



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Λειτουργικός Χαρακτηρισμός της
Ανθρώπινης Πυρηνικής Πρωτεΐνης
hCINAP

ANNA ΜΑΛΕΚΚΟΥ

Ιούνιος 2011



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**Λειτουργικός Χαρακτηρισμός της
Ανθρώπινης Πυρηνικής Πρωτεΐνης
hCINAP**

ANNA ΜΑΛΕΚΚΟΥ

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

Ιούνιος 2011

ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ

Υποψήφιος Διδάκτορας: Άννα Μαλέκκου

Τίτλος Διατριβής: Λειτουργικός χαρακτηρισμός της ανθρώπινης πυρηνικής πρωτεΐνης hCINAP

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για απόκτηση Διδακτορικού Διπλώματος στο Τμήμα Βιολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κύπρου και εγκρίθηκε στις 1.6.2011 από τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ερευνητικός Σύμβουλος:

Νιόβη Σανταμά

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τμήμα Βιολογικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Κύπρου.

Εξωτερικά Μέλη

Μπογός (Παύλος) Αγιανιάν

Επίκουρος Καθηγητής
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Κυριάκος Πετράτος

Κύριος Ερευνητής
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας
Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), Κρήτης

Εσωτερικά Μέλη

Αντώνης Κυρμιζής

Επίκουρος Καθηγητής
Τμήμα Βιολογικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Κύπρου

Βασίλης Προμπονάς

Λέκτορας
Τμήμα Βιολογικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Κύπρου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα ερευνητική διδακτορική διατριβή επιζητεί τον λειτουργικό χαρακτηρισμό της νέας, μερικώς χαρακτηρισμένης ανθρώπινης πυρηνικής πρωτεΐνης, hCINAP (**human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein**). Η hCINAP πρωτοανακαλύφθηκε μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα, καθώς βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη coilin, συστατικό των σωματιδίων Cajal (CBs), ενδοπυρηνικών δομών που δρουν ως χώροι συναρμολόγησης και ωρίμανσης πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων.

Η hCINAP παρουσιάζεται φυλογενετικά συντηρημένη στα κύρια ευκαρυωτικά φύλα. Αν και έχει οριστεί ως αδενυλική κινάση (AK6), εμφανίζει ασυνήθιστα ευρεία εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, δομικά χαρακτηριστικά της οικογένειας των ΑΤΡασών/GΤΡασών (μοτίβα Walker A και B) και διπλή ενεργότητα ΑΚ/ΑΤΡάσης.

Παρουσιάζει διάχυτη πυρηνοπλασματική κατανομή, εξαιρετέου του πυρηνίσκου και σπανίως εντοπίζεται στα ίδια τα CBs. Υπερέκφραση της σε κύτταρα HeLa με παροδική επιμόλυνση, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των CBs/πυρήνα, υποδηλώνοντας πως η αλληλεπίδραση hCINAP-coilin επηρεάζει τη συγκρότηση των σωματιδίων αυτών.

Με βάση την υφιστάμενη γνώση, στόχος της εργασίας μου ήταν ο περαιτέρω χαρακτηρισμός της hCINAP, για τη κατανόηση του λειτουργικού ρόλου που επιτελεί στον ευκαρυωτικό πυρήνα.

Η hCINAP κωδικοποιείται ως εναλλακτικό μεταγράφημα από τον γενετικό τόπο TAF9 έχοντας κοινά τα δύο πρώτα εξόνια με τον μεταγραφικό παράγοντα TAFIID₃₂, χωρίς όμως πρωτεϊνική ομοιότητα. Τα μεταγραφήματα των TAFIID₃₂ και hCINAP, εκφράζονται σε στοιχειομετρία 1:1 σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς και κυτταροσειρές που εξετάστηκαν.

Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών hCINAP και coilin επιβεβαιώθηκε με πειράματα συν-επιλογής και η χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών, ανέδειξε τα 215 καρβοξυτελικά κατάλοιπα της coilin. Επιπλέον, επιχειρήθηκε η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που παρουσιάζουν φυσική αλληλεπίδραση με την hCINAP με δύο *in vivo* τεχνικές μαζικής σάρωσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων: α) σάρωση cDNA βιβλιοθήκης από κύτταρα *HeLa*, με χρήση του συστήματος των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα και β) συνδυαστική τεχνική SILAC/φασματοσκοπία μάζας. Αυτές αποκάλυψαν αριθμό υποψήφιων πρωτεϊνικών στόχων που επιχειρήθηκε να επιβεβαιωθούν περαιτέρω.

Κατασκευάστηκε σταθερά μετασηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP}, χαρακτηρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε σε σειρά *in vivo* πειραμάτων. Μέσω FRAP προέκυψε ότι η hCINAP διαχέεται ελεύθερα στον πυρήνα ($t_{1/2}=0.29\pm 0.03s$) και ποσοστό της ($11\%\pm 4$) είναι σταθερά προσδεσμένη. Επιπλέον, μελετήθηκε φαινοτυπικά κατά τη διάρκεια της μίτωσης με τεχνική μικροσκοπίας πραγματικού χρόνου.

Τόσο η ενδογενής hCINAP όσο και η GFP-hCINAP, μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA pol.II, ανακατανέμονται στους δακτυλίους Dark Nucleolar Caps (DNCs) γύρω από τους πυρηνίσκους, όπου συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη των παραδιάστικτων σωματιδίων, PSP1. Ο συνεντοπισμός hCINAP/PSP1 παρατηρείται επίσης σε εστίες στον πυρήνα και στους πυρηνίσκους, μετά από έκθεση των κυττάρων σε ακτινοβολία UV-C.

Τέλος, με βάση την δομή της hCINAP επιλέχθηκαν και μεταλλάχθηκαν συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα της, σημαντικά για τη δράση της ως ATPάσης (T17A και H79G). Έκφραση των μεταλλαγμάτων σε κύτταρα HeLa, είχε ως αποτέλεσμα αλλαγή του μέσου όρου του αριθμού των CBs ανά κύτταρο και δραματική αλλαγή της κατανομής του αριθμού τους στον πληθυσμό, με κύτταρα που παρουσίαζαν είτε πολύ μικρό αριθμό (0-1 CB) είτε πολύ μεγάλο αριθμό (30 CBs) ανά πυρήνα. Επίσης παρατηρήθηκε τοξικότητα και μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Τα ευρήματα εισηγούνται πιθανή εμπλοκή της hCINAP σε μονοπάτια απόκρισης μετά από κυτταρικό στρες και στον έλεγχο της συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης των CBs στους πυρήνες των ανθρώπινων κυττάρων.

Abstract

The aim of this PhD thesis was the functional characterization of a novel, partially characterised human nuclear protein, termed as hCINAP (**h**uman **C**oilin **I**nteracting **N**uclear **A**TPase **P**rotein). hCINAP was originally identified, using the yeast two-hybrid system, as a protein interacting with coilin, a marker of Cajal bodies (CB), nuclear organelles involved in the maturation of snRNPs and snoRNPs ribonucleoprotein complexes.

hCINAP is highly conserved across its full-length in all species. Although previously designated as an adenylate kinase (AK6), its unusually broad substrate specificity, structural features characteristic of ATPase/GTPase proteins (Walker A and B motifs) and ATPase activity establish it as a dual-activity AK/ATPase.

hCINAP exhibits a diffuse nucleoplasmic pattern, excluding nucleoli, with occasional concentration in CBs. Its transient overexpression in HeLa cells results in a decrease of the average number of CBs per nucleus, indicating that the functional interaction of hCINAP-coilin affects their assembly.

Based on existing knowledge, the purpose of my thesis was to further characterise the functional role of hCINAP in the eukaryotic nucleus.

The hCINAP mRNA is an alternatively spliced transcript from the *TAF9* locus, sharing the first two exons with the basal transcription factor subunit TAFIID₃₂, without having any similarities in their respective protein sequence. The TAFIID₃₂ and hCINAP transcripts are stoichiometrically expressed in a 1:1 ratio in all human tissues and cell lines examined.

The interaction between hCINAP and coilin was confirmed through *in vitro* co-selection experiments. The interacting domain was mapped within the 215 carboxy-terminal amino acids of coilin. Furthermore, the identification of additional hCINAP-interacting proteins was pursued, using two large scale *in vivo* techniques: (a) screening of a HeLa cDNA library, using the yeast two-hybrid system and (b) the combination of SILAC and mass spectrometry. These screens revealed a number of putative candidates that were further validated.

A stable cell line HeLa^{GFP-hCINAP} was constructed, characterised and used in a series of *in vivo* experiments. Using FRAP, hCINAP was shown to freely diffuse within the nucleus ($t_{1/2}=0.29\pm0.03$) with only a small fraction (11%±4) binding to nuclear structures. The dynamic protein cycle was also monitored with time-lapse microscopy.

Upon specific transcriptional inhibition of RNA pol.II, hCINAP or GFP-hCINAP segregates in perinucleolar Dark Nucleolar Caps (DNCs), where it co-localizes with the

Paraspeckle protein 1 (PSP1). The co-segregation of these two proteins is also observed in nuclear and nucleolar foci formed upon UV-C irradiation.

Finally, according to the solved structure of hCINAP, conserved amino acid residues, critical for its ATPase activity, were selected and point mutated (T17A and H79G). Expression of these mutants in HeLa cells resulted in the change of the mean number of CB per nucleus, as well as the dramatic change of their distribution within the population, having cells with either abnormally small (0-1 CB/cell) or high (30 CB/cell) number per nucleus. Moreover, toxicity and severe reduction of cell proliferation have been observed.

Our combined findings suggest an involvement of hCINAP in stress response signalling pathways and in the pathway controlling the assembly and disassembly of CBs in the nucleus of human cells.

ANNA MAMLEKKO

ANNA MAMLEKKOY

Στους γονείς και στο σύζυγο μου

Ευχαριστώ θερμά,

την καθηγήτρια μου Νιόβη Σανταμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε παρέχοντας μου την ευκαιρία να διεξάγω αυτή τη διδακτορική Διατριβή. Η συνεχής καθοδήγηση της, η απεριόριστη και πολύτιμη βοήθεια της ήταν για μένα πολύ σημαντικά. Κοντά της είχα την ευκαιρία να γνωρίσω και να συνεργαστώ με επιστήμονες που χαίρουν διεθνούς αναγνώρισης και καταξίωσης, και να κατανοήσω το επίπεδο του επαγγελματισμού, της επικοινωνίας και της δημιουργικότητας που απαιτείται στην έρευνα, βοηθώντας με να ωριμάσω επιστημονικά.

στους μεταδιδακτορικούς συνεργάτες, Δρα Σπύρο Ζωγράφο και Δρα Carsten Laderer για την άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, την ανεκτίμητη βοήθεια τους στην εκτέλεση πειραμάτων και για τις ατελείωτες επιστημονικές συζητήσεις.

το Δρα Angus Lamond για τη φιλοξενία στο εργαστήριο του (WTB), όπου διεξάχθηκε ένα μεγάλο μέρος των πειραμάτων μου (*in vivo* πειράματα μικροσκοπίας, τεχνική SILAC/MS), καθώς και όλα τα άτομα του εργαστηρίου του για την ανεκτίμητη βοήθεια τους στην εξοικείωση μου με πρωτοποριακές τεχνικές στο χώρο της επιστήμης.

όλα τα παλιά και καινούργια μέλη του εργαστηρίου μας, ιδιαίτερα τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Δέσποινα Χαραλάμπους, Γρηγορία Χατζηγιάννη, και Αντώνη Βερβέρη και τη Δρα Έλενα Κυπρή, για το πνεύμα άριστης συνεργασίας και κατανόησης που υπήρχε όλα αυτά τα χρόνια ανάμεσά μας, τη συνεχή υποστήριξη τους και την απλόχερη βοήθεια τους όποτε χρειάστηκε.

τους γονείς μου και το σύζυγο μου για την απεριόριστη αγάπη, την κατανόηση και τη συνεχή συμπαράσταση και πολύπλευρη υποστήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

| | |
|---|-----|
| Σχήμα 1.1: Νουκλεοτιδική (μαύρο χρώμα) και αμινοξική (μπλε χρώμα) αλληλουχία της hCINAP, όπως προέκυψε από κλωνοποίηση του cDNA της, από HeLa cDNA βιβλιοθήκη..... | 2 |
| Σχήμα 1.2: Ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης hCINAP ως προς το ATP..... | 3 |
| Σχήμα 1.3: Διάγραμμα της δομής της πρωτεΐνης hCINAP..... | 6 |
| Σχήμα 1.4: Απεικόνιση του δικτύου των υδρογονοδεσμών που σχηματίζει το ADP με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης και με τα μόρια του ύδατος..... | 9 |
| Σχήμα 1.5: Απεικόνιση του δικτύου δεσμών που σχηματίζονται στο σύμπλοκο hCINAP-Mg ²⁺ ADP-PO ₄ ³⁻ | 10 |
| Σχήμα 1.6: Απεικόνιση της δομής της hCINAP σε σύγκριση με τις άλλες αδενυλικές κινάσες..... | 11 |
| Σχήμα 1.7: Μοντέλο δομικού μηχανισμού μετάβασης της hCINAP μεταξύ των ενεργοτήτων ATPάσης και AK..... | 13 |
| Σχήμα 1.8: Cajal bodies..... | 16 |
| Σχήμα 1.9: Το μονοπάτι βιογένεσης των μικρών πυρηνικών ριβονουκλεο-πρωτεϊνών (snRNPs)..... | 21 |
| Σχήμα 1.10: Διαγραμματικό μοντέλο που παρουσιάζει το εύρος των πιθανών λειτουργιών των CBs..... | 24 |
| Σχήμα 1.11: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP (εικόνες A1 και B1) και υπερέκφραση της myc-hCINAP (εικόνα C2) σε κύτταρα HeLa..... | 30 |
| Σχήμα 2.1: Αναπαράσταση σταδίων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) | 74 |
| Σχήμα 2.2: Αναπαράσταση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε κατά τη μέθοδο της μεταλλαξογένεσης | 82 |
| Σχήμα 3.1: Διαγνωστικές αντιδράσεις PCR με χρήση πλασμιδιακού DNA (20 ng) για τα cDNA της hCINAP ή της TAFIID ₃₂ | 276 |
| Σχήμα 3.2: Έκφραση των μεταγραφημάτων των ισομορφών hCINAP και TAFIID ₃₂ | 137 |
| Σχήμα 3.3: Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών hCINAP και coilin..... | 143 |
| Σχήμα 3.4: Έκφραση των διάφορων τμημάτων της coilin ως υβρίδια με το DBD στο στέλεχος AH109..... | 145 |

| | |
|---|-----|
| Σχήμα 3.5: Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης της coilin με την hCINAP..... | 146 |
| Σχήμα 3.6: Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης της hCINAP με την coilin..... | 147 |
| Σχήμα 3.7: Πρωτεϊνική έκφραση των διάφορων τμημάτων της hCINAP στο στέλεχος σακχαρομύκητα AH109..... | 150 |
| Σχήμα 3.8: Σχηματική πορεία της συνολικής πορείας και των αποτελεσμάτων της μεθόδου των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα (Yeast Two-Hybrid System)..... | 153 |
| Σχήμα 3.9: Διαχωρισμός σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR των θετικών κλώνων και των θραυσμάτων αυτών, που προέκυψαν με νουκλεοτιδική διάσπαση AluI..... | 154 |
| Σχήμα 3.10: Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης hCINAP με τις πρωτεΐνες EGLN2 και GAPDH..... | 164 |
| Σχήμα 3.11: Πιλοτικό πείραμα ανοσοκαταβύθισης των πρωτεϊνών GFP-hCINAP και GFP στους δύο κλώνους 62L και 33C..... | 167 |
| Σχήμα 3.12: Πιλοτικό πείραμα ανοσοκαταβύθισης για SILAC..... | 168 |
| Σχήμα 3.13: Ανοσοκαταβύθιση μεθόδου SILAC..... | 169 |
| Σχήμα 3.14: Ανοσοκαταβύθιση της διαδικασίας SILAC..... | 170 |
| Σχήμα 3.15: Σχεδιάγραμμα της σύνθετης πειραματικής διαδικασίας της μεθόδου SILAC..... | 171 |
| Σχήμα 3.16: Ανοσοκαταβύθιση/Διερεύνηση αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης GFP-hCINAP, με μέρος πρωτεϊνών που προέκυψαν από τη μέθοδο SILAC..... | 174 |
| Σχήμα 3.17: Επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης του cDNA της GFP-hCINAP στις δύο σταθερές μετασχηματισμένες κυτταροσειρές, 33C και 62L και σύγκριση των μεταγραφικών τους επιπέδων..... | 177 |
| Σχήμα 3.18: Σύγκριση πρωτεϊνικών επιπέδων της GFP-hCINAP, στις δύο σταθερά μετασχηματισμένες κυτταροσειρές 33C και 62L με την ενδογενή πρωτεΐνη..... | 178 |
| Σχήμα 3.19: Ενδοκυττάριος εντοπισμός και έκφραση της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP..... | 180 |
| Σχήμα 3.20: Σύγκριση του προτύπου κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου των δύο κλώνων, 33C και 62L, με την κυτταροσειρά HeLa, μετά από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS)..... | 182 |
| Σχήμα 3.21: Κατανομή των Μιτωτικών Φάσεων, όπως αυτές προέκυψαν από Μικροσκοπία Φθορισμού..... | 184 |

| | |
|---|-----|
| Σχήμα 3.22: Μελέτη της κινητικότητας της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP..... | 187 |
| Σχήμα 3.23: Παρακολούθηση της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP σε ζωντανά κύτταρα με μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (time-lapse microscopy).. | 191 |
| Σχήμα 3.24: Στιγμιότυπα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της μίτωσης σε ζωντανά κύτταρα HeLa ^{GFP-hCINAP(33C)} | 192 |
| Σχήμα 3.25: Ανωμαλίες που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, όπως καταγράφηκαν σε ζωντανά κύτταρα HeLa ^{GFP-hCINAP(33C)} , με μικροσκοπία πραγματικού χρόνου..... | 193 |
| Σχήμα 3.26: Ανάλυση FACS των πρώτων 8 δειγμάτων που προέκυψαν από συγχρονισμό της κυτταροσειράς HeLa, μετά από διπλό μπλοκάρισμα με θυμιδίνη..... | 196 |
| Σχήμα 3.27: Αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης hCINAP στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου..... | 197 |
| Σχήμα 3.28: Εντοπισμός της GFP-hCINAP σε δομές γύρω από τους πυρηνίσκους (caps) μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol I και Pol II... | 199 |
| Σχήμα 3.29: Εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP σε δακτυλίους γύρω από του πυρηνίσκους (caps) μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol. I και Pol. I..... | 283 |
| Σχήμα 3.30: Ενδοκυττάρια κατανομής της GFP-hCINAP μετά από μεταγραφική καταστολή των RNA Pol. I και RNA Pol. II..... | 201 |
| Σχήμα 3.31: Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός σε κύτταρα ελέγχου, των πρωτεϊνών coilin (A), fibrillarin (B) και PSP1 (C), σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη GFP-hCINAP (A-C), στην σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa ^{GFP-hCINAP(33C)} | 202 |
| Σχήμα 3.32: Ενδοκυττάρια κατανομής της GFP-hCINAP μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol. I..... | 205 |
| Σχήμα 3.33: Ενδοκυττάρια κατανομής της GFP-hCINAP μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol. II..... | 206 |
| Σχήμα 3.34: Ενδοκυττάρια κατανομής της υβριδική πρωτεΐνης GFP-hCINAP μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol. II..... | 207 |
| Σχήμα 3.35: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της GFP-hCINAP μετά από ακτινοβολία UV-C και ανοσοφθορισμό με SMN..... | 284 |
| Σχήμα 3.36: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP μετά από ακτινοβολία UV-C και συνεντοπισμός της με PSP1..... | 210 |

| | |
|--|-----|
| Σχήμα 3.37: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της GFP-hCINAP μετά από υπερωσμωτικό στρες..... | 212 |
| Σχήμα 3.38: Ποσοτικός προσδιορισμός του βαθμού καταστολής της hCINAP.... | 214 |
| Σχήμα 3.39: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των πρωτεϊνών hCINAP, firillarin, PML και coilin σε κύτταρα μετά από καταστολή του μεταγραφήματος της hCINAP (siRNA) και κύτταρα ελέγχου (GC)..... | 215 |
| Σχήμα 3.40α: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των μορφών της GFP-hCINAP που φέρουν συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις σε κρίσιμα κατάλοιπα της..... | 220 |
| Σχήμα 3.40β: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των μορφών της GFP-hCINAP που φέρουν συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις σε κρίσιμα κατάλοιπα της..... | 221 |
| Σχήμα 3.41: Η υπερέκφραση των GFP-hCINAPH79G και GFP-hCINAPT17A σε κύτταρα HeLa οδηγεί στην αποδιοργάνωση των Cajal bodies (CBs), τόσο με αλλαγή του μέσου όρου όσο και της κατανομής τους..... | 225 |
| Σχήμα 3.42: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της αλλαγής του αριθμού των CBs σε κύτταρα HeLa που έχουν επιμολυνθεί με τις μεταλλαγμένες μορφές GFP-hCINAPH79G (A1 και A2) και GFP-hCINAPT17A (C1 και C2) σε σύγκριση με την GFP-hCINAP-WT (B)..... | 226 |
| Σχήμα 3.43: Οι πυρηνικές δομές PML δεν παρουσιάζονται αλλοιωμένες, μετά από επιμόλυνση κυττάρων HeLa με τις μεταλλαγμένες υβριδικές πρωτεΐνες GFP-CINAPH79G και GFP-hCINAPT17A σε σύγκριση με την υβριδική πρωτεΐνη GFP-hCINAPWT..... | 227 |
| Σχήμα 3.44: Οι πυρηνικές δομές Speckles, δεν παρουσιάζονται αλλοιωμένες, μετά από επιμόλυνση κυττάρων HeLa με τις μεταλλαγμένες υβριδικές πρωτεΐνες GFP-CINAPH79G και GFP-hCINAPT17A σε σύγκριση με την υβριδική πρωτεΐνη GFP-hCINAPWT..... | 228 |
| Σχήμα 3.45: Η έκφραση των μεταλλαγμένων υβριδικών πρωτεϊνών GFP-CINAPH79G και GFP-CINAPT17A είναι τοξική και αυξάνει την απόπτωση στα κύτταρα HeLa, τα οποία είναι επιμολυσμένα με αυτά..... | 230 |
| Σχήμα 4.1: Οι δακτύλιοι γύρω από τους πυρηνίσκους, οι οποίοι παρατηρούνται μετά από καταστολή της RNA Pol. II..... | 239 |
| Σχήμα 4.2: Μικροσκοπία διαφορικής συμβολής (Differential Interference Contrast, DIC), ζωντανού κυττάρου HeLa, όπου διακρίνονται οι πυρηνίσκοι..... | 241 |
| Σχήμα 4.3: Δομές του πυρηνίσκου σε κύτταρα με καταστολή της ενεργότητας της RNA πολυμεράσης..... | 243 |

| | |
|--|-----|
| Σχήμα 4.4: Επιφανειακή πυκνότητα της κρυσταλλικής δομής του τριπλού συμπλόκου hCINAP-Mg ²⁺ ADP-PO ₄ ³⁻ | 254 |
| Σχήμα Π1: Βιοχημικός καθαρισμός της πρωτεΐνης his-hCINAP με χρωματογραφία συγγενείας μετάλλου, NTA-Ni ²⁺ | 286 |
| Σχήμα Π2: Απεικόνιση της αρχής μεθόδου χρωματογραφίας μοριακής διήθησης..... | 287 |
| Σχήμα Π3: Βιοχημικός καθαρισμός της πρωτεΐνης his-hCINAP με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πήκτωμα Sephatex G-75..... | 288 |
| Σχήμα Π4: Πρωτεολυτική διάσπαση της his ₆ -hCINAP με το ένζυμο εντεροκινάση (EK), για απομάκρυνση του επιτοπίου της his ₆ | 289 |
| Σχήμα Π6: Κρύσταλλοι της hCINAP υπό μορφή δεματίων βελόνων..... | 292 |

| | |
|---|-----|
| Πίνακας 2.1: Στελέχη σακχαρομύκητα <i>S. cerevisiae</i> που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. | 39 |
| Πίνακας 2.2: Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δύο υβριδίων. | 39 |
| Πίνακας 2.3: Αμινοξέα που περιέχονται στα διάφορα επιλεκτικά μέσα..... | 40 |
| Πίνακας 2.4: Στελέχη βακτηρίου <i>E.coli</i> που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία..... | 54 |
| Πίνακας 2.5: Πλασμιδιακοί φορείς για κλωνοποίηση και έκφραση σε βακτήρια <i>E.coli</i> , που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία..... | 54 |
| Πίνακας 2.6: Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την παρασκευή επιλεκτικών θρεπτικών μέσων. | 55 |
| Πίνακας 2.7: Τελική συγκέντρωση άλατος που χρησιμοποιείται για την καταβύθιση DNA. | 61 |
| Πίνακας 2.8: Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα ερευνητική εργασία στη διαδικασία της μεταλλαξογένεσης. | 81 |
| Πίνακας 2.9: Ολιγονουκλεοτίδια αποσιώπησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. | 104 |
| Πίνακας 2.10: Φίλτρα απορρόφησης/εκπομπής του μικροσκοπίου DeltaVision Spectris wide-field deconvolution..... | 117 |
| Πίνακας 2.11: Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. | 135 |
| Πίνακας 3.1: Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων για την έκφραση και την διαλυτότητα της πρωτεΐνης coilin στα τρία πλασμιδιακά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν..... | 140 |
| Πίνακας 3.2: Τα διάφορα τμήματα της coilin, και ο τρόπος που προέκυψαν..... | 276 |
| Πίνακας 3.3: Τα διάφορα τμήματα της hCINAP, και ο τρόπος που προέκυψαν.... | 277 |
| Πίνακα 3.4: Τα πλασμίδια που δοκιμάστηκαν για επιλογή του καταλληλότερου για τη χρήση στη σάρωση της cDNA βιβλιοθήκης, καθώς και τα αποτελέσματα ελέγχου της μεταγραφικής αυτοενεργοποίησης τους | 277 |
| Πίνακας 3.5: Πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη hCINAP με το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα | 157 |

| | |
|---|-----|
| Πίνακας 3.6: Συνοπτικός πίνακας συνδυαστικών παραμέτρων έκφρασης και διαλυτότητας της ανασυνδυνασμένης πρωτεΐνης EGLN2 στα τρία πλασμίδια και στα δύο βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν..... | 161 |
| Πίνακας 3.7: Συνοπτικός πίνακας συνδυαστικών παραμέτρων έκφρασης και διαλυτότητας της ανασυνδυνασμένης πρωτεΐνης GAPDH στα τρία πλασμίδια και στα δύο βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν..... | 162 |
| Πίνακας 3.8: Πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη hCINAP με τη μέθοδο SILAC-MS..... | 278 |
| Πίνακας 3.9: Ανωμαλίες που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης στις δύο σταθερά μετασχηματισμένες κυτταροσειρές HeLa ^{GFP-hCINAP} ... | 190 |
| Πίνακας 3.10: Θέσεις αμινοξικών καταλοίπων στα οποία πραγματοποιήθηκε σημειακή μεταλλαξογένεση της πρωτεΐνης hCINAP. | 218 |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|-------------------------|----|
| Σελίδα Εγκυρότητας..... | I |
| Περίληψη..... | II |
| Abstract..... | |
| Ευχαριστίες..... | V |
| Κατάλογος Σχημάτων..... | VI |
| Κατάλογος Πινάκων..... | XI |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

| | |
|---|----------|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 1 |
| 1.1 Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης hCINAP (human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein)..... | 1 |
| 1.2 Αδενυλικές Κινάσες (AKs) | 4 |
| 1.3 Δομή των αδενυλικών κινασών..... | 5 |
| 1.4 Δομή της πρωτεΐνης hCINAP..... | 6 |
| 1.5 Διαφοροποίηση της hCINAP από την οικογένεια των αδενυλικών κινασών..... | 7 |
| 1.6 Καινούργια δεδομένα για τη δομή της hCINAP..... | 8 |
| 1.7 Ο Πυρήνας | 14 |
| 1.8 Το σωματίδιο Cajal (CB) | 15 |
| 1.8.1 Ανακάλυψη των Cajal Bodies | 15 |
| 1.8.2 Τα συστατικά που εντοπίζονται στα Cajal Bodies (CBs) | 16 |
| 1.8.3 Η δυναμική φύση των Cajal bodies..... | 17 |
| 1.8.4 Πιθανή λειτουργία των Cajal Bodies..... | 19 |
| 1.9 p80 coilin – το αντιγόνο των Cajal bodies..... | 25 |
| 1.10 Μερικός Χαρακτηρισμός hCINAP..... | 28 |
| 1.10.1 Ενδοκυττάριος εντοπισμός της hCINAP και επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης της με την πρωτεΐνη coilin..... | 28 |
| 1.10.2 Παροδική υπερέκφραση (transient overexpression) της hCINAP σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa..... | 29 |
| 1.10.3 Καταστολή του μεταγραφήματος της hCINAP (RNAi) | 31 |
| 1.11 Ομόλογες πρωτεΐνες της hCINAP σε άλλους οργανισμούς..... | 32 |
| 1.11.1 Η πρωτεΐνη Fap7..... | 32 |
| 1.11.2 Η πρωτεΐνη ADLP..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 1.11.3 Η πρωτεΐνη DAK6..... | 34 |
| 1.12 Στόχοι διδακτορικής έρευνας..... | 35 |
| 1.13 Δομή της παρούσας διδακτορικής Διατριβής..... | 37 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

| | |
|--|-----------|
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 39 |
| 2.1 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας..... | 39 |
| 2.1.1 Στο σακχαρομύκητα | 39 |
| 2.1.1.1 Στελέχη σακχαρομύκητα <i>S. cerevisiae</i> και πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν..... | 39 |
| 2.1.1.2 Επιλεκτικά θρεπτικά υλικά για καλλιέργειες σακχαρομύκητα..... | 40 |
| 2.1.1.3 Καλλιέργεια και χειρισμός στελεχών σακχαρομύκητα..... | 41 |
| 2.1.1.3.1 Κατάψυξη στελεχών σακχαρομύκητα..... | 41 |
| 2.1.1.3.2 Ανάκτηση κατεψυγμένων κυττάρων σακχαρομύκητα..... | 42 |
| 2.1.1.3.3 Καλλιέργειες σακχαρομύκητα..... | 42 |
| 2.1.1.4 Μετασχηματισμός σε σακχαρομύκητα μικρή κλίμακας | 43 |
| 2.1.1.4.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων σακχαρομύκητα..... | 44 |
| 2.1.1.4.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων σακχαρομύκητα..... | 44 |
| 2.1.1.5 Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα σακχαρομύκητα... .. | 45 |
| 2.1.1.5.1 Καλλιέργεια σακχαρομύκητα για παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος..... | 45 |
| 2.1.1.5.2 Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα σακχαρομύκητα με χρήση τριχλωρο-οξικού οξέως [Trichloroacetic acid (TCA)] | 46 |
| 2.1.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από σακχαρομύκητα..... | 48 |
| 2.1.1.7 Ανίχνευση β-γαλακτοσιδάσης επί φίλτρου (β-galactosidase filter Assay)..... | 49 |
| 2.1.1.8 cDNA βιβλιοθήκη..... | 50 |
| 2.1.1.8.1 Μέθοδος διυβριδισμού σε σύστημα σακχαρομύκητα (Yeast two-hybrid system) | 50 |
| 2.1.1.8.2 Σύζευξη σακχαρομύκητα (Yeast Mating) | 52 |
| 2.1.2 Μέθοδοι στα Βακτήρια..... | 54 |
| 2.1.2.1 Στελέχη Βακτηρίου <i>E.coli</i> και πλασμιδιακοί φορείς..... | 54 |
| 2.1.2.2 Επιλεκτικά θρεπτικά υλικά για βακτηριακές καλλιέργειες | 55 |
| 2.1.2.3 Κατάψυξη βακτηριακών στελεχών..... | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.2.4 Ανάκτηση κατεψυγμένων βακτηριακών κυττάρων..... | 56 |
| 2.1.2.5 Παρασκευή δεκτικών βακτηρίων για πλασμιδιακό μεταχηματισμό με χρήση χλωριούχου ασβεστίου..... | 56 |
| 2.1.2.6 Βακτηριακός μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων (transformation)... | 58 |
| 2.1.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεσαίας κλίμακας (Mini and Midi Preps) από βακτηριακά στελέχη..... | 58 |
| 2.1.2.8 Καταβύθιση πλασμιδιακού DNA με αιθανόλη..... | 61 |
| 2.1.3 Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA..... | 62 |
| 2.1.3.1 Ενδονουκλεολυτική διάσπαση πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα..... | 62 |
| 2.1.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης..... | 62 |
| 2.1.3.3 Εξαγωγή και καθαρισμός τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)..... | 64 |
| 2.1.3.4 Συγκόλληση (ligation) DNA..... | 65 |
| 2.1.3.5 Αποφωσφορυλίωση 5'-άκρων γραμμικού πλασμιδιακού DNA..... | 66 |
| 2.1.3.6 Απομόνωση poly(A) ⁺ RNA..... | 67 |
| 2.1.3.7 Απομόνωση συνολικού RNA..... | 68 |
| 2.1.3.7.1 Βάσει πρωτοκόλλου του πακέτου RNeasy Mini Kit της εταιρείας Qiagen..... | 68 |
| 2.1.3.7.2 Βάσει πρωτοκόλλου του αντιδραστηρίου Trizol της εταιρείας InVitrogen..... | 70 |
| 2.1.3.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων RNA και DNA με φωτομέτρηση..... | 71 |
| 2.1.3.9 Τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής..... | 72 |
| 2.1.3.10.1 PCR με χρήση μείγματος DNA-πολυμερασών υψηλής πιστότητας..... | 75 |
| 2.1.3.10.2 PCR με χρήση της θερμοανθεκτικής DNA-πολυμεράσης Taq..... | 77 |
| 2.1.3.11 Κλωνοποίηση cDNA με τη μέθοδο T/A (T/A Cloning) και επιλογή των κλώνων <i>in situ</i> με έλεγχο ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης..... | 77 |
| 2.1.3.12 Στοχευόμενη σημειακή μεταλλαξογένεση με χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (site-directed mutagenesis) | 79 |
| 2.2 Μέθοδοι Βιοχημικής Ανάλυσης..... | 83 |
| 2.2.1 Επαγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακά συστήματα έκφρασης..... | 83 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2 Διερεύνηση βέλτιστων συνθηκών επαγωγής έκφρασης ετερόλογης πρωτεΐνης σε βακτήρια (Μικρή κλίμακα/ Μεγάλη κλίμακα) | 83 |
| 2.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)..... | 84 |
| 2.2.4 Ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) | 86 |
| 2.2.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting) | 87 |
| 2.2.6 Αυτοραδιόγραφο ανοσοαποτύπωσης..... | 89 |
| 2.2.7 Απομάκρυνση αντισωμάτων και επανανίχνευσης μεμβρανών (stripping and reprobing) | 90 |
| 2.2.8 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford..... | 91 |
| 2.2.8.1 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς..... | 91 |
| 2.2.8.2 Φωτομέτρηση δειγμάτων..... | 92 |
| 2.2.9 Τεχνική της συν-επιλογής (Pull down assay ή co-selection) | 92 |
| 2.3 Μέθοδοι Κυτταρικής Βιολογίας..... | 95 |
| 2.3.1 Θρεπτικά Υλικά και άλλα αντιδραστήρια απαραίτητα για την ανάπτυξη κυτταροκαλλιέργειας HeLa..... | 95 |
| 2.3.2 Ανάπτυξη κυτταροκαλλιέργειας από κατεψυγμένα κύτταρα..... | 96 |
| 2.3.3 Επαναδιασπορά κυττάρων για ανακαλλιέργεια τους..... | 96 |
| 2.3.4 Κρυοδιατήρηση κυτταροκαλλιέργειας-Πάγωμα κυττάρων..... | 97 |
| 2.3.5 Μέτρηση βιώσιμων κυττάρων..... | 98 |
| 2.3.6 Τεχνική της επιμόλυνσης (transfection) | 99 |
| 2.3.6.1 Τεχνική παροδικής επιμόλυνσης με φωσφορικό ασβέστιο..... | 99 |
| 2.3.6.2 Τεχνική επιμόλυνσης με χρήση κατιονικών λιπιδίων..... | 101 |
| 2.3.6.3 Τεχνική παροδικής επιμόλυνσης με χρήση ριβοολιγονοκλεοτιδίων αποσιώπησης (siRNA) | 102 |
| 2.3.7 Δημιουργία σταθερά μετασηματισμένης κυτταροσειράς HeLa ^{GFP-hCINAP} | 104 |
| 2.3.8 Τεχνική του ανοσοφθορισμού..... | 106 |
| 2.3.8.1 Μονιμοποίηση, διαπερατότητα και κάλυψη των κυττάρων..... | 106 |
| 2.3.8.1.1 Μέθοδος (Κλασσικό πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA) | 107 |
| 2.3.8.1.2 Μέθοδος Β [Πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA με προ-εκχύλιση (pre-extraction)] | 107 |
| 2.3.8.2 Σήμανση με χρήση αντισωμάτων και τοποθέτηση των δειγμάτων σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου..... | 108 |
| 2.3.9 Πειραματικοί χειρισμοί κυττάρων..... | 109 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.9.1 Μεταγραφική καταστολή..... | 110 |
| 2.3.9.2 Ακτινοβολία UV-C..... | 110 |
| 2.3.9.3 Υπερωσμωτικό στρες..... | 111 |
| 2.3.10 Κυτταρομετρία ροής (FACS) | 111 |
| 2.3.11 Συγχρονισμός κυτταροσειράς HeLa..... | 113 |
| 2.3.12 Μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα (<i>in vivo</i> πειράματα) | 114 |
| 2.3.12.1 Μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (Time-lapse microscopy) | 115 |
| 2.3.12.2 Επαναφορά Φθορισμού Μετά από Φωτολεύκανση (FRAP- Fluorescence Recovery After Photobleaching) | 115 |
| 2.3.12.3 Μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε στα <i>in vivo</i> πειράματα..... | 117 |
| 2.3.13 SILAC (stable isotope labeling of amino acids in culture) και φασματοσκοπία μάζας (MS) | 118 |
| 2.3.13.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών..... | 118 |
| 2.3.13.2 Καλλιέργεια και σήμανση κυτταροσειρών..... | 119 |
| 2.3.13.3 Απομόνωση πυρήνων..... | 120 |
| 2.3.13.4 Πρόσδεση αντισώματος με ομοιοπολικό τρόπο σε σφαιρίδια με μήτρα σεφαρόζης (protein G Sepharose beads)..... | 122 |
| 2.3.13.5 Ανοσοκαταβύθιση..... | 123 |
| 2.3.13.6 Διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και χρώση του..... | 124 |
| 2.3.13.7 Εξαγωγή των πρωτεϊνικών μπαντών από το πήκτωμα..... | 124 |
| 2.3.13.8 Αποχρωματισμός των τμημάτων του πηκτώματος..... | 125 |
| 2.3.13.9 Αναγωγή/ Αλκυλίωση των πρωτεϊνικών τμημάτων πηκτώματος..... | 126 |
| 2.3.13.10 Πέψη των πρωτεϊνικών μπαντών στα τμήματα του πηκτώματος..... | 127 |
| 2.3.13.11 Εξαγωγή των πεπτιδίων..... | 128 |
| 2.3.13.12 Φασματοσκοπία μάζας και ανάλυση δεδομένων..... | 129 |
| 2.3.14 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία..... | 129 |
| 2.4 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία..... | 129 |
| 2.4.1 Πρώτα αντισώματα..... | 129 |
| 2.4.2 Δεύτερα αντισώματα..... | 132 |
| 2.4.2.1 Για ανοσοαποτύπωση κατά Western..... | 132 |
| 2.4.2.2 Για ανοσοφθορισμό..... | 132 |
| 2.5 Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία..... | 133 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

| | |
|---|------------|
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 136 |
| 3.1 Έκφραση των μεταγραφημάτων των hCINAP και TAF _{II} D ₃₂ σε διάφορους ιστούς | 136 |
| 3.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών hCINAP και coilin..... | 138 |
| 3.2.1 Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών hCINAP και coilin..... | 144 |
| 3.2.2 Χαρακτηρισμός αλληλεπίδρασης..... | 144 |
| 3.2.2.1 Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης της coilin με την hCINAP..... | 144 |
| 3.2.2.2 Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης της hCINAP με την coilin..... | 147 |
| 3.3 Προσπάθεια ταυτοποίησης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της hCINAP..... | 148 |
| 3.3.1 Διερεύνηση νέων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών της hCINAP με το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα με σάρωση cDNA βιβλιοθήκης.... | 148 |
| 3.3.1.1 Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων και έλεγχος μεταγραφικής αυτοενεργοποίησης..... | 148 |
| 3.3.1.2 Σάρωση cDNA βιβλιοθήκης..... | 151 |
| 3.3.2 Διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων της hCINAP..... | 158 |
| 3.3.2.1 Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της hCINAP που προέκυψαν από το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα..... | 158 |
| 3.3.2.2 Εξέταση αλληλεπίδρασης της hCINAP με τον επαγόμενο από την υποξία, μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α..... | 165 |
| 3.3.3 Πρωτεομική ανάλυση αλληλεπιδράσεων της hCINAP..... | 166 |
| 3.3.3.1 Πιλοτικό πείραμα ανοσοκαταβύθισης της υβριδικής..... | 172 |
| 3.3.3.2 Μέθοδος SILAC/MS..... | 175 |
| 3.3.3.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που προέκυψαν με τη μέθοδο SILAC με πειράματα ανοσοκαταβύθισης | 172 |
| 3.4 Κατασκευή και χαρακτηρισμός της σταθερά μετασχηματισμένης κυτταροσειράς (stable transformant) HeLa ^{GFP-hCINAP} | 175 |
| 3.4.1 Κατασκευή σταθερά μετασχηματισμένης κυτταροσειράς τύπου HeLa ^{GFP-hCINAP} | 175 |
| 3.4.2 Χαρακτηρισμός των δύο σταθερά μετασχηματισμένων κλώνων, 33C και 62L, HeLa ^{GFP-hCINAP} | 176 |
| 3.4.2.1 Έλεγχος μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων..... | 177 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.2.2 Μελέτη του ενδοκυττάρου εντοπισμού..... | 179 |
| 3.4.2.3 Έλεγχος κυτταρικού κύκλου..... | 181 |
| 3.5 Χρήση της σταθεράς επιμολυσμένης κυτταροσειράς HeLa ^{GFP-hCINAP} σε <i>in vitro</i> πειράματα..... | 185 |
| 3.5.1 Μελέτη της κινητικότητας της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP με επαναφορά Φθορισμού Μετά από Φωτολεύκανση (FRAP-Fluorescence Recovery After Photobleaching) | 185 |
| 3.5.2 Ανάλυση πρωτεϊνικού κύκλου ζωής της hCINAP με βιντεομικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο (Time-lapse microscopy) | 188 |
| 3.6 Συγχρονισμός κυτταροσειράς HeLa και ανίχνευση της hCINAP στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου..... | 194 |
| 3.7 Μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής της πρωτεΐνης hCINAP μετά από πειραματικούς χειρισμούς..... | 198 |
| 3.7.1 Μεταγραφική καταστολή..... | 198 |
| 3.7.2 Ακτινοβολία UV-C..... | 208 |
| 3.7.3 Υπερωσμωτικό στρες..... | 211 |
| 3.8 Καταστολή του μεταγραφήματος της hCINAP (RNAi) και ανάλυση των επιπτώσεων..... | 213 |
| 3.9 Σημειακή μεταλλαξογένεση και έκφραση της πρωτεΐνης GFP-hCINAP σε κύτταρα HeLa..... | 217 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

| | |
|---|------------|
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 232 |
| 4.1 Μερικός λειτουργικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης hCINAP..... | 232 |
| 4.2 Πιθανή εμπλοκή της πρωτεΐνης hCINAP στα μονοπάτια απόκρισης κυτταρικού στρες..... | 238 |
| 4.3 Σχέση δομής-λειτουργίας της hCINAP..... | 248 |
| 4.4 Ανοικτός ορίζοντας-μελλοντικές προεκτάσεις της ερευνητικής εργασίας..... | 255 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

| | |
|-----------------------------|------------|
| 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 257 |
|-----------------------------|------------|

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι..... 276

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ..... 285

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ..... 294

ΑΝΝΑ ΜΑΛΕΚΚΟΥ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ερευνητική μου διατριβή πραγματεύεται το λειτουργικό χαρακτηρισμό μιας νέας, ανθρώπινης πυρηνικής πρωτεΐνης, της hCINAP, η οποία πρωτοανακαλύφθηκε σε σάρωση cDNA HeLa βιβλιοθήκης ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της πρωτεΐνης coilin, πρωτεΐνη των σωματιδίων Cajal.

1.1 Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης hCINAP (human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein) (Santama et al., 2005)

Με σκοπό την εύρεση πρωτεϊνών οι οποίες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη coilin, που εντοπίζεται στα Cajal bodies, διεξάχθηκαν πειράματα με τη μέθοδο των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα (yeast two-hybrid system), μέσω της οποίας έγινε σάρωση cDNA βιβλιοθήκης από κύτταρα HeLa, χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» το cDNA της coilin. Μετά από σάρωση 2×10^6 cDNA κλώνων, ενενήντα ήταν θετικοί και τέσσερις εξ' αυτών κωδικοποιούσαν την ίδια πρωτεΐνη όπως αποδείχτηκε από ανάλυση της αλληλουχίας του cDNA.

Για την επιβεβαίωση ότι η αλληλουχία αυτή κωδικοποιούσε μια γνήσια ανθρώπινη πρωτεΐνη, απομονώθηκε το μεταγράφημα της από cDNA ανθρώπινου πλακούντα με την μέθοδο της RT-PCR και το προϊόν της PCR αλληλουχήθηκε πλήρως, δίνοντας μία πανομοιότυπη αλληλουχία, μεγέθους περίπου 500 bp, με αυτή που λήφθηκε από τα κύτταρα HeLa, ανταποκρινόμενη στο πλήρες ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) (Σχήμα 1.1). Σ' αυτή την πρωτεΐνη δόθηκε το όνομα hCINAP (human Coilin Interacting ATPase Protein) και έτυχε περαιτέρω χαρακτηρισμού.

Το cDNA αυτό, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ως ανιχνευτής για αποτύπωση κατά Northern blot για εξέταση polyA⁺ RNA από διάφορους ανθρώπινους ιστούς. Το αποτέλεσμα έδειξε υβριδισμό του ανιχνευτή σε ένα μεταγράφημα περίπου 1.2 Kb, το οποίο εκφραζόταν σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν, με μεγαλύτερη έκφραση στον ιστό του σκελετικού μυός.

Σύγκριση της αλληλουχίας της hCINAP που προέκυψε, με διαθέσιμες βάσεις νουκλεοτιδικών δεδομένων, αποκάλυψε ότι κωδικοποιούσε μια τότε εντελώς καινούργια και μη χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη. Παρουσίαζε 90% ομοιότητα με νουκλεοτιδική αλληλουχία EST (expressed sequence tag), η οποία προερχόταν από ποντικό, και 100% ταύτιση της με ανθρώπινη EST η οποία περιείχε επιπλέον αλληλουχία UTR στην

κατεύθυνση του 3' άκρου. Η αλληλουχία αυτή κατατέθηκε στη βάση δεδομένων GenBankTM/EBI, με τους κωδικούς εισόδου AJ878880 και AJ878881.

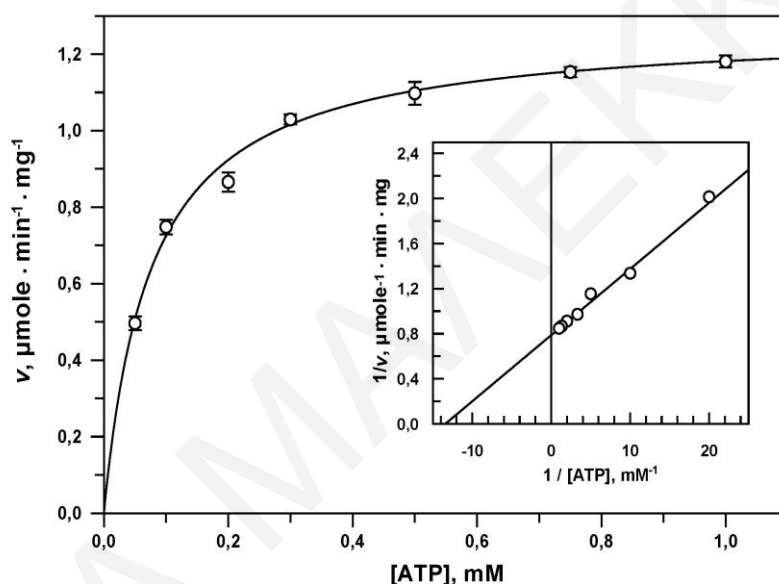
```
1 atg ttg ctt ccg aac atc ctg ctc acc ggt aca cca ggg gtt gga aaa acc aca cta ggc
  M L L P N I L L T G T P G V G K T T L G
61 aaa gaa ctt gcg tca aaa tca gga ctg aaa tac att aat gtg ggt gat tta gct cga gaa
  K E L A S K S G L K Y I N V G D L A R E
121 gag caa ttg tat gat ggc tat gat gaa gag tat gac tgt ccc att tta gat gaa gac aga
  E Q L Y D G Y D E E Y D C P I L D E D R
181 gta gtt gat gag tta gat aac caa atg aga gaa ggt gga gtt att gtt gat tac cat ggt
  V V D E L D N Q M R E G G V I V D Y H G
241 tgt gat ttc ttc cct gaa cgc tgg ttt cat ata gtt ttt gtg ctg aga aca gat acc aat
  C D F F P E R W F H I V F V L R T D T N
301 gta ttg tac gaa aga ctt gaa aca agg ggt tat aat gag aag aaa cta aca gac aat att
  V L Y E R L E T R G Y N E K K L T D N I
361 cag tgt gag att ttt caa gtt ctt tat gaa gaa gcc aca gca tcc tac aag gaa gaa atc
  Q C E I F Q V L Y E E A T A S Y K E E I
421 gtg cat cag ctg ccc agt aat aaa cca gaa gag cta gaa aat aat gta gat cag atc ttg
  V H Q L P S N K P E E L E N N V D Q I L
481 aaa tgg att gag cag tgg atc aaa gat cat aac tct tga
  K W I E Q W I K D H N S *
```

Σχήμα 1.1: Νουκλεοτιδική (μαύρο χρώμα) και αμινοξική (μπλε χρώμα) αλληλουχία της hCINAP, όπως προέκυψε από κλωνοποίηση του cDNA της, από HeLa cDNA βιβλιοθήκη.

Η hCINAP κωδικοποιείται ως εναλλακτικό μεταγράφημα από τον γενετικό τόπο TAF9, που βρίσκεται στη θέση 68.7 Mb στο χρωμόσωμα 5, ο οποίος κωδικοποιεί ακόμα 3 μεταγραφήματα. Το πρώτο μεταγράφημα (variant 1, NM_003187.4) κωδικοποιεί τη μεγαλύτερη ισομορφή (a) που αντιστοιχεί στον μεταγραφικό παράγοντα TAFII₃₂ που κωδικοποιείται επίσης και από το τέταρτο μεταγράφημα (variant 4, NM_001015892.1) που διαφέρει μόνο στο 5' UTR σε σύγκριση με το μεταγράφημα 1. Το δεύτερο μεταγράφημα (variant 2, NM_016283) έχει κοινά τα δύο πρώτα εξόνια που κωδικοποιούν τα πρώτα 141 νουκλεοτίδια, με το μεταγράφημα 1, αλλά χρησιμοποιεί ως αρχή για τη μετάφραση μια ανοδική τριπλέττα ATG που έχει ως αποτέλεσμα την μετάφραση μιας τελείως διαφορετικής πρωτεΐνης (ισομορφή b), της hCINAP. Το τρίτο μεταγράφημα (variant 3, NM_001015891.1), το οποίο κωδικοποιεί την ισομορφή c, διαφέρει στο 5' UTR και 3' UTR και διαφέρει μόνο στο αμινοτελικό εξόνιο με την hCINAP, που έχει ως αποτέλεσμα οι δύο ισομορφές πέρα από τα πρώτα 6 διαφορετικά αμινοξέα, να είναι κατά τα άλλα οι ίδιες.

Το cDNA της hCINAP κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 172 αμινοξέα, με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 20.048 KDa. Η σύγκριση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας

της, με βάση δεδομένων, αποκάλυψε ότι η hCINAP είναι φυλογενετικά συντηρημένη από τον άνθρωπο μέχρι τα φυτά και το ζυμομύκητα και ότι δεν παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με καμία άλλη γνωστή πρωτεΐνη. Παρόλα αυτά, περιέχει χαρακτηριστικό μοτίβο πρόσδεσης τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου (ATP ή GTP) τύπου P-loop (GX₄GKT), χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών δέσμευσης ATP/GTP. Αυτό το συντηρημένο μοτίβο είναι παρόμοιο με αυτό που εμφανίζεται στα μέλη της οικογένειας των αδενυλικών κινασών. Σε συμφωνία με αυτές τις προβλέψεις δείχθηκε ότι η ανασυνδυασμένη hCINAP παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα ATPάσης με μεγάλη συγγένεια για το υπόστρωμα ATP ($K_m=75.3 \pm 5 \mu\text{M}$, $V_{\max}=1.27 \pm 0.2 \mu\text{mol}$ σχηματισμένου ADP/min.mg) (Σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2: Ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης hCINAP ως προς το ATP. Γραφική παράσταση της ταχύτητας υδρόλυσης του ATP σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του ATP (0.05-1 mM). Η καμπύλη δημιουργήθηκε σύμφωνα με τη σχέση Michaelis-Menten (GraFit) από την οποία προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι: $K_m=75.3 \pm 5 \mu\text{M}$ and $V_{\max}=1.27 \pm 0.02 \mu\text{mol}$ σχηματισμένου ADP · min⁻¹ · mg⁻¹. Η εσωτερική γραφική παράσταση αντιπροσωπεύει την αντίστροφη ταχύτητα υδρόλυσης της ίδια αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του ATP.

1.2 Αδενυλικές Κινάσες (AKs)

Η δομή της hCINAP παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με τις δομές των άλλων αδενυλικών κινασών (AKs), για αυτό το λόγο προτάθηκε ως η 6^η ισομορφή αυτών και ονομάστηκε AK6 (Ren et al., 2005).

Οι Αδενυλικές Κινάσες [Adenylate kinases (AK)] αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων και στο κυτταρικό ισοζύγιο ενέργειας, καταλύοντας την μεταφορά της β- και γ- φωσφορικής ομάδας από ένα δότη φωσφόρου (συνήθως ATP) στο AMP, με την ελευθέρωση 2 μορίων ADP, σύμφωνα με την αντιστρεπτή αντίδραση: $Mg^{2+}ADP + ADP \leftrightarrow Mg^{2+}ATP + AMP$ (Noda, 1973).

Η αντίδραση αυτή είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ζωής καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση των αδενινο-νουκλεοτιδίων ATP, ADP και AMP διατηρώντας τις ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις αυτών στα φυσιολογικά επίπεδα. Οι AKs έχουν αναγνωριστεί ως αισθητήρες της κυτταρικής ενεργειακής κατάστασης, μεταφράζοντας μικρές μεταβολές στις συγκεντρώσεις ATP και ADP σε σχετικά υψηλές μεταβολές στη συγκέντρωση του AMP, ενεργοποιώντας ένζυμα και μεταβολικούς αισθητήρες, που επηρεάζονται από το AMP, ώστε να ανταποκρίνονται με μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια σε εξωτερικά ερεθίσματα και σήματα καταπόνησης (στρες) (Dzeja and Terzic, 2009).

Στα θηλαστικά έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα 8 ισοένζυμα της αδενυλικής κινάσης (AK1-8), τα οποία διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος, τις κινητικές ιδιότητες, την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και την ενδοκυττάρια κατανομή τους (Bae and Phillips, 2006). Αυτό το δίκτυο των οχτώ διαφορετικών αδενυλικών κινασών, είναι διασκορπισμένο σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα, ρυθμίζοντας τα ενεργειακά και μεταβολικά μονοπάτια ανάλογα με τις τοπικές μεταβολικές απαιτήσεις (van Rompay et al., 2000; Dzeja and Terzic, 2009).

Οι AK1 και AK2, εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό διάστημα αντίστοιχα, και ευνοούν τη σύνδεση του ATP σε σχέση με τα άλλα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια ενώ δεσμεύουν ειδικά το AMP (Tanabe et al., 1993). Έχουν βρεθεί διαφορετικές υπομορφές της AK1 (AK1-1 και AK1-2) (Janssen et al., 2004) και εναλλακτικές μορφές ματίσματος του γονιδίου της AK2 (AK2A-D) (Lee et al., 1998) με διαφορετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες και χαρακτηριστικές κινητικές ιδιότητες. Η AK3 είναι μια GTP:AMP φωσφοτρανσφεράση ειδική για τη φωσφορυλίωση του ενδο-μιτοχονδριακού AMP χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το GTP ή το ITP (Tomasselli et al., 1979). Η AK4 εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα και παρόλο που

δεν έχει ενζυμική δραστηριότητα, διατηρεί την ικανότητα να προσδένει νουκλεοτίδια και να αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή ADP/ATP μετατοπίαση (Yoneda et al., 1998). Η AK5 εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των ανθρώπινων β-παγκρεατικών κυττάρων και εμπλέκεται στη ρύθμιση του καναλιού K⁺-ATP (Stanojevic et al., 2008). Η AK5 διαθέτει σημαντικές νευρο-ειδικές μεταβολικές λειτουργίες, στις οποίες περιλαμβάνονται η μεταφορά ενέργειας μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων και η σύνθεση DNA και RNA (Ren et al., 2005). Η AK6 (hCINAP) εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων (Santama et al., 2005), όπου η διοχέτευση νουκλεοτιδίων και ενέργειας παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του DNA και στην επεξεργασία της γενετικής πληροφορίας. Η AK7 εντοπίζεται στις βλεφαρίδες (cilia), όπου φαίνεται να συνδέεται με την κυτταρική κίνηση και τη λειτουργία του βλεφαριδικού σώματος (ciliary) (Fernandez-Gonzalez et al., 2009), και στο κυτταρόπλασμα όπου εντοπίζεται και η AK8 (Panayiotou et al., 2011).

1.3 Δομή των αδενυλικών κινασών

Οι αλληλουχίες των AKs, παρουσιάζουν μεταξύ τους αρκετές συντηρημένες περιοχές. Ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο στο N-τελικό άκρο, με ομόφωνη αλληλουχία G/AxxxxGK(x)S/T, που ονομάζεται Walker A μοτίβο ή θηλιά πρόσδεσης φωσφορικών (phosphate binding loop, P-loop), και τις περιοχές NMP bind domain και LID domain (Bae and Phillips, 2006).

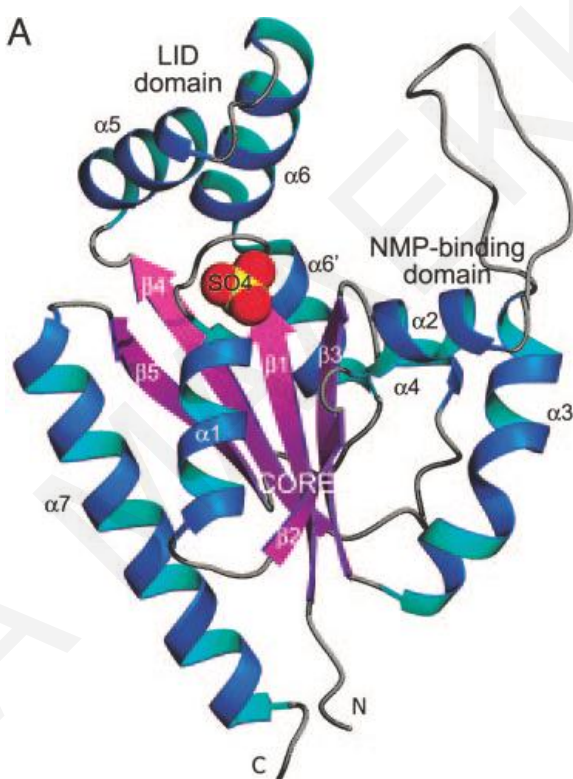
Δομικά, είναι τυπικές α/β πρωτεΐνες, οι οποίες μοιράζονται κοινή αρχιτεκτονική. Περιέχουν μία κεντρική αυτοτελή δομική περιοχή (CORE domain) και τις πλευρικές περιοχές, την LID domain και την NMP bind domain (περιοχή δέσμευσης μονοσφωφορικών νουκλεοτιδίων). Η CORE domain αποτελείται από έναν πυρήνα β-πτυχωτών επιφανειών, ο οποίος περικλείεται από α-έλικες (Schulz et al., 1990). Η περιοχή πρόσδεσης του ATP σχηματίζεται από αμινοξέα της LID domain και από την P-loop.

Η κεντρική περιοχή και η NMP bind domain είναι διατηρημένες σε όλες τις αδενυλικές κινάσες, ενώ η LID domain είναι αρκετά διαφορετική. Με βάση το μήκος της LID domain οι AKs κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: της βραχείας μορφής, όπου η LID domain είναι μια απλή μεταβλητή θηλιά (AK1, AK5, AK6), και της μακράς μορφής (AK2, AK3, AK4) που αποτελείται από αντι-παράλληλες β-αλυσίδες (Fukami-Kobayashi et al., 1996).

1.4 Δομή της πρωτεΐνης hCINAP

Η hCINAP είναι μια τυπική α/β πρωτεΐνη (Σχήμα 1.3) που περιέχει τρεις λειτουργικές υπο-περιοχές:

- i) Μια κεντρική πτυχωτή επιφάνεια με πέντε β -κλώνους (CORE domain), η οποία περικλείεται από επτά α -έλικες και περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του ATP.
- ii) Την NMP bind domain που σχηματίζεται από τις έλικες α_2 , α_3 και α_4 και ένα μακρύ βρόχο μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 33-58.
- iii) Την LID domain που περιλαμβάνει τις έλικες α_5 και α_6 .



Σχήμα 1.3: Διάγραμμα της δομής της πρωτεΐνης hCINAP (Η δομή παράχθηκε με το πρόγραμμα PREPI v0.9). Η πρωτεΐνη περιέχει 7 α -έλικες (μπλε κορδέλες), 5 β -κλώνοι (λιλά τόξα) και μια μακριά θηλιά NMP (γκρίζο τμήμα). Στο σχήμα επίσης παρουσιάζονται οι 3 λειτουργικές υπό-περιοχές: το καταλυτικό κέντρο (core), η περιοχή lid και η περιοχή δέσμευσης NMP. Επίσης φαίνεται το ιόν του θειϊκού οξέως, ως σφαίρα Corey-Pauling-Koltun sphere (S: κίτρινο, O: κόκκινο), το οποίο εντοπίζεται στη P-loop (Αναπαραγωγή εικόνας από Ren et al., 2005).

1.5 Διαφοροποίηση της hCINAP από την οικογένεια των αδενυλικών κινασών

Αν και η hCINAP κατατάχθηκε στην οικογένεια των αδενυλικών κινασών, λόγω της ομοιότητας στη δομή (Ren et al., 2005), παρουσιάζει αρκετά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, όσον αφορά το υπόστρωμα φωσφορυλίωσης και τη δομή, που την διαφοροποιούν από τις άλλες AKs. Η hCINAP σε αντίθεση με τις άλλες AKs, οι οποίες παρουσιάζουν επιλεκτικότητα υποστρώματος, παρουσιάζει ένα ασυνήθιστα μεγάλο εύρος ειδικών υποστρωμάτων δοτών και δεκτών (Ren et al., 2005), καθώς και ουσιαστική ενεργότητα ATPase (Santama et al., 2005). Η μακριά θηλιά (33-58 αα) η οποία βρίσκεται στη περιοχή NMP binding domain, δεν έχει παρατηρηθεί στις άλλες AKs. Σε αντίθεση με τις δομές των άλλων AKs, όπου οι περιοχές δέσμευσης NMP και lid δεν αλληλεπιδρούν, στη περίπτωση της hCINAP, στην «ανοικτή» διαμόρφωση, οι περιοχές αυτές αλληλεπιδρούν (Ren et al., 2005).

Τέλος, η δομή της hCINAP απαντάται συχνά και σε κινάσες που φωσφορυλιώνουν υποστρώματα διαφορετικά από νουκλεοτίδια. Καταρχήν, στο συντηρημένο μοτίβο Walker A στις AK1-AK5 το αμινοξύ στο τέλος της P-loop είναι γλυκίνη (Gly). Στη hCINAP το κατάλοιπο αυτό της Gly απουσιάζει, και στη θέση του υπάρχει μια θρεονίνη (Thr) (αμινοξικό κατάλοιπο 17). Αυτό το χαρακτηριστικό είναι κοινό για τις ATPάσες και τις GTPάσες, όπως τη μυοσίνη (Rayment et al., 1993; Fisher et al., 1995; Smith and Rayment, 1996) και κάποιες G-πρωτεΐνες (Pai et al., 1989; Kjeldgaard et al., 1993; Noel et al., 1993; Coleman et al., 1994; Al-Karadaghi et al., 1996), όπου το κατάλοιπο της θρεονίνης ή σερίνης συντονίζει το ιόν Mg^{2+} , που είναι απαραίτητο για την κατάλυση.

Επιπλέον, η hCINAP, σε αντίθεση με τις άλλες αδενυλικές κινάσες, περιέχει ένα μοτίβο Walker B (αμινοξικά κατάλοιπα 74-80). Το μοτίβο αυτό, με αλληλουχία hhhDYHG (όπου h οποιοδήποτε υδρόφοβο αμινοξύ), είναι υψηλά διατηρημένο στις ATPάσες και GTPάσες (Walker et al., 1982), προσδένοντας την γ-φωσφορική ομάδα του ATP και του GTP και υφίσταται μεγάλες αλλαγές διαμόρφωσης μετά την κατάλυση (Pai et al., 1989; Kjeldgaard et al., 1993; Noel et al., 1993).

Όλα αυτά συνηγορούν ότι η hCINAP ίσως να επιτελεί μια λειτουργία διαφορετική/ ή επιπρόσθετη από αυτή της αδενυλικής κινάσης.

1.6 Καινούργια δεδομένα για τη δομή της hCINAP (Drakou et al., in review)

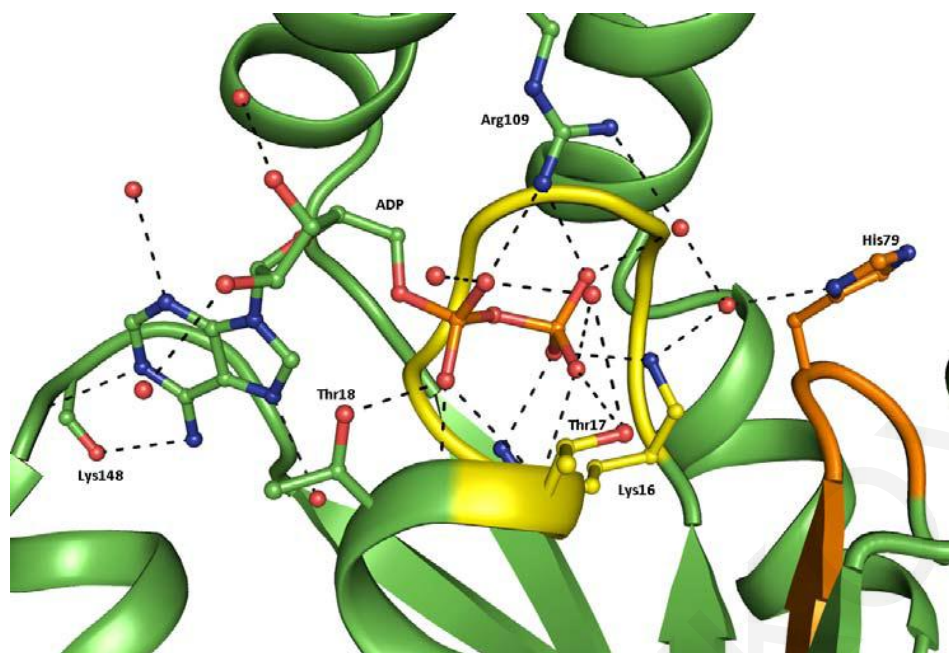
Σε πρόσφατη πειραματική εργασία, που πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του Δρ. Σπύρου Ζωγράφου, Εργαστήριο Οργανικής & Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών Ελλάδας, έχουν προκύψει καινούργια και σημαντικά δεδομένα που αφορούν τη δομή και κατ' επέκταση τη λειτουργία της πρωτεΐνης hCINAP.

Για πρώτη φορά, έχουν προσδιορισθεί με μεγάλη ευκρίνεια η δομή της πρωτεΐνης hCINAP σε σύμπλοκο με το υπόστρωμα ADP (και dADP) και το τριπλό σύμπλοκο hCINAP-Mg²⁺ADP-Pi (Drakou et al., in review). Επιπλέον, έχει προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ευκρίνεια η δομή της hCINAP με το θειϊκό ιόν στην περιοχή δέσμευσης του AMP, προσθέτοντας επιπρόσθετα στοιχεία όσον αφορά τη δομή, που παρουσιάζονταν ασαφή στην προηγούμενη προσδιορισμένη δομή (Ren et al., 2005).

Από την ανάλυση της δομής της hCINAP με το μόριο ADP (Σχήμα 1.4), προέκυψε ότι το μόριο ADP δεσμεύεται σε μια κοιλότητα κοντά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, με το δακτύλιο της αδερίνης να καταλαμβάνει την είσοδο του καταλυτικού κέντρου και τις φωσφορικές ομάδες να προσανατολίζονται προς την περιοχή της P-Loop. Η δομή του κρυστάλλου έδειξε ότι το δεσμευμένο ADP δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου και δεσμούς lower case Van der Waals με τα κατάλοιπα της περιοχής δέσμευσης του ATP. Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται κυρίως μεταξύ των φωσφορικών ομάδων του ADP και των αμινοξέων της P-loop (αμινοξέα 10-17) και της Arg109 του LID domain. Η αδενοσίνη του ADP, συμμετέχει μόνο σε τρεις δεσμούς υδρογόνου με κατάλοιπα της πρωτεΐνης, που είναι σε συμφωνία με το μεγάλο εύρος ειδικών υποστρωμάτων που κατέχει η hCINAP.

Επιπρόσθετα, η μεγάλη ευκρίνεια της δομής επέτρεψε τον ακριβή προσδιορισμό της NMP binding domain (των αμινοξικών καταλοίπων 45–55), η οποία ερμηνεύτηκε ως μια μη δομημένη περιοχή σε προηγούμενη ανάλυση (Ren et al., 2005). Βρέθηκε ότι η θηλιά NMP binding υιοθετεί μια δομή β πτυχωτή-στροφή-β πτυχωτή (Drakou et al., in review).

Αυτή η μορφολογία της θηλιάς NMP binding παρουσιάζεται και στη δομή hCINAP-SO₄²⁻, υποδηλώνοντας ότι δεν εξαρτάται από τον υποκαταστάτη. Επιπλέον, στη δομή hCINAP-SO₄²⁻ παρατηρήθηκαν δύο ιόντα SO₄²⁻ δεσμευμένα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Το πρώτο ιόν βρισκόταν συνδεδεμένο στην P-loop, και το δεύτερο ανάμεσα στην His79 και την Arg39.



Σχήμα 1.4: Απεικόνιση του δικτύου των υδρογονοδεσμών που σχηματίζει το ADP με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης και με τα μόρια του ύδατος.

Επιπρόσθετα, λόγω της δυσκολίας των άμεσων κρυσταλλογραφικών στοιχείων για τη θέση δέσμευσης του AMP, που απαιτείται για την ενεργότητα της AK, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη του τριπλού συμπλόκου hCINAP-Mg²⁺ATP-AMP, με την υπολογιστική μέθοδο docking (IFD), με την οποία έγινε πρόβλεψη των δομικών αλλαγών οι οποίες προκαλούνται σε αυτή την περίπτωση. Το μοντέλο πρόβλεψε ότι η θέση δέσμευσης του AMP βρίσκεται μεταξύ του μοτίβου Walker B και της Arg39.

Η θέση αυτή βρίσκεται κοντά στη θέση της α-φωσφορικής ομάδας του AMP και είναι πολύ παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στις αδενυλικές κινάσες από *E.coli* (AKeco) και *Sulfolobus acidocaldarius* (AKas), 1ANK (PDB ID) και 1NKS (PDB ID) αντίστοιχα, στις οποίες το θειικό ιόν αλληλεπιδρά με ένα συντηρημένο κατάλοιπο αργινίνης (Arg36 και Arg54 αντίστοιχα) (Berry et al., 1994; Vonrhein et al., 1998). Το εύρημα αυτό υποστηρίζει ότι η θέση που καταλαμβάνεται από το θειικό ιόν σε αυτή τη δομή αντιπροσωπεύει τη θέση αναγνώρισης της α-φωσφορικής ομάδας του AMP στο ένζυμο hCINAP.

Πολύ σημαντικά ήταν και τα ευρήματα που προέκυψαν από τη δομή της hCINAP με το δεσμευμένο σύμπλοκο Mg²⁺ADP-PO₄³⁻. Η δομή αυτή προέκυψε μετά από χρήση του αναστολέα Ap5A, που δρα ως αναστολέας των αδενυλικών κινασών με πρόσδεση του και στα δύο κέντρα σύνδεσης υποστρωμάτων. Χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί η θέση

πρόσδεσης του AMP και να «συλληφθεί» το μεταβατικό στάδιο της αντίδρασης της αδενυλικής κινάσης. Η ληφθείσα κρυσταλλική δομή (Σχήμα 1.5) αντιστοιχούσε σε ένα μετα-υδρολυτικό στάδιο και αποκάλυψε ότι:

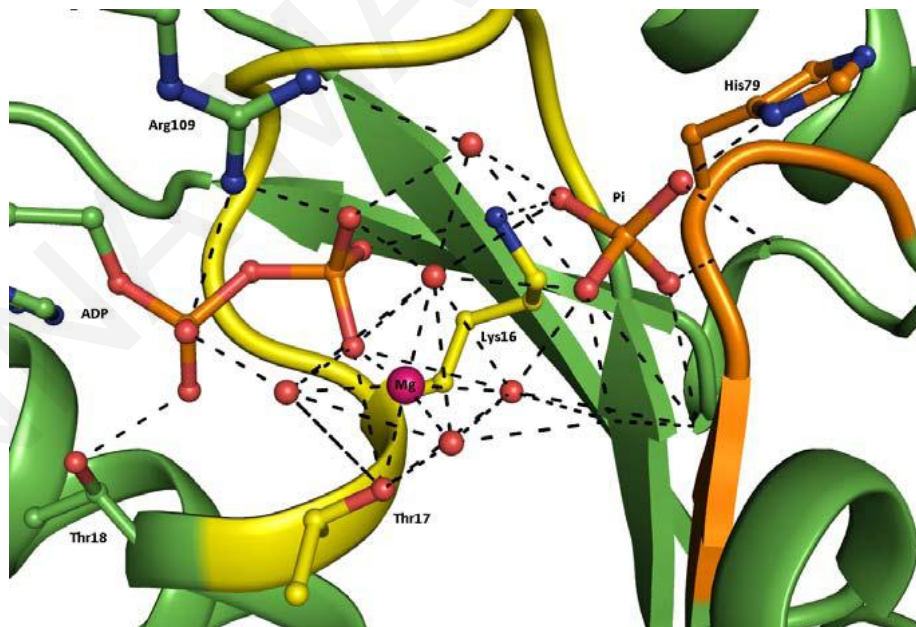
i. Η θέση πρόσδεσης του ATP είναι κατειλημμένη από το σύμπλοκο $Mg^{2+}ADP$ και από ένα ιόν PO_4^{3-} πολύ κοντά στην His79 του μοτίβου Walker B.

ii. Υπάρχει μια αλλαγή στη γωνία στρέψης της κύριας αλυσίδας της His79 που συνοδεύεται από μια μετακίνηση του ιμιδαζολικού δακτυλίου κατά 2.1\AA μακριά από το κέντρο του ATP, ώστε να δημιουργηθούν δεσμοί μεταξύ της H79 και της ελεύθερης φωσφορική ομάδας.

iii. Το ιόν Mg^{2+} έχει οκταεδρική γεωμετρία με έξι άτομα οξυγόνου στην εξωτερική σφαίρα σύνταξης. Δύο από τα οξυγόνα συνεισφέρονται από τη β-φωσφορική ομάδα και την υδροξυλική ομάδα της Thr17, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα από μόρια ύδατος.

iv. Το μόριο του ADP καταλαμβάνει ακριβώς την ίδια θέση με αυτή στο σύμπλοκο hCINAP-ADP.

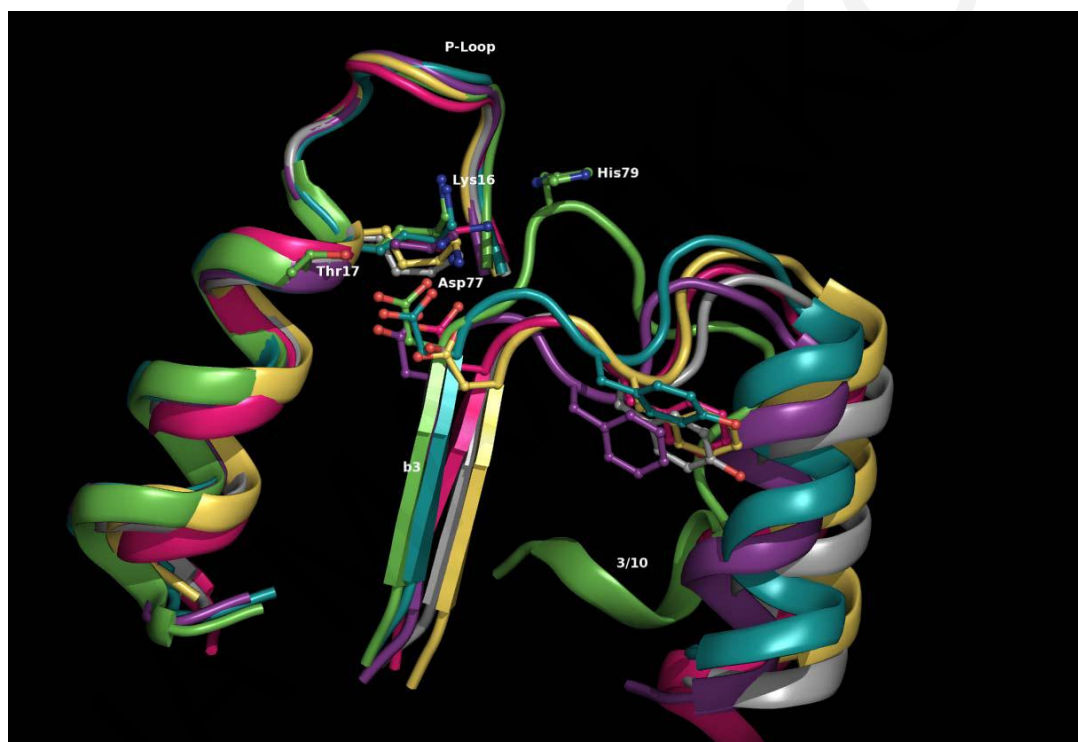
Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτό είναι το πρώτο παράδειγμα αδενυλικής κινάσης που έχει δεσμευμένο ιόν Mg^{2+} στην κρυσταλλική δομή της.



Σχήμα 1.5: Απεικόνιση του δικτύου δεσμών που σχηματίζονται στο σύμπλοκο hCINAP- $Mg^{2+}ADP-PO_4^{3-}$. Ένα εκτενές δίκτυο πολικών δεσμών σχηματίζεται μεταξύ του $Mg^{2+}ADP$, του PO_4^{3-} , των αμινοξέων της P-loop (Lys16, Thr17 και Thr18), της His79 του B μοτίβου και της Arg109 του LID domain.

Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τις καινούργιες δομές της hCINAP, συνεπάγεται ότι το καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης αποτελείται από τα αμινοξέα 10-17 του μοτίβου Walker-A (P-loop), την Arg109 που βρίσκεται στην περιοχή LID και την His79 του μοτίβου Walker B.

Επιπλέον, η περιοχή της θηλιάς από την Asp77 ως την Pro85, συμπεριλαμβανομένου και του μοτίβου Walker B, έχει διαφορετικό προσανατολισμό σε σύγκριση με τις άλλες AKs (Σχήμα 1.6), παρουσιάζοντας δομικά χαρακτηριστικά τυπικά για την οικογένεια των ΑΤΡασών/ΓΤΡασών παρά των ΑΚs. Πιθανότατα, αυτός ο διαφορετικός προσανατολισμός να είναι σημαντικός για την εμφάνιση της ενεργότητας ΑΤΡάσης.

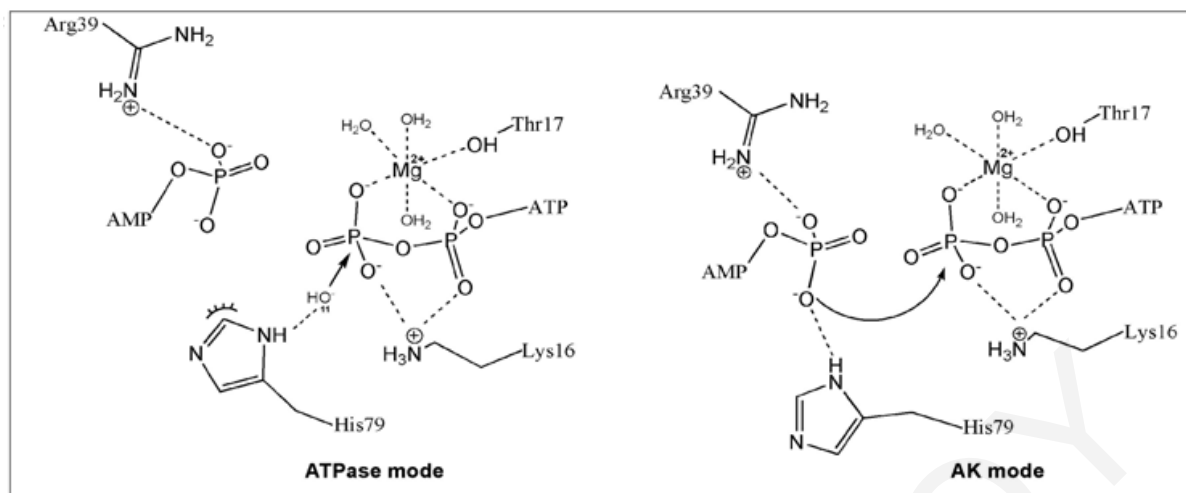


Σχήμα 1.6: Απαικόνιση της δομής της hCINAP (πράσινο) σε σύγκριση με τις άλλες αδενυλικές κινάσες (AK1: μπλε, AK2: ροζ, AK3: κίτρινο, AK4: μοβ, AK5: γκρι). Το μοτίβο Walker A (P-loop) είναι υψηλά συντηρημένο ενώ η περιοχή που συνδέει τις επιφάνειες β3 και β4 στη hCINAP αποτελείται από μια μεγάλη θηλιά την οποία ακολουθεί μια έλικα 3₁₀. Η περιοχή αυτή περιέχει και ένα Walker B μοτίβο χαρακτηριστικό για τις ΑΤΡάσες/ΓΤΡάσες, αλλά όχι για τις αδενυλικές κινάσες. Ο προσανατολισμός της περιοχής αυτής επιτρέπει στην His79 να εισχωρεί στη θέση πρόσδεσης του ATP, καταδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο του αμινοξέος αυτού στην κατάλυση. Στις άλλες αδενυλικές κινάσες των θηλαστικών η αντίστοιχη θέση της His79 καταλαμβάνεται από ένα υδρόφοβο αμινοξύ που προσανατολίζεται προς τη θέση πρόσδεσης του AMP.

Ο συνδυασμός όλων των δομικών στοιχείων που προέκυψαν, καθώς και η απόδειξη ότι η hCINAP παρουσιάζει ασυνήθιστη υψηλή ενεργότητα ATPάσης (Santama et al., 2005; Drakou et al., in review), επιπρόσθετα της ενεργότητας AK (Ren et al., 2005), υποστηρίζουν την ύπαρξη διπλής ενεργότητας AK/ATPάσης για την πρωτεΐνη hCINAP.

Τέλος, προτείνεται ένας πιθανός δομικός μηχανισμός (Σχήμα 1.7), ο οποίος επιτρέπει την επιλογή μεταξύ της ενεργότητας ATPάσης και AK. Ο δακτύλιος του ιμιδαζολίου της His79 μπορεί να μεταβαίνει μεταξύ δύο πιθανών διευθύνσεων. Στη πρώτη διαμόρφωση («flip» ή «κατάσταση AK»), το άζωτο του ιμιδαζολίου αντικρίζει τη θέση δέσμευσης AMP και συν-κατευθύνει τον α-φωσφόρο του AMP μαζί με την Arg39. Στη δεύτερη διαμόρφωση («flip» ή κατάσταση «ATPάσης»), το άζωτο του ιμιδαζολίου αντικρίζει το καταλυτικό κέντρο $Mg^{+2}ATP$ και η υδρόλυση του ATP μπορεί να πραγματοποιείται σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει προταθεί για τη μυοσίνη (Okimoto et al., 2001). Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό η His79 δρα σαν καταλυτική βάση για να ενεργοποιήσει ένα μόριο ύδατος, προάγοντας έτσι την πυρηνόφιλη προσβολή στη γειτονική γ-φωσφορική ομάδα του ATP. Το απελευθερωμένο φωσφορικό ιόν σχηματίζει στη νέα του θέση δεσμούς υδρογόνου με το ιμιδαζολικό άζωτο της His79 και της Lys16. Το ιόν Mg^{2+} διατηρεί τη θέση του με ένα μόριο ύδατος να καταλαμβάνει πλέον τη θέση του οξυγόνου της γ-φωσφορικής ομάδας (Drakou et al., in review).

Συνεπώς, η His79 τοποθετείται στην ευκίνητη περιοχή μεταξύ των θέσεων δέσμευσης ATP και AMP, παρέχοντας τη δυνατότητα της εναλλαγής μεταξύ των διαμορφώσεων flip και flop. Ως εκ τούτου μπορεί να διαδραματίζει ρόλο δομικού διακόπτη προτιμώντας μία εκ των δύο διαμορφώσεων, με επακόλουθο την επιλογή μιας εκ των δύο ενζυμικών ενεργοτήτων, AK ή ATPάσης.



Σχήμα 1.7: Μοντέλο δομικού μηχανισμού μετάβασης της hCINAP μεταξύ των ενεργοτήτων ΑΤΡάσης και ΑΚ. Αντιπαράθεση των δύο διαμορφώσεων της His79. Στη διαμόρφωση της ΑΤΡάσης, το ιμιδαζολικό άζωτο ND1 της His79 είναι στραμμένο προς τη θέση πρόσδεσης του ΑΤΡ και ενεργοποιεί ένα μόριο ύδατος ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Στη διαμόρφωση ΑΚ η His79 στρέφεται ώστε να σχηματίσει τη θέση αναγνώρισης του ΑΜΡ μαζί με τις αμιδικές ομάδες της Arg39.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε μετάλλαξη στο κρίσιμο κατάλοιπο His79 με μετατροπή της ιστιδίνης σε γλυκίνη (H79G) και από κινητικά πειράματα που έγιναν προέκυψε ότι η μετάλλαξη αυτή μειώνει περίπου 72% την ενζυμική δραστηριότητα της ΑΚ και 76% της ΑΤΡάσης σε σύγκριση με την πρωτεΐνη του φυσικού τύπου. Το γεγονός αυτό, δηλώνει ότι ο ρόλος της His79 είναι σημαντικός στην κατάλυση και των δύο αντιδράσεων (Drakou et al., in review).

Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η His79 συμβάλλει κυρίως στην αναγνώριση του ΑΤΡ (η K_m για το ΑΤΡ διπλασιάζεται), αλλά δεν είναι κρίσιμο αμινοξύ για την κατάλυση, αφού η μετάλλαξη του συνοδεύεται από σχετικά μικρή επίδραση στη καταλυτική ταχύτητα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το ένζυμο hCINAP-H79G εμφανίζει για το ΑΜΡ μικρότερη K_M (μεγαλύτερη συγγένεια). Η κινητική ανάλυση του ενζύμου σε συνδυασμό με τα δομικά στοιχεία οδηγεί στην πρόταση ότι αυτή η μετάλλαξη «κλειδώνει» τη θέση πρόσδεσης του ΑΜΡ σε μια πιο κλειστή διαμόρφωση με μεγαλύτερη συγγένεια για το ΑΜΡ.

Συμπερασματικά, βάσει των δομικών και κινητικών αποτελεσμάτων, η hCINAP προτείνεται να λειτουργεί ως αισθητήρας της διαθεσιμότητας των υποστρωμάτων και η επιλογή της καταλυτικής ενεργότητας (ΑΚ προς ΑΤΡase) να ρυθμίζεται από το ενδοκυττάριο περιβάλλον του ενζύμου και τη δυναμική προσαρμογή στην ενέργεια και

στις μεταβολικές απαιτήσεις του κυττάρου οποιαδήποτε στιγμή, διαδραματίζοντας κρίσιμο ρόλο για την ρύθμιση των φυσιολογικών επιπέδων των νουκλεοτιδίων στον ευκαρυωτικό πυρήνα.

Η πρωτεΐνη hCINAP εντοπίζεται διάχυτη στο πυρηνόπλασμα, εξαιρετέου του πυρηνίσκου και σπανίως στα σωματίδια Cajal (Santama et al., 2005), υποπυρηνικών δομών του πυρήνα. Ως εκ τούτου στη συνέχεια δίνονται πληροφορίες για τη δυναμική οργάνωση του πυρήνα στα ευκαρυωτικά κύτταρα με εκτεταμένη αναφορά στα σωματίδια Cajal και την πρωτεΐνη coilin, συστατικό των δομών αυτών.

1.7 Ο Πυρήνας

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ο κυτταρικός πυρήνας αποτελεί μια πολύ οργανωμένη δομή, που περιέχει δομικά και λειτουργικά διακριτά υποδιαμερίσματα, πολλά από τα οποία εξακολουθούν να μην είναι πλήρως χαρακτηρισμένα.

Σε αυτά τα πυρηνικά σωματίδια ή διαμερίσματα, συμπεριλαμβάνονται ο πυρηνίσκος, τα διάστικτα (speckles), τα παραδιάστικτα (paraspeckles), τα σωματίδια Cajal (Cajal bodies), τα gems και τα σωματίδια PML (Promyelocytic Leukaemia bodies) (Matera, 1999). Αυτά τα οργανίδια αν και δεν περικλείονται από μεμβράνες, είναι διακριτά από το πυρηνόπλασμα που τα περιβάλλει και είναι εμπλουτισμένα με συγκεκριμένες πυρηνικές πρωτεΐνες ή συμπλέγματα πρωτεϊνών-RNA, που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι λειτουργούν ως περιοχές συναρμολόγησης περίπλοκων μοριακών συμπλόκων (πχ. μεταγραφής) και εμπλέκονται σε διάφορες πυρηνικές διαδικασίες, όπως η βιογένεση των ριβοσωμάτων, η μεταγραφή και το μάτισμα του RNA.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία ότι η εσωτερική οργάνωση του πυρήνα παρουσιάζει δυναμική μορφή και ως εκ τούτου και πολλές πρωτεΐνες και παράγοντες των RNP του πυρήνα παρουσιάζουν αντίστοιχα δυναμική μορφή. Η ενδοπυρηνική κατανομή πολλών πρωτεϊνών και κατά συνέπεια η οργάνωση του πυρήνα, μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και σε απόκριση στην κυτταρική μεταβολική δραστηριότητα. Για παράδειγμα μετά από πρόκληση μεταγραφικής καταστολής με διάφορες ουσίες [πχ. ακτινομικίνη (actD) και 5,6-διχλωρο-1-β-D-ριβοφουρανοσυλβενζιμιδαζολιο (DRB)] πολλοί πυρηνικοί παράγοντες αποδιοργανώνονται και επαναδιοργανώνονται σε διαφορετικές πυρηνικές περιοχές, μεταβάλλοντας με αυτό το τρόπο τη μορφολογία των υποδιαμερισμάτων του πυρήνα (Shav-Tal et al., 2005).

1.8 Το σωματίδιο Cajal (CB)

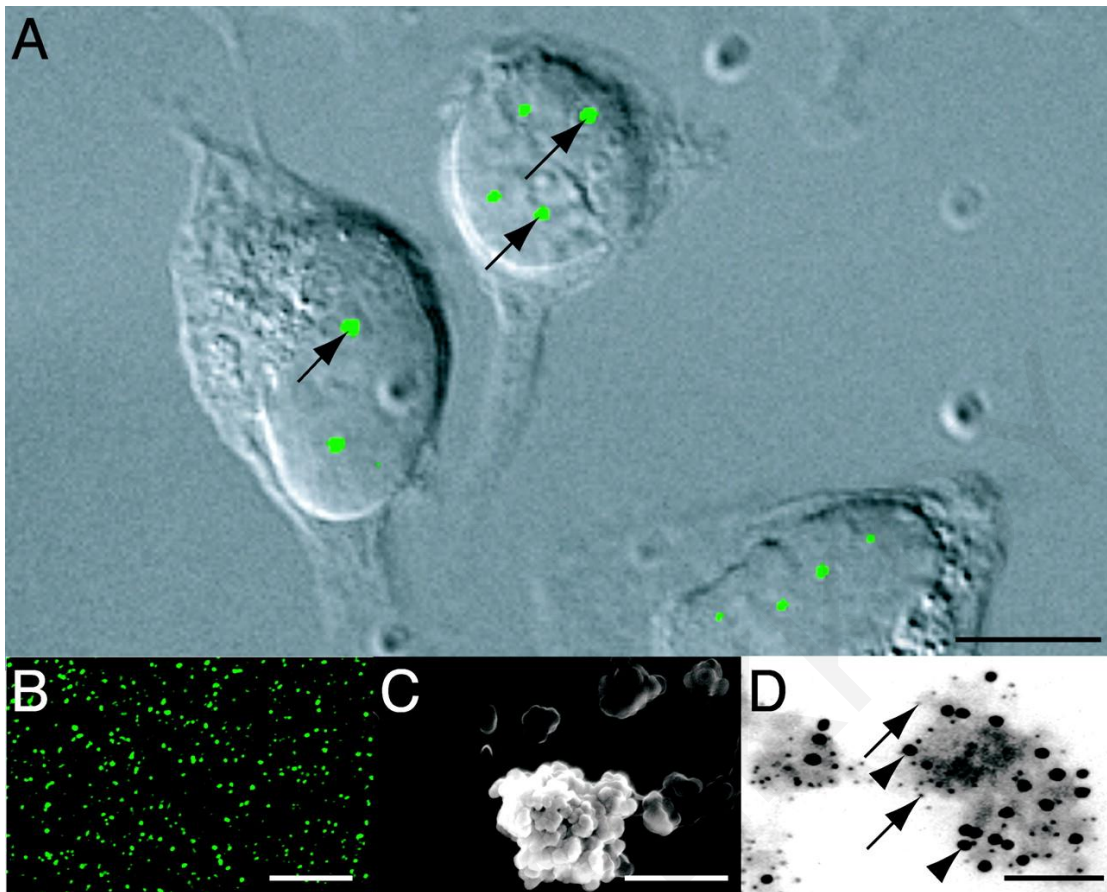
Μία από αυτές τις ενδοπυρηνικές δομές είναι το σωματίο Cajal, το οποίο έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον μετά την ανακάλυψη ότι περιέχει υψηλή συγκέντρωση από ριβοπυρηνοπρωτεϊνικά σωματίδια (snRNPs) που εμπλέκονται στη διαδικασία του «ματίσματος» του πρόδρομου RNA (RNA splicing) (Lamond and Carmo-Fonseca, 1993).

1.8.1 Ανακάλυψη των Cajal Bodies

Η δομή που είναι σήμερα γνωστή ως Cajal body, αναγνωρίστηκε αρχικά το 1903 από τον διάσημο Ισπανό κυτταρολόγο Ramon-y-Cajal, ο οποίος παρατήρησε ότι οι νευρώνες περιείχαν χαρακτηριστικές σφαιρικές δομές στον πυρήνα, οι οποίες βάφονταν έντονα μετά από χρώση αργύρου. Επειδή βρίσκονταν πολύ κοντά στον πυρηνίσκο τις ονόμασε «εξαρτήματα του πυρηνίσκου» (nucleolar accessory bodies). Αργότερα, το 1969, η ίδια δομή «ξανα-ανακαλύφθηκε» με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και της δόθηκε το όνομα «σπειρωμένο σωματίο» λόγω της μορφολογίας της διαμόρφωσης της (μπλεγμένα σπειρωμένα σπειράματα) (Monneron and Bernhard, 1969). Σήμερα ονομάζονται Cajal Bodies προς τιμή του Ramon-y-Cajal που τα πρωτοανακάλυψε.

Τα Cajal bodies (CBs) είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που έχουν εξεταστεί, έχοντας την ίδια μορφολογία τόσο στα φυτικά όσο και στα ζωικά κύτταρα. Εντοπίζονται είτε ελεύθερα στο πυρηνόπλασμα είτε συνδέονται με την περιφέρεια του πυρηνίσκου (Σχήμα 1.8). Έχουν ακόμα ανιχνευτεί και μέσα στον πυρηνίσκο σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού και σε ηπατικά κύτταρα (Malatesta et al., 1994). Τα CBs εμφανίζονται ως πυρηνικές εστίες, συνήθως 1-6 σε αριθμό και το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0.2 μm μέχρι 2 μm ή ακόμα μεγαλύτερο, όμως, τόσο το μέγεθος όσο και ο αριθμός τους ανά πυρήνα ποικίλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον οργανισμό (Platani et al., 2000).

Τα CBs είναι περισσότερο εμφανή σε κύτταρα που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων που διαφοροποιούνται ή διαιρούνται πολύ γρήγορα όπως τα καρκινικά ή τα κύτταρα που είναι μεταβολικώς ενεργά όπως οι νευρώνες (Carmo-Fonseca et al., 1993, Fernandez et al., 2002).



Σχήμα 1.8: Cajal bodies.

A: Κύτταρα HeLa που εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη FP-coilin (τα βέλη υποδεικνύουν τα Cajal bodies). **B:** Εικόνα φθορισμού απομονωμένων CBs, που έχουν σημειωθεί με αντίσωμα έναντι της coilin. **C:** Πεδίο από εικόνα απομονωμένου CB με σάρωση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. **D:** Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μεταφοράς, απομονωμένου CB. Η πρωτεΐνη coilin σημάνθηκε με χρυσό 5 nm (βέλη) και η SMN (Survival of Motor Neuron) με χρυσό 10 nm (κεφαλές βέλων). Κλίμακα: 10 μ m (A και B), 500 nm (C), 200 nm (D) (Αναπαραγωγή εικόνας από Ogg and Lamond, 2002).

1.8.2 Τα συστατικά που εντοπίζονται στα Cajal Bodies (CBs)

Η μεγαλύτερη πρόοδος όσον αφορά την μελέτη των CBs, επιτεύχθηκε με την ανακάλυψη ενός αντισώματος που απομονώθηκε από έναν ασθενή, με αυτο-άνοσο νόσημα, το οποίο αναγνώριζε επιλεκτικά κάποιο αντιγόνο στα CBs. Συγκεκριμένα ένα αντιγόνο με ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ~80 KDa. Μελέτες ανοσοφθορισμού που έγιναν με χρήση του αντισώματος αυτού έδειξαν ότι τα CBs ήταν οι κύριες πυρηνικές εστίες εντοπισμού της πρωτεΐνης αυτής, που επίσης εντοπιζόταν διάχυτη στο πυρηνόπλασμα. Λόγω του μεγέθους της και του συγκεκριμένου εντοπισμού της στα Cajal bodies ονομάστηκε p80 coilin (Andrade et al., 1991).

Εκτός από την πρωτεΐνη p80 coilin, όπως έγινε γνωστό μέσω αναλύσεων ανοσοφθορισμού και υβριδισμού, ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών αντιγόνων εντοπίζεται στα CBs, συμπεριλαμβανομένων των snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles- μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα).

Τα snRNPs είναι σύμπλοκα μικρών πυρηνικών μορίων RNA (snRNA) και ειδικών πρωτεϊνών, των Sm (Smith), οι οποίες είναι απαραίτητα συστατικά του σωματίου ματίσματος (spliceosome), που απαιτείται για την διαδικασία ματίσματος του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA).

Μέχρι σήμερα έχει αποδειχτεί ότι στα CBs περιέχονται τρεις κύριες κατηγορίες μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών. Αυτές είναι οι ισομορφές U1, U2, U3, U4, U5 και U6 των snRNPs οι οποίες είναι υπομονάδες των συμπλόκων ματίσματος (επανασυνδεοσώματων) (Carvalho et al., 1999), το U7 snRNA το οποίο ίσως να απαιτείται για την αντιγραφή του 3' άκρου των mRNAs των ιστονών (Wu et al., 1996; Pillai et al., 2001) και τα μικρά RNAs του πυρηνίσκου (snoRNAs) U3 και U8 και άλλα snoRNPs, τα οποία λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία επεξεργασίας του πρόδρομου rRNA (Jimenez-Garcia et al., 1994; Bauer et al., 1994; Boulon et al., 2004).

Επίσης στα CBs εντοπίζονται ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, και θεμελιώδεις μεταγραφικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν τις πυρηνικές πρωτεΐνες Nopp140 και NAP57 (Meier and Blobel, 1994), την ινδική πυρηνική πρωτεΐνη fibrillarin (Frey and Matera, 1995), την ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 (Jimenez-Garcia et al., 1994) καθώς και τις πρωτεΐνες SMN και SIP1 οι οποίες εντοπίζονται στην ίδια θέση με τα snRNPs και εμπλέκονται στη βιογένεση τους (Carvalho et al., 1999). Ακόμα τα CBs συμπεριλαμβάνουν ένα αριθμό πρωτεϊνικών κινασών (kinases): την εξαρτώμενη από την cdk κινάση, η οποία αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα TFII_H, την εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση και την διπλοελικωμένη RNA πρωτεϊνική κινάση DAI (Jordan et al., 1997).

1.8.3 Η δυναμική φύση των Cajal bodies

Τα Cajal bodies είναι δυναμικές μορφές, οι οποίες υφίστανται κύκλους οργάνωσης και αποδιοργάνωσης, ως προς τη μορφολογία και το περιεχόμενό τους. Επηρεάζονται από παράγοντες οι οποίοι μεταβάλλουν: την γονιδιακή έκφραση, όπως είναι το στάδιο του κυτταρικού κύκλου, το στάδιο της κυτταρικής διαφοροποίησης, η θερμοκρασία και η χρήση μεταγραφικών αναστολέων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του μεγέθους και του αριθμού τους στα κύτταρα, την μεταβολή της σύνδεσης και της ποσότητας των

snRNPs που βρίσκονται σ' αυτά και το βαθμό φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης coilin (Lamond and Carmo-Fonseca, 1993).

Έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στο μέγεθος και στον αριθμό των CBs κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στη μίτωση είναι σε μεγάλο βαθμό αποδιοργανωμένα και η πρωτεΐνη coilin είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα όπως και τα snRNPs. Μόνο μικρά κατάλοιπα των CBs μπορούν να ανιχνευτούν κατά τη διάρκεια της μετάφασης και της ανάφασης. Δεν ανιχνεύονται καθόλου CBs στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη διάρκεια του πρώιμου G1 σταδίου, αλλά γίνονται διακριτά αργότερα και παραμένουν σταθερά κατά τη μεσόφαση. Ο αριθμός των CBs και το μέγεθος τους είναι μέγιστα στην μεταγωγή από την G1 στην S φάση (Andrade et al., 1993; Fernandez et al., 2002).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η πρωτεΐνη coilin υφίσταται υπερφωσφορυλίωση κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Είναι πιθανόν αυτή η φωσφορυλίωση στη μετάφαση να αποτελεί έναυσμα για την αποδιοργάνωση των CBs (Lamond and Carmo-Fonseca, 1993). Τα CBs υπόκεινται σ' ένα γρήγορο κύκλο οργάνωσης/ αποδιοργάνωσης όπως φαίνεται από δύο στοιχεία. Κατά πρώτον, η εξωγενούς προέλευσης πρωτεΐνη coilin που εκφράζεται σε κυτταροκαλιέργειες, μπορεί να εντοπιστεί σ' αυτά άμεσα, και κατά δεύτερον η χρήση αναστολέων κατά της πρωτεϊνσύνθεσης προκαλεί σταδιακή εξαφάνιση των CBs (Rebelo et al., 1996).

Είναι γνωστό επί παραδείγματι, ότι η παρουσία των snRNPs στα CBs είναι εξαρτώμενη από την μεταγραφή. Όταν η μεταγραφή βρίσκεται σε καταστολή, τα snRNPs δεν ανιχνεύονται πλέον στα CBs, ούτε και συνδέονται με την πρωτεΐνη coilin, αλλά σε αντίθεση, συναθροίζονται σε μεγάλα συμπλέγματα πάνω σε τεμάχια χρωματίνης (Bohmann et al., 1995). Κάτω από συνθήκες έντονου θερμικού σοκ, όπου επίσης καταστέλλεται η μεταγραφή των περισσότερων γονιδίων, παρατηρείται επίσης αποδέσμευση των snRNPs από τα CBs. Αντίθετα, ο αριθμός των CBs ανά πυρήνα αυξάνεται κάτω από συνθήκες που τα κύτταρα διεγείρονται ώστε να αναπτυχθούν με γρήγορους ρυθμούς ή όταν προκαλείται γονιδιακή έκφραση σε ψηλά επίπεδα (Carmo-Fonseca et al., 1992; Lamond and Carmo-Fonseca, 1993). Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι η σχέση που υπάρχει μεταξύ των snRNPs και των CBs είναι δυναμικής φύσεως και ότι η σύνδεση τους ενισχύεται όταν νέα αντίγραφα συντίθενται. Επιπλέον υποδεικνύεται ότι είναι απίθανο τα CBs να ενεργούν ως χώροι αποθήκευσης για τα ανενεργά snRNPs τα οποία συσσωρεύονται σ' αυτά στην απουσία μεταγραφής.

Ακόμα μια ένδειξη ότι τα CBs αποτελούν δυναμικές μορφές, είναι η ενδοπυρηνική τους κίνηση. Έχει παρατηρηθεί ένα εύρος κινήσεων, συμπεριλαμβανομένων της κίνησης τους διαμέσου του πρωτοπλάσματος του πυρήνα, της συνένωσης και της απομάκρυνσης

μεμονωμένων CBs. Έχει παρατηρηθεί επίσης η κίνηση τους προς και από την περιφέρεια του πυρηνίσκου και εντός αυτού (Platani et al., 2000; Platani et al., 2002). Επομένως τα CBs, είναι πολύ ευκίνητα και παρουσιάζουν απροσδόκητα μεγάλης εμβέλειας κινήσεις, οι οποίες ίσως να είναι σημαντικές για την ενδοκυττάρια λειτουργία τους. Αυτές οι κινήσεις ίσως να είναι το συνδυασμένο αποτέλεσμα της ενεργού ρύθμισης της δέσμευσης στα ενδοπυρηνικά συστατικά και της παθητικής διάχυσης τους εντός του πυρηνοπλάσματος.

Οι πειραματικές μελέτες με βάση αυτά τα στοιχεία, αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο τύπων CBs, τα οποία διαφέρουν στο μέγεθος, στη μοριακή σύνθεση και στη δυναμική συμπεριφορά και επομένως ενδέχεται να εκπληρώνουν διαφορετικές λειτουργίες στον πυρήνα. Ο πρώτος τύπος αποτελείται από CBs με διάμετρο 0.4-0.7 μm ενώ ο δεύτερος τύπος από CBs με διάμετρο $<0.2 \mu\text{m}$. Στα CBs του πρώτου τύπου ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες fibrillarin και Sm snRNP, οι οποίες δεν ανιχνεύονται σε όλα τα σωμάτια του δεύτερου τύπου. Επιπρόσθετα, η μοριακή σύνθεση των CBs του δεύτερου τύπου ποικίλει από σωμάτιο σε σωμάτιο, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ίσως και άλλων υποκατηγοριών. Όσον αφορά την δυναμική τους συμπεριφορά, οι δύο αυτοί τύποι διαφέρουν στην ταχύτητα και στην εμβέλεια κίνησης τους. Τα CBs του δεύτερου τύπου κινούνται με μεγαλύτερες ταχύτητες και σε μεγαλύτερο εύρος απ' ό,τι του πρώτου (Platani et al., 2000).

Επιπλέον, πειράματα φωτολεύκανσης (FRAP) που έχουν διεξαχθεί, εισηγούνται μια συνεχή κίνηση και ταχεία εναλλαγή των πρωτεϊνών μεταξύ των CBs και του πυρηνοπλάσματος (Sleeman et al., 2003; Dundr et al., 2004).

1.8.4 Πιθανή λειτουργία των Cajal Bodies

Η πλήρης λειτουργία που επιτελούν τα CBs παραμένει μέχρι στιγμής αδιευκρίνιστη, παρά το γεγονός του συνεχούς εμπλουτισμού των δεδομένων που αφορούν τη σύνθεση, τον εντοπισμό και τη διαμόρφωση αυτών των δομών. Αρκετά διαφορετικά μοντέλα έχουν προταθεί για την εξήγηση της λειτουργίας αυτής. Πολλά από αυτά έχουν εγκαταλειφθεί, λόγω νεότερων πειραματικών δεδομένων, ενώ άλλα ανταποκρίνονται καλύτερα στα υφιστάμενα πειραματικά δεδομένα.

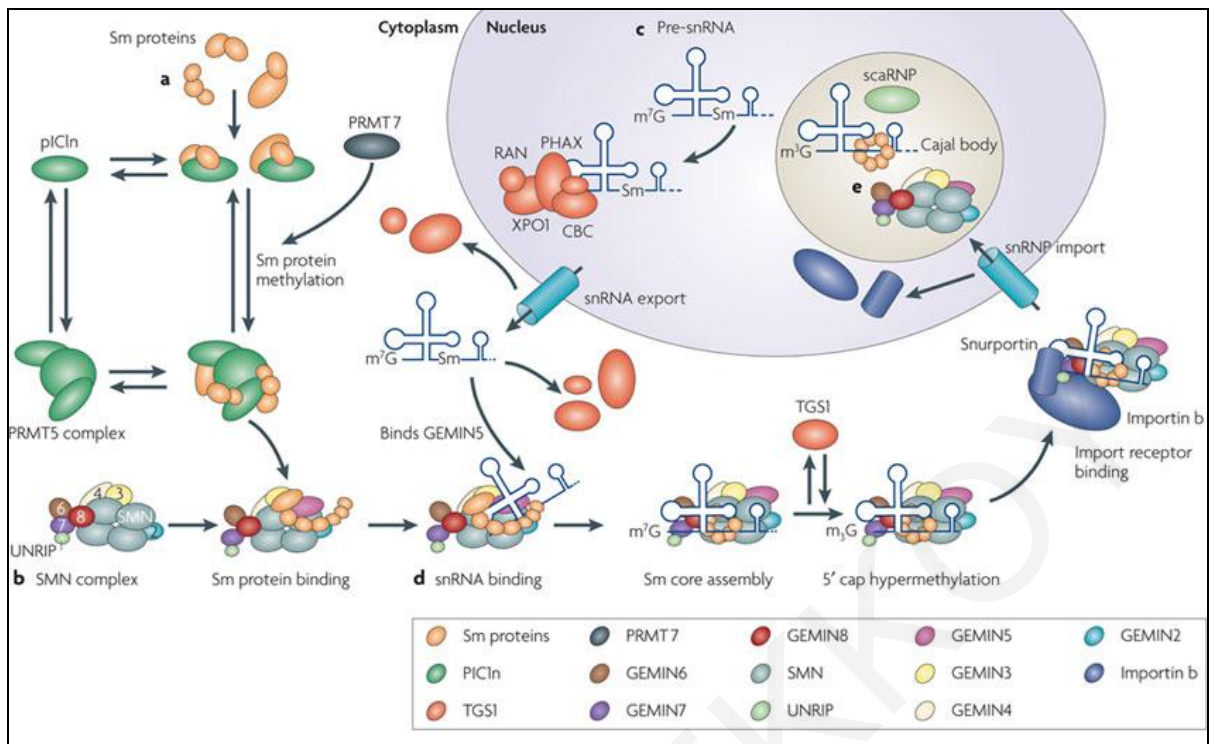
Όπως έχει προαναφερθεί, τα CBs είναι πλούσια σε μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (snRNPs). Αρχικά τα μικρά πυρηνικά RNA (snRNA) συντίθενται στον πυρήνα και έπειτα εξάγονται στο κυτταρόπλασμα όπου συγκροτούνται με τις 7 πρωτεΐνες Sm, με τη βοήθεια του συμπλέγματος της SMN (8 πρωτεΐνες Gemins μαζί με τη SMN). Οι πρωτεΐνες Sm, χρησιμεύουν ως σήμα για τις διαδικασίες υπερ-μεθυλίωσης του καλύμματος m^7G του 5' και τη διάσπαση του 3' άκρου των snRNA. Όταν ολοκληρωθούν

αυτά τα βήματα, επανεισάγονται στον πυρήνα ως ριβοπρωτεϊνικά σωματίδια (επανασυνδεοσώματα) (Wahl et al., 2009) (Σχήμα 1.9).

Αρκετά πειραματικά δεδομένα δεικνύουν ότι, όταν τα συμπλέγματα αυτά εισέλθουν στο πυρήνα, αρχικά συναθροίζονται στα CBs και έπειτα μετακινούνται στα πυρηνικά speckles, ο οποίος είναι ο χώρος αποθήκευσης των μεταγραφικών παραγόντων (Sleeman and Lamond, 1999) και αντίστοιχα τα U3 και U8 snoRNAs συναθροίζονται παροδικά στα CBs πριν την κίνηση τους προς τον πυρηνίσκο (Narayanan et al., 1999). Επεξεργασία των κυττάρων με τον αναστολέα Λεπτομυκίνη B, ο οποίος αναστέλλει την έξοδο των νεοσυντιθέμενων μεταγραφημάτων snRNA στο κυτταρόπλασμα και ως επακόλουθο αναχαιτίζεται η παραγωγή των snRNPs, προκαλεί επίσης την κένωση των CBs από τα snRNPs (Carvalho et al., 1999).

Ο εντοπισμός αυτών των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων στα CBs υποδηλώνει την ενδεχόμενη εμπλοκή τους στη διαδικασία του ματίσματος του πρόδρομου mRNA. Ωστόσο οι δομές αυτές δεν περιέχουν ούτε DNA (Thiry, 1994), ούτε άλλες πρωτεΐνες, non-snRNP, όπως τις πρωτεΐνες SR και τον παράγοντα U2AF⁶⁵, απαραίτητες για τη διαδικασία του ματίσματος, ούτε και τα ίδια τα πρωτογενή μεταγραφήματα (Carmona-Fonseca et al., 1992). Επομένως, τα CBs είναι απίθανο να αποτελούν τις κύριες εστίες διεξαγωγής του ματίσματος του πρόδρομου mRNA, αλλά φαίνεται να εμπλέκονται στις διαδικασίες συναρμολόγησης, ωρίμανσης και μεταφοράς των snRNPs και snoRNPs στα σημεία λειτουργίας τους και πιθανόν και άλλων μακρομοριακών συμπλεγμάτων (Gall et al., 1999).

Το σύμπλεγμα SMN συνοδεύει τα snRNPs από το κυτταρόπλασμα στο πυρήνα και έπειτα στα CBs. Για τη στοχευόμενη αυτή κίνηση στα CBs είναι απαραίτητη η άμεση αλληλεπίδραση αυτού του συμπλέγματος με την πρωτεΐνη coilin, μέσω της συμμετρικής διμεθυλίωσης των αμινοξικών καταλοίπων αργινίνης στη δομή RG της coilin (Hebert et al., 2001). Επιπλέον, η SMN αλληλεπιδρά με παρόμοια αμινοξικά κατάλοιπα διμεθυλαργινίνης με ορισμένες από τις Sm πρωτεΐνες του ίδιου συμπλέγματος (Friesen et al., 2001). Επομένως τα CBs, μπορεί να αποτελούν χώρους όπου το σύμπλεγμα SMN ελευθερώνεται από τα snRNPs και ανακυκλώνεται πίσω στο κυτταρόπλασμα, δεδομένου ότι οι δομές RG των πρωτεϊνών coilin και Sm συναγωνίζονται για τη δέσμευση της SMN, ενώ η coilin αλληλεπιδρά με διαφορετική περιοχή των Sm πρωτεϊνών από ότι η SMN (Hebert et al., 2001).



Σχήμα 1.9: Το μονοπάτι βιογένεσης των μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (snRNPs). **a:** Στο κυτταρόπλασμα οι 7 πρωτεΐνες Sm δεσμεύονται στην πρωτεΐνη ρύθμισης αγωγιμότητας χλωρίου, pICln (chloride conductance regulatory protein), με το σύμπλοκο της μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης 5 (PRMT5) - η οποία διμεθυλιώνει συμμετρικά τις SmB, SmD1 και SmD3 – και με το σύμπλεγμα της SMN (survival motor neuron). **b:** Το σύμπλεγμα της SMN αποτελείται από τις πρωτεΐνες SMN (σε ολιγομερή μορφή), GEMIN2–8 και την UNR-interacting protein (UNRIP). **c:** τα snRNA μεταγράφονται στον πυρήνα και στη συνέχεια δεσμεύονται στις πρωτεΐνες εξαγωγής, τον φωσφορυλιωμένο προσαρμογέα του RNA (PHAX), το σύμπλεγμα πρόσδεσης καλύμματος (CBC), την exportin (XPO1) και την πυρηνική πρωτεΐνη GTP συνδεδεμένη με τον Ras (RAN) και εξάγονται στο κυτταρόπλασμα. **d:** Το σύμπλεγμα της SMN τοποθετεί τις πρωτεΐνες Sm στα snRNA. Το κάλυμμα 7-μεθυλγουανοσίνης (m^7G) των snRNA υπερμεθυλιώνεται από την συνθετάση της τριμεθυλογουανοσίνης 1 (TGS1), επιτρέποντας στο σύμπλεγμα να προσδέσει τις snurportin και importin, που μεσολαβούν για την είσοδο του συμπλέγματος SMN με τις snRNP στον πυρήνα. **e:** Στον πυρήνα, το σύμπλεγμα αυτό εντοπίζεται στα Cajal bodies και τα snRNPs υφίστανται περαιτέρω ωρίμανση (Αναπαραγωγή εικόνας από Burghes and Beattie, 2009).

Επίσης έχει βρεθεί η ύπαρξη μικρών RNAs (scaRNAs), τα οποία εντοπίζονται ειδικά στα CBs και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των πλούσιων σε ουριδίνη (U) snRNAs (Darzacq et al., 2002), όπως 2'-Ο-ριβοσωμική-μεθυλίωση και ψευδο-ουριδυλίωσης, ενισχύοντας έτσι το ρόλο των CBs στη βιογένεση των snRNPs (Jady et al., 2003).

Πολύ πιθανόν τα CBs να διαδραματίζουν και επιπλέον ρόλο στον πυρήνα. Έχει δειχθεί, ότι συνδέονται ειδικά με συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους, συμπεριλαμβανομένων των ιστονών (Frey et al., 1999) και των συμπλεγμάτων των γονιδίων U1 και U2 snRNA και U3 snoRNA (Smith et al., 1995), και ίσως να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση σε συγκεκριμένους τόπους ή να εφοδιάζουν με μεταγραφικούς παράγοντες ή άλλα συστατικά που είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική έκφραση σε αυτά τα σημεία (Frey and Matera, 2001).

Η σύνδεση των CBs με το γενετικό τόπο των snRNA, συνδέεται συχνά με τα σωματίδια PML, τα οποία είναι πλούσια σε μεταγραφικούς παράγοντες και αυτή η σύνδεση επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση μεταξύ της coilin και της πρωτεΐνης των PML, PIASy (Sun et al., 2005).

Έχει προταθεί επίσης ότι ίσως να ρυθμίζουν τη συναρμολόγηση ενός μεγάλου εύρους μακρομοριακών συμπλεγμάτων, συμπεριλαμβανομένων των συμπλεγμάτων της μεταγραφής. Αυτό λόγω του εντοπισμού στα CBs του *Xenopus*, πολλαπλών μεταγραφικών παραγόντων (μεταγραφικών, σχηματισμού καλύμματος, ματίσματος, πολυαδενυλίωσης και διάσπασης των pre-mRNAs) της RNA πολυμεράσης II (RNA pol II). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες συμπεριλαμβάνουν τις υπομονάδες της pol II (Morgan et al., 2000; Doyle et al., 2002), τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIF (Gall et al., 1999), την υπομονάδα TBP του TFIID (Gall, 2000), το παράγοντα σύνδεσης με τον TBP, TAFII70 (Bucci et al., 2001) και τον παράγοντα επιμήκυνσης TFIIS (Smith et al., 2003). Ο εμπλουτισμός των CBs με μεταγραφικούς παράγοντες, δηλώνει ότι συναρμολογούνται ή τυγχάνουν επεξεργασίας εκεί, πριν μεταφερθούν στα σημεία λειτουργίας τους και ενδεχομένως το πολυπαραγοντικό σύμπλεγμα της RNA Pol II, να προσυναρμολογείται αρχικά στα CBs (Morgan et al., 2000; Smith et al., 2003).

Η ολοένα αυξανόμενη λίστα των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα CBs διευρύνει και το φάσμα των λειτουργιών που πιθανόν να επιτελούν τα CBs. Μάλιστα, η παρουσία της ανθρώπινης τελομεράσης, με εντοπισμό της εσωτερικής μήτρας RNA (hTR) (Jady et al., 2004) και της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας hTERT (Zhu et al., 2004) στα CBs, εισηγείται πιθανή σχέση μεταξύ των CBs και της γήρανσης. Τα CBs εμπλέκονται, είτε

στην ωρίμανση των συστατικών της RNA τελομεράσης ή/και στη συναρμολόγηση των ενεργών RNP συμπλόκων.

Πολλοί από τους παράγοντες που συναθροίζονται στα CBs είναι λειτουργικά συνδεδεμένοι με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η συγκέντρωσή τους στα CBs αυξάνεται σε κύτταρα που διαφοροποιούνται και η ενδοκυττάρια τους συγκέντρωση εξαρτάται από τη μιτωτική διέγερση των κυττάρων, όπως στη περίπτωση του πιθανού μεταγραφικού παράγοντα ZPR1, που αλληλεπιδρά με την SMN (Gangwani et al., 2001) και του αυξητικού παράγοντα FGF-2 (fibroblast growth factor 2) (Claus et al., 2003). Η παρουσία στα CBs, της NPAT (Zhao et al., 2000) και του συμπλέγματος cdk2/cyclin E κατά τη διάρκεια της G1/S μετάβασης (Liu et al., 2000), υποστηρίζουν ότι ίσως τα CBs να συμμετέχουν σε πολλά φαινόμενα που έχουν σχέση με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως είναι η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η βιοσύνθεση των ιστονών. Επιπλέον, η NPAT αλληλεπιδρά με την CBP (CREB-binding protein), η οποία είναι συστατικό των σωματιδίων PML και είναι σημαντική για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και η υπερέκφραση αυτών των δύο έχει ως αποτέλεσμα την επίσπευση των κυττάρων για είσοδο τους στην S φάση (Wang et al., 2004).

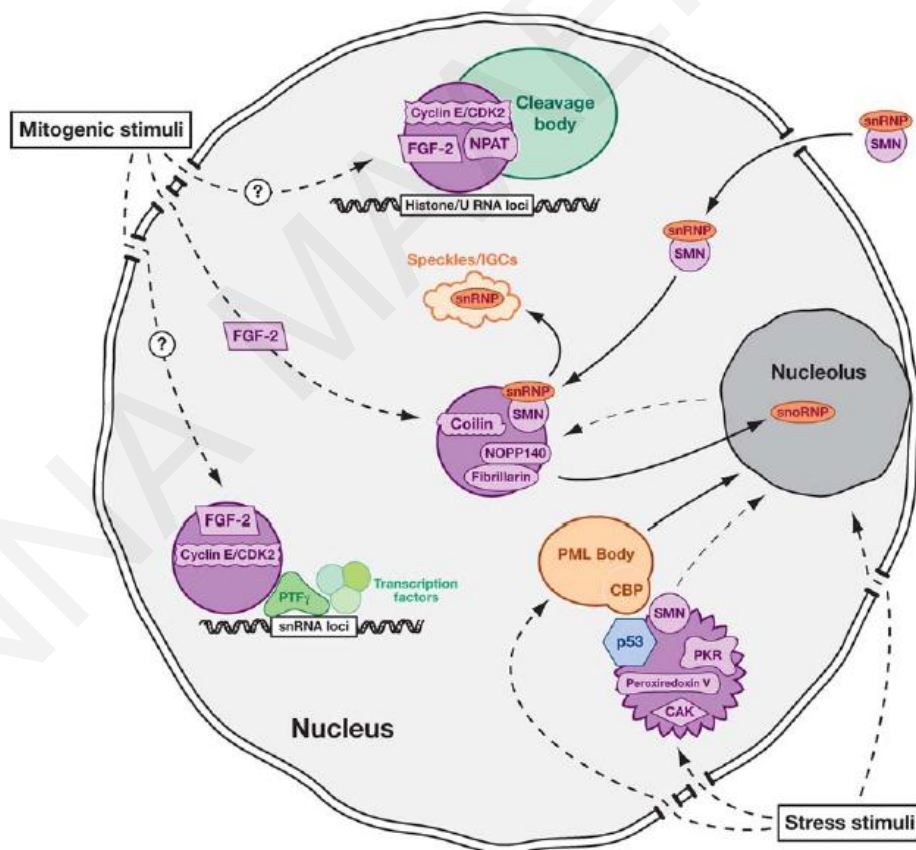
Ακόμα ένα παράδειγμα της σύνδεσης των CBs με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, είναι η παρουσία σε αυτά του συμπλέγματος CAK (cyclin-dependent-activating kinase) (Jordan et al., 1997), το οποίο φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τα σύμπλοκα μεταξύ κινασών (CDKs) και κυκλινών, ιδιαίτερα των συμπλεγμάτων cdk2/cyclin A και cdk2/cyclin E.

Η παρουσία της υπεροξυρεδοξίνης V (peroxiredoxin V) (Kropotov et al., 2004) και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την p53 (SMN και PKR), όπως και της ίδιας της p53 στα CBs, σε συνθήκες στρες, οδηγεί στη πιθανή εμπλοκή των CBs σε μονοπάτια απόκρισης μετά από κυτταρικό στρες (Cioce and Lamond, 2005). Η p53 αποτελεί ένα εξαιρετο αισθητήρα του κυτταρικού στρες και διαδραματίζει σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA και ελέγχου της μεταγραφής και της απόπτωσης (Jin and Levine, 2001).

Ακόμα μια ενδιαφέρουσα προοπτική για το ρόλο που διαδραματίζουν τα CBs, και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε αυτά, είναι η πιθανή σύνδεσή τους με ένα εύρος ανθρώπινων ασθενειών, όπως είναι οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Ανάλυση ανθρώπινων νευρώνων, από ασθενείς με νευροεκφυλιστικές ασθένειες [Huntington's (HD), dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) και Machado-Joseph's (MJD)], που οφείλονται σε επιμήκυνση των επαναλήψεων CAG (polyQ) στις αλληλουχίες των γονιδίων τους, έδειξε στενή σύνδεση των CBs με τα πυρηνικά νευρικά συσσωματώματα

(NIIs), που παρατηρούνται σ' αυτές τις ασθένειες. Αυτά τα πυρηνικά νευρικά συσσωματώματα είναι χαρακτηριστικά για οκτώ polyQ ασθένειες, καθώς επίσης και για άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως Alzheimer's και Parkinson's, που δε χαρακτηρίζονται από την επέκταση των πολυγλουταμικών επαναλήψεων, υποδηλώνοντας ότι ίσως αυτές οι ασθένειες να μοιράζονται κοινούς μοριακούς μηχανισμούς ή κοινούς μοριακούς τροποποιητές. Συνήθως, αυτή η σύνδεση παρουσιάζεται, είτε με απευθείας επαφή τους, είτε με μεσολάβηση μεταξύ τους δομών ινιδίων (Yamada et al., 2001).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμα κι αν τα πιο πάνω μοντέλα λειτουργίας των CBs θεωρηθούν ορθά (Σχήμα 1.10), δεν αποκλείεται η πιθανότητα ύπαρξης επιπλέον λειτουργιών που θα μπορούσαν να επιτελούν αυτά τα σωματίδια. Επί του παρόντος πολλά πειράματα βρίσκονται σε εξέλιξη με την ελπίδα εύρεσης νέων στοιχείων που θα οδηγήσουν στην εύρεση της ακριβούς λειτουργίας ή λειτουργιών των CBs όπως και άλλων ενδοπυρηνικών δομών, έχοντας ως απώτερο στόχο την εύρεση της ακριβούς λειτουργικής οργάνωσης του πυρήνα.



Σχήμα 1.10: Διαγραμματικό μοντέλο που παρουσιάζει το εύρος των πιθανών λειτουργιών των CBs. (Αναπαραγωγή εικόνας από Cioce and Lamond, 2005).

1.9 p80 coilin – το αντιγόνο των Cajal bodies

Η πρωτεΐνη p80 coilin είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη 576 αμινοξέων και εντοπίζεται στα CBs, αλλά και διάχυτη στο πυρηνόπλασμα, διατηρώντας ένα δυναμικό ισοζύγιο εντοπισμού μεταξύ των δύο αυτών περιοχών (Platani et al., 2000). Η πρωτεΐνη coilin είναι φυλογενετικά συντηρημένη, αλλά δεν παρουσιάζει καμία ομολογία με άλλη γνωστή πρωτεΐνη, εκτός από την πρωτεΐνη Sph1 του *Xenopus* (Tuma et al., 1993), με την οποία παρουσιάζει υψηλό ποσοστό ομοιότητας μόνο στην αμινοξική αλληλουχία του άμινο- και καρβόξυ- τελικού άκρου (Bohmann et al., 1995).

Πειράματα παροδικής υπερέκφρασης της coilin σε κύτταρα HeLa, είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της πυρηνοπλασματικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, χωρίς όμως κανένα αποτέλεσμα στον αριθμό και τη μορφολογία των CBs, δηλώνοντας ότι η συγκέντρωση της coilin δεν είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τη συναρμολόγηση των CBs (Hebert and Matera, 2000).

Μελέτες απαλοιφής ή μειορρύθμισης της πρωτεΐνης coilin, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη coilin είναι απαραίτητη για την φυσιολογική δημιουργία των CBs και της σύστασης τους (Collier et al., 2006; Liu et al., 2009; Lemm et al., 2006; Whittom et al., 2008). Στην *Drosophila* και στην *Arabidopsis* δεν παρατηρήθηκε κανένας φαινότυπος στην ανάπτυξη των μεταλλαγμένων οργανισμών που απουσίαζε η πρωτεΐνη coilin (Liu et al., 2009; Collier et al., 2006). Εν τούτοις, σε κύτταρα HeLa που πραγματοποιήθηκε καταστολή της πρωτεΐνης coilin με τη μέθοδο RNAi, παρατηρήθηκε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Lemm et al., 2006; Whittom et al., 2008), ενώ ποντίκια στα οποία έγινε απαλοιφή του γονιδίου της coilin, παρουσίαζαν μείωση της βιωσιμότητας, του ρυθμού αύξησης και της γονιμότητας (Walker et al., 2009). Όπως προκύπτει, η πρωτεΐνη coilin και κατ' επέκταση τα CBs, δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση, αλλά η συντηρημένη ύπαρξή τους (θηλαστικά, φυτά, μύγες) υποδηλεί κάποιο σημαντικό ρόλο.

Η coilin αλληλεπιδρά με τον εαυτό της και αυτή η αλληλεπίδραση καθορίζεται από τα 93 αμινοξέα της αμινοτελικής της περιοχής, τα οποία είναι απαραίτητα για τη στόχευση της στα CBs (Hebert and Matera, 2000). Απομάκρυνση είτε της άμινο-, είτε της καρβόξυ-τελικής αλληλουχίας της coilin, είχε ως αποτέλεσμα την αποτροπή του εντοπισμού της στα CBs. Επομένως, για την παρουσία της σ' αυτά, απαιτούνται κατά μήκος της πρωτεΐνης, πολλαπλές, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Sleeman and Lamond, 1999).

Επιπλέον μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση και μεθυλίωση, που παρουσιάζονται στο καρβοξυτελικό άκρο της coilin επηρεάζουν τη συγκρότηση των σωματιδίων Cajal (Hebert and Matera, 2000; Hebert et al., 2002). Η αλληλουχία της coilin περιλαμβάνει μεγάλο ποσοστό σερινών, πολλές από τις οποίες είναι φωσφορυλιωμένες *in*

in vivo (Carmo-Fonseca et al., 1993). Σημειακές μεταλλάξεις (Ser σε Asp) στα προβλεπόμενα σημεία φωσφορυλίωσης στη συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή, έχει ως αποτέλεσμα εντυπωσιακή αλλαγή στον αριθμό των CBs και δημιουργία ανάλογων δομών μέσα στον πυρηνίσκο (Sleeman et al., 1998).

Ανάλογο αποτέλεσμα λήφθηκε και μετά από έκθεση των κυττάρων σε ειδικό αναστολέα της φωσφατάσης Ser/Thr, υποδηλώνοντας ότι η διφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης είναι αναγκαία για την συγκρότηση των CBs (Lyon et al., 1997). Επίσης, έχει δείχθει ότι συμμετρική διμεθυλίωση των καταλοίπων αργινίνης που βρίσκονται στο μοτίβο του RG box της coilin είναι ζωτικής σημασίας για την ενσωμάτωση του συμπλέγματος της SMN στα CBs, μέσω αλληλεπίδρασης με την coilin (Hebert et al., 2002). Αντιθέτως, Sm πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τη coilin και αυτή η αλληλεπίδραση δεν επηρεάζεται από την διμεθυλίωση (Xu et al., 2005). Επομένως, οι μεταγραφικές τροποποιήσεις της coilin ίσως να προκαλούν αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης που να διευκολύνουν την αλληλεπίδραση της με τον εαυτό της ή με άλλες πρωτεΐνες κρίσιμες για τη συναρμολόγηση των CBs.

Εκτός από τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζει η coilin στην ακεραιότητα των CBs, λίγα είναι γνωστά για την λειτουργία που επιτελεί η πυρηνοπλασματική coilin. Πρόσφατες μελέτες, υποδεικνύουν ότι η πυρηνοπλασματική coilin ίσως να λαμβάνει μέρος στα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA και απόκρισης στο κυτταρικό στρες (Gilder et al., 2011; Velma et al., 2010; Morency et al., 2007; Cioce et al., 2006).

Επίσης παρατηρήθηκε, ότι μετά από βλάβη του DNA, που επάγεται με χρήση Cisplatin ή έκθεση ακτινοβολίας γ , οι οποίες προκαλούν ξεχωριστά είδη βλάβης, προκαλούν τη συσσώρευση της πρωτεΐνης coilin στους πυρηνίσκους υπό μορφή συσσωματωμάτων, γεγονός που συμπίπτει χρονικά με την καταστολή της ενεργότητας της RNA πολυμεράσης I (Pol I). Επιπλέον, τόσο η cisplatin όσο και η ακτινοβολία γ , επάγουν τον συνεντοπισμό της coilin με την RPA-194, η οποία αποτελεί τη μεγαλύτερη υπομονάδα της RNA Pol I, με την οποία αλληλεπιδρά ειδικά η coilin όπως και με τον παράγοντα UBF (upstream binding factor) που αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ενεργότητας της Pol I. Με ανοσοκαταβύθιση της χρωματίνης, παρέχονται στοιχεία ότι η coilin συντονίζει την σύνδεση της Pol I με το ριβοσωμικό DNA (Gilder et al., 2011).

Η πρωτεΐνη coilin, έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Ku70 και Ku80, οι οποίες διαδραματίζουν τον κυρίαρχο ρόλο στην διαδικασία της επιδιόρθωσης του DNA. Στους ανώτατους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι Ku δημιουργούν σύμπλεγμα με την καταλυτική υπομονάδα της DNA εξαρτώμενης κινάσης DNA-PK [DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)] (Carter et al., 1990) και θεωρούνται ότι

λειτουργούν ως πρωτεΐνες κριώματα (scaffold), στις οποίες μπορούν να προσδεθούν άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία επιδιόρθωσης του μη ομόλογου θραύσματος της διπλής έλικας του DNA [non-homologous DNA end joining (NHEJ)]. Η coilin είναι ικανή να καταστείλει *in vitro* τη διαδικασία αυτή και επειδή οι πρωτεΐνες Ku δεν εντοπίζονται στα CBs, πολύ πιθανόν στη ρύθμιση της επιδιόρθωσης του DNA να συμμετέχει η νουκλεοπλασματική coilin (Velma et al., 2010).

Η καρβοξυτελική περιοχή της coilin [460–576] έχει αποδειχθεί με τη μέθοδο NMR, ότι περιέχει δομή Tudor, η οποία είναι μια άτυπη δομή που οφείλεται στη παρουσία 2 μη δομημένων θηλιών, με μία από αυτές να είναι μεγαλύτερη από 30 αμινοξέα σε μήκος (Shanbhag et al., 2010). Οι δομές Tudor έχουν εντοπιστεί σε πολλές πρωτεΐνες που συνεντοπίζονται με τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες ή με συμπλέγματα που συνδέονται με μονή αλυσίδα DNA στο πυρήνα, την μιτοχονδιακή μεμβράνη ή στο κινητόχωρο. Έχει δειχθεί ότι δεσμεύουν DNA και RNA και τροποποιούν αμινοξέα (Ponting, 1997).

Η coilin έχει δειχθεί επίσης να αποκρίνεται στη βλάβη των κεντρομεριδίων της μεσόφασης, που δημιουργείται από την προσβολή του ιού του Έρπητα τύπου 1 [Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)] και να συναθροίζεται σε αυτά (Morency et al., 2007). Ο HSV-1, επάγει την αποσταθεροποίηση των κεντρομεριδίων κατά τη μεσόφαση, αποτρέποντας την συναρμολόγηση του κινητοχώρου και τη δέσμευση των μικροσωληνίσκων κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Everrett et al., 1999). Ο παράγοντας που ευθύνεται για αυτό είναι η ιϊκή πρωτεΐνη ICP0, η οποία εντοπίζεται στα κεντρομερίδια και προάγει την αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα των CENP-A, -B και -C (Everrett et al., 1999a; Lomonte and Morency, 2007). Ως αποτέλεσμα αυτού, τα κύτταρα μπλοκάρονται στα αρχικά στάδια της μίτωσης και τελικά υφίστανται πρόωρη κυτταρική διαίρεση, χωρίς το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, οδηγώντας σε ανευλοειδία (Lomonte and Everett, 1999). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να προκύψει από οποιοδήποτε στρες που μπορεί να επιφέρει βλάβη στο DNA ή την χρωματίνη.

Πριν τη μίτωση, ως γνωστό τα κύτταρα πραγματοποιούν έλεγχο για βλάβη στο DNA τους, καθώς επίσης και για τη σωστή δομή της ατράκτου. Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, τα κύτταρα επίσης ελέγχουν τα κεντρομερίδια τους με ένα άγνωστο μηχανισμό. Οι πρωτεΐνες coilin, fibrillarin και SMN, βρέθηκαν να συναθροίζονται στα προσβεβλημένα κεντρομερίδια, χωρίς όμως να αντικαθιστούν τις CENPs που απουσιάζουν. Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται ως γνωστό στα CBs, που περιέχουν μικρά RNAs και ίσως ο ρόλος τους να είναι η μεταφορά αυτών στα κεντρομερίδια, για να ενεργοποιήσουν την επιδιόρθωση τους (Morency et al., 2007).

Επιπλέον, έκθεση σε ακτινοβολία που επάγει την βλάβη του DNA, έχει ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των CBs και ανακατανομή εν μέρει των συστατικών τους. Οι πρωτεΐνες fibrillarin, NPAT και NOPP140 παραμένουν στα CBs, ενώ οι πρωτεΐνες coilin και SMN και τα snRNP δεν εντοπίζονται πλέον στα CBs. Η coilin εμφανίζεται σε εκατοντάδες μικροεστίες στο πυρηνόπλασμα και εν μέρει εντοπίζεται στα speckles, ενώ η SMN παρουσιάζει διασπορά στο κυτταρόπλασμα και τα snRNAs και οι πρωτεΐνες snRNP παρουσιάζουν νουκλεοπλασματική διασπορά και συσώρευση στα speckles. Η απόκριση αυτή των CBs, στο ερέθισμα της ακτινοβολίας UV-C, επιτυγχάνεται εν μέρει με την διαμεσολάβηση του PA28γ (υπομονάδα γ του ενεργοποιητή του πρωτεασώματος), που έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την coilin και η υπερέκφραση του προκαλεί τον ίδιο φαινότυπο με αυτό της ακτινοβολίας UV-C (Cioce et al., 2006).

Τα ευρήματα αυτά που αφορούν τη coilin, είναι σημαντικά γιατί υποδηλώνουν καινούργιες λειτουργίες της πρωτεΐνης αυτής, που είναι ανεξάρτητες από τη βιογένεση των snRNPs.

1.10 Μερικός Χαρακτηρισμός hCINAP

1.10.1 Ενδοκυττάριος εντοπισμός της hCINAP και επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης της με την πρωτεΐνη coilin (Santama et al, 2005)

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη hCINAP, έχοντας στο αμινοτελικό της άκρο συγχωνευμένο το επιτόπιο της εξα-ιστιδίνης (6xHis), εκφράστηκε σε υψηλά επίπεδα σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης σε βακτήρια *E. coli* και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος σε κουνέλια (anti-rec.hCINAP). Επιπλέον, δημιουργήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πεπτιδικής αλληλουχίας των 19 αμινοξικών καταλοίπων του καρβοξυτελικού άκρου (157-175 α.α) της hCINAP και πάλι σε κουνέλια. Τα δύο αυτά αντισώματα, μετά από πραγματοποίηση ανοσοαποτύπωσης κατά Western, αναγνώριζαν τόσο την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη his₆-hCINAP μετά από έκφραση σε βακτήρια, όσο και την ενδογενή πρωτεΐνη hCINAP σε κύτταρα HeLa. Επιπλέον, αναγνώριζαν την υβριδική πρωτεΐνη YFP-hCINAP, η οποία εκφραζόταν μετά από παροδική επιμόλυνση σε κύτταρα HeLa.

Για τον προσδιορισμό του ενδοκυττάριου εντοπισμού της hCINAP στα κύτταρα HeLa, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός με τα δύο ειδικά αντισώματα, τόσο για ολόκληρη την πρωτεΐνη όσο και για την πεπτιδική αλληλουχία εντός της πρωτεΐνης. Ο ανοσοφθορισμός που πραγματοποιήθηκε ήταν διπλός, ανιχνεύοντας ταυτόχρονα τις

πρωτεΐνες hCINAP και p80 coilin. Και στις δύο περιπτώσεις αποκαλύφθηκε ότι η hCINAP παρουσίαζε διάχυτη κατανομή στο πυρηνόπλασμα με εξαίρεση τον πυρηνίσκο (Σχήμα 1.11 A, B). Σε ορισμένα κύτταρα, μπορούσαν να παρατηρηθούν ευδιάκριτα σήματα συνεντοπισμού της hCINAP με την coilin, υποδηλώνοντας ότι η hCINAP συγκεντρώνεται παροδικά στα Cajal bodies. Συνεπώς, το πυρηνόπλασμα θα μπορούσε να θεωρηθεί ως η κυριότερη περιοχή του ενδοκυττάρου εντοπισμού του συνόλου της hCINAP, και η ανίχνευση της στα CBs εκπροσωπεί μια περιστασιακή ανίχνευση.

Ο εντοπισμός και η κατανομή της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP, όπως εξάχθηκε από τα πειράματα του ανοσοφθορισμού, επιβεβαιώθηκε με πειράματα παροδικής υπερέκφρασης (transient transfection) σε κύτταρα HeLa, μετά από συγχώνευση στη hCINAP του επιτοπίου YFP (YFP-hCINAP). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν απολύτως συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν κατά τον εντοπισμό της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP.

Για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης της hCINAP με την πρωτεΐνη coilin σε κύτταρα θηλαστικών, πραγματοποιήθηκε παροδική υπερέκφραση της YFP-hCINAP σε κύτταρα HeLa και ακολούθως ανοσοκαταβύθιση της με αντίσωμα έναντι της φθορίζουσας πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε εντοπισμός της coilin μόνο στη παρουσία της YFP-hCINAP, δηλώνοντας της αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, για τη διερεύνηση αν τα συμπλέγματα των hCINAP-coilin *in vivo*, παρουσίαζαν και άλλους γνωστούς παράγοντες με τους οποίους ως γνωστό αλληλεπιδρά η coilin ή παράγοντες που εντοπίζονται στα CBs, πραγματοποιήθηκε εκ νέου παροδική υπερέκφραση και ανοσοκαταβύθιση της YFP-hCINAP σε κύτταρα HeLa και στη συνέχεια ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών fibrillarin, SMN, Sm, Sp100 και U1A snRNP. Το αποτέλεσμα έδειξε, ότι σε αντίθεση με την παρουσία της coilin, κανένας από αυτούς τους παράγοντες δεν συν-ανοκαταβυθιζόταν με την YFP-hCINAP, δηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών είναι ειδική και δεν εμπλέκει κανένα από τους παράγοντες των CBs που εξετάστηκαν.

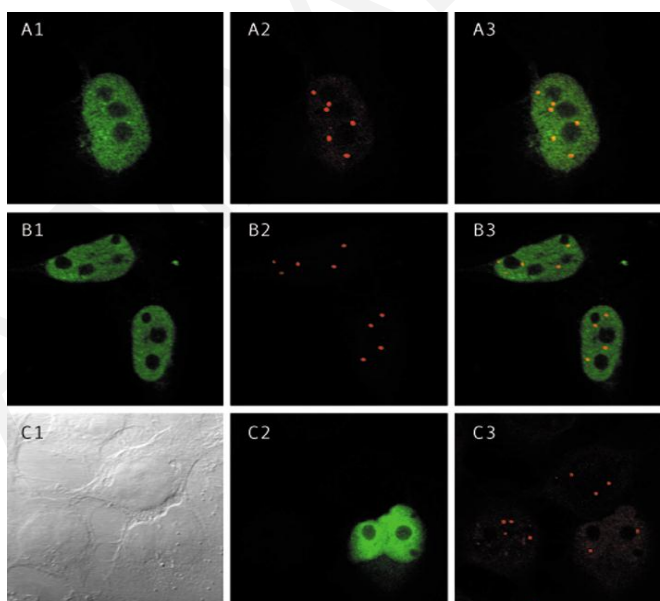
1.10.2 Παροδική υπερέκφραση (transient overexpression) της hCINAP σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa (Santama et al., 2005)

Όπως προαναφέρθηκε, στο πυρηνόπλασμα εντοπίζεται επίσης διάχυτη ποσότητα της πρωτεΐνης coilin εκτός του εντοπισμού της στα CBs. Επομένως ενδέχεται το πυρηνόπλασμα να είναι ο χώρος αλληλεπίδρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών ίσως να είναι δυναμικής

φύσεως. Έχει παρατηρηθεί ότι η υπερέκφραση της hCINAP επηρεάζει τον αριθμό των CBs, μειώνοντας τον, στους πυρήνες των κυττάρων HeLa που μελετήθηκαν.

Το συμπέρασμα αυτό εξάχθηκε από πειράματα παροδικής υπερέκφρασης της YFP-hCINAP σε κύτταρα HeLa, στα οποία πραγματοποιήθηκε διπλός ανοσοφθορισμός με χρήση του αντισώματος έναντι της coilin, με χρήση παράλληλα, ως δείγμα ελέγχου, το πλασμίδιο YFP. Σε μια σειρά από τυχαία επιλεγμένες περιοχές καταμετρήθηκε ο αριθμός των CBs σε 200 κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της YFP-hCINAP ή της YFP μόνο και σε 200 κύτταρα που δεν πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση. Τα αποτελέσματα έδειξαν την αισθητή μείωση του μέσου όρου του αριθμού των CBs ανά κύτταρο (περίπου 3 φορές μείωση) στα κύτταρα που έγινε υπερέκφραση της YFP-hCINAP, σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση μόνο της YFP ή δεν έγινε υπερέκφραση. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύτηκαν με χρήση της υβριδικής πρωτεΐνης myc-hCINAP (Σχήμα 1.11 C2,C3).

Όλα τα πιο πάνω πειραματικά δεδομένα δηλώνουν την ύπαρξη σχέσης σύνδεσης μεταξύ των δυο πρωτεϊνών.



Σχήμα 1.11: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP (εικόνες A1 και B1) και υπερέκφραση της myc-hCINAP (εικόνα C2) σε κύτταρα HeLa.

A1: αντίσωμα έναντι ολόκληρης της αλληλουχίας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης hCINAP (anti-hCINAP). **B1:** πεπτιδικό αντίσωμα έναντι συγκεκριμένης αλληλουχίας της hCINAP στο καρβοξυτελικό άκρο. **A2, B2:** αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης coilin (anti-coilin) στα ίδια κύτταρα. **A3, B3:** επικάλυψη των εικόνων A1 και A2 και B1 και B2, αντίστοιχα. **C1:** εικόνα συνεστιακού μικροσκοπίου του κυττάρου **C2:** υπερέκφραση της myc-hCINAP και ανίχνευση της με αντίσωμα έναντι του επιτοπίου myc **C3:** ανίχνευση της coilin με αντίσωμα έναντι της στο ίδιο κύτταρο. Στο κύτταρο που υπερεκφράζεται η myc-hCINAP ο αριθμός των CBs είναι μικρότερος σε σύγκριση με αυτά που δεν την εκφράζουν.

1.10.3 Καταστολή του μεταγραφήματος της hCINAP (RNAi)

Σε πρόσφατη δημοσίευση (Zhang et al., 2010), έχει δειχθεί σε αντίθεση με δικά μας πειραματικά αποτελέσματα (Santama et al., 2005), ότι η hCINAP, σε κύτταρα HEK 293 T, αλληλεπιδρά με σημαντικούς παράγοντες των CBs, όπως η fibrillarin, η SMN και η NPAT. Επιπλέον, η ίδια ομάδα έδειξε ότι καταστολή του μεταγραφήματος της hCINAP, προκαλεί πρόβλημα στην οργάνωση των CBs και διαταράσσει την ενδοκυττάρια κατανομή των βασικών συστατικών των CBs, συμπεριλαμβανομένων της coilin, της SMN, των spliceosomal snRNP, της fibrillarin και της NPAT (Zhang et al., 2010). Αυτές οι παρατηρήσεις ήταν παρόμοιες με αυτές που λήφθηκαν μετά από μειορρύθμιση της έκφρασης συστατικών των CBs, όπως της SMN και της FLASH (FLICE-associated huge protein) (Lemm et al., 2006; Barcaroli et al., 2006). Στα κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε η μείωση της hCINAP, τα 5'-m3G cap U snRNAs που εντοπίζονταν στα CBs, αποδιοργανώθηκαν και διασκορπίστηκαν στο πυρηνόπλασμα, με εντοπισμό μόνο στα speckles. Επιπλέον, έλεγχος των επιπέδων των snRNAs, φανέρωσε ότι η μείωση της hCINAP προκαλούσε μείωση επιπλέον των U1, U2, U4 και U5 snRNAs (Zhang et al., 2010). Ως γνωστό, η συνεχής βιογένεση των U snRNP είναι απαραίτητη για την ακεραιότητα των CBs (Lemm et al., 2006) και πιθανόν, η λάθος κατανομή της SMN και τα χαμηλά επίπεδα των snRNAs, να αναστέλλουν την βιογένεση των ριβοσωμικών U snRNPs και ίσως αυτό να εξηγεί γιατί τα CBs αποδιοργανώνονται.

Η πρωτεΐνη NPAT αποτελεί επίσης συστατικό των CBs και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή των γονιδίων των ιστονών και στην είσοδο της S φάσης του κυτταρικού κύκλου κυρίως με την φωσφορυλίωση της ή με την συναρμολόγηση άλλων παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων των ιστονών (Ye et al., 2003; Ma et al., 2000). Η μείωση της hCINAP με RNAi, είχε ως συνέπεια τη διαταραχή του κανονικού εντοπισμού της NPAT και επιπλέον την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων των ιστονών, όμως μόνο στη περίπτωση που τα επίπεδα του mRNA της hCINAP μειώνονταν δραστικά (στο 5% του δείγματος αναφοράς) (Zhang et al., 2010). Τα CBs συνδέονται με το σύμπλεγμα των γονιδίων της ιστόνης και ρυθμίζουν την μεταγραφή τους (Gall, 2001) και ως εκ τούτου ίσως η hCINAP να διαδραματίζει έμμεσο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής της ιστόνης.

Εκτός αυτού, η μείωση των επιπέδων της hCINAP έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, με αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων (Zhang et al., 2010).

1.11 Ομόλογες πρωτεΐνες της hCINAP σε άλλους οργανισμούς

Μέχρι στιγμής έχουν μελετηθεί ορθόλογα της hCINAP στο *Saccharomyces cerevisiae* (Far7), στο *Caenorhabditis elegans* (cAK6) και στη *Drosophila melanogaster* (dAK6).

1.11.1 Η πρωτεΐνη Far7

Η καλύτερα χαρακτηρισμένη ενδοπυρηνική δομή είναι αυτή του πυρηνίσκου, όπου τα γονίδια του ριβοσωμικού RNA (rRNA) αντιγράφονται και το πρόδρομο rRNA (pre-rRNA) τυγχάνει επεξεργασίας και συγκροτείται σε ριβοσωμικές υπομονάδες.

Στον πυρηνίσκο, η RNA πολυμεράση I μεταγράφει το πρόδρομο rRNA (pre-rRNA), το οποίο αποτελείται από τα 18S, 25S/28S και 5.8S rRNA, όπως και αρκετές εσωτερικές και εξωτερικές περιοχές οι οποίες δεν κωδικοποιούνται. Το pre-rRNA τροποποιείται χημικά και διασπάται από ένδο- και εξω- νουκλεάσες για την παραγωγή του ώριμου rRNA. Αυτή η διαδικασία έχει μελετηθεί εκτενώς στο σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*), όπου το αρχικό 35S pre-rRNA διασπάται στα σημεία A₀, A₁ και A₂, για να δώσει τα ενδιάμεσα 20S και 27SA₂ pre-rRNA. Αυτά τα βήματα διάσπασης επιτυγχάνονται με τη μεσολάβηση των συστατικών της 80S μικρής υπομονάδας (SSU) 90S προ-ριβοσωμάτων. Το 20S pre-rRNA, πακετάρεται στα 43S προ-ριβοσώματα και εξάγεται στο κυτταρόπλασμα, όπου διμεθυλιώνεται από το Dim1 και τυγχάνει επεξεργασίας στη θέση D για να δημιουργηθεί το ώριμο 18S rRNA και ως εκ τούτου και τη 40S ριβοσωμική υπομονάδα (SSU) (Venema and Tollervey, 1999; Raue, 2004).

Στο σακχαρομύκητα, το τελικό κυτταροπλασματικό βήμα στην ωρίμανση των 40S ριβοσωμάτων περιλαμβάνει τη διάσπαση του 20S rRNA για τη δημιουργία του ώριμου 3' άκρου του 18S rRNA. Πολλαπλοί συμπληρωματικοί παράγοντες εμπλέκονται σε αυτό το στάδιο, μεταλλάξεις των οποίων οδηγούν στη συσσώρευση του 20S rRNA στο κυτταρόπλασμα και την αποτυχία της δημιουργίας ώριμων και ενεργών ριβοσωμάτων (Peng et al., 2003).

Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η Far7, η οποία περιέχει ομόλογη αλληλουχία ATPase και αποτελεί την ομόλογη πρωτεΐνη της hCINAP στο σακχαρομύκητα. Η πρωτεΐνη Far7 είναι απαραίτητη για την διάσπαση του σημείου D στο κυτταρόπλασμα και όχι σε οποιοδήποτε άλλο βήμα της διαδικασίας, δηλώνοντας ότι διαδραματίζει ρόλο στο τελικό βήμα του διαχωρισμού που οδηγεί στην ώριμη 40S ριβοσωμική υπομονάδα (SSU) (Granneman et al., 2005).

Καταστολή του μεταγραφήματος της *Fap7*, είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ασυνήθιστα ψηλών επιπέδων του 20S pre-rRNA στο κυτταρόπλασμα (20 φορές υψηλότερα). Επομένως, η *Fap7*, πιθανόν να μην αποτελεί δομικό συστατικό των 43S προ-ριβωσωμάτων, αλλά να αλληλεπιδρά παροδικά με αυτά τα συμπλέγματα με την άμεση αλληλεπίδραση με την *Rps14*, με την οποία βρέθηκε να αλληλεπιδρά, και ίσως να την τοποθετεί σε άμεση επαφή με το σημείο διάσπασης D (Granneman et al., 2005).

Επιπλέον, μεταλλάξεις που είχαν εισαχθεί σε συγκεκριμένα πρωτεϊνικά κατάλοιπα της *Fap7*, σε χαρακτηριστικά συντηρημένα μοτίβα που εμπλέκονται στην υδρόλυση του ATP, K20R (Walker A) και D82AH84A (Walker B), έδειξαν ότι είναι κρίσιμα για την λειτουργία της *Fap7* και είναι απαραίτητα για την διαδικασία του 20S pre-rRNA in vivo (Granneman et al., 2005).

Η *Fap7*, έχει επίσης ενοχοποιηθεί για την εμπλοκή της στη ρύθμιση της μεταγραφικής απόκρισης μετά από οξειδωτικό στρες (Juhnke et al., 2000). Η μεταγραφική ενεργοποίηση πολλών γονιδίων, μετά από οξειδωτικό στρες, ρυθμίζεται κυρίως από δυο μεταγραφικούς παράγοντες, τον *Yap1* και *Pos9* (Izawa et al., 1996; Stephen and Jamieson, 1997; Charizanis et al., 1999a). Το γονίδιο της *Fap7*, ταυτοποιήθηκε ως επιζών κλώνος με σημειακή μετάλλαξη μετά από σάρωση μεταλλάξεων που εμπλέκονταν στην ενεργοποίηση του συστήματος αναφοράς που βασιζόταν στο υβρίδιο του μεταγραφικού παράγοντα *Gal4-Pos9*, μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες.

Η σημειακή μετάλλαξη που ευθυνόταν για τη μη ενεργοποίηση αυτού του συστήματος, αντιστοιχούσε στη μετάλλαξη *Gly19*→*Ser*, η οποία εντοπιζόταν στο μοτίβο ATP/GTP (P-loop), το οποίο είναι συντηρημένο σε όλες τις αδενυλικές κινάσες. Επιπλέον, η μετάλλαξη προσέδιδε αργή ανάπτυξη του κλώνου, δηλώνοντας ότι το συγκεκριμένο κατάλοιπο είναι σημαντικό για τον πολλαπλασιασμό της *Fap7* (Juhnke et al., 2000).

Επίσης, εισήχθηκε μετάλλαξη στη θέση 21 με μετατροπή *Ser21*→*Gly*, για να μελετηθεί πως αυτή η μετάλλαξη επηρεάζει την ενεργότητα της πρωτεΐνης. Η γλυκίνη σε αυτή τη θέση είναι συντηρημένη στο μοτίβο P-loop σε όλες τις αδενυλικές κινάσες, σε αντίθεση με την *Fap7*, όπου σε αυτή τη θέση παρουσιάζεται σερίνη. Ο φαινότυπος που παρουσιάστηκε ήταν πιο ήπιος από αυτόν της μετάλλαξης στο αμινοξικό κατάλοιπο της θέσης 19, παρουσιάζοντας όχι τόσο έντονη καταστολή της ανάπτυξης (Juhnke et al., 2000).

Τέλος, διαγραφή του γονιδίου *Fap7* ήταν θνησιγόνος για τα κύτταρα (Juhnke et al., 2000), και ως εκ τούτου συμφωνούσε με την παρατήρηση ότι πολλοί παράγοντες που συνδέονται με τη μηχανή μεταγραφής είναι απαραίτητοι για τα κύτταρα (Hampsey, 1998).

1.11.2 Η πρωτεΐνη ADLP

Η πρωτεΐνη ADLP από τον *C. elegans*, είναι μια πρωτεΐνη 182 αμινοξέων με άγνωστη λειτουργία και παρουσιάζει περίπου 40% ομοιότητα (σε επίπεδο αλληλουχίας) με την πρωτεΐνη hCINAP, ενώ η ομολογία της με τις υπόλοιπες αδενυλικές κινάσες είναι χαμηλότερη από το 20%. Αυτή η πρωτεΐνη παρουσιάζει όπως και η hCINAP, πυρηνική ενδοκυττάρια κατανομή και ενζυμική ενεργότητα αδενυλικής κινάσης, με τα AMP και dAMP και το σικιμικό οξύ (shikimic acid) να αποτελούν τα καλύτερα υποστρώματα αποδοχής της φωσφορικής ομάδας από την υδρόλυση του ATP, το οποίο κρίθηκε ως το καλύτερο τρινουκλεοτίδιο δότης (Zhai et al., 2006).

Μετά από αποσιώπηση του γονιδίου της ADLP με RNAi, παρατηρήθηκε αργή ανάπτυξη των σκουληκιών στην F1 γενεά και επιπλέον το μέγεθος τους ήταν μικρότερο συγκρινόμενο με των σκουληκιών που δεν έτυχαν αποσιώπησης, αν και δεν παρουσίαζαν διαφορά στη σύνθεση των τμημάτων τους ή στη κίνηση τους. Επομένως ίσως η ADLP να διαδραματίζει ρόλο στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Zhai et al., 2006).

1.11.3 Η πρωτεΐνη DAK6

Το cDNA της DAK6 στη *Drosophila*, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 175 αμινοξέων, που παρουσιάζει 47.85% ομοιότητα με την ανθρώπινη AK6 (hCINAP). Χαρακτηρισμός της ενεργότητας αυτής της πρωτεΐνης, έδειξε ότι παρουσιάζει ενεργότητα αδενυλικής κινάσης και τα τρινουκλεοτίδια AMP και CMP (UMP ως ένα βαθμό) αποτελούσαν τα προτιμητέα υποστρώματα, με το ATP να δρα ως ο καλύτερος δότης φωσφόρου. Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της ήταν κυρίως πυρηνικός (Meng et al., 2008).

Η πρωτεΐνη AK6 όπως προέκυψε, παρουσιάζεται ως σύμπλεγμα διμερούς και μονομερούς μορφής, λόγω των τριών καταλοίπων κυστεΐνης που υπάρχουν σε αυτή (Ren et al., 2004). Επειδή η DAK6 περιέχει τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης, από τα οποία τα δύο (Cys49 και Cys77) είναι συντηρημένα στην οικογένεια της AK6, πιθανόν να δημιουργεί διμερή ή πολυμερή λόγω του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των μορίων. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης έδειξαν ότι η DAK6 παρουσιάζεται υπό μορφή διμερούς και μονομερούς (Meng et al., 2008).

1.12 Στόχοι διδακτορικής έρευνας

Η παρούσα διδακτορική εργασία είχε ως στόχο, με συνδυασμό τεχνικών μοριακής και κυτταρικής βιολογίας, βιοχημείας και γενετικής, τον πλήρη δομικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό της νέας ανθρώπινης πυρηνικής πρωτεΐνης, της hCINAP (human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein).

Η πρωτεΐνη αυτή είχε ταυτοποιηθεί από προηγούμενη μελέτη, που στόχο είχε την εύρεση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη coilin, που εντοπίζεται στα σωματίδια Cajal (CBs). Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε συντομογραφικά hCINAP και χαρακτηρίστηκε μερικώς (υποκεφάλαιο 1.10). Το γεγονός ότι η hCINAP παρουσιάζεται συντηρημένη σε όλο το φάσμα του ευκαρυωτικού φυλογενετικού δέντρου (θηλαστικά, φυτά και ζυμομύκητα), εκφράζεται σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων ιστών, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη coilin που συμμετέχει σε μια εξελικτικά συντηρημένη δομή -το σωματίδιο Cajal- και μάλιστα η αλληλεπίδραση τους έχει δυναμική μορφή, αφού υπερέκφραση της hCINAP έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του αριθμού των CBs ανά πυρήνα, δηλώνει ότι η λειτουργία που πραγματοποιεί η hCINAP ίσως να είναι σημαντική στον πυρήνα του κυττάρου.

Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή δεν παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με καμία άλλη γνωστή πρωτεΐνη αλλά περιέχει χαρακτηριστικό μοτίβο πρόσδεσης τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου (ATP ή GTP) τύπου P-loop, παρόμοιο με αυτό που παρουσιάζεται στην οικογένεια των αδενυλικών κινασών (Santama et al., 2005). Σε συμφωνία με την πρόβλεψη αυτή δείχθηκε ότι έχει δομή αδενυλικής κινάσης (AK) (Ren et al., 2005) και παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα τόσο AK (Ren et al., 2005) όσο και ATPάσης (Santama et al., 2005). Έχει προκύψει (Drakou et al., in review) ότι μπορεί να δρα με αλλαγή διαμόρφωσης, είτε ως AK, είτε ως ATPάση, δηλώνοντας τη σημαντικότητα που μπορεί να κατέχει στον μεταβολισμό του πυρήνα, διαδραματίζοντας ενδεχομένως ανεξάρτητες λειτουργίες.

Τα CBs, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές λειτουργίες πέρα από την ήδη γνωστή λειτουργία που επιτελούν στην ωρίμανση των snRNPs και snoRNPs, όπως την βιοσύνθεση των ιστονών, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA και απόκρισης στο κυτταρικό στρες και επιπλέον σύνδεσης τους με πληθώρα νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Επομένως θα ήταν ενδιαφέρουσα η προσπάθεια σύνδεσης της πρωτεΐνης hCINAP, με κάποιο από αυτά τα ενδεχόμενα λειτουργικά μονοπάτια και εύρεση του βιολογικού ρόλου που επιτελεί στο κύτταρο.

Με βάση την υφιστάμενη γνώση, η διδακτορική μου διατριβή είχε ως κεντρικό στόχο τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης hCINAP, για την πιθανή κατανόηση του βιολογικού ρόλου που επιτελεί στον ευκαρυωτικό πυρήνα και τα πειράματα οργανώθηκαν γύρω από τους πιο κάτω ειδικούς στόχους:

A) Δομικός χαρακτηρισμός

Προσπάθεια κρυστάλλωσης και επίλυσης πρωτεϊνικής δομής της hCINAP με πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Η πειραματική αυτή προσέγγιση εγκαταλήφθηκε από μένα, μετά από δημοσίευση της δομής της hCINAP από τον Ren και τους συνεργάτες του (Ren et al., 2005). (Οι πειραματικές διαδικασίες, οι συνθήκες κρυστάλλωσης που δοκιμάστηκαν, καθώς και εν μέρει αποτελέσματα που προέκυψαν, παρατίθενται συνοπτικά στο Παράρτημα II).

Συνεχίστηκε η προσπάθεια συνκρυστάλλωσης με υποστρώματα από τον ερευνητικό μας συνεργάτη Δρα Σπύρο Ζωγράφο (Εργαστήριο Φαρμακευτικής και Οργανικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών Ελλάδας) και τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στην εργασία μας Drakou et al. (in review).

B) Λειτουργικός χαρακτηρισμός

1. Την ανάλυση του τοπικού προτύπου έκφρασης του μεταγραφήματος της hCINAP
2. Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών hCINAP και coilin και χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης αυτής, με χαρτογράφηση των περιοχών αλληλεπίδρασης τους.
3. Διερεύνηση νέων αλληλεπιδρωσών πρωτεϊνών με την hCINAP.
4. Καταστολή του μεταγραφήματος της hCINAP (RNAi) και ανάλυση των επιπτώσεων.
5. Κατασκευή και χρήση σταθεράς μετασηματισμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP} σε *in vivo* πειράματα:
 - α) ανάλυση του πρωτεϊνικού κύκλου ζωής της με βιντεοσκοπία πραγματικού χρόνου.
 - β) μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής της πρωτεΐνης hCINAP μετά από πειραματικούς χειρισμούς που προάγουν την μεταγραφική καταστολή, βλάβη του DNA και υπερωσμωτικό στρες.
6. Στοχευμένη σημειακή μεταλλαξογένεση κρίσιμων αμινοξέων της hCINAP και μελέτη της έκφρασης τους σε κύτταρα HeLa.

1.13 Δομή της παρούσας διδακτορικής Διατριβής

Η παρούσα διδακτορική Διατριβή αποτελείται από πέντε Κεφάλαια και δύο Παραρτήματα όπου στο καθένα παρατίθενται διαφορετικά δεδομένα που σχετίζονται με το αντικείμενο της εργασίας.

- Το Κεφάλαιο 1 (Εισαγωγή) αποτελεί το θεωρητικό υπόβαθρο της όλης εργασίας και σε αυτό παρατίθενται βασικές πληροφορίες βασισμένες είτε στην υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία, είτε σε αδημοσίευτα δικά μας πειραματικά δεδομένα, που στοιχειοθετούν το επιστημονικό υπόβαθρο πάνω στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός της παρούσας διδακτορικής έρευνας.
- Στο Κεφάλαιο 2 (Υλικά και Μέθοδοι), παρουσιάζεται η πειραματική προσέγγιση της διδακτορικής εργασίας και περιλαμβάνονται αναλυτικά οι διάφορες τεχνικές και τα διάφορα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων που περιγράφονται στη Διατριβή.
- Στο Κεφάλαιο 3 (Αποτελέσματα), παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη κάθε πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε, πλαισιωμένα από τα αντίστοιχα σχήματα με βάση τα οποία εξάχθηκαν τα αποτελέσματα των επιμέρους πειραμάτων κατά τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας, τα οποία ερμηνεύονται και συζητούνται.
- Στο κεφάλαιο 4 (Συζήτηση), προτείνονται τα συνολικά συμπεράσματα που εξάχθηκαν από την επεξεργασία των πρωτογενών αποτελεσμάτων και συζητούνται μέσα στο πλαίσιο της διεθνούς βιβλιογραφίας. Επίσης συζητούνται μελλοντικοί στόχοι και προοπτικές της παρούσας διδακτορικής διατριβής.
- Το Κεφάλαιο 5 (Βιβλιογραφία) περιλαμβάνει αναλυτικό κατάλογο του συνόλου της διεθνούς βιβλιογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για τη συγγραφή της παρούσας Διατριβής.
- Το Παράρτημα I, περιέχει επιπρόσθετα σχήματα και πίνακες και συμπληρωματικά στοιχεία που συνοδεύουν το κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων.
- Το Παράρτημα II, περιέχει συνοπτικά την πειραματική μεθοδολογία και τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν κατά την προσπάθεια κρυστάλλωσης της hCINAP.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής δημοσιεύονται στα ακόλουθα άρθρα (επισυνάπτονται στο Παράρτημα ΙΙΙ):

1. Santama, N., Ogg, S.C., **Malekkou, A.**, Zographos, S.E., Weis, K. and Lamond A.I. (2005). Characterization of hCINAP, a novel coilin-interacting protein encoded by a transcript from the transcription factor TAFII₃₂ locus. *J. Biol. Chem.* 280: 36429-36441.
2. **Malekkou, A.**, Lederer, C.W., Lamond, A.I. and Santama, N. (2010). The nuclear ATPase/adenylate kinase hCINAP is recruited to perinucleolar caps generated upon RNA pol.II inhibition. *FEBS Letters.* 584: 4559-4564.
3. Drakou, C.E., **Malekkou, A.**, Hayes, J.M., Lederer, C.W., Leonidas, D.D., Oikonomakos, N.G., Lamond, A.I., Santama, N. and Zographos, S.E. hCINAP is an atypical mammalian nuclear adenylate kinase with ATPase motif: structural and functional studies. (in review).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

2.1.1 Στο σακχαρομύκητα

2.1.1.1 Στελέχη σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν

| Στέλεχος σακχαρομύκητα <i>S. cerevisiae</i> | Γονότυπος | Γονίδια αναφοράς | Μάρτυρες μετασχηματισμού |
|---|--|-------------------------------|--------------------------|
| AH109 | <i>MAT^α, trp1-901, leu 2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1</i> <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3:: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i> | <i>HIS3, ADE2, lacZ, MEL1</i> | <i>trp1, leu2</i> |
| Y187 | <i>MAT^α, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu 2-3, 112, gal4Δ, met, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i> | <i>lacZ, MEL1</i> | <i>trp1, leu2</i> |

Πίνακας 2.1: Στελέχη σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

| Πλασμιδιακοί Φορείς (Clontech) | Περιγραφή | Επιλογή σε θρεπτικό υλικό SD | Μέγεθος kb |
|--------------------------------|--|------------------------------|------------|
| pACT ₂ | GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, LEU2, amp ^r , επιτόπιο HA | -Leu | 8.1 |
| pAS2-1 | GAL4(1-147) DNA-BD, TRP1, amp ^r , CYH ^{s2} | -Trp | 8.4 |
| pGBKT7-53 | Murine p53 ₍₇₂₋₃₉₀₎ in pGBKT7, TRP1, kan ^r | -Trp | 8.3 |
| pGADT7-T | SV40 large T-antigen ₍₈₄₋₇₀₈₎ in pGADT7, LEU2, amp ^r | -Leu | 10.0 |
| pTD1-1 | SV40 large T-antigen ₍₈₄₋₇₀₈₎ in pACT ₂ , LEU2, amp ^r | -Leu | ~10.0 |

Πίνακας 2.2: Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δυο υβριδίων.

2.1.1.2 Επιλεκτικά θρεπτικά υλικά για καλλιέργειες σακχαρομύκητα

1. **Υγρό θρεπτικό υλικό YPD:** 20 g/L πεπτόνη (Difco), 10 g/L εκχύλισμα ζύμης (Difco), 2% (w/v) γλυκόζη, pH 6.5.
2. **Στερεό θρεπτικό υλικό YPD:** 20 g/L πεπτόνη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) γλυκόζη, 20 g/L άγαρ (Difco), pH 6.5.
3. **Υγρό θρεπτικό υλικό YPDA:** 20 g/L πεπτόνη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) γλυκόζη, 0.003% (w/v) adenine hemisulfate, pH 6.5.
4. **Στερεό θρεπτικό υλικό YPDA:** 20 g/L πεπτόνη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) γλυκόζη, 0.003% (w/v) adenine hemisulfate, 20 g/L άγαρ, pH 6.5.
5. **Επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD (synthetic dropout):** 6.7 g/L αζωτούχες βάσεις σακχαρομύκητα χωρίς αμινοξέα (Yeast Nitrogen Base, Difco), 100 ml/L από το 10X θρεπτικό υλικό που απουσιάζουν συγκεκριμένα αμινοξέα (Dropout Solution, DO), 2% (w/v) γλυκόζη και 20 g/L άγαρ σε περίπτωση στερεού θρεπτικού υλικού.

| Αμινοξέα (Sigma) | Συγκέντρωση 10X mg/L |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| L-Αδενίνη hemisulfate | 200 |
| L-Αργινίνη HCl | 200 |
| L-Ιστιδίνη HCl monohydrate | 200 |
| L-Ισολευκίνη | 300 |
| L-Λευκίνη | 1000 |
| L-Λυσίνη HCl | 300 |
| L-Μεθειονίνη | 200 |
| L-Φαινυλαλανίνη | 500 |
| L-Θρεονίνη | 2000 |
| L-Τρυπροφάνη | 200 |
| L-Τυροσίνη | 300 |
| L-Ουρακίλη | 200 |
| L-Βαλίνη | 1500 |

Πίνακας 2.3: Αμινοξέα που περιέχονται στα διάφορα επιλεκτικά μέσα.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων σακχαρομύκητα με πλασμίδια που προσδίδουν αυξοτροφία σε συγκεκριμένα αμινοξέα γίνεται με χρήση επιλεκτικών θρεπτικών υλικών από τα οποία απουσιάζουν τα συγκεκριμένα αμινοξέα. Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν τα θρεπτικά υλικά από τα οποία απουσίαζαν:

1. η λευκίνη (SD,-Leu).
2. η τρυπτοφάνη (SD,-Trp).
3. η τρυπτοφάνη και η λευκίνη (SD,-Trp/-Leu).
4. η τρυπτοφάνη, η λευκίνη και η ιστιδίνη (SD,-Trp/-Leu/-His).
5. η τρυπτοφάνη, η λευκίνη, η ιστιδίνη και η αδενίνη (SD,-Trp/-Leu/-His/-Ade).

2.1.1.3 Καλλιέργεια και χειρισμός στελεχών σακχαρομύκητα:

2.1.1.3.1 Κατάψυξη στελεχών σακχαρομύκητα

Τα στελέχη του σακχαρομύκητα διατηρούνται έπ' άπειρον στους -80 °C σε υγρό θρεπτικό υλικό YPD στην παρουσία 25% (v/v) γλυκερόλης. Για τα μετασχηματισμένα στελέχη είναι καλύτερο να γίνεται η φύλαξη τους στο κατάλληλο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD, ώστε να διατηρηθεί η επιλογή του πλασμιδίου.

Υλικά:

1. Αποστειρωμένες ειδικές λαβίδες μίας χρήσης (100ps).
2. Τρυβλίο με αναπτυγμένες αποικίες σακχαρομύκητα.
3. Αποστειρωμένη 50% (v/v) γλυκερόλη.
4. Θρεπτικό υλικό YPD ή κατάλληλο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD.
5. Αποστειρωμένοι σωλήνες *Eppendorf* των 1.5 ml.

Μέθοδος:

1. Λαμβάνεται με αποστειρωμένη ειδική λαβίδα από ένα τρυβλίο, μια απομονωμένη αποικία.
2. Τα κύτταρα της αποικίας επαναδιασπείρονται σε 500 μl θρεπτικού υλικού YPD ή κατάλληλου επιλεκτικού θρεπτικού υλικού SD που περιέχονται σε αποστειρωμένο σωλήνα *Eppendorf* των 1.5 ml.
3. Προστίθενται 500 μl 50% (v/v) αποστειρωμένης γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση 25%). Ο σωλήνας αναδεύεται καλά και φυλάγεται σε ψυκτικό θάλαμο -80 °C.

2.1.1.3.2 Ανάκτηση κατεψυγμένων κυττάρων σακχαρομύκητα

Υλικά:

1. Γλυκερόλη από κατεψυγμένα στελέχη σακχαρομύκητα.
2. Τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό YPD ή κατάλληλο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD.
3. Αποστειρωμένες ειδικές λαβίδες μίας χρήσης (loops).

Μέθοδος:

1. Μικρή ποσότητα γλυκερόλης από κατεψυγμένα κύτταρα σακχαρομύκητα λαμβάνεται με τη βοήθεια ειδικής λαβίδας και διασπείρεται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό YPD ή κατάλληλο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD.
2. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C έως ότου να διακριθούν αποικίες διαμέτρου 2 mm (2-5 μέρες).
3. Τέλος τα τρυβλία κλείνονται με φύλλο παραφίνης και αποθηκεύονται στους 4 °C μέχρι 2 μήνες.

2.1.1.3.3 Καλλιέργειες σακχαρομύκητα

Υλικά:

1. Τρυβλίο με φρέσκες αποικίες.
2. Αποστειρωμένες ειδικές λαβίδες μίας χρήσης (loops).
3. Θρεπτικό υλικό YPD ή κατάλληλο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD.

Μέθοδος:

1. Χρησιμοποιείται φρέσκια αποικία (διαμέτρου 2-3 mm) από τρυβλίο (< 2 μήνες) για εμβολιασμό 5 ml θρεπτικού υλικού.
2. Τα κύτταρα διασπείρονται στο θρεπτικό υλικό με χρήση voltex για 1 min.
3. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση στις 230-270 rpm για 16-18 h. Για τα περισσότερα στελέχη αυτό θα δώσει καλλιέργεια σε φάση πλατώ (OD > 1.5).
4. Σε περίπτωση που απαιτείται καλλιέργεια σε εκθετική φάση, εμβολιάζεται καινούργια καλλιέργεια με προσθήκη μέρους της αρχικής καλλιέργειας σε καινούργιο θρεπτικό υλικό έτσι ώστε η οπτική πυκνότητα να είναι $OD_{600} = 0.2-0.3$. Στη συνέχεια επωάζεται

στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση στις 230-250 rpm για 3-5 h. Για τα περισσότερα στελέχη αυτό θα δώσει καλλιέργεια σε εκθετική φάση με OD ~ 0.4-0.6.

2.1.1.4 Μετασηματισμός σε σακχαρομύκητα μικρής κλίμακας

Ο μετασηματισμός σε σακχαρομύκητα έγινε με χρήση της μεθόδου του οξικού λιθίου βάσει του πρωτοκόλλου των Gietz and Woods, (2002) με την οποία λαμβάνονται 10⁵ μετασηματισμένα κύτταρα ζύμης/μg πλασμιδιακού DNA.

Υλικά:

1. YPAD ή το κατάλληλο επιλεκτικό υγρό θρεπτικό υλικό SD.
2. Τρυβλία με κατάλληλο επιλεκτικό στερεό θρεπτικό υλικό SD.
3. Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 10X TE: 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5.
4. Αποστειρωμένο διάλυμα 10X LiAc: 1M οξικό λίθιο (Sigma) pH 7.5
5. 50% (w/v) PEG 4000 (Fluca).
6. 100% DMSO (Sigma).
7. Αποστειρωμένο διάλυμα PEG/LiAc (ετοιμάζεται πάντα φρέσκο πριν να χρησιμοποιηθεί).

| Αντιδραστήρια | Τελική συγκέντρωση ανά αντίδραση |
|----------------------|---|
| PEG 4000 50% (w/v) | 40% (w/v) |
| 10X LiAc | 1X |
| 10X TE | 1X |

8. 2 mg/ml μονής έλικας μεταφορέας DNA (single stand-carrier DNA) σε ρυθμιστικό διάλυμα TE. Ο μεταφορέας αυτός είναι υψηλού μοριακού βάρους DNA και πιο συγκεκριμένα άλας νατρίου του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος τύπου III από όρχεις σολωμού (Deoxyribonucleic acid sodium salt type III from salmon testes) (Sigma). Πριν την χρήση αποδιατάσσεται με βράσιμο για 20 min και έπειτα ψύξη σε πάγο.
9. Κατάλληλο πλασμιδιακό DNA.
10. Κατάλληλο στέλεχος σακχαρομύκητα για παρασκευή δεκτικών κυττάρων.
11. Αποστειρωμένα γυάλινα σφαιρίδια για διασπορά των κυττάρων στα τρυβλία.

Μέθοδος:

2.1.1.4.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων σακχαρομύκητα

1. Εμβολιάζονται σε 1 ml θρεπτικού υλικού YPAD ή κατάλληλου επιλεκτικού θρεπτικού υλικού SD, 2-3 αποικίες (διάμετρο 2-3 mm) από το κατάλληλο στέλεχος (AH109, Y187 ή Y190) και τα κύτταρα διασπείρονται στο θρεπτικό υλικό με χρήση voltex για 5 min.
2. Στη συνέχεια το 1 ml μεταφέρεται σε κωνική φιάλη που περιέχει 50 ml κατάλληλου θρεπτικού υλικού και επωάζεται στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm για 16-18 h ($OD > 1.5$).
3. Την επόμενη μέρα, μεταφέρονται 30 ml της αρχικής καλλιέργειας σε κωνική φιάλη που περιέχει 300 ml θρεπτικού υλικού YPD και η καλλιέργεια φωτομετρείται στα 600 nm. Η τιμή της οπτικής πυκνότητας θα πρέπει να είναι ίση με 0.2-0.3 ($OD_{600} = 0.2-0.3$). Στη περίπτωση που δεν είναι, προστίθεται επιπλέον ποσότητα αρχικής καλλιέργειας, ώστε να γίνει.
4. Η καλλιέργεια αυτή επωάζεται στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση (230 rpm) για 3 h. Σε αυτό το σημείο η οπτική πυκνότητα θα πρέπει να είναι 0.4-0.6.
5. Τα κύτταρα στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 1000 g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 25 ml αποστειρωμένου ddH₂O.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000 g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 1.5 ml φρέσκου αποστειρωμένου διαλύματος 1X TE/1X LiAc.
9. Με τα κύτταρα αυτά μπορούν να πραγματοποιηθούν 15 μικρής κλίμακας αντιδράσεις μετασηματισμού.

2.1.1.4.2 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων σακχαρομύκητα

1. Για κάθε αντίδραση μετασηματισμού που θα πραγματοποιηθεί τοποθετούνται σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf των 1.5 ml, 100 µg πλασμιδιακού DNA και 100 mg herring testes DNA και αναμειγνύονται.
2. Στη συνέχεια στον κάθε σωλήνα προστίθενται 100 µl δεκτικών κυττάρων σακχαρομύκητα που έχουν παρασκευασθεί προηγουμένως και αναμειγνύονται καλά με χρήση vortex.

3. Ακολούθως προστίθενται σε κάθε σωλήνα 600 μl αποστειρωμένου διαλύματος PEG/LiAc και αναμειγνύονται καλά με χρήση vortex σε υψηλή ταχύτητα για 10 sec.
4. Οι σωλήνες επωάζονται στους 30 °C για 30 min υπό ανάδευση στις 200 rpm.
5. Ακολούθως προστίθενται 70 μl DMSO και τα κύτταρα αναδεύονται ήπια με αναστροφή των σωλήνων.
6. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 15 min και έπειτα τα κύτταρα ψύχονται σε πάγο για 1-2 min.
7. Ακολούθως φυγοκεντρώνονται στις 13000 rpm για 5 sec σε θερμοκρασία δωματίου και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
8. Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 0.5 ml αποστειρωμένου διαλύματος 1X TE.
9. 100 μl από αυτά στρώνονται σε τρυβλίο των 100 mm με το κατάλληλο επιλεκτικό SD θρεπτικό υλικό, ώστε να επιλεγούν τα αντίστοιχα μετασχηματισμένα πλασμίδια. Για να είναι σίγουρο ότι θα υπάρξουν διακριτοί διαχωρισμένοι κλώνοι στρώνονται επίσης 100 μl από διάφορες αραιώσεις: 1:1000, 1:100 και 1:10.
10. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C έως ότου γίνουν διακριτές αποικίες (2-5 μέρες).
11. Για να υπολογιστεί η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού, μετρούνται οι αποικίες που αναπτύσσονται στο τρυβλίο με την κατάλληλη αραιώση, ώστε να παρουσιάζονται 30-300 αποικίες και υπολογίζεται με βάσει τον τύπο:

$$\text{Transf. Efficiency} = \frac{\text{cfux} \times \text{Suspension Vol. (ml)}}{\text{Vol. plated (ml)}} \times \text{amount of DNA (}\mu\text{g)}$$

12. Τέλος κλείνονται με φύλλο παραφίνης και αποθηκεύονται στους 4 °C για 3-4 εβδομάδες.

2.1.1.5 Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα σακχαρομύκητα

2.1.1.5.1 Καλλιέργεια σακχαρομύκητα για παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

Υλικά:

1. Κατάλληλο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD.
2. Υγρό θρεπτικό υλικό YPD.
3. Παγωμένο H₂O
4. Υγρό άζωτο.

Μέθοδος:

1. Από κάθε μετασηματισμένο στέλεχος σακχαρομύκητα που επιθυμείται να μελετηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης σε αυτό με τη μέθοδο Western, λαμβάνεται μία φρέσκα αποικία (με διάμετρο 1-2 mm, όχι πάνω από 4 μέρες) και εμβολιάζεται σε 5 ml επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD. Επίσης λαμβάνεται και μία αποικία από το μη μετασηματισμένο στέλεχος, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως αρνητικό δείγμα, και εμβολιάζεται σε 10 ml θρεπτικού υλικού YPD. Οι αποικίες επωάζεται στους 30 °C υπό ανάδευση στις 200 rpm για 16-18 h.
2. Την επόμενη μέρα η κάθε καλλιέργεια μεταφέρεται σε 50 ml θρεπτικού υλικού YPD και επωάζεται στους 30 °C υπό ανάδευση στις 200 rpm έως ότου η οπτική πυκνότητα τους φτάσει τα 0.4-0.6 στα 600 nm ($OD_{600} = 0.4-0.6$). Χρειάζονται περίπου 4-8 h ανάλογα με την πρωτεΐνη.
3. Ο συνολικός αριθμός των μονάδων οπτικής πυκνότητας (total number of OD_{600} units) ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί μετέπειτα υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας την οπτική πυκνότητα (OD_{600}) από 1 ml καλλιέργειας με τον συνολικό όγκο της καλλιέργειας (π.χ. $0.6 \times 55 = 33$ συνολικές μονάδες οπτικής πυκνότητας).
4. Οι καλλιέργειες παγώνονται αμέσως με τοποθέτηση τους σε σωλήνες των 50 ml γεμάτους κατά το μισό με πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm για 5 min στους 4 °C.
5. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml παγωμένο αποστειρωμένο d-H₂O.
6. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 5 min στους 4 °C.
7. Τα κυτταρικά ιζήματα παγώνονται με υγρό άζωτο και φυλάγονται στους -80 °C μέχρι την χρήση τους.

2.1.1.5.2 Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα σακχαρομύκητα με χρήση τριχλωρο-οξικού οξέως [Trichloroacetic acid (TCA)]

Υλικά:

1. 100X PMSF (phenylmethyl-sulfonyl fluoride-φαίνυλ-μέθυλ-σουλφόνυλοφθορίδιο, Sigma). 0.1742 g PMSF διαλύονται σε 10 ml ισοπροπανόλης. Ο σωλήνας τυλίγεται με αλουμινοχαρτό για προστασία από το φως και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα TCA: 20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM οξικό αμμώνιο, 2 mM EDTA, 1X complete (αναστολείς πρωτεασών), 1X PMSF.

3. Διάλυμα 20% (w/v) TCA σε νερό.
4. Διάλυμα SDS/γλυκερόλης: 7.3% (w/v) SDS, 29.1% (v/v) γλυκερόλη, 83.3 mM Tris-base, κυανό της βρωμοφαινόλη.
5. Διάλυμα Tris/EDTA: 200 mM Tris-base, 20 mM EDTA.
6. Ρυθμιστικό διάλυμα φορτώματος δειγμάτων TCA-Laemmli: 0.48% (v/v) διάλυμα SDS/γλυκερόλης, 0.4% (v/v) διάλυμα Tris/EDTA, 2x PMSF, 1X complete (αναστολείς πρωτεασών), 0.720 M β-μερκαπτοαιθανόλη.
7. Γυάλινα σφαιρίδια (425-600 μm, Sigma).

Μέθοδος:

1. Τα κυτταρικά ιζήματα ξεπαγώνονται στο πάγο (10-20 min) και το κάθε ένα αναδιασπείρεται σε 100 μl παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TCA για κάθε 7.5 μονάδες οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀. (π.χ. αν ο συνολικός αριθμός των μονάδων οπτικής πυκνότητας ισούται με 33 τότε τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 440 μl ρυθμιστικό διάλυμα TCA).
2. Ακολούθως το κάθε αναδιασπειρόμενο κυτταρικό ίζημα μεταφέρεται ξεχωριστά σε σωλήνα ο οποίος περιέχει γυάλινα σφαιρίδια και παγωμένο διάλυμα 20% (w/v) TCA. Χρησιμοποιούνται 100 μl γυάλινα σφαιρίδια και 100 μl 20% (w/v) TCA για κάθε 7,5 OD₆₀₀ μονάδες.
3. Τα κύτταρα λύνονται με vortex σε μέγιστη ταχύτητα για 10 min στους 4 °C και το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί το πρώτο κυτταρικό εκχύλισμα, μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα ο οποίος τοποθετείται στο πάγο.
4. Τα γυάλινα σφαιρίδια ξεπλένονται με προσθήκη σε αυτά 500 μl μείγματος 1:1 20% (v/v) TCA: ρυθμιστικό διάλυμα TCA, vortex σε μέγιστη ταχύτητα για 5 min στους 4 °C και στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρεται και ενώνεται με το πρώτο κυτταρικό εκχύλισμα από το βήμα 3.
5. Το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 10 min στους 4 °C ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες και το υπερκείμενο απομακρύνεται εντελώς.
6. Κάθε πρωτεϊνικό ίζημα αναδιασπείρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φορτώματος δειγμάτων TCA-Laemmli. Χρησιμοποιούνται 10 μl για κάθε μονάδα οπτικής πυκνότητας των κυττάρων.
7. Τα δείγματα βράζονται στους 100 °C για 10 min και φυγοκεντρούνται στις 13000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα και τα δείγματα αναλύονται με SDS-ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.1.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από σακχαρομύκητα

Υλικά:

1. Κατάλληλο SD επιλεκτικό θρεπτικό υλικό.
2. Διάλυμα λύσης: 2% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 µg/ml RNase.
3. Διάλυμα φαινόλης : χλωροφόρμιου : ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) (v/v/v).
4. 10 M οξικό αμμώνιο.
5. 100% αιθανόλη.
6. Γυάλινα σφαιρίδια (425-600 µm, Sigma).

Μέθοδος:

1. Μία μετασηματισμένη αποικία σακχαρομύκητα εμβολιάζεται σε 1.5 ml υγρού επιλεκτικού θρεπτικού υλικού και επωάζεται στους 30 °C υπό ανάδευση στις 250 rpm για 16-18 h.
2. Ακολούθως φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 5 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
3. Τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 0.2 ml διάλυμα λύσης και γίνεται προσθήκη 0.2 ml μείγματος φαινόλης:χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής αλκοόλης 25:24:1 (v/v/v) και 0.3 g γυάλινων σφαιριδίων.
4. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με χρήση vortex σε μέγιστη ταχύτητα για 5 min στους 4 °C και έπειτα φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 min.
5. Η υδατική φάση στην οποία περιέχεται το πλασμιδιακό DNA μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.
6. Το πλασμιδιακό DNA καταβυθίζεται με 100% παγωμένη αιθανόλη ίση με 2.5 φορές τον όγκο του υπερκείμενου στην παρουσία 2 mM οξικού αμμωνίου, με τοποθέτηση των σωλήνων στους -80 °C για 1 h.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρωση των σωλήνων στις 13000 rpm για 15 min στους 4 °C και η αιθανόλη απομακρύνεται. Το πλασμιδιακό ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα 70% (v/v) αιθανόλης και αφήνεται να στεγνώσει στο αέρα.
8. Το πλασμιδιακό ίζημα διαλυτοποιείται σε 20 µl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

2.1.1.7 Ανίχνευση β-γαλακτοσιδάσης επί φίλτρου (β-galactosidase filter Assay)

Η ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης από αποικίες σακχαρομύκητα επί φίλτρου χρησιμοποιείται για γρήγορη σάρωση των κλώνων στη μέθοδο διυβριδισμού σε σύστημα σακχαρομύκητα ώστε να ελεγχθεί αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πρωτεϊνών.

Υλικά:

1. Αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά Whatman.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα Z: 60 mM Na₂HPO₄, 60 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.0.
3. 20 mg/ml X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο) σε DMF (N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο).
4. 14.4 M β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma).
5. X-gal/ Ρυθμιστικό διάλυμα Z: 0.33 mg/ml X-gal, 40 mM β-μερκαπτοαιθανόλη σε ρυθμιστικό διάλυμα Z.
6. Υγρό άζωτο.

Μέθοδος:

1. Για κάθε τρυβλίο, στο οποίο υπάρχουν μετασχηματισμένες αποικίες σακχαρομύκητα (2-4 ημερών), στις οποίες θα γίνει ανίχνευση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, βυθίζεται ένα διηθητικό χαρτί σε 5 ml Z-διαλύματος/X-gal διαλύματος σε καθαρό τρυβλίο.
2. Ακολούθως τοποθετείται στεγνό διηθητικό χαρτί πάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου με τις αποικίες που θα αναλυθούν και η μεταφορά των αποικιών στο χαρτί υποβοηθείται με απαλή πίεση μέσω χρήσης λαβίδας.
3. Στο διηθητικό χαρτί, καθώς και στο τρυβλίο σημειώνονται τρία ασύμμετρα σημεία για να διευκολυνθεί η αναγνώριση του προσανατολισμού, και να μπορούν εκ των υστέρων, να ταυτοποιηθούν οι αποικίες.
4. Το διηθητικό χαρτί απομακρύνεται από το τρυβλίο, βυθίζεται για 10 sec σε υγρό άζωτο και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσει.
5. Ακολούθως τοποθετείται, με τις αποικίες προς τα πάνω, επί διηθητικού χαρτιού που είναι βυθισμένο σε Z-διάλυμα/ X-gal μέσα σε καθαρό τρυβλίο (από το βήμα 1).
6. Ακολουθεί επώαση στους 30 °C και περιοδικός έλεγχος για την εμφάνιση μπλε χρώματος. Ο χρόνος που παίρνει για να εμφανιστεί το μπλε χρώμα κυμαίνεται συνήθως από 30 min ως 8 h.

7. Η θέση των αποικιών, που δίνουν μπλε χρώμα, αναγνωρίζεται με τη βοήθεια των ασύμμετρων σημαδιών που τοποθετήθηκαν στο χαρτί και το τρυβλίο (βήμα 3) και οι αποικίες μεταφέρονται σε τρυβλίο με το κατάλληλο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό. Στις αποικίες αυτές μεταγράφεται το γονίδιο αναφοράς, *lacZ* και παράγεται η β-γαλακτοσιδάση παρουσία της οποίας το υπόστρωμα X-gal γίνεται μπλε. Οι αποικίες αυτές θεωρούνται “θετικές” αφού η μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς αποτελεί σοβαρή ένδειξη ότι γίνεται αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης-“δόλωμα” και της πρωτεΐνης από cDNA βιβλιοθήκη.

2.1.1.8 cDNA βιβλιοθήκη

Στη παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκε cDNA βιβλιοθήκη (BD Biosciences) από ανθρώπινα κύτταρα HeLa, που κωδικοποιούσε πρωτεΐνες συγχωνευμένες με την περιοχή ενεργοποίησης (Activation Domain) του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.

Τα διάφορα cDNA ήταν κλωνοποιημένα στο πλασμίδιο pACT₂ και μετασηματισμένα στο στέλεχος του σακχαρομύκητα Y187. Αγοράστηκε κατεψυγμένη καλλιέργεια αυτών σε θρεπτικό υλικό κατάψυξης (5 x 1 ml).

Ο αριθμός των ανεξάρτητων κλώνων που περιέχονται στη βιβλιοθήκη είναι 1.3×10^7 και το μέγεθος των cDNA κυμαίνεται από 0.5 έως ≥ 3 kb.

2.1.1.8.1 Μέθοδος διυβριδισμού σε σύστημα σακχαρομύκητα (Yeast two-hybrid system)

(Yeast Protocols Handbook, 2000; Matchmaker Gal4 Two-Hybrid User manual, 2000)

Το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα (Y2H) είναι ένα ισχυρό εργαλείο που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης *in vivo*. Επιτρέπει τη σάρωση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών (π.χ. αυτών που κωδικοποιούνται από μια βιβλιοθήκη cDNA), για την ανίχνευση αυτών που παρουσιάζουν φυσική αλληλεπίδραση με την υπό μελέτη πρωτεΐνη, ή μεμονωμένων υποψήφιων πρωτεϊνών για την επαλήθευση πιθανών αλληλεπιδράσεων. Μπορεί επίσης με το σύστημα αυτό να γίνει περαιτέρω ανάλυση και να αποκαλυφθούν τα επιμέρους τμήματα ή αμινοξέα των πρωτεϊνών που είναι αναγκαία για την αλληλεπίδραση.

Η αρχή λειτουργίας του Y2H βασίζεται στο γεγονός ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούνται από δύο χωριστές, διακριτές δομές: την περιοχή πρόσδεσης του DNA

[DNA-binding domain (DBD)], η οποία προσδένεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία του υποκινητή, και την περιοχή ενεργοποίησης [activation domain (AD)] που αλληλεπιδρά με την RNA-πολυμεράση. Ωστόσο ένας μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να δημιουργηθεί τεχνητά από δύο διαφορετικές πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, όπου η μία φέρει τη DBD και η άλλη την AD. Όταν αυτές οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδράσουν θα πραγματοποιηθεί μεταγραφή κάποιων γονιδίων αναφοράς (αυξοτροφία σε επιλεκτικά θρεπτικά μέσα, ενεργοποίηση του γονιδίου *lacZ*).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της εταιρείας CLONTECH, MACHMAKER Two-Hybrid System 2 το οποίο περιέχει:

1. Το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (Πίνακας 2.1).
2. Το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y187 με μετασηματισμένη cDNA βιβλιοθήκη HeLa στο πλασμίδιο pACT2-1 (Πίνακας 2.1).
3. Το πλασμίδιο pAS2-1 (Πίνακας 2.2).
4. Το πλασμίδιο pACT2-1 (Πίνακας 2.2).
5. Το πλασμίδιο pGBK53 (Πίνακας 2.2).
6. Το πλασμίδιο pTD1-1 (Πίνακας 2.2).
7. Το πλασμίδιο pGADT7-T (Πίνακας 2.2).

Η αρχή της μεθόδου είναι η εξής:

1. Αρχικά το γονίδιο της υπό μελέτη πρωτεΐνης (hCINAP), πρωτεΐνη-δόλωμα, συγχωνεύεται με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (**DNA-BD-DNA-Binding Domain**) του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 του σακχαρομύκητα με χρήση του πλασμιδίου pAS2-1 το οποίο φέρει το γονίδιο της TRP1, παρέχοντας αυξοτροφία στο αμινοξύ τρυπτοφάνη.
2. Το γονίδιο μιας πρωτεΐνης X που πιθανόν να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-δόλωμα είναι συγχωνευμένο με την περιοχή ενεργοποίησης (**AD-Activation Domain**) του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 στο πλασμίδιο pACT2 το οποίο φέρει το γονίδιο της LEU2 παρέχοντας αυξοτροφία στο αμινοξύ λευκίνη.
3. Το πλασμίδιο pAS2-1 με την υπό μελέτη πρωτεΐνη μετασηματίζεται στο στέλεχος του σακχαρομύκητα AH109 το οποίο φέρει στο γονιδίωμα του τρία γονίδια αναφοράς που ελέγχονται από διαφορετικές αλληλουχίες ενεργοποίησης (UASs) και TATA boxes:
α) του *HIS3* που όταν εκφράζεται δίνει τη δυνατότητα στα κύτταρα να μεγαλώνουν σε επιλεκτικό θρεπτικό υλικό από το οποίο απουσιάζει το αμινοξύ ιστιδίνη, β) του *ADE2* που όταν εκφράζεται δίνει τη δυνατότητα στα κύτταρα να μεγαλώνουν σε επιλεκτικό θρεπτικό υλικό από το οποίο απουσιάζει η αδενίνη και γ) *lacZ* το οποίο κωδικοποιεί την β-γαλακτοσιδάση, παρουσία της οποίας το υπόστρωμα X-gal γίνεται μπλε. Η

παρουσία των τριών γονιδίων αναφοράς εξυπηρετεί στον αποκλεισμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Επίσης από τα στελέχη σακχαρομύκητα που χρησιμοποιούνται έχουν διαγραφεί από το γονιδίωμα τους τα γονίδια των ενδογενών πρωτεϊνών GAL4 και GAL80 (απουσία γαλακτόζης προσδένεται στην GAL4 και αναστέλλει την λειτουργία της).

4. Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης-δόλωμα με την πρωτεΐνη X φέρνει κοντά τα DNA-BD και AD, ενεργοποιώντας το μεταγραφικό παράγοντα GAL4 επιτρέποντας την έκφραση των γονιδίων αναφοράς κάνοντας την αλληλεπίδραση φαινοτυπικά διακριτή.

2.1.1.8.2 Σύζευξη σακχαρομύκητα (Yeast Mating)

Με αυτή τη μέθοδο κύτταρα σακχαρομύκητα τύπου “α” μετασχηματισμένα με ένα πλασμίδιο και κύτταρα σακχαρομύκητα τύπου “α” μετασχηματισμένα με ένα άλλο πλασμίδιο, αφήνονται να συζευχθούν, και έτσι προκύπτουν διπλοειδή κύτταρα σακχαρομύκητα που περιέχουν και τα δύο πλασμίδια. Η σύζευξη σακχαρομύκητα χρησιμεύει στη γρήγορη αναγνώριση των ψευδώς θετικών κλώνων και κατ’ επέκταση στον αποκλεισμό τους (Matchmaker Gal4 Two-Hybrid User manual, 2000).

Υλικά:

1. Υγρό θρεπτικό υλικό YPD.
2. Τρυβλία με στερεό επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD/-Trp/-Leu.
3. Τρυβλία με στερεό επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD/-Trp/-Leu/-His.
4. Τρυβλία με στερεό επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade.

Μέθοδος:

1. Επιλέγεται μία μετασχηματισμένη αποικία από τον κάθε τύπο σακχαρομύκητα και οι δύο αποικίες εμβολιάζονται σε 0.5 ml YPD θρεπτικού υλικού σε σωλήνα των 1.5 ml. Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται με vortex.
2. Η καλλιέργεια επώαζεται στους 30 °C υπό ανάδευση στις 200 rpm για 20-24 h.
3. 100 μl από την καλλιέργεια μεταφέρονται και επαναδιασπείρονται σε τρυβλίο με επιλεκτικό θρεπτικό υλικό SD/-Trp/-Leu, το οποίο επιτρέπει μόνο στα διπλοειδή κύτταρα σακχαρομύκητα να επιζήσουν ή σε SD/-Trp/-Leu/-His, που επιτρέπει την επιλογή του γονιδίου αναφοράς *His3* (ήπια επιλογή) ή σε SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, που επιτρέπει την επιλογή του γονιδίου αναφοράς *Ade2* (πιο αυστηρή επιλογή).

4. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C για 3-8 μέρες στη περίπτωση του επιλεκτικού μέσου SD/-Trp/-Leu/-His ή για 6-18 μέρες στη περίπτωση του επιλεκτικού μέσου SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade.

Μέθοδος (μικρής κλίμακας):

Όταν υπάρχουν πολλά πλασμίδια τα οποία πρέπει να μελετηθούν τότε χρησιμοποιείται η μέθοδος σύζευξης σε μικροκλίμακα και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται τρυβλίο χωρισμένο σε πολλά κελιά (microtiter plate)

1. Αρχικά γεμίζονται τα κελιά του τρυβλίου με 160 μl θρεπτικό υλικό YPD.
2. Για κάθε πλασμίδιο που θα αναλυθεί εμβολιάζεται μία μετασηματισμένη αποικία σε 1 ml θρεπτικό υλικό YPD.
3. Για κάθε τύπο πλασμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί ως δείγμα αναφοράς εμβολιάζονται 2-3 μετασηματισμένες αποικίες σε 3 ml θρεπτικό υλικό YPD.
4. Οι στήλες του τρυβλίου εμβολιάζονται με 20 μl από την καλλιέργεια του βήματος 2.
5. Οι σειρές εμβολιάζονται με 20 μl από την καλλιέργεια του βήματος 3. Για κάθε ξεχωριστό τύπο πλασμιδίου αναφοράς χρησιμοποιείται ξεχωριστή σειρά κελιών στο τρυβλίο.
6. Το τρυβλίο επωάζεται στους 30 °C υπό ανάδευση στις 200 rpm για 6-18 h.
7. 100 μl από κάθε ξεχωριστή συζευγμένη καλλιέργεια μεταφέρονται και επαναδιασπείρονται σε τρυβλία με επιλεκτικά θρεπτικά υλικά SD όπως και προηγουμένως.
8. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C όπως και προηγουμένως.

2.1.2 Μέθοδοι στα Βακτήρια

2.1.2.1 Στελέχη Βακτηρίου *Escherichia coli* και πλασμιδιακοί φορείς

| Στέλεχος βακτηρίου <i>E.coli</i> | Γονότυπος | Αντιβιοτικό |
|----------------------------------|--|-------------------------------|
| XL1-Blue | <i>E.coli lamda⁻ F⁻ recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F⁻ proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)]</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 |
| BL21-codonplus (DE3)-RIL | <i>E.coli B F⁻ ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm+ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU ileW Cam^r]</i> | Χλωραμφαινικόλη, Τετρακυκλίνη |
| TOP10F ⁻ (InVitrogen) | <i>F⁻{lacI^q Tn10 (Tet^r)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i> | Τετρακυκλίνη |

Πίνακας 2.4: Στελέχη βακτηρίου *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

| Πλασμιδιακοί φορείς | Περιγραφή | Επιλογή σε θρεπτικό μέσο | Μέγεθος Kb |
|---|--|--------------------------|------------|
| pCR2.1 (InVitrogen) | Τμήμα <i>lacZα</i> , amp ^r , kan ^r | Αμπικιλλίνη ή Καναμυκίνη | 3.9 |
| pGEX-4T-1 (Amesham Pharmacia Biotech) | Αμινοτελικό επιτόπιο μεταφοράς της S-γλουταθειόνης (26KDa GST) amp ^r , αλληλουχία θρομβίνης | Αμπικιλλίνη | 4.96 |
| pHAT ₂ (Peranen et al, 1996) | Αμινοτελικό επιτόπιο εξα-ιστιδίνης (6xHis), amp ^r | Αμπικιλλίνη | 2.95 |
| pET32a+ (Novagen) | Αμινοτελικό επιτόπιο εξα-ιστιδίνης (6xHis), αλληλουχία θειορεδοξίνης (Trx), amp ^r | Αμπικιλλίνη | 5.9 |
| pRSET _{A,B,C} (Invitrogen) | Αμινοτελικό επιτόπιο εξα-ιστιδίνης (6xHis), amp ^r | Αμπικιλλίνη | 2.9 |

Πίνακας 2.5: Πλασμιδιακοί φορείς για κλωνοποίηση και έκφραση σε βακτήρια *E.coli*, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.1.2.2 Επιλεκτικά θρεπτικά υλικά για βακτηριακές καλλιέργειες

1. **Θρεπτικό υλικό LB (Luria Bertani Medium):** 1% (w/v) τρυπτόνη, 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 0.71 M NaCl, pH 7.0.
2. **Θρεπτικό υλικό SOC:** 2% (w/v) τρυπτόνη, 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 10 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM γλυκόζη.
3. **Στερεό θρεπτικό υλικό LB με άγαρ (τρυβλία):** 1% (w/v) τρυπτόνη, 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 0.171 M NaCl και 1.5% (w/v) άγαρ, pH 7.0.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση του DNA που μας ενδιαφέρει περιέχουν γονίδιο/α που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά έτσι ώστε να είναι δυνατή η καλλιέργεια των βακτηριακών αποικιών που τα φέρουν σε επιλεκτικό μέσο. Μερικά από τα χρησιμοποιούμενα βακτηριακά στελέχη διαθέτουν επίσης ανθεκτικότητα σε ορισμένα αντιβιοτικά λόγω εισδοχής σχετικού γονιδίου στο χρωμόσωμα τους (βλ. Πίνακα 2.4). Επομένως η επιλογή των βακτηριακών κλώνων γίνεται βάσει της ανθεκτικότητάς τους στα κατάλληλα αντιβιοτικά και στις κατάλληλες συγκεντρώσεις (βλ. Πίνακα 2.6), ανάλογα με το πλασμίδιο και το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται.

| Αντιβιοτικό | Συγκεντρωμένο διάλυμα | Τελική Συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο |
|-----------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Αμπικιλίνη | 50mg/ml | 100μg/ml |
| Χλωραμφαινικόλη | 30mg/ml | 30μg/ml |
| Τετρακυκλίνη | 5mg/ml | 25μg/ml |
| Καναμυκίνη | 50mg/ml | 50μg/ml |

Πίνακας 2.6: Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την παρασκευή επιλεκτικών θρεπτικών μέσων.

2.1.2.3 Κατάψυξη βακτηριακών στελεχών

Από μικρές υγρές βακτηριακές καλλιέργειες που αναπτύσσονται για 12-16 h και προέρχονται από απομονωμένες αποικίες τρυβλίου μεταφέρονται 0.5 ml σε σωλήνες τύπου erpendorf οι οποίοι περιέχουν ήδη 0.5 ml αποστειρωμένης γλυκερόλης 50% (v/v) και αναμειγνύονται. Οι σωλήνες αποθηκεύονται στους -80 °C έπ' άπειρον, έτσι ώστε να

χρησιμοποιούνται ανά πάσα στιγμή ως αποθέματα για την αναπαραγωγή των βακτηριακών κλώνων.

2.1.2.4 Ανάκτηση κατεψυγμένων βακτηριακών κυττάρων

Υλικά:

1. Κατεψυγμένα βακτηριακά στελέχη σε γλυκερόλη.
2. LB τρυβλία.
3. Αποστειρωμένες ειδικές λαβίδες μιας χρήσης (loops).

Μέθοδος:

1. Μικρή ποσότητα γλυκερόλης από κατεψυγμένα βακτηριακά κύτταρα λαμβάνεται και διασπείρεται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB.
2. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 16-18 h μέχρι να διακριθούν αποικίες (12-18 h).
3. Τέλος κλείνονται με φύλλο παραφίνης και αποθηκεύονται στους 4 °C μέχρι 1 μήνα.

2.1.2.5 Παρασκευή δεκτικών βακτηρίων για πλασμιδιακό μετασχηματισμό με χρήση γλωριούχου ασβεστίου

Υλικά:

1. Υγρό θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB) με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.
2. Τρυβλία με τα ίδια αντιβιοτικά όπως και του θρεπτικού υλικού.
3. 0.1 M CaCl₂ αποστειρωμένο μέσω φίλτρου 0.45 μm.
4. Αποστειρωμένη 50% (v/v) γλυκερόλη.

Μέθοδος:

1. Από κατεψυγμένα (-80 °C) βακτηριακά αποθέματα σε γλυκερόλη εμβολιάζουμε τρυβλίο που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Στη συνέχεια τοποθετούμε το τρυβλίο στους 37 °C για 16-20 h για ανάπτυξη κλώνων.
2. Παίρνουμε ένα κλώνο (2-3 mm) από απομονωμένες αποικίες που αναπτύχθηκαν σε αυτό και εμβολιάζουμε μικρή καλλιέργεια (3 ml) υγρού θρεπτικού υλικού LB και την αφήνουμε να μεγαλώσει για περίπου 12 h.

3. Στη συνέχεια μεταφέρουμε 1 ml από τη μικρή καλλιέργεια σε 100 ml LB μέσα σε κωνική φιάλη των 500 ml και την αφήνουμε για επώαση στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση στις 250-300 rpm. Σε τακτά χρονικά διαστήματα παίρνουμε δείγμα από την καλλιέργεια και μετρούμε την οπτική πυκνότητα (OD) στα 600 nm, ως δείκτη για την ανάπτυξη της. Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν βακτήρια σε εκθετική φάση ανάπτυξης (περίπου $OD_{600} = 0.4$), όπου διαιρούνται με πολύ γρήγορο ρυθμό. Για να εξακριβωθεί αυτό μπορούμε να κατασκευάσουμε το διάγραμμα της οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου [$OD=f(t)$]. Σ' αυτό το διάγραμμα βλέπουμε αρχικά μια μικρή μεταβολή της τιμής της οπτικής πυκνότητας συναρτήσει του χρόνου και από ένα σημείο και μετά μια απότομη αλλαγή στη κλίση της καμπύλης, ενδεικτικό ότι τα βακτήρια έχουν μπει στην εκθετική φάση. Στο τελευταίο τμήμα του διαγράμματος (στάσιμη φάση) η τιμή της οπτικής πυκνότητας παραμένει σταθερή με τη πάροδο του χρόνου, ένδειξη ότι όσα βακτήρια διαιρούνται τόσα πεθαίνουν. Τελικά επέρχεται μείωση της οπτικής πυκνότητας με τη πάροδο του χρόνου, όπου τα βακτήρια πεθαίνουν λόγω έλλειψης θρεπτικού υλικού ή οξυγόνου ή λόγω της έκκρισης χημικών αποβλήτων. Επομένως για να πετύχει ένας μετασχηματισμός θα πρέπει οι βακτηριακές καλλιέργειες να διατηρηθούν στην αρχή της εκθετικής φάσης, ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη τους στο στερεό υπόστρωμα.
4. Ενώσω η καλλιέργεια βρίσκεται στην αρχή της εκθετικής φάσης μεταφέρεται ασηπτικά μέσα σε παγωμένους σωλήνες των 50 ml, οι οποίοι τοποθετούνται σε πάγο για 10 min.
5. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 4000 rpm για 10 min, στους 4 °C.
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι σωλήνες αφήνονται αναποδογυρισμένοι για ένα λεπτό ώστε να στεγνώσουν.
7. Τα βακτήρια του κάθε σωλήνα επαναδιασπείρονται σε 10 ml παγωμένου διαλύματος 0.1 M $CaCl_2$.
8. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 4 και 5.
9. Τέλος, τα βακτήρια του κάθε σωλήνα επαναδιασπείρονται σε 2 ml παγωμένου διαλύματος 0.1 M $CaCl_2$.
10. Τα βακτήρια ίδιας καλλιέργειας, μεταφέρονται σε ένα σωλήνα και προστίθενται 2.4 ml αποστειρωμένης γλυκερόλης 50% (v/v).
11. Οι σωλήνες τοποθετούνται σε πάγο και κατόπι στο ψυγείο κατά τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη μέρα το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα χωρίζεται σε σωλήνες τύπου Eppendorf ανά δόσεις των 100 μl (aliquots), οι οποίοι φυλάγονται στους -80 °C για μελλοντική χρήση μετασχηματισμού.

2.1.2.6 Βακτηριακός μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων (transformation)

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από αυτές που έγινε χρήση του πακέτου T/A Cloning (InVitrogen).

Υλικά:

1. Υγρό θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά.
2. Τρυβλία με τα κατάλληλα αντιβιοτικά ανάλογα με το είδος του πλασμιδίου και βακτηρίου που θα χρησιμοποιηθεί.
3. Απομονωμένο πλασμίδιο.
4. Βακτήρια δεκτικά για μετασχηματισμό.

Μέθοδος:

1. Ανάλογα με τον αριθμό των μετασχηματισμών, λαμβάνονται από τους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σωλήνες με 100 μl δεκτικών βακτηρίων και ξεπαγώνονται γρήγορα πάνω σε πάγο.
2. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 50-100 ng πλασμιδίου και αναμιγνύονται πολύ απαλά. Οι σωλήνες αφήνονται στον πάγο για 30 min.
3. Στη συνέχεια τα βακτήρια υποβάλλονται σε θερμικό σοκ στους $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 45 sec ώστε η μεμβράνη τους να γίνει παροδικά διαπερατή επιτρέποντας να διεισδύσει δια μέσου αυτής ποσότητα πλασμιδίου.
4. Οι σωλήνες τοποθετούνται στον πάγο για 1-2 min και έπειτα στον κάθε σωλήνα προστίθενται 400 μl υγρού θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικά.
5. Οι σωλήνες επωάζονται στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 h υπό συνεχή ανάδευση (200 cycles/min), ώστε τα βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό και το οποίο βρίσκεται ενσωματωμένο στο πλασμίδιο.
6. Στη συνέχεια μεταφέρονται 100 μl και 150 μl βακτηριακής καλλιέργειας από τον κάθε σωλήνα σε αντίστοιχα τρυβλία, που περιέχουν τα κατάλληλα αντιβιοτικά για αυστηρή επιλογή κλώνων. Με τη βοήθεια αποστειρωμένων γυάλινων σφαιριδίων το υγρό διασπείρεται με απαλές κυκλικές κινήσεις σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου.
7. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετούνται αναποδογυρισμένα σε επωαστήρα, στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 16-18 h ώστε να αναπτυχθούν βακτηριακές αποικίες.

2.1.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεσαίας κλίμακας (Mini and Midi Preps) από βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (QIAGEN)

Υλικά:

1. Υγρό θρεπτικό υλικό LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα P1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A, pH 8.0.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα P2: 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS.
4. Ρυθμιστικό διάλυμα P3: 3.0 M CH₃COOK, pH 5.5.
5. Ρυθμιστικό διάλυμα QBT: 750 mM NaOH, 50 mM MOPS, 15% (v/v) αιθανόλη, 0.15% (v/v) Triton X-100, pH 7.0.
6. Ρυθμιστικό διάλυμα QC: 1.0 M NaOH, 50 mM MOPS, 15% (v/v) αιθανόλη, pH 7.0.
7. Ρυθμιστικό διάλυμα QF: 1.25 M NaOH, 50 mM Tris-HCl, 15% (v/v) αιθανόλη, pH 8.5.
8. Ρυθμιστικό διάλυμα TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0.
9. Αιθανόλη 75% και 100% (v/v).
10. Ισοπροπανόλη 100% (v/v).
11. Ανιοανταλλακτική στήλη: **QIAGEN-tip 20** ή **QIAGEN-tip 100**

Μέθοδος:

1. Από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια τοποθετούνται **3 ml** ή **50 ml** σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυγοκεντρώνται στις 6000 rpm για 5 min.
2. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιασπείρεται με προσθήκη **300 µl** ή **4 ml** ρυθμιστικού διαλύματος P1. Το διάλυμα αυτό είναι υπερτονικό και προκαλεί διόγκωση των κυττάρων και περιέχει επίσης RNAάση για αποικοδόμηση του RNA των βακτηρίων όταν αυτά βρεθούν σε αλκαλικές συνθήκες με την προσθήκη του διαλύματος P2.
3. Προστίθενται σε κάθε σωλήνα **300 µl** ή **4 ml** ρυθμιστικού διαλύματος P2, το οποίο προκαλεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών. Ακολουθεί απαλή ανάδευση και επώαση όχι περισσότερο από 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το SDS που περιέχεται σε αυτό το διάλυμα διαλυτοποιεί τα φωσφολιπίδια και τα πρωτεϊνικά συστατικά της βακτηριακής μεμβράνης προκαλώντας την απελευθέρωση του εσωτερικού περιεχομένου των βακτηρίων. Το NaOH αποδιατάσει τα χρωμοσωμικά και πλασμιδιακά DNAς και τις πρωτεΐνες. Το διάλυμα αυτό είναι αλκαλικό και έτσι ο

χρόνος παραμονής σε αλκαλικές συνθήκες θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να υπάρχει μέγιστη απελευθέρωση πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια χωρίς να θραυματοποιείται το χρωμοσωμικό DNA και χωρίς να υπάρχει κίνδυνος το πλασμιδιακό DNA να αποδιαταχθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε μετά να μην μπορεί να επαναδιαταχθεί.

4. Προστίθενται σε κάθε σωλήνα **300 µl** ή **4 ml** ρυθμιστικού διαλύματος P3 και ακολουθεί απαλή ανάδευση και επώαση για **10 min** ή **15 min** στον πάγο. Το όξινο διάλυμα P3 εξουδετερώνει τις αλκαλικές συνθήκες που επικρατούν στο P2, με αποτέλεσμα να καταβυθίζονται το SDS, οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA. Τα υπόλοιπα υποκυτταρικά οργανίδια παγιδεύονται σε σύμπλοκα που σχηματίζονται από το οξικό κάλιο με το SDS. Το πλασμιδιακό DNA επαναδιατάσσεται και παραμένει στο υπερκείμενο.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min στους 4 °C.
6. Μεταφέρεται το υπερκείμενο (που φέρει το πλασμιδιακό DNA) σε καθαρό σωλήνα.
7. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 5-6.
8. Μια ανιοανταλλακτική στήλη **QIAGEN-tip 20** ή **QIAGEN-tip 100** εξισορροπείται με **1 ml** ή **4 ml** ρυθμιστικού διαλύματος QBT και αφήνεται να αδειάσει, λόγω βαρύτητας.
9. Το υπερκείμενο από το βήμα 7 προστίθεται στη στήλη και αφήνεται να περάσει δια μέσου της στήλης.
10. Η στήλη ξεπλένεται τέσσερις φορές με **1 ml** ή 2 φορές με **10 ml** ρυθμιστικού διαλύματος QC.
11. Η έκλυση του DNA γίνεται με **0.8 ml** ή **5 ml** ρυθμιστικού διαλύματος QF και λαμβάνεται σε καθαρό σωλήνα.
12. Στο έκλυσμα προστίθεται ισοπροπανόλη ίση με 0.7 φορές τον όγκο του υπερκείμενου.
13. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 min στους 4 °C και απομάκρυνση της ισοπροπανόλης.
14. Το πλασμιδιακό ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα 70% (v/v) αιθανόλης και αφήνεται να στεγνώσει.
15. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TE.
16. Το απομονωμένο πλασμίδιο φυλάγεται στους -20 °C για περαιτέρω χρήση.

2.1.2.8 Καταβύθιση πλασμιδιακού DNA με αιθανόλη

Υλικά:

1. Απομονωμένο πλασμίδιο.
2. 100% (v/v) παγωμένη αιθανόλη.
3. Αλάς (Πίνακας 2.7).
4. 70 % (v/v) αιθανόλη.

Μέθοδος:

Ακολουθούνται τα βήματα 1-7 της προηγούμενης μεθόδου (2.1.2.7).

8. Στη συνέχεια προστίθενται στο υπερκείμενο 100% (v/v) παγωμένη αιθανόλη ίση με 2.5 φορές τον όγκο του υπερκείμενου. Η αιθανόλη προκαλεί την καταβύθιση του πλασμιδιακού DNA στην παρουσία ικανοποιητικής συγκέντρωσης άλατος (θετικών ιόντων). Η καταβύθιση μπορεί να επιτευχθεί επίσης με τη χρήση ισοπροπανόλης σε όγκο 0.7-1 φορές τον όγκο της υδατικής φάσης στην παρουσία των πιο κάτω αλάτων (Πίνακας 2.7).
9. Για να είναι πιο αποτελεσματική η καταβύθιση οι σωλήνες τοποθετούνται στους -20 °C για 30 min.
10. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 13000 rpm για 15 min στους 4 °C και η αιθανόλη απομακρύνεται. Το πλασμιδιακό ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα 70% (v/v) αιθανόλης, φυγοκεντρείται και πάλι στις 13000 rpm, για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το πλασμιδιακό ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα.
11. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε 40 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE και οι σωλήνες με το απομονωμένο πλασμίδιο φυλάγονται στους -20 °C. Το EDTA που περιέχεται στο διάλυμα αυτό δρα ως καταστολέας ενδονουκλεασών που προκαλούν αποικοδόμηση του DNA.

| Άλας | Τελική Συγκέντρωση |
|--------------------------|---------------------------|
| Οξικό αμμώνιο/ 10 M | 2-2.5 M |
| Χλωριούχο λίθιο/ 8 M | 0.8 M |
| Οξικό νάτριο/ 3 M pH 5.2 | 0.3 M |

Πίνακας 2.7: Τελική συγκέντρωση άλατος που χρησιμοποιείται για την καταβύθιση DNA.

2.1.3 Τεχνικές ανασυνδρασμένου DNA

2.1.3.1 Ενδονουκλεολυτική διάσπαση πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα

Τα περιοριστικά ένζυμα, που λέγονται και περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες βάσεων σε διπλή έλικα DNA και διασπούν και τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας σε συγκεκριμένες θέσεις. Οι περισσότερες απ' αυτές αναγνωρίζουν μια ειδική αλληλουχία από τέσσερα έως έξι ζεύγη βάσεων και υδρολύουν έναν μόνο φωσφοροδιεστερικό δεσμό σε κάθε μια αλυσίδα του στόχου. Η αλληλουχία που αναγνωρίζεται είναι παλίνδρομη και οι θέσεις διάσπασης είναι τοποθετημένες συμμετρικά.

Υλικά:

1. Ποσότητα 500-1000 ng πλασμιδίου.
2. Χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (10X), ειδικού για το κάθε ένζυμο.
3. Διάλυμα 10X αλβουμίνης από βόειο ορό (BSA), στις περιπτώσεις όπου χρειάζεται.
4. Ποσότητα ενζύμου (1U/μg DNA) 1/10 του τελικού όγκου (New England Biolabs).
5. Απεσταγμένο νερό ddH₂O μέχρι συμπλήρωσης επιθυμητού τελικού όγκου.

Μέθοδος:

1. Σε σωλήνα τύπου eppendorf προστίθενται τα πιο πάνω υλικά πάντα κατά την ακόλουθη σειρά: α) απιονισμένο νερό, β) ρυθμιστικό διάλυμα (1X), γ) BSA (1X), δ) πλασμίδιο και ε) ένζυμο. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20 μl.
2. Η αντίδραση γίνεται με επώαση για 2 h σε κατάλληλη θερμοκρασία που εξαρτάται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται, συνήθως 37 °C.
3. 5-10 μl από κάθε αντίδραση ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.1.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Οι μικρές διαφορές μάζας μεταξύ συγγενών μορίων DNA μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν μέσω διαχωρισμού και εμφάνισης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης που λειτουργεί ως μοριακός ηθμός. Κατά την ηλεκτροφόρηση τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα, κινούνται προς την άνοδο με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των τμημάτων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των ζευγών βάσεων.

Οι ζώνες των τμημάτων DNA σ' ένα πήκτωμα εμφανίζονται με βάνιμο του πηκτώματος με βρωμιούχο αιθίδιο, που δίνει έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού κάτω

από υπεριώδη ακτινοβολία ($\lambda=260$ nm) και όταν αυτό είναι δεσμευμένο σε διπλοελικωμένο DNA.

Υλικά:

1. Αγαρόζη (Sigma).
2. Ρυθμιστικό διάλυμα 10X TRIS-Borate/ EDTA (TBE) pH 8.0 (0.5 M EDTA pH 8.0, 0.3 M βάση TRIS, 0.5 M βορικό οξύ).
3. Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), 10 mg/ml (Sigma).
4. 5X Ρυθμιστικό διάλυμα φορτώματος δειγμάτων (gel-loading buffer): 0.25% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% (v/v) κυανού του ξυλενίου FF, 15% (v/v) χρωστική Ficoll-400, (Amersham Pharmacia Biotech), 35% (v/v) νερό.
5. Δείκτες μοριακού βάρους: 1 kb ladder και 100 bp (Amersham-Pharmacia ή Invitrogen).

Μέθοδος:

1. Ανάλογα με το μέγεθος του τμήματος του DNA που θα μελετηθεί, επομένως και του μεγέθους των πόρων του πηκτώματος που χρειάζεται, επιλέγεται η επί της εκατό περιεκτικότητα του διαλύματος σε αγαρόζη (Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα περιεκτικότητας 8%, 1%, 1.5% και 2% w/v). Με θέρμανση διαλυτοποιείται αυτή η ποσότητα σε 100 ml διαλύματος 1X TBE.
2. Ακολούθως προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/ml}$.
3. Το διάλυμα χύνεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (οριζόντιας ηλεκτροφόρησης για μικρά πηκτώματα) αφού προηγουμένως έχουν τοποθετηθεί τα ειδικά διαχωριστικά και η κτένα, με την βοήθεια της οποίας θα δημιουργηθούν ειδικοί υποδοχείς (κελιά) μέσα στους οποίους θα γίνει το φόρτωμα των δειγμάτων, όταν το πήκτωμα στερεοποιηθεί.
4. Όταν πλέον το πήκτωμα στερεοποιείται, η κτένα και τα διαχωριστικά αφαιρούνται και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE, ώστε να καλύπτεται το πήκτωμα.
5. Τα δείγματα DNA αναμειγνύονται με κατάλληλο όγκο 5X ρυθμιστικού διαλύματος φορτώματος, ώστε η τελική του συγκέντρωση να γίνει 1X.
6. Έπειτα τα δείγματα φορτώνονται στα ειδικά κελιά του πηκτώματος, καθώς επίσης και δείκτες μοριακού βάρους (500-700 ng marker DNA) και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 90 V. Τα δείγματα, αρνητικά φορτισμένα, αρχίζουν να μετακινούνται προς την άνοδο.
7. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εξετάζεται κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφίζεται για αρχειοθέτηση με την βοήθεια ψηφιακής κάμερας BioCap1, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος BIO-CAPTV.99.

2.1.3.3 Εξαγωγή και καθαρισμός τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Υλικά:

1. Τα διαλύματα και οι κολώνες που περιέχονται στο πακέτο QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN):
 - α) Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης QG (Binding Buffer).
 - β) Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PE (Wash Buffer) το οποίο περιέχει αιθανόλη.
 - γ) Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης EB (Elution Buffer): 10 mM Tris, pH 8.5.
 - δ) Μικροστήλες QIAquick Spin με τους σωλήνες τους.
2. Ισοπροπανόλη 100% (v/v).
3. Αποστειρωμένες λεπίδες.

Μέθοδος:

1. Μετά την ηλεκτροφόρηση το επιθυμητό τμήμα του DNA αποκόπτεται από το πήκτωμα αγαρόζης με καθαρή αποστειρωμένη λεπίδα κάτω από χαμηλής έντασης υπεριώδη ακτινοβολία.
2. Το κομμάτι του πηκτώματος τοποθετείται σ' ένα σωλήνα τύπου Eppendorf και ζυγίζεται. Έπειτα προστίθεται τριπλάσιος όγκος διαλύματος QG από το βάρος του (για παράδειγμα για κάθε 100 mg πηκτώματος προστίθενται 300 μl διαλύματος QG).
3. Ο σωλήνας επωάζεται στους 50 °C για 10 min. Για να υποβοηθηθεί το λιώσιμο του πηκτώματος ο σωλήνας αντιστρέφεται 2-3 φορές.
4. Όταν το πήκτωμα λιώσει, προστίθενται ένας όγκος 100% (v/v) ισοπροπανόλης στο δείγμα και αναδεύεται.
5. Τοποθετείται η ειδική στήλη σε σωλήνα των 2 ml και προστίθεται σ' αυτή το περιεχόμενο του σωλήνα (λιωμένο πήκτωμα και τμήμα DNA του ενδιαφέροντος).
6. Ο σωλήνας με τη στήλη φυγοκεντρώνεται για 1 min στις 13000 rpm. Με αυτό τον τρόπο το διάλυμα του λιωμένου πηκτώματος αγαρόζης μεταφέρεται στο σωλήνα ενώ το κομμάτι του DNA προσδένεται πάνω στη στήλη.
7. Απομακρύνεται το διάλυμα από το σωλήνα και ανατοποθετείται σ' αυτόν η στήλη, στην οποία προστίθενται 0.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος QG και φυγοκεντρείται και πάλι στις 13000 rpm για 1 min.
8. Απομακρύνεται εκ νέου το διάλυμα και η στήλη ξεπλένεται με 0.75 ml διαλύματος PE με φυγοκέντρηση για 1 min στις 13000 rpm. Αν το κομμάτι του DNA που θα

απομονωθεί θα χρησιμοποιηθεί για άμεσο ανασυνδυασμό ή αλληλούχηση ή για διάσπαση με ένζυμα χαμηλών αλάτων, αναμένονται 5 min πριν τη φυγοκέντρηση.

9. Το περιεχόμενο του σωλήνα αδειάζετε και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος PE. Το διάλυμα αυτό περιέχει αιθανόλη και τυχόν παραμονή της στη στήλη, θα μπορούσε να αναστείλει μεταγενέστερες ενζυμικές αντιδράσεις.
10. Τέλος, η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα και προστίθεται σ' αυτήν 50 μl διαλύματος 10 mM Tris/ HCl, pH 8.5 (ή dH₂O), για έκλουση του DNA από τη στήλη. Το ζητούμενο τμήμα του DNA ελευθερώνεται μόνο στην παρουσία διαλύματος με χαμηλή περιεκτικότητα σε άλατα. Αφήνεται για 1 min και έπειτα φυγοκεντρείται για 1 min στις 13000 rpm και το ζητούμενο τμήμα του DNA συλλέγεται στον καθαρό σωλήνα, ο οποίος φυλάγεται στους -20 °C για περαιτέρω χρήση.

2.1.3.4 Συγκόλληση (ligation) DNA

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η συμμετρική διάσπαση σε αντίποδα σημεία ενός πλασμιδίου που προκαλείται από τα περιοριστικά ένζυμα, δίνει συμπληρωματικά μονόκλιωνα άκρα που έχουν ειδική συγγένεια το ένα με το άλλο και είναι γνωστά ως συνεκτικά άκρα. Οποιοδήποτε θραύσμα DNA μπορεί να τοποθετηθεί μέσα στο πλασμίδιο εφ' όσον έχει τα ίδια συνεκτικά άκρα. Το τμήμα του DNA και το ανοιγμένο πλασμίδιο μπορούν να επανελικωθούν και να ενωθούν με το ένζυμο της DNA λιγάσης, το οποίο καταλύει τον σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των δύο αλυσίδων DNA. Η DNA λιγάση απαιτεί ένα ελεύθερο OH στο 3' άκρο της μιας αλυσίδας και μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο της άλλης.

Υλικά:

1. T4 DNA λιγάση (4 Weiss units/μl, Invitrogen).
2. Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης δέκα φορές συγκεντρωμένο (10X): 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μg/ml BSA.
3. Πλασμιδιακός φορέας 50 ng.
4. Ένθεμα (150 ng).
5. dd-H₂O: αποστειρωμένο, διπλοαπιονισμένο νερό.

Μέθοδος:

1. Ο πλασμιδιακός φορέας και το ένθεμα τυγχάνουν της ίδιας ενδονουκλεολυτικής διάσπασης για τη δημιουργία συνεκτικών άκρων σύμφωνα με τη μέθοδο 2.1.3.1
2. Στη συνέχεια το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος απομονώνονται με εξαγωγή και καθαρισμό από πήκτωμα αγαρόζης (μέθοδος 2.1.3.3).
3. Σε ένα σωλήνα τοποθετούνται οι κατάλληλες ποσότητες των τμημάτων DNA που απομονώθηκαν και έπειτα προστίθενται οι ανάλογες ποσότητες του ενζύμου DNA λιγάση (5 units) και του ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 1X. Γίνεται συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης (10 μl) με απιονισμένο αποστειρωμένο νερό.
4. Τέλος, ο σωλήνας επωάζεται στους 16 °C για περίπου 16 h, έτσι ώστε τα συμπληρωματικά άκρα του πλασμιδίου και του ενθέματος να υβριδιστούν με τη βοήθεια της DNA λιγάσης (κλωνοποίηση).
5. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται βακτηριακός μετασχηματισμός (μέθοδος 2.1.2.6) ή η αντίδραση φυλάγεται στους -20 °C για μετέπειτα χρήση.

2.1.3.5 Αποφωσφορυλίωση 5'-άκρων γραμμικού πλασμιδιακού DNA

Η αλκαλική φωσφατάση (SAP, Shrimp Alkaline Phosphatase) είναι ένζυμο το οποίο απομακρύνει τις φωσφορικές ομάδες από το 5' άκρο ενός γραμμικού DNA. Χρησιμοποιείται για την αποφωσφορυλίωση πλασμιδιακού DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα ώστε τα άκρα του πλασμιδίου να μη μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους. Ένα ετερόλογο τμήμα cDNA με άθικτα 5'-τελικά φωσφορικά κατάλοιπα μπορεί να υβριδιστεί μέσω συμπληρωματικότητας με το αποφωσφορυλιωμένο πλασμιδιακό DNA, με αυτό το τρόπο η αποφωσφορυλίωση χρησιμεύει για διευκόλυνση της διαδικασίας κλωνοποίησης.

Υλικά:

1. Πλασμιδιακό DNA μετά από ενδονουκλεοτική διάσπαση.
2. 10X ρυθμιστικό διάλυμα αποφωσφορυλίωσης: 5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.5 (Roche).
3. Αλκαλική φωσφατάση από γαρίδα SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) 1000 units/ ml (Roche).
4. ddH₂O: αποστειρωμένο, διπλοαπιονισμένο νερό.

Μέθοδος:

1. Σε σωλήνα τύπου Eppendorf προστίθενται τα πιο πάνω υλικά και τέλος το νερό ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 40 µl.
2. Ο σωλήνας επωάζεται για 45 min στους 37 °C για να δράσει το ένζυμο και ακολούθως για 20 min στους 65 °C για απενεργοποίηση του.

2.1.3.6 Απομόνωση poly(A)⁺ RNA

(Εκτελείται βάσει πρωτοκόλλου του πακέτου OligotexTM Direct mRNA Mini της εταιρείας Qiagen).

Υλικά:

1. Τα διαλύματα που περιέχονται στο πακέτο Oligotex Direct mRNA της Qiagen:
 - α) Διάλυμα λύσης OL1: 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1% (v/v) Nonidet P-40 και πριν τη χρήση προστίθενται 20 µl β-μερκαπτοαιθανόλης/600 µl διαλύματος.
 - β) Διάλυμα αιωρήματος σφαιριδίων Oligotex (1 mg/10 µl)
 - γ) Διάλυμα αραίωσης ODB
 - δ) Στήλες
 - ε) Διάλυμα έκπλυσης OW1
 - στ) Διάλυμα έκπλυσης OW2
 - ζ) Διάλυμα έκλουσης OEB
2. ddH₂O: αποστειρωμένο, διπλοαπιονισμένο νερό απαλλαγμένο από RNAάσες.
3. Σωλήνες των 2 ml, αποστειρωμένοι και απαλλαγμένοι από RNAάσες.
4. Ομογενοποιητής χειρός.
5. 14.3 M β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME).

Μέθοδος:

1. Αρχικά προετοιμάζονται τα κύτταρα ή/ και οι ιστοί που θα χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του poly(A)⁺ RNA (μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι 2 X 10⁷ κύτταρα ή 100 mg ιστού).

Τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και έπειτα αποκολλώνται με τη βοήθεια της θρυψίνης και μεταφέρονται σε αποστειρωμένο σωλήνα των 2 ml. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνται στις 1000 rpm για 5 min και στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο.

Οι ιστοί (φρέσκοι ή παγωμένοι) δεν χρειάζονται οποιαδήποτε προετοιμασία.

2. Αρχικά προστίθεται στο διάλυμα λύσης OL1 η β-μερκαπτοαιθανόλη (20 μl β-μερκαπτοαιθανόλης για κάθε 600 μl διαλύματος λύσης). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 600 μl διαλύματος λύσης και τοποθετούνται σε ομογενοποιητή χειρός και ο ιστός τοποθετείται σε ομογενοποιητή χειρός και προστίθενται σε αυτόν 600 μl διαλύματος λύσης.
3. Πραγματοποιείται ομογενοποίηση.
4. Προστίθενται 2 όγκοι διαλύματος αραίωσης (1200 μl) και το διάλυμα μεταφέρεται σε σωλήνες των 2 ml. Αναμειγνύονται καλά και έπειτα φυγοκεντρώνονται στις 13000 rpm για 3 min, για να απομακρυνθούν οι μεμβράνες των κυττάρων και κάποιες πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.
5. Προστίθενται 20 μl αιωρήματος σφαιριδίων Oligotex, οι σωλήνες αναμειγνύονται και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Σ' αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η υβριδοποίηση μεταξύ του oligo dT₃₀, που βρίσκετε προσδεδεδεμένο στα σφαιρίδια και των poly(A) καταλοίπων του mRNA.
6. Φυγοκεντρώνονται στις 13000 rpm για 5 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
7. Προστίθενται στα σφαιρίδια 300 μl διαλύματος έκπλυσης OW1 και αναμειγνύονται, έπειτα μεταφέρονται σε στήλη που τοποθετείται σε σωλήνα των 1.5 ml και τέλος φυγοκεντρώνονται στις 13000 rpm για 30 sec.
8. Η στήλη μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα και προστίθενται σε αυτή 350 μl διαλύματος έκπλυσης OW2 και φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως.
9. Επαναλαμβάνεται το στάδιο 8.
10. Η στήλη μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα και προστίθενται σε αυτή 20-100 μl διαλύματος έκλυσης που έχει προθερμανθεί στους 70 °C. Τα σφαιρίδια επαναδιασπείρονται και έπειτα φυγοκεντρώνονται όπως προηγουμένως.
11. Το mRNA που εκλύεται από τα σφαιρίδια είτε χρησιμοποιείται αμέσως για παραγωγή cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής, είτε φυλάγεται στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

2.1.3.7 Απομόνωση συνολικού RNA

2.1.3.7.1 Βάσει πρωτοκόλλου του πακέτου RNeasy Mini Kit της εταιρείας Qiagen

Υλικά:

1. Στήλες φυγοκέντρωσης RNeasy (Mini Spin Columns).
2. Σωλήνες των 1.5 ml και 2 ml, αποστειρωμένοι και απαλλαγμένοι από RNAάσες.

3. Διάλυμα RLT
4. Διάλυμα RW1
5. Διάλυμα RPE (συγκεντρωμένο).
6. ddH₂O: αποστειρωμένο και διπλοαπιονισμένο νερό απαλλαγμένο από RNAάσες.
7. 14.3 M β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME).
8. Αιθανόλη (96-100%).
9. Ένζυμο DNase I, 1500 Kunitz units (Qiagen).
10. Διάλυμα RDD της DNase I.
11. Σύριγγα με βελόνα διαμέτρου 0.9 mm.

Μέθοδος:

1. Ακολουθείται το πρώτο στάδιο της μεθόδου 2.1.3.6 (μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι 1×10^7 κύτταρα ή 30 mg ιστού).
2. Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται πολύ καλά σε 600 μl διαλύματος RLT. Πριν τη χρήση προστίθεται στο διάλυμα RLT β-μερκαπτοαιθανόλη (10 μl β-ME για κάθε 1 ml διαλύματος).
3. Το λύμα των κυττάρων ομογενοποιείται με πέρασμα 5-6 φορές διαμέσου σύριγγας με βελόνα διαμέτρου 0.9 mm.
4. Στο ομογενοποιημένο λύμα προστίθεται ένας όγκος αιθανόλης 70% (v/v) και αναμιγνύεται καλά με χρήση πιπέτας.
5. Μεταφέρονται μέχρι 700 μl του δείγματος, συμπεριλαμβανομένου κι οποιουδήποτε ιζήματος που πιθανόν να δημιουργηθεί, στην στήλη RNeasy, η οποία τοποθετείται σε ένα σωλήνα των 2 ml. Το πώμα κλείνεται και ο σωλήνας φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 15 sec.
6. Στη συνέχεια το διάλυμα που πέρασε από την στήλη απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το στάδιο 5 αν ο όγκος ξεπερνά τα 700 μl με προσθήκη του υπόλοιπου δείγματος στην ίδια στήλη.
7. Προστίθενται 350 μl διαλύματος RW1 στη στήλη. Κλείνεται το πώμα και ο σωλήνα φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 15 sec, για έκπλυση της μεμβράνης της στήλης.
8. Προστίθενται 10 μl DNase I σε 70 μl διαλύματος RDD και αναμιγνύονται με αναποδογύρισμα του σωλήνα. Ο σωλήνας φυγοκεντρείται σύντομα και το περιεχόμενο του προστίθεται στην μεμβράνη της στήλης και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.

9. Στη συνέχεια, προστίθενται 350 μ l του διαλύματος RW1 στη στήλη. Το πώμα κλείνεται και η στήλη φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 15 sec και απομακρύνεται το διάλυμα που μαζεύεται στον σωλήνα κάτω από τη στήλη.
10. Προστίθενται 500 μ l του διαλύματος RPE στη στήλη, το πώμα κλείνεται και η στήλη φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 15 sec για να ξεπλυθεί η στήλη και έπειτα απομακρύνεται το διάλυμα που μαζεύεται στον σωλήνα κάτω από τη στήλη. Πριν χρησιμοποιηθεί το διάλυμα RPE αραιώνεται και προστίθεται σε αυτό αιθανόλη (4 όγκοι αιθανόλης).
11. Επαναλαμβάνεται το στάδιο 10 με τη διαφορά ότι η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται για 2 min ώστε να στεγνώσει τελείως η στήλη από την αιθανόλη η οποία θα επηρεάσει τις περαιτέρω διαδικασίες (πχ. στη σύνθεση cDNA) .
12. Η στήλη τοποθετείται σε καινούργιο σωλήνα των 2 ml και φυγοκεντρείται για 1 min επιπλέον.
13. Τέλος η στήλη τοποθετείται σε καινούργιο σωλήνα των 1.5 ml και προστίθεται απευθείας στη μεμβράνη της στήλης 30–50 μ l ddH₂O απαλλαγμένο από RNAάσες και φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 1 min για την έκλυση του RNA.

2.1.3.7.2 Βάσει πρωτοκόλλου του αντιδραστηρίου Trizol της εταιρίας InVitrogen

Υλικά:

1. Αντιδραστήριο Trizol (Invitrogen).
2. Χλωροφόρμιο 100% (v/v).
3. Ισοπροπανόλη 100% (v/v).
4. 75% (v/v) αιθανόλη.
5. ddH₂O: αποστειρωμένο και διπλοαπιονισμένο νερό απαλλαγμένο από RNAάσες.

Μέθοδος:

1. Χρησιμοποιείται 1 ml αντιδραστηρίου Trizol για ομοιογενοποίηση 1×10^6 κυττάρων (ή 150 μ l για κάθε καλυπτρίδα).
2. Προαιρετικά, το ομοιογενοποίημα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 10 min στους 4 °C για απομάκρυνση κυτταρικών πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών και ψηλού μοριακού βάρους DNA και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.

3. Το ομοιογενοποίηση επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αποσυνδεθούν τα νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Σε αυτό το στάδιο μπορεί να φυλαχτεί στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για περαιτέρω χρήση.
4. Ακολούθως προστίθενται προσεκτικά 200 μl χλωροφόρμιο σε κάθε δείγμα, αναδεύεται έντονα με το χέρι για 15 sec και αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13000 rpm για 15 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ που έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τριών φάσεων: στην κατώτερη οργανική φάση (φαινόλη-χλωροφόρμιο), στην οποία υπάρχουν οι πρωτεΐνες, στη μεσόφαση στην οποία υπάρχει το DNA και στην άχρωμη υδατινή φάση, η οποία περιέχει το RNA.
6. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα και σε αυτή προστίθεται 500 μl 100% (v/v) ισοπροπανόλης για να βοηθήσει στην καταβύθιση του RNA. Τα δείγματα αναδεύονται για 15 sec και επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13000 rpm για 30 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
8. Το ίζημα του RNA ξεπλένεται με 1 ml παγωμένης 75% (v/v) αιθανόλης, φυγοκεντρείται στις 7500 rpm για 10 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
9. Το ίζημα RNA αφήνεται να στεγνώσει καλά στον αέρα, επαναδιασπείρεται σε 50 μl ddH₂O και επωάζεται στον πάγο για 30 min. Αν το ίζημα δεν διαλυθεί επωάζεται στους $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 5 min και έπειτα φυλάγεται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.3.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων RNA και DNA με φωτομέτρηση

Τα εκχυλίσματα των DNA και RNA που απομονώνονται, προσδιορίζονται ποσοτικά με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας υπεριώδους (UV). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊνικών οξέων (DNA και RNA) να απορροφούν σε μήκος κύματος 260 nm, των πρωτεϊνών στα 280 nm, ενώ των φαινολικών στα 240 nm. Τιμή απορρόφησης στα 260 nm ίση με 1 ($A_{260} = 1$) ισοδυναμεί με 40 μg/ml RNA ή μονής έλικας DNA (μονόκλωνου DNA), 50 μg/ml διπλής έλικας DNA και περίπου 20 μg/ml ολιγονουκλεοτιδίων. Ποιοτικά κριτήρια της καθαρότητας των απομονωμένων RNAs είναι η αναλογία απορρόφησης μεταξύ νουκλεϊνικών οξέων, πρωτεϊνών και φαινολικών. Έτσι, παράλληλα για κάθε δείγμα που φωτομετρείται λαμβάνεται και η τιμή απορρόφησης στα 280 nm και 240 nm. Ο λόγος A_{260}/A_{280} για καθαρά δείγματα νουκλεϊνικών οξέων συνιστάται να κυμαίνεται σε τιμές $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ και ο λόγος $A_{260}/A_{240} \geq 1$. Αν στα

δείγματα υπάρχουν προσμίξεις από πρωτεΐνες ή φαινόλη τότε η τιμή που λαμβάνεται είναι μικρότερη.

Μέθοδος:

1. Σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 500 μl ddH₂O και η κυψελίδα τοποθετείται στη ειδική υποδοχή του φωτόμετρου και το φωτόμετρο μηδενίζεται στα 260 nm.
2. 5 μl δείγματος αραιώνονται σε 495 μl ddH₂O και τοποθετούνται σε κυψελίδα χαλαζία και έπειτα στην ειδική θέση του φωτόμετρου.
3. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 260 nm, 280 nm και 240 nm και καταγράφονται οι απορροφήσεις.
4. Στη συνέχεια υπολογίζονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του δείγματος και οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

$$[\text{RNA}] (\text{mg/ml}) = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

$$[\text{DNA}] (\text{mg/ml}) = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

2.1.3.9 Τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής

Η τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμεύει για τη δημιουργία “δεξαμενής” cDNA από κάποιο ιστό ή κύτταρα. Αρχικά απομονώνεται το συνολικό αγγελιοφόρο-RNA [mRNA (polyA⁺ RNA)] και αντιγράφεται σε cDNA (complementary DNA) μέσω του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης. Χρησιμοποιείται ένα ολιγονουκλεοτίδιο - εκκινητής (συνήθως το oligo-dT), το οποίο είναι συμπληρωματικό για την poly-A ουρά του 3' άκρου του ώριμου mRNA.

Υλικά:

1. Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο ProtoScript (New England Biolabs) το οποίο περιέχει:
 - α) 25units/ μl μεταγραφάση [Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MuLV)].
 - β) 10X ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου: 500 mM Tris-HCl, pH 8.3, 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 100 mM DTT.
 - γ) 50 μM (dT₂₃VN) εκκινητικό μόριο (primer).
 - δ) 10 mM μείγμα dNTPs (2.5 mM από το κάθε ένα).
 - ε) 10 units/ μl αναστολέα της RNA-άσης (από ανθρώπινο πλακούντα).
 - στ) 2 units/ μl RNAάση.
 - ζ) ddH₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες.
2. Απομονωμένο συνολικό RNA (μέθοδος 2.3.7).

3. Μικροσωλήνες με λεπτά τοιχώματα για PCR των 0.2 ml (Perkin-Elmer GmbH, Germany).
4. Συσκευή PCR (DNA Engine, M.J.R.).

Μέθοδος:

(Εκτελείται βάσει πρωτοκόλλου του κατασκευαστή του πακέτου ProtoScript New England Biolabs).

1. Σε ένα σωλήνα Eppendorf αναμειγνύονται:

| | |
|---|--------------------------------|
| Ολικό RNA | 1-10 μl (1 ng-2 μg) |
| Εκκινητικό μόριο dT ₂₃ VN | 2 μl |
| Μείγμα dNTPs | 4 μl |
| ddH ₂ O απαλλαγμένο από νουκλεάσες | x μl μέχρι τελικού όγκου 16 μl |

2. Ακολούθως το μείγμα θερμαίνεται στους 70 °C για 5 min, ώστε να αποδιαταχθεί το RNA και τοποθετείται αμέσως στο πάγο.

3. Στη συνέχεια προστίθενται στο μείγμα του σταδίου 1:

| | |
|------------------------------------|------|
| 10X ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης | 2 μl |
| Αναστολέας RNAάσης | 1 μl |
| Αντίστροφη μεταγραφάση | 1 μl |

4. Ο σωλήνας επωάζεται στους 42 °C για 1 h.

5. Ακολούθως το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης απενεργοποιείται με θέρμανση στους 95 °C για 5 min.

6. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, το RNA αποικοδομείται με προσθήκη 1 μl (2 units) RNAάσης H και επώαση στους 37 °C για 20 min. Έπειτα, η RNAάση H απενεργοποιείται με θέρμανση στους 95 °C για 5 min.

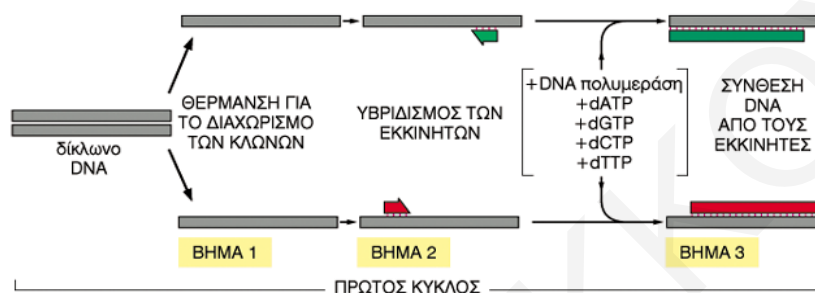
7. Τέλος, η αντίδραση αραιώνεται μέχρι τα 30 μl και οι σωλήνες με τα cDNAs φυλάγονται στους -80 °C, για μελλοντική χρήση.

2.1.3.10 Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία *in vitro* μέθοδος για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA και βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων, οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο.

Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια (Σχήμα 2.1):

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
2. Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο (primer annealing).
3. Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (primer extension).



Σχήμα 2.1: Αναπαράσταση σταδίων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως στους 94 °C. Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (50-65 °C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία είναι συμπληρωματικά με την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72 °C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει τη σύνθεση του DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (Taq Polymerase). Η Taq Polymerase συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA-στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.

Σε μια τυπική ανάλυση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο, ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Η αντίδραση PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με χρήση μείγματος DNA πολυμεράσεων υψηλής πιστότητας, όταν το προϊόν που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί πρέπει να είναι πιστό αντίγραφο του αρχικού μορίου cDNA χωρίς να περιέχει σημειακές μεταλλάξεις, είτε με χρήση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης Taq (η οποία είναι οικονομικότερη), όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τη γρήγορη σάρωση διαφόρων κλώνων ή για τη μελέτη του χρονικού και τοπικού προτύπου της γονιδιακής έκφρασης ενός γονιδίου διεξάγοντας ημιποσοτική αντίδραση RT-PCR.

2.1.3.10.1 PCR με χρήση μείγματος DNA-πολυμερασών υψηλής πιστότητας

Υλικά:

1. Μείγμα πολυμεράσεων υψηλής πιστότητας (Expand Long Template PCR), 3.5 units/μl (Roche)
2. 3 ρυθμιστικά διαλύματα 10X της πολυμεράσης με διαφορετική συγκέντρωση $MgCl_2$: (1) με 17.5 mM $MgCl_2$, (2) με 27.5 mM $MgCl_2$ και (3) με 27.5 mM $MgCl_2$ και απορρυπαντικά.
3. Ολιγονουκλεοτίδια (20 pmole/μl), το καθένα χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 20 pmole ανά αντίδραση.
4. dNTPs: μείγμα των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων 10 mM από το καθένα (Amersham Pharmacia Biotech).
5. cDNA ή απομονωμένο πλασμιδιακό DNA.
6. d.d-H₂O: διπλοαπιονισμένο αποστειρωμένο νερό.
7. Μικροσωλήνες με λεπτά τοιχώματα για PCR των 0.2 ml (Perkin-Elmer GmbH, Germany).
8. Αποστειρωμένοι σωλήνες τύπου Eppendorf.
9. Συσκευή PCR (DNA Engine, M.J.R.).

Μέθοδος:

(Εκτελείται βάσει οδηγιών του κατασκευαστή Roche).

1. Για κάθε αντίδραση PCR επιλέγεται το σύστημα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί, ανάλογα με το μέγεθος του DNA που επιθυμείται να πολλαπλασιαστεί και ετοιμάζεται η αντίδραση. Ο όγκος και η τελική συγκέντρωση των συστατικών που χρησιμοποιούνται φαίνεται στον πιο κάτω πίνακα:

| Πολ/σμός Γενομικού DNA | 0.5-9 Kb Σύστημα 1 | | Σύστημα 2 9-12 Kb | | Σύστημα 3 > 12 Kb | |
|-------------------------------|-----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|
| | Όγκος | Συγκ. | Όγκος | Συγκ. | Όγκος | Συγκ. |
| Αντιδραστήρια | | | | | | |
| dNTPs | 1.75 μl | 350 mM | 2.5 μl | 500 mM | 2.5 μl | 500 mM |
| Ολιγονουκλεοτίδιο 1 | X μl | 300 nM | X μl | 300 nM | X μl | 300 nM |
| Ολιγονουκλεοτίδιο 2 | Y μl | 300 nM | Y μl | 300 nM | Y μl | 300 nM |
| 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα | 5 μl διαλύματος 1 | | 5 μl διαλύματος 2 | | 5 μl διαλύματος 3 | |
| Μήτρα DNA | Z μl | 1.75 mM | Z μl | 2.75 mM | Z μl | 2.75 mM |
| Ένζυμο | 0.75 μl | | 0.75 μl | | 0.75 μl | |
| ddH₂O | Μέχρι 50 μl | | Μέχρι 50 μl | | Μέχρι 50 μl | |

2. Οι σωλίνες τοποθετούνται στη μηχανή PCR, η οποία προγραμματίζεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο που φαίνεται στον πιο κάτω πίνακα.

| | Θερμοκρασίας | Χρόνος | Κύκλοι |
|---|-----------------------|--------------------------|--------|
| Αρχική αποδιάταξη της μήτρας DNA | 94 °C | 2 min | 1 |
| Αποδιάταξη | 94 °C | 10 sec | 29 |
| Υβριδισμός | 45-65 °C ^α | 30 sec | |
| Πολυμερισμός | 68 °C | 45 s-30 min ^β | |
| Τελική επιμήκυνση | 68 °C | 7 min | 1 |
| Ψύξη | 4 °C | Έπ' άπειρον | |

^α: Υβριδισμός στην κατάλληλη θερμοκρασία ανάλογα με τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται, σύμφωνα με τη σχέση $T_H = T_m - (2-5\text{ }^\circ\text{C})$. Εμπειρικά: $T_m = [(2x \text{ αρ. ζευγών AT}) + (4x \text{ αρ. ζευγών GT})]$.

^β: Ο χρόνος του πολυμερισμού εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος του DNA που θα πολλαπλασιαστεί (2 min για 3 kb, 4 min για 6 kb, 8 min για 10 kb, 15 min για 20 kb).

3. 5-10 μl από κάθε αντίδραση PCR ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Βλέπε μέθοδο 2.1.12) και το υπόλοιπο δείγμα διατηρείται στον πάγο και είτε ακολουθείται κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR με χρήση του συστήματος T/A cloning, είτε απευθείας κλωνοποίηση του προϊόντος στον τελικό πλασμιδιακό φορέα μετά από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση, τρέξιμο σε πήκτωμα, απομόνωση του και συνένωση του στον πλασμιδιακό φορέα.

2.1.3.10.2 PCR με χρήση της θερμοανθεκτικής DNA-πολυμεράσης Taq

Υλικά:

1. Ένζυμο Ampli-Taq πολυμεράση, 5 units/μl (Amersham Pharmacia Biotech).
2. 10X ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης Ampli-Taq.

Μέθοδος:

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη μέθοδο 2.1.3.10.1 με τη διαφορά ότι ετοιμάζεται ένα μείγμα αντίδρασης όπως φαίνεται στο πιο κάτω πίνακα και ότι η θερμοκρασία πολυμερισμού για την Taq DNA-πολυμεράση γίνεται στους 72 °C αντί στους 68 °C.

| Αντιδραστήρια | Συγκέντρωση ανά αντίδραση |
|------------------------------------|----------------------------------|
| dNTPs | 0.5 mM |
| Ολιγονουκλεοτίδιο 1 | 20 pmole |
| Ολιγονουκλεοτίδιο 2 | 20 pmole |
| 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Πολυμεράσης | 1X |
| Ampli-Taq πολυμεράση | 1.25 units |
| Απομονωμένο πλασμίδιο ή cDNA | 10 ng ή 3-5 μl |
| ddH ₂ O | Μέχρι να συμπληρωθούν 50 μl |

2.1.3.11 Κλωνοποίηση cDNA με τη μέθοδο T/A (T/A Cloning) και επιλογή των κλώνων *in situ* με έλεγχο ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης

Ο πλασμιδιακός φορέας pCR2.1-TOPO είναι γραμμικός με 3'-ελεύθερα άκρα δεοξυθυμίνης και με την τοποϊσομεράση I ομοιοπολικά προσδεμένη σε αυτόν. Οι θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες έχουν ενεργότητα τρανσφεράσης, που δεν εξαρτάται από το υπόστρωμα, και προσθέτουν δεοξυαδενοσίνη στα 3'-άκρα των προϊόντων της PCR. Ο pCR2.1-TOPO διαθέτει στα 3'-άκρα του κατάλοιπα δεοξυθυμίνης και επιτρέπει στα ενθέματα της PCR να συγκολληθούν με τον φορέα μέσω της δράσης της τοποϊσομεράσης I. Το στέλεχος TOP10F' που χρησιμοποιείται υπερεκφράζει τον καταστολέα Lac (lacI^q), που δίνει την δυνατότητα για επιλογή μπλε (αρνητικών) ή άσπρων (θετικών) βακτηριακών αποικιών στην παρουσία του επαγωγέα IPTG στα τρυβλία, ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου-μάρτυρα της β-γαλακτοσιδάσης. Η περιοχή ενσωμάτωσης του ενθέματος στο πλασμίδιο pCR2.1-TOPO είναι εντός του γονιδίου της β-gal και έτσι οι

ανασυνδυασμένοι κλώνοι παραμένουν άσπροι αφού η παρουσία του ενθέματος διακόπτει το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου-μάρτυρα.

Υλικά:

1. Γραμμικό T/A πλασμιδίο pCR2.1-TOPO (Invitrogen).
2. Προϊόν PCR.
3. Διάλυμα άλατος: 1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂.
4. ddH₂O: διπλοαπιονισμένο, αποστειρωμένο νερό.
5. Βακτήρια *E.coli* τύπου TOP10F' (Invitrogen).
6. Θρεπτικό υλικό SOC.
7. Τρυβλία με αντιβιοτικό 50 µg/ml καναμυκίνη.
8. Αρχικές συγκεντρώσεις: 0.1 M IPTG και 20 mg/ml X-gal.

Μέθοδος:

(Εκτελείται βάσει πρωτοκόλλου της εταιρείας Invitrogen).

1. Σε μικροσωλήνες με λεπτά τοιχώματα για PCR των 200 µl προστίθενται 0.5-4 µl φρέσκου προϊόντος PCR (ανάλογα με τη ποσότητα που παράγεται κατά τη PCR), 1 µl διαλύματος άλατος, 1 µl (10 ng) γραμμικού T/A πλασμιδίου pCR2.1-TOPO και νερό μέχρι τελικό όγκο 6 µl.
2. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται απαλά και επωάζεται για 5-30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Σε σωλήνα που περιέχονται 50 µl δεκτικών βακτηρίων τύπου TOP10F', προστίθενται 2-4 µl από την αντίδραση και ακολουθεί επώαση στο πάγο για 30 min.
4. Τα βακτήρια υποβάλλονται σε θερμικό σοκ στους 42 °C για 30 sec και μεταφέρονται αμέσως για ανάκαμψη στον πάγο για 1-2 min.
5. Προστίθενται 250 µl θρεπτικού υλικού SOC και τα βακτήρια επωάζονται στους 37 °C για 1 h υπό συνεχή ανάδευση στις 225 rpm για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου που έχουν προσλάβει.
6. Από τη μετασηματισμένη καλλιέργεια διασπείρονται σε τρυβλίο που περιέχει 50 µg/ml καναμυκίνη, 100 µl IPTG (100 mM) και 100 µl X-gal (40 µg/ml).
7. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 16-18 h για την ανάπτυξη μπλε/άσπρων αποικιών.
8. Επιλέγονται για έλεγχο ένας αριθμός άσπρων κλώνων που αναμένεται να περιέχουν το ένθεμα της PCR.

2.1.3.12 Στοχευόμενη σημειακή μεταλλαξογένεση με χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (site-directed mutagenesis)

Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός κλωνοποιημένου τμήματος του γενετικού υλικού μπορεί να τροποποιηθεί σε συγκεκριμένες προεπιλεγμένες θέσεις με στοχευόμενη μεταλλαξογένεση. Η πλέον συνηθισμένη προσέγγιση είναι η χρήση ενός ζεύγους συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικών ως προς ένα συγκεκριμένο τμήμα μιας δίκλωνης DNA μήτρας, το οποίο περιέχει μια λανθασμένη βάση (mismatch) ώστε να είναι σε θέση να κατευθύνει την μετάλλαξη. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να προκληθούν όχι μόνο σημειακές μεταλλάξεις, αλλά και τροποποιήσεις μεγαλύτερης έκτασης που αφορούν δύο ή περισσότερες βάσεις, προσθήκες (insertions) και ελλείψεις (deletions).

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση το πακέτο QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit της εταιρείας Stratagene. Στο Σχήμα 2.2 αναπαριστούνται τα βήματα αυτής της μεθόδου.

Υλικά:

1. Πλασμιδιακό DNA στο οποίο είναι κλωνοποιημένο το cDNA που στοχεύετε η μεταλλαξογένεση.
2. Κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια που φέρουν την σημειακή μετάλλαξη.
3. Ένζυμο *PfuUltra*TM High-Fidelity DNA πολυμεράση (2.5 U/μl).
4. 10X ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης.
5. dNTPs: μείγμα των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων (10 mM από το καθένα).
6. Ένζυμο ενδονουκλεάσης *Dpn* I (10 U/μl).
7. Υπερ-δεκτικά βακτήρια *E. coli* (supercompetent cells) τύπου XL1-Blue έτοιμα για μετασχηματισμό.
8. Αποστειρωμένο διπλά απιονισμένο νερό (d.dH₂O).
9. Μικροσωλήνες με λεπτά τοιχώματα για PCR των 0.2 ml (Perkin-Elmer GmbH).
10. Συσκευή PCR (M.J.R.).

Μέθοδος:

1. Σύνθεση κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδίων. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνονται στον Πίνακα 2.8.
Τα ολιγονουκλεοτίδια εκκινήτες που φέρουν τις μεταλλάξεις και χρησιμοποιούνται σε αυτό το πρωτόκολλο, σχεδιάζονται ανεξάρτητα ανάλογα με την επιθυμητή μετάλλαξη και ακολουθούν τους πιο κάτω κανόνες:

- πρέπει να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και να υβριδίζονται στην ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία, στις αντίθετες αλυσίδες του πλασμιδίου.
- πρέπει να έχουν μέγεθος από 25 μέχρι 45 βάσεις, με θερμοκρασία τήξεως (T_m) $\geq 78^\circ\text{C}$.

$$T_m = 81.5 + 0.41(\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

Όπου N: μέγεθος εκκινητή σε βάσεις

% GC: ποσοστό των βάσεων G και C (ελάχιστο ποσοστό 40%)

% mismatch: ποσοστό μη υβριδισμού

- η επιθυμητή μετάλλαξη (έλλειψη ή προσθήκη) θα πρέπει να είναι στο μέσο του εκκινητή και να πλαισιώνεται με ~10–15 βάσεις και στις δύο πλευρές.

| Name of primer | Sequence of primer | N | % GC | % mis | T_m |
|----------------|---|----|------|-------|-------|
| POS16_FW | ggtccagggtgGCAccaactggcaactg | 37 | 56.7 | 5.4 | 81.1 |
| POS16_RV | tagtgtggttctccaaccctggtgtacc | | | | |
| POS17_FW | acaccaggggttgaaaaGCCacactaggcaagaactt | 39 | 48.7 | 2.56 | 81.6 |
| POS17_RV | aagttctttgcctagagtggctttccaaccctggtgt | | | | |
| POS18_FW | ccaggggttgaaaaaccGCActaggcaagaacttgcg | 39 | 53.8 | 2.56 | 83.7 |
| POS18_RV | cgcaagttttgcctagtgcggtttccaaccctgg | | | | |
| POS109_FW | cgaaagacttgaaacaGCGggttataatgagaagaactaaca | 46 | 39.1 | 4.3 | 78.5 |
| POS109_RV | gac gtctgtagttctctcattataaccgctgttcaagtcttcg | | | | |

Πίνακας 2.8: Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα ερευνητική εργασία στη διαδικασία της μεταλλαξογένεσης.

2. Ετοιμασία της αντίδρασης ως ακολούθως:

| Αντιδραστήρια | Συγκέντρωση ανά αντίδραση |
|------------------------------------|--|
| 10X ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης | 5 μl (1X) |
| Μήτρα πλασμιδιακού dsDNA | X μl (20 ng) |
| Ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής 1 | X μl (125 ng) |
| Ολιγονουκλεοτιδικός εκκινητής 2 | X μl (125 ng) |
| Μείγμα dNTPs | 1 μl |
| DNA πολυμεράση <i>PfuUltra</i> HF | 1 μl (2.5 Units) |
| ddH ₂ O | Y μl μέχρι τον τελικό όγκο των 50 μl |

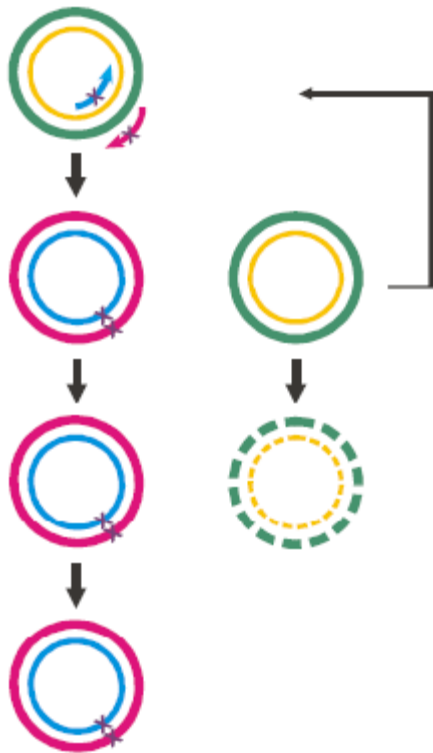
2. Οι σωλήνες τοποθετούνται στη μηχανή PCR, η οποία προγραμματίζεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο που φαίνεται στον πιο κάτω πίνακα.

| ΣΤΑΔΙΟ | ΚΥΚΛΟΣ | ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ | ΧΡΟΝΟΣ |
|--------|--------------------|-------------|---------------------------------|
| 1 | 1 | 95 °C | 30 sec |
| 2 | 12-18 ^a | 95 °C | 30 sec |
| | | 55 °C | 1 min |
| | | 68 °C | 1 min/ kb μήκους του πλασμιδίου |

^a: Οι κύκλοι του σταδίου 2 καθορίζονται από τον τύπο της μετάλλαξης που θέλουμε να επιτύχουμε και φαίνονται στον πιο κάτω πίνακα.

| ΤΥΠΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΚΛΩΝ |
|---|----------------|
| Σημειακή μετάλλαξη | 12 |
| Αλλαγή ενός αμινοξέως | 16 |
| Πολλαπλές ελλείψεις ή προσθήκες αμινοξέων | 18 |

3. Οι σωλήνες, όταν τελειώσει η PCR, τοποθετούνται στο πάγο για 2 min για να μειωθεί η θερμοκρασία της αντίδρασης.
4. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 μl του ενζύμου *Dpn I* (10 U/μl) σε κάθε αντίδραση και το διάλυμα ανακατεύεται με πιπέτα πολύ καλά.
5. Αμέσως, οι σωλήνες επωάζονται στους 37 °C, για 1 h, έτσι ώστε να διασπαστεί το υπερελικωμένο dsDNA που δεν περιέχει τις σημειακές μεταλλάξεις.
6. Τέλος, πραγματοποιείται μετασχηματισμός με 1 μl της αντίδρασης σε δεκτικά XL1-Blue βακτήρια για μετασχηματισμό.
7. Το DNA απομονώνεται από τους κλώνους που αναπτύσσονται και αλληλουχείται, για εύρεση αυτού που περιέχει τη σωστή μετάλλαξη. Έπειτα το κατάλληλο πλασμίδιο πολλαπλασιάζεται.



Σύνθεση της μεταλλαγμένης αλυσίδας

- 1) Αποδιάταξη της μήτρας.
- 2) Υβριδισμός των ολιγονουκλεοτιδίων που φέρουν τη μετάλλαξη.
- 3) Πολυμερισμός της μήτρας με την DNA πολυμεράση PfuUltra.

Νουκλεοτιδική διάσπαση της μήτρας με το ένζυμο Dpn I

Το Dpn I διασπά μεθυλιωμένη και υπερμεθυλιωμένη διπλή έλικα DNA.

Μετασηματισμός

Τα βακτήρια στελέχη επιδιορθώνουν το nick των μεταλλαγμένων μορίων DNA.

Σχήμα 2.2: Αναπαράσταση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε κατά τη μέθοδο της μεταλλαξογένεσης

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

2.2.1 Επαγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακά συστήματα έκφρασης

Για την παραγωγή ικανοποιητικών ποσοτήτων πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται βακτηριακά συστήματα έκφρασης στα οποία εισάγονται τα πλασμίδια έκφρασης που φέρουν το cDNA της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος. Η ενεργοποίηση της έκφρασης του ενσωματωμένου cDNA στο πλασμίδιο γίνεται με τη χρήση ισοπροπυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσιδίου (IPTG), το οποίο επάγει το μηχανισμό μεταγραφής των βακτηρίων να αναγνωρίζει τις αλληλουχίες των υποκινητών των πλασμιδίων και να αρχίζει η μεταγραφή του υπό εξέταση cDNA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς και τα βακτηριακά στελέχη *E.coli* που φαίνονται στους Πίνακες 2.5 και 2.4, αντίστοιχα.

2.2.2 Διερεύνηση βέλτιστων συνθηκών επαγωγής έκφρασης ετερόλογης πρωτεΐνης σε βακτήρια (Μικρή κλίμακα/ Μεγάλη κλίμακα)

Υλικά:

1. Τρυβλία με φρέσκες μετασχηματισμένες αποικίες βακτηρίων με το πλασμίδιο που μας ενδιαφέρει.
2. Υγρό θρεπτικό υλικό LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.
3. Αποστειρωμένο (μέσω φίλτρου 0.22 μm) διάλυμα ισοπροπυλ-β-D-θειογαλακτοπυρανοσιδίου (IPTG) 100 mM.
4. Κλεισμένες με βαμβάκι και αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 100 ml ή 1 L.
5. Αποστειρωμένοι σωλήνες των 1.5 ml (Eppendorf) ή 50 ml

Μέθοδος:

1. Εμβολιάζεται μια μετασχηματισμένη αποικία (διαμέτρου 2-3 mm) σε υγρή καλλιέργεια 5 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση για 16-18 h.
2. Μεταφέρονται ασηπτικά 10 ml ή 200-500 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά σε κάθε κωνική φιάλη και στη συνέχεια κάθε φιάλη εμβολιάζεται με ποσότητα από τη μικρή καλλιέργεια σε αραιώση 1:100. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση και κατά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα και φωτομετρικές μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 600 nm μέχρι να

παρουσιαστεί εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας (περίπου $OD=0.4$). Όταν αυτές εισέλθουν στην εκθετική φάση προστίθεται ο επαγωγέας IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM-1.0 mM.

3. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια επωάζεται στους 20-25 °C υπό συνεχή ανάδευση (250-300 rpm), καθώς τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται αρχίζουν να μεταφράζουν το cDNA της ετερόλογης πρωτεΐνης. Η ανάπτυξη γίνεται σε αυτή τη θερμοκρασία για να έχουμε όσο το δυνατό μεγαλύτερη ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης.
4. Για την παρακολούθηση της εξέλιξης της έκφρασης λαμβάνονται δείγματα των 1.5 ml σε σωλήνες (Eppendorf) κατά τακτά χρονικά διαστήματα ($t = 0, 1, 2, 3$ και 18 h). Στη περίπτωση της μεγάλης κλίμακας οι συνθήκες έχουν εντοπιστεί από πριν και η καλλιέργεια χωρίζεται σε σωλήνες των 50 ml.
5. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 5000 rpm για 5 min στους 4 °C και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Οι σωλήνες με τα βακτήρια τοποθετούνται αμέσως σε υγρό άζωτο και έπειτα φυλάγονται στους -20 °C ή -80 °C ανάλογα με το διάστημα φύλαξης τους, για μελλοντική χρήση. Τα δείγματα αναλύονται αργότερα μέσω SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Πριν την ηλεκτροφόρηση το μείγμα των πρωτεϊνών διαλύεται πρώτα σε διάλυμα δωδεκάκυλ-θειικού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Στο διάλυμα αυτό περιέχεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς σε σουλφυδρίλια.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πεπτιδικές αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου ανά δύο αμινοξέα. Προσδίδει έτσι στο σύμπλοκο SDS-αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο αρνητικό φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης καθίσταται αμελητέο εφόσον αυτό που αποκτάται από τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο απ' το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης και προσδίδει ένα σταθερό λόγο αρνητικού φορτίου/ μάζα για όλες τις πρωτεΐνες και επομένως αυτές μπορούν να διαχωριστούν με βάση τη διαφορά της μάζας τους.

Υλικά:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 5X (sample buffer): 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 50% (v/v) γλυκερόλη 50%, 10% (w/v) διαλύματος δωδεκάκυλ-θειικού νατρίου (SDS), 0.57 M β-μερκαπτοαιθανόλης και 1% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer): 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4-7.6, 0.5% (v/v) Tween-20, 10% (v/v) γλυκερόλη, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη και κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (σε 0.5 ml του διαλύματος προσθέτουμε 20 μl κοκτέιλ 25X).

Μέθοδος:

1. **Για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης** συλλέγονται δείγματα βακτηριακών ιζημάτων σε διαφορετικούς χρόνους. Στα δείγματα των χρόνων $t=0$, 1 και 2 h προστίθενται 100 μl sample buffer 1X (20 μl 5X sample buffer και 80 μl dH₂O) και επαναδιασπείρεται το ίζημα. Στα δείγματα των χρόνων $t=3$ h προστίθενται 150 μl sample buffer 1X (30 μl 5X sample buffer και 120 μl dH₂O) και επαναδιασπείρεται το ίζημα. Στα δείγματα των χρόνων $t=16-18$ h προστίθενται 200 μl sample buffer 1X (40 μl 5X sample buffer και 160 μl dH₂O) και επαναδιασπείρεται το ίζημα. Ακολουθεί βράσιμο των δειγμάτων για 5 min στους 95 °C και φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm ώστε να διαχωριστούν τα αδιάλυτα υποκυτταρικά οργανίδια και χρωμοσώματα από τις πρωτεΐνες. Χρησιμοποιείται το υπερκείμενο για φόρτωμα στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.
2. **Για έλεγχο της διαλυτότητας** στα δείγματα των βακτηριακών ιζημάτων που έχουν συλλεχθεί για χρόνο $t=3$ h και $t=16-18$ h προστίθενται 200 μl lysis buffer και επαναδιασπείρεται το ίζημα. Ακολουθεί λύση των βακτηρίων με υπερήχους (παλμοί 15 sec με ενδιάμεσα διαλείμματα και τοποθέτηση του δείγματος σε πάγο). Η διαδικασία γίνεται προσεκτικά ώστε να μη θερμανθούν ή να αφρίσουν τα δείγματα για να αποφευχθεί η πρωτεόλυση και η οξειδωση των πρωτεϊνών αντίστοιχα. Μετά τη λύση ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα. Στο υπερκείμενο βρίσκονται οι διαλυτές πρωτεΐνες ενώ στο ίζημα οι αδιάλυτες. Στο υπερκείμενο προστίθενται 50 μl 5X sample buffer (συνολικός όγκος 250 μl) ενώ στο ίζημα 35 μl 5X sample buffer και 140 μl dH₂O (συνολικός όγκος 175 μl, μισός υπερκείμενου). Τα δείγματα βράζονται για 5 min στους 94 °C και φυγοκεντρώνονται για 5 min στις 13000 rpm. Τα δείγματα είναι τώρα έτοιμα για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Υλικά:

1. Διάλυμα 40% ακρυλαμίδης/ δις-ακρυλαμίδης (RapidGel-XL 40% concentrated, Amersham Pharmacia Biotech).
2. Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (APS).
3. Διάλυμα N,N,N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνης (TEMED).
4. Βουτανόλη 100%.
5. 5-15% (v/v) πήκτωμα διαχωρισμού (running gel): 1.5 M Tris pH 8.8, 8 mM EDTA, 0.4% (w/v) SDS, 5-15% διάλυμα ακρυλαμίδιου, 0.04% (v/v) APS, 0.2% (v/v) TEMED.
6. 4.5% (v/v) πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel): 0.5 M Tris pH 6.8, 8 mM EDTA, 0.4% (w/v) SDS, 4.5% διάλυμα ακρυλαμίδιου, 0.04% (v/v) APS, 0.5% (v/v) TEMED.
7. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X, pH 8.3: 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη και 0.1% (w/v) SDS.
8. Διάλυμα χρωματισμού του πηκτώματος (Staining solution): 0.5% (w/v) κυανού της coomassie, 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ (v/v) και 40% dH₂O.
9. Διάλυμα αποχρωματισμού του πηκτώματος (Destaining solution): 10% (v/v) μεθανόλη, 7% (v/v) οξικό οξύ και 83% (v/v) dH₂O.
10. Πρωτεϊνικοί δείκτες μοριακού βάρους (Fermentas).

Μέθοδος:

1. Αρχικά συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης της εταιρίας BioRad για μικρά πηκτώματα (Protean mini gel system). Χρησιμοποιούνται δυο γυάλινες πλάκες και δυο διαχωριστικά πάχους 1.0 mm για την κατασκευή κάθε πηκτώματος.
2. Ετοιμάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel) και αναδεύεται προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθεί αφρισμός και χύνεται στη συσκευή μέχρι περίπου τα 10 cm και αμέσως μετά τοποθετείται μια στοιβάδα βουτανόλης, έτσι ώστε να μην έρχεται το πήκτωμα σε επαφή με το οξυγόνο, το οποίο τερματίζει τον πολυμερισμό καταστρέφοντας τις ελεύθερες ρίζες. Το πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Όταν στερεοποιηθεί το πήκτωμα διαχωρισμού, απομακρύνεται η βουτανόλη, ετοιμάζεται και προστίθεται από πάνω το πήκτωμα συσσώρευσης. Αμέσως

τοποθετείται η χτένα με την βοήθεια της οποίας δημιουργούνται ειδικοί υποδοχείς (κελιά) μέσα στους οποίους γίνεται το φόρτωμα των δειγμάτων, όταν το πήκτωμα στερεοποιηθεί. Το πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα αφαιρείται η χτένα και το πήκτωμα τοποθετείται στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια προστίθενται περίπου 800 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1X και τα δείγματα φορτώνονται.
5. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 100 V και τα δείγματα που είναι αρνητικά φορτισμένα αρχίζουν να μετακινούνται προς την άνοδο που βρίσκεται στο κάτω μέρος του πηκτώματος.
6. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης απομακρύνεται το πήκτωμα συσσώρευσης και το πήκτωμα διαχωρισμού είτε βάφεται υπό ελαφριά ανακίνηση για 20 min είτε χρησιμοποιείται για ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στην πρώτη περίπτωση, το πήκτωμα ξεπλένεται με το διάλυμα αποχρωματισμού και έπειτα αφήνεται κατά τη διάρκεια της νύχτας με αυτό το διάλυμα για πλήρη αποχρωματισμό. Μετά από αυτή τη διαδικασία οι διαχωρισμένες μπάντες των πρωτεϊνών γίνονται ορατές.
7. Τέλος το πήκτωμα φωτογραφίζεται και σώζεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και κάμερας BioCap1, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος BIO-CAPT V.99.

2.2.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)

Αυτή η μέθοδος είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση και τη ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση μιας υπό μελέτη πρωτεΐνης μέσα σε ένα πρωτεϊνικό δείγμα. Η ταυτοποίηση γίνεται με ειδικά αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν μόνο αυτή και πιο συγκεκριμένα μια ειδική θέση της που ονομάζεται αντιγονικός προσδιοριστής ή επιτόπιο.

Οι πρωτεΐνες ενός δείγματος, αφού διαχωριστούν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρονται με αποτύπωση σε φύλλο νιτροκυτταρίνης, πάνω στο οποίο ανιχνεύονται με τη χρήση του ειδικού αντισώματος. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης- 1^{00} αντισώματος μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο, το οποίο είναι σημασμένο με ένζυμο. Με προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος δημιουργείται έγχρωμο προϊόν που μπορεί να ανιχνευθεί σε φιλμ αυτοραδιογραφίας (όπως στη χρησιμοποιούμενη μέθοδο χημειοφωταύγειας, Chemiluminesce).

Υλικά:

1. Συσκευή μεταφοράς Mini Trans-Blot, wet transfer (BioRad).
2. Μembrάνη μεταφοράς νιτροκυτταρίνης (Hybond ECL Nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia Biotech).
3. Διηθητικό χαρτί Whatman 3 mm.
4. Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Blot buffer): α) 10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20% (v/v) μεθανόλη, pH 9,9 (ρύθμιση με Na₂CO₃) ή β) 48 mM Tris pH 9.2, 39 mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη (τα διαλύματα αυτά διατηρούνται στους 4 °C).
5. Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate buffered saline): 1 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl και 2.7 mM KCl, pH 7.4.
6. Διάλυμα PBS-Tween-20 0.1% (v/v).
7. 5% (w/v) αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος (Marvel) σε διάλυμα PBS-Tween-20 0.1% (v/v).
8. Κατάλληλα αντισώματα ανάλογα με την πρωτεΐνη που θα ανιχνευθεί (2.4.2.1).

Μέθοδος:

1. Αρχικά πραγματοποιείται η διαδικασία της μεθόδου 2.2.4.
2. Καθώς η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης βρίσκεται σε εξέλιξη, κόβονται 6 διηθητικά χαρτιά Whatman στο μέγεθος του πηκτώματος και τοποθετούνται στο διάλυμα μεταφοράς, καθώς επίσης και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σ' αυτό το μέγεθος. Η μεμβράνη ενυδατώνεται με τοποθέτηση της σε dH₂O και ακολούθως τοποθετείται στο διάλυμα μεταφοράς.
3. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, απομακρύνεται το πήκτωμα συσσώρευσης από το κυρίως πήκτωμα και το κυρίως πήκτωμα τοποθετείται στο διάλυμα μεταφοράς.
4. Για τη διαδικασία της μεταφοράς χρησιμοποιείται η συσκευή Trans-Blot της BIORAD, είτε για σχεδόν στεγνή μεταφορά (semidry), είτε για υγρή μεταφορά. Στην πρώτη περίπτωση βρέχεται το ένα ηλεκτρόδιο με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και πάνω σε αυτό τοποθετούνται με σειρά: τρία χαρτονάκια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και τέλος τα υπόλοιπα 3 χαρτονάκια («σάντουιτς»). Σε κάθε βήμα της διαδικασίας απομακρύνονται τυχόν φυσαλίδες αέρα οι οποίες πιθανόν να έχουν εγκλωβιστεί μεταξύ των «στρωμάτων» με τη βοήθεια μιας ράβδου, διότι η ύπαρξη φυσαλίδων παρεμποδίζει την μεταφορά. Τέλος, βρέχεται και το άλλο ηλεκτρόδιο της συσκευής με το ρυθμιστικό μεταφοράς και η συσκευή κλείνεται. Η μεταφορά πραγματοποιείται για 1 h στα 10-15 V. Στην δεύτερη περίπτωση, αφού δημιουργηθεί το «σάντουιτς» τοποθετείται σε ειδική κασετίνα

μεταξύ δύο ειδικών σφουγγαριών και έπειτα τοποθετείται στην ειδική συσκευή η οποία γεμίζεται με διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά πραγματοποιείται υπό συνεχή ανάδευση για 1h στα 100V. Ενόσω οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα προς την άνοδο συναντούν την μεμβράνη πάνω στην οποία δεσμεύονται μιας και η ίδια είναι φορτισμένη θετικά.

5. Με το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε διάλυμα 5% (w/v) γάλακτος PBS-Tween-20 0.1% (v/v) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υποβάλλοντας έτσι τη μεμβράνη σε «κορεσμό» των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης (blocking) για να αποφευχθεί η μη εξειδικευμένη δέσμευση του πρώτου αντισώματος πάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης.
6. Ακολούθως, η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα το οποίο αραιώνεται είτε σε διάλυμα 3% (w/v) γάλακτος PBS-Tween-20 0.1% (v/v), είτε σε διάλυμα PBS-Tween-20 0.1% (v/v) ανάλογα με το αντίσωμα που χρησιμοποιείται. Η επώαση πραγματοποιείται για 2 h ή για 12-14 h ανάλογα με το αντίσωμα.
7. Η μεμβράνη αφαιρείται από το πρώτο αντίσωμα και ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα PBS-Tween-20 0.1% (v/v) για 10 min την κάθε φορά.
8. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται για 1 h με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο και πάλι αραιώνεται σε διάλυμα PBS-Tween-20 0.1% (v/v). Η αραιώση είναι ανάλογη με το αντίσωμα το οποίο χρησιμοποιείται.
9. Τέλος, το δεύτερο αντίσωμα αφαιρείται και η μεμβράνη ξεπλένεται μια φορά με PBS-Tween 20 0.1% (v/v) για 10 min και για άλλα 10 min με PBS μόνο.

2.2.6 Αυτοραδιογράφημα ανοσοαποτύπωσης

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης όπως προαναφέρθηκε γίνεται αντιληπτή με την εμφάνιση μιας σκοτεινής γραμμής σε φιλμ όταν αυτό έρθει σε επαφή με τη ενζυμική σήμανση του δεύτερου αντισώματος. Αυτή η σήμανση είναι το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP) το οποίο είναι συνδεδεμένο με το δεύτερο αντίσωμα. Το ένζυμο αυτό οξειδώνει κυκλικά διακυλυδραζίδια σε αλκαλικές συνθήκες. Με την οξείδωση τους αυτά διεγείρονται και με την αποδιέγερση στη βασική τους κατάσταση εκπέμπουν φως, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί με σύντομη έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας (φθορισμός). Για αύξηση της έντασης του εκπεμπόμενου φωτός ως επίσης και του χρόνου εκπομπής (ενισχυμένη χημειοφωταύγεια) γίνεται χρήση ενισχυτικών ενώσεων όπως είναι οι φαινόλες.

Υλικά:

1. Διαλύματα εμφάνισης 1 και 2 από το πακέτο Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech).
2. Φιλμ αυτοραδιογραφίας (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech).
3. Κασετίνα εμφάνισης (Amersham Pharmacia Biotech).

Μέθοδος:

1. Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται στο διάλυμα εμφάνισης που παρασκευάζεται με προσθήκη ίσων όγκων από τα 2 διαλύματα για 1 min. Τα διαλύματα περιέχουν το υπόστρωμα που θα οξειδωθεί, υπό την επίδραση του ενζύμου HRP που φέρει το δεύτερο αντίσωμα, εκπέμποντας φως.
2. Η μεμβράνη αφαιρείται από το διάλυμα εμφάνισης, τυλίγεται σε διάφανο σελοφάν και τοποθετείται σε ειδική κασετίνα εμφάνισης αυτοραδιογραφίας.
3. Σε σκοτεινό θάλαμο τοποθετείται φιλμ αυτοραδιογραφίας πάνω από τη μεμβράνη για χρόνο που θα εξαρτηθεί από το πόσο έντονες είναι οι μπάντες πάνω στο φιλμ (συνήθως 10 sec-10 min) και το φιλμ εμφανίζεται με τον ειδικό αυτόματο επεξεργαστή (KODAK M35 X-OMAT processor).

2.2.7 Απομάκρυνση αντισωμάτων και επανανίχνευσης μεμβρανών (stripping and reprobing)

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση ήδη δεσμευμένων αντισωμάτων από τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Επομένως χωρίς να χρειαστεί να επαναληφθεί η ανοσοαποτύπωση (2.2.5) η μεμβράνη μπορεί να ξαναεπωαστεί με διαφορετικά αντισώματα που αναγνωρίζουν την ίδια ή διαφορετική πρωτεΐνη ή να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισωμάτων με σκοπό την εύρεση της καταλληλότερης.

Υλικά:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα απομάκρυνσης (Stripping buffer): (α) 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% (w/v) SDS και 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 ή (β) 0.1M NaOH.
2. PBS-Tween-20 0.1% (v/v).
3. 3% (w/v) αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος (Marvel) σε διάλυμα PBS-Tween-20 0.1% (w/v).

Μέθοδος:

1. Η μεμβράνη τοποθετείται στο ρυθμιστικό διάλυμα απομάκρυνσης: (α) για 30 min στους 50 °C ή (β) για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ελαφριά ανάδευση, ανάλογα με το διάλυμα απομάκρυνσης που επιλέγεται [(α) ή (β)]. Η επιλογή του διαλύματος γίνεται βάσει του πόσο έντονη επιθυμείται να είναι η απομάκρυνση των αρχικών αντισωμάτων και της ποσότητας των πρωτεϊκών δειγμάτων.
2. Στη συνέχεια ξεπλένεται δύο φορές από 15 min με διάλυμα PBS-Tween-20 0.1% (v/v) σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιώντας μεγάλους όγκους διαλύματος.
3. Η μεμβράνη υποβάλλεται σε κορεσμό των ελεύθερων θέσεων δέσμησης (Blocking) με 3% (w/v) αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος σε PBS-Tween-20 0.1% (v/v) για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση.
4. Ακολουθούνται τα βήματα των μεθόδων 2.2.5 και 2.2.6.

2.2.8 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford

Η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976) είναι μια γρήγορη και εύκολη μέθοδος για την μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Η μέθοδος βασίζεται στην αλλαγή χρώματος του όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 όταν αυτή αντιδράσει δεσμευτεί σε πρωτεΐνες, προκαλώντας μεταβολή της απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm.

Υλικά:

1. Αντιδραστήριο Bradford (BioRad).
2. Κυψελίδες του 1 ml
3. 1 mg/ml BSA σε ddH₂O.

Μέθοδος:

2.2.8.1 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

1. Αρχικά φτιάχνονται τα διαλύματα των 0.125, 0.250, 0.5 και 1 mg/ml BSA σε ddH₂O.
2. Για κάθε 800μl διαλύματος BSA προστίθενται 200 μl αντιδραστηρίου Bradford και επωάζονται για 15-30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ταυτόχρονα ετοιμάζεται και τυφλό δείγμα το οποίο περιέχει 800 μl νερό και 200 μl αντιδραστηρίου Bradford.
3. Τα δείγματα φωτομετρούνται, μετρώντας την απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm.
4. Ακολούθως κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς $A_{595nm} = f[C]$

2.2.8.2 Φωτομέτρηση δειγμάτων

1. Σε νερό προστίθεται μέρος του πρωτεϊνικού δείγματος που θα μετρηθεί έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι ίσος με 800μl και ακολούθως προστίθενται 200 μl αντιδραστηρίου Bradford.
2. Τα δείγματα επωάζονται για 15-30 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετράται η απορρόφηση τους στα 595 nm.
3. Βάσει της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε διάλυμα.

2.2.9 Τεχνική της συν-επιλογής (Pull down assay ή co-selection)

Είναι μια βιοχημική μέθοδος διερεύνησης/επιβεβαίωσης της αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών, η οποία βασίζεται στις αρχές της χρωματογραφίας χημικής συγγένειας (affinity chromatography). Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια της μιας εκ των δύο πρωτεϊνών για ειδικό υπόστρωμα που βρίσκεται ομοιοπολικά προσδεδεμένο σε μήτρα αδρανούς υλικού (σφαιρίδια). Η υψηλή συγγένεια της πρωτεΐνης για το υπόστρωμα αυτό οφείλεται σε ειδική αλληλουχία (επιτόπιο), που βρίσκεται συγχωνευμένη στο 5' άκρο του κλωνοποιημένου γονιδίου της ετερόλογης πρωτεΐνης. Η μέθοδος προϋποθέτει τη σήμανση των δύο πρωτεϊνών με διαφορετικά κατάλληλα επιτόπια (epitope tagging) έτσι ώστε μόνο η μια εκ των δύο πρωτεϊνών να έχει συγγένεια με το υπόστρωμα της μήτρας.

Η κατασκευή υβριδικών πρωτεϊνών που να φέρουν διαφορετικά επιτόπια επιτυγχάνεται με συγχώνευση των cDNA των δύο πρωτεϊνών σε κατάλληλους πλασμδιακούς φορείς. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια τα οποία περιείχαν γονίδια για μετάφραση των επιτόπιων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της εξα-ιστιδίνης (6xhis) (Πίνακας 2.5) και χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα, μήτρα αδρανούς υλικού (σφαιρίδια) με υπόστρωμα γλουταθειόνης (Sephacrose 4B beads) ή συμπλόκων νικελίου (Ni^{2+} -NTA agarose beads).

Υλικά:

1. Μήτρα αδρανούς υλικού, σφαιρίδια σεφαρόζης, με υπόστρωμα γλουταθειόνης (Sephacrose 4B beads, Sigma).
2. Μήτρα αδρανούς υλικού, σφαιρίδια αγαρόζης, με σύμπλοκα νικελίου (Ni^{2+} -NTA agarose beads).
3. Διάλυμα A: 1X PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.3), 1% Tween-20 και κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών 1X.

4. Διάλυμα B: 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 1mM Na₂HPO₄, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 mM ιμιδαζολίου και κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών 1X (χωρίς EDTA).
5. Διάλυμα 1M Guanidium-HCl (Gu-HCl).
6. Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 5 και 2 φορές (5X και 2X) συγκεντρωμένο (sample buffer), (για συνταγή βλ. 2.12).

Για την πραγματοποίηση των πιο κάτω πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά ιζήματα δειγμάτων (2 ml), που είχαν συλλεγεί από βακτηριακές καλλιέργειες στον κατάλληλο χρόνο ($t = 3h$ ή $t = 16-18 h$) μετά την επαγωγή τους με IPTG και τα οποία έτυχαν κατάλληλης επεξεργασίας (2.11).

Μέθοδος:

1. Το βακτηριακό ίζημα της υπό μελέτη πρωτεΐνης συγχωνευμένης με το κατάλληλο επιτόπιο, GST ή His6, επαναδιασπείρεται σε 200 μl του διαλύματος A ή B αντίστοιχα.
2. Τα δείγματα ομογενοποιούνται με υπερήχους (λύση βακτηρίων με παλμούς 10 sec με ενδιάμεσα διαλείμματα των 10 sec και τοποθέτηση του δείγματος σε πάγο), έτσι ώστε να μη θερμανθούν ή να αφρίσουν για να αποφευχθεί η πρωτεόλυση και η οξειδωση αντίστοιχα.
3. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm στους 4 °C και συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες των βακτηρίων μαζί και την υπό μελέτη πρωτεΐνη.
4. Σε σωλήνες τύπου erpendorf τοποθετούνται 13.5 μl σφαιρίδια, φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm, για 5 min, στους 4 °C και το υπερκείμενο (διάλυμα αιθανόλης) απομακρύνεται και τα σφαιρίδια ξεπλένονται 3 φορές με 150 μl διαλύματος A ή B. Κάθε φορά φυγοκεντρώνονται στις ίδιες συνθήκες με πιο πάνω και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
5. Στο στάδιο αυτό μπορούν να ακολουθηθούν 3 διαφορετικά πρωτόκολλα:

1^ο Πρωτόκολλο:

α) Το υπερκείμενο του σταδίου 3 προστίθεται στα έτοιμα σφαιρίδια και επωάζεται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου ή 1 h στους 4 °C υπό ελαφριά ανάδευση. Με την επώαση αυτή αναμένεται η υπό μελέτη πρωτεΐνη με το κατάλληλο επιτόπιο να προσδεθεί εκλεκτικά πάνω στο αντίστοιχο υπόστρωμα των σφαιριδίων.

β) Στη συνέχεια τα σφαιρίδια φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm, για 5 min, στους 4 °C και το υπερκείμενο συλλέγεται (αποτελεί το αδέσμευτο κλάσμα).

γ) Τα σφαιρίδια ξεπλένονται 3 φορές με 100 μl διαλύματος A ή B, το οποίο απομακρύνει τις πρωτεΐνες οι οποίες δεν έχουν ειδική συγγένεια με το υπόστρωμα.

δ) Ακολούθως προστίθεται το υπερκείμενο της δεύτερης υπό μελέτη πρωτεΐνης και πραγματοποιείται επώαση και πάλι για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου ή 1 h στους 4 °C, υπό συνεχή ανάδευση.

2° Πρωτόκολλο

α) τα πρωτεϊνικά λύματα από τις δύο υβριδικές πρωτεΐνες συνδυάζονται και επωάζονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες όπως και προηγουμένως.

β) μετά την επώαση προστίθενται στο διάλυμα τα προεπεξεργασμένα σφαιρίδια και ακολουθεί και πάλι επώαση στις ίδιες συνθήκες.

3° Πρωτόκολλο

α) Ακολουθούνται τα βήματα του πρώτου πρωτοκόλλου αλλά με τη διαφορά ότι μετά την δέσμευση της πρώτης πρωτεΐνης πραγματοποιείται ξέπλυμα των σφαιριδίων με 100 μl διαλύματος 1M Gu-HCl, για αποδιάταξη της υπό μελέτης πρωτεΐνης.

β) Τα σφαιρίδια στη συνέχεια ξεπλένονται και επωάζονται με την δεύτερη υπό μελέτη πρωτεΐνη.

6. Στα δείγματα των σφαιριδίων προστίθενται 60 μl 2x Sample buffer, ενώ στα αδέσμευτα δείγματα που συλλέγηκαν από το κάθε στάδιο 50 μl 5x Sample buffer και θερμαίνονται για 5 min στους 96 °C.

7. Τέλος, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western για έλεγχο του αποτελέσματος.

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Στη παρούσα εργασία, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια τύπου HeLa. Τα κύτταρα HeLa είναι ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα τραχήλου της μήτρας. Είναι τα πρώτα ανθρώπινα κύτταρα από τα οποία δημιουργήθηκε μόνιμη κυτταρική σειρά (1951) και προήλθαν από τον ιστό της Henrietta Lacks, μιας Αμερικανής, Αφρικανικής καταγωγής γυναίκας 31 χρονών.

Οι ακόλουθες μέθοδοι, πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα (Laminar Air Flow).

2.3.1 Θρεπτικά Υλικά και άλλα αντιδραστήρια απαραίτητα για την ανάπτυξη κυτταροκαλλιέργειας HeLa

1. D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO-Invitrogen).
Στο θρεπτικό υλικό DMEM περιέχονται 4500 mg/L D- γλυκόζη, GlutaMAX (L-Alanul-L-Glutamine) το οποίο αντικαθιστά την L-γλουταμίνη σε ίση μοριακή αναλογία, 25 mM HEPES χωρίς πυροσταφυλικό νάτριο.
2. Θερμικά απενεργοποιημένος εμβρυϊκός βόειος ορός - FBS (fetal bovine serum) (GIBCO-Invitrogen).
3. D-PBS (Dulbecco's PBS) χωρίς CaCl_2 και MgCl_2 (GIBCO-Invitrogen).
4. Διάλυμα ενζύμου θρυψίνης-EDTA·4Na: 0.25% (v/v) θρυψίνη, 1 mM EDTA·4Na (GIBCO-Invitrogen).
5. Μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη: 10000 U/ml πενικιλίνη G (άλας νατρίου), 10000 U/ml θειική στρεπτομυκίνη σε φυσιολογικό ορό (GIBCO-Invitrogen).
6. Αντιβιοτικό 50 mg/ml Geneticin® (G418) (GIBCO-Invitrogen).
7. Μέσο κατάψυξης κυττάρων: 70% (v/v) FCS, 20% (v/v) DMEM και 10% (v/v) DMSO (διμέθυλο-σουλφοξείδιο).

Για τα μετέπειτα στάδια χρησιμοποιείται πλήρες θρεπτικό υλικό το οποίο κατασκευάζεται με προσθήκη σε θρεπτικό υλικό DMEM-GlutaMAX-I (500ml) 10% (v/v) FCS και 50 U/ml πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

2.3.2 Ανάπτυξη κυτταροκαλλιέργειας από κατεψυγμένα κύτταρα

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται με αποθήκευση τους σε υγρό άζωτο (-195 °C).

Υλικά

1. 100 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (Corning incorporated, CORNING).
2. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM-GlutaMAX-I.
3. Κατεψυγμένα κύτταρα HeLa.

Μέθοδος

1. Σε τρυβλίο των 100 mm προστίθενται 7 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM-GlutaMAX-I, το οποίο προηγουμένως προθερμαίνεται στους 37 °C σε υδατόλουτρο.
2. Ακολούθως, από το υγρό άζωτο στο οποίο διατηρούνται οι σωλήνες με τα κύτταρα, μεταφέρεται ένας σωλήνας με κύτταρα HeLa, σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει νερό 37 °C για άμεσο ξεπάγωμα. Στη συνέχεια τα κύτταρα διασπείρονται στο προετοιμασμένο τρυβλίο.
3. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C σε ατμόσφαιρα που περιέχει υγρασία και 5% CO₂ έως ότου καλυφθεί το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου δηλαδή η καλλιέργεια να βρίσκεται σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Συνήθως χρειάζονται 3-4 μέρες για να επιτευχθεί αυτό.

2.3.3 Επαναδιασπορά κυττάρων για ανακαλλιέργεια τους

Τα κύτταρα καλλιεργούνται προσκολλημένα σε επίπεδα αποστειρωμένα τρυβλία μέχρι να αναπτυχθούν πλήρως όπου παρουσιάζεται αναστολή της ανάπτυξης τους λόγω επαφής, τα κύτταρα αναδιασπείρονται (αραιώνονται) και ποσότητα αυτών ανακαλλιεργείται.

Υλικά:

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM-GlutaMAX-I.
2. D-PBS.
3. Διάλυμα πρωτεολυτικού ενζύμου θρυψίνης-EDTA·4Na.
4. Κυτταροκαλλιέργεια HeLa σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
5. 100 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (Corning incorporated, CORNING).

Μέθοδος:

1. Από ένα τρυβλίο των 100 mm, στο οποίο μεγαλώνουν κύτταρα HeLa που βρίσκεται σε εκθετική φάση ανάπτυξης, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur που είναι συνδεδεμένη με αντλία κενού.
2. Τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με 10 ml προθερμασμένου ρυθμιστικού διαλύματος D-PBS. Με την έκπλυση των κυττάρων αφαιρείται πλήρως ο ορός που περιέχει το DMEM και ο οποίος δρα ανασταλτικά στην ενεργότητα του επόμενου χειρισμού που είναι η τρυψινοποίηση.
3. Για να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια του τρυβλίου προστίθεται 1 ml διαλύματος ενζύμου θρυψίνη-EDTA·4Na και το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστήρα περίπου για 1 min ώστε να δράσει η θρυψίνη και να αποκολληθούν τα κύτταρα. Η αποκόλληση επιβεβαιώνεται με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου.
4. Ακολούθως προστίθενται στο τρυβλίο 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM (αραίωση 1:6), το οποίο απενεργοποιεί την θρυψίνη. Τα κυτταρικά συσσωματώματα διασπώνται με τη βοήθεια της αυτόματης συσκευής αναρρόφησης-εκρόφησης και αποστειρωμένης πιπέτας των 10ml.
5. 1 ml από το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε τρυβλίο των 100 mm στο οποίο περιέχονται 7 ml προθερμασμένου (37 °C) πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM, αναδεύονται ήπια και επωάζονται σε ατμόσφαιρα που περιέχει υγρασία και 5% CO₂ έως ότου καλυφθεί το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου.

2.3.4 Κρυοδιατήρηση κυτταροκαλλιέργειας-Πάγωμα κυττάρων

Για τη διατήρηση αποθεμάτων κυτταροκαλλιέργειας τα κύτταρα φυλάσσονται σε θερμοκρασία -135 °C σε υγρό άζωτο στην παρουσία κρυοπροστατευτικού μέσου όπως DMSO (διμέθυλο-σουλφοξείδιο) το οποίο αποτρέπει τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων.

Υλικά:

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM-GlutaMAX-I.
2. D-PBS.
3. Διάλυμα πρωτεολυτικού ενζύμου θρυψίνης-EDTA·4Na.
4. Μέσο κατάψυξης κυττάρων: 70% (v/v) FCS, 20% (v/v) DMEM και 10% (v/v) DMSO (διμέθυλο-σουλφοξείδιο).

5. Κρυογόνοι σωλήνες NALGENE[®] (cryogenic vial) των 2 ml για κατάψυξη κυτταροκαλλιέργειας (Nalge Nunc International).
6. Κρυοψύκτης NALGENE[®] (Nalge Nunc International).

Μέθοδος:

1. Ακολουθούνται τα βήματα 1-4 από τη διαδικασία επαναδιασποράς κυττάρων (2.3.3).
2. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε σωλήνα των 15 ml και φυγοκεντρούνται στις 1000 rpm για 4 min.
3. Στη συνέχεια απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur που είναι συνδεδεμένη με αντλία κενού και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 1 ml μέσου παγώματος κυττάρων το οποίο μεταφέρεται σε κρυογόνο σωλήνα.
4. Για τη σταδιακή και ελεγχόμενη ψύξη των κυττάρων πριν τη μεταφορά σε θερμοκρασία υγρού αζώτου, τοποθετούνται σε κρυοψύκτη NALGENE[®] στους -80 °C για 18-24 h.
5. Την επόμενη μέρα ο σωλήνας μεταφέρεται και αποθηκεύεται σε υγρό άζωτο.

2.3.5 Μέτρηση βιώσιμων κυττάρων

Η μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων έγινε με τη χρήση ενός αιμοκυτταρομέτρου και της χρωστικής Trypan blue, η οποία έχει την ιδιότητα να χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα.

Υλικά:

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM-GlutaMAX-I.
2. D-PBS.
3. Διάλυμα πρωτεολυτικού ενζύμου θρυψίνης-EDTA·4Na.
4. Χρωστικής Trypan blue 0.4% (v/v) (Invitrogen).
5. Αιμοκυτταρόμετρο (Hirschmann).

Μέθοδος:

1. Ακολουθούνται τα βήματα 1-4 από τη διαδικασία επαναδιασποράς κυττάρων (2.3.3).
2. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε σωλήνα των 15 ml και φυγοκεντρούνται στις 1000 rpm για 4 min.

3. Στη συνέχεια απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur που είναι συνδεδεμένη με αντλία κενού και τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε 5 ml πλήρου θρεπτικού υλικού DMEM-GlutaMAX-I με καλή ανάμιξη, έτσι ώστε το τελικό εναιώρημα των κυττάρων να είναι ομοιογενές και τα κύτταρα να μην παρουσιάζουν συσσωματώματα.
4. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάμιξη 20 μl εναιωρήματος κυττάρων με 20 μl χρωστικής Trypan blue σε σωλήνα τύπου Eppendorf (αραίωση 1:1).
5. 10 μl από το μίγμα αυτό μεταφέρεται στο θάλαμο εισαγωγής δείγματος του αιμοκυτταρομέτρου και πραγματοποιείται μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων, μη χρωματισμένα κύτταρα, με τη βοήθεια μικροσκοπίου.
6. Γίνεται υπολογισμός των κυττάρων με βάση τον τύπο:

$$\frac{\text{cells in 4 quadrants}}{2} \times 10^4 = \frac{\text{cells}}{\text{ml}}$$

2.3.6 Τεχνική της επιμόλυνσης (transfection)

Η τεχνική της επιμόλυνσης χρησιμοποιείται για την εισαγωγή ενός ετερόλογου cDNA σε κυτταροκαλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της παροδικής επιμόλυνσης (transient transfection) με φωσφορικό ασβέστιο (calcium-phosphate-mediated) και η τεχνική επιμόλυνσης με χρήση κατιονικών λιπιδίων.

2.3.6.1 Τεχνική παροδικής επιμόλυνσης με φωσφορικό ασβέστιο

Η τεχνική αυτή προάγει τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του DNA και του φωσφορικού ασβεστίου, το οποίο καταβυθίζεται, προσροφάται στην επιφάνεια των κυττάρων και ακολούθως εισάγεται σε αυτά μέσω του μονοπατιού της ενδοκύτωσης (Graham and van der Eb, 1973). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Santama et al., 1998.

Υλικά:

1. Κυτταροκαλλιέργεια τύπου HeLa σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
2. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα 2X HBS: 54 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid], 1.5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, pH 7.0. (Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο 22 μm, χωρίζεται σε σωλήνες των 2 ml, οι οποίοι φυλάγονται στους -20 °C).

4. 2 M CaCl₂ (Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο 22 μm, χωρίζεται σε σωλήνες των 2 ml, οι οποίοι φυλάγονται στους 4 °C).
5. 1 μg/ml πλασμίδιο αραιωμένο σε TE.
6. Αποστειρωμένο ddH₂O.
7. 100 mm τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες (Corning incorporated, CORNING).
8. Καλυπτρίδες (coverslips) 12 x 12 mm (Marienfeld GmbH).
9. Σωλήνες τύπου Eppendorf των 1.5 ml.

Μέθοδος:

1. Τα κύτταρα κυτταροκαλλιέργειας HeLa που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης αραιώνονται με χρήση θρυψίνης, έτσι ώστε να καλύπτουν το 30% της επιφάνειας του τρυβλίου, τουλάχιστο 2 h πριν την διαδικασία της επιμόλυνσης (2.3.3) και μεταφέρονται σε τρυβλία των 100 mm που φέρουν καλυπτρίδες και 4 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM.
2. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C σε ατμόσφαιρα που περιέχει υγρασία και 5% CO₂, μέχρι τη στιγμή της επιμόλυνσης.
3. Ξεπαγώνονται όσοι σωλήνες θα χρειαστούν, 2X HBS, σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε τρυβλίο των 100 mm, τοποθετούνται 0.5 ml 2X HBS σε αποστειρωμένο σωλήνα των 1.5 ml.
4. Σε ξεχωριστό σωλήνα των 1.5 ml τοποθετούνται 10 μg DNA, 61 μl 2 M CaCl₂ και ποσότητα αποστειρωμένου ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 0.5 ml. Το μείγμα αναμειγνύεται καλά και επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (στη φάση αυτή θα πρέπει να είναι διακριτό ελαφρύ άσπρο ίζημα).
5. Στη συνέχεια το μείγμα DNA/CaCl₂ προστίθεται στο σωλήνα που περιέχει το 2X HBS, ανά σταγόνα με ταυτόχρονη ανάδευση του σωλήνα.
6. Το τελικό μείγμα προστίθεται σταγόνα-σταγόνα στα τρυβλία που περιέχουν τα κύτταρα και αυτά επωάζονται στους 37 °C για 16-24 h σε ατμόσφαιρα που περιέχει υγρασία και 5% CO₂.
7. Την επόμενη μέρα (16-24 h) το μέσο επιμόλυνσης απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με προθερμασμένο στους 37 °C PBS.
8. Τέλος προστίθενται 7 ml πλήρους DMEM στην κυτταροκαλλιέργεια και επωάζεται στους 37 °C σε ατμόσφαιρα που περιέχει υγρασία και 5% CO₂.
9. Οι καλυπτρίδες συλλέγονται μετά την απομάκρυνση του μέσου επιμόλυνσης στην επιθυμητή ώρα ανάλογα με το εκάστοτε πείραμα (24-48 h) και τα εναπομείναντα κύτταρα στο τρυβλίο μπορούν να συλλεχθούν για περαιτέρω μελέτη.

2.3.6.2 Τεχνική επιμόλυνσης με χρήση κατιονικών λιπιδίων

Στη συγκεκριμένη μέθοδο η μεταφορά του DNA γίνεται με χρήση κατιονικών λιποσωμάτων τα οποία δημιουργούν θετικά φορτισμένα σύμπλοκα με τα ανιονικά μόρια του DNA. Τα θετικά φορτισμένα σύμπλοκα λιποσωμάτων-DNA αλληλεπιδρούν με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη και το DNA εισάγεται στο κύτταρο μέσω του μονοπατιού της ενδοκύτωσης ή με συγχώνευση του κατιονικού λιπιδίου με την κυτταρική μεμβράνη η οποία επιτρέπει την είσοδο του DNA στο κυτταρόπλασμα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πολυκατιονικό λιπίδιο Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen).

Υλικά:

1. Κυτταροκαλλιέργεια τύπου HeLa σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
2. 1 mg/ml Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen).
3. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς αντιβιοτικά.
4. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM με αντιβιοτικά.
5. Θρεπτικό υλικό Opti-MEM® I Reduced serum Media (GIBCO-Invitrogen).
6. D-PBS.
7. Διάλυμα θρυψίνης-EDTA·4Na.
8. 4 μg πλασμιδιακού DNA.
9. Τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες των 60 mm (IWAKI).
10. Αποστειρωμένες καλυπτρίδες (Marienfeld GmbH).

Μέθοδος: (Εκτελείται βάσει οδηγιών του κατασκευαστή Invitrogen)

1. 24 h πριν την διαδικασία της επιμόλυνσης, τα κύτταρα κυτταροκαλλιέργειας HeLa που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης, αραιώνονται με χρήση θρυψίνης (2.3.3) και μεταφέρονται 5×10^5 - 2×10^6 κύτταρα σε κάθε τρυβλίο των 60 mm που φέρει καλυπτρίδες και περιέχει 4 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM χωρίς αντιβιοτικά.
2. Ακολούθως η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C για 24 h σε ατμόσφαιρα που περιέχει υγρασία και 5% CO₂. Τα κύτταρα θα πρέπει σε αυτή τη φάση να καλύπτουν το 90-95% της επιφάνειας του τρυβλίου.
3. Σε ένα σωλήνα τύπου erpendorf αναμειγνύονται 5 μg πλασμιδίου με 500 μl Opti-MEM® I θρεπτικού υλικού.
4. Ταυτόχρονα σε ένα άλλο σωλήνα τύπου erpendorf αναμειγνύονται 5 μg Lipofectamine™ 2000 με 500 μl Opti-MEM® I θρεπτικού υλικού και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

5. Ακολούθως το αραιωμένο DNA προστίθεται στην αραιωμένη Lipofectamine™ 2000, αναμειγνύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min ώστε να δημιουργηθούν τα σύμπλοκα DNA- Lipofectamine™ 2000.
10. Το μείγμα του 1 ml προστίθεται ανά σταγόνα στο τρυβλίο των 60 mm που περιέχει τα κύτταρα, το οποίο ταυτόχρονα αναδεύεται απαλά και έπειτα επωάζεται στους 37 °C για 6 h σε ατμόσφαιρα που περιέχει υγρασία και 5% CO₂.
11. Μετά τις 6 h το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με πλήρες DMEM το οποίο περιέχει αντιβιοτικά και το τρυβλίο επανατοποθετείται πίσω στον επωαστήρα.
12. Οι καλυπτρίδες συλλέγονται μετά την επιμόλυνση, στην επιθυμητή ώρα ανάλογα με το εκάστοτε πείραμα.

2.3.6.3 Τεχνική παροδικής επιμόλυνσης με χρήση ριβοολιγονουκλεοτιδίων αποσιώπησης (siRNA)

Η καταστολή/αποσιώπηση του RNA είναι ένας μηχανισμός γονιδιακής ρύθμισης στα θηλαστικά και στα φυτά, ο οποίος μειώνει τα μεταγράφηκα επίπεδα είτε με καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής (transcriptional gene silencing), είτε με ενεργοποίηση της διαδικασίας αποικοδόμησης συγκεκριμένης αλληλουχίας του mRNA (RNA interference, RNAi). Στο RNAi ως ενεργοποιητής/επαγωγέας αυτής της διαδικασίας είναι ένα μόριο δίκλωνου RNA (dsRNA) το οποίο με ενζυμική πέψη με RNase III (Dicer) κόβεται σε μικρότερου μήκους τμήματα, 21 και 22 νουκλεοτιδίων (siRNA), τα οποία με τη σειρά τους ενώνονται με συμπλέγματα πολυνουκλεασών (RISC) και αποικοδομούν το ομόλογο mRNA στόχο (Bernstein et al., 2001, Agrawal et al., 2003).

Στην παρούσα πειραματική εργασία πραγματοποιήθηκε καταστολή/μειορρύθμιση της πρωτεΐνης hCINAP, σε κυτταροσειρά τύπου *HeLa*, με χρήση σύνθετων δίκλωνων μορίων RNA, 25 νουκλεοτιδίων, τα οποία επιλέχθηκαν με το πρόγραμμα Custom-made *Stealth* siRNA duplexes της εταιρίας Invitrogen, από την οποία και κατασκευάστηκαν.

Υλικά:

1. Κυτταροκαλλιέργεια τύπου HeLa.
2. Lipofectamine™ 2000 πολυκατιοντικού λιπιδίου (1 mg/ml) (Invitrogen).
3. Θρεπτικό υλικό πλήρους DMEM χωρίς αντιβιοτικά.
4. Θρεπτικό υλικό πλήρους DMEM με αντιβιοτικά.
5. Διάλυμα θρυψίνης-EDTA·4Na.
6. D-PBS.

7. Opti-MEM I Reduced Serum.
8. Ζεύγη εξειδικευμένων ολιγονουκλεοτιδίων αποσιώπησης (siRNA1 και siRNA2), συγκέντρωσης 20μM (Invitrogen) (Πίνακας 2.9).
9. Ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων αναφοράς MED GC (medium GC content), συγκέντρωσης 20 μM (Invitrogen).
10. Τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες των 60 mm (IWAKI).
11. Αποστειρωμένες καλυπτρίδες (Marienfeld GmbH).

Μέθοδος: (εκτελείται βάσει οδηγιών του κατασκευαστή Invitrogen)

1. Μια μέρα πριν την επιμόλυνση τα κύτταρα αραιώνονται και τοποθετούνται σε τρυβλίο των 60 mm που φέρει καλυπτρίδες και περιέχει 4 ml πλήρες DMEM χωρίς αντιβιοτικά, έτσι ώστε να καλύπτουν το 30-50% της επιφάνειας του τρυβλίου κατά την επιμόλυνση την επόμενη μέρα. Το τρυβλίο επωάζεται στον επωαστήρα (37 °C, 5% CO₂) για 24 h.
2. Σε σωλήνες τύπου erppendorf αναμειγνύονται 8 μl ή 16 μl (160 pM ή 320 pM συνολική συγκέντρωση ολιγονουκλεοτιδίων, αντίστοιχα) από το κάθε ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων siRNA καθώς και από το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων αναφοράς (medium GC content) σε 100 μl θρεπτικού υλικού Opti-MEM I.
3. Σε ένα σωλήνα τύπου erppendorf αναμειγνύονται 8 μl ή 16 μl LipofectamineTM 2000 σε 100 μl θρεπτικό υλικό Opti-MEM I.
4. Οι σωλήνες επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Τα αραιωμένα siRNAs προστίθεται στην αραιωμένη LipofectamineTM 2000, αναμειγνύονται απαλά και επωάζονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να δημιουργηθούν τα σύμπλοκα RNA-LipofectamineTM 2000.
6. Το διάλυμα προστίθεται σταγόνα-σταγόνα στο τρυβλίο των 60 mm που περιέχει τα κύτταρα και αναδεύεται απαλά. Το τρυβλίο επωάζεται στον επωαστήρα (37 °C, 5% CO₂) για 6 h και μετά το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με πλήρες DMEM με αντιβιοτικά.
7. Τα κύτταρα αφήνονται στον επωαστήρα για 24-72 h και είτε συλλέγονται και χρησιμοποιούνται για απομόνωση συνολικού RNA, συνολικής πρωτεΐνης καθώς επίσης και οι καλυπτρίδες συλλέγονται για χρησιμοποίηση σε πειράματα ανοσοφθορισμού, είτε τυγχάνουν και δεύτερη επιμόλυνση με τις ίδιες συγκεντρώσεις (στάδια 2-5) πριν πραγματοποιηθεί αυτό.

| Όνομα ολιγονουκλεοτιδίου | Νοηματική αλληλουχία 5'-3' Αντινοηματική αλληλουχία 3'-5' |
|--------------------------|--|
| siRNA1 | GCAGAACCAGCAGGUGGAUAGUAUA UAUACUAUCCACCUUGCUGGUUCUGC |
| siRNA2 | CGUGCAUCAGCUGCCCAGUAAUAAA UUUAUUACUGGGCAGCUGAUGCACG |

Πίνακας 2.9: Ολιγονουκλεοτίδια αποσιώπησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.3.7 Δημιουργία σταθερά μετασηματισμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP}

Υλικά:

1. Κυτταροκαλλιέργεια κυττάρων HeLa σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
2. 1 μg/ml πλασμίδιο pEGFP-hCINAP αραιωμένο σε TE.
3. 1 mg/ml LipofectamineTM 2000 (Invitrogen).
4. Θρεπτικό υλικό Opti-MEM[®] I Reduced serum Media (GIBCO-Invitrogen).
5. Θρεπτικό υλικό πλήρες DMEM χωρίς αντιβιοτικά.
6. Διάλυμα θρυψίνης-EDTA·4Na.
7. Αντιβιοτικό 50 mg/ml Γενετισίνη [Geneticin[®] (G418), GIBCO-Invitrogen].
8. Τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες των 60 mm (IWAKI).
9. Τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες των 100 mm (IWAKI).
10. Τρυβλία των 24 κελίων (IWAKI).
11. Τρυβλία των 12 κελίων (IWAKI).
12. Τρυβλία των 6 κελίων (IWAKI).
13. Αποστειρωμένες καλυπτρίδες (Marienfeld GmbH).

Μέθοδος:

1. Αρχικά πραγματοποιείται τιτλοδότηση των κυττάρων HeLa με το αντιβιοτικό G418 (300, 400 και 500 μg/ml) για να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που σκοτώνει τα κύτταρα (που δεν εκφράζουν το πλασμίδιο), σε περίοδο 2 εβδομάδων και η οποία θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για τη επιλογή και τη δημιουργία της σταθεράς μετασηματισμένης κυτταροσειράς.
2. Ακολουθούνται τα βήματα 1-11 από το τμήμα 2.3.6.2, της επιμόλυνσης κυττάρων, με χρήση 5 μg πλασμιδίου pEGFP-hCINAP, είτε κυκλικό, είτε γραμμικό. Το πλασμίδιο

αυτό φέρει γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και νεομυκίνη (G418) για επιλογή σε βακτήρια και κύτταρα θηλαστικών αντίστοιχα.

3. Την επόμενη μέρα απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επαναδιασπείρονται (2.3.3) σε 7 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και έπειτα το εναιώρημα τους αραιώνεται σε διάφορες συγκεντρώσεις (1:50-1:10 000) σε καινούργια τρυβία που περιέχουν πλήρες θρεπτικό υλικό με 500 µg/ml G418.
4. Πραγματοποιείται καθημερινή αλλαγή του θρεπτικού υλικού με καινούργιο πλήρες θρεπτικό υλικό που περιέχει 500 µg/ml G418. Με την πάροδο του χρόνου, αυτό θα επιλέξει τα κύτταρα τα οποία έχουν ενσωματώσει το πλασμίδιο pEGFP-hCINAP, στο γενωμικό τους DNA. Αυτή η επιλογή διαρκεί για 2 βδομάδες.
5. Σε κάποιο χρονικό σημείο θα υπάρξει μαζικός θάνατος των κυττάρων και αποκόλληση τους από τον πάτο των τρυβλίων, αφήνοντας πίσω τους αποικίες με σταθερά μετασηματισμένα κύτταρα. Σε κάποιο από τα τρυβλία με τις διάφορες αραιώσεις θα υπάρξουν αποικίες οι οποίες είναι καλά διαχωρισμένες που να μπορούν να ληφθούν.
6. Για τη λήψη των αποικιών, προετοιμάζεται ένα τρυβλίο των 24 κελίων προσθέτοντας 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού που περιέχει 500 µg/ml G418 σε κάθε κελί.
7. Ακολούθως το τρυβλίο ξεπλένεται με 10 ml PBS και έπειτα προσθέτεται σε αυτό διάλυμα PBS (37 °C) που περιέχει 5% θρυψίνη (1 ml θρυψίνη-EDTA σε 19 ml PBS). Οι αποικίες μπορούν να συλλεχθούν κάτω από στερεοσκόπιο χρησιμοποιώντας πιπέτα Gilson με ελαφρύ ξύσιμο και αναρρόφηση τους και τοποθέτηση τους σε τρυβλίο των 24 κελίων. Κάθε αποικία τοποθετείται σε διαφορετικό κελί.
8. Όταν τα κελιά είναι 80-90% πλήρης, ξεπλένονται με PBS και γίνεται τρυψινοποίηση τους με προσθήκη 100 µl διαλύματος τρυψίνης-EDTA. Το επαναιώρημα των κυττάρων χωρίζεται σε δύο κελιά ενός τρυβλίου των 12 κελιών. Σε ένα εκ' των δύο κελιών τοποθετείται για κάθε κλώνο μια καλυπτρίδα. Τα κύτταρα σε αυτές τις καλυπτρίδες όταν βρίσκονται σε πληρότητα 80% (2-4 μέρες ανάλογα με την αποικία) μονιμοποιούνται για να ελεγχθούν μικροσκοπικά για να αποφασισθεί ποιές από αυτές τις αποικίες αξίζουν να φυλαχτούν – παρουσιάζουν φθορισμό και η GFP-hCINAP έχει σωστό ενδοκυττάριο εντοπισμό – και ποιές χρειάζονται περαιτέρω υποκλωνοποίηση (subcloning) για να φθάσουν σε ομογένεια > 95%.
9. Όλοι οι κλώνοι που κρίνονται σωστοί και θα φυλαχτούν μεταφέρονται με τρυψινοποίηση από το τρυβλίο των 12 κελιών σε τρυβλίο των 6 κελιών και στη συνέχεια σε 3 τρυβλία των 100 mm: το ένα για κρυοδιατήρηση των κυττάρων (στάδιο 0), το δεύτερο για διατήρηση κυτταροκαλιέργειας και το τρίτο για υποκλωνοποίηση

- όπου χρειάζεται (10 μl από αραιώση 1:5 από το τρυβλίο των 6 κελιών σε τρυβλίο των 100 mm).
10. Όταν τελικά ληφθεί ο κλώνος που μας ενδιαφέρει, μεγαλώνετε σε μικρότερη συγκέντρωση G418 (300 μg/ml) για διατήρηση του. Φυλάγονται κύτταρα σε τάστα χρονικά διαστήματα ώστε ανά πάσα χρονική στιγμή να υπάρχει η δυνατότητα, σε περίπτωση που συμβεί κάτι, να ανατρέξει κανείς σε αυτά. Η σταθερότητα του κάθε κλώνου διαφέρει και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί μετά από κάποιο χρονικό διάστημα να χαθεί ο φθορισμός.

2.3.8 Τεχνική του ανοσοφθορισμού

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των υπό εξέταση πρωτεϊνών σε κυτταροκαλλιέργεια τύπου HeLa. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στην υπό εξέταση πρωτεΐνη και ακολούθως ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο φέρει μια φθορίζουσα ομάδα και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε. Με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού είναι δυνατός ο εντοπισμός της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axiovert 200M, με ψηφιακή κάμερα AxioCam και λογισμικό AxioVision 4.2.

2.3.8.1 Μονιμοποίηση, διαπερατότητα και κάλυψη των κυττάρων

Παραλαμβάνονται οι καλυπτρίδες από τα τρυβλία στα οποία αναπτύσσονται κύτταρα κυτταροκαλλιέργειας, τα οποία έχουν καλύψει περίπου 50-70% της επιφάνειας του τρυβλίου ανάλογα με εκάστοτε πείραμα.

Υλικά:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 2X PHEM, pH 7.0: 130 mM PIPES, 60 mM HEPES, 20 mM EGTA, 4 mM MgCl₂. Το διάλυμα φιλτράρεται και χωρίζεται σε σωλήνες των 50 ml, οι οποίοι παγώνονται και ξεπαγώνονται ανά πείραμα.
2. 8% (w/v) παραφορμαλδεΐδη (PFA) σε ρυθμιστικό διάλυμα PHEM, pH 8.0 (για να διαλυθεί η PFA χρειάζεται θέρμανση). Το διάλυμα φιλτράρεται και χωρίζεται σε σωλήνες των 15 ml, οι οποίοι παγώνονται και ξεπαγώνονται ανά πείραμα.
3. Διάλυμα μονιμοποίησης: Αναμειγνύονται ίσοι όγκοι διαλυμάτων 2X PHEM και 8% PFA.

4. 0.5% (v/v) TritonX-100 σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X PHEM.
5. 0.2% (v/v) SDS σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X PHEM.
6. Ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
7. 50 mM NH₄Cl σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
8. 0.05% (v/v) Tween-20 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

2.3.8.1.1 Μέθοδος A (Κλασσικό πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA)

1. Οι καλυπτρίδες οι οποίες λαμβάνονται από τρυβλία στα οποία αναπτύσσεται κυτταροκαλλιέργεια, ξεπλένονται για απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού με στιγμιαία βύθιση τούς σε προθερμασμένο στους 37 °C διάλυμα PHEM και απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύματος με τοποθέτηση της άκρης τους σε χαρτομάντιλο.
2. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε τρυβλίο των 12 κελιών το οποίο περιέχει διάλυμα 4% (w/v) PFA/ 1X PHEM για 10 min, για μονιμοποίηση των κυττάρων.
3. Ακολουθεί έκπλυση τους τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα 1X PHEM για 5 min.
4. Κατόπιν, στα κελιά με τις καλυπτρίδες προστίθεται 1 ml διαλύματος 0.5% (v/v) Triton X-100 σε PHEM ή 0.2% (v/v) SDS σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X PHEM, για 10 min ώστε τα κύτταρα να γίνουν διαπερατά.
5. Ακολούθως οι καλυπτρίδες ξεπλένονται 2 φορές από 5 min με διάλυμα 1X PHEM.
6. Στη συνέχεια γίνεται κορεσμός (quenching) των κυττάρων για τον αυτο-φθορισμό, με 50 mM NH₄Cl σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 15 min.
7. Τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές από 5 min με διάλυμα PBS. Στο σημείο αυτό οι καλυπτρίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως για να σημανθούν με τα κατάλληλα αντισώματα για τις πρωτεΐνες-στόχους ή να φυλαχτούν στους 4 °C για μια εβδομάδα για μελλοντική χρήση.

2.3.8.1.2 Μέθοδος B [Πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA με προ-εκχύλιση (pre-extraction)]

[Συνήθως χρησιμοποιείται όταν η σήμανση γίνεται με πεπτιδικά αντισώματα (anti-peptide ab)]

1. Οι καλυπτρίδες οι οποίες λαμβάνονται από τρυβλία στα οποία αναπτύσσεται κυτταροκαλλιέργεια, ξεπλένονται για απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού με στιγμιαία βύθιση τούς σε προθερμασμένο στους 37 °C διάλυμα PHEM και απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύματος με τοποθέτηση της άκρης τους σε χαρτομάντιλο.

2. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε διάλυμα 0.5% (v/v) Triton-X σε 1X PHEM για μόνο 5 sec, ώστε τα κύτταρα να γίνουν διαπερατά και αμέσως μετά ξεπλένονται με στιγμιαία τοποθέτηση τους σε διάλυμα 1X PHEM.
3. Ακολούθως, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε τρυβλίο των 12 κελιών το οποίο περιέχει διάλυμα 4% (w/v) PFA/ 1X PHEM για 10 min, για μονιμοποίηση των κυττάρων και έπειτα ακολουθούνται τα στάδια 5-7 της Α μεθόδου.

2.3.8.2 Σήμανση με χρήση αντισωμάτων και τοποθέτηση των δειγμάτων σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου

Υλικά:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα κάλυψης 100%: 2% FCS (v/v), 2% BSA (w/v), 0.2% (v/v) ζελατίνη από δέρμα ψαριού σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
2. 5% (v/v) ρυθμιστικό διάλυμα κάλυψης σε PBS.
3. 0.05% (v/v) Tween 20 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
4. Ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
5. Πρώτα αντισώματα (2.4.1).
6. Δεύτερα αντισώματα (2.4.2).
7. Hoechst 33342, αρχικής συγκέντρωσης 10mg/ml (Sigma).
8. Mowiol με 100 μg/ml DABCO (antifading agent) (1,4 diazabicyclo-[2,2,2] octane).
9. Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου 26 x 76 mm (EUROTUBO[®] DELTALAB).

Μέθοδος:

1. Τα κύτταρα που βρίσκονται στις καλυπτρίδες αφού μονιμοποιηθούν και γίνουν διαπερατά (2.3.8.1) επωάζονται με το ρυθμιστικό διάλυμα κάλυψης (blocking mix) για 15-30 min ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων.
2. Οι καλυπτρίδες ξεπλένονται με 0.05% (v/v) Tween-20 σε PBS για 1 min.
3. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται κατάλληλα σε 5% (v/v) ρυθμιστικό διάλυμα κάλυψης (αν θα γίνει χρήση και ενός άλλου πρώτου αντισώματος από διαφορετικό είδος τότε γίνεται ταυτόχρονη επώαση).
4. Με το πέρας της επώασης ξεπλένονται τρεις φορές με 0.05% (v/v) Tween-20 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 3 min.

5. Ακολούθως επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου, το οποίο και πάλι αραιώνεται κατάλληλα σε 5% (v/v) ρυθμιστικό διάλυμα κάλυψης και έπειτα ξεπλένονται 2 φορές με 0.05% (v/v) Tween-20 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 min.
6. Στη συνέχεια, γίνεται σήμανση του DNA με διάλυμα χρωστικής Hoechst 33342, η οποία αραιώνεται διάλυμα PBS σε αναλογία 1:20000, για 1 min και ξεπλένονται μία φορά με 0.05% (v/v) Tween 20 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 min και μία φορά με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 min.
7. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται με την πλευρά που αναπτύχθηκαν τα κύτταρα πάνω σε μεγάλη αντικειμενοφόρο πλάκα για παρατήρηση με μικροσκοπία φθορισμού με χρήση Mowiol στη παρουσία DABCO, ο οποίος είναι παράγοντας που καθυστερεί τη διαδικασία ξεθωριάσματος επιτρέποντας τη μελέτη των δειγμάτων (antifading agent).
8. Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν και εξετάζονται με χρήση του ανεστραμμένου μικροσκοπίου φθορισμού Axiovert 200M (C. Zeiss) με μηχανική τράπεζα εργασίας. Οι εικόνες λαμβάνονται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Axioacam MRm μέσω του προγράμματος Zeiss Axiovision 4.3 και τυγχάνουν ψηφιακής ανάλυσης επεξεργασίας με τα προγράμματα Adobe Photoshop CS3 και Adobe Illustrator CS3.

2.3.9 Πειραματικοί χειρισμοί κυττάρων

Υλικά:

1. Κυτταροσειρά HeLa.
2. Σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP} (κλώνοι 33C και 62L).
3. Σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP}.
4. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM.
5. Διάλυμα D-PBS (Invitrogen).
6. Διάλυμα 2.5 mg/ml ακτινομυκίνης D (actD, Sigma).
7. Διάλυμα 5 mg/ml 5,6-διχλωρο-β-D-ριβοφουρανοσυλβενζιμιδαζολίου (DRB, Sigma).
8. Σορβιτόλη (Sigma).
9. Τρυβλία των 12 κελιών (IWAKI).
10. Αποστειρωμένες καλυπτρίδες (Marienfeld GmbH).
11. Συσκευή UV Stratalinker 2400 (Stratagene).

Μέθοδος:

2.3.9.1 Μεταγραφική καταστολή

1. Σε 4 τρυβλία των 12 κελιών, τοποθετούνται καλυπτρίδες και έπειτα κύτταρα από τις 4 κυτταροσειρές: HeLa, HeLa^{GFP} και HeLa^{GFP-hCINAP} (κλώνοι 33C και 62L), μετά από αραίωση κυττάρων που αναπτύσσονταν σε επωαστήρα (37 °C, 5% CO₂), έτσι ώστε την επόμενη μέρα τα κύτταρα να καλύπτουν το 40-50% της επιφάνειας του τρυβλίου.
2. Την επόμενη μέρα απομακρύνεται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό και στη θέση του προστίθεται καινούργιο στο οποίο προηγουμένως αραιώνεται είτε actD σε τελική συγκέντρωση 0.04 µg/ml και 1.0 µg/ml, είτε DRB σε τελική συγκέντρωση 25 µg/ml και 50 µg/ml.
3. Τα τρυβλία τοποθετούνται πίσω στον επωαστήρα για περίοδο 3 h.
4. Στη συνέχεια αναρροφείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS και έπειτα μονιμοποιούνται με PFA (2.3.8.1) στις καλυπτρίδες και σημαίνονται με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (2.3.8.2).

2.3.9.2 Ακτινοβολία UV-C

1. Σε τρυβλία των 12 κελιών, τοποθετούνται καλυπτρίδες και έπειτα κύτταρα από τις 4 κυτταροσειρές: HeLa, HeLa^{GFP} και HeLa^{GFP-hCINAP} (κλώνοι 33C και 62L), μετά από αραίωση κυττάρων που αναπτύσσονταν σε επωαστήρα (37°C, 5% CO₂), έτσι ώστε την επόμενη μέρα τα κύτταρα να καλύπτουν το 50-60% της επιφάνειας του τρυβλίου.
2. Την επόμενη μέρα το θρεπτικό υλικό συλλέγεται και κρατείται σε σωλήνες των 50 ml στους 37 °C και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS.
3. Το διάλυμα PBS απομακρύνεται με αναρρόφηση και τα τρυβλία με τα κύτταρα που θα τύχουν ακτινοβολία UV τοποθετούνται στη συσκευή UV Stratalinker 2400, όπου ακτινοβολούνται με λυχνία 254 nm στα 30 J/m², ενώ τα τρυβλία που θα χρησιμοποιηθούν ως αρνητικά δείγματα ελέγχου αφήνονται στο θάλαμο κάθετης ροής για το ίδιο χρονικό διάστημα.
4. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό που φυλάχτηκε τοποθετείται πίσω στο κάθε τρυβλίο και τα τρυβλία τοποθετούνται πίσω στον επωαστήρα.
5. Στις ενδεδειγμένες ώρες, 6 h, 8 h, 10 h και 24 h, συλλέγονται καλυπτρίδες τόσο από τα κύτταρα που υπέστησαν ακτινοβολία, όσο και από τα κύτταρα που δεν έτυχαν (αρνητικά δείγματα ελέγχου) και τα κύτταρα μονιμοποιούνται με PFA (2.3.8.1) και σημαίνονται με κατάλληλα αντισώματα (2.3.8.2).

2.3.9.3 Υπερωσμωτικό στρες

Πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία με τη διαδικασία της μεταγραφικής καταστολής (2.3.9.1) με τη διαφορά ότι στα κύτταρα προστίθεται καινούργιο πλήρες θρεπτικό υλικό στο οποίο έχει διαλυθεί σορβιτόλη σε τελική συγκέντρωση 0.5 M και τέλος τα κύτταρα μονιμοποιούνται σε χρόνο 1 h και 2 h.

2.3.10 Κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η Κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονικής ανίχνευσης.

Μία δέσμη φωτός (λείζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).

Υλικά:

1. Διάλυμα PBS.
2. 70% αιθανόλη.
3. Ιωδιούχο προπίδιο [propidium iodide (PI), 1 mg/ml stock]
4. RNase A (10 mg/ml stock) (Roche).
5. Σωλήνες των 15 ml.
6. Ειδικά φίλτρα κυττάρων (BD Biosciences).

7. Ειδικοί πλαστικοί σωλήνες με στρογγυλό πυθμένα για ανάλυση FACS (BD Biosciences).
8. Σύστημα κυτταρομετρίας ροής FACSVantage SE (BD Biosciences).

Μέθοδος:

1. Αναπτύσσεται κυτταροκαλλιέργεια σε εκθετική φάση (περίπου 1×10^6 κύτταρα) τύπου HeLa, είτε των σταθερά μετασχηματισμένων κυτταροσειρών, είτε κυττάρων που έχουν τύχει επιμόλυνσης με πλασμίδιο προηγουμένως.
2. Τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια θρυψίνης και τοποθετούνται σε σωλήνες των 15 ml, φυγοκεντρώνται στις 1000 rpm και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
3. Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται και ξεπλένονται σε 10 ml διαλύματος PBS, φυγοκεντρώνται στις 1000 rpm και απομακρύνεται και πάλι το υπερκείμενο.
4. Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται πολύ καλά σε 0.5 ml PBS, ώστε να επιτευχθεί αιώρημα με μονήρη κύτταρα.
5. Αμέσως, προστίθενται 5 ml παγωμένης 70% (v/v) αιθανόλης, αναμειγνύονται καλά και τοποθετούνται στους 4 °C για τουλάχιστο 2 h, ώστε τα κύτταρα να μονιμοποιηθούν.
6. Όταν το μηχάνημα ανάλυσης FACS είναι έτοιμο, τα κύτταρα φυγοκεντρώνται στις 1000 rpm, απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα ξεπλένονται με 10 ml PBS.
7. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνται στις 1000 rpm και απομακρύνεται όσο το δυνατό περισσότερο υπερκείμενο προσέχοντας να μην χαθούν κύτταρα.
8. Τα κύτταρα κάθε σωλήνα επαναδιασπείρονται πολύ καλά σε 1 ml διαλύματος PI (20 μl PI, 20 μl RNase και 960 μl PBS) και επωάζονται για 40 min στους 37 °C για να σημανθεί το DNA.
9. Τέλος τα κύτταρα φιλτράρονται με ειδικό φίλτρο, για να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα και τοποθετούνται σε ειδικούς κυκλικούς σωλήνες για την ανάλυση FACS.
10. Αφού ληφθούν τα δεδομένα για το κάθε δείγμα με το σύστημα κυτταρομετρίας ροής FACSVantage SE, πραγματοποιείται ανάλυση των δεδομένων για διασπορά του κυτταρικού κύκλου με το πρόγραμμα ModFit (Verity Software House).

2.3.11 Συγχρονισμός κυτταροσειράς HeLa

Υλικά:

1. Κυτταροσειρά HeLa.
2. Πλήρες θρεπτικό υλικό.
3. Διάλυμα PBS.
4. Διάλυμα Θυμιδίνη σε PBS.

Μέθοδος:

1. Αναπτύσσεται κυτταροκαλλιέργεια τύπου HeLa, σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM σε τρυβλία των 100 mm μέχρι πληρότητας περίπου 40%. Αναπτύσσονται 2 τρυβλία, ένα για ανοσοαποτύπωση κατά Western και ακόμη ένα για ανάλυση FACS, για κάθε χρονική στιγμή που θα ληφθούν δείγματα μετά τον συγχρονισμό της κυτταροκαλλιέργειας (12 σημειακά δείγματα ανά 2 h).
2. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε τρυβλίο διάλυμα θυμιδίνης, ώστε η τελική συγκέντρωση της να είναι στο θρεπτικό υλικό 2 mM.
3. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστήρα (37 °C, 5% CO₂) για 19 h (αυστηρό αυτό το χρονικό πλαίσιο).
4. Μετά την επώαση τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με διάλυμα PBS και προστίθεται καινούργιο πλήρες θρεπτικό υλικό χωρίς θυμιδίνη και τα τρυβλία τοποθετούνται και πάλι στον επωαστήρα για 9 h.
5. Έπειτα προστίθεται διάλυμα θυμιδίνης τελικής συγκέντρωσης 2 mM και τα τρυβλία επιστρέφονται στον επωαστήρα για ακόμα 16 h.
6. Τέλος τα κύτταρα ξεπλένονται και πάλι 3 φορές με διάλυμα PBS και προστίθεται καινούργιο πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα σε αυτό το σημείο έχουν συγχρονιστεί στη διαχωριστική φάση G1/S. Θα παραμείνουν συγχρονισμένα για περίπου 1-2 κυτταρικές διαιρέσεις και μετά θα ξαναεπιστρέψουν στην ασυγχρόνιστη μορφή τους.
7. Επομένως λαμβάνονται δείγματα ανά 2 h για τις επόμενες 24 h. Για κάθε χρονική στιγμή, ξεπλένεται ένα τρυβλίο με διάλυμα PBS και έπειτα παγώνεται το τρυβλίο και μελλοντική χρήση σε ανοσοαποτύπωση κατά Western (2.2.5) και ένα δεύτερο τρυβλίο τυγχάνει τη διαδικασία της μονιμοποίησης με 70% (v/v) αιθανόλη για την μελλοντική ανάλυση με τη μέθοδο FACS (2.3.10).

2.3.12 Μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα (in vivo πειράματα)

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια σειρά μεθόδων που επιτρέπουν την απεικόνιση και την μελέτη βιομορίων σε ζωντανά κύτταρα. Σε αυτό συντέλεσε κατά κύριο λόγο η ανακάλυψη και κλωνοποίηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (*Green Fluorescence Protein-GFP*, Prasher et al.1992), η οποία έδωσε ώθηση στη Κυτταρική Βιολογία και άνοιξε νέους ορίζοντες στην ανάλυση και κατανόηση της λειτουργίας των βιομορίων.

Το πλεονέκτημα της πρωτεΐνης GFP είναι ότι επιτρέπει τον άμεσο εντοπισμό των βιομορίων σε ζωντανά κύτταρα παρέχοντας ταυτόχρονα τοπικές και χρονικές πληροφορίες, δηλαδή τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης σε συνάρτηση με το χρόνο. Αυτό επιτυγχάνεται με σύζευξη της πρωτεΐνης GFP με το υπό μελέτη μόριο και έκφραση πλέον του υβριδικού μορίου στα υπό μελέτη κύτταρα. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε σταθερά μετασηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP}, όπου η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος (hCINAP) εκφραζόταν σταθερά συγχωνευμένη με την πρωτεΐνη GFP σε κύτταρα HeLa.

Υλικά:

1. Σταθερά μετασηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP} (κλώνοι 33C και 62L)
2. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM.
3. CO₂-ανεξάρτητο θρεπτικό υλικό χωρίς κόκκινο της φαινόλης (Invitrogen).
4. Τρυβλίο WillCo 35 mm με γυάλινο πυθμένα (Intracel).
5. Γυάλινος θάλαμος Lab-Tek (chambered cover glass) (Sigma).
6. Χρωστική Hoechst-33342 (bisbenzimidazole) για χρώση του DNA σε ζωντανά κύτταρα (Sigma).

Παρασκευάζεται αρχικό διάλυμα 5 mg/ml σε dH₂O και φυλάγεται στους 4 °C. Το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φορά με αραιώση 1:1000 από το αρχικό σε dH₂O (τελική συγκέντρωση 25 µg/ml) και από αυτό χρησιμοποιούνται 20 µl σε 2 ml θρεπτικού υλικού DMEM.

6. Καταδυτικό έλαιο (κεδρέλαιο) για φακούς (Applied Precision).

2.3.12.1 Μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (Time-lapse microscopy)

Μέθοδος:

1. Αναπτύσσεται σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP} (κλώνοι 33C και 62L) σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM που περιέχει 300 µg/ml G418.
2. Μια μέρα πριν το πείραμα, τα κύτταρα αραιώνονται με τη βοήθεια θρυψίνης και τοποθετούνται σε ποσοστό 30% σε τρυβλίο WillCo 35 mm με γυάλινο πυθμένα, ειδικό για μικροσκοπία πραγματικού χρόνου, σε 2 ml θρεπτικού υλικού.
3. Τη μέρα του πειράματος απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και προστίθενται 2 ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει 20 µl χρωστικής Hoechst-33342 και το τρυβλίο τοποθετείται πίσω στον επωαστήρα για 30 min, έτσι ώστε να σημανθεί το DNA ενώ τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά.
4. Στη συνέχεια απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση, και τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με 3 ml διαλύματος PBS.
5. Στο τρυβλίο προστίθενται 2 ml CO₂-ανεξάρτητου θρεπτικού υλικού χωρίς κόκκινο της φαινόλης στο οποίο έχει προστεθεί FBS και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και το τρυβλίο μεταφέρεται στον ειδικό γυάλινο θάλαμο του μικροσκοπίου, ο οποίος διατηρεί την θερμοκρασία στους 37 °C και το CO₂ σε ποσοστό 5%.
6. Τα κύτταρα τα οποία θα μπουν στον κυτταρικό κύκλο ανιχνεύονται με το χαρακτηριστικό μοτίβο του συμπυκνμένου DNA, επιλέγονται (περίπου 10 κύτταρα σε κάθε πείραμα) και φυλάγονται οι συντεταγμένες τους.
7. Το μικροσκόπιο ρυθμίζεται ώστε να λαμβάνει εικόνες κατά ταχτά χρονικά διαστήματα (περίπου κάθε 10 ή 20 min) για περίοδο 24 h, με μικρούς χρόνους έκθεσης ώστε το ποσό του φωτός που λαμβάνουν τα κύτταρα να είναι όσο το δυνατό λιγότερο, αλλά να επιτυγχάνεται επαρκής ευκρίνεια.

2.3.12.2 Επαναφορά Φθορισμού Μετά από Φωτολεύκανση (FRAP-Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Η πρωτεΐνη GFP έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς και σε μια άλλη σύγχρονη τεχνική, τη τεχνική της επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP). Η τεχνική FRAP παρέχει πληροφορίες που αφορούν την κινητικότητα των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εξάγουμε βιολογικά συμπεράσματα, όπως αν η υπό μελέτη πρωτεΐνη διαχέεται ελεύθερα μέσα στο κύτταρο, αν

αποτελεί μέλος ενός μεγαλύτερου συμπλόκου ή αν προσδένεται σταθερά σε υποκυτταρικές δομές ή στο DNA του κυττάρου.

Κατά τη μέθοδο αυτή, προκαλείται φωτολεύκανση λόγω υψηλής έντασης του λέιζερ σε μια μικρή περιοχή του πυρήνα φθορίζοντος ζωντανού κυττάρου και καταγράφεται η αύξηση της έντασης του φθορισμού (επαναφορά του φθορισμού) σε αυτή την περιοχή σε σχέση με το χρόνο. Θα πρέπει να τονισθεί ότι η φωτολεύκανση αφορά καταστροφή των μορίων GFP και όχι της συντηγμένης με αυτά πρωτεΐνης. Οπότε πλέον μέσα στο κύτταρο υπάρχουν δυο πληθυσμοί της πρωτεΐνης: μόρια πρωτεΐνης που φθορίζουν και μόρια πρωτεΐνης που δεν φθορίζουν.

Αν η υπό μελέτη πρωτεΐνη διαχέεται ελεύθερα μέσα στο κύτταρο, τότε αναμένεται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα ο φθορισμός να επανέλθει στα επίπεδα της αρχικής του έντασης στην περιοχή όπου έχει πραγματοποιηθεί η φωτολεύκανση λόγω ανταλλαγής των μορίων που δεν φθορίζουν με τα μόρια που φθορίζουν. Αν όμως η πρωτεΐνη λόγω συγκεκριμένης βιολογικής δράσης δεν διαχέεται ελεύθερα μέσα στο κύτταρο, τότε αναμένουμε να υπάρχει καθυστέρηση στο χρόνο που χρειάζεται για να επανέλθει ο φθορισμός στα αρχικά του επίπεδα. Αν δε η πρωτεΐνη προσδένεται πολύ σταθερά σε δομές του κυττάρου, τότε ενδέχεται να μην υπάρξει επαναφορά στα αρχικά επίπεδα φθορισμού (για το χρόνο που παρατηρούμε το φαινόμενο). Η διαφορά ανάμεσα στην αρχική ένταση του φθορισμού και στην ένταση που παρατηρείται μετά τη φωτολεύκανση και επαναφορά παρέχει την επιπρόσθετη πληροφορία του επί τοις εκατό ποσοστού της πρωτεΐνης η οποία είναι προσδεμένη με τη σταθερή αυτή δομή.

Μέθοδος:

1. Ακολουθούνται τα βήματα 1-5 της μεθόδου 2.3.12.2.
2. Αρχικά λαμβάνονται 3 εικόνες του κυττάρου, το οποίο επιλέγεται, πριν την φωτολεύκανση.
3. Έπειτα φωτολευκαίνεται μια συγκεκριμένη περιοχή περίπου στο 50% της αρχικής της έντασης (100% ισχύς του λέιζερ για διάρκεια 0.15 s), χρησιμοποιώντας την φωτοκινητική λειτουργία του μικροσκοπίου.
4. Στη συνέχεια λαμβάνονται οπτικές εικόνες κατά τη διάρκεια του χρόνου μετά τη φωτολεύκανση, με χρόνο έκθεσης 0.1 s για κάθε εικόνα, έτσι ώστε να γίνει παρακολούθηση της επαναφοράς του σήματος φθορισμού στην περιοχή που έχει φωτολευκανθεί.
5. Τέλος, χρησιμοποιείται το πρόγραμμα SoftWoRx για την απόκτηση της εικόνας και για τον υπολογισμό της έντασης του φθορισμού σε μια περιοχή που φωτολευκάνθηκε

και που δεν φωτολευκάνθηκε, πριν και μετά τη χρήση του λέιζερ. Από τα δεδομένα αυτά υπολογίζεται το κινητό κλάσμα της πρωτεΐνης και ο χρόνος $t_{1/2}$, ο οποίος αποτελεί το χρονικό διάστημα που απαιτείται η ένταση του φθορισμού να φτάσει στο 50% της τελικής.

2.3.12.3 Μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε στα *in vivo* πειράματα

Τα πειράματα μικροσκοπίας πραγματικού χρόνου και FRAP, πραγματοποιήθηκαν στο μικροσκόπιο DeltaVision Spectris wide-field deconvolution (Applied Precision), το οποίο ήταν εφοδιασμένο με τρισδιάστατη κινούμενη έδρα και θάλαμο ελέγχου της θερμοκρασίας και του CO₂ (Solent Scientific) και με δίοδο laser 488 nm (για φωτολεύκανση της GFP). Οι εικόνες συλλέχτηκαν χρησιμοποιώντας αποχρωματικό φακό 60x NA 1.4 Plan (Olympus) και μαγνητοσκοπήθηκαν με κάμερα CoolSNAP coupled-charge device (CCD) (Roper Scientific). Το μικροσκόπιο ελεγχόταν από την απεικόνιση SoftWorx και τα οπτικά δεδομένα έτυχαν επεξεργασία με εξειδικευμένο λογισμικό (deconvolution, Applied Precision), για υψηλής ευκρίνειας τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής. Γίνεται χρήση συγκεκριμένων φίλτρων απορρόφησης/εκπομπής (Chroma Technology), όπως φαίνονται στον Πίνακα 2.10, για τον διαχωρισμό των διαφορετικών φθοροφόρων σημάτων και για την μείωση του bleed-through των φασμάτων.

| ΦΙΛΤΡΑ | ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ | ΕΚΠΟΜΠΗ | ΦΘΟΡΟΦΟΡΟ |
|---------------|-------------------|----------------|-------------------------|
| DAPI/PC | 360/40 nm | 457/50 nm | DAPI, Hoechst No. 33342 |
| FITC/PC | 490/20 nm | 528/38 nm | Fluorescein; EGFP |
| RD-TR-PE/PC | 555/28 nm | 617/73 nm | Rhodamine; Texas red |
| CFP/JP4 | 436/10 nm | 470/30 nm | ECFP |
| YFP/JP4 | 500/20 nm | 535/30 nm | EYFP |

Πίνακας 2.10: Φίλτρα απορρόφησης/εκπομπής του μικροσκοπίου DeltaVision Spectris wide-field deconvolution

2.3.13 SILAC (stable isotope labeling of amino acids in culture) και φασματοσκοπία μάζας (MS)

Η τεχνική αυτή αποτελεί τον συνδυασμό της μεθόδου SILAC (stable isotope labeling of amino acids in culture) και της ποσοτικής πρωτεομικής ανάλυσης, με χρήση υψηλής ευκρίνειας φασματοσκοπίας μάζας (Trinkle-Mulcahy et al., 2006). Κατά τη μέθοδο αυτή οι πυρήνες των κυττάρων σημαίνονται με ραδιενεργά ισότοπα και στη συνέχεια πραγματοποιείται ανοσοκαταβύθιση και ανάλυση σε μεγάλη κλίμακα (high throughput) των λειτουργικών αλληλεπιδράσεων της υπό μελέτη πρωτεΐνης.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθοδολογίας είναι, πέρα από τη δυνατότητά της να ανακαλύπτει το σύνολο των αλληλεπιδράσεων μαζικά και ταυτόχρονα, η δυνατότητα ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων, η εξειδίκευση (αποφυγή ψευδώς θετικών αλληλεπιδράσεων λόγω της χρησιμοποίησης ως εσωτερικού ελέγχου αναφοράς διαφορεικά σημασμένης κυτταροκαλλιέργειας π.χ. *HeLa^{GFP}*) και η μεγάλη ευαισθησία της που επιτρέπει την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεγάλης ισχύος μεν, αλλά με πρωτεΐνες χαμηλής ενδοκυττάριας συγκέντρωσης, που συνήθως δεν είναι ανιχνεύσιμες με τις άλλες διαθέσιμες τεχνικές.

2.3.13.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

1. Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM (Invitrogen).
2. Διάλυμα PBS (Invitrogen).
3. Θερμικά απενεργοποιημένος εμβρυϊκός βόειος ορός - FBS (fetal bovine serum) μετά από διαπίδυση (GIBCO Invitrogen).
4. Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3) (Sigma).
5. Αντιβιοτικό 50 mg/ml G148.
6. Συσκευασία σκόνης του θρεπτικού υλικού Dulbecco's Modified Eagle's Medium (High Glucose, w/L-Glutamine, w/Sodium Pyruvate, w/o Sodium Bicarbonate) (Biowest). Η σκόνη διαλύεται σε ddH₂O υπό συνεχή ανάδευση, χωρίς θέρμανση και στη συνέχεια προστίθενται στο διάλυμα 3.7 g NaHCO_3 / L θρεπτικού υλικού που θα παρασκευασθεί και ρυθμίζεται το pH του σε 0.1-0.3 μονάδες κάτω από το επιθυμητό (pH 7.0). Έπειτα συμπληρώνεται ο τελικός του όγκος με προσθήκη νερού, φιλτράρεται αμέσως χρησιμοποιώντας φίλτρο με πόρους 0.22 μm και μεταφέρεται ασηπτικά σε αποστειρωμένο δοχείο.
7. Βασικά αμινοξέα: L-arginine, L-lysine, L-Methionine για το θρεπτικό υλικό ROKO (Sigma).

Παρασκευάζονται συγκεντρωμένα διαλύματα των τριών αμινοξέων (Arg0: 84 mg/ml, Lys0: 146 mg/ml και Met0: 30 mg/ml) σε PBS και έπειτα χωρίζονται σε σωλήνες των 0.5 ml και φυλάγονται στους -20 °C. Χρησιμοποιείται ένας σωλήνας από το κάθε αμινοξύ για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού R0K0 και ένας σωλήνας Met0 για έκαστο από τα ακόλουθα θρεπτικά υλικά: R6K6, R6K4 και R10K8.

8. Ισοτοπικά σημασμένα αμινοξέα L-Arginine:HCl (U-13C6, 98%) και L-Lysine-2HCl (U-13C6, 98%) για το θρεπτικό υλικό R6K6 (Cambridge Isotope Lab).

Τα ισότοπα παρασκευάζονται συγκεντρωμένα (Arg6: 84 mg/ml, Lys6: 146 mg/ml) σε PBS και έπειτα χωρίζονται σε σωλήνες των 0.5 ml και φυλάγονται στους -20 °C.

9. Διάλυμα αποσύνδεσης των κυττάρων (Invitrogen).

Δεν χρησιμοποιείται διάλυμα θρυψίνης στα πειράματα SILAC γιατί πιθανών να περιέχονται αμινοξέα.

10. Θρεπτικό υλικό SILAC:

| | |
|--|-----------------------|
| Σε 500 ml υγρού θρεπτικού υλικού προστίθενται: | 50 ml FBS |
| | 5.5 ml Pen/Strep |
| | 3 ml G418 (300 µg/ml) |
| | 0.5 ml Met0 |
| | 0.5 ml Arg (R0 ή R6) |
| | 0.5 ml Lys (K0 ή K6) |

Το διάλυμα αναμιγνύεται καλά, φιλτράρεται μέσω φίλτρου 0.22 µm με την βοήθεια αντλίας κενού και φυλάγεται στους 4 °C.

2.3.13.2 Καλλιέργεια και σήμανση κυτταροσειρών

Υλικά:

1. Σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP}
2. Σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP}
3. Θρεπτικά υλικά (2.3.13.1)
4. Τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες των 10 cm (IWAKI).
5. Τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες των 14 cm (IWAKI).

Μέθοδος:

1. Ξεπαγώνονται 2 σωλήνες με παγωμένα κύτταρα (2.3.2) από τις δύο σταθερά μετασχηματισμένες κυτταροσειρές HeLa^{GFP} και HeLa^{GFP-hCINAP}.

2. Όταν τα κύτταρα καλύψουν κατά 80% την επιφάνεια του τρυβλίου, ξεπλένονται με προθερμασμένο διάλυμα PBS και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά 0.5 ml διαλύματος αποσύνδεσης κυττάρων και αφήνονται 5 min στους 37 °C για να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα του τρυβλίου.
6. Στη συνέχεια προστίθεται μικρή ποσότητα υγρού θρεπτικού υλικού R0K0 και R6K6 στις κυτταροσειρές HeLa^{GFP} και HeLa^{GFP-hCINAP} αντίστοιχα και τα κύτταρα μαζεύονται σε σωλήνα των 15 ml.
7. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 4 min και απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε υγρό θρεπτικό υλικό R0K0 (1:10 αραιώση) ή R6K6 (1:2 αραιώση).
5. Τα κύτταρα αραιώνονται σε τρυβλία των 14 cm που περιέχουν 12 ml θρεπτικού υλικού R0K0 ή R6K6 και τοποθετούνται σε επωαστήριο με ατμόσφαιρα που περιέχει υγρασία και 5% CO₂.
5. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να αποκτηθούν 10 τρυβλία των 14 cm και τα κύτταρα να κάνουν 5 κύκλους στα θρεπτικά υλικά της SILAC, ώστε να σημανθούν κατάλληλα.

2.3.13.3 Απομόνωση πυρήνων

Υλικά:

1. **Διάλυμα A:** 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT.
 2. **Διάλυμα S1:** 0.25 M Sucrose, 10 mM MgCl₂.
 3. **Διάλυμα S2:** 0.35 M Sucrose, 0.5 mM MgCl₂.
 4. **Διάλυμα S3:** 0.88 M Sucrose, 0.5 mM MgCl₂.
- Όλα τα πιο πάνω διαλύματα περιέχουν 1X complete (Proteins inhibitors, Roche).
5. Διάλυμα PBS

Μέθοδος:

1. Αρχικά αναπτύσσεται κυτταροκαλλιέργεια τύπου HeLa σε 10 τρυβλία των 14 cm (περίπου 10⁷ κύτταρα ανά τρυβλίο).
2. 1 h πριν από την απομόνωση των πυρήνων, το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται από καινούργιο προθερμασμένο.

3. Τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με προθερμασμένο διάλυμα PBS και έπειτα προστίθεται σε αυτά 2 ml διαλύματος θρυψίνης και τοποθετούνται στον επωαστήρα για 2 min, έτσι ώστε τα κύτταρα να αποκολληθούν από τα τρυβλία.
4. Προστίθεται προθερμασμένο πλήρες θρεπτικό υλικό σε κάθε τρυβλίο, τα κύτταρα αναδιασπείρονται και συλλέγονται σε δύο σωλήνες των 50 ml.
5. Φυγοκεντρώνονται στις 1000 rpm στους 4 °C και το υπερκείμενο (θρεπτικό υλικό) απομακρύνεται με αναρρόφηση.
6. Τα κύτταρα ξεπλένονται 3X με παγωμένο διάλυμα PBS με φυγοκέντρηση στις 1000 rpm, στους 4 °C.
7. Μετά το τελευταίο ξέπλυμα με PBS, τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 5 ml του διαλύματος A και επωάζονται στο πάγο για 5 min. Τοποθετείται μια μικρή σταγόνα από το εναιώρημα σε ένα γυάλινο πλακίδιο και ελέγχεται κάτω από μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (phase contrast), Zeiss Axiovert 25. Τα κύτταρα θα πρέπει να διογκωθούν αλλά όχι να σπάσουν. Οι πυρηνίσκοι των θηλαστικών κυττάρων που καλλιεργούνται αποδιοργανώνονται στους 37 °C κάτω από υποτονικές συνθήκες (Zatsepina et al, 1997), για αυτό το λόγο το εναιώρημα διατηρείται στο πάγο κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου.
8. Στη συνέχεια μεταφέρεται το εναιώρημα των κυττάρων σε παγωμένο ομογενοποιητή των 7 ml (Wheaton Scientific Product) και πραγματοποιείται ομογενοποίηση για 10 φορές στο πάγο. Τα ομογενοποιημένα κύτταρα ελέγχονται και πάλι κάτω από το μικροσκόπιο αντίθετης φάσης. Η ομογενοποίηση σταματά όταν το >90% των κυττάρων έχει σπάσει και οι πυρήνες διακρίνονται.
9. Τα ομογενοποιημένα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα των 15 ml και φυγοκεντρώνονται στις 1000 rpm (218g) για 5 min στους 4 °C. Το ίζημα περιέχει εμπλουτισμένους πυρήνες, αλλά όχι σε υψηλή καθαρότητα.
10. Το ίζημα των πυρήνων επαναδιασπείρεται σε 3 ml του διαλύματος S1. Αν το ίζημα δε μπορεί να διαλυθεί τότε σημαίνει ότι οι πυρήνες έχουν λυθεί και η διαδικασία θα πρέπει να διακοπεί.
11. Στη συνέχεια προστίθενται προσεκτικά με την βοήθεια πιπέτας 3 ml του διαλύματος S2 στον πυθμένα του σωλήνα, ώστε να σχηματιστούν δύο διακριτά στρώματα των δύο διαλυμάτων, λόγω της διαφορετικής τους περιεκτικότητας σε σουκρόζη.
12. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500 rpm (1430 g) για 5 min στους 4 °C και το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά. Αυτό το βήμα έχει ως επακόλουθο την λήψη καθαρότερου πυρηνικού ιζήματος. Οι απομονωμένοι πυρήνες μπορούν να παγωθούν

με υγρό άζωτο και να φυλαχτούν στους -80 °C ή να λυθούν και να πραγματοποιηθεί απευθείας ανοσοκαταβύθιση (2.3.13.5).

2.3.13.4 Πρόσδεση αντισώματος με ομοιοπολικό τρόπο σε σφαιρίδια με μήτρα σεφαρόζης (protein G Sepharose beads)

Υλικά:

1. Σφαιρίδια με μήτρα σεφαρόζης (protein G Sepharose).
2. Αντίσωμα anti-GFP (Roche).
3. Διάλυμα PBS
4. Διάλυμα 0.1 M Βορικό νάτριο (sodium borate), pH 9 (Sigma).
5. DMP (dimethyl pimelimidate) (Sigma).
6. 50 mM γλυκίνη (glycine), pH 2.5 (Fluka).

Μέθοδος:

1. Τα σφαιρίδια σεφαρόζης (0.1 ml) ξεπλένονται 3 φορές με 1 ml PBS (10X τον όγκο τους) και επωάζονται σε σωλήνα Eppendorf των 1.5 ml με 500 µl PBS που περιέχει 2 mg/ml αντίσωμα έναντι-GFP, στους 4 °C, για 4 h ή για 16 h υπό συνεχή ανάδευση.
2. Μετά την επώαση τα σφαιρίδια ξεπλένονται 3 φορές με 1 ml PBS για να απομακρυνθεί το μη δεσμευμένο αντίσωμα και στη συνέχεια 2 φορές με 10X τον όγκο των σφαιριδίων (1 ml) με διάλυμα 0.1 M βορικού νατρίου pH 9.
3. Τα σφαιρίδια φυγοκεντρώνονται και επαναδιασπείρονται σε 1 ml διαλύματος 20 mM DMP/βορικού νατρίου και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα αυτό είτε παρασκευάζεται και φυλάσσεται στην κατάψυξη και χρησιμοποιείται μόνο μια φορά είτε παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα σφαιρίδια επαναδιασπείρονται εκ νέου σε 1 ml διαλύματος 20 mM DMP/βορικού νατρίου και επωάζονται και πάλι όπως και προηγουμένως.
5. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση, απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα σφαιρίδια ξεπλένονται 2 φορές με 1 ml διαλύματος 50 mM γλυκίνης, pH 2.5 και έπειτα αρκετές φορές με διάλυμα PBS.
6. Τέλος, προσθέτεται όγκος διαλύματος PBS ίσος με τον όγκο των σφαιριδίων (0.1 ml σφαιρίδια και 0.1 ml PBS) και φυλάγονται στους 4 °C.

2.3.13.5 Ανοσοκαταβύθιση

Υλικά:

1. Διάλυμα RIPA: 50 mM Tris pH 7.0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5% (v/v) Deoxycholate, 1X Complete EDTA free.
2. Συσκευή υπερήχων virsonic 600 (VirTis).

Μέθοδος:

1. Οι απομονωμένοι πυρήνες επαναδιασπείρονται σε 2 ml παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RIPA και τοποθετούνται σε πάγο για 30 min.
2. Πραγματοποιείται ολική λύση των κυττάρων με παλμούς υπέρηχων των 10 sec και ενδιάμεσα διαλείμματα των 10 sec μέσα σε πάγο για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση και η πρωτεόλυση του δείγματος. Λαμβάνεται δείγμα ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ελέγχεται κάτω από στερεοσκόπιο το σπάσιμο των πυρήνων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν το 90% των πυρήνων έχουν λυθεί.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min στους 4 °C.
4. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα και κρατείται στον πάγο.
5. Στη συνέχεια στο κάθε υπερκείμενο προστίθενται 50 μl σφαιριδίων Sepharose-G, τα οποία έχουν ξεπλυθεί 3 φορές προηγουμένως με διάλυμα RIPA.
6. Το υπερκείμενο με τα σφαιρίδια επώάζεται για 30 min, στους 4 °C, υπό συνεχή ανάδευση και στη συνέχεια οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται και το υπερκείμενο κρατείται σε καθαρό σωλήνα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται μη ειδικά στα σφαιρίδια, έτσι ώστε να μην παρεμποδίσουν την μετέπειτα διαδικασία.
7. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο κάθε δείγμα υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford.
8. Αναμειγνύονται ίσες ποσότητες ολικών πρωτεϊνών από τις δύο σταθερά μετασχηματισμένες κυτταροσειρές: HeLa^{GFP-hCINAP} και HeLa^{GFP} (κυτταροσειρά ελέγχου) και προστίθενται τα σφαιρίδια Sepharose-G στα οποία έχει προσδεθεί ήδη το αντίσωμα της GFP σε αυτά (2.3.13.4).
9. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση για 3 h, στους 4 °C, υπό συνεχή ανάδευση.
10. Μετά την πάροδο της επώασης τα σφαιρίδια με τα δεσμευμένα ανοσοσυμπλέγματα, φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα σφαιρίδια ξεπλένονται 3 φορές με 10X τον όγκο των σφαιριδίων με διάλυμα RIPA.
11. Στα σφαιρίδια προστίθενται 30 μl 5X ρυθμιστικού διαλύματος φορτώματος δειγμάτων (sample buffer) για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και βράζονται για 5 min.

2.3.13.6 Διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και χρώση του

Υλικά:

1. Πήκτωμα ακρυλαμιδίου 4–12% (NuPAGE Novex Bis-Tris).
2. Χρωστική Coomassie blue (Novex colloidal blue staining kit, Invitrogen)
3. Διάλυμα μονιμοποίησης: 40 ml dH₂O, 50 ml μεθανόλη και 10 ml οξικό οξύ.
4. Διάλυμα χρώσης: 55 ml dH₂O, 20 ml μεθανόλη, 20 ml χρωστική A και 5 ml χρωστική B που προστίθεται μετά.

Μέθοδος:

1. Το δείγμα φορτώνεται σε διαβαθμιζόμενο πήκτωμα ακρυλαμιδίου 4–12% και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα 200 V για 25 min (μέχρι να φτάσει στη μέση).
2. Στη συνέχεια το πήκτωμα βάφεται με τη χρωστική Coomassie blue. Για τη μείωση των επιμολύνσεων, όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένο τρυβλίο των 14 cm.
3. Το πήκτωμα τοποθετείται στο τρυβλίο που περιέχει διάλυμα μονιμοποίησης και αναδεύεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Έπειτα το διάλυμα αυτό απομακρύνεται και προστίθεται το διάλυμα χρώσης από το οποίο απουσιάζει η χρωστική B και αναδεύεται και πάλι για 10 min.
5. Μετά την πάροδο των 10 min προστίθεται η χρωστική B στο προϋπάρχον διάλυμα και το πήκτωμα αναδεύεται σε αυτό για 3 h.
6. Στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα χρώσης και προστίθενται 200 ml απιονισμένου νερού. Το πήκτωμα αφήνεται υπό ανάδευση το ελάχιστο για 7 h για να επιτευχθεί αποχρωματισμός του που θα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των πρωτεϊνικών μπαντών.

2.3.13.7 Εξαγωγή των πρωτεϊνικών μπαντών από το πήκτωμα

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα (Laminar Air Flow).

Υλικά:

1. Ειδικά φύλλα διαφάνειας.
2. Αποστειρωμένο τρυβλίο των 14 cm.
3. Αποστειρωμένης λεπίδα

4. Σωλήνες *Lobind Eppendorf*.

Μέθοδος:

1. Πριν την εξαγωγή των πρωτεϊνικών μπαντών το πήκτωμα σαρώνεται ώστε να υπάρχει εικόνα και να σημειωθεί σε αυτή που θα γίνει το κόψιμο του πηκτώματος. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, το πήκτωμα τοποθετείται μεταξύ δύο ειδικά φύλλα διαφάνειας, τα οποία προηγουμένως ξεπλένονται με dH_2O και στη συνέχεια τοποθετείται σε σαρωτή. Έπειτα το πήκτωμα επιστρέφεται στο τρυβλίο με το dH_2O .
2. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε καθαρό αποστειρωμένο τρυβλίο των 14 cm και με τη βοήθεια αποστειρωμένης λεπίδα κόβονται και απομακρύνονται τα αχρείαστα μέρη του (πάνω και κάτω μέρος και το δείγμα του μεγέθους αναφοράς).
3. Στη συνέχεια το πήκτωμα στη περιοχή του δείγματος κόβεται σε 5-12 τμήματα, ανάλογα με το προφίλ της χρώσης του πηκτώματος με το Coomassie blue. Τα τμήματα αυτά σημειώνονται στην εκτύπωση της σάρωσης.
4. Κάθε τμήμα από το πήκτωμα τεμαχίζεται σε μικρότερα τμήματα των 1X1 mm με διαφορετική αποστειρωμένη λεπίδα και τοποθετείται στον αντίστοιχο αριθμημένο σωλήνα *Lobind Eppendorf* με τη βοήθεια της σπάτουλας. Η διαδικασία αυτή πρέπει να πραγματοποιηθεί σύντομα γιατί με το πέρασμα του χρόνου, τα τμήματα του πηκτώματος γίνονται πιο κολλώδη και δυσκολεύουν τη διαδικασία.

2.3.13.8 Αποχρωματισμός των τμημάτων του πηκτώματος

Υλικά:

1. dH_2O .
2. Διάλυμα ακετυλονιτριλίου (CH_3CN , Sigma).
3. Διάλυμα 20 mM NH_4HCO_3 (Sigma).
4. Αντλία κενού.

Μέθοδος:

1. Σε κάθε σωλήνα, που περιέχει τα τμήματα του πηκτώματος, προστίθενται 300 μ l dH_2O και σείονται για 15 min. Στη συνέχεια προστίθενται 300 μ l CH_3CN και η διαδικασία συνεχίζεται για ακόμα 15 min.

2. Απομακρύνεται το υπερκείμενο με τη βοήθεια της πιπέτας (Τοποθετείται ένα tip P10 πάνω σε tip P1000, γιατί τα κομμάτια μπορούν να αναρροφηθούν με χρήση μόνο του tip P1000) και προστίθενται 300 µl διαλύματος 20 mM NH_4HCO_3 (Sigma) για 15 min.
3. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται εκ νέου 300 µl διαλύματος 20 mM NH_4HCO_3 / CH_3CN (50:50 v/v) για 15 min. Σε αυτό το σημείο τα τμήματα του πηκτώματος θα πρέπει να συρρικνωθούν και να φαίνονται αδιαφανή. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνεται.
4. Αν τα τμήματα του πηκτώματος συνεχίζουν να παρουσιάζουν μπλε χρώμα τότε επαναλαμβάνεται το στάδιο 3.
5. Προστίθενται 100 µl CH_3CN για 5 min, για την ενυδάτωση των τμημάτων του πηκτώματος, τα οποία θα πρέπει να συρρικνωθούν και να φαίνονται τελείως άσπρα.
6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα τμήματα του πηκτώματος ξηραίνονται σε αντλία κενού για περίοδο 5 min.

2.3.13.9 Αναγωγή/ Αλκυλίωση των πρωτεϊνικών τμημάτων πηκτώματος

Η αναγωγή και η αλκυλίωση των αμινοξικών καταλοίπων κυστεΐνης, με χρήση DTT και IAA αντίστοιχα, βελτιώνει την ανάκτηση των πεπτιδίων που περιέχουν κυστεΐνη κατά τη διάρκεια της πέψης των πρωτεϊνών στα τμημάτων του πηκτώματος και μειώνει την εμφάνιση άγνωστων μοριακών μαζών στην ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας (MS) λόγω δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών και τροποποιήσεων στην πλευρική αλυσίδα.

Υλικά:

1. Διάλυμα 1 M DTT (BDH).
2. Διάλυμα 100 mM NH_4HCO_3 .
3. Διάλυμα 1 M ιωδο-ακεταμιδίου (IAA) (Sigma).
4. Διάλυμα CH_3CN .

Μέθοδος:

1. Προστίθενται 50 µl/μπάντα πηκτώματος, διαλύματος 10 mM DTT σε 100 mM NH_4HCO_3 και επωάζεται για 1 h στους 56 °C.
2. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 50 µl/μπάντα πηκτώματος, διαλύματος 10 mM IAA σε 100 mM NH_4HCO_3 που παρασκευάζεται φρέσκο και επωάζεται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Τα τμήματα του πηκτώματος ξεπλένονται για 15 min υπό ανάδευση, με 300 μl διαλύματος 100 mM NH_4HCO_3 .
4. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα τμήματα του πηκτώματος ξεπλένονται υπό ανάδευση για 15 min με 300 μl διαλύματος 20 mM NH_4HCO_3 / CH_3CN (50:50 v/v).
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 100 μl διαλύματος CH_3CN για 5 min που σκοπό έχει την αφυδάτωση των τμημάτων του πηκτώματος.
6. Τέλος το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα τμήματα του πηκτώματος ξηραίνονται με χρήση αντλίας κενού υπό φυγοκέντρηση για 5 min.

2.3.13.10 Πέψη των πρωτεϊνικών μπαντών στα τμήματα του πηκτώματος

Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση της σερίνης, η οποία διασπά ειδικά πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξικών κατάλοιπων της λυσίνης και της αργινίνης. Όμως η διάσπαση μπορεί να αναχαιτιστεί ή να επιβραδυνθεί από γειτονικά οξικά ή αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα ή κατάλοιπα προλίνης, η οποία παρουσιάζει τη σημαντικότερη επίδραση. Επομένως, πεπτιδικά τμήματα που δεν έχουν διασπαστεί σε ένα σημείο είναι επικαλυπτόμενα και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη διάρκεια ανάλυσης μάζας.

Υλικά:

1. Ένζυμο Θρυψίνης (Gold, Promega).
2. Διάλυμα 20 mM NH_4HCO_3 .
3. Παρασκευάζεται διάλυμα θρυψίνης 0.5 μg/μl σε 20 mM NH_4HCO_3 και φυλάγεται στους -20°C .

Μέθοδος:

1. Σε κάθε σωλήνα, που περιέχει τμήμα του πηκτώματος, προστίθενται 0.5 μg θρυψίνης σε 20 μl διαλύματος 20 mM NH_4HCO_3 .
2. Οι σωλήνες επωάζονται για 30 min. Τα τμήματα του πηκτώματος θα αποκτήσουν το αρχικό τους μέγεθος και θα πρέπει να υπάρχει αρκετό διάλυμα θρυψίνης ώστε να καλύπτονται. Αν είναι απαραίτητο προστίθεται επιπλέον διάλυμα 20 mM NH_4HCO_3 χωρίς το ένζυμο, ώστε να καλύπτονται και σημειώνεται ο ακριβής όγκος που προστέθηκε ο οποίος θα χρειαστεί μετά κατά την εξαγωγή των πεπτιδίων.
3. Οι σωλήνες επωάζονται χωρίς ανάδευση, στους 30°C , για τη διάρκεια της νύχτας (> 16 h).

2.3.13.11 Εξαγωγή των πεπτιδίων

Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε πλατφόρμα που κινείται για να διαβεβαιωθεί η εξαγωγή των πεπτιδίων.

Υλικά:

1. CH₃CN.
2. 100% φορμικό οξύ (BDH).
3. Σκουρόχρωμοι σωλήνες με ειδικό πάμα για χρήση στο φασματογράφο μάζας (Kinesis).

Μέθοδος:

1. Σε κάθε σωλήνα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος CH₃CN με τον όγκο του διαλύματος πέψης του προηγούμενου σταδίου και οι σωλήνες επωάζονται στους 30 °C για 30 min.
2. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τα πεπτίδια που θα αναλυθούν, μεταφέρεται σε νέο καθαρό σωλήνα Eppendorf LoBind.
3. Σε κάθε σωλήνα με τα τμήματα του πηκτώματος προστίθενται 50 μl 1% (v/v) φορμικού οξέως (ή αρκετή ποσότητα ώστε να καλυφθούν τα τμήματα του πηκτώματος) και επωάζονται για 20 min.
4. Το υπερκείμενο μεταφέρεται στο σωλήνα του βήματος 2.
5. Στη συνέχεια επαναλαμβάνονται τα βήματα 3 και 4 για ακόμα μια φορά.
6. Έπειτα σε κάθε σωλήνα προστίθενται 150 μl CH₃CN και επωάζονται για 10 min. Τα τμήματα του πηκτώματος θα πρέπει να συρρικνωθούν και να πάρουν άσπρο χρώμα.
7. Το υπερκείμενο μεταφέρεται και πάλι στο σωλήνα του βήματος 2.
8. Οι σωλήνες του βήματος 2 τοποθετούνται σε φυγόκεντρη αντλία κενού στους 60 °C, μέχρι τα πεπτίδια που έχουν απομονωθεί να ξηραθούν τελείως.
9. Τέλος, επαναδιασπείρεται το «αόρατο» ίζημα σε 1% (v/v) φορμικού οξέως. Για να επιτευχθεί βέλτιστη διαλυτοποίηση των πεπτιδίων, αρχικά προστίθενται 10 μl 5% (v/v) φορμικού οξέως, ανάμιξη με vortex, και έπειτα προσθήκη 40 μl dH₂O. Οι σωλήνες με τα πεπτίδια φυλάγονται στην κατάψυξη.
10. Για την έγχυση στο φασματογράφο μάζας, τα πεπτίδια ξεπαγώνονται, φυγοκεντρούνται για 10 min στις 13000 rpm και μεταφέρονται 15-20 μl σε σκουρόχρωμο ειδικό σωλήνα με πάμα. Η υπόλοιπη ποσότητα φυλάγεται στην κατάψυξη.

2.3.13.12 Φασματοσκοπία μάζας και ανάλυση δεδομένων

Η ανάλυση των πεπτιδίων πραγματοποιείται με υψηλής ευκρίνειας φασματοσκοπική ανάλυση μάζας όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Andersen et al, 2005) χρησιμοποιώντας τον φασματογράφο LTQ-FT-ICR (Thermo Finnigan). Η αναλογία των πρωτεϊνών υπολογίζεται για κάθε αργινίνη που περιέχεται στο πεπτίδιο ως το πηλίκιο του εμβαδού της κορυφής [¹³C]/[¹⁵N]Arg δια της [¹²C]Arg για κάθε φάσμα μάζας. Η ανάλυση των δεδομένων της φασματοσκοπίας, η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των τρυπτικών πεπτιδίων, και συνεπώς του συνόλου των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την hCINAP, διεξάγεται με το λογισμικό MS-Quant σε συνδυασμό με τη βάση δεδομένων Mascot HTML database search files (Matrix Science).

2.4 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

2.4.1 Πρώτα αντισώματα

1. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι ολόκληρης της αλληλουχίας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His₆-hCINAP που παράχθηκε σε κουνέλι στις εγκαταστάσεις του EMBL (Santama et al., 2005), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική του ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:800 (ορός από τρίτη αφαίμαξη).
2. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι ολόκληρης της αλληλουχίας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης His₆-hCINAP που παράχθηκε σε κουνέλι στις εγκαταστάσεις του WTB από τον Dr. Stephen Org, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:1000 και στη τεχνική της ανοσοκαταβύθισης (3 μl από τον ορό της τρίτης αφαίμαξης).
3. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (anti-GFP) από ποντίκι (Roche), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:1000.
4. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του DNA-BD του μεταγραφικού παράγοντα GAL-4 (anti-DNA-BD_{GAL4}) από ποντίκι (Clontech), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:5000.
5. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τρανσφεράσης της S-γλουταθειόνης (anti-GST) από ποντίκι (Sigma), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:4000.

6. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης (anti- α -tubulin) από ποντίκι (Sigma, clone T5168), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:6000.
7. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της δυνείνης (anti-dynein) από ποντίκι (Santa Cruz), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:600.
8. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της β -ακτίνης (anti- β -actin) από ποντίκι (Sigma), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:5000.
9. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Cyclin A (anti-Cyclin A) από ποντίκι (κλώνος E23.1, Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:200.
10. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Cyclin B1 (anti-Cyclin B1) από ποντίκι (κλώνος V152, Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:400.
11. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Cyclin D1 (anti-Cyclin D1) από ποντίκι (κλώνος DCS-6, Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:200.
12. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεύδης (GAPDH) (anti-GAPDH) από ποντίκι (κλώνος 6C5, Santa Cruz), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:1000.
13. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της fibrillarin (anti-fibrillarin) από ποντίκι (κλώνος AFB01, tebu-bio), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:200.
14. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της coilin (anti-Coilin) από ποντίκι (κλώνος δ4, ευγενής παραχώρηση από την Δρα. Carmo-Fonseca), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:1000.
15. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της coilin (anti-Coilin) από ποντίκι (κλώνος 5P10, ευγενή παραχώρηση από τον Δρ. Angus Lamond, WTB), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:50.
16. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της SMN (anti-SMN) από ποντίκι (ευγενής παραχώρηση από τον Δρ. Angus Lamond, WTB), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:100.

17. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1a (anti-HIF-1a) από ποντίκι (κλώνος H1a 67, Santa Cruz), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:200.
18. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των συμπλόκων RNA-πρωτεϊνών (anti-Sm) από ποντίκι (κλώνος YI2, ευγενής παραχώρηση από τον Δρ. Angus Lamond, WTB), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:700.
19. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των συμπλόκων RNA-πρωτεϊνών (anti-Sm) από ποντίκι (κλώνος YI2, Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:250.
20. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PML (anti-PML) από ποντίκι (κλώνος PG-M3 (Santa Cruz), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε 1:100.
21. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της hnRNP U (anti-hnRNP U) από ποντίκι (κλώνος 3G6, Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:1000.
22. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της DNA-PKcs (anti-DNA-PKcs) από ποντίκι (κλώνος 18-2, Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:400.
23. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της DJ-1 (anti-DJ-1) από ποντίκι (κλώνος 3E8, MBL Medical & Biological Laboratories), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:200.
24. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της p14ARF (anti-p14ARF) από ποντίκι (κλώνος DCS-240, MBL Medical & Biological Laboratories), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:200.
25. Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της p14ARF (anti-p14ARF) από ποντίκι (κλώνος 14P02, Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:100.
26. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης hCINAP (anti-hCINAP) από κουνέλι, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:800 και στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:1000.
27. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PSP1 (anti-PSP1) από κουνέλι (κλώνος 48, ευγενής παραχώρηση από τον Δρ. Angus Lamond, WTB), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραιώση 1:250 και στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραιώση 1:5000.

28. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης coilin (anti-coilin) από κουνέλι (κλώνος 204/10, ευγενής παραχώρηση από τον Δρ. Angus Lamond, WTB), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοφθορισμού σε αραίωση 1:250.
29. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης SMC1 (anti-SMC1) από κουνέλι (Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραίωση 1:500.
30. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης SMC3 (anti-SMC3) από κουνέλι (Abcam), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραίωση 1:5000.
31. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης p14ARF (anti-p14ARF) από κουνέλι (κλώνος H-132, Santa Cruz), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραίωση 1:50.
32. Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PHD1 (anti-PHD1) από κατσίκι (κλώνος N-13, Santa Cruz), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε αραίωση 1:700.

2.4.2 Δεύτερα αντισώματα

2.4.2.1 Για ανοσοαποτύπωση κατά Western

1. Αντίσωμα έναντι της IgG του ποντικού, συνεζευγμένο με το ένζυμο HRP (Amersham-Pharmacia) σε πρόβατο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1: 6000.
2. Αντίσωμα έναντι της IgG του κουνελιού, συνεζευγμένο με το ένζυμο HRP (Roche) σε γάδαρο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1: 30000.
3. Αντίσωμα έναντι του IgG του κατσικιού, συνεζευγμένο με το ένζυμο HRP (Amersham-Pharmacia), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:6000.

2.4.2.2 Για ανοσοφθορισμό

1. Αντίσωμα έναντι της IgG του ποντικού σε κατσίκια συνεζευγμένο με Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:700.
2. Αντίσωμα έναντι του IgG του κουνελιού σε κοτόπουλο ή κατσίκια συνεζευγμένο με Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:600.
3. Αντίσωμα έναντι της IgG του ποντικού σε γαϊδούρι συνεζευγμένο με Alexa Fluor 555 (Molecular Probes), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:2000.

4. Αντίσωμα έναντι της IgG του κουνελιού σε γαϊδούρι συνεζευγμένο με Alexa Fluor 555 (Molecular Probes), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:1000.
5. Αντίσωμα έναντι της IgG του κουνελιού σε κατσίκα συνεζευγμένο με Alexa Fluor 568 (Molecular Probes), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:1500.
6. Αντίσωμα έναντι της IgG του ποντικού σε κατσίκα συνεζευγμένο με Alexa Fluor 350 (Molecular Probes), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:100.
7. Αντίσωμα έναντι της IgG του ποντικού σε κατσίκα συνεζευγμένο με Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:100.
8. Αντίσωμα έναντι της IgG του κουνελιού σε κατσίκα συνεζευγμένο με TRITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:500.

2.5 Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της PCR, στην παρούσα εργασία

| ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ | | |
|--------------------------|-----------------------------------|--|
| ΟΝΟΜΑ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3') | ΣΚΟΠΟΣ |
| VIII PCR5' | cggaattcatgttgetccgaacatcctg | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA της hCINAP στο πλασμίδιο pRSET _B |
| VIII PCR3' | acgcgtcgacttaagtagctagcctataag | |
| gTAF.3 | ccagactccatgatatccgatgatc | Για τον πολλαπλασιασμό ενός κομματιού cDNA της TAFDII ₃₂ (~150 bp) σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο VIII PCR5' |
| CIPFW_121 | cggaatgagaagagcaattgatgatgg | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του κομματιού 121- 550 nt του cDNA της hCINAP στο πλασμίδιο pAS2-1 σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο VIII PCR3 |
| CIPRV_329 | acgcgtcgacttcaagctcttcgtacaatac | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του κομματιού 1-329 nt του cDNA της hCINAP στο πλασμίδιο pAS2-1 σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο VIII PCR5' |
| CIPFW_204 | cggaattcgataaccaaatgagagaaggtgg | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του κομματιού 204-550 nt του cDNA της hCINAP στο πλασμίδιο pAS2-1 σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο VIII PCR5 |
| CIPFW_330 | cggaattcacaaggggttataatgagaagaaac | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του κομματιού 330-550 nt του cDNA της hCINAP στο πλασμίδιο pAS2-1 σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο VIII PCR5' |

| | | |
|------------------|----------------------------------|--|
| CIPFW-pACT2 | tccccggggatgttgettcgaacat | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA της hCINAP στο πλασμίδιο pACT2 |
| CIPRV-pACT2 | ccggaattcttaagtagctagccttataag | |
| COILFW-1 | catgccatggcagcttccgagacg | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA της coilin στο πλασμίδιο pAS2-1 |
| COILRV-1728 | cgggatccggcaggttctgtacttg | |
| COILRV-1086 | cgggatcctgcagctctgtgatag | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του κομματιού 1-1086 nt του cDNA της coilin στο πλασμίδιο pAS2-1 σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο COILFW-1 |
| COILRV-477 | cgggatccgctgacagctctgatctg | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του κομματιού 1-477 nt του cDNA της coilin στο πλασμίδιο pAS2-1 σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο COILFW-1 |
| COILFW-1084 | catgccatggcaggtgctgctgga | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του κομματιού 1084-1728 nt του cDNA της coilin στο πλασμίδιο pAS2-1 σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο |
| GAL4BDFW | tcatcggaagagagtagtaacaaaggtcaaag | Για την διαγνωστική αντίδραση ύπαρξης ενθέματος στο πλασμίδιο pAS2-1, σε συνδυασμό με ολιγονουκλεοτίδιο έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης |
| AD_UP | tataacgcgtttggaatcactaca | Για τον πολλαπλασιασμό του cDNA της περιοχής ενεργοποίησης (AD) του πλασμιδίου έκφρασης pACT2-1 |
| AD_DO | ttgccccgggttttcagtatctac | |
| PUMI_UP | tgaggtgtgccatgaac | Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του cDNA της PUMI στον άνθρωπο |
| PUMI_DO | cagaatgtgcttccatagg | |
| EGLN2-EcoRI (FW) | ggaattcatggacagcccgtgccagc | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA της EGLN ₂ στα πλασμίδια pGEX-4T-1 και pHAT ₂ |
| EGLN2-SalI (RV) | acgcgtcgacctaggtgggcgtagge | |
| EGLN2-XhoI (FW) | ccgctcgagatatggacagcccgtgcca | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA της EGLN ₂ στο πλασμίδιο DsRed ₂ C1 σε συνδυασμό με το ολιγονουκλεοτίδιο EGLN2-SalI (RV) |
| GAPDH-SalI (FW) | acgcgtcgacatggggaaggtgaagg | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA του GAPDH στα πλασμίδια DsRed ₂ C1 και pHAT ₂ |
| GAPDH-BamHI (FW) | cgggatccatggggaaggtgaagg | |
| GAPDH-BamHI (FV) | cgggatccttactccttgaggccat | Για τον πολλαπλασιασμό και την κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA του GAPDH στα πλασμίδια pGEX-4T-1 και pRSET _A |
| GAPDH-EcoRI (RV) | ggaattcttactccttgaggccatg | |
| GFP (FW) | ctctgaccaccctgacctac | Για την διάκριση υβριδικών cDNA συγχωνευμένα με το cDNA της πρωτεΐνης GFP |

| | | |
|----------|-----------------------|---|
| L19 (FW) | ggctgctcagaagataccgtg | Για τον πολλαπλασιασμό διαγνωστικού κομματιού του cDNA της L19 στον άνθρωπο |
| L19 (RV) | ggcgcttgcgtgcttccttgg | |

Πίνακας 2.11: Τα oligονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

ANNA MALEKKOY

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έκφραση των μεταγραφημάτων των hCINAP και TAFIID₃₂ σε διάφορους ιστούς

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η hCINAP και ο μεταγραφικός παράγοντας TAFIID₃₂, κωδικοποιούνται από δύο μεταγραφήματα που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του ίδιου γενετικού τόπου (TAF9), ο οποίος παρουσιάζεται συντηρημένος σε όλα τα θηλαστικά, αλλά όχι σε άλλα σπονδυλόζωα (ψάρια, αμφίβια), δηλώνοντας ότι οι δύο πρωτεΐνες είναι γενετικά αλλά όχι φυσικά συνδεδεμένες. Παραδόξως όμως, οι δύο αυτές πρωτεΐνες δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο γιατί η εκκίνηση της μετάφρασης τους πραγματοποιείται από διαφορετικά κωδικόνια ATG σε διαφορετικά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF).

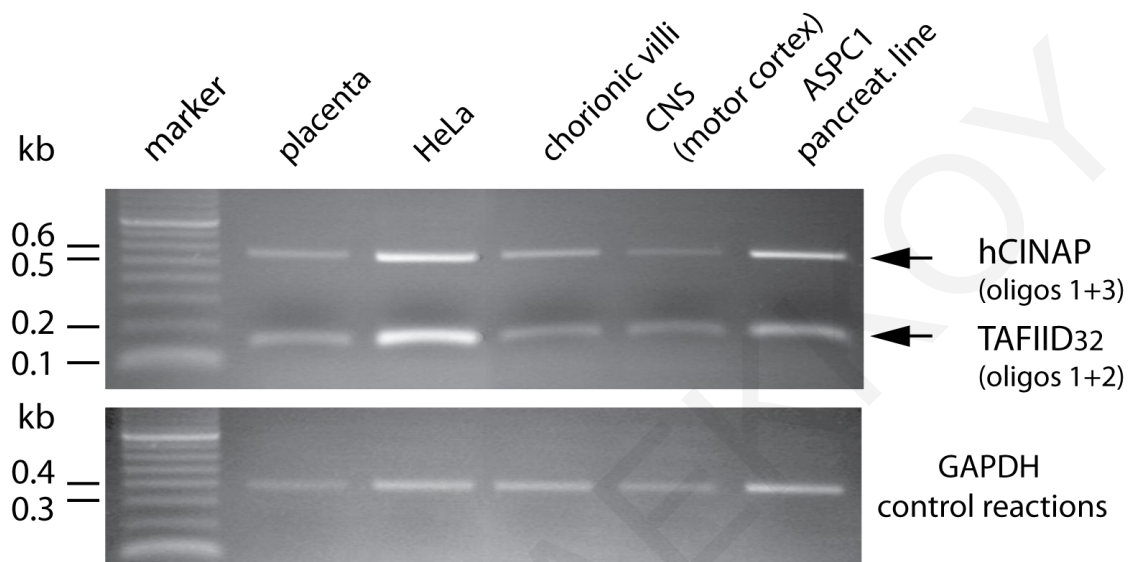
Για την διερεύνηση της συγκριτικής έκφρασης αυτών των δύο μεταγραφημάτων σε διάφορους ιστούς (πλακούντα, χοριονικές λάχνες και κινητικό φλοιό εγκεφάλου) και δύο ανθρώπινες κυτταροσειρές (HeLa και παγκρεατική κυτταροσειρά ASPC1) πραγματοποιήθηκε ημι-ποσοτική αντίστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) με χρήση κατάλληλων νουκλεοτιδίων για το κάθε μεταγράφημα.

Για τον αρχικό καθορισμό των συνθηκών της RT-PCR αντίδρασης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με χρήση πλασμιδιακών φορέων (pRSET_B-hCINAP και Topo-TAFIID₃₂) που έφεραν τα cDNA των δύο πρωτεϊνών, με χρήση κατάλληλων εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων (Πίνακας 2.11) που πολλαπλασίαζαν είτε το πλήρες cDNA της hCINAP (ολιγονουκλεοτίδια: PCR₅ και PCR₃), είτε ένα μέρος της αλληλουχίας (1-180 nt) στην περίπτωση της TAFIID₃₂ (ολιγονουκλεοτίδια: PCR₅ και gTAF), δίνοντας διαφορετικού διαγνωστικού μεγέθους προϊόντα.

Οι διαγνωστικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας την ίδια συγκέντρωση πλασμιδιακού DNA (20 ng) ως μήτρα και για τα δύο πλασμίδια, για 18, 23 και 28 κύκλους (Σχήμα 3.1, Παράρτημα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο εκθετικό μέρος της αντίδρασης (που επιτεύχθηκε μεταξύ 18-23 κύκλων), η συγκέντρωση των προϊόντων των δύο γονιδίων ήταν συγκρίσιμη.

Επειτα, πραγματοποιήθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες ημιποσοτική αντίδραση RT-PCR με τη χρήση cDNAs από διάφορους ιστούς και κύτταρα. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και αντιδράσεις εσωτερικού ελέγχου με τη χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων για το cDNA του γονιδίου της αφυδρογονάσης της 3-φώσφο-γλυκεριναλδεϋδης [Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)]. Τα αποτελέσματα (Σχήμα 3.2) έδειξαν ότι τα cDNA για την hCINAP και την TAFIID₃₂,

φαίνονται να εκφράζονται περίπου σε ισομοριακή αναλογία (1:1) σε κάθε ιστό ή κυτταροσειρά που μελετήθηκε.



Σχήμα 3.2: Έκφραση των μεταγραφημάτων των ισομορφών hCINAP και TAFIID₃₂. Αντίδραση RT-PCR αρχίζοντας με ισόποσα RNAs από διάφορους ανθρώπινους ιστούς και ανθρώπινες κυτταροσειρές με χρήση ειδικών εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων για τα cDNA των hCINAP και TAFIID₃₂.

3.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών hCINAP και coilin

Στόχος της παρούσας πειραματικής ενότητας ήταν κατά πρώτον η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης (protein-protein interaction) μεταξύ των δύο ανθρώπινων πυρηνικών πρωτεϊνών, hCINAP και coilin, και κατά δεύτερον η διερεύνηση και ο εντοπισμός των περιοχών των δύο πρωτεϊνών που είναι ικανές για την μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

3.2.1 Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών hCINAP και coilin

Όπως προαναφέρθηκε, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών coilin και hCINAP είχε αρχικά ανιχνευθεί με βάση προηγούμενη πειραματική εργασία κάνοντας χρήση της γενετικής μεθόδου των δύο υβριδίων σε σακχαρομύκητα (yeast two-hybrid system) (Santama et al, 2005). Η μέθοδος αυτή δεν εκλαμβάνεται όμως ως αδιαμφισβήτητη απόδειξη της αλληλεπίδρασης και κρίνεται αναγκαία η διερεύνηση και επιβεβαίωση αυτής της αλληλεπίδρασης με μια άλλη συμπληρωματική, ανεξάρτητη μέθοδο, η οποία να ενισχύει το εύρημα της αλληλεπίδρασης.

Αυτή η διερεύνηση/ επιβεβαίωση διεξήχθη με βιοχημικά *in vitro* πειράματα με τη μέθοδο της συν-επιλογής, η οποία βασίζεται στις αρχές της χρωματογραφίας χημικής συγγένειας (affinity chromatography). Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια της μια εκ των δύο πρωτεϊνών, που μελετούνται για την αλληλεπίδραση, για ειδικό υπόστρωμα (γλουταθειόνης) ή μέταλλο (Ni^{2+}) που βρίσκεται ομοιοπολικά προσδεδεμένο σε μήτρα αδρανούς υλικού (σφαιρίδια αγαρόζης). Η υψηλή αυτή συγγένεια της πρωτεΐνης για το υπόστρωμα οφείλεται σε ειδική αλληλουχία (επιτόπιο), που βρίσκεται στο 5' άκρο του κλωνοποιημένου γονιδίου της ετερόλογης πρωτεΐνης. Η μέθοδος προϋποθέτει τη συγχώνευση των δύο πρωτεϊνών με διαφορετικά κατάλληλα πρωτεϊνικά επιτόπια (epitope tagging), έτσι ώστε μόνο η μία εκ των δύο πρωτεϊνών να έχει συγγένεια με το υπόστρωμα της μήτρας για να εξασφαλίζεται η εγκυρότητα της αλληλεπίδρασης.

Για να είναι εφικτή η πραγματοποίηση των πειραμάτων της συν-επιλογής ήταν αναγκαία, η έκφραση των ανασυνδυασμένων γονιδίων της hCINAP και της coilin, σε ικανοποιητικά επίπεδα και σε διαλυτή μορφή. Η παραγωγή των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με χρήση κλασικών μεθόδων ετερόλογης έκφρασης σε βακτήρια.

Στη παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκαν τρεις ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς για την πρωτεΐνη coilin: pGEX-4T-1, pET32a+ και pHAT₂ και δύο ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς για την πρωτεΐνη hCINAP: pRSET_B και pGEX-4T-1. Με τη χρήση των πλασμιδίων pET32a+, pHAT₂ και pRSET_B η πρωτεΐνη εκφράζεται

συγχωνευμένη με το επιτόπιο 6-ιστιδινών (6xHis) στο αμινοτελικό της άκρο, ενώ στον pGEX-4T-1 η πρωτεΐνη εκφράζεται συγχωνευμένη με το επιτόπιο της τρανσφεράσης της S-γλουταθειόνης (GST- Glutathione-S-Transferase) στο αμινοτελικό της άκρο. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν ως ξενιστές δύο βακτηριακά στελέχη της *E.coli*: τα βακτήρια BL21 codonplus-DE3-RIL και τα βακτήρια BL21 LysS. Η μελέτη της έκφρασης και της διαλυτότητας της πρωτεΐνης coilin πραγματοποιήθηκε με χρήση και των δύο βακτηριακών στελεχών, ενώ η ίδια μελέτη για την πρωτεΐνη hCINAP πραγματοποιήθηκε μόνο με χρήση του βακτηριακού στελέχους BL21 codonplus-DE3-RIL. Τα επίπεδα της έκφρασης και της διαλυτότητας ελέγχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Στην περίπτωση της hCINAP, δεν υπήρχε περιορισμός στην επιλογή του πλασμιδίου που θα χρησιμοποιείτο, καθώς διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε αισθητή διαφορά στο επίπεδο έκφρασης και το ποσοστό διαλυτότητας με χρήση είτε του πλασμιδίου pRSET_B, είτε του pGEX-4T-1. Με βάση τις απαιτήσεις που προϋπήρχαν (έκφραση, διαλυτότητα και διαφορετικά επιτόπια) και τα ληφθέντα πειραματικά αποτελέσματα για την πρωτεΐνη coilin, που φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.1, ως καταλληλότεροι για την διεξαγωγή των πειραμάτων της συν-επιλογής κρίθηκαν οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς pET32α⁺-coilin στο βακτηριακό στέλεχος BL21 LysS και pGEX-4T-1-hCINAP στο βακτηριακό στέλεχος BL21 codonplus- DE3-RIL με προσθήκη του επαγωγέα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM, σε θερμοκρασία επαγωγής 25 °C για 3 h.

Εφόσον έγινε κατορθωτή η παραγωγή των δύο αυτών πρωτεϊνών, ακολουθήθηκε η περαιτέρω μελέτη τους με βιοχημικά πειράματα συν-επιλογής, που αποσκοπούσαν στην επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασής τους και διερεύνηση εν μέρει των συνθηκών κατά τις οποίες επιτυγχάνεται αυτή η αλληλεπίδραση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα, κατά τα οποία η επώαση των δύο πρωτεϊνών (αλληλεπίδραση τους) επιτυγχάνεται κάτω από διαφορετικές συνθήκες.

Κατά το πρώτο πρωτόκολλο, πραγματοποιήθηκε πρώτα δέσμευση της GST-hCINAP πάνω στο ειδικό υπόστρωμα της S-γλουταθειόνης των σφαιριδίων. Στη συνέχεια οι δύο πρωτεΐνες αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν με επώαση του ομογενοποιημένου διαλύματος της his-coilin με τα σφαιρίδια που είχαν ήδη δεσμευμένη την GST-hCINAP.

| Πλασμιδιακός φορέας | Αναμενόμενο μέγεθος υβριδικής πρωτεΐνης (kDa) | Βακτηριακό στέλεχος <i>E. coli</i> | <u>Έκφραση</u> | | <u>Διαλυτότητα</u> | | <u>Επιλογή για έκφραση της coilin</u> |
|-------------------------|---|------------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------|------------|---------------------------------------|
| | | | <i>SDS-PAGE</i> | <i>Western</i> | % Διαλυτή | % Αδιάλυτη | |
| pGEX-4T-1 | 92 | BL21-codonPlus (DE3)-RIL | Διακριτές μπάντες στο αναμενόμενο μέγεθος | Θετικό σήμα αναμενόμενου μεγέθους | 0 | 100 | |
| pET32a+ | 78.7 | BL21-codonPlus (DE3)-RIL | Μη διακριτές μπάντες | Θετικό σήμα αναμενόμενου μεγέθους | 95 | 5 | |
| | | BL21 LysS | Μη διακριτές μπάντες | Θετικό σήμα αναμενόμενου μεγέθους | 100 | 0 | √ |
| pHAT₂ | 66.7 | BL21-codonPlus (DE3)-RIL | Μη διακριτές μπάντες | Θετικό σήμα αναμενόμενου μεγέθους | 95 | 5 | |
| | | BL21 LysS | Μη διακριτές μπάντες | Θετικό σήμα αναμενόμενου μεγέθους | 100 | 0 | |

Πίνακας 3.1. Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων για την έκφραση και την διαλυτότητα της πρωτεΐνης coilin στα τρία πλασμιδιακά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν

Κατά το δεύτερο πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε αρχικά η επώαση των δύο πρωτεϊνών με επώαση των ομογενοποιημένων διαλυμάτων τους (υπερκειμένου), και έπειτα επιδιώχθηκε η πρόσδεση των δύο πρωτεϊνών υπό μορφή συμπλόκου στο υπόστρωμα των σφαιριδίων με επώαση του διαλύματος αυτού με τα σφαιρίδια S-γλουταθειόνης. Το σύμπλοκο αυτό δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια λόγω της ειδικής συγγένειας που παρουσίαζε η GST-hCINAP για το υπόστρωμα.

Στο τρίτο πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε στο πρώτο πρωτόκολλο με τη μόνη διαφορά ότι η ήδη δεσμευμένη GST- hCINAP αποδιατάχθηκε με τη χρήση διαλύματος 1M Guanidium-HCl και έπειτα με χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος η πρωτεΐνη επαναδιατάχθηκε, πριν να πραγματοποιηθεί η επώαση της με την his-coilin.

Παράλληλα, σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό δείγμα αναφοράς η επώαση των ομογενοποιημένων βακτηριακών ιζημάτων του πλασμιδίου pGEX-4T-1 (χωρίς ενσωματωμένο το cDNA της hCINAP) και της υβριδικής πρωτεΐνης his-coilin.

Επιπλέον, επειδή η hCINAP φέρει στο άμινο-τελικό της άκρο μοτίβο πρόσδεσης ATP, κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί το κατά πόσο η αλληλεπίδραση εξαρτάτο από την ύπαρξη ή όχι της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Για το λόγο αυτό στα πειράματα που διεξήχθησαν, και στα τρία πρωτόκολλα, πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα τέσσερις επωάσεις με διαφορετική συγκέντρωση ATP (0, 1, 2 και 3mM).

Για κάθε ενότητα πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν συνεπώς έξι επωάσεις: τέσσερις επωάσεις των GST-hCINAP και his-coilin, όπου η καθεμία περιείχε διαφορετική συγκέντρωση ATP (0-3 mM), και δύο επωάσεις των his-coilin και pGEX-4T-1, όπου η μια περιείχε 0 mM και η άλλη 2 mM ATP (ως αρνητικά δείγματα αναφοράς). Αυτά τα έξι δείγματα καθώς και τα δείγματα του αδέσμευτου υπερκειμένου (input), προετοιμάστηκαν για ανάλυση. Κάθε δείγμα χωρίστηκε σε δύο ισόποσα μέρη και αναλύθηκε σε δύο πηκτώματα ακρυλαμιδίου στα οποία διενεργήθηκε ηλεκτροφόρηση παράλληλα. Στο ένα εκ των δύο πηκτωμάτων πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος αντί-coilin δ4, ενώ στο άλλο ηλεκτροφόρημα, η hCINAP μπορούσε να ανιχνευθεί απευθείας με χρώση του με Coomassie, έτσι με το ηλεκτροφόρημα και το αυτοραδιογράφημα, είναι δυνατή η ανίχνευση των υβριδικών πρωτεϊνών GST-hCINAP και his-coilin αντίστοιχα.

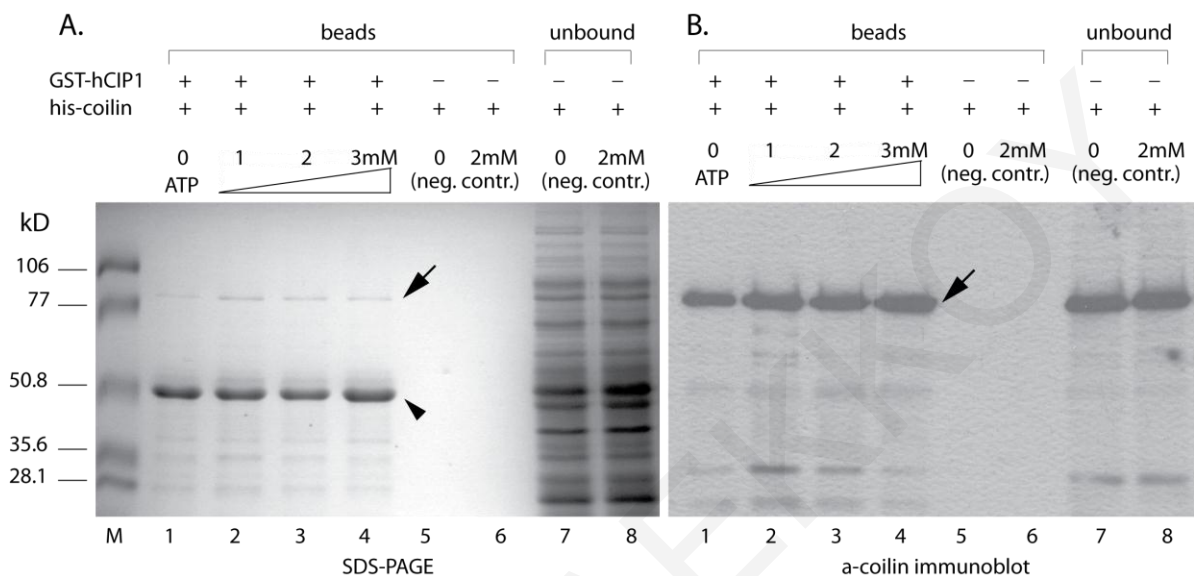
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις τρεις πειραματικές πορείες που ακολουθήθηκαν, αλληλεπίδραση ανιχνεύθηκε με τα πρωτόκολλα 1 και 2 (από τα οποία το πρωτόκολλο 2 παρουσίαζε αυξημένη ευαισθησία), ενώ το τρίτο πρωτόκολλο δεν παρουσίασε καμία ένδειξη για την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

Στο ενδεικτικό ηλεκτροφόρημα (Πρωτόκολλο 2, Σχήμα 3.3 A) είναι διακριτές έντονες μπάντες στο αναμενόμενο μέγεθος (46 KDa) στα 4 πρώτα δείγματα της επώασης, οι οποίες αντιστοιχούν στην υβριδική πρωτεΐνη GST-hCINAP, ενώ στα 2 αρνητικά δείγματα, όπως αναμένεται, δεν υπάρχουν αντίστοιχες μπάντες. Επιπλέον υπάρχουν διακριτές μπάντες που αντιστοιχούν στην αναμενόμενη μάζα (78.7 KDa) της υβριδικής πρωτεΐνης his-coilin και στα 4 αυτά δείγματα της επώασης.

Στο αντίστοιχο αυτοραδιογράφημα του ίδιου πειράματος (Σχήμα 3.3 B) διαπιστώνονται έντονα θετικά σήματα στα 4 δείγματα της επώασης, που συμπίπτουν με τις παρατηρούμενες στο ηλεκτροφόρημα μπάντες της υβριδικής πρωτεΐνης his-coilin, ενώ δεν υπάρχουν θετικά σήματα στα δύο αρνητικά δείγματα.

Όσον αφορά το ρόλο που διαδραματίζει η παρουσία της συγκέντρωσης του ATP στη πορεία της αλληλεπίδρασης, φάνηκε από τα προκύπτοντα πειραματικά αποτελέσματα, ότι η παρουσία του δεν ήταν απαραίτητη προϋπόθεση για την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών. Στα δείγματα που μελετήθηκαν, τα οποία περιείχαν διαφορετική συγκέντρωση ATP (0-3mM), δε παρατηρήθηκε δραστικά αισθητή διαφορά στο αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης όπως αυτό εξάχθηκε από την ένταση των σημάτων που λήφθηκαν στο αυτοραδιογράφημα. Αξιοπρόσεκτο είναι επίσης το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών είναι το ίδιο σημαντική στη παρουσία ή όχι του ATP.

Τα πιο πάνω αποτελέσματα θεμελιώνουν το εύρημα ότι οι δύο πρωτεΐνες, hCINAP και coilin, αλληλεπιδρούν και επιβεβαιώνεται με αυτό τον τρόπο το αποτέλεσμα που λήφθηκε από τα προηγούμενα πειράματα που διεξάχθηκαν με τη μέθοδο των δύο υβριδίων σε σακχαρομύκητα.



Σχήμα 3.3: Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών hCINAP και coilin.

A: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά από χρώση με Coumassie blue και ανίχνευση της υβριδικής πρωτεΐνης GST-hCINAP (κεφάλι βέλους) και coilin (βέλος), μετά από καταβύθιση των συμπλεγμάτων σε σφαιρίδια γλουταθειόνης. Εξετάστηκαν 4 δείγματα σφαιριδίων με διαφορετική συγκέντρωση ATP (0-3 mM), καθώς επίσης και 2 αρνητικά δείγματα σφαιριδίων (επώαση his-coilin με pGEX χωρίς GST-hCINAP), όπως και τα αδέσμευτα υπερκείμενα της επώασης των δειγμάτων αυτών.

B: Το αντίστοιχο αυτοραδιογράφημα κατά Western, για την ανίχνευση της υβριδικής πρωτεΐνης his-coilin, μετά από επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα δ4 anti-coilin. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η coilin είναι ανιχνεύσιμη στα σφαιρίδια μόνο στην παρουσία της GST-hCINAP και ότι η αλληλεπίδραση δεν εξαρτάται από την παρουσία ή όχι του ATP.

3.2.2 Χαρακτηρισμός αλληλεπίδρασης

Για τη διερεύνηση και τον εντοπισμό των επιμέρους περιοχών των δύο πρωτεϊνών, hCINAP και coilin, που είναι αναγκαίες και ικανές για την μεταξύ τους αλληλεπίδραση, κατασκευάστηκαν διαδοχικά τμήματα των δύο πρωτεϊνών και ελέγχθησαν με τη μέθοδο Y2H για την αλληλεπίδραση με την πλήρη αλληλουχία της άλλης πρωτεΐνης.

3.2.2.1 Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης της coilin με την hCINAP

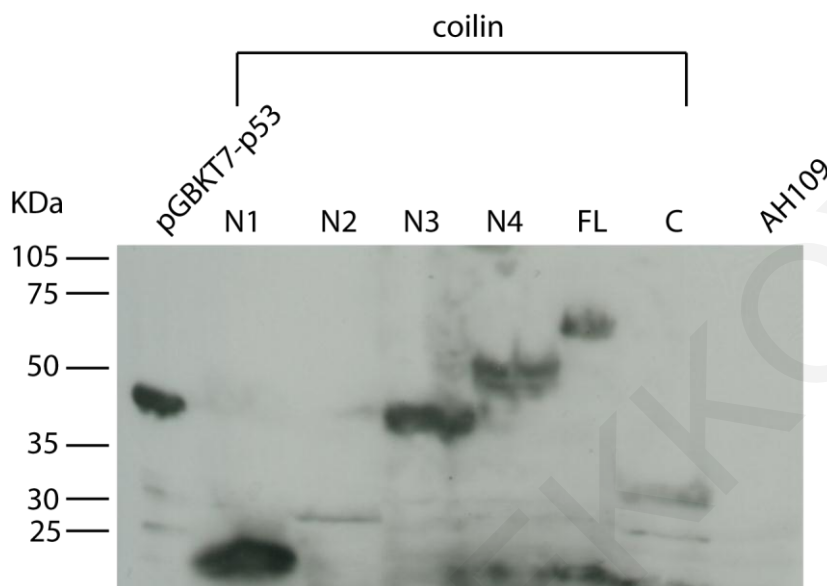
Για τη δημιουργία των διάφορων τμημάτων της coilin χρησιμοποιήθηκε είτε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), για τον πολλαπλασιασμό του αντίστοιχου πιστού αντίγραφου του κάθε τμήματος, με χρήση κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδίων (Πίνακας 3.2, Παράρτημα) και ως μήτρα το πλασμίδιο pHAT₂-coilin, είτε ενδονουκλεολυτική διάσπαση του πλασμιδιακού φορέα pHAT₂-coilin με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που διασπούσαν σε εσωτερικές θέσεις την coilin.

Κατασκευάστηκαν έξι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς pAS2-1-coilin, όπου ο κάθε ένας είχε ενσωματωμένο διαφορετικό τμήμα του cDNA της coilin, συγχωνευμένο με την περιοχή BD (Σχήμα 3.5). Το πώς προέκυψαν τα διάφορα τμήματα φαίνονται στον Πίνακα 3.2 (Παράρτημα). Αντίστοιχα, για τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pACT₂-hCINAP που περιείχε το πλήρες cDNA της hCINAP συγχωνευμένο με την περιοχή AD, χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχη διαδικασία.

Οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς που προέκυψαν, μετασχηματίστηκαν στο στέλεχος του ζυμομύκητα AH109 (2.1.1.4) και εξετάστηκαν πρώτα για τυχόν (ανεπιθύμητη) αυτοενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς, ώστε να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητα τους για χρήση στο εν λόγω σύστημα διυβριδισμού. Ο έλεγχος αυτός ανέδειξε ότι όλα τα τμήματα της πρωτεΐνης coilin δυστυχώς ενεργοποιούσαν τη μεταγραφική δραστηριότητα του GAL4 (αυξοτροφία και ενεργοποίηση του lacZ γονιδίου) και έτσι κρίθηκε αναγκαία η χρήση άλλου πλασμιδιακού φορέα (pGBKT7) στον οποίο κλωνοποιήθηκαν τα τμήματα της coilin. Ο έλεγχος αυτή τη φορά ήταν αρνητικός και συνεχίστηκε η διαδικασία.

Στη συνέχεια, για να διαπιστωθεί η έκφραση του κάθε τμήματος της πρωτεΐνης στα κύτταρα του ζυμομύκητα, παρασκευάστηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μέσω καταβύθισης με τριγλωροοξικό οξύ (2.1.1.5). Τα πρωτεϊνικά αυτά δείγματα, μαζί με θετικό (pGBKT7-53) και αρνητικό (μόνο το στέλεχος AH109) δείγμα αναφοράς, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και στη συνέχεια με ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της περιοχής GAL4-DBD (1-144 αα). Το

ανοσοαποτύπωμα αυτό έδειξε ότι και τα 6 τμήματα της coilin εκφράζονταν ικανοποιητικά στο στέλεχος του ζυμομύκητα AH109 (Σχήμα 3.4).

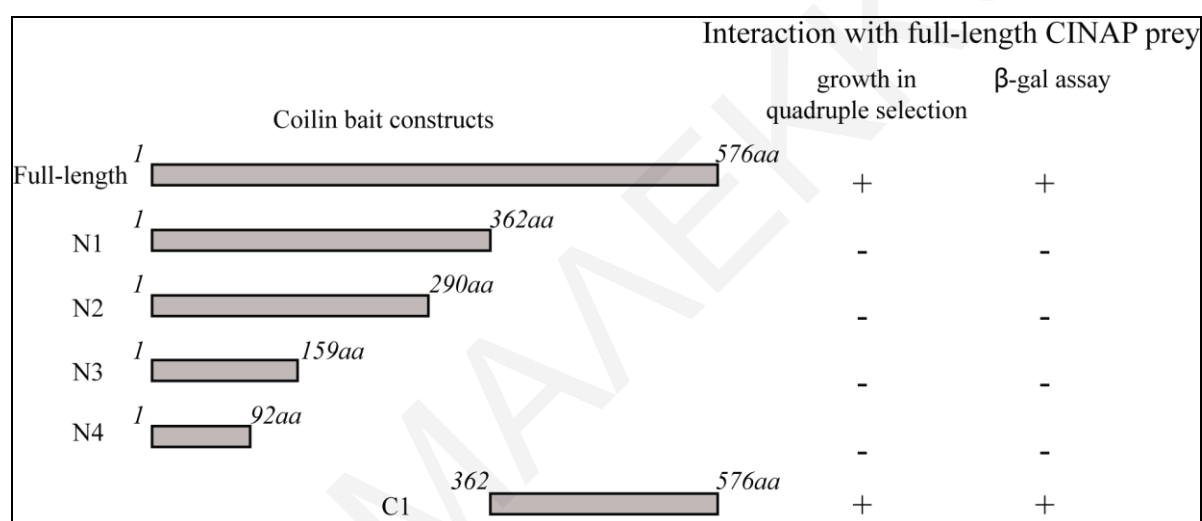


Σχήμα 3.4: Έκφραση των διάφορων τμημάτων της coilin ως υβρίδια με το DBD στο στέλεχος AH109. Στο αυτοραδιογράφημα κατά Western παρουσιάζονται μπάντες στα αναμενόμενα μεγέθη που αντιστοιχούν στα 5 διαφορετικά τμήματα της coilin (N1, N2, N3, N4 και C), καθώς και στην πλήρη πρωτεΐνη (FL). Ως θετικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGBKT7-p53 και ως αρνητικό το στέλεχος AH109.

Για να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση κάθε ενός τμήματος με την hCINAP, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος μετασχηματισμός κάθε ενός από αυτά μαζί με το πλασμίδιο pACT₂-hCINAP, στο στέλεχος του ζυμομύκητα AH109. Αρχικά, τα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα μεγάλωσαν σε διπλό μέσο επιλογής (SD/-Trp, -Leu), για επιλογή των κλώνων που περιείχαν και τα δύο πλασμίδια αντίστοιχα και στη συνέχεια οι κλώνοι που αναπτύχθηκαν μεταφέρθηκαν σε τετραπλό μέσο επιλογής (-QDO) και μετά από πάροδο 4 ημερών πραγματοποιήθηκε αντίδραση β-γαλακτοσιδάσης, ενδεικτική της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου ελέγχου. Αλληλεπίδραση ορίστηκε η ικανότητα των διπλά μετασχηματισμένων κλώνων να παρουσιάζουν αυξοτροφία στο τετραπλό μέσο επιλογής και ταυτόχρονα να δίδουν θετική μπλε χρωματική αλλαγή στην αντίδραση της β-γαλακτοσιδάσης. Στη διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκαν παράλληλα όλα τα απαραίτητα πειράματα αρνητικού ελέγχου.

Τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής διαδικασίας, όπως φαίνονται στο Σχήμα 3.5, φανέρωσαν ότι μόνο ο συνδυασμός του καρβοξυτελικού άκρου των 215 αμινοξέων

της coilin (C1: 362-576 aa) μαζί με την πλήρη αλληλουχία της hCINAP ήταν ικανός να εμφανίσει αλληλεπίδραση, εκτός από τον συνδυασμό των πλήρων cDNA των δύο πρωτεϊνών, που ήταν αναμενόμενος (θετικός έλεγχος). Επομένως, αναδείχθηκε ότι η απαραίτητη περιοχή για την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών εντοπίζεται στα τελευταία 215 καρβοξυτελικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης coilin. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό αποτέλεσμα γιατί έχει ήδη δειχθεί σε πρόσφατες μελέτες (βλ. Εισαγωγή) ότι το καρβοξυτελικό άκρο της coilin μπορεί να επηρεάζει τη συγκρότηση των σωματιδίων Cajal καθώς και τον αριθμό τους ανά πυρήνα.

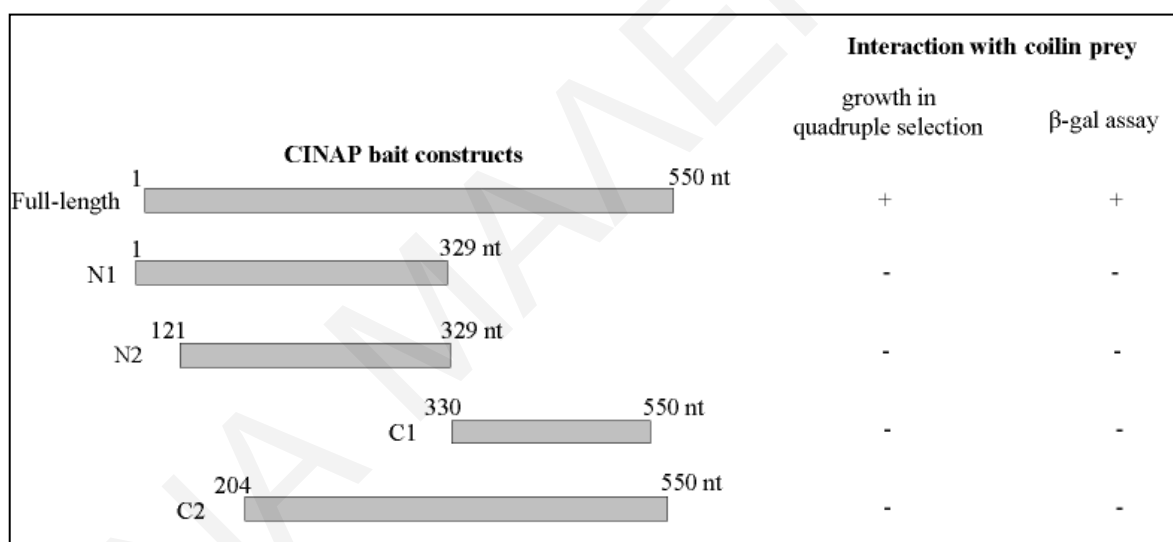


Σχήμα 3.5: Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης της coilin με την hCINAP.

Μέθοδος των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα με ταυτόχρονο μετασχηματισμό στο στέλεχος AH109 του πλήρους cDNA της hCINAP, με ένα από τα επιμέρους τμήματα της coilin (N1, N2, N3, N4 και C1) που παρουσιάζονται σχηματικά στο αριστερό τμήμα του σχήματος. Αλληλεπίδραση ορίστηκε η ικανότητα των διπλά μετασχηματισμένων κλώνων να παρουσιάζουν αυξοτροφία στο τετραπλό μέσο επιλογής και να δίνουν μπλε χρωματική αλλαγή στην αντίδραση β-gal.

3.2.2.2 Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης της hCINAP με την coilin

Για τον εντοπισμό της αντίστοιχης περιοχής της hCINAP, η οποία είναι αναγκαία για την αλληλεπίδραση με την coilin, πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και προηγουμένως. Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε το πλήρες cDNA της πρωτεΐνης coilin κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα pACT₂ και διάφορα τμήματα της hCINAP (Πίνακας 3.3, Παράρτημα), κλωνοποιημένα στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7. Τα αποτελέσματα (Σχήμα 3.6) δεν οδήγησαν σε θετικό αποτέλεσμα για κανένα από τα επιμέρους τμήματα παρά μόνο για την πλήρη αλληλουχία της hCINAP. Η επιλογή στο τετραπλό μέσο ήταν αρνητική, δηλώνοντας είτε ότι η πλήρης αλληλουχία της hCINAP είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση, είτε ότι ο διαχωρισμός της hCINAP στα συγκεκριμένα επί μέρους τμήματα κατάστρεψε τα πιθανά επιτόπια της αλληλεπίδρασης ή επηρέασε με απαγορευτικό τρόπο τη δευτεροταγή/τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.



Σχήμα 3.6: Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης της hCINAP με την coilin.

Μέθοδος των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα με ταυτόχρονο μετασχηματισμό στο στέλεχος AH109 του πλήρους cDNA της coilin, με ένα από τα επιμέρους τμήματα της hCINAP που παρουσιάζονται σχηματικά στα αριστερά του σχήματος. Αλληλεπίδραση ορίστηκε η ικανότητα των διπλά μετασχηματισμένων κλώνων να παρουσιάζουν αυξοτροφία στο τετραπλό μέσο επιλογής και να δίνουν μπλε χρωματική αλλαγή στην αντίδραση β-gal.

3.3 Προσπάθεια ταυτοποίησης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της hCINAP

Σε αυτή την πειραματική ενότητα έγινε προσπάθεια εξεύρεσης καινούριων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της hCINAP, οι οποίες αποσκοπούσαν στην παροχή αξιόπιστων πληροφοριών για τις λεπτομερείς κυτταρικές διαδικασίες στις οποίες πιθανόν να ενέχεται η hCINAP, που είχε ως απώτερο στόχο την αποσαφήνιση του λειτουργικού μονοπατιού και περιβάλλοντος στα πλαίσια του οποίου δραστηριοποιείται.

Η υλοποίηση του στόχου αυτού επιχειρήθηκε με τη χρήση δύο διαφορετικών *in vivo* τεχνικών: α) του συστήματος των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα με σάρωση cDNA βιβλιοθήκης και β) με τη σύνθετη τεχνική SILAC (Stable Isotope Labeling of Amino acid in Cell culture), σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας.

3.3.1 Διερεύνηση νέων αλληλεπιδρώσεων πρωτεϊνών της hCINAP με το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα με σάρωση cDNA βιβλιοθήκης

Το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα χρησιμοποιήθηκε, όπως ήδη προαναφέρθηκε, και ανέδειξε την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών coilin και hCINAP (Santama et al., 2005). Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε επίσης και σε αυτή την πειραματική ενότητα, για την προσπάθεια εύρεσης νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της hCINAP.

Από το αποτέλεσμα του τμήματος 3.1, προέκυψε ότι το μεταγράφημα της hCINAP στην κυτταροσειρά HeLa εκφραζόταν σε υψηλά επίπεδα, για το λόγω αυτό πραγματοποιήθηκε σάρωση cDNA βιβλιοθήκης κυτταροσειράς τύπου *HeLa*. Για την επίτευξη της σάρωσης είναι αναγκαία αρχικά η επιλογή του κατάλληλου «δολώματος» της πρωτεΐνης (μπορεί να μην είναι εφικτή η χρησιμοποίηση ολόκληρου του cDNA της πρωτεΐνης), ώστε να μην επάγει την αυτοενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς και να εκφράζεται στο ζυμομύκητα.

3.3.1.1 Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων και έλεγχος μεταγραφικής αυτοενεργοποίησης

Αρχικά κατασκευάστηκε ο ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας pAS2-1-hCINAP, στον οποίο το πλήρες cDNA της hCINAP κλωνοποιήθηκε μετά από νουκλεολυτική διάσπαση του πλασμιδίου pGEX-4T-1-hCINAP, με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI-SalI.

Μετασηματισμένοι με αυτόν κλώνοι εξετάστηκαν για αυτοενεργοποίηση των 3 γονιδίων αναφοράς: HIS3, ADE2 και LACZ (MEL1). Σε αυτή την περίπτωση οι κλώνοι

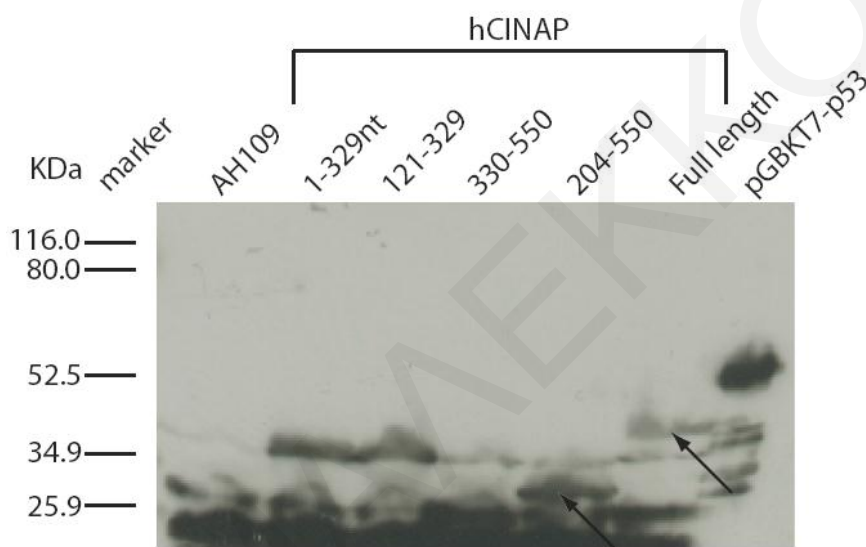
δεν θα έπρεπε να παρουσιάζουν αυξοτροφία στα επιλεκτικά θρεπτικά μέσα, ούτε να εμφανίζουν μπλε χρώμα με πραγματοποίηση πειράματος β-γαλακτοσιδάσης (γονίδιο αναφοράς), εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι παρούσα μόνο η περιοχή GAL4-DBD η οποία δε θα έπρεπε να επάγει από μόνη της τα γονίδια αναφοράς. Ο έλεγχος αυτός ανέδειξε ότι το πλασμίδιο αυτό δυστυχώς ενεργοποιούσε την μεταγραφική δραστηριότητα του GAL4 (αυξοτροφία και ενεργοποίηση του lacZ γονιδίου).

Με βάση την βιβλιογραφία (Ruden et al., 1991), αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της ύπαρξης στην αλληλουχία της πρωτεΐνης μιας περιοχής ενεργοποίησης ή μιας περιοχής με μεγάλο αριθμό αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων που έχουν ως αποτέλεσμα την αυτοενεργοποίηση της GAL4. Επομένως κρίθηκε αναγκαίος ο εντοπισμός μιας τέτοια περιοχής και διαγραφής της, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτή η πρωτεΐνη για σάρωση cDNA βιβλιοθήκης.

Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν διάφοροι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς που περιείχαν κλωνοποιημένο διαφορετικό τμήμα της πρωτεΐνης hCINAP, συγχωνευμένο με την περιοχή BD. Για τη δημιουργία των διάφορων τμημάτων της hCINAP, χρησιμοποιήθηκε είτε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με χρήση κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδίων (Πίνακας 2.11) που έφεραν στα άκρα τους ειδικές θέσεις αναγνώρισης κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων και ως μήτρα το πλασμίδιο pAS2-1-hCINAP, είτε με ενδονουκλεολυτική διάσπαση του πλασμιδιακού φορέα pAS2-1-hCINAP με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου XhoI, βάσει του οποίου δημιουργήθηκαν δύο επιμέρους τμήματα της hCINAP: 1-120 nt και 120-550 nt. Τα τμήματα που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν στη συνέχεια στον πλασμιδιακό φορέα pAS2-1.

Οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς που προέκυψαν, μετασχηματίστηκαν και πάλι στο στέλεχος του ζυμομύκητα AH109 και εξετάστηκαν και πάλι για αυτοενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς (Πίνακας 3.4, Παράρτημα). Ο έλεγχος ανέδειξε ότι όλα τα τμήματα της πρωτεΐνης hCINAP αυτοενεργοποιούσαν και πάλι την μεταγραφική δραστηριότητα του GAL4 (αυξοτροφία και ενεργοποίηση του lacZ γονιδίου) και κρίθηκε αναγκαία η χρήση άλλου πλασμιδιακού φορέα, του pGBKT7, στον οποίο κλωνοποιήθηκαν με ενδονουκλεολυτική διάσπαση τα διάφορα τμήματα της hCINAP. Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι ελέχθησαν και πάλι για αυτοενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς και από το αποτέλεσμα προέκυψε ότι όλα τα επιμέρους τμήματα της hCINAP ενεργοποιούσαν και πάλι το γονίδιο αναφοράς LACZ, αλλά όχι και τα γονίδια αυξοτροφίας (Πίνακας 3.4, Παράρτημα), ενώ ολόκληρο το cDNA της hCINAP αυτοενεργοποιούσε όλα τα γονίδια αναφοράς.

Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι μελετήθηκαν επίσης για την έκφραση των επιμέρους τμημάτων της πρωτεΐνης και όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.7 λήφθηκαν μάντες στο αναμενόμενο μέγεθος στη περίπτωση της πλήρους πρωτεΐνης (40 KDa) και στο τμήμα της hCINAP που αντιστοιχούσε στα 204-550nt (32,6 KDa) (βέλος), καθώς επίσης και για το θετικό δείγμα. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα αποτελέσματα και τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτοεργοποίησης, αποφασίσθηκε όπως χρησιμοποιηθεί το πλασμίδιο pGBKT7-hCINAP [204-550nt] ως «δόλωμα», για τη σάρωση της cDNA βιβλιοθήκης.



Σχήμα 3.7: Πρωτεϊνική έκφραση των διάφορων τμημάτων της hCINAP στο στέλεχος σακχαρομύκητα AH109. Στο αυτοραδιογράφημα κατά Western φαίνονται τα διάφορα πρωτεϊνικά δείγματα των τμημάτων της hCINAP συγχωνευμένα με το GAL4-DNA-BD (16 kDa), το θετικού δείγμα (pGBKT7-p53) και το αρνητικό δείγμα (AH109). Με βέλος φαίνεται η έκφραση του πλήρους cDNA της hCINAP, καθώς και του τμήματος 204-550 nt (pGBKT7-hCINAP[204-550nt]) που επιλέχθηκε για σάρωση της cDNA βιβλιοθήκης.

3.3.1.2 Σάρωση cDNA βιβλιοθήκης

Ο ανασυνδυασμένος πλασμιδικός φορέας pGBKT7-hCINAP [204-550nt], μετασχηματίστηκε στο στέλεχος AH109 (MATa). Το στέλεχος αυτό διαθέτει 3 γονίδια αναφοράς ελεγχόμενων από την UAS: του HIS3 και ADE2, που δίνουν τη δυνατότητα στα κύτταρα να μεγαλώνουν σε επιλεκτικό θρεπτικό υλικό από το οποίο απουσιάζει το αμινοξύ ιστιδίνη και η αζωτούχος βάση αδενίνη αντίστοιχα, και του MEL1 (ή lacZ) που κωδικοποιεί την β-γαλακτοσιδάση, παρουσία της οποίας το υπόστρωμα X-gal γίνεται μπλε.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε συνολική σάρωση πρωτεϊνών με τη χρησιμοποίηση cDNA βιβλιοθήκης από κύτταρα *HeLa* (Clontech), η οποία ήταν ήδη μετασχηματισμένη στο στέλεχος Y187 (MATa), που αποκάλυψε αριθμό πιθανών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης hCINAP (Πίνακας 3.5).

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία εξελίχθηκε ως ακολούθως: πραγματοποιήθηκε ζευγάρωμα σε υγρή καλλιέργεια του στελέχους AH109 (MATa) που είχε ήδη ενσωματωμένο τον πλασμιδικό φορέα με την υπό μελέτη πρωτεΐνη, pGBKT7-hCINAP (204-550nt), με το στέλεχος Y187 (MATa) στο οποίο βρισκόταν μετασχηματισμένη cDNA βιβλιοθήκη από κύτταρα τύπου *HeLa*. Η καλλιέργεια στρώθηκε σε τρυβλία με τετραπλό επιλεκτικό μέσο -QDO (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) και τα τρυβλία επωάστηκαν για 2 βδομάδες στους 30 °C, για επιλογή των θετικών κλώνων που εξέφραζαν τα γονίδια αναφοράς HIS3 και ADE2. Οι κλώνοι αυτοί, 700 στο σύνολο, μεταφέρθηκαν σε καινούργια τρυβλία -QDO, αριθμήθηκαν και υποβλήθηκαν σε μια διαδικασία σταδιακού χαρακτηρισμού (Σχήμα 3.8).

Επειδή τα κύτταρα σακχαρομύκητα έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν κατά το μετασχηματισμό τους ένα ή περισσότερα πλασμίδια ήταν απαραίτητο το στρώσιμο των θετικών κλώνων σε θρεπτικό μέσο SD/-leu/-trp τουλάχιστο 3 φορές, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν επιπλέον πλασμίδια προερχόμενα από την βιβλιοθήκη, τα οποία θα δυσκόλευαν την περαιτέρω ανάλυση. Στη συνέχεια οι εναπομείναντες κλώνοι (595) στρώθηκαν σε θρεπτικό μέσο -QDO και υποβλήθηκαν σε αντίδραση β-γαλακτοσιδάσης για να βρεθούν οι κλώνοι αυτοί που ενεργοποιούσαν και το τρίτο γονίδιο αναφοράς, εκτός από την αυξοτροφία, lacZ, για να αποκλειστούν οι ψευδώς θετικοί κλώνοι. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε επί φίλτρου, στη παρουσία του υποστρώματος X-gal το οποίο διασπάται από τη β-γαλακτοσιδάση, δίνοντας μπλε χρωματική αλλαγή.

Ακολούθως, από κάθε θετικό κλώνο απομονώθηκε το μίγμα των δύο πλασμιδίων: pGBKT7-hCINAP (204-550nt) και pGADT7-Rec-cDNA βιβλιοθήκης, και για επιλογή και απομόνωση μόνο του πλασμιδίου της βιβλιοθήκης, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός

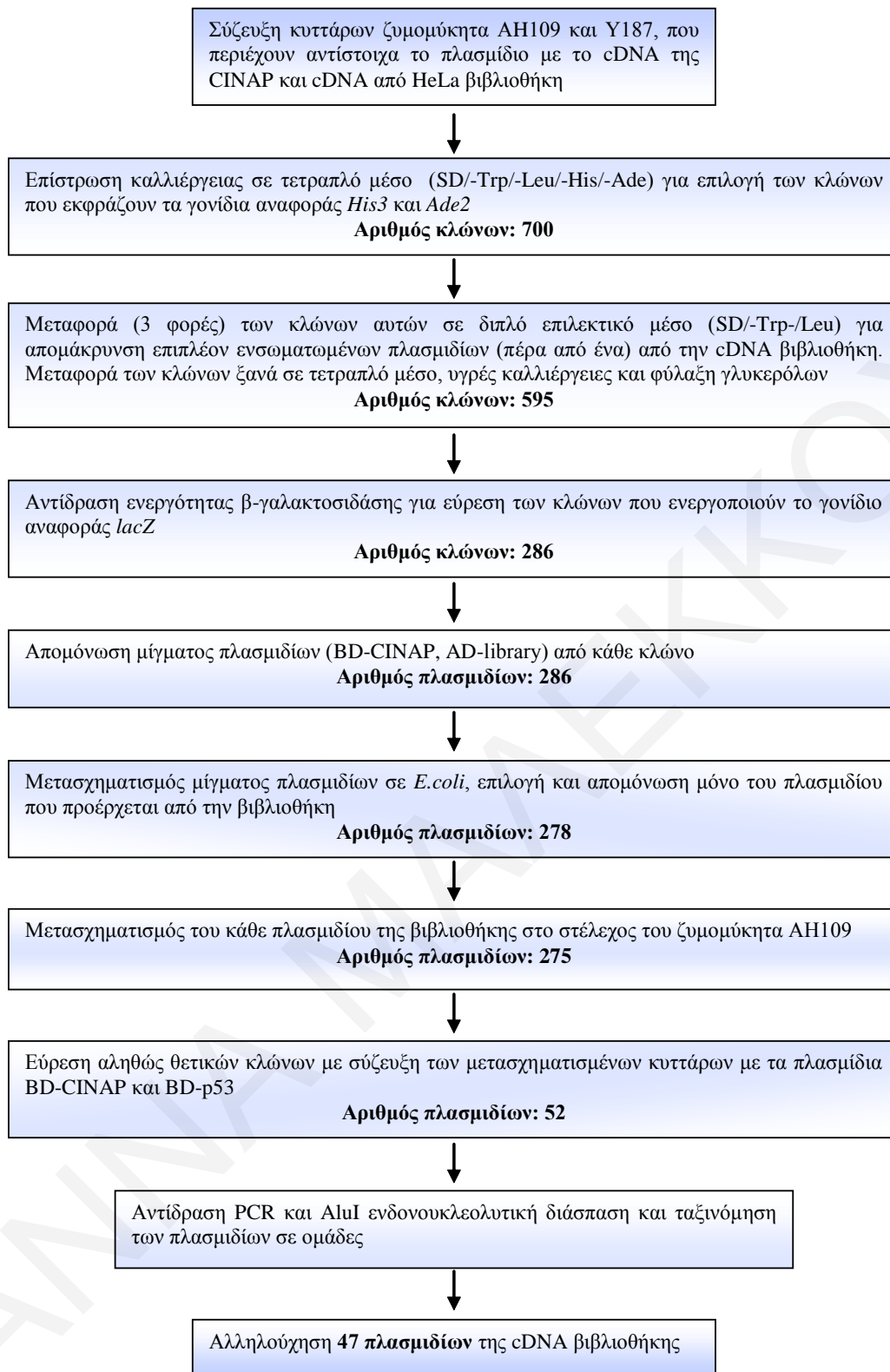
του μίγματος των δύο πλασμιδίων σε δεκτικά βακτήρια *E. coli* DH5a, τα οποία αναπτύχθηκαν σε επιλεκτικό θρεπτικό μέσο που περιείχε αμπικιλίνη. Η επιλογή αυτή ήταν κατορθωτή γιατί μόνο ο πλασμιδιακός φορέας pGADT7-Rec φέρει γονίδιο που προσδίδει αντίσταση στο αντιβιοτικό αυτό, ενώ ο πλασμιδιακός φορέας pGBKT7 φέρει γονίδιο που προσδίδει αντίσταση στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Οι κλώνοι που αναπτύχθηκαν, μεγάλωσαν σε υγρό θρεπτικό μέσο και το DNA του κάθε κλώνου απομονώθηκε για περαιτέρω ανάλυση.

Επόμενο βήμα ήταν ο αποκλεισμός των ψευδώς θετικών κλώνων και αυτό έγινε κατορθωτό με το μετασχηματισμό του κάθε απομονωμένου πλασμιδίου της βιβλιοθήκης ξεχωριστά στο στέλεχος του ζυμομύκητα AH109 και έπειτα σύζευξη του με το στέλεχος Y187 που περιείχε είτε το πλασμίδιο pGBKT7-hCINAP (204-550nt), είτε το πλασμίδιο pGBKT7-p53 (συγχωνευμένη η πρωτεΐνη p53) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος για απόρριψη των μη πραγματικών αλληλεπιδράσεων.

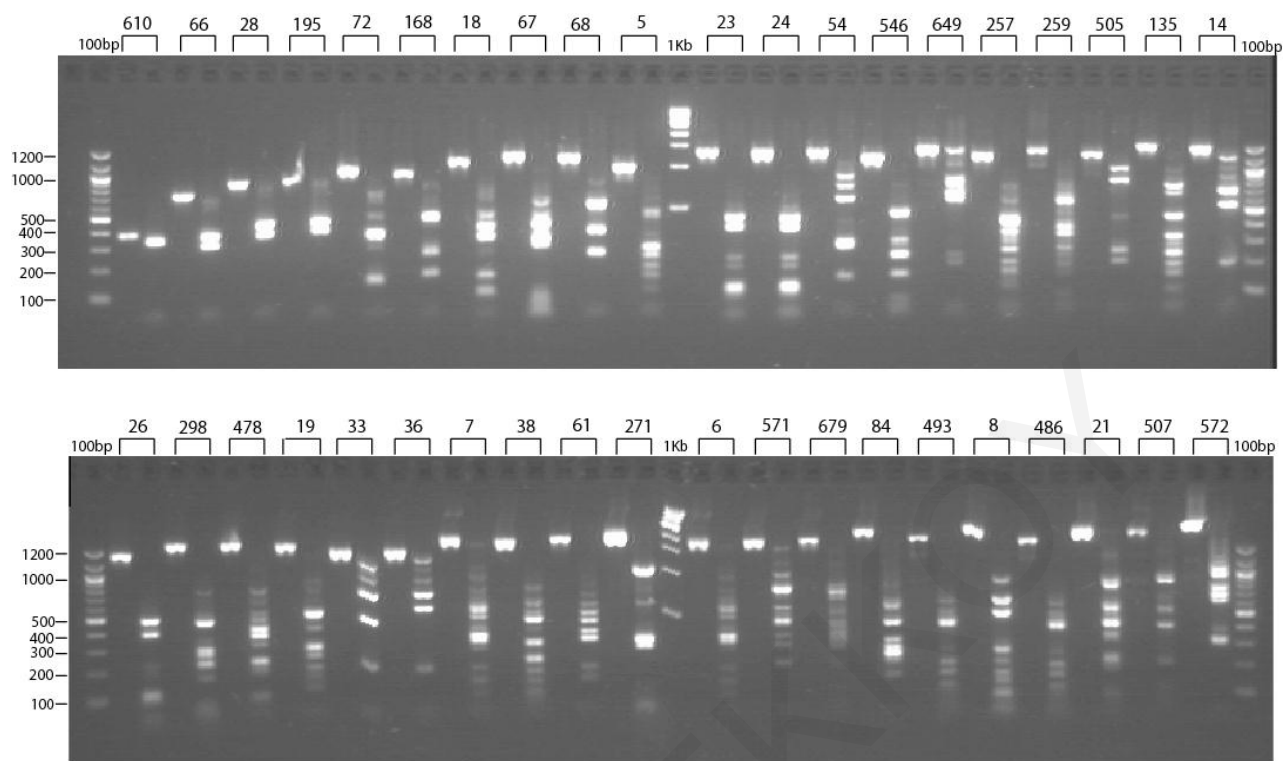
Οι καλλιέργειες της σύζευξης στρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό –QDO. Θετικοί κλώνοι θεωρήθηκαν μόνο αυτοί οι κλώνοι της βιβλιοθήκης που αναπτύσσονταν σ' αυτό το επιλεκτικό μέσο στην παρουσία μόνο της υβριδικής πρωτεΐνης GAL4-DBD-hCINAP και όχι στην παρουσία της GAL4-DBD-p53, καθώς επίσης παρουσίαζαν ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας παρέμειναν **52 θετικοί κλώνοι**, οι οποίοι έτυχαν περαιτέρω ανάλυσης.

Οι θετικοί κλώνοι κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες με βάση τα χαρακτηριστικά πρότυπα που λήφθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (Σχήμα 3.9), μετά από πολλαπλασιασμό των θετικών cDNAs της βιβλιοθήκης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και με νουκλεοτιδική διάσπαση των προϊόντων της αντίδρασης με το ένζυμο AluI. Αντιπροσωπευτικά cDNA από κάθε ομάδα υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση.

Αντιπαραβολή της προκύπτουσας αλληλουχίας με τις διαθέσιμες ηλεκτρονικές Βάσεις Νουκλεοτιδικών Αλληλουχιών οδήγησε στην ταυτοποίηση της μεταφραζόμενης πρωτεΐνης σε κάθε περίπτωση (Πίνακας 3.5).



Σχήμα 3.8: Σχηματική πορεία της συνολικής πορείας και των αποτελεσμάτων της μεθόδου των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα (Yeast Two-Hybrid System).



Σχήμα 3.9: Διαχωρισμός σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR των θετικών κλώνων και των θραυσμάτων αυτών, που προέκυψαν με νουκλεοτιδική διάσπαση AluI.

| TABLE | | | |
|---------------------|--|---|-------------------------|
| CLONE NUMBER | IDENTITY | BASIC FUNCTION | ACCESSION NUMBER |
| 4, 18 | Member RAS oncogene family (RAB1B) | Small GTPase, involved in transfer from ER to Golgi. | NM_030981.1 |
| 7 | Choroideremia-like (Rab assort protein2) | Rab protein geranylgeranyltransferase activity, GTPase activator activity, Rab escort protein activity. | NM_001821.2 |
| 14, 20, 33, 36 | HCLS1 associated protein X-1 (HAX1), transcript variant 1 | Associates with hs1, may function in promoting cell survival and may associate with cortactin/ems1. HAX-1 is RNA binding protein, which suggests new role in mRNA translation and/or perinuclear localization (3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1gamma and HAX1). | NM_006118.3 |
| 21 | Coatomer protein complex subunit beta (COPB) | Golgi coatomer complex, component of the coat of the non clathrin-coated vesicle, involved in regulation membrane trafficking. | NM_016451.3 |
| 24 | Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1) | Responsible for GTP-dependant binding of aminoacyl-tRNAs to ribosomes. | NM_001402.5 |
| 54 | Ribosomal protein S4 X-linked (RPS4X) | RNA binding, protein biosynthesis | NM_001007.3 |
| 66 | Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 binding protein (APBA2BP), transcript variant 1 and transcript variant 2 | Oxidoreductase activity, protein binding, calcium ion binding, regulation of amyloid precursor. | NM_031232.2 |
| 67 | Proteasome (prosome, macropain) subunit beta type 9 (large multifunctional protease 2) | Involved in the degradation of cytoplasmic antigens for MHC class I antigen presentation pathways (in an ATP/ ubiquitin-dependent non-lysosomal proteolytic pathway). | CR541656.1 |

| | | | |
|--------|--|---|-------------------------------|
| 168 | LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial) (LANCL1) | G-protein coupled receptor activity/ signalling pathway. May play a role as a peptide-modifying enzyme component. | NM_006055.1 |
| 117 | Coenzyme Q9 homolog (S. cerevisiae) | Hypothetical protein LOC57017 Protein alignment: Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial precursor. Uncharacterized conserved protein (Function unknown). | NM_020312.1 |
| 259 | ACN9 homolog (S. cerevisiae) | Acn9 is a novel protein of gluconeogenesis that is located in the mitochondrial intermembrane space. | BC028409.1 |
| 73 | Egl nine homolog 2 (C.elegans) (EGLN2), transcript variant 1 and 3 | Regulator of hypoxia inducible factor HIF, alpha-1 subunit by hydroxylation and targeting it to proteasome degradation, contributing in a non-redundant manner to the regulation of both HIF-1 alpha and HIF-2 alpha subunits | NM_080732.1 NM_053046.2 |
| 478 | NODAL modulator 3 (NOMO3) NODAL modulator 2 (NOMO2), transcript variant 2 | Part of a protein complex that participates in the Nodal signaling pathway during vertebrate development. May antagonize nodal signalling (by similarity). | NM_001004067.1 NM_173614.2 |
| 298 | Major histocompatibility complex, class I, B | Involved in the presentation of foreign antigens to the immune system. | BC013187.1 |
| 528 | Major histocompatibility complex, class I, C | Involved in the presentation of foreign antigens to the immune system. | BC002463.1 |
| 271 | Beta actin | Involved in cell motility, structure and integrity. | AK223055.1 |
| 257 | Ferritin, light polypeptide | Storage of iron in soluble and non-toxic state. | BC016346.1 |
| 546 | Ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) | Unknown function | NM_181575.3 |
| 5, 135 | Electron-transfer-flavoprotein alpha polypeptide (glutaric aciduria II) (ETFA) | Auxiliary transport protein activity | NM_000126.2 |
| 507 | DAZ associated protein 2 (DAZAP2) | RNA-binding protein with 2 RNP motifs. Interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ (cell differentiation, fertilization, spermatogenesis) and DAZL1 (regulation of translation). | NM_014764.2 |

| | | | |
|----------|--|--|-------------|
| 72 | Golgi reassemble stacking protein 2 (GORASP2) | May be involved in assembly and membrane stacking of the Golgi cisternae, and in the process by which Golgi stacks reform after mitotic breakdown. | NM_015530.3 |
| 8 | Disulfide isomerase family A, member 6 (PDIA6) | Electron transport activity, isomerase activity, protein disulfide isomerase activity. | NM_005742.2 |
| 195, 529 | Intestinal alkaline phosphatase (ALPI) | Alkaline phosphatase activity, hydrolase activity, magnesium ion binding | HUMALPI |
| 68 | Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) | NAD binding, phosphorylating activity, oxidoreductase activity. Displays multiple activities, independent of its role in energy generation. This functional diversity is dependent on its membrane, cytoplasmic or nuclear localization. | NM_002046 |
| 229 | Carbamoyl 1-phosphate synthetase 1, mitochondrial (CPS1) | Involved in the urea cycle where the enzyme plays an important role in removing excess ammonia from the cell. | NM_001875.2 |
| 493 | 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 7 (lysophosphatidic acid acyltransferase, eta) (AGPAT7) | Acyltransferase activity, calcium ion binding | NM_153613.2 |
| 505 | Procollagen-lysine 1, oxoglutarate 5-dioxygenase 1 (PLOD1) | Forms hydroxylysine residues in -xaa-lys-gly- sequences in collagens, essential for the stability of the intermolecular collagen crosslinks. | NM_000302.2 |
| 649 | Ornithine decarboxylase antizyme1 (OAZ1) | Ornithine decarboxylase inhibitor activity | NM_004152.2 |
| 38 | Hypothetical protein FLJ20628 | Protein alignment: Chain B, Human putative Trna [1-methyladenosine methyltransferase] (334/334 aa). | NM_017910.2 |
| 244 | Parvin alpha (PARVA) | May regulate reorganization of the actin cytoskeleton in cell division. | NM_018222.2 |

Πίνακας 3.5: Πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη hCINAP με το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα. Με μπλε χρώμα φαίνονται οι πρωτεΐνες που θεωρήθηκαν πιο σημαντικές με βάση την λειτουργία (όπως εξάχθηκε από την βιβλιογραφία) και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό (πυρηνοπλάσματικός) για περαιτέρω μελέτη.

3.3.2 Διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων της hCINAP

3.3.2.1 Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της hCINAP που προέκυψαν από το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα

Μετά τη συστηματική σάρωση της cDNA βιβλιοθήκης κυτταροσειράς *HeLa*, που διενεργήθηκε, ταυτοποιήθηκε ένας αριθμός στόχων που φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την hCINAP (Πίνακας 3.5). Στο κατάλογο αυτό, δεν εμφανιζόταν καμία γνωστή πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο λειτουργικό μονοπάτι της coilin ή των CBs, όπως αναμενόταν. Επιπλέον, παρατηρείται η ύπαρξη αρκετών πρωτεϊνών, που ο ενδοκυττάριος εντοπισμός τους με βάση την βιβλιογραφία, παρουσιάζεται σε συγκεκριμένα οργανίδια του κυττάρου όπως μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο και συσκευή Golgi ή σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου όπως κυτταρόπλασμα και πλασματική μεμβράνη. Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός αυτών των πρωτεϊνών ως εκ τούτου, δεν ταυτίζεται με αυτόν που παρουσιάζει η πρωτεΐνη hCINAP, η οποία παρουσιάζεται διάχυτη στο πυρηνόπλασμα και ως αυτού κρίθηκε απίθανο να αλληλεπιδρούν. Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες, παρουσιάζουν λειτουργία ενζύμων που καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις.

Το γεγονός αυτό μπορεί να μην είναι τυχαίο. Ως γνωστό, η πρωτεΐνη hCINAP κατατάχτηκε στην οικογένεια των αδενυλικών κινασών (AKs) λόγω της ομοιότητας στην αλληλουχία και τη δομή που παρουσιάζει (Ren et al., 2005). Μέλη της οικογένειας των AKs έχουν ενδοκυττάρια κατανομή είτε στα μιτοχόνδρια, είτε στο κυτταρόπλασμα (βλ. Εισαγωγή) και συναπομονώνονται και πιθανώς να παρουσιάζουν αλληλεπίδραση με πολλά γλυκολυτικά ένζυμα (Dzeja et al., 1985, Gellerich, 1992) ή αλληλεπιδρούν άμεσα με πολλά ένζυμα του συμπλέγματος της dNTP συνθάσης (Kim et al., 2005).

Ανάμεσα σε αυτούς τους πρωτεϊνικούς στόχους, κρίθηκαν ως ιδιαίτερα ενδιαφέροντες, το ένζυμο αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής-D-γλυκεριναλδεϋδης (GAPDH) και η προλυλ-υδροξυλάση PHD1. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες παρουσιάζουν πυρηνική ενδοκυττάρια κατανομή, που συμφωνεί με αυτή της hCINAP και επιπλέον διαδραματίζουν σημαντικές λειτουργίες στον πυρήνα και θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί κατά πόσο η hCINAP εμπλέκεται σε αυτές. Το GAPDH τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ως ένα πολυ-λειτουργικό μόριο στον πυρήνα λαμβάνοντας μέρος σε διαδικασίες όπως η πυρηνική εξαγωγή του RNA, η αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, η ενίσχυση της γονιδιακής έκφρασης, η ογκογένεση και η απόπτωση (Sirover, 1999), επιπρόσθετα από τη γνωστή του δράση κατά τη γλυκόλυση. Η PHD1, είναι μια προλύλ-υδροξυλάση που λειτουργεί υδροξυλιώνοντας τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α σε κανονική συγκέντρωση οξυγόνου (20% O₂) προωθώντας την ουβικιτιλίωση και την

στόχευση του στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση (Pugh and Ratcliffe, 2003). Αντιθέτως, κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (1% O₂, υποξία), η PHD1 είναι σημαντικά ανενεργή, οδηγώντας στη σταθεροποίηση του HIF-1α, ο οποίος επάγει την ενεργοποίηση περίπου 60 γονιδίων (Fedele et al., 2002).

Όπως προαναφέρθηκε, η μέθοδος των δύο υβριδίων, δεν εκλαμβάνεται ως αδιαμφισβήτητη απόδειξη της αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών, και έτσι ήταν αναγκαία η διερεύνηση και η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης με άλλες συμπληρωματικές, ανεξάρτητες μεθόδους, οι οποίες θα ενίσχυαν το εύρημα της αλληλεπίδρασης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο παράλληλες, συμπληρωματικές προσεγγίσεις: α) βιοχημικά πειράματα συν-επιλογής (co-selection) *in vitro* και β) συν-ανοσοκαταβύθιση (co-immunoprecipitation).

Η μέθοδος της συν-επιλογής, η οποία βασίζεται στις αρχές της χρωματογραφίας συγγένειας. Ως πρώτο βήμα, ήταν η κλωνοποίηση του πλήρους cDNA που κωδικοποιούσε την κάθε «εν δυνάμει» αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη, PHD1 και GAPDH, σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς, οι οποίοι περιείχαν γονίδια για μετάφραση των επιτοπίων είτε της τρανσφεράσης της S-γλουταθειόνης (GST) [pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia)], είτε της εξά-ιστιδίνης (His₆) [pHAT₂ και pRSET_{A/B}, (Invitrogen)]. Το κάθε cDNA πολλαπλασιάστηκε με την τεχνική της PCR με τη χρήση mRNA από κυτταροσειρά HeLa και κατάλληλα εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια (Πίνακας 2.11).

Επειτα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης και της διαλυτότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα βακτήρια BL21(DE3)-pLysS και BL21-codonplus (DE3)-RIL, με χρήση συνδυασμού παραμέτρων (συγκέντρωση IPTG: 0.05 mM και 1 mM, χρόνος: 3 h, 5 h και 16 h), για την εύρεση των ιδανικότερων συνθηκών. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά δείγματα ελέγχου (πλασμιδιακοί φορείς χωρίς ένθεμα) για τον έλεγχο της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων.

Τα επίπεδα έκφρασης και το ποσοστό διαλυτότητας της κάθε υπό μελέτη πρωτεΐνης, ελέγχθησαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωσης κατά Western με ειδικά αντισώματα έναντι των υπο-μελέτη πρωτεϊνών (2.4).

Στους Πίνακες 3.6 και 3.7 παρατίθενται οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν για κάθε πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε, αντίστοιχα για την πρωτεΐνη EGLN2 και GAPDH, καθώς επίσης και το καλύτερο αποτέλεσμα που προέκυψε σχετικά με την έκφραση και το ποσοστό διαλυτότητας της κάθε υπό μελέτη πρωτεΐνης. Για την πρωτεΐνη EGLN2 κρίθηκε καταλληλότερο το πλασμίδιο pGEX-4T-1 στο βακτηριακό στέλεχος BL21-codonplus (DE3)-RIL, ενώ για την πρωτεΐνη GAPDH το πλασμίδιο pGEX-4T-1 στο βακτηριακό

στέλεχος BL21(DE3)-pLysS. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις, οι καταλληλότερες συνθήκες προέκυψαν από επαγωγή της έκφρασης με IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και συλλογή των δειγμάτων μετά από 6 h για την EGLN2 και 18 h για το GAPDH. Για την πρωτεΐνη hCINAP ήταν ήδη γνωστό ότι εκφραζόταν σε ψηλά επίπεδα κυρίως σε διαλυτή μορφή στο πλασμίδιο pRSET_B στο βακτηριακό στέλεχος BL21(DE3)-pLysS, με επαγωγή της έκφρασης με IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και συλλογή των δειγμάτων μετά από 3 h.

Για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της hCINAP με την EGLN2 και αντίστοιχα με την GAPDH, λύθηκαν δείγματα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών 6xHis-hCINAP, GST-EGLN2 και GST-GAPDH, καθώς και του πλασμιδίου pGEX-4T-1 ως δείγμα αρνητικού ελέγχου. Αρχικά το πρωτεϊνικό λύμα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης hCINAP χωρίστηκε σε 3 ισόποσα μέρη και στη συνέχεια σε καθένα από αυτά προστέθηκε το πρωτεϊνικό λύμα των GST-EGLN2, GST-GAPDH και GST (από pGEX-4T-1) και ακολούθησε επώαση για 1 h στους 4 °C, έτσι ώστε αν οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούσαν να δημιουργήσουν σύμπλοκο. Έπειτα στο μείγμα των πρωτεϊνών προστέθηκαν σφαιρίδια που έφεραν ακινητοποιημένη γλουταθειόνη και επώαστηκαν για ακόμα 1 h στους 4 °C.

Το κάθε δείγμα χωρίστηκε σε δύο ισόποσα μέρη και φορτώθηκε σε δύο πηκτώματα ακρυλαμιδίου που ηλεκτροφορήθηκαν. Στην ανοσοαποτύπωση κατά Western που ακολούθησε χρησιμοποιήθηκε στη μία μεμβράνη το αντίσωμα έναντι της hCINAP και στη δεύτερη μεμβράνη το αντίσωμα έναντι της EGLN2 ή της GAPDH (το σχήμα δε παρατίθεται). Από το αποτέλεσμα προέκυψε ότι η πρωτεΐνη 6xHis-hCINAP εμφανιζόταν στο αυτοραδιογράφημα εκτός από τα δείγματα με τα σφαιρίδια που περιείχαν την GST-EGLN2 και GST-GAPDH και στο δείγμα με τα σφαιρίδια που περιείχε το πλασμίδιο pGEX-4T-1, το οποίο λειτουργούσε ως αρνητικό δείγμα αναφοράς, με ακριβώς την ίδια ένταση. Συνεπώς με τη μεθοδολογία αυτή δεν ήταν δυνατή η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης.

| Πλασμίδιο | Στέλεχος E. coli | Τελική συγκέντρωση IPTG (mM) | Χρόνος Επαγωγής (h) | SDS-PAGE | Διαλυτότητα | | Ανοσο- αποτύπωση κατά Western |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------|----------------|-----------------|--|
| | | | | | Διαλυτή (%) | Αδιάλυτη (%) | |
| pGEX-4T-1 | BL21(DE3)- pLysS | 1 | 4 | Διακριτή μπάντα | 60 | 40 | Θετικό σήμα |
| | | | 18 | Διακριτή μπάντα | 100 | 0 | |
| | BL21-codonplus (DE3)-RIL | 1 | 6 | Έντονη διακριτή μπάντα | 50 | 50 | Έντονο θετικό σήμα |
| | | | 18 | Έντονη διακριτή μπάντα | 50 | 50 | |
| pHAT ₂ | BL21(DE3)- pLysS | 1 | 4 | Αχνή μπάντα | 0 | 100 | Μη θετικό σήμα |
| | | | 18 | Διακριτή μπάντα | 50 | 50 | |
| | BL21-codonplus (DE3)-RIL | 1 | 6 | Διακριτή μπάντα | 80 | 20 | Θετικό σήμα |
| | | | 18 | Έντονη διακριτή μπάντα | 80 | 20 | |
| pRSET _B | BL21(DE3)- pLysS | 1 | 4 | Διακριτή μπάντα | 0 | 100 | / |
| | | | 18 | Μη διακριτή μπάντα | / | / | |
| | BL21-codonplus (DE3)-RIL | 0.05 | 5 | Μη διακριτή μπάντα | / | / | Ασθενές θετικό σήμα |
| | | | 18 | Διακριτή μπάντα | 80 | 20 | |

Πίνακας 3.6: Συνοπτικός πίνακας συνδυαστικών παραμέτρων έκφρασης και διαλυτότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης EGLN2 στα τρία πλασμίδια και στα δύο βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Οι καλύτερες συνθήκες έκφρασης και διαλυτότητας που επιτεύχθηκαν φαίνονται με γκριζό χρώμα.

| Πλασμίδιο | Στέλεχος E. coli | Τελική συγκέντρωση IPTG (mM) | Χρόνος Επαγωγής (h) | SDS-PAGE | Διαλυτότητα | | Ανοσο- αποτύπωση κατά Western |
|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------|--|----------------|-----------------|--|
| | | | | | Διαλυτή (%) | Αδιάλυτη (%) | |
| pGEX-4T-1 | BL21(DE3)- pLysS | 1 | 4 | Έντονες μπάντες στο αναμενόμενο μέγεθος | 10 | 9 | Έντονο θετικό σήμα |
| | | | 18 | Έντονες μπάντες στο αναμενόμενο μέγεθος | 60 | 40 | |
| pHAT ₂ | BL21(DE3)- pLysS | 1 | 4 | Μη διακριτή μπάντα | / | / | Ασθενές θετικό σήμα |
| | | | 18 | Μη διακριτή μπάντα | / | / | |
| | BL21- codonplus (DE3)-RIL | 0.05 | 5 | Μη διακριτή μπάντα | / | / | |
| | | | 18 | Μη διακριτή μπάντα | / | / | |
| pRSET _A | BL21(DE3)- pLysS | 1 | 3 | Έντονες μπάντες στο αναμενόμενο μέγεθος | 0 | 100 | Θετικό σήμα |
| | | | 18 | Μπάντες στο αναμενόμενο μέγεθος | 0 | 100 | |
| | BL21- codonplus (DE3)-RIL | 0.05 | 5 | Έντονες μπάντες στο αναμενόμενο μέγεθος | 0 | 100 | |
| | | | 18 | Έντονες μπάντες στο αναμενόμενο μέγεθος | 0 | 100 | |

Πίνακας 3.7: Συνοπτικός πίνακας συνδυαστικών παραμέτρων έκφρασης και διαλυτότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GAPDH στα τρία πλασμίδια και στα δύο βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Οι καλύτερες συνθήκες έκφρασης και διαλυτότητας που επιτεύχθηκαν φαίνονται με γκριζό χρώμα.

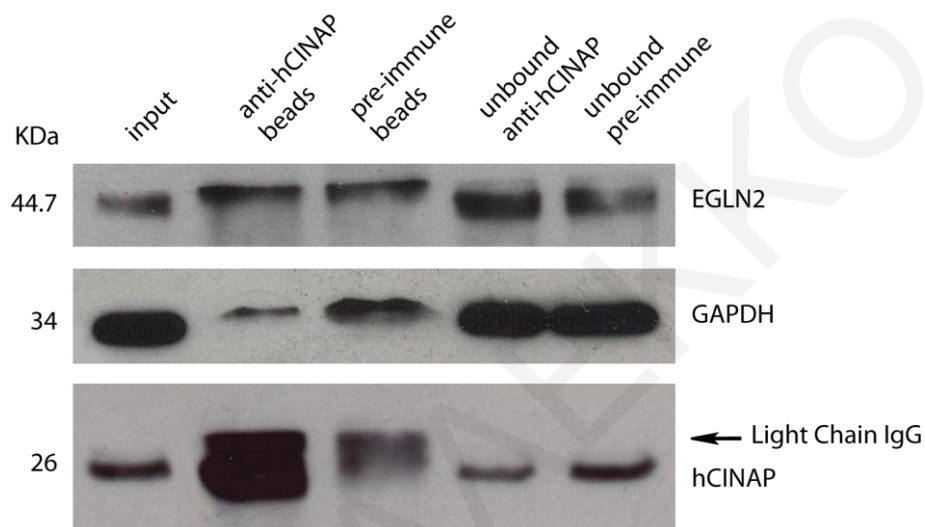
Έτσι, επιχειρήθηκε επανάληψη του πειράματος με χρήση σφαιριδίων νικελίου (Ni^{2+} -NTA) για δέσμευση της 6xHis-hCINAP σε αυτά και ελέγχου δέσμευσης των πρωτεϊνών GST-EGLN2 ή GST-GAPDH αντίστοιχα. Ως αρνητικό δείγμα αναφοράς, σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το πλασμιδίο pRSET_B. Από τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, προέκυψε και πάλι ότι οι πρωτεΐνες GST-EGLN2 και GST-GAPDH δεσμεύονταν στα σφαιρίδια Ni^{2+} -NTA, τόσο στην παρουσία της 6xHis-hCINAP όσο και στην παρουσία μόνο του πλασμιδίου pRSET_B (αρνητικό δείγμα). Αν και η ένταση στο αρνητικό δείγμα ήταν εμφανώς μικρότερη σε σύγκριση με το θετικό δείγμα, δεν μπορούσε να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για την αλληλεπίδραση των υπό μελέτη πρωτεϊνικών ζευγαριών hCINAP-EGLN2 και hCINAP-GAPDH (το σχήμα δε παρατίθεται).

Λόγω του γεγονότος ότι δεν μπορούσε να εξαχθεί συμπέρασμα για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος των αλληλεπιδράσεων με τη μέθοδο της συν-επιλογής, επιχειρήθηκε διερεύνηση της αλληλεπίδρασης με τη μέθοδο της **συν-ανοσοκαταβύθισης**. Κατά τη μέθοδο αυτή, πραγματοποιήθηκε λύση κυττάρων HeLa και χωρισμός του σε δύο ίσα μέρη. Στο ένα προστέθηκε εξειδικευμένο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης hCINAP και στο άλλο αντίσωμα πριν την ανοσία του ζώου (pre-immune), το οποίο λειτούργησε ως αρνητικό δείγμα αναφοράς και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 4 °C για 3 h, υπό συνεχή ανάδευση. Τα σχηματισθέντα ανοσοσυμπλέγματα της hCINAP ανοσοκαταβυθίστηκαν με σφαιρίδια G-Sepharose στα οποία προσδέθηκε το αντίσωμα, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και έπειτα με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με χρήση αντισωμάτων έναντι των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

Από το ανοσοαποτύπωμα (Σχήμα 3.10) προέκυψε, ότι ενώ η πρωτεΐνη hCINAP δεσμευόταν και ανοσοκαταβυθιζόταν μόνο στη περίπτωση που χρησιμοποιείτο το αντίσωμα έναντι της, και όχι στη περίπτωση του αρνητικού δείγματος αναφοράς (pre-immune), οι πρωτεΐνες EGLN2 και GAPDH ανοσοκαταβυθίζονταν τόσο στην περίπτωση που στα σφαιρίδια ήταν δεσμευμένο το αντίσωμα έναντι της hCINAP όσο και στην περίπτωση που στα σφαιρίδια ήταν δεσμευμένο το pre-immune (μάλιστα στη περίπτωση του GAPDH το σήμα στο αρνητικό δείγμα αναφοράς ήταν και μεγαλύτερης έντασης από το δείγμα ελέγχου). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μπάνα που εμφανίζεται στα δείγματα των σφαιριδίων, πιο ψηλά από την hCINAP (πάνω από τα 26 kDa), αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα του αντισώματος (Light Chain IgG).

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις που ακολουθήθηκαν, δεν ήταν δυνατή η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης hCINAP και των πρωτεϊνών EGLN2 και GAPDH. Επομένως, είναι πιθανόν οι πρωτεΐνες αυτές να έδωσαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα στη μέθοδο του

συστήματος των δύο υβριδίων. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, μπορεί να οφείλονται αυτό καθ' αυτό στο συγκεκριμένο σύστημα το οποίο είναι γνωστό ότι παρουσιάζει ψευδώς θετικά αποτελέσματα ή στο γεγονός ότι για τη σάρωση της cDNA βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε αναγκαστικά τμήμα του cDNA της hCINAP, αφού ολόκληρο το cDNA ενεργοποιούσε τα γονίδια αναφοράς και δεν ήταν εφικτό να χρησιμοποιηθεί.



Σχήμα 3.10: Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης hCINAP με τις πρωτεΐνες EGLN2 και GAPDH. Στο σχήμα παρουσιάζεται το ανοσοαποτύπωμα κατά Western μετά από πείραμα ανοσοκαταβύθισης που πραγματοποιήθηκε με σφαιρίδια σεφαρόζης A, στα οποία δεσμεύτηκε αντίσωμα είτε έναντι της hCINAP, είτε ορός πριν την ανοσία του ζώου (pre-immune), το οποίο είναι αρνητικό δείγμα ελέγχου. Στο σχήμα φαίνονται τα δείγματα που αντιστοιχούν σε αυτά τα σφαιρίδια, καθώς επίσης το αρχικό δείγμα του πρωτεϊνικού λύματος, όπως και τα αδέσμευτα δείγματα. Με βέλος δηλώνεται η μπάντα που αντιστοιχεί στην ελαφριά αλυσίδα του αντισώματος.

3.3.2.2 Εξέταση αλληλεπίδρασης της hCINAP με τον επαγόμενο από την υποξία, μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α

Παράλληλα με την διεξαγωγή πειραμάτων στο τμήμα 3.3.2.1, για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης της hCINAP με τις πρωτεΐνες EGLN2 (PHD1) και GAPDH όπως αυτές προέκυψαν από το σύστημα των δύο υβριδίων, επιχειρήθηκε η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της hCINAP με τη μέθοδο του Y2H, με το μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α, ο οποίος υδροξυλιώνεται από την EGLN2, συνεισφέροντας έτσι στην αποικοδόμησή του σε συνθήκες κανονικής τάσης O₂.

Όπως έχει προαναφερθεί, ο HIF-1α είναι μεταγραφικός παράγοντας και όπως είναι φυσικό διαθέτει και τις δύο περιοχές (DBD και AD) που είναι ικανές για να προάξουν την ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς όπως έχει εξηγηθεί προηγουμένως. Επομένως για τη χρήση αυτής της πρωτεΐνης σε αυτό το σύστημα, έπρεπε να διαγραφεί μία εκ των δύο της περιοχών και από τη δομική και λειτουργική της σύσταση ήταν φανερό ότι αυτή ήταν η DBD. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την πειραματική διαδικασία ήταν ο pAS2-1 στον οποίο ήταν ενσωματωμένο το τμήμα του cDNA του HIF-1α (576-826 αα), το οποίο είχε εξασφαλισθεί από τον Δρα Gregg Semenza (Johns Hopkins Institute for Cell Engineering) και είχε ήδη χρησιμοποιηθεί από την ομάδα του για σάρωση cDNA βιβλιοθήκης (Mahon et al., 2001).

Το πλασμίδιο αυτό μετασηματίστηκε στο στέλεχος AH109, ενώ παράλληλα το πλασμίδιο pACT2-hCINAP μετασηματίστηκε στο στέλεχος Y187. Επίσης μετασηματίστηκαν και οι πλασμιδιακοί φορείς χωρίς ένθεμα (αρνητικά δείγματα ελέγχου) στα δύο στελέχη. Στη συνέχεια τα μετασηματισμένα κύτταρα σακχαρομούκητα συζεύχθηκαν (pAS2-1-HIF-1α/pACT2-hCINAP, pAS2-1/pACT2-hCINAP, pAS2-1-HIF-1α/pACT2) και αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε διπλό, τριπλό και τετραπλό θρεπτικό στερεό υλικό. Στην περίπτωση που η δύο πρωτεΐνες θα αλληλεπιδρούσαν θα αναπτύσσονταν κλώνοι σε περίοδο μια βδομάδας στα τριπλά και τετραπλά θρεπτικά μέσα. Το αποτέλεσμα αυτής της μεθόδου ήταν αρνητικό και επομένως οι δύο πρωτεΐνες φαίνεται να μην αλληλεπιδρούν ή δεν αλληλεπιδρούν κάτω από τις συνθήκες που μελετήθηκαν.

3.3.3 Πρωτεομική ανάλυση αλληλεπιδράσεων της hCINAP με τη μέθοδο SILAC-MS

Σ' αυτή την πειραματική ενότητα επιχειρήθηκε ποιοτική και ποσοτική ταυτοποίηση των συνολικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης hCINAP στον πυρήνα του ανθρώπινου κυττάρου με χρησιμοποίηση του συνδυασμού της μεθόδου SILAC (stable isotope labeling of amino acids in culture) και της υψηλής ευκρίνειας φασματοσκοπίας μάζας (Trinkle-Mulcahy et al., 2006).

Για την πραγματοποίηση του στόχου αυτής της ενότητας ήταν αρχικά απαραίτητη η κατασκευή σταθεράς μετασχηματισμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP}, στην οποία η πρωτεΐνη hCINAP βρισκόταν συγχωνευμένη με την πράσινο-φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP). Η κατασκευή και ο χαρακτηρισμός της κυτταροσειράς αυτής αναλύονται στο τμήμα 3.4.

Επιπλέον, ήταν αναγκαία η παράλληλη χρήση της σταθεράς μετασχηματισμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP} ως δείγμα αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε και παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του καθηγητή Angus I. Lamond (University of Dundee, UK), στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας, στο εργαστήριο του οποίου διεξάχθηκε η μέθοδος αυτή, όπως και ένα μεγάλο μέρος των πειραμάτων που ακολουθούν (υποκεφάλαια 3.5, 3.6, 3.7), κατά τη διάρκεια υποτροφίας μικρής διάρκειας (3 μήνες) που μου απενεμήθη από το EMBO (EMBO short-term fellowship).

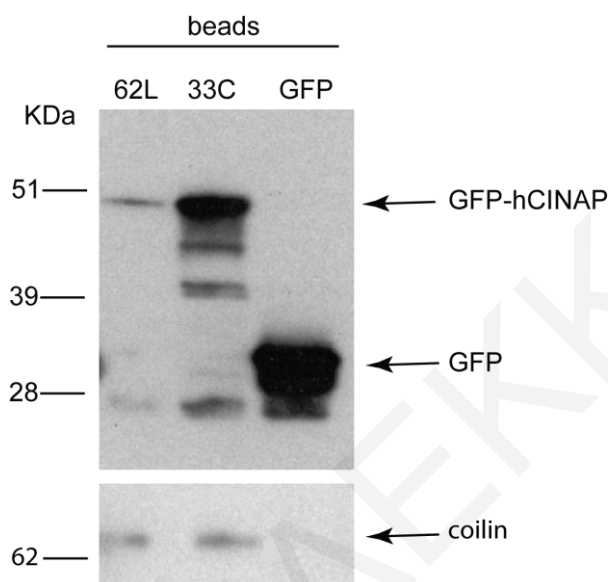
3.3.3.1 Πιλοτικό πείραμα ανοσοκαταβύθισης της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP

Για την επιβεβαίωση της ανοσοκαταβύθισης της GFP-hCINAP, στους δύο κλώνους της σταθερά μετασχηματισμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP} που κατασκευάστηκε, και επιλογή του καταλληλότερου για πραγματοποίηση της διαδικασίας της SILAC, πραγματοποιήθηκε αρχικά πιλοτικό πείραμα ανοσοκαταβύθισης της, με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GFP.

Έτσι πραγματοποιήθηκε ανοσοκαταβύθιση με χρήση σφαιριδίων G-Sepharose όπου προσδέθηκε σε αυτά αντίσωμα έναντι της GFP και αφού τα σφαιρίδια χωρίστηκαν σε τρία ίσα μέρη προστέθηκαν σε αυτά πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τις τρεις κυτταροσειρές 33C, 62L και GFP (δείγμα ελέγχου). Τα δείγματα έτυχαν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και στη συνέχεια ανοσοαποτύπωση κατά Western, με χρήση του αντισώματος έναντι της GFP.

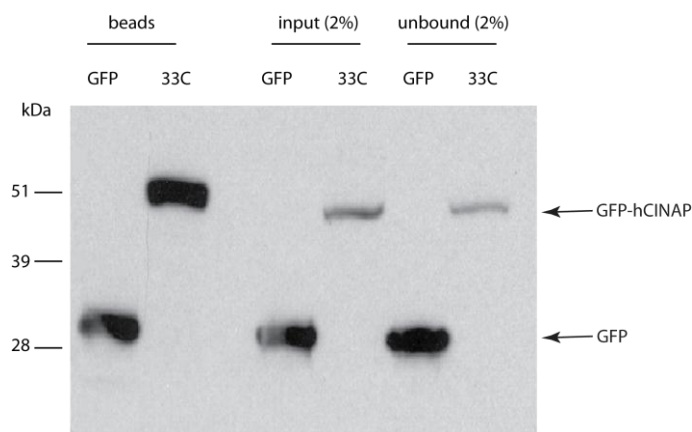
Το ανοσοαποτύπωμα (Σχήμα 3.11) έδειξε ότι η πρωτεΐνη GFP-hCINAP ήταν ικανή να ανοσοκαταβυθιστεί και στους δύο κλώνους που μελετήθηκαν. Επιπρόσθετα, για επιβεβαίωση της λειτουργικότητας της GFP-hCINAP στους δύο αυτούς κλώνους, διερευνήθηκε κατά πόσο επιτυγχανόταν ταυτόχρονη καταβύθιση της πρωτεΐνης coilin, η

οποία είχε ήδη αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την hCINAP. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι όντως οι δύο πρωτεΐνες (GFP-hCINAP και coilin) συγκαταβυθίζονταν και στους δύο κλώνους, ενώ όχι στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό δείγμα αναφοράς η σταθερά μετασηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP} (Σχήμα 3.11, κάτω σειρά).



Σχήμα 3.11: Πιλοτικό πείραμα ανοσοκαταβύθισης των πρωτεϊνών GFP-hCINAP και GFP στους δύο κλώνους 62L και 33C. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GFP για ανοσοκαταβύθιση και για ανίχνευση των πρωτεϊνών GFP-hCINAP και GFP (αντίστοιχα βέλη) και έναντι της coilin (κάτω σειρά). Η πρωτεΐνη coilin ανοσοκαταβυθιζόταν, όπως αναμενόταν, στην περίπτωση της GFP-hCINAP στους δύο κλώνους αλλά όχι στη περίπτωση της GFP.

Για την πραγματοποίηση της μεθόδου SILAC, αποφασίστηκε η χρησιμοποίηση του κλώνου 33C, γιατί η έκφραση, και κατά συνέπεια το ποσοστό του προσδεδεμένου κλάσματος της πρωτεΐνης hCINAP σε αυτόν, ήταν υψηλότερο από ότι του 62L και συγκρίσιμο με αυτό του GFP (Σχήμα 3.11). Έτσι πραγματοποιήθηκε πιλοτικό πείραμα με τον κλώνο αυτό (Σχήμα 3.12), όπου επιβεβαιώθηκε ότι επιτυγχανόταν πρόσδεση της GFP-hCINAP κατά το ήμισυ στα σφαιρίδια, που ήταν συγκρίσιμη με την ποσότητα της προσδεδεμένης GFP.



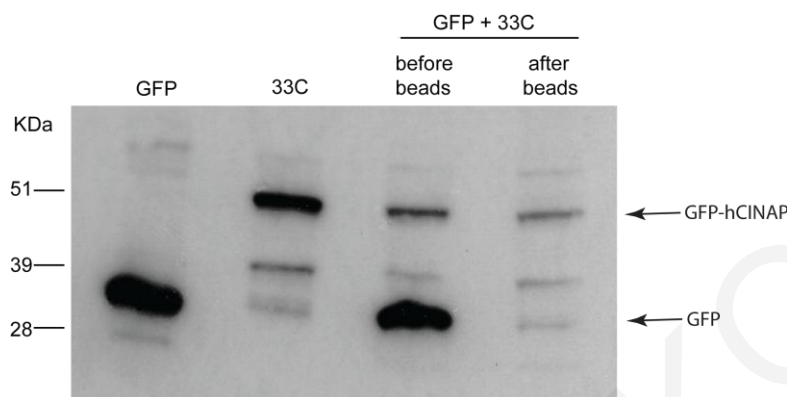
Σχήμα 3.12: Πιλοτικό πείραμα ανοσοκαταβύθισης για SILAC. Το ποσοστό πρόσδεσης της πρωτεΐνης GFP-hCINAP είναι συγκρίσιμο με αυτό της GFP.

3.3.3.2 Μέθοδος SILAC/MS

Η ολική διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται στο Σχήμα 3.15. Αρχικά η κατασκευασθήσα κυτταροσειρά *HeLa*^{GFP-CINAP} καλλιεργήθηκε και σημάνθηκε για 6 κυτταρικές γενεές στην παρουσία σημασμένου θρεπτικού υλικού του αμινοξέος L-αργινίνης, που έφερε τα ραδιενεργά ισότοπα ¹³C¹⁵N. Η κυτταροσειρά *HeLa*^{GFP} καλλιεργήθηκε σε μη ραδιενεργά σημασμένο υπόστρωμα L-αργινίνης. Οι πυρήνες των κυττάρων των δύο σταθερά μετασχηματισμένων κυτταροσειρών απομονώθηκαν, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Υλικά και Μέθοδοι, Andersen et al, 2002) και τα κυτταρικά εκχυλίσματα από κάθε τύπο κυτταροσειράς (*HeLa*^{GFP-CINAP} και *HeLa*^{GFP}) αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 με βάση την συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες GFP-hCINAP και GFP ανοσοκαταβυθίστηκαν, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GFP (GFP binder), το οποίο δεσμεύτηκε σε σφαιρίδια G-Sepharose. Για τον έλεγχο της επιτυχίας δέσμευσης των δύο πρωτεϊνών στα σφαιρίδια κρατήθηκαν δείγματα (α) τόσο των δύο ξεχωριστών δειγμάτων πριν την ανάμιξη, (β) όσο και μετά την ανάμιξη, (γ) πριν και μετά την προσθήκη των σφαιριδίων και (δ) στο τέλος της όλης διαδικασίας πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση του αντισώματος έναντι της GFP (Σχήμα 3.13).

Από το αποτέλεσμα φάνηκε ότι επιτεύχθηκε δέσμευση των δύο πρωτεϊνών στα σφαιρίδια, όμως ενώ η GFP-hCINAP δεσμεύτηκε κατά το ήμισυ (όπως έδειξε και το πιλοτικό πείραμα), η GFP δεσμεύτηκε σχεδόν εξ' ολοκλήρου, δρώντας έτσι ανταγωνιστικά. Η διαφορά με το πιλοτικό πείραμα (χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της GFP από την εταιρεία Roche) ήταν ότι χρησιμοποιήθηκε ένα καινούργιο αντίσωμα κατασκευασμένο σε καμήλα, που ονομαζόταν GFP-binder, και όπως φάνηκε

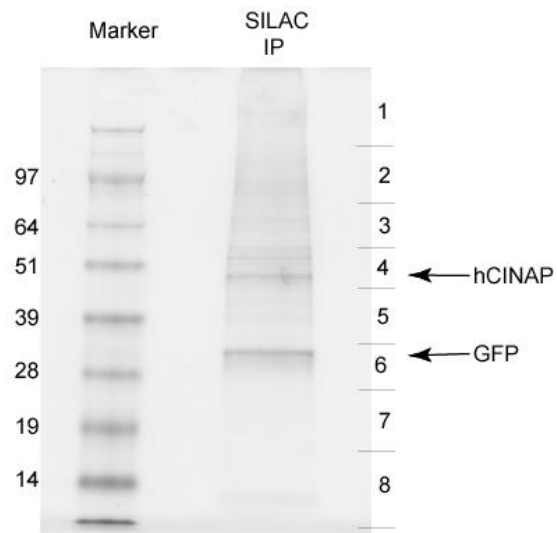
μεταγενέστερα (Trinkle-Mulcahy et al., 2008), είναι πιο ισχυρό αντίσωμα και είναι ικανό να ανοσοκαταβύθισει σχεδόν εξ ολοκλήρου την ποσότητα της GFP. Το περιεργό ήταν που λειτούργησε επιλεκτικά μόνο με την πρωτεΐνη GFP και όχι με την GFP-hCINAP.



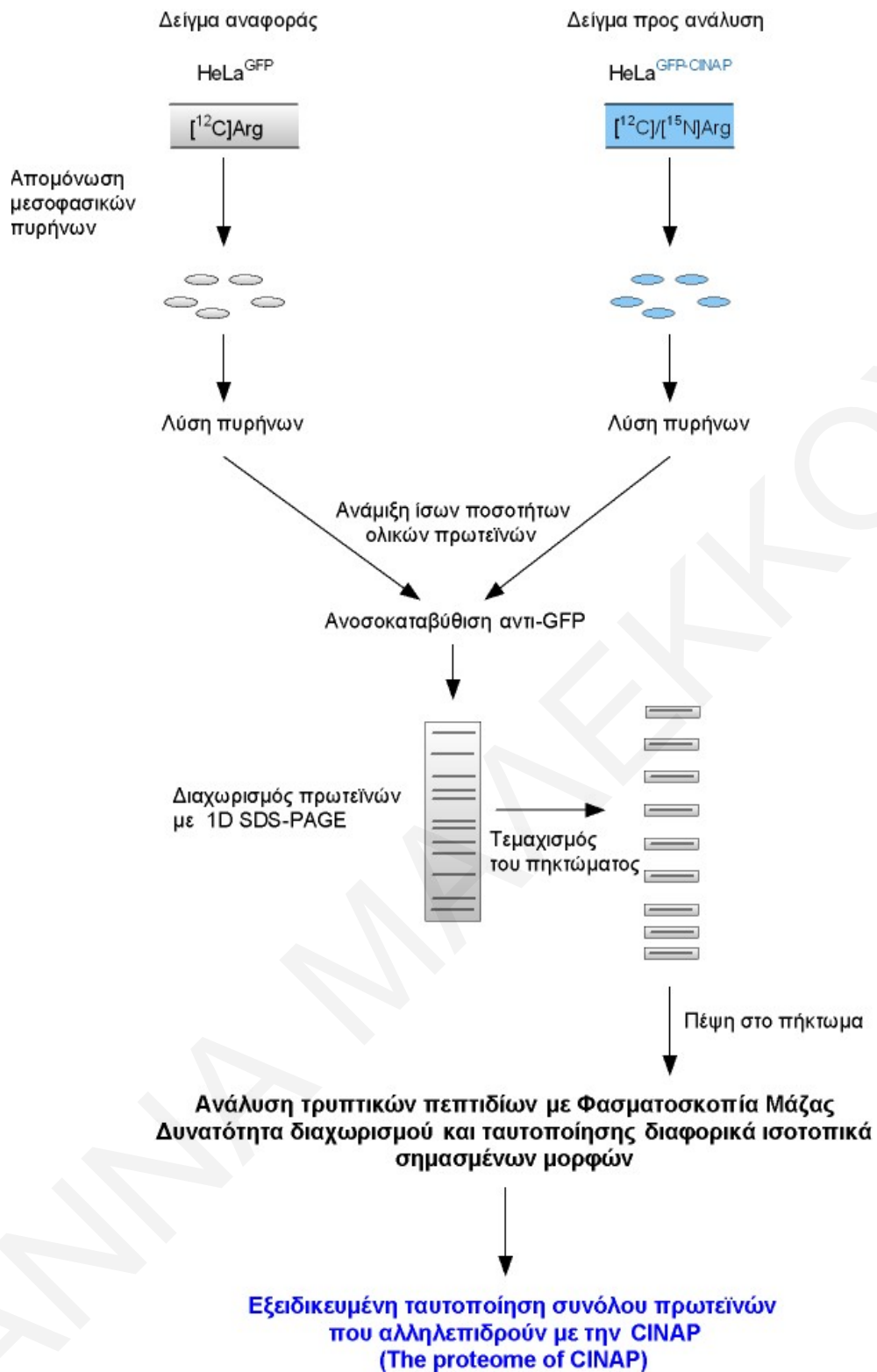
Σχήμα 3.13: Ανοσοκαταβύθιση μεθόδου SILAC. Στο ανοσοαποτύπωμα κατά Western που λήφθηκε μετά την ανοσοκαταβύθιση φαίνονται οι πρωτεΐνες GFP και hCINAP πριν την ανάμιξη τους (δύο πρώτα δείγματα αντίστοιχα) και μετά την ανάμιξη τους σε αναλογία 1:1 πριν την προσθήκη (τρίτο δείγμα) και μετά την προσθήκη (τέταρτο δείγμα) των σφαιριδίων. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν έναντι της GFP (GFP-binder).

Στη συνέχεια οι ανοσοκαθυθιζόμενες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Σχήμα 3.14) και έπειτα το πήκτωμα τεμαχίστηκε σε μικρά τμήματα (8 τμήματα) τα οποία έτυχαν πρωτεολυτικής διάσπασης με θρυψίνη πάνω στο πήκτωμα (in-gel). Με τη ραδιενεργό σήμανση της αργινίνης, οι πρωτεΐνες σημάνθηκαν συγκεκριμένα στα σημεία τα οποία διασπώνται από τη θρυψίνη και αυτό διευκόλυνε την περαιτέρω ανάλυση τους.

Τα παραγόμενα τρυπτικά πεπτίδια εξήχθησαν από τα τμήματα του πηκτώματος, για την αυτοματοποιημένη ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας, με τον φασματογράφο LTQ-FT-ICR (Thermo Finnigan). Η ανάλυση των δεδομένων της φασματοσκοπίας, η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των τρυπτικών πεπτιδίων, και συνεπώς του συνόλου των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την hCINAP, πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MS-Quant σε συνδυασμό με τη βάση δεδομένων Mascot HTML database search files (Matrix Science). Το σύνολο των πρωτεϊνών που φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με την GFP-hCINAP, όπως αυτά προέκυψαν μετά από την ανάλυση των δεδομένων της φασματοσκοπίας μάζας, φαίνονται στον Πίνακα 3.8 (Παράρτημα).



Σχήμα 3.14: Ανοσοκαταβύθιση της διαδικασίας SILAC. Στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου NuPAGE 4-12% Bis-Tris φαίνεται το δείγμα όπως αυτό προέκυψε μετά την ανοσοκαταβύθιση της SILAC (καταβυθισμένες πρωτεΐνες) μετά την αποδιάταξη και αποδέσμευση του από τα σφαιρίδια. Στο πήκτωμα είναι διακριτές οι δύο γνωστές πρωτεΐνες GFP και hCINAP (βέλη), ενώ δεξιά σημειώνονται τα 8 τμήματα στα οποία τεμαχίστηκε στη συνέχεια το πήκτωμα.



Σχήμα 3.15: Σχεδιάγραμμα της σύνθετης πειραματικής διαδικασίας της μεθόδου SILAC

3.3.3.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών που προέκυψαν με τη μέθοδο SILAC με πειράματα ανοσοκαταβύθισης

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων, από τη φασματοσκοπία μάζας, οδήγησε στην ταυτοποίηση των αντίστοιχων πρωτεϊνών και από αυτές επιλέγηκαν αρχικά οι πρωτεΐνες οι οποίες παρουσίαζαν αναλογία GFP-hCINAP:GFP πάνω από 1.5 (Πίνακας 3.8, Παράρτημα). Αφού μελετήθηκαν προσεκτικά τα φάσματα που έδωσαν τα πεπτίδια σε κάθε περίπτωση ξεχωριστά, επιλέγηκαν οι πρωτεΐνες αυτές (γκρίζο και πράσινο χρώμα), για τις οποίες τα τρύπτικα πεπτίδια επιβεβαίωναν με ασφαλή τρόπο τα ληφθέντα αριθμητικά αποτελέσματα. Από αυτές υπήρχαν αρκετές πρωτεΐνες οι οποίες είναι γνωστό ότι σε πειράματα SILAC ανοσοκαταβυθίζονται όχι ειδικά και μάλιστα σε αναλογία μεγαλύτερη από 1, όπως είναι διάφορες δομικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (διάφορα είδη κερατινών, μυοσίνη, ακτίνη, πλεκτίνη, τουμπουλίνη κ.α), οι οποίες και αποκλείστηκαν (Trinkle-Mulcahy, δημοσίευτα πειραματικά δεδομένα). Στη συνέχεια από το σύνολο των πρωτεϊνών αυτών, επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση αυτές (πράσινο χρώμα) που θεωρήθηκαν πιο ενδιαφέρουσες ως προς την λειτουργία και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό (πυρηνικές) και επιπλέον, υπήρχαν διαθέσιμα εμπορικά αντισώματα έναντι τους.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την συνδυαστική τεχνική SILAC-MS, επιχειρήθηκε να επιβεβαιωθούν με την τεχνική της ανοσοκαταβύθισης, τόσο με χρήση πυρηνικών πρωτεϊνικών κλασμάτων από τη σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά 33C (GFP-hCINAP) όσο και από την κυτταροσειρά HeLa (ενδογενής hCINAP). Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια G-Sepharose και A-Sepharose στα οποία προσδέθηκαν τα αντισώματα έναντι του GFP και της hCINAP ή pre-immune, αντίστοιχα. Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν: η σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP} στη πρώτη περίπτωση και το αντίσωμα pre-immune στη δεύτερη περίπτωση.

Για τον έλεγχο του αποτελέσματος, τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο ισόποσα μέρη, φορτώθηκαν σε δύο πανομοιότυπα πηκτώματα ακρυλαμιδίου και πραγματοποιήθηκε παράλληλη ηλεκτροφόρηση στην ίδια συσκευή ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα anti-GFP και anti-hCINAP για την επιβεβαίωση της δέσμευσης των αντίστοιχων πρωτεϊνών πάνω στα σφαιρίδια (επιτυχία ανοσοκαταβύθισης) και εξειδικευμένα αντισώματα έναντι των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

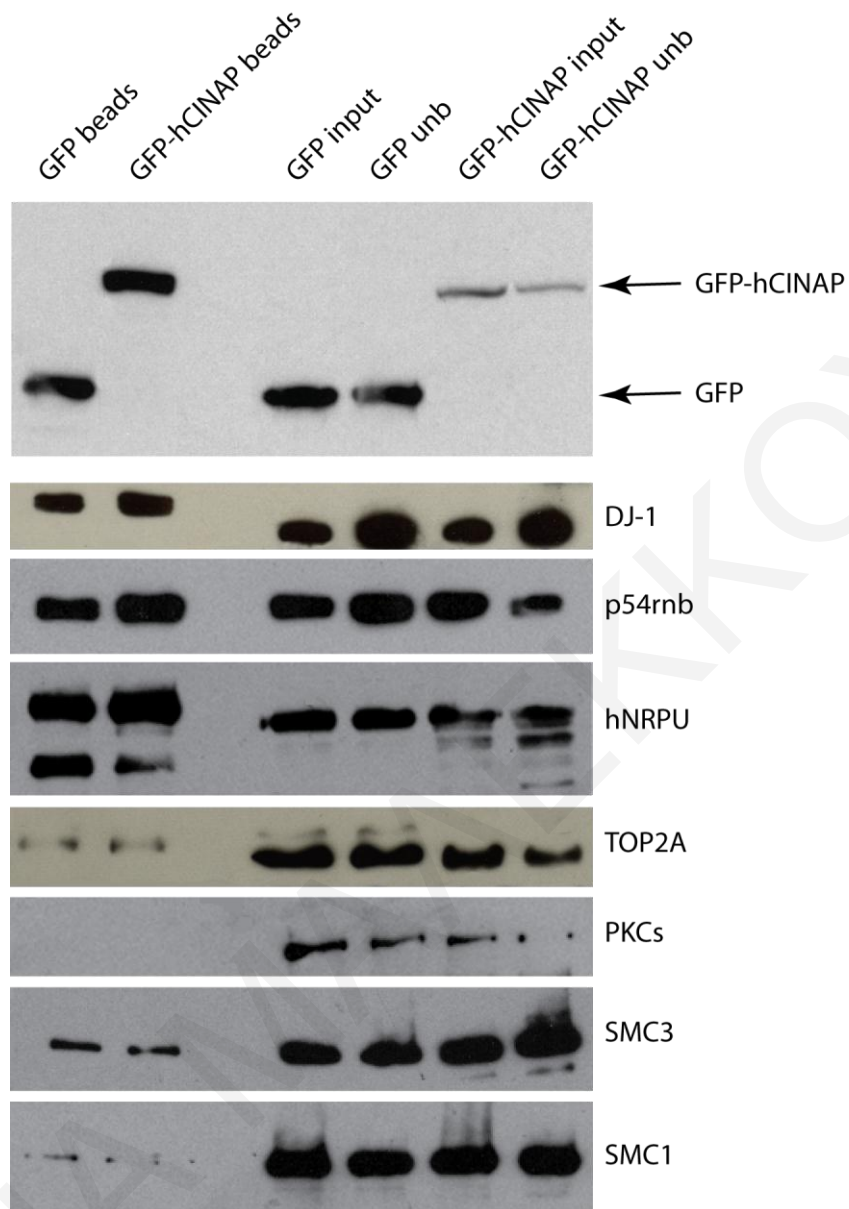
Στο Σχήμα 3.16, φαίνονται τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν μετά από ανοσοκαταβύθιση. Στο πάνω μέρος του σχήματος, παρουσιάζεται το ανοσοαποτύπωμα που λήφθηκε με χρήση του αντισώματος έναντι της GFP. Παρατηρείται ότι οι δύο

πρωτεΐνες δεσμεύονται σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό στα αντίστοιχα σφαιρίδια. Στο ίδιο σχήμα φαίνονται τα αντίστοιχα ανοσοαποτυπώματα για τις διάφορες πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν να διερευνηθούν. Από το αποτέλεσμα, γίνεται αντιληπτό ότι οι πρωτεΐνες αυτές ανοσοκαταβυθίζονται με το ίδιο περίπου ποσοστό τόσο με τα σφαιρίδια που είναι προσδεδεμένη η πρωτεΐνη GFP-hCINAP, όσο και με τα σφαιρίδια στα οποία είναι προσδεδεμένη μόνο η πρωτεΐνη GFP (αρνητικό δείγμα ελέγχου). Αυτό συμβαίνει με όλες τις πρωτεΐνες, εκτός από την περίπτωση της καταλυτικής υπομονάδας της εξαρτώμενης κινάσης του DNA (catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase, DNA-PKCs), η οποία δεν ανιχνεύεται σε κανένα από τα δείγματα των σφαιριδίων.

Αντίστοιχα αποτελέσματα για τις υπό μελέτη πρωτεΐνες λήφθηκαν και με την ανοσοκαταβύθιση της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP (το σχήμα δε παρατίθεται). Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, δεν μπορεί δυστυχώς να εξαχθεί θετικό αποτέλεσμα για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με την πρωτεΐνη hCINAP.

Επομένως, από την πραγματοποίηση της μεθόδου SILAC/MS, δεν έγινε κατορθωτό να ταυτοποιηθούν οι πρωτεϊνικοί εταίροι της hCINAP, που ήταν ο στόχος της παρούσας ενότητας. Οι πρωτεΐνες οι οποίες επιλέχθηκαν να μελετηθούν δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα. Σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες ανοσοκαταβυθίζονταν τόσο με την hCINAP όσο και με την GFP, δηλώνοντας την ύπαρξη μη ειδικότητας προς την αλληλεπίδραση. Άρθρο το οποίο δημοσιεύτηκε μετά την επιλογή αυτών των πρωτεϊνών και την πραγματοποίηση της διερεύνησης της αλληλεπίδρασης κατάταξε πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες στον κατάλογο των πρωτεϊνών που ανιχνεύονται στη μέθοδο SILAC ως πρωτεΐνες που δεσμεύονται μη ειδικά με την πρωτεΐνη GFP ή στα σφαιρίδια σεφαρόζης και εμφανίζονται θετικές (Trinkle-Mulcahy et al., 2008). Παρόλο που η τεχνική SILAC παρέχει μεγάλη βοήθεια στην διαλογή των ειδικών από τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις, προκύπτει ότι δεν μπορούν όλες οι «ειδικές» αλληλεπιδράσεις να επιβεβαιωθούν χωρίς αμφιβολία, ειδικά αυτές που έχουν χαμηλό λόγο πρωτεΐνης:GFP.

Μελλοντικά, θα μπορούσαν να επιλεγούν και να μελετηθούν κάποιες από τις πρωτεΐνες που προέκυψαν, οι οποίες δεν παρουσιάζονται στον κατάλογο των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, ενδιαφέρον θα αποτελούσε η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της hCINAP με τη ριβοσωμική πρωτεΐνη RPS14. Αν και οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες συγκαταλέγονται στη λίστα των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων, στη μέθοδο SILAC, το γεγονός ότι η ομόλογη της RPS14 σε δύο οργανισμούς, στο σακχαρομύκητα και στη Δροσόφιλα, παρουσιάζει αλληλεπίδραση με τις ομόλογες πρωτεΐνες της hCINAP σε αυτούς τους οργανισμούς, την FAP7 (Granneman et al., 2005) και την DAK6 (Giot et al., 2003) αντίστοιχα, την κατατάσσει ως έναν ενδιαφέροντα στόχο προς διερεύνηση.



Σχήμα 3.16: Ανοσοκαταβόθιση/Διερεύνηση αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης GFP-hCINAP, με μέρος πρωτεϊνών που προέκυψαν από τη μέθοδο SILAC.

3.4 Κατασκευή και χαρακτηρισμός της σταθερά μετασηματισμένης κυτταροσειράς (stable transformant) HeLa^{GFP-hCINAP}

3.4.1 Κατασκευή σταθερά μετασηματισμένης κυτταροσειράς τύπου HeLa^{GFP-hCINAP}

Για την πραγματοποίηση των στόχων αυτής της πειραματικής ενότητας ήταν αναγκαία η κατασκευή σταθερά μετασηματισμένης κυτταροσειράς (stable transformant) τύπου HeLa^{GFP-hCINAP} (2.3.7), στην οποία η πρωτεΐνη hCINAP ήταν συγχωνευμένη με την πράσινο-φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein).

Το πρώτο βήμα για την κατασκευή αυτής της κυτταροσειράς ήταν η κλωνοποίηση του cDNA της πρωτεΐνης hCINAP στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP (Clontech). Αυτός ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη (kan^r), για επιλογή στα βακτήρια, και νεομυκίνη (neo^r) για επιλογή σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ενδονουκλεολυτική διάσπαση του πλασμιδίου pAS2-1-hCINAP με τα ένζυμα EcoRI-SalI και κλωνοποίηση του cDNA της πρωτεΐνης hCINAP στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP.

Δεύτερο βήμα στη δημιουργία σταθερά μετασηματισμένης κυτταροσειράς αποτέλεσε ο προσδιορισμός της επιθυμητής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού γενετισίνης (G418), που ήταν ικανή να σκοτώσει τα κύτταρα HeLa. Η G418 αποτελεί ανάλογο της νεομυκίνης και χρησιμοποιείται για επιλογή στα ευκαρυωτικά κύτταρα παρεμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, με αποτέλεσμα το σταδιακό θάνατο των κυττάρων σε περίοδο 2 βδομάδων. Η συγκέντρωση που απαιτείται διαφέρει αναλόγως με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν κύτταρα HeLa στην παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού και προσδιορίστηκε η μικρότερη ποσότητα του αντιβιοτικού που ήταν ικανή να θανατώσει τα κύτταρα, 500 µg/ml, και η οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την κατασκευή της σταθερά μετασηματισμένης κυτταροσειράς, για την επιλογή των κυττάρων που εξέφραζαν το διαγονίδιο GFP-hCINAP.

Εν συνεχεία, κυτταροκαλλιέργεια τύπου HeLa επιμολύνθηκε με το πλασμίδιο pEGFP-hCINAP, είτε στη κυκλική του μορφή είτε στη γραμμική μετά από ενδονουκλεολυτική του διάσπαση με το ένζυμο *MluI* και πραγματοποιήθηκε επιλογή των σταθερά μετασηματισμένων κλώνων με το αντιβιοτικό γενετισίνη (G418) για περίοδο 2 βδομάδων. Επομένως, στην καλλιέργεια ευνοήθηκε η ανάπτυξη μόνο εκείνων των κυττάρων, τα οποία είχαν ενσωματώσει το πλασμίδιο στο γενετικό τους υλικό, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα οδηγήθηκαν σε θάνατο.

Με την πάροδο του χρόνου, με αυτό τον τρόπο, επιλέγηκαν τα κύτταρα που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418 και απομονώθηκαν 70 ανθεκτικές αποικίες. Ακολούθησε έλεγχος τους με μικροσκοπία φθορισμού και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Οι μονήρεις αποικίες παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού για εντοπισμό εκείνων που το ποσοστό των κυττάρων τους που παρουσίαζε φθορισμό ήταν $\geq 50\%$ και επιπλέον ο ενδοκυττάριος εντοπισμός συμφωνούσε με αυτόν που παρουσίαζε η GFP-hCINAP. Επιπρόσθετα, οι κλώνοι μελετήθηκαν με την τεχνική ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με αντίσωμα έναντι της GFP και της hCINAP, για να διαπιστωθεί η παρουσία της υβριδικής πρωτεΐνης και για να γίνει σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της με την ενδογενή hCINAP. Σε αρκετούς από τους κλώνους αυτούς δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της υβριδικής πρωτεΐνης, πιθανόν λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής έκφρασης της πρωτεΐνης ή λόγω του ότι τα κύτταρα με κάποιο τρόπο αποσιωπούν το ενσωματωμένο στο γονιδίωμα τους υβριδικό διαγονίδιο GFP-hCINAP.

Ακολούθως, οι θετικοί κλώνοι αραιώθηκαν διαδοχικά για την παραγωγή κυτταροσειράς υψηλής απόδοσης, στην οποία το 95% των κυττάρων εξέφραζε την υβριδική πρωτεΐνη GFP-hCINAP. Οι αντίστοιχοι μονήρεις κλώνοι, φυλάχτηκαν σε υγρό άζωτο για μελλοντικά πειράματα.

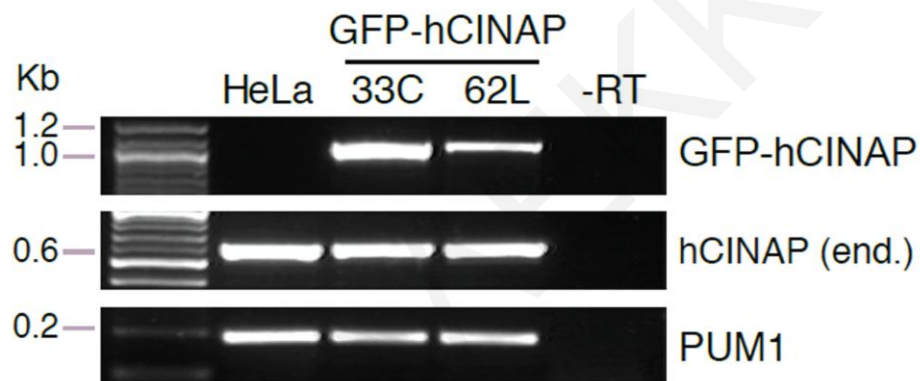
3.4.2 Χαρακτηρισμός των δύο σταθερά μετασηματισμένων κλώνων, 33C και 62L, HeLa^{GFP-hCINAP}

Από τους κλώνους της σταθεράς μετασηματισμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP} που φυλάχθηκαν, επιλέχθηκαν δύο για περαιτέρω ανάλυση: οι κλώνοι 33C και 62L. Το C δηλώνει ότι ο κλώνος αυτός προήλθε μετά από επιμόλυνση του πλασμιδίου GFP-hCINAP σε κυκλική μορφή και το L σε γραμμική μορφή, αντίστοιχα. Οι κλώνοι αυτοί μελετήθηκαν ως προς τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα, τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της εκφραζόμενης πρωτεΐνης και τη κατανομή του κυτταρικού κύκλου.

3.4.2.1 Έλεγχος μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων

Για να επιβεβαιωθεί ότι το cDNA της hCINAP είχε ενσωματωθεί στο γονιδίωμα των κυττάρων στις δύο αυτές κυτταροσειρές (33C και 62L) και για να γίνει σύγκριση των μεταγραφικών επιπέδων του πραγματοποιήθηκε RT-PCR (Σχήμα 3.17). Για την PCR χρησιμοποιήθηκε εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο του 5' άκρου (Πίνακας 2.11), το οποίο

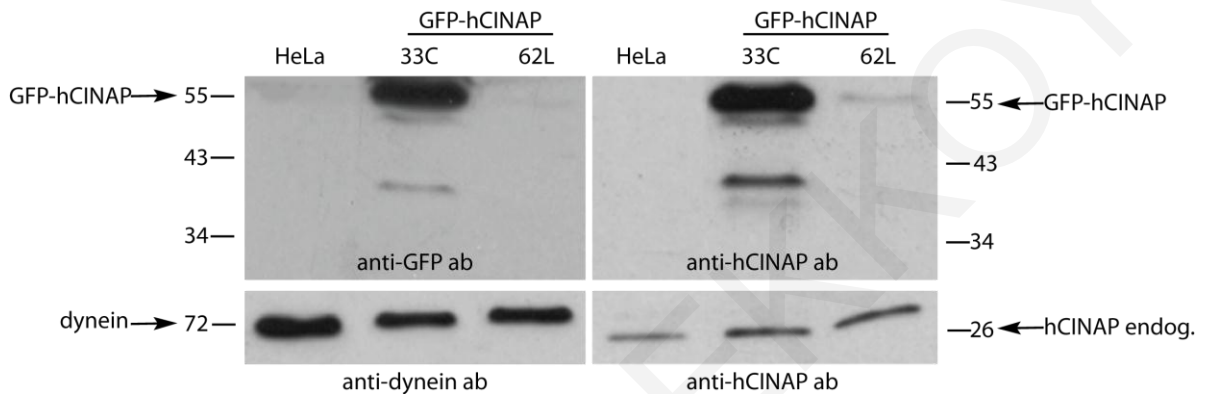
υβριδιζόταν σε αλληλουχία της GFP και όχι της ενδογενούς hCINAP, και εκκινητικό ολιγονουκλεοτίδιο του 3' άκρου το οποίο υβριδιζόταν στην αλληλουχία της hCINAP, πολλαπλασιάζοντας έτσι ειδικά το μεταγράφημα της GFP-hCINAP (GFPUP και CIPRV-pACT2), δίνοντας ένα προϊόν 1055 bp. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν και αντιδράσεις εσωτερικού ελέγχου με τη χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων για τα ενδογενή μεταγραφήματα της hCINAP (VIIPCR5' και CIPRV-pACT2) και του γονιδίου Pumilio 1 (PMU1, housekeeping gene) (PUM1UP και PUM1RV), δίνοντας αντίστοιχα προϊόντα 530 bp και 186 bp.



Σχήμα 3.17: Επιβεβαίωση της ενσωμάτωσης του cDNA της GFP-hCINAP στις δύο σταθερές μετασηματισμένες κυτταροσειρές, 33C και 62L και σύγκριση των μεταγραφικών τους επιπέδων. Ανίχνευση με την μέθοδο RT-PCR του cDNA της GFP-hCINAP (πάνω σειρά), της ενδογενούς hCINAP (μεσαία σειρά) και του γονιδίου PUM1 (housekeeping gene) που λειτούργησε ως εσωτερικό δείγμα ελέγχου (κάτω σειρά), στις σταθερά μετασηματισμένες κυτταροσειρές 33C και 62L, καθώς επίσης και στη κυτταροσειρά HeLa. Για τον έλεγχο της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε δείγμα που περιείχε το mRNA από τον κλώνο 33C στο οποίο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση χωρίς αντίστροφη μεταγραφή (33C-RT).

Παράλληλα, για την σύγκριση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης στις δύο σταθερά μετασηματισμένες κυτταροσειρές, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τις δύο κυτταροσειρές, καθώς και από την κυτταροσειρά HeLa, που λειτουργούσε ως δείγμα ελέγχου, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών hCINAP (Σχήμα 3.18, πάνω και κάτω, σειρά δεξιά) και GFP (Σχήμα 3.18, πάνω σειρά, αριστερά), καθώς επίσης και έναντι

της δυνεΐνης το οποίο λειτούργησε ως δείγμα εσωτερικού ελέγχου για το ισόποσο φόρτωμα των δειγμάτων (Σχήμα 3.18, κάτω σειρά, αριστερά).



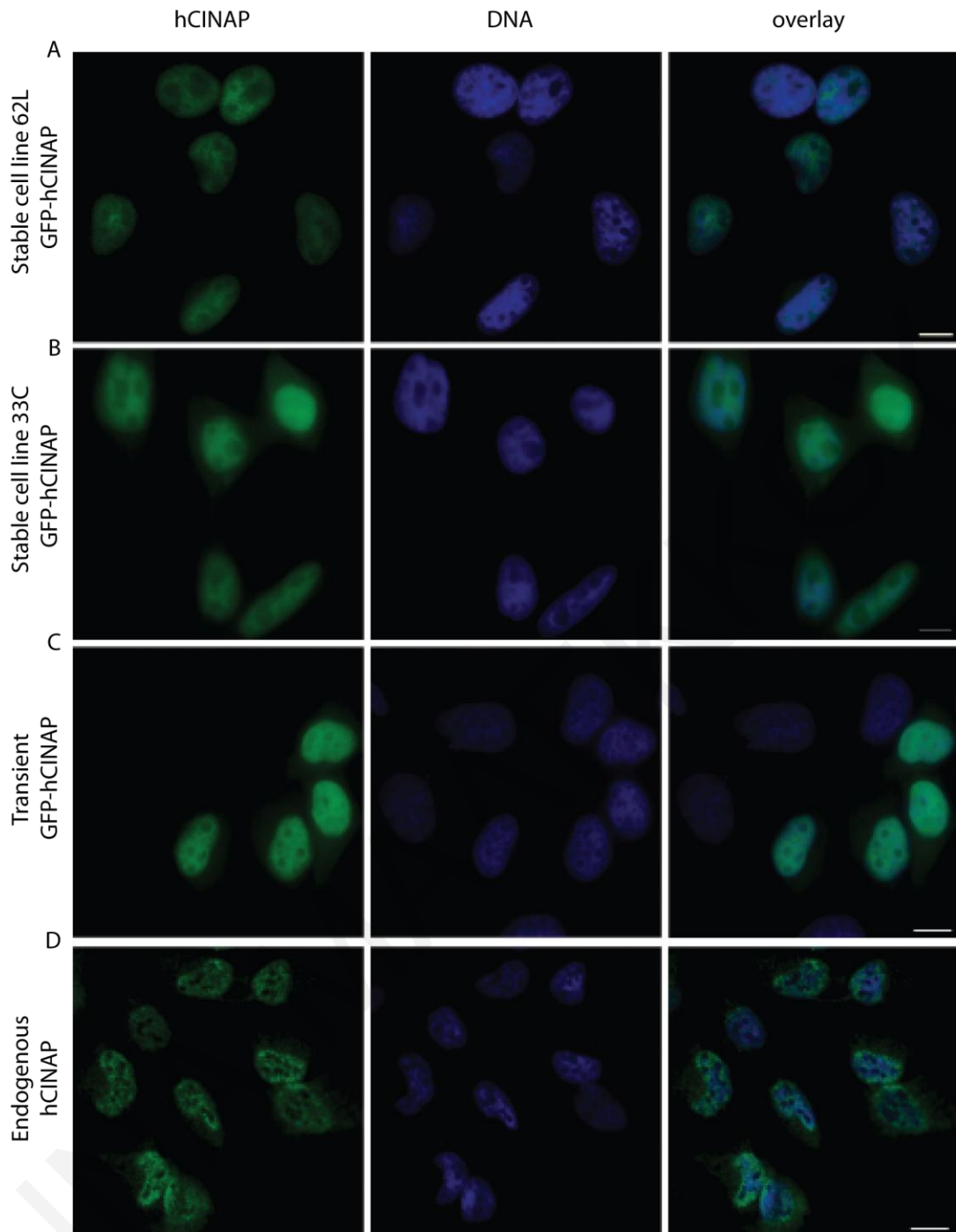
Σχήμα 3.18: Σύγκριση πρωτεϊνικών επιπέδων της GFP-hCINAP, στις δύο σταθερά μετασηματισμένες κυτταροσειρές 33C και 62L με την ενδογενή πρωτεΐνη. Αυτοραδιογράφημα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης GFP-hCINAP (πάνω αριστερή και δεξιά σειρά) και της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP (endog.) (κάτω δεξιά σειρά), με χρήση των αντισωμάτων anti-GFP και anti-hCINAP, όπως δηλώνονται στο σχήμα. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η κυτταροσειρά HeLa. Η ανίχνευση της δυνεΐνης (dynein) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό δείγμα αναφοράς φορτώματος (ισόποσα δείγματα). Τα τέσσερα αυτοραδιογραφήματα προήλθαν από δύο πανομοιότυπα πηκτώματα SDS-PAGE που έτρεξαν παράλληλα, αλλά κόπηκαν και επώαστηκαν με διαφορετικά αντισώματα. Ο χρόνος έκθεσης ήταν 10 s, εκτός από το τμήμα της ενδογενούς hCINAP που ήταν 20 s.

Από το αποτέλεσμα της RT-PCR, φαίνεται ότι το διαγονίδιο GFP-hCINAP έχει ενσωματωθεί στους δύο κλώνους, 33C και 62L, και μάλιστα το επίπεδο έκφρασης του μεταγραφήματος του σε αυτούς είναι συγκρίσιμο με αυτό της ενδογενούς hCINAP. Επιπλέον προκύπτει, ότι η έκφραση του μεταγραφήματος της GFP-hCINAP στον κλώνο 33C είναι περίπου 3 φορές πιο ψηλή σε σχέση με αυτήν του 62L.

Αντίστοιχα, από την ανοσοαποτύπωση κατά Western προκύπτει ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GFP-hCINAP στον κλώνο 62L είναι συγκρίσιμα με αυτά της ενδογενούς hCINAP, δεδομένου του γεγονότος ότι ο χρόνος έκθεσης του αυτοραδιογραφήματος της GFP-hCINAP (Σχήμα 3.18, πάνω αριστερή σειρά) είναι ο μισός αυτού της hCINAP (Σχήμα 3.18, κάτω αριστερή σειρά), ενώ του 33C είναι πολύ μεγαλύτερα από αυτά της ενδογενούς πρωτεΐνη hCINAP και κατά συνέπεια και του κλώνου 62L (περίπου 15 φορές).

3.4.2.2 Μελέτη του ενδοκυττάριου εντοπισμού

Με χρήση της τεχνικής του ανοσοφθορισμού επιβεβαιώθηκε ότι η πρωτεΐνη GFP-hCINAP και στους δυο αυτούς κλώνους, παρουσίαζε σωστό ενδοκυττάριο εντοπισμό (Σχήμα 3.19, A και B), ταυτόσημο με αυτό που παρουσίαζε μετά από παροδική επιμόλυνση με το πλασμίδιο pEGFP-hCINAP (Σχήμα 3.19, C) και αυτόν της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP (Σχήμα 3.19, D), όπως αυτή ανιχνεύτηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της. Το επίπεδο της έκφρασης της GFP-hCINAP, όπως ανιχνεύθηκε από τη μικροσκοπία φθορισμού, ήταν εμφανώς πολύ μεγαλύτερο στο κλώνο 33C (Σχήμα 3.19, B) σε σύγκριση με τον κλώνο 62L (Σχήμα 3.19, A). Να σημειωθεί ότι ο χρόνος έκθεσης του 33C ήταν 7 φορές λιγότερος σε σχέση με αυτόν του 62L στη φωτογραφία του σχήματος 3.19. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με το αποτέλεσμα που προέκυψε από τον έλεγχο της έκφρασης των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων, όπου η έκφραση στον 33C είναι πολύ μεγαλύτερη σε σύγκριση με τον 62L.



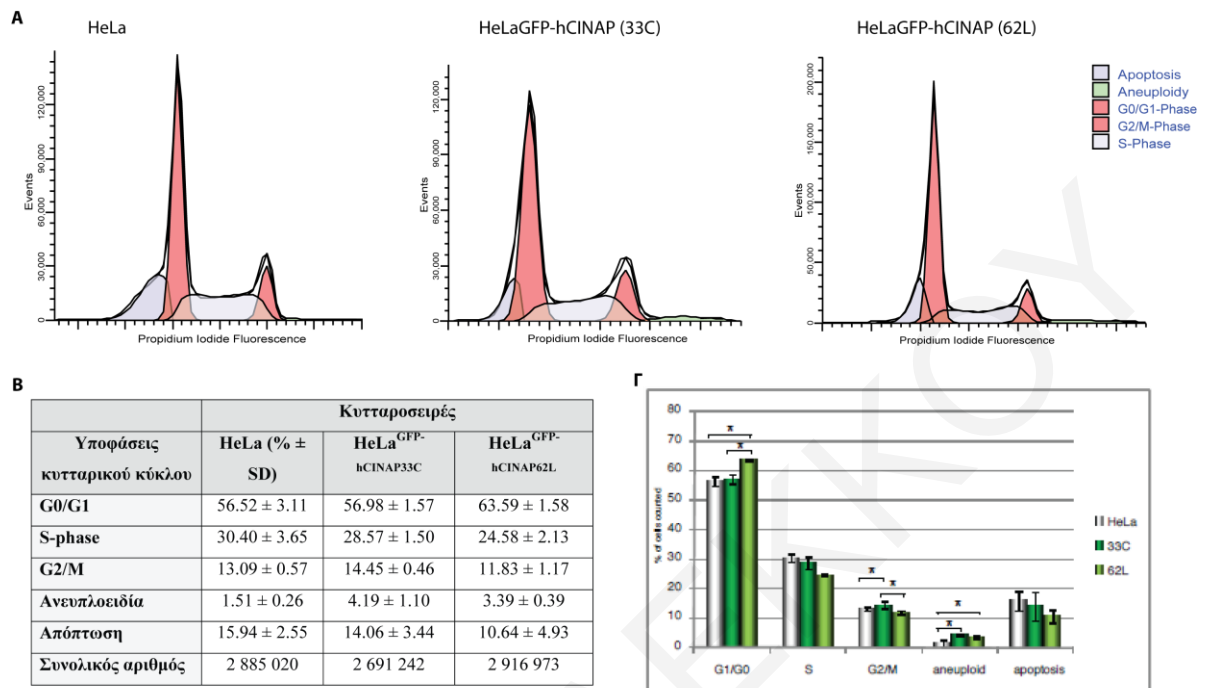
Σχήμα 3.19: Ενδοκυττάριος εντοπισμός και έκφραση της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP. Ανοσοφθορισμός της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP, στις δύο σταθερά μετασχηματισμένες κυτταροσειρές HeLa^{GFP-hCINAP}, 62L (A) και 33C (B) ή σε κύτταρα HeLa μετά από παροδική επιμόλυνση με το πλασμίδιο GFP-hCINAP (C). Για σύγκριση, παρουσιάζεται η ενδογενής hCINAP, όπως αυτή ανιχνεύεται με πολικλωνικό αντίσωμα έναντι της (D). Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει είτε τον φθορισμό από την GFP-hCINAP (A, B και C), είτε τον φθορισμό από το δεύτερο αντίσωμα (D), ενώ το μπλε χρώμα τους πυρήνες που σημάνθηκαν με τη χρωστική Hoechst 33342. Κλίμακα: 10 μm.

3.4.2.3 Έλεγχος κυτταρικού κύκλου

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των δύο κλώνων, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής (FACS) για να μελετηθεί ο κυτταρικός κύκλος του πληθυσμού των δύο κλώνων (33C και 62L) σε σχέση με την κυτταροσειρά HeLa, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η υβριδική πρωτεΐνη GFP-hCINAP ρυθμίζεται κατά τον ίδιο τρόπο με την ενδογενή πρωτεΐνη.

Κύτταρα των τριών διαφορετικών κυτταροσειρών που βρίσκονταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, μονιμοποιήθηκαν με τη βοήθεια 70% αιθανόλης και ακολούθησε χρώση του DNA με προσθήκη διαλύματος ιωδιούχου προπιονιδίου/RNase (2.3.10) και υποβλήθηκαν σε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS).

Τα διαγράμματα μιας ενδεικτικής πειραματικής ενότητας από την ανάλυση FACS, για τις τρεις κυτταροσειρές, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.20 Α, ενώ η ποσοτικοποίηση της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου για κάθε κυτταροσειρά παρουσιάζεται στο πίνακα του Σχήματος 3.20 (τμήμα Β), με υπόδειξη του μέσου όρου τριών διαφορετικών πειραμάτων και τις τυπικές αποκλίσεις σε κάθε περίπτωση. Το ίδιο αποτέλεσμα παρουσιάζεται υπό μορφή ραβδογράμματος (Σχήμα 3.20 Γ) με τους αστερίσκους να υποδηλώνουν την μεγαλύτερη απόκλιση, συγκρίνοντας την κάθε φάση ξεχωριστά. Από τα αποτελέσματα αυτά, γίνεται σαφές ότι οι σταθερά μετασχηματισμένες κυτταροσειρές εμφανίζουν παρόμοια κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου με αυτή που εμφανίζει η κυτταροσειρά HeLa, με μικρές μόνο διαφορές στις φάσεις, με πιο εμφανή την μικρή αύξηση των ανευπλοειδών κυττάρων στις δύο σταθερά μετασχηματισμένες κυτταροσειρές, 33C και 62L σε σύγκριση με τη κυτταροσειρά HeLa. Επομένως, η ενσωμάτωση του διαγονιδίου στα κύτταρα και η έκφραση του υβριδικού μορίου GFP-hCINAP δε φαίνεται να προκαλεί προβλήματα στον κυτταρικό κύκλο.

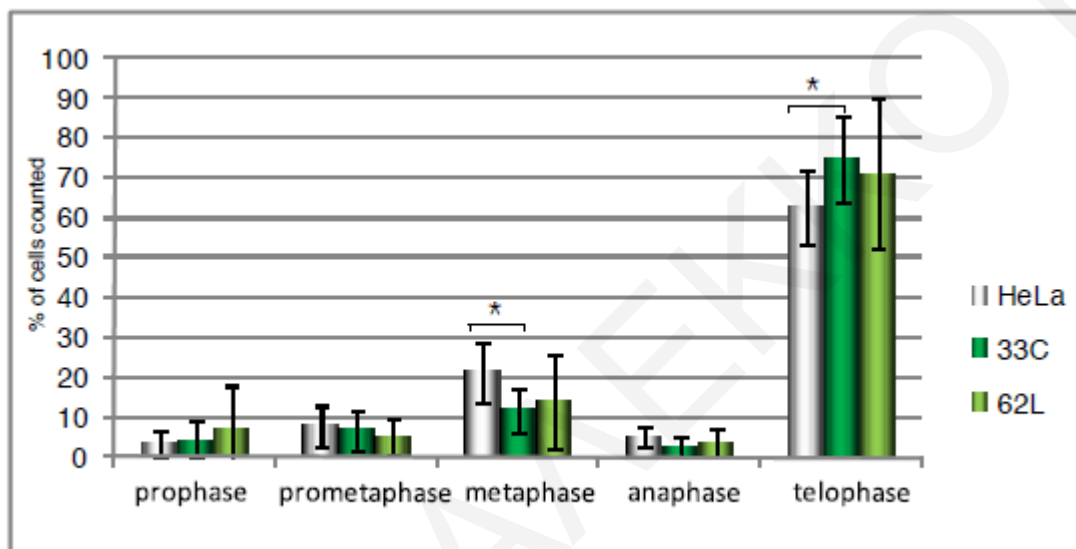


Σχήμα 3.20: Σύγκριση του προτύπου κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου των δύο κλώνων, 33C και 62L, με την κυτταροσειρά HeLa, μετά από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS). **A:** Παρουσιάζονται τα διαγράμματα κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου για τις τρεις κυτταροσειρές, όπως αυτά προέκυψαν με ανάλυση των αποτελεσμάτων FACS με το πρόγραμμα ModFit. **B:** Στον πίνακα αναγράφονται τα αντίστοιχα % ποσοστά του μέσου όρου των κυττάρων, των τριών κυτταροσειρών, που βρίσκονται στις αντίστοιχες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, όπως προέκυψαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Σε κάθε περίπτωση σημειώνονται οι στατιστικές αποκλίσεις. **Γ:** Παρουσιάζονται τα ίδια αποτελέσματα υπό μορφή ραβδογράμματος, με τους αστερίσκους να υποδηλώνουν την μεγαλύτερη απόκλιση συγκρίνοντας την κάθε φάση ξεχωριστά (G1/G0: HeLa vs. 62L $p=0.0397938$, 33C vs. 62L $p=0.0067896$, G2/M: HeLa vs. 33C $p=0.0338386$, 33C vs. 62L $p=0.0459393$, Aneuploid: HeLa vs. 33C $p=0.0457571$, HeLa vs. 62L $p=0.0035021$) όπως προέκυψε από το heteroschedastic t-test (*Microsoft Excel*).

Για πιο ενδελεχή μελέτη της μίτωσης, έγινε ποσοτικοποίηση των επιμέρους υποφάσεων της, καθώς επίσης και του αριθμού των πυρήνων ανά κύτταρο με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Σε κύτταρα των δύο σταθερά μετασχηματισμένων κυτταροσειρών, καθώς και της κυτταροσειράς HeLa, πραγματοποιήθηκε σήμανση των μικροσωληνίσκων (αντίσωμα που αναγνώριζε την α -τουμπουλίνη) και του DNA (χρωστική Hoechst), έτσι ώστε να είναι εμφανής η μιτωτική άτρακτος και κατ' επέκταση οι διάφορες υποφάσεις της μίτωσης. Κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού, μετρήθηκε μεγάλος αριθμός κυττάρων ($n=6000$ για κάθε κυτταρική σειρά), και σε διάφορα οπτικά πεδία προσδιορίστηκε ο αριθμός των μεσοφασικών και μιτωτικών κυττάρων, καθώς και ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε επιμέρους υποφάση της μίτωσης.

Τα αποτελέσματα του μέσου όρου των μετρήσεων που προέκυψαν από τρία διαφορετικά πειράματα, όπως και οι στατιστικές αποκλίσεις, φαίνονται στο Σχήμα 3.21. Τα αποτελέσματα έτυχαν επεξεργασίας με στατιστική ανάλυση two-way ANOVA με το Bonferroni post-test (GraphPad Prism). Προέκυψε ότι υπήρχε μια μικρή αυξομείωση στις υποφάσεις της μίτωσης με τη κυτταροσειρά 33C να παρουσιάζει μικρή αλλά στατιστικά σημαντική διαφορά από την κυτταροσειρά ελέγχου HeLa, όπως υποδηλώνεται από τα αστεράκια στο ραβδόγραμμα (Σχήμα 3.21). Η κυτταροσειρά 33C παρουσίαζε μικρή μείωση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονταν στη μετάφαση και μικρή αύξηση αυτών της τελόφασης. Ωστόσο το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων που προέκυψε δεν παρουσίαζε διαφορά μεταξύ των κυτταροσειρών HeLa, 33C και 62L, που ήταν 6.40% ($n=6297$), 6.26% ($n=6379$) και 6.26% ($n=5274$), αντίστοιχα.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το χαρακτηρισμό των δύο σταθερά μετασχηματισμένων κυτταροσειρών HeLa^{GFP-hCINAP}, οι δύο κλώνοι, 33C και 62L, παρουσίαζαν φυσιολογική μορφολογία, σταθερή έκφραση και σωστό ενδοκυττάριο εντοπισμό της GFP-hCINAP, φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο και κρίθηκαν κατάλληλοι για πραγματοποίηση των περαιτέρω πειραμάτων.



Σχήμα 3.21: Κατανομή των Μιτωτικών Φάσεων, όπως αυτές προέκυψαν από Μικροσκοπία Φθορισμού. Τα κύτταρα σημάνθηκαν με αντί- α -tubulin και Hoechst 33342 και ποσοτικοποιήθηκαν ως μεσοφασικά ή κύτταρα συγκεκριμένων μιτωτικών υποφάσεων. Στο ραβδόγραμμα φαίνονται οι διάφορες φάσεις της μίτωσης για τις 3 κυτταροσειρές (HeLa, 33C και 62L) και οι αριθμοί αποτελούν το % ποσοστό τους επί των μιτωτικών κυττάρων. Οι αστερίσκοι δηλώνουν τις διαφορές οι οποίες είναι στατιστικά σημαντικές (metaphase: $p < 0.01$, telophase: $p < 0.001$), όπως αυτές προέκυψαν από την ανάλυση two-way ANOVA με Bonferroni post-test (GraphPad Prism).

3.5 Χρήση της σταθεράς επιμολυσμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP} σε *in vivo* πειράματα

Η πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτής της ενότητας διεξήχθησαν στο εργαστήριο του Καθηγητή Angus I. Lamond (University of Dundee, UK), το οποίο διέθετε όλο τον απαραίτητο εξοπλισμό, μετά από υποτροφία μικρής διάρκειας (3 μήνες) που μου απονεμήθη από το EMBO.

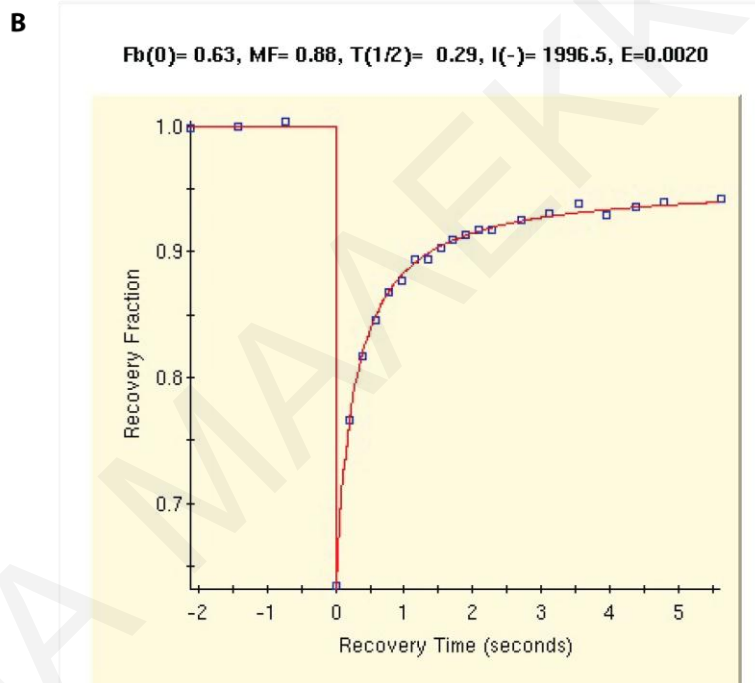
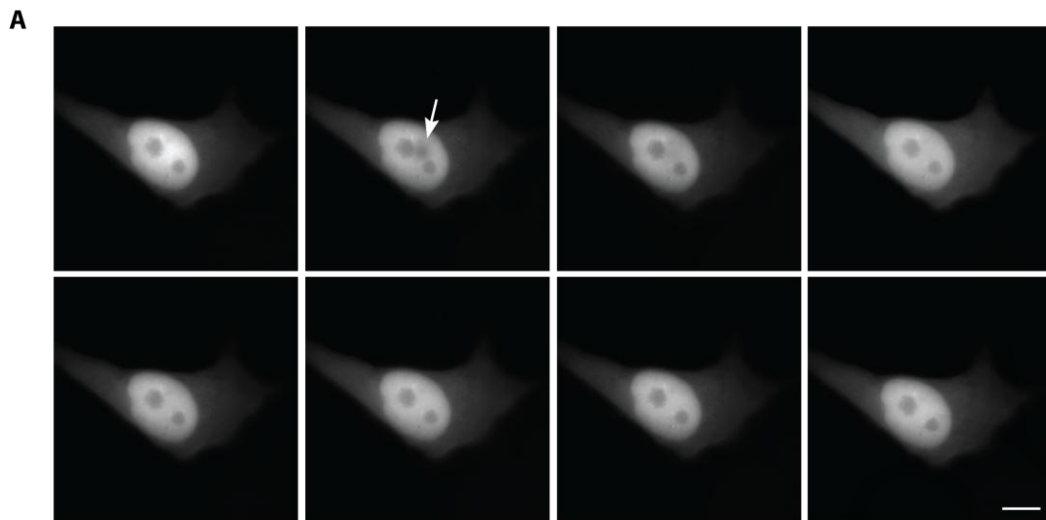
3.5.1 Μελέτη της κινητικότητας της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP με επαναφορά Φθορισμού Μετά από Φωτολεύκανση (FRAP-Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Η τεχνική της Επαναφοράς Φθορισμού Μετά από Φωτολεύκανση (FRAP) παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κινητική που εμφανίζει η υπό μελέτη πρωτεΐνη, καθώς και τη δυναμική που εμφανίζουν οι αλληλεπιδράσεις της με άλλα βιολογικά μακρομόρια. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από την τεχνική αυτή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εξαχθούν βιολογικά συμπεράσματα, όπως αν η hCINAP διαχέεται ελεύθερα μέσα στο κύτταρο, αν αποτελεί μέλος ενός μεγαλύτερου συμπλόκου ή αν προσδένεται σταθερά σε υποκυτταρικές δομές ή στο DNA του κυττάρου.

Για την πραγματοποίηση του πειράματος FRAP (2.3.12.2), τα κύτταρα της σταθεράς μετασηματισμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP(33C)} τοποθετήθηκαν στον ειδικό θερμαινόμενο θάλαμο του μικροσκοπίου DeltaVision Spectris wide-field deconvolution ο οποίος διέθετε αντλία παροχής διοξειδίου του άνθρακα, αφού προηγουμένως είχαν αναπτυχθεί σε ειδικά τρυβλία 35 mm με γυάλινο πυθμένα και το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό ανεξάρτητο του CO₂ που δεν περιείχε κόκκινο της φαινόλης. Αρχικά, λήφθηκαν 3 φωτογραφίες του κυττάρου και έπειτα προκλήθηκε φωτολεύκανση με το φωτοκινητικό μοντέλο του μικροσκοπίου σε μια μικρή περιοχή του πυρήνα με χρήση λέιζερ στα 488 nm (100% της ισχύς του λέιζερ για διάστημα 0.15 s). Θα πρέπει να τονισθεί ότι η φωτολεύκανση αφορά καταστροφή των μορίων GFP και όχι της συντηγμένης με αυτά πρωτεΐνης (Η φθορίζουσα ομάδα σε αυτή την περιοχή, λαμβάνει τόσο υψηλής έντασης ακτινοβολίας, που παρέρχεται η διάρκεια του φθορισμού της). Έπειτα λήφθηκαν συνεχόμενες φωτογραφίες, με χρόνο έκθεσης 0.1 s για κάθε εικόνα, για τη παρακολούθηση της ανάκαμψης του σήματος φθορισμού στην περιοχή που έτυχε φωτολεύκανση. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα φωτολεύκανσης που πραγματοποιήθηκε φαίνεται στο Σχήμα 3.22 Α.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SoftWoRx, με το οποίο έγινε ποσοτικοποίηση της έντασης του φθορισμού στην περιοχή της φωτολεύκανσης πριν και μετά τη διαδικασία. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η γραφική παράσταση της έντασης του φθορισμού ως συνάρτηση του χρόνου (καμπύλη επαναφοράς, Σχήμα 3.22 B) και υπολογίστηκε από αυτή ο χρόνος $t_{1/2}$, ο οποίος αποτελεί το χρονικό διάστημα που απαιτείται ώστε η ένταση του φθορισμού να φτάσει στο 50% της τελικής. Επίσης προσδιορίστηκε το επί τοις εκατό ποσοστό της πρωτεΐνης που είναι σταθερά προσδεδεμένο, που ορίζεται ως η διαφορά της αρχικής έντασης φθορισμού και του φθορισμού επαναφοράς μετά την φωτολεύκανση.

Η φωτολεύκανση πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 50 κύτταρα σε διάφορα σημεία του πυρηνοπλάσματος και ο $t_{1/2}$, όπως προέκυψε από τον μέσο όρο, ήταν 0.29 ± 0.03 s, ο οποίος είναι παρόμοιος με αυτόν της GFP ($t = 0.21$ s), όπως προκύπτει από την βιβλιογραφία, και το ποσοστό του κινητού κλάσματος $89\% \pm 4$. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η πρωτεΐνη hCINAP διαχέεται ελεύθερα μέσα στο κύτταρο, και ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό της ($11\% \pm 4$) προσδένεται σταθερά σε δομές του κυττάρου.



Σχήμα 3.22: Μελέτη της κινητικότητας της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP.

A. Φωτογραφικά στιγμιότυπα κατά την πραγματοποίηση της τεχνικής FRAP. Η αρχική εικόνα αποτελεί εικόνα πριν την φωτολεύκανση, η δεύτερη την στιγμή της φωτολεύκανσης και οι υπόλοιπες εικόνες κατοπινά στιγμιότυπα της φωτολεύκανσης μέχρι επαναφοράς της έντασης φθορισμού. Κλίμακα: 10 μm . **B.** Καμπύλη επαναφοράς του φθορισμού της GFP-hCINAP σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από πειράματα FRAP στη σταθερά επιμολυσμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP (33C)}. Οι μετρήσεις από τα πειράματα FRAP έχουν αναχθεί με τέτοιο τρόπο ώστε η πριν τη φωτολεύκανση ένταση του φθορισμού να αντιστοιχεί στη μονάδα, ενώ τη στιγμή της φωτολεύκανσης ($t=0$ sec) η ένταση να ισούται με το μηδέν.

3.5.2 Ανάλυση πρωτεϊνικού κύκλου ζωής της hCINAP με βιντεομικροσκοπία σε πραγματικό χρόνο (Time-lapse microscopy)

Για την διερεύνηση της δυναμικής συμπεριφοράς της hCINAP στον ευκαρυωτικό πυρήνα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ζωής, πραγματοποιήθηκε στιγμιοτυπική βιντεομικροσκοπία πραγματικού χρόνου. Η τεχνική αυτή, μπορεί να παράσχει ακριβείς πληροφορίες σχετικά με την χρονική αλληλουχία των γεγονότων που συμβαίνουν στο κύτταρο.

Για να είναι εφικτή η χρήση αυτής της τεχνικής θα πρέπει η υπό μελέτη πρωτεΐνη να παρουσιάζεται ως υβρίδιο με την αυτοφθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (πρασίνο-φθορίζουσα). Επομένως για την πραγματοποίηση αυτής της πειραματικής ενότητας χρησιμοποιήθηκε και πάλι η σταθερά μετασηματισμένη κυτταροσειρά *HeLa*^{GFP-CINAP} (κλώνοι 33C και 62L).

Τα κύτταρα μια μέρα πριν την παρατήρηση κάτω από το μικροσκόπιο DeltaVision Spectris wide-field deconvolution (Applied Precision), μεταφέρθηκαν σε ειδικά τρυβλία 35 mm με γυάλινο πυθμένα και κατά τη διάρκεια του πειράματος διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό ανεξάρτητο του CO₂, που δεν περιείχε κόκκινο της φαινόλης, αφού προηγουμένως σημάνθηκε το DNA των πυρήνων με αραιό διάλυμα χρωστικής Hoechst-33342 (2.3.12.1).

Στη συνέχεια τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον ειδικό θερμαινόμενο θάλαμο του μικροσκοπίου ο οποίος διαθέτει αντλία παροχής διοξειδίου του άνθρακα, ώστε η παρατήρηση των κυττάρων να επιτυγχανόταν υπό φυσιολογικές για το κύτταρο συνθήκες (37 °C θερμοκρασία και ατμόσφαιρα 5% CO₂). Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συστηματική στιγμιοτυπική καταγραφή του φθορισμού με λήψη δέσμης υπέρλεπτων (0.2 μm) οπτικών τομών (περίπου 20) ανά 20 min, για διάστημα περίπου 24 h, με αυτοματοποιημένο τρόπο, κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλής έντασης, με βάση το πρωτόκολλο των Platani et al., 2000. Τέλος, τα οπτικά δεδομένα έτυχαν επεξεργασίας με εξειδικευμένο αλγόριθμο (iterative constrained deconvolution algorithm) και η δομή απεικονίστηκε τρισδιάστατα με υψηλή ευκρίνεια (Swedlow et al., 1997). Ένα τέτοιο παράδειγμα παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.23.

Από τα πειράματα βιντεοσκοπίας πραγματικού χρόνου που πραγματοποιήθηκαν, και τις ταινίες που λήφθηκαν για κύτταρα που διαιρούνται [10 ταινίες για 62L και 17 ταινίες για 33C (19 κυτταρικές διαιρέσεις για κάθε κυτταροσειρά)], εξάγονται οι εξής παρατηρήσεις/ συμπεράσματα:

- 1) Στα διάφορα οπτικά πεδία παρατηρήθηκαν κύτταρα με διαφορετική ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης GFP-hCINAP. Εκείνο που παρατηρήθηκε στις ταινίες, είναι ότι τα

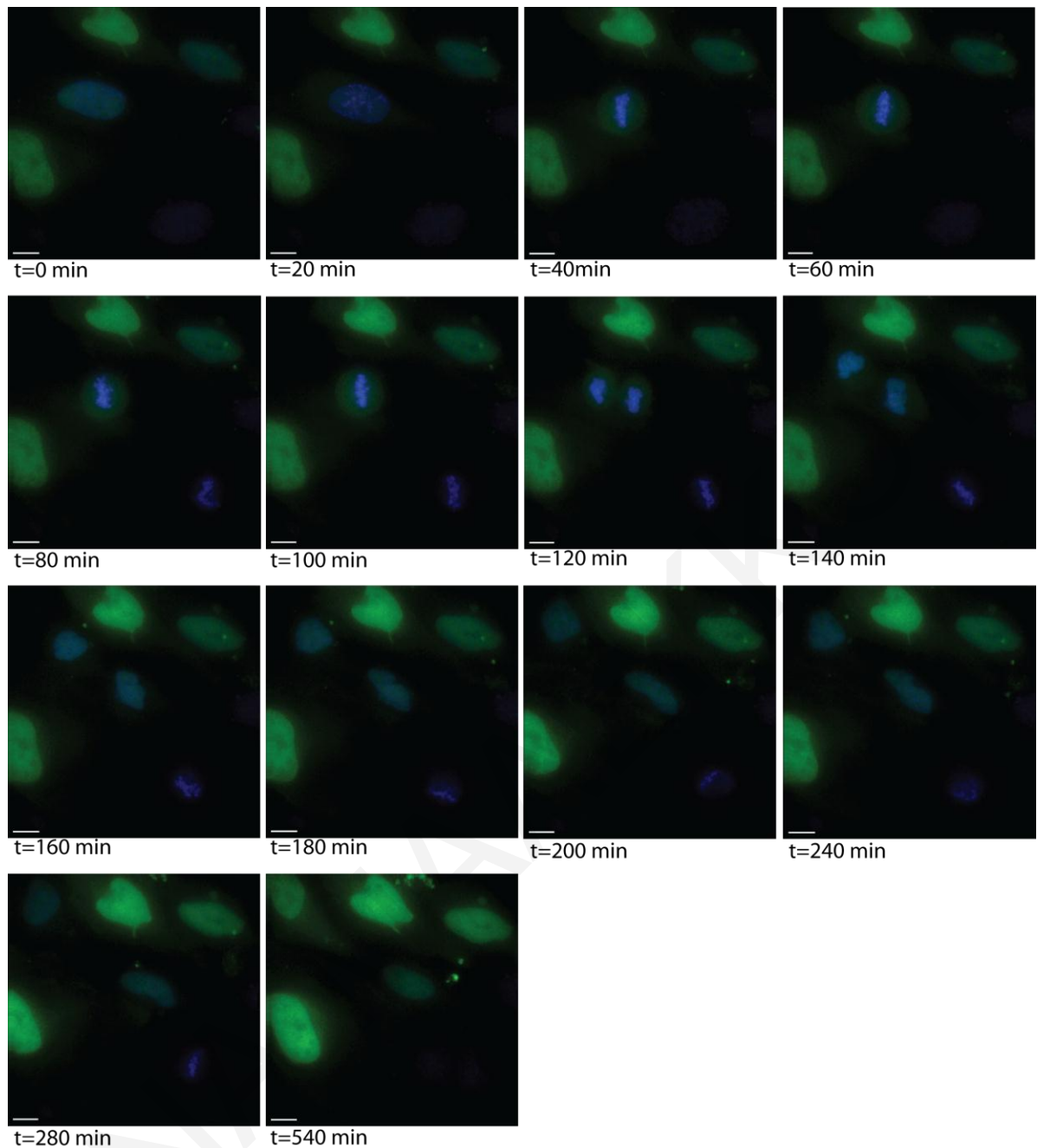
επίπεδα φθορισμού της πρωτεΐνης αυξομειώνονταν σε συνάρτηση με τον χρόνο και αυτό υποδηλώνει κατ' επέκταση ότι η πρωτεϊνική έκφραση της, είναι διαφορετική στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Η ένταση φθορισμού της GFP-hCINAP βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα στο μιτωτικό κύτταρο, ενώ σταδιακά τα επίπεδα φθορισμού αυξάνονται καθώς το κύτταρο εισέρχεται στη φάση G0/G1 (4-9 h μετά την διαίρεση του κυττάρου, Σχήμα 3.23).

- 2) Καθώς το κύτταρο εισέρχεται στην μίτωση η πρωτεΐνη διαχέεται, και δεν συντοπίζεται με το DNA, παρά μόνο στη τελόφαση (Σχήμα 3.24).
- 3) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και με τις δύο σταθερά επιμολυσμένες κυτταροσειρές, 33C (ψηλή έκφραση) και 62L (χαμηλή έκφραση), και έτσι έγινε προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης με την διαδικασία της μίτωσης. Παρατηρήθηκε ότι ένα ποσοστό 53% των μιτωτικών κυττάρων του 62L (10 από τα 19 κύτταρα) μπόρεσαν να ολοκληρώσουν φυσιολογικά τη διαδικασία της μίτωσης σε σχέση με 21% του 33C (4 από τα 19 κύτταρα), στον οποίο παρουσιάζονταν διάφορες ανωμαλίες κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης (Πίνακας 3.9).
- 4) Παρατηρήθηκε ότι η μίτωση στα κύτταρα που κατάφεραν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της φυσιολογικά, διαρκούσε 80 min, με διαφορά 20 min μεταξύ όλων των μιτωτικών υποφάσεων. Εξαιρεση αποτέλεσε μόνο ένα κύτταρο της κυτταροσειράς 33C όπου χρόνος μεταξύ των διάφορων κυτταρικών υποφάσεων ήταν 10 min.
- 5) Υπήρχε ένας ψηλός αριθμός κυττάρων [47% για 62L (9 από 19 κύτταρα), 79% για 33C (15 από 19 κύτταρα)] που παρουσίαζαν ανωμαλίες κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (Πίνακας 3.9), όπως:
 - α) παραμονή για αρκετό χρονικό διάστημα στη προμετάφαση ή μετάφαση ή σε κάποιες περιπτώσεις μεταβίβαση των κυττάρων από τη μια φάση στην άλλη, χωρίς τα κύτταρα να καταφέρνουν να στοιχίσουν τα χρωμοσώματα τους και στο τέλος παρατηρήθηκε απόπτωση τους (2 από τα 19 κύτταρα για 62L και 8 από τα 19 κύτταρα για 33C), όπως φάνηκε από τη μορφολογία του κυττάρου (συρρίκνωση κυττάρου και συμπύκνωση DNA) (Σχήμα 3.25 A).
 - β) πραγματοποίηση της κυτταρικής διαίρεσης φυσιολογικά, αλλά στο τέλος τα κύτταρα (3 από τα 19 κύτταρα για 62L και 1 από τα 19 κύτταρα για 33C) παράμεναν στην κυτοκίνηση για αρκετό χρονικό διάστημα, μερικές φορές μέχρι και 20 h (Σχήμα 3.25 B). Σε κάποιες από τις ταινίες, φαίνεται ότι τα κύτταρα προβαίνουν στο τέλος σε απόπτωση ή ένωση τους και δημιουργία πολυπύρηνων κυττάρων. Η απόπτωση συνέβαινε στις περιπτώσεις που παρουσιάζονταν ανωμαλίες κατά τη μιτωτική διαίρεση. Στη πλειοψηφία των κυττάρων η απόπτωση συνέβαινε όταν τα κύτταρα

παρέμεναν σε κάποια υποφάση της μίτωσης για αρκετή ώρα ή μετέβαιναν από τη μετάφαση στην προμετάφαση, χωρίς να μπορούν να ολοκληρώσουν την κυτταρική διαίρεση.

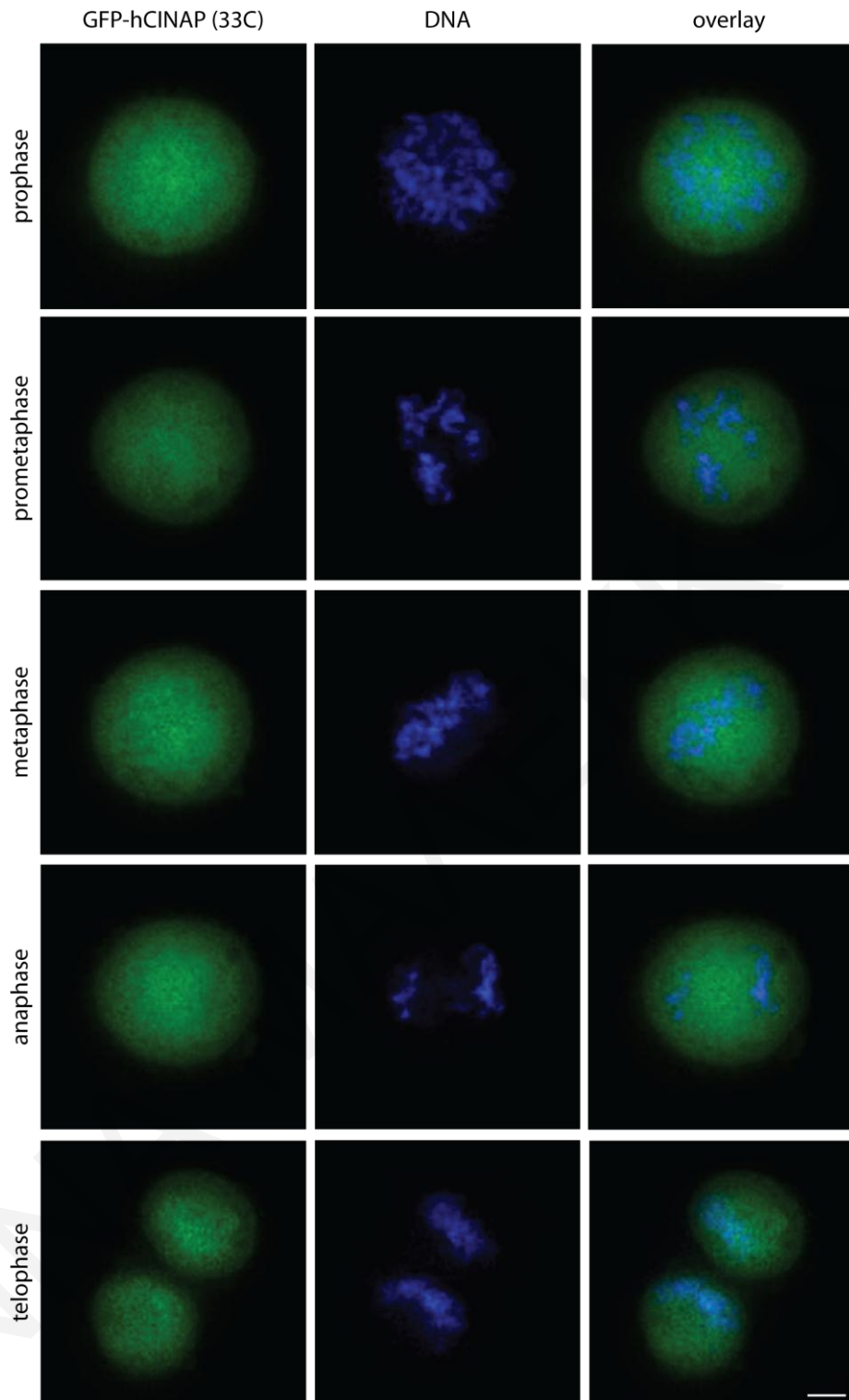
| Ανωμαλίες Κυτταρικής διαίρεσης | 62L | 33C |
|--|------------|------------|
| Παραμονή προμετάφαση | 0 | 2 |
| Καθυστέρηση στη μετάφαση | 2 | 5 |
| Μεταβίβαση από μετάφαση σε προμετάφαση ή πρόφαση και πάλι πίσω | 2 | 4 |
| Παραμονή ή καθυστέρηση στη κυτοκίνηση | 3 | 3 |
| Δημιουργία πολυπύρηνων κυττάρων | 1 | 2 |
| Απόπτωση | 2 | 8 |

Πίνακας 3.9: Ανωμαλίες που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης στις δύο σταθερά μετασχηματισμένες κυτταροσειρές HeLa^{GFP-hCINAP}.



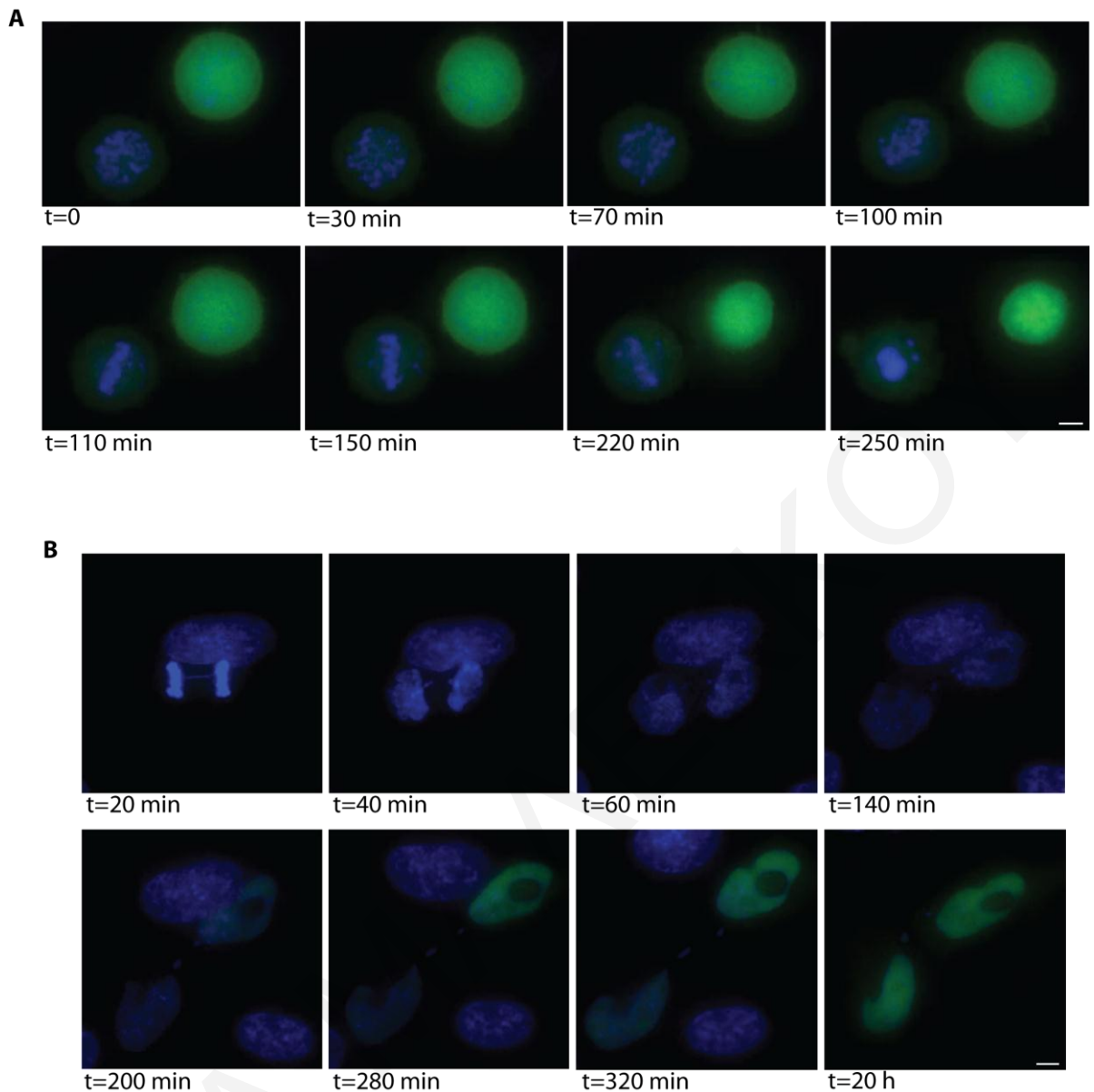
Σχήμα 3.23: Παρακολούθηση της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP σε ζωντανά κύτταρα με μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (time-lapse microscopy).

Στο σχήμα παρουσιάζονται οι εικόνες ενός οπτικού πεδίου που λήφθηκαν ανά 20 min κατά τη διάρκεια παρακολούθησης της κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP(33C)}, κάτω από ειδικό μικροσκόπιο DeltaVision Spectris wide-field deconvolution (Applied Precision). Κλίμακα 10 μm.



Σχήμα 3.24: Στιγμιότυπα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της μίτωσης σε ζωντανά κύτταρα **HeLa**^{GFP-hCINAP(33C)}.

Παρουσιάζονται οι διάφορες υποφάσεις της μίτωσης, όπως αυτές διακρίνονται από τη μορφολογία του DNA, το οποίο σημάνθηκε με χρωστική Hoechst-33342 (μπλε χρώμα) και ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP (πράσινο χρώμα). Κλίμακα: 5 μm.



Σχήμα 3.25: Ανωμαλίες που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, όπως καταγράφηκαν σε ζωντανά κύτταρα HeLa^{GFP-hCINAP^(33C)}, με μικροσκοπία πραγματικού χρόνου.

A: Παρουσιάζονται δύο κύτταρα, τα οποία παραμένουν για αρκετό χρονικό διάστημα στη πρόφαση-προμετάφαση (100 min) και στη συνέχεια το ένα εκ των δύο προχωρά στη μετάφαση, όπου τα χρωμοσώματα φαίνονται μη στοιχισμένα (110 min). Στο τέλος τα δύο κύτταρα προβαίνουν σε απόπτωση. **B:** Παρουσιάζεται ένα παράδειγμα τελόφασης-κυτοκίνησης, όπου τα κύτταρα παραμένουν ενωμένα, δεν ολοκληρώνεται η κυτοκίνηση ακόμα και μετά από 20 h. Στο κάθε σχήμα παρουσιάζονται εικόνες με ενδεικτικούς χρόνους. Κλίμακα 10 μm.

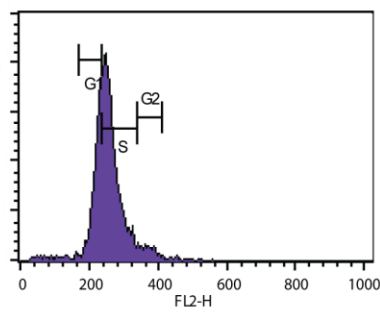
Τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας πραγματικού χρόνου ανέδειξαν ότι πιθανόν η πρωτεΐνη hCINAP να εμπλέκεται στις διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης και θα πρέπει μελλοντικά να διερευνηθεί πιο διεξοδικά. Κατά την πραγματοποίηση του πειράματος, αρχικά δεν ήταν δυνατό να παρατηρηθούν μιτωτικές διαιρέσεις. Για το λόγο αυτό μειώθηκε ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στην ακτινοβολία, με μείωση του χρόνου έκθεσης κατά τη λήψη της εικόνας και μείωση των τομών του κυττάρου (από 20-24 σε 10-12). Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε ότι ένα ποσοστό 53% των κυττάρων του κλώνου 62L κατάφεραν να ολοκληρώσουν φυσιολογικά την κυτταρική διαίρεση σε αντίθεση με 21% των κυττάρων του 33C που παρουσίαζαν περισσότερες ανωμαλίες, όπως μη στοίχιση χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση με παρατήρηση απόπτωσης ή παραμονή στη κυτοκίνηση. Η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών κλώνων μπορεί να οφείλεται στην διαφορά της πρωτεϊνικής έκφρασης της hCINAP (μεγαλύτερη έκφραση στον 33C). Όμως ο μικρός αριθμός των μιτωτικών κυττάρων που λήφθηκαν, δεν επιτρέπει την εξαγωγή τελικών συμπερασμάτων. Επομένως, θα πρέπει να γίνουν επιπλέον πειράματα όπως υπολογισμός των αποπτωτικών κυττάρων, για να μπορέσει να αναδειχθεί μια ενδεχόμενη συμμετοχή της hCINAP στην μίτωση.

3.6 Συγχρονισμός κυτταροσειράς HeLa και ανίχνευση της hCINAP στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου

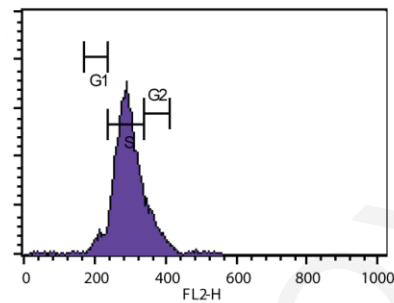
Από την ανάλυση του πρωτεϊνικού κύκλου ζωής της πρωτεΐνης GFP-hCINAP, προέκυψε ότι η πρωτεϊνική έκφραση της hCINAP δεν είναι σταθερή, αλλά παρουσιάζει αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, επιχειρήθηκε μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ώστε να προσδιοριστεί σε πιο συγκεκριμένο σημείο του κυτταρικού κύκλου παρουσιάζεται αυτή η αύξηση.

Για το σκοπό αυτό, επιτεύχθηκε συγχρονισμός κυτταροκαλιέργειας τύπου HeLa στην φάση G1/S με τη μέθοδο του διπλού μπλοκαρίσματος με διάλυμα θυμιδίνης (2.3.11). Στη συνέχεια λήφθηκαν δείγματα ανά 2 h για διάστημα εικοσιτεσσέρων ωρών, τόσο για ανάλυση FACS, όσο και για ανοσοαποτύπωση κατά Western. Οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, που επικρατούσαν σε κάθε δείγμα ελέγχθησαν με την βοήθεια της ανάλυσης FACS, τα οποία φαίνονται στο Σχήμα 3.26. Από την ανάλυση FACS, επιβεβαιώθηκε ο συγχρονισμός της κυτταροσειράς HeLa, ο οποίος διατηρήθηκε μέχρι τις 14 πρώτες ώρες μετά την ελευθέρωση από την θυμιδίνη.

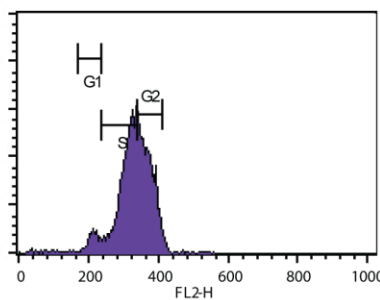
Στα αντίστοιχα δείγματα που προορίζονταν για ανοσοαποτύπωση κατά Western, απομονώθηκαν οι συνολικές πρωτεΐνες και τα δείγματα φωτομετρήθηκαν για υπολογισμό της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας ισόποσα δείγματα κυτταρικών εκχυλισμάτων και αντισώματα έναντι κυκλινών που είναι μάρτυρες συγκεκριμένων φάσεων του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 3.27 A). Στα ίδια πρωτεϊνικά δείγματα πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western (Σχήμα 3.27 B) με αντίσωμα τόσο έναντι της πρωτεΐνης hCINAP όσο και της actin, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό δείγμα αναφοράς για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης hCINAP. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Scion Image, με το οποίο υπολογίστηκε η ένταση του σήματος από τις μπάντες της hCINAP και της actin και στη συνέχεια ο λόγος των εντάσεων hCINAP/actin που προέκυψε καθόρισε και το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης παρατίθενται στο κάτω μέρος του Σχήματος 3.27. Από αυτά προκύπτει ότι η πρωτεΐνη hCINAP εκφράζεται περισσότερο στα δείγματα των 12 και 14 ωρών, τα οποία αντιστοιχούν στην G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου.



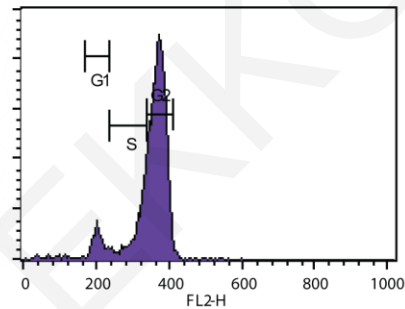
t=0 h
 % Gated
 G1 4.92
 S 53,20
 G2 41.51



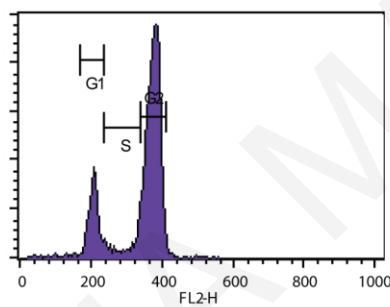
t=2 h
 % Gated
 G1 34.35
 S 61.40
 G2 3.75



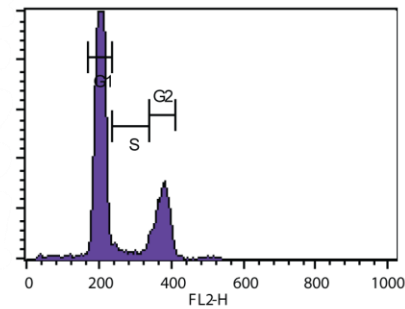
t=4 h
 % Gated
 G1 6.03
 S 80,53
 G2 12.63



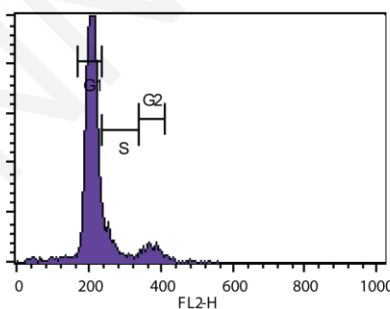
t=6 h
 % Gated
 G1 6.03
 S 16.68
 G2 76.62



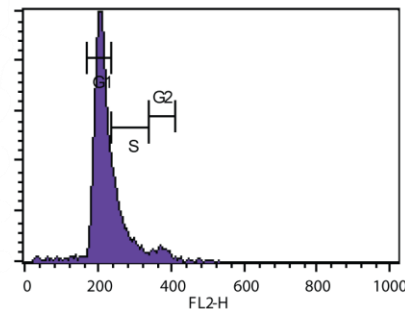
t=8 h
 % Gated
 G1 17.03
 S 8.10
 G2 74.17



t=10 h
 % Gated
 G1 72.23
 S 4.89
 G2 21.44

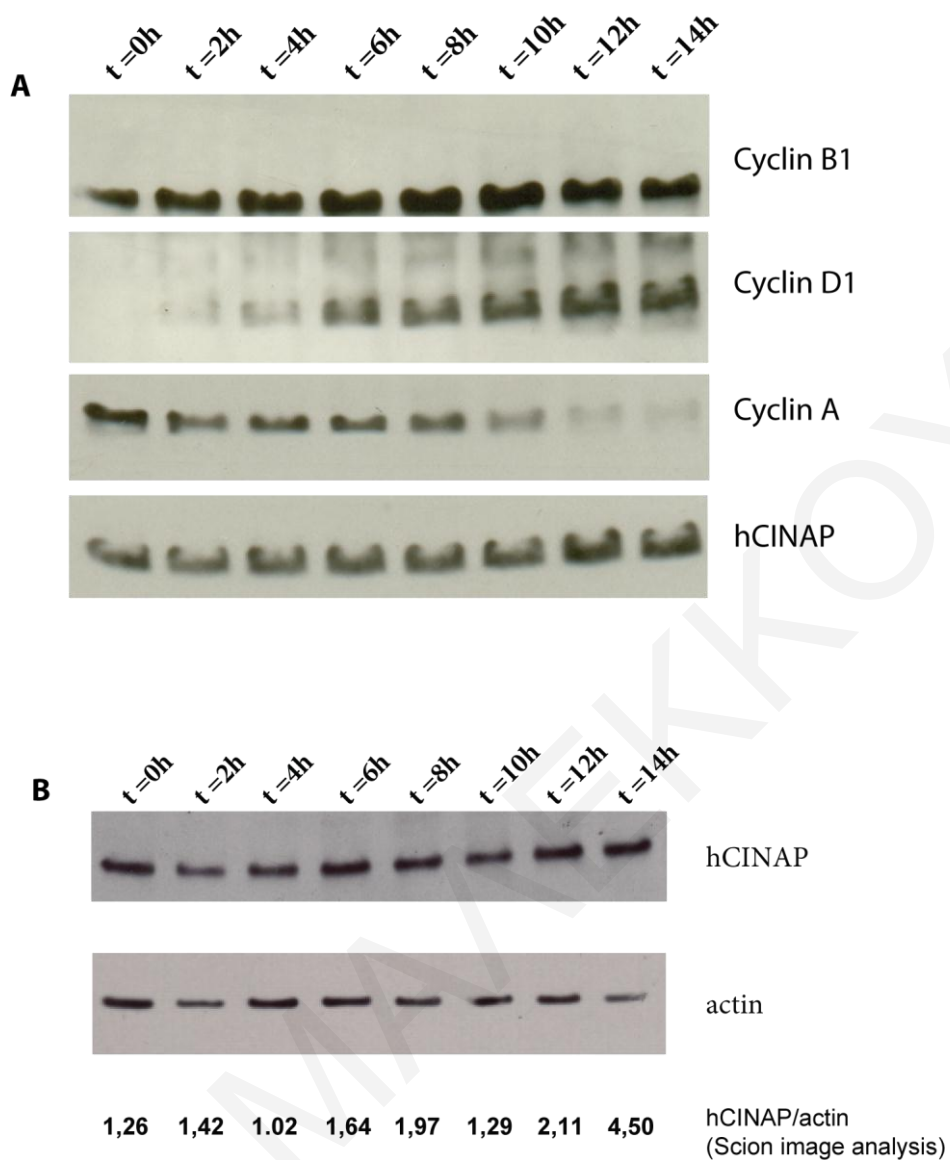


t=12 h
 % Gated
 G1 85.29
 S 8.25
 G2 4.54



t=14 h
 % Gated
 G1 73.25
 S 21.85
 G2 3.76

Σχήμα 3.26: Ανάλυση FACS των πρώτων 8 δειγμάτων που προέκυψαν από συγχρονισμό της κυτταροσειράς HeLa, μετά από διπλό μπλοκάρισμα με θυμιδίνη.



Σχήμα 3.27: Αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης hCINAP στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ισόποσα δείγματα κυτταρικών εκχυλισμάτων, που προέκυψαν μετά από συγχρονισμό κυτταροσειράς HeLa, έτυχαν ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των κυκλινών που είναι μάρτυρες συγκεκριμένων φάσεων του κυτταρικού κύκλου **(A)** και έναντι της hCINAP και actin για ποσοτικοποίηση της έκφρασης της hCINAP, όπως πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Scion Image **(B)**

3.7 Μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής της πρωτεΐνης hCINAP μετά από πειραματικούς χειρισμούς

Η μορφολογία και η σύνθεση των υποπυρηνικών οργανιδίων, όπως τα Cajal bodies (CBs), ο πυρηνίσκος και άλλα πυρηνικά σωματίδια, παρουσιάζουν δυναμική φύση και μπορούν να μεταβληθούν μετά από απόκριση σε ποικιλόμορφα εξωτερικά ερεθίσματα (στρες) που υφίσταται το κύτταρο (Cioce et al., 2006). Τα κύτταρα που υπόκεινται σε ακτινοβολία UV, οξειδωτικό, μηχανικό ή ωσμωτικό στρες, υφίστανται τόσο μεσοπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα, μεταβολές στη λεπτή δομή του πυρήνα (Lang et al., 1998).

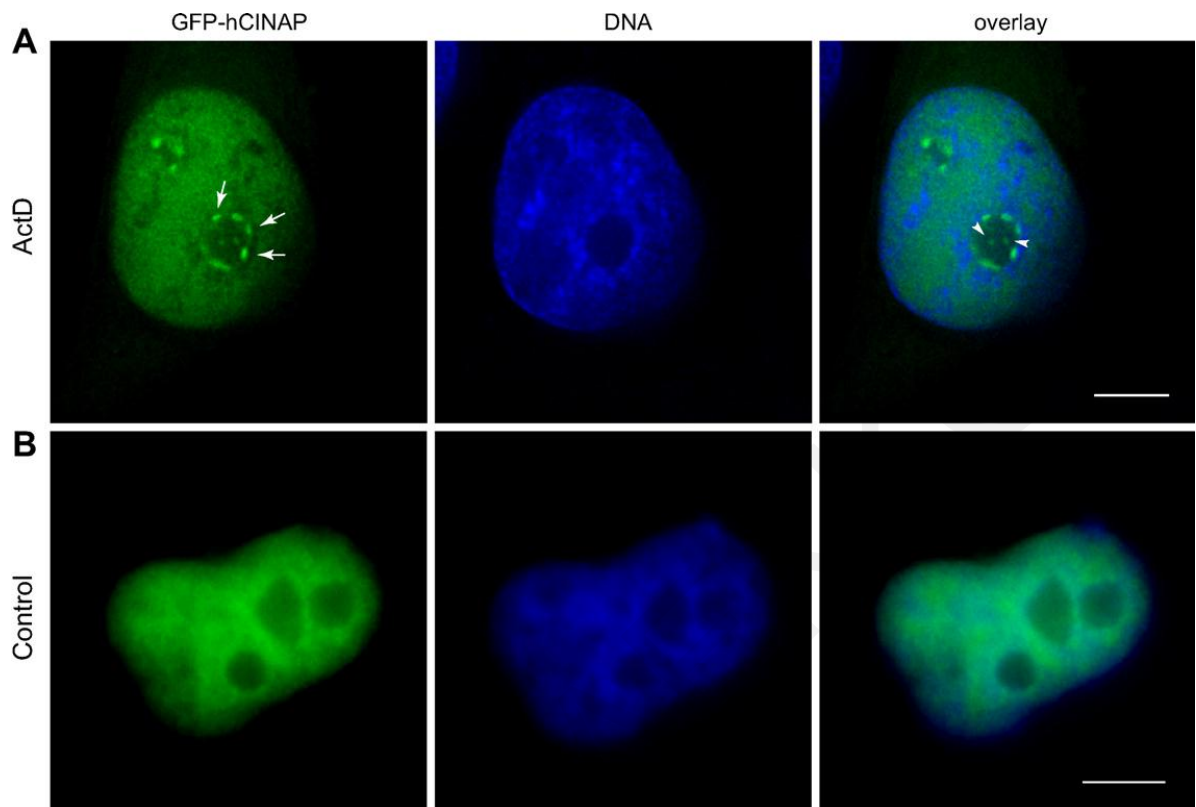
Θέλοντας να διερευνήσουμε την μεταβολή στον ενδοκυττάριο εντοπισμό της πρωτεΐνης hCINAP και τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζει στην δυναμική οργάνωση του πυρήνα, πραγματοποιήσαμε πειράματα πρόκλησης στρες στις δύο κυτταροσειρές HeLa^{GFP-hCINAP} (33C και 62L), χρησιμοποιώντας ως δείγματα ελέγχου τις κυτταροσειρές HeLa και HeLa^{GFP}.

3.7.1 Μεταγραφική καταστολή

Είναι ήδη γνωστό, ότι αριθμός πρωτεϊνών που εντοπίζονται στους πυρηνίσκους και στο πυρηνόπλασμα (κυρίως πρωτεΐνες που προσδένονται σε RNA), όπως και RNAs (pre-rRNAs, U1snRNA, 7SK RNA, snoRNAs, U93 scaRNA) ανακατανέμονται υπό μορφή δακτυλίων (caps) γύρω από τους πυρηνίσκους κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καταστολής της μεταγραφής. Αναπαραγωγή αυτής της διαδικασίας μπορεί να γίνει με χρήση των ουσιών ακτινομυκίνης D (actinomycin D, actD) και 5,6-διχλωρο-β-D-ριβοφουρανοσυλβενζιμιδαζολίου (5,6-dichloro-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole, DRB), που δρουν ως αναστολείς της μεταγραφής (Shav-Tal et al., 2005).

Για να μελετηθεί τυχόν αλλαγή της ενδοκυττάριας κατανομής της πρωτεΐνης hCINAP κάτω από συνθήκες μεταγραφικής καταστολής, χρησιμοποιήθηκε αρχικά η κυτταροσειρά 33C και ο αναστολέας actD σε συγκέντρωση 1 μg/ml, που προκαλεί καταστολή τόσο της RNA Pol. II, όσο και της RNA Pol. I και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν μετά από 3 h της προσθήκης της actD.

Από τον ανοσοφθορισμό έγινε αντιληπτό ότι μέρος της πυρηνοπλασματικής GFP-hCINAP εμφανιζόταν σε δακτυλίους γύρω από τους πυρηνίσκους, καθώς επίσης μερικές φορές και σε συσσωματώματα μέσα στους πυρηνίσκους (Σχήμα 3.28, βέλη και κεφαλή βέλους αντίστοιχα). Το αποτέλεσμα εμφανιζόταν σε ποσοστό >80% των κυττάρων που έτυχαν επεξεργασίας με την actD.



Σχήμα 3.28: Εντοπισμός της GFP-hCINAP σε δομές γύρω από τους πυρηνίσκους (caps) μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol. I και Pol. II. **A:** Μεταγραφική καταστολή με χρήση ακτινομυκίνης D (ActD, 1 $\mu\text{g/ml}$) και δημιουργία δακτυλίων γύρω από του πυρηνίσκους (βέλη) της GFP-hCINAP και εστιών μέσα στους πυρηνίσκους (κεφαλές βέλων). **B:** Κύτταρο ελέγχου, που δεν υπέστη την διαδικασία της καταστολής. Η GFP-hCINAP παρουσιάζεται με πράσινο ενώ το DNA με μπλε. Κλίμακα: 5 μm .

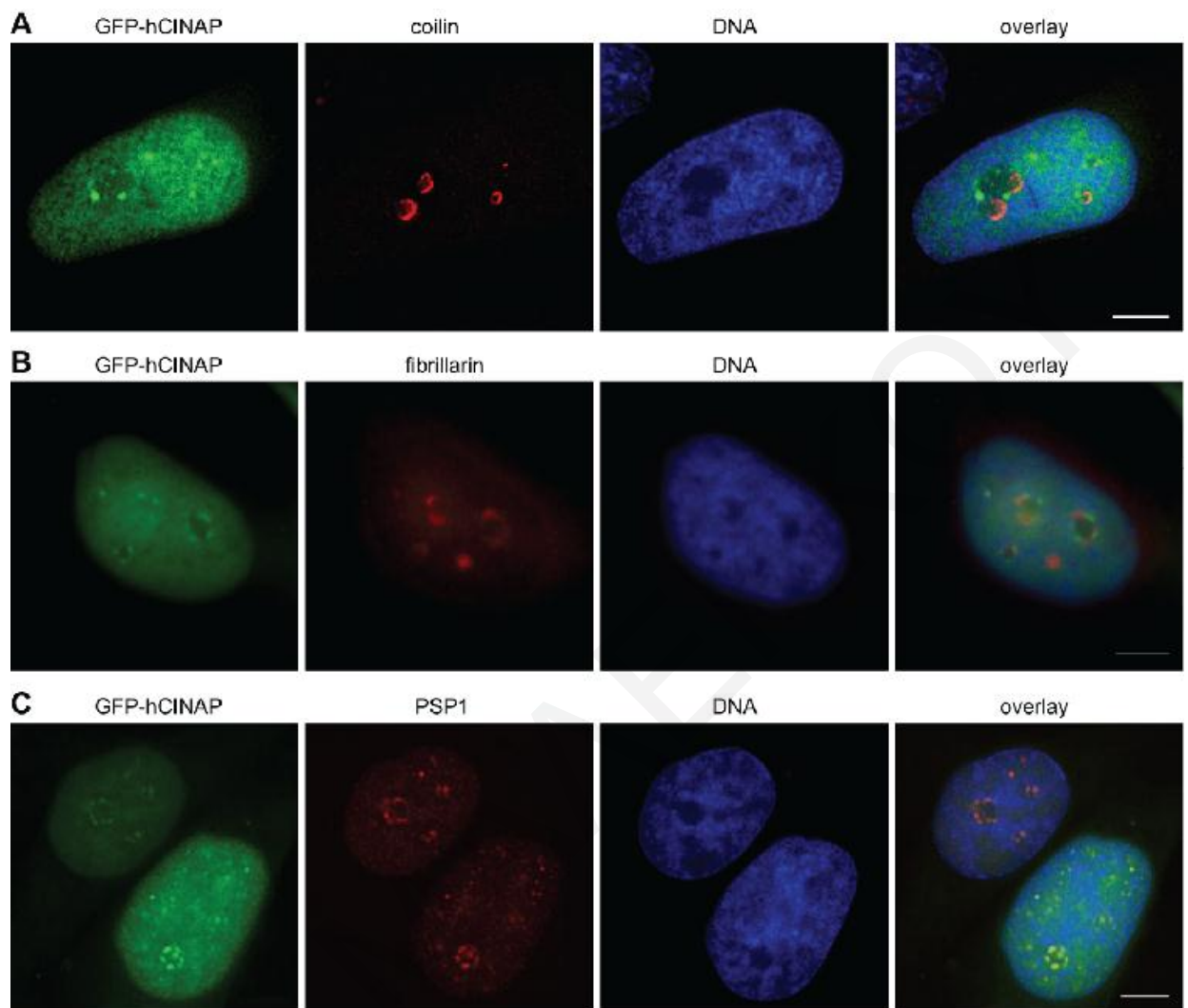
Στη συνέχεια, για να επιβεβαιωθεί ότι η πρωτεΐνη GFP-hCINAP συμπεριφερόταν κατά τον ίδιο τρόπο με την ενδογενή πρωτεΐνη hCINAP, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα σε κανονική κυτταροσειρά HeLa. Ο φαινότυπος επιβεβαιώθηκε με ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης, με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της (Σχήμα 3.29, Παράρτημα). Το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε επιπλέον και στον κλώνο 62L, που παρουσίαζε ακριβώς τον ίδιο φαινότυπο με τον 33C (η εικόνα δεν παρατίθεται). Για την περαιτέρω διερεύνηση του φαινοτύπου επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση του κλώνου 33C.

Σε συνθήκες μεταγραφικής καταστολής, είναι γνωστή από τη βιβλιογραφία η ύπαρξη δύο κύριων διαφορετικών τύπων caps: τα Dark Nucleolar Caps (DNCs), τα οποία βρίσκονται συσσωρευμένα στην περιφέρεια του πυρηνίσκου και τα Light Nucleolar Caps (LNCs), τα οποία έχουν μορφή τόξου και δεν βρίσκονται σε άμεση επαφή με την περιφέρεια του πυρηνίσκου αλλά φαίνεται να προεξέχουν από αυτόν (Shav-Tal et al., 2005).

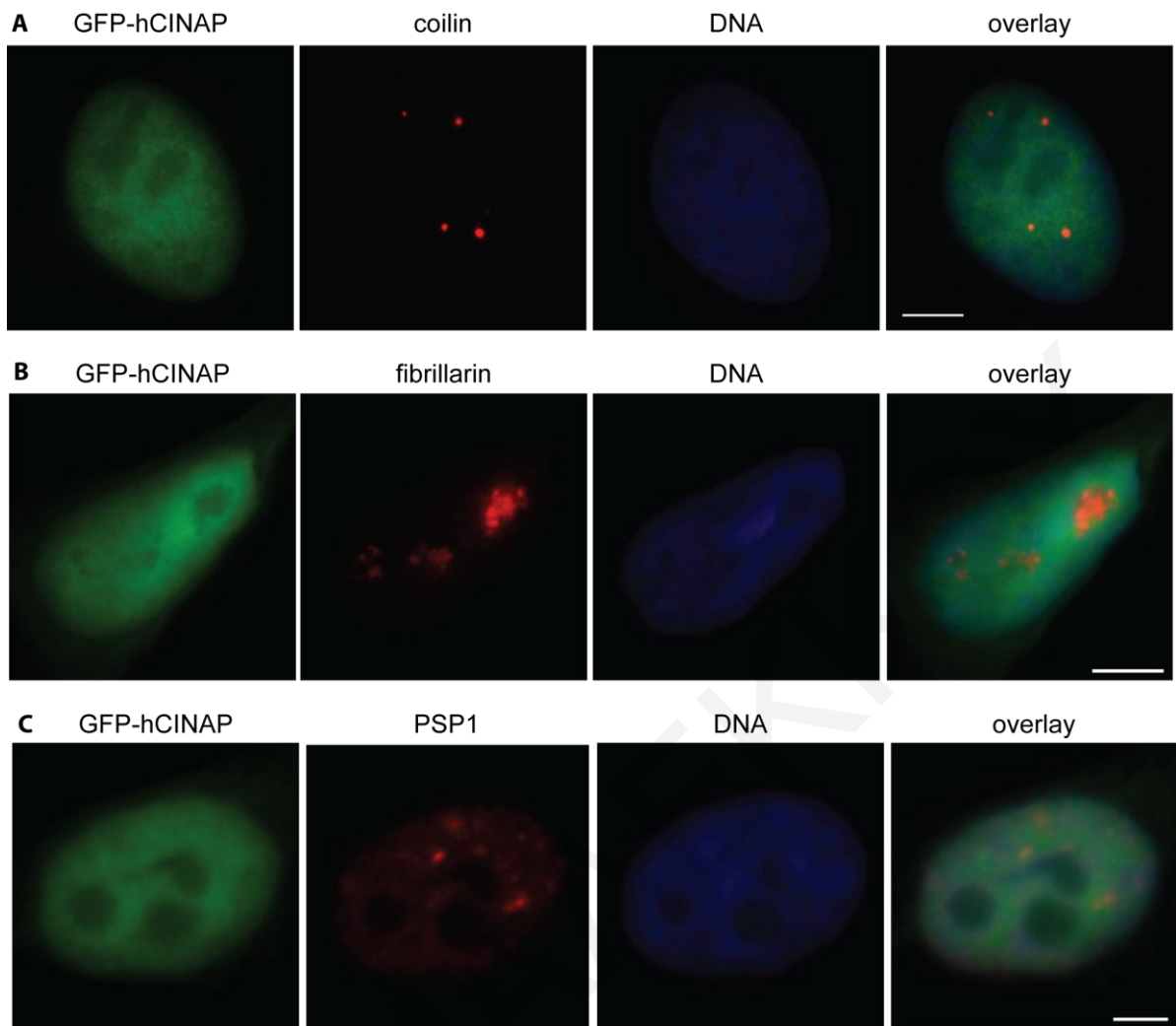
Όπως είναι ήδη γνωστό, η πρωτεΐνη hCINAP αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη coilin (Santama et al., 2005) και επίσης, η coilin εντοπίζεται στους δακτυλίους LNCs μετά από καταστολή της μεταγραφής (Raska et al., 1990; Carmo-Fonseca et al., 1992). Για τη διερεύνηση πιθανού συνεντοπισμού των δύο αυτών πρωτεϊνών στις δομές αυτές πραγματοποιήθηκε διπλός ανοσοφθορισμός της GFP-hCINAP και της coilin (Σχήμα 3.30 A). Παράλληλα πραγματοποιήθηκε διπλός ανοσοφθορισμός της GFP-hCINAP με την fibrillarin (Σχήμα 3.30 B), συστατικό των πυρηνίσκων και των Cajal bodies, η οποία είναι επίσης γνωστό ότι ανακατανέμεται στα LNCs μετά από μεταγραφική καταστολή (Santama et al., 1996) και συνεντοπίζεται μερικώς με την coilin (Shav-Tal et al., 2005).

Παραδόξως, και στις δύο περιπτώσεις η GFP-hCINAP δεν συνεντοπιζόταν με καμία από αυτές τις δύο πρωτεΐνες. Επομένως τα περιπυρηνικά caps, στα οποία εντοπίζεται η hCINAP, δεν είναι τα LNCs και παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες hCINAP και coilin αλληλεπιδρούν, ανακατανέμονται διαφορετικά μετά από μεταγραφική καταστολή.

Ως εκ τούτου, κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση του τύπου των δακτυλίων που δημιουργεί η GFP-hCINAP. Η πρωτεΐνη PSP1 (Paraspeckle Protein 1), που εντοπίζεται στα πυρηνικά σωματίδια που ονομάζονται Paraspeckles, συναθροίζεται μετά από καταστολή της RNA Pol. II σε περιπυρηνικά caps (Fox et al., 2002), που έχουν ταυτοποιηθεί ως DNCs. Επομένως, επιχειρήθηκε διπλός ανοσοφθορισμός της GFP-hCINAP με την PSP1. Από το αποτέλεσμα του ανοσοφθορισμού έγινε αντιληπτό ότι η πρωτεΐνη GFP-hCINAP συνεντοπιζόταν με την πρωτεΐνη PSP1 (Σχήμα 3.30 C), υποδεικνύοντας έτσι ότι οι δακτύλιοι της GFP-hCINAP αντιστοιχούσαν με DNCs Caps.



Σχήμα 3.30: Ενδοκυττάρια κατανομή της GFP-hCINAP μετά από μεταγραφική καταστολή των RNA Pol. I και RNA Pol. II. Η GFP-hCINAP εμφανίζεται και συνεντοπίζεται με την PSP1 στους δακτυλίους γύρω από τους πυρηνίσκους (caps) DNC, όπως και σε συσσωματώματα μέσα στους πυρηνίλους, μετά από μεταγραφική καταστολή. Η σταθερά μετασηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP(33C)} εκτέθηκε για 3 h σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 1 μg/ml Actinomycin D. Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει την GFP-hCINAP, το κόκκινο την coilin (A), fibrillarin (B) και PSP1 (C), μετά από χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Οι πυρήνες σημάνθηκαν με Hoechst 33342 (μπλε). Κλίμακα: 5 μm.



Σχήμα 3.31: Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός σε κύτταρα ελέγχου, των πρωτεϊνών coilin (A), fibrillarin (B) και PSP1 (C), σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη GFP-hCINAP (A-C), στην σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά $\text{HeLa}^{\text{GFP-hCINAP}(33\text{C})}$. Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει την GFP-hCINAP, το κόκκινο την coilin (A), fibrillarin (B) και PSP1 (C), μετά από χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Οι πυρήνες σημάνθηκαν με Hoechst 33342 (μπλε). Κλίμακα: 5 μm .

Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των πρωτεϊνών coilin, fibrillarin και PSP1, σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη GFP-hCINAP, σε κύτταρα ελέγχου (κύτταρα που δεν υπέστησαν την διαδικασία της μεταγραφικής καταστολής) φαίνεται στο Σχήμα 3.31.

Επειδή η χρήση της actD σε συγκέντρωση 1 µg/ml προκαλεί καταστολή τόσο της RNA pol.II, όσο και της RNA pol.I (Sobell, 1985), επιχειρήθηκε περαιτέρω μελέτη του φαινοτύπου, με χρήση της actD σε συγκέντρωση 0.04 µg/ml που προκαλεί καταστολή μόνο της RNA pol.I και της DRB. Η DRB σε συγκέντρωση 25 ή 50 µg/ml, καταστέλλει συγκεκριμένες CTD κινάσες (carboxyterminal domain kinases), αλλά κυρίως δρα ως ειδικός αναστολέας της μεταγραφής της RNA Pol. II (te Poele et al., 1999). Για τον έλεγχο του αποτελέσματος, πραγματοποιήθηκε και πάλι διπλός ανοσοφθορισμός έναντι της GFP-hCINAP και κάθε μίας εκ των τριών πρωτεϊνών: coilin, fibrillarin και PSP1.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα κύτταρα που πραγματοποιήθηκε καταστολή της μεταγραφής με συγκέντρωση 0.04 µg/ml actD, παρουσιάζονταν οι χαρακτηριστικοί δακτύλιοι (caps) LNCs για τις πρωτεΐνες coilin και fibrillarin, ενώ οι πρωτεΐνες GFP-hCINAP και PSP1 διατηρούσαν την φυσιολογική τους ενδοκυττάρια κατανομή (Σχήμα 3.32).

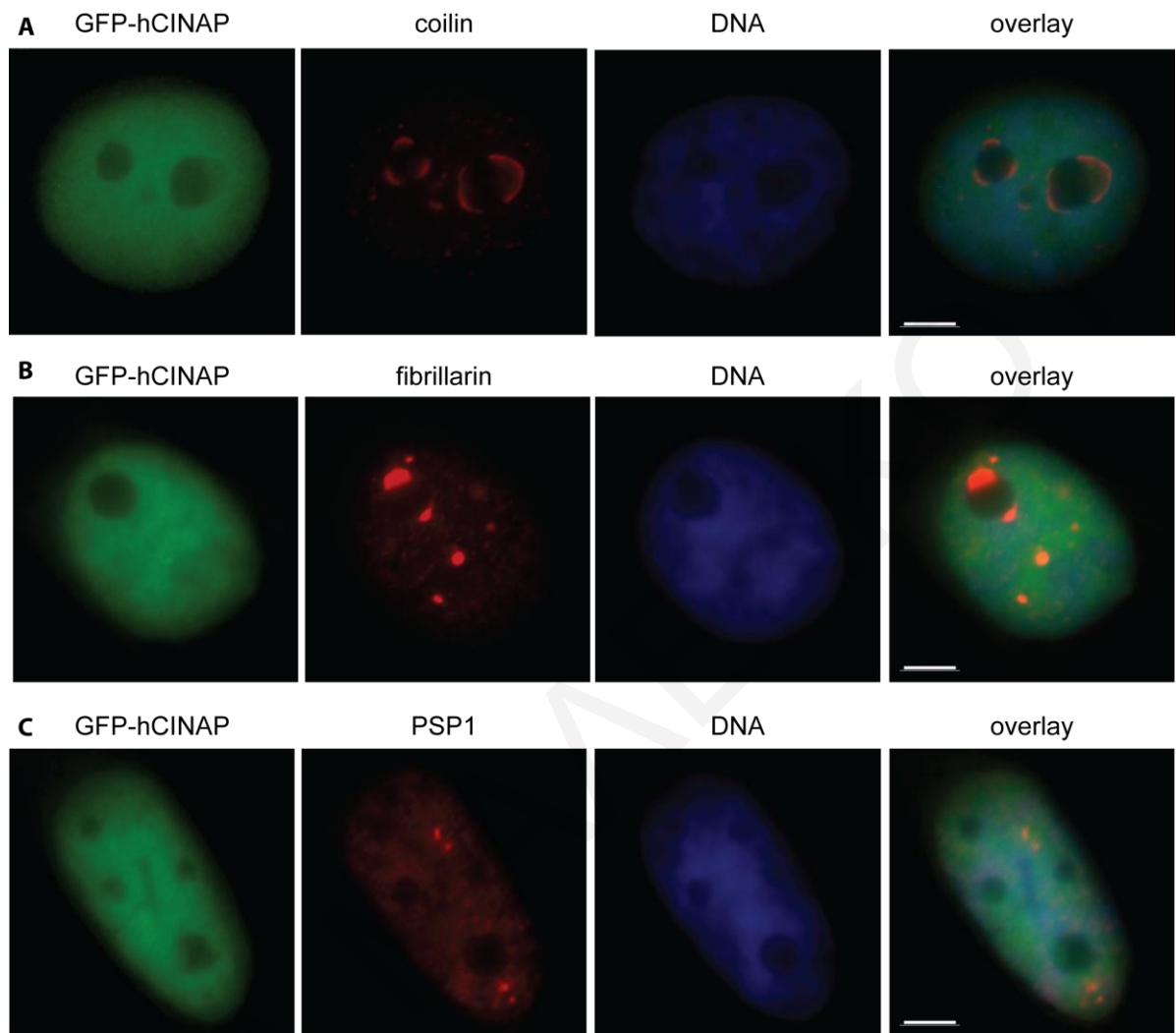
Επιπλέον, στα κύτταρα που πραγματοποιήθηκε καταστολή της μεταγραφής με DRB, η GFP-hCINAP και η PSP1 εμφανίζονταν ως συσσωματώματα κοντά στους πυρηνίσκους και συνεντοπίζονταν και πάλι σε ποσοστό >80% των κυττάρων (Σχήμα 3.33 C). Η coilin εντοπιζόταν, όπως και προηγουμένως, υπό μορφή caps γύρω από τους πυρηνίσκους (Σχήμα 3.33 A) ενώ η fibrillarin εντοπιζόταν υπό μορφή caps μόνο σε ποσοστό 10% των κυττάρων (Σχήμα 3.33 B, βελάκια) και στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (~80%) ήταν αποδιοργανωμένη όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.33 B (κεφαλή βέλους).

Για περαιτέρω μελέτη του συνεντοπισμού της GFP-hCINAP με τη PSP1, πραγματοποιήθηκε τριπλός ανοσοφθορισμός: GFP-hCINAP (πράσινο), PSP1 (κόκκινο) και fibrillarin (μπλε) και το αποτέλεσμα έδειξε ξεκάθαρα ότι οι πρωτεΐνες GFP-hCINAP και PSP1 συνεντοπίζονταν και βρίσκονταν πολύ κοντά ή σε άμεση επαφή με την αποδιοργανωμένη fibrillarin, ως αποτέλεσμα της αποδιοργάνωσης του πυρηνίσκου (Σχήμα 3.34 A, σε μεγαλύτερη μεγένθυση στο ένθετο φαίνεται ο λεπτομερής αυτός συνεντοπισμός) (Martin et al., 2009). Ο εντοπισμός των τριών πρωτεϊνών σε κύτταρα ελέγχου φαίνεται στο Σχήμα 3.34 B.

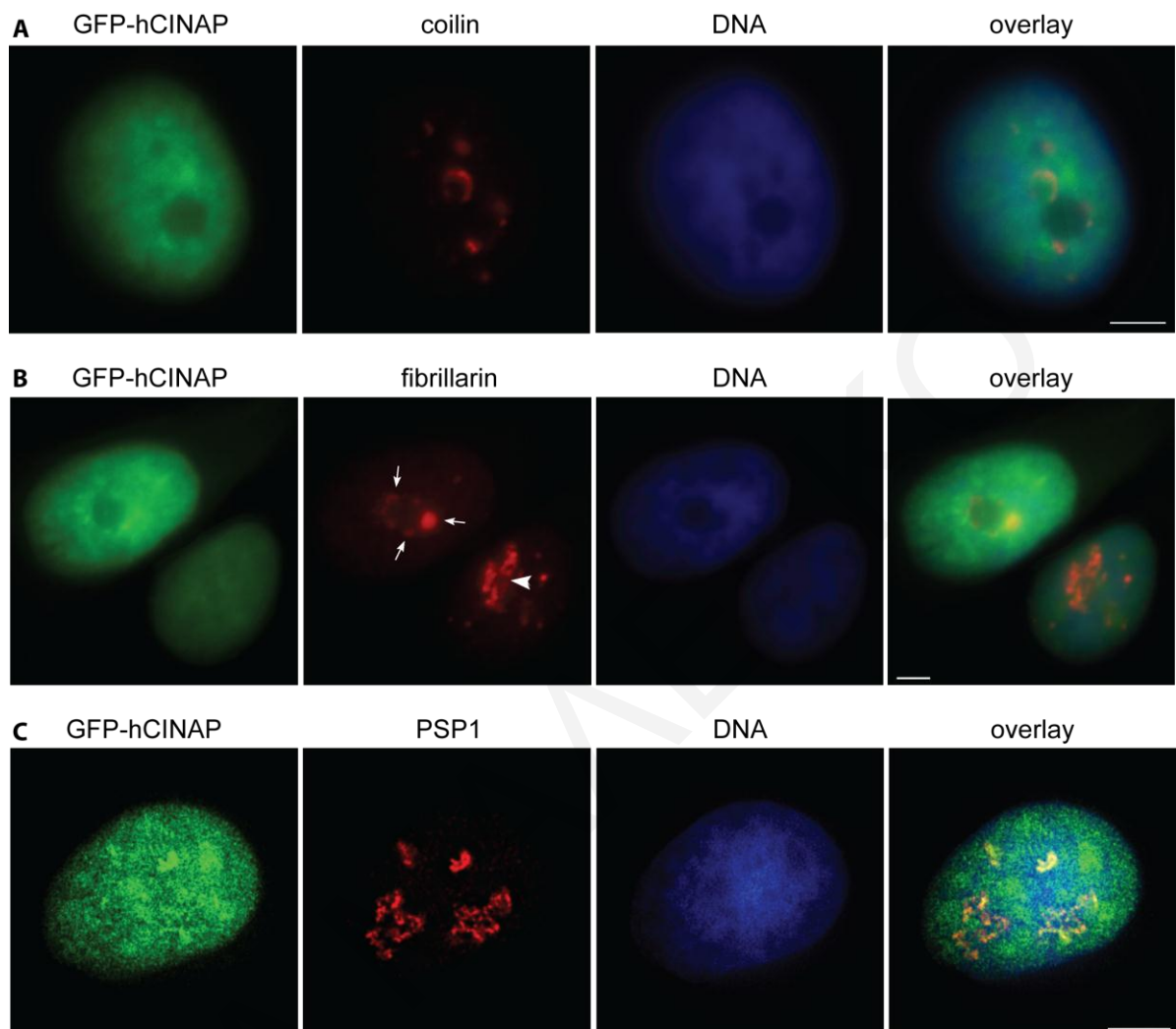
Από το συνδυασμό των πιο πάνω αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι η hCINAP ανακατανέμεται από το πυρηνόπλασμα στους δακτυλίους DNCs γύρω από τους πυρηνίσκους, όπου συνεντοπίζεται εκεί με την πρωτεΐνη PSP1, που στρατολογείται από την αποσυναρμολόγηση των Paraspeckles, μόνο μετά από καταστολή της RNA

πολυμεράσης II. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι η hCINAP συγκαταλέγεται στο μικρό αριθμό του πυρηνοπλασματικών πρωτεϊνών που δημιουργούν caps κάτω από αυτές τις συνθήκες. Οι περισσότερες πυρηνοπλασματικές πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα σωματίδια speckle, διατηρούν την ενδοκυττάρια κατανομή τους (Shav-Tal et al., 2005)

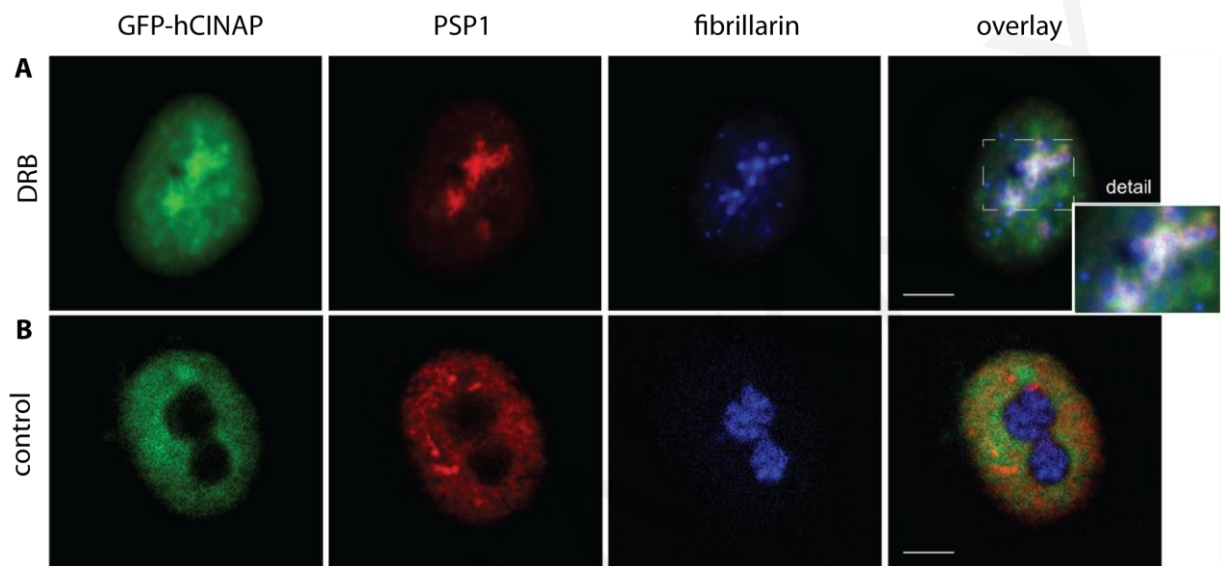
ΑΝΝΑ ΜΑΛΕΚΚΟΥ



Σχήμα 3.32: Ενδοκυττάρια κατανομή της GFP-hCINAP μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol. I. Μετά από μεταγραφική καταστολή οι πρωτεΐνες coilin (A) και fibrillarin (B) παρουσιάζουν τους χαρακτηριστικούς δακτυλίους γύρω από τους πυρηνίσκους (caps), αλλά όχι οι PSP1 (C) και GFP-hCINAP, οι οποίες ούτε συνεντοπίζονταν. Η σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP(33C)} εκτέθηκε για 3 h σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 0.04 μg/ml Actinomycin D. Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει την GFP-hCINAP, το κόκκινο την coilin (A), fibrillarin (B) και PSP1 (C), μετά από χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Οι πυρήνες σημάνθηκαν με Hoechst 33342 (μπλε). Κλίμακα: 5 μm.



Σχήμα 3.33: Ενδοκυττάρια κατανομής της GFP-hCINAP μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA pol.II. Η GFP-hCINAP συνεντοπίζεται με την PSP1 σε συσσωματώματα κοντά στους πυρηνίσκους (C), ενώ η coilin εντοπίζεται υπό μορφή δακτυλίων (caps) γύρω από τους πυρηνίσκους (A). Η fibrillarin (B) εντοπίζεται υπό μορφή caps μόνο σε ποσοστό 10% των κυττάρων (βελάκια) και στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (~80%) εμφανίζεται αποδιοργανωμένη (κεφαλή βέλους). Η σταθερά μετασηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP(33C)} εκτέθηκε για 3 h σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 25 μg/ml DRB. Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει την GFP-hCINAP, το κόκκινο την coilin (A), fibrillarin (B) και PSP1 (C), μετά από χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Οι πυρήνες σημάνθηκαν με Hoechst 33342 (μπλε). Κλίμακα: 5 μm.



Σχήμα 3.34: Ενδοκυττάρια κατανομής της υβριδική πρωτεΐνης GFP-hCINAP μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA pol.II. **A:** Τριπλός ανοσοφθορισμός των κυττάρων HeLa^{GFP-hCINAP(33C)}, μετά από μεταγραφική καταστολή με DRB, όπου παρουσιάζεται η GFP-hCINAP (πράσινο), η PSP1 (κόκκινο) και η fibrillarlin (μπλε). Η μεγέθυνση της υπέρθεσης όπως φαίνεται στο ένθετο, παρουσιάζει την περιοχή που είναι θετική για την fibrillarlin κοντά στον πυρηνίσκο, ο οποίος δεν παρουσιάζει τόσο συμπαγή δομή, να βρίσκεται πολύ κοντά ή σε άμεση επαφή με την περιοχή συνεντοπισμού της GFP-hCINAP και της PSP1. **B:** Αντίστοιχο παράδειγμα από κύτταρα που δεν έτυχαν την επεξεργασία (κύτταρα ελέγχου). Κλίμακα: 5 μm.

3.7.2 Ακτινοβολία UV-C

Έχει δειχθεί ότι τα σωματίδια CBs αλλάζουν σε αριθμό και εμφάνιση μετά από ακτινοβολία UV-C, με την coilin να διασπείρεται σε εκατοντάδες μικροεστιακά συμπλέγματα σε όλο το πυρηνόπλασμα (Cioce et al., 2006). Η μέγιστη επίπτωση στη διασπορά της coilin παρατηρήθηκε σε χρόνο 6 h μετά την έκθεση σε UV-C και οι επιπτώσεις ήταν εν μέρει αντιστρεπτές με επαναφορά της φυσιολογικής κατανομής της coilin στο ~40% των κυττάρων που υπέστησαν ακτινοβολία, μετά από 10-12 h. Μέρος των ακτινοβολημένων κυττάρων μετά από 8-10 h, παρουσίαζαν δακτυλίους γύρω από τους πυρηνίσκους. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η ακτινοβολία UV-C επηρεάζει την κατανομή και άλλων πρωτεϊνών οι οποίες εντοπίζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στα CBs, όπως η πρωτεΐνη επιβίωσης των κινητικών νευρώνων (survival of motor neuron, SMN) (Cioce et al., 2006).

Για τη μελέτη, αντίστοιχα, της ενδοκυττάριας κατανομής της hCINAP κάτω από συνθήκες ακτινοβολίας UV-C και για την διερεύνηση τυχόν συνεντοπισμού των πρωτεϊνών hCINAP και PSP1 και σε αυτές τις συνθήκες, εκτός από συνθήκες μεταγραφικής καταστολής, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με ακτινοβολία UV-C χρησιμοποιώντας την σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά 33C, καθώς και τη κυτταροσειρά HeLa ως δείγμα ελέγχου.

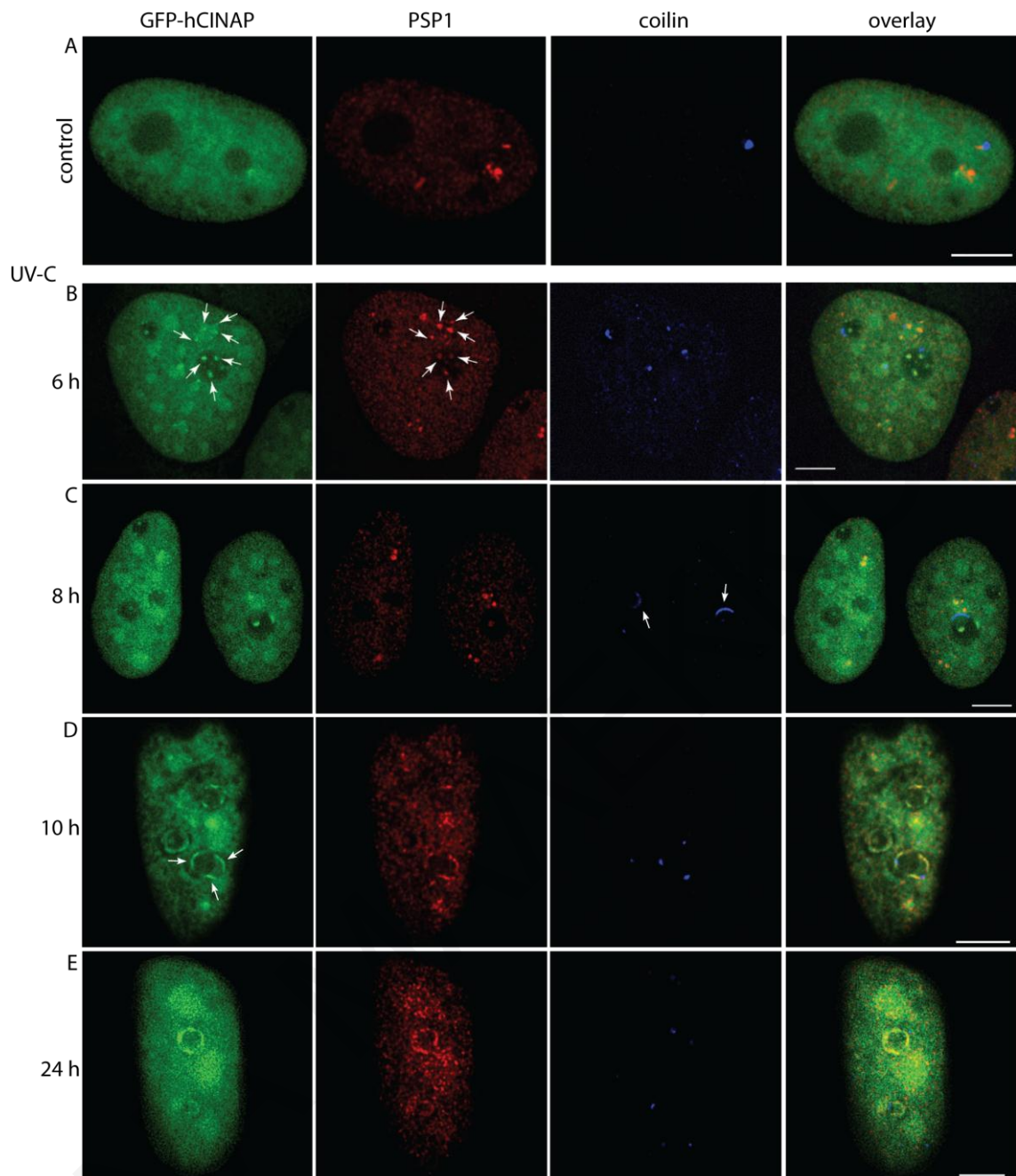
Τα κύτταρα έτυχαν ακτινοβολία στα 254 nm με 30 J/m² με χρήση της συσκευής UV Stratalinker 2400 (2.3.9.2), και έπειτα μονιμοποιήθηκαν στις ενδεδειγμένες ώρες, 6 h, 8 h, 10 h και 24 h, καθώς επίσης και κύτταρα που δεν υπέστησαν ακτινοβολία (αρνητικά δείγματα ελέγχου).

Για τον έλεγχο του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι της SMN και της coilin που είναι ήδη γνωστή η ενδοκυττάρια διασπορά τους μετά από ακτινοβολία UV-C (Cioce et al., 2006), καθώς και για την PSP1. Τα κύτταρα που λήφθηκαν στις 6 h, έδειξαν όπως αναμενόταν, ότι η πρωτεΐνη SMN διαχεόταν στο κυτταρόπλασμα (Σχήμα 3.35 B, Παράρτημα) ενώ η πρωτεΐνη coilin ανακατανεμόταν σε δεκάδες μικροεστιακά συμπλέγματα στο πυρηνόπλασμα (Σχήμα 3.36 B). Η πρωτεΐνη GFP-hCINAP αντιθέτως, σχημάτιζε μεγάλες στρογγυλές πυρηνικές δομές, καθώς και μικρότερες εστίες στον πυρήνα και μέσα στους πυρηνίσκους (Σχήμα 3.36, B, βελάκια). Από τον τριπλό ανοσοφθορισμό (GFP-hCINAP, coilin και PSP1), φάνηκε ότι οι πρωτεΐνες GFP-hCINAP και PSP1 συνεντοπίζονταν τόσο στις πυρηνικές εστίες όσο και στις εστίες μέσα στους πυρηνίσκους, οι οποίες ήταν διαφορετικές από τις μικροεστίες που εντοπιζόταν η coilin στο πυρηνόπλασμα (Σχήμα 3.36 B).

Από τα κύτταρα που λήφθηκαν σε μεταγενέστερους χρόνους (8 h, 10 h και 24 h), έγινε αντιληπτό ότι οι επιπτώσεις ήταν εν μέρει αντιστρεπτές περίπου στο 40% των κυττάρων στις 10 h, ενώ σ' ένα ποσοστό των κυττάρων στις 8 και 10 h η coilin εντοπιζόταν υπό μορφή caps γύρω από τους πυρηνίσκους καθώς επίσης και οι πρωτεΐνες GFP-hCINAP και PSP1, οι οποίες όμως συνεντοπίζονταν σε διαφορετικά caps από αυτά της coilin (Σχήμα 3.36 C και D). Το φαινόμενο αυτό παρουσιαζόταν επίσης σε ένα μικρό ποσοστό κυττάρων ακόμα και μετά από 24 h από την ακτινοβολία, με την GFP-hCINAP να εντοπίζεται περισσότερο ως δακτύλιος μέσα στους πυρηνίσκους ή σε caps ακόμα και όταν η coilin επανερχόταν εν μέρει στην φυσιολογική της κατάσταση (Σχήμα 3.36 E). Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση της SMN (Σχήμα 3.35, Παράρτημα).

Συνοψίζοντας, η πρωτεΐνη GFP-hCINAP μετά από 6 h από την ακτινοβολία UV-C, που παρουσιάζεται ο πιο έντονος φαινότυπος, ανακατανέμεται σε μικρές εστίες στον πυρήνα και μέσα στους πυρηνίσκους, όπου συνεντοπίζεται και πάλι με την πρωτεΐνη PSP1, όπως και στη περίπτωση της μεταγραφικής καταστολής. Σε μεταγενέστερο χρόνο (10 και 24 h), στα κύτταρα που δεν επαναφέρεται η φυσιολογική κατανομή, συνεντοπίζεται και πάλι υπό μορφή δακτυλίων (DNCs) με την PSP1 και διαφέρουν από αυτούς που εντοπίζεται η coilin (Σχήμα 3.36 D). Παρατηρήθηκαν κύτταρα, που ενώ η πρωτεΐνη coilin και SMN επανέρχονταν εν μέρει στη φυσιολογική τους κατανομή, η GFP-hCINAP εξακολουθούσε να παρουσιάζει τον ίδιο φαινότυπο, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανόν η επαναφορά της να γίνεται με πιο αργούς ρυθμούς ή να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ακτινοβολία.

Επιπλέον, η GFP-hCINAP κάτω από αυτές τις συνθήκες, σε όλους τους χρόνους που παρατηρήθηκαν τα κύτταρα, εντοπιζόταν επιπρόσθετα και σε πιο μεγάλες πυρηνικές δομές, συσσωματωμάτων. Με την πάροδο του χρόνου οι δομές αυτές ελαττώνονταν σε αριθμό και αυξάνονταν σε μέγεθος. Οι δομές αυτές ίσως αξίζει στο μέλλον να μελετηθούν και να διερευνηθεί κατά πόσο αυτά τα συσσωματώματα απαρτίζονται και από άλλες πρωτεΐνες ή παράγοντες και να γίνει ταυτοποίηση τους.



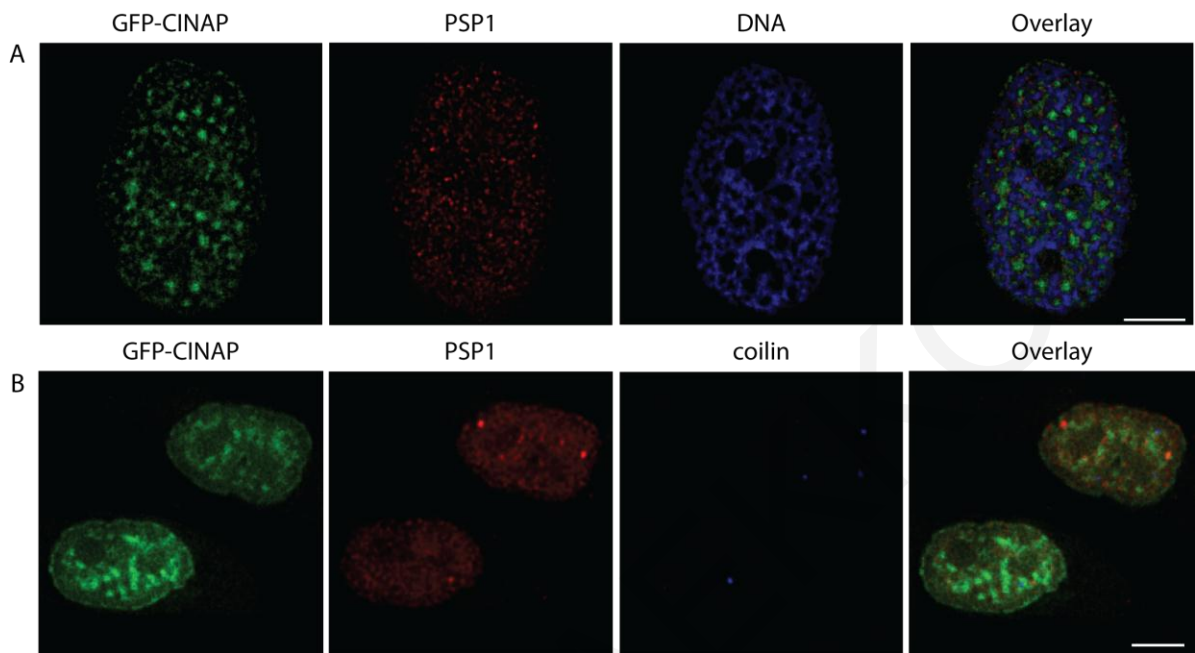
Σχήμα 3.36: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της υβριδικής πρωτεΐνης GFP-hCINAP μετά από ακτινοβολία UV-C και συνεντοπισμός της με PSP1. **A:** Κύτταρο το οποίο δεν υπέστη ακτινοβολία. **B-E:** κύτταρα που υπέστησαν ακτινοβολία UV-C και μονιμοποιήθηκαν στους ενδεικτικούς χρόνους. **B,C:** Η πρωτεΐνη GFP-hCINAP σχηματίζει μεγάλες στρογγυλές πυρηνικές δομές καθώς και μικρότερες εστίες στον πυρήνα και στους πυρηνίσκους στις οποίες συνεντοπίζεται με την PSP1 και όχι την coilin (B, βέλη). **D, E:** η GFP-hCINAP παρουσιάζει δακτυλίους γύρω από τους πυρηνίσκους και συνεντοπίζεται με την PSP1 και όχι την coilin. Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει την GFP-hCINAP, το κόκκινο την PSP1 και το μπλε την coilin, μετά από χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Κλίμακα: 5 μm.

3.7.3 Υπερωσμοτικό στρες

Για μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής της πρωτεΐνης hCINAP κάτω από συνθήκες υπερωσμοτικού στρες, χρησιμοποιήθηκε σορβιτόλη που είναι γνωστή για τη δράση της ως παράγοντα προώθησης αυτού του στρες (Caruccio et al., 1997). Η σταθερά μετασηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP} (33C) επωάστηκε για 1 h σε θρεπτικό υλικό με 0.5 M σορβιτόλη (2.3.9.3) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού για τον προσδιορισμό του ενδοκυττάριου εντοπισμού της GFP-hCINAP. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα αντισώματα που αναγνώριζαν τις πρωτεΐνες PSP1 και coilin, για διερεύνηση πιθανού συνεντοπισμού της GFP-hCINAP κάτω από αυτές τις συνθήκες με την PSP1, και σήμανση του πυρήνα με τη χρωστική Hoechst 33342.

Από το αποτέλεσμα του ανοσοφθορισμού φάνηκε ότι η GFP-hCINAP εντοπιζόταν υπό μορφή συσσωματωμάτων στο πυρηνόπλασμα, στις περιοχές όπου δεν ήταν συμπυκνωμένο το DNA (Σχήμα 3.37 A). Η πρωτεΐνη PSP1, σε ένα αριθμό κυττάρων φάνηκε να αποδιοργανώνεται και να διασπείρεται στο πυρηνόπλασμα, εμφανίζοντας πολύ μικρές εστίες οι οποίες δεν φαίνονταν να παρουσιάζουν συνεντοπισμό με την GFP-hCINAP (Σχήμα 3.37 A). Στη πλειοψηφία των κυττάρων όμως, ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών coilin και PSP1 δεν παρατηρήθηκε να μεταβάλλεται (Σχήμα 3.37 B).

Η πρωτεΐνη hCINAP, κάτω από συνθήκες υπερωσμοτικού στρες παρουσίαζε επίσης δομές ή συσσωματώματα στο πυρηνόπλασμα, όπως και στη περίπτωση της ακτινοβολίας UV-C, τα οποία δεν εμφάνιζαν όμως την ίδια μορφολογία. Σε αυτή την περίπτωση οι δομές αυτές ήταν περισσότερες, μικρότερες και δεν παρουσίαζαν τόσο στρογγυλή δομή όπως προηγουμένως. Αυτή ήταν η μόνη περίπτωση, που η hCINAP δεν εμφάνιζε κανένα συνεντοπισμό με την πρωτεΐνη PSP1.



Σχήμα 3.37: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της GFP-hCINAP μετά από υπερωσμωτικό στρες.

A: Η GFP-hCINAP εμφανίζεται υπό μορφή συσσωματωμάτων στο πυρηνόπλασμα στις περιοχές μεταξύ της συμπυκνωμένης χρωματίνης και η PSP1 αποδιοργανωμένη σε μικροεστίες. **B:** Οι πρωτεΐνες PSP1 και coilin δεν παρουσιάζουν δομικές αλλαγές στην πλειοψηφία των κυττάρων παράλληλα με αλλαγή στη μορφολογία της GFP-hCINAP. Οι πρωτεΐνες GFP-hCINAP και PSP1 δεν φαίνονται να συνεντοπίζονται κάτω από αυτές τις συνθήκες. Τα κύτταρα HeLa^{GFP-hCINAP(33C)} πριν μονιμοποιηθούν, επώαστηκαν για 1 h σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 0.5 M σορβιτόλη. Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει την GFP-hCINAP, το κόκκινο την PSP1 και το μπλε το DNA (A) και την coilin (B), μετά από χρήση κατάλληλων αντισωμάτων ή της χρωστικής Hoechst 33342. Κλίμακα: 5 μm.

3.8 Καταστολή του μεταγραφήματος της hCINAP (RNAi) και ανάλυση των επιπτώσεων

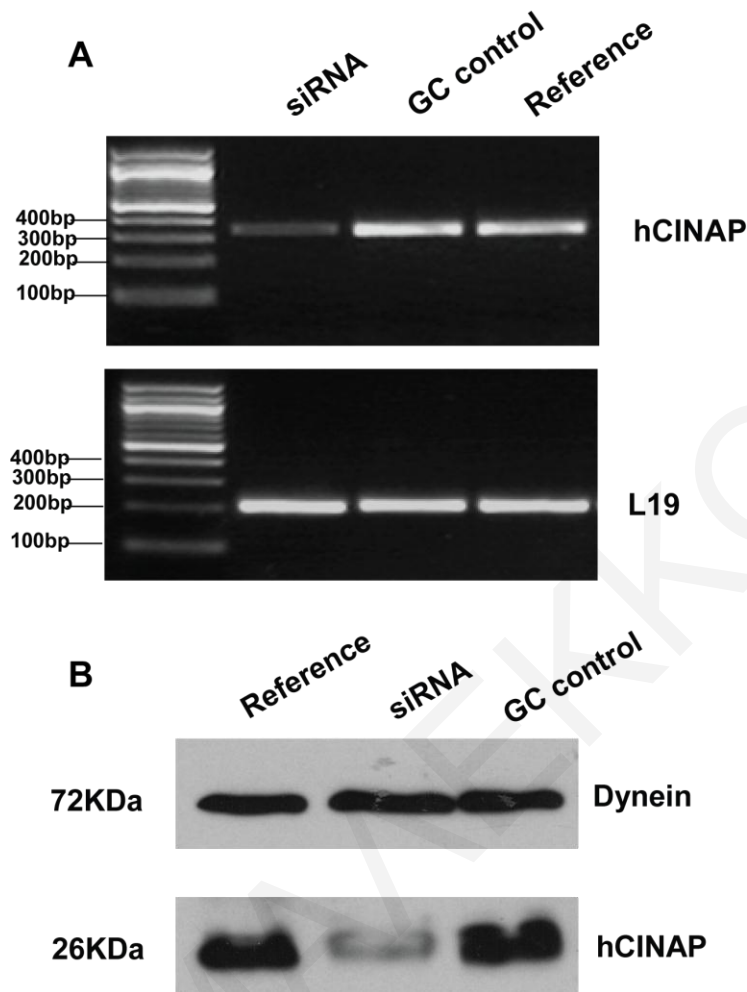
(Τα πειράματα αυτά έγιναν από τη κυρία Γρηγορία Χατζηγιάννη και παρουσιάζονται με την ευγενή συγκατάθεση της).

Το γεγονός ότι η hCINAP παρουσιάζεται συντηρημένη σε όλο το φάσμα του ευκαρυωτικού φυλογενετικού δέντρου (θηλαστικά, φυτά και ζυμομύκητα), το ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη coilin που συμμετέχει σε μια εξελικτικά συντηρημένη δομή -το σωματίδιο Cajal- και τέλος το γεγονός ότι διαγραφή του γονιδίου της στον ζυμομύκητα (*S. cerevisiae*) είναι θνησιγόνος (Juhnke et al., 2000), αποτελούν ισχυρότατες ενδείξεις ότι η λειτουργία που επιτελεί συνόδευσε εξελικτικά τη γένεση του πυρήνα (εμφάνιση ευκαρυωτικών οργανισμών) και είναι ζωτικής σημασίας για τον κυτταρικό μεταβολισμό.

Συνεπώς η μεθοδολογία καταστολής ή μείωσης της έκφρασης της πρωτεΐνης hCINAP αναμενόταν να δημιουργήσει φαινότυπο και ενδεχόμενες δομικές ανωμαλίες στον πυρήνα, που η ανάλυση τους θα ήταν διαφωτιστική για τις φυσιολογικές λειτουργίες του πυρήνα που επηρεάζονται από την έλλειψη αυτής της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση τον περαιτέρω λειτουργικό χαρακτηρισμό της υπό μελέτη πρωτεΐνης, hCINAP. Έτσι πραγματοποιήθηκε καταστολή/μειορρύθμιση της πρωτεΐνης hCINAP σε κυτταροσειρά τύπου *HeLa*, μέσω της τεχνικής της αποσιώπησης RNA (RNA interference-RNAi).

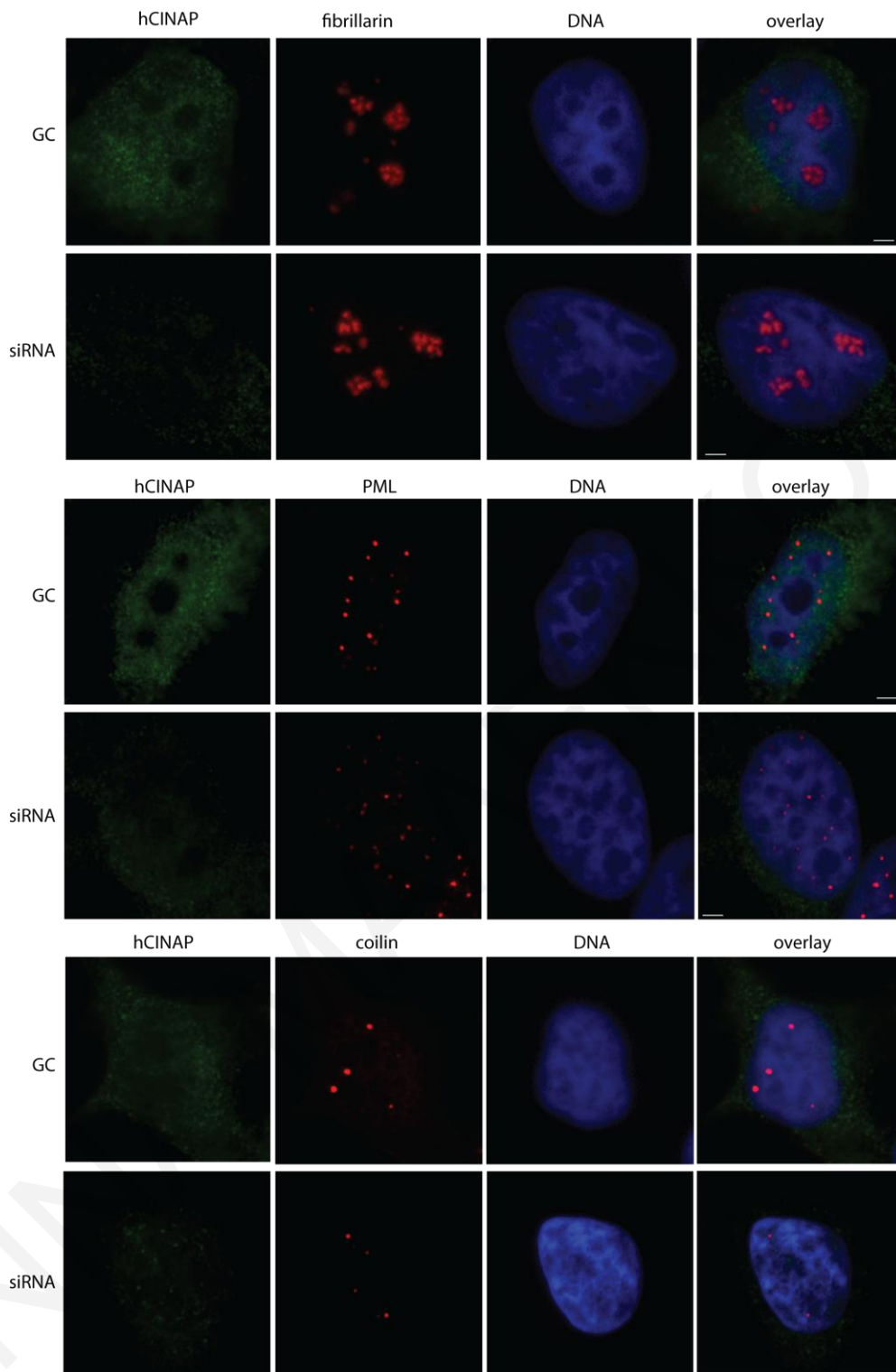
Σε προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, μελετήθηκε τόσο η αποτελεσματικότητα των δύο διαφορετικών siRNAs που είχαν σχεδιαστεί (Πίνακας 2.9, 2.3.6.3) καθώς και ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων (24, 48 και 120 h). Τα κύτταρα που υπέστησαν τη διαδικασία RNAi καθώς επίσης κύτταρα αναφοράς (κύτταρα που δεν υπέστησαν καταστολή) και ελέγχου (κύτταρα που υπέστησαν καταστολή με μη ειδικό για την πρωτεΐνη siRNA) αναλύθηκαν αρχικά ποσοτικά για τον προσδιορισμό του βαθμού καταστολής του μεταγραφήματος της hCINAP. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε RT-PCR με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων που αναγνώριζαν τα πρώτα 350 nt της hCINAP (Πίνακας 2.11). Για τα μετέπειτα πειράματα αποφασίστηκε η χρήση του Si1 στις 48 h.

Στο Σχήμα 3.38 Α φαίνεται το αποτέλεσμα της RT-PCR ενός ενδεικτικού πειράματος αποσιώπησης, όπου φαίνεται ότι τα επίπεδα του mRNA της hCINAP με τη διαδικασία της αποσιώπησης μειώθηκαν περίπου κατά 70% σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (GC control) και το δείγμα αναφοράς (Reference). Για τον εσωτερικό έλεγχο της ειδικότητας του αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκαν επίσης ειδικά ολιγονουκλεοτίδια (Πίνακας 2.11) που αναγνώριζαν 200 nt του L19 (housekeeping gene).



Σχήμα 3.38: Ποσοτικός προσδιορισμός του βαθμού καταστολής της hCINAP.

A) Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης των αποτελεσμάτων καταστολής των επιπέδων του mRNA, μετά από μεταγραφική αποσιώπηση της hCINAP μέσω RNAi, όπως αυτά προέκυψαν με τη τεχνική της RT-PCR. Για τον έλεγχο του αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που αναγνώριζαν τα πρώτα 350 nt της hCINAP και τα 200 nt του L19, που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό δείγμα αναφοράς. **B)** Αυτοραδιογράφημα αποτύπωσης κατά Western των αποτελεσμάτων καταστολής των πρωτεϊνικών επιπέδων της hCINAP, μετά από μεταγραφική αποσιώπηση της hCINAP μέσω RNAi. Για τον έλεγχο του αποτελέσματος χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα που αναγνώριζαν την hCINAP και την δυνεΐνη, που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό δείγμα αναφοράς. Στα σχήματα φαίνονται: το δείγμα που έτυχε αποσιώπηση (siRNA), το δείγμα ελέγχου (GC control) και το δείγμα αναφοράς (Reference).



Σχήμα 3.39: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των πρωτεϊνών hCINAP, fibrillarin, PML και coilin σε κύτταρα μετά από καταστολή του μεταγραφήματος της hCINAP (siRNA) και κύτταρα ελέγχου (GC). Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει την hCINAP, το κόκκινο την fibrillarin, PML και coilin μετά τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων και το μπλε το DNA. Κλίμακα: 5 μ m.

Αντίστοιχα διαπιστώθηκε, με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα που αναγνώριζε την hCINAP, σε ισόποσα πρωτεϊνικά δείγματα, όπως αυτό επιβεβαιώθηκε με χρήση αντισώματος έναντι της δυνεΐνης, ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης hCINAP μειώθηκαν κατά 90% σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς και ελέγχου (Σχήμα 3.38 B).

Αφού επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματική αποσιώπηση, στη συνέχεια για την αξιολόγηση/μελέτη τυχόν επιπτώσεων που μπορούσε να επιφέρει στη δομή του πυρήνα και στο κύτταρο η μείωση της έκφρασης της hCINAP, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική ανάλυση του κυτταρικού φαινοτύπου με χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι της hCINAP και έναντι υποπυρηνικών δομών ή διαμερισμάτων [fibrillarin-πυρηνίσκος, coilin-Cajal bodies, Sm και PSP1-speckles, PML-PML) και ειδική χρώση του χρωμοσωμικού DNA με τη χρωστική Hoechst.

Από τα αποτελέσματα της μικροσκοπία φθορισμού, συγκρίνοντας τα κύτταρα που έτυχαν επιμόλυνση με το siRNA ελέγχου και αυτά που έτυχαν επιμόλυνση με το siRNA έναντι της hCINAP, δεν προέκυψε καμιά εμφανής φαινοτυπική διαφορά μεταξύ τους (Σχήμα 3.39).

Αν και η μεταγραφική αποσιώπηση (siRNA) που πραγματοποιήθηκε ήταν επιτυχής, μειώνοντας σημαντικά τόσο τα επίπεδα του mRNA (κατά 70%), όσο και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης hCINAP (κατά 90%), δεν φάνηκε να επιφέρει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμες φαινοτυπικές αλλαγές στη δομή και την οργάνωση του πυρήνα. Μια τέτοια τεχνική αναμενόταν να δώσει ενδεχόμενες δομικές ανωμαλίες στον πυρήνα, που η ανάλυση τους θα ήταν ίσως διαφωτιστική για τις φυσιολογικές λειτουργίες που επιτελεί η hCINAP, που επηρεάζονται από την έλλειψη της. Ίσως το ποσοστό καταστολής που επιτεύχθηκε να μην ήταν ικανό να επιφέρει τέτοιες μεταβολές.

Πρόσφατη δημοσίευση (Zhang et al., 2010), έχει δείξει ότι καταστολή της hCINAP με τη μέθοδο RNAi, προκαλεί πρόβλημα στην δόμηση των CBs και διαταράσσει την ενδοκυττάρια κατανομή των βασικών συστατικών των CBs, συμπεριλαμβανομένου της coilin, της SMN, των spliceosomal snRNP, της fibrillarin και της NPAT (nuclear protein ataxia-telangiectasia). Στο άρθρο αυτό, για να είναι ορατός ο φαινότυπος αυτός, επιτεύχθηκε μείωση των επιπέδων του mRNA της hCINAP κατά 95% και η πρωτεΐνη hCINAP μπορούσε να διακριθεί με δυσκολία μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η μείωση αυτή έγινε κατορθωτή με χρήση ειδικού πλασμιδίου (pSUPER), το οποίο προκαλεί με πιο αποτελεσματικό, μείωση της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου (stable loss-of-function) (Brummelkamp et al., 2002).

3.9 Σημειακή μεταλλαξογένεση και έκφραση της πρωτεΐνης GFP-hCINAP σε κύτταρα HeLa

Από το εργαστήριο του Δρα Σπύρου Ζωγράφου (Οργανική & Φαρμακευτική Χημεία, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών Ελλάδας), με το οποίο συνεργαζόμαστε, έχουν επιτευχθεί και προσδιορισθεί, όπως έχει αναφερθεί αναλυτικά στην εισαγωγή (υποκεφάλαιο 1.6), με μεγάλη ευκρίνεια τρεις δομές της hCINAP: η προϋπάρχουσα δομή με το θειικό ιόν στην περιοχή δέσμησης του AMP και δύο καινούργιες δομές α) η δομή της hCINAP σε συνδυασμό με την δέσμηση του τρινουκλεοτιδίου ADP (και dADP) στο κέντρο πρόσδεσης του Mg^{2+} ATP και β) η δομή του τριπλού συμπλόκου hCINAP- Mg^{2+} ADP-Pi. Επιπλέον, επειδή δεν ήταν δυνατός ο πειραματικός προσδιορισμός της δομής του τριπλού συμπλόκου hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη της με την υπολογιστική μέθοδο docking (IFD) (Drakou et al., in review).

Από την ανάλυση των δομών αυτών, προέκυψαν πολύ σημαντικά δεδομένα που αφορούν τη δομή και, κατ' επέκταση, τη λειτουργία της hCINAP. Προέκυψε ότι το καταλυτικό κέντρο σχηματίζεται από τα κρίσιμα αμινοξέα 10-17 του μοτίβου Walker-A (P-loop), την Arg109 που βρίσκεται στην περιοχή LID και την His79 του μοτίβου Walker B.

Αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα παρουσιάζονται είτε ταυτόσημα είτε ως συντηρημένες αντικαταστάσεις τους στα ορθόλογα της hCINAP στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Επιπλέον, τα αμινοξικά κατάλοιπα Lys16 και Arg109 είναι ταυτόσημα με αυτά των αδενυλικών κινασών, ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα Thr17 και His79, που είναι κρίσιμα για τη δομή της hCINAP (Drakou et al., in review) διαφέρουν από τις υπόλοιπες AKs.

Η His79, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δομή της πρωτεΐνης λαμβάνοντας δύο διαφορετικές διαμορφώσεις: «flip» ή «κατάσταση AK» και «flor» ή «κατάσταση ATPάσης», με αλλαγή της διαμόρφωσης του ιμιδαζολίου (βλ. Εισαγωγή, υποκεφάλαιο 1.6). Στη διαμόρφωση ATPάσης, το άζωτο του ιμιδαζολίου αντικρίζει το καταλυτικό κέντρο Mg^{2+} ATP και συν-κατευθύνει το μόριο του νερού μαζί με το κατάλοιπο της Lys16 για την πυρηνόφιλη αντίδραση στο γ-φωσφόρο του ATP, ενώ η Thr17, δρα συντονίζοντας το ιόν Mg^{2+} .

Λόγω της σημαντικότητας των αμινοξικών αυτών καταλοίπων στη δομή και κατ' επέκταση στη λειτουργία της hCINAP, πραγματοποιήθηκε σημειακή μεταλλαξογένεση των καταλοίπων αυτών, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.10 και οι μεταλλαγμένες μορφές της hCINAP που προέκυψαν μελετήθηκαν τόσο φαινοτυπικά όσο και για την εμπλοκής τους στη λειτουργική οργάνωση του πυρήνα.

| Θέση αμινοξικών καταλοίπων | Χαρακτηριστικά | Σημειακές Μεταλλάξεις |
|----------------------------|--|-------------------------------------|
| 16 (Walker A, P-loop) | Συντηρημένο σε όλες τις AKs | L16A |
| 17 (Walker A, P-loop) | Διαφέρει από τις άλλες AKs οι οποίες παρουσιάζουν Gly στη θέση αυτή αντί Lys | T17A |
| 18 (Walker A, P-loop) | Συντηρημένο σε όλες τις AKs | T18A |
| 79 (Walker B) | Διαφέρει από τις άλλες AKs | H79G |
| 109 (LID domain) | Συντηρημένο σε όλες τις AKs | R109A |
| | | Διπλές σημειακές Μεταλλάξεις |
| | | L16A και R109A |
| | | T17A και R109A |
| | | T18A και R109A |

Πίνακας 3.10: Θέσεις αμινοξικών καταλοίπων στα οποία πραγματοποιήθηκε σημειακή μεταλλαξογένεση της πρωτεΐνης hCINAP.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η τεχνική της σημειακής μεταλλαξογένεσης (2.1.3.12), με χρήση ειδικού πακέτου και ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων που έφεραν τις σημειακές μεταλλάξεις στις συγκεκριμένες θέσεις νουκλεοτιδίων, όπως φαίνονται στο Πίνακα 2.8, με χρήση του πλασμιδίου pEGFP-hCINAP. Τα πλασμίδια που προέκυψαν αλληλουχρήθηκαν για επιβεβαίωση και τα επιθυμητά πλασμίδια πολλαπλασιάστηκαν. Η μεταλλαγμένη μορφή GFP-hCINAP-H79G προέκυψε από ενδονουκλεολυτική διάσπαση του πλασμιδίου pGEX-6P-hCINAPH79G, το οποίο κατασκευάστηκε από το εργαστήριο του Δρ. Σπύρου Ζωγράφου, και κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε παράλληλη επιμόλυνση των κυττάρων HeLa, τόσο των πλασμιδίων που έφεραν την μεταλλαγμένη μορφή της hCINAP, όσο και του φυσικού τύπου της hCINAP (WT). Τα κύτταρα, μετά από πάροδο 16-20 h από την επιμόλυνση, μελετήθηκαν τόσο για την έκφραση όσο και για την σταθερότητα με ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας για την ανίχνευση τους αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GFP (το σχήμα δεν παρατίθεται). Όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της hCINAP ήταν ανιχνεύσιμες.

Για μελέτη του ενδοκυττάριου εντοπισμού της πρωτεΐνης GFP-hCINAP και πώς αυτός επηρεαζόταν με την ύπαρξη μεταλλάξεων σε λειτουργικά συντηρημένα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε εκ νέου επιμόλυνση κυττάρων HeLa με τα διάφορα πλασμίδια που έφεραν τις σημειακές μεταλλάξεις. Στη συνέχεια αφού τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, σημάθηκαν με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού οι πυρηνίσκοι, με αντίσωμα έναντι της fibrillarín και το DNA με τη χρωστική Hoechst 33342. Τα αποτελέσματα της ενδοκυττάριας κατανομής της GFP-hCINAP, για κάθε τύπο υβριδίου, φαίνονται στο Σχήμα 3.40 α και β.

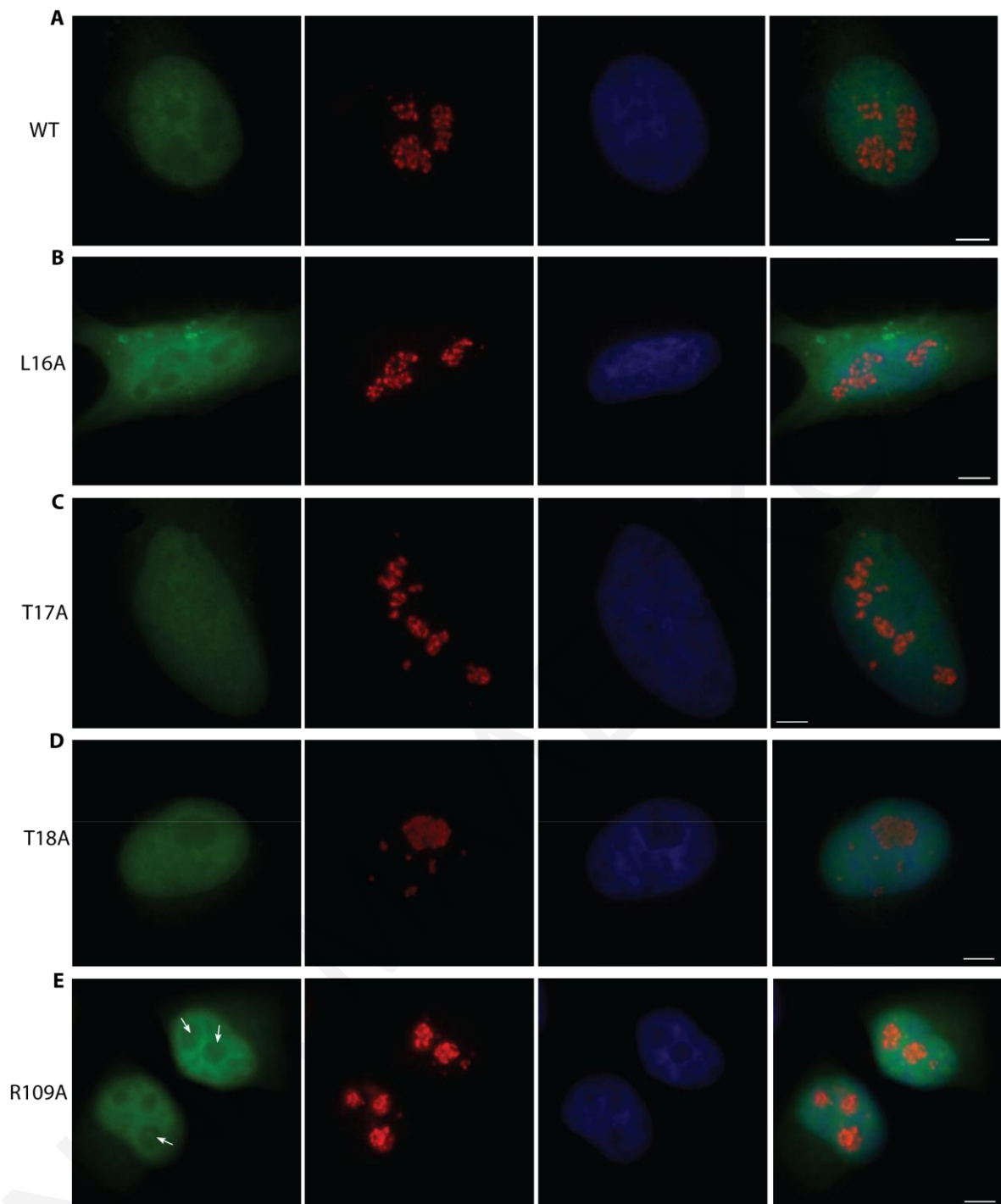
Από τον ανοσοφθορισμό, έγινε αντιληπτό ότι τα μεταλλαγμένα υβρίδια της hCINAP (GFP-hCINAP) παρουσίαζαν φαινοτυπικά, σε ένα ποσοστό των κυττάρων τους, διαφορές ως προς τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους συγκριτικά με το υβρίδιο του φυσικού τύπου της hCINAP (Σχήμα 3.40 Α).

Η GFP-hCINAPL16A στη μεγάλη πλειοψηφία των κυττάρων παρουσίαζε σωστό ενδοκυττάριο εντοπισμό, εκτός του γεγονότος ότι εμφανιζόταν να εντοπίζεται ελαφρώς και στο κυτταρόπλασμα και οι πυρηνίσκοι ήταν πιο διακριτοί. Σε κύτταρα όπου η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφραζόταν, εμφανίζονταν συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα (15% περίπου των επιμολυσμένων κυττάρων) (Σχήμα 3.40 Β). Η διπλά μεταλλαγμένη GFP-hCINAPL16A/R109A παρουσίαζε τα ίδια γνωρίσματα με την L16A, αλλά επιπρόσθετα σε ένα μικρό ποσοστό (περίπου 5% των επιμολυσμένων κυττάρων) παρουσιαζόταν κυτταροπλασματική κοντά στον πυρήνα, πιθανώς στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Σχήμα 3.40 F).

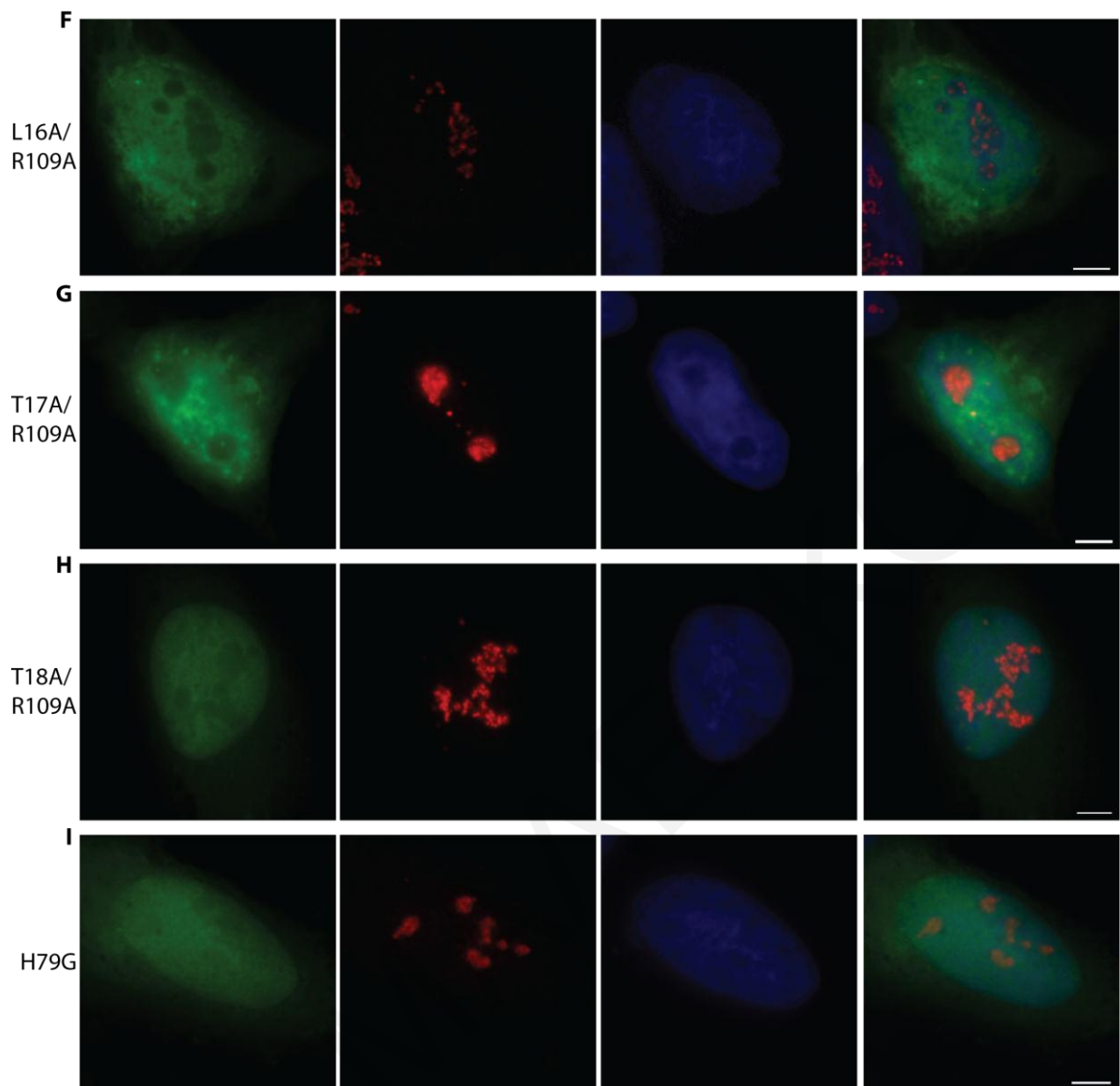
Η GFP-hCINAPT17A παρουσίαζε μειωμένα επίπεδα έκφρασης (περίπου στο 50% των επιμολυσμένων κυττάρων), με την πρωτεΐνη να εμφανίζεται διάχυτη στον πυρήνα αλλά και μέσα στους πυρηνίσκους (Σχήμα 3.40 C), ενώ στα κύτταρα στα οποία η έκφραση ήταν σε ψηλά επίπεδα η πρωτεΐνη εμφανιζόταν να κατέχει την φυσιολογική της κατανομή. Η διπλά μεταλλαγμένη GFP-hCINAPT17A/R109A, στα κύτταρα στα οποία εκφραζόταν σε ψηλά επίπεδα, παρουσίαζε συσσωματώματα στο πυρηνόπλασμα (Σχήμα 3.40 G).

Τόσο η GFP-hCINAPT18A (Σχήμα 3.40 D), όσο και η διπλά μεταλλαγμένη GFP-hCINAPT18A/R109A (Σχήμα 3.40 H) παρουσίαζαν φυσιολογική ενδοκυττάρια κατανομή. Η GFP-hCINAPR109A, ενώ είχε φυσιολογική κατανομή στη πλειοψηφία των κυττάρων, σε ένα ποσοστό 10% των κυττάρων εντοπιζόταν στους πυρηνίσκους υπό μορφή κουκκίδας (Σχήμα 3.40 E, βελάκια).

Τέλος, η GFP-hCINAPH79G παρουσίαζε πανομοιότυπη κατανομή με την φυσική πρωτεΐνη GFP-hCINAP, με ελαφρώς αυξημένου κυτταροπλασματικού εντοπισμού (Σχήμα 3.40 I).



Σχήμα 3.40α: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των μορφών της GFP-hCINAP που φέρουν συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις (Πίνακας 3.10) σε κρίσιμα κατάλοιπα της. **A:** GFP-hCINAP φυσικού τύπου (WT). **B:** GFP-hCINAPL16A, 15% των επιμολυσμένων κυττάρων παρουσίαζαν συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα. **C:** GFP-hCINAPT17A, 50% των επιμολυσμένων κυττάρων εξέφραζαν σε χαμηλά επίπεδα την πρωτεΐνη, που παρουσιαζόταν διάχυτη στο πυρηνόπλασμα και στους πυρηνίσκους. **D:** GFP-hCINAPT18A, πανομοιότυπη κατανομή με WT. **E:** GFP-hCINAPR109A, στο 15% των επιμολυσμένων κυττάρων εντοπιζόταν στους πυρηνίσκους υπό μορφή κουκκίδας.



Σχήμα 3.40β: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των μορφών της GFP-hCINAP που φέρουν συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις (Πίνακας 3.10) σε κρίσιμα κατάλοιπα της.

F: GFP-hCINAPL16A/R109A, στο 5% των επιμολυσμένων κυττάρων εντοπιζόταν στο κυτταρόπλασμα, πιθανώς στο ενδοπλασματικό δίκτυο. **G:** GFP-hCINAPT17A/R109A, στα κύτταρα που υπερεκφραζόταν, παρουσίαζαν συσσωματώματα στο πυρηνόπλασμα. **H:** hCINAPT18A/R109A, πανομοιότυπη κατανομή με WT. **I:** GFP-hCINAPH79G, πανομοιότυπη κατανομή με την WT, ελαφρώς αυξημένου κυτταροπλασματικού εντοπισμού. Με πράσινο χρώμα φαίνονται οι μεταλλαγμένες υβριδικές πρωτεΐνες της GFP-hCINAP, με κόκκινο χρώμα η fibrillarlin μετά από σήμανση με εξειδικευμένο αντίσωμα και μπλε χρώμα το DNA, μετά από σήμανση με την χρωστική Hoechst 33342. Κλίμακα: 5 μm.

Με την φαινοτυπική παρατήρηση των διάφορων μορφών της GFP-hCINAP, που έφεραν συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα πρωτεϊνικά κατάλοιπα (Πίνακας 3.10), προέκυψε ότι οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης hCINAP παρουσίαζαν σωστό ενδοκυττάριο εντοπισμό στην πλειοψηφία των κυττάρων, με πολύ μικρές διαφορές στο φαινότυπο σε ένα ποσοστό των κυττάρων, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά πιο πάνω. Τα συσσωματώματα που παρατηρήθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις, και κυρίως σε περιπτώσεις υπερέκφρασης, ίσως να οφείλονται σε αποδιάταξη της δομής της πρωτεΐνης.

Η μεταλλαγμένη μορφή GFP-hCINAPT17A, φαινόταν να παρουσιάζει τον πιο έντονο φαινότυπο, με την πρωτεΐνη να εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο 50% των επιμολυσμένων κυττάρων και να εντοπίζεται σε αυτά διάχυτη στους πυρηνίσκους. Επίσης στους πυρηνίσκους φάνηκε να εντοπίζεται και η μεταλλαγμένη μορφή GFP-hCINAPR109A, σε ποσοστό 10% των επιμολυσμένων κυττάρων, η οποία όμως εντοπιζόταν υπό μορφή κουκκίδας, παρομοίως με τον φαινότυπο που παρατηρήθηκε μετά από καταστολή της μεταγραφής τόσο της RNA Pol I όσο και της II, με χρήση 1 µg/ml actD και μετά από έκθεση των κυττάρων σε ακτινοβολία UV-C (βλ. 3.7.2).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μεταλλαγμένες μορφές GFP-hCINAPT18A και hCINAPT18A/R109A, δεν παρουσίασαν καμία φαινοτυπική διαφορά στον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους σε σύγκριση με τον φυσικό τύπο της πρωτεΐνης hCINAP. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν την μετάλλαξη T18A, η Thr στη θέση αυτή είναι συντηρημένη σε όλες τις AKs, αλλά δεν αποτελεί μέρος των κρίσιμων αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της hCINAP.

Επιπλέον, ο φαινότυπος της πρωτεΐνης fibrillarin, που χρησιμοποιήθηκε για σήμανση των πυρηνίσκων, δεν παρουσίαζε καμία φαινοτυπική διαφορά στις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της hCINAP, ακόμα και σε εκείνες τις περιπτώσεις (GFP-hCINAPT17A και GFP-hCINAPR109A) που εισέρχονταν στον πυρηνίσκο.

Για περαιτέρω μελέτη των μεταλλαγμένων υβριδίων, επιχειρήθηκε η διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής τους στη λειτουργική οργάνωση του πυρήνα και πιο συγκεκριμένα διερευνήθηκε αν επηρεάζουν φαινοτυπικά την πρωτεΐνη coilin και κατ' επέκταση τα Cajal bodies (CBs). Όπως έχει ήδη αποδειχθεί, η πρωτεΐνη hCINAP αλληλεπιδρά με την coilin, την πρωτεΐνη των CBs και η υπερέκφραση της προκαλεί μείωση του αριθμού των CBs ανά πυρήνα (Santama et al., 2005). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση κυττάρων HeLa, όπως και προηγουμένως, χρησιμοποιώντας τα 8 πλασμίδια των μεταλλαγμένων υβριδικών πρωτεϊνών και παράλληλα το πλασμίδιο του φυσικού τύπου της hCINAP (WT). Στη συνέχεια τα CBs σημάνθηκαν με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με ειδικό αντίσωμα που αναγνώριζε της coilin και το DNA με την

χρωστική Hoechst 33342. Στη συνέχεια μετρήθηκε μικροσκοπικά, για το κάθε πλασμίδιο ξεχωριστά, καθώς επίσης και μη επιμολυσμένων κυττάρων HeLa, ο αριθμός των CBs που εντοπιζόταν στους πυρήνες των επιμολυσμένων κυττάρων, σε τυχαία οπτικά πεδία από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

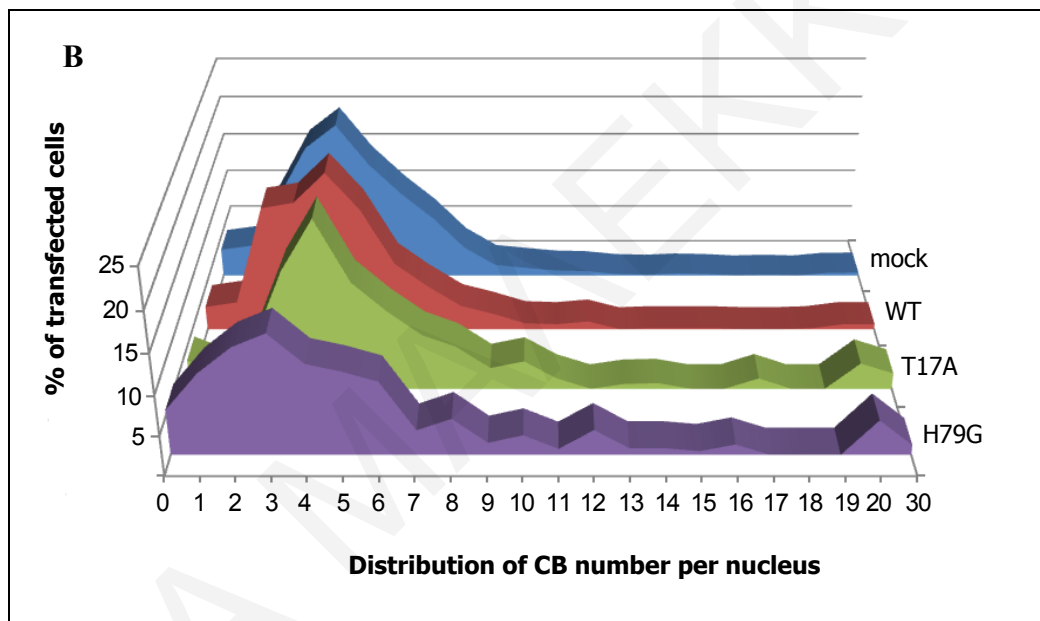
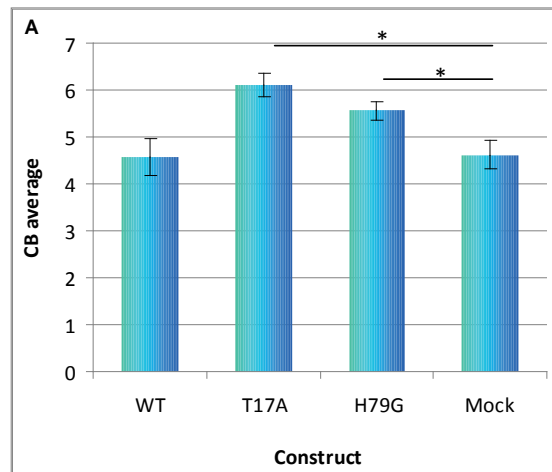
Τα ληφθέντα αποτελέσματα έτυχαν επεξεργασίας με στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα Prism (GraphPad Software). Αφού υπολογίστηκε ο μέσος όρος του αριθμού των CBs ανά κύτταρο και οι τυπικές αποκλίσεις τους, ελέχθησαν στατιστικώς με το Welch's t-test. Επιπλέον, δημιουργήθηκε το ιστόγραμμα κατανομής του αριθμού των CBs για κάθε υβρίδιο ξεχωριστά και η διασπορά συγκρίθηκε με τη μέθοδο 2-way ANOVA με την κατανομή των κυττάρων ελέγχου (mock). Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι στατιστικώς σημαντικές ήταν οι διασπορές που αντιστοιχούσαν στις υβριδικές πρωτεΐνες GFP-hCINAP-T17A και GFP-hCINAP-H79G (Σχήμα 3.41 A). Όπως φάνηκε από το διάγραμμα διασποράς των CBs (Σχήμα 3.41 B), παρουσιαζόταν ανομοιογένεια στον αριθμό των CBs ανά πυρήνα για τις 2 μεταλλαγμένες υβριδικές πρωτεΐνες.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες αυτής της κατανομής των δύο μεταλλαγμένων υβριδικών πρωτεϊνών, GFP-hCINAP-T17A και GFP-hCINAPH79G, σε σύγκριση με την GFP-hCINAP (WT) φαίνονται στο Σχήμα 3.42. Τα κύτταρα που εξέφραζαν την GFP-hCINAP-T17A, παρουσίαζαν κατανομή με ομάδες κυττάρων με μεγαλύτερο αριθμό CBs από τον αριθμό του μέσου όρου της WT (και των κυττάρων ελέγχου). Συγκεκριμένα, υπήρχαν ομάδες κυττάρων που παρουσίαζαν 10 CBs (Σχήμα 3.42 A2) ή 20-30 CBs (Σχήμα 3.42 A1). Στη περίπτωση της GFP-hCINAP-H79G, παρουσιάζονταν ομάδες κυττάρων που είχαν είτε λιγότερα CBs ανά πυρήνα (0-2) (Σχήμα 3.42 A2), είτε μεγαλύτερο αριθμό CBs, μέχρι 30 ανά πυρήνα (Σχήμα 3.42 A1), σε σύγκριση με τον αριθμό του μέσου όρου της WT (ή των κυττάρων ελέγχου).

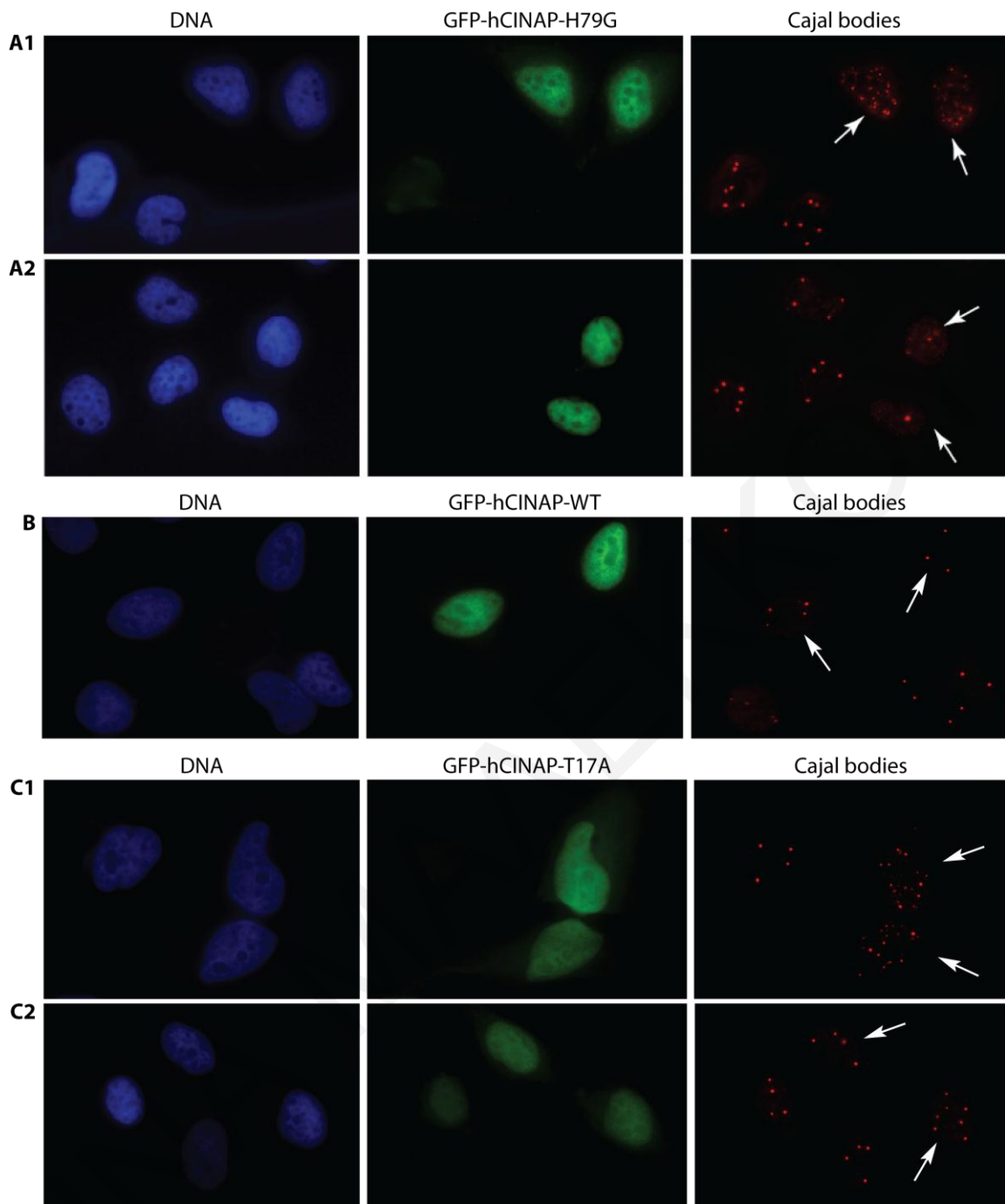
Οι δύο αυτές υβριδικές μεταλλαγμένες πρωτεΐνες (GFP-hCINAPT17A και GFP-hCINAPH79G) επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη τυχόν φαινοτυπικών αλλαγών των πυρηνικών δομών της προμυελικής λευχαιμίας (Pro Myeloid Leukemia Bodies, PML) και των speckles, με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων που αναγνώριζαν τις πρωτεΐνες αυτών των δομών [Promyelocytic leukemia protein (PML) και Smith protein (Sm)] και μικροσκοπίας φθορισμού. Όπως φαίνεται και στα Σχήματα 3.43 και 3.44, δεν παρουσιαζόταν καμιά διακριτή φαινοτυπική αλλαγή είτε στον αριθμό είτε στην οργάνωση αυτών των δομών στα κύτταρα που εξέφραζαν τις μεταλλαγμένες υβριδικές πρωτεΐνες, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα του φυσικού τύπου. Αυτό υποδηλώνει ότι οι επιπτώσεις στην οργάνωση των CBs στον πυρήνα των κυττάρων μετά την υπερέκφραση των

συγκεκριμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, είναι ειδικές και όχι δευτερεύουσες που προκύπτουν από γενικευμένες αλλαγές επί της πυρηνικής δομής.

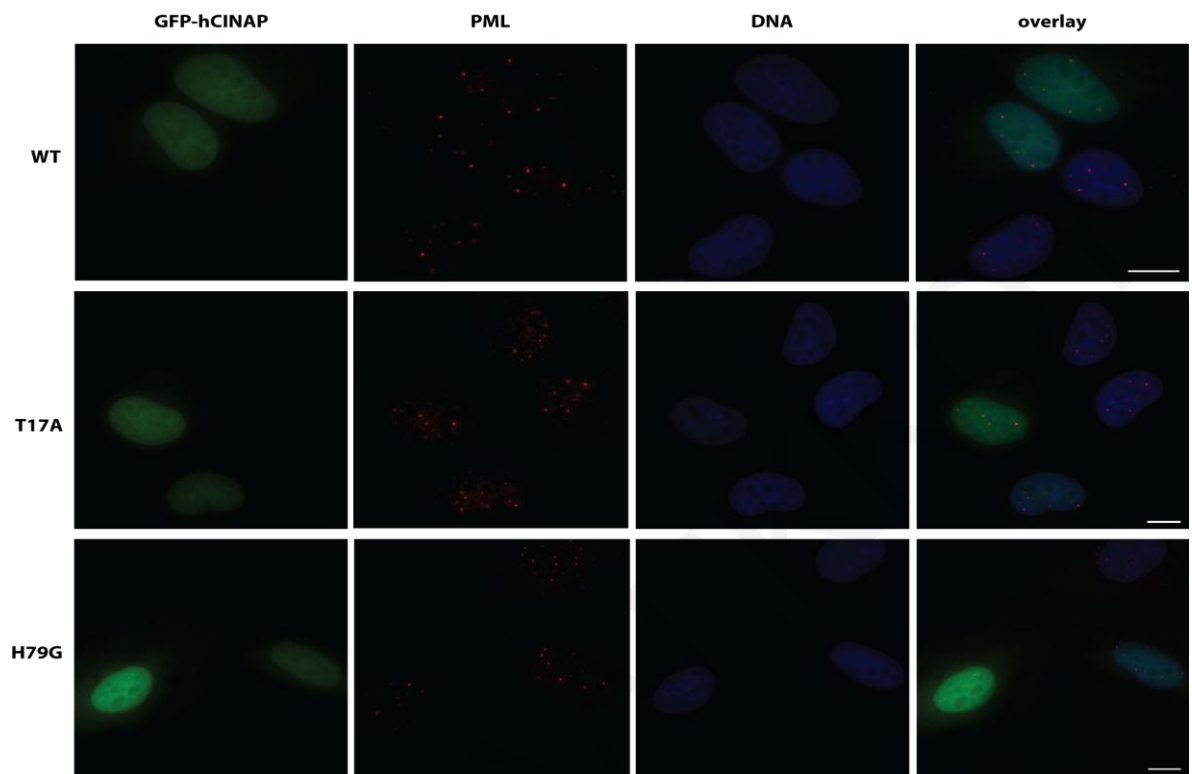
ΑΝΝΑ ΜΑΛΕΚΚΟΥ



Σχήμα 3.41: Η υπερέκφραση των GFP-hCINAPH79G και GFP-hCINAPT17A σε κύτταρα HeLa οδηγεί στην αποδιοργάνωση των Cajal bodies (CBs), τόσο με αλλαγή του μέσου όρου όσο και της κατανομής τους. **A:** Μέσος όρος του αριθμού των CBs με τυπική απόκλιση σε κύτταρα HeLa και κύτταρα που εξέφραζαν τις GFP-hCINAPWT, GFP-hCINAPH79G και GFP-hCINAPT17A, μετά από επιμόλυνση κυττάρων HeLa. Ο μέσος όρος των CBs των H79G και T17A ήταν σημαντικά ψηλότερος συγκρίνοντας τον με αυτό των κυττάρων, $p=0.034$ και $p=0.0121$, αντίστοιχα (Welch's t-test). **B:** Διάγραμμα κατανομής του αριθμού των CBs ανά πυρήνα στους 3 διαφορετικούς πληθυσμούς επιμολυσμένων κυττάρων, σε σύγκριση με τα κύτταρα HeLa (mock). Η ολική διασπορά των CBs είναι διαφορετική και στατιστικώς σημαντική (two-way ANOVA) στα κύτταρα που εκφράζουν την GFP-hCINAPH79G σε σύγκριση με αυτά που εκφράζουν την WT ($p=0.0151$) ή σε σύγκριση με τα κύτταρα HeLa ($p=0.0122$), ενώ της GFP-hCINAPT17A στατιστικώς σημαντική με την WT (0.0049).

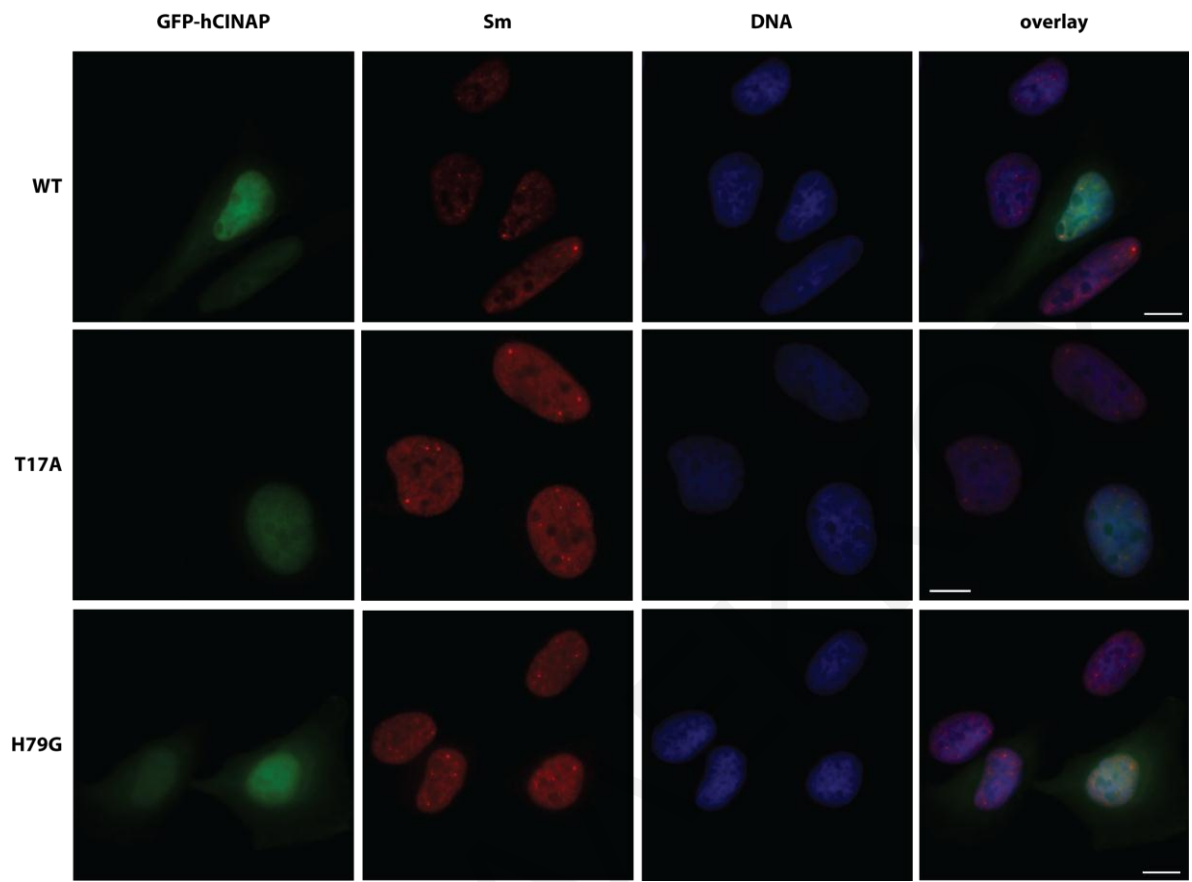


Σχήμα 3.42: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της αλλαγής του αριθμού των CBs σε κύτταρα HeLa που έχουν επιμολυνθεί με τις μεταλλαγμένες μορφές GFP-hCINAPH79G (A1 και A2) και GFP-hCINAPT17A (C1 και C2) σε σύγκριση με την GFP-hCINAP-WT (B). Στη περίπτωση της μετάλλαξης H79G, ο αριθμός των CBs είτε αυξάνεται δραματικά, 20-30 CBs (A1), είτε μειώνεται (A2) σε σύγκριση με το WT (B) και τα κύτταρα που δεν είναι επιμολυσμένα στο ίδιο οπτικό πεδίο, ενώ στη περίπτωση της T17A, ο αριθμός των CBs είτε αυξάνεται δραματικά, 20-30 CBs (C1), είτε λιγότερο, 5-7 CBs (C2). Με πράσινο χρώμα φαίνονται τα επιμολυσμένα κύτταρα (βελάκια) της κάθε περίπτωσης (H79G, T17A ή WT), με κόκκινο χρώμα η coilin μετά από σήμανση με εξειδικευμένο αντίσωμα και με μπλε χρώμα το DNA, μετά από σήμανση με την χρωστική Hoechst 33342. Κλίμακα: 20 μ m.



Σχήμα 3.43: Οι πυρηνικές δομές PML δεν παρουσιάζονται αλλοιωμένες, μετά από επιμόλυνση κυττάρων HeLa με τις μεταλλαγμένες υβριδικές πρωτεΐνες GFP-CINAPH79G και GFP-hCINAPT17A σε σύγκριση με την υβριδική πρωτεΐνη GFP-hCINAPWT.

Τυχαία οπτικά πεδία που παρουσιάζουν κύτταρα επιμολυσμένα (πράσινο χρώμα), με τις τρεις υβριδικές πρωτεΐνες H79G, T17A και WT. Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με τη χρωστική Hoechst (μπλε χρώμα), ενώ με κόκκινο χρώμα τα σωματίδια PML με εξειδικευμένο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PML. Κλίμακα: 20 μm.



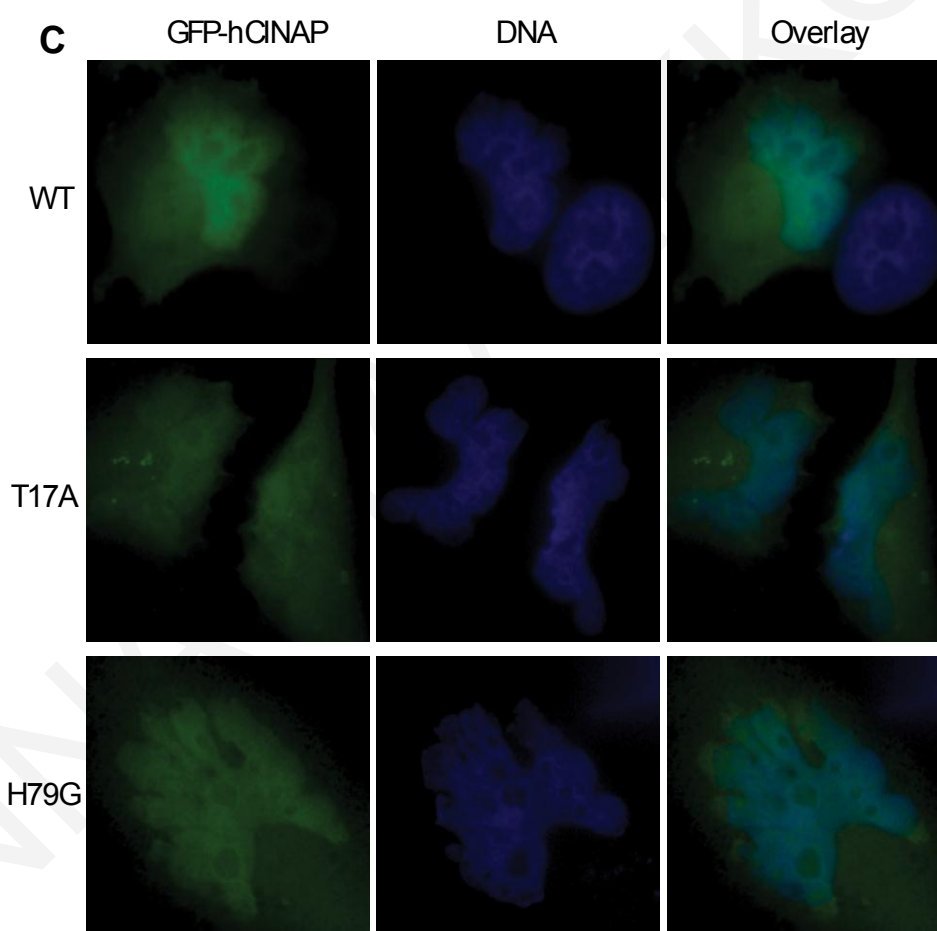
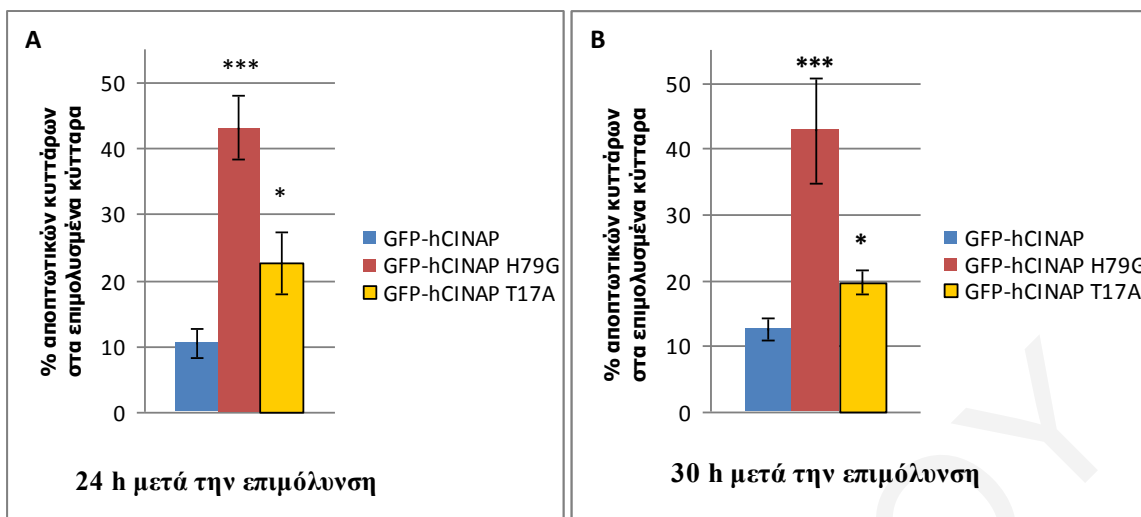
Σχήμα 3.44: Οι πυρηνικές δομές Speckles, δεν παρουσιάζονται αλλοιωμένες, μετά από επιμόλυνση κυττάρων HeLa με τις μεταλλαγμένες υβριδικές πρωτεΐνες GFP-CINAPH79G και GFP-hCINAPT17A σε σύγκριση με την υβριδική πρωτεΐνη GFP-hCINAPWT.

Τυχαία οπτικά πεδία που παρουσιάζουν κύτταρα επιμολυσμένα (πράσινο χρώμα), με τις τρεις υβριδικές πρωτεΐνες H79G, T17A και WT. Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με τη χρωστική Hoechst (μπλε χρώμα), ενώ με κόκκινο χρώμα τα σωματίδια Speckles με εξειδικευμένο αντίσωμα έναντι των πρωτεϊνών Sm. Κλίμακα: 20 μm.

Κατά τη διάρκεια των πιο πάνω πειραμάτων, παρατηρήθηκε ότι επιμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια που έφεραν της σημειακές μεταλλάξεις της hCINAP, είχε αρνητικό αντίκτυπο τόσο στην αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης όσο και της επιβίωσης των κυττάρων που έφεραν αυτά τα πλασμίδια, με εμφάνιση κυττάρων σε κατάσταση απόπτωσης (Σχήμα 3.45 C). Για την ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων, στην κάθε περίπτωση ξεχωριστά, πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση των κυττάρων στις 24 και 30 h μετά την επιμόλυνση τους με τα πλασμίδια που έφεραν τις GFP-hCINAP-T17A και GFP-hCINAP-H79G, καθώς και την GFP-hCINAP (WT) και στη συνέχεια αφού σημάνθηκε το DNA με την χρωστική Hoechst 33342 καταμετρήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού τα αποπτωτικά κύτταρα, με βάση την μορφολογία που παρουσίαζε το DNA τους (συσπείρωση και παραμόρφωση χρωματίνης, δημιουργία αποπτωτικών σωματίων), σε σύνολο 5000 κυττάρων σε κάθε περίπτωση.

Στις 24 h μετά την επιμόλυνση, ο πληθυσμός των GFP-hCINAP-T17A επιμολυσμένων αποπτωτικών κυττάρων (22.67%) ήταν 2 φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με αυτών της GFP-hCINAP (WT) (10.41%), ενώ των GFP-hCINAP-H79G (43.14%) τέσσερις φορές μεγαλύτερος, με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.005$ για T17A και $p\leq 0.001$ για H79G) όπως προέκυψε με στατιστική ανάλυση ANOVA (Tukey's multiple comparison post-test) (Σχήμα 3.45 A). Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν επίσης στις 30 h μετά την επιμόλυνση (Σχήμα 3.45 B), όπου ο πληθυσμός των επιμολυσμένων αποπτωτικών κυττάρων στη περίπτωση της GFP-hCINAP-T17A (19.72%) και της GFP-hCINAP-H79G (42,87%) ήταν και πάλι στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με την φυσικού τύπου πρωτεΐνη GFP-hCINAP (12.56%).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι κατά την μετάβαση από τις 24 στις 30 h, μόνο τα κύτταρα που ήταν διαμολυσμένα με τον WT τύπο έδειξαν αύξηση των κυττάρων που εξέφραζαν διαγονιδιακό υβρίδιο (από 25.27% σε 27.13%), ενώ τα θετικά κύτταρα των δύο μεταλλαγμένων πρωτεϊνών GFP-hCINAP-T17A και GFP-hCINAP-H79G παρουσίασαν μείωση από 14.79% σε 9.55% και από 16.40% σε 7.42%, αντίστοιχα, με μεγαλύτερη μείωση αυτών της GFP-hCINAP-H79G με υψηλή στατιστική σημασία ($P=0.0053$). Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν την συσχέτιση των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης hCINAP με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Σχήμα 3.45: Η έκφραση των μεταλλαγμένων υβριδικών πρωτεϊνών GFP-CINAPH79G και GFP-CINAPT17A είναι τοξικά και αυξάνει την απόπτωση στα κύτταρα HeLa, τα οποία είναι επιμολυσμένα με αυτά. Σύγκριση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων στον αριθμό των επιμολυσμένων κυττάρων με τις GFP-hCINAP (WT), GFP-hCINAP H79G και GFP-CINAPT17A, σε χρόνους 24 h (A) και 36 h (B), μετά την επιμόλυνση. Τα αποπτωτικά κύτταρα, που παρουσίαζαν αποδιοργανωμένο πυρήνα (C) μετρήθηκαν κάτω από αντεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού. Σε κάθε περίπτωση, στην κάθε χρονική στιγμή μετρήθηκαν πάνω από 5000 κύτταρα. Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων με τις H79G και T17A ήταν στατιστικά πολύ ψηλότερο σε σύγκριση με την WT ($p \leq 0.001$ για H79G και $p = 0.005$ για T17A) (Tukey's Multiple Comparison Test).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των δύο αυτών μεταλλαγμένων μορφών της hCINAP σε λειτουργικό επίπεδο, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η έκφραση τους έχει ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των CBs με δημιουργία ετερογενούς διασποράς στον αριθμό τους ανά πυρήνα, που έχει ως επακόλουθο την εμφάνιση τοξικότητας με αύξηση της απόπτωσης ή και την μείωση του πολλαπλασιασμού των συγκεκριμένων κυττάρων.

ΑΝΝΑ ΜΑΛΕΚΚΟΥ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μερικός λειτουργικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης hCINAP

Το ενδιαφέρον μας στην παρούσα μελέτη εστιάστηκε στη προσπάθεια του πληρέστερου λειτουργικού χαρακτηρισμού μιας καινούργιας μερικώς χαρακτηρισμένης ανθρώπινης πυρηνικής πρωτεΐνης, της hCINAP.

Η πρωτεΐνη hCINAP (Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein) ταυτοποιήθηκε μετά από σάρωση cDNA βιβλιοθήκης από κύτταρα *HeLa*, με το σύστημα των δύο υβριδίων στο ζυμομύκητα, που σκοπό είχε την εύρεση πρωτεϊνών οι οποίες αλληλεπιδρούν με την πυρηνική πρωτεΐνη coilin. Η coilin είναι συστατικό των ενδοπυρηνικών σωματιδίων Cajal (CBs), τα οποία εμπλέκονται κυρίως στην ωρίμανση των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων.

Το cDNA της hCINAP κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 172 αμινοξέα, με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 20.048 KDa. Η σύγκριση της αλληλουχίας της με βάση δεδομένων, αποκάλυψε ότι η hCINAP είναι φυλογενετικά συντηρημένη από τον άνθρωπο μέχρι τα φυτά και το σακχαρομύκητα και δεν παρουσιάζει υψηλή ομολογία με καμιά άλλη γνωστή πρωτεΐνη.

Η ορθόλογη πρωτεΐνη της hCINAP στο σακχαρομύκητα, Far7, είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και ενοχοποιείται για την εμπλοκή της στη ρύθμιση της μεταγραφικής απόκρισης μετά από οξειδωτικό στρες (Juhnke et al., 2000). Επίσης, διαδραματίζει ρόλο στην ωρίμανση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας (SSU) (Granneman et al., 2005), ενώ η ορθόλογη της στον *C. elegans*, ADLP, φαίνεται να εμπλέκεται στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Zhai et al., 2006).

Η αλληλουχία της hCINAP περιέχει χαρακτηριστικό μοτίβο πρόσδεσης τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου (ATP ή GTP) τύπου P-loop, το οποίο εμφανίζεται παρόμοιο με αυτό που εμφανίζεται στα μέλη της οικογένειας των ATP/GTPασών ή αδενυλικών κινασών. Σε συμφωνία με αυτή την πρόβλεψη, δείχθηκε ότι η ανασυνδυασμένη hCINAP παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα ATPάσης, με $K_m=75.3 \pm 5$ μM , $V_{max}=1.27 \pm 0.2$ μmol σχηματισμένου ADP.min⁻¹.mg⁻¹ (Santama et al., 2005).

Ο προσδιορισμός της δομής της hCINAP (Ren et al., 2005) φανέρωσε δομική ομοιότητα, πέρα από την ομοιότητα στην αλληλουχία, με την οικογένεια των αδενυλικών κινασών (AKs), οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων και στο κυτταρικό ισοζύγιο ενέργειας, καταλύοντας την αντιστρεπτή

αντίδραση μεταφοράς της γ -φωσφορικής ομάδας από ένα δότη φωσφόρου (συνήθως ATP) στο AMP, με την ελευθέρωση 2 μορίων ADP (Noda, 1973). Ως εκ τούτου, κατατάχθηκε σε αυτή την οικογένεια και ονομάστηκε AK6 (Adenylate Kinase 6), επειδή αντιπροσωπεύει την 6^η ισομορφή των οκτώ αδενυλικών κινασών (AKs 1-8) που έχουν ταυτοποιηθεί (Ren et al., 2005).

Η hCINAP κωδικοποιείται ως εναλλακτικό μεταγράφημα από τον γενετικό τόπο TAF9 που βρίσκεται στη θέση 68.7 Mb στο χρωμόσωμα 5, ο οποίος κωδικοποιεί ακόμα 3 μεταγραφήματα.

Η hCINAP έχει κοινά τα δύο πρώτα εξόνια (141 νουκλεοτίδια), με το mRNA που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα TAFIID₃₂. Τα δύο αυτά μεταγραφήματα ωστόσο δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα στην πρωτεϊνική αλληλουχία, λόγω του ότι χρησιμοποιούν διαφορετικό κωδικόνιο έναρξης. Η hCINAP χρησιμοποιεί το πρώτο κωδικόνιο έναρξης (ATG) που εμφανίζεται στο 5' άκρο, ενώ η TAFIID₃₂ ένα εσωτερικό ATG, 18 νουκλεοτίδια μετά τα πρώτα 141 κοινά νουκλεοτίδια. Επιπλέον, σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών της hCINAP και TAFIID₃₂, έδειξε ότι δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα μεταξύ τους.

Η πρωτεΐνη TAFIID₃₂ αποτελεί μια από τις μικρότερες υπομονάδες (32 kDa) του μεταγραφικού παράγοντα TAFIID, ο οποίος είναι ένα πολυπαραγοντικό σύμπλεγμα βασικών μεταγραφικών παραγόντων. Αποτελείται από την πρωτεΐνη που δεσμεύεται στη περιοχή TATA (TATA-binding protein, TBP) και από μια ομάδα από συντηρημένες πρωτεΐνες που είναι γνωστές ως παράγοντες που συνδέονται με την πρωτεΐνη TBP ή TAFs. Οι TAFs ίσως να εμπλέκονται στη μεταγραφή δρώντας ως συνενεργοποιητές για την αναγνώριση του υποκινητή ή στη τροποποίηση βασικών μεταγραφικών παραγόντων (GTFs), διευκολύνοντας τη συναρμολόγηση του συμπλόκου της μεταγραφής και την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II (Muller and Tora, 2004).

Παρατηρήθηκε ότι τα μεταγραφήματα των TAFIID₃₂ και hCINAP, εκφράζονται σε αναλογία 1:1 σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς (πλακούντα, χοριονικές λάχνες και κινητικό φλοιό εγκεφάλου) και τις κυτταροσειρές (HeLa και παγκρεατική κυτταροσειρά ASPC1) που δοκιμάστηκαν στην εργασία μου.

Το γεγονός ότι δύο μεταγραφήματα από τον ίδιο γενετικό τόπο κωδικοποιούν δύο διαφορετικές πρωτεΐνες είναι ασυνήθιστο. Φυλογενετική μελέτη έδειξε ότι αυτή η διάταξη του γονιδίου είναι συντηρημένη σε όλα τα θηλαστικά (χιμπατζήδες, αρουραίους, ποντίκια και σκύλους), αλλά δεν είναι συντηρημένη σε άλλα σπονδυλόζωα, όπως ψάρια και αμφίβια, στα οποία κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γενετικούς τόπους, αν και τα ορθόλογα τους είναι συντηρημένα σε αυτούς του οργανισμούς. Αυτό υποδηλώνει ότι οι

δύο αυτές πρωτεΐνες είναι γενετικά αλλά όχι λειτουργικά συνδεδεμένες και ότι η σύνδεση τους στο γονιδίωμα συνέβηκε σχετικά πρόσφατα στην εξέλιξη των σπονδυλόζωων.

Αν και στις βάσεις δεδομένων η hCINAP αναφέρεται ως μεταγραφικός παράγοντας, λόγω της γενετικής σύνδεσης της με την TAF_{II}D₃₂, δεν παρουσιάζει περιοχή δέσμευσης του DNA (DNA-binding domain) και δεν φαίνεται να λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας, αλλά αυτό δεν αποκλείει το γεγονός να λειτουργεί με κάποιο τρόπο στη μεταγραφή. Η hCINAP παρουσιάζει διπλή ενεργότητα ATPάσης (Santama et al., 2005) και AK (Ren et al., 2005; Drakou et al., in review) και έχει δειχθεί ότι τέτοιες πρωτεΐνες λαμβάνουν μέρος στη μεταγραφή, αν και δεν παρουσιάζουν δομές δέσμευσης του DNA (Brivanlou and Darnell, 2002).

Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της hCINAP, είτε με παροδική επιμόλυνση με την υβριδική κίτρινο-φθορίζουσα πρωτεΐνη YFP-hCINAP, είτε με ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι ολόκληρης της αλληλουχίας ή έναντι πεπτιδικής αλληλουχίας στο καρβοξυτελικό άκρο (157-175 αα), έδειξε ότι η πρωτεΐνη παρουσιάζει διάχυτη πυρηνοπλασματική κατανομή, εξαιρετικού του πυρηνίσκου, με επιπλέον κατανομή στα σωματίδια Cajal, αλλά όχι σε όλα τα κύτταρα (Santama et al., 2005). Επιπλέον, όπως προέκυψε από ανάλυση με την τεχνική της επαναφοράς φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (FRAP-Fluorescence Recovery After Photobleaching), η πρωτεΐνη hCINAP διαχέεται ελεύθερα μέσα στο κύτταρο, με χρόνο ημιζωής $t_{1/2}=0.29\pm 0.03$ s, που είναι συγκρίσιμος με αυτόν που παρουσιάζει η πρωτεΐνη GFP ($t=0.21$ s) και μόνο ένα μικρό ποσοστό της (11%±4) προσδένεται σταθερά σε δομές του κυττάρου.

Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, hCINAP και coilin, επιβεβαιώθηκε με πειράματα, τόσο *in vivo* (ανοσοκαταβύθιση) όσο και *in vitro* (συν-επιλογή) και συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι αναγκαία για την αλληλεπίδραση είναι τα 215 καρβοξυτελικά αμινοξέα (362-576 nt) της coilin. Επιπλέον, παροδική υπερέκφραση της hCINAP που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa, έδειξε σημαντική μείωση τόσο του αριθμού, όσο και του μεγέθους των σωματιδίων Cajal (Santama et al., 2005), υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών έχει δυναμική μορφή και είναι σημαντική για τη συγκρότηση και τη σταθερότητα των σωματιδίων Cajal (CBs).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα 96 καρβοξυτελικά αμινοξέα της coilin είναι από μόνα τους ικανά να ρυθμίζουν τον αριθμό των σωματιδίων Cajal, μειώνοντας τα ανά πυρήνα (Shpargel et al., 2003). Επιπλέον μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση και μεθυλίωση, που παρουσιάζονται στο καρβοξυτελικό άκρο της coilin επηρεάζουν τη συγκρότηση των σωματιδίων Cajal (Hebert and Matera, 2000; Hebert et al.,

2002). Επιπλέον, σημειακές μεταλλάξεις (Ser σε Asp) στα προβλεπόμενα σημεία φωσφορυλίωσης στη συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή, έχει ως αποτέλεσμα εντυπωσιακή αλλαγή στον αριθμό των CBs και δημιουργία ανάλογων δομών μέσα στον πυρηνίσκο (Sleeman et al., 1998).

Το γεγονός ότι η hCINAP αλληλεπιδρά με την coilin πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα Cajal bodies, και ο παροδικός εντοπισμός της hCINAP σε αυτά, ίσως να υποδηλώνει ότι η hCINAP συμμετέχει κατά κάποιο τρόπο στις διαδικασίες ωρίμανσης των συμπλόκων των RNA-πρωτεϊνών ή στη συναρμολότητα των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, διαδικασίες στις οποίες λαμβάνουν μέρος τα CBs (Ogg and Lamond., 2002).

Τα *in vivo* σύμπλοκα των πρωτεϊνών hCINAP-coilin, που προέκυψαν μετά από ανοσοκαταβύθιση σε κύτταρα HeLa, έχειδειχθεί ότι δεν παρουσιάζουν άλλες γνωστές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη coilin ή άλλα συστατικά των CBs, συμπεριλαμβανομένων των U1A, fibrillarin, SMN (Survival Motor Neuron), Sm (Smith antigen) και Sp100 (Santama et al., 2005), υποδηλώνοντας ότι η μεταξύ τους αλληλεπίδραση είναι ανεξάρτητη από την ύπαρξη άλλων πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από την άμεση αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, hCINAP και coilin, όπως αυτή προέκυψε από τα *in vitro* πειράματα, από τα οποία επίσης συμπεραίνεται ότι για την αλληλεπίδραση αυτή δεν είναι αναγκαία προϋπόθεση η παρουσία του ATP.

Σε αντίθεση με τα δικά μας πειραματικά αποτελέσματα (Santama et al., 2005), έχειδειχθεί ότι η hCINAP αλληλεπιδρά με σημαντικούς παράγοντες των CBs, όπως την fibrillarin, την SMN και την NPAT. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HEK 293 T αντί σε HeLa (Zhang et al., 2010).

Η εύρεση πρωτεϊνών με τις οποίες μια πρωτεΐνη αλληλεπιδρά είναι σημαντικό βήμα στην κατανόηση του λειτουργικού ρόλου που επιτελεί. Αν και έγιναν κοπιώδεις προσπάθειες για την εύρεση και ταυτοποίηση καινούργιων πρωτεϊνών οι οποίες να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη hCINAP, με δύο μεγάλης κλίμακας διαφορετικές *in vivo* τεχνικές [σύστημα των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα (Yeast two hybrid system) και συνδυαστική τεχνική SILAC (Stable Isotope Labeling of Amino acids in Culture) με φασματοσκοπία μάζας], δυστυχώς δεν κατέστη τελικά δυνατή μια τέτοια ταυτοποίηση. Ίσως στο μέλλον, θα μπορούσαν να διερευνηθούν αυτές κάτω από διαφορετικές συνθήκες ή να επιλεγούν κάποιες από τις πρωτεΐνες που δεν επιλέγηκαν αρχικά από τον κατάλογο πρωτεϊνών που προέκυψε και να μελετηθούν κάτω από το πρίσμα καινούργιων δεδομένων που προέκυψαν.

Το γεγονός ότι η hCINAP παρουσιάζεται συντηρημένη σε όλο το φάσμα του ευκαρυωτικού φυλογενετικού δέντρου (θηλαστικά, φυτά και ζυμομύκητα) και η διαγραφή

του γονιδίου της στον ζυμομύκητα (*S. cerevisiae*) είναι θνησιγόνος (Juhnke et al., 2000) αποτελούν ισχυρότατες ενδείξεις ότι η λειτουργία που επιτελεί ίσως να είναι ζωτικής σημασίας για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Επιχειρήθηκε καταστολή ή μείωσης της έκφρασης της πρωτεΐνης hCINAP (siRNA). Αν και παρατηρήθηκε μείωση του μεταγραφήματος της hCINAP κατά 70% και των πρωτεϊνικών επιπέδων κατά 90%, δεν φάνηκε να επιφέρει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμες φαινοτυπικές αλλαγές στη δομή και την οργάνωση του πυρήνα.

Σε αντίθεση, πρόσφατη δημοσίευση (Zhang et al., 2010), έχει δείξει ότι καταστολή της hCINAP, με τη χρήση ενός άλλου συστήματος που προκαλεί σταθερή καταστολή του γονιδίου (stable loss-of-function), κατά το οποίο επιτεύχθηκε σχεδόν ολοκληρωτική μείωση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων της hCINAP, είχε ως επακόλουθο τη διατάραξη της ενδοκυττάριας κατανομής των βασικών συστατικών των CBs [coilin, SMN, snRNPs, fibrillarin και NPAT (nuclear protein ataxia-telangiectasia)]. Οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκαν να διαχέονται στο πυρηνόπλασμα μετά την αποδιοργάνωση των CBs. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των snRNPs, καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων των ιστονών και μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, με αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων.

Το παράδοξο που παρουσιάζει αυτό το άρθρο, είναι ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης hCINAP που παρουσιάζεται να εντοπίζεται σταθερά στα CBs και συμπεραίνεται ότι είναι συστατικό των CBs. Δικά μας αποτελέσματα που προέκυψαν, τόσο με ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης με την χρήση δύο διαφορετικών αντισωμάτων (έναντι ολόκληρης της αλληλουχίας ή έναντι πεπτιδικής αλληλουχίας στο καρβοξυτελικό άκρο), όσο και παροδική επιμόλυνση των υβριδικών πρωτεϊνών YFP-hCINAP και GFP-hCINAP, όσο και από σταθερά διαμολυσμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP}, υποδηλώνουν ότι η hCINAP παρουσιάζει διάχυτη πυρηνοπλασματική κατανομή, εξαιρετέου του πυρηνίσκου, με επιπλέον κατανομή στα σωματίδια Cajal, αλλά όχι σε όλα τα κύτταρα και όχι σε όλα τα CBs του ίδιου κυττάρου (Santama, et al., 2005; Malekkou et al., 2010).

Αυτό που είναι ακόμα πιο απροσδόκητο είναι ότι η ίδια ομάδα, σε προηγούμενο της άρθρο (Ren et al., 2005), έδειξε ότι ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της hCINAP ήταν πυρηνικός και ήταν σε πλήρη συμφωνία με τα δικά μας πειράματα. Επομένως, αυτό που παρουσιάζεται στο συγκεκριμένο άρθρο (Zhang et al., 2010), ίσως να αποτελεί αποτέλεσμα ενός μόνο μέρους των κυττάρων, και να μην είναι αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα ή να οφείλεται σε τεχνικές ατέλειες της πειραματικής διαδικασίας (artifacts).

Τα CBs είναι δυναμικές μορφές με κύκλους οργάνωσης και αποδιοργάνωσης, με μεταβολή της μορφολογίας και της σύστασης τους (Lamond and Carmo-Fonseca, 1993). Έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στο μέγεθος και στον αριθμό των CBs κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Παρουσιάζονται μεγαλύτερα σε μέγεθος στις S και G2 φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της πρώιμης G1 φάσης δεν παρατηρούνται CBs, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός τους παρουσιάζεται αργότερα, στη μέση και ύστερη G1 φάση (mid- and late G1 phase), όπου παρατηρούνται πολλά μικρά CBs. Η συγκέντρωση όμως της πρωτεΐνης coilin παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της μίτωσης, με διάχυση της στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται περιέχουν μεγαλύτερα, πιο φωτεινά και περισσότερα CBs. Επιπλέον, η πρωτεϊνική έκφραση της coilin στα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται είναι δύο φορές αυξημένη σε σύγκριση με αυτά που δεν πολλαπλασιάζονται, υποδηλώνοντας ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό και τον κύκλο οργάνωσης και αποδιοργάνωσης των CBs (Andrade et al., 1993).

Η πρωτεΐνη hCINAP, όπως και η πρωτεΐνη coilin, φαίνεται να ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Από πειράματα μικροσκοπίας πραγματικού χρόνου που έγιναν σε σταθερά μετασχηματισμένη κυτταροσειρά HeLa^{GFP-hCINAP}, τα επίπεδα φθορισμού της πρωτεΐνης GFP-hCINAP αυξομειώνονταν σε συνάρτηση με τον χρόνο υποδηλώνοντας ότι η πρωτεϊνική έκφραση της, είναι διαφορετική στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Η ένταση φθορισμού της GFP-hCINAP βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα στο μιτωτικό κύτταρο, ενώ σταδιακά τα επίπεδα φθορισμού αυξάνονται καθώς το κύτταρο εισέρχεται στη φάση G0/G1 (4-9 h μετά την διαίρεση του κυττάρου). Μετά από κυτταρικό συγχρονισμό κυτταροσειράς HeLa επιβεβαιώθηκε ότι η πρωτεϊνική έκφραση της hCINAP εμφανιζόταν μεγαλύτερη κατά την G0/G1 (late G1) φάση του κυτταρικού κύκλου.

Επιπλέον, από τη μικροσκοπία πραγματικού χρόνου προκύπτει ότι η GFP-hCINAP διαχέεται κατά τη διάρκεια της μίτωσης, χωρίς να συνεντοπίζεται με το DNA παρά μόνο στη τελόφαση. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης GFP-hCINAP, φαίνεται να επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση με αύξηση ανωμαλιών κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όπως μη στοίχιση χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση ή παραμονή στη κυτοκίνηση, με επακόλουθο να παρατηρείται απόπτωση. Όμως είναι πρόωρο να εξαχθεί οποιοδήποτε τελικό συμπέρασμα, όσο αφορά την εμπλοκή της hCINAP στη διαδικασία της μίτωσης. Ένας τέτοιος φαινότυπος μπορεί να παρατηρηθεί και κατά τη διάρκεια βλάβης του DNA, μετά από έκθεση των κυττάρων σε ακτινοβολία. Επομένως περαιτέρω πειράματα, κρίνονται

αναγκαία για τη διασαφήνιση της πιθανής εμπλοκής της hCINAP σε μια τόσο σημαντική διαδικασία του κυττάρου, όπως είναι η κυτταρική διαίρεση.

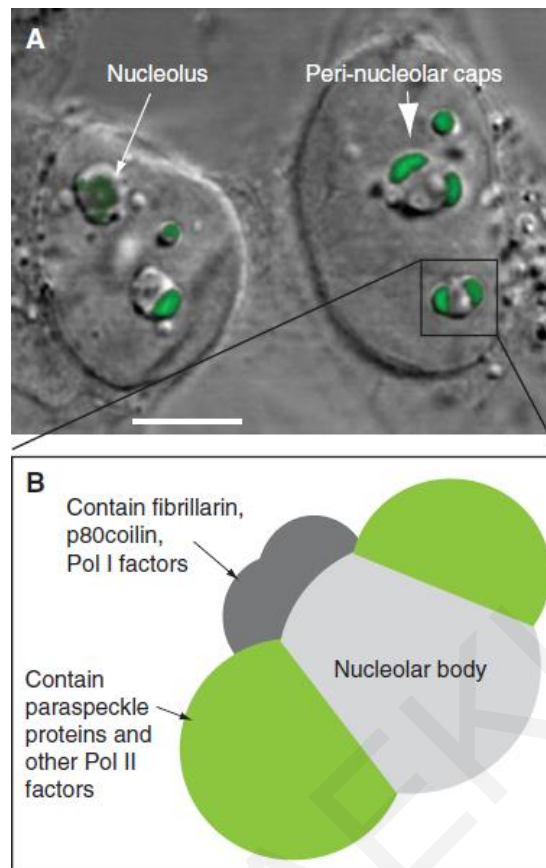
4.2 Πιθανή εμπλοκή της πρωτεΐνης hCINAP στα μονοπάτια απόκρισης κυτταρικού στρες

Όπως είναι ήδη γνωστό, η μορφολογία και η σύνθεση των υποπυρηνικών οργανιδίων, όπως τα Cajal bodies (CBs), ο πυρηνίσκος και άλλα πυρηνικά σωματίδια, παρουσιάζουν δυναμική φύση και μπορούν να μεταβληθούν, μετά από απόκριση σε ποικιλόμορφα εξωτερικά ερεθίσματα (στρες) που υφίσταται το κύτταρο (Cioce et al., 2006). Πολλοί πυρηνικοί παράγοντες μπορούν να αποδιοργανώνονται και να επαναδιοργανώνονται σε διαφορετικές πυρηνικές περιοχές, σε απόκριση στη κυτταρική μεταβολική δραστηριότητα, μεταβάλλοντας με αυτό το τρόπο τη μορφολογία των υποδιαμερισμάτων του πυρήνα (Shav-Tal et al., 2005).

Διερεύνηση της ενδοκυττάριας κατανομής της GFP-hCINAP, μετά από διάφορους πειραματικούς χειρισμούς, που προκαλούν είτε μεταγραφική καταστολή, είτε βλάβη του DNA, είτε υπερωσμωτικό στρες, ανέδειξε ότι η GFP-hCINAP παρουσιάζει δυναμική φύση και είναι ικανή να εντοπιστεί σε συγκεκριμένες δομές μέσα στον πυρήνα.

Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν με χρήση σταθεράς μετασχηματισμένης κυτταροσειράς HeLa^{GFP-hCINAP}, που εξέφραζε την πρωτεΐνη hCINAP συγχωνευμένη με την πρωτεΐνη GFP (πρασινοφθορίζουσα πρωτεΐνη), αφού πρώτα η κυτταροσειρά αυτή χαρακτηρίστηκε, και επιβεβαιώθηκε ότι η υβριδική πρωτεΐνη GFP-hCINAP συμπεριφερόταν παρόμοια με την ενδογενή πρωτεΐνη. Η κυτταροσειρά αυτή παρουσίαζε φυσιολογική μορφολογία, φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο και σταθερή έκφραση και σωστό ενδοκυττάριο εντοπισμό της GFP-hCINAP.

Είναι ήδη γνωστό ότι αριθμός πρωτεϊνών που εντοπίζονται στους πυρηνίσκους και στο πυρηνόπλασμα (κυρίως πρωτεΐνες που προσδέονται σε RNA), όπως και RNAs (pre-rRNAs, U1snRNA, 7SK RNA, snoRNAs, U93 scaRNA) ανακατανέμονται υπό μορφή δακτυλίων (caps) γύρω από τους πυρηνίσκους (Σχήμα 4.1), τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καταστολής της μεταγραφής όσο και με χρήση ουσιών που καταστέλλουν την RNA πολυμεράση I και II (Shav-Tal et al., 2005).



Σχήμα 4.1: Οι δακτύλιοι γύρω από τους πυρηνίσκους, οι οποίοι παρατηρούνται μετά από καταστολή της RNA Pol II. (A) Συνδυασμός DIC και μικροσκοπίας φθορισμού σε κύτταρα HeLa, μετά από έκθεση των κυττάρων για 4 h σε ακτινομυκίνη (Actinomycin D), για να επιτευχθεί η καταστολή της μεταγραφής από την RNA Pol II. Η μορφολογία του πυρηνίσκου αλλάζει κάτω από αυτές τις συνθήκες, με τη δημιουργία του σώματος του πυρηνίσκου (Nucleolar body) και ένα αριθμό από δακτυλίους γύρω από τους πυρηνίσκους (μικρό βέλος). Τα κύτταρα έχουν επιμολυνθεί με πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη YFP-PSPC1 (πράσινο), η οποία εντοπίζεται σε caps κάτω από αυτές τις συνθήκες (μεγάλο βέλος). Κλίμακα: 5 μm. (B) Παρουσιάζονται τα δύο κύρια είδη δακτυλίων: τα Dark Nucleolar Caps (DNCs), στα οποία εντοπίζονται πρωτεΐνες των παραδιάστικτων σωματιδίων (Paraspeckles) και άλλων παραγόντων της RNA Pol II και τα Light Nucleolar Caps (LNCs), στα οποία εντοπίζονται οι πρωτεΐνες fibrillarin και coilin και παράγοντες της RNA Pol I (Shav-tal et al., 2005). (Αναπαραγωγή εικόνας από Fox and Lamond, 2010).

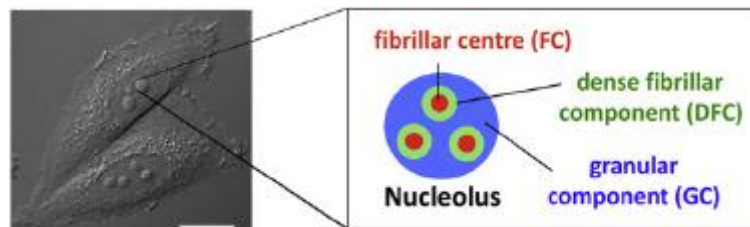
Μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA πολυμεράσης I και II (1 μg/ml ακτινομυκίνη D), η GFP-hCINAP ανακατανέμεται εν μέρει από το πυρηνόπλασμα στους δακτυλίους των πυρηνίσκων DNCs (Dark Nucleolar Caps) και σε εστίες μέσα στους πυρηνίσκους, όπου συνεντοπίζεται εκεί με την πρωτεΐνη των παραδιάστικτων σωματιδίων 1, PSP1 (Paraspeckle Protein 1), ενώ οι πρωτεΐνες coilin και fibrillarin ανακατανέμονται σε ξεχωριστούς δακτυλίους, Light Nucleolar Caps (LNCs). Λόγω της υφιστάμενης αλληλεπίδρασης της hCINAP με την πρωτεΐνη coilin, θα αναμενόταν οι δύο αυτές πρωτεΐνες να συνεντοπίζονταν, κάτι που δεν παρατηρήθηκε.

Ο φαινότυπος αυτός, δεν παρατηρήθηκε με καταστολή της RNA Pol I (0.04 µg/ml ακτινομυκίνη D). Οι δύο πρωτεΐνες, GFP-hCINAP και PSP1 κάτω από αυτές τις συνθήκες διατηρούν την φυσιολογική ενδοκυττάρια τους κατανομή, ενώ οι πρωτεΐνες coilin και fibrillarin παρουσίασαν τους χαρακτηριστικούς δακτυλίους (caps) LNCs. Ως εκ τούτου προκύπτει, ότι μόνο μετά από καταστολή της RNA πολυμεράσης II η hCINAP μπορεί να στρατολογηθεί και να εντοπιστεί στους δακτυλίους DNCs.

Η πρωτεΐνη PSP1 είναι συστατικό των παραδιάστικτων σωματιδίων (Paraspeckles) και παρουσιάζει ομοιότητα στην αλληλουχία με τις πρωτεΐνες p54nrb και PSF, που επίσης είναι συστατικά των Paraspeckles, περιέχοντας δύο μοτίβα αναγνώρισης του RNA (RRM, RNA Recognition Motif) (Fox et al., 2002). Όλες οι πρωτεΐνες των Paraspeckles ανακατανέμονται στα ίδια caps (DNCs) μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol II, υποδηλώνοντας αποδιοργάνωση των Paraspeckles (Shav-Tal et al., 2005).

Ενδιαφέρον, αποτέλεσε το γεγονός ότι η GFP-hCINAP, μετά τη μεταγραφική καταστολή εκτός από τον εντοπισμό της στους δακτυλίους εντοπιζόταν και μέσα στους πυρηνίσκους υπό μορφή εστιών, που φαινομενικά μοιάζουν με τα fibrillar center (FC) (Σχήμα 4.2). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η hCINAP εντοπίζεται διάχυτη στο πυρηνόπλασμα εξαιρετέου των πυρηνίσκων (Santama et al., 2005).

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι η hCINAP συγκαταλέγεται στο μικρό αριθμό του πυρηνοπλασματικών πρωτεϊνών που δημιουργούν caps κάτω από αυτές τις συνθήκες. Οι περισσότερες πυρηνοπλασματικές πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα σωματίδια speckle, όπως έχει αποδειχθεί από προηγούμενη ανάλυση >70 πυρηνικών πρωτεϊνών που επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες, διατηρούν την ενδοκυττάρια κατανομή τους (Shav-Tal et al., 2005).



Σχήμα 4.2: Μικροσκοπία διαφορικής συμβολής (Differential Interference Contrast, DIC), ζωντανού κυττάρου HeLa, όπου διακρίνονται οι πυρηνίσκοι. Κλίμακα: 15 μm (αριστερά). Σχηματική απεικόνιση της τριπλής εσωτερικής οργάνωσης του πυρηνίσκου: fibrillar center (FC), dense fibrillar component (DFC) και granular component (GC) (δεξιά). (Αναπαραγωγή εικόνας από Boulon, et al., 2010).

Στους DNCs δακτυλίους, στους οποίους εντοπίζεται η hCINAP, έχειδειχθεί ότι εντοπίζονται κυρίως πυρηνοπλασματικές πρωτεΐνες οι οποίες στη πλειοψηφία τους είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν RNA, χωρίς όμως να αποτελεί γενικό μονοπάτι συναρμολόγησης όλων των παραγόντων που εμπλέκονται στην μεταγραφή και διαδικασία του RNA (Shav-Tal et al., 2005). Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου και της PSP1, έχουν ανιχνευθεί προηγουμένως να εντοπίζονται στους πυρηνίσκους μετά από πρωτεομική ανάλυση (Andersen et al., 2002; Scherl et al., 2002). Παρόλα αυτά, αυτές οι πρωτεΐνες όπως και η hCINAP, εμφανίζουν πυρηνοπλασματική κατανομή εξαιρετικού των πυρηνίσκων, όπως έχει παρατηρηθεί με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού.

Επιπλέον, στους DNCs δακτυλίους, έχει ανιχνευθεί το πρόδρομο rRNA (pre-rRNA) που εντοπίζεται φυσιολογικά στους πυρηνίσκους και υποδηλώνει ότι ο εντοπισμός των πυρηνοπλασματικών πρωτεϊνών που ανακατανέμονται σε αυτούς δεν είναι τυχαίος, αλλά είναι αποτέλεσμα των ιδιοτήτων τους να αλληλεπιδρούν με το RNA (Shav-Tal et al., 2005).

Αυτή η ανακατανομή των πυρηνικών πρωτεϊνών σε νεοσυντιθέμενα λειτουργικά διαμερίσματα (όπως οι δακτύλιοι γύρω από τους πυρηνίσκους), αποτελεί ένα μέρος της γενικής αποδεκτής διαδικασίας αναδιοργάνωσης του πυρήνα κατά τη διάρκεια μεταγραφικής καταστολής και περιλαμβάνει προϋπάρχουσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ RNA-πρωτεϊνών, καθώς και καινούργιες αλληλεπιδράσεις. Τα αποτελέσματα από την ανακατανομή της hCINAP και ο συνεντοπισμός της με την PSP1, επισημαίνουν την παρατήρηση αυτή.

Αν και η hCINAP αλληλεπιδρά με την coilin σε φυσιολογικές συνθήκες, κάτω από μεταγραφική καταστολή οι δύο αυτές πρωτεΐνες συνεντοπίζονται σε διαφορετικά είδη caps, DNCs και LNCs αντίστοιχα. Ενώ πρωτεΐνες που σε φυσιολογικές συνθήκες δεν συνεντοπίζονται (πχ. στα Paraspeckles) και ούτε ενδεχομένως αλληλεπιδρούν, όπως οι hCINAP και PSP1, σε συνθήκες μεταγραφικής καταστολής συνεντοπίζονται και ενδεχομένως να αλληλεπιδρούν. Δεν έχει ανιχνευθεί άμεση αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών σε φυσιολογικές συνθήκες (δικές μας αδημοσίευτες παρατηρήσεις), αλλά ίσως να υφίσταται ασθενής αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών στο πυρηνόπλασμα, όπου εντοπίζονται, αλλά η αλληλεπίδραση να σταθεροποιείται κάτω από συνθήκες μεταγραφικής καταστολής.

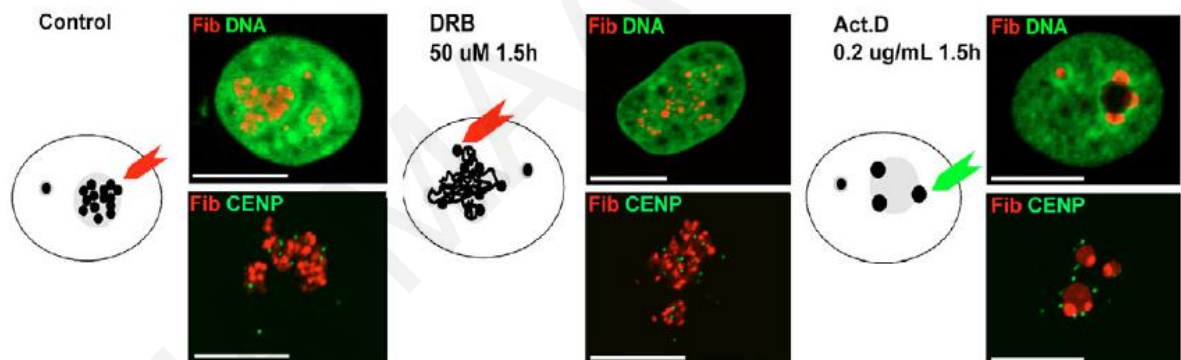
Η ενέργεια από τα μονοπάτια της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διαδικασία της αναδιοργάνωσης των πυρηνικών πρωτεϊνών και τη δημιουργία των δακτυλίων DNCs και LNCs, κατά τη διάρκεια της μεταγραφικής καταστολής. Η πρωτεΐνη hCINAP παρουσιάζει ενεργότητα αδενυλικής κινάσης (Ren et al., 2005; Drakou et al., in review), επομένως η παρουσία της στους δακτυλίους ίσως να συνδέει τη δράση της για παραγωγή ενέργειας.

Περαιτέρω μελέτη της ανακατανομής της hCINAP, πραγματοποιήθηκε με καταστολή της RNA Pol II [5,6-διχλωρο-β-D-ριβοφουρανοσυλβενζιμιδαζολίου (DRB)]. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η GFP-hCINAP και η PSP1 συνεντοπίζονταν και εμφανίζονταν ως συσσωματώματα κοντά στους πυρηνίσκους και βρίσκονταν πολύ κοντά ή σε άμεση επαφή με την αποδιοργανωμένη fibrillar. Η fibrillar εντοπιζόταν υπό μορφή caps μόνο σε ποσοστό 10% των κυττάρων και στο υπόλοιπο ποσοστό των κυττάρων παρουσίαζε μια αποδιοργανωμένη μορφή (Σχήμα 4.3), ως αποτέλεσμα της αποδιοργάνωσης του πυρηνίσκου, που συμφωνούσαν πλήρως με τη βιβλιογραφία (Martin et al., 2009).

Η αποδιοργάνωση του πυρηνίσκου που παρατηρείται σε αυτή τη περίπτωση, μετά από την καταστολή της RNA Pol II (και όχι της RNA Pol I) και συγκεκριμένων CTD κινασών (carboxyterminal domain kinases) (David-Pfeuty, 1999; Haaf and Ward, 1996), είναι διαφορετικό φαινόμενο από την αναδιοργάνωση του πυρηνίσκου (RNA Pol I και II). Κατά τη διάρκεια της καταστολής της RNA Pol II, ο πυρηνίσκος φαίνεται να παρουσιάζει επιμήκυνση και συνήθως να βρίσκεται σε επαφή με την περιφέρεια του πυρήνα, ενώ τα ενεργά του κέντρα: fibrillar center (FC), dense fibrillar component (DFC) και granular component (GC) (Σχήμα 4.2) παρουσιάζονται αποδιοργανωμένα και διάχυτα (Σχήμα 4.3, μεσαία εικόνα) (Martin et al., 2009).

Η αποδιοργανωμένη δομή του πυρηνίσκου που παρουσιάζεται («κοιλίε με χάντρες»), ανταποκρίνεται στην τρισδιάστατη διασπορά των rDNA (Haaf and Ward 1996; Junera et al. 1997) και πολλών πρωτεϊνών που εμπλέκονται μεταγενέστερα στη διαδικασία συναρμολόγησης του ριβοσώματος (Louvet et al., 2005). Κάθε «σφαίρα» περιλαμβάνει: rDNA, rRNAs, pol I, DNA topoisomerase I, UBF και fibrillarin (Scheer and Benavente 1990; Haaf et al., 1991; Junera et al., 1997; Le Panse et al., 1999).

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε ότι αυτή η δομή αποτελείται από FCs πρωτεΐνες που ενώνονται η μια με την άλλη με DFC πρωτεΐνες (Junera et al., 1997; Le Panse et al., 1999) και οι περιοχές κοντά σε αυτές που περιέχουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται μεταγενέστερα στη διαδικασία του rRNA, που προέρχονται από τις GC περιοχές (Louvet et al., 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να αποσυνδεθούν από τα σημεία μεταγραφής του rRNA, υποδηλώνοντας ότι τα μεταγραφήματα rRNA, δεν είναι ικανά να προσηλυτίσουν τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία του rRNA και οι πρωτεΐνες αυτές είναι ικανές να δημιουργήσουν πυρηνικές δομές χωρίς την παρουσία των μεταγραφημάτων (Hernandez-Verdun, 2005).



Σχήμα 4.3: Δομές του πυρηνίσκου σε κύτταρα με καταστολή της ενεργότητας της RNA πολυμεράσης. Κύτταρο ελέγχου (αριστερά), κύτταρο που έτυχε επεξεργασία για την καταστολή της RNA polymerase II [κέντρο, 5,6-διχλωρο-β-D-ριβοφουρανοσυλβενζιμιδαζολίου (DRB) για 1.5 ώρες] ή της RNA polymerase I [δεξιά, ακτινομυκίνη D (Act.D) για 1.5 ώρες]. Οπτικές τομές των επικρατέστερων δομών που παρατηρήθηκαν σε κάθε πληθυσμό κυττάρων. Τα κύτταρα σημάνθηκαν: fibrillarin (κόκκινο), DNA (Sytox green, πράσινο) ή τα κεντρομερίδια (CENP, πράσινο). Τα σχέδια απεικονίζουν τις επικρατέστερες δομές σε κάθε πληθυσμό. (Αναπαραγωγή από Martin et al., 2009).

Μετά από την απομάκρυνση του DRB, οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία του rRNA στρατολογούνται στα σημεία της μεταγραφής και ο πυρηνίσκος συναρμολογείται ξανά. Έχει αποδειχθεί ότι για την επανασύνδεση των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η υδρόλυση ATP ή GTP. Αυτό εισηγείται ότι η φωσφορυλίωση ίσως να

διαδραματίζει ρόλο στην επανασύνδεση των πρωτεϊνών αυτών και την επαναδημιουργία του πυρηνίσκου (Louvet et al., 2006). Η πρωτεΐνη hCINAP όπως έχει δειχθεί, παρουσιάζει ενεργότητα αδενυλικής κινάσης (AK) (Ren et al., 2005; Drakou et al., in review) και ATPάσης (Santama et al., 2005, Drakou et al., in review) και ίσως ο λόγος που εντοπίζεται στις αποδιοργανωμένες περιοχές του πυρηνίσκου, να είναι ακριβώς η προσφορά ενέργειας σε αυτά τα σημεία ή η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων υποστρωμάτων, για την επαναφορά της δομής του πυρηνίσκου.

Η πρωτεΐνη GFP-hCINAP, μελετήθηκε επιπλέον μετά από έκθεση των κυττάρων σε ακτινοβολία UV-C. Η ακτινοβολία UV αντιπροσωπεύει ένα σύμπλεγμα πολυπαραγοντικής απόκρισης στο στρες, το οποίο καταστρέφει την μεταβολική ενεργότητα του πυρήνα του κυττάρου. Επηρεάζει διάφορες πυρηνικές δομές συμπεριλαμβανομένου του πυρηνίσκου (Al-Baker et al., 2004; Kurki et al., 2004), των σωματιδίων PML (Kurki et al., 2003; Seker et al., 2003) και τα Cajal Bodies (Cioce et al., 2006). Η ακτινοβολία UV προκαλεί άμεση ενεργοποίηση του υποδοχέα των κινασών τυροσίνης (π.χ EGF και PDGF), κατά τρόπο μη εξαρτώμενο από το υπόστρωμα, το οποίο προκαλείται από την απενεργοποίηση των υποδοχέων που κατευθύνονται από τις φωσφατάσες τυροσίνης (Gross et al., 1999; Gulati et al., 2004). Ακολούθως, προκαλείται βλάβη στο DNA με τη δημιουργία διμερών φωτοπροϊόντων κυκλοβουτανικής πυριμιδίνης (6-4) (Tornaletti and Pfeifer, 1996), παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (Nishigori, 2006) και σύνθετη μεταγραφική απόκριση περιλαμβανομένων ρυθμιστικών γονιδίων που συνδέονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιδιόρθωση του επηρεαζόμενου DNA (Koch-Paiz et al., 2004). Η επόμενη φάση χαρακτηρίζεται είτε από την επιδιόρθωση των επηρεαζόμενων περιοχών του DNA, είτε από το θάνατο του κυττάρου το οποίο δεν κατάφερε να αντιδράσει κατάλληλα.

Η πρωτεΐνη GFP-hCINAP, μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV-C, ανακατανέμεται σε μικρές εστίες στον πυρήνα και μέσα στους πυρηνίσκους, όπου συνεντοπίζεται και πάλι με την πρωτεΐνη PSP1, ενώ η πρωτεΐνη coilin ανακατανέμεται στο πυρηνόπλασμα υπό μορφή μικρών εστιών, χωρίς όμως να παρουσιάζεται συνεντοπισμός της με τις πρωτεΐνες GFP-hCINAP και PSP1. Επιπλέον, η GFP-hCINAP εντοπίζεται, επιπρόσθετα, και σε πιο μεγάλες πυρηνικές δομές.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι οι μικρές εστίες, που ήταν πιο φωτεινές και στις οποίες οι δύο πρωτεΐνες, GFP-hCINAP και PSP1 συνεντοπίζονταν, παρουσιάζονταν στην περιφέρεια, σε ένα μέρος των μεγαλύτερων πυρηνικών δομών που σχημάτιζε η hCINAP.

Ο εντονότερος φαινότυπος που παρατηρήθηκε ήταν στις 6 h και τα αποτελέσματα της ακτινοβολίας UV-C ήταν εν μέρει αντιστρεπτά (μετά από 10 h) σε ~40% των

κυττάρων που έτυχαν ακτινοβολίας, με επαναφορά της φυσιολογικής κατανομής των πρωτεϊνών. Σε μεταγενέστερους χρόνους, σε ποσοστό των κυττάρων που δεν παρουσιάστηκε επαναφορά του φυσιολογικού φαινότυπου (10 και 24 h), οι πρωτεΐνες hCINAP και PSP1 συνεντοπίζονταν και πάλι υπό μορφή δακτυλίων (DNCs) που διέφεραν από αυτούς που εντοπιζόταν η coilin. Τέλος, παρατηρήθηκαν κύτταρα, που ενώ η πρωτεΐνη coilin και SMN επανέρχονταν στη φυσιολογική τους κατανομή, η hCINAP εξακολουθούσε να παρουσιάζει τον ίδιο φαινότυπο ή πιο έντονο φαινότυπο με δημιουργία δακτυλίου μέσα στους πυρηνίσκους, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανόν η επαναφορά της να γίνεται με πιο αργούς ρυθμούς ή να παραμένει εκεί ως απόκριση σε μεταγενέστερα στάδια των μονοπατιών απόκρισης του στρες.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για την πρωτεΐνη coilin και SMN, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν εν μέρει ως πρωτεΐνες ελέγχου για τη διαδικασία της ακτινοβολίας, λόγω της γνωστής ενδοκυττάριας τους κατανομής κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ήταν σε πλήρη συμφωνία με την βιβλιογραφία (Cioce et al., 2006).

Τόσο σε συνθήκες μεταγραφικής καταστολής της RNA Pol II όσο και σε συνθήκες βλάβης του DNA, μετά από έκθεση των κυττάρων σε ακτινοβολία UV-C, η hCINAP ανακατανέμεται εν μέρει από την πυρηνόπλασματική της κατανομή σε διαφορετικά ενδοπυρηνικά διαμερίσματα ή σε εστίες μέσα στους πυρηνίσκους, όπου εκεί συνεντοπίζεται με την PSP1 μετά την αποδιοργάνωση των Paraspeckles. Ως εκ τούτου προκύπτει ότι και οι δύο πρωτεΐνες, hCINAP και PSP1, παρουσιάζουν μια τοπική ή λειτουργική σχέση με τον πυρηνίσκο.

Η πρωτεΐνη PSP1 εντοπίζεται συγκεκριμένα στα paraspeckles, αλλά παρουσιάζει διάχυτο εντοπισμό στο πυρηνόπλασμα, με συνεχή κίνηση μεταξύ των paraspeckles και του πυρηνίσκου, όταν είναι ενεργή η μεταγραφή (Fox et al., 2002). Επιπρόσθετα η Far7, η ομόλογη πρωτεΐνη της hCINAP στο σακχαρομύκητα, είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των 40S ριβοσωμάτων με τη διάσπαση της 20S pre-rRNA, με άμεση αλληλεπίδραση με την ριβοσωμική πρωτεΐνη RPS14 (Granneman et al., 2005).

Η λειτουργική σύνδεση μεταξύ της hCINAP και του πυρηνίσκου θα πρέπει ενδεχομένως να διευκρινιστεί, καθώς τα δεδομένα εισηγούνται μιας παροδική διασύνδεση της πρωτεΐνης αυτής με τους πυρηνίσκους. Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη coilin, συσσωρεύεται στους πυρηνίσκους υπό μορφή συσσωματωμάτων, μετά από επαγωγή βλάβης του DNA με χρήση Cisplatin ή μετά από έκθεση σε ακτινοβολίας γ, γεγονός που συμπίπτει χρονικά με την καταστολή της ενεργότητας της RNA πολυμεράσης I (Pol I). Η Cisplatin, είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο, που εισάγει σταυροσυνδέσμους στο DNA καταστέλλοντας την αντιγραφή επάγοντας την απόπτωση

(Bartek et al., 2004), ενώ η ακτινοβολία γ δημιουργεί θραύσματα στη διπλή έλικα του DNA. Στην κατάσταση αυτή, επάγεται ο συνεντοπισμός της coilin με την RPA-194, η οποία αποτελεί τη μεγαλύτερη υπομονάδα της RNA Pol I, με την οποία και αλληλεπιδρά όπως και με τον παράγοντα UBF (upstream binding factor) που αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ενεργότητας της Pol. I. Με ανοσοκαταβύθιση της χρωματίνης, παρέχονται στοιχεία ότι η coilin συντονίζει την σύνδεση της Pol. I με το ριβοσωμικό DNA (Gilder et al., 2011). Επομένως η παρουσία της hCINAP στους πυρηνίσκους ίσως να διαδραματίζει μια συγκεκριμένη λειτουργία μετά από απόκριση στο στρες, που μελλοντικά θα ήταν ενδιαφέρον να διευκρινισθεί. Ο πυρηνίσκος, επιπρόσθετα από το ρόλο του στη βιογένεση των ριβοσωμικών RNA, φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού (Carmo-Fonseca et al., 2000)

Τέλος, ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της πρωτεΐνης GFP-hCINAP μελετήθηκε κάτω από συνθήκες υπερωσμωτικού στρες. Το υπερωσμωτικό στρες προάγει γρήγορα αφυδάτωση, η οποία οδηγεί στην ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος και μείωση του κυτταρικού όγκου, δημιουργώντας φυσική τάση τόσο στον κυτταροσκελετό όσο και στην πλασματική μεμβράνη (Lang et al., 1998). Ως απόκριση σε αυτές τις αλλαγές, τα κύτταρα πολύ σύντομα εφαρμόζουν ένα μονοπάτι σήματος για το στρες και επιχειρούν να επαναφέρουν την ισο-ωσμωτικότητα με μεταφορά ανόργανων ιόντων και προβαίνουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Haussinger, 1996; Di Ciano et al., 2002). Άμεσα, ανάκαμψη του κυτταρικού όγκου επιτυγχάνεται με την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ανόργανων ιόντων, ωστόσο, αυξημένα επίπεδα των εντοκυττάρια αλάτων, μπορούν να αποβούν επιζήμια στην δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών (Yancey et al., 1982; Russo et al., 2003).

Μακροπρόθεσμα η προσαρμογή στο υπερωσμωτικό στρες επιτυγχάνεται, διαμέσου μονοπατιών μεταγωγής σήματος τα οποία επικοινωνούν με τη μεταβολική και μεταγραφική μηχανή του κυττάρου, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ή την συσσώρευση των οργανικών ωσμωλυτών που αυξάνουν την ενδοκυττάρια ώσμωση χωρίς να επηρεάζουν την δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών (O'Neill, 1999).

Η GFP-hCINAP, κάτω από συνθήκες υπερωσμωτικού στρες, εντοπίστηκε επίσης σε πυρηνικές δομές, όπως και στη περίπτωση της ακτινοβολίας UV-C, οι οποίες όμως δεν εμφάνιζαν επακριβώς την ίδια μορφολογία, σε σύγκριση με αυτές που παρουσιάστηκαν κατά τη ακτινοβολία UV-C. Σε αυτή την περίπτωση, οι δομές αυτές, παρουσιάζονταν περισσότερες σε αριθμό και μικρότερες σε μέγεθος και κάποιες βρισκόνταν σε επαφή.

Οι πυρηνικές αυτές δομές που σημαίνονται από την παρουσία της πρωτεΐνης GFP-hCINAP και εμφανίζονται στους πυρήνες των κυττάρων μετά από έκθεση των κυττάρων

σε ακτινοβολία UV-C και υπερωσμοτικό στρες αποτελούν ένα ακόμα σημαντικό εύρημα το οποίο θα πρέπει να διερευνηθεί. Θα πρέπει να διερευνηθεί κατά πόσο αυτές οι πυρηνικές δομές απαρτίζονται από άλλες πρωτεΐνες ή παράγοντες ώστε να επιτευχθεί ταυτοποίηση τους.

Αυτές οι δομές, ίσως να αποτελούν δομές nSBs (nuclear stress body). Οι δομές nSBs, αρχικά ανιχνεύθηκαν σε κύτταρα μετά από θερμικό σοκ (Mahl et al. 1989; Sarge et al. 1993) και η ακριβής λειτουργία που επιτελούν αυτές οι δομές είναι μέχρι στιγμής αδιευκρίνιστη. Συγκεντρώνονται σε αυτά μερικά hnRNP (heterogeneous ribonucleoprotein particles) (Chiodi et al., 2000), παράγοντες ματίσματος του RNA (Denegri et al., 2001), ο μεταγραφικός παράγοντας του θερμικού σοκ 1 (HSF1, heat shock transcription factor 1) (Sarge et al., 1993), καθώς και άλλες πρωτεΐνες. Οι δομές nSBs παρουσιάζονται στις περιοχές της χρωματίνης που εμφανίζονται επαναλαμβανόμενες περιοχές με satellite III και επάγεται η μεταγραφή τους (Jolly et al., 2004).

Η παρουσία των παραγόντων ματίσματος στα nSBs, υποδηλώνει ότι ίσως αυτές οι δομές ρυθμίζουν εναλλακτικό μάτισμα κάτω από συνθήκες στρες (Denegri et al., 2001; Metz et al., 2004), αλλά μέχρι σήμερα η ακριβής δημιουργία και λειτουργία που επιτελούν παραμένουν αδιευκρίνιστες. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι δομές αυτές προέρχονται από τη μη αναμενόμενη μεταγραφή μεγάλων περιοχών περικεντρομερικής χρωματίνης από μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται σε απόκριση στο στρες (Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004).

Αυτές οι δομές έχουν επίσης παρατηρηθεί σε συνθήκες υπερωσμοτικού στρες, όπου ο μεταγραφικός παράγοντας tonicity enhancer binding protein (TonEBP) οδηγεί στη δημιουργία των δομών nSBs και στη μεταγραφή των αλληλουχιών Sat III (Valgardsdottir et al., 2008).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους διάφορους πειραματικούς χειρισμούς, μεταγραφική καταστολή, ακτινοβολία UV-C και υπερωσμοτικό στρες, υποδηλώνουν ότι η hCINAP εμπλέκεται στις διαδικασίες απόκρισης μετά από στρες ή πρόκλησης βλάβης στο DNA, λαμβάνοντας μέρος σε δυναμικές δομές μέσα στον πυρήνα. Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της σε αυτές τις δυναμικές δομές, υποδηλώνει ότι εμπλέκεται σε συγκεκριμένες λειτουργικές διαδικασίες του πυρήνα, ενδεχομένως με εμπλοκή της στη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων και σε μονοπάτια απόκρισης μετά από στρες.

Το γεγονός ότι η ομόλογη πρωτεΐνη της hCINAP στο σακχαρομύκητα, Fap7, έχει επίσης αναδειχθεί για την εμπλοκή της στη ρύθμιση της μεταγραφικής απόκρισης μετά από οξειδωτικό στρες (Juhnke et al., 2000), ενισχύει την υπόθεση αυτή. Στο σακχαρομύκητα η μεταγραφική ενεργοποίηση πολλών γονιδίων, μετά από οξειδωτικό

στρες, ρυθμίζεται κυρίως από δυο μεταγραφικούς παράγοντες, τον Yap1 και Pos9 (Izawa et al., 1996; Stephen and Jamieson, 1997; Charizanis et al., 1999). Μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες, το γονίδιο της *Fap7* ταυτοποιήθηκε σε επιζώντες κλώνους που περιείχαν τη σημειακή μετάλλαξη Gly19→Ser [μοτίβο Walker A (P-loop)], και απέτυχε να ενεργοποιήσει συγκεκριμένα γονίδια που εμπλέκονται στην απόκριση μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες (Juhnke et al., 2000).

Επιπλέον, η πρωτεΐνη *Fap7* είναι απαραίτητη για τις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου, αφού διαγραφή του γονιδίου της είναι θνησιγόνος για τα κύτταρα (Juhnke et al., 2000), και ως εκ τούτου συμφωνεί με την παρατήρηση ότι πολλοί παράγοντες που συνδέονται με τη μηχανή μεταγραφής είναι απαραίτητοι για τα κύτταρα (Hampsey, 1998).

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη *coilin*, με την οποία αλληλεπιδρά η *hCINAP*, έχει επίσης περιγραφεί για την εμπλοκή της σε μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA και απόκρισης στο κυτταρικό στρες (Cioce et al., 2006; Morency et al., 2007; Velma et al., 2010; Gilder et al., 2011) (βλ. Εισαγωγή).

4.3 Σχέση δομής-λειτουργίας της hCINAP

Οι μεταλλαγμένες μορφές τις *GFP-hCINAP*, που περιείχαν είτε μονές (K16A, T17A, T18A, R109A, H79G), είτε διπλές (K16AR109A, T17AR109A, T18AR109A) σημειακές μεταλλάξεις σε συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα της *hCINAP* σε λειτουργικά μοτίβα (Walker A, LID domain και Walker B), αφού εκφράστηκαν σε κύτταρα HeLa, παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά για τον ενδοκυττάριο εντοπισμό. Καμιά από αυτές τις μεταλλάξεις δεν ήταν ικανή να μεταβάλει δραματικά τον φυσιολογικό φαινότυπο του ενδοκυττάρου εντοπισμού της *GFP-hCINAP*. Μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων που τις εξέφραζε σε κάθε περίπτωση παρουσίαζε κάποια διαφορετικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα.

Εκείνο που παρατηρήθηκε σε αρκετές από τις μεταλλαγμένες μορφές ήταν η παρουσία συσσωματωμάτων, είτε στον πυρήνα είτε στο κυτταρόπλασμα (K16A, K16A/R109A, 17A/R109A) και παρουσιάστηκαν κυρίως σε περιπτώσεις υπερέκφρασης, ίσως λόγω αποδιάταξης της δομής της πρωτεΐνης.

Η μεταλλαγμένη μορφή *GFP-hCINAPR109A*, σε ποσοστό 10% των επιμολυσμένων κυττάρων εντοπιζόταν υπό μορφή «κουκκίδας», παρομοίως με τον φαινότυπο που παρατηρήθηκε μετά από καταστολή της μεταγραφής τόσο της RNA Pol I όσο και της II και μετά από έκθεση των κυττάρων σε ακτινοβολία UV-C. Η παρατήρηση αυτή ίσως να

υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη αυτή να δημιουργεί μια διαμόρφωση της hCINAP η οποία να αυξάνει την ευαισθησία της σε συνθήκες στρες.

Η μεταλλαγμένη μορφή GFP-hCINAPT17A, παρουσίαζε τον πιο έντονο φαινότυπο, με την πρωτεΐνη να εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο 50% των επιμολυσμένων κυττάρων και να εντοπίζεται εκτός από το πυρηνόπλασμα διάχυτη και στους πυρηνίσκους. Από τα πειράματα μεταγραφικής καταστολής και ακτινοβολίας UV-C είχε προκύψει ότι θα πρέπει να υπάρχει διασύνδεση της hCINAP με τους πυρηνίσκους, λόγω του γεγονότος ότι η hCINAP εντοπιζόταν σε αυτούς. Αυτή η μετάλλαξη είναι ακόμα μια ένδειξη ότι η hCINAP κάτω από ορισμένες συνθήκες εντοπίζεται στους πυρηνίσκους.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μεταλλαγμένες μορφές GFP-hCINAPT18A και hCINAPT18A/R109A, δεν παρουσίασαν καμία φαινοτυπική διαφορά στον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους σε σύγκριση με τον φυσικό τύπο της πρωτεΐνης hCINAP. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν την μετάλλαξη T18A, και η Thr στη θέση αυτή είναι συντηρημένη σε όλες τις AKs, αλλά δεν αποτελεί μέρος των κρίσιμων αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της hCINAP, όπως έχει προκύψει από την δομή (Drakou et al., in review).

Μελέτη των επιπτώσεων της έκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της hCINAP, στη συγκρότηση των CBs, έδειξε ότι μόνο οι μεταλλάξεις T17A και H79G ήταν ικανές να αποδιοργανώσουν τα CBs, αλλοιώνοντας την μορφολογία και τον αριθμό τους ανά πυρήνα. Η υπερέκφραση της hCINAP έχειδειχθεί ότι δημιουργεί αποδιοργάνωση των CBs μειώνοντας τον αριθμό τους ανά κύτταρο (Santama et al., 2005), υποδηλώνοντας εμπλοκή της hCINAP στη ρύθμιση της οργάνωσης των CBs, πιθανότατα μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη coilin.

Στη περίπτωση της υπερέκφρασης της μεταλλαγμένης μορφής GFP-hCINAP-T17A, παρατηρήθηκε ο αντίθετος φαινότυπος σε σύγκριση με την GFP-hCINAP του φυσικού τύπου, δηλαδή αύξηση του μέσου αριθμού των CBs, με απορύθμιση του εύρους της κατανομής του πληθυσμού των CBs, σε ομάδες κυττάρων που εμφάνιζαν περίπου 10 CBs ανά πυρήνα ή ακόμα μεγαλύτερο αριθμό, 20-30 CBs ανά πυρήνα. Η μεταλλαγμένη μορφή GFP-hCINAP-H79G, παρουσίαζε δύο διαφορετικές διασπορές. Μια διασπορά με μικρότερο αριθμό CBs (0-2 CBs) και μια με μεγαλύτερο, 20-30 CBs, παρόμοιο με το φαινότυπο που παρουσίαζε η GFP-hCINAP-T17A.

Οι δύο αυτές μεταλλαγμένες μορφές, δεν δημιούργησαν οποιεσδήποτε μεταβολές στις πυρηνικές δομές των σωματιδίων της προμυελικής λευχαιμίας (PML) και των speckles και του πυρηνίσκου (fibrillarin), υποδηλώνοντας ότι οι επιπτώσεις στην οργάνωση των CBs στον πυρήνα των κυττάρων μετά την υπερέκφραση των

συγκεκριμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, είναι ειδικές και όχι δευτερεύουσες που προκύπτουν από γενικευμένες αλλαγές επί της πυρηνικής δομής.

Επιπλέον, η έκφραση σε κύτταρα HeLa των μεταλλαγμένων μορφών της hCINAP, που έφεραν τις μεταλλάξεις H79G και T17A, είχε ως αποτέλεσμα εμφάνιση τοξικότητας, με μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Το γεγονός ότι μόνο αυτές οι μεταλλάξεις επέφεραν τόσο δραστική αλλοίωση στην δομή των CBs, υποδηλώνει την σημαντικότητα αυτών των πρωτεϊνικών καταλοίπων στη λειτουργία της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση στην οργάνωση των CBs. Τα δύο αυτά αμινοξικά κατάλοιπα, Thr17 και His79, είναι συντηρημένα σε όλα τα ορθόλογα της hCINAP στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, και διαφέρουν από τα αντίστοιχα των αδενυλικών κινασών.

Στο συντηρημένο μοτίβο Walker A στις AK1-AK5 το αμινοξύ στο τέλος της P-loop είναι γλυκίνη (Gly), ενώ στην hCINAP το κατάλοιπο αυτό της Gly απουσιάζει, και στη θέση του υπάρχει μια θρεονίνη (Thr) (αμινοξικό κατάλοιπο 17). Αυτό το χαρακτηριστικό είναι κοινό για τις ATPάσες και τις GTPάσες, όπως τη μυοσίνη (Rayment et al., 1993; Fisher et al., 1995; Smith et al., 1996) και κάποιες G-πρωτεΐνες (Pai et al., 1989; Kjeldgaard et al., 1993; Noel et al., 1993; Coleman et al., 1994; Al-Karadaghi et al., 1996), όπου το κατάλοιπο της θρεονίνης ή σερίνης συντονίζει το ιόν Mg^{2+} , που είναι απαραίτητο για την κατάλυση.

Επιπλέον, η hCINAP, σε αντίθεση με τις άλλες αδενυλικές κινάσες, περιέχει μοτίβο Walker B hhhDYHG (αμινοξικά κατάλοιπα 74-80), το οποίο είναι υψηλά διατηρημένο στις ATPάσες και GTPάσες (Walker et al., 1982), προσδένοντας την γ -φωσφορική ομάδα του ATP και του GTP και υφίσταται μεγάλες αλλαγές διαμόρφωσης μετά την κατάλυση (Pai et al., 1989; Kjeldgaard et al., 1993; Noel et al., 1993).

Όλα αυτά συνηγορούν ότι η hCINAP ίσως να επιτελεί μια λειτουργία διαφορετική/ ή επιπρόσθετη από αυτή της αδενυλικής κινάσης. Δημιουργείται το ενδεχόμενο η hCINAP να λειτουργεί ίσως ως κινάση φωσφορυλιώνοντας την coilin. Η hCINAP αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της coilin, στο οποίο παρουσιάζονται πολλά φωσφορυλιωμένα αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία είναι σημαντικά για τη συγκρότηση των σωματιδίων Cajal (Hebert and Matera, 2000; Hebert et al., 2002). Πιθανόν η coilin να περιέχει συγκεκριμένα φωσφορυλιωμένα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία οδηγούν στην δημιουργία των CBs και κάποια άλλα που οδηγούν στην αποδιοργάνωση τους (Hebert, 2010).

Ο προσδιορισμός της δομής της πρωτεΐνης hCINAP σε συνδυασμό με την δέσμευση του τρινουκλεοτιδίου ADP (και dADP) στο κέντρο πρόσδεσης του Mg^{2+} ATP και η δομή του τριπλού συμπλόκου hCINAP- Mg^{2+} ADP-Pi, καθώς και η υπολογιστική πρόβλεψη του

τριπλού συμπλόκου hCINAP-Mg²⁺ATP-AMP (Drakou et al., in review), ενισχύουν την υπόθεση αυτή. Από την ανάλυση των δομών αυτών, προέκυψαν πολύ σημαντικά δεδομένα που αφορούν τη δομή και κατ' επέκταση τη λειτουργία της hCINAP. Προέκυψε ότι το καταλυτικό κέντρο σχηματίζεται από τα κρίσιμα αμινοξέα 10-17 του μοτίβου Walker-A (P-loop), την Arg109 που βρίσκεται στην περιοχή LID και την His79 του μοτίβου Walker B.

Επιπλέον από τις δομές προέκυψε, ότι η περιοχή της θηλιάς από την Asp77 ως την Pro85, συμπεριλαμβανομένου και του μοτίβου Walker B, έχει διαφορετικό προσανατολισμό σε σύγκριση με τις άλλες AKs, παρουσιάζοντας δομικά χαρακτηριστικά τυπικά για την οικογένεια των ATPασών/GTPασών παρά των AKs. Πιθανότατα, αυτός ο διαφορετικός προσανατολισμός να είναι σημαντικός για την εμφάνιση της ενεργότητας ATPάσης (Drakou et al., in review).

Για αυτό το λόγο προτάθηκε ένα μοντέλο (Drakou et al., in review) κατά το οποίο η hCINAP μεταβαίνει μεταξύ δύο διαμορφώσεων για επιλογή των δύο διαφορετικών ενεργοτήτων, ATPάσης και AK. Το αμινοξικό κατάλοιπο His79 τοποθετείται στην ευκίνητη περιοχή μεταξύ των θέσεων δέσμευσης ATP και AMP και είναι αυτό που καθορίζει τις δύο αυτές διαφορετικές διαμορφώσεις: «flip» ή «κατάσταση AK» και «flor» ή «κατάσταση ATPάσης», με αλλαγή της διαμόρφωσης του ιμιδαζολίου, διαδραματίζοντας ρόλο δομικού διακόπτη προτιμώντας μία εκ των δύο διαμορφώσεων με επακόλουθο την επιλογή μιας εκ των δύο ενζυμικών ενεργοτήτων, AK ή ATPάσης.

Για παράδειγμα στη περίπτωση των ABC μεταφορέων και των καναλιών ανιόντων CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), τα οποία κατέχουν διπλή ενεργότητα ATPάσης και GTPάσης (η επιπρόσθετη ενεργότητα αδενυλικής κινάσης αμφισβητείται από μερικούς στο πεδίο), έχει υποτεθεί ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μπορεί η διαμόρφωση να μεταβάλλεται ανάμεσα στις διαφορετικές ενζυμικές καταστάσεις, με βάση τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος ή της ενέργειας (Randak and Welsh, 2005). Η πυρηνική πρωτεΐνης Rad50, μέλος του συμπλέγματος RMN, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ανίχνευση διασπάσεων στη διπλή έλικα του DNA, είναι ATPάση που κατέχει ενεργότητα AK απαραίτητης για την επιδιόρθωση του DNA (Bhaskara et al., 2007).

Αν και οι μεταλλάξεις H79G και T17A συνοδεύονται από σχετικά μικρή επίδραση στην καταλυτική ταχύτητα, παρουσιάζουν σημαντική βιολογική επίδραση στο κύτταρο, με μείωση του αριθμού των κυττάρων και δραματική μεταβολή του αριθμού των CBs. Αυτό, είναι σε συμφωνία με αυτό που παρατηρείται για την ορθόλογη πρωτεΐνη της hCINAP στο σακχαρομύκητα *Fap7*. Αν και η ενεργότητα ATPάσης της *Fap7* είναι αμελητέα *in vitro*, τα

στελέχη που περιέχουν τις μεταλλαγμένες μορφές της Fap7 K20R (μοτίβο Walker A) ή D82AH84A (μοτίβο Walker B), παρουσιάζουν σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης σε σύγκριση με το στέλεχος που φέρει την φυσικού τύπου πρωτεΐνη. Αυτά τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα που προβλέπονται να εμπλέκονται στη σύνδεση νουκλεοτιδίων και στην ενεργότητα NTPase, είναι απαραίτητα για τη λειτουργία της Fap7 (Juhnke et al, 2000).

Η εμπλοκή της hCINAP στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενισχύεται και από το γεγονός ότι μετά από αποσιώπηση του γονιδίου της ομόλογης πρωτεΐνης της hCINAP, ADLP (*C. elegans*), παρατηρήθηκε αργή ανάπτυξη των σκουληκιών στην F1 γενεά με μείωση του μεγέθους τους, χωρίς να παρουσιάζουν διαφορά στη σύνθεση των τμημάτων που αποτελούνται ή στη κίνηση τους, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή της ADLP στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Zhai et al., 2006).

Επιπλέον, καταστολή της πρωτεΐνης coilin με τη μέθοδο RNAi, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Lemm et al., 2006, Whittom et al., 2008), ενώ ποντίκια στα οποία έγινε απαλοιφή του γονιδίου της coilin, παρουσίαζαν μείωση της βιωσιμότητας, του ρυθμού αύξησης και της γονιμότητας (Walker et al., 2009).

Με βάση τα στοιχεία αυτά, προκύπτει ότι ίσως οι δυο πρωτεΐνες hCINAP και coilin οι οποίες αλληλεπιδρούν, να εμπλέκονται από κοινού σε διαδικασίες όπως ρύθμισης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της απόπτωσης.

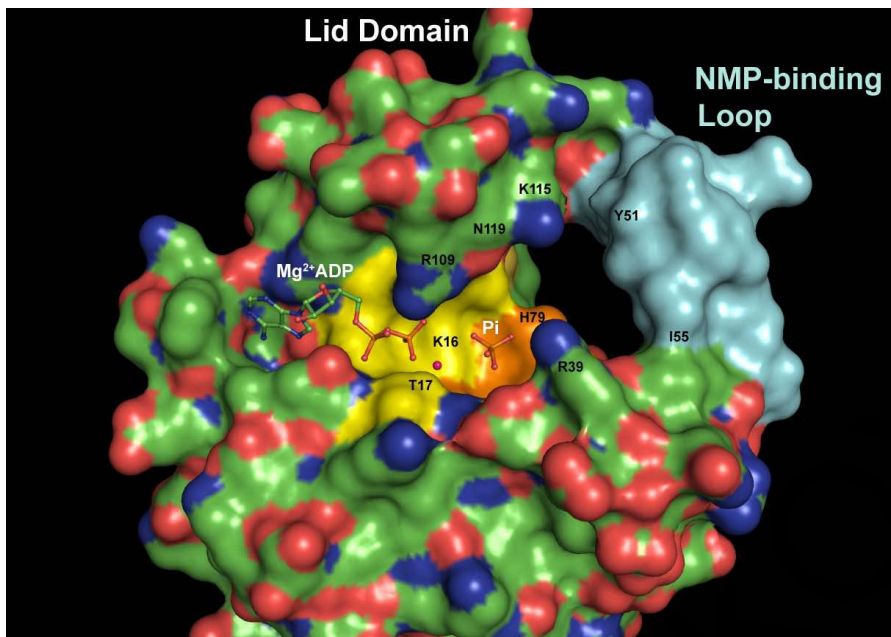
Επιπρόσθετα, η ρύθμιση της οργάνωσης και αποδιοργάνωσης των CBs κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με την πιθανή εμπλοκή της hCINAP σε αυτό, ίσως να αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προοπτική. Ίσως η hCINAP επηρεάζει την ομοιόσταση των νουκλεοτιδίων στον πυρήνα, με επακόλουθο τον επηρεασμό των κινήσεων των CBs που εξαρτώνται από το ATP (Platani et al., 2002).

Η δομική ανάλυση της hCINAP (Drakou et al., in review), πέρα από την εύρεση του καταλυτικού κέντρου, υποδεικνύει εναλλακτικές λειτουργίες της hCINAP. Στην ανοικτή διαμόρφωση που λαμβάνει η hCINAP, λόγω της έκθεσης του καταλυτικού κέντρου και της παρουσίας της μακριάς θηλιάς, η οποία δεν παρατηρήθηκε στις άλλες αδενυλικές κινάσες, το ένζυμο παρουσιάζει μια μορφή που πιθανόν να μπορεί προσδέσει κάποια πρωτεΐνη. Επιπλέον, στη κλειστή διαμόρφωση του τριπλού συμπλόκου hCINAP-Mg²⁺ADP-PO₄³⁻, παρουσιάζεται ένα τούνελ (κανάλι), που δημιουργείται από την NMP-binding domain και την LID domain (Σχήμα 4.4).

Αυτό το κανάλι, με το ένα του άκρο εκτεθειμένο στο εξωτερικό περιβάλλον και το άλλο του άκρο να βρίσκεται στη περιοχή δέσμευσης του ATP, ίσως να λειτουργεί ως χώρος εισδοχής του αμινοτελικού ή καρβοξυτελικού μέρους μια πεπτιδικής αλυσίδας.

Αυτό θα επέτρεπε την φωσφορυλίωση συγκεκριμένου υποστρώματος πρωτεΐνης, ενισχύοντας τη πιθανή δράση της hCINAP ως πρωτεϊνική κινάση.

Η αλληλουχία του μοτίβου Walker A της hCINAP παρουσιάζει ομοιότητα με την αλληλουχία του μοτίβου Walker A που παρουσιάζεται στην οικογένεια των AAA πρωτεϊνών (GxPGxGKTTL), οι οποίες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που ανήκουν στην υπεροικογένεια των P-loop NTPασών. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε ένα εύρος διαδικασιών που εξαρτώνται από την ενέργεια, συμπεριλαμβανομένων της αποικοδόμησης πρωτεϊνών, της σύντηξης μεμβρανών, της διατήρησης των μικροσωληνίσκων, της βιογένεσης των υπερξυσωμάτων, της μεταγωγής σήματος και της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Koonin, et al., 2004; Lupas and Frickey, 2004). Επομένως, η hCINAP θα μπορούσε να λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο σε κάποια ή κάποιες από τις διαδικασίες αυτές.



Σχήμα 4.4: Αναπαράσταση επιφάνειας της κρυσταλλικής δομής του τριπλού συμπλόκου **hCINAP-Mg²⁺ADP-PO₄³⁻**. Η περιοχή της P-loop, το μοτίβο Walker B και η NMP-binding domain παρουσιάζονται με κίτρινο, πορτοκαλί και γαλάζιο, αντίστοιχα. Το μόριο Mg²⁺ADP δεσμεύεται σε ένα κανάλι κοντά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, με τον δακτύλιο της αδενίνης να καταλαμβάνει την είσοδο του κέντρου δέσμευσης του Mg²⁺ATP και ο φωσφόρος να περικλείεται από τα κατάλοιπα της P-loop και να προσανατολίζεται προς την περιοχή του μοτίβου Walker-B. Η δομή της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται επίσης από ένα τούνελ με μήκος 14 Å, που τα τοιχώματα του δημιουργούνται από τα αμινοξικά κατάλοιπα του μοτίβου Walker B (Tyr78 and His79), την NMP-binding domain (Tyr51, Asp52, Cys53, Pro54 and Ile55) και την LID domain (Lys115, Asp118 and Asn119).

Επιπλέον, το ενδεχόμενο η hCINAP να λειτουργεί ως κινάση φωσφορυλιώνοντας την coilin, θα πρέπει να διερευνηθεί. Η αλληλεπίδραση της hCINAP με το καρβοξυτελικό άκρο της coilin στο οποίο παρουσιάζονται πολλά φωσφορυλιωμένα αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία είναι σημαντικά για τη συγκρότηση των σωματιδίων Cajal (Hebert and Matera, 2000; Hebert et al., 2002), δημιουργούν το ενδεχόμενο η hCINAP να δρα ως κινάση, ή πρωτεΐνη συνοδός ή συντονίζει τις αλληλεπιδράσεις σε λειτουργικά σύμπλοκα.

4.4 Ανοικτός ορίζοντας-μελλοντικές προεκτάσεις της ερευνητικής εργασίας

Το πιο ενδιαφέρον ανοικτό ερώτημα-πρόκληση, ως απόρροια της παρούσας εργασίας, είναι η κατανόηση της εμπλοκής της hCINAP σε ένα σημαντικό βιολογικό μονοπάτι του κυττάρου, της απόκρισης σε καταστάσεις στρες.

Όπως φάνηκε, η ενδοκυττάρια κατανομή της GFP-hCINAP παρουσιάζει δυναμική φύση και μεταβάλλεται διαφορετικά μετά από απόκριση σε ποικιλόμορφα εξωτερικά ερεθίσματα (στρες) που υφίσταται το κύτταρο (μεταγραφική καταστολή, βλάβη του DNA, υπερωσμωτικό στρες), υποδηλώνοντας πιθανή εμπλοκή της σε μονοπάτια απόκρισης στρες. Επομένως, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί μια τέτοια πιθανότητα, αν και είναι δύσκολο να καθοριστεί επακριβώς ο ρόλος της σε αυτά, γιατί πολλά στοιχεία των μονοπατιών αυτών παραμένουν αδιευκρίνιστα.

Εκείνο που θα μπορούσε αρχικά να πραγματοποιηθεί είναι η ταυτοποίηση των δομών που παρουσιάζονται στο πυρηνόπλασμα και σημαίνονται από την GFP-hCINAP κάτω από συνθήκες UV-C και η εύρεση των πρωτεϊνών ή άλλων παραγόντων που τις απαρτίζουν. Οι δομές αυτές, όπως έχει αναλυθεί πιο πάνω, πιθανόν να αποτελούν δομές απόκρισης στο στρες (nSBs, nuclear stress bodies), οι οποίες παρουσιάζονται μετά από θερμικό σοκ και θα ήταν ενδιαφέρον αν μπορούσαν να ταυτοποιηθούν. Θα μπορούσε να γίνει ανοσοφθορισμός των κυττάρων που υπόκεινται σε ακτινοβολία UV-C, με χρήση διαφορετικών αντισωμάτων έναντι παραγόντων που είναι γνωστό ότι εντοπίζονται σε αυτές τις δομές (πχ. HSF1). Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί πρόκληση θερμικού σοκ, και μελέτη εκ νέου της ενδοκυττάριας κατανομής της hCINAP σε αυτές τις συνθήκες και πιθανή επιβεβαίωση του εντοπισμού της hCINAP στα nSBs και συσχέτιση/σύγκριση τους με αυτά που παρατηρούνται κάτω από συνθήκες UV-C.

Θα ήταν χρήσιμο να διευκρινισθεί, αν αυτή η αλλαγή της ενδοκυττάριας κατανομής της hCINAP είναι γενικευμένη ή αν παρουσιάζεται μόνο κάτω από συνθήκες ακτινοβολίας UV-C, λόγω καταστροφής συγκεκριμένης περιοχής του DNA. Θα μπορούσε να γίνει χρήση διαφορετικών ουσιών ή συνθηκών που προκαλούν διαφορετική βλάβη του DNA, όπως γ-ακτινοβολία, υδροξείδιο του υπεροξειδίου, cisplatin ή psoralen και να μελετηθεί εκ νέου η ενδοκυττάρια κατανομή της hCINAP.

Η coilin, με την οποία αλληλεπιδρά η hCINAP, πρόσφατα έχει δειχθεί ότι μετά από έκθεση των κυττάρων σε Cisplatin ή έκθεση ακτινοβολίας γ, συσσωρεύεται στους πυρηνίσκους και εκεί συντονίζει την σύνδεση της Pol I με το ριβοσωμικό DNA (Gilder et al., 2011). Επομένως, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί κατά πόσο η hCINAP εμπλέκεται σε αυτό το βιολογικό μονοπάτι κάτω από αυτές τις συνθήκες.

Επιπλέον, η *coilin*, έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Ku70 και Ku80 (Velma et al., 2010), οι οποίες διαδραματίζουν τον κυρίαρχο ρόλο στην διαδικασία της επιδιόρθωσης του DNA, δημιουργώντας σύμπλεγμα με την καταλυτική υπομονάδα της DNA εξαρτώμενης κινάσης DNA-PK (DNA-PKcs) και θεωρούνται ότι λειτουργούν ως πρωτεΐνες κριώματα (scaffold), στις οποίες μπορούν να προσδεθούν άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία επιδιόρθωσης του μη ομόλογου θραύσματος της διπλής έλικας του DNA [non-homologous DNA end joining (NHEJ)]. Η πρωτεΐνη DNA-PKcs έχει προκύψει από την ανάλυση SILAC ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη hCINAP, αλλά δεν επιβεβαιώθηκε με ανοσοκαταβύθιση και ανοσοαποτύπωση κατά Western (δεν ανιχνεύτηκε στα σφαιρίδια), ίσως λόγω του χαμηλού ενδοκυττάριου εντοπισμού ή λόγω μεμονωμένης αλληλεπίδρασης κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Επομένως, θα μπορούσε να μελετηθεί αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών κάτω από συνθήκες βλάβης του DNA, όπως και μελέτη αλληλεπίδρασης της hCINAP με τις πρωτεΐνες Ku70 και Ku80 που αλληλεπιδρά η *coilin*.

Η δεύτερη βιολογική διεργασία η οποία προέκυψε, είναι η ενδεχόμενη εμπλοκή της hCINAP στις διεργασίες του κυτταρικού κύκλου και τις απόπτωσης, αφού οι μεταλλαγμένες μορφές της hCINAP φαίνεται να μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως και η ομόλογη της, *Fap7* στο σακχαρομύκητα, και αυξάνουν την απόπτωση. Επομένως κρίνεται αναγκαία η μελέτη της εμπλοκής της hCINAP στα μονοπάτια της απόπτωσης.

Επιπλέον από τα δεδομένα που προέκυψαν, από την επίλυση της δομής και την διπλή ενεργότητα της hCINAP ως ATPase/AK, ανοίγεται ο ορίζοντας για τη δράση αυτής της πρωτεΐνης στον πυρήνα του ευκαρυωτικού κυττάρου. Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί κατά πόσο η hCINAP, δρα ως κινάση φωσφορυλιώνοντας συγκεκριμένα υποστρώματα, όπως την *coilin*. Επομένως θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν πειράματα προς αυτή την κατεύθυνση για εξεύρεση πιθανόν στόχων της hCINAP, που θα μπορούσαν να εμπλουτίσουν τις γνώσεις που έχουμε για αυτή την πρωτεΐνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. and Mukherjee S.K. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 657-685.
2. Al-Baker, E.A., Boyle, J., Harry, R. and Kill, I.R. (2004). A p53-independent pathway regulates nucleolar segregation and antigen translocation in response to DNA damage induced by UV irradiation. *Exp. Cell Res.* 292: 179-86.
3. Al-Karadaghi, S., Aevansson, A., Garber, M., Zheltonosova, J. and Liljas, A. (1996). The structure of elongation factor G in complex with GDP: conformational flexibility and nucleotide exchange. *Structure* 4: 555-565.
4. Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433: 77-83.
5. Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 12: 1-11.
6. Andrade, L.E., Chan, E.K., Raska, I., Peebles, C.L., Roos, G. and Tan, E.M. (1991). Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J. Exp. Med.* 173: 1407-1419.
7. Andrade, L.E., Tan, E.M. and Chan, E.K. (1993). Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1947-1951.
8. Bae, E. and Phillips, G.N. (2006). Roles of static and dynamic domains in stability and catalysis of adenylate kinase. *PNAS* 103: 2132-2137.
9. Barcaroli, D., Bongiorno-Borbone, L., Terrinoni, A., Hofmann, T.G., Rossi, M., Knight, R.A., Matera, A.G., Melino, G. and Laurenzi, V.D. (2006). FLASH is required for histone transcription and S-phase progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 14808-14812.
10. Bartek, J., Lukas, C. and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 792-804.

11. Bauer, D.W., Murphy, C., Wu, Z., Wu, C.H.H. and Gall, J.G. (1994). In vitro assembly of coiled bodies in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Biol. Cell.* 5: 633-644.
12. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
13. Berry, M.B., Meador, B., Bilderback, T., Liang, P., Glaser, M. and Phillips Jr, G.N. (1994). The closed conformation of a highly flexible protein: the structure of *E. coli* adenylate kinase with bound AMP and AMPPNP. *Proteins* 19:183-198.
14. Bhaskara, V., Dupre, A., Lengsfeld, B., Hopkins, B.B., Chan, A., Lee, J.H., Zhang, X., Gautier, J., Zakian, V. and Paull, T.T. (2007). Rad50 adenylate kinase activity regulates DNA tethering by Mre11/Rad50 complexes. *Mol. Cell* 25: 647-661.
15. Bohmann, K., Ferreira, J., Santama, N., Weis, K. and Lamond, A.I. (1995). Molecular analysis of the coiled body. *J. Cell Sci. Suppl.* 19: 107-113.
16. Boulon, S., Verheggen, C., Jady B.E., Girard, C. and Pescia, C. (2004). PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli. *Mol. Cell* 16: 777-787.
17. Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M. and Lamond, A.I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol. Cell* 40: 216-227.
18. 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: 248-254.
19. Brivanlou, A.H. and Darnell, J.E. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295: 813-8.
20. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553.
21. Bucci, S., Giani, L., Mancino, G., Pellegrino, M. and Raghianti, M. (2001). TAFII70 protein in Cajal bodies of the amphibian germinal vesicle. *Genome* 44: 1100-1103.
22. Burghes, H.M. and Beattie C.E. (2009). Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature Reviews Neur.* 10: 597-609.

23. Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T. and Lamond, A.I. (1992). Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J. Cell Biol.* 117: 1.
24. Carmo-Fonseca, M., Ferreira, J. and Lamond, A.I. (1993). Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J. Cell Biol.* 120: 841-852.
25. Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. and Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 2: 107-112.
26. Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M. T. and Lamond, A.I. (1992). Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. *J. Cell Biol.* 117: 1-14.
27. Carter, T., Vancurová, I., Sun, I., Lou, W. and DeLeon, S. (1990). A DNA-activated protein kinase from HeLa cell nuclei. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6460-6471.
28. Caruccio, L., Bae, S., Liu, A.Y. and Chen, K.Y. (1997). The heat-shock transcription factor HSF1 is rapidly activated by either hyper- or hypo-osmotic stress in mammalian cells. *Biochem. J.* 327: 341-347.
29. Carvalho, T., Almeida, F., Calapez, A., Lafarga, M., Berciano, M.T. and Carmo-Fonseca, M. (1999). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: a link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J. Cell Biol.* 147: 715-728.
30. Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B. and Entian, K.D. (1999). The mitochondrial cytochrome c peroxidase Ccp1 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in conveying an oxidative stress signal to the transcription factor Pos9 (Skn7). *Mol. Gen. Genet.* 262: 437-447.
31. Chiodi, I., Biggiogera, M., Denegri, M., Corioni, M., Weighardt, F., Cobianchi, F., Riva, S. and Biamonti, G. (2000). Structure and dynamics of hnRNP-labelled nuclear bodies induced by stress treatments. *J. Cell Sci.* 113: 4043-4053.
32. Cioce, M. and Lamond, A.I. (2005). Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 105-131.
33. Cioce, M., Boulon, S., Matera, A.G. and Lamond, A.I. (2006) UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *J. Cell Biol.* 175: 401-413.
34. Claus, P., Doring, F., Gringel, S., Muller-Ostermeyer, F. and Fuhrott, J. (2003). Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and

- specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J. Biol. Chem.* 278: 479-485.
35. Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1994). Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 265: 1405-1412.
 36. Collier, S., Pendle, A., Boudonck, K., van Rij, T., Dolan, L. and Shaw, P. (2006). A Distant Coilin Homologue Is Required for the Formation of Cajal Bodies in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell* 17: 2942-2951.
 37. Darzacq, X., Jady, B.E., Verheggen, C., Kiss, A.M., Bertrand, E. and Kiss, T. (2002). Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J.* 21: 2746-2756.
 38. David-Pfeuty T. (1999). Potent inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 induce nuclear accumulation of wild-type p53 and nucleolar fragmentation in human untransformed and tumorderived cells. *Oncogene*, 18: 7409-7422.
 39. Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Cobianchi, F., Riva, S. and Biamonti, G. (2001). Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell* 12: 3502-3514.
 40. Di Ciano, C., Nie, Z., Szász, K., Lewis, A., Uruno, T., Zhan, X., Rotstein O.D., Mak, A. and Kapus, A. (2002). Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: C850-C865.
 41. Doyle, O., Corden, J.L., Murphy, C. and Gall, J.G. (2002). The distribution of RNA polymerase II largest subunit (RPB1) in the *Xenopus* germinal vesicle. *J. Struct. Biol.* 140: 154-166.
 42. Drakou, C.E., Malekkou, A., Hayes, J.M., Lederer, C.W., Leonidas, D.D., Oikonomakos, N.G., Lamond, A.I., Santama, N. and Zographos, S.E. hCINAP is an atypical mammalian nuclear adenylate kinase with ATPase motif: structural and functional studies (in review).
 43. Dunder, M., Hebert, M.D., Karpova, T.S., Stanek, D., Xu, H., Shpargel, K.B., Meier, U.T., Neugebauer, K.M., Matera, A.G. and Misteli, T. (2004). In vivo kinetics of Cajal body components. *J. Cell Biol.* 164: 831-842.

44. Dzeja, P., Kalvenas, A., Toleikis, A. and Praskevicius, A. (1985). The effect of adenylate kinase activity on the rate and efficiency of energy transport from mitochondria to hexokinase. *Biochem. Int.* 10: 259-265.
45. Dzeja, P. and Terzic, A. (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: Metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 1729-1772.
46. Everett, R.D., Earnshaw, W.C., Findlay, J. and Lomonte, P. (1999). Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110. *EMBO J.* 18: 1526-1538.
47. Fedele, A.O., Whitelaw, M.L. and Peet, D.J. (2002). Regulation of Gene Expression by the Hypoxia-Inducible Factors. *Mol. Interv.* 2: 229-243.
48. Fernandez, R., Pena, E., Navascues, J., Casafont, I., Lafarga, M., Berciano, M.T. (2002). cAMPdependent reorganization of the Cajal bodies and splicing machinery in cultured Schwann cells. *Glia* 40: 378-88.
49. Fernandez-Gonzalez, A., Kourembanas, S., Wyatt, T.A. and Mitsialis, S.A. (2009). Mutation of Murine Adenylate Kinase 7 Underlies a Primary Ciliary Dyskinesia Phenotype. *Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol.* 40: 305-313.
50. Fisher, A.J., Smith, C.A., Thoden, J.B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H.M. and Rayment, I. (1995). X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AlF₄⁻. *Biochem.* 34: 8960-8972.
51. Fox, A.H. and Lamond, A.I. (2010). Paraspeckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a000687.
52. Fox, A.H., Lam, Y.W., Leung, A.K., Lyon C.E., Andersen, J., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002). Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr. Biol.* 12: 13-25.
53. Frey, M.R., Bailey, A.D., Weiner, A.M. and Matera, A.G. (1999). Association of snRNA genes with coiled bodies is mediated by nascent snRNA transcripts. *Curr. Biol.* 9: 126-135.
54. Frey, M.R. and Matera, A.G. (1995). Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 5915-5919.

55. Frey, M.R. and Matera, G. (2001). RNA-mediated interaction of Cajal bodies and U2 snRNA genes. *J. Cell Biol.* 154: 499-509.
56. Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A. and Dreyfuss, G., (2001). SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylargininecontaining protein targets. *Mol. Cell* 7: 1111-1117.
57. Fukami-Kobayashi, K., Nosaka, M., Nakazawa, A. and Go, M. (1996). Ancient divergence of long and short isoforms of adenylate kinase: molecular evolution of the nucleoside monophosphate kinase family. *FEBS Lett.* 385: 214-220.
58. Gall, J.G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 273-300.
59. Gall, J.G. (2001). A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Lett.* 498: 164-167.
60. Gall, J.G., Bellini, M., Wu, Z. and Murphy, C. (1999). Assembly of the Nuclear Transcription and Processing Machinery: Cajal Bodies (Coiled Bodies) and Transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell.* 10: 4385-4402.
61. Gangwani, L., Mikrut, M., Theroux, S., Sharma, M., Davis, R.J. (2001). Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat. Cell Biol.* 3: 376-383.
62. Gellerich, F.N. (1992). The role of adenylate kinase in dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space. *FEBS Lett.* 297: 55-58.
63. Gilder, A.S., Do, P.M., Carrero, Z.I., Cosman, A.M., Broome, H.J., Velma, V., Martinez, L.A. and Hebert, M.D. (2011). Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage. *MboC* 22: 1070-1079.
64. Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamodar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrolla, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L., Jr., White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets,

- R.A., McKenna, M.P., Chant, J. and Rothberg, J.M. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302: 1727-1736.
65. Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467.
 66. Granneman, S., Nandimani, M.R. and Baserga, S.J. (2005). The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S Pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14. *Mol. Cell Biol.* 25: 10352-10364.
 67. Gross, S., Knebel, A., Tenev, T., Neining, A., Gaestel, M., Herrlich, P. and Böhmer, F-D. (1999). Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatases as Mechanism of UV-induced Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 274: 26378-26386.
 68. Gulati, P., Markova, B., Göttlicher, M., Böhmer F-D and Herrlich, P.A. (2004). UVA inactivates protein tyrosine phosphatases by calpain-mediated degradation. *EMBO reports* 5: 812-817.
 69. Haaf, T. and Ward, D.C. (1996). Inhibition of RNA polymerase II transcription causes chromatin decondensation, loss of nucleolar structure and dispersion of chromosomal domains. *Exp. Cell Res.* 224: 163-173.
 70. Haaf, T., Hayman, D.L. and Schmid, M. (1991). Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells. *Exp. Cell Res.* 193: 78-86.
 71. Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 465-503.
 72. Haussinger, D. (1996). The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem. J.* 313: 697-710.
 73. Hebert, M.D. (2010) Phosphorylation and the Cajal body: modification in search of function. *Arch. Biochem. Biophys.* 496: 69-76.
 74. Hebert, M.D. and Matera, A.G. (2000). Self-association of Coilin Reveals a Common Theme in Nuclear Body Localization. *Mol. Biol. Cell* 11: 4159-4171.
 75. Hebert, M.D., Shpargel, K.B., Ospina, J.K., Tucker, K.E. and Matera, A.G. (2002). Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev. Cell* 3: 329-337.
 76. Hebert, M.D., Szymczyk, P.W., Shpargel, K.B. and Matera, A.G. (2001). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev.* 15: 2720-2729.

77. Hernandez-Verdun, D. (2005). Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Med. Sci. (Paris)* 21:1025-1027.
78. Izawa, S., Inoue, Y. and Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 320: 61-67.
79. Jady, B.E., Bertrand, E. and Kiss, T. (2004). Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J. Cell Biol.* 164: 647-652.
80. Jady, B.E., Darzacq, X., Tucker, K.E., Matera, A.G., Bertrand, E. and Kiss, T. (2003). Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBO J.* 22: 1878-1888.
81. Janssen, E., Kuiper, J., Hodgson, D., Zingman, L.V., Alekseev, A.E., Terzic, A. and Wieringa, B. (2004). Two structurally distinct and spatially compartmentalized adenylyate kinases are expressed from the AK1 gene in mouse brain. *Mol. Cell. Biochem.* 256-257: 59-72.
82. Jimenez-Garcia, L.F., Segura-Valdez, M.L., Ochs, R.L., Rothblum, L.I., Hannan, R. and Spector, D.L. (1994). Nucleogenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of actine pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 5: 955-966.
83. Jin, S. and Levine, A.J. (2001). The p53 functional circuit. *J. Cell Sci.* 114: 4139-40.
84. Jolly, C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner, B.M., Khochbin, S. and Vourc'h, C. (2004). Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J. Cell Biol.* 164: 25-33.
85. Jordan, P., Cunha, C. and Carmo-Fonseca, M. (1997). The cdk7-cyclin H-MAT1 complex associated with TFIIH is localized in coiled bodies. *Mol. Biol. Cell* 8: 1207-1217.
86. Juhnke, H., Charizanis, C., Latifi, F., Krems, B. and Entian, K.D. (2000). The essential protein *fap7* is involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35: 936-948.
87. Junera, H.R., Masson, C., Géraud G., Suja, J. and Hernandez-Verdun, D. (1997). Involvement of in situ conformation of ribosomal genes and selective distribution of UBF in rRNA transcription. *Mol. Biol. Cell* 8: 145-156.

88. Kim, J.U., Hyun, Shen, R., Olcott, M.C., Rajagopal, I. and Mathews, C.K. (2005). Adenylate Kinase of *Escherichia coli*, a Component of the Phage T4 dNTP Synthetase Complex. *J. Biol. Chem.* 280: 28221-28229.
89. Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S. and Nyborg, J. (1993). The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure* 1: 35-50.
90. Koch-Paiz, C.A., Amundson, S.A., Bittner, M.L., Meltzer, P.S. and Fornace, A.J. (2004). Functional genomics of UV radiation responses in human cells. *J. Mutat. Res.* 549: 65-78.
91. Koonin, E.V., Aravind, L., Leipe, D.D. and Iyer, L.M. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* 146: 11-31.
92. Kropotov, A.V., Grudinkin, P.S., Pleskach, N.M., Gavrilov, B.A., Tomilin, N.V. and Zhivotovsky, B. (2004). Downregulation of peroxiredoxin V stimulates formation of etoposide-induced doublestrand DNA breaks. *FEBS Lett.* 572: 75-79.
93. Kurki, S., Latonen L. and Laiho, M. (2003). Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. *J. Cell Sci.* 116: 3917-3925.
94. Kurki, S., Peltonen, K. and Laiho, M. (2004). Nucleophosmin, HDM2 and p53: players in UV damage incited nucleolar stress response. *Cell Cycle* 3: 976-979.
95. Lamond A.I. and Carmo-Fonseca, M. (1993). The coiled body. *Trends Cell Biol.* 3: 198-204.
96. Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E. and Haussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78: 247-306.
97. Le Panse, S., Masson, C., Héliot, L., Chassery, J-M., Junéra, H.R. and Hernandez-Verdun, D. (1999). 3-D organization of single ribosomal transcription units after DRB inhibition of RNA polymerase II transcription. *J. Cell Sci.* 112: 2145-2154.
98. Lee, Y., Kim, J.W., Lee, S.M., Kim, H.J., Lee, K.S., Park, C. and Choe, I.S. (1998). Cloning and expression of human adenylate kinase 2 isozymes: differential expression of adenylate kinase 1 and 2 in human muscle tissues. *J. Biochem.* 123: 47-54.

99. Lemm, I., Girard, C., Kuhn, A.N., Watkins, N.J., Schneider, M., Bordonne, R. and Luhrmann, R. (2006). Ongoing U snRNP biogenesis is required for the integrity of Cajal bodies. *Mol Biol Cell* 17: 3221-3231.
100. Liu, J., Hebert, M.D., Ye, Y., Templeton, D.J., Kung, H. and Matera, A.G. (2000). Cell cycle-dependent localization of the CDK2-cyclin E complex in Cajal (coiled) bodies. *J. Cell Sci.* 113: 1543-1552.
101. Liu, J.L., Wu, Z., Nizami, Z., Deryusheva, S., Rajendra, T.K., Beumer, K.J., Gao, H., Matera, A.G., Carroll, D., Gall, J.G. (2009). Coilin Is Essential for Cajal Body Organization in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* 20: 1661-1670.
102. Lomonte, P. and E. Morency. (2007). Centromeric protein CENP-B proteasomal degradation induced by the viral protein ICP0. *FEBS Lett.* 581: 658-662.
103. Lomonte, P. and Everett, R.D. (1999). Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein Vmw110 Inhibits Progression of Cells through Mitosis and from G1 into S Phase of the Cell Cycle. *J. Virol.* 73: 9456-9467.
104. Louvet, E., Junera, H.R., Berthuy, I. and Hernandez-Verdun, D. (2006). Compartmentation of the Nucleolar Processing Proteins in the Granular Component Is a CK2-driven Process. *Mol. Biol. Cell* 17: 2537-2546.
105. Louvet, E., Junera, H.R., Le Panse, S. and Hernandez-Verdun, D. (2005). Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Exp. Cell Res.* 304: 457-470.
106. Lupas, A.N. and Frickey, T. (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J. Struct. Biol.* 146: 2-10.
107. Lyon, C.E., Bohmann, K., Sleeman, J. and Lamond, A.I. (1997). Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. *Exp. Cell Res.* 230: 84-93.
108. Ma, T., Van Tine, B.A., Wei, Y., Garrett, M.D., Nelson, D., Adams, P.D., Wang, J., Qin, J., Chow, L.T. and Harper J.W. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of p220^{NPAT} by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes & Dev.* 14: 2298-2313.
109. Mahl, P., Lutz, Y., Puvion, E. and Fuchs, J.P. (1989). Rapid effect of heat shock on two heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-associated antigens in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 109: 1921-1935.

110. Mahon, P.C., Hirota, K. and Semenza, G.L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & Dev.* 15: 2675-2686.
111. Malatesta, M., Zancanaro, C., Martin, T.E., Chan, E. K. L., Almaric, F., Luhrmann, R., Vogel, P. and Fakan, S. (1994). Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation. *Eur. J. Cell Biol.* 65: 82-93.
112. Malekkou, A., Lederer, C.W., Lamond, A.I. and Santama, N. (2010). The nuclear ATPase/adenylate kinase hCINAP is recruited to perinucleolar caps generated upon RNA pol.II inhibition. *FEBS Lett.* 584: 4559-4564.
113. Martin, C., Chen, S., Maya-Mendoza, A., Lovric, J., Sims P.F.G. and Martin, D.A.J. (2009). Lamin B1 maintains the functional plasticity of Nucleoli. *J. Cell Sci.* 122: 1551-1562.
114. Matera, A.G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9: 302-309.
115. Meier, U.T. and Blobel, G. (1994). NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J. Cell Biol.* 127: 1505-1514.
116. Meng, G., Zhai, R., Liu, B. and Zheng, X. (2008). Identification of a Novel Nuclear_Localized Adenylate Kinase from *Drosophila melanogaster*. *Bioch. (Moscow)* 73: 38-43.
117. Metz, A., Soret, J., Vourc'h, C., Tazi, J. and Jolly, C. (2004). A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J. Cell Sci.* 117: 4551-4558.
118. Monneron, A. and Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase cell nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 266-288.
119. Morency, E., Sabra, M., Catez, F., Texier, P. and Lomonte, P. (2007). A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability. *J. Cell Biol.* 177: 757-768.
120. Morgan, G.T., Doyle, O., Murphy, C. and Gall, J.G. (2000). RNA polymerase II in Cajal bodies of amphibian oocytes. *J. Struct. Biol.* 129: 258-268.
121. Müller, F. and Tora, L. (2004) The multicoloured world of promoter recognition complexes. *Embo J.* 23: 2-8.

122. Narayanan, A., Speckmann, W., Terns, R. and Terns, M.P. (1999). Role of the box C/D motif in localization of small nucleolar RNAs to coiled bodies and nucleoli. *Mol. Biol. Cell.* 10: 2131-2147.
123. Nishigori, C. (2006). Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci.* 5: 208-214.
124. Noda, L. (1973). The Enzymes, 3rd Ed. Boyer, P.D. (Academic, New York) 8: 279-305.
125. Noel, J. P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* 366: 654-663.
126. O'Neill, W. C. (1999). Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am. J. Physiol.* 276: C995-C1011.
127. Ogg, S.C. and Lamond, A.I. (2002). Cajal bodies and coilin-moving towards function. *J. Cell Biol.* 159: 17-21.
128. Okimoto, N., Yamanaka, K., Ueno, J., Hata, M., Hoshino, T. and Tsuda, M. (2001). Theoretical studies of the ATP hydrolysis mechanism of myosin. *Biophysical Journal* 81: 2786-2794.
129. Pai, E.F., Kabsch, W., Krenkel, U., Holmes, K.C., John, J. and Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 341: 209-214.
130. Panayiotou, C., Solaroli, N., Xu, Y., Johansson, M. and Karlsson, A. (2011). The characterization of human adenylate kinases 7 and 8 demonstrates differences in kinetic parameters and structural organization among the family of adenylate kinase isoenzymes. *Biochem. J.* 433: 527-534.
131. Peng, W.T., Robinshon, M.D., Mnaimneh, N.J., Cagney, G., Morris, Q., Davierwala, A.P., Grigull, J., Yang, X., Zhang, W., Mitsakakis, N., Ryan, O.W., Datta, N., Jojic, V., Pal, C., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Wu, L.F. Altschuler S.J., Roweis, S., Frey, B.J., Emili, A., Greenblatt, J.F. and Hughes T.R. (2003). A panoramic view of yeast noncoding RNA processing. *Cell* 113: 919-933.
132. Peranen, J., Rikkonen, M., Hyvonen, M. and Kaariainen, L. (1996). T7 vectors with modified T7lac promoter for expression of proteins in Escherichia coli. *Anal. Biochem.* 236: 371-373.

133. Pillai, R.S., Will, C.L., Luhrmann, R., Schumperli, D. and Muller, B. (2001). Purified U7 snRNPs lack the Sm proteins D1 and D2 but contain Lsm10, a new 14 kDa Sm D1-like protein. *EMBO J.* 20: 5470-5479.
134. Platani, M., Goldberg, I., Lamond, A.I. and Swedlow, J.R. (2002). Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat. Cell Biol.* 4: 502-508.
135. Platani, M., Goldberg, I., Swedlow, J. R. and Lamond, A.I. (2000). In vivo analysis of Cajal body movement, separation and joining in live human cells. *J. Cell Biol.* 151: 1561-1574.
136. Ponting, C.P. (1997). Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem. Sci.* 22: 51-52.
137. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111: 229-233.
138. Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine* 9: 677-684.
139. Randak, C.O. and Welsh, M.J. (2005). Adenylate kinase activity in ABC transporters. *J. Biol. Chem.* 280: 34385-34388.
140. Raska, Ochs, R.L., Andrade, L.E., Chan, E.K., Burlingame, R., Peebles, C., Gruol, D. and Tan, E.M. (1990). Association between the nucleolus and the coiled body. *J. Struct. Biol.* 104: 120-127.
141. Raue, H. A. (2004). Pre-ribosomal RNA processing and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The nucleolus*, Ed. Olson, M.O. (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York) 199-222.
142. Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G. and Holden, H.M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261: 50-58.
143. Rebelo, L., Almeida, F., Ramos, C., Bohmann, K., Lamond, A.I. and Carmo-Fonseca, M. (1996). The dynamics of coiled bodies in the nucleus of adenovirus-infected cells. *Mol. Biol. Cell.* 7: 1137-1151.

144. Ren, H., Liang, Y., Li, R., Ding, H., Qiu, S., Lu, S., An, J., Li, L., Luo, M., Zheng, X. and Su, X.D. (2004) Protein preparation, crystallization and preliminary X-ray analysis of human adrenal gland protein AD-004. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60: 1292-1294.
145. Ren, H., Wang, L., Bennett, M., Liang, Y., Zheng, X., Lu, F., Li, L., Nan, J., Luo, M., Eriksson, S., Zhang, C., and Su, X.D. (2005). The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus. *PNAS* 102: 303-308.
146. Rizzi, N., Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Valgardsdottir, R., Cobianchi, F., Riva, S. and Biamonti, G. (2004). Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol. Biol. Cell.* 15: 543-551.
147. Ruden, D.M., Ma, J., Li, Y., Wood, K. And Ptashne, M. (1991). Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* 350: 250-252.
148. Russo, A.T., Rosgen, J. and Bolen, D.W. (2003). Osmolyte effects on kinetics of FKBP12 C22A folding coupled with prolyl isomerization. *J. Mol. Biol.* 330: 851-866.
149. Santama, N., J. Krijnse-Locker, G. Griffiths, Y. Noda, N. Hirokawa, and C.G. Dotti. (1998). KIF2beta, a new kinesin superfamily protein in non-neuronal cells, is associated with lysosomes and may be implicated in their centrifugal translocation. *EMBO J.* 17: 5855-5867.
150. Santama, N., Ogg, S.C., Malekkou, A., Zographos, S.E., Weis, K. and Lamond, A.I. (2005). Characterization of hCINAP, a Novel Coilin-interacting Protein Encoded by a Transcript from the Transcription Factor TAFIIID₃₂ Locus. *J. Biol. Chem.* 280: 36429-36441.
151. Sarge, K.D., Murphy, S.P. and Morimoto, R.I. (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1392-1407.
152. Scheer, U. and Benavente, R. (1990). Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bioessays* 12: 14-21.

153. Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J.C., Greco, A., Hochstrasser, D. and Diaz, J.J. (2002). Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 13: 4100-4109.
154. Schulz, G.E., Muller, C.W. and Diederichs K. (1990). Induced-fit movements in adenylate kinases. *J. Mol. Biol.* 213: 627-630.
155. Seker, H., Rubbi, C., Linke, S.P., Bowman, E.D., Garfield, S., Hansen, L., Borden, K.L., Milner, J. and Harris, C.C. (2003). UV-C-induced DNA damage leads to p53-dependent nuclear trafficking of PML. *Oncogene* 22: 1620-1628.
156. Shanbhag, R., Kurabi, A., Kwan, J.J. and Donaldson, L.W. (2010). Solution structure of the carboxy-terminal Tudor domain from human Coilin. *FEBS Lett.* 584: 4351-4356.
157. Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye B.T., Patton, J.G., Singer R.H. and Zipori D. (2005). Dynamic Sorting of Nuclear Components into Distinct Nucleolar Caps during Transcriptional Inhibition. *Mol. Biol. Cell* 16: 2395-2413.
158. Shpargel, K.B., Ospina, J.K., Tucker, K.E., Matera, A.G. and Hebert, M.D. (2003). Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *J. Cell Sci.* 116: 303-312.
159. Sirover, M. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1432: 159-184.
160. Sleeman, J., Lyon, C.E., Platani, M., Kreivi, J.P. and Lamond, A.I. (1998). Dynamic interactions between splicing snRNPs, coiled bodies and nucleoli revealed using snRNP protein fusions to the green fluorescent protein. *Exp. Cell Res.* 243: 290-304.
161. Sleeman, J.E. and Lamond, A.I. (1999). Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr. Biol.* 9: 1065-1074.
162. Sleeman, J.E., Trinkle-Mulcahy, L., Prescott, A.R., Ogg, S.C. and Lamond, A.I. (2003). Cajal body proteins SMN and coilin show differential dynamic behaviour in vivo. *J. Cell Sci.* 116: 2039-2050.
163. Smith, K.P., Carter, K.C., Johnson, C.V. and Lawrence, J.B. (1995). U2 and U1 snRNA gene loci associate with coiled bodies. *J. Cell Biochem.* 59: 473-485.

164. Smith, A. J., Ling, Y. and Morgan, G.T. (2003). Subnuclear Localization and Cajal Body Targeting of Transcription Elongation Factor TFIIIS in Amphibian Oocytes. *Mol. Biol. Cell* 14: 1255-1267.
165. Smith, C.A. and Rayment, I. (1996). Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys. J.* 70: 1590-1602.
166. Sobell, H.M. (1985). Actinomycin and DNA transcription. *PNAS U. S. A.* 82: 5328-5331.
167. Stanojevic, V., Habener, J.F., Holz, G.G. and Leech, C.A. (2008). Cytosolic adenylate kinases regulate K-ATP channel activity in human beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368: 614-619.
168. Stephen, D.W. and Jamieson, D.J. (1997). Amino acid dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* 23: 203-210.
169. Sun, J., Xu, H., Subramony, S.H. and Hebert, M.D. (2005). Interactions between coilin and PIASy partially link Cajal bodies to PML bodies. *J. Cell Sci.* 118: 4995-5003.
170. Swedlow, J.R., Sedat, J.W. and Agard, D.A. (1997). Deconvolution in optical microscopy. In *Deconvolution of Images and Spectra*. Jansson, P.A. editor. *Academic Press New York*.
171. Tanabe, T., Yamada, M., Noma, T., Kajii, T. and Nakazawa, A. (1993). Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. *J. Biochem.* 113: 200-207.
172. te Poele, R.H., Okorokov, A.L. and Joel, S.P. (1999). RNA synthesis block by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) triggers p53-dependent apoptosis in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 18: 5765-5772.
173. Thiry, M. (1994). Cytochemical and immunocytochemical study of coiled bodies in different cultured cell lines. *Chromosoma* 103: 268-276.
174. Tomasselli, A.G., Schirmer, R.H. and Noda, L.H. (1979). Mitochondrial GTP-AMP phosphotransferase. 1. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 93: 257-262.
175. Tornaletti, S. and Pfeifer, G.P. (1996). UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioassays* 18: 221-228.

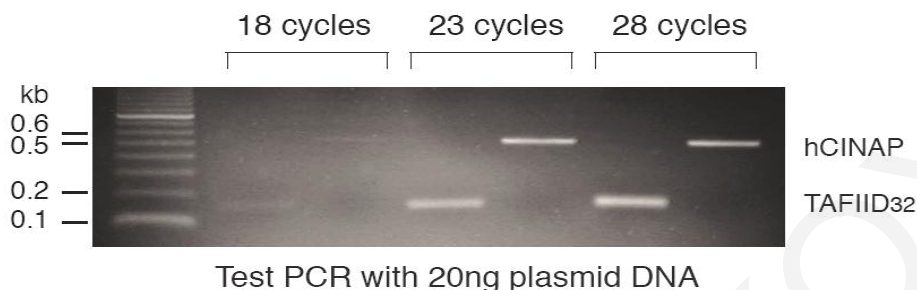
176. Trinkle-Mulcahy, L., Andersen, J., Lam, Y.W., Moorhead, G., Mann, M. and Lamond, A.I. (2006). Repo-Man recruits PP1 γ to chromatin and is essential for cell viability. *J. Cell Biol.* 172: 679-692.
177. Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y.W., Urcia, R., Boisvert, F-M., Vandermoere, F., Morrice, N.A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H. and Lamond, A. (2008). Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell Biol.* 183: 223-239.
178. Tuma, R.S., Stolk, J.A. and Roth, M.B. (1993). Identification and characterization of a sphere organelle protein. *J. Cell Biol.* 122: 767-773.
179. Valgardsdottir, R., Chiodi, I., Giordano, M., Rossi, A., Bazzini, S., Ghigna, C., Riva, S. and Biamonti, G. (2008). Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. *Nucleic Acids Res.* 36: 423-434.
180. van Rompay, A. R., Johansson, M. and Karlsson, A. (2000) *Pharmacol. Ther.* 87: 189-198.
181. Velma, V., Carrero, Z.I., Cosman, A.M. and Hebert, M.D. (2010). Coilin interacts with Ku proteins and inhibits in vitro non-homologous DNA end joining. *FEBS Lett.* 584: 4735-4739.
182. Venema, J. and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33: 261-311.
183. Vornrhein, C., Bonisch, H., Schafer, G. and Schulz, G.E. (1998). The structure of a trimeric archaeal adenylate kinase. *J. Mol. Biol.* 282: 167-179.
184. Wahl, M.C., Will, C.L. and Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136: 701-718.
185. Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta- subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
186. Walker, M.P., Tian, L. and Matera, A.G. (2009). Reduced viability, fertility and fecundity in mice lacking the cajal body marker protein, coilin. *PLoS One* 4: e6171
187. Wang, A., Ikura, T., Eto, K. and Ota, M.S. (2004). Dynamic interaction of p220 (NPAT) and CBP/p300 promotes S-phase entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325: 1509-1516.

188. Whittom, A.A., Xu, H. and Hebert, M.D. (2008). Coilin levels and modifications influence artificial reporter splicing. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 1256-1271.
189. Wu, C., Murphy, C. and Gall, J.G. (1996). The Sm binding site targets U7 snRNA to coiled bodies (spheres) of amphibian oocytes. *RNA (NY)*. 2: 811-823.
190. Xu, H., Pillai, R.S., Azzouz, T.N., Shpargel, K.B., Kambach, C., Hebert, M.D., Schumperli, D. and Matera, A.G. (2005). The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. *Chromosoma* 114: 155-166.
191. Yamada, M., Sato, T., Shimohata, T., Hayashi, S., Igarashi, S., Tsuji, S. and Takahashi, H. (2001). Interaction between Neuronal Intranuclear Inclusions and Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear and Coiled Bodies in CAG Repeat Diseases. *Am. J. Pathol.* 159: 1785-1795.
192. Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222.
193. Ye, X., Wei, Y., Nalepa, G. and Harper, J.W. (2003). The cyclin E/Cdk2 substrate p220 (NPAT) is required for S-phase entry, histone gene expression, and Cajal body maintenance in human somatic cells. *Mol. Cell Biol.* 23: 8586-8600.
194. Yoneda, T., Sato, M., Maeda, M. and Takagi, H. (1998). Identification of a novel adenylate kinase system in the brain: cloning of the fourth adenylate kinase. *Mol. Brain. Res.* 62: 187-195.
195. Zatssepina, O.V., Dudnic, O.A., Chentsov, Y.S., Thiry, M., Spring, H. and Trendelenburg, M.F. (1997). Reassembly of functional nucleoli following in situ unraveling by low-ionic-strength treatment of cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 233: 155-168.
196. Zhai, R., Meng, G., Zhao, Y., Liu, B., Zhang, G. and Zheng, X. (2006). A novel nuclear-localized protein with special adenylate kinase properties from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 580: 3811-3817.
197. Zhang, J., Zhang, F. and Zheng, X. (2010). Depletion of hCINAP by RNA interference causes defects in Cajal body formation, histone transcription, and cell viability. *Cell Mol. Life Sci.* 67: 1907-1918.
198. Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Matera AG, et al. (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev.* 14: 2283-2297.

199. Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M. and Terns, M.P. (2004).
Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol. Biol. Cell*
15: 81-90.

ANNA MALEKKOY

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



Σχήμα 3.1: Διαγνωστικές αντιδράσεις PCR με χρήση πλασμιδιακού DNA (20 ng) για τα cDNA της hCINAP ή της TAFIID₃₂.

| Διάφορα Τμήματα coilin | <u>Πώς Προέκυψαν</u> |
|--|---|
| Full-length 1-576 αα (1-1728 nt) | Ενδονουκλεολυτική διάσπαση του pHAT ₂ -coilin με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και BamHI |
| N1 1-362 αα (1-1086 nt) | Αντίδραση PCR με τα ολιγονουκλεοτίδια COILFW-1 και COILRV-1086 |
| N2 1-290 αα (1-870 nt) | Ενδονουκλεολυτική διάσπαση του pHAT ₂ -coilin με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και PstI |
| N3 1-159 αα (1-477 nt) | Αντίδραση PCR με τα ολιγονουκλεοτίδια COILFW-1 και COILRV-477 |
| N4 1-92 αα (1-276 nt) | Ενδονουκλεολυτική διάσπαση του pHAT ₂ -coilin με τα περιοριστικά ένζυμα NcoI και EcoRI |
| C1 362-576 αα (1084-1728 nt) | Αντίδραση PCR με τα ολιγονουκλεοτίδια COILFW-1084 και COILRV-1728 |

Πίνακας 3.2: Τα διάφορα τμήματα της coilin, και ο τρόπος που προέκυψαν

| Διάφορα Τμήματα hCINAP | <u>Πώς Προέκυψαν</u> |
|--------------------------------|---|
| Full-length 1-550 nt | Αντίδραση PCR με τα ολιγονουκλεοτίδια PCR ₅ και PCR ₃ |
| N1 1-329 nt | Αντίδραση PCR με τα ολιγονουκλεοτίδια PCR ₅ και CIPRV-329 |
| N2 121-329 nt | Αντίδραση PCR με τα ολιγονουκλεοτίδια CIPFW-121 και CIPRV-329 |
| C1 330-550 nt | Αντίδραση PCR με τα ολιγονουκλεοτίδια CIPFW-330 και PCR ₃ |
| C2 204-550 nt | Αντίδραση PCR με τα ολιγονουκλεοτίδια CIPFW-204 και PCR ₃ |

Πίνακας 3.3: Τα διάφορα τμήματα της hCINAP, και ο τρόπος που προέκυψαν.

| ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ | SD/-Trp-His | SD/-Trp-Ade | X-gal |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| pAS2-1- hCINAP | √ | √ | √ |
| pAS2-1- hCINAP [1-120nt] | √ | √ | √ |
| pAS2-1-hCINAP [120-550nt] | √ | √ | √ |
| pAS2-1- hCINAP [1-329nt] | √ | √ | √ |
| pAS2-1- hCINAP [121-329nt] | X | X | √ |
| pAS2-1- hCINAP [330-550nt] | √ | √ | √ |
| pAS2-1- hCINAP [204-550] | √ | √ | √ |
| pGBKT7- hCINAP | √ | √ | √ |
| pGBKT7- hCINAP [1-329nt] | X | X | √ |
| pGBKT7-hCINAP [121-329nt] | X | X | √ |
| pGBKT7-hCINAP [330-550nt] | X | X | √ |
| pGBKT7-hCINAP [204-550nt] | X | X | √ |

Πίνακας 3.4: Τα πλασμίδια που δοκιμάστηκαν για επιλογή του καταλληλότερου για τη χρήση στη σύρση της cDNA βιβλιοθήκης, καθώς και τα αποτελέσματα ελέγχου της μεταγραφικής αυτοενεργοποίησης τους. Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι εξετάστηκαν για αυτοενεργοποίηση των 3 γονιδίων αναφοράς: HIS3, ADE2 και LACZ (MEL1), με στρώσιμο των κλώνων σε τρυβλία SD/-Trp/-His και SD/-Trp/-Ade και με πραγματοποίηση πειράματος β-γαλακτοσιδάσης, αντίστοιχα.

| MASS (Da) | PEPTS. | SCORE | IDENTITY | RADIO | CHECKED VERIFIED | ACCESSION NUMBER |
|-----------|--------|-------|---|--------|------------------|------------------|
| 19793 | 5 | 325 | hCINAP | 50.269 | TRUE | IPI00556532 |
| 28603 | 1 | 14 | LOC642451 similar to ribosomal protein L7-like 1 | 33.321 | FALSE | IPI00740474 |
| 30582 | 2 | 35 | HCCS Cytochrome c-type hemelyase | 28.108 | TRUE | IPI00023406 |
| 16174 | 1 | 43 | CDA Cytidine deaminase | 16.47 | TRUE | IPI00027983 |
| 153797 | 1 | 9 | RAD50 Isoform 1 of DNA repair protein RAD50 | 16.152 | FALSE | IPI00305282 |
| 52133 | 2 | 60 | OAS1 2'-5' oligoadenylate synthetase 1 p52 isoform | 10.67 | TRUE | IPI00651622 |
| 14719 | 7 | 310 | UBA52 ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor | 9.743 | TRUE | IPI00456429 |
| 51354 | 24 | 1388 | KRT7 keratin 7 | 8.081 | TRUE | IPI00847342 |
| 278021 | 39 | 1686 | FLNB Isoform 1 of Filamin-B | 7.585 | TRUE | IPI00289334 |
| 17995 | 3 | 119 | CDKN2A Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4 | 7.429 | TRUE | IPI00478390 |
| 51386 | 2 | 45 | KRT7 Keratin, type II cytoskeletal 7 | 7.191 | TRUE | IPI00306959 |
| 145526 | 2 | 25 | CNTNAP4 Cell recognition protein CASPR4 | 7.025 | TRUE | IPI00216250 |
| 29645 | 1 | 12 | LOC439992 similar to ribosomal protein S3a isoform 2 | 6.656 | FALSE | IPI00736158 |
| 36712 | 4 | 119 | AKR1C2 Aldo-keto reductase family 1 member C2 | 5.742 | TRUE | IPI00005668 |
| 47139 | 5 | 192 | ENO1 Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase | 5.584 | TRUE | IPI00465248 |
| 49892 | 1 | 24 | TUBA4A Tubulin alpha-4A chain | 5.44 | TRUE | IPI00007750 |
| 48076 | 30 | 1622 | KRT17 Keratin, type I cytoskeletal 17 | 5.435 | TRUE | IPI00450768 |
| 88199 | 3 | 28 | IFI16 Isoform 1 of Gamma-interferon-inducible protein Ii-16 | 5.328 | TRUE | IPI00003443 |
| 57900 | 13 | 516 | PKM2 Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2 | 4.692 | TRUE | IPI00479186 |
| 50104 | 7 | 322 | TUBA1A Tubulin alpha-1A chain | 4.599 | TRUE | IPI00180675 |
| 86416 | 3 | 86 | NSUN2 tRNA | 4.289 | TRUE | IPI00306369 |
| 56160 | 2 | 67 | PSMD5 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 | 4.129 | TRUE | IPI00002134 |
| 11730 | 4 | 222 | TXN Thioredoxin | 4.106 | TRUE | IPI00216298 |

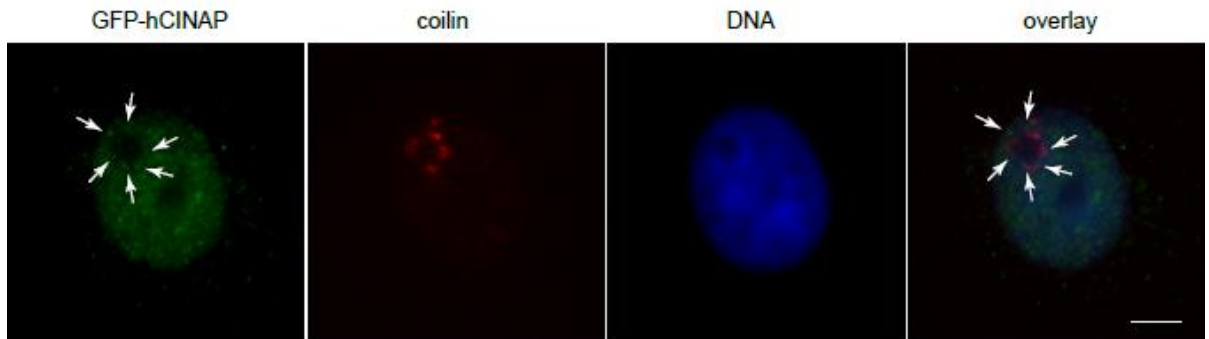
| | | | | | | |
|--------|----|-----|---|-------|-------|-------------|
| 49799 | 9 | 616 | TUBB2C Tubulin beta-2C chain | 4.049 | TRUE | IPI00007752 |
| 31711 | 1 | 49 | STOM Erythrocyte band 7 integral membrane protein | 3.855 | TRUE | IPI00219682 |
| 40069 | 7 | 268 | SLC25A3 Isoform A of Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor | 3.829 | TRUE | IPI00022202 |
| 37443 | 3 | 89 | GPSN2 37 kDa protein | 3.795 | TRUE | IPI00644037 |
| 292745 | 2 | 70 | GCN1L1 GCN1-like protein 1 | 3.77 | TRUE | IPI00001159 |
| 12150 | 1 | 45 | MGST1 12 kDa protein | 3.694 | TRUE | IPI00796051 |
| 226392 | 7 | 177 | MYH9 Myosin-9 | 3.565 | TRUE | IPI00019502 |
| 32874 | 16 | 768 | SLC25A5 ADP/ATP translocase 2 | 3.495 | TRUE | IPI00007188 |
| 68348 | 2 | 16 | C20orf119 Polyadenylate-binding protein 1-like | 3.463 | TRUE | IPI00556259 |
| 357974 | 4 | 88 | RANBP2 E3 SUMO-protein ligase RanBP2 | 3.43 | TRUE | IPI00221325 |
| 13706 | 1 | 40 | B2M Beta-2-microglobulin precursor | 3.256 | TRUE | IPI00004656 |
| 26081 | 1 | 10 | GSTM2 26 kDa protein | 3.156 | FALSE | IPI00639805 |
| 104788 | 1 | 66 | ACTN4 Alpha-actinin-4 | 3.099 | TRUE | IPI00013808 |
| 40883 | 7 | 368 | HLA-B;MICA;LOC730410;HLA-C;HLA-A29.1;HLA-A HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain precursor | 3.084 | TRUE | IPI00472882 |
| 11133 | 1 | 60 | CSTB Cystatin-B | 3.048 | TRUE | IPI00021828 |
| 34040 | 3 | 197 | SLC25A11 Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein | 3.006 | TRUE | IPI00219729 |
| 178600 | 5 | 169 | TOP2A Isoform 3 of DNA topoisomerase 2-alpha | 3.005 | TRUE | IPI00218753 |
| 208570 | 3 | 128 | PDCD11 RRP5 protein homolog | 2.988 | TRUE | IPI00400922 |
| 19878 | 4 | 118 | PARK7 Protein DJ-1 | 2.964 | TRUE | IPI00298547 |
| 66177 | 6 | 305 | ATAD3A Isoform 2 of ATPase family AAA domain-containing protein 3A | 2.952 | TRUE | IPI00295992 |
| 37815 | 2 | 172 | ERLIN2 Isoform 1 of Erlin-2 precursor | 2.908 | TRUE | IPI00026942 |
| 49639 | 1 | 79 | TUBB Tubulin beta chain | 2.882 | TRUE | IPI00011654 |
| 39922 | 1 | 7 | LOC650909 similar to activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1 | 2.871 | FALSE | IPI00735397 |

| | | | | | | |
|--------|----|------|---|-------|-------|-------------|
| 468788 | 51 | 1863 | PRKDC Isoform 1 of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit | 2.849 | TRUE | IPI00296337 |
| 47239 | 1 | 8 | ENO2 Gamma-enolase | 2.811 | FALSE | IPI00216171 |
| 69826 | 1 | 55 | XRCC6 70 kDa protein | 2.803 | TRUE | IPI00465430 |
| 113823 | 2 | 88 | NNT NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial precursor | 2.732 | TRUE | IPI00337541 |
| 53671 | 39 | 2376 | KRT8 Keratin, type II cytoskeletal 8 | 2.711 | TRUE | IPI00554648 |
| 27344 | 1 | 51 | PSME2 Proteasome activator complex subunit 2 | 2.703 | TRUE | IPI00384051 |
| 33276 | 10 | 518 | PHB2 Prohibitin-2 | 2.601 | TRUE | IPI00027252 |
| 22768 | 1 | 39 | HSPB1 Heat-shock protein beta-1 | 2.557 | TRUE | IPI00025512 |
| 32845 | 5 | 275 | SLC25A6 ADP/ATP translocase 3 | 2.539 | TRUE | IPI00291467 |
| 28504 | 1 | 6 | TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain | 2.514 | FALSE | IPI00010779 |
| 188031 | 3 | 61 | SMARCA4 SMARCA4 isoform 2 | 2.497 | TRUE | IPI00029822 |
| 32929 | 2 | 135 | CAPZA2 F-actin capping protein subunit alpha-2 | 2.443 | TRUE | IPI00026182 |
| 138346 | 2 | 42 | RAD50 Isoform 3 of DNA repair protein RAD50 | 2.439 | TRUE | IPI00107531 |
| 35596 | 4 | 159 | SFXN1 Sideroflexin-1 | 2.378 | TRUE | IPI00009368 |
| 20240 | 7 | 367 | RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11 | 2.366 | TRUE | IPI00376798 |
| 27960 | 2 | 107 | TMEM33 Transmembrane protein 33 | 2.348 | TRUE | IPI00299084 |
| 32902 | 11 | 445 | CAPZA1 F-actin capping protein subunit alpha-1 | 2.322 | TRUE | IPI00005969 |
| 54197 | 13 | 508 | NONO Non-POU domain-containing octamer-binding protein | 2.244 | TRUE | IPI00304596 |
| 56221 | 3 | 93 | GSR Isoform Mitochondrial of Glutathione reductase, mitochondrial precursor | 2.241 | TRUE | IPI00016862 |
| 531466 | 98 | 4430 | PLEC1 plectin 1 isoform 6 | 2.232 | TRUE | IPI00186711 |
| 33760 | 4 | 161 | CAPZB Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta | 2.211 | TRUE | IPI00218782 |
| 149996 | 2 | 22 | ABCC11 Isoform 2 of ATP-binding cassette transporter sub-family C member 11 | 2.21 | TRUE | IPI00152538 |
| 133513 | 2 | 13 | ATP8A2 ATPase, aminophospholipid transporter-like, Class I, type 8A, member 2 | 2.174 | FALSE | IPI00465166 |

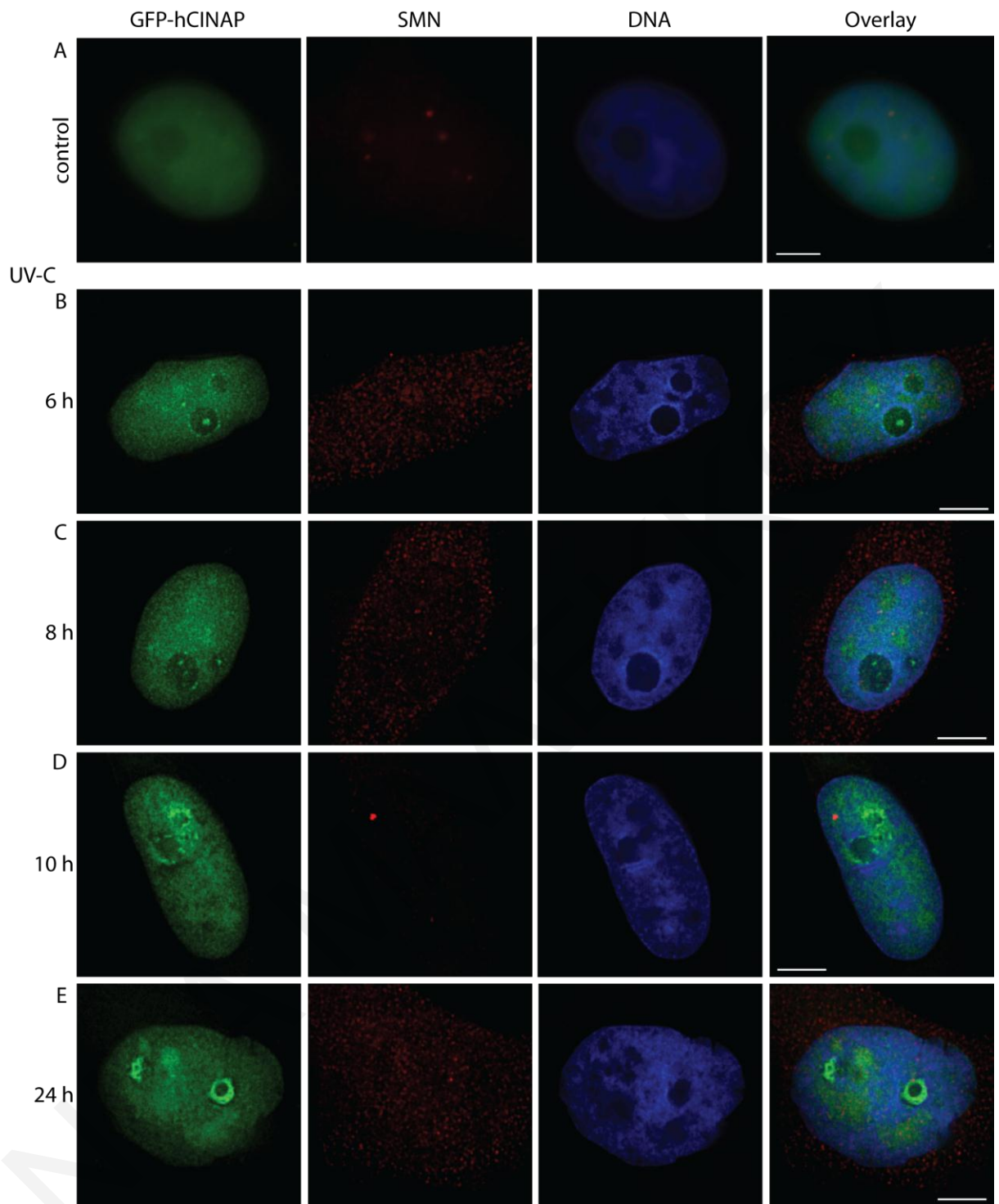
| | | | | | | |
|--------|----|------|---|-------|-------|-------------|
| 141454 | 4 | 127 | SMC3 Structural maintenance of chromosomes protein 3 | 2.131 | TRUE | IPI00219420 |
| 74095 | 37 | 2291 | LMNA Isoform A of Lamin-A/C | 2.115 | TRUE | IPI00021405 |
| 14706 | 1 | 38 | LGALS1 Galectin-1 | 1.98 | TRUE | IPI00219219 |
| 236372 | 3 | 109 | NUMA1 Isoform 2 of Nuclear mitotic apparatus protein 1 | 1.963 | TRUE | IPI00006196 |
| 57988 | 1 | 44 | CCT6A T-complex protein 1 subunit zeta | 1.944 | TRUE | IPI00027626 |
| 21878 | 3 | 119 | PRDX2 Peroxiredoxin-2 | 1.924 | TRUE | IPI00027350 |
| 102966 | 3 | 79 | KIAA1967 Isoform 2 of Protein KIAA1967 | 1.893 | TRUE | IPI00182757 |
| 100136 | 3 | 149 | PSMD2 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 | 1.876 | TRUE | IPI00012268 |
| 73108 | 1 | 7 | DDX3Y ATP-dependent RNA helicase DDX3Y | 1.875 | FALSE | IPI00293616 |
| -1 | 1 | 8 | USP9X ubiquitin specific protease 9, X-linked isoform 4 | 1.858 | FALSE | IPI00003964 |
| 18879 | 4 | 113 | LOC641293 Ribosomal protein L21 variant (Fragment) | 1.835 | TRUE | IPI00845507 |
| 14778 | 1 | 63 | RPL22 60S ribosomal protein L22 | 1.813 | TRUE | IPI00219153 |
| 88924 | 13 | 503 | HNRPU Isoform Short of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U | 1.797 | TRUE | IPI00479217 |
| 48029 | 22 | 1228 | KRT18 Keratin, type I cytoskeletal 18 | 1.76 | TRUE | IPI00784347 |
| 26671 | 7 | 295 | RPS3 40S ribosomal protein S3 | 1.741 | TRUE | IPI00011253 |
| 89266 | 4 | 107 | VCP Transitional endoplasmic reticulum ATPase | 1.718 | TRUE | IPI00022774 |
| 70009 | 8 | 375 | HSPA1B;HSPA1A Heat shock 70 kDa protein 1 | 1.702 | TRUE | IPI00304925 |
| 18314 | 1 | 7 | PRDX4 Protein | 1.698 | FALSE | IPI00639945 |
| 36999 | 4 | 163 | RPL7 RPL7 protein | 1.683 | TRUE | IPI00472171 |
| 11421 | 5 | 193 | ATP5L ATP synthase subunit g, mitochondrial | 1.631 | TRUE | IPI00027448 |
| 279843 | 67 | 2945 | FLNA filamin A, alpha | 1.616 | TRUE | IPI00302592 |
| 60424 | 2 | 78 | CCT3 chaperonin containing TCP1, subunit 3 isoform b | 1.606 | TRUE | IPI00290770 |
| 121828 | 8 | 264 | SMARCA5 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 | 1.604 | TRUE | IPI00297211 |
| 23757 | 1 | 33 | BAG2 BAG family molecular chaperone regulator 2 | 1.587 | TRUE | IPI00000643 |

| | | | | | | |
|--------|---|-----|--|-------|-------|-------------|
| 73409 | 4 | 143 | RECQL ATP-dependent DNA helicase Q1 | 1.58 | TRUE | IPI00178431 |
| 16263 | 5 | 255 | RPS14 40S ribosomal protein S14 | 1.558 | TRUE | IPI00026271 |
| 189134 | 2 | 52 | IQGAP1 Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 | 1.557 | TRUE | IPI00009342 |
| 21850 | 1 | 28 | RPL9 60S ribosomal protein L9 | 1.552 | TRUE | IPI00031691 |
| 14159 | 1 | 7 | HIST1H2BA Histone H2B type 1-A | 1.537 | FALSE | IPI00465363 |
| 143144 | 6 | 114 | SMC1A Structural maintenance of chromosomes protein 1A | 1.469 | TRUE | IPI00291939 |

Πίνακας 3.8: Πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη hCINAP με τη μέθοδο SILAC-MS. Στο πίνακα φαίνονται οι πρωτεΐνες που είχαν αναλογία GFP-hCINAP:GFP 1.5 και πάνω. Με γκριζο και πράσινο χρώμα φαίνονται οι πρωτεΐνες των οποίων τα πεπτίδια ελέγχθηκαν και παρουσιάζονταν σωστά, ενώ με πράσινο χρώμα οι πρωτεΐνες που θεωρήθηκαν πιο σημαντικές με βάση την λειτουργία και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό για περαιτέρω διερεύνηση.



Σχήμα 3.29: Εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης hCINAP σε δακτυλίους γύρω από τους πυρηνίσκους (caps) μετά από μεταγραφική καταστολή της RNA Pol. I και Pol. II. **A:** Μεταγραφική καταστολή με χρήση ακτινομυκίνης D (ActD, 1 μg/ml) και δημιουργία δακτυλίων γύρω από τους πυρηνίσκους της hCINAP. Η ενδογενής hCINAP ανιχνεύτηκε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της (πράσινο), η coilin με ειδικό αντίσωμα έναντι της, ενώ το DNA με τη χρωστική Hoechst-33342 (μπλε). Κλίμακα: 5 μm.



Σχήμα 3.35: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της GFP-hCINAP μετά από ακτινοβολία UV-C και ανοσοφθορισμό με SMN. **A:** Κύτταρο το οποίο δεν υπέστη ακτινοβολία. **B-E:** κύτταρα που υπέστησαν ακτινοβολία UV-C και μονιμοποιήθηκαν στους ενδεικτικούς χρόνους. **B,C:** Η πρωτεΐνη GFP-hCINAP σχηματίζει μεγάλες στρογγυλές πυρηνικές δομές καθώς και μικρότερες εστίες στον πυρήνα και στους πυρηνίσκους, ενώ η SMN διαχέεται στο κυτταρόπλασμα. **D, E:** η GFP-hCINAP παρουσιάζει δακτύλιους γύρω από τους πυρηνίσκους ακόμα κι όταν η SMN επανέρχεται (D). Το πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύει την GFP-hCINAP, το κόκκινο την SMN και το μπλε το DNA. Κλίμακα: 5 μm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Ένας από τους κεντρικούς στόχους της διδακτορικής μου διατριβής, ήταν ο δομικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης hCINAP. Για το σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης hCINAP, που αποσκοπούσε στην επίλυση της πρωτεϊνικής της δομής με πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Η πειραματική αυτή προσέγγιση εγκαταλήφθηκε από μένα, μετά από δημοσίευση της δομής της hCINAP από τον Ren και τους συνεργάτες του (Ren et al., 2005).

Στο παράρτημα αυτό παρατίθεται εν συντομία, η βέλτιστη πορεία της διαδικασίας έκφρασης και καθαρισμού της hCINAP που προέκυψε και οι συνθήκες κρυστάλλωσης που δοκιμάστηκαν. Τα πειράματα αυτής της ενότητας έγιναν κάτω από τη στενή επίβλεψη του Δρα Σπύρου Ζωγράφου.

Πορεία που ακολουθήθηκε:

Π1. Κλωνοποίηση της hCINAP στον πλασμιδιακό φορέα pRSET_B

Το cDNA του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) της hCINAP πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της PCR, με χρήση κατάλληλων εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων (VIII PCR5' και VIII PCR3', Πίνακας 2.11) και έπειτα με ενδονουκλεολυτική διάσπαση κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pRSET_B, στον οποίο εκφράστηκε συγχωνευμένη με το επιτόπιο της εξα-ιστιδίνης (his₆).

Π2. Έκφραση και βιοχημικός καθαρισμός της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης his₆-hCINAP

Π2.1 Έκφραση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης his₆-hCINAP

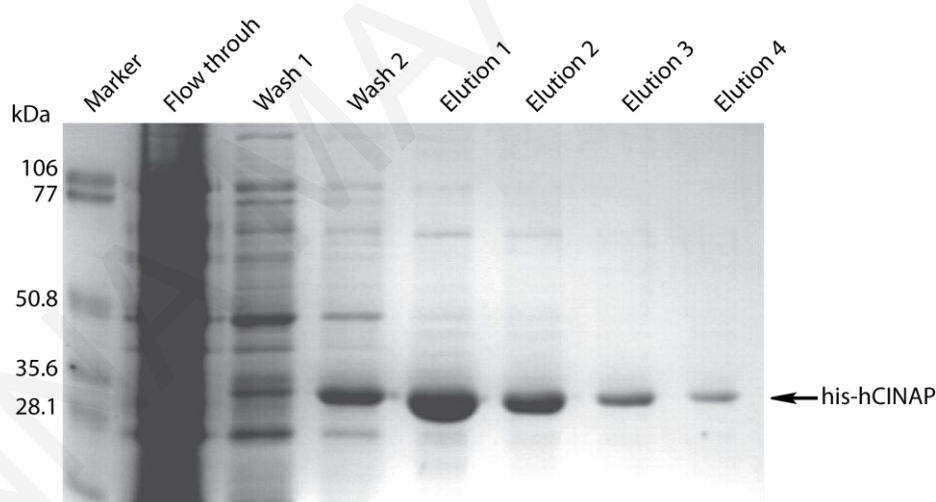
Η ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη his₆-hCINAP εκφράστηκε σε υψηλά επίπεδα και κυρίως σε διαλυτή μορφή στο βακτηριακό στέλεχος BL₂₁-LysS, μετά από επαγωγή με 1 mM IPTG, για 4 h, στους 25 °C. Η απόδοση της υπολογίστηκε περίπου σε 10 mg/L καλλιέργειας.

Π2.2 Χρωματογραφία συγγενείας NTA-Ni²⁺

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη his-hCINAP αρχικά απομονώθηκε με χρήση χρωματογραφίας συγγενείας με μήτρα αгарόζης που έφερε σύμπλοκα δισθενούς νικελίου (NTA-Ni²⁺), στα οποία δεσμεύεται μέσω του επιτόπιου της εξα-ιστιδίνης (his₆).

Εν συντομία, το ομογενοποιημένο εκχύλισμα των βακτηρίων που εξέφραζε την his-hCINAP επώαστηκε με σφαιρίδια NTA-Ni²⁺, έτσι ώστε η πρωτεΐνη να δεσμευτεί σε αυτά. Ακολούθως τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με διάλυμα έκπλυσης που περιείχε μικρή συγκέντρωση ιμιδαζολίου για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεσμεύονται μη ειδικά στα σφαιρίδια. Έπειτα, η πρωτεΐνη, εκλούστηκε με διάλυμα που περιείχε υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, το οποίο συναγωνιζόταν τη δεσμευμένη πρωτεΐνη.

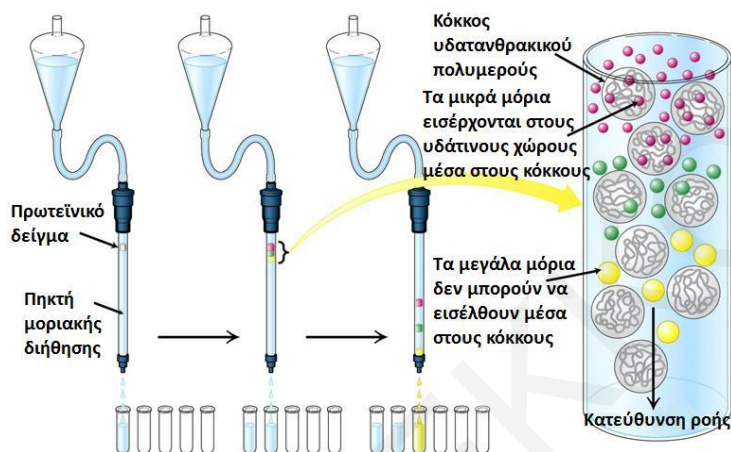
Για την επιβεβαίωση του βιοχημικού καθαρισμού της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και χρώση του πηκτώματος με Coomassie blue (Σχήμα Π1). Τα κλάσματα έκλυσης της πρωτεΐνης, ενώθηκαν και πραγματοποιήθηκε διαπίδυση της πρωτεΐνης, με χρήση ημιπερατής μεμβράνης με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, για περίοδο 16 h στους 4 °C και τέλος το δείγμα συμπυκνώθηκε με υπερδιήθηση με φίλτρο 10K MWCO, μέχρι τελικού όγκου 0.5-1 ml.



Σχήμα Π1: Βιοχημικός καθαρισμός της πρωτεΐνης his-hCINAP με χρωματογραφία συγγενείας μετάλλου, NTA-Ni²⁺. Ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο του βιοχημικού καθαρισμού της his-hCINAP, όπου παρουσιάζονται τα δείγματα: διέλευσης από τη στήλη (flow through), έκπλυσης (Wash 1 και 2) και έκλυσης (Elution 1-4).

Π2.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πήκτωμα Sephatex G-75

Δεύτερο στάδιο του εμπλουτισμού της πρωτεΐνης his-hCINAP, αποτέλεσε ο βιοχημικός καθαρισμός της με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πήκτωμα Sephatex G-75. Η αρχή της μεθόδου απεικονίζεται στο Σχήμα Π2.

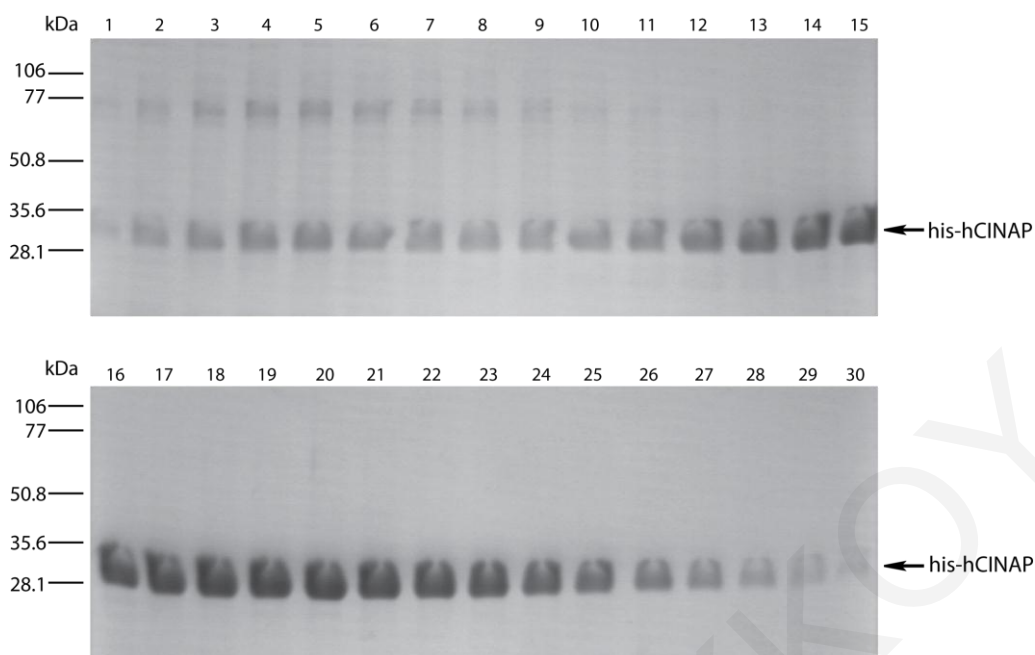


Σχήμα Π2: Απεικόνιση της αρχής μεθόδου χρωματογραφίας μοριακής διήθησης (Biochemistry Sixth Edition, StryerL., 2007, W.H Freemanand Company).

Αφού η στήλη πληρώθηκε με το πήκτωμα, εξισορροπήθηκε στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για τουλάχιστο δύο όγκους στήλης. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το δείγμα της πρωτεΐνης στην κορυφή της στήλης και εκλούστηκε με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Τέλος, συλλέχθηκαν, μετά τον νεκρό όγκο της στήλης, κλάσματα του 0.5 ml. Για την αξιολόγηση της καθαρότητας των κλασμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου των 30 πρώτων κλασμάτων (Σχήμα Π3).

Τα κλάσματα που δεν παρουσίαζαν προσμίξεις και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν υψηλή, επιλέγηκαν και συνδυάστηκαν (δείγματα 13-28). Η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε με υπερδιήθηση με χρήση φίλτρου 10 KMWCO, μέχρι τελικής συγκέντρωσης ~ 10 mg/ml.

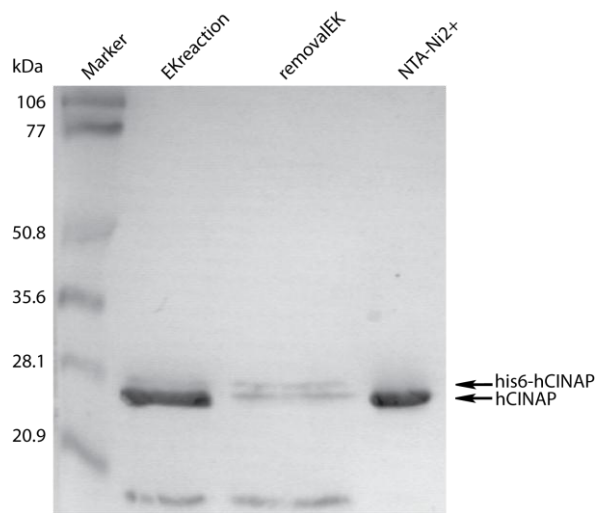
Ακολούθως, η πρωτεΐνη his-hCINAP, είτε τοποθετήθηκε για κρυσταλλώσεις, είτε έτυχε πρωτεολυτική διάσπαση, με το ένζυμο εντεροκινάση, για απομάκρυνση του επιτοπίου της εξα-ιστιδίνης (his₆).



Σχήμα Π3: Βιοχημικός καθαρισμός της πρωτεΐνης his-hCINAP με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πήκτωμα Sephatex G-75. Ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο του αποτελέσματος καθαρισμού, με χρήση των 30 πρώτων δειγμάτων που λαμβάνονται μετά τον νεκρό όγκο της στήλης.

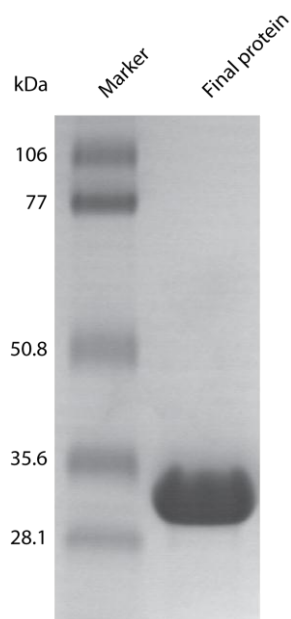
Π3. Πρωτεολυτική διάσπαση της πρωτεΐνης his₆-hCINAP με το ένζυμο εντεροκινάση για απομάκρυνση του επιτοπίου της his₆

Η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη his-hCINAP, που προέκυψε από τον βιοχημικό καθαρισμό, επώαστηκε με το ένζυμο της εντεροκινάσης (EK), για 3 h, στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει και διασπά την αλληλουχία (AspAspAspAspLys) που βρίσκεται μετά το επιτόπιο της εξα-ιστιδίνης αλλά πριν το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνθηκε η επιπλέον αλληλουχία που παρουσιάζεται στο αμινοξικό άκρο της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια το ένζυμο απομακρύνθηκε από το πρωτεϊνικό διάλυμα με σφαιρίδια που περιείχαν προσδεδεμένο αντίσωμα έναντι της EK. Τα πρωτεολυτικά κομμάτια, καθώς και η αδιάσπαστη πρωτεΐνη, απομακρύνθηκαν με επώαση με σφαιρίδια NTA-Ni²⁺. Τέλος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου, με χρήση δειγμάτων από τα στάδια αυτά, για τον έλεγχο της διαδικασίας (Σχήμα Π4).



Σχήμα Π4: Πρωτεολυτική διάσπαση της his_6 -hCINAP με το ένζυμο εντεροκινάση (EK), για απομάκρυνση του επιτοπίου της his_6 . Δείγματα από τα διάφορα στάδια της αντίδρασης: δείγμα μετά την αντίδραση με το ένζυμο EK (EKreaction), δείγμα μετά την απομάκρυνση του ενζύμου (removalEK) και δείγμα μετά την απομάκρυνση της his_6 με σφαιρίδια NTA- Ni^{2+} .

Η ληφθείσα πρωτεΐνη hCINAP, μετά από διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM Tris pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.02% NaN_3 , 2% γλυκερόλη) για 16 h, συμπυκνώθηκε με υπερδιήθηση με φίλτρο 10K MWCO, μέχρι τελικής συγκέντρωσης ~10 mg/ml (Σχήμα Π5) και χρησιμοποιήθηκε για κρυσταλλώσεις.



Σχήμα Π5: Συμπυκνωμένη πρωτεΐνη hCINAP μετά από χρωματογραφία συγγενείας μετάλλου Ni^{2+} και μοριακής διήθησης σε πήκτωμα Sephadex G-75.

Π4. Προσπάθειες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης his-hCINAP ή hCINAP

Η ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων αποτελεί το σημαντικότερο αλλά και το δυσκολότερο στάδιο στην όλη κρυσταλλογραφική μελέτη, λόγω του μεγάλου αριθμού παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη τους (πχ. θερμοκρασία, pH ρυθμιστικού διαλύματος, ιοντική ισχύς, οργανικοί διαλύτες) και στην περιορισμένη γνώση που έχουμε για την πορεία ανάπτυξης των κρυστάλλων. Η μέθοδος που εφαρμόζεται συνήθως είναι αυτή της δοκιμής- σφάλματος (trial and error method), δοκιμάζοντας τις μέχρι τώρα γνωστές συνθήκες κρυστάλλωσης.

Π4.1 Τεχνικές Κρυστάλλωσης που δοκιμάστηκαν

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών είναι η πλέον συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και εφαρμόζεται συνήθως με τις τεχνικές της κρεμάμενης σταγόνας, της καθημερινής σταγόνας και της μικροδιαπίδυσης. Αυτές είναι και οι τεχνικές που δοκιμάστηκαν στην παρούσα εργασία.

1. Τεχνική κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop)

Μια σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος καταβυθιστικού σε αναλογία 1:1 (συνήθως αναμιγνύονται 2-5 μl από το κάθε διάλυμα), τοποθετείται στο μέσο μιας υδρόφοβης καλυπτρίδας. Η καλυπτρίδα τοποθετείται στη συνέχεια πάνω από σχετικά μεγάλο όγκο (700-1000 μl) διαλύματος καταβυθιστικού (δεξαμενή) και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς δημιουργώντας έτσι ένα απομονωμένο σύστημα όπου δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ύλης και ενέργειας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση του καταβυθιστικού στη σταγόνα να έχει συγκέντρωση 50% αυτού στη δεξαμενή, και για την αποκατάσταση της ισορροπίας απομακρύνονται μόρια νερού από το αραιό διάλυμα, δηλαδή την σταγόνα και μετατοπίζεται προς τη δεξαμενή μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία. Καθώς συμβαίνει αυτό, η σταγόνα σε κάποιο σημείο φτάνει στη βέλτιστη συγκέντρωση, δηλαδή στη συγκέντρωση που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η κρυστάλλωση.

2. Τεχνική της επικαθίμενης σταγόνας (sitting drop)

Το σύστημα και πάλι απομονώνεται ώστε να μη συμβαίνει μεταφορά μάζας και ενέργειας προς το περιβάλλον. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ο σχετικά μικρός χρόνος που απαιτείται και η απλότητα της όλης διαδικασίας. Το μειονέκτημα είναι ότι

μερικές φορές οι κρύσταλλοι προσκολλούνται στο τοίχωμα του δοχείου και παραλαμβάνονται δύσκολα από τη σταγόνα.

3. Τεχνική Μικροδιαπίδωσης (Microdialysis Crystallization)

Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται σ' ένα κομβίο μικροδιαπίδωσης του οποίου το ανοικτό άκρο κλείνεται με μια ημιπερατή μεμβράνη μέσω της οποίας μπορεί να περάσει ο διαλύτης αλλά όχι η πρωτεΐνη. Το κομβίο στη συνέχεια εμβαπτίζεται στη δεξαμενή του καταβυθιστικού και λαμβάνει μέρος αργή διάχυση του καταβυθιστικού έως ότου η συγκέντρωση του στο πρωτεϊνικό διάλυμα εξισωθεί με τη συγκέντρωση του στη δεξαμενή. Εάν η ποσότητα της πρωτεΐνης είναι πολύ μικρή, αντί κομβίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί τριχοειδής σωλήνας, που τα δύο του άκρα κλείνονται με ημιδιαπερατή μεμβράνη.

Από προηγούμενη πειραματική προσπάθεια που είχε γίνει στο εργαστήριο μας από την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Άντρη Χατζηκυριάκου, υπό την επίβλεψη του Δρα Σπύρου Ζωγράφου, επιτεύχθηκε εν μέρει ο προσδιορισμός των αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης his-hCINAP. Είχε πραγματοποιηθεί σάρωση 100 διαφορετικών καταβυθιστικών διαλυμάτων από την εταιρεία Hampton (Crystal Screen I και II) και είχε προκύψει ότι οι συνθήκες που περιείχαν Li_2SO_4 και NH_4SO_2 ευνοούσαν τη δημιουργία κρυσταλλικού ιζήματος ή πολύ μικρών κρυστάλλων.

Στόχος της ερευνητικής μου εργασίας ήταν η βελτίωση των συνθηκών αυτών και η προσπάθεια κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης hCINAP χωρίς το επιτόπιο της εξα-ιστιδίνης (his_6), για βελτίωση πιθανόν της ποιότητας των κρυστάλλων.

Π4.2 Συνθήκες κρυστάλλωσης που δοκιμάστηκαν

Αρχικά, για τον προσδιορισμό των συνθηκών κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης hCINAP χρησιμοποιήθηκαν 100 διαφορετικά διαλύματα καταβυθιστικών από την εταιρεία Hampton (Crystal Screen I και II) και μεταβλήθηκαν διάφορες συνδυαστικές παράμετροι:

- i) Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν όπως είχαν ή αραιώθηκαν κατά το ήμισυ με ddH₂O.
- ii) Χρησιμοποιήθηκαν ως τεχνικές κρυστάλλωσης, τόσο η τεχνική της κρεμμάμενης σταγόνας, όσο και της επικαθίμενης.
- iii) Δύο διαφορετικές θερμοκρασίες για όλες τις περιπτώσεις, θερμοκρασία δωματίου (RT) και 4 °C.

iv) Διαφορετική συγκέντρωση πρωτεΐνης his-hCINAP (2-15 mg/ml).

Μετά από πάροδο 40 ημερών παρατηρήθηκαν «ενδείξεις για κρυστάλλους» στις συνθήκες (6, 17 και 18) του Crystal Screen I:

Συνθήκη 6: 30% MPD, 0.1M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl₂ (RT)

Συνθήκη 17: 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Li₂SO₄ (RT)

Συνθήκη 18: 20% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M NH₄SO₂ (4 °C).

Μετά από αυτές τις ενδείξεις, παρασκευάστηκαν διάφορα διαλύματα με διάφορες μεταβλητές παραμέτρους:

- i) Μεταβολή του pH του διαλύματος.
- ii) Μεταβολή της συγκέντρωσης του καταβυθιστικού.
- iii) Μεταβολή του PEG (400, 2000, 4000, 6000)
- iv) Μεταβολή της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος.

Πραγματοποιήθηκαν εκ νέου κρυσταλλώσεις, σε θερμοκρασία δωματίου, 18 °C και 4 °C και επιπλέον στις υποσχόμενες συνθήκες δοκιμάστηκαν διάφορα πρόσθετα όπως:

- i) AMP, ii) ATP, iii) MgCl₂ και iv) διάφορα απορρυπαντικά (πχ tween και triton).

Τελικά επιτεύχθηκαν κρύσταλλοι που είχαν τη μορφή δεματίων βελόνων (Σχήμα Π6) με τη τεχνική επικαθίμενης σταγόνας, στους 18 °C και συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 mg/ml στις εξής συνθήκες:

- 0.1 M HEPES pH 8.0, 0.4 M Li₂SO₄ (μεγαλύτερες)
- 0.1 M Tris HCl pH 8.0, 0.4 M Li₂SO₄
- 0.1 M HEPES pH 7, 0.8M NH₄SO₂
- 0.1 M Tris HCl pH 8.0, 0.8M NH₄SO₂
- 30% 2-μεθυλ-1,3-προπανοδιόλη (MPD), 0.1M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl₂, και με πρόσθετο στη σταγόνα 0.5 mM MgCl₂ + 0.5 mM AMP.



Σχήμα Π6: Κρύσταλλοι της hCINAP υπό μορφή δεματίων βελόνων.

Από τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα φαίνεται ότι ήμασταν πολύ κοντά στις συνθήκες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης. Ο Ren και οι συνεργάτες κατόρθωσαν να πάρουν κρυστάλλους σε διάλυμα που αποτελείτο από 0.1 M HEPES pH 7.5 και 1.44 M Li₂SO₄. Εκείνο που διαφοροποίησε τις δικές τους προσπάθειες από τις δικές μας, είναι ότι χρησιμοποίησαν για κρυστάλλωση μόνο την τρίτη κορυφή έκλουσης της πρωτεΐνης hCINAP από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Στο χρωματογράφημα, η πρωτεΐνη εκλύεται σε τρεις κορυφές. Η πρώτη κορυφή περιέχει προσμίξεις, η δεύτερη πιθανόν να αποτελεί ολιγομερές της πρωτεΐνης, ενώ το τρίτο, που αποτελεί το μονομερές της πρωτεΐνης ήταν το μόνο ικανό κλάσμα που μπορούσε να δώσει κρυστάλλους (Ren et al., 2004).

Στη δική μας περίπτωση, λόγω έλλειψης ανιχνευτή στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, χρησιμοποιείτο το άθροισμα του δεύτερου και τρίτου κλάσματος, ενώ απομακρυνόταν το πρώτο κλάσμα, που ήταν ορατό στο ηλεκτροφόρημα πολυακρυαμιδίου.

Characterization of hCINAP, a Novel Coilin-interacting Protein Encoded by a Transcript from the Transcription Factor TAFII₃₂ Locus^{*[5]}

Received for publication, February 22, 2005, and in revised form, July 5, 2005. Published, JBC Papers in Press, August 2, 2005, DOI 10.1074/jbc.M501982200

Niovi Santama^{†1}, Stephen C. Ogg[§], Anna Malekkou[‡], Spyros E. Zographos[‡], Karsten Weis[¶], and Angus I. Lamond^{§2}

From the [†]Department of Biological Sciences, University of Cyprus and Cyprus Institute of Neurology and Genetics, P.O. Box 20537, 1678 Nicosia, Cyprus, the [§]Division of Gene Regulation and Expression, University of Dundee, MSI/WTB Complex, Dundee DD1 5EH, Scotland, United Kingdom, and the [¶]Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, California 94720-3200

Coilin is a marker protein for the Cajal body, a subnuclear domain acting as a site for assembly and maturation of nuclear RNA-protein complexes. Using a yeast two-hybrid screen to identify coilin-interacting proteins, we have identified hCINAP (human coilin interacting nuclear ATPase protein), a nuclear factor of 172 amino acids with a P-loop nucleotide binding motif and ATPase activity. The hCINAP protein sequence is highly conserved across its full-length from human to plants and yeast and is ubiquitously expressed in all human tissues and cell lines tested. The yeast orthologue of CINAP is a single copy, essential gene. Tagged hCINAP is present in complexes containing coilin in mammalian cells and recombinant, *Escherichia coli* expressed hCINAP binds directly to coilin *in vitro*. The 214 carboxyl-terminal residues of coilin appear essential for the interaction with hCINAP. Both immunofluorescence and fluorescent protein tagging show that hCINAP is specifically nuclear and distributed in a widespread, diffuse nucleoplasmic pattern, excluding nucleoli, with some concentration also in Cajal bodies. Overexpression of hCINAP in HeLa cells results in a decrease in the average number of Cajal bodies per nucleus, consistent with it affecting either the stability of Cajal bodies and/or their rate of assembly. The hCINAP mRNA is an alternatively spliced transcript from the TAF9 locus, which encodes the basal transcription factor subunit TAFII₃₂. However, hCINAP and TAFII₃₂ mRNAs are translated from different ATG codons and use distinct reading frames, resulting in them having no identity in their respective protein sequences.

Cajal bodies are subnuclear domains that contain newly imported snRNP³ and snoRNP complexes, as well as certain transcription factors.

* This work was funded in part by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (Project Grant 94/C12944), in part by Research Training Network Grant HPRN-CT-2000-00079 from the European Union and in part by grant ENISX0603/03 from the Research Promotion Foundation (Cyprus). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S3.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AJ87888 and AJ87881.

¹ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 357-22-392-757; Fax: 357-22-358-237; E-mail: santama@ucy.ac.cy.

² Supported by a Wellcome Trust Principal Research Fellowship. To whom correspondence may be addressed. Tel.: 44-1382-345-473; Fax: 44-1382-345-695; E-mail: a.i.lamond@lifesci.dundee.ac.uk.

³ The abbreviations used are: snRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; hCINAP, human coilin-interacting nuclear ATPase protein; mAb, monoclonal antibody; RT, reverse transcription; ORF, open reading frame; YFP, yellow fluorescent protein; IPTG, isopropylgalactopyranoside; PBS, phosphate-buffered saline; GST, glutathione S-transferase; Pipes, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid.

They are thought to be centers for the maturation of these nuclear RNA-protein complexes that are en route to their sites of function in the nucleoplasm and nucleolus, respectively (for review see Ref. 1). Although Cajal bodies do not contain DNA, they have been shown to associate specifically with certain gene loci, including the histone and U snRNA gene clusters (2–4). In the case of the U2 genes, studies on stable cell lines containing arrays of exogenous U2 genes showed that Cajal body association was dependent on the expression of the U2 snRNA transcripts, rather than on the presence of specific DNA sequences in the U2 genes (2). It is possible that Cajal bodies can regulate gene expression from certain loci and/or deliver RNA processing factors or other components required for efficient expression at these sites.

Coilin is a human autoantigen that is widely used as a marker protein for Cajal bodies. It is a specifically nuclear protein that is modified by both serine phosphorylation and symmetrical dimethylation of arginine. Coilin shows a diffuse nucleoplasmic distribution but also concentrates within Cajal bodies, appearing as one or more bright nuclear foci when analyzed by immunofluorescence. Analysis of a mouse knock-out of coilin has revealed that coilin $-/-$ cells are viable in culture, although animals lacking coilin show a decrease in embryonic viability, as judged by the reduced ratios of coilin $-/-$ mice recovered in litters (5). The coilin $-/-$ cells lack normal Cajal bodies but instead have microbodies containing a subset of the usual Cajal body components. Deletion mutants of coilin can disrupt endogenous Cajal bodies when transiently expressed in mammalian cells (6, 7). Coilin is a self-interacting protein, dependent upon sequences in the first 92 amino-terminal residues (8). These data indicate that coilin is likely to play a functional role in the formation of wild type Cajal bodies.

Several proteins have been shown to bind directly to coilin, including the survival of motor neurons (SMN) protein (7), the nucleolar shuttling factor NOPP140 (9), and the α importins (10), which are adaptors involved in nuclear import. In the case of the SMN protein, its binding to coilin is dependent on the presence in coilin of symmetrical dimethyl arginine residues, a modification shared with the Sm family of snRNP proteins, which also localize in Cajal bodies (11). In the case of NOPP140, it has been shown that deletion mutants removing the amino-terminal portion of NOPP140, which no longer bind to coilin, have a dominant negative effect on Cajal body formation when exogenously expressed in mammalian cells (9). These data support the important role of coilin in Cajal body formation and further indicate that the mechanisms involved likely require the interaction of coilin with other partner proteins.

To search for novel interaction partners for coilin we have conducted a yeast two-hybrid screen using coilin as the bait. Here we report the

hCINAP Is a Coilin-interacting Protein

molecular characterization of hCINAP, a highly conserved nuclear protein that we show binds directly to coilin.

MATERIALS AND METHODS

Cell Line—HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum (BD Biosciences), 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin and maintained at 37 °C in 5% CO₂.

Antibodies—Rabbit polyclonal antibodies to full-length, His₆-tagged hCINAP were generated at the EMBL animal facility, and by Diagnostics Scotland (Edinburgh, UK). A second rabbit polyclonal antibody, to synthetic peptide DQLKWIEQWIKDHNS, corresponding to amino acid residues 157–175 in hCINAP, was also generated at the EMBL facility. For both antibodies, the specificity of the antiserum from the third bleed was characterized by Western blotting (Fig. 4, and data not shown) and these batches were used for the experiments described here (1:400 dilution for Western blotting and immunofluorescence with the anti-recombinant protein antibody, 1:400 for blotting and 1:200 for immunofluorescence with the anti-peptide antibody).

The following primary antibodies were used: rabbit anti-coilin 204/5 (6), mouse anti-coilin monoclonal antibody (mAb) δ 4 (12), rabbit anti-U1A 856 (13), rabbit anti-fibrillarin Fib42, rabbit anti-SMN (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Sm mAb Y12, rabbit anti-Sp100 (Chemicon), and mouse mAb 9E10 (anti-myc) (14).

The following secondary antibodies were used (Dianova, Hamburg, Germany): fluorescein isothiocyanate-conjugated, donkey anti-mouse IgG, Texas Red-conjugated, goat anti-mouse IgG+M, fluorescein isothiocyanate-conjugated, donkey anti-rabbit IgG, and rhodamine-conjugated, donkey anti-rabbit IgG.

Oligonucleotides—The following oligonucleotides were used in polymerase chain reaction (PCR) amplifications: oligonucleotide 1, 5'-cgggaattcatgttgcttccgaacatcctg-3'; oligonucleotide 2, 5'-ccagactccatgatatccgatgatc-3'; oligonucleotide 3, 5'-accgtcgacttaagtagctagcttataag-3'; oligonucleotide 4, 5'-acattcagcaaggctagattacag-3'; oligonucleotide 5, 5'-acaccaaagtgtcccttac-3'; oligonucleotide 6, 5'-taattgtgggtgattagctcgagaag-3'; oligonucleotide 7, 5'-cttcattgacctcaactacatggt-3'; and oligonucleotide 8, 5'-tcattgatgaccttggccagg-3'.

Two-hybrid System Analysis—Vectors and yeast strains for the two-hybrid analysis were used as described by Brent and coworkers (15), and β -galactosidase assays were performed as reported (16, 17). A HeLa cDNA library was used to generate the activation domain fusion constructs. Interacting clones were identified as described (10). For mapping the CINAP interaction domain on coilin, deletion constructs of coilin (as shown in Fig. 7) were subcloned either as restriction- or PCR-amplified fragments in yeast vector pGBKT7 or vector pACT2 for construct C1. They were each tested for interaction by co-transformation in yeast strain AH109 with full-length hCINAP in yeast vector pACT2 (or in pGBKT7 for testing with C1), followed by screening of reporter gene expression on appropriate selective media. First, transformants were selected with double selection on media lacking leucine and tryptophan and then transferred to quadruple selection on media also lacking adenine and histidine. Clones that were viable on quadruple selection were subjected to colony β -galactosidase assay for confirmation of the interaction. For independent confirmation of the interaction, coilin constructs were in vitro transcribed and translated in the presence of [³⁵S]methionine and incubated either with lysate from bacteria expressing glutathione *S*-transferase (GST)-tagged full-length CINAP after induction with 1 mM IPTG or without induction as negative control. Proteins interacting with GST-CINAP were recovered by glutathione-agarose pull-down and subjected to SDS-PAGE, followed by autoradiography to detect coilin fragments.

RT-PCR, Semiquantitative RT-PCR for the TAF9 Locus Transcripts, and PCR on Genomic DNA—cDNA was synthesized from 1 μ g of purified human placenta poly(A)⁺ RNA (Clontech) and served as a template for the amplification of the complete ORF of hCINAP with oligonucleotides 1 and 3. The amplified product was digested with EcoRI/Sall, cloned into Bluescript, and sequenced.

For semiquantitative RT-PCR, poly(A)⁺ RNA was extracted from human tissues or human cell lines with the Oligotex mRNA mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. To evaluate the efficacy of RT-PCR conditions with the various tissues, and compare the hybridization efficiency of the two sets of oligonucleotides used for the experiments shown in Fig. 3 (*B* and *E*) (one set specific for the hCINAP transcript and two sets specific for the TAFII₃₂ transcript), control reactions with plasmid DNA were performed. Reactions were carried out in parallel with identical conditions, using 20 ng of plasmid as template with either TAFII₃₂- or hCINAP-specific oligonucleotides of the same concentration at 18, 23, and 28 cycles. The results indicated that, in the linear range of the reaction (achieved between 18 and 23 cycles), the concentration of two types of products is comparable (supplementary Fig. S2). Semiquantitative RT-PCR was therefore subsequently performed with the same PCR conditions (except for the increased number of cycles that were necessary to detect the amplified product from cDNA samples). Control reactions using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-specific oligonucleotides were run in parallel as internal standards.

For the amplification of human genomic sequences, purified high molecular weight human genomic DNA (Roche Applied Science) was used as a template and PCR reactions, with a variety of oligonucleotides (see "Oligonucleotides") were carried out with the Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science), following the exact reaction and amplification instructions of the manufacturer. PCR products were directly cloned into vector pCR2.1, using the Original T/A cloning kit (Invitrogen). DNA sequencing was performed by the EMBL sequencing service.

Construction of Bacterial Expression and Mammalian Transfection Vectors—The bacterial expression vector pRSET_B-hCINAP was constructed by an in-frame EcoRI/Sall insertion of hCINAP, excised from Bluescript (see previous section) to vector pRSET_B (Invitrogen). This created a 5' His₆-tagged version of hCINAP. The same hCINAP insert was also ligated to expression vector pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences) to generate GST-tagged hCINAP. To create YFP-hCINAP, we made a vector fragment derived from pEYFP-C1 (BD biosciences) by digestion with BglII and HindIII. An insert fragment containing hCINAP was derived from pRSET_B-hCINAP by digestion with BglII and HindIII.

Bacterial Expression and Purification of His₆-hCINAP—Competent BL21-pLysS strain of *E. coli* was transformed with pRSET_B-hCINAP. Large cultures were induced with 1 mM IPTG during exponential growth in LB at 37 °C and harvested 3 h post-induction. The bacterial pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0, 10% glycerol, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.5% Triton X-100, 10 mM imidazole, and 1 tablet/50 ml of Complete protease inhibitor (Roche Applied Science), mechanically lysed with a French press and centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C. The insoluble pellet was resuspended in buffer B (as per lysis buffer but with 100 mM NaH₂PO₄ instead of NaCl), containing 6 M guanidinium HCl, and the recombinant protein was purified over a nickel-nitrilotriacetic acid column (Qiagen) under denaturing conditions, according to the manufacturer's instructions. For animal immunization, the purified protein was dialyzed extensively against PBS.

The same construct was used for the production of soluble protein, suitable for enzyme kinetic experiments, with culture growth at 30 °C for 5 h after induction with 0.5 mM IPTG. This resulted in the production of 30–40 mg of soluble His₆-hCINAP/liter. The recombinant protein was affinity purified over a nickel-nitrilotriacetic acid column, followed by gel filtration through a Superdex-200 column (Amersham Biosciences), equilibrated in 25 mM Hepes, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 2 mM MgCl₂, and 5 mM β-mercaptoethanol, and desalted by dialysis. It was stored at –20 °C in a buffer containing 12.5 mM Hepes, pH 7.5, 12.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM β-mercaptoethanol, and 50% glycerol for use in ATPase assays.

ATPase Assays with His₆-hCINAP—The ATP hydrolysis activity of hCINAP was measured by an assay in which ADP production is coupled to the β-NADH oxidation by pyruvate kinase and L-lactic dehydrogenase (18). The rate of β-NADH disappearance was monitored at 340 nm, and all enzymatic reactions were performed at 30 °C. The final assay mixture was 75 mM Tris-HCl, pH 8.0, 65 mM KCl, 0.2 mM β-NADH, 1 mM phenyl enol pyruvate, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 20 units/ml pyruvate kinase (Sigma), 20 units/ml L-lactic dehydrogenase (Sigma), 3 μg/ml CINAP, and 0.05–1 mM ATP. Control samples, containing reaction mixture without CINAP, were used to subtract background ATP hydrolysis, mainly due to the activity of pyruvate kinase. Kinetic data were analyzed with the use of the nonlinear regression program GraFit. Calculations of molarity were based on a molar extinction coefficient of 6220 M⁻¹ cm⁻¹ for β-NADH at 340 nm.

In Vitro Co-selection Experiments—Plasmid pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences) was used for expression of hCINAP as a GST fusion protein and pET32a+ (Novagen) was used for expression of p80-coilin as a His₆ and thioredoxin fusion. Bacterial expression was carried out as described in the previous section with culture growth at 25 °C. Two-milliliter aliquots of bacterial cultures were collected 3 h post-induction, bacterial pellets were resuspended in 200 μl of binding buffer (PBS, containing 1% (v/v) Tween 20 and 1 tablet/50 ml Complete protease inhibitor, Roche Applied Science) and lysed by brief sonication. After clarification of bacterial lysates (13,000 rpm at 4 °C for 15 min), GST-hCINAP, and His₆-coilin were mixed in the presence of 0, 1, 2, and 3 mM ATP, respectively, and incubated for 30 min at room temperature with constant agitation. An equal volume of pre-equilibrated glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences) were then added into each protein mix, and the solution was incubated with gentle agitation at room temperature for 30 min. The beads with bound complexes were collected by centrifugation at 500 rpm for 5 min. The supernatant (unbound fraction) was saved for analysis. Beads were washed with ice-cold binding buffer, resuspended in SDS sample buffer, and analyzed, together with the unbound fractions, by SDS-PAGE, and Western blotting.

In Vivo Co-immunoprecipitation Experiments—HeLa cells were transiently transfected with the pEYFP-hCINAP construct (details below) using Effectene (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. One microgram of plasmid DNA was used per 10-cm dish, 18 h after transfection the dishes were rinsed 2× with warm PBS, and cells were lysed with 0.5 ml/dish Lysis Buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1% v/v Nonidet P-40, 1% w/v deoxycholic acid, 0.1% w/v SDS, 2 mM EDTA, and 1 tablet/10 ml protease inhibitor Complete, Roche Applied Science). The cell lysate was scraped into a 1.5-ml Eppendorf tube, and the DNA was sheared to reduce the viscosity by processing with a QIAshredder (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The lysate was precleared by incubating with protein G-Sepharose for 1 h at 4 °C. After brief centrifugation to remove the protein G-Sepharose, the precleared extract was transferred to a new

tube, and then 1 μl of anti-green fluorescent protein monoclonal antibody (Roche Applied Science) was added. Incubation at 4 °C for 1 h allowed formation of immune complexes, which were subsequently recovered by adding protein G-Sepharose and rotating overnight at 4 °C. Protein G-Sepharose beads containing the immune complexes were separated from the supernatant by centrifugation and washed. Finally, proteins in both the supernatant and pellet fraction were denatured with SDS sample buffer and separated by SDS-PAGE. After transfer to nitrocellulose, the blot was probed with an antibody against coilin followed by incubation with a second anti-rabbit antibody coupled to HRP (Pierce, 1:5000).

Standard Molecular Biology and Protein Analysis Techniques—All molecular biology techniques (cDNA library screening, plasmid purifications, restriction digests, ligations, blue/white bacterial colony selection, Northern blotting, and others) were performed according to standard procedures (19).

SDS-PAGE on a mini-gel system (Protean, Bio-Rad) or using gradient "Novex" gels from Invitrogen was essentially as described (20). Western blotting was carried out using standard techniques and visualized by the enhanced chemiluminescence system, ECL-Plus (Amersham Biosciences). HeLa nuclear extracts were obtained commercially from the Computer Cell Culture Center (Mons, Belgium)

Transient Transfections of Tagged hCINAP in HeLa Cell Line—Exponentially growing HeLa cultures were harvested and replated onto coverslips in 60-mm diameter dishes, 24 h prior to transfection. Transfections were carried out with the DOTAP reagent (Roche Applied Science) or with Effectene (Qiagen), according to the manufacturer's instructions in each case or with calcium phosphate precipitation (lamondlab.com/f6protocols.htm). Coverslips were retrieved for immunofluorescence 16–20 h after removal of the transfection medium.

Immunolabeling of Cultured Cells—For hCINAP immunofluorescence, using the antiserum to hCINAP recombinant protein or the anti-peptide antiserum, cells grown on glass coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PHEM buffer (30 mM Hepes, 65 mM Pipes, pH 6.9, 10 mM EGTA, and 2 mM MgCl₂) for 10 min and permeabilized for 15 min with 0.2% SDS in the same buffer. Transfected cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PHEM buffer for 10 min. They were quenched with 50 mM NH₄Cl in PBS for 10 min, permeabilized for 10 min with 0.5% Triton X-100 in PHEM buffer, and blocked with 2% BSA, 2% fetal calf serum, 0.2% fish skin gelatin in PBS ("blocking mix") for 30 min.

Cells were incubated with primary antibodies, in PBS containing 5% blocking mix, for 1 h at room temperature. For double labeling, incubation was carried out sequentially for each of the primary antibodies and secondary antibodies were applied as a mixture. Coverslips were mounted with Mowiol (Merck, Germany), containing 100 mg/ml DABCO (Sigma, Germany) as an anti-fading agent.

Confocal and Epifluorescence Microscopy—Immunofluorescent preparations were analyzed on the EMBL Compact Confocal Microscope (21) or a Zeiss Axiophot light microscope. Excitation wavelengths of 476 nm (for fluorescein isothiocyanate-coupled antibodies) or 594 nm (Texas Red-coupled antibodies) were selected.

Some images presented in Figs. 5 and 8A were recorded on a Zeiss Axiovert S100 2TV DeltaVision Restoration microscope (Applied Precision) using either a Zeiss Plan-apochromat (100×, 1.40 numerical aperture objective) or a Zeiss Plan-neofluar (40×, 1.30 numerical aperture objective) and a CCD-1300-Y/HS camera (Roper Scientific). Images were captured and processed by constrained iterative deconvolution using SoftWorx (Applied Precision) and prepared as illustrations using Adobe Photoshop. Two-dimensional images presented here are

hCINAP Is a Coilin-interacting Protein

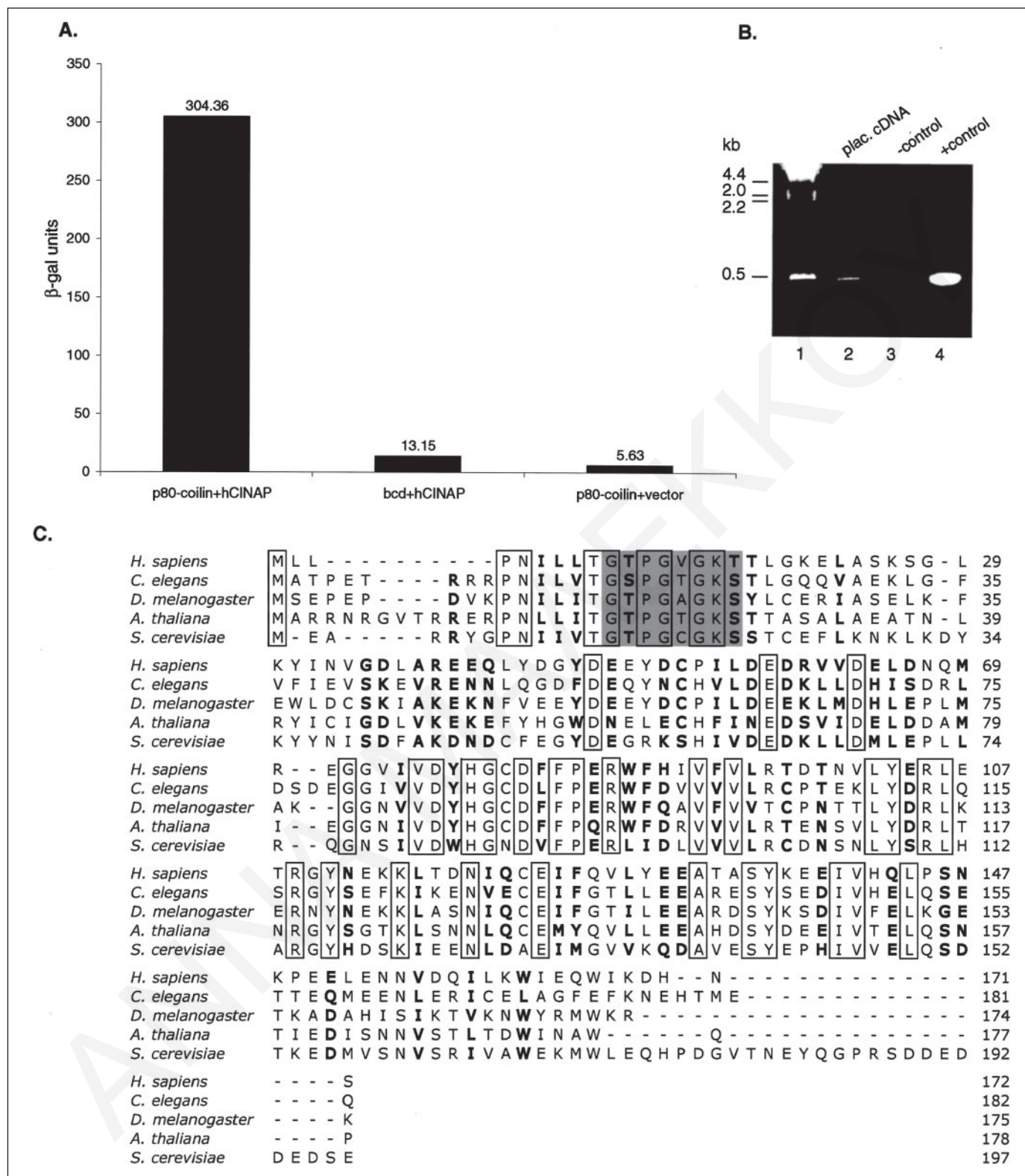
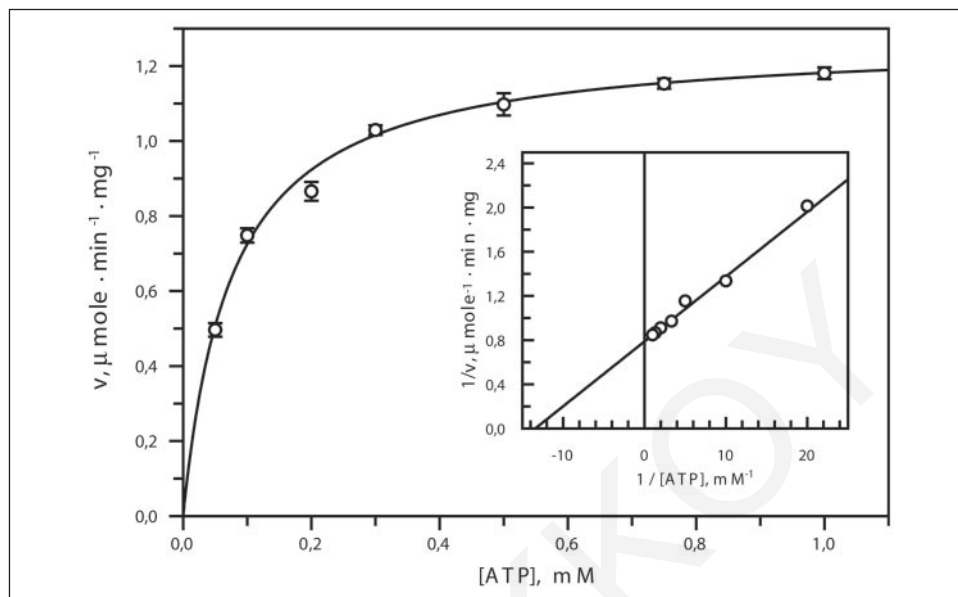


FIGURE 1. A, identification of hCINAP, a protein that interacts specifically with p80-coilin in the yeast two-hybrid assay. Two-hybrid interactions between LexA-p80 coilin (lanes 1 and 3) and either a hCINAP-B42 hybrid protein (lane 1) or the B42 transcriptional activation domain alone (lane 3) were analyzed by liquid β -galactosidase assays. As a negative control, the interaction between the hCINAP-B42 hybrid and the unrelated LexA-bcd fusion protein was included (lane 2). For each experiment, the β -galactosidase activity was determined two times from individual cultures, and β -galactosidase units were calculated as described under "Materials and Methods." B, cloning by RT-PCR and sequencing of hCINAP from human placenta: 1, λ /HindIII MW markers; 2, amplified product from human placenta cDNA using oligonucleotides 1 and 3; 3, identical reaction with no cDNA template; 4, identical reaction with 15 ng of pR_{SETB}-hCINAP_{HeLa} as template. The sequence derived from the cloned product in lane 2 was identical to the sequence from the HeLa cDNA library in lane 4. C, alignment of CINAP protein from different organisms. Sequences were aligned using ClustalX and are represented by the single letter amino acid code. Sequences from human (*H. sapiens*, accession numbers AJ878880 and AJ878881), nematode (*C. elegans*, NP496065), fruit fly (*D. melanogaster*, NP610797), thale cress (*A. thaliana*, BAB10972), and baker's yeast (*S. cerevisiae*, AAS56894) are presented. Boxed residues are identical among these five sequences, residues in bold represent conservative amino acid substitutions, and the shaded sequence represents a conserved domain found in many ATP/GTP binding proteins (P-loop motif).

FIGURE 2. Enzymatic activity of CINAP with respect to ATP. Plot of Initial ATP hydrolysis velocities versus various ATP concentrations (0.05 to 1 mM). Best-fit curves were computer-generated by non-linear regression according to the Michaelis-Menten equation (GraFit). The apparent kinetic parameters determined by this method are as follows: the $K_m = 75.3 \pm 5 \mu\text{M}$ and $V_{\max} = 1.27 \pm 0.02 \mu\text{mol of ADP formed} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. *Inset*, double reciprocal plot of initial reaction velocities versus ATP concentration.



maximal intensity projections of three-dimensional volumes along the optical axis.

RESULTS

To identify novel coilin interacting proteins, a yeast two-hybrid screen was performed with a HeLa cDNA library, using human coilin as the bait. Two million colonies were screened and ninety positive clones identified, as previously described (10, 22). Among the ninety positive clones four overlapping cDNAs, encoding the same open reading frame, were isolated. An apparently full-length cDNA clone encoding this protein was used to quantify its interaction with coilin using a liquid β -galactosidase yeast two-hybrid assay (Fig. 1A). This showed a strong interaction of the hCINAP protein with coilin relative to the negative controls.

To ensure that the positive clones from the HeLa library encode a *bona fide* human protein, the transcript was amplified by PCR from human placental cDNA (Fig. 1B). This yielded a cDNA amplification product of identical size to the HeLa cDNA clone (Fig. 1B, compare lanes 2 and 4). DNA sequence analysis showed that both the original HeLa and the placental cDNA clones were identical. The sequences were deposited in the GenBankTM/EBI data base as accession numbers AJ878880 and AJ878881. We have termed the resulting gene product hCINAP (human coilin interacting nuclear ATPase protein), which is a 172-amino acid protein of molecular mass 20,048 Da. Fig. 1C shows the full protein sequence of hCINAP aligned with putative orthologues from other species spanning the major eukaryotic divide, including plants, flies, worms, and yeast. This shows that hCINAP is highly conserved from human to yeast across its entire length. Thus there is a 22% identity and ~46% overall similarity in amino acid sequence conserved between all orthologues in human, fly, nematode, plants, and yeast. A direct comparison of the human and *Saccharomyces cerevisiae* CINAP protein sequences shows that they are 41% identical and ~62% similar. The hCINAP gene is apparently unique and includes a consensus nucleotide (ATP or GTP) binding motif (GX₄GKT). Sequence comparison shows that hCINAP is not highly homologous to any other known proteins. It does however contain an amino-terminal P-loop motif characteristic of ATP/GTP binding proteins. This consensus motif is strictly conserved in all CINAP orthologues examined and is similar to the

adenylate kinase motif found in members of the adenylate kinase family. This similarity with adenylate kinase and in particular the conservation in the P-loop region, suggests that hCINAP likely binds ATP rather than GTP. Consistent with this prediction, we found that recombinant hCINAP shows ATP hydrolysis activity. A kinetic analysis of ATP hydrolysis with recombinant hCINAP was performed (Fig. 2). The K_m value for ATP was calculated to be $75.3 \pm 5 \mu\text{M}$, whereas the V_{\max} value was $1.27 \pm 0.2 \mu\text{mol of ADP formed} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Fig. 2). These results showed that hCINAP exhibits a significant ATPase activity and an apparent high affinity for ATP as a substrate.

The high primary sequence conservation of hCINAP, extending over the length of the protein, strongly suggests that it is functionally important. To test this we knocked out the corresponding orthologue of hCINAP in the budding yeast, *S. cerevisiae* and observed that it is essential (data not shown). This essential phenotype has also been independently described (23). These workers isolated the budding yeast hCINAP orthologue, which they termed Fap7p, as a factor required for transcriptional regulation of yeast genes upon oxidative stress. Based on its interaction with human coilin in the yeast two-hybrid assay, its essential phenotype in yeast, and its high sequence conservation, we therefore selected hCINAP for further analysis.

During our characterization of hCINAP, we noticed that the first 141 nucleotides of hCINAP mRNA, which encode the first 41 amino acids of hCINAP protein, were identical with the 5'-untranslated region of another human mRNA encoding subunit 9 of the transcription factor TAFIIID₃₂ (24). However, despite this common nucleotide sequence, hCINAP does not share any amino acid similarity with TAFIIID₃₂. This observation prompted us to investigate the genomic organization of hCINAP.

Examination of the Ensembl data base (www.ensembl.org) showed that the sequences of both the hCINAP and TAFIIID₃₂ transcripts arise from map position 68.7 Mb on chromosome 5 (annotated as the TAF9 locus, Ensembl Gene ID ENSG00000085231). The hCINAP and TAFIIID₃₂ mRNAs are generated as alternatively spliced transcripts that share exons 1 and 2, but diverge downstream of the XhoI site at nucleotide 141 (Fig. 3A). Translation of hCINAP initiates at the first ATG codon in the shared 5'-terminal region of the mRNA. In contrast, initiation of TAFIIID₃₂ starts at an internal ATG, which is located 18 nucle-

hCINAP Is a Coilin-interacting Protein

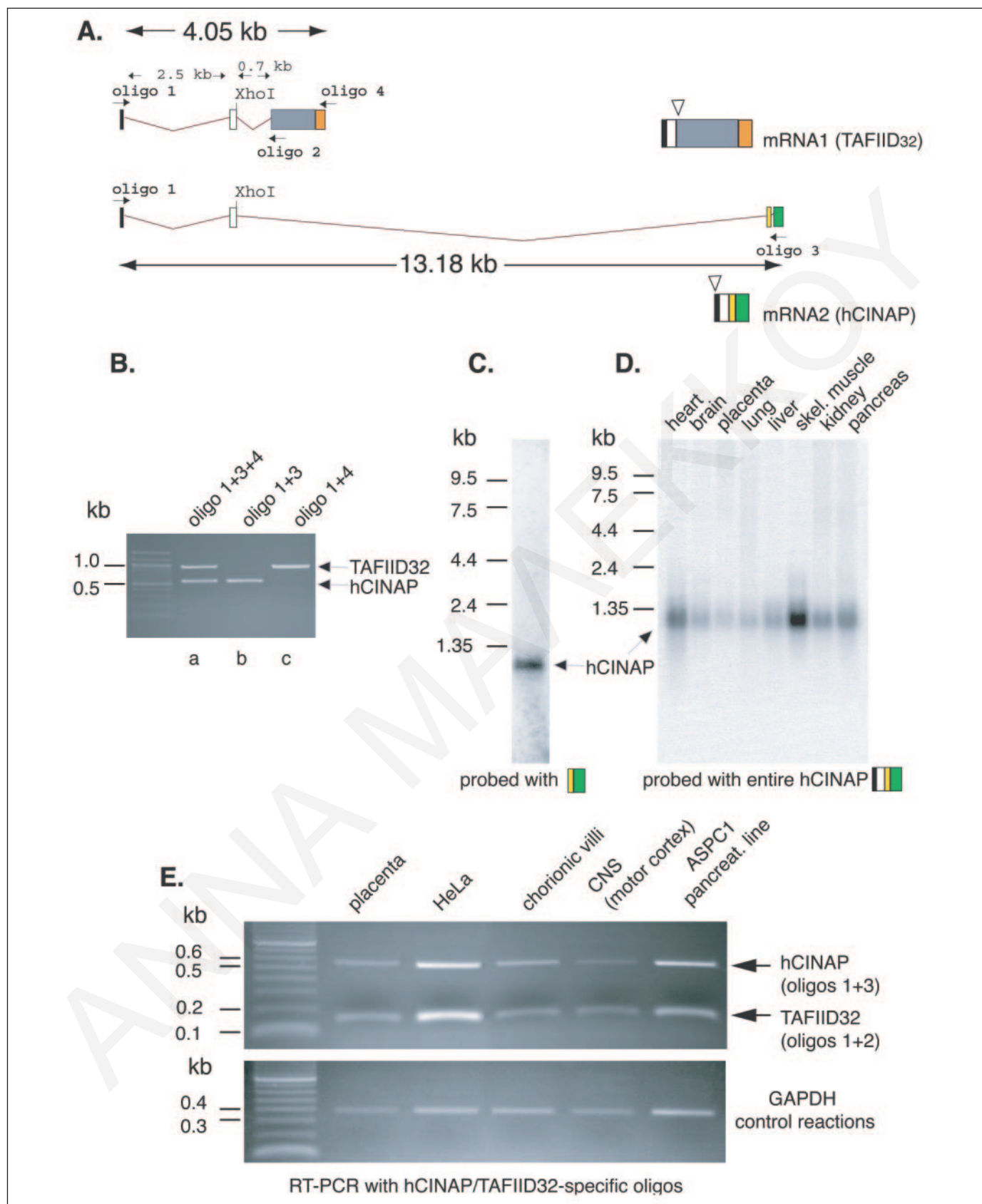
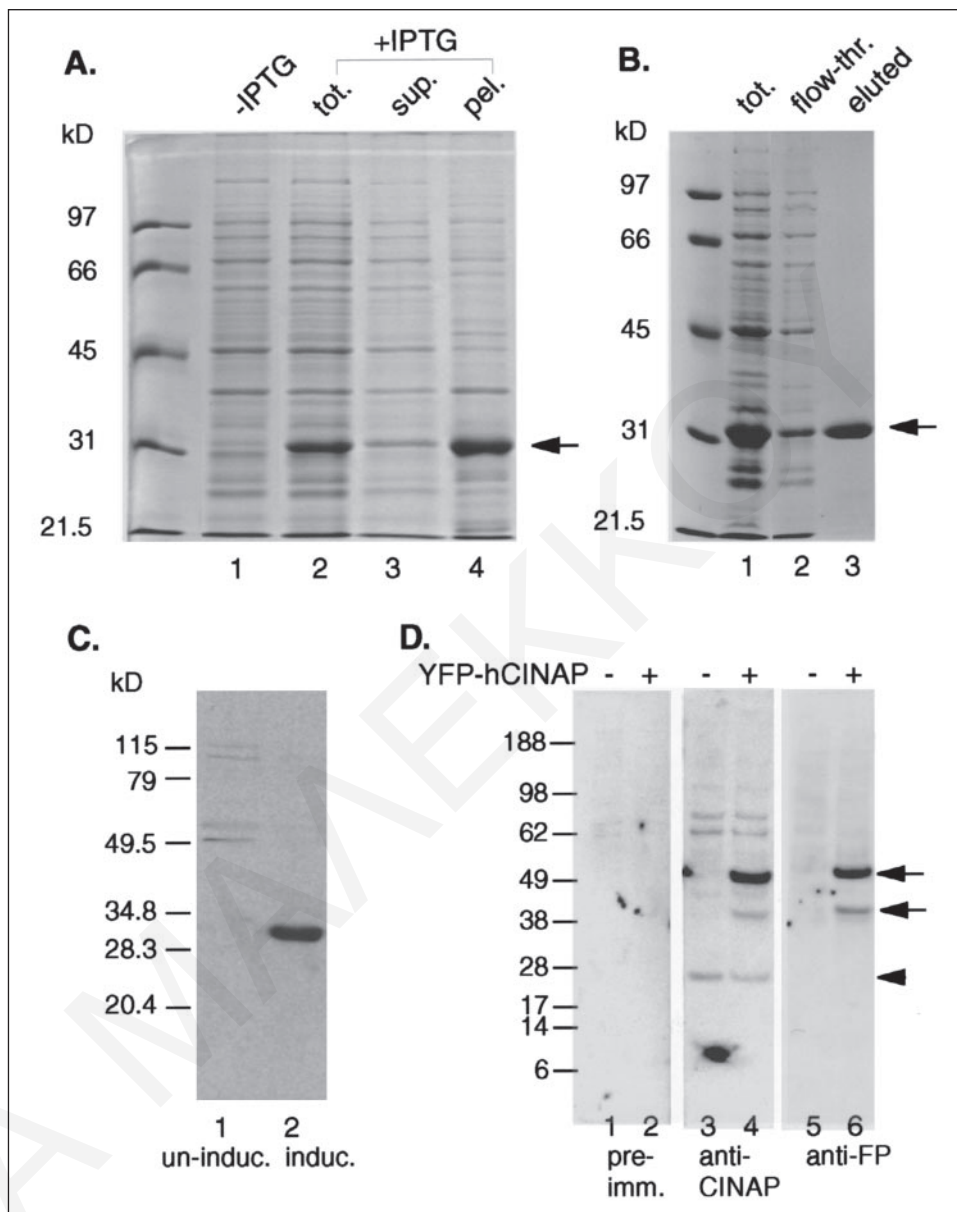


FIGURE 3. *A*, model of alternative splicing of two transcripts from the *TAF9* locus. Two transcripts, sharing two exons at their 5'-end are generated, the first encoding hCINAP and the second encoding TAFIID₃₂. Partial characterization of this locus, as shown in this schematic, was achieved with genomic PCR using exon- and intron-spanning oligonucleotides generating overlapping products for sequencing (oligonucleotides 1, 2, 5, and 6, see "Materials and Methods"; data not shown but available as supplemental Fig. S1). The positions of complementary sequences to oligonucleotides used for RT-PCR experiments (shown in *B* and *D*) are marked as well as the translation start sites for the two transcripts (open triangles). *B*, confirmation of the predicted transcripts for the *TAF9* locus by amplification with RT-PCR of cDNAs containing full-length ORFs. Simultaneous co-amplification of TAFIID₃₂

FIGURE 4. Recombinant and native expression and affinity purification of hCINAP. *A*, SDS-PAGE showing production of His₆-tagged hCINAP (arrow) in *E. coli* upon induction with IPTG: 1, total lysate from uninduced culture; 2, total culture lysate 3 h post-induction; 3, corresponding supernatant, following high speed centrifugation of lysate; 4, corresponding insoluble pellet. *B*, purification of His₆-tagged recombinant hCINAP on a Ni²⁺-agarose column (1) total culture lysate with overexpressed recombinant hCINAP; (2) flow-through fraction; (3) one of the eluted serial fractions (peak) containing purified hCINAP (arrow). Peak fractions were combined, dialyzed against PBS and used for rabbit immunization. *C*, Western blotting probed with hCINAP anti-peptide anti-serum, showing: a total bacterial lysate from an uninduced culture (1) and a total bacterial lysate from an induced culture (2). *D*, detection of endogenous hCINAP, and YFP-hCINAP by Western blot. Whole cell lysate from HeLa cells was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with antibodies specific for hCINAP (lanes 3 and 4), its cognate pre-immune serum (lanes 1 and 2), or green fluorescent protein (lanes 5 and 6). The lysate in lanes 1, 3, and 5 was from control cells, whereas the lysate in lanes 2, 4, and 6 was derived from HeLa cells transiently transfected with pEYFP-hCINAP. Arrow indicates the exogenously expressed YFP-hCINAP and breakdown products, whereas the arrowhead indicates endogenous hCINAP.



otides downstream of the shared 141 nucleotide 5' sequence and is therefore unique to TAFIIID₃₂ (Fig. 3A, *open triangles* indicate translation start sites). Although the TAFIIID₃₂ mRNA also has the same upstream ATG used by hCINAP, the downstream ATG actually used to initiate translation of TAFIIID₃₂ is in a different reading frame. Thus, it appears that, at the *TAF9* locus on chromosome 5, alternative splicing results in two transcripts that encode proteins with zero shared amino acid sequence, despite the common 5' region of the mRNA. This was a sufficiently unusual situation that we decided to verify the genomic organization and transcription pattern at the *TAF9* locus directly by

PCR analysis and DNA sequencing using human genomic DNA (supplementary Fig. S1). The data obtained were fully consistent with the transcript structures reported in the Ensembl annotation, although we also detected multiple apparent pseudogenes dispersed on different chromosomes (data not shown), again consistent with Ensembl annotations. Parallel RT-PCR data using probes either specific for hCINAP, or TAFIIID₃₂ ORF sequences, identified two cDNAs of the sizes expected for hCINAP and TAFIIID₃₂ (Fig. 3B). A combination of Northern blotting and semiquantitative RT-PCR analyses showed that both transcripts were expressed in all tissues and cell lines tested (Fig. 3,

(expected size 950 bp, EMBL accession number U21858) and hCINAP ORF (expected size 550 bp) utilizing a common upstream oligonucleotide (*oligo 1*, see "Materials and Methods") and downstream oligonucleotides 3 (specific for hCINAP) and 4 (specific for TAFIIID₃₂) (*lane a*) and for comparison single amplification of hCINAP (*lane b*) and single amplification of TAFIIID₃₂ (*lane c*). *C*, Northern blot of HeLa poly(A)⁺ RNA probed with a 3', hCINAP-specific, probe (nucleotides 118–550 of hCINAP transcript) reveals hybridization to a band below the 1.35-kb size marker (arrow), which is very likely to correspond to the hCINAP transcript. *D*, multitissue Northern blot using the whole of hCINAP cDNA as a probe, showing ubiquitous expression of hCINAP. *E*, semiquantitative RT-PCR with equivalent amounts of cDNA from different human tissues, using hCINAP- and TAFIIID₃₂-specific oligonucleotides (oligonucleotides 1 and 3 and oligonucleotides 1 and 2, respectively, see "Materials and Methods") to generate diagnostic full-length or partial cDNA products. Results indicate that the two cDNAs appear to be expressed in nearly equimolar concentrations in each tissue type but display a differential pattern of tissue-to-tissue expression. Control reactions using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-specific oligonucleotides (oligonucleotides 7 and 8, see "Materials and Methods") were run in parallel and are shown in the *bottom panel*. PCR conditions and oligonucleotide hybridization were tested to ascertain that RT-PCR results for the two DNAs are comparable (data not shown but included in supplemental Fig. S2).

hCINAP Is a Coilin-interacting Protein

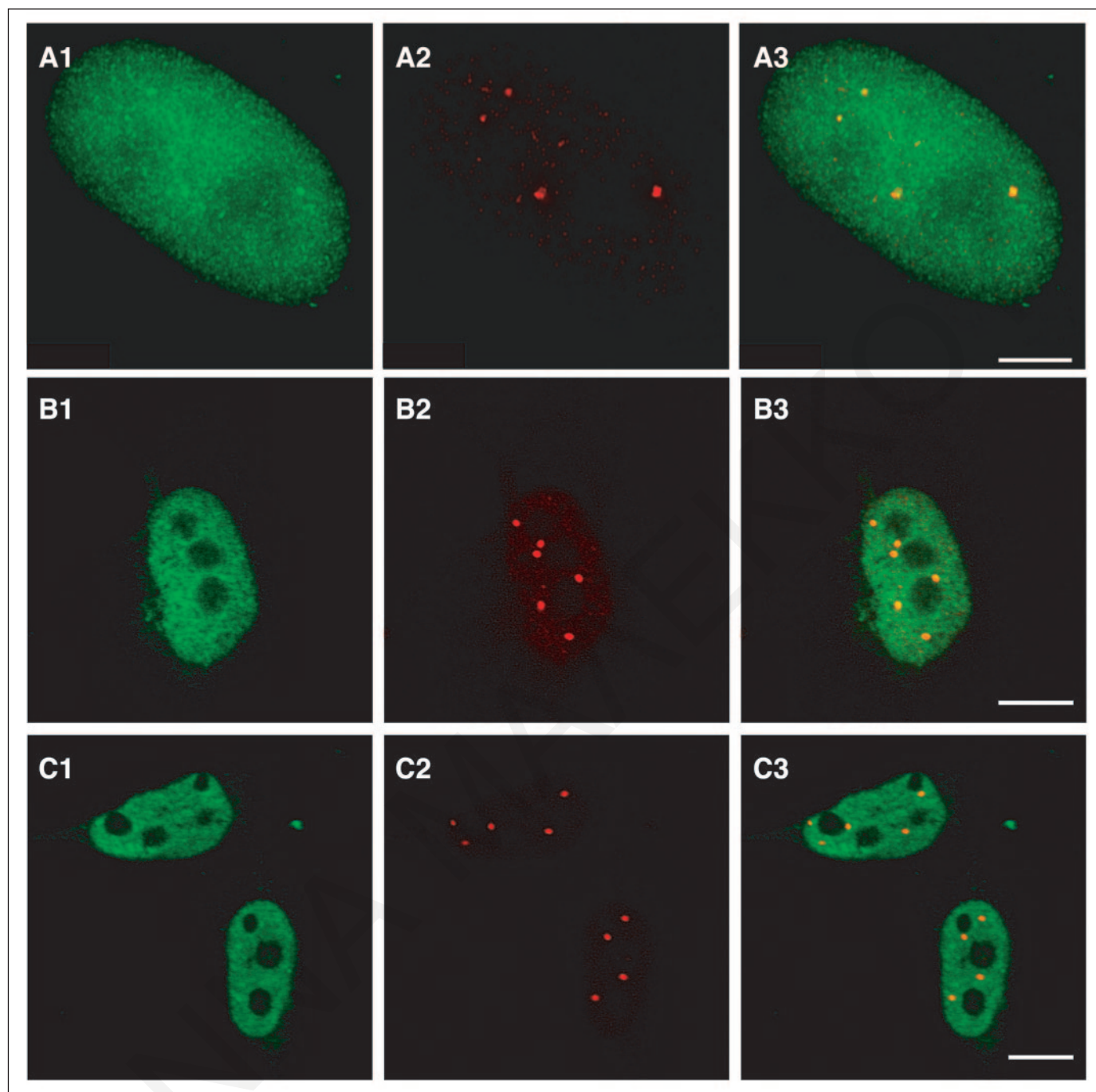


FIGURE 5. Immunolocalization of native and YFP-tagged hCINAP in HeLa cells. *A1*, YFP-hCINAP fluorescence; *A2*, the same cells stained with 204/5 anti-coilin; *A3*, overlay of images *A1* and *A2*; *B1*, anti-hCINAP staining using the antiserum to the whole recombinant protein; *B2*, anti-coilin; *B3*, overlay of images *B1* and *B2*; *C1*, anti-hCINAP staining, using anti-peptide antiserum; *C2*, the same cell stained with anti-coilin antiserum; *C3*, overlay of images *C1* and *C2*; Scale bar in all images: 5 μ m.

C–E). Preliminary phylogenetic analysis (data not shown) reveals that this unusual gene arrangement for hCINAP and TAFIID₃₂ is conserved in mammals, including specifically chimp, rat, mouse, and dog. However, it is not conserved in other vertebrates examined, including fish and amphibians. Outside of mammals, protein orthologues of both CINAP and TAFIID₃₂ are conserved, but they are encoded at separate loci. We thus conclude that the hCINAP protein is genetically but not physically related to TAFIID₃₂.

We next conducted a biochemical characterization of the hCINAP protein. First, recombinant hCINAP was expressed in *Escherichia coli*

fused at the amino terminus to a hexahistidine tag (Fig. 4, lanes 1 and 2). The *E. coli*-expressed protein was largely insoluble and co-fractionated with the bacterial pellet after cell lysis (lanes 3 and 4, arrow). Due to its insolubility, recombinant hCINAP was affinity-purified over a nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column under denaturing conditions, and the resulting purified protein (Fig. 4B, lane 3, arrow) used for antibody production in rabbits (see “Materials and Methods”). Protein blotting analysis using the resulting polyclonal rabbit antiserum showed that it recognized specifically both recombinant hCINAP and endogenous hCINAP in HeLa cell extracts and similar results were obtained using an

hCINAP Is a Coilin-interacting Protein

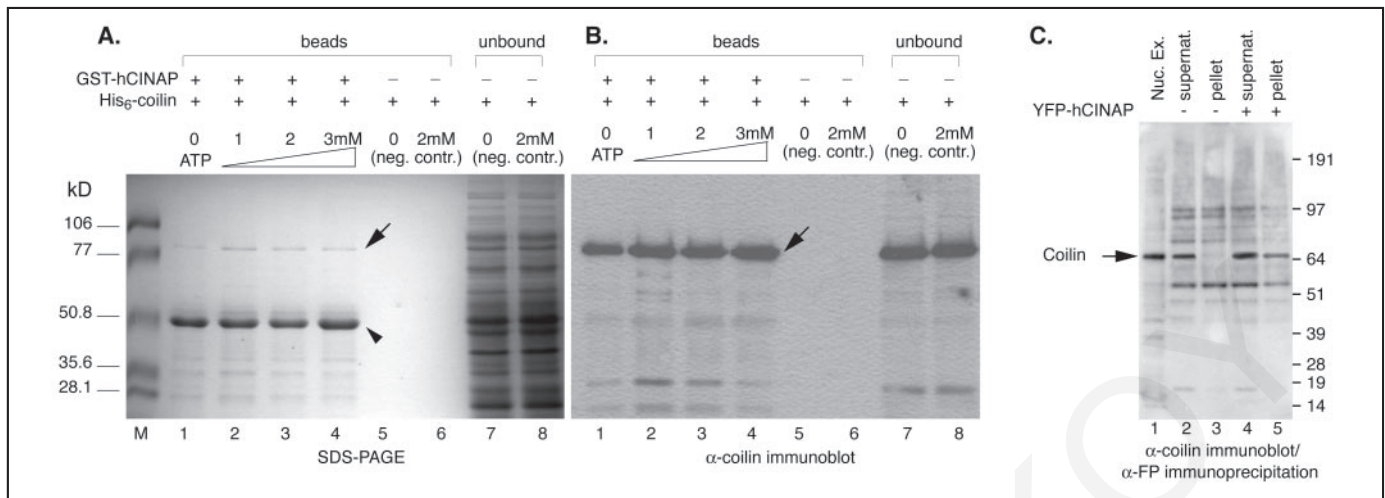


FIGURE 6. Co-selection and immunoprecipitation experiments indicating an interaction between hCINAP and coilin. *A*, recombinant GST-hCINAP and His₆-coilin were expressed in bacteria and probed for interaction in crude bacterial lysates, as described under "Materials and Methods." Complexes were immobilized on glutathione beads and analyzed by SDS-PAGE, followed by visualizing GST-hCINAP and His₆-coilin with Coomassie Blue. The molecular mass of recombinant coilin (native form is 66 kDa), expressed from vector pET2+, which bears in addition to the hexahistidine tag (0.66 kDa) a thioredoxin peptide (12 kDa), totals 78.66 kDa. *B*, immunoblotting of an identical gel, using anti-coilin antiserum for the detection of coilin. Reactions were carried out either in the absence or presence of ATP (1–3 mM). The results show that coilin is detectable on the glutathione beads only in the presence of hCINAP and hCINAP-coilin interaction appears to be ATP-independent. Arrows point to the band corresponding to His₆-coilin, and an arrowhead to the band corresponding to GST-hCINAP. *C*, detection of hCINAP-coilin interaction *in vivo*. HeLa extract from control cells (lanes 2 and 3) or cells transfected with YFP-hCINAP (lanes 4 and 5) was subjected to immunoprecipitation under native conditions using an anti-green fluorescent protein antibody to recover YFP-hCINAP and associated proteins. Bound (lanes 3 and 5) or unbound (lanes 2 and 4) fractions were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and native coilin was detected by immunoblotting using a rabbit anti-coilin antibody. As a marker for coilin, 5 μg of a nuclear extract prepared for *in vitro* splicing was also included on the gel (lane 1). The arrow indicates coilin band. Molecular weight markers are indicated.

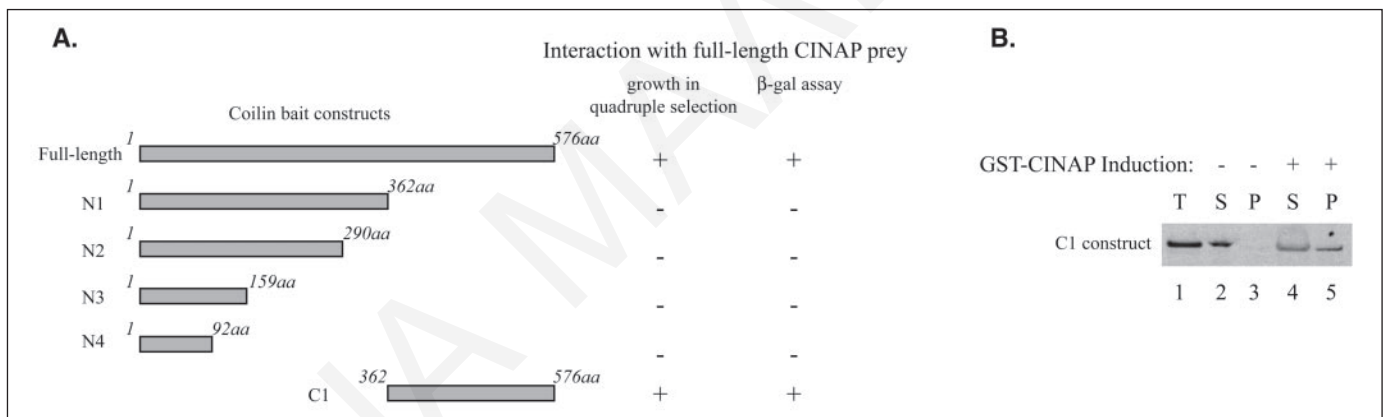


FIGURE 7. Mapping of the CINAP-interaction domain of coilin within the carboxyl-terminal 214 amino acid residues of coilin. *A*, yeast strain AH109 was simultaneously transformed with one of the six coilin bait constructs shown in conjunction with full-length hCINAP. Interaction was defined as the ability of >95% of resulting clones, containing both bait and prey constructs, to grow on quadruple selective media (-Leu, -Trp, -His, and -Ade) and to also display β-galactosidase activity upon filter assay. In addition to the interaction observed between full-length coilin and full-length CINAP (positive control), an additional positive result was obtained between coilin construct C1 and full-length CINAP. For validation of the later, negative controls included co-transformation of C1 and p53 (negative control 1) and of full-length CINAP and AD vector pACT2 (negative control 2), which failed the interaction tests. *B*, autoradiogram of *in vitro* translated coilin C1 fragment after SDS-PAGE, showing that the fragment interacts with GST-CINAP (lanes 4 and 5). Importantly, the C1 fragment is absent from the pellet of the pull-down (lane 3) when it is incubated with bacterial lysate of an uninduced culture that only contains negligible background concentration of GST-CINAP. T, total *in vitro* transcribed product; S, supernatant; P, pellet. The combination of these data revealed that an essential CINAP interaction domain lies within the carboxyl-terminal 214 amino acid residues of coilin.

independent antibody raised against the synthetic peptide DQILK-WIEQWIKDHNS, corresponding to carboxyl-terminal amino acid residues 157–175 in hCINAP (Fig. 4, C and D, and other data not shown). Both antibodies show that the endogenous HeLa hCINAP co-migrated with the bacterial recombinant protein, indicating that hCINAP is likely not extensively post-translationally modified (data not shown).

We next examined the cellular localization of hCINAP. An amino-terminal YFP fusion of hCINAP was constructed (see "Materials and Methods"), and the fusion protein transiently expressed following transfection into HeLa cells (Figs. 4 and 5). Protein blotting analysis confirmed that the YFP-hCINAP, as well as endogenous hCINAP, were

both recognized by the rabbit anti-hCINAP serum (Fig. 4D, lanes 3 and 4, arrows show YFP-hCINAP, arrowhead shows endogenous hCINAP), whereas an anti-fluorescent protein antiserum specifically recognized the fusion protein but not endogenous hCINAP (Fig. 4D, lanes 5 and 6). Fluorescence microscopy analysis of cells transiently expressing YFP-hCINAP showed that the fusion protein is specifically nuclear, with a widespread diffuse nucleoplasmic distribution, excluding nucleoli, and some additional concentration in nuclear bodies (Fig. 5, panel A1). A similar widespread nucleoplasmic distribution for endogenous hCINAP was observed in untransfected HeLa cells using both the polyclonal antiserum to the full-length recombinant protein and the serum raised

hCINAP Is a Coilin-interacting Protein

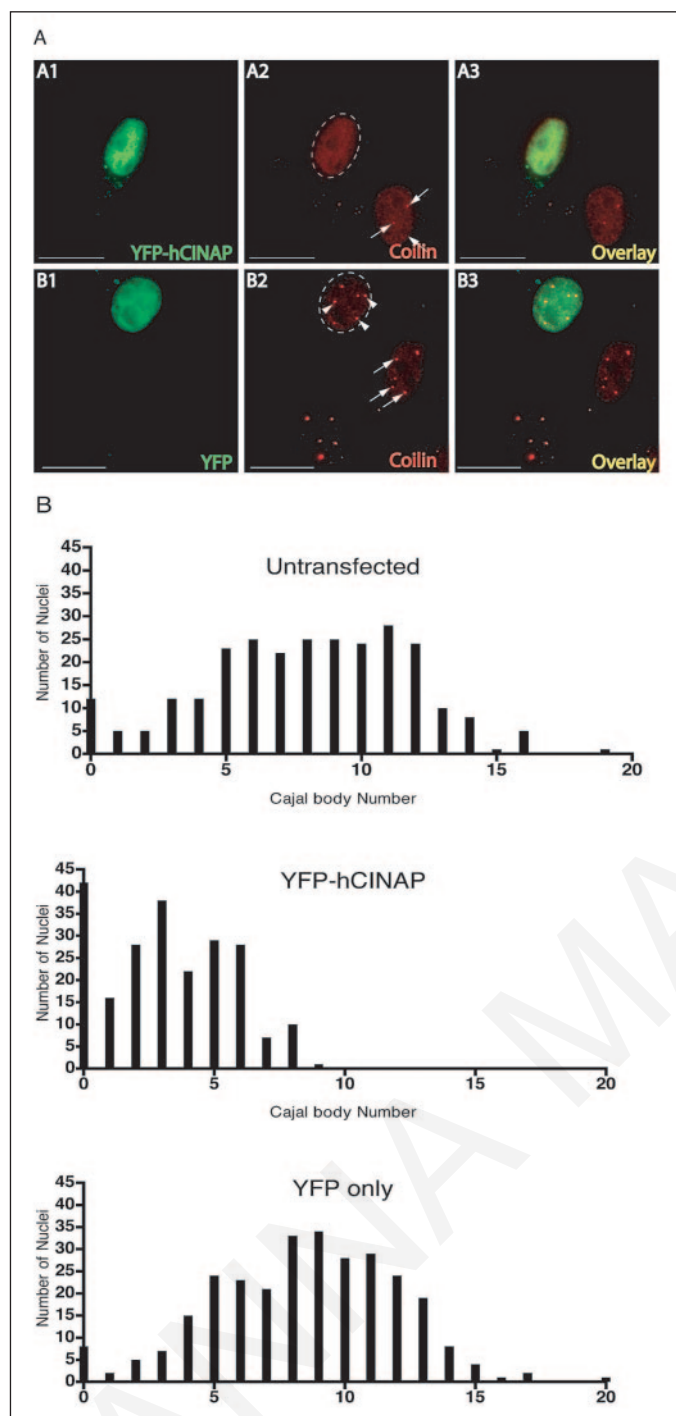


FIGURE 8. Overexpression of hCINAP affects the number of Cajal bodies per nucleus. *A*, fluorescence micrographs of HeLa cells transfected with either YFP-hCINAP (A1, A2, and A3) or unfused YFP control (B1, B2, and B3). Tagged proteins were detected by fluorescence (A1 and B1), whereas coilin was detected using immunofluorescence (A2 and B2) with a rabbit anti-coilin antibody as described under "Materials and Methods." The merged YFP and coilin images are presented in A3 and B3. Untransfected nuclei show the characteristic coilin staining pattern in both A2 and B2 with both bright foci (arrows) and a diffuse nucleoplasmic staining. Transfected nuclei, as assessed by detection of the fluorescent proteins in A1 and B1 (dashed outline in A2 and B2), only show a reduction in the number of Cajal bodies when transfected with YFP-hCINAP (A2) and not YFP control (B2, see arrowheads for examples of Cajal bodies in a cell transfected with YFP control). Scale bars in all images are 20 μ m. *B*, three-dimensional images of random fields of cells were collected and presented as maximum intensity projections to allow all Cajal bodies within nuclei to be displayed onto a two-dimensional space. The number of Cajal bodies (see *A* for example) were counted from over 200 nuclei resulting from more than 20 images from each of three conditions: untransfected control (top graph); YFP alone transfected control (bottom graph); YFP-hCINAP transfected (middle graph). The results are displayed as frequency distributions showing the number of Cajal bodies in each nucleus

against the hCINAP peptide (Fig. 5, panels B1 and C1). The specific nuclear localization of hCINAP was further supported by the detection of the endogenous protein in HeLa nuclear extract by immunoblotting (data not shown). As we observed in some cells additional concentration of hCINAP in nuclear bodies, we performed double-labeling immunofluorescence experiments to identify these subnuclear structures (Fig. 5, panels A2–C2 and A3–C3). The nuclear bodies containing hCINAP co-localized with anti-coilin antibodies, indicating that the structures are Cajal bodies. This is consistent with the original observation that hCINAP interacts with coilin in the yeast two-hybrid assay.

We next tested whether hCINAP and coilin interact directly using purified, tagged recombinant proteins (Fig. 6). A GST-tagged form of hCINAP was constructed, expressed in *E. coli*, and incubated together with *E. coli*-expressed hexahistidine-tagged coilin for 30 min at room temperature in the presence of 0–3 mM ATP (Fig. 6, A and B). Following incubation, the proteins were mixed with glutathione-Sepharose beads, the beads were collected by centrifugation, washed, and bound and unbound fractions were separated by SDS-PAGE (Fig. 6A) and then transferred to nitrocellulose and probed with an anti-coilin antibody (Fig. 6B). This shows that His₆-coilin was recovered in the pellet fraction only when incubated in the presence of GST-hCINAP, consistent with a direct interaction between the two proteins (Fig. 6, A and B, compare lanes 1–4 with the negative control in lanes 5 and 6, arrows indicate His₆-coilin). In the negative control lacking GST-hCINAP, all of the His₆-coilin was recovered in the supernatant fraction (lanes 7 and 8). Although hCINAP contains a predicted ATP-binding domain and exhibits ATPase activity, no major change in the level of coilin bound to hCINAP was observed using the concentrations of ATP tested. We conclude that ATP does not inhibit binding between hCINAP and coilin and that it is either not strictly required for binding, or it stimulates binding at very low concentrations. To confirm that interaction between hCINAP and coilin occurs also in mammalian cells, we tested for binding of endogenous coilin to YFP-tagged hCINAP in transiently transfected HeLa cells (Fig. 6C). Using a co-immunoprecipitation assay with anti-fluorescent protein antibodies, we observe that coilin is recovered in the antibody-bound fraction only in the presence of YFP-hCINAP (compare lanes 3 and 5, arrow shows endogenous coilin). Taken together, the data indicate strongly that hCINAP is a *bona fide* interaction partner for coilin.

To test whether the hCINAP-coilin complexes *in vivo* contain any other known coilin-interacting proteins or components of Cajal bodies or other nuclear antigens, we repeated these immunoprecipitation assays and screened the antibody-bound fractions with antibodies against the U1A snRNP protein, fibrillarin, SMN, Sm, and Sp100 proteins. In contrast with coilin, none of these factors were co-immunoprecipitated with CINAP (data not shown). From these results we infer that the CINAP-coilin interaction is specific and does not involve the other Cajal body proteins tested. To localize the domain of coilin sufficient for interaction with hCINAP we constructed a series of progressively truncated fragments of coilin and assayed for their interaction with full-length hCINAP by the yeast two hybrid assay (Fig. 7). In addition to the combination of full-length coilin and hCINAP only the combination of full-length hCINAP and a construct of coilin containing its 214 carboxyl-terminal amino acids (residues 362–576, construct C1) was able to

(x-axis) and the number of nuclei (y-axis). Untransfected control nuclei (8.0 ± 0.23 Cajal bodies) (average \pm S.E., $n = 267$) and YFP alone control nuclei (8.5 ± 0.21 , $n = 288$) do not have significantly different numbers of Cajal bodies, whereas those nuclei transfected with YFP-hCINAP (3.3 ± 0.16 , $n = 221$) have a reduced number of Cajal bodies per nucleus. This difference was confirmed to be statistically significant by performing a one-tailed *t* test ($p < 0.0001$).

grow on quadruple selection medium and also displayed β -galactosidase activity (Fig. 7A). This result indicated interaction between hCINAP and the carboxyl-terminal coilin fragment that resulted in the activation of the three independent reporter genes (auxotrophy to adenine and histidine and β -galactosidase activity). The interaction was independently confirmed by *in vitro* translating the C1 coilin fragment in the presence of [35 S]methionine, and testing whether it could be recovered with glutathione-agarose beads after incubation with a lysate made from bacteria expressing GST-tagged CINAP (Fig. 7B, lanes 4 and 5). As a negative control, bacterial lysate carrying the GST-CINAP plasmid, but not induced to express GST-CINAP (Fig. 7B, lanes 2 and 3) was also incubated with the *in vitro* translated coilin fragment. As shown, the C1 fragment is recovered in the pellet of the glutathione agarose pull-down only in the presence of GST-CINAP and is absent from the pellet when GST-CINAP is not expressed. These results are consistent with and strengthen the results from yeast two-hybrid assay presented above.

Finally, having established the connection between hCINAP and coilin and mapped the CINAP interaction domain on coilin, we examined whether altering the expression level of hCINAP *in vivo* might have a corresponding effect on either coilin or Cajal bodies (Fig. 8). HeLa cells were transiently transfected with plasmids encoding either full-length YFP-hCINAP or YFP alone and the number of Cajal bodies, as detected using an anti-coilin antibody, scored in more than 200 transfected and 200 non-transfected control cells. The transfected cells expressing YFP-hCINAP were analyzed by direct fluorescence microscopy detection of the YFP (Fig. 8A). These data show that there is an approximate 3-fold reduction in the average number of Cajal bodies per nucleus in the cells that are transiently expressing exogenous hCINAP (Fig. 8B). To confirm this finding, a similar experiment was performed using a myc-tagged hCINAP construct, which also showed an approximate 3-fold reduction in the number of Cajal bodies per nucleus (supplementary Fig. S3). These data indicate that hCINAP expression levels can influence Cajal body number and suggest that hCINAP may have a functional role in modulating either the formation or stability of Cajal bodies.

DISCUSSION

Here we have identified a novel interaction partner for the Cajal body marker protein, coilin, using a yeast two-hybrid assay with coilin as the bait. The novel protein, termed hCINAP for human coilin interacting nuclear ATPase protein, is highly conserved across its full-length in all species examined, including yeast, plants, and invertebrates. In budding yeast, the orthologue of hCINAP, termed Fap7p (23), is essential for viability. hCINAP (whose nucleotide sequence had previously been reported in cDNA sequencing studies (25–27)) is a predicted ATP-binding protein that is not highly homologous to any other known proteins, but the amino-terminal P-loop motif shows similarity to the adenylate kinase family consensus motif. A very recent study (28) reported the crystal structure of the same protein and proposed to designate it an adenylate kinase (AK6). It was assigned to a distinct subfamily due to its unusually broad substrate specificity and distinct structural features as compared with known human adenylate kinase classes AK1–5. Although in our view the assignment of hCINAP as a *bona fide* adenylate kinase remains to be validated, our present data confirm its status as an ATPase. We show here that recombinant hCINAP exhibits high apparent affinity ATPase activity ($K_m = 75.3 \pm 5 \mu\text{M}$ and $V_{\text{max}} = 1.27 \pm 0.2 \mu\text{mol of ADP formed per min}\cdot\text{mg}$).

Interestingly, hCINAP is expressed as an alternatively spliced transcript from the *TAF9* locus on human chromosome 5 and shares the two 5'-terminal exons with the mRNA encoding TAFIIID₃₂, despite there being no common amino acid sequences in the hCINAP and

TAFIIID₃₂ proteins. Tagged hCINAP interacts with coilin in mammalian cells and recombinant, *E. coli*-expressed hCINAP, and coilin bind each other *in vitro*. hCINAP-coilin complexes *in vivo* do not contain other known coilin-interacting proteins or Cajal body components, including U1A, fibrillarin, SMN, Sm proteins, and Sp100. Hence the interaction seems to be distinct and independent of the other proteins tested. hCINAP appears to interact with the carboxyl terminus of coilin. It is interesting to note that earlier studies have shown that the carboxyl-terminal 96 amino acids of human coilin seem to be capable of down-regulating the number of Cajal bodies per nucleus (29). Furthermore, post-translational modifications such as phosphorylation and methylation at the carboxyl terminus of coilin influence Cajal body assembly (8, 11). Here we report that the carboxyl terminus of coilin, which appears essential for hCINAP-coilin interaction, also appears to influence Cajal body formation and/or stability, because overexpression of hCINAP causes a reduction in the average number of Cajal bodies in the nucleus of HeLa cells. The combination of these findings suggests that carboxyl terminus of coilin is important for the regulation of Cajal body number in the nucleus of human cells both through its intrinsic properties (structure and/or post-translational modifications) and also through protein-protein interactions with other nuclear proteins (for example hCINAP).

The hCINAP protein shows the hallmarks of a *bona fide* coilin-interacting protein. This is evident in its biochemical properties, because it interacts with coilin in all of the binding assays we have tested and is also present in complexes containing coilin *in vivo*. Like coilin, it is also a specifically nuclear factor. hCINAP is present in a widespread, diffuse nucleoplasmic pool, excluding nucleoli, and shows some enrichment in Cajal bodies, although not in all cells. Coilin is a marker protein for Cajal bodies. However, although it is more obviously concentrated in Cajal bodies than is evident for hCINAP, previous studies have shown that it is still a minor fraction of the total pool of nuclear coilin that is located within Cajal bodies at any one time (30). The majority of coilin is present instead in a diffuse nucleoplasmic pool that dynamically exchanges with the Cajal body fraction. It is possible that the hCINAP and coilin proteins interact therefore mainly in the diffuse nucleoplasmic compartment outside of Cajal bodies. The hCINAP protein was identified as a putative coilin interaction partner using a yeast two-hybrid screen with coilin as the bait. This same screen identified a number of other clones, of which the best characterized to date corresponded to cDNAs encoding nuclear import receptors of the importin α /karyopherin family (10, 22). The interaction of these factors with coilin *in vivo* is physiologically significant, because they transport coilin into the nucleus. Nonetheless, the interaction of these import receptors with coilin is transient, and they do not colocalize with coilin *in vivo*. It remains to be established whether hCINAP is a stable or transient interaction partner for coilin, despite its ability to bind to coilin *in vitro*. One possibility that merits future investigation is that coilin could be a substrate for hCINAP. For example, the predicted ATP binding of hCINAP and its homology with the adenylate kinase motif suggests that it may have kinase activity, which is supported by our finding that hCINAP hydrolyzes ATP *in vitro*. Consistent with this idea, coilin is known to be a phosphoprotein *in vivo*. Alternatively, the binding of ATP to hCINAP might affect its conformation and regulate its participation in specific complexes and/or activity.

The primary amino acid sequence of hCINAP is highly conserved, and its orthologue in budding yeast shows 41% identity and ~62% similarity across its full length. As expected for such a highly conserved, single copy gene, knock-out of the gene in budding yeast is lethal, indicating that it has an essential and non-redundant function in the cell.

hCINAP Is a Coilin-interacting Protein

The lethal phenotype of the budding yeast CINAP orthologue has been reported previously in a study of the transcriptional control of genes regulated in response to oxidative stress (23). The yeast *POS9/SKN7* gene encodes a transcription factor that is required for the induction of genes activated upon oxidative stress. Juhnke *et al.* (23) conducted a screen for mutants in budding yeast that failed to activate a *POS9*-dependent reporter gene and thereby identified a gene they termed *FAP7* (Factor activating Pos9p), which corresponds to the *S. cerevisiae* orthologue of hCINAP. They showed that Fap7/scCINAP, encoding a nuclear protein, is an essential gene in yeast and further showed that strains containing the mutant allele *fap7-1*, which is viable, fail to activate specifically oxidative stress-dependent genes, but not genes responding to other forms of stress. The *fap7-1* allele results from a point mutation converting the conserved Gly-19 to Ser within the adenylate kinase-like P-loop motif. At present it is not clear by what mechanism Fap7p/scCINAP influences *POS9* function or whether the effect results from a direct or indirect interaction.

Considering the implication from the analysis of Fap7p in yeast that hCINAP may play a role in the transcriptional control of oxidative stress-regulated target genes, it is interesting that we find here that hCINAP is encoded as an alternative transcript from the *TAF9* locus that also encodes a basal transcription factor subunit. The TFIID complex is a multisubunit general transcription factor comprising the TATA box-binding protein TBP and multiple TBP-associated factors, called TAFs (31). It binds to the TATA box element and helps to recruit the TFIIB and TFIIF components of the transcription machinery, forming a protein-DNA complex (preinitiation complex) to which RNA polymerase II subsequently binds. The *TAF9* locus on human chromosome 5 encodes a 32-kDa TAFIID subunit (TAFIID₃₂). We show here that the coilin-interacting protein hCINAP is encoded by an alternatively spliced transcript from this same *TAF9* locus and shares the first 2 exons with TAFIID₃₂ at the 5' terminus of both mRNAs. However, because translation of TAFIID₃₂ initiates at an internal ATG codon downstream of the first 2 exons that are shared with hCINAP, with a concomitant shift in the reading frame of TAFIID₃₂ as compared with the reading frame used by hCINAP, the respective translation products of hCINAP and TAFIID₃₂ share no common amino acid sequences. Furthermore, alignment of hCINAP and TAFIID₃₂ protein sequences shows that they are unrelated. This represents an unusual situation where two alternative transcripts from the same gene encode completely distinct protein products and is conserved in mammals but not other vertebrates. We observe that a similar ratio of hCINAP and TAFIID₃₂ transcripts is expressed in all the human tissues and cell lines tested, consistent with their being coordinately regulated. However, although the lack of sequence relationship does not exclude hCINAP from playing a possible role in some aspect of transcriptional regulation or related mechanisms, at present there is no direct evidence that hCINAP is a transcription factor. We note that in the genome annotation provided by Ensembl the hCINAP transcript is called "transcription factor TAFIID₃₁," reflecting its genetic relationship with the known transcription factor TAFIID₃₂. Based on our present data, we suggest that it is premature to assign the function of "transcription factor" to hCINAP. Nonetheless, it is possible that hCINAP could be a transcription factor and still play other roles. For example, several nuclear factors have been shown to play dual roles in transcription and RNA binding or processing, including TFIIB and WT1 (for review see Ref. 32). The role of hCINAP as a coilin interaction partner could be consistent with possible connections to either transcription or RNA-processing mechanisms, or both. Thus Cajal bodies play a role as sites of RNA-protein complex maturation

and RNP assembly (1). However, they also contain several transcription factors and have been shown to associate with, and potentially regulate the activity of, specific gene loci, including histones and U snRNA genes (2–4). Future studies will address further the potential role of hCINAP in Cajal body assembly and function.

Acknowledgments—We thank the EMBL DNA sequencing and oligonucleotide services and Doros Panayi at the photolab for excellent photographic assistance. We also thank Ursula Ryder for expert technical assistance with the two-hybrid screen. We acknowledge R. Brent (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA) for kindly providing the two-hybrid vectors, strains, and HeLa cDNA library and G. Christopoulos at the Cyprus Institute of Neurology and Genetics for the gift of a chorionic villi sample. A human motor cortex biopsy was obtained from the University of Miami Brain and Tissue Bank.

REFERENCES

- Ogg, S. C., and Lamond, A. I. (2002) *J. Cell Biol.* **159**, 17–21
- Frey, M. R., Bailey, A. D., Weiner, A. M., and Matera, A. G. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 126–135
- Frey, M. R., and Matera, A. G. (2001) *J. Cell Biol.* **154**, 499–509
- Shopland, L. S., Byron, M., Stein, J. L., Lian, J. B., Stein, G. S., and Lawrence, J. B. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 565–576
- Tucker, K. E., Berciano, M. T., Jacobs, E. Y., LePage, D. F., Shpargel, K. B., Rossire, J. J., Chan, E. K., Lafarga, M., Conlon, R. A., and Matera, A. G. (2001) *J. Cell Biol.* **154**, 293–307
- Bohmann, K., Ferreira, J. A., and Lamond, A. I. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 817–831
- Hebert, M. D., Szymczyk, P. W., Shpargel, K. B., and Matera, A. G. (2001) *Genes Dev.* **15**, 2720–2729
- Hebert, M. D., and Matera, A. G. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 4159–4171
- Isaac, C., Yang, Y., and Meier, U. T. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 319–329
- Weis, K., Mattaj, I. W., and Lamond, A. I. (1995) *Science* **268**, 1049–1053
- Hebert, M. D., Shpargel, K. B., Ospina, J. K., Tucker, K. E., and Matera, A. G. (2002) *Dev. Cell* **3**, 329–337
- Carvalho, T., Almeida, F., Calapez, A., Lafarga, M., Berciano, M. T., and Carmo-Fonseca, M. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 715–728
- Kambach, C., and Mattaj, I. W. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 11–21
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3610–3616
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993) *Cell* **75**, 791–803
- Kandels-Lewis, S., and Seraphin, B. (1993) *Science* **262**, 2035–2039
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K. (1997) *Cell* **90**, 1041–1050
- Skamnaki, V. T., Owen, D. J., Noble, M. E., Lowe, E. D., Lowe, G., Oikonomakos, N. G., and Johnson, L. N. (1999) *Biochemistry* **38**, 14718–14730
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Stelzer, E. H., Wacker, I., and De Mey, J. R. (1991) *Semin. Cell Biol.* **2**, 145–152
- Nachury, M. V., Ryder, U. W., Lamond, A. I., and Weis, K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 582–587
- Juhnke, H., Charizanis, C., Latifi, F., Krems, B., and Entian, K. D. (2000) *Mol. Microbiol.* **35**, 936–948
- Klemm, R. D., Goodrich, J. A., Zhou, S., and Tjian, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5788–5792
- Lai, C. H., Chou, C. Y., Ch'ang, L. Y., Liu, C. S., and Lin, W. (2000) *Genome Res.* **10**, 703–713
- Hu, R. M., Han, Z. G., Song, H. D., Peng, Y. D., Huang, Q. H., Ren, S. X., Gu, Y. J., Huang, C. H., Li, Y. B., Jiang, C. L., Fu, G., Zhang, Q. H., Gu, B. W., Dai, M., Mao, Y. F., Gao, G. F., Rong, R., Ye, M., Zhou, J., Xu, S. H., Gu, J., Shi, J. X., Jin, W. R., Zhang, C. K., Wu, T. M., Huang, G. Y., Chen, Z., Chen, M. D., and Chen, J. L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9543–9548
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., Zeeberg, B., Buetow, K. H., Schaefer, C. F., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Jordan, H., Moore, T., Max, S. I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A. A., Rubin, G. M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Brownstein, M. J., Ustun, T. B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S. S., Loquellano, N. A., Peters, G. J., Abramson, R. D., Mullahy, S. J., Bosak, S. A., McEwan, P. J., McKernan, K. J., Malek, J. A., Gunaratne, P. H., Richards, S., Worley, K. C., Hale, S., Garcia, A. M., Gay, L. J., Hulyk, S. W., Villalon, D. K., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Lu, X., Gibbs, R. A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S.,

- Sanchez, A., Whiting, M., Madan, A., Young, A. C., Shevchenko, Y., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Touchman, J. W., Green, E. D., Dickson, M. C., Rodriguez, A. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Butterfield, Y. S., Krzywinski, M. I., Skalska, U., Smailus, D. E., Schnerch, A., Schein, J. E., Jones, S. J., Marra, M. A. (the Mammalian Gene Collection Program Team) (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16899–16903
28. Ren, H., Wang, L., Bennett, M., Liang, Y., Zheng, X., Lu, F., Li, L., Nan, J., Luo, M., Eriksson, S., Zhang, C., and Su, X. D. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 303–308
29. Shpargel, K. H., Ospina, J. K., Tucker, K. E., Matera, A. G., and Hebert, M. D. (2003) *J. Cell Science* **116**, 3103–3110
30. Bellini, M., and Gall, J. G. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 2987–3001
31. Muller, F., and Tora, L. (2004) *EMBO J.* **23**, 2–8
32. Ladomery, M. (1997) *BioEssays* **19**, 903–909
33. Santama, N., Krijnse-Locker, J., Griffiths, G., Noda, Y., Hirokawa, N., and Dotti, C. G. (1998). *EMBO J.* **17**, 5855–5867

ANNA MAHEKKOY



The nuclear ATPase/adenylate kinase hCINAP is recruited to perinucleolar caps generated upon RNA pol.II inhibition

Anna Malekkou^a, Carsten W. Lederer^a, Angus I. Lamond^b, Niovi Santama^{a,*}

^a Department of Biological Sciences, University of Cyprus and Cyprus Institute of Neurology and Genetics, P.O. Box 20537, 1678 Nicosia, Cyprus

^b Division of Gene Regulation and Expression, University of Dundee, MSI/WTB Complex, Dundee DD1 5EH, Scotland, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2010

Revised 1 October 2010

Accepted 19 October 2010

Available online xxxx

Edited by Ulrike Kutay

Keywords:

Nuclear organization

Cajal Body

Coilin

Paraspeckle Protein 1

Paraspeckle

ABSTRACT

hCINAP is an atypical nucleoplasmic enzyme, combining structural features of adenylate kinases and ATPases, which exhibits dual enzymatic activity. It interacts with the Cajal Body marker coilin and its level of expression and enzymatic activity influence Cajal Body numbers. Here we show that upon specific transcriptional inhibition of RNA pol.II, hCINAP segregates in perinuclear caps identified as Dark Nucleolar Caps (DNCs). These are distinct from perinucleolar caps where coilin and fibrillarlin (both Cajal Body components) accumulate. In DNCs, hCINAP co-localizes with Paraspeckle Protein (PSP1) and also co-segregates with PSP1, and not coilin, in nuclear and nucleolar foci upon UV irradiation.

Structured summary:

MINT-8048545: hCINAP (uniprotkb:Q9Y3D8) and PSP1 (uniprotkb:Q8WXF1) colocalize (MI:0403) by fluorescence microscopy (MI:0416)

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein (hCINAP) is a nuclear factor, originally identified as a protein interacting with the Cajal Body marker protein, p80 coilin [1]. hCINAP exhibits several unusual or unique properties. First, the hCINAP mRNA is an alternatively spliced transcript from the TAF9 locus, which also encodes the basal transcription factor TAFII₃₂, although the two proteins have no identity in their sequence due to differential usage of ATG starting codons and reading frames in the translation of the alternative transcripts [1]. Second, crystallographic analysis shows that while hCINAP has a structure typical for an adenylate kinase (AK), it also contains features characteristic of ATPase/GTPase proteins. Furthermore, it displays dual enzymatic activity of both an atypical AK, with unusually broad substrate specificity, and of an ATPase, an activity not reported for any other human adenylate kinase [2,3]. Intriguingly, His79, a B-motif amino acid residue, is crucial for the regulation of hCINAP's dual enzyme selectivity, in response to intracellular substrate concentration [3].

At steady state hCINAP has a diffuse nucleoplasmic localization, excluding nucleoli, and although it does not concentrate in Cajal Bodies (CBs), its levels of expression and also its enzymatic activity influence CB organization. Specifically, overexpression of hCINAP decreases the average number of CBs per nucleus [1], while depletion of hCINAP causes defects in CB formation and redistribution of CB components [4]. Expression of an hCINAP mutant with His79 changed to Gly deregulates CB number, both increasing the average number of CBs per nucleus and also dramatically altering the frequency distribution of CBs, with numbers ranging from 0 to 30 per cell rather than 1–7 as seen when wild-type hCINAP is exogenously expressed [3]. Cajal Bodies are conserved nuclear organelles that serve as macromolecular assembly platforms (scaffolds), facilitating the maturation of splicing snRNPs and snoRNPs and other small nuclear RNPs involved in nuclear metabolic processes [5–8].

These findings have highlighted the putative importance of hCINAP in nucleotide homeostasis in the mammalian nucleus and in the assembly and/or stability of CBs. The challenge remains however to elucidate what is the mechanism through which hCINAP can impact on nuclear organization and eventually what is the biological function that is associated with hCINAP's AK and ATPase activity in the nucleus, where movement or assembly of chromatin and nuclear organelles are ATP-dependent processes [9,10]. In this study we present new findings on hCINAP's role in nuclear dynamics and organization.

Abbreviations: DRB, 5,6-dichloro-β-D-ribofuranosylbenzimidazole; GFP, green fluorescent protein; hCINAP, human coilin-interacting protein; PSP1, Paraspeckle Protein 1; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction

* Corresponding author. Fax: +357 22 350557.

E-mail address: santama@ucy.ac.cy (N. Santama).

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and drug treatments

HeLa cells were cultured in GMax-DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin-streptomycin at 37 °C with 5% CO₂.

DRB (5,6-dichloro-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) was added at a final concentration of 25 or 50 μg/ml and Actinomycin D at 0.04 μg/ml or 1 μg/ml. Cells were incubated for 3 h before sampling.

2.2. UV-C irradiation

Semiconfluent cells were washed with PBS and the medium was collected and kept at 37 °C. The cells were irradiated in a UV Stratalinker 2400 oven at 254 nm with 30 J/m². The saved medium was added back and cells were incubated for 6 h, prior to microscopic examination.

2.3. Generation of HeLa^{GFP-hCINAP} stable cell lines

For the establishment of HeLa^{GFP-hCINAP}, 5 μg of EGFP-hCINAP plasmid [circular (C) or linear (L)] was transfected into a 6 cm dish of HeLa cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 18 h, cells were split at different dilutions (1:10–1:500) and medium containing 400 μg/ml G418 was added to select for cells that had stably incorporated the plasmid into their genomic DNA. After 14 days, visible colonies were picked, subcloned and expanded for biochemical and microscopic analyses.

2.4. Antibodies

Primary antibodies were: rabbit anti-hCINAP [1:1000 for Western blot (WB) and 1:800 for immunofluorescence (IF)] [1], mouse monoclonal anti-coilin 5P10 (1:50, IF) [11], rabbit anti-PSP1_48 (1:250, IF) [12], mouse monoclonal anti-fibrillarin AFB01 (1:200, IF, tebu-bio), mouse anti-GFP (1:1000, WB, Roche), mouse monoclonal anti-dynein (1:600, WB, Santa Cruz) and mouse monoclonal anti-α tubulin T5168 (1:6000, IF, Sigma). Secondary antibodies were: TRITC-conjugated goat anti rabbit IgGs (1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories), goat Cy5 anti mouse IgG (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories), donkey Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG (1:600, Molecular Probes), donkey Alexa Fluor 555 anti-mouse IgG (1:1500, Molecular Probes), goat Alexa Fluor 350 anti-mouse IgG (H+L) (1:100, Molecular Probes), sheep HRP anti mouse IgG (1:6000, Amersham Pharmacia Biotech) and donkey HRP anti rabbit IgG (1:30 000, Santa Cruz). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (0.5 μg/ml, Invitrogen).

2.5. Immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence labeling was performed as previously described [3]. Deconvoluted fluorescent images were acquired with a Deltavision Restoration Microscope (Applied Precision) and a Micromax KAF1400 (Kodak) camera, and conventional fluorescent images with a C. Zeiss Axiovert 200M inverted fluorescence microscope equipped with an AxioCam MRm camera, using a ×63 1.3 or ×100 oil Plan-Apochromat objective lenses.

2.6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Poly A⁺ RNA from HeLa cultures was purified with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and cDNA was reverse transcribed from 2 μg of RNA using the Protoscript Kit (New England Biolabs). For the detection of endogenous hCINAP (excluding GFP-hCINAP) by

semi-quantitative PCR, the upstream primer CINAP5UTR (gtagagcaaagggcacgtgagcgag) and the downstream CINAPRV (ccggaattcttaagtagctagcctataag) were used (product size 620 bp). For the detection of GFP-hCINAP (excluding endogenous hCINAP) the upstream primer GFPUP (ctcgtgaccaccctgactac) was used in conjunction with primer CINAPRV (product size 1055 bp). The amplification of house keeping gene Pumilio 1 (PUM1) with primers PUM1UP (tggaacaagaggcatctg) and PUM1RV (tgaggtgtgcacatgaac) (product size 186 bp), was used as an internal reference reaction to normalize reaction conditions across samples. A mock RT reaction (2 μg of RNA, no reverse transcriptase) was used as negative control.

2.7. Cell cycle analysis by flow cytometry and analysis of mitotic progression by microscopy

To analyze cell cycle progression, cells in exponential growth were fixed with 70% ethanol for 2 h, stained for DNA content with propidium iodide, scored for their fluorescence on a FACSVantage SE and analyzed for their cell-cycle distribution using ModFit (Verity Software House).

The determination of the percentage of mitotic cells (mitotic index) and their assignment to mitotic subphases ($n = 6000$ cells) was performed by visual analysis using fluorescence microscopy of cells immunofluorescently labeled for α-tubulin and counterstained with Hoechst 33342. Statistical significance was assigned by two-way ANOVA analysis with Bonferroni post-test (GraphPad Prism).

3. Results and discussion

As a starting point, we constructed a HeLa cell line stably expressing GFP-hCINAP, following integration into the genome. Two stable clones, designated 33C and 62L, were pursued after purification with limiting dilution and expansion. Both stable clones displayed correct nuclear localization of GFP-hCINAP (Fig. 1A1, A2, B1, and B2, respectively), identical to GFP-hCINAP localization observed after transient transfection (Fig. 1C1 and C2) and also identical to endogenous hCINAP (Fig. 1D1 and D2). The level of expression of GFP-hCINAP was markedly greater in clone 33C compared with 62L, as assessed by fluorescence microscopy (note that exposure time in Fig. 1A1 is seven times lower than in B1) and confirmed (a) by RT-PCR, using oligonucleotide primers that would specifically amplify the GFP-hCINAP transcript (Fig. 1E, top panel) and (b) by Western immunoblotting, using anti-GFP tag antibodies (Fig. 1F, middle left panel) and anti-hCINAP antibodies (Fig. 1F, middle right panel). Expression levels of endogenous hCINAP transcript and endogenous protein in both clones were comparable to wild-type HeLa cells (Fig. 1E, middle panel; Fig. 1F, bottom right panel) while expression of GFP-hCINAP protein in clone 33C was much higher than that of endogenous hCINAP protein (note that the exposure time of right top immunoblot panel in Fig. 1F is half of that in the right bottom panel). We further characterized clones 33C and 62L, by evaluating their cell cycle profiles (Suppl. Fig. S1 and Suppl. Table 1), quantifying their mitotic indexes and mitotic phase distribution (Suppl. Fig. S2), and measuring the number of nuclei per cell (data not shown). There were minor differences in both clones as compared with wild-type cells, most notably a small increase in the percentage of aneuploid cells (Suppl. Fig. S1 and Suppl. Table 1) and small fluctuations in the distribution of cell cycle or mitotic subphases (Suppl. Fig. S2). However, both stable clones maintained a robust proliferation rate, normal morphology, stable expression and correct localization of hCINAP. Stable clone 33C was utilized for subsequent experiments.

We subjected clone 33C cells to transcriptional arrest, using Actinomycin D at a concentration that causes inhibition of both

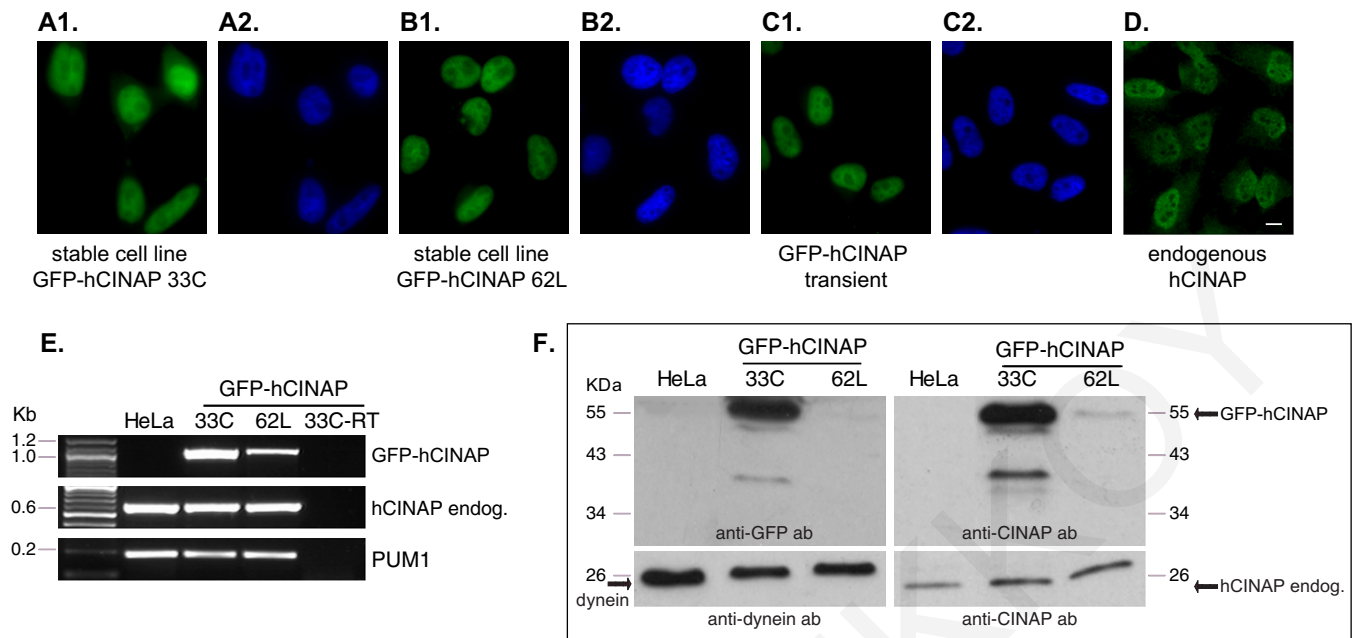


Fig. 1. Generation of stable cell lines. Expression of GFP-hCINAP in stable cell line 33C (A1 and A2), in stable cell line 62L (B1 and B2), or after transient transfection (C1 and C2), and endogenous hCINAP as detected by antibody staining (D1 and D2). Green panels represent GFP-hCINAP fluorescence or secondary antibody labeling (D1) and nuclei were labeled with Hoechst 33342 (blue panels). Scale bar 10 μ m. (E) Detection by RT-PCR of the cDNA of GFP-hCINAP (top panel), endogenous hCINAP (middle panel), and equivalent reactions for house keeping gene PUM1 as internal control (bottom panel), in the stable cell lines 33C and 62L. (F) Detection of GFP-hCINAP protein and of endogenous hCINAP by Western immunoblot in the stable cell lines 33C and 62L by anti-GFP and anti-hCINAP antibodies, as indicated. Detection of dynein was used as internal loading control. Endog.: endogenous. All four blot panels derive from two identical SDS-PAGE gels that were run simultaneously but cut and probed with different antibodies. Exposure time for right bottom panel is 20 s and for all other panels 10 s.

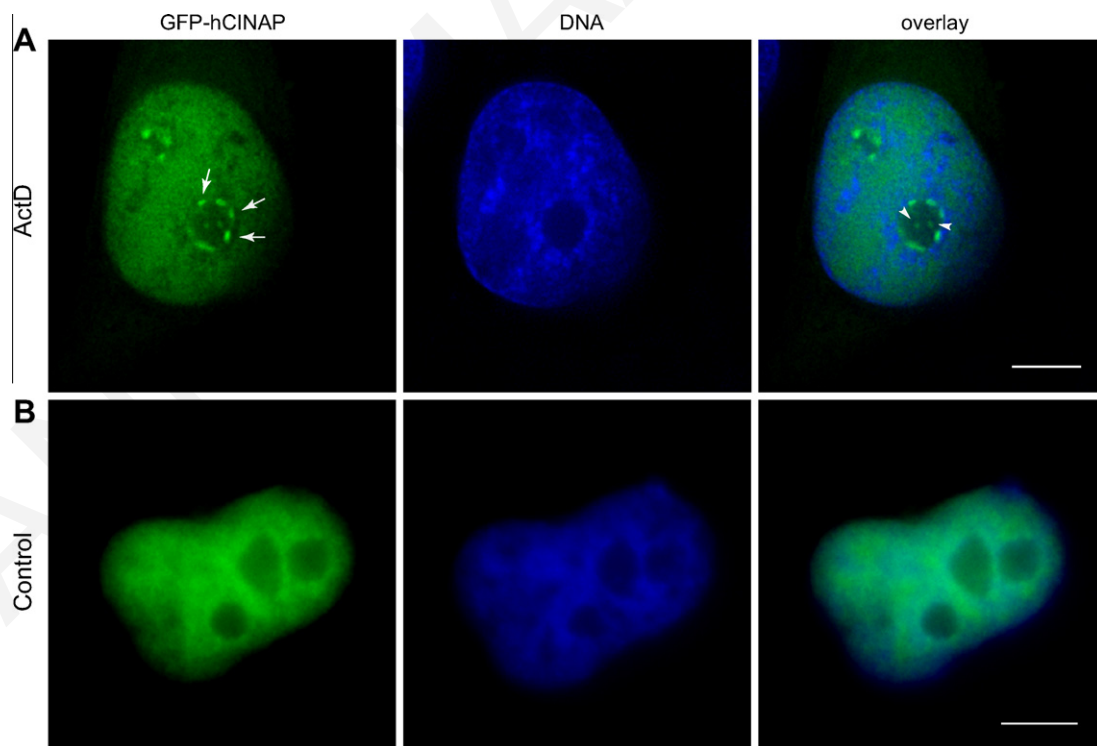


Fig. 2. GFP-hCINAP segregates in perinucleolar caps. (A) Transcriptional inhibition of RNA pol.II with Actinomycin D (1 μ g/ml) causes the formation of GFP-hCINAP perinucleolar caps (arrows) and intranucleolar inclusions (arrowheads). GFP-hCINAP in green, nuclei in blue. (B) Equivalent control samples. Scale bar 5 μ m.

RNA pol.II and pol.I (1 μ g/ml), and observed a reproducible segregation of at least part of the nucleoplasmic GFP-hCINAP to perinucleolar caps and intranucleolar inclusions (Fig. 2, arrows and

arrowheads, typically in >80% of treated cells). We confirmed that this phenotype was also detectable with endogenous hCINAP in wild-type HeLa cells (Suppl. Fig. S3). These perinucleolar caps were

reminiscent of typical structures formed upon either physiological or experimentally-induced transcriptional arrest in mammalian cells [13,14]. In such conditions, the nucleolar, nucleoplasmic and nuclear body proteins and RNAs segregate and specifically relocate into different nuclear subdomains, including distinct types of perinucleolar caps [10]. The most prominent of such caps are the so-called Dark Nucleolar Caps (DNCs) and the Light Nucleolar Caps (LNCs) [10]. Because of the known interaction of hCINAP with p80 coilin [1] and since coilin has been shown to segregate into LNCs during transcriptional arrest [15,16], we carried out double labeling for GFP-hCINAP and coilin to test whether the two proteins would be co-localized in the perinucleolar caps (Fig. 3A). In parallel, we also performed double labeling for GFP-hCINAP and fibrillarin (Fig. 3B), a nucleolar and Cajal Body component, also known to segregate to LNCs [10] and colocalizing with coilin when transcription is inhibited [17,10]. Surprisingly, in both sets of experiments, the lack of co-localization of GFP-hCINAP with coilin or fibrillarin (Fig. 3A and B, see also Suppl. Fig. 3 for endogenous hCINAP and Suppl. Fig. S4 for controls) indicated that (a) despite hCINAP's interaction with coilin, the two proteins segregated differentially, and (b) the perinucleolar caps containing hCINAP were not LNCs.

Paraspeckle Protein 1 (PSP1) is a marker protein of the nuclear organelle Paraspeckles and when RNA pol.II is inhibited it accumulates in perinucleolar caps [18] that have positively been identified as DNCs. Hence PSP1 can serve as a marker for DNCs following transcriptional inhibition [10]. Further analysis demonstrated that GFP-hCINAP and PSP1 co-localized in the same perinucleolar caps, therefore identifying these caps as DNCs (Fig. 3C).

Because a high concentration of Actinomycin D causes a simultaneous inhibition of both RNA pol.I and pol.II, we sought to better characterize the co-segregation of hCINAP and PSP1 in DNCs. We utilized DRB, a widely used nucleoside analog that inhibits certain CTD kinases (carboxyterminal domain kinases) and affects positive and negative RNA pol.II elongation factors, thus acting as a specific inhibitor of RNA pol.II transcription. First, treatment of 33C cells with DRB, confirmed co-localization of GFP-hCINAP and PSP1 in DNCs, typically in >80% of treated cells (Fig. 4A for double GFP-hCINAP/PSP1 labeling). Including anti-fibrillarin as a nucleolar marker in triple labeling experiments, we also confirmed, as before with Actinomycin D, absence of co-localization of GFP-hCINAP/PSP1 with fibrillarin-positive fragments, resulting from the segregation of the nucleolus (Fig. 4B, enlarged detail in inset, and

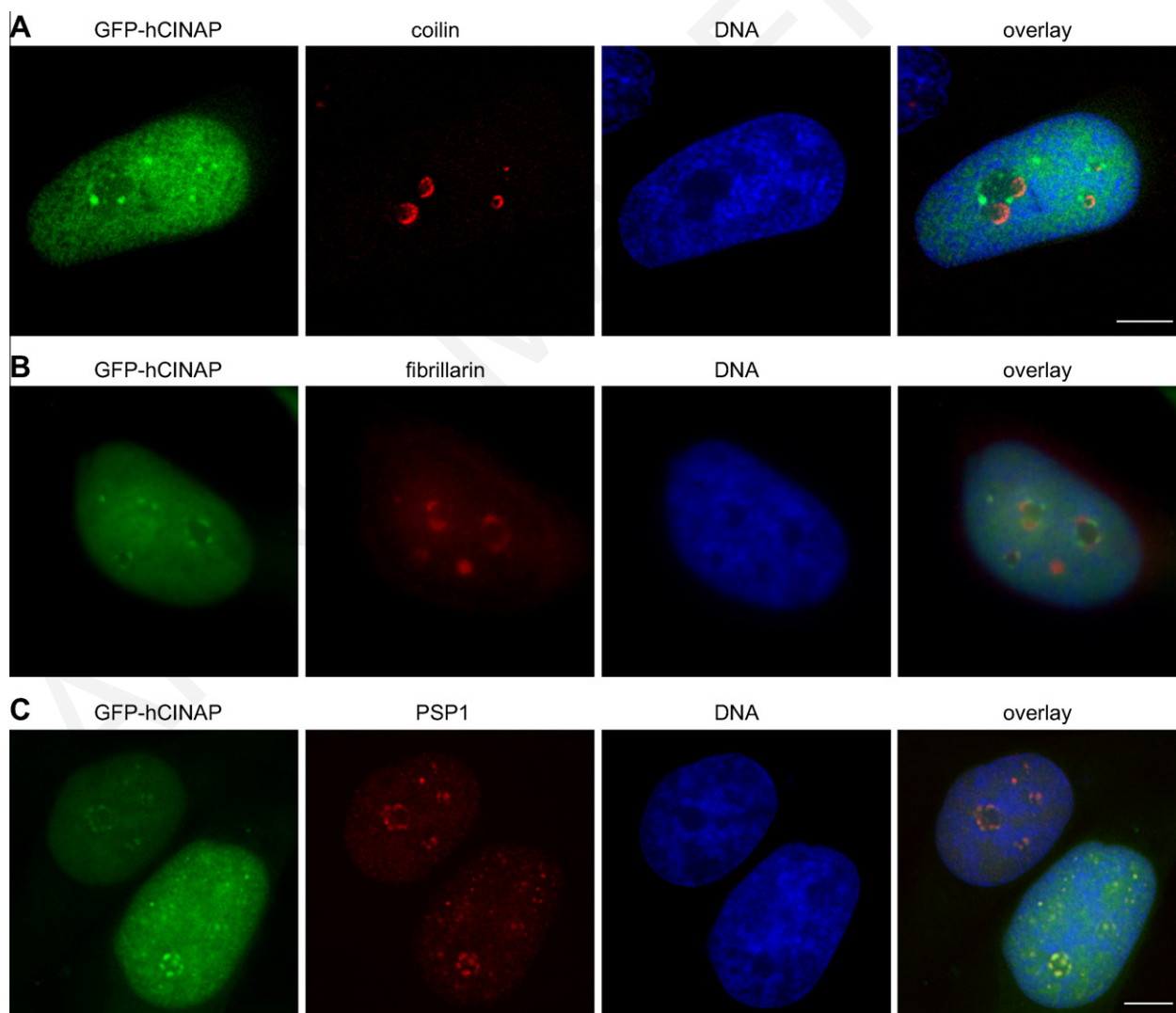


Fig. 3. GFP-hCINAP co-segregates with PSP1 in DNC, and not LNC, perinucleolar caps and intranucleolar inclusions upon transcriptional inhibition. HeLa 33C stable cell line was treated with Actinomycin D (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Red panels: HeLa 33C stable cell line probed with antibodies coilin (A); fibrillarin (B); PSP1 (C); green panels: GFP-hCINAP fluorescence. Blue panels: nuclei labeled with Hoechst 33342. Equivalent control samples are shown in Suppl. Fig. S4. Scale bars 5 μm .

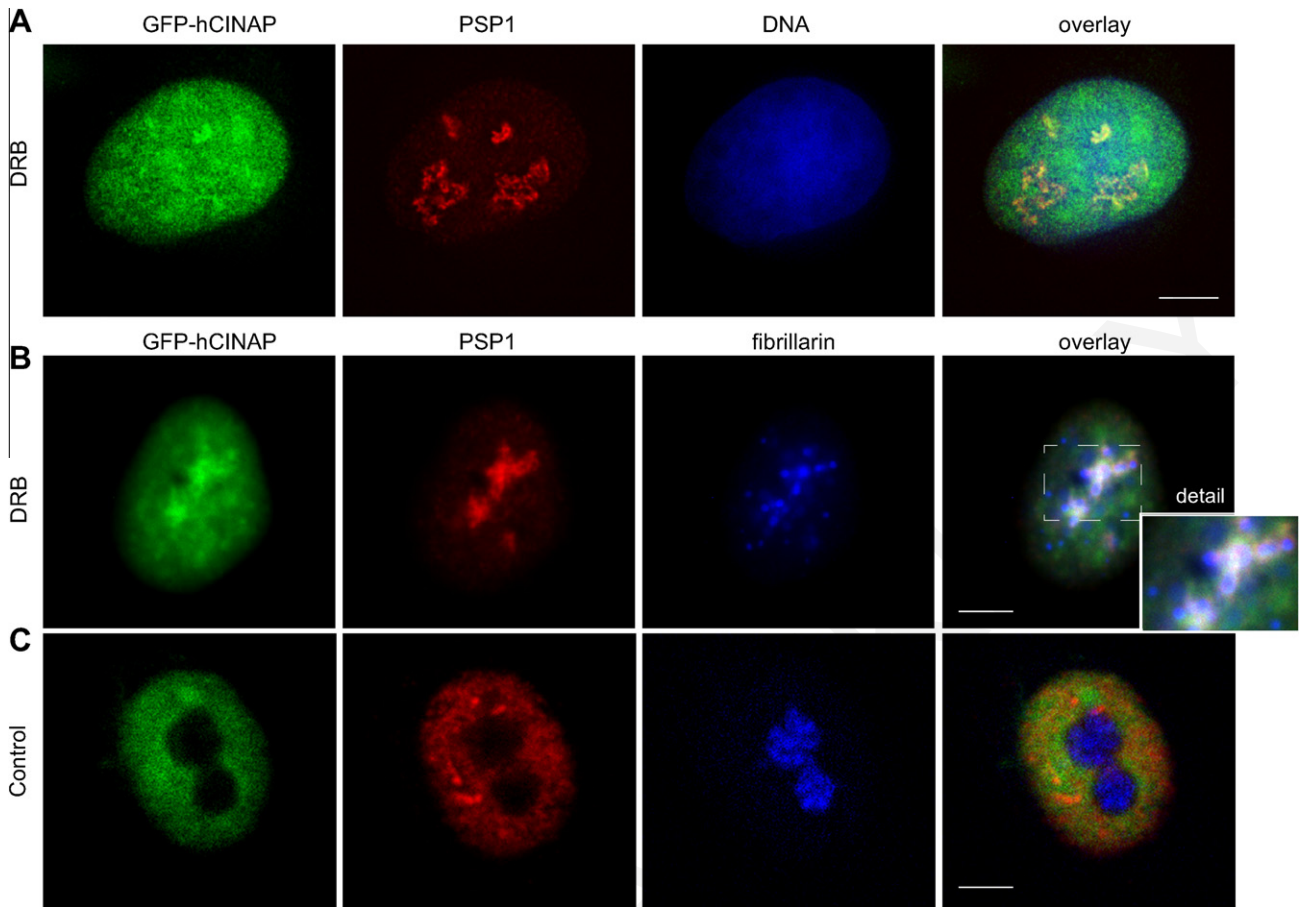


Fig. 4. Co-localization of GFP-hCINAP with PSP1 is specific to inhibition of RNA pol.II. (A) Double labeling of HeLa 33C stable cell line, treated with DRB. GFP-hCINAP fluorescence in green, PSP1 labeling in red and nuclei in blue. (B) Triple labeling of HeLa 33C, treated with DRB, showing GFP-hCINAP fluorescence (green), PSP1 (red) and fibrillarin (blue). The extracted area from the overlay image (dotted rectangle) is shown magnified in the inset and illustrates that fibrillarin-positive fragments of the nucleolus (blue) are in close proximity or in contact with but are distinct from co-segregated GFP-hCINAP (green) and PSP1 (red) caps. Note that segregation of the nucleolus, resulting from DRB treatment, has a less compact and more spread-out morphology, compared with the typical morphology resulting from Actinomycin treatment (as also documented in the literature [22–24]). (C) Equivalent examples as in B from control samples. Scale bar 5 μ m.

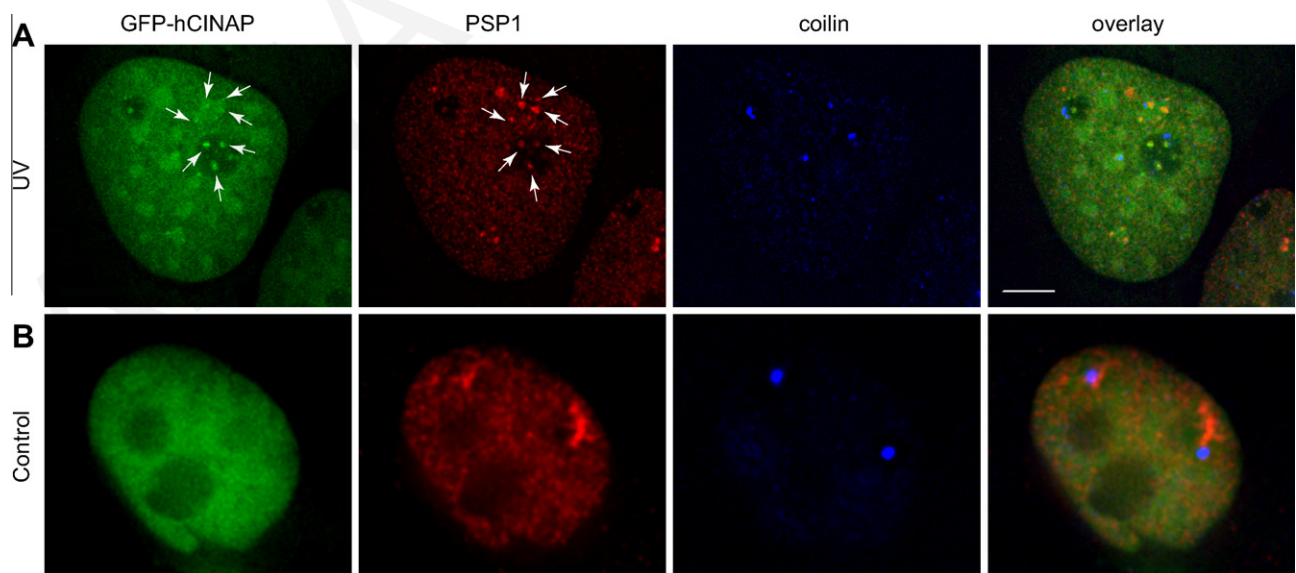


Fig. 5. GFP-hCINAP co-segregates with PSP1 but not with coilin following UV-irradiation. (A) GFP-hCINAP and PSP1 co-localization in nuclear and intranucleolar foci indicated with arrows. HeLa GFP-hCINAP fluorescence in green, PSP1 labeling in red and coilin labeling in blue. (B) Equivalent control samples. Scale bar 5 μ m.

Fig. 4C for equivalent controls). Furthermore, when Actinomycin D was used at a low concentration (0.04 μ g/ml), known to only inhibit RNA pol.I, we observed that GFP-hCINAP did not form perinucleolar caps or co-segregate with PSP1 (Suppl. Fig. S5).

These combined experiments therefore revealed that the re-distribution of hCINAP from its nucleoplasmic distribution to DNCs and its co-segregation with PSP1, recruited from the disassembled Paraspeckles, is specific to transcriptional arrest caused by RNA pol.II inhibition.

We next tested whether the co-segregation of the hCINAP and PSP1 proteins was a phenomenon that was only associated with transcriptional arrest, or if it also resulted from stress responses known to affect nuclear dynamics. UV-C irradiation, for instance, causes the disassembly of Cajal bodies to nuclear microfoci and differentially redistributes a subset of CB components [19]. Interestingly, when we subjected 33C cells to UV-C irradiation (254 nm at 30 J/m²) for 6 h, we found that GFP-hCINAP did not form perinucleolar caps but, instead, formed large rounded nuclear structures as well as small nuclear and intranucleolar foci. GFP-hCINAP and PSP1 were again co-localized in both nuclear and intranucleolar foci, which were, however, distinct from the coilin-containing microfoci resulting from UV-fragmentation of Cajal Bodies (Fig. 5A, compare with control panels in Fig. 5B).

We have therefore observed that under two physiological conditions, i.e. RNA pol.II-specific transcriptional arrest and UV-induced DNA damage, hCINAP redistributes, at least partly, from its nucleoplasmic localization to different nuclear or intranucleolar compartments where, in both cases, it co-localizes with PSP1 that has relocated from disassembled Paraspeckles. It is unusual for a nucleoplasmic protein, such as hCINAP, to redistribute in this way as a previous analysis of >70 endogenous nucleoplasmic proteins has shown that most retained their original localization and were not compartmentalized upon transcriptional arrest [10].

While the differential redistribution of nucleolar components in transcriptional inhibition is now well established, our findings underline that segregation of different nuclear bodies involves a concerted process of specific redistribution of individual components into new compartments (such as the different types of perinucleolar caps) that includes the formation of new protein associations, as seen here between hCINAP and PSP1. We have not detected direct *in vitro* interaction between these two proteins (our unpublished observations), but transient or low affinity *in vivo* interaction could occur or these proteins may also associate indirectly via other partner proteins. Such interactions may take place in the nucleoplasmic fraction of these proteins *in vivo*, may be critical for self-assembly of functional complexes in the nucleus and may get stabilized in perinucleolar caps when transcription is inhibited.

Perinucleolar DNCs, where PSP1 and hCINAP transiently associate under conditions of RNA pol.II arrest, mostly contain proteins associated with RNA pol.II transcription [10]. Intriguingly however, both PSP1 and hCINAP also appear to have distinct topological or functional relationships with the nucleolus. PSP1 continually traffics through nucleoli, despite its distinctive steady-state enrichment within Paraspeckles, a fact that explains its original identification in the nucleolar proteome [18,20]. Additionally, Fap7, a yeast ortholog of hCINAP, has been found to be essential specifically for the cleavage of the 20S pre-rRNA from pre-40S particles and directly interacting with ribosomal protein RPS14 [21].

Acknowledgements

This work was supported by Grant YGEIA/0506/05 from the Research Promotion Foundation of Cyprus to N.S. AIL is a Wellcome Trust Principal Research Fellow.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2010.10.044.

References

- [1] Santama, N., Ogg, S.C., Malekkou, A., Zographos, S.E., Weis, K. and Lamond, A.I. (2005) Characterization of hCINAP, a novel coilin-interacting protein encoded by a transcript from the transcription factor TAFII₃₂ locus. *J. Biol. Chem.* 280, 36429–36441.
- [2] Ren, H., Wang, L., Bennett, M., Liang, Y., Zheng, X., Lu, F., Li, L., Nan, J., Luo, M., Eriksson, S., Zhang, C. and Su, X.D. (2005) A crystal structure of human adenylate kinase 6: an adenylate kinase localised to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 303–308.
- [3] Zographos, S.E., Drakou, C.E., Malekkou, A., Lederer, C.W., Hayes, J.M., Leonidas D.D., Lamond A.I., Santama, N., and Oikonomakos, N.G. (in review). hCINAP is an atypical mammalian nuclear adenylate kinase with ATPase activity: insights into its catalytic mechanism and function.
- [4] Zhang, J., Zhang, F. and Zheng, X. (2010) Depletion of hCINAP by RNA interference causes defects in Cajal Body formation, histone transcription and cell viability. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1907–1918.
- [5] Matera, G.A. and Shpargel, K.B. (2006) Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline. *Cur. Opin. Cell Biol.* 18, 317–324.
- [6] Morris, G.E. (2008) The Cajal Body. *BBA* 1783, 2108–2115.
- [7] Pontes, O. and Pikaard, C.S. (2008) siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal Bodies. *Cur. Opin. Genet. Dev.* 18, 197–203.
- [8] Strzelecka, M., Trowitzsch, S., Weber, G., Lüthmann, R., Oates, A.C. and Neugebauer, K.M. (2010) Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis. *Nat. Struct. Biol.* 17, 403–409.
- [9] Platani, M., Goldberg, I., Lamond, A.I. and Swedlow, J.R. (2002) Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat. Cell Biol.* 4, 502–508.
- [10] Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye, B.T., Patton, J.G., Singer, R.H. and Zipori, D. (2005) Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol. Biol. Cell* 16, 2395–2413.
- [11] Almeida, F., Saffrich, R., Ansorge, W. and Carmo-Fonseca, M. (1998) Microinjection of anti-coilin antibodies affects the structure of coiled bodies. *J. Cell Biol.* 142, 899–912.
- [12] Fox, A.H., Bond, C.S. and Lamond, A.I. (2005) P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to Paraspeckles in an RNA-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 16, 5304–5315.
- [13] Reynolds, R.C., Montgomery, P.O. and Hughes, B. (1964) Nucleolar “Caps” produced by Actinomycin D. *Cancer Res.* 24, 1269–1277.
- [14] Smetana, K. and Busch, H. (1974) The nucleolus and nucleolar DNA in: *The Cell Nucleus* (Busch, H., Ed.), pp. 73–147, Academic Press, NY.
- [15] Raska, I., Ochs, R.L., Andrade, L.E., Chan, E.K., Burlingame, R., Peebles, C., Gruol, D. and Tan, E.M. (1990) Association between the nucleolus and the coiled body. *J. Struct. Biol.* 104, 120–127.
- [16] Carmo-Fonseca, M., Ferreira, J. and Lamond, A.I. (1992) Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis-evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J. Cell Biol.* 120, 841–852.
- [17] Santama, N., Dotti, C.G. and Lamond, A.I. (1996) Neuronal differentiation in the rat hippocampus involves a stage-specific re-organisation of subnuclear structure *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 8, 892–905.
- [18] Fox, A.H., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Lyon, C.E., Andersen, J., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002) Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr. Biol.* 12, 13–25.
- [19] Cioce, M., Boulon, S., Matera, G.A. and Lamond, A.I. (2006) UV-induced fragmentation of Cajal Bodies. *J. Cell Biol.* 175, 401–413.
- [20] Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K.L., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 12, 1–11.
- [21] Granneman, S., Nandimani, M.R. and Baserga, S.J. (2005) The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14. *Mol. Cell Biol.* 25, 10352–10364.
- [22] Shav-Tal, Y., Lee, B.-C., Bar-Haim, S., Schori, H. and Zipori, D. (2001) Reorganization of nuclear factors during myeloid differentiation. *J. Cell. Biochem.* 81, 379–392.
- [23] Clemson, C.M., Hutchinson, J.N., Sara, S.A., Ensminger, A.W., Fox, A.H., Chess, A. and Lawrence, J.B. (2009) An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of Paraspeckles. *Mol. Cell* 33, 717–726.
- [24] Martin, C., Chen, S., Maya-Mendoza, A., Lovric, J., Sims, P.F.G. and Jackson, D.A. (2009) Lamin A maintains the functional plasticity of nucleoli. *J. Cell Sci.* 122, 1551–1562.



hCINAP is an atypical mammalian nuclear adenylate kinase with an ATPase motif: Structural and functional studies.

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics</i> |
| Manuscript ID: | Prot-00728-2010.R1 |
| Wiley - Manuscript type: | Research Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Drakou, Christina; National Hellenic Research Foundation, Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry Malekkou, Anna; University of Cyprus and Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Department of Biological Sciences Hayes, Joseph; National Hellenic Research Foundation, Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry Lederer, Carsten; University of Cyprus and Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Department of Biological Sciences Leonidas, Demetres; University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology Oikonomakos, Nikos; National Hellenic Research Foundation, Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry Lamond, Angus; University of Dundee, Wellcome Trust Centre for Gene Regulation & Expression, College of Life Sciences Santama, Niovi; University of Cyprus and Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Department of Biological Sciences Zographos, Spyros; National Hellenic Research Foundation, Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry |
| Key Words: | Crystal structure, Adenylate kinase 6, ATPase, Coilin, Cajal Bodies |

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **hCINAP, an atypical dual adenylate kinase / ATPase, influences the formation of Cajal**
4 **Bodies in the nucleus of human cells.**
5
6
7

8
9 **Christina E. Drakou¹, Anna Malekkou², Joseph M. Hayes¹, Carsten W. Lederer²,**
10 **Demetres D. Leonidas³, Nikos G. Oikonomakos^{1†}, Angus I. Lamond⁴, Niovi Santama²,**
11 **and Spyros E. Zographos^{1*}**
12
13

14
15 ¹Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation,
16 48 Vas. Constantinou Ave., 11635 Athens, Greece
17

18
19 ²Department of Biological Sciences, University of Cyprus and Cyprus Institute of Neurology
20 and Genetics, PO Box 20537, 1678 Nicosia, Cyprus
21

22
23 ³Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos Str.
24 41221 Larissa, Greece
25

26
27 ⁴Wellcome Trust Centre for Gene Regulation & Expression, College of Life Sciences,
28 University of Dundee, MSI/WTB/JBC Complex, Dow Street, Dundee, DD1 5EH, UK.
29

30 [†]Passed away on August 30th 2008
31
32

33
34 *Address correspondence to Spyros E. Zographos, Institute of Organic and Pharmaceutical
35 Chemistry, National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Avenue, 11635
36 Athens, Greece. Tel. +30-210-7273850; Fax. +30-210-7273831; e-mail: sez@eie.gr
37
38
39

40
41 **Short title:** hCINAP is an atypical nuclear AK and ATPase
42
43

44 **Abbreviations**

45
46 The abbreviations used are: hCINAP, human coilin-interacting nuclear ATPase protein; AK,
47 adenylate kinase; GFP, green fluorescent protein; UsnRNP, Uridine-rich small nuclear
48 ribonucleoprotein; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; NMP, Nucleoside
49 Monophosphate; mab, monoclonal antibody; IPTG, isopropyl-galacto-pyranoside; GST,
50 glutathione S-transferase; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Tris,
51 Tris(hydroxymethyl)aminomethane; PBS, phosphate buffered saline; DMEM, Dulbecco's
52 modified Eagle's medium; AP5A, P₁,P₅-Di(Adenosine-5')Pentaphosphate; AMPPNP,
53 Adenosine 5'-(β,γ-imido)triphosphate; TLS, Translation/Libration/Screw; OPLS-AA,
54 Optimized Potential for Liquid Simulations–All Atoms; IFD, induced fit docking; vdW, van
55 der Waals.
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein (hCINAP) directly interacts with coilin, a marker protein of Cajal Bodies, nuclear organelles involved in the maturation of small nuclear ribonucleoproteins UsnRNPs and snoRNPs. hCINAP has previously been designated as an adenylate kinase (AK6), but is very atypical as it exhibits unusually broad substrate specificity, structural features characteristic of ATPase/GTPase proteins (Walker motifs A and B) and also intrinsic ATPase activity. Despite its intriguing structure, unique properties and cellular localisation, the enzymatic mechanism and biological function of hCINAP have remained poorly characterised. Here, we offer the first high-resolution structure of hCINAP in complex with the substrate ADP (and dADP), the structure of hCINAP with a sulfate ion bound at the AMP binding site, and the structure of the ternary complex hCINAP-Mg²⁺ADP-Pi. Structural analysis and induced-fit docking calculations suggest a functional role for His79 in the Walker B-motif. Kinetic analysis of mutant hCINAP-H79G indicates that His79 affects both AK and ATPase catalytic efficiency and may also have a regulatory role in the selection of catalytic activity (AK vs. ATPase). In addition, we show that *in vivo* expression of hCINAP-H79G in human cells is toxic and drastically deregulates the number and appearance of Cajal Bodies (CBs) in the cell nucleus. These findings suggest that hCINAP may be a key molecule influencing homeostasis of nuclear nucleotides and possibly affecting the network of critical interactions, energy requirements or substrate phosphorylations involved in the assembly/disassembly process of Cajal Bodies in the nucleus of human cells.

Keywords: Crystal structure; Adenylate kinase 6; ATPase; Coilin; Cajal Bodies

INTRODUCTION

Adenylate kinase (AK; phosphotransferase; EC 2.7.4.3) is an abundant enzyme class, catalysing the interconversion of ATP, ADP, and AMP, according to the reversible reaction: $\text{Mg}^{2+}\text{ADP} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{Mg}^{2+}\text{ATP} + \text{AMP}$. The adenylate kinase system is able to provide ATP rapidly during intense activity and thus regarded as a reserve energy system used to regenerate ATP from ADP under energy stress conditions.

Five AK isoforms (AK1–5) with various substrate specificities and tissue distributions are known in vertebrates^{1,2,3,4,5}. These isoforms localize to the cytoplasm (AK1 and AK5) or mitochondria (AK2, AK3 and AK4). They are key enzymes in nucleotide homeostasis, maintaining the physiological nucleotide ratios in different cell compartments and cell types. Structurally, AKs are typical α/β proteins sharing a common architecture that is consistent with a β -sheet CORE domain, bearing a phosphate binding loop (P-loop), and two flanking mobile domains called the LID and NMP bind domains⁶. hCINAP (Human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein), or also assigned as AK6 because of its AK activity², has unique properties relative to the known AKs: it exhibits unusually broad substrate specificity², displays intrinsic ATPase activity¹, has a nuclear localisation¹ and possesses a number of atypical structural features for an adenylate kinase, namely a Walker B motif and a metal-coordinating residue, highly conserved and typical among the members of the ATPase/GTPase superfamily^{7,8,9,10}. The question therefore of its enzymatic classification as an AK, as well as certain aspects of its enzymatic activity and structure, still remain unresolved for hCINAP.

So far, hCINAP orthologs have been identified in yeast (Fap7), *C. elegans* (cAK6) and *D. melanogaster* (dAK6)¹¹. In *C. elegans*, knockdown of the cAK6 gene results in growth suspension¹². In yeast, Fap7p¹³ interacts with ribosomal protein RPS14 and appears to be involved in pre-rRNA processing: a Walker B motif mutant (D82AH84A) is unable to cleave the 20S pre rRNA from 40S pre-rRNA particles¹⁴. In human cells, hCINAP was shown to interact directly with the carboxyl terminal tail of coilin, a marker protein of Cajal Bodies (CBs), which are nuclear organelles involved in the maturation of UsnRNPs and snoRNPs en route to their sites of function in the nucleoplasm and nucleolus¹. Furthermore, overexpression of hCINAP causes a decrease in the average number of CBs per nucleus in human cells¹. Despite these intriguing associations with RNA metabolism in the nucleus, the functional role of hCINAP is also still poorly defined.

The unique localization and structural features of hCINAP, indicating an atypical dual enzymatic activity and its undefined biological function prompted us to undertake this

1
2
3 investigation. We present here the structural analysis of hCINAP in complex with ADP,
4 dADP, SO_4^{2-} and $\text{Mg}^{2+}\text{ADP-PO}_4^{3-}$ and also provide a model for the hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP
5 complex. We characterize the dual ATPase and AK activity of hCINAP by kinetic analysis
6 and with site-directed mutagenesis in residue H79 within VIVDYHG, a functional Walker B
7 motif (hhhDXXG), uncover the effect of this mutation in its kinetic properties and enzymatic
8 mode. Furthermore, we demonstrate that an H79G mutation *in vivo*, has striking effects in the
9 formation of Cajal Bodies in the nucleus of human cells.
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

MATERIALS AND METHODS

Cell Line – HeLa cells were cultured in DMEM, containing 10% v/v fetal calf serum (Gibco/BRL), 2 mM L-glutamine and 50 U/ml of penicillin/streptomycin, and maintained at 37 °C in 5% CO₂.

Antibodies – The following primary antibodies were used for immunofluorescence: Mouse anti-coilin δ 4 monoclonal antibody (mab) 5P10 TC at 1:50 dilution, mouse anti-PML Bodies mab P6-M3 at 1:100 (Santa Cruz Biotech.) and mouse anti-fibrillarin mab AFB01 at 1:200 (tebu-bio). Secondary antibodies (Molecular Probes) were: Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG, both at 1:1500 dilution.

Immunofluorescence – Immunofluorescence was carried as described by Santama et. al., 1998¹⁵ and labeled cells were analysed on a Zeiss Axiovert 200M inverted fluorescence microscope, equipped with a Zeiss AxioCam MRm camera and Zeiss Axiovision 4.2 software, using a Zeiss Apochromat x63 1.3 oil lens.

Transient Transfections and Statistical Analysis – Exponentially growing HeLa cultures were harvested and replated onto coverslips 24 h prior to transfection. Transfections were carried out using a Ca²⁺ / PO₄⁻³ precipitation protocol¹. At 24 and 36 h post transfection, coverslips were retrieved for immunofluorescence and microscopic analysis. For analysis of the Cajal Bodies phenotypes, random fields of cells were scored for the number of CBs per nucleus (as revealed by coilin immunostaining) from three independent experiments (n=571 for GFP-hCINAP-H79G, n=1439 for GFP-hCINAP-WT and n=1072 for mock-transfected cells). Data processing was performed in Excel (Microsoft Corp.) and statistical tests undertaken in Prism (GraphPad Software, Inc.). The mean CB number (\pm sample standard deviation) was calculated and statistically tested by Welch's t-test. A histogram of the number distribution was generated for each construct and the distributions compared by 2-way ANOVA. P values <0.05, 0.01 and 0.001 were assigned as significant, highly and extremely significant, respectively.

Construction of Bacterial Expression Vectors – hCINAP cDNA was subcloned as a BamHI/SalI fragment from pGEX-4T-1-hCINAP [described by Santama et al., 2005¹] into

1
2
3 bacterial expression vector pGEX-6P-3 (Amersham Biosciences). The hCINAP-H79G mutant
4 was generated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and confirmed
5 by DNA sequencing (MWG, Germany).
6
7
8

9
10 *Bacterial Expression and Purification of Recombinant Proteins* – For recombinant protein
11 expression, competent *E. coli* B834(DE3)pLysS (Novagen) were transformed with pGEX-6P-
12 3-hCINAP or pGEX-6P-3-hCINAP-H79G, cultured at 37 °C until OD₆₀₀ was 0.4–0.5 AU,
13 induced with 0.5 mM isopropyl β-thiogalactopyranose (IPTG, Sigma) and grown at 18 °C
14 overnight. Cells were lysed in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.2, 0.2 M NaCl, 0.5 mM
15 DTT, 0.5 mM PMSF, and a mixture of protease inhibitors (Roche)] and disrupted by
16 sonication. The cell lysate was clarified (130,000 x g at 4 °C for 30 min), the cleared
17 supernatant was affinity purified onto a GSTrap 4B column (GE Healthcare), followed by on-
18 column cleavage of the GST tag by injection of 3C protease, performed as described by Dian
19 et al., 2002¹⁶. The eluate was concentrated by ultrafiltration and further purified by gel
20 filtration chromatography on a 150-ml Superdex 75 (GE Healthcare) column. Fractions
21 containing the hCINAP monomer were pooled, concentrated to 14 mg/ml and used for
22 crystallization experiments. Additionally, purified proteins were desalted by dialysis against
23 20 mM Tris, pH 7.5 and used for AK or ATPase assays.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35
36 *AK Assays* – AK assays were performed on a dual-beam Cary 100 conc UV/VIS
37 spectrophotometer. The rate of β-NADH disappearance was monitored at 340 nm by
38 simultaneous measurement of test and reference cell absorbance. Reference samples,
39 containing reaction mixture without hCINAP, were used to automatically subtract background
40 absorbance, mainly attributable to the ATPase activity of pyruvate kinase and nonenzymatic
41 ATP hydrolysis. The AK activity of hCINAP with respect to ATP was measured in the
42 presence of 0.3 mM AMP. The final assay mixture (0.2 ml) consisted of 100 mM Tris-HCl,
43 pH 7.5, 60 mM KCl, 0.21 mM β-NADH, 1 mM PEP, 5 mM MgCl₂, 11.4 U/ml PK (Sigma),
44 10.6 U/ml LDH (Sigma), 20 μg hCINAP, 0.3 mM AMP and 0.01–1.0 mM ATP.
45
46
47
48
49
50
51
52

53 The effects of the AK-specific inhibitor, AP5A, were determined in the presence of
54 0.33 mM ATP, 0.3 mM AMP and 1–120 nM AP5A.
55

56 All kinetic data were analyzed with the nonlinear regression program GraFit¹⁷.
57
58
59

60 *ATPase Assay* – ATPase activity was determined by the malachite-green assay¹⁸. The reaction
mixture (0.2 ml) contained 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.01–2

1
2
3 mM ATP and 20 μg wild-type or mutant enzyme. Parallel control samples, containing
4 reaction mixture without hCINAP, were used to subtract absorbance derived mainly from
5 nonenzymatic ATP hydrolysis. Blank samples, containing buffer with and without hCINAP,
6 showed no absorbance difference and were used to adjust the baseline of the instrument.
7 Reactions took place for 10 min at 30 °C and were stopped by addition of the color reagent.
8 Mixtures were allowed to stand for 10 min, and colorimetric determination of PO_4^{3-} liberation
9 was monitored at 630 nm.

10
11
12
13
14
15
16
17 *Crystallization and Data Collection* – Co-crystals of hCINAP in complex with ADP, dADP
18 and $\text{Mg}^{2+}\text{ADP-PO}_4^{3-}$ (average size of 0.3–0.5 mm), were obtained at 20 °C using the sitting
19 drop vapour diffusion technique in a buffer comprising 14 mg/ml enzyme, 0.1 M HEPES pH
20 7.5, 1.5 M Li_2SO_4 , 0.2 M NaCl, 0.5 mM DTT, 25 mM MgCl_2 , and 2 mM ADP or 2 mM
21 dADP or 25 mM AP5A, respectively. Prior to flash freezing for data collection, crystals were
22 transferred for 5–15 sec to fresh buffer containing 25% v/v glycerol. Single crystal diffraction
23 data were collected on the PX 10.1 beamline (SRS, Daresbury Laboratory), using a 225-mm
24 MAR CCD detector. The crystal-to-image plate distance was 150 mm and gave a maximum
25 resolution of 1.75 Å at the edge of the detector.

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35 *Structure Determination*– Integration and data reduction were performed with the programs
36 DENZO and SCALEPACK¹⁹ or MOSFLM²⁰ and SCALA, from CCP4 suite²¹, and intensities
37 transformed to amplitudes with TRUNCATE²². The crystals were isomorphous with the
38 sulfate-bound form (1RKB)². Phases were obtained with Molrep²³, using the 1RKB structure
39 as a molecular replacement model ($R_f/\sigma= 11.53$, $T_f/\sigma=35.01$). Alternate cycles of manual
40 building with the program Coot²⁴ and refinement using the maximum likelihood target
41 function as implemented in the program REFMAC²⁵ improved the model phases. At this
42 stage, water molecules were added to unidentified F_o-F_c map peaks greater than 1.0 σ by
43 using the “water find” module of the program Coot. After an additional cycle of refinement
44 and manual building, the ligand molecule was included in subsequent refinement cycles.
45 ADP, dADP, $\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$, PO_4^{3-} and SO_4^{2-} models, retrieved from the REFMAC library, were
46 fitted into the electron density with Coot. The final model was generated by TLS refinement
47 within REFMAC using TLS groups for the protein generated by the TLSMD web server²⁶.
48 Details of data processing and refinement statistics are summarized in **Table I**.

49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 PROCHECK²⁷ was used to assess the quality of the final structure. Structures were
analysed by programs “contacts” and “angle” of the CCP4 suite, and hydrogen bonds were

1
2
3 assigned if the distance between electronegative atoms was less than 3.3 Å and if both angles
4 between these atoms and the preceding atoms were greater than 90°. Van der Waals (vdW)
5 contacts were noted for nonhydrogen atoms separated by less than 4 Å.
6
7

8
9
10 *Protein Preparation for Substrate Docking Calculations* – Using the hCINAP-Mg²⁺ADP-
11 PO₄³⁻ X-ray complex coordinates, an initial hCINAP- Mg²⁺ATP-PO₄³⁻ was prepared by
12 conversion of ADP to ATP, based on the position of the extra phosphate group in the
13 superimposed AK-AMPPNP-AMP (PDB entry 1ANK) structure²⁸. Wat12 and Wat8 were
14 deleted, as the extra phosphate takes their places in coordinating to Mg²⁺ and forming a
15 hydrogen bond contact with Arg109. The initial model was prepared for docking using
16 Schrödinger’s Protein Preparation Wizard by deleting residual SO₄²⁻ molecules, the Li atom,
17 all crystallographic water molecules beyond 5 Å of Mg²⁺, ATP or PO₄³⁻. Two further water
18 molecules (Wat9 and Wat10), to accommodate different orientations of the docked AMP
19 molecule, were also deleted. Bond orders were assigned and hydrogen atoms added. Initial
20 assignment of protonation states for basic and acidic residues and tautomeric states were
21 based on pKa at their normal pH (7.0). Subsequent optimization of hydroxyl, His protonation
22 states, C/N atom “flips” and side-chain O/N atom “flips” of Asn and Gln was based on
23 optimizing hydrogen bonding patterns. His residues were assigned as neutral, either in a HIE
24 or HID state. Any steric clashes or bad contacts were removed by a final Impref minimization
25 using the OPLS-AA (2001) force field²⁹.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 *Ligand Preparation for Docking* – The AMP and ADP ligands were extracted directly from
41 the crystal structures (PDB entries 1ANK and 3IIL, respectively), and ATP from the prepared
42 hCINAP-Mg²⁺ATP-PO₄³⁻ complex. Hydrogens were added, bond orders assigned and
43 structures minimized using MacroModel version 9.5³⁰ and the OPLS-AA (2005) force
44 field^{29,31}, with water solvation effects included via the GB/SA continuum model³².
45
46
47
48
49

50 *Rigid Receptor Docking* – Initial validation of the hCINAP-Mg²⁺ATP-PO₄³⁻ model structure
51 and the Glide-XP (version 4.5)³³ docking method^{34,35,36} was performed by re-docking of ATP
52 to the model. Docking grids were centered on the ATP ligand and prepared with/without the
53 PO₄³⁻ ion at the AMP binding site. Glide-XP docking of AMP to the AMP binding site was
54 performed with PO₄³⁻ used as the centre for the docking grids. In each case, the grids
55 represented the shape and properties of the binding sites with dimensions ~ 30 Å × 30 Å × 30
56 Å.
57
58
59
60

1
2
3
4
5 *Induced Fit Docking* – IFD calculations³⁷, including receptor flexibility of AMP to the AMP
6 binding site, were performed using the Glide-XP (rigid receptor) top-ranked AMP-pose as
7 input. Grids for the hCINAP-Mg²⁺ ATP-AMP model had dimensions of 30 Å × 30 Å × 30 Å,
8 centered on AMP. A maximum of 20 ligand binding poses were saved from Stage I Glide-SP
9 docking. Stage II was a Prime induced fit, where residues within 5 Å of the AMP ligand
10 initial poses were refined. Residues 45–54 of the NMP-binding loop were explicitly included
11 and P-loop residues Lys16 and Thr17 explicitly excluded, due to their role in coordinating to
12 the Mg²⁺. For Stage III, up to 20 structures within 30 kcal/mol of the lowest-energy structure
13 were used for Glide-XP AMP re-docking. The resulting receptor-ligand poses were analyzed
14 in terms of structure, ligand re-docking GlideScore (GS), and IFDScore (ligand re-docking
15 GS + 0.05% Prime complex energy).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 *QM/MM Calculations* – QM/MM single point calculations using QSite 5.0³⁸ were performed
27 on the geometries from the IFD calculations to estimate changes in ESP fit atomic charges as
28 the AMP α-phosphate approaches the ATP γ-phosphate. The QM region contained: the ATP
29 and AMP ligands with the -CH₂- groups “hydrogen-capped” in place of the riboses; any
30 residue and water molecule directly hydrogen-bonded with the AMP and ATP α- and γ-
31 phosphates; the hexa-coordinated Mg²⁺, its 3 coordinated waters and the Thr17 side chain.
32 The B3LYP^{39,40} DFT method was used with the 6-31+G* basis set^{41,42,43}, while the OPLS-
33 AA(2005) force field^{29,31} was used for the MM region.
34
35
36
37
38
39
40
41

42 *Superimposition and Structure Presentation* – These were performed with LSQKAB⁴⁴ and
43 SUPERPOSE⁴⁵. Figures were prepared and rendered with PyMol⁴⁶.
44
45

46 The coordinates of the protein complexes have been deposited to the RCSB Protein
47 Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>), with codes 3IIJ, 3IIK, 3IIL and 3IIM.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

The structures of hCINAP in complex with ADP, dADP and SO_4^{2-} : identification of substrate binding sites

To re-examine and fully resolve the structural features of hCINAP as an atypical putative AK enzyme and probe ADP binding sites for the forward reaction ($2\text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) plus the expected AMP and ATP binding sites for the bisubstrate reverse reaction ($\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2\text{ADP}$), we provide here a series of structural analyses. We achieved the first structure of hCINAP in complex with ADP, its putative AK substrate (**Fig. 1 and 2A, Table I**), at a higher resolution (1.76 Å) than the existing structure for the sulfate-bound form at 2 Å resolution (1RKB)². Inspection of the electron density maps of the hCINAP-ADP complex shows a strong $F_o - F_c$ accompanied by a $2F_o - F_c$ electron density, which can neatly accommodate one ADP molecule. The catalytic center is lined by P-loop amino acids 10–17, Arg109 from the LID domain and also His79 (**Fig. 1 and 2A**). ADP binds in a groove located near the protein surface with the adenine ring occupying the entrance of the catalytic center and the phosphate groups orientated toward the P-Loop region. The crystal structure shows that, upon binding to hCINAP, ADP forms numerous polar and non-polar contacts with the residues of the ATP binding site (summarized in **Sup-Table I**). In agreement with the broad substrate specificity of hCINAP, the adenosine moiety of ADP participates in only three hydrogen bonds with protein residues (**Fig. 2A**).

We also conducted the structural analysis of hCINAP-dADP complex at 2 Å resolution, (**Table I**), which showed that dADP perfectly overlaps with the ADP molecule (RMSD=0.121 Å; data not shown), but that the N1 of adenine and the remaining sugar oxygen O3' are not hydrogen bonded, reducing dADP interaction by four hydrogen bonds, compared to ADP (**Sup-Table II**).

Additionally, in the hCINAP-ADP structure the deduced ATP binding site is bordered by a loop composed of residues 78 to 84. This loop links the C-terminal end of the CORE $\beta 3$ strand (Asp77) with a 3_{10} helix, and, significantly, bears a Walker B motif, 77-DYHG-80, indicating its possible role in catalysis^{8,9,10,14} (**Sup-Fig. 1**). In particular, His79 is linked with the β -phosphate in the ATP binding site by a hydrogen bond network extending from amide ND1 to Wat11, from Wat11 to P loop-Lys16 and from Lys16 back to the β -phosphate. (**Fig. 2A**). Water molecule Wat11 lies between the β -phosphate (PB) of ADP (PB-O_W11; 4.5 Å) and His79 (O_W11-ND1; 2.9 Å), and is hydrogen bonded to NZ of Lys16 (2.81 Å). O_W11 is in-line with respect to ND1 and PB (angle ND1-O_W11-PB=177.12°), suggesting that this

1
2
3 position is of high potential for a nucleophilic attack of an oxygen on the β -phosphate of
4 acceptor ADP during the forward AK reaction (**Fig. 2A**).
5
6

7 In its totality, the tertiary structure of hCINAP bound to ADP (or dADP) (**Fig. 1**),
8 including its ATP binding site, closely resembles the previously reported sulfate-bound
9 protein structure². However, in the ATP site, the most important difference that we have
10 identified is a shift by 1.5 Å in the side chain of Arg109, which could be associated with a
11 conformational change of the LID domain, possibly in order to optimize the contacts with the
12 α - and β -phosphate groups of ADP (**Fig. 1 and Fig. 2A**). Additionally, the higher-resolution
13 structure allowed us to build accurately the nucleoside monophosphate-binding loop (NMP-
14 binding loop; amino acids 45–55), whose residues were interpreted as disordered in a
15 previous structural analysis of hCINAP². In our structure (**Fig.1**), the NMP-binding loop
16 adopts a β strand-turn- β strand conformation and has a well defined electron density with
17 average B factor for all atoms 30 Å (**Sup-Table V**).
18
19
20
21
22
23
24
25

26 To assess whether the observed structural difference of the NMP-binding domain in
27 this work may be due to ADP binding to the enzyme, we obtained data from the hCINAP-
28 SO_4^{2-} complex at 1.95 Å resolution, and refined to an R-factor of 0.179 (Rfree = 0.206)
29 (**Table I**). In our hCINAP- SO_4^{2-} structure, we observed the same structural motif of the NMP-
30 binding domain as in the ADP complex, indicating that it is independent of ligand (ADP)
31 binding and strengthening our interpretation of the NMP-binding loop (**Fig.2B**).
32
33
34
35
36

37 Finally, in the hCINAP- SO_4^{2-} structure, in addition to a sulphate ion at the ATP-
38 binding site, we also found a weakly bound sulfate at the AMP-binding site located between
39 His79 and Arg39 (**Fig. 2B, Sup-Table III**). This position is very similar to that observed for
40 the α -phosphate moiety of AMP in AKs from *Escherichia coli* (AKeco) and *Sulfolobus*
41 *acidocaldarius* (AKas), 1ANK and 1NKS, respectively (**Sup-Fig. 2A**). SO_4^{2-} interacts with a
42 conserved guanidinium group, also present in the AMP binding site of 1ANK and 1NKS
43 (Arg36 and Arg54, respectively)^{47,48}. These findings suggest that the location occupied by the
44 sulfate ion (known to mimic the PO_4^{3-}) represents the recognition site for the α -phosphate of
45 AMP in hCINAP.
46
47
48
49
50
51
52

53 In conclusion therefore, the combination of our structures allowed the identification of
54 the ADP binding mode, within the ATP-binding site, and suggested the location of the AMP
55 binding site.
56
57
58
59
60

Mg²⁺ADP-PO₄³⁻ binding

To further probe the AMP binding site in hCINAP and, at the same time, capture its transition intermediate, we used a known inhibitor of AKs, the bisubstrate analog bis-adenosine pentaphosphate (AP5A). We found AP5A to be a potent inhibitor of hCINAP with an IC₅₀ of 27.03 ± 2.93 nM AP5A (**Sup-Fig. 3**).

The hCINAP structure that we obtained in the presence of AK5A (**Fig. 2C**) did not correspond to a transition intermediate, as expected, but appeared to correspond to a post-hydrolysis state. This may be explained by a technical limitation of the x-ray crystallography technique: in our experiments co-crystal formation in the presence of AP5A required 1 month and it is therefore likely that the co-crystallized AP5A was slowly hydrolyzed enzymatically or chemically during the crystallization period. Soaking of preformed crystals with fresh AP5A solution led to crystal deterioration, indicating that the crystal complex formation was accompanied by extensive structural re-organisation (as would be expected in AKs).

The obtained structure revealed that (a) the ATP site was occupied by a Mg²⁺ADP complex and a phosphate group (Pi) in close contact with His79 of the Walker B motif, (b) a large shift in the backbone torsional angle of His79 occurred ($\Delta\Phi = -67.8^\circ$), accompanied by a shift of the imidazole ring by 2.1 Å away from the ATP site in order to establish contacts with the phosphate group (**Sup-Fig. 4**), (c) the magnesium ion was hexa-coordinated with one ligand supplied by a β -phosphate oxygen and a second one supplied by the hydroxyl group of Thr17, and finally (d) ADP possessed an identical conformation to that of the ADP complex (RMSD=0.061 Å).

There is strong evidence that PO₄³⁻ (as a product of hydrolysis), rather than SO₄²⁻, was bound in the presented crystal structure: (a) We could not detect a SO₄²⁻ ion in this position or a shift in the His79 side chain in any other of the three reported structures (SO₄²⁻, ADP, dADP), but exclusively in the Mg²⁺ADP-PO₄³⁻ structure, although the precipitant Li₂SO₄ was present at a concentration of 1.5 M in all four crystallization experiments. Furthermore, (b) we have carried out the co-crystallization experiments (data not shown) in the presence of Mg²⁺, Mg²⁺ADP and Mg²⁺dADP, but have not obtained SO₄²⁻ in this position, neither a His79 shift, nor a bound Mg²⁺ ion.

The PO₄³⁻ at its position makes hydrogen bonds to the imidazole nitrogen of His79 (2.65 Å) and the NZ atom of Lys16 (2.83 Å). We propose that during the forward AK reaction (2ADP → ATP + AMP) the Mg²⁺ ion does not follow the movement of the attacking β -phosphate, but maintains its observed position and hexa-coordinated geometry, with 2 γ -phosphate oxygens of the produced ATP replacing two water molecules, most probably Wat8

1
2
3 and Wat12 (Fig. 2C and Sup-Table IV).
4

5 Therefore, while for technical reasons, this approach did not reveal unequivocally the
6 binding site of AMP, the post hydrolysis structure obtained was very informative in
7 determining the residues that provide the co-ordination for the Mg^{2+} ion (this is the first
8 example of an AK with a bound Mg^{2+} ion) and in revealing that P loop His79 is involved in
9 the recognition of PO_4^{3-} in the structure with $Mg^{2+}ADP-PO_4^{3-}$ present.
10
11
12
13
14

15 **Prediction of the hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP ternary complex by modeling.**

16
17 In the difficulty of direct crystallographic evidence for the AMP binding site (required
18 for an AK activity) and with hCINAP already classified as an AK², we decided to model a
19 hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP ternary complex in order to predict what structural changes this
20 would induce and to gain further insights into the nature of hCINAP *if* functioning as an AK.
21 Successful docking of ATP to the hCINAP- Mg^{2+} ATP- PO_4^{3-} model, prepared from the
22 hCINAP- Mg^{2+} ADP- PO_4^{3-} X-ray complex (see Materials & Methods), required removal of the
23 PO_4^{3-} ion from the model, indicating unfavorable ATP- PO_4^{3-} electrostatics with PO_4^{3-} in its
24 present position at the ATP binding site. All ATP docking poses produced the ATP binding
25 conformation in the model complex, with the superimposed RMSD (heavy atoms) for the top-
26 ranked pose being 0.828 Å, compared to the starting model.
27
28
29
30
31
32
33
34

35 ATP binding site structural changes going from ADP to ATP are minimal with the
36 more significant conformational changes expected in the NMP-bind domain and Walker B-
37 motif loop in order to accommodate AMP at the AMP binding site.
38
39

40 In addition, induced fit docking (IFD), including receptor flexibility of AMP to the
41 AMP binding site, resulted in eight receptor-ligand binding structures, four of which made
42 intuitive sense with the α -phosphate occupying a similar position to the α -phosphate in 1ANK
43 (*E. coli* AK with bound AMPPNP and AMP) and 1NKS (*S. acidocaldarius* AK with bound
44 ADP and AMP) structures (Table II). The hexa-coordinated Mg^{2+} coordination sphere is
45 conserved for all structures. The first three structures (IFD-1 – IFD-3) were also the top-
46 ranked IFD poses. IFD-1 and IFD-2 poses with the highest IFD scores reproduce best the
47 AMP-bound conformations in 1ANK and 1NKS, with superimposed ligand RMSDs (heavy
48 atoms) being all less than 1 Å. They both have similar ATP-AMP inter-phosphate P-P
49 distances (~ 5 Å) and form 7 direct AMP – protein hydrogen bonds which compares well with
50 the homologous 1ANK and 1NKS complexes forming eight hydrogen bonds. The main
51 structural differences between IFD-1 and IFD-2 are the length of the hydrogen bonds and the
52 AMP α -phosphate position, which differs spatially by about 1 Å. IFD-1 (P-P=5.12 Å), shown
53
54
55
56
57
58
59
60

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

in **Fig. 3B**, forms more favorable contacts with hCINAP as judged by the higher Glide Score (-10.17) compared to IFD-2 (-8.82). Compared to the hCINAP-Mg²⁺ADP-PO₄³⁻ X-ray structure, there is a backbone shift in the NMP binding domain (residues 45–55) with the largest shifts of 3.5–5 Å for residues 49–51. Accompanying side-chain rearrangements are mainly associated with increasing favorable contacts with AMP (**Sup-Fig. 2B**).

The other two receptor-ligand poses in **Table II** have longer (6.49 Å; IFD-4; **Fig. 3A**) or shorter P-P distances (4.53 Å; IFD-3; **Fig. 3C**) than those of IFD-1 and IFD-2. The structures suggest a key role for water bridging in the approach of an α-AMP phosphate towards the γ-ATP phosphate, as well as some assistance from the Walker B motif residues, Tyr78 and His79. In IFD-3, the AMP ligand is ideally placed for a phosphate transfer mechanism involving a nucleophilic attack. The case for such a pathway is accentuated by our QM/MM calculations of electrostatic potential (ESP) atomic partial charges at the different P-P distances for IFD-1, IFD-3 and IFD-4 (**Sup-Table VI**). As the AMP approaches the ATP, an AMP α-phosphate O_{P1} becomes hydrogen bonded with a Mg²⁺ coordinated water (Wat5) and this is reflected in its estimated partial charge of -0.82 for P-P distance 4.53 Å (**Fig. 3C**). The corresponding partial charge for His79 hydrogen bonded phosphate O_{P2} is -0.98. Approach of a mobile AMP towards an immobile ATP is consistent with a transfer mechanism in which the AMP α-phosphate attacks the γ-phosphate of ATP, assisted by water molecules that bridge ATP γ- and AMP α- phosphates. Further, the structures and P-P distances reported here, although derived from docking (and should therefore be considered with some caution), are consistent with molecular dynamics simulations of *E. coli* AK Mg²⁺ATP-ADP⁴⁹.

Overall, the modeling strongly indicated that the AMP binding site would lie between the B motif and Arg39. This conclusion is strengthened by the fact that Arg39 is a highly conserved residue in other known AKs.

An H79G mutation affects both AK and ATPase activities of hCINAP

The overall structural analysis and the proposed catalytic mechanism have highlighted the significance of certain amino acids in the P loop region (Lys16, Thr17), the LID domain (Arg109) and Walker B motif (His79). These residues are either identical or correspond to conservative substitutions in orthologs of hCINAP across the eukaryotic phyla. Interestingly, in human adenylate kinases AK1–AK5, Lys16 and Arg109 are conserved, while Thr17 and His79, perceived as functionally critical for hCINAP, are absent. Because our structural and

1
2
3 modeling studies indicate that H79 may be a regulatory residue that responds to substrate
4 binding, we decided to generate an hCINAP-H79G mutant and perform kinetic analysis to
5 evaluate its effect on catalytic activity.
6
7

8
9 We first calculated the AK activities of highly purified hCINAP and hCINAP-H79G
10 with respect to ATP, in the presence of a fixed concentration of AMP (0.3 mM). Second, we
11 determined ATPase hydrolysis by hCINAP-WT and hCINAP-H79G, in the absence of AMP
12 (Table III and Fig. 4). We found that in the presence of the H79 mutation (a) the AK
13 enzymatic efficiency (K_{cat}/K_m) is reduced by 72% relative to the wild type enzyme, and (b)
14 the efficiency for ATP hydrolysis in the absence of AMP (ATPase activity) is reduced by
15 76%, relative to the wild type. Furthermore, the ATPase activity of wild type hCINAP (1.45
16 $M^{-1}.s^{-1}$) is about 1% of its AK activity ($140 M^{-1}.s^{-1}$). While many protein kinases exhibit ATP
17 hydrolysis in the absence of their substrate, the high intrinsic ATPase activity of hCINAP is
18 quite unusual for an AK.
19
20
21
22
23
24
25

26 Kinetic analysis has therefore provided the evidence for a dual enzymatic activity for
27 hCINAP that is consistent with the dual structural features of the enzyme, namely the overall
28 folding that is appropriate for an AK and a catalytic centre that is characteristic for an
29 ATPase.
30
31
32
33

34 35 **The expression of the hCINAP-H79G mutant is toxic and causes a significant change in** 36 **Cajal Body organisation in the nucleus** 37

38 hCINAP and Cajal Body protein coilin interact directly via coilin's 214 carboxy-
39 terminal residues¹. Because of the effect of Walker B motif His79 in enzymatic efficiency,
40 affecting both AK and ATPase activity *in vitro*, we next examined whether expression of
41 mutant hCINAP-H79G *in vivo* might have functional implications for nuclear organization,
42 accompanied by a corresponding phenotypic effect on either coilin or CBs. GFP-tagged
43 expression vectors of wild-type hCINAP (WT) and mutant hCINAP-H79G were constructed,
44 tested by western blot (data not shown) and used for transient transfections of HeLa cells.
45
46
47
48
49
50

51 We observed that transfection with a mutant GFP-hCINAP-H79G construct had
52 detrimental effects both on transfection efficiency and proliferation of transfected cells: at 24
53 h post transfection, the proportion of hCINAP-H79G-transfected apoptotic cells (43%) was
54 four times higher than of wild-type GFP-hCINAP (WT) cells (11%) with extreme statistical
55 significance, and at 36 h the proportion of apoptotic hCINAP-H79G-transfected cells was
56 maintained very high (43% compared to 13% for WT transfected apoptotic cells) with high
57 statistical significance (ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test; Sup-Fig. 5),
58
59
60

1
2
3
4 indicative of mutant-specific impairment of proliferation or cell survival.

5
6 The number of CBs per nucleus, as detected with an anti-coilin antibody, was scored
7 in cells transfected with GFP-hCINAP-WT (n=1439), GFP-hCINAP-H79G (n=571) and
8 mock-transfected control cells (n=1072). In highly-expressing GFP-hCINAP transfected cells,
9 we observed profound changes in CB organization: the mean number of CBs per nucleus was
10 significantly higher in cells transfected with mutant hCINAP-H79G, as compared to the mock
11 transfected cells (Welch's t-test, $p=0.034$) (**Fig. 5A**). Importantly, there was a marked
12 heterogeneity in the numbers of CBs in the nuclei of hCINAP-H79G transfected cells as
13 evidenced by the frequency distribution displayed in **Fig. 6B**, so that large groups of cells
14 either had much fewer CBs than the mean number in WT-hCINAP-expressing or mock-
15 transfected cells, or groups of H79G cells possessed unusually high numbers of CBs (up to 30
16 per nucleus) (**Fig. 5B**). Representative examples of hCINAP-H79G-expressing cells with
17 either a very large number of CBs (**Fig. 5D upper panels**) or a small number of CBs (**Fig. 5D**
18 **bottom panels**), are shown in **Fig. 5**. As a result of this heterogeneity, the frequency
19 distribution of CBs in cells expressing the mutant form was significantly different overall
20 from that of WT-hCINAP samples (two way ANOVA, $p=0.0151$) and from mock-transfected
21 samples ($p=0.0122$).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 The same analysis was repeated examining other types of distinct subnuclear
34 structures, namely the nucleolus, a site historically linked to Cajal Bodies by Cajal himself⁵⁰,
35 and PML Bodies (Pro Myeloid Leukemia Bodies), a nuclear domain not directly linked to
36 CBs. No discernible phenotypic change of the numbers or overall organisation of these two
37 nuclear domains was observed in mutant vs. wild type hCINAP expressing cells (**Sup-Fig. 6**).
38 This indicates that the effect of overexpression of hCINAP-H79G on CB organisation (mean
39 and distribution) is specific and not secondary to general effects of the mutant enzyme on
40 nuclear structure.
41
42
43
44
45
46
47

48 Taken together, these data indicate that the expression of the mutant protein results in
49 CB de-regulation (causing an elevated average number and abnormal heterogeneous
50 distribution of CB numbers) and is toxic to the cell, resulting in enhanced apoptosis and/or
51 reduced proliferation.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

Although the structure of hCINAP in complex with SO_4^{2-} had previously been published, the additional 3 structures presented in this work as well as our modeling of the hCINAP- Mg^{2+} -ATP-AMP ternary complex (a) resolve residues in the predicted AMP binding site that were previously interpreted as disordered, (b) confirm that the overall folding of hCINAP conforms to that expected for the AK family, with ADP and AMP binding sites in its catalytic centers, and (c) reveal that, in the vicinity of the ATP binding site, hCINAP possesses structural features typical of the ATPase/GTPase family rather than of AKs. These are a Walker-A motif (P-loop), bearing a Mg^{2+} -coordinating residue (Thr17), and a Walker-B motif, not reported for any other known AK in any species. hCINAP is thus the first member of the adenylate kinase family (AK1–6) carrying a Walker B motif. Additionally, loop region Asp77 to Pro85, including the Walker B-motif is oriented quite differently from that of the other AKs (**Sup-Fig. 1**). In all likelihood, this distinct sequence piece and its unusual orientation is important for the display of ATPase activity. We corroborated the structural evidence by demonstrating that hCINAP has unusually high intrinsic ATPase activity, in addition to AK activity, being essentially a dual activity AK/ATPase.

Based on our structural and modeling analysis, we can propose a possible structural mechanism that would allow the selection between ATPase and AK activity in hCINAP. In our proposed model of switching of enzymatic activities, shown in **Fig. 6**, the role of Walker B motif His79 is important, as its imidazole ring can flip between two possible orientations (rotation about a $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$ single bond is assumed to be free⁵¹). In the first orientation (“flip” or “AK mode”), the imidazole nitrogen faces the AMP binding site and co-ordinates the α -phosphate of AMP together with Arg39 (**Fig. 6 – AK mode**). In the second orientation (“flop” or “ATPase mode”), the imidazole nitrogen faces the Mg^{2+} ATP catalytic center (**Fig. 6 – ATPase mode**) and co-ordinates a lytic water together with Lys16 for a nucleophilic attack on the γ -phosphate of ATP, similar to the mechanism which has been proposed for myosin by Okimoto and co-workers⁵². At the same time, the imidazole carbon CE1 faces the AMP binding site, thus preventing a phosphoryl transfer reaction by creating a site with low affinity for AMP. Therefore, His79, which is located on the flexible region between the ATP and AMP binding sites and having the potential to rotate between its flip or flop conformations, may thus play a pivotal role as a structural switch favoring, in each of its conformations, one of the two enzymatic activities. The role of H79 in catalysis is also

1
2
3 important both for the AK and ATPase reactions as we demonstrate that the H79A mutation
4 reduces by about 72% the AK enzymatic efficiency and by 76% the ATPase efficiency.
5 However the role of H79 as a possible structural transducer between the catalytic centers may
6 be even more important.
7
8
9

10 The selection of catalytic modes (AK vs. ATPase) may be a more generalized
11 modality regulated by the intracellular milieu of the enzyme and dynamically fine-tuned to
12 the energy or metabolic requirements of the cell at any given time. For example, in the case of
13 the ABC-type transporter and anion channel CFTR (cystic fibrosis transmembrane
14 conductance regulator), which displays a double ATPase and GTPase activity (its additional
15 AK activity may be the matter of some disagreement in the field), it has been speculated that
16 under physiological conditions it may switch back and forth between the different enzymatic
17 states, depending on substrate and/or energy availability⁵³. Nuclear protein Rad50, a member
18 of the RMN complex that is responsible for detecting double-strand breaks on DNA, is an
19 ATPase that possesses an AK activity necessary for DNA tethering⁵⁴
20
21
22
23
24
25
26
27

28 In the case of the CBs, highly dynamic and cell cycle-dependent structures, whose
29 nuclear movements are ATP-dependent⁵⁵, the regulation of assembly and disassembly during
30 the cell cycle might be intrinsically linked with the activity of enzymes, such as hCINAP, that
31 regulate the nucleotide homeostasis in the mammalian nucleus. The expression of the H79G
32 mutant in human cells in culture was found to be toxic, reducing proliferation and increasing
33 apoptosis compared to the wild-type enzyme (**Sup-Fig. 5**), and also causing a profound effect
34 in Cajal Body (CB) organization in the nucleus (**Fig. 5**). Essentially, the results indicated that
35 CBs are deregulated, causing numbers of this organelle per nucleus to fluctuate widely and
36 abnormally (ranging from 0 to over 30 CB/nucleus, with an overall significantly different
37 frequency distribution as compared to WT). The known role of the protein coilin in CB
38 assembly^{56,57} and its interaction with hCINAP make it one likely link between the H79
39 mutation and the observed phenotype, but the involvement of alternative or additional factors
40 cannot be excluded at this stage. Deficiency of hCINAP could bring about a nucleotide pool
41 imbalance, possibly affecting the network of other critical interactions, energy requirements
42 or substrate phosphorylation during the CB assembly process and thus resulting in the
43 observed abnormal heterogeneity of CB numbers in the cell population. How the AK or
44 ATPase activity contributes to Cajal Body regulation and how the switch between the two
45 activities might be regulated physiologically, are fascinating questions that warrant concerted
46 investigation.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGMENTS

SEZ was funded by a Marie Curie European Reintegration Grant MERG-CT-2004-006358 and grant ENTER01-EP115 from the Greek General Secretariat for Research and Technology. NS was funded by grant YGEIA/0506/05 from the Research Promotion Foundation of Cyprus. SEZ, CED, JMH and DDL were supported by the EU FP7 “SP4-Capacities Coordination and Support Action, Support Actions” EUROSTRUCT project (CSA-SA_FP7-REGPOT-2008-1). AIL is a Wellcome Trust Principal Research Fellow. This work was also supported by grants to SEZ from the European Community Research Infrastructure Action under the FP6 programme ‘Structuring the European Research Area’ for work at the Synchrotron Radiation Source, CCLRC, Daresbury, England, MAX-lab, Lund, Sweden and EMBL Hamburg Outstation, Germany.

REFERENCES

1. Santama N, Ogg SC, Malekkou A, Zographos SE, Weis K, Lamond AI. Characterization of hCINAP, a novel coilin-interacting protein encoded by a transcript from the transcription factor TAFIID(32) locus. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(43):36429-36441.
2. Ren H, Wang L, Bennett M, Liang Y, Zheng X, Lu F, Li L, Nan J, Luo M, Eriksson S, Zhang C, Su XD. The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(2):303-308.
3. Van Rompay AR, Johansson M, Karlsson A. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol Ther* 2000;87(2-3):189-198.
4. Noma T. Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J Med Invest* 2005;52(3-4):127-136.
5. Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S, Wyatt TA, Mitsialis SA. Mutation of Murine Adenylate Kinase 7 Underlies a Primary Ciliary Dyskinesia Phenotype. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2009;40(3):305-313.
6. Schulz GE, Muller CW, Diederichs K. Induced-fit movements in adenylate kinases. *J Mol Biol* 1990;213(4):627-630.
7. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982;1(8):945-951.
8. Pai EF, Kabsch W, Krengel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 1989;341(6239):209-214.
9. Kjeldgaard M, Nissen P, Thirup S, Nyborg J. The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure* 1993;1(1):35-50.
10. Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* 1993;366(6456):654-663.
11. Meng G, Zhai R, Liu B, Zheng X. Identification of a novel nuclear-localized adenylate kinase from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73(1):38-43.
12. Zhai R, Meng G, Zhao Y, Liu B, Zhang G, Zheng X. A novel nuclear-localized protein with special adenylate kinase properties from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 2006;580(16):3811-3817.

13. Juhnke H, Charizanis C, Latifi F, Krems B, Entian KD. The essential protein fap7 is involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2000;35(4):936-948.
14. Granneman S, Nandineni MR, Baserga SJ. The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14. *Mol Cell Biol* 2005;25(23):10352-10364.
15. Santama N, Krijnse-Locker J, Griffiths G, Noda Y, Hirokawa N, Dotti CG. KIF2beta, a new kinesin superfamily protein in non-neuronal cells, is associated with lysosomes and may be implicated in their centrifugal translocation. *EMBO J* 1998;17(20):5855-5867.
16. Dian C, Eshaghi S, Urbig T, McSweeney S, Heijbel A, Salbert G, Birse D. Strategies for the purification and on-column cleavage of glutathione-S-transferase fusion target proteins. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002;769(1):133-144.
17. Leatherbarrow RJ. *GrafFit Version 3.0*. Erithakus Software, Staines, UK.; 1992.
18. Geladopoulos TP, Sotiroidis TG, Evangelopoulos AE. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal Biochem* 1991;192(1):112-116.
19. Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A* 1997;276:307-326.
20. Leslie AGW. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl Protein Crystallogr* 1992;No. 26
21. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50(Pt 5):760-763.
22. French S, Wilson K. Treatment of Negative Intensity Observations. *Acta Crystallographica Section A* 1978;34(Jul):517-525.
23. Vagin A, Teplyakov A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography* 1997;30:1022-1025.
24. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2004;60:2126-2132.
25. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 1997;53:240-255.

- 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
26. Painter J, Merritt EA. TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *Journal of Applied Crystallography* 2006;39:109-111.
27. Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* 1993;26:283-291.
28. Althoff S, Zambrowicz B, Liang P, Glaser M, Phillips GN, Jr. Crystallization and preliminary X-ray analysis of Escherichia coli adenylate kinase. *J Mol Biol* 1988;199(4):665-666.
29. Jorgensen WL, Maxwell DS, TiradoRives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society* 1996;118(45):11225-11236.
30. MacroModel, version 9.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007
31. Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *Journal of Physical Chemistry B* 2001;105(28):6474-6487.
32. Still WC, Tempczyk A, Hawley RC, Hendrickson T. Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *Journal of the American Chemical Society* 1990;112(16):6127-6129.
33. Glide, version 4.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007.
34. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P, Shenkin PS. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47(7):1739-1749.
35. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, Banks JL. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47(7):1750-1759.
36. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Sanschagrin PC, Mainz DT. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006;49(21):6177-6196.
37. Schrödinger Suite 2007 Induced Fit Docking protocol; Glide version 4.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007; Prime version 1.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007.

- 1
- 2
- 3
- 4 38. QSite, version 5.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2008.
- 5
- 6 39. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy
7 formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B Condens Matter*
8 1988;37(2):785-789.
- 9
- 10 40. Becke AD. Density-Functional Thermochemistry .3. The Role of Exact Exchange.
11 *Journal of Chemical Physics* 1993;98(7):5648-5652.
- 12
- 13 41. Francl MM, Pietro WJ, Hehre WJ, Binkley JS, Gordon MS, Defrees DJ, Pople JA.
14 Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .23. A Polarization-Type Basis Set for
15 2nd-Row Elements. *Journal of Chemical Physics* 1982;77(7):3654-3665.
- 16
- 17 42. Harihara.Pc, Pople JA. Influence of Polarization Functions on Molecular-Orbital
18 Hydrogenation Energies. *Theoretica Chimica Acta* 1973;28(3):213-222.
- 19
- 20 43. Hehre WJ, Ditchfie.R, Pople JA. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .12.
21 Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular-Orbital Studies
22 of Organic-Molecules. *Journal of Chemical Physics* 1972;56(5):2257-&.
- 23
- 24 44. Kabsch W. Solution for Best Rotation to Relate 2 Sets of Vectors. *Acta*
25 *Crystallographica Section A* 1976;32(Sep1):922-923.
- 26
- 27 45. Krissinel E, Henrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast
28 protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D-*
29 *Biological Crystallography* 2004;60:2256-2268.
- 30
- 31 46. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific. Palo Alto,
32 CA, USA; 2002.
- 33
- 34 47. Berry MB, Meador B, Bilderback T, Liang P, Glaser M, Phillips GN, Jr. The closed
35 conformation of a highly flexible protein: the structure of E. coli adenylate kinase with
36 bound AMP and AMPPNP. *Proteins* 1994;19(3):183-198.
- 37
- 38 48. Vonrhein C, Bonisch H, Schafer G, Schulz GE. The structure of a trimeric archaeal
39 adenylate kinase. *J Mol Biol* 1998;282(1):167-179.
- 40
- 41 49. Krishnamurthy H, Lou H, Kimple A, Vieille C, Cukier RI. Associative mechanism for
42 phosphoryl transfer: a molecular dynamics simulation of Escherichia coli adenylate
43 kinase complexed with its substrates. *Proteins* 2005;58(1):88-100.
- 44
- 45 50. Cajal SR. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmico y sus
46 efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados y invertebrados. *Trab Lab*
47 *Invest Biol* 1903;2:129-221.
- 48
- 49 51. Ramani R, Boyd RJ. Conformational Aspects of L-Histidine. *Canadian Journal of*
50 *Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 1981;59(23):3232-3236.
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 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
52. Okimoto N, Yamanaka K, Ueno J, Hata M, Hoshino T, Tsuda M. Theoretical studies of the ATP hydrolysis mechanism of myosin. *Biophysical Journal* 2001;81(5):2786-2794.
 53. Randak CO, Welsh MJ. Adenylate kinase activity in ABC transporters. *J Biol Chem* 2005;280(41):34385-34388.
 54. Bhaskara V, Dupre A, Lengsfeld B, Hopkins BB, Chan A, Lee JH, Zhang X, Gautier J, Zakian V, Paull TT. Rad50 adenylate kinase activity regulates DNA tethering by Mre11/Rad50 complexes. *Mol Cell* 2007;25(5):647-661.
 55. Platani M, Goldberg I, Lamond AI, Swedlow JR. Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol* 2002;4(7):502-508.
 56. Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Hebert MD, Matera AG. Posttranslational modifications of coilin control Cajal body number and composition. *Molecular Biology of the Cell* 2002;13:421a-421a.
 57. Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Matera AG, Hebert MD. Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *Journal of Cell Science* 2003;116(2):303-312.

Table I: Statistics of data collection, processing and refinement of the hCINAP complexes

| hCINAP Complex (PDB ID) | SO ₄ ²⁻ (3IIK) | ADP (3IIJ) | dADP (3IIM) | Mg ²⁺ ADP- PO ₄ ³⁻ (3IIL) |
|---|--|---------------------|------------------------|--|
| CCLRC PX10.1; λ (Å) | 1.04498 | 1.11665 | 0.979 | 1.04498 |
| Space group <i>P</i> 6 ₁ ; Cell dimensions (Å), a,b,c, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ | 98.67, 98.67, 57.65 | 99.14, 99.14, 57.84 | 99.28, 99.28, 57.97 | 99.17, 99.17, 58.05 |
| Resolution (Å) | 34.32-1.95 | 28.3-1.76 | 25.0-2.00 | 34.52-2.00 |
| Outermost shell (Å) | 2.06-1.95 | 1.79-1.76 | 2.03-2.00 | 2.03-2.00 |
| Reflections measured | 188,312 | 152,209 | 140,350 | 144,687 |
| Unique reflections | 23,444 | 31,610 | 22,173 | 22,102 |
| R _{symm} ^a | 0.050 (0.449) | 0.044 (0.499) | 0.066 (0.470) | 0.057 (0.461) |
| Completeness % | 99.9 (100.0) | 98.1 (88.4) | 100.0 (100.0) | 99.9 (100.0) |
| $\langle I/\sigma I \rangle$ | 25.80 (4.50) | 17.92 (3.41) | 17.80 (4.82) | 20.13 (4.25) |
| Redundancy | 8.0 (8.0) | 4.9 (4.3) | 6.3 (6.2) | 6.5 (6.5) |
| Final R _{cryst} ^b (R _{free} ^c) % | 17.98 (20.56) | 18.12 (19.51) | 18.56 (21.62) | 17.10 (19.27) |
| No. of protein residues (residue range) ^d | 175 (-2 - 172) | 175 (-2 - 172) | 174 (-1 - 172) | 175 (-2 - 172) |
| No. of water molecules in final cycle | 200 | 190 | 205 | 201 |
| R.m.s. deviation in bond lengths (Å) | 0.0089 | 0.0077 | 0.0097 | 0.0103 |
| R.m.s. deviation in bond angles (°) | 1.113 | 1.128 | 1.160 | 1.258 |
| Average B factor (Å ²) | | | | |
| Protein atoms | 19.103 | 19.633 | 18.752 | 20.596 |
| Water molecules | 30.903 | 32.011 | 31.242 | 32.233 |
| Ligand molecules | 27.3 (SO ₄ ^{ATP} site) 95.7 (SO ₄ ^{AMP} site) | 30.214 (ADP) | 32.605 (dADP) | 33.099 (ADP) 36.600 (Mg ²⁺) 34.058 (Pi) |
| Ramachandran (u-w) plot | Residues in most favored regions 93%, Residues in allowed regions 7% | | | |

Values in parentheses are for the outermost shell.

^aR_{symm} = $\sum_h \sum_i |I_i(h) - I_i(h)| / \sum_h \sum_i I_i(h)$ where $I_i(h)$ and $I(h)$ are the i th and the mean measurements of the intensity of reflection h . ^bR_{cryst} = $\sum_h |F_o - F_c| / \sum_h F_o$, where F_o and F_c are the observed and calculated structure factors amplitudes of reflection h , respectively. ^cR_{free} is equal to R_{cryst} for a randomly selected 5% subset of reflections not used in the refinement. ^dResidues -2 to 0 correspond to additional amino acids introduced by the cloning procedure.

Table II. Output receptor-ligand poses (structures) and data from the IFD calculations

| Structure | P-P distance (Å) ^a | H-bonds ^b | RMSD (Å) ^c | Prime Energy (kcal/mol) | XP Gscore | IFDScore |
|-----------|-------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------|----------|
| 1 | 5.12 | 7 | 0.880 (0.826) | -11316.3 | -10.17 | -575.98 |
| 2 | 5.05 | 7 | 0.958 (0.769) | -11319.3 | -8.82 | -574.78 |
| 3 | 4.53 | 5 | 1.429 (1.640) | -11328.3 | -7.92 | -574.33 |
| 4 | 6.49 | 6 | 1.611 (1.367) | -11331.4 | -5.59 | -572.15 |

^aATP-ADP interphosphate distances measured between P atoms. ^bNumber of direct AMP-hCINAP hydrogen bonds. ^cRMSD (heavy atoms) on superimposition of AMP conformation on its conformations in the 1ANK and 1NKS (in parentheses) complexes.

Table III: Summary of kinetic parameters**A. Adenylate kinase activity (ATP + AMP ↔ 2ADP)**

| Enzyme | Specific activity (nmol/min /mg) | K_{cat} (s ⁻¹) | K_m (μM ATP) | K_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹) |
|------------------------|--|------------------------------|-------------------|--|
| hCINAP ^{WT} | 18±0.9 | 6.3x10 ⁻³ | 45±5 | 140 |
| hCINAP ^{H79G} | 11±0.16 (n _H =1.99 ^a) | 3.7x10 ⁻³ | 93±8 ^a | 39 |

B. ATPase activity (ATP → ADP + Pi)

| Enzyme | Specific activity (nmol/min /mg) | K_{cat} (s ⁻¹) | K_m (μM ATP) | K_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹) |
|------------------------|--|------------------------------|--------------------|--|
| hCINAP ^{WT} | 1.37±0.08 (n _H =1.21 ^a) | 4.8x10 ⁻⁴ | 332±8 ^a | 1.45 |
| hCINAP ^{H79G} | 0.74±0.04 (n _H =2.10 ^a) | 2.5x10 ⁻⁴ | 721±1 ^a | 0.34 |

^a Best-fit curve obtained by fitting the data to the Hill equation. K_m and n_H were calculated by linear regression of the logarithmically transformed data (Hill plots)

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Structure superimposition of hCINAP-ADP complex (green) onto the sulfate-bound form 1RKB (purple). The overall root mean square deviation (RMSD) between $C\alpha$ and backbone atoms of hCINAP-ADP and 1RKB was 0.576 and 0.594 Å, respectively. The NMP binding domain (designated by cyan), which comprises amino acids 45–55 (average RMSD for $C\alpha$ atoms is 2.43 Å), adopts a β strand-turn- β strand conformation. The conserved Lys16 residue adopts identical conformation in the two structures, whereas the side chain of the conserved Arg109 shifts by 1.5 Å towards the phosphate groups to stabilize the large number of negative charges. The P-loop (a.a.10–17) and the Walker B motif (a.a. 77–80) regions are indicated in yellow and orange, respectively.

FIGURE 2: Structural analysis of hCINAP complexes

A. Polar contacts of ADP in the vicinity of the Mg^{2+} ATP binding site. Guanidine nitrogen of Arg109 from the LID domain makes polar contacts with the α - and β -phosphate oxygens, O2A and O2B. The hydroxyl group of Thr17 interacts directly with β -phosphate oxygen O3B, whereas NZ of Lys16 forms one hydrogen bond with O1B. The hydroxyl group of Thr18 interacts with O1A oxygen. The phosphate moiety makes additional polar contacts with water molecules and the main chain O/N atoms of residues Gly13, Gly15, Lys16, Thr17 and Thr18. The ribose moiety forms only two polar contacts with water molecules. The purine moiety interacts with two water molecules, while two additional polar contacts are formed between N6 and the carbonylic oxygen of Lys148 and N1 and the amide nitrogen of Pro149.

B. Polar contacts of SO_4^{2-} bound at the AMP binding site. The SO_4^{2-} ion, bound at the AMP binding site, makes a direct polar contact with the guanidinium nitrogen NH1 and two indirect polar contacts with the NH2 via a water molecule. The imidazole ND1 of His79 is hydrogen bonded to water Wat11 (ND1-OW11; 2.82 Å), whereas nonpolar-polar contacts are formed between imidazole carbon CE1 and the sulfate oxygen O1 (CE1-O1; 3.17 Å).

C. Polar contacts of Mg^{2+} ADP and Pi, in the vicinity of the Mg^{2+} ATP binding site. In the vicinity of the Mg^{2+} ATP binding site, an extensive network of hydrogen bonds is created between Mg^{2+} ADP, PO_4^{3-} , P-loop residues Lys16, Thr17, Thr18, Walker B motif His79, and Arg109 from the LID-domain. The Mg^{2+} ion is hexa-coordinated, with the hydroxyl group of Thr17 and the Wat12 occupying two apical positions. The Wat12 and Wat8 are located in the positions that would be occupied by two of the γ -phosphate oxygens of ATP. Arg109 forms hydrogen bonds with α - and β -phosphate oxygens and Wat8 and is proposed to protect ATP

from random hydrolysis. Mg^{2+} contributes to positive polarization of γ -phosphate and makes it more susceptible to nucleophilic attack.

FIGURE 3: Models of the hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP complex from induced fit docking calculations.

Predicted hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP poses with different interphosphate (P-P) distances, showing the approach of a mobile AMP towards a fixed ATP.

A. IFD-4, P-P distance 6.49 Å: AMP phosphate interacts with His79 side chain NH and Arg39 guanidine NH₂. The Tyr78 side chain hydroxyl hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen. The ribose 2'- and 3'-OHs form hydrogen bonds with Arg39 guanidine NH₂ (2'-OH) and backbone carbonyl and amide (3'-OH) of Pro54.

B. IFD-1, P-P distance 5.12 Å: His79 forms a side-chain bond with the AMP phosphate. The Tyr78 side-chain hydroxyl hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen and the adenine nitrogen N1. Water-bridging contacts of the AMP phosphate and the ATP phosphate with the Arg39 guanidine side chain (NH₂) are formed. Arg39 forms a direct H-bond contact with ribose 2'-OH through side-chain guanidine NE and NH₂. Ribose-3'-OH hydrogen-bonds with the backbone-carbonyl O of Pro54.

C. IFD-3, P-P distance 4.53 Å: AMP phosphate now interacts with the backbone and side-chain NHs of His79, and the Mg^{2+} -coordinated water molecules Wat5 and Wat20. Waters bridge the AMP (α -) –ATP (γ -) phosphates. Arg39 forms a direct H-bond contact with ribose 2'-hydroxyl through side chain guanidine NH₂. Ribose-3'-OH hydrogen bonds with Tyr44 OH. The Tyr78 side-chain hydroxyl hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen.

FIGURE 4: Kinetics of hCINAP-WT and hCINAP-H79G.

A. hCINAP-WT adenylate kinase activity with respect to ATP at a constant concentration of AMP. Inset: Double-reciprocal plot.

B. hCINAP-H79G adenylate kinase activity with respect to ATP. Inset: Hill plot.

C. Comparison of the AK activities of A and B; hCINAP-WT (▲) and hCINAP-H79G (●).

D. hCINAP-WT ATPase activity. Inset: Hill plot

E. hCINAP-H79G ATPase activity. Inset: Hill plot.

F. Comparison of the ATPase activities of D and E; hCINAP-WT (▲) and hCINAP-H79G (●). All data are means from two experiments.

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

FIGURE 5: The overexpression of GFP-hCINAP-H79G alters Cajal Body (CB) organization (mean and distribution) in the nucleus of HeLa cells.

A. Mean number of CB (\pm sample standard deviation) per nucleus in mock-treated cells, cells highly expressing GFP-hCINAP-WT and cells highly expressing GFP-hCINAP-H79G upon transient transfection. The mean number of CBs is significantly higher in the hCINAP-H79G mutant as compared to the mock transfected cells (Welch's t-test, $p=0.034$).

B. Histogram of the distribution of Cajal Body (CB) numbers per nucleus in the same three populations of transiently transfected cells. The overall distribution of CB numbers is significantly different in hCINAP-H79G mutant samples compared to the WT control samples ($p=0.0151$) and mock transfected samples ($p=0.0122$, two-way ANOVA).

C, D. Representative images of changed CB numbers in cells transiently transfected with GFP-hCINAP-H79G (**D**), as compared to cells transiently transfected with GFP-hCINAP-WT (**C**). Hoechst staining of nuclei (blue), GFP-fluorescence indicative of transfected cells in each case (WT or mutant H79G) (green panels) and immunostaining of CBs with an anti-coilin mab (red). In the examples of mutant H79G expression given here, the CBs are either considerably increased in number in transfected cells (white arrows) as opposed to non-transfected cells in the same field (top right panel), or markedly reduced (white arrows, bottom right panel). In WT-transfected cells, the number of CBs is more homogeneous from nucleus to nucleus (**C**). Scale bars: 20 μm .

39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE 6: A model of the role of His79 as a structural switch for the selectivity of enzymatic activity: Juxtaposition of "ATPase mode" and "AK mode"

According to the proposed ring-flip hypothesis, based on the structural analysis, the imidazole nitrogen ND1 of His79 can coordinate a lytic water molecule (together with the NZ of Lys16) during the ATPase reaction ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$; **ATPase-mode**) or coordinate the α -phosphate of AMP (together with the NH1 of Arg39) during the reverse AK reaction ($\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2\text{ADP}$; **AK-mode**) (further details in the Discussion section).

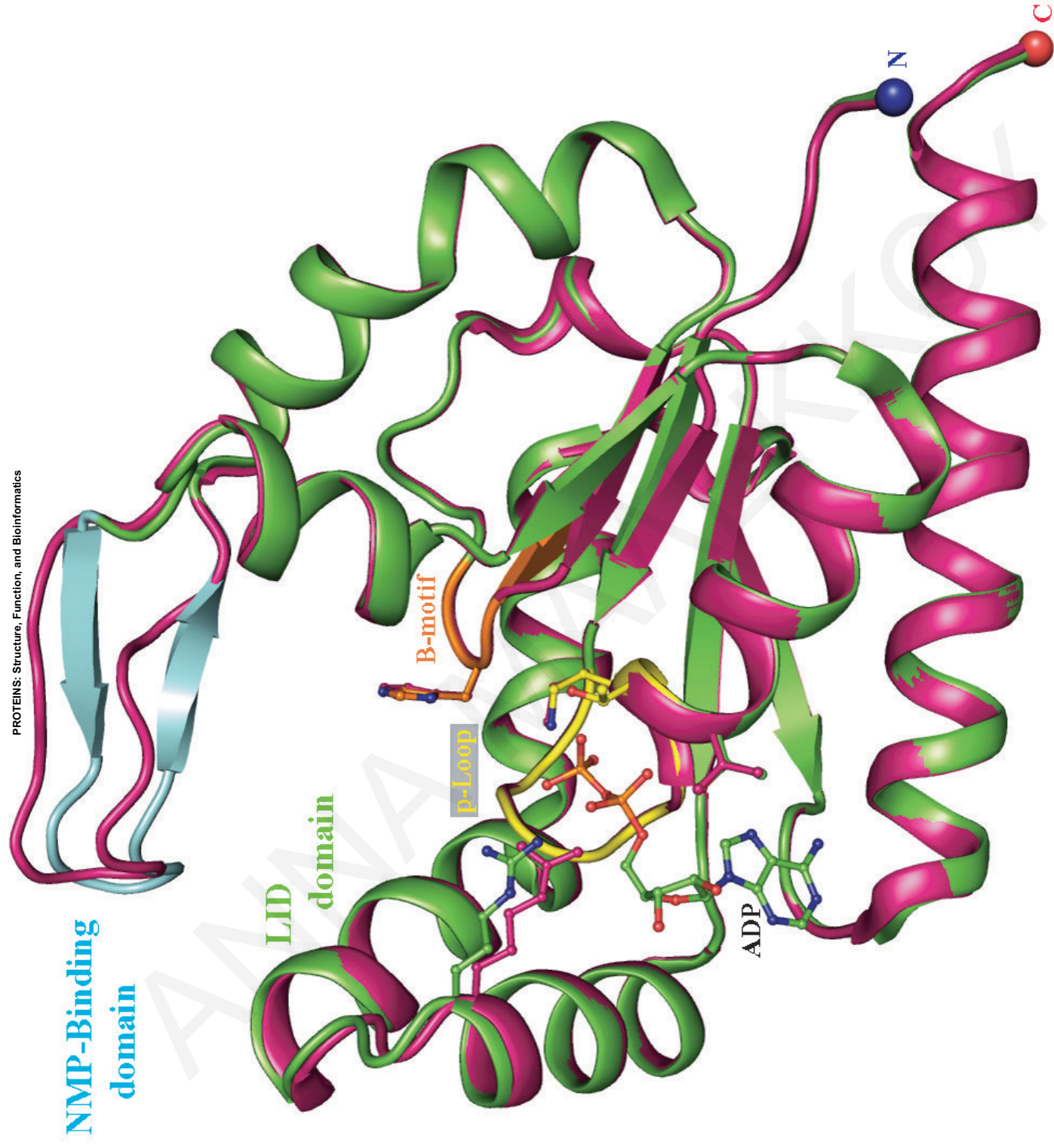


Figure 1

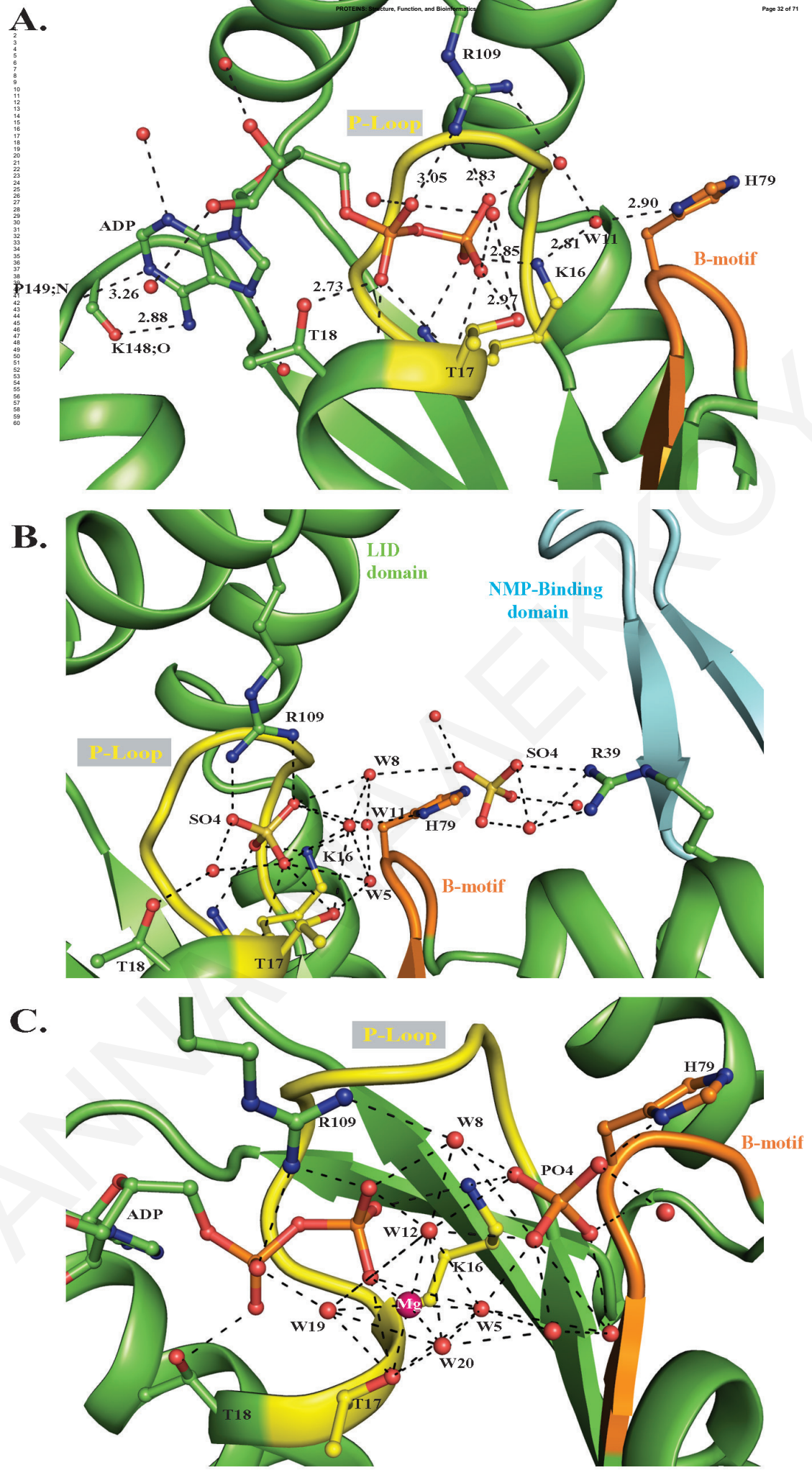


FIGURE 2

Page 33 of 71
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

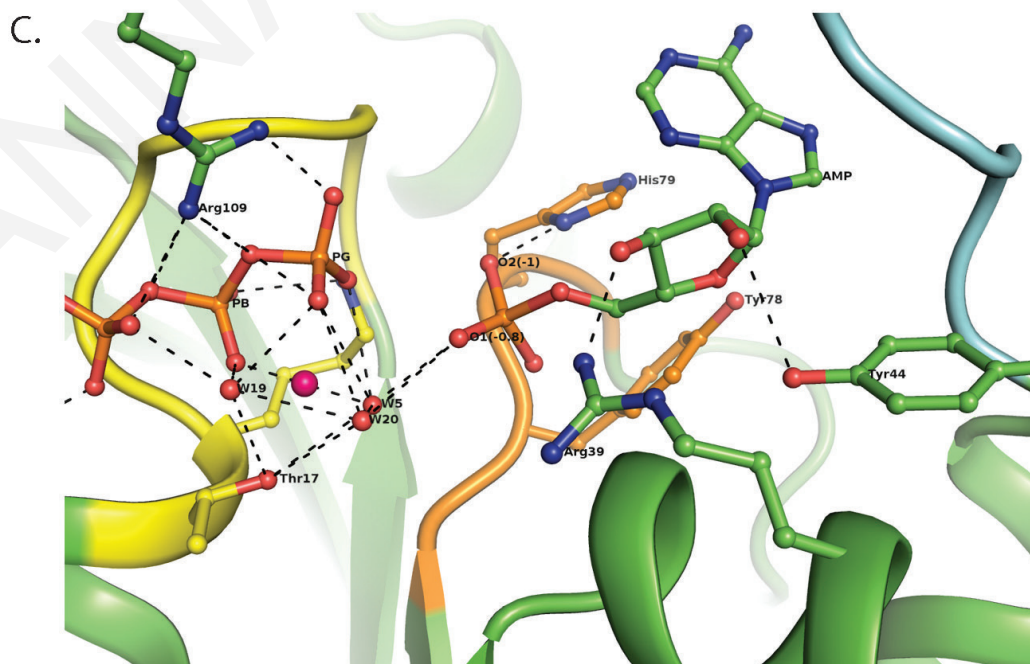
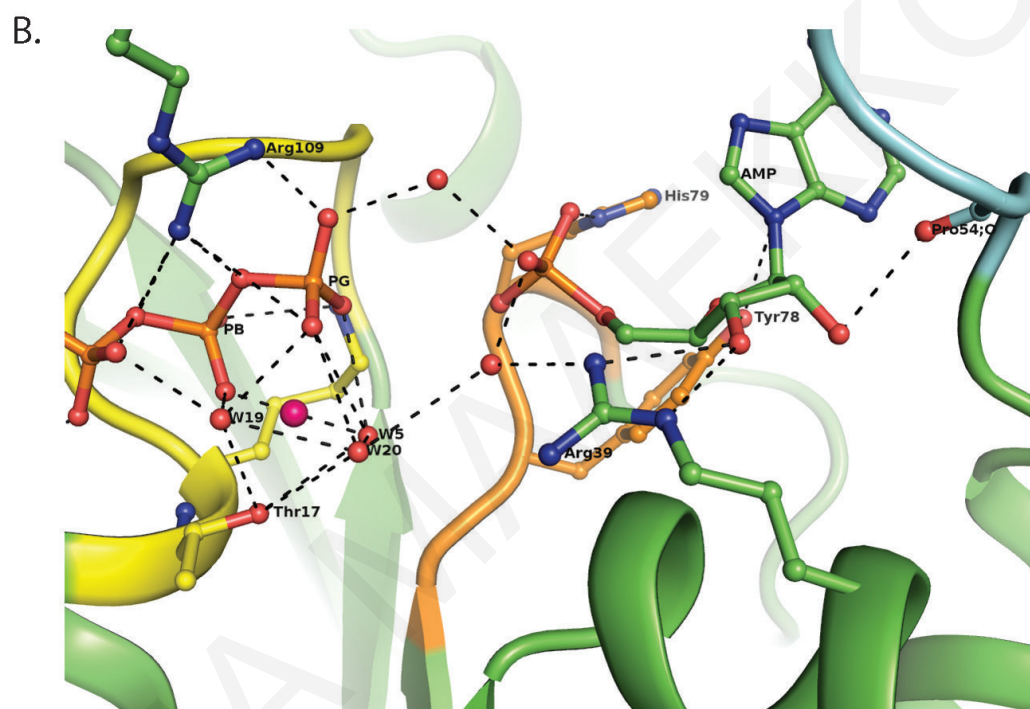
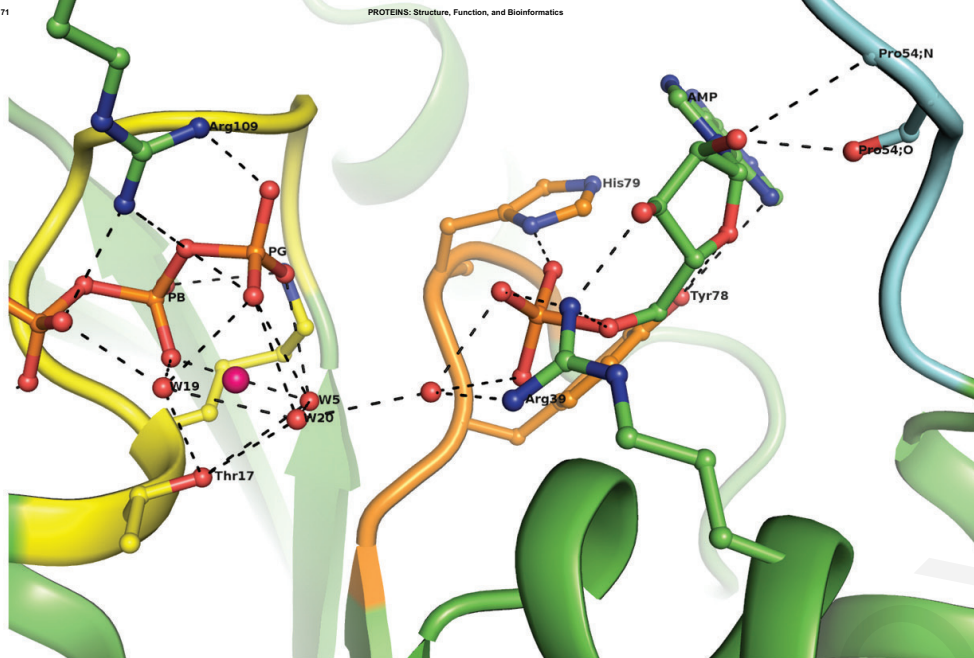
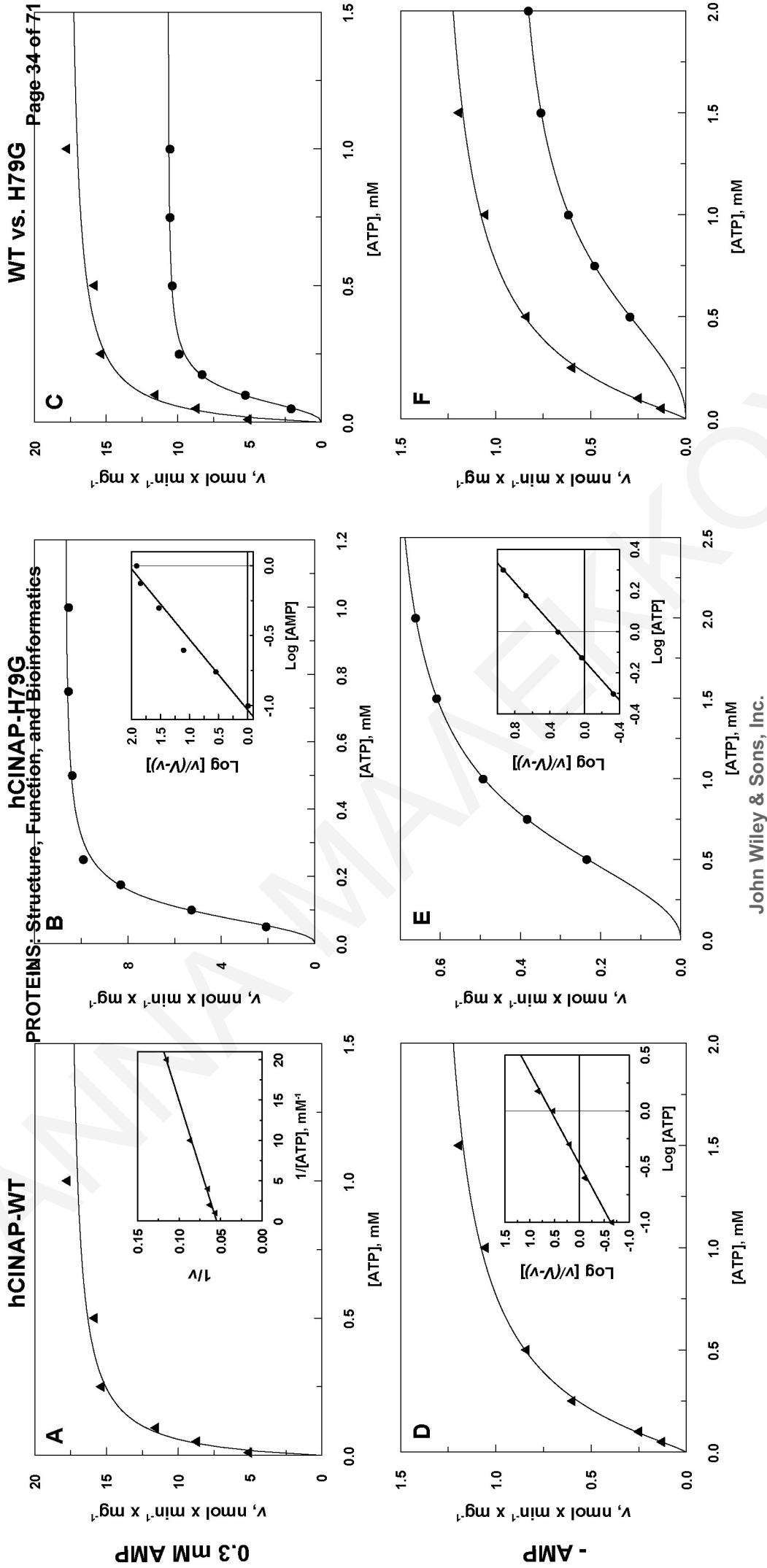


FIGURE 3



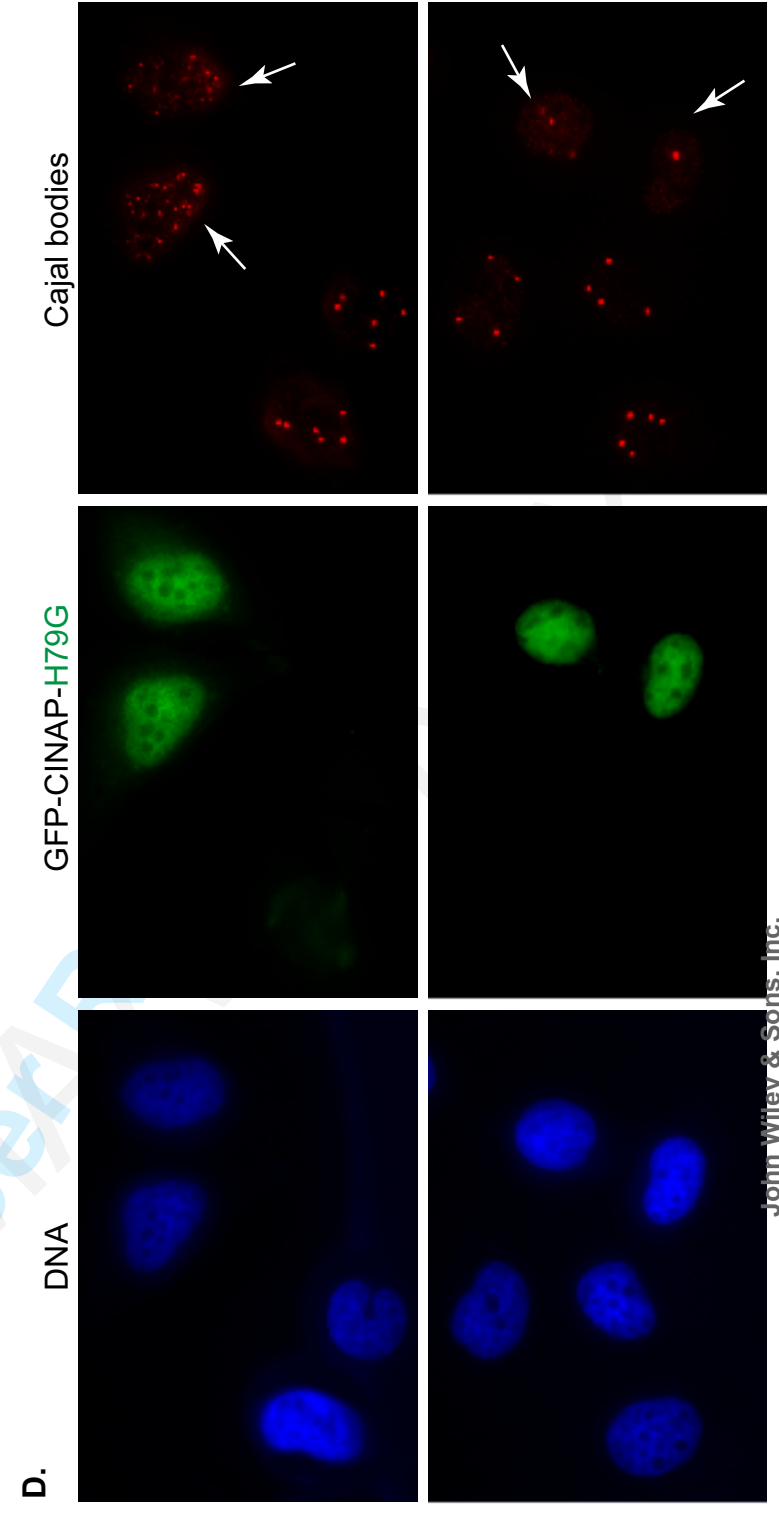
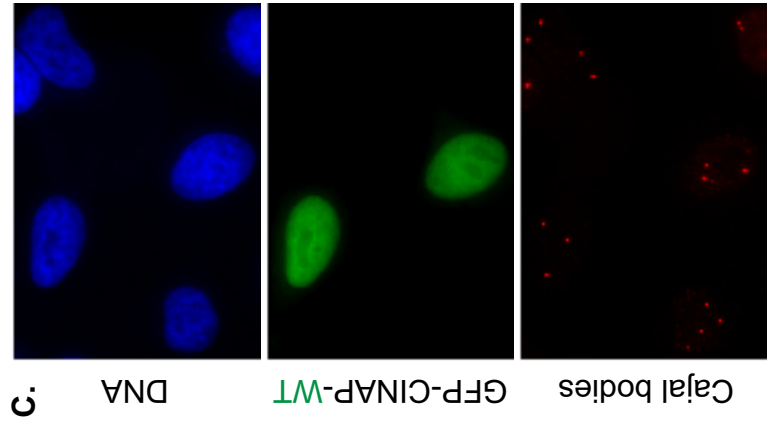
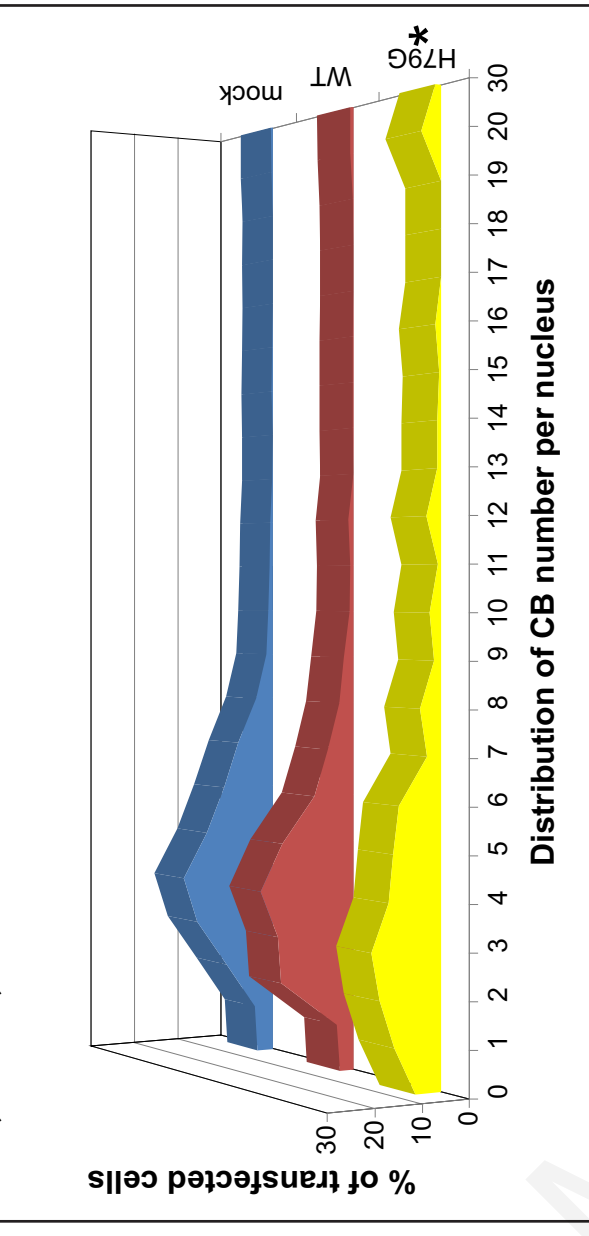
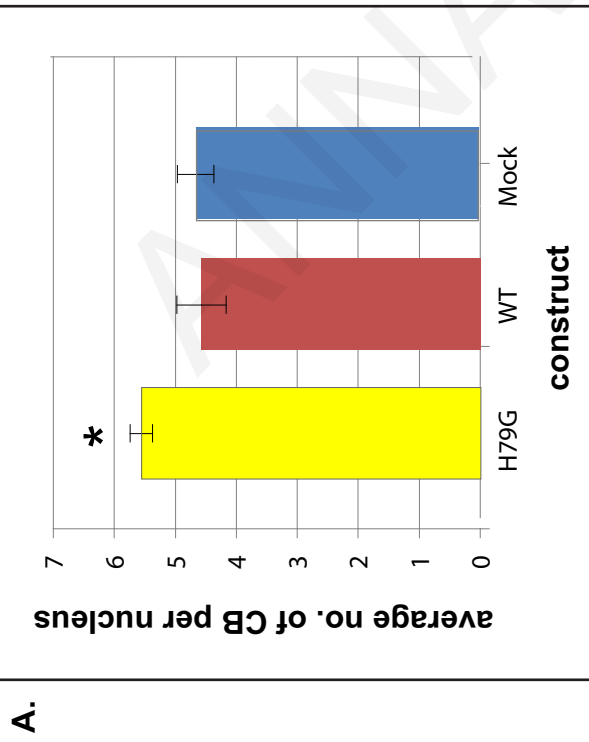
WT vs. H79G

Page 34 of 71

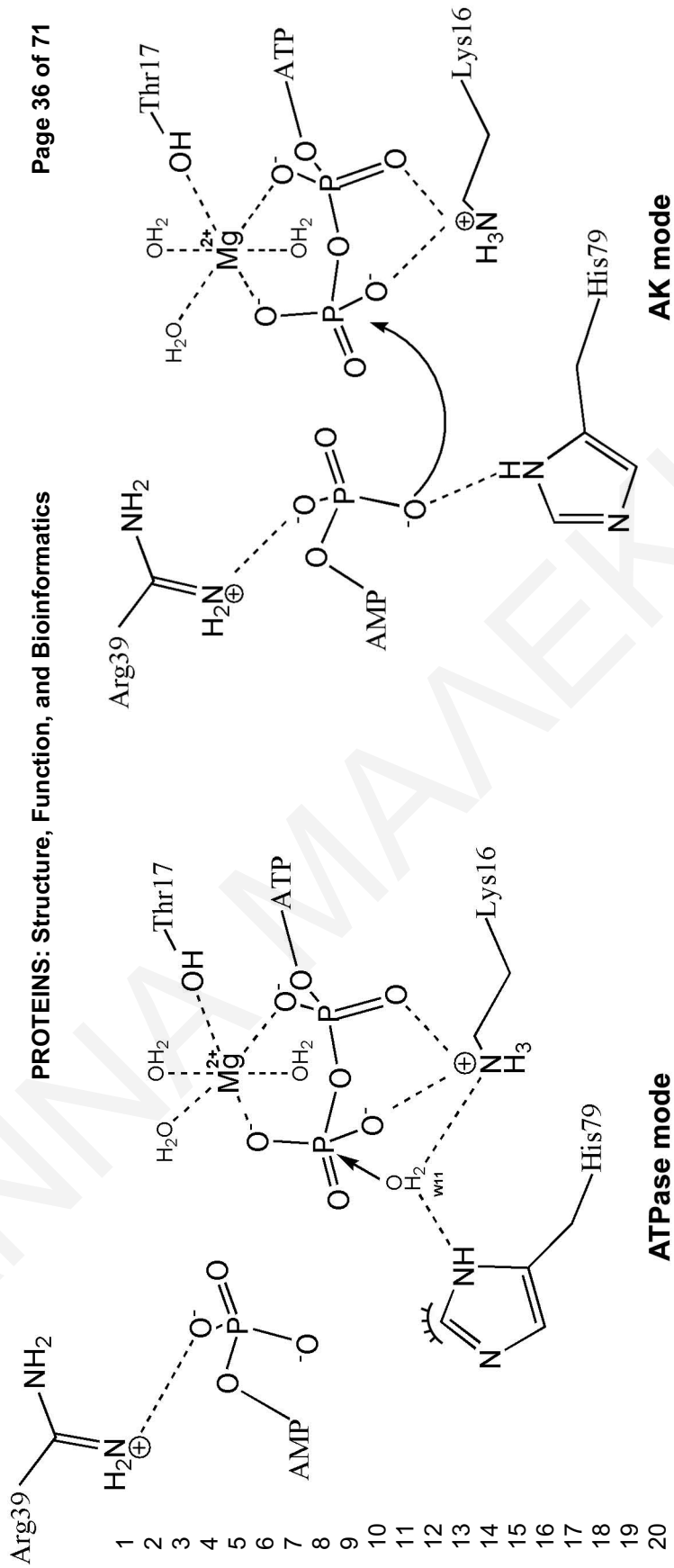
John Wiley & Sons, Inc.

FIGURE 4

Figure 5



PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics



John Wiley & Sons, Inc.

FIGURE 6

1
2
3 **“hCINAP is an atypical mammalian nuclear adenylate kinase with an ATPase motif:**
4 **Structural and functional studies.”**
5
6
7

8
9 **Christina E. Drakou¹, Anna Malekkou², Joseph M. Hayes¹, Carsten W. Lederer²,**
10 **Demetres D. Leonidas³, Nikos G. Oikonomakos^{1†}, Angus I. Lamond⁴, Niovi Santama²,**
11 **and Spyros E. Zographos^{1*}**
12
13

14
15
16 ¹Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation,
17 48 Vas. Constantinou Ave., 11635 Athens, Greece
18

19 ²Department of Biological Sciences, University of Cyprus and Cyprus Institute of Neurology
20 and Genetics, PO Box 20537, 1678 Nicosia, Cyprus
21

22 ³Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos Str.
23 41221 Larissa, Greece
24

25 ⁴Wellcome Trust Centre for Gene Regulation & Expression, College of Life Sciences,
26 University of Dundee, MSI/WTB/JBC Complex, Dow Street, Dundee, DD1 5EH, UK.
27

28 [†]Passed away on August 30th 2008
29
30

31
32
33 *Address correspondence to Spyros E. Zographos, Institute of Organic and Pharmaceutical
34 Chemistry, National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Avenue, 11635
35 Athens, Greece. Tel. +30-210-7273850; Fax. +30-210-7273831; e-mail: sez@eie.gr
36
37
38
39

40 **Short title:** hCINAP is an atypical nuclear AK and ATPase
41
42

43 **Abbreviations**

44
45 The abbreviations used are: hCINAP, human coilin-interacting nuclear ATPase protein; AK,
46 adenylate kinase; GFP, green fluorescent protein; UsnRNP, uridine-rich small nuclear
47 ribonucleoprotein; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; NMP, nucleoside
48 monophosphate; mab, monoclonal antibody; IPTG, isopropyl-galacto-pyranoside; GST,
49 glutathione S-transferase; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Tris,
50 tris(hydroxymethyl)aminomethane; PBS, phosphate buffered saline; DMEM, Dulbecco's
51 modified Eagle's medium; AP5A, P₁P₅-di(Adenosine-5')pentaphosphate; AMPPNP,
52 adenosine 5'-(β,γ -imido)triphosphate; TLS, Translation/Libration/Screw; OPLS-AA,
53 optimized potential for liquid simulations—all atoms; IFD, induced fit docking; vdW, van der
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

ABSTRACT

Human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein (hCINAP) directly interacts with coilin, a marker protein of Cajal Bodies (CBs), nuclear organelles involved in the maturation of small nuclear ribonucleoproteins UsnRNPs and snoRNPs. hCINAP has previously been designated as an adenylate kinase (AK6), but is very atypical as it exhibits unusually broad substrate specificity, structural features characteristic of ATPase/GTPase proteins (Walker motifs A and B) and also intrinsic ATPase activity. Despite its intriguing structure, unique properties and cellular localisation, the enzymatic mechanism and biological function of hCINAP have remained poorly characterised. Here, we offer the first high-resolution structure of hCINAP in complex with the substrate ADP (and dADP), the structure of hCINAP with a sulfate ion bound at the AMP binding site, and the structure of the ternary complex hCINAP-Mg²⁺ADP-Pi. Structural analysis and induced-fit docking calculations suggest a functional role for His79 in the Walker B motif. Kinetic analysis of mutant hCINAP-H79G indicates that His79 affects both AK and ATPase catalytic efficiency. **Finally**, we show that *in vivo* expression of hCINAP-H79G in human cells is toxic and drastically deregulates the number and appearance of CBs in the cell nucleus. **Our findings suggest that hCINAP may not simply regulate nucleotide homeostasis, but may have broader functionality, including control of CB assembly and disassembly in the nucleus of human cells.**

Keywords: crystal structure; adenylate kinase 6; ATPase; coilin; Cajal bodies

INTRODUCTION

Adenylate kinase (AK; phosphotransferase; EC 2.7.4.3) is an abundant enzyme class, catalysing the interconversion of ATP, ADP, and AMP, according to the reversible reaction: $\text{Mg}^{2+}\text{ADP} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{Mg}^{2+}\text{ATP} + \text{AMP}$. The adenylate kinase system is able to provide ATP rapidly during intense activity and thus regarded as a reserve energy system used to regenerate ATP from ADP under energy stress conditions.

Five AK isoforms (AK1–5) with various substrate specificities and tissue distributions are known in vertebrates.¹⁻⁵ These isoforms localize to the cytoplasm (AK1 and AK5) or mitochondria (AK2, AK3 and AK4). They are key enzymes in nucleotide homeostasis, maintaining the physiological nucleotide ratios in different cell compartments and cell types. Structurally, AKs are typical α/β proteins sharing a common architecture that is consistent with a β -sheet CORE domain, bearing a phosphate-binding loop (P-loop), and two flanking mobile domains called the LID and NMP-binding domains.⁶ hCINAP (Human Coilin Interacting Nuclear ATPase Protein), also now known as AK6 because of its AK activity,² has unique properties compared with the other known AKs. It exhibits unusually broad substrate specificity,² displays intrinsic ATPase activity and has a nuclear localisation.¹ It also possesses a number of atypical structural features for an adenylate kinase, namely a Walker B motif and a metal-coordinating residue, highly conserved and typical among the members of the ATPase/GTPase superfamily.⁷⁻¹⁰ The enzymatic classification of hCINAP as a pure AK therefore remains open to discussion.

So far, hCINAP orthologs have been identified in yeast (Fap7), *C. elegans* (cAK6) and *D. melanogaster* (dAK6).¹¹ In *C. elegans*, knockdown of the cAK6 gene results in growth suspension.¹² In yeast, Fap7p¹³ interacts with ribosomal protein RPS14 and appears to be involved in pre-rRNA processing: a Walker B-motif mutant (D82AH84A) is unable to cleave the 20S pre-rRNA from 40S pre-rRNA particles.¹⁴ In human cells, hCINAP was shown to interact directly with the carboxy-terminal tail of coilin, a marker protein of Cajal bodies (CBs), which are nuclear organelles involved in the maturation of UsnRNPs and snoRNPs en route to their sites of function in the nucleoplasm and nucleolus.¹ Furthermore, overexpression of hCINAP causes a decrease in the average number of CBs per nucleus in human cells.¹ Despite these intriguing associations with RNA metabolism in the nucleus, the functional role of hCINAP is also still poorly defined.

The unique localization and structural features of hCINAP, indicating an atypical dual enzymatic activity and its undefined biological function prompted us to undertake this investigation. We present here the structural analysis of hCINAP in complex with ADP,

1
2
3 dADP, SO_4^{2-} and $\text{Mg}^{2+}\text{ADP-PO}_4^{3-}$ and also provide a model for the hCINAP- $\text{Mg}^{2+}\text{ATP-AMP}$
4 complex. We characterize the dual ATPase and AK activity of hCINAP by kinetic analysis,
5 and with site-directed mutagenesis in residue H79 within VIVDYHG, a functional Walker B
6 motif (hhhDXXG), uncover the effect of this mutation on its kinetic properties. Furthermore,
7 we demonstrate that an H79G mutation *in vivo* has striking effects on the formation of CBs in
8 the nucleus of human cells.
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

MATERIALS AND METHODS

Cell Line – HeLa cells were cultured in DMEM, containing 10% v/v fetal calf serum (Gibco/BRL), 2 mM L-glutamine and 50 U/ml of penicillin/streptomycin, and maintained at 37 °C in 5% CO₂.

Antibodies – The following primary antibodies were used for immunofluorescence: Mouse anti-coilin δ 4 monoclonal antibody (mab) 5P10 TC at 1:50 dilution, mouse anti-PML Bodies mab P6-M3 at 1:100 (Santa Cruz Biotech.) and mouse anti-fibrillarin mab AFB01 at 1:200 (tebu-bio). Secondary antibodies (Molecular Probes) were: Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG, both at 1:1500 dilution.

Immunofluorescence – Immunofluorescence was carried as described by Santama et. al., 1998¹⁵ and labeled cells were analysed on a Zeiss Axiovert 200M inverted fluorescence microscope, equipped with a Zeiss AxioCam MRm camera and Zeiss Axiovision 4.2 software, using a Zeiss Apochromat x63 1.3 oil lens.

Transient Transfections and Statistical Analysis – Exponentially growing HeLa cultures were harvested and replated onto coverslips 24 h prior to transfection. Transfections were carried out using a Ca²⁺ / PO₄⁻³ precipitation protocol.¹ At 24 and 36 h post transfection, coverslips were retrieved for immunofluorescence and microscopic analysis. For analysis of the CB phenotypes, random fields of cells were scored for the number of CBs per nucleus (as revealed by coilin immunostaining) from three independent experiments (n=571 for GFP-hCINAP-H79G, n=1439 for GFP-hCINAP-WT and n=1072 for mock-transfected cells). Data processing was performed in Excel (Microsoft Corp.) and statistical tests undertaken in Prism (GraphPad Software, Inc.). The mean CB number (\pm sample standard deviation) was calculated and statistically tested by Welch's t-test. A histogram of the number distribution was generated for each construct and the distributions compared by 2-way ANOVA. P values <0.05, 0.01 and 0.001 were assigned as significant, highly and extremely significant, respectively.

Construction of Bacterial Expression Vectors – hCINAP cDNA was subcloned as a BamHI/SalI fragment from pGEX-4T-1-hCINAP (described by Santama et al., 2005¹) into

1
2
3 bacterial expression vector pGEX-6P-3 (Amersham Biosciences). The hCINAP-H79G mutant
4 was generated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and confirmed
5 by DNA sequencing (MWG, Germany).
6
7
8

9
10 *Bacterial Expression and Purification of Recombinant Proteins* – For recombinant protein
11 expression, competent *E. coli* B834(DE3)pLysS (Novagen) were transformed with pGEX-6P-
12 3-hCINAP or pGEX-6P-3-hCINAP-H79G, cultured at 37 °C until OD₆₀₀ was 0.4–0.5 AU,
13 induced with 0.5 mM isopropyl β-thiogalactopyranose (IPTG, Sigma) and grown at 18 °C
14 overnight. Cells were lysed in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.2, 0.2 M NaCl, 0.5 mM
15 DTT, 0.5 mM PMSF, and a mixture of protease inhibitors (Roche)] and disrupted by
16 sonication. The cell lysate was clarified (130,000 x g at 4 °C for 30 min), the cleared
17 supernatant was affinity purified onto a GSTrap 4B column (GE Healthcare), followed by on-
18 column cleavage of the GST tag by injection of 3C protease, performed as described by Dian
19 et al., 2002.¹⁶ The eluate was concentrated by ultrafiltration and further purified by gel
20 filtration chromatography on a 150-ml Superdex 75 (GE Healthcare) column. Fractions
21 containing the hCINAP monomer were pooled, concentrated to 14 mg/ml and used for
22 crystallization experiments. Additionally, purified proteins were desalted by dialysis against
23 20 mM Tris, pH 7.5 and used for AK or ATPase assays.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35
36
37 *AK Assays* – AK assays were performed on a dual-beam Cary 100 conc UV/VIS
38 spectrophotometer. The rate of β-NADH disappearance was monitored at 340 nm by
39 simultaneous measurement of test and reference cell absorbance. Reference samples,
40 containing reaction mixture without hCINAP, were used to automatically subtract background
41 absorbance, mainly attributable to the ATPase activity of pyruvate kinase and nonenzymatic
42 ATP hydrolysis. The AK activity of hCINAP with respect to ATP was measured in the
43 presence of 0.3 mM AMP. The final assay mixture (0.2 ml) consisted of 100 mM Tris-HCl,
44 pH 7.5, 60 mM KCl, 0.21 mM β-NADH, 1 mM PEP, 5 mM MgCl₂, 11.4 U/ml PK (Sigma),
45 10.6 U/ml LDH (Sigma), 20 μg hCINAP, 0.3 mM AMP and 0.01–1.0 mM ATP.
46
47
48
49
50
51
52

53 The effects of the AK-specific inhibitor, AP5A, were determined in the presence of
54 0.33 mM ATP, 0.3 mM AMP and 1–120 nM AP5A.
55

56 All kinetic data were analyzed with the nonlinear regression program GraFit.¹⁷
57
58

59
60 *ATPase Assay* – ATPase activity was determined by the malachite-green assay.¹⁸ The reaction
mixture (0.2 ml) contained 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.01–2

1
2
3 mM ATP and 20 μg wild-type or mutant enzyme. Parallel control samples, containing
4 reaction mixture without hCINAP, were used to subtract absorbance derived mainly from
5 nonenzymatic ATP hydrolysis. Blank samples, containing buffer with and without hCINAP,
6 showed no absorbance difference and were used to adjust the baseline of the instrument.
7 Reactions took place for 10 min at 30 $^{\circ}\text{C}$ and were stopped by addition of the color reagent.
8 Mixtures were allowed to stand for 10 min, and colorimetric determination of PO_4^{3-} liberation
9 was monitored at 630 nm.

10
11
12
13
14
15
16
17 *Crystallization and Data Collection* – Co-crystals of hCINAP in complex with ADP, dADP
18 and $\text{Mg}^{2+}\text{ADP-PO}_4^{3-}$ (average size of 0.3–0.5 mm), were obtained at 20 $^{\circ}\text{C}$ using the sitting-
19 drop vapour diffusion technique in a buffer comprising 14 mg/ml enzyme, 0.1 M HEPES pH
20 7.5, 1.5 M Li_2SO_4 , 0.2 M NaCl, 0.5 mM DTT, 25 mM MgCl_2 , and 2 mM ADP or 2 mM
21 dADP or 25 mM AP5A, respectively. Prior to flash freezing for data collection, crystals were
22 transferred for 5–15 sec to fresh buffer containing 25% v/v glycerol. Single crystal diffraction
23 data were collected on the PX 10.1 beamline (SRS, Daresbury Laboratory), using a 225-mm
24 MAR CCD detector. The crystal-to-image plate distance was 150 mm and gave a maximum
25 resolution of 1.75 \AA at the edge of the detector.

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35 *Structure Determination*– Integration and data reduction were performed with the programs
36 DENZO and SCALEPACK¹⁹ or MOSFLM²⁰ and SCALA, from CCP4 suite,²¹ and intensities
37 transformed to amplitudes with TRUNCATE.²² The crystals were isomorphous with the
38 sulfate-bound form (1RKB).² Phases were obtained with Molrep²³, using the 1RKB structure
39 as a molecular replacement model ($R_f/\sigma= 11.53$, $T_f/\sigma=35.01$). Alternate cycles of manual
40 building with the program Coot²⁴ and refinement using the maximum likelihood target
41 function as implemented in the program REFMAC²⁵ improved the model phases. At this
42 stage, water molecules were added to unidentified F_o-F_c map peaks greater than 1.0 σ by
43 using the “water find” module of the program Coot. After an additional cycle of refinement
44 and manual building, the ligand molecule was included in subsequent refinement cycles.
45 ADP, dADP, $\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$, PO_4^{3-} and SO_4^{2-} models, retrieved from the REFMAC library, were
46 fitted into the electron density with Coot. The final model was generated by TLS refinement
47 within REFMAC using TLS groups for the protein generated by the TLSMD web server.²⁶
48 Details of data processing and refinement statistics are summarized in **Table I**.

49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 PROCHECK²⁷ was used to assess the quality of the final structure. Structures were
analysed by programs “contacts” and “angle” of the CCP4 suite, and hydrogen bonds were

1
2
3 assigned if the distance between electronegative atoms was less than 3.3 Å and if both angles
4 between these atoms and the preceding atoms were greater than 90°. Van der Waals (vdW)
5 contacts were noted for nonhydrogen atoms separated by less than 4 Å.
6
7

8
9
10 *Protein Preparation for Substrate Docking Calculations* – Using the hCINAP-Mg²⁺ADP-
11 PO₄³⁻ X-ray complex coordinates, an initial hCINAP- Mg²⁺ATP-PO₄³⁻ was prepared by
12 conversion of ADP to ATP, based on the position of the extra phosphate group in the
13 superimposed AK-AMPPNP-AMP (PDB entry 1ANK) structure.²⁸ Wat12 and Wat8 were
14 deleted, as the extra phosphate takes their places in coordinating to Mg²⁺ and forming a
15 hydrogen bond contact with Arg109. The initial model was prepared for docking using
16 Schrödinger’s Protein Preparation Wizard by deleting residual SO₄²⁻ molecules, the Li atom,
17 all crystallographic water molecules beyond 5 Å of Mg²⁺, ATP or PO₄³⁻. Two further water
18 molecules (Wat9 and Wat10), to accommodate different orientations of the docked AMP
19 molecule, were also deleted. Bond orders were assigned and hydrogen atoms added. Initial
20 assignment of protonation states for basic and acidic residues and tautomeric states were
21 based on pKa at their normal pH (7.0). Subsequent optimization of hydroxyl, His protonation
22 states, C/N atom “flips” and side-chain O/N atom “flips” of Asn and Gln was based on
23 optimizing hydrogen bonding patterns. His residues were assigned as neutral, either in a HIE
24 or HID state. Any steric clashes or bad contacts were removed by a final Impref minimization
25 using the OPLS-AA (2001) force field.²⁹
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 *Ligand Preparation for Docking* – The AMP and ADP ligands were extracted directly from
41 the crystal structures (PDB entries 1ANK and 3IIL, respectively), and ATP from the prepared
42 hCINAP-Mg²⁺ATP-PO₄³⁻ complex. Hydrogens were added, bond orders assigned and
43 structures minimized using MacroModel version 9.5³⁰ and the OPLS-AA (2005) force
44 field,^{29,31} with water solvation effects included via the GB/SA continuum model.³²
45
46
47
48
49

50 *Rigid Receptor Docking* – Initial validation of the hCINAP-Mg²⁺ATP-PO₄³⁻ model structure
51 and the Glide-XP (version 4.5)³³ docking method³⁴⁻³⁶ was performed by re-docking of ATP to
52 the model. Docking grids were centered on the ATP ligand and prepared with/without the
53 PO₄³⁻ ion at the AMP binding site. Glide-XP docking of AMP to the AMP binding site was
54 performed with PO₄³⁻ used as the centre for the docking grids. In each case, the grids
55 represented the shape and properties of the binding sites with dimensions ~ 30 Å × 30 Å × 30
56 Å.
57
58
59
60

1
2
3
4
5 *Induced Fit Docking* – IFD calculations,³⁷ including receptor flexibility of AMP to the AMP
6 binding site, were performed using the Glide-XP (rigid receptor) top-ranked AMP-pose as
7 input. Grids for the hCINAP-Mg²⁺ATP-AMP model had dimensions of 30 Å × 30 Å × 30 Å,
8 centered on AMP. A maximum of 20 ligand binding poses were saved from Stage I Glide-SP
9 docking. Stage II was a Prime induced fit, where residues within 5 Å of the AMP ligand
10 initial poses were refined. Residues 45–54 of the NMP-binding loop were explicitly included
11 and P-loop residues Lys16 and Thr17 explicitly excluded, due to their role in coordinating to
12 the Mg²⁺. For Stage III, up to 20 structures within 30 kcal/mol of the lowest-energy structure
13 were used for Glide-XP AMP re-docking. The resulting receptor-ligand poses were analyzed
14 in terms of structure, ligand re-docking GlideScore (GS), and IFDScore (ligand re-docking
15 GS + 0.05% Prime complex energy).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 *QM/MM Calculations* – QM/MM single point calculations using QSite 5.0³⁸ were performed
27 on the geometries from the IFD calculations to estimate changes in ESP fit atomic charges as
28 the AMP α-phosphate approaches the ATP γ-phosphate. The QM region contained: the ATP
29 and AMP ligands with the -CH₂- groups “hydrogen-capped” in place of the riboses; any
30 residue and water molecule directly hydrogen-bonded with the AMP and ATP α- and γ-
31 phosphates; the hexa-coordinated Mg²⁺, its 3 coordinated waters and the Thr17 side chain.
32 The B3LYP^{39,40} DFT method was used with the 6-31+G* basis set,⁴¹⁻⁴³ while the OPLS-
33 AA(2005) force field^{29,31} was used for the MM region.
34
35
36
37
38
39
40
41

42 *Superimposition and Structure Presentation* – These were performed with LSQKAB⁴⁴ for
43 hCINAP complexes and with SUPERPOSE⁴⁵ for comparison between hCINAP and its
44 homologues. Figures were prepared and rendered with PyMol.⁴⁶
45
46
47

48 The coordinates of the protein complexes have been deposited to the RCSB Protein
49 Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>), with codes 3IIJ, 3IIK, 3IIL and 3IIM.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

The structures of hCINAP in complex with ADP, dADP and SO_4^{2-} : identification of substrate binding sites

To re-examine and fully resolve the structural features of hCINAP as an atypical putative AK enzyme and probe ADP binding sites for the forward reaction ($2\text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) plus the expected AMP and ATP binding sites for the bisubstrate reverse reaction ($\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2\text{ADP}$), we provide here a series of structural analyses. We achieved the first structure of hCINAP in complex with ADP, its putative AK substrate (**Fig. 1 and 2A, Table I**), at a higher resolution (1.76 Å) than the existing structure for the sulfate-bound form at 2 Å resolution (1RKB).² Inspection of the electron density maps of the hCINAP-ADP complex shows a strong $F_o - F_c$ accompanied by a $2F_o - F_c$ electron density, which can neatly accommodate one ADP molecule. The catalytic center is lined by P-loop amino acids 10–17, Arg109 from the LID domain and also His79 (**Fig. 1 and 2A**). ADP binds in a groove located near the protein surface with the adenine ring occupying the entrance of the catalytic center and the phosphate groups orientated toward the P-Loop region. The crystal structure shows that, upon binding to hCINAP, ADP forms numerous polar and non-polar contacts with the residues of the ATP binding site (summarized in **Sup-Table I**). In agreement with the broad substrate specificity of hCINAP, the adenosine moiety of ADP participates in only three hydrogen bonds with protein residues (**Fig. 2A**).

We also conducted the structural analysis of hCINAP-dADP complex at 2 Å resolution, (**Table I**), which showed that dADP perfectly overlaps with the ADP molecule (RMSD=0.121 Å; data not shown), but that the N1 of adenine and the remaining sugar oxygen O3' are not hydrogen bonded, reducing dADP interaction by four hydrogen bonds, compared to ADP (**Sup-Table II**).

Additionally, in the hCINAP-ADP structure the deduced ATP binding site is bordered by a loop composed of residues 78 to 84. This loop links the C-terminal end of the CORE β_3 strand (Asp77) with a 3_{10} helix, and, significantly, bears a Walker B motif, 77-DYHG-80, indicating its possible role in catalysis^{8-10, 14} (**Fig. S1**). In particular, His79 is linked with the β -phosphate in the ATP binding site by a hydrogen bond network extending from amide ND1 to Wat11, from Wat11 to P loop-Lys16 and from Lys16 back to the β -phosphate (**Fig. 2A**). Water molecule Wat11 lies between the β -phosphate (PB) of ADP (PB-O_W11; 4.5 Å) and His79 (O_W11-ND1; 2.9 Å), and is hydrogen-bonded to NZ of Lys16 (2.81 Å). O_W11 is in-line with respect to ND1 and PB (angle ND1-O_W11-PB=177.12°), suggesting that this position is

1
2
3 of high potential for a nucleophilic attack of an oxygen on the β -phosphate of acceptor ADP
4 during the forward AK reaction (**Fig. 2A**).

5
6
7 In its totality, the tertiary structure of hCINAP bound to ADP (or dADP) (**Fig. 1**),
8 including its ATP binding site, resembles the previously reported sulfate-bound protein
9 structure.² However, in the ATP site, the most important difference that we have identified is
10 a shift by 1.5 Å in the side chain of Arg109, which could be associated with a conformational
11 change of the LID domain, possibly in order to optimize the contacts with the α - and β -
12 phosphate groups of ADP (**Fig. 1 and Fig. 2A**). Additionally, the higher-resolution structure
13 allowed us to build accurately the nucleoside monophosphate-binding loop (NMP-binding
14 loop; amino acids 45–55), whose residues were interpreted as disordered in a previous
15 structural analysis of hCINAP.² In our structure (**Fig.1**), the NMP-binding loop adopts a β
16 strand-turn- β strand conformation and has a well-defined electron density with average B
17 factor for all atoms 30 Å (**Sup-Table V**).

18
19
20 To assess whether the observed structural difference of the NMP-binding domain in
21 this work may be due to ADP binding to the enzyme, we obtained data from the hCINAP-
22 SO_4^{2-} complex at 1.95 Å resolution, and refined to an R-factor of 0.179 (Rfree = 0.206)
23 (**Table I**). In our hCINAP- SO_4^{2-} structure, we observed the same structural motif of the NMP-
24 binding domain as in the ADP complex, indicating that it is independent of ligand (ADP)
25 binding and strengthening our interpretation of the NMP-binding loop (**Fig.2B**).

26
27
28 Finally, in the hCINAP- SO_4^{2-} structure, in addition to a **sulfate** ion at the ATP-binding
29 site, we also found a weakly bound sulfate at the AMP-binding site located between His79
30 and Arg39 (**Fig. 2B, Sup-Table III**). This position is very similar to that observed for the α -
31 phosphate moiety of AMP in AKs from *Escherichia coli* (AKeco) and *Sulfolobus*
32 *acidocaldarius* (AKas), 1ANK and 1NKS, respectively (**Fig. S2A**). SO_4^{2-} interacts with a
33 conserved guanidinium group, also present in the AMP binding site of 1ANK and 1NKS
34 (Arg36 and Arg54, respectively).^{47,48} These findings suggest that the location occupied by the
35 sulfate ion (known to mimic the PO_4^{3-}) represents the recognition site for the α -phosphate of
36 AMP in hCINAP.

37
38
39 In conclusion, therefore, the combination of our structures allowed the identification
40 of the ADP binding mode, within the ATP-binding site, and suggested the location of the
41 AMP binding site.

42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 **Mg²⁺ADP-PO₄³⁻ binding**

To further probe the AMP binding site in hCINAP and, at the same time, capture its

1
2
3 transition intermediate, we used a known inhibitor of AKs, the bisubstrate analog bis-
4 adenosine pentaphosphate (AP5A). We found AP5A to be a potent inhibitor of hCINAP with
5 an IC_{50} of 27.03 ± 2.93 nM AP5A (**Fig. S3**).

6
7
8 The hCINAP structure that we obtained in the presence of AK5A (**Fig. 2C**) did not, as
9 expected, correspond to a transition intermediate but appeared to correspond to a post-
10 hydrolysis state. This may be explained by a technical limitation of the X-ray crystallography
11 technique: in our experiments co-crystal formation in the presence of AP5A required 1 month,
12 and it is therefore likely that the co-crystallized AP5A was slowly hydrolyzed enzymatically
13 or chemically during the crystallization period. Soaking of preformed crystals with fresh
14 AP5A solution led to crystal deterioration, indicating that the crystal complex formation was
15 accompanied by extensive structural re-organisation (as would be expected in AKs).⁶

16
17 The obtained structure revealed that (a) the ATP site was occupied by a Mg^{2+} ADP
18 complex and a phosphate group (Pi) in close contact with His79 of the Walker B motif, (b) a
19 large shift in the backbone torsional angle of His79 occurred ($\Delta\Phi=-67.8^\circ$), accompanied by
20 a shift of the imidazole ring by 2.1 Å away from the ATP site in order to establish contacts
21 with the phosphate group (**Fig. S4**), (c) the magnesium ion was hexa-coordinated with one
22 ligand supplied by a β -phosphate oxygen and a second one supplied by the hydroxyl group of
23 Thr17, and finally (d) ADP possessed an identical conformation to that of the ADP complex
24 (RMSD=0.061Å).

25
26 There is strong evidence that PO_4^{3-} (as a product of hydrolysis), rather than SO_4^{2-} , was
27 bound in the presented crystal structure: (a) We could not detect a SO_4^{2-} ion in this position or
28 a shift in the His79 side chain in any other of the three reported structures (SO_4^{2-} , ADP,
29 dADP), but exclusively in the Mg^{2+} ADP- PO_4^{3-} structure, although the precipitant Li_2SO_4 was
30 present at a concentration of 1.5 M in all four crystallization experiments. Furthermore, (b)
31 we have carried out the co-crystallization experiments (data not shown) in the presence of
32 Mg^{2+} , Mg^{2+} ADP and Mg^{2+} dADP, but have not obtained SO_4^{2-} in this position, neither a His79
33 shift, nor a bound Mg^{2+} ion.

34
35 The PO_4^{3-} at its position makes hydrogen bonds to the imidazole nitrogen of His79
36 (2.65 Å) and the NZ atom of Lys16 (2.83 Å). We propose that during the forward AK
37 reaction ($2ADP \rightarrow ATP + AMP$) the Mg^{2+} ion does not follow the movement of the attacking
38 β -phosphate, but maintains its observed position and hexa-coordinated geometry, with 2 γ -
39 phosphate oxygens of the produced ATP replacing two water molecules, most probably Wat8
40 and Wat12 (**Fig. 2C and Sup-Table IV**).

41
42 Therefore, while for technical reasons this approach did not reveal unequivocally the

1
2
3 binding site of AMP, the post-hydrolysis structure obtained was very informative in
4 determining the residues that provide the co-ordination for the Mg^{2+} ion (this is the first
5 example of an AK with a bound Mg^{2+} ion) and in revealing that P loop His79 is involved in
6 the recognition of PO_4^{3-} in the structure with $Mg^{2+}ADP-PO_4^{3-}$ present.
7
8
9

10 11 12 **Prediction of the hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP ternary complex by modeling.**

13
14 **In the absence** of direct crystallographic evidence for the AMP binding site (required
15 for an AK activity) and with hCINAP already classified as an AK,² we decided to model a
16 hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP ternary complex in order to predict what structural changes this
17 would induce **compared with the ADP bound complexes** and to gain further insights into the
18 nature of hCINAP *if* functioning as an AK. Successful docking of ATP to the hCINAP-
19 Mg^{2+} ATP- PO_4^{3-} model, prepared from the hCINAP- Mg^{2+} ADP- PO_4^{3-} X-ray complex (see
20 Materials & Methods), required removal of the PO_4^{3-} ion from the model, indicating
21 unfavorable ATP- PO_4^{3-} electrostatics with PO_4^{3-} in its present position. **On removal of PO_4^{3-} ,**
22 all ATP docking poses produced the ATP binding conformation in the model complex, with
23 the superimposed RMSD (heavy atoms) for the top-ranked pose being 0.828 Å, compared to
24 the starting model.
25
26
27
28
29
30
31
32

33 ATP binding site structural changes going from ADP to ATP are minimal with the
34 more significant conformational changes expected in the NMP-binding domain and Walker
35 B-motif loop in order to accommodate AMP at the AMP binding site.
36
37

38 **Meanwhile,** induced fit docking (IFD), including receptor flexibility of AMP to the
39 AMP binding site, resulted in eight receptor-ligand binding structures, four of which made
40 intuitive sense with the **α -AMP** phosphate occupying a similar position to the **α -AMP**
41 phosphate in 1ANK (*E. coli* AK with bound AMPPNP and AMP) and 1NKS (*S.*
42 *acidocaldarius* AK with bound ADP and AMP) structures (**Table II**). The hexa-coordinated
43 Mg^{2+} coordination sphere is conserved for all structures. The first three structures (IFD-1 –
44 IFD-3) were also the top-ranked IFD poses. IFD-1 and IFD-2 poses with the highest IFD
45 scores reproduce best the AMP-bound conformations in 1ANK and 1NKS, with
46 superimposed ligand RMSDs (heavy atoms) being all less than 1 Å. They both have similar
47 ATP-AMP inter-phosphate P-P distances (~ 5 Å) and form seven direct AMP-protein
48 hydrogen bonds, which compares well with the eight hydrogen bonds formed by the
49 homologous 1ANK and 1NKS complexes. The main structural differences between IFD-1
50 and IFD-2 are the length of the hydrogen bonds and the AMP α -phosphate position, which
51 differs spatially by about 1 Å. IFD-1 (P-P=5.12 Å), shown in **Fig. 3B**, forms more favorable
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 contacts with hCINAP as judged by the higher Glide Score (-10.17) compared to IFD-2 (-
4 8.82). Compared to the hCINAP-Mg²⁺ADP-PO₄³⁻ X-ray structure, there is a backbone shift in
5 the NMP-binding domain (residues 45–55) with the largest shifts of 3.5–5 Å for residues 49–
6 51. Accompanying side-chain rearrangements are mainly associated with increasing favorable
7 contacts with AMP (**Fig. S2B**).
8
9

10
11 The other two receptor-ligand poses in **Table II** have longer (6.49 Å; IFD-4; **Fig. 3A**)
12 or shorter P-P distances (4.53 Å; IFD-3; **Fig. 3C**) than those of IFD-1 and IFD-2. The
13 structures suggest a key role for water bridging in the approach of an α-AMP phosphate
14 towards the γ-ATP phosphate, as well as some assistance from the Walker B-motif residues,
15 Tyr78 and His79. In IFD-3, the AMP ligand is ideally placed for a phosphate transfer
16 mechanism involving a nucleophilic attack. The case for such a pathway is accentuated by our
17 QM/MM calculations of electrostatic potential (ESP) atomic partial charges at the different P-
18 P distances for IFD-1, IFD-3 and IFD-4 (**Sup-Table VI**). As the AMP approaches the ATP,
19 an AMP α-phosphate O_{P1} becomes hydrogen bonded with a Mg²⁺ coordinated water (Wat5)
20 and this is reflected in its estimated partial charge of -0.82 for P-P distance 4.53 Å (**Fig. 3C**).
21 The corresponding partial charge for His79 hydrogen bonded phosphate O_{P2} is -0.98.
22 Approach of a mobile AMP towards an immobile ATP is consistent with a transfer
23 mechanism in which the AMP α-phosphate attacks the γ-phosphate of ATP, assisted by water
24 molecules that bridge ATP γ- and AMP α-phosphates. Further, the structures and P-P
25 distances reported here, although derived from docking (and therefore to be considered with
26 some caution), are consistent with molecular dynamics simulations of *E. coli* AK Mg²⁺ATP-
27 ADP.⁴⁹ Of note in this context is a recent publication by Nucci et al.,⁵⁰ which highlights the
28 limitations of the "static" picture of water molecule positions, as given by crystal structure
29 determination, compared with a more detailed dynamic picture, which can be produced by
30 NMR reverse micelle technology. To address this shortcoming, retention and modeling of
31 water molecules in our IFD calculations attempt to account for some of the dynamic water
32 behavior associated with the approach of AMP towards ATP at different P-P distances in our
33 proposed models.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 Overall, the modeling strongly indicated that the AMP binding site would lie between
54 the B motif and Arg39. This conclusion is strengthened by the fact that Arg39 is a highly
55 conserved residue in other known AKs.
56
57
58
59
60

An H79G mutation affects both AK and ATPase activities of hCINAP

The overall structural analysis and the proposed catalytic mechanism have highlighted the significance of certain amino acids in the P loop region (Lys16, Thr17), the LID domain (Arg109) and Walker B motif (His79). These residues are either identical or correspond to conservative substitutions in orthologs of hCINAP across the eukaryotic phyla. Interestingly, in human adenylate kinases AK1–AK5, Lys16 and Arg109 are conserved, while Thr17 and His79, perceived as functionally critical for hCINAP, are absent. Because our structural and modelling studies indicate that H79 may be a regulatory residue that responds to substrate binding, we decided to generate an hCINAP-H79G mutant and perform kinetic analysis to evaluate its effect on catalytic activity.

We first measured the AK activities of highly purified hCINAP and hCINAP-H79G with respect to ATP, in the presence of a fixed concentration of AMP (0.3 mM). Second, we determined ATPase hydrolysis by hCINAP-WT and hCINAP-H79G, in the absence of AMP (Table III and Fig. 4). We found that in the presence of the H79 mutation (a) the AK enzymatic efficiency (k_{cat}/K_m) is reduced by 72% relative to the wild-type enzyme, and (b) the efficiency for ATP hydrolysis in the absence of AMP (ATPase activity) is reduced by 76% relative to the wild type. Furthermore, the ATPase activity of wild type hCINAP ($1.45 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) is about 1% of its AK activity ($140 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). While many protein kinases exhibit ATP hydrolysis in the absence of their substrate, the high intrinsic ATPase activity of hCINAP is quite unusual for an AK.

Kinetic analysis has therefore provided the evidence for a dual enzymatic activity for hCINAP that is consistent with the dual structural features of the enzyme, namely the overall folding typical of an AK and a catalytic centre characteristic for an ATPase.

The expression of the hCINAP-H79G mutant is toxic and causes a significant change in Cajal Body organisation in the nucleus

hCINAP and CB protein coilin interact directly via the latter's 214 carboxy-terminal residues.¹ Because of the effect of Walker B-motif His79 in enzymatic efficiency, affecting both AK and ATPase activity *in vitro*, we next examined whether expression of mutant hCINAP-H79G *in vivo* might have functional implications for nuclear organization, accompanied by a corresponding phenotypic effect on either coilin or CBs. GFP-tagged expression vectors of wild-type hCINAP (WT) and mutant hCINAP-H79G were constructed, tested by Western blot (data not shown) and used for transient transfections of HeLa cells.

We observed that transfection with a mutant GFP-hCINAP-H79G construct had

1
2
3 detrimental effects both on transfection efficiency and proliferation of transfected cells: at 24
4 h post transfection, the proportion of hCINAP-H79G-transfected apoptotic cells (43%) was
5 four times higher than that of wild-type GFP-hCINAP (WT) cells (11%) with extreme
6 statistical significance, and at 36 h the proportion of apoptotic hCINAP-H79G-transfected
7 cells was maintained very high (43% compared to 13% for WT transfected apoptotic cells)
8 with high statistical significance (ANOVA with Tukey's multiple comparison post-test; **Fig.**
9 **S5**), indicative of mutant-specific impairment of proliferation or cell survival.

10
11
12 The number of CBs per nucleus, as detected with an anti-coilin antibody, was scored
13 in cells transfected with GFP-hCINAP-WT (n=1439), GFP-hCINAP-H79G (n=571) and
14 mock-transfected control cells (n=1072). In highly-expressing GFP-hCINAP transfected cells,
15 we observed profound changes in CB organization: the mean number of CBs per nucleus was
16 significantly higher in cells transfected with mutant hCINAP-H79G, as compared with the
17 mock transfected cells (Welch's t-test, $p=0.034$) (**Fig. 5A**). Importantly, there was a marked
18 heterogeneity in the numbers of CBs in the nuclei of hCINAP-H79G transfected cells as
19 evidenced by the frequency distribution displayed in **Fig. 5B**, so that large groups of cells
20 either had much fewer CBs than the mean number in WT-hCINAP-expressing or mock-
21 transfected cells, or groups of H79G cells possessed unusually high numbers of CBs (up to 30
22 per nucleus) (**Fig. 5B**). Representative examples of hCINAP-H79G-expressing cells with
23 either a very large number of CBs (**Fig. 5D upper panels**) or a small number of CBs (**Fig. 5D**
24 **bottom panels**), are shown in **Fig. 5**. As a result of this heterogeneity, the frequency
25 distribution of CBs in cells expressing the mutant form was significantly different overall
26 from that of WT-hCINAP samples (two way ANOVA, $p=0.0151$) and from mock-transfected
27 samples ($p=0.0122$).

28
29
30 The same analysis was repeated examining other types of distinct subnuclear
31 structures, namely the nucleolus, a site historically linked to CBs by Cajal himself,⁵¹ and PML
32 Bodies (Pro Myeloid Leukemia Bodies), a nuclear domain not directly linked to CBs. No
33 discernible phenotypic change of the numbers or overall organisation of these two nuclear
34 domains was observed in mutant vs. wild-type hCINAP-expressing cells (**Fig. S6**). This
35 indicates that the effect of overexpression of hCINAP-H79G on CB organisation (mean and
36 distribution) is specific and not secondary to general effects of the mutant enzyme on nuclear
37 structure.

38
39
40 Taken together, these data indicate that the expression of the mutant protein results in
41 CB de-regulation (causing an elevated average number and abnormal heterogeneous
42 distribution of CB numbers) and is toxic to the cell, resulting in enhanced apoptosis and
43

1
2
3 reduced proliferation.
4
5
6
7
8

9 DISCUSSION

10 Although the structure of hCINAP in complex with SO_4^{2-} had previously been
11 published, the additional four structures presented in this work as well as our modeling of the
12 hCINAP- Mg^{2+} -ATP-AMP ternary complex (a) resolve residues in the predicted AMP binding
13 site that were previously interpreted as disordered, (b) confirm that the overall folding of
14 hCINAP conforms to that expected for the AK family, with ADP and AMP binding sites in its
15 catalytic centers, and (c) reveal that, in the vicinity of the ATP binding site, hCINAP
16 possesses structural features typical of the ATPase/GTPase family rather than of AKs. These
17 are a Walker A motif (P-loop), bearing a Mg^{2+} -coordinating residue (Thr17), and a Walker B
18 motif, not reported for any other known AK in any species. hCINAP is thus the first member
19 of the adenylate kinase family (AK1–6) carrying a Walker B motif. Additionally, loop region
20 Asp77 to Pro85, including the Walker B motif is oriented quite differently from that of the
21 other AKs (**Fig. S1**). **In all likelihood, this distinct sequence piece and its unusual orientation**
22 **is important for the display of ATPase activity. We corroborated the structural evidence by**
23 **demonstrating that hCINAP has unusually high intrinsic ATPase activity, in addition to AK**
24 **activity, being essentially a dual-activity AK/ATPase. The role of H79 in catalysis was found**
25 **to be equally important both for the AK and ATPase reactions, as we demonstrate that the**
26 **H79G mutation reduces by approximately 72% the AK enzymatic efficiency and by 76% the**
27 **ATPase efficiency.**

28 Based on our structural and modeling analysis, we can propose a possible structural
29 mechanism that **accounts for the participation of His79 in both ATPase and AK reactions.** In
30 our proposed model shown in **Fig. 6**, **the imidazole ring of His79** can flip between two
31 possible orientations (rotation about a $\text{C}\beta\text{-C}\gamma$ single bond is assumed to be free⁵²). In the first
32 orientation (“flip” or “AK mode”), the imidazole nitrogen faces the AMP binding site and co-
33 ordinates the α -phosphate of AMP together with Arg39 (**Fig. 6 – AK mode**). In the second
34 orientation (“flop” or “ATPase mode”), the imidazole nitrogen faces the Mg^{2+} ATP catalytic
35 center (**Fig. 6 – ATPase mode**) and co-ordinates a lytic water together with Lys16 for a
36 nucleophilic attack on the γ -phosphate of ATP, similar to the mechanism which has been
37 proposed for myosin by Okimoto and co-workers.⁵³

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

The expression of the H79G mutant in human cells in culture was found to be toxic, reducing proliferation and increasing apoptosis compared to the wild-type enzyme (**Fig. S5**), and also exerting a profound and specific effect on CB organization in the nucleus (**Fig. 5**). The observed CB deregulation was detectable as a significantly altered frequency distribution compared with controls, and an abnormally wide range of between 0 and over 30 CBs/nucleus. The observed dramatic effect of the H79 mutation is in agreement with that observed for the yeast ortholog of hCINAP, FAP7.¹⁴ While FAP7 ATPase activity is negligible *in vitro*, strains harboring Fap7 K20R (Walker A motif) or D82AH84A (Walker B motif) mutations exhibit a significantly reduced growth rate compared to the wild-type strain and show that conserved amino acids predicted to be involved in nucleotide binding and NTPase activity are essential for Fap7 function *in vivo*. Likewise, regulation of CB assembly and disassembly during the cell cycle could be intrinsically linked with the putative involvement of hCINAP in nucleotide homeostasis in the mammalian nucleus, which might affect the ATP-dependent movement⁵⁴ of these highly dynamic and cell cycle-dependent structures. At the same time, the relatively low *in vitro* catalytic activities measured, such as an AK activity of approximately 1/1000 that of AK1, bring into question whether enzymatic activity of hCINAP is its main feature *in vivo*. Indeed, the relatively small effect of the H79G mutation on catalytic activities combined with its significant biological effect raises the possibility that H79 may mediate an alternative function of hCINAP, including involvement in formation or dissolution of protein complexes and the recognition of a substrate not tested in our *in vitro* assays.

Intriguingly, our structural analysis beyond the catalytic center points towards possible alternative functions of hCINAP. The protein possesses an enclosed tunnel, formed by the long NMP-binding domain and the LID domain (**Fig. S7**). This tunnel, with one end exposed to the bulk solvent and the opposite end to the ATP binding site, might constitute the path for the N- or C-terminus of a peptide chain. This would allow phosphorylation of a specific protein substrate (should hCINAP act as a protein kinase) or other energy-dependent processes, including the conformational correction of a misfolded target protein (should hCINAP act as a molecular chaperone). For instance, the known role of the phosphoprotein coilin in CB assembly^{55,56} and its interaction with hCINAP warrant further investigation of whether hCINAP may act on coilin as a kinase, a chaperone or a coordinator of its interaction in functional protein complexes

In conclusion, the unique properties of hCINAP relative to other AK isoforms, including differences in structure, substrate preference, intrinsic ATPase activity and cellular

1
2
3 localization, indicate that its function *in vivo* may also be exceptional amongst AKs. Ongoing
4 investigation into the intriguing link between hCINAP and CB regulation might hold the key
5 to its principal biological action.
6
7
8
9

10 ACKNOWLEDGMENTS

11 SEZ was funded by a Marie Curie European Reintegration Grant MERG-CT-2004-006358
12 and grant ENTER01-EP115 from the Greek General Secretariat for Research and
13 Technology. NS was funded by grant YGEIA/0506/05 from the Research Promotion
14 Foundation of Cyprus. SEZ, CED, JMH and DDL were supported by the EU FP7 ‘SP4-
15 Capacities Coordination and Support Action, Support Actions’ EUROSTRUCT project
16 (CSA-SA_FP7-REGPOT-2008-1). AIL is a Wellcome Trust Principal Research Fellow. This
17 work was also supported by grants to SEZ from the European Community Research
18 Infrastructure Action under the FP6 programme ‘Structuring the European Research Area’ for
19 work at the Synchrotron Radiation Source, CCLRC, Daresbury, England, MAX-lab, Lund,
20 Sweden and EMBL Hamburg Outstation, Germany.
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

REFERENCES

1. Santama N, Ogg SC, Malekkou A, Zographos SE, Weis K, Lamond AI. Characterization of hCINAP, a novel coilin-interacting protein encoded by a transcript from the transcription factor TAFII(32) locus. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(43):36429-36441.
2. Ren H, Wang L, Bennett M, Liang Y, Zheng X, Lu F, Li L, Nan J, Luo M, Eriksson S, Zhang C, Su XD. The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(2):303-308.
3. Van Rompay AR, Johansson M, Karlsson A. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol Ther* 2000;87(2-3):189-198.
4. Noma T. Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J Med Invest* 2005;52(3-4):127-136.
5. Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S, Wyatt TA, Mitsialis SA. Mutation of Murine Adenylate Kinase 7 Underlies a Primary Ciliary Dyskinesia Phenotype. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2009;40(3):305-313.
6. Schulz GE, Muller CW, Diederichs K. Induced-fit movements in adenylate kinases. *J Mol Biol* 1990;213(4):627-630.
7. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982;1(8):945-951.
8. Pai EF, Kabsch W, Krenzel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 1989;341(6239):209-214.
9. Kjeldgaard M, Nissen P, Thirup S, Nyborg J. The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure* 1993;1(1):35-50.
10. Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* 1993;366(6456):654-663.
11. Meng G, Zhai R, Liu B, Zheng X. Identification of a novel nuclear-localized adenylate kinase from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73(1):38-43.
12. Zhai R, Meng G, Zhao Y, Liu B, Zhang G, Zheng X. A novel nuclear-localized protein with special adenylate kinase properties from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* 2006;580(16):3811-3817.
13. Juhnke H, Charizanis C, Latifi F, Krems B, Entian KD. The essential protein *fap7* is involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2000;35(4):936-948.
14. Granneman S, Nandineni MR, Baserga SJ. The putative NTPase *Fap7* mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with *Rps14*. *Mol Cell Biol* 2005;25(23):10352-10364.
15. Santama N, Krijnse-Locker J, Griffiths G, Noda Y, Hirokawa N, Dotti CG. KIF2beta, a new kinesin superfamily protein in non-neuronal cells, is associated with lysosomes and may be implicated in their centrifugal translocation. *EMBO J* 1998;17(20):5855-5867.
16. Dian C, Eshaghi S, Urbig T, McSweeney S, Heijbel A, Salbert G, Birse D. Strategies for the purification and on-column cleavage of glutathione-S-transferase fusion target proteins. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002;769(1):133-144.
17. Leatherbarrow RJ. *GraFit Version 3.0*. Erithakus Software, Staines, UK.; 1992.
18. Geladopoulos TP, Sotiroidis TG, Evangelopoulos AE. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal Biochem* 1991;192(1):112-116.
19. Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A* 1997;276:307-326.
20. Leslie AGW. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl Protein Crystallogr* 1992;No. 26

- 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
21. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50(Pt 5):760-763.
22. French S, Wilson K. Treatment of Negative Intensity Observations. *Acta Crystallographica Section A* 1978;34(Jul):517-525.
23. Vagin A, Teplyakov A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography* 1997;30:1022-1025.
24. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2004;60:2126-2132.
25. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 1997;53:240-255.
26. Painter J, Merritt EA. TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *Journal of Applied Crystallography* 2006;39:109-111.
27. Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* 1993;26:283-291.
28. Althoff S, Zambrowicz B, Liang P, Glaser M, Phillips GN, Jr. Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Escherichia coli* adenylate kinase. *J Mol Biol* 1988;199(4):665-666.
29. Jorgensen WL, Maxwell DS, TiradoRives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society* 1996;118(45):11225-11236.
30. MacroModel, version 9.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007
31. Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *Journal of Physical Chemistry B* 2001;105(28):6474-6487.
32. Still WC, Tempczyk A, Hawley RC, Hendrickson T. Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *Journal of the American Chemical Society* 1990;112(16):6127-6129.
33. Glide, version 4.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007.
34. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P, Shenkin PS. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47(7):1739-1749.
35. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, Banks JL. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47(7):1750-1759.
36. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Sanschagrin PC, Mainz DT. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006;49(21):6177-6196.
37. Schrödinger Suite 2007 Induced Fit Docking protocol; Glide version 4.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007; Prime version 1.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2007.
38. QSite, version 5.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2008.
39. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B Condens Matter* 1988;37(2):785-789.
40. Becke AD. Density-Functional Thermochemistry .3. The Role of Exact Exchange. *Journal of Chemical Physics* 1993;98(7):5648-5652.
41. Francl MM, Pietro WJ, Hehre WJ, Binkley JS, Gordon MS, Defrees DJ, Pople JA. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .23. A Polarization-Type Basis Set for 2nd-Row Elements. *Journal of Chemical Physics* 1982;77(7):3654-3665.
42. Hariharo.Pc, Pople JA. Influence of Polarization Functions on Molecular-Orbital Hydrogenation Energies. *Theoretica Chimica Acta* 1973;28(3):213-222.
43. Hehre WJ, Ditchfie.R, Pople JA. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .12. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular-Orbital Studies of Organic-Molecules. *Journal of Chemical Physics* 1972;56(5):2257-&.

- 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
44. Kabsch W. Solution for Best Rotation to Relate 2 Sets of Vectors. *Acta Crystallographica Section A* 1976;32(Sep1):922-923.
45. Krissinel E, Henrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2004;60:2256-2268.
46. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific. Palo Alto, CA, USA; 2002.
47. Berry MB, Meador B, Bilderback T, Liang P, Glaser M, Phillips GN, Jr. The closed conformation of a highly flexible protein: the structure of *E. coli* adenylate kinase with bound AMP and AMPPNP. *Proteins* 1994;19(3):183-198.
48. Vonrhein C, Bonisch H, Schafer G, Schulz GE. The structure of a trimeric archaeal adenylate kinase. *J Mol Biol* 1998;282(1):167-179.
49. Krishnamurthy H, Lou H, Kimple A, Vieille C, Cukier RI. Associative mechanism for phosphoryl transfer: a molecular dynamics simulation of *Escherichia coli* adenylate kinase complexed with its substrates. *Proteins* 2005;58(1):88-100.
50. Nucci NV, Pometun MS, Wand AJ. Site-resolved measurement of water-protein interactions by solution NMR. *Nat Struct Mol Biol*;18(2):245-249.
51. Cajal SR. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados y invertebrados. *Trab Lab Invest Biol* 1903;2:129-221.
52. Ramani R, Boyd RJ. Conformational Aspects of L-Histidine. *Canadian Journal of Chemistry- Revue Canadienne De Chimie* 1981;59(23):3232-3236.
53. Okimoto N, Yamanaka K, Ueno J, Hata M, Hoshino T, Tsuda M. Theoretical studies of the ATP hydrolysis mechanism of myosin. *Biophysical Journal* 2001;81(5):2786-2794.
54. Platani M, Goldberg I, Lamond AI, Swedlow JR. Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol* 2002;4(7):502-508.
55. Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Hebert MD, Matera AG. Posttranslational modifications of coilin control Cajal body number and composition. *Molecular Biology of the Cell* 2002;13:421a-421a.
56. Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Matera AG, Hebert MD. Control of Cajal body number is mediated by the coilin C-terminus. *Journal of Cell Science* 2003;116(2):303-312.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Structure superimposition of hCINAP-ADP complex (green) onto the sulfate-bound form 1RKB (purple). The overall root mean square deviation (RMSD) between C α and backbone atoms of hCINAP-ADP and 1RKB was 0.576 and 0.594 Å, respectively. The NMP binding domain (designated by cyan), which comprises amino acids 45–55 (average RMSD for C α atoms is 2.43 Å), adopts a β strand-turn- β strand conformation. The conserved Lys16 residue adopts identical conformation in the two structures, whereas the side chain of the conserved Arg109 shifts by 1.5 Å towards the phosphate groups to stabilize the large number of negative charges. The P-loop (a.a.10–17) and the Walker B motif (a.a. 77–80) regions are indicated in yellow and orange, respectively.

FIGURE 2: Structural analysis of hCINAP complexes

A. Polar contacts of ADP in the vicinity of the Mg²⁺ATP binding site. Guanidine nitrogen of Arg109 from the LID domain makes polar contacts with the α - and β -phosphate oxygens, O2A and O2B. The hydroxyl group of Thr17 interacts directly with β -phosphate oxygen O3B, whereas NZ of Lys16 forms one hydrogen bond with O1B. The hydroxyl group of Thr18 interacts with O1A oxygen. The phosphate moiety makes additional polar contacts with water molecules and the main chain O/N atoms of residues Gly13, Gly15, Lys16, Thr17 and Thr18. The ribose moiety forms only two polar contacts with water molecules. The purine moiety interacts with two water molecules, while two additional polar contacts are formed between N6 and the carbonylic oxygen of Lys148 and N1 and the amide nitrogen of Pro149.

B. Polar contacts of SO₄²⁻ bound at the AMP binding site. The SO₄²⁻ ion, bound at the AMP binding site, makes a direct polar contact with the guanidinium nitrogen NH1 and two indirect polar contacts with the NH2 via a water molecule. The imidazole ND1 of His79 is hydrogen bonded to water Wat11 (ND1-OW11; 2.82 Å), whereas nonpolar-polar contacts are formed between imidazole carbon CE1 and the sulfate oxygen O1 (CE1-O1; 3.17 Å).

C. Polar contacts of Mg²⁺ADP and Pi, in the vicinity of the Mg²⁺ATP binding site. In the vicinity of the Mg²⁺ATP binding site, an extensive network of hydrogen bonds is created between Mg²⁺ADP, PO₄³⁻, P-loop residues Lys16, Thr17, Thr18, Walker B motif His79, and Arg109 from the LID-domain. The Mg²⁺ ion is hexa-coordinated, with the hydroxyl group of Thr17 and the Wat12 occupying two apical positions. The Wat12 and Wat8 are located in the positions that would be occupied by two of the γ -phosphate oxygens of ATP. Arg109 forms hydrogen bonds with α - and β -phosphate oxygens and Wat8 and is proposed to protect ATP

from random hydrolysis. Mg^{2+} contributes to positive polarization of γ -phosphate and makes it more susceptible to nucleophilic attack.

FIGURE 3: Models of the hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP complex from induced fit docking calculations.

Predicted hCINAP- Mg^{2+} ATP-AMP poses with different interphosphate (P-P) distances, showing the approach of a mobile AMP towards a fixed ATP.

A. IFD-4, P-P distance 6.49 Å: AMP phosphate interacts with His79 side chain NH and Arg39 guanidine NH₂. The Tyr78 side chain hydroxyl hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen. The ribose 2'- and 3'-OHs form hydrogen bonds with Arg39 guanidine NH₂ (2'-OH) and backbone carbonyl and amide (3'-OH) of Pro54.

B. IFD-1, P-P distance 5.12 Å: His79 forms a side-chain bond with the AMP phosphate. The Tyr78 side-chain hydroxyl hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen and the adenine nitrogen N1. Water-bridging contacts of the AMP phosphate and the ATP phosphate with the Arg39 guanidine side chain (NH₂) are formed. Arg39 forms a direct H-bond contact with ribose 2'-OH through side-chain guanidine NE and NH₂. Ribose-3'-OH hydrogen-bonds with the backbone-carbonyl O of Pro54.

C. IFD-3, P-P distance 4.53 Å: AMP phosphate now interacts with the backbone and side-chain NHs of His79, and the Mg^{2+} -coordinated water molecules Wat5 and Wat20. Waters bridge the AMP (α -) –ATP (γ -) phosphates. Arg39 forms a direct H-bond contact with ribose 2'-hydroxyl through side chain guanidine NH₂. Ribose-3'-OH hydrogen bonds with Tyr44 OH. The Tyr78 side-chain hydroxyl hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen.

FIGURE 4: Kinetics of hCINAP-WT and hCINAP-H79G.

A. hCINAP-WT adenylate kinase activity with respect to ATP at a constant concentration of AMP. Inset: Double-reciprocal plot.

B. hCINAP-H79G adenylate kinase activity with respect to ATP. Inset: Hill plot.

C. Comparison of the AK activities of A and B; hCINAP-WT (▲) and hCINAP-H79G (●).

D. hCINAP-WT ATPase activity. Inset: Hill plot

E. hCINAP-H79G ATPase activity. Inset: Hill plot.

F. Comparison of the ATPase activities of D and E; hCINAP-WT (▲) and hCINAP-H79G (●). All data are means from two experiments.

1
2
3 **FIGURE 5: The overexpression of GFP-hCINAP-H79G alters Cajal Body (CB)**
4 **organization (mean and distribution) in the nucleus of HeLa cells.**

5
6
7 **A.** Mean number of CB (\pm sample standard deviation) per nucleus in mock-treated cells, cells
8 highly expressing GFP-hCINAP-WT and cells highly expressing GFP-hCINAP-H79G upon
9 transient transfection. The mean number of CBs is significantly higher in the hCINAP-H79G
10 mutant as compared to the mock transfected cells (Welch's t-test, $p=0.034$).
11

12
13
14 **B.** Histogram of the distribution of Cajal Body (CB) numbers per nucleus in the same three
15 populations of transiently transfected cells. The overall distribution of CB numbers is
16 significantly different in hCINAP-H79G mutant samples compared to the WT control
17 samples ($p=0.0151$) and mock transfected samples ($p=0.0122$, two-way ANOVA).
18

19
20
21 **C, D.** Representative images of changed CB numbers in cells transiently transfected with
22 GFP-hCINAP-H79G (**D**), as compared to cells transiently transfected with GFP-hCINAP-WT
23 (**C**). Hoechst staining of nuclei (blue), GFP-fluorescence indicative of transfected cells in
24 each case (WT or mutant H79G) (green panels) and immunostaining of CBs with an anti-
25 coilin mab (red). In the examples of mutant H79G expression given here, the CBs are either
26 considerably increased in number in transfected cells (white arrows) as opposed to non-
27 transfected cells in the same field (top right panel), or markedly reduced (white arrows,
28 bottom right panel). In WT-transfected cells, the number of CBs is more homogeneous from
29 nucleus to nucleus (**C**). Scale bars: 20 μm .
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **FIGURE 6: A model of the role of His79 in enzymatic activities: Juxtaposition of**
40 **“ATPase mode” and “AK mode”**

41
42 According to the proposed ring-flip hypothesis, based on the structural analysis, the imidazole
43 nitrogen ND1 of His79 can coordinate a lytic water molecule (together with the NZ of Lys16)
44 during the ATPase reaction ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$; **ATPase-mode**) or coordinate the α -
45 phosphate of AMP (together with the NH1 of Arg39) during the reverse AK reaction ($\text{ATP} +$
46 $\text{AMP} \rightarrow 2\text{ADP}$; **AK-mode**) (further details in the Discussion section).
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table I: Statistics of data collection, processing and refinement of the hCINAP complexes

| hCINAP Complex (PDB ID) | SO ₄ ²⁻ (3IIK) | ADP (3IIJ) | dADP (3IIM) | Mg ²⁺ ADP- PO ₄ ³⁻ (3IIL) |
|---|--|---------------------|------------------------|--|
| CCLRC PX10.1; λ (Å) | 1.04498 | 1.11665 | 0.979 | 1.04498 |
| Space group <i>P</i> 6 ₁ ; Cell dimensions (Å), a,b,c, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ | 98.67, 98.67, 57.65 | 99.14, 99.14, 57.84 | 99.28, 99.28, 57.97 | 99.17, 99.17, 58.05 |
| Resolution (Å) | 34.32-1.95 | 28.3-1.76 | 25.0-2.00 | 34.52-2.00 |
| Outermost shell (Å) | 2.06-1.95 | 1.79-1.76 | 2.03-2.00 | 2.03-2.00 |
| Reflections measured | 188,312 | 152,209 | 140,350 | 144,687 |
| Unique reflections | 23,444 | 31,610 | 22,173 | 22,102 |
| R _{symm} ^a | 0.050 (0.449) | 0.044 (0.499) | 0.066 (0.470) | 0.057 (0.461) |
| Completeness % | 99.9 (100.0) | 98.1 (88.4) | 100.0 (100.0) | 99.9 (100.0) |
| $\langle I/\sigma I \rangle$ | 25.80 (4.50) | 17.92 (3.41) | 17.80 (4.82) | 20.13 (4.25) |
| Redundancy | 8.0 (8.0) | 4.9 (4.3) | 6.3 (6.2) | 6.5 (6.5) |
| Final R _{cryst} ^b (R _{free} ^c) % | 17.98 (20.56) | 18.12 (19.51) | 18.56 (21.62) | 17.10 (19.27) |
| No. of protein residues (residue range) ^d | 175 (-2 - 172) | 175 (-2 - 172) | 174 (-1 - 172) | 175 (-2 - 172) |
| No. of water molecules in final cycle | 200 | 190 | 205 | 201 |
| R.m.s. deviation in bond lengths (Å) | 0.0089 | 0.0077 | 0.0097 | 0.0103 |
| R.m.s. deviation in bond angles (°) | 1.113 | 1.128 | 1.160 | 1.258 |
| Average B factor (Å ²) | | | | |
| Protein atoms | 19.103 | 19.633 | 18.752 | 20.596 |
| Water molecules | 30.903 | 32.011 | 31.242 | 32.233 |
| Ligand molecules | 27.3 (SO ₄ ^{ATP} site) 95.7 (SO ₄ ^{AMP} site) | 30.214 (ADP) | 32.605 (dADP) | 33.099 (ADP) 36.600 (Mg ²⁺) 34.058 (Pi) |
| Ramachandran (u-w) plot | Residues in most favored regions 93%, Residues in allowed regions 7% | | | |

Values in parentheses are for the outermost shell.

^aR_{symm} = $\sum_i \sum_j |I_i(h) - I_j(h)| / \sum_i \sum_j I_i(h)$ where $I_i(h)$ and $I(h)$ are the i th and the mean measurements of the intensity of reflection h . ^bR_{cryst} = $\sum_i |F_o - F_c| / \sum_i F_o$, where F_o and F_c are the observed and calculated structure factors amplitudes of reflection h , respectively. ^cR_{free} is equal to R_{cryst} for a randomly selected 5% subset of reflections not used in the refinement. ^dResidues -2 to 0 correspond to additional amino acids introduced by the cloning procedure.

Table II. Output receptor-ligand poses (structures) and data from the IFD calculations

| Structure | P-P distance (Å) ^a | H-bonds ^b | RMSD (Å) ^c | Prime Energy (kcal/mol) | XP Gscore | IFDScore |
|-----------|-------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------|----------|
| 1 | 5.12 | 7 | 0.880 (0.826) | -11316.3 | -10.17 | -575.98 |
| 2 | 5.05 | 7 | 0.958 (0.769) | -11319.3 | -8.82 | -574.78 |
| 3 | 4.53 | 5 | 1.429 (1.640) | -11328.3 | -7.92 | -574.33 |
| 4 | 6.49 | 6 | 1.611 (1.367) | -11331.4 | -5.59 | -572.15 |

^aATP-ADP interphosphate distances measured between P atoms. ^bNumber of direct AMP-hCINAP hydrogen bonds. ^cRMSD (heavy atoms) on superimposition of AMP conformation on its conformations in the 1ANK and 1NKS (in parentheses) complexes.

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

ANNA MAM EKKOY
For Peer Review

Table III: Summary of kinetic parameters

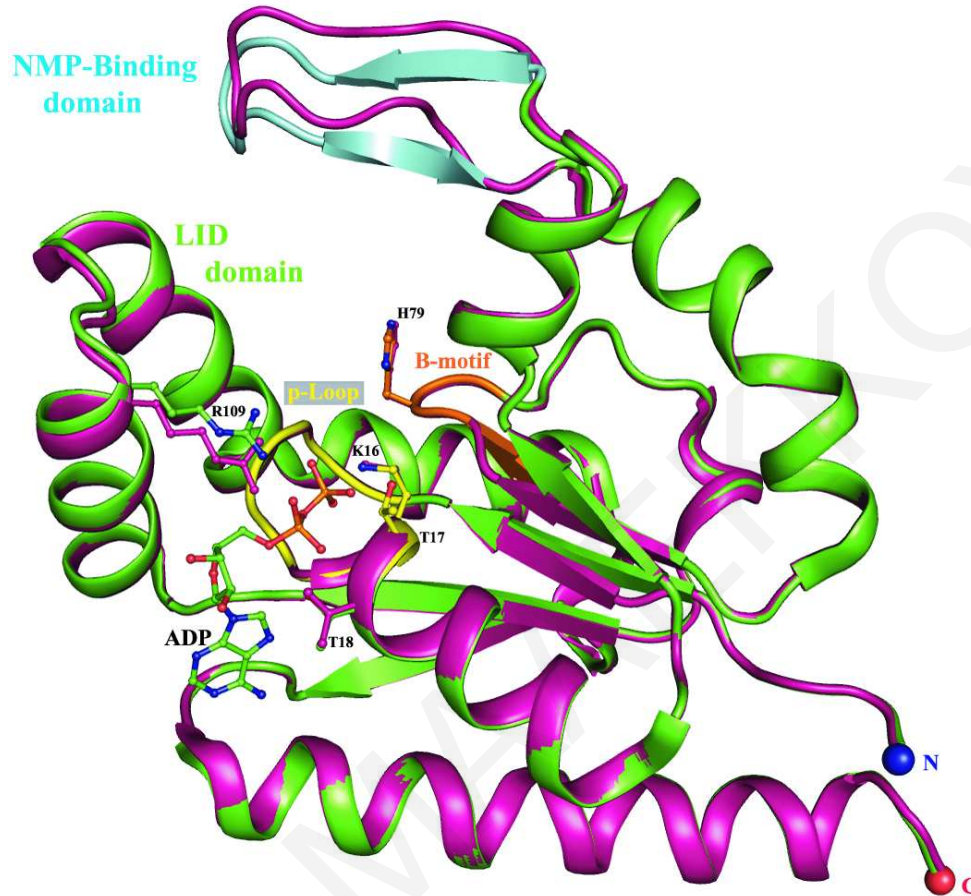
A. Adenylate kinase activity ($\text{ATP} + \text{AMP} \leftrightarrow 2\text{ADP}$)

| Enzyme | Specific activity (nmol/min /mg) | k_{cat} (s^{-1}) | K_m (μM ATP) | k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) |
|------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|---|
| hCINAP ^{WT} | 18±0.9 | 6.3×10^{-3} | 45±5 | 140 |
| hCINAP ^{H79G} | 11±0.16 ($n_H=1.99^a$) | 3.7×10^{-3} | 93±8 ^a | 39 |

B. ATPase activity ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$)

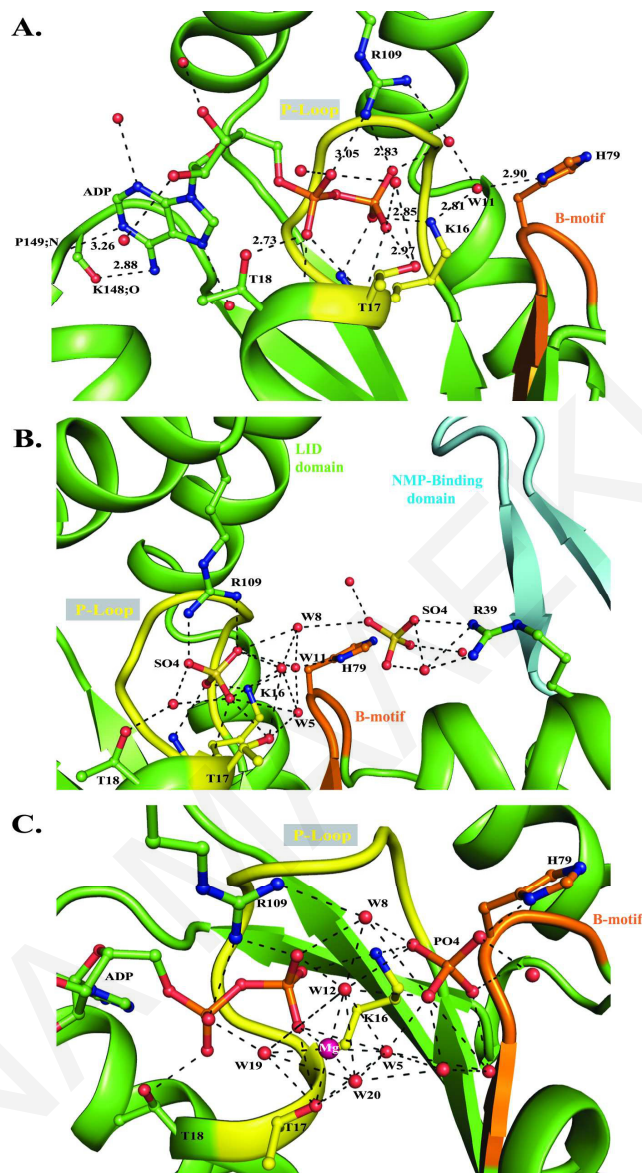
| Enzyme | Specific activity (nmol/min /mg) | k_{cat} (s^{-1}) | K_m (μM ATP) | k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) |
|------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|---|
| hCINAP ^{WT} | 1.37±0.08 ($n_H=1.21^a$) | 4.8×10^{-4} | 332±8 ^a | 1.45 |
| hCINAP ^{H79G} | 0.74±0.04 ($n_H=2.10^a$) | 2.5×10^{-4} | 721±1 ^a | 0.34 |

^a Best-fit curve obtained by fitting the data to the Hill equation. K_m and n_H were calculated by linear regression of the logarithmically transformed data (Hill plots)



Structure superimposition of hCINAP-ADP complex (green) onto the sulfate-bound form 1RKB (purple). The overall root mean square deviation (RMSD) between C α and backbone atoms of hCINAP-ADP and 1RKB was 0.576 and 0.594 Å, respectively. The NMP binding domain (designated by cyan), which comprises amino acids 45–55 (average RMSD for C α atoms is 2.43 Å), adopts a β strand-turn- β strand conformation. The conserved Lys16 residue adopts identical conformation in the two structures, whereas the side chain of the conserved Arg109 shifts by 1.5 Å towards the phosphate groups to stabilize the large number of negative charges. The P-loop (a.a.10–17) and the Walker B motif (a.a. 77–80) regions are indicated in yellow and orange, respectively.

89x83mm (300 x 300 DPI)



Structural analysis of hCINAP complexes

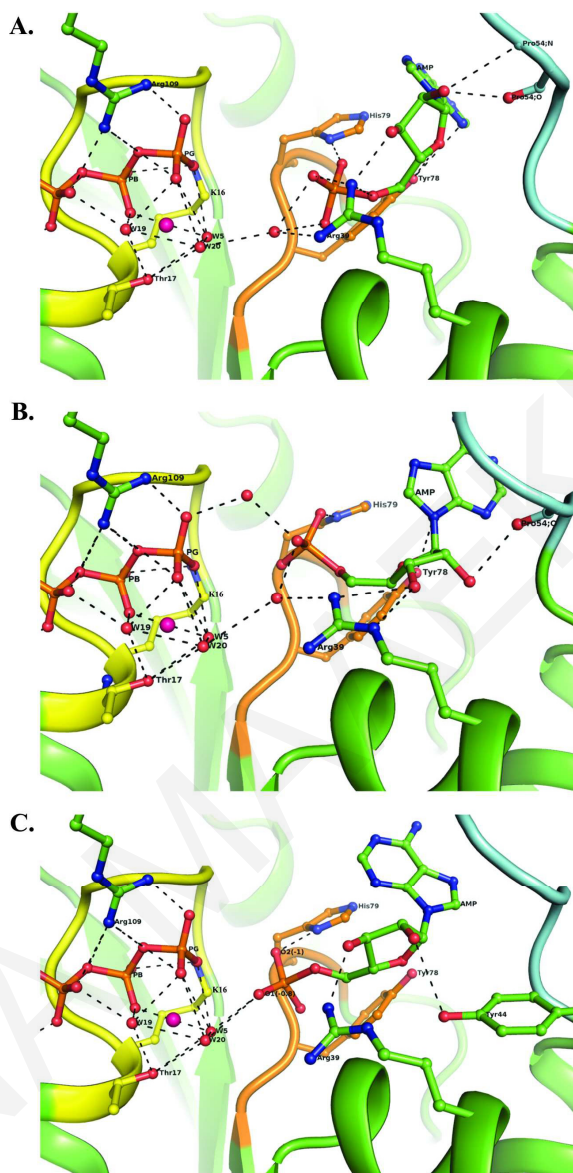
A. Polar contacts of ADP in the vicinity of the Mg²⁺ ATP binding site. Guanidine nitrogen of Arg109 from the LID domain makes polar contacts with the α - and β -phosphate oxygens, O2A and O2B. The hydroxyl group of Thr17 interacts directly with β -phosphate oxygen O3B, whereas NZ of Lys16 forms one hydrogen bond with O1B. The hydroxyl group of Thr18 interacts with O1A oxygen. The phosphate moiety makes additional polar contacts with water molecules and the main chain O/N atoms of residues Gly13, Gly15, Lys16, Thr17 and Thr18. The ribose moiety forms only two polar contacts with water molecules. The purine moiety interacts with two water molecules, while two additional polar contacts are formed between N6 and the carbonylic oxygen of Lys148 and N1 and the amide nitrogen of Pro149.

B. Polar contacts of SO₄²⁻ bound at the AMP binding site. The SO₄²⁻ ion, bound at the AMP binding site, makes a direct polar contact with the guanidinium nitrogen NH1 and two indirect polar contacts with the NH2 via a water molecule. The imidazole ND1 of His79 is hydrogen bonded to

1
2
3 water Wat11 (ND1-OW11; 2.82 Å), whereas nonpolar-polar contacts are formed between imidazole
4 carbon CE1 and the sulfate oxygen O1 (CE1-O1; 3.17 Å).

5 **C. Polar contacts of Mg²⁺ADP and Pi, in the vicinity of the Mg²⁺ATP binding site.** In the
6 vicinity of the Mg²⁺ATP binding site, an extensive network of hydrogen bonds is created between
7 Mg²⁺ADP, PO₄³⁻, P-loop residues Lys16, Thr17, Thr18, Walker B motif His79, and Arg109 from the
8 LID-domain. The Mg²⁺ ion is hexa-coordinated, with the hydroxyl group of Thr17 and the Wat12
9 occupying two apical positions. The Wat12 and Wat8 are located in the positions that would be
10 occupied by two of the γ-phosphate oxygens of ATP. Arg109 forms hydrogen bonds with α- and β-
11 phosphate oxygens and Wat8 and is proposed to protect ATP from random hydrolysis. Mg²⁺
12 contributes to positive polarization of γ-phosphate and makes it more susceptible to nucleophilic
13 attack.

14 76x142mm (458 x 458 DPI)



Models of the hCINAP-Mg²⁺ ATP-AMP complex from induced fit docking calculations.

Predicted hCINAP-Mg²⁺ ATP-AMP poses with different interphosphate (P-P) distances, showing the approach of a mobile AMP towards a fixed ATP.

A. IFD-4, P-P distance 6.49 Å: AMP phosphate interacts with His79 side chain NH and Arg39 guanidine NH₂. The Tyr78 side chain hydroxyl hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen. The ribose 2'- and 3'-OHs form hydrogen bonds with Arg39 guanidine NH₂ (2'-OH) and backbone carbonyl and amide (3'-OH) of Pro54.

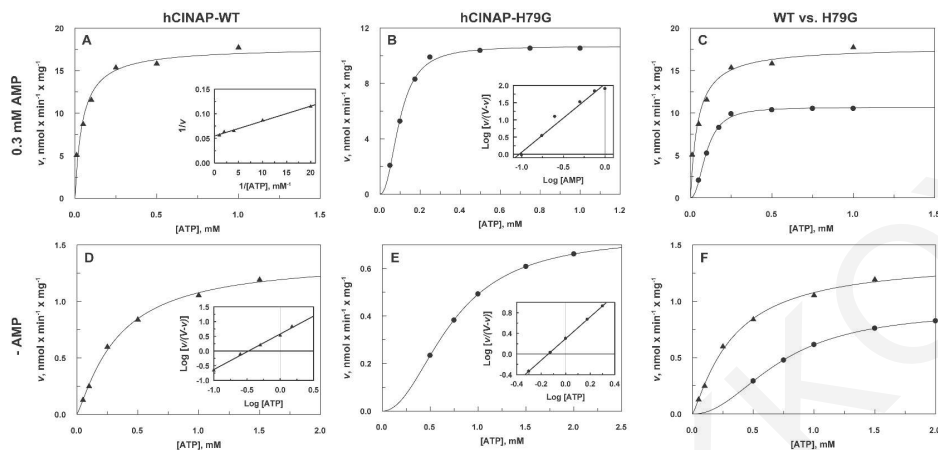
B. IFD-1, P-P distance 5.12 Å: His79 forms a side-chain bond with the AMP phosphate. The Tyr78 side-chain hydroxyl hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen and the adenine nitrogen N1. Water-bridging contacts of the AMP phosphate and the ATP phosphate with the Arg39 guanidine side chain (NH₂) are formed. Arg39 forms a direct H-bond contact with ribose 2'-OH through side-chain guanidine NE and NH₂. Ribose-3'-OH hydrogen-bonds with the backbone-carbonyl O of Pro54.

C. IFD-3, P-P distance 4.53 Å: AMP phosphate now interacts with the backbone and side-chain NHs

1
2
3 of His79, and the Mg²⁺-coordinated water molecules Wat5 and Wat20. Waters bridge the AMP (α-
4 -ATP (γ-) phosphates. Arg39 forms a direct H-bond contact with ribose 2'-hydroxyl through side
5 chain guanidine NH₂. Ribose-3'-OH hydrogen bonds with Tyr44 OH. The Tyr78 side-chain hydroxyl
6 hydrogen-bonds with the ribose-ring oxygen.
7

8 77x157mm (425 x 425 DPI)
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

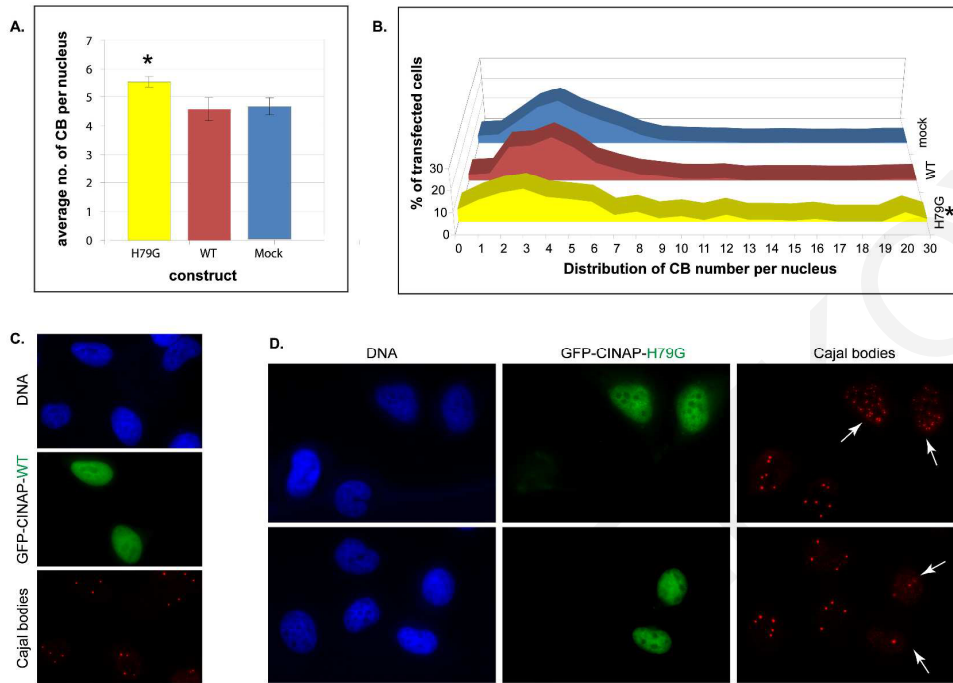
ANNA MARIE EKKOY
For Peer Review



Kinetics of hCINAP-WT and hCINAP-H79G.

- A.** hCINAP-WT adenylate kinase activity with respect to ATP at a constant concentration of AMP. Inset: Double-reciprocal plot.
- B.** hCINAP-H79G adenylate kinase activity with respect to ATP. Inset: Hill plot.
- C.** Comparison of the AK activities of A and B; hCINAP-WT (▲) and hCINAP-H79G (●).
- D.** hCINAP-WT ATPase activity. Inset: Hill plot
- E.** hCINAP-H79G ATPase activity. Inset: Hill plot.
- F.** Comparison of the ATPase activities of D and E; hCINAP-WT (▲) and hCINAP-H79G (●). All data are means from two experiments.

156x71mm (567 x 567 DPI)



The overexpression of GFP-hCINAP-H79G alters Cajal Body (CB) organization (mean and distribution) in the nucleus of HeLa cells.

A. Mean number of CB (\pm sample standard deviation) per nucleus in mock-treated cells, cells highly expressing GFP-hCINAP-WT and cells highly expressing GFP-hCINAP-H79G upon transient transfection. The mean number of CBs is significantly higher in the hCINAP-H79G mutant as compared to the mock transfected cells (Welch's t-test, $p=0.034$).

B. Histogram of the distribution of Cajal Body (CB) numbers per nucleus in the same three populations of transiently transfected cells. The overall distribution of CB numbers is significantly different in hCINAP-H79G mutant samples compared to the WT control samples ($p=0.0151$) and mock transfected samples ($p=0.0122$, two-way ANOVA).

C, D. Representative images of changed CB numbers in cells transiently transfected with GFP-hCINAP-H79G (**D**), as compared to cells transiently transfected with GFP-hCINAP-WT (**C**). Hoechst staining of nuclei (blue), GFP-fluorescence indicative of transfected cells in each case (WT or mutant H79G) (green panels) and immunostaining of CBs with an anti-coilin mab (red). In the examples of mutant H79G expression given here, the CBs are either considerably increased in number in transfected cells (white arrows) as opposed to non-transfected cells in the same field (top right panel), or markedly reduced (white arrows, bottom right panel). In WT-transfected cells, the number of CBs is more homogeneous from nucleus to nucleus (**C**). Scale bars: 20 μm .

143x101mm (600 x 600 DPI)

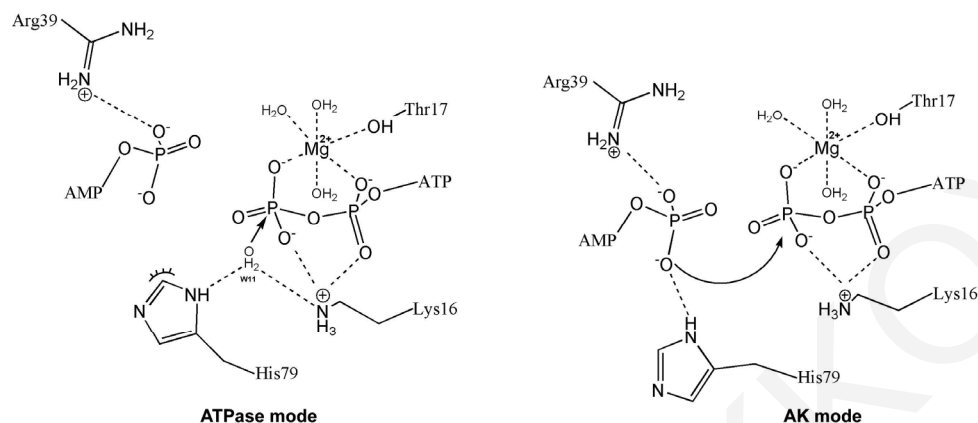


Figure 6: **A model of the role of His79 in enzymatic activities: Juxtaposition of "ATPase mode" and "AK mode"**

According to the proposed ring-flip hypothesis, based on the structural analysis, the imidazole nitrogen ND1 of His79 can coordinate a lytic water molecule (together with the NZ of Lys16) during the ATPase reaction ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$; **ATPase-mode**) or coordinate the α -phosphate of AMP (together with the NH1 of Arg39) during the reverse AK reaction ($\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2\text{ADP}$; **AK-mode**) (further details in the Discussion section).

156x69mm (440 x 440 DPI)