



**Πανεπιστήμιο
Κύπρου**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΥΠΟΥ ΚΑΤΑΝΙΝΗΣ,
ΚΑΤNAL2, ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ**

ΑΝΤΩΝΗΣ ΒΕΡΒΕΡΗΣ

**Διατριβή η οποία υποβλήθηκε προς απόκτηση διδακτορικού
τίτλου σπουδών στο Πανεπιστήμιο Κύπρου**

ΜΑΪΟΣ 2015

ΑΝΤΩΝΗΣ ΒΕΡΒΕΡΗΣ

ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ

Υποψήφιος Διδάκτορας: Αντώνης Βερβέρης

Τίτλος Διατριβής: Ταυτοποίηση και λειτουργικός χαρακτηρισμός μιας νέας πρωτεΐνης τύπου Κατανίνης, KATNAL2, σε κύτταρα ποντικού

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για απόκτηση Διδακτορικού διπλώματος στο Τμήμα Βιολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κύπρου και εγκρίθηκε στις 11/05/2015 από τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.

Εξεταστική Επιτροπή:

Ερευνητικός Σύμβουλος:

Νιόβη Σανταμά Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Επιστημών,
Πανεπιστήμιο Κύπρου

Εσωτερικά Μέλη:

Χρυσούλα Πιτσούλη Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Επιστημών,
Πανεπιστήμιο Κύπρου

Κατερίνα Στρατή Λέκτορας, Τμήμα Βιολογικών Επιστημών,
Πανεπιστήμιο Κύπρου

Εξωτερικά Μέλη:

Μαρία Κόφφα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής,
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Σταύρος Μαλάς Διευθυντής Ερευνητικού Εργαστηρίου Αναπτυξιακής και Λειτουργικής
Γενετικής, Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ

Η παρούσα διατριβή υποβάλλεται προς συμπλήρωση των απαιτήσεων για απονομή Διδακτορικού Τίτλου του Πανεπιστημίου Κύπρου. Είναι προϊόν πρωτότυπης εργασίας αποκλειστικά δικής μου, εκτός των περιπτώσεων που ρητώς αναφέρονται μέσω βιβλιογραφικών αναφορών, σημειώσεων ή και άλλων δηλώσεων.

Αντώνης Βερβέρης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Katanin αποτελεί μία φυλογενετικά ευρέως διαδεδομένη και καλά χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη που ταξινομείται στην υπεροικογένεια των AAA ATPάσεων και χαρακτηρίζεται από τη δράση της ως ένζυμο κατάτμησης των μικροσωληνίσκων, συμμετέχοντας σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες όπως η μίτωση. Παράλληλα, σε διάφορους οργανισμούς έχει εξακριβωθεί η παρουσία συγγενικών πρωτεϊνών της Katanin, τύπου Katanin-like, που η λειτουργία τους παραμένει σχετικά ανεξερεύνητη.

Στα πλαίσια της διατριβής, απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν πέντε ισομορφές τύπου *Katanin-like 2 (Katnal2)* από κυτταροσειρά ινοβλαστών ποντικού. Τα mRNAs των ισομορφών έχουν διαφορετικά μεγέθη (*Katnal2-L1*: 1617 bp, *L2*: 1611 bp, *L3*: 1518 bp, *S1*: 1215 bp, *S2*: 1116 bp), αποτελώντας προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος των εξονίων της γονιδιακής θέσης που τις κωδικοποιεί (χρωμόσωμα 18). Η ανάλυση του τοπικού και αναπτυξιακού προτύπου γονιδιακής έκφρασης κατέδειξε ότι οι *Katnal2* είναι εμπλουτισμένες σε ιστούς με έντονη μιτωτική δραστηριότητα.

Κατασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό έναντι της οικογένειας ισομορφών KATNAL2. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας επαλήθευσαν την παρουσία των πρωτεϊνών αυτών και ταυτόχρονα αποκάλυψαν πιθανές αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες, που περιλάμβαναν ριβοσωμικές πρωτεΐνες και μοριακές συνοδούς (chaperones).

Πειράματα ανοσοφθορισμού για τη μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των ισομορφών φανέρωσαν ότι στη μεσόφαση οι KATNAL2 βρίσκονται κυρίως στους μικροσωληνίσκους και στα κεντροσώματα. Κατά τα αρχικά στάδια της μίτωσης εμπλουτίζονται στα κεντροσώματα και στους πόλους της ατράκτου, στη συνέχεια επεκτείνονται στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής συσκευής, ενώ κατά την κυτοκίνηση ανιχνεύονται και στο ενδιάμεσο σώμα (midbody). Ακόμη συνεντοπίζονται με το βασικό σωματίο και το αξόνημα των μονήρων αισθητήριων βλεφαρίδων (cilia). Κλάσμα των KATNAL2 συναντάται στον πυρηνίσκο, όπου συνεντοπίζονται με την μεθυλτρανσφεράση Φιμπριλλαρίνη υπό κανονικές συνθήκες αλλά και υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής όταν οι δύο πρωτεΐνες ανακατανέμονται στους περιπυρηνισκικούς δακτυλίους γνωστούς ως LNC (Light Nucleolar Centres).

Διαμεσολαβούμενη από shRNA σταθερή αποσιώπηση των *Katnal2* είχε ως συνέπεια την επαγωγή ιδιαίτερα σοβαρών φαινοτύπων που χαρακτηρίζονταν από σημαντική μεγέθυνση των κυττάρων και των πυρήνων τους, την παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με επακόλουθο την δημιουργία ανώμαλων πολυπολικών μιτωτικών ατράκτων, την ανάδειξη ανωμαλιών κατά τη μίτωση και την κυτοκίνηση, την αυξημένη εμφάνιση γεφυρών χρωματίνης και διπύρηνων κυττάρων, τη διαφοροποίηση του φυσιολογικού προτύπου του

κυτταρικού κύκλου ειδικά στις φάσεις S και G2, και την αυξημένη παρουσία ακετυλιωμένων μακρών και σταθερών μικροσωληνίσκων. Τέλος, σε αποσιωπημένους για τις KATNAL2 πληθυσμούς, καταγράφηκε ελάττωση του ποσοστού των βλεφαριδοφόρων κυττάρων.

Παράλληλα, στο εργαστήριο μας, μέσω πειραμάτων συνεπιλογής, αποδείχθηκε ότι οι ισομορφές KATNAL2-L1 και KATNAL2-S1 αλληλεπιδρούν τόσο με τον εαυτό τους όσο και με άλλες ισομορφές. Επίσης διαφάνηκε ότι οι ισομορφές L1 και S1 αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Nubp1 και Nubp2, που αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της βλεφαριδογένεσης και συμμετέχουν στο μηχανισμό ρύθμισης διπλασιασμού των κεντροσωματίων (Christodoulou et al., 2006, Kypri et al., 2014), δίδοντας τα πρώτα στοιχεία για τους μοριακούς μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχουν οι KATNAL2, στις διαδικασίες που αναδείχτηκαν από τα πειράματα αποσιώπησης.

Συμπερασματικά, οι KATNAL2 αποτελούν πολυλειτουργικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε διεργασίες που επηρεάζουν τη δυναμική οργάνωση των μικροσωληνίσκων, τη ρύθμιση του αριθμού των κεντριδίων, την κυτοκίνηση, τη βλεφαριδογένεση, το κυτταρικό και πυρηνικό μέγεθος και σχήμα ενώ πιθανόν να εμπλέκονται και σε διεργασίες που εδράζονται στον πυρηνίσκο.

Η διδακτορική εργασία αποτελεί μέρος κατατεθειμένου άρθρου που βρίσκεται υπό επιστημονική κρίση για δημοσίευση.

ABSTRACT

Katanin is a phylogenetically conserved and well characterized microtubule (MT)-severing AAA protein, which has been implicated in various cellular functions including mitosis. In parallel, several organisms also encode a number of closely related katanin-like proteins (KATNAL1s and KATNAL2s), whose activities remain relatively underexplored.

We have cloned and identified five novel katanin-like 2 proteins (KATNAL2) from mouse NIH3T3 fibroblast cells. The mRNAs of these isoforms have different sizes (L1: 1617 bp, L2: 1611 bp, L3: 1518 bp, S1: 1215 bp and S2: 1116 bp) and are products of differential mRNA splicing of the 16 exons constituting the *Katnal2* genomic locus on mouse chromosome 18. Analysis by RT-PCR revealed that *Katnal2* isoforms are ubiquitously expressed and under developmental regulation in specific tissues associated with elevated mitotic activity.

We generated and characterized a goat polyclonal antibody (anti-KATNAL2), specifically recognizing all five KATNAL2 isoforms and confirmed the presence of KATNAL2s in mouse tissues through immunoprecipitation experiments coupled with mass spectrometric analysis. Additionally, various putative KATNAL2-interacting partners were identified, including ribosomal and molecular chaperone proteins.

Immunofluorescence analysis using the designed antibody in various mouse cell lines, indicated that at interphase KATNAL2s are associated with MTs in a detergent-resistant manner and localized at the centrioles of centrosomes. In mitotic cells, immunoreactivity was enriched at the centre of the two MT asters at the onset of mitosis and through to prometaphase, extended to spindle MT in later mitotic stages, and concentrated on the midbody in cytokinesis. KATNAL2 isoforms were also present at the basal body and axoneme of the solitary sensory cilia formed upon cell cycle exit. Notably, a fraction of immunoreactivity was found inside nucleoli and co-localized with the methyltransferase protein Fibrillarin; upon drug-induced transcriptional inhibition Fibrillarin & KATNAL2 were still associated and co-segregated in perinucleolar caps known as Light Nucleolar Centres (LNCs).

shRNA-mediated stable silencing of *Katnal2*, induced severe cellular phenotypes consisting of significant enlargement of cellular and nuclear size, supernumerary centrioles throughout the cell cycle that led to the formation of multipolar mitotic spindles, the manifestation of mitotic and cytokinesis defects, the formation of chromatin bridges, the acquisition of binuclearity, an increased incidence of acetylation of the MT network, and an altered cell cycle pattern, especially during phases S and G2. KATNAL2 downregulation also markedly decreased the percentage of ciliated cells within the silenced population.

Pull-down co-selection assays conducted in our lab, demonstrated that KATNAL2-L1 and KATNAL2-S1 are able to interact with themselves and with other KATNAL2 isoforms.

Additionally KATNAL2s directly interact with Nubp1 or Nubp2 proteins, previously shown to be negative regulators of ciliogenesis (Kypri et al., 2014) and also involved in the regulation of centrosome duplication (Christodoulou et al., 2006).

In conclusion, the novel KATNAL2s are multifunctional proteins involved in critically important processes affecting centriole arithmetics, MT dynamics, cytokinesis, cellular and nuclear size and ciliogenesis and are also implicated in cell cycle progression.

This work is included in a submitted manuscript, currently under review.

Ευχαριστώ θερμά,

την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Δρα Νιόβη Σανταμά, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να διεξάγω τη διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριο της. Η άμεση της υποστήριξη και η συνεχής της καθοδήγηση, υπήρξαν καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή περάτωση της διατριβής,

τη μετά-διδακτορική συνεργάτιδα Δρα Άντρη Χριστοδούλου για τη βοήθεια της και την αρμονική συνεργασία που είχαμε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων,

τη μετά-διδακτορική συνεργάτιδα Δρα Έλενα Κυπρή, καθώς και τις Δρα Άννα Μαλέκκου και Δρα Δέσποινα Χαραλάμπους για τη συνεχή βοήθεια, την εκπαίδευση, τις διαρκείς συμβουλές τους, και τη στήριξη,

τον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Μαϊμάρη, όπως και τα πρώην μέλη του εργαστηρίου, μεταπτυχιακούς φοιτητές Αδάμο Αδάμου, Αρίστη Πισή, Χριστίνα Καμηλάρη, Μαρία Χριστοφόρου, και τους προπτυχιακούς φοιτητές Κατερίνα Μαρίνου, Γιώργο Μιχαήλ, για την άσπρη συνεργασία που είχαμε καθόλη τη διάρκεια συνύπαρξης μας στο εργαστήριο,

τους Δρα Carsten Lederer και Δρα Μαρία Παντελίδου, για την πολύτιμη βοήθεια τους, όποτε τους χρειάστηκα,

τον Δρα Κωνσταντίνο Δέλτα καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου του, και ιδιαίτερα τους Δρα Γρηγόρη Παπαρηγορίου και Δρα Χάρη Στεφάνου, για τη βοήθεια και τη στήριξη που μου προσέφεραν απλόχερα,

την αρραβωνιαστικιά μου, Μαρία, για την ψυχολογική στήριξη, την κατανόηση και την ατελείωτη υπομονή που επέδειξε, όλα αυτά τα χρόνια,

και τέλος, τη μητέρα μου, Αθηνά, για την απεριόριστη αγάπη και τη συνεχή ηθική και οικονομική υποστήριξη. Χωρίς την αρωγή της, δεν θα μπορούσα ποτέ να εκπληρώσω τον στόχο απόκτησης διδακτορικού διπλώματος.

Στη μητέρα μου

Στη Μαρία

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I	Κατάλογος Γραφημάτων	xiv
II	Κατάλογος Εικόνων	xv
III	Κατάλογος Σχημάτων	xviii
IV	Κατάλογος Πινάκων.....	xix
1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1	Δομή και λειτουργία των μικροσωληνίσκων	2
1.2	Ένζυμα κατάτμησης μικροσωληνίσκων	3
1.2.1	Πρωτεΐνη Spastin	5
1.2.2	Η πρωτεΐνη Fidgetin και οι ομόλογες της πρωτεΐνες	6
1.2.3	Πρωτεΐνη Katanin	8
1.2.3.1	Δομή και ενδοκυτταρικός εντοπισμός της Katanin.....	8
1.2.3.2	Λειτουργία.....	10
1.2.3.2.1	Κυτταρική διαίρεση	10
1.2.3.2.2	Νευρική ανάπτυξη.....	12
1.2.3.2.3	Βλεφαρίδες και μαστίγια.....	14
1.2.3.2.4	Κυτταρική μετανάστευση	14
1.2.3.2.5	Η Katanin στους φυτικούς οργανισμούς.....	16
1.2.3.3	Πρωτεΐνες τύπου Katanin-like 1 και Katanin-like 2	16
1.2.3.3.1	Πρωτεΐνες τύπου Katanin-like 1	16
1.2.3.3.2	Πρωτεΐνες τύπου Katanin-like 2	18
1.3	Πρωτεΐνες Nubp1 και Nubp2.....	19
1.4	Κεντρίδια.....	20
1.4.1	Κεντροσωμάτια	21
1.4.2	Κυτταρικές βλεφαρίδες.....	24
1.5	Επιστημονική υπόθεση και στόχοι της διδακτορικής εργασίας.....	27
1.6	Δομή της παρούσας διδακτορικής διατριβής	28
2	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1	Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας	30
2.1.1	Στελέχη βακτηρίου <i>E. coli</i>	30
2.1.2	Πλασμδιακοί φορείς.....	31
2.1.3	Θρεπτικά μέσα για τις βακτηριακές καλλιέργειες	31
2.1.3.1	Παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου LB για τις βακτηριακές καλλιέργειες.....	31

2.1.3.2	Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου LB για τις βακτηριακές καλλιέργειες.....	32
2.1.4	Κατάψυξη βακτηριακών στελεχών.....	33
2.1.5	Παρασκευή βακτηρίων δεκτικών σε μετασχηματισμό με χρήση γλωριούχου ασβεστίου.....	33
2.1.6	Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων.....	34
2.1.7	Κλωνοποίηση DNA με τη χρήση του pGEM-T Easy Vector System και επιλογή των κλώνων <i>in situ</i> με έλεγχο ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης.....	35
2.1.8	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια.....	36
2.1.8.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα από βακτήρια.....	36
2.1.8.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα από βακτήρια.....	38
2.1.9	Απομόνωση RNA.....	39
2.1.10	Απομάκρυνση γενωμικού DNA από δείγματα απομονωμένου RNA.....	41
2.1.11	Παρασκευή cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής.....	42
2.1.12	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	42
2.1.13	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με τη χρήση μείγματος DNA πολυμεράσεων υψηλής πιστότητας.....	44
2.1.14	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR). 45	
2.1.15	Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών για τη διάσπαση πλασμιδιακού DNA.....	47
2.1.16	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	48
2.1.17	Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	49
2.1.18	Καταβύθιση DNA με χρήση αιθανόλης.....	50
2.1.19	Αντίδραση συνένωσης DNA (ligation).....	50
2.1.20	Ολιγονουκλεοτίδια και κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για έκφραση πρωτεϊνών KATNAL2.....	51
2.1.20.1	Ολιγονουκλεοτίδια.....	51
2.1.21	Κατασκευή πλασμιδίων για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	53
2.1.21.1	Κατασκευή <i>6xHis-Katnal2-S1</i>	53
2.1.21.2	Κατασκευή <i>Flag-Katnal2-L1</i> και <i>Flag-Katnal2-S1</i>	53
2.1.21.3	Κατασκευή <i>pmCherry-Katnal2-L1</i> και <i>pmCherry-Katnal2-S1</i>	53
2.2	Μέθοδοι Βιοχημείας.....	54
2.2.1	Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford.....	54
2.2.2	Επαγωγή έκφρασης ετερόλογης πρωτεΐνης σε βακτήρια.....	54
2.2.3	Βιοχημικός καθαρισμός ετερόλογης πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγενείας.....	55
2.2.4	Καθαρισμός αντισώματος με μέθοδο χημικής συγγενείας επί της μεμβράνης.....	57
2.2.5	Συλλογή και προετοιμασία εκχυλισμάτων από κυτταροκαλλιέργειες για ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.....	58
2.2.6	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	58
2.2.7	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Wet Transfer).....	60

2.2.8	Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)	60
2.2.9	Ποσοτική μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε ανοσοαποτύπωση με το λογισμικό ImageJ	61
2.2.10	Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue	62
2.2.11	Αποδέσμευση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για επαναχρησιμοποίηση της.....	62
2.2.12	Προετοιμασία πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ιστούς	63
2.2.13	Ανοσοκατακρήμνιση.....	64
2.2.14	Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Brilliant Blue G-Colloidal.....	65
2.3	Μέθοδοι Κυτταρικής Βιολογίας.....	66
2.3.1	Κυτταροσειρές	66
2.3.2	Θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη των κυτταροκαλλιέργειων.....	67
2.3.3	Ανάκτηση κυτταροκαλλιέργειας από κατεψυγμένα αποθέματα.....	67
2.3.4	Επαναδιασπορά κυττάρων για ανακαλλιέργεια τους.....	68
2.3.5	Κρυοδιατήρηση κυτταροκαλλιέργειας.....	69
2.3.6	Μέτρηση κυττάρων κυτταροκαλλιεργειών	69
2.3.7	Κατασκευή καμπύλης ανάπτυξης κυτταροσειρών.....	70
2.3.8	Επαγωγή βλεφαριδογένεσης <i>in vitro</i> με αποστέρηση ορού	71
2.3.9	Μεταγραφική αποσιώπηση με τη χρήση shRNAs μέσω μόνιμης επιμόλυνσης με τη βοήθεια φακοϊών (Lentivirus)	72
2.3.9.1	Παροδική επιμόλυνση της κυτταροσειράς HEK293T για την κατασκευή ιϊκών πλασμιδιακών φορέων	72
2.3.9.2	Διερεύνηση κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικού πουρομυκίνης για την κυτταροσειρά NIH 3T3	73
2.3.9.3	Εισαγωγή αλληλουχίας ολιγονουκλεοτιδίου shRNA σε κύτταρα NIH 3T3 μέσω μόνιμης επιμόλυνσης με τη χρήση φακοϊών (Lentivirus)	74
2.3.9.4	Επιλογή κλώνου με την μέγιστη μεταγραφική αποσιώπηση των υπό μελέτη πρωτεϊνών	75
2.3.10	Εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κυτταροσειρές μέσω παροδικής επιμόλυνσης με λιποφεκταμίνη.....	76
2.3.11	Αναστολή μεταγραφής σε κυτταροκαλλιέργειες	77
2.3.12	Ανοσοφθορισμός.....	78
2.3.12.1	Μεθόδοι μονιμοποίησης για ανοσοφθορισμό	78
2.3.12.1.1	Μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΰδη.....	78
2.3.12.2	Τεχνική ανοσοφθορισμού	79
2.3.12.3	Μικροσκοπία.....	80
2.3.12.3.1	Ανάλυση μεγέθους κυτταρικών πληθυσμών.....	81
2.3.12.3.2	Ανάλυση κυτταρικού κύκλου διαιρουμένων κυττάρων.....	81

2.3.12.3.3	Ανάλυση βλεφαριδογένεσης διαιρουμένων κυττάρων καθώς και κυττάρων τα οποία είχαν αποστερηθεί ορό	81
2.3.12.3.4	Στατιστική Ανάλυση	82
2.3.13	Κυτταρομετρία ροής	82
2.3.13.1	Συλλογή και προετοιμασία των κυττάρων	83
2.3.13.2	Μέτρηση κυττάρων και ανάλυση των αποτελεσμάτων	83
2.4	Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν	83
2.4.1	Πρωτογενή αντισώματα	84
2.4.2	Δευτερογενή αντισώματα	85
2.4.3	Χρωστικές	85
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	86
3.1	Εισαγωγή	87
3.2	Αναγνώριση και ταυτοποίηση μιας καινούριας οικογένειας πρωτεϊνικών ισομορφών τύπου Katanin-like 2 (KATNAL2) στον ποντικό	89
3.3	Ανάλυση του αναπτυξιακού και τοπικού προτύπου γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών <i>Katnal2</i> στο ποντίκι	95
3.4	Παρασκευή αντισώματος έναντι των ισομορφών KATNAL2 και ανάλυση της πρωτεϊνικής τους έκφρασης	101
3.4.1	Παρασκευή αντισώματος	101
3.4.2	Ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης των ισομορφών KATNAL2	105
3.4.3	Ταυτοποίηση των ισομορφών KATNAL2 με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης, ακολουθούμενης από ανάλυση απομονωμένων πρωτεϊνικών μπαντών με φασματοσκοπία μάζας	106
3.5	Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνικών ισομορφών KATNAL2	113
3.5.1	Ενδοκυτταρικός εντοπισμός ισομορφών KATNAL2 συγχωνευμένων με το επιτόπιο Flag	113
3.5.1.1	Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων pFlag-Katnal2-L1 & pFlag-Katnal2-S1	113
3.5.1.2	Εντοπισμός με παροδική επιμόλυνση σημασμένων με επιτόπια Flag μορφών της KATNAL2	114
3.5.2	Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των ενδογενών πρωτεϊνικών ισομορφών KATNAL2 με χρήση του αντισώματος έναντι της KATNAL2-S1	115
3.5.3	Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των ισομορφών KATNAL2 κατά τη βλεφαριδογένεση	118
3.5.4	Διερεύνηση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνικών ισομορφών KATNAL2 στον πυρήνισκο	119
3.6	Μεταγραφική αποσίωψη των ισομορφών KATNAL2 με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδίων shRNA	123

3.6.1	Μεταγραφική αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 με τη χρήση του ολιγονουκλεοτιδίου shRNA με τον κωδικό TRCN0000090749.....	123
3.6.1.1	Επιλογή κλώνου που φέρει το ολιγονουκλεοτίδιο shRNA TRCN0000090749	123
3.6.1.2	Χαρακτηρισμός κλώνου 2.43.....	126
3.6.1.3	Ανάλυση κυτταρικού κύκλου κλώνου 2.43	130
3.6.1.4	Ανάλυση βλεφαριδογένεσης κλώνου 2.43.....	139
3.6.2	Μεταγραφική αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 με τη χρήση του ολιγονουκλεοτιδίου shRNA με τον κωδικό TRCN0000090751.....	140
3.6.2.1	Επιλογή κλώνου που φέρει το ολιγονουκλεοτίδιο shRNA TRCN0000090751	140
3.6.2.2	Χαρακτηρισμός & ανάλυση κυτταρικού κύκλου κλώνου 3.81	141
3.6.2.3	Ανάλυση βλεφαριδογένεσης κλώνου 3.81	146
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	148
4.1	Αναγνώριση μιας καινούριας οικογένειας πρωτεϊνών Katanin-like 2 και χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων τους	149
4.2	Πολυλειτουργικότητα των KATNAL2.....	151
4.2.1	Λειτουργίες των ισομορφών KATNAL2 σε διαιρούμενα κύτταρα.....	152
4.2.1.1	Οι KATNAL2 εμπλέκονται στην κυτοκίνηση.....	152
4.2.1.2	Οι KATNAL2 εμπλέκονται στον μηχανισμό ρύθμισης διπλασιασμού του κεντροσωματίου.....	153
4.2.1.3	Οι KATNAL2 εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του δικτύου των μικροσωληνίσκων	154
4.2.1.4	Οι KATNAL2 πιθανόν εμπλέκονται στον αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά την ανάφαση.....	156
4.2.2	Λειτουργίες των ισομορφών KATNAL2 σε μη διαιρούμενα κύτταρα.....	157
4.2.2.1	Οι KATNAL2 εμπλέκονται στη βλεφαριδογένεση	157
4.2.3	Οι KATNAL2 εντοπίζονται στον πυρηνίσκο	158
4.3	Μελλοντικές προεκτάσεις.....	159
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	161
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	169

I Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 3.1: Μέτρηση των επιπέδων αποσιώπησης των <i>Katnal2</i> στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43, μέσω Real-Time RT PCR.	124
Γράφημα 3.2: Διαγραμματική απεικόνιση της μείωσης στην έκφραση των ισομορφών KATNAL2 και των πρωτεϊνών Nubp1 και Nubp2 στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43.	125
Γράφημα 3.3: Διάγραμμα που απεικονίζει τις καμπύλες ανάπτυξης για τον κλώνο 2.43, καθώς και για τη μητρική του κυτταροσειρά NIH 3T3.	127
Γράφημα 3.4: Ανάλυση της επίδρασης της αποσιώπησης των KATNAL2 στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43, στο κυτταρικό και στο πυρηνικό μέγεθος.	127
Γράφημα 3.5: Ανάλυση κυτταρικών κύκλων του κλώνου 2.43 και της μητρικής κυτταροσειράς NIH 3T3 μέσω κυτταρομετρίας ροής.	131
Γράφημα 3.6: Διαγραμματική απεικόνιση της συνολικής κατανομής των κεντριδίων στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43 και στα φυσιολογικά NIH 3T3.	136
Γράφημα 3.7: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί τη μείωση των βλεφαριδοφόρων κυττάρων στον κλώνο 2.43.	140
Γράφημα 3.8: Διαγραμματική απεικόνιση της συνολικής κατανομής των κεντριδίων στον αποσιωπημένο κλώνο 3.81 και στα φυσιολογικά NIH 3T3.	144
Γράφημα 3.9: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί τη μείωση των βλεφαριδοφόρων κυττάρων στον κλώνο 3.81.	147

II Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Διαδικασία κατάτμησης μικροσωληνίσκων από πρωτεΐνες AAA.	4
Εικόνα 1.2: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών μοτίβων και περιοχών που συναντώνται στη δομή της Spastin, και οι γνωστές πρωτεϊνικές της αλληλεπιδράσεις (Lumb et al., 2012).	6
Εικόνα 1.3: Επίδραση της αποσιώπησης της Fidgetin στην ανάφαση.....	8
Εικόνα 1.4: Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της Katanin σε απομονωμένες ατράκτους αχινού.	10
Εικόνα 1.5: Τα ένζυμα κατάτμησης κατά τη μίτωση και τη μείωση.	12
Εικόνα 1.6: Ο ρόλος της Katanin στην ανάπτυξη των νευρώνων.....	13
Εικόνα 1.7: Η δράση της Katanin σε μεταναστευτικά κύτταρα στη <i>Drosophila</i>	15
Εικόνα 1.8: Πειράματα υπερέκφρασης και αποσιώπησης της KL1 σε ανθρώπινη κυτταροσειρά U2OS.....	18
Εικόνα 1.9: Τα κεντρίδια σχηματίζουν τα κεντροσωμάτια και τις βλεφαρίδες.	21
Εικόνα 1.10: Η δομή και ο κύκλος διπλασιασμού των κεντροσωματίων.....	23
Εικόνα 1.11: Υπεράριθμα κεντρίδια και χρωμοσωμική αστάθεια.....	24
Εικόνα 1.12: Κύκλος διπλασιασμού των βλεφαρίδων.....	26
Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης των προϊόντων αντίδρασης RT-PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του mRNA/cDNA της <i>Katnal2</i> σε ολικό cDNA ινοβλαστών κυτταρικής σειράς NIH 3T3.	89
Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης των προϊόντων αντίδρασης RT-PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του mRNA/cDNA της <i>Katnal2</i> σε ολικά cDNA κυτταρικών σειρών ποντικού NIH 3T3, IMCD 3, και TM 4.	90
Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης με ενδονουκλεολυτικές πέψεις NotI σε δείγματα που αντιπροσωπεύουν τους 5 διαφορετικού μεγέθους τύπους cDNA (με κόκκινο βελάκι) που κλωνοποιήθηκαν με τη χρήση του pGEM-T Easy Vector System.	91
Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών <i>Katnal2</i> σε διάφορους ιστούς και όργανα ποντικού.	97
Εικόνα 3.5: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών <i>Katnal2</i> σε διάφορες περιοχές του νευρικού συστήματος ποντικού.....	98
Εικόνα 3.6: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών <i>Katnal2</i> σε διαφορετικά <i>in vitro</i> αναπτυξιακά στάδια νευρωνικής ανάπτυξης ιππόκαμπου και σε <i>in vivo</i> αναπτυξιακά στάδια ιππόκαμπου ποντικού.	99
Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών <i>Katnal2</i> σε διάφορες κυτταρικές σειρές από ποντικό.	100

Εικόνα 3.8: Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue, όπου παρουσιάζεται ο βιοχημικός καθαρισμός της ετερόλογης πρωτεΐνης 6xHis-KATNAL2-S1.....	102
Εικόνα 3.9: Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue, όπου παρουσιάζονται τα δύο μείγματα των εκλουσμάτων του βιοχημικού καθαρισμού της ετερόλογης πρωτεΐνης 6xHis-KATNAL2-S1.	102
Εικόνα 3.10: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, με χρήση του καθαρισμένου αντισώματος έναντι της 6xHis-KATNAL2-S1.....	103
Εικόνα 3.11: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών mCherry-KATNAL2-S1 και mCherry-KATNAL2-L1, με τη χρήση του καθαρισμένου αντισώματος έναντι της KATNAL2.....	104
Εικόνα 3.12: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών pFlag-KATNAL2-S1 και pFlag-KATNAL2-L1, με τη χρήση του καθαρισμένου αντισώματος έναντι της KATNAL2.	104
Εικόνα 3.13: Αυτοραδιογράφημα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπου παρουσιάζεται η έκφραση των ενδογενών πρωτεϊνικών ισομορφών KATNAL2 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων ποντικών τύπου IMCD 3, NIH 3T3, TM 4, Neuro 2A καθώς και σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα όρχεων ποντικού.	106
Εικόνα 3.14: Αποτελέσματα πρώτου πειράματος ανοσοκατακρήμνισης το οποίο διεξήχθη σε μικρή κλίμακα.	109
Εικόνα 3.15: Αποτελέσματα δεύτερου πειράματος ανοσοκατακρήμνισης το οποίο διεξήχθη σε μεγάλη κλίμακα.....	110
Εικόνα 3.16: Ηλεκτροφόρημα αгарόζης όπου παρουσιάζεται ο έλεγχος της ενσωμάτωσης των ενθεμάτων <i>Katnal2-L1</i> και <i>Katnal2-S1</i> στο πλασμίδιο pFlag-CMV2, μετά από διπλή πέψη με NotI και XbaI.	114
Εικόνα 3.17: Εντοπισμός των ετερόλογων Flag-KATNAL2-S1 («S1») και Flag-KATNAL2-L1 («L1») μέσω παροδικής επιμόλυνσης.....	115
Εικόνα 3.18: Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των ενδογενών KATNAL2 κατά τη μεσόφαση.....	117
Εικόνα 3.19: Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των ενδογενών KATNAL2 κατά τη μίτωση.....	117
Εικόνα 3.20: Οι KATNAL2 εντοπίζονται στο αξόνημα και στο βασικό σωματίο των πρωτογενών βλεφαρίδων.	119
Εικόνα 3.21: Ένα κλάσμα των KATNAL2 εντοπίζεται στον πυρηνίσκο και υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με Ακτινομυκίνη D (1 µg/ml) συνεντοπίζεται με την Φιμπριλλαρίνη στα LNCs, δεν εντοπίζεται όμως στα DNCs στα κύτταρα NIH 3T3.....	121
Εικόνα 3.22: Ένα κλάσμα των KATNAL2 εντοπίζεται στον πυρηνίσκο και υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με DRB (50 µg/ml) συνεντοπίζεται με την Φιμπριλλαρίνη, δεν συνεντοπίζεται όμως με την PSP1 στα κύτταρα NIH 3T3.	122

Εικόνα 3.23: Μέτρηση των επιπέδων αποσιώπησης των KATNAL2 στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.....	125
Εικόνα 3.24: Τα κύτταρα του αποσιωπημένου κλώνου 2.43 είναι εμφανώς μεγαλύτερα από τα κύτταρα NIH 3T3 φυσικού τύπου.....	128
Εικόνα 3.25: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί την ενίσχυση της ακετυλίωσης στους μικροσωληνίσκους.....	129
Εικόνα 3.26: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί την αυξημένη παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων τόσο σε μεσοφασικά όσο και σε μιτωτικά κύτταρα, καθώς και την εμφάνιση φαινοτύπων που επιδεικνύουν μη φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση....	137
Εικόνα 3.27: Η αποσιώπηση των KATNAL2 παρεμποδίζει τη φυσιολογική κυτοκίνηση και προκαλεί την εμφάνιση ανωμαλιών στον πυρήνα.....	138
Εικόνα 3.28: Μείωση πρωτεϊνικής έκφρασης των KATNAL2, στον αποσιωπημένο κλώνο 3.81.....	141
Εικόνα 3.29: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί την παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων τόσο στα μεσοφασικά όσο και στα μιτωτικά κύτταρα του κλώνου 3.81.....	145

III Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 3.1: Α. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του μη πλήρους cDNA της πρωτεΐνης που πιθανόν αλληλεπιδρά με τη Nubp1 και το πολυπεπτίδιο που κωδικοποιεί. Β. Αντιστοίχιση του μη πλήρους cDNA με την αλληλουχία XM_006526437.....	88
Σχήμα 3.2: Οι ισομορφές <i>Katnal2</i> αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος των 16 εξονίων του γονιδίου <i>Katnal2</i> στον ποντικό.....	93
Σχήμα 3.3: Αντιστοίχιση με ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των πέντε ισομορφών KATNAL2 με τη χρήση του εργαλείου ClustalW2.....	94
Σχήμα 3.4: Διαγραμματική απεικόνιση των ισομορφών KATNAL2 και των πρωτεϊνικών μοτίβων που περιέχουν.....	95
Σχήμα 3.5: Διαγραμματική απεικόνιση των ισομορφών <i>Katnal2-L1</i> & <i>Katnal2-S1</i> , στην οποία εμφανίζεται η θέση του κάθε ολιγονουκλεοτιδικού εκκινήτη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των <i>Katnal2</i>	96
Σχήμα 3.6: Η ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση του καθαρισμένου αντισώματος έναντι της KATNAL2, σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας, κατέδειξε την ειδική αναγνώριση πεπτιδίων της KATNAL2.	111

IV Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1: Στελέχη βακτηρίου <i>E. coli</i> που χρησιμοποιήθηκαν.	30
Πίνακας 2.2: Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν.....	31
Πίνακας 2.3: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια αντίδραση συνένωσης (Promega pGEM-T Easy).....	36
Πίνακας 2.4: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια αντίδραση DNάσης.....	41
Πίνακας 2.5: Οι τελικοί όγκοι των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	42
Πίνακας 2.6: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια PCR αντίδραση.....	43
Πίνακας 2.7: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια PCR αντίδραση υψηλής πιστότητας.....	45
Πίνακας 2.8: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια Real-Time PCR αντίδραση.....	46
Πίνακας 2.9: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια αντίδραση πένης περιορισμού.....	47
Πίνακας 2.10: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια αντίδραση συνένωσης DNA (NEB M0202S).....	51
Πίνακας 2.11: Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR αντιδράσεις.....	51
Πίνακας 2.12: Τα ολιγονουκλεοτίδια shRNA που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα μεταγραφικής αποσιώπησης.....	73
Πίνακας 3.1: Οι 5 διακριτές ισομορφές <i>Katnal2</i> που κλωνοποιήθηκαν με τη χρήση του pGEM-T Easy Vector System.....	91
Πίνακας 3.2: Τα δείγματα από ποντίκι που χρησιμοποιήθηκαν για διερεύνηση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών <i>Katnal2</i>	97
Πίνακας 3.3: Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας μάζας στις μπάντες του 1ου πειράματος ανοσοκατακρήμνισης σε εκχύλισμα όρχεων ποντικού.....	111
Πίνακας 3.4: Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας μάζας των ζωνών στο 2ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σε εκχύλισμα όρχεων ποντικού.....	112
Πίνακας 3.5: Επίδραση της αποσιώπησης των KATNAL2 στη μιτωτική δραστηριότητα του κυττάρων του κλώνου 2.43.....	132
Πίνακας 3.6: Επίδραση της αποσιώπησης των KATNAL2 στον αριθμό των κεντριδίων των κυττάρων του κλώνου 2.43.....	135

Πίνακας 3.7: Επίδραση της αποσιώπησης των KATNAL2 στον αριθμό των κεντριδίων των κυττάρων του κλώνου 3.81..... 143

ΑΝΤΩΝΗΣ ΒΕΡΒΕΡΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δομή και λειτουργία των μικροσωληνίσκων

Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν έναν από τους τρεις τύπους πολυμερών μακροϊνιδίων του κυτοσκελετού στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελούνται από ετεροδιμερή α - και β -τουμπουλίνης, τα οποία πολυμερίζονται για να συνθέσουν τα γραμμικά πρωτοϊνίδια των μικροσωληνίσκων. 13 πρωτοϊνίδια σε κυλινδρική διάταξη σχηματίζουν ένα μικροσωληνίσκο (Evans et al., 1985). Η σύνδεση των διμερών γίνεται με τη δημιουργία δεσμών μεταξύ της α -τουμπουλίνης του ενός διμερούς και της β -τουμπουλίνης του επόμενου. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα στο ένα άκρο να βρίσκεται α -τουμπουλίνη (θετικό άκρο) και στο άλλο β -τουμπουλίνη (αρνητικό άκρο), προσδίδοντας δομική «πολικότητα» στους μικροσωληνίσκους (Walker et al., 1988). Επίσης, τα ετεροδιμερή τουμπουλίνης συνδέονται με GTP, η α -τουμπουλίνη σε μόνιμη βάση ενώ η β -τουμπουλίνη μπορεί να υδρολύσει το GTP σε GDP (πρόσφατη ανασκόπηση από Wade, 2009).

Οι μικροσωληνίσκοι εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Κατά τη μίτωση και τη μείωση συγκροτούν τη μιτωτική άτρακτο, βοηθώντας στο σωστό διαχωρισμό του γενετικού υλικού. Καθορίζουν την κυτταρική πολικότητα ενώ είναι απαραίτητοι για τη ρύθμιση του κυτταρικού σχήματος, την κυτταρική μετανάστευση, και την ενδοκυτταρική μεταφορά οργανιδίων, κυστιδίων και άλλων σωματιδίων (πρόσφατη ανασκόπηση από Vasiliev and Samoylov, 2013). Επίσης είναι αναγκαίοι παράγοντες για το σχηματισμό των κυτταρικών βλεφαρίδων και μαστιγίων, συγκροτώντας το βασικό σωματίο και το αξόνημα αυτών των οργανιδίων (Satir et al., 2010, Gluenz et al., 2010).

Η πυρήνωση των μικροσωληνίσκων, δηλαδή η *de novo* δημιουργία τους, επιτελείται κυρίως μέσω της δράσης της γ -τουμπουλίνης, η οποία συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες για να σχηματίσει το σύμπλεγμα δακτυλίου της γ -τουμπουλίνης (γ -TuRC, γ -Tubulin Ring Complex). Αυτό το σύμπλεγμα εντοπίζεται στα κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC), που στα ζωικά κύτταρα τα κυριότερα είναι τα κεντροσωμάτια (πρόσφατη ανασκόπηση από Kollman et al., 2010). Τα αρνητικά άκρα των μικροσωληνίσκων βρίσκονται αγκυροβολημένα στα κεντροσωμάτια, ενώ τα θετικά τους άκρα επιμηκύνονται προς την κυτταρική μεμβράνη (πρόσφατη ανασκόπηση από Wade, 2009).

Οι μικροσωληνίσκοι χαρακτηρίζονται από τη "δυναμική αστάθεια", δηλαδή την ικανότητα να μεταβαίνουν με γοργό ρυθμό από κατάσταση αύξησης σε κατάσταση αποδιοργάνωσης και το αντίθετο. Μέσω αυτού του φαινομένου μπορούν να επιτελούν και τις διάφορες λειτουργίες τους. Συγκεκριμένα η β -τουμπουλίνη εμφανίζει μεγαλύτερη δράση GTPάσης όταν βρίσκεται πολυμερισμένη σε ένα μικροσωληνίσκο, παρά όταν είναι σε ελεύθερη μορφή. Έτσι οι περισσότερες β -τουμπουλίνες των μικροσωληνίσκων είναι συνδεδεμένες με GDP. Στα θετικά άκρα των μικροσωληνίσκων όμως, οι νεοπροστιθέμενες β -τουμπουλίνες είναι συνδεδεμένες με GTP, μια

δομή γνωστή ως GTP-cap, επειδή δεν πρόλαβαν να υδρολύσουν το GTP. Όταν ο ρυθμός πολυμερισμού είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό της υδρόλυσης του GTP, τότε διατηρείται το GTP cap και ο μικροσωληνίσκος παραμένει σε κατάσταση αύξησης. Όταν γίνεται το αντίθετο ο μικροσωληνίσκος συρρικνώνεται (πρόσφατη ανασκόπηση από Morgan, 2006).

Η δυναμική αστάθεια των μικροσωληνίσκων ελέγχεται μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με διάφορες ρυθμιστικές πρωτεΐνες που διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: σε αυτές που ευνοούν την αύξηση των μικροσωληνίσκων, και σε αυτές που ευνοούν την αποδιοργάνωση τους (πρόσφατη ανασκόπηση από Horio and Murata, 2014). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι σταθεροποιητές των μικροσωληνίσκων όπως οι πρωτεΐνες CLIP170, Tau και EB1, οι οποίες ευνοούν την αύξηση του ρυθμού πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και τη μείωση του ρυθμού αποπολυμερισμού. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι αποσταθεροποιητές των μικροσωληνίσκων (πχ Stathmin, KinI) που με τη δράση τους προωθούν τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, και τα ένζυμα κατάτμησης των μικροσωληνίσκων (Katanin, Spastin, Fidgetin), τα οποία κόβουν τους μικροσωληνίσκους σε μικρότερα μεγέθη χρησιμοποιώντας ενέργεια που προέρχεται από την υδρόλυση του ATP (πρόσφατη ανασκόπηση από Lawson and Carazo Salas, 2013). Ακόμη, διάφορες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που διαθέτουν οι μικροσωληνίσκοι παίζουν ρόλο στην κατάτμηση τους, μιας και η Katanin εκδηλώνει τη δράση της επιλεκτικά σε ακετυλιωμένους μικροσωληνίσκους (Sudo and Baas, 2010), ενώ η Spastin σε πολυγλουταμιλωμένους μικροσωληνίσκους (Lacroix et al., 2010).

1.2 Ένζυμα κατάτμησης μικροσωληνίσκων

Τα ένζυμα κατάτμησης μικροσωληνίσκων αποτελούν μία κατηγορία πρωτεϊνών, η οποία είναι ευρέως διαδεδομένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, με παρουσία σε πρωτόζωα όπως στην *Tetrahymena*, σε μονοκύτταρα φύκη όπως τη *Chlamydomonas*, μέχρι και στον άνθρωπο (πρόσφατη ανασκόπηση από Roll-Mecak and McNally, 2010). Κύριοι αντιπρόσωποι της κατηγορίας αυτής αποτελούν οι πρωτεΐνες που ανήκουν στις κλάσεις των Katanins, Spastins και Fidgetins (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012). Όλες ανήκουν στην υπεροικογένεια των AAA πρωτεϊνών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας καλά συντηρημένης πρωτεϊνικής περιοχής, της AAA, μεγέθους ~240 αμινοξέων, που προσδίδει ενεργότητα ATPάσης (Frickey and Lupas, 2004). Ένα τέταρτο μέλος αυτής της κατηγορίας είναι και η πρωτεΐνη VPS4, η οποία όμως δεν κατέχει δυνατότητες κατάτμησης των μικροσωληνίσκων αλλά εμπλέκεται στην αποδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης για σκοπούς ενδοκύτωσης ή κυτταρικής διαίρεσης (Hill and Babst, 2012).

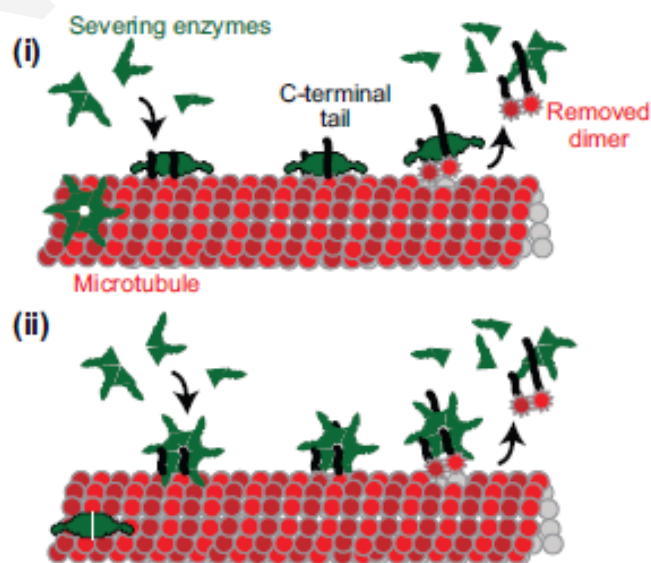
Αυτές οι πρωτεΐνες, μέσω της κατάτμησης των μικροσωληνίσκων, εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες των κυττάρων, όπως στη μίτωση και τη μείωση, στη μορφογένεση καθώς και στη λειτουργία των νευρώνων, στη συναρμολόγηση και επίσης στην αποικοδόμηση των

βλεφαρίδων, καθώς και στην κυτταρική μετανάστευση (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).

Όλες οι AAA ATPάσες έχουν κοινό ότι χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να διαχωρίσουν ή να αναδιαμορφώσουν μεγάλα μοριακά σύμπλοκα εντός του κυττάρου (Εικόνα 1.1). Αν και δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι λεπτομέρειες όσο αφορά τον τρόπο δράσης τους, είναι γνωστό ότι σχηματίζουν εξαμερείς δακτυλίους στην παρουσία ATP, καθώς μόνο σε αυτή τη μορφή μπορούν να συνδεθούν στο υπόστρωμα τους, τους μικροσωληνίσκους, με υψηλή συγγένεια (πρόσφατη ανασκόπηση από Roll-Mecak and McNally, 2010). Τα υπάρχοντα ερευνητικά στοιχεία καταδεικνύουν ότι τα ένζυμα κατάτμησης συνδέονται μέσω της περιοχής AAA στο καρβοξυτελικό άκρο της τουμπουλίνης των μικροσωληνίσκων, και χρησιμοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση του ATP για να μετατοπίσουν την τουμπουλίνη μέσα στον κεντρικό πόρο των εξαμερών δομών τους. Ενώσω γίνεται αυτό, το πολυπεπτιδίο τουμπουλίνης χάνει την τριτοταγή του δομή και/ή οι δεσμοί μεταξύ των ετεροδιμερών τουμπουλίνης αποδυναμώνονται, επιτρέποντας στα ετεροδιμερή να αποχωριστούν από το πολυμερές τουμπουλίνης. Με την υδρόλυση του ATP τα εξαμερή των ενζύμων κατάτμησης αποδιοργανώνονται (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).

Εικόνα 1.1: Διαδικασία κατάτμησης μικροσωληνίσκων από πρωτεΐνες AAA.

Η κατάτμηση των μικροσωληνίσκων φαίνεται να προκύπτει μέσω μιας διαδικασίας κατά την οποία η εξαμερής δομή των ενζύμων κατάτμησης (πράσινο χρώμα) συναρμολογείται γύρω από το καρβοξυτελικό άκρο (μαύρες γραμμές) των διμερών τουμπουλίνης (κόκκινοι κύκλοι). Η περιοχή AAA χρησιμοποιεί την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για την απομάκρυνση του διμερούς από το υπόλοιπο μόριο της τουμπουλίνης των μικροσωληνίσκων. Στα (i) και (ii) εμφανίζονται δύο πιθανοί προσανατολισμοί του εξαμερούς κατά τη διάρκεια της κατάτμησης (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).



1.2.1 Πρωτεΐνη Spastin

Η Spastin είναι μια πρωτεΐνη που έχει την ικανότητα κατάτμησης των μικροσωληνίσκων. Μεταλλάξεις του γονιδίου που την κωδικοποιεί αναγνωρίστηκαν ως μία από τις κύριες αιτίες πρόκλησης της οικογενούς σπαστικής παραπληγίας (HSP, Hereditary Spastic Paraplegia) (Hazan et al., 1999). Η HSP είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια που κύριο σύμπτωμα της είναι η αδυναμία και σπαστικότητα των κάτω άκρων, ως αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας του νευράξονα των φλοιονωτιαίων οδών (Lumb et al., 2012). Στον ποντικό, η απώλεια της δράσης της Spastin προκαλεί τη μεγέθυνση των νευραξόνων και ανωμαλίες κατά την αξονική μεταφορά, συνοδευόμενες από την παρουσία μη φυσιολογικών μικροσωληνίσκων στα άκρα του νευράξονα (Kasher et al., 2009).

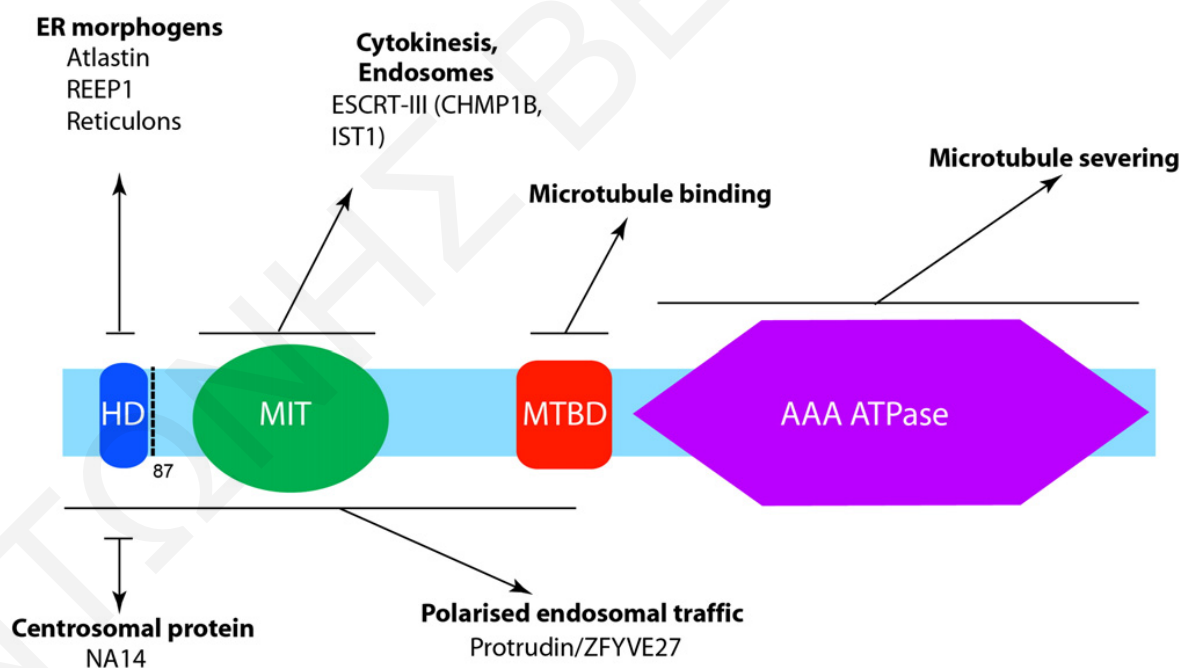
Η Spastin διαθέτει τέσσερις ισομορφές στα θηλαστικά, την M1 που είναι η μεγαλύτερη (Εικόνα 1.2), την M87 στην οποία απουσιάζουν τα πρώτα 86 αμινοξέων της M1, και δύο άλλες παραλλαγές των ισομορφών M1 και M87 οι οποίες στερούνται μια περιοχή 32 αμινοξέων στο 4^ο εξώνιο. Η ύπαρξη διαφορετικών ισομορφών εξηγεί ως ένα βαθμό τον σύνθετο κυτταρικό εντοπισμό της στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στη συσκευή Golgi, στα ενδοσώματα, και ακόμη και στον πυρήνα.

Η Spastin επιτελεί διάφορους ρόλους μέσα στα κύτταρα. Στην ανθρώπινη κυτταροσειρά HeLa φαίνεται να εμπλέκεται στον καθορισμό του σχήματος του ενδοπλασματικού δικτύου, μέσω της δυνατότητας της για κατάτμηση των μικροσωληνίσκων, αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής της ρόλος. Επίσης αν και η Spastin αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα ενδοσώματα, εν τούτοις δεν της έχει αποδοθεί κάποιος ρόλος σχετικός με αυτά τα οργανίδια (Lumb et al., 2012). Στη *Drosophila*, κατά τη μίτωση εντοπίζεται συνεργάζεται με τις Fidgetin και Katanin για την κίνηση των χρωμοσωμάτων προς τους πόλους κατά την ανάφαση, αποπολυμερίζοντας τους μικροσωληνίσκους του κινητοχώρου. Συγκεκριμένα, η Spastin εντοπίζεται μαζί με τη Fidgetin στα κεντροσώματα, όπου μέσω της κατάτμησης απομακρύνουν τις περιοχές που προστατεύουν τους μικροσωληνίσκους από τον αποπολυμερισμό (Zhang et al., 2007), δηλαδή τα αρνητικά άκρα τα οποία προστατεύονται από τα συμπλέγματα γ-TuRC ή και από την πρωτεΐνη Patronin. Έτσι θα έχει την ευκαιρία η Kinesin-13 να έλθει σε επαφή με τους μικροσωληνίσκους και να τους αποπολυμερίσει (Goodwin and Vale, 2010). Στους νευρώνες ευνοεί την αναδιαμόρφωση των μικροσωληνίσκων, υπέρ της αύξησης τους στις συναπτικές απολήξεις και υπέρ της δημιουργίας διακλαδώσεων στους δενδρίτες (πρόσφατη ανασκοπή από Sharp and Ross, 2012). Υπερέκφραση της Spastin προκαλεί την καταστροφή των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού (Zhang et al., 2007).

Στη δομή της Spastin συναντώνται διάφορα πρωτεϊνικά μοτίβα (Εικόνα 1.2). Στο καρβοξυτελικό άκρο της Spastin εμπεριέχεται η πρωτεϊνική περιοχή AAA ATPάσης. Επίσης στην ίδια περιοχή βρίσκεται το μοτίβο MTBD που προωθεί την αλληλεπίδραση της Spastin με τους

μικροσωληνίσκους. Αυτά τα δύο μοτίβα επιτρέπουν στη Spastin να δρα ως ένζυμο κατάτμησης των μικροσωληνίσκων (White et al., 2007). Μεταλλάξεις στην περιοχή AAA μπορούν α) να αναστείλουν τη διαδικασία πολυμερισμού της Spastin για το σχηματισμό των εξαμερών δομών, αναγκαίων για την κατάτμηση των μικροσωληνίσκων, β) να εμποδίσουν την πρόσδεση και την υδρόλυση του ATP, γ) να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση με τα μόρια της τουμπουλίνης (πρόσφατη ανασκόπηση από Roll-Mecak and Vale, 2008). Στο αμινοτελικό άκρο της Spastin συναντιέται το μοτίβο MIT, το οποίο καταλύει την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη CHMP1B του συμπλόκου ESCRT. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι αναγκαία για τη στρατολόγηση της Spastin στο ενδιάμεσο σώμα (midbody) κατά την κυτοκίνηση. Τυχόν απώλεια της δράσης της Spastin, προκαλεί τη μη αποδόμηση των μικροσωληνίσκων κατά το τελικό στάδιο διαχωρισμού των δύο θυγατρικών κυττάρων στην κυτοκίνηση (Lumb et al., 2012). Τέλος, υπάρχει και το μοτίβο HD που συναντάται μόνο στις M1 ισομορφές της Spastin, και το οποίο πιθανότατα τη στοχεύει στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μιας και είναι η μόνη ισομορφή που συναντάται στο συγκεκριμένο οργανίδιο (Park et al., 2010).

Εικόνα 1.2: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών μοτίβων και περιοχών που συναντώνται στη δομή της Spastin, και οι γνωστές πρωτεϊνικές της αλληλεπιδράσεις (Lumb et al., 2012).



1.2.2 Η πρωτεΐνη Fidgetin και οι ομόλογες της πρωτεΐνες

Η Fidgetin είναι πρωτεΐνη που δρα ως ένζυμο κατάτμησης των μικροσωληνίσκων. Ανήκει στην υποοικογένεια 7 των AAA ATPάσεων, την ίδια υποοικογένεια στην οποία ανήκουν οι Spastin και Katanin (Mukherjee et al., 2012). Στη *Drosophila* και στον *C. elegans* εντοπίζεται μόνο μία

ισομορφή της Fidgetin, η FIGN, ενώ στα θηλαστικά ταυτοποιήθηκαν εκτός της αρχέτυπης FIGN, και οι στενά συγγενικές FIGN-like 1 και FIGN-like 2 (Yang et al., 2005).

Στη *Drosophila*, η Fidgetin εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια κατά τη μίτωση, και ο ρόλος της είναι ο αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου στα αρνητικά τους άκρα, για να παρέχει την κινητήριο δύναμη για το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και την κίνηση τους προς τους πόλους, κατά την ανάφαση Α. Για αυτή τη λειτουργία δρα μαζί με τη Spastin, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα σε αυτή τη διατριβή (Rogers et al., 2005, Goodwin and Vale, 2010). Η υπερέκφραση της Fidgetin στη *Drosophila* έχει ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση του κυττοσκελετού των μικροσωληνίσκων (Zhang et al., 2007). Στον Νηματώδη Σκόληκα η Fidgetin είναι σημαντική για την πρόοδο της μίτωσης των βλαστικών κυττάρων (Luke-Glaser et al., 2007). Μεταλλάξεις της Fidgetin στα ποντίκια προκαλούν φαινοτύπους με κύριο χαρακτηριστικό την έλλειψη ισορροπίας, που οφείλεται στη μη φυσιολογική ανάπτυξη των καναλιών του εσωτερικού αυτιού. Παρουσιάζουν επίσης μικροφθalmία που οφείλεται σε καθυστέρηση στη διενέργεια του κυτταρικού κύκλου και διάφορες σκελετικές ανωμαλίες (Cox et al., 2000).

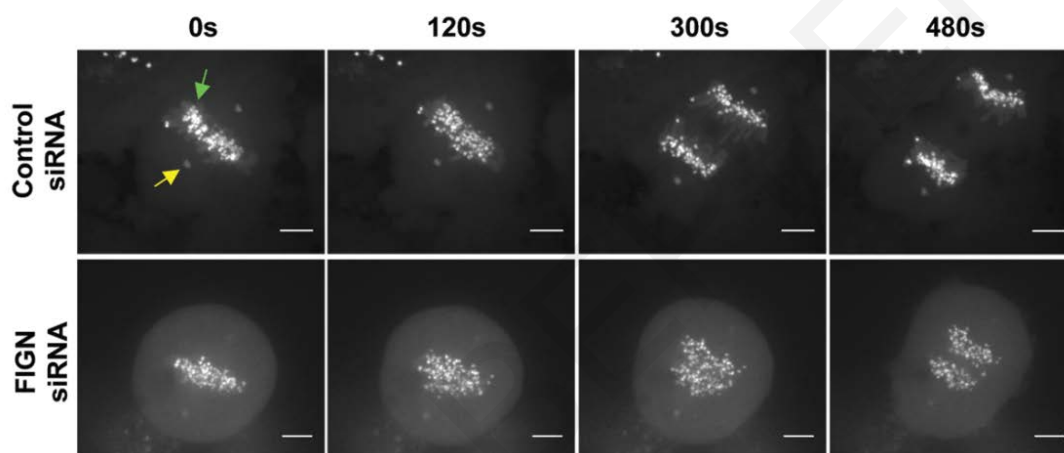
Η ανθρώπινη Fidgetin έχει διττό ρόλο κατά τη μίτωση. Καταρχήν εντοπίζεται στα μιτωτικά κεντροσωμάτια, και αποπολυμερίζει τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου, αφότου έχουν συνδεθεί με τα χρωμοσώματα, συμβάλλοντας έτσι καθοριστικά στην ανάφαση Α, όπως και στη Δροσόφιλα. Επιπρόσθετα, καταστέλλει την αύξηση των αστρικών μικροσωληνίσκων της ατράκτου για τη διατήρηση της κατάλληλης αρχιτεκτονικής της μιτωτικής συσκευής. Τυχόν ανωμαλίες στη δράση της, καθυστερούν σημαντικά την ανάφαση (Εικόνα 1.3) και επίσης μπορεί να οδηγήσουν σε ανευπλοειδία ή και πολυπλοειδία, καταστάσεις που συνδέονται με την καρκινογένεση. Ακόμη εμπλέκεται και στη σωστή οργάνωση της δομής των μιτωτικών κεντροσωματίων μιας και η αποσιώπηση της Fidgetin έχει ως συνέπεια την αύξηση του μεγέθους τους, λόγω μη ικανοποιητικού αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων που προβάλλουν από τα κεντροσωμάτια. Η δράση της Fidgetin πιθανώς εκτείνεται και πέραν της μίτωσης. Έχει προταθεί ότι ο αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων στα κεντροσωμάτια από τη Fidgetin, συμβάλλει στην κυτταρική μετανάστευση και στη διαφοροποίηση των νευρώνων (Mukherjee et al., 2012).

Η ομόλογη πρωτεΐνη της Fidgetin, Fidgetin-like 1 σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με την KIAA0146/SPIDR, το οποίο συμμετέχει στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Επίσης αλληλεπιδρά με τη RAD51 η οποία κατέχει κεντρικό ρόλο στον μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού, που είναι αναγκαία για την επιδιόρθωση των σπασιμάτων στο δίκλωνο DNA. Η αποσιώπηση της Fidgetin-like 1 προκαλεί ανωμαλίες στον ομόλογο ανασυνδυασμό, και κατά επέκταση στην επιδιόρθωση του DNA (Yuan and Chen, 2013). Η δεύτερη ομόλογη πρωτεΐνη, η Fidgetin-like 2 αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή της κυτταρικής μετανάστευσης. Εντοπίζεται στην περιφέρεια των κυττάρων, ιδιαίτερα στο κορυφαίο τμήμα των πολωμένων κυττάρων, από όπου μέσω της ικανότητας κατάτμησης των μικροσωληνίσκων που διαθέτει ρυθμίζει την

οργάνωση των μικροσωληνίσκων του κυττοσκελετού. *In vitro* αποσιώπηση της Fidgetin-like 2 σε κυτταροσειρές θηλαστικών προκαλεί σημαντική αύξηση στην κυτταρική κίνηση, ενώ *in vivo* αποσιώπηση της σε ποντίκια, οδηγεί στη γρηγορότερη επούλωση των πληγών (Charafeddine et al., 2015).

Εικόνα 1.3: Επίδραση της αποσιώπησης της Fidgetin στην ανάφαση.

Παρατήρηση της ανάφασης σε διάφορα χρονικά διαστήματα, σε κύτταρα αποσιωπημένα για τη Fidgetin, και σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα. Είναι προφανής η καθυστέρηση στην ανάφαση στα αποσιωπημένα κύτταρα. Το πράσινο βέλος (anti-CENPB) υποδεικνύει τα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων και το κίτρινο βέλος (anti-γ-tubulin) τα κεντροσωμάτια (Mukherjee et al., 2012).



1.2.3 Πρωτεΐνη Katanin

Η Katanin είναι ιστορικά το πρώτο ένζυμο κατάτμησης των μικροσωληνίσκων που ανακαλύφθηκε. Ανήκει στην υπερικογενεία των AAA ATPάσεων, και χρησιμοποιεί την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για την κατάτμηση των μικροσωληνίσκων. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από αυγά θαλάσσιου αχινού το 1993. Πήρε το όνομα της από το ιαπωνικό σπαθί katana (McNally and Vale, 1993) και έχει χαρακτηριστεί ως ο «κυτταρικός σαμουράι» (πρόσφατη ανασκόπηση από Quarmby, 2000). Η Katanin εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες εντός του κυττάρου, αναλόγως του κυτταρικού τύπου και του ενδοκυτταρικού της εντοπισμού (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).

1.2.3.1 Δομή και ενδοκυτταρικός εντοπισμός της Katanin

Η Katanin είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο υπομονάδες, την 60kDa με δράση ATPάσης, η οποία είναι η καταλυτική υπομονάδα και χρησιμεύει για την κατάτμηση των μικροσωληνίσκων, και την 80kDa η οποία χαρακτηρίζεται ως η υπομονάδα στόχευσης και ρύθμισης της Katanin, μιας και ρυθμίζει τη δράση της ATPάσης και είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό της Katanin στα κεντροσωμάτια (McNally and Vale, 1993). Αυτές οι δύο

υπομονάδες είναι συντηρημένες σε υψηλό βαθμό στα ζώα, στα ανώτερα φυτά και στα πρωτόζωα. Αρκετοί οργανισμοί διαθέτουν και ομόλογες ως προς την Katanin πρωτεΐνες, τις Katanin-like (πρόσφατη ανασκόπηση από Roll-Mecak and McNally, 2010).

Η μικρή υπομονάδα της Katanin, η 60kDa (p60) που αποτελείται από 516 αμινοξέα, περιέχει στο καρβοξυτελικό της άκρο τη συντηρημένη περιοχή AAA που της προσδίδει ενεργότητα ΑΤΡάσης. Σε αυτή την περιοχή εμπεριέχονται τα μοτίβα Walker A και Walker B που παρέχουν θέση πρόσδεσης στο ΑΤΡ (Frickey and Lupas, 2004). Ένα άλλο μοτίβο που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της Katanin είναι το VPS4_C, το οποίο προωθεί τον ολιγομερισμό των Katanins (Vajjhala et al., 2008). Στο αμινοτελικό άκρο της 60kDa βρίσκεται ένα άλλο μοτίβο, το MIT, που κατευθύνει τη σύνδεση της καταλυτικής υπομονάδας με τους μικροσωληνίσκους (McNally et al., 2000).

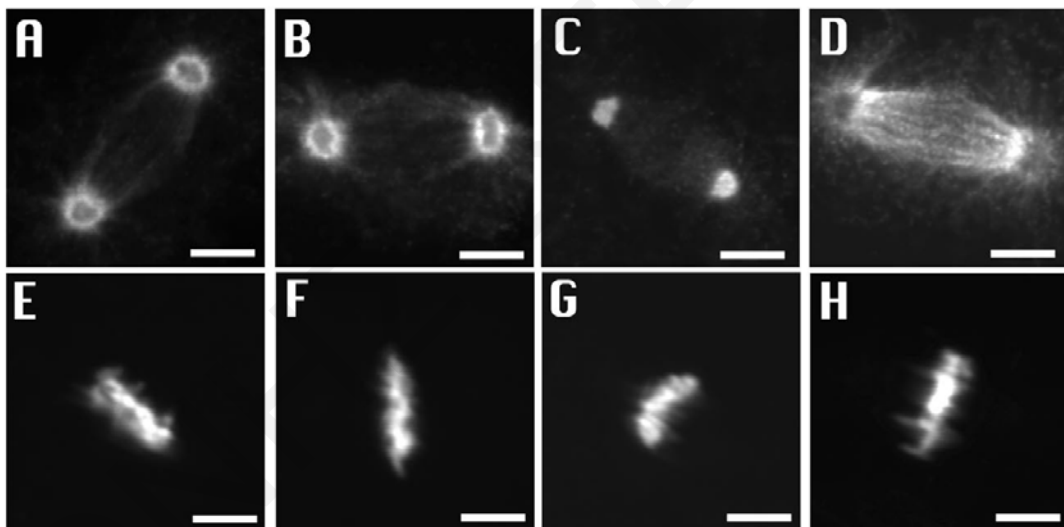
Η μεγάλη υπομονάδα, η 80kDa (p80) που αποτελείται από 690 αμινοξέα, περιέχει 6 επαναλαμβανόμενα WD40 μοτίβα τα οποία συναντώνται στο αμινοτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Το WD40 μοτίβο είναι απαραίτητο για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της Katanin στα κεντροσωμάτια. Επίσης, στο καρβοξυτελικό άκρο της ρυθμιστικής υπομονάδας βρίσκεται μια περιοχή που είναι αναγκαία για το διμερισμό της με την καταλυτική υπομονάδα και την τεταρτοταγή δομή της Katanin, αλληλεπιδρώντας με το αμινοτελικό άκρο της μικρής καταλυτικής υπομονάδας (McNally et al., 2000). Η p80 δεν διαθέτει ικανότητα κατάτμησης των μικροσωληνίσκων από μόνη της (Hartman et al., 1998).

Η Katanin εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τόσο στη μεσόφαση όσο και στη μίτωση, καθώς και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Στα μιτωτικά κεντροσωμάτια η Katanin εκτείνεται από τα κεντροσωμάτια μέχρι τους πόλους, καλύπτοντας περιφερειακά κυρίως τους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, σε αντίθεση με τη γ -τουμπουλίνη που καλύπτει το κεντρικό μέρος των πόλων (Εικόνα 1.4). Συνεπώς, αν και η Katanin και η γ -τουμπουλίνη είναι κεντροσωμικές πρωτεΐνες, δεν συνεντοπίζονται, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η Katanin είναι πρωτεΐνη κυρίως του περικεντριδιακού χώρου. Επίσης ενώ ο κεντροσωμικός εντοπισμός της γ -τουμπουλίνης δεν επηρεάζεται από την επώαση με ουσίες που αποπολυμερίζουν τους μικροσωληνίσκους όπως η νοκοδαζόλη, ο κεντροσωμικός εντοπισμός της Katanin υπό αυτές τις συνθήκες χάνεται, γεγονός που υποδεικνύει ότι η Katanin δεν αποτελεί θεμελιώδη πρωτεΐνη του περικεντριδιακού χώρου και ότι απαιτείται η παρουσία άθικτων μικροσωληνίσκων για να διατηρείται ο κεντροσωμικός εντοπισμός (McNally et al., 1996). Αν και *in vitro* η Katanin προσδένεται στους μικροσωληνίσκους (McNally and Vale, 1993), *in vivo* δεν έγινε κατορθωτή η ταυτοποίηση σταθερού συνεντοπισμού μεταξύ της Katanin και των μικροσωληνίσκων, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πιθανόν σύνδεση τους επιτελείται με χαμηλή συγγένεια και είναι ευαίσθητη σε διάφορες παραμέτρους (McNally et al., 1996).

Όπως και τα υπόλοιπα ένζυμα κατάτμησης των μικροσωληνίσκων, η Katanin σχηματίζει εξαμερή μόρια μόνο αφότου συνδεθεί με ATP. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αύξηση της συγγένειας της Katanin με τους μικροσωληνίσκους, την εισαγωγή των μικροσωληνίσκων στους πόρους των εξαμερών Katanin, και τελικά στην κατάτμηση τους (Εικόνα 1.1) (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).

Εικόνα 1.4: Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της Katanin σε απομονωμένες ατράκτους αχινού.

- A.** Χρώση με αντίσωμα έναντι της μεγάλης υπομονάδας της Katanin, και
- B.** Χρώση με αντίσωμα έναντι της μικρής υπομονάδας της Katanin καταδεικνύουν τον σφαιρικό κοίλο τρόπο χρώσης των κεντροσωματίων της μιτωτικής ατράκτου.
- C.** Χρώση με αντίσωμα έναντι της γ -τουμπουλίνης και,
- D.** με αντίσωμα έναντι της β -τουμπουλίνης για σύγκριση.
- E.F.G.H.** Οι αντίστοιχες χρώσεις του DNA με DAPI (McNally et al., 1996).



1.2.3.2 Λειτουργία

1.2.3.2.1 Κυτταρική διαίρεση

Η Katanin παίζει σημαντικό ρόλο στη μίτωση, σε διάφορα είδη. Στα ωοκύτταρα του *Xenopus* είναι μια από τις κύριες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη δομή της μιτωτικής ατράκτου. Οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου αποπολυμερίζονται από την Katanin ώστε να διατηρείται μια ισορροπία όσο αφορά τον αριθμό των μικροσωληνίσκων του κινητοχώρου που συνδέονται με τα χρωμοσώματα (McNally and Thomas, 1998, Loughlin et al., 2011).

Στον *C. elegans*, η καταλυτική υπομονάδα της Katanin, MEI-1, και η ρυθμιστική MEI-2 χρειάζονται για το σχηματισμό της ατράκτου μόνο στη μείωση και όχι στη μίτωση. Συγκεκριμένα

βοηθούν στη μετατόπιση της διπολικής ατράκτου προς την περιφέρεια του κυττάρου, ώστε να επιτελεστεί η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση του *C. elegans* (Yang et al., 2003, Srayko et al., 2000). Η απώλεια της δράσης των MEI-1 και MEI-2 οδηγεί στο σχηματισμό ατράκτου χωρίς πολικότητα, ενώ σε πιο ήπιες περιπτώσεις σε μεγαλύτερες μιτωτικές ατράκτους. Ακόμη η παρουσία τους είναι καταλυτική για τη δημιουργία νέων μικροσωληνίσκων στην άτρακτο (Εικόνα 1.5A). Μέσω της κατάτμησης των πρώτων μικροσωληνίσκων της ατράκτου, δημιουργούνται οι μήτρες για την ανάπτυξη νέων μικροσωληνίσκων, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητάς τους (McNally et al., 2006).

Στη *Drosophila melanogaster* η Katanin κατατέμνει τους μικροσωληνίσκους κοντά στα θετικά τους άκρα βοηθώντας στον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων κοντά στη θέση σύνδεσης μικροσωληνίσκων και χρωμοσωμάτων, ώστε να επιτευχθεί η κίνηση των χρωμοσωμάτων προς τους πόλους κατά την ανάφαση (Εικόνα 1.5B). Την ίδια στιγμή, οι Spastin και Fidgetin κατατέμνουν τους μικροσωληνίσκους στα αρνητικά τους άκρα που βρίσκονται στα κεντροσώματα, ώστε να επιταχύνουν την κίνηση των χρωμοσωμάτων (Buster et al., 2002).

Στη *Chlamydomonas* η Katanin προκαλεί την κατάτμηση των ζευγών μικροσωληνίσκων του αξονήματος, στην περιοχή κοντά στη μεταβατική ζώνη, προκαλώντας την αποδέσμευση του βασικού σωματίου, ώστε ο οργανισμός να εισέλθει σε φάση μίτωσης (Rasi et al., 2009).

Στον ποντικό μια μετάλλαξη στο μοτίβο WD40 του γονιδίου *Katnb1*, το οποίο κωδικοποιεί τη ρυθμιστική υπομονάδα της Katanin, προκαλεί στειρότητα στα αρσενικά ζώα που συνοδεύεται από ολιγοασθενοτερατοσπερμία. Η φυσιολογική λειτουργία της Katanin είναι αναγκαία για το σχηματισμό της μειωτικής ατράκτου, και για τον κατάλληλο σχηματισμό της κεφαλής των σπερματοζωαρίων. Επίσης συμμετέχει και στην κυτοκίνηση, μέσω της ρύθμισης των μικροσωληνίσκων του ενδιάμεσου σώματος (midbody) (O'Donnell et al., 2012).

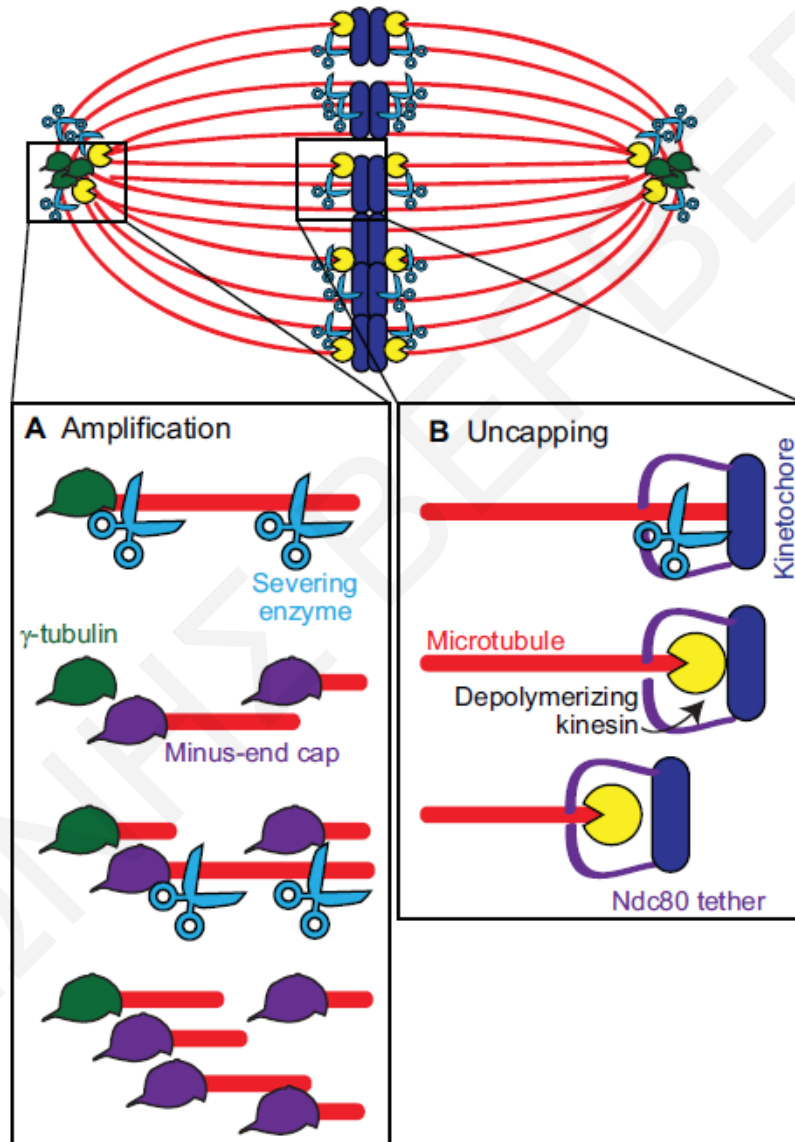
Σε διάφορες κυτταρικές σειρές αρουραίου, η καταλυτική υπομονάδα p60 εντοπίζεται στο ενδιάμεσο σώμα από την ανάφαση ως την κυτοκίνηση. Η αποσιώπηση της p60, είχε ως αποτέλεσμα την ατελή κυτοκίνηση και την αύξηση των διπύρηνων κυττάρων. Φαίνεται ότι η p60 παίζει ρόλο στην αποδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων στο ενδιάμεσο σώμα, συμβάλλοντας ουσιαστικά στη διαδικασία της κυτοκίνησης (Matsuo et al., 2013).

Σε ανθρώπινες κυτταροσειρές στις οποίες αποσιωπήθηκε η έκφραση του γονιδίου *Katnb1* της ρυθμιστικής υπομονάδας, εμφάνιζαν ανώμαλες δομές μιτωτικής ατράκτου και υπεράριθμο αριθμό κεντριδίων με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ικανότητα τους να πολλαπλασιαστούν (Hu et al., 2014).

Εικόνα 1.5: Τα ένζυμα κατάτμησης κατά τη μίτωση και τη μείωση.

A. Κατάτμηση των μικροσωληνίσκων στα αρνητικά άκρα, ώστε να δημιουργηθούν νέες μήτρες για να πυρηνωθούν νέοι μικροσωληνίσκοι. Για κάθε νέα μήτρα που δημιουργείται, ένα μόριο πατρονίνης (μωβ χρώμα) καλύπτει το αρνητικό της άκρο. Κάθε νέος μικροσωληνίσκος που δημιουργείται, θα κατατμηθεί και θα προστεθούν νέα καλύμματα πατρονίνης, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητας των μικροσωληνίσκων.

B. Κατάτμηση των μικροσωληνίσκων του κινητοχώρου στα θετικά τους άκρα κατά την ανάφαση A, ώστε να συρρικνωθούν οι μικροσωληνίσκοι και να μετακινηθούν τα χρωμοσώματα προς τους δύο πόλους (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).



1.2.3.2.2 Νευρική ανάπτυξη

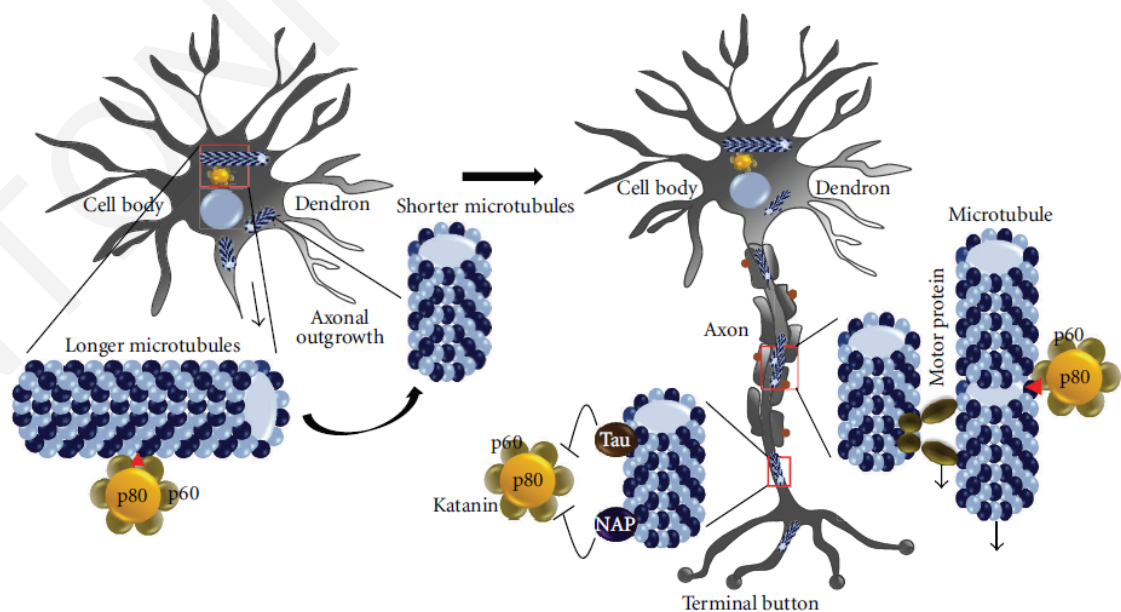
Σε διάφορες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η Katanin αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των νευρώνων. Συγκεκριμένα, σε κυτταροσειρά νευρώνων αρουραίου διαφάνηκε ότι η δράση της προκαλεί κατάτμηση των μικροσωληνίσκων στα κεντροσωμάτια, ώστε να διευκολυνθεί η μεταφορά τους προς τον νευράξονα για την επιμήκυνση του (Εικόνα 1.6) (Ahmad et al., 1999).

Τα πιο πάνω ενισχύονται από το εύρημα ότι η έκφραση της Katanin αυξάνεται σε περιόδους ταχείας επιμήκυνσης των αξόνων, και μειώνεται όταν οι άξονες βρουν τον στόχο τους και σταματούν να επεκτείνονται (Karabay et al., 2004). Ακόμη, πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της p60 σε νευρώνες ιππόκαμπου αρουραίου, είχε ως συνέπεια την έκφυση πολλών και μεγάλων δενδριτών από το κυτταρικό σώμα, ενώ ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα προκάλεσε η αποσιώπηση της p60. Βάσει αυτών, προκύπτει ότι η δράση της p60 συμβάλλει στην αναδιοργάνωση του δικτύου των μικροσωληνίσκων, που είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των νευριτών των νευρώνων και την επέκταση του νευράξονα (Chen et al., 2014).

Η κατάτμηση των μικροσωληνίσκων στον νευρώνα ρυθμίζεται από κατάλληλες MAP πρωτεΐνες, με πιο χαρακτηριστικές την tau και τη NAP, που συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους, προστατεύοντας τους από την ενζυμική δράση της Katanin (Qiang et al., 2006, Sudo and Baas, 2011). Σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, με πιο χαρακτηριστική τη νόσο Alzheimer, η πρωτεΐνη tau είναι υπερφωσφορυλιωμένη, γεγονός που οδηγεί στην ανεξέλεγκτη κατάτμηση των μικροσωληνίσκων από την Katanin (Baas and Qiang, 2005), η οποία ενδεχομένως είναι επιβλαβής για την επιμήκυνση του άξονα (Karabay et al., 2004).

Εικόνα 1.6: Ο ρόλος της Katanin στην ανάπτυξη των νευρώνων.

Στο κυτταρικό σώμα των νευρώνων, η Katanin κατατμεί τους μικροσωληνίσκους ώστε να δημιουργήσει νέους μικρότερους, οι οποίοι εύκολα θα μπορούν να μεταφερθούν στον νευράξονα με τη βοήθεια πρωτεϊνών κινητήρων, ώστε να βοηθηθεί η επιμήκυνση του άξονα και η ανάπτυξη των νευραξονικών απολήξεων. Στον νευράξονα, η πρόσδεση των tau και NAP στους μικρότερους μικροσωληνίσκους, τους προστατεύει από περαιτέρω δράση της Katanin (πρόσφατη ανασκόπηση από Ghosh et al., 2012).



1.2.3.2.3 Βλεφαρίδες και μαστίγια

Η Katanin έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στη συναρμολόγηση και στην αποσυναρμολόγηση των βλεφαρίδων και των μαστιγίων, οργανίδια που η δομή τους βασίζεται στους μικροσωληνίσκους. Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της Katanin στα είδη *Chlamydomonas* και *Tetrahymena*, οδήγησαν στη δημιουργία ακίνητων μαστιγίων και βλεφαρίδων αντίστοιχα, τα οποία στερούνταν το κεντρικό ζεύγος των μικροσωληνίσκων του αξονήματος (Dymek et al., 2004, Sharma et al., 2007). Φαίνεται ότι η κατάτμηση από την Katanin των μικροσωληνίσκων στις βλεφαρίδες και στα μαστίγια, ή ακόμη και από το κυτταρικό σώμα, δημιουργεί μικρότερα πολυμερή που αποστολή τους είναι η συγκρότηση του κεντρικού ζεύγους των μικροσωληνίσκων στο αξόνημα (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).

Στη *Chlamydomonas* η αποσιώπηση της Katanin αναστέλλει την αποδιοργάνωση των μαστιγίων κατά την έναρξη της μίτωσης, που είναι αναγκαία για την επαναχρησιμοποίηση των βασικών σωματίων των μαστιγίων ως κεντρίδια των κεντροσωματίων. Πιθανότατα η Katanin με τη δράση της απελευθερώνει το βασικό σωματίο από το αξόνημα, μέσω της επιλεκτικής κατάτμησης των μικροσωληνίσκων της μεταβατικής ζώνης (Rasi et al., 2009). Στην *Tetrahymena* η δράση της Katanin είναι επιλεκτική, μια και δεν προκαλεί κατάτμηση των κεντρικών ζευγών μικροσωληνίσκων του αξονήματος, αλλά δρα μόνο στα περιφερειακά ζεύγη (Sharma et al., 2007). Ακόμη, σε παράσιτα της οικογένειας των τρυπανοσωμιδών (*Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*) η Katanin p60 συμβάλλει στη μείωση του μεγέθους των μαστιγίων (Casanova et al., 2009).

Η αποσιώπηση του γονιδίου *Katnb1* της ρυθμιστικής υπομονάδας, σε ανθρώπινες κυτταροσειρές, προκαλεί την εμφάνιση υπεράριθμων κεντρίδιων και βλεφαρίδων, αποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο της Katanin στη συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση των βλεφαρίδων (Hu et al., 2014).

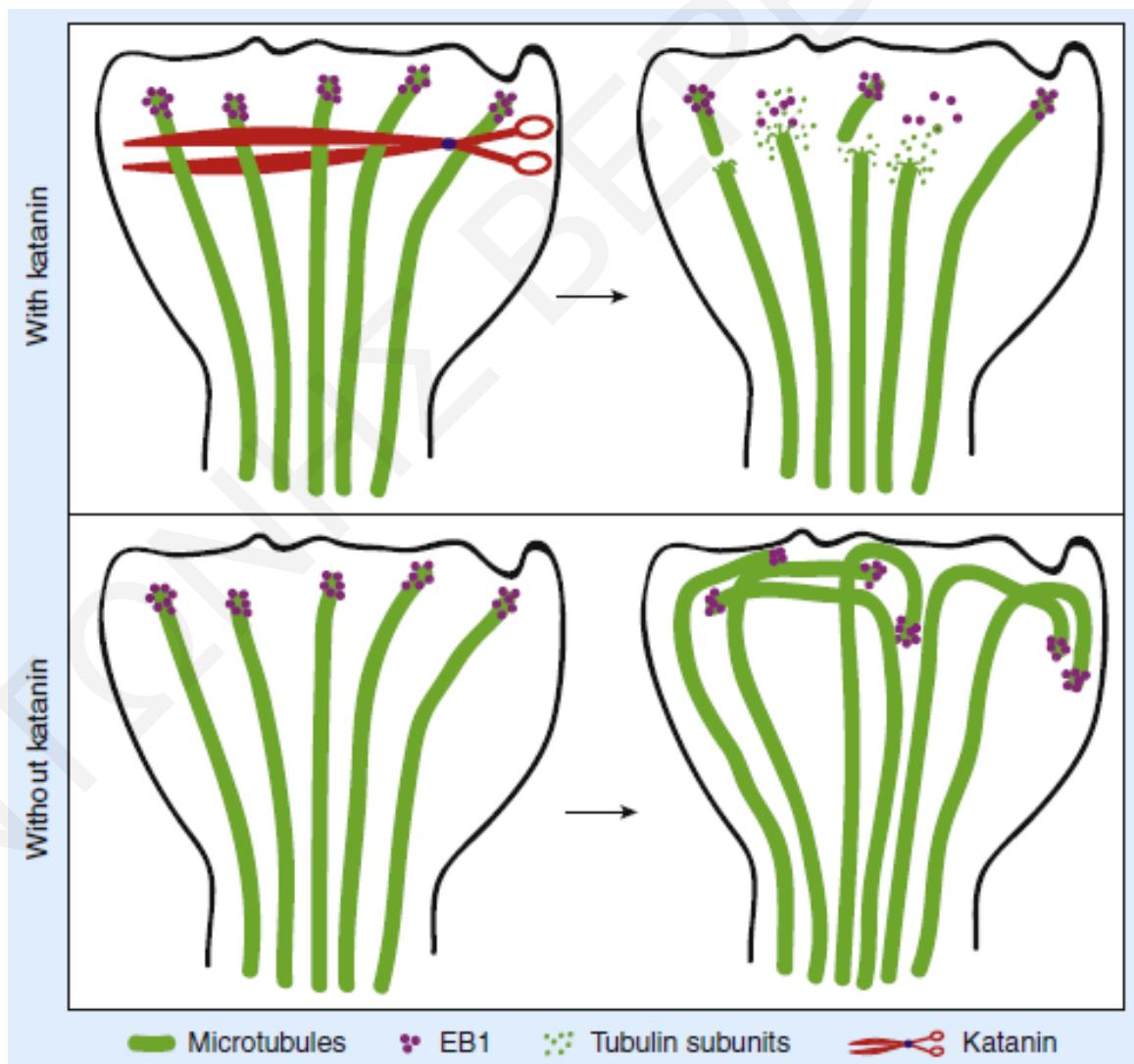
1.2.3.2.4 Κυτταρική μετανάστευση

Η αναστολή της δράσης της Katanin p60 προκαλεί μείωση της μετανάστευσης των νευρώνων στον ποντικό (Toyo-Oka et al., 2005), ενώ η αποσιώπηση της p80 επιβραδύνει την κίνηση σε επιθηλιακά κύτταρα αρουραίου (Sudo and Maru, 2008). Στον άνθρωπο, η αρχέτυπη Katanin εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τον φυσιολογικό, σε οστά που έχουν υποστεί μετάσταση από καρκίνο του προστάτη. Αυτή η αύξηση στην έκφραση της Katanin συνοδεύεται από ενισχυμένη κυτταρική κινητικότητα (Ye et al., 2012). Από αυτά τα δεδομένα προκύπτει ότι η δράση της Katanin ενισχύει την κυτταρική κίνηση και κατά επέκταση τη μετανάστευση. Ο πιθανός τρόπος που το κάνει αυτό, είναι μέσω κατάτμησης των μικροσωληνίσκων στα κεντροσώματα και πρόωθηση της μεταφοράς τους στην αιχμή του κυττάρου που κάνει την κίνηση (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).

Σε αντίθεση με τα ευρήματα στα κύτταρα θηλαστικών, στη *Drosophila* η αποσιώπηση της βCt έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση στην κινητικότητα των κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η Katanin μπορεί να δρα και ως αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής μετανάστευσης. Σε αυτή την περίπτωση η Katanin εντοπίζεται στην περιφέρεια του κυττάρου κατατέμνοντας τους μικροσωληνίσκους (Εικόνα 1.7) (Zhang et al., 2011).

Εικόνα 1.7: Η δράση της Katanin σε μεταναστευτικά κύτταρα στη *Drosophila*.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η Katanin κατατέμνει τους μικροσωληνίσκους στα θετικά τους άκρα για σκοπούς κυτταρικής μετανάστευσης. Υπό συνθήκες αποσιώπησης της Katanin, τα άκρα των μικροσωληνίσκων δεν κατατέμνονται και επιμηκύνονται, με αποτέλεσμα κάποιοι να γυρίζουν προς τα πίσω, ενώ άλλοι εκτείνονται προς τις πλευρικές επιφάνειες του κυττάρου. Τα κύτταρα μεταναστεύουν με πιο γρήγορο ρυθμό όταν η Katanin δεν εκφράζεται. Με πράσινο χρώμα φαίνονται οι μικροσωληνίσκοι, με κόκκινο χρώμα η Katanin, με μωβ χρώμα η πρωτεΐνη σταθεροποιητής των μικροσωληνίσκων, EB1 (πρόσφατη ανασκόπηση από Baas and Sharma, 2011).



1.2.3.2.5 Η Katanin στους φυτικούς οργανισμούς

Η Katanin παίζει σημαντικό ρόλο και στα φυτά. Στην *Arabidopsis thaliana*, σε μεταλλαγμένα ως προς την Katanin στελέχη, όπως τα fra2 και lue1, κατά την κυτταρική διαίρεση παρατηρείται λανθασμένη ευθυγράμμιση, προσανατολισμός και πολικότητα των μικροσωληνίσκων που οδηγεί σε αλλοίωση του προσανατολισμού της διαίρεσης του μητρικού κυττάρου (Panteris et al., 2011).

Οι μικροσωληνίσκοι του φλοιού βρίσκονται διευθετημένοι σε παράλληλη διάταξη και είναι υπεύθυνοι για τον έλεγχο της κατεύθυνσης εναπόθεσης της κυτταρίνης, και κατά επέκταση του κυτταρικού σχήματος. Αυτοί οι μικροσωληνίσκοι προέρχονται από κατάτμηση άλλων μικροσωληνίσκων που βρίσκονται πιο εσωτερικά στο φυτικό κύτταρο. Μεταλλάξεις στην Katanin οδηγούν στην παύση της συγκεκριμένης κατάτμησης, στην απουσία της παράλληλης διάταξης των μικροσωληνίσκων του φλοιού, στην ελαττωματική εναπόθεση κυτταρίνης, και τελικά σε αλλοιωμένο κυτταρικό σχήμα (πρόσφατη ανασκόπηση από Roll-Mecak and McNally, 2010).

Σε φυτά ρυζιού, η ομόλογη πρωτεΐνη της Katanin, DGL1 εμπλέκεται στην κυτταρική επιμήκυνση και στον διπλασιασμό. Επίσης προκαλεί αύξηση της έκφρασης των γονιδίων για τη βιοσύνθεση γιββεριλλίνης (Komorisono et al., 2005).

1.2.3.3 Πρωτεΐνες τύπου Katanin-like 1 και Katanin-like 2

Αν και η μεγάλη πλειοψηφία των ερευνητικών εργασιών που δημοσιεύτηκαν ως σήμερα αφορούν την αρχέτυπη Katanin, τα γονιδιώματα αρκετών οργανισμών κωδικοποιούν αρκετές όμοιες πρωτεΐνες, τις Katanin-like 1 και τις Katanin-like 2, που οι κυτταρικές τους λειτουργίες δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί (Sonbuchner et al., 2010).

1.2.3.3.1 Πρωτεΐνες τύπου Katanin-like 1

Στη *Drosophila*, η πρωτεΐνη Kat-60L1 εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση συγκεκριμένων αισθητικών νευριτών, διαδικασία που προκύπτει κατά την ωρίμανση των νευριτών που εκφύονται από το κυτταρικό σώμα, και στην οποία παρατηρείται αποκοπή των αχρειαστών και πλεοναζόντων νευριτών. Συγκεκριμένα η Kat-60L1 συμμετέχει στην κατάτμηση των μικροσωληνίσκων στους αχρειαστούς δενδρίτες, ώστε αυτοί να μπορούν να απομακρυνθούν από το κυτταρικό σώμα (Lee et al., 2009).

Στην *Arabidopsis thaliana* έχει απομονωθεί μία πρωτεΐνη Katanin-like 1, η AtKSS (*Arabidopsis thaliana* Katanin-like protein small subunit) που στη δομή της υπάρχει η περιοχή AAA και το μοτίβο Walker για πρόσδεση του ATP. Στα μεσοφασικά κύτταρα η AtKSS εντοπίζεται στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα, ενώ στη μίτωση περικυκλώνει τους πόλους της ατράκτου. Ο ενδοκυτταρικός της εντοπισμός εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου, και

είναι προφανώς εξαρτημένος από την κατάτμηση των μικροσωληνίσκων, αλλά χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για να εξακριβωθεί ο ρόλος της (McClinton et al., 2001).

Στον άνθρωπο έχει μελετηθεί ο ρόλος της KL1 (Katanin-like 1). Η KL1 παρουσιάζει σημαντική αμινοξική ομοιότητα στην AAA περιοχή με την αρχέτυπη Katanin, της τάξεως του 85%. Επίσης περιέχει και τα υπόλοιπα πρωτεϊνικά μοτίβα που συναντώνται και στην Katanin, το MIT και το VPS4_C (Sonbuchner et al., 2010).

Η υπερέκφραση της KL1 σε ανθρώπινη κυτταροσειρά U2OS προκαλεί την πλήρη κατάτμηση των μικροσωληνίσκων, αποδεικνύοντας την ιδιότητα της KL1 ως ενζύμου κατάτμησης. Πειράματα ανοσοφθορισμού κατέδειξαν την παρουσία της KL1 στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, με διαφορετικό όμως εντοπισμό σε σχέση με την αρχέτυπη Katanin. Ενώ η Katanin εκτείνεται από τα κεντροσωμάτια ως τους πόλους της ατράκτου, η KL1 είναι απύσα από τα κεντροσωμάτια και εντοπίζεται μόνο στους πόλους. Ο εντοπισμός αυτός είναι ορατός μόνο στη φυσιολογική παρουσία μικροσωληνίσκων. Η αποσιώπηση της KL1 είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φαινοτύπων με ανωμαλίες στη δομή της μιτωτικής ατράκτου και τον διπλασιασμό των μιτωτικών κυττάρων, ένδειξη καθυστέρησης στην ολοκλήρωση της μίτωσης. Οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου εμφανίζονταν πιο επιμηκυμένοι, με μικρότερη όμως πυκνότητα, ενώ η αυξήθηκε η ένταση και η επιφάνεια του εντοπισμού της γ-τουμπουλίνης, κέντρου πυρήνωσης των μικροσωληνίσκων (Εικόνα 1.8). Δεν βρέθηκε καμιά συσχέτιση της KL1 με τη κίνηση των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση Α, ενώ η απουσία συνεντοπισμού και ο αποκλεισμός της αλληλεπίδρασης με την p80 καταδεικνύουν ότι δεν χρειάζεται τη ρυθμιστική υπομονάδα p80 για τη δράση της (Sonbuchner et al., 2010).

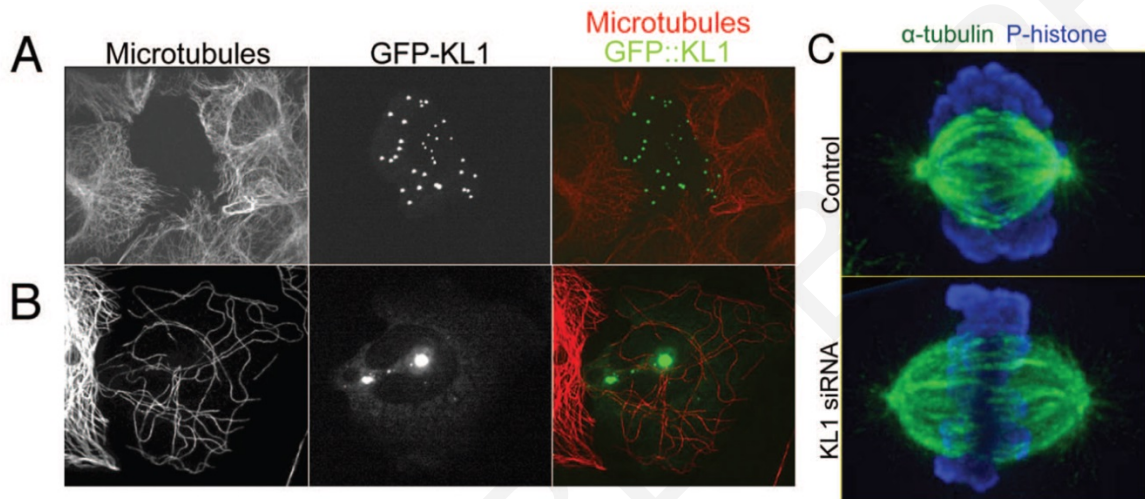
Από αυτά τα δεδομένα προκύπτει ότι η KL1 εργάζεται για την αύξηση της πυκνότητας των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου. Συγκεκριμένα κατατρέπει τους μεγαλύτερους μικροσωληνίσκους που διαπερνούν τους πόλους της ατράκτους, σε μικρότερους οι οποίοι θα αποτελέσουν τους «πυρήνες» για τη δημιουργία νέων μεγάλων μικροσωληνίσκων. Η απώλεια της δράσης της επηρεάζει τη φυσιολογική ισορροπία των κινητήριων δυνάμεων που καθορίζουν το μήκος της μιτωτικής ατράκτου (Sonbuchner et al., 2010).

Εικόνα 1.8: Πειράματα υπερέκφρασης και αποσιώπησης της KL1 σε ανθρώπινη κυτταροσειρά U2OS.

A. Παρατηρείται ολικός αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων 24 ώρες μετά την επιμόλυνση με GFP-KL1

B. Παρατηρείται μερικός αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων 15 ώρες μετά την επιμόλυνση με GFP-KL1.

C. Η αποσιώπηση της KL1 προκαλεί αύξηση του μήκους της ατράκτου και μείωση της πυκνότητας των μικροσωληνίσκων που την αποτελούν (Sonbuchner et al., 2010).



1.2.3.3.2 Πρωτεΐνες τύπου Katanin-like 2

Οι πρωτεΐνες τύπου Katanin-like 2, δεν έχουν μελετηθεί καθόλου σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία. Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί την πρώτη απόπειρα διερεύνησης του ρόλου αυτής της κατηγορίας πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι πρωτεϊνικές ισομορφές Katanin-like 2 στον ποντικό. Ο λόγος για τη μελέτη των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών ισομορφών ήταν η ταυτοποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των Katanin-like 2 και των πρωτεϊνών Nubp1 και Nubp2 στο ερευνητικό μας εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου από τις Χριστίνα Καμηλάρη και Δρα Άντρη Χριστοδούλου (Καμηλάρη, 2010). Εκτός αυτού του δεδομένου, στο εργαστήριο μας βρέθηκε από πειράματα της Μαρίας Χριστοφόρου, ότι η υπερέκφραση των Katanin-like 2 προκαλεί μείωση στην εμφάνιση πρωτογενών βλεφαρίδων, ίσως λόγω κατάτμησης των μικροσωληνίσκων του αξονήματος, εμπλέκοντας για πρώτη φορά πρωτεΐνες Katanin-like 2 στη βλεφαριδογένεση (Χριστοφόρου, 2014).

1.3 Πρωτεΐνες Nubp1 και Nubp2

Οι Nubp1 και Nubp2 είναι πρωτεΐνες που ανήκουν στην υποοικογένεια MRP/MinD των P-loop NTPάσεων. Αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, όπως και η κάθε μια ξεχωριστά με την πρωτεΐνη κινητήρα KIFC5A, και εμπλέκονται όλες μαζί στη ρύθμιση του διπλασιασμού του κεντροσωματίου στα κύτταρα θηλαστικών.

Οι Nubp1 και Nubp2 παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα με την πρωτεΐνη των προκαρυωτικών οργανισμών MinD (Christodoulou et al., 2006). Η MinD είναι αναγκαία για τον σωστό καθορισμό του σημείου κυτταρικής διαίρεσης στα βακτήρια (de Boer et al., 1991). Στον ζυμομύκητα οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν σαν σύμπλοκο και εμπλέκονται στη σύνθεση των σιδηροθειούχων πρωτεϊνών (Netz et al., 2007). Την ίδια λειτουργία σύνθεσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών διατηρούν και στον άνθρωπο, στον οποίο παίζει επίσης ρόλο στην ομοίωση του σιδήρου, μιας και συμμετέχει στην ωρίμανση της πρωτεΐνης IRP1 που ρυθμίζει τον μεταβολισμό του σιδήρου (Stehling et al., 2008).

Οι Nubp1 και Nubp2 εντοπίζονται στον πυρήνα σε μεσοφασικά κύτταρα, ενώ κατά τη μίτωση η Nubp1 συγκεντρώνεται στα κεντροσωμάτια κατά την πρόφαση και την προμετάφαση, ενώ στις υπόλοιπες μιτωτικές φάσεις εκτείνεται και στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου, σε αντίθεση με τη Nubp2 που παραμένει καθόλη τη διάρκεια της μίτωσης στα κεντροσωμάτια (Christodoulou et al., 2006, Kyprī et al., 2014). Σε κυτταροσειρές από ποντικό, η αποσιώπηση της Nubp1 ή η διπλή αποσιώπηση των Nubp1 και Nubp2 οδηγούν στην εμφάνιση σημαντικού ποσοστού κυττάρων με υπεράριθμα κεντροσωμάτια, τα οποία με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα την παρουσία πολυπολικών μιτωτικών ατράκτων. Παρόμοιος φαινότυπος εμφανίζεται και κατά την αποσιώπηση της αλληλεπιδρώσας τους πρωτεΐνης KIFC5A (Christodoulou et al., 2006).

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα στο εργαστήριο μας επέλεξαν τις Nubp1 και Nubp2 στη βλεφαριδογένεση. Συγκεκριμένα πρόκειται για θεμελιώδεις πρωτεΐνες των κεντριδίων, οι οποίες συναντώνται στα βασικά σωμάτια τόσο των αισθητικών όσο και των κινητήριων βλεφαρίδων. Η αποσιώπηση της Nubp1 προκαλεί την αύξηση των βλεφαρίδων στους αισθητήριους νευρώνες του *C. elegans*. Παρομοίως, στην κυτταροσειρά NIH 3T3 από ποντικό, η μεταγραφική αποσιώπηση είτε της Nubp1 είτε της Nubp2 αυξάνει σημαντικά το ποσοστό των βλεφαριδοφόρων κυττάρων. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της βλεφαριδογένεσης (Kyprī et al., 2014). Οι Nubp1 και Nubp2 αλληλεπιδρούν μαζί με το σύμπλοκο των CCT/TRiC chaperons, αποτελώντας ίσως συμπράγοντες για τις συγκεκριμένες chaperones στη διαδικασία της τελικής αναδίπλωσης διαφόρων πρωτεϊνών. Ο συνεντοπισμός, οι κοινές λειτουργίες και οι κοινές αλληλεπιδράσεις των Nubp1 και Nubp2 αφήνουν να νοηθεί ότι οι δύο πρωτεΐνες δρουν μαζί ως σύμπλοκο (Kyprī et al., 2014).

1.4 Κεντρίδια

Τα κεντρίδια είναι ενδοκυτταρικές κυλινδρικές δομές, που συναντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εκτός από τα ανώτερα φυτά και τους μύκητες. Η δομή των κεντριδίων στηρίζεται στους μικροσωληνίσκους · συγκεκριμένα αποτελούνται από εννιά τριπλέτες μικροσωληνίσκων, διατεταγμένες σε ακτινωτή συμμετρία (πρόσφατη ανασκόπηση από Marshall, 2009).

Είναι απαραίτητα για το σχηματισμό των κεντροσωματίων, των βλεφαρίδων και των μαστιγίων. Πιο αναλυτικά, τα κεντρίδια σχηματίζουν τα βασικά σωμάτια, που είναι αναγκαία για τη δόμηση των βλεφαρίδων και των μαστιγίων. Επίσης, ένα ζεύγος κεντριδίων βρίσκεται εντός του περικεντριδιακού χώρου, ως βασικά συστατικά του κεντροσωματίου, του κέντρου οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC) στο κύτταρο. Στα διαιρούμενα κύτταρα, τα κεντρίδια διπλασιάζονται μία φορά ανά κυτταρικό κύκλο, ενώ σε συγκεκριμένα εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να σχηματιστούν εκατοντάδες βασικά σωμάτια ταυτόχρονα (Εικόνα 1.9) (πρόσφατη ανασκόπηση από Nigg and Raff, 2009).

Για να κατασκευαστεί ένα πλήρως λειτουργικό κεντρίδιο χρειάζονται δύο κυτταρικοί κύκλοι, το οποίο στη συνέχεια θα κληθεί να σχηματίσει ένα κεντροσωμάτιο ή και μια βλεφαρίδα ή μαστίγιο. Στον πρώτο κυτταρικό κύκλο, η δημιουργία του κεντριδίου ξεκινά κατά τη φάση S, με το σχηματισμό του προκεντριδίου. Στο κέντρο του προκεντριδίου, βρίσκεται ένα κεντρικό σωληνάριο το οποίο περιστοιχίζεται από εννιά τριπλέτες μικροσωληνίσκων σε ακτινωτή συμμετρία. Στις φάσεις G2, M και G1 που ακολουθούν το κεντρίδιο επιμηκύνεται, χωρίς να έχει καταστεί ακόμη λειτουργικό. Καθώς εισέρχεται στον δεύτερο κυτταρικό κύκλο το κεντρίδιο αρχίζει να αποκτά χαρακτηριστικά ώριμου κεντριδίου. Στη δεύτερη S φάση θα αποτελέσει την πλατφόρμα, για το σχηματισμό ενός προκεντριδίου. Στη δεύτερη G2, το ανώριμο ακόμη κεντρίδιο (μαζί με το προκεντρίδιο) θα αυξήσει τον περικεντριδιακό του χώρο, θα ξεκινήσει την πυρήνωση αστρικών μικροσωληνίσκων και θα ξεκινήσει να δρα ως ανεξάρτητο κεντροσωμάτιο. Στην G1 φάση, το ώριμο πλέον κεντρίδιο θα αποκτήσει τις περιφερειακές αποφύσεις (distal appendages) που το βοηθούν να αγκυροβολήσει στην πλασματική μεμβράνη, από όπου μπορεί να αποτελέσει την πλατφόρμα για τη σύνθεση του αξονήματος των βλεφαρίδων (πρόσφατη ανασκόπηση από Avidor-Reiss and Gopalakrishnan, 2013).

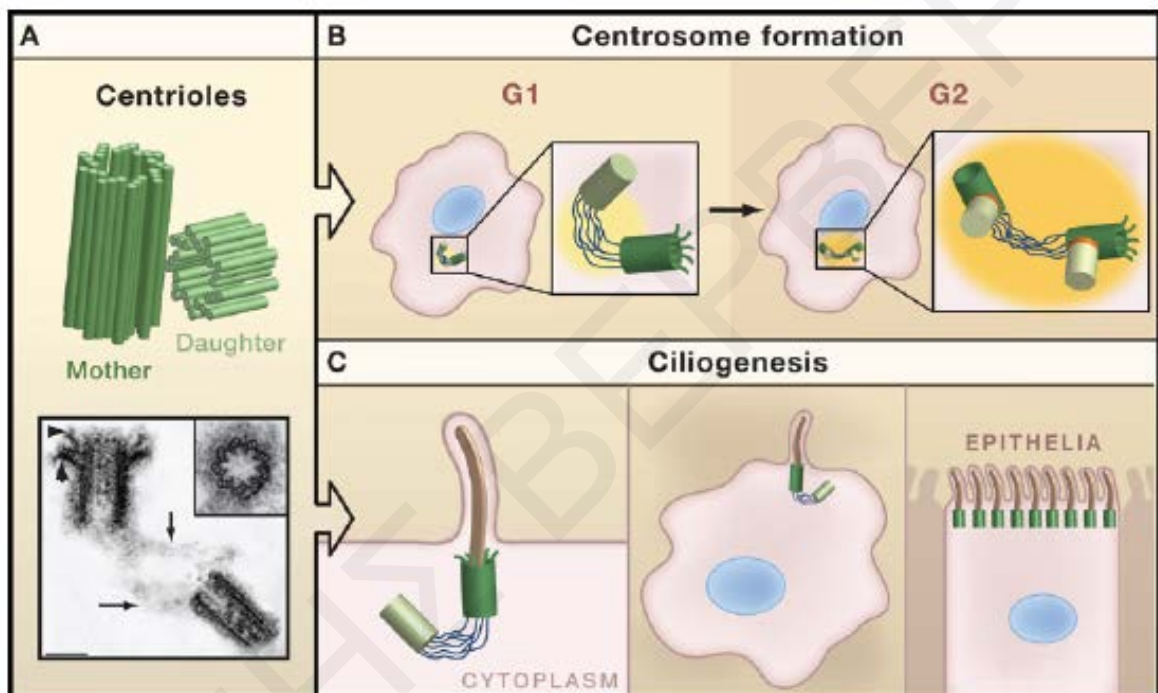
Ανωμαλίες στη βιογένεση και στη λειτουργία των κεντριδίων, σχετίζονται με πληθώρα ανθρωπίνων ασθενειών, όπως τις βλεφαριδοπάθειες (ciliopathies), διάφορα νοσήματα του εγκεφάλου, καρκίνο κλπ (πρόσφατη ανασκόπηση από Nigg and Stearns, 2011).

Εικόνα 1.9: Τα κεντρίδια σχηματίζουν τα κεντροσωμάτια και τις βλεφαρίδες.

A. Σχηματική αναπαράσταση ζεύγους κεντρίδιων και φωτογραφία τους με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (HM). Στην HM το παλιότερο, μητρικό κεντρίδιο ξεχωρίζει λόγω των περιφερειακών αποφύσεων που διαθέτει.

B. Σε διαιρούμενα κύτταρα, τα κεντρίδια μαζί με τον περικεντριδιακό χώρο (κίτρινο χρώμα), ο οποίος αυξάνεται κατά τη μεσόφαση, θα αποτελέσουν τα κεντροσωμάτια.

C. Σε μη διαιρούμενα κύτταρα, τα κεντρίδια μεταναστεύουν στην πλασματική μεμβράνη, και μια βλεφαρίδα (καφέ χρώμα) συγκροτείται από τη μητρικό κεντρίδιο. Σε συγκεκριμένα επιθηλιακά κύτταρα, πολλά κεντρίδια δημιουργούνται ταυτόχρονα, οδηγώντας στην ανάπτυξη πολλών βλεφαρίδων από ένα κύτταρο (πρόσφατη ανασκόπηση από Nigg and Raff, 2009).



1.4.1 Κεντροσωμάτια

Τα κεντροσωμάτια είναι τα κύρια κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC) στο κύτταρο. Καθορίζουν τη διάταξη των μικροσωληνίσκων καθόλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, επηρεάζοντας το κυτταρικό σχήμα, την κυτταρική πολικότητα και κινητικότητα, όπως επίσης και τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου, τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και την κυτταρική διαίρεση. Αποτελούνται από δύο κεντρίδια και τον πλούσιο σε πρωτεϊνικά μόρια, περικεντριδιακό χώρο (PCM). Μερικές από τις πρωτεΐνες του PCM εμπλέκονται άμεσα στην πυρήνωση των μικροσωληνίσκων, όπως το σύμπλεγμα δακτυλίου της γ-τουμπουλίνης και η pericentrin (πρόσφατες ανασκοπήσεις από Nigg et al., 2014, Vitre and Cleveland, 2012).

Η κύρια λειτουργία των κεντροσωματίων είναι κατά τη μίτωση, στον σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα. Όπως και τα χρωμοσώματα, έτσι και τα δύο κεντροσωμάτια του μητρικού κυττάρου θα διαχωριστούν κατά την κυτταρική διαίρεση, με

αποτέλεσμα κάθε θυγατρικό κύτταρο που θα προκύψει θα έχει ένα κεντροσωμάτιο. Με τη βοήθεια ενός αυστηρού μηχανισμού ελέγχου, το κεντροσωμάτιο θα διπλασιαστεί μόνο μια φορά, κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, και τα δύο πλέον κεντροσωμάτια θα πυρηνώσουν μικροσωληνίσκους, σχηματίζοντας τους δύο πόλους της ατράκτου κατά την επόμενη μίτωση (Εικόνα 1.10) (πρόσφατη ανασκόπηση από Vitre and Cleveland, 2012).

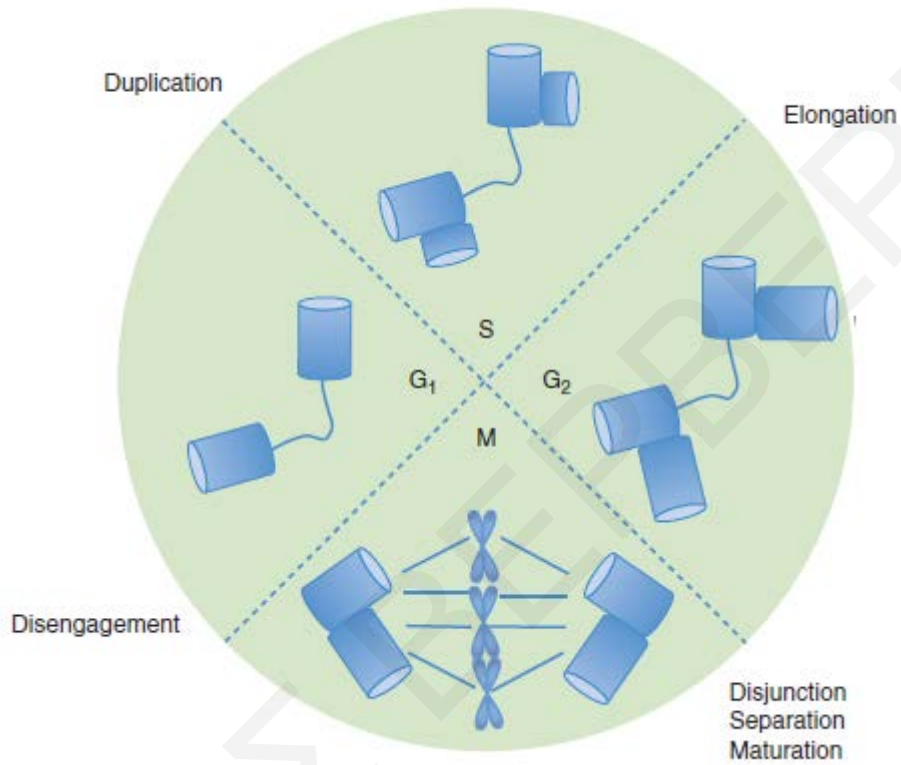
Ανωμαλίες στην έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη βιογένεση των κεντροσωματίων, μπορεί να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία των εν λόγω οργανιδίων ή σε μη φυσιολογικό αριθμό τους εντός του κυττάρου λόγω σφαλμάτων στον έλεγχο διπλασιασμού τους, με συνέπειες τη λαθεμένη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου, τον εσφαλμένο διαχωρισμό του γενετικού υλικού και τη γενετική ανισορροπία (πρόσφατη ανασκόπηση από Vitre and Cleveland, 2012).

Η γενετική ανισορροπία είναι μαζί με τις μεταλλάξεις οι κύριες αιτίες καρκινογένεσης. Σε αρκετούς τύπους καρκινικών κυττάρων εμφανίζονται κεντροσωμάτια τα οποία είναι υπεράριθμα ή έχουν διάφορες δομικές ανωμαλίες. Η παρουσία υπεράριθμων κεντροσωματίων οφείλεται είτε στον υπερδιπλασιασμό τους, είτε σε αποτυχία κυτταρικής διαίρεσης. Δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί αν αυτό αποτελεί αιτία καρκινογένεσης, επειδή έχει διαφανεί ότι κύτταρα με πολυπολικές ατράκτους σπάνια διαιρούνται πολυπολικά, και όταν το κάνουν τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν πολύ δύσκολα επιβιώνουν. Από την άλλη, αρκετά κύτταρα με υπεράριθμα κεντροσωμάτια χρησιμοποιούν μηχανισμούς δημιουργίας της ατράκτου, μέσω των οποίων παρατηρείται απενεργοποίηση ή ομαδοποίηση των υπεράριθμων κεντροσωματίων σε δύο, ώστε να προχωρήσει κανονικά η δημιουργία διπολικής ατράκτου, και να επιβιώσουν (Εικόνα 1.11). Αυτοί οι μηχανισμοί αποτελούν συχνές αιτίες λανθασμένου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων και γενετικής ανισορροπίας. Οι δομικές ανωμαλίες των κεντροσωματίων, που συνήθως οφείλονται σε μη φυσιολογική ρύθμιση της έκφρασης ή της μεταμεταφραστικής τροποποίησης των κεντροσωματικών πρωτεϊνών, δεν έχουν ακόμη μελετηθεί εκτενώς για το ρόλο τους στην καρκινογένεση. Είναι πιθανό όμως, αναλόγως της πρωτεΐνης που απορρυθμίζεται, να αυξηθεί ή να μειωθεί ο βαθμός πυρήνωσης των μικροσωληνίσκων, με αποτέλεσμα να επηρεαστούν το σχήμα, η κυτταρική κινητικότητα και πολικότητα, ώστε να υποβοηθηθεί τυχόν μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (πρόσφατη ανασκόπηση από Nigg et al., 2014).

Επίσης, τα κεντροσωμάτια φαίνεται να εμπλέκονται σε διάφορες νευροαναπτυξιακές διαταραχές, μιας και 10 από τα 13 γονίδια που εμπλέκονται στη μικροκεφαλία, κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κεντροσωμάτια και/ή στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου. Ακόμη, μεταλλάξεις που επηρεάζουν κάποιες κεντροσωματικές πρωτεΐνες έχουν συνδεθεί με τον νανισμό (πρόσφατη ανασκόπηση από Nigg et al., 2014).

Εικόνα 1.10: Η δομή και ο κύκλος διπλασιασμού των κεντροσωματίων.

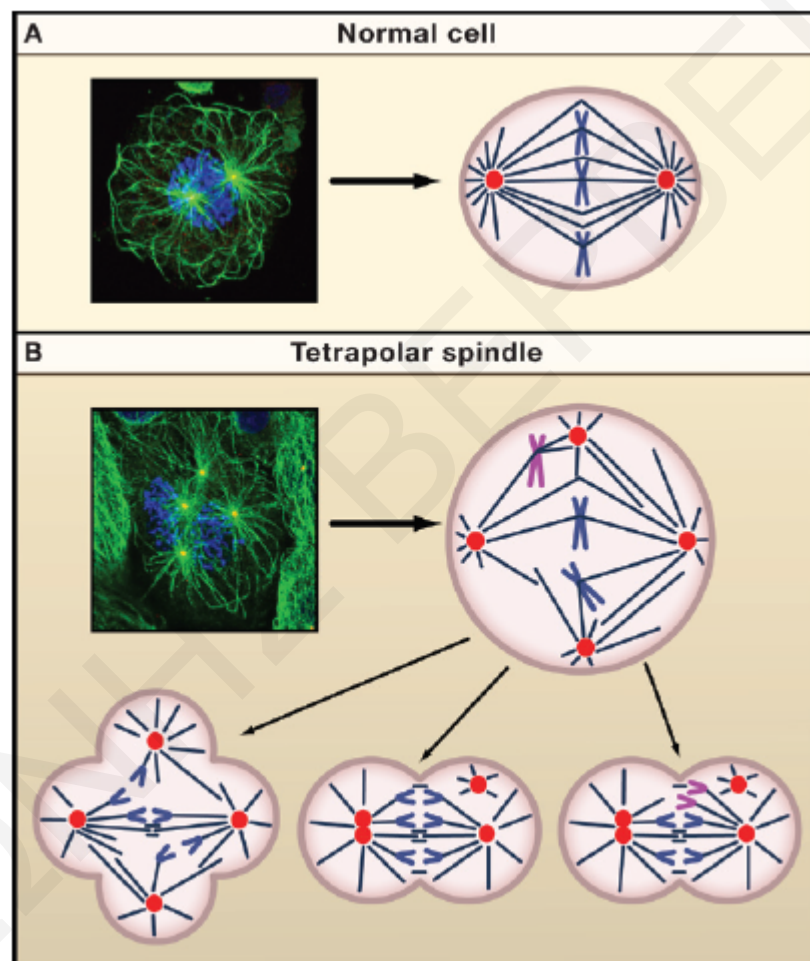
Ο διπλασιασμός των κεντροσωματίων γίνεται σε συνάρτηση με τον κυτταρικό κύκλο. Στην αρχή της μεσόφασης, στη φάση G₁, γίνεται αποχωρισμός των δύο κεντριδίων που συγκροτούν το κεντροσωμάτιο. Στη φάση S, διπλασιάζονται τα κεντριδία, τα οποία στη συνέχεια (φάση G₂) επιμηκύνονται. Στη φάση M, τα κεντροσωμάτια βρίσκονται στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, και αποτελούν κέντρα πυρήνωσης μικροσωληνίσκων (πρόσφατη ανασκόπηση από Fu et al., 2015).



Εικόνα 1.11: Υπεράριθμα κεντρίδια και χρωμοσωμική αστάθεια.

A. Μίτωση σε ένα φυσιολογικό κύτταρο με δύο κεντροσωμάτια (κόκκινο χρώμα), όπου η δημιουργία της διπολικής μιτωτικής ατράκτου εξασφαλίζει τον ίσο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων.

B. Μίτωση σε κύτταρο με τέσσερα κεντροσωμάτια, και δημιουργία τετραπολικής ατράκτου που μπορεί να οδηγήσει: i) στη δημιουργία τεσσάρων νέων κυττάρων με γενετική ανισορροπία, ii) στη δημιουργία διπολικής ατράκτου μέσω μηχανισμών που ομαδοποιούν ή απενεργοποιούν τα επιπρόσθετα κεντροσωμάτια, η οποία μπορεί να προχωρήσει κανονικά ή iii) να αποτύχει οδηγώντας σε άνισο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων ή και σε αποτυχία στην κυτοκίνηση λόγω χρωμοσωμάτων που παραμένουν στο ισημερινό επίπεδο (πρόσφατη ανασκόπηση από Nigg and Raff, 2009).



1.4.2 Κυτταρικές βλεφαρίδες

Οι βλεφαρίδες (cilia) είναι οργανίδια που προεξέχουν από την πλασματική μεμβράνη, και των οποίων η δομή τους στηρίζεται στους μικροσωληνίσκους. Είναι εξελικτικά συντηρημένα και συναντώνται σε όλους σχεδόν τους ανθρώπινους κυτταρικούς τύπους. Διακρίνονται στις κινητήριες και στις πρωτογενείς αισθητήριες βλεφαρίδες. Οι κινητήριες βλεφαρίδες συναντώνται κυρίως σε δέσμες και πάλλονται συγχρόνως για να δημιουργήσουν ροή σε υγρά μέσα σε όργανα όπως η τραχεία και οι ωαγωγοί. Οι αισθητήριες είναι ακίνητες και η κάθε μια λειτουργεί αυτόνομα,

ενώ δεν συναντώνται περισσότερες από μία σε κάθε κύτταρο που διαθέτει. Μπορούν να συλλάβουν φυσικά και βιοχημικά εξωτερικά σήματα μέσω των διαφόρων μεμβρανικών υποδοχέων που διαθέτουν, ώστε να ρυθμίσουν κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες όπως την ομοιόσταση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση (πρόσφατες ανασκοπήσεις από Kim and Dynlacht, 2013, Ishikawa and Marshall, 2011, Sung and Leroux, 2013).

Η βλεφαρίδα συναρμολογείται από ώριμα κεντρίδια τα οποία μετατρέπονται σε βασικά σωμάτια, μεταναστεύουν στην πλασματική μεμβράνη, και χρησιμεύουν στην πυρήνωση των αξονημάτων των δύο διαφορετικών ειδών βλεφαρίδων. Το βασικό σωμάτιο αποτελείται από 9 τριπλέτες μικροσωληνίσκων, ενώ το αξόνημα στις κινητικές βλεφαρίδες όπως και στα μαστίγια αποτελείται από 9 ζεύγη περιφερειακών και 2 ζεύγη κεντρικών μικροσωληνίσκων (9+2), σε αντίθεση με τις πρωτογενείς αισθητήριες βλεφαρίδες στις οποίες συγκροτείται από 9 περιφερειακά ζεύγη μόνο (9+0). Το αξόνημα περιβάλλεται από εξειδικευμένη μεμβράνη που αποτελεί συνέχεια της πλασματικής μεμβράνης (πρόσφατη ανασκόπηση από Satir et al., 2010). Οι αισθητήριες βλεφαρίδες σχηματίζονται συνήθως σε φάση κυτταρικής αδράνειας ή κατά τη φάση G0 ή G1 του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 1.12). Το βασικό σωμάτιο αποτελεί τη βάση πάνω στην οποία θα συντεθεί το αξόνημα. Η επέκταση του αξονήματος είναι αναγκαία για την επιμήκυνση της βλεφαρίδας και γίνεται στη μακρινή πλευρά προς τη μεμβράνη. Η επιμήκυνση όπως και η συντήρηση των βλεφαρίδων απαιτούν τη μεταφορά των απαραίτητων υλικών από το κυρίως σώμα του κυττάρου, μέσω των μικροσωληνίσκων του αξονήματος, με ένα σύστημα αμφίδρομης μεταφοράς γνωστό ως ενδοβλεφαριδική μεταφορά (IFT) (πρόσφατες ανασκοπήσεις από Kim and Dynlacht, 2013, Ke and Yang, 2014).

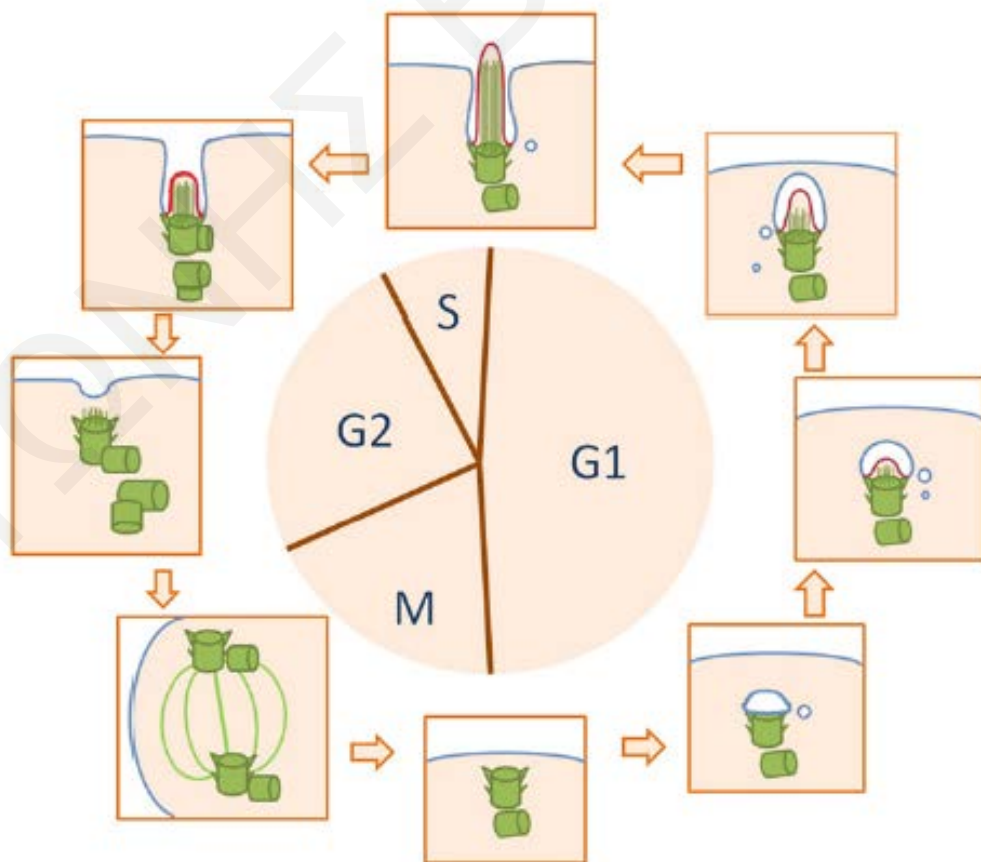
Η αποσυναρμολόγηση των αισθητήριων βλεφαρίδων γίνεται προτού το κύτταρο εισέλθει στη μίτωση, κατά τη φάση G2 (Εικόνα 1.12), μιας και οι παρουσία βλεφαρίδων δεν είναι συμβατή με τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης (πρόσφατη ανασκόπηση από Ke and Yang, 2014). Ακόμη οι βλεφαρίδες μπορεί να αποσυναρμολογηθούν κατά τη διάρκεια κυτταρικού στρες ή για να προχωρήσει η κυτταρική διαφοροποίηση (Hu et al., 2015). Το μέγεθος των βλεφαρίδων μειώνεται μέσω της μεταφοράς εντός του αξονήματος τους (intraflagellar transport, IFT), όταν ο ρυθμός της μεταφοράς από τις βλεφαρίδες προς το κυτταρικό σώμα αυξηθεί (Wang et al., 2014). Με αυτό τον τρόπο η αποσυναρμολόγηση των βλεφαρίδων γίνεται από το κορυφαίο σημείο τους. Ένας δεύτερος τρόπος που μπορεί να γίνει η αποδιοργάνωση είναι μέσω της κατάτμησης των μικροσωληνίσκων της βλεφαρίδας, στην περιοχή που βρίσκεται κοντά στο βασικό σωμάτιο (πρόσφατη ανασκόπηση από Plotnikova et al., 2009).

Ανωμαλίες στην παρουσία και τη δομή των βλεφαρίδων, καθώς και των συσχετιζόμενων τους πρωτεϊνών, προκαλούν την απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οδηγώντας σε γενετικά σύνδρομα όπως την πολυκυστική νόσο των νεφρών, το σύνδρομο Joubert, το σύνδρομο Meckel-Gruber και άλλα, που όλα μαζί συνοψίζονται στην

κατηγορία των βλεφαριδοπαθειών, οι οποίες έχουν τεράστιο εύρος κλινικών φαινοτύπων. Πρόσφατα δεδομένα κατηγοριοποιούν ακόμη και τη νόσο του Alzheimer ως βλεφαριδοπάθεια, μιας και παρουσιάζονται ανωμαλίες στις πρωτογενείς αισθητήριες βλεφαρίδες των κυττάρων των ασθενών (πρόσφατες ανασκοπήσεις από Ke and Yang, 2014, Armato et al., 2013). Επίσης οι βλεφαρίδες έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο. Συγκεκριμένα σε ποντίκια, η απώλεια των βλεφαρίδων έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση περιστατικών βασικοκυτταρικού καρκινώματος και μυελοβλαστώματος. Απώλεια των βλεφαρίδων παρατηρείται και σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους, όπως τον καρκίνο του παγκρέατος, το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, το χολαγγειοκαρκίνωμα, το μελάνωμα, τον καρκίνο των ωοθηκών και τον καρκίνο του προστάτη. Ίσως η μη εμφάνιση αυτών των οργανιδίων να προάγει την ογκογένεση σε συγκεκριμένους ιστούς (Menzl et al., 2014).

Εικόνα 1.12: Κύκλος διπλασιασμού των βλεφαρίδων.

Η βλεφαριδογένεση ξεκινά μετά τη μίτωση στη φάση G1, κατά την οποία το μητρικό ώριμο κεντρίδιο διαφοροποιείται σε βασικό σωματίο και μεταναστεύει προς την πλασματική μεμβράνη. Το βασικό σωματίο θα χρησιμεύσει ως βάση για τη σύνθεση του αξονήματος, το οποίο επιμηκύνεται μέσω του IFT. Δημιουργείται εγκόλπωση από την οποία ξεπροβάλλει η βλεφαρίδα. Στη φάση G2, η βλεφαρίδα αποσυναρμολογείται, ώστε το κύτταρο να εισέλθει στη μίτωση (πρόσφατη ανασκόπηση από Ke and Yang, 2014).



1.5 Επιστημονική υπόθεση και στόχοι της διδακτορικής εργασίας

Διενεργήθηκε σάρωση βιβλιοθήκης με τη χρήση του συστήματος δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα από την εταιρεία Hybrigenics (France), κατόπιν παραγγελίας. Μέσω αυτής διαφάνηκε ότι η ποντικίσια πρωτεΐνη Nubp1, πιθανόν να αλληλεπιδρά με μία πρωτεΐνη Katanin-like 2 που εντοπίζεται σε διάφορες ισομορφές στον ποντικό. Αυτή η αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε μέσω πειραμάτων συνεπιλογής που διεξήχθησαν από τις Χριστίνα Καμηλάρη και Άντρη Χριστοδούλου (Καμηλάρη, 2010). Επιπρόσθετα διαφάνηκε ότι η πρωτεΐνη Katanin-like 2 (KATNAL2) αλληλεπιδρά και με τη Nubp2, η οποία αλληλεπιδρά με τη Nubp1 και εμπλέκονται στη ρύθμιση του διπλασιασμού του κεντροσωματίου και στη μίτωση (Christodoulou et al., 2006). Επίσης, οι Nubp1 και Nubp2 αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της διαδικασίας της βλεφαριδογένεσης (Kyprri et al., 2014). Πρόσφατα πειράματα στο εργαστήριο μας, από τη Μαρία Χριστοφόρου, έδειξαν ότι η υπερέκφραση των KATNAL2 σε κυτταροσειρές ποντικού, προκαλεί τη μείωση της βλεφαριδογένεσης (Χριστοφόρου, 2014).

Ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά για τις πρωτεΐνες Katanin-like 2 από τη διεθνή βιβλιογραφία, σε αντίθεση με την καλά χαρακτηρισμένη αρχέτυπη Katanin, η οποία εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες όπως τη βλεφαριδογένεση και τη μίτωση, αναλόγως του ενδοκυτταρικού της εντοπισμού και του κυτταρικού τύπου που συναντάται (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012). Μια άλλη συγγενική οικογένεια είναι οι πρωτεΐνες Katanin-like 1, για τις οποίες τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί μελέτες που τις εμπλέκουν εκτός των άλλων και στη μίτωση (Sonbuchner et al., 2010). Η αλληλεπίδραση της KATNAL2 με τις Nubp1 και Nubp2, εγείρει υποψίες για πιθανή εμπλοκή της KATNAL2 στη ρύθμιση του διπλασιασμού του κεντροσωματίου και στη βλεφαριδογένεση.

Μέσω αυτής της διδακτορικής διατριβής, για πρώτη φορά επιχειρείται συστηματικός χαρακτηρισμός μιας πρωτεΐνης Katanin-like 2. Έτσι ο κύριος στόχος αυτής της εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός της λειτουργίας της πρωτεΐνης KATNAL2 στο ποντίκι, ο οποίος περιλαμβάνει:

- α) Ταυτοποίηση πρωτεϊνών τύπου KATNAL2 στο ποντίκι.
- β) Ανάλυση του τοπικού και αναπτυξιακού προτύπου έκφρασης της *Katnal2*.
- γ) Εξέταση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της υπό μελέτη πρωτεΐνης.
- δ) Εύρεση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της KATNAL2.
- ε) Αποσαφήνιση του βιολογικού της ρόλου στο κύτταρο, και συγκεκριμένα κατά τη μίτωση, τον διπλασιασμό των κεντροσωματίων, και τη βλεφαριδογένεση.

1.6 Δομή της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελείται από τα παρακάτω πέντε κεφάλαια και ένα παράρτημα.

- **Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή:** Ανασκόπηση της πρόσφατης διεθνούς βιβλιογραφίας για την παρουσίαση του θεωρητικού υπόβαθρου του αντικειμένου της διατριβής.
- **Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι:** Παρουσίαση των πειραματικών τεχνικών και πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της ερευνητικής εργασίας.
- **Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα:** Παρουσίαση, λεπτομερής ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.
- **Κεφάλαιο 4 – Συζήτηση:** Παράθεση των συμπερασμάτων που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της διατριβής, με σχολιασμό και συζήτηση στο πλαίσιο της διεθνούς βιβλιογραφίας. Κατάθεση προοπτικών για πιθανή μελλοντική επέκταση της εργασίας.
- **Κεφάλαιο 5 – Βιβλιογραφία:** Καταγραφή όλων των αναφορών που χρησιμοποιήθηκαν για την εργασία, σε αλφαβητική σειρά.
- **Παράρτημα:** Περιέχει το υποβιβλημένο άρθρο που βασίζεται στα αποτελέσματα της διδακτορικής έρευνας. Το άρθρο υποβλήθηκε στο περιοδικό *Cellular and Molecular Life Sciences* που εκδίδεται από το Springer Basel με τον εξής τίτλο:

Ververis A., Christodoulou A., Christoforou M., Kamilari C., Lederer C.W. & Santama N.
“A novel family of Katanin-like 2 protein isoforms (KATNAL2), interacting with nucleotide binding proteins Nubp1 and Nubp2, are key regulators of different MT-based processes in mammalian cells”

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

2.1.1 Στελέχη βακτηρίου *E. coli*

Τα στελέχη του βακτηρίου *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση και την έκφραση των ισομορφών KATNAL2 παρατίθενται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Στελέχη βακτηρίου *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν.

Στέλεχος βακτηρίου <i>E. coli</i>	Γονότυπος	Ενδογενής αντίσταση σε αντιβιοτικό
XL1-Blue	<i>E.coli lambda⁻ F⁻ recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F['] proAB lacI[']ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Τετρακυκλίνη
TOP10F ['] (Invitrogen)	<i>F['] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Τετρακυκλίνη
BL21(DE3)pLysS	<i>E. coli B F⁻ ompT dcm hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r]</i>	Χλωραμφαινικόλη

2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση ή την έκφραση των ισομορφών KATNAL2 σε βακτήρια ή σε ευκαρυωτικές κυτταροκαλλιέργειες, παρατίθενται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν.

Πλασμιδιακοί φορείς και κατασκευαστής	Περιγραφή	Αντιβιοτικό επιλογής	Μέγεθος (kbp)
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ			
pGEM-T Easy (Promega)	<i>lacZa</i> fragment, amp ^r	Αμπικιλίνη	3.0
pCR2.1 (Invitrogen)	<i>lacZa</i> fragment, amp ^r , kan ^r	Αμπικιλίνη, Καναμυκίνη	3.9
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ			
Πλασμίδιο έκφρασης pRSET _B (Invitrogen)	<u>6xHis επιτόπιο (αμινοτελικό)</u> , αμινοτελικό Xpress® επιτόπιο, αλληλουχία εντεροκινάσης, amp ^r	Αμπικιλίνη	2.9
ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ			
Πλασμίδιο έκφρασης pmCherry-C1 (Clontech)	<u>Κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη Cherry (αμινοτελική)</u> , kan ^r , neo ^r	Καναμυκίνη, Γενετισίνη	4.7
Πλασμίδιο έκφρασης pFlag-CMV-2 (Sigma)	<u>Επιτόπιο Flag (αμινοτελικό)</u> <u>N-terminal Met-preprotrypsin leader (PPT)</u> , amp ^r	Αμπικιλίνη	4.7
Πλασμίδιο έκφρασης pEGFP-C2 (Clontech)	<u>Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) (αμινοτελική)</u> , kan ^r , neo ^r	Καναμυκίνη	4.7

2.1.3 Θρεπτικά μέσα για τις βακτηριακές καλλιέργειες

2.1.3.1 Παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου LB για τις βακτηριακές καλλιέργειες

Υλικά:

- ddH₂O, αποστειρωμένο διπλοαπιονισμένο νερό
- Σκόνη LB Broth Base (86.2 mM NaCl, 10000 mg/L peptone, 5000 mg/L Yeast Extract) (Invitrogen 12780-052)
- Αμπικιλίνη 100 mg/ml (Sigma A9518)
- Χλωραμφαινικόλη 35 mg/ml

Μέθοδος:

1. Διαλυτοποίηση 20 g σκόνης LB Broth Base ανά λίτρο ddH₂O.
2. Ρύθμιση του pH του θρεπτικού υλικού ώστε να έχει τιμή 7.
3. Αποστείρωση του θρεπτικού υλικού σε κλίβανο αποστείρωσης.
4. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Εάν στο θρεπτικό υλικό χρειάζεται να προστεθεί το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, αυτό γίνεται ακριβώς πριν το θρεπτικό χρησιμοποιηθεί και η τελική συγκέντρωση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού θα πρέπει να είναι 100 µg/ml. Το ίδιο ισχύει και για το αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη που χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 35 µg/ml.

2.1.3.2 Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου LB για τις βακτηριακές καλλιέργειες

Υλικά:

- ddH₂O, αποστειρωμένο διπλοαποιονισμένο νερό
- Σκόνη LB Agar (86.2 mM NaCl, 10000mg/L peptone, 5000 mg/L Yeast Extract, 12000 mg/L Agar) (Invitrogen 22700-025)
- Αμπικιλίνη 100 mg/ml (Sigma A9518)
- Χλωραμφαινικόλη 35 mg/ml
- Τρυβλία 90mm (Sterilin 101VR20)

Μέθοδος:

1. Διαλυτοποίηση 32 g σκόνης LB Broth Base Agar σε 1 λίτρο ddH₂O.
2. Ρύθμιση του pH του θρεπτικού υλικού ώστε να έχει τιμή 7.
3. Αποστείρωση του θρεπτικού υλικού σε κλίβανο αποστείρωσης.
4. Επώαση του ζεστού θρεπτικού υλικού σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου η θερμοκρασία του μειωθεί στους ~50 °C. Σε αυτό το σημείο αν χρειάζεται, γίνεται προσθήκη του αντιβιοτικού αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml ή/και του αντιβιοτικού χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 35 µg/ml. Άμεση διανομή στα τρυβλία (~15 ml στο καθένα), και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη στερεοποίηση του θρεπτικού υλικού.
5. Αποθήκευση των τρυβλίων στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.1.4 Κατάψυξη βακτηριακών στελεχών

Τα βακτηριακά στελέχη διατηρούνται ως κατεψυγμένα αποθέματα (-80 °C) σε γλυκερόλη.

Υλικά:

- Υγρή βακτηριακή καλλιέργεια σε υψηλή πυκνότητα
- Αποστειρωμένη 50% (v/v) γλυκερόλη
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml

Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση σε σωλήνα erpendorf 500 μl 50% γλυκερόλης και 500 μl βακτηριακής καλλιέργειας κάτω από ασηπτικές συνθήκες.
2. Ακολουθεί ανάμειξη και αποθήκευση στους -80 °C.

2.1.5 Παρασκευή βακτηρίων δεκτικών σε μετασχηματισμό με χρήση χλωριούχου ασβεστίου

Υλικά:

- Υγρό θρεπτικό μέσο LB χωρίς αντιβιοτικά
- Τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB χωρίς αντιβιοτικά
- 0.1 M CaCl₂
- 50% (v/v) αποστειρωμένη γλυκερόλη
- XL1-blue ή BL21(DE3)pLysS δεκτικά βακτήρια
- Σωλήνες Falcon των 50 ml
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml

Μέθοδος:

1. Σε τρυβλίο με LB άγαρ γίνεται εμβολιασμός των βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν (XL1-blue ή BL21(DE3)pLysS), από κατεψυγμένα αποθέματα και αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37 °C για 16-20 hrs.
2. Επιλογή μιας μονήρους αποικίας από το τρυβλίο και μεταφορά της σε υγρή καλλιέργεια 3 ml υγρού LB. Επώαση στους 37 °C για 16-20 hrs.
3. Μεταφορά 1 ml από την καλλιέργεια και επέκταση του σε 100 ml υγρού LB, σε κωνική φιάλη του 1 L. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει την τιμή 0.4 (OD₆₀₀ = 0.4).
4. Μεταφορά της καλλιέργειας σε δυο παγωμένους σωλήνες Falcon των 50 ml και τοποθέτηση τους στον πάγο για 10 min.
5. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 4000 rpm για 10 min, στους 4 °C. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και στέγνωμα των σωλήνων με αναποδογύρισμα τους για 1 min.

6. Επαναδιασπορά των κυτταρικών ιζημάτων σε 10 ml παγωμένου 0.1 M CaCl₂ το καθένα. Επανάληψη των βημάτων 4 και 5.
7. Επαναδιασπορά των ιζημάτων σε 2 ml παγωμένου 0.1 M CaCl₂ το καθένα και ανάμειξη στον ίδιο σωλήνα.
8. Προσθήκη στα κύτταρα 2.4 ml 50% γλυκερόλης και τοποθέτηση στους 4 °C για 16-18h.
9. Διαχωρισμός των κυττάρων σε σωλήνες erpendorf 1,5 ml, σε μερίδες των 50 μl και αποθήκευση στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

2.1.6 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό βακτηρίων με διάφορα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσης ερευνητικής εργασίας.

Υλικά:

- Πλασμιδιακό DNA
- Δεκτικά βακτήρια τύπου XL1-blue ή BL21(DE3)pLysS
- Υγρό θρεπτικό υλικό LB
- LB τρυβλία με τα κατάλληλα αντιβιοτικά

Μέθοδος:

1. Ξεπάγωμα 50 μl δεκτικών βακτηρίων XL1-blue ή BL21(DE3)pLysS σε πάγο.
2. Προσθήκη στα βακτήρια 100 ng πλασμιδιακού DNA ή 2 μl του προϊόντος αντίδρασης συνένωσης (ligation). Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση.
3. Επώαση για 30 min στον πάγο.
4. Θερμικό σοκ στους 42 °C για 45-50 sec και επιστροφή του σωλήνα στον πάγο για 2 min.
5. Προσθήκη 400 μl θρεπτικού μέσου LB στον σωλήνα με τα βακτήρια, και επώαση με ανάδευση στους 37 °C για 1 hr.
6. Επίστρωση 200 μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας βακτηρίων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.
7. Επώαση του τρυβλίου στους 37 °C για 16-18 hrs. Οι κλώνοι που θα εμφανιστούν είναι αυτοί που είναι μετασχηματισμένοι με το πλασμίδιο, και εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα κατάλληλα αντιβιοτικά.
8. Ανάλυση των κλώνων με απομόνωση του πλασμιδιακού τους DNA και πέψη περιορισμού για ταυτοποίηση του cDNA που εισάχθηκε στο πλασμίδιο.

2.1.7 Κλωνοποίηση DNA με τη χρήση του pGEM-T Easy Vector System και επιλογή των κλώνων *in situ* με έλεγχο ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης

Αυτό το σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση προϊόντων της PCR. Το πλασμίδιο pGEM-T Easy έχει γραμμική διαμόρφωση με ελεύθερα 3' άκρα δεοξυθιμίνης (T). Αντίστοιχα, το προϊόν μιας PCR αντίδρασης έχει στο 3' άκρο δεοξυαδενοσίνη (A), που προκύπτει εξαιτίας της δράσης της DNA πολυμεράσης. Τα συμπληρωματικά άκρα του προϊόντος της PCR και του πλασμιδίου συνενώνονται, με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση.

Η επιλογή των κλώνων που έχουν ενσωματώσει το προϊόν PCR γίνεται εύκολα με τη διάκριση των κλώνων σε άσπρους και μπλε. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy περιέχει το γονίδιο *lac*, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Η β-γαλακτοσιδάση, της οποίας η μεταγραφή επάγεται από το IPTG, διασπά το τεχνητό υπόστρωμα X-gal που προστίθεται στο στερεό θρεπτικό υλικό με αποτέλεσμα την παραγωγή μπλε αδιάλυτου προϊόντος που αποδίδει στους κλώνους κυανό χρώμα. Η περιοχή κλωνοποίησης όπου εισάγεται το προϊόν PCR στον πλασμιδιακό φορέα είναι εντός του γονιδίου *lac*, με αποτέλεσμα τη διακοπή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του, την αναστολή της μετάφρασης της β-γαλακτοσιδάσης και επομένως την παραμονή του λευκού χρώματος στους ανασυνδυασμένους κλώνους. Συνεπώς το λευκό χρώμα είναι ένα πρακτικό κριτήριο επιλογής ειδικά των ανασυνδυασμένων κλώνων, κατά την ανάλυση μετά από βακτηριακό μετασχηματισμό.

Υλικά:

- pGEM-T Easy Vector System I (Promega A1360):
 - i. πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (50 ng/μl)
 - ii. T4 DNA λιγάση (4 ng/μl)
 - iii. 2x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης
- XL1-blue δεκτικά βακτήρια
- ddH₂O, απαλλαγμένο από νουκλεάσες
- Μικροσωλήνες για PCR των 0.2 ml
- Προϊόν PCR
- Τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει αμικικιλίνη (100 μg/ml)
- Θρεπτικό μέσο SOC (Invitrogen 15544-034)

Μέθοδος:

Αντίδραση συνένωσης για το pGEM-T Easy Vector System

1. Ετοιμασία αντίδρασης συνένωσης σε μικροσωλήνα ως εξής:

Πίνακας 2.3: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια αντίδραση συνένωσης (Promega pGEM-T Easy).

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	μέχρι τελικού όγκου 10 μl
2x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	1x
Πλασμίδιο pGEM-T Easy	50 ng
Προϊόν PCR	25 ng
T4 DNA λιγάση	4 ng

2. Ανάδευση του περιεχομένου του μικροσωλήνα με ελαφρό πιπετάρισμα και επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ο βακτηριακός μετασχηματισμός.

Βακτηριακός μετασχηματισμός για το pGEM-T Easy Vector System

1. Ξεπάγωμα στον πάγο 50 μl δεκτικών βακτηρίων XL1-blue, που ήταν αποθηκευμένα στους -80 °C.
2. Μεταφορά 2 μl αντίδρασης συνένωσης στον σωλήνα που βρίσκονται τα βακτήρια, και ελαφριά ανάδευση.
3. Επώαση στον πάγο για 20 min.
4. Θερμικό σοκ στους 42 °C για 45-50 sec και επιστροφή του σωλήνα στον πάγο για 2 min.
5. Προσθήκη 950 μl θρεπτικού μέσου SOC στον σωλήνα με τα βακτήρια, και επώαση με ανάδευση στους 37 °C για 1.5 hrs.
6. Επίστρωση 100 μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας βακτηρίων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB με αμπικιλίνη.
7. Επώαση του τρυβλίου στους 37 °C για 16-24 hrs. Οι λευκές αποικίες που θα εμφανιστούν είναι αυτές που έχουν μετασχηματιστεί επιτυχώς με το πλασμίδιο που περιέχει το προϊόν της PCR, σε αντίθεση με τις μπλε αποικίες που περιέχουν "κενό" πλασμίδιο.
8. Ανάλυση των λευκών αποικιών με απομόνωση του πλασμιδιακού τους DNA και πέψη περιορισμού για ταυτοποίηση του PCR προϊόντος που εισάχθηκε στο πλασμίδιο.

2.1.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια

2.1.8.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα από βακτήρια

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA γίνεται με δύο τρόπους. Εάν το πλασμιδιακό DNA προοριζόταν για πειράματα αλληλούχησης ή επιμόλυνσης τότε χρησιμοποιείται το πακέτο απομόνωσης της Qiagen που αναφέρεται πιο κάτω και το οποίο περιέχει ανιοανταλλακτική στήλη φυγοκέντρωσης. Αν ο σκοπός απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA ήταν διαγνωστικός, κυρίως

μέσω πειραμάτων πέψης περιορισμού, τότε χρησιμοποιείται η απλούστερη τεχνική της καταβύθισης πλασμιδιακού DNA με αιθανόλη χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Υλικά:

- Πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Qiagen 27106):
 - o Διάλυμα P1: 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A
 - o Διάλυμα P2: 200 mM NaOH, 1% SDS
 - o Διάλυμα N3: 4.2 M GuHCl, 0.9 M KAc, pH 4.8
 - o Διάλυμα PE: 10 mM Tris, pH 7.5, 80% (v/v) αιθανόλη
 - o Διάλυμα EB: 10 mM Tris-Cl, pH 8.5
 - o Στήλες φυγοκέντρησης QIAprep
- Διάλυμα P3: 3.0 M potassium acetate, pH 5.5 (Qiagen 19503)
- ddH₂O, απαλλαγμένο από νουκλεάσες
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml
- 70% (v/v) αιθανόλη
- 100% (v/v) αιθανόλη

Μέθοδος:

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη χρήση ανιοανταλλακτικής στήλης

1. Φυγοκέντρηση 1-5 ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας στις 6000 rpm για 5 min. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιασπορά του βακτηριακού ιζήματος σε 250 µl διαλύματος P1.
2. Προσθήκη 250 µl διαλύματος P2 για λύση των βακτηρίων και ανάδευση του μείγματος με ανακίνηση του σωλήνα 4-6 φορές. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
3. Προσθήκη στο σωλήνα 350 µl διαλύματος N3 για επιλεκτική διαλυτοποίηση του DNA και ανάδευση με ανακίνηση 4-6 φορές.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min, και μεταφορά του υπερκείμενου σε στήλη QIAprep.
5. Φυγοκέντρηση της στήλης στις 13000 rpm για 1 min, και απόρριψη του υπερκείμενου.
6. Έκπλυση με προσθήκη στη στήλη 750 µl διαλύματος PE και φυγοκέντρηση της στις 13000 rpm για 1 min. Απόρριψη του υπερκείμενου και επανάληψη της φυγοκέντρησης της στήλης στις 13000 rpm για 1 min για την ολική απομάκρυνση των υπολειμμάτων του διαλύματος PE.
7. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα erpendorf 1,5 ml και προσθήκη στη στήλη 50 µl διαλύματος EB για έκλυση του δεσμευμένου πλασμιδίου από την στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.

8. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Thermo Scientific Nano Drop 2000), και αποθήκευση των πλασμιδίων στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μέσω καταβύθισης με αιθανόλη

1. Φυγοκέντρηση 1.5 ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας στις 6000 rpm για 5 min. Απόρριψη του υπερκείμενου και διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 150 μl διαλύματος P1.
2. Προσθήκη 150 μl διαλύματος P2 και ανάδευση του μείγματος με ανακίνηση του σωλήνα 4-6 φορές. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
3. Προσθήκη στο σωλήνα 150 μl διαλύματος P3 και ανάδευση με ανακίνηση 4-6 φορές. Τοποθέτηση του σωλήνα στον πάγο για 10 min.
4. Φυγοκέντρηση του σωλήνα στις 13000 rpm για 15 min, στους 4°C , και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα eppendorf.
5. Προσθήκη 1000 μl 100% αιθανόλης για καταβύθιση του πλασμιδίου, και ανάδευση του μείγματος με ανακίνηση του σωλήνα. Επώαση στους -20°C για 30 min.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min, στους 4°C . Απόρριψη του υπερκείμενου.
7. Ξέπλυμα του σωλήνα με 200 μl 70% αιθανόλης για απομάκρυνση των αλάτων και στέγνωμα του στον αέρα.
8. Διαλυτοποίηση του ιζήματος που περιέχει το πλασμίδιο σε 40 μl ddH₂O.

2.1.8.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα από βακτήρια

Αυτή ή τεχνική βασίστηκε στη χρήση ανιοανταλλακτικής στήλης (Qiagen)

Υλικά:

- Πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Qiagen 12143)
 - o Διάλυμα P1: 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 μg/mL RNase A
 - o Διάλυμα P2: 200 mM NaOH, 1% SDS
 - o Διάλυμα P3: 3.0 M potassium acetate, pH 5.5
 - o Διάλυμα QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% (v/v) ισοπροπανόλη, 0.15% (v/v) Triton X-100
 - o Διάλυμα QC: 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% (v/v) ισοπροπανόλη
 - o Διάλυμα QF: 1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8.5, 15% (v/v) ισοπροπανόλη
 - o Διάλυμα TE: 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA
 - o Qiagen-tip 100 ανιοανταλλακτική στήλη
- 100 % (v/v) Ισοπροπανόλη
- 70% (v/v) Αιθανόλη
- Σωλήνες falcon 50 ml

- Σωλήνες erpendorf 1.5 ml

Μέθοδος:

1. Φυγοκέντρηση 50 ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας σε σωλήνες falcon 50 ml, στις 6000 rpm για 5 min. Απόρριψη του υπερκείμενου και διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 4 ml διαλύματος P1.
2. Προσθήκη 4 ml διαλύματος P2 και ανάδευση του μείγματος με ανακίνηση του σωλήνα 4-6 φορές. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
3. Προσθήκη στο σωλήνα 4 ml διαλύματος P3 και ανάδευση με ανακίνηση 4-6 φορές. Τοποθέτηση του σωλήνα στον πάγο για 15 min.
4. Φυγοκέντρηση του σωλήνα στις 13000 rpm για 30 min, στους 4°C, και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα falcon των 50 ml.
5. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση του υπερκείμενου στις 13000 rpm για 15 min στους 4 °C, και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα falcon.
6. Εξיסορρόπηση ανιοανταλλακτικής στήλης QIAGEN-tip 100 με 4 ml διαλύματος QBT.
7. Προσθήκη στη στήλη, του υπερκείμενου από το βήμα 5, και αφήνεται να περάσει διαμέσου της στήλης.
8. Ξέπλυμα της στήλης δυο φορές με 10 ml διαλύματος QC.
9. Ακολουθεί έκλυση του DNA με 5 ml διαλύματος QF. Λήψη του υπερκείμενου που περιέχει το DNA σε νέο σωλήνα falcon.
10. Προσθήκη στο έκλουσμα 3.5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση του στις 13000 rpm για 30 min στους 4 °C. Απόρριψη του υπερκείμενου.
11. Ξέπλυμα του πλασμιδιακού ιζήματος με 70% αιθανόλη και στέγνωμα του σωλήνα.
12. Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 600 μl διαλύματος TE σε νέο σωλήνα erpendorf 1,5 ml και αποθήκευση στους -20 °C.

2.1.9 Απομόνωση RNA

Υλικά:

- Πακέτο απομόνωσης ολικού RNA RNeasy mini kit (Qiagen 74104):
 - o Buffer RLT (διάλυμα λύσης)
 - o Buffer RW1 (διάλυμα έκπλυσης)
 - o Buffer RPE (διάλυμα έκπλυσης)
 - o Νερό απαλλαγμένο από RNάσες
 - o Στήλες καθαρισμού
 - o Σωλήνες συλλογής 1,5 ml
 - o Σωλήνες συλλογής 2 ml
- 14.3 M β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma 63689)

- Αιθανόλη 70% v/v
- Αποστειρωμένες σύριγγες 30Gx 8mm (BD Micro-Fine)
- Αποκολλητής κυττάρων (cell scraper), λαβή 18 cm (BD Falcon)
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)
- Τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (κάλυψη επιφάνειας 80 %) ή καλυπτρίδες σε τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (κάλυψη επιφάνειας 80 %)

Μέθοδος:

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο με την κυτταροκαλλιέργεια
2. Ξέπλυμα με DPBS και αφαίρεση του από το τρυβλίο
3. Προσθήκη διαλύματος RLT και μερκαπτοαιθανόλης (600 μl RLT + 6 μl μερκαπτοαιθανόλης για ολόκληρο το τρυβλίο των 10 mm ή 350 μl RLT + 3,5 μl μερκαπτοαιθανόλης για δύο καλυπτρίδες) για να λυθούν τα κύτταρα. Με τη χρήση του αποκολλητή γίνεται συλλογή των κυττάρων σε σωλήνα συλλογής 1,5 ml.
4. Αναρρόφηση και έκχυση του κυτταρικού εκχυλίσματος με τη χρήση σύριγγας. Επανάληψη του βήματος 5 φορές.
5. Προσθήκη στο εκχύλισμα ίσου όγκου 70% αιθανόλης. Ακολουθεί ανάδευση με τη χρήση πιπέτας.
6. Μεταφορά του εκχυλίσματος για δέσμευση του RNA στη στήλη καθαρισμού (μέγιστη χωρητικότητα 700 μl) η οποία είναι τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 sec στις 10000 rpm, απόρριψη του περιεχομένου του σωλήνα συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στον ίδιο σωλήνα συλλογής. Μεταφορά τυχόν εναπομένουσας ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος στην ίδια στήλη φυγοκέντρησης και επανάληψη του βήματος.
7. Προσθήκη 700 μl διαλύματος RW1 στη στήλη και φυγοκέντρηση για 15 sec στις 10000 rpm. Απόρριψη του περιεχομένου του σωλήνα συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα συλλογής.
8. Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE για έκπλυση της στήλης και φυγοκέντρηση για 15 sec στις 10000 rpm. Απόρριψη του περιεχομένου του σωλήνα συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης στον σωλήνα συλλογής.
9. Προσθήκη ξανά 500 μl διαλύματος RPE στη στήλη και φυγοκέντρηση για 2 min στις 10000 rpm. Το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής 2 ml.
10. Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 min στις 13000 rpm. Απόρριψη του περιεχομένου του σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής 1,5 ml.

11. Προσθήκη 30 μl νερού, απαλλαγμένου από RNάσες για έκλυση του δεσμευμένου RNA. Φυγοκέντρωση για 1 min στις 10000 rpm. Τοποθέτηση του σωλήνα συλλογής, που πλέον περιέχει το ολικό RNA, σε πάγο.
12. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Thermo Scientific Nano Drop 2000).
13. Απομάκρυνση του γενωμικού DNA από τα δείγματα RNA (**Μέθοδος 2.1.10**).
14. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -80 °C έως ότου να χρησιμοποιηθούν.

2.1.10 Απομάκρυνση γενωμικού DNA από δείγματα απομονωμένου RNA

Υλικά:

- Δείγμα RNA (παρασκευασθέντος όπως στο 2.1.9)
- DNάση 2 units/μl (NEB M0303S)
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης
- 0.5M EDTA (Invitrogen 15575-020)
- ddH₂O αποστειρωμένο διπλοαπιονισμένο νερό
- Σωλήνες eppendorf 1,5 ml

Μέθοδος:

1. Ετοιμασία αντίδρασης σε σωλήνα eppendorf 1,5 ml ως εξής:

Πίνακας 2.4: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια αντίδραση DNάσης.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	μέχρι τελικού όγκου 100 μl
Δείγμα RNA	10 μg
10x ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης	1x
DNάση	2 units

2. Ακολουθεί ανάδευση με πιπετάρισμα και επώαση του σωλήνα στους 37 °C για 10 min.
3. Προσθήκη 1 μl 0.5M EDTA για τερματισμό της αντίδρασης και ανάδευση με πιπετάρισμα.
4. Επώαση του σωλήνα για απενεργοποίηση της DNάσης, στους 75 °C για 10 min.
5. Αποθήκευση του RNA δείγματος στους -80 °C έως ότου να επαναχρησιμοποιηθεί

2.1.11 Παρασκευή cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής

Υλικά:

- Πακέτο αντίστροφης μεταγραφής iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad 170-8891):
 - o iScript αντίστροφη μεταγραφάση
 - o 5x iScript μείγμα αντίδρασης
 - o ddH₂O, απαλλαγμένο από νουκλεάσες
- Δείγμα RNA
- Μικροσωλήνες για PCR των 0,2 ml

Μέθοδος:

1. Ετοιμασία αντίδρασης σε μικρό σωληνάκι για PCR ως εξής:

Πίνακας 2.5: Οι τελικοί όγκοι των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά αντίδραση
ddH ₂ O	μέχρι τελικού όγκου 20 μl
Ολικό RNA	όγκος που αντιστοιχεί σε 1 μg
5x iScript μείγμα αντίδρασης	4 μl
αντίστροφη μεταγραφάση	1 μl

2. Ελαφριά ανάμειξη του μείγματος στο σωληνάκι.
3. Η αντίδραση γίνεται στην συσκευή PCR (MJ Research PTC 200 Thermal Cycler) στις εξής συνθήκες:
 - 25 °C για 5 min
 - 42 °C για 30 min
 - 85 °C για 5 min
4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης cDNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Thermo Scientific Nano Drop 2000).
5. Αραίωση των δειγμάτων με νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες σε τελική συγκέντρωση 50 ng/μl.
6. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20 °C έως ότου να χρησιμοποιηθούν.

2.1.12 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR με τη χρήση συμβατικής Taq DNA πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκε κυρίως για να πραγματοποιηθούν ημιποσοτικές αντιδράσεις για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης των ισομορφών *Katnal2*.

Υλικά:

- Πακέτο Taq DNA Polymerase (Qiagen 201205)
 - o Taq DNA πολυμεράση, 5 units/μl
 - o 10x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης
 - o 5x διάλυμα Q
 - o dNTPs, μείγμα των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων, 10 mM το καθένα
 - o ddH₂O, αποστειρωμένο διπλοαποιονισμένο νερό
- Μικροσωλήνες για PCR των 0,2 ml
- cDNA ενδιαφέροντος
- Κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (2 για κάθε αντίδραση) οι οποίοι θα ενισχύσουν την γονιδιακή περιοχή του ενδιαφέροντος

Μέθοδος:

1. Ετοιμασία αντίδρασης σε μικροσωλήνα ως εξής:

Πίνακας 2.6: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια PCR αντίδραση.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	μέχρι τελικού όγκου 50 μl
dNTPs	200 μM
ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής 1	400 nM
ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής 2	400 nM
10x ρυθμιστικό διάλυμα	1x
5x διάλυμα Q	1x
Taq DNA πολυμεράση	2,5 units
cDNA	1 μg

2. Ακολουθεί ανάδευση με πιπετάρισμα και τοποθέτηση του μικροσωλήνα στην συσκευή PCR (MJ Research PTC 200 Thermal Cycler) που είναι ρυθμισμένη στις εξής συνθήκες:
 - i. 94 °C για 3 min (Αρχική αποδιάταξη)
 - ii. 94 °C για 30 sec (Αποδιάταξη)
 - iii. 55 °C για 30 sec (Υβριδισμός: η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης, T_m των εκκινητών και συνήθως είναι 5 °C πιο χαμηλή από το T_m)
 - iv. 72 °C για 1 min (Επιμήκυνση: Αν το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι μεγαλύτερο από 1 kb τότε η διάρκεια του σταδίου της επιμήκυνσης θα είναι 1 kb / 1 min)
 - v. Τα βήματα ii ως iv επαναλαμβάνονται 29 φορές

- vi. 72 °C για 10 min (Τελική επιμήκυνση)
 - vii. 4 °C επ'άπειρον
3. Χρήση 10 μl της αντίδρασης για έλεγχο των προϊόντων, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.1.13 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με τη χρήση μείγματος DNA πολυμεράσεων υψηλής πιστότητας

Όταν η πιστότητα στην αλληλουχία του προϊόντος της PCR απαιτείται να είναι υψηλή, π.χ., χωρίς σημειακές μεταλλάξεις ή αλλαγές στο ορθό πλαίσιο ανάγνωσης, όπως σε περιπτώσεις κλωνοποίησης για έκφραση ενός cDNA ή για αλληλούχηση νέων cDNA, τότε χρησιμοποιείται μείγμα DNA πολυμεράσεων υψηλής πιστότητας. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των ισομορφών *Katnal2*.

Υλικά:

- Πακέτο Expand High Fidelity PCR System (Roche 11732641001)
 - i. Expand High Fidelity μείγμα DNA πολυμεράσεων (3,5 units/μl)
 - ii. 10x ρυθμιστικό διάλυμα των Expand πολυμεράσεων με 15 mM MgCl₂
 - iii. dNTPs, μείγμα των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων, 10 mM το καθένα
 - iv. ddH₂O, αποστειρωμένο διπλοαπιονισμένο νερό
- Μικροσωλήνες για PCR των 0,2 ml
- cDNA ενδιαφέροντος
- Κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (2 για κάθε αντίδραση) οι οποίοι θα ενισχύσουν την γονιδιακή περιοχή του ενδιαφέροντος

Μέθοδος:

1. Ετοιμασία δύο ισόποσων μειγμάτων αντιδραστηρίων για κάθε αντίδραση. Στο μείγμα 1 περιέχονται τα dNTPs, οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές καθώς και το cDNA του ενδιαφέροντος ενώ στο μείγμα 2 περιέχονται το ρυθμιστικό διάλυμα και οι Expand DNA πολυμεράσεις. Ακολουθεί ανάμειξη των δύο μειγμάτων σε ένα μικροσωλήνα με τις τελικές συγκεντρώσεις των διαφόρων αντιδραστηρίων να είναι οι εξής:

Πίνακας 2.7: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια PCR αντίδραση υψηλής πιστότητας.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	μέχρι τελικού όγκου 50 μl
dNTPs	200 μM
ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής 1	400 nM
ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής 2	400 nM
10x ρυθμιστικό διάλυμα	1x
Expand DNA πολυμεράσες	2.6 Units
cDNA	250 ng

2. Τοποθέτηση του μικροσωλήνα στην συσκευή PCR (MJ Research PTC 200 Thermal Cycler) που είναι ρυθμισμένη στις εξής συνθήκες:
 - i. 94 °C για 2 min (Αρχική αποδιάταξη)
 - ii. 94 °C για 15 sec (Αποδιάταξη)
 - iii. 55 °C για 30 sec (Υβριδισμός: η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης, T_m των εκκινητών και συνήθως είναι 5 °C πιο χαμηλή από το T_m)
 - iv. 72 °C για 1 min (Επιμήκυνση: Αν το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι μεγαλύτερο από 1,5 kb τότε η διάρκεια του σταδίου της επιμήκυνσης θα είναι 1.5 kb / 1 min)
 - v. Τα βήματα ii ως iv επαναλαμβάνονται 29 φορές
 - vi. 72 °C για 7 min (Τελική επιμήκυνση)
 - vii. 4 °C επ' άπειρον
3. Χρήση 10 μl της αντίδρασης για έλεγχο των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, και τοποθέτηση του υπόλοιπου στον πάγο για να χρησιμοποιηθεί εντός της ημέρας για κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR με το σύστημα T/A cloning (Invitrogen K4550-01) ή με το σύστημα pGEM-T easy (Promega A1360).

2.1.14 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

Για τον ακριβή ποσοτικό έλεγχο των επιπέδων mRNA των υπό μελέτη πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της συγκριτικής ανάλυσης (Comparative Ct) της Real-Time PCR. Για να μπορούν να συγκριθούν οι μετρήσεις από τα διαφορετικά δείγματα, για κάθε δείγμα μετρήθηκαν και τα επίπεδα mRNA του L19 που αποτελεί γνωστό διαχειριστικό γονίδιο με σχετικά σταθερή έκφραση, με στόχο την κανονικοποίηση των τιμών. Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο λογισμικό REST-384©, το οποίο διενεργεί Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test©, για σύγκριση της σχετικής

έκφρασης συγκεκριμένων mRNA σε διάφορες κυτταροσειρές καθώς και για τη διερεύνηση της στατιστικής σημαντικότητας του αποτελέσματος (Pfaffl et al., 2002).

Υλικά:

- Δείγματα cDNA (50 ng/μl)
- Κατάλληλοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (2 για κάθε αντίδραση)
- 2x Μείγμα για αντίδραση PCR (ABI Fast SYBR Green Master Mix, ABI 4385612)
- PCR plates με 96 πηγαδάκια (ABI 4346907)
- Ειδική διάφανη μεμβράνη (ABI 4311971)
- ddH₂O, αποστειρωμένο διπλοαπιονισμένο νερό

Μέθοδος:

1. Ετοιμασία της κάθε αντίδρασης εις τριπλούν για ελαχιστοποίηση του τυπικού σφάλματος. Σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας 96 δειγμάτων η αντίδραση έχει ως εξής:

Πίνακας 2.8: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια Real-Time PCR αντίδραση.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	μέχρι τελικού όγκου 10 μl
ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής 1	400 nM
ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής 2	400 nM
2x Μείγμα για αντίδραση PCR	1x
cDNA	100 ng

2. Κάλυψη της πλάκας με ειδική διάφανη μεμβράνη.
3. Φυγοκέντρωση της πλάκας για 1 min, στους 4 °C, στις 1000 rpm.
4. Τοποθέτηση της πλάκας στη συσκευή Real-Time PCR (Viia 7, ABI), η οποία είναι ρυθμισμένη για συγκριτική ανάλυση (Comparative Ct) στο εξής πρωτόκολλο:
 - i. 95 °C για 20 sec
 - ii. 95 °C για 1 sec
 - iii. 60 °C για 20 sec
 - iv. Τα βήματα ii έως iii επαναλαμβάνονται 39 φορές
 - v. 95 °C για 15 sec
 - vi. 60 °C για 1 min
 - vii. 95 °C για 15 sec
6. Ανάλυση αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του λογισμικού της ABI και παράλληλος έλεγχος δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.1.15 Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών για τη διάσπαση πλασμιδιακού DNA

Με τη χρήση αυτών των ενζύμων, ελέγχθηκε η παρουσία του PCR προϊόντος σε πλασμιδιακούς φορείς μετασχηματισμένων βακτηρίων.

Υλικά:

- Ένζυμο ή ένζυμα περιοριστικής ενδονουκλεάσης (New England Biolabs)
- 10x κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ενδονουκλεασών (NEB)
- 100x BSA (NEB)
- Πλασμιδιακό DNA
- ddH₂O, απαλλαγμένο από νουκλεάσες
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml

Μέθοδος:

1. Ετοιμασία αντίδρασης σε ένα σωλήνα erpendorf 1,5 ml ως εξής:

Πίνακας 2.9: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια αντίδραση πέψης περιορισμού.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	μέχρι τελικού όγκου 20 μl
Ένζυμο ή ένζυμα περιοριστικής ενδονουκλεάσης	1 unit/μg DNA το καθένα
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενδονουκλεασών	1x
Προϊόν PCR	25 ng
T4 DNA λιγάση	4 ng

2. Αφού με ανάδευση, εξασφαλιστεί η ομοιογένεια του περιεχομένου του σωλήνα, ακολουθεί επώαση στους 37 °C (ή στην κατάλληλη για το ένζυμο θερμοκρασία που υποδεικνύεται από τον κατασκευαστή) για 2 hrs.
3. Χρήση 5 μl από κάθε αντίδραση για έλεγχο της αντίδρασης, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.1.16 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση και ταυτοποίηση νουκλεϊνικών οξέων με διαφορετικό μοριακό βάρος, συγκρινόμενων με δείκτες γνωστού μοριακού βάρους.

Υλικά:

- Αγαρόζη (Nippon Genetics)
- 1x TBE ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (89 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA)
- 10 mg/ml Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- 5x Διάλυμα φορτώματος δειγμάτων
- Δείκτες μοριακού βάρους (1kb plus Invitrogen 10787-018, 100bp DNA Ladder NEB)

Μέθοδος:

1. Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης:
 - i. Διαλυτοποίηση κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης με τη βοήθεια θέρμανσης, σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE. Αναλόγως των αναγκών παρασκευή είτε 0.8% (w/v), είτε 2% (w/v) πήκτωμα αγαρόζης.
 - ii. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα αγαρόζης σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml.
 - iii. Έκχυση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί μια κτένα που θα σχηματίσει τις θέσεις φορτώματος των δειγμάτων DNA όταν το πήκτωμα στερεοποιηθεί.
 - iv. Μετά τη στερεοποίηση του πηκτώματος, ακολουθεί αφαίρεση της κτένας, και κάλυψη του πηκτώματος με ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE.
2. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας 5x διαλύματος φορτώματος στα υπό μελέτη δείγματα DNA, ώστε η τελική του συγκέντρωση στο δείγμα να είναι 1x.
3. Φόρτωση των δειγμάτων και των δεικτών μοριακού βάρους στο πήκτωμα και εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 90V.
4. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, εξέταση του πηκτώματος σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογράφιση του με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας.

2.1.17 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για την απομόνωση ενός PCR προϊόντος ή ενός πλασμιδίου από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το πακέτο απομόνωσης της Qiagen.

Υλικά:

- Δείγμα με το επιθυμητό DNA
- Πακέτο απομόνωσης DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Qiagen 28704):
 - ο Στήλη φυγοκέντρησης QIAquick Spin
 - ο Διάλυμα QG (πρόσδεσης)
 - ο Διάλυμα PE (έκπλυσης) το οποίο περιέχει αιθανόλη
 - ο Διάλυμα EB (έκλουσης)
 - ο Σωλήνες συλλογής 2 ml
- 100% (v/v) Ισοπροπανόλη
- Αποστειρωμένες λεπίδες
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml

Μέθοδος:

1. Ηλεκτροφόρηση του δείγματος στο επιθυμητό DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. (**Μέθοδος 2.1.16**)
2. Εντοπισμός του υπό μελέτη DNA στο πήκτωμα με τη χρήση πηγής υπεριώδους φωτός.
3. Προσεκτική αποκοπή του πηκτώματος αγαρόζης στην περιοχή της μπάντας DNA, με τη χρήση λεπίδας. Ζύγισμα και τοποθέτηση σε νέο σωλήνα erpendorf.
4. Προσθήκη στον σωλήνα με την μπάντα, 3 όγκων διαλύματος QG για 1 όγκο πηκτώματος αγαρόζης, ο οποίος αντιστοιχεί με το βάρος του (100 mg ~ 100 µl).
5. Επάωση στους 50 °C για 10 min έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα αγαρόζης.
6. Προσθήκη στο μείγμα 1 όγκου ισοπροπανόλης και ανάμειξη του.
7. Μεταφορά του μείγματος σε στήλη φυγοκέντρησης QIAquick Spin, η οποία είναι τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής των 2 ml. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min. Απόρριψη του υπερκείμενου.
8. Ξέπλυμα στήλης φυγοκέντρησης με 750 µl διαλύματος PE και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min. Απόρριψη του υπερκείμενου.
9. Απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος PE από την στήλη με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
10. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα erpendorf 1.5 ml και έκλυση του DNA με 50 µl διαλύματος EB. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
11. Άμεση χρήση του DNA ή αποθήκευση του στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

2.1.18 Καταβύθιση DNA με χρήση αιθανόλης

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την αύξηση της συγκέντρωσης (συμπύκνωση) του DNA των εκλουσμάτων της τεχνικής της απομόνωσης DNA από πήκτωμα αγαρόζης (βλέπε 2.1.17).

Υλικά:

- Δείγμα DNA
- Διάλυμα 3M οξικού νατρίου (sodium acetate, $C_2H_3NaO_2$)
- 100% (v/v) αιθανόλη παγωμένη (-20 °C)
- 70% (v/v) αιθανόλη παγωμένη (-20 °C)

Μέθοδος:

1. Σε σωλήνα με το DNA δείγμα γίνεται προσθήκη 3M οξικού νατρίου σε ποσότητα 1/10 του όγκου του DNA δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση με ανακίνηση του περιεχομένου του σωλήνα.
2. Προσθήκη 2.5 όγκων 100% αιθανόλης (βάσει του συνολικού όγκου του σωλήνα που συμπεριλαμβάνει το οξικό νάτριο). Ανάδευση με ανακίνηση.
3. Τοποθέτηση του σωλήνα στους -20 °C για 30 min.
4. Φυγοκέντρηση του σωλήνα στις 13000 rpm για 15 min στους 4 °C, και απόρριψη του υπερκείμενου.
5. Ξέπλυμα του σωλήνα με 1 ml 70% αιθανόλης και στέγνωμα του στον αέρα.
6. Επαναδιαλυτοποίηση του DNA στον επιθυμητό όγκο.

2.1.19 Αντίδραση συνένωσης DNA (ligation)

Η αντίδραση συνένωσης DNA χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των cDNA των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε ειδικά πλασμίδια έκφρασης, και τη δημιουργία ανασυνδυασμένων DNA μορίων με αποτέλεσμα την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών. Η συνένωση των DNA στηρίζεται στη δράση του ενζύμου T4 DNA λιγάση.

Υλικά:

- Πλασμίδιο έκφρασης και cDNA των υπό μελέτη πρωτεϊνών κομμένα με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες (**Μέθοδος 2.1.15**)
- T4 DNA λιγάση (400,000 units/ml) (NEB M0202S)
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης
- ddH₂O, απαλλαγμένο από νουκλεάσες
- Μικροσωλήνες για PCR των 0,2 ml

Μέθοδος:

1. Η αντίδραση συνένωσης γίνεται σε μικροσωλήνα ως εξής:

Πίνακας 2.10: Η τελική συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που απαιτείται για μια αντίδραση συνένωσης DNA (NEB M0202S).

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	μέχρι τελικού όγκου 10 µl
10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	1x
Πλασμίδιο έκφρασης	50 ng
cDNA υπό μελέτη πρωτεΐνης	50-150 ng
T4 DNA λιγάση	400 units

2. Το περιεχόμενο του μικροσωλήνα αναδεύεται με πιπετάρισμα και επωάζεται για 16-18 hrs στους 16 °C. Στη συνέχεια είτε ακολουθεί άμεσα ο βακτηριακός μετασχηματισμός, είτε η αντίδραση φυλάσσεται στους -20 °C.

2.1.20 Ολιγονουκλεοτίδια και κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων για έκφραση πρωτεϊνών KATNAL2

2.1.20.1 Ολιγονουκλεοτίδια

Τα ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες PCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.11.

Πίνακας 2.11: Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR αντιδράσεις.

Ολιγονουκλεοτίδια	Σκοπός
Katnal2 FW: ATG GAG CTT TCT TAC CAG ACT CTC A	Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA όλων των ισομορφών <i>Katnal2</i> .
Katnal2 RV: TAC AGA CTC AAA CTT CTC TTG CCA G	
K2Flag FW: CGC GCG GCC GCC ATG GAG CTT TCT TAC CAG ACT C	Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA των ισομορφών <i>Katnal2</i> , στο πλασμίδιο έκφρασης pFlag-CMV-2.
K2Flag RV: GCT CTA GAT TAT ACA GAC TCA AAC TTC TCT TGC CAG G	

Ολιγονουκλεοτίδια	Σκοπός
K2GFP-pRSET FW: CGC TCG AGC ATG GAG CTT TCT TAC CAG ACT CTC AAA C	Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA των ισομορφών <i>Katnal2</i> , στο πλασμίδιο έκφρασης pRSET B.
K2GFP-pRSET RV: CGG GTA CCT TAT ACA GAC TCA AAC TTC TCT TGC CAG	
KL2B FW: TGG TGA GCC GGG ACA TTT ATC	Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του cDNA όλων των ισομορφών <i>Katnal2</i> , για ημιποσοτικό έλεγχο.
KL2all RV: CAG TCC AGC TCC CAT GGC A	
Ktnl2LargeF: TAC GAG ATG AGA ACA GAA GCA CGG	Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του cDNA των μεγαλύτερων ισομορφών <i>Katnal2</i> (<i>L1</i> , <i>L2</i> , <i>L3</i>), για ημιποσοτικό έλεγχο.
Ktnl2R: CGA CTC CAG CTC ATC CAG GAA	
KL2B FW: TGG TGA GCC GGG ACA TTT ATC	Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του cDNA όλων των ισομορφών <i>Katnal2</i> , για σκοπούς Real-Time PCR.
KL2B RV: GCT TCT TTG ACT AGC TGC TTG G	
KL2L FW: CAC AAG AAG GCT ACA TGG ATG C	Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του cDNA των <i>Katnal2-L1</i> , <i>L2</i> & <i>L3</i> για σκοπούς Real-Time PCR.
KL2L RV: CCT CCA CTT CGT GAC GGT AAA T	
mCherry FW: GGA CGG CGA GTT CAT CTA CA	Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του επιτοπίου mCherry.
mCherry RV: TTG TAC AGC TCG TCC ATG CC	
mCherry FW: GGA CGG CGA GTT CAT CTA CA	Για τον έλεγχο εισαγωγής των ισομορφών <i>Katnal2</i> στο πλασμίδιο pmCherry-C1.
KL2isof RV: CGT CTG AGA GCA GTC CTC GGA	
mL19 FW: CAT CCG CAA GCC TGT GAC TG	Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του cDNA της <i>L19</i> στον ποντικό.
mL19 RV: GGC GCT TTC GTG CTT CCT TG	
PUMI_UP: TGA GGT GTG CAC CAT GAA C	Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του cDNA της <i>PUMI</i> στον ποντικό.
PUMI_DO: CAG AAT GTG CTT GCC ATA GG	

2.1.21 Κατασκευή πλασμιδίων για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

2.1.21.1 Κατασκευή 6xHis-Katnal2-S1

Η ισομορφή *Katnal2-S1* ενισχύθηκε με PCR με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών (K2GFP-pRSET FW & K2GFP-pRSET RV), οι οποίοι είχαν στα άκρα τους τις αλληλουχίες αναγνώρισης των ενδονουκλεάσων XhoI και KpnI αντίστοιχα. Το cDNA της *Katnal2-S1* κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο κλωνοποίησης pCR2.1, και ακολούθως με τη χρήση των δύο ενδονουκλεάσων έγινε κατορθωτή η ενσωμάτωση του στο πλασμίδιο έκφρασης pRSET B. Ο συγκεκριμένος φορέας κατασκευάστηκε από την Χριστίνα Καμηλάρη στα πλαίσια της μεταπτυχιακής της εργασίας (Καμηλάρη, 2010).

2.1.21.2 Κατασκευή Flag-Katnal2-L1 και Flag-Katnal2-S1

Οι ισομορφές (*Katnal2-L1* & *Katnal2-S1*) ενισχύθηκαν με PCR με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών (K2Flag FW & K2Flag RV), οι οποίοι είχαν στα άκρα τους τις αλληλουχίες αναγνώρισης των ενδονουκλεάσων NotI και XbaI αντίστοιχα. Τα cDNA των δυο *Katnal2* κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο κλωνοποίησης pCR2.1 (από την Μαρία Στέλικου στα πλαίσια της μεταπτυχιακής της εργασίας), και ακολούθως με τη χρήση των δύο ενδονουκλεάσων έγινε κατορθωτή η ενσωμάτωση των υπό μελέτη cDNA στο πλασμίδιο έκφρασης pFlag-CMV-2.

2.1.21.3 Κατασκευή pmCherry-Katnal2-L1 και pmCherry-Katnal2-S1

Τα cDNA των ισομορφών *Katnal2-L1* και *S1*, που βρίσκονταν στους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς *pFlag-Katnal2-L1* και *pFlag-Katnal2-S1*, κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο έκφρασης pmCherry-C3. Αυτό έγινε κατορθωτό με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεάσων SmaI και HindIII για την εξαγωγή των cDNA των δυο ισομορφών από το πλασμίδιο pFlag, καθώς και για την εισαγωγή τους στο πλασμίδιο pmCherry-C3. Οι συγκεκριμένοι φορείς κατασκευάστηκαν από την Μαρία Χριστοφόρου στα πλαίσια της μεταπτυχιακής της εργασίας (Χριστοφόρου, 2014).

2.2 Μέθοδοι Βιοχημείας

2.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford (Bradford, 1976)

Υλικά:

- Αντιδραστήριο Bradford Pierce Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Thermo Scientific 23238)
- κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml
- 1 mg/ml BSA σε dH₂O
- dH₂O

Μέθοδος:

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς:

1. Ετοιμασία διαλυμάτων BSA διαφόρων συγκεντρώσεων (0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml).
2. Μεταφορά 800 μl διαλύματος BSA σε κάθε κυψελίδα και προσθήκη 200 μl αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ταυτόχρονα γίνεται ετοιμασία τυφλού δείγματος, το οποίο αποτελείται από 800 μl dH₂O και 200 μl Bradford.
3. Φωτομέτρηση των δειγμάτων, με μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm.
4. Κατασκευή της καμπύλης αναφοράς $A_{595nm} = f[C]$.

Φωτομέτρηση δειγμάτων:

1. Ετοιμασία μείγματος dH₂O και του πρωτεϊνικού δείγματος που θα μετρηθεί σε τελικό όγκο 800 μl και προσθήκη 200 μl Bradford.
2. Γίνεται επώαση των δειγμάτων για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και με τη βοήθεια φωτόμετρου διενεργείται μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm.
3. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του δείγματος γίνεται βάσει της καμπύλης αναφοράς.

2.2.2 Επαγωγή έκφρασης ετερόλογης πρωτεΐνης σε βακτήρια

Για παραγωγή σχετικά μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνης ήταν απαραίτητη (πχ ώστε να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία αντισώματος), χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά συστήματα έκφρασης, δηλαδή βακτηριακά στελέχη μετασχηματισμένα με πλασμίδιο έκφρασης που έφερε το cDNA της σχετικής πρωτεΐνης. Το IPTG (ισοπροπύλ-β-D γαλακτοπυρανοσίδιο) επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης, ενεργοποιώντας τον υποκινητή του πλασμιδίου.

Υλικά:

- LB τρυβλία με φρέσκες αποικίες BL21(DE3)pLysS βακτηρίων μετασχηματισμένων με πλασμίδιο pRSET_B που φέρει το cDNA της *Katnal2-S1*
- 100 mM IPTG (Santa Cruz sc-202185A)
- Υγρό θρεπτικό υλικό LB με αμπικιλίνη (100 µg/ml) και χλωραμφαινικόλη (35 µg/ml)

Μέθοδος:

1. Μεταφορά μετασχηματισμένης αποικίας σε 2 υγρές καλλιέργειες των 10 ml LB η κάθε μια, με αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη. Επώαση υπό ανάδευση στους 37 °C για 16-18 hrs.
2. Μεταφορά κατάλληλης ποσότητας από την καλλιέργεια σε 4 κωνικές φιάλες του 1L που περιείχαν συνολικά 2 L LB με αντιβιοτικά, ώστε να επιτευχθεί αραιώση της αρχικής καλλιέργειας 1:100.
3. Επώαση υπό ανάδευση στους 37 °C έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει τιμή OD₆₀₀=0.6. Ακολούθως γίνεται προσθήκη του επαγωγέα IPTG στην καλλιέργεια σε τελική συγκέντρωση 0.05 mM.
4. Επώαση υπό ανάδευση στους 20 °C για 16-18 hrs.
5. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 6000 rpm για 20 min στους 4 °C, και απόρριψη του υπερκείμενου.
6. Αποθήκευση των βακτηριακών ιζημάτων στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

2.2.3 Βιοχημικός καθαρισμός ετερόλογης πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγενείας

Η ετερόλογη KATNAL2-S1 φέρει το επιτόπιο 6xHis. Ο καθαρισμός έγινε με την τεχνική της χρωματογραφίας συγγενείας με τη χρήση σφαιριδίων αгарόζης φερόντων συμπλέγματα νικελίου, στα οποία προσδένονται οι ιστιδίνες του επιτόπιου 6xHis. Η έκλυση της προσδεμένης πρωτεΐνης έγινε με την προσθήκη ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται την πρωτεΐνη για τα ιόντα νικελίου.

Υλικά:

- Βακτηριακό ίζημα στο οποίο έχει επαχθεί η έκφραση της ετερόλογης KATNAL2-S1
- Σφαιρίδια Ni²⁺-NTA αгарόζης (Qiagen 30210)
- Διάλυμα λύσης: 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mg/ml Λυσοζύμη
- Διάλυμα B (διαλυτοποίησης) pH 8.0: 8 M Ουρία, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 10% (v/v) γλυκερόλη, 5 mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% (v/v) Triton-X, 8 mM Ιμιδαζόλιο
- Διάλυμα C (έκπλυσης I) pH 6.3: 8 M Ουρία, 100 mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 10% (v/v) γλυκερόλη, 5 mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% (v/v) Triton-X, 20 mM Ιμιδαζόλιο

- Διάλυμα D (έκπλυσης II) pH 6.3: 8 M Ουρία, 100 mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 10% (v/v) γλυκερόλη, 5 mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% (v/v) Triton-X, 50 mM Ιμιδαζόλιο
- Διάλυμα E (έκλουσης) pH 6.3: 6 M Ουρία, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 300 mM Ιμιδαζόλιο
- 5x SDS-PAGE Sample Buffer (0.5 M Tris pH 6.8, 50% (v/v) γλυκερόλη, 10% (w/v) SDS, 5% (w/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% (w/v) Bromophenol blue)
- Σωλήνες falcon 50 ml

Μέθοδος:

1. Ξεπάγωμα και διαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος σε διάλυμα λύσης (5 ml ανά γραμμάριο ιζήματος). Επώαση υπό κυκλική ανακίνηση για 30min.
2. Μηχανική λύση των κυττάρων με 3 σετ υπερήχων.
3. Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 30 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα falcon και φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 20 min.
4. Επαναδιαλυτοποίηση των ιζημάτων από τις δυο φυγοκεντρήσεις του βήματος 3, σε νέο διάλυμα λύσης. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3 και λήψη όλων των ιζημάτων.
5. Διαλυτοποίηση των ιζημάτων στο διάλυμα B (5 ml ανά γραμμάριο ιζήματος). Επώαση υπό κυκλική ανακίνηση για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Εφαρμογή υπερήχων για την θρυμματοποίηση του γενωμικού DNA. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα falcon.
7. Βράσιμο μικρής ποσότητας του υπερκείμενου σε 5x SDS-PAGE Sample Buffer και αποθήκευση στους -20 °C. Αυτό αποτελεί το αρχικό δείγμα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (input) και θα χρησιμεύσει ως μάρτυρας της αρχικής ποσότητας της πρωτεΐνης.
8. Προσθήκη στο υπερκείμενο της κατάλληλης ποσότητας σφαιριδίων Ni²⁺-NTA αγαρόζης (1 ml σφαιριδίων ανά 4 ml υπερκείμενου). Επώαση υπό κυκλική ανακίνηση για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Μικρή ποσότητα από το υπερκείμενο βράζεται σε 5x SDS-PAGE Sample Buffer και αποθηκεύεται στους -20 °C. Αυτό το δείγμα (unbound) θα αποτελέσει δείκτη του ποσοστού πρωτεΐνης που δεν δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια νικελίου.
10. Ξέπλυμα των σφαιριδίων αρχικά με το διάλυμα C, και στη συνέχεια με το διάλυμα D. Τα ξεπλύματα γίνονται για 10 min το καθένα υπό κυκλική ανακίνηση στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται κάθε φορά με φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 min στους 4 °C.
11. Έκλυση ετερόλογης πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια με τη χρήση του διαλύματος E, με επώαση υπό κυκλική ανακίνηση για 10 min στους 4 °C. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 5 φορές, και αφού ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης του κάθε κλάσματος έκλουσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western, τα δείγματα με την μεγαλύτερη καθαρότητα για την ετερόλογη πρωτεΐνη θα αναμειχθούν και θα φυλαχθούν στους -80 °C.

2.2.4 Καθαρισμός αντισώματος με μέθοδο χημικής συγγένειας επί της μεμβράνης

Η βελτιστοποίηση της ειδικότητας του αντισώματος έναντι της KATNAL2, έγινε με καθαρισμό συγγένειας έναντι της ανασυνδυασμένης βακτηριακής πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήθηκε μια *in situ* μέθοδος με την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης KATNAL2-S1 σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, την επώαση του αντιορού στην μεμβράνη, και τέλος την έκλυση του κλάσματος του αντιορού που αναγνωρίζει ειδικά την υπό μελέτη πρωτεΐνη.

Υλικά:

- Δείγμα έκλυσης καθαρισμένης ετερόλογης πρωτεΐνης KATNAL2-S1
- Αντιορός
- Πήκτωμα ακρυλαμίδης (8%)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (διαστάσεις 9 cm x 6 cm) (Porablot NCP, Macherey-Nagel 741280)
- Διάλυμα 1x PBS pH 7.4: 13.5 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.75 mM KH₂PO₄
- 100 mM pH 2.0 γλυκίνη
- Διάλυμα κορεσμού (Blocking buffer): 5% (w/v) άπαχο γάλα Regilait σε διάλυμα PBS
- 5x SDS-PAGE Sample Buffer (0.5 M Tris pH 6.8, 50% (v/v) γλυκερόλη, 10% (w/v) SDS, 5% (w/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% (w/v) Bromophenol blue)
- Χρωστική Ponceau
- Λεπίδες

Μέθοδος:

1. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 2 mg ετερόλογης πρωτεΐνης, αφού αναμειχθεί με την κατάλληλη ποσότητα 5x SDS-PAGE Sample Buffer. **(Μέθοδος 2.2.8)**
2. Μεταφορά της πρωτεΐνης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 100V για 1 hr. **(Μέθοδος 2.2.9)**
3. Επώαση για 1 min με την χρωστική Ponceau ώστε να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές μπάντες της μεμβράνης. Μαρκάρισμα της περιοχής της μεμβράνης στην οποία εντοπίζεται η ετερόλογη πρωτεΐνη με τη χρήση μαλακού μολυβιού.
4. Επώαση υπό ανάδευση σε διάλυμα κορεσμού για 1 hr. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 min με διάλυμα PBS.
5. Επώαση της μεμβράνης υπό ανάδευση με 2 ml αντιορού υπό αραίωση 1:5 σε PBS (1 μl αραιωμένου αντιορού για κάθε 1 μg πρωτεΐνης) για 16-18 hrs σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Τρεις πλύσεις των 10 min με διάλυμα PBS.
7. Αποκοπή του τεμαχιδίου της μεμβράνης, στο οποίο βρίσκεται η ετερόλογη πρωτεΐνη, με τη χρήση λεπίδας.

8. Έκλυση των δεσμευμένων στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αντισωμάτων, με επώαση υπό ανάδευση για 10 min σε διάλυμα γλυκίνης 0.1 M, pH 2.0. Λαμβάνονται τρία διαδοχικά κλάσματα των 500 μl, και φυλάσσονται στους -20 °C.

2.2.5 Συλλογή και προετοιμασία εκχυλισμάτων από κυτταροκαλλιέργειες για ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Υλικά:

- Τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (κάλυψη επιφάνειας 80 %) ή καλυπτρίδες σε τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (κάλυψη επιφάνειας 80 %)
- 2x SDS-PAGE Sample Buffer (200 mM Tris pH 6.8, 20% (v/v) γλυκερόλη, 4% (w/v) SDS, 2% (w/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.2% (w/v) Bromophenol blue)
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml
- Εργαλείο απόξεσης κυττάρων (cell scraper)
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)

Μέθοδος:

1. Ξέπλυμα του τρυβλίου (100 mm) με DPBS, και πλήρης απομάκρυνση του. Προσθήκη στο τρυβλίο 400 μl 2x SDS-PAGE Sample buffer (σε τρυβλίο 60 mm αντιστοιχούν 250 μl και σε μια καλυπτρίδα 20 μl 2x SDS-PAGE S.B.).
2. Ακολουθεί ελαφριά ανακίνηση του τρυβλίου για να καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια του τρυβλίου με το διάλυμα SDS-PAGE S.B., και με τη βοήθεια ενός εργαλείου απόξεσης των κυττάρων αποκόλληση και πιπετάρισμα τους σε νέο σωλήνα erpendorf.
3. Με τη βοήθεια υπερήχων γίνεται λύση των κυττάρων.
4. Βράσιμο του πρωτεϊνικού δείγματος στους 95 °C για 5 min και φυγοκέντρηση του στις 13000 rpm για 10 min. Συλλογή και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf. Άμεση χρήση για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ή αποθήκευση στους -20 °C.

2.2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανάλυση και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που διαφέρουν στο μοριακό τους βάρος, σε σύγκριση με πρωτεϊνικούς δείκτες γνωστού μοριακού βάρους.

Υλικά:

- dH₂O
- Ακρυλαμίδη: Bis Acrylamide (19:1) 40% (w/v) (Biorad 161-044)
- 1.5 M Tris-Cl, pH 8.8

- 1 M Tris-Cl, pH 6.8
- 10% (w/v) APS (υπερθειϊκό αμμώνιο)
- 10% (w/v) SDS
- TEMED (N,N-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη) (Scharlau TE00500100)
- 20% (v/v) Ισοπροπανόλη
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x Running buffer) pH 8.3: 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0,1% (w/v) SDS
- Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (NEB Colorplus Prestained Protein Ladder, Broad Range 10-230 kDa)
- Πρωτεϊνικά δείγματα

Πήκτωμα διαχωρισμού 8% (running gel):

375 mM Tris-Cl (pH 8.8), 8% (w/v) Ακρυλαμίδα, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED

Πήκτωμα συσσώρευσης 5% (stacking gel):

125 mM Tris-Cl (pH 6.8), 5% (w/v) Ακρυλαμίδα, 0.25% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.125% (v/v) TEMED

Μέθοδος:

1. Συναρμολόγηση των γυάλινων πλακών (BioRad) για την παρασκευή του πηκτώματος ακρυλαμίδης.
2. Ετοιμασία του πηκτώματος διαχωρισμού και άμεση έκχυση στις πλάκες. Κάλυψη του πηκτώματος με ισοπροπανόλη, ώστε να εμποδιστεί το ατμοσφαιρικό οξυγόνο από το να αναστείλει τον πολυμερισμό του πηκτώματος.
3. Αφού ολοκληρωθεί η στερεοποίηση του πηκτώματος διαχωρισμού, ακολουθεί απόρριψη της ισοπροπανόλης, και ξέπλυμα του πηκτώματος με dH₂O.
4. Ετοιμασία του πηκτώματος συσσώρευσης και άμεση έκχυση του στις πλάκες, πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Άμεση τοποθέτηση της ειδικής κτένας που θα δημιουργήσει τις θέσεις φορτώματος των πρωτεϊνικών δειγμάτων.
5. Αφού ολοκληρωθεί η στερεοποίηση του πηκτώματος συσσώρευσης, ακολουθεί αφαίρεση της κτένας και τοποθέτηση των γυάλινων πλακών στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad) η οποία περιέχει 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
6. Ξεπάγωμα των πρωτεϊνικών δειγμάτων και των πρωτεϊνικών δεικτών γνωστού μοριακού βάρους και φόρτωμα τους στις θέσεις φορτώματος.
7. Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 100V έως ότου το μέτωπο του δείγματος φτάσει στο τέρμα του πηκτώματος διαχωρισμού.

2.2.7 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Wet Transfer)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Υλικά:

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (διαστάσεις 9 cm x 6 cm) (Porablot NCP, Macherey-Nagel 741280)
- Διηθητικά χαρτιά (διαστάσεις 10 cm x 8 cm)
- Σφουγγαράκια υγρής μεταφοράς
- Διάλυμα μεταφοράς (Blot buffer): 48 mM Tris-Cl, 39 mM Γλυκίνη, 20% (v/v) Μεθανόλη
- dH₂O
- Πήκτωμα ακρυλαμίδης στο οποίο έχουν ηλεκτροφορηθεί πρωτεϊνικά δείγματα (2.2.6)

Μέθοδος:

1. Εμποτισμός των σφουγγαριών και των διηθητικών χαρτιών στο διάλυμα μεταφοράς για τουλάχιστον 10 min. Εμποτισμός της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε dH₂O για 2 min και ακολούθως σε διάλυμα μεταφοράς για τουλάχιστον 15 min. Ξέπλυμα του πηκτώματος ακρυλαμίδης σε διάλυμα μεταφοράς.
2. Τοποθέτηση διαδοχικά ενός σφουγγαριού στην μεριά της κασετίνας που βρίσκεται στον αρνητικό πόλο, ενός τεμαχίου διηθητικού χαρτιού και του πηκτώματος ακρυλαμίδης.
3. Πάνω από το πήκτωμα γίνεται τοποθέτηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης. Είναι σημαντικό να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων μεταξύ του πηκτώματος και της μεμβράνης.
4. Τοποθέτηση πάνω από τη μεμβράνη ενός διηθητικού χαρτιού, και σφουγγαριού που θα βρίσκεται στη μεριά του θετικού πόλου της συσκευής.
5. Μεταφορά της συναρμολογημένης κασετίνας στη συσκευή υγρής μεταφοράς (Biorad), η οποία είναι γεμάτη με διάλυμα μεταφοράς.
6. Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 100V για 1 hr.

2.2.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών-στόχων με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι σχεδιασμένο για να ανιχνεύει την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο με τη σειρά του αναγνωρίζει την σταθερή περιοχή (Fc) του πρωτογενούς αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP) που η δράση του μετασχηματίζει την λουμινόλη, προκαλώντας χημειοφωταύγεια η οποία είναι ανιχνεύσιμη και μετρήσιμη με το ChemiDoc MP System (Biorad).

Υλικά:

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχει ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών
- Διάλυμα 1x PBS pH 7.4: 13.5 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.75 mM KH₂PO₄
- Διάλυμα PBS/Tween-20: 1x PBS, 0.1% (v/v) Tween-20
- Διάλυμα κορεσμού (Blocking buffer): 5% (w/v) άπαχο γάλα σε σκόνη σε διάλυμα PBS/Tween-20
- Πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε Blocking buffer
- Δευτερογενές αντίσωμα αραιωμένο σε Blocking buffer
- ECL buffers:
Buffer A: 0.1 M Tris-Cl pH 8.5, 2.5 mM Luminol, 0.45 mM Coumaric Acid
Buffer B: 0.1 M Tris-Cl pH 8.5, 0.006 % (v/v) H₂O₂

Μέθοδος:

1. Αφαίρεση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, στην οποία έχουν μεταφερθεί τα πρωτεϊνικά δείγματα από το πήκτωμα ακρυλαμίδης, από τη συσκευή μεταφοράς και επώαση της υπό συνεχή ανάδευση για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου, σε Blocking buffer.
2. Ξέπλυμα της μεμβράνης σε διάλυμα PBS/Tween-20 για 10 min.
3. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, υπό συνεχή ανάδευση για 16-18 hrs στους 4 °C.
4. Ξέπλυμα της μεμβράνης 3 φορές για 10 min με διάλυμα PBS/Tween-20.
5. Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα, υπό συνεχή ανάδευση για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Ξέπλυμα της μεμβράνης 2 φορές για 20 min με διάλυμα PBS/Tween-20 και μία φορά για 10 min σε διάλυμα PBS.
7. Ανάμειξη των δύο διαλυμάτων ECL (Buffer A & Buffer B) και επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το μείγμα τους για 1min, υπό ανάδευση.
8. Τύλιγμα της μεμβράνης με διάφανο σελοφάν και εμφάνιση των σημάτων χημειοφωταύγειας προερχόμενων από τις ανοσοανιχνευθείσες πρωτεΐνες, με τη χρήση του ChemiDoc MP System (Biorad), σε συνδυασμό με το λογισμικό Image Lab.
9. Αποθήκευση των εικόνων της ανοσοαποτύπωσης σε αρχεία τύπου TIFF.

2.2.9 Ποσοτική μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε ανοσοαποτύπωση με το λογισμικό ImageJ

Για την ποσοτική μέτρηση των διαφόρων πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ 1.49n, το οποίο είναι κατάλληλο για την ποσοτικοποίηση της έντασης των διαφόρων πρωτεϊνικών μπαντών από αρχεία

τύπου TIFF. Μέσω του ImageJ είναι δυνατή η μέτρηση των εμβαδών όλων των πρωτεϊνικών μπαντών της ανοσοαποτύπωσης, χωρίς να προσμετρείται το φόντο της εικόνας, ώστε να είναι κατορθωτός ο υπολογισμός της έκφρασης των εν λόγω πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα μπορούν να μεταφερθούν στην Microsoft Excel για περαιτέρω επεξεργασία και στατιστική ανάλυση με τη χρήση του student's t-test, για την εύρεση σημαντικά στατιστικών διαφορών.

2.2.10 Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την μη ειδική χρώση των πρωτεϊνών που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Με αυτή την τεχνική ήταν δυνατή η ανίχνευση μπαντών οι οποίες περιείχαν έως και 0,1-1 μg πρωτεΐνης.

Υλικά:

- Πήκτωμα ακρυλαμίδης στο οποίο έχουν ηλεκτροφορηθεί τα υπό μελέτη δείγματα (2.2.6)
- Διάλυμα χρώσης: 50% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ, 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma B7920)
- Διάλυμα αποχρωματισμού: 7% (v/v) οξικό οξύ, 20% (v/v) μεθανόλη
- ddH₂O, αποστειρωμένο διπλοαπιονισμένο νερό

Μέθοδος:

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί μεταφορά του πηκτώματος σε ειδικό δοχείο και επώαση υπό ανάδευση για 15 min σε διάλυμα χρώσης.
2. Ξέπλυμα του πηκτώματος με ddH₂O.
3. Αποχρωματισμός του πηκτώματος για 2 hrs υπό ανάδευση σε διάλυμα αποχρωματισμού.
4. Φωτογράφιση του πηκτώματος με τη βοήθεια του ChemiDoc MP System (Biorad), σε συνδυασμό με το λογισμικό Image Lab.

2.2.11 Αποδέσμευση αντισώματος από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για επαναχρησιμοποίηση της

Μετά το τέλος της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης για επώαση με διαφορετικά αντισώματα. Για να γίνει αυτό πρέπει να αποδεσμευτούν τα σύμπλοκα των ήδη χρησιμοποιηθέντων πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος από τη μεμβράνη πριν την επώαση με νέο σετ αντισωμάτων.

Υλικά:

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης η οποία έχει ήδη επωαστεί με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα
- 0.2 M NaOH

- Διάλυμα PBS/Tween-20: 1x PBS, 0.1% (v/v) Tween-20

Μέθοδος:

1. Ξέπλυμα της μεμβράνης για 5 min με διάλυμα PBS/Tween-20.
2. Η αποδέσμευση των αντισωμάτων γίνεται με επώαση για 5 min σε διάλυμα 0.2 M NaOH.
3. Η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις φορές για 5 min η κάθε φορά με διάλυμα PBS/Tween-20.
4. Η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης (2.2.8) ξεκινά από την αρχή με επώαση σε διάλυμα κορεσμού.

2.2.12 Προετοιμασία πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ιστούς

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για την απομόνωση πρωτεϊνών από ιστούς (και πιο συγκεκριμένα τους όρχεις), για σκοπούς ανοσοκατακρήμνισης.

Υλικά:

- Όρχεις από ποντίκι
- Υάλινος χειροκίνητος ομογενοποιητής με έμβολο, χωρητικότητας 10 ml
- Υγρό άζωτο σε ειδικό δοχείο μεταφοράς
- Διάλυμα λύσης: 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton x-100, 1x Διάλυμα Αναστολέων Πρωτεάσεων Complete (Roche)
- Σωλήνες falcon 50 ml
- Σωλήνες falcon 15 ml

Μέθοδος:

1. Εξαγωγή όρχεων από ποντίκι με τη βοήθεια αποστειρωμένων λαβίδων, και τοποθέτηση τους σε σωλήνα falcon 15 ml στον πάγο για να επιβραδυνθεί η δράση των πρωτεάσεων.
2. Αμέσως μετά, τοποθέτηση των όρχεων στο δοχείο που περιέχει το υγρό άζωτο για να άμεση ψύξη. Ακολουθεί είτε αποθήκευση των δειγμάτων στους -80 °C για μελλοντική χρήση, είτε ομογενοποίηση τους για άμεση χρήση.
3. Ομογενοποίηση των όρχεων σε αποστειρωμένο χειροκίνητο ομογενοποιητή που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα παγωμένου διαλύματος λύσης (για κάθε ~5 mg ιστού απαιτούνται ~300 μl διαλύματος λύσης). Μεταφορά του ομογενοποιημένου σε νέο σωλήνα falcon των 50 ml.
4. Εφαρμογή παλμών υπερήχων στο δείγμα για να υποβοηθηθεί η λύση των κυττάρων (3x παλμοί των 10 sec με ενδιάμεσα διαλείμματα των 10 sec).
5. Επώαση του πρωτεϊνικού δείγματος στον πάγο για 30 min, και στη συνέχεια φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 20 min στους 4 °C. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα falcon.
6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος με τη μέθοδο κατά Bradford.

2.2.13 Ανοσοκατακρήμνιση

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ικανότητα του αντισώματος να δεσμεύεται ειδικά με τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζει σε συνθήκες που επιτρέπουν τη διατήρηση τυχόν συμπλεγμάτων της πρωτεΐνης αυτής με αλληλεπιδρώσες άλλες πρωτεΐνες. Αν η πρόσδεση του αντισώματος γίνει σε ήπιες συνθήκες αλατότητας και απουσία ή χαμηλή συγκέντρωση απορρυπαντικών και αποδιατακτικών παραγόντων, τότε σε αυτά τα σύμπλοκα διατηρούνται και άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζει το αντίσωμα. Στην εργασία αυτή η ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκε τόσο για να επιβεβαιωθεί η αναγνώριση των υπό μελέτη πρωτεϊνών από το σχετικό αντίσωμα (εξειδίκευση), όσο και για την διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών KATNAL2.

Υλικά:

- Πρωτεϊνικό εκχύλισμα
- Σφαιρίδια G σεφαρόζης (GE Healthcare 17-6002-35)
- Κατάλληλο αντίσωμα
- Διάλυμα ανοσοσφαιρίνων μη ανοσοποιημένου ίδιου είδους ζώου από το οποίο προέρχεται το αντίσωμα (normal goat IgG, Santa Cruz sc-2028)
- Διάλυμα 1x PBS pH7.4: 13.5 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.75 mM KH₂PO₄
- 0.2 M Sodium Borate pH 9.0
- DMP (Dimethyl Pimelimidate)
- 100 mM Γλυκίνη pH 2.0
- 250 mM Tris-Cl pH 8.0
- Διάλυμα λύσης: 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton x-100, 1x Διάλυμα Αναστολέων Πρωτεάσεων (Roche)
- 5x SDS-PAGE Sample Buffer (0.5 M Tris pH 6.8, 50% (v/v) γλυκερόλη, 10% (w/v) SDS, 5% (w/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% (w/v) Bromophenol blue)
- Σωλήνες eppendorf 1,5 ml

Μέθοδος:

1. Μεταφορά κατάλληλης ποσότητας σφαιριδίων G σεφαρόζης (~150 μl διαλύματος σφαιριδίων για 28 μg αντισώματος) σε σωλήνα eppendorf 1,5 ml. Σε δεύτερο σωλήνα γίνεται μεταφορά σφαιριδίων του ίδιου όγκου για χρήση τους για αρνητικό έλεγχο.
2. Ξέπλυμα των σφαιριδίων με PBS. Η απομάκρυνση του PBS γίνεται με φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 2 min.
3. Προσθήκη του κατάλληλου αντισώματος στον ένα σωλήνα, και προσθήκη της ίδια ποσότητας ανοσοσφαιρίνης από μη ανοσοποιημένο ζώο, στον σωλήνα του αρνητικού ελέγχου. Επώαση υπό κυκλική ανάδευση για 16-18 hrs στους 4 °C

4. Απομάκρυνση με φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 2 min, του αντισώματος και του ορού από τους αντίστοιχους σωλήνες.
5. Ξέπλυμα των σωλήνων 2 φορές με 0.2 M Sodium Borate.
6. Ακολουθεί επώαση υπό κυκλική ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου των σφαιριδίων με διάλυμα 20 mM DMP σε 0.2 M Sodium Borate. Το DMP θα καταλύσει την ομοιοπολική σύνδεση του αντισώματος με τα σφαιρίδια.
7. Ξέπλυμα των σφαιριδίων 3 φορές για 15 min με 250 mM Tris-Cl.
8. Βράσιμο μικρής ποσότητας του αρχικού εκχυλίσματος σε 5x SDS-PAGE Sample Buffer και αποθήκευση στους -20 °C. Αυτό αποτελεί το αρχικό δείγμα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (input) και θα χρησιμεύσει ως μάρτυρας της αρχικής ποσότητας της πρωτεΐνης. Διαμοιρασμός του υπόλοιπου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που θα χρησιμοποιηθεί στους δύο σωλήνες (του αντισώματος και του αρνητικού ελέγχου) σε ίσες ποσότητες. Ακολουθεί επώαση υπό κυκλική ανάδευση για 16-18 hrs στους 4 °C.
9. Μικρή ποσότητα και από τους δυο σωλήνες βράζεται σε 5x SDS-PAGE Sample Buffer και αποθηκεύεται στους -20 °C. Αυτά τα δείγματα (unbounds) θα αποτελέσουν δείκτες του ποσοστού πρωτεΐνης που δεν δεσμεύτηκε στα σύμπλοκα σφαιριδίων και αντισώματος. Απομάκρυνση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και ξέπλυμα των σφαιριδίων τρεις φορές για 10min με το διάλυμα λύσης. Ακολουθεί πλήρης απομάκρυνση όλης της ποσότητας του διαλύματος λύσης που παραμένει στα σφαιρίδια.
10. Έκλυση των πρωτεϊνών, με προσθήκη στα σφαιρίδια της κατάλληλης ποσότητας 0.1 M γλυκίνης (~75 μl γλυκίνης για κάθε 150 μl αρχικού διαλύματος σφαιριδίων που χρησιμοποιήθηκε). Ακολουθεί ανάδευση με πιπετάρισμα και μεταφορά της υπερκείμενης γλυκίνης σε νέο σωλήνα erpendorf.
11. Επανάληψη του βήματος 11 με νέα ποσότητα γλυκίνης. Μεταφορά των υπερκείμενων ποσοτήτων γλυκίνης στους αντίστοιχους σωλήνες erpendorf. Απόρριψη των σφαιριδίων.
12. Προσθήκη στα εκλούσματα της ανάλογης ποσότητας 5x SDS-PAGE και στη συνέχεια βράσιμο στους 95 °C για 5 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min, και μεταφορά των υπερκείμενων σε νέους σωλήνες erpendorf 1.5 ml.
13. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20 °C , είτε άμεση ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.

2.2.14 Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Brilliant Blue G-Colloidal

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την χρώση και αποκοπή από το πήκτωμα των πρωτεϊνικών μπαντών που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μετά από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης διότι είναι συμβατή με την περαιτέρω επεξεργασία των πρωτεϊνών για ανάλυση τους με φασματοσκοπία μάζας.

Υλικά:

- Πηκτώμα ακρυλαμίδης στο οποίο έχουν ηλεκτροφορηθεί τα υπό μελέτη δείγματα (2.2.6)
- Διάλυμα μονιμοποίησης: 7% (v/v) οξικό οξύ, 40% (v/v) μεθανόλη
- Διάλυμα χρώσης: 20% (v/v) μεθανόλη, 80% (v/v) 1x Brilliant Blue G-Colloidal (Sigma B2025)
- Διάλυμα αποχρωματισμού: 10% (v/v) οξικό οξύ, 25% (v/v) μεθανόλη
- 25% (v/v) μεθανόλη
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml
- Αποστειρωμένες λεπίδες

Μέθοδος:

5. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί μεταφορά του πηκτώματος σε ειδικό αποστειρωμένο δοχείο και επώαση υπό ανάδευση για 1 hr σε διάλυμα μονιμοποίησης.
6. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση με φρέσκο διάλυμα χρώσης για 2 hrs.
7. Αποχρωματισμός του πηκτώματος για 30 sec υπό ανάδευση σε διάλυμα αποχρωματισμού.
8. Ξέπλυμα με 25% μεθανόλη, και αποχρωματισμός με νέα ποσότητα 25% μεθανόλης υπό ανάδευση για 2 hrs.
9. Φωτογράφιση του πηκτώματος με τη βοήθεια του ChemiDoc MP System (Biorad), σε συνδυασμό με το λογισμικό Image Lab.
10. Κόψιμο των πρωτεϊνικών μπαντών του ενδιαφέροντος με τη χρήση λεπίδας μιας χρήσεως και αποθήκευση τους σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf στους -20 °C, έως ότου σταλούν για ταυτοποίηση μέσω φασματοσκοπίας μάζας.

2.3 Μέθοδοι Κυτταρικής Βιολογίας

2.3.1 Κυτταροσειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταροσειρές:

1. Ινοβλάστες τύπου NIH 3T3 (ποντικίσια)
2. Κινητικοί νευρώνες τύπου NSC 34 (ποντικίσια)
3. Νεφρικά κύτταρα τύπου IMCD 3 (ποντικίσια)
4. Sertoli κύτταρα όρχεων τύπου TM 4 (ποντικίσια)
5. Νευροβλάστες τύπου Neuro 2A (ποντικίσια)
6. Νεφρικά εμβρυονικά κύτταρα τύπου HEK 293T (ανθρώπινη)

2.3.2 Θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη των κυτταροκαλλιέργειων

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των πλήρων θρεπτικών υλικών είναι τα εξής:

- Θρεπτικό Υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) το οποίο περιέχει 25 mM γλυκόζη, 3.97 mM γλουταμίνη, χωρίς πυροσταφυλικό νάτριο (Gibco 61965-026)
- Θρεπτικό Υλικό DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) το οποίο περιέχει 17.5 mM γλυκόζη, 2.5 mM γλουταμίνη και 0.5 mM πυροσταφυλικό νάτριο (Gibco 11320-033)
- Θρεπτικό υλικό MEM Alpha (Minimum Essential Medium) το οποίο περιέχει 5.33 mM γλυκόζη, 2 mM γλουταμίνη και 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο (Gibco 22561-021)
- Βόειος Εμβρυϊκός ορός θερμικά απενεργοποιημένος (FBS, Fetal Bovine Serum) (Gibco 10082-147)
- Ορός Αλόγου θερμικά απενεργοποιημένος (HS, Horse Serum) (Gibco 26050-070)
- Μείγμα αντιβιοτικών: Πενικιλίνη (5000 units/mL) και Στρεπτομυκίνη (5000 µg/mL) (Gibco 15070-063)

Με τα πιο πάνω αντιδραστήρια ετοιμάστηκαν τα εξής θρεπτικά υλικά για την κάθε κυτταροσειρά:

NIH 3T3 & NSC 34 & HEK 293T: DMEM, 10% FBS, Πενικιλίνη (5 units/mL) και Στρεπτομυκίνη (5 µg/mL)

IMCD 3: DMEM/F-12, 10% FBS, Πενικιλίνη (5 units/mL) και Στρεπτομυκίνη (5 µg/mL)

TM 4: DMEM/F-12, 5% HS, 2,5% FBS, Πενικιλίνη (5 units/mL) και Στρεπτομυκίνη (5 µg/mL)

Neuro 2A: MEM Alpha, 10% FBS, Πενικιλίνη (5 units/mL) και Στρεπτομυκίνη (5 µg/mL)

2.3.3 Ανάκτηση κυτταροκαλλιέργειας από κατεψυγμένα αποθέματα

Υλικά:

- Κατεψυγμένα κύτταρα NIH 3T3 ή NSC 34 ή HEK293T ή IMCD 3 ή TM 4 ή Neuro 2A σε κρυσωλήνες (Nunc).
- 100 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (Sterilin DCT100)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την κάθε κυτταροσειρά (2.3.2)

Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση 7 ml πλήρους θρεπτικού υλικού κατάλληλου για την κυτταροσειρά, σε νέο τρυβλίο των 100 mm.

2. Γρήγορη επαναφορά στους 37 °C της κατεψυγμένης κυτταροκαλλιέργειας (1 ml) που βρίσκεται σε σωλήνα κρυσυντήρησης, με τη χρήση υδατόλουτρου. Επαναδιασπορά του περιεχόμενου του στο προθερμασμένο τρυβλίο.
3. Ακολουθεί επώαση σε ειδικό θάλαμο (37 °C, 5% CO₂), έως ότου τα κύτταρα καλύψουν το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου.

2.3.4 Επαναδιασπορά κυττάρων για ανακαλλιέργεια τους

Για τη διατήρηση της κυτταροκαλλιέργειας, τα κύτταρα αραιώνονταν σε συγκεκριμένη αναλογία και ανακαλλιεργούνταν. Η αναλογία αραιώσεως για τα NIH 3T3 είναι 1:8, για τα NSC 34 είναι 1:8, για τα HEK293T 1:8, για τα IMCD 3 1:10, για τα TM 4 είναι 1:10, και για τα Neuro 2A είναι 1:8.

Υλικά:

- Τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (80% κάλυψη επιφάνειας)
- 100 mm ή και 60 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (Sterilin DCT100, Sterilin DCT060)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την κάθε κυτταροσειρά (2.3.2)
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)
- 0.25% Θρυψίνη - EDTA 1x (Gibco 25200-072)

Μέθοδος:

1. Πλήρης αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας.
2. Ξέπλυμα με 8 mL DPBS στο τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας.
3. Πλήρης αφαίρεση του DPBS.
4. Προσθήκη στο τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας 1 mL 0.25% Θρυψίνης - EDTA.
5. Επώαση στους 37 °C, 5% CO₂ για περίπου 2 min ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα λόγω της δράσης της θρυψίνης
6. Προσθήκη στο τρυβλίο 7 ml (για αραιώση 1:8) ή 9 ml (για αραιώση 1:10) κατάλληλου πλήρους θρεπτικού υλικού και επαναδιασπορά των κυττάρων.
7. Προσθήκη 1 ml κυτταροκαλλιέργειας σε νέο τρυβλίο 100 mm που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση.
8. Επώαση σε ειδικό θάλαμο (37 °C, 5% CO₂), έως ότου τα κύτταρα καλύψουν το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου.

2.3.5 Κρυοδιατήρηση κυτταροκαλλιέργειας

Για να διατηρηθούν αποθέματα κυτταροκαλλιέργειων, τα κύτταρα φυλάσσονται σε θερμοκρασία $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε υγρό άζωτο, τοποθετημένα σε κατάλληλους σωλήνες κρυοσυντήρησης, στην παρουσία κρυοπροστατευτικού μέσου (DMSO).

Υλικά:

- Τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (80% κάλυψη επιφάνειας)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την κάθε κυτταροσειρά
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)
- 0.25% Θρυψίνη - EDTA 1x (Gibco 25200-072)
- Σωλήνες κρυοσυντήρησης (Nalgene Cryogenic Tubes 5000-0012)
- Κρυοψύκτης (Nalgene Cryo $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ Freezing Container)
- Σωλήνες Falcon 15 ml (Sterilin 15CTB)
- 100% (v/v) DMSO (Sigma D2650)
- Θρεπτικό μέσο κατάψυξης (95% πλήρες θρεπτικό υλικό, 5% DMSO)

Μέθοδος:

1. Πλήρης αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας.
2. Ξέπλυμα με 8 mL DPBS στο τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας.
3. Πλήρης αφαίρεση του DPBS.
4. Προσθήκη στο τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας 1 mL 0.25% Θρυψίνης - EDTA.
5. Επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 για 2 min ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα λόγω της δράσης της θρυψίνης.
6. Προσθήκη στο τρυβλίο 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού, επαναδιασπορά των κυττάρων, και συλλογή τους σε σωλήνα Falcon 15 ml.
7. Φυγοκέντρηση για 5 min στις 1000 rpm.
8. Αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και αναδιασπορά του κυτταρικού ιζήματος σε 1 ml θρεπτικού μέσου κατάψυξης, και μεταφορά του σε σωλήνα κρυοσυντήρησης.
9. Τοποθέτηση του σωλήνα σε κρυοψύκτη και μεταφορά στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
10. Την επόμενη μέρα γίνεται η αποθήκευση του σωλήνα κρυοσυντήρησης σε υγρό άζωτο.

2.3.6 Μέτρηση κυττάρων κυτταροκαλλιεργειών

Για τη μέτρηση των συνολικών κυττάρων που βρίσκονται σε μια κυτταροσειρά χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυτταρομετρητής Countess (Invitrogen).

Υλικά:

- Τρυβλίο με την υπό μελέτη κυτταροκαλλιέργεια
- Κυτταρομετρητής Countess Automated Cell Counter (Invitrogen C10277)
- Κυψέλες μέτρησης κυττάρων Countess Cell Counting Chamber Slides (Invitrogen C10228)
- Διάλυμα Trypan blue 0.4% (Invitrogen 15250-061)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την κάθε κυτταροσειρά (2.3.2)
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)
- 0.25% Θρυψίνη - EDTA 1x (Gibco 25200-072)
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml

Μέθοδος:

1. Πλήρης αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας.
2. Ξέπλυμα με DPBS στο τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας.
3. Πλήρης αφαίρεση του DPBS.
4. Προσθήκη στο τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας της κατάλληλης ποσότητας 0.25% Θρυψίνης - EDTA.
5. Επώαση στους 37 °C, 5% CO₂ για 2 min ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα λόγω της δράσης της θρυψίνης.
6. Προσθήκη στο τρυβλίο πλήρους θρεπτικού υλικού, επαναδιασπορά των κυττάρων, και συλλογή 100 μl κυττάρων σε νέο σωλήνα erpendorf 1,5 ml.
7. Προσθήκη στον σωλήνα erpendorf 100 μl διαλύματος Trypan blue 0.4% και ανάμειξη με τα κύτταρα.
8. Πιπετάρισμα 10 μl μείγματος κυττάρων – Trypan blue σε κυψέλη μέτρηση κυττάρων.
9. Τοποθέτηση της κυψέλης με το μείγμα κυττάρων στον αυτόματο καταμετρητή Countess και υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων ανά ml.

2.3.7 Κατασκευή καμπύλης ανάπτυξης κυτταροσειρών

Στις κυτταροσειρές που κρίθηκε αναγκαία η διερεύνηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων τους, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης τους. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

Υλικά:

- Τρυβλία με τις κατάλληλες κυτταροσειρές
- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την κάθε κυτταροσειρά (2.3.2)

- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)
- 0.25% Θρυψίνη - EDTA 1x (Gibco 25200-072)
- Κυτταρομετρητής Countess Automated Cell Counter (Invitrogen C10277)
- Κυψέλες μέτρησης κυττάρων Countess Cell Counting Chamber Slides (Invitrogen C10228)
- Διάλυμα Trypan blue 0.4% (Invitrogen 15250-061)
- Σωλήνες erpendorf 1,5 ml
- Πλάκα με 6 δεξαμενές (6-well plate)

Μέθοδος:

1. Μέτρηση των κυτταρικών συγκεντρώσεων των υπό μελέτη κυτταροκαλλιιεργειών (2.3.6)
2. Μεταφορά συγκεκριμένης ποσότητας κυττάρων των υπό μελέτη κυτταροσειρών σε δεξαμενές 6-well plates. Για να είναι πιο αξιόπιστα τα αποτελέσματα, μεταφέρονται κύτταρα σε τρεις δεξαμενές 6-well plate, για κάθε μέτρηση που χρειάζεται να γίνει.
3. Μέτρηση των κυτταρικών συγκεντρώσεων στις 24 hrs μετά την επαναδιασπορά, και επανάληψη της μέτρησης κάθε 24 hrs μέχρι τις 96 hrs.
4. Χρήση των αποτελεσμάτων για την απεικόνιση της καμπύλης ανάπτυξης σε διάγραμμα.

2.3.8 Επαγωγή βλεφαριδογένεσης *in vitro* με αποστέρηση ορού

Όταν κυτταροσειρές (NIH 3T3, IMCD 3 και TM 4) αφεθούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 24 ώρες, τότε οδηγούνται στη δημιουργία μονήρων πρωτογενών βλεφαρίδων. Συμβαίνει τόσο σε κύτταρα που δεν εμφανίζονται συχνά οι βλεφαρίδες (πχ NIH 3T3), όσο και αυξάνεται το ποσοστό των βλεφαριδοφόρων κυττάρων σε κυτταρικούς τύπους όπου εμφανίζονται συχνά οι βλεφαρίδες (πχ IMCD 3). Έτσι έγινε κατορθωτή η πραγματοποίηση των πειραμάτων με στόχο τη μελέτη της βλεφαριδογένεσης.

Υλικά:

- Τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (80% κάλυψη επιφάνειας)
- Θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικά, χωρίς την παρουσία ορού

Μέθοδος:

1. Αφαίρεση πλήρους θρεπτικού υλικού από την κυτταροκαλλιέργεια, και αντικατάσταση του με θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικά, χωρίς την προσθήκη ορού.
2. Επώαση σε ειδικό θάλαμο για 24 hrs στο θάλαμο επώασης (37 °C, 5% CO₂).

2.3.9 Μεταγραφική αποσιώπηση με τη χρήση shRNAs μέσω μόνιμης επιμόλυνσης με τη βοήθεια φακοϊών (lentivirus)

Για την αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σχεδιασμένα μόρια shRNA (short hairpin RNA) (Πίνακας 2.12) εισηγμένα στον ιικό πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pLKO.1, τα οποία αναγνωρίζουν και διασπών το mRNA των συγκεκριμένων πρωτεϊνών για τα οποία είναι σχεδιασμένα, μέσω του μηχανισμού της RNA παρεμβολής. Η επιμόλυνση των κυτταροκαλλιέργειων έγινε με τη χρήση φακοϊών. Ακολούθως, ο μετασηματισμένος πλασμιδιακός φορέας εκφράζεται στις επιμολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες μέσω επαγωγέα (U6) που υπάρχει σε αυτόν (Moffat et al., 2006). Η μόνιμη επιμόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε επιτεύχθηκε χάρις στην ανθεκτικότητα του φορέα pLKO.1 στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη, και τη χρήση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού για επιλογή των κλώνων που έφεραν τους φορείς pLKO.1 με τα κατάλληλα shRNA.

2.3.9.1 Παροδική επιμόλυνση της κυτταροσειράς HEK293T για την κατασκευή ιικών πλασμιδιακών φορέων

Υλικά:

- shRNA ολιγονουκλεοτίδια ειδικά σχεδιασμένα έναντι του mRNA της ποντικίσιας *Katnal2* εισηγμένα στον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (Erasmus MC TRCN0000090749, TRCN0000090751) (Πίνακας 2.12)
- shRNA ολιγονουκλεοτίδια για αρνητικό έλεγχο εισηγμένα στον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1 (Addgene plasmid #1864)
- Πλασμίδια: ENV, pMDLg/pRRE, REV, pADVANTAGE
- 150 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (BD 353025)
- Τρυβλίο με κυτταροκαλλιέργεια τύπου HEK293T (80% κάλυψη επιφάνειας)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό IMDM: IMDM (Gibco 31980030), 10% FBS, Πενικιλίνη (5 units/mL) και Στρεπτομυκίνη (5 µg/mL)
- 2.5 M CaCl₂ (αποστειρωμένο με φίλτρο 0.22 µm)
- 0.1X TE διάλυμα: 1 mM Tris (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (pH 8.0) (αποστειρωμένο με φίλτρο 0.22 µm)
- 2X HBS: 281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.12 (αποστειρωμένο με φίλτρο 0.22 µm)
- 1 mM Na Butyrate

Μέθοδος:

1. (t = -24 hrs) Διασπορά και επώαση σε τρυβλίο διαμέτρου 15cm, 9 x 10⁶ κυττάρων HEK293T σε 20 ml τελικό όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού IMDM.

2. (t = 2 hrs) Αλλαγή θρεπτικού υλικού με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό IMDM (22 ml τελικός όγκος).
3. (t = 0 hrs) Ετοιμασία του μείγματος πλασμιδίων για κάθε τρυβλίο σε τελικό όγκο 1125 μl 0.1X TE/dH₂O (2:1):
 - i. Πλασμίδιο ENV, 9 μg
 - ii. Πλασμίδιο pMDLg/pRRE, 12.5 μg
 - iii. Πλασμίδιο REV, 6.25 μg
 - iv. Πλασμίδιο pADVANTAGE, 15 μg
 - v. Πλασμίδιο pLKO.1 στο οποίο έχει εισαχθεί η κατάλληλη shRNA αλληλουχία, 32 μg
4. Στο μείγμα πλασμιδίων προστίθενται 125 μl 2.5 M CaCl₂. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προσθήκη σταγόνας-σταγόνας 1250 μl διαλύματος 2X HBS, στα 1250 μl διαλύματος DNA-TE-CaCl₂ ενόσω γίνεται ανάμειξη με τη χρήση vortex. Μόλις ολοκληρωθεί η ανάμειξη των δύο διαλυμάτων, το μείγμα τους προστίθεται άμεσα στο τρυβλίο με τα HEK293T.
6. Επώαση των κυττάρων για 12-14 hrs, και αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό IMDM, το οποίο περιέχει επιπρόσθετα 1 mM Na Butyrate (16 ml ανά τρυβλίο).
7. (t = 30 hrs) Συλλογή του θρεπτικού υλικού της κυτταροκαλλιέργειας, το οποίο θα πρέπει να περιέχει τον ιό με το πλασμίδιο pLKO.1, φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 5 min, συλλογή του υπερκείμενου και φιλτράρισμα με τη χρήση φίλτρων 0.22 μm.

Πίνακας 2.12: Τα ολιγονουκλεοτίδια shRNA που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα μεταγραφικής αποσιώπησης.

Κωδικός shRNA	Αλληλουχία στόχευσης	Ισομορφές <i>Katnal2</i>
	ολιγονουκλεοτιδίου shRNA	
TRCN0000090749	CGGGACATTTATCTCCATAAT	<i>L1, L2, L3, S1, S2</i>
TRCN0000090751	CTTCGGATGAAGACGGAGTTA	<i>L1, L2, L3, S1, S2</i>

2.3.9.2 Διερεύνηση κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικού πουρομυκίνης για την κυτταροσειρά NIH 3T3

Το πλασμίδιο pLKO.1 φέρει την αλληλουχία για ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη. Επειδή η μεταγραφική αποσιώπηση αποφασίστηκε να γίνει στα κύτταρα NIH 3T3, έπρεπε να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση πουρομυκίνης για αυτή την κυτταροσειρά, ώστε να γίνει επιλογή των κυττάρων που επιτυχώς έχουν δεχτεί και εκφράσει το πλασμίδιο pLKO.1. Η

κατάλληλη συγκέντρωση είναι η μικρότερη στην οποία όλα τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα πεθαίνουν εντός 24 ωρών.

Υλικά:

- Αντιβιοτικό πουρομυκίνη (Sigma P8833)
- Τρυβλίο με την κυτταροσειρά NIH 3T3
- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την κυτταροσειρά NIH 3T3
- Πλάκα με 6 δεξαμενές (6-well plate)

Μέθοδος:

1. Επαναδιασπορά ίσων ποσοτήτων κυττάρων NIH 3T3, σε δεξαμενές 6-well plate, οι οποίες περιέχουν πλήρες θρεπτικό υλικό με πουρομυκίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.5 - 10 µg/ml).
2. Επώαση για 24 hrs στο θάλαμο επώασης (37 °C, 5% CO₂).
3. Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων. Επιλέγεται η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία όλα τα κύτταρα NIH 3T3 έχουν απολέσει την βιωσιμότητα τους.

2.3.9.3 Εισαγωγή αλληλουχίας ολιγονουκλεοτιδίου shRNA σε κύτταρα NIH 3T3 μέσω μόνιμης επιμόλυνσης με τη χρήση φακοϊών (lentivirus)

Υλικά:

- Ιός με το πλασμίδιο pLKO.1 το οποίο περιέχει την κατάλληλη αλληλουχία shRNA (2.3.9.1)
- Κυτταροσειρά NIH 3T3
- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την κυτταροσειρά NIH 3T3 (2.3.2)
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)
- Πλάκα με 24 δεξαμενές (24-well plate)
- Polybrene (800 µg/ml)
- Αντιβιοτικό πουρομυκίνη (Sigma P8833)

Μέθοδος:

1. Επαναδιασπορά σε δεξαμενή 24-well plate που περιέχει 900 µl πλήρους θρεπτικού υλικού, 2×10^5 κυττάρων NIH 3T3.
2. Προσθήκη 100 µl ιού.
3. Προσθήκη 10 µl polybrene (800 µg/ml) ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 8 µg/ml.
4. Επώαση για 24 hrs στο θάλαμο επώασης (37 °C, 5% CO₂).
5. Πλύσιμο με 1 ml DPBS και προσθήκη 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού για NIH 3T3.
6. Επώαση για άλλες 24 hrs στο θάλαμο επώασης (37 °C, 5% CO₂).

7. Πλύσιμο με 1 ml DPBS και προσθήκη 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού για NIH 3T3 το οποίο περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση πουρομυκίνης (**2.3.9.2**).
8. Επώαση στο θάλαμο επώασης (37 °C, 5% CO₂).
9. Εξέταση των κυττάρων σε καθημερινή βάση, και επαναδιασπορά τους όποτε είναι απαραίτητο. Πάντοτε το θρεπτικό υλικό που θα χρησιμοποιείται θα πρέπει να περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση πουρομυκίνης, ώστε να επιλεγθούν τα κύτταρα που μετασχημάτισαν επιτυχώς το πλασμίδιο pLKO.1.
10. Σταδιακή μεταφορά της κυτταροσειράς σε μεγαλύτερης χωρητικότητας plate και τρυβλία.

2.3.9.4 Επιλογή κλώνου με την μέγιστη μεταγραφική αποσιώπηση των υπό μελέτη πρωτεϊνών

Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι της κυτταρικής σειράς NIH 3T3, που επιμολύνθηκε με το πλασμίδιο pLKO.1, το οποίο φέρει την κατάλληλη αλληλουχία shRNA, παρουσιάζουν ετερογένεια όσον αφορά τον βαθμό της επιτυγχανόμενης μεταγραφικής αποσιώπησης. Συνεπώς, έγινε απομόνωση μεμονωμένων κλώνων από την επιμολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια, και μετά από σάρωση για ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της KATNAL2 επιλέχθηκε ο κλώνος με τη μέγιστη μεταγραφική αποσιώπηση, για τη διεξαγωγή περαιτέρω πειραμάτων.

Υλικά:

- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την κυτταροσειρά NIH 3T3 (**2.3.2**) με την κατάλληλη συγκέντρωση πουρομυκίνης (Sigma P8833)
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)
- 0.25% Θρυψίνη - EDTA 1x (Gibco 25200-072)
- 100 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (Sterilin DCT060)
- Πολυκλωνική επιμολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια NIH 3T3 με το πλασμίδιο pLKO.1 που φέρει το επιθυμητό ολιγονουκλεοτίδιο shRNA (**2.3.9.3**)
- Πλάκα με 96 δεξαμενές (96-well plate)

Μέθοδος:

1. Επαναδιασπορά 7 ml πλήρους θρεπτικού υλικού με την κατάλληλη συγκέντρωση πουρομυκίνης, πολυκλωνικής επιμολυσμένης κυτταροσειράς σε τρυβλία των 100 mm, σε συγκέντρωση 10 κύτταρα ανά ml θρεπτικού υλικού. Έτσι κάθε τρυβλίο θα περιέχει περίπου 70 διαμοιρασμένα ξεχωριστά κύτταρα.
2. Έλεγχος τρυβλίων κάθε 24 hrs για την παρατήρηση της προόδου ανάπτυξης αποικιών από τα κύτταρα, έως τη μέρα που οι αποικίες γίνονται ορατές με τη χρήση μικροσκοπίου.
3. Ξέπλυμα με DPBS, και επώαση με 0.05% Θρυψίνη - EDTA (αραιωμένη με DPBS).

4. Αναρρόφηση των ξεχωριστών αποικιών κάτω από μικροσκόπιο με τη χρήση πιπέτας και μεταφορά τους για καλλιέργεια σε ξεχωριστές δεξαμενές 96-well plate.
5. Σταδιακή μεταφορά των αποικιών σε μεγαλύτερης χωρητικότητας plate και τρυβλία. Στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας διατηρείται η πουρομυκίνη, ώστε να μην απολέσει η αποικία το πλασμίδιο με την αλληλουχία shRNA.
6. Ανάλυση της αποσιώπησης με Real-Time RT-PCR (2.1.14) και της πρωτεϊνικής έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, και χρήση της αποικίας με τη μεγαλύτερη μεταγραφική αποσιώπηση της υπό μελέτη πρωτεΐνης σε διάφορες πειραματικές διαδικασίες.

2.3.10 Εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κυτταροσειρές μέσω παροδικής επιμόλυνσης με λιποφεκταμίνη

Υλικά:

- Πλασμίδια ενδιαφέροντος
- Θρεπτικό υλικό Opti-MEM (Gibco 51985-026)
- Λιποφεκταμίνη 2000 (Invitrogen 11668-019)
- Τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (80 % κάλυψη επιφάνειας)
- 100 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (Sterilin DCT060)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό
- Θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με ορό, χωρίς αντιβιοτικά
- Αποστειρωμένες καλυπτρίδες

Μέθοδος:

1. ($t=-24$ hrs) 24 hrs πριν την επιμόλυνση γίνεται συλλογή των κυττάρων της κυτταροσειράς (80 % κάλυψη επιφάνειας) που θα χρησιμοποιηθεί και επαναδιασπορά τους σε δύο νέα τρυβλία των 100 mm που περιέχουν από 6 ml θρεπτικού υλικού με ορό αλλά χωρίς αντιβιοτικά καθώς και 6 αποστειρωμένες καλυπτρίδες, με τέτοια αραιώση έτσι ώστε την ώρα της επιμόλυνσης την επόμενη μέρα τα κύτταρα να καλύπτουν περίπου το 90-95 % της επιφάνειας των τρυβλίων.
2. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών στους 37 °C, 5 % CO₂ για 24 hrs.
3. ($t=0$ hrs) Σε τέσσερις σωλήνες τύπου eppendorf 1,5 ml προστίθενται στον καθένα 1500 μl Opti-MEM. Στους δύο προστίθενται 20 μl λιποφεκταμίνη και στους άλλους δύο 24 μg πλασμιδιακού DNA (στον ένα το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA και στον άλλο ο κενός πλασμιδιακός φορέας για αρνητικό έλεγχο). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Μεταφορά του περιεχομένου του σωλήνα με την λιποφεκταμίνη στο σωλήνα με το πλασμιδιακό DNA. Αυτό ισχύει και για το άλλο ζεύγος. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προσθήκη στάγδην του κάθε μείγματος DNA-λιποφεκταμίνης στο αντίστοιχο τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας. Ελαφριά ανάδευση και μεταφορά των τρυβλίων στο θάλαμο επώασης (37 °C, 5 % CO₂) για 6h.
6. Αφαίρεση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού από τα τρυβλία των κυτταροκαλλιέργειων και προσθήκη στο καθένα 7 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
7. (t=24 hrs) 24 hrs μετά την επιμόλυνση γίνεται συγκομιδή των έξι καλυπτρίδων από τα 2 τρυβλία. Δύο καλυπτρίδες θα χρησιμοποιηθούν για απομόνωση RNA, τέσσερις για ανοσοφθορισμό, και το υπόλοιπο κυτταρικό υλικό θα συλλεχθεί για ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.3.11 Αναστολή μεταγραφής σε κυτταροκαλλιέργειες

Το αντιβιοτικό ακτινομυκίνη D σε συγκέντρωση 1 μg/ml αναστέλλει τη δράση των RNA πολυμερασών I, II και III (Olson, 2011), ενώ σε συγκέντρωση 0,04 μg/ml αναστέλλει ειδικά τη δράση της RNA πολυμεράσης I (Lindell, 1976). Το DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) αναστέλλει ειδικά τη δράση της RNA πολυμεράσης II (Stoimenov et al., 2011).

Υλικά:

- Ακτινομυκίνη D (Santa Cruz, sc-200906)
- DRB (Santa Cruz, sc-200581)
- 100% (v/v) DMSO (Sigma D2650)
- 60 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (Sterilin DCT060)
- Τρυβλίο με την κατάλληλη κυτταροκαλλιέργεια (80 % κάλυψη επιφάνειας)
- Πλήρες θρεπτικό υλικό
- Αποστειρωμένες καλυπτρίδες

Μέθοδος:

1. (t=-24 hrs) 24 hrs πριν την επώαση με τους μεταγραφικούς αναστολείς, γίνεται συλλογή των κυττάρων της κυτταροσειράς (80 % κάλυψη επιφάνειας) που θα χρησιμοποιηθεί και μεταφορά τους σε έξι νέα τρυβλία των 60 mm που το καθένα περιέχει 4 ml πλήρους θρεπτικού υλικού καθώς και 6 αποστειρωμένες καλυπτρίδες, με τέτοια αραιώση έτσι ώστε την ώρα της επώασης την επόμενη μέρα τα κύτταρα να καλύπτουν περίπου το 70-80 % της επιφάνειας των τρυβλίων.

2. (t=0 hrs) Ετοιμασία των πλήρων θρεπτικών υλικών που θα χρησιμοποιηθούν. Στο πρώτο τρυβλίο γίνεται εισαγωγή πλήρους θρεπτικού υλικού με 1 µg/ml ακτινομυκίνη D διαλυμένη σε 10 µl DMSO, στο δεύτερο πλήρες θρεπτικό υλικό με 0,04 µg/ml ακτινομυκίνη D διαλυμένη σε 10 µl DMSO, στο τρίτο πλήρες θρεπτικό υλικό με 50 µg/ml DRB διαλυμένο σε 10 µl DMSO, και στα υπόλοιπα τρία τρυβλία (αρνητικού ελέγχου) πλήρες θρεπτικό υλικό με 10 µl DMSO μόνο. Ακολουθεί επώαση για 3 hrs στο θάλαμο επώασης (37 °C, 5 % CO₂).
3. (t=3 hrs) Γίνεται συγκομιδή των καλυπτρίδων από τα έξι τρυβλία, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για πειράματα ανοσοφθορισμού.

2.3.12 Ανοσοφθορισμός

Για την εφαρμογή της μεθόδου τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες σε τρυβλία με κυτταροσειρές, των οποίων τα κύτταρα τους, αφού μονιμοποιήθηκαν και επώαστηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα, παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.3.12.1 Μέθοδοι μονιμοποίησης για ανοσοφθορισμό

Προτού επωαστούν τα κύτταρα με τα αντισώματα για σκοπούς ανοσοφθορισμού, θα πρέπει πρώτα να μονιμοποιηθούν και να διαπερατοποιηθούν, για να μπορέσουν τα αντισώματα να εισχωρήσουν στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Αυτή η διαδικασία μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές.

2.3.12.1.1 Μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΐδη

Σε αυτή την μέθοδο η μονιμοποίηση γίνεται με τη χρήση παραφορμαλδεΐδης και η διαπερατοποίηση με τη χρήση του απορρυπαντικού Triton-X. Υπάρχουν δυο διαφορετικοί τρόποι που μπορεί να γίνει αυτή η διαδικασία, αναλόγως του αν προηγείται η μονιμοποίηση (Μέθοδος Α') ή η διαπερατοποίηση (Μέθοδος Β'). Το κριτήριο επιλογής ήταν η βέλτιστη λειτουργία των αντισωμάτων σε κάθε περίπτωση.

Υλικά:

- Τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας με καλυπτρίδες (80% κάλυψη επιφάνειας)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PHEM pH 6.9: 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂
- Διάλυμα μονιμοποίησης: 4% (w/v) παραφορμαλδεΐδη σε ρυθμιστικό διάλυμα PHEM
- Διάλυμα διαπερατοποίησης: 0.5% (v/v) Triton-X σε ρυθμιστικό διάλυμα PHEM
- Διάλυμα κορεσμού: 50 mM NH₄Cl σε ρυθμιστικό διάλυμα PHEM
- Ποτηράκια ζέσεως 10 ml

- Πλάκα με 12 δεξαμενές (12-well plate)
- Διηθητικό χαρτί
- Αποστειρωμένη λαβίδα

Μέθοδος:

Μέθοδος A' (Classic protocol):

1. Αφαίρεση των καλυπτρίδων από το τρυβλίο με τη χρήση λαβίδας, ξέπλυμα σε διάλυμα RHEM που είναι τοποθετημένο σε ποτηράκι ζέσεως, στέγνωμα σε διηθητικό χαρτί και μεταφορά της κάθε μιας καλυπτρίδας σε ένα πηγαδάκι μιας πλάκας με 12 δεξαμενές, στα οποία έχει προστεθεί από πριν διάλυμα μονιμοποίησης. Ακολουθεί επώαση για 10 min.
2. Ξέπλυμα καλυπτρίδων σε διάλυμα RHEM για 5 min.
3. Επώαση σε διάλυμα διαπερατοποίησης για 10 min.
4. Ξέπλυμα σε διάλυμα RHEM για 5 min.
5. Επώαση σε διάλυμα κορεσμού για 10 min.
6. Ξέπλυμα σε διάλυμα RHEM για 5 min.
7. Τέλος, είτε άμεση χρησιμοποίηση καλυπτρίδων για πειράματα ανοσοφθορισμού, είτε αποθήκευση στους -4°C για μελλοντική χρήση.

Μέθοδος B' (Pre-extraction protocol):

1. Αφαίρεση των καλυπτρίδων από το τρυβλίο με τη χρήση λαβίδας, ξέπλυμα σε διάλυμα RHEM που είναι τοποθετημένο σε ποτηράκι ζέσεως, και αμέσως μετά εμβάπτιση σε ένα δεύτερο ποτηράκι ζέσεως που περιέχει διάλυμα διαπερατοποίησης για 5s.
2. Στη συνέχεια ακολουθεί στέγνωμα σε διηθητικό χαρτί και μεταφορά της κάθε καλυπτρίδας σε ένα πηγαδάκι μιας πλάκας με 12 δεξαμενές, στα οποία έχει προστεθεί από πριν διάλυμα μονιμοποίησης. Επώαση για 10 min.
3. Ξέπλυμα καλυπτρίδων σε διάλυμα RHEM για 10 min.
4. Επώαση σε διάλυμα κορεσμού για 10 min.
5. Ξέπλυμα σε διάλυμα RHEM για 5 min.
6. Τέλος, είτε άμεση χρησιμοποίηση καλυπτρίδων για πειράματα ανοσοφθορισμού, είτε αποθήκευση στους 4°C μέχρι μια εβδομάδα για μελλοντική χρήση.

2.3.12.2 Τεχνική ανοσοφθορισμού

Υλικά:

- Μονιμοποιημένες καλυπτρίδες
- Πάραφιλμ
- Διάλυμα Blocking: 2% (v/v) FBS, 2% (w/v) BSA, 0.2% (w/v) fish skin gelatin

- Διάλυμα 1x PBS pH 7.4: 13.5 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.75 mM KH₂PO₄
- Διάλυμα PBS/Tween-20: 1x PBS, 0.05% (v/v) Tween-20
- Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα στην κατάλληλη αραίωση σε 5% διάλυμα Blocking
- Διάλυμα χρωστικής Hoechst (1:20000 σε ddH₂O)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες (Globe Scientific Inc)
- Διάλυμα επικάλυψης, mounting media (DAKO)
- Διηθητικό χαρτί

Μέθοδος:

1. Μεταφορά των μονιμοποιημένων καλυπτρίδων σε πάραφιλμ, και άμεση πλύση με διάλυμα PBS/Tween-20 για 3 min.
2. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα Blocking για 30 min.
3. Δύο πλύσεις με διάλυμα PBS/Tween-20 για 3 min η κάθε μια.
4. Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για 1 hr.
5. Δύο πλύσεις με διάλυμα PBS/Tween-20 για 3 min η κάθε μια.
6. Επώαση με δεύτερο πρωτογενές αντίσωμα για 1 hr (Αν δεν θα χρησιμοποιηθεί δεύτερο πρωτογενές αντίσωμα, η διαδικασία συνεχίζεται στο βήμα 8).
7. Δύο πλύσεις με διάλυμα PBS/Tween-20 για 3 min η κάθε μια.
8. Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα ή το συνδυασμό των δευτερογενών αντισωμάτων (αν έχουν χρησιμοποιηθεί δυο πρωτογενή αντισώματα που προέρχονται από διαφορετικό ζώο) για 1 hr στο σκοτάδι.
9. Δύο πλύσεις με διάλυμα PBS/Tween-20 για 3 min η κάθε μια, και μια πλύση με διάλυμα PBS για 3 min, όλες στο σκοτάδι
10. Επώαση με το διάλυμα χρωστικής Hoechst για 1 min, και δύο πλύσεις με διάλυμα PBS για 3 min η κάθε μια, στο σκοτάδι.
11. Προσθήκη σταγόνων διαλύματος επικάλυψης (DAKO) στις αντικειμενοφόρες πλάκες.
12. Πλήρης αφαίρεση του PBS, στέγνωμα σε διηθητικό χαρτί και τοποθέτηση των καλυπτρίδων στις σταγόνες του διαλύματος επικάλυψης στις αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι καλυπτρίδες θα πρέπει να εφάπτονται με το διάλυμα επικάλυψης, με την επιφάνεια τους στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα.
13. Στέγνωμα σε σκοτεινό μέρος για 16-18 hrs, και παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

2.3.12.3 Μικροσκοπία

Για την παρατήρηση και την εξέταση των καλυπτρίδων που έτυχαν επεξεργασίας με την τεχνική του ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axiovert 200M

και συγκεκριμένα οι ελαιοκαταδυτικοί του φακοί Zeiss Aplanachromat 63x (NA 1.4) και Zeiss Plan Aplanachromat 20x (NA 0.75), σε συνδυασμό με το λογισμικό AxioVision (v 4.8.2.SP2, Zeiss 2012). Οι φωτογραφίες που λήφθηκαν, υπέστησαν επεξεργασία με τη χρήση των λογισμικών Adobe Photoshop CS6 και Adobe Illustrator CS6.

2.3.12.3.1 Ανάλυση μεγέθους κυτταρικών πληθυσμών

Για τη μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών στο κυτταρικό μέγεθος, αφού διενεργήθηκε διπλή χρώση στα υπό μελέτη κύτταρα με αντίσωμα anti- α -tubulin και χρωστική Hoechst 33342, φωτογραφήθηκαν. Για κάθε περίπτωση αναλύθηκαν περίπου 130 κύτταρα, που για το καθένα μετρήθηκε το εμβαδό της κυτταρικής και της πυρηνικής του επιφάνειας, με τη χρήση του λογισμικού AxioVision (v 4.8.2.SP2, Zeiss 2012). Για την εξαγωγή συμπερασμάτων πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις (2.3.12.3.4). Ο συγκεκριμένος κύκλος πειραμάτων έγινε από τη Δρα Νιόβη Σανταμά.

2.3.12.3.2 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου διαιρουμένων κυττάρων

Για την μελέτη των επιπτώσεων που προκαλούνται στον κυτταρικό κύκλο εξαιτίας της αποσιώπησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών, διενεργήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοφθορισμού για κάθε περίπτωση (αποσιώπησης και μη αποσιώπησης), στα οποία τα κύτταρα σημάνθηκαν με anti- α -tubulin, anti- γ -tubulin και Hoechst 33342. Στο κάθε πείραμα για κάθε περίπτωση αναλύθηκαν 1000 κύτταρα, και καταγράφηκαν με μικροσκοπική μελέτη τα εξής για κάθε κύτταρο:

- Κυτταρική φάση [μεσόφαση ή μίτωση (πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση, τελόφαση, κυτοκίνηση)]
- Αριθμός πυρήνων
- Αριθμός κεντριδίων
- Κυτταρικές δομές όπως γέφυρες χρωματίνης
- Διάφορες ανωμαλίες

Για την εξαγωγή συμπερασμάτων διενεργήθηκαν οι κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις (2.3.12.3.4).

2.3.12.3.3 Ανάλυση βλεφαριδογένεσης διαιρουμένων κυττάρων καθώς και κυττάρων τα οποία είχαν αποστερηθεί ορό

Για την μελέτη των επιπτώσεων στη βλεφαριδογένεση διαιρουμένων κυττάρων καθώς και κυττάρων τα οποία είχαν αποστερηθεί ορό, εξαιτίας της αποσιώπησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών, διενεργήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα ανοσοφθορισμού για κάθε περίπτωση (αποσιώπησης

και μη αποσιώπησης). Ως γνωστό η αποστέρηση ορού για 24 ώρες προκαλεί την επαγωγή της βλεφαριδογένεσης. Στο κάθε πείραμα για κάθε περίπτωση αναλύθηκαν 1000 κύτταρα, τα οποία είχαν σημανθεί με anti- γ -tubulin, anti-acetylated-tubulin και Hoechst 33342, και καταγράφηκαν τα εξής για κάθε κύτταρο:

- Αριθμός των βλεφαρίδων
- Αριθμός πυρήνων
- Αριθμός κεντριδίων
- Διάφορες ανωμαλίες

Για την εξαγωγή συμπερασμάτων διενεργήθηκαν οι κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις (2.3.12.3.4).

2.3.12.3.4 Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση και την σύγκριση των διαφόρων μετρήσεων στους πληθυσμούς των αποσιωπημένων κύτταρα έναντι των πληθυσμών των κυττάρων ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά Microsoft Excel 2010 και GraphPad Prism 6. Συγκεκριμένα για την ανάλυση της κατανομής των ολικών κυτταρικών μεγεθών και των μεγεθών των πυρήνων των δύο πληθυσμών, διενεργήθηκε two-tailed Mann Whitney test. Για την ανάλυση της κατανομής των μιτωτικών κυττάρων στις διάφορες φάσεις της μίτωσης, καθώς και για την ανάλυση των ποσοστών των κυττάρων ανάλογα με τον αριθμό των κεντροσωματίων, χρησιμοποιήθηκε stacked two-way ANOVA and post hoc test with Sidak correction, το οποίο διενεργήθηκε από τον Δρα Carsten Lederer. Για τις υπόλοιπες αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το student's t-test. Από τις πιο πάνω συγκρίσεις, υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα (P-value) της διαφοράς των αποσιωπημένων πληθυσμών και των φυσιολογικών. Τιμές κάτω από το 0.05 θεωρούνται ως στατιστικά σημαντικές, τιμές κάτω από το 0.01 ακόμη πιο στατιστικά σημαντικές, και τιμές κάτω από το 0.001 εξαιρετικά στατιστικά σημαντικές.

2.3.13 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία τεχνική, για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό κυττάρων καθώς αυτά βρίσκονται σε ένα ρέον υγρό. Τα κύτταρα σημαίνονται με φθοριοφόρο, το οποίο διεγείρεται από δέσμη φωτός προερχόμενη από laser, ώστε να είναι ανιχνεύσιμα. Η κυτταρομετρία ροής εφαρμόστηκε για την διαλεύκανση του προτύπου κατανομής των πληθυσμών διαφόρων κυτταροσειρών, στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η σήμανση των κυττάρων έγινε στο DNA τους με τη χρήση ιωδιούχου προπίδιου (PI).

2.3.13.1 Συλλογή και προετοιμασία των κυττάρων

Υλικά:

- Τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας (70% κάλυψη επιφάνειας)
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο (Gibco 14190-169)
- 0.25% Θρυψίνη - EDTA 1x (Gibco 25200-072)
- 70% (v/v) παγωμένη αιθανόλη
- Διάλυμα χρώσης: 1 ml DPBS, 20 µl Ιωδιούχο προπίδιο PI (1 mg/ml), 20 µl RNase A (100 mg/ml)
- Σωλήνες Falcon 15 ml (Sterilin 15CTB)
- Κατάλληλοι σωλήνες για τον κυτταρομετρητή ροής

Μέθοδος:

1. Διενέργεια των βημάτων 1-7 της μεθόδου 2.3.5, ώστε τα κύτταρα της κυτταροκαλλιέργειας να μαζευτούν σε ένα σωλήνα falcon των 15 ml.
2. Αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και αναδιασπορά του κυτταρικού ιζήματος σε 0.5 ml DPBS, και ανάδευση για την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων.
3. Προσθήκη 5 ml 70% παγωμένης αιθανόλης, ανάδευση και επώαση του σωλήνα στους 4 °C για 2 hrs.
4. Φυγοκέντρηση στις 900 rpm για 2 min, αφαίρεση υπερκείμενου διαλύματος και πλύση για με 10 ml DPBS.
5. Φυγοκέντρηση στις 900 rpm για 2 min και ακολούθως αφαίρεση υπερκείμενου διαλύματος.
6. Επαναδιασπορά των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος χρώσης και ανάδευση. Επώαση στους 37 °C για 40 min.
7. Μεταφορά του δείγματος σε σωλήνα κατάλληλο για τον κυτταρομετρητή ροής.

2.3.13.2 Μέτρηση κυττάρων και ανάλυση των αποτελεσμάτων

Οι μετρήσεις των δειγμάτων διενεργήθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi) με χρήση της προεπιλεγμένης ρύθμισης φίλτρου για την ανάλυση με χρώση ιωδιούχου προπιδίου. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του ειδικού λογισμικού FCS ModFit LT 4.0 (Verity Software House). Για την στατιστική ανάλυση και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τον κυτταρικό κύκλο, επιλέχθηκε η στατιστική ανάλυση stacked two-way ANOVA and post hoc test with Sidak correction. Η συγκεκριμένη ανάλυση έγινε από τη Δρα Αντρη Χριστοδούλου. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

2.3.14 Πρωτογενή αντισώματα

1. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι ολόκληρης της ανασυνδυσμένης 6xHis-KATNAL2-S1 (anti-KATNAL2) του ποντικού από κατσίκια. Το αντίσωμα κατασκευάστηκε μετά από παραγγελία από την εταιρεία Sicgen (Πορτογαλία). Αφού έγινε καθαρισμός της χημικής συγγένειας του αντιορού (2.2.4), το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:100. Επίσης χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:250.
2. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης (anti- α -tubulin, clone B-5-1-2) από ποντίκι (Sigma T9026). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:6000. Επίσης χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:4000.
3. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της γ -τουμπουλίνης (anti- γ -tubulin, H-183) από κουνέλι (Santa Cruz sc-10732). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:50.
4. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γ -τουμπουλίνης (anti- γ -tubulin, GTU-88) από ποντίκι (Abcam ab11316). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:75.
5. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (anti-acetylated tubulin) από ποντίκι (Sigma T7451). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:500.
6. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (anti-acetylated tubulin) από κουνέλι (Cell Signaling 5335S). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:500.
7. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της φιμπριλλαρίνης (anti-fibrillarin, 72B9) από ποντίκι (Cytoskeleton AFB01). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:200.
8. Αντίσωμα έναντι της PSP1 (anti-PSP1) από κουνέλι (ευγενική παραχώρηση από τον Dr Angus I. Lamond, University of Dundee). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:250.
9. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GAPDH (anti-GAPDH, 6C5) από ποντίκι (Santa Cruz sc-32233). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:500.
10. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτοπίου cherry (anti-mCherry) από ποντίκι (Clontech). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:1000. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:1000.
11. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτοπίου flag (anti-flag M2) από ποντίκι (Sigma F3165). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:1000. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:1000.

12. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της καλνεξίνης (anti-Calnexin, H-70) από κουνέλι (Santa Cruz sc-11397). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:200.
13. Αντίσωμα έναντι της Nubp1 (anti-Nubp1) από κουνέλι (Kyprí et al., 2014). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:300.
14. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Nubp2 (anti-Nubp2) από κουνέλι (Kyprí et al., 2014). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:300.
15. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης (anti-β-Actin) από ποντίκι (Sigma A1978, Clone AC-15). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:10000.

2.3.15 Δευτερογενή αντισώματα

1. Αντίσωμα από γαϊδούρι έναντι της IgG της κατσίκας, συνεζευγμένο με το ένζυμο HRP (Santa Cruz sc-2020). Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1: 5000.
2. Αντίσωμα από πρόβατο έναντι της IgG του ποντικού, συνεζευγμένο με το ένζυμο HRP (Amersham-Pharmacia). Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1: 10000.
3. Αντίσωμα από γαϊδούρι έναντι της IgG της κατσίκας, συνεζευγμένο με FITC (Jackson 705-095-147). Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:200.
4. Αντίσωμα από κατσίκα έναντι της IgG του ποντικού, συνεζευγμένο με Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A-11017). Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:1000.
5. Αντίσωμα από κοτόπουλο έναντι της IgG του κουνελιού, συνεζευγμένο με Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A-21441). Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:1000.
6. Αντίσωμα από γαϊδούρι έναντι της IgG του ποντικού, συνεζευγμένο με Alexa Fluor 555 (Molecular Probes A-31570). Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:1000.
7. Αντίσωμα από γαϊδούρι έναντι της IgG του κουνελιού, συνεζευγμένο με Alexa Fluor 555 (Molecular Probes A-31572). Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:1000.

2.3.16 Χρωστικές

1. Χρωστική Hoechst 33342 (0.5 mg/ml). Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού για τη χρώση του DNA σε τελική συγκέντρωση 0.25 μg/ml.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εισαγωγή

Σε παλαιότερη εργασία του εργαστηρίου μας είχε δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες Nubp1, Nubp2 και KIFC5A αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εμπλέκονται από κοινού στον μηχανισμό ρύθμισης του διπλασιασμού των κεντροσωματίων (Christodoulou et al., 2006). Περαιτέρω, πιο πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα κατέδειξαν ότι οι Nubp1 και Nubp2 εντοπίζονται στο βασικό σωματίο των πρωτογενών και των κινητικών βλεφαρίδων· στις κινητικές συναντώνται και στο αξόνημα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο ως αρνητικοί ρυθμιστές της βλεφαριδογένεσης (Kyrgi et al., 2014). Ως επέκταση αυτής της γραμμής έρευνας και στα πλαίσια του λειτουργικού χαρακτηρισμού της Nubp1, διενεργήθηκε, επί παραγγελία για το εργαστήριο μας, σάρωση βιβλιοθήκης εμβρυονικού cDNA εγκεφάλου από ποντικό έναντι του cDNA της *Nubp1* με τη χρήση του συστήματος δύο υβριδίων στον ζυμομύκητα από την εταιρεία Hybrigenics (France) με στόχο την ταυτοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων για τη Nubp1. Μεταξύ άλλων, η σάρωση ανέδειξε ότι η Nubp1 πιθανώς αλληλεπιδρά με μια αλληλουχία που κωδικοποιείται από ένα μη πλήρες cDNA, μεγέθους 374 bp (Σχήμα 3.1.A1), η οποία αναγνωρίστηκε μέσω σύγκρισης (με χρήση του εργαλείου BLAST, Blast Local Alignment Search Tool) έναντι της νουκλεοτιδικής βάσης δεδομένων του EMBL/EBI. Το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης έδειξε ότι το σύνολο αυτής της αλληλουχίας μη πλήρους cDNA, εμπεριέχεται στο cDNA που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη τύπου Κατανίνης, την *Katanin-like 2* (*Katnal2*) με αριθμό αναφοράς XM_006526437 (Σχήμα 3.1.B). Ειδικότερα, το ανιχνευθέν cDNA αντιστοιχεί με την αλληλουχία που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 73-184 της προβλεπόμενης πρωτεΐνης KATNAL2 (Σχήμα 3.1.A2, Σχήμα 3.2).

Πολύ λίγα στοιχεία είναι γνωστά για τις πρωτεΐνες Katanin-like 2, εν αντιθέσει με την καλά χαρακτηρισμένη αρχέτυπη Κατανίνη (Katanin), η οποία μέσω της ιδιότητας της να δρα ως ένζυμο κατάτμησης των μικροσωληνίσκων, συμμετέχει ως ρυθμιστικό μόριο σε ποικίλα ενδοκυτταρικά φαινόμενα, όπως τη βλεφαριδογένεση και την κυτταρική διαίρεση (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012). Επίσης πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα φανέρωσαν εμπλοκή της Katanin στον μηχανισμό ρύθμισης του διπλασιασμού των κεντριδίων (Hu et al., 2014). Αυτά τα στοιχεία καθιστούσαν ενδιαφέροντα τη δυνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών Nubp1 και KATNAL2, επειδή δημιουργούσαν σαφείς υπόνοιες για την εμπλοκή ενός νέου παίκτη, της KATNAL2, στις ζωτικής σημασίας λειτουργίες που συμμετέχει η Nubp1, στις οποίες εμπλέκεται και η Katanin.

Τα αρχικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σάρωση με το σύστημα των δύο υβριδίων, ενισχύθηκαν, μέσω πειραμάτων συνεπιλογής που διενεργήθηκαν από τις Χριστίνα Καμηλάρη και Δρα Άντρη Χριστοδούλου στο εργαστήριο μας, που απέδειξαν ότι τόσο η Nubp1 όσο και η Nubp2 αλληλεπιδρούν με την KATNAL2 (Καμηλάρη, 2010). Συνεπώς η διερεύνηση και

ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της KATNAL2, ως η πρώτη προσπάθεια μελέτης της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης τύπου Katanin-like 2 στη βιβλιογραφία, αποτέλεσε το θέμα της διδακτορικής μου διατριβής. Η έρευνα αυτή θα μπορούσε επιπλέον να είναι σημαντική και για την εξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων περί του βιολογικού ρόλου των Nubps αλλά και γενικότερα για την πιο λεπτομερή κατανόηση των κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες εμπλέκονται αυτές οι αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες.

Σχήμα 3.1: Α. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του μη πλήρους cDNA της πρωτεΐνης που πιθανόν αλληλεπιδρά με τη Nubp1 και το πολυπεπτίδιο που κωδικοποιεί. Β. Αντιστοίχιση του μη πλήρους cDNA με την αλληλουχία XM_006526437.

A1. Η αλληλουχία του μη πλήρους cDNA που ταυτοποιήθηκε από σάρωση βιβλιοθήκης εμβρυονικού cDNA εγκεφάλου ποντικού, με τη χρήση του συστήματος δύο υβριδίων, και του cDNA της Nubp1 ως δολώματος (“bait”). Η ανάλυση διενεργήθηκε από την εταιρεία Hybrigenics.
A2. Το πολυπεπτίδιο που κωδικοποιείται από το μη πλήρες cDNA.

B. Συγκριτική ανάλυση με νουκλεοτιδική αντιστοίχιση φανέρωσε ότι η αλληλουχία των 374 νουκλεοτιδίων του μη πλήρους cDNA εμπεριέχεται επακριβώς στο cDNA της XM_006526437 (περιοχή μεταξύ του 180ου και του 553ου νουκλεοτιδίου του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης), αποδεικνύοντας ότι το υπό μελέτη cDNA αντιστοιχεί στην εν λόγω πρωτεΐνη, KATNAL2. Η ανάλυση διεξήχθη με τη χρήση του εργαλείου BLAST.

A1.				
TGAAGTTTGTGACAACGTTGACCTGGAAACTATTTTGTATGGAATATGAGAGCTATTATTTTGTAAAGTTCAGAAAGTACCCCAAAG TGGTTAAGAAGGCCCGGACCCAGTGGAAAATAATTTACCGTCACGAAGTGGAGGGAAGAACAAGGCTGACGAATGACAGTTGT CAAAATCTCCCAAGATATGTCACCAGAAGTCACGACCTAAAACCTTCAGCAGTGAAGACAGGGGACACCAAATCTGTCAAGGAACA CCTTAAACAGGTCAAGGAGAGTGTCACTGACACTCAAGCAGAGAGCACTGACTTCGGCCTGAACATATCAAAAATCCCAAAGACC AGCCAGAGGAAAAGGCCCAACCACGAAGAG				
A2.				
EVCNDVDLETILMEYESYFVKFQKYPKVVKKAPDPVENNLPSPRSGGKNKRLTNDSCQNLPKICHQKSRPKTSAVKTGDTKSVK EHLKQVKESVTDQTAESTDFGLNISKIHKDQPEEKAQPRRX				
B.				
Partial cDNA	1	TGAAGTTTGTGACAACGTTGACCTGGAAACTATTTTGTATGGAATATGAGAGCTATTATTT	60	
XM_006526437	180	TGAAGTTTGTGACAACGTTGACCTGGAAACTATTTTGTATGGAATATGAGAGCTATTATTT	239	
Partial cDNA	61	TGTAAAGTTCAGAAAGTACCCCAAAGTGGTTAAGAAGGCCCGGACCCAGTGGAAAATAA	120	
XM_006526437	240	TGTAAAGTTCAGAAAGTACCCCAAAGTGGTTAAGAAGGCCCGGACCCAGTGGAAAATAA	299	
Partial cDNA	121	TTTACCGTCACGAAGTGGAGGGAAGAACAAGGCTGACGAATGACAGTTGTCAAAATCT	180	
XM_006526437	300	TTTACCGTCACGAAGTGGAGGGAAGAACAAGGCTGACGAATGACAGTTGTCAAAATCT	359	
Partial cDNA	181	CCCAAGATATGTCACCAGAAGTCACGACCTAAAACCTTCAGCAGTGAAGACAGGGGACAC	240	
XM_006526437	360	CCCAAGATATGTCACCAGAAGTCACGACCTAAAACCTTCAGCAGTGAAGACAGGGGACAC	419	
Partial cDNA	241	CAAATCTGTCAAGGAACACCTTAAACAGGTCAAGGAGAGTGTCACTGACACTCAAGCAGA	300	
XM_006526437	420	CAAATCTGTCAAGGAACACCTTAAACAGGTCAAGGAGAGTGTCACTGACACTCAAGCAGA	479	
Partial cDNA	301	GAGCACTGACTTCGGCCTGAACATATCAAAAATCCACAAAGACCAGCCAGAGGAAAAGGC	360	
XM_006526437	480	GAGCACTGACTTCGGCCTGAACATATCAAAAATCCACAAAGACCAGCCAGAGGAAAAGGC	539	
Partial cDNA	361	CCAACCACGAAGAG	374	
XM_006526437	540	CCAACCACGAAGAG	553	

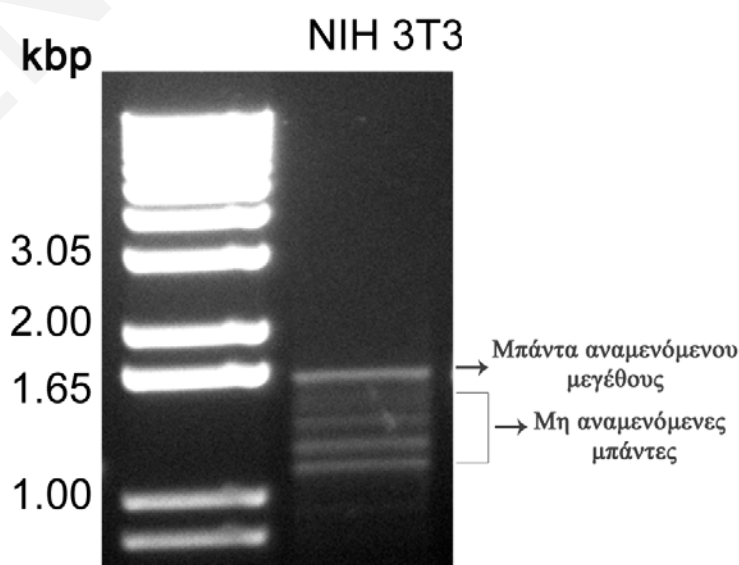
3.2 Αναγνώριση και ταυτοποίηση μιας καινούριας οικογένειας πρωτεϊνικών ισομορφών τύπου Katanin-like 2 (KATNAL2) στον ποντικό

Ως εκκίνηση για την ανάλυση μας, επιχειρήθηκε ο πολλαπλασιασμός και η απομόνωση του συνολικού, πλήρους cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη KATNAL2 μέσω διενέργειας αντίδρασης RT-PCR από την κυτταρική σειρά NIH 3T3 ινοβλαστών ποντικού. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές ειδικά σχεδιασμένοι για τα άκρα του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) της *Katnal2* με αριθμό αναφοράς XM_006526437 με στόχο τον πολλαπλασιασμό του (εκκινητές: *Katnal2* FW & *Katnal2* RV, Πίνακας 2.11).

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR έδειξε μία μπάντα η οποία ήταν στο αναμενόμενο μέγεθος (1.6 kb) με βάση την υφιστάμενη αλληλουχία XM_006526437 της βάσης δεδομένων, αλλά επίσης εμφάνισε και άλλες 4 μπάντες μικρότερου μεγέθους (μεταξύ 1.1 kb και 1.6 kb) οι οποίες ήταν μη αναμενόμενα προϊόντα (Εικόνα 3.1). Αυτές οι απροσδόκητες μπάντες εμφανίζονταν με συνέπεια σε όλες τις PCR που έγιναν στα NIH 3T3 κύτταρα, όπως επίσης και σε άλλες κυτταρικές σειρές ποντικού όπως τις IMCD 3, και TM 4 (Εικόνα 3.2). Για να διευκρινιστεί κατά πόσο αυτές οι μπάντες αντιστοιχούσαν σε μη ειδικά παραπροϊόντα ή, ενδεχομένως αντιπροσώπευαν άγνωστες, νέες ισομορφές της *Katnal2*, όλα τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε ανάλυση.

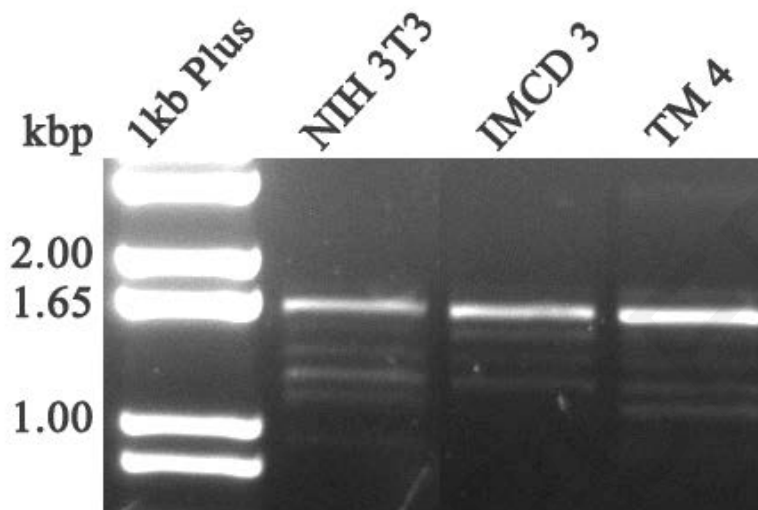
Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης των προϊόντων αντίδρασης RT-PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του mRNA/cDNA της *Katnal2* σε ολικό cDNA ινοβλαστών κυτταρικής σειράς NIH 3T3.

Παρατηρείται ενίσχυση μίας μπάντας 1.6 kbp, που είναι και το αναμενόμενο μέγεθος για την *Katnal2*, αλλά είναι εμφανής και η παρουσία διαφόρων άλλων μικρότερων μπάντων, που ο πολλαπλασιασμός τους δεν ήταν αναμενόμενος.



Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης των προϊόντων αντίδρασης RT-PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του mRNA/cDNA της *Katnal2* σε ολικά cDNA κυτταρικών σειρών ποντικού NIH 3T3, IMCD 3, και TM 4.

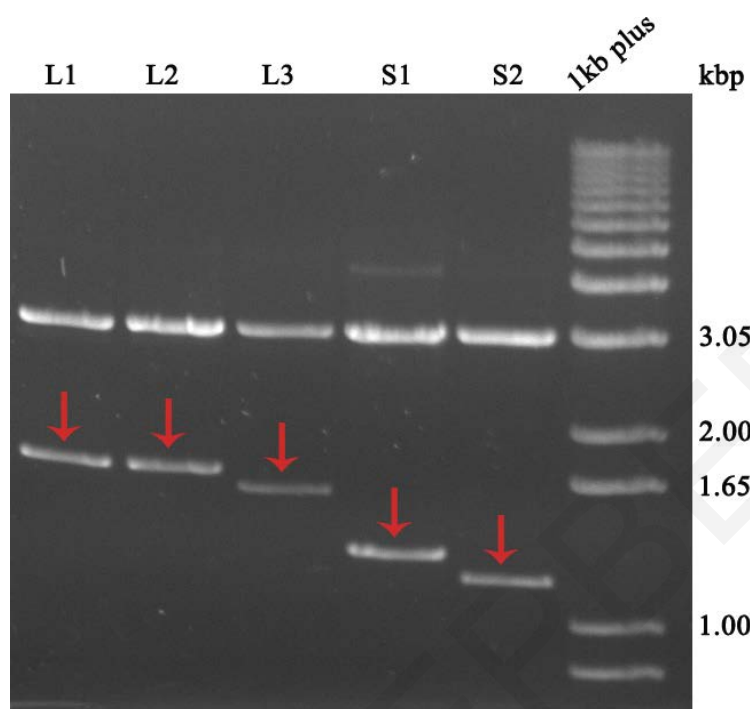
Η παρουσία των μη αναμενόμενων μπάντων είναι επαναλήψιμη και παρατηρείται με το ίδιο πρότυπο σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν.



Ειδικότερα, για την ταυτοποίηση όλων των προϊόντων, διενεργήθηκε RT-PCR με τη χρήση των ίδιων εκκινητών, όπως προηγουμένως, που ενίσχυαν ολόκληρο το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης των *Katnal2* (εκκινητές: *Katnal2* FW & *Katnal2* RV) με τη χρήση μείγματος πολυμεράσης υψηλής πιστότητας αυτή τη φορά, σε ολικό cDNA από κυτταροσειρά NIH 3T3. Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pGEM-T Easy, και ακολούθως, τα πλασμίδια με τα ενσωματωμένα πλέον ενθέματα μετασηματίστηκαν σε βακτηριακά δεκτικά κύτταρα XL1-blue. Για την αναγνώριση των διαφόρων ενθεμάτων βάσει του μεγέθους τους, πραγματοποιήθηκε ενδονουκλεολυτική διάσπαση με το ένζυμο περιορισμού NotI (κατάλληλη για την πλήρη απελευθέρωση του ενθέματος από το πλασμίδιο), ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση. Μετά από ανάλυση 98 συνολικά κλώνων, ταυτοποιήθηκαν 5 διαφορετικού μεγέθους προϊόντα cDNA (Εικόνα 3.3, Σχήμα 3.2). Ακολούθως τα πλασμίδια με τα διαφορετικού μεγέθους ενθέματα υποβλήθηκαν σε νουκλεοτιδική αλληλούχηση (Εταιρεία MWG Eurofins, Germany).

Η αλληλούχηση αποκάλυψε την ύπαρξη πέντε διαφορετικών ισομορφών της *Katnal2*. Οι ισομορφές ονομάστηκαν βάσει του μεγέθους τους, όπως παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι οι κλωνοποιήσεις των ισομορφών *L1*, *L2* και *S1* έγιναν από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Αδάμο Αδάμου, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής του διπλωματικής εργασίας (Αδάμου, 2009).

Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρημα αγαρόζης με ενδονουκλεολυτικές πέψεις NotI σε δείγματα που αντιπροσωπεύουν τους 5 διαφορετικού μεγέθους τύπους cDNA (με κόκκινο βελάκι) που κλωνοποιήθηκαν με τη χρήση του pGEM-T Easy Vector System.



Πίνακας 3.1: Οι 5 διακριτές ισομορφές *Katnal2* που κλωνοποιήθηκαν με τη χρήση του pGEM-T Easy Vector System.

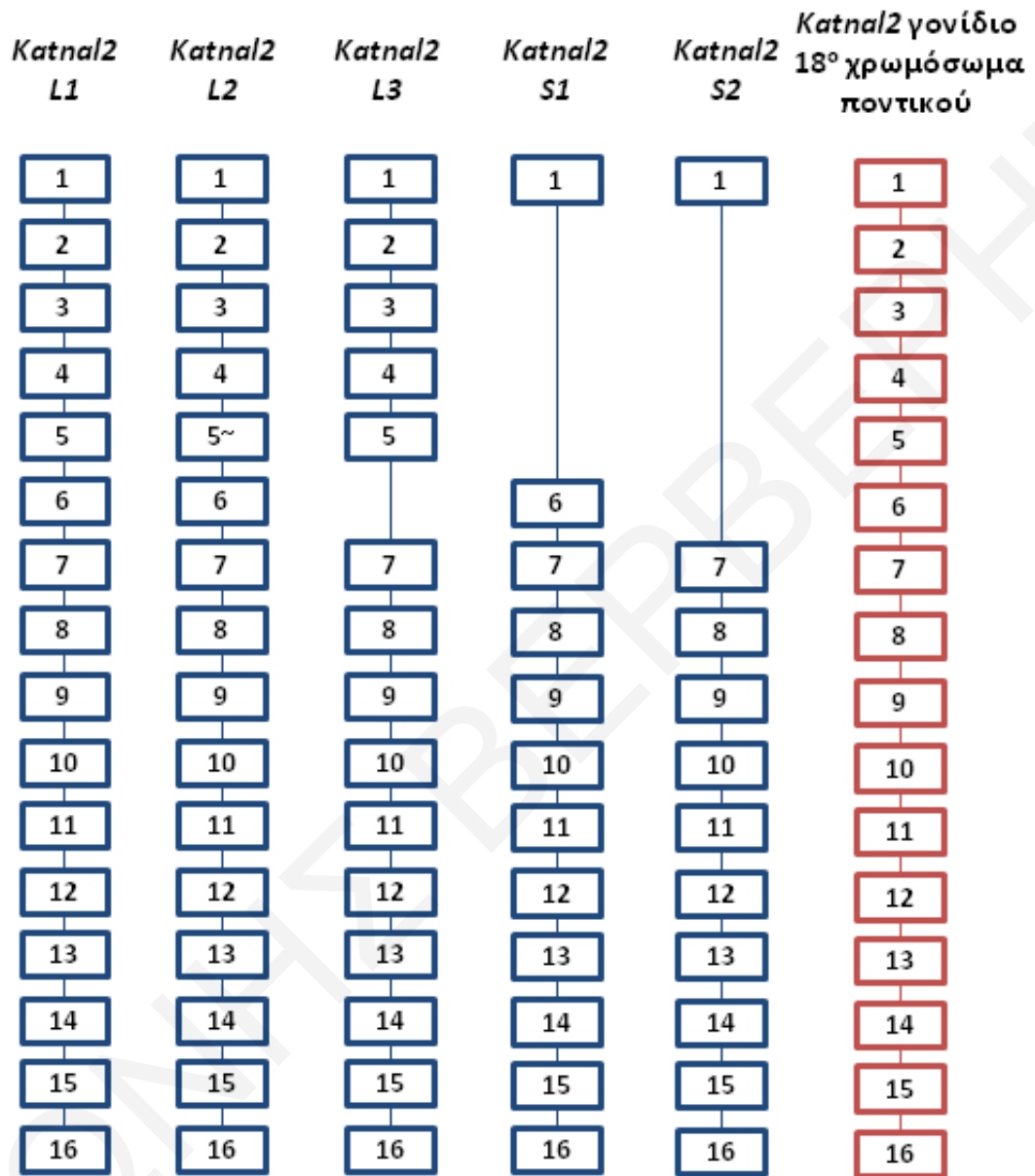
Ισομορφή	Μέγεθος cDNA (bp)	Προβλεπόμενο πρωτεϊνικό μέγεθος (kDa)
<i>L1</i> (Large 1)	1617	61.13
<i>L2</i> (Large 2)	1611	60.91
<i>L3</i> (Large 3)	1518	57.59
<i>S1</i> (Small 1)	1215	45.58
<i>S2</i> (Small 2)	1116	41.84

Με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) δείχθηκε ότι οι πέντε ισομορφές *Katnal2* αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της *Katnal2*, το οποίο εδράζεται στο 18^ο χρωμόσωμα του ποντικού (μεταξύ των νουκλεοτιδίων 76976029 - 77047618 της συμπληρωματικής αλυσίδας). Το γονίδιο της *Katnal2* στον ποντικό αποτελείται τουλάχιστον από 16 διαφορετικά εξώνια, τα οποία συγκροτούν τις πέντε ισομορφές *Katnal2* με διαφορετικούς συνδυασμούς εξωνίων, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.2. Ειδικότερα, η *Katnal2-L1* (πανομοιότητα με την XM_006526437 της βάσης δεδομένων) συγκροτείται και από τα 16 εξώνια, όπως και η *Katnal2 L2*, με τη διαφορά όμως ότι στο 5^ο εξώνιο

η *L2* στερείται 6 νουκλεοτιδίων σε σχέση με την *L1* (πρόκειται μάλλον για πολυμορφισμό καθώς τα 6 αυτά νουκλεοτίδια δεν αποτελούν μέρος διακριτού εξωνίου). Από την *L3* απουσιάζει μόνο το 6^ο εξώνιο, από την *S1* απουσιάζουν 4 εξώνια (από το 2^ο έως και το 5^ο) και από την *S2* απουσιάζουν συνολικά 5 εξώνια (από το 2^ο μέχρι και το 6^ο).

Με τη χρήση του εργαλείου ExPASy (<http://expasy.prosite.org>) διενεργήθηκε ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των πέντε ισομορφών KATNAL2 για την εύρεση τυχόν πρωτεϊνικών μοτίβων. Διαφάνηκε ότι όλες οι KATNAL2 είναι P-loop NTPάσες, που ανήκουν στην υπερκογένεια των AAA πρωτεϊνών (ATPάσες που εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες), όπως και οι συγγενικές τους Katanins. Όλες οι ισομορφές διαθέτουν το μοτίβο P-loop, το οποίο συναντάται στις πρωτεΐνες που έχουν ικανότητα σύνδεσης με ATP ή με GTP (Saraste et al., 1990). Επίσης η ανάλυση έδειξε ότι στις αμινοτελικές αλληλουχίες των ισομορφών L1, L2 και L3 αποκλειστικά περιέχεται το μοτίβο LisH, το οποίο ευνοεί το διμερισμό μιας πρωτεΐνης, την αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες ή τη σύνδεση της στους μικροσωληνίσκους (Emes and Ponting, 2001), ενώ ενδέχεται να επηρεάζει επίσης και τον χρόνο ημιζωής της καθώς και τον ενδοκυτταρικό της εντοπισμό (Gerlitz et al., 2005). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των περιεχόμενων πρωτεϊνικών μοτίβων φαίνονται διαγραμματικά στα σχήματα 3.3 και 3.4.

Σχήμα 3.2: Οι ισομορφές *Katnal2* αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος των 16 εξωνίων του γονιδίου *Katnal2* στον ποντικό.



Σχήμα 3.3: Αντιστοίχιση με ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών των πέντε ισομορφών KATNAL2 με τη χρήση του εργαλείου ClustalW2.

Με κίτρινη σκίαση απεικονίζεται το μοτίβο LisH, και με γαλάζια σκίαση το μοτίβο P-loop.

L1	MELSYQTLKLTHQAREAYEMRTEARRKNLLILILHLYLTQEGYMDAAKALEEETKPLGRRF	60
L2	MELSYQTLKLTHQAREAYEMRTEARRKNLLILILHLYLTQEGYMDAAKALEEETKPLGRRF	60
L3	MELSYQTLKLTHQAREAYEMRTEARRKNLLILILHLYLTQEGYMDAAKALEEETKPLGRRF	60
S1	MELSYQTLKLTHQAREA-----	17
S2	MELSYQTLKLTHQAREA-----	17

L1	EVCNDVDLETILMEYESYYFVKFQKYPKVVKKAPDPVENNLPSSRSGGKNKRLTNDSCQNL	120
L2	EVCNDVDLETILMEYESYYFVKFQKYPKVVKKAPDPVENNLPSSRSGGKNKRLTNDSCQNL	120
L3	EVCNDVDLETILMEYESYYFVKFQKYPKVVKKAPDPVENNLPSSRSGGKNKRLTNDSCQNL	120
S1	-----	
S2	-----	
L1	PKICHQKSRPKTSAVKTDGTSVKEHLKQVKESVTDTQAESTDGFLNISKIHKDQPEEKA	180
L2	PKICHQKSRPKTSAVKTDGTSVKEHLKQ--ESVTDTQAESTDGFLNISKIHKDQPEEKA	178
L3	PKICHQKSRPKTSAVKTDGTSVKEHLKQVKESVTDTQAESTDGFLNISKIHKDQPEEKA	180
S1	-----ESVTDTQAESTDGFLNISKIHKDQPEEKA	46
S2	-----	
L1	QPRRGQIIDFRGLLSDAIKGATSEFALNTFCNPDPSERLLKPLSAFIGMNSEMRELAAV	240
L2	QPRRGQIIDFRGLLSDAIKGATSEFALNTFCNPDPSERLLKPLSAFIGMNSEMRELAAV	238
L3	QPRR-----ERLLKPLSAFIGMNSEMRELAAV	207
S1	QPRRGQIIDFRGLLSDAIKGATSEFALNTFCNPDPSERLLKPLSAFIGMNSEMRELAAV	106
S2	---GQIIDFRGLLSDAIKGATSEFALNTFCNPDPSERLLKPLSAFIGMNSEMRELAAV	73

L1	VSRDIYLHNPNIKWNDIIGLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLYGPPGTG	300
L2	VSRDIYLHNPNIKWNDIIGLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLYGPPGTG	298
L3	VSRDIYLHNPNIKWNDIIGLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLYGPPGTG	267
S1	VSRDIYLHNPNIKWNDIIGLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLYGPPGTG	166
S2	VSRDIYLHNPNIKWNDIIGLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLYGPPGTG	133

L1	KTLAKAVATECKTTFFNISASTIVSKWRGDSEKLVRVLFELARYHAPSTIFLDELESVM	360
L2	KTLAKAVATECKTTFFNISASTIVSKWRGDSEKLVRVLFELARYHAPSTIFLDELESVM	358
L3	KTLAKAVATECKTTFFNISASTIVSKWRGDSEKLVRVLFELARYHAPSTIFLDELESVM	327
S1	KTLAKAVATECKTTFFNISASTIVSKWRGDSEKLVRVLFELARYHAPSTIFLDELESVM	226
S2	KTLAKAVATECKTTFFNISASTIVSKWRGDSEKLVRVLFELARYHAPSTIFLDELESVM	193

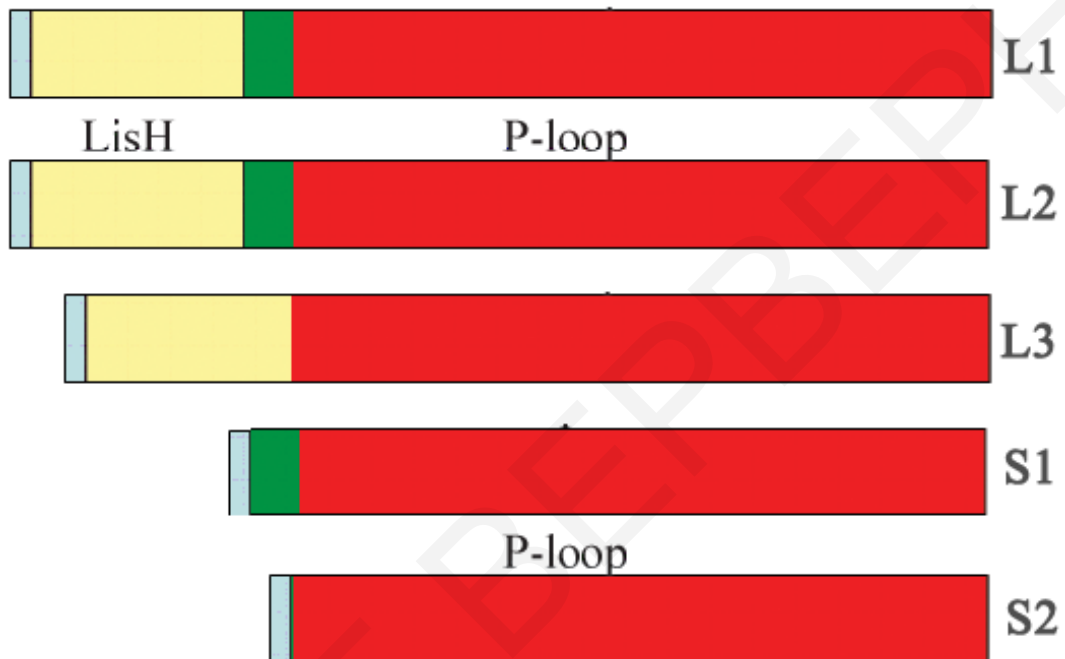
L1	SQRGMVPGGEHESLRMKTELLVQMDGLAHSEDLVFLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRIL	420
L2	SQRGMVPGGEHESLRMKTELLVQMDGLAHSEDLVFLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRIL	418
L3	SQRGMVPGGEHESLRMKTELLVQMDGLARSEDLVFLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRIL	387
S1	SQRGMVPGGEHESLRMKTELLVQMDGLARSEDLVFLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRIL	286
S2	SQRGMVPGGEHESLRMKTELLVQMDGLARSEDLVFLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRIL	253

L1	VDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALELHTQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMRP	480
L2	VDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALELHTQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMRP	478
L3	VDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALELHTQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMRP	447
S1	VDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALELHTQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMRP	346
S2	VDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALELHTQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMRP	313

L1	VRKIFSVLENNQSESNLPGIQLDTVTTQDFLDVLAHTKPSAKNLTERYLAWQEKFESV	539
L2	VRKIFSVLENNQSESNLPGIQLDTVTTQDFLDVLAHTKPSAKNLTERYLAWQEKFESV	537
L3	VRKIFSVLENNQSESNLPGIQLDTVTTQDFLDVLAHTKPSAKNLTERYLAWQEKFESV	506
S1	VRKIFSVLENNQSESNLPGIQLDTVTTQDFLDVLAHTKPSAKNLTERYLAWQEKFESV	405
S2	VRKIFSVLENNQSESNLPGIQLDTVTTQDFLDVLAHTKPSAKNLTERYLAWQEKFESV	372

Σχήμα 3.4: Διαγραμματική απεικόνιση των ισομορφών KATNAL2 και των πρωτεϊνικών μοτίβων που περιέχουν.

Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η κοινή περιοχή (7ο έως 16ο εξώνιο) η οποία περιέχει το μοτίβο P-loop, και με κίτρινο χρώμα μια περιοχή (2ο έως 5ο εξώνιο) η οποία συναντάται μόνο στις L1, L2 και L3 και περιέχει το μοτίβο LisH. Με γαλάζιο χρώμα εμφανίζεται η αμινοτελική κοινή πρωτεϊνική αλληλουχία των ισομορφών (1ο εξώνιο), ενώ με πράσινο χρώμα η πρωτεϊνική περιοχή που κωδικοποιείται από το 6ο εξώνιο και συναντάται μόνο στις ισομορφές L1, L2 και S1.

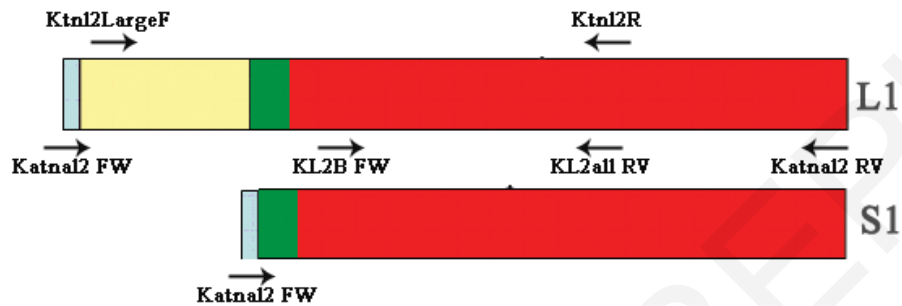


3.3 Ανάλυση του αναπτυξιακού και τοπικού προτύπου γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών *Katnal2* στο ποντίκι

Στα πλαίσια της διαλεύκανσης του βιολογικού ρόλου των KATNAL2, διερευνήθηκε το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών *Katnal2* μέσω ημιποσοτικών αντιδράσεων RT-PCR. Σκοπός της ανάλυσης ήταν η μελέτη α) του μεγέθους και του τρόπου της εξάπλωσης της έκφρασης των KATNAL2 στους ιστούς, και β) της τυχόν εξάρτησης που μπορεί να έχει η έκφραση τους αναλόγως του αναπτυξιακού σταδίου που βρίσκεται ένας οργανισμός. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν: (α) οι εκκινητές KL2B FW & KL2all RV για ενίσχυση εσωτερικού διαγνωστικού κομματιού μεγέθους 508 bp, που είναι κοινό σε όλες τις ισομορφές (Εικόνα 3.3), (β) οι εκκινητές *Katnal2* FW & *Katnal2* RV για ενίσχυση ολόκληρου του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης των ισομορφών *Katnal2* (Εικόνες 3.4, 3.5, 3.6), καθώς και (γ) οι εκκινητές *Ktnl2LargeF* & *Ktnl2R* για ενίσχυση διαγνωστικού κομματιού που βρίσκεται μόνο στις μεγαλύτερες ισομορφές *Katnal2* (L1, L2 & L3) (Εικόνες 3.4, 3.5). Παρόλο που σχεδιάστηκαν και εκκινητές που αναγνώριζαν αλληλουχίες που διέσχιζαν τα εκατέρωθεν όρια της «κίτρινης αλληλουχίας» (Σχήμα 3.5) και στόχο είχαν να είναι ειδικοί μόνο για τις «μικρές» ισομορφές τύπου

S1 και S2, σε προκαταρκτικούς ελέγχους αποδείχθηκε ότι δεν παρουσίαζαν την απαιτούμενη εξειδίκευση και έτσι δεν χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω.

Σχήμα 3.5: Διαγραμματική απεικόνιση των ισομορφών *Katnal2-L1* & *Katnal2-S1*, στην οποία εμφανίζεται η θέση του κάθε ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των *Katnal2*.



Διεξήχθησαν αντιδράσεις οι οποίες περιελάμβαναν ανάλυση δειγμάτων από: α) ιστούς και όργανα του ποντικού, β) διαφορετικές περιοχές του νευρικού συστήματος από ενήλικα ποντικό 3 μηνών, γ) αναπτυξιακά στάδια ιππόκαμπου ποντικού τα οποία περιλαμβάνουν και δείγματα που λήφθησαν από νευρώνες αναπτυσσόμενους *in vitro*, ειδικότερα του σταδίου 2 (διαφοροποίηση των ελασματοποδίων σε μικρές απολήξεις), του σταδίου 3 (δημιουργία και ωρίμανση νευράξονα) και του σταδίου 5 (πλήρως ώριμοι νευρώνες) (Dotti et al., 1988), και τέλος, δ) διαφορετικές κυτταρικές σειρές ποντικού (Εικόνες 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, Πίνακας 3.2). Για την ποσοτική εξισορρόπηση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, διενεργήθηκε παράλληλα PCR για την ενίσχυση διαγνωστικού κομματιού του cDNA της ριβοσωμικής πρωτεΐνης L19 ποντικού (Εικόνες 3.3, 3.4, 3.5, 3.6). Η L19 είναι πρωτεΐνη με σταθερή γονιδιακή έκφραση, ανεξαρτήτως αναπτυξιακού σταδίου και ιστού (Al-Bader and Al-Sarraf, 2005) και για αυτό το λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα κανονικοποίησης σε πειράματα συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης άλλων πρωτεϊνών.

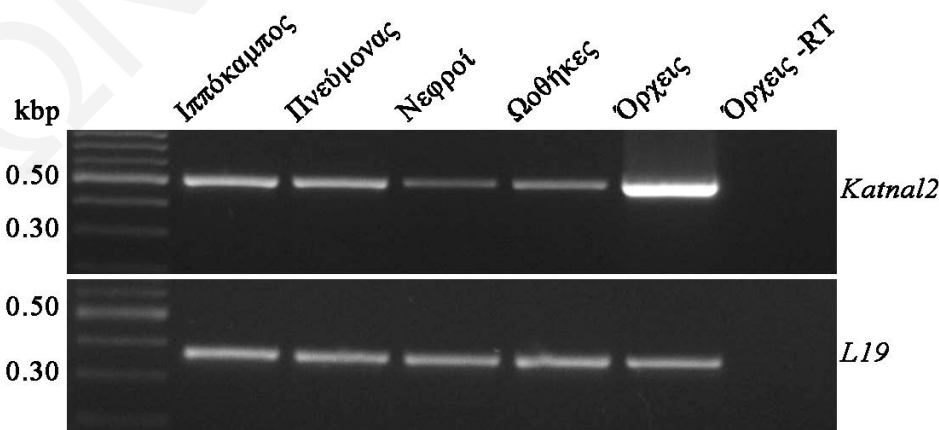
Πίνακας 3.2: Τα δείγματα από ποντίκι που χρησιμοποιήθηκαν για διερεύνηση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών *Katnal2*.

Ιστοί/Όργανα	Περιοχές νευρικού συστήματος	Αναπτυξιακά στάδια ιππόκαμπου	Κυτταρικές σειρές
Νεφρός	Φλοιός εγκεφάλου	Στάδιο 2 <i>in vitro</i>	NIH 3T3
Πνεύμονας	Παρεγκεφαλίδα	Στάδιο 3 <i>in vitro</i>	NSC 34
Όρχεις	Ιππόκαμπος	Στάδιο 5 <i>in vitro</i>	TM 4
Ωοθήκη	Νωτιαίος μυελός	E13 (Εμβρυϊκό στάδιο 13 ημερών)	IMCD 3
Ιππόκαμπος		E18 (Εμβρυϊκό στάδιο 18 ημερών)	
		Νεογέννητο (2,5 εβδομάδων)	
		Ενήλικας (3 μηνών)	
		Γλοία νεογέννητου	

Όσον αφορά τη γονιδιακή έκφραση των *Katnal2* σε ιστούς και όργανα του ποντικού, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ισομορφές *Katnal2* εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα στους όρχεις και σε σχετικά μικρότερο στον ιππόκαμπο, στις ωοθήκες, στους πνεύμονες και στους νεφρούς (Εικόνα 3.4). Σε άλλους ιστούς δεν παρατηρείται έκφραση των ισομορφών. Είναι εμφανές ότι οι *Katnal2* εκφράζονται κυρίως σε ιστούς/όργανα υψηλής μιτωτικής δραστηριότητας, εύρημα που παραπέμπει στο συμπέρασμα ότι οι ισομορφές εκφράζονται κυρίως σε διαιρούμενα κύτταρα.

Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρημα αгарόζης συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών *Katnal2* σε διάφορους ιστούς και όργανα ποντικού.

Η RT-PCR για τις *Katnal2* διενεργήθηκε με ενίσχυση μιας κοινής αλληλουχίας των ισομορφών μεγέθους 508 bp. Το ψηλότερο επίπεδο έκφρασης παρατηρείται στους όρχεις.



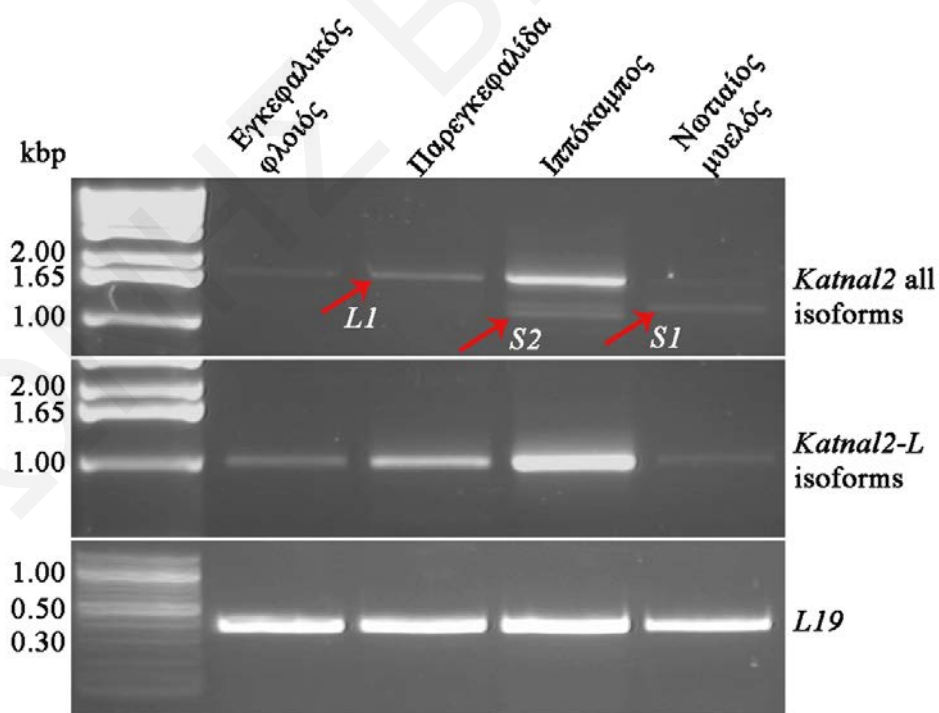
Λόγω του ότι ανιχνεύθηκε έκφραση των *Katnal2* στο δείγμα προερχόμενο από τον ιππόκαμπο (Εικόνα 3.4), διενεργήθηκε στη συνέχεια συγκριτική ανάλυση σε διάφορες υποπεριοχές του εγκεφάλου (Εικόνα 3.5) η οποία φανέρωσε ότι οι *Katnal2* (και κυρίως η *Katnal2-L1*)

εκφράζονται σε υψηλό βαθμό στην περιοχή του ιππόκαμπου, σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές του νευρικού συστήματος που μελετήθηκαν. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και μέσω της ανάλυσης με την χρήση εκκινητών ειδικών για τις isoμορφές *Katnal2 L1, L2 & L3*.

Δεν διενεργήθηκε ανάλυση ιστολογικών τομών του εγκεφάλου με υβριδισμό *in situ* για να διερευνηθεί εάν ο ιππόκαμπος είναι η μοναδική περιοχή του εγκεφάλου που αποκλειστικά εκφράζονται οι *Katnal2* σε σημαντικά επίπεδα. Όμως λόγω της σχετικά σημαντικής έκφρασης στον ιππόκαμπο, ακολούθησε ειδικευμένη ανάλυση του εξετάζοντας τόσο τα αναπτυξιακά στάδια του *in vivo* (αναλύοντας δείγματα από εμβρυικά στάδια E13 και E18 μέχρι και ενήλικο άτομο) όσο και αδιαφοροποίητους πυραμιδικούς νευρώνες ιππόκαμπου που εξάγονται από έμβρυο σταδίου E13 και διαφοροποιούνται πλήρως *in vitro* σε ώριμους λειτουργικούς νευρώνες μέσα από ένα καλά χαρακτηρισμένο στερεότυπο πρόγραμμα (Dotti et al., 1988) (Εικόνα 3.6).

Εικόνα 3.5: Ηλεκτροφόρημα αгарόζης συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των isoμορφών *Katnal2* σε διάφορες περιοχές του νευρικού συστήματος ποντικού.

Η RT-PCR για τις *Katnal2* διενεργήθηκε με ενίσχυση ολόκληρου του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης των isoμορφών, καθώς και με ενίσχυση κομματιού που συναντάται μόνο στις μεγάλες isoμορφές (*Katnal2 L1, L2, L3*). Το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης των KATNAL2 στον εγκεφαλο, παρατηρείται στον ιππόκαμπο.

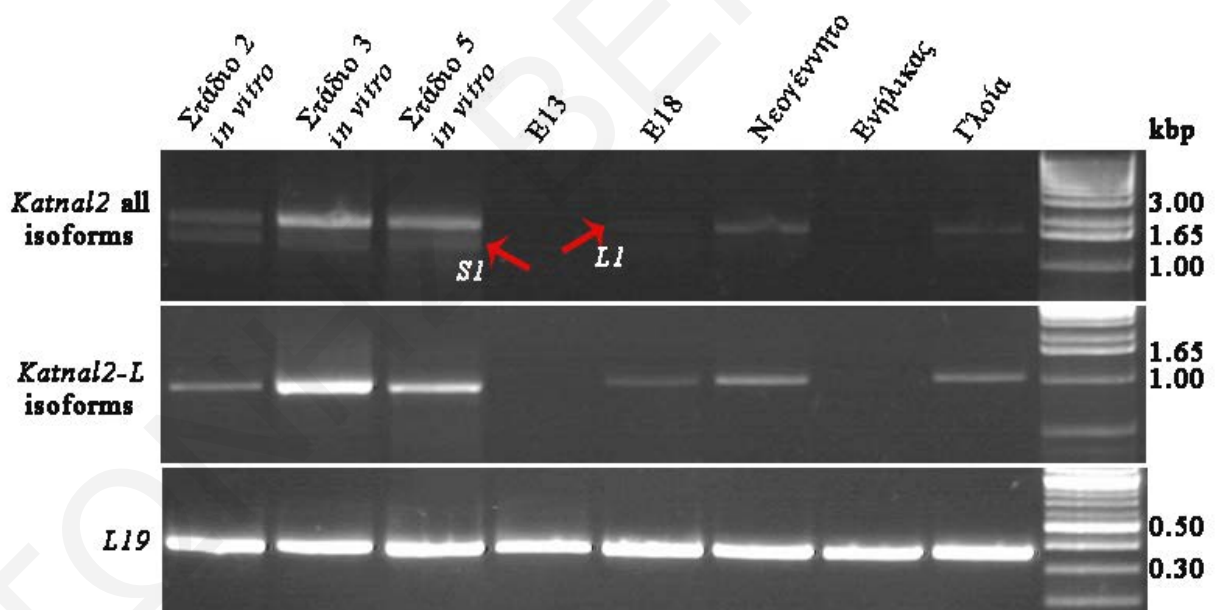


Τα αποτελέσματα της μελέτη των αναπτυξιακών σταδίων έδειξαν ότι οι *Katnal2* εκφράζονται σε σημαντικό βαθμό στα *in vitro* στάδια ανάπτυξης των νευρώνων του ιππόκαμπου. Συγκεκριμένα κατά τη διαφοροποίησή τους σε ώριμους νευρώνες ακολουθείται μια ανοδική τάση έκφρασης των *Katnal2*, η οποία ωστόσο μειώνεται όταν φτάσουν στο σημείο της πλήρους

διαφοροποίησης τους. Στα *in vivo* στάδια, η έκφραση των *Katnal2* ξεκινά κατά τα τελευταία εμβρυϊκά στάδια και κορυφώνεται μετά τις πρώτες εβδομάδες γέννησης του ποντικού. Επίσης παρατηρήθηκε γονιδιακή έκφραση και στα διαιρούμενα κύτταρα της γλοίας. Στους πλήρως διαφοροποιούμενους νευρώνες ώριμων ποντικών, η έκφραση είναι αμελητέα. Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης έδειξε και η ανάλυση με την χρήση εκκινητών ειδικών για τις ισομορφές *Katnal2 L1, L2 & L3*. Από τα πιο πάνω φαίνεται ότι από τη στιγμή που ξεκινά η έκφραση των ισομορφών *Katnal2*, αυτές κυρίως εκφράζονται σε αναπτυξιακά στάδια τα οποία χαρακτηρίζονται από ψηλά ποσοστά διαιρουμένων ή/και υπό διαφοροποίηση κυττάρων. Σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα η έκφραση των *Katnal2* μειώνεται σημαντικά αν όχι πλήρως.

Εικόνα 3.6: Ηλεκτροφόρημα αгарόζης συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών *Katnal2* σε διαφορετικά *in vitro* αναπτυξιακά στάδια νευρωνικής ανάπτυξης ιππόκαμπου και σε *in vivo* αναπτυξιακά στάδια ιππόκαμπου ποντικού.

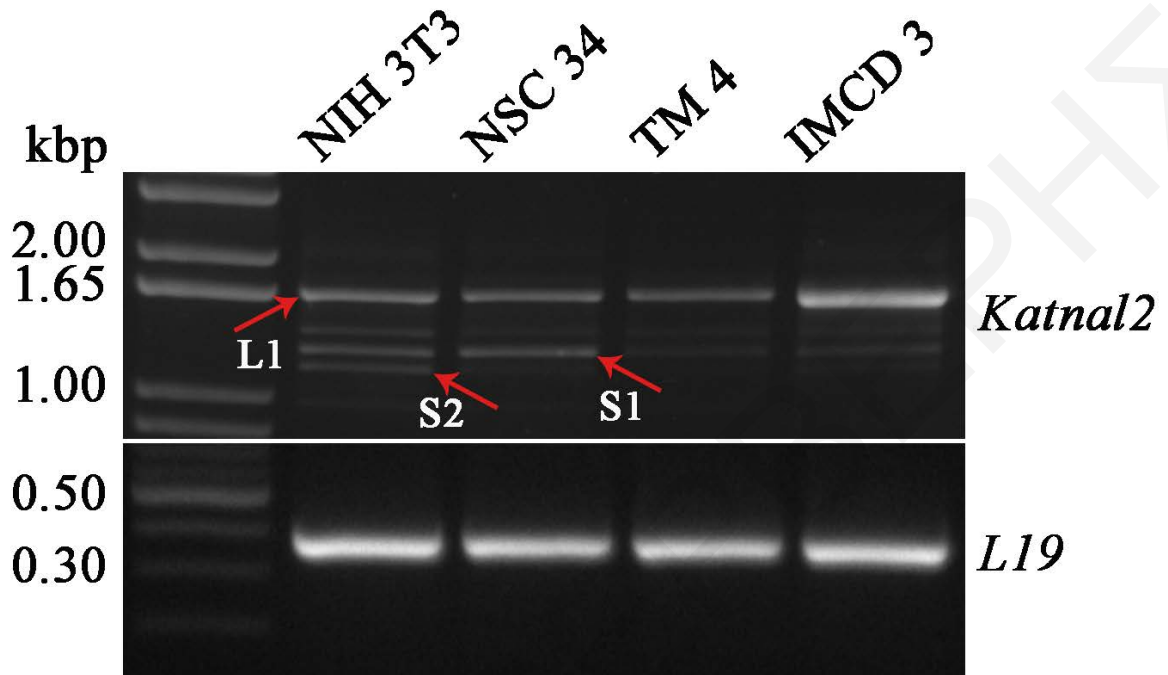
Η RT-PCR για τις *Katnal2* διενεργήθηκε με ενίσχυση ολόκληρου του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης των ισομορφών, καθώς και με ενίσχυση κομματιού που συναντάται μόνο στις μεγάλες ισομορφές (*Katnal2 L1, L2, L3*). Στα *in vitro* στάδια, η γονιδιακή έκφραση φτάνει στο μέγιστο της κατά το Στάδιο 3, ενώ *in vivo* λίγο μετά τη γέννηση.



Η συγκριτική ανάλυση των κυτταρικών σειρών (Εικόνα 3.7) κατέδειξε ότι οι ισομορφές *Katnal2* εκφράζονται σε όλες τις σειρές που μελετήθηκαν, με το ψηλότερο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης της *Katnal2-L1* να παρατηρείται στα κύτταρα IMCD 3. Οι μικρότερες ισομορφές *Katnal2* εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα NIH 3T3 και NSC 34. Για αυτό το λόγο έγινε άλλωστε κατορθωτή η κλωνοποίηση τους από τα κύτταρα NIH 3T3.

Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση αгарόζης συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών *Katnal2* σε διάφορες κυτταρικές σειρές από ποντικό.

Η RT-PCR για τις *Katnal2* διενεργήθηκε με ενίσχυση ολόκληρου του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης των ισομορφών.



Συμπερασματικά ο ιστός με την πιο υψηλή γονιδιακή έκφραση των ισομορφών *Katnal2* είναι ο ιστός των όρχεων. Οι *Katnal2* εκφράζονται σε σημαντικά επίπεδα στις περιοχές του σώματος που παρουσιάζουν υψηλή μιτωτική δραστηριότητα, ενώ η γονιδιακή τους έκφραση περιορίζεται σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Όσον αφορά τα ξεχωριστά επίπεδα έκφρασης της κάθε μίας, διαφάνηκε ότι αν και παρουσιάζουν εκτεταμένη ομοιότητα στις αλληλουχίες τους, διαθέτοντας ειδικότερα κοινό αρχικό και τελικό εξόνιο, δεν φαίνεται να μεταγράφονται όλες με τον ίδιο ρυθμό. Πιθανό να υπόκεινται σε έλεγχο από διαφορετικούς υποκινητές. Οι ισομορφές με την υψηλότερη έκφραση είναι οι *Katnal2-L1* & *Katnal2-L2* οι οποίες θα πρέπει να λογίζονται ως μία ισομορφή μιας και είναι πρακτικώς αδύνατος ο διαχωρισμός τους σε αντιδράσεις PCR, και ακολουθεί η *Katnal2-S1*. Η *Katnal2-S2* εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό στον ιππόκαμπο καθώς και στις κυτταροσειρές που αναλύθηκαν, ενώ η *Katnal2-L3* φαίνεται να έχει αμελητέα γονιδιακή έκφραση με παρουσία μόνο σε κυτταροσειρές. Οι διαφορές στην έκφραση τους, πιθανό να σχετίζονται με διαφοροποίηση στη λειτουργία που επιτελεί η κάθε μία ισομορφή, ενώ φανερώνουν ξεχωριστό τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης για την κάθε μία.

3.4 Παρασκευή αντισώματος έναντι των ισομορφών KATNAL2 και ανάλυση της πρωτεϊνικής τους έκφρασης

3.4.1 Παρασκευή αντισώματος

Για να γίνει κατορθωτή η μελέτη των ισομορφών KATNAL2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο, κατασκευάστηκε πολυκλωνικό αντίσωμα σε κατσικά, έναντι της ανασυνδυσμένης 6xHis-KATNAL2-S1, ώστε να είναι σε θέση να ανιχνεύσει εξίσου καλά τόσο τις μικρές όσο και τις μεγάλες ισομορφές. Οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής της έκφρασης σε βακτήρια (2.2.2) για τη συγκεκριμένη ετερόλογη πρωτεΐνη είχαν μελετηθεί από τη Χριστίνα Καμηλάρη κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διπλωματικής της εργασίας (Καμηλάρη, 2010) και συνοψίζονται σε χρόνο επαγωγής για 16 έως 18 ώρες σε συγκέντρωση 0.05 mM IPTG. Στη συνέχεια διενεργήθηκε βιοχημικός καθαρισμός της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης (2.2.3) κατά τον οποίο εκλούστηκαν έξι κλάσματα, εκ των οποίων τα τέσσερα τελευταία είχαν τη μεγαλύτερη καθαρότητα (Εικόνα 3.8). Αυτά συνενώθηκαν (Εικόνα 3.9) και ακολούθως στάλθηκαν στην εταιρεία Sicgen (Portugal), για τη δημιουργία του αντισώματος. Το αντίσωμα που λήφθηκε από την Sicgen υποβλήθηκε σε καθαρισμό χημικής συγγένειας (2.2.4) για να βελτιωθεί η ειδικότητα του.

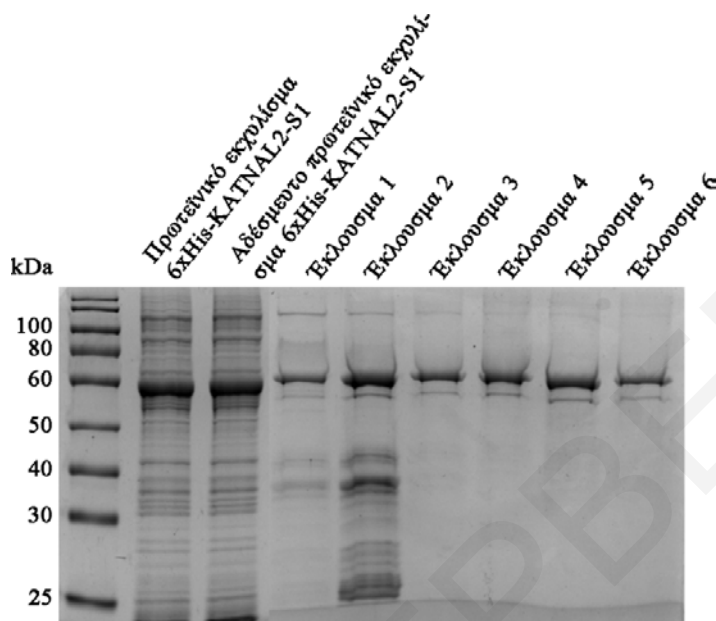
Με ανοσοαποτύπωση κατά Western, το καθαρισμένο αντίσωμα επιτυχώς αναγνώριζε τη βακτηριακά εκφρασμένη πρωτεΐνη 6xHis-KATNAL2-S1, έναντι της οποίας παρήχθη, τόσο στα ολικά βακτηριακά εκχυλίσματα όσο και στα συνδυασμένα εκλούσματα 3-6 (Εικόνα 3.10).

Το καθαρισμένο αντίσωμα δοκιμάστηκε επίσης σε κύτταρα IMCD3 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια mCherry, mCherry-Katnal2-L1 και mCherry-Katnal2-S1 τα οποία κατασκευάστηκαν από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Χριστοφόρου (Χριστοφόρου, 2014) (Εικόνα 3.11). Επίσης δοκιμάστηκε σε κύτταρα NIH 3T3 μετασηματισμένα με τα πλασμίδια Flag-Katnal2-L1 και Flag-Katnal2-S1, η κατασκευή των οποίων περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.1.21.2 (Εικόνα 3.12). Σε όλες τις περιπτώσεις το αντίσωμα αναγνώριζε τις ετερόλογες υπερεκφρασμένες ισομορφές KATNAL2, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο.

Μετά από διάφορες δοκιμές, βρέθηκε ότι οι βέλτιστες αραιώσεις για τη χρήση του καθαρισμένου αντισώματος είναι 1:100 για πειράματα ανοσοφθορισμού, και 1:250 για πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

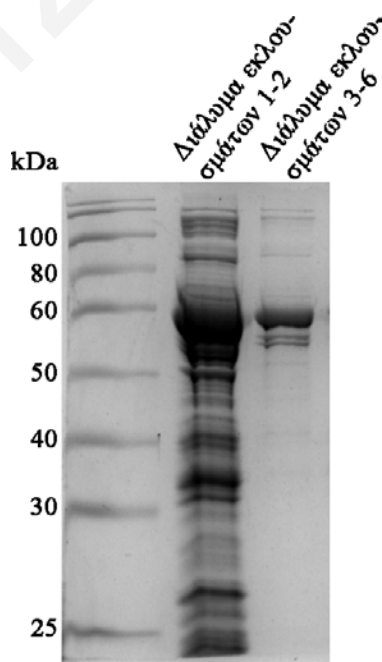
Εικόνα 3.8: Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue, όπου παρουσιάζεται ο βιοχημικός καθαρισμός της ετερόλογης πρωτεΐνης 6xHis-KATNAL2-S1.

Τα κλάσματα έκλουσης 3 ως 6, εμφάνιζαν τη μεγαλύτερη καθαρότητα.



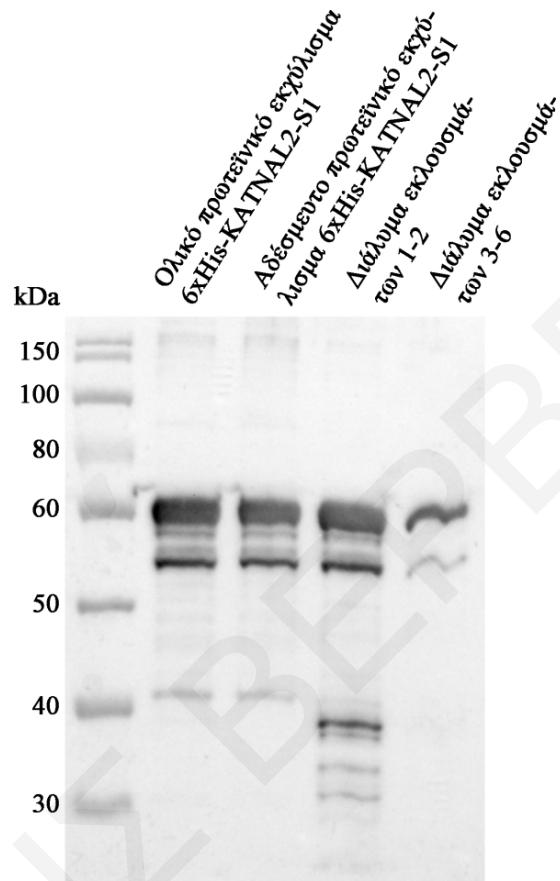
Εικόνα 3.9: Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue, όπου παρουσιάζονται τα δύο μείγματα των εκλουσμάτων του βιοχημικού καθαρισμού της ετερόλογης πρωτεΐνης 6xHis-KATNAL2-S1.

Το διάλυμα εκλουσμάτων 3-6 είναι αυτό με τη μεγαλύτερη καθαρότητα (Εικόνα 3.8).



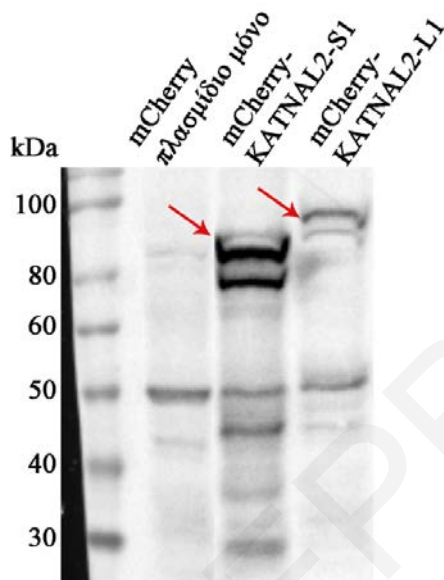
Εικόνα 3.10: Ανοσοαποτύπωση κατά Western, με χρήση του καθαρισμένου αντισώματος έναντι της 6xHis-KATNAL2-S1.

Το καθαρισμένο αντίσωμα έναντι της KATNAL2 φαίνεται να αναγνωρίζει επιτυχώς την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε ολικά βακτηριακά εκχυλίσματα καθώς και στα καθαρισμένα κλάσματα από τη διαδικασία καθαρισμού της (πείραμα Εικόνα 3.9).



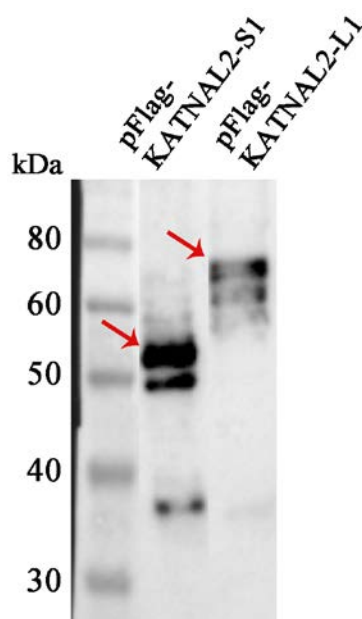
Εικόνα 3.11: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών mCherry-KATNAL2-S1 και mCherry-KATNAL2-L1, με τη χρήση του καθαρισμένου αντισώματος έναντι της KATNAL2.

Το καθαρισμένο αντίσωμα έναντι της KATNAL2 φαίνεται να αναγνωρίζει επιτυχώς τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (κόκκινα βελάκια) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επιμολυσμένων κυττάρων IMCD 3.



Εικόνα 3.12: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών pFlag-KATNAL2-S1 και pFlag-KATNAL2-L1, με τη χρήση του καθαρισμένου αντισώματος έναντι της KATNAL2.

Το καθαρισμένο αντίσωμα έναντι της KATNAL2 φαίνεται να αναγνωρίζει επιτυχώς τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (κόκκινα βελάκια) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επιμολυσμένων κυττάρων NIH 3T3.



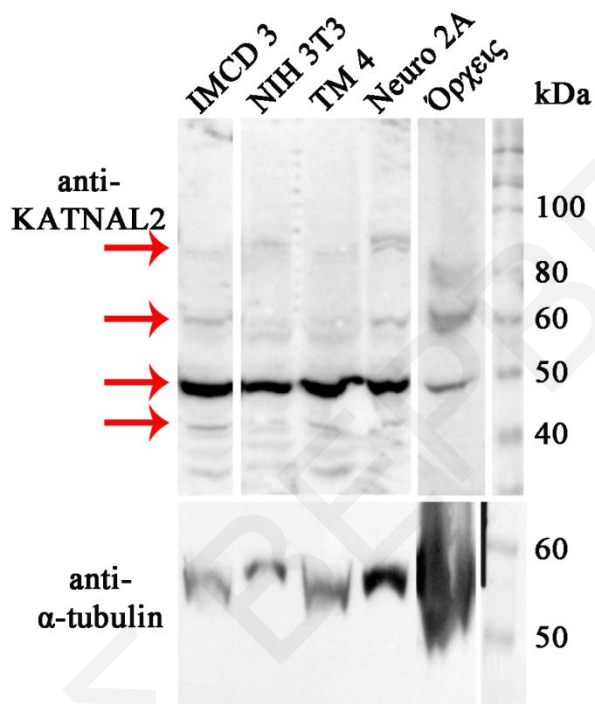
3.4.2 Ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης των ισομορφών KATNAL2

Το καθαρισμένο αντίσωμα έναντι της KATNAL2, χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης των ισομορφών KATNAL2 σε διάφορες κυτταροσειρές όπως επίσης και στον ιστό των όρχεων (που με βάση τα αποτελέσματα της συγκριτικής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης των *Katnal2*, θεωρείται ο ιστός με την πιο υψηλή έκφραση των υπό μελέτη ισομορφών). Η ανοσοαποτύπωση κατά Western φανέρωσε διάφορες ανοσοαντιδραστικές μπάντες (Εικόνα 3.11), κοντά στα μοριακά μεγέθη τα οποία ήταν αναμενόμενο να εντοπίζονται ισομορφές της KATNAL2 βάσει των αλληλουχιών του cDNA τους (Πίνακας 3.1). Συγκεκριμένα εμφανίζονται τέσσερις μπάντες: α) μία πολύ έντονη μπάντα στην περιοχή των 50 KDa η οποία πολύ πιθανό να αντιστοιχεί στην KATNAL2-S1, β) μια μπάντα πολύ κοντά στα 60 KDa η οποία πιθανότατα αντιστοιχεί στην KATNAL2 L1, γ) μια μπάντα λίγο πιο πάνω από τα 40 KDa που πιθανό αντιστοιχεί στην KATNAL2-S2 και δ) μια μπάντα λίγο πιο πάνω από τα 80 KDa για την οποία δεν έχει απομονωθεί κάποια αλληλουχία cDNA που να κωδικοποιεί προϊόν σε αυτό το πρωτεϊνικό μέγεθος, χωρίς φυσικά να λαμβάνεται υπόψη πιθανή αύξηση της μοριακής μάζας λόγω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

Το γεγονός ότι η πιο έντονη μπάντα που αναγνώριζε το καθαρισμένο αντίσωμα, ήταν αυτή που πιθανό αντιστοιχούσε στην KATNAL2-S1, ερχόταν σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της ημιποσοτικής ανάλυσης των cDNA των ισομορφών, όπου διαφαινόταν η *Katnal2-L1* ως η ισομορφή με τη μεγαλύτερη έκφραση. Συνεπώς, θα έπρεπε πρώτα να ξεκαθαριστεί αν το αντίσωμα που κατασκευάστηκε, όντως αναγνώριζε τις ισομορφές KATNAL2, προτού να μπορούμε να προβούμε σε αξιόπιστες εικασίες για την ταυτότητα ή τα επίπεδα έκφρασης της κάθε ισομορφής. Η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ταυτοποίηση των ανοσοδραστικών μπαντών και να απαντήσει και τα δύο αυτά ερωτήματα.

Εικόνα 3.13: Αυτοραδιογράφημα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπου παρουσιάζεται η έκφραση των ενδογενών πρωτεϊνικών ισομορφών KATNAL2 σε πρωτεϊνικά εκχύλισματα κυττάρων ποντικών τύπου IMCD 3, NIH 3T3, TM 4, Neuro 2A καθώς και σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα όρχεων ποντικού.

Οι πρωτεΐνες έχουν εντοπιστεί με την χρήση του αντί-KATNAL2 αντισώματος. Με κόκκινο βελάκι φαίνονται οι μπάντες που πιθανώς να αντιστοιχούν σε ισομορφές της KATNAL2. Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης για έλεγχο της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε από κάθε εκχύλισμα.



3.4.3 Ταυτοποίηση των ισομορφών KATNAL2 με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης, ακολουθούμενης από ανάλυση απομονωμένων πρωτεϊνικών μπαντών με φασματοσκοπία μάζας

Τα μεγέθη των μπαντών που αναγνωρίζονται ως θετικές με το αντίσωμα έναντι της KATNAL2 στην ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 3.13) φαίνονται εκ πρώτης όψεως να συνάδουν με τα προβλεπόμενα μεγέθη για τις διάφορες ισομορφές της. Επειδή όμως πρόκειται για νέες και μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες και η ανίχνευση δεν είναι αυταπόδεικτη, χρησιμοποιήθηκε η ενδεικνυόμενη μέθοδος ταυτοποίησης, δηλαδή ανοσοκατακρήμνιση και ανάλυση των απομονωμένων θετικών πρωτεϊνικών ειδών με φασματοσκοπία μάζας. Η μεθοδολογία αυτή (2.2.13) όχι μόνο είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των ισομορφών KATNAL2 και της ειδικής αναγνώρισης τους από το αντίσωμα έναντι της KATNAL2, αλλά ενδεχομένως θα μπορούσε να οδηγήσει ακόμη και στην εύρεση πιθανών αλληλεπιδρωσών πρωτεϊνών με τις KATNAL2. Επίσης, μέσω της ξεχωριστής ανάλυσης των τεσσάρων ανοσοδραστικών μπαντών που

ανιχνεύει το συγκεκριμένο αντίσωμα (Εικόνα 3.13), θα μπορούσαμε να ξεκαθαρίσουμε σε ποια ισομορφή KATNAL2 αντιστοιχεί η κάθε μία.

Για την ανοσοκατακρήμνιση, 8 μg αντισώματος έναντι της KATNAL2 προσδέθηκαν ομοιοπολικά στην κατάλληλη ποσότητα σφαιριδίων G σεφαρόζης. Ακολούθησε επώαση με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από 4 όρχεις ποντικού, και έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών. Το 80% του όγκου του εκλούσματος ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, και στη συνέχεια το πήκτωμα υπέστη χρώση με διάλυμα Brilliant Blue G-Colloidal, για να διαφανούν τρεις μπάντες (μπάντες 1, 2, 3, Εικόνα 3.14A) που ανοσοκατακρημνήστικαν με τη χρήση του αντισώματος έναντι της KATNAL2, ενώ εμφάνιζαν και ανοσοδραστικότητα σε ανοσοαποτύπωση κατά Western που διεξήχθη με το υπόλοιπο 20% του όγκου του εκλούσματος (Εικόνα 3.14B). Αυτές οι τρεις μπάντες κόπηκαν από το πήκτωμα που είχε βαφτεί με Colloidal και αποθηκεύτηκαν για μελλοντική ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας (μπάντες 1, 2, 3, Εικόνα 3.14A). Επίσης κόπηκε και αποθηκεύτηκε μία μπάντα (3n, Εικόνα 3.14A) από τον αρνητικό έλεγχο, αντίστοιχη της μπάντας 3 του πειράματος, για σκοπούς σύγκρισης, ώστε να ελεγχθεί η ειδικότητα της ανοσοαντίδρασης (Εικόνα 3.14A). Ο λόγος που αποφασίστηκε η αποκοπή της συγκεκριμένης μπάντας, ήταν η αντιστοιχία της με κύρια ανοσοδραστική μπάντα του πειράματος (μπάντα 3, Εικόνα 3.14B) σε περιοχή αναμενόμενου πρωτεϊνικού μεγέθους για τις νεοανακαλυφθείσες KATNAL2.

Η ανάγκη για έλεγχο της επαναληψιμότητας της ειδικότητας της ανοσοκατακρήμνισης με τη χρήση του αντισώματος έναντι της KATNAL2, οδήγησε στην επανάληψη της διαδικασίας η οποία όμως διενεργήθηκε σε μεγαλύτερη κλίμακα, ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες για ταυτοποίηση πιθανών αλληλεπιδρωσών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 28 μg αντισώματος έναντι της KATNAL2, τα οποία αφού προσδέθηκαν σε κατάλληλο όγκο σφαιριδίων G σεφαρόζης, επώαστηκαν με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από 8 όρχεις ποντικού. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western φανέρωσε διάφορες μπάντες μεταξύ των περιοχών 45-80 KDa που εμφανίστηκαν στο έκλουσμα του αντισώματος έναντι της KATNAL2 ενώ απουσίαζαν από το έκλουσμα του πειράματος αρνητικού ελέγχου (Εικόνα 3.15B). Έτσι κόπηκαν και αποθηκεύτηκαν έξι ευρύτερες ζώνες (και όχι μπάντες αυτή τη φορά) από το πήκτωμα που είχε υποστεί χρώση με το διάλυμα Colloidal (Εικόνα 3.15A), τρεις (ζώνες 1, 2, 3, Εικόνα 3.15) από την περιοχή του εκλούσματος του αντισώματος έναντι της KATNAL2, οι οποίες κάλυπταν αθροιστικά όλη την περιοχή μεταξύ 45 και 80 KDa, ώστε να καλυφθεί η ευρύτερη περιοχή του πηκτώματος που περιείχε τις ανοσοδραστικές με το αντί-KATNAL2 αντίσωμα πρωτεΐνες καθώς και υποψήφιες αλληλεπιδρώσες με αυτές πρωτεΐνες. Οι υπόλοιπες τρεις ζώνες (1n, 2n, 3n, Εικόνα 3.15) κόπηκαν από τις αντίστοιχες περιοχές του εκλούσματος του αρνητικού δείγματος αναφοράς, για σύγκριση.

Οι μπάντες και οι ζώνες που αποθηκεύτηκαν από τα δύο πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στάλθηκαν για ανάλυση των πολυπεπτιδίων που περιείχαν με φασματοσκοπία μάζας, στο

Εργαστήριο Πρωτεωμικής του EMBL στην Χαϊδελβέργη της Γερμανίας. Η ανάλυση κατέδειξε (Πίνακας 3.3 για το πρώτο πείραμα μικρής κλίμακας και Πίνακας 3.4 για το πείραμα μεγαλύτερης κλίμακας) ότι όλες οι μπάντες και οι ζώνες του εκλούσματος του αντισώματος έναντι της KATNAL2, περιείχαν πεπτίδια τα οποία ανήκαν στην ισομορφή KATNAL2-L1 (Σχήμα 3.6), της οποίας η πρωτεϊνική της αλληλουχία υπερκαλύπτει όλες τις υπόλοιπες ισομορφές. Επιπρόσθετα σε καμία μπάντα ή ζώνη του εκλούσματος του φυσιολογικού ορού (δείγμα αρνητικού ελέγχου) δεν βρέθηκε πεπτίδιο που να αντιστοιχεί στις KATNAL2, γεγονός που επιβεβαιώνει την ειδική αναγνώριση των ισομορφών KATNAL2 από το αντί-KATNAL2 αντίσωμα. Η αναγνώριση σε όλες τις ζώνες/μπάντες πεπτιδίων ειδικών για την L1 (ακόμη και σε περιοχές μικρότερου πρωτεϊνικού μεγέθους από την κλωνοποιημένη L1, στις οποίες θα περιμέναμε να εντοπίζαμε πεπτίδια που να αντιστοιχούν μόνο στις ισομορφές S) δεν επιτρέπει την ευθεία αντιστοίχιση των μπαντών που ανιχνεύει το αντίσωμα με τις κλωνοποιημένες ισομορφές KATNAL2 (Πίνακας 3.1). Μία εξήγηση για αυτό είναι η πιθανή παρουσία μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις μεγάλες ισομορφές που αυξάνουν ή μειώνουν το πρωτεϊνικό μέγεθος. Επίσης δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ύπαρξης σε αυτές τις μπάντες/ζώνες και άλλων ισομορφών KATNAL2, οι οποίες δεν είχαν κλωνοποιηθεί εξαιτίας διαφορετικού αμινοτελικού ή και καρβοξυτελικού άκρου, που δεν επέτρεψαν στους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν να τις πολλαπλασιάσουν. Λόγω της ανυπαρξίας ειδικών πεπτιδίων που να αντιστοιχούν στις μικρές (S) ισομορφές, η ειδική ανίχνευση τους είναι αδύνατη, αλλά θεωρούμε αμελητέα την πιθανότητα να μην αναγνωρίζονται από το αντίσωμα μιας και α) κατασκευάστηκε έναντι στην S1, β) επιβεβαιωμένα αναγνωρίζει ισομορφές KATNAL2 και, γ) και στα δύο πειράματα ανοσοκατακρήμνισης είχαμε την ειδική παρουσία ανοσοδραστικών μπαντών στο προβλεπόμενο μέγεθος για την S1. Εν κατακλείδι, το αντίσωμα που είχαμε στη διάθεση μας ήταν ικανό για την ανίχνευση αρκετών, αν όχι όλων, των ισομορφών KATNAL2.

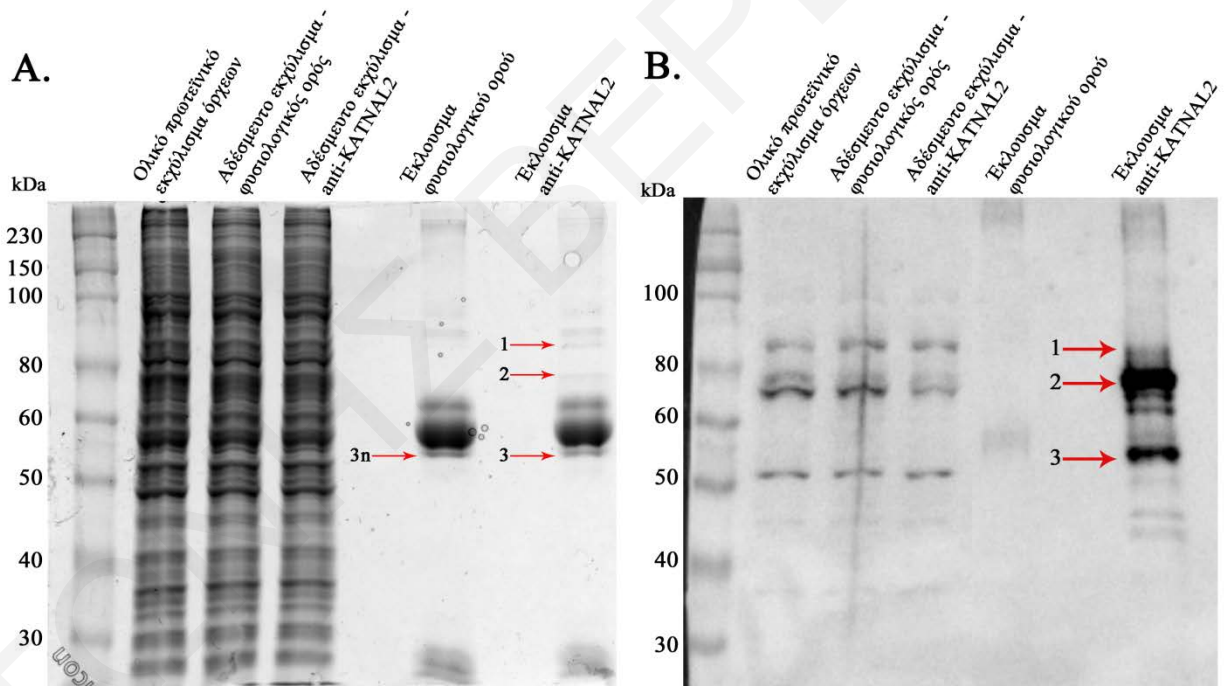
Παράλληλα, ταυτοποιήθηκαν και κάποιες άλλες πρωτεΐνες, μέλη της οικογένειας των Heat Shock Proteins, οι οποίες συναντώνται στο έκλουσμα του αντισώματος έναντι της KATNAL2 ενώ είτε απουσιάζουν, είτε βρίσκονται σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο δείγμα αρνητικού ελέγχου. Αυτές οι πρωτεΐνες πιθανότατα αλληλεπιδρούν με τις ισομορφές KATNAL2, το γεγονός όμως ότι βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στο πείραμα αρνητικού ελέγχου, όπως και το ότι κάποιες άλλες Heat Shock Proteins ταυτοποιήθηκαν τόσο στο έκλουσμα του φυσιολογικού ορού όσο και στο έκλουσμα του αντισώματος έναντι της KATNAL2 σε μεγάλες ποσότητες και στα δύο πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, δεν επιτρέπει την εξαγωγή απολύτως ασφαλών συμπερασμάτων όσο αφορά τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις και είναι κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Αξιοσημείωτο είναι το ότι οι κύριες πρωτεΐνες HSP που ταυτοποιήθηκαν, ανήκουν στο σαπερόνιο HSP70, του οποίου μία από τις λειτουργίες είναι και η πρόσδεση στα ριβοσώματα, για την ωρίμανση των υπό σύνθεση πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Willmund et al., 2013). Πιθανόν αυτό το σαπερόνιο να είναι υπεύθυνο για την κατάλληλη αναδίπλωση των

ισομορφών KATNAL2. Επίσης στις πιθανές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνες βρίσκονται, έστω και σε μικρές ποσότητες, και κάποιες δομικές ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Πίνακες 3.3 & 3.4).

Εικόνα 3.14: Αποτελέσματα πρώτου πειράματος ανοσοκατακρήμνισης το οποίο διεξήχθη σε μικρή κλίμακα.

A. Χρώση πηκτώματος ακρυλαμίδης με διάλυμα Brilliant Blue G-Colloidal, όπου παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του πρώτου πειράματος ανοσοκατακρήμνισης, το οποίο διενεργήθηκε με τη χρήση 8 μg αντισώματος έναντι της KATNAL2 σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από 4 όρχεις ποντικού. Με κόκκινα βελόνια φαίνονται οι 3 μπάντες που εντοπίζονται μόνο μέσω της ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα έναντι της KATNAL2, καθώς και η αντίστοιχη μπάντα 3n του αρνητικού ελέγχου, που αποκόπηκαν από το πήκτωμα και ταυτοποιήθηκαν οι περιεχόμενες πρωτεΐνες με φασματοσκοπία μάζας (Πίνακας 3.3).

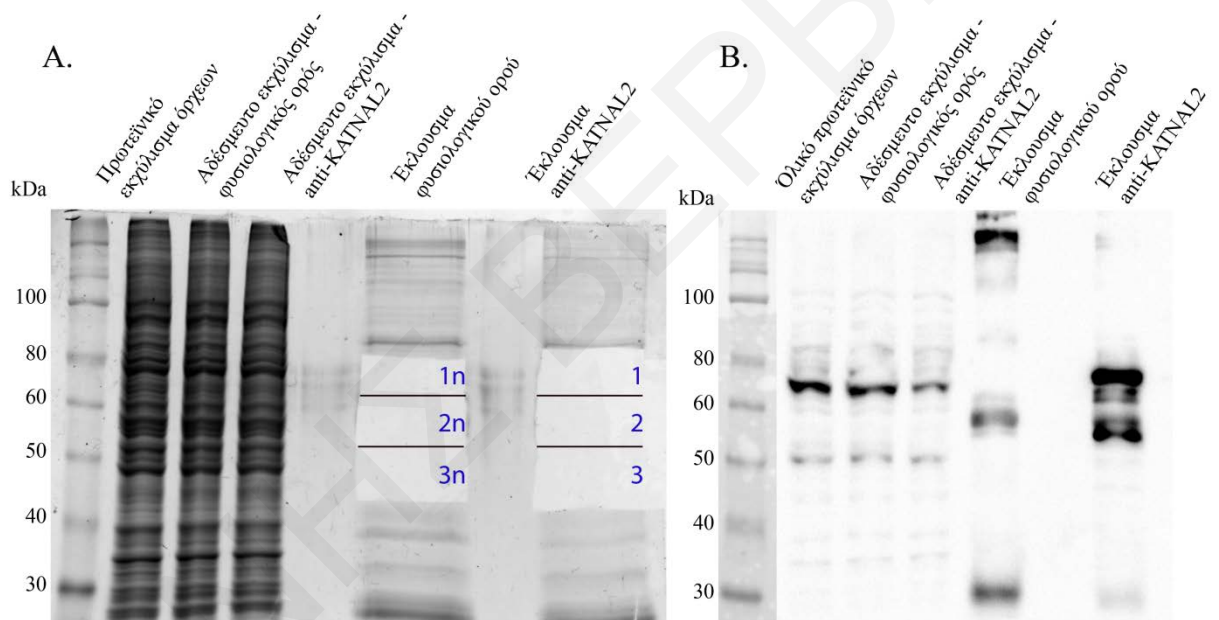
B. Αντίστοιχη ανοσοαποτύπωση κατά Western, με το αντίσωμα έναντι της KATNAL2, που εξετάζει τα ίδια δείγματα όπως στο (A). Οι ειδικές για το δείγμα της KATNAL2 ανοσοκατακρημισμένες μπάντες 1-3 είναι και ανοσοδραστικές, για αυτό και αποκόπηκαν για ταυτοποίηση των περιεχομένων πρωτεϊνών μέσω φασματοσκοπία μάζας στο πήκτωμα (A).



Εικόνα 3.15: Αποτελέσματα δεύτερου πειράματος ανοσοκατακρήμνισης το οποίο διεξήχθη σε μεγάλη κλίμακα.

A. Πήκτωμα ακρυλαμίδης που έχει υποστεί χρώση με διάλυμα Brilliant Blue G-Colloidal, όπου φαίνονται οι κομμένες ζώνες του δεύτερου πειράματος της ανοσοκατακρήμνισης. Κόπηκαν συνολικά 6 ζώνες: (α) τρεις (1, 2, 3) στις οποίες δεν μπορούσε να διακριθεί ειδική μπάντα στο έκλουσμα του αντισώματος έναντι της KATNAL2, αλλά η ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 3.15B) κατέδειξε την ύπαρξη ανοσοδραστικών μπαντών σε αυτές τις περιοχές, και β) τρεις ζώνες από το έκλουσμα του φυσιολογικού ορού (πείραμα αρνητικού ελέγχου), αντίστοιχες των 1, 2 και 3 (1n, 2n, 3n), για σύγκριση του περιεχομένου τους με αυτό του εκλούσματος του αντισώματος έναντι της KATNAL2.

B. Αυτοραδιογράφημα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπου παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του δεύτερου πειράματος της ανοσοκατακρήμνισης. Φαίνονται ξεκάθαρα διάφορες μπάντες από τα 45 KDa ως τα 80 KDa που εντοπίζονται ειδικά μέσω της ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα έναντι της KATNAL2. Για τον εντοπισμό των μπαντών χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της KATNAL2.



Σχήμα 3.6: Η ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση του καθαρισμένου αντισώματος έναντι της KATNAL2, σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας, κατέδειξε την ειδική αναγνώριση πεπτιδίων της KATNAL2.

Η αμινοξική αλληλουχία της KATNAL2-L1. Με κίτρινη σκίαση οι πεπτιδικές περιοχές που μέσω της φασματοσκοπίας μάζας, εντοπίστηκαν συνολικά ειδικά σε όλες τις ζώνες του εκλούσματος της ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα έναντι της KATNAL2. Τα ταυτοποιημένα πεπτίδια εκτείνονται τόσο στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, όσο και στο καρβοξυτελικό της άκρο, και αρκετά είναι κοινά σε όλες τις ισομορφές KATNAL2, γεγονός που δεν μπορεί να αποκλείσει την ύπαρξη και άλλων ισομορφών KATNAL2 σε αυτές τις ζώνες.

```

MELSYQTLKL THQAREAYEM RTEARRKNLL ILILHYLTQE GYMDAAKALE EETKLG LRRF EVCNDVDLET
ILMEYESYF VKFQKYPKVV KKAPDPVENN LPSRSGGKNK RLTNDSCQNL PKICHQKSRP KTSAVKTGDT
KSVKEHLKQV KESVTDTOAE STDFGLNISK IHKDPPEEKA QPRRGQIDF RGLLSDAIKG ATSEFALNTF
ECNPDPSERL LKPLSAFIGM NSEMRELAAY VSRDIYLHNP NIKWNDIIGL DAAKQLVKEA VVYPIRYPQL
FTGILSPWKG LLLYGPPGTG KTLAKAVAT ECKTTFFNIS ASTIVSKWRG DSEKLVRLVF ELARYHAPST
IFLDELESVM SQRGMVPGGE HEGSLRMKTE LLVQMDGLAR SEDLVFVLAAS SNLPWELDCA MLRRLEKRIL
VDLPSQEARQ AMIYHWLPPV SKNHAELEHT QLEYSVLSQE TEGYSGSDIK LVCREAAMRP VRKIFSVLEN
NQSESNLPG IQLDVTVTQD FLDVLAHTKP SAKNLTERYL AWQEKFESV

```

Πίνακας 3.3: Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας μάζας στις μπάντες του 1ου πειράματος ανοσοκατακρήμνισης σε εκχύλισμα όρχεων ποντικού.

Ανιχνεύθηκαν πεπτίδια των KATNAL2 (κίτρινη σκίαση) στις μπάντες 1, 2 & 3, επιβεβαιώνοντας την ορθή αναγνώριση τους από το αντίσωμα έναντι της KATNAL2. Ο κατάλογος που στάλθηκε από την μονάδα φασματοσκοπίας του EMBL ήταν σαφώς μεγαλύτερος, αλλά αποκλείστηκαν οι πρωτεΐνες οι οποίες ήταν παρούσες στην μπάντα του αρνητικού ελέγχου (3n) του 1ου πειράματος (αντίστοιχη της μπάντας 3 του εκλούσματος του αντί-KATNAL2), ή των τριών ζωνών του αρνητικού ελέγχου (1n, 2n & 3n) του 2ου πειράματος. Οι heat shock proteins που αναφέρονται σε αυτό τον πίνακα, απουσιάζουν από τους αρνητικούς ελέγχους των δύο πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης, αλλά χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση τυχόν αλληλεπίδραση τους με τις KATNAL2, λόγω της ταυτοποίησης διαφόρων άλλων heat shock proteins τόσο στο εκλούσμα του αντισώματος έναντι της KATNAL2 όσο και στους αρνητικούς ελέγχους των δύο πειραμάτων.

Πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν (<i>Mus musculus</i>)	Αριθμός καταχώρησης	Μοριακή μάζα	Μπάντα 1	Μπάντα 2	Μπάντα 3
Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	Q9D3R6	61 kDa		23	
Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	D3Z4J2_	56 kDa	7	20	12
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	sp P63038 CH60	61 kDa		2	
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C	71 kDa	17		
Heat shock protein 1-like	A1L347	71 kDa	5		
Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C	E9Q7V6	71 kDa	4		
Cytosolic 5'-nucleotidase 1B	sp Q91YE9 5NT1B	65 kDa	6		
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	IF2B	38 kDa			2

Πίνακας 3.4: Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας μάζας των ζωνών στο 2ο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σε εκχύλισμα όρχεων ποντικού.

Όπως και στο 1ο μικρότερης κλίμακας πείραμα, το αντίσωμα έναντι της KATNAL2 αναγνωρίζει ξεκάθαρα τις ισομορφές KATNAL2 (κίτρινη σκίαση). Στις ζώνες αρνητικού ελέγχου δεν ταυτοποιήθηκαν πεπτίδια των KATNAL2. Ο κατάλογος από την μονάδα φασματοσκοπίας του EMBL περιλάμβανε σαφώς περισσότερες πρωτεΐνες, εδώ όμως παρουσιάζονται μόνο οι πρωτεΐνες οι οποίες α) αντιπροσωπεύονται από τρία τουλάχιστον διαφορετικά πεπτίδια, και β) απουσιάζουν από τον αρνητικό έλεγχο. Εξαίρεση αποτελούν μερικά μέλη της οικογένειας των Heat Shock Proteins (πράσινη σκίαση), οι οποίες εντοπίστηκαν και στον αρνητικό έλεγχο, αλλά είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένες στο έκλουσμα του αντισώματος έναντι της KATNAL2. Αυτές οι πρωτεΐνες ενδεχομένως αλληλεπιδρούν με τις ισομορφές KATNAL2, αλλά χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση γιατί και διάφορες άλλες heat shock proteins ταυτοποιήθηκαν τόσο στο έκλουσμα του αντισώματος έναντι της KATNAL2 όσο και στους αρνητικούς ελέγχους των δύο πειραμάτων.

Πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν (<i>Mus musculus</i>)	Αριθμός καταχώρησης	MW (kDa)	Αντίσωμα έναντι της KATNAL2 (έκλουσμα)	Φυσιολογικός ορός (έκλουσμα)
Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	D3Z4J2_	56	94	0
Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	Q9D3R6	61	73	0
60S ribosomal protein L7 (Fragment)	F6XI62_	33	5	0
Histone H1.1	H11	22	10	0
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	IF2B_	38	11	0
ELAV (Embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i>)-like 2 (Hu antigen B)	B1AXZ0_	38	4	0
39S ribosomal protein L39, mitochondrial	RM39_	39	8	0
Galactokinase	GALK1_	42	4	0
28S ribosomal protein S9, mitochondrial	RT09_	45	12	0
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	PSMD6_	46	4	0
Protease (Prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 5	B1ARK2_	46	4	0
Desmin	DESM_	53	10	0
Protein misato homolog 1	D3YX87_	64	4	0
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	CLPX_	69	4	0
Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSP72_	70	44	17
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	DDX41_	70	4	0
Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C	E9Q7V6_	71	9	0
Heat shock 70kD protein 5 (Glucose-regulated protein)	A2AUF6_	72	39	19
Heat shock protein 9	Q7TSZ0_	73	43	23
Pentatricopeptide repeat-containing protein 3, mitochondrial	PTCD3_	78	4	0
Plakophilin-1	PKP1_	81	7	0
Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A_	85	6	0
Treacle protein	E9PYV2_	130	4	0

3.5 Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνικών ισομορφών KATNAL2

Μετά την επιβεβαίωση της αναγνώρισης των KATNAL2 από το αντίσωμα που σχεδιάστηκε έναντι της KATNAL2-S1, επόμενο βήμα του λειτουργικού χαρακτηρισμού τους ήταν ο ενδοκυτταρικός τους εντοπισμός. Για τη μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των ισομορφών διεξήχθησαν διάφορα πειράματα, που περιελάμβαναν την ανίχνευση τόσο σημασμένων όσο και ενδογενών ισομορφών.

3.5.1 Ενδοκυτταρικός εντοπισμός ισομορφών KATNAL2 συγχωνευμένων με το επιτόπιο Flag

Μια πρώτη προσέγγιση για τη μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των KATNAL2, ήταν και η παροδική επιμόλυνση κυτταροκαλλιέργειων με πλασμίδια που εξέφραζαν μορφές της KATNAL2 συγχωνευμένες στο αμινοτελικό άκρο με το επιτόπιο Flag. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν καταρχήν οι κατάλληλοι πλασμιδιακοί φορείς.

3.5.1.1 Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων pFlag-Katnal2-L1 & pFlag-Katnal2-S1

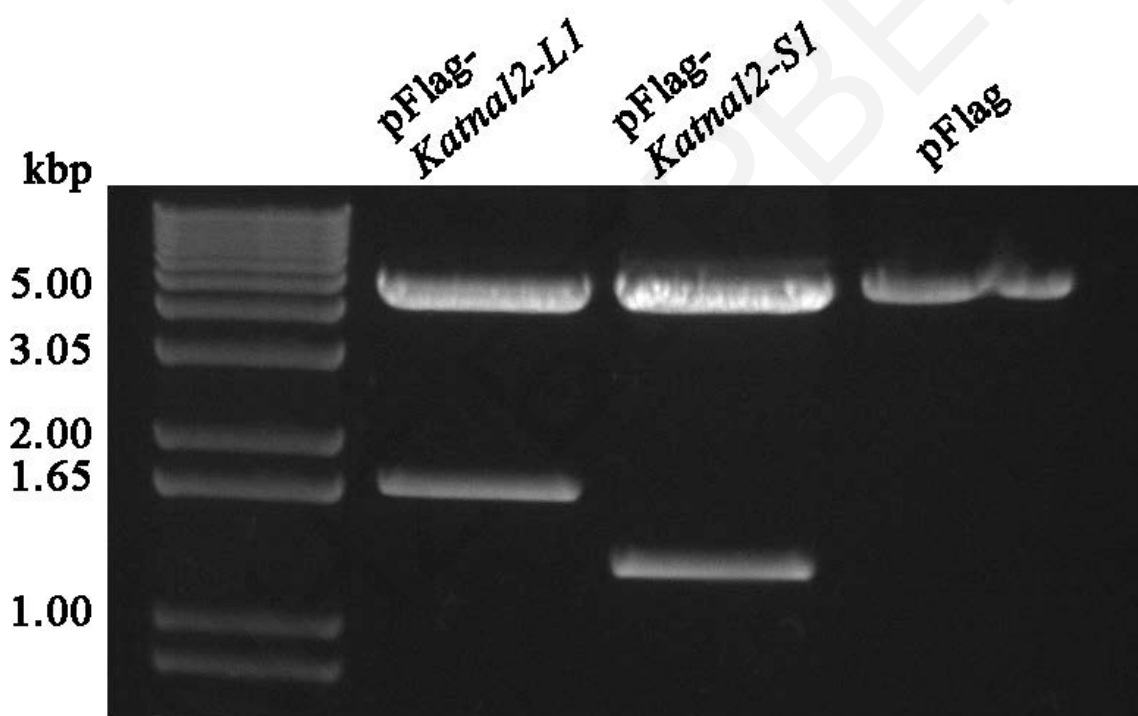
Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων pFlag-CMV2-Katnal2-L1 και pFlag-CMV2-Katnal2-S2, χρησιμοποιήθηκαν οι, προκατασκευασμένοι από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο, ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς pCR2.1-Katnal2-L1 και pCR2.1-Katnal2-S1. Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων pCR2.1, προηγήθηκε ενίσχυση του cDNA των ισομορφών *Katnal2* από δεξαμενή cDNA της κυτταρικής σειράς NIH 3T3, μέσω PCR με τη χρήση μείγματος πολυμεράσεων υψηλής πιστότητας. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές K2Flag FW και K2Flag RV, οι οποίοι σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση της πλήρους πρωτεϊνικής αλληλουχίας των ισομορφών ενώ ταυτόχρονα περιείχαν θέσεις αναγνώρισης για τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NotI (K2Flag FW) και XbaI (K2Flag RV).

Στους πλασμιδιακούς φορείς pCR2.1-Katnal2-L1 και pCR2.1-Katnal2-S1 καθώς και στο πλασμίδιο pFlag-CMV2 διενεργήθηκε πέψη περιορισμού με τη ταυτόχρονη χρήση των ενζύμων NotI και XbaI. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και τα ενθέματα *Katnal2-L1* και *Katnal2-S1*, όπως και ο "κομμένος" άδειος πλασμιδιακός φορέας pFlag-CMV2 απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και συγκεντρώθηκαν με καταβύθιση αιθανόλης. Ακολούθως διενεργήθηκε αντίδραση συνένωσης του DNA μεταξύ α) του ενθέματος *Katnal2-L1* και του "κομμένου" pFlag-CMV2 και β) του ενθέματος *Katnal2-S1* και του "κομμένου" pFlag-CMV2. Στη συνέχεια τα προϊόντα της συνένωσης των ενθεμάτων με το πλασμίδιο μετασχηματίστηκαν σε δεκτικά βακτήρια τύπου XL1-blue και εξετάστηκαν διάφοροι κλώνοι για επιτυχή ενσωμάτωση των δύο ενθεμάτων ξεχωριστά στο πλασμίδιο pFlag, με διπλή πέψη NotI και XbaI.

Το αποτέλεσμα ήταν η επιτυχής κλωνοποίηση των ενθεμάτων και η δημιουργία των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων pFlag-*Katnal-L1* και pFlag-*Katnal2-S1* (Εικόνα 3.16). Η επιβεβαίωση της απουσίας τυχόν μεταλλάξεων στις αλληλουχίες των ενθεμάτων που ενσωματώθηκαν στο πλασμίδιο και η διατήρηση του ορθού πλαισίου ανάγνωσης, έγινε με την αλληλούχηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων από την εταιρεία MWG Biotech.

Εικόνα 3.16: Ηλεκτροφόρημα αгарόζης όπου παρουσιάζεται ο έλεγχος της ενσωμάτωσης των ενθεμάτων *Katnal2-L1* και *Katnal2-S1* στο πλασμίδιο pFlag-CMV2, μετά από διπλή πέψη με NotI και XbaI.

Τα ενθέματα των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων βρίσκονται στο αναμενόμενο μέγεθος (~1.6 kbp για την *Katnal2-L1* και ~1.2 kbp για την *Katnal2-S1*).



3.5.1.2 Εντοπισμός με παροδική επιμόλυνση σημασμένων με επιτόπια Flag μορφών της KATNAL2

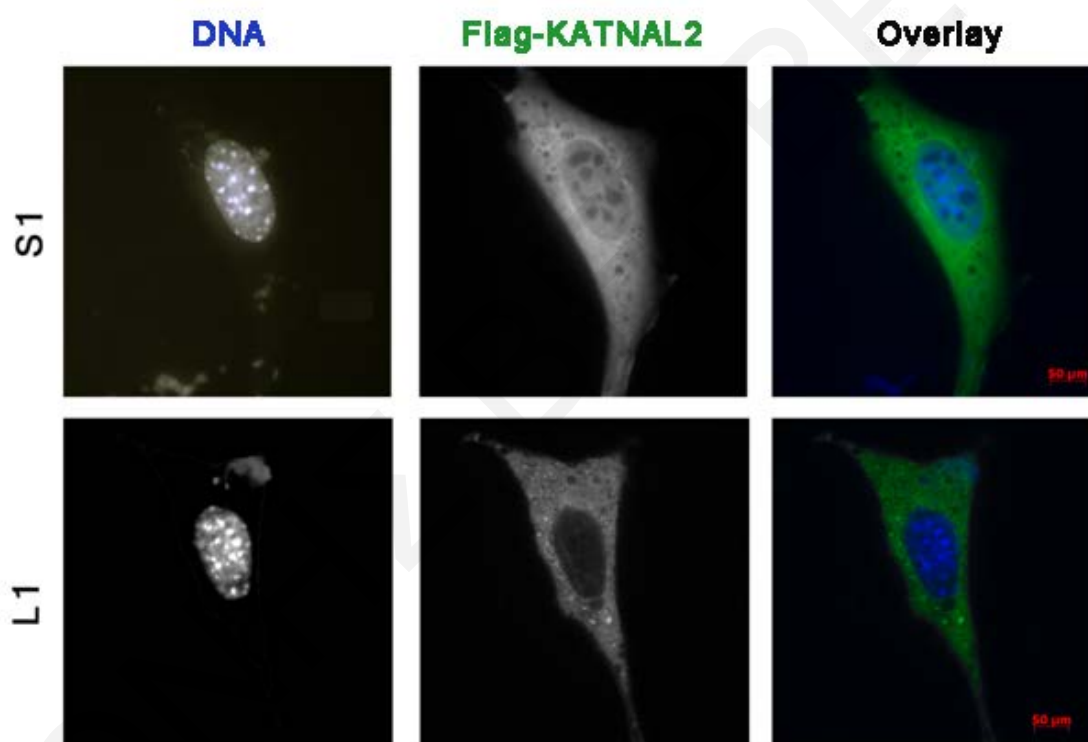
Τα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν όπως πιο πάνω χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παροδικής επιμόλυνσης (2.3.10) στην κυτταροσειρά NIH 3T3. Στα επιμολυσμένα κύτταρα διεξήχθη ακολούθως ανοσοφθορισμός (2.3.12) με χρήση αντισώματος έναντι της επιτοπίου Flag, για εξέταση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού του σήματος στα κύτταρα που εξέφραζαν την πρωτεΐνη Flag-KATNAL2-L1 ή Flag-KATNAL2-S1.

Η Flag-KATNAL2-L1 παρουσίαζε κυρίως κυτταροπλασματικό εντοπισμό, ενώ η Flag-KATNAL2-S1 ήταν διάχυτη και στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στον πυρήνα. Επίσης, στα περισσότερα επιμολυσμένα κύτταρα (>50%) με την Flag-KATNAL2-L1, εντοπίζονταν ποικίλου

μεγέθους πρωτεϊνικά συσσωματώματα (aggregates) (Εικόνα 3.17). Η παρουσία αυτών των συσσωματωμάτων ήταν ενδεικτικά πρωτεϊνικής αποδιάταξης (ίσως συνοδευόμενης από πρωτεόλυση) και κατά πάσα πιθανότητα δηλωτικά αδυναμίας ορθού εντοπισμού κάτω από συνθήκες υπερέκφρασης, καθώς δεν φαίνονταν να συνάδουν με την τοπολογία που θα αναμένετο με βάση τον χαρακτήρα των πρωτεϊνών αυτών τύπου Κατανίνης και τη βιβλιογραφία που υπάρχει για σχετιζόμενες πρωτεΐνες. Συνεπώς, καθώς η προσέγγιση αυτή δεν έδωσε βάσιμες πληροφορίες, εγκαταλείφθηκε.

Εικόνα 3.17: Εντοπισμός των ετερόλογων Flag-KATNAL2-S1 («S1») και Flag-KATNAL2-L1 («L1») μέσω παροδικής επιμόλυνσης.

Η κλίμακα στις φωτογραφίες είναι 50 μm.



3.5.2 Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των ενδογενών πρωτεϊνικών ισομορφών KATNAL2 με χρήση του αντισώματος έναντι της KATNAL2-S1

Στη συνέχεια προχωρήσαμε με τον εντοπισμό των ενδογενών ισομορφών KATNAL2, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα έναντι της KATNAL2, το οποίο βάσει των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης αποδείχθηκε πως διαθέτει την απαιτούμενη εξειδίκευση. Για τον ενδοκυτταρικό τους εντοπισμό, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού στις κυτταρικές σειρές NIH 3T3, IMCD 3 και TM 4. Συγκεκριμένα διενεργήθηκαν συνδυασμοί χρώσεων του αντισώματος έναντι της KATNAL2 με αντισώματα έναντι της α- και γ- τουμπουλίνης, που θα μας επέτρεπαν την γενικότερη εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικών με τον εντοπισμό των KATNAL2.

Επιπρόσθετοι λόγοι της χρήσης των συγκεκριμένων αντισωμάτων, ήταν η πιστοποιημένη παρουσία της αλληλεπιδρώσας Nubp1 στα κεντροσωμάτια (αντί-γ-τουμπουλίνη), και η πιθανή εμπλοκή των KATNAL2 στην κατάτμηση των μικροσωληνίσκων (αντί-α-τουμπουλίνη), μια ιδιότητα που χαρακτηρίζει την συγγενική αρχέτυπη Katanin.

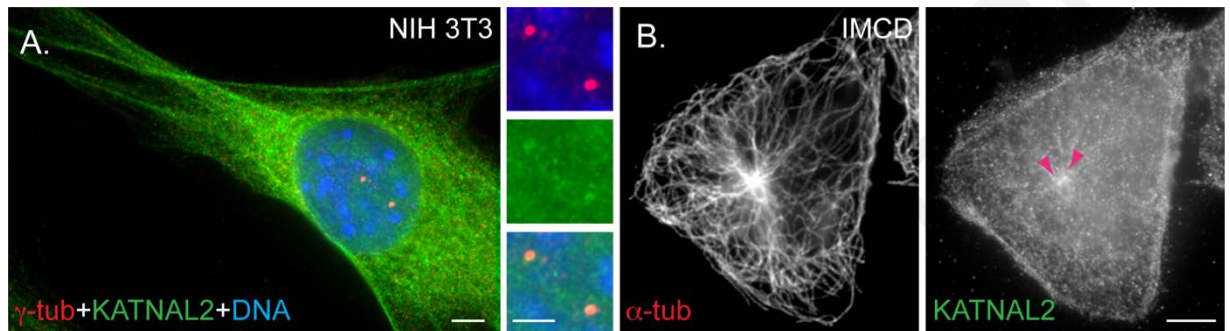
Η χρήση του αντί-KATNAL2 αντισώματος αποκάλυψε ότι κατά τη μεσόφαση, οι ισομορφές KATNAL2 παρουσίαζαν έντονο κυτταροπλασματικό εντοπισμό (Εικόνα 3.18Α), ενώ από τη διπλή χρώση με αντί-KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της α-τουμπουλίνης διαφάνηκε συνεντοπισμός των KATNAL2 με τους μεσοφασικούς μικροσωληνίσκους (Εικόνα 3.18Β), ενισχύοντας τις υποψίες για εμπλοκή των KATNAL2 στην κατάτμηση των συγκεκριμένων δομών. Η διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της γ-τουμπουλίνης σε μεσοφασικά κύτταρα φανέρωσε μια μάλλον ισχυρή παρουσία των KATNAL2 στα μεσοφασικά κεντροσωμάτια (Εικόνα 3.18Α).

Στα μιτωτικά κύτταρα, διαφάνηκε ότι κατά τα αρχικά στάδια της μίτωσης (πρόφαση και προμετάφαση), η χρώση στα κεντρίδια των κεντροσωματίων στους σχηματιζόμενους αστέρες ήταν πολύ πιο έντονη σε σχέση με τα μεσοφασικά κύτταρα, φανερώνοντας την έντονη παρουσία των ισομορφών KATNAL2 στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου. Στα μετέπειτα στάδια της μίτωσης, οι KATNAL2 εντοπίζονταν στους μικροσωληνίσκους που προεκβάλλουν από τους αστέρες των δύο πόλων της μιτωτικής ατράκτου, καθώς και στο πυρηνόπλασμα. Κατά την κυτοκίνηση οι KATNAL2 συναντώνται στο ενδιάμεσο σώμα (Εικόνα 3.19). Παρόμοιο μιτωτικό φαινόμενο εμφανίζουν και οι αλληλεπιδρώσες Nubp1 και Nubp2 (Kyrgi et al., 2014), αποκαλύπτοντας ένα σημείο στο οποίο οι KATNAL2 μπορεί να συνεργάζονται με τις Nubps, για να επιτελέσουν συγκεκριμένη λειτουργία κατά τη μίτωση. Η έντονη παρουσία και η πιθανή λειτουργικότητα των KATNAL2 στα μιτωτικά κύτταρα, ενδέχεται να αποτελεί έναν από τους λόγους που οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες εκφράζονται περισσότερο σε διαιρούμενα παρά σε διαφοροποιημένα κύτταρα (3.3).

Εικόνα 3.18: Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των ενδογενών KATNAL2 κατά τη μεσόφαση.

A. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της γ -τουμπουλίνης σε κύτταρα NIH 3T3 που δείχνει ότι οι ισομορφές KATNAL2 εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των μεσοφασικών κυττάρων, ενώ είναι επίσης διακριτές στα μεσοφασικά κεντροσωμάτια.

B. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης σε κύτταρα IMCD που φανερώνει την στενή σύνδεση των ισομορφών KATNAL2 με τους μεσοφασικούς μικροσωληνίσκους και κεντροσωμάτια (κόκκινα βέλη). Η κλίμακα στις φωτογραφίες είναι 5 μm και στις μεγεθυμένες εικόνες 3 μm .



Εικόνα 3.19: Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των ενδογενών KATNAL2 κατά τη μίτωση.

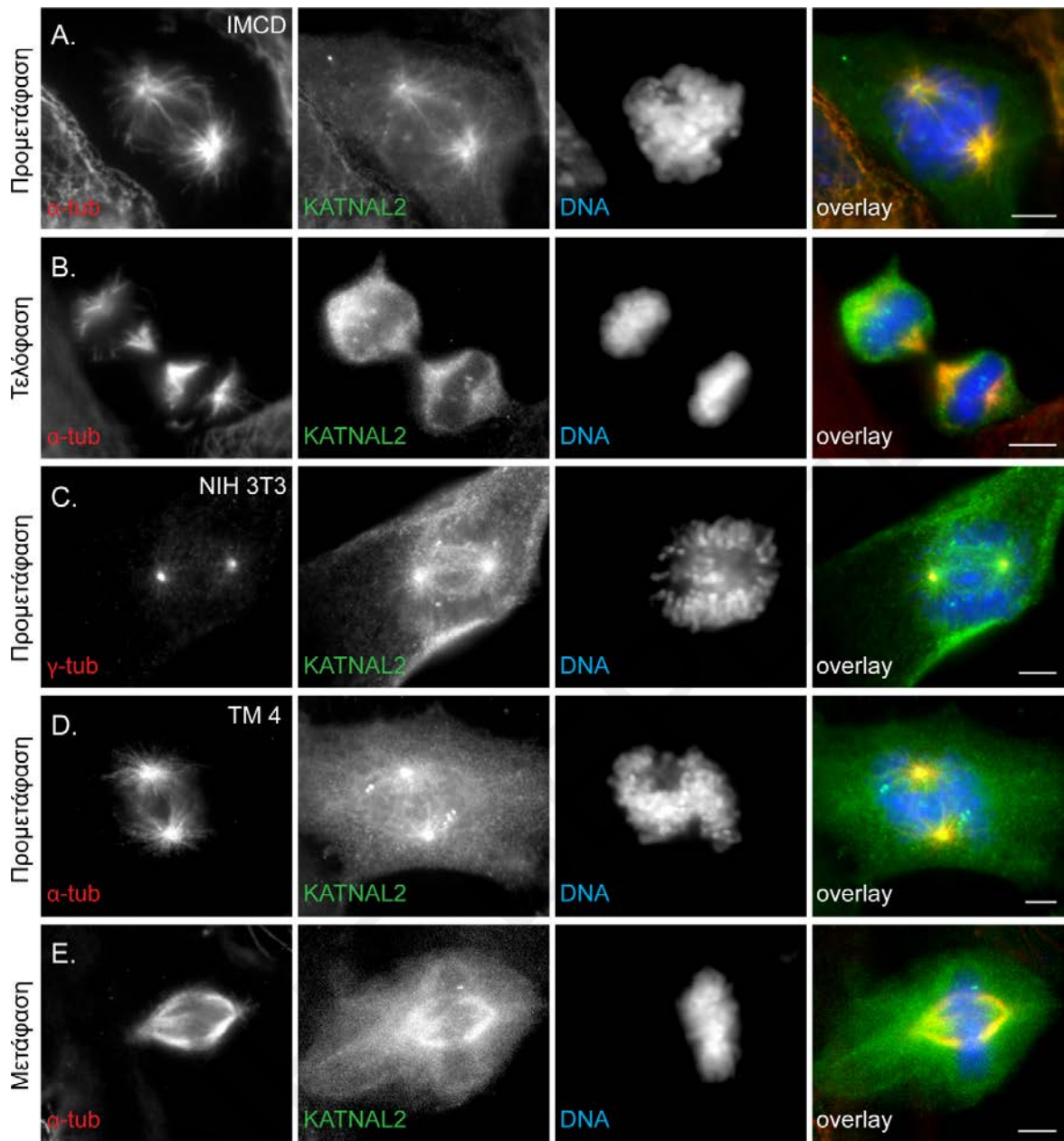
A. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης σε κύτταρα IMCD που βρίσκονται στην προμετάφαση, όπου οι KATNAL2 εντοπίζονται στους πόλους της μιτωτικής ατράκτους καθώς και στους μικροσωληνίσκους που προεκβάλλουν από τους δύο πόλους.

B. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης σε κύτταρα IMCD που βρίσκονται στην τελόφαση, όπου οι KATNAL2 εντοπίζονται στο ενδιάμεσο σώμα (midbody) και διάχυτες στο πυρηνόπλασμα.

C. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της γ -τουμπουλίνης σε κύτταρα NIH 3T3 που βρίσκονται στην προμετάφαση, όπου είναι εμφανής η παρουσία των KATNAL2 στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου και ειδικά στα κεντροσωμάτια.

D. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης σε κύτταρα TM 4 που βρίσκονται στην προμετάφαση, όπου οι KATNAL2 εντοπίζονται στους πόλους της μιτωτικής ατράκτους καθώς και στους μικροσωληνίσκους που προεκβάλλουν από τους δύο πόλους.

E. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης σε κύτταρα TM 4 που βρίσκονται στην μετάφαση, όπου η παρουσία των KATNAL2 στους πόλους της μιτωτικής ατράκτους δεν είναι τόσο έντονη όσο είναι στην προμετάφαση, αλλά είναι πλέον ξεκάθαρος ο εντοπισμός της στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου. Η κλίμακα σε όλες τις φωτογραφίες είναι 5 μm .



3.5.3 Ενδοκυτταρικός εντοπισμός των ισομορφών KATNAL2 κατά τη βλεφαριδογένεση

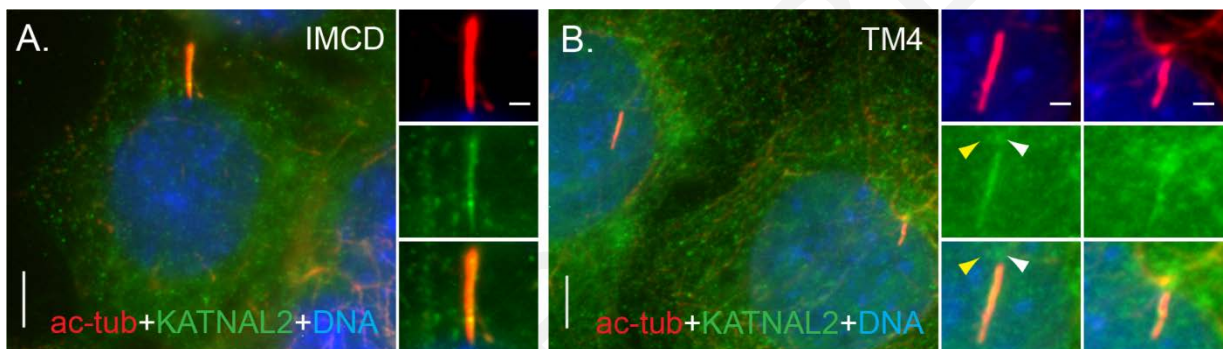
Λόγω του σημαντικού ρόλου που επιτελεί η αρχέτυπη πρωτεΐνη Κατανίνη κατά την βλεφαριδογένεση (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012), καθώς και της εμπλοκής της αλληλεπιδρώσας Nubp1 στην ίδια διαδικασία (Kyrgi et al., 2014), θεωρήθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί ο εντοπισμός των ισομορφών KATNAL2 στις μονήρεις αισθητήριες κυτταρικές βλεφαρίδες. Ο έλεγχος έγινε με διπλή χρώση με το αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (που είναι δείκτης του αξονήματος των βλεφαρίδων) σε κυτταρικές σειρές IMCD 3 και TM 4 (Εικόνα 3.20), στις οποίες είχε διενεργηθεί επαγωγή βλεφαριδογένεσης (2.3.8). Και στις δυο περιπτώσεις οι KATNAL2 εντοπίστηκαν και στο αξόνημα, αλλά και στο βασικό σωματίο των βλεφαρίδων (μητρικό κεντροσωμάτιο) καθώς και στο θυγατρικό κεντροσωμάτιο που παραμένει, επιβεβαιώνοντας την παρουσία των υπό μελέτη

ισομορφών στις βλεφαρίδες κινώντας παράλληλα και υπόνοιες για πιθανή εμπλοκή των KATNAL2 στη βλεφαριδογένεση, και πιθανή συνεργασία τους με τη Nubp1 για τη διεκπεραίωση του ρόλου τους στην όλη διεργασία.

Εικόνα 3.20: Οι KATNAL2 εντοπίζονται στο αξόνημα και στο βασικό σωματίο των πρωτογενών βλεφαρίδων.

A. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης σε κύτταρα IMCD που εμφανίζει τις ισομορφές KATNAL2 να εντοπίζονται στο αξόνημα και στο βασικό σωματίο των βλεφαρίδων.

B. Διπλή χρώση με αντίσωμα έναντι της KATNAL2 και αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης σε κύτταρα TM 4 που εμφανίζει τις ισομορφές KATNAL2 να εντοπίζονται στο αξόνημα και στο βασικό σωματίο των βλεφαρίδων. Η κλίμακα στις φωτογραφίες είναι 5 μm , και στις μεγεθυμένες εικόνες 1 μm .



3.5.4 Διερεύνηση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνικών ισομορφών KATNAL2 στον πυρηνίσκο

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ανοσοφθορισμού, ένα κλάσμα των KATNAL2 φαινόταν να εντοπίζεται σε διακριτές θέσεις μέσα στον πυρήνα, ειδικότερα ως κοκκία εντός των πυρηνίσκων. Η διπλή χρώση με αντισώματα έναντι των KATNAL2 και της πρωτεΐνης-δείκτη των υποπεριοχών του ινώδους κέντρου (fibrillar center) και του πυκνού ινώδους διαμερίσματος (dense fibrillar component) του πυρηνίσκου, Φιμπριλλαρίνης (Chen and Jiang, 2004), έδειξε ότι οι δυο αυτές πρωτεΐνες συνεντοπίζονται εντός του πυρηνίσκου (Εικόνα 3.21). Αυτή είναι και η πρώτη φορά που μία πρωτεΐνη τύπου Κατανίνης, φαίνεται να εμπλέκεται με οποιοδήποτε τρόπο στη λειτουργία του πυρηνίσκου, που αφορά κυρίως τη σύνθεση των ριβοσωμικών υπομονάδων και κατά επέκταση την πρωτεϊνοσύνθεση (Olson and Dundr, 2015).

Βάσει αυτών των δεδομένων, για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του κλάσματος των KATNAL2 που εντοπίζονται στον πυρηνίσκο, διενεργήθησαν πειράματα αναστολής της μεταγραφής του DNA σε κυτταροκαλλιέργειες (2.3.11). Υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής, οι πρωτεΐνες του πυρήνα, του πυρηνίσκου και του πυρηνοπλάσματος ανακατανέμονται, δημιουργώντας συσσωματώματα, και προκαλώντας το σχηματισμό διάφορων τύπων δακτυλίων

(caps) γύρω από τους πυρηνίσκους, εκ των οποίων τα κυριότερα είναι: α) τα πολλαπλά Dark Nucleolar Caps (DNCs) με χαρακτηριστικό κυρτό σχήμα βάσης, τα οποία περιστοιχίζουν τον πυρηνίσκο σαν δακτυλίδι και β) τα λιγότερα συχνά Light Nucleolar Caps (LNCs) με κυρτό σχήμα, τα οποία εμφανίζονται να είναι συνδεδεμένα με το κέντρο του πυρηνίσκου ή και να προεξέχουν από αυτό. Έτσι λοιπόν η κυτταροσειρά NIH 3T3 επωάστηκε με 1 µg/ml Ακτινομυκίνης D για να επιτευχθεί αναστολή της δράσης των RNA πολυμερασών I, II και III (Olson, 2011). Ακολούθως με την τεχνική του ανοσοφθορισμού διενεργήθηκε διπλή χρώση των κυττάρων με το αντίσωμα έναντι των KATNAL2 και είτε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης φιμπριλλαρίνης, η οποία υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής συναθροίζεται στα LNCs, είτε της πρωτεΐνης PSP1 (paraspeckle protein 1), η οποία εντοπίζεται στα οργανίδια που είναι γνωστά ως πυρηνικά στίγματα (paraspeckles) και υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής συναθροίζεται στα DNCs (Shav-Tal et al., 2005).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι KATNAL2 εντοπίζονται στον πυρηνίσκο μαζί με την Φιμπριλλαρίνη, και σε συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με Ακτινομυκίνη D (1 µg/ml) ανακατανέμονται και εξακολουθούν να συνεντοπίζονται στα LNCs. Οι KATNAL2 δεν συνεντοπίζονται με την PSP1 ούτε υπό φυσιολογικές συνθήκες στα πυρηνικά στίγματα, ούτε υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής (1 µg/ml Ακτινομυκίνη D) στα DNCs (Εικόνα 3.21).

Η μεταγραφική αναστολή με το DRB (50 µg/ml), η οποία αναστέλλει ειδικά τη δράση της RNA πολυμεράσης II, αλλά δεν προκαλεί την εκτεταμένη ανακατανομή που συμβαίνει με τη χρήση της Ακτινομυκίνης D (1 µg/ml) (Stoimenov et al., 2011), έδωσε παρόμοια αποτελέσματα, δηλαδή τον συνεντοπισμό των KATNAL2 με τα συσσωματώματα Φιμπριλλαρίνης και την απουσία τους από τα συναθροίσματα της PSP1 (Εικόνα 3.22).

Το συμπέρασμα που εξάγεται από τα πιο πάνω δεδομένα είναι ότι το κλάσμα των KATNAL2 του πυρηνίσκου, φαίνεται να συναθροίζεται με τη Φιμπριλλαρίνη τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά ακόμα και όταν οι δύο πρωτεΐνες ανακατανέμονται στον πυρήνα λόγω μεταγραφικής αναστολής, εκτεταμένης ή αποκλειστικά της RNA πολυμεράσης II. Πιθανόν οι δύο πρωτεΐνες να παρουσιάζουν άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση, θέμα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης για να αναλυθεί και ο πιθανός λειτουργικός ρόλος μιας πρωτεΐνης τύπου Κατανίνης στον πυρηνίσκο.

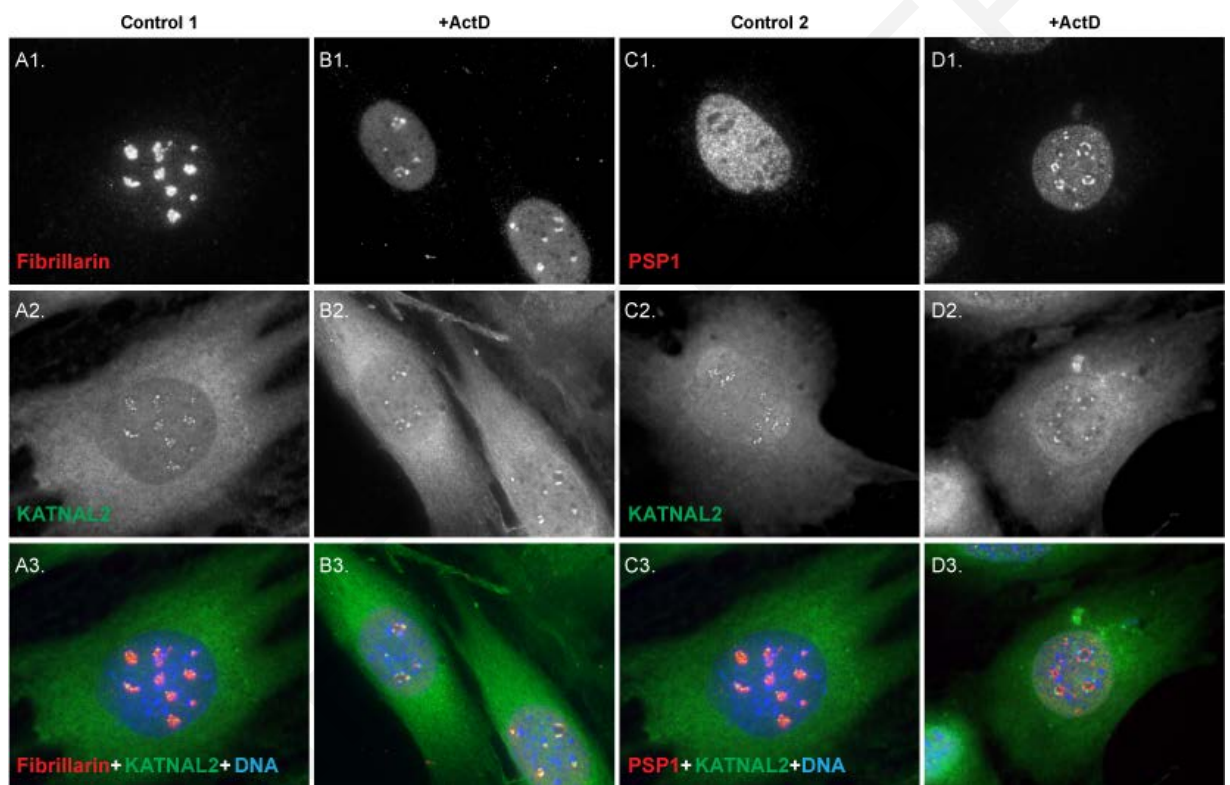
Εικόνα 3.21: Ένα κλάσμα των KATNAL2 εντοπίζεται στον πυρηνίσκο και υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με Ακτινομυκίνη D (1 µg/ml) συσπεντοπίζεται με την Φιμπριλλαρίνη στα LNCs, δεν εντοπίζεται όμως στα DNCs στα κύτταρα NIH 3T3.

A. Στη μεσόφωση ένα κλάσμα των KATNAL2 εντοπίζεται στον πυρηνίσκο και συσπεντοπίζεται με την Φιμπριλλαρίνη.

B. Υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με Ακτινομυκίνη D οι KATNAL2 του πυρηνίσκου ανακατανέμονται στα LNCs όπου συναθροίζονται με την Φιμπριλλαρίνη.

C. Οι KATNAL2 του πυρηνίσκου δεν συσπεντοπίζονται με την PSP1 στα πυρηνικά στίγματα.

D. Υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με Ακτινομυκίνη D οι KATNAL2 συνεχίζουν να μην συσπεντοπίζονται με την PSP1 στα DNCs.



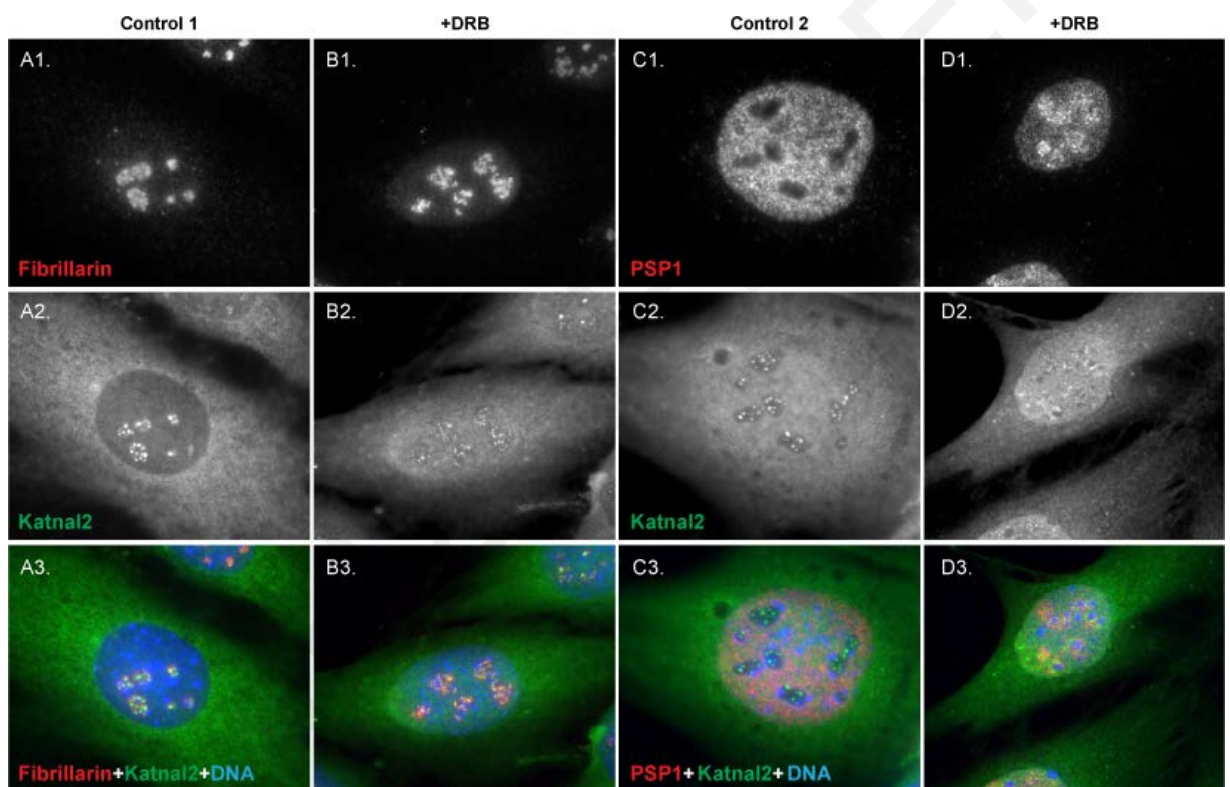
Εικόνα 3.22: Ένα κλάσμα των KATNAL2 εντοπίζεται στον πυρηνίσκο και υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με DRB (50 µg/ml) συσσωματώνεται με την Φιμπριλλαρίνη, δεν συσσωματώνεται όμως με την PSP1 στα κύτταρα NIH 3T3.

A. Στη μεσόφαση ένα κλάσμα των KATNAL2 εντοπίζεται στον πυρηνίσκο και συσσωματώνεται με την Φιμπριλλαρίνη.

B. Υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με DRB (50 µg/ml) οι KATNAL2 του πυρηνίσκου ανακατανέμονται και εντοπίζονται σε συναθροίσματα Φιμπριλλαρίνης.

C. Οι KATNAL2 του πυρηνίσκου δεν συσσωματώνονται με την PSP1 στα πυρηνικά στίγματα.

D. Υπό συνθήκες μεταγραφικής αναστολής με DRB (50 µg/ml) οι KATNAL2 συνεχίζουν να μην συσσωματώνονται με τα συσσωματώματα της PSP1, αν και τα δυο υποσύνολα πρωτεϊνών βρίσκονται σε πολύ κοντινή απόσταση ή ακόμα και σε επαφή.



3.6 Μεταγραφική αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδίων shRNA

Μετά και το πέρας των πειραμάτων ενδοκυτταρικού εντοπισμού, επόμενος σταθμός του χαρακτηρισμού των KATNAL2 ήταν η μεταγραφική τους αποσιώπηση. Η μείωση της έκφρασης των υπό μελέτη ισομορφών, και η παρατήρηση των συνεπειών αυτής, στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, προσέφερε πολύτιμα στοιχεία σχετικά με τη λειτουργία τους.

Για τα πειράματα της μεταγραφικής αποσιώπησης ακολουθήθηκε η στρατηγική της χρήσης ολιγονουκλεοτιδίων shRNA (Πίνακας 2.12), ειδικά σχεδιασμένων έναντι κοινής περιοχής του mRNA όλων των κλωνοποιημένων ισομορφών *Katnal2*, για τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του συνολικού κλάσματος των KATNAL2. Τα συγκεκριμένα shRNA ήταν ήδη ενσωματωμένα στον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1, και χρησιμοποιήθηκαν (το καθένα ξεχωριστά) για τη μόνιμη επιμόλυνση κυτταροσειρών NIH 3T3, μέσω της διαμεσολάβησης φακοίων (2.3.9). Ακολούθησε επιλογή των κυττάρων που είχαν επιτυχώς επιμολυνθεί με το πλασμίδιο με τη χρήση του αντιβιοτικού πουρομυκίνη σε συγκέντρωση 4 μg/ml (2.3.9.2). Η τιμή αυτή βρέθηκε να είναι η μικρότερη που προκαλεί θάνατο σε όλα τα μη επιμολυσμένα κύτταρα NIH 3T3 εντός 24 ωρών. Ακολούθησε απομόνωση κλώνων κάτω από το μικροσκόπιο, πολλαπλασιασμός τους και σάρωση τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western ώστε να επισημανθούν κλώνοι με υψηλό βαθμό αποσιώπησης και να χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή πειραμάτων που θα βοηθήσουν στην αποσαφήνιση του ρόλου των ισομορφών KATNAL2.

3.6.1 Μεταγραφική αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 με τη χρήση του ολιγονουκλεοτιδίου shRNA με τον κωδικό TRCN0000090749

3.6.1.1 Επιλογή κλώνου που φέρει το ολιγονουκλεοτίδιο shRNA TRCN0000090749

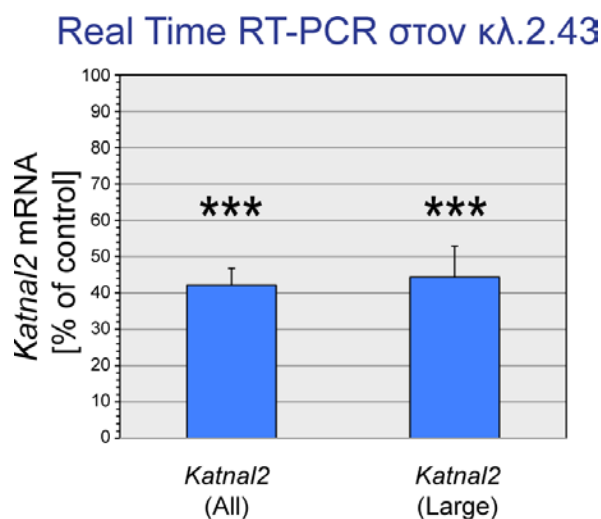
Από τον πληθυσμό των επιμολυσμένων NIH 3T3 με το ολιγονουκλεοτίδιο shRNA με τον κωδικό TRCN0000090749, απομονώθηκαν και καλλιιεργήθηκαν συνολικά 52 κλώνοι/αποικίες. Οι αποικίες ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση του αντισώματος έναντι της KATNAL2. Τη μέγιστη μεταγραφική αποσιώπηση εμφάνιζε ο κλώνος με την κωδική ονομασία 2.43. Πιο αναλυτικά, η διεξαγωγή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων έδειξε ότι η έκφραση των mRNA όλων των *Katnal2* στον κλώνο 2.43 μειώθηκε με στατιστική σημαντικότητα ($p=2.68 \times 10^{-5}$) στο $42.17 \pm 4.62\%$ των φυσιολογικών επιπέδων (δηλαδή σε μη επιμολυσμένη κυτταροσειρά NIH 3T3), ενώ η έκφραση των mRNA των μεγάλων *Katnal2* (*L1*, *L2*, *L3*) μειώθηκε σημαντικά ($p=3.40 \times 10^{-4}$) στο $44.37 \pm 8.47\%$ (Γράφημα 3.1). Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα *L19* και *PUM1*. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό REST-384 (Pfaffl et al., 2002).

Σε παρόμοια ποσοστά μείωσης κυμάνθηκαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των KATNAL2, καθώς τρία ανεξάρτητα πειράματα έδειξαν την έκφραση των ισομορφών να βρίσκεται μόνο στο $38.04 \pm 13.78\%$ ($p=0.02$) της φυσιολογικής (Εικόνα 3.23, Γράφημα 3.2). Η κανονικοποίηση έγινε ως προς τις αντίστοιχες ποσότητες της πρωτεΐνης του ενδοπλασματικού δικτύου, Calnexin (Spencer et al., 2004). Δεν έγινε κατορθωτή η απομόνωση κλώνου με μεγαλύτερη ελάττωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα των KATNAL2, γεγονός που αφήνει υπόνοιες για πρόκληση κυτταρικής τοξικότητας ή και θανάτου σε περιπτώσεις πλήρους αποσιώπησης των εν λόγω πρωτεϊνών.

Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα που κατέδειξε η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ήταν η ελάττωση στον κλώνο 2.43 και της πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεϊνών Nubp1 ($47.97 \pm 8.93\%$ της φυσιολογικής έκφρασης, $p=0.04$) και Nubp2 ($58.34 \pm 8.06\%$ της φυσιολογικής έκφρασης, $p=0.01$), οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις KATNAL2. Η έκφραση πρωτεϊνών που δεν σχετίζονται ή αλληλεπιδρούν με τις KATNAL2, όπως της Ακτίνης, ήταν σε παρόμοια επίπεδα στον φυσιολογικό πληθυσμό και στον κλώνο 2.43, υποστηρίζοντας την ειδικότητα της μείωσης των Nubp1 και Nubp2 (Γράφημα 3.2). Το γεγονός αυτό ενισχύει περαιτέρω τη συσχέτιση που έχουν μεταξύ τους οι KATNAL2 με τις Nubp1 και Nubp2, στα διάφορα ρυθμιστικά μονοπάτια των ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών που εμπλέκονται. Υπενθυμίζουμε ότι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ενώ συνεντοπίζονται στα μεσοφασικά κεντροσωμάτια, στους πόλους και στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου, και στις βλεφαρίδες.

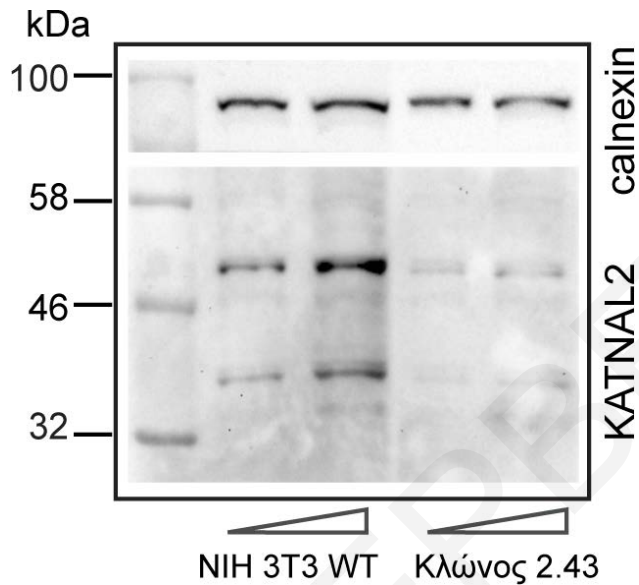
Γράφημα 3.1: Μέτρηση των επιπέδων αποσιώπησης των *Katnal2* στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43, μέσω Real-Time RT PCR.

Διάγραμμα που απεικονίζει α) τη μείωση με στατιστική σημαντικότητα (t -test, $p=2.68 \times 10^{-5}$) της έκφρασης των mRNA όλων των ισομορφών *Katnal2* στο $42.17 \pm 4.62\%$ των φυσιολογικών επιπέδων και β) τη πτώση (t -test, $p=3.40 \times 10^{-4}$) της έκφρασης των μεγάλων ισομορφών *Katnal2* (*L1*, *L2*, *L3*) στο $44.37 \pm 8.47\%$ των φυσιολογικών επιπέδων. Τα αποτελέσματα λήφθηκαν με τη διενέργεια αντίδρασης Real-time PCR με τη χρήση ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που ενισχύουν τα cDNA όλων των ισομορφών *Katnal2* (α) και ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που ενισχύουν τα cDNA μόνο των μεγάλων ισομορφών *Katnal2* (*L1*, *L2*, *L3*) (β). Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα *L19* και *PUM1*, και διεξήχθησαν τρία ανεξάρτητα πειράματα.



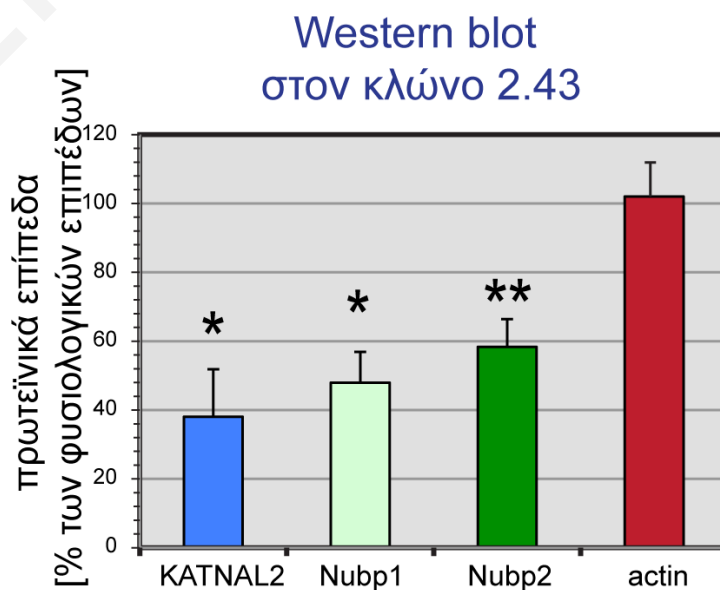
Εικόνα 3.23: Μέτρηση των επιπέδων αποσιώπησης των KATNAL2 στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Αυτοραδιογράφημα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπου φαίνεται ξεκάθαρα η μείωση της έκφρασης της κύριας μπάντας που αναγνωρίζει το αντίσωμα έναντι της KATNAL2 στον κλώνο 2.43. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε ως προς τις αντίστοιχες ποσότητες Calnexin.



Γράφημα 3.2: Διαγραμματική απεικόνιση της μείωσης στην έκφραση των ισομορφών KATNAL2 και των πρωτεϊνών Nubp1 και Nubp2 στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43.

Διάγραμμα που απεικονίζει α) την ελάττωση (t-test, $p=0.02$) της πρωτεϊνικής έκφρασης των KATNAL2 στο $38.04 \pm 13.78\%$ των φυσιολογικών επιπέδων και β) την πτώση (t-test, $p=0.04$) της πρωτεϊνικής έκφρασης της Nubp1 στο $47.97 \pm 8.93\%$ των φυσιολογικών επιπέδων, γ) τη μείωση (t-test, $p=0.01$) της πρωτεϊνικής έκφρασης της Nubp2 στο $58.34 \pm 8.06\%$ των φυσιολογικών επιπέδων. δ) Η έκφραση της Ακτίνης δεν παρουσίασε μεταβολή στον κλώνο 2.43 έναντι της φυσιολογικής έκφρασης στην μητρική κυτταροσειρά του κλώνου, NIH 3T3. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε ως προς τις αντίστοιχες ποσότητες Calnexin. Διεξήχθησαν τρία ανεξάρτητα πειράματα και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών σημάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ 1.49n.



3.6.1.2 Χαρακτηρισμός κλώνου 2.43

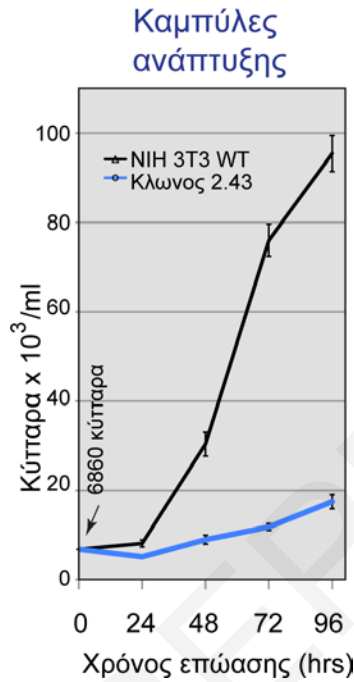
Για τον χαρακτηρισμό του κλώνου 2.43, ο οποίος παρουσιάζει μειωμένη έκφραση των KATNAL2, αρχικά κατασκευάστηκε η καμπύλη ανάπτυξης του (2.3.7). Συγκεκριμένα κατασκευάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης για τον κλώνο 2.43 και τη μητρική του κυτταροσειρά, NIH 3T3. Αν και οι αρχικοί πληθυσμοί των δύο καλλιέργειών ήταν ίσοι (6860 κύτταρα), στα επόμενα σημεία της καμπύλης ανάπτυξης ο κυτταρικός πληθυσμός του 2.43 ήταν κατά πολύ μικρότερος (Γράφημα 3.3). Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε σημαντικά χαμηλότερο ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης στον κλώνο 2.43, είτε σε υψηλότερο ρυθμό κυτταρικού θανάτου στον ίδιο κλώνο. Είναι προφανές ότι η αποσιώπηση προκαλεί ανωμαλίες στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων, καθυστερώντας την επέκταση της κυτταροκαλλιέργειας.

Η ανάλυση του συνολικού κυτταρικού μεγέθους, καθώς και του μεγέθους των πυρήνων σε μεγάλο αριθμό κυττάρων (2.3.12.3.1) κατέδειξε ότι τα κύτταρα του κλώνου 2.43 ήταν μεγαλύτερα ($p < 0.00001$) από τα κύτταρα NIH 3T3. Συνολικά αναλύθηκαν 127 κύτταρα του κλώνου 2.43 και 129 κύτταρα NIH 3T3. Ενώ το ολικό κυτταρικό μέγεθος των κυττάρων NIH 3T3 κυμαινόταν μεταξύ 100-1000 μm^2 , στα σαφώς μεγαλύτερα κύτταρα 2.43 το μέγεθος ήταν μεταξύ 100-70,000 μm^2 (Γράφημα 3.4A). Τα μεγέθη των πυρήνων κυμαίνονταν μεταξύ 200-800 μm^2 στα φυσιολογικά κύτταρα, και μεταξύ 200-3,000 μm^2 στα κύτταρα του κλώνου 2.43 ($p < 0.00001$) (Γράφημα 3.4B). Αυτές οι διαφορές μεταξύ των κυτταρικών μεγεθών των αποσιωπημένων και των φυσιολογικών κυττάρων φαίνονται ξεκάθαρα στο μικροσκόπιο (Εικόνα 3.24), τονίζοντας το γεγονός ότι αν και τα αποσιωπημένα κύτταρα εμφανίζουν αργό ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης, εν τούτοις συνεχίζουν να μεγαλώνουν σε μέγεθος με αύξηση της κυτταρικής και πυρηνικής μάζας. Τέτοιος φαινότυπος είναι πιθανά συνδεδεμένος με ανωμαλίες κατά την κυτοκίνηση (Nakaya et al., 2009), ένας ισχυρισμός που ενισχύεται από την παρουσία των KATNAL2 στο ενδιάμεσο σώμα (Εικόνα 3.19B). Επιπλέον, αδυναμία στην κατάτμηση μεγάλου μεγέθους μικροσωληνίσκων, η οποία μπορεί να προκύπτει εξαιτίας της αποσιώπησης των KATNAL2, μπορεί να συντείνει στην αλλοίωση του κυτταρικού σχήματος και στην αύξηση του κυτταρικού μεγέθους.

Έχοντας υπόψη τη θεμελιώδη λειτουργία της αρχέτυπης Katanin, ως ενζύμου κατάτμησης των μικροσωληνίσκων, εξετάστηκαν στη συνέχεια οι συνέπειες της μείωσης της έκφρασης των KATNAL2 στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων στον κλώνο 2.43. Με τη χρήση αντισώματος έναντι της α -τουμπουλίνης, δεν παρατηρήθηκε καμία ορατή φαινοτυπική διαφορά στη συνολική οργάνωση των μικροσωληνίσκων στα μεσοφασικά κύτταρα (Εικόνες 3.25A1, 3.25B1 & 3.25C1). Η χρήση όμως αντισώματος έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης, αποκάλυψε ενίσχυση του ποσοστού των ακετυλιωμένων μικροσωληνίσκων στα αποσιωπημένα κύτταρα (Εικόνες 3.25A2, 3.25B2 & 3.25C2), φανερώνοντας ότι η ακετυλίωση, μια κύρια μετά-μεταφραστική τροποποίηση, που αποτελεί δείκτη πιο σταθερών και λιγότερο δυναμικών μικροσωληνίσκων (Janke, 2014), ενισχύεται στην απουσία της δράσης των ισομορφών KATNAL2.

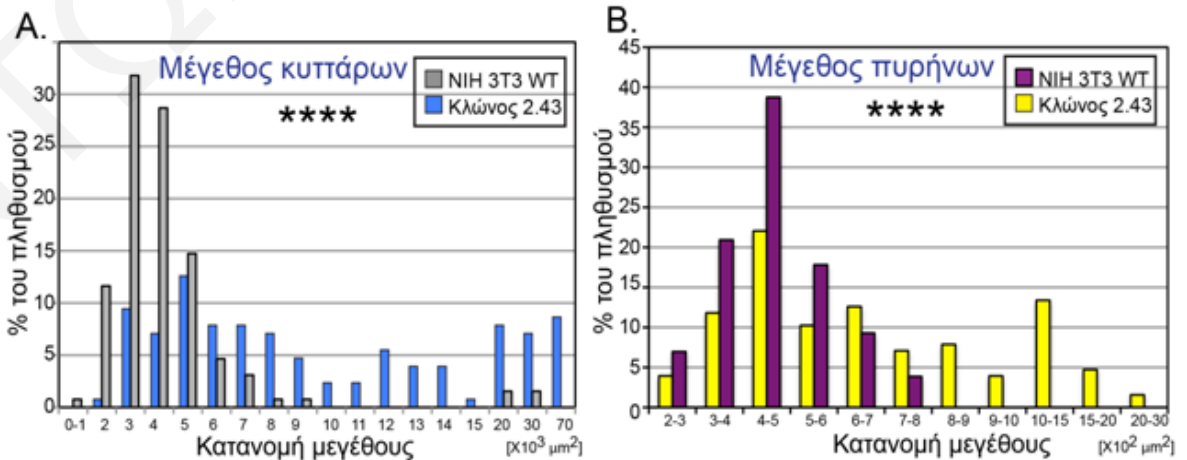
Γράφημα 3.3: Διάγραμμα που απεικονίζει τις καμπύλες ανάπτυξης για τον κλώνο 2.43, καθώς και για τη μητρική του κυτταροσειρά NIH 3T3.

Ο κλώνος 2.43 παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη ανάπτυξη σε όλα τα χρονικά σημεία της δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια 96 hrs, σε σχέση με τα φυσιολογικά NIH 3T3.



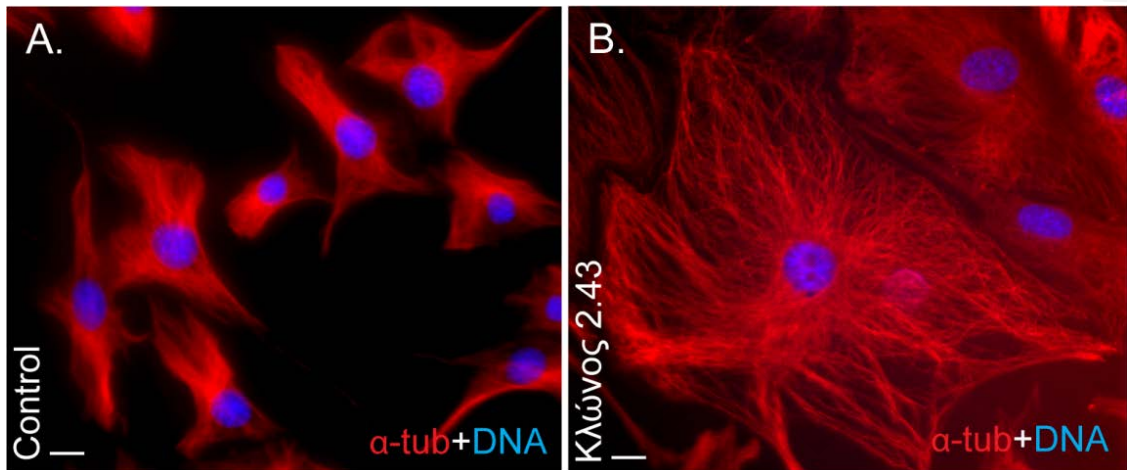
Γράφημα 3.4: Ανάλυση της επίδρασης της αποσιώπησης των KATNAL2 στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43, στο κυτταρικό και στο πυρηνικό μέγεθος.

Ανάλυση του ολικού κυτταρικού μεγέθους (A) και του πυρηνικού μεγέθους (B) στον κλώνο 2.43 και στην μητρική του κυτταροσειρά NIH 3T3, η οποία φανέρωσε στατιστικώς σημαντικές αυξήσεις τόσο στο ολικό μέγεθος όσο και στο μέγεθος του πυρήνα στα αποσιωπημένα για τις KATNAL2 κύτταρα. Η ολική κυτταρική επιφάνεια και η πυρηνική επιφάνεια μετρήθηκαν και οι τιμές τους κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες που κυμαίνονταν από 0-70,000 μm^2 (A) ή 200-3,000 μm^2 (B).



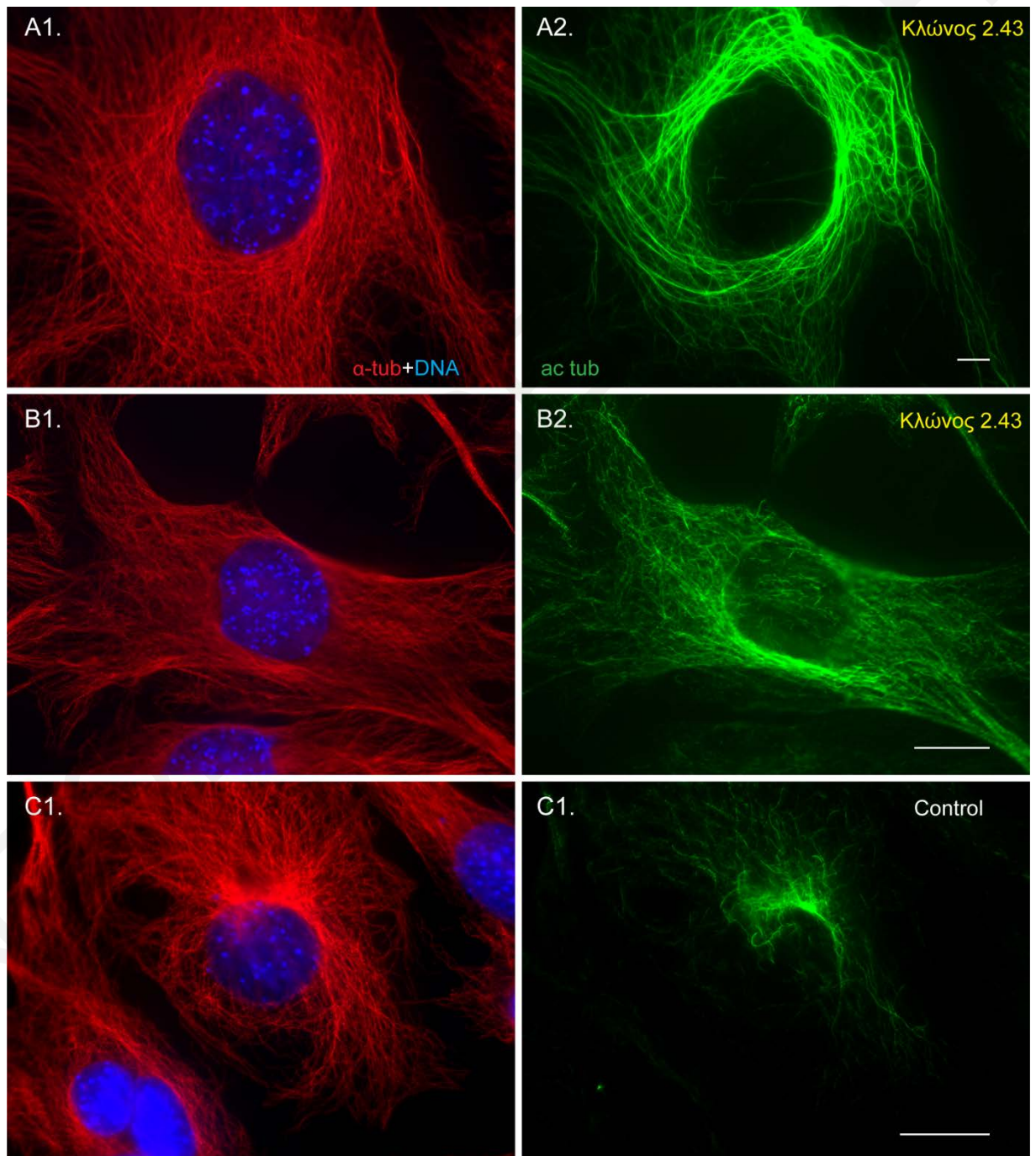
Εικόνα 3.24: Τα κύτταρα του αποσιωπημένου κλώνου 2.43 είναι εμφανώς μεγαλύτερα από τα κύτταρα NIH 3T3 φυσικού τύπου.

Χρώση με αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης και Hoechst 33342 σε τυχαία πεδία των Α. φυσιολογικών κυττάρων NIH 3T3 και Β. κυττάρων του κλώνου 2.43 στην οποία είναι εμφανής η μεγάλη διαφορά μεταξύ του μεγέθους των κυττάρων των δύο πληθυσμών. Η κλίμακα και για τις δύο φωτογραφίες είναι 20 μm .



Εικόνα 3.25: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί την ενίσχυση της ακετυλίωσης στους μικροσωληνίσκους.

Συνδυασμός χρώσης με αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης, με αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης και Hoechst 33342. **A1-B2.** Στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43 εμφανίζεται ένα πρότυπο εκτεταμένης ακετυλίωσης των μικροσωληνίσκων. **C1-C2.** Στα φυσιολογικά κύτταρα NIH 3T3 η ακετυλίωση των μικροσωληνίσκων εμφανίζεται να είναι περιορισμένη σε σχέση με τα κύτταρα του κλώνου 2.43. Η έκθεση του πράσινου καναλιού στην εικόνα **A2** είναι 2500 ms, στην εικόνα **B2** 5243 ms, και στην εικόνα **C2** είναι 6000 ms (που αντιστοιχεί στο 250% της έκθεσης στο **A2**, και στο 114.4% της έκθεσης στο **B2**). Η κλίμακα για όλες τις φωτογραφίες είναι 20 μm .

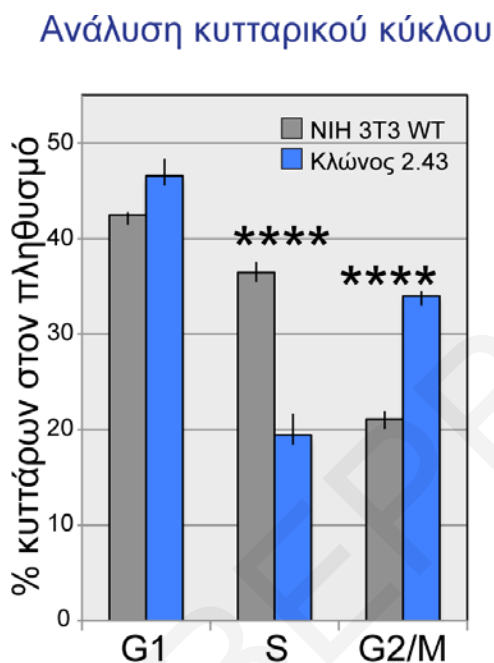


3.6.1.3 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου κλώνου 2.43

Με βάση το σαφώς διαφορετικό πρότυπο κυτταρικής ανάπτυξης στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43 (Γράφημα 3.3), κρίθηκε ενδιαφέρουσα η μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης των KATNAL2 στον κυτταρικό κύκλο συνολικά. Για το σκοπό αυτό, διενεργήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα με τη χρήση της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής, στα οποία αναλύθηκε το πρότυπο του κυτταρικού κύκλου ενός πολύ μεγάλου αριθμού κυττάρων τόσο του αποσιωπημένου κλώνου ($n=92,577$) όσο και των φυσιολογικών NIH 3T3 ($n=197,664$). Διαφάνηκε ότι η αποσιώπηση των KATNAL2 επηρεάζει τη φυσιολογική πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αναλυτικά, το ποσοστό των κυττάρων του κλώνου 2.43 που βρίσκονταν στη φάση S ($19.45\pm 2.25\%$) ήταν περίπου το μισό του αντίστοιχου ποσοστού του φυσιολογικού πληθυσμού ($36.46\pm 1.07\%$), σε αντίθεση με τη φάση G2/M, κατά την οποία το ποσοστό των κυττάρων του κλώνου 2.43 ($34\pm 0.51\%$) ήταν αυξημένο σε σχέση με τα φυσιολογικά NIH 3T3 ($21.1\pm 0.83\%$) (και στις δύο περιπτώσεις τα p-values ήταν μικρότερα του 0.0001) (Γράφημα 3.5). Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν μια σημαντική καθυστέρηση ή ακόμη και παρατεταμένη στάθμευση του κύκλου στη φάση G2/M. Αυτό το γεγονός μπορεί να ερμηνευθεί κυρίως ως εξής: α) διάφορες βλάβες στο DNA δεν επιτρέπουν στο κύτταρο να εισέλθει στη φάση της μίτωσης έως ότου διορθωθούν από τους διαθέσιμους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (Stark and Taylor, 2006), β) καθυστέρηση στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου καθυστερούν τη διενέργεια της μίτωσης και γ) προβλήματα κατά την κυτοκίνηση, δεν επιτρέπουν στα κύτταρα να ολοκληρώσουν την κυτταρική διαίρεση, αδυνατώντας να περάσουν στη φάση G1.

Γράφημα 3.5: Ανάλυση κυτταρικών κύκλων του κλώνου 2.43 και της μητρικής κυτταροσειράς NIH 3T3 μέσω κυτταρομετρίας ροής.

Διαφάνεται η μείωση των κυττάρων στη φάση S, και η αύξηση των κυττάρων στη φάση G2/M ($p < 0.0001$ και για τις περιπτώσεις). Προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί καθυστέρηση ή διακοπή του κύκλου στη φάση G2/M. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα από τρία ανεξάρτητα πειράματα και συνοδεύονται από την τυπική απόκλιση τους.



Για την ολοκληρωμένη διαλεύκανση των συνεπειών της αποσιώπησης των ισομορφών KATNAL2 στον κυτταρικό κύκλο, επιχειρήθηκε λεπτομερής μικροσκοπική ανάλυση (2.3.12.3.2) ενός πολύ μεγάλου αριθμού διαιρούμενων κυττάρων του κλώνου 2.43 ($n=2978$) και φυσιολογικών κυττάρων NIH 3T3 ($n=3128$). Διεξήχθησαν τρία ανεξάρτητα πειράματα, στα οποία κατά τον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα έναντι της α -τουμπουλίνης και έναντι της γ -τουμπουλίνης, για την κατάλληλη διάκριση των μιτωτικών κυττάρων. Διαφάνηκε ότι ο μιτωτικός δείκτης στον κλώνο 2.43 ($2.55 \pm 0.80\%$ των συνολικών κυττάρων) ήταν κατά πολύ μικρότερος (t -test, $p=0.00018$) από ότι στα αντίστοιχα φυσιολογικά NIH 3T3 ($11.78 \pm 0.89\%$). Η κατανομή των μιτωτικών κυττάρων στις διακριτές φάσεις της μίτωσης ήταν διαφορετική (two way ANOVA, $p=0.0011$) στους δύο πληθυσμούς, με την κυριότερη διαφορά να εντοπίζεται στη φάση της προμετάφασης (two way ANOVA, $p=0.0007$) στην οποία βρισκόταν το 18.4% των μιτωτικών κυττάρων του κλώνου 2.43, εν αντιθέσει με το αντίστοιχο 2.2% των NIH 3T3 φυσικού τύπου (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.5: Επίδραση της αποσιώπησης των KATNAL2 στη μιτωτική δραστηριότητα του κυττάρων του κλώνου 2.43.

Η αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 στον κλώνο 2.43 προκαλεί σημαντική μείωση του συνολικού αριθμού των μιτωτικών κυττάρων (t-test, $p=0.00018$). Επίσης, στα αποσιωπημένα κύτταρα η κατανομή των κυττάρων στις διακριτές φάσεις της μίτωσης είναι διαφορετική από ότι στα φυσικού τύπου NIH3T3 (two way ANOVA, $p=0.0011$).

shRNA	Φυσιολογικός πληθυσμός (NIH 3T3)	Αποσιωπημένος Κλώνος 2-43
Κύτταρα που μετρήθηκαν	3128	2978
Μιτωτικά κύτταρα εκ των οποίων:	368 (11.8% των συνολικών)	76 (2.6% των συνολικών)
Πρόφαση	15 (4.1% των μιτωτικών)	2 (2.6% των μιτωτικών)
Προμετάφαση	8 (2.2% των μιτωτικών)	14 (18.4% των μιτωτικών)
Μετάφαση	4 (1.1% των μιτωτικών)	3 (3.9% των μιτωτικών)
Ανάφαση	16 (4.3% των μιτωτικών)	3 (3.9% των μιτωτικών)
Τελόφαση	160 (43.5% των μιτωτικών)	22 (28.9% των μιτωτικών)
Κυτοκίνηση	165 (44.8% των μιτωτικών)	32 (42.1% των μιτωτικών)

Ο κεντροσωμικός εντοπισμός των KATNAL2 σε συνδυασμό με τον γνωστό ρόλο της αλληλεπιδράσας Nubp1 στο μηχανισμό ρύθμισης διπλασιασμού των κεντροσωματίων (Christodoulou et al., 2006), μας οδήγησε στη διερεύνηση του αριθμού των κεντριδίων στους δύο πληθυσμούς, για τον έλεγχο τυχόν επιδράσεων της αποσιώπησης στα συγκεκριμένα οργανίδια, και συνεπώς εμπλοκής των KATNAL2 σε αυτό το μονοπάτι. Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκάλεσε την αυξημένη παρουσία κυττάρων με υπεράριθμα κεντρίδια (t-test, $p=0.00055$) (Εικόνα 3.26A). Αναλυτικά το $32.93\pm 3.15\%$ των κυττάρων του κλώνου 2.43 είχαν περισσότερα από 2 κεντρίδια (Εικόνα 3.26A), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στα φυσιολογικά NIH 3T3 ήταν μόνο $6.57\pm 3.27\%$. Ως επακόλουθο αυξήθηκε και ο μέσος όρος των κεντριδίων ανά κύτταρο (t-test, $p=0.00026$) στον κλώνο 2.43 (3.02 ± 0.12) σε σχέση με τα NIH 3T3 (2.12 ± 0.05) (Πίνακας 3.6). Ακόμη η συνολική κατανομή του αριθμού των κεντριδίων ανά κύτταρο στους δύο διαφορετικούς πληθυσμούς εμφανιζόταν διαφοροποιημένη (two way ANOVA, $p<0.0001$) (Γράφημα 3.6). Αριθμός μιτωτικών κυττάρων σχημάτιζε ανώμαλες πολυπολικές ατράκτους εξαιτίας της παρουσίας υπεράριθμων κεντριδίων (Εικόνα 3.26B). Αυτά τα αποτελέσματα εμπλέκουν τις KATNAL2 στον μηχανισμό διπλασιασμού των κεντριδίων, καθορίζοντας τους και κοινό λειτουργικό ρόλο με τις Nubp1 και Nubp2, των οποίων η αποσιώπηση δίνει παρόμοια αποτελέσματα (Christodoulou et al., 2006).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα μας, μπορούμε να πούμε ότι ο ελαττωμένος αριθμός μιτωτικών κυττάρων υποδηλώνει αδυναμία των κυττάρων να εισέλθουν στη μίτωση, ενώ φαίνεται ότι όταν τελικά τα καταφέρουν, καθυστερούν στη φάση της προμετάφασης, περιμένοντας μάλλον τον πλήρη σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, για να συνεχίσουν στις επόμενες φάσεις (Hardwick et al., 1999). Πιθανότατα η καθυστέρηση αυτή στη δημιουργία της ατράκτου, να μην

είναι τυχαία, μιας και ένας ακόμη φαινότυπος που παρατηρήθηκε ήταν η μη φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά το στάδιο της μετάφασης (Εικόνα 3.26C), φαινόμενο που συνήθως οφείλεται στη μη ολοκληρωμένη συγκρότηση της μιτωτικής συσκευής, εξαιτίας καθυστέρησης στην αναδιοργάνωση των μεσοφασικών μικροσωληνίσκων (Hardwick et al., 1999), που πιθανό οφείλεται σε μειωμένη κατάτμηση τους λόγω της αποσιώπησης της δράσης των KATNAL2. Ένα ενισχυτικό στοιχείο αυτής της άποψης είναι και η παρουσία κυττάρων που διαθέτουν μεγάλους πυρήνες με τρύπες, τις οποίες διαπερνά δεσμίδα μικροσωληνίσκων (Εικόνα 3.27C), ενδεικτικό της προβληματικής κατάτμησης των μεσοφασικών μικροσωληνίσκων, που επηρεάζει το πυρηνικό μέγεθος και σχήμα. Από την άλλη, η παρουσία πολυπολικών ατράκτων, εξαιτίας της αύξησης του μέσου όρου των κεντριδίων, μπορεί να δικαιολογήσει την καθυστέρηση της μίτωσης στην προμετάφαση (λόγω των διαφόρων δυνάμεων που ασκούνται ταυτόχρονα από τους υπεράριθμους πόλους, που δεν επιτρέπουν την σωστή οργάνωση των χρωμοσωμάτων στο ισημερινό επίπεδο για τον κατάλληλο διαχωρισμό τους), ενώ ενδέχεται να προκαλέσει μέχρι και την έξοδο από τη μίτωση προτού αυτή ολοκληρωθεί (πρόσφατη ανασκόπηση από Gergely and Basto, 2008), δικαιολογώντας τη μείωση των μιτωτικών κυττάρων στον κλώνο 2.43. Τέλος η μη φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά το στάδιο της μετάφασης, αποτελεί ακόμη ένα φαινόμενο που μπορεί να εξηγηθεί λόγω της παρουσίας των υπεράριθμων κεντριδίων (Εικόνα 1.11).

Ένας άλλος ενδιαφέρον φαινότυπος που καταγράφηκε ήταν αυτός των γεφυρών χρωματίνης (chromatin bridges) (Εικόνες 3.27A & 3.27B) (Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013), οι οποίες συναντώνται συχνά στον κλώνο 2.43 ($6.51 \pm 0.51\%$), σε σύγκριση με τα μητρικά NIH 3T3 ($0.61 \pm 0.11\%$) (t-test, $p=0.0027$). Βάσει της βιβλιογραφίας ο σχηματισμός των γεφυρών χρωματίνης αποτελεί συνέπεια μη ορθού διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων που οφείλεται συνήθως σε: α) ελαττωματικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA, β) συγχωνεύσεις χρωμοσωμάτων που οδηγούν στη δημιουργία δικεντρικών χρωμοσωμάτων και γ) ελαττωματική κατάτμηση των μικροσωληνίσκων του κινητοχώρου κατά το στάδιο της ανάφασης (Stewenius et al., 2005, Schroder-Heurich et al., 2014, Rogers et al., 2005). Έχοντας υπόψη τη δράση της αρχέτυπης Katanin, υποθέτουμε ότι η αύξηση στην εμφάνιση των συγκεκριμένων δομών, πολύ πιθανό να σχετίζεται με ελαττωματική κατάτμηση των μικροσωληνίσκων του κινητοχώρου κατά την ανάφαση. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να αποκλειστεί η πιθανότητα, ένα σημαντικό ποσοστό τους να οφείλεται και στην παρουσία πολυπολικών ατράκτων, μιας και το $35.6 \pm 9.9\%$ των γεφυρών στον αποσιωπημένο κλώνο ήταν πολυκεντριδιακές, που δεν επιτρέπουν τον ορθό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Εικόνα 1.11). Η παρουσία των γεφυρών χρωματίνης ενδέχεται να μην προκαλέσει τελικά δυσάρεστες συνέπειες για τα εμπλεκόμενα κύτταρα, μπορεί όμως και να οδηγήσει στην απόπτωση, στην συγχώνευση των θυγατρικών για τον σχηματισμό διπύρηνων κυττάρων, στην αύξηση του αριθμού των κεντροσωματίων, και σε καταστάσεις ανευπλοειδίας/πολυπλοειδίας (Huang et al., 2008).

Τέλος, αρκετά κύτταρα 2.43 παρουσίαζαν ανωμαλίες κατά το στάδιο της κυτοκίνησης, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μη ακριβή διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Εικόνες 3.27A & 3.27B) και σε καταστάσεις ανευπλοειδίας/πολυπλοειδίας (Matsuo et al., 2013). Επιπρόσθετα, η ευδιάκριτη και έντονη παρουσία δεσμίδων μικροσωληνίσκων στο ενδιάμεσο σώμα (midbody), που χαρακτηρίζει τον πληθυσμό των αποσιωπημένων κυττάρων (Εικόνες 3.27A & 3.27B), είναι χαρακτηριστικό που συνάδει με τη ελαττωματική κυτοκίνηση, αφού ως γνωστό, για να μπορέσουν δύο θυγατρικά κύτταρα να αποχωριστούν, θα πρέπει να καταταμηθούν πλήρως οι μικροσωληνίσκοι του ενδιάμεσου σώματος (Elad et al., 2011). Τα πιο πάνω συνηγορούν στην πρόκληση βλάβης στη διαδικασία της κυτοκίνησης, κατά την αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2. Οι προβληματικές κυτοκινήσεις ενδεχομένως αποτελούν κύρια αιτία, για την ενισχυμένη παρουσία (t-test, p=0.0001) των πολυπύρηνων (διπύρηνων κυρίως) κυττάρων στον κλώνο 2.43 ($7.12 \pm 0.70\%$ των συνολικών) σε σχέση με τα φυσιολογικά NIH 3T3 ($1.66 \pm 0.01\%$), την αύξηση του αριθμού των κεντριδίων ανά κύτταρο, και την μεγέθυνση του κυτταρικού και πυρηνικού μεγέθους (**3.6.1.2**). Οι καταστάσεις ανευπλοειδίας/πολυπλοειδίας που προκαλούνται λόγω της ελαττωματικής κυτοκίνησης, μπορεί να θεωρηθούν υπεύθυνες για την παρουσία πυρήνων ποικίλων μεγεθών (από πολύ μικρούς ως και τεράστιους) (Εικόνα 3.26A), αλλά και για την πρόκληση διαφόρων ανωμαλιών στη δομή του πυρήνα (Εικόνα 3.27A), όπως ήταν η εμφάνιση πολυλοβικών και άλλων περιέργων σχημάτων.

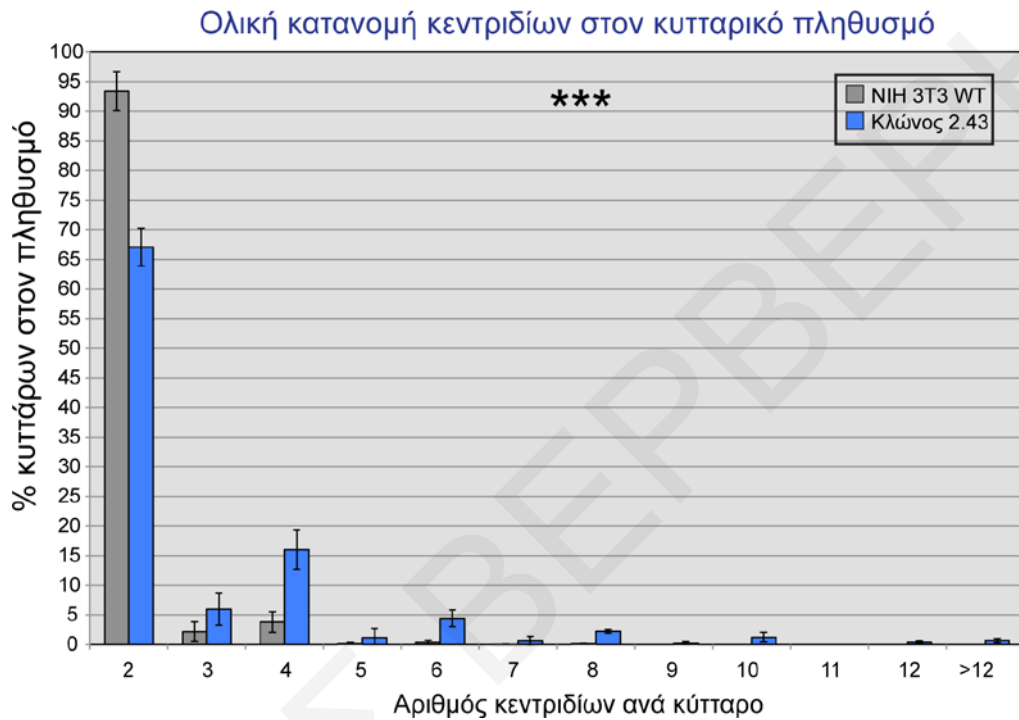
Πίνακας 3.6: Επίδραση της αποσιώπησης των KATNAL2 στον αριθμό των κεντριδίων των κυττάρων του κλώνου 2.43.

Η αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 στον κλώνο 2.43 προκαλεί αύξηση των κυττάρων με υπεράριθμα κεντρίδια (t-test, p=0.00055) και άνοδο του μέσου όρου των κεντριδίων ανά κύτταρο (t-test, p= 0.00026). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα από τρία ανεξάρτητα πειράματα και συνοδεύονται από την τυπική απόκλιση τους.

shRNA	Φυσιολογικός πληθυσμός (NIH 3T3)	Αποσιωπημένος Κλώνος 2.43
Κύτταρα που μετρήθηκαν (ποσοστό ± τ.α.)		
Αριθμός κεντριδίων ανά κύτταρο	3128 συνολικά	2978 συνολικά
2 κεντρίδια	2921 (93.38±3.28%)	1997 (67.06±3.15%)
3 κεντρίδια	68 (2.17±1.66%)	178 (5.98±2.73%)
4 κεντρίδια	119 (3.80±1.73%)	477 (16.02±3.32%)
5 κεντρίδια	4 (0.13±0.21%)	35 (1.18±1.53%)
6 κεντρίδια	11 (0.35±0.37%)	132 (4.43±1.41%)
7 κεντρίδια	1 (0.03±0.06%)	18 (0.6±0.79%)
8 κεντρίδια	4 (0.13±0.06%)	67 (2.25±0.30%)
9 κεντρίδια	-	6 (0.20±0.26%)
10 κεντρίδια	-	37 (1.24±0.83%)
11 κεντρίδια	-	-
12 κεντρίδια	-	11 (0.37±0.21%)
≥13 κεντρίδια	-	20 (0.67±0.35%)
Κύτταρα με >2 κεντρίδια (% των συνολικών ± τ.α.)	207 (6.57±3.27%)	981 (32.93±3.15%)
Μέσος όρος των κεντριδίων ανά κύτταρο ± τ.α.	2.12±0.05	3.02±0.12

Γράφημα 3.6: Διαγραμματική απεικόνιση της συνολικής κατανομής των κεντριδίων στον αποσιωπημένο κλώνο 2.43 και στα φυσιολογικά NIH 3T3.

Παρουσίαση της συνολικής κατανομής των κεντριδίων στους κυτταρικούς πληθυσμούς τόσο του κλώνου 2.43 (μπλε) όσο και των φυσιολογικών NIH 3T3 (γκρίζο). Η συνολική κατανομή των κεντριδίων ανά κύτταρο είναι διαφορετική (two way ANOVA, $p < 0.0001$) στα αποσιωπημένα κύτταρα. Είναι εμφανής η μείωση των κυττάρων με 2 κεντρίδια και η αύξηση των κυττάρων με υπεράριθμα κεντρίδια στον κλώνο 2.43. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα από τρία ανεξάρτητα πειράματα και συνοδεύονται από την τυπική απόκλιση τους.



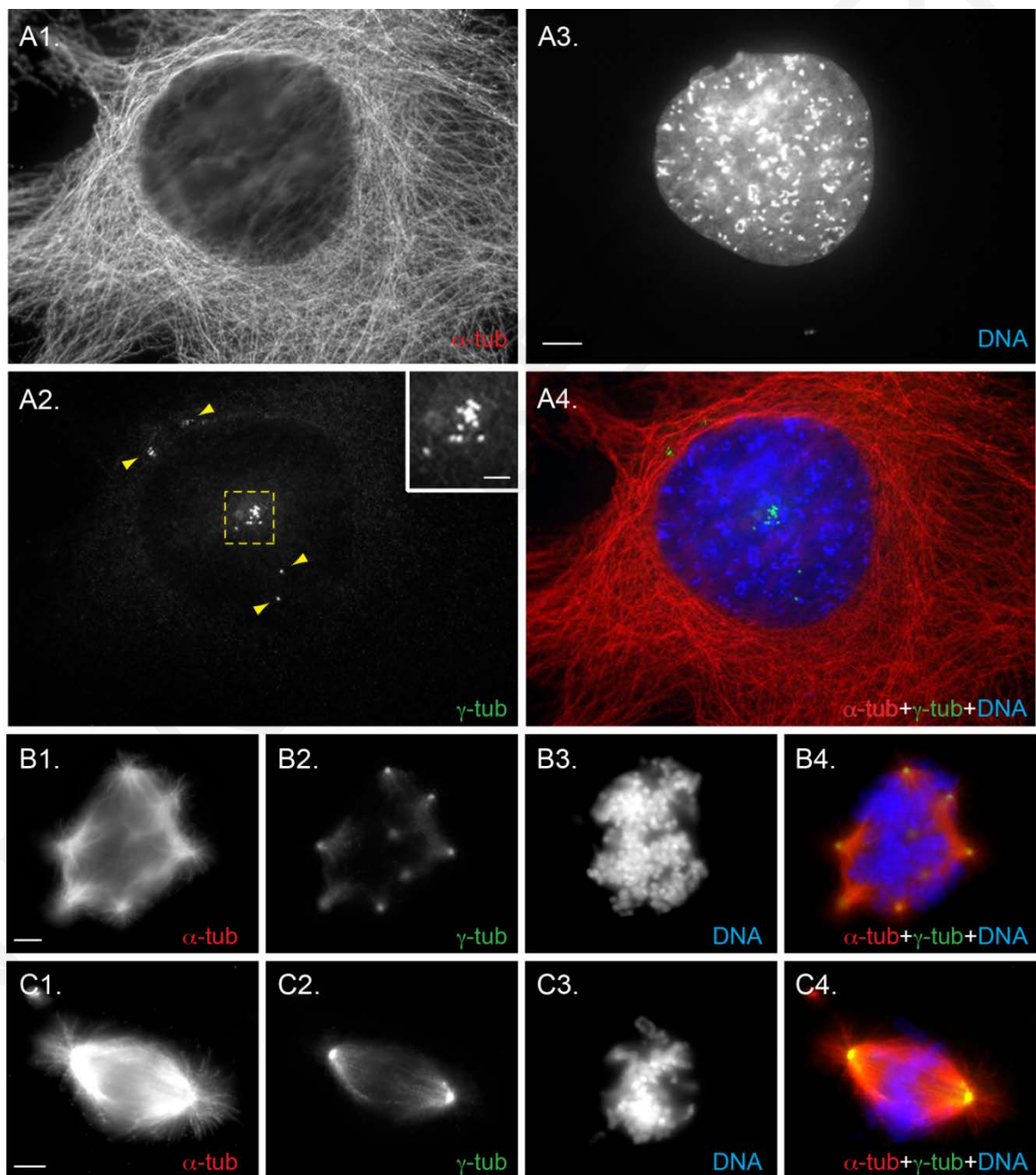
Εικόνα 3.26: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί την αυξημένη παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων τόσο σε μεσοφασικά όσο και σε μιτωτικά κύτταρα, καθώς και την εμφάνιση φαινοτύπων που επιδεικνύουν μη φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση.

Συνδυασμός χρώσης με αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης, με αντίσωμα έναντι της γ -τουμπουλίνης και Hoechst 33342 στα κύτταρα του κλώνου 2.43 αποκαλύπτει:

A. Μεσοφασικά κύτταρα με υπεράριθμα κεντριδία (Κλίμακα 10 μ m).

B. Μιτωτικά κύτταρα με υπεράριθμα κεντριδία (Κλίμακα 3 μ m).

C. Μιτωτικά κύτταρα με μη φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση (Κλίμακα 5 μ m).



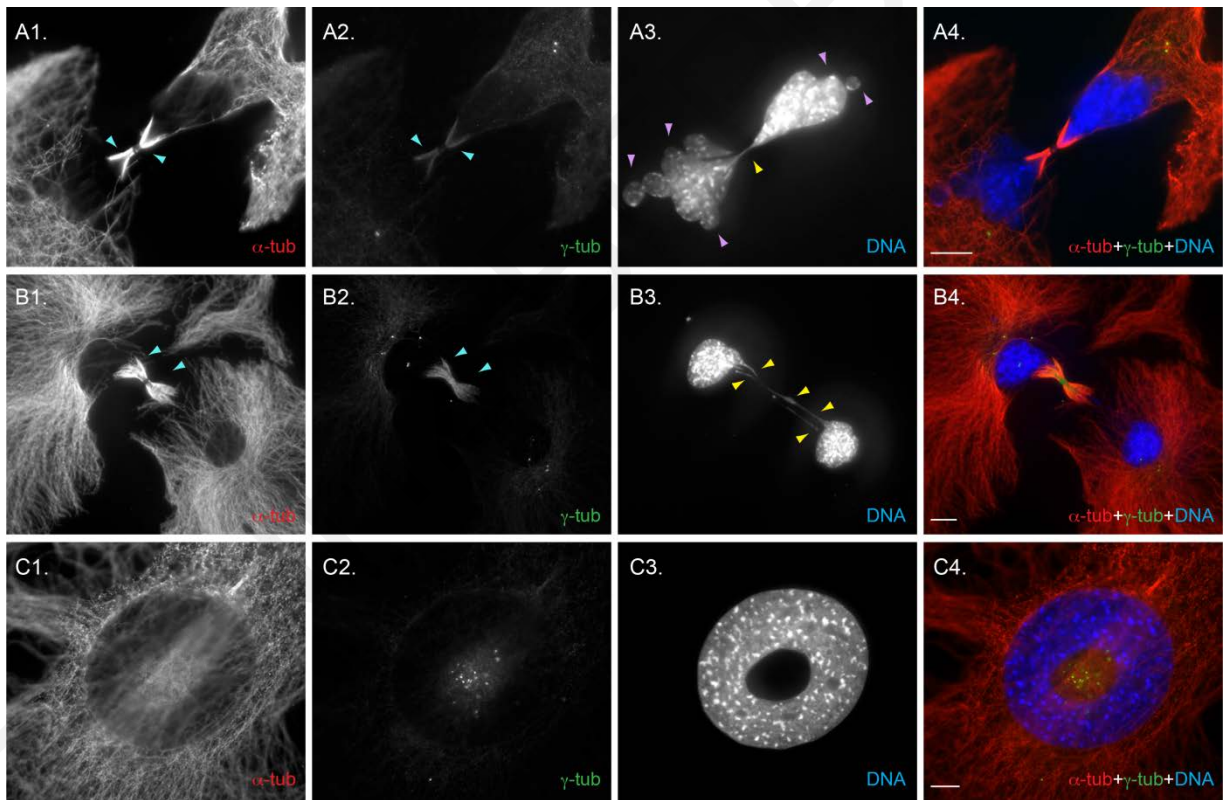
Εικόνα 3.27: Η αποσιώπηση των KATNAL2 παρεμποδίζει τη φυσιολογική κυτοκίνηση και προκαλεί την εμφάνιση ανωμαλιών στον πυρήνα.

Συνδυασμός χρώσης με αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης, με αντίσωμα έναντι της γ -τουμπουλίνης και Hoechst 33342 στα κύτταρα του κλώνου 2.43 φανερώνει την παρουσία:

A. Παραδειγμάτων αποσιωπημένων κυττάρων με ανωμαλίες στην κυτοκίνηση: με κίτρινο βελάκι υποδεικνύεται γέφυρα χρωματίνης μεταξύ δύο ανισομεγεθών θυγατρικών κυττάρων που εμφανίζουν ανώμαλους πολυλοβικούς πυρήνες (ροζ βελάκια), και τα οποία διατηρούν κυτταροπλασματική σύνδεση μεταξύ τους κατά την κυτοκίνηση. Με γαλάζια βελάκια υποδεικνύεται η παρουσία έντονων δεσμίδων μικροσωληνίσκων στο midbody.

B. Παραδειγμάτων ανωμαλιών κατά την κυτοκίνηση, με την παρουσία δύο δομών γέφυρας χρωματίνης μεταξύ των δύο θυγατρικών κυττάρων, τα οποία φέρουν υπεράριθμα κεντρίδια. Ακόμη είναι εμφανής η έντονη παρουσία δεσμίδων μικροσωληνίσκων στο midbody.

C. Τεράστιων κυττάρων με μεγάλο αριθμό (>12) κεντρίδιών, τα οποία σε κάποιες περιπτώσεις έφεραν ανώμαλο πυρήνα με τρύπα, την οποία διαπερνούσε δεσμίδα μικροσωληνίσκων. Η κλίμακα για όλες τις φωτογραφίες είναι 10 μ m.



3.6.1.4 Ανάλυση βλεφαριδογένεσης κλώνου 2.43

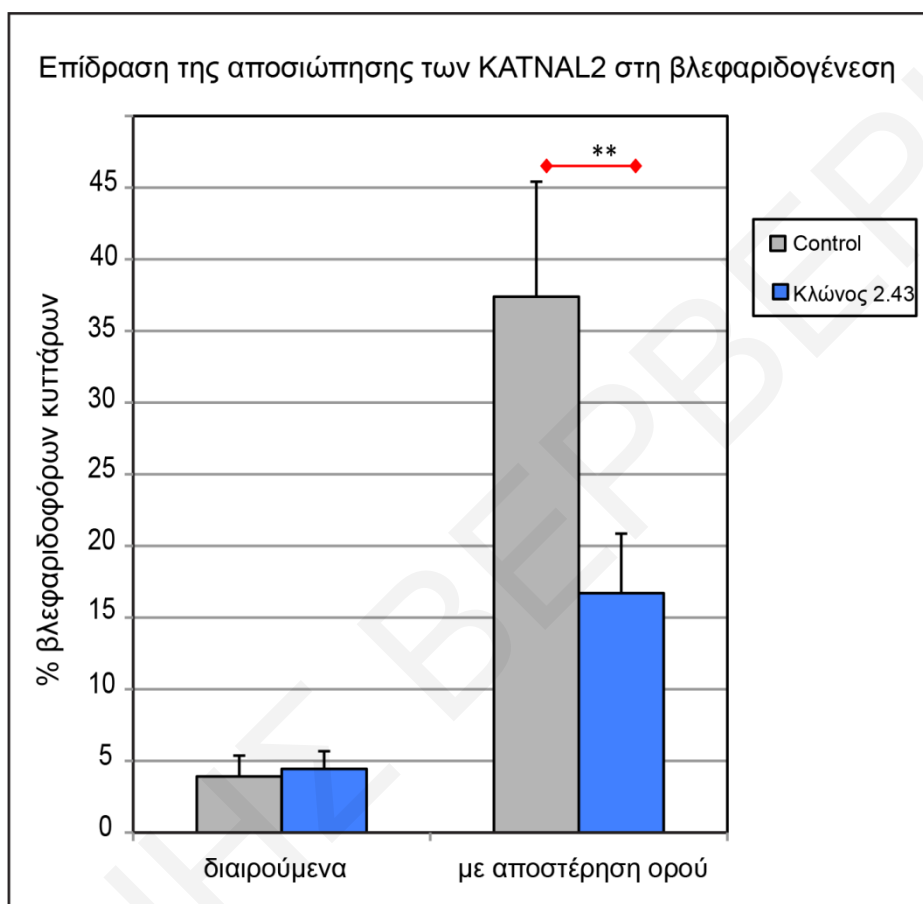
Εξαιτίας του εντοπισμού των KATNAL2 στο αξόνημα και στο βασικό σωματίο των βλεφαρίδων, των διάφορων ρόλων της αρχέτυπης Κατανίνης στη βλεφαριδογένεση αρκετών ειδών (Sharp and Ross, 2012), αλλά και τη λειτουργία των αλληλεπιδρώσεων Nubp1 και Nubp2 ως αρνητικών ρυθμιστών της όλης διαδικασίας (Kypri et al., 2014), διερευνήθηκαν τυχόν επιπτώσεις της αποσιώπησης των ισομορφών KATNAL2 στη βλεφαριδογένεση. Για αυτό το λόγο διενεργήθηκε μικροσκοπική ανάλυση της βλεφαριδογένεσης διαιρούμενων κυττάρων καθώς και κυττάρων τα οποία είχαν αποστερηθεί ορό (2.3.12.3.3), με χρήση αντισωμάτων έναντι της γ-τουμπουλίνης και της ακετυλιωμένης-τουμπουλίνης, τα οποία ανιχνεύουν το βασικό σωματίο και το αξόνημα των βλεφαρίδων αντίστοιχα. Διεξήχθησαν τρία ανεξάρτητα πειράματα για την κάθε περίπτωση, στα οποία μετρήθηκαν συνολικά 2090 διαιρούμενα φυσιολογικά κύτταρα NIH 3T3 και 2093 διαιρούμενα κύτταρα κλώνου 2.43. Αντίστοιχα στα πειράματα με την αποστέρηση ορού, μετρήθηκαν συνολικά 2076 κύτταρα φυσικού τύπου NIH 3T3 και 2063 κύτταρα κλώνου 2.43.

Αποδείχθηκε ότι οι KATNAL2 είναι αναγκαίες για τη συναρμολόγηση των βλεφαρίδων, μιας και σε κύτταρα στα οποία διεξήχθη επαγωγή της βλεφαριδογένεσης μέσω αποστέρησης ορού για 24 ώρες, παρατηρήθηκε μείωση (t-test, $p=0.0165$) των βλεφαρίδων στα αποσιωπημένα κύτταρα ($16.70\pm 4.15\%$), σε σχέση με τα φυσιολογικά NIH 3T3 ($37.39\pm 8.02\%$) (Γράφημα 3.7). Σε διαιρούμενα κύτταρα δεν παρατηρήθηκε καμιά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποσιωπημένων για τις KATNAL2 κυττάρων του κλώνου 2.43 και των φυσιολογικών NIH 3T3.

Αυτό το σημαντικό αποτέλεσμα, εμπλέκει τις KATNAL2 στη βλεφαριδογένεση πιθανόν μέσω συνεργασίας με τις αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες τους Nubp1 και Nubp2. Αυτή είναι η δεύτερη φορά που στα πλαίσια αυτής της διατριβής διαπιστώνεται κοινή συμμετοχή των πρωτεϊνών Nubp1, Nubp2 και KATNAL2 σε κυτταρική λειτουργία, μετά και το μηχανισμό ρύθμισης του αριθμού των κεντροσωματίων. Είναι πιθανό η πτώση των επιπέδων των KATNAL2 να προκαλεί τη μείωση της βλεφαριδογένεσης, λόγω της ελάττωσης της καταταμητικής δράσης έναντι των μικροσωληνίσκων στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, που δεν επιτρέπει την αναδιοργάνωση των πολυμερών για τον σχηματισμό του αξονήματος, οδηγώντας σε μικρότερα ποσοστά βλεφαριδοφόρων κυττάρων.

Γράφημα 3.7: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί τη μείωση των βλεφαριδοφόρων κυττάρων στον κλώνο 2.43.

Διάγραμμα που απεικονίζει α) την μη ύπαρξη σημαντικής διαφοράς στο ποσοστό των βλεφαριδοφόρων διαιρούμενων κυττάρων μεταξύ του κλώνου 2.43 και των φυσιολογικών NIH 3T3 και β) υπό συνθήκες αποστέρησης ορού, την μείωση (t-test, $p=0.0165$) του ποσοστού των βλεφαριδοφόρων κυττάρων στην αποσιωπημένη κυτταροσειρά 2.43 ($16.70\pm 4.15\%$) έναντι των φυσιολογικών NIH 3T3 ($37.39\pm 8.02\%$).



3.6.2 Μεταγραφική αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 με τη χρήση του ολιγονουκλεοτιδίου shRNA με τον κωδικό TRCN0000090751

3.6.2.1 Επιλογή κλώνου που φέρει το ολιγονουκλεοτίδιο shRNA TRCN0000090751

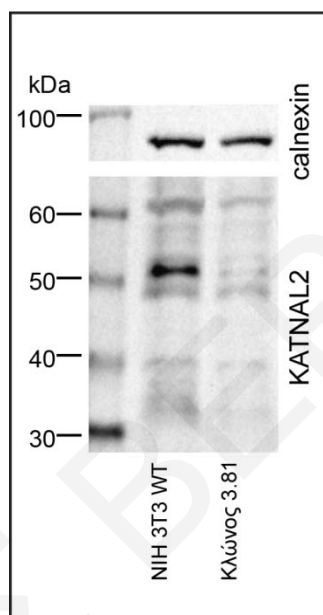
Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των συνεπειών της αποσιώπησης των KATNAL2 με το ολιγονουκλεοτίδιο shRNA TRCN0000090749, διενεργήθηκε ακόμη ένας κύκλος πειραμάτων αποσιώπησης με τη χρήση δεύτερου ολιγονουκλεοτιδίου shRNA (TRCN0000090751), κατάλληλου για όλες τις απομονωθείσες ισομορφές KATNAL2.

Από τον πληθυσμό των επιμολυσμένων NIH 3T3 με το ολιγονουκλεοτίδιο shRNA με τον κωδικό TRCN0000090751, απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν συνολικά 94 κλώνοι/αποικίες. Οι αποικίες ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση του αντισώματος έναντι της

KATNAL2. Τη μέγιστη μεταγραφική αποσιώπηση εμφάνιζε ο κλώνος που ονομάσαμε με την κωδική ονομασία **3.81** (Εικόνα 3.28). Επιλέχθηκε λοιπόν, ο συγκεκριμένος κλώνος για επανάληψη των κυριότερων από τις αναλύσεις που διενεργήθηκαν για τον κλώνο 2.43.

Εικόνα 3.28: Μείωση πρωτεϊνικής έκφρασης των KATNAL2, στον αποσιωπημένο κλώνο 3.81.

Αυτοραδιογράφημα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπου φαίνεται η μείωση της έκφρασης της κύριας μπάντας που αναγνωρίζει το αντίσωμα έναντι της KATNAL2 στον κλώνο 3.81. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε ως προς τις αντίστοιχες ποσότητες Calnexin.



3.6.2.2 Χαρακτηρισμός & ανάλυση κυτταρικού κύκλου κλώνου 3.81

Όσο αφορά τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, διενεργήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα στα οποία επιχειρήθηκε η λεπτομερής μικροσκοπική ανάλυση ενός πολύ μεγάλου αριθμού διαιρούμενων κυττάρων (**2.3.12.3.2**) του κλώνου 3.81 ($n=2997$) και των φυσιολογικών κυττάρων NIH 3T3 ($n=3007$), με τη χρήση των αντισωμάτων έναντι των α - και γ -τουμπουλίνης. Από την μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων διαφάνηκε ότι και τα κύτταρα του κλώνου 3.81 παρουσίαζαν μεγάλο κυτταροπλασματικό και πυρηνικό μέγεθος, όπως και τα κύτταρα του κλώνου 2.43 (Εικόνα 3.29A).

Όπως και στον κλώνο 2.43, ο μιτωτικός δείκτης στον κλώνο 3.81 ήταν μικρότερος ($2.55 \pm 0.80\%$ των συνολικών κυττάρων) από ότι στα φυσιολογικά NIH 3T3 ($10.44 \pm 1.2\%$ των συνολικών κυττάρων) (t -test, $p=0.0006$). Ακόμη, στον αποσιωπημένο κλώνο 3.81 διατηρήθηκε το υψηλό ποσοστό κυττάρων που έφεραν υπεράριθμα κεντρίδια ($32.76 \pm 0.84\%$ έναντι $8.25 \pm 0.30\%$ στα φυσιολογικά NIH 3T3, $p=1.18 \times 10^{-6}$), όπως επίσης και ο ψηλότερος (t -test, $p=1.09 \times 10^{-5}$) μέσος όρος κεντρινίων ανά κύτταρο (2.79 ± 0.039) σε σχέση με τα φυσικού τύπου NIH 3T3

(2.16 ± 0.012) (Πίνακας 3.7). Επιπρόσθετα, η συνολική κατανομή του αριθμού των κεντριδίων ανά κύτταρο στους δύο πληθυσμούς παρέμεινε διαφορετική (two way ANOVA, $p < 0.0001$) (Γράφημα 3.8). Τέλος, παρατηρήθηκε άνοδος (t-test, $p = 2.24 \times 10^{-5}$) του ποσοστού των μιτωτικών κυττάρων του αποσιωπημένου κλώνου ($15.83 \pm 1.01\%$) που έφεραν υπεράριθμα κεντρίδια έναντι της μητρικής τους κυτταροσειράς ($1.56 \pm 0.40\%$) (Εικόνα 3.29B).

Στο ίδιο πρότυπο με τον κλώνο 2.43 ήταν και η αύξηση (t-test, $p = 0.0006$) των διπύρηνων κυττάρων στον κλώνο 3.81 ($3.9 \pm 0.35\%$) έναντι των NIH 3T3 ($1.36 \pm 0.25\%$). Ακόμη η εμφάνιση των γεφυρών χρωματίνης συνέχισε να είναι πιο συχνή στον αποσιωπημένο για τις KATNAL2 κυτταρικό πληθυσμό ($2.33 \pm 0.23\%$) από ότι στα NIH 3T3 ($0.40 \pm 1.15 \times 10^{-5}$) (t-test, $p = 0.0045$).

Είναι ξεκάθαρο ότι η χρήση δύο διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων shRNA για τη μεταγραφική αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί όμοιες φαινοτυπικές συνέπειες, γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων και επιβεβαιώνει την ειδικότητα των επιπτώσεων της αποσιώπησης. Συμπερασματικά η αποσιώπηση των KATNAL2 φαίνεται να επηρεάζει δομές και οργανίδια που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, καθώς και τον ίδιο τον κυτταρικό κύκλο. Αυτά τα δεδομένα συνάδουν με την αίσθηση που αποκτήθηκε κατά τη διενέργεια της παρούσας διατριβής, ότι οι KATNAL2 συμμετέχουν σε κοινές λειτουργίες με τις Nubps, όπως στη ρύθμιση του διπλασιασμού των κεντροσωματίων (Christodoulou et al., 2006). Από τα αποτελέσματα επίσης συμπεραίνεται, ότι οι KATNAL2 εμπλέκονται κατά τη συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου και την κυτοκίνηση, λειτουργίες στις οποίες ως γνωστό συμμετέχουν και οι Katanins (O'Donnell et al., 2012).

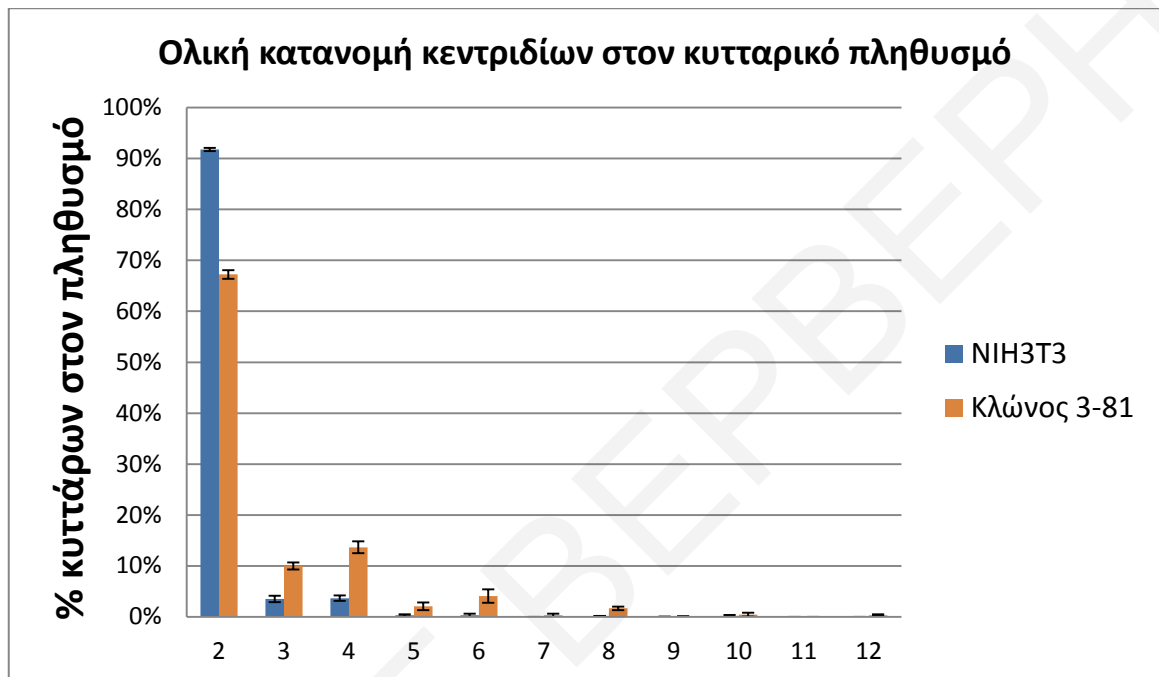
Πίνακας 3.7: Επίδραση της αποσιώπησης των KATNAL2 στον αριθμό των κεντριδίων των κυττάρων του κλώνου 3.81.

Η αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 στον κλώνο 3.81 προκαλεί αύξηση των κυττάρων με υπεράριθμα κεντρίδια (t-test, $p=0.0006$) και άνοδο του μέσου όρου των κεντριδίων ανά κύτταρο (t-test, $p=1.09 \times 10^{-5}$). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα από τρία ανεξάρτητα πειράματα και συνοδεύονται από την τυπική απόκλιση τους.

shRNA	Φυσιολογικός πληθυσμός (NIH 3T3)	Αποσιωπημένος Κλώνος 3.81
	Αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν (ποσοστό \pm τ.α.)	
Αριθμός κεντριδίων ανά κύτταρο	3007 συνολικά	2997 συνολικά
2 κεντρίδια	2759 (91.75 \pm 0.30%)	2015 (67.23 \pm 0.84%)
3 κεντρίδια	106 (3.53 \pm 0.65%)	300 (10.01 \pm 0.70%)
4 κεντρίδια	111 (3.69 \pm 0.52%)	410 (13.68 \pm 1.15%)
5 κεντρίδια	9 (0.30 \pm 0.20%)	62 (2.07 \pm 0.76%)
6 κεντρίδια	10 (0.33 \pm 0.32%)	123 (4.10 \pm 1.30%)
7 κεντρίδια	-	10 (0.33 \pm 0.32%)
8 κεντρίδια	5 (0.17 \pm 0.06%)	51 (1.70 \pm 0.35%)
9 κεντρίδια	1 (0.03 \pm 0.06%)	2 (0.07 \pm 0.06%)
10 κεντρίδια	6 (0.20 \pm 0.17%)	14 (0.47 \pm 0.38%)
11 κεντρίδια	-	-
12 κεντρίδια	-	10 (0.33 \pm 0.15%)
Κύτταρα με υπεράριθμα κεντρίδια (% των συνολικών \pmτ.α)	248 (8.25\pm0.30%)	982 (32.76\pm0.84%)
Μέσος αριθμός κεντριδίων ανά κύτταρο \pmτ.α.	2.16\pm0.01	2.79\pm0.04

Γράφημα 3.8: Διαγραμματική απεικόνιση της συνολικής κατανομής των κεντριδίων στον αποσιωπημένο κλώνο 3.81 και στα φυσιολογικά NIH 3T3.

Παρουσίαση της συνολικής κατανομής των κεντριδίων ανά κύτταρο στους κυτταρικούς πληθυσμούς τόσο του κλώνου 3.81 (καφέ χρώμα) όσο και των φυσιολογικών NIH 3T3 (μπλε). Η συνολική κατανομή των κεντριδίων ανά κύτταρο είναι διαφορετική (two way ANOVA, $p < 0.0001$) στα αποσιωπημένα κύτταρα. Είναι εμφανής η μείωση των κυττάρων με 2 κεντρίδια και η αύξηση των κυττάρων με υπεράριθμα κεντρίδια στον κλώνο 3.81. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν αποτελέσματα από τρία ανεξάρτητα πειράματα και συνοδεύονται από την τυπική απόκλιση τους.

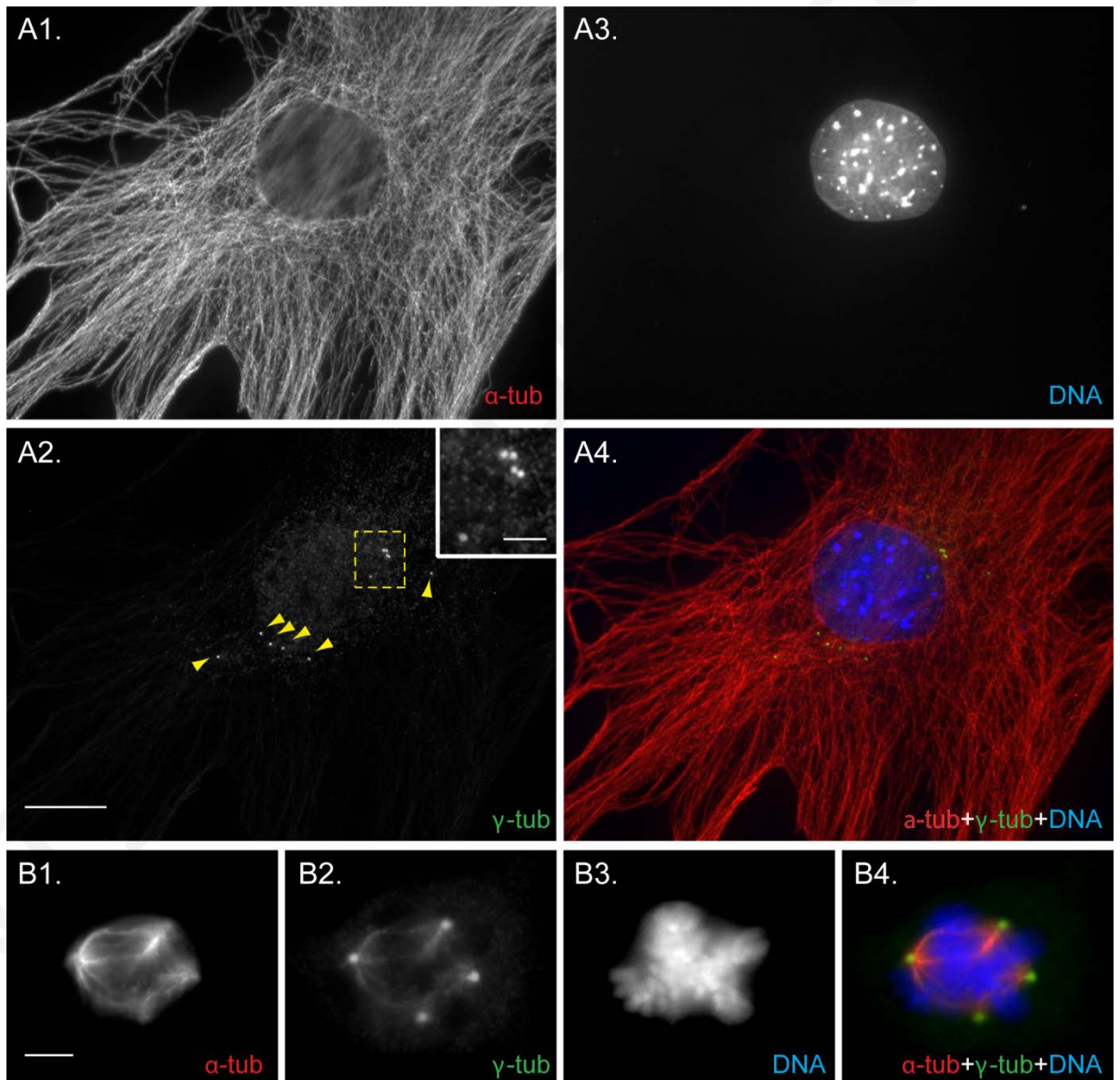


Εικόνα 3.29: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί την παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων τόσο στα μεσοφασικά όσο και στα μιτωτικά κύτταρα του κλώνου 3.81.

Συνδυασμός χρώσης με αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης, με αντίσωμα έναντι της γ -τουμπουλίνης και Hoechst 33342 σε κύτταρα του κλώνου 3.81.

A. Παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων (κίτρινα βελιάκια) σε μεσοφασικό κύτταρο, το οποίο διαθέτει μεγάλο κυτταροπλασματικό και πυρηνικό μέγεθος. Το ένθετο στο **A2** παρουσιάζει τα κεντρίδια σε μεγαλύτερη μεγέθυνση.

B. Η παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων στα αποσιωπημένα κύτταρα οδηγεί στην εμφάνιση πολυπολικών μιτωτικών ατράκτων. Διακρίνεται μιτωτικό κύτταρο στη μετάφαση με τετραπολική μιτωτική άτρακτο. Η κλίμακα για όλες τις φωτογραφίες **A1-A4** είναι 20 μm , 5 μm για τις **B1-B4** και 2 μm για το ένθετο της **A2**.



3.6.2.3 Ανάλυση βλεφαριδογένεσης κλώνου 3.81

Όπως και στην περίπτωση του κλώνου 2.43, διενεργήθηκε ανάλυση της βλεφαριδογένεσης διαιρουμένων κυττάρων καθώς και κυττάρων τα οποία είχαν αποστερηθεί ορό (2.3.12.3.3), μέσω μικροσκοπικής ανάλυσης με την χρήση των αντισωμάτων έναντι της α -τουμπουλίνης και της ακετυλιωμένης-τουμπουλίνης. Διεξήχθησαν τρία ανεξάρτητα πειράματα για την κάθε περίπτωση, στα οποία μετρήθηκαν συνολικά 3004 διαιρούμενα φυσιολογικά κύτταρα NIH 3T3 και 3023 διαιρούμενα κύτταρα κλώνου 3.81. Αντίστοιχα στα πειράματα με την αποστέρηση ορού, μετρήθηκαν συνολικά 3020 κύτταρα φυσικού τύπου NIH 3T3 και 3013 κύτταρα κλώνου 3.81.

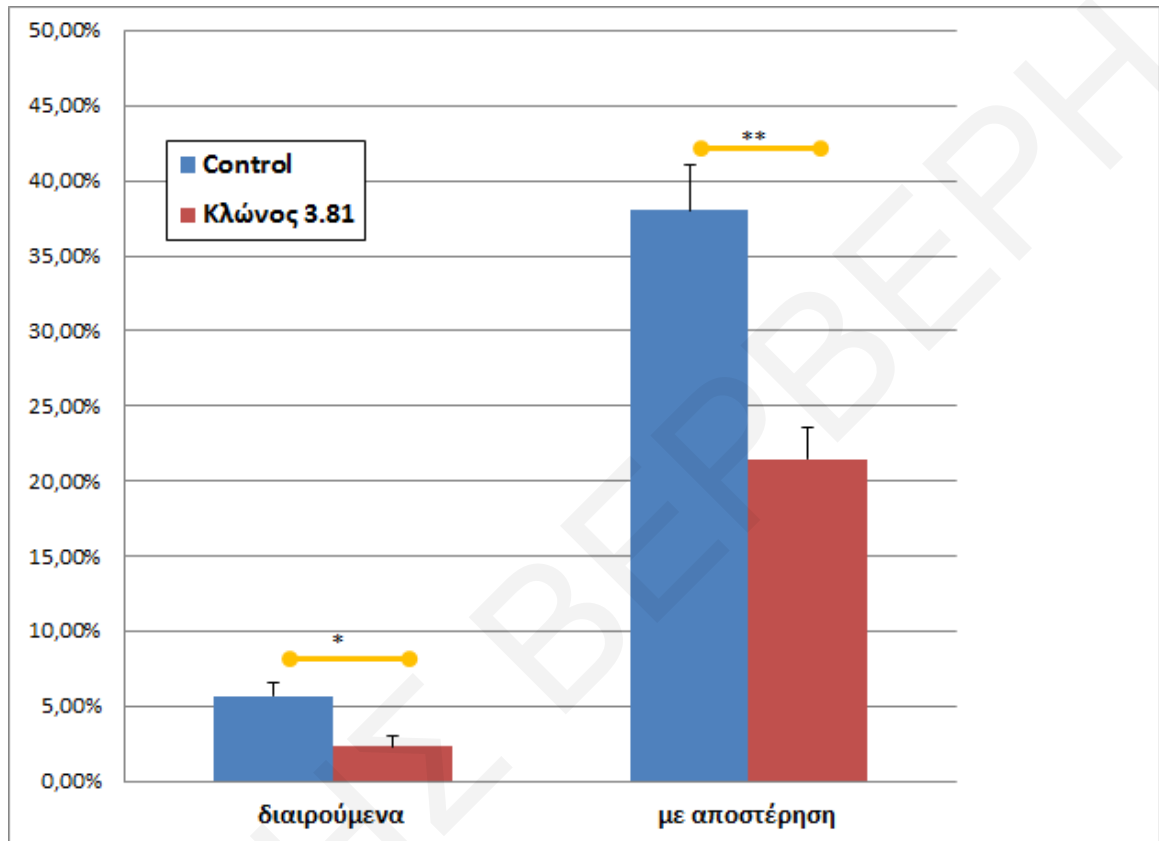
Στην περίπτωση του κλώνου 3.81 παρατηρήθηκε μείωση (t-test, $p=0.0062$) στην εμφάνιση βλεφαρίδων στην αποσιωπημένη για τις KATNAL2 κυτταροσειρά 3.81 ($2.35\pm 0.71\%$) έναντι των φυσιολογικών NIH 3T3 ($5.69\pm 0.83\%$). Το ίδιο μοντέλο εντοπίστηκε και σε κύτταρα στα οποία διεξήχθη επαγωγή της βλεφαριδογένεσης μέσω αποστέρησης ορού για 24 ώρες, αφού παρατηρήθηκε ελάττωση (t-test, $p=0.0014$) των κυττάρων που έφεραν βλεφαρίδες στον πληθυσμό του κλώνου 3.81 ($21.47\pm 2.12\%$) έναντι των φυσιολογικών NIH 3T3 ($38.06\pm 2.97\%$) (Γράφημα 3.9).

Αυτά τα αποτελέσματα, τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα του αποσιωπημένου κλώνου 2.43, επιβεβαιώνουν την ειδικότητα στον φαινότυπο που προκύπτει κατά την αποσιώπηση των KATNAL2, οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζουν τη βλεφαριδογένεση, λειτουργία στην οποία εμπλέκονται και οι αλληλεπιδρώσες τους, Nubp1 και Nubp2 (Kypri et al., 2014), αλλά και η συγγενική τους, αρχέτυπη Katanin (Sharp and Ross, 2012).

Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής εργασίας αποτελούν μέρος κατατεθειμένου άρθρου: **Ververis, A., Christodoulou, A., Christoforou, M., Kamilari, C., Lederer, C.W., and Santama, N.** “A novel family of Katanin-like 2 protein isoforms (KATNAL2), interacting with nucleotide binding proteins Nubp1 and Nubp2, are key regulators of different MT-based processes in mammalian cells”, το οποίο βρίσκεται υπό επιστημονική κρίση για δημοσίευση στο περιοδικό Cellular and Molecular Life Sciences (επισυνάπτεται ως ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ).

Γράφημα 3.9: Η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί τη μείωση των βλεφαριδοφόρων κυττάρων στον κλώνο 3.81.

Διάγραμμα που απεικονίζει α) την πτώση (t-test, $p=0.0062$) στο ποσοστό των βλεφαριδοφόρων διαιρούμενων κυττάρων στον κλώνο 3.81 ($2.35\pm 0.71\%$) έναντι των φυσιολογικών NIH 3T3 ($5.69\pm 0.83\%$) και β) υπό συνθήκες αποστέρησης ορού, την μείωση (t-test, $p=0.0014$) του ποσοστού των βλεφαριδοφόρων κυττάρων στην αποσιωπημένη κυτταροσειρά 3.81 ($21.47\pm 2.12\%$) έναντι των φυσιολογικών NIH 3T3 ($38.06\pm 2.97\%$).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αναγνώριση μιας καινούριας οικογένειας πρωτεϊνών Katanin-like 2 και χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων τους

Η αρχέτυπη Katanin είναι μία καλά χαρακτηρισμένη και ευρέως διαδεδομένη πρωτεΐνη, με αντιπροσώπους και στα πέντε βασίλεια στα οποία ταξινομείται το σύνολο των οργανισμών. Σε αντιδιαστολή, οι συγγενικές της πρωτεΐνες Katanin-like, αποτελούν μία οικογένεια για την οποία δεν έχει διεξαχθεί τόσο εκτεταμένη έρευνα, όσο για την Katanin. Φαίνεται όμως ότι και αυτές εμφανίζονται ευρέως, με καταγεγραμμένη παρουσία σε θηλαστικά όπως τον άνθρωπο, σε φυτά όπως την *Arabidopsis thaliana*, και σε ασπόνδυλα όπως τη *Drosophila* (Sonbuchner et al., 2010, McClinton et al., 2001, Lee et al., 2009). Επιπρόσθετα, η ύπαρξη τέτοιων πρωτεϊνών προβλέπεται και σε διάφορους άλλους οργανισμούς μέσω των βάσεων δεδομένων Pubmed και Phytozome, όπως το πτηνό κουρούνα (*Corvix cornix cornix*), αλλά και σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως το χλωροφύκος *Chlamydomonas reinherdii*. Συγκεκριμένα, η Cre10.g446400 της *Chlamydomonas*, είναι μία πρωτεΐνη Katanin-like 2, η οποία εμφανίζει ομοιότητα 44.1% με την KATNAL2-L1 του ποντικού (προσωπική επικοινωνία της Δρος Νιόβης Σανταμά με τις Δρ Mette Lethan και Δρ Lotte B. Pedersen).

Στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής, για πρώτη φορά διεξήχθη αναλυτική μελέτη του ρόλου μίας πρωτεΐνης Katanin-like 2. Κατά την προσπάθεια απομόνωσης της, αποκαλύφθηκε μάλιστα ότι στον ποντικό υπάρχουν πέντε διαφορετικές ισομορφές *Katnal2*, που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα των 16 εξονίων της γονιδιακής θέσης που τις κωδικοποιεί.

Ο κυριότερος λόγος της ενασχόλησης μας με την Katanin-like 2 ήταν αρχικά η υπό διερεύνηση αλληλεπίδραση της με τη Nubp1, που προέκυψε στα πλαίσια σάρωσης βιβλιοθήκης εμβρυονικού cDNA από ποντικό έναντι του cDNA της *Nubp1*. Αυτή η σχέση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, επιβεβαιώθηκε μέσω πειραμάτων συνεπιλογής, που πραγματοποιήθηκαν από τις Χριστίνα Καμηλάρη και Δρ Άντρη Χριστοδούλου (Καμηλάρη, 2010), τα οποία απέδειξαν ότι η KATNAL2-L1 και η KATNAL2-S1 αλληλεπιδρούν τόσο με τη Nubp1 όσο και με τη Nubp2, που εμπλέκονται στο διπλασιασμό των κεντροσωματίων και στη ρύθμιση της βλεφαριδογένεσης (Christodoulou et al., 2006, Kypri et al., 2014). Τα πιο πάνω επικυρωμένα αποτελέσματα εμπλέκουν τις KATNAL2 στις λειτουργίες που επιτελούν οι Nubps, και για τους σκοπούς της διατριβής έγινε προσπάθεια να αποσαφηνιστεί ο τρόπος που γίνεται αυτό. Οι λόγοι για τους οποίους διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση μόνο των KATNAL2-L1 και -S1, ήταν επειδή α) ήταν οι πρώτες χρονικά που απομονώθηκαν, β) εκδήλωναν την υψηλότερη γονιδιακή έκφραση σε σχέση με τις υπόλοιπες ισομορφές, όπως έδειξαν τα πειράματα ανάλυσης προτύπου γονιδιακής έκφρασης (3.3), και γ) η μεγάλη ομοιότητα που παρατηρείται μεταξύ των ισομορφών (Σχήματα 3.2, 3.3 & 3.4), καθιστά την αλληλεπίδραση των Nubps και με τις υπόλοιπες ισομορφές το πιθανότερο σενάριο.

Ένα ακόμη πόρισμα που προέκυψε από τα παραπάνω πειράματα συνεπιλογής, ήταν η διαπίστωση ύπαρξης αλληλεπίδρασης της KATNAL2-L1 με τον εαυτό της, καθώς και με όλη την γκάμα ενδογενών KATNAL2 που αναγνώριζε το αντίσωμα έναντι της KATNAL2. Επιπρόσθετα και η KATNAL2-S1 βρέθηκε να αλληλεπιδρά τόσο με τον εαυτό της όσο και με τις υπόλοιπες KATNAL2. Η αλληλεπίδραση των KATNAL2 με τον εαυτό τους, δεν είναι κάτι καινούριο στην οικογένεια των AAA ATPάσων, αφού ως γνωστό η Katanin p60, η Spastin και η Fidgetin σχηματίζουν η κάθε μία ομοεξαμερείς δομές για τη σύνδεση τους στους μικροσωληνίσκους (Roll-Mecak and Vale, 2008, Sharp and Ross, 2012, Roll-Mecak and McNally, 2010, Peng et al., 2013). Επίσης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ισομορφών, παραπέμπουν στην αλληλεπίδραση της Katanin p60 με την Katanin p80 (McNally and Vale, 1993), πιστοποιώντας ακόμη μία ομοιότητα μεταξύ των KATNAL2 και των αρχέτυπων Katanin.

Πιθανότατα, η διαφορετική χρήση των ισομορφών για τον σχηματισμό όμο-ολιγομερών και έτερο-ολιγομερών συμπλόκων των KATNAL2, να είναι απαραίτητη για τον ενδοκυτταρικό τους εντοπισμό ή ακόμη και για τη λειτουργική τους εξειδίκευση. Για παράδειγμα, διαφορετικά σύμπλοκα έτερο-ολιγομερών μπορεί να κατατέμουν ξεχωριστά υποσύνολα μικροσωληνίσκων. Ως γνωστό, η ετερογένεια που συναντάται στις διακριτές κατηγορίες μικροσωληνίσκων, οφείλεται είτε στη διαφορετική σύσταση των ισομορφών τουμπουλίνης, είτε στις διάφορες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των δομικών τους τουμπουλίνων. Η ύπαρξη λοιπόν τέτοιων διακριτών υποσυνόλων μικροσωληνίσκων, προσδίδει στην κάθε ομάδα μοναδική λειτουργικότητα και διαφορετική συγγένεια ως προς τα υποστρώματα τους, αλλά και ως προς τη σύνδεση τους με ένζυμα που κατατέμουν τους μικροσωληνίσκους (πρόσφατη ανασκόπηση από Janke, 2014). Η δομή των ξεχωριστών συμπλόκων των ισομορφών KATNAL2, καθώς και η λειτουργία του καθενός, είναι δύσκολο να αποσαφηνιστούν λόγω της εκτεταμένης ομοιότητας των αλληλουχιών των ισομορφών, ενώ άγνωστη παραμένει και η συχνότητα εμφάνισης τους στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Αυτό που είναι ξεκάθαρο όμως, είναι ότι το μοτίβο LiSH, που θεωρείται μοτίβο ολιγομερισμού (Emes and Ponting, 2001), δεν είναι απαραίτητο για τις εν λόγω ένδο-αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ισομορφών, μιας και η ισομορφή KATNAL2-S1 που συμμετέχει σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις δεν το διαθέτει στη δομή της. Επίσης η αλληλεπίδραση της S1 με τις Nubps, αποδεικνύει ότι το μοτίβο LiSH δεν είναι αναγκαίο ούτε και για αυτές τις σχέσεις των KATNAL2, ασχέτως αν η αλληλουχία που το κωδικοποιεί συμπεριλαμβάνεται στην αρχική μη πλήρη αλληλουχία cDNA (Σχήμα 3.1A), που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τη Nubp1, μέσω της σάρωσης με τη χρήση του συστήματος δύο υβριδίων.

4.2 Πολυλειτουργικότητα των KATNAL2

Οι KATNAL2 είναι πρωτεΐνες που ο ενδοκυτταρικός τους εντοπισμός είναι άμεσα συνυφασμένος με τους μικροσωληνίσκους. Συγκεκριμένα εντοπίζονται στους μεσοφασικούς μικροσωληνίσκους, στα κεντροσωμάτια, στη μιτωτική άτρακτο, στο ενδιάμεσο σώμα, και στο βασικό σωμάτιο και το αξόνημα των βλεφαρίδων (3.5). Επίσης, ένα κλάσμα των KATNAL2 συναντάται και στον πυρηνίσκο. Ο σύνθετος εντοπισμός τους αφήνει να νοηθεί ότι διαθέτουν διαφορετικούς λειτουργικούς ρόλους, στα διάφορα ενδοκυτταρικά οργανίδια και υπό-οργανίδια που εντοπίζονται. Πειράματα αποσιώπησης της δράσης των KATNAL2 επιβεβαίωσαν αυτή την υποψία, μιας και είχαν ως αποτέλεσμα τον επηρεασμό αρκετών από τα ενδοκυτταρικά φαινόμενα που παρατηρούνται σε αυτές τις περιοχές. Αυτή η πολυλειτουργικότητα φαίνεται να αποτελεί χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών τύπου Katanin, μιας και παρατηρείται και στην αρχέτυπη Katanin (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι η έκφραση των KATNAL2 στους αποσιωπημένους κλώνους ήταν γύρω στο 40% των φυσιολογικών επιπέδων. Παρά την εντατική και εκτεταμένη προσπάθεια, δεν έγινε κατορθωτή η απομόνωση αποσιωπημένων κλώνων με μεγαλύτερη μείωση στο ποσοστό έκφρασης. Παρόμοιες δυσκολίες συναντήθηκαν και κατά την προσπάθεια αποσιώπησης της αρχέτυπης Katanin στο χλωροφύκος *Chlamydomonas* (Rasi et al., 2009). Φαίνεται ότι οι KATNAL2, όπως και η Katanin, είναι απαραίτητες για την κυτταρική βιωσιμότητα, και για αυτό χρειάζεται η πρωτεϊνική τους έκφραση να ρυθμίζεται σε συγκεκριμένα επίπεδα χωρίς σημαντικές μεταβολές. Αυτή η άποψη ενισχύεται και από παρατηρήσεις που πάρθηκαν από απόπειρες υπερέκφρασης των KATNAL2, όπου ήταν εμφανής το πόσο τοξική ήταν η αύξηση των επιπέδων τους, για τον πληθυσμό των επιμολυσμένων κυτταροσειρών (Χριστοφόρου, 2014).

Άξιο αναφοράς ήταν το γεγονός ότι η αποσιώπηση των KATNAL2 προκαλεί ενίσχυση στην ακετυλίωση των μεσοφασικών μικροσωληνίσκων, ενώ δεν προκαλεί καμία αλλαγή στην οργάνωση του δικτύου τους (Εικόνα 3.25). Η ακετυλίωση αποτελεί μία από τις κυριότερες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις της α -τουμπουλίνης, και χαρακτηρίζει μικροσωληνίσκους που είναι πιο σταθεροί και σχετικά παλιότεροι από τους υπόλοιπους, και που αποτελούν ειδικό στόχο κατάτμησης λόγω της δράσης της Katanin (Janke, 2014, Sharma et al., 2007). Καταλύει την ύπαρξη ενός σχετικά σταθερού αντί δυναμικού δικτύου μικροσωληνίσκων, του οποίου η αναποτελεσματική κατάτμηση ενδέχεται να συντελεί στην εμφάνιση των μεγάλων και ανώμαλων σχημάτων που παρατηρήθηκαν στα αποσιωπημένα κύτταρα και στους πυρήνες τους. Ακετυλίωση συναντάται κυρίως σε μικροσωληνίσκους που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στη μιτωτική άτρακτο, στα κεντρίδια και στο αξόνημα (Wloga and Gaertig, 2010), μια κατανομή που θυμίζει τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των KATNAL2. Εάν η εμπλοκή των KATNAL2 στο δίκτυο των μικροσωληνίσκων αφορά αποκλειστικά τους ακετυλιωμένους, τότε το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε αλλοίωση του δικτύου των μικροσωληνίσκων κατά την αποσιώπηση τους, θα

πρέπει να θεωρείται αναμενόμενο μιας και η προσθήκη ή και η αφαίρεση της ακετυλίωσης δεν προκαλεί καμία αλλαγή στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων (Howes et al., 2014), αλλά μάλλον καθορίζει την ικανότητα σύνδεσης τους με τις διάφορες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν (Nagai et al., 2013). Αν και δεν υπάρχουν άμεσες αποδείξεις για καταταμητική δραστηριότητα των KATNAL2, η ενίσχυση της ακετυλίωσης λόγω της ελάττωσης στη δραστηριότητά τους, υπονοεί ότι οι KATNAL2 μάλλον συμβάλλουν άμεσα στην κατάτμηση των ακετυλιωμένων μικροσωληνίσκων, έχοντας παρόμοιο λειτουργικό ρόλο με την πρωτότυπη Katanin.

4.2.1 Λειτουργίες των ισομορφών KATNAL2 σε διαιρούμενα κύτταρα

Η ανάλυση του αναπτυξιακού και τοπικού προτύπου γονιδιακής έκφρασης των ισομορφών *Katnal2* στο ποντίκι (3.3), έδειξε ότι αυτές οι ισομορφές συναντώνται κυρίως σε ιστούς με έντονη μιτωτική δραστηριότητα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία διαιρούμενων κυττάρων, ενώ σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα η δράση τους μειώνεται. Επομένως η βιολογική λειτουργία των KATNAL2 θα πρέπει να έχει άμεση συσχέτιση με τον κυτταρικό κύκλο.

4.2.1.1 Οι KATNAL2 εμπλέκονται στην κυτοκίνηση

Η αποσιώπηση των ισομορφών KATNAL2 προκαλεί τη σημαντική αύξηση του κυτταρικού και πυρηνικού μεγέθους. Ο φαινότυπος αυτός είναι άμεσα συνδεδεμένος με μη φυσιολογική διεκπεραίωση της φάσης της κυτοκίνησης (Nakaya et al., 2009), η οποία ενδεχομένως προκύπτει λόγω αναποτελεσματικής κατάτμησης των δεσμίδων ακετυλιωμένων μικροσωληνίσκων στο ενδιάμεσο σώμα (midbody). Η έντονη παρουσία μικροσωληνίσκων στο ενδιάμεσο σώμα στα αποσιωπημένα κύτταρα (Εικόνες 3.27A & 3.27B), σε συνδυασμό με τον εντοπισμό των KATNAL2 στην ίδια περιοχή (Εικόνα 3.19B) ενισχύουν αυτό τον ισχυρισμό. Οδηγούμαστε λοιπόν, είτε στην ολική αποτυχία της κυτοκίνησης, είτε στον άνισο διαχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση φαινοτύπων που χαρακτηρίζονται από ανευπλοειδία/πολυπλοειδία, που τελικώς θα οδηγήσουν σε μεγάλα κυτταρικά και πυρηνικά μεγέθη, και την παρουσία διπύρηνων κυττάρων. Η μεγέθυνση του γονιδιώματος, που σε αυτή την περίπτωση γίνεται μέσω της πολυπλοειδίας, μπορεί να αυξήσει αναλογικά το πυρηνικό μέγεθος, όπως διαφάνηκε στα αγγειόσπερμα (Jovtchev et al., 2006). Για να αντιληφθούμε πώς η πολυπλοειδία μπορεί να επηρεάσει και το κυτταρικό μέγεθος, αναφέρουμε ότι ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου της κυκλίνης *CLN3*, επηρεάζει αναλογικά το μέγεθος που πρέπει να έχει ένα κύτταρο, ώστε να περάσει από τη φάση G1 στην S. Έχοντας υπόψη ότι η συχνότητα της κυτταρικής διαίρεσης δεν επηρεάζεται από την κατάσταση πλοειδίας, και τον αυξημένο ρυθμό μεταγραφής λόγω της πολυπλοειδίας, φαίνεται ότι για να ανταποκριθεί το κύτταρο στις ανάγκες του επιθυμητού μεγέθους θα χρειαστεί μια ανάλογη αύξηση του ρυθμού βιογένεσης των ριβοσωματίων και της πρωτεϊνοσύνθεσης (Di Talia et al., 2007, Verges et al., 2007, Wu et al., 2010).

Παρόμοιοι φαινότυποι συναντώνται και στην περίπτωση αποσιώπησης της αρχέτυπης Katanin p60, λόγω ανωμαλιών κατά την κυτοκίνηση (Matsuo et al., 2013). Επίσης λόγω της ατελούς ή της ασύμμετρης κυτοκίνησης αναμένεται να παρατηρηθούν αυξημένοι αριθμοί κεντριδίων στα διάφορα κύτταρα του αποσιωπημένου πληθυσμού, όπως και τελικά παρατηρήθηκαν.

Το σενάριο εμπλοκής των KATNAL2 στην κυτοκίνηση ενισχύθηκε περαιτέρω από τη διεξαγωγή πειραμάτων μελέτης του δυναμικού κύκλου ζωής των αποσιωπημένων και μη κυττάρων *in vivo*, με τη χρήση βιντεομικροσκοπίας διαφοράς φάσης σε πραγματικό χρόνο σε ζωντανά κύτταρα, τα οποία πραγματοποιήθηκαν από τους Δρα Νικόλα Μαστρογιαννόπουλο και Δρα Άντρη Χριστοδούλου. Μέσω αυτών, καταγράφηκαν αρκετές ανωμαλίες κατά την κυτοκίνηση στα αποσιωπημένα κύτταρα, όπως α) επανασύνδεση των θυγατρικών κυττάρων και δημιουργία διπύρηνων λίγο προτού ολοκληρωθεί η φάση της κυτοκίνησης, β) ελλιπής σχηματισμός της θέσης διάσπασης σε μιτωτικά κύτταρα στα οποία είχαν ήδη διαχωριστεί οι πυρήνες με συνέπεια τη δημιουργία διπύρηνων κυττάρων, και γ) την γένεση δύο ανισομεγεθών θυγατρικών κυττάρων από ένα μητρικό, λόγω ασυμμετρίας κατά την κυτοκίνηση, με αποτέλεσμα το ένα να είναι σημαντικά μεγαλύτερο από το άλλο. Αυτές οι παρατηρήσεις συνάδουν και με τον χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης που παρουσιάζουν τα αποσιωπημένα κύτταρα, καθώς και με το διαταραγμένο πρότυπο κυτταρικού κύκλου αφού τα κύτταρα δυσκολεύονται να ολοκληρώσουν τη μίτωση, με συνέπεια να παραμένουν στη φάση G2/M.

Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η λειτουργία των KATNAL2 είναι αναγκαία για την επιτυχή διεξαγωγή της κυτοκίνησης, πιθανόν μέσω της κατάτμησης των ακετυλιωμένων μικροσωληνίσκων του ενδιάμεσου σώματος.

4.2.1.2 Οι KATNAL2 εμπλέκονται στον μηχανισμό ρύθμισης διπλασιασμού του κεντροσωματίου

Ο μηχανισμός ρύθμισης διπλασιασμού του κεντροσωματίου βασίζεται στο ότι το κάθε μητρικό κεντρίδιο μπορεί να διπλασιαστεί μόνο μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο, ώστε να σχηματιστεί μόνο ένα θυγατρικό κεντρίδιο ανά μητρικό (πρόσφατη ανασκόπηση από Nigg and Stearns, 2011). Οι Nubp1 και Nubp2 αποτελούν ρυθμιστές αυτού του μηχανισμού, μιας και από πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο μας διαπιστώθηκε ότι η αποσιώπηση τους οδηγεί στην αύξηση των κεντριδίων ανά κύτταρο (Christodoulou et al., 2006). Οι δύο πρωτεΐνες Nubp αλληλεπιδρούν με τις KATNAL2, δίνοντας ένα πρώτο στοιχείο για πιθανή συμμετοχή των KATNAL2 στο διπλασιασμό των κεντροσωματίων. Αυτό δεν πρόκειται να αποτελέσει κάτι πρωτόγνωρο για τις Katanins, μιας και η αποσιώπηση της p80, ρυθμιστικής υπομονάδας της Katanin, σε ανθρώπινες κυτταροσειρές, έδωσε παρόμοιο φαινότυπο με κύτταρα με υπεράριθμα κεντρίδια (Hu et al., 2014).

Στα πλαίσια αυτής της διατριβής, η αποσιώπηση των *Katnal2* με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδίων shRNA, οδήγησε στην άνοδο του αριθμού των κεντριδίων ανά κύτταρο, καθόλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα υπεράριθμα κεντριδία διατηρούν τη λειτουργικότητά τους, αφού είναι ικανά να προβούν στην πυρήνωση μικροσωληνίσκων κατά τη μίτωση στην άτρακτο, όπως ακριβώς συμβαίνει και κατά την αποσιώπηση της αλληλεπιδρώσας Nubp1 ή κατά την ταυτόχρονη αποσιώπηση των Nubp1 και Nubp2 (Christodoulou et al., 2006). Άμεση συνέπεια αυτού του φαινομένου είναι η συγκρότηση μη φυσιολογικών πολυπολικών ατράκτων, που όπως αναφέρθηκε νωρίτερα (Εικόνα 1.11) μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία θυγατρικών κυττάρων με γενετική αστάθεια ή ακόμα και στην εμφάνιση διπύρηνων κυττάρων λόγω αποτυχίας της κυτοκίνησης (πρόσφατη ανασκόπηση από Nigg and Raff, 2009). Ως επιβεβαίωση των πιο πάνω, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των διπύρηνων κυττάρων στον αποσιωπημένο για την KATNAL2 πληθυσμό, και μεγέθυνση των κυττάρων και των πυρήνων τους, οδηγώντας σε αρκετές περιπτώσεις στην εμφάνιση γιγαντιαίων πολυπλοειδών κυττάρων ανώμαλου σχήματος. Ακόμη, η παρουσία πολυπολικών ατράκτων, δικαιολογεί την καθυστέρηση της μίτωσης στην προμετάφαση (δυσκολεύοντας τη σωστή διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση), ενώ μπορεί να προκαλέσει μέχρι και έξοδο από τη μίτωση (πρόσφατη ανασκόπηση από Gergely and Basto, 2008).

Επιπλέον η αποσιώπηση των *Katnal2*, οδήγησε στη μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης τόσο της Nubp1 όσο και της Nubp2. Εγείρεται το ενδεχόμενο ότι οι KATNAL2 παίζουν ρόλο στη σωστή οργάνωση και λειτουργία του συμπλόκου των Nubps, και πιθανότατα είναι μέσω αυτής της σχέσης που εμπλέκονται στο μηχανισμό διπλασιασμού των κεντροσωματίων. Η ελάττωση των επιπέδων των KATNAL2 μειώνει τη σταθερότητα των Nubps, διαταράσσοντας τον μηχανισμό ρύθμισης διπλασιασμού των κεντροσωματίων, οδηγώντας στους φαινοτύπους των υπεράριθμων κεντριδίων που παρατηρήθηκαν.

Είναι εύλογο να υποτεθεί ότι μία συνέπεια από την αποτυχία της κυτοκίνησης είναι και η παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων, παρόλο που πιθανόν δεν είναι το μοναδικό αίτιο. Όπως αναφέρθηκε, τα αποτελέσματα των πειραμάτων της μελέτης του κύκλου ζωής των κυττάρων *in vivo*, σε συνδυασμό με την έντονη παρουσία των KATNAL2 στο ενδιάμεσο σώμα (Εικόνα 3.19), επιβεβαιώνουν τον ρυθμιστικό ρόλο των ισομορφών κατά την κυτοκίνηση. Έτσι μπορούμε να υποστηρίξουμε με σχετική βεβαιότητα ότι η αποσιώπηση των KATNAL2, προκαλεί βλάβη και κατά την κυτοκίνηση, αλλά και κατά τη ρύθμιση του διπλασιασμού των κεντροσωματίων.

4.2.1.3 Οι KATNAL2 εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του δικτύου των μικροσωληνίσκων

Είναι δεδομένο ότι η καταμητική δραστηριότητα της Katanin επηρεάζει άμεσα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ενώ αυτό είναι και κάτι που ισχύει και αντίστροφα μιας και η δράση της Katanin επηρεάζεται από τον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα η σταθερότητα και η

δραστικότητα της Katanin ελέγχεται μέσω χημικών τροποποιήσεων του μορίου της, και μέσω αλληλεπιδράσεων της με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή και με διάφορα σύμπλοκα πρωτεϊνικής αποικοδόμησης, αναλόγως της φάσης του κυτταρικού κύκλου. Ως συνέπεια αυτών των μηχανισμών, η Katanin εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα κατά τη μίτωση σε σχέση με τη μεσόφαση (McNally and Thomas, 1998, Lohret et al., 1998, Ghosh et al., 2012). Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι στη μεσόφαση, και ιδιαίτερα κατά τη φάση G2, επιτελείται έντονη κατάτμηση μικροσωληνίσκων ώστε να αναδιαμορφωθεί το δίκτυο τους για την είσοδο στη μίτωση (Zhai et al., 1996). Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η συγκέντρωση μικρού μεγέθους μικροσωληνίσκων φτάνει στο μέγιστο της κατά το τέλος της πρόφασης (McNally and Thomas, 1998).

Στην παρούσα διατριβή, τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι τα αποσιωπημένα κύτταρα εμφανίζονται ελαττωμένα στη φάση S και αυξημένα στη φάση G2/M. Η μικροσκοπική καταμέτρηση των κυττάρων κατέδειξε την αισθητή μείωση των μιτωτικών κυττάρων λόγω της μετρίασης της έκφρασης των KATNAL2. Ο συνδυασμός των πιο πάνω δεδομένων υποδηλώνει ουσιαστικά μειωμένη τάση των κυττάρων να εισέλθουν στη μίτωση και συσσώρευση στη φάση G2. Μάλιστα αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με τη διενέργεια επιπρόσθετων πειραμάτων μεταγραφικής αποσιώπησης με τη χρήση δεύτερου ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή shRNA. Τα δεδομένα αυτά αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ανεπάρκειας στη διαδικασία αναδιοργάνωσης των μικροσωληνίσκων που συμβαίνει στο τέλος της μεσόφασης, για την είσοδο στη μίτωση.

Δύο επιπλέον ευρήματα στον πληθυσμό των αποσιωπημένων κυττάρων, ήταν α) ότι τα κύτταρα που επιτυγχάνουν τελικά να εισέλθουν στη μίτωση, καθυστερούν στη φάση της προμετάφασης (Πίνακας 3.5), και β) παρατηρείται μη φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά το στάδιο της μετάφασης (Εικόνα 3.26C). Ως γνωστό, για να καταφέρει το κύτταρο να περάσει από την προμετάφαση στη μετέπειτα μίτωση, θα πρέπει τα χρωμοσώματα να στοιχιστούν με τον κατάλληλο τρόπο στο ισημερινό επίπεδο του κυττάρου, και οι κινητοχώροι όλων των χρωματίδων να συνδεθούν με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου. Αν δεν ικανοποιηθούν αυτές οι προϋποθέσεις, τότε το μιτωτικό κύτταρο θα παραμείνει στην προμετάφαση (Uetake and Sluder, 2010, Hardwick et al., 1999). Τυχόν ανωμαλίες και προβλήματα στην κατάτμηση των μεσοφασικών μικροσωληνίσκων, για τη δημιουργία των μικρότερων κομματιών που θα συγκροτήσουν τη μιτωτική άτρακτο, εξαιτίας της μείωσης της δραστικότητας των KATNAL2, μπορεί να αποτελεί την εξήγηση της καθυστέρησης της φυσιολογικής ανάπτυξης της μιτωτικής ατράκτου, προκαλώντας έτσι την καθυστέρηση στην προμετάφαση μέχρι να ολοκληρωθεί η δόμηση της ατράκτου.

Φυσικά, όλοι οι πιο πάνω φαινότυποι (διαφοροποίηση προτύπου κυτταρικού κύκλου, μείωση ποσοστού μιτωτικών κυττάρων, καθυστέρηση στην προμετάφαση), μπορούν να αποδοθούν στην παρουσία υπεράριθμων κεντριδίων, φαινόμενο το οποίο αποδίδεται τόσο σε σφάλματα κατά

τον διπλασιασμό τους, όσο και στην προβληματική κυτοκίνηση. Επίσης το αυξημένο κυτταρικό και πυρηνικό μέγεθος αποδίδεται σε σφάλματα κατά την κυτοκίνηση. Εν τούτοις ένα υπερβολικά σταθερό δίκτυο μικροσωληνίσκων αποτελεί έναν παράγοντα που συντείνει στην εμφάνιση ανώμαλων σχημάτων. Στην *Arabidopsis* για παράδειγμα, η κατατμητική δράση της Katanin επηρεάζει το κυτταρικό μέγεθος και σχήμα (Uyttewaal et al., 2012). Κατά τα πειράματα βιντεομικροσκοπίας παρατηρήθηκε σε αρκετές περιπτώσεις στους αποσιωπημένους κυτταροπληθυσμούς, η παρουσία μεγάλων πυρήνων, οι οποίοι περιστρέφονταν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα τόσο κατά τη μεσόφαση όσο και κατά την κυτοκίνηση. Αυτό το φαινόμενο αποδίδεται στην μεγέθυνση των μικροσωληνίσκων του φλοιού, των οποίων τα θετικά τους άκρα σπρώχνουν τον πυρηνικό φάκελο, εξασκώντας δυνάμεις που αλλοιώνουν την ενδοκυτταρική θέση του πυρήνα (Szikora et al., 2013). Φαίνεται ότι οι «περιστρεφόμενοι» πυρήνες οφείλονται στην αναποτελεσματική κατάτμηση μεσοφασικών μικροσωληνίσκων από τις KATNAL2. Ακόμη, η εμφανής παρουσία ανωμαλιών στον πυρήνα, όπως «τρυπών», μέσω των οποίων διέρχονται μικροσωληνίσκοι, ενισχύει την πιο πάνω άποψη.

Ο συνδυασμός των πιο πάνω αποτελεσμάτων συνηγορεί στο ότι οι KATNAL2 εμπλέκονται στην κατάτμηση των μεσοφασικών μικροσωληνίσκων, που χρειάζεται να γίνει για την αναδιοργάνωση τους ώστε α) το κύτταρο να διαμορφώσει το κατάλληλο μέγεθος και σχήμα που χρειάζεται να έχει β) το κύτταρο να μεταβεί από τη μετάφαση στη μίτωση, χρησιμοποιώντας τους μικρότερους μικροσωληνίσκους που προκύπτουν από την κατάτμηση, για τη δημιουργία της μιτωτικής συσκευής.

4.2.1.4 Οι KATNAL2 πιθανόν εμπλέκονται στον αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά την ανάφαση

Η ελάττωση των επιπέδων των KATNAL2, προκαλεί την αυξημένη παρουσία γεφυρών χρωματίνης στα αποσιωπημένα κύτταρα. Οι γέφυρες χρωματίνης αποτελούν δομές που εμφανίζονται στις περιπτώσεις ανωμαλιών κατά τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων στη μίτωση, εντοπίζονται στο ενδοκυτταρικό κανάλι που συνδέει τα δύο θυγατρικά κύτταρα, και μπορεί να οδηγήσουν στη διατάραξη ή και στην αποτυχία της κυτοκίνησης, με συνέπεια την ανευπλοειδία και πολυπλοειδία (Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013). Σε μια τέτοια περίπτωση, τα θυγατρικά κύτταρα είτε θα παραμείνουν ενωμένα (διπύρηνα κύτταρα), είτε θα προκληθεί θραύση των συνδεδεμένων χρωμοσωμάτων που απαρτίζουν τη γέφυρα, για να γίνει κατορθωτός ο διαχωρισμός των κυττάρων (Germann et al., 2014).

Έχοντας υπόψη ότι το 35% περίπου των γεφυρών χρωματίνης, αφορά κύτταρα με υπεράριθμα κεντρίδια, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ένας από τους λόγους δημιουργίας τους είναι η αύξηση στον αριθμό των κεντριδίων. Φαίνεται όμως, ότι υποβόσκουν και άλλοι παράγοντες σχηματισμού των εν λόγω δομών που στην προκειμένη περίπτωση, το πιο πιθανό σενάριο είναι οι KATNAL2 να εμπλέκονται στην κατάτμηση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής συσκευής για

την κίνηση των χρωμοσωμάτων προς τα θυγατρικά κύτταρα κατά την ανάφαση. Αντίστοιχη λειτουργία κατέχει και η Katanin (πρόσφατη ανασκόπηση από Quarmbay, 2000, McNally and Thomas, 1998), και η ελάττωση της έκφρασης των KATNAL2 πιθανόν να καθυστερεί την κίνηση των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση, με επακόλουθο την εμφάνιση των γεφυρών χρωματίνης (Rogers et al., 2005).

4.2.2 Λειτουργίες των ισομορφών KATNAL2 σε μη διαιρούμενα κύτταρα

4.2.2.1 Οι KATNAL2 εμπλέκονται στη βλεφαριδογένεση

Οι εξακριβωμένες αλληλεπιδράσεις των KATNAL2 με τις Nubp1 και Nubp2, οι οποίες αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της βλεφαριδογένεσης (Kyrri et al., 2014), άφηναν υποψίες για πιθανή συμμετοχή τους στον κύκλο ζωής αυτών των οργανιδίων. Ως επιβεβαίωση, ένας φαινότυπος που παρατηρήθηκε κατά την αποσιώπηση των KATNAL2 ήταν η ελάττωση των βλεφαριδοφόρων κυττάρων, σε μη διαιρούμενα κύτταρα. Επίσης, προηγούμενα πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο μας, είχαν δείξει επίσης ότι το ποσοστό των βλεφαριδοφόρων κυττάρων μειώνεται σε συνθήκες μόνιμης σταθερής έκφρασης των ανασυνδυασμένων ισομορφών mCherry-KATNAL2-L1 και mCherry-KATNAL2-S1 (Χριστοφόρου, 2014). Το γεγονός ότι τόσο η πτώση όσο και η αύξηση της έκφρασης των KATNAL2, είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση των κυττάρων που έφεραν πρωτογενείς αισθητήριες βλεφαρίδες, υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού ρόλου για τις KATNAL2 κατά τη διαδικασία της βλεφαριδογένεσης, που προϋποθέτει την αυστηρή ποσοτική ρύθμιση τους στα κατάλληλα επίπεδα, ώστε να είναι σε θέση να επιτελέσουν τον βιολογικό τους ρόλο. Η άνοδος της κυτταρικής θνησιμότητας, σε περιπτώσεις υπερέκφρασης ή ριζικής αποσιώπησης των KATNAL2, ενισχύουν αυτή τη θέση. Πιθανόν οι KATNAL2 μέσω της καταταμητικής τους δράσης, ή της ρύθμισης της καταταμητικής δραστηριότητας άλλων πρωτεϊνών, να συμβάλλουν στη συγκρότηση μικρότερων μικροσωληνίσκων, βάσει των οποίων δημιουργείται το αξόνημα των βλεφαρίδων. Αυτή η εμπλοκή των KATNAL2 με τις βλεφαρίδες, δεν αποτελεί κάτι καινούριο για τη οικογένεια των Katanins, μιας και αρκετές πρωτεΐνες Katanin έχουν συσχετιστεί σε διάφορα είδη, με τη συναρμολόγηση και την αποσυναρμολόγηση των βλεφαρίδων (πρόσφατη ανασκόπηση από Sharp and Ross, 2012).

Οι αρνητικοί ρυθμιστές της βλεφαριδογένεσης Nubp1 και Nubp2, οι οποίες μάλλον δρουν ως σύμπλοκο, αλληλεπιδρούν με όλες σχεδόν τις σαπερονίνες που συγκροτούν το σύμπλοκο σαπερονίων CCT/TRiC, το οποίο εντοπίζεται στις βλεφαρίδες. Εκεί το σύμπλοκο CCT/TRiC είναι υπεύθυνο για την κατάλληλη αναδίπλωση της τουμπουλίνης, της ακτίνης καθώς και άλλων πρωτεϊνών που εντοπίζονται στις βλεφαρίδες και στα κεντρίδια, εξασκώντας έτσι σημαντική δράση κατά τη βλεφαριδογένεση (Kyrri et al., 2014, Seixas et al., 2010). Τα πιο πάνω γεγονότα συνηγορούν στο ότι οι Nubps μπορεί να αποτελούν συμπαράγοντες του συμπλόκου CCT/TRiC, αλληλεπιδρώντας με διάφορες πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά σύμπλοκα, επηρεάζοντας την αναδίπλωση

τους και ρυθμίζοντας τη δραστικότητα τους (Kyrgi et al., 2014). Οι Nubps μπορεί να εξασκούν τον ρόλο τους ως αρνητικού ρυθμιστή της βλεφαριδογένεσης, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τις KATNAL2, καταστέλλοντας τη κατατημητική δράση των τελευταίων, και μη επιτρέποντας τη δημιουργία μικρότερων μικροσωληνίσκων που θα αποτελέσουν τη βάση σχηματισμού του αξονήματος των βλεφαρίδων. Η μείωση των επιπέδων των Nubps ενδεχομένως να προκαλεί την αύξηση των διαθέσιμων και λειτουργικών μορίων KATNAL2, οδηγώντας σε μεγαλύτερα ποσοστά βλεφαριδοφόρων κυττάρων. Έτσι, αναμένεται ότι σε περίπτωση ταυτόχρονης αποσιώπησης, μίας ή και των δύο πρωτεϊνών Nubr και των KATNAL2, ο φαινότυπος που θα υπερνικήσει θα είναι αυτός της μείωσης των KATNAL2, μιας και οι Nubps ασκούν την επίδραση τους στη βλεφαριδογένεση εμμέσως, μέσω της επιρροής τους στις KATNAL2.

Βάσει των πιο πάνω, καθώς και της παρατηρημένης μείωσης των επιπέδων των Nubr1 και Nubr2 κατά την αποσιώπηση των KATNAL2, είναι πολύ πιθανό ότι *in vivo* τα πρωτεϊνικά επίπεδα των KATNAL2 δεν παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις, και αυτό είναι κάτι που συνάδει με τις δυσκολίες που συναντήθηκαν κατά τις προσπάθειες αποσιώπησης και υπερέκφρασης τους. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίζεται η σταθερότητα των Nubps, που με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη δραστικότητα των KATNAL2, μέσω της αυξομείωσης τους στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου (Kyrgi et al., 2014).

4.2.3 Οι KATNAL2 εντοπίζονται στον πυρηνίσκο

Ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα ήταν και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός ενός κλάσματος των KATNAL2 στον πυρηνίσκο, και μάλιστα σε συνεντοπισμό με το ένζυμο Φιμπριλλαρίνη, ακόμη και σε συνθήκες μεταγραφικής αναστολής στα Light Nucleolar Caps. Ο πυρηνίσκος αποτελεί μια ευδιάκριτη δομή του πυρήνα, που κύρια της λειτουργία είναι η σύνθεση και η συναρμολόγηση των ριβοσωμικών υπομονάδων. Ακόμη στον πυρηνίσκο περιλαμβάνονται πρωτεΐνες και RNAs που δεν σχετίζονται με τη βιογένεση των ριβοσωματίων, αλλά εμπλέκονται στη συγκρότηση σωματιδίων που αναγνωρίζουν διάφορα σήματα, καθώς και στην αίσθηση καταστάσεων κυτταρικού στρες (Olson and Dundr, 2015). Η Φιμπριλλαρίνη είναι μία μεθυλτρανσφεράση που εντοπίζεται στον πυρηνίσκο μεταξύ του ινώδους κέντρου και του πυκνού ινώδους διαμερίσματος, όπου γίνεται η μεταγραφή του rDNA, και στο πυκνό ινώδες διαμέρισμα, όπου διεξάγεται η επεξεργασία των pre-rRNA, συμμετέχοντας στα αρχικά στάδια αυτής της διαδικασίας (Sobol et al., 2013). Στα LNCs συγκεντρώνονται πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δράση της RNA πολυμεράσης I και στην επεξεργασία των rRNAs (Shav-Tal et al., 2005, Chen et al., 1999, Adamson et al., 2001, Nakamura et al., 2002, Ballarino et al., 2005). Ο συγκεκριμένος ενδοκυτταρικός εντοπισμός των KATNAL2, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα ανοσοκατακρήμνισης με τη χρήση του αντισώματος anti-KATNAL2, τα οποία κατέδειξαν διάφορες δομικές ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Πίνακας 3.4) ως πιθανές αλληλεπιδρώσεις των

KATNAL2, αφήνει υπόνοιες για πιθανή εμπλοκή των KATNAL2 στις λειτουργίες του πυρηνίσκου.

4.3 Μελλοντικές προεκτάσεις

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, διεξήχθη για πρώτη φορά απόπειρα χαρακτηρισμού μιας πρωτεΐνης τύπου Κατανίνης 2 (Katanin-like proteins 2). Για αυτή την οικογένεια δεν υπάρχουν καταχωρημένες πληροφορίες στον μεγάλο όγκο της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Η προσπάθεια αυτή στέφθηκε με επιτυχία, μιας και αρκετά στοιχεία βγήκαν στην επιφάνεια, μέσα από την επίπονη προσπάθεια που συντελέστηκε.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα μας, μπορούμε να πούμε ότι οι διάφορες ισομορφές KATNAL2 συγκροτούν όμο- και έτερο-ολιγομερή, για να επιτελέσουν τη δράση τους στα διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Οι ποικίλες λειτουργίες τους περιλαμβάνουν ρόλους α) που στηρίζονται στην κατάτμηση των μικροσωληνίσκων, όπως κατά την αναδιοργάνωση των μεσοφασικών μικροσωληνίσκων, την κυτοκίνηση, και τη βλεφαριδογένεση και β) που δεν στηρίζονται στο κόψιμο των μικροσωληνίσκων όπως κατά τον μηχανισμό διπλασιασμού των κεντριδίων. Το ερώτημα που προκύπτει είναι πώς οι KATNAL2 αναμειγνύονται σε τόσες πολλές και ταυτόχρονα διαφορετικές διαδικασίες. Όπως φανερώνουν και τα ευρήματα της μελέτης του τοπικού και αναπτυξιακού προτύπου των ισομορφών, οι ισομορφές KATNAL2 παρουσιάζουν ξεχωριστή γονιδιακή έκφραση. Συνεπώς, η απάντηση στο προηγούμενο ερώτημα, μπορεί να βρίσκεται στη διαφορετική χρήση των ισομορφών για το σχηματισμό όμο- και έτερο-ολιγομερών. Διαφορετικές ισομορφές μπορεί να απασχολούνται για τη δράση των KATNAL2 στη βλεφαριδογένεση, σε σχέση με αυτές που εμφανίζουν καταλυτική δράση κατά την κυτοκίνηση. Ακόμη, μπορεί σε διακριτές λειτουργίες να συμμετέχουν και ακριβώς οι ίδιες ισομορφές, οι οποίες όμως να σχηματίζουν διαφορετικής στοιχειομετρίας έτερο-ολιγομερή, αλλάζοντας τη δομική ισορροπία και τη λειτουργική κατεύθυνση.

Η αποσαφήνιση της δομής των όμο- και έτερο-ολιγομερών που συμμετέχουν σε κάθε μια διαδικασία, θα πρόσθετε πολύτιμα στοιχεία για την αποσαφήνιση της λειτουργίας των υπό μελέτη ισομορφών. Φυσικά, η μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των ισομορφών καθιστά αυτό το έργο πάρα πολύ δύσκολο. Δυστυχώς, δεν μπορεί να κατασκευαστεί ειδικό αντίσωμα έναντι των μικρών ισομορφών, ή να αποσιωπηθούν μόνο αυτές, για να διερευνηθεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια η δράση τους. Όμως, ένα βήμα προς αυτή την πορεία, ενδεχομένως θα είναι η κατασκευή αντισώματος ειδικού ως προς τις μεγάλες ισομορφές (L1, L2, L3), το οποίο θα βοηθήσει στην κατάλληλη αντιστοίχιση των ρόλων, ή τουλάχιστον στην άμεση συσχέτιση των μεγάλων ισομορφών στις λειτουργίες που όντως εμπλέκονται. Ακόμη, η ειδική αποσιώπηση των μεγάλων ισομορφών, και η σύγκριση των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν με τα αντίστοιχα της παρούσας εργασίας, μπορεί να βοηθήσει προς αυτή την κατεύθυνση.

Ένα άλλο σημείο που χρήζει περαιτέρω αποσαφήνισης είναι και ο ακριβής λειτουργικός ρόλος των KATNAL2 στον πυρηνίσκο. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, θα πρέπει να εξακριβωθεί πέραν πάσης αμφιβολίας η αλληλεπίδραση τους με τη Φιμπριλλαρίνη (λόγω του συνεντοπισμού τους), καθώς και με διάφορες άλλες ριβοσωμικές πρωτεΐνες, οι οποίες στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, εμφανίζονταν στο έκλουσμα του πειράματος, σε χαμηλές συχνότητες. Ακολούθως ο σχεδιασμός νέας πειραματικής διαδικασίας, θα πρέπει να περιλαμβάνει τις κατάλληλες μεθοδεύσεις για τον πλήρη χαρακτηρισμό για πρώτη φορά, της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης τύπου Katanin, στον πυρηνίσκο. Για παράδειγμα, η εξακρίβωση της αλληλεπίδρασης των KATNAL2 και με άλλες πρωτεΐνες του πυρηνίσκου και η αποσαφήνιση των συγκεκριμένων ισομορφών που συμμετέχουν, θα μπορούσε να προσδώσει περισσότερες λεπτομέρειες στη γνώση μας, ώστε να μπορέσουμε να εκπονήσουμε ένα μοντέλο για να εξηγήσουμε την όλη λειτουργία.

Σε αυτή τη διατριβή, αναφερθήκαμε πολλές φορές στις ομοιότητες στη δράση των KATNAL2 με αυτήν της αρχέτυπης Katanin, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις συνεντοπίζονται. Αν και δεν υπάρχει κάτι σχετικό στη βιβλιογραφία, ίσως οι δυο πρωτεΐνες να σχετίζονται. Η μελέτη των συνεπειών της αποσιώπησης των KATNAL2 στην έκφραση της Katanin, και η διευκρίνιση του κατά πόσον αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των KATNAL2.

Εν κατακλείδι, αυτή είναι μια προσπάθεια που διαθέτει πρόσφορο έδαφος για να συνεχιστεί, επειδή η πλήρης διαλεύκανση του ρόλου των KATNAL2, θα προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για σημαντικές διεργασίες που συμβαίνουν εντός των κυττάρων, όπως η βλεφαριδογένεση, ο μηχανισμός ρύθμισης του διπλασιασμού των κεντροσωματίων, η κυτοκίνηση και γενικά όλων των λειτουργιών που χαρακτηρίζονται από τη συμμετοχή των KATNAL2.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ADAMSON, C., NIU, S., BAHL, J. J. & MORKIN, E. 2001. Cloning and characterization of P110, a novel small nucleolar U3 ribonucleoprotein, expressed in early development. *Exp Cell Res*, 263, 55-64.
- AHMAD, F. J., YU, W., MCNALLY, F. J. & BAAS, P. W. 1999. An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J Cell Biol*, 145, 305-15.
- AL-BADER, M. D. & AL-SARRAF, H. A. 2005. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain Res Dev Brain Res*, 156, 38-45.
- ARMATO, U., CHAKRAVARTHY, B., PACCHIANA, R. & WHITFIELD, J. F. 2013. Alzheimer's disease: an update of the roles of receptors, astrocytes and primary cilia (review). *Int J Mol Med*, 31, 3-10.
- AVIDOR-REISS, T. & GOPALAKRISHNAN, J. 2013. Building a centriole. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 72-7.
- BAAS, P. W. & QIANG, L. 2005. Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock. *Trends Cell Biol*, 15, 183-7.
- BAAS, P. W. & SHARMA, V. 2011. Cell migration: katanin gives microtubules a trim. *Curr Biol*, 21, R302-4.
- BALLARINO, M., MORLANDO, M., PAGANO, F., FATICA, A. & BOZZONI, I. 2005. The cotranscriptional assembly of snoRNPs controls the biosynthesis of H/ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 25, 5396-403.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BUSTER, D., MCNALLY, K. & MCNALLY, F. J. 2002. Katanin inhibition prevents the redistribution of gamma-tubulin at mitosis. *J Cell Sci*, 115, 1083-92.
- CASANOVA, M., CROBU, L., BLAINEAU, C., BOURGEOIS, N., BASTIEN, P. & PAGES, M. 2009. Microtubule-severing proteins are involved in flagellar length control and mitosis in *Trypanosomatids*. *Mol Microbiol*, 71, 1353-70.
- CHARAFEDDINE, R. A., MAKDISI, J., SCHAIRER, D., O'ROURKE, B. P., DIAZ-VALENCIA, J. D., CHOUAKE, J., KUTNER, A., KRAUSZ, A., ADLER, B., NACHARAJU, P., LIANG, H., MUKHERJEE, S., FRIEDMAN, J. M., FRIEDMAN, A., NOSANCHUK, J. D. & SHARP, D. J. 2015. Fidgetin-Like 2: A Microtubule-Based Regulator of Wound Healing. *J Invest Dermatol*.
- CHEN, H. K., PAI, C. Y., HUANG, J. Y. & YEH, N. H. 1999. Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization. *Mol Cell Biol*, 19, 8536-46.
- CHEN, K., YE, Y., JI, Z., TAN, M., LI, S., ZHANG, J., GUO, G. & LIN, H. 2014. Katanin p60 promotes neurite growth and collateral formation in the hippocampus. *Int J Clin Exp Med*, 7, 2463-70.
- CHEN, M. & JIANG, P. 2004. Altered subcellular distribution of nucleolar protein fibrillarin by actinomycin D in HEP-2 cells. *Acta Pharmacol Sin*, 25, 902-6.
- CHRISTODOULOU, A., LEDERER, C. W., SURREY, T., VERNOS, I. & SANTAMA, N. 2006. Motor protein KIFC5A interacts with Nubp1 and Nubp2, and is implicated in the regulation of centrosome duplication. *J Cell Sci*, 119, 2035-47.
- COX, G. A., MAHAFFEY, C. L., NYSTUEN, A., LETTS, V. A. & FRANKEL, W. N. 2000. The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat Genet*, 26, 198-202.
- DE BOER, P. A., CROSSLEY, R. E., HAND, A. R. & ROTHFIELD, L. I. 1991. The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. *EMBO Journal*, 10, 10.

- DI TALIA, S., SKOTHEIM, J. M., BEAN, J. M., SIGGIA, E. D. & CROSS, F. R. 2007. The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature*, 448, 947-51.
- DOTTI, C. G., SULLIVAN, C. A. & BANKER, G. A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8, 1454-68.
- DYMEK, E. E., LEFEBVRE, P. A. & SMITH, E. F. 2004. PF15p is the chlamydomonas homologue of the Katanin p80 subunit and is required for assembly of flagellar central microtubules. *Eukaryot Cell*, 3, 870-9.
- ELAD, N., ABRAMOVITCH, S., SABANAY, H. & MEDALIA, O. 2011. Microtubule organization in the final stages of cytokinesis as revealed by cryo-electron tomography. *J Cell Sci*, 124, 207-15.
- EMES, R. D. & PONTING, C. P. 2001. A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet*, 10, 2813-20.
- EVANS, L., MITCHISON, T. & KIRSCHNER, M. 1985. Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol*, 100, 1185-91.
- FRICKEY, T. & LUPAS, A. N. 2004. Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol*, 146, 2-10.
- FU, J., HAGAN, I. M. & GLOVER, D. M. 2015. The centrosome and its duplication cycle. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5, a015800.
- GERGELY, F. & BASTO, R. 2008. Multiple centrosomes: together they stand, divided they fall. *Genes Dev*, 22, 2291-6.
- GERLITZ, G., DARHIN, E., GIORGIO, G., FRANCO, B. & REINER, O. 2005. Novel functional features of the Lis-H domain: role in protein dimerization, half-life and cellular localization. *Cell Cycle*, 4, 1632-40.
- GERMANN, S. M., SCHRAMKE, V., PEDERSEN, R. T., GALLINA, I., ECKERT-BOULET, N., OESTERGAARD, V. H. & LISBY, M. 2014. TopBP1/Dpb11 binds DNA anaphase bridges to prevent genome instability. *J Cell Biol*, 204, 45-59.
- GHOSH, D. K., DASGUPTA, D. & GUHA, A. 2012. Models, Regulations, and Functions of Microtubule Severing by Katanin. *ISRN Molecular Biology*, 2012, 14.
- GLUENZ, E., HOOG, J. L., SMITH, A. E., DAWE, H. R., SHAW, M. K. & GULL, K. 2010. Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. *FASEB J*, 24, 3117-21.
- GOODWIN, S. S. & VALE, R. D. 2010. Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. *Cell*, 143, 263-74.
- HARDWICK, K. G., LI, R., MISTROT, C., CHEN, R. H., DANN, P., RUDNER, A. & MURRAY, A. W. 1999. Lesions in many different spindle components activate the spindle checkpoint in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 152, 509-18.
- HARTMAN, J. J., MAHR, J., MCNALLY, K., OKAWA, K., IWAMATSU, A., THOMAS, S., CHEESMAN, S., HEUSER, J., VALE, R. D. & MCNALLY, F. J. 1998. Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell*, 93, 277-87.
- HAZAN, J., FONKNECHTEN, N., MAVEL, D., PATERNOTTE, C., SAMSON, D., ARTIGUENAVE, F., DAVOINE, C. S., CRUAUD, C., DURR, A., WINCKER, P., BROTTIER, P., CATTOLICO, L., BARBE, V., BURGUNDER, J. M., PRUD'HOMME, J. F., BRICE, A., FONTAINE, B., HEILIG, B. & WEISSENBACH, J. 1999. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet*, 23, 296-303.
- HILL, C. P. & BABST, M. 2012. Structure and function of the membrane deformation AAA ATPase Vps4. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 172-81.
- HORIO, T. & MURATA, T. 2014. The role of dynamic instability in microtubule organization. *Front Plant Sci*, 5, 511.
- HOWES, S. C., ALUSHIN, G. M., SHIDA, T., NACHURY, M. V. & NOGALES, E. 2014. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol Biol Cell*, 25, 257-66.

- HU, W. F., POMP, O., BEN-OMRAN, T., KODANI, A., HENKE, K., MOCHIDA, G. H., YU, T. W., WOODWORTH, M. B., BONNARD, C., RAJ, G. S., TAN, T. T., HAMAMY, H., MASRI, A., SHBOUL, M., AL SAFFAR, M., PARTLOW, J. N., AL-DOSARI, M., ALAZAMI, A., ALOWAIN, M., ALKURAYA, F. S., REITER, J. F., HARRIS, M. P., REVERSADE, B. & WALSH, C. A. 2014. Katanin p80 regulates human cortical development by limiting centriole and cilia number. *Neuron*, 84, 1240-57.
- HU, Z., LIANG, Y., HE, W. & PAN, J. 2015. Cilia Disassembly with Two Distinct Phases of Regulation. *Cell Rep.*
- HUANG, H., FLETCHER, L., BEEHARRY, N., DANIEL, R., KAO, G., YEN, T. J. & MUSCHEL, R. J. 2008. Abnormal cytokinesis after X-irradiation in tumor cells that override the G2 DNA damage checkpoint. *Cancer Res*, 68, 3724-32.
- ISHIKAWA, H. & MARSHALL, W. F. 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 222-34.
- JANKE, C. 2014. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol*, 206, 461-72.
- JOVTCHEV, G., SCHUBERT, V., MEISTER, A., BAROW, M. & SCHUBERT, I. 2006. Nuclear DNA content and nuclear and cell volume are positively correlated in angiosperms. *Cytogenet Genome Res*, 114, 77-82.
- KARABAY, A., YU, W., SOLOWSKA, J. M., BAIRD, D. H. & BAAS, P. W. 2004. Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. *J Neurosci*, 24, 5778-88.
- KASHER, P. R., DE VOS, K. J., WHARTON, S. B., MANSER, C., BENNETT, E. J., BINGLEY, M., WOOD, J. D., MILNER, R., MCDERMOTT, C. J., MILLER, C. C., SHAW, P. J. & GRIERSON, A. J. 2009. Direct evidence for axonal transport defects in a novel mouse model of mutant spastin-induced hereditary spastic paraplegia (HSP) and human HSP patients. *J Neurochem*, 110, 34-44.
- KE, Y. N. & YANG, W. X. 2014. Primary cilium: an elaborate structure that blocks cell division? *Gene*, 547, 175-85.
- KIM, S. & DYNLACHT, B. D. 2013. Assembling a primary cilium. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 506-11.
- KOLLMAN, J. M., POLKA, J. K., ZELTER, A., DAVIS, T. N. & AGARD, D. A. 2010. Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature*, 466, 879-82.
- KOMORISONO, M., UEGUCHI-TANAKA, M., AICHI, I., HASEGAWA, Y., ASHIKARI, M., KITANO, H., MATSUOKA, M. & SAZUKA, T. 2005. Analysis of the rice mutant dwarf and gladius leaf 1. Aberrant katanin-mediated microtubule organization causes up-regulation of gibberellin biosynthetic genes independently of gibberellin signaling. *Plant Physiol*, 138, 1982-93.
- KYPRI, E., CHRISTODOULOU, A., MAIMARIS, G., LETHAN, M., MARKAKI, M., LYSANDROU, C., LEDERER, C. W., TAVERNARAKIS, N., GEIMER, S., PEDERSEN, L. B. & SANTAMA, N. 2014. The nucleotide-binding proteins Nubp1 and Nubp2 are negative regulators of ciliogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 71, 517-38.
- LACROIX, B., VAN DIJK, J., GOLD, N. D., GUIZETTI, J., ALDRIAN-HERRADA, G., ROGOWSKI, K., GERLICH, D. W. & JANKE, C. 2010. Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol*, 189, 945-54.
- LAWSON, J. L. & CARAZO SALAS, R. E. 2013. Microtubules: greater than the sum of the parts. *Biochem Soc Trans*, 41, 1736-44.
- LEE, H. H., JAN, L. Y. & JAN, Y. N. 2009. Drosophila IKK-related kinase Ik2 and Katanin p60-like 1 regulate dendrite pruning of sensory neuron during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 6363-8.
- LINDELL, T. J. 1976. Evidence for an extranucleolar mechanism of actinomycin D action. *Nature*, 263, 347-50.
- LOHRET, T. A., MCNALLY, F. J. & QUARMBY, L. M. 1998. A role for katanin-mediated axonemal severing during Chlamydomonas deflagellation. *Mol Biol Cell*, 9, 1195-207.

- LOUGHLIN, R., WILBUR, J. D., MCNALLY, F. J., NEDELEC, F. J. & HEALD, R. 2011. Katanin contributes to interspecies spindle length scaling in *Xenopus*. *Cell*, 147, 1397-407.
- LUKE-GLASER, S., PINTARD, L., TYERS, M. & PETER, M. 2007. The AAA-ATPase FIGL-1 controls mitotic progression, and its levels are regulated by the CUL-3MEL-26 E3 ligase in the *C. elegans* germ line. *J Cell Sci*, 120, 3179-87.
- LUMB, J. H., CONNELL, J. W., ALLISON, R. & REID, E. 2012. The AAA ATPase spastin links microtubule severing to membrane modelling. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 192-7.
- MARSHALL, W. F. 2009. Centriole evolution. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 14-9.
- MATSUO, M., SHIMODAIRA, T., KASAMA, T., HATA, Y., ECHIGO, A., OKABE, M., ARAI, K., MAKINO, Y., NIWA, S., SAYA, H. & KISHIMOTO, T. 2013. Katanin p60 contributes to microtubule instability around the midbody and facilitates cytokinesis in rat cells. *PLoS One*, 8, e80392.
- MCCLINTON, R. S., CHANDLER, J. S. & CALLIS, J. 2001. cDNA isolation, characterization, and protein intracellular localization of a katanin-like p60 subunit from *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 216, 181-90.
- MCNALLY, F. J., OKAWA, K., IWAMATSU, A. & VALE, R. D. 1996. Katanin, the microtubule-severing ATPase, is concentrated at centrosomes. *J Cell Sci*, 109 (Pt 3), 561-7.
- MCNALLY, F. J. & THOMAS, S. 1998. Katanin is responsible for the M-phase microtubule-severing activity in *Xenopus* eggs. *Mol Biol Cell*, 9, 1847-61.
- MCNALLY, F. J. & VALE, R. D. 1993. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, 75, 419-29.
- MCNALLY, K., AUDHYA, A., OEGEMA, K. & MCNALLY, F. J. 2006. Katanin controls mitotic and meiotic spindle length. *J Cell Biol*, 175, 881-91.
- MCNALLY, K. P., BAZIRGAN, O. A. & MCNALLY, F. J. 2000. Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin. *J Cell Sci*, 113 (Pt 9), 1623-33.
- MENZL, I., LEBEAU, L., PANDEY, R., HASSOUNAH, N. B., LI, F. W., NAGLE, R., WEIHS, K. & MCDERMOTT, K. M. 2014. Loss of primary cilia occurs early in breast cancer development. *Cilia*, 3, 7.
- MOFFAT, J., GRUENEBERG, D. A., YANG, X., KIM, S. Y., KLOEPFER, A. M., HINKLE, G., PIQANI, B., EISENHAURE, T. M., LUO, B., GRENIER, J. K., CARPENTER, A. E., FOO, S. Y., STEWART, S. A., STOCKWELL, B. R., HACOEN, N., HAHN, W. C., LANDER, E. S., SABATINI, D. M. & ROOT, D. E. 2006. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell*, 124, 1283-98.
- MORGAN, D. O. 2006. *The cell cycle : principles of control*, London, New Science Press.
- MUKHERJEE, S., DIAZ VALENCIA, J. D., STEWMAN, S., METZ, J., MONNIER, S., RATH, U., ASENJO, A. B., CHARAFEDDINE, R. A., SOSA, H. J., ROSS, J. L., MA, A. & SHARP, D. J. 2012. Human Fidgetin is a microtubule severing the enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis. *Cell Cycle*, 11, 2359-66.
- NAGAI, T., IKEDA, M., CHIBA, S., KANNO, S. & MIZUNO, K. 2013. Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle by inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase. *J Cell Sci*, 126, 4369-80.
- NAKAMURA, T., MORI, T., TADA, S., KRAJEWSKI, W., ROZOVSKAIA, T., WASELL, R., DUBOIS, G., MAZO, A., CROCE, C. M. & CANAANI, E. 2002. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell*, 10, 1119-28.
- NAKAYA, K., OOISHI, R., FUNABA, M. & MURAKAMI, M. 2009. A JNK inhibitor SP600125 induces defective cytokinesis and enlargement in P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Biochem Funct*, 27, 468-72.
- NETZ, D. J., PIERIK, A. J., STUMPFIG, M., MUHLENHOFF, U. & LILL, R. 2007. The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat Chem Biol*, 3, 278-86.
- NIGG, E. A., CAJANEK, L. & ARQUINT, C. 2014. The centrosome duplication cycle in health and disease. *FEBS Lett*, 588, 2366-72.

- NIGG, E. A. & RAFF, J. W. 2009. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*, 139, 663-78.
- NIGG, E. A. & STEARNS, T. 2011. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol*, 13, 1154-60.
- O'DONNELL, L., RHODES, D., SMITH, S. J., MERRINER, D. J., CLARK, B. J., BORG, C., WHITTLE, B., O'CONNOR, A. E., SMITH, L. B., MCNALLY, F. J., DE KRETSEK, D. M., GOODNOW, C. C., ORMANDY, C. J., JAMSAI, D. & O'BRYAN, M. K. 2012. An essential role for katanin p80 and microtubule severing in male gamete production. *PLoS Genet*, 8, e1002698.
- OLSON, M. O. J. 2011. *The Nucleolus*, USA, Springer.
- OLSON, M. O. J. & DUNDR, M. 2015. Nucleolus: Structure and Function. *eLS*, 1-9.
- PANTERIS, E., ADAMAKIS, I. D., VOULGARI, G. & PAPADOPOULOU, G. 2011. A role for katanin in plant cell division: microtubule organization in dividing root cells of *fra2* and *lue1* *Arabidopsis thaliana* mutants. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 68, 401-13.
- PAPAMICHOS-CHRONAKIS, M. & PETERSON, C. L. 2013. Chromatin and the genome integrity network. *Nat Rev Genet*, 14, 62-75.
- PARK, S. H., ZHU, P. P., PARKER, R. L. & BLACKSTONE, C. 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest*, 120, 1097-110.
- PENG, W., LIN, Z., LI, W., LU, J., SHEN, Y. & WANG, C. 2013. Structural insights into the unusually strong ATPase activity of the AAA domain of the *Caenorhabditis elegans* fidgetin-like 1 (FIGL-1) protein. *J Biol Chem*, 288, 29305-12.
- PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W. & DEMPFFLE, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30, e36.
- PLOTNIKOVA, O. V., PUGACHEVA, E. N. & GOLEMIS, E. A. 2009. Primary cilia and the cell cycle. *Methods Cell Biol*, 94, 137-60.
- QIANG, L., YU, W., ANDREADIS, A., LUO, M. & BAAS, P. W. 2006. Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J Neurosci*, 26, 3120-9.
- QUARMBY, L. 2000. Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. *J Cell Sci*, 113 (Pt 16), 2821-7.
- RASI, M. Q., PARKER, J. D., FELDMAN, J. L., MARSHALL, W. F. & QUARMBY, L. M. 2009. Katanin knockdown supports a role for microtubule severing in release of basal bodies before mitosis in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell*, 20, 379-88.
- ROGERS, G. C., ROGERS, S. L. & SHARP, D. J. 2005. Spindle microtubules in flux. *J Cell Sci*, 118, 1105-16.
- ROLL-MECAK, A. & MCNALLY, F. J. 2010. Microtubule-severing enzymes. *Curr Opin Cell Biol*, 22, 96-103.
- ROLL-MECAK, A. & VALE, R. D. 2008. Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature*, 451, 363-7.
- SARASTE, M., SIBBALD, P. R. & WITTINGHOFER, A. 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, 15, 430-4.
- SATIR, P., PEDERSEN, L. B. & CHRISTENSEN, S. T. 2010. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci*, 123, 499-503.
- SCHRODER-HEURICH, B., WIELAND, B., LAVIN, M. F., SCHINDLER, D. & DORK, T. 2014. Protective role of RAD50 on chromatin bridges during abnormal cytokinesis. *FASEB J*, 28, 1331-41.
- SEIXAS, C., CRUTO, T., TAVARES, A., GAERTIG, J. & SOARES, H. 2010. CCTalpha and CCTdelta chaperonin subunits are essential and required for cilia assembly and maintenance in *Tetrahymena*. *PLoS One*, 5, e10704.
- SHARMA, N., BRYANT, J., WLOGA, D., DONALDSON, R., DAVIS, R. C., JERKA-DZIADOSZ, M. & GAERTIG, J. 2007. Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J Cell Biol*, 178, 1065-79.
- SHARP, D. J. & ROSS, J. L. 2012. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci*, 125, 2561-9.

- SHAV-TAL, Y., BLECHMAN, J., DARZACQ, X., MONTAGNA, C., DYE, B. T., PATTON, J. G., SINGER, R. H. & ZIPORI, D. 2005. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell*, 16, 2395-413.
- SOBOL, M., YILDIRIM, S., PHILIMONENKO, V. V., MARASEK, P., CASTANO, E. & HOZAK, P. 2013. UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus*, 4, 478-86.
- SONBUCHNER, T. M., RATH, U. & SHARP, D. J. 2010. KL1 is a novel microtubule severing enzyme that regulates mitotic spindle architecture. *Cell Cycle*, 9, 2403-11.
- SPENCER, M. L., THEODOSIOU, M. & NOONAN, D. J. 2004. NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif. *J Biol Chem*, 279, 37069-78.
- SRAYKO, M., BUSTER, D. W., BAZIRGAN, O. A., MCNALLY, F. J. & MAINS, P. E. 2000. MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes Dev*, 14, 1072-84.
- STARK, G. R. & TAYLOR, W. R. 2006. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol*, 32, 227-48.
- STEHLING, O., NETZ, D. J., NIGGEMEYER, B., ROSSER, R., EISENSTEIN, R. S., PUCCIO, H., PIERIK, A. J. & LILL, R. 2008. Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Mol Cell Biol*, 28, 5517-28.
- STEWENIUS, Y., GORUNOVA, L., JONSON, T., LARSSON, N., HOGLUND, M., MANDAHL, N., MERTENS, F., MITELMAN, F. & GISSELSSON, D. 2005. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5541-6.
- STOIMENOV, I., GOTTIPATI, P., SCHULTZ, N. & HELLEDAY, T. 2011. Transcription inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) causes DNA damage and triggers homologous recombination repair in mammalian cells. *Mutat Res*, 706, 1-6.
- SUDO, H. & BAAS, P. W. 2010. Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J Neurosci*, 30, 7215-26.
- SUDO, H. & BAAS, P. W. 2011. Strategies for diminishing katanin-based loss of microtubules in tauopathic neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 20, 763-78.
- SUDO, H. & MARU, Y. 2008. LAPSER1/LZTS2: a pluripotent tumor suppressor linked to the inhibition of katanin-mediated microtubule severing. *Hum Mol Genet*, 17, 2524-40.
- SUNG, C. H. & LEROUX, M. R. 2013. The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nat Cell Biol*, 15, 1387-97.
- SZIKORA, S., GASPAR, I. & SZABAD, J. 2013. 'Poking' microtubules bring about nuclear wriggling to position nuclei. *J Cell Sci*, 126, 254-62.
- TOYO-OKA, K., SASAKI, S., YANO, Y., MORI, D., KOBAYASHI, T., TOYOSHIMA, Y. Y., TOKUOKA, S. M., ISHII, S., SHIMIZU, T., MURAMATSU, M., HIRAIWA, N., YOSHIKI, A., WYNSHAW-BORIS, A. & HIROTSUNE, S. 2005. Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. *Hum Mol Genet*, 14, 3113-28.
- UETAKE, Y. & SLUDER, G. 2010. Prolonged prometaphase blocks daughter cell proliferation despite normal completion of mitosis. *Curr Biol*, 20, 1666-71.
- UYTTEWAAL, M., BURIAN, A., ALIM, K., LANDREIN, B., BOROWSKA-WYKRET, D., DEDIEU, A., PEAUCELLE, A., LUDYNIA, M., TRAAS, J., BOUDAUD, A., KWIATKOWSKA, D. & HAMANT, O. 2012. Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis*. *Cell*, 149, 439-51.
- VAJJHALA, P. R., NGUYEN, C. H., LANDSBERG, M. J., KISTLER, C., GAN, A. L., KING, G. F., HANKAMER, B. & MUNN, A. L. 2008. The Vps4 C-terminal helix is a critical determinant for assembly and ATPase activity and has elements conserved in other members of the meiotic clade of AAA ATPases. *FEBS J*, 275, 1427-49.
- VASILIEV, J. M. & SAMOYLOV, V. I. 2013. Regulatory functions of microtubules. *Biochemistry (Mosc)*, 78, 37-40.

- VERGES, E., COLOMINA, N., GARI, E., GALLEGU, C. & ALDEA, M. 2007. Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol Cell*, 26, 649-62.
- VITRE, B. D. & CLEVELAND, D. W. 2012. Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol*, 24, 809-15.
- WADE, R. H. 2009. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol*, 43, 177-91.
- WALKER, R. A., O'BRIEN, E. T., PRYER, N. K., SOBOEIRO, M. F., VOTER, W. A., ERICKSON, H. P. & SALMON, E. D. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol*, 107, 1437-48.
- WANG, W., WU, T. & KIRSCHNER, M. W. 2014. The master cell cycle regulator APC-Cdc20 regulates ciliary length and disassembly of the primary cilium. *Elife*, 3, e03083.
- WHITE, S. R., EVANS, K. J., LARY, J., COLE, J. L. & LAURING, B. 2007. Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing. *J Cell Biol*, 176, 995-1005.
- WILLMUND, F., DEL ALAMO, M., PECHMANN, S., CHEN, T., ALBANESE, V., DAMMER, E. B., PENG, J. & FRYDMAN, J. 2013. The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukaryotic protein homeostasis. *Cell*, 152, 196-209.
- WLOGA, D. & GAERTIG, J. 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci*, 123, 3447-55.
- WU, C. Y., ROLFE, P. A., GIFFORD, D. K. & FINK, G. R. 2010. Control of transcription by cell size. *PLoS Biol*, 8, e1000523.
- YANG, H. Y., MCNALLY, K. & MCNALLY, F. J. 2003. MEI-1/katanin is required for translocation of the meiosis I spindle to the oocyte cortex in *C. elegans*. *Dev Biol*, 260, 245-59.
- YANG, Y., MAHAFFEY, C. L., BERUBE, N., NYSTUEN, A. & FRANKEL, W. N. 2005. Functional characterization of fidgetin, an AAA-family protein mutated in fidget mice. *Exp Cell Res*, 304, 50-8.
- YE, X., LEE, Y. C., CHOUERI, M., CHU, K., HUANG, C. F., TSAI, W. W., KOBAYASHI, R., LOGOTHETIS, C. J., YU-LEE, L. Y. & LIN, S. H. 2012. Aberrant expression of katanin p60 in prostate cancer bone metastasis. *Prostate*, 72, 291-300.
- YUAN, J. & CHEN, J. 2013. FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 10640-5.
- ZHAI, Y., KRONEBUSCH, P. J., SIMON, P. M. & BORISY, G. G. 1996. Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J Cell Biol*, 135, 201-14.
- ZHANG, D., GRODE, K. D., STEWMAN, S. F., DIAZ-VALENCIA, J. D., LIEBLING, E., RATH, U., RIERA, T., CURRIE, J. D., BUSTER, D. W., ASENJO, A. B., SOSA, H. J., ROSS, J. L., MA, A., ROGERS, S. L. & SHARP, D. J. 2011. *Drosophila* katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration. *Nat Cell Biol*, 13, 361-70.
- ZHANG, D., ROGERS, G. C., BUSTER, D. W. & SHARP, D. J. 2007. Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *J Cell Biol*, 177, 231-42.
- ΑΔΑΜΟΥ, Α. 2009. Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ισομορφών μιας νέας οικογένειας πρωτεϊνών τύπου Κατανίνης και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του διπλασιασμού των κεντροσωματίων στον ποντικό. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κύπρου.
- ΚΑΜΗΛΑΡΗ, Χ. 2010. Διερεύνηση αλληλεπιδράσεων των ισομορφών της πρωτεΐνης τύπου κατανίνης p60 (*katanin like-2 p60 protein, ktnl2*), με τις πρωτεΐνες *Nubp2* και *Nubp1*. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κύπρου.
- ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΥ, Μ. 2014. Διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης *katanin-like 2 (ktnl2)* στη διαδικασία της βλεφαριδογένεσης σε κύτταρα ποντικού. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κύπρου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Cellular and Molecular Life Sciences

A novel family of Katanin-like 2 protein isoforms (KATNAL2), interacting with nucleotide binding proteins Nubp1 and Nubp2, are key regulators of different MT-based processes in mammalian cells

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	A novel family of Katanin-like 2 protein isoforms (KATNAL2), interacting with nucleotide binding proteins Nubp1 and Nubp2, are key regulators of different MT-based processes in mammalian cells
Article Type:	Research article
Corresponding Author:	Niovi Santama, Ph.D. University of Cyprus Nicosia, CYPRUS
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Cyprus
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Antonis Ververis, M.Sc.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Antonis Ververis, M.Sc. Andri Christodoulou, Ph.D. Maria Christoforou, M.Sc. Christina Kamilari, M.Sc. Carsten W. Lederer, Ph.D. Niovi Santama, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Research Promotion Foundation of Cyprus and Structural Funds from the EU (PENEK/ENISXYSI/0308-06) Dr Niovi Santama
Abstract:	<p>Katanins are microtubule (MT)-severing AAA proteins with high phylogenetic conservation throughout the eukaryotes. They have been functionally implicated in processes requiring MT remodeling, such as spindle assembly in mitosis and meiosis, assembly/disassembly of flagella and cilia and neuronal morphogenesis. Here we uncover a novel family of katanin-like 2 proteins (KATNAL2) in mouse, consisting of five alternatively spliced isoforms encoded by the <i>Katnal2</i> genomic locus. We further demonstrate that in vivo these isoforms are able to interact with themselves, with each other and moreover directly and independently with MRP/MinD-type P-loop NTPases Nubp1 and Nubp2, which are integral components of centrioles, negative regulators of ciliogenesis and implicated in centriole duplication in mammalian cells. We find KATNAL2 localized on interphase MTs, centrioles, mitotic spindle, midbody and the axoneme and basal body of sensory cilia in cultured murine cells. shRNAi of <i>Katnal2</i>s results in severe phenotypes of enlarged cells and nuclei, significant amplification of centrioles throughout the cell cycle and the manifestation of aberrant multipolar mitotic spindles, mitotic defects, chromosome bridges, inefficient cytokinesis, multinuclearity, increased MT acetylation and an altered cell cycle pattern. Both, silencing and stable overexpression of KATNAL2 isoforms drastically reduces ciliogenesis.</p> <p>In conclusion, KATNAL2s are multitasking enzymes involved in the same cell type in critically important processes affecting centriole arithmetics, MT dynamics, cytokinesis, cellular and nuclear size and ciliogenesis and are also implicated in cell cycle progression.</p>

<p>Suggested Reviewers:</p>	<p>Jacek Gaertig, Ph.D. Professor, University of Georgia, Athens, GA 30602-2607, USA jgaertig@uga.edu Professor Gaertig is a leading expert in the field of katanins, MTs, tubulin modifications and has prominent publications that are extremely relevant to the submitted manuscripts</p> <p>Lynne Quarmby, Ph.D. Professor, Simon Fraser University, Vancouver, Canada quarmby@sfu.ca Professor Quarmby is a leader in the study of flagella/cilia in Chlamydomonas and of MT dynamics and thus very relevant to the submitted work</p> <p>Alexander Dammermann, Ph.D. Group Leader, Max F Perutz Laboratories, Vienna Biocenter, University of Vienna, Austria alex.dammermann@univie.ac.at Dr Dammermann is a recognised expert in centriole assembly and dynamics and thus very relevant to the research area of the manuscript</p> <p>Brian Mitchell, Ph.D. Assistant Professor, Northwestern University Feinberg School of Medicine, IL, USA brian-mitchell@northwestern.edu Dr Mitchell is a recognised leader in cilia and centriole research, exploring multiciliogenesis and planar polarity in Xenopus: his research area is relevant to several aspects of the manuscript.</p>
<p>Opposed Reviewers:</p>	

1
2
3
4
5
6
7 **A novel family of Katanin-like 2 protein isoforms (KATNAL2), interacting with**
8 **nucleotide binding proteins Nubp1 and Nubp2, are key regulators of different**
9 **MT-based processes in mammalian cells**
10
11
12
13
14
15

16 Antonis Ververis^{1‡}, Andri Christodoulou^{1‡}, Maria Christoforou¹, Christina Kamilari¹, Carsten
17 W. Lederer² and Niovi Santama^{1*}
18
19
20
21
22

23 ¹Department of Biological Sciences, University of Cyprus, Cyprus
24

25 ²The Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Cyprus
26
27
28
29
30

31 [‡]These authors contributed equally to the experimental work
32
33
34

35 *Address correspondence to Niovi Santama
36

37 Department of Biological Sciences, University of Cyprus, University Avenue 1,
38 1678 Nicosia, Cyprus
39

40 (Tel. +357-22-892881, Fax. +357-22-350557, e-mail: santama@ucy.ac.cy)
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Keywords: microtubule-severing enzymes, katanin, cilia, cytoskeleton, cytokinesis
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

1
2
3 Katanins are microtubule (MT)-severing AAA proteins with high phylogenetic conservation
4 throughout the eukaryotes. They have been functionally implicated in processes requiring MT
5 remodeling, such as spindle assembly in mitosis and meiosis, assembly/disassembly of
6 flagella and cilia and neuronal morphogenesis. Here we uncover a novel family of katanin-
7 like 2 proteins (KATNAL2) in mouse, consisting of five alternatively spliced isoforms
8 encoded by the *Katnal2* genomic locus. We further demonstrate that *in vivo* these isoforms
9 are able to interact with themselves, with each other and moreover directly and independently
10 with MRP/MinD-type P-loop NTPases Nubp1 and Nubp2, which are integral components of
11 centrioles, negative regulators of ciliogenesis and implicated in centriole duplication in
12 mammalian cells. We find KATNAL2 localized on interphase MTs, centrioles, mitotic
13 spindle, midbody and the axoneme and basal body of sensory cilia in cultured murine cells.
14 shRNAi of *Katnal2* results in severe phenotypes of enlarged cells and nuclei, significant
15 amplification of centrioles throughout the cell cycle and the manifestation of aberrant
16 multipolar mitotic spindles, mitotic defects, chromosome bridges, inefficient cytokinesis,
17 multinuclearity, increased MT acetylation and an altered cell cycle pattern. Both, silencing
18 and stable overexpression of KATNAL2 isoforms drastically reduces ciliogenesis.
19 In conclusion, KATNAL2s are multitasking enzymes involved in the same cell type in
20 critically important processes affecting centriole arithmetics, MT dynamics, cytokinesis,
21 cellular and nuclear size and ciliogenesis and are also implicated in cell cycle progression.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

INTRODUCTION

1
2
3 The temporal or localized dynamic re-organization of microtubule (MT) high order arrays is
4 of critical importance to a multitude of fundamental developmental and cellular processes
5 through its role in cell motility and migration, intracellular transport, mitotic and meiotic
6 division, targeted flow of extracellular fluid and sensory input by cilia. MT-end dynamics,
7 with rapid growth by α/β tubulin heterodimer subunit addition or shrinkage by subunit loss,
8 can determine polymer length, which can be further modulated by MT-interacting proteins
9 that stabilize or destabilize MTs, such as microtubule-associated proteins (MAPs), MT plus-
10 end-tracking proteins (+TIPS) and bundling/depolymerising motors [1-6]. In parallel, a lot has
11 been learned about additional mechanisms underlying MT plasticity. Following the initial
12 discovery of katanin [7], the uncovering of a still expanding superfamily of proteins with MT-
13 severing activity that can introduce breaks into the polymer lattice and generate shorter MT
14 fragments, has provided some understanding on how existing MT architecture can be
15 modified and re-modeled locally or how structures can be organized *de novo* using such
16 released MT fragments, sometimes transported to other intracellular domains, as seeds [8-11].
17 Currently, the three main classes of MT-severing proteins, katanins, spastins and fidgetins, all
18 belong to a subgroup of the protein superfamily of “ATPases associated with diverse cellular
19 activities” (AAA), bearing the highly conserved ~230aa signature AAA domain that harbors
20 the ATPase activity. Their functional form is believed to consist of ~15 nm hexameric rings,
21 which are formed in an ATP-stimulated and template-dependent manner on the MT lattice,
22 and able to bind on the C-terminal tail of tubulins possibly with some preference for β -tubulin
23 [12-15]. ATP hydrolysis is thought to induce translocation of the tubulin polypeptide through
24 the hexamer ring pore and its local unfolding, which enables weakening and breaking of
25 interdimer bonds and causes severing of filaments [16].

26
27 Katanin was purified as a heterodimer of the p60 AAA-bearing catalytic subunit and the p80
28 centrosome-targeting and regulatory subunit [17, 18]; both subunits are very highly conserved
29 in animals, plants, and even unicellular eukaryotes, such as green algae and protozoa [9, 10;
30 Table 2 in 11]. In some invertebrates and vertebrates, additional katanin p60-like proteins
31 (KATNAL 1 or 2) have been reported [19, 20] in others, including unicellular organisms, they
32 can be predicted from their genome sequence. Katanin p60 appears to be a multitasking
33 enzyme implicated in an impressive number of MT-based processes (meiosis and mitosis,
34 ciliogenesis and neurogenesis), as either a positive or a negative regulator of MT polymer
35 mass. In oocyte meiosis of *C. elegans*, katanin contributes to an amplification of spindle MT
36 number and density by providing severed short MTs for nucleation of new MTs [21, 22]
37 while also exhibiting MT bundling activity independent from its severing activity [23].
38 Conversely, in *Drosophila* mitotic spindles, katanin promotes severing, release and uncapping
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 from end-binding (EB) proteins of chromosome-attached MT (+) ends to enable kinesin 13-
2 induced MT (+) end depolymerization and thus allow pacman flux and poleward chromatid
3 mobility and segregation in anaphase A [24]. Additionally, severing by katanin at the MT (-)
4 ends at the centrosome promotes the redistribution of γ -tubulin rings to enhance new MT
5 nucleation [25]; Katanin-like protein 1 (KATNAL1) also seems to boost the formation of
6 spindle MTs and increase spindle MT density in human cells by altering γ -tubulin ring
7 kinetics [20] and is also involved in spermatogenesis [26]. The role of katanin in cytokinesis
8 has been highlighted in protozoa such as *Tetrahymena*, where katanin-null cells can
9 successfully complete nuclear division but not cytokinesis, resulting in chains of non-
10 separated cells [14], while in *Trypanosoma* and *Leishmania* both p60 and p80 are essential for
11 distinct steps of cytokinesis [27, 28]. In vertebrate cells, where the mechanism of cytokinesis
12 is different, katanin p60 is present on the midbody constriction, where it is proposed to
13 influence its resolution [29], possibly involving katanin interactions with tumor suppressor
14 protein LAPSER1 [30]; however its role and molecular mechanism in vertebrate cytokinesis
15 remain sketchy.

16 Katanins have a highly conserved function in ciliary dynamics as shown in unicellular
17 eukaryotes, where their loss of function results in the formation of immotile cilia due to loss
18 of the central pair of axonemal MTs in *Chlamydomonas* and *Tetrahymena* [31, 14], possibly
19 through lack of a pool of short MT precursors earmarked for axoneme assembly. In
20 *Tetrahymena*, katanin's severing selectivity for ciliary MTs may be based on specific tubulin
21 posttranslational modifications [14]. In *Chlamydomonas*, katanin is also responsible for
22 deciliation [32], facilitated by the release of basal bodies from the ciliary axoneme through
23 selective severing of MTs at the transition zone, in preparation for mitosis [33]. Ciliary-based
24 Hedgehog signaling seems to be compromised in fibroblasts derived from p80 katanin-null
25 mouse embryos and in neocortical development of these animals, displaying severe
26 microlissencephaly [34, 35].

27 The need for fine-tuned regulation of katanin activity/concentration remains a particularly
28 important aspect for its cellular multitasking functions and it is exerted via its intricate
29 network of protein interactions, its reversible phosphorylation and by discrete degradation
30 routes [36, 37, comprehensively summarized in Fig. 3 and 4 of 11].

31 Intriguing outstanding questions remain in our current understanding of the functional roles of
32 katanins and related proteins in MT dynamics in diverse cellular processes. What is the
33 distinct role of so many MT-severing activities, even within the same family, given that both
34 higher and unicellular eukaryotes have several katanins and katanin-like proteins in addition
35 to multiple spastins and fidgetins? What is the balance between "division of labour" [38] and
36 functional redundancy amongst the multitude of MT-severing enzymes? Additionally, do the
37 different katanin-like proteins also acquire an oligomeric form to be functional (akin to p60
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 katanin) and what is the nature of such oligomers (homo- or hetero- oligomers)? Is there a
2 possibility for combinatorial (mix-and-match) utilization and, given the impressive
3 multitasking of katanins, does the process of oligomerization also assign spatiotemporal
4 specificity to the enzyme, i.e. to bind and affect different subsets of cellular MT as substrates
5 or MTs at different cell-cycle or developmental stages? Or is specificity determined by
6 differential gene expression of such katanins in different cell types and/or times? Finally,
7 given the intimately reciprocal relationship of the dynamics of MTs, cilia and centrioles with
8 cell cycle progression, should katanins and katanin-like proteins, affecting all three structures,
9 be investigated in the renewed light of potential cell cycle drivers or contributors?
10

11 In this work, we uncover a novel family of KATNAL2 proteins in mouse cells and present
12 their first functional characterization. We find these new members of the katanin family to be
13 involved in many aspects of MT-based processes taking place in the same cell type, affecting
14 spindle formation, cytokinesis, centriole arithmetics, ciliogenesis and influencing the cell
15 cycle. For some of these processes, such as ciliogenesis and regulation of centriole
16 arithmetics, this is the first time that a katanin-like protein has been implicated in mammalian
17 cells. We show that these novel katanin-like isoforms can interact with themselves and with
18 the other isoforms and, importantly, with nucleotide binding proteins AAA ATPases Nubp1
19 and Nubp2, which we previously showed to be negative regulators of ciliogenesis in
20 vertebrates and invertebrates [39] and also important for centriole duplication [40]. These new
21 findings provide significant insights to in the emerging definition of the molecular
22 mechanisms and protein interactions underlying katanin-like cellular function.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

MATERIALS AND METHODS

Mouse cell culture

Mouse NIH 3T3 and NSC34 cells were cultured in DMEM containing 10% v/v fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine and 50 U/mL of penicillin/streptomycin. IMCD3 (IMCD) cells were cultured in DMEM/F-12 (1:1) medium with 10% v/v FCS, 2 mM glutamine and 50 U/mL of penicillin/streptomycin. TM4 cells were grown as for IMCD but FCS was replaced by 5% v/v horse serum and 2.5% FCS. Neuro2A cells were kept as NIH 3T3 but with MEM α instead of DMEM. All lines were maintained at 37 °C in 5% CO₂. For induction of ciliogenesis, cells were grown in serum-free media for 24 h and sampled for immunofluorescence (IF) or Western blotting (WB).

RNA extraction, RT-PCR for the identification and cloning of *Katnal2* isoforms and quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR) to analyse *Katnal2* gene expression

Polyadenylated RNA was affinity-purified from mouse cell lines or tissues, using the RNeasy mRNA purification kit (Qiagen). cDNA was synthesized with the iScript cDNA synthesis kit (Biorad). For the identification of *Katnal2* transcripts, PCR amplification with oligonucleotides flanking the full-length open reading frame (ORF) of *Katnal2* (XM_006526437) was employed (Table S1), using the Expand High Fidelity PCR system (Roche). PCR products (Fig. 1A) were cloned by T/A cloning into vector pGEM-T Easy (Promega) or pCRII-TOPO (Invitrogen) and identified by DNA sequencing (MWG GmbH). For in-frame subcloning of ORFs into different plasmid vectors, a range of oligonucleotides, bearing appropriate restriction sites, were designed (see *Plasmid Constructs* and Table S1). For relative quantification of mRNA in silencing experiments, RT-qPCR was conducted on the LightCycler (Roche) as described in [41] and primers specific for either *Katnal2-L* (amplifying a diagnostic fragment specific for *Katnal2* isoforms L1-L3) or *Katnal2-ALL* (co-amplifying a diagnostic product derived from all five *Katnal2* isoforms). Melting curve analysis was performed at the end of each experiment to determine the specificity of the amplification. All experiments included two no-template controls, and samples were analyzed independently three times. Crossing Point determination and quantification was achieved using the Second Derivative Maximum Method of the of Viia™ 7 Software (ABI). For data normalization, expression of the reference genes for mouse ribosomal protein L19 (*Rpl19*) and pumilio homolog 1 transcript variant 2 (*Pum1*) was used. Oligonucleotide primer sequences for PCR are given in Table S1. For statistical analysis of RT-qPCR data, the REST-384[©] software was used, based on a PairWise Fixed Reallocation Randomization Test[©], to compare the relative quantification between two groups and determine the significance of results [42].

Expression plasmid constructs, yeast two-hybrid screen

For antibody generation, KATNAL2-S1 was expressed in *E. coli* [BL21-(DE3)-pLysS] as a His-tagged fusion protein from vector pRSET_B and affinity-purified over Ni²⁺-NTA beads (Qiagen) under denaturing conditions. For *in vitro* co-selection assays to study KATNAL2 interactions (Fig. 2), GST-fusions of KATNAL2-S1 and -L1 were generated from pGEX-4T-1 constructs and used together with His-tagged fusions of Nubp1 and Nubp2 in pRSET_B. Mammalian expression (transient or stable) of KATNAL2 isoforms, tagged with different epitopes was driven from plasmids pEGFP-C2 (Clontech), pmCherry-C3 (Ellenberg group, EMBL), pFLAG-CVM-1 (Sigma) and pSVmyc1.0 [43]. Construction of plasmids and oligonucleotides used for cloning are summarized in Table S1. Standard molecular biology techniques were as per [44]. A yeast two-hybrid screen was conducted for this project by Hybrigenics (France), using full-length mouse Nubp1 cDNA as bait (hgx1836v1) against a mouse embryo brain RP1 cDNA prey library in pB27 (LexA, C-terminal fusion) and analyzing 58.04 million interactions. A partial *Katnal2* cDNA (aligning with mouse *Katnal2* XM_006526437) was amongst 43 putative interactors identified in this screen (see *Results*).

SDS-PAGE and WB

SDS-PAGE was performed on a Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad), and WB on a Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), using 48 mM Tris pH 9.2, 39 mM glycine and 20% v/v methanol as transfer buffer. Visualization of immunoreactive bands was performed with the ECL System (GE Healthcare) using ChemiDoc™ MP (Biorad). For quantification of protein levels, intensity volumes (area x height) of WB signals were extracted with *ImageJ 1.49n* (NIH, USA) and normalized using same-sample and same-membrane band intensities for the housekeeping protein calnexin. Significance of knockdown for KATNAL2 (three independent experiments) was assessed for log-transformed normalized values by one-tailed paired t-test and deregulation of Nubp1, Nubp2 and actin normalized protein quantities was assessed by two-tailed paired t-test (Excel 2010, Microsoft).

Antibodies

An antibody against recombinant mouse KATNAL2-S1 (accession number LN831865), expressed as a 6xHis-fusion in *E. coli* and affinity-purified (see *Plasmid constructs*), was custom-made in goat by Sicgen (Portugal). The goat antiserum was affinity-purified on a WB membrane: 2mg of Ni²⁺-NTA-affinity-purified 6xHis-tagged KATNAL2-S1 were run on a preparative SDS-PAGE gel, transferred onto nitrocellulose and stained with 0.1% w/v Ponceau in 5% v/v acetic acid to identify the position of the recombinant protein, which was outlined with a soft pencil. The membrane was incubated with 2 ml anti-KATNAL2 crude serum (1:5 dilution in PBS) at 4 °C overnight and the marked strip excised with a sterile

1 scalpel and washed extensively with PBS. The antibody bound on the strip was eluted with
2 2x1ml of 100mM glycine containing 50% v/v glycerol at pH 2.2; fraction 2 of the purified
3 antibody was used in 1:100 dilution for IF and 1:250 for WB. Affinity-purified rabbit
4 antibodies to Nubp1 and Nubp2 [39] were used at 1:300 dilution for WB. Additional primary
5 and secondary antibodies are listed in Table S2. Nuclei were counterstained with Hoechst
6 33342 (0.5 µg/ml).
7
8
9

10 11 **Immunoprecipitation (IP) and LC-MS/MS analysis**

12 For IP, 8 µg of affinity-purified goat anti-KATNAL2 antibody (fraction 2) or 8 µg goat IgG
13 (negative control) were each covalently bound onto 40 µl Protein-G Sepharose CL-4B beads
14 (GE Healthcare) by DNP crosslinking. Eight adult-mouse testicles were homogenized in 50
15 ml of 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5% v/v Triton x-100, 1x
16 *Complete* protease inhibitor cocktail (Roche) and divided in two equal aliquots of 25 ml (2.2
17 mg/ml total protein). Each extract aliquot was incubated overnight at 4 °C with one set of
18 beads (KATNAL2 or goat IgG), washed 3 times with lysis buffer and eluted with 2x20 µl of
19 100 mM glycine, pH 2.0. The eluate was boiled with 10 µl of 5x SDS-PAGE sample buffer.
20 Thirty percent from each eluted IP sample were analyzed by WB to identify KATNAL2-
21 immunoreactive bands and 70% were run on an SDS-PAGE gel, stained with 80% v/v 1x
22 working solution of Brilliant Blue G-Colloidal (Sigma B2025) in 20% v/v methanol. Three
23 bands, unique to the KATNAL2-IP samples and immunoreactive by WB, were cut out (Fig.
24 1D). For the larger-scale experiment in Fig. S3, the same protocol was used but 16 testicles
25 were lysed in 100 ml homogenization buffer and used in conjunction with 28 µg KATNAL2
26 antiserum and 150 µl bead slurry. Bands or zones excised from gels were trypsin-digested in-
27 gel and eluted, and tryptic peptides were separated and analyzed by LC-MS/MS (Orbitrap
28 Velos, Thermo Scientific) at the EMBL Proteomics Core Facility. Full scan MS spectra (mass
29 range 300-1700 *m/z*) were acquired in profile mode in the FT with resolution of 30,000. Data
30 were filtered by Software MaxQuant (version 1.0.13.13) and searched in species-specific
31 mode (mouse) against the Swiss-Prot database.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 ***In vivo and in vitro* co-selection assays to study KATNAL2 interactions**

49 For *in vivo* co-selection experiments, FLAG-tagged-KATNAL2-S1 or -L1 (Table S1) were
50 expressed by transient transfection into the IMCD-pmCherry-KATNAL2-S1 stable cell line,
51 (see later section). Two 10 cm dishes of the transiently transfected stable cell line were
52 extracted in a total of 0.5 ml lysis buffer (150mM KCl, 20mM Tris, pH 7.5 and 0.5% v/v
53 Triton-X 100), containing 2x of *Complete* protease inhibitor cocktail. The extract was mixed
54 with 10 µl anti-FLAG beads (Anti-Flag M2 Affinity Gel; Sigma) and incubated for 3 h at 4
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 °C. Negative controls included parallel reactions without FLAG-tagged bait proteins. Beads
2 with bound complexes were collected at 2000 rpm for 5 min, washed three times with 10x
3 bed volumes of lysis buffer, re-suspended in 20 µl SDS sample buffer and boiled. From each
4 sample, 20% was subjected to WB with anti-FLAG antibody and the remainder to a parallel
5 WB which was cut into two segments for the detection of bound, interacting proteins with
6 antibodies to mCherry and KATNAL2 (segment above 45kDa) and to Nubp1 and Nubp2
7 (segment below 45kDa).
8
9

10 *In vitro* co-selection experiments were conducted to confirm and characterize pairwise
11 interactions between KATNAL2-S1/L1 with Nubp1/2. The four proteins were expressed in *E.*
12 *coli* strain BL21(DE3)pLysS; KATNAL2-S1 and -L1 were produced as soluble GST fusions
13 (Table S1), after a 5h-induction with 0.5 mM IPTG (-S1) or a 3h-induction with 0.05mM
14 IPTG (-L1), or a 5h-induction with 0.5mM IPTG (GST-only, negative control), all at 20 °C.
15 Nubp1 and Nubp2 were expressed as soluble His-tagged fusions from pRSET_A [39], under
16 the same conditions as for KATNAL2-S1. Bacterial pellets (1.5ml of liquid culture) were
17 sonicated in 200 µl lysis buffer (150mM NaCl, 20mM Tris, pH 7.4, 1% v/v Tween 20, 1mM
18 β-mercaptoethanol and 1x *Complete* protease inhibitor), centrifuged at 13,000 rpm for 15 min
19 at 4 °C and the soluble fraction, containing the recombinant protein retrieved (1/20 in each
20 case was used as “Input” in Fig. 2). KATNAL2 and Nubp1 or 2 protein interactions were
21 tested in pairwise combinations by mixing the selected protein extracts, incubating for 30 min
22 at room temperature and combining for another 30 min at room temperature with 25 µl
23 glutathione sepharose 4B bead slurry (GE Healthcare), pre-equilibrated with lysis buffer. In
24 some experiments, GST-tagged proteins were first bound on glutathione beads, washed and
25 then mixed with His-tagged Nubp protein extracts. In all cases, beads were subsequently spun
26 at 2000 rpm for 5 min at 4 °C, the supernatant collected (“unbound” fraction), beads washed
27 three times in 100 µl lysis buffer and bound proteins retrieved by boiling in SDS-PAGE
28 sample buffer for 5 min at 96 °C. The eluate (“bound fraction”) was split in two and together
29 with the other fractions subjected to WB, using anti-GST and anti-His antibodies to probe for
30 KATNAL2 and Nubp proteins respectively. Negative controls consisted of identical parallel
31 experiments but with the use of GST-only protein in conjunction with His-Nubp1 or -Nubp2.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **Immunofluorescence (IF) and live imaging.**

51 IF was performed as described in [39]. Samples were analyzed with a Zeiss Apochromat 63x
52 NA 1.4 oil lens on a Zeiss *Axiovert 200M* inverted fluorescence microscope, equipped with an
53 *AxioCam MRm* camera. For live imaging, cells were seeded in a 6-well plate and after 24 h
54 were transferred onto the stage of a temperature- and CO₂-regulated Zeiss *AxioObserver.Z1*
55 automated microscope, equipped with a Plan-Neofluar 5x NA 0.16 air objective lens. Phase
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 contrast images were acquired every 7 min for 24 h using the Zeiss *AxioVision* program (v.
2 4.8.2) and an *AxioCam MRm* camera.
3
4

5 **shRNA-mediated silencing and analysis**

6 Two pLKO.1-based lentiviral shRNA vectors [The RNAi Consortium (TRC);
7 www.broadinstitute.org/rnai/public/], expressing a puromycin resistance gene and targeting
8 different areas of the mouse *Katnal2* ORF (TRCN0000090749 and TRCN0000090751) were
9 obtained from the Erasmus Medical Center (University Medical Center Rotterdam, The
10 Netherlands). Lentiviral shRNA production, lentivirus particle packaging, harvesting and
11 transductions of NIH 3T3 mouse fibroblasts were carried out with standard procedures [45].
12 Stably transfected, puromycin resistant, single clones were hand-picked under the microscope
13 after several days of puromycin selection (4 µg/ml), expanded and subjected to initial
14 screening by WB, using anti-KATNAL2 antibody, to identify those clones with reduced
15 KATNAL2 protein expression. Clone 2.43 (shRNA targeting ORF area 1, yellow in Fig. S1)
16 was identified out of 52 clones and clone 3.81 (shRNA targeting ORF area 2, light blue in
17 Fig. S1) out of 94 clones in this initial screen, and *Katnal2* silencing was quantified by RT-
18 qPCR and quantitative WB (3 independent experiments in each case). To confirm their
19 genotypes, PCR of genomic DNA from clones 2.43 and 3.81 was employed using appropriate
20 insert-flanking oligonucleotides (Table S1) to amplify the shRNA-bearing cassette and the
21 product was sequenced (MWG GmbH).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 To assess phenotypic effects of silencing, we carried out IF analysis in cycling cells or cells
34 subjected to a 24-h serum withdrawal. Cycling cells were scored for the morphology of the
35 mitotic spindle as visualized with α -tubulin staining, the number of centrioles, as determined
36 by γ -tubulin staining, the count of nuclei per cell and the presence of chromatin bridges or
37 chromosomal misalignment as labeled with Hoechst 33342. For each parameter, the average
38 \pm s.d. of three independent experiments each of NIH 3T3 control cells and cells of *Katnal2*-
39 silenced clones 2.43 or 3.81 was determined. Total sample sizes of the datasets (from 3
40 experiments) were: *dataset 1* with a total of n=2978 clone 2.43 silenced cells vs. a total of
41 n=3128 NIH 3T3 control cells and *dataset 2* with n=2997 clone 3.81 silenced cells vs. n=3007
42 control cells. For each parameter, equality of variance within the dataset was confirmed with
43 the F-test and statistical significance of differences across samples evaluated by
44 homoscedastic two-tailed Student's t-tests (Microsoft Excel 2010). Statistical significance to
45 compare differences in the overall distribution of cells in distinct subphases of mitosis or in
46 the overall distribution of numbers of centrioles per cell across the population in control and
47 silenced cells was determined by stacked two-way ANOVA and post hoc test with Sidak
48 correction for multiple comparisons.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Serum-starved cells were assessed for the presence of a cilium, as visualized by double γ -tubulin (basal body) and acetylated tubulin (axoneme) labeling. The average percentage of ciliated cells was calculated in three independent experiments (*dataset 3* with a total n=2063 clone 2.43 cells vs. n=2076 NIH 3T3 control and *dataset 4* with n=3013 clone 3.81 cells vs. n=3020 control cells). For each pairwise comparison between silenced and control cells, F-tests indicated equality of variance, and thus statistical significance of observed differences was evaluated by homoschedastic, two-tailed Student's t-test.

To compare total cell size and nuclear size in clone 2.43 vs. control NIH 3T3 cells, cell or nuclear surface areas were measured with the AxioVision software (v. 4.8.2.SP2) on fluorescence images acquired after double α -tubulin and Hoechst labeling and photographed with a Zeiss Plan Apochromat 20x NA 0.75 lens on *Axiovert 200M* (n=127 cells in clone 2.43 and n=129 cells in control). The difference in size distributions of total cell size or nuclear size between the two populations was evaluated for statistical significance by a two-tailed Mann Whitney test.

Generation of IMCD^{mCherry-KATNAL2} stable cell lines

5 μ g of plasmids pmCherry-KATNAL2-L1 or pmCherry-KATNAL2-S1 (Table S1) were each transfected into a 10 cm dish of IMCD cells, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 18 h, medium containing 400 μ g/ml G418 was added to select for cells that had stably incorporated the plasmid into their genome. Several days later, resistant individual colonies were picked and expanded for biochemical and microscopic analyses. Phenotypic analysis of cycling or serum-deprived cells was carried out in the same manner as described for shRNA-silenced cells. For cycling conditions, populations of IMCD-KATNAL2-S1 (n=2608 cells), and IMCD-KATNAL2-L1 (n=1972) were compared with corresponding control IMCD wild type cells (n=5868) (*dataset 5*). Statistical analysis of differences was determined by one-way ANOVA with Dunnett's post-test for multiple comparisons (GraphPad *Prism 6*). The proportion of ciliated cells was compared within populations of IMCD-KATNAL2-S1 (n=8826 cells), IMCD-KATNAL2-L1 (n=6664) and control IMCD wild-type cells (n=6708) (*dataset 6*). Statistical evaluation of differences was performed by one-way ANOVA with Dunnett's post-test for multiple comparisons.

Cell cycle analysis

The determination of the mitotic index (percentage of mitotic cells in population) and assignment to mitotic subphases was performed in three independent experiments by microscopic analysis of *Katnal2*-silenced stable cell lines 2.43 and 3.81 and their parental line NIH 3T3 (control) (datasets 1 and 3 as per "shRNA silencing" section), or of stable lines mCherry-KATNAL2-S1, mCherry-KATNAL2-L1 and their IMCD parental line (dataset 5),

1 all immunofluorescently labeled for α - and γ -tubulin and counterstained with Hoechst 33342.

2 Statistical evaluation of pairwise differences between silenced and control cells was
3 performed by homoscedastic two-tailed Student's t-tests. For the Cherry lines and their
4 parental IMCD cells, statistical significance was assigned by one-way ANOVA with
5 Dunnett's post-test for multiple comparisons (GraphPad *Prism 6*).
6

7 To generate growth curves (Fig. 4C), multiple cultures of control and clone 2.43 cells were
8 seeded each with 6860 cells in six-well plates, and triplicate measurements of cell counts
9 were recorded with a hemocytometer every 24 h for a total of 96 h. Growth curves for 2.43
10 and NIH 3T3 control cells were compared by stacked two-way ANOVA for analysis of
11 parameter means with Sidak post-test for multiple comparisons with explicit reporting of p
12 values down to 0.0001.
13

14 For flow cytometry, cell lines were harvested from 10-cm culture dishes at 70% confluence,
15 washed in PBS, fixed with 70% v/v ethanol, washed, treated with RNase A and stained with 1
16 mg/ml propidium iodide. Cell cycle data were acquired in independent triplicate repeats for
17 clone 2.43 and NIH 3T3 control cells using a MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer
18 (Miltenyi) and the default filter setting for propidium iodide. Output was analyzed using
19 ModFit LT 4.0 (Verity Software House) diploid modeling with automatic linearity detection
20 without range restrictions except for restriction of debris recognition below the maximum
21 value of the putative G1 peak. All RCS values, indicative of goodness of fit, were below 3.3.
22 The modeled G1, S, G2, Aggregate and Debris values were analyzed by stacked two-way
23 ANOVA, as described for analyses of growth curves.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESULTS

Identification of a novel family of katanin-like 2 (KATNAL2) isoforms in mouse

We have recently shown that nucleotide binding proteins Nubp1 and Nubp2, conserved proteins localized at the basal body of the primary cilium in mouse cells or *C. elegans* sensory cilia and in the axoneme of motile cilia in mouse and the flagella of *Chlamydomonas*, are critically involved in ciliogenesis [39]. In mouse cells, when either of the Nubps is downregulated by siRNA-mediated silencing, there is a marked increase in the frequency of cilia formation, demonstrating a role of these proteins as regulators of ciliogenesis. A starting point of the current investigation was a yeast two-hybrid screen aiming at identifying novel protein interactions for Nubp1. Fifty-eight million interactions were screened between a mouse embryonic brain cDNA library and mouse Nubp1 cDNA as bait: several candidate clones were identified, amongst them a partial cDNA clone of 374 bp. Upon BLAST query of the EMBL database, it was shown to align with sequences within a predicted murine katanin-like protein 2 cDNA (*Katnal2*; accession no. XM_006526437) and encoding 112 amino acids of its predicted open reading frame (ORF; aa 73-184; Fig. S1). This candidate was particularly interesting, given the important role of katanin and other MT-severing proteins in many MT-based processes, including ciliary dynamics (see *Introduction*), and we thus decided to characterize it further.

When we performed RT-PCR using oligonucleotide primers that hybridized to the extremities of the predicted ORF of mouse *Katnal2* XM_006526437, we noticed that, in addition to the expected full-length *Katnal2* cDNA product (1.6 kbp), we consistently obtained several, closely migrating products with cDNA from the NIH 3T3 mouse cell line (Fig. 1A) and also from the IMCD, NSC34 and TM4 mouse cell lines and mouse testis (data not shown). Upon cloning and sequencing of these discrete bands from NIH 3T3 cells, we identified 5 distinct cDNAs containing ORFs that range in size between 1.62-1.12 kbp and correspond to alternatively spliced products of the *Katnal2* genomic locus (Fig. 1B, E). The *Katnal2* gene (localized on the complement strand of mouse chromosome 18:76,977,147-77,048,225, Build GRCm38.p3) is composed of 16 exons and the 5 cDNAs reflect alternative exon usage, as shown in Fig. 1E. We named these 5 members of the novel KATNAL2 protein family as *Katnal2-L1* (identical to database entry XM_006526437), *Katnal2-L2*, *Katnal2-L3*, *Katnal2-S1* and *Katnal2-S2* (in descending order of size; their accession numbers are given in the legend of Fig. 1E). We detected *Katnal2* gene expression in several mouse tissues by RT-PCR, using oligonucleotide primers that would amplify a short diagnostic fragment common to all five *Katnal2* transcripts, with notable high-level expression in the testis (Fig. 1C).

All five *Katnal2* alternative transcripts encode katanin p60-like proteins bearing the typical diagnostic protein sequence elements of katanin (i.e. the AAA, MT-binding and Walker motif

signature sequences), ranging in expected molecular masses between 41.8-61.1 kDa, with sequence variations close to their N-terminus, and with three of them harboring a characteristic LiSH motif, stipulated to be important in self-association, MT-binding or protein-protein interactions with ATPases and β -propeller-containing proteins [46] (Fig. 1E and Fig. S1). We generated a polyclonal antibody raised and purified against recombinant His-tagged KATNAL2-S1, which was expected to recognize the endogenous S1 isoform as well as all other KATNAL2 isoforms, given their extensive sequence similarity. This antibody recognized the recombinant protein against which it was raised as well as KATNAL2-S1 and KATNAL2-L1 fused with different tags (mCherry-, GFP-, Myc- and FLAG-) in transfected NIH 3T3 or IMCD mouse cell lines (Fig. 2, 7 and data not shown). Western blot (WB) analysis revealed several KATNAL2-immunoreactive bands in various mouse cell lines and in mouse testis in the range of ca. 45-80 kDa (Fig. 1D lane 1 and Fig. S2), being compatible with the expected sizes of KATNAL2 isoforms, as predicted by cDNA cloning. We employed immunoprecipitation (IP) in conjunction with liquid chromatography, coupled with tandem mass spectrometry, to identify these signals using mouse testis. We excised 3 bands (migrating close to the 50-, 60- and 80-kDa markers; red arrows in Fig. 1D, lane 3') that were uniquely visible in the bound fraction of the KATNAL2-IP sample and absent from the equivalent negative control in a colloidal blue-stained gel and, at the same time, corresponded to the main immunoreactive signals on the WB that was carried out concurrently with a smaller quantity (20%) of the same samples (red arrows Fig. 1D, lane 3). MS analysis confirmed the existence of KATNAL2 signature peptides in all three bands (Table S3). We repeated the experiment at a larger scale, using twice as much starting material (testis) and cutting out contiguous broader zones (rather than bands) flanking the 50-, 60- and 80-kDa markers in both the KATNAL2 IP and also the negative control sample (goat IgG) (Fig. S3A2). We identified by MS analysis all proteins in each broad zone: this analysis confirmed the existence of KATNAL2 proteins in all 3 zones (the sequence coverage map indicates peptides throughout the KATNAL2 length, including its N- and C-termini; Fig. S3B) and comparison between the positive and corresponding negative samples revealed KATNAL2-derived peptides uniquely in the positive samples, illustrating the specificity of the IP test reaction (Table S4).

In conclusion, therefore, the combination of cloning, immunodetection and IP/MS confirmed the existence of a novel family of alternatively spliced KATNAL2 isoforms in mouse cells.

KATNAL2 isoforms interact with themselves, with each other and with Nubp1 and Nubp2

Having identified and confirmed the existence of a novel protein family of KATNAL2 isoforms, and prompted by our initial finding of the yeast two-hybrid screen, we next sought

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

to characterize putative interactions of KATNAL2s with Nubp1 and Nubp2 proteins. Because in initial pilot experiments we became aware of evidence indicating likely self-interactions of the KATNAL2s, we set up the experiments in a manner that would allow us to probe their putative interactions with the Nubp proteins but also amongst themselves. Specifically, we set up *in vivo* pull down assays using as bait transiently transfected FLAG-tagged KATNAL2-S1 or -L1 in a constructed stable cell line that expressed tagged Cherry-KATNAL2-S1 (see later Results section for full characterization of this stable line). When we pulled down the FLAG-KATNAL2-S1 or -L1 as bait in extracts of such cells with anti-FLAG sepharose beads, we consistently and specifically detected both Nubp1 and Nubp2 by WB as co-selected proteins; Nubp1 and Nubp2 were absent in the equivalent negative control reaction, lacking the bait protein (compare lanes 1' vs. 2' and 3' in Fig. 2A). Interestingly, in the co-selected complex we also clearly detected the “endogenous” Cherry-KATNAL2-S1 (Fig. 2A; “CS” for Cherry-KATNAL2-S1) as well as several native KATNAL2 isoforms migrating close to 40-, 50- and 60-kDa markers (Fig. 2A, lane 2'), indicating that the FLAG-KATNAL2-S1 bait was pulling down with it the whole range of available KATNAL2s. Again, all these KATNAL2s were absent in the negative control IP reaction (Fig. 2A, compare lanes 1' and 2'). In the parallel experiment, using this time FLAG-KATNAL2-L1 as bait, FLAG-KATNAL2-L1 was not only able to specifically pull down both Nubp1 and Nubp2, but, as before, it co-selected both Cherry-KATNAL2-S1 as well as native KATNAL2s (Fig. 2A, lane 3'). Together these results give consistent evidence for interactions within the KATNAL2 family, both self-interactions (i.e. S1 with itself, and L1 with L-isoforms), as well as interactions between S1 and L1 isoforms and between L- and S-isoforms in general. This is not unprecedented within the katanin family, given the well-characterized interactions between p60 monomers or between p60 and p80 katanin proteins [17, 18].

These assays from mouse cells clearly indicated the co-selection of both Nubp1 and Nubp2 with either S1 or L1 KATNAL2 isoforms. However, because of the well-established interaction between Nubp1 and Nubp2 in mouse cells [40], these assays could not discriminate whether the presence of both Nubp1 and Nubp2 in the bound fraction was a result of an interaction of each protein individually with the KATNALs or could have occurred because of the interaction of one of the Nubps with the KATNALs and the “passive” concurrent co-selection of the other Nubp protein. To resolve this important point, we next tested *in vitro* whether each of the KATNALs interacts directly with Nubp1 or Nubp2, using tagged recombinant proteins expressed in bacteria. GST-tagged forms of KATNAL2-L1 or KATNAL2-S1 were incubated in pairwise combinations with His-tagged Nubp1 or Nubp2. Following incubation, the proteins were mixed with glutathione sepharose beads, the beads collected by centrifugation, washed extensively, and bound and unbound fractions were separated by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose and probed with anti-GST and

1 anti-His antibodies to detect the presence of KATNALs and Nubps, respectively (Fig. 2, B1,
2 B2, C1, C2). These experiments showed that Nubp1 and Nubp2 were each, individually,
3 recovered in the bound fraction only when incubated in the presence of KATNAL2-L1 or
4 KATNAL2-S1; in the negative control with GST-only, all of the His-Nubp1 or Nubp2 protein
5 was recovered in the supernatant, unbound fraction (Fig. 2 B1, B2, C1, C2 compare lanes 1-3
6 with negative controls in lanes 1'-3'). These results with the recombinant proteins thus
7 strongly support the conclusion that KATNAL2-L1 interacts directly with Nubp1 and also
8 Nubp2 and, similarly, that KATNAL2-S1 also interacts directly with Nubp1 and Nubp2.
9

10
11
12
13
14
15 ***KATNAL2 is localized on interphase MTs, centrosomes, mitotic spindle, midbody and***
16 ***cilium***
17

18 We next probed the intracellular localization of KATNAL2. Immunofluorescence (IF)
19 analysis in mouse NIH 3T3 and IMCD cells (Fig. 3), using double labeling combinations of
20 the anti-KATNAL2 antibody with antibodies to α - or γ -tubulin, revealed prominent
21 KATNAL2 labeling of the cytoplasm, associated with the MT cytoskeleton at interphase (Fig.
22 3A). Although at interphase the concentration of KATNAL2 immunoreactivity at the
23 centrosomes specifically was modest (Fig. 3A and B), the protein was highly enriched in
24 centrioles at the center of MT asters at the onset of mitosis (prophase and prometaphase) and
25 in later mitotic phases labeling extended locally to MTs emanating from the two asters at the
26 two spindle poles and to the spindle MTs in general; the nucleocytoplasm was also labeled
27 throughout mitosis (Fig. 3 C, D). The same pattern of labeling at interphase and mitosis was
28 observed in several other mouse cell lines that we tested, namely TM4, NSC34 and N2A
29 (selected examples in Fig. 3 panels F and G and other data not shown).
30

31 Because of the important role of katanin in ciliogenesis and axoneme dynamics
32 (*Introduction*), we were prompted to probe specifically KATNAL2 localization in cilia, and
33 examined IMCD and TM4 cells induced to form primary cilia by serum deprivation
34 (*Materials and Methods*). In both cases, we detected KATNAL2 signal at the axoneme itself
35 and its associated basal body, as well as in the daughter centriole that did not form a cilium, in
36 both cases at levels comparable to interphase centrioles (Fig. S4). These results therefore
37 indicated the presence of KATNAL2 at the cilium; to date the localization of katanin and MT-
38 depolymerising kinesin-like proteins have been documented at the ciliary axoneme and basal
39 body [32, 31, 14, 47-49] and thus KATNAL2 proteins can now, too, be added as putative
40 players in axonemal dynamics.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 ***KATNAL2 affects centriole arithmetics and MT dynamics, is involved in cytokinesis and is***
58 ***implicated in cell cycle progression***
59
60
61
62
63
64
65

1 We found the MTs and centrosomes in interphase cells and the mitotic spindle and
2 centrosomes at its poles in dividing cells to be prominent sites of localization of KATNAL2
3 proteins, consistent with reported roles of related proteins katanin and KATNAL1
4 (*Introduction*); they were thus a logical target for further functional investigation. We
5 therefore next attempted to address the functional role of KATNAL2 at these sites in cycling
6 cells by manipulating its concentration *in vivo*.
7
8
9

10 We first attempted to impose *Katnal2* downregulation with the use of siRNA-mediated RNA-
11 silencing. By using different *Katnal2*-specific siRNAs, we noticed that while efficient
12 reduction of *Katnal2* RNA and protein could be achieved, silenced cells were particularly
13 sensitive to very low *Katnal2* expression which appeared toxic and caused massive cell death
14 (data not shown). We therefore turned to shRNA-mediated silencing instead that would offer
15 the possibility of antibiotic selection of viable clones and generated a stable NIH 3T3 line via
16 transduction with lentivirus expressing a *Katnal2*-specific silencing vector, targeting an area
17 in its ORF that was common to all *Katnal2* isoforms and would thus simultaneously silence
18 them all (Fig. S1, yellow highlight to indicate the protein sequence of the targeted area). As
19 our protein-protein interactions experiments had indicated that KATNAL2 isoforms
20 interacted with each other, possibly forming oligomers *in vivo*, the alternative strategy of
21 targeting individual KATNAL2 isoforms was not pursued. The latter approach might mask
22 effects of individual silencing through redundancy of different isoforms and would therefore
23 be less informative on its own. After selection and screening of isolated puromycin-resistant
24 clones, we identified clone 2.43, which showed considerable reduction of *Katnal2* expression.
25 Specifically, total *Katnal2* mRNA was reduced to $42.17 \pm 4.62\%$ of the normalized average
26 control value of the NIH 3T3 parental line, as quantified by RT-qPCR using oligonucleotides
27 to amplify sequences common to all *Katnal2* isoforms ($p=2.68 \times 10^{-5}$; or was reduced to
28 $44.37 \pm 8.47\%$ of controls using PCR oligonucleotides specific for the large *Katnal2* isoforms,
29 $p=3.40 \times 10^{-4}$) (Fig. 4A). Consistently, KATNAL2 protein normalized average levels were
30 similarly reduced relative to control levels as quantified by WB (to $38.04 \pm 13.78\%$ of
31 normalized average control values, $p=0.02$) (Fig. 4B1, B2). Interestingly, protein levels of
32 KATNAL2-interacting proteins Nubp1 and Nubp2 were also found to be significantly
33 reduced (to $47.97 \pm 8.93\%$ of control value, $p=0.04$ for Nubp1, and to $58.34 \pm 8.06\%$, $p=0.01$
34 for Nubp2; while the expression of actin, as an unrelated protein, was essentially unaffected;
35 Fig. 4B2).

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Characterization of the *Katnal2*-silenced clone 2.43 revealed a series of its distinctive features. First, this clone displayed an extremely significantly altered growth pattern ($p<0.0001$) compared to the control parental clone (wild-type NIH 3T3 cells), with markedly reduced cell numbers at each time point of its growth curve, sampled over a period of 96 h after seeding, suggesting a drastically lower rate of cell division or increased cell death (Fig.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4C). Combined with this growth defect, *Katnal2*-silenced cells had a significantly larger total size compared with controls; while total cell size (measured as cell surface) of control cells ranged between 100-1000 μm^2 , the size distribution in silenced cells extended between 100-70,000 μm^2 (difference of distribution $p < 0.00001$; Fig 5D1). This was accompanied by a significantly larger size of nucleus, extending between 200-800 μm^2 in controls and between 200-3,000 μm^2 in silenced cells (difference $p < 0.00001$; Fig. 4D2). A random wide field view of control and of silenced cells, photographed at the same magnification, is shown in Fig. 4E1 and E2, respectively, illustrating the remarkable difference in cellular size. This indicated viability with low rate of cell division combined with a steadily increasing cell size for silenced cells, in the absence of typical apoptotic phenotypes.

Live imaging of control parental NIH 3T3 cells and clone 2.43 cultures, over a period of 24 hours, provided an intriguing first insight into the mechanisms underlying the observed phenotypes. The often bi-nucleated enlarged cells with enlarged nuclei, typical of *Katnal2*-silencing, often had clear difficulty in progressing through the complete mitotic sequence, which was visibly disturbed and lengthy or even anomalous (movie S1), or in successfully executing cytokinesis; incomplete ingression of the cleavage furrow in late mitotic cells in which nuclei had already divided resulted in many cases in the formation of one binucleated cell (movie S2). Even when cytokinesis was almost complete, occasionally the daughter cells re-fused to give a large, visibly binuclear cell (movie S3). Alternatively, the result of mitosis was the formation of two daughter cells that were not fully separated but were connected with a persisting narrow cytoplasmic bridge and remained close to one another long after mitosis (movie S4). When complete cleavage was achieved, it was sometimes asymmetrical (movie S5). These observations were indicative of severe cytokinesis and also mitotic defects when KATNAL2 was depleted, leading to multinucleated, polyploid and aneuploid cells that could grow in size, but not divide effectively. Such defects were consistent with the observed impairment in their growth curve.

Furthermore, the cell cycle profile of populations of silenced and control cultures, as determined by flow cytometry, revealed that silencing of KATNAL2 affected normal progression through the cell cycle in silenced cells. In particular, in clone 2.43 the percentage of cells in phase S was significantly reduced and in G2/M significantly increased, compared to controls (both with extreme statistical significance $p < 0.0001$) (Fig. 4F); this indicated stalling in G2/M phase, being consistent with mitotic and cytokinesis defects underlying an altered cell cycle progression pattern, caused by reduction of KATNAL2.

To analyze in more depth and to quantify these phenotypes further, we next performed a detailed microscopic analysis of a very large number of cycling cells (*Materials and Methods*) with triple fluorescence for α - and γ - tubulin and DNA labeling, scoring in each culture the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

mitotic index, the percentage of cells in each mitotic subphase, the number of centrioles in interphase and mitosis, the morphology of the mitotic spindle, the number of nuclei per cell and incidence of chromosomal abnormalities (such as chromatin bridges). This revealed a statistically significant 4.5-fold reduction of the mitotic index in silenced cells, with $2.55 \pm 0.80\%$ of silenced cells in mitosis as opposed to $11.78 \pm 0.89\%$ in control cells (Table S5; $p=0.00018$). Analysis of the distribution of mitotic cells in different mitotic subphases gave a highly significant overall difference between the two populations ($p=0.0011$), with a main difference in the apparent accumulation of a sizeable proportion of cells (18.4% in silenced vs. 2.6% in control mitotic cells) in prometaphase ($p=0.0007$; Table S5). The most striking observation was the high incidence of marked centriole amplification in silenced cells, throughout the cell cycle, both in mitosis and interphase: a third of all silenced cells had supernumerary centrioles, representing a 5-fold increase relative to control cells ($p=0.00055$) and the centriole number distribution was remarkable and different overall for control and silenced cells ($p<0.0001$) (Table S6 and Fig. 4G). The numbers of supernumerary centrioles per cell ranged from 5 up to $\gg 15$ in silenced cells (Table S6 and Fig. 4G) and, as a consequence, the average number of centrioles per cell was significantly elevated (3.02 ± 0.12 centrioles on average per silenced cell vs. 2.12 ± 0.05 in controls, $p=0.00026$; Table S6) (with Fig. 5A1-A4 giving an example of a multicentriolar interphase cell). As a result of centriole amplification, many mitotic cells possessed anomalous multipolar spindles (Fig. 5B1-B4) and some exhibited chromosome misalignments (Fig. 5C1-C4). The presence of such multipolar spindles most likely accounted for the observed increase of the proportion of cells in prometaphase (indicating difficulties in the accurate sorting of chromosomes due to simultaneous forces exerted by multiple poles) and for abortive mitotic sequences (observed by live imaging) with a concomitant reduction of the mitotic index in silenced cells. The presence of multipolar spindles is also an established contributor to chromosomal aneuploidy and polyploidy as a result of inaccurate chromosome segregation on the spindle. Aneuloidy and polyploidy are further exacerbated by inaccurate cytokinesis; we had already observed cytokinesis defects by live image, an observation corroborated by aberrant or unequally dividing daughter cells in silenced cultures (Fig. 6 series A and B). Consistent with chromatin segregation and cytokinesis failure was the elevated incidence (a) of multinucleated cells (with $7.12 \pm 0.70\%$ of silenced cells having more than one nucleus vs. only $1.66 \pm 0.01\%$ in controls, $p=0.0001$), as well as the enlarged size (already analyzed above) accompanied by the presence of multi-lobed nuclei, mini nuclei, adjoining nuclear “buds” or nuclei with abnormal size or shape (Fig. 6A3, purple arrowheads, 6C3), all features being indicative of polyploidy and aneuploidy, and (b) of long chromatin bridges in post-mitotic cells (Fig. 6A3 and B3 yellow arrowheads) or imperfectly aligned chromosomes in mitotic cells (Fig. 5C3-C4), landmark aberrations stemming from inaccurate or incomplete chromosome segregation.

1 A notable observation in silenced cells in cytokinesis was the frequent presence of
2 pronounced, elaborate and persistent MT bundles at the midbody (as exemplified in Fig. 6A
3 and B series), often visible in post-mitotic cells that had not fully separated and were still
4 attached to each other.
5

6 Prompted by these observations and given the role of katanin proteins in MT severing, we
7 studied the overall organization of the MT network in silenced cells: there was no discernible
8 gross morphological change of the MT network in interphase cells, as revealed by anti- α -
9 tubulin labeling of *Katnal2*-silenced cells and compared with control cells (Fig. S5, panels
10 A1-C1). Interestingly, however, when we concurrently compared this same network with an
11 antibody to acetylated tubulin, we observed a notable signal increase of the proportion of
12 acetylated microtubules within the MT network in silenced cells, implying that acetylation, a
13 major post-translational modification of MTs often used as a marker of older, more stable and
14 less dynamic MTs, is enhanced in the absence of KATNAL2 activity (Fig. S5 compare
15 control in C2 and silenced cells in A2, B2).
16
17
18
19
20
21
22

23 Given that we could not carry out rescue experiments with silenced clone 2.43 (see
24 subsequent section), in order to consolidate our findings and to exclude the (remote)
25 possibility that its phenotypes derived from chance insertional effects of the shRNA-encoding
26 cassette into the genome, we went ahead to generate an independent *Katnal2*-silenced clone,
27 using a different shRNA construct targeted to another ORF area, common to all *Katnal2*
28 transcripts and downstream from that affected in clone 2.43 (Fig. S1, area highlighted in
29 blue). We isolated clone 3.81 after screening lentivirus-transduced, single puromycin-resistant
30 clones; *Katnal2* mRNA levels (not shown) as well as protein levels were both reduced,
31 compared to controls (Fig. S6 panel C for WB). After careful repetition for clone 3.81 of
32 analyses undertaken for clone 2.43, including triple fluorescence labeling of test and control
33 cells and compiling large datasets by fluorescence microscopy, our findings closely paralleled
34 those obtained with clone 2.43 and replicated all the tell-tail features described for the
35 downregulation of *Katnal2* in clone 2.43 cells. Specifically, clone 3.81 cells exhibited
36 increased cellular and nuclear size (Fig. S6 A1-A4), acquisition of supernumerary centrioles
37 and multipolar spindles (Fig. S6, A1-A4, detail in A2; B1-B4) so that a third of silenced clone
38 3.81 cells had more than two centrioles (with $32.76 \pm 0.84\%$ vs. $8.25 \pm 0.30\%$ in control,
39 $p=1.18 \times 10^{-6}$; Table S7), the average number of centrioles per cell was significantly
40 augmented as compared with control wild-type cells (2.79 ± 0.039 centrioles per cell vs.
41 2.16 ± 0.012 , $p=1.09 \times 10^{-5}$, Fig. S6D; Table S7) and the overall distribution of their numbers
42 per cell different ($p < 0.0001$; Table S7), the incidence of multipolar mitotic spindles was over
43 an order of magnitude higher than in controls (with $15.83 \pm 1.01\%$ of mitotic cells vs.
44 $1.56 \pm 0.40\%$ in controls, $p=2.24 \times 10^{-5}$). As before, the incidence of binucleated cells was
45 increased (tripled to $3.9 \pm 0.35\%$ vs. $1.36 \pm 0.25\%$, $p=0.0006$), the frequency of chromatin
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
bridges, indicating chromosome segregation and cytokinesis defects, quadrupled (to 2.33±0.23% vs. 0.40±1.15X10⁻⁵ %, p=0.0045) and the mitotic index reduced to a third of controls (to 3.37±0.0025% vs. 10.44±1.2%, p=0.0006). Our findings with two differently targeted and totally independent *Katnal2*-silenced stable clones showed remarkable consistency of phenotypic characteristics and thus confirmed the specificity of the silencing phenotypes.

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
In conclusion, the combination of highly complementary evidence with different experimental approaches indicated that *Katnal2* downregulation appears to affect MT-based structures throughout the cell cycle and likely has an impact on the cell cycle itself; these findings are consistent with different aspects of MT-based function of katanin in discrete biological processes.

20 21 22 ***Katnal2 is also involved in ciliogenesis***

23
24
25
26
27
28
29
Additionally, because of the localization of KATNAL2s at the ciliary axoneme and basal body, their interactions with the Nubp proteins, shown to be regulators of ciliogenesis [39], and the known involvement of the archetypal katanin in axoneme dynamics in motile cilia [14, 50], we also wished to investigate the possible role of KATNAL2 proteins specifically in ciliogenesis.

30
31
32
33
34
35
36
37
We thus first subjected silenced clones 2.43 and 3.81 and normal control NIH 3T3 cells to serum deprivation to induce the formation of sensory cilia. We compared them to equivalent cultures grown in parallel in full growth media by microscopically scoring the number of ciliated cells, as revealed by double labelling for γ -tubulin (basal body marker) and acetylated tubulin (ciliary axoneme marker), in each of the silenced and control populations.

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
We observed that while uninduced silenced cells had essentially the same, low basal-level proportion of ciliated cells as control cultures, upon induction by serum deprivation the incidence of cilia of *Katnal2*-silenced cells of clone 2.43 was less than half that of controls, resulting in a significantly lower number of ciliated cells. Specifically, the average percentage of ciliated cells in the *Katnal2*-silenced 2.43 population was reduced to less than half, compared to the average of control-silenced levels (with 16.70±4.15% in *Katnal2* silencing vs. 37.39±8.02% in controls, p=0.0165) (Fig. S7). The equivalent results with silenced clone 3.81 reproduced the significant decrease in the proportion of ciliated cells to about half the control value (with 21.47±2.12% vs. 38.06±2.97% in controls, p=0.0014; Fig. S6E). These results suggested that in the absence of KATNAL2, there is a decline in the propensity for ciliogenesis or in the stability of newly-formed cilia, resulting in a reduced population of ciliated cells.

58
59
60
61
62
63
64
65
To elaborate our investigation, we next wished to assess the impact of increased KATNAL2 expression on ciliogenesis, initially by overexpression of KATNAL2 via transient

transfection. We consistently observed that overexpression of tagged forms of either KATNAL2-L1 or KATNAL2-S1 or their combination resulted in pronounced cell apoptosis and in the vast majority (>80%) of non-apoptotic cells to the mislocalization and aggregation of KATNAL2 in large cytoplasmic inclusions/aggregates, irrespective of the tag used or its position in the fusion protein (examples of FLAG-, Myc-, GFP- and mCherry-tag in Fig. S8). These observations, in conjunction with our observations with initial siRNA-mediated silencing attempts (previous section), led us to speculate that *in vivo* there is a strict regulation of KATNAL2 levels of protein expression and that deviation to very low or high-level expression may be toxic to cells. As an alternative strategy, we proceeded to construct IMCD cell lines stably expressing fusion proteins of either Cherry-KATNAL2-S1 or -L1 following integration into the genome. Clones were cultured under antibiotic selection, isolated, screened and characterized: the final selected clones exhibited relatively moderate fusion-protein transcript levels, as assessed by RT-PCR using oligonucleotide primers specific for the Cherry-KATNAL2 fusions (Fig. 7A), moderate fusion-protein expression and comparable to that of the endogenous protein (Fig. 7B), and correct Cherry-S1 or -L1 localization (cytoplasm, mitotic spindle and cilia) identical to that of the endogenous KATNAL2 protein (examples in Fig. 7C-K series). We further characterized these stable clones by evaluating their cell cycle profiles by flow cytometry (Fig. 7I) and quantifying their mitotic indexes (Fig. 7J) and mitotic phase distribution by microscopic analysis of a large number of cells (Fig. S9). Cell-cycle analysis for S1- and L1-expressing cells, compared to wild-type IMCD cells, revealed a significant difference between the overall distribution of cells in different phases of the cell cycle (G1/0, S and G2/M) ($p=0.0139$), and also a marked increase of cells specifically in the S phase for both S1-transgenic ($p=0.0208$) and L1-transgenic ($p=0.0111$) cells (Fig. 7I). Consistent with differences in the cell cycle profile, both KATNAL2 S1- and L1-expressing populations showed a lowered mitotic index ($p=0.0007$ for S1-transgenic cells and $p=0.003$ for L1-transgenic cells; Fig. 7J). Moreover, overall distribution in mitotic subphases was different between cell populations ($p=0.0011$) and for S1-transgenic cells compared to wild-type cells revealed significant ($p=0.0122$) and extremely significant ($p=0.0006$) differences in particular for telophase and prophase percentages, respectively (Fig. S9). Despite these clear differences in their cell cycle parameters, all stable clones maintained a good proliferation rate, normal morphology, stable but moderate expression and correct localization of the fusion proteins, and were thus used for further experiments.

We proceeded to quantify ciliogenesis in the mCherry-KATNAL2-S1 and -L1 stable cell lines, comparing them with the parental IMCD cell line from which they were derived, after a 24 h serum starvation regime. Results with both stable cell lines showed a consistent and drastic reduction of the percentage of ciliated cells. Specifically, while the average percentage of the control IMCD line was at $18.73\pm 2.38\%$, it was only $4.84\pm 0.82\%$ for the KATNAL2-

1 L1 stable line (i.e. 26% of the wild type control value) and was even further reduced in the
2 KATNAL2-S1 line to a mere 1.29 ± 0.48 % (i.e. 7% of the wild type), a difference with
3 extreme statistical significance (with overall and individual p-values compared to wild-type
4 cells < 0.0001 , Fig. 7L). It was also apparent that the length of those rare cilia was reduced
5 compared to the controls, although it was difficult to quantify this observation due to the very
6 small numbers of cilia observed in the cultures of KATNAL2-S1 and -L1 cells. This set of
7 experiments supported the notion that increased KATNAL2 expression reduces the number of
8 ciliated cells in the population by either negatively impacting on their assembly or their
9 stability. Although these results could appear unexpected in the face of our silencing results,
10 demonstrating the same effect. i.e. reduced numbers of cilia in the absence/downregulation of
11 KATNAL2s, this finding may in fact point to the idea that what is critically important in this
12 MT-based process is balanced and appropriate MT-severing activity.

13 In conclusion therefore, our results with both silencing and increased *Katnal2* expression
14 strongly support a regulatory role of the KATNAL2s in ciliogenesis, suggesting the need of
15 highly regulated activity, ranging within a defined window, as critically important for correct
16 biological output. Overall, finely balancing KATNAL2 activity may be critical for the control
17 of many, if not all, MT-dependent processes, including centriole arithmetics, cell division and
18 cytokinesis and cellular and nuclear size.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

DISCUSSION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In this work we uncovered the existence of a new family of Katanin-like 2 protein isoforms in mouse, arising from alternative splicing of the *Katnal2* genomic locus. It is interesting to note that in addition to the archetypal katanin, it would appear that katanin-like proteins are phylogenetically as ancient given that, besides their reported existence in both vertebrates and invertebrates (KATNAL1 and 2) [51, 20], such sequences can be predicted in unicellular eukaryotes like *Chlamydomonas* [(chromosome 10) Cre10.g446400 (phytozome database) is a *C. reinherdii* KATNAL2-predicted protein (44.1% identity with mouse KATNAL2-L1) in addition to *Chlamydomonas* katanin p60 (Cre10.g427600, also on chromosome 10 at a ca. 4.5 Mb distance); Mette Lethan and Lotte B. Pedersen, personal communication].

Here we show that the different mouse KATNAL2 isoforms are capable of forming protein-protein interactions between them and this finding could suggest an oligomeric functional form, akin to p60 katanin. It is plausible that differential usage of isoforms in a combinatorial manner to form discrete homo- and hetero-oligomeric complexes could underlie their intracellular targeting and/or functional specialization (i.e. determine the subset of MT with which each different complex could interact). Conceivably, the distribution of specific tubulin isoforms or post-translational modifications to distinct MT subsets can create discrete MT subpopulations with unique functionality [52, 53] and severing enzyme affinities and thus also contribute to substrate specialization. Given the extensive sequence similarity between the KATNAL2 isoforms and likely low abundance of specific complexes, it would be technically challenging to address such scenarios directly. It is clear in any case that the LiSH domain is not essential for inter-isoform interactions since these occur even between LiSH-less (S-type) isoforms.

KATNAL2 is localized on interphase MTs, centrosomes, mitotic spindle, midbody and at the basal body and axoneme of the cilium, raising the question what functional roles KATNAL2s might have at these diverse sites in mouse cells? The battery of phenotypes documented in *Katnal2*-silenced cells indicate an impressive multitasking functionality of KATNAL2s, affecting different MT-based processes in these intracellular locations: downregulation was characterized by centriole amplification throughout the cell cycle, the consequent formation of aberrant multipolar spindles in mitosis, absence, deficiency or inequality of cytokinesis with a concomitant significant number of binucleated cells, a strikingly enlarged cellular and nuclear size likely accompanied by polyploidy and occasionally by abnormal nuclear shape, a disturbed cell cycle profile with increased accumulation in G2/M phase, an altered mitotic profile combining reduced mitotic index and some stalling at prophase, and a seemingly normal organization of the MT network at interphase, albeit with indications of enhanced acetylation. Acetylation at K40, a major post-translational modification of α -tubulin, is a

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

molecular hallmark of older MTs that are hotspots of katanin binding and severing activity [14, 54] and its increase in silenced clone 2.43 was not only consistent with the downregulation of KATNAL2 but could be at the basis of several of the observed phenotypes. For instance, depletion or reduction of KATNAL2 would hinder efficient resolution of a highly acetylated and particularly stable bundle of long midbody MTs to allow cytokinesis progression, thus contributing to inability of or unequal daughter cell segregation and consequent anomalies in cellular and nuclear size and ploidy and the acquisition of multiple nuclei. Furthermore, it is well documented that MT severing by katanin is implicated in cell cycle progression and, reciprocally, also regulated by the cell cycle with low MT-severing activity at interphase and highly stimulated activity in mitosis [55, 32]. Notably, MT severing by katanin, that accelerates the generation of unstable and highly turning over MTs, enables G2/M transition and mitotic entry and the concentration of MT fragments with the smallest length reaches a peak at the end of prophase [56]. In this context, the observed increase of the proportion of *Katnal2*-silenced cells at G2 was a clear indication of a depletion of sufficient MT severing activity and thus a reduction in the ability to efficiently transform MTs at a critical transition, causing consequent delayed entry into mitosis. Therefore, KATNAL2s appear to influence cell cycle progression through directly modulating MT dynamics.

The enlarged cellular and nuclear size (and presumed altered ploidy) of silenced cells is a remarkable morphological landmark of *Katnal2* silencing and a clear consequence of ineffective cytokinesis. Enlarged cell size and polyploidy have been linked [57]: it is thought that polyploidy does not affect the frequency of cell division [58] but rather, it may enlarge cell size by boosting the rate of ribosome biogenesis [59], which could provide an indicator of cellular growth and fitness for mitosis. Additionally, an overly stabilized and less dynamic MT network is a likely contributor to the acquisition of this abnormal size (up to 70 times larger than controls). In *Arabidopsis*, cellular size and shape were found to be affected by katanin-dependent cortical MT dynamics and orientation that influence the ability of the cell to respond to mechanical stress [60]. A frequent observation in the live imaging recordings of *Katnal2* silenced cell populations was the occurrence of large nuclei, “rotating” widely over prolonged periods of time at both interphase and cytokinesis. Spinning nuclei have been reported in a variety of tissues and cells [61, 62] and a model for nuclear “wriggling”, based on this phenomenon in *Drosophila* follicle cells in egg primordia, entails that the polymerizing (+) ends of cortical long MTs poke the nuclear envelope and exert forces that induce changes in nuclear positioning [63]. The long-lived and elongated MTs in *Katnal2*-silenced cells may likewise contribute to the observed nuclear rotations. It is conceivable that excessive such forces exerted by unusually stable MTs may also account for nuclear shape deformities (like the hole traversed by a MT bundle in Fig. 6C1-C4).

1 An additional phenotype in the population of silenced cells is a reduced frequency of cilia, a
2 feature also detected in cells stably expressing Cherry-tagged KATNAL2 isoforms; these
3 findings may indicate that KATNAL2 activity needs to be strictly regulated within a
4 functional range that is compatible with the assembly of the ciliary axoneme using severed
5 seeds of the appropriate length and concentration; an activity of KATNAL2 either below or
6 above a distinct gradient may be detrimental to the process. The increased cellular toxicity of
7 both overt silencing or protein overexpression is compatible with this concept and may
8 explain the difficulty in the katanin field in producing viable or long lasting cellular or animal
9 models with katanin depletion [for example 33]. We find that KATNAL2s interact directly
10 and independently with Nubp1 and Nubp2 AAA proteins. Our previous work showed the
11 Nubps acting as negative regulators of ciliogenesis and also raised the possibility that the
12 Nubps may be acting as cellular co-chaperones [39]. It is known that some AAA enzymes can
13 disassemble or modulate stable protein-protein complexes [64], conjuring up the intriguing
14 possibility that Nubp1&2, through their direct interactions with the KATNALs, may form
15 part of KATNAL2 complexes and thus modulate their activity. Through its suppression, for
16 instance, Nubp1&2 may keep ciliogenesis at low basal levels by reducing KATNAL2-
17 induced severing of MTs and limiting the supply of MT seeds for the formation of the ciliary
18 axoneme in cycling cells. Upon serum deprivation and cell cycle exit, when Nubp1&2 levels
19 are reduced, ciliogenesis was shown to be enhanced compared to cycling cells and, when
20 serum deprivation was combined with Nubp1 or 2 siRNA-mediated silencing for further
21 reduction of Nubp protein levels, ciliogenesis was augmented even further [39]. In the light of
22 the current work, in both cases appropriate increased levels of KATNAL2 activity may be
23 established within a physiological range that is conducive to axoneme formation and thus
24 ciliogenesis can proceed. Consistent with this model, we report here that in conditions of
25 significant KATNAL2 depletion through silencing, the frequency of ciliogenesis drops
26 considerably (to half that of control levels). Interestingly, we found that KATNAL2 depletion
27 appears to cause a decrease of both Nubp1 and Nubp2 protein levels, an observation
28 suggesting decreased stability of the Nubps in the absence of their binding partners. This
29 observation could further suggest an intricate reciprocal relationship between the KATNAL2s
30 and the Nubps: while the Nubps may be acting as repressors of KATNAL2 downstream
31 activity, the absence of KATNAL2 protein may cause degradation of Nubps. It may be the
32 case that *in vivo* KATNAL2s don't significantly fluctuate (contrary to the Nubps) or get
33 downregulated (unpublished observations). However, it may be that upon reduction of both
34 protein classes under experimental conditions, for instance by depletion of Nubps under
35 serum starvation combined with KATNAL2 silencing, the phenotype associated with
36 KATNAL2 loss of function (reduction of the percentage of ciliated cells in the population) is
37 epistatic to that of the Nubps.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A striking feature of the *Katnal2* silencing phenotype is the significant amplification of centrioles throughout the cell cycle with the inevitable formation of multipolar spindles in mitosis. These centrioles appear functional as they appear to be able to nucleate MTs in the spindle and this phenotype is highly reminiscent of the situation that arises from the silencing of the KATNAL2 binding partner, Nubp1 [39]. Very recently, centriole amplification was described as a feature of primary cells derived from patients suffering from severe microlissencephaly found to be caused by mutations in the non-catalytic p80 subunit of katanin [34, 35]. Thus it would appear that many, if not all, katanins affect centriole numbers. While no mechanism was proposed for p80 katanin and centrioles and no specific reference was made regarding cytokinesis defects in asymmetrically dividing human progenitors in the diseased cerebral cortex [34, 35], it is obvious that centriole amplification must, at least in part, be caused as a consequence of cytokinesis defects, as the present study has documented in the case of KATNAL2. However, given that silencing of either Nubp1 (which does not affect cytokinesis) or *Katnal2* result in the same phenotype, an additional pathway, likely pertaining to centriole duplication licensing [40], may be at play and is an obvious target for further analysis.

A final consideration is to what extent there is functional redundancy between the different types of katanin in a cell, given that they mostly seem to execute similar functions and to be active within the same cell type; from work in the field and our results it seems, rather paradoxically, that different katanin and katanin-like protein family members do not rescue or substitute the missing function of other knocked-out katanins. This raises the possibility that each katanin may be strictly regulated by distinct upstream partners, such as the Nubps for KATNAL2s, which are not interchangeable so that, despite their functional relatedness, the katanins themselves are not interchangeable either.

REFERENCES

1. Akhmanova A, Steinmetz MO (2010) Microtubule +TIPs at a glance. *Journal of Cell Science* 123 (Pt 20):3415-3419.
2. Walczak CE, Gayek S, Ohi R (2013) Microtubule-depolymerizing kinesins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29:417-441.
3. Prokop A (2013) The intricate relationship between microtubules and their associated motor proteins during axon growth and maintenance. *Neural Development* 8:17.
4. Sayas CL, Avila J (2014) Regulation of EB1/3 proteins by classical MAPs in neurons. *Bioarchitecture* 4 (1):1-5.
5. Ferreira JG, Pereira AL, Maiato H (2014) Microtubule plus-end tracking proteins and their roles in cell division. *International Review of Cell and Molecular Biology* 309:59-140.
6. Niwa S (2015) Kinesin superfamily proteins and the regulation of microtubule dynamics in morphogenesis. *Anatomical Science International* 90 (1):1-6.
7. McNally FJ, Vale RD (1993) Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* 75 (3):419-429.
8. Baas PW, Qiang L (2005) Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock. *Trends in Cell Biology* 15 (4):183-187.
9. Roll-Mecak A, McNally FJ (2010) Microtubule-severing enzymes. *Current Opinion in Cell Biology* 22 (1):96-103.
10. Sharp DJ, Ross JL (2012) Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *Journal of Cell Science* 125 (Pt 11):2561-2569.
11. Ghosh DK, Dasgupta D, Guha A (2012) Models, Regulations, and Functions of Microtubule Severing by Katanin. *ISRN Molecular Biology* 2012:14.
12. Hartman JJ, Vale RD (1999) Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science* 286 (5440):782-785.
13. White SR, Evans KJ, Lary J, Cole JL, Lauring B (2007) Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing. *The Journal of Cell Biology* 176 (7):995-1005.
14. Sharma N, Bryant J, Wloga D, Donaldson R, Davis RC, Jerka-Dzidosz M, Gaertig J (2007) Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *The Journal of Cell Biology* 178 (6):1065-1079.
15. Lu C, Mains PE (2007) The *C. elegans* anaphase promoting complex and MBK-2/DYRK kinase act redundantly with CUL-3/MEL-26 ubiquitin ligase to degrade MEI-1 microtubule-severing activity after meiosis. *Developmental Biology* 302 (2):438-447.
16. Roll-Mecak A, Vale RD (2008) Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* 451 (7176):363-367.
17. Hartman JJ, Mahr J, McNally K, Okawa K, Iwamatsu A, Thomas S, Cheesman S, Heuser J, Vale RD, McNally FJ (1998) Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell* 93 (2):277-287.
18. McNally KP, Bazirgan OA, McNally FJ (2000) Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin. *Journal of Cell Science* 113 (Pt 9):1623-1633.

19. Lee HH, Jan LY, Jan YN (2009) *Drosophila* IKK-related kinase Ik2 and Katanin p60-like 1 regulate dendrite pruning of sensory neuron during metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (15):6363-6368.
20. Sonbuchner TM, Rath U, Sharp DJ (2010) KL1 is a novel microtubule severing enzyme that regulates mitotic spindle architecture. *Cell Cycle* 9 (12):2403-2411.
21. Srayko M, O'Toole E T, Hyman AA, Muller-Reichert T (2006) Katanin disrupts the microtubule lattice and increases polymer number in *C. elegans* meiosis. *Current Biology : CB* 16 (19):1944-1949.
22. Yang HY, McNally K, McNally FJ (2003) MEI-1/katanin is required for translocation of the meiosis I spindle to the oocyte cortex in *C elegans*. *Developmental Biology* 260 (1):245-259.
23. McNally KP, McNally FJ (2011) The spindle assembly function of *Caenorhabditis elegans* katanin does not require microtubule-severing activity. *Molecular biology of the cell* 22 (9):1550-1560.
24. Zhang D, Rogers GC, Buster DW, Sharp DJ (2007) Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 177 (2):231-242.
25. Buster D, McNally K, McNally FJ (2002) Katanin inhibition prevents the redistribution of gamma-tubulin at mitosis. *Journal of Cell Science* 115 (Pt 5):1083-1092.
26. Smith LB, Milne L, Nelson N, Eddie S, Brown P, Atanassova N, O'Bryan MK, O'Donnell L, Rhodes D, Wells S, Napper D, Nolan P, Lalanne Z, Cheeseman M, Peters J (2012) KATNAL1 regulation of sertoli cell microtubule dynamics is essential for spermiogenesis and male fertility. *PLoS Genetics* 8 (5):e1002697.
27. Casanova M, Crobu L, Blaineau C, Bourgeois N, Bastien P, Pages M (2009) Microtubule-severing proteins are involved in flagellar length control and mitosis in *Trypanosomatids*. *Molecular Microbiology* 71 (6):1353-1370.
28. Benz C, Clucas C, Mottram JC, Hammarton TC (2012) Cytokinesis in bloodstream stage *Trypanosoma brucei* requires a family of katanins and spastin. *PloS One* 7 (1):e30367.
29. Matsuo M, Shimodaira T, Kasama T, Hata Y, Echigo A, Okabe M, Arai K, Makino Y, Niwa S, Saya H, Kishimoto T (2013) Katanin p60 contributes to microtubule instability around the midbody and facilitates cytokinesis in rat cells. *PloS One* 8 (11):e80392.
30. Sudo H, Maru Y (2008) LAPSER1/LZTS2: a pluripotent tumor suppressor linked to the inhibition of katanin-mediated microtubule severing. *Human Molecular Genetics* 17 (16):2524-2540.
31. Dymek EE, Lefebvre PA, Smith EF (2004) PF15p is the *Chlamydomonas* homologue of the Katanin p80 subunit and is required for assembly of flagellar central microtubules. *Eukaryotic Cell* 3 (4):870-879.
32. Lohret TA, McNally FJ, Quarmby LM (1998) A role for katanin-mediated axonemal severing during *Chlamydomonas* deflagellation. *Molecular Biology of the Cell* 9 (5):1195-1207.
33. Rasi MQ, Parker JD, Feldman JL, Marshall WF, Quarmby LM (2009) Katanin knockdown supports a role for microtubule severing in release of basal bodies before mitosis in *Chlamydomonas*. *Molecular Biology of the Cell* 20 (1):379-388.
34. Hu WF, Pomp O, Ben-Omran T, Kodani A, Henke K, et al. (2014) Katanin p80 regulates human cortical development by limiting centriole and cilia number. *Neuron* 84 (6):1240-1257.
35. Mishra-Gorur K, Caglayan AO, Schaffer AE, Chabu C, et al. (2014) Mutations in KATNB1 cause complex cerebral malformations by disrupting asymmetrically dividing neural progenitors. *Neuron* 84 (6):1226-1239.

- 1 36. Loughlin R, Wilbur JD, McNally FJ, Nedelec FJ, Heald R (2011) Katanin contributes to
2 interspecies spindle length scaling in *Xenopus*. *Cell* 147 (6):1397-1407.
- 3
- 4 37. Whitehead E, Heald R, Wilbur JD (2013) N-terminal phosphorylation of p60 katanin directly
5 regulates microtubule severing. *Journal of Molecular Biology* 425 (2):214-221.
- 6
- 7 38. Baas PW, Sudo H (2010) More microtubule severing proteins: more microtubules. *Cell Cycle* 9
8 (12):2273.
- 9
- 10 39. Kypri E, Christodoulou A, Maimaris G, Lethan M, Markaki M, Lysandrou C, Lederer CW,
11 Tavernarakis N, Geimer S, Pedersen LB, Santama N (2014) The nucleotide-binding proteins Nubp1
12 and Nubp2 are negative regulators of ciliogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 71
13 (3):517-538.
- 14
- 15 40. Christodoulou A, Lederer CW, Surrey T, Vernos I, Santama N (2006) Motor protein KIFC5A
16 interacts with Nubp1 and Nubp2, and is implicated in the regulation of centrosome duplication.
17 *Journal of Cell Science* 119 (Pt 10):2035-2047.
- 18
- 19 41. Pantelidou M, Zographos SE, Lederer CW, Kyriakides T, Pfaffl MW, Santama N (2007)
20 Differential expression of molecular motors in the motor cortex of sporadic ALS. *Neurobiology of*
21 *Disease* 26 (3):577-589.
- 22
- 23 42. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-
24 wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic*
25 *Acids Research* 30 (9):e36.
- 26
- 27 43. Santama N, Krijnse-Locker J, Griffiths G, Noda Y, Hirokawa N, Dotti CG (1998) KIF2beta, a new
28 kinesin superfamily protein in non-neuronal cells, is associated with lysosomes and may be
29 implicated in their centrifugal translocation. *The EMBO Journal* 17 (20):5855-5867.
- 30
- 31 44. Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4th edn. Cold Spring
32 Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 33
- 34 45. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation
35 lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology* 72 (11):8463-8471.
- 36
- 37 46. Emes RD, Ponting CP (2001) A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and
38 oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Human Molecular*
39 *Genetics* 10 (24):2813-2820.
- 40
- 41 47. He M, Subramanian R, Bangs F, Omelchenko T, Liem KF, Jr., Kapoor TM, Anderson KV (2014)
42 The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip
43 compartment. *Nature Cell Biology* 16 (7):663-672.
- 44
- 45 48. Vasudevan KK, Jiang YY, Lehtreck KF, Kushida Y, Alford LM, Sale WS, Hennessey T, Gaertig J
46 (2015) Kinesin-13 regulates the quantity and quality of tubulin inside cilia. *Molecular Biology of*
47 *the Cell* 26 (3):478-494.
- 48
- 49 49. Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, Yamamoto T, Dynlacht BD,
50 Matsuura S (2015) The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A
51 Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. *Cell Reports*.
52 doi:10.1016/j.celrep.2015.01.003
- 53
- 54 50. Dymek EE, Smith EF (2012) PF19 encodes the p60 catalytic subunit of katanin and is required for
55 assembly of the flagellar central apparatus in *Chlamydomonas*. *Journal of Cell Science* 125 (Pt
56 14):3357-3366.
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
51. Srayko M, Buster DW, Bazirgan OA, McNally FJ, Mains PE (2000) MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes & Development* 14 (9):1072-1084.
 52. Venkei Z, Gaspar I, Toth G, Szabad J (2006) alpha4-Tubulin is involved in rapid formation of long microtubules to push apart the daughter centrosomes during early *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science* 119 (Pt 15):3238-3248.
 53. Ikegami K, Setou M (2010) Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. *Cell Structure and Function* 35 (1):15-22.
 54. Sudo H, Baas PW (2010) Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *The Journal of Neuroscience* 30 (21):7215-7226.
 55. McNally FJ, Thomas S (1998) Katanin is responsible for the M-phase microtubule-severing activity in *Xenopus* eggs. *Molecular Biology of the Cell* 9 (7):1847-1861.
 56. Zhai Y, Kronebusch PJ, Simon PM, Borisy GG (1996) Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 135 (1):201-214
 57. Otto SP (2007) The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131 (3):452-462. doi:10.1016/j.cell.2007.10.022
 58. Di Talia S, Skotheim JM, Bean JM, Siggia ED, Cross FR (2007) The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature* 448 (7156):947-951. doi:10.1038/nature06072
 59. Verges E, Colomina N, Gari E, Gallego C, Aldea M (2007) Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Molecular Cell* 26 (5):649-662.
 60. Uyttewaal M, Burian A, Alim K, Landrein B, Borowska-Wykret D, Dedieu A, Peaucelle A, Ludynia M, Traas J, Boudaoud A, Kwiatkowska D, Hamant O (2012) Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis*. *Cell* 149 (2):439-451.
 61. Pomerat CM (1953) Rotating nuclei in tissue cultures of adult human nasal mucosa. *Experimental Cell Research* 5 (1):191-196.
 62. Englander LL, Rubin LL (1987) Acetylcholine receptor clustering and nuclear movement in muscle fibers in culture. *The Journal of Cell Biology* 104 (1):87-95.
 63. Szikora S, Gaspar I, Szabad J (2013) 'Poking' microtubules bring about nuclear wriggling to position nuclei. *Journal of Cell Science* 126 (Pt 1):254-262.
 64. Confalonieri F, Duguet M (1995) A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 17 (7):639-650.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very thankful to Adamos Adamou for his initial help with cloning of *Katnal2* isoforms. We are indebted to Dr Elena Panayiotou-Worth for providing us with mouse tissues for the IP/MS analysis, and to Dr Nicholas Mastroiannopoulos for his kind help with live imaging (both at the Cyprus Institute of Neurology and Genetics) and to Dr Maria Pantelidou (Frederick University, Cyprus) for advice with the REST-384 software. We are grateful to Prof. Agamemnon Epenetos, Dr Zacharias Kallis and Ms Efi Yiacomou at Lifeline for granting us access to the MACSQuant flow cytometer for cell cycle analysis.

This work was funded by the Research Promotion Foundation of Cyprus and Structural Funds from the EU (grant PENEK/ENISXYSI/0308-06 to N.S.).

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1

Identification of a family of KATNAL2 isoforms with N-terminal sequence variation

- (A) RT-PCR amplification of cDNA derived from NIH 3T3 cells, using oligonucleotide primers (SET1 in Table S1) at the extremities of the predicted ORF of mouse *Katnal2* XM_006526437. Several distinct bands (1.2 to 1.6 kbp) were obtained (bracket).
- (B) The mixed PCR product from (A) was subcloned in vector pGEM T easy, and after screening of 100 clones, five distinct types of cDNA, shown here as products of SacII/SacI restriction digests (arrows), were identified by DNA sequencing and assigned names *Katnal2-L1*, *-L2*, *-L3*, *-S1* and *-S2*.
- (C) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *Katnal2* expression in selected mouse tissues, using primers (SET5 in Table S1) that resulted in the amplification of a diagnostic product of 508 bp, common to all *Katnal2* transcripts.
- (D) Analysis of IP experiment from mouse testis, using the affinity-purified anti-KATNAL2 antibody. IP samples were analyzed in parallel by WB (25%, left) and on a colloidal-blue-stained gel (75%, right) to identify unique bands in the KATNAL2-IP that were immunoreactive. Three such bands were identified (red arrows bands 1-3) and cut out of the gel for MS analysis. Lanes: 1, 1' input; 2, 2' negative control IP (goat IgG); 3, 3' KATNAL2 IP. Results from MS analysis of the 3 cut bands, shown in Table S3, confirm the presence of KATNAL2 proteins in these immunoreactive bands.
- (E) Sketch of the *Katnal2* genomic locus on mouse chromosome 18. Exons (1-16) are shown colour-coded and to scale (introns are not to scale). The five distinct cDNAs in B correspond to transcripts designated *Katnal2-L1*, *L2*, *L3*, *S1* and *S2* with differential exon combinations, as shown on the left of the panel. Corresponding encoded proteins are shown on the right-hand side; isoforms L1 and L2 differ only in two additional amino acids (VK) in L1; their position is marked by a red line in L1. Protein motifs are shown: LiSH domain as a yellow box, Walker sequence motif as a blue box and SNPs in L1 and L2 (H instead of R) are indicated as a green line. Full protein sequences in Fig. S1. cDNA sequences were deposited to the European Nucleotide Archive as entries LN831862-LN831866 (www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN831862-LN831866).

FIGURE 2

Nubp1 and Nubp2 interact with KATNAL2 *in vivo* and *in vitro*, and KATNAL2s interact with themselves

- (A) The Cherry-KATNAL2-S1 (“Che-KATNAL2-S1”) stable cell line was transiently transfected with plasmids expressing as bait either FLAG-KATNAL2-S1 (“FLAG-

1 S1”) or FLAG-KATNAL2-S1 (“FLAG-S1”) (as indicated at the header for each set)
2 or mock empty vector plasmid (negative control) and subjected to IP with anti-
3 FLAG beads. The presence of Cherry-KATNAL2-S1, KATNAL2s, FLAG, Nubp1
4 and Nubp2 was probed by WB with appropriate antibodies as shown. Results show
5 that the FLAG-KATNAL2-S1 or -L1 bait co-immunoprecipitates Nubp1 and Nubp2
6 but also the “endogenous” Cherry-KATNAL2-S1 and several native KATNAL2
7 (different bands migrating in positions within ca. 40-80 kDa). All these proteins are
8 absent from the negative control IP reaction (lane 1’). Other abbreviations: *CS*:
9 Cherry-KATNAL2-S1; *FS*: FLAG-KATNAL2-S1; *FL*: FLAG-KATNAL2-L1).

10
11
12
13
14
15 **(B1-C2)** Recombinant GST-KATNAL2-L1 or -S1 and His-Nubp1 or His-Nubp2 were
16 expressed in bacteria and probed for pairwise interactions (as indicated for each set
17 in the blue header). GST-only was used in conjunction with His-Nubp1 or His-
18 Nubp2 in parallel negative control reactions. Complexes were immobilized on
19 glutathione beads, eluted, and two equal parts were analyzed by WB, either using
20 anti-GST (to detect the KATNALs) or anti-His (to detect the Nubps). Results show
21 that Nubp1 or Nubp2 is detectable on the glutathione beads only in the presence of a
22 KATNAL2 and indicate that both KATNAL2-L1 and KATNAL2-S1 interact
23 individually with both Nubp1 and Nubp2.
24
25 Abbreviations: “input” corresponds to 1/20 volume of the lysate used for the
26 reaction; “unb” is the unbound fraction after incubation of the mixed recombinant
27 protein lysates with glutathione beads; “B” is the bound fraction corresponding to
28 preformed protein complexes, captured on the beads.
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **FIGURE 3**

39 **Intracellular localization of KATNAL2 on MTs, centrioles and mitotic spindle in** 40 **different mouse cells by immunofluorescence**

41
42
43 **(A,B)** At interphase, immunostaining for KATNAL2 (green) revealed a pronounced,
44 detergent-resistant, cytoplasmic network and some concentration at the centrioles of the
45 centrosome, as shown in NIH 3T3 fibroblasts (A; double labeling of centrosomes with
46 anti- γ -tub in red; detail of centrioles at higher magnification in small side images) or
47 IMCD cells (B; double labeling of MTs with anti- α -tub in red; arrowheads point at the
48 two centrioles). Nuclei were counterstained for DNA with Hoechst (blue).
49

50
51
52 **(C-F)** Series of examples of localization of KATNAL2 (green) during mitotic subphases,
53 showing double labeling for α -tub (red) or for γ -tub (red, panel E) and counterstaining
54 for DNA (blue) in different mouse cell lines (IMCD in panels C-D; NIH 3T3 in E;
55 TM4 in F-G). KATNAL2 is highly concentrated at the centrosome and MT asters at
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

early mitotic phases and extends to the whole spindle in metaphase. The nucleocytoplasm is also strongly labeled throughout mitosis.

Scale bars 5 μm ; 3 μm in detail of panel A

FIGURE 4

Characterization of stable clone 2.43 generated with shRNA-mediated silencing of *Katnal2*

- (A) Efficiency of *Katnal2*-specific silencing in stable clone 2.43, assessed by quantitative RT-qPCR, using oligonucleotide primers specific for all *Katnal2s* (lane 1) or *Katnal2-L1+L2* (“Large”; lane 2), depicts respectively, a normalized average knockdown in silenced cells, expressed as a percentage of the normalized average control values (parental NIH 3T3 line). Error bars correspond to s.d. of three independent experiments. *L19* and *Pum1* housekeeping gene mRNA levels were used for sample normalization.
- (B1,B2) Representative WB to confirm silencing of KATNAL2 isoform proteins (B1). Concurrent detection of calnexin in the same samples was used as a loading control for sample normalization. The quantification of 3 independent experiments shown in (B2), depicting the average normalized value of KATNAL2 protein levels as a percentage of the control value (set at 100%), reveals reduction of KATNAL2 protein levels as well as reduction of interacting proteins Nubp1 and Nubp2, but not of actin.
- (C) Growth curves of clone 2.43 (blue) and parental control lines (gray) reveal a severely reduced growth rate in *Katnal2*-silenced cells. Shown are the average values \pm s.d. of three replicate cultures, each seeded with 6680 cells, grown in parallel for 96 hours in 6-well plates and sampled every 24 h.
- (D1,D2) Analysis of total cellular size (D1) and size of nucleus (D2) in clone 2.43 (blue) and parental control line (gray), revealing large increases of both total cellular and nuclear size (yellow vs. purple) due to *Katnal2* silencing. The total cell surface area and the nuclear area were measured and plotted out as a size distribution in groups ranging from 0-70,000 μm^2 (D1) or 200-3,000 μm^2 (D2).
- (E1,E2) Visualisation of the remarkable difference in cell size between control (E1) and *Katnal2*-silenced clone 2.43 (E2) in two random fields, photographed at the same magnification. Labeling for α -tub in red and for DNA in blue. Scale bars 20 μm
- (F) Cell cycle analysis of clone 2.43 and parental control line by flow cytometry, illustrating extremely statistically significant reduction of S-phase and increase of G2/M-phase cells (3 independent experiments, n=75-200 thousand events each from control and clone 2.43 silenced cells). This indicated that *Katnal2* silencing causes

1 stalling in G2/M phase, being consistent with an altered cell cycle progression
2 pattern.

- 3 (G) Quantification of the *Katnal2* silencing effect on centrosome numbers, compared to
4 the control, in a bar chart depicting the overall distribution of the number of centrioles
5 per cell in the population of silenced clone 2.43 (blue) or the control parental line
6 (gray). While most cells possess 2 centrioles, in the silenced cells supernumerary
7 centrioles can reach very high numbers (>12 per cell). Shown are the means (\pm s.d.
8 values) from three independent experiments (see also Table S6). Sample size
9 corresponded to “dataset 1” (*Materials and Methods*).

16 **FIGURE 5**

17 **shRNA-mediated silencing of *Katnal2* causes a battery of aberrant phenotypes (I)**

18 In all images, α -tub labeling is in red, γ -tub in green and DNA in blue.

- 19 (A1-A4) IF in silenced clone 2.43 shows excessive supernumerary centrioles (yellow
20 arrowheads and square) in an interphase cell. The inset in panel A2 shows the detail
21 of a cluster of amplified centrioles (contained in the yellow square) at higher
22 magnification.

- 23 (B1-B4) The presence of supernumerary centrioles in silenced cells induces the formation of
24 multipolar mitotic spindles: here a cell in prometaphase with eight centrioles and a
25 multi-polar spindle as an example.

- 26 (C1-C4) The depicted silenced cell shows mis-aligned chromosomes in the metaphase plate.
27 Scale bars 10 μ m in panels A1-A4; 3 μ m in inset of panel A2; 5 μ m in B and C series

38 **FIGURE 6**

39 **shRNA-mediated silencing of *Katnal2* causes a battery of aberrant phenotypes (II)**

- 40 (A1-A4) Aberrant cytokinesis in silenced cells: a persistent chromatin bridge (yellow
41 arrowheads) is visible between two cells with anomalous multi-lobed nuclei (pink
42 arrowheads), which are still linked through a cytoplasmic connection despite being at
43 an advanced stage of cytokinesis. Pronounced and persistent MT bundles, revealed by
44 α -tub labeling and also visible with γ -tub staining, can be observed at the midbody
45 (blue arrowheads). DNA labeling in blue. The dividing cells are unequal in size (the
46 field does not contain the entirety of the cells) and unusually shaped.

- 47 (B1-B2) Another example of aberrant cytokinesis of multicentrioled dividing cells, linked
48 with a double chromatin bridge (yellow arrowheads) and persistent and elaborate
49 MTs at the midbody (α -tub), also immunoreactive for γ -tub (blue arrowheads).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(C1-C4) An excessively overcentrioled cell (>12 centrioles) with an anomalous enlarged nucleus harboring a large hole that is traversed by a bundle of MTs (blurred in the image as they are in a different focal plane).

In all panels, cells were immunostained for α -tub (red), γ -tub (green) and counterstained for DNA (blue). Scale bars 10 μ m

FIGURE 7

Generation and characterization of stable cell lines expressing Cherry-KATNAL2-S1 or -L1: increased expression of KATNAL2 decreases the percentage of ciliated cells

(A) Confirmation by RT-PCR of the integration of mCherry-KATNAL2 constructs into the genome of IMCD cells in each case (top panel), and equivalent reactions for housekeeping gene *L19* as internal normalizing control (bottom panel). Forward oligos to *mCherry* and reverse oligos either to *mCherry* (lane 1) or an internal *Katnal2* sequence (lanes 2-5), were used to generate specific diagnostic products (oligo sequences in Table S1). From left to right: stable cell line IMCD-pmCherry-KATNAL2-S1 (lanes 1&2), IMCD-pmCherry-KATNAL2-L1 (lane 3), IMCD wild-type (neg. control 1; lane 4), IMCD-pmCherry-KATNAL2-S1 minus RT (neg. control 2; lane 5). M: size markers in kb.

(B) Confirmation by WB of expression of mCherry-KATNAL2 fusion proteins, using anti-mCherry (top panel), anti-KATNAL2 (middle panel), as well as anti-GAPDH antibody as loading control (bottom panel). From left to right: IMCD wild-type (neg. control; lane 1), stable cell line IMCD-pmCherry-KATNAL2-S1 (lane 2) and IMCD-pmCherry-KATNAL2-L1 (lane 3). In lanes 3&4, bands consistent with the appropriate size for Cherry-fusion proteins KATNAL2-S1 and -L1 are detected (red arrowheads) with expression levels comparable to the native KATNALs (all lanes).

(C-K) Series of examples to show correct localization of mCherry-KATNAL2-S1 or -L1 at interphase (C and D), mitosis (prophase in panels E1-E2 and F1-F2; prometaphase in G1-G2 and metaphase in H1-H2) as well as at the primary cilium (panels K1-K3 and magnified images of cilium in the detail). mCherry labeling in red, acetylated tubulin in green and DNA in blue. Scale bars 5 μ m; panels C, D 10 μ m; detail of K1-K3 series 2.5 μ m

(I) FACS analysis of the cell cycle profile of the three cell lines (IMCD and mCherry-KATNAL2-S1 or -L1) reveals a significant difference in the overall proportion of cells in different cell-cycle phases (G1/0, S and G2/M) in the populations expressing KATNAL2 fusions, and, in particular, a significant increase of cells in the S phase for both -S1 and -L1 cells.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- (J) Determination of the mitotic index of the Cherry fusion KATNALs shows a lowered value, compared to the control line from which they are derived: with extreme significance for -S1 cells and high significance for -L1 cells. Values shown are the means of 3 independent experiments \pm s.d. Sample size corresponded to “dataset 5” (*Materials and Methods*).
- (L) Quantification of the percentage of ciliated cells in populations of mCherry-KATNAL2-S1 (“S1”), and -L1 (“L1”), compared with corresponding control IMCD cells (“Control”). Shown are the average percentages from three independent experiments \pm s.d. values. Differences are statistically extremely significant for both -S1 and -L1. Sample size corresponded to “dataset 6” (*Materials and Methods*).

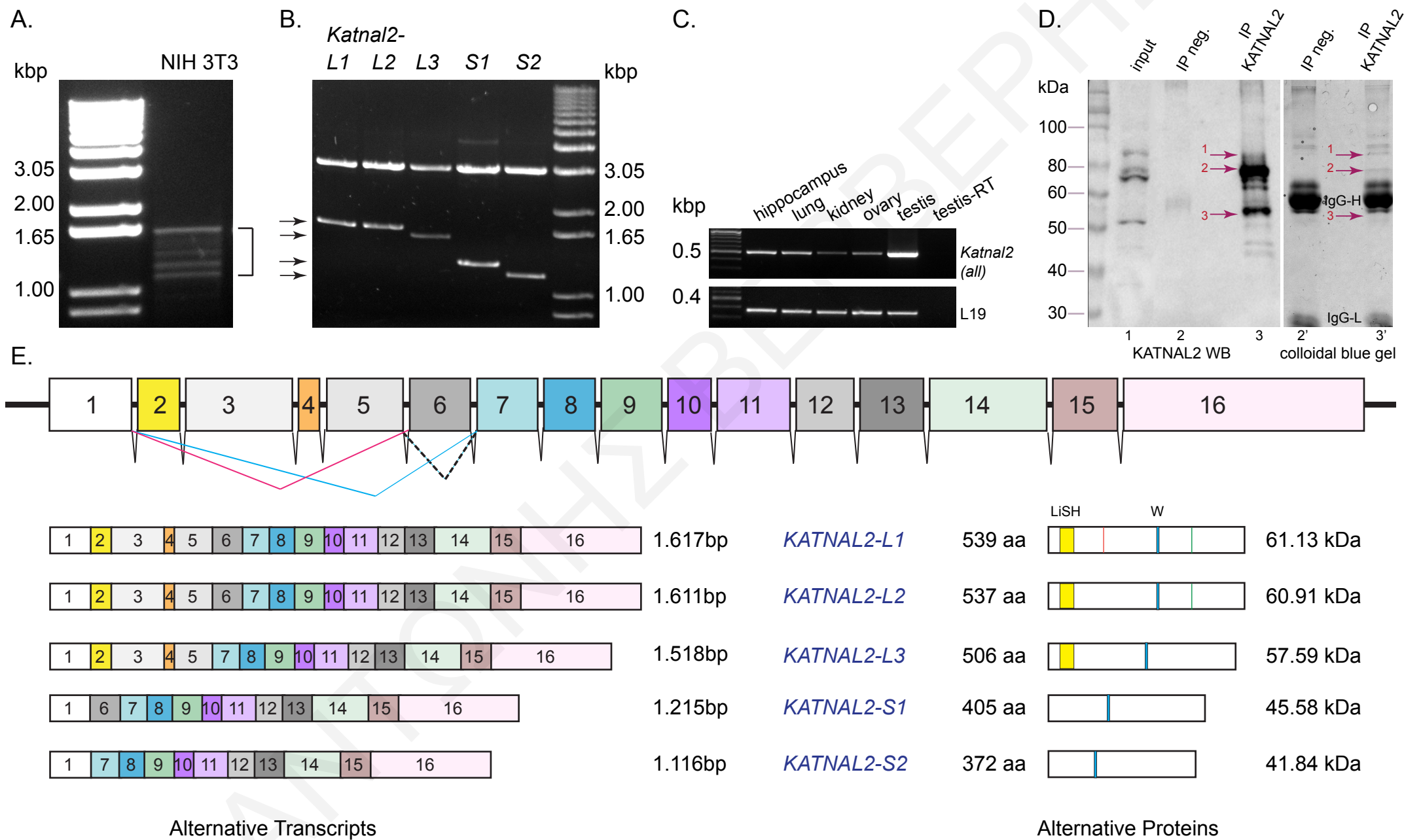


FIGURE 1

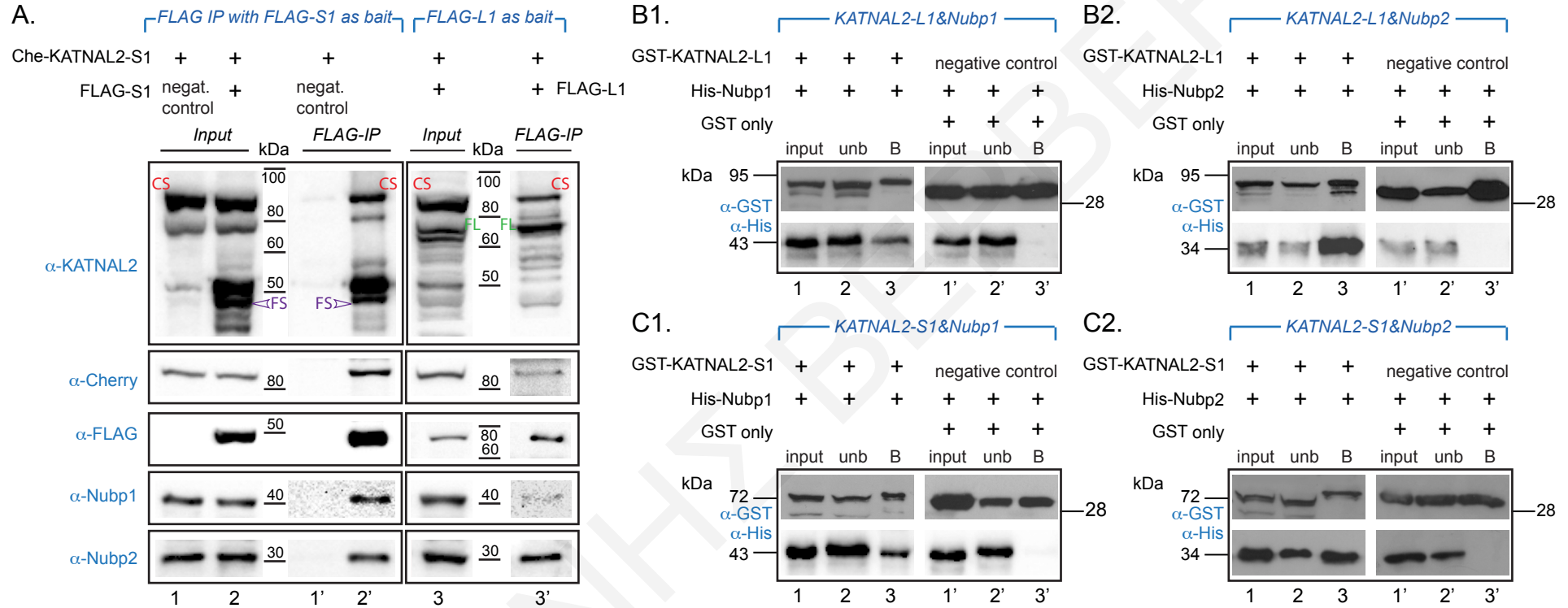


FIGURE 2

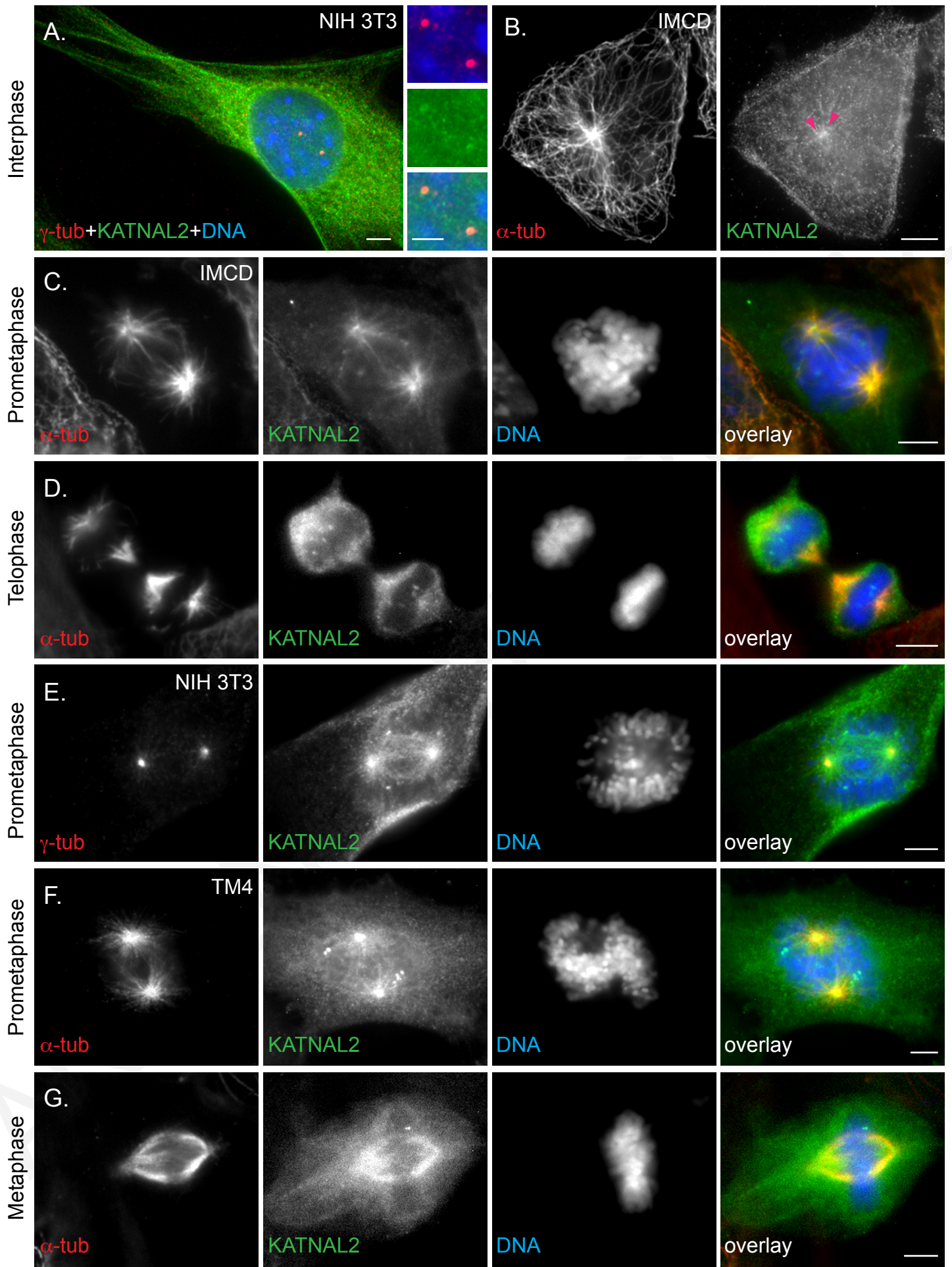
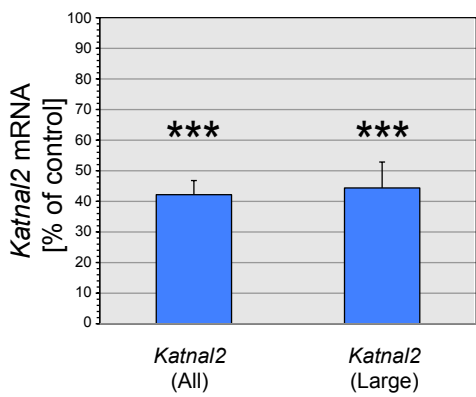
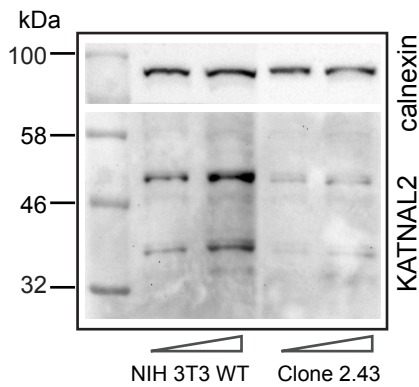


FIGURE 3

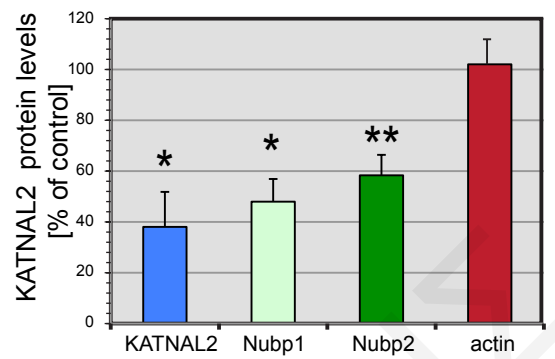
A. Real Time RT-PCR of sil. cl. 2.43



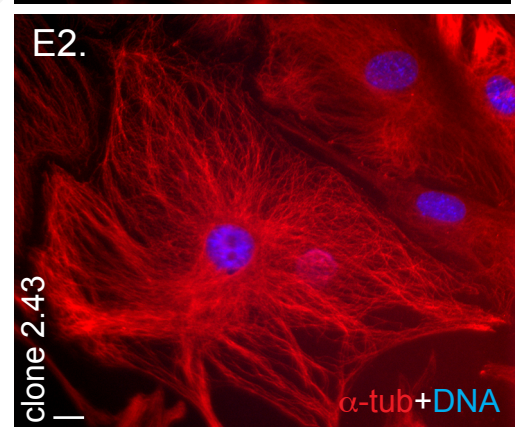
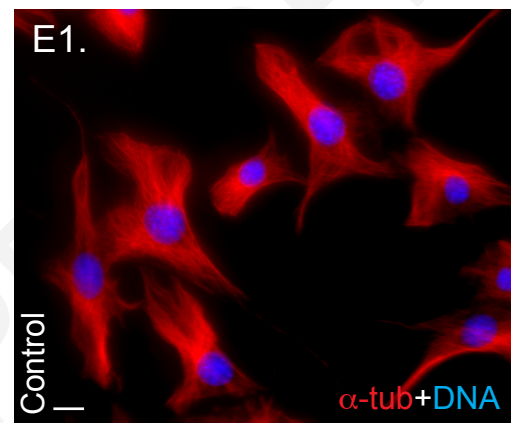
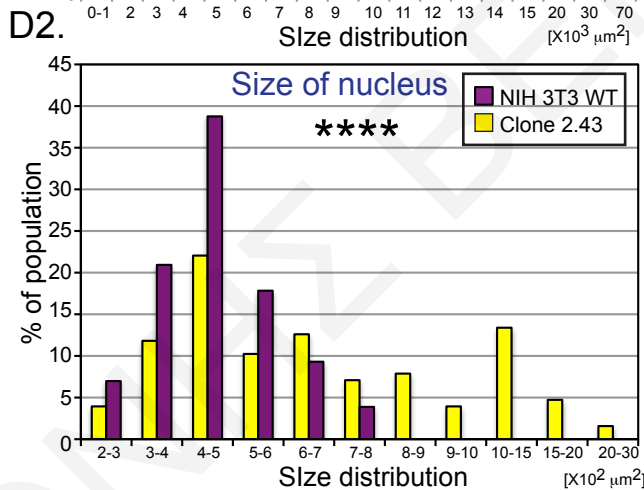
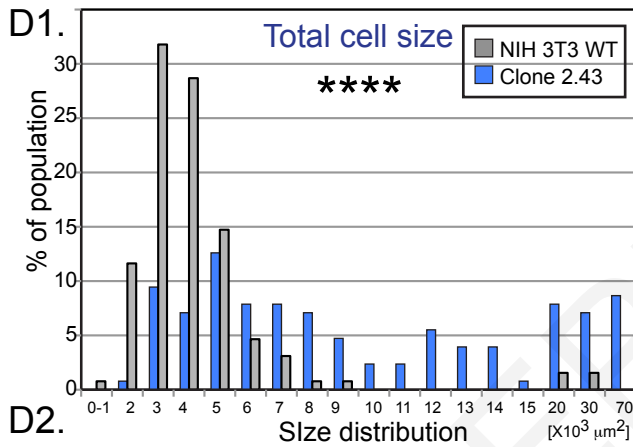
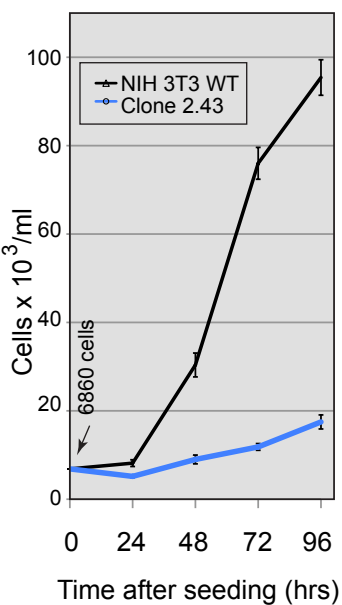
B1. Western blot of silenced clone 2.43



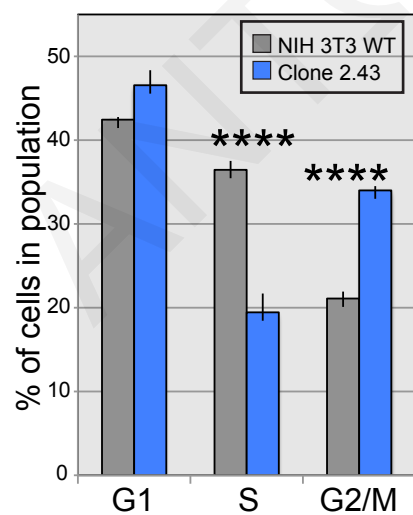
B2. Western blot of silenced clone 2.43



C. Growth curves



F. Cell cycle analysis



G. Overall distribution of centrosomes in cell population

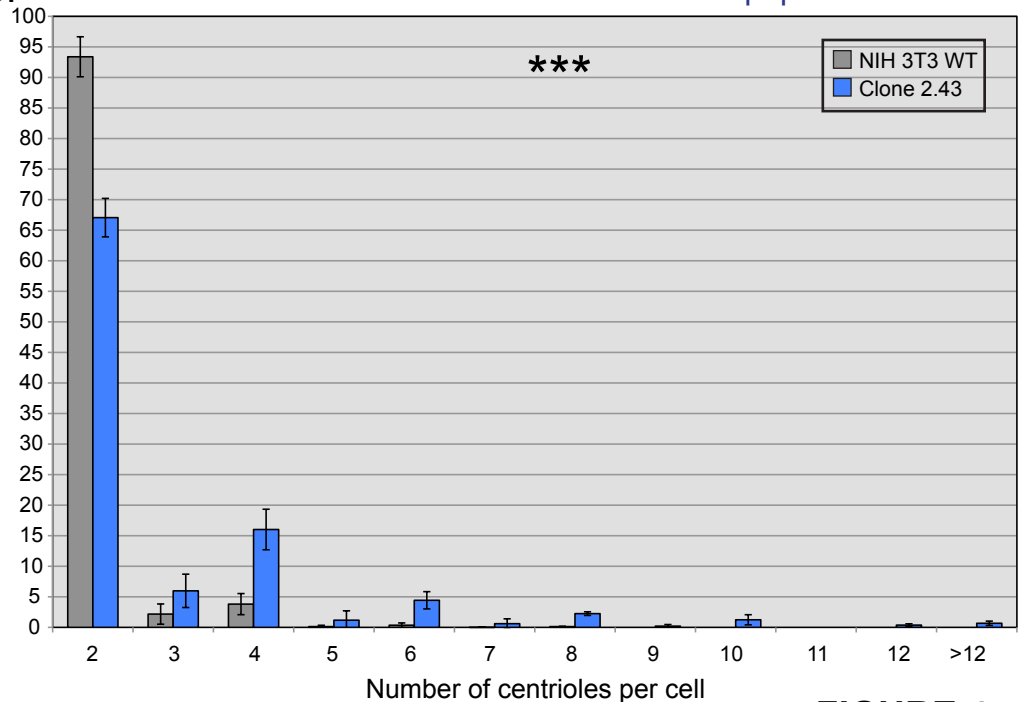


FIGURE 4

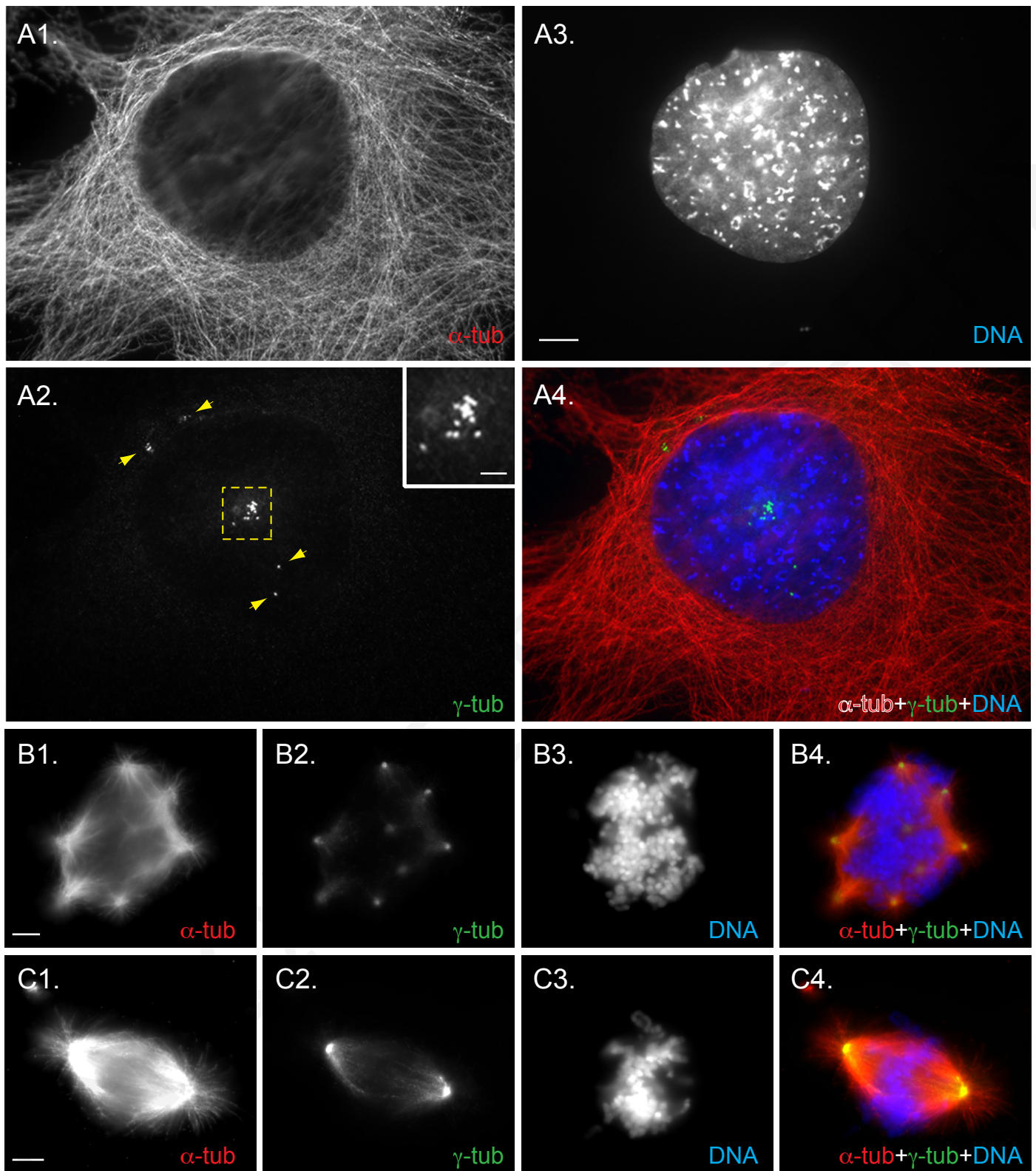


FIGURE 5

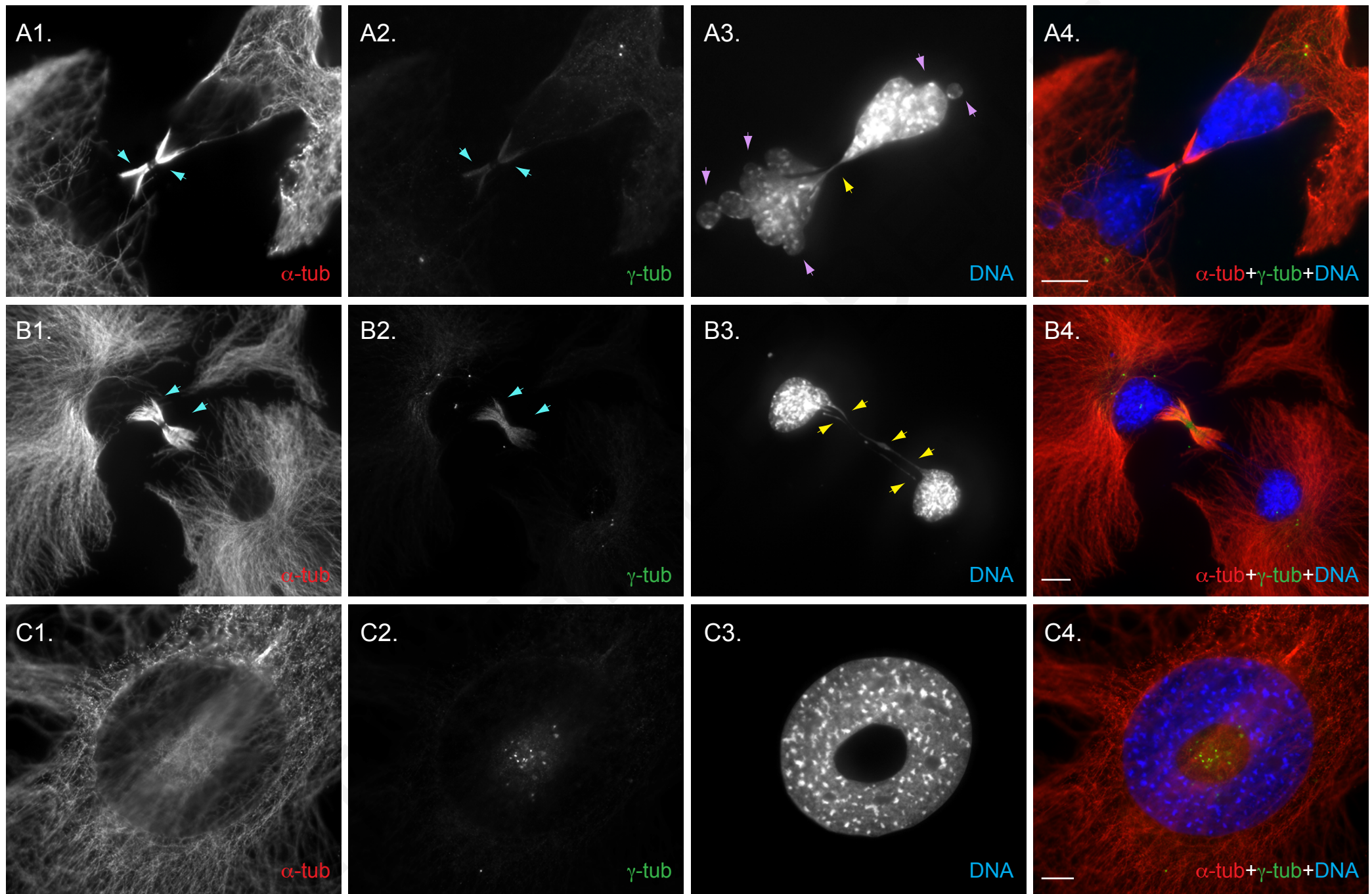


FIGURE 6

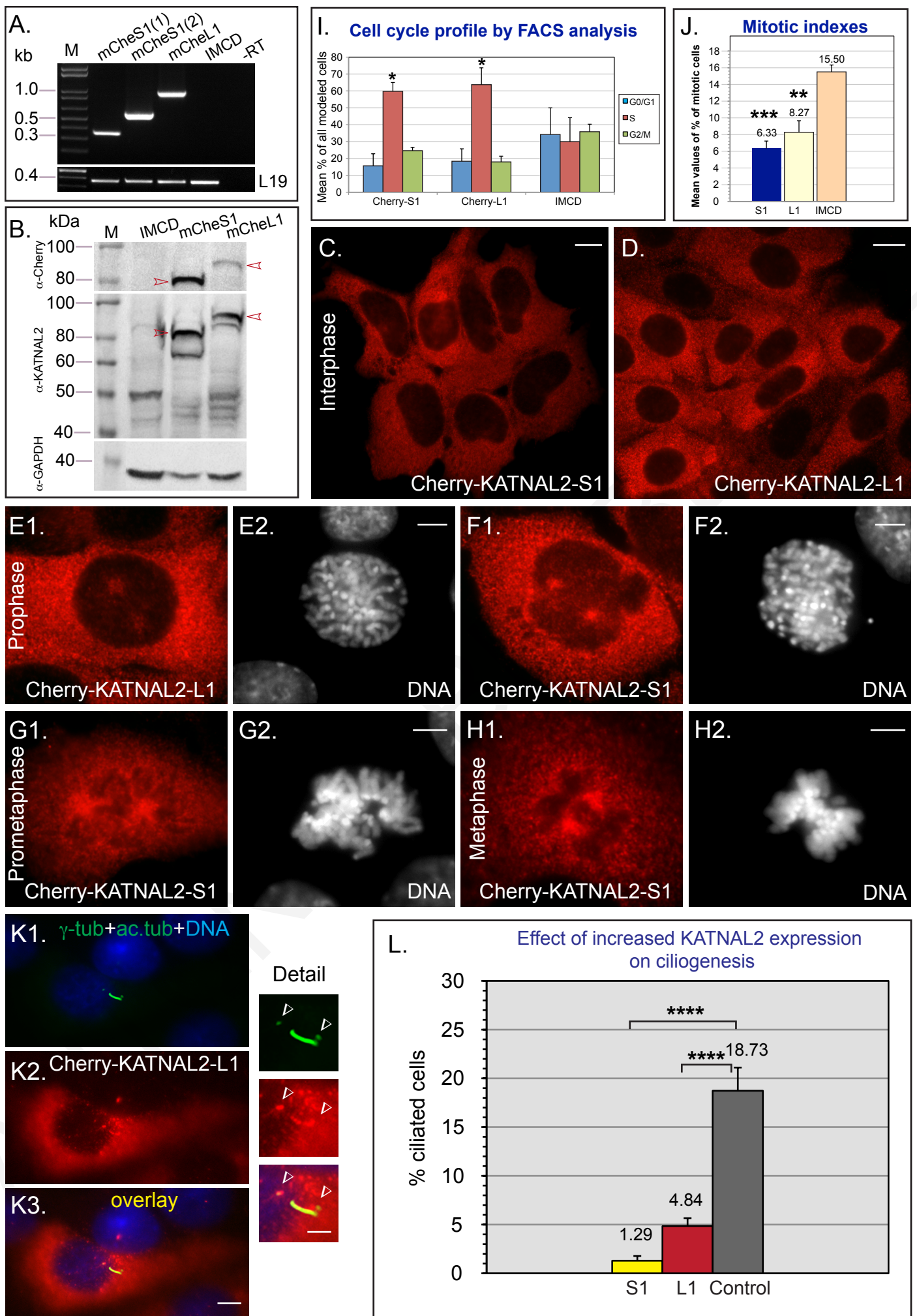


FIGURE 7

SUPPLEMENTARY SECTION

A novel family of Katanin-like 2 protein isoforms (KATNAL2), interacting with nucleotide binding proteins Nubp1 and Nubp2, are key regulators of different MT-based processes in mammalian cells

Antonis Ververis^{1‡}, Andri Christodoulou^{1‡}, Maria Christoforou¹, Christina Kamilari¹, Carsten W. Lederer² and Niovi Santama^{1*}

¹Department of Biological Sciences, University of Cyprus, Cyprus

²The Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Cyprus

[‡]These authors contributed equally to the experimental work

*Address correspondence to Niovi Santama

Department of Biological Sciences, University of Cyprus, University Avenue 1,
1678 Nicosia, Cyprus

(Tel. +357-22-892881, Fax. +357-22-350557, e-mail: santama@ucy.ac.cy)

SUPPLEMENTARY MATERIALS

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

FIGURE S1

Primary protein sequences encoded by all the *Katnal2* cDNAs identified in this work.

Protein motifs and SNPs are indicated. The sequences within the ORF that were targeted for the shRNA-mediated silencing of *Katnal2s* in clones 2.43 (yellow highlights) and 3.81 (blue highlights) are also indicated. In magenta highlight, the amino acids corresponding to the initial, partial cDNA sequence identified by a yeast two-hybrid screen is indicated.

FIGURE S2

Detection of KATNAL2 proteins in four mouse cell lines and tissue by WB.

(A,B) Anti-KATNAL2 WB of total protein extracts from the indicated mouse cell lines and from mouse testis consistently detects three main immunoreactive bands migrating in the vicinity of 50, 60 and 80 kDa (blue arrowheads). These signals correspond to the signals also obtained in the IP experiment shown in Fig. 1D, in which the three bands were excised from the gel, analyzed by MS and found positive for the existence of KATNAL2 proteins. Abbreviations: M, molecular mass markers.

FIGURE S3

Results of LC-MS/MS analysis at larger scale and of the 3 cut-out bands of Figure 1D.

(A1,A2) Shown is a larger scale KATNAL2 IP experiment starting with more material, as described in *Materials and Methods*. Proteins were visualized by SDS-PAGE followed by colloidal-blue staining (A1) and 3 broad zones (boxed), ranging, respectively, between 80-60 kDa (zones “1”), 60-50 kDa (zones “2”) and 50-45 kDa (zones “3”), were cut out from the KATNAL2-IP sample (“POS” series) or the negative control IP (“NEG” series). MS identification of the proteins contained in the 3 positive and 3 negative zones shown here is given as a list in Table S4.

(A3) WB analysis of the same samples as in A1/A2 to indicate the existence of several major and minor KATNAL2 immunoreactive bands within the 3 excised zones. KATNAL2 positive identification was obtained in all 3 zones, indicating the existence of multiple KATNAL2 isoforms in this size range specifically in the IP KATNAL2 and not in the IP neg.

(B) Aggregate sequence coverage map for KATNAL2 protein, derived from KATNAL2 signature peptides, uniquely detected in the “positive samples” (see Table S4) reveals extensive coverage, throughout the sequence and spanning both termini of the protein.

FIGURE S4

KATNAL2 localizes at the axoneme and basal body of primary cilia

(A,B) Examples of localization of KATNAL2 (green) at the axoneme and basal body (white arrowheads) of primary cilia in serum-deprived IMCD cells (A) and TM4 cells (B), showing acetylated tubulin (axonemal marker, red), DNA labeling (blue) and accompanying magnified detailed views of the cilia. The daughter centriole also shows comparable immunoreactivity (yellow arrowheads).

Scale bars 5 μm ; 1 μm in detailed views

FIGURE S5

shRNA-mediated silencing of *Katnal2* is accompanied by a pronounced increase in the acetylation of the MT network

(A1-B2) Two examples of extensive acetylation of the MT network in *Katnal2*-silenced cells of clone 2.43, as revealed by double α -tubulin (red) and acetylated tubulin labeling (green). DNA is counterstained in blue. Exposure of panel A2 for green channel was 2500 ms; for B2 5243 ms.

(C1-C2) Equivalent double staining in a wild type NIH 3T3 control cell for comparison showing relatively restricted or no acetylation of the MT network. Exposure for panel C2 is 6000 ms (that is 250% of exposure in A2 and 114.4% of exposure in B2).

Scale bars 20 μm

FIGURE S6

Characterization and phenotypes of *Katnal2*-silenced stable clone 3.81

In all images, α -tubulin labeling is in red, γ -tubulin in green and DNA in blue.

(A1-A4) IF in silenced clone 3.81 shows excessive supernumerary centrioles in an interphase cell (yellow arrowheads and square). The inset in panel A2 shows the detail of a cluster of amplified centrioles (contained in the yellow square) at higher magnification.

(B1-B4) The presence of supernumerary centrioles in silenced cells induces the formation of multipolar mitotic spindles: here, as an example, a cell in metaphase with four centrioles and a spindle with 4 poles. Scale bars 20 μm for A1-A4; 5 μm for B1-B4; 2 μm in inset of panel A2.

(C) Representative WB to confirm silencing of KATNAL2 isoform proteins. The concurrent detection of calnexin protein in the same samples was used as a loading control for sample normalization.

- (D) Quantification of the average number of centrioles per cell in *Katnal2*-silenced populations of clone 3.81 (red), compared with corresponding control-silenced populations (gray), showing the average value from three independent experiments and bars representing s.d. values. The 30% increase of the average number per cell, caused by silencing, is extremely significant (****). Sample size corresponded to “dataset 3” (*Materials and Methods*).
- (E) Quantification of the percentage of ciliated cells in *Katnal2*-silenced populations of clone 3.81 (red), compared with corresponding control-silenced populations (gray), at growth conditions (cycling cells) and after induction of ciliogenesis by serum deprivation for 24 hours (cell cycle arrest), respectively. Shown are the averages from three independent experiments and bars represent s.d. values. The reduction in the percentage of silenced ciliated cells after induction of ciliogenesis by serum deprivation is highly significant (**). Sample size corresponded to “dataset 4” (*Materials and Methods*).

FIGURE S7

shRNA-mediated silencing of *Katnal2* in clone 2.43 causes significant reduction of the frequency of sensory cilia in the cell population

Quantification of the percentage of ciliated cells in *Katnal2*-silenced populations of clone 2.43 (blue), compared with corresponding control-silenced populations (gray), at growth conditions (cycling cells) and after induction of ciliogenesis by serum deprivation for 24 hours (cell cycle arrest). Shown are the averages from three independent experiments and bars represent s.d. values. The reduction in the percentage of silenced ciliated cells after induction of ciliogenesis by serum deprivation is highly significant (**). Sample size corresponded to “dataset 2” (*Materials and Methods*).

FIGURE S8

Transient overexpression of KATNAL2-S1 or -L1 tagged fusions leads to cytoplasmic aggregation of the protein in mouse cells

(A-D) Representative examples of common overexpression phenotypes, resulting from transient transfections of differently tagged versions of KATNAL2-S1 or -L1, as indicated. Fluorescence corresponds to GFP emission (green, A), mCherry emission (red, B), anti-FLAG (C) and anti-myc (D) immunofluorescence (green). DNA was counterstained with Hoechst (blue). Panels A, C and D display NIH 3T3 cells and panel B is with IMCD cells.

Scale bars 10 μ m

FIGURE S9

Cell cycle analysis of IMCD stable cell lines expressing mCherry-KATNAL2-S1 and -L1, and the control line IMCD

Analysis of the distribution in mitotic subphases of the same cells as for the datasets in Fig. 7J (dataset 5 in *Materials and Methods*) reveals that it was highly significantly different between cell populations ($p=0.0011$). Additionally, for -S1 cells, compared to wild-type cells, it revealed significant ($p=0.0122$) and extremely significant ($p=0.0006$) differences for telophase and prophase percentages in particular.

SUPPLEMENTARY TABLE LEGENDS

TABLE S1

List of oligonucleotides for the generation of plasmid constructs and diagnostic PCRs. Details of the cloning strategy for each construct and PCR purpose and specificity of oligo sets are included.

TABLE S2

Detailed list of primary and secondary antibodies used in this work, additional to those listed in the “Antibodies” section of *Materials and Methods*.

TABLE S3

Identification of proteins contained in KATNAL2 immunoprecipitates from mouse testis (bands 1-3 in Fig. 1D) by LC-MS/MS.

In all three samples, the major component by far is several signature peptides for mouse KATNAL2 (yellow highlights), providing its positive identification.

For compiling this processed table, the original, somewhat larger, list of proteins (available upon request) was filtered to include only proteins that are unique (i.e. absent from the negative control experiment at larger scale, presented in Table S4). Additional negative controls included a band equivalent to band 3 (Fig. 1D) that was cut out from the negative control sample, only yielding a low count (2-4 peptides) of various keratins which also appeared in the KATNAL2 sample with the same frequency and was filtered out of the analysis as noise/contamination. The specific heat shock proteins listed here are absent from the negative controls in Table S4. Nevertheless, their presence (and potential as KATNAL2 interactors) should be evaluated with some caution as several other heat shock proteins had come up both in the test and negative controls of this experiment as well as the larger scale experiment in Table S4, and were thus filtered out as non-specific.

TABLE S4

Identification of proteins contained in KATNAL2 immunoprecipitates from mouse testis (“positive”) and corresponding negative controls (“negative”) (NEG1–NEG3 & POS1–POS3 zones in Fig. S3 A2) by LC-MS/MS.

The results per zone for the 3 positive samples and, correspondingly, for the 3 negative samples (full set available upon request) were pooled together for simplicity in this summary table. Similar to the smaller-scale experiment shown in Table S3, in all three samples, the major component was a high number of signature peptides for mouse KATNAL2 (yellow

highlights). In the negative samples, zero KATNAL2 peptides were identified, proving the high specificity of the KATNAL2 antibody and the IP reaction.

For compiling this processed table, in addition to pooling the positive or negative results, the original, much larger list of proteins was filtered more stringently to include (a) proteins that are represented by at least 3 signature peptides, (b) only proteins that are unique (i.e. completely absent from the negative control experiment). An exception to the second criterion was made for some heat shock proteins (green highlights), which were highly represented but were also present (albeit with reduced coverage) in the negative controls. Their putative interaction with KATNALs should hence be evaluated with caution (see also Table S3 and its legend).

TABLE S5

Effect of silencing of *Katnal2* in mitotic clone 2.43 cells.

The mitotic index of silenced cells is reduced 4.5 fold in silenced clone 2.43 cells, compared to control cells ($p=0.00018$). The overall distribution of cells in distinct subphases of mitosis is significantly different in silenced compared to control cells ($p=0.0011$). Sample size corresponded to “dataset 1” (*Materials and Methods*).

TABLE S6

Effect of *Katnal2* silencing (clone 2.43) on number of centrioles

The overall distribution of centrioles per cell is significantly different in silenced from control cells ($p<0.0001$). The average percentage of cells with more than 2 centrioles is extremely significantly higher in silenced than in control cells ($p=0.00056$), as is the average number of centrioles per cell ($p=0.00026$). Values represent results from 3 independent experiments and are accompanied by standard deviation (s.d.). Sample size corresponded to “dataset 1” (*Materials and Methods*).

TABLE S7

Effect of *Katnal2* silencing (clone 3.81) on number of centrioles

The overall distribution of centrioles per cell is significantly different in silenced from control cells ($p<0.0001$). The average percentage of cells with more than 2 centrioles is significantly higher in silenced than in control cells ($p=1.18\times 10^{-6}$). The average number of centrioles per cell is significantly higher in silenced than in control cells ($p=1.09\times 10^{-5}$). Values represent results from 3 independent experiments and are accompanied by standard deviation (s.d.). Sample size corresponded to “dataset 3” (*Materials and Methods*).

SUPPLEMENTARY MOVIE LEGENDS

MOVIE S1

A very large, binucleated *Katnal2*-silenced cell (clone 2.43) is struggling to complete mitosis with what appears like a multipolar spindle (observe multiple MT asters). At the end of the sequence, no cytokinesis has been achieved and the nuclear mass consists of multiple, irregularly shaped multi-lobed fragments. The movie is composed of 87 frames, acquired at 7 min intervals (total time=10.15 hours).

MOVIE S2

Mitosis without cytokinesis in silenced clone 2.43

A large *Katnal2*-silenced cell (clone 2.43) with a large nucleus undergoes mitosis (chromosome alignment on the metaphase plate is discernible) without the formation of a complete ingression furrow and fails cytokinesis, resulting in one binuclear cell. The movie is composed of 120 frames, acquired at 7 min intervals (total time=14 hours).

MOVIE S3

Failure of cytokinesis and re-fusion of mitotic cells in silenced clone 2.43

A *Katnal2*-silenced cell (clone 2.43) undergoes mitosis and cytokinesis, which is almost complete. However, at the end of the sequence the two almost totally separated daughter cells fuse again by re-extending cytoplasmic bridges and become a single binuclear cell. Note a long MT bundle, which appears to be pulling the separated cells back towards each other and causing their re-fusion. The movie is composed of 90 frames, acquired at 7 min intervals (total time=10.5 hours).

MOVIE S4

Post-mitotic cells remain joined via a cytoplasmic bridge in silenced clone 2.43

A cell undergoes mitotic division and cytokinesis. However, the daughter cells remain attached via a persistent cytoplasmic flexible narrow bridge (possibly containing MT fibers). The movie is composed of 80 frames, acquired at 7 min intervals (total time=9.33 hours), the bridge appears in the movie for 3.26 hours and persists beyond the duration of the movie.

MOVIE S5

Unequal cytokinesis in silenced clone 2.43

A cell with an enlarged nucleus (likely polyploid; at the top right corner of the frame at the beginning of the sequence) undergoes mitosis and unequal cytokinesis, resulting in a visibly binuclear large cell (right) and a miniscule cell with a small nucleus (left). The movie is composed of 115 frames, acquired at 7 min intervals (total time=13.42 hours).

Isoform Katnal2-L1 (mass 61134.11 Da)

MELSYQTLKLTHQAREAAYEMRTEARRKNLLILILHYLTQEGYMDAAKALEEETKLGRRFE
VCDNVDLETILMEYESYFVKFQKYPKVVKKAPDPVENNLPSSRSGGKNKRLTNDSCQNLPKICH
QKSRPKTSAVKTGDTKSVKEHLKQVKESVTDQAESTDFGLNISKIHKDQPEEKAQPRRGQIIDF
RGLLSDAIKGATSEFALNTFECNPDPSERLLKPLSAFIGMNSEMRELA AVVS **RDIYLHN**PNIKWN
DIIGLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLY **GPPGTGKT**LLAKAVATECKTTFFNIS
ASTIVSKWRGDSEKLV RVLFELARYHAPSTIFLDELESVMSQRGMVPGGEHEGS **LRMKTEL**LVQ
MDGLA **H**SEDLV FVLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRILVDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALE
LHTQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMRPVRKIFSVLENNQSESNNLPGIQLDVTVTQDFL
DVL AHTKPSAKNLTERYLAWQEFESV

Isoform Katnal2-L2 (mass 60906.80Da)

MELSYQTLKLTHQAREAAYEMRTEARRKNLLILILHYLTQEGYMDAAKALEEETKLGRRFE
VCDNVDLETILMEYESYFVKFQKYPKVVKKAPDPVENNLPSSRSGGKNKRLTNDSCQNLPKICH
QKSRPKTSAVKTGDTKSVKEHLKQESVTDQAESTDFGLNISKIHKDQPEEKAQPRRGQIIDFRG
LLSDAIK GATSEFALNTFECNPDPSERLLKPLSAFIGMNSEMRELA AVVS **RDIYLHN**PNIKWNDII
GLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLY **GPPGTGKT**LLAKAVATECKTTFFNISAS
TIVSKWRGDSEKLV RVLFELARYHAPSTIFLDELESVMSQRGMVPGGEHEGS **LRMKTEL**LVQMD
GLA **H**SEDLV FVLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRILVDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALELH
TQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMRPVRKIFSVLENNQSESNNLPGIQLDVTVTQDFLDV
LAHTKPSAKNLTERYLAWQEFESV

Isoform Katnal2-L3 (mass 57.555Da)

MELSYQTLKLTHQAREAAYEMRTEARRKNLLILILHYLTQEGYMDAAKALEEETKLGRRFE
VCDNVDLETILMEYESYFVKFQKYPKVVKKAPDPVENNLPTRSGGKNKRLTNDSCQNLPKICH
QKARPKTSAVKTGDTISVKEHLKQVKESVTDQAESTDLGLNISKIHKDQPEEKAQPRRERLLKP
LSAFIGMNSEMRELA AVVS **RDIYLHN**PNIKWNDIIIGLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPW
KGLLLY **GPPGTGKT**LLAKAVATECKTTFFNISASTIVSKWRGDSEKLV RVLFELARYHAPSTIFL
DELESVMSQRGMVPGGEHEGS **LRMKTEL**LVQMDGLA **R**SEDLV FVLAASNLPWELDCAMLRRL
EKRILVDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALELHTQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMR
PVRKIFSVLENNQSESNNLPGIQLDVTVTQDFLDVLAHTKPSAKNLTERYLAWQEFESV

Isoform Katnal2-S1 (mass 45577.16 Da)

MELSYQTLKLTHQAREAESVTDQAESTDFGLNISKIHKDQPEEKAQPRRGQIIDFRGLLSDAIKG
ATSEFALNTFECNPDPSERLLKPLSAFIGMNSEMRELA AVVS **RDIYLHN**PNIKWNDIIIGLDAAKQL
VKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLY **GPPGTGKT**LLAKAVATECKTTFFNISASTIVSKWRGD
SEKLV RVLFELARYHAPSTIFLDELESVMSQRGMVPGGEHEGS **LRMKTEL**LVQMDGLA **R**SEDLV
FVLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRILVDLPSQEARQAMIYHWLPPVSKNHALELHTQLEYSVLSQ
ETEGYSGSDIKLVCREAAMRPVRKIFSVLENNQSESNNLPGIQLDVTVTQDFLDVLAHTKPSAKN
LTERYLAWQEFESV

Isoform Katnal2-S2 (mass 41839.12 Da)

MELSYQTLKLTHQAREAGQIIDFRGLLSDAIKGATSEFALNTFECNPDPSERLLKPLSAFIGMNSE
MRELA AVVS **RDIYLHN**PNIKWNDIIIGLDAAKQLVKEAVVYPIRYPQLFTGILSPWKGLLLY **GPPG
TGKT**LLAKAVATECKTTFFNISASTIVSKWRGDSEKLV RVLFELARYHAPSTIFLDELESVMSQR
GMVPGGEHEGS **LRMKTEL**LVQMDGLA **R**SEDLV FVLAASNLPWELDCAMLRRLLEKRILVDLPSQ
EARQAMIYHWLPPVSKNHALELHTQLEYSVLSQETEGYSGSDIKLVCREAAMRPVRKIFSVLEN
NQSESNNLPGIQLDVTVTQDFLDVLAHTKPSAKNLTERYLAWQEFESV

Green font: LISH domain

Red font: SNPs

Blue font: Walker motif

Yellow and blue highlights: (protein sequences of) targeted areas in shRNA-mediated silencing of clone 2.43 and 3.81, respectively

FIGURE S1

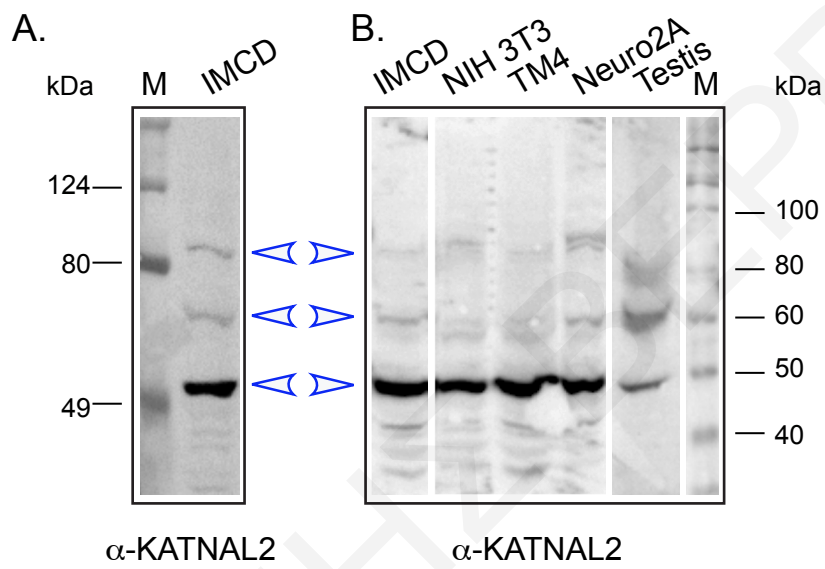


FIGURE S2

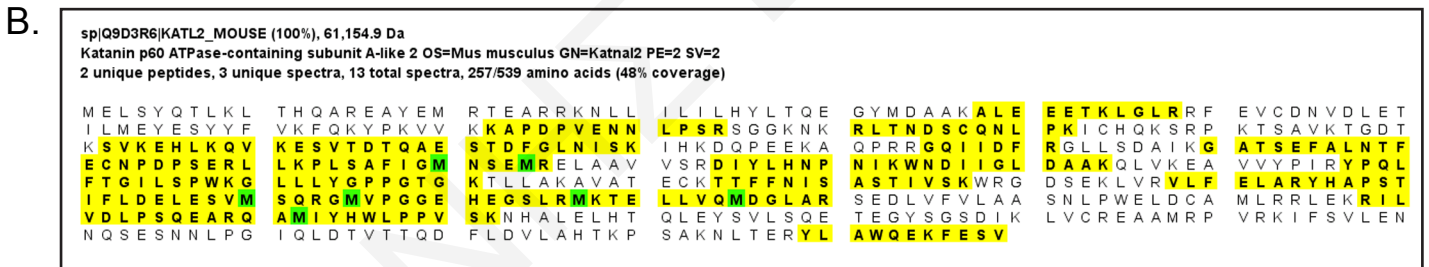
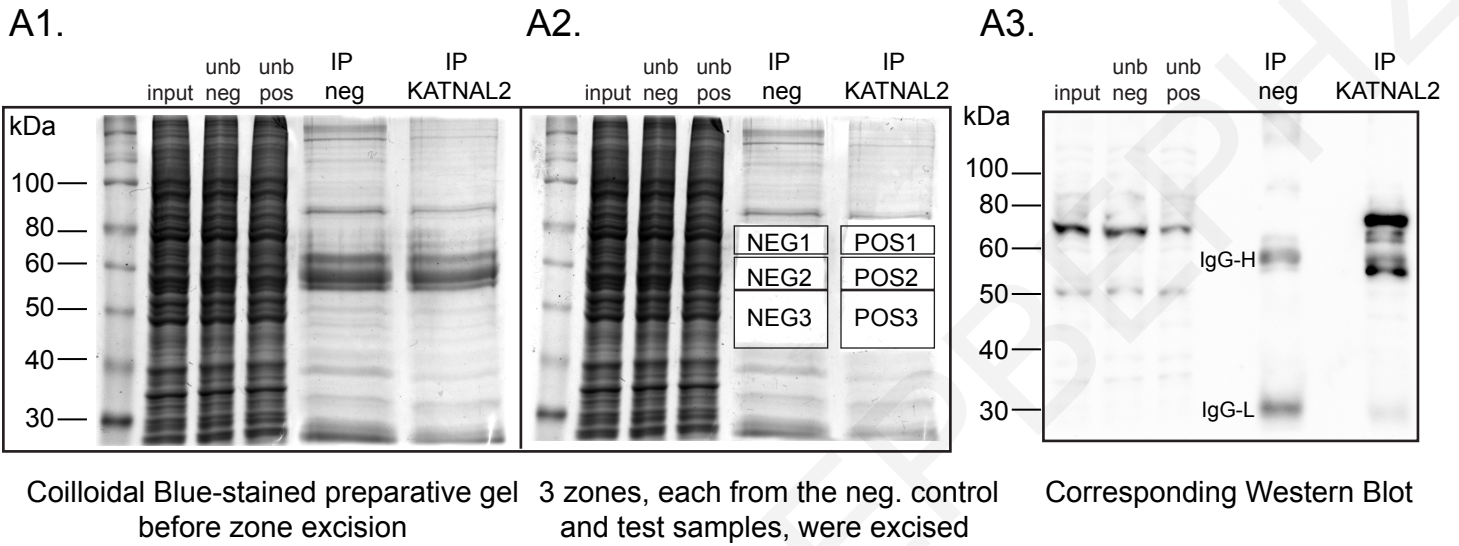


FIGURE S3

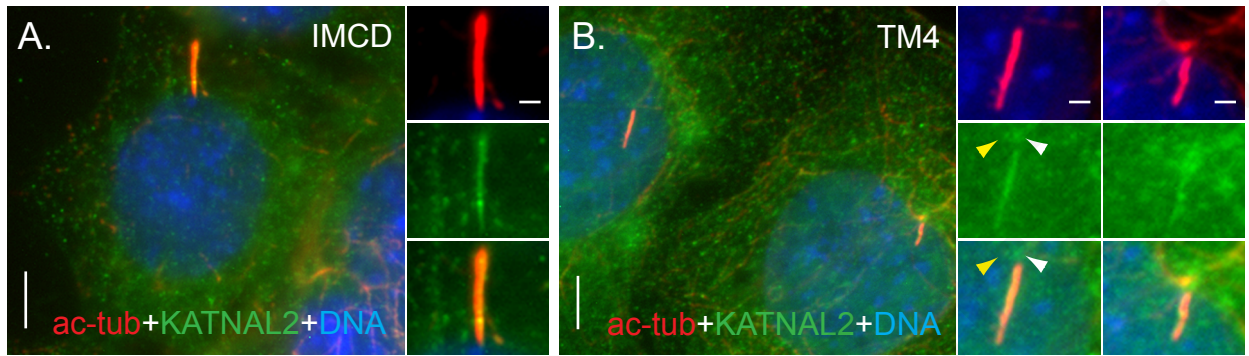


FIGURE S4

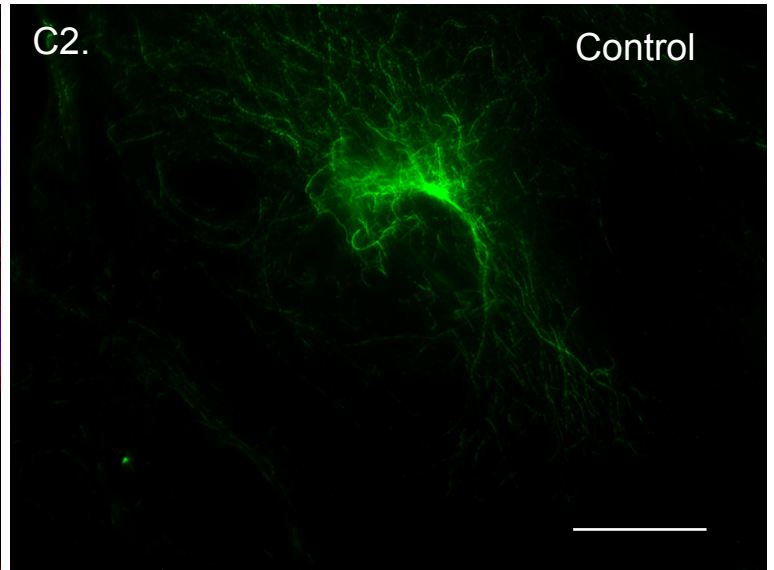
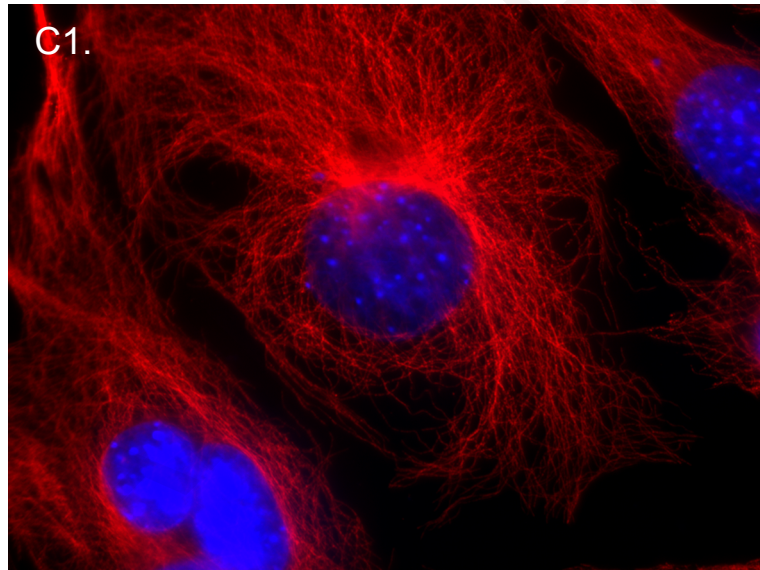
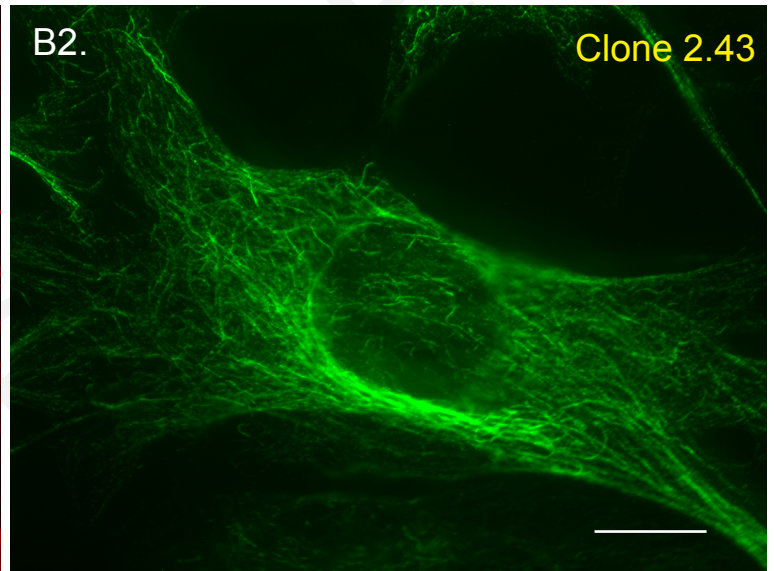
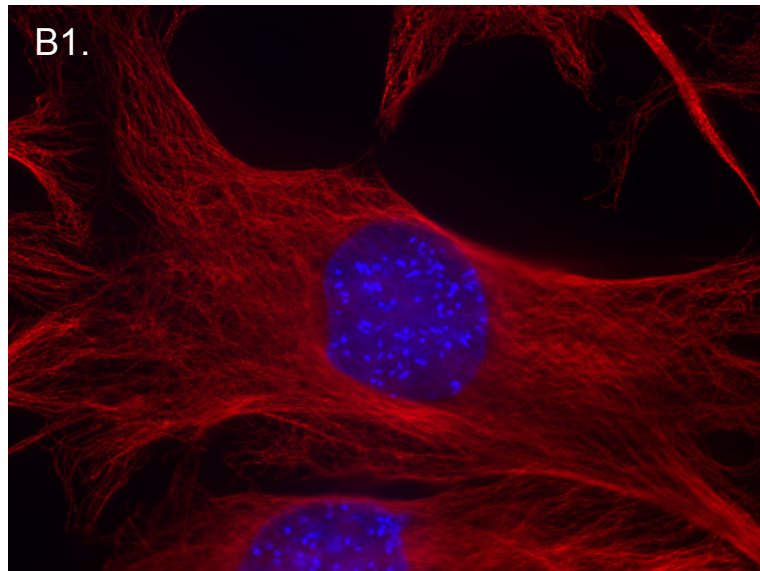
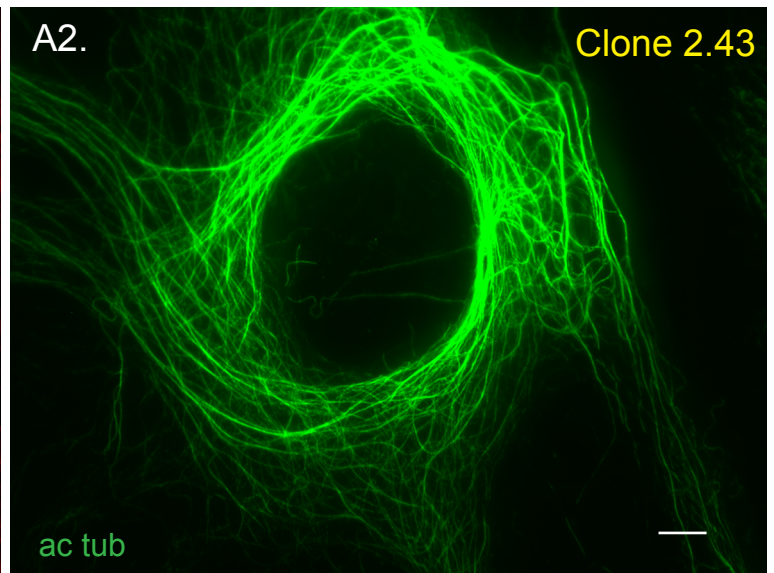
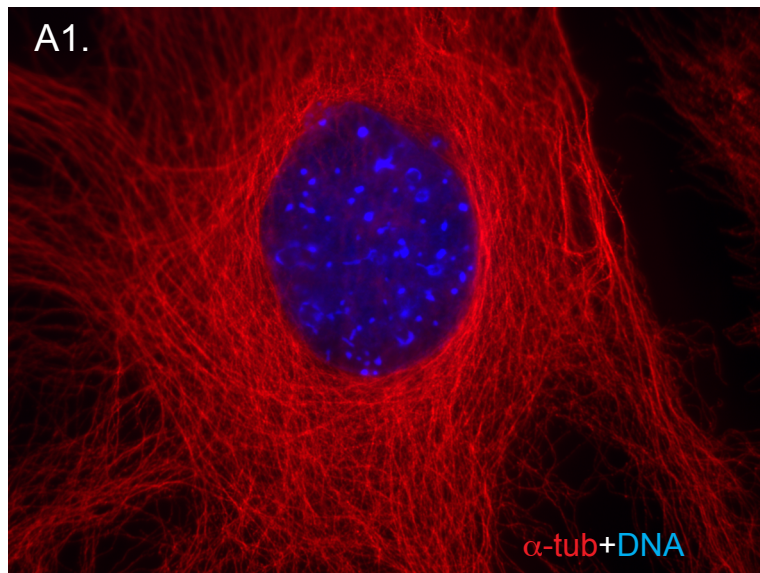


FIGURE S5

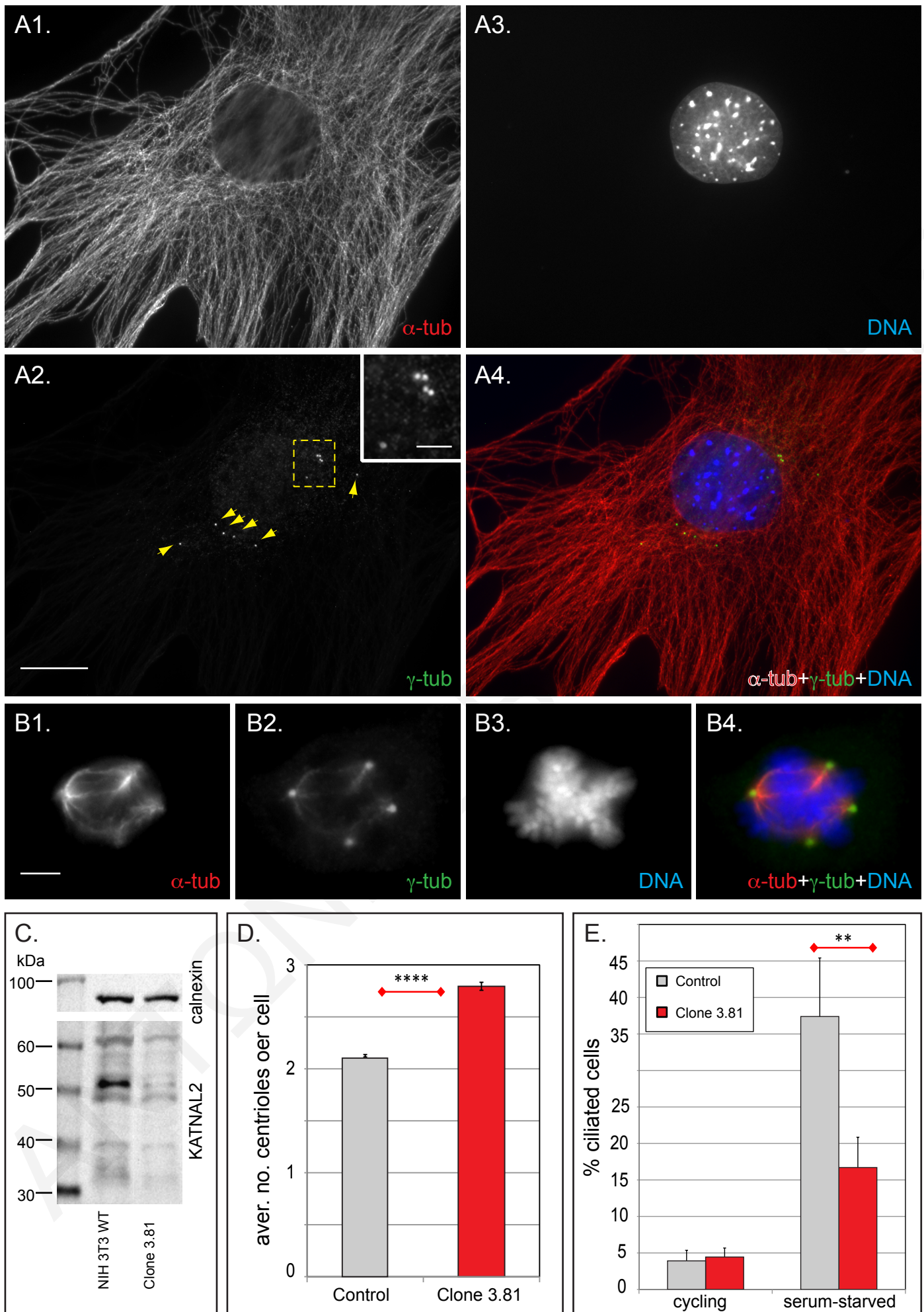


FIGURE S6

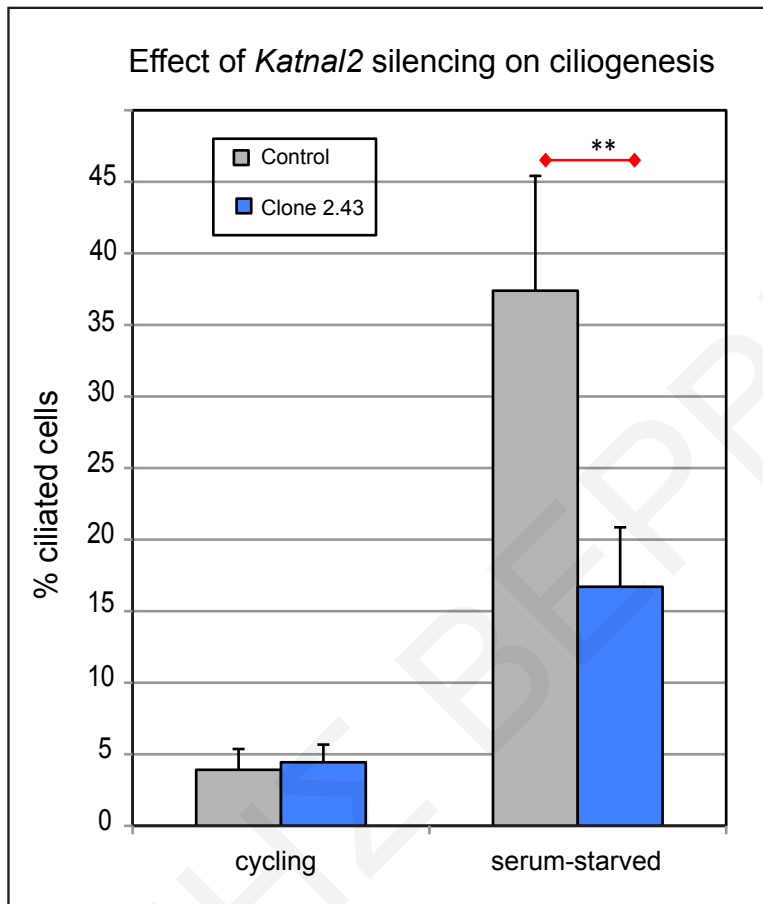


FIGURE S7

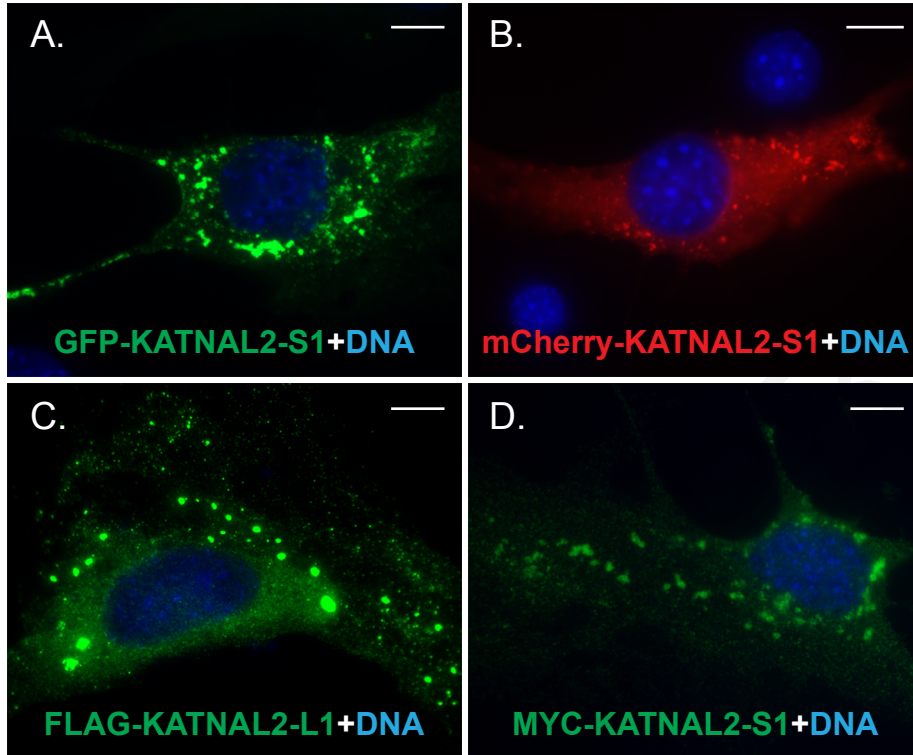


FIGURE S8

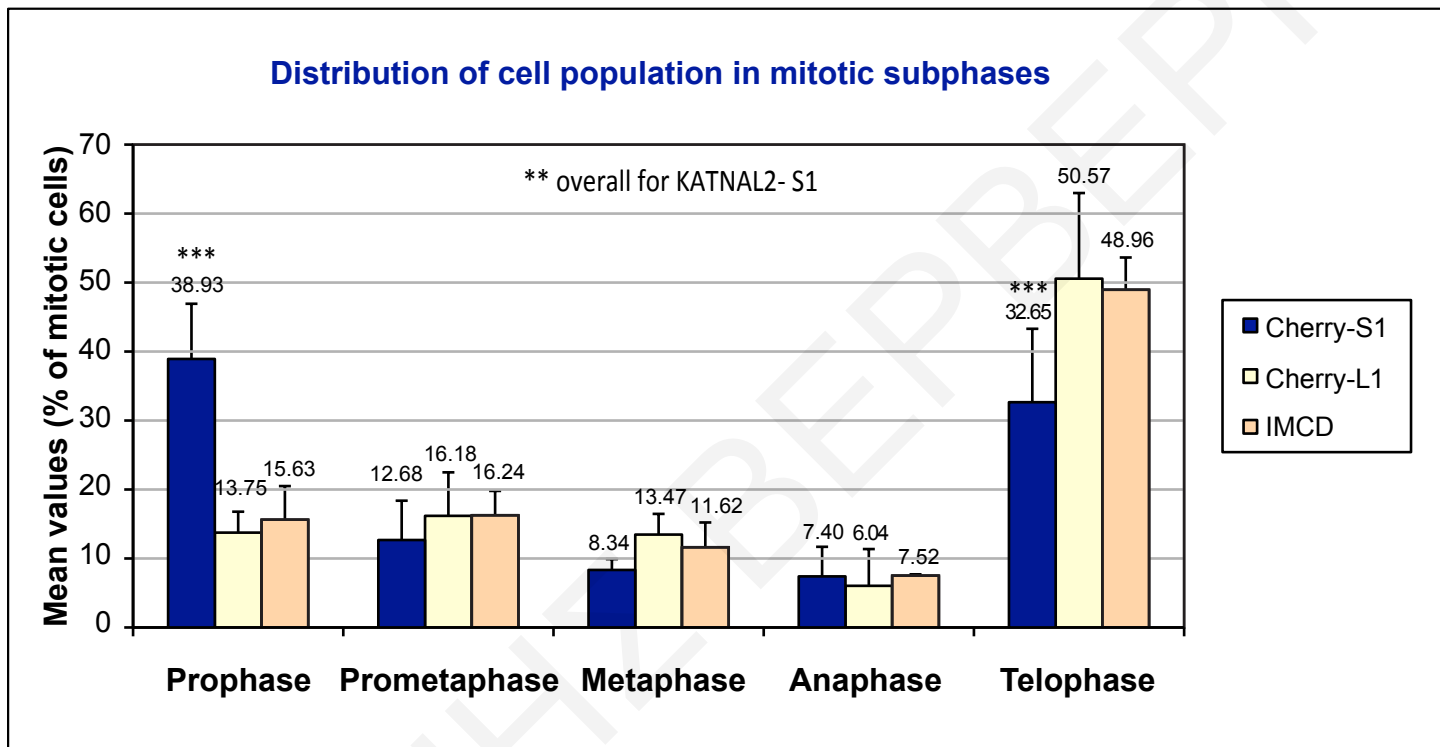


FIGURE S9

TABLE S1

NAME	OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES	PURPOSE OR CONSTRUCT
SET1	atggagctttctaccagactctca (F) tacagactcaaacctctcttggccag (R)	For the amplification of the full-length ORF of mouse <i>Katnal2</i> cDNAs and cloning into vectors pGEM-T easy or pCRII-TOPO (Fig. 1A).
SET2	cgcccgggaatggagctttctaccagact (F) gcctcgaggtatacagactcaaacctctcttggcc (R)	For cloning of full-length <i>Katnal2-S1</i> and <i>L1</i> into vectors pGEX-4T-1 and pSVmyc1.0 (Santama <i>et al.</i> , 1998) as an <i>XmaI</i> (<i>SmaI</i>)/ <i>XhoI</i> in-frame fragment (Fig. 2, Fig. S8).
SET3	cgctcgagcatggagctttctaccagactctcaaac (F) cgggtaccttatacagactcaaacctctcttggccag (R)	For cloning of full-length <i>Katnal2-S1</i> and <i>L1</i> into vectors pRSET _B , and pEGFP-C2 as an <i>XhoI/KpnI</i> in-frame fragment (Fig. S8).
SET4	cgcgcgccgccatggagctttctaccagactc (F) gctctagattatacagactcaaacctctcttggcagg (R)	For cloning of full-length <i>Katnal2-S1</i> and <i>L1</i> into vector pFLAG-CMV-2 as a <i>NotI/XbaI</i> in-frame fragment. <i>Katnal2</i> cDNAs were excised as <i>HindIII/SmaI</i> fragments for subsequent in-frame subcloning into vector mCherry-C3 (Fig. S8 and Fig. 7).
SET5	tggtgagccgggacattatc (F) cagtcacgtcccatggca (R)	For a diagnostic RT-PCR, resulting in a 508 bp product, common to all <i>Katnal2</i> isoforms (Fig. 1C).
SET6a	ggacggcgagttcatctaca (F) ttgtacagctcgtccatgcc (R)	For the amplification of a diagnostic product of 351 bp within the mCherry ORF (Fig. 7A)
SET6b	ggacggcgagttcatctaca (F) cgctgagagcagtcctcggca (R)	For the amplification of a diagnostic product of 560 bp (mCherryKATNAL-S1) and a product of 962 bp (mCherryKATNAL-L1). These products span the mCherry/ KATNAL2 junction in the fusion cDNA (Fig. 7A).
SET7a	catccgcaagcctgtgactg (F) ggcgcttctgtgcttccttg (R)	For the amplification of a diagnostic fragment of 368 bp of mouse ribosomal protein L19 transcript, serving as a reference internal control and normalizing sample in RT-qPCR (Fig. 4A).
SET7b	tgaggtgtgcaccatgaac (F) cagaatgtgcttgccatagg (R)	For the amplification of a diagnostic fragment of 187 bp of mouse pumilio homolog 1 transcript variant 2 (PUM1), serving as a second reference internal control and normalizing sample in RT-qPCR (Fig. 4A).
SET8a	tggtgagccgggacattatc (F) gcttctttgactagctgcttgg (R)	For the amplification of a diagnostic fragment of 91 bp, common to all <i>katnal2</i> isoforms, by RT-qPCR, following shRNA-mediated silencing, in order to assess silencing efficiency (Fig. 4A).
SET8b	cacaagaaggctacatggatgc (F) cctccactcgtgacggtaaat (R)	For the amplification of a diagnostic fragment of 207 bp, specific to the L-type <i>katnal2</i> isoforms, by RT-qPCR, following shRNA-mediated silencing, in order to assess silencing efficiency (Fig. 4A).
SET9	caaggctgtagagagataattgga (F) cgatctcggcgaacacc (R)	For the amplification of a 1272 bp product from the shRNA-bearing cassette in vector pLKO1 by PCR of genomic DNA for genotyping confirmation of shRNA-silenced clones 2.43 and 3.81.

TABLE S2

PRIMARY ANTIBODIES (TO)	SOURCE/REFERENCE	WORKING DILUTION
α -tubulin mouse monoclonal ab (mab)	Sigma T5168	1:5000 (IF)
γ -tubulin rabbit ab	Santa Cruz sc-10732	1:50 (IF)
γ -tubulin mouse mab	Abcam GTU-88	1:50 (IF)
acetylated α -tubulin (Lys40) rabbit ab	Cell Signaling #5335	1:500 (IF)
acetylated tubulin mouse mab	Sigma T7451	1:500 (IF)
c-MYC mouse mab 9E10	Santa Cruz sc-40	1:800 (IF)
mCherry mouse mab	Clontech 632543	1:1000 (IF), 1:500 (WB)
FLAG mouse mab	Sigma F4042	1:1000 (IF&WB)
GST mouse mab	Sigma G1160	1:4000 (WB)
His (penta) mouse mab	Qiagen 34660	1:1000 (WB)
GAPDH mouse mab 6C5	Santa Cruz sc-32233	1:500 (WB)
Calnexin	Santa Cruz sc-11397	1:200 (WB)
β -actin	Sigma A1978	1:5000 (WB)
SECONDARY ANTIBODIES	SOURCE	WORKING DILUTION
AF488 donkey anti-goat IgG	Molecular Probes A11055	1:2000 (IF)
AF488 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes A11034	1:600 (IF)
AF555 donkey anti-rabbit IgG	Molecular Probes A31572	1:1000 (IF)
AF488 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes A11017	1:700 (IF)
AF555 donkey anti-mouse IgG	Molecular Probes A31570	1:1500 (IF)
HRP donkey anti-goat IgG	Santa Cruz sc-2020	1:5000 (WB)
HRP donkey anti-rabbit IgG	Santa Cruz sc-2077	1:60,000 (WB)
HRP sheep anti-mouse IgG	GE Healthcare NA931	1:8000 (WB)

TABLE S3

MS/MS View:Identified Proteins (Mus musculus)	Accession Number	Mol. Mass	Band 1	Band 2	Band 3
Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	Q9D3R6	61 kDa		23	
Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	D3Z4J2_	56 kDa	7	20	12
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	sp P63038 CH60	61 kDa		2	
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C	71 kDa	17		
Heat shock protein 1-like	A1L347	71 kDa	5		
Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C	E9Q7V6	71 kDa	4		
Cytosolic 5'-nucleotidase 1B	sp Q91YE9 5NT1B	65 kDa	6		
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	IF2B	38 kDa			2

TABLE S4

Identified Proteins (Mus musculus)	Accession Number	Molecular Mass (kDa)	POSITIVE ("POS" series of zones in Fig. S3: pooled result)	NEGATIVE ("POS" series of zones in Fig. S3: pooled result)
Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	D3Z4J2_	56	94	0
Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	Q9D3R6	61	73	0
60S ribosomal protein L7 (Fragment)	F6XI62_	33	5	0
Histone H1.1	H11	22	10	0
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	IF2B_	38	11	0
ELAV (Embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)	B1AXZ0_	38	4	0
39S ribosomal protein L39, mitochondrial	RM39_	39	8	0
Galactokinase	GALK1_	42	4	0
28S ribosomal protein S9, mitochondrial	RT09_	45	12	0
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	PSMD6_	46	4	0
Protease (Prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 5	B1ARK2_	46	4	0
Desmin	DESM_	53	10	0
Protein misato homolog 1	D3YX87_	64	4	0
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	CLPX_	69	4	0
Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSP72_	70	44	17
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	DDX41_	70	4	0
Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C	E9Q7V6_	71	9	0
Heat shock 70kD protein 5 (Glucose-regulated protein)	A2AUF6_	72	39	19
Heat shock protein 9	Q7TSZ0_	73	43	23
Pentatricopeptide repeat-containing protein 3, mitochondrial	PTCD3_	78	4	0
Plakophilin-1	PKP1_	81	7	0
Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A_	85	6	0
Treacle protein	E9PYV2_	130	4	0

shRNA	Control (NIH 3T3)	Silenced Clone 2.43
Number of cells counted	3128	2978
Number of cells in mitosis	368 (11.78±0.89% of total)	76 (2.55±0.80% of total)
of which:		
Prophase	15 (4.1% of mitotic)	2 (2.6% of mitotic)
Prometaphase	8 (2.2% of mitotic)	14 (18.4% of mitotic)
Metaphase	4 (1.1% of mitotic)	3 (3.9% of mitotic)
Anaphase	16 (4.3% of mitotic)	3 (3.9% of mitotic)
Telophase	160 (43.5% of mitotic)	22 (28.9% of mitotic)
Cytokinesis	165 (44.8% of mitotic)	32 (42.1% of mitotic)

TABLE S5

shRNA experiments	Control (NIH3T3)	Silenced Clone 2.43
	Number of cells counted (percentage \pm s.d.)	
Number of centrioles per cell (γ -tubulin foci)	3128 in total	2978 in total
2 centrioles	2921 (93.38 \pm 3.28%)	1997 (67.06 \pm 3.15%)
3 centrioles	68 (2.17 \pm 1.66%)	178 (5.98 \pm 2.73%)
4 centrioles	119 (3.80 \pm 1.73%)	477 (16.02 \pm 3.32%)
5 centrioles	4 (0.13 \pm 0.21%)	35 (1.18 \pm 1.53%)
6 centrioles	11 (0.35 \pm 0.37%)	132 (4.43 \pm 1.41%)
7 centrioles	1 (0.03 \pm 0.06%)	18 (0.6 \pm 0.79%)
8 centrioles	4 (0.13 \pm 0.06%)	67 (2.25 \pm 0.30%)
9 centrioles	-	6 (0.20 \pm 0.26%)
10 centrioles	-	37 (1.24 \pm 0.83%)
11 centrioles	-	-
12 centrioles	-	11 (0.37 \pm 0.21%)
\geq 13 centrioles	-	20 (0.67 \pm 0.35%)
Cells with multiple centrosomes (% of total\pm s.d.)	207 (6.57\pm3.27%)	981 (32.93\pm3.15%)
Average number of centrosomes per cell \pms.d	2.12\pm0.05	3.02\pm0.12

TABLE S6

shRNA experiments	Control (NIH3T3)	Silenced Clone 3.81
	Number of cells counted (percentage \pm s.d.)	
Number of centrioles per cell (γ -tubulin foci)	3007 in total	2997 in total
2 centrioles	2759 (91.75 \pm 0.30%)	2015 (67.23 \pm 0.84%)
3 centrioles	106 (3.53 \pm 0.65%)	300 (10.01 \pm 0.70%)
4 centrioles	111 (3.69 \pm 0.52%)	410 (13.68 \pm 1.15%)
5 centrioles	9 (0.30 \pm 0.20%)	62 (2.07 \pm 0.76%)
6 centrioles	10 (0.33 \pm 0.32%)	123 (4.10 \pm 1.30%)
7 centrioles	-	10 (0.33 \pm 0.32%)
8 centrioles	5 (0.17 \pm 0.06%)	51 (1.70 \pm 0.35%)
9 centrioles	1 (0.03 \pm 0.06%)	2 (0.07 \pm 0.06%)
10 centrioles	6 (0.20 \pm 0.17%)	14 (0.47 \pm 0.38%)
11 centrioles	-	-
12 centrioles	-	10 (0.33 \pm 0.15%)
Cells with multiple centrosomes (% of total (\pms.d))	248 (8.24\pm0.30%)	982 (32.76\pm0.84%)
Average number of centrosomes per cell \pms.d	2.16\pm0.01	2.79\pm0.04

TABLE S7