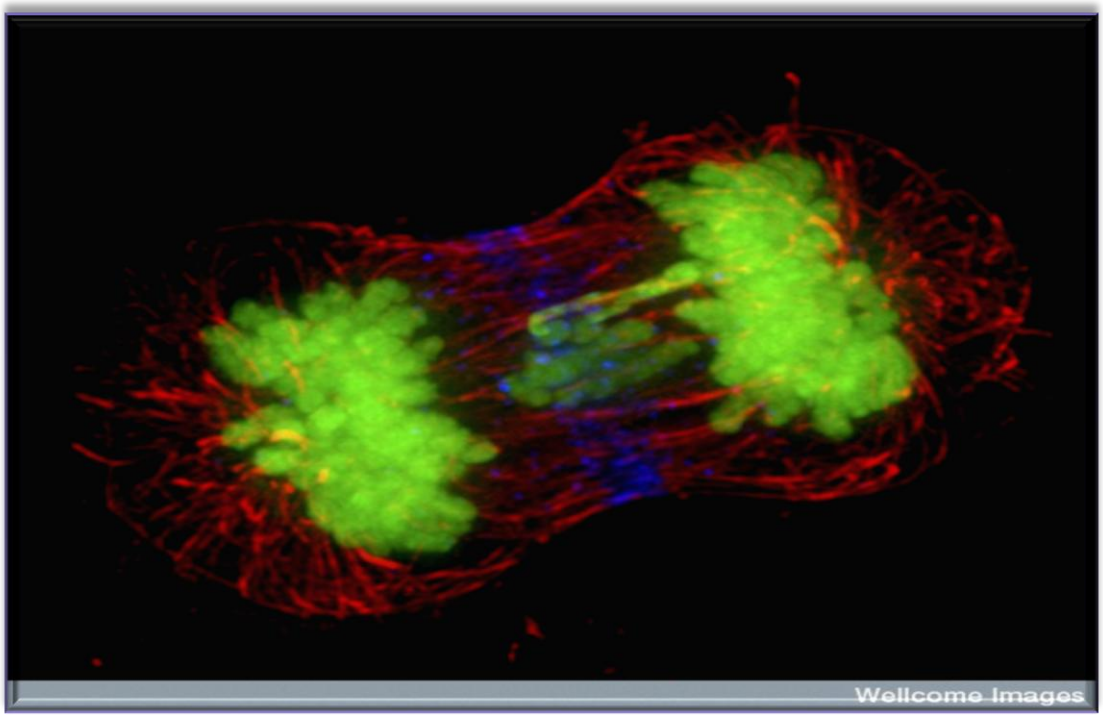
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα : Μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Chk1 και Aurora B.



Κορομηλά Γεωργία

Υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Ζάχου Γεώργιου

Ηράκλειο, 2012

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες 3

Περίληψη 4

Σύντομη ανασκόπηση του κυτταρικού κύκλου 5 - 8

Εισαγωγή 9 - 22

Πειραματική διαδικασία – Αποτελέσματα 22 – 25

Συζήτηση 25 – 27

Υλικά 28 – 29

Μέθοδοι 29 – 36

Παράρτημα 37 - 41

Βιβλιογραφία 42 - 46

Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Ζάχο Γεώργιο που με βοήθησε εις το έπακρον μεταδίδοντάς μου ένα υψηλό επίπεδο γνώσεων στα πλαίσια μιας προπτυχιακής έρευνας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την διδακτορικό Πετσαλάκη Ελένη που συνέβαλε καθοριστικά στην ενίσχυση του τεχνικού μου υποβάθρου.

Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Chk1 και Aurora B και πιο συγκεκριμένα εστιάστηκε το ενδιαφέρον στον εντοπισμό συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου της Chk1 και συνεπώς αμινοξικών αλληλουχιών που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Aurora B.

Η Chk1 όντας μία checkpoint κινάση συμμετέχει στους μηχανισμούς ελέγχου του κυττάρου σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου με απώτερο σκοπό να καταστείλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου παρουσία βλαβών του DNA έως ότου επιδιορθωθούν τα λάθη, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από τη δημιουργία χρωμοσωμικής αστάθειας.

Όσον αφορά την Aurora B, αποτελεί τη βασική πρωτεΐνη του chromosomal passenger complex που διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο στο mitotic spindle checkpoint αποτρέποντας την πρώιμη είσοδο των κυττάρων από τη μετάφαση στην ανάφαση απουσία τάσης των κινητοχώρων ή ΄΄μερικής΄΄ τάσης λόγω λαθεμένης πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους.

Πώς συνδέονται όμως οι πρωτεΐνες Chk1 και Aurora B ; Η καθοριστική απάντηση δόθηκε το 2011 από τους Petsalaki et al. οι οποίοι απέδειξαν ότι στη μίτωση η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora B στο κατάλοιπο σερίνη 331 αυξάνοντας σημαντικά την ενεργότητα της.

Το επόμενο βήμα των ερευνών όπως αναφέρθηκε ήταν να αποδειχθεί αν Chk1 και Aurora B αλληλεπιδρούν σταθερά μεταξύ τους και να εντοπιστούν οι αλληλουχίες της Chk1 που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με την Aurora B. Μετά από κλωνοποίηση τεσσάρων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και έπειτα από την απομόνωση των αντίστοιχων πρωτεϊνικών αλληλουχιών και με χρήση της τεχνικής GST pull down assay διαπιστώθηκε με western blot analysis ότι:

1) Η Chk1 full length αλληλεπιδρά σταθερά με την Aurora B.
2) Το N-αμινοτελικό άκρο της Chk1 όπως και το C-καρβοξυτελικό άκρο δεν είναι ικανά από μόνα τους για να αλληλεπιδράσουν με την Aurora B
3) Απαραίτητες για την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών με βάση τα πειράματα που διεξήχθησαν είναι δύο περιοχές της Chk1, μία στο N-αμινοτελικό και μία στο C-καρβοξυτελικό άκρο.

Σύντομη ανασκόπηση του κυτταρικού κύκλου

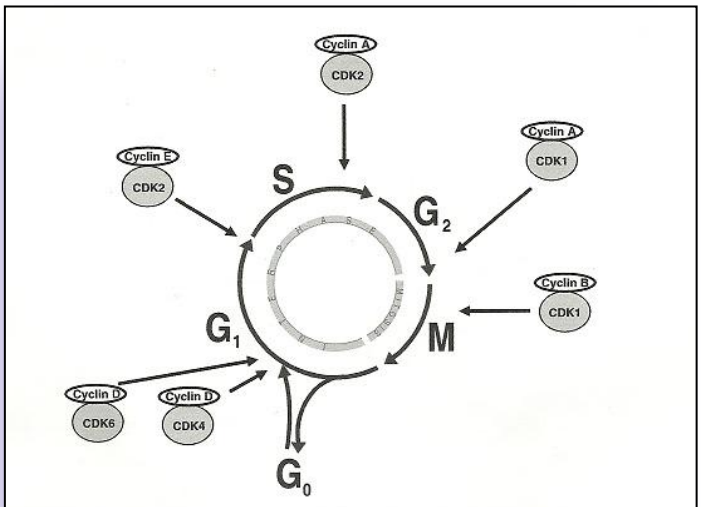
Ο κυτταρικός κύκλος αποτελεί μια σύνθετη και ρυθμιζόμενη διαδικασία διαδοχής μορφολογικών και βιοχημικών μονοπατιών που οδηγεί στη δημιουργία δύο θυγατρικών κυττάρων πανομοιότυπων με το προγονικό κύτταρο. Η πιο βασική λειτουργία του κυτταρικού κύκλου είναι η ακριβής αντιγραφή του γενετικού υλικού DNA των χρωμοσωμάτων και ο διαχωρισμός των αντιγράφων στα θυγατρικά κύτταρα .Ο χρωμοσωμικός διπλασιασμός συμβαίνει κατά την φάση S (synthesis DNA) του κύκλου η οποία τυπικά διαρκεί 10 -12 ώρες όσον αφορά τα κύτταρα των θηλαστικών ενώ ο χρωμοσωμικός διαχωρισμός και η κυτταρική διαίρεση λαμβάνει χώρα κατά την φάση M (Mitosis) η οποία διαρκεί λιγότερο από 1 ώρα για τα προαναφερθέντα κύτταρα. Η φάση M περιλαμβάνει δύο σημαντικά γεγονότα : α) την διαίρεση του πυρήνα ή μίτωση όπου τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα διανέμονται στους θυγατρικούς πυρήνες και β) την διαίρεση του κυτταροπλάσματος ή κυτταροκίνηση όπου έχουμε την πλήρη δημιουργία των δύο πανομοιότυπων κυττάρων. Ωστόσο δύο ακόμη στάδια παρατηρούνται κατά τον κυτταρικό κύκλο το στάδιο G1 ανάμεσα στη φάση M και S και το στάδιο G2 μεταξύ της φάσης S και M.

Κατά τη φάση G1 το κύτταρο προετοιμάζεται για να μεταβεί στη φάση S και χαρακτηρίζεται από υψηλό μεταβολικό ρυθμό καθώς συντίθενται δομικές πρωτεΐνες ,ένζυμα και γίνεται και διπλασιασμός ορισμένων οργανιδίων. Στη φάση G2 η κυτταρική αύξηση συνεχίζεται ενώ ταυτόχρονα συντίθεται ορισμένες πρωτεΐνες και ένζυμα απαραίτητα για τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G2 στη μίτωση. Οι φάσεις G1 ,S και G2 αποτελούν τη μεσόφαση. Πλην των τεσσάρων φάσεων υπάρχει και η φάση G0.Το θυγατρικό κύτταρο που έχει προκύψει από τη μίτωση αντί να εισέλθει στη φάση προετοιμασίας G1 για μία επερχόμενη διαίρεση εισέρχεται σε μία φάση ηρεμίας G0 η οποία καθορίζεται από ποικίλλα εξωτερικά ερεθίσματα όπως την έλλειψη αυξητικών παραγόντων, μιτογόνων. Η τυχόν θετική επίδραση των αυξητικών παραγόντων οδηγεί το κύτταρο να εισέλθει στη G1 υπερβαίνοντας το R (Restriction point) και πλέον η πορεία του κυττάρου προς τη μίτωση είναι προδιαγεγραμμένη καθώς δεν υπακούει στους αυξητικούς παράγοντες.

Η μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη ρυθμίζεται από μια ποικιλία διαφορετικών κυτταρικών πρωτεϊνών. Οι ρυθμιστικές αυτές πρωτεΐνες ονομάζονται κυκλινό-εξαρτώμενες κινάσες CDKs και αποτελούν κινάσες σερίνης-θρεονίνης και ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένες στιγμές κατά τον κυτταρικό κύκλο. Για την ενεργοποίηση των CDKs απαραίτητη προϋπόθεση είναι η σύνδεση τους με τις κυκλίνες. Τα επίπεδα των CDKs παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του κύκλου σε αντίθεση με τις κυκλίνες που τα επίπεδα τους αυξομειώνονται λόγος που επιβεβαιώνει την περιοδική ενεργοποίηση των CDKs (Evans et al.1983; Pines 1991). Ωστόσο για την πλήρη ενεργοποίηση των CDKs εκτός της πρόσδεσης των κυκλινών απαραίτητο καθίσταται το γεγονός της φωσφορυλίωσης καταλοίπων θρεονίνης ή τυροσίνης από ειδικές κινάσες Cdk –independent kinase (CAK) στο ενεργό κέντρο των CDKs. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο CDK – Cyclin ανάλογα με

το στάδιο του κυτταρικού κύκλου φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα με στόχο να προωθήσει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την G1εως τη μίτωση (Εικόνα 1).

Παρόλο αυτά σημαντικό ρόλο στη ρυθμιστική διαδικασία του κυτταρικού κύκλου έχουν και οι αναστολείς των συμπλεγμάτων CDKS –Cyclin(CKI, CDK inhibitors) καθώς και οι κινάσες Wee1 και Myt1 οι οποίες με ανασταλτική φωσφορυλίωση της CDK1 στην τυροσίνη 15 και στην θρεονίνη 14 απενεργοποιούν την κινάση έως ότου μπει στη μίτωση όπου μετέπειτα μια ειδική φωσφατάση η Cdc 25 την ενεργοποιεί (Lew and Kornbluth 1996). Έτσι ρυθμίζονται τα επίπεδα των συμπλόκων στις διάφορες φάσεις.

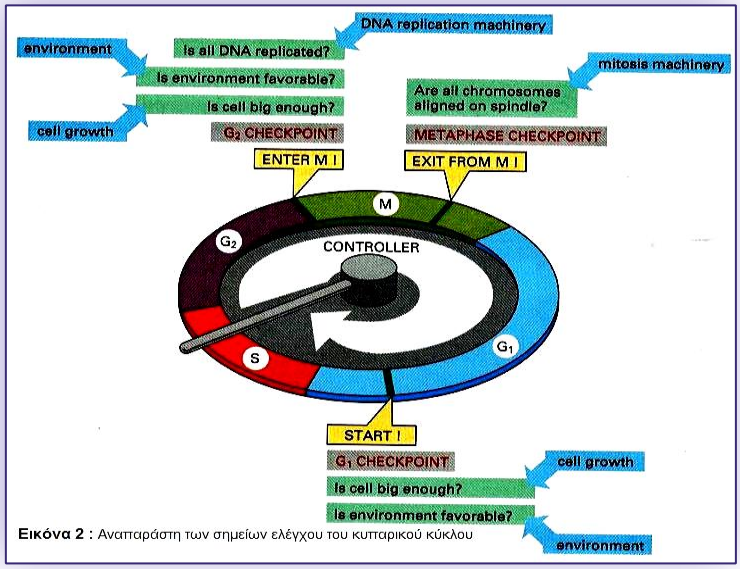


Εικόνα 1 : Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου-Σύμπλοκα CDK -cyclin σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικόυ κύκλου

Ωστόσο για να ξεκινήσει η επομένη φάση στον κυτταρικό κύκλο το κύτταρο θα πρέπει να βεβαιωθεί ότι η προηγούμενη φάση ολοκληρώθηκε επιτυχώς και δεν υπήρξαν λάθη. Έτσι το κύτταρο διαθέτει ένα μηχανισμό που του επιτρέπει να ελέγχει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω τριών σημείων ελέγχου checkpoint τα οποία είναι τα εξής :G1/S ,G2/M και το mitotic spindle checkpoint (Εικόνα 2).Αυτά τα σημεία μπορούν ν' αναστείλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου έως ότου οι συνθήκες γίνουν ευνοητές για τη μετάβαση στις επόμενες φάσεις.

Κατά τη φάση G1 το κύτταρο ελέγχει αν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές για τον πολλαπλασιασμό τους και αν το γονιδίωμα είναι έτοιμο για αντιγραφή. Αν ωστόσο το γονιδίωμα φέρει βλάβες τότε ενεργοποιείται ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί το κύτταρο είτε σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη είτε σε κυτταρικό θάνατο, απόπτωση. Επόμενο σημείο ελέγχου εντοπίζεται ανάμεσα στις φάσεις G2 και M και ελέγχει αν το DNA είναι πλήρως και σωστά αντιγραμμένο, χωρίς βλάβες με στόχο να συμβεί η επιτυχημένη μετάβαση στη μίτωση.Το τελευταίο checkpoint αφορά τη μετάβαση από την μετάφαση της μίτωσης στην ανάφαση. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η διπολική πρόσδεση των μικροσωληνίσκων της ατράκτου στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων. Σε περίπτωση που αυτό δεν συμβεί τότε ενεργοποιείται το mitotic

spindle checkpoint για αναστολή της μετάβασης από τη μετάφαση στην ανάφαση έως ότου διορθωθεί το λάθος.



Εικόνα 2 : Αναπαράστη των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Η μίτωση

Όταν το κύτταρο μεταβεί από το σημείο ελέγχου G2/S τότε είναι ικανό να εισέλθει στη φάση της μίτωσης.Η μίτωση διαχωρίζεται στα εξής στάδια (Εικόνα 3) :

Πρόφαση

- Αρχίζει με τη συμπύκνωση των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων τα οποία συστρατεύουν την πυρηνική πρωτεΐνη condesin II.
- Η πρωτεΐνη cohesin μετατοπίζεται από του χρωμοσωμικούς βραχίονες στο κεντομερές .
- Τα διπλασιασμένα ζευγάρια των κεντριολίων εκτός του πυρήνα που σχηματίζουν τα δύο κεντροσώματα αρχίζουν να σχηματίζουν την μιτωτική άτρακτο μετακινούμενα σε αντίθετους πόλους.
- Αρχίζει ο πολυμερισμός των μικροσωληνίσκων από τα κεντροσώματα.

Προμετάφαση

- Διάλυση του πυρηνικού φακέλου.
- Γρήγορος πολυμερισμός και αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων από τα κεντροσώματα.
- Συστράτευση στα χρωμοσώματα της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης condesin I
- Οι κινητοχώροι των μικροσωληνίσκων προσδένουν μικροσωληνίσκους από τους αντίθετους πόλους της ατράκτου.

Μετάφαση

- Τα χρωμοσώματα εμφανίζουν το μέγιστο βαθμό συσπείρωσης
- Τα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται στον ισημερινό της ατράκτου

Ανάφαση

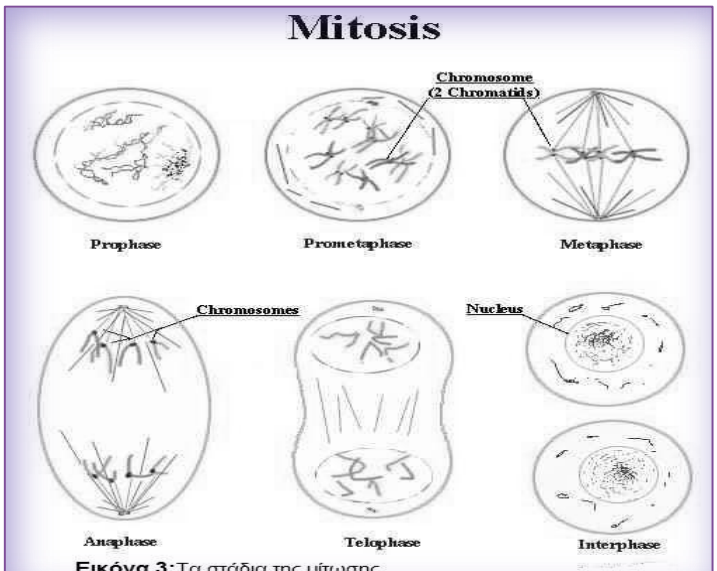
- Ξεκινά ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων με τη βοήθεια της separase η οποία αποικοδομεί την cohesin.
- Οι μικροσωληνίσκοι του κινητοχώρου αποπολυμερίζονται με απώλεια μονάδων τουμπουλίνης από την περιοχή του κινητοχώρου και έτσι τα χρωμοσώματα ωθούνται προς τους αντίθετους πόλους της ατράκτου (Ανάφαση Α) ενώ οι μη προσδεδεμένοι μικροσωληνίσκοι σε κινητοχώρους ή επικαλυπτόμενοι φέρουν πρωτεΐνες κίνησης οι οποίες είναι υπεύθυνες για την επιμήκυνση της ατράκτου (Ανάφαση Β).

Τελόφαση

- Τα χρωμοσώματα ομαδοποιούνται στους αντίθετους πόλους της ατράκτου.
- Αρχίζει η αποσυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων.
- Αρχικός σχηματισμός πυρηνικής μεμβράνης γύρω από τα χρωμοσώματα ,σχηματισμός Golgi και ενδοπλασματικού δικτύου.
- Δημιουργία συσταλτού δακτυλίου για το διαχωρισμό του κυτταροπλάσματος.

Κυτταροκίνηση

- Σχηματισμένη πυρηνική μεμβράνη.
- Σχηματισμός κυτταροπλασματικής αύλακας.
- Διαχωρισμός κυτταροπλάσματος, σχηματισμός δύο θυγατρικών κυττάρων πανομοιότυπα με το αρχικό

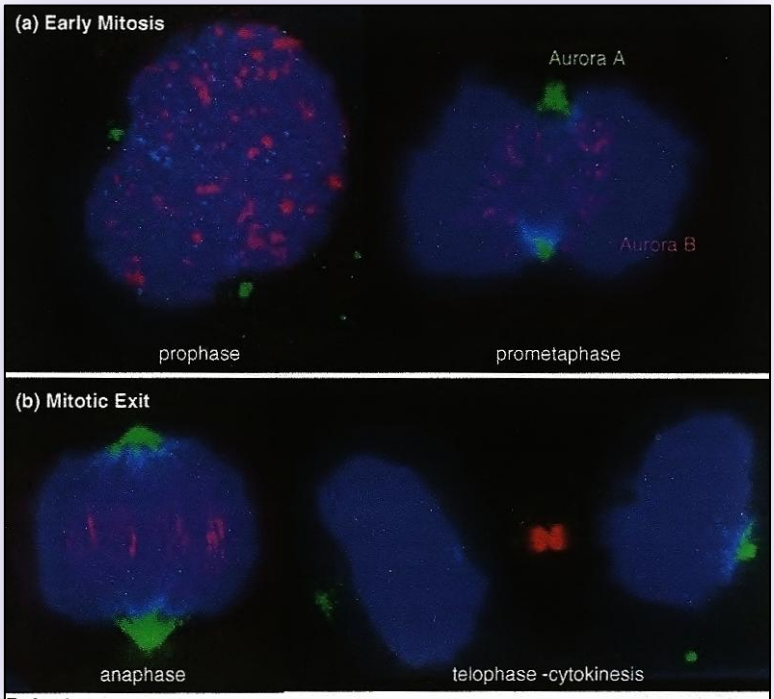


Εικόνα 3: Τα στάδια της μίτωσης

Εισαγωγή

Η οικογένεια των κινασών Aurora.

Η οικογένεια των κινασών Aurora αποτελούν κινάσες σερίνης –θρεονίνης. Συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τη στιγμή που τα χρωμοσώματα εισέρχονται στη μίτωση έως το στάδιο της κυτταροκίνησης. Ο αριθμός των μελών της οικογένειας Aurora ποικίλλει ανάλογα με το είδος. Ο μύκητας (budding yeast) έχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την Aurora (αναφέρεται συνήθως και ως Aurora/IpII) (Chan et al. 1993), η Drosophila καθώς και οι ανώτεροι ευκαρυώτες έχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν την Aurora A και Aurora B (Glover et al.1995) ενώ στα θηλαστικά έχει ταυτοποιηθεί και η Aurora C η οποία εκφράζεται στα γαμετικά κύτταρα των όρχεων συμμετέχοντας στη διαδικασία της μείωσης. Αν και η Aurora A παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την Aurora B όσον αφορά την καταλυτική τους περιοχή, ομολογία που ανέρχεται στο 70% οι δυο πρωτεΐνες έχουν διαφορετική κυτταρική τοποθέτηση και λειτουργία (Εικόνα 4). Αναφορικά η Aurora A εντοπίζεται στα κεντροσώματα κατά τη φάση late G2 του κυτταρικού κύκλου και έπειτα κατά τη μίτωση κατευθύνεται στους πόλους της ατράκτου. Επιγραμματικά συμμετέχει στην ωρίμανση των κεντροσωμάτων, στο διαχωρισμό και στη διπολικότητα της ατράκτου (Barr et al.2007 ;Vader et al.2008). Η πρωτεΐνη Aurora B είναι η πιο καλά μελετημένη όντας υψηλά συντηρημένη από τους μύκητες μέχρι και τα θηλαστικά.

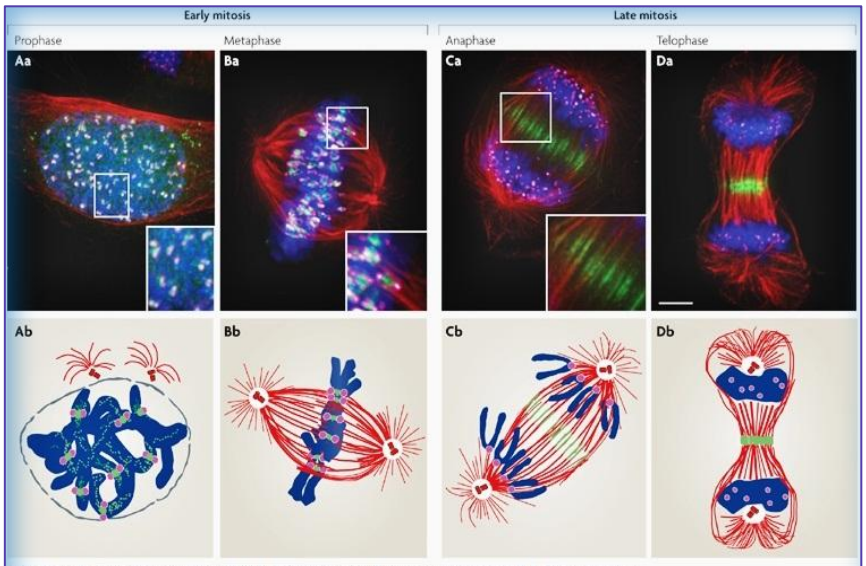


Εικόνα 4 :Κυτταρική τοποθέτηση **Aurora A** και **Aurora B** σε μιτωτικά κύτταρα HeLa (Carmena et al.2009)

Aurora B- Η καρδιά του CPC

Η ρύθμιση του μηχανισμού της μίτωσης μέσω του συντονισμού των χρωμοσωμάτων καθώς και κυτταροσκελετικών γεγονότων κατά τις επιμέρους φάσεις βρίσκεται υπό την κυριαρχία ενός συμπλόκου πρωτεϊνών που ονομάζεται CPC Chromosomal passenger complex. Αυτό το σύμπλοκο των πρωτεϊνών εντοπίζεται κατά τη φάση G2 στον πυρήνα,συνδέεται κατά μήκος των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων στην πρόφαση ενώ συσσωρεύεται στο εσωτερικό των κεντρομερών κατά την προμετάφαση και τη μετάφαση. Στην ανάφαση μετατοπίζεται από τα χρωμοσώματα και τοποθετείται στην ενδιάμεση ζώνη της ατράκτου (spindle midzone) ενώ κατά την τελόφαση και την κυτταροκίνηση το CPC συγκεντρώνεται στο ενδιάμεσα σώμα (midbody) (Εικόνα 5).

Το CPC αποτελείται από την κίναση σερίνης- θρεονίνης Aurora B που διαδραματίζει ενεργό ρόλο στο σύμπλοκο , από την πρωτεΐνη ικρίωμα INCENP και από τις Survivin και Borealin (γνωστή και ως Dasra –B).Τα μη ενζυματικά μέλη του συμπλόκου ρυθμίζουν την στόχευση, την ενζυματική ενεργότητα και τη σταθερότητα της κύριας πρωτεΐνης Aurora B (Lens et al. 2006). Η απενεργοποίηση οποιασδήποτε πρωτείνης του συμπλόκου με την τεχνική της σίγησης (RNAi) είχε ως αποτέλεσμα των αποπροσανατολίσμο των επιμέρους πρωτείνων εκτός του CPC, την αποσταθεροποίση τους και τέλος βλάβες στη διαδίκασία της μίτωσης (Honda et al. 2003 ;Gassmann et al. 2004; Adams et al. 2001; Vader et al 2006).



Εικόνα 5 : Ο εντοπισμός του CPC σε όλα τα στάδια της μίτωσης σε HeLa cells με την τεχνική του ανοσοφθορισμού : DNA, a-tubulin, CPC Aurora B, κεντρομερή (Ruchaud et al. 2007)

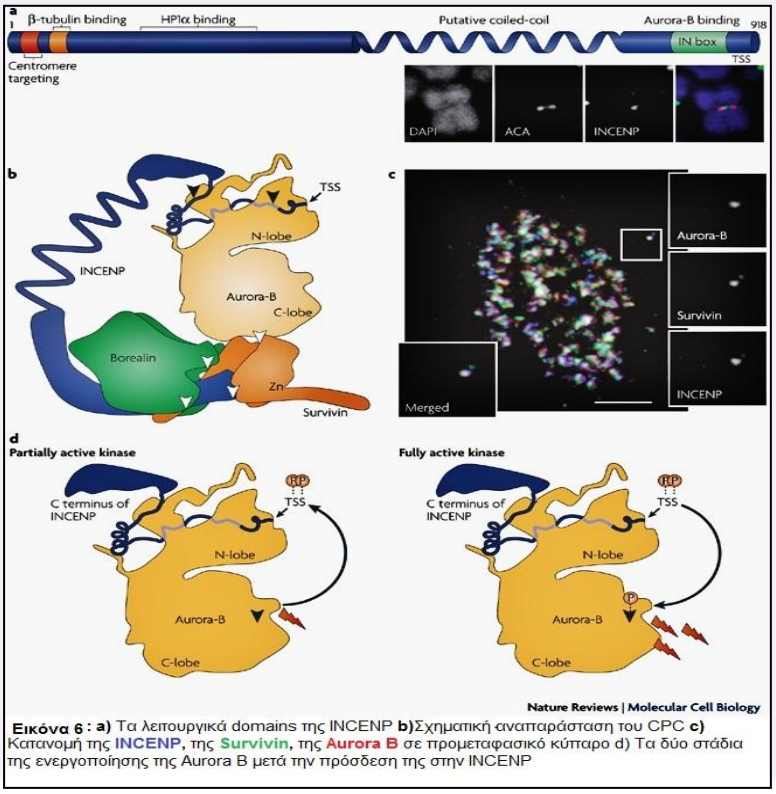
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών του συμπλόκου

Η INCENP ήταν η πρώτη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε στο σύμπλοκο CPC και εντοπίστηκε στο εσωτερικό των κεντρομέρων γι' αυτό και ονομάστηκε inner centromeric protein. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη λειτουργεί ως ικρίωμα για την πρόσδεση των άλλων πρωτεϊνών. Το συντηρημένο C τελικό άκρο της INCENP περιέχει μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων 892-900 αα (στον άνθρωπο) γνωστή ως

IN-BOX η οποία προσδένει και ενεργοποιεί την Aurora B η οποία με τη σειρά της αυτοφωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο θρεονίνη 232 (Honda et al. 2003 ;Yasui et al. 2004). Έπειτα η Aurora B όντας μερικώς ενεργή και έχοντας την ιδιότητα της κινάσης φωσφορυλιώνει in trans την INCENP στο συντηρημένο μοτίβο TSS (Thr-Ser-Ser) του C τελικού άκρου (Honda et al.,2003) αποκτώντας έτσι την πλήρη ενεργότητα της ως κινάση. Αντίστοιχα στο N τελικό άκρο προσδένονται οι πρωτεΐνες Borealin και Survivin μέσω μία μικρής αλληλουχίας αμινοξέων 1-58 αα (στον άνθρωπο) (Honda et al., 2003; Gassmann et al., 2004; Klein et al., 2006; Sessa et al., 2005) (Εικόνα 6). Η Borealin συνδέεται δυναμικά με τη Survivin μέσω του N –τελικού άκρου (Gassmann et al. 2004) ενώ η Survivin αλληλεπιδρά άμεσα με την Aurora B. Τόσο η Survivin όσο και η Borealin συνιστούν υποστρώματα της Aurora B.

Η Survivin φωσφορυλιώνεται από την Aurora B in vitro στο κατάλοιπο θρεονίνη 117(Wheatley et al. 2004) μία φωσφορυλίωση απαραίτητη τόσο για την πρόσδεση της ίδιας στην INCENP όσο και για στόχευση του CPC στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων. Μελέτες έχουν δείξει ότι και η Borealin φωσφορυλιώνεται από την Aurora B αλλά ακόμη δεν έχει αποδειχθεί αυτό in vivo. Ωστόσο έχει προταθεί ότι η Borealin διευκολύνει την αλληλεπίδραση της INCENP με τη Survivin (Klein et al.,2006;Vader et al., 2006) καθώς και ότι η Borealin αλληλεπιδρά άμεσα με DNA in vitro γεγονός που οδηγεί στο σκεπτικό της άμεσης αλληλεπίδρασης του CPC με τη χρωματινική περιοχή στο κεντρομερές. Άρα τόσο η Survivin όσο και η Borealin είναι απαραίτητες για την στόχευση ολόκληρου του συμπλόκου στα κεντρομερή.



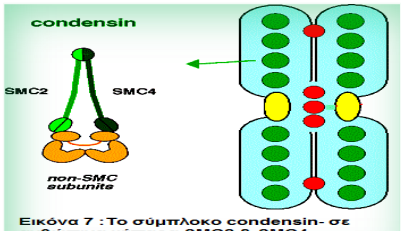
Εικόνα 6 : a) Τα λειτουργικά domains της INCENP **b)**Σχηματική αναπαράσταση του CPC **c)** Κατανομή της **INCENP**, της **Survivin**, της **Aurora B** σε προμεταφασικό κύτταρο d) Τα δύο στάδια της ενεργοποίησης της Aurora B μετά την πρόσδεση της στην INCENP

Ο ρόλος του chromosomal passenger complex στη μίτωση και η καταλυτική συμμετοχή της Aurora B.

Συμμετοχή στη διαμόρφωση της χρωμοσωμικής δομής.

Στο τέλος της φάσης G2 στην περιοχή των κεντρομερών των χρωμοσωμάτων παρατηρείται φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη σερίνη 10 από την Aurora B του συμπλόκου CPC. Με την είσοδο στη μίτωση το σύμπλοκο CPC καλύπτει ολόκληρη την έκταση των χρωμοσωμάτων, συνεπώς και η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη σερίνη 10 εντοπίζεται σε όλη τους την επιφάνεια (Monier et al., 2007). Αρχικά είχε προταθεί ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση σχετίζεται με τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων χαρακτηριστικό της μίτωσης (Gurley et al.,1974). Πειράματα στη Drosophila έδειξαν ότι με απενεργοποίηση της Aurora B δεν παρατηρείται φωσφορυλίωση και ότι τα μιτωτικά χρωμοσώματα αν και εμφανίζουν ανώμαλη μορφολογία παρουσιάζουν κανονικά επίπεδα συμπύκνωσης (Adams et al., 2001). Συνεπώς η συμμετοχή του CPC και κατά επέκταση της Aurora B στη συμπύκνωση είναι αμφιλεγόμενη. Το 2005 οι Wolfgang et al . έδειξαν ότι η συγκεκριμένη φωσφορυλιώση εκτοπίζει την ετεροχρωματινίκη πρωτεΐνη HP-1 από τα μιτωτικά χρωμοσώματα εμποδίζοντας την να προσδεθεί στην τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης 3. Ωστόσο με το τέλος της μίτωσης η αποφωσφορυλίωση της ιστόνης H3 (Prigent et al. 2003) επιτρέπει ξανά την πρόσδεση της ετεροχρωματινικής πρωτείνης.Θεωρείται ότι η απομάκρυνση της HP-1 κατά τη μίτωση επιτρέπει σε ειδικούς παράγοντες να προσδεθούν στα χρωμοσώματα και να επιτύχουν την κατάλληλη χρωμοσωμική συμπύκνωση και τον ακριβή χρωμοσωμικό διαχωρισμό (Wolfgang et al. 2005).

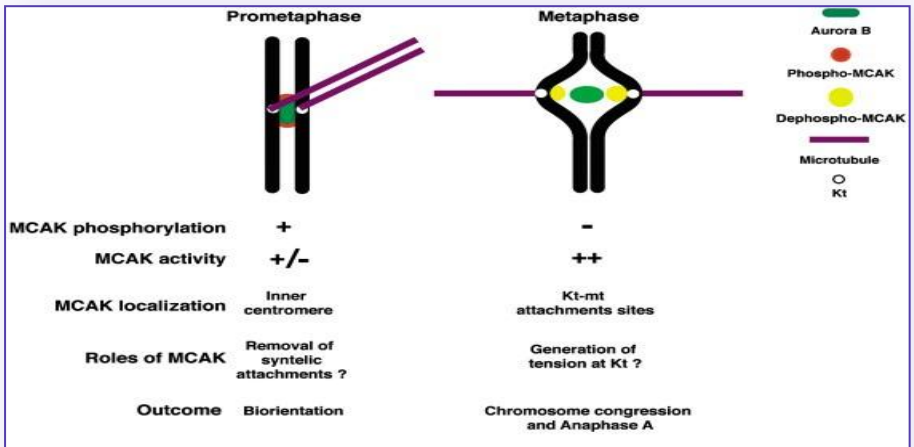
Ένα ακόμη υπόστρωμα της Aurora B που εντοπίστηκε σε ανθρώπινα μιτωτικά κύτταρα ήταν το σύμπλοκο Condensin I. Υπάρχουν 2 σύμπλοκα Condensin (I & II). Το σύμπλοκο Condensin II συνδέεται με τα χρωμοσώματα κατά την πρόφαση και συνεισφέρει στη συμπύκνωση τους ενώ το σύμπλοκο Condensin I συνδέεται με τα χρωμοσώματα κατά την προμετάφαση, μετατρέποντας τα σε άκαμπτες δομές. Για να μεταφερθεί το σύμπλοκο Condensin I στα προμεταφασικά χρωμοσώματα και για να διατηρηθεί η παρουσία του και στα επόμενα στάδια της μίτωσης απαιτείται η φωσφορυλίωση του συμπλόκου από την Aurora B (Jesse et al., 2007). Το condesin I αποτελείται από δύο μεγάλες ATP-άσες διατήρησης της δομής των χρωμοσωμάτων (SMC) και από τρεις non SMC υπομονάδες (Hagstrom and Meyer,2003) (Εικόνα 7). Οι τρεις non SMC υπομονάδες φωσφορυλιώνονται από τη Aurora B τόσο in vitro όσο και in vivo σαν απόρροια τη αποτελεσματική μεταφορά του Condensin I συμπλόκου στα χρωμοσώματα (Jesse et al., 2007). Αντίθετα η σύνδεση του Condensin II στα χρωμοσώματα γίνεται φυσιολογικά απουσία της Aurora B.



Εικόνα 7 : Το σύμπλοκο condensin- σε ανθρώπινα κύτταρα SMC2 & SMC4 αποτελούν τις ATP-άσες ενώ οι non -SMC είναι οι εξής: CAP D2, CAP G, CAP H

Συμμετοχή στο σχηματισμό της συνδεσμολογίας της ατράκτου

Η Aurora B και το CPC σύμπλοκο έχει αποδειχθεί με μελέτες κυρίως σε Xenopus egg extracts ότι συμμετέχουν στη συνδεσμολογία και κυρίως στη σταθερότητα της ατράκτου μέσω σταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων. Το 2004 οι Andrews et al. απόδειξαν ότι η Aurora B φωσφορυλιώνει μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη την KinI kinesin MCAK (mitotic centromere –associated kinesin) στο N τελικό άκρο σε μία αλληλουχία 5 συντηρημένων σερινών με στόχο να μεταφερθεί στο κεντρομερές και να αναστείλει μερικώς την ιδιότητα της που έχει στο να αποπολυμερίζει τους μικροσωληνίσκους χρησιμοποιώντας ATP (μία ιδιότητα που φυσιολογικά δεν κατέχουν οι πρωτεΐνες κίνησης). Κατά την προμετάφαση η μερικώς ενεργή MCAK εντοπίζεται μαζί με την Aurora B στο κεντρομερές με στόχο τη ρύθμιση και τον έλεγχο της σωστής πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων στα χρωμοσώματα. Όταν επιτευχθεί η διπολική πρόσδεση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους η MCAK αποσυνδέεται από την Aurora B αποφωσφορυλιώνεται από την PP1 ,γίνεται πλήρως ενεργή και εκτοπίζεται στους κινητοχώρους αυξάνοντας έτσι την τάση ασκούν οι μικροσωληνίσκοι σε αυτούς (Εικόνα 8).



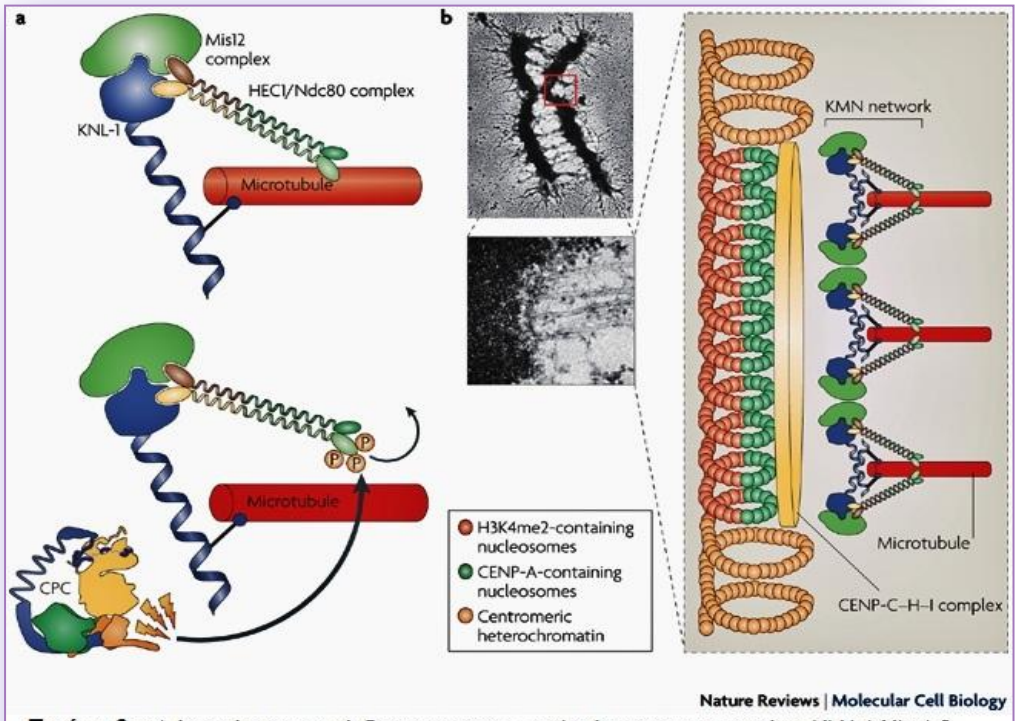
Εικόνα 8 : Ο ρόλος της Aurora B στη φωσφορυλιώση της MCAK (Andrews et al. 2004)

Η συμμετοχή της Aurora B στην αναγνώριση και επιδιόρθωση λαθεμένων προσδέσεων των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους.

Η Aurora B για να ελέγξει τις προσδέσεις των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους οφείλει να ρυθμίσει μία ποικιλία πρωτεϊνών στην εξωτερική πλευρά του κινητοχώρου. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι οι εξής: a)KNL -1,Mis 1,2 complex, Ndc80/HEC 1 complex (Εικόνα 9). Έχει δειχθεί ότι το N τελικό άκρο της Hec 1 φωσφορυλιώνεται από την Aurora B σε 5 αμινοξικά κατάλοιπα in vivo (DeLuca et al., 2006). Οι συγκεκριμένες φωσφορυλιώσεις είναι απαραίτητες για να ρυθμίσουν τη δυναμική των plus ακρών των μικροσωληνίσκων που είναι προσδεδεμένοι στους κινητοχώρους καθώς και να οδηγήσει στην απελευθέρωση των μικροσωληνίσκων που έχουν προσδεθεί λαθεμένα. Ένα σαφές παράδειγμα λαθεμένων προσδέσεων είναι οι μεροτελικές προσδέσεις όπου παρατηρείται ένας κινητοχώρος να έχει

προσδέσει μικροσωληνίσκους και από τους δύο πόλους της ατράκτου. Οι μεροτελικές προσδέσεις αποτελούν την κύρια αιτία δημιουργίας lagging chromosomes κατά την ανάφαση και οδηγεί σε ανευπλοειδίες στα κύτταρα (Cimini et al.,2001). Μερική απενεργοποίηση της Aurora B έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνει την δυναμική του πολυμερισμού και του αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων στο plus άκρο τους που είναι προσδεδεμένο στους κινητοχώρους, προσδίδοντας τους μια σταθερότητα μη επιθυμητή (Hauf et al., 2003). Επιπλέον η ολική απενεργοποίηση της Aurora B οδηγεί σε τεράστια λάθη στην πρόσδεση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους και κατά συνέπεια στην δημιουργία ανευπλοειδικών κυττάρων και στη μετέπειτα καρκινογένεση λόγω αυτών (Carmena and Earnshaw , 2003).

Σύμφωνα με νεότερες έρευνες (Welburn et al., 2010) η Aurora B φωσφορυλιώνει εκτός της Hec 1 και τις άλλες πρωτεΐνες στην εξωτερική πλευρά του κινητοχώρου . Συγκεκριμένα η Aurora B φωσφορυλιώνει την υπομονάδα Dsn1 του Mis 1,2 complex καθώς και το N τελικό άκρο της KNL -1 απελευθερώνοντας τον μικροσωληνίσκο και δίνοντας το σήμα στο κύτταρο ότι ο κινητοχώρος είναι ελεύθερος. Καθώς η ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων ξανά εγκαθιδρύεται ένας νέος μικροσωληνίσκος προσδένεται στον κινητόχωρο και επιτυγχάνεται η τάση.



Εικόνα 9 : a) Απεικόνιση της σύνδεσης των μικροσωληνίκων με τις πρωτείνες KLN-1,Mis 1,2 complex, HEC1/Ndc80 complex. b) εικόνα απο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που απεικόνιζει (πάνω) τη θέση του κεντρομερούς και (κάτω) τη σύνδεση του κεντρομερούς με τους μικροσωληνίσκους , δεξία απεικονίζεται η επιφάνεια του κινητοχώρου με τα κεντρομερικά νουκλεοσώματα και τη σύνδεση του συμπλόκου των πρωτείνων εξωτερικά (στο εσωτερικό του κεντρομερούς εντοπίζεται η Aurora B η οποία δεν απεικονίζεται) (Ruchaud et al., 2007)

Συμμετοχή της CPC και της Aurora B στο mitotic spindle checkpoint

Το mitotic spindle checkpoint είναι ένας μηχανισμός επιβίωσης του κυττάρου που καθυστερεί την είσοδο στην ανάφαση μέχρις ότου όλα τα χρωμοσώματα προσδεθούν μέσω των κινητόχωρων διπολικά με μικροσωληνίσκους της ατράκτου

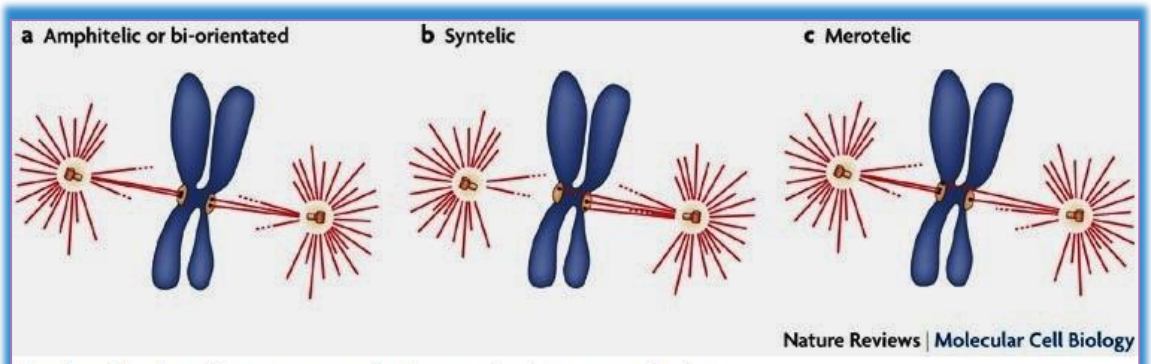
(Kops et al., 2005). Ενεργοποιείται αυθόρμητα κατά τη διάταξη των χρωμοσωμάτων στη μιτωτική άτρακτο λόγω έλλειψης πρόσδεσης των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους ή λόγω απουσίας τάσης μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. Ακόμη σε διάφορα πειράματα έχει δειχθεί ότι το mitotic spindle checkpoint ενεργοποιείται παρουσία φαρμάκων όπως nocodazole και taxol που δρουν επιλεκτικά στους μικροσωληνίσκους (αναφορά εκτενής σε επόμενη ενότητα). Βλάβες στο spindle checkpoint οδηγούν σε χρωμοσωμική αστάθεια, ανευπλοειδία καθώς και αυξημένη προδιάθεση για καρκινογένεση (Kops et al., 2005).

Το mitotic spindle checkpoint αναστέλλει την καταλυτική υπομονάδα του Cdc20 του συμπλόκου APC (anaphase promoting complex)/cyclosome. Το APC είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών με ενεργότητα E3 ubiquitin ligase που μεταφέρει αλυσίδες ubiquitin σε πρωτεΐνες στόχους με σκοπό την αναγνώριση τους από το πρωτεάσωμα και τη μετέπειτα αποικοδόμηση τους. Η αναστολή APC(APC off) μπλοκάρει το διαχωρισμό των χρωματίδων και την έξοδο από τη μίτωση μέχρι τη στιγμή που οι μικροσωληνίσκοι προσδεθούν αμφιτελικά στους κινητοχώρους .Όταν συμβεί η σωστή αμφιτελική πρόσδεση τότε το APC ενεργοποιείται και προωθεί την αποικοδόμηση της securin και της Cyclin B. Η αποικοδόμηση της securin ενεργοποιεί την separase η οποία κόβει την cohesin που συνδέει τα χρωμοσώματα με σκοπό το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων. Ακόμη η αποικοδόμηση της Cyclin B απενεργοποιεί την Cdk1 κινάση που σχημάτιζε σύμπλοκο με τη Cyclin B από την αρχή της μίτωσης και έτσι επιτρέπεται η μιτωτική έξοδος.

Κατά τη μετάφαση επιστρατεύονται μια ποικιλία πρωτεϊνών στον κινητοχώρο και στο κεντρομερές με απώτερο σκοπό τον έλεγχο των προσδέσεων των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους , την ενεργοποίηση του mitotic spindle checkpoint και την επιδιόρθωση τυχόν λαθών πριν το κύτταρο προχωρήσει στην ανάφαση. Τον ενεργό ρόλο για τις παραπάνω λειτουργίες κατέχει το σύμπλοκο CPC και η κύρια υπομονάδα του Aurora B. Έτσι επιγραμματικά αναφέρουμε τις εξής:

- Πρωτεΐνες του κινητοχώρου που συμμετέχουν στη σηματοδότηση του spindle checkpoint : Mad proteins (Mad 1, Mad 2, Mad 3 ή BubR1) ,Bub proteins (Bub1 ,Bub3), Mps1, Cenp E (Vigneron et al., 2004; Ditchfield et al., 2003).
- Πρωτεΐνες υπεύθυνες για τις αλληλεπιδράσεις μικροσωληνίσκων και κινητοχώρων : Ndc80, KNL-1, Mis 1,2 complex, MCAK, PLK -1, Cenp E (Emanuele et al., 2008; Goto et al., 2006).
- Πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με το εσωτερικό του κεντρομερούς.

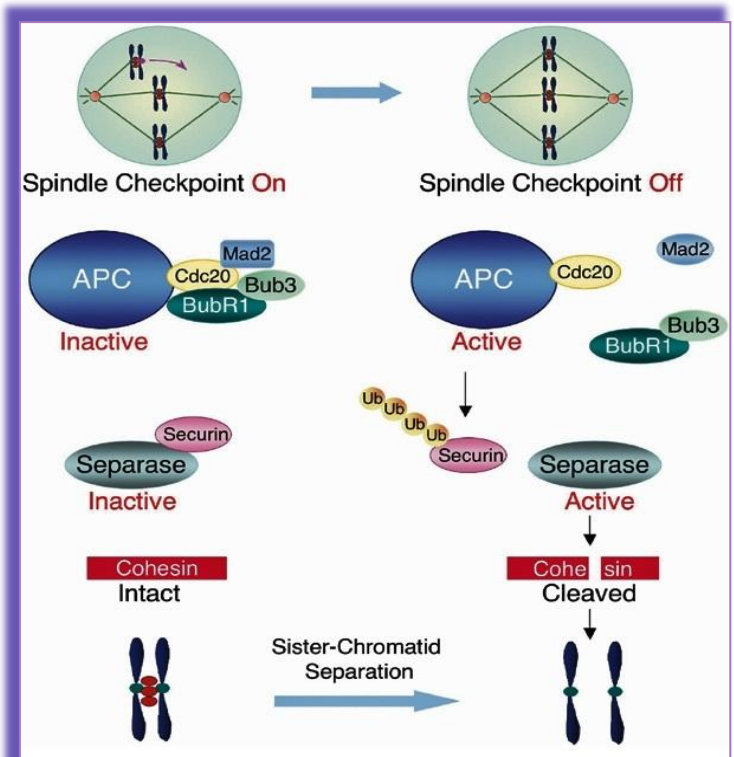
Σε περίπτωση που το CPC δεν λειτουργεί σωστά λόγω απενεργοποίησης μίας από τις υπομονάδες του (Aurora B, INCENP, Survivin,Borealin) τότε παρατηρούνται μεροτελικές και συντελικές προσδέσεις μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους καθώς και αδυναμία επιδιόρθωσης των βλαβών (συντελικές προσδέσεις έχουμε όταν και οι δύο κινητοχώροι προσδένουν μικροσωληνίσκους προερχόμενοι από τον ένα πόλο ενώ μεροτελικές έχουμε όταν ο ένας κινητοχώρος φέρει μικροσωληνίσκους και από τους δύο πόλους) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10 : Απεικόνιση των αμφιτελικών ,συντελικών και μεροτελικών προσδέσεων. (Ruchaud et al., 2007)

Η ύπαρξη της Aurora B στο εσωτερικό των κεντρομέρων είναι απαραίτητη για την αρχική συστράτευση των πρωτεϊνών Bub 1,BubR1, CENP- E και Mad 2 στους κινητοχώρους που δεν έχουν προσδέσει μικροσωληνίσκους, καθώς αν γίνει αναστολή της ενεργότητας της τότε οι παραπάνω πρωτεΐνες χάνουν την ικανότητα τους να τοποθετηθούν σωστά στους κινητοχώρους (Ditchfield et al., 2003 ; Hauf et al., 2003). Αντίθετα η απουσία ενός από των παραπάνω πρωτεϊνών δεν εμποδίζει την τοποθέτηση της Aurora B στο κεντρομερές γεγονός που υποδηλώνει ότι η Aurora B είναι ένας upstream regulator του μονοπατιού (Vigneron et al., 2004).Ωστόσο η Aurora B δεν μπορεί να δράσει μόνη της καθώς η απομάκρυνση των πρωτεϊνών INCENP και Survivin έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία από τους κινητοχώρους των downstream checkpoint πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τη σηματοδότηση του spindle checkpoint (Carvalho et al., 2003; Lens et al.,2003). Στη μελέτη των Vigneron et al 2004 οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι οι πρωτεΐνες Bub 3 ,Mps 1,CENP E , Bub 1,BubR1 δρουν ταυτόχρονα στον κινητοχώρο για να σηματοδοτήσουν τη spindle checkpoint , όμως δρουν μετέπειτα της Aurora B οπότε θεωρούνται downstream regulators.

Παρόλα αυτά η πρωτεΐνη που απενεργοποίει το APC/C αρχικά είχε προσδιοριστεί η Mad 2 (Li et al.,1997). Μετέπειτα μελέτη απέδειξε ότι APC/C αναστέλλεται από ένα πιο μεγάλο σύμπλοκο πρωτεϊνών το οποίο ονομάστηκε mitotic checkpoint complex MCC (Sudakin et al.,2001; Tang et ., 2001). Σήμερα το MCC έχει προσδιοριστεί και αποτελείται από τις Bub 3, Mad 2, BubR1 και την υπομονάδα του APC Cdc20. Τελικά όταν έχουν προσδεθεί σωστά οι μικροσωληνίσκοι στους κινητοχώρους απενεργοποιείται η αναστολή του APC/C ,ουβικιτινιλιώνονται οι πρωτεΐνες Securin και Cyclin B και σηματοδοτείται η αρχή της ανάφασης και η έξοδος από τη μίτωση (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 : Αριστερά παρατηρούμε την απενεργοποίηση του συμπλόκου APC/C όταν το spindle checkpoint είναι ενεργό. Δεξιά παρατηρούμε την ενεργοποίηση του APC/C ,την ουβικιτινιλίωση της securi,την ενεργοποίση της separase και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων όταν το spindle checkpoint είναι ανενεργό

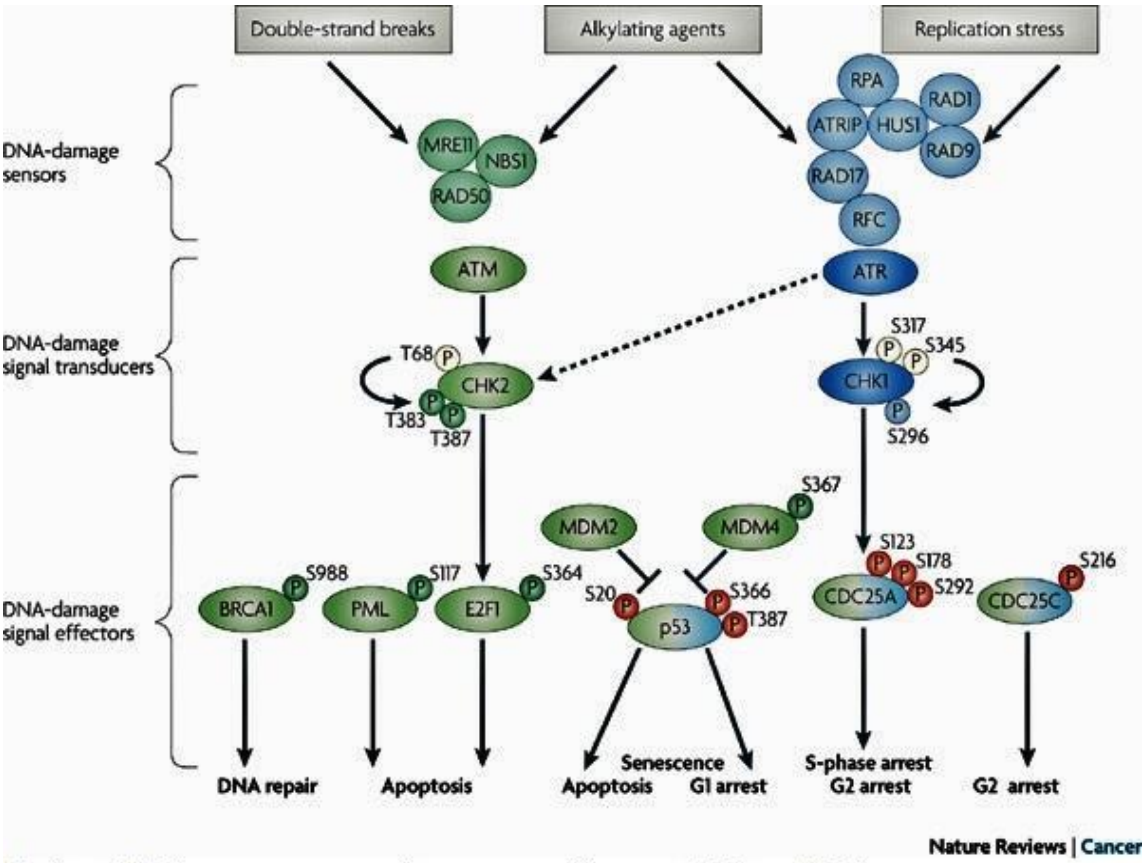
Οι πρωτεΐνες Chk1 και Chk2

Τα κύτταρα για να διατηρήσουν τη γενωμική τους ακεραιότητα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τα προστατεύουν έναντι παραγόντων που καταστρέφουν το λειτουργικό τους μόριο το DNA (genotoxic agents). Αυτοί οι παράγοντες είναι συνήθως εξωγενείς όπως χημικά μεταλλαξιγόνα, ultraviolet UV, ιονίζουσα ακτινοβολία IR ή ενδογενείς όπως παραπροϊόντα του μεταβολισμού και λάθη κατά τη διαδικασία της αντιγραφής.Τα παραπάνω προκαλούν καταστροφή στο DNA προκαλώντας είτε single strand breaks ή double strand breaks.Έτσι τα κύτταρα έχοντας τους κατάλληλους μηχανισμούς ελέγχου(checkpoints) αναγνωρίζουν τη γενωμική διαταραχή και ενεργοποιούν ένα πολύπλοκο μονοπάτι πρωτεϊνών που σηματοδοτούν το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου μέσω αναστολής των Cdks έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη. Σε περίπτωση που η βλάβη του DNA είναι ανεπανόρθωτη τότε επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος.

Στη σηματοδότηση αυτή για αναστολή του κυτταρικού κύκλου συμμετέχουν μία σειρά από πρωτεΐνες με εξειδικευμένη δράση. Έτσι υπάρχουν οι πρωτεΐνες sensors που αναγνωρίζουν την παρουσία βλάβης και ξεκινούν τη σηματοδότηση, οι πρωτεΐνες transducers οι οποίες ενισχύουν το σήμα και το μεταβιβάζουν στους effectors οι οποίοι μετέπειτα επάγουν την επιδιόρθωση των βλαβών ή ανάλογα την απόπτωση των κυττάρων. Γνωστές και καλά μελετημένες πρωτεΐνες transducers είναι δύο πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των Phosphatidylinositol 3-kinase related kinases και είναι η ATM (Ataxia telangiestacia mutated) και η ATR (ATR-Rad3-related). Στόχος των παραπάνω είναι η ενεργοποίηση των effectors

πρωτεϊνών Chk1 και Chk2 μέσω φωσφορυλίωσης οι οποίες μετέπειτα ενεργοποιούν άλλες πρωτεΐνες υποστρώματα μέσω φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης – θρεονίνης.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η ATM φωσφορυλιώνει την Chk2 ενώ η ATR την Chk1 αν και έχει παρατηρηθεί cross talk μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών. Παρόλο αυτά οι Chk1 και Chk2 διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο στην απόκριση σε βλάβη του DNA. Αναφορικά η Chk2 ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την ATM σε απόκριση double strand breaks ή οξειδωτικού stress (Guo et al.,2010) και έτσι επάγει το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1/S και G2/M ενώ αντίθετα η Chk1 αποκρίνεται σε single strand breaks (Εικόνα12).(Εκτενής αναφορά στην Chk1 ακολουθεί).



Εικόνα 12: Σχηματικη αναπαράσταση των ρόλων της Chk2 και Chk1 (Antoni et al., 2007)

Η πρωτεΐνη Chk1

Το γονίδιο της Chk1 ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο μοντέλο – οργανισμό fission yeast. Η απώλεια αυτού του γονίδιου προκαλούσε στα κύτταρα ευαισθησία στην ακτινοβολία UV καθώς και πρώιμη είσοδο στη μίτωση παρουσία βλάβης του DNA οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη Chk1 είναι απαραίτητη για τον έλεγχο του DNA παρουσία βλαβών (Walworth et al., 1993). Σε αντίθεση με το fission yeast, η απουσία Chk1 στο ποντίκι οδηγούσε σε εμβρυικό θάνατο σε 3.5 με 7.5 μέρες γεγονός που υποδηλώνει την απαραίτητη λειτουργιά της στην εμβρυική

ανάπτυξη αυτών των οργανισμών (Takai et al., 2000). Ωστόσο στα DT40 (B-lymphoma cells from chicken) η απουσία του γονιδίου της επέτρεπε να συμβεί η διαίρεση κανονικά αλλά τα κύτταρα δεν μπορούσαν να καθυστερήσουν τη μετάβαση από τη G2 στην M φάση (Zachos et al.,2003). Παρόλα αυτά έχουν ταυτοποιηθεί ομόλογα γονίδια της Chk1 σε θηλαστικά, μύγες, μύκητες, σκουλήκια, βατράχους και κοτόπουλο και οι λειτουργίες αυτής της πρωτεΐνης φαίνονται να είναι υψηλά συντηρημένες.

Η Chk1 κίναση σερίνης θρεονίνης ενεργοποιείται παρουσία βλαβών του DNA κυρίως single strand breaks μέσω φωσφορυλίωσης σε συντηρημένα μοτίβα SQ/TQ (κατάλοιπα σερίνης θρεονίνης ακολουθούμενα από γλουταμίνη) στο C terminus. Από μελέτες έχει φανεί ότι αυτά μοτίβα είναι συνήθως δύο συντηρημένες περιοχές αμινοξέων S345/Q346 και S317/Q318.Πειράματα που έχουν γίνει σε διάφορους οργανισμούς φανερώνουν τη σημασία αυτών των φωσφορυλιώσεων από την ATR.

Χαρακτηριστικά στον οργανισμό fission yeast παρατήρησαν ότι μία μόνο μετάλλαξη στο κατάλοιπο σερίνη 345 προς αλανίνη ήταν αρκετή ώστε να μην φωσφορυλιώθεί η Chk1 από την Rad 3(ομόλογη των ATM και ATR του ανθρώπου). Στα κύτταρα που εξέφραζαν την μεταλλαγμένη Chk1 παρατηρούνταν ευαισθησία σε DNA damage καθώς και ότι οι μηχανισμοί έλεγχου ήταν αναποτελεσματικοί (Lopez – Girona et al., 2001). Αντίστοιχο πείραμα στην Chk1 του Xenopus όπου έγιναν μεταλλαγές σε 4 κατάλοιπα των SQ/TQ δεν παρατηρήθηκε καμία φωσφορυλίωση της Chk1 και η μεταλλαγμένη Chk1 οδηγούσε σε ξαφνική είσοδο στη μίτωση ενώ η αντιγραφή του DNA είχε ανασταλεί παρουσία aphidicolin (αναστολέας των ευκαρυώτικων πολυμερασών, γεγονός που δεν έπρεπε να συμβεί (Guo et al., 2000). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πόσο σημαντική είναι η φωσφορυλίωση της Chk1 από την ATR στα συντηρημένα αμινοξέα προκειμένου να αποκριθεί το κύτταρο σε βλάβες στο DNA. Όντας έτσι η Chk1 καταλυτικά ενεργή μπορεί να φωσφορυλίωσει ποικίλλες πρωτεΐνες σε διάφορα επιμέρους στάδια του κυτταρικού κύκλου.

Η Chk1 είναι μία πρωτεΐνη effector που επάγει την απόκριση του κυττάρου σε DNA damage εξαιτίας γενοτοξίκων παραγόντων .Έτσι όταν συμβεί μία βλάβη ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου έχουμε και την ανάλογη απόκριση όπως να μπλοκαριστεί η είσοδος στη φάση αντιγραφής S(G1/S phase checkpoint), να σταματήσει η αντιγραφή (intra –S, S phase checkpoint) λόγω ύπαρξης stalled forks (σταματημένες αντιγραφικές θηλιές) που οδηγούν σε single strand breaks ή να αποτραπεί η είσοδος στη μίτωση (G2/M phase) λόγω ατελούς αντιγραφής.

Η είσοδος στη μίτωση απαιτεί την σύνδεση της κίνασης Cdk1 και της Cyclin B τόσο στον πυρήνα όσο και στο κεντρόσωμα.Σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου η Cdk1 είναι απενεργοποιημένη μέσω ανασταλτικής φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα θρεονίνη 14 και τυροσίνη 15 από δύο γνωστές κινάσες την Wee1 και Myt. Για να ενεργοποιηθεί το η Cdk1 απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αποφωσφορυλίωση από τις Cdc 25 φωσφατάσες. Τα θηλαστικά έχουν τρείς φωσφατάσες Cdc25A ,Cdc25B, Cdc25C οι οποίες έχουν μεγάλη ομολογία στο C terminus ~65 % και φέρουν και ένα συντηρημένο μοτίβο CX5R που χαρακτηρίζει τις φωσφατάσες τυροσίνης CX5R. Αντίθετα στο N terminus περιέχονται μοτίβα που ρυθμίζουν την κυτταρική τοποθέτηση των φωσφατασών στον πυρήνα καθώς και θέσεις πρόσδεσης στις πρωτεΐνες 14-3-3(Trinkle-Mulcany and Lamond 2006).

Σε περίπτωση που έχει διαπιστωθεί βλάβη στο DNA ,για να αποτραπεί η είσοδος στη μίτωση η ενεργοποιημένη Chk1 που είναι φωσφορυλιώμενη στη S345 και S317

από την ATR φωσφορυλιώνει με τη σειρά της τις Cdc25A ,-B,-C ρυθμίζοντας έτσι είτε την αποικοδόμηση τους είτε την αναστολή τους ώστε να μην ενεργοποιηθεί το σύμπλοκο Cdk1-Cyclin B πρώιμα. Αρχικά η Chk1 με άγνωστο έως πρότινος τρόπο οδηγούσε στην αποικοδόμηση της Cdc25A από το πρωτεάσωμα. Σε πρόσφατη έρευνα των Sørensen et al., 2010 ανακάλυψαν ότι παρουσία DNA damage από ιονίζουσα ακτινοβολία ενεργοποιείται η ATR που ως γνωστό φωσφορυλιώνει την Chk1, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την κίναση σερίνης θρεονίνης NEK11 στο κατάλοιπο σερίνη 273. Έπειτα συμπέραναν ότι τόσο η NEK11 όσο και η Chk1 φωσφορυλιώνουν την Cdc25A στα κατάλοιπα σερίνη 82 και σερίνη 72 αντίστοιχα, οδηγώντας την φωσφατάση προς αποικοδόμηση. Σε επόμενο στάδιο η Chk1 φωσφορυλιώνει τη Cdc25C στο κατάλοιπο σερίνη 216 δημιουργώντας έτσι μια θέση αναγνώρισης στην φωσφατάση από τις πρωτεΐνες 14-3-3 οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν τη Cdc25C στο κυτταρόπλασμα όπου εκεί δεν μπορεί να δράσει. Παράλληλα με την απενεργοποίηση των Cdks που καθίστανται ανενεργές, συμβαίνει και μία ακόμη φωσφορυλίωση από την Chk1 στην κίναση Wee1.Με αυτόν τον τρόπο ενισχύεται η καταλυτική της ενεργότητα έναντι της Cdk1 κινάσης διατηρώντας έτσι τα επίπεδα της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης υψηλά(Lee et al., 2001).

Ωστόσο κατά τη διάρκεια ενός φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου η είσοδος στη μίτωση ρυθμίζεται με παρόμοιο τρόπο. Κατά τη μεσόφαση ένα ποσοστό της Chk1 τοποθετείται στα κεντροσώματα όπου εκεί φωσφορυλιώνοντας τη Cdc25B της αποτρέπει να προσδεθεί στο σύμπλοκο Cdk1 /Cyclin B και να το ενεργοποιήσει (Schmitt et al., 2006). Στο τέλος της G2 η Chk1 αποσυνδέεται από τα κεντροσώματα ενώ ταυτόχρονα μια άλλη φωσφορυλίωση στη Cdc25B από την Aurora A στη σερίνη 353 (Dutertre et al., 2004), οδηγεί τη φωσφατάση στο να ενεργοποιήσει το σύμπλοκο CDK1/Cyclin B το οποίο εισέρχεται στον πυρήνα και έπεται η μίτωση. Από την άλλη πυρηνική Chk1κατά τη μεσόφαση φωσφορυλιώνει την CDC25A του πυρήνα στη σερίνη 178 και θρεονίνη 507 ώστε να αναγνωριστούν από τις πρωτεΐνες 14-3-3 οι οποίες την απομακρύνουν από τον πυρήνα(Chen et al., 2003).Τόσο η αναστολή των φωσφατασών στο κεντρόσωμα όσο και του πυρήνα κατά τη μεσόφαση αποτρέπουν την πρώιμη είσοδο στη μίτωση. Αυτό θα γίνει εφικτό μόνο όταν οι φάσεις G1, S, G2 έχουν τελειοποιηθεί σωστά και δεν έχει συμβεί βλάβη στο DNA. Έτσι παρατηρούμε ότι τα κύτταρα έχουν πολλούς μηχανισμούς ελέγχου checkpoints με στόχο τη διατήρηση της γενομικής τους σταθερότητας και ακεραιότητας.

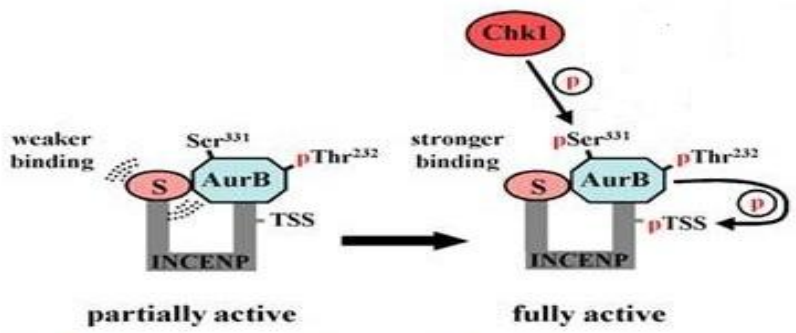
Η συμμετοχή της Chk1 στο mitotic spindle checkpoint

Το 2007 οι ερευνητές Zachos et al., επισήμαναν για πρώτη φορά το ρόλο της Chk1 στη σηματοδότηση του spindle checkpoint. Η Chk1 κατά τη μίτωση εντοπίστηκε με συνεστιακή μικροσκόπια στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων κατά την προμετάφαση ενώ κατά την κυτοκίνηση παρατηρήθηκε στον ενδιάμεσο σώμα όπου συνεντοπίστηκε με την πρωτεΐνη INCENP. Στη μίτωση η Chk1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων των σπονδυλωτών έναντι του μη σωστού χρωμοσωμικού διαχωρισμού τους (που οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια και αυξημένη προδιάθεση για καρκινογένεση) καθώς και είναι απαραίτητη για τη διατηρήσει την καθυστέρηση της εισόδου των κυττάρων στην ανάφαση παρουσία του φαρμάκου taxol. Το προαναφερθέν φάρμακο χρησιμοποιείται ευρέως στην αντικαρκινική θεραπεία καθώς εμποδίζει τον αποπολυμερισμό της β τουμπουλίνης

στους μικροσωληνίσκους οδηγώντας έτσι στην σταθεροποίηση τους και επιπλέον παρεμβαίνει στην τάση στην που δημιουργούν οι μικροσωληνίσκοι στους κινητοχώρους. Επιπρόσθετα σε πειράματα τους σε κύτταρα που δεν εξέφραζαν την Chk1 παρατήρησαν μειωμένη ενεργότητα της κινάσης Aurora B καθώς και λαθεμένη φωσφορυλίωση και τοποθέτηση της BubR1 στους κινητοχώρους.

Ακόμη απέδειξαν ότι η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora B in vitro αυξάνοντας έτσι την καταλυτική της ενεργότητα. Το μοντέλο που πρότειναν για την Chk1 ήταν το εξής : όταν οι κινητοχώροι παράγουν 'αδύναμο' σήμα λόγω απουσία πρόσδεσης μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους και συνεπώς απουσία τάσης, η Chk1 συμμετέχει στο mitotic spindle checkpoint αυξάνοντας την ενεργότητα της Aurora B και συμμετέχοντας στη σωστή τοποθέτηση της BubR1 στους κινητοχώρους και αποτρέπει την είσοδο στην ανάφαση έως ότου προσδεθούν όλοι οι μικροσωληνίσκοι διπολικά στους κινητοχώρους. Απώτερος στόχος των ερευνητών αποτελούσε η περαιτέρω διερεύνηση της φωσφορυλίωσης της Aurora B από την Chk1.Έτσι το 2011 οι ερευνητές Petsalaki et al ., έδειξαν ότι η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora B στο αμινοξύ σερίνη 331 κατά τη μίτωση τόσο σε φυσιολογικά προμεταφασικά κύτταρα όσο και σε κύτταρα των οποίων οι μικροσωληνίσκοι είχαν υποστεί αποδιοργάνωση παρουσία ταξόλης. Όπως αναφέραμε η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση είναι αναγκαία για την πλήρη ενεργότητα της Aurora B. Επιπρόσθετα η φωσφορυλίωση στη σερίνη 331 είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη φωσφορυλίωση της INCENP από την Aurora B στο συντηρημένο μοτίβο TSS του καρβοξυτελικού άκρου καθώς και για τη σωστή πρόσδεση της Survivin στο chromosomal passenger complex. Αντίθετα κύτταρα που φέρουν μεταλλαγμένη Aurora B S331A, παρουσιάζουν μη σωστό χρωμοσωμικό διαχωρισμό, ασταθή πρόσδεση της στους κινητοχώρους και πρώιμη είσοδο στην ανάφαση παρουσία ταξόλης γεγονός που ευνοεί τη δημιουργία χρωμοσωμικής αστάθειας καθώς και καρκινογένεσης.

Συνεπώς με τα σημερινά δεδομένα η Chk1 είναι η μόνη γνωστή κινάση που φωσφορυλιώνει την Aurora B και γενικά επικρατεί το παρακάτω μοντέλο : 1) Η Aurora B προσδένεται στο συντηρημένο C τελικό άκρο της INCENP το οποίο περιέχει μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων 892-900 αα (στον άνθρωπο) γνωστή ως IN-BOX η οποία ενεργοποιεί την Aurora B 2) μετά την πρόσδεση της στην INCENP η Aurora B αυτοφωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο θρεονίνη 232 3) η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora B στη σερίνη 331 καθιστώντας την πλήρως ενεργή 4) η Aurora B έχοντας την ιδιότητα της κινάσης φωσφορυλιώνει in trans την INCENP στο συντηρημένο μοτίβο TSS (Thr-Ser-Ser) του C τελικού άκρου (Εικόνα 13).



Εικόνα 13 : Φωσφορυλίωση της Aurora B από την Chk1 στο κατάλοιπο σερίνη 331 καθιστώντας την πλήρως ενεργή (Petsalaki et al., 2011).

Γνωρίζοντας πλέον ότι η Chk1 και η Aurora B συμμετέχουν στο mitotic spindle checkpoint και ότι η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora B στη σερίνη 331 το επόμενο βήμα θα ήταν να εντοπιστεί αν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν σταθερά μεταξύ τους και αν αυτό συνέβαινε θα έπρεπε να εντοπιστεί ποια περιοχή της Chk1 είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών. Έτσι λοιπόν διατελώντας την διπλωματική μου εργασία στο Πανεπιστήμιο Κρήτης στο εργαστήριο του Επίκουρου Καθηγητή κ. Ζάχου Γεώργιου ο οποίος ασχολείται με του μηχανισμούς ελέγχου που διέπουν τον κυτταρικό κύκλο και πιο συγκεκριμένα με τους μηχανισμούς ελέγχου κατά τη μίτωση, μου δόθηκε να εξετάσω το εξής : ποιες αλληλουχίες του γονιδίου της Chk1 είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση της με την Aurora B.

Πειραματική διαδικασία - Αποτελέσματα

A) Κλωνοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών του γονίδιου της avian Chk1 σε πλασμιδιακό φορέα και απομόνωση των πρωτεϊνών που αντιστοιχούσαν στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

Το γονίδιο της avian Chk1 απομονώθηκε από cDNA βιβλιοθήκη του οργανισμού *Gallus gallus* χρησιμοποιώντας ως ιχνηθέτη το ανθρώπινο γονίδιο της Chk1. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιήθηκε από το cDNA αποτελείται από 476 αμινοξέα (1626bp mRNA) και επιδεικνύει μεγάλη ομολογία της τάξεως του 75 % με την αντίστοιχη Chk1 του ανθρώπου, του ποντικιού και του βατράχου (Zachos et al., 2001).

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση αλληλουχιών του γονιδίου της Chk1 χρησιμοποιήθηκε το cDNA της Chk1 εκφρασμένο στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1zeo _ (+). Οι αλληλουχίες του γονίδιου που επιλέχθηκαν για κλωνοποίηση ήταν οι εξής(αντιστοίχιση ως προς τα αμινοξέα) : 1-292aa, 1-410aa, 1-444aa, 293-476aa. Οι αλληλουχίες του γονιδίου που αντιστοιχούσαν στα αμινοξέα 1-292 αφορούσαν όλο το N-αμινοτελικό άκρο ενώ οι αλληλουχίες που αντιστοιχούσαν στα αμινοξέα 293-476 αφορούσαν όλο το C-καρβοξυτελικό άκρο. Τα αμινοξέα 1-410 και 1-444 αντιστοιχούσαν σε ενδιάμεσες αλληλουχίες.

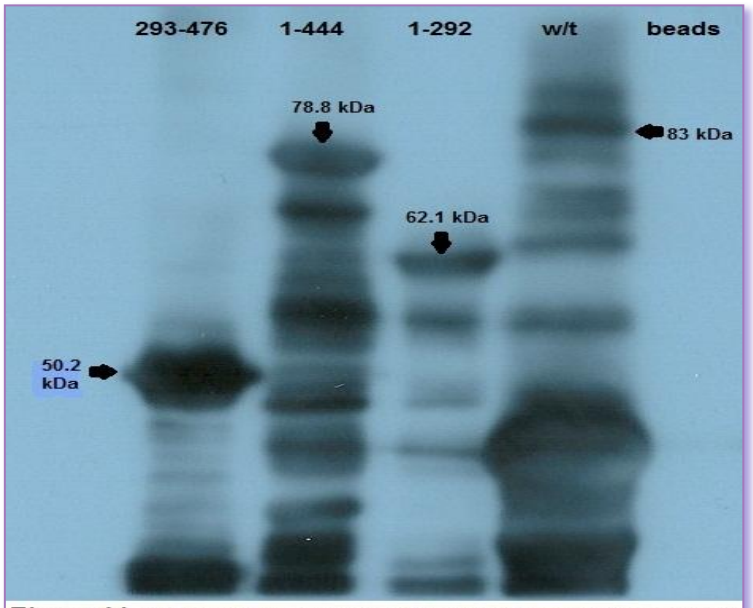
Έχοντας ως στόχο την απομόνωση των παραπάνω αλληλουχιών από το γονίδιο της Chk1, πραγματοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR, με τους κατάλληλους εκκινητές για κάθε νουκλεοτιδική αλληλουχία. Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR υπέστησαν πέψη με τα περιοστικά ένζυμα EcoRI και XhoI. Για να γίνει όμως η κλωνοποίηση τους έπρεπε να εισαχθούν σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα ο οποίος στην προκειμένη περίπτωση επιλέχθηκε να είναι το πλασμίδιο pGEX-4T-1 που φέρει τις θέσεις περιορισμού των ενζύμων EcoRI και XhoI. Σημαντικό πλεονέκτημα ωστόσο του pGEX-4T-1 είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκφραση GST υβριδικών πρωτεϊνών εφόσον στο γονιδίωμα

του έχει ενσωματωθεί η αλληλουχία που κωδικοποιεί την GST (Glutathione S-transferase). Ο πλασμιδιακός φορέας υπέστη πέψη με τα παραπάνω ένζυμα έτσι ώστε φορέας και αλληλουχίες να φέρουν τα κατάλληλα, συμβατά άκρα ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της ligation με τη βοήθεια της Quick-Stick λιγάσης.

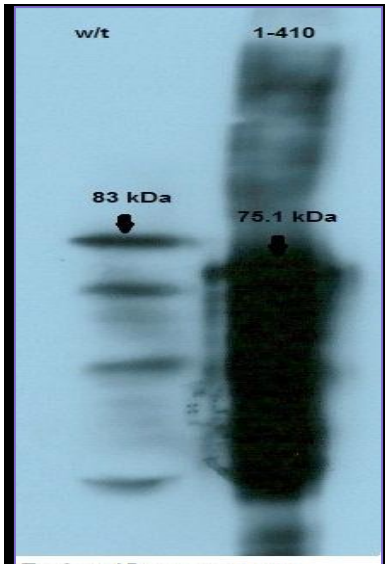
Έπειτα με τη διαδικασία του μετασχηματισμού (transformation), τα πλασμίδια εισήχθησαν σε βακτηριακά επιδεκτικά κύτταρα E.coli τα επονομαζόμενα TOP10. Για να εξακριβωθεί αν τα βακτηριακά κύτταρα είχαν υποστεί μετασχηματισμό, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με mini-preps και ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις.

Κατόπιν το καθένα από τα 4 πλασμίδια που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων BL21. Παρουσία IPTG επάχθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών ενώ με τη χρήση NETN buffer και χρησιμοποιώντας την τεχνική του sonication απομονώθηκε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των BL21 κυττάρων μετά από τη διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος και κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης.

Τέλος για την απομόνωση των πρωτεϊνών που προέρχονταν από τις προαναφερόμενες αμινοξικές αλληλουχίες καθώς και για την απομόνωση της full length Chk1 πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κατακρήμνιση συγγένειας GST (GST pull down assay). Για την ανάλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε η τεχνική του western blot και ο ανοσοεντοπισμός τους στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος(GST mouse monoclonal) κατάλληλο για την GST tag. Να σημειωθεί επίσης ότι στα αρχικά πειράματα για να ανιχνευτεί η πρωτεϊνική αλληλουχία των αμινοξέων 1-410 χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της Chk1 (Εικόνες 14,15).



Είκονα 14 : Western blot analysis : (από δεξία προς τα αριστερά) 1)control, 2) w/t - full length Chk1, 3) αμινοξική αλληλουχία 1-292 4)αμινοξική αλληλουχία 1-444 5) αμινοξική αλληλουχία 293-476.Η μεβράνη νιτροκυτταρίνης έχει ιχνηθετηθεί με αντίσωμα έναντι της GST tag. Απεικονίζονται ακόμη και τα μοριακά βάρη των πρωτεινών.



Εικόνα 15 : Western blot analysis για την 1) αμινοξική αλληλυχία 1-410 και για την 2) w/t-full length Chk1.Η μεμβράνη ιχνηθετήθηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της Chk1.Απεικονίση και των μοριακών βαρών.

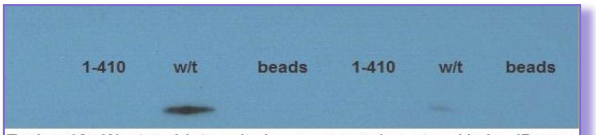
Β) Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της Chk1 με την πρωτεΐνη Aurora B.

Για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών έπρεπε να απομονωθεί η πρωτεΐνη Aurora B.Η ενδογενής Aurora B υφίσταται σε πολύ μικρές ποσότητες στα κύτταρα και συνεπώς η απομόνωση της καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη. Γι αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε stable cell line CHO τα οποία υπερέκφαζαν την πρωτεΐνη 6xmyc – Aurora B.

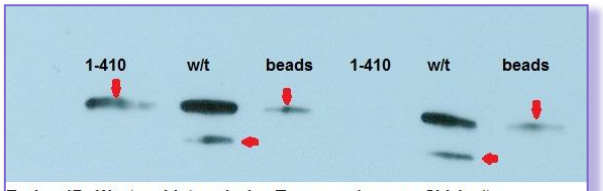
Χάρις το σύστημα tet – on παρουσία τετρακυκλίνης έγινε η υπερέκφραση της 6xmyc – Aurora B. Έπειτα απομονώθηκε όλο το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων με sonication παρουσία IP kinase buffer και κατάλληλων αναστολέων πρωτεασών, φωσφατασών(αναλυτική αναφορά σε υλικά και μεθόδους) και με GST pull down assay πραγματοποιήθηκε η αλληλεπίδραση της Chk1 με την Aurora B. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόσθηκε και για τις προαναφερόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της Chk1 που κωδικοποιούσαν τα αμινοξέα 1-292,1-410,1-444, 293-444(Παράρτημα). Έπειτα με τη τεχνική του western blot ανιχνεύσαμε την ύπαρξη της 6xmyc - Aurora B (~50 kDa) στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιώντας σε συγκεκριμένες δοκιμές το μονοκλωνικό αντίσωμα AIM-1(mouse monoclonal) έναντι της Aurora B. Ωστόσο επειδή οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συγκεκριμένου αντισώματος και της πρωτεΐνης Aurora B ήταν ασθενείς, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί μονοκλωνικό αντίσωμα c-myc (mouse monoclonal) έναντι της 6xmyc – tag (Εικόνες 16,17,18).

Αλληλεπίδραση	Chk1 w/t	1-292	1-410	1-444	293-476
Aurora B	+	-	-	+	-

Εικόνα 16 : Διαγραμματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της Chk1 και των επιμέρους αμινοξικών αλληλουχίων με την Aurora B.Το σύμβολο (+) επιδυκνείει την αλληλεπίδραση ενώ το σύμβολο (-) φανερώνει ότι δεν υπέστη αλληλεπίδραση



Εικόνα 16 : Western blot analysis που φανερώνει την αλληλεπίδραση μόνο της Chk1 w/t με την Aurora B. Η αμινοξική αλληλουχία 1-410 δεν αλληλεπιδρά με την Aurora B. Η μεβράνη νιτρικυπαρίνης ιχνηθετήθηκε με αντισώμα AIM-1 έναντι επιτόπου της Aurora B. Το μοριακό βάρος της 6xmyc-Aurora B είναι ~50 kDa.
Να επισημανθέι οτι τα beads ειναι τα glutathione sepharose beads και λειτουργούν ως control.



Εικόνα 17 : Western blot analysis : Παρατηρούμε οτι η Chk1 w/t αλληλεπιδρά με την Aurora B και στα δύο δείγματα. Ωστόσο όσο αφορά την αμινοξική αλληλουχία 1-410 στο ένα δείγμα (αριστερά) δεν ανιχνεύετε καμία αλληλεπίδραση ενώ στο δείγμα δεξία παρατηρούμε μία μπάντα.Η συγκεκριμένη μπάντα και οι υπόλοιπες που απεικονίζονται με κόκκινο βελάκι οφείλονται πιθανότατα σε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Η μεμβράνη νιτροκυπαρίνης ιχνηθετήθηκε με αντίσωμα έναντι του επιτόπου της 6x- myc tag. Το μορακό βάρος της Aurora B είναι ~ 50 kDa.

Εικόνα 18 : Western blot analysis : Παρατηρούμε ότι η full length Chk1 w/t αλληλεπριδρά με την Aurora B και το ίδιο ισχύει για την αμινοξική αλληλουχία της Chk1 1-444.Ωστόσο το N - αμινοτελικό άκρο της (1-292) και το C - καρβοξυτελικό (293-476) της Chk1 δεν αλληλεπιδρούν με την Aurora B. Η δεύτερη μπάντα που εμφανίζεται στο δείγμα της w/t (απεικόνιση με κόκκινο βελάκι) οφείλεται σε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις.
Η συγκεκριμένη μεμβράνη ιχνηθετήθηκε με αντίσωμα έναντι επιτόπου της 6xmyc - tag. Το μοριακό βάρος της 6xmyc - Aurora B είναι ~ 50 kDa.

Συζήτηση

Από το παραπάνω πειράματα μπορούμε να διεξάγουμε τα εξής συμπεράσματα:

Όσον αφορά την απομόνωση των πρωτεϊνών και των μικρότερων πρωτεϊνικών αλληλουχιών της Chk1 σε όλα τα δείγματα κατά την western blot analysis παρατηρήθηκαν μπάντες μικρότερου μοριακού βάρους από τις αναμενόμενες πρωτεΐνες. Να σημειωθεί ότι σε αρχικό πείραμα που η απομόνωση αφορούσε μόνο την πρωτεϊνική αλληλουχία 1-410 χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της Chk1 (Εικόνα 15).Το συγκεκριμένο αντίσωμα δεν επιλέχθηκε κατά το δεύτερο πείραμα στα δείγματα 1-292, 1-410, 1-444, 293-476 (Εικόνα 14) λόγω του ότι δεν είναι γνωστός ο αντιγονικός επίτοπος που ανιχνεύει η Chk1 και συνεπώς χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της GST – tag. Ωστόσο οι υβριδικές πρωτεΐνες GST-Chk1 full length, GST /1-292, GST /1-410, GST /1-444, GST /293-476 υπήρχαν στα δείγματα σε ικανοποιητικές ποσότητες και στο σωστό μοριακό βάρος :83 kDa, 62.1 kDa, 75.1 kDa, 78.8 kDa, 50.2 kDa κατά αντιστοιχία με τα παραπάνω και σε σύγκριση με το

πρωτεϊνικό μάρτυρα. Οι χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες μπορεί να εξηγηθεί ως αποικοδόμηση συγκεκριμένης ποσότητας των επιθυμητών πρωτεϊνών από τις βακτηριακές πρωτέασες. Το γεγονός της αποικοδόμησης μπορεί να οφείλεται σε τεχνικά προβλήματα του χειριστή. Πιο συγκεκριμένα η διάτρηση των βακτηριακών τοιχωμάτων και η μετέπειτα απομόνωση των πρωτεϊνών απαιτεί σταθερή θερμοκρασία +4°C έτσι ώστε να μην δρουν οι πρωτεάσες. Οπότε τυχόν απροσεξία επιτρέπει στις πρωτεάσες να δράσουν διασπώντας το επιθυμητό προϊόν.

Μία πιθανή εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών από πρωτεάσες θα ήταν να χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα με το NETN buffer και ο αναστολέας σερινοπρωτεασών PMSF.

Αφού επετεύχθη η απομόνωση των πρωτεϊνών με GST pull down assay το επόμενο βήμα όπως αναφέρθηκε ήταν η ανίχνευση τυχόν αλληλεπιδράσεων των μεμονωμένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών της Chk1 με την Aurora B. Αρχικά θα ήταν σωστό να αναφερθεί ότι σε προηγούμενα πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο είχε ήδη αποδειχθεί ότι GST/Chk1 full length αλληλεπιδρά με την Aurora B αλλά και ότι η πρωτεϊνική αλληλουχία 1-292 που αντιστοιχεί στο N- αμινοτελικό άκρο της Chk1 δεν αλληλεπιδρούσε με την GST/Chk1 full length. Συνεπώς ήταν απαραίτητο να ελεχθεί η περαιτέρω αλληλεπίδραση Aurora B με τις άλλες απομονωμένες πρωτεϊνικές αλληλουχίες της Chk1 αλλά και η ταυτόχρονη επαλήθευση των αρχικών πειραμάτων. Από τα πρώτα πειράματα τα οποία διεξήχθησαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας εντοπίστηκε ότι η GST/Chk1 full length αλληλεπιδρά όντως με την Aurora B προερχόμενη από πρωτεϊνικό εκχύλισμα των CHO κυττάρων καθώς μετά από western blot analysis και χρησιμοποιώντας ως αντίσωμα το AIM-1 ανιχνεύθηκε η 6x-myc Aurora B ~50 kDa. Χρησιμοποιώντας το ίδιο αντίσωμα δεν ανιχνεύσαμε την ύπαρξη της 6x-myc Aurora B στο δείγμα 1-410 γεγονός που υποδηλώνει ότι η Aurora B δεν είχε αλληλεπιδράσει με την πρωτεϊνική αλληλουχία 1-410 της Chk1 κατά τη διαδικασία GST –pull down assay (Εικόνα 16) .Για να επιβεβαιωθεί περαιτέρω το αποτέλεσμα επαναλήφθηκε το πείραμα και ελέγχθηκε η παρουσία της Aurora B στο δείγμα 1-410 με παρουσία αντισώματος έναντι της 6x myc tag της Aurora B. Όπως φαίνεται στην εικόνα 17 τόσο στα δείγματα control τα οποία περιλαμβάνουν μόνο beads όσο και σε ένα από τα 2 δείγματα που έφεραν την πρωτεϊνική αλληλουχία 1-410 μετά από επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα έναντι της 6x myc tag εμφανίζεται μπάντα ~ 50 kDa κάτι που δεν έπρεπε να γίνει φανερό, κυρίως στα δείγματα control και συμπερασματικά αυτές οι αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύθηκαν είναι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Οπότε συνδυάζοντας τα αποτελέσματα που ανιχνεύθηκαν με το αντίσωμα AIM-1 και το αντίσωμα έναντι της myc tag, υποτέθηκε ότι η Aurora B και η πρωτεϊνική αλληλουχία 1-410 δεν αλληλεπιδρούσαν.

Επίσης γνωρίζοντας ότι η Aurora B δεν αλληλεπιδρά ούτε με το N αμινοτελικό άκρο 1-292 αλλά ούτε με την ενδιάμεση αλληλουχία 1-410, ήταν φυσικό να εστιαστεί η προσοχή σε πρωτεϊνικές αλληλουχίες μεγαλύτερες των 410 αμινοξέων αλλά και να ελεγχθεί αν το C καρβοξυτελικό άκρο της Chk1 ήταν απαραίτητο για την αλληλεπίδραση.

Συνεπώς έγινε απομόνωση μεμονωμένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών της Chk1 που αντιστοιχούσαν στα αμινοξέα 1-444 και 293-476 και ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση με την Aurora B. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18 μετά από επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι της myc tag είναι φανερό ότι η Aurora B δεν αλληλεπιδρά με τα N αμινοτελικό άκρο όπως είχε προβλεφθεί αλλά ούτε με το C καρβοξυτελικό άκρο της

Chk1. Παρόλο αυτά παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας 1-444 με την Aurora B.

Συνοψίζοντας όλα τα αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι 1) το N αμινοτελικό της Chk1 δεν καθίσταται ικανό για να συμβεί η αλληλεπίδραση 2) το C τελικό δεν ευθύνεται για την αλληλεπίδραση 3) εφόσον αλληλεπιδρά η πρωτεϊνική αλληλουχία 1-444 αλληλεπιδρά με την Aurora B κανονικά θα έπρεπε να συμβαίνει το ίδιο και με την αλληλουχία 1-410 κάτι το οποίο δεν συμβαίνει. Άρα οι αρχικές υποθέσεις σχετικά με την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών συγκλίνουν στο γεγονός ότι για να συμβεί αλληλεπίδραση της Chk1 με την Aurora B είναι απαραίτητες δύο περιοχές της πρωτεΐνης Chk1, μία στο N αμινοτελικό άκρο και μία στο C καρβοξυτελικό άκρο, φαινόμενο όχι τόσο σπάνιο μεταξύ της αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών.

Για να επιβεβαιωθεί αυτή η αλληλεπίδραση στα πλαίσια της διπλωματικής έγινε προσπάθεια επανάληψης του πειράματος αλλά δεν στέφθηκε με επιτυχία λόγω πιθανούς λάθους κατά την μέθοδο. Συνεπώς πειράματα συνεχίζονται στο εργαστήριο για να διαπιστωθεί αν όντως ισχύει αυτή η υπόθεση.

Η Chk1 είναι η μόνη κίναση που έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει την Aurora B όμως για το πώς αλληλεπιδρούν οι δύο πρωτεΐνες είναι αδιευκρίνιστο γεγονός. Αλληλεπιδρούν παροδικά ,αλληλεπιδρούν έμμεσα μέσω μίας τρίτης πρωτεΐνης βοηθού ή αλληλεπιδρούν άμεσα;

Με βάση λοιπόν τα προαναφερθέντα πειράματα και με την βάση ότι η GST pull down assay δεν φανερώνει παροδικές αλληλεπιδράσεις, υποτέθηκε ότι η Chk1 με την Aurora B αλληλεπιδρούν σταθερά μέσω δύο απαραίτητων περιοχών της Chk1, μία στο N αμινοτελικό και μία στο C καρβοξυτελικό.

Αν εντοπιστούν ποιες περιοχές ακριβώς είναι αυτές που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση τότε τα επόμενα βήματα των ερευνητών θα ήταν να δημιουργήσουν διάφορα μεταλλάγματα της Chk1 ως προς τις δύο απαραίτητες περιοχές, τα οποία θα εισαχθούν σε ευκαρυωτικά κύτταρα και με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy) θα μελετήσουν τον εντοπισμό των δύο πρωτεϊνών. Τέλος η μελέτη του φαινοτύπου των κυττάρων κατά τη μίτωση με μεταλλαγμένη Chk1 η οποία δεν θα μπορεί να αλληλεπιδράσει με την Aurora B θα οδηγήσει σε σημαντικά συμπεράσματα.

Υλικά

Ολιγονουκλεοτίδια – primers: Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας προήλθαν από το εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ.

Αύξων αριθμός	Όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	Primers 5'-3' sense	Primers 5'-3' antisense
1	**Chk1 1-292aa**	**5' GGAGGAATTCATGGCGGTGCCCTTCG 3'**	**5' ATAACTCGAGTGTCAGAGCGGATGTG 3'**
2	**Chk1 1-410aa**	**5' GGAGGAATTCATGGCGGTGCCCTTCG 3'**	**5' CTAACTCGAGTGACCTGGTTGGTGCAGCTC 3'**
3	**Chk1 1-444aa**	**5' GGAGGAATTCATGGCGGTGCCCTTCG 3'**	**5' CTAACTCGAGGGAGAGGCGGAAGTCCACC 3'**
4	**Chk1 293-476aa**	**5' GGAGGAATTCCACATCCGCTCTGACACAG 3'**	**5' ATAACTCGAGGTCAGGGTGGGGGCAG 3'**

Ένζυμα: Κατά τη διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκε η Pfx polymerase της εταιρείας Invitrogen.Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ως περιοστικές ενδονουκλεάσες για την πέψη των προϊόντων της PCR ήταν η EcoRI και η XhoI της εταιρείας Minotech Biotechnology ενώ για τη διαδικασία της συγκόλλησης των μεμονωμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της Chk1 με το πλασμίδιο pGEX- 4T- 1 χρησιμοποιήθηκε η Quick stick ligase της εταιρείας New England Biolabs.

Πλασμίδια: Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ήταν ο pGEX- 4T- 1.Ο συγκεκριμένος φορέας έχει μήκος 4969 bp και φέρει α) υποκινητή tac, β) GST tag, γ) γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη. Να σημειωθεί ότι το γονίδιο της Chk1 είχε εντεθεί σε πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1 zeo(+). Στο παράρτημα απεικονίζονται οι χάρτες των πλασμιδίων.

Αντισώματα και υλικά ανοσοεντοπισμού: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν έναντι της GST – Chk1 ήταν ανάλογα με το πείραμα τα εξής : 1) Chk1 (G-4) mouse monoclonal της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology και 2) GST (B-14) mouse monoclonal της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology. Αντίθετα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την 6x myc Aurora B ήταν : 1) AIM -1 mouse monoclonal της εταιρείας Biosciences και 2) c – myc (9E10) της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology.Το δευτερογενές αντίσωμα anti mouse συζευγμένο με HRP προήλθε από την εταιρεία Sigma.

Σφαιρίδια Protein – A Sepharose: Τα σφαιρίδια Protein A-Sepharose® 4B Conjugate προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Invitrogen.

Μεμβράνες: Η μεταφορά των πρωτεϊνών για ανοσοαποτύπωση κατά Western, πραγματοποιήθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Protran της εταιρείας Whatman.

Κυτταροκαλλιέργειες: Τα CHO κύτταρα (Chinese Hamster Ovary) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο F12 της εταιρείας Gibco το οποίο περιείχε 10% fetal bovine serum και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη 30 μg/ml και 50 μg/ml στρεπτομυκίνη. Η καλλιέργεια έγινε στους 37°C παρουσία 5% CO_2.

Η επαγωγή της 6x myc Aurora B έγινε παρουσία τετρακυκλίνης συγκεντρώσεως 17ng/ml για 16 ώρες.

Μέθοδοι

1) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR

Η αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε για τις αλληλουχίες της Chk1 που αντιστοιχούσαν στα αμινοξικά κατάλοιπα 1-292, 1-410, 1-444, 293-476(Παράρτημα).Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την αντίδραση πολυμερισμού ήταν 100 ng. Οι αντιδράσεις με Platinum Pfx DNA Polymerase και ως επί το πλείστον γινόταν στα 50 μl και περιελάμβαναν τα εξής :

- 5 μl 10X Pfx Amplification Buffer
- 1 μl ATP 10 μM
- 1 μl TTP 10 μM
- 1 μl CTP 10 μM
- 1 μl GTP 10 μM
- 1 μl MgSO4 50 Mμ
- 1 μl template Chk1 100ng
- 5 μl primer each 10μM
- 5 μl 10X PCRx Enhancer Solution
- 0.5 μl Platinum Pfx DNA Polymerase
- 23.5 μl H_2O

Το γενικό σχήμα των αντιδράσεων πολυμερισμού που εφαρμόσθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν ίδιο με εξαίρεση την αλληλουχία των 1332 bp που αντιστοιχούσε στα αμινοξέα 1-444 όπου υπήρξε μια μικρή αλλαγή στο χρόνο της επιμήκυνσης ο οποίος ενώ σε όλα ήταν 1 min, για τη συγκεκριμένη ο χρόνος μεταβλήθηκε σε 1:30 min λόγω μεγαλύτερης αλληλουχίας. Έτσι το πρόγραμμα είχε ως εξής :

- 94°C για 1 min για αρχική αποδιάταξη
- 94 °C για 1 min για αποδιάταξη
- 60 °C για 1 min για υβριδοποίηση των εκκινητών
- 68 °C για 1:30 min για επιμήκυνση της αλυσίδα (ή για 1 min)

  } x 29 cycles
- 68 °C για 10 min για τελική επιμήκυνση
- 4 °C για απεριόριστο χρονικό διάστημα. Τέλος αντίδρασης.

2) Ανάλυση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης τα μόρια DNA μπορούν να διαχωριστούν με κριτήριο το μήκος τους μετά από επεξεργασία με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Τα δείγματα DNA που προέκυψαν από διάφορες πέψεις π.χ. για να ελεχθεί αν το πλασμίδιο είχε μετασχηματιστεί με την κατάλληλη αλληλουχία που έχει εντεθεί τοποθετούνταν στα σχηματισμένα πηγαδάκια του πηκτώματος της αγαρόζης σε ειδική συσκευή και καλύπτονταν από ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE. Η τοποθέτηση των ηλεκτροδίων στη συσκευή δημιουργεί τάση η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο της συσκευής

Ωστόσο η ταχύτητα μμετακίνησης ενός τμήματος DNA εξαρτάται από το μέγεθος του και έτσι τα μικρά θραύσματα κινούνται πιο γρήγορα. Για να γίνουν αντιληπτά τα τμήματα DNA χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία βρωμιούχο αιθίδιο. Τέλος για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο ο μάρτυρας ο 1 kb DNA ladder της Invitrogen.Θα ήταν σημαντικό να τονιστεί ότι πηκτώματα με χαμηλή συγκέντρωση σε αγαρόζη 0.7 % χρησιμοποιούνται για να διαχωριστούν μεγαλύτερα θραύσματα (5-10 kb) ενώ πηκτώματα με υψηλή συγκέντρωση σε αγαρόζη 2%χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μικρών θραυσμάτων (0.2–1kb).

3) Διαδικασία της συγκόλλησης (ligation) των μονόκλωνων άκρων του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T-1 με τα μονόκλωνα άκρα των διάφορων αλληλουχιών του γονιδίου της Chk1.

Εφόσον έγιναν οι πέψεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της Chk1 που είχαν σχεδιαστεί με τα ένζυμα EcoRI και XhoI και με την προϋπόθεση ότι και ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 είχε υποστεί ακριβώς τις ίδιες πέψεις, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της συγκόλλησης των άκρων του πλασμιδίου και της κάθε νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (ligation). Γενικά κατά τη διαδικασία της ligation σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η Quick-Stick Ligase και ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο της Bioline:

- Πλασμιδιακό DNA και η αλληλουχία του DNA που ενσωματώνεται στο πλασμίδιο δεν πρέπει να ξεπερνούν συνολικά τα 100 ng
- 5 μl 4x QS Buffer
- 1 μl Quick-Stick Ligase
- Προσθήκη H_2O έως τελικού όγκου 20 μl

} 15min RT

4) Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων E.coli (TOP 10) με πλασμιδιακούς φορείς

Τα βακτηριακά κύτταρα TOP10 των 50 μl λήφθησαν από τους -80°C και ξεπάγωσαν σε πάγο. Προστέθηκε 4 μl από το διάλυμα της ligation και επωάστηκαν σε πάγο για 30 min. Η διαδικασία συνεχίστηκε με heat shock για 30 sec στους 42°C ώστε η απότομη αλλαγή θερμοκρασίας να δημιουργήσει οπές στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων με στόχο να εισαχθούν τα πλασμίδια. Προστέθηκαν 250 μl

προθερμασμένου θρεπτικού μέσου SOC και έπειτα τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Τέλος 200 μl των κυττάρων επιστρώθηκαν σε υπό στείρες συνθήκες σε πιάτο με θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού, στην προκειμένη περίπτωση παρουσία αμπικιλλίνης με το οποίο έγινε και η επιλογή. Το πιάτο τοποθετήθηκε στους 37°C για 16 ώρες.

5) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Μετά την επίστρωση των βακτηριακών κυττάρων στο πιάτο LB και αμπικιλλίνη, αναπτύχθηκαν κυρίως τα κύτταρα που είχαν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο που τους παρείχε την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό (μερικά αναπτύσσονται χωρίς να έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο αλλά καταφέρνουν να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλλίνη).Επιλέχθηκαν ορισμένες αποικίες που αναπτύχθηκαν και ενέθηκε η καθεμία σε 5 ml LB παρουσία 5 μl αμπικιλλίνης. Έπειτα από 12-16 ώρες (ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται) επώαση με ανάδευση τα falcon των 15 ml συλλέχθηκαν και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 3000 rpm. Το κυτταρικό ίζημα που σχηματίσθηκε στο falcon χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο πρωτόκολλο (kit) «NucleoSpin (NoLid)» της εταιρείας Macherey-Nagel το οποίο περιλαμβάνει 6 στάδια:

I) Εφόσον αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από τα falcons, προστέθηκαν 250 μl από το διάλυμα A1 και οι πελλέτες επαναδιαλύθηκαν πιπετάροντας. Οι ποσότητες των 250 μl μεταφέρθηκαν σε eppendorfs. Στη συνέχεια προστέθηκαν 250 μl από το διάλυμα A2, ανακινήθηκαν τα eppendorfs 6-8 φορές ήπια και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.Τέλος προστέθηκαν 300 μl από το buffer A3 και ανακινήθηκαν τα eppendorfs 6-8 φορές ήπια.

II) Ακολούθως τα eppendorfs φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 11,000 x g.

III) Το kit παρείχε ειδικές κολώνες NucleoSpin Plasmid Columns οι οποίες τοποθετήθηκαν σε collection tubes των 2 ml που παρέχονταν από τον κατασκευαστή. Στις κολώνες μεταφέρθηκαν 750 μl από το υπερκείμενο του κάθε eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στα 11,000 x g. Έπειτα αφού αφαιρέθηκαν οι NucleoSpin Plasmid Columns κολώνες από τους collection tubes αδειάστηκε το περιεχόμενο των collection tubes ενώ το πλασμιδιακό DNA είχε προσδεθεί στο φίλτρο της κολώνας και επανατοποθετήθηκαν οι NucleoSpin Plasmid Columns κολώνες. Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε μέχρι να φορτωθεί όλο το υπερκείμενο των eppendorfs στις κολώνες NucleoSpin Plasmid Columns.

IV) Στο συγκεκριμένο στάδιο πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις της κολώνας. Η μία αφορούσε την πλύση με 500 μl προθερμασμένου buffer AW και τη μετέπειτα φυγοκέντρηση των collection tubes για 1 min στα 11,000 x g. Η δεύτερη πλύση απαιτούσε την προσθήκη 600 μl από το buffer A4 και την ακόλουθη φυγοκέντρηση για 1 min στα 11,000 x g (μετά από κάθε φυγοκέντρηση αδείαζονταν το περιεχόμενο των collection tubes).

V) Επιπρόσθετη φυγοκέντρηση ακολουθήθηκε για 2 min στα 11,000 x g

VI) Στο τελικό στάδιο NucleoSpin Plasmid Columns κολώνες τοποθετήθηκαν σε eppendorfs των 1.5 ml και σε κάθε κολώνα προστέθηκαν 50 μl H_2O. Τα δείγματα επωάστηκαν για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου ενώ με το πέρας του χρόνου επώασης, τα eppendorfs που έφεραν τις κολώνες φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στα 11,000 x g.

6) Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Chk1 και των πρωτεϊνικών αλληλουχιών 1-292αα, 1-410αα, 1-444αα, 293-476αα.

Για την έκφραση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά κύτταρα BL21 (DH3) τα οποία είναι ιδανικά για την έκφραση παρουσία IPTG.Για να συμβεί όμως αυτό έπρεπε τα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τη διαδικασία των mini-preps να εισαχθούν στα παραπάνω κύτταρα.Η διαδικασία του μετασχηματισμού που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με τη διαδικασία που αναφέρθηκε όσο αφορά το μετασχηματισμό των βακτηρίων TOP 10 (μέθοδος 4).Εφόσον τα βακτηριακά κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα LB παρουσία αμπικιλλίνης και ύστερα από επώαση 16 ωρών στους 37° C, επιλέχθηκαν αποικίες μία από κάθε πιάτο (Εικόνα).Η κάθε αποικία προστέθηκε υπό στείρες συνθήκες σε 4 ml LB παρουσία 4 μl αμπικιλλίνης και οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για περίπου 16 ώρες στους 37^oC υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα 2 ml από κάθε καλλιέργεια προστέθηκαν η καθεμία σε 100 ml LB παρουσία 100 μl αμπικιλλίνης σε φλάσκα των 2 L και επωάστηκαν υπό ανάδευση για 2 ώρες στους 37° C μέχρι η οπτική απορρόφηση OD να φτάσει τις τιμές 0.3 – 0.5. Στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση και έχουν μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης. Μετά το πέρας των 2 ωρών για να επαχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών προστέθηκε 1 ml IPTG σε κάθε φλάσκα έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση από 100mM αρχικά, να μειωθεί στο 1 mM και ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση για 3 ώρες στους 37° C.

7) GST pull down assay

Μετά τη διαδικασία της επώασης των βακτηριακών κυττάρων με IPTG, το περιεχόμενο των φλασκών μοιράστηκε σε falcons των 50 ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 min. Η βακτηριακή πελέτα που σχηματίσθηκε επαναδιαλύθηκε με 1 ml NETN buffer (για κάθε falcon). Το NETN buffer συνίσταται από 20 mM Tris pH 8.0, 100 Mm NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40. Ακολούθησε διάτρηση των βακτηριακών τοιχωμάτων με sonication 3 φορές επί 15 sec έως ότου παρατηρηθεί διαφορά στο χρώμα του δείγματος (συνήθως παρατηρούνταν αλλαγή από πυκνό άσπρο σε διαφανές).Τα δείγματα πριν, καθ ’όλη τη διάρκεια και με το πέρας του sonication διατηρούνταν σε πάγο. Επακόλουθη φυγοκέντρηση των δειγμάτων που έφεραν πλέον όλο το πρωτεϊνικό εκχύλισμα ακολούθησε για 10 min στους 4 °C στη ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μεταφέρθηκε σε καθαρά eppendorfs. Επόμενο βήμα αφορούσε την πρόσδεση των υβριδικών πρωτεϊνικών αλληλουχιών της Chk1 με GST στα glutathione sepharose slurry. Τα GST beads χρησιμοποιηθήκαν σε ποσότητα 50 μl/ δείγμα Γι’ αυτό το σκοπό 50 μl glutathione sepharose slurry ξεπλύθηκαν από το συντηρητικό τους μέσο με 50 μl NETN buffer δύο φορές. Έπειτα από την τελευταία πλύση τα 50 μl GST beads αναδεύτηκαν με ίσο όγκο NETN buffer και το μείγμα προστέθηκε στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Στη συνέχεια το μίγμα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και των GST beads υποβλήθηκε σε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min σε

περιστρεφόμενη ρόδα (rotation).Με το πέρας του χρόνου επώασης τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση για 10 sec και ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις με 100 μl NETN buffer.Τέλος μετά το spin down τα 50 μl GST beads αναδεύτηκαν ήπια με 50 μl NETN buffer.Τα GST beads είχαν πλέον προσδέσει την υβριδική GST protein η οποία μπορεί να διατηρηθεί προσδεδεμένη στα glutathione sepharose slurry στους 4 °C για μερικές ημέρες.

8) SDS – PAGE electrophoresis και Western blot analysis

Οι υβριδικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο και με το μέγεθος τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS.

Για το σκοπό αυτό έπρεπε να φτιαχτεί το running καθώς και το stacking gel

A) Running gel 10%, V=40 ml

- H_2O 19.2 ml
- 40 % acrylamide mix 10 ml
- 1.5 M Tris (pH 8.8) 10 ml
- 10% SDS 0.4 ml
- 10% APS 0.4 ml
- TEMED 0.1% 40 μl

B) Stacking gel V=10 ml

- H_2O 7.3 ml
- 40 % acrylamide mix 1.25 ml
- 1 M Tris (pH 6.8) 1.25 ml
- 10% SDS 0.1 ml
- 10% APS 0.1 ml
- TEMED 0.1% 10 μl

Αφού αρχικά προετοιμάστηκε το Running gel χύθηκε στη συσκευή ενώ αμέσως μετά με τη χρήση πιπέτας από πάνω από gel περιχύθηκε 1 ml βουτανόλης. Μετά τον πολυμερισμό του Running gel προετοιμάστηκε το Stacking gel και αφού έγινε ξέπλυμα του gel από τη βουτανόλη με H_2O προστέθηκε το Stacking gel και τα ειδικά χτένια που δημιουργούν οπές στο gel. Το gel στην ειδική συσκευή ήταν πλέον έτοιμο μετά τον πλήρη πολυμερισμό.

Ακολούθησε προετοιμασία των δειγμάτων που θα φορτώνονταν στο gel. Από το κάθε δείγμα των GST beads που είχαν προσδέσει τις επιθυμητές πρωτεΐνες λήφθηκε ποσότητα των 10 μl και ανακατεύτηκε με κατάλληλες ποσότητες SDS και DTT ενώ η διαδικασία συνεχίστηκε με αποδιάταξη των πρωτεϊνών από τα beads στους 95°C για 10 min.Τα δείγματα υπέστησαν spin down και τα εναιωρήματα φορτώθηκαν στο gel ενώ παράλληλα είχαν φορτωθεί και 10 μl πρωτεϊνικού μάρτυρα.

Το buffer της ηλεκτροφόρησης ήταν Tris glycine 1x και όγκου 1L (800 ml H_2O + 200 ml 5x Tris glycine.Το gel έτρεχε για 3 ώρες στα 180 V.

Για τον ανοσοεντοπισμό των αναλυθέντων πρωτεϊνών έγινε ηλεκτροφορητική μεταφορά αυτών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης για 1 ώρα και 15 min στα 20 V. (Transfer buffer : 20 ml 10x transfer buffer + 140 ml H_2O + 40 ml μεθανόλη η οποία προστίθεται τελευταία στο buffer)

Επόμενο βήμα μετά το transfer είναι η διαδικασία του blocking της μεμβράνης όπου μπλοκάρονται οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε 50 ml διαλύματος TBS-Tween 1x και 5% nonfat dry milk διαλυμένο στο TBS-Tween σε πλαστικό πιάτο ειδικό για τις μεμβράνες. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε στο shaker για 1 ώρα. Έπειτα από 1 ώρα η μεμβράνη ξεπλύθηκε με TBS-Tween 1x για 5 min ενώ με το πέρας των 5 min αφαιρέθηκε το TBS-Tween και προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα σε αραίωση 1:2000(6μl αντισώματος σε 12 μl 1% nonfat dry milk + TBS-Tween 1x). Η μεμβράνη με το αντίσωμα τοποθετήθηκε σε shaker στους 4°C για όλη τη νύχτα. Όσον αφορά την ανίχνευση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών της Chk1 τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν όπως αναφέρθηκε ήταν 1) Chk1 (G-4) mouse monoclonal έναντι της Chk1 και 2) GST (B-14) mouse monoclonal έναντι της GST tag. (Παρακάτω γίνεται αναφορά στην Aurora B).

Την επόμενη μέρα έγιναν μία σειρά από διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με TBS-Tween 1x.

- Ένα γρήγορο πλύσιμο με TBS-Tween 1x.
- 1 x 15 min << <<
- 2 x 5 min << <<

Εφόσον πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω πλύσεις ακολούθησε επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε shaker με το δεύτερο αντίσωμα anti mouse συζευγμένο με HRP σε αραίωση 1:6000. Επιπρόσθετα πλυσίματα ήταν αναγκαία εφόσον πραγματοποιήθηκε η απαιτούμενη επώαση.

- 1 x 10 min πλύσιμο με TBS-Tween 1x
- 4 x 5 min << <<

Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα του horseradish peroxidase (HRP) enzyme το Thermo Scientific Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate της εταιρείας Thermo Scientific έγινε η εμφάνιση των ζωνών των πρωτεϊνών(ECL). Άλλοτε για να φανεί δυνατότερο σήμα χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate της ίδιας εταιρείας (Femto).Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο μεγεθών ο μάρτυρας Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder της εταιρείας Thermo Scientific.

9) Επαγωγή της 6x myc Aurora B παρουσία τετρακυκλίνης

Όπως αναφέρθηκε στο εργαστήριο υπήρχε κυτταρική σειρά CHO κυττάρων που υπερέκφραζε την 6x myc Aurora B παρουσία τετρακυκλίνης. Για το σκοπό αυτό έγινε αρχικά set up των κυττάρων και με χρήση αιματοκυτταρόμετρου υπολογίσθηκε μετά από αναλογίες ο αριθμός τους που αντιστοιχούσε στην φλάσκα των 75 cm^2 και μετέπειτα υπολογίσθηκε ο όγκος των κύτταρων που θα τοποθετούνταν σε πιατάκια των 60 mm. Εφόσον έγιναν οι κατάλληλοι υπολογισμοί ορισμένος όγκος κυττάρων

τοποθετήθηκε σε πιατάκια έγινε συμπλήρωση με θρεπτικό μέσο F-12 έως τελικού όγκου των 5 ml. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν για 5 ώρες στον incubator ώστε να κολλήσουν στο υπόστρωμα. Για να επαχθεί η έκφραση μετά τις 5 ώρες τοποθετήθηκε τετρακυκλίνη με τελική συγκέντρωση 17ng/ml και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 16 ώρες στους 37°C παρουσία 5 % CO_2.

10) Απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα CHO κύτταρα

Ύστερα από την επαγωγή της έκφρασης, η διαδικασία για την απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα ευκαρυωτικά κύτταρα είχε ως εξής :

Αρχικά αφαιρέθηκε όλο το θρεπτικό μέσο από τα πιατάκια με χρήση πιπέτας και προστέθηκε 2 ml PBS με στόχο το ξέπλυμα από το medium.Στη συνέχεια σε κάθε πιάτο προστέθηκαν 800 μl από το IP kinase buffer το οποίο έφερε και τους κατάλληλους inhibitors. Το συγκεκριμένο buffer έφερε τα εξής συστατικά:

<u>IP Kinase buffer</u>

- HEPES pH 7.5 ⇨ 50mM
- NaCl ⇨ 150 mM
- EDTA ⇨ 1 Mm
- EGTA ⇨ 2.5 mM
- Tween 20 ⇨ 0.1 %
- Glycerol ⇨ 10 %
- H_2O

} τελικές συγκεντρώσεις

<u>Inhibitors</u>

- NaF ⇨ 1 mM (αναστολέας φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης)
- PMSF ⇨ 0.1 mM (αναστολέας σερινό-πρωτεασών)
- b- glycerophosphate ⇨ 10 mM (αναστολέας φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης)
- $NaVO_4$ ⇨ 0.1 mM (αναστολέας αλκαλικών φωσφατασών και φωσφατάσης τυροσίνης)
- Leupeptin ⇨ 10μg/ml (αναστολέας πρωτεασών σερίνης, κυστείνης)
- Aprotinin ⇨ 10μg/ml (αναστολέας πρωτεασών σερίνης)

Με την προσθήκη των 800 μl IP kinase buffer/inhibitors σε κάθε πιάτο γινόταν παράλληλα και το ΄΄ξύσιμο΄΄ των κυττάρων με ειδικό εργαλείο έτσι ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από το υπόστρωμα τους. Η διαδικασία γινόταν πάνω σε πάγο ενώ τα εναιωρήματα τοποθετούνταν σε eppendorfs που είχα τοποθετηθεί σε πάγο. Η μέθοδος του sonication ήταν το επόμενο βήμα ώστε να σπάσουν οι κυτταρικές μεμβράνες και να απομονωθούν οι πρωτεΐνες. Η διάτρηση των κυτταροπλασματικών μεμβρανών πραγματοποιήθηκε 3 φορές για κάθε δείγμα για 10

sec.Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 rpm για 10 min στους 4°C στην ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση Bradford.

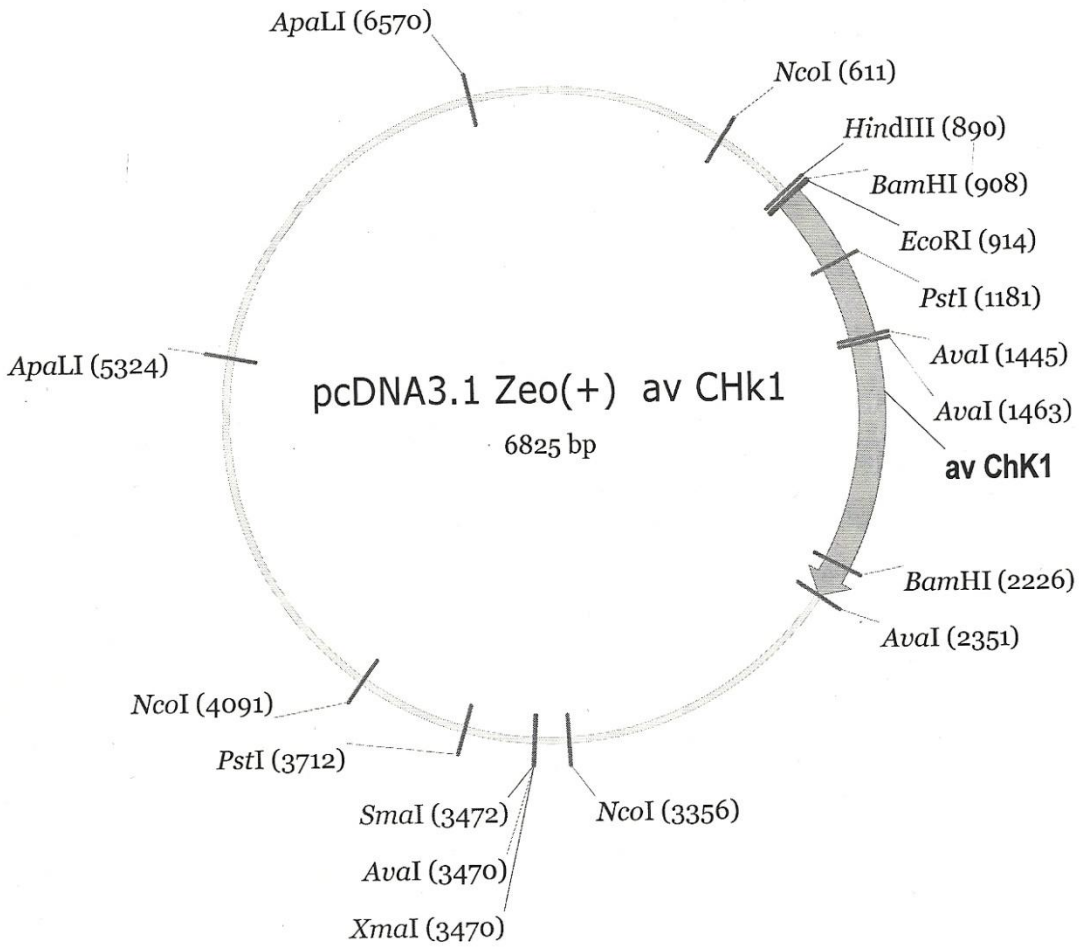
Έχοντας υπολογίσει τον κατάλληλο όγκο του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων CHO που θα χρησιμοποιούνταν για την αλληλεπίδραση με τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες της Chk1 μέσω GST pull down assay, έγινε ανάμειξη των κατάλληλων ποσοτήτων και τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενη ρόδα (rotation) στους 4°C για όλη τη νύχτα.

Την επόμενη μέρα του πειράματος έγινε φυγοκέντρηση των GST beads που έφεραν πλέον προσδεδεμένες τις επιθυμητές πρωτεΐνες στις 3000 rpm για 5 min στους 4°C στην ψυχόμενη φυγόκεντρο .Ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις με 1 ml IP kinase buffer κάθε φορά, για κάθε δείγμα, ενώ μετά από πλύση έπονταν φυγοκέντρηση3000 rpm για 5 min στους 4°C.Οι πρωτείνες αποδιατάχθηκαν στους 95°C παρουσία SDS και DTT.

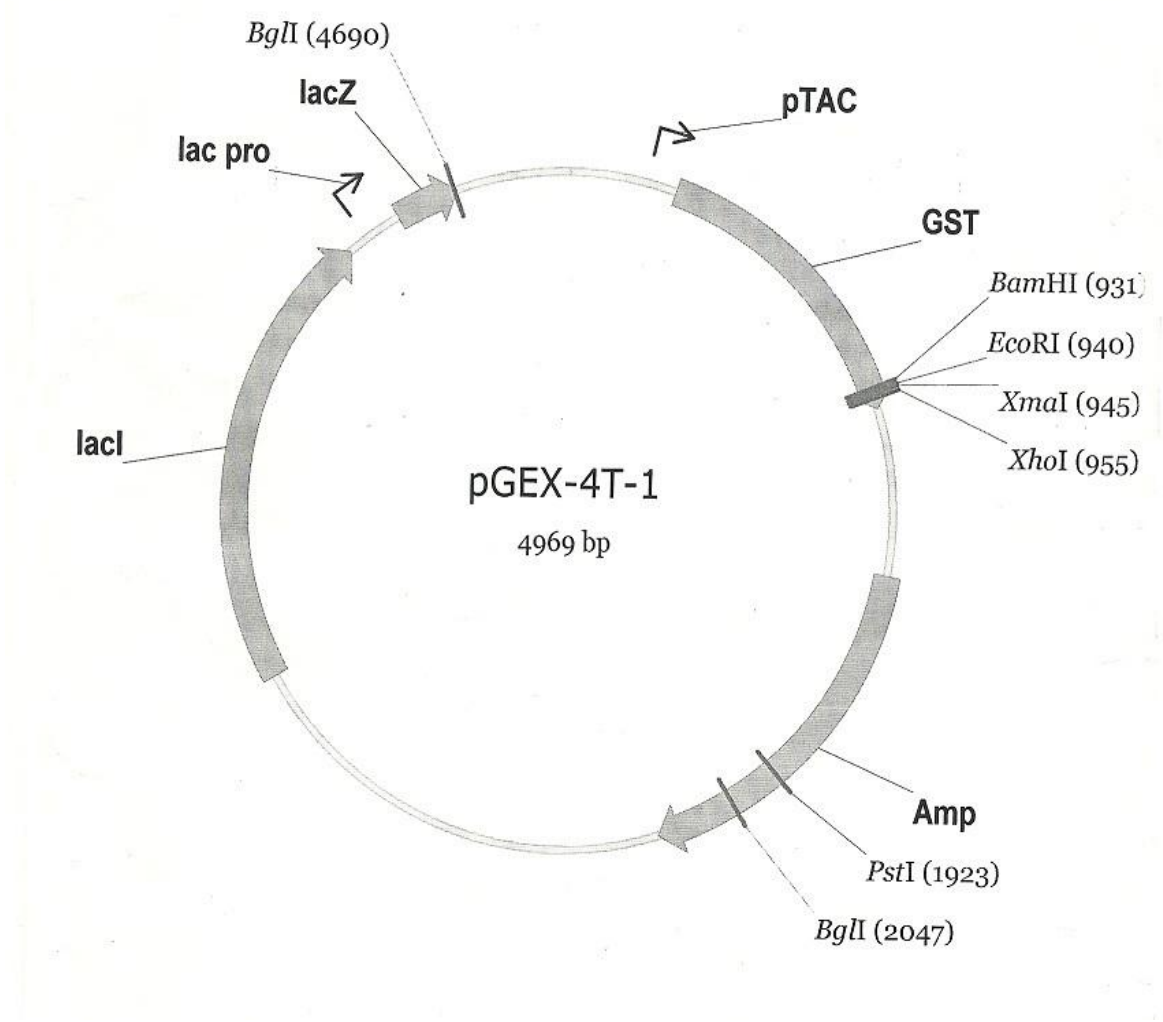
Το αν η Aurora B είχε αλληλεπιδράσει με την GST - Chk1 και με τις υβριδικές πρωτεϊνικές αλληλουχίες της Chk1 που ήταν ήδη δεσμευμένες στα bead, θα γινόταν ορατό μέσω της μεθόδου Western blot analysis. Τα βήματα είναι ακριβώς τα ίδια με τη μέθοδο 8 που αναφέρθηκε. Η μόνη διαφορά ήταν στα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς εδώ ανιχνεύαμε την ύπαρξη της 6x myc Aurora B ~ 50 kDa (Υλικά).

Παράρτημα

Πλασμιδιακός χάρτης 1: Απεικόνιση του γονιδίου της Chk1 σε πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1 zeo (+)



<u>Πλασμιδιακός χάρτης 2:</u> Απεικόνιση του πλασμιδίου – φορέα κλωνοποίησης pGEX- 4T- 1



Η αλληλουχία της Chk1 στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1 zeo (+) (με βελάκια φαίνονται οι αλληλουχίες που κλωνοποιήθηκαν)

```
   1  GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTCGACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT
      CTGCCTAGCC CTCTAGAGGG CTAGGGGATA CCAGCTGAGA GTCATGTTAG ACGAGACTAC GGCGTATCAA TTCGGTCATA GACGAGGGAC GAACACACAA

 101  GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG
      CCTCCAGCGA CTCATCACGC GCTCGTTTTA AATTCGATGT TGTTCCGTTC CGAACTGGCT GTTAACGTAC TTCTTAGACG AATCCCAATC CGCAAAACGC

 201  CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
      GACGAAGCGC TACATGCCCG GTCTATATGC GCAACTGTAA CTAATAACTG ATCAATAATT ATCATTAGTT AATGCCCCAG TAATCAAGTA TCGGGTATAT

                                          BglI
 301  TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
      ACCTCAAGGC GCAATGTATT GAATGCCATT TACCGGGCGG ACCGACTGGC GGGTTGCTGG GGGCGGGTAA CTGCAGTTAT TACTGCATAC AAGGGTATCA

                                                                  BglI
 401  AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAC TATTTACGGT AAACTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCCC
      TTGCGGTTAT CCCTGAAAGG TAACTGCAGT TACCCACCTG ATAAATGCCA TTTGACGGGT GAACCGTCAT GTAGTTCACA TAGTATACGG TTCATGCGGG

                                   BglI
 501  CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
      GGATAACTGC AGTTACTGCC ATTTACCGGG CGGACCGTAA TACGGGTCAT GTACTGGAAT ACCCTGAAAG GATGAACCGT CATGTAGATG CATAATCAGT

 601  TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
      AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG TCATGTAGTT ACCCGCACCT ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTTCA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT

 701  TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
      ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC CCTGAAAGGT TTTACAGCAT TGTTGAGGCG GGGTAACTGC GTTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC

                                                                                                   HindIII
 801  GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTTGGTACC
      CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGAACCATGG

                   EcoRI
          BamHI
 +1                   Met AlaVal Pro PheValGlu Asp TrpAspLeu ValGln Thr LeuGlyGlu Gly AlaTyr Gly GluVal Gln LeuAlaValAsn
 901  GAGCTCGGAT CCGAATTCAT GGCGGTGCCC TTCGTGGAGG ACTGGGACCT GGTGCAGACC CTGGGAGAAG GCGCTTACGG GGAGGTGCAG TTGGCCGTGA
      CTCGAGCCTA GGCTTAAGTA CCGCCACGGG AAGCACCTCC TGACCCTGGA CCACGTCTGG GACCCTCTTC CGCGAATGCC CCTCCACGTC AACCGGCACT

 +1  ·AsnArgArg Thr GluGlu Ala ValAlaVal Lys Ile Val Asp MetLys Arg AlaAlaAsp Cys ProGlu Asn Ile Lys Lys GluIle Cys Ile AsrLysMet·
1001  ACCGCCGCAC CGAGGAGGCC GTGGCCGTGA AGATCGTGGA CATGAAGCGC GCGGCCGACT GCCCGGAGAA CATCAAGAAG GAGATCTGCA TCAACAAGAT
      TGGCGGCGTG GCTCCTCCGG CACCGGCACT TCTAGCACCT GTACTTCGCG CGCCGGCTGA CGGGCCTCTT GTAGTTCTTC CTCTAGACGT AGTTGTTCTA

                                                                                                  PstI
 +1  ·MetLeuAsn His GluAsnVal Val LysPhe Tyr GlyHis Arg ArgGluGly Ala ThrGln Tyr LeuPheLeu GluTyrCys Ser GlyGly Glu LeuPheAsp
1101  GCTGAACCAC GAGAACGTCG TCAAGTTCTA CGGGCACCGG CGGGAGGGGG CCACGCAGTA CCTGTTCCTG GAGTACTGCA GCGGCGGGGA GCTCTTCGAC
      CGACTTGGTG CTCTTGCAGC AGTTCAAGAT GCCCGTGGCC GCCCTCCCCC GGTGCGTCAT GGACAAGGAC CTCATGACGT CGCCGCCCCT CGAGAAGCTG

 +1  Arg Ile Glu Pro AspIle Gly MetPro Glu ProGluAla Gln ArgPhePhe GlnGln Leu Ile AlaGly Val ValTyr Leu HisSer Met Gly Ile ThrHis·
1201  CGCATCGAGC CGGACATTGG GATGCCGGAG CCGGAGGCGC AGCGCTTCTT CCAGCAGCTG ATTGCTGGTG TGGTGTACCT GCACAGCATG GGCATCACGC
      GCGTAGCTCG GCCTGTAACC CTACGGCCTC GGCCTCCGCG TCGCGAAGAA GGTCGTCGAC TAACGACCAC ACCACATGGA CGTGTCGTAC CCGTAGTGCG

 +1  ·HisArgAsp Leu LysPro Glu AsrLeuLeu Leu AspGlu Arg AspAsn Leu Lys Ile Ser Asp PheGly Leu AlaThr Val PheLysHis Asn GlyArgGlu
1301  ACCGCGACCT CAAGCCGGAG AACCTGCTGC TGGATGAGCG AGACAACCTG AAGATCTCCG ATTTCGGCCT GGCCACCGTC TTCAAGCACA ACGGGCGCGA
      TGGCGCTGGA GTTCGGCCTC TTGGACGACG ACCTACTCGC TCTGTTGGAC TTCTAGAGGC TAAAGCCGGA CCGGTGGCAG AAGTTCGTGT TGCCCGCGCT

 +1  ·GluArgLeu Leu AsrLysMet Cys GlyThr Leu ProTyr Val AlaProGlu Leu LeuArg Arg ProGlu Phe ArgAlaGlu Pro ValAsp Val TrpAlaCys
1401  GCGGCTGCTG AACAAGATGT GTGGCACACT GCCCTACGTG GCCCCCGAGC TGCTGCGGCG CCCCGAGTTC CGTGCGGAGC CCGTGGACGT GTGGGCCTGC
      CGCCGACGAC TTGTTCTACA CACCGTGTGA CGGGATGCAC CGGGGGCTCG ACGACGCCGC GGGGCTCAAG GCACGCCTCG GGCACCTGCA CACCCGGACG

                                BglI
 +1  GlyValVal Leu ThrAla Met LeuAla Gly GluLeuPro Trp AspGln Pro SerAsp Ser CysGlnGlu Tyr SerAsp Trp LysGlu Arg LysThrTyrLeu
1501  GGCGTGGTGC TGACCGCCAT GCTGGCGGGA GAGCTACCCT GGGATCAGCC CAGCGACAGC TGCCAGGAGT ACAGCGACTG GAAGGAGAGG AAGACCTACC
      CCGCACCACG ACTGGCGGTA CGACCGCCCT CTCGATGGGA CCCTAGTCGG GTCGCTGTCG ACGGTCCTCA TGTCGCTGAC CTTCCTCTCC TTCTGGATGG

 +1  ·LeuAlaPro Trp ArgLys Ile AspSerAla Pro LeuAla Leu LeuHis Lys Ile LeuThr Glu AsrPro Thr AlaArg Ile Thr Ile Pro Asp Ile LysLys·
1601  TGGCGCCCTG GAGGAAGATC GACTCTGCAC CATTAGCACT GCTGCACAAG ATCCTGACCG AGAACCCCAC GGCGCGCATC ACCATCCCCG ACATCAAGAA
      ACCGCGGGAC CTCCTTCTAG CTGAGACGTG GTAATCGTGA CGACGTGTTC TAGGACTGGC TCTTGGGGTG CCGCGCGTAG TGGTAGGGGC TGTAGTTCTT

 +1  ·LysAspArg Trp TyrCysArg Pro LeuLys Lys GlyThr Lys ArgGlyArg Val SerSer Gly GlyVal Thr GluSerPro Gly AlaLeu Pro LysHis Ile
1701  GGACCGCTGG TACTGCCGGC CCCTGAAGAA GGGCACAAAG CGTGGCCGCG TGTCCTCAGG TGGTGTCACC GAGTCCCCCG GAGCCCTCCC CAAACACATC
      292 CCTGGCGACC ATGACGGCCG GGGACTTCTT CCCGTGTTTC GCACCGGCGC ACAGGAGTCC ACCACAGTGG CTCAGGGGGC CTCGGGAGGG GTTTGTGTAG

 +1  ArgSerAsp Thr AspPhe Ser ProVal Lys SerAlaLeu Gly GluAsp Lys AlaSer Tyr SerThrSer Gln ProGlu Pro GlyThr Gly GlyAlaLeuTrp
1801  CGCTCTGACA CAGACTTCTC TCCTGTGAAG AGTGCCCTGG GTGAGGACAA GGCGAGCTAC TCCACATCAC AGCCTGAGCC CGGCACCGGC GGCGCGCTGT
      GCGAGACTGT GTCTGAAGAG AGGACACTTC TCACGGGACC CACTCCTGTT CCGCTCGATG AGGTGTAGTG TCGGACTCGG GCCGTGGCCG CCGCGCGACA
                                                293
```

```
+1   TrpAspSer Ser ThrGly Ser Ile AspArg Leu ValGln Gly Ile Ser Phe SerGlnPro Ala CysPro Glu HisMetLeu LeuAsnSer Gln LeuLeuGly
1901 GGGACAGCAG CACGGGCAGC ATCGACCGCC TGGTGCAGGG CATCAGCTTC TCCCAGCCTG CCTGCCCTGA GCACATGCTG CTCAACAGCC AGCTGCTCGG
     CCCTGTCGTC GTGCCCGTCG TAGCTGGCGG ACCACGTCCC GTAGTCGAAG AGGGTCGGAC GGACGGGACT CGTGTACGAC GAGTTGTCGG TCGACGAGCC

+1   GlyThrPro Gly SerSerGln Ser ProTrp Gln ArgLeu Val ArgArgMet Thr ArgPhePhe ThrLys Leu AspAlaAsp Gly SerTyr Arg SerLeuArg
2001 CACGCCAGGC TCCTCCCAGA GCCCGTGGCA GCGCCTGGTG AGGCGGATGA CGCGCTTCTT CACCAAGCTG GACGCCGACG GCTCCTACCG CAGCCTGAGG
     GTGCGGTCCG AGGAGGGTCT CGGGCACCGT CGCGGACCAC TCCGCCTACT GCGCGAAGAA GTGGTTCGAC CTGCGGCTGC CGAGGATGGC GTCGGACTCC
                                                                    410
+1   AspValCys Glu LysMet Gly TyrGly Trp LysGlnSer Cys ThrAsn Gln ValThr Ile SerThrThr Asp ArgArg Asn AsnLys Leu Ile PheLysVal
2101 GACGTGTGTG AGAAGATGGG CTACGGCTGG AAGCAGAGCT GCACCAACCA GGTCACCATC TCCACCACGG ACCGGAGGAA CAACAAGCTG ATCTTCAAGG
     CTGCACACAC TCTTCTACCC GATGCCGACC TTCGTCTCGA CGTGGTTGGT CCAGTGGTAG AGGTGGTGCC TGGCCTCCTT GTTGTTCGAC TAGAAGTTCC

                                BamHI
                                                    444
+1   ·ValAsnLeu Leu GluMet Glu SerArg Ile Leu ValAsp Phe ArgLeu Ser LysGlyAsp Gly LeuGlu Phe LysArg His PheLeuLys Ile LysGlyLys·
2201 TGAACCTGCT GGAGATGGAG AGCAGGATCC TGGTGGACTT CCGCCTCTCC AAGGCGCACG GGTTGGAGTT CAAGCGGCAT TTCCTGAAAA TCAAAGGCAA
     ACTTGGACGA CCTCTACCTC TCGTCCTAGG ACCACCTGAA GGCGGAGAGG TTCCCGCTGC CCAACCTCAA GTTCGCCGTA AAGGACTTTT AGTTTCCGTT

                                                                    XhoI
                                476
+1   ·LysLeuSer Asp ValValSer Thr GlnLys Val TrpLeuPro ProPro***
2301 ACTGAGCGAC GTGGTCAGCA CCCAGAAGGT GTGGCTGCCC CCACCCTGAC TCGAGCATGC ATCTAGAGGG CCCTATTCTA TAGTGTCACC TAAATGCTAG
     TGACTCGCTG CACCAGTCGT GGGTCTTCCA CACCGACGGG GGTGGGACTG AGCTCGTACG TAGATCTCCC GGGATAAGAT ATCACAGTGG ATTTACGATC

2401 AGCTCGCTGA TCAGCCTCGA CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCCTC CCCCGTGCCT TCCTTGACCC TGGAAGGTGC CACTCCCACT
     TCGAGCGACT AGTCGGAGCT GACACGGAAG ATCAACGGTC GGTAGACAAC AAACGGGGAG GGGGCACGGA AGGAACTGGG ACCTTCCACG GTGAGGGTGA

2501 GTCCTTTCCT AATAAAATGA GGAAATTGCA TCGCATTGTC TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGACAGCAAG GGGGAGGATT
     CAGGAAAGGA TTATTTTACT CCTTTAACGT AGCGTAACAG ACTCATCCAC AGTAAGATAA GACCCCCCAC CCCACCCCGT CCTGTCGTTC CCCCTCCTAA

2601 GGGAAGACAA TAGCAGGCAT GCTGGGGATG CGGTGGGCTC TATGGCTTCT GAGGCGGAAA GAACCAGCTG GGGCTCTAGG GGGTATCCCC ACGCGCCCTG
     CCCTTCTGTT ATCGTCCGTA CGACCCCTAC GCCACCCGAG ATACCGAAGA CTCCGCCTTT CTTGGTCGAC CCCGAGATCC CCCATAGGGG TGCGCGGGAC

2701 TAGCGGCGCA TTAAGCGCGG CGGGTGTGGT GGTTACGCGC AGCGTGACCG CTACACTTGC CAGCGCCCTA GCGCCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCCTTCC
     ATCGCCGCGT AATTCGCGCC GCCCACACCA CCAATGCGCG TCGCACTGGC GATGTGAACG GTCGCGGGAT CGCGGGCGAG GAAAGCGAAA GAAGGGAAGG

2801 TTTCTCGCCA CGTTCGCCGG CTTTCCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGCAT CCCTTTAGGG TTCCGATTTA GTGCTTTACG GCACCTCGAC CCCAAAAAAC
     AAAGAGCGGT GCAAGCGGCC GAAAGGGGCA GTTCGAGATT TAGCCCCGTA GGGAAATCCC AAGGCTAAAT CACGAAATGC CGTGGAGCTG GGGTTTTTTG

2901 TTGATTAGGG TGATGGTTCA CGTAGTGGGC CATCGCCCTG ATAGACGGTT TTTCGCCCTT TGACGTTGGA GTCCACGTTC TTTAATAGTG GACTCTTGTT
     AACTAATCCC ACTACCAAGT GCATCACCCG GTAGCGGGAC TATCTGCCAA AAAGCGGGAA ACTGCAACCT CAGGTGCAAG AAATTATCAC CTGAGAACAA

3001 CCAAACTGGA ACAACACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT AAGGGATTTT GGGGATTTCG GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA
     GGTTTGACCT TGTTGTGAGT TGGGATAGAG CCAGATAAGA AAACTAAATA TTCCCTAAAA CCCCTAAAGC CGGATAACCA ATTTTTTACT CGACTAAATT

3101 CAAAAATTTA ACGCGAATTA ATTCTGTGGA ATGTGTGTCA GTTAGGGTGT GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC
     GTTTTTAAAT TGCGCTTAAT TAAGACACCT TACACACAGT CAATCCCACA CCTTTCAGGG GTCCGAGGGG TCCGTCCGTC TTCATACGTT TCGTACGTAG

3201 TCAATTAGTC AGCAACCAGG TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA TAGTCCCGCC
     AGTTAATCAG TCGTTGGTCC ACACCTTTCA GGGGTCCGAG GGGTCGTCCG TCTTCATACG TTTCGTACGT AGAGTTAATC AGTCGTTGGT ATCAGGGCGG

3301 CCTAACTCCG CCCATCCCGC CCCTAACTCC GCCCAGTTCC GCCCATTCTC CGCCCCATGG CTGACTAATT TTTTTTATTT ATGCAGAGGC CGAGGCCGCC
     GGATTGAGGC GGGTAGGGCG GGGATTGAGG CGGGTCAAGG CGGGTAAGAG GCGGGGTACC GACTGATTAA AAAAAATAAA TACGTCTCCG GCTCCGGCGG

3401 TCTGCCTCTG AGCTATTCCA GAAGTAGTGA GGAGGCTTTT TTGGAGGCCT AGGCTTTTGC AAAAAGCTCC CGGGAGCTTG TATATCCATT TTCGGATCTG
     AGACGGAGAC TCGATAAGGT CTTCATCACT CCTCCGAAAA AACCTCCGGA TCCGAAAACG TTTTTCGAGG GCCCTCGAAC ATATAGGTAA AAGCCTAGAC

3501 ATCAAGAGAC AGGATGAGGA TCGTTTCGCA TGATTGAACA AGATGGATTG CACGCAGGTT CTCCGGCCGC TTGGGTGGAG AGGCTATTCG GCTATGACTG
     TAGTTCTCTG TCCTACTCCT AGCAAAGCGT ACTAACTTGT TCTACCTAAC GTGCGTCCAA GAGGCCGGCG AACCCACCTC TCCGATAAGC CGATACTGAC

3601 GGCACAACAG ACAATCGGCT GCTCTGATGC CGCCGTGTTC CGGCTGTCAG CGCAGGGGCG CCCGGTTCTT TTTGTCAAGA CCGACCTGTC CGGTGCCCTG
     CCGTGTTGTC TGTTAGCCGA CGAGACTACG GCGGCACAAG GCCGACAGTC GCGTCCCCGC GGGCCAAGAA AAACAGTTCT GGCTGGACAG GCCACGGGAC

          PstI
3701 AATGAACTGC AGGACGAGGC AGCGCGGCTA TCGTGGCTGG CCACGACGGG CGTTCCTTGC GCAGCTGTGC TCGACGTTGT CACTGAAGCG GGAAGGGACT
     TTACTTGACG TCCTGCTCCG TCGCGCCGAT AGCACCGACC GGTGCTGCCC GCAAGGAACG CGTCGACACG AGCTGCAACA GTGACTTCGC CCTTCCCTGA

3801 GGCTGCTATT GGGCGAAGTG CCGGGGCAGG ATCTCCTGTC ATCTCACCTT GCTCCTGCCG AGAAAGTATC CATCATGGCT GATGCAATGC GGCGGCTGCA
     CCGACGATAA CCCGCTTCAC GGCCCCGTCC TAGAGGACAG TAGAGTGGAA CGAGGACGGC TCTTTCATAG GTAGTACCGA CTACGTTACG CCGCCGACGT

3901 TACGCTTGAT CCGGCTACCT GCCCATTCGA CCACCAAGCG AAACATCGCA TCGAGCGAGC ACGTACTCGG ATGGAAGCCG GTCTTGTCGA TCAGGATGAT
     ATGCGAACTA GGCCGATGGA CGGGTAAGCT GGTGGTTCGC TTTGTAGCGT AGCTCGCTCG TGCATGAGCC TACCTTCGGC CAGAACAGCT AGTCCTACTA

4001 CTGGACGAAG AGCATCAGGG GCTCGCGCCA GCCGAACTGT TCGCCAGGCT CAAGGCGCGC ATGCCCGACG GCGAGGATCT CGTCGTGACC CATGGCGATG
     GACCTGCTTC TCGTAGTCCC CGAGCGCGGT CGGCTTGACA AGCGGTCCGA GTTCCGCGCG TACGGGCTGC CGCTCCTAGA GCAGCACTGG GTACCGCTAC

4101 CCTGCTTGCC GAATATCATG GTGGAAAATG GCCGCTTTTC TGGATTCATC GACTGTGGCC GGCTGGGTGT GGCGGACCGC TATCAGGACA TAGCGTTGGC
     GGACGAACGG CTTATAGTAC CACCTTTTAC CGGCGAAAAG ACCTAAGTAG CTGACACCGG CCGACCCACA CCGCCTGGCG ATAGTCCTGT ATCGCAACCG

4201 TACCCGTGAT ATTGCTGAAG AGCTTGGCGG CGAATGGGCT GACCGCTTCC TCGTGCTTTA CGGTATCGCC GCTCCCGATT CGCAGCGCAT CGCCTTCTAT
     ATGGGCACTA TAACGACTTC TCGAACCGCC GCTTACCCGA CTGGCGAAGG AGCACGAAAT GCCATAGCGG CGAGGGCTAA GCGTCGCGTA GCGGAAGATA

4301 CGCCTTCTTG ACGAGTTCTT CTGAGCGGGA CTCTGGGGTT CGAAATGACC GACCAAGCGA CGCCCAACCT GCCATCACGA GATTTCGATT CCACCGCCGC
     GCGGAAGAAC TGCTCAAGAA GACTCGCCCT GAGACCCCAA GCTTTACTGG CTGGTTCGCT GCGGGTTGGA CGGTAGTGCT CTAAAGCTAA GGTGGCGGCG
```

```
4401  CTTCTATGAA AGGTTGGGCT TCGGAATCGT TTTCCGGGAC GCCGGCTGGA TGATCCTCCA GCGCGGGGAT CTCATGCTGG AGTTCTTCGC CCACCCCAAC
      GAAGATACTT TCCAACCCGA AGCCTTAGCA AAAGGCCCTG CGGCCGACCT ACTAGGAGGT CGCGCCCCTA GAGTACGACC TCAAGAAGCG GGTGGGGTTG

4501  TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCACTGCA TTCTAGTTGT GGTTTGTCCA
      AACAAATAAC GTCGAATATT ACCAATGTTT ATTTCGTTAT CGTAGTGTTT AAAGTGTTTA TTTCGTAAAA AAAGTGACGT AAGATCAACA CCAAACAGGT

4601  AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGTA TACCGTCGAC CTCTAGCTAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA ATTGTTATCC
      TTGAGTAGTT ACATAGAATA GTACAGACAT ATGGCAGCTG GAGATCGATC TCGAACCGCA TTAGTACCAG TATCGACAAA GGACACACTT TAACAATAGG

4701  GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAAGCCT GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG
      CGAGTGTTAA GGTGTGTTGT ATGCTCGGCC TTCGTATTTC ACATTTCGGA CCCCACGGAT TACTCACTCG ATTGAGTGTA ATTAACGCAA CGCGAGTGAC

4801  CCCGCTTTCC AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT
      GGGCGAAAGG TCAGCCCTTT GGACAGCACG GTCGACGTAA TTACTTAGCC GGTTGCGCGC CCCTCTCCGC CAAACGCATA ACCCGCGAGA AGGCGAAGGA

4901  CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
      GCGAGTGACT GAGCGACGCG AGCCAGCAAG CCGACGCCGC TCGCCATAGT CGAGTGAGTT TCCGCCATTA TGCCAATAGG TGTCTTAGTC CCCTATTGCG

5001  AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT
      TCCTTTCTTG TACACTCGTT TTCCGGTCGT TTTCCGGTCC TTGGCATTTT TCCGGCGCAA CGACCGCAAA AAGGTATCCG AGGCGGGGGG ACTGCTCGTA

5101  CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC
      GTGTTTTTAG CTGCGAGTTC AGTCTCCACC GCTTTGGGCT GTCCTGATAT TTCTATGGTC CGCAAAGGGG GACCTTCGAG GGAGCACGCG AGAGGACAAG

5201  CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT
      GCTGGGACGG CGAATGGCCT ATGGACAGGC GGAAAGAGGG AAGCCCTTCG CACCGCGAAA GAGTTACGAG TGCGACATCC ATAGAGTCAA GCCACATCCA

5301  CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC
      GCAAGCGAGG TTCGACCCGA CACACGTGCT TGGGGGGCAA GTCGGGCTGG CGACGCGGAA TAGGCCATTG ATAGCAGAAC TCAGGTTGGG CCATTCTGTG

5401  GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
      CTGAATAGCG GTGACCGTCG TCGGTGACCA TTGTCCTAAT CGTCTCGCTC CATACATCCG CCACGATGTC TCAAGAACTT CACCACCGGA TTGATGCCGA

5501  ACACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG
      TGTGATCTTC CTGTCATAAA CCATAGACGC GAGACGACTT CGGTCAATGG AAGCCTTTTT CTCAACCATC GAGAACTAGG CCGTTTGTTT GGTGGCGACC

5601  TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
      ATCGCCACCA AAAAAACAAA CGTTCGTCGT CTAATGCGCG TCTTTTTTTC CTAGAGTTCT TCTAGGAAAC TAGAAAAGAT GCCCCAGACT GCGAGTCACC

5701  AACGAAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA
      TTGCTTTTGA GTGCAATTCC CTAAAACCAG TACTCTAATA GTTTTTCCTA GAAGTGGATC TAGGAAAATT TAATTTTTAC TTCAAAATTT AGTTAGATTT

5801  GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCGT TCATCCATAG TTGCCTGACT
      CATATATACT CATTTGAACC AGACTGTCAA TGGTTACGAA TTAGTCACTC CGTGGATAGA GTCGCTAGAC AGATAAAGCA AGTAGGTATC AACGGACTGA

5901  CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
      GGGGCAGCAC ATCTATTGAT GCTATGCCCT CCCGAATGGT AGACCGGGGT CACGACGTTA CTATGGCGCT CTGGGTGCGA GTGGCCGAGG TCTAAATAGT

                          BglI
6001  GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA
      CGTTATTTGG TCGGTCGGCC TTCCCGGCTC GCGTCTTCAC CAGGACGTTG AAATAGGCGG AGGTAGGTCA GATAATTAAC AACGGCCCTT CGATCTCATT

6101  GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC
      CATCAAGCGG TCAATTATCA AACGCGTTGC AACAACGGTA ACGATGTCCG TAGCACCACA GTGCGAGCAG CAAACCATAC CGAAGTAAGT CGAGGCCAAG

6201  CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG
      GGTTGCTAGT TCCGCTCAAT GTACTAGGGG GTACAACACG TTTTTTCGCC AATCGAGGAA GCCAGGAGGC TAGCAACAGT CTTCATTCAA CCGGCGTCAC

6301  TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT
      AATAGTGAGT ACCAATACCG TCGTGACGTA TTAAGAGAAT GACAGTACGG TAGGCATTCT ACGAAAAGAC ACTGACCACT CATGAGTTGG TTCAGTAAGA

6401  GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
      CTCTTATCAC ATACGCCGCT GGCTCAACGA GAACGGGCCG CAGTTATGCC CTATTATGGC GCGGTGTATC GTCTTGAAAT TTTCACGAGT AGTAACCTTT

6501  ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
      TGCAAGAAGC CCCGCTTTTG AGAGTTCCTA GAATGGCGAC AACTCTAGGT CAAGCTACAT TGGGTGAGCA CGTGGGTTGA CTAGAAGTCG TAGAAAATGA

6601  TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT
      AAGTGGTCGC AAAGACCCAC TCGTTTTTGT CCTTCCGTTT TACGGCGTTT TTTCCCTTAT TCCCGCTGTG CCTTTACAAC TTATGAGTAT GAGAAGGAAA

6701  TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC CGCGCACATT
      AAGTTATAAT AACTTCGTAA ATAGTCCCAA TAACAGAGTA CTCGCCTATG TATAAACTTA CATAAATCTT TTTATTTGTT TATCCCCAAG GCGCGTGTAA

6801  TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTC
      AGGGGCTTTT CACGGTGGAC TGCAG
```

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, R.R., Maiato, H., Earnshaw, W.C. and Carmena. M. (2001). Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kineto-chore disjunction, and chromosome segregation. **Journal of Cell Biology** 153:865–880

Alberts,B.,Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (2007). **Molecular Biology of the Cell 5th Edition**. New York. Garland Science.

Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J.R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. **Developmental Cell** 6: 253–268.

Antoni, L., Sodha, N., Collins, I. and Garrett, M.D. (2007).CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy—two sides of the same coin? **Nature Reviews Cancer** 7: 925–936.

Barr, A. R. and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. **Journal of Cell Science** 120: 2987-2996.

Barr, A.R. and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. **Journal of Cell Science** 120: 2987-2996.

Carmena, M. and Earnshaw., W.C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 4: 842–854.

Carvalho, A., Carmena, M., Sambade, C., Earnshaw, W.C. and Wheatley. S.P. (2003). Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. **Journal of Cell Science** 116: 2987–2998.

Chan, C.S. and Botstein D. (1993). Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. **Genetics** 135: 677-91.

Chen, M. S., Ryan, C. E. and Piwnica-Worms, H. (2003). Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. **Molecular Cell Biology** 23:7488-7497.

Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrassi, F. and Salmon, E. D. (2001). Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. **Journal of Cell Biology** 153: 517-527.

DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A. and Salmon, E.D. (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. **Cell** 127: 969–982.

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. Journal of Cell Biology 161: 267–280.

Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J. P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E. et al. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. **Journal Cell Science** 117: 2523-2531.

Emanuele, M.J., Lan, W., Jwa, M., Miller, S.A., Chan, C.S. and Stukenberg P.T. (2008). Aurora B kinase and protein phosphatase 1 have opposing roles in modulating kinetochore assembly. **Journal of Cell Biology** 181: 241–254.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt T.(1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. **Cell** 33: 389-396.

Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.F. and Earnshaw, W.C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. **Journal of Cell Biology** 166: 179–191.

Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A. and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. **Cell** 81: 95–105.

Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg. E.A. and Inagaki, M. (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. **Nature Cell Biology** 8:180–187.

Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S. X. and Dunphy, W. G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in Xenopus egg extracts. **Genes and Development** 14: 2745-2756.

Gurley L. R., Walters R. A. and Tobey R. A. (1974). CELL CYCLE-SPECIFIC CHANGES IN HISTONE PHOSPHORYLATION ASSOCIATED WITH CELL PROLIFERATION AND CHROMOSOME CONDENSATION**. Journal of Cell Biology** 60: 356–364.

Hagstrom, K.A. and Meyer, B.J. (2003). Condensin and cohesin: More than chromosome compactor and glue. **Nature Reviews Genetics** 4: 520-534.

Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., Meel, J., Rieder, C.L. and Peters. J.M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore- microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. **Journal of Cell Biology** 161: 281–294.

Honda, R., Korner, R. and Nigg, E.G. (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. **Molecular Biology of the Cell** 14: 3325–3341.

Klein, U.R., Nigg, E.A., and Gruneberg. U. (2006). Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary sub-complex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. **Molecular Biology of The Cell** 17(6): 2547–2558.

Kops, G.J., Kim, Y., Weaver, B.A., Mao, Y., McLeod, I., Yates, J.R., Tagaya, M. and Cleveland, D.W. (2005). ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore. **Journal of Cell Biology** 169: 49–60.

Lee, J., Kumagai, A. and Dunphy, W.G.(2001). Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. **Molecular Biology of the** Cell **12**: 551–563.

Lens, S.M., Rodriguez, J.A., Vader, G,. Span, S.W., Giaccone, G. and Medema. R.H. (2006). Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. **Molecular Biology of Cell** 17:1897–1909.

Lens, S.M., Wolthuis, R.M.F., Klompmaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. and Medema, R.H.(2003). Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. **EMBO Journal** 22: 2934–2947.

Lew, D.J. and Kornbluth, S.(1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. **Current Opinion in Cell Biology** 8(6): 795–804.

Lipp, J.J., Hirota, T., Poser, I. and Peters, J-M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes**. Journal of Cell Science** 120: 1245-1255.

Li, Y., Gorbea,C., Mahaffey,D., Rechsteiner , M.and Benezra, R. (1997). MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. **PNAS** 94: 12431-12436.

Lopez-Girona, A., Tanaka, K., Chen, X. B., Baber, B. A., McGowan, C.H. and Russell, P. (2001). Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. **PNAS** 98:11289-11294.

Monier, K., Mouradian, S. and Sullivan, K. F. (2007). DNA methylation promotes Aurora-B-driven phosphorylation of histone H3 in chromosomal subdomains. **Journal of Cell Science** 120: 101–114.

Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E.J., Gillespie, D.A. and Zachos G. (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. **Journal of Cell Biology** 195(3): 449-466.

Pines, J. and Hunter T. (1991). Human Cyclins A and BI Are Differentially Locatedin the Cell and Undergo Cell Cycle-Dependent Nuclear Transport. **The Journal of Cell Biology** 115(1): 1-17

Prigent, C. and Dimitrov, S.(2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? **Journal of Cell Science** 116: 3677-3685.

Ruchaud, S., Carmena, M. and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 8: 798–812.

Schmitt, E., Boutros, R., Froment, C., Monsarrat, B., Ducommun, B. and Dozier C. (2006). CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. **Journal of Cell Science** 119: 4269–4275.

Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L.B., Schneider, T.R., Stukenberg, P.T. and Musacchio. A. (2005). Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. **Molecular Cell** 18:379–391.

Sørensen, C.S., Melixetian, M., Klein, D.K. and Helin, K. (2010). NEK11: linking CHK1 and CDC25A in DNA damage checkpoint signaling.**Cell Cycle** 9: 450-5.

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

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

Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B. and Yu. H. (2001). Mad2-independent inhibition of APC^{Cdc20} by the mitotic checkpoint protein BubR1. **Developmental Cell** 1: 227–237.

Trinkle-Mulcahy, L. and Lamond, A.I. (2006). Mitotic phosphatases: no longer silent partners. **Current Opinion in Cell Biology** 18: 623-63.

Vader, G. and Lens, S. M. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer.**Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on cancer** 1786(1): 60-72.

Vader, G., Medema, R. H. and Lens, S. M. (2006). The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. **Journal of Cell Biology** 173: 833-837.

Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbe, J.C., Castro, A. and Lorca, T. (2004). Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? **Molecular Biology of the Cell** 15: 4584–4596.

Walworth, N. C. and Bernards, R. (1996). Rad-dependent response of the Chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. **Science** 271: 353-356.

Welburn, J.P., Vleugel, M., Liu, D., Yates III, J.R., Lampson, M.A., Fukagawa, T. and Cheeseman I.M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. **Molecular Cell** 38: 383–392.

Wheatley, S.P., Henzing, A.J., Dodson, H., Khaled, W. and Earnshaw. W.C.(2004). Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. **Journal of Biological Chemistry** 279: 5655–5660.

Wolfgang, F., Tseng, B.S., Dormann, D.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki ,H. and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1–chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. **Nature** 438: 1116-1122.

Yasui, Y., Urano, T., Kawajiri, A., Nagata, K., Tatsuka, M., Saya, H., Furukawa, K.,Takahashi, T., Izawa, I. and Inagaki. M. (2004). Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. **Journal of Biological Chemistry** 279: 12997–13003.

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. **Developmental Cell** 12(2): 247-260.

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. **Developmental Cell.**12: 247–260.

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

.