

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα  
«Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής»

«Ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1  
κατά την ενεργοποίηση του spindle checkpoint»

**Ιωάννα Περάκη**

Υπεύθυνος καθηγητής και επιστημονικά υπεύθυνος: Δρ. Γ. Ζάχος

Εξεταστές: Δρ. Δ. Τζαμαρίας και Δρ. Γ. Χαλεπάκης

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2010

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</b>	<b>3</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>6</b>
1. Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoints).....	6
2. Chk1: Ένας από τους κύριους ρυθμιστές των σημείων ελέγχου.....	7
<i>Chk1 και βιωσιμότητα.....</i>	<i>7</i>
<i>Δομή της Chk1.....</i>	<i>7</i>
3. Chk1 και G2/M σημείο ελέγχου.....	8
4. Η Chk1 στο spindle checkpoint.....	10
<i>Η Chk1 παρουσία ταξόλης.....</i>	<i>11</i>
<i>Η Chk1 παρουσία νοκοδαζόλης.....</i>	<i>12</i>
<i>Η Chk1 απουσία φαρμάκων.....</i>	<i>12</i>
5. Χημική γενετική: Μέθοδος ταυτοποίησης υποστρωμάτων κινασών.....	13
6. Αντικείμενο μελέτης.....	14
<b>II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>16</b>
1. Κυτταρικές σειρές και κυτταροκαλλιέργειες.....	16
2. Αντισώματα.....	16
3. Χειρισμοί με φάρμακα.....	17
4. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry).....	17
5. Ανοσοφθορισμός και Συνεστιακή Μικροσκοπία (confocal microscopy).....	18
6. Λύση κυττάρων (whole cell lysates).....	19
7. Απομόνωση εκχυλίσματος μιτωτικής ατράκτου.....	19
8. Ανοσοαποτύπωση Western.....	20

9. Ανοσοκατακρήμιση (IP).....	21
10. Ομοιοπολική σύνδεση της Chk1 σε πρωτεΐνης A σφαιρίδια σεφαρόζης.....	21
11. Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με χρώση νιτρικού αργύρου (Silver Staining).....	22
12. Φασματοσκοπία μάζας (mass-spectrometry).....	22
<b>III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>23</b>
<u>Εφαρμογή χημικής γενετικής για τη μελέτη των λειτουργιών της Chk1</u>	
1. Έλεγχος της λειτουργίας του χημικού αναστολέα NM-PP1 στο G2/M επαγόμενο από βλάβη του DNA σημείο ελέγχου.....	23
2. Έλεγχος της λειτουργίας του χημικού αναστολέα NM-PP1 και 3MB-PP1 στο spindle checkpoint.....	26
<u>Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη Chk1 με απομόνωση εκχυλίσματος της μιτωτικής ατράκτου</u>	
3. Συγχρονισμός των κυττάρων HeLa στη μίτωση παρουσία ταξόλης.....	27
4. Απομόνωση της Chk1 με λύση κυττάρων οδηγεί σε προσμίξεις από μη- ειδικές πρωτεΐνες.....	29
5. Η Chk1 απομονώνεται σε 0,02% Triton μέσω εκχυλίσματος μιτωτικών ατράκτων.....	30
6. Απομάκρυνση της τουμπουλίνης με τη χρήση ασβεστίου.....	32
7. Ανίχνευση της Chk1 και των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά μετά από ανοσοκατακρήμιση.....	33
8. Ομοιοπολική σύνδεση αντισώματος για την Chk1 σε σφαιρίδια.....	34
9. Απομόνωση των μιτωτικών κυττάρων HeLa παρουσία ταξόλης και ανίχνευση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1.....	35
<b>IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>38</b>
<b>VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>40</b>

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και ερευνητή Γ. Ζάχο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπαιδευτώ επιστημονικά και ερευνητικά ως μέλος της ομάδας του και για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση, σταθερή ενθάρρυνση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της επιτροπής Δρ. Δ. Τζαμαρία και Δρ. Γ. Χαλεπάκη για τη συνεργασία τους.

Ευχαριστώ θερμά την Τώνια Ακουμιανάκη για την επιστημονική της συνεισφορά και συμπαράσταση στο ξεκίνημα της παρούσας εργασίας, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και το ενδιαφέρον για τα επόμενα μου βήματα, ερευνητικά και επαγγελματικά.

Ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου Ελένη Πετσαλάκη για τη πολύτιμη συνεργασία της και τη Γωγώ Ξενάκη για τη μικρή σε διάρκεια αλλά ευχάριστη συνεργασία μας.

Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τις φίλες μου Μαίρη, Εμμανουέλα, Μαρία, Σοφία, Αναστασία και Μακρίνα για την πολύτιμη συμπαράσταση, ενθάρρυνση και υπομονή τους και κυρίως για τη φιλία τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για όσα πέρασαν και συνεχίζουν να περνούν μαζί μου ...

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το spindle checkpoint σταματά την έναρξη της ανάφασης όταν τα χρωμοσώματα δεν έχουν διαταχθεί στο ισημερινό επίπεδο με ακρίβεια και προστατεύει από λάθη στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Ενεργοποιείται όταν οι μικροσωληνίσκοι δεν έχουν προσδεθεί στους κινητοχώρους ή όταν υπάρχει λάθος τάση ανάμεσα στους αδελφούς κινητοχώρους. Η Chk1 έχει καλά χαρακτηρισμένους ρόλους στο σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου το οποίο επάγεται από βλάβες του DNA (DNA damage checkpoint) ωστόσο ο ακριβής ρόλος της Chk1 και τα πιθανά υποστρώματά της στο spindle checkpoint δεν έχουν πλήρως περιγραφεί. Για να ανιχνεύσουμε πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η Chk1 στο spindle checkpoint παρουσία ταξόλης σε κύτταρα σπονδυλοζώων χρησιμοποιήσαμε δύο προσεγγίσεις. α) Με τη μέθοδο της χημικής γενετικής ελέγξαμε εάν κύτταρα κοτόπουλου DT40 Chk1<sup>as</sup>, τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνη Chk1 ευαίσθητη σε αναστολή από τις ογκώδεις χημικές ενώσεις NM-PP1 και 3MB-PP1, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανεύρεση νέων υποστρωμάτων της Chk1 στο G2/M DNA damage και στο spindle checkpoint, β) Απομονώσαμε εκχύλισμα μιτωτικών ατράκτων από κύτταρα ανθρώπου HeLa μετά από επώαση με ταξόλη και ανιχνεύσαμε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την Chk1 μετά από ανοσοκατακρήμνιση. Δείξαμε ότι: α) Τα κύτταρα DT40 Chk1<sup>as</sup> δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την ανεύρεση νέων υποστρωμάτων της Chk1 στο G2/M DNA damage αλλά όχι στο spindle checkpoint, β) Ανιχνεύσαμε πρωτεΐνες που πιθανά αλληλεπιδρούν με την Chk1 με μοριακά βάρη περίπου 160, 105 και 75 kDa. Η ταυτοποίηση τους αναμένεται μετά από ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας. Ανίχνευση νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1 στο spindle checkpoint θα οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της κυτταρικής διαίρεσης.

Λέξεις κλειδιά: Chk1, spindle checkpoint, πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, υποστρώματα, χημική γενετική

## ABSTRACT

The spindle checkpoint blocks initiation of anaphase when chromosomes are not bipolarly attached to spindle microtubules and protects against chromosome mis-segregation. The spindle checkpoint is triggered by unattached kinetochores or lack of tension across attached sister kinetochores. Chk1 has well-defined roles in the DNA damage checkpoints, but the role and substrates of Chk1 in the spindle checkpoint have not been fully described. We used two approaches to identify novel proteins that interact with Chk1 during activation of the spindle checkpoint by taxol in vertebrate cells : a) Using chemical genetics, we investigated whether avian DT40 Chk1<sup>as</sup> cells expressing a mutant Chk1 which is sensitive to inhibition by bulky compounds NM-PP1 and 3MB-PP1, may be used to identify novel Chk1 substrates in the G2/M DNA damage and spindle checkpoints, b) We isolated mitotic spindles extracts from human HeLa cells and detected Chk1-interacting proteins by immunoprecipitation experiments. We showed that: a) DT40 Chk1<sup>as</sup> cells might be used to identify Chk1 substrates in the G2/M DNA damage, but not the spindle checkpoint, b) We detected Chk1-interacting candidate proteins with approximate masses of 160, 105 and 75 kDa and will identify them by mass-spectrometry. Identifying novel Chk1 interacting proteins in the spindle checkpoint will help us to better understand the mechanisms of mitotic cell division.

Key words: Chk1, spindle checkpoint, protein interactions, chemical genetics, substrates

# I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoints)

Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι βασικοί μηχανισμοί που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη μια φάση στην άλλη και διασφαλίζουν ότι κρίσιμα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου γίνονται με τη σωστή σειρά και χρονική διάρκεια (Abraham, 2001). Ενεργοποιούνται κυρίως από βλάβες του DNA, μπλοκάρισμα της αντιγραφής και ελαττώματα της μιτωτικής ατράκτου, με στόχο το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση των βλαβών ή την απόπτωση σε περίπτωση αποτυχίας της επιδιόρθωσης (Elledge, 1996). Τα μονοπάτια που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου είναι κοινά στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τονίζοντας τη συντήρηση των ρυθμιστικών στοιχείων που εμπλέκονται στα σημεία ελέγχου. Απώλεια των σημείων ελέγχου έχει ως αποτέλεσμα την αστάθεια του γονιδιώματος και τη δημιουργία καρκινικών κυττάρων (Bartek and Lukas, 2003).

Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου χωρίζονται ανάλογα με το είδος βλάβης σε τρεις κατηγορίες: α) το επαγόμενο από βλάβη του DNA σημείο ελέγχου (**DNA damage checkpoint**), το οποίο αναλόγως με τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκεται το κύτταρο υποδιαιρείται σε G1, Intra-S και G2/M σημείο ελέγχου (Samuel et al., 2002), β) το επαγόμενο από μπλοκάρισμα της αντιγραφής του DNA σημείο ελέγχου (**DNA replication checkpoint**), το οποίο οδηγεί σε σταθεροποίηση των ακινητοποιημένων διχάλων (Desany et al., 1998; Lopes et al., 2001), καταστολή της πυροδότησης των αρχών αντιγραφής ώστε η σύνθεση του DNA να συνεχιστεί μετά από επιδιόρθωση της βλάβης (Kim and Huberman, 2001; Santocanale and Diffley, 1998) και σε καταστολή της εισόδου του κυττάρου στη μίτωση παρουσία μη-αντιγραφόμενου DNA (S-M checkpoint) (Amon, 1999; Zachos et al., 2005) και γ) το επαγόμενο από βλάβες της μιτωτικής ατράκτου σημείο ελέγχου (**mitotic spindle checkpoint**), το οποίο διασφαλίζει το σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και επομένως την πιστότητα της μίτωσης (Kang and Yu, 2009; Kops et al., 2005).

## **2. Chk1: Ένας από τους κύριους ρυθμιστές των σημείων ελέγχου**

Από τους κυριότερους ρυθμιστές των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι η πρωτεϊνική κινάση Chk1 (checkpoint1), κατέχοντας σημαντικό ρόλο στην πρόοδο και την πιστότητα του κυτταρικού κύκλου (Zachos et al., 2007).

### Chk1 και βιωσιμότητα

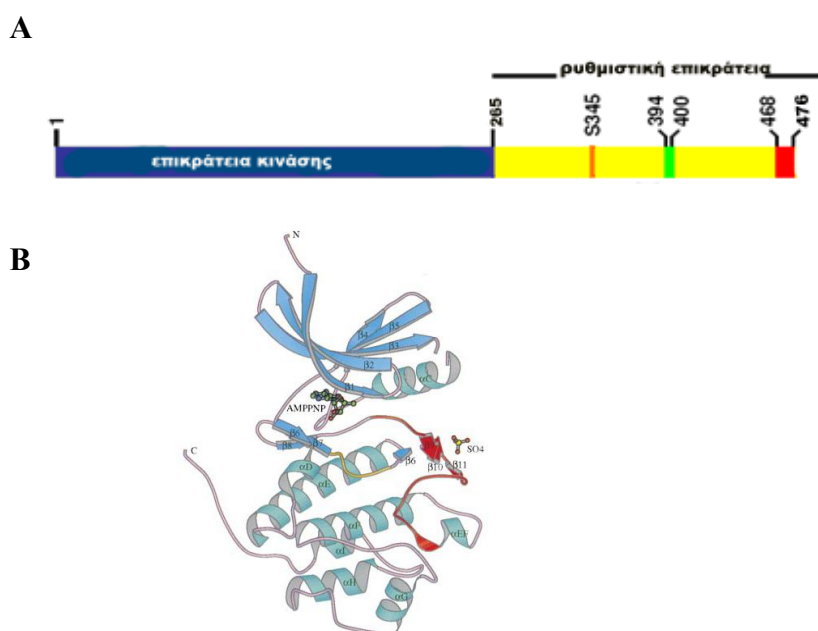
Η Chk1 είναι αναγκαία για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση νωρίς κατά την εμβρυογένεση σε ποντίκια (Takai et al., 2000) και για το βέλτιστο πολλαπλασιασμό των σωματικών κυττάρων πτηνών (Zachos et al., 2003b). Απαλοιφή της Chk1 (*Chk1*<sup>-/-</sup>) σε εμβρυικά κύτταρα ποντικών έχει ως αποτέλεσμα μορφολογικές ανωμαλίες του πυρήνα στο στάδιο της βλαστοκύστης και τελικά οδηγεί σε θάνατο (Takai et al., 2000). Απαλοιφή της Chk1 σε DT40 Β-λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο έχει ως αποτέλεσμα μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και αυξημένα ποσοστά κυτταρικού θανάτου, όμως τα κύτταρα είναι βιώσιμα (Zachos et al., 2003b).

### Δομή της Chk1

Η Chk1 είναι συντηρημένη κινάση σερίνης-θρεονίνης μεγέθους 54 kDa με 476 αμινοξέα στον άνθρωπο (Sanchez et al., 1997) και αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη επικράτεια κινάσης στο αμινοτελικό άκρο (κατάλοιπα 1-265) ακολουθώμενη από ένα συνδέτη (linker) και μία λιγότερο συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή, ~200 αμινοξέων σε όλα τα είδη (Chen et al., 2000), αποτελούμενη από συντηρημένα SQ μοτίβα που διαμορφώνουν τις πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης από τις ATM και ATR κινάσες (Εικόνα 1A) (Liu et al., 2000; Zhao and Piwnica-Worms, 2001). Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης επικράτειας κινάσης της Chk1 σε σύμπλοκο με το AMP-PNP, ένα ανάλογο του ATP, έχει προσδιοριστεί και αποκαλύπτει μία ταυτόσημη με άλλες κινάσες ανοιχτή διαμόρφωση (Εικόνα 1B). Η αμινοτελική επικράτεια της Chk1 αποτελείται από β δομές στον ένα λοβό, ενώ στον άλλο λοβό είναι κατά μεγάλο μέρος ελικοειδής. Οι δύο λοβοί ενώνονται με μία περιοχή συνδέτη. Το ενεργό κέντρο είναι στο σημείο ένωσης των δύο λοβών. Επιπλέον, δεν παρατηρείται αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης παρουσία AMP-PNP και του αποενζύμου (Chen et al., 2000). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το καρβοξυτελικό άκρο κατέχει ανασταλτικό ρόλο με το να ανταγωνίζεται τη θέση πρόσδεσης του ATP στο ίδιο μορίο και να μπλοκάρει την πρόσδεση υποστρώματος (Tapia-Alveal et al., 2009). Οι φωσφορυλιώσεις στη S345 και S317 που ενεργοποιούν την Chk1 όταν υπάρχει βλάβη στο DNA πιθανότητα σταματούν αυτή την αυτοκαταστολή (Katsuragi and Sagata, 2004). Η φωσφορυλίωση



της Chk1 μπορεί να διευκολύνει την αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες συνεισφέροντας στα σημεία ελέγχου (Taria-Alveal et al., 2009).



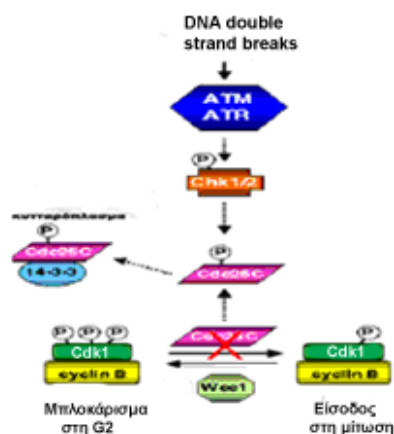
**Εικόνα 1. Α. Επικράτειες της Chk1 στον άνθρωπο.** Η Chk1 αποτελείται από μία αμινοτελική επικράτεια ενεργότητας κινάσης (μπλε) και μία καρβοξυτελική ρυθμιστική επικράτεια (κίτρινο). Υποδεικνύονται οι δύο συντηρημένες περιοχές (κόκκινο και πράσινο) μεταξύ των ειδών και η φωσφορυλίωση ενεργοποίησης στη S345 κατά το G2/M (πορτοκαλί) στο καρβοξυτελικό άκρο. **Β. Κρυσταλλική δομή της επικράτειας κινάσης της Chk1 σε σύμπλοκο με το AMP-PNP.** Οι α-έλικες εμφανίζονται με μπλε, οι β-δομές με κυανό, η καταλυτική λούπα με πορτοκαλί και η λούπα ενεργοποίησης με κόκκινο. Στοιχεία της δευτεροταγής δομής αριθμούνται από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο (Chen et al., 2000).

### 3. Chk1 και G2/M σημείο ελέγχου

Το G2/M σημείο ελέγχου επάγεται από βλάβη του DNA και μπλοκάρει τα κύτταρα στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου, ώστε να επιδιορθωθεί η βλάβη πριν την έναρξη της μίτωσης (Ye et al., 1997). Η Chk1 ταυτοποιήθηκε στο σακχαρομύκητα ως απαραίτητη κινάση για το G2/M επαγόμενο από βλάβη του DNA σημείου ελέγχου (Walworth et al., 1993). Βλάβες στο DNA σε *Chk1*<sup>-/-</sup> κύτταρα θηλαστικών και κοτόπουλου αποτυγχάνουν να σταματήσουν τον κυτταρικό κύκλο πριν την έναρξη της μίτωσης, επιβεβαιώνοντας την αναγκαιότητα της Chk1 στη

ρύθμιση του G2/M σημείου ελέγχου κύκλου (Takai et al., 2000); (Zachos et al., 2003b).

Κατά τη δημιουργία θραυσμάτων του DNA (double strand breaks) από ιονίζουσα ακτινοβολία ή από αναστολές τοποϊσομερασών κατά τη διάρκεια της G2 φάσης, οι ATR και ATM κινάσες στρατολογούνται στην περιοχή της βλάβης, φωσφορυλιώνουν την ανθρώπινη Chk1 στη S345 και S317 και την ενεργοποιούν (Jazayeri et al., 2006). Επίσης, η Chk1 φωσφορυλιώνεται από τη Cdk1 στη S284 και S301 (Ikegami et al., 2008). Ίσως, συνεισφέρουν στη μεταφορά της Chk1 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα κατόπιν αποφωσφορυλίωσης της στη S345 και S317 και απενεργοποίησης του σημείου ελέγχου (Ikegami et al., 2008). Ένας από τους καλύτερους χαρακτηρισμένους στόχους της Chk1 είναι η Cdc25C, μία φωσφατάση τυροσίνης η οποία αποφωσφορυλιώνει τη κινάση σερίνης/θρεονίνης Cdk1 (ή Cdc2) στην T14 και Y15 (ανασταλτικές φωσφορυλιώσεις), έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργότητα της κινάσης και τη μετάβαση στη μίτωση (Εικόνα 2) (Rhind et al., 2000). Η φωσφορυλίωση της Cdc25C στη S216 (Loffler et al., 2007) οδηγεί στη μεταφορά της στο κυτταρόπλασμα μέσω των 14-3-3 πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τη φωσφορυλιωμένη στη S345 και S317 μορφή της Chk1 (Carasso et al., 2002; Chen et al., 1999) έχοντας ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ανασταλτικών φωσφορυλιώσεων στη Cdk1 και την αναστολή της εισόδου στη μίτωση. Η Chk1 επίσης ενισχύει την ενεργότητα της Wee1, κινάσης που φωσφορυλιώνει άμεσα τη Cdk1 (στη T14 και Y15), με επακόλουθη απενεργοποίηση της (O'Connell et al., 1997). Αν και οι ακριβείς λεπτομέρειες δεν έχουν αποδειχθεί πλήρως, γενετικές και βιοχημικές ενδείξεις προτείνουν ότι υπάρχει μία συντονισμένη ρύθμιση των αρνητικών και θετικών ρυθμιστών της φωσφορυλίωσης της Cdk1 στη T14 και Y15 (Raleigh and O'Connell, 2000).

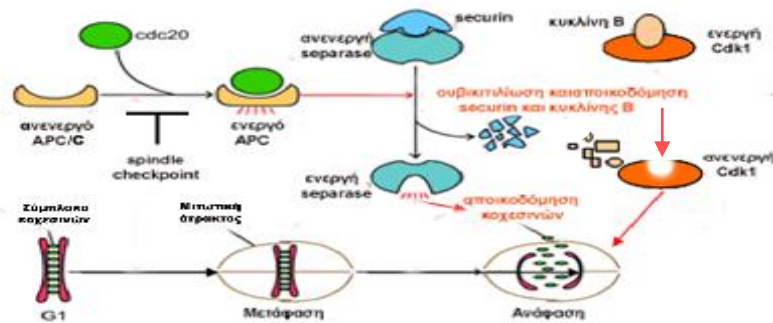


**Εικόνα 2. Το G2/M σημείο ελέγχου.** Η Chk1 ενεργοποιείται από την ATM/ATR κινάση και φωσφορυλιώνει τη Cdc25C φωσφατάση, η οποία μεταφέρεται από τις 14-3-3 πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα η Cdk1 (Cdc2) να απενεργοποιείται (Nyberg et al., 2002).

#### 4. Η Chk1 στο Spindle checkpoint

Το spindle checkpoint είναι ένας μηχανισμός του κυττάρου που διασφαλίζει το σωστό διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων εμποδίζοντας τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση, όταν υπάρχουν βλάβες στη μιτωτική άτρακτο. Ενεργοποιείται όταν οι μικροσωληνίσκοι δεν έχουν προσδεθεί στους κινητοχώρους καθώς και όταν υπάρχει έλλειψη τάσης ανάμεσα στις αδελφές χρωματίδες στις οποίες έχουν προσδεθεί οι μικροσωληνίσκοι (Kops et al., 2005). Ελαττώματα στο spindle checkpoint οδηγούν σε ανευπλοειδία, η οποία συνδέεται με την καρκινογένεση (Bharadwaj and Yu, 2004).

Το spindle checkpoint αναστέλλει την έναρξη της μίτωσης μέσω άμεσης πρόσδεσης της υπομονάδας Cdc20 του APC/C συμπλόκου (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) και επακόλουθη απενεργοποίησή του (Εικόνα 3). Το ενεργό APC/C είναι μία λιγάση ουβικιτίνης, το οποίο είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων στο στάδιο μετάφασης-ανάφασης και δρα ταυτόχρονα με δύο τρόπους: α) αποικοδομεί τη securin ώστε να απελευθερωθεί η separase, η οποία αποικοδομεί τις κοχεςίνες οι οποίες διαχωρίζουν τις αδελφές χρωματίδες β) αποικοδομεί τη ρυθμιστική υπομονάδα της Cdk1, τη κυκλίνη B, ώστε να πραγματοποιηθεί η μιτωτική έξοδος. Η BubR1 μαζί με τις πρωτεΐνες Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, Mps1 και το CPC (Chromosomal Passengers Complex) το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες Aurora B, INCENP, Survivin, Borealin και CSC-1 TD-60 αποτελούν τα κύρια στοιχεία του spindle checkpoint (Kang and Yu, 2009). Ο εντοπισμός των BubR1 και Mad2 στους κινητοχώρους οδηγούν στην πρόσδεση του Cdc20 και ενεργοποιούν την ενεργότητα της Bub1 προς τη Cdc20 (Sudakin et al., 2001) αναστέλλοντας το APC κι επομένως το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και την πρόοδο προς την ανάφαση μέχρι όλοι οι μικροσωληνίσκοι να προσδεθούν στους κινητοχώρους με τη σωστή τάση (αμφιτελική πρόσδεση) (Amon, 1999); (Bharadwaj and Yu, 2004). Όταν αυτό συμβεί τότε το spindle checkpoint απενεργοποιείται, το APC ενεργοποιείται μέσω την πρόσδεσης του cdc20 και ο κυτταρικός κύκλος προχωρά στη φάση της ανάφασης.



**Εικόνα 3. Απενεργοποίηση του APC/C συμπλόκου κατά το spindle checkpoint.** Ενεργοποίηση του spindle checkpoint απενεργοποιεί το APC/C μέσω πρόσδεσης της υπομονάδας Cdc20, καταστέλλοντας τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση. Το APC/C υπό φυσιολογικές συνθήκες αποικοδομεί τη securin και απελευθερώνει τη separase, ρόλος της οποίας είναι η αποικοδόμηση των κοχρεσινών και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων. Επιπλέον, το APC/C αποικοδομεί την κυκλίνη B και απενεργοποιείται η Cdk1 ώστε η μίτωση να τερματιστεί.

Οι μοριακοί μηχανισμοί ενεργοποίησης του spindle checkpoint εξαρτώνται από το είδος της βλάβης της μιτωτικής ατράκτου και ενεργοποιούν τα αντίστοιχα μονοπάτια σηματοδότησης, στα οποία εμπλέκονται κινάσες που συμμετέχουν στην αναγέννηση και ενίσχυση του σήματος. Διαφορετικά φάρμακα, ταξόλη και νοκοδαζόλη, οδηγούν σε διαφορετικές σηματοδοτήσεις. Ωστόσο οι ακριβείς μηχανισμοί και ο ρόλος της Chk1 σε αυτούς βρίσκονται υπό εξέλιξη και δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί.

### Η Chk1 παρουσία ταξόλης

Η Chk1 βρίσκεται στην κορυφή ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει πρωτεΐνες του spindle checkpoint και κατέχει ένα σημαντικό ρόλο για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου παρουσία ταξόλης (Zachos et al., 2007). Η ταξόλη ενεργοποιεί το spindle checkpoint σταθεροποιώντας τους μικροσωληνίσκους με το να εμποδίζει τον αποπολυμερισμό της τουμποουλίνης και να μειώνει την τάση στους κινητοχώρους (Schiff and Horwitz, 1980). Η Chk1 είναι υπεύθυνη για την ενεργότητα της κινάσης Aurora-B (Zachos et al., 2007), η οποία αποτελεί το λεγόμενο σύμπλοκο CPC (Chromosomal Passengers Complex) μαζί με τις πρωτεΐνες INCENP, Survivin, Borealin, CSC-1 TD-60, οι οποίες εντοπίζονται στους κινητοχώρους στην προμετάφαση, στη μεσοζώνη (midzone) στην ανάφαση και στο μεσόσωμα (midbody) στην τελόφαση ώστε να ενεργοποιήσουν συγκεκριμένα υποστρώματα (Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora B, η οποία φωσφορυλιώνει τη BubR1 (Ditchfield et al., 2003). Ωστόσο, η Chk1 είναι υπεύθυνη

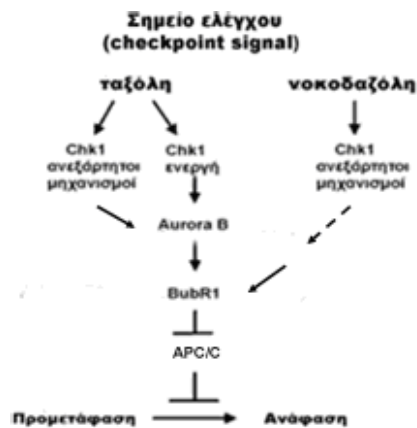
για την ενεργότητα και τοποθέτηση της BubR1 στους κινητοχώρους, αλλά δεν είναι απαραίτητη για την τοποθέτηση της Aurora-B (Zachos et al., 2007). Μελέτες εντοπισμού φωσφορυλιώσεων στη S345 και S317 έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της Chk1 συμβαίνει (μέσω των ATM και ATR κινασών) σε διαφορετικές θέσεις παρουσία ταξόλης από ότι παρουσία βλάβης του DNA, η οποία δεν είναι απαραίτητη για τη τοποθέτηση της Chk1 στους κινητοχώρους, αλλά μόνο για την ενεργότητά της (Zachos et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχουν και ανεξάρτητοι μηχανισμοί της Chk1, οι οποίοι ενεργοποιούν τη Aurora-B παρουσία ταξόλης, αφού απενεργοποίηση της Aurora-B σε Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα μειώνει ακόμη περισσότερο τα μιτωτικά κύτταρα (Zachos et al., 2007).

#### Η Chk1 παρουσία νοκοδαζόλης

Chk1 δεν είναι απαραίτητη για το spindle checkpoint παρουσία νοκοδαζόλης (nocodazole) (Zachos et al., 2007). Αυτό ίσως συμβαίνει γιατί το σήμα είναι μεγαλύτερο, αφού η νοκοδαζόλη εμποδίζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και καθιστά μη προσδεμένους τους κινητοχώρους, οπότε δεν χρειάζεται η Chk1 για ενίσχυση του σήματος (Samson et al., 1979).

#### Η Chk1 απουσία φαρμάκων

Η Chk1 είναι απαραίτητη για το σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής μίτωσης και για την ενεργότητα της Aurora-B, την ενεργότητα και τον εντοπισμό της BubR1 στους κινητοχώρους κατά τη μίτωση απουσία φαρμάκων (unperturbed) (Peddibhotla et al., 2009). Η Chk1 συνεντοπίζεται με την Aurora B στους κινητοχώρους κατά την προμετάφαση, στη μεσοζώνη (midzone) στην ανάφαση και στο μεσόσωμα (midbody) κατά την τελόφαση σε μιτωτικά κύτταρα απουσία φαρμάκου (Peddibhotla et al., 2009). Στο μεσόσωμα (midbody) κατά την τελόφαση συνεντοπίζεται με την INCENP (Zachos et al., 2007).



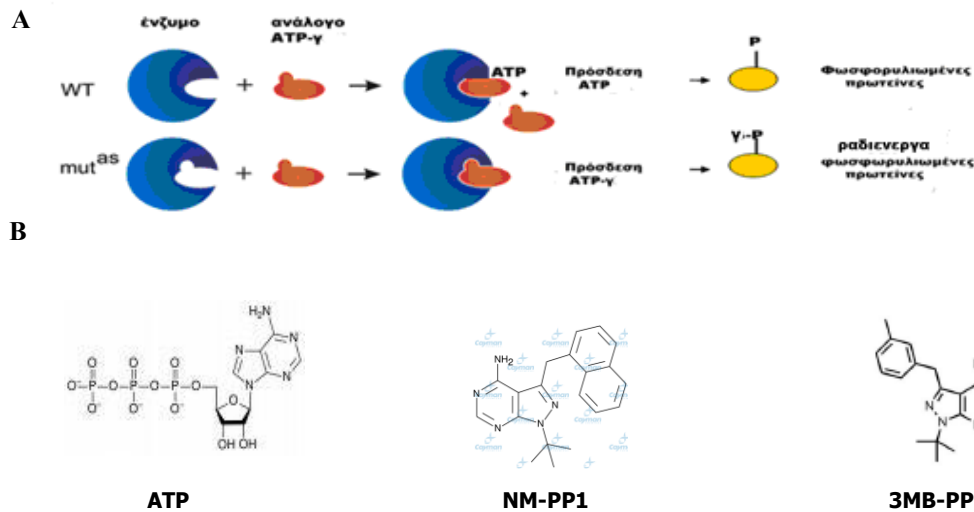
**Εικόνα 4. Μηχανισμός του spindle checkpoint παρουσία ταξόλης και νοκοδαζόλης.** Η Chk1 εμπλέκεται στον έλεγχο μόνο παρουσία ταξόλης και όχι νοκοδαζόλης. Ενεργοποιεί την Aurora B, η οποία φωσφορυλιώνει την BubR1 οδηγώντας στην πρόσδεση του Cdc20 συμπαραγόνα και καταστέλοντας το APC. Ευθύνεται για την τοποθέτηση της BubR1 στους κινητοχώρους. Ανεξάρτητοι της Chk1, αλλά εξαρτώμενοι της Aurora μηχανισμοί εμπλέκονται επιπλέον στην ενεργοποίηση του spindle checkpoint παρουσία ταξόλης.

### 5. Χημική γενετική: μέθοδος ταυτοποίησης υποστρωμάτων κινασών

Η χημική γενετική βασίζεται στη χρήση μικρών χημικών μορίων που έχουν την ικανότητα να προσδένονται αντιστρεπτά σε βιολογικά μακρομόρια οδηγώντας στην απενεργοποίησή τους. Χρησιμοποιείται με σκοπό την ταυτοποίηση υποστρωμάτων ενζύμων, την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών με τις οποίους οι πρωτεΐνες πραγματοποιούν τις βιολογικές τους λειτουργίες και τον χαρακτηρισμό μικρών μορίων-αναστολέων που ίσως έχουν μεγάλη κλινική σημασία (Ho et al., 2010; Smukste and Stockwell, 2005).

Η μέθοδος εκμεταλλεύεται τη χρήση χημικών αναστολέων, όπως τον NM-PP1 και 3MB-PP1, οι οποίοι είναι ογκώδεις ώστε να μην ταιριάζουν τη θέση πρόσδεσης του ATP των περισσότερων κινασών και επομένως να είναι αδρανείς όταν εφαρμόζονται σε αγρίου τύπου κύτταρα, αλλά υψηλά ενεργοί σε ανάλογα κινασών τα οποία φέρουν ογκώδη θέση πρόσδεσης του ATP λόγω μετάλλαξης (Bishop et al., 1998). Στην περίπτωση της Chk1, η ενδογενής κινάση έχει αντικατασταθεί με ένα μετάλλαγμα αλανίνης αντί λευκίνης στη θέση 84 στη θέση πρόσδεσης του ATP (Chk1<sup>as</sup>), ώστε να προσαρμόζει ογκώδη ανάλογα πουρίνης. Χρήση του κατάλληλου αναλόγου ATP, το οποίο έχει ίδια δομή με τον λειτουργικό χημικό αναστολέα της κινάσης χρησιμοποιείται ώστε με τη χρήση ραδιενέργειας να ταυτοποιηθούν τα υποστρώματα της κινάσης (Εικόνα 5) (Bishop et al., 1998).

Η στρατηγική αυτή ξεπερνά το πρόβλημα που αντιμετωπίζουν μελέτες βιολογικών αναστολέων καθώς είναι δύσκολο να επιβεβαιώσουν ότι τα αποτελέσματα δεν προκύπτουν από την απενεργοποίηση μη-ειδικών στόχων (Randall et al., 2007).



**Εικόνα 5. Χρήση χημικής γενετικής για ταυτοποίηση υποστρωμάτων κινασών. Α.** Ανάλογα κινασών χρησιμοποιούνται με ανάλογα ATP σημασμένα με ραδιενεργό φώσφορο για άμεση ταυτοποίηση υποστρωμάτων. Στην αγρίου τύπου κινάση προσδένεται το ATP, ενώ στο ανάλογο κινάσης προσδένεται το ραδιενεργό ογκώδες ανάλογο του ATP και τα υποστρώματα φωσφορυλιώνονται. **Β.** Δομή του ATP και των αναστολέων NM-PP1 και 3MB-PP1 που χρησιμοποιούνται για την εύρεση του κατάλληλου αναλόγου ATP.

## 6. Αντικείμενο μελέτης

Σκοπός εργασίας είναι η ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1 κατά την ενεργοποίηση του spindle checkpoint παρουσία ταξόλης.

Αρχικά, ελέγχθηκε μέσω χημικής γενετικής η δράση των χημικών αναστολέων της Chk1, NM-PP1 και 3MB-PP1 παρουσία G2/M DNA damage checkpoint και spindle checkpoint, ώστε να βρεθούν τα υποστρώματα της Chk1 με τη χρήση ραδιενεργού ATP αναλόγου. Chk1<sup>as</sup> DT40 Β-λεμφοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την εύρεση των συνθηκών που λειτουργούν οι χημικοί αναστολείς NM-PP1 και 3MB-PP1 όταν ενεργοποιείται το G2/M και spindle checkpoint. Κυτταρικές σειρές αγρίου τύπου και Chk1<sup>-/-</sup> χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν παρουσία etoposide, το οποίο αναστέλλει την τοποϊσομεράση II και προκαλεί βλάβη στο DNA και nocodazole, το οποίο εμποδίζει τον πολυμερισμό

των μισκροσωληνίσκων ή και των δύο, σε χρονικά διαστήματα των 0, 4, 8, 12 και 16 ωρών ώστε να ενεργοποιηθεί το G2/M σημείο ελέγχου. Οι επώσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία ή όχι του NM-PP1 αναστολέα. Σε δεύτερη φάση, μελετήθηκε η δράση του NM-PP1 και 3MB-PP1 παρουσία ταξόλης στα ίδια χρονικά διαστήματα, με σκοπό να μελετηθεί η δράση τους στο spindle checkpoint. Κυτταρομετρία ροής με χρώση PI και αντίσωμα ενάντια στη pH3 χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό της ενεργότητας των αναστολέων. Το συμπέρασμα είναι ότι ο χημικός αναστολέας NM-PP1 μπλοκάρει 38% των κυττάρων στη φάση G2/M μετά από 8 ώρες επώαση με etoposide και είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση υποστρωμάτων της Chk1 στο DNA damage checkpoint, ενώ οι χημικοί αναστολείς NM-PP1 και 3MB-PP1 δεν μπλοκάρουν τα κύτταρα στη μίτωση παρουσία ταξόλης και δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση υποστρωμάτων στο spindle checkpoint.

Με σκοπό την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1 στο spindle checkpoint, εφαρμόστηκε μία διαφορετική μέθοδος. HeLa κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τον συγχρονισμό στη μίτωση παρουσία ταξόλης σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$  για 8 ώρες. Κυτταρομετρία ροής έδειξε ποσοστό μιτωτικών κυττάρων 46%, το οποίο αποτέλεσε το μεγαλύτερο ποσοστό από τις επώσεις 4, 8 και 12 ωρών ταξόλης 1  $\mu\text{M}$ . Ακολούθησε απομόνωση των μιτωτικών κυττάρων μέσω χτυπήματος της φλάσκας (shake off) οδηγώντας σε ποσοστό μιτωτικών κυττάρων 80%. Χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας επιβεβαίωσε ότι τα μιτωτικά βρισκόταν στη φάση της προμετάφασης. Μετά το συγχρονισμό των κυττάρων και την εφαρμογή ή όχι του shake off, απομονώθηκε η Chk1 από τους κινητοχώρους με σκοπό την αποφυγή υψηλών συγκεντρώσεων από τουμπουλίνη και ακτίνη. Ανοσοκατακρήμιση (IP) της Chk1 και χρώση νιτρικού αργύρου ακολούθησε με σκοπό τον εντοπισμό των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά η Chk1 μέσω φασματοσκοπία μάζας. Τα αποτελέσματα στα κύτταρα όπου δεν έγινε shake off δεν ήταν ξεκάθαρα λόγω του ότι τα αντισώματα έκρυβαν πρωτεΐνες που υπήρχαν σε παρόμοια μοριακά βάρη, ενώ στα κύτταρα όπου πραγματοποιήθηκε shake-off χρησιμοποιήθηκε cross-linked αντίσωμα και στάλθηκε για φασματοσκοπία μάζας.



## II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Κυτταρικές σειρές και κυτταροκαλλιέργειες

DT40 κύτταρα, Β λεμφοκύτταρα από κοτόπουλο, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, το οποίο περιείχε 2 mM γλουταμίνη, 10% fetal bovine serum, 1% chicken serum, 10  $\mu$ M  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη, 30  $\mu$ g/ml πενικιλίνη και 50  $\mu$ g/ml στρεπτομυκίνη στους 39.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> (όλα τα αντιδραστήρια από τη Gibco). Τα Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα προήλθαν από αγρίου τύπου DT40 με απαλοιφή των ενδογενών αλληλομόρφων του γονιδίου της Chk1 (Zachos et al., 2003a). Τα Chk1<sup>as</sup> προήλθαν μέσω μετάλλαξης της λευκίνης σε αλανίνη στη θέση 84 (L84A) δημιουργώντας μία ογκώδη θέση πρόσδεσης του ATP με σκοπό την πρόσδεση συγκεκριμένων χημικών αναστολέων (δώρο από τον Dr. DA. Gillespie). Τα DT40 κύτταρα αναπτύσσονται σε εναιώρημα, εμφανίζουν υψηλή συχνότητα ανασυνδυασμού και έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο p53 με αποτέλεσμα παρουσίας βλάβης DNA, να σταματούν στη G2 φάση και όχι στη G1.

Η κυτταρική σειρά HeLa, ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος, καλλιεργήθηκε σε DMEM θρεπτικό μέσο που περιείχε 10% εμβρυϊκό ορό μοσχαριού (FBS), 2 mM L-γλουταμίνη, 30  $\mu$ g/ml πενικιλίνη και 50  $\mu$ g/ml στρεπτομυκίνη στους 37 °C παρουσία 5% CO<sub>2</sub> (τα αντιδραστήρια είναι από τη Gibco). Μιτωτικά HeLa κύτταρα απομονώθηκαν είτε με θρυψινοποίηση έχοντας προσμίξεις από κύτταρα των υπόλοιπων φάσεων του κυτταρικού κύκλου είτε με ελαφρύ χτύπημα του πιάτου οδηγώντας σε αποπροσκόλληση των μιτωτικών κυττάρων και εναιώρηση τους στο θρεπτικό μέσο (shake off). Ο αριθμός κυττάρων που στήθηκε ήταν  $9 \times 10^6$  σε 8 και σε 30 πιάτα διαμέτρου 150 mm, αντίστοιχα.

### 2. Αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα για την ανίχνευση της Chk1 (G-4) ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology, της ακτίνης (AC-40) και της  $\alpha$ -τουμπουλίνης (DM1A) από τη Sigma και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:2000, 1:5000 και 1:10000 αντίστοιχα για ανοσοαποτύπωση, ενώ η  $\alpha$ -τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία 1:300 για συνεστιακή μικροσκοπία. Το πολυκλωνικό αντίσωμα για την Plk1 (H-152) ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:500 σε ανοσοαποτύπωση. Το αντίσωμα anti-mouse-FITC και ήταν από τη Sigma και χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:100 σε συνεστιακή μικροσκοπία. Τα

αντισώματα anti-mouse-HRP και anti-rabbit HRP ήταν από τη Sigma και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:5000 για την ανίχνευση των πρωτογενών αντισωμάτων σε ανοσοαποτύπωση Western. Το πολυκλωνικό αντίσωμα για την Chk1 (FL-476) και τα normal mouse IGg ήταν από την Santa Cruz Biotechnology και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:500 και 1:1000 αντίστοιχα. σε ανοσοκατακρήμιση, ενώ το πρώτο χρησιμοποιήθηκε και σε ομοιοπολική σύνδεση σε σφαιρίδια σεφαρόζης με πρωτεΐνη A. Το πολυκλωνικό αντίσωμα στη φωσφορυλιωμένη ιστόνη 3 στη σερίνη 10 (pH3) ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology και το αντίσωμα anti-rabbit-FITC ήταν από τη Jackson Immunoresearch και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:200 σε κυτταρομετρία ροής.

### **3. Χειρισμοί με φάρμακα**

Τα DT40 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών αναστολής της Chk1 από τους χημικούς αναστολείς NM-PP1 (Cayman Chemical Company) και 3MB-PP1 (δώρο του Dr. K.Shokat). Για τη μελέτη της ενεργότητάς τους επώαστηκαν με etoposide (Calbiochem) συγκεντρώσεως 10  $\mu\text{M}$ , ή και nocodazole (Sigma) συγκεντρώσεως 1 $\mu\text{g/ml}$  και με ταξόλη 1  $\mu\text{M}$  για 4, 8, 12 και 16 hrs. Οι χημικοί αναστολείς NM-PP1 και 3MB-PP1 επώαστηκαν για 15 min πριν τη χρήση φαρμάκων σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$ . Τα HeLa κύτταρα επώαστηκαν με ταξόλη (Sigma) συγκέντρωσης 1  $\mu\text{M}$  για 8 hrs.

### **4. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)**

Κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για τη διαπίστωση της φάσης του κυτταρικού κύκλου που βρίσκονται τα DT40 κύτταρα μετά από επώσεις των φαρμάκων ταξόλης, etoposide ή και nocodazole και παρουσία των χημικών αναστολέων που αναφέρθηκαν παραπάνω και για την εύρεση του ποσοστού των μιτωτικών HeLa κυττάρων παρουσία ταξόλης. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 70% εθανόλη σε 1xPBS για 30 λεπτά στους 4 °C. Επώαση με 0.25% Triton X-100 (Sigma) για 15 λεπτά στους 4 °C εφαρμόστηκε με σκοπό την ποσοτικοποίηση των μιτωτικών κυττάρων. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα ενάντια στη φωσφορυλιωμένη ιστόνη 3 στη σερίνη 10 (pH3) σε 100  $\mu\text{l}$  1% BSA (Applichem) σε PBS για 1,5 hr σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναδιάλυση 1ml διαλύματος 1% BSA σε 1xPBS και φυγοκέντρηση στις 290 g για 5 min πραγματοποιήθηκαν. Επώαση των κυττάρων με δευτερεύον πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με το χρωμοφόρο

fluorescein isothiocyanate (FITC) αραιωμένο σε 100μl 1% BSA σε PBS ακολούθησε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Για την ποσοτικοποίηση του DNA, πραγματοποιήθηκε επώαση με ιωδιούχο προπίδιο (PI) συγκέντρωσης 20 μg/ml και με RNaseA συγκέντρωσης 250 μg/ml σε 1xPBS για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάλυση για τη pH3 (Zachos et al., 2005), η οποία είναι χαρακτηριστική στα μιτωτικά κύτταρα και η ποσοτικοποίηση του DNA για τη διάκριση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος WinMDI 2.8 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry). Για τον έλεγχο των αναστολέων παρουσία etoposide πραγματοποιήθηκε μόνο μονιμοποίηση και επώαση με ιωδιούχο προπίδιο και RNase σύμφωνα με τις παραπάνω συνθήκες.

## **5. Ανοσοφθορισμός και Συνεστιακή Μικροσκοπία (confocal microscopy)**

### **α) Μονιμοποίηση κυττάρων**

Με σκοπό την εξακρίβωση των προμεταφάσεων μετά από επώαση των HeLa κυττάρων με ταξόλη για 8 ώρες τα κύτταρα πλύθηκαν με 1xPBS και προσδέθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με πολυλυσίνη (Thermo Scientific) για 30 min. Πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεΐδη σε Cytoskeletal buffer pH 6.1 (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 2 mM, PIPES 5 mM, glucose 5.5 mM) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με 0,5 % Triton X-100 σε 1 x CSK για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου για να επιτευχθεί διαπερατότητα των μεμβρανών ώστε να εισέλθουν τα αντισώματα και ακολούθησαν δύο πλυσίματα με 1xPBS. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4°C.

### **β) Χρώση**

Τα μονιμοποιημένα κύτταρα επώαστηκαν με 1% BSA σε 1xPBS για 30 min στους 37 °C με σκοπό την αποφυγή μη-ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα ενάντια της α-τουμπουλίνης για 1hr στους 37 °C. Τρία πλυσίματα με 1xPBS για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιήθηκαν και ακολούθησε επώαση με δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με το χρωμοφόρο fluorescein isothiocyanate (FITC) για την ανίχνευση σήματος της τουμπουλίνης. Τα αντισώματα αραιώθηκαν σε διαλύμα 1% BSA-1xPBS. Επιπλέον, ιωδιούχο προπίδιο (SIGMA) συγκέντρωσης 100 μg/ml και DAPI συγκέντρωσης 50 μg/ml προστέθηκε για τη χρώση του DNA. Η επώαση διάρκεισε για 45 min στους 37 °C. Ακολούθησαν τρία πλυσίματα με 1xPBS για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετήθηκε

mounting PI (Vector). Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία και η ποσοτικοποίηση του φθορισμού έγινε με το Leica Confocal Software. Όλα τα διαλύματα ήταν προθερμασμένα στους 37 °C, ώστε να μην αποπολυμεριστούν οι μικροσωλινίσκοι.

#### **6. Λύση κυττάρων (whole cell lysates)**

HeLa κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στα 290 g για 5 min και πλύθηκαν με 1xPBS. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε IP διάλυμα (50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 0.1% Tween-20, 10% glycerol, 0.1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin) και εφαρμόστηκαν υπέρηχοι τρεις φορές για 5 sec. Ακολούθησε επώαση για 30 min σε πάγο και φυγοκέντρωση στα 5700 g για 5 min. Το υπερκείμενο περιείχε τις πρωτεΐνες των οποίων η συγκέντρωση βρέθηκε με τη χρήση Bradford.

#### **7. Απομόνωση εκχυλίσματος μιτωτικής ατράκτου**

HeLa κύτταρα επώαστηκαν με 1µM ταξόλη για 8 hrs και είτε θρυψινοποιήθηκαν είτε τα μιτωτικά κύτταρα απομονώθηκαν μέσω shake-off. Αντίστοιχα, κύτταρα χωρίς την παρουσία φαρμάκων καλλιεργήθηκαν ως δείγμα ελέγχου. Φυγοκέντρωση των κυττάρων στα 290 g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και πλύσιμο με 1x PBS πραγματοποιήθηκε. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε διαδοχικά διαλύματα με σκοπό την απομόνωση της Chk1 χωρίς προσμίξεις από μη ειδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (τροποποίηση του πρωτοκόλου του (Sillje and Nigg, 2006); (Sauer et al., 2005) και επικοινωνία με Dr. Fr. Barr). Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον διαφορετικές συγκεντρώσεις του μη- ιοντικού αντιδραστηρίου Triton X-100: 0.05%, 0.035% και 0.02% v/v ώστε να βρεθεί εκείνη η συγκέντρωση όπου οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της Chk1 δεν καταστρέφονται με αποτέλεσμα να απομονώνεται στο τέλος της διαδικασίας όσο το δυνατόν πιο καθαρή με τη χρήση του ιοντικού NaCl. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επώαση με το διάλυμα PTEML (50 mM PIPES, x % Triton X-100, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µg/ml Latrunculin B) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να λυθούν τα κύτταρα. Η latrunculin b (Sigma) είναι ένα φάρμακο αποπολυμερισμού της ακτίνης, το οποίο μειώνει την επιμόλυνση της ατράκτου με ακτίνη. Τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 200 g για 3 min, επαναδιαλύθηκαν στο ίδιο διάλυμα, επώαστηκαν για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Επώαση με το διάλυμα

PTEM (50 mM PIPES pH 6.8, x % Triton X-100, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) πραγματοποιήθηκε για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντρηση, έγινε επαναδιάλυση σε διάλυμα PTCM (50 mM PIPES pH 6.8, x % Triton X-100, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) για 20 min στους 4°C. Η προσθήκη CaCl<sub>2</sub> και η χαμηλή θερμοκρασία οδηγεί σε αποπολυμερισμό της μεγαλύτερης ποσότητας τουμπουλίνης ώστε το δείγμα να γίνει καθαρό από μη ειδικές προσμίξεις. Μετά από ακόλουθη φυγοκέντρηση στα 200 g για 3 min στους 4°C, πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση δύο φορές στο διάλυμα PTCM (50 mM PIPES pH 6.8, x % Triton X-100, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) για 20 min στους 4°C ώστε να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν μη-ειδική τουμπουλίνη. Στη συνέχεια, ακολούθησαν διαδοχικές επώσεις με τα διαλύματα PTCM (50 mM PIPES pH 6.8, x % Triton X-100, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) παρουσία 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl και 400 mM NaCl για 20 min στους 4°C ώστε να απομονωθεί η Chk1 με το σύμπλοκο πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά. Όλα τα παραπάνω διαλύματα περιείχαν τους αναστολείς πρωτεασών PMSF 50μg/ml, 100 mM και B-glycerophosphate 20 mM leupeptin 5 μg/ml, aprotinin 5 μg/ml και τους αναστολείς φωσφατασών NaVanadate.

## **8. Ανοσοαποτύπωση Western**

Με σκοπό την ανίχνευση των πρωτεϊνών Chk1, τουμπουλίνης, ακτίνης και Plk1 σε καθένα από κλάσματα του παραπάνω πρωτοκόλλου, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western με SDS-PAGE. Τα δείγματα επώστηκαν σε SDS loading διάλυμα τελικής σύστασης 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% w/v SDS, 10% v/v γλυκερόλης και 0.01% w/v phenol red παρουσία DTT τελικής συγκέντρωσης 40 mM για 10 min στους 94°C (όλα από τη BioLabs). Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία 1x Running buffer (24.8 mM Tris, 250 mM γλυκίνη και 0.1% w/v SDS) και semi-dry μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη χρήση διαλύματος σύστασης 48 mM Tris, 39 mM γλυκίνη, 1.3 mM SDS, pH 9.2 και 20% v/v μεθανόλη. Έπειτα από μπλοκάρισμα της μεμβράνης με 5% γάλα σε 1 x TBS-T (10 mM Tris, 10 mM NaCl και 0.1% v/v Tween-20 pH 7.4) για 30 min, ακολούθησε επώαση με αντισώματα ενάντια της Chk1, τουμπουλίνης, ακτίνης και Plk1, ολονύχτια στους 4°C. Μετά από 3 πλύσεις με 1 x TBS-T για 15 min, πραγματοποιήθηκε επώαση με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης HRP για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίου (οι αραιώσεις

αντισωμάτων αναφέρονται παραπάνω). Η εμφάνιση πραγματοποιήθηκε με διάλυμα ECL .

### **9. Ανοσοκατακρήμνιση (IP)**

Η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης ενάντια της Chk1 εφαρμόστηκε με σκοπό την απομόνωση του πρωτεϊνικού συμπλόκου της Chk1 παρουσία ταξόλης. Τα κλάσματα των 50 mM, 100 mM, 200 mM και 400 mM NaCl, επώστηκαν με σφαιρίδια σεφαρόζης καλυμένα με πρωτεΐνη A (Invitrogen) για 1 hr στους 4°C, ώστε να απομακρυνθούν οι μη-ειδικές προσδέσεις στα σφαιρίδια. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 1000 g για 5 min και είτε επώαση του υπερκειμένου με αντίσωμα για την Chk1 ολονύχτια στους 4°C και με σφαιρίδια σεφαρόζης καλυμένα με πρωτεΐνη A για 1 hr στους 4°C, την επόμενη μέρα είτε με αντίσωμα για την Chk1 συνδεδεμένο με σφαιρίδια σεφαρόζης καλυμένα με πρωτεΐνη A ολονύχτια στους 4°C με σκοπό την αποφυγή προσμίξεων αντισώματος στο δείγμα. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε επώαση με IgG ή μόνο σφαιρίδια στις ίδιες συνθήκες. Ακολούθησαν τρία πλυσίματα με τα buffer PTCM (50 mM PIPES pH 6.8, x % Triton X-100, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) παρουσία 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl και 400 mM NaCl στα αντίστοιχα δείγματα με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 1000 g για 5 min. Τα σφαιρίδια επώστηκαν με 1xSDS loading buffer παρουσία 1xDTT για 10 min στους 94 °C και το υπερκείμενο ηλεκτροφορήθηκε σε SDS-PAGE συγκέντρωσης 10%.

### **10. Ομοιοπολική σύνδεση της Chk1 σε πρωτεΐνης A σφαιρίδια σεφαρόζης**

Σφαιρίδια σεφαρόζης πρωτεΐνης A (Invitrogen) πλύθηκαν δύο φορές με 1xPBS και αναμείχθηκαν σε 400 μl 1xPBS παρουσία πολυκλωνικού Chk1 αντισώματος σε ποσότητα 20 μg / 100 μl beads. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 4°C. Μετά από φυγοκέντρωση στα 1000 g για 5 min τα σφαιρίδια πλύθηκαν δύο φορές με 10 όγκους 0,2 M Βορικού Νατρίου pH 9. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 1000 g for 5 min και επαναδιάλυση σε 2,5 όγκους 0.2 M Βορικού Νατρίου pH 9 συγκεντρώσεως 20 mM DMP. Ο DMP είναι ένας διασυνδέτης (cross-linker), ο οποίος είναι σταθερός σε pH 7-9 και δεν αποδομείται παρουσία DTT. Το δείγμα επώστηκε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου επί δύο φορές. Μετά από φυγοκέντρωση ακολούθησε σταμάτημα της ενεργότητας του cross-linker με επώαση 10 όγκων 0.2 M Tris pH 8

για 1 hr σε θερμοκρασία δωματίο επι δύο φορές. Τα σφαιρίδια επαναδιαλύθηκαν σε αναλογία 1:1 σε 1x PBS.

### **11. Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με χρώση νιτρικού αργύρου (Silver staining)**

Η ανίχνευση και ανάλυση των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά η Chk1 πραγματοποιήθηκε με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου, η οποία ανιχνεύει ποσότητα πρωτεΐνης μικρότερη από 1 ng. Μετά από ανοσοκατακρήμνιση και ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE, οι πρωτεΐνες μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 50% v/v μεθανόλης και 5% v/v οξικού οξέος για 20 min. Ακολούθησε επώαση με 50% v/v μεθανόλη για 10 min και πλύσιμο με ddH<sub>2</sub>O, overnight. Για την απομάκρυνση μη-ειδικών αλάτων νιτρικού αργύρου, το πήκτωμα επώαστηκε με 0,02% w/v Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (sodium thiosulfate pentahydrate) για 1 min. Ακολούθησαν δύο πλυσίματα με ddH<sub>2</sub>O για 1 min και επώαση με 0.1% w/v AgNO<sub>3</sub> για 20 min σε σκότος. Απομάκρυνση του μη προσδεδεμένου νιτρικού αργύρου έγινε με δύο πλυσίματα με ddH<sub>2</sub>O για 1 min, ενώ η αναγωγή του αργύρου επιτεύχθηκε με επώαση 0,04% v/v φορμαλδεύδης και 2% w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες χρωματισμού κιτρινο-καφέ. Για την αποφυγή υψηλού background, η αντίδραση αποσβήστηκε με 5% v/v οξικό οξύ και το πήκτωμα διατηρήθηκε σε 1% v/v οξικό οξύ ή σε μεμβράνη στους 4°C σε σκότος.

### **12. Φασματοσκοπία μάζας (mass-spectrometry)**

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF από το Beatson Institute for Cancer Research (BICR). Οι πρωτεΐνες που περιείχε το πήκτωμα ακρυλαμίδης ανήχθησαν, αλκυλιώθηκαν και πραγματοποιήθηκε πέψη με θρυψίνη (Nousiainen et al., 2006). Τα πεπτίδια που προέκυψαν αναλύθηκαν με το Q-star. Τα δεδομένα ερευνήθηκαν με το Mascot έναντι της SwissProt βάσης δεδομένων.

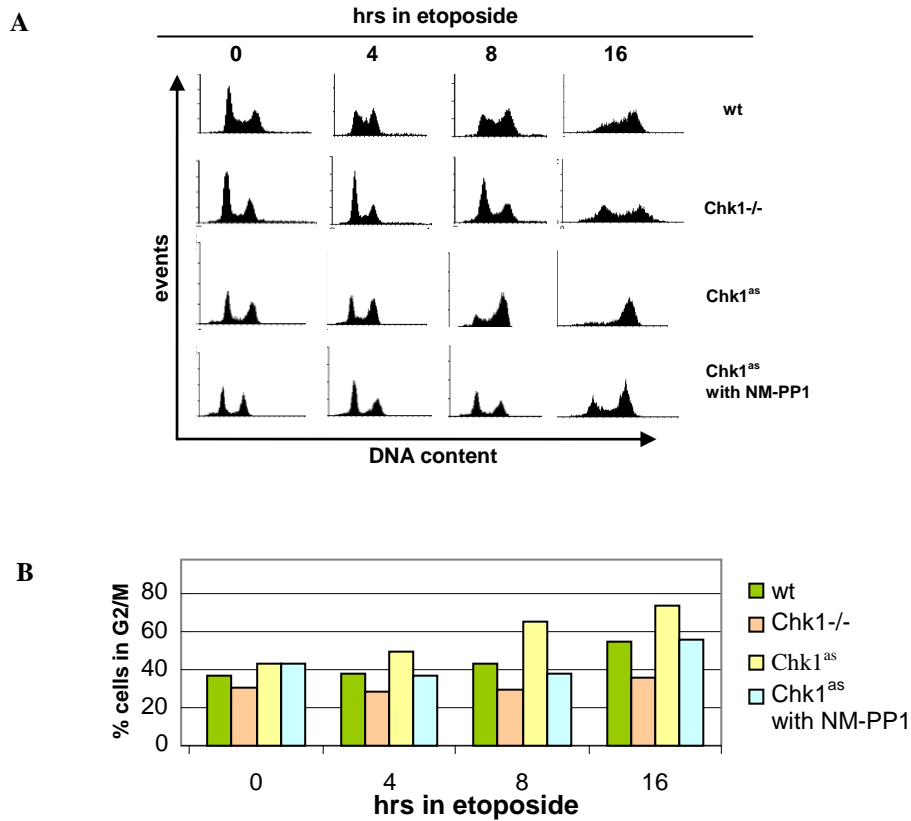
### III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Εφαρμογή της χημικής γενετικής για τη μελέτη των λειτουργιών της Chk1

##### **1. Έλεγχος της λειτουργίας του χημικού αναστολέα NM-PP1 στο G2/M επαγόμενο από βλάβη του DNA σημείο ελέγχου**

Με σκοπό την ταυτοποίηση των υποστρωμάτων της Chk1 μέσω χημικής γενετικής, ελέγχθηκε η ενεργότητα του χημικού αναστολέα NM-PP1 κατά το G2/M DNA damage checkpoint. Chk1<sup>as</sup> DT40 Β-λεμφοκύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία του NM-PP1 αναστολέα (10 μM) και etoposide (10 μM) στα χρονικά διαστήματα των 4, 8, 12 και 16 ωρών. Το etoposide οδηγεί σε ενεργοποίηση του G2/M DNA damage checkpoint σε DT40 λεμφοκύτταρα προκαλώντας βλάβη στο DNA με το να αναστέλλει την τοποϊσομεράση II (Schonn et al., 2010). Τα Chk1<sup>as</sup> κύτταρα μπορούν να προσδέσουν τον χημικό αναστολέα NM-PP1 λόγω της ογκώδους θέσεως πρόσδεσης του ATP μετά από μετάλλαξη της λευκίνης σε αλανίνη στη θέση 84 (L84A). Κυτταρικές σειρές αγρίου τύπου, Chk1<sup>-/-</sup> και Chk1<sup>as</sup> απουσία του NM-PP1 χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Τα αγρίου τύπου κύτταρα αυξάνουν σταδιακά στη φάση G2/M παρουσία etoposide και τελικά φτάνουν σε ποσοστό 55% G2/M κυττάρων μετά από 16 hrs επώασης. Αυτό συμβαίνει, διότι η Chk1 είναι ενεργή και οδηγεί σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου μέχρι να επιδιορθωθεί η βλάβη. Τα Chk1<sup>-/-</sup> δε συσσωρεύονται στη G2/M φάση (Zachos et al., 2003b). Η επώαση του NM-PP1 στα Chk1<sup>as</sup> κύτταρα για 8 hrs οδηγεί σε 38% των κυττάρων στη G2/M φάση, ενώ απουσία του αναστολέα τα Chk1<sup>as</sup> κύτταρα εμφανίζουν 65% G2/M κύτταρα. Αντιθέτως, μετά από 16 ώρες επώασης, το ποσοστό των G2/M κυττάρων παρουσία αναστολέα ανεβαίνει στο 56%, ενώ απουσία αναστολέα τα G2/M κύτταρα φτάνουν στο 75% (Εικόνα 6). Οπότε, ο αναστολέας NM-PP1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση των υποστρωμάτων της Chk1 μετά από επώαση με etoposide για 8 ώρες.

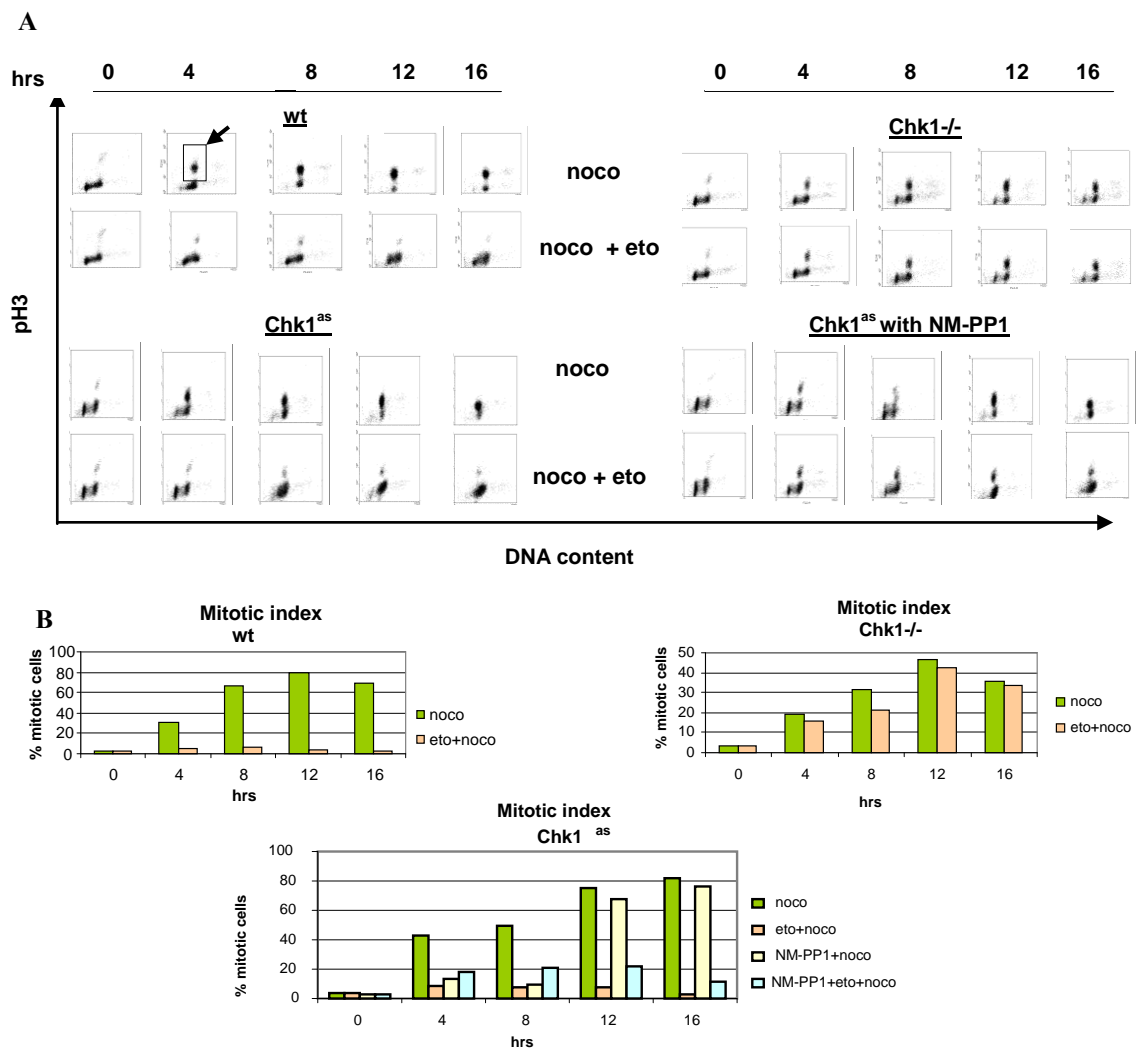




**Εικόνα 6.** Έλεγχος της λειτουργίας του NM-PP1 στο G2/M DNA damage σημείο ελέγχου. **A.** Κυτταρομετρία ροής με χρώση ιωδιούχου προπιδίου παρουσία etoposide και NM-PP1 σε Chk1<sup>as</sup> DT40 κύτταρα. Δείγματα ελέγχου αποτελούν τα αγρίου τύπου, Chk1<sup>-/-</sup> και Chk1<sup>as</sup> κύτταρα απουσία του NM-PP1. **B.** Διάγραμμα ποσοστού G2/M κυττάρων παρουσία etoposide στις παραπάνω κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι ο NM-PP1 σταματά το 38% των κυττάρων στη G2/M φάση στις 8 ώρες επώασης με etoposide.

Για να εξακριβωθεί ότι τα Chk1<sup>as</sup> κύτταρα πράγματι προχωρούν στη μίτωση παρουσία του NM-PP1 αναστολέα, πραγματοποιήθηκαν επώσεις των κυττάρων με nocodazole ή nocodazole και etoposide για 4, 8, 12 και 16 hrs και χρώση για τη pH3, χαρακτηριστικό δείκτη των μιτωτικών κυττάρων (Hans and Dimitrov, 2001). Το nocodazole εμποδίζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και ενεργοποιεί το spindle checkpoint σταματώντας τα κύτταρα στη φάση της προμετάφασης ανεξαρτήτως της ύπαρξης της Chk1 (Samson et al., 1979). Δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου και Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα μετά από επώσεις με τα παραπάνω φάρμακα Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία αναστολέα μετά από επώαση με nocodazole για 16 ώρες, τα Chk1<sup>as</sup> κύτταρα σταματούν στη φάση της μίτωσης φτάνοντας σε ποσοστό 76% μιτωτικών, παρόμοιο ποσοστό με αυτό απουσία αναστολέα (Εικόνα 7). Επομένως, τα Chk1<sup>as</sup> κύτταρα παρουσία αναστολέα

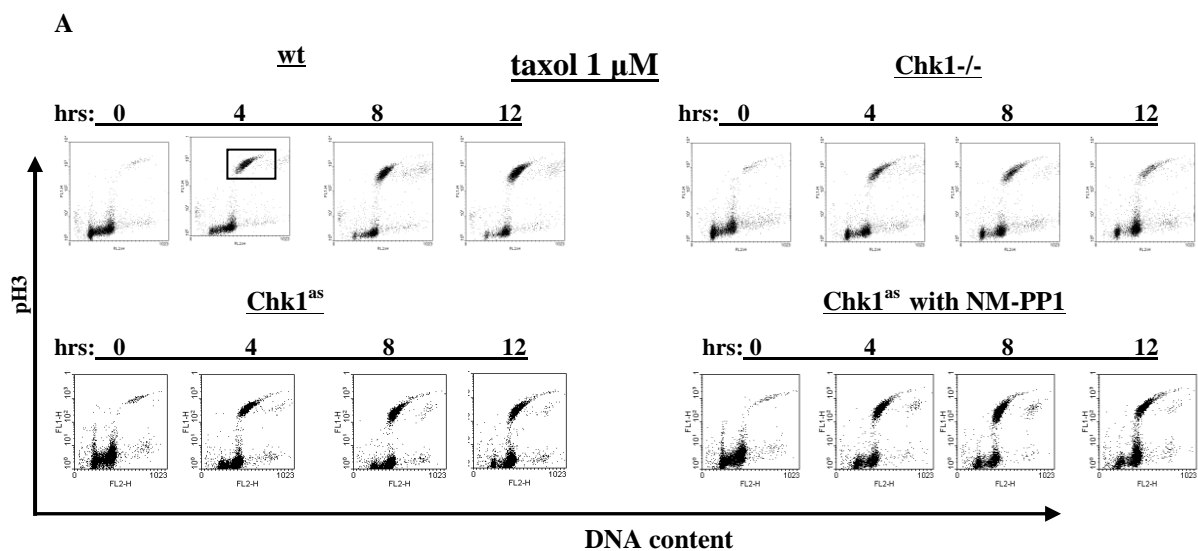
προχωρούν κανονικά στη μίτωση. Παρουσία nocodazole και etoposide, τα κύτταρα φτάνουν στη μίτωση σε μικρό ποσοστό (~20%) παρότι υπάρχει ο αναστολέας, λόγω της ενεργοποίησης του G2/M DNA damage checkpoint. Τα δείγματα ελέγχου έδειξαν ότι το etoposide και nocodazole λειτουργούν, αφού τα αγρίου τύπου αυξάνουν σε ποσοστό μιτωτικών κυττάρων μετά από επώαση με nocodazole, ενώ παρουσία και του etoposide σταματούν στη φάση G2/M λόγω δράσης της Chk1. Τα Chk1<sup>-/-</sup> κύτταρα παρουσία ή απουσία etoposide αυξάνουν το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων.

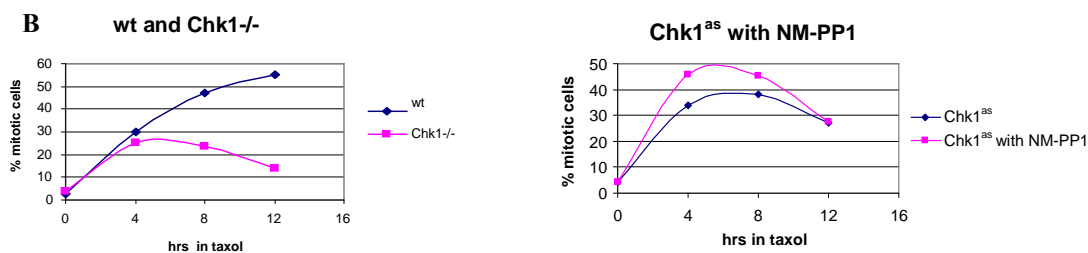


**Εικόνα 7. Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου παρουσία NM-PP1 nocodazole και etoposide. Α.** Κυτταρομετρία ροής με χρώση ιωδιούχου προπιδίου και pH3 παρουσία nocodazole ή etoposide και nocodazole και NM-PP1. Δείγματα ελέγχου αποτελούν τα αγρίου τύπου, Chk1<sup>-/-</sup> και Chk1<sup>as</sup> κύτταρα απουσία του NM-PP1. **Β.** Διάγραμμα ποσοστού των μιτωτικών κυττάρων παρουσία παρουσία nocodazole ή etoposide στις παραπάνω κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι ο κυτταρικός κύκλος προχωράει κανονικά στη μίτωση παρουσία NM-PP1. Το βέλος υποδεικνύει την περιοχή που βρίσκονται τα μιτωτικά κύτταρα σε κάθε διάγραμμα.

## 2. Έλεγχος της λειτουργίας του χημικού αναστολέα NM-PP1 και 3MB-PP1 στο spindle checkpoint

Ακολούθως ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα του χημικού αναστολέα NM-PP1 όταν ενεργοποιείται το spindle checkpoint παρουσία ταξόλης. Η ταξόλη ενεργοποιεί το spindle checkpoint, σταθεροποιώντας τους μικροσωλινίσκους και ελαττώνοντας την τάση στους κινητοχώρους (Schiff and Horwitz, 1980). Chk1<sup>as</sup> DT40 Β-λεμφοκύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία του NM-PP1 αναστολέα (10 μM) και ταξόλης (1 μM) στα χρονικά διαστήματα των 4, 8 και 12 ωρών. Κυτταρικές σειρές αγρίου τύπου, Chk1<sup>-/-</sup> και Chk1<sup>as</sup> απουσία του NM-PP1 χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Μετά από επώαση με ταξόλη, τα αγρίου τύπου φτάνουν στο μέγιστο ποσοστό μιτωτικών κυττάρων 55%, ενώ τα Chk1<sup>-/-</sup> δε συσσωρεύονται στη μίτωση (Εικόνα 8) (Zachos et al., 2007). Το ποσοστό μιτωτικών κυττάρων αυξάνεται στο 45% παρουσία του αναστολέα, ενώ απουσία του φτάνει στο 38% μετά από 8 hrs επώασης με ταξόλη. Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα, ο NM-PP1 δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση των υποστρωμάτων της Chk1 στο spindle checkpoint. Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τον 3MB-PP1, ένα διαφορετικό αναστολέα της Chk1, παρουσία ταξόλης και τα αποτελέσματα ήταν ακριβώς ίδια με προηγουμένως (data not shown).





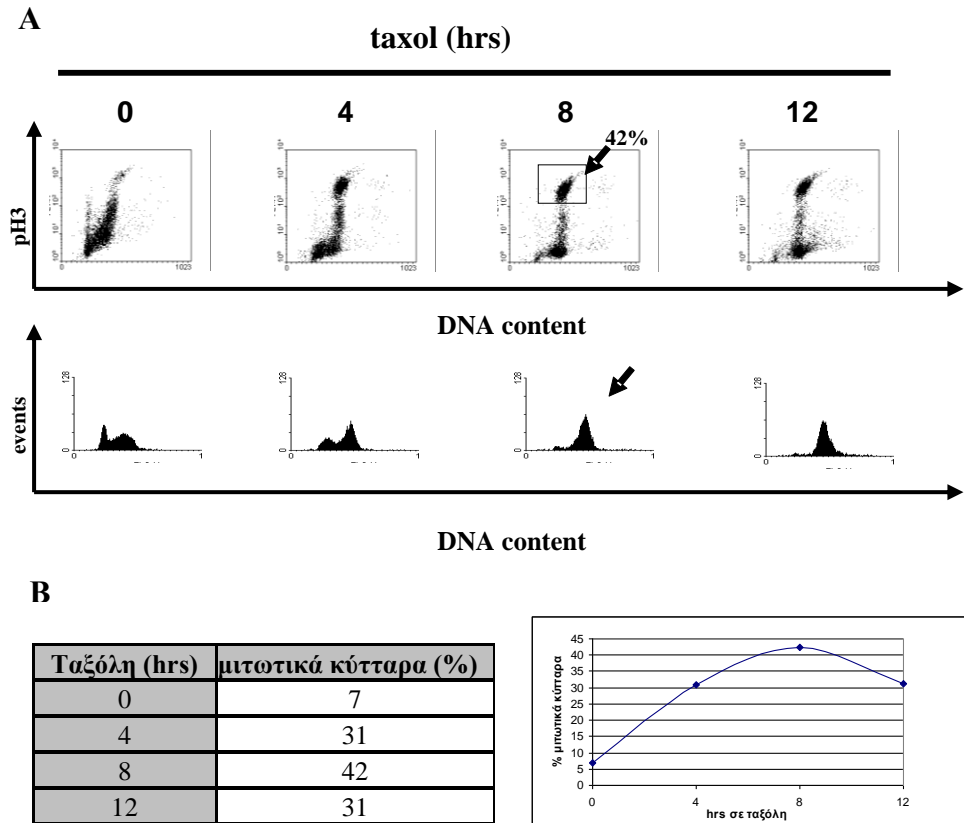
**Εικόνα 8. Έλεγχος της λειτουργίας του NM-PP1 στο spindle checkpoint.** **A.** Κυτταρομετρία ροής με χρώση ιωδιούχου προπιδίου και pH3 ταξόλης 1  $\mu$ M και NM-PP1. Δείγματα ελέγχου αποτελούν τα αγρίου τύπου, Chk1<sup>-/-</sup> και Chk1<sup>as</sup> κύτταρα απουσία του NM-PP1. **B.** Διάγραμμα ποσοστού των μιτωτικών κυττάρων στις παραπάνω κυτταρικές σειρές έδειξε ότι ο NM-PP1 αναστολέας δεν σταματά τα κύτταρα στη μίτωση παρουσία ταξόλης. Το περίγραμμα υποδεικνύει την περιοχή που βρίσκονται τα μιτωτικά κύτταρα σε κάθε διάγραμμα.

### Ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη Chk1 με απομόνωση εκχυλίσματος της μιτωτικής ατράκτου

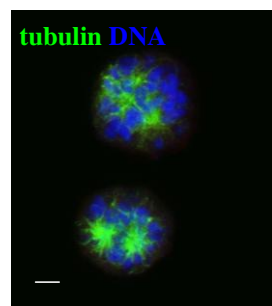
#### **3. Συγχρονισμός των κυττάρων HeLa στη μίτωση παρουσία ταξόλης**

Για να βρεθούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την Chk1, μετά από ενεργοποίηση του spindle checkpoint παρουσία ταξόλης (Zachos et al., 2007), πραγματοποιήθηκαν επώσεις των κυττάρων HeLa με ταξόλη σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M στα χρονικά διαστήματα των 4, 8 και 12 ωρών. Η ταξόλη δρα εμποδίζοντας τον αποπολυμερισμό της τουμποουλίνης με αποτέλεσμα να σταθεροποιεί τους μικροσωλινίσκους και να μπλοκάρει τα κύτταρα στη φάση της προμετάφασης (Schiff and Horwitz, 1980). Ακολούθησε θρυψινοποίηση των κυττάρων και ανάλυση τους με κυτταρομετρία ροής με χρώση για τη φωσφορυλιωμένη ιστόνη 3 στη σερίνη 10 (pH3), η οποία αποτελεί δείκτη των μιτωτικών κυττάρων (Hans and Dimitrov, 2001) και χρώση για το DNA με τη χρήση ιωδιούχου προπιδίου (PI). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μιτωτικών κυττάρων εμφανίζεται μετά από 8 ώρες επώασης με ταξόλη (42%), ενώ σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων μειώνεται (Εικόνα 9 A, B). Για να εξακριβωθεί ότι τα κύτταρα έχουν συγχρονιστεί στην προμετάφαση με σχηματισμένη άτρακτο μετά από επώαση με ταξόλη για 8 ώρες, πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων για την  $\alpha$ -τουμποουλίνη, χρώση του

DNA και ακολούθησε παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ικανοποιητικές προμεταφάσεις με τα δύο κεντροσώματα στους δύο πόλους του κυττάρου και την τουμπουλίνη να έχει προσδεθεί στα χρωμοσώματα (Εικόνα 9 Γ).



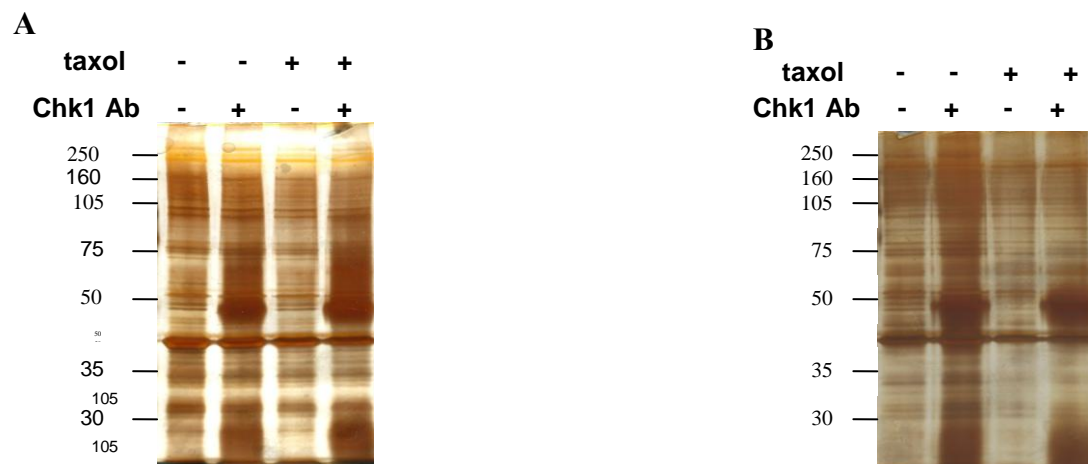
**Γ.**



**Εικόνα 9.** Τα HeLa κύτταρα συγχρονίζονται στη μίτωση με ταξόλη 1μM για 8hrs. **A.** Κυτταρομετρία ροής για τη pH3 και το DNA με χρώση αντισωμάτων και ιδιούχου προπιδίου αντίστοιχα, για την ανίχνευση των μιτωτικών κυττάρων. Το περίγραμμα υποδεικνύει τα μιτωτικά κύτταρα και το βέλος στο ιστόγραμμα υποδεικνύει τα G2/M κύτταρα. **B.** Διάγραμμα του ποσοστού των μιτωτικών κυττάρων μετά από 4, 8 και 12 hrs επώασης με ταξόλη. Επώαση των κυττάρων με ταξόλη 1μM για 8 hrs οδηγεί σε ποσοστό μιτωτικών κυττάρων 42%. **Γ.** Χαρακτηριστική προμετάφαση μετά από 8 hrs επώαση με ταξόλη, η οποία αναλύθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία. Πράσινο: α-τουμπουλίνη, μπλε: DNA. Η κλίμακα είναι 5 μm.

#### 4. Απομόνωση της Chk1 με λύση κυττάρων οδηγεί σε προσμίξεις από μη-ειδικές πρωτεΐνες

Με σκοπό την απομόνωση της Chk1 από μιτωτικά κύτταρα παρουσία ταξόλης, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με τη μέθοδο whole cell lysates και ανοσοκατακρήμνιση της Chk1 ώστε να βρεθούν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Δείγμα ελέγχου αποτέλεσε η επώαση δείγματος μόνο με σφαιρίδια πρωτεΐνης A. Χρώση νιτρικού αργύρου πραγματοποιήθηκε για την εύρεση των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες ειδικές συγκρίνοντας με το δείγμα ελέγχου δεν ήταν δυνατόν να εντοπιστούν λόγω πολλών μη-ειδικών ζωνών (Εικόνα 10A). Για την επίτευξη πιο καθαρού δείγματος πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με σφαιρίδια πρωτεΐνης A για 1 ώρα ώστε να απομακρυνθούν οι μη-ειδικές πρωτεΐνες και ακολούθως ανοσοκατακρήμνιση της Chk1. Τα δείγματα συνέχισαν να παρουσιάζουν προσμίξεις από μη ειδικές πρωτεΐνες και δεν ήταν εφικτός ο εντοπισμός (Εικόνα 10B).



**Εικόνα 10.** Ανίχνευση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1 παρουσία ταξόλης μετά από λύση των HeLa κυττάρων με wce είναι αδύνατη λόγω προσμίξεων μη-ειδικών πρωτεϊνών. **A.** Χρώση νιτρικού αργύρου μετά από λύση κυττάρων και ανοσοκατακρήμνιση της Chk1 παρουσία ή απουσία ταξόλης 1μM για 8 hrs. Το δείγμα ελέγχου έχει επωαστεί μόνο με σφαιρίδια. **B.** Χρώση νιτρικού αργύρου μετά από καθαρισμό από τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με δύο επώσεις σφαιριδίων πρωτεΐνης A με το εκχύλισμα της παραπάνω μεθόδου για 1 hr. Τα δείγματα παρουσιάζουν προσμίξεις από μη ειδικές πρωτεΐνες και πάλι δεν είναι εφικτός ο εντοπισμός ειδικών πρωτεϊνών ανάμεσα στο δείγμα ελέγχου και σε αυτό παρουσία της Chk1 πρωτεΐνη.

## 5. Η Chk1 απομονώνεται σε 0,02% Triton μέσω εκχυλίσματος μιτωτικών ατράκτων

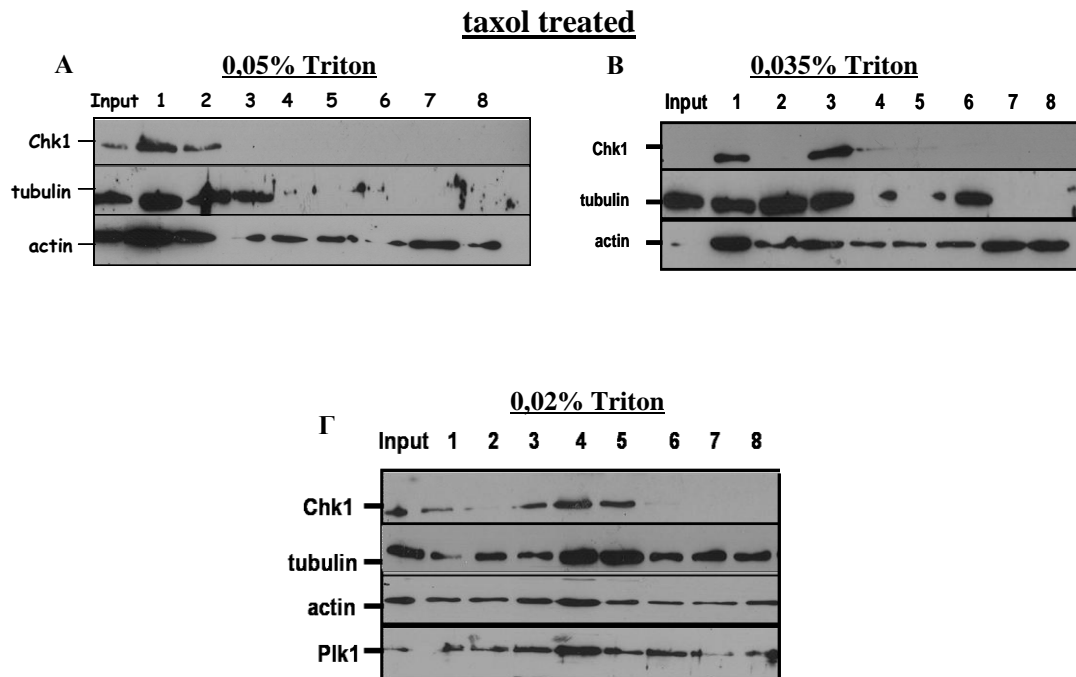
Με σκοπό την μείωση των προσμίξεων κατά την απομόνωση της Chk1 από μιτωτικά HeLa κύτταρα, εφαρμόστηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης μιτωτικών ατράκτων ((Sillje and Nigg, 2006; Sauer et al., 2005) και του Dr Fr. Barr μετά από επικοινωνία) κατά το οποίο με σταδιακές επώσεις διαλυμάτων απομακρύνονται πρωτεΐνες, όπως τουμπουλίνη και ακτίνη ώστε στο τέλος της διαδικασίας να απομονωθεί η Chk1 από τους κινητοχώρους όσο το δυνατόν καθαρότερη. Συγκεκριμένα, μετά από 8 ώρες επώαση με ταξόλη συγκέντρωσης 1  $\mu\text{M}$ , τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και επώαστηκαν με μία σειρά διαλυμάτων που περιείχαν αρχικά συγκέντρωση Triton 0,05%. Έλεγχος για την ανίχνευση των πρωτεϊνών Chk1, τουμπουλίνης και ακτίνης πραγματοποιήθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western με φόρτωμα της ίδιας ποσότητας δείγματος από το εκάστοτε υπερκείμενο κάθε επώασης (Εικόνα 11). Δείγμα ελέγχου (input) αποτέλεσε ποσότητα που λήφθηκε αμέσως μετά το τέλος επώασης με το πρώτο στη σειρά διάλυμα, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη της Chk1 μετά από λύση κυττάρων. Ο δύο πρώτες επώσεις πραγματοποιήθηκαν με το διάλυμα PTEML, το οποίο εκτός των άλλων περιέχει τη latrunculin b, η οποία αποπολυμερίζει την ακτίνη (Morton et al, 2000), ώστε στα τελευταία δείγματα στα οποία πρόκειται να απομονωθεί η Chk1 να μην υπάρχει μεγάλη ποσότητα ακτίνης. Η επόμενη επώαση πραγματοποιήθηκε με το διάλυμα PTEM (fraction 3) σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ οι επόμενες επώσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία ασβεστίου στους 4°C. Οι υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου και οι χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε αποπολυμερισμό της τουμπουλίνης, ώστε να απομακρυνθεί η περισσότερη ποσότητα τουμπουλίνης (Keller et al., 1982). Μία επώαση με το διάλυμα PTCM παρουσία 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (fraction 4) και ακόλουθες επώσεις του ίδιου διαλύματος παρουσία NaCl συγκεντρώσεων 50 mM, 200 mM και 400 mM (fraction 5, 6, και 7 αντίστοιχα) πραγματοποιήθηκαν, με σκοπό την απομόνωση της Chk1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, όλη η ποσότητα της Chk1 έχει εκχυλιστεί μετά από τις δύο πρώτες επώσεις με το διάλυμα PTEML συγκέντρωσης 0,05% Triton (fraction 1 και 2), ενώ στις επόμενες επώσεις είναι η Chk1 δεν είναι ανιχνεύσιμη. Η περισσότερη τουμπουλίνη απομακρύνεται μετά από τρεις πρώτες επώσεις (fraction 1-3), και η περισσότερη ακτίνη απομακρύνεται μετά τις δύο πρώτες επώσεις, όπως είναι λογικό λόγω της ύπαρξης της latrunculin. Οπότε,

σε συγκέντρωση 0,05% η Chk1 απομακρύνεται μετά από τις δύο πρώτες επώσεις μαζί με υψηλές συγκεντρώσεις τουμπουλίνης και ακτίνης.

Για να επιτευχθεί η εκχύλιση της Chk1 στα τελευταία fraction ώστε να αφαιρεθεί ,εγάλο μέρος της τουμπουλίνης και ακτίνης, πραγματοποιήθηκαν επώσεις στις ίδιες συνθήκες, αλλά με τη συγκέντρωση του Triton να μειώνεται στο 0,02 %. Το Triton είναι μη-ιοντικό απορρυπαντικό, το οποίο διακόπτει τις υδρόφιλες και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οπότε σε περίπτωση που η Chk1 δημιουργεί αρκετές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες των κινητοχώρων, δε θα απομονωθεί αμέσως στα πρώτα fractions σε χαμηλότερη συγκέντρωση Triton. Ανοσοαποτύπωση Western έδειξε ότι η Chk1 απομονώθηκε μετά την πρώτη επώαση με το PTEML, το PTEM, το PTCM και τα PTCM παρουσία 50 mM και 200 mM NaCl (fraction 1, 3, 4, 5 και 6 αντίστοιχα). Η τουμπουλίνη σε αντίθεση με τα αποτελέσματα συγκέντρωσης 0,05% Triton απομονώνεται και αυτή σε μεγάλες ποσότητες ως τα 200 mM NaCl, το οποίο σημαίνει ότι η Chk1 έχει αρκετές προσμίξεις από τουμπουλίνη αλλά χαμηλή συγκέντρωση σε ακτίνη στα τελευταία fraction, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10. Ως θετικό δείγμα ελέγχου αποτέλεσε η Plk1, πρωτεΐνη που εντοπίζεται στους κινητοχώρους και η οποία σε παλαιότερα πειράματα είχε αποδειχθεί ότι απομονώνεται παρουσία 50 mM , 200 mM και 400 mM NaCl (Elowe et al., 2007).

Για να ελαττωθεί η συγκέντρωση τουμπουλίνης στα δείγματα που έχει απομονωθεί η Chk1, πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες επώσεις αλλά στη μεγαλύτερη συγκέντρωση Triton του 0,035% ώστε να απομακρυνθεί η περισσότερη τουμπουλίνη στα αρχικά δείγματα στην περίπτωση που δημιουργεί περισσότερες υδρόφιλες και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις από την Chk1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι περισσότερη τουμπουλίνη απομακρύνεται στα πρώτα fraction, αλλά η Chk1 απομονώνεται σε μικρές ποσότητες παρουσία 50 mM και 200 mM NaCl (Εικόνα 11). Οπότε, η συγκέντρωση Triton 0,02% θεωρείται η καταλληλότερη για την απομόνωση αρκετής ποσότητας Chk1, αλλά το πρόβλημα προσμίξεων με τουμπουλίνη και ακτίνη να παραμένει.



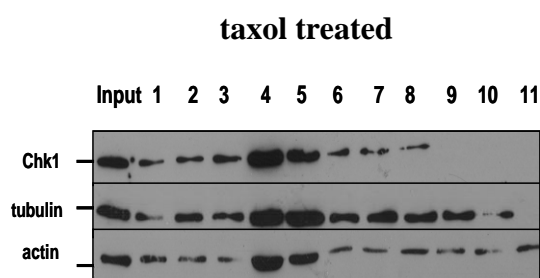


**Εικόνα 11.** Η Chk1 εκχυλίζεται από εκχυλίσματα της μιτωτικής ατράκτου παρουσία ταξόλης σε **0.02% Triton**. Διαδοχικές επώσεις με διαλύματα που απομακρύνουν προσμίξεις από πρωτείνες όπως τουμπουλίνη και ακτίνης και διαφορετικές συγκεντρώσεις Triton χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το σκοπό. **A.** Ανοσοαποτύπωση Western μετά από επώσεις με 0,05% Triton. **B.** Ανοσοαποτύπωση Western μετά από επώσεις με 0,035% Triton. **Γ.** Ανοσοαποτύπωση Western μετά από επώσεις με 0,02% Triton. Τα δείγματα αποτελούν το υπερκείμενο κάθε επώσεως. Δείγμα **1:** PTEML, **2:** PTEML, **3:** PTEM, **4:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub>, **5:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 50 mM NaCl, **6:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 200 mM NaCl, **7:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 400 mM NaCl, **8:** ίζημα.

## 6. Απομάκρυνση της τουμπουλίνης με τη χρήση ασβεστίου

Με σκοπό την απομάκρυνση της τουμπουλίνης, πραγματοποιήθηκαν τρεις επώσεις με ασβέστιο, μία επώση συγκέντρωσης 5 mM και δύο ακόλουθες επώσεις ασβεστίου συγκέντρωσης 1 mM, τροποποιώντας το πρωτόκολλο απομόνωσης της μιτωτικής ατράκτου παρουσία 0,02% Triton. Επιπλέον, λόγω του ότι η Chk1 απομονώνεται ως τα 200 mM NaCl πραγματοποιήθηκε μία επιπλέον επώση παρουσία 100 mM NaCl με την πιθανότητα να αποτελέσει ένα καθαρό και σε αρκετή ποσότητα της Chk1 δείγμα. Μετά από Western αποδείχθηκε ότι η Chk1 υπάρχει σε μικρές ποσότητες στα δείγματα των 50 mM και 100 mM (fraction 7 και 8 αντίστοιχα), ενώ στα 200 mM NaCl (fraction 9) είναι μη-ανιχνεύσιμη (Εικόνα 12). Επίσης, η ποσότητα της τουμπουλίνης σε αυτά τα δείγματα έχει μειωθεί αρκετά λόγω

απομάκρυνσης της μεγαλύτερης ποσότητας μετά από επώαση με ασβεστόιο 5 mM και 1 mM σε πάγο, οπότε αυτά τα δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοκατακρήμνιση.

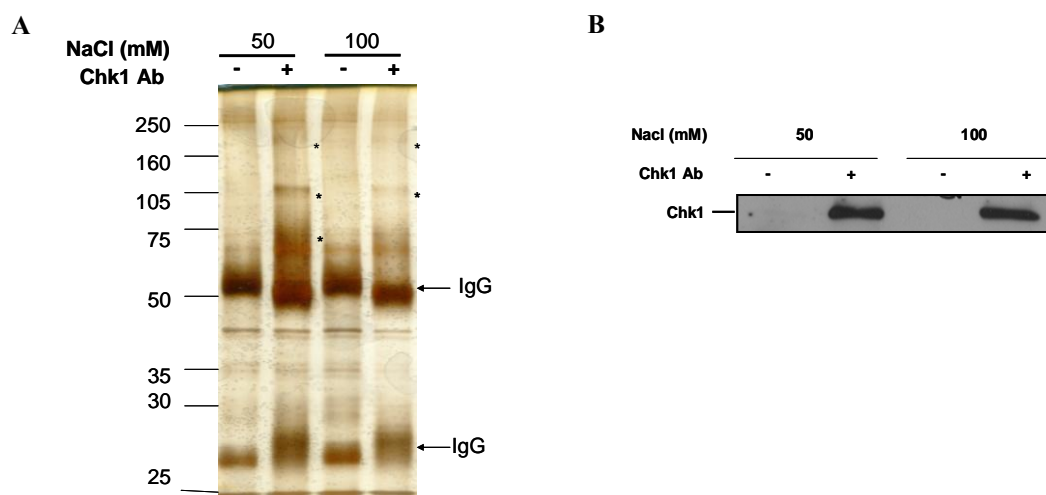


**Εικόνα 12.** Επώσεις ασβεστίου οδήγησαν σε αποπολυμερισμό της τουμπουλίνης. Ανοσοαποτύπωση Western μετά από επώσεις με 5 mM CaCl<sub>2</sub> και δύο φορές με 1 mM CaCl<sub>2</sub> σε 0,02% Triton παρουσία ταξόλης. Δείγμα **1:** PTEML, **2:** PTEML, **3:** PTEM, **4:** PTCM 5 mM CaCl<sub>2</sub>, **5:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub>, **6:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub>, **7:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 50 mM NaCl, **8:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 100 mM NaCl, **9:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 200 mM NaCl, **10:** PTCM 1 mM CaCl<sub>2</sub> + 400 mM NaCl, **11:** ίζημα

### **7. Ανίχνευση της Chk1 και των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά μετά από ανοσοκατακρήμνιση**

Η Chk1 εκχυλίστηκε από μιτωτικές ατράκτους με 0,02% Triton, μετά από επιπρόσθετες επώσεις ασβεστίου στα δείγματα των 50 mM και 100 mM, ανοσοκατακρημνίστηκε και οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά ανιχνεύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν επώσεις IgG και σφαιριδίων, ώστε να μη ληφθούν υπόψιν οι πρωτεΐνες που προσδένονται μη-ειδικά σε σφαιρίδια και αντισώματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη μίας έντονης ζώνης στο μοριακό βάρος των 105 kDa και λιγότερο έντονες ζώνες κοντά στα μοριακά βάρη των 170 και 70 kDa και στα δύο δείγματα (Εικόνα 13A). Για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της Chk1 μετά από ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Chk1 υπάρχει μετά από ανοσοκατακρήμνιση στο δείγμα των 50 mM και των 100 mM NaCl (Εικόνα 13B). Το υπόλοιπο δείγμα εστάλη για φασματοσκοπία μάζας ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η Chk1 παρουσία ταξόλης. Τα αποτελέσματα τελικά έδειξαν την ύπαρξη δύο μη ειδικών πρωτεϊνών της βιμεντίνης και της χορνερίνης στα 57 kDa και στα 160 kDa, αντίστοιχα. Η βιμεντίνη αποτελεί ενδιάμεσο ινίδιο, ενώ η χορνερίνη είναι πρωτεΐνη της επιδερμίδας. Οι έντονες ζώνες των βαριών

και ελαφριών αλυσίδων των αντισωμάτων στα 50 και 25 kDa, εμπόδισαν την ανίχνευση τόσο της Chk1 στα 50 kDa όσο και άλλων πρωτεϊνών που πιθανότατα να βρίσκονται σε αυτά τα μοριακά βάρη, αλλά και την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών λόγω των μεγάλων ποσοτήτων τους.

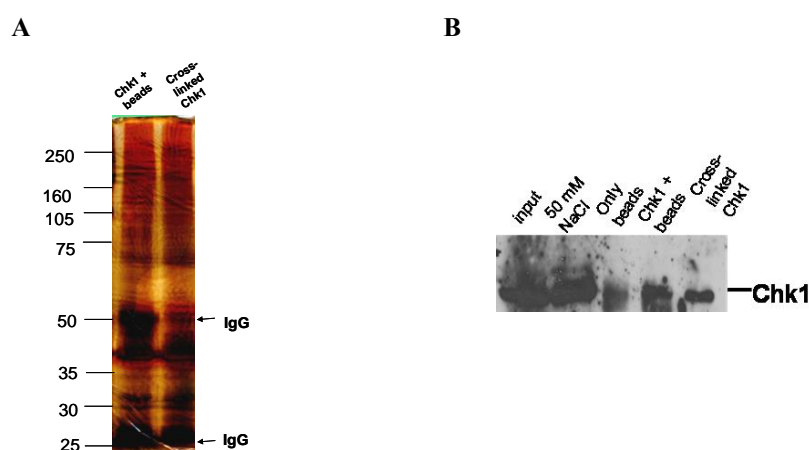


**Εικόνα 13. Ανίχνευση της Chk1 και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρά παρουσία ταξόλης μετά από ανοσοκατακρήμνιση.** Ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε στα δείγματα των 50 mM και 100 mM NaCl μετά από επώαση 8 hrs με ταξόλη και θρυψινοποίηση κυττάρων. Αρνητικό δείγμα ελέγχου αποτέλεσε επώαση με IgG και σφαιρίδια. **A.** Χρώση νιτρικού αργύρου μετά από ανοσοκατακρήμνιση αποκάλυψε νέες πρωτεΐνες στα 105, ~170 και ~70 kDa. \*::ζώνες που δεν υπάρχουν στα δείγματα ελέγχου. **B.** Ανοσοαποτύπωση Western ανίχνευσε την Chk1 μετά από ανοσοκατακρήμνιση

## 8. Ομοιοπολική σύνδεση αντισώματος για την Chk1 σε σφαιρίδια

Με σκοπό την απομάκρυνση των IgGs, πραγματοποιήθηκε ομοιοπολική σύνδεση του αντισώματος της Chk1 σε σφαιρίδια σεφαρόζης με πρωτεΐνη A (cross-linked αντίσωμα). HeLa κύτταρα λύθηκαν με υπερήχους και ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε με cross-linked αντίσωμα της Chk1. Δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η επώαση δείγματος με αντίσωμα ενάντια της Chk1 και ακόλουθη επώαση με σφαιρίδια. Λόγω ομοιοπολικής σύνδεσης του αντισώματος με την πρωτεΐνη A, μέσω ενός διασυνδέτη DSP, ο οποίος δεν αποδομείται παρουσία DTT, μειώνονται οι προσμίξεις IgGs στο δείγμα. Χρώση νιτρικού αργύρου επιβεβαίωσε ότι η ποσότητα του αντισώματος στο δείγμα έχει μειωθεί κατά πολύ μετά από cross-linking (Εικόνα 14A). Για να εξακριβωθεί ότι το cross-linked αντίσωμα προσδένει την Chk1, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western. Ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου εκχυλίσματος της

μιτωτικής ατράκτου με 50 mM NaCl γιατί εφαρμογή λύσης με υπερήχους οδηγούσε σε υψηλό background. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14B, το cross-linked αντίσωμα αναγνωρίζει Chk1 και ανιχνεύει σχεδόν ίδια ποσότητα πρωτεΐνης με το non-cross-linked αντίσωμα. Αρνητικό δείγμα ελέγχου αποτέλεσε η επώαση δείγματος με σφαιρίδια ώστε να ποσοτικοποιηθεί το background.

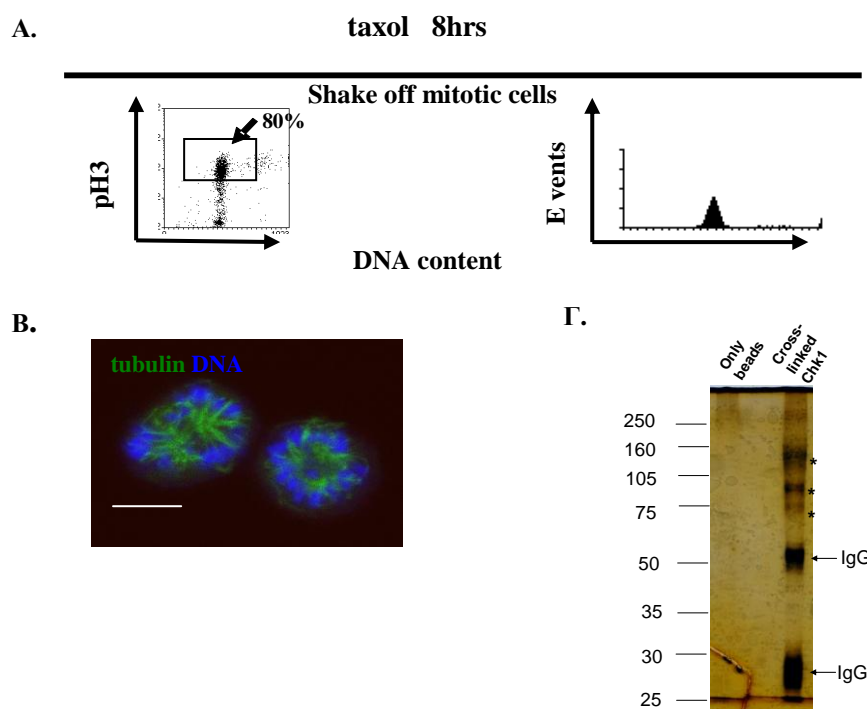


**Εικόνα 14. Μείωση αντισώματος στο δείγμα με τη χρήση cross-linked αντισώματος σε σφαιρίδια.** **A.** Χρώση νιτρικού αργύρου μετά από ανοσοκατακρήμνιση με cross-linked αντίσωμα σε δείγμα πρωτεϊνών από λύση με υπερήχους. **B.** Ανοσοαποτύπωση Western επιβεβαιώνει την ανίχνευση της Chk1 στις ίδιες ποσότητες παρουσία του cross-linked και non-cross-linked αντισώματος μετά από ανοσοκατακρήμνιση με 50 mM NaCl. Επώαση με σφαιρίδια αποτελεί αρνητικό δείγμα ελέγχου. Δείγμα 50 mM επιβεβαιώνει την ύπαρξη της Chk1 πριν την ανοσοκατακρήμνιση.

### 9. Απομόνωση των μιτωτικών κυττάρων HeLa παρουσία ταξόλης και ανίχνευση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1

Για να αυξήσουμε το εκχύλισμα μας με μιτωτικές ατράκτους, απομονώνουμε μιτωτικά κύτταρα με το λεγόμενο “shake-off”. Μετά από επώαση ταξόλης για 8 ώρες πραγματοποιήθηκε ελαφρύ χτύπημα της φλάσκας, ώστε τα μιτωτικά κύτταρα, λόγω του ότι δεν προσδένονται ισχυρά, να εναιωρηθούν στο θρεπτικό μέσο. Κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε για την εύρεση του ποσοστού των μιτωτικών κυττάρων. Το αποτέλεσμα ήταν ικανοποιητικό με ποσοστό μιτωτικών κυττάρων 80%, σε σχέση με το 42% μιτωτικών κυττάρων μετά από θρυψινοποίηση (Εικόνα

15A). Με συνεστιακή μικροσκοπία επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου στη φάση της προμετάφασης (Εικόνα 15B).



**Εικόνα 14.** Ανίχνευση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1 μετά από shake-off των μιτωτικών κυττάρων παρουσία ταξόλης. **A.** Κυτταρομετρία ροής για τη pH3 και το DNA με χρώση αντισωμάτων και ιωδιούχου προπιδίου αντίστοιχα, για την ανίχνευση των μιτωτικών κυττάρων μετά από shake-off έδειξε 80% μιτωτικά κύτταρα. **B.** Χαρακτηριστική προμετάφαση μετά από 8 hrs επώαση με ταξόλη και shake-off, η οποία αναλύθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία. Πράσινο: α-τουμπουλίνη, μπλε: DNA. Η κλίμακα είναι 5  $\mu\text{m}$ . **Γ.** Χρώση νιτρικού αργύρου μετά από ανοσοκατακρήμνιση αποκάλυψε νέες πρωτεΐνες στα ~160, ~105 και ~75 kDa. Η ανοσοκατακρήμνιση έγινε στο δείγμα των 50 mM NaCl (με 0,02% Triton και επιπρόσθετες επωάσεις ασβεστίου) και χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την Chk1 ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε σφαιρίδια. Δείγμα ελέγχου αποτέλεσε η επώση μόνο σφαιριδίων. \*': ζώνες που δεν υπάρχουν στα δείγματα ελέγχου.

Μειονέκτημα του shake-off αποτελεί ότι απομονώνεται μικρότερη ποσότητα κυττάρων οπότε η ποσότητα των κυττάρων έπρεπε να αυξηθεί για να ακολουθήσει χρώση νιτρικού αργύρου με αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε λύση κυττάρων με υπερήχους και μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης μετά από θρυψινοποίηση ή shake off κυττάρων που είχαν επωαστεί με ταξόλη. Η ποσότητα της πρωτεΐνης μετά από θρυψινοποίηση ήταν τετραπλάσια από αυτή μετά από shake off. Για το λόγο αυτό τετραπλάσια ποσότητα κυττάρων στήθηκε

για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μετά από shake-off. Το πρωτόκολλο απομόνωσης της μιτωτικής ατράκτου εφαρμόστηκε στις ίδιες συνθήκες όπως προηγουμένως (0,02% Triton, 5 mM και 2 φορές 1 mM ασβέστιο) και ανοσοκατακρήμιση της Chk1 πραγματοποιήθηκε στο δείγμα των 50 mM NaCl. Για την αποφυγή προσμίξεων αντισώματος στο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντια της Chk1 ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε σφαιρίδια πρωτεΐνης A. Δείγμα ελέγχου υπήρξε η επώαση δείγματος με σφαιρίδια. Χρώση νιτρικού αργύρου ανίχνευσε πρωτεΐνες σε μοριακά βάρη κοντά στα 160, 105 και 75 kDa (Εικόνα 15Γ). Το υπόλοιπο δείγμα εστάλη για φασματοσκοπία μάζας ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η Chk1 παρουσία ταξόλης και το αποτέλεσμα αναμένεται.

#### IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Chk1 κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του spindle checkpoint και στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου παρουσία ταξόλης (Zachos et al., 2007). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της Chk1 και τα πιθανά υποστρώματά της δεν έχουν πλήρως περιγραφεί. Το μόνο ως τώρα γνωστό υπόστρωμα της Chk1 παρουσία ταξόλης είναι η Aurora B (Zachos et al., 2007), η οποία μαζί με τις πρωτεΐνες INCENP, Survivin, Borealin και CSC-1 TD-60 αποτελεί το λεγόμενο σύμπλοκο CPC (Chromosomal Passengers Complex) (Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Με σκοπό την ταυτοποίηση νέων υποστρωμάτων της Chk1 στο spindle checkpoint ελέγχθηκε η δράση των χημικών αναστολέων της Chk1, NM-PP1 και 3MB-PP1 παρουσία etoposide ή ταξόλης, με τη χρήση χημικής γενετικής. Οι χημικοί αναστολείς είναι ογκώδεις ώστε να ταιριάζουν μόνο στο καταλυτικό κέντρο του μεταλλάγματος της Chk1, στο οποία έχει αντικατασταθεί στη θέση πρόσδεσης του ATP η λευκίνη σε αλανίνη, ώστε να προσαρμόζει ογκώδη ανάλογα πουρίνης. Οπότε οι χημικοί αναστολείς δεν ταιριάζουν στα καταλυτικά κέντρα των περισσότερων κινασών, είναι αδρανείς όταν εφαρμόζονται σε αγρίου τύπου κύτταρα, αλλά υψηλά ενεργοί στο ανάλογο της Chk1, ώστε με τη χρήση ραδιενέργειας η φωσφορική ομάδα του αναστολέα να μεταφέρεται μόνο στα υποστρώματα της Chk1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο χημικός αναστολέας NM-PP1 σταματά το 38% των κυττάρων στην G2/M φάση μετά από 8 ώρες επώασης με etoposide, το οποίο προκαλεί βλάβη στο DNA, ενώ απουσία αναστολέα το 65% των κυττάρων βρίσκεται στη G2/M φάση. Αυτό σημαίνει ότι ο NM-PP1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση των υποστρωμάτων της Chk1 στην G2/M φάση. Αντιθέτως, ο αναστολέας NM-PP1 παρουσία ταξόλης δε μειώνει το ποσοστό κυττάρων στη μίτωση από ότι απουσία του αναστολέα. Ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα δίνει και η χρήση του χημικού αναστολέα 3MB-PP1 παρουσία ταξόλης. Οπότε συμπεραίνουμε ότι ο χημικός αναστολέας NM-PP1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση υποστρωμάτων στο G2/M checkpoint, αλλά όχι στο spindle checkpoint. Αυτό ίσως συμβαίνει, διότι ο NM-PP1 είναι αρκετός για να απενεργοποιήσει μερικώς το G2/M checkpoint, αλλά δεν είναι ικανός να απενεργοποιήσει το spindle checkpoint λόγω πιθανότητα μεγαλύτερης ενεργοποίησης της Chk1.

Μία δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1 μετά από ενεργοποίηση του spindle

checkpoint παρουσία ταξόλης. Η Chk1 απομονώθηκε σε χαμηλή συγκέντρωση Triton από 80% μιτωτικών HeLa κυττάρων. Μετά από ανοσοκατακρήμνιση της και χρώση νιτρικού αργύρου εντοπίστηκαν πιθανές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την Chk1 κοντά στα μοριακά βάρη των 160, 105 και 75 kDa. Μία πιθανή πρωτεΐνη που ίσως αλληλεπιδρά με την Chk1 και αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος των 106 kDa είναι η INCENP, η οποία αποτελεί μία από τις πρωτεΐνες του συμπλόκου CPC και συνεντοπίζεται με την Chk1 στο μεσόσωμα (midbody) κατά την τελόφαση απουσία φαρμάκων (Zachos et al., 2007). Επιπλέον, κοντά στο μοριακό βάρος των 160 kDa βρίσκεται η BubR1, η οποία αποτελεί υπόστρωμα της Aurora B και της οποίας η τοποθέτηση στους κινητοχώρους είναι εξαρτώμενη από την Chk1 (Zachos et al., 2007). Η Aurora B, αν και βρίσκεται στο μοριακό βάρος των 40 kDa, αναμένεται ως πιθανή πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την Chk1, αφού αποτελεί υπόστρωμά της. Ωστόσο, καμία από τις παραπάνω πρωτεΐνες δεν είναι σίγουρο ότι αλληλεπιδρούν με την Chk1 καθώς νέες πρωτεΐνες μπορεί να ταυτοποιηθούν μέσω φασματοσκοπίας μάζας. Τα δείγματα στάλθηκαν για φασματοσκοπία μάζας και τα αποτελέσματα αναμένονται.

Μετά την ταυτοποίηση των νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Chk1 πρέπει να ελεγχθεί κάθε πρωτεΐνη ξεχωριστά, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η αλληλεπίδραση είναι αληθής, ειδική και άμεση. Η τεχνική FAR-Western και GST-pull down θα μπορούσε να εφαρμοστεί για τον έλεγχο της άμεσης πρόσδεσης της εκάστοτε πρωτεΐνης στην Chk1, ενώ η εφαρμογή του kinase assay θα ήταν δυνατή για την εύρεση πιθανού υποστρώματος της Chk1. Επιπλέον, με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας θα μπορούσε να ελεγχθεί αν οι πρωτεΐνες συνεντοπίζονται με την Chk1 (co-localization) στους κινητοχώρους, όπου η Chk1 εντοπίζεται παρουσία ταξόλης (Zachos et al., 2007). Μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στη φάση της ανάφασης και της τελόφασης μετά από release από ταξόλη θα αποτελούσε επόμενο στόχο εργασίας.

Οι αναστολείς του spindle checkpoint επάγουν μαζικό λάθος διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και οδηγούν σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων (Harrington et al., 2004). Κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους λειτουργεί η Chk1 και ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά είναι δυνατό να οδηγήσει σε κατασκευή νέων αναστολέων και την εύρεση νέων μεθόδων για τη βελτίωση της θεραπείας του καρκίνου..



## V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.
- Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 9, 69-75.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-429.
- Bharadwaj, R., and Yu, H. (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 23, 2016-2027.
- Bishop, A.C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C., and Shokat, K.M. (1998). Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol* 8, 257-266.
- Capasso, H., Palermo, C., Wan, S., Rao, H., John, U.P., O'Connell, M.J., and Walworth, N.C. (2002). Phosphorylation activates Chk1 and is required for checkpoint-mediated cell cycle arrest. *J Cell Sci* 115, 4555-4564.
- Chen, L., Liu, T.H., and Walworth, N.C. (1999). Association of Chk1 with 14-3-3 proteins is stimulated by DNA damage. *Genes Dev* 13, 675-685.
- Chen, P., Luo, C., Deng, Y., Ryan, K., Register, J., Margosiak, S., Tempczyk-Russell, A., Nguyen, B., Myers, P., Lundgren, K., *et al.* (2000). The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: implications for Chk1 regulation. *Cell* 100, 681-692.
- Desany, B.A., Alcasabas, A.A., Bachant, J.B., and Elledge, S.J. (1998). Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev* 12, 2956-2970.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* 161, 267-280.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Elowe, S., Hummer, S., Uldschmid, A., Li, X., and Nigg, E.A. (2007). Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev* 21, 2205-2219.
- Hans, F., and Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 20, 3021-3027.
- Harrington, E.A., Bebbington, D., Moore, J., Rasmussen, R.K., Ajose-Adeogun, A.O., Nakayama, T., Graham, J.A., Demur, C., Hercend, T., Diu-Hercend, A., *et al.* (2004). VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med* 10, 262-267.
- Ho, C.H., Piotrowski, J., Dixon, S.J., Baryshnikova, A., Costanzo, M., and Boone, C. (2010). Combining functional genomics and chemical biology to identify targets of bioactive compounds. *Curr Opin Chem Biol*.
- Ikegami, Y., Goto, H., Kiyono, T., Enomoto, M., Kasahara, K., Tomono, Y., Tozawa, K., Morita, A., Kohri, K., and Inagaki, M. (2008). Chk1 phosphorylation at Ser286 and Ser301 occurs with both stalled DNA replication and damage checkpoint stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 1227-1231.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8, 37-45.

Kang, J., and Yu, H. (2009). Kinase signaling in the spindle checkpoint. *J Biol Chem* 284, 15359-15363.

Katsuragi, Y., and Sagata, N. (2004). Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell* 15, 1680-1689.

Kim, S.M., and Huberman, J.A. (2001). Regulation of replication timing in fission yeast. *EMBO J* 20, 6115-6126.

Kops, G.J., Weaver, B.A., and Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5, 773-785.

Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., *et al.* (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.

Loffler, H., Bochtler, T., Fritz, B., Tews, B., Ho, A.D., Lukas, J., Bartek, J., and Kramer, A. (2007). DNA damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function. *Cell Cycle* 6, 2541-2548.

Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* 412, 557-561.

Nousiainen, M., Sillje, H.H., Sauer, G., Nigg, E.A., and Korner, R. (2006). Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5391-5396.

Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36, 617-656.

O'Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M., and Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J* 16, 545-554.

Peddibhotla, S., Lam, M.H., Gonzalez-Rimbau, M., and Rosen, J.M. (2009). The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5159-5164.

Raleigh, J.M., and O'Connell, M.J. (2000). The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* 113 ( Pt 10), 1727-1736.

Randall, C.L., Burkard, M.E., and Jallepalli, P.V. (2007). Polo kinase and cytokinesis initiation in Mammalian cells: harnessing the awesome power of chemical genetics. *Cell Cycle* 6, 1713-1717.

Rhind, N., Baber-Furnari, B.A., Lopez-Girona, A., Boddy, M.N., Brondello, J.M., Moser, B., Shanahan, P., Blasina, A., McGowan, C., and Russell, P. (2000). DNA damage checkpoint control of mitosis in fission yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 353-359.

Samson, F., Donoso, J.A., Heller-Bettinger, I., Watson, D., and Himes, R.H. (1979). Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport. *J Pharmacol Exp Ther* 208, 411-417.

Samuel, T., Weber, H.O., and Funk, J.O. (2002). Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell Cycle* 1, 162-168.

Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., and Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.

Santocanale, C., and Diffley, J.F. (1998). A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 395, 615-618.

Sauer, G., Korner, R., Hanisch, A., Ries, A., Nigg, E.A., and Sillje, H.H. (2005). Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics* 4, 35-43.

Schiff, P.B., and Horwitz, S.B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1561-1565.

Schonn, I., Hennesen, J., and Dartsch, D.C. (2010). Ku70 and Rad51 vary in their importance for the repair of doxorubicin- versus etoposide-induced DNA damage. *Apoptosis*.

Sillje, H.H., and Nigg, E.A. (2006). Purification of mitotic spindles from cultured human cells. *Methods* 38, 25-28.

Smukste, I., and Stockwell, B.R. (2005). Advances in chemical genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 261-286.

Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154, 925-936.

Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., and Nakanishi, M. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* 14, 1439-1447.

Tapia-Alveal, C., Calonge, T.M., and O'Connell, M.J. (2009). Regulation of chk1. *Cell Div* 4, 8.

Vagnarelli, P., and Earnshaw, W.C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113, 211-222.

Walworth, N., Davey, S., and Beach, D. (1993). Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 363, 368-371.

Ye, X.S., Fincher, R.R., Tang, A., and Osmani, S.A. (1997). The G2/M DNA damage checkpoint inhibits mitosis through Tyr15 phosphorylation of p34cdc2 in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 16, 182-192.

Zachos, G., Black, E.J., Walker, M., Scott, M.T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C., and Gillespie, D.A. (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* 12, 247-260.

Zachos, G., Rainey, M., and Gillespie, D.A. (2003a). Lethal errors in checkpoint control--life without Chk1. *Cell Cycle* 2, 14-16.

Zachos, G., Rainey, M.D., and Gillespie, D.A. (2003b). Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J* 22, 713-723.

Zachos, G., Rainey, M.D., and Gillespie, D.A. (2005). Chk1-dependent S-M checkpoint delay in vertebrate cells is linked to maintenance of viable replication structures. *Mol Cell Biol* 25, 563-574.

Zhao, H., and Piwnicka-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 21, 4129-4139.