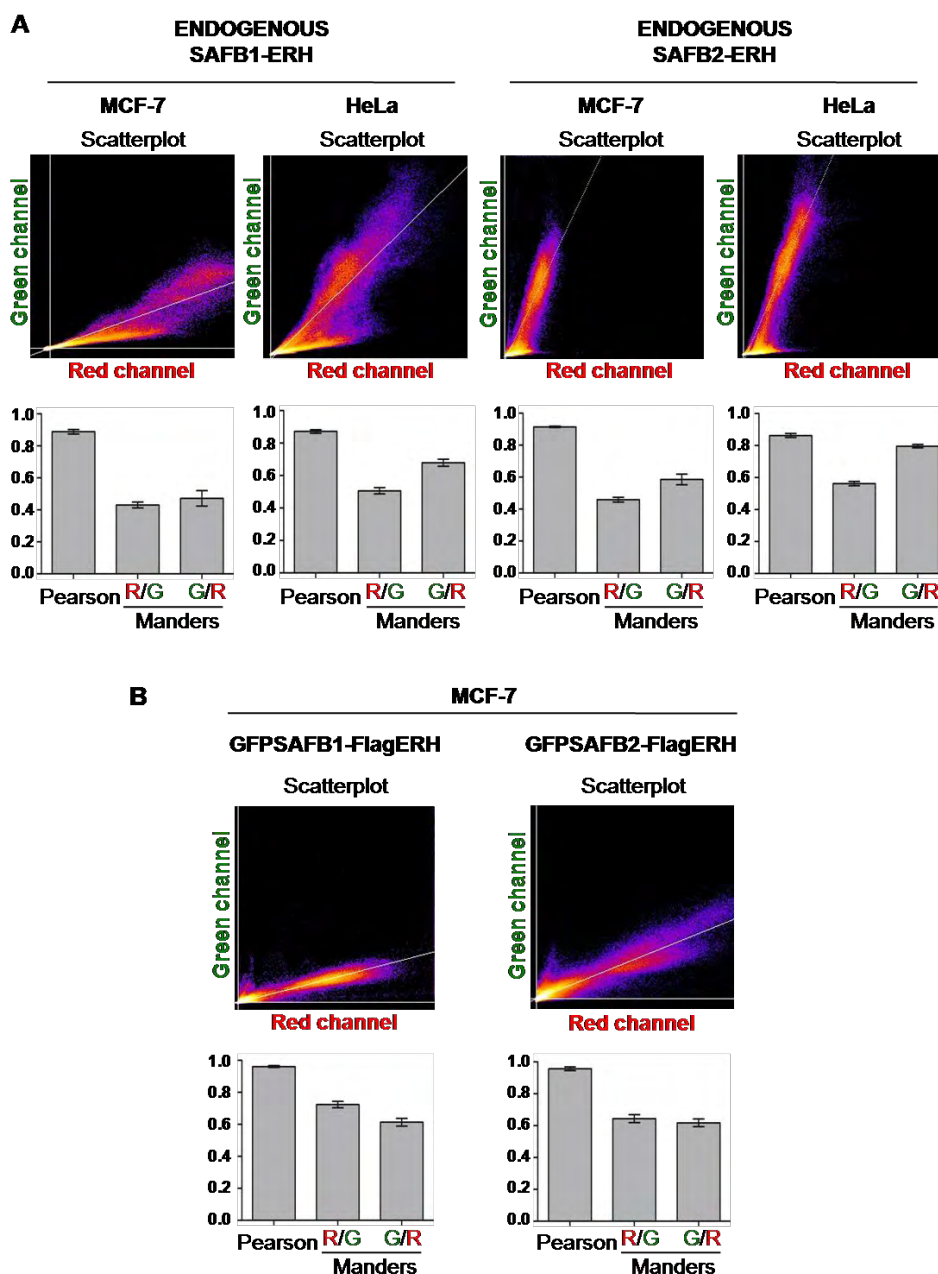
Για τον εντοπισμό των ενδογενών συμπλόκων SAFB-ERH, πραγματοποιήθηκαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού με την χρήση ειδικών αντισωμάτων, αντι-SAFB1, αντι-SAFB2 και αντι-ERH σε κύτταρα MCF-7 και HeLa. Όπως φαίνεται στην εικόνα 63A, η πρωτεΐνη ERH εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ενώ ο κυτταρικός εντοπισμός του SAFB1 και SAFB2 είναι αποκλειστικά πυρηνικός, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Από την επιπροβολή των εικόνων φαίνεται ότι τα σύμπλοκα SAFB1-ERH και SAFB2-ERH εντοπίζονται σε συγκεκριμένες κοκκιώδεις πυρηνικές δομές. Επιβεβαιωτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα MCF-7, στα οποία υπερεκφράστηκε ταυτόχρονα ο SAFB1 ή ο SAFB2, σε σύντηξη με την GFP, και η χμιαϊκή πρωτεΐνη Flag-ERH. Η επιπροβολή των εικόνων έδειξε το ίδιο αποτέλεσμα, όπως φαίνεται στην εικόνα 63B.



Εικόνα 63: Υποκυτταρικός εντοπισμός των ενδογενών και των εξωγενών εκφρασμένων SAFB1, SAFB2 και ERH. (A) Σε κύτταρα MCF-7 ή HeLa ανιχνεύτηκαν οι πρωτεΐνες SAFB1, SAFB2 και ERH με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτών, μέσω της διαδικασίας του έμμεσου ανοσοφθορισμού. (B) Κύτταρα MCF-7 διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με τα πλασμίδια που εκφράζουν τον GFP-SAFB1 και την Flag-ERH ή τον GFP-SAFB2 και την Flag-ERH. Ακολούθησε η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση ειδικού αντισώματος αντι-Flag. Για την ανίχνευση των πυρήνων, έγινε χρώση του DNA με DAPI. Η επιπροβολή των εικόνων δείχνει την επικάλυψη του

σήματος σε κίτρινο χρώμα. Στο (A) και στο (B) υπάρχουν ένθετες μεγενθυμένες περιοχές των αντίστοιχων εικόνων.

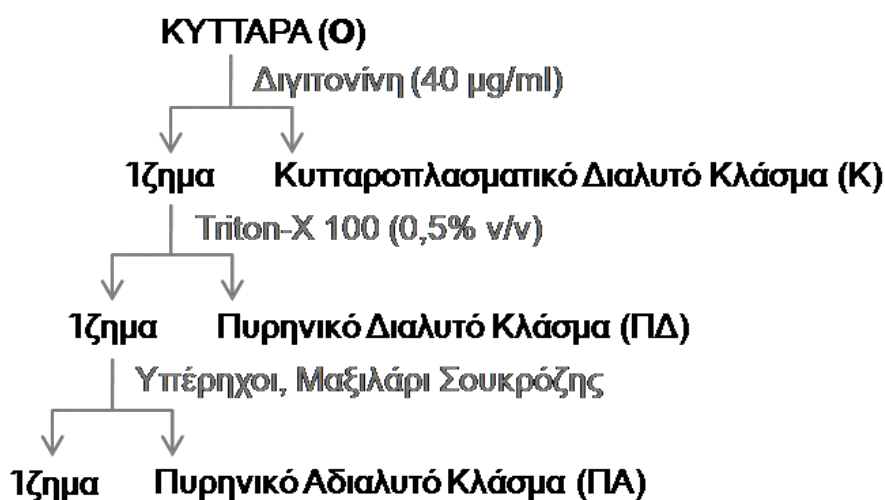
Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν ποιοτικές και ποσοτικές μετρήσεις των δεδομένων μικροσκοπίας με την χρήση ειδικών προγραμμάτων μικροσκοπίας όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.17.1.. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η συνεπικάλυψη των δύο σημάτων φθορισμού (σε διαφορετικά κανάλια εκπομπής, κόκκινο για το φθορισμό της ERH, R και πράσινο για το φθορισμό των SAFB, G) και εκφράστηκε με βάση τους συντελεστές συνεντοπισμού Pearson και Manders. Ο συντελεστής Pearson, ο οποίος είναι ένας ποιοτικός δείκτης αλληλοεπικάλυψης των δύο σημάτων φθορισμού, σε όλα τα διαγράμματα κυμαίνεται από 0,8 έως 1 (-1: Αρνητική επικάλυψη, 0: Τυχαία επικάλυψη, +1: Θετική επικάλυψη) (εικόνα 64A και 64B κάτω διαγράμματα), αποτέλεσμα που δηλώνει ότι ο συνεντοπισμός ERH-SAFB δεν είναι τυχαίος. Ο συντελεστής Manders, ο οποίος αποτελεί μια επέκταση του συντελεστή Pearson και εκφράζει ποσοτικά το ποσοστό επικάλυψης των σημάτων φθορισμού και η τιμή του κυμαίνεται από το 0 έως το +1, με +1 να δείχνει ότι τα δύο διαφορετικά σήματα φθορισμού επικαλύπτονται σε ποσοστό 100%, έδειξε ότι ο συνεντοπισμός του SAFB1 και του SAFB2 με την ERH υπολογίζεται στο 50-70% του συνολικού ποσοστού των πρωτεϊνών (εικόνα 64A και 64B κάτω διαγράμματα). Τέλος, από τα διαγράμματα διασποράς (scatter plot) (εικόνα 64A και 64B πάνω διαγράμματα) φαίνεται ότι η επικάλυψη των σημάτων που δίνεται από την σύγκλιση των εντάσεων τους στην περιοχή που ορίζεται από την ευθεία, είναι σημαντική.



Εικόνα 64: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της επικάλυψης δύο καναλιών εκπομπής των πειραμάτων ανοσοφθορισμού. Διαγράμματα διασποράς των σημάτων φθορισμού των ενδογενών πρωτεϊνών (A, Πάνω διαγράμματα) και των υπερεκφρασμένων (B, Πάνω διάγραμμα). Κόκκινο (φθορισμός ERH) και πράσινο (φθορισμός SAFB). Η επικάλυψη των σημάτων δίνεται από την σύγκλιση των εντάσεων τους στην περιοχή που ορίζεται από την ευθεία. Γραφήματα ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης του συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών σε δείγμα 15 κυττάρων όπως προκύπτουν από τις τιμές των τιμών Pearson και Manders των ενδογενών (A, Κάτω διαγράμματα) και των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών (B, Κάτω διάγραμμα).

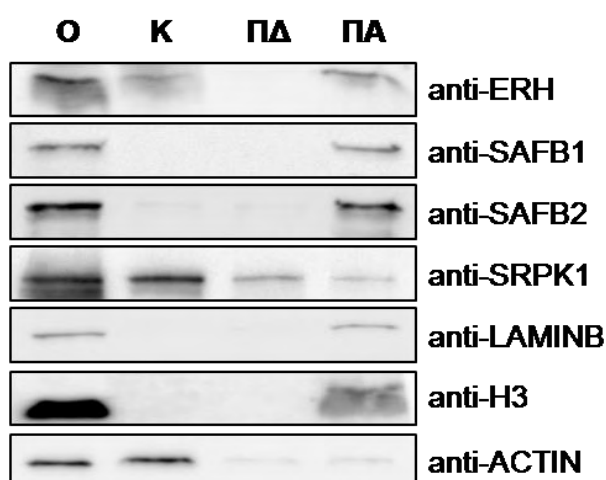
Δ.3.4.3. Υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών SAFB και ERH με τη μέθοδο της βιοχημικής κλασμάτωσης.

Ο συνεντοπισμός των SAFB και ERH ως διακριτές δομές στο μικροσκόπιο μας ώθησε να πραγματοποιήσουμε βιοχημική κλασμάτωση, προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω την υποπυρηνική κατανομή των πρωτεϊνών αυτών στον πυρήνα. Η πορεία της βιοχημικής κλασμάτωσης που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στην εικόνα 65 και περιγράφεται αναλυτικά στα Y&M, παράγραφος Γ.16. Συνοπτικά, τα κύτταρα κατεργάστηκαν με 40 μg/ml διγιτονίνη, προκειμένου μετά από φυγοκέντρηση στο ίζημα να υπάρχουν άθικτοι οι πυρήνες των κυττάρων και όσα οργανίδια παραμένουν αδιάλυτα σε αυτή τη συγκέντρωση διγιτονίνης (π.χ. μιτοχόνδρια) ενώ στο υπερκείμενο, το κυτταρόπλασμα. Το ίζημα κατεργάστηκε με 0,5% μη ιοντικό απορρυπαντικό, Triton-X 100, με στόχο την ήπια λύση των πυρήνων αφήνοντας στο ίζημα τις αδιάλυτες πρωτεΐνες των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες της χρωματίνης και της πυρηνικής μήτρας ενώ στο υπερκείμενο το πυρηνόπλασμα των κυττάρων. Τέλος, ύστερα από επαναδιαλυτοποίηση του παραπάνω αδιάλυτου κλάσματος, χρήση υπερήχων και φυγοκέντρηση μετά από 30% σουκρόζη, παραλήφθηκαν στο υπερκείμενο διαλυτές οι πρωτεΐνες της χρωματίνης και της πυρηνικής μήτρας, αντιπροσωπεύοντας το πυρηνικό αδιάλυτο κλάσμα του κυττάρου ύστερα από κατεργασία με μια ιοντικά απορρυπαντικά και κατ' επέκταση το κλάσμα που περιέχει τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας και τις ιστόνες.



Εικόνα 65: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση, της διαδικασίας, της βιοχημικής κλασμάτωσης.

Ως μάρτυρες των αντίστοιχων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκαν η ακτίνη για το κυτταροπλασματικό διαλυτό κλάσμα (Κ) και η λαμίνη Β και η ιστόνη 3 για το πυρηνικό αδιάλυτο κλάσμα (ΠΑ) ενώ η κινάση SRPK1 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για το πυρηνικό διαλυτό κλάσμα (ΠΔ), έτσι όπως ορίζονται τα κλάσματα στην εικόνα 65. Όπως φαίνεται στην εικόνα 66 η ακτίνη ανιχνεύεται μόνο στο κυτταροπλασματικό κλάσμα (Κ), ενώ η λαμίνη Β και η ιστόνη μόνο στο πυρηνικό αδιάλυτο κλάσμα (ΠΑ). Η SRPK1 ανιχνεύεται και στα τρία κλάσματα, με κατανομή η οποία συμφωνεί με προηγούμενα δημοσιευμένα πειραματικά αποτελέσματα του εργαστηρίου Βιοχημείας. Οι πρωτεΐνες SAFB1 ανιχνεύονται στο κλάσμα που περιέχει τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας, όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, ενώ η ERH φαίνεται να κατανέμεται ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και στο πυρηνικό αδιάλυτο κλάσμα του κυττάρου.



Εικόνα 66: Υποκυτταρική κατανομή των SAFB1, SAFB2 και ERH. Ανοσοαποτύπωση κατά Western Ολικών (O), Κυτταροπλασματικών (K), Πυρηνικών Διαλυτών (ΠΔ) και Πυρηνικών Αδιάλυτων (ΠΑ) κλασμάτων, κυττάρων MCF-7 με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων αντι-ERH, αντι-SAFB1, αντι-SAFB2, αντι-SRPK1, αντι-LAMINB, αντι-Histone 3 και αντι-Actin, όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Από αυτά τα αποτελέσματα αλλά και από το πείραμα της ανοσοκατακρήμνισης συμπεραίνουμε ότι τα σύμπλοκα SAFB1-ERH και SAFB2-ERH δημιουργούνται στο πυρηνικό ικρίωμα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η απουσία της ERH από το πυρηνικό διαλυτό κλάσμα.

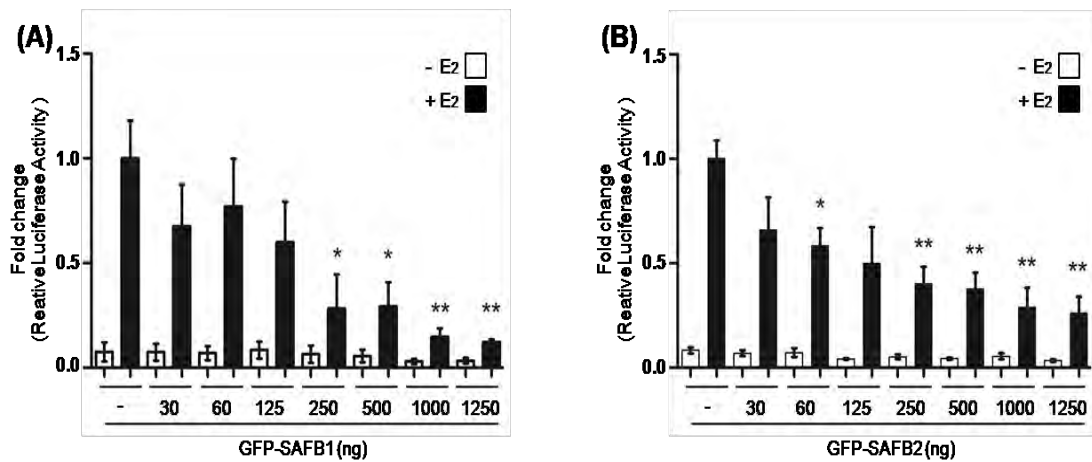
Δ.3.5. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ SAFB-ERH

Το τελικό ερώτημα που προέκυψε μετά την εύρεση της δημιουργίας των συμπλόκων SAFB-ERH στην πυρηνική μήτρα των κυττάρων είναι αυτό του βιολογικού ρόλου αυτής της αλληλεπίδρασης. Από την στιγμή που δημιουργούνται μέσα στα κύτταρα τα σύμπλοκα SAFB1-ERH και SAFB2-ERH, είναι σημαντικό να ανιχνευθεί πώς αυτή η αλληλεπίδραση επηρεάζει τη λειτουργία καθενός από τα συστατικά του και κατ' επέκταση τη λειτουργία του κυττάρου. Δεδομένου ότι πρωταρχικός σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η λειτουργία των SAFB1 και SAFB2 μέσω των αλληλεπιδράσεών τους, μελετήθηκε η επιρροή της ERH σε δυο γνωστές λειτουργίες τους.

Δ.3.5.1. Επίδραση της πρωτεΐνης ERH στην κατασταλτική δράση των SAFB1/2 στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα

Όπως έχει αναφερθεί και στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων, μια καλά μελετημένη λειτουργία των SAFB1/2 είναι η καταστολή που προκαλούν στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα. Ως εκ τούτου διερευνήθηκε η επίδραση της ERH στη συγκεκριμένη δράση των SAFB1 και SAFB2.

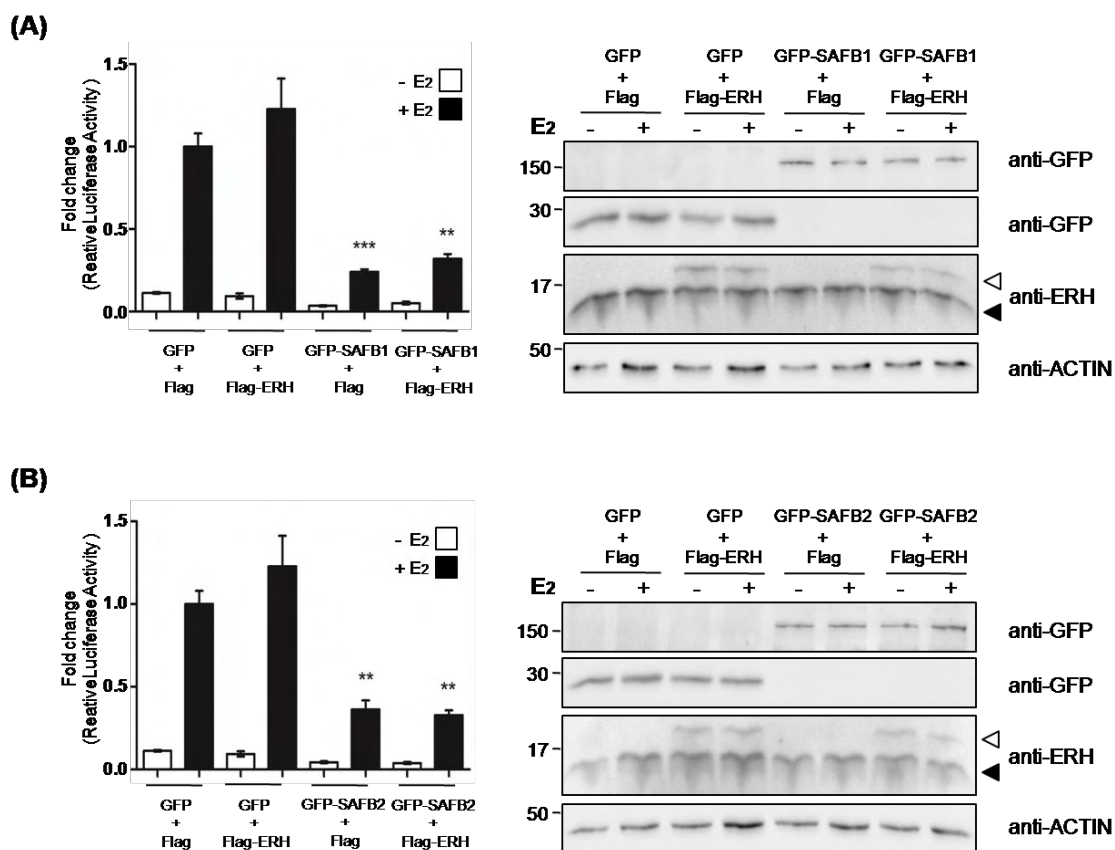
Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων πλασμίδιου που εκφράζει τους SAFB1 και SAFB2 αντίστοιχα, για την εύρεση της μέσης καταστολής στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα, η οποία προκαλείται παρουσία τους. Κύτταρα MCF-7 συνδιαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει τα τεχνητά στοιχεία ERE, τα πλασμίδια που εκφράζουν τον SAFB1 ή τον SAFB2 σε αυξανόμενες ποσότητες καθώς και το πλασμίδιο της Renilla για την κανονικοποίηση των μετρήσεων. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 24 ώρες παρουσία ή απουσία 10^{-8} M E2 Ακολούθησε λύση των κυττάρων και μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του ERα.



Εικόνα 67: Δοσοεξαρτώμενη επίδραση του SAFB1 και του SAFB2 στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα. Μέτρηση της μεταγραφική ενεργότητα του ERα, σε συν-διαμολυσμένα κύτταρα MCF-7 με το πλασμίδιο αναφοράς 3xERE-TATA-Luc και το πλασμίδιο rCI-Renilla καθώς και αυξανόμενες ποσότητες πλασμιδίων rEGFP-SAFB1 (A) ή rEGFP-SAFB2 (B), έπειτα από επώαση για 24 ώρες απουσία και παρουσία E2, σε συγκέντρωση 10^{-8} M. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Στην εικόνα παρουσιάζεται με μπάρες το τυπικό σφάλμα και με αστερίσκους η στατιστική σημαντικότητα (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 67, η οιστραδιόλη προκαλεί αύξηση στη μεταγραφική ενεργότητα του ERα όπως είναι αναμενόμενο, ενώ ο SAFB1 αλλά και ο SAFB2 φαίνεται να καταστέλλουν. Η καταστολή είναι δοσοεξαρτώμενη και ποσοτικά συγκρίσιμη για τους δύο παράγοντες. Για τα πειράματα επίδρασης της ERH στην δράση των SAFB, επιλέχθηκαν τα 500 ng πλασμιδίου καθώς είναι αρκετά, ώστε εκφραζόμενοι οι SAFB1/2 αντίστοιχα, να προκαλέσουν σχεδόν την πλήρη καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του ERα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργότητας, όπως περιγράφηκαν παραπάνω συνδιαμολώνοντας τα κύτταρα MCF-7 με το πλασμίδιο που εκφράζει τα τεχνητά στοιχεία ERE, το πλασμίδιο της Renilla τα πλασμίδια που εκφράζουν τον SAFB1 ή τον SAFB2 στην ποσότητα που επιλέχθηκε και το πλασμίδιο που εκφράζει την ERH.



Εικόνα 68: Επίδραση της ERH στην κατασταλτική δράση του SAFB1 και του SAFB2 στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα. MCF-7 κύτταρα, συνδιαμολώνθηκαν με τα πλασμίδια που εκφράζουν την GFP, τον GFP-SAFB1 (A) ή τον GFP-SAFB2 (B) (500 ng) και τον επίτοπο Flag ή την Flag-ERH (1000 ng) ή τον συνδυασμό τους (αριστερή στήλη). Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επίσης με το πλασμίδιο αναφοράς 3xERE-TATA-Luc και το πλασμίδιο pCI-Renilla. Επωάστηκαν για 24 ώρες απουσία και παρουσία E2, σε συγκέντρωση 10^{-8} M. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 9 τιμών από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Στην εικόνα παρουσιάζεται με μπάρες το τυπικό σφάλμα και με αστερίσκους η στατιστική σημαντικότητα (**P<0,01, ***P<0,001). Τα επίπεδα έκφρασης ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων αντι-GFP, αντι-ERH και αντι-ACTIN (δεξιά στήλη). Τα λευκά βέλη δείχνουν τη θέση της εξωγενούς εκφρασμένης ERH, ενώ τα μαύρα βέλη τη θέση της ενδογενούς.

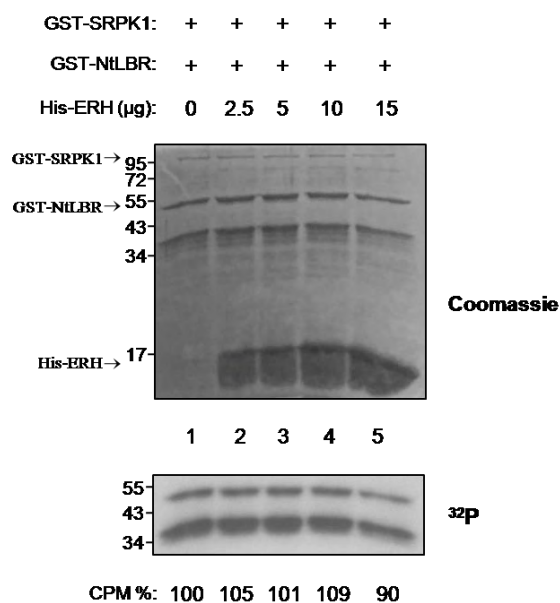
Στα αποτελέσματα της εικόνας 68, είναι εμφανής η αύξηση που προκαλεί η οιστραδιόλη καθώς και η πτώση που προκαλείται από τους SAFB1 και SAFB2 στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα. Η ERH δεν φαίνεται να μεταβάλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του ERα, όταν εκφράζεται μόνη της. Επίσης, εκφραζόμενη είτε με τον SAFB1 (εικόνα 68A) είτε με τον SAFB2 (εικόνα 68B) δεν επιφέρει καμία μεταβολή στη δράση τους. Παράλληλα με τη μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας στα ίδια κυτταρικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και των τριών

πρωτεϊνών. Όπως φαίνεται δεξιά στην εικόνα 68A και 68B, από την ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όλες οι υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες εκφράζονται στο ίδιο ποσοστό και τα επίπεδα έκφρασής τους παρέμειναν αμετάβλητα σε όλες τις συνθήκες. Συνεπώς, η ERH δεν επηρεάζει την καταστολή που προκαλούν οι SAFB1/2 στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα, σε κύτταρα MCF-7.

Δ.3.5.2. Επίδραση της πρωτεΐνης ERH στην κατασταλτική δράση των SAFB1/2 στην ενζυμική δράση της SRPK1

Μια άλλη γνωστή λειτουργία των SAFB είναι η αναστολή της ενζυμικής δράσης της κινάσης SRPK1. Γνωρίζουμε ότι οι πρωτεΐνες SAFB1/2 αλληλεπιδρούν με τις κινάσες SRPK1/1a *in vitro* και *in vivo* και καταστέλλουν την ενζυμική τους δράση [62, 63]. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του SAFB1, έχει δειχθεί ότι στην αλληλεπίδραση με την SRPK1 ενέχονται τα 205 πλούσια σε RG καρβοξυτελικά αμινοξικά κατάλοιπά του, ενώ στην περίπτωση του SAFB2 δεν έχει εντοπιστεί μικρότερο τμήμα από τα 312 καρβοξυτελικά αμινοξικά κατάλοιπά του. Δεδομένου ότι και η ERH φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα ίδια τμήματα του SAFB1 και του SAFB2, ελέγχθηκε κατά πόσον η ERH επηρεάζει την καταστολή που προκαλούν οι SAFB1/2, στην ενζυμική δράση της κινάσης. Πραγματοποιήθηκαν έτσι δοκιμές *in vitro* φωσφορυλίωσης, όπως περιγράφεται στα Y&M, παράγραφος Γ.9 και Γ.10.

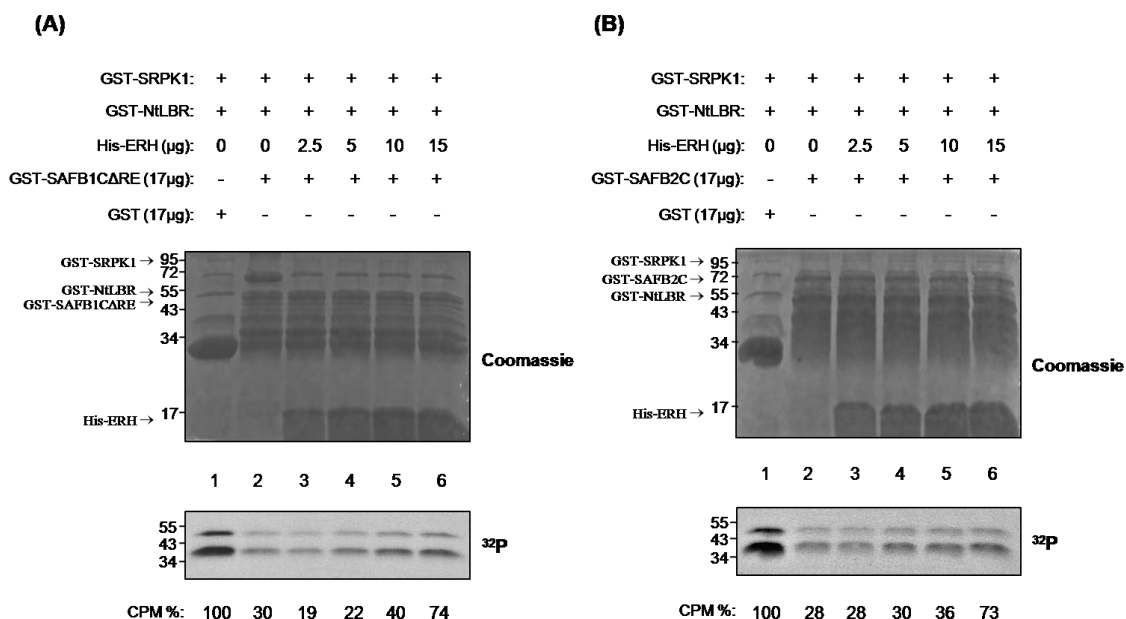
Γι' αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις *in vitro* φωσφορυλίωσης ενός καλά χαρακτηρισμένου υποστρώματος της SRPK1, του αμινοτελικού τμήματος του υποδοχέα της λαμίνης B (GST-Nt-LBR), από την GST-SRPK1, παρουσία ραδιενεργώς σημασμένου ATP (³²P). Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία.



Εικόνα 69: Επίδραση της βακτηριακά εκφρασμένης His-ERH στη φωσφορυλίωση του GSTNt-LBR από την GST-SRPK1. Ανάλυση των πρωτεϊνών της αντίδρασης φωσφορυλίωσης σε SDS-PAGE και χρώση με Coomassie (Πάνω), το φιλμ της αυτοραδιογραφίας ^{32}P (κάτω). Οι τιμές κάτω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν το επί της εκατό ποσοστό ραδιενεργών κρούσεων (%). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Αρχικά ελέγχθηκε η δράση της His-ERH, στη δράση της κινάσης, GST-SRPK1. Ως εκ τούτου πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης παρουσία ή απουσία His-ERH. Αφού δεν μεταβλήθηκαν τα φωσφορυλιωμένα επίπεδα του GST-NtLBR, συμπεραίνουμε ότι η παρουσία της πρωτεΐνης His-ERH σε αυξανόμενες ποσότητες (0, 2,5, 5, 10 μg) δεν επηρεάζει την ενζυμική δράση της κινάσης, όπως φαίνεται στην εικόνα 69 (σύγκριση διαδρομών 1 με 2-5).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες *in vitro* φωσφορυλίωσης του GST-LBRNt, παρουσία σταθερής ποσότητας GST-SAFB1CARE ή GST-SAFB2C και προσθήκη σταδιακά αυξανόμενων ποσοτήτων His-ERH 0, 2,5, 5, 10, 15 μg. Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανίχνευση των ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών με αυτοραδιογραφία.

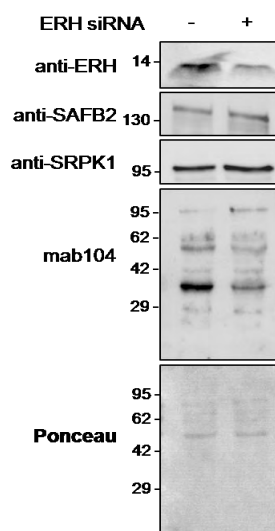


Εικόνα 70: Επίδραση της βακτηριακά εκφρασμένης His-ERH, παρουσία του GSTSAFB1ΔRE ή του GSTSAFB2C στη φωσφορυλίωση του GSTNt-LBR από την GST-SRPK1. Ανάλυση των πρωτεϊνών των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης παρουσία του GSTSAFB1ΔRE (A) ή του GSTSAFB2C (B) σε SDS-PAGE και χρώση με Coomassie (Πάνω), το φιλμ της αυτοραδιογραφίας ^{32}P (κάτω). Οι τιμές κάτω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν το επί της εκατό ποσοστό ραδιενεργών κρούσεων (%). Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 70, η παρουσία του GST-SAFB1ΔRE (διαδρομή A2) αλλά και η παρουσία του GST-SAFB2C (διαδρομή B2) μειώνει τη φωσφορυλίωση του GST-NtLBR στο 30%, συγκρινόμενη με την φωσφορυλίωσή του παρουσία της GST (αρνητικός μάρτυρας) (διαδρομή A1 και B1), αποτέλεσμα που συμφωνεί απόλυτα με προηγούμενα ευρήματα [63]. Η προσθήκη όμως αυξανόμενων ποσοτήτων His-ERH ταυτόχρονα με την παρουσία σταθερής ποσότητας είτε του GST-SAFB1ΔRE (διαδρομές 3A-6A) είτε του GST-SAFB2C (διαδρομή 3B-6B), φαίνεται να αναιρεί, δόσοεξαρτώμενα, την προηγούμενη παρατηρούμενη καταστολή και να επαναφέρει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του GST-NtLBR σε ποσοστό ~75% (διαδρομή 6A-6B). Επομένως, φαίνεται ότι η παρουσία της ERH είναι ικανή να εμποδίσει την καταστολή που προκαλείται στην ενζυμική της δράση, από τον SAFB1 και τον SAFB2, καθιστώντας την ξανά ικανή να φωσφορυλιώσει τα υποστρώματά της *in vitro*.

Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει έναν ανταγωνισμό των πρωτεϊνών ERH και SRPK1 στο καρβοξυτελικό άκρο των SAFB. Έτσι, όταν υπάρχουν χαμηλά επίπεδα

ERH στο κύτταρο είναι πιθανόν, η SRPK1 να είναι δεσμευμένη στον SAFB και άρα ανενεργή, ενώ με την προσθήκη ERH, η SRPK1 απελευθερώνεται από τον SAFB και ενεργοποιείται. Γι' αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκε πείραμα αποσιώπησης της πρωτεΐνης ERH με siRNA σε κύτταρα HeLa και εξετάστηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SR πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι όλων των φωσφορυλιωμένων SR πρωτεϊνών (mAb 104).



Εικόνα 71: Επίδραση της αποσιώπησης της ERH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των SR πρωτεϊνών. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με το siRNA μάρτυρα ή με το siRNA για την ERH (30nM). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα αντι-SAFB2, αντι-ERH, αντι-SRPK1 και mab104, όπως σημειώνεται στην εικόνα. Στο κάτω μέρος απεικονίζεται η χρώση με Ponceau της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης ως μάρτυρας ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 71, η αποσιώπηση της ERH δεν μεταβάλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του SAFB2 και της SRPK1. Φαίνεται όμως να προκαλεί σημαντική μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα των φωσφορυλιωμένων SR πρωτεϊνών, ειδικότερα των SRp35 και SRp55.

Ανακεφαλαιώνοντας τα αποτελέσματα του τρίτου μέρους, η νέα αλληλεπίδραση των SAFB με τη μικρή πρωτεΐνη ERH εντοπίζεται στην πυρηνική μήτρα, αποδίδοντας για πρώτη φορά στην ERH το χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης του πυρηνικού ικρίωματος, καθώς η βιοχημική κλασμάτωση έδειξε την παντελή απουσία της από το πυρηνόπλασμα. Τέλος η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να μην επηρεάζει

την κατασταλτική δράση των SAFB στην μεταγραφική ενεργότητα του ERα, αλλά να επηρεάζει την καταστολή που προκαλούν στην ενζυμική δράσης της SRPK, ίσως μέσω ανταγωνιστικής δέσμευσης της ERH και της SRPK1 στην πλούσια σε RG περιοχή τους.

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λειτουργική αρχιτεκτονική του πυρήνα έχειδειχθεί ότι είναι πολύ σημαντική για την οργάνωση των βασικών λειτουργιών του κυττάρου. Οι δομές του πυρήνα χαρακτηρίζονται από την απουσία μεμβράνης και την συνεχή δυναμική κίνηση και χωροταξική επικοινωνία. Η ύπαρξη της πυρηνικής μήτρας φαίνεται να έχει τον ρόλο του οργανωτή για τη σωστή ρύθμιση του γονιδιώματος, των πυρηνικών διεργασιών και της σωστής γονιδιακής έκφρασης. Η πυρηνική μήτρα σχηματίζει ένα τρισδιάστατο δίκτυο πρωτεϊνών πάνω στην οποία είναι προσκολλημένη η χρωματίνη, υπό τη μορφή θηλειών. Η αλληλεπίδραση της χρωματίνης και της πυρηνικής μήτρας συμβαίνει σε ειδικές θέσεις, οι οποίες ονομάζονται περιοχές προσάρτησης της μήτρας ή του ικριώματος (S/MARs). Στις περιοχές S/MARs έχουν αποδοθεί λειτουργίες που σχετίζονται με την προσέγγιση της χρωματίνης και την γονιδιακή έκφραση καθώς και την πρόσδεση μεταγραφικών συμπλόκων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεϊνών της πυρηνικής μήτρας που προσδένονται στα στοιχεία S/MARs, αποτελεί η οικογένεια των πρωτεϊνών SAFB (Scaffold Attachment Factor B), οι οποίες και αποτέλεσαν το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής [23, 31].

Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα διατριβή χωρίζεται σε δύο μέρη. Το πρώτο μέρος (**A, ενότητα αποτελεσμάτων Δ.1**) αφορά την διερεύνηση των λειτουργιών των SAFB1/2 με βάση την ιδιότητα που τους προσδίδει το αμινοτελικό τους άκρο, η οποία είναι η πρόσδεσή τους στην χρωματίνη, ως πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας. Το δεύτερο μέρος (**B, ενότητες αποτελεσμάτων Δ.2 και Δ.3**) αφορά την εμβάθυνση και την διερεύνηση των μηχανισμών δράσης των SAFB1/2, διαμέσου της μελέτης δύο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο, με την κινάση των πρωτεϊνών SR, SRPK1 (**B1**) και την πρωτεΐνη ERH (**B2**).

A) Εξετάστηκε η επίδραση δυο στρεσογόνων μεταβολικών συνθηκών, οι οποίες απαντώνται σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις και είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την οργάνωση της χρωματίνης, την έκφραση και την μεταγραφή πολλών γονιδίων. Η πρώτη συνθήκη που εφαρμόστηκε ήταν η επίδραση της υποξίας, υπό την οποία βρέθηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα των SAFB1/2, τα οποία αντιπροσωπεύουν το κλάσμα που βρίσκεται διαλυτό στο πυρηνόπλασμα αυξάνονται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (λιγότερο από 15 λεπτά). Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να οφείλεται στην μετατόπισή τους στο πυρηνόπλασμα από το κλάσμα που βρίσκεται προσδεδεμένο στην πυρηνική μήτρα. Η διαδικασία αυτή βρέθηκε ότι είναι

ανεξάρτητη των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και HIF-2α, οι οποίοι είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία, αποτέλεσμα αναμενόμενο, λόγω της άμεσα παρατηρούμενης απόκρισης η οποία θα ήταν δύσκολο να συμβαίνει τόσο σύντομα σε μεταγραφικό επίπεδο. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι πιθανόν κατά την υποξία το κύτταρο ενεργοποιεί κάποιον μηχανισμό δράσης ανεξάρτητο των HIFs, τουλάχιστον άμεσα, ο οποίος σχετίζεται με την ικανότητα των SAFB1/2 να προσδένονται στην χρωματίνη. Πιο συγκεκριμένα είναι φανερό η ύπαρξη δύο πληθυσμών των SAFB1/2. Ο πρώτος είναι αυτός που προσδένεται στην πυρηνική μήτρα και ο δεύτερος είναι αυτός που βρίσκεται στο πυρηνόπλασμα των κυττάρων. Η αλλαγή των ποσοστών μεταξύ αυτών των δύο πληθυσμών φαίνεται να βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία και να αλλάζει σύμφωνα με τις απαιτήσεις του κυττάρου στα ερεθίσματα που δέχεται. Η υποξία φαίνεται να μεταβάλλει αυτή την ισορροπία αυξάνοντας τα ποσοστά του πληθυσμού που βρίσκονται στο πυρηνόπλασμα. Οι παράγοντες SAFB είναι πιθανόν σε χαμηλές συνθήκες οξυγόνου να μην μπορούν να προσδεθούν ή να προσδένονται πιο χαλαρά στα στοιχεία S/MAR και κατ' επέκταση στην πυρηνική μήτρα και να βρίσκονται στο πυρηνόπλασμα σε μεγαλύτερο ποσοστό, συμμετέχοντας στο σχηματισμό συμπλόκων ή στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών ως απόκριση του κυττάρου στην υποξία. Δεν είναι γνωστό ποιο είναι το φαινόμενο που συμβαίνει κατά την υποξία και προκαλεί την μετατόπιση των SAFB από την πυρηνική μήτρα στο πυρηνόπλασμα σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα. Ένα τέτοιο φαινόμενο θα μπορούσε να είναι η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι γνωστό ότι παράγονται κατά την υποξία και επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μακρομορίων [177]. Επίσης είναι γνωστό ότι υπάρχουν ένζυμα τα οποία επηρεάζονται από την υποξία και τροποποιούν τη χρωματίνη (απομεθυλάσες Jumonji). Τέτοιες τροποποιήσεις είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης και συνεπώς την πρόσδεση πρωτεϊνών σε αυτήν. Είναι δυνατόν επίσης η υποξία να δημιουργεί βλάβες στο DNA κατά την διάρκεια της αντιγραφής [178] επάγοντας έτσι μηχανισμούς επιδιόρθωσης, στους οποίους έχει βρεθεί ότι συμμετέχει ο SAFB1 (και πιθανόν και ο SAFB2) με ταχύτατες αλλαγές του εντοπισμού του στα σημεία αυτά [54]. Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε ότι η επίδραση της υποξίας δεν προκάλεσε αλλαγή στην δράση των SAFB1/2, ως συνγκαταστολέων του ERα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η αλληλεπίδραση SAFB-ERα συμβαίνει στην πυρηνική μήτρα. Την υπόθεση αυτή ενισχύουν δεδομένα στα οποία έχει δειχθεί ότι η

καταστολή του υποδοχέα των οιστρογόνων ERα από τον SAFB1 και τον SAFB2 είναι αποτέλεσμα της μειωμένης ενδοπυρηνικής κινητικότητας του, λόγω της έμμεσης πρόσδεσης του στην πυρηνική μήτρα [72]. Επίσης, ο SAFB1 καταστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα p53 όταν αυτός μετατοπίζεται στην πυρηνική μήτρα παρουσία 5-φθοροουρακίλης (5-FU) [74].

Η δεύτερη συνθήκη μεταβολικού στρες που δοκιμάστηκε ήταν η στέρηση γλυκόζης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο υποκυτταρικός εντοπισμός των SAFB1/2 δεν μεταβλήθηκε αλλά τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα μειώθηκαν. Η συγκεκριμένη μεταβολή δεν είναι γνωστό αν συμβαίνει στο επίπεδο της μεταγραφής ή αν οφείλεται σε μηχανισμό αντίστοιχο της υποξίας. Ενδιαφέρον όμως θα παρουσίαζε η περαιτέρω διερεύνηση της συγκεκριμένης συνθήκης ή ακόμη και ο συνδυασμός της με την επίδραση της υποξίας, προσομοιάζοντας έτσι το μικροπεριβάλλον της ισχαιμίας.

B1) Διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των SAFB με την κινάση SRPK1, η οποία από προηγούμενα αποτελέσματα είχε βρεθεί ότι συμβαίνει με τα 205 καρβοξυαμινοξικά κατάλοιπα του SAFB1 και ότι προκαλεί την καταστολή της ενζυμικής δράσης της κινάσης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε δομική μελέτη της αλληλεπίδρασης και στη συνέχεια προσεγγίστηκε ο λειτουργικός της ρόλος [63].

Στόχο της δομικής μελέτης αποτέλεσε η εύρεση του τμήματος της SRPK1 που ενέχεται στην αλληλεπίδραση με τον SAFB. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι το υπεύθυνο τμήμα αλληλεπίδρασης της SRPK1 είναι το καρβοξυτελικό της άκρο και πιο συγκεκριμένα τα 182 καρβοξυτελικά αμινοξικά κατάλοιπά της (Εικόνα 49).

Ήδη ήταν γνωστό ότι ο SAFB1 δεν αποτελεί φυσικό υπόστρωμα της SRPK1 καθώς δεν περιέχει διπεπτίδια RS. Περιέχει όμως στο καρβοξυτελικό του άκρο την περιοχή πλούσια σε RE περιοχή η οποία προσομοιάζει τη φωσφορυλιωμένη περιοχή RS. Παράλληλα ήταν γνωστό ότι η SRPK1 από την οποία απουσιάζει η ενδιάμεση περιοχή είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με τον SAFB1 και ως εκ τούτου να απενεργοποιηθεί. Η υπόθεση ήταν ότι η SRPK1 χρειάζεται και τις δύο καταλυτικές περιοχές της για να αλληλεπιδράσει με τον SAFB1, καθώς δεν θα μπορούσε να σχηματίσει την δίλοβη ενεργή διαμόρφωσή της μόνο με το αμινοτελικό άκρο της, ή μόνο με το καρβοξυτελικό της άκρο. Για τους παραπάνω λόγους, το εύρημα το οποίο δείχνει ότι η SRPK1 αλληλεπιδρά με τον SAFB1 μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου αποτελεί ένα πρωτότυπο αποτέλεσμα που ως πιθανή εξήγηση έχει ότι ο

SAFB1 δεν αλληλεπιδρά με την SRPK1 ως υπόστρωμα. Θα μπορούσε όμως να προσεγγιστεί και με άλλους τρόπους:

α) Το τμήμα αυτό, περιέχει διάσπαρτες αλληλουχίες RE, δηλαδή διπεπτίδια που λόγω του αρνητικού φορτίου του γλουταμινικού οξέος προσομοιάζουν χημικά με τα φωσφορυλιωμένα διπεπτίδια RS. Γι' αυτό το λόγο είναι πιθανόν ο SAFB1 να προσδένεται στην αύλακα αγκυροβόλησης ως υπόστρωμα και τα γλουταμινικά των διπεπτιδίων RE να δεσμεύονται στη θέση P-2 του ενεργού κέντρου της κινάσης, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο την πρόσδεση των φυσικών υποστρωμάτων της [105].

β) Υπάρχει η πιθανότητα να δεσμεύεται σε άλλη περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της SRPK1 και να αλλάζει την στερεοδιαμόρφωσή της καθιστώντας την μη ενεργή, καθώς από βιβλιογραφικά δεδομένα έχει προταθεί ότι το δίκτυο των επαφών μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της είναι αυτό που συμβάλλει στην ενεργή διαμόρφωση της κινάσης [101].

γ) Υπάρχει το ενδεχόμενο τα 205 καρβοξυτελικά κατάλοιπα του SAFB1 να προσομοιάζουν είτε σε δομή είτε σε φορτίο το αμινοτελικό τμήμα της SRPK1, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο τον σχηματισμό της δίλοβης διαμόρφωσης.

Για τη διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου της αλληλεπίδρασης SAFB-SRPK1 δοκιμάστηκαν τέσσερις στρεσογόνες συνθήκες, οι οποίες θα μπορούσαν να μετατοπίσουν την SRPK1 στον πυρήνα με σκοπό την εύρεση κοινού υποκυτταρικού εντοπισμού με τους SAFB1 και SAFB2. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν η υποξία, το οσμωτικό στρες, η στέρηση αμινοξέων και η στέρηση γλυκόζης. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1 δεν μεταβλήθηκαν σε καμία από τις τέσσερις συνθήκες. Η υποξία και η στέρηση των αμινοξέων δεν μετέβαλαν ούτε τον κυτταρικό εντοπισμό της. Το οσμωτικό στρες και η στέρηση γλυκόζης όμως προκάλεσαν την μετατόπιση της SRPK1 με διαφορετικό τρόπο η κάθε μια συνθήκη. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση της στέρησης γλυκόζης προκάλεσε την καλύτερα παρατηρούμενη μεταβολή. Για το μικρό χρονικό διάστημα των δύο ωρών υπό την επίδραση της στέρησης γλυκόζης από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας παρατηρήθηκε η συγκρότηση της SRPK1 σε μεγάλες κυκλικές δομές, οι οποίες εντοπίζονται γύρω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη ενώ για μεγάλο χρονικό διάστημα από 12 έως 24 ώρες παρατηρήθηκε η μετατόπισή της SRPK1 στον πυρήνα, αποκλειόμενη από τους πυρηνίσκους, προσομοιάζοντας την χρώση των πυρήνων με DAPI. Η συνθήκη της στέρησης γλυκόζης έχει αρκετό ενδιαφέρον καθώς η SRPK1

έχει βρεθεί να φωσφορυλιώνει την PGC-1a, μια πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει διάφορα βασικά μεταβολικά μονοπάτια [99, 179]. Επίσης η στέρηση της γλυκόζης είναι μια συνθήκη, η οποία μετατοπίζει την SRPK1 στον πυρήνα, όπου βρίσκεται ο SAFB1 και ο SAFB2 των οποίων υπενθυμίζεται ότι τα επίπεδα μειώνονται κάτω από αυτή τη συνθήκη. Είναι πιθανόν ότι τα δύο φαινόμενα συνδυάζονται, έτσι ώστε τα μόρια της SRPK1 που μετατοπίζονται στον πυρήνα κάτω από το συγκεκριμένο μεταβολικό στρες (έλλειψη πηγής άνθρακα) να είναι όσο το δυνατόν πιο ενεργά. Σ' αυτές τις συνθήκες στον πυρήνα του κυττάρου τα επίπεδα των SAFB1/2 που θα δεσμεύσουν/απενεργοποιήσουν την SRPK1 είναι χαμηλά.

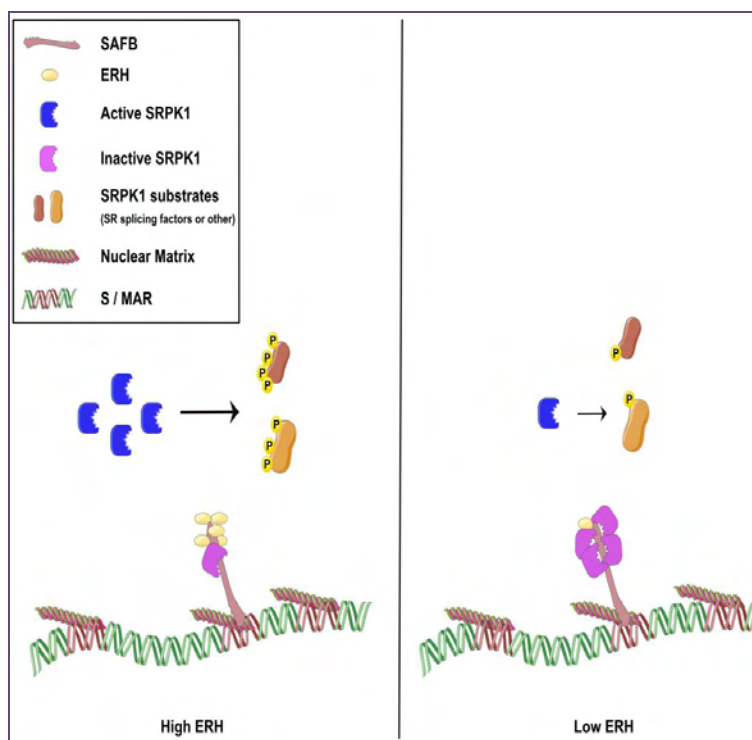
B2) Εξετάστηκε εξ αρχής η νέα αλληλεπίδραση των SAFB1/2 με την πρωτεΐνη ERH (Δ.3). Αρχικά, βρέθηκε ότι η ERH αλληλεπιδρά άμεσα σε κύτταρα θηλαστικών (MCF-7, HeLa) μέσω των 205 καρβοξυτελικών καταλοίπων των SAFB. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μικροσκοπίας (ImageJ) ότι ο συνεντοπισμός των δύο μορίων δεν είναι τυχαίος αλλά υπολογίζεται στο 50-70% του συνολικού ποσοστού των πρωτεϊνών τους. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση φαίνεται ότι λαμβάνει χώρα στην πυρηνική μήτρα. Τέλος, η ERH δεν μετέβαλε την κατασταλτική δράση των SAFB1 και SAFB2 στην μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα των οιστρογόνων ERα, αλλά φάνηκε να αναιρεί την καταστολή που προκαλούν στην ενζυμική δράση της SRPK1.

Η ERH είναι μια πρωτεΐνη πολύ μικρού μεγέθους, μόλις 12kDa, επομένως έχει την ικανότητα να διαχέεται στον πυρήνα μέσω των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων, χωρίς την ανάγκη ύπαρξης σήματος πυρηνικού εντοπισμού, το οποίο δεν υπάρχει στην αλληλουχία της [167]. Για πρώτη φορά η πρωτεΐνη ERH παρατηρήθηκε να κατανέμεται στο κυτταρόπλασμα και στο αδιάλυτο πυρηνικό κλάσμα, με παντελή απουσία από το πυρηνόπλασμα. Επομένως η ύπαρξη της μόνο στο αδιάλυτο πυρηνικό κλάσμα υποδηλώνει ότι είναι προσκολλημένη στην πυρηνική μήτρα μέσω διαφόρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των οποίων και αυτή με τους SAFB. Αυτό υποδηλώνει έναν μηχανισμό συγκράτησης της ERH στην πυρηνική μήτρα. Την υπόθεση αυτή ενδυναμώνουν πολύ πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία προτείνουν ότι ο εντοπισμός της ERH στον πυρήνα διαμεσολαβείται από την δέσμευσή της σε πρωτεΐνες που διαθέτουν σήμα πυρηνικού εντοπισμού [167]. Επίσης δείχθηκε ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της οφείλεται στα 24 πρώτα αμινοξέα της αλληλουχίας της. Ενδιαφέροντα στόχο θα αποτελούσε η εύρεση του τμήματος της

ERH το οποίο αλληλεπιδρά με τους SAFB, μέσω πειραμάτων χρωματογραφίας αγγιστείας.

Είναι γνωστό ότι ο SAFB1 και ο SAFB2 καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα του ERα με το καρβοξυτελικό τους άκρο. Η ERH όμως, η οποία αλληλεπιδρά μαζί τους στην ίδια περιοχή, δεν φάνηκε να επηρεάζει αυτή την ιδιότητα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο ERα έχει δύο θέσεις πρόσδεσης με τους SAFB, μια ισχυρή, η οποία εντοπίζεται στο τμήμα 426-600 και μια κατά πολύ λιγότερο ισχυρή η οποία δεν έχει εντοπιστεί με σαφήνεια, στο καρβοξυτελικό τους τμήμα. [46].

Η ERH αλληλεπιδρά με τους SAFB επίσης στην ίδια περιοχή, με την οποία αλληλεπιδρά και η SRPK1. Εφόσον εντοπίστηκε πλέον η περιοχή αλληλεπίδρασης της SRPK1 στα 182 καρβοξυτελικά αμινοξικά κατάλοιπα της, η σύγκριση με τα 104 αμινοξέα της αλληλουχίας της ERH θα μπορούσε να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη δέσμευση των πρωτεϊνών στην RG περιοχή των SAFB. Το αποτέλεσμα της αναστολής της δράσης των SAFB στη δράση της κινάσης παρουσία της ERH, υποδηλώνει έναν ανταγωνισμό μεταξύ των πρωτεϊνών ERH και SRPK1 στην RG περιοχή, η οποία έχει χαρακτηριστεί μέσω έρευνας με διαφορετικά προγράμματα βιοπληροφορικής, όπως DisEMBL, Globplot, PONDR, PSIPRED, ως εγγενώς εύκαμπτη περιοχή. Αυτή η ιδιότητα δίνει την ικανότητα σ' αυτή την περιοχή, να αλλάζει την δομή της ανάλογα με την πρωτεΐνη που προσδένεται. Έτσι, όταν υπάρχουν χαμηλά επίπεδα ERH, η SRPK1 είναι δεσμευμένη στον SAFB και άρα ανενεργή, ενώ με την προσθήκη της ERH, η SRPK1 απελευθερώνεται από τον SAFB και ενεργοποιείται. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε μέσω πειραμάτων αποσιώπησης της πρωτεΐνης ERH και ελέγχου των επιπέδων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SR, οι οποίες αποτελούν και το κύριο υπόστρωμα της SRPK1. Η αποσιώπηση της ERH φάνηκε να μειώνει τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών SR χωρίς να μεταβάλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SRPK1 και του SAFB2. Επομένως τα μειωμένα επίπεδα της ERH πιθανότατα να αυξάνουν την σύνδεση της SRPK1 με τους SAFB1/2 καταστέλλοντάς την. Η εικόνα 72 απεικονίζει το προτεινόμενο μοντέλο της βιολογικής αλληλεπίδρασης SAFB-ERH-SRPK1.



Εικόνα 72: Προτεινόμενο μοντέλο του βιολογικού ρόλου της αλληλεπίδρασης SAFB-ERH. Οι SAFB1/2 αλληλεπιδρούν με την ERH άμεσα στην πυρηνική μήτρα. Η ERH προσδένεται στο πλούσιο σε διπεπτίδια RG καρβοξυτελικό άκρο των SAFB, όπου αποτελεί θέση πρόσδεσης και της SRPK1. Τα επίπεδα της ERH, υψηλά έναντι χαμηλών, μπορούν να επηρεάσουν την δράση της SRPK1 μέσω της αλληλεπίδρασης της με τους SAFB και να αλλάξουν τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών SR.

Περαιτέρω διερεύνηση των συνθηκών υπό τις οποίες ρυθμίζεται η δέσμευση των ERH-SRPK1 στους SAFB θα αποτελούσε χρήσιμη πηγή πληροφοριών για την εμπλοκή και των τριών μορίων στις διεργασίες του ματίσματος αλλά και της οργάνωσης της χρωματίνης, αφού και οι τρεις αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν στην πυρηνική μήτρα.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η εμπλοκή και των τριών μορίων (SAFB, ERH, SRPK1) στον καρκίνο είναι σημαντική. Για τους SAFB, είναι γνωστό ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης τους σε επιθετικούς τύπους καρκίνου του μαστού συσχετίζονται με την αρνητική πορεία ασθενών [56]. Επίσης, αρκετές μελέτες συνηγορούν στο ότι υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών SAFB και του καρκίνου του μαστού, γι' αυτό και σχεδόν σε όλη την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυρίως κύτταρα MCF-7. Για την SRPK1 από την άλλη πλευρά, έχει βρεθεί ότι η έκφρασή της είναι υψηλή σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως είναι ο καρκίνος του προστάτη, ο καρκίνος του μαστού αλλά και πολλοί άλλοι [136-138]. Επίσης αρκετές μελέτες έχουν δείξει

ότι η αναστολή της έχει αντικαρκινική δράση και ως εκ τούτου η SRPK1 έχει προταθεί ως ένας νέος υποψήφιος της στοχευμένης θεραπείας του καρκίνου. Επομένως, η διερεύνηση των μηχανισμών της αλληλεπίδρασης SAFB-ERH μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την διαλεύκανση μηχανισμών που επάγουν την ογκογένεση. Επιπλέον η δομική προσέγγιση, η οποία στοχεύει στην εύρεση του μηχανισμού δράσης της SRPK1 με τα υποστρώματά της, θα μπορούσε να συμβάλλει μακροπρόθεσμα στην εύρεση καλύτερων αναστολέων της δράσης της. Τέλος, και τα επίπεδα έκφρασης της ERH έχουν βρεθεί αυξημένα σε πολλά είδη καρκίνου, χωρίς όμως να έχει μελετηθεί ακόμα εις βάθος ο ρόλος της [168]. Επομένως η εύρεση των μηχανισμών εμπλοκής της στις διάφορες διεργασίες του κυττάρου, μέσω της αλληλεπίδρασης SAFB-ERH θα μπορούσε επίσης να αποτελεί χρήσιμο εργαλείο διερεύνησης μηχανισμών που σχετίζονται με την καρκινογένεση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Solovei I, Thanisch K, Feodorova Y. How to rule the nucleus: divide et impera. *Current opinion in cell biology*. 2016;40:47-59.
2. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(4):292-301.
3. Solovei I, Kreysing M, Lanctot C, Kosem S, Peichl L, Cremer T, et al. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell*. 2009;137(2):356-368.
4. Kumaran RI, Thakar R, Spector DL. Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell*. 2008;132(6):929-934.
5. Brown JM, Green J, das Neves RP, Wallace HA, Smith AJ, Hughes J, et al. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *The Journal of cell biology*. 2008;182(6):1083-1097.
6. Feuerborn A, Cook PR. Why the activity of a gene depends on its neighbors. *Trends in genetics : TIG*. 2015;31(9):483-490.
7. Lawrence JB, Clemson CM. Gene associations: true romance or chance meeting in a nuclear neighborhood? *The Journal of cell biology*. 2008;182(6):1035-1038.
8. Papantonis A, Cook PR. Transcription factories: genome organization and gene regulation. *Chemical reviews*. 2013;113(11):8683-8705.
9. Nickerson J. Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 3):463-474.
10. Pederson T. Half a century of "the nuclear matrix". *Molecular biology of the cell*. 2000;11(3):799-805.
11. Spector DL. Nuclear domains. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 16):2891-2893.
12. Berezney R, Basler J, Hughes BB, Kaplan SC. Isolation and characterization of the nuclear matrix from Zajdela ascites hepatoma cells. *Cancer research*. 1979;39(8):3031-3039.
13. Berezney R, Coffey DS. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochemical and biophysical research communications*. 1974;60(4):1410-1417.
14. Berezney R, Mortillaro MJ, Ma H, Wei X, Samarabandu J. The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol*. 1995;162A:1-65.
15. Nickerson JA, Krockmalnic G, Wan KM, Penman S. The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(9):4446-4450.
16. Fey EG, Wan KM, Penman S. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *The Journal of cell biology*. 1984;98(6):1973-1984.
17. Coffey DS. Nuclear matrix proteins as proteomic markers of preneoplastic and cancer lesions : commentary re: G. Brunagel et al., nuclear matrix protein alterations associated with colon cancer metastasis to the liver. *Clin. Cancer Res.*, 8: 3039-3045, 2002. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(10):3031-3033.
18. Albrethsen J, Knol JC, Jimenez CR. Unravelling the nuclear matrix proteome. *Journal of proteomics*. 2009;72(1):71-81.

19. Leman ES, Getzenberg RH. Nuclear structure as a source of cancer specific biomarkers. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;104(6):1988-1993.
20. Sjakste N, Sjakste T, Vikmanis U. Role of the nuclear matrix proteins in malignant transformation and cancer diagnosis. *Experimental oncology*. 2004;26(3):170-178.
21. Han HJ, Russo J, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature*. 2008;452(7184):187-193.
22. Rynearson AL, Sussman CR. Nuclear structure, organization, and oncogenesis. *Journal of gastrointestinal cancer*. 2011;42(2):112-117.
23. Laemmli UK, Kas E, Poljak L, Adachi Y. Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev*. 1992;2(2):275-285.
24. Boulikas T. Homeodomain protein binding sites, inverted repeats, and nuclear matrix attachment regions along the human beta-globin gene complex. *Journal of cellular biochemistry*. 1993;52(1):23-36.
25. Platts AE, Quayle AK, Krawetz SA. In-silico prediction and observations of nuclear matrix attachment. *Cell Mol Biol Lett*. 2006;11(2):191-213.
26. van Drunen CM, Sewalt RG, Oosterling RW, Weisbeek PJ, Smeekens SC, van Driel R. A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucleic acids research*. 1999;27(14):2924-2930.
27. Gerasimova TI, Corces VG. Boundary and insulator elements in chromosomes. *Curr Opin Genet Dev*. 1996;6(2):185-192.
28. Ma H, Siegel AJ, Berezney R. Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *The Journal of cell biology*. 1999;146(3):531-542.
29. Galande S, Purbey PK, Notani D, Kumar PP. The third dimension of gene regulation: organization of dynamic chromatin loopscape by SATB1. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(5):408-414.
30. Martens JH, Verlaan M, Kalkhoven E, Dorsman JC, Zantema A. Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(8):2598-2606.
31. Nayler O, Stratling W, Bourquin JP, Stagljar I, Lindemann L, Jasper H, et al. SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic acids research*. 1998;26(15):3542-3549.
32. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
33. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(11):838-849.
34. S. P, J. D. Histone modifications under environmental stress. *Biol Lett (Warsaw)*. 2007;44(2):65-73.
35. Renz A, Fackelmayer FO. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic acids research*. 1996;24(5):843-849.
36. Oesterreich S, Lee AV, Sullivan TM, Samuel SK, Davie JR, Fuqua SA. Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 1997;67(2):275-286.

37. Weighardt F, Cobianchi F, Cartegni L, Chiodi I, Villa A, Riva S, et al. A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 10):1465-1476.
38. Chan CW, Lee YB, Uney J, Flynn A, Tobias JH, Norman M. A novel member of the SAF (scaffold attachment factor)-box protein family inhibits gene expression and induces apoptosis. *The Biochemical journal.* 2007;407(3):355-362.
39. Townson SM, Dobrzycka KM, Lee AV, Air M, Deng W, Kang K, et al. SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278(22):20059-20068.
40. Garee JP, Oesterreich S. SAFB1's multiple functions in biological control-lots still to be done! *Journal of cellular biochemistry.* 2010;109(2):312-319.
41. Oesterreich S. Scaffold attachment factors SAFB1 and SAFB2: Innocent bystanders or critical players in breast tumorigenesis? *Journal of cellular biochemistry.* 2003;90(4):653-661.
42. Kipp M, Gohring F, Ostendorp T, van Drunen CM, van Driel R, Przybylski M, et al. SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Molecular and cellular biology.* 2000;20(20):7480-7489.
43. Aravind L, Koonin EV. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(3):112-114.
44. Helbig R, Fackelmayer FO. Scaffold attachment factor A (SAF-A) is concentrated in inactive X chromosome territories through its RGG domain. *Chromosoma.* 2003;112(4):173-182.
45. Kiledjian M, Dreyfuss G. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *The EMBO journal.* 1992;11(7):2655-2664.
46. Townson SM, Kang K, Lee AV, Oesterreich S. Structure-function analysis of the estrogen receptor alpha corepressor scaffold attachment factor-B1: identification of a potent transcriptional repression domain. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(25):26074-26081.
47. Duan G, Walther D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS Comput Biol.* 2015;11(2):e1004049.
48. Mukhopadhyay NK, Kim J, You S, Morello M, Hager MH, Huang WC, et al. Scaffold attachment factor B1 regulates the androgen receptor in concert with the growth inhibitory kinase MST1 and the methyltransferase EZH2. *Oncogene.* 2014;33(25):3235-3245.
49. Garee JP, Meyer R, Oesterreich S. Co-repressor activity of scaffold attachment factor B1 requires sumoylation. *Biochemical and biophysical research communications.* 2011;408(4):516-522.
50. Liu HW, Banerjee T, Guan X, Freitas MA, Parvin JD. The chromatin scaffold protein SAFB1 localizes SUMO-1 to the promoters of ribosomal protein genes to facilitate transcription initiation and splicing. *Nucleic acids research.* 2015;43(7):3605-3613.
51. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004;95(11):866-871.
52. Song M, Hakala K, Weintraub ST, Shiio Y. Quantitative proteomic identification of the BRCA1 ubiquitination substrates. *Journal of proteome research.* 2011;10(11):5191-5198.

53. Jungmichel S, Rosenthal F, Altmeyer M, Lukas J, Hottiger MO, Nielsen ML. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Molecular cell*. 2013;52(2):272-285.
54. Altmeyer M, Toledo L, Gudjonsson T, Grofte M, Rask MB, Lukas C, et al. The chromatin scaffold protein SAFB1 renders chromatin permissive for DNA damage signaling. *Molecular cell*. 2013;52(2):206-220.
55. Gluch A, Vidakovic M, Bode J. Scaffold/matrix attachment regions (S/MARs): relevance for disease and therapy. *Handbook of experimental pharmacology*. 2008(186):67-103.
56. Hammerich-Hille S, Kaiparettu BA, Tsimelzon A, Creighton CJ, Jiang S, Polo JM, et al. SAFB1 mediates repression of immune regulators and apoptotic genes in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(6):3608-3616.
57. Tai HH, Geisterfer M, Bell JC, Moniwa M, Davie JR, Boucher L, et al. CHD1 associates with NCoR and histone deacetylase as well as with RNA splicing proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;308(1):170-176.
58. Hernandez-Hernandez JM, Mallappa C, Nasipak BT, Oesterreich S, Imbalzano AN. The Scaffold attachment factor b1 (Safb1) regulates myogenic differentiation by facilitating the transition of myogenic gene chromatin from a repressed to an activated state. *Nucleic acids research*. 2013;41(11):5704-5716.
59. Arao Y, Kuriyama R, Kayama F, Kato S. A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;380(2):228-236.
60. Li J, Hawkins IC, Harvey CD, Jennings JL, Link AJ, Patton JG. Regulation of Alternative Splicing by SRp86 and Its Interacting Proteins. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(21):7437-7447.
61. Sergeant KA, Bourgeois CF, Dalgliesh C, Venables JP, Stevenin J, Elliott DJ. Alternative RNA splicing complexes containing the scaffold attachment factor SAFB2. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 2):309-319.
62. Nikolakaki E, Kohen R, Hartmann AM, Stamm S, Georgatsou E, Giannakouros T. Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(43):40175-40182.
63. Tsianou D, Nikolakaki E, Tzitzira A, Bonanou S, Giannakouros T, Georgatsou E. The enzymatic activity of SR protein kinases 1 and 1a is negatively affected by interaction with scaffold attachment factors B1 and 2. *The FEBS journal*. 2009;276(18):5212-5227.
64. Hong E, Best A, Gautrey H, Chin J, Razdan A, Curk T, et al. Unravelling the RNA-Binding Properties of SAFB Proteins in Breast Cancer Cells. *BioMed research international*. 2015;2015:395816.
65. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*. 2006;15 Spec No 1:R17-29.
66. Norman M, Rivers C, Lee YB, Idris J, Uney J. The increasing diversity of functions attributed to the SAFB family of RNA-/DNA-binding proteins. *The Biochemical journal*. 2016;473(23):4271-4288.
67. Rivers C, Idris J, Scott H, Rogers M, Lee YB, Gaunt J, et al. iCLIP identifies novel roles for SAFB1 in regulating RNA processing and neuronal function. *BMC biology*. 2015;13:111.
68. Hong EA, Gautrey HL, Elliott DJ, Tyson-Capper AJ. SAFB1- and SAFB2-mediated transcriptional repression: relevance to cancer. *Biochemical Society transactions*. 2012;40(4):826-830.

69. Oesterreich S, Zhang Q, Hopp T, Fuqua SA, Michaelis M, Zhao HH, et al. Tamoxifen-bound estrogen receptor (ER) strongly interacts with the nuclear matrix protein HET/SAF-B, a novel inhibitor of ER-mediated transactivation. *Mol Endocrinol*. 2000;14(3):369-381.
70. Oesterreich S, Zhang QP, Lee AV. Inhibition of oestrogen receptor activity by the co-repressor HET/SAF-B is relieved by blockade of histone deacetylase activity. *Eur J Cancer*. 2000;36 Suppl 4:S43-44.
71. Jiang S, Meyer R, Kang K, Osborne CK, Wong J, Oesterreich S. Scaffold attachment factor SAFB1 suppresses estrogen receptor alpha-mediated transcription in part via interaction with nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol*. 2006;20(2):311-320.
72. Hashimoto T, Matsuda K, Kawata M. Scaffold attachment factor B (SAFB)1 and SAFB2 cooperatively inhibit the intranuclear mobility and function of ERalpha. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(9):3039-3050.
73. Debril MB, Dubuquoy L, Feige JN, Wahli W, Desvergne B, Auwerx J, et al. Scaffold attachment factor B1 directly interacts with nuclear receptors in living cells and represses transcriptional activity. *Journal of molecular endocrinology*. 2005;35(3):503-517.
74. Peidis P, Voukkalis N, Aggelidou E, Georgatsou E, Hadzopoulou-Cladaras M, Scott RE, et al. SAFB1 interacts with and suppresses the transcriptional activity of p53. *FEBS letters*. 2011;585(1):78-84.
75. Lin J, Xu P, LaVallee P, Hoidal JR. Identification of proteins binding to E-Box/Ku86 sites and function of the tumor suppressor SAFB1 in transcriptional regulation of the human xanthine oxidoreductase gene. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(44):29681-29689.
76. Omura Y, Nishio Y, Takemoto T, Ikeuchi C, Sekine O, Morino K, et al. SAFB1, an RBMX-binding protein, is a newly identified regulator of hepatic SREBP-1c gene. *BMB reports*. 2009;42(4):232-237.
77. Alfonso-Parra C, Maggert KA. Drosophila SAF-B links the nuclear matrix, chromosomes, and transcriptional activity. *PloS one*. 2010;5(4):e10248.
78. Jiang S, Katz TA, Garee JP, DeMayo FJ, Lee AV, Oesterreich S. Scaffold attachment factor B2 (SAFB2)-null mice reveal non-redundant functions of SAFB2 compared with its paralog, SAFB1. *Disease models & mechanisms*. 2015;8(9):1121-1127.
79. Ivanova M, Dobrzycka KM, Jiang S, Michaelis K, Meyer R, Kang K, et al. Scaffold attachment factor B1 functions in development, growth, and reproduction. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(8):2995-3006.
80. Lee YB, Colley S, Norman M, Biamonti G, Uney JB. SAFB re-distribution marks steps of the apoptotic process. *Experimental cell research*. 2007;313(18):3914-3923.
81. Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(3):1392-1407.
82. Chen T, Boisvert FM, Bazett-Jones DP, Richard S. A role for the GSG domain in localizing Sam68 to novel nuclear structures in cancer cell lines. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(9):3015-3033.
83. Chiodi I, Biggiogera M, Denegri M, Corioni M, Weighardt F, Cobianchi F, et al. Structure and dynamics of hnRNP-labelled nuclear bodies induced by stress treatments. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 22):4043-4053.

84. Denegri M, Chiodi I, Corioni M, Cobianchi F, Riva S, Biamonti G. Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(11):3502-3514.
85. Townson SM, Sullivan T, Zhang Q, Clark GM, Osborne CK, Lee AV, et al. HET/SAF-B overexpression causes growth arrest and multinuclearity and is associated with aneuploidy in human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(9):3788-3796.
86. Hammerich-Hille S, Bardout VJ, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Oesterreich S. Low SAFB levels are associated with worse outcome in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2010;121(2):503-509.
87. Dobrzycka KM, Kang K, Jiang S, Meyer R, Rao PH, Lee AV, et al. Disruption of scaffold attachment factor B1 leads to TBX2 up-regulation, lack of p19ARF induction, lack of senescence, and cell immortalization. *Cancer research*. 2006;66(16):7859-7863.
88. Oesterreich S, Allredl DC, Mohsin SK, Zhang Q, Wong H, Lee AV, et al. High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2001;84(4):493-498.
89. Miller BJ, Wang D, Krahe R, Wright FA. Pooled analysis of loss of heterozygosity in breast cancer: a genome scan provides comparative evidence for multiple tumor suppressors and identifies novel candidate regions. *Am J Hum Genet*. 2003;73(4):748-767.
90. Bergman A, Abel F, Behboudi A, Yhr M, Mattsson J, Svensson JH, et al. No germline mutations in supposed tumour suppressor genes SAFB1 and SAFB2 in familial breast cancer with linkage to 19p. *BMC medical genetics*. 2008;9:108.
91. Sobottka SB, Haase M, Fitze G, Hahn M, Schackert HK, Schackert G. Frequent loss of heterozygosity at the 19p13.3 locus without LKB1/STK11 mutations in human carcinoma metastases to the brain. *Journal of neuro-oncology*. 2000;49(3):187-195.
92. Gui JF, Lane WS, Fu XD. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*. 1994;369(6482):678-682.
93. Gui JF, Tronchere H, Chandler SD, Fu XD. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(23):10824-10828.
94. Wang HY, Arden KC, Birmingham JR, Jr., Viars CS, Lin W, Boyer AD, et al. Localization of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes. *Genomics*. 1999;57(2):310-315.
95. Papoutsopoulou S, Nikolakaki E, Chalepakis G, Krufft V, Chevaillier P, Giannakouros T. SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic acids research*. 1999;27(14):2972-2980.
96. Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, et al. SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 1998;140(4):737-750.
97. Jang SW, Yang SJ, Ehlen A, Dong S, Khoury H, Chen J, et al. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. *Cancer research*. 2008;68(12):4559-4570.

98. Nakagawa O, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, et al. Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes & development*. 2005;19(17):2066-2077.
99. Giannakouros T, Nikolakaki E, Mylonis I, Georgatsou E. Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. *The FEBS journal*. 2011;278(4):570-586.
100. Papoutsopoulou S, Nikolakaki E, Giannakouros T. SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;255(3):602-607.
101. Ngo JC, Gullingsrud J, Giang K, Yeh MJ, Fu XD, Adams JA, et al. SR protein kinase 1 is resilient to inactivation. *Structure*. 2007;15(1):123-133.
102. Ngo JC, Chakrabarti S, Ding JH, Velazquez-Dones A, Nolen B, Aubol BE, et al. Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Molecular cell*. 2005;20(1):77-89.
103. Ghosh G, Adams JA. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *The FEBS journal*. 2011;278(4):587-597.
104. Aubol BE, Chakrabarti S, Ngo J, Shaffer J, Nolen B, Fu XD, et al. Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(22):12601-12606.
105. Nolen B, Yun CY, Wong CF, McCammon JA, Fu XD, Ghosh G. The structure of Sky1p reveals a novel mechanism for constitutive activity. *Nat Struct Biol*. 2001;8(2):176-183.
106. Serrano P, Aubol BE, Keshwani MM, Forli S, Ma CT, Dutta SK, et al. Directional Phosphorylation and Nuclear Transport of the Splicing Factor SRSF1 Is Regulated by an RNA Recognition Motif. *J Mol Biol*. 2016;428(11):2430-2445.
107. Graveley BR. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*. 2000;6(9):1197-1211.
108. Aubol BE, Wu G, Keshwani MM, Movassat M, Fattet L, Hertel KJ, et al. Release of SR Proteins from CLK1 by SRPK1: A Symbiotic Kinase System for Phosphorylation Control of Pre-mRNA Splicing. *Molecular cell*. 2016;63(2):218-228.
109. Jiang K, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, et al. Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKCbetaII messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*. 2009;150(5):2087-2097.
110. Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anderson P, Utz PJ. Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(9):1213-1225.
111. Zhong XY, Ding JH, Adams JA, Ghosh G, Fu XD. Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes & development*. 2009;23(4):482-495.
112. Solovei I, Wang AS, Thanisch K, Schmidt CS, Krebs S, Zwerger M, et al. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell*. 2013;152(3):584-598.
113. Hirano Y, Hizume K, Kimura H, Takeyasu K, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(51):42654-42663.

114. Liokatis S, Edlich C, Soupsana K, Giannios I, Panagiotidou P, Tripsianes K, et al. Solution structure and molecular interactions of lamin B receptor Tudor domain. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(2):1032-1042.
115. Ye Q, Callebaut I, Pezhman A, Courvalin JC, Worman HJ. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(23):14983-14989.
116. Ma Y, Cai S, Lv Q, Jiang Q, Zhang Q, Sodmergen, et al. Lamin B receptor plays a role in stimulating nuclear envelope production and targeting membrane vesicles to chromatin during nuclear envelope assembly through direct interaction with importin beta. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 3):520-530.
117. Sellis D, Drosou V, Vlachakis D, Voukkalis N, Giannakouros T, Vlassi M. Phosphorylation of the arginine/serine repeats of lamin B receptor by SRPK1-insights from molecular dynamics simulations. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1820(1):44-55.
118. Ye Q, Worman HJ. Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(15):11306-11311.
119. Duband-Goulet I, Courvalin JC. Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochemistry*. 2000;39(21):6483-6488.
120. Makatsori D, Kourmouli N, Polioudaki H, Shultz LD, McLean K, Theodoropoulos PA, et al. The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(24):25567-25573.
121. Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, et al. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO reports*. 2001;2(10):920-925.
122. Takano M, Takeuchi M, Ito H, Furukawa K, Sugimoto K, Omata S, et al. The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region. *Eur J Biochem*. 2002;269(3):943-953.
123. Ye Q, Worman HJ. Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(25):14653-14656.
124. Lu X, Shi Y, Lu Q, Ma Y, Luo J, Wang Q, et al. Requirement for lamin B receptor and its regulation by importin {beta} and phosphorylation in nuclear envelope assembly during mitotic exit. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(43):33281-33293.
125. Nikolakaki E, Meier J, Simos G, Georgatos SD, Giannakouros T. Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34(cdc2). *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(10):6208-6213.
126. Simos G, Georgatos SD. The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *The EMBO journal*. 1992;11(11):4027-4036.
127. Takano M, Koyama Y, Ito H, Hoshino S, Onogi H, Hagiwara M, et al. Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(13):13265-13271.
128. Nikolakaki E, Simos G, Georgatos SD, Giannakouros T. A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions

between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(14):8365-8372.

129. Mimura Y, Takagi M, Clever M, Imamoto N. ELYS regulates the localization of LBR by modulating its phosphorylation state. *J Cell Sci*. 2016;129(22):4200-4212.

130. Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1991;40:25-94.

131. Mylonis I, Drosou V, Brancorsini S, Nikolakaki E, Sassone-Corsi P, Giannakouros T. Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(12):11626-11631.

132. Ding JH, Zhong XY, Hagopian JC, Cruz MM, Ghosh G, Feramisco J, et al. Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*. 2006;17(2):876-885.

133. Zhou Z, Qiu J, Liu W, Zhou Y, Plocinik RM, Li H, et al. The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Molecular cell*. 2012;47(3):422-433.

134. Koutroumani M, Papadopoulos GE, Vlassi M, Nikolakaki E, Giannakouros T. Evidence for disulfide bonds in SR Protein Kinase 1 (SRPK1) that are required for activity and nuclear localization. *PloS one*. 2017;12(2):e0171328.

135. Mylonis I, Giannakouros T. Protein kinase CK2 phosphorylates and activates the SR protein-specific kinase 1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;301(3):650-656.

136. Hayes GM, Carrigan PE, Miller LJ. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer research*. 2007;67(5):2072-2080.

137. Mavrou A, Brakspear K, Hamdollah-Zadeh M, Damodaran G, Babaei-Jadidi R, Oxley J, et al. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) inhibition as a potential novel targeted therapeutic strategy in prostate cancer. *Oncogene*. 2015;34(33):4311-4319.

138. Odunsi K, Mhaweche-Fauceglia P, Andrews C, Beck A, Amuwo O, Lele S, et al. Elevated expression of the serine-arginine protein kinase 1 gene in ovarian cancer and its role in Cisplatin cytotoxicity in vitro. *PloS one*. 2012;7(12):e51030.

139. Bullock N, Oltean S. The many faces of SRPK1. *The Journal of pathology*. 2016.

140. Batson J, Toop HD, Redondo C, Babaebi-Jadidi R, Chaikuad A, Wearmouth SF, et al. Development of Potent, Selective SRPK1 Inhibitors as Potential Topical Therapeutics for Neovascular Eye Disease. *ACS chemical biology*. 2017.

141. Lin JC, Lin CY, Tarn WY, Li FY. Elevated SRPK1 lessens apoptosis in breast cancer cells through RBM4-regulated splicing events. *RNA*. 2014;20(10):1621-1631.

142. van Roosmalen W, Le Devedec SE, Golani O, Smid M, Pulyakhina I, Timmermans AM, et al. Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(4):1648-1664.

143. Wojcik E, Murphy AM, Fares H, Dang-Vu K, Tsubota SI. Enhancer of rudimentaryp1, e(r)p1, a highly conserved enhancer of the rudimentary gene. *Genetics*. 1994;138(4):1163-1170.

144. Krzyzanowski MK, Kozłowska E, Kozłowski P. Identification and functional analysis of the erh1(+) gene encoding enhancer of rudimentary homolog from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PloS one*. 2012;7(11):e49059.

145. Arai R, Kukimoto-Niino M, Uda-Tochio H, Morita S, Uchikubo-Kamo T, Akasaka R, et al. Crystal structure of an enhancer of rudimentary homolog (ERH) at 2.1 Angstroms resolution. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2005;14(7):1888-1893.
146. Gelsthorpe M, Pulumati M, McCallum C, Dang-Vu K, Tsubota SI. The putative cell cycle gene, enhancer of rudimentary, encodes a highly conserved protein found in plants and animals. *Gene*. 1997;186(2):189-195.
147. Isomura M, Okui K, Fujiwara T, Shin S, Nakamura Y. Cloning and mapping of a novel human cDNA homologous to DROER, the enhancer of the *Drosophila melanogaster* rudimentary gene. *Genomics*. 1996;32(1):125-127.
148. Pogge von Strandmann E, Senkel S, Ryffel GU. ERH (enhancer of rudimentary homologue), a conserved factor identical between frog and human, is a transcriptional repressor. *Biol Chem*. 2001;382(9):1379-1385.
149. Weng MT, Luo J. The enigmatic ERH protein: its role in cell cycle, RNA splicing and cancer. *Protein & cell*. 2013;4(11):807-812.
150. Wan C, Tempel W, Liu ZJ, Wang BC, Rose RB. Structure of the conserved transcriptional repressor enhancer of rudimentary homolog. *Biochemistry*. 2005;44(13):5017-5023.
151. Jin T, Guo F, Serebriiskii IG, Howard A, Zhang YZ. A 1.55 Å resolution X-ray crystal structure of HEF2/ERH and insights into its transcriptional and cell-cycle interaction networks. *Proteins*. 2007;68(2):427-437.
152. Li H, Inoue M, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, et al. Solution structure of the mouse enhancer of rudimentary protein reveals a novel fold. *J Biomol NMR*. 2005;32(4):329-334.
153. Gelsthorpe ME, Tan Z, Phillips A, Eissenberg JC, Miller A, Wallace J, et al. Regulation of the *Drosophila melanogaster* protein, enhancer of rudimentary, by casein kinase II. *Genetics*. 2006;174(1):265-270.
154. Amente S, Napolitano G, Licciardo P, Monti M, Pucci P, Lania L, et al. 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*. 2005;579(3):683-689.
155. Kwak YT, Guo J, Prajapati S, Park KJ, Surabhi RM, Miller B, et al. Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Molecular cell*. 2003;11(4):1055-1066.
156. Javed A, Guo B, Hiebert S, Choi JY, Green J, Zhao SC, et al. Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 12):2221-2231.
157. van de Peppel J, Kettelarij N, van Bakel H, Kockelkorn TT, van Leenen D, Holstege FC. Mediator expression profiling epistasis reveals a signal transduction pathway with antagonistic submodules and highly specific downstream targets. *Molecular cell*. 2005;19(4):511-522.
158. Lukasik A, Uniewicz KA, Kulis M, Kozłowski P. Ciz1, a p21 cip1/Waf1-interacting zinc finger protein and DNA replication factor, is a novel molecular partner for human enhancer of rudimentary homolog. *The FEBS journal*. 2008;275(2):332-340.
159. Smyk A, Szuminska M, Uniewicz KA, Graves LM, Kozłowski P. Human enhancer of rudimentary is a molecular partner of PDIP46/SKAR, a protein interacting with DNA polymerase delta and S6K1 and regulating cell growth. *The FEBS journal*. 2006;273(20):4728-4741.

160. Copeland NA, Sercombe HE, Ainscough JF, Coverley D. Ciz1 cooperates with cyclin-A-CDK2 to activate mammalian DNA replication in vitro. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 7):1108-1115.
161. Mitsui K, Matsumoto A, Ohtsuka S, Ohtsubo M, Yoshimura A. Cloning and characterization of a novel p21(Cip1/Waf1)-interacting zinc finger protein, ciz1. *Biochemical and biophysical research communications.* 1999;264(2):457-464.
162. Fujimura A, Kishimoto H, Yanagisawa J, Kimura K. Enhancer of rudimentary homolog (ERH) plays an essential role in the progression of mitosis by promoting mitotic chromosome alignment. *Biochemical and biophysical research communications.* 2012;423(3):588-592.
163. Weng MT, Lee JH, Wei SC, Li Q, Shahamatdar S, Hsu D, et al. Evolutionarily conserved protein ERH controls CENP-E mRNA splicing and is required for the survival of KRAS mutant cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(52):E3659-3667.
164. Weng MT, Tung TH, Lee JH, Wei SC, Lin HL, Huang YJ, et al. Enhancer of rudimentary homolog regulates DNA damage response in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports.* 2015;5:9357.
165. Kavanaugh G, Zhao R, Guo Y, Mohni KN, Glick G, Lacy ME, et al. Enhancer of Rudimentary Homolog Affects the Replication Stress Response through Regulation of RNA Processing. *Molecular and cellular biology.* 2015;35(17):2979-2990.
166. Banko MI, Krzyzanowski MK, Turcza P, Maniecka Z, Kulis M, Kozlowski P. Identification of amino acid residues of ERH required for its recruitment to nuclear speckles and replication foci in HeLa cells. *PLoS one.* 2013;8(8):e74885.
167. Tsubota SI, Phillips AC. Drosophila Enhancer of Rudimentary Homolog, ERH, Is a Binding Partner of RPS3, RPL19, and DDIT4, Suggesting a Mechanism for the Nuclear Localization of ERH. *Molecular biology international.* 2016;2016:8371819.
168. Zafrakas M, Losen I, Knuchel R, Dahl E. Enhancer of the rudimentary gene homologue (ERH) expression pattern in sporadic human breast cancer and normal breast tissue. *BMC Cancer.* 2008;8:145.
169. Marcotte R, Brown KR, Suarez F, Sayad A, Karamboulas K, Krzyzanowski PM, et al. Essential gene profiles in breast, pancreatic, and ovarian cancer cells. *Cancer discovery.* 2012;2(2):172-189.
170. Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol.* 1999;293(2):321-331.
171. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, et al. MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 2007;20(6):995-1006.
172. Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, et al. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 22):5224-5238.
173. Lin S, Xiao R, Sun P, Xu X, Fu XD. Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Molecular cell.* 2005;20(3):413-425.
174. Mili S, Shu HJ, Zhao Y, Pinol-Roma S. Distinct RNP complexes of shuttling hnRNP proteins with pre-mRNA and mRNA: candidate intermediates in formation and export of mRNA. *Molecular and cellular biology.* 2001;21(21):7307-7319.
175. Bolte S, Cordeliers FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy.* 2006;224(Pt 3):213-232.

176. George AL, Rajoria S, Suriano R, Mittleman A, Tiwari RK. Hypoxia and estrogen are functionally equivalent in breast cancer-endothelial cell interdependence. *Molecular cancer*. 2012;11:80.
177. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(7):1263-1268.
178. Olcina M, Lecane PS, Hammond EM. Targeting hypoxic cells through the DNA damage response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(23):5624-5629.
179. Nikolakaki E, Drosou V, Sanidas I, Peidis P, Papamarcaki T, Iakoucheva LM, et al. RNA association or phosphorylation of the RS domain prevents aggregation of RS domain-containing proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1780(2):214-225.