



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Διερεύνηση πολυγλουταμυλίωσης σε πυρηνικές πρωτεΐνες που
περιέχουν εγγενώς εύκαμπτες περιοχές**

ΜΟΥΣΤΑΚΑ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης με τίτλο "Βιοτεχνολογία".

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Κα Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη, υπό την επίβλεψη της οποίας πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία. Την ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου, να αποκτήσω γνώσεις και εμπειρίες αλλά και να συνεργαστώ με ικανά άτομα. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συνεχή καθοδήγηση, το ειλικρινές ενδιαφέρον και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Ζωή Καρέτσου για την άποψη συνεργασία, τη βοήθεια και το αδιάκοπο ενδιαφέρον της καθόλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Σ' αυτό το σημείο μου δίνεται η ευκαιρία να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου και στην υποψήφια διδάκτορα Ηλιάνα Σερίφη, η οποία στάθηκε δίπλα μου με προθυμία τόσο σε επαγγελματικό όσο και προσωπικό επίπεδο.

Για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα συνεργασίας, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για τη συνεχή στήριξη που μου παρέχει όλα αυτά τα χρόνια και γιατί με ενθαρρύνει να θέτω στόχους και να τους κυνηγώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	-3-
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	-6-
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	-8-
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	-10-
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	-11-
SUMMARY	-12-
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	-13-
1.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και βιολογικός τους ρόλος.....	-14-
1.1.1 Η πολυγλουταμυλίωση.....	-15-
1.1.2 Ρόλος πολυγλουταμυλίωσης.....	-17-
1.1.3 Η πολυγλουταμυλίωση ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση ευρύτερου φάσματος υποστρωμάτων.....	-19-
1.1.4 Ένζυμα πολυγλουταμυλίωσης.....	-21-
1.1.5 Ανίχνευση πολυγλουταμυλίωσης με ειδικά αντισώματα.....	-24-
1.2 Όξινες πρωτεΐνες με πολυ-E περιοχές ως στόχος πολυγλουταμυλίωσης.....	-25-
1.2.1 Η ογκοπρωτεΐνη SET.....	-27-
1.2.1α Δομή της SET.....	-27-
1.2.1β Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της SET.....	-28-
1.2.1γ Βιολογικός ρόλος της SET.....	-29-
1.2.2 Η προθυμοσίνη α.....	-31-
1.2.2α Δομή της προθυμοσίνης α.....	-31-
1.2.2β Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της προθυμοσίνης α.....	-33-
1.2.2γ Βιολογικός ρόλος της προθυμοσίνης α.....	-33-
1.2.3 Η παραθυμοσίνη.....	-35-
1.2.3α Δομή της παραθυμοσίνης.....	-36-
1.2.3β Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της παραθυμοσίνης.....	-36-
1.2.3γ Βιολογικός ρόλος της παραθυμοσίνης.....	-37-

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	-39-
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	-41-
3.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	-42-
3.1.1 Κυτταρική σειρά και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας.....	-42-
3.1.2 Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυττάρων.....	-42-
3.1.3 Μέτρηση αριθμού και βιωσιμότητας κυττάρων.....	-43-
3.2 Πλασμιδιακές κατασκευές.....	-44-
3.2.1 Σχεδιασμός και κλωνοποίηση.....	-44-
3.2.2 Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων.....	-45-
3.2.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	-45-
3.2.4 Απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα ("Mini-Prep").....	-46-
3.2.5 Απομόνωση DNA σε μεσαία κλίμακα ("Midi-Prep").....	-46-
3.2.6 Ποσοτικοποίηση DNA.....	-47-
3.2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης.....	-47-
3.3 Διαμόλυνση κυττάρων.....	-48-
3.4 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων.....	-49-
3.4.1 Απομόνωση ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος.....	-49-
3.4.2 Απομόνωση πυρηνικού εκχυλίσματος.....	-49-
3.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	-50-
3.5 Ανοσοκαταβύθιση πρωτεϊνών.....	-50-
3.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western.....	-51-
3.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	-51-
3.6.2 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	-52-
3.6.3 Ανοσοαποτύπωση.....	-52-
3.6.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.....	-52-
3.7 Απομόνωση αντισώματος απο αντιορό με χρωματογραφία συγγένειας.....	-53-
3.7.1 Προετοιμασία στήλης χρωματογραφίας.....	-53-
3.7.2 Ομοιοπολική σύνδεση πεπτιδίου στο υλικό χρωματογραφίας.....	-54-
3.7.3 Καθαρισμός αντιορού.....	-54-
3.8 Ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία.....	-55-

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	-57-
4.1 Διερεύνηση ενζυμικής προσθήκης γλουταμικού στις πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη.....	-58-
4.2 Ταυτοποίηση αυτόνομων περιοχών πολυγλουταμυλίωσης.....	-61-
4.2.1 Περιοχές πολυγλουταμυλίωσης στην SET.....	-62-
4.2.2 Περιοχές πολυγλουταμυλίωσης στην προθυμοσίνη α.....	-65-
4.2.3 Περιοχές πολυγλουταμυλίωσης στην παραθυμοσίνη.....	-71-
4.3 Έλεγχος υποκυτταρικής εντόπισης των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη.....	-76-
4.4 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών με τις ιστόνες.....	-78-
4.4.1 Αλληλεπίδραση της πολυγλουταμυλιωμένης SET με την ιστόνη H3 και επίδραση της τροποποίησης στα επίπεδα ακετυλίωσης της H3.....	-78-
4.4.2 Αλληλεπίδραση των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη με την ιστόνη H1.....	-80-
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	-83-
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	-91-

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

APS (Ammonium Persulfate): υπερθειϊκό αμμώνιο

BSA (Bovine Serum Albumin): αλβουμίνη ορού βοός

ddH₂O (double distilled H₂O): δισαπεσταγμένο H₂O

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας DMEM

DMSO (Dimethyl Sulfoxide): διμεθυλο-σουλφοξείδιο

DTT (Dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid): αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

FBS (Fetal Bovine Serum): εμβρυϊκός ορός βοός

g (gravity-relative centrifuge force): σχετική φυγόκεντρος δύναμη

LB (Luria-Bertani): θρεπτικό υλικό βακτηριακής καλλιέργειας

mA (milliampere)

MES (2-(N – morpholino) ethanesulfonic acid): 2-(N- μορφολινο) αιθανοσουλφονικό οξύ

MOPS (3-(N – morpholino) propanesulfonic acid): 3-(N- μορφολινο) προπανοσουλφονικό οξύ

OD (Optical Density): οπτική πυκνότητα

O/N (Overnight): ολονύκτια επώαση

PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis): ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

PBS (Phosphate Buffered Saline): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PFA (Paraformaldehyde): παραφορμαδεύδη

Pipes (piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid))

PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride): φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο φθορίδιο

rpm (rounds per minute): στροφές το λεπτό

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate): θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο

TAE (Tris-acetate Ethylenediaminetetraacetic acid): τρις-οξικό αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

TEMED (Tetramethylethylene Diamine): N, N, N', N' – τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη

TTL (Tubulin Tyrosine Ligase-Like): ένζυμο που μοιάζουν με τη λιγάση τυροσίνης της τουμπουλίνης

Εικόνα 1: Μηχανισμός πολυγλουταμυλίωσης.....	-16-
Εικόνα 2: Κατανομή πολυγλουταμυλιωμένης τουμπουλίνης.....	-17-
Εικόνα 3: Η οικογένεια των TTLL πρωτεϊνών.....	-22-
Εικόνα 4: Ενζυμική προσθήκη και απομάκρυνση γλουταμικών.....	-23-
Εικόνα 5: Ενζυμική προσθήκη καταλοίπων γλυκίνης από μέλη της TTLL οικογένειας.....	-24-
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της τροποποίησης που αναγνωρίζει το αντίσωμα GT335.....	-25-
Εικόνα 7: Η κρυσταλλογραφική δομή της SET.....	-28-
Εικόνα 8: Αμινοξική αλληλουχία της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης.....	-32-
Εικόνα 9: Ανίχνευση πολυγλουταμυλίωσης της πρωτεΐνης SET.....	-59-
Εικόνα 10: Ανίχνευση πολυγλουταμυλίωσης των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη.....	-61-
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών της SET που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των χιμαιρικών πρωτεϊνών.....	-62-
Εικόνα 12: Οι θέσεις πολυγλουταμυλίωσης της SET περιλαμβάνονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 98-277.....	-63-
Εικόνα 13: Ταυτοποίηση των περιοχών της SET που είναι απαραίτητες για την πολυγλουταμυλίωση.....	-64-
Εικόνα 14: Οι επιμέρους περιοχές της SET και η συμμετοχή τους στην πολυγλουταμυλίωση.....	-65-
Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών της προθυμοσίνης α που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των χιμαιρικών πρωτεϊνών.....	-66-
Εικόνα 16: Οι θέσεις πολυγλουταμυλίωσης της προθυμοσίνης α περιλαμβάνονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 41-112.....	-67-
Εικόνα 17: Η όξινη περιοχή της προθυμοσίνης α αποτελεί υπόστρωμα πολυγλουταμυλίωσης.....	-68-
Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων της όξινης περιοχής της προθυμοσίνης α που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση πολυγλουταμυλίωσης.....	-69-
Εικόνα 19: Τα αμινοξέα 62-70 της όξινης περιοχής της προθυμοσίνης α περιλαμβάνουν τις θέσεις τροποποίησης από την πολυγλουταμυλίωση TTLL4.....	-70-

- Εικόνα 20:** Οι επιμέρους περιοχές της προθυμοσίνης α και η συμμετοχή τους στην πολυγλουταμυλίωση..... -71-
- Εικόνα 21:** Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών της παραθυμοσίνης που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των χμαιρικών πρωτεϊνών..... -72-
- Εικόνα 22:** Οι θέσεις πολυγλουταμυλίωσης της παραθυμοσίνης περιλαμβάνονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 39-102..... -73-
- Εικόνα 23:** Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων της όξινης περιοχής της παραθυμοσίνης που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση πολυγλουταμυλίωσης..... -74-
- Εικόνα 24:** Τα αμινοξέα 36-77 της όξινης περιοχής της παραθυμοσίνης περιλαμβάνουν τις θέσεις τροποποίησης από την πολυγλουταμυλίωση TTLL4..... -75-
- Εικόνα 25:** Οι επιμέρους περιοχές της παραθυμοσίνης και η συμμετοχή τους στην πολυγλουταμυλίωση..... -76-
- Εικόνα 26:** Υποκυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη παρουσία της πολυγλουταμυλίωσης TTLL4..... -77-
- Εικόνα 27:** Η πολυγλουταμυλίωση της πρωτεΐνης SET δεν φαίνεται να επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με την ιστόνη H3..... -79-
- Εικόνα 28:** Η πολυγλουταμυλίωση των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη δεν φαίνεται να επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους με την ιστόνη H1..... -81-

Πίνακας 1: Πιθανές πρωτεΐνες-στόχοι της πολυγλουταμυλίωσης.....	-20-
Πίνακας 2: Εξειδίκευση πολυγλουταμυλασών ως προς τα υποστρώματά τους.....	-23-
Πίνακας 3: Συνθήκες διαμόλυνσης κυττάρων με το αντιδραστήριο Xfect.....	-48-
Πίνακας 4: Αντισώματα και αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	-53-
Πίνακας 5: Αντισώματα και αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στον ανοσοφθορισμό.....	-56-

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυγλουταμυλίωση είναι μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία σχηματίζονται γλουταμικές αλυσίδες ποικίλου μήκους στις πρωτεΐνες-στόχους. Τα πιο γνωστά και εκτενώς μελετημένα υποστρώματά της είναι οι τουμπουλίνες και οι NAP πρωτεΐνες. Η ανακάλυψη νέων πρωτεϊνών-στόχων, ανέδειξε την πολυγλουταμυλίωση σε μία ευρύτερη μετα-μεταφραστική τροποποίηση από ότι θεωρήθηκε αρχικά, η οποία πιθανόν να μετέχει στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών διεργασιών. Παρότι δεν έχει προταθεί συγκεκριμένη αλληλουχία πολυγλουταμυλίωσης, όλα τα υποστρώματα περιέχουν περιοχές πλούσιες σε γλουταμικά κατάλοιπα και τα περισσότερα είναι πρωτεΐνες που μετακινούνται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, συμπεριλαμβανομένων και πολλών που σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης.

Οι πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α (ProTa) και παραθυμοσίνη (ParaT), περιέχουν εκτενείς πολυ-E περιοχές και εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Οι όξινης πρωτεΐνες ProTa και ParaT αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα εγγενώς εύκαμπτων πρωτεϊνών (IDPs) και περιέχουν μία περιοχή πλούσια σε γλουταμικά στο κέντρο του μορίου τους. Η ογκοπρωτεΐνη SET περιλαμβάνει μία εγγενώς εύκαμπτη περιοχή (IDR) πλούσια σε γλουταμικά στο καρβοξυτελικό άκρο της. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες SET, ProTa και ParaT ως πιθανά υποστρώματα πολυγλουταμυλίωσης. Αναλύθηκε η υποκυτταρική εντόπιση των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών καθώς και το ενδεχόμενο να μεταβάλλεται η αλληλεπίδρασή τους με τις ιστόνες, ως αποτέλεσμα της τροποποίησης. Όπως αποδείχθηκε, και οι τρεις πρωτεΐνες τροποποιούνται παρουσία της ενεργής πολυγλουταμύλασης TTLL4. Όσον αφορά τις περιοχές πολυγλουταμυλίωσης, βρέθηκε ότι ο NAP τομέας της SET όπως επίσης και η όξινη περιοχή που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της, απαιτούνται για την τροποποίηση. Αντίστοιχα, η παρουσία της όξινης περιοχής των ProTa και ParaT, είναι εξίσου απαραίτητη. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των παραπάνω πρωτεϊνών, δεν φάνηκε να μεταβάλλεται παρουσία της πολυγλουταμυλίωσης. Επίσης, βρέθηκε ότι η πολυγλουταμυλίωση δεν επηρέασε την αλληλεπίδραση της SET με την ιστόνη H3, ούτε τα επίπεδα ακετυλίωσης της H3. Τέλος, δεν διαπιστώθηκαν αλλαγές ως προς τη συγγένεια των πολυγλουταμυλιωμένων ProTa και ParaT για την ιστόνη H1. Η εργασία αυτή μπορεί να χρησιμεύσει ως βάση για τις μελλοντικές εργασίες που θα μελετήσουν περαιτέρω το φυσιολογικό ρόλο της μετα-μεταφραστικής αυτής τροποποίησης.

SUMMARY

Polyglutamylation is a new class of post-translational modification in which glutamate side chains of variable lengths are formed on the modified proteins. The well-known targets of polyglutamylation are tubulins and nucleosome assembly proteins. The identification of new substrates revealed that polyglutamylation is a much more widespread modification than initially thought and it might be a regulator of many cellular processes. Although a "polyglutamylation motif" has not been defined yet, all the identified substrates contain glutamate-rich stretches and most of them are proteins that shuttle between cytoplasm and nucleus, including many chromatin-related proteins.

The proteins SET, prothymosin α (ProT α) and parathymosin (ParaT) contain poly-E stretches and are all involved in chromatin remodeling. The acidic proteins ProT α and ParaT are typical intrinsically disordered proteins (IDPs) with poly-E stretches spanning mainly the central parts of the molecules. The oncoprotein SET contains a poly-E IDR region in its carboxy-terminal part. In this study, we investigated whether these proteins undergo polyglutamylation. We also analysed the subcellular localization of the polyglutamylated proteins and the interaction of the modified proteins with histones. Our results showed that all three proteins were polyglutamylated in the presence of the active form of the TTL4 polyglutamylase. Concerning SET, the NAP domain of the protein as well as the carboxy-terminal acidic region, were detected as polyglutamylation sites. The acidic domains of ProT α and ParaT were also modified in the presence of TTL4. The localization of all the above proteins was not altered in the presence of polyglutamylation. We have also found that polyglutamylation did not influence the interaction of SET with histone or the binding of ProT α and ParaT to histone H1. Our work may serve as the basis for future studies that will address the *in vivo* role of polyglutamylation within the cell nucleus.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και βιολογικός τους ρόλος

Τα κύτταρα αντιλαμβάνονται τις αλλαγές που συμβαίνουν στις συνθήκες του περιβάλλοντός τους και αποκρίνονται σε αυτές κατάλληλα. Ένας μηχανισμός άμεσης κυτταρικής απόκρισης αφορά τις αντιστρεπτές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές αποτελούν ένα βασικό ρυθμιστή της λειτουργίας των πρωτεϊνών, δεδομένου ότι μπορούν να επηρεάσουν πολλές από τις ιδιότητές τους, όπως η ενζυμική ενεργότητα, η αλληλεπίδραση με άλλα μόρια του κυττάρου και ο υποκυτταρικός εντοπισμός. Επιτελούνται από ένζυμα που καταλύουν την ομοιοπολική σύνδεση ομάδων σ' ένα ή περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης-στόχου και στην πλειοψηφία τους είναι αντιστρεπτές χάρη στην ύπαρξη του αντιστρεπτού ενζυμικού μηχανισμού.

Η φασματομετρία μάζας συνέβαλε σημαντικά στην ανάδειξη ενός πλήθους μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 200 τροποποιήσεις (Minguez *et al.*, 2012) οι οποίες κυμαίνονται από την προσθήκη μικρών χημικών ομάδων (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση) μέχρι και ολόκληρων αλυσίδων (ουβικιτινυλίωση). Κάποιες από αυτές φαίνεται να είναι εξελικτικά συντηρημένες μεταξύ των ειδών, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή τους σε βασικές κυτταρικές διεργασίες. Ωστόσο δεν είναι όλες εξίσου χαρακτηρισμένες ως προς το λειτουργικό τους ρόλο.

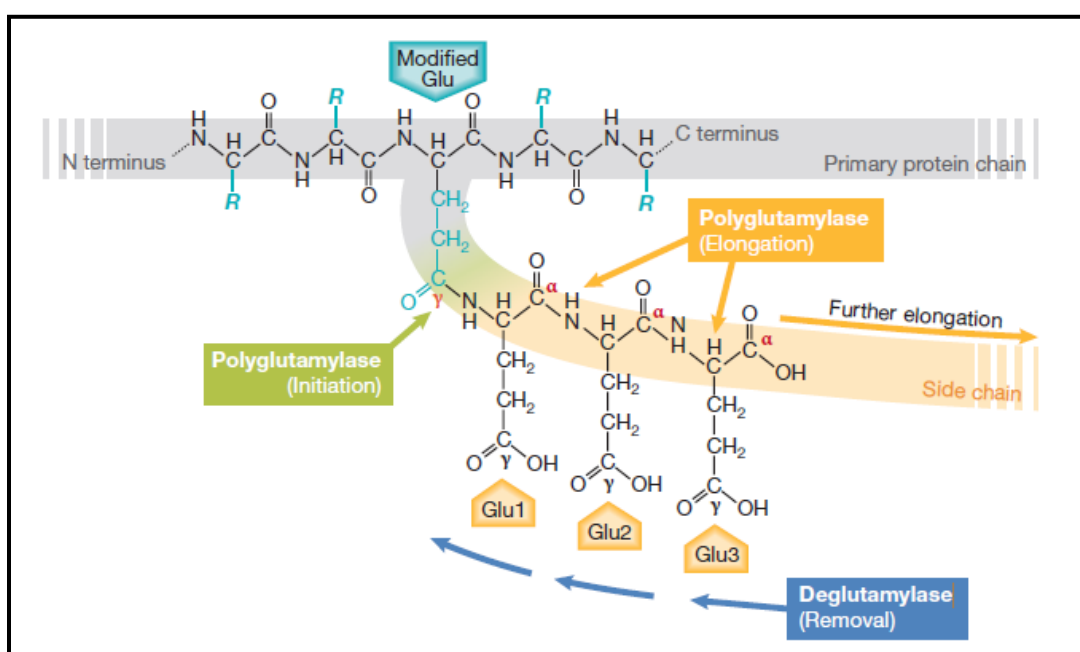
Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία μίας πρωτεΐνης μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Η διατήρηση των τροποποιήσεων στα μέλη μίας πρωτεϊνικής οικογένειας, φανερώνει τη συσχέτισή τους με ρυθμιστικές περιοχές απαραίτητες για την ενεργότητα των πρωτεϊνών (Beltrao *et al.*, 2012). Επιπλέον, πολλές τροποποιήσεις εντοπίζονται σε περιοχές που είναι υπεύθυνες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, γεγονός που αναδεικνύει τη συμμετοχή τους στο σχηματισμό ή/και τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων (Nishi *et al.*, 2011). Οι τροποποιήσεις μπορούν επίσης να ρυθμίσουν την κυτταρική θέση μίας πρωτεΐνης, επεμβαίνοντας και τροποποιώντας το πεπτιδιο-σήμα που καθορίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της (van Roey *et al.*, 2013). Η λειτουργία μίας πρωτεΐνης μπορεί ακόμα να ρυθμιστεί και μέσω τροποποιήσεων που μεταβάλλουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια (Serber *et al.*, 2007).

Ο συνδυασμός των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην ίδια πρωτεΐνη, μπορεί να είναι αυτός που καθορίζει τη λειτουργία της. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο κώδικας των ιστονών (histone code). Σύμφωνα μ' αυτόν, ο συνδυασμός των τροποποιήσεων των ιστονών συμβάλλει στην αναγνώριση και την αλληλεπίδρασή τους με μία σειρά πρωτεϊνών που συνδέονται στις ιστόνες εφόσον αναγνωρίσουν τις συγκεκριμένες τροποποιήσεις (Jenuwein and Allis, 2001). Πρόκειται για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης και την επαγωγή της μεταγραφής. Μία τέτοια περίπτωση αφορά το συνδυασμό φωσφορυλίωσης και ακετυλίωσης της ιστόνης H3 από την κινάση Snf1 και την ακετυλτρανσφεράση Gcn5 αντίστοιχα (Lo *et al.*, 2001). Ωστόσο, ο συνδυασμός των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μπορεί να αφορά και διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια. Για παράδειγμα, η ουβικιτινυλίωση της ιστόνης H2B από τον ενζυμικό μηχανισμό Rad6/Bre1, προαπαιτείται για τη μεθυλίωση της ιστόνης H3 από τις μεθυλτρανσφεράσες COMPASS και Dot1 (Shukla *et al.*, 2009). Ένα άλλο παράδειγμα αφορά το κολλαγόνο, η διαμόρφωση και η σταθερότητα του οποίου καθορίζεται από το συνδυασμό γλυκοζυλίωσης και υδροξυλίωσης των πρωτεϊνών του (Bann and Bachinger, 2000).

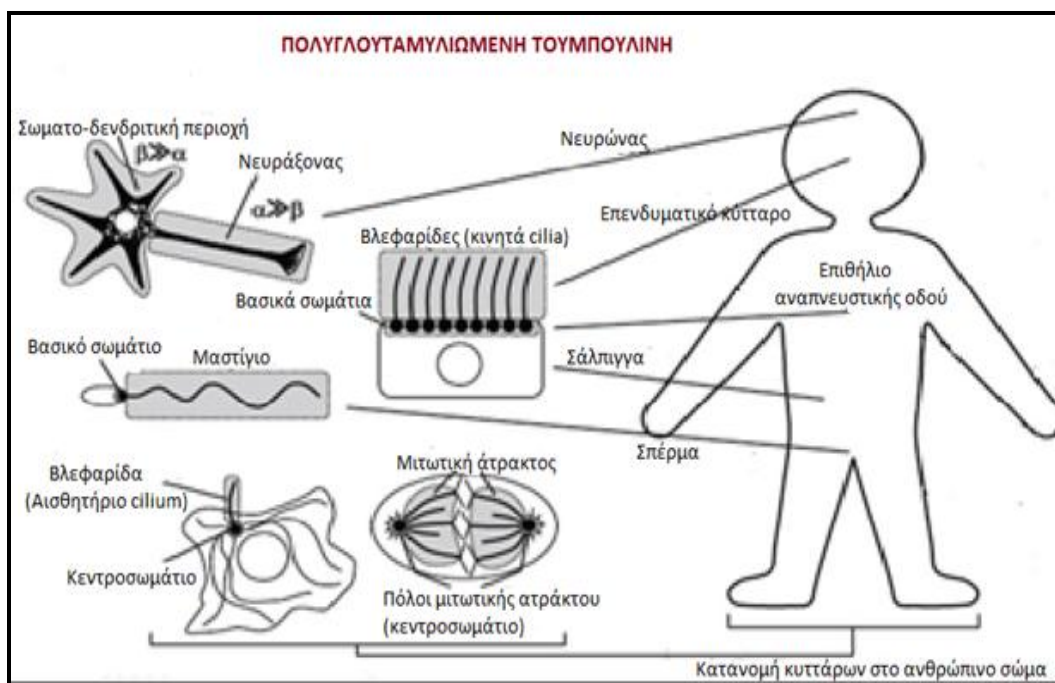
1.1.1 Η πολυγλουταμυλίωση

Η πολυγλουταμυλίωση είναι μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία γλουταμικά κατάλοιπα συνδέονται ομοιοπολικά σ' ένα ή περισσότερα γλουταμικά που βρίσκονται εντός της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης-στόχου. Η διαδοχική σύνδεση των γλουταμικών οδηγεί στο σχηματισμό όξινων πλευρικών αλυσίδων, ενισχύοντας έτσι τον όξινο χαρακτήρα της πρωτεΐνης. Το μήκος των σχηματισθέντων αλυσίδων ποικίλει και μπορεί να ξεπεράσει τα 20 αμινοξικά κατάλοιπα. Η προσθήκη του πρώτου γλουταμικού γίνεται μέσω αμιδικού δεσμού στη γ-καρβοξυλική ομάδα του γλουταμικού της πρωτεΐνης που υφίσταται την τροποποίηση. Η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως "έναρξη" (initiation). Η επακόλουθη προσθήκη γλουταμικών, η λεγόμενη αντίδραση "επιμήκυνσης" (elongation) γίνεται κατά προτίμηση στην α-καρβοξυλική ομάδα του τελευταίου γλουταμικού σε σχέση με την γ-καρβοξυλική ομάδα που είναι επίσης διαθέσιμη (Redeker *et al.*, 1991, Wolff *et al.*, 1994) (Εικόνα 1).

Η α-τουμπουλίνη είναι η πρώτη πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε ότι πολυγλουταμυλιώνεται, όταν βρέθηκε ότι ένα γλουταμικό κατάλοιπο στο καρβοξυτελικό άκρο της τροποποιείται με την προσθήκη πολυγλουταμικών αλυσίδων ποικίλου μήκους (Eddé *et al.*, 1990). Λίγο αργότερα διαπιστώθηκε ότι το καρβοξυτελικό άκρο της β-τουμπουλίνης, αποτελεί επίσης στόχο της τροποποίησης (Alexander *et al.*, 1991, Rudiger *et al.*, 1992).



Εικόνα 1: Μηχανισμός πολυγλουταμυλίωσης. Η πρώτη αντίδραση (initiation) δημιουργεί έναν αμιδικό δεσμό μεταξύ της γ-καρβοξυλικής ομάδας του γλουταμικού της πρωτεΐνης που υφίσταται την τροποποίηση (modified Glu) και της αμινομάδας του πρώτου γλουταμικού που προστίθεται (Glu 1). Η επακόλουθη προσθήκη γλουταμικών (elongation), συνδέει την α-καρβοξυλική ομάδα κάθε καταλοίπου με την αμινομάδα του επόμενου (Glu 2, Glu 3). Η ενζυμική προσθήκη γλουταμικών καταλύεται από τις πολυγλουταμυλάσες (polyglutamylase) ενώ η ενζυμική απομάκρυνση από τις απο-γλουταμυλάσες (deglutamylase) (Janke *et al.*, 2008).



Εικόνα 2: Κατανομή πολυγλουταμυλιωμένης τουμπουλίνης (Ikegami and Setou, 2010).

1.1.2 Ρόλος πολυγλουταμυλίωσης

Εξελικτικά, η πολυγλουταμυλίωση είναι μία τροποποίηση που έχει διατηρηθεί μεταξύ των ειδών, μιας και έχει ανιχνευτεί από τους μονοκύτταρους οργανισμούς (Bré *et al.*, 1994, Weber *et al.*, 1997, Schneider *et al.*, 1997, 1998) μέχρι τα θηλαστικά (Fouquet *et al.*, 1994). Αρχικά εντοπίστηκε στην τουμπουλίνη α και β, τις πρωτεΐνες που δομούν τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού. Όπως έχει δειχθεί, η παρουσία της τροποποίησης ρυθμίζει τόσο τη λειτουργία όσο και την οργάνωση των συγκεκριμένων δομών (Westermann and Weber, 2003).

Όσον αφορά την κατανομή της πολυγλουταμυλιωμένης τουμπουλίνης, τα επίπεδα της τροποποίησης είναι ιδιαίτερα αυξημένα στους μικροσωληνίσκους των νευρώνων. Μάλιστα το μεγαλύτερο ποσοστό α- και β-τουμπουλίνης φέρει πλευρικές αλυσίδες μήκους ενός μέχρι έξι γλουταμικών καταλοίπων (Audebert *et al.*, 1994). Η πολυγλουταμυλιωμένη β-τουμπουλίνη φαίνεται να συγκεντρώνεται στη σωματο-δενδριτική περιοχή, ενώ η α-τουμπουλίνη στους νευράξονες (Ikegami *et al.*, 2006, 2007). Μεγαλύτερους μήκους αλυσίδες έχουν βρεθεί στις τουμπουλίνες των κεντριδίων (centrioles) που δομούν τα κεντροσωμάτια (centrosomes) και τα βασικά σωμάτια (basal bodies) (Bobinnec *et al.*, 1998). Επίσης κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η

πολυγλουταμυλίωση της β-τουμπουλίνης αυξάνεται σημαντικά στη μιτωτική άτρακτο (Regnard *et al.*, 1999). Υψηλά επίπεδα τροποποίησης εντοπίζονται και στους μικροσωληνίσκους των κροσσών (cilia) και των μαστιγίων (flagella) (Million *et al.*, 1999, Lechtreck *et al.*, 2000, Kierszenbaum *et al.*, 2002) (Εικόνα 2).

Το καρβοξυτελικό άκρο της τουμπουλίνης στο οποίο στοχεύουν τα ένζυμα της πολυγλουταμυλίωσης, αποτελεί θέση σύνδεσης πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τους μικροσωληνίσκους (Microtubule Associated Proteins - MAPs). Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι MAP1, MAP2 και tau καθώς και οι κινητήριες πρωτεΐνες κινησίνη και δυνεΐνη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ μικροσωληνίσκων και MAP πρωτεϊνών ρυθμίζεται τόσο από την παρουσία της τροποποίησης όσο και από το μήκος των πολυγλουταμικών αλυσίδων (Bonnet *et al.*, 2001, Boucher *et al.*, 1994, Larcher *et al.*, 1996). Ένα ακόμα παράδειγμα MAP πρωτεΐνης που συνδέεται επιλεκτικά στην πολυγλουταμυλωμένη τουμπουλίνη είναι η CSAP (Centriole and Spindle Associated Protein) (Backer *et al.*, 2012). Επιπλέον, η προσθήκη των γλουταμικών οδηγεί σε αύξηση του αρνητικού φορτίου στο καρβοξυτελικό άκρο της τουμπουλίνης, γεγονός που φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία των μοριακών κινητήρων (Thorn *et al.*, 2000).

Η πολυγλουταμυλίωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία των νευρώνων. Μάλιστα κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του εγκεφάλου, τα επίπεδα της τροποποίησης είναι ιδιαίτερα αυξημένα (Audebert *et al.*, 1994). Επιπλέον, φαίνεται να επηρεάζει τη νευρωνική δραστηριότητα μέσω ρύθμισης της μεταφοράς των συναπτικών κυστιδίων (Ikegami *et al.*, 2007). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αυξημένη πολυγλουταμυλίωση συνδέεται άμεσα και με τον νευροεκφυλισμό. Αυτό υποδεικνύει ότι η ρύθμιση του μήκους των πολυγλουταμικών αλυσίδων στην τουμπουλίνη, είναι κρίσιμη για την επιβίωση των νευρώνων (Rogowski *et al.*, 2010). Η τροποποίηση φαίνεται επίσης να εμπλέκεται και στη νόσο Alzheimer, μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης spastin (Zembel *et al.*, 2013).

Στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα πολυγλουταμυλίωσης (Regnard *et al.*, 1999), γεγονός που φανερώνει την πιθανή εμπλοκή της τροποποίησης στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Η πολυγλουταμυλίωση φαίνεται να εμπλέκεται και στη δημιουργία της χαρακτηριστικής κίνησης των μαστιγίων και των κροσσών (beating), μέσω της αλληλεπίδρασης των μικροσωληνίσκων με τη δυνεΐνη (Gagnon *et al.*, 1996, Kubo *et al.*, 2010, Suryavanshi *et al.*, 2010). Η τροποποίηση είναι σημαντική για τη λειτουργία των κροσσών (Ikegami *et al.*, 2010) και η απώλειά της συνδέεται με δομικές και λειτουργικές

ανωμαλίες των δομών αυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μετάλλαγμα *fleer* στο zebrafish (Pathak *et al.*, 2007).

Τέλος, αυξημένα επίπεδα πολυγλουταμυλίωσης έχουν χαρακτηριστεί ως διαμεσολαβητές της καρκινικής εξέλιξης (Soucet *et al.*, 2006). Δεδομένου ότι οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν σημαντικό στόχο αντικαρκινικής θεραπείας, τα επίπεδα της πολυγλουταμυλιωμένης τουμπουλίνης συνδέονται όχι μόνο με την καρκινογένεση αλλά και την αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά μόρια (Das *et al.*, 2014).

1.1.3 Η πολυγλουταμυλίωση ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση ευρύτερου φάσματος υποστρωμάτων

Παράλληλα με την εκτεταμένη μελέτη σχετικά με το βιολογικό ρόλο της πολυγλουταμυλίωσης στην τουμπουλίνη, γεννήθηκε το ερώτημα αν πρόκειται για μία τροποποίηση που περιορίζεται στην πρωτεΐνη αυτή. Η πρώτη απόδειξη ότι και άλλες πρωτεΐνες, εκτός της τουμπουλίνης πολυγλουταμυλιώνονται, αφορά στις πρωτεΐνες συγκρότησης του νουκλεοσώματος NAP-1 και NAP-2 που αποτελούν επίσης στόχο της τροποποίησης. Οι NAP πρωτεΐνες τροποποιούνται στην καρβοξυτελική τους περιοχή με την προσθήκη γλουταμικών που μπορούν να φτάσουν τα 10 κατάλοιπα. Η πολυγλουταμυλίωση φαίνεται να σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση των NAP πρωτεϊνών με τις ιστόνες (Regnard *et al.*, 2000). Υπάρχουν και πρόσφατα στοιχεία που φανερώνουν ότι η αλληλεπίδραση της πολυγλουταμυλιωμένης NAP-1 με την ιστόνη H1, συμβάλλει στη χρωμοσωμική συμπύκνωση (Miller *et al.*, 2015). Επιπρόσθετα ερευνητικά δεδομένα, αναδεικνύουν άλλες πιθανές πρωτεΐνες-υποστρώματα (van Dijk *et al.*, 2008) (Πίνακας 1), προτείνοντας ότι η πολυγλουταμυλίωση είναι μία ευρύτερα διαδεδομένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Πολλά από τα νέα υποστρώματα (πρωτεΐνες ANP32, νουκλεοφωσμίνη B23, νουκλεολίνη και RNP-K) όπως επίσης και οι NAP πρωτεΐνες είναι μόρια που μετακινούνται από και προς τον πυρήνα. Αυτό σε συνδυασμό με την πολυγλουταμυλίωση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μετακίνηση μορίων μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (νουκλεοπορίνη, RANGAP), υποδεικνύει ότι η τροποποίηση θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ρυθμιστής ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας. Επιπλέον κάποιες από τις παραπάνω πρωτεΐνες (NAP, νουκλεοφωσμίνη B23, νουκλεολίνη) αλληλεπιδρούν με τις ιστόνες ή λειτουργούν και ως ρυθμιστές της μεταγραφής (ANP32, NF45, PELP1, RNP-K), γεγονός που φανερώνει ότι η πολυγλουταμυλίωση πιθανόν να ρυθμίζει την πρόσβαση πρωτεϊνών στη χρωματίνη. Τέλος,

πιθανά υποστρώματα όπως η EB1 και η RANGAP που επηρεάζουν τη δυναμική των μικροσωληνίσκων, προτείνουν ότι η πολυγλουταμυλίωση και άλλων πρωτεϊνών πέραν της τουμπουλίνης, είναι σημαντική για την οργάνωση και τη λειτουργία των συγκεκριμένων δομών.

Ένας ακόμα στόχος της τροποποίησης που ανακαλύφθηκε πολύ πρόσφατα, είναι η συνθάση cGAS. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει το DNA παθογόνων οργανισμών και επάγει μηχανισμούς ανοσολογικής απόκρισης. Όπως αποδείχτηκε, η πολυγλουταμυλίωση ρυθμίζει την ικανότητα της συνθάσης να συνδέεται στο DNA καθώς και την ενεργότητά της (Xia *et al*, 2016).

Πρωτεΐνη	Μοριακό μέγεθος (kDa)	pI
Νουκλεοπορίνη	358	5.9
Πρωτεΐνη σύνδεσης Myb-1A	149	9.3
PELP1	120	4.3
NAP-1	45	4.4
NF45	45	8.3
NAP-2	43	4.6
SET	33	4.2
PHAPII	32	4.1
Νουκλεοφωσμίνη B23	31	4.7
ANP32E	31	3.8
ANP32A	29	4.0
ANP32B	22	4.2

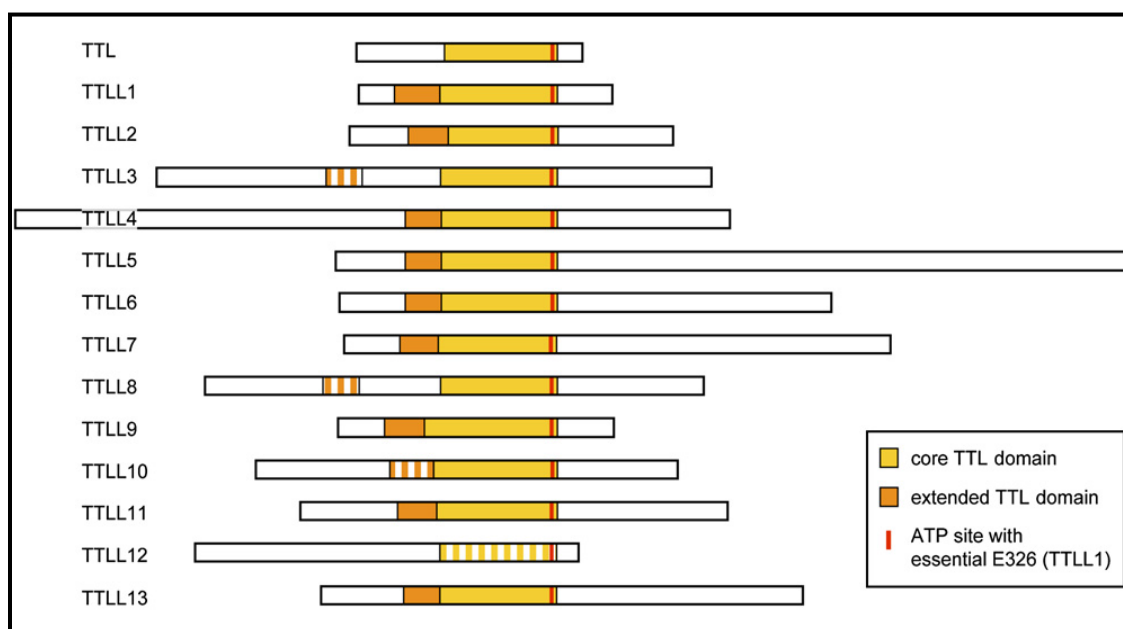
Πίνακας 1: Πιθανές πρωτεΐνες-στόχοι της πολυγλουταμυλίωσης (van Dijk *et al.*, 2008).

1.1.4 Ένζυμα πολυγλουταμυλίωσης

Τα ένζυμα που καταλύουν την πολυγλουταμυλίωση, οι λεγόμενες πολυγλουταμυλάσες, είναι μέλη της TLL (Tubulin Tyrosine Ligase-like) οικογένειας πρωτεϊνών (Janke *et al.*, 2005, Ikegami *et al.*, 2006, van Dick *et al.*, 2007). Πρόκειται για πρωτεϊνικά μόρια που εμφανίζουν ομολογία με τη λιγάση TTL (Tubulin Tyrosine Ligase) η οποία καταλύει την προσθήκη τυροσίνης στην τουμπουλίνη (Ersfeld *et al.*, 1993). Έχουν ταυτοποιηθεί 13 πρωτεΐνες TLL, των οποίων η καταλυτική περιοχή διακρίνεται σε 2 επιμέρους περιοχές: μία περιοχή-πυρήνα (core domain) που είναι κοινή σε όλες τις πρωτεΐνες και ανοδικά αυτής μία εκτεταμένη περιοχή (extended domain) η οποία είναι διατηρημένη σε μεγάλο βαθμό (Εικόνα 3). Μεταξύ των TLL πρωτεϊνών, οι TLL4, 5, 6, 7, 11 και 13 είναι αυτόνομα ενεργές πολυγλουταμυλάσες. Κάθε TLL πολυγλουταμυλάση εμφανίζει προτίμηση ως προς το υπόστρωμα που θα τροποποιήσει (Πίνακας 2) αλλά και ως προς την αντίδραση που θα καταλύσει (έναρξη ή επιμήκυνση) (Εικόνα 4). Σε όλες αυτές τις πρωτεΐνες, η εκτεταμένη περιοχή είναι κοινή. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη περιοχή συνδέεται με την εξειδίκευση των ενζύμων ως προς την προσθήκη γλουταμικών. Σε αυτό το συμπέρασμα συνηγορεί και το γεγονός ότι οι TLL3, 8, 10 από τις οποίες απουσιάζει η εκτεταμένη περιοχή, καταλύουν μία διαφορετική τροποποίηση, την πολυγλυκυλίωση (Ikegami *et al.*, 2008, Rogowski *et al.*, 2009) (Εικόνα 5).

Η πολυγλουταμυλίωση είναι μία αντιστρεπτή τροποποίηση. Η ισορροπία μεταξύ των ενζύμων που τροποποιούν και εκείνων που αναιρούν την τροποποίηση, αποτελεί ένα μηχανισμό ελέγχου που καθορίζει το μήκος των πολυγλουταμικών αλυσίδων. Τα ένζυμα που καταλύουν την απομάκρυνση των γλουταμικών καταλοίπων από τις πολυγλουταμικές αλυσίδες (απο-γλουταμυλάσες) είναι μέλη της οικογένειας των κυτοσολικών καρβοξυπεπτιδασών (cytosolic carboxypeptidases-CCPs). Έχουν ταυτοποιηθεί 4 ένζυμα της οικογένειας CCP με ενεργότητα απο-γλουταμυλάσης (Kimura *et al.*, 2010, Rogowski *et al.*, 2010) τα οποία αντίστοιχα με τις πολυγλουταμυλάσες διακρίνονται ανάλογα με την αντίδραση εξειδίκευσής τους. Συγκεκριμένα τα ένζυμα CCP1, CCP4 και CCP6 υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των γλουταμικών καταλοίπων της αλυσίδας, μειώνοντας έτσι το μήκος της. Το τέταρτο ένζυμο, η CCP5, απομακρύνει την πρώτη διακλάδωση μεταξύ της πρωτεΐνης-στόχου και του πρώτου γλουταμικού της αλυσίδας (branching point) (Εικόνα 4). Επιπλέον τα ένζυμα CCP1, CCP4 και CCP6 καταλύουν την απομάκρυνση γλουταμικών που δεν είναι αποτέλεσμα τροποποίησης αλλά κωδικοποίησης από το αντίστοιχο γονίδιο. Μάλιστα η ενεργότητα αυτή επεκτείνεται και σε άλλα υποστρώματα πέραν της τουμπουλίνης, όπως στην πρωτεΐνη MLCK1 (Myosin Light Chain

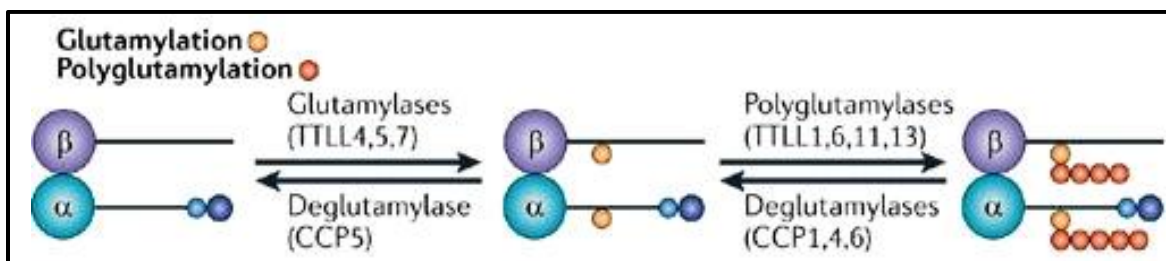
Kinase 1) (Rogowski *et al.*, 2010). Όσον αφορά την CCP1, η συγκεκριμένη δεν λειτουργεί μόνο ως απο-γλουταμυλάση αλλά οδηγεί και στο σχηματισμό της Δ2-τουμπουλίνης ενώ η απώλειά της συνδέεται με νευροεκφυλισμό (Rogowski *et al.*, 2010). Τέλος, η CCP6 συμβάλλει στην ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων μέσω ρύθμισης των επιπέδων πολυγλουταμυλίωσης της Mad2 πρωτεΐνης (Ye *et al.*, 2014).



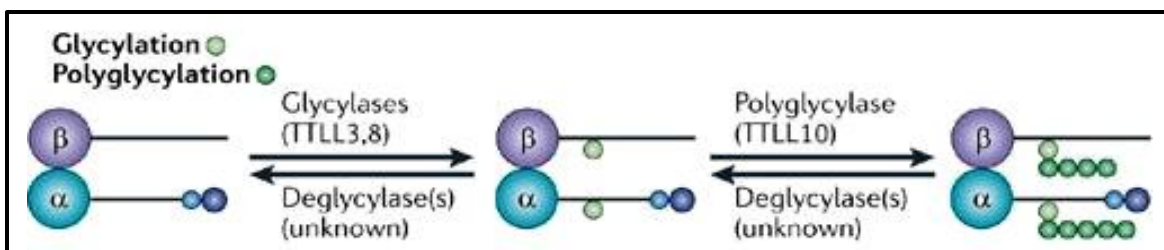
Εικόνα 3: Η οικογένεια των TTLL πρωτεϊνών. Απεικονίζονται τα 13 μέλη της TTLL (Tubulin Tyrosine Ligase – like) οικογένειας που εμφανίζουν ομολογία με την TTL (Tubulin Tyrosine Ligase). Διακρίνονται οι δύο επιμέρους καταλυτικές περιοχές : η περιοχή-πυρήνας (core TTL domain) που είναι διατηρημένη μεταξύ των μελών της οικογένειας και η εκτεταμένη περιοχή (extended TTL domain) που είναι κοινή σε όλες τις πολυγλουταμυλάσες (TTLL4, 5, 6, 7, 11, 13) (van Dick *et al.*, 2007).

Πολυγλουταμυλάση	Εξειδίκευση υποστρώματος		
	α-τουμπουλίνη	β-τουμπουλίνη	Άλλο υπόστρωμα
TTLL1	+++	++	-
TTLL4	+	+++	+++
TTLL5	+++	+	+
TTLL6	+++	+	-
TTLL7	+	+++	-
TTLL11	++	+	-
TTLL13	++	+	-

Πίνακας 2: Εξειδίκευση πολυγλουταμυλασών ως προς τα υποστρώματά τους.



Εικόνα 4: Ενζυμική προσθήκη και απομάκρυνση γλουταμικών. Απεικονίζονται τα διμερή α, β-τουμπουλίνης και οι τροποποιήσεις που υφίστανται. Διακρίνεται η εξειδίκευση των πολυγλουταμυλασών ως προς την αντίδραση που καταλύουν (οι TTLL4, 5, 7 προσθέτουν το αρχικό γλουταμικό ενώ οι TTLL6, 11, 13 δημιουργούν πολυγλουταμικές αλυσίδες). Αντίστοιχη εξειδίκευση εμφανίζουν και οι απογλουταμυλάσες (η CCP5 απομακρύνει την πρώτη διακλάδωση ενώ οι CCP1, 4, 6 απομακρύνουν τα γλουταμικά της αλυσίδας (Janke and Bulinski, 2011)).



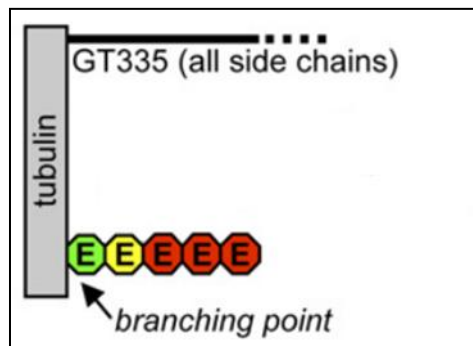
Εικόνα 5: Ενζυμική προσθήκη καταλοίπων γλυκίνης από μέλη της TTLL οικογένειας. Απεικονίζονται τα διμερή α, β-τουμπουλίνης που τροποποιούνται από την ενζυμική προσθήκη γλυκίνης. Οι γλυκυλάσες (glycylases) καταλύουν είτε την προσθήκη του πρώτου καταλοίπου γλυκίνης (TTLL3, 8) είτε το σχηματισμό αλυσίδας γλυκίνης (TTLL10). Ο αντιστρεπτός ενζυμικός μηχανισμός (deglycylases) δεν έχει ταυτοποιηθεί (Janke and Bulinski, 2011).

1.5 Ανίχνευση πολυγλουταμιλώσης με ειδικά αντισώματα

Το μονοκλωνικό αντίσωμα GT335 αναπτύχθηκε έναντι του συνθετικού πεπτιδίου (EGEGEEEG) που αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο της α-τουμπουλίνης και τροποποιήθηκε με την προσθήκη δύο γλουταμικών καταλοίπων στο πέμπτο κατά σειρά γλουταμικό (Wolff *et al.*, 1992). Αναγνωρίζει την 1^η διακλάδωση (branching point) μεταξύ της αμινοξικής αλληλουχίας της τουμπουλίνης και του πρώτου γλουταμικού της αλυσίδας (Εικόνα 6). Συνεπώς μπορεί να αναγνωρίσει πολυγλουταμικές αλυσίδες μικρού μήκους αλλά και περισσότερο εκτεταμένες. Πέραν όμως της πολυγλουταμιλωμένης τουμπουλίνης, το αντίσωμα αυτό ανιχνεύει ένα μεγάλο φάσμα υποστρωμάτων των πολυγλουταμυλασών (Regnard *et al.*, 2000, van Dijk *et al.*, 2008).

Η πολυγλουταμιλώση μπορεί να ανιχνευτεί και με τη χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος polyE (Rogowski *et al.*, 2010, van Dijk *et al.*, 2007). Το συγκεκριμένο αντίσωμα αναγνωρίζει αλληλουχίες τριών τουλάχιστον διαδοχικών γλουταμικών καταλοίπων και είναι ειδικό στην ανίχνευση πολυγλουταμικών αλυσίδων μεγάλου μήκους τόσο στην τουμπουλίνη όσο και σε άλλα υποστρώματα. Μπορεί να αναγνωρίσει και πρωτεΐνες που φέρουν τρία ή περισσότερα γλουταμικά στο καρβοξυτελικό τους άκρο, λόγω κωδικοποίησης από το αντίστοιχο γονίδιο και όχι τροποποίησης.

Ο συνδυασμός των δύο αντισωμάτων επιτρέπει το διαχωρισμό μεταξύ των πολυγλουταμικών αλυσίδων μικρού και μεγαλύτερου μήκους. Λόγω μη εμπορικής διαθεσιμότητας του polyE αντισώματος, το GT335 ήταν αυτό που συνέβαλε ουσιαστικά στην αναγνώριση νέων υποστρωμάτων της τροποποίησης. Το συγκεκριμένο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της τροποποίησης που αναγνωρίζει το αντίσωμα GT335. Με το "E" συμβολίζονται τα γλουταμικά κατάλοιπα που συνδέονται στην τουμποουλίνη. Το αντίσωμα αναγνωρίζει την πρώτη διακλάδωση (branching point) μεταξύ της πρωτεΐνης που υφίσταται την τροποποίηση και του πρώτου γλουταμικού που συνδέεται σ' αυτήν (πράσινο). Συνεπώς αναγνωρίζει όλες τις πολυγλουταμικές αλυσίδες, ανεξάρτητα από το μήκος τους.

1.2 Όξινες πρωτεΐνες με πολύ-E περιοχές ως στόχος πολυγλουταμυλίωσης

Παρόλο που δεν έχει προταθεί συγκεκριμένη αλληλουχία πολυγλουταμυλίωσης, όλα τα υποστρώματα που έχουν αναγνωριστεί, περιέχουν όξινες περιοχές πλούσιες σε γλουταμικά. Οι περιοχές αυτές αποτελούν δυνητικά τη θέση της τροποποίησης και υποδεικνύουν ότι η παρουσία ενός όξινου περιβάλλοντος συμβάλλει θετικά στην πολυγλουταμυλίωση. Επιπλέον, τα περισσότερα από τα υποστρώματα είναι πρωτεΐνες που μετακινούνται από και προς των πυρήνα, συμπεριλαμβανομένων και πολλών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης (van Dijk *et al.*, 2008).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ως πιθανά υποστρώματα πολυγλουταμυλίωσης οι πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α (ProTa) και παραθυμοσίνη (ParaT). Και οι τρεις πρωτεΐνες περιέχουν εκτενείς περιοχές γλουταμικών καταλοίπων, εμφανίζουν χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο και μία αμινοξική αλληλουχία φτωχή σε υδροφοβικά κατάλοιπα. Καθεμία από αυτές έχει

ταυτιστεί με διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, ωστόσο όλες συνδέονται με τις ιστόνες και εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Ένα ακόμα κοινό χαρακτηριστικό τους αποτελεί το γεγονός ότι υιοθετούν μία τυχαία διαμόρφωση, χωρίς σταθερή δευτεροταγή δομή. Αυτή η τυχαία δομή μπορεί να εμφανίζεται σε ολόκληρο το μόριο, όπως στην ProTa και την ParaT ή να περιορίζεται σε κάποια περιοχή, όπως ισχύει για το καρβοξυτελικό άκρο της SET. Η απουσία σταθερής δομής, τις κατατάσσει στις εγγενώς εύκαμπτες πρωτεΐνες (IDPs-Intrinsically Disordered Proteins) ή πρωτεϊνικές περιοχές (IDRs- Intrinsically Disordered Regions).

Οι IDPs/IDRs είναι πρωτεϊνικά μόρια ή περιοχές αυτών που στερούνται σταθερής τεταρτοταγούς ή/και δευτεροταγούς δομής (Wright and Dyson, 1999, Dunker *et al.*, 2001) και αποτελούν μέχρι και το 50% των πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μεταξύ αυτών, το 35% περιλαμβάνει περιοχές μήκους 30 τουλάχιστον αμινοξικών καταλοίπων με εγγενή ευκαμψία ενώ το 15% αφορά σε πλήρως εύκαμπτα μόρια χωρίς διακριτή δευτεροταγή δομή (Ward *et al.*, 2004, Peng *et al.*, 2014). Χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη αμινοξική σύσταση που είναι φτωχή σε υδροφοβικά κατάλοιπα (Uversky *et al.*, 2000, Williams *et al.*, 2001) και περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Romero *et al.*, 2001, Jorda *et al.*, 2010). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η πλειοψηφία των IDPs μεταβαίνει από μία κατάσταση ευκαμψίας σε ακαμψία (disorder-order transition) (Wright and Dyson, 1999, Dunker *et al.*, 2001).

Η έλλειψη σταθερής δομής των IDPs, όχι μόνο δεν εμποδίζει τα μόρια αυτά να είναι βιολογικά ενεργά αλλά τους προσδίδει πλεονεκτήματα. Καταρχάς, δεδομένου ότι πολλές IDPs αναδιπλώνονται κατά τη σύνδεση με το στόχο τους, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδράσουν με υψηλή εξειδίκευση και χαμηλή συγγένεια. Φαίνεται δηλαδή να υφίσταται ένας μηχανισμός που επιτρέπει τη γρήγορη αλληλεπίδραση των IDPs οδηγώντας στην επαγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνει την αποδέσμευσή τους με την ολοκλήρωση της σηματοδότησης (Dyson and Wright, 2002, Fuxreiter *et al.*, 2004, Wright and Dyson, 2009). Επιπλέον, οι IDPs προσφέρουν μεγαλύτερη επιφάνεια αλληλεπίδρασης με το στόχο τους σε σχέση με άκαμπτες πρωτεΐνες του ίδιου μήκους (Dunker *et al.*, 2001). Ένα ακόμα πλεονέκτημα των IDPs είναι η ικανότητα αλληλεπίδρασης με διαφορετικές πρωτεΐνες. Αυτή προκύπτει από την πλαστικότητα που εμφανίζουν τα μόρια αυτά αλλά και την ύπαρξη ειδικών μοτίβων αλληλεπίδρασης (Molecular Recognition Features, MoRFs) (Oldfield *et al.*, 2008, Hsu *et al.*, 2013). Τέλος, οι IDPs αποτελούν στόχο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων λόγω της αμινοξικής τους σύστασης αλλά και της ευελιξίας που εμφανίζουν. Αυτή η ευελιξία επιτρέπει αφενός την πρόσβαση ενζύμων που καταλύουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

(Iakoucheva *et al.*, 2004) και αφετέρου την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται ειδικά στις τροποποιημένες IDPs (Galea *et al.*, 2008).

1.2.1 Η ογκοπρωτεΐνη SET

Η πρωτεΐνη SET ταυτοποιήθηκε αρχικά ως προϊόν σύντηξης των γονιδίων *set* και *can* μετά από χρωμοσωμική μετάθεση, σε ασθενή με οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία (von Lindern *et al.*, 1992). Πρόκειται για μία φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 39 kDa, η οποία εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και εκφράζεται σε διάφορους ιστούς στον άνθρωπο και το ποντίκι (Nagata *et al.*, 1998). Στη βιβλιογραφία απαντάται με διάφορα ονόματα όπως SET/TAF-Ιβ, I2PP2A, PHAP II και IGAAD, τα οποία αντιστοιχούν σε ανάλογη λειτουργία της.

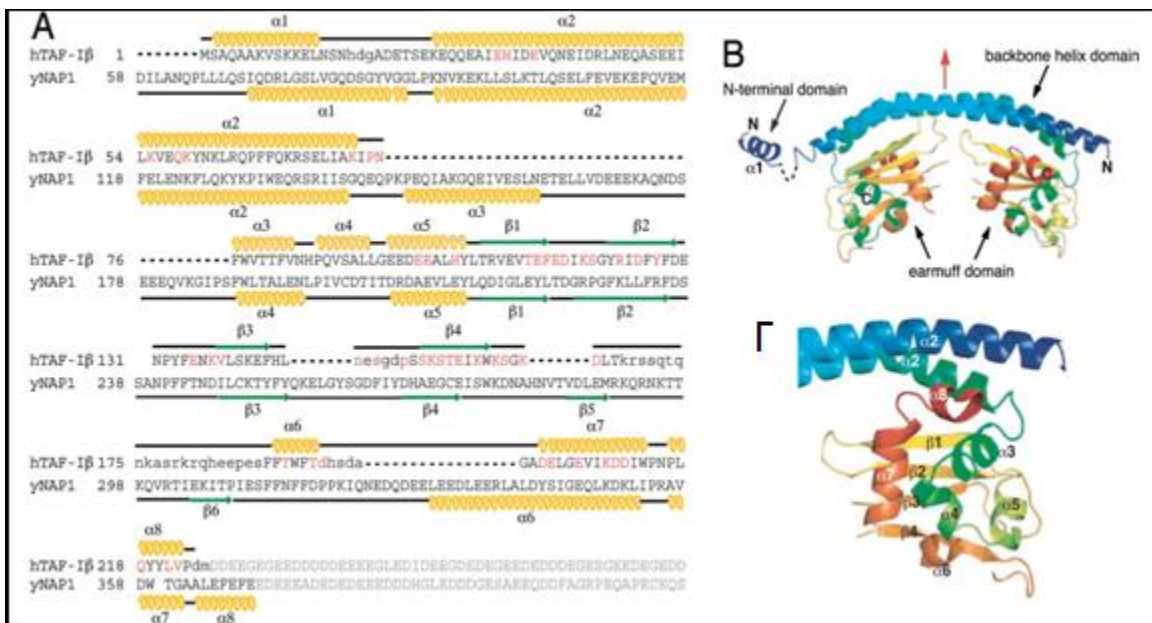
Αποτελεί μέλος της οικογένειας των NAP πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στη συγκρότηση του νουκλεοσώματος και μάλιστα είναι ομόλογη με την NAP-1 (Muto *et al.*, 2007). Πολλές από τις λειτουργίες της SET συνδέονται με το γεγονός ότι αποτελεί αναστολέα της φωσφατάσης PP2A (Li *et al.*, 1996), μίας φωσφατάσης σερίνης-θρεονίνης που αποτελεί βασικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου.

1.2.1α Δομή της SET

Δομικά η SET μπορεί να διακριθεί σε τρεις περιοχές. Η πρώτη είναι ένα μοτίβο που εντοπίζεται στην N-τελική περιοχή (αμινοξέα 1-76) και σχηματίζει μία δομή coiled-coil, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για το διμερισμό της πρωτεΐνης. Το κεντρικό τμήμα (αμινοξέα 80-225) περιλαμβάνει την NAP περιοχή η οποία είναι εξελικτικά συντηρημένη σε όλα τα μέλη της NAP οικογένειας πρωτεϊνών και θεωρείται υπεύθυνη για τη δέσμευση με τις ιστόνες (Park and Luger, 2006a, 2006b). Η τρίτη περιοχή (αμινοξέα 226-277) αφορά το όξινο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, το οποίο αποτελείται από 42 κατάλοιπα γλουταμικού και ασπαρτικού μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται κάποια κατάλοιπα γλυκίνης. Αυτή η περιοχή υιοθετεί μία τυχαία διαμόρφωση και χαρακτηρίζεται ως εγγενώς εύκαμπτη (Park *et al.*, 2005, McBryant *et al.*, 2003).

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση, αποκάλυψε ότι η SET σχηματίζει ένα διμερές με χαρακτηριστικό σχήμα "headphone shape". Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μία ασταθή α-έλικα υψηλής κινητικότητας, μία backbone έλικα και μία α+β περιοχή (earmuff domain) την

οποία συνιστούν έξι α -έλικες τοποθετημένες πάνω σε μία β -πτυχωτή επιφάνεια τεσσάρων κλώνων (Muto *et al.*, 2007) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Η κρυσταλλογραφική δομή της SET. Α) Οι αμινοξικές αλληλουχίες των SET και NAP-1. Υποδεικνύονται οι α -έλικες (κίτρινο) και οι β -αλυσίδες (πράσινο). Η όξινη περιοχή απεικονίζεται με ανοιχτό γκρι χρώμα. Β) Η συνολική δομή του διμερούς της SET. Γ) Η δομική περιοχή "headphone shape" (Muto *et al.*, 2007).

1.2.1β Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της SET

Μία τροποποίηση που έχει ανιχνευτεί στην SET, είναι η φωσφορυλίωση της σερίνης στο κατάλοιπο 9. Η συγκεκριμένη τροποποίηση επάγει την μετατόπιση της πρωτεΐνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ενώ ταυτόχρονα εμπλέκεται και στην κυτταρική μετανάστευση. Αυτό συμβαίνει καθώς η φωσφορυλίωση της Ser9 αποτελεί το σήμα για την κατάργηση της διμερούς μορφής που έχει η SET στον πυρήνα, την έξοδό της στο κυτταρόπλασμα και την αλληλεπίδρασή της με την Rac1 (ten Klooster *et al.*, 2007).

Μία άλλη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που έχει αναγνωριστεί, είναι η φωσφορυλίωση της σερίνης στη θέση 171. Η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση καταλύεται από την PDK2 σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και οδηγεί σε μείωση της ανασταλτικής δράσης της SET έναντι της PP2A (Irie *et al.*, 2012).

1.2.1γ Βιολογικός ρόλος της SET

Ρόλος στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης

Η SET εμπλέκεται σε μία σειρά διεργασιών που σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης. Ως μέλος της NAP οικογένειας πρωτεϊνών, αποτελεί μόριο-συνοδό των ιστονών. Αλληλεπιδρά με όλες τις ιστόνες του νουκλεοσώματος, ωστόσο απουσία της καρβοξυτελικής της περιοχής αλληλεπιδρά μόνο με τις ιστόνες H3 και H4. Πιο πρόσφατα διαπιστώθηκε και η αλληλεπίδρασή της με την συνδετική ιστόνη H1 (Kato *et al.*, 2011). Επιπλέον, ως υπομονάδα του συμπλόκου αναστολής των ακετυλτρανσφερασών (INHAT complex), η SET αναστέλλει την ακετυλίωση των ιστονών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανισμού "histone-masking" με τον οποίο η SET παρεμποδίζει την πρόσβαση των ακετυλτρανσφερασών p300/CBP και PCAF στις ιστόνες (Seo *et al.*, 2001). Επίσης, είναι γνωστό ότι η SET αλληλεπιδρά και σχηματίζει σύμπλοκο με την προ-θυμοσίνη α, επάγοντας τη συνολική αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (Karetsou *et al.*, 2004). Τέλος, ως παράγοντας TAF-1, η SET προκαλεί την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης στα σπερματικά κύτταρα του *Xenopus* (Matsumoto *et al.*, 1999).

Ρόλος στην αντιγραφή και τη μεταγραφή

Η SET ενισχύει τόσο την αντιγραφή όσο και τη μεταγραφή του γονιδιώματος των αδενοϊών (Matsumoto *et al.*, 1993, Haruki *et al.*, 2006, Pegoraro *et al.*, 2006). Επίσης, είναι γνωστό ότι επάγει τη μεταγραφή μίας σειράς γονιδίων μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου της ακετυλίωσης των ιστονών (Kato *et al.*, 2007). Στην ενεργοποίηση της μεταγραφής συμβάλλει και η άμεση αλληλεπίδραση της SET με το μεταγραφικό συνενεργοποιητή CBP (CREB-binding protein) (Karetsou *et al.*, 2005). Τέλος, η SET αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και οδηγεί σε αναστολή της μεταγραφικής του ενεργότητας (Ichijo *et al.*, 2008).

Ρόλος στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Η SET επηρεάζει τη λειτουργία βασικών ρυθμιστικών στοιχείων του κυτταρικού κύκλου. Όπως έχει δειχθεί, αλληλεπιδρά ειδικά με τις κυκλίνες τύπου B αλλά όχι με τις κυκλίνες τύπου A (Kellogg *et al.*, 1995). Επίσης είναι γνωστή η άμεση αλληλεπίδρασή της με την καρβοξυτελική περιοχή του αναστολέα p21^{Cip1} (Estanyol *et al.*, 1999).

Ρόλος κατά τη Μείωση II

Η SET απαιτείται για το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά τη Μείωση II. Συγκεκριμένα, η PP2A-B56 που εντοπίζεται στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων, διατηρεί ενεργή την πρωτεΐνη Rec8 και οι αδελφές χρωματίδες παραμένουν ενωμένες κατά την Μείωση I. Ωστόσο η δράση της PP2A-B56 αναστέλλεται από την SET κατά τη Μείωση II και έτσι τα χρωμοσώματα διαχωρίζονται επιτυχώς (Chambon *et al.*, 2013).

Ρόλος στην κυτταρική μετανάστευση

Η SET εμπλέκεται στην κυτταρική μετανάστευση μέσω της αλληλεπίδρασής της με την Rho GTPase, Rac1 (ten Klooster *et al.*, 2007). Πιο συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της SET στο κατάλοιπο Ser9, καταργεί τη διμερή μορφή της πρωτεΐνης και συμβάλλει στην έξοδο της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Η μετατόπιση αυτή, της δίνει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει με την Rac1 που επίσης βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η επακόλουθη ενεργοποίηση της Rac1 επάγει τη μετακίνηση του συμπλόκου SET/Rac1 στην πλασματική μεμβράνη. Εκεί η Rac1 αλληλεπιδρά με κινάσες και επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη διαδικασία της κυτταρικής μετανάστευσης. Βασική προϋπόθεση αποτελεί η αναστολή της PP2A από τη SET, προκειμένου να παραμείνουν ενεργές οι κινάσες και να αλληλεπιδράσουν με την Rac1.

Ρόλος στην απόπτωση

Η πρωτεΐνη SET αποτελεί παράγοντα κλειδί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs). Τα CTLs επάγουν την απόπτωση μέσω απελευθέρωσης κυτταρολυτικών κυστιδίων, τα οποία περιέχουν την περφορίνη (perforin) και τις πρωτεάσες σερινών Granzyme A (GzmA) και Granzyme B (GzmB). Η πρωτεάση GzmA ενεργοποιεί ένα αποπτωτικό μονοπάτι ανεξάρτητο των κασπασών που περιλαμβάνει τομές στην μονή αλυσίδα του DNA (Beresford *et al.*, 1999). Η NM23-H1 είναι μία GzmA-επαγόμενη DNAάση (GAAD) και η SET αποτελεί ειδικό αναστολέα της (Fan *et al.*, 2003). Επιπλέον, η SET εμπλέκεται στην απόπτωση μέσω της δράσης της ως αναστολέας των ακετυλτρανσφερασών που στοχεύει την πρωτεΐνη p53. Η SET καταστέλλει την ενεργότητα της p53 καθώς εμποδίζει την ακετυλίωσή της κυρίως από τις ακετυλοτρανσφεράσες p300 και PCAF. Μέσω αρνητικής ρύθμισης της p53, η SET αναστέλλει την παύση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (Kim *et al.*, 2011).

Ρόλος στον καρκίνο

Η πρώτη ένδειξη για την εμπλοκή της SET στον καρκίνο, προέρχεται από την ταυτοποίησή της ως προϊόν γονιδιακής σύντηξης σε οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία. Έκτοτε διαπιστώθηκε ένας μεγάλος αριθμός περιπτώσεων καρκίνου που χαρακτηρίζονται από την υπερέκφραση της SET (Carlson *et al.*, 1998, Ouellet *et al.*, 2006, Leopoldino *et al.*, 2012, Dong *et al.*, 2014). Υπό αυτήν την έννοια, η SET θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο αντικαρκινικής θεραπείας. Ως αναστολέας της φωσφατάσης PP2A, η SET συμβάλλει στην καρκινογένεση. Η PP2A αποτελεί ένα μόριο με ογκοκατασταλτική δράση το οποίο ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση των Akt και c-Myc σηματοδοτικών μονοπατιών. Συνεπώς, η αναστολή της φωσφατάσης από την SET επάγει τα ογκογόνα αυτά μονοπάτια (Eichhorn *et al.*, 2009). Επιπλέον, μέσω αλληλεπίδρασης με την Rac-1, η SET συμβάλλει στην κυτταρική μετανάστευση που αποτελεί κρίσιμη διαδικασία για τη διήθηση και τη διασπορά των εξαλλαγμένων κυττάρων (ten Klooster *et al.*, 2007). Τέλος, η ογκογόνος δράση της SET σχετίζεται με την αναστολή που ασκεί στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 καθώς εμποδίζει την ακετυλίωσή της. Κατά συνέπεια, αναστέλλεται η απόπτωση και επάγεται η κυτταρική επιβίωση (Kim *et al.*, 2011).

1.2.2 Η προθυμοσίνη α

Η προθυμοσίνη α (ProTα) είναι μία ισχυρά όξινη (pI 3,5) πυρηνική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 12,5 kDa η οποία έχει ανιχνευτεί σε μία ποικιλία ιστών (Haritos *et al.*, 1984, Clinton *et al.*, 1989). Πρόκειται για μία από τις πιο όξινες πρωτεΐνες που απαντώνται στη φύση. Το γονίδιο της εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 του ανθρώπινου γονιδιώματος (Szabo *et al.*, 1993) και αποτελείται από 5 εξόνια που διακόπτονται από 4 ιντρόνια (Pineiro *et al.*, 2000). Θεωρείται ότι ανήκει στα πιο ισχυρά εκφραζόμενα γονίδια, μαζί με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90, την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης και ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Adams *et al.*, 1995).

1.2.2α Δομή της προθυμοσίνης α

Η προθυμοσίνη α περιλαμβάνει 109-111 αμινοξικά κατάλοιπα, ανάλογα με το είδος από το οποίο προέρχεται (Εικόνα 8). Η N-τελική αλληλουχία της (αμινοξέα 1-28) αντιστοιχεί στην θυμοσίνη α1 και είναι πλήρως συντηρημένη σε όλα τα είδη. Αντίθετα, το C-τελικό άκρο της είναι λιγότερο συντηρημένο. Περίπου το 50% των αμινοξέων της είναι όξινα (Glu, Asp) και στην πλειοψηφία τους συσσωρεύονται στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης δημιουργώντας μία

όξινη περιοχή 30 περίπου καταλοίπων (αμινοξέα 49-84). Στερείται αρωματικών και θειούχων αμινοξέων καθώς και ισχυρά υδρόφοβων αλληλουχιών. Οχτώ κατάλοιπα λυσίνης είναι διατηρημένα σε όλα τα είδη, από τα οποία τα τέσσερα συγκεντρώνονται στην N-τελική περιοχή ενώ τα υπόλοιπα απαντώνται στην C-τελική περιοχή. Ο ισχυρά όξινος χαρακτήρας της και η παρουσία μίας όξινης περιοχής στο κέντρο του μορίου της, αποτελούν δύο σημαντικές ομοιότητες με πυρηνικά εντοπιζόμενες πρωτεΐνες όπως είναι η νουκλεοπλασμίνη, οι HMG πρωτεΐνες και οι N1/N2 πρωτεΐνες. Επιπλέον, η αλληλουχία $^{101}\text{KKQK}^{104}$ στο C-τελικό άκρο της λειτουργεί ως σήμα πυρηνικής μετατόπισης.

Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού όξινων αμινοξέων που φέρει στην αλληλουχία της, η ProTa εμφανίζει έντονα αρνητικό φορτίο, γεγονός που σταθεροποιεί την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες θετικά φορτισμένες. Υιοθετεί μία διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος, χωρίς κανονική δευτεροταγή δομή (Gast *et al.*, 1995). Ωστόσο σε όξινο pH φαίνεται να επάγεται η μερική αναδίπλωσή της λόγω εξουδετέρωσης του αρνητικού φορτίου της (Pavlov *et al.*, 2002). Η έλλειψη σταθερής δευτεροταγούς δομής, που την κατατάσσει στις εγγενώς εύκαμπτες πρωτεΐνες (IDPs), είναι σημαντική για το φυσιολογικό ρόλο της και ρυθμίζει την αλληλεπίδρασή της με άλλα μόρια.

ProTa (ανθρώπινη)

SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVEEAENGRDAPANGANEENGEQEADNEVDEEEEEE **58**
 GGEEEEEEEEEGDGEEEDGDEDEEAESATGKRAAEDDEDDDVDTKKQKTDEDD **110**

ParaT (ανθρώπινη)

SEKSVEAAAELELSAKDLKEKKEKVEEKASRKERKKEVVEEEENGAEEEEEEE **52**
 TAEDGEEEDEGEEEDEEEEEEDDEGPALKRAAEEEEDEADPKRQKTENGASA **101**

Εικόνα 8 : Αμινοξική αλληλουχία της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης.

1.2.2β Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της προθυμοσίνης

Όσον αφορά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της προθυμοσίνης α , αρχικά βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται από την κινάση 2 της καζεΐνης (casein kinase 2) σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης που εντοπίζονται στα 14 πρώτα αμινοξέα της αλληλουχίας της (Barcia *et al.*, 1992). Αργότερα διαπιστώθηκε ότι η φωσφορυλίωση στοχεύει μόνο τα κατάλοιπα θρεονίνης στις θέσεις 7, 12 και 13, αναδεικνύοντας την ύπαρξη μίας κινάσης διαφορετικής από την κινάση 2 της καζεΐνης (Barcia *et al.*, 1993). Τελικά, όπως έγινε γνωστό ότι πρόκειται για το M2-ισοένζυμο της κινάσης του πυροσταφυλικού (Diaz-Jullien *et al.*, 2011). Μάλιστα η φωσφορυλίωση φαίνεται να σχετίζεται με την ογκογόνο δράση της πρωτεΐνης, τουλάχιστον στα λεμφοκύτταρα. Αυτό προκύπτει καθώς και τα τρία κατάλοιπα (Thr7, 12, 13) εμφανίζονται φωσφορυλιωμένα στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα, ενώ στα καρκινικά φωσφορυλιώνεται μόνο το κατάλοιπο Thr7 (Freire *et al.*, 2016).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το N-τελικό άκρο της προθυμοσίνης ακετυλιώνεται και μάλιστα η ακετυλοσερίνη της μπορεί να αποτελέσει και στόχο φωσφορυλίωσης (Sburlati *et al.*, 1993).

1.2.2γ Βιολογικός ρόλος της προθυμοσίνης α

Ρόλος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Η εμπλοκή της προθυμοσίνης α στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι καλά τεκμηριωμένη δεδομένου ότι η έκφρασή της ανιχνεύεται αυξημένη σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενους ιστούς (Sburlati *et al.*, 1991, Vareli *et al.*, 1996). Από τις πρωτεΐνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, η προθυμοσίνη αλληλεπιδρά κυρίως με την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 2 (Cdk2), την κυκλίνη A και το πυρηνικό αντιγόνο κυτταρικού πολλαπλασιασμού PCNA (Freire *et al.*, 2001).

Ρόλος στον καρκίνο

Η προθυμοσίνη αποτελεί ένα δυνητικά ογκογόνο μόριο που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη πολλών περιπτώσεων καρκίνου (Sasaki *et al.*, 2001, Magdalena *et al.*, 2008, Tsai *et al.*, 2009, Tripathi *et al.*, 2011). Το γονίδιο της ProTa επάγεται από το ογκογονίδιο c-myc, το οποίο αποτελεί γνωστό ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και παράγοντα-κλειδί στην καρκινογένεση (Eilers *et al.*, 1991). Επιπλέον, σε κύτταρα καρκίνου του μαστού που εκφράζουν τον υποδοχέα των οιστρογόνων (ER), ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα προθυμοσίνης τα οποία

συνδέονται με ενίσχυση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα (Martini *et al.*, 2000). Η ProTa φαίνεται να επηρεάζει και τη μεταγραφική ενεργότητα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Όπως έχει δειχθεί, η υπερέκφραση της προθυμοσίνης *a* επάγει την p53 μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την ακετυλίωσή της (Kobayashi *et al.*, 2006). Τέλος, η ProTa αλληλεπιδρά με την ιστόνη H1, την απομακρύνει από το σύμπλοκο H1/p53 και συνεπώς επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα της p53 (Zakharova *et al.*, 2011).

Ρόλος στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης και τη ρύθμιση της μεταγραφής

Η προθυμοσίνη αλληλεπιδρά με τη συνδετική ιστόνη H1, η οποία είναι υπεύθυνη για την οργάνωση και τη σταθεροποίηση των ανώτερων δομών της χρωματίνης (Papamarcaki and Tsolas, 1994). Παρόλο που έχει διαπιστωθεί η σύνδεσή της και με τις πυρηνικές ιστόνες H3 και H4 (Diaz-Jullien *et al.*, 1996), η προθυμοσίνη συνδέεται επιλεκτικά με την H1 και μέσω αυτής της σύνδεσης ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της ιστόνης με τη χρωματίνη (Karetsou *et al.*, 1998). Επίσης, η ProTa αλληλεπιδρά και σχηματίζει σύμπλοκο με την ογκοπρωτεΐνη SET, μέσω του οποίου συμβάλλει στη συνολική αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (Karetsou *et al.*, 2004). Η ProTa αλληλεπιδρά και με την ακετυλτρανσφεράση των ιστονών CBP (CREB-binding protein) (Karetsou *et al.*, 2002). Η αλληλεπίδραση επιτελείται μεταξύ της N-τελικής περιοχής της CBP (αμινοξέα 1-771) και της όξινης περιοχής της ProTa (αμινοξέα 52-69), υποδεικνύοντας ότι η παρουσία των όξινων γλουταμικών και η τοπική διαμόρφωση του πεπτιδίου συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση με την ακετυλτρανσφεράση. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης, η ProTa ενισχύει την AP-1 και NF-κB-επαγόμενη μεταγραφή. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η ProTa εντοπίζεται σε θέσεις ενεργούς μεταγραφής (Vareli *et al.*, 2000) καθώς και ότι μέσω αλληλεπίδρασης με το πυρηνικό αντιγόνο των ιών Epstein-Barr (EBNA3C), ρυθμίζει την ακετυλίωση των ιστονών (Cotter and Robertson, 2000). Τέλος, η προθυμοσίνη ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) μέσω της σύνδεσής της με τον αναστολέα REA. Ο αναστολέας σχηματίζει σύμπλοκο με την ProTa, απομακρύνεται από τον υποδοχέα και ο συνενεργοποιητής SRC-1 είναι ελεύθερος να συνδεθεί στον υποδοχέα και να τον ενεργοποιήσει (Martini *et al.*, 2000).

Ρόλος στην απόπτωση

Μία από τις λειτουργίες της προθυμοσίνης που σχετίζεται και με την εμπλοκή της στον καρκίνο, είναι η αναστολή της απόπτωσης. Μάλιστα, η αντιαποπτωτική της δράση φαίνεται να διατηρείται από τον άνθρωπο μέχρι το zebrafish (Emmanouilidou *et al.*, 2013). Όπως είναι γνωστό, η ProTa εμποδίζει το σχηματισμό του αποπτοσώματος (Jiang *et al.*, 2003). Μέσω αλληλεπίδρασης με την αποπτωτική πρωτεΐνη Araf-1 (Qi *et al.*, 2010) ή σύνδεσης στο κυτόχρωμα c (Markova *et al.*, 2003), η ProTa αναστέλλει την ενεργοποίηση των κασπασών. Επίσης, έχειδειχθεί ότι η ταυτόχρονη υπερέκφραση της προθυμοσίνης και της p8, οδηγεί στην αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών προς σχηματισμό συμπλόκου το οποίο αναστέλλει τη δράση των κασπασών (Malicet *et al.*, 2006). Τέλος, η ProTa φαίνεται να λειτουργεί ως «διακόπτης» μεταξύ νευρωνικής νέκρωσης και απόπτωσης (Ueda *et al.*, 2007).

1.2.3 Η παραθυμοσίνη

Η παραθυμοσίνη (ParaT) είναι μία όξινη (pI 4,15), πυρηνική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 11,5 kDa. Συγκριτικά με την προθυμοσίνη, η ParaT είναι λιγότερο χαρακτηρισμένη. Εξαιτίας της μεγάλης ομοιότητας, θεωρείται ότι τα δύο πεπτίδια δομούν μία πρωτεϊνική οικογένεια με αντίστοιχες λειτουργίες. Ωστόσο οι διαφορές στη βιολογικό τους ρόλο φανερώνουν πως οι δύο πρωτεΐνες πρέπει να εξετάζονται ως διακριτά μόρια.

Η ParaT παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε ιστούς και ανιχνεύεται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο συκώτι, τους νεφρούς και τον εγκέφαλο (Clinton *et al.*, 1989). Όλοι οι ιστοί, με εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα, εκφράζουν παραθυμοσίνη (Brand *et al.*, 1991).

Το γονίδιο της ανθρώπινης παραθυμοσίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και αποτελείται από 5 εξόνια που διακόπτονται από ένα μεγάλο ιντρόνιο και άλλα 3 μικρότερα (Szabo *et al.*, 1989, Bruniquel *et al.*, 1997). Θεωρείται πως αντίστοιχα με την προθυμοσίνη, η παραθυμοσίνη συντίθεται χωρίς το σχηματισμό ενός μεγαλύτερου πρόδρομου μορίου (Trompeter and Soling, 1992).

1.2.3α Δομή της παραθυμοσίνης

Η παραθυμοσίνη είναι ένα όξινο πεπτίδιο που περιλαμβάνει 101 αμινοξικά κατάλοιπα (Εικόνα 8) και μάλιστα ο ίδιος αριθμός αμινοξέων εμφανίζεται σε όλα τα είδη. Σύγκριση της πρωτοταγούς δομής της παραθυμοσίνης μεταξύ των ειδών, φανερώνει τον υψηλό βαθμό συντήρησης του μορίου. Η αμινοξική της σύνθεση εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με της προθυμοσίνης α. Το N-τελικό άκρο της (αμινοξέα 1-37) είναι ακετυλιωμένο ενώ το C-τελικό περιλαμβάνει την αλληλουχία-σήμα πυρηνικού εντοπισμού της (NLS). Πάνω από το 50% των όξινων αμινοξέων της εντοπίζονται στο κέντρο του μορίου, δημιουργώντας μία όξινη περιοχή (αμινοξέα 38-74) πλούσια σε γλουταμικά και ασπαρτικά κατάλοιπα. Επίσης, η πρωτεΐνη στερείται αρωματικών και θειούχων αμινοξέων. Αντίστοιχα με την προθυμοσίνη, η παραθυμοσίνη δεν εμφανίζει σταθερή δευτεροταγή δομή, αντίθετα υιοθετεί μία διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη της παραθυμοσίνης, αποκάλυψε την κατανομή της μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και παρά την παρουσία του NLS. Φαίνεται ότι η θέση της εξαρτάται από το στάδιο πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων, καθώς σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ανιχνεύεται στον πυρήνα ενώ σε διαφοροποιημένα ο εντοπισμός της είναι κυτταροπλασματικός (Brand *et al.*, 1991). Η θέση της παραθυμοσίνης φαίνεται να σχετίζεται και με την κυτταρική πυκνότητα. Συγκεκριμένα σε χαμηλή πυκνότητα των κυττάρων, η πρωτεΐνη ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα σε υψηλή πυκνότητα εντοπίζεται στον πυρήνα (Trompeter *et al.*, 1999).

1.2.3β Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της παραθυμοσίνης

Η μόνη τροποποίηση που έχει αναγνωριστεί στην παραθυμοσίνη, είναι η ακετυλίωση της σερίνης στο N-τελικό άκρο της (Haritos *et al.*, 1985, Komiyama *et al.*, 1986). Παρά την υψηλή ομολογία με την προθυμοσίνη, δεν έχουν αναγνωριστεί θέσεις φωσφορυλίωσης στην αμινοξική αλληλουχία της ParaT.

1.2.3γ Βιολογικός ρόλος της παραθυμοσίνης

Ρόλος στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης

Η κατανομή της ParaT στον πυρήνα συνδέεται με θέσεις που εμπλέκονται στα πρώιμα στάδια της αντιγραφής (Vareli *et al.*, 2000). Έχει δειχθεί ότι η παραθυμοσίνη συνδέεται ειδικά με την ιστόνη H1 *in vitro* και *in vivo* (Kondili *et al.*, 1996). Μάλιστα η σύνδεση ενισχύεται μετά την προσθήκη Zn^{2+} , γεγονός που συμφωνεί με το χαρακτηρισμό της ως Zn^{2+} -συνδεόμενη πρωτεΐνη. Ωστόσο η προσθήκη γλουταμικού αναστέλλει την αλληλεπίδραση ParaT-H1, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της όξινης περιοχής της ParaT στην αλληλεπίδραση. Τέλος, η ParaT φαίνεται να ρυθμίζει την πρόσδεση της H1 στο νουκλεόσωμα και κατά αυτόν τον τρόπο να εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης (Martic *et al.*, 2005).

Ρόλος στην αναστολή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Η παραθυμοσίνη συνδέεται μέσω της όξινης περιοχής της (43-79) σε περιοχές του DNA που είναι ειδικές για τα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid-response elements), εμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση του ενεργοποιημένου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σ' αυτές. Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγουν τη διαφοροποίηση. Κατά αυτόν τον τρόπο, η παραθυμοσίνη θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού (Okamoto and Isohashi, 2000).

2 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η πολυγλουταμυλίωση έχει αναδειχθεί σε μία γενική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που στοχεύει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων (van Dijk *et al.*, 2008). Παρότι δεν έχει προταθεί συγκεκριμένη αλληλουχία πολυγλουταμυλίωσης, οι πρωτεΐνες-στόχοι της περιέχουν περιοχές πλούσιες σε γλουταμικά κατάλοιπα και πολλές από αυτές σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης. Οι πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α (ProTa) και παραθυμοσίνη (ParaT) περιέχουν αντίστοιχες πολύ-E περιοχές και εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Ωστόσο δεν είναι γνωστό εάν πράγματι πολυγλουταμυλιώνονται, πιθανότητα που διερευνήθηκε στην παρούσα εργασία. Πιο συγκεκριμένα, οι επιμέρους στόχοι αφορούν:

- ✓ Τη διερεύνηση της ενζυμικής προσθήκης γλουταμικού στις πρωτεΐνες SET, ProTa και ParaT.
- ✓ Την ταυτοποίηση αυτόνομων περιοχών πολυγλουταμυλίωσης σε καθεμία πρωτεΐνη.
- ✓ Τον έλεγχο της υποκυτταρικής εντόπισης των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών.
- ✓ Τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών και των ιστονών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.1.1 Κυτταρική σειρά και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK293 (Human Embryonic Kidney cells 293). Πρόκειται για κύτταρα μη καθορισμένης προέλευσης που αναπτύσσονται προσκολλούμενα σε σταθερό υπόστρωμα. Κάποια δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα HEK293 έχουν νευρωνική προέλευση (Shaw *et al.*, 2002) και άλλα ότι εκφράζουν μοριακούς δείκτες χαρακτηριστικούς των επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων (Inada *et al.*, 2016).

Για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) εμπλουτισμένο με 10% v/v εμβρυικό ορό βοός (FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη. Ο ορός απενεργοποιήθηκε πριν τη χρήση του μέσω θέρμανσης στους 58° C για 45 λεπτά. Ο χειρισμός των κυττάρων έγινε σε εστία κάθετης νηματικής ροής (Safeflow 1.2, Bioair Instruments) ώστε να εξασφαλιστεί περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific CO₂ water Jacketed incubator) με θερμοκρασία σταθερή στους 37° C, ατμόσφαιρα κορεσμένη με υδρατμούς και σταθερή παροχή 5% CO₂, προκειμένου να παραμείνει σταθερό το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

3.1.2 Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε ειδικά πιάτα κυτταροκαλλιέργειας (cell culture dishes 10cm, Greiner) μέχρι να καλύψουν περίπου το 80% της επιφάνειας του πιάτου (80% confluency), οπότε και μοιράστηκαν σε περισσότερα πιάτα (splitting). Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, αρχικά απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό από το πιάτο και ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με 5 ml διαλύματος PBS 1X. Κατόπιν προστέθηκαν 2 ml διαλύματος θρυψίνης (trypsin-EDTA solution, Biochrom) και τα κύτταρα τοποθετήθηκαν για 2 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Μετά την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων, προστέθηκαν 4 ml πλήρους θρεπτικού υλικού για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Το κυτταρικό εναιώρημα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 1000 στροφές/λεπτό (1000 rpm) σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Hettich Universal II). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος (ανάλογα με την επιθυμητή αραίωση) μεταφέρθηκε σε νέο πιάτο στο οποίο και προστέθηκε πλήρες καλλιεργητικό μέσο μέχρι τελικού όγκου 10ml.

Για τη μακρόχρονη διατήρηση της κυτταρικής σειράς, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Κατά τη διαδικασία αυτή, συλλέχθηκε το κυτταρικό εναιώρημα μετά από θρυψινοποίηση και ακολούθησε φυγοκέντρηση, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος έγινε σε διάλυμα FBS-DMSO και συγκεκριμένα κύτταρα σε συγκέντρωση 2×10^6 /ml, επαναιωρήθηκαν σε 1 ml διαλύματος 90% FBS - 10% DMSO. Ακολούθησε μεταφορά σε ειδικά φιαλίδια ψύξης (cryovials) τα οποία ψύχθηκαν σταδιακά: αρχικά στους -20°C για 2 ώρες, έπειτα στους -80°C για 24 ώρες και τελικά σε δοχείο υγρού αζώτου στους -192°C . Η απόψυξη των κυττάρων έγινε με γρήγορη μεταφορά των cryovials από το υγρό άζωτο στους 37°C . Το περιεχόμενο των φιαλιδίων μεταφέρθηκε σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας που περιείχε 9ml πλήρους θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν στις συνήθεις συνθήκες.

3.1.3 Μέτρηση αριθμού και βιωσιμότητας κυττάρων

Για τον προσδιορισμό του αριθμού και το διαχωρισμό ζωντανών-νεκρών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου από τα ζωντανά κύτταρα (Trypan blue dye exclusion). Για το σκοπό αυτό, 10μl κυτταρικού εναιωρήματος αναμίχθηκαν με 10μl διαλύματος χρωστικής 1X. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και ακολουθούσε παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Olympus CK2). Τα ζωντανά κύτταρα ήταν φωτεινά και διάφανα, ενώ τα νεκρά εμφανίστηκαν με βαθύ μπλε χρώμα καθώς η χρωστική είχε διαπεράσει τη μεμβράνη τους. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε ως εξής: Συνολικός αριθμός κυττάρων = (Μέσος όρος κυττάρων που καταμετρήθηκαν x Αραίωση x 10^4).

3.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

3.2.1 Σχεδιασμός και κλωνοποίηση

Για τη μελέτη των περιοχών πολυγλουταμυλίωσης, κατασκευάστηκαν τα παρακάτω πλασμίδια :

ParaT 1-53: Το πλασμίδιο CMV-ParaT χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της περιοχής του ανθρώπινου γονιδίου ParaT που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1 έως 53. μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ParaEco (5'- CCG GAA TTC ATG TCG GAG AAA AGC GTG -3') και ParaBamHI (5'- CCG GGA TCC TCA GGC AGT TTC TTC TTC -3'). Έγινε πέψη του προϊόντος με *EcoRI/BamHI* και κλωνοποίηση στον pEGFP-C2 φορέα που είχε προηγουμένως επωαστεί με τα ένζυμα *EcoRI* και *BamHI*.

ParaT 54-102: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ParaEco (5'- GGC GAA TTC GAG GAT GGA GAG GAG GAA GAT- 3') και ParaXhoI (5'- TCC GCT CGA GTC ACG CCG ATG CCC CAT T- 3') και το αρχικό πλασμίδιο ήταν το pEGFP-C1-ParaT. Το προϊόν κλωνοποιήθηκε στον pEGFP-C2 φορέα που είχε κοπεί με τα ένζυμα *EcoRI* και *XhoI*.

ParaT 36-77: Το γονίδιο απομονώθηκε από το πλασμίδιο pFlag-Para36-77 μετά από πέψη με τα ένζυμα *EcoRI* και *BamHI* και εισήχθη στον pEGFP-C1 φορέα που διέθετε *EcoRI/BamHI* θέσεις κλωνοποίησης.

ProTa 1-70 : Η περιοχή του γονιδίου ProTa αρουραίου που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1 έως 70, ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ProTEco (5'- CCG GAA TTC ATG TCA GAC GCG GCA GTG -3') και ProTSal (5'- GCC GTC GAC TTA ACC TTC TTC CTC CTC -3') με πρότυπο πλασμίδιο το pFlag-ProTa. Η κλωνοποίηση έγινε στο φορέα pEGFP-C2 που διέθετε *EcoRI/SalI* θέσεις κλωνοποίησης.

ProTa 1-61: Για την ενίσχυση της περιοχής που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 61, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ProTSal (5'- GCC GTC GAC TTA CCC ACC TTC TTC CTC CTC -3') και ProTEco (5'- CCG GAA TTC ATG TCA GAC GCG GCA GTG -3'). Το αρχικό πλασμίδιο ήταν το pFlag-ProTa και η κλωνοποίηση έγινε στον pEGFP-C2 που κόπηκε με τα ένζυμα *EcoRI* και *SalI*.

ProTa 71-112: Το γονίδιο ενισχύθηκε με τους εκκινητές ProTSal (5'- CCG GTC GAC GAT GGT GAG GAA GAA GAT GGA G -3') και ProTBamHI (5'- CGC GGA TCC CCC GGG CTA GTC ATC CTC ATC AGT CTT -3'), αποκόπηκε από το pFlag-ProTa και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pEGFP-C1 μέσω θέσεων *SalI / BamHI*.

ProTa 41-112: Το γονίδιο απομακρύνθηκε από τον φορέα pFlag-ProTa με *EcoRI/ BamHI* και κλωνοποιήθηκε στον pEGFP-C1 που είχε επωαστεί με τα ένζυμα *EcoRI/ BamHI*.

ProTa Δ53-84: Το γονίδιο αφαιρέθηκε από το πλασμίδιο pFlag-ProTa με *EcoRI/ BamHI* και εισήχθη στο pEGFP-C1 που περιείχε *EcoRI/ BamHI* θέσεις κλωνοποίησης.

3.2.2 Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Για την παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά κύτταρα DH10b της *E.coli*. Τα κύτταρα εμβολιάστηκαν σε 5 ml θρεπτικού μέσου LB (1% w/v τρυπτόνη, 1% w/v NaCl, 0,5% εκχύλισμα ζύμης) εμπλουτισμένου με καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml και επώστηκαν για περίπου 16 ώρες στους 37° C. Κατόπιν, 1 ml από την ολονύκτια καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 200 ml LB και επώστηκε υπό ανάδευση στους 37° C μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD₆₀₀) να φτάσει την τιμή 0.42. Η καλλιέργεια μεταφέρθηκε στον πάγο όπου και παρέμεινε για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 3000 rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το κυτταρικό ίζημα επαναωρήθηκε σε 40 ml διαλύματος TFI (10 mM MES, 45 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂) και αφέθηκε σε πάγο για 5 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε εκ νέου σε 3000 rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το ίζημα επαναωρήθηκε σε 2,5 ml TFI (10 mM Pipes, 50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% γλυκερόλη) και παρέμεινε σε πάγο για 15 λεπτά. Κατόπιν, το εναιώρημα των επιδεκτικών κυττάρων μεταφέρθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο στους -192° C και έπειτα αποθηκεύτηκε στους -80° C.

3.2.3 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Το εναιώρημα των επιδεκτικών κυττάρων DH10b, απομακρύνθηκε από τους -80° C και αφέθηκε στον πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε όλη η αντίδραση ανασύνδεσης σε 50μl εναιωρήματος. Ακολούθησε επώση για 30 λεπτά στον πάγο και έπειτα τα βακτηριακά κύτταρα υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ στους 42° C για 2 λεπτά. Το δείγμα μεταφέρθηκε άμεσα σε πάγο, όπου και παρέμεινε για 2 λεπτά. Κατόπιν προστέθηκαν 250μl LB και ακολούθησε επώση υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 37° C. Έπειτα τα βακτηριακά κύτταρα επιστρώθηκαν σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο επιλογής με το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Το τρυβλίο Petri επώστηκε για περίπου 16 ώρες στους 37° C , οπότε και εμφανίστηκαν αποικίες επιτυχώς μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.

3.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα ("Mini-Prep")

Υπό στείρες συνθήκες, ανασύρθηκαν σταδιακά 5 αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων από το τρυβλίο Petri και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Κάθε σωλήνας περιείχε 3 ml θρεπτικού υλικού LB εμπλουτισμένου με το αντιβιοτικό καναμυκίνη, σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Οι υγρές καλλιέργειες αφέθηκαν να αναπτυχθούν υπό ολονύκτια ανάδευση στους 37° C. Στη συνέχεια, 1,5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου erpendorf και φυγοκεντρήθηκε σε 13.200 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100µl διαλύματος P1 (50 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ ml RNAase A) και στο εναιώρημα προστέθηκαν 100µl διαλύματος λύσης P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) και 100µl διαλύματος P3 (3 M Οξικό Κάλιο, pH 5,5). Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε 13.200 rpm για 5 λεπτά στους 4° C. Συλλέχθηκε η υπερκείμενη φάση που περιείχε το πλασμιδιακό DNA και προστέθηκε σ' αυτήν 1 ml 100% αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 13.200 rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το κατακρημνισμένο DNA επαναιωρήθηκε σε 500 µl 70% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε σε 13.200 rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Απορρίφθηκε η αιθανόλη και το ίζημα που περιείχε το DNA, αφέθηκε για 10 λεπτά στους 37° C προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη. Κατόπιν επαναδιαλύθηκε σε 30 µl ddH₂O.

3.2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα ("Midi-Prep")

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε ικανοποιητική συγκέντρωση και υψηλή καθαρότητα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της *QIAGEN Plasmid Purification Kit*. Αρχικά, 1 ml από την προκαλλιέργεια μίας θετικής αποικίας μεταφέρθηκε σε 100 ml LB παρουσία καναμυκίνης σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml και αφέθηκε να αναπτυχθεί υπό ολονύκτια ανάδευση στους 37° C. Ακολούθως, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε σε 6000 x g για 15 λεπτά στους 4° C και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml διαλύματος P1 (50 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ ml RNAase A). Προστέθηκαν 4 ml διαλύματος P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), το μίγμα αναδεύτηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 4 ml διαλύματος P3 (3 M Οξικό Κάλιο, pH 5,5), ανάδευση και επώαση στον πάγο για 15 λεπτά. Κατόπιν, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 20.000 x g για 30 λεπτά στους

4° C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επαναφυγοκεντρήθηκε σε 20.000 x g για 15 λεπτά στους 4° C. Το τελικό υπερκείμενο τοποθετήθηκε στη στήλη *QIAGEN-tip 100*, η οποία είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με την προσθήκη 4 ml διαλύματος QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15% ισοπροπανόλη, 0.15% Triton X-100). Έπειτα, η στήλη εκπλύθηκε με 20 ml διαλύματος QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15% ισοπροπανόλη). Το πλασμιδιακό DNA που συνδέθηκε στη στήλη, εκλούστηκε με 5 ml διαλύματος QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8,5, 15% ισοπροπανόλη). Η κατακρήμνιση του DNA έγινε με 3,5 ml ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 13.200 rpm για 30 λεπτά στους 4° C και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το ίζημα που περιείχε το DNA, εκπλύθηκε με 2 ml 70% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε σε 13.200 rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα αφέθηκε για 10 λεπτά στους 37° C προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη, οπότε και επαναδιαλύθηκε σε 30 μl ddH₂O.

3.2.6 Ποσοτικοποίηση DNA

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm (A_{260}) και τη χρήση της εξίσωσης: C_{DNA} (μg/μl) = (A_{260} x 50 x παράγοντας αραίωσης)/1000, καθώς υπολογίζεται ότι συγκέντρωση DNA ίση με 50 μg/μl έχει A_{260} ίση με την τιμή 1.

Η καθαρότητα του DNA προσδιορίστηκε με βάση την τιμή της απορρόφησης στα 260 (A_{260}) και στα 280 nm (A_{280}) και πιο συγκεκριμένα από το πηλίκο A_{260}/A_{280} . Υψηλής καθαρότητας DNA απαλλαγμένο από προσμίξεις πρωτεϊνών ή RNA, έχει λόγο A_{260}/A_{280} ~ 1.8. Χαμηλότερο πηλίκο αντιστοιχεί σε παρασκεύασμα με αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης, ενώ πηλίκο που προσεγγίζει την τιμή 2 υποδεικνύει την παρουσία αυξημένης ποσότητας RNA.

3.2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Για το διαχωρισμό των μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτή 1% w/v αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (40 mM Tris, pH8, 20 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA). Κατά την παρασκευή της πηκτής, μετά το βρασμό του διαλύματος της αγαρόζης προστέθηκε στο διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml. Τα δείγματα αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης (6x Loading Dye, Takara: 10 mM Tris, pH7,6, 0,03% μπλε της βρωμοφαινόλης,

0,03% κυανού της ξυλόλης, 60% γλυκερόλη, 60 mM EDTA) σε αναλογία 5:1 και τοποθετήθηκαν στην πηκτή. Παράλληλα τοποθετήθηκαν και μάρτυρες μοριακών μεγεθών (Nippon). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή, στην οποία η πηκτή βρισκόταν καλυμμένη με το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο τάσης 90V και το DNA κινήθηκε προς την άνοδο. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτέθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας, προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα του DNA με το βρωμιούχο αιθίδιο.

3.3 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η διαμόλυνση των κυττάρων HEK293 έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου *Xfect Transfection Reagent* (Clontech) στις συνθήκες που αναγράφονται στον Πίνακα 3. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε κατάλληλο πιάτο ώστε τη στιγμή της διαμόλυνσης να έχουν καλύψει περίπου το 70% της επιφάνειάς του (70% confluency). Αρχικά, το πλασμιδιακό DNA αναμίχθηκε με το διάλυμα της αντίδρασης (reaction buffer) και κατόπιν προστέθηκε το αντιδραστήριο *Xfect*. Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η αντίδραση μεταφέρθηκε στο αντίστοιχο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας, όπου προϋπήρχε ο κατάλληλος όγκος πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM. Το πιάτο ανακινήθηκε ήπια και μεταφέρθηκε στον επωαστικό κλίβανο όπου παρέμεινε για περίπου 24 ώρες. Η απόδοση της διαμόλυνσης (efficiency) ελέγχθηκε με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού (Axiovert S100 ZEISS).

Πιάτο κυτταροκαλλιέργειας	Ποσότητα DNA (μg)	Τελικός όγκος αραιώσης DNA στο διάλυμα αντίδρασης (μl)	Όγκος αντιδραστηρίου Xfect (μl)	Όγκος πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM
10 cm	20	600	6	10 ml
6-θέσεων	2,5	100	0,75	1 ml
24-θέσεων	1	25	0,3	250 μl

Πίνακας 3: Συνθήκες διαμόλυνσης κυττάρων με το αντιδραστήριο Xfect.

3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

3.4.1 Απομόνωση ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος

Κύτταρα HEK293 επιστρώθηκαν σε πιάτο 6 θέσεων (6-well plate) και διαμολύνθηκαν με το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA (κεφάλαιο 3.3). Μετά την παραμονή των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο επί 24 ώρες, ακολούθησε η διαδικασία συλλογής ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος. Αρχικά, απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο από το πιάτο και τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS 1X. Κατόπιν, προστέθηκαν 150 μl/θέση διαλύματος λύσης (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100). Ακολούθησε απόξεση του ταπητίου με ειδικό ξέστρο και συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος. Το εναιώρημα εμπλουτίστηκε με κατάλληλο μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche) σε αραιώση 1:100. Ακολούθησε επώαση σε πάγο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση σε 13.200 rpm για 30 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20 ° C. Ο προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης του εκχυλίσματος έγινε με τη μέθοδο Bradford (κεφάλαιο 3.4.3).

3.4.2 Απομόνωση πυρηνικού εκχυλίσματος

Κύτταρα HEK293 επιστρώθηκαν σε πιάτο 10cm και διαμολύνθηκαν με το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA (κεφάλαιο 3.3). Μετά την ολοκλήρωση παραμονή των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο, ακολούθησε η διαδικασία συλλογής πυρηνικού εκχυλίσματος. Αρχικά, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό από το πιάτο και τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 5 ml διαλύματος PBS 1X. Κατόπιν, προστέθηκαν 600 μl διαλύματος λύσης (0,25 M σουκρόζη, 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 1 mM EDTA) και ακολούθησε απόξεση του ταπητίου με ειδικό ξέστρο. Το κυτταρικό εναιώρημα συλλέχθηκε και εμπλουτίστηκε με 6 μl μίγματος αναστολέων πρωτεασών (Roche). Έπειτα, το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε 2.300 x g για 10 λεπτά στους 4° C, οπότε συλλέχθηκαν οι πυρήνες ως ίζημα. Για τη λύση των πυρήνων προστέθηκαν 500 μl διαλύματος NP40 (0,4% NP40, mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8) εμπλουτισμένου με 5 μl μίγματος αναστολέων πρωτεασών. Ακολούθησε χρήση υπερήχων (sonication: 3x10sec, amplitude 20%) και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 16.100 x g για 30 λεπτά στους 4° C. Το πυρηνικό εκχύλισμα συλλέχθηκε ως υπερκείμενο και αποθηκεύτηκε στους -20 ° C. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης του εκχυλίσματος έγινε με τη μέθοδο Bradford (κεφάλαιο 3.4.3).

3.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπική μέθοδος Bradford. Κατά τη διαδικασία αυτή, το δείγμα αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 800μl. Κατόπιν, προστέθηκαν 200μl αντιδραστηρίου *Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Biorad Laboratories). Το δείγμα επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η απορρόφησή του μετρήθηκε στα 595nm (φωτόμετρο SHIMADZU UVmini-1240). Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε από τις τιμές απορρόφησης διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (BSA) γνωστής συγκέντρωσης.

3.5 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών και των ιστονών, πραγματοποιήθηκε ανοσοκαταβύθιση των συμπλεγμάτων GFP-SET-H3, GFP-ProTα-H1 και GFP-ParaT-H1. Αρχικά, κύτταρα HEK293 διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της GFP μορφής των πρωτεϊνών μαζί με την ενεργή ή ανενεργή μορφή της πολυγλουταμυλάσης TTLL4. Απομονώθηκαν τα πυρηνικά εκχυλίσματα (κεφάλαιο 3.4.2) και επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι της GFP πρωτεΐνης (DSHB, U Iowa) έτσι ώστε 300μg εκχυλίσματος να επωαστούν με 3 μg αντισώματος επί 24 ώρες στους 4° C. Ακολούθησε επώαση με σφαιρίδια πρωτεΐνης G (Invitrogen) για 3 ώρες στους 4° C. Χρησιμοποιήθηκαν 20 μl σφαιριδίων για κάθε εκχύλισμα, τα οποία προηγουμένως εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και μία φορά με το διάλυμα λύσης των πυρήνων (0,4% NP40, mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8). Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1600 rpm για 4 λεπτά στους 4° C και ακολούθησαν τρεις πλύσεις των σφαιριδίων με διάλυμα 0,2% NP40, mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7,4. Μετά την τελευταία πλύση, τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν σε 20 μl διαλύματος Laemmli 2X, θερμάνθηκαν στους 95°C για 5min και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western (κεφάλαιο 3.6).

3.6 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN

Η μέθοδος της Ανοσοαποτύπωσης κατά Western περιλαμβάνει τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πηκτή, τη μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και την ανίχνευσή τους μετά από τη σύνδεση με ειδικό αντίσωμα.

3.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή ακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Σαν εκκινητής για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) ενώ η διαδικασία επιταχύνθηκε από την παρουσία N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ασυνεχές σύστημα, δηλαδή σε 2 διαδοχικά πηκτώματα: ένα πηκτώμα επιστοιβάξης (stacking gel) και ένα πηκτώμα διαχωρισμού (separating gel). Η πηκτή επιστοιβάξης περιείχε 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS και 0,1% TEMED. Η πηκτή διαχωρισμού περιείχε 10% ή 12% ακρυλαμίδιο, 0,38 M Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS και 0,05% TEMED. Συγκεκριμένα για την ανίχνευση των GFP-SET, GFP-ProTa και GFP-ParaT ή των τμημάτων τους, χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού 10%. Για την ανάλυση των ανοσοσυμπλεγμάτων των εξεταζόμενων πρωτεϊνών με τις ιστόνες, χρησιμοποιήθηκαν πηκτές 12%.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli 4X (250mM Tris-HCl, pH 6,8, 9,2% SDS, 40% w/v γλυκερόλη, 0,2% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 100 mM DTT) σε αναλογία όγκων 3/1. Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 5min με στόχο την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κατόπιν τοποθετήθηκαν στην πηκτή. Παράλληλα, τοποθετήθηκαν πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους συνδεδεμένες με χρωστική (BlueStar PLUS Prestained Protein Marker, MWPO4). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (25mM Tris, 192mM γλυκίνη, 0,1% SDS) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η αρχική ένταση ήταν 16 mA για το διάστημα που οι πρωτεΐνες κινούνταν εντός της πηκτής επιστοιβάξης και 25mA καθόλη τη διάρκεια κίνησής τους στην πηκτή διαχωρισμού.

3.6.2 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, τοποθετήθηκε πάνω στην πηκτή μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45μm (GE Healthcare) η οποία είχε προηγουμένως ενεργοποιηθεί με εμβάπτιση σε νερό. Πηκτή και μεμβράνη τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε δύο διηθητικά χαρτιά Whatman 3mm και στη συνέχεια στο ειδικό πλαίσιο της συσκευής μεταφοράς. Το σύστημα βυθίστηκε στο διάλυμα μεταφοράς (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0,1% SDS, 20% μεθανόλη) και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο έντασης 200 mA για 70 λεπτά.

3.6.3 Ανοσοαποτύπωση

Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα PBST (PBS-0,1% Tween-20) για 20 λεπτά και επώαστηκε σε διάλυμα δέσμησης (blocking buffer) PBST-5% άπαχο γάλα για 16 ώρες στους 4° C. Κατόπιν, τοποθετήθηκε σε διάλυμα PBST-2% ζελατίνη (fish skin gelatin, SIGMA) για 20 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με ειδικό αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε PBST-0,5% ζελατίνη (Πίνακας 4) σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες ή ολονύκτια στους 4°C. Έπειτα, η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα PBST και στη συνέχεια με διάλυμα δέσμησης για 30 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (IgG-HRP). Η αραιώση ήταν 1:3000 σε PBST-5% άπαχο γάλα και η επώαση έγινε για 1 ώρα.

3.6.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα, η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα PBST για 30 λεπτά και επώαστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate, GenScript). Χρησιμοποιήθηκε 0,1 ml υποστρώματος/cm² μεμβράνης και η επώαση έγινε για 1 λεπτό. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ για διάφορους χρόνους, από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι και λίγα λεπτά. Μετά την έκθεση, ακολούθησε η εμφάνιση του φιλμ με τοποθέτησή του στο διάλυμα εμφάνισης (Fuji Hunt Developer) για 3 λεπτά και έπειτα στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fuji Hunt Fixer) για 7 λεπτά.

ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	IgG-HRP
anti-GFP (SICGEN)	1:2000	Goat
GT335 (Adipogen)	1:1000	Mouse
anti-H3 (Abcam)	1:10.000	Rabbit
anti-Acetyl-H3 (Millipore)	1:2000	Rabbit
anti-H1 (απομονωμένο από αντιορό με χρωματογραφία συγγένειας)	1: 1000	Rabbit

Πίνακας 4: Αντισώματα και αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western.

3.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΝΤΙΟΡΟ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Το αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της προθυμοσίνης α (anti-ct, αμινοξέα 87-109) απομονώθηκε από αντιορό κουνελιού μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Η απομόνωση βασίστηκε στην ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Το ct πεπτίδιο συνδέθηκε ομοιοπολικά σε κατάλληλη στήλη χρωματογραφίας και ακολούθησε ο καθαρισμός του αντιορού.

3.7.1 Προετοιμασία στήλης χρωματογραφίας

Για τον καθαρισμό του anti-ct αντιορού, χρησιμοποιήθηκε στήλη με υλικό χρωματογραφίας Affigel 15 (Biorad). Το υλικό αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά. Κατόπιν, 2 ml εναιωρήματος τοποθετήθηκαν σε πορώδες γυάλινο χωνί και το υγρό

αναρροφήθηκε άμεσα υπό κενό. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν αρχικά με 2-προπανόλη και κατόπιν με ddH₂O. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μl διαλύματος σύζευξης (0,1 M HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF) και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 13.200 rpm για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προσδιορίστηκε ο όγκος των σφαιριδίων. Η επαναιώρηση έγινε σε 2 όγκους διαλύματος σύζευξης.

3.7.2 Ομοιοπολική σύνδεση πεπτιδίου στο υλικό χρωματογραφίας

Σε 1ml διαλύματος σύζευξης (0,1 M HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF) διαλύθηκε 1,5 mg πεπτιδίου ct και ακολούθησε διαπίδυση επί 24 ώρες. Έπειτα, το διάλυμα πεπτιδίου αναμίχθηκε με τα σφαιρίδια και επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και 3 ώρες στους 4° C. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 13.200 rpm για 2 λεπτά, οπότε το μη συζευγμένο πεπτίδιο απομακρύνθηκε ως υπερκείμενο ενώ τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα: 1M Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (blocking buffer). Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 13.200 rpm για 2 λεπτά, επαναιώρηση των σφαιριδίων σε 2 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος (blocking buffer) και ολονύκτια επώαση στους 4° C. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 13.200 rpm για 2 λεπτά, οπότε το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν 3 φορές με το ισοτονικό διάλυμα: 0,9% NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM PMSF, pH 7,3. Μετά την τελευταία πλύση, τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα BSA (250μg BSA/ ml ισοτονικού διαλύματος) και επώαστηκαν για 2 ώρες στους 4° C. Μετά την απόρριψη του διαλύματος BSA, το υλικό επαναιωρήθηκε σε ισοτονικό διάλυμα και αποθηκεύτηκε στους 4° C.

3.7.3 Καθαρισμός αντιορού

Σε 1,5 ml αντιορού προστέθηκε Tween-20 και PMSF σε τελική περιεκτικότητα 0,1% και τελική συγκέντρωση 0,5mM αντίστοιχα. Ο αντιορός τοποθετήθηκε στη στήλη, η οποία είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με 20ml διαλύματος PBS, και επώαστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν η στήλη εκπλύθηκε με 30ml διαλύματος PBST (PBS-0,1% Tween-20) για την απομάκρυνση των μη ειδικών συνδέσεων και εξισορροπήθηκε με 20ml διαλύματος PBS.

Η έκλουση του anti-ct αντισώματος που δεσμεύτηκε στη στήλη, έγινε με διάλυμα 0,2M γλυκίνης, 0,5M NaCl, pH 2,2. Συλλέχθηκαν 10 κλάσματα όγκου 1ml σε σωληνάρια στα οποία προϋπήρχαν 0,2 ml διαλύματος 1M Tris, pH 11,5, με στόχο την άμεση εξουδετέρωση των εκλουσμάτων. Η ποσότητα του αντισώματος σε κάθε κλάσμα ελέγχθηκε με τη μέθοδο Bradford (κεφάλαιο 3.4.3). Με βάση τις τιμές απορρόφησης στα 595nm, επιλέχθηκαν τα κλάσματα στα οποία εκλούστηκε το αντίσωμα και ενώθηκαν. Ακολούθησε διαπίδυση έναντι PBS επί 24 ώρες στους 4° C. Η μεμβράνη διαπίδυσης που χρησιμοποιήθηκε, είχε όριο μοριακού βάρους 12 kDa (Sigma). Κατόπιν, το αντίσωμα συλλέχθηκε ενώ η στήλη εκπλύθηκε με 30ml PBS, πληρώθηκε με διάλυμα PBS-0,02% NaN₃ και αποθηκεύτηκε στους 4° C.

3.8 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Κύτταρα HEK293 επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες τοποθετημένες σε πιάτο 24 θέσεων και διαμολύνθηκαν με το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA (κεφάλαιο 3.3). Μετά την ολονύκτια παραμονή των κυττάρων στον επωαστικό κλίβανο, ακολούθησε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού. Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από το πιάτο και τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα PBS 1X. Κατόπιν τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με την προσθήκη 300μl/καλυπτρίδα διαλύματος 4% παραφολμαδεύδης (PFA) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Μετά την απομάκρυνση της PFA, προστέθηκαν από 300 μl διαλύματος 50 mM NH₄Cl και τα κύτταρα επώαστηκαν για 15 λεπτά σε RT. Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με PBS 1X και επώαση με 300 μl διαλύματος 0,1% Triton για 6 λεπτά σε RT. Κατόπιν οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα PBS 1X και επώαστηκαν με 10% εμβρυικό ορό μόσχου (FCS) για 20 λεπτά σε R/T, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων (blocking). Ακολούθησε η επώαση κάθε καλυπτρίδας με το πρωτογενές αντίσωμα για 2,5 ώρες στους 37° C (Πίνακας 5). Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα PBS 1X και επώαστηκαν με 10% FCS για 5 λεπτά σε RT. Ακολούθησε η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 50 λεπτά σε RT. Οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν τέσσερις φορές με διάλυμα PBS 1X και τοποθετήθηκαν με την επιφάνεια των κυττάρων προς τα κάτω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο που είχε προηγουμένως τοποθετηθεί μία σταγόνα mounting medium (ibidi). Σφραγίστηκαν με την τοποθέτηση βερνικιού στην περιφέρειά τους και ακολούθησε παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με πηγή ακτινοβολίας Laser Argon (488nm)/Krypton (568nm) και λογισμικό Leica TCS.

1^ο ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	2^ο ΑΝΤΙΣΩΜΑ (αραίωση 1:200)
anti-ct (έναντι των αμινοξέων 87-109 της προθυμοσίνης, απομονωμένο από αντιγόρο με χρωματογραφία συγγένειας)	1:50	anti-Rabbit 488
anti-P1 (έναντι των αμινοξέων 5-30 της παραθυμοσίνης, απομονωμένο από αντιγόρο με χρωματογραφία συγγένειας)	1: 20	anti-Rabbit 488

Πίνακας 5: Αντισώματα και αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στον ανοσοφθορισμό.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Διερεύνηση ενζυμικής προσθήκης καταλοίπων γλουταμικού στις πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, οι πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν υποστρώματα των πολυγλουταμυλασών περιέχουν αλληλουχίες πλούσιες σε γλουταμικά κατάλοιπα. Η δράση πολλών από αυτές σχετίζεται με τη δομή της χρωματίνης (van Dijk *et al.*, 2008). Οι πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α (ProTa) και παραθυμοσίνη (ParaT) περιέχουν αντίστοιχες πολυ-E περιοχές και εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν τις εν λόγω πρωτεΐνες πιθανούς στόχους πολυγλουταμύλωσης.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες πράγματι τροποποιούνται, οι κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων SET, ProTa και ParaT κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης EGFP-C1. Οι χημεικές αυτές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση κυττάρων HEK293 σε συνδυασμό με την πολυγλουταμύλαση TTLL4 σε δύο μορφές, την ενεργή και την ανενεργή. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη πολυγλουταμύλαση μεταξύ των μελών της TTLL οικογένειας, λόγω της ικανότητάς της να τροποποιεί και άλλα υποστρώματα πέραν της τουμπουλίνης (Πίνακας 2). Η ενεργή μορφή του ενζύμου (TTLL4_C639-EYFP) αποτελείται από τα τελευταία 639 αμινοξικά κατάλοιπα της πλήρους αλληλουχίας (αμινοξέα 555-1193). Η ανενεργή μορφή της TTLL4_C639-EYFP φέρει τη μετάλλαξη E901G στην περιοχή πρόσδεσης ATP (van Dijk *et al.*, 2007).

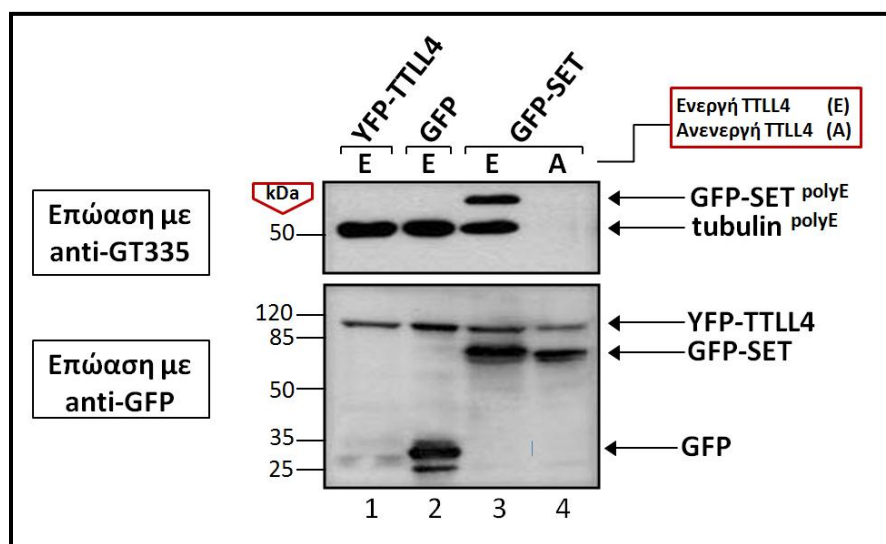
Η πολυγλουταμύλωση της πρωτεΐνης SET

Η GFP-SET εκφράστηκε σε κύτταρα HEK293 παρουσία της ενεργής (E) ή ανενεργής (A) πολυγλουταμύλασης TTLL4. Ως θετικός μάρτυρας πολυγλουταμύλωσης χρησιμοποιήθηκε η τροποποίηση των ενδογενών τουμπουλινών α και β από την ενεργή TTLL4. Επιπλέον, ως δείγμα ελέγχου τροποποίησης της GFP-SET, εκφράστηκε η πρωτεΐνη GFP παρουσία του ενεργού ενζύμου. Για την ανίχνευση της πολυγλουταμύλωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335 ενώ με το αντίσωμα που αναγνωρίζει την GFP ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9, μετά την έκφραση της ενεργής TTLL4, το αντίσωμα GT335 ανίχνευσε μόνο μία πρωτεϊνική ζώνη (~50kDa) η οποία αντιστοιχεί στις πολυγλουταμυλιωμένες τουμπουλίνες α και β (διαδρομή 1). Το ίδιο συνέβη και όταν συνδιαμολύνθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς που κωδικοποιούν την GFP πρωτεΐνη και την ενεργή TTLL4 (διαδρομή 2). Από τα παραπάνω επιβεβαιώνεται ότι η GFP δεν αποτελεί υπόστρωμα της πολυγλουταμύλασης. Ωστόσο, όταν εκφράστηκε η GFP-SET παρουσία της ενεργής TTLL4, το GT335 αποκάλυψε την

ύπαρξη μίας δεύτερης πρωτεϊνικής ζώνης πέραν της αναμενόμενης τουμπουλίνης (διαδρομή 3). Η ζώνη αυτή αντιστοιχεί στην πολυγλουταμυλιωμένη GFP-SET. Αντίθετα, όταν εκφράστηκε η GFP-SET παρουσία του ανενεργού ενζύμου, το GT335 δεν αναγνώρισε καμία τροποποιημένη πρωτεΐνη (διαδρομή 4). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης της GFP-SET παρουσία ενεργής (διαδρομή 3) και ανενεργής TTLL4 (διαδρομή 4) είναι μεταξύ τους συγκρίσιμα, όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση του anti-GFP αντισώματος. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη SET αποτελεί στόχο πολυγλουταμυλίωσης.

Τέλος, μετά την επώαση με το anti-GFP αντίσωμα, διαπιστώθηκε μία μικρή διαφορά ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης. Η πολυγλουταμυλιωμένη GFP-SET κινείται πιο αργά (διαδρομή 3) σε σχέση με την μη τροποποιημένη (διαδρομή 4). Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αλλαγή του μοριακού της βάρους ως αποτέλεσμα προσθήκης γλουταμικών καταλοίπων.

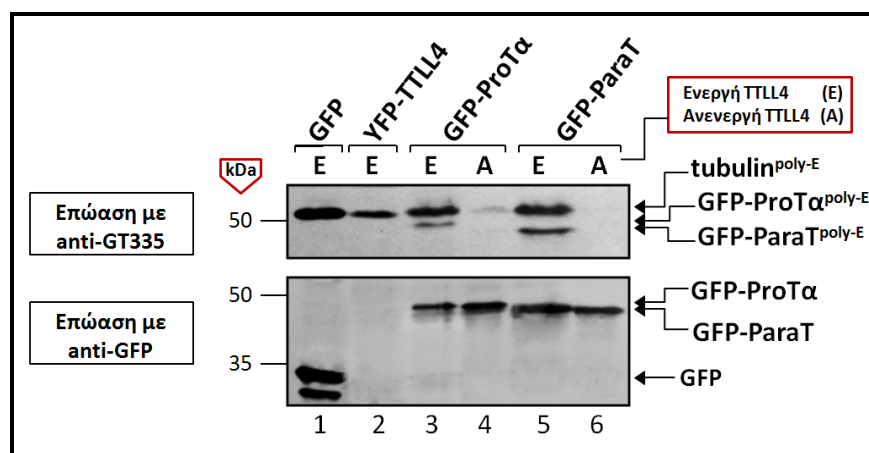


Εικόνα 9: Ανίχνευση πολυγλουταμυλίωσης της πρωτεΐνης SET. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν η ενεργή πολυγλουταμυλάση TTLL4 (διαδρομή 1), η πρωτεΐνη GFP παρουσία της ενεργής TTLL4 (διαδρομή 2) και η GFP-SET παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TTLL4 (διαδρομές 3, 4). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE 10% και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για την ανίχνευση της πολυγλουταμυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ελέγχθηκαν με αντίσωμα έναντι της GFP πρωτεΐνης. Οι τουμπουλίνες α και β , που αποτελούν το κύριο υπόστρωμα των πολυγλουταμυλασών λειτουργούν ως θετικός μάρτυρας της τροποποίησης και εμφανίζονται ως μία ενιαία ζώνη στην περιοχή των 50 kDa.

Η πολυγλουταμυλίωση των πρωτεϊνών ProTa και ParaT

Οι χμαιοτικές πρωτεΐνες GFP-ProTa και GFP-ParaT εκφράστηκαν σε κύτταρα HEK293 παρουσία της ενεργής ή ανενεργής πολυγλουταμυλάσης TTLL4. Όπως και στην περίπτωση της GFP-SET, ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι τουμπουλίνες α και β καθώς και η πρωτεΐνη GFP παρουσία της ενεργής TTLL4. Αντίστοιχα, η ανίχνευση των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών έγινε με το ειδικό για την τροποποίηση αντίσωμα GT335 ενώ τα επίπεδα έκφρασης των εν λόγω πρωτεϊνών αναλύθηκαν με αντίσωμα έναντι της GFP.

Ειδικότερα, όταν εκφράστηκε μόνο η ενεργή πολυγλουταμυλάση TTLL4, το αντίσωμα GT335 ανίχνευσε την πολυγλουταμυλιωμένη τουμπουλίνη, όπως αναμενόταν (Εικόνα 10, διαδρομή 2). Όταν πραγματοποιήθηκε συνδυαστική έκφραση της πρωτεΐνης GFP και της ενεργής TTLL4, το GT335 αναγνώρισε μόνο την πολυγλουταμυλιωμένη τουμπουλίνη (διαδρομή 1). Ωστόσο, όταν εκφράστηκε η GFP-ProTa παρουσία της ενεργής TTLL4, το GT335 ανίχνευσε δύο πρωτεϊνικές ζώνες (διαδρομή 3). Η μία ζώνη αντιστοιχεί στην πολυγλουταμυλιωμένη τουμπουλίνη και η δεύτερη στην πολυγλουταμυλιωμένη GFP-ProTa. Αντίθετα, όταν στα κύτταρα εκφράστηκε η GFP-ProTa παρουσία της ανενεργής TTLL4, το GT335 δεν αναγνώρισε καμία πρωτεΐνη (διαδρομή 4). Τα επίπεδα έκφρασης της GFP-ProTa όπως ανιχνεύθηκαν με το anti-GFP αντίσωμα είναι παρόμοια παρουσία είτε του ενεργού είτε του ανενεργού ενζύμου. Από τα παραπάνω υποδεικνύεται ότι η προθυμοσίνη α τροποποιείται μετα-μεταφραστικά μέσω πολυγλουταμυλίωσης. Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν όταν εκφράστηκε η GFP-ParaT παρουσία της ενεργής TTLL4 (Εικόνα 10, διαδρομή 5). Επομένως, τόσο η προθυμοσίνη α όσο και η παραθυμοσίνη αποτελούν υπόστρωμα της πολυγλουταμυλάσης TTLL4.



Εικόνα 10: Ανίχνευση πολυγλουταμυλίωσης των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν η GFP πρωτεΐνη παρουσία της ενεργής πολυγλουταμυλάσης TLL4 (διαδρομή 1), η ενεργή TLL4 (διαδρομή 2), η GFP-ProTα παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TLL4 (διαδρομές 3, 4) και η GFP-ParaT παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TLL4 (διαδρομές 5, 6). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση και οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η πολυγλουταμυλίωση ελέγχθηκε με το αντίσωμα GT335 και η έκφραση των πρωτεϊνών με αντίσωμα έναντι της GFP πρωτεΐνης. Οι τουμπουλίνες α και β αποτελούν θετικό μάρτυρα της τροποποίησης.

4.2 Ταυτοποίηση αυτόνομων περιοχών πολυγλουταμυλίωσης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη περιλαμβάνουν περιοχές πλούσιες σε γλουταμικά κατάλοιπα. Όσον αφορά τις πρωτεΐνες ProTα και ParaT, οι πολυ-E περιοχές εντοπίζονται στο κεντρικό τμήμα των αλληλουχιών τους ενώ στην περίπτωση της SET στο καρβοξυτελικό άκρο.

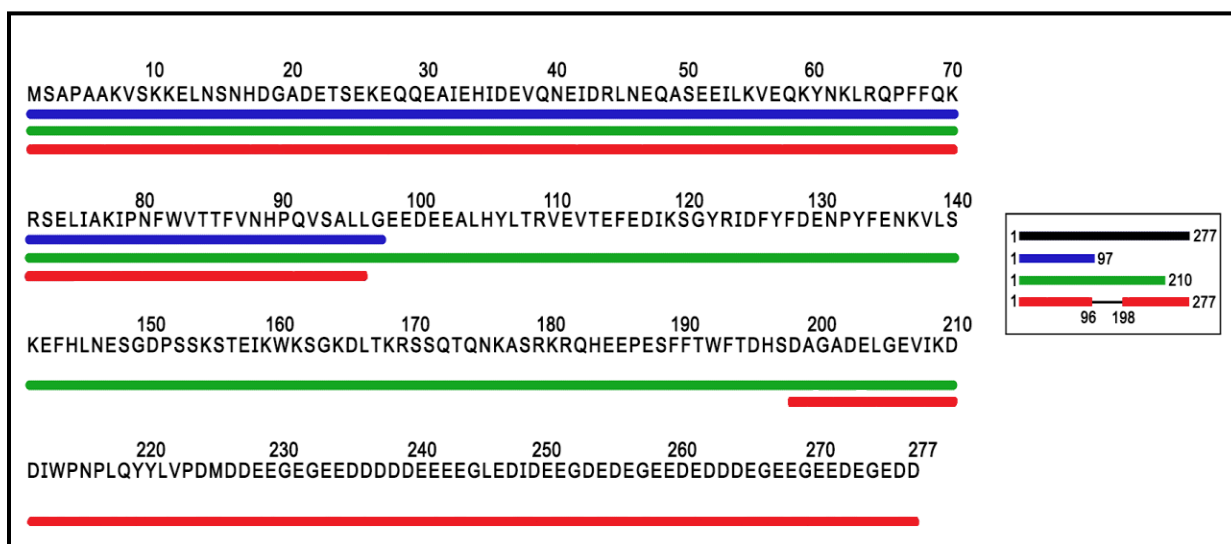
Στην παρούσα εργασία, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού αυτόνομων περιοχών πολυγλουταμυλίωσης σε καθεμία πρωτεΐνη ώστε να διαπιστωθεί εάν οι εν λόγω περιοχές αναγνωρίζονται από την πολυγλουταμυλάση TLL4 και συνιστούν θέσεις τροποποίησης. Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν για την αντίδραση της πολυγλουταμυλίωσης απαιτείται το σύνολο των περιοχών αυτών ή επιμέρους τμήματά τους. Προκειμένου να απαντηθούν τα ερωτήματα αυτά, δημιουργήθηκαν χιμαιρικές κατασκευές αποτελούμενες από τμήματα των αλληλουχιών των SET, ProTα και ParaT συζευγμένα με την GFP πρωτεΐνη.

4.2.1 Περιοχές πολυγλουταμυλίωσης στην SET

Η πρωτεΐνη SET αποτελείται από 277 αμινοξικά κατάλοιπα. Τα όξινα αμινοξέα (αμινοξέα 226-277) συγκεντρώνονται στην καρβοξυτελική περιοχή ενώ στο κέντρο του μορίου εντοπίζεται η NAP περιοχή (αμινοξέα 97-197). Οι χημικικές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 11), σχεδιάστηκαν έτσι ώστε:

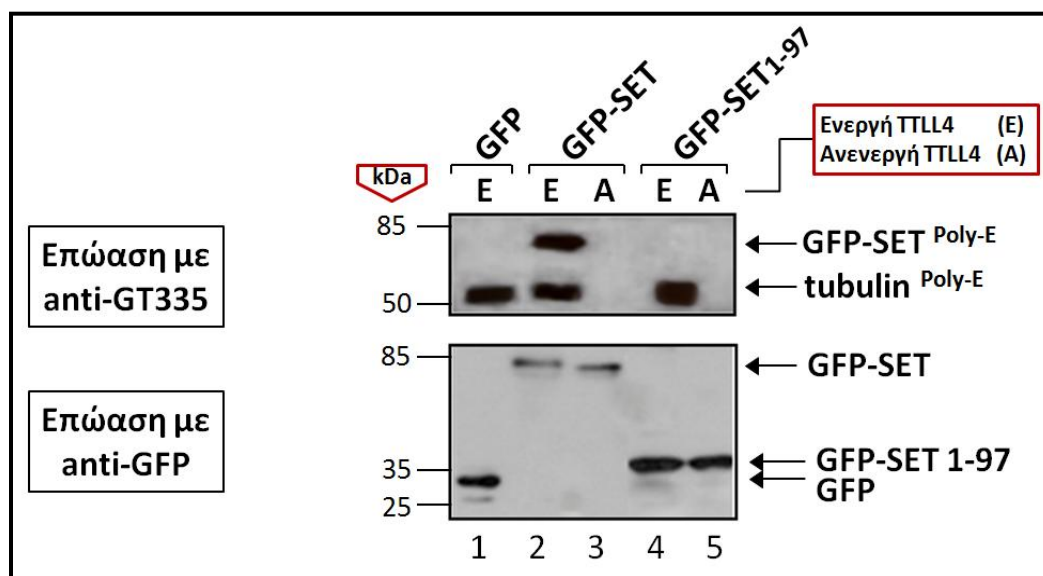
- 1) να απουσιάζει η όξινη περιοχή (**GFP-SET₁₋₂₁₀**),
- 2) να απουσιάζει η NAP περιοχή (**GFP-SET_{Δ97-197}**),
- 3) να εκφράζεται μόνο το αμινοτελικό τμήμα (**GFP-SET₁₋₉₇**).

Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση κυττάρων HEK293 σε συνδυασμό με την ενεργή ή ανενεργή πολυγλουταμυλάση TTL4. Για την ανίχνευση της πολυγλουταμυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335 και για τον προσδιορισμό έκφρασης των πρωτεϊνών το αντίσωμα έναντι της GFP.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών της SET που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των χημικών πρωτεϊνών. Η πλήρης αλληλουχία της SET αποτελείται από 277 αμινοξέα (NP_003002.2). Οι χημικικές κατασκευές περιλαμβάνουν την GFP πρωτεΐνη συζευγμένη με τμήματα της SET: SET₁₋₉₇, SET₁₋₂₁₀ και SET_{Δ97-197}.

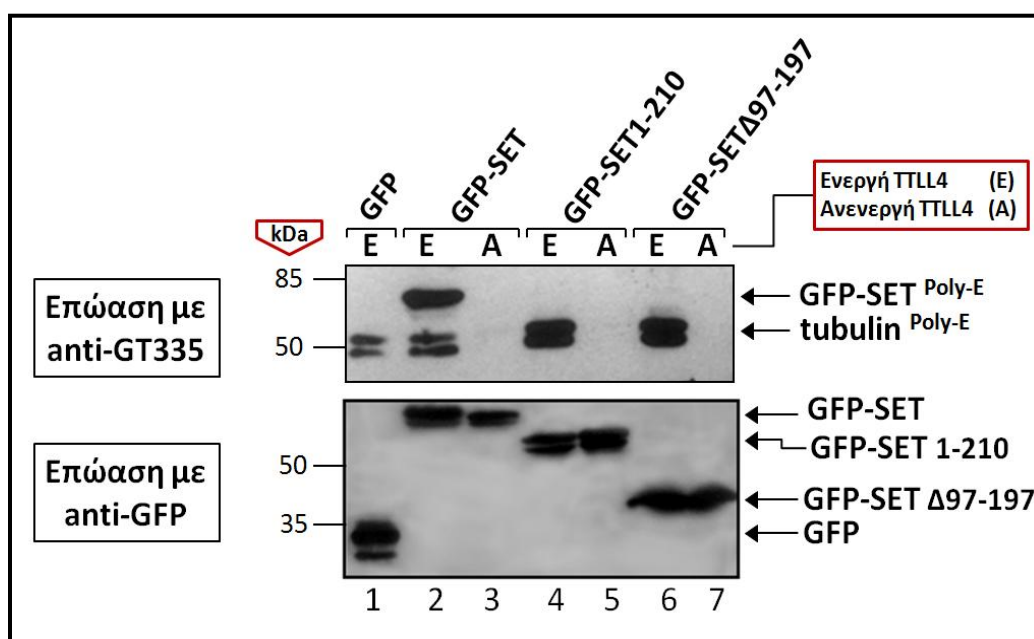
Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή GFP-SET₁₋₉₇ η οποία εκφράστηκε παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TTLL4 (Εικόνα 12, διαδρομές 4, 5) και τα επίπεδα έκφρασης της ελέγχθησαν με το anti-GFP αντίσωμα. Όπως διαπιστώθηκε, η GFP-SET₁₋₉₇ (διαδρομές 4, 5) εκφράστηκε σε αντίστοιχα επίπεδα με τη GFP-SET (διαδρομές 2, 3) και την πρωτεΐνη GFP (διαδρομή 1). Από τη χρήση του αντισώματος GT335, φάνηκε ότι παρουσία του ενεργού ενζύμου η GFP-SET₁₋₉₇ δεν πολυγλουταμυλιώνεται (διαδρομή 4) ενώ αντίθετη ήταν η εικόνα της GFP-SET παρουσία της ενεργής TTLL4 (διαδρομή 2). Επομένως, η αμινοξική περιοχή 1-97 της SET δεν αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα πολυγλουταμυλίωσης. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με την απουσία όξινων περιοχών από το συγκεκριμένο (αμινοτελικό) τμήμα της πρωτεΐνης. Παράλληλα, επιβεβαιώνεται ότι οι περιοχές-στόχοι της TTLL4 εντοπίζονται στο κεντρικό και καρβοξυτελικό τμήμα της SET (αμινοξέα 98-277).



Εικόνα 12: Οι θέσεις πολυγλουταμυλίωσης της SET περιλαμβάνονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 98-277. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν η GFP πρωτεΐνη παρουσία της ενεργής πολυγλουταμυλάσης TTLL4 (διαδρομή 1), η GFP-SET παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TTLL4 (διαδρομές 2, 3) και η GFP-SET₁₋₉₇ παρουσία του ενεργού ή ανενεργού ενζύμου (διαδρομές 4, 5). Για την ανίχνευση της πολυγλουταμυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335 ενώ τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ελέγχθησαν με αντίσωμα έναντι της GFP.

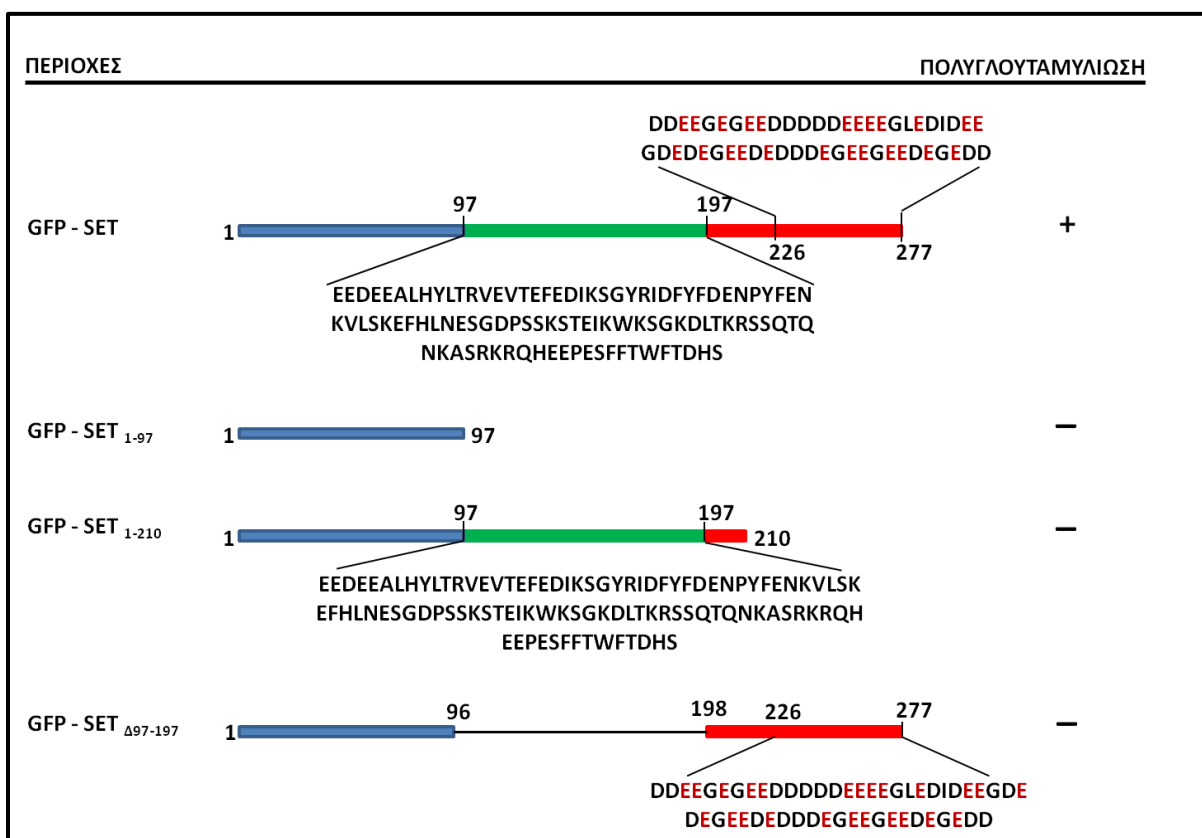
Κατόπιν, ο προσδιορισμός των περιοχών πολυγλουταμυλίωσης επικεντρώθηκε σε δύο βασικές περιοχές. Η μία αφορά την κεντρική NAP περιοχή και η δεύτερη την όξινη περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές GFP-SET₁₋₂₁₀ από την οποία απουσιάζει το καρβοξυτελικό τμήμα καθώς και η GFP-SET_{Δ97-197} από την οποία απουσιάζει η περιοχή NAP. Σε συμφωνία με όλα τα παραπάνω πειράματα, οι χημεικές κατασκευές εκφράστηκαν παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TTLL4 ενώ ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν η GFP πρωτεΐνη και η GFP-SET (Εικόνα 13).

Αρχικά, όταν εκφράστηκε η GFP-SET₁₋₂₁₀ παρουσία της ενεργής TTLL4, το GT335 αναγνώρισε μόνο την πολυγλουταμυλιωμένη τουμπουλίνη α και β (διαδρομή 4). Άρα, όταν απουσιάζει η όξινη αλλά διατηρείται η NAP περιοχή, η πρωτεΐνη χάνει την ικανότητά της να πολυγλουταμυλιώνεται. Το ίδιο αρνητικό αποτέλεσμα προέκυψε όταν εκφράστηκε η GFP-SET_{Δ97-197} παρουσία του ενεργού ενζύμου (διαδρομή 6) δηλαδή αν απουσιάζει η NAP περιοχή αλλά διατηρείται η όξινη, η πρωτεΐνη αδυνατεί να τροποποιηθεί. Ως εκ τούτου, τόσο η GFP-SET₁₋₂₁₀ όσο και η GFP-SET_{Δ97-197} δεν αποτελούν στόχο της τροποποίησης. Αντίθετα, η GFP-SET ανιχνεύθηκε πολυγλουταμυλιωμένη παρουσία της ενεργής TTLL4, όπως αναμενόταν (διαδρομή 2). Συνοψίζοντας, από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι για την πολυγλουταμυλίωση της πρωτεΐνης SET, απαιτείται ο συνδυασμός της NAP περιοχής και του όξινου, πολυ-E τμήματος.



Εικόνα 13: Ταυτοποίηση των περιοχών της SET που είναι απαραίτητες για την πολυγλουταμυλίωση. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν η GFP πρωτεΐνη παρουσία της ενεργής

πολυγλουταμύλασης TTLL4 (διαδρομή 1), η GFP-SET παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TTLL4 (διαδρομές 2, 3), η GFP-SET₁₋₂₁₀ και η GFP-SET_{Δ97-197} παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TTLL4 (διαδρομές 4, 5 και 6,7 αντίστοιχα). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για την ανίχνευση της πολυγλουταμύλωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335 ενώ τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ελέγχθησαν με αντίσωμα έναντι της GFP. Η GFP-SET και οι τουμπουλίνες α και β λειτουργούν ως θετικοί μάρτυρες της τροποποίησης.



Εικόνα 14: Οι επιμέρους περιοχές της SET και η συμμετοχή τους στην πολυγλουταμύλωση. Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών της SET: αμινοτελική περιοχή: αμινοξέα 1-97, NAP περιοχή: αμινοξέα 97-197 και καρβοξυτελική περιοχή: αμινοξέα 198-277.

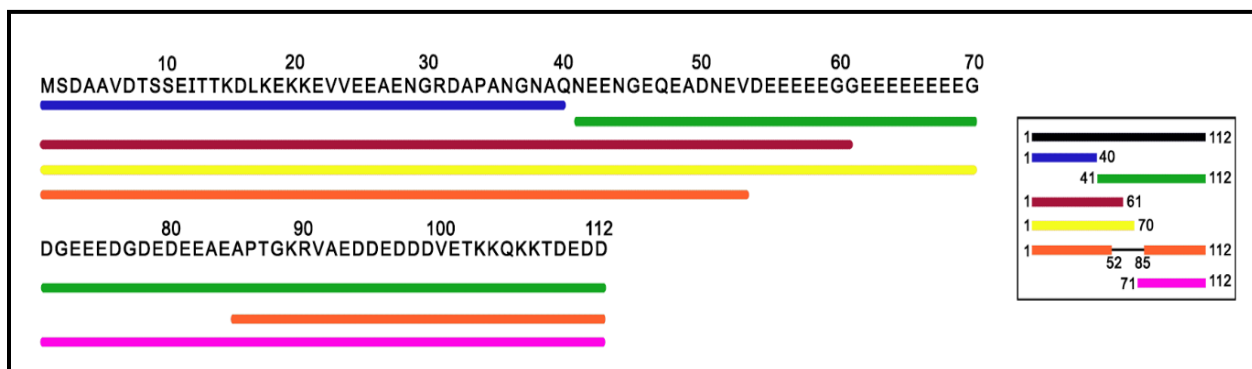
4.2.2 Περιοχές πολυγλουταμύλωσης στην προθυμοσίνη α

Επόμενο βήμα στην παρούσα εργασία ήταν η διερεύνηση της μετα-μεταφραστικής προσθήκης γλουταμικού στις πρωτεΐνες προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη. Ενώ στην περίπτωση της SET οι πολυ-E περιοχές συγκεντρώνονται στο καρβοξυτελικό της άκρο, στις πρωτεΐνες ProTa και ParaT αποτελούν τμήματα της κεντρικής αμινοξικής περιοχής. Ειδικότερα, η προθυμοσίνη α αποτελείται από 112 αμινοξέα, εκ των οποίων οι θέσεις 1-40 αποτελούν το

αμινοτελικό της τμήμα ενώ η όξινη περιοχή βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 53-84. Οι χημειρικές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 15), σχεδιάστηκαν έτσι ώστε:

- 1) να υπάρχει μόνο η αμινοτελική περιοχή (**GFP-ProTα₁₋₄₀**),
- 2) να απουσιάζει η αμινοτελική περιοχή (**GFP-ProTα₄₁₋₁₁₂**),
- 3) να απουσιάζει η όξινη περιοχή (**GFP-ProTα_{Δ53-84}**),
- 4) να εκφράζεται το αμινοτελικό ή το καρβοξυτελικό άκρο με επιμέρους τμήματα της όξινης περιοχής (**GFP-ProTα₁₋₆₁**, **GFP-ProTα₁₋₇₀**, **GFP-ProTα₇₁₋₁₁₂**).

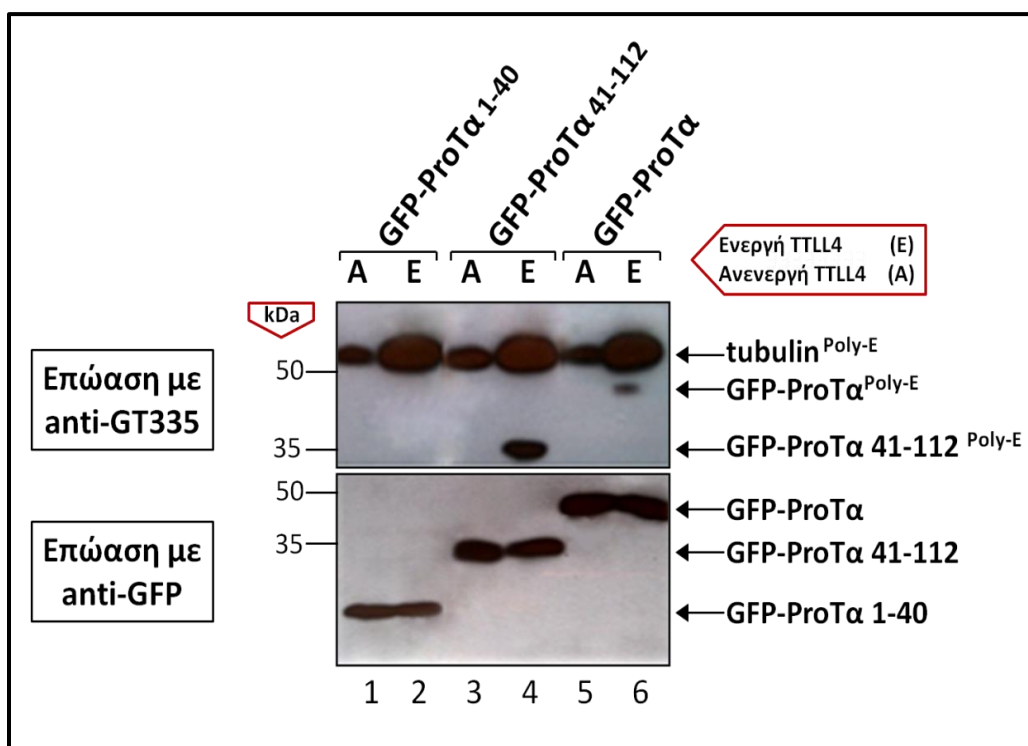
Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση κυττάρων HEK293 σε συνδυασμό με την ενεργή ή ανενεργή μορφή της πολυγλουταμυλάσης TTLL4. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα: α) GT335 για την ανίχνευση της πολυγλουταμυλίωσης και β) anti-GFP για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών της προθυμοσίνης α που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των χημειρικών πρωτεϊνών. Η πλήρης αλληλουχία της ProTα αποτελείται από 112 αμινοξέα (NP_068508.1). Οι χημειρικές κατασκευές περιλαμβάνουν την GFP πρωτεΐνη συζευγμένη με τμήματα της ProTα: ProTα₁₋₄₀, ProTα₄₁₋₁₁₂, ProTα₁₋₆₁, ProTα₁₋₇₀, ProTα_{Δ53-84} και ProTα₇₁₋₁₁₂.

Αρχικά, εκφράστηκαν οι GFP-ProTα₁₋₄₀, GFP-ProTα₄₁₋₁₁₂ και GFP-ProTα, παρουσία της ενεργής ή ανενεργής πολυγλουταμυλάσης TTLL4 (Εικόνα 16). Αναφορικά με τη χημειρική πρωτεΐνη GFP-ProTα₁₋₄₀ παρουσία της ενεργής TTLL4, βρέθηκε ότι μόνο η τουμπουλίνη φέρει προσθήκη γλουταμικών (διαδρομή 1). Ωστόσο, όταν εκφράστηκε η GFP-ProTα₄₁₋₁₁₂ παρουσία της ενεργής TTLL4, το GT335 ανίχνευσε δύο πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες αντιστοιχούν στις πολυγλουταμυλιωμένες πρωτεΐνες τουμπουλίνη και GFP-ProTα₄₁₋₁₁₂ (διαδρομή 4). Η ανίχνευση

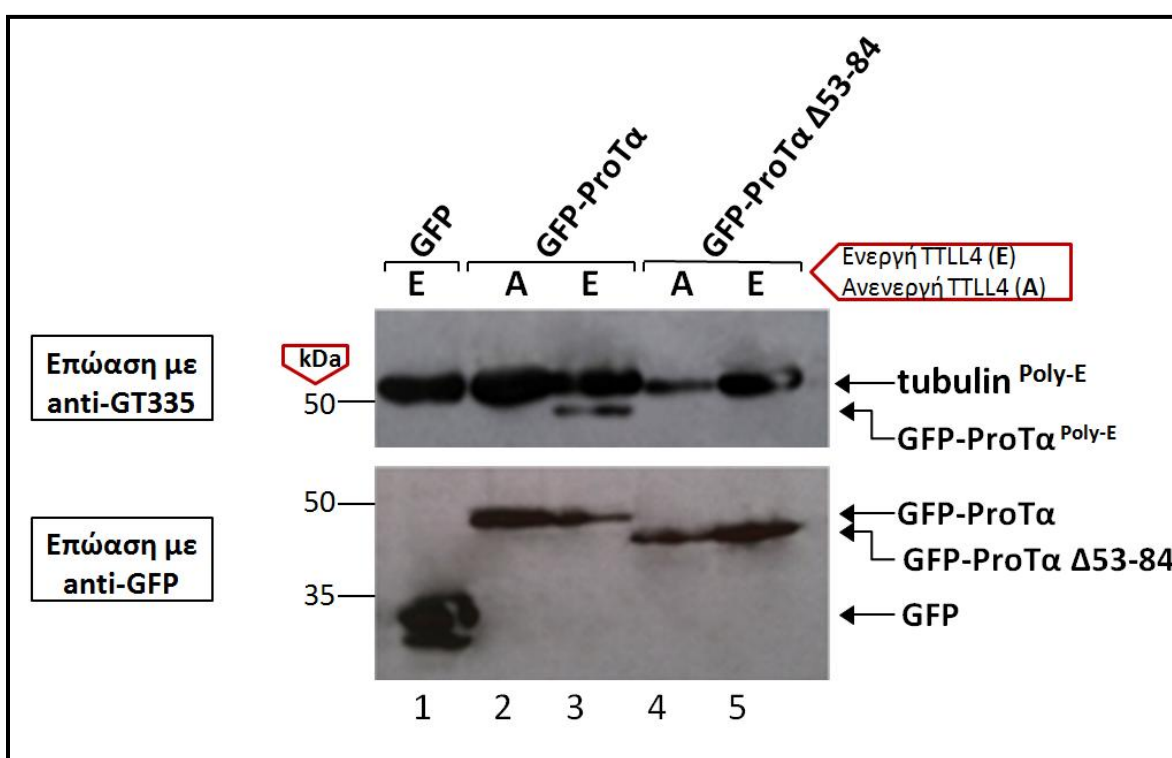
πολυγλουταμυλίωσης της GFP-ProTα παρουσία του ενεργού ενζύμου, χρησίμευσε ως θετικός μάρτυρας της τροποποίησης (διαδρομή 6). Τα επίπεδα της πολυγλουταμυλιωμένης τουμπουλίνης που ανιχνεύθηκαν όταν στα κύτταρα εκφράστηκε η ανενεργή TTLL4 (διαδρομές 1, 3, 5) οφείλονται στην παρουσία μικρών ποσοτήτων ενδογενών πολυγλουταμυλασών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η περιοχή της προθυμοσίνης α που απαιτείται για την πολυγλουταμυλίωσή της βρίσκεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 41-112.



Εικόνα 16: Οι θέσεις πολυγλουταμυλίωσης της προθυμοσίνης α περιλαμβάνονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 41-112. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν παρουσία της ενεργής η ανενεργής TTLL4, οι πρωτεΐνες GFP-ProTα₁₋₄₀ (διαδρομές 1, 2), GFP-ProTα₄₁₋₁₁₂ (διαδρομές 3, 4) και GFP-ProTα (διαδρομές 5, 6). Για την ανίχνευση της πολυγλουταμυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ελέγχθηκαν με αντίσωμα έναντι της GFP. Οι τουμπουλίνες α και β αποτελούν θετικούς μάρτυρες της τροποποίησης.

Κατόπιν, εξετάστηκε εάν η όξινη περιοχή της ProTα (αμινοξέα 53-84) που περιλαμβάνεται στην χμαιρική πρωτεΐνη GFP-ProTα₄₁₋₁₁₂ είναι αυτή που τροποποιείται (Εικόνα 17). Για το σκοπό αυτό, η GFP-ProTα_{Δ53-84} από την οποία απουσιάζει η όξινη περιοχή εκφράστηκε σε κύτταρα παρουσία της ανενεργής ή ενεργής TTLL4 (Εικόνα 17, διαδρομές 4, 5). Ως αρνητικός

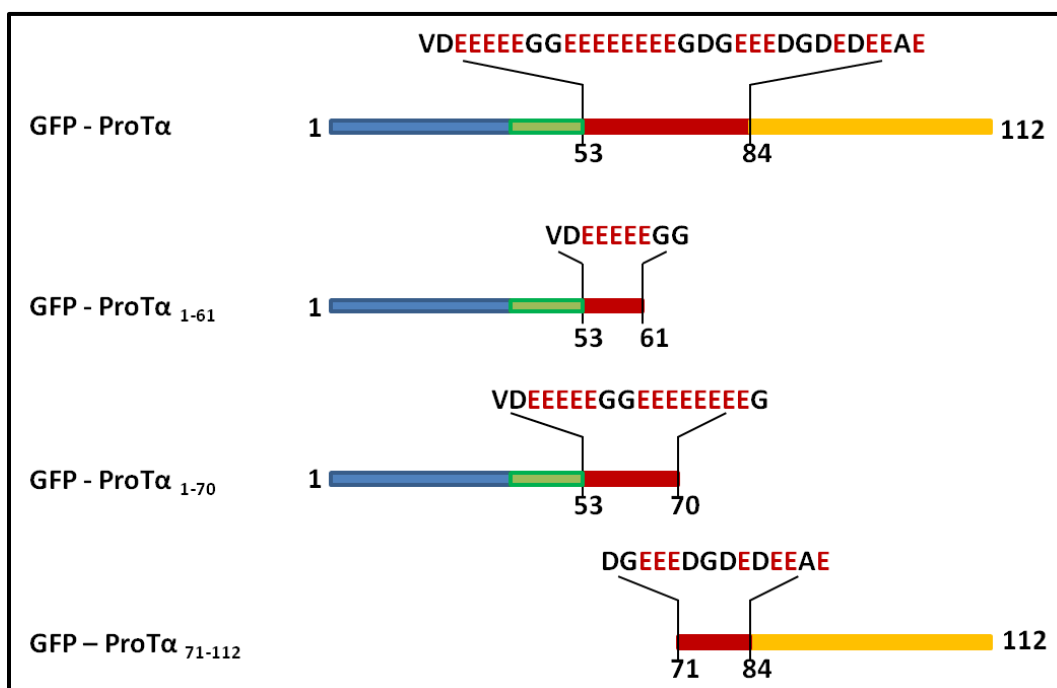
μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GFP (διαδρομή 1) και ως θετικός η GFP-ProTa (διαδρομές 2, 3). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η GFP-ProTa $_{\Delta 53-84}$ δεν πολυγλουταμυλιώνεται εφόσον το GT335 δεν αναγνώρισε καμία πρωτεΐνη πέραν της τουμπουλίνης παρουσία του ενεργού ενζύμου (διαδρομή 5). Παρουσία του ανενεργού ενζύμου το GT335 ανίχνευσε χαμηλά επίπεδα τουμπουλίνης λόγω των ενδογενών πολυγλουταμυλασών (διαδρομή 4). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η όξινη περιοχή (αμινοξέα 53-84) περιλαμβάνει θέσεις που αναγνωρίζονται από την πολυγλουταμυλάση.



Εικόνα 17: Η όξινη περιοχή της προθυμοσίνης *a* αποτελεί υπόστρωμα πολυγλουταμυλίωσης. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν η GFP πρωτεΐνη παρουσία της ενεργής πολυγλουταμυλάσης TLL4 (διαδρομή 1), η GFP-ProTa και η GFP-ProTa $_{\Delta 53-84}$ παρουσία της ανενεργής ή ενεργής TLL4 (διαδρομές 2, 3 και 4,5). Για την ανίχνευση της πολυγλουταμυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335. Η έκφραση των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με αντίσωμα έναντι της GFP.

Εφόσον διαπιστώθηκε ότι η πολυ-Ε περιοχή 53-84 απαιτείται για την πολυγλουταμυλίωση της προθυμοσίνης α, εξετάστηκε εάν η τροποποίηση εντοπίζεται σε επιμέρους τμήμα της περιοχής αυτής. Η όξινη περιοχή περιλαμβάνει τρεις υποπεριοχές με διαδοχικά γλουταμικά κατάλοιπα ($^{53}\text{VDEEEEEEGG}^{61}$, $^{53}\text{VDEEEEEEGGEEEEEEEG}^{70}$ και $^{71}\text{DGEEEDGDEDEEAE}^{112}$). Στα πλαίσια περαιτέρω ανάλυσης της εν λόγω περιοχής, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω χημεικές κατασκευές που απεικονίζονται σχηματικά στην Εικόνα 18:

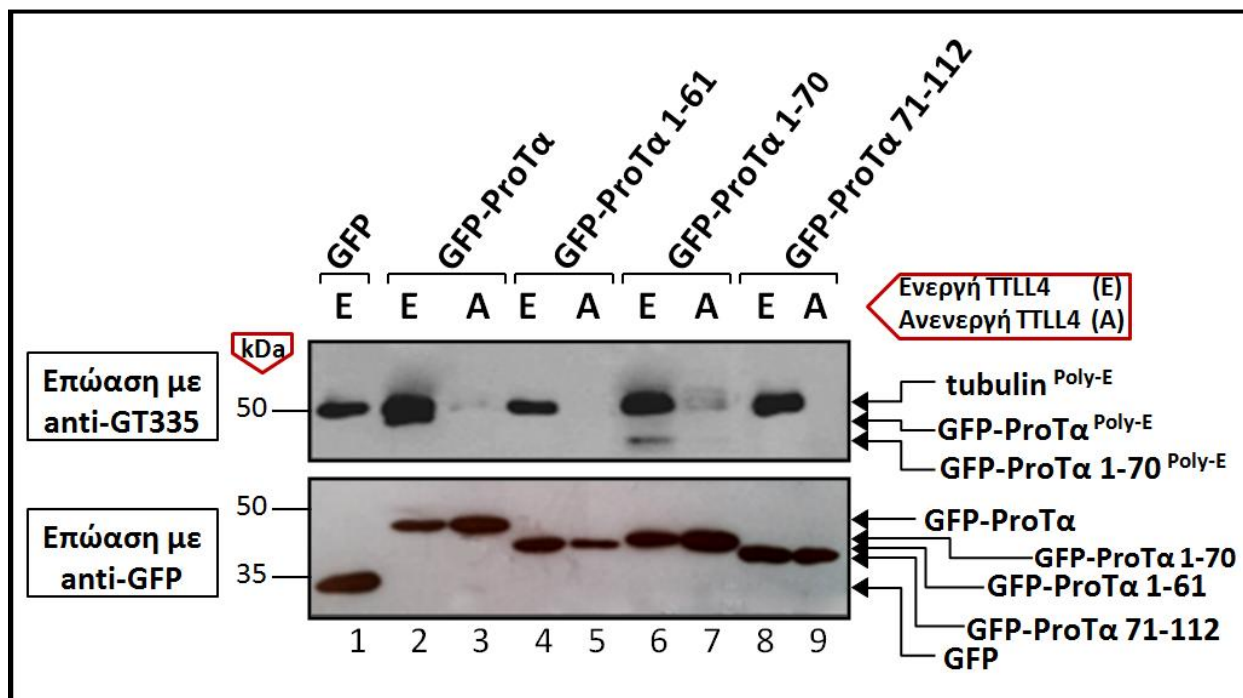
- α) GFP-ProTα₁₋₆₁, αμινοξέα $^{53}\text{VDEEEEEEGG}^{61}$
- β) GFP-ProTα₁₋₇₀, αμινοξέα $^{53}\text{VDEEEEEEGGEEEEEEEG}^{70}$
- γ) GFP-ProTα₇₁₋₁₁₂, αμινοξέα $^{71}\text{DGEEEDGDEDEEAE}^{112}$.



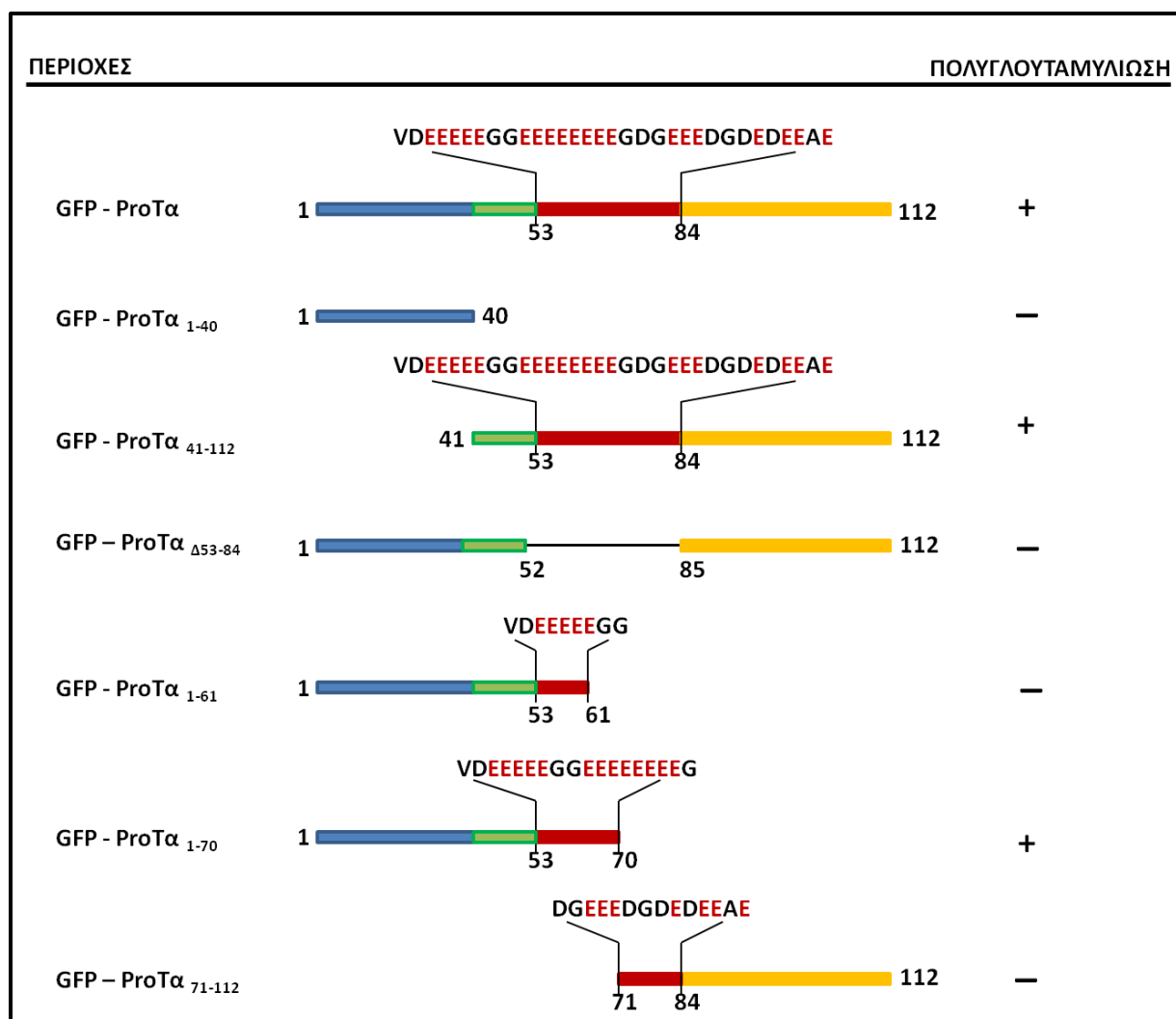
Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων της όξινης περιοχής της προθυμοσίνης α που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση πολυγλουταμυλίωσης.

Πιο συγκεκριμένα, όταν εκφράστηκαν οι παραπάνω χημεικές πρωτεΐνες (GFP-ProTα₁₋₆₁, GFP-ProTα₁₋₇₀ και η GFP-ProTα₇₁₋₁₁₂) παρουσία της ενεργής TLL4 (διαδρομές 4, 6, 8) το αντίσωμα της πολυγλουταμυλίωσης ανίχνευσε την ύπαρξη τροποποίησης μόνο στην περίπτωση της GFP-ProTα₁₋₇₀ (διαδρομή 6). Συνεπώς, η συγκεκριμένη περιοχή της πρωτεΐνης αποτελεί υπόστρωμα της πολυγλουταμυλίωσης. Από την ανάλυση των υποπεριοχών προέκυψε ότι η αλληλουχία $^{53}\text{VDEEEEEEGG}^{61}$ δεν επαρκεί για την τροποποίηση της προθυμοσίνης α.

Απαιτούνται επιπλέον τα αμινοξικά κατάλοιπα 62 EEEEEEG 70 ώστε η πρωτεΐνη να πολυγλουταμλιωθεί. Επίσης, η περιοχή 71 DGEEEDGDEDEEEAE 112 δεν υφίσταται τροποποίηση. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται συνοπτικά στην Εικόνα 20.



Εικόνα 19: Τα αμινοξέα 62-70 της όξινης περιοχής της προθυμοσίνης α περιλαμβάνουν τις θέσεις τροποποίησης από την πολυγλουταμύλαση TLL4. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν η GFP πρωτεΐνη παρουσία της ενεργής πολυγλουταμύλασης TLL4 (διαδρομή 1), και οι πρωτεΐνες GFP-ProTα (διαδρομές 2, 3), GFP-ProTα $_{1-61}$ (διαδρομές 4, 5), GFP-ProTα $_{1-70}$ (διαδρομές 6, 7) και GFP-ProTα $_{71-112}$ (διαδρομές 8, 9) παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TLL4. Για την ανίχνευση της πολυγλουταμύλωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335. Η έκφραση των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με αντίσωμα έναντι της GFP. Οι τουμπουλίνες α και β , αποτελούν θετικούς μάρτυρες της τροποποίησης.

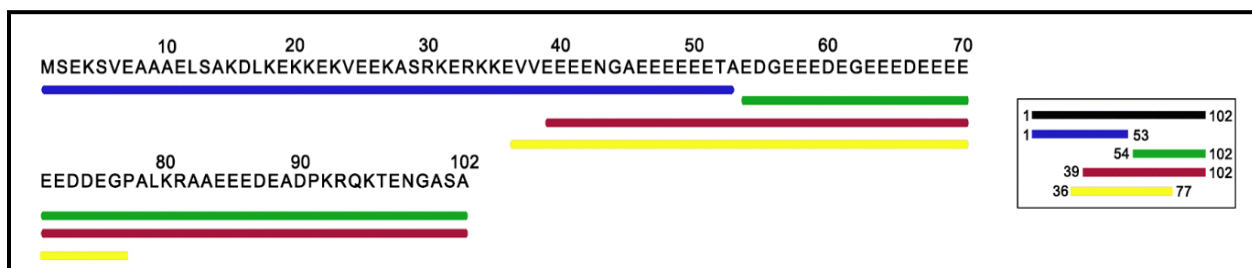


Εικόνα 20: Οι επιμέρους περιοχές της προθυμοσίνης α και η συμμετοχή τους στην πολυγλουταμυλίωση. Απεικονίζονται σχηματικά οι δομικές περιοχές της ProTα: αμινοτελική περιοχή: αμινοξέα 1-40 , κεντρική μη όξινη περιοχή: αμινοξέα 41-52, κεντρική όξινη περιοχή: αμινοξέα 53-84 και καρβοξυτελική περιοχή: αμινοξέα 85-112.

4.2.3 Περιοχές πολυγλουταμυλίωσης στην παραθυμοσίνη

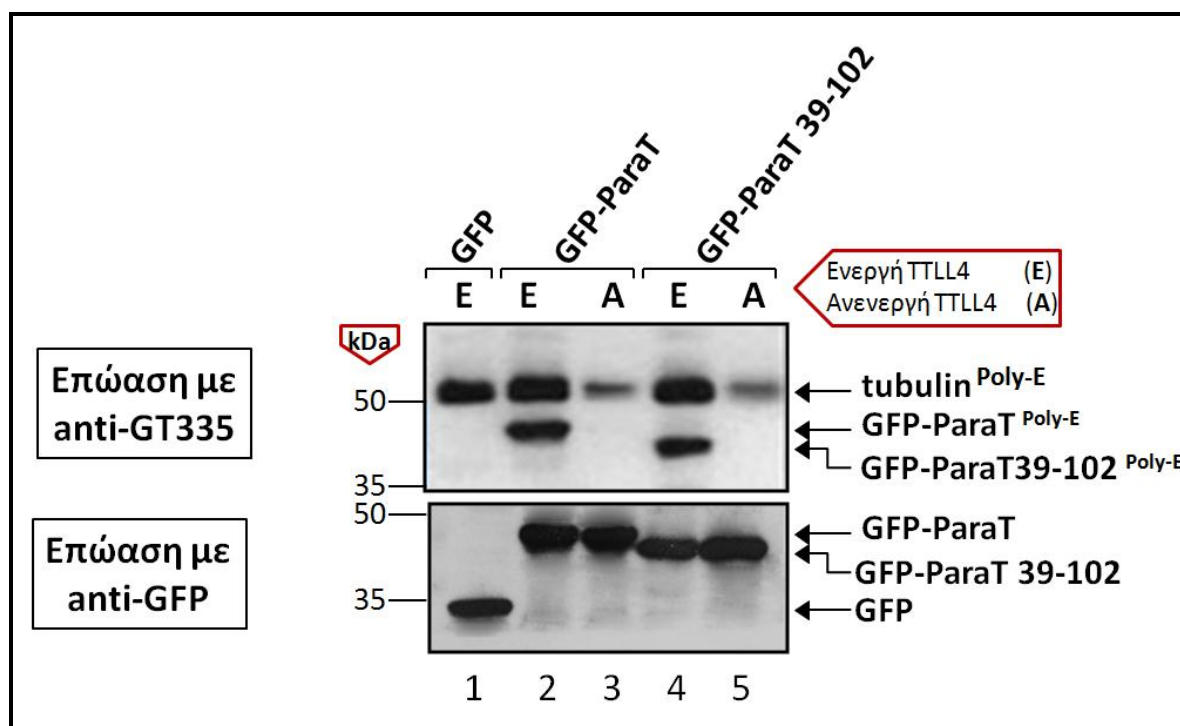
Η μελέτη της πολυγλουταμυλίωσης συνεχίστηκε με την πρωτεΐνη παραθυμοσίνη. Πρόκειται για ένα ιδιαίτερα όξινο μόριο, που εμφανίζει υψηλή ομολογία με την προθυμοσίνη α και περιλαμβάνει την όξινη περιοχή στο κέντρο του μορίου του. Πιο συγκεκριμένα, η παραθυμοσίνη αποτελείται από 102 αμινοξέα, το αμινοτελικό τμήμα της εντοπίζεται στις θέσεις 1-38 και η όξινη περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 36-77. Οι χιμαιρικές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της πολυγλουταμυλίωσης (Εικόνα 21), σχεδιάστηκαν έτσι ώστε:

- 1) να απουσιάζει η αμινοτελική περιοχή (**GFP-ParaT₃₉₋₁₀₂**)
- 2) να υπάρχει αποκλειστικά η όξινη περιοχή (**GFP-ParaT₃₆₋₇₇**)
- 3) να εκφράζεται το αμινοτελικό άκρο με τμήμα της όξινης περιοχής (**GFP-ParaT₁₋₅₃**) ή το καρβοξυτελικό άκρο με ένα διαφορετικό τμήμα της όξινης περιοχής (**GFP-ParaT₅₄₋₁₀₂**).



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών της παραθυμοσίνης που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των χιμαιρικών πρωτεϊνών. Η πλήρης αλληλουχία της ParaT αποτελείται από 102 αμινοξέα (AAA61185.1). Οι χιμαιρικές κατασκευές περιλαμβάνουν την GFP πρωτεΐνη συζευγμένη με τμήματα της ParaT : ParaT₁₋₅₃, ParaT₅₄₋₁₀₂, ParaT₃₉₋₁₀₂ και ParaT₃₆₋₇₇.

Έπειτα από συνδιαμόλυνση των πλασμιδιακών φορέων που κωδικοποιούν την GFP-ParaT₃₉₋₁₀₂ και την ενεργή TTLL4, το αντίσωμα GT335 αναγνώρισε την πολυγλουταμυλιωμένη GFP-ParaT₃₉₋₁₀₂ (διαδρομή 4). Στην περίπτωση έκφρασης της GFP-ParaT παρουσία του ενεργού ενζύμου, το GT335 ανίχνευσε όπως αναμενόταν τις πολυγλουταμυλιωμένες πρωτεΐνες τουμπουλίνη και GFP-ParaT (διαδρομή 2). Παρουσία της ανενεργής TTLL4, δεν ανιχνεύθηκε η προσθήκη γλουταμικών σε κανένα από αυτά τα υποστρώματα (διαδρομές 3, 5). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι οι περιοχές που τροποποιούνται εντοπίζονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 39 έως 102.



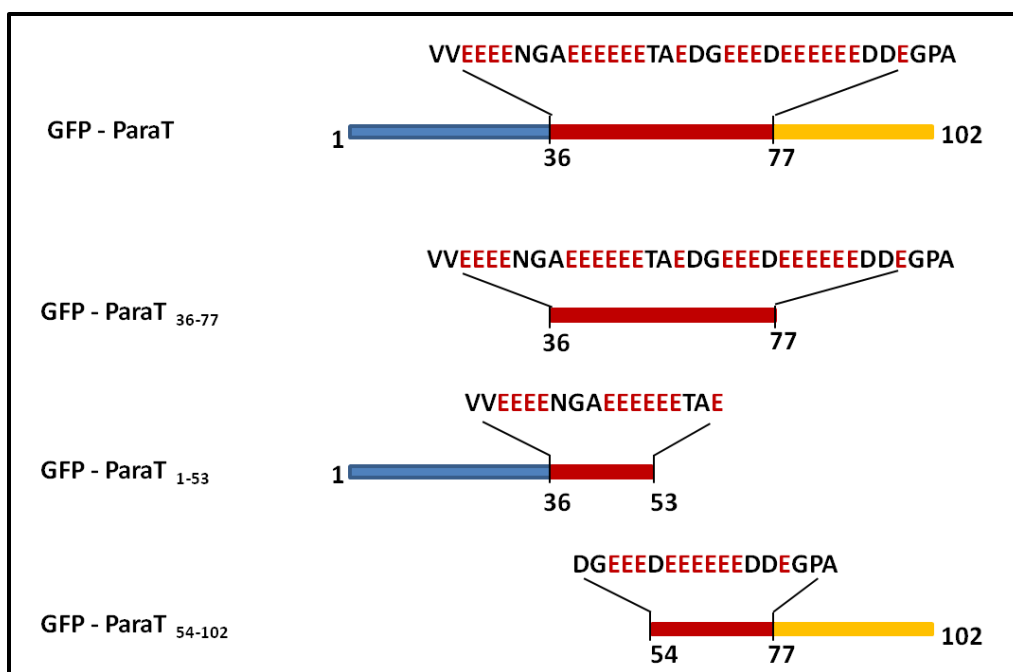
Εικόνα 22: Οι θέσεις πολυγλουταμυλίωσης της παραθυμοσίνης περιλαμβάνονται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 39-102. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν οι πρωτεΐνες GFP παρουσία της ενεργής TLL4 (διαδρομή 1), GFP-ParaT (διαδρομές 2, 3) και η GFP-ParaT₃₉₋₁₀₂ (διαδρομές 4, 5) παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TLL4. Η πολυγλουταμυλίωση ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα GT335 ενώ τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ελέγχθησαν με αντίσωμα έναντι της GFP. Οι τουμπουλίνες α και β, αποτελούν θετικούς μάρτυρες της τροποποίησης.

Η αμινοξική περιοχή της ParaT (αμινοξέα 39-102) η οποία εμπλέκεται στην τροποποίηση περιλαμβάνει την πολυ-E περιοχή. Η περιοχή αυτή εντοπίζεται στα αμινοξέα 36-77 και αποτελείται από δύο επιμέρους τμήματα διαδοχικών γλουταμικών καταλοίπων (³⁶VVEEEEENG-AEEEEEEETAE⁵³ και ⁵⁴DGEEEEDEEEEEEDDEGPA⁷⁷). Για να διερευνηθεί εάν οι δύο αυτές υποπεριοχές περιέχουν θέσεις-στόχους της τροποποίησης, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω χημιακές κατασκευές που απεικονίζονται σχηματικά στην Εικόνα 23:

α) GFP- ParaT₃₆₋₇₇, αμινοξέα ³⁶VVEEEEENGAEEEEEETAEDGEEEEDEEEEEEDDEGPA⁷⁷

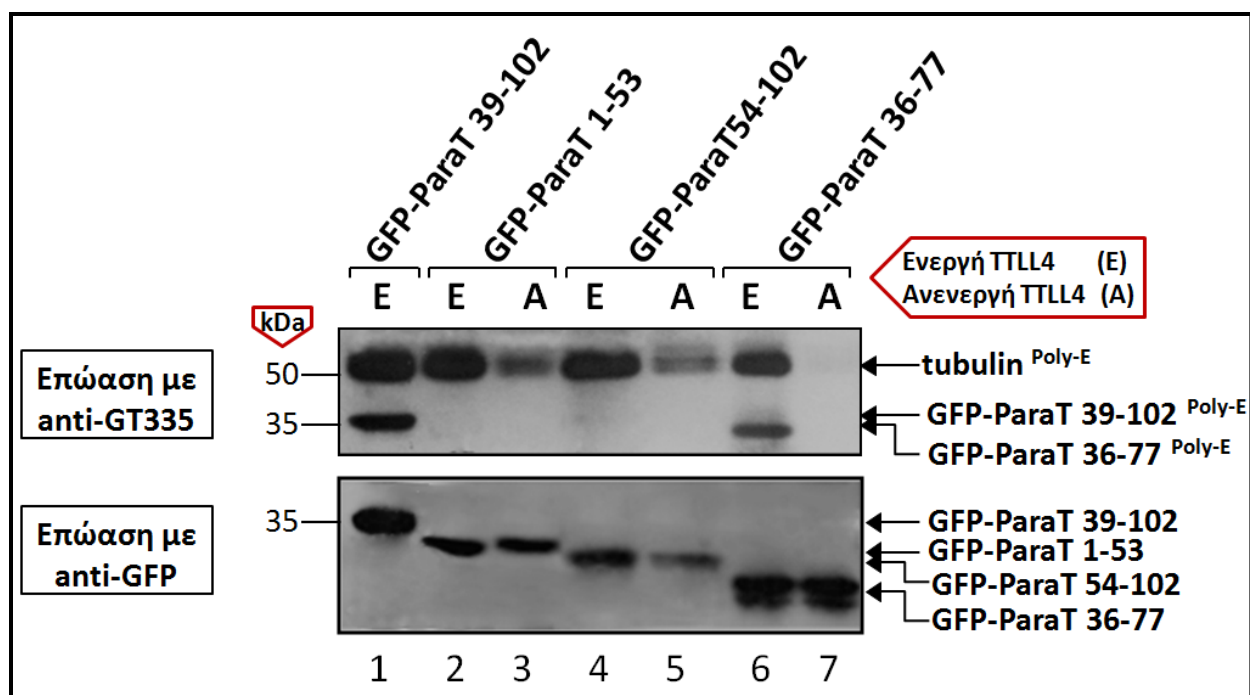
β) GFP- ParaT₁₋₅₃, αμινοξέα ³⁶VVEEEEENGAEEEEEETAE⁵³

γ) GFP- ParaT₅₄₋₁₀₂, αμινοξέα ⁵⁴DGEEEEDEEEEEEDDEGPA⁷⁷.

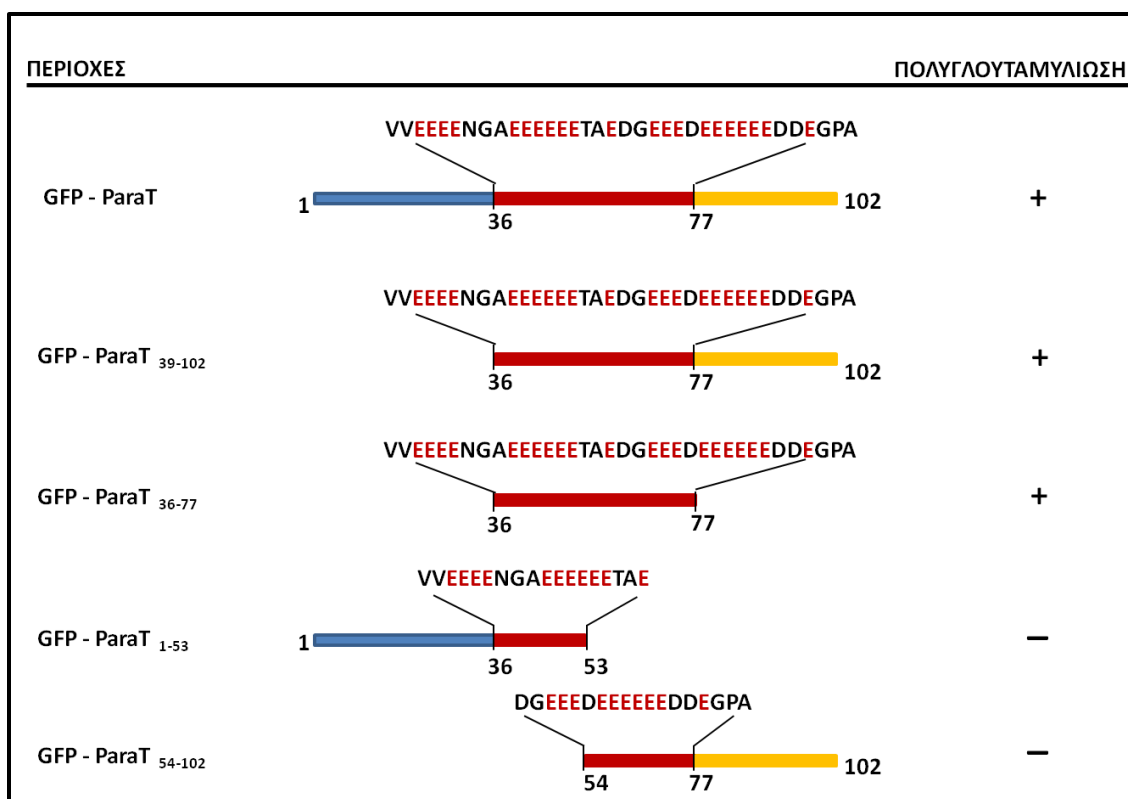


Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων της όξινης περιοχής της παραθυμοσίνης που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση πολυγλουταμυλίωσης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, όταν εκφράστηκαν οι GFP-ParaT₃₉₋₁₀₂, ParaT₁₋₅₃, GFP-ParaT₅₄₋₁₀₂ και η GFP-ParaT₃₆₋₇₇ παρουσία της ενεργής TTLL4 (διαδρομές 1, 2, 4, 6), το αντίσωμα GT335 ανίχνευσε την πολυγλουταμυλίωση στην περιοχή 39-102 (διαδρομή 1) και στην περιοχή 36-77 της παραθυμοσίνης (διαδρομή 6). Αντίθετα, παρουσία της ανενεργής TTLL4 οι ζώνες που αντιστοιχούν στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες δεν ανιχνεύθηκαν (διαδρομές 3, 5, 7). Συνεπώς η ParaT₁₋₅₃ δεν μπορεί να πολυγλουταμυλιωθεί, δηλαδή τα αμινοξέα ³⁶VVEEEEENGAE EEEEEETA E⁵³ της όξινης περιοχής δεν επαρκούν για την τροποποίηση. Ομοίως συμβαίνει και με την αμινοξική αλληλουχία ⁵⁴DGEEED EEEEEEDDEGPA⁷⁷ που περιέχεται στην GFP-ParaT₅₄₋₁₀₂. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι οι θέσεις αναγνώρισης της πολυγλουταμυλάσης βρίσκονται μεταξύ των καταλοίπων 36 έως 77.



Εικόνα 24: Τα αμινοξέα 36-77 της όξινης περιοχής της παραθυμοσίνης περιλαμβάνουν τις θέσεις τροποποίησης από την πολυγλουταμυλάση TLL4. Σε κύτταρα HEK293 εκφράστηκαν οι GFP-ParaT₃₉₋₁₀₂ παρουσία της ενεργής πολυγλουταμυλάσης TLL4 (διαδρομή 1), GFP-ParaT₁₋₅₃ παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TLL4 (διαδρομές 2, 3), GFP-ParaT₅₄₋₁₀₂ παρουσία της ενεργής ή ανενεργής TLL4 (διαδρομές 4, 5) και GFP-ParaT₃₆₋₇₇ παρουσία του ενεργού ή ανενεργού ενζύμου (διαδρομές 6, 7). Για την ανίχνευση της πολυγλουταμυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ελέχθησαν με αντίσωμα έναντι της GFP. Η GFP-ParaT₃₉₋₁₀₂ και οι τουμπουλίνες α και β, αποτελούν θετικούς μάρτυρες της τροποποίησης.



Εικόνα 25: Οι επιμέρους περιοχές της παραθυμοσίνης και η συμμετοχή τους στην πολυγλουταμυλίωση. Απεικονίζονται σχηματικά οι δομικές περιοχές της ParaT: **αμινοτελική** περιοχή: αμινοξέα **1-38**, **όξινη** περιοχή: αμινοξέα **36-77** και **καρβοξυτελική** περιοχή: αμινοξέα **77-102**.

4.3 Έλεγχος υποκυτταρικής εντόπισης των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη

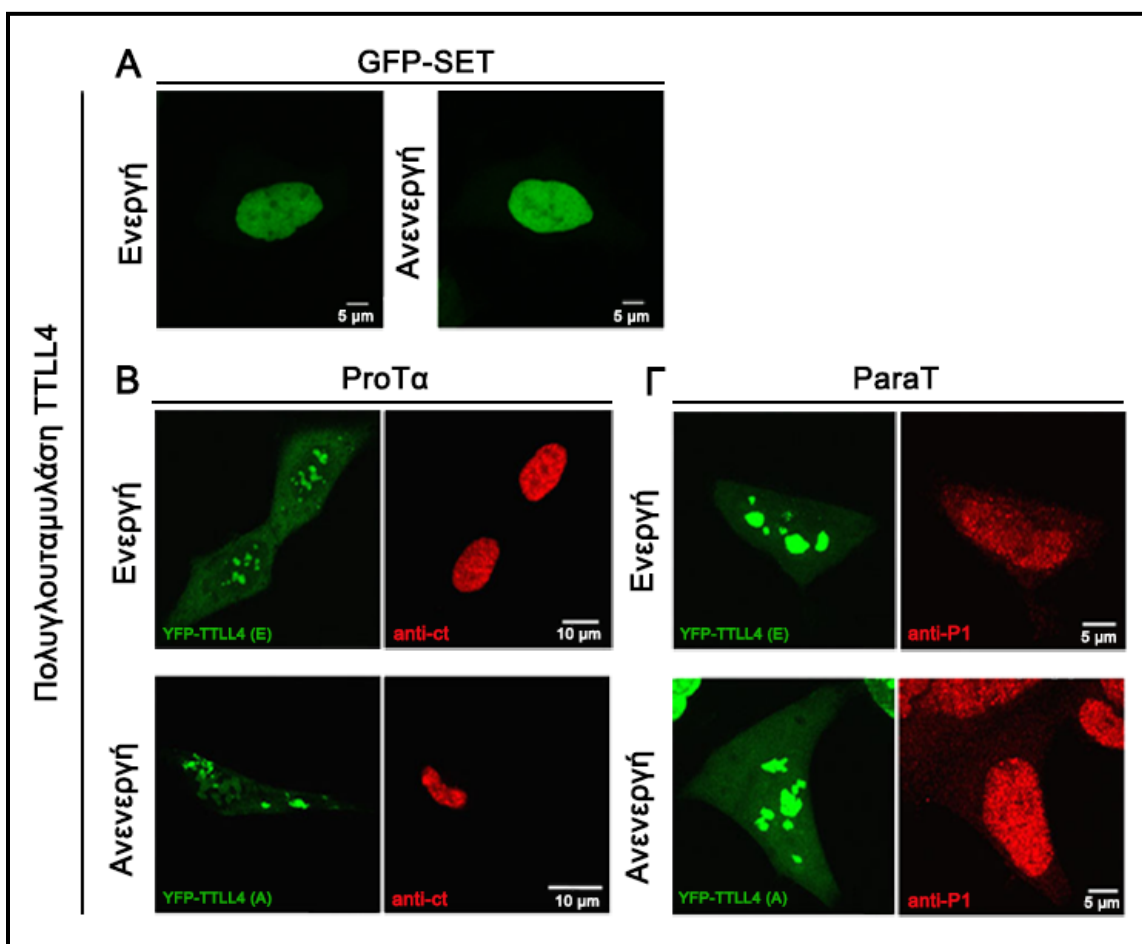
Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ρυθμίζουν την πρωτεϊνική λειτουργία μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Ένας από αυτούς αφορά στη μεταβολή της υποκυτταρικής θέσης των πρωτεϊνών ως αποτέλεσμα της τροποποίησης. Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε η κυτταρική κατανομή των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών SET, ProTa και ParaT.

Προκειμένου να μελετηθεί η υποκυτταρική θέση της SET, η GFP-SET εκφράστηκε σε κύτταρα HEK293 παρουσία της ενεργής ή ανενεργής πολυγλουταμυλάσης TTL4 (Εικόνα 26A). Η ανάλυση με συνεστιακή μικροσκοπία αποκάλυψε τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης και στις δύο περιπτώσεις. Συνεπώς, η πολυγλουταμυλίωση δεν φάνηκε να μεταβάλλει την κατανομή της SET μέσα στο κύτταρο.

Για να ελεγχθεί η επίδραση της πολυγλουταμυλίωσης στην υποκυτταρική θέση της προθυμοσίνης α, μελετήθηκε ο εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης παρουσία της ενεργής ή

ανενεργής TTLL4 (Εικόνα 26B). Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της, δηλαδή ειδικό για τα αμινοξέα 87-109 (anti-ct). Όπως φάνηκε από την ανάλυση, η ενδογενής ProTa ανιχνεύεται στον πυρήνα παρουσία της ανενεργής TTLL4. Ωστόσο, δεν διαπιστώθηκε μετατόπισή της εκτός πυρήνα και παρουσία του ενεργού ενζύμου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η ProTa παραμένει στον πυρήνα ανεξάρτητα από την πολυγλουταμυλίωσή της.

Αντίστοιχα, για την ανίχνευση της ενδογενούς παραθυμοσίνης, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα το οποίο προσδένεται ειδικά στην αμινοξική περιοχή 5-30 του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης (anti-P1) (Εικόνα 26Γ). Από την ανάλυση της κατανομής του φορισμού διαπιστώθηκε, όπως και στις παραπάνω περιπτώσεις, ότι η παρουσία της πολυγλουταμυλίωσης δεν επηρεάζει τη θέση της παραθυμοσίνης στο κύτταρο και την εντόπισή της στον πυρήνα.



Εικόνα 26: Υποκυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη παρουσία της πολυγλουταμυλίωσης TTLL4. Α. Η GFP-SET εκφράστηκε σε κύτταρα HEK293 παρουσία της ενεργής ή ανενεργής πολυγλουταμυλίωσης TTLL4. Β. Ανοσοανίχνευση της ενδογενούς ProTa με τη χρήση του αντισώματος anti-ct (κόκκινο) παρουσία της ενεργής ή ανενεργής

TTLL4. Η πολυγλουταμυλάση απεικονίζεται με πράσινο χρώμα και διακρίνονται οι χαρακτηριστικές δομές στον πυρήνα. Γ. Ανοσοανίχνευση της ενδογενούς ParaT με τη χρήση του αντισώματος anti-P1 (κόκκινο) παρουσία του ενεργού ή ανενεργού ενζύμου. Η πολυγλουταμυλάση TTLL4 απεικονίζεται με πράσινο χρώμα.

4.4 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών με τις ιστόνες

Πολλές από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις εντοπίζονται σε περιοχές που είναι υπεύθυνες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, γεγονός που αναδεικνύει την εμπλοκή τους στο σχηματισμό ή/και τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων (Nishi *et al.*, 2011). Η πολυγλουταμυλίωση ως μία τέτοια τροποποίηση, προσθέτει αρνητικό φορτίο και δημιουργεί όξινες πλευρικές αλυσίδες που εκτείνονται από την κύρια αλληλουχία της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή που αποκτούν οι τροποποιημένες πρωτεΐνες, είναι πιθανόν να επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια και ενδεχομένως να σταθεροποιεί την πρόσδεσή τους στα φέροντα θετικό φορτίο.

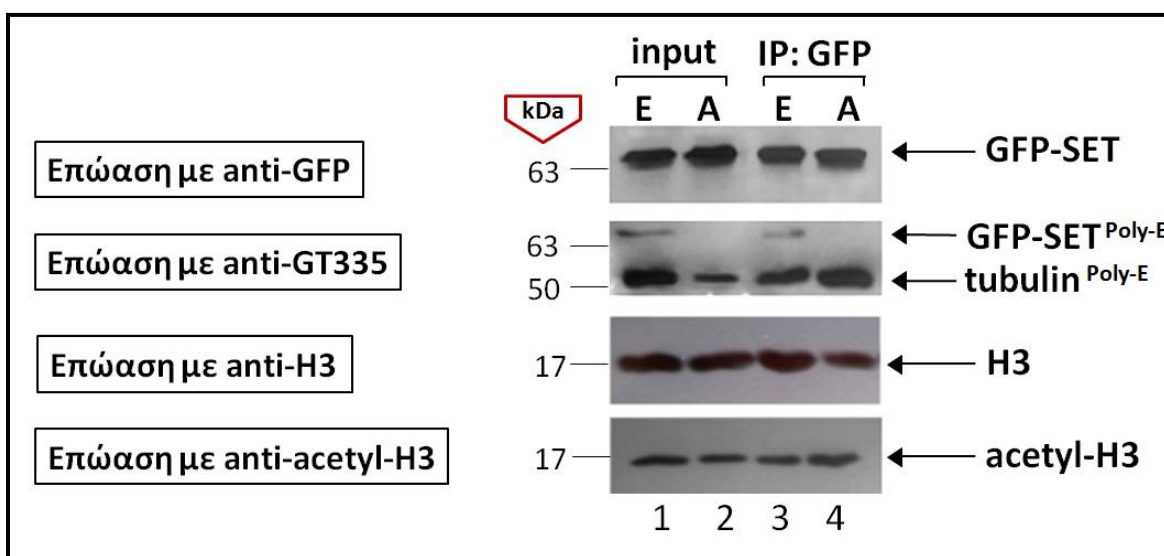
Οι πρωτεΐνες SET, ProTα και ParaT αλληλεπιδρούν με μία σειρά μορίων και μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων εμπλέκονται σε διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες. Ωστόσο, κοινό χαρακτηριστικό και των τριών πρωτεϊνών είναι η αλληλεπίδρασή τους με τις ιστόνες. Στα πλαίσια αυτά, εξετάστηκε το ενδεχόμενο μεταβολής της συγγένειας των τριών πρωτεϊνών για τις ιστόνες, ως συνέπεια της πολυγλουταμυλίωσης.

4.4.1 Αλληλεπίδραση της πολυγλουταμυλιωμένης SET με την ιστόνη H3

Η ογκοπρωτεΐνη SET αλληλεπιδρά μέσω της NAP περιοχής με την ιστόνη H3 (Karetsou *et al.*, 2009). Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης, η GFP-SET εκφράστηκε σε κύτταρα HEK293 παρουσία της ενεργής ή ανενεργής πολυγλουταμυλάσης TTLL4. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα που συλλέχθηκαν μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων (input) χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με τη χρήση αντισώματος έναντι της GFP πρωτεΐνης (IP:anti-GFP). Ακολούθησε η ανάλυση των εκχυλισμάτων μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Προκειμένου να ανιχνευθεί η ιστόνη H3 που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SET, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-H3 το οποίο προσδένεται ειδικά στη συγκεκριμένη ιστόνη. Παράλληλα εξετάστηκαν τα επίπεδα ακετυλίωσης της H3 με τη βοήθεια του anti-acetyl-H3 αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει την ακετυλίωση του αμινοτελικού άκρου της ιστόνης. Ελέγχθηκε η ακετυλίωση της H3 καθώς η SET εμποδίζει την ακετυλίωση των ιστονών, ως μέλος

του συμπλόκου αναστολής των ακετυλοτρανσφερασών (Seo *et al.*, 2001). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πολυγλουταμυλίωση της GFP-SET, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα GT335 ενώ για τον προσδιορισμό της έκφρασης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-GFP.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση της GFP-SET με τη χρήση του αντισώματος anti-GFP. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που κατακρημνίστηκε ήταν επαρκής και σε συγκρίσιμα επίπεδα παρουσία ενεργής ή ανενεργής TLL4 (Εικόνα 27, διαδρομές 3, 4). Ειδικότερα στη διαδρομή 3 παρουσία του ενεργού ενζύμου, ένα ποσοστό της GFP-SET φάνηκε ότι πολυγλουταμυλιώνεται, όπως αποκάλυψε η επώαση με το αντίσωμα GT335. Χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της ιστόνης H3, στα εκχυλίσματα όπου εκφράζεται η GFP-SET δεν φάνηκε να υπάρχει διαφορά παρουσία και απουσία πολυγλουταμυλίωσης (διαδρομές 3, 4). Επίσης, δεν διαπιστώθηκε αλλαγή των επιπέδων της ακετυλιωμένης H3 η οποία συγκατακρημνίζεται με την GFP-SET (διαδρομές 3, 4). Επομένως, η παρουσία της πολυγλουταμυλίωσης δεν συνδέεται με μεταβολές στη συγγένεια της GFP-SET για την ιστόνη H3 ούτε επηρεάζει την ακετυλίωση της ιστόνης. Η ανάλυση αυτή αν και ποιοτική, αποτελεί μία πρώτη ένδειξη σχετικά με την επίδραση της πολυγλουταμυλίωσης στην αλληλεπίδραση μεταξύ SET και H3. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η ύπαρξη της πολυγλουταμυλίωσης μπορεί πράγματι να μην επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Ωστόσο, δεν αποκλείεται η πολυγλουταμυλίωση να επάγει κάποια μεταβολή στη συγγένεια μεταξύ των εν λόγω μορίων, η οποία όμως να μην ανιχνεύεται από την πειραματική προσέγγιση που ακολουθήσαμε.



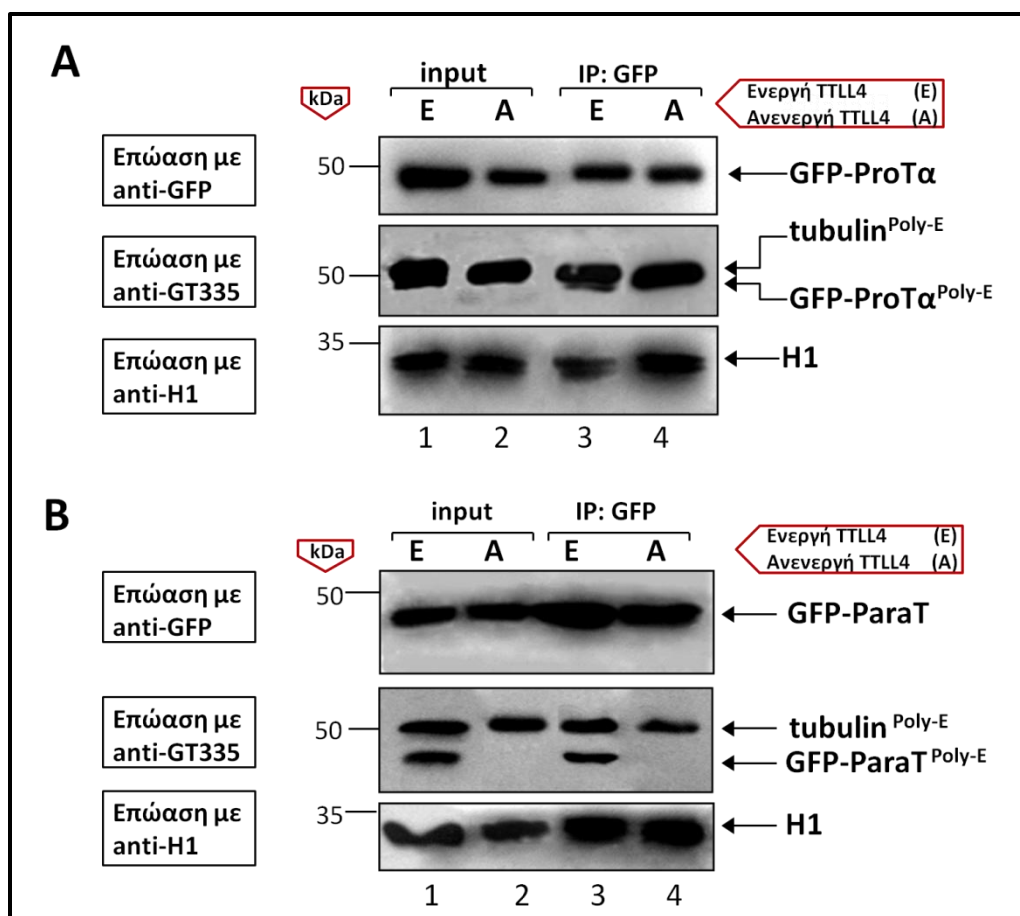
Εικόνα 27: Η πολυγλουταμυλίωση της πρωτεΐνης SET δεν φαίνεται να επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με την ιστόνη H3. Η GFP-SET εκφράστηκε σε κύτταρα HEK293 παρουσία της ενεργής ή ανενεργής πολυγλουταμυλάσης TLL4 (διαδρομές 1,2 input). Η ανοσοκατακρήμνιση των

πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων έγινε με τη χρήση αντισώματος έναντι της GFP (διαδρομές 3, 4). Η έκφραση της GFP-SET ελέγχθηκε με το αντίσωμα anti-GFP και η πολυγλουταμυλίωση με το αντίσωμα GT335. Για την ανίχνευση της ιστόνης H3 καθώς και τον έλεγχο των επιπέδων ακετυλίωσής της, χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα anti-H3 και anti-acetyl-H3 αντίστοιχα.

4.4.2 Αλληλεπίδραση των πολυγλουταμυλιωμένων πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη με την ιστόνη H1

Η προθυμοσίνη α και η παραθυμοσίνη αλληλεπιδρούν με τη συνδετική ιστόνη H1 μέσω της όξινης περιοχής τους (Papamarcaki and Tsolas, 1994, Kondili *et al.*, 1996) και ρυθμίζουν την σύνδεση της ιστόνης H1 με τη χρωματίνη (Karetsou *et al.*, 1998, Martic *et al.*, 2005). Για να διερευνηθεί εάν η πολυγλουταμυλίωση επηρεάζει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με την H1, οι GFP-ProTα και GFP-ParaT εκφράστηκαν σε κύτταρα HEK293 παρουσία της ενεργής ή ανενεργής πολυγλουταμυλάσης TTLL4. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα που συλλέχθηκαν (input) χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με τη χρήση αντισώματος έναντι της GFP πρωτεΐνης (IP:GFP). Για τον έλεγχο έκφρασης της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-GFP. Η ανίχνευση της πολυγλουταμυλίωσης έγινε με το αντίσωμα GT335. Προκειμένου να ανιχνευθεί η ιστόνη H1 που αλληλεπιδρά με την ProTα και την ParaT, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-H1.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, οι χιμαιρικές πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνίστηκαν από τα εκχυλίσματα σε ικανοποιητικά επίπεδα μετά τη συνδυαστική τους έκφραση τόσο με την ενεργή όσο και με την ανενεργή TTLL4 (Εικόνα 28Α και Β, διαδρομές 3, 4). Επίσης με τη βοήθεια του αντισώματος GT335, παρατηρήθηκε ότι οι GFP-ProTα και GFP-ParaT είναι μερικώς πολυγλουταμυλιωμένες. Όμως παρά την παρουσία της πολυγλουταμυλίωσης, η ποσότητα της ιστόνης που κατακρημνίστηκε, είναι ίδια παρουσία του ενεργού και ανενεργού ενζύμου (Εικόνα 28Α και Β, διαδρομές 3, 4). Συνεπώς, από τη συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση δεν διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή ως προς την αλληλεπίδραση ProTα-H1 και ParaT-H1.



Εικόνα 28: Η πολυγλουταμλίωση των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη δεν φαίνεται να επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους με την ιστόνη H1. Η GFP-ProT α και GFP-ParaT εκφράστηκαν σε κύτταρα HEK293 παρουσία της ενεργής (διαδρομές 1, 3) ή ανενεργής πολυγλουταμύλασης TLL4 (διαδρομές 2, 4). Ακολούθησε η συλλογή των πυρηνικών εκχυλισμάτων και η ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με τη χρήση αντισώματος έναντι της GFP πρωτεΐνης. Η έκφραση της χμιαϊρικής πρωτεΐνης ελέγχθηκε με το αντίσωμα anti-GFP και η πολυγλουταμλίωση ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα GT335. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων της ιστόνης H1 έγινε χρήση του αντισώματος anti-H1.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελούν ένα γενικό μηχανισμό ρύθμισης της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Πολλές από αυτές οδηγούν στην αντιστρεπτή προσθήκη ενός εύρους μορίων τα οποία κυμαίνονται από χημικές ομάδες (μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση) μέχρι λιπίδια ή μικρού μεγέθους πρωτεϊνικά μόρια. Η πολυγλουταμυλίωση είναι μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία σχηματίζονται γλουταμικές αλυσίδες ποικίλου μήκους στις πρωτεΐνες-στόχους. Τα ένζυμα που την καταλύουν είναι οι πολυγλουταμυλάσες και ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών TTLL (Tubulin Tyrosine Ligase-Like) (Janke *et al.*, 2005). Η φύση της πολυγλουταμυλίωσης, δηλαδή η προσθήκη αμινοξικών καταλοίπων με τη μορφή ομοπολυμερών αλυσίδων, την καθιστά ιδιαίτερη συγκριτικά με άλλες γνωστές τροποποιήσεις.

Οι πιο γνωστοί και εκτενώς μελετημένοι στόχοι της πολυγλουταμυλίωσης είναι οι τουμπουλίνες α και β (Eddé *et al.*, 1990, Alexander *et al.*, 1991) καθώς και οι NAP πρωτεΐνες (Regnard *et al.*, 2000). Επιπρόσθετα ερευνητικά δεδομένα αναδεικνύουν και άλλες πρωτεΐνες ως πιθανά υποστρώματα των πολυγλουταμυλάσων, προτείνοντας ότι η πολυγλουταμυλίωση είναι μια πιο ευρεία μετα-μεταφραστική τροποποίηση από ότι θεωρήθηκε αρχικά. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών περιλαμβάνονται οι ANP32, η νουκλεοφωσμίνη B23, η νουκλεοπορίνη, η νουκλεολίνη, η NF45, η RNP-K, η RANGAP και η EB1 (van Dijk *et al.*, 2008). Τα τελευταία πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες PELP1 (Kashiyawa *et al.*, 2010), Mad-2 (Ye *et al.*, 2014), νουκλεοπλάσμίνη (Onicubo *et al.*, 2015) και συνθάση cGAS (Xia *et al.*, 2016) τροποποιούνται με τη μετα-μεταφραστική προσθήκη καταλοίπων γλουταμικού.

Παρά τον χαρακτηρισμό ενός μεγαλύτερου εύρους πρωτεϊνών-στόχων, ο βιολογικός ρόλος της τροποποίησης δεν είναι πλήρως κατανοητός ούτε έχει προταθεί συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχος της πολυγλουταμυλίωσης. Ωστόσο, όλα τα υποστρώματα περιέχουν όξινες περιοχές πλούσιες σε γλουταμικά κατάλοιπα και τα περισσότερα είναι πρωτεΐνες που μετακινούνται από και προς τον πυρήνα, συμπεριλαμβανομένων και πολλών που σχετίζονται με τη δομή της χρωματίνης. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκαν οι πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α (ProTa) και παραθυμοσίνη (ParaT) ως πιθανά υποστρώματα της τροποποίησης αυτής. Και οι τρεις πρωτεΐνες

περιέχουν εκτενείς πολύ-E περιοχές και εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης, χαρακτηριστικά που τις καθιστούν υποψήφιους στόχους πολυγλουταμυλίωσης.

Η ογκοπρωτεΐνη SET ανήκει στην οικογένεια των NAP πρωτεϊνών και μάλιστα είναι ομόλογη με την NAP-1 (Muto *et al.*, 2007). Από δομικής πλευράς, η SET διακρίνεται σε τρεις περιοχές (Karetsou *et al.*, 2009). Η πρώτη (αμινοξέα 1-76) αφορά το N-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης και θεωρείται υπεύθυνη για το διμερισμό της. Η κεντρική περιοχή (αμινοξέα 80-225) περιλαμβάνει τον NAP τομέα και μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με τις ιστόνες. Η τρίτη περιοχή εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τμήμα της και περιέχει μία αλληλουχία πλούσια σε γλουταμικά (αμινοξέα 226-277). Αυτή η όξινη, πολύ-E περιοχή υιοθετεί μία τυχαία διαμόρφωση και χαρακτηρίζεται ως εγγενώς εύκαμπτη (IDR-Intrinsically Disordered Region) (Park *et al.*, 2005, McBryant *et al.*, 2003).

Η προθυμοσίνη α είναι μία από τις πιο όξινες πρωτεΐνες που απαντώνται στη φύση. Η N-τελική αλληλουχία της (αμινοξέα 1-28) αντιστοιχεί στην θυμοσίνη α1 και είναι πλήρως συντηρημένη σε όλα τα είδη. Περίπου το 50% των αμινοξέων της είναι όξινα και συσσωρεύονται στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας μία περιοχή πλούσια σε γλουταμικά (αμινοξέα 53-84). Η πρωτεΐνη υιοθετεί μία διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος, χωρίς κανονική δευτεροταγή δομή (Gast *et al.*, 1995). Αυτή η έλλειψη σταθερής δομής την κατατάσσει στις εγγενώς εύκαμπτες πρωτεΐνες (IDPs-Intrinsically Disordered Proteins) και είναι σημαντική για το φυσιολογικό ρόλο και την αλληλεπίδρασή της με άλλα μόρια.

Η παραθυμοσίνη εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με την προθυμοσίνη α. Περισσότερα από το ήμισυ των όξινων αμινοξέων της εντοπίζονται στο κέντρο του μορίου, δημιουργώντας μία περιοχή πλούσια σε γλουταμικά (αμινοξέα 36-70). Αντίστοιχα με την προθυμοσίνη α, η παραθυμοσίνη αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα εγγενώς εύκαμπτης πρωτεΐνης (IDP).

Η παρούσα μελέτη αποκάλυψε ότι οι πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη τροποποιούνται παρουσία της ενεργής πολυγλουταμυλάσης TTLL4. Συνεπώς, και οι τρεις πρωτεΐνες αποτελούν πράγματι στόχους πολυγλουταμυλίωσης. Η συγκεκριμένη πολυγλουταμυλάση επιλέχθηκε μεταξύ των μελών της TTLL οικογένειας, λόγω της ικανότητάς της να τροποποιεί και άλλα υποστρώματα πέραν της τουμπουλίνης (van Dick *et al.*, 2007). Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε σε δύο μορφές, την ενεργή και την ανενεργή η οποία φέρει μία μετάλλαξη στην περιοχή πρόσδεσης ATP (van Dijk *et al.*, 2007).

Η προσπάθεια προσδιορισμού αυτόνομων περιοχών πολυγλουταμυλίωσης, ανέδειξε την εμπλοκή επιμέρους αλληλουχιών σε κάθε πρωτεΐνη. Σχετικά με την SET, διαπιστώθηκε ότι αν απαλειφθεί η καρβοξυτελική περιοχή της (αμινοξέα 211-277), η πρωτεΐνη χάνει την ικανότητα να πολυγλουταμυλιώνεται. Η περιοχή αυτή όχι μόνο συγκεντρώνει τα γλουταμικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης αλλά υιοθετεί και μία τυχαία διαμόρφωση (IDR), αρκετά ευέλικτη και ενδεχομένως προσβάσιμη από την πολυγλουταμυλάση. Επίσης, απαραίτητη για την πολυγλουταμυλίωση βρέθηκε να είναι και η περιοχή NAP, η οποία ευθύνεται για την αλληλεπίδραση της SET με τις ιστόνες. Το τμήμα αυτό (αμινοξέα 97-197) δεν είναι πλούσιο σε γλουταμικά, ωστόσο ενδέχεται να περιλαμβάνει στοιχεία που απαιτούνται για την τροποποίηση ή να συμβάλλει στη συνολική διαμόρφωση της SET, προκειμένου να αναγνωριστεί από την TTLL4. Συνεπώς, ο συνδυασμός όξινης και NAP περιοχής, είναι αυτός που απαιτείται για την πολυγλουταμυλίωση της SET.

Όσον αφορά την προθυμοσίνη α, η πολυ-E περιοχή στο κέντρο του μορίου της (αμινοξέα 53-84), είναι αυτή που απαιτείται για την πολυγλουταμυλίωσή της. Πιο συγκεκριμένα, τα γλουταμικά κατάλοιπα 62-70 είναι ικανά και αναγκαία για την τροποποίηση της πρωτεΐνης. Για την πολυγλουταμυλίωση της παραθυμοσίνης, η πειραματική ανάλυση έδειξε ότι το καρβοξυτελικό τμήμα της που περιλαμβάνει την όξινη πολυ-E περιοχή, τροποποιείται από την TTLL4. Ειδικότερα τα αμινοξέα 36-77 απαιτούνται για την τροποποίηση της πρωτεΐνης.

Η ανάδειξη των SET, ProTa και ParaT ως νέων υποστρωμάτων, επιβεβαίωσε τη σημασία των πλούσιων σε γλουταμικά περιοχών ως στοιχεία που αναγνωρίζονται από την πολυγλουταμυλάση TTLL4. Επιπλέον, στις πρωτεΐνες SET, ProTa και ParaT υπάρχουν στοιχεία τα οποία απαντώνται σε μόρια που χαρακτηρίζονται ως εγγενώς εύκαμπτα (IDRs). Όπως έχει δειχθεί, οι IDRs αποτελούν συχνά στόχους μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων λόγω της ευέλικτης δομής και της πλαστικότητας που εμφανίζουν (Iachouvera *et al.*, 2004). Τέτοιου είδους πρωτεΐνες, διευκολύνουν αφενός την αναγνώρισή τους από τα κατάλληλα τροποποιητικά ένζυμα και αφετέρου την πρόσβαση των ενζύμων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεϊνών με IDRs αποτελούν οι τουμπουλίνες, τα καρβοξυτελικά άκρα των οποίων περιέχουν θέσεις αναγνώρισης για μία σειρά τροποποιητικών ενζύμων (Roll-Mecak, 2015). Αντίστοιχα, η ευέλικτη δομή που χαρακτηρίζει τις SET, ProTa και ParaT, πιθανόν να διευκολύνει την αναγνώριση της αλληλουχίας πολυγλουταμυλίωσης από την TTLL4 αλλά και την πρόσβασή της στις πρωτεΐνες αυτές.

Η πολυγλουταμυλίωση των άκρων της τουμπουλίνης α και β , λειτουργεί ως σήμα σύνδεσης για μια σειρά MAP πρωτεϊνών (Microtubule Associated Proteins) που αλληλεπιδρούν επιλεκτικά με την πολυγλουταμυλιωμένη τουμπουλίνη (Bonnet *et al.*, 2001). Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι η CSAP (Centriole and Spindle Associated Protein) (Backer *et al.*, 2012). Επιπλέον, η αύξηση του αρνητικού φορτίου στο καρβοξυτελικό άκρο της τουμπουλίνης, φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία των μοριακών κινητήρων (Thorn *et al.*, 2000). Πρόσφατα, οι Sirajuddin και συνεργάτες, έδειξαν ότι η πολυγλουταμυλίωση της β -τουμπουλίνης των νευρικών κυττάρων αυξάνει την κινητικότητα της κινησίνης-1 (Sirajuddin *et al.*, 2014). Επιπλέον, ο αριθμός των γλουταμικών καταλοίπων που προστίθενται στα άκρα της τουμπουλίνης ρυθμίζει ποσοτικά τη διάσπαση των μικροσωληνίσκων από την πρωτεΐνη spastin. Έχει βρεθεί επίσης ότι η πολυγλουταμυλίωση ρυθμίζει την αλληλεπίδραση και άλλων πρωτεϊνών εκτός από τις τουμπουλίνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Mad-2 πρωτεΐνη, η αυξημένη πολυγλουταμυλίωση της οποίας επάγει τη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση της μιτωτικής κινάσης Aurora B η οποία φυσιολογικά αναστέλλεται από την Mad-2. Ένα ακόμα παράδειγμα είναι η πολυγλουταμυλίωση της συνθάσης του κυκλικού GMP-AMP η οποία παρεμποδίζει τη σύνδεσή του στο DNA ενώ η μονογλουταμυλίωση από την TTL4 εμποδίζει την λειτουργία του. Στο σύστημα του *Xenopus laevis*, η πολυγλουταμυλίωση της νουκλεοπλασμίνης σε συνδυασμό με άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μεταβάλλει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και την αλληλεπίδρασή της με τις ιστόνες (Onikubo *et al.*, 2015). Στο ίδιο σύστημα, η προσθήκη γλουταμικών καταλοίπων στην πρωτεΐνη Nap1 τροποποιεί τη δυναμική της ιστόνης H1 και τη συμπύκνωση των μιτωτικών χρωμοσωμάτων (Miller *et al.*, 2015). Τέλος, σε κύτταρα καρκίνου του παγκρέατος βρέθηκε ότι η πολυγλουταμυλίωση της πρωτεΐνης PELP1 ενισχύει τη συγγενεία της για την ιστόνη H3 και διαδραματίζει ρόλο στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης (Kashiwaya *et al.*, 2010).

Ο σχηματισμός όξινων αλυσίδων που εκτείνονται από την κύρια αλληλουχία της πρωτεΐνης και η προσθήκη αρνητικού φορτίου αποτελούν συνέπειες της πολυγλουταμυλίωσης. Αυτή η δομή των τροποποιημένων πρωτεϊνών δημιουργεί ένα ευνοϊκό περιβάλλον για τη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης με θετικά φορτισμένα μόρια. Στα πλαίσια αυτά, διερευνήθηκε εάν η πολυγλουταμυλίωση μεταβάλλει τη συγγενεία των τροποποιημένων πρωτεϊνών για τις θετικά φορτισμένες ιστόνες. Πιο συγκεκριμένα, για την SET μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή της με την ιστόνη H3 καθώς εμφανίζει προτίμηση για τη συγκεκριμένη ιστόνη συγκριτικά με τις υπόλοιπες (Karetsou *et al.*, 2009). Επιπλέον, εξετάστηκαν τα επίπεδα

ακετυλίωσης της H3, δεδομένου ότι η SET αναστέλλει την ακετυλίωση των ιστονών μέσω ενός μηχανισμού "histone-masking" (Seo *et al.*, 2001). Άλλωστε από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η πολυγλουταμυλίωση της πρωτεΐνης PELP1 μειώνει τα επίπεδα ακετυλίωσης της ιστόνης H3 (Kashiwaya *et al.*, 2010). Όσον αφορά την προθυμοσίνη α, μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή της με την ιστόνη H1 καθώς έχει δειχθεί ότι συνδέεται επιλεκτικά στη συγκεκριμένη ιστόνη μέσω της όξινης περιοχής της (Papamarcaki and Tsolas, 1994, Karetsoy *et al.*, 1998). Αντίστοιχα, η παραθυμοσίνη συνδέεται στην ιστόνη H1 (Kondili *et al.*, 1996) και μ' αυτόν τον τρόπο ρυθμίζει την πρόσδεση της ιστόνης στο νουκλεόσωμα (Martic *et al.*, 2005).

Όπως διαπιστώθηκε, η παρουσία της πολυγλουταμυλίωσης δεν μεταβάλλει τη συγγένεια των τροποποιημένων πρωτεϊνών για τις ιστόνες. Πιο συγκεκριμένα, δεν βρέθηκε αλλαγή στην ικανότητα πρόσδεσης της SET στην ιστόνη H3, ούτε στα επίπεδα ακετυλίωσης της H3. Αντίστοιχα, δεν ανιχνεύτηκε διαφοροποίηση στην αλληλεπίδραση των ProTa και ParaT με την ιστόνη H1. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη προσέγγιση με την οποία μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις, η οποία ήταν ποιοτική και όχι αυτή που ενδείκνυται για τέτοιου είδους αναλύσεις. Πιθανόν μία ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιώντας απομονωμένα υποστρώματα υψηλής καθαρότητας καθώς και η εισαγωγή ενός *in vitro* συστήματος θα ήταν οι ενδεδειγμένες συνθήκες για να απαντηθούν τα ερωτήματά μας. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι αν και η πολυγλουταμυλίωση δεν φαίνεται να επηρεάζει τη σύνδεση των πρωτεϊνών μας με τις ιστόνες, μπορεί ωστόσο να επιδρά στο ρόλο των ιστονών στην οργάνωση της χρωματίνης, όπως έχει βρεθεί στην περίπτωση της Nap1 (Miller *et al.*, 2015). Από την άλλη πλευρά, η πολυγλουταμυλίωση μπορεί πράγματι να επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις των εν λόγω πρωτεϊνών με κάποιους από τους στόχους τους, στους οποίους όμως δεν περιλαμβάνονται οι ιστόνες.

Είναι γνωστό ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ρυθμίζουν τη λειτουργία μίας πρωτεΐνης μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Ένας από αυτούς αφορά στη μεταβολή της κυτταρικής θέσης της πρωτεΐνης (van Roey *et al.*, 2013). Αυτό συμβαίνει στην πρωτεΐνη SET, όπου η φωσφορυλίωση της Ser9, οδηγεί στη μεταβολή της υποκυτταρικής θέσης της πρωτεΐνης (ten Klooster *et al.*, 2007). Η συγκεκριμένη τροποποίηση προκαλεί την κατάργηση της διμερούς μορφής που έχει η SET στον πυρήνα και την έξοδό της στο κυτταρόπλασμα. Ανάλογο παράδειγμα αποτελεί η πολυγλυκυλίωση, μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με την πολυγλουταμυλίωση και καταλύεται από μέλη της TTLL οικογένειας. Πιο συγκεκριμένα, στο παράσιτο *Giardia duodenalis*, έχει βρεθεί ότι απουσία πολυγλυκυλίωσης η πρωτεΐνη 14-3-3 μετατοπίζεται στον πυρήνα (Lalle *et al.*, 2011). Στα

πλαίσια προσδιορισμού του βιολογικού ρόλου της πολυγλουταμυλίωσης εξετάστηκε εάν η παρουσία της μεταβάλλει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της SET αλλά και των πρωτεϊνών προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι τροποποιημένες πρωτεΐνες SET, ProTa και ParaT εξακολουθούν να βρίσκονται στον πυρήνα όπως συμβαίνει και απουσία της πολυγλουταμυλίωσης. Η πυρηνική παραμονή των πρωτεϊνών ενδεχομένως να σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις τους. Πιο συγκεκριμένα, οι τροποποιημένες πρωτεΐνες παραμένουν στον πυρήνα προκειμένου να αλληλεπιδράσουν με άλλα πυρηνικά μόρια τα οποία συνδέονται επιλεκτικά στην πολυγλουταμυλιωμένη μορφή. Μέσω αυτών των εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων, είναι πιθανόν να επάγονται σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγώντας σε συγκεκριμένη κυτταρική απόκριση. Επιπρόσθετα, η ίδια η φύση της πολυγλουταμυλίωσης πιθανόν να συμβάλλει στην πυρηνική παραμονή των πρωτεϊνών SET, ProTa και ParaT. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί η συσσώρευση αρνητικού φορτίου στις τροποποιημένες πρωτεΐνες εμποδίζει την έξοδό τους από τον πυρήνα.

Συνοψίζοντας, η πολυγλουταμυλίωση αποτελεί μία ιδιαίτερη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό μοτίβο στις πρωτεΐνες-στόχους της. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη ως νέων υποστρωμάτων της πολυγλουταμυλάσης TTLL4, έρχεται να διευρύνει το πλήθος των ήδη γνωστών στόχων της πολυγλουταμυλίωσης. Επίσης, συνηγορεί με τα ήδη γνωστά δεδομένα σχετικά με τη σημασία των πολυ-E περιοχών στη συγκεκριμένη τροποποίηση. Επιβεβαιώνει ακόμα ότι πρωτεϊνικά μόρια που εμπλέκονται σε διεργασίες σχετικές με τη χρωματίνη, αποτελούν συχνά στόχους πολυγλουταμυλίωσης και είναι πιθανόν να επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ενζυμική προσθήκη γλουταμικού στις πρωτεΐνες SET, προθυμοσίνη α και παραθυμοσίνη, ως αποτέλεσμα πολυγλουταμύλωσης. Όπως αποδείχθηκε:

- Και οι τρεις πρωτεΐνες τροποποιούνται παρουσία της ενεργής πολυγλουταμύλωσης TTLL4.
- Η παρουσία της τροποποίησης δεν μεταβάλλει τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών.
- Για την πολυγλουταμύλωση της SET απαιτείται η NAP περιοχή καθώς και η πλούσια σε γλουταμικά καρβοξυτελική περιοχή.
- Η όξινη περιοχή τόσο της προθυμοσίνης, όσο και της παραθυμοσίνης είναι αυτή που εμπλέκεται στην τροποποίηση.
- Η πολυγλουταμύλωση δεν φαίνεται να επιδρά στην αλληλεπίδραση των παραπάνω πρωτεϊνών με τις ιστόνες.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Adams, M.D., Kerlavage, A.R., Fleischmann, R.D., Fuldner, R.A., Bult, C.J., Lee, N.H., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Gocayne, J.D., White, O., et al. (1995). Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377, 3-174.
- Alexander, J.E., Hunt, D.F., Lee, M.K., Shabanowitz, J., Michel, H., Berlin, S.C., MacDonald, T.L., Sundberg, R.J., Rebhun, L.I., Frankfurter, A. (1991). Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III β -tubulin by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4685–4689.
- Audebert, S., Koulakoff, A., Berward-Netter, Y., Gros, F., Denoulet, B., Eddé, B (1994). Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *J Cell Sci* 107, 2313-2322.
- Backer, C., Gutzman, J., Pearson, C., Cheeseman, I. (2012). CSAP localizes to polyglutamylated microtubules and promotes proper cilia function and zebrafish development. *Mol Biol Cell* 23, 2122-2130.
- Bann, J.G., Bachinger, H.P. (2000). Glycosylation/Hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix. 4-trans-hydroxyproline in the Xaa position can stabilize the triple helix. *J Biol Chem* 275, 24466 – 24469.
- Barcia, M.G., Castro, J.M., Jullien, C.D., González, C.G., Freire, M. (1992). Prothymosin alpha is phosphorylated by casein kinase-2. *FEBS Lett* 312, 152-156.
- Barcia, M.G., Castro, J.M., Jullien, C.D., Freire, M. (1993). Prothymosin alpha is phosphorylated in proliferating stimulated cells. *J Biol Chem* 268, 4704-4708.
- Beltrao, P., Albanese, V., Kenner, L.R., Swaney, D.L., Burlingame, A., Villen, J., Lim, W.A., Fraser, J.S., Frydman, J., Krogan, N.J. (2012). Systematic functional prioritization of protein posttranslational modifications. *Cell* 150, 413 – 425.
- Beresford, P.J, Xia, Z., Greenberg, A.H., Lieberman, J. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 10, 585-594.
- Bobinac, Y., Moudjou, M., Fouquet, J.P. Desbruyeres E., Eddé, B., Bornens, M. (1998). Glutamylated tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 39, 223-232.
- Bonnet C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P., Larcher, J.C. (2001). Differential binding regulation of microtubule – associated proteins MAP1A, MAP1B and MAP2 by tubulin polyglutamylated. *J Biol Chem* 276, 12839-12848.
- Boucher, D., Larcher, J.C., Gros, F., Denoulet, P. (1994). Polyglutamylated tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated Tau and tubulin. *Biochemistry* 33, 12471-12477.
- Brand, I. A., and Heinickel, A. (1991). Key enzymes of carbohydrate metabolism as targets of the 11,5-kDa Zn²⁺- binding protein (parathymosin). *J. Biol. Chem.* 226 , 20984-20989.
- Bré, M.H., de Nechaud, B., Wolff, A., Fleury, A. (1994). Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335. *Cell Motil Cytoskeleton* 27, 337–349.
- Bruniquel, D., Borie, N. and Triebel, F. (1997). Genomic organization of the human LAG-3/CD4 locus. *Immunogenetics*, 47, 96-98.

Carlson, S.G., Eng, E., Kim, E.G., Perlman, E.J., Copeland, T.D., Ballermann, B.J. (1998). Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *J Am Soc Nephrol* 9, 1873-1880.

Chambon, J.P., Touati, S.A., Berneau, S., Cladière, D., Hebras, C., Groeme, R., McDougall, A., Wassmann, K. (2013). The PP2A inhibitor I2PP2A is essential for sister chromatid segregation in oocyte meiosis II. *Curr Biol* 23, 485-490.

Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Panneerselvam, C. and Horecker, B.L. (1989). Prothymosin alpha and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues. *Arch Biochem Biophys*, 269, 256-263.

Cotter, M.A 2nd, Robertson, E.S. (2000). Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of epstein-barr nuclear antigen 3C with prothymosin alpha. *Mol Cell Biol* 20, 5722-5735.

Das V., Kanakkanthara A., Chan, A., Miller, J.H. (2014). Potential role of tubulin tyrosine ligase-like enzymes in tumorigenesis and cancer cell resistance. *Cancer Lett* 350, 1-4.

Díaz-Jullien, C., Pérez-Estévez, A., Covelo, G., Freire, M. (1996). Prothymosin alpha binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay. *Biochim Biophys Acta* 1296, 219-227.

Díaz-Jullien, C., Moreira, D., Sarandeses, C.S., Covelo, G., Barbeito, P., Freire, M. (2011). The M2-type isoenzyme of pyruvate kinase phosphorylates prothymosin α in proliferating lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1814, 355-365.

Dong, L., Zhu, J., Wen, X., Jiang, T., Chen, Y. (2014). Involvement of SET in the Wnt signaling pathway and the development of human colorectal cancer. *Oncol Lett* 7, 1203-1208.

Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Higgs, K.W., Ausio, J., Nissen, M.S., Reeves, R., Kang C., Kissinger, C.R., Bailey R.W., Griswold, M.D., Chiu, W., Garner, E.C., Obradovic, Z. (2001). Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19, 26-59.

Dyson, H.J., Wright, P.E. (2002). Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol* 12, 54-60.

Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyeres, E., Gros, F., Denoulet, P. (1990). Posttranslational glutamylation of α -tubulin. *Science* 247, 83-85.

Eichhorn, P.J., Creighton, M.P., Bernards, R. (2009). Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1795, 1-15.

Eilers, M., Schirm, S., Bishop, J.M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* 10, 133-141.

Emmanouilidou, A., Karetso, Z., Tzima, E., Kobayashi, T., Papamarcaki, T. (2013). Knockdown of prothymosin α leads to apoptosis and developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Cell Biol* 91, 325-332.

Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V., Weber, K. (1993). Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol* 120, 725-732.

Estanyol, J.M., Jaumot, M., Casanovas, O., Rodriguez-Vilarrupla, A., Agell, N., Bachs, O. (1999). The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. *J Biol Chem* 274, 33161-33165.

- Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., Lieberman, J. (2003). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112, 659-672.
- Fouquet, J.P., Eddé, B., Kann, M.L., Wolff, A., Desbruyeres, E., Denoulet, P. (1994). Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian testis. *Cell Motil Cytoskeleton* 27, 49-58.
- Freire, J., Covelo, G., Sarandeses, C., Díaz-Jullien, C., Freire, M. (2001). Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that bind to prothymosin alpha. *Biochem Cell Biol* 79, 123-131.
- Freire, M., Sarandeses, C.S., Covelo, G., Díaz-Jullien, C. (2016). Phosphorylation of Prothymosin α . An Approach to Its Biological Significance. *Vitam Horm* 102, 73-99.
- Fuxreiter, M., Simon, I., Friedrich, P., Tompa, P. (2004). Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* 338, 1015-1026.
- Gagnon, C., White, D., Cosson, J., Huitorel, P., Eddé, B., Desbruyeres E., Paturle-Lafanecherel L., Multinger, L., Job, D., Cibert, C. (1996). The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *J Cell Sci* 109, 1545-1553.
- Galea, C.A., Wang, Y., Sivakolundu S.G., Kriwacki, R.W. (2008). Regulation of Cell Division by Intrinsically Unstructured Proteins; Intrinsic Flexibility, Modularity and Signaling Conduits. *Biochem* 47, 7598-7609.
- Gast, K., Damaschun, H., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Maurer, H.R., Müller-Frohne, M., Zirwer, D., Czarnecki, J., Damaschun, G. (1995). Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry* 34, 13211-13218.
- Haritos, A.A., Tsolas, O., Horecker, B.L. (1984). Distribution of prothymosin alpha in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1391-1393.
- Haritos, A.A., Salvin, S.B., Blacher, R., Stein, S., Horecker, B.L. (1985). Parathymosin alpha: a peptide from rat tissues with structural homology to prothymosin alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1050-1053.
- Haruki, H., Okuwaki, M., Miyagishi, M., Taira, K., Nagata, K. (2006). Involvement of Template-Activating Factor I/SET in Transcription of Adenovirus Early Genes as a Positive-Acting Factor. *J Virol* 80, 794-801.
- Hsu, W.L., Oldfield, C.J., Xue, B., Meng, J., Huang, F., Romero, P., Uversky, V.N., Dunker, A.K. (2013). Exploring the binding diversity of intrinsically disordered proteins involved in one-to-many binding. *Protein Science* 22, 258-273.
- Iakoucheva, L.M., Radivojac, P., Brown, C.J., O'Connor, T.R., Sikes, J.G., Obradovic, Z., Dunker, A.K. (2004). The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res*, 32, 1037-1049.
- Ichijo, T., Chrousos, G.P., Kino, T. (2008). Activated glucocorticoid receptor interacts with the INHAT component Set/TAF-Ibeta and releases it from a glucocorticoid-responsive gene promoter, relieving repression: implications for the pathogenesis of glucocorticoid resistance in acute undifferentiated leukemia with Set-Can translocation. *Mol Cell Endocrinol* 283, 19-31.
- Ikegami, K., Mukai, M., Tsuchida, J.-i., Heier, R.L., MacGregor, G.R., Setou, M. (2006). TTL7 is a mammalian b-tubulin polyglutamylase required for growth of MAP2-positive neurites. *J Biol Chem* 281, 30707-30716.

Ikegami, K., Heier, R.L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., et al. (2007). Loss of α -tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3213–3218.

Ikegami, K., Horigome, D., Mukai, M., Livnat, I., MacGregor, G.R., Setou, M. (2008). TTLL10 is a protein polyglycylase than can modify nucleosome assembly protein. *FEBS Lett* 582, 1129-1134.

Ikegami, K., Setou, M. (2010). Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. *Cell Struct Funct* 35, 15-22.

Inada, M., Izawa, G., Koboyashi, W., Ozawa, M. (2016). 293 cells express both epithelial as well as mesenchymal cell adhesion molecules. *Int J Mol Med* 37, 1521-1527.

Irie, A., Harada, K., Araki, N., Nishimura, Y. (2012). Phosphorylation of SET protein at Ser171 by protein kinase D2 diminishes its inhibitory effect on protein phosphatase 2A. *PLoS One* 7, e51242.

Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A.V., Strub, J.M., Temurak, N., van Dijk, D., Boucher, D., van Dorsselaer, A., Suryavanshi, S., Gaertig, J., Eddé, B. (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* 308, 1758-1762.

Janke, C., Rogowski, K., van Dijk, J. (2008). Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? 'Protein modifications: Beyond the usual suspects' Review Series. *EMBO Rep* 9, 636-41.

Janke, C., Bulinski, J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 773-786.

Jenuwein, T., Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074 – 1080.

Jiang, X., Kim, H.E., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S.C., Rosenberg, S., Wang, X. (2003). Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin- α in a death regulatory pathway. *Science* 299, 223-226.

Jorda, J., Xue, B., Uversky, V.N., Kajava, A.V. (2010). Protein tandem repeats - the more perfect, the less structured. *FEBS J* 277, 2673–2682.

Karetsou, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C.Y., Tsolas, O., Becker, P.B., Papamarcaki, T. (1998). Prothymosin α modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic Acids Res* 26, 3111-3118.

Karetsou, Z., Kretsovali, A., Murphy, C., Tsolas, O., Papamarcaki, T. (2002). Prothymosin α interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep* 3, 361-366.

Karetsou, Z., Martic, G., Tavoulari, S., Christoforidis, S., Wilm, M., Gruss, C., Papamarcaki, T. (2004). Prothymosin α associates with the oncoprotein SET and is involved in chromatin decondensation. *FEBS Lett* 577, 496-500.

Karetsou, Z., Martic, G., Sflomos, G., Papamarcaki, T. (2005). The histone chaperone SET/TAF-I β interacts functionally with the CREB-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 322-327.

Karetsou, Z., Emmanouilidou, A., Sanidas, I., Liokatis, S., Nikolakaki, E., Politou A.S., Papamarcaki, T. (2009). Identification of distinct SET/TAF-I β domains required for core histone binding and quantitative characterisation of the interaction. *BMC Biochem*, 10:10.

- Kashiwaya, K., Nakagawa, H., Hosokawa, M., Mochizuki, Y., Ueda, K., Piao, L., et al. (2010). Involvement of the tubulin tyrosine ligase-like family member 4 polyglutamylase in PELP1 polyglutamylation and chromatin remodeling in pancreatic cancer cells. *Mol Cell Pathol* 70, 4023-4033.
- Kato, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M., Nagata, K. (2007). Histone acetylation-independent transcription stimulation by a histone chaperone. *Nucleic Acids Res* 35, 705-715.
- Kato, K., Okuwaki, M., Nagata, K. (2011). Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J Cell Sci* 124, 3254-3265.
- Kellogg, D.R., Kikuchi, A., Fujii-Nakata, T., Turck, C.W., Murray, A.W. (1995). Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *J Cell Biol* 130, 661-673.
- Kierszenbaum, A.L. (2002). Sperm axoneme: a tale of tubulin posttranslation diversity. *Mol Reprod Dev* 62, 1-3.
- Kim, J.Y., Lee, K.S., Seol, J.E., Yu, K., Chakravarti, D., Seo, S.B. (2011). Inhibition of p53 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β represses p53 activity. *Nucleic Acids Res* 40, 75-87.
- Kimura, Y., Kurabe N., Ikegami, K., Tsutsumi, K., Konishi, Y., Kaplan, O.I., Kunitomo, H., Iino Y., Blacque O.E., Setou, M. (2010). Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases. *J Biol Chem* 285, 22936-22941.
- Kobayashi, T., Wang, T., Maezawa, M., Kobayashi, M., Ohnishi, S., Hatanaka, K., Hige, S., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M., Tanaka, J., Imamura, M., Hasegawa, K., Tanaka, Y., Brachmann, R.K. (2006). Overexpression of the oncoprotein prothymosin alpha triggers a p53 response that involves p53acetylation. *Cancer Res* 66, 3137-3144.
- Kondili, K., Tsolas, O., Papamarcaci, T. (1996). Selective interaction between parathymosin and histone H1. *Eur J Biochem* 242, 67-74.
- Komiyama, T., Pan, L.X., Haritos, A.A., Wideman, J.W., Pan, Y.C., Chang, M., Rogers, I., Horecker, B.L. (1986). The primary structure of rat parathymosin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 1242-1245.
- Kubo, T., Yanagisawa H.A., Yagi, T., Hirono, M., Kamiya, R. (2010). Tubulin polyglutamylation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dynein. *Curr Biol* 20, 441-445.
- Larcher, J.C., Boucher, D., Lazereg, S., Gros, F., Denoulet, P. (1996). Interaction of kinesin motor domains with α - and subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation. *J Biol Chem* 271, 22117-22124.
- Lalle, M., Camerini, S., Cecchetti, S., Fantauzzi, C.B., Crescenzi, M. and Pozio E. (2011). *Giardia duodenalis* 14-3-3 protein is polyglycylated by a tubulin tyrosine ligase-like member and deglycylated by two metalloproteinases. *J Biol Chem* 286, 4471-4484.
- Lechtreck, K.F., Geimer, S. (2000). Distribution of polyglutamylated tubulin in the flagellar apparatus of green flagellates. *Cell Motil Cytoskeleton* 47, 219-235.
- Leopoldino, A.M., Squarize, C.H., Garcia, C.B., Almeida, L.O., Pestana, C.R., Sobral, L.M., Uyemura, S.A., Tajara, E.H., Silvio Gutkind, J., Curti, C. (2012). SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. *Oral Oncol* 48, 1106-1113.

- Li, M., Makkinje, A., Damuni, Z. (1996). The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 271, 11059-11062.
- Lo, W.S., Duggan, L., Emre, N.C., Belotserkovskya, R., Lane, W.S., Shiekhattar, R., Berger, S.L. (2001). Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293, 1142 – 1146.
- Malicet, C, Giroux, V., Vasseur, S., Dagorn, J.C., Neira, J.L., Iovanna, J.L. (2006). Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin alpha complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2671-2676.
- Magdalena, C., Dominguez, F., Loidi, L., Puente, J.L. (2008). Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Br J Cancer* 82, 584–590.
- Markova, O.V, Evstafieva, A.G., Mansurova, S.E., Moussine, S.S., Palamarchuk, L.A., Pereverzev, M.O., Vartapetian, A.B., Skulachev, V.P. (2003). Cytochrome c is transformed from anti- to pro-oxidant when interacting with truncated oncoprotein prothymosin alpha. *Biochim Biophys Acta* 1557, 109–117.
- Martic, G., Karetsou Z., Kefala, K., Politou A.S., Clapier, C.R., Staub, T., Papamarcaci, T. (2005). Parathymosin affects the binding of linker histone H1 to nucleosomes and remodels chromatin structure. *J Biol Chem* 280, 16143-16150.
- Martini, P.G., Delage-Mourroux, R., Kraichely, D.M., Katzenellenbogen, B.S. (2000). Prothymosin alpha selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity. *Moll Cell Biol* 20, 6229-6232.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Ui, M., Hanaoka, F. (1993). Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J Biol Chem* 268, 10582-10587.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Okuwaki, M., Tsujimoto, M. (1999). Histone- and chromatin-binding activity of template activating factor-I. *FEBS Lett* 463, 285-288.
- McBryant, S.J., Park, Y.J., Abernathy, S.M., Laybourn, P.J., Nyborg, J.K., Luger, K. (2003). Preferential binding of the histone (H3–H4)₂ tetramer by NAP1 is mediated by the amino-terminal histone tails. *J. Biol. Chem.* 278, 44574- 44583.
- Miller, K.E., Heald, R. (2015). Glutamylation of Nap1 modulates histone H1 dynamics and chromosome condensation in *Xenopus*. *J Cell Biol* 209, 211-220.
- Million, K., Larcher, J., Laoukili, J., Bourguignon, D., Marano, F., and Tournier, F. (1999). Polyglutamylation and polyglycylation of α - and β -tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells. *J Cell Sci* 112, 4357–4366.
- Minguez, P., Parca, L., Diella, F., Mende, D.R., Kumar, R., Helmer-Citterich, M., Gavin, A-C., van Noort, V., Bork, P. (2012). Deciphering a global network of functionally associated post-translational modifications. *Mol Syst Biol* 8, 1 – 14.
- Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., Horikoshi, M. (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-I β /INHAT and its histone chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4285-4290.
- Nagata, K., Saito, S., Okuwaki, M., Kawase, H., Furuya, A., Kusano, A., Hanai, N., Okuda, A., Kikuchi, A. (1998). Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp Cell Res* 240, 274-281.
- Nishi, H., Hashimoto, K., Panchenko, A.R. (2011). Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure* 19, 1807 – 1815.

- Okamoto, K., Isohashi, F. (2000). Purification and primary structure of a macromolecular-translocation inhibitor II of glucocorticoid-receptor binding to nuclei from rat liver. Inhibitor II is the 11.5-kDa Zn²⁺-binding protein (parathymosin). *Eur J Biochem* 242, 67-74.
- Oldfield, C.J., Meng, J., Yang, J.Y., Yang, M.Q., Uversky, V.N., Dunker, A.K. (2008). Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics* 9(Suppl 1), S1.
- Onikubo, T., Nicklay, J.J., Xing, L., Warren, C., Anson, B., Wang, W.L., Burgos, C., et al. (2015). Developmentally regulated post-translational modification of nucleoplamin controls histone sequestration and deposition, *Cell Reports* 10, 1735-1748.
- Ouellet, V., Le Page, C., Guyot, M.C., Lussier, C., Tonin, P.N., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M. (2006). SET complex in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 119, 2119-2126.
- Papamarcaki, T., Tsolas, O. (1994). Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett* 345, 71-75.
- Park, Y.J., Chodaparambi, J.V., Bao, Y., McBryant, S.J., Luger, K. (2005). Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem* 280, 1817-1825.
- Park, Y.J., Luger, K. (2006). The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1248-1253. **(a)**
- Park, Y.J., Luger, K. (2006). Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem Cell Biol* 84, 549-558. **(b)**
- Pathak, N., Obara, T., Mangos, S., Liu, Y., Drummond, I.A. (2007). The zebrafish fleer gene encodes an essential regulator of cilia tubulin polyglutamylation. *Mol Biol Cell* 18, 4353-4364.
- Pavlov, N.A., Cherny, D.I., Heim, G., Jovin, T.M., Subramaniam, V. (2002). Amyloid fibrils from the mammalian protein prothymosin alpha. *FEBS Lett* 517, 37-40.
- Pegoraro, G., Marcello, A., Myers, M.P., Giacca, M. (2006). Regulation of adeno-associated virus DNA replication by the cellular TAF-I/set complex. *J Virol* 80, 6855-6864.
- Peng, Z., Mizianty, M.J., Kurgan, L. (2014). Genome-scale prediction of proteins with long intrinsically disordered regions. *Proteins* 82, 145-158.
- Piñeiro, A., Cordero, O.J., Nogueira, M. (2000). Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides* 21, 1433-1446.
- Qi, X., Wang, L., Du, F. (2010). Novel small molecules relieve prothymosin alpha-mediated inhibition of apoptosome formation by blocking its interaction with Apaf-1. *Biochemistry* 49, 1923-1930.
- Redeker, V., Le Caer, J.P., Rossier, J., and Prome, J.C. (1991). Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to α -tubulin. *J Biol Chem* 266, 23461-23466.
- Regnard, C., Desbruyeres, E., Denoulet, P., and Eddé, B. (1999). Tubulin polyglutamylation: isozymic variants and regulation during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Sci* 112, 4281-4289.
- Regnard, C., Desbruyeres, E., Huet, J.C., Beauvallet, C., Pernollet, J.C., Eddé, B. (2000). Polyglutamylation of nucleosome assembly proteins. *J Biol Chem* 275, 15969-15976.

Rogowski, K., Juge, F., van Dijk, J., Wloga, D., Strub J.M., Levilliers, N., Thomas, D., Bré, M.H., van Dorsselaer, A., Gaertig, J., Janke, C. (2009). Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell* 137, 1076-1087.

Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M.M., Bosc, C., Deloulme, J.C., Bosson, A., Petris, L., Gold, N.D., Lacroix, B., Bosch Grau, M., Bec, N., Larroque, C., Desagher, S., Holzer, M., Andrieux, A., Moutin, M.J., Janke, C. (2010). A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564-578.

Roll-Mecak, A. (2015). Intrinsically disordered tubulin tails: complex tuners of microtubule functions? *Semin Cell Dev Biol* 37, 11-19.

Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E.C., Brown, C.J., Dunker, A.K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* 42, 38–48.

Rüdiger, M., Plessman, U., Kloppel, K.D., Wehland, J., Weber, K. (1992). Class II tubulin, the major brain β tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. *FEBS Lett* 308, 101–105.

Sasaki, H., Nonaka, M., Fujii, Y., Yamakawa, Y., Fukai, I., Kiriyama, M., Sasaki, M. (2001). Expression of the prothymosin-a gene as a prognostic factor in lung cancer. *Surg Today* 31, 936–938.

Sburlati, A.R., Manrow, R.E., Berger, S.L. (1991). Prothymosin alpha antisense oligomers inhibit myeloma cell division. *Proc natl Acad Sci USA* 88, 253-257.

Sburlati, A.R., De La Rosa, A., Batey, D.W., Kurys, G.L., Manrow, R.E., Pannell, L.K., Martin, B.M., Sheeley, D.M., Berger, S.L. (1993). Phosphorylation of human and bovine prothymosin alpha in vivo. *Biochemistry* 32, 4587-4596.

Schneider, A., Plessmann, U., Weber, K. (1997). Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei* are extensively glutamylated. *J Cell Sci* 110, 431–437.

Schneider, A., Plessman, U., Felleisen, R. and Weber, K. (1998). Posttranslational modifications of trichomonad tubulins; identification of multiple glutamylation sites. *FEBS Lett.* 429, 399-402.

Seo, S.B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W.S., Chakravarti, D. (2001). Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* 104, 119-130.

Serber, Z., Ferrell, J.E. Jr. (2007). Tuning bulk electrostatics to regulate protein function. *Cell* 128, 441-444.

Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F.L. (2002). Preferential trans-formation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16, 869-871.

Shukla, A., Chaurasia, P., Bhaumik, S.R. (2009). Histone methylation and ubiquitination with their cross-talk and roles in gene expression and stability. *Cell Mol life Sci* 66, 1419 – 1433.

Sirajuddin, M., Rice, L.M. and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and posttranslational modifications. *Nat Cell Biol.* 4, 335–344.

Soucet, K., Kamaid, A., Phung, A.D., Kubala, L., Bulinski, J.C., Harper, R.W., Eiserich, J.P. (2006). Normal and prostate cancer cells display distinct molecular profiles of α -tubulin posttranslational modifications. *Prostate* 66, 954-965.

- Suryavanshi, S., Eddé, B., Fox, L.A., Guerrero, S., Hard, R., Hennessey, T., Kabi, A., Malison, D., Pennock, D., Sale, W.S., Wloga, D., Gaertig, J. (2010). Tubulin glutamylation ciliary motility by altering inner arm activity. *Curr Biol* 20, 435-440.
- Szabo, P., Clinton, M., Macera, M. and Horecker, B.L. (1989). Localization of the gene coding for parathymosin to chromosome 17 in humans. *Cytogenet Cell Genet*, 50, 91-92.
- Szabo, P., Panneerselvam, C., Clinton, M., Frangou-Lazaridis, M., Weksler, D., Whittington, E., Macera, M.J., Grzeschik, K.H., Selvakumar, A., Horecker, B.L. (1993). Prothymosin alpha gene in humans: organization of its promoter region and localization to chromosome 2. *Hum Genet* 90, 629-634.
- Ten Klooster, J.P., Leeuwen, Iv., Scheres, N., Anthony, E.C., Hordijk, P.L. (2007). Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J* 26, 336-345.
- Thorn, K.S., Ubersax, J.A., Vale, R.M. (2000). Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J Cell Biol* 151, 1093-1100.
- Tripathi, S.C., Matta, A., Kaur, J., Grigull, J., Chauhan, S.S., Thakar, A., Shukla, N.K., Duggal, R., Choudhary, A.R., Dattagupta, S., Sharma, M.C., Ralhan, R., Siu, K.W. (2011). Overexpression of prothymosin alpha predicts poor disease outcome in head and neck cancer. *PLoS One* 6, e19213.
- Trompeter, H.I., Söling, H.D. (1992). Cloning and characterisation of a gene encoding the 11.5 kDa zinc-binding protein (parathymosin-alpha). *FEBS Lett* 298, 245-248.
- Trompeter, H.I., Schiermeyer, A., Blankenburg, G., Hennig, E., Söling, H.D. (1999). Factors involved in the cell density-dependent regulation of nuclear/cytoplasmic distribution of the 11.5-kDa Zn(2+)-binding protein (parathymosin-alpha) in rat hepatocytes. *J Cell Sci* 112, 4113-4122.
- Tsai, Y.S., Jou, Y.C., Lee, G.F., Chen, Y.C., Shiau, A.L., Tsai, H.T., Wu, C.L., Tzai, T.S. (2009). Aberrant prothymosin-alpha expression in human bladder cancer. *Urology* 73, 188-192.
- Ueda, H., Fujita, R., Yoshida, A., Matsunaga, H., Ueda, M. (2007). Identification of prothymosin-alpha1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures. *J Cell Biol* 176, 853-862.
- Uversky, V.N., Gillespie, J.R., Fink, A.L. (2000). Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41, 415-427.
- Van Dijk, J., Rogowski, K., Miro, J., Lacroix, B., Edde, B., Janke, C. (2007). A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol Cell* 26, 437-448.
- van Dijk, J., Miro, J., Strub, J.M., Lacroix, B., van Dorseelaer, A., Edde, B., Janke, C. (2008). Polyglutamylation is a post-translational modification with a broad range of substrates. *J Biol Chem* 283, 3915-3922.
- van Roey, K., Dinkel, H., Weatheritt, R.J., Gibson, T.J., Davey, N.E. (2013). The switches.ELM resource: a compendium of conditional regulatory interaction interfaces. *Sci Signal* 6 : rs7.
- Vareli, K., Tsolas, O., Frangou-Lazaridis, M. (1996). Regulation of prothymosin alpha during the cell cycle. *Eur J Biochem* 238, 799-806.
- Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M., van der Kraan, I., Tsolas O., van Driel, R. (2000). Nuclear distribution of prothymosin alpha and parathymosin: evidence that prothymosin alpha is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication. *Exp Cell Res* 257, 152-166.

- von Lindern M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeyer, A., Grosveld, G. (1992). Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* 12, 3346-3355.
- Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., Jones, D.T. (2004). Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* 337, 635–645.
- Weber, K., Schneider, A., Westermann, S., Muller, N., Plessmann, U. (1997). Posttranslational modifications of α - and β -tubulin in *Giardia lamblia*, an ancient eukaryote. *FEBS Lett* 419, 87-91.
- Westermann, S., Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Moll Cell Biol* 4, 938-947.
- Williams, R.M., Obradovi, Z., Mathura, V., Braun, W., Garner, E.C., Young, J., Takayama, S., Brown, C.J., Dunker, A.K. (2001). The protein non-folding problem: amino acid determinants of intrinsic order and disorder. Pacific Symposium on Biocomputing. *Pac Symp Biocomput* 89–100.
- Wolff, A., de Nechaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyeres, E., Audebert, S., Edde, B., Gros, F., and Denoulet, P. (1992). Distribution of glutamylated α - and β -tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell Biol.* 59, 425–432.
- Wolff, A., Houdayer, M., Chillet, D., de Nechaud, B., Denoulet, P. (1994). Structure of the polyglutamyl chain of tubulin: occurrence of α and γ linkages between glutamyl units revealed by monoreactive polyclonal antibodies. *Biol Cell* 81, 11-16.
- Wright, P.E., Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293, 321-331.
- Wright, P.E., Dyson, H.J. (2009). Linking folding and binding. *Curr Opin Struct Biol* 19, 31-38.
- Xia, P., Ye, P., Wang, S., Zhu, X., Du, Y., Xiong, Z., Tian, Y., Fan, Z. (2016). Glutamylation of the DNA sensor cGAS regulates its binding and synthase activity in antiviral immunity. *Nat Immunol* 17, 369-378.
- Ye, B., Li, C., Yang, Z., Hao, J., Wang, L., Li Y., Du Y., Hao L., Liu, B., Wang, S., Xia, P., Huang, G., Sun, L., Tian, Y., Fan, Z. (2014). Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation. *J Exp Med* 211, 2439-2454.
- Zakharova, N.I., Sokolov, V.V., Suvorova, A.A., Shiao, A.I., Wu, C.L., Efstaeva, A.G. (2011). Prothymosin α interacts with C-terminal domain of histone H1 and dissociates p53-histone H1 complex. *Mol Biol* 45, 679-688.
- Zemmel H., Luedtke, J., Kumar, Y., Biernat, J., Dawson, H., Mandelkow, E., Mandelkow E.M. (2013). Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via tau-independent microtubule severing by TTL6 and spastin. *EMBO J* 32, 2920-2937.