

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΕΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**Εργασία στα πλαίσια της πρακτικής άσκησης του
Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος
Μοριακής Βιολογίας-Βιοϊατρικής**

Θέμα:

**Μεταφορά πυρηνικών πρωτεϊνών
μέσω των μικροσωληνίσκων
της πυρηνικής ατράκτου**

Υπεύθυνος καθηγητής: Π. Θεοδωρόπουλος

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΙΑΛΥΝΑΣ

Την εργασία αυτή την αφιερώνω στην
σε όλους τους συνεργάτες μου
και σε όλους όσους με
αγαπάνε!!!

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας του Τομέα Βασικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, με επιβλέποντες τον καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής κ. Π.Θεοδωρόπουλο και τον καθηγητή Κυτταρικής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής κ. Σ.Γεωργάτο.

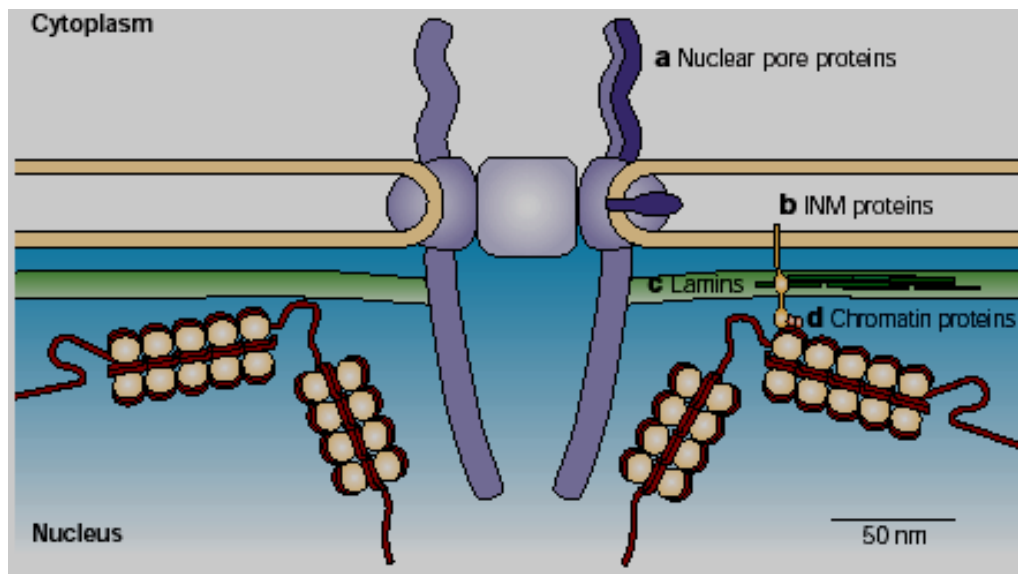
Ευχαριστώ θερμά όλα τα παιδιά στο εργαστήριο(την Νίκη Κουρμούλη, την Χαρά Πολιουδάκη, την Δήμητρα Μακατσώρη, την Αλεξάνδρα Δελλή, την Τώνια Ακουμιανάκη) για βοήθεια που μου προσέφεραν, για τη συνεργασία που είχαμε, και για το ότι με ανέχθηκαν. Ο επίλογος αυτής της εργασίας γράφεται σε άλλη πόλη μακριά από το Ηράκλειο και μου λείπει πολύ το περιβάλλον και οι άνθρωποι του "παλιού" μου πλεον εργαστηρίου. Ευχαριστώ τους δικούς μου, την Μαρία, όλους μου τους φίλους που με στήριξαν.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	2
Περιεχόμενα	3
1. Εισαγωγή	5
1.1 Οργάνωση του πυρηνικού φακέλου	5
1.2 Μικροσωληνίσκοι: Δομή και λειτουργία	6
1.3 Πρωτεΐνες κινητήρες - Δομή και λειτουργία	8
1.4 Η αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου στη μίτωση	10
1.5 Η μορφολογία του NEBD – Ο ρόλος της μιτωτικής ατράκτου	13
1.6 Στόχος της παρούσας μελέτης	15
2. Υλικά και μέθοδοι	16
2.1 Βιοχημικές Μέθοδοι	16
2.1.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου	16
2.1.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών	17
2.1.3 Western Blot	17
2.2 Παρασκευαστικές μέθοδοι	18
2.2.1 Εκχύλιση μεμβρανών με ουρία	18
2.2.2 Παραγωγή GST ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια	19
2.2.3 Παραγωγή πρωτεϊνών συζευγμένων με ουρά ιστιδινών (His tagged)	20
2.2.4 Απομόνωση κυτταρικών κλασμάτων	21
2.2.5 Απομόνωση Τουμπουλίνης	22
2.2.6 Παρασκευή πυρηνικών φακέλων από ηπατοκύτταρα αρουραίου	23
2.2.7 Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας	24
2.2.8 Μετασηματισμός βακτηρίων	24
2.2.9 Ετοιμασία κυττάρων για επιμόλυνση	25
2.2.10 Επιμόλυνση κυτταρικών σειρών	25
2.3 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων και επίδραση φαρμάκων	26
2.3.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	26
2.3.2 Συγχρονισμός κυττάρων	26
2.4 Μορφολογικές μέθοδοι	27
2.4.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός	27
2.4.2 Συνεστιακή μικροσκοπία	28
2.5 Μικροενέσεις	29
3. Αποτελέσματα	32
3.1 Υποκυτταρική κατανομή της διαλυτής β2-τουμπουλίνη	32
3.2 Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών κινητήρων (motor proteins) με τον πυρηνικό φάκελο	36
3.3 In vitro σύστημα μελέτης του ρόλου της β2-τουμπουλίνης και των πρωτεϊνών κινητήρων	38
4. Συζήτηση	40
5. Βιβλιογραφία	42

1.1 Οργάνωση του πυρηνικού φακέλου

Ο πυρήνας των ευκαρυωτικών κυττάρων περιβάλλεται από τον πυρηνικό φάκελο, μια οργανωμένη μεμβρανική δομή. Τα διακριτά μέρη του πυρηνικού φακέλου είναι τα εξής: α) Η έξω πυρηνική μεμβράνη η οποία αποτελεί συνέχεια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και έχει και την ίδια πρωτεϊνική σύσταση με αυτό, β) Η έσω πυρηνική μεμβράνη η οποία έχει την δική της ιδιαίτερη σύσταση, γ) Η μεμβράνη των πυρηνικών πόρων που επίσης έχει ιδιαίτερη πρωτεϊνική σύσταση. Στα παραπάνω μέρη έχει προστεθεί τελευταία η περιφερική ετεροχρωματίνη, η οποία προσφύεται στην έσω πυρηνική μεμβράνη (Burke & Ellenberg, 2002).



Εικόνα 1: Τοπολογία του πυρηνικού φακέλου. Ο πυρηνικός φάκελος αποτελείται από την έσω και την έξω και την έσω πυρηνική μεμβράνη (κίτρινο) που συνδέονται στους πυρηνικούς πόρους (μωβ). Στην έσω πυρηνική μεμβράνη βρίσκονται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που την διασυνδέουν με το υποκείμενο δίκτυο της λάμινας (πράσινο), αλλά και με την περιφερική χρωματίνη.

Ο πυρήνας περικλείει το γενετικό υλικό του κυττάρου και διαχωρίζεται σαφώς μέσω του πυρηνικού φακέλου από το κυτταρόπλασμα. Τα δυο όμως αυτά διαμερίσματα επικοινωνούν συνεχώς μεταξύ τους μέσω των πυρηνικών πόρων. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του πυρήνα επηρεάζονται τόσο από την τρισδιάστατη δομή του γενώματος, όσο και από καρυοσκελετικά στοιχεία (π.χ. πυρηνική λάμινα).

Η συμπύκνωση του γενετικού υλικού σε χρωματίνη είναι απαραίτητη για να "πακεταριστεί" το γένωμα μέσα στα όρια του πυρήνα. Έτσι, η χρωματίνη αντιπροσωπεύει το φυσιολογικό περιβάλλον όλων των γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αλλαγές στην οργάνωση της χρωματίνης είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η χρωματίνη ανάλογα με τον βαθμό συμπύκνωσής της και το πόσο ενεργή είναι μεταγραφικά διακρίνεται σε ευχρωματίνη (ενεργή, λιγότερο συμπυκνωμένη) και ετεροχρωματίνη (ανενεργή, περισσότερο συμπυκνωμένη). Η περιφερική ετεροχρωματίνη βρίσκεται σε στενή χωρική σχέση προς τον πυρηνικό φάκελο (Blobel, 1985, Mathog κ.α. 1984, Paddy κ.α., 1990) και η σύνδεση αυτή φαίνεται να οφείλεται στην άμεση/έμμεση σύνδεσή της με πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης (Ye και Worman, 1996; Polioudaki et al., 2001).

1.2 Μικροσωληνίσκοι: Δομή και λειτουργία

Οι μικροσωληνίσκοι είναι επιμήκεις, σχετικά άκαμπτοι πρωτεϊνικοί σωλήνες. Έχουν διάμετρο περίπου 25nm και σχηματίζονται από υπομονάδες τουμπουλίνης, ένα διμερές που αποτελείται από δυο παρόμοιες σφαιρικές πρωτεΐνες

την α και την β (Dustin, 1984). Κάθε μικροσωληνίσκος αποτελείται από 13 παράλληλα πρωτοϊνίδια (γραμμικές αλυσίδες από μόρια α - και β -τουμπουλίνης που εναλλάσσονται κατά μήκος του πολυμερούς). Κάθε πρωτοϊνίδιο έχει πολικότητα: το ένα άκρο περιέχει β -τουμπουλίνη και ονομάζεται "συν", το άλλο άκρο περιέχει α -τουμπουλίνη και ονομάζεται "πλην". Κατά την συγκρότηση ενός μικροσωληνίσκου διμερή τουμπουλίνης συνδέονται και αποσυνδέονται και στα δυο άκρα του με διαφορετικό ρυθμό και έτσι η κατάσταση του πολυμερούς εναλλάσσεται, μεταξύ αύξησης και συρρίκνωσης, φαινόμενο που καλείται και δυναμική αστάθεια (Mitchison & Kirschner, 1984a,b). Οι α - και β -υπομονάδες της τουμπουλίνης κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (Little and Seehaus, 1988) και απαντώνται σε διαφορετικούς ισότυπους, έξι για την α -τουμπουλίνη και επτά για την β -τουμπουλίνη. Οι διαφορετικοί ισότυποι διαφέρουν σημαντικά στην ικανότητα πολυμερισμού, στη δυναμική, στην αρχιτεκτονική και στην ικανότητα να συνδέονται με άλλους παράγοντες (Banerjee and Luduena, 1992; Banerjee et al., 1992; Panta et al., 1994; Sharma and Luduena, 1994, Schwarz et al., 1998). Οι διαφορετικοί ισότυποι τουμπουλίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και στον τρόπο λειτουργίας του κυττάρου (Hoyle and Raff, 1990; Matthews et al., 1993; Luduena, 1993). Ακόμη, τα μόρια της τουμπουλίνης υφίστανται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως τυροσινυλίωση και από-τυροσινυλίωση (Raybin and Flavin, 1977, Thompson, 1982; Mullins et al., 1994), ακετυλίωση (στην α -τουμπουλίνη) (LeDizet and Piperno, 1987), προσθήκη γλουταμικού, καθώς και φωσφορυλίωση στην β -τουμπουλίνη (Edde et al., 1990). Οι διαφορετικές ισομορφές και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις προσδίδουν επιπλέον ποικιλομορφία και μπορεί να

ρυθμίζουν την δυναμική των μικροσωληνίσκων με ένα επιπλέον τρόπο πέραν της χημικής ισορροπίας. Η ρύθμιση του σταθεροποιητικού καλύμματος (stabilizing cap) στο θετικό άκρο των μικροσωληνίσκων και η αλληλεπίδραση των MAPs (Microtubule Associated Proteins) με τα άκρα και την επιφάνεια των μικροσωληνίσκων είναι άλλοι δυο πιθανοί μηχανισμοί ρύθμισης της δυναμικής αυτών των πολυμερών (Panda D. et al., 1994).

1.3 Πρωτεΐνες κινητήρες - Δομή και λειτουργία

Οι δυο μεγάλες οικογένειες των πρωτεϊνών κινητήρων είναι οι κινεσίνες (kinesins) και οι δυνεΐνες (dyneins), που θεωρούνται υπεύθυνες για όλες τις μικρομετακινήσεις φορτίου κατά μήκος των μικροσωληνίσκων. Το φορτίο μπορεί να είναι μεμβρανοσύνδετα οργανίδια και κυστίδια, καθώς και χρωμοσώματα. Οι κινητήρες της κατηγορίας της δυνεΐνης μετακινούν τον ευατό τους και το φορτίο προς το "πλην" άκρο των μικροσωληνίσκων, ενώ οι κινητήρες της οικογένειας των κινεσινών μετακινούνται προς το "συν" άκρο των μικροσωληνίσκων. Οι πρωτεΐνες κινητήρες αποτελούνται από τρεις δομικές περιοχές: α) Την κεφαλή του μορίου που έχει δράση ATPασης, β) Το μεσαίο τμήμα, που έχει σχήμα ραβδοειδές (coiled coil) και γ) Την ουρά του μορίου που έχει ιδιότητα να προσδένεται σε διάφορες κυτταρικές δομές όπως π.χ. μεμβράνες και χρωμοσώματα. Ειδικότερα, οι δυνεΐνες αποτελούνται από 1-3 βαριές αλυσίδες με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 500KD, και ανήκουν στην υπεροικογένεια των AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) μηχανοενζύμων. Καθεμία περιέχει έξι συνεχόμενα AAA μοτίβα το

ένα δίπλα με το άλλο στην περιοχή της κεφαλής στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, αλλά μόνο το AAA1 μοτίβο υδρολύει ATP (King S. 2000; Asai D. 2001; Neuwald A.F. 1999). Οι ισομορφές των βαριών, μεσαίων και ελαφριών αλυσίδων προσδίδουν μεγάλη ποικιλομορφία στα μόρια της δυνεΐνης και κατά συνέπεια εξειδίκευση για διαφορετικές λειτουργίες, όπως είναι η κίνηση των ινιδίων, των βλεφαρίδων, των μαστιγίων, αλλά και των κυτταρικών οργανιδίων και των χρωμοσωμάτων. Οι κινεσίνες περιέχουν βαριές αλυσίδες. Κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με μια ελαφριά αλυσίδα και το συνολικό σύμπλοκο έχει μάζα 380KD. Η περιοχή της κεφαλής, όπου εντοπίζεται η δράση κινητήρα της πρωτεΐνης, συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους και με ATP, ενώ η περιοχή της ουράς είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με το φορτίο (Mandelkow E. & Johnson K.A., 1998). Η οικογένεια των κινεσινών περιέχει πάνω από 12 μέλη που κύρια διαφέρουν στην περιοχή της ουράς και εμφανίζουν εξειδίκευση στην σύνδεση με συγκεκριμένο οργανίδιο-φορτίο (Moore J.D. et al, 1996). Οι περισσότερες έχουν στην αμινοτελική περιοχή τους τον τομέα του κινητήρα, ενώ σε μερικές ο κινητήρας εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα του μορίου ή στο καρβοξυτελικό τμήμα. Στην τελευταία κατηγορία έχει παρατηρηθεί ότι η κατεύθυνση της κίνησης είναι προς τον "πλην" άκρο των μικροσωληνίσκων (όπως η ncd στον σακχαρομύκητα), αντίθετα με όλα τα υπόλοιπα μέλη που κατευθύνονται προς το "συν" άκρο.

1.4 Η αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου στη μίτωση

Μετά την επιδιόρθωση, την αύξηση και τον διπλασιασμό των κυτταρικών αποθεμάτων, το ευκαρυωτικό κύτταρο θα διαιρεθεί σε δυο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Η διαδικασία της μίτωσης αρχίζει στην πρόφαση, όπου τα χρωμοσώματα (ζεύγη χρωματίδων που συνδέονται στα κεντρομερή) αρχίζουν να συμπυκνώνονται με ταυτόχρονο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Κατά την πρόφαση στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα παρατηρούμε την αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου (NEBD , nuclear envelope breakdown). Η NEBD αφορά την αποσύνδεση και τη διασπορά των κύριων δομικών συστατικών του πυρηνικού φακέλου (Lee et al., 2000), συμπεριλαμβανομένων της πυρηνικής λάμινας (Heald and McKeon, 1990; Peter et al., 1990; Pfaller and Newport, 1995; Ward and Kirschner, 1990; Gerace and Blobel , 1980; Stick et al., 1988), των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων (Macaulay et al., 1995) και των πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης. Η διάσπαση του πυρηνικού φακέλου σηματοδοτεί το τέλος της πρόφασης. Στο σημείο αυτό δομικές πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης και των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων χάνονται από την περιφέρεια του πυρήνα και διασκορπίζονται σε όλο το κύτταρο (Chaudhary and Courvalin, 1993; Ellenberg et al., 1997; Yang et al., 1997). Από το χρονικό αυτό σημείο και έπειτα η μιτωτική άτρακτος διατάσσει τα χρωμοσώματα στον ισημερινό του κυττάρου (μετάφαση) και τα διαχωρίζει (ανάφαση). Στην τελόφαση, ο πυρήνας αρχίζει να επανασχηματίζεται, ενώ παράλληλα διαλύεται η μιτωτική άτρακτος, αποσυμπυκνώνονται οι χρωματίδες και ο πυρηνικός φάκελος επανασυγκροτείται. Τελικά, στην

κυτοκίνηση ο σχηματισμός των θυγατρικών κυττάρων ολοκληρώνεται αφού διαιρεθεί και το κυτταρόπλασμα.

Η αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου αφορά δυο χρονικά και μηχανιστικά διακριτές διαδικασίες : τον αποπολυμερισμό της πυρηνικής λάμινας και τον κατακερματισμό της πυρηνικής μεμβράνης (Newport and Spann, 1987; Peter et al., 1990). Ο ακριβής μηχανισμός του NEBD δεν έχει διαλευκανθεί. Με βάση όμως πρόσφατες παρατηρήσεις δυο μοντέλα επικρατούν στην διεθνή βιβλιογραφία : α) Αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου μέσω μιας διαδικασίας χημικής τροποποίησης (φωσφορυλίωσης), και β) Αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου με μηχανικό τρόπο (διάτρηση/“διάσχιση”) του μέσω των μικροσωληνίσκων της πυρηνικής ατράκτου.

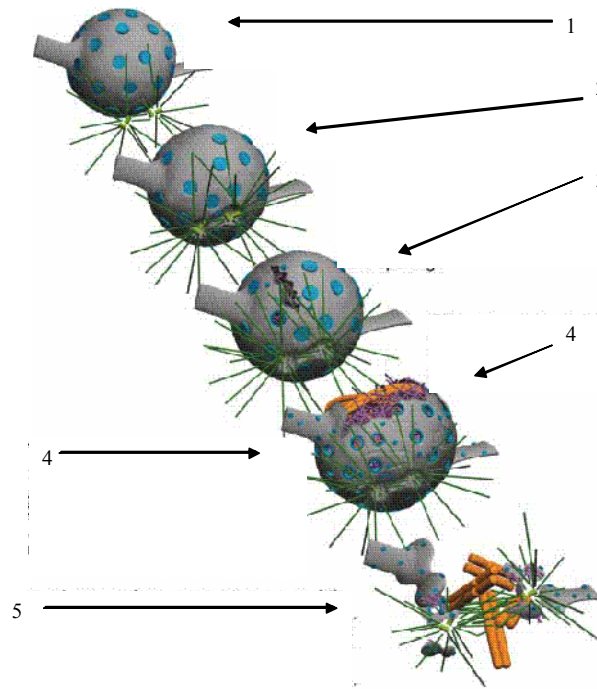
Μια σειρά από βιοχημικά δεδομένα υποστηρίζουν το πρώτο μοντέλο. Παραδείγματος χάριν έχει δειχθεί ότι πολλές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου υφίστανται μιτωτική φωσφορυλίωση από την κινάση p34^{cdc2}. Το γεγονός αυτό φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που είναι απαραίτητες για την ακεραιότητα του πυρήνα και οδηγεί στο διασκορπισμό (ή "κονιορτοποίηση") όλων των κύριων δομικών συστατικών του πυρηνικού φακέλου. Η φωσφορυλίωση των λαμινών οδηγεί στον αποπολυμερισμό (Peter et al., 1990, 1991; Ward and Kirschner, 1990) και στην διάχυσή τους στο μιτωτικό κυτταρόπλασμα (Daigle et al., 2001; Gerace and Blobel, 1980; Stick et al., 1988). Τα συστατικά των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων επίσης έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνονται από την p34^{cdc2} (Favreau et al., 1996; Macaulay et al., 1995) με αποτέλεσμα να οδηγούνται στην απελευθέρωσή τους από τα σύμπλοκα των πόρων (Daigle et al., 2001; Yang et al., 1997; Belgareh et al., 2001). Ακόμη έχει δειχθεί ότι σε μιτωτική

φωσφορυλίωση υπόκεινται και οι πρωτεΐνες της έσω πυρηνικής μεμβράνης (Courvalin et al., 1992; Foisner and Gerace, 1993; Pfaller et al., 1991), αλλά η περαιτέρω τύχη τους δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Το μοντέλο αυτό μέχρι σήμερα δεν έχει πλήρως εδραιωθεί, ενώ τελευταίες μελέτες σε ωκύτταρα αστερία προτείνουν την αποδόμηση του συμπλόκου των πόρων ως το πιθανό ερέθισμα για να αρχίσει ο NEBD (Terasaki et al., 2001).

Το σχήμα και η δομή του πυρηνικού φακέλου επηρεάζονται επίσης από τους μιτωτικούς μικροσωληνίσκους που εκφύονται από τα κεντροσώματα στο μεταβατικό στάδιο της όψιμης G₂/πρώιμης πρόφασης. Έχει δειχθεί με κλασσικές μελέτες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πολύ στενή σύνδεση ανάμεσα στους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου και στον πυρηνικό φάκελο σε κύτταρα HeLa (Paweletz and Lang, 1988; Robbins and Gonatas, 1964) και σε φυτικά κύτταρα (Bajer and Molé-Bayer, 1969). Έχει δειχθεί ακόμη ότι υπάρχουν βαθιές εγκολπώσεις στον πυρηνικό φάκελο στην περιοχή των κεντροσωματίων ακριβώς πριν την κατάρρευσή του (Robbins and Gonatas, 1964). Προσφάτως, η επανεξέταση αυτών των δομών σε κύτταρα θηλαστικών με μεθόδους ανοσοφθορισμού οδήγησε στην πρόταση ότι ο πυρηνικός φάκελος αποδομείται με διάτρηση χάρη στην δράση μικροσωληνίσκων (Georgatos et al., 1997). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι μια πρωτεΐνη κινητήρας των μικροσωληνίσκων που έχει κατεύθυνση προς το μείον άκρο (η κυτταροπλασματική δυνεΐνη) και άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτή και συγκροτούν ένα σύμπλοκο (την δυνακτίνη) πιθανόν να εντοπίζεται στον πυρηνικό φάκελο (Busson et al., 1998; Göncy et al., 1999; Reinsch and Karsenti, 1997).

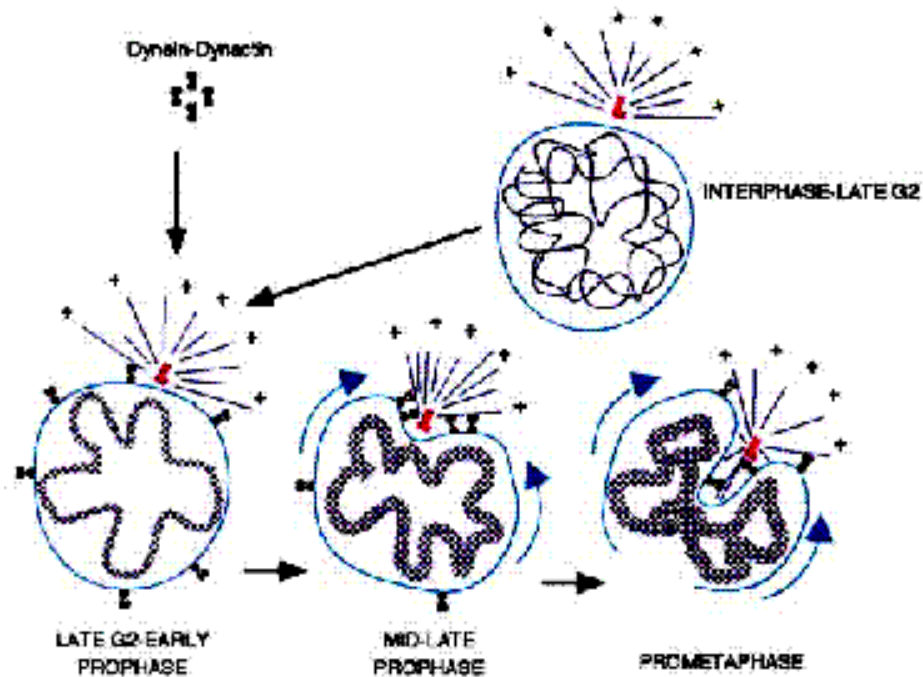
1.5 Η μορφολογία του NEBD – Ο ρόλος της μιτωτικής ατράκτου

Η εντόπιση μικροσωληνίσκων και κεντροσωμάτων σε βαθιές εγκολπώσεις του πυρηνικού φακέλου (Georgatos et al., 1997) δείχνει ότι οι μικροσωληνίσκοι πιέζουν τον πυρηνικό φάκελο (NE) με αποτέλεσμα τη διάρρηξή του. Τελευταίες και πιο αναλυτικές μελέτες επιβεβαιώνουν τον μηχανισμό αυτό με μια αξιοσημείωτη όμως διαφοροποίηση: Η ρήξη του NE δεν συμβαίνει στις εγκολπώσεις αλλά σε άλλα σημεία, όπου συγκεντρώνεται η μέγιστη τάση που προκύπτει από την πίεση που ασκούν οι μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου. Στην δημιουργία της πίεσης στον NE σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η δυνεΐνη. Η πρωτεΐνη-κινητήρας προσδένεται στον πυρηνικό φάκελο και καθώς κινείται κατά μήκος των μικροσωληνίσκων προκαλεί διάταση και τελικά ρήξη του πυρηνικού φακέλου (Beaudouin et al., 2002; Salina et al., 2002). Σχηματικά στις εικόνες 1 & 2 περιγράφονται τα βήματα του μοντέλου για την NEBD.



Εικόνα 1 : Ρόλος των μικροσωληνίσκων στην αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου. (1) Ο πυρήνας, που οριοθετείται από τον ΝΕ (γκρι), περιέχει σύμπλοκα πυρηνικών πόρων (μπλε δίσκοι), και είναι σε συνέχεια με το ενδοπλασματικό δίκτυο (γκρι προβολές). Τα κεντροσώματα που μόλις έχουν διπλασιαστεί είναι προσδεδεμένα στους μικροσωληνίσκους και (πράσινο) και συνδέονται με τον πυρηνικό φάκελο. (2) Κινητήρες δυνεΐνης πάνω στους μικροσωληνίσκους έλκουν τον πυρηνικό φάκελο προς τα κεντροσώματα δημιουργώντας αναδιπλώσεις (3) Τελικά ο πυρηνικός φάκελος διαρρηγνύεται και η λάμινα, τα συμπλόκα των πυρηνικών πόρων και της έσω πυρηνικής μεμβράνης αποδομούνται με την είσοδο κυτταροπλάσματος από το άνοιγμα. (4) Τα κεντροσώματα αρχίζουν να βυθίζονται περαιτέρω και το άνοιγμα μεγαλώνει. Τα χρωμοσώματα (πορτοκαλί), ενώ οι πρωτεΐνες του ΝΕ διαχέονται προς το ενδοπλασματικό δίκτυο. (5) Τα υπολείμματα του πυρηνικού φακέλου γύρω από τα κεντροσώματα συνεχίζουν να διαχέονται προς το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα είναι ελεύθερα να ευθυγραμμιστούν στην μιτωτική άτρακτο που μόλις έχει σχηματιστεί.

Στην παρακάτω εικόνα αναλύεται σχηματικά με μεγαλύτερη λεπτομέρεια ο ρόλος των μικροσωληνίσκων και της δυνεΐνης στην αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου.



Εικόνα 2 : Η δυνεΐνη συνδέεται με τον NE και μετακινούμενη πάνω στους μικροσωληνίσκους έχει ως αποτέλεσμα την συγκέντρωση συστατικών του NE γύρω από τα κεντροσώματα και την δημιουργία εγκολπώσεων. Τελικά η κατάληξη είναι η διάρρηξη του πυρηνικού φακέλου.

1.6 Στόχος της παρούσας μελέτης

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθεί η μεταφορά των πυρηνικών πρωτεϊνών [δομικά συστατικά του πυρηνικού φακέλου, όπως ο υποδοχέας της λαμίνης Β (LBR) της έσω μεμβράνης ή οι LAP (lamin associated polypeptides) πρωτεΐνες (ανασκόπηση Georgatos, 2001) οι πρωτεΐνες ετεροχρωματίνης (HP1, M31, M32)] μέσω των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, αμέσως μετά την αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιοχημικές Μέθοδοι

2.1.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτική πολυακρυλαμιδίου 12.5% (SDS-PAGE), με ασυνεχή συστήματα ρυθμιστικών διαλυμάτων, υπό αναγωγικές συνθήκες (Laemmli, 1970). Τα διαλύματα και τα χημικά τα οποία χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή των πηκτών ήταν: 30% διάλυμα ακρυλαμίδης/bis-ακρυλαμίδης, SDS, Tris-Base, APS (ammonium persulfate) και TEMED (n, n, n', n'-tetramethylethylenodiamine, BIO-RAD) καθώς και γλυκίνη. Οι πρωτεΐνες πριν ηλεκτροφορηθούν διαλύονταν σε διάλυμα Laemmli, το οποίο φτιάχνονταν 4 φορές συγκεντρωμένο σε σχέση με την συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιούνταν. Το διάλυμα Laemmli έχει την εξής σύσταση: 250mM Tris-HCl (pH 7), 9.2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0.2% (βάρος κατ' όγκο) μπλε της βρωμοφαινόλης και 100mM DTT. Κατόπιν οι πρωτεΐνες θερμαίνονταν για 5 λεπτά στους 95⁰ C προκειμένου να αναχθούν. Η ηλεκτροφόρηση γίνονταν σε διάλυμα 192mM γλυκίνη, 25mM Tris base, 0.1% SDS και η διάρκειά της ήταν 3-4 ώρες στα 45mA (και σε σταθερό μέγιστο voltage). Δείκτες μοριακού βάρους (BIORAD) περιείχαν τις εξής πρωτεΐνες: Μυοσίνη (250KDa), β-γαλακτοσιδάση (115KDa), Φωσφορυλάση B (97KDa), αλβουμίνη ορού βοός (69KDa), Ωαλβουμίνη (46KDa), Καρβονική Ανυδράση (30KDa) και Λυσοζύμη (14.3KDa). Η χρώση των πηκτών πολυακρυλαμιδίου έγινε με Coomassie Blue R250. Μετά την ηλεκτροφόρηση, η

πηκτή εμβαπτιζόταν σε διάλυμα χρωστικής (50% μεθανόλη, 12% οξικό οξύ, 38% νερό, 0.1% Coomassie Blue) όπου παρέμενε υπό ανάδευση για ελάχιστο χρονικό διάστημα μιας ώρας. Με το διάλυμα αυτό επιτυγχάνεται χρώση και μονιμοποίηση. Στη συνέχεια, η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνονταν με την τοποθέτηση της πηκτής σε διάλυμα 10% μεθανόλης, 10% όξικού οξέως, 80% νερού.

2.1.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τον καθορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης διαλυμάτων εφαρμόστηκε η χρωματομετρική μέθοδος Bradford χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο της BIORAD. Η αρχή της μεθόδου (Bradford, 1976) στηρίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου των πρωτεϊνών με την χρωστική Coomassie Blue και μετράται η απορρόφηση του φωτός σε μήκος κύματος 595nm από το σύμπλοκο αυτό. Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη ορού βο-ός (BSA, Sigma) και η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται από 1-15mg πρωτεΐνης / ml.

2.1.3 Western Blot

Οι πρωτεΐνες που έπρεπε να ανιχνευθούν με την τεχνική του Western Blot διαχωρίζονταν αρχικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου και κατόπιν μεταφέρονταν από τις πηκτές σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 35V για 3 ώρες. Το ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στο οποίο γίνονταν η μεταφορά περιείχε 192mM γλυκίνη, 25mM Tris base, 0.1% SDS και 20% μεθανόλη. Η νιτροκυτταρίνη επώαστηκε σε διάλυμα έκπλυσης (20mM Tris HCl pH 7.4, 0.9% β/o NaCl και 0.1% Tween 20) για 15 λεπτά και στη συνέχεια όλο το βράδυ σε διάλυμα έκπλυσης που περιείχε 1%

ζελατίνη (blocking buffer) ώστε να αποφευχθεί μη ειδική σύνδεση του αντισώματος. Κατόπιν έγινε επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώσεις 1:500 για το αντι-LBR (πολυκλωνικό), 1:300 για το αντι-LAP2B (πολυκλωνικό), και 1:500 για το αντι-M31. Η επώαση των φίλτρων γίνεται για τουλάχιστον 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί ξέπλυμα των μεμβρανών με blocking buffer για 10 λεπτά επί 4 φορές, ώστε να απομακρυνθεί όλο το μη δεσμευμένο αντίσωμα. Στη συνέχεια έγινε επώαση με τα αντίστοιχα δεύτερα αντισώματα (alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG αραιωμένο 1:5000 και alkaline phosphatase conjugated anti-rat IgG 1:4000). Στη συνέχεια τα φίλτρα ξεπλύθηκαν επανειλημμένα με blocking buffer και με διάλυμα έκπλυσης και επώαστηκε για 5 λεπτά σε διάλυμα αλκαλικού pH (100mM Tris base, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH 9.4. Η εμφάνιση έγινε αφού τα φίλτρα τοποθετούνταν σε μικρό όγκο του παραπάνω διαλύματος στο οποίο προστέθηκαν 0.33mg/ml NBT (4-Nitroblue-Tetrazolium) και 0.165mg/ml BCIP (5-Bromo-4Chloro-Indolylphosphate). Η εμφάνιση σταματούσε όταν τα φίλτρα νιτροκυτταρίνης τοποθετούνταν σε νερό.

2.2 Παρασκευαστικές μέθοδοι

2.2.1 Εκχύλιση μεμβρανών με ουρία

Πυρηνικοί φάκελοι από ηπατοκύτταρα αρουραίων, επανασυστημένοι (reconstituted) πυρηνικοί φάκελοι από ηπατοκύτταρα αρουραίων, μεμβράνες ενδοπλασματικού δικτύου από ηπατοκύτταρα αρουραίων και πυρηνικοί φάκελοι από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας εκχυλίστηκαν με το ακόλουθο διάλυμα ουρίας: 8M ουρία, 10mM Tris-HCl pH7.3, 1mM EDTA, 1mM DTT και 1mM

PMSF. Για να γίνει η εκχύλιση 2mg ιζήματος μεμβρανών επαναδιαλύθηκαν στο παραπάνω διάλυμα, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε κατεργασία με υπέρηχους για 20-30'' σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα δείγματα υπερφυγοκεντρήθηκαν για 1 ώρα στα 40000g σε κεφαλή TLS 55. Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στην απομάκρυνση των περιφερικών πρωτεϊνών της μεμβράνης. Τα ιζήματα είτε παγώνονταν αμέσως μετά την φυγοκέντρωση είτε επαναδιαλύονταν σε απεσταγμένο νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα (PBS ή KHM) για να ξεπλυθεί η ουρία, προσδιορίζονταν η πρωτεϊνική τους συγκέντρωση και επαναφυγοκεντρούνταν για 15' στα 13000g σε φυγόκεντρο Eppendorf. Οι εκχυλισμένες μεμβράνες διατηρούνταν στους -80°C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

2.2.2 Παραγωγή GST ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια

Η παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Smith και Johnson, 1988. Ξεκινώντας από μια βακτηριακή καλλιέργεια BL21 των 40ml αραιώνουμε 1:10 και αφήνουμε να αναπτυχθεί για 1 ώρα στους 37°C . Η επαγωγή της πρωτεϊνικής σύνθεσης έγινε με 0.1mM IPTG, στους 30°C για 3 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 5000 στροφές ανα λεπτό (σ.α.λ.) στους 4°C και τα βακτήρια επαναδιαλύθηκαν σε 6ml MTPBS (PBS στο οποίο προστέθηκε 1mM Triton X-100, 10mM μερκαπτοαιθανόλη, 1.3mM PMSF). Ακολούθησε σύντομη επεξεργασία με υπέρηχους (για 10'' και επι 3 φορές) και φυγοκέντρωση στις 10000 σ.α.λ. για 10 λεπτά. Ακολούθησε συλλογή της υγρής φάσης και επώασή της με 600μl σφαιριδίων GST εξισορροπημένων με MTPBS, για 30 λεπτά στους 4°C . Κατόπιν έγινε έκπλυση των σφαιριδίων με το ίδιο διάλυμα

και ακολούθησε έκλυση της πρωτεΐνης με διάλυμα έκλυσης (10mM ανηγμένης γλουταθειόνης, 50mM Tris-HCl pH 8). Όλες οι πρωτεΐνες πριν χρησιμοποιηθούν υπερφυγοκεντρώνονται στις 14000 σ.α.λ. για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα.

2.2.3 Παραγωγή πρωτεϊνών συζευγμένων με ουρά ιστιδινών (His tagged)

Ξεκινώντας από μια καλλιέργεια βακτηρίων E.coli BL21 των 40ml γίνεται αραιώση 1:10 και αφήνεται να αναπτυχθεί για 1ώρα στους 37 °C. Κατόπιν έγινε επαγωγή της σύνθεσης της πρωτεΐνης με προσθήκη 1mM IPTG για 2 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 5000 σαλ στους 4 °C και τα βακτήρια επαναδιαλύθηκαν σε 4ml διαλύματος λύσης (50mM Tris-HCl pH 7.3, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 10mM μερκαπτοαιθανόλη, 2 μg/ml αναστολείς πρωτεασών, 1.25 mg/ml λυσοζύμη) και επώαστηκαν σε κινούμενη πλατφόρμα για 1 ώρα στους 4 °C. Ακολούθησε διάσπαση των βακτηριακών τοιχωμάτων με υπέρηχους, προσθήκη 1mM Triton X-100, 2mM MgCl₂ και 20 μg/ml DNase I και επώαση σε κινούμενη πλατφόρμα για 15 λεπτά στους 4 °C. Το υλικό φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 10000 σ.α.λ. και συλλέχθηκε η υγρή φάση η οποία αραιώθηκε 1:1 με διάλυμα λύσης που όμως δεν περιείχε μερκαπτοαιθανόλη, λυσοζύμη και EGTA. Στη συνέχεια προστέθηκε 5mM ιμιδαζόλη και το υλικό επώαστηκε σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα επί μια ώρα μαζί με 600ml σφαιριδίων Ni που είχαν προηγουμένως πλυθεί με νερό και εξισορροπηθεί με διάλυμα λύσης στο οποίο είχε προστεθεί 5mM ιμιδαζόλης. Μετά την επώαση τα σφαιρίδια Ni ξεπλύθηκαν με τουλάχιστον 300ml διαλύματος λύσης στο οποίο είχε προστεθεί 20mM ιμιδαζόλη και ακολούθησε έκλυση της πρωτεΐνης με διάλυμα λύσης στο οποίο είχαν προστεθεί 500mM ιμιδαζόλης.

2.2.4 Απομόνωση κυτταρικών κλασμάτων

Για την παρασκευή μιτωτικού κυτταροπλάσματος έγινε συλλογή των κυττάρων μιας συγχρονισμένης καλλιέργειας που αποτελούνταν από περίπου 10 τρυβλία Ishikawa διαμέτρου 10εκ. Τα κύτταρα πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό ώστε να απομακρυνθεί η θρυψίνη και στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37 °C για 45 λεπτά με θρεπτικό μέσο στο οποίο είχε προστεθεί 20μM κυτοχλασίνη B καθώς και το φάρμακο του συγχρονισμού τους (100 ng/ml νοκοδαζόλη ή 10 nM ταξόλη) προκειμένου να διατηρηθεί η μιτωτική κατάσταση. Ακολούθησε πλύσιμο των κυττάρων δυο φορές με κρύο διάλυμα PBS και μια φορά με κρύο διάλυμα KHM (78mM KCl, 50mM HEPES-KOH, 4mM MgCl₂, 10mM EGTA, 1mM DTT, 20μM κυτοχλασίνη B, 1mM PMSF). Στη συνέχεια αραιώθηκαν με διάλυμα KHM σε αναλογία όγκων 1/1 αντίστοιχα και ομογενοποιήθηκαν με γυάλινο ομογενοποιητή Dounce (300 περίπου χτυπήματα) στους 0 °C. Στο ομογενοποίημα προστέθηκε 1mM ATP και αναγεννητικό σύστημα του ATP που αποτελείται από 20mM φωσφορικό άλας της κρεατίνης και 400μg/ml κινάση της κρεατίνης, αναστολείς της δράσης φωσφατασών (5mM NaF, 1μM μικροκυστίνη, 80mM φωσφορικού άλατος της β-γλυκερόλης) καθώς και 2μg/ml αναστολείς πρωτεασών (απρονιτίνη, λευπεπτίνη, πεπστατίνη, αντιπαΐνη). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε για μια ώρα στα 100000g σε κεφαλή TLS 55 και στη συνέχεια έγινε συλλογή της υγρής φάσης η οποία συνιστά το διαλυτό κυτταρόπλασμα εμπλουτισμένο με μιτωτικούς παράγοντες. Για την παρασκευή μεσοφασικού κυτταροπλάσματος χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα μιας καλλιέργειας που βρίσκονταν σε 70% περίπου πληρότητα και ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία μόνο που αυτή τη φορά δεν έγινε πρό-

σθεση φαρμάκων συγχρονισμού καθώς και αναστολέων των φωσφατασών στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2.5 Απομόνωση Τουμπουλίνης από εγκέφαλο ποντικού

Για την απομόνωση τουμπουλίνης θανατώθηκαν 15 ποντίκια. Κατόπιν λαμβάνεται ο εγκέφαλος από κάθε ποντίκι αφού αφαιρεθούν προσεκτικά οι μήνιγγες που τον περιβάλλουν. Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνει όσο το δυνατόν πιο γρήγορα και διατηρώντας τους εγκεφάλους παγωμένους στους 0 °C. Στη συνέχεια ξεπλένονται οι εγκέφαλοι με διάλυμα ομογενοποίησης. Το διάλυμα ομογενοποίησης περιέχει τα εξής: 300ml διάλυμα PM, pH=6.9(100mM PIPES, 2mM MgSO₄, 1mM EGTA), 52.3mg PMSF(1mM τελική συγκέντρωση), 3gr λευπεπτίνη (10mg/ml τελική συγκέντρωση ή 1μl/ml), 300μg πεπστατίνη A (1μg/ml τελική συγκέντρωση), 3mg N-α-π-τοσυλ-L-αργινομεθυλεστερα (TAME, 10μg/ml τελική συγκέντρωση). Μετά από καλή ανάδευση το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται αμέσως για να είναι φρέσκο. Προστίθενται 0.5ml διαλύματος ομογενοποίησης για κάθε γραμμάριο ιστού. Ο ιστός ομογενοποιείται μέχρι το ομογενοποίημα να πάρει ένα ελαφρό ροζ χρώμα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 35000 σ.α.λ. στους 4 °C για μια ώρα στην υπερφυγόκεντρο Beckman (κεφαλή 70.1 Ti). Λαμβάνεται το υπερκείμενο και προστίθενται σε αυτό ίσος όγκος διαλύματος PMG pH=6.9 (80mM PIPES, 2mM MgSO₄, 1mM EGTA, 60% glycerol v/v)-0.2mM GTP. Επιάζεται στους 37 °C για 45 λεπτά σε υδατόλουτρο. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 45 λεπτά στις 35000 σαλ στους 25 °C. Διατηρείται η πελλέτα στον πάγο και επαναδιαλύεται σε ένα όγκο διαλύματος PM που περιέχει 0.2mM GTP ίσο με το 1/5 του όγκου του ομογενοποιήματος. Εφόσον δεν είναι δυνατή η επαναδιάλυση χρησιμοποιείται γι' αυτό το σκοπό

ομογενοποιητής Dounce (5-10 χτυπήματα). Για 30 λεπτά επωάζουμε στον πάγο, αναδεύοντας ελαφρά κάθε 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 100000g (35000 σ.α.λ.) για 45 λεπτά στους 4 °C στην κεφαλή 70.1 Ti. Στο υπερκείμενο προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος PMG-GTP 0.2mM και επωάζουμε για 45 λεπτά στους 37 °C σε υδατόλουτρο. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 35000 σ.α.λ. για 45 λεπτά στους 25 °C. Διατηρούμε την πελλέτα την οποία και αποθηκεύουμε στους -80 °C.

2.2.6 Παρασκευή πυρηνικών φακέλων από ηπατοκύτταρα αρουραίου.

Χρησιμοποιήθηκε το συκώτι από 10-15 αρουραίους, το οποίο αφού πλύθηκε με PBS τεμαχίστηκε με νυστέρι σε πολύ μικρά κομμάτια. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν στους 4 °C. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διπλάσιο όγκο διαλύματος ομογενοποίησης (0.25M σακχαρόζη, 12.5mM KCl, 50mM Tris-HCl pH=7.5, 5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 1mM PMSF, 2μg/ml αναστολείς πρωτεασών) και ομογενοποιήθηκαν 15 φορές στις 1700 σαλ. Το ομογενοποίημα φιλτραρίστηκε μέσα από μεταλλική σίτα και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 2500 σαλ σε κεφαλή SS34. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα ομογενοποίησης και ομογενοποιήθηκε 5 φορές. Στη συνέχεια συμπληρώθηκε ο όγκος με το ίδιο ως τα 60ml και προστέθηκαν 120ml από το ίδιο διάλυμα αλλά με υψηλής συγκέντρωσης σακχαρόζη (2.3M). Το μείγμα τοποθετήθηκε πάνω από ένα στρώμα 5ml πυκνού διαλύματος και φυγοκεντρήθηκε σε κεφαλή SW28 στις 25000 σ.α.λ., στους 4 °C. Το ίζημα που αντιστοιχεί σε πυρήνες επαναδιαλύθηκε σε 10ml του αρχικού διαλύματος και φυγοκεντρήθηκε σε κεφαλή SS34 για 15 λεπτά στις 2500 σ.α.λ.. Οι πυρήνες

διαλύθηκαν σε 5ml διαλύματος 0.1mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 2μg/ml αναστολείς πρωτεασών και προστέθηκαν 15ml διαλύματος: 10% σακχαρόζη, 20mM Tris-HCl pH=8.5, 0.1mM DTT, PMSF, 0.2μg/ml αναστολείς πρωτεασών και στη συνέχεια 500μl διαλύματος DNAσης I (2mg/ml DNAση I σε PBS). Ακολούθησε επώαση 15 λεπτών σε κινούμενη πλατφόρμα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά φυγοκέντρηση για 15 σε κεφαλή SS34, στις 45000 σαλ, 4 °C. Τα τρία τελευταία στάδια επαναλήφθηκαν με διάλυμα ίδιας σύστασης, αλλά pH=7.5 και μετά τη φυγοκέντρηση το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 10ml διαλύματος 2M KCl, 20mM Tris-HCl pH=7.5, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 2μg/ml αναστολείς πρωτεασών. Μετά από αυτό το στάδιο ακολούθησε φυγοκέντρηση στον SS34, στις 10000 σ.α.λ., στους 4 °C, για 45 λεπτά. Οι πυρηνικοί φάκελοι πλύθηκαν με παγωμένο νερό, και διατηρήθηκαν στους -80 °C.

2.2.7 Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.

Η απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας έγινε με τη χρήση κολώνων QIAGEN και σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρείας.

2.2.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού “σοκ”.

- Τοποθετούμε 100λ βακτηρίων σε σωλήνα των 15ml
- Προσθήκη 0,5 καθαρού πλασμιδίου ή 10λ αντίδραση συγκόλλησης
- Τοποθέτηση στον πάγο για 30 λεπτά
- Θέρμανση στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα
- Τοποθέτηση για 2 λεπτά σε πάγο
- Προσθήκη 900λ LB

- Επώαση για 1 ώρα στους 37 °C στις 225 στροφές
Απλώμα σε πιάτο LB+Amp και επώαση στους 37 °C όλη νύχτα

2.2.9 Ετοιμασία κυττάρων για επιμόλυνση.

Κύτταρα HeLa

Αφαίρεση θρεπτικού από τη φλάσκα

Πλύσιμο με 2ml τρυψίνη

Αφαίρεση τρυψίνης

Προσθήκη 2ml τρυψίνη και επώαση στους 37°C για 5 λεπτά

Προσθήκη 2ml θρεπτικού 10% και μεταφορά σε σωλήνα των 15ml

Σπάσιμο συσσωματωμάτων

Αραίωση μέχρι τα 12ml με θρεπτικό 10%

Μέτρηση κυττάρων

Αραίωση κυττάρων σε 10^6 κύτταρα/ml με θρεπτικό 10%

Προσθήκη 5×10^5 κύτταρα/πηγάδι

Προσθήκη 2,5ml κυττάρων σε φλάσκα

2.2.10 Επιμόλυνση κυτταρικών σειρών.

Όλες οι κυτταρικές σειρές επιμολύνθηκαν με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου. Τα COS-7 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πιάτα 6-well με πυκνότητα 5×10^5 κύτταρα ανά πηγάδι. Τα μίγματα του DNA προστέθηκαν σε ίσο όγκο διαλύματος 2xHBS.

Σύνθεση διαλύματος 2xHBS.

274mM NaCl

10mM KCl

1,5mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

12mM dextrose

42mM HEPES

ρύθμιση του pH στο $7,1 \pm 0,1$

2.3 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων και επίδραση φαρμάκων

2.3.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Ishikawa (προερχόμενα από επιθήλιο του ανθρώπινου ενδομητρίου), ανθρώπινα HeLa (προερχόμενα από ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας), C127I (προερχόμενα από επιθηλιακά κύτταρα ποντικού), MSF (ινοβλάστες επιθηλίου ποντικού). Όλα τα κύτταρα καλλιεργούνται στους 37°C και σε 5% CO_2 . Για την καλλιέργεια των κυττάρων Ishikawa χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό MEM, ενώ για τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM. Και στις δυο περιπτώσεις τα θρεπτικά υλικά συμπληρώνονταν με 10% FCS, 2mM γλουταμίνη και αντιβιοτικά πενικιλίνη (100U/ml), στρεπτομυκίνη (100μg/ml). Η αραίωση γίνονταν με επώαση των κυττάρων με διάλυμα τρυψίνης/EDTA για 2-3 λεπτά στους 37°C . Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε δισκία της εταιρίας NUNC.

2.3.2 Συγχρονισμός κυττάρων

Ο συγχρονισμός των κυττάρων έγινε σύμφωνα με τροποποιημένα πρωτόκολλα των Zieve κ.α., 1980 και Nakagawa κ.α., 1989. Για τον συγχρονισμό κυττάρων χρησιμοποιούνταν δισκία στα οποία τα κύτταρα ήταν πυκνά διατεταγμένα. Για παραγωγή μιτωτικών κυττάρων γίνεται απλός συγχρονισμός με νοκο-

δαζόλη. Αφού η καλλιέργεια αφηθεί να φθάσει σε πληρότητα περίπου 70% στο δισκίο τοποθετούνταν νοκοδαζόλη μαζί με το θρεπτικό υλικό στα δισκία σε τελική συγκέντρωση 100ng/ml για 18-20 ώρες πριν την συλλογή των μυωτικών κυττάρων. Τα κύτταρα που είχαν συγχρονισθεί με αυτό τον τρόπο ήταν σταματημένα στην προμετάφαση.

2.4 Μορφολογικές μέθοδοι

2.4.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η εκάστοτε κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται καλλιεργείται για 48 ώρες σε καλυπτρίδες. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και γίνεται έκλυση με PBS και μονιμοποίηση σε διάλυμα φορμαλδεΰδης σε PBS για 10 λεπτά. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα γλυκίνης 20mM σε PBS, επι 5 λεπτά, ώστε να απενεργοποιηθεί η φορμαλδεΰδη. Στη συνέχεια προκειμένου να διανοιχτούν οπές στις μεμβρανικές δομές ώστε να γίνει δυνατή η είσοδος του αντισώματος στο κύτταρο αλλά και να αποφευχθεί η δέσμευσης του αντισώματος σε μη ειδικές θέσεις, τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά με διάλυμα (blocking buffer) το οποίο περιέχει τα εξής : PBS 1x, 0.2% Triton X-100, 0.5% ζελατίνη επιδερμίδας ψαριού και 2mM MgCl₂. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα με το πρωτογενές αντίσωμα. Η επώαση γίνεται τοποθετώντας πάνω στην καλυπτρίδα και στο κέντρο αυτής μια σταγόνα αντισώματος των 55-60μl και σε ξεχωριστή για το κάθε αντίσωμα συγκέντρωση (η οποία γίνεται μέσα σε blocking buffer). Κατόπιν τα δείγματα επωά-

ζονται με blocking buffer για 5 λεπτά επί 3 φορές ώστε να απομακρυνθεί το πρωτογενές αντίσωμα που δεν έχει συνδεθεί ειδικά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με φθορίζουσες χρωστικές όπως FITC ή Rhodamine και αντιδρά με IgG αρουραίου ή κουνελιού ανάλογα με την προέλευση του πρώτου αντισώματος (μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίστοιχα). Μετά την έκπλυση της περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος, όπως και προηγουμένως και επιπλέον ακολουθεί έκπλυση με PBS. Στη συνέχεια γίνεται χρώση των πυρήνων των κυττάρων με κατάλληλη χρωστική ουσία είτε DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) είτε PI (Propidium Iodide) ανάλογα με το αν έχει γίνει απλός ή διπλός φθορισμός και ποια φθορίζουσα χρωστική είναι συνδεδεμένη στο δευτερογενές αντίσωμα.

2.4.2 Συνεστιακή μικροσκοπία

Το συνεστιακό μικροσκόπιο είναι ένα όργανο υψηλής ανάλυσης και ακρίβειας. Αποτελείται από τρία μέρη: α) Ένα μικροσκόπιο φθορισμού, β) Μια πηγή λέιζερ, γ) Ένας προσωπικός υπολογιστής με ένα πακέτο προγραμμάτων τα οποία χρησιμεύουν στην επεξεργασία των εικόνων καθώς και για πολλούς άλλους χειρισμούς. Όσον αφορά την τεχνική ανάλυση του μικροσκοπίου φθορισμού αποτελείται από 4 φακούς με διαφορετική μεγέθυνση ο καθένας. Οι φακοί έχουν τα εξής χαρακτηριστικά: 1) Ο φακός με την μεγέθυνση 63x έχει αριθμητικό άνοιγμα 1.32 και είναι καταδυτικός, 2) Ο φακός με την μεγέθυνση 40x έχει αριθμητικό άνοιγμα 1.00 και είναι καταδυτικός, 3) Ο φακός με την μεγέθυνση 20x έχει αριθμητικό άνοιγμα 0.70, 4) Ο φακός με την

μεγέθυνση 10x έχει αριθμητικό άνοιγμα 0.40. Το μοντέλο του μικροσκοπίου είναι το TCS NT από την εταιρία Leica Optics, Germany.

Η πηγή του λέιζερ είναι ακτίνα Ar/Kr (αργού/κρυπτού) και επιτρέπει την λήψη οπτικών πάχους της τάξης του δεκάτου των μικρομέτρων. Μια καλή μέση λύση για την λήψη λεπτών οπτικών τομών χωρίς να είναι πάρα πολύ λεπτές και άρα και πάρα πολλές είναι τομές πάχους 0.3-0.4μm. Η συγκεκριμένη πηγή λέιζερ επιτρέπει την λήψη φωτογραφιών στα μήκη κύματος της πράσινης μονοχρωματικής ακτινοβολίας (FITC), καθώς και της κόκκινης (TRITC, Texas Red, Rhodamine).

Το πακέτο προγραμμάτων στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το μικροσκόπιο δίνει καταρχήν την δυνατότητα να αποθηκεύονται σε λογισμική μορφή οι εικόνες. Εκτός όμως από την αποθήκευση το λογισμικό αυτό προσφέρει την δυνατότητα περαιτέρω ανάλυσης των εικόνων. Επί παραδείγματι μπορεί να γίνει τρισδιάστατη ανάλυση και επεξεργασία εικόνας, μέτρηση έντασης φθορισμού στο σύνολο μιας εικόνας ή σε συγκεκριμένα σημεία που επιλέγει ο χρήστης καθώς και πολλές άλλες δυνατότητες.

2.5 Μικροενέσεις

Η τεχνική των μικροενέσεων αποσκοπεί στην εισαγωγή ξένων μορίων στο εσωτερικό ενός κυττάρου. Τέτοιες ουσίες όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, ή φάρμακα μπορούν να ενεθούν κατευθείαν στον πυρήνα του κυττάρου ή στο κυτταρόπλασμα μοναδίων κυττάρων μέσω ενός σωληνίσκου μικροεγχύσεων το οποίο έχει υποστεί κατάλληλη επεξεργασία ώστε η μια του άκρη να έχει πολύ μικρό άνοιγμα. Το άνοιγμα του σωληνίσκου μικροεγχύσεων πρέπει να

είναι τέτοιο που να δημιουργεί την μικρότερη δυνατή ζημιά στην μεμβράνη του κυττάρου. Η ζημιά αυτή χάρη στην πλαστικότητα της μεμβράνης αποκαθίσταται πλήρως όταν δεν είναι πολύ μεγάλη, ενώ όταν το σωληνίσκος μικροεγχύσεων ανοίξει σε μεγάλο βαθμό την κυτταρική μεμβράνη τότε η ζημιά δεν διορθώνεται και το κύτταρο δεν επιβιώνει.

Για να γίνουν οι μικροενέσεις χρειάζεται ένα ανάστροφο μικροσκόπιο με το

Για να γίνουν οι μικροενέσεις χρειάζεται ένα ανάστροφο μικροσκόπιο με το οποίο να γίνονται ορατά τα κύτταρα όταν αυτά βρίσκονται μέσα στο τρυβλίο.

Εκτός από το μικροσκόπιο απαραίτητα είναι τρεις ακόμη συσκευές: α) Μια συσκευή με την οποία θα φτιάχνονται οι σωληνίσκοι μικροεγχύσεων, β) Μια συσκευή με την οποία θα δημιουργούνται οι κατάλληλες πιέσεις κατά την χρονική στιγμή της μικροένεσης, πριν από αυτήν αλλά και μετά, γ) Μια συσκευή η οποία θα μετακινεί τον σωληνίσκο μικροεγχύσεων στις τρεις διαστάσεις του χώρου.

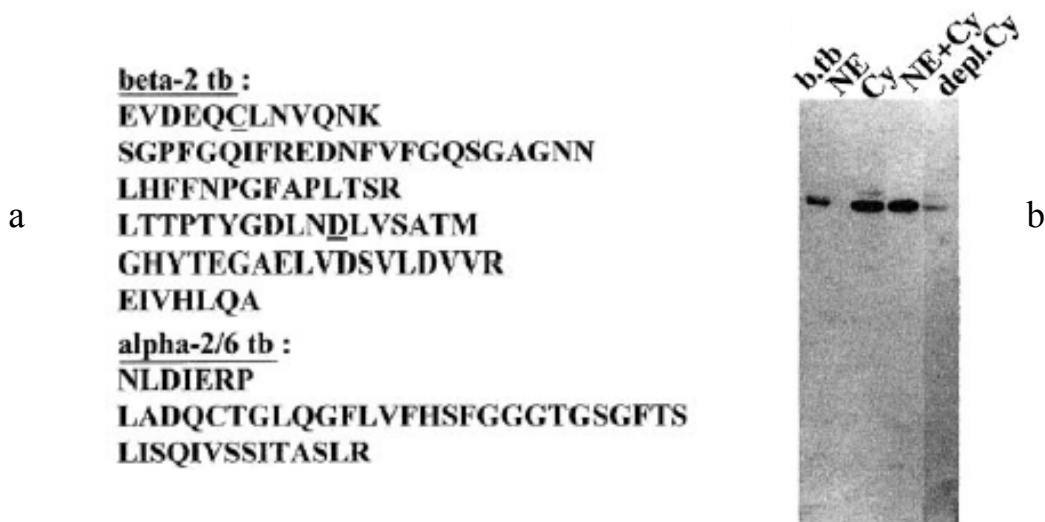
Η συσκευή με την οποία θα φτιάχνονται οι σωληνίσκοι μικροεγχύσεων είναι η PN-30 Microelectrode Puller της Narishige Group. Η αρχή λειτουργίας αυτής της συσκευής είναι ότι ένα γυάλινο τριχοειδές τοποθετείται στο κέντρο ενός μεταλλικού ελάσματος σχήματος Ω. Από το μεταλλικό αυτό έλασμα, του οποίου η θέση είναι στο μεσο του τριχοειδούς περνάει ρεύμα με αποτέλεσμα να θερμαίνεται και έτσι το γυαλί από το οποίο είναι φτιαγμένο το τριχοειδές να είναι πιο εύκαμπτο. Στις δυο άκρες του το τριχοειδές είναι σταθεροποιημένο και κατά τη διάρκεια που θερμαίνεται επενεργεί μια πρώτη δύναμη μέσω ενός μαγνητικού πεδίου με αποτέλεσμα να ελαττώνεται πάρα πολύ η διατομή του τριχοειδούς. Σε αυτή την πρώτη δύναμη επενεργεί και μια δεύτερη η οποία προστίθενται στην πρώτη με αποτέλεσμα η διατομή του τριχοειδούς

από μικρή που ήταν να γίνει πάρα πολύ μικρή, τέτοια που να 'τρυπάει' ένα κύτταρο αφήνοντάς του άνοιγμα που να μπορεί να το κλείσει σε μικρό χρονικό διάστημα. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι από ένα τριχοειδές να παραχθούν δυο λειτουργικοί σωληνίσκοι μικροεγχύσεων.

3. Αποτελέσματα

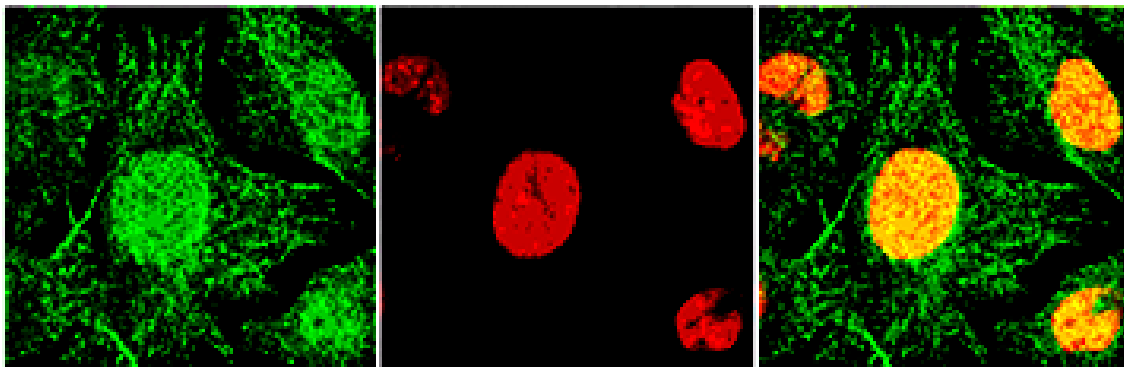
3.1 Υποκυτταρική κατανομή της διαλυτής β2-τουμπουλίνης

Η έσω πυρηνική μεμβράνη περιέχει ποικιλία πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να δημιουργήσουν μια πλειάδα αλληλεπιδράσεων με πυρηνοπλασματικά στοιχεία. Η μόναδική περίπτωση που η έσω πυρηνική μεμβράνη αλληλεπιδρά με στοιχεία του κυτταροπλάσματος είναι κατά την μίτωση, όπου κυστίδια του πυρηνικού φακέλου μεταφέρονται στους πόλους του κυττάρου μέσω της πυρηνικής ατράκτου. Για να ελέγξουμε την πιθανότητα σύνδεσης της τουμπουλίνης (μονομερές των μικροσωληνίσκων) ή άλλων παραγόντων με την έσω πλευρά του πυρηνικού φακέλου επώασαμε μιτωτικό και μεσοφασικό κυτταρόπλασμα με πυρηνικούς φακέλους, όπου παρατηρήσαμε ότι συνδέεται μια πρωτεΐνη με μάζα 55KD, η οποία ταυτοποιήθηκε ως μια α2/6-β2-τουμπουλίνη και συνδέεται ειδικά στις πυρηνικές μεμβράνες.



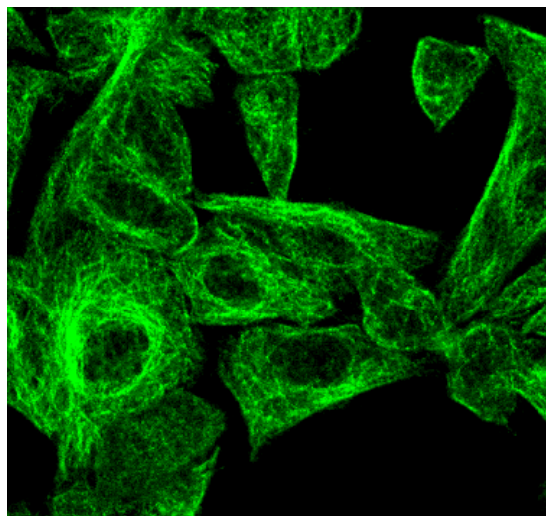
Εικόνα 1: α) Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης 55-KD. Τα πεπτίδια ταιριάζουν απόλυτα με την ανθρώπινη β2- και την ανθρώπινη ή ποντική α2/6-τουμπουλίνη, ενώ υπάρχουν διαφορές σε δυο πεπτίδια (κυστεΐνη αντί μεθειονίνη και ασπαραγίνη αντί ιστιδίνη) οι οποίες υπογραμμίζονται. β) Σύνδεση της διαλυτής τουμπουλίνης στους πυρηνικούς φακέλους (ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και αποτύπωση κατά western, με αντίσωμα για την τουμπουλίνη), b.tb.: τουμπουλίνη από εγκέφαλο ποντικού, NE: πυρηνικοί φάκελοι από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας, Cy: ολικό κυτταρόπλασμα, NE+Cy: πυρηνικοί φάκελοι μετά από επώαση με κυτταρόπλασμα, depl.cyt.: υλικό που παραμένει στο υπερκείμενο μετά από την επώαση με τους πυρηνικούς φακέλους

Για να διερευνηθεί αν ο δομικός και λειτουργικός ρόλος της $\beta 2$ -τουμπουλίνης διαφέρει σημαντικά από τις άλλες ισομορφές αρχικά μελετήθηκε η υποκυτταρική κατανομή της σε μεσοφασικά κύτταρα καθώς και διάφορα στάδια της μίτωσης με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Κατά τη μεσόφαση, η $\beta 2$ -τουμπουλίνη εντοπίζεται εν μέρει στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στον πυρήνα, δηλαδή δεν ακολουθεί το κλασσικό πρότυπο των μικροσωληνίσκων.



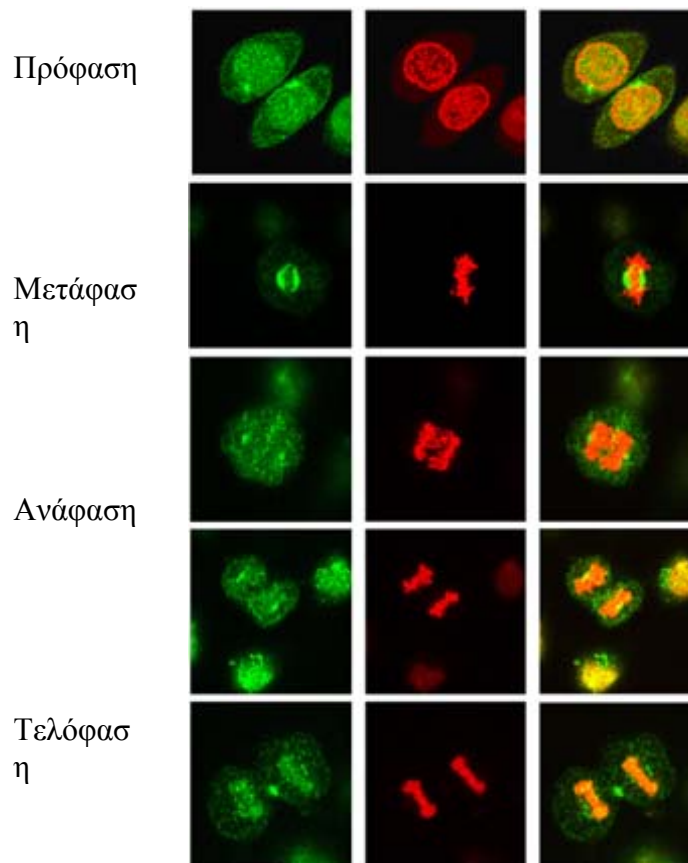
Εικόνα 2: Κατανομή της $\beta 2$ -τουμπουλίνης σε κύτταρα HeLa (που βρίσκονται στην μεσόφαση). Διπλή χρώση με αντίσωμα για την $\beta 2$ -τουμπουλίνη (πράσινο) και ιωδιούχο προπίδιο (κόκκινο). Οι εικόνες αναπαριστούν οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου στο ισημερινό επίπεδο για κάθε κύτταρο

Αντιθέτως, μια άλλη ισομορφή η $\beta 4$ -τουμπουλίνη, που ελέγχθηκε στις ίδιες συνθήκες παρουσιάζει αποκλειστικά κυτταροπλασματική εντόπιση, ακολουθώντας το κλασσικό πρότυπο.



Εικόνα 3: Κατανομή της $\beta 4$ -τουμπουλίνης σε κύτταρα HeLa (που βρίσκονται στην μεσόφαση). Χρώση με το αντίσωμα για την $\beta 4$ -τουμπουλίνη (πράσινο). Οι εικόνες αναπαριστούν οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου στο ισημερινό επίπεδο για κάθε κύτταρο

Κατά τη διάρκεια της μίτωσης το πρότυπο φθορισμού της $\beta 2$ -τουμπουλίνης ακολουθεί το πρότυπο των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου.

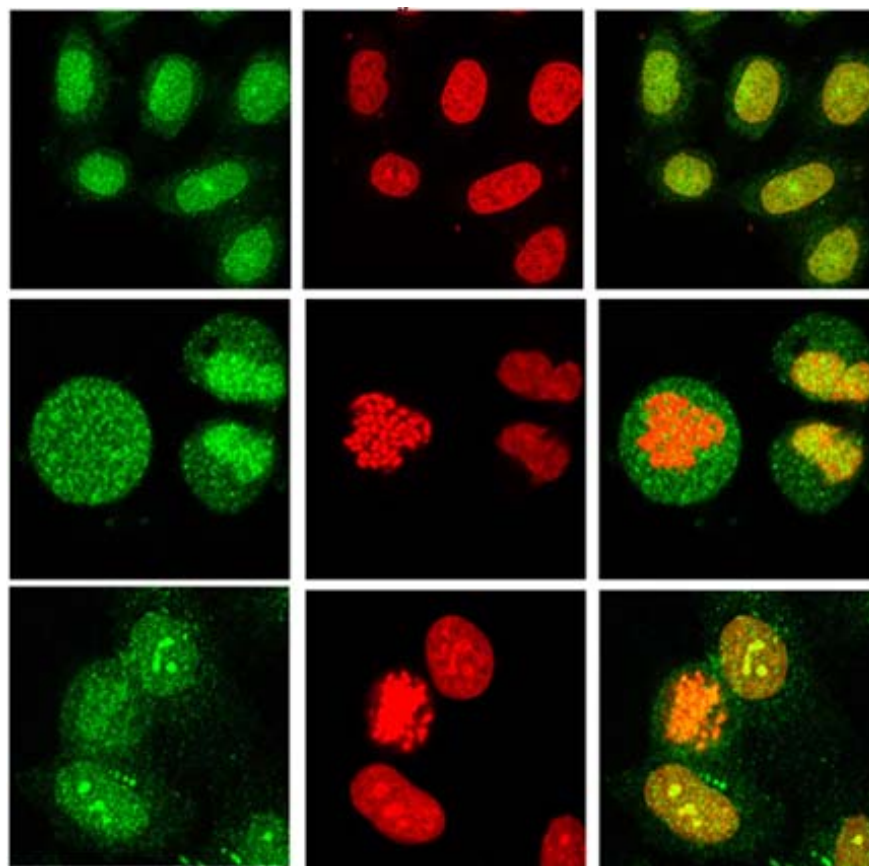


Εικόνα 4: Η κατανομή της $\beta 2$ -τουμπουλίνης κατά την μίτωση. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα HeLa. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την β -τουμπουλίνη (FITC), η χρώση του πυρήνα έγινε με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Οι εικόνες αναπαριστούν οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου στο ισημερινό επίπεδο για κάθε κύτταρο

Αυτή η κατανομή καταδεικνύει ότι η συγκεκριμένη ισομορφή στρατολογείται στην μιτωτική άτρακτο και συμμετέχει στην διαίρεση των χρωμοσωμάτων και των υπολοίπων συστατικών του κυττάρου.

Το εύρημα ότι η $\beta 2$ -τουμπουλίνη στρατολογείται στην μιτωτική άτρακτο και ότι η σύνδεση αυτή είναι ειδική μπορεί να επιβεβαιωθεί αν αποσταθεροποιήσουμε την μιτωτική άτρακτο και παρατηρήσουμε την κατανομή της $\beta 2$ -τουμπουλίνης. Αυτό επιτυγχάνεται όταν επεξεργαστούμε τα κύτταρα με νοκοδαζόλη. Το πρότυπο της $\beta 2$ -

τουμπουλίνης με έμμεσο ανοσοφθορισμό κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι πλέον διάχυτο στο πυρηνόπλασμα των προφασικών κυττάρων απουσία της μιτωτικής ατράκτου.



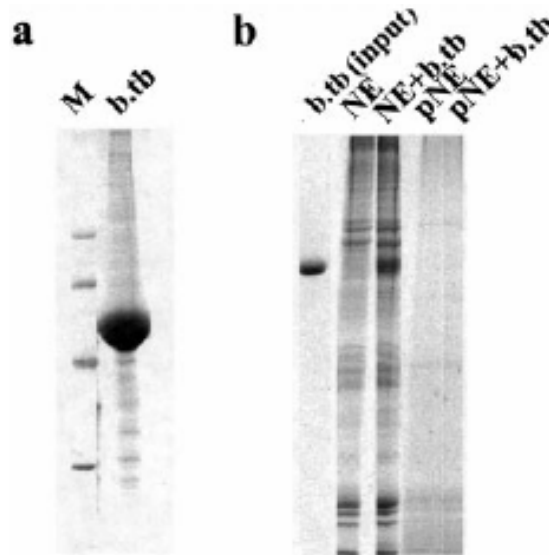
Εικόνα 5: Η κατανομή της $\beta 2$ -τουμπουλίνης κατά την μίτωση μετά από επεξεργασία με νοκοδαζόλη. Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα HeLa. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την $\beta 2$ -τουμπουλίνη (FITC), η χρώση του πυρήνα έγινε με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Οι εικόνες αναπαριστούν οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου στο ισημερινό επίπεδο για κάθε κύτταρο

3.2 Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών κινητήρων (motor proteins)

με τον πυρηνικό φάκελο

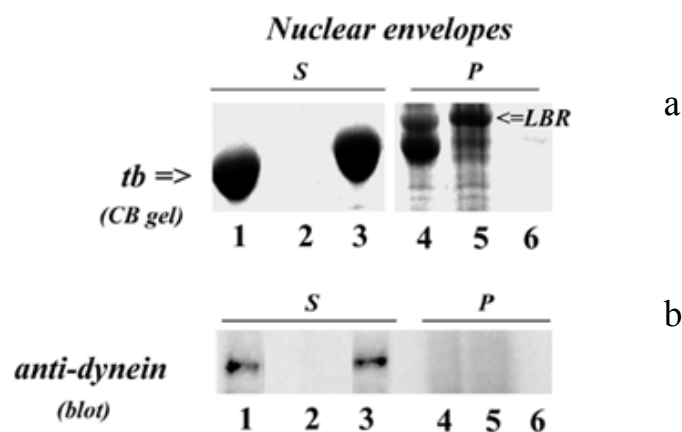
Οι πρωτεΐνες κινητήρες χρησιμοποιούν την ενέργεια του ATP για να μετακινούνται στους μικροσωληνίσκους μεταφέροντας κάποιο φορτίο από ένα σημείο του κυττάρου σε ένα άλλο. Πρόσφατα δείχθηκε ότι η δυνεΐνη (μια πρωτεΐνη-κινητήρας) στρατολογείται γύρω από τον πυρηνικό φάκελο στην πρόφαση, λίγο πριν την αποδιάταξή του (NEBD) (Salina et al., 2002). Η δυνεΐνη στην συγκεκριμένη χρονική στιγμή φαίνεται ότι συνδέεται με τον πυρηνικό φάκελο και τον έλκει ισχυρά προς το μείον άκρο των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην διάρρηξη του πυρηνικού φακέλου (Salina et al., 2002; Beaudouin et al., 2002).

Γνωρίζοντας ότι η β2-τουμπουλίνη συνδέεται με τον πυρηνικό φάκελο και λαμβάνοντας υπόψιν τον ρόλο της δυνεΐνης στην μίτωση προκύπτει το ερώτημα του αν στρατολογούνται ταυτόχρονα και οι δυο αυτές πρωτεΐνες στον πυρηνικό φάκελο. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό θα αποσαφηνίσει τον ρόλο της δυνεΐνης στην μεταφορά των θραυσμάτων του πυρηνικού φακέλου και άλλων πυρηνοπλασματικών παραγόντων. Όταν "φαντάσματα" πυρηνικών φακέλων που έχουν προκύψει από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (όπου η εσωτερική μεμβράνη είναι στραμμένη προς τα έξω) επωαστούν με τουμπουλίνη από εγκέφαλο ποντικού η β-τουμπουλίνη συνδέεται ισχυρά.



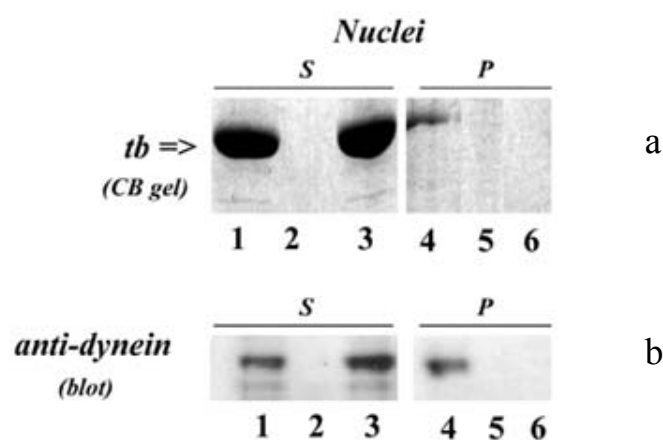
Εικόνα 6 : α) SDS-PAGE ηλεκτροφορητικό προφίλ καθαρισμένης τουμπουλίνης από αρουραίο (b.tb.) και δείκτες μοριακών βαρών (M) (97000, 68000, 45000, 31000 από πάνω προς τα κάτω). Τα δείγματα φορτώθηκαν σε μεγάλη ποσότητα, β) Πρόσδεση της καθαρισμένης τουμπουλίνης στους πυρηνικούς φακέλους, μετά από ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. NE+ b.tb. : πυρηνικοί φάκελοι και τουμπουλίνη από εγκέφαλο ποντικού

Σε ένα επόμενο στάδιο ελέγχθηκε αν η δυνεΐνη συνδέεται και αυτή με την έσω πλευρά του πυρηνικού φακέλου. Εάν το ίδιο πείραμα επαναληφθεί και τα δείγματα εξεταστούν με αντισώματα που αναγνωρίζουν πρωτεΐνες κινητήρες προκύπτει ότι η δυνεΐνη δεν συνδέεται με τον πυρηνικό φάκελο.



Εικόνα 7: α) SDS-PAGE ηλεκτροφορητική ανάλυση δοκιμής πρόσδεσης τουμπουλίνης από εγκέφαλο ποντικού σε πυρηνικούς φακέλους. Τα δείγματα 1-3 είναι υπερκείμενα και τα 4-6 ιζήματα. Δείγματα 1/4: πυρηνικοί φάκελοι και τουμπουλίνη, δείγματα 2/5: πυρηνικοί φάκελοι, δείγματα 3/6: τουμπουλίνη, β) Ανάλυση με αποτύπωση τύπου western, χρησιμοποιώντας αντισώμα για την δυνεΐνη

Όταν όμως χρησιμοποιηθούν ακέραιοι πυρήνες από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας τόσο η $\beta 2$ -τουμπουλίνη όσο και η δυνεΐνη συνδέονται ισχυρά. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι ο ρόλος της δυνεΐνης στην απαρχή της αποδιάταξης του πυρηνικού φακέλου είναι η συμβολή στην διάταξη και τελική διάρρηξη του τελευταίου, ενώ η μεταφορά των κομματιών του μάλλον είναι αποτέλεσμα της δυναμικής των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου.



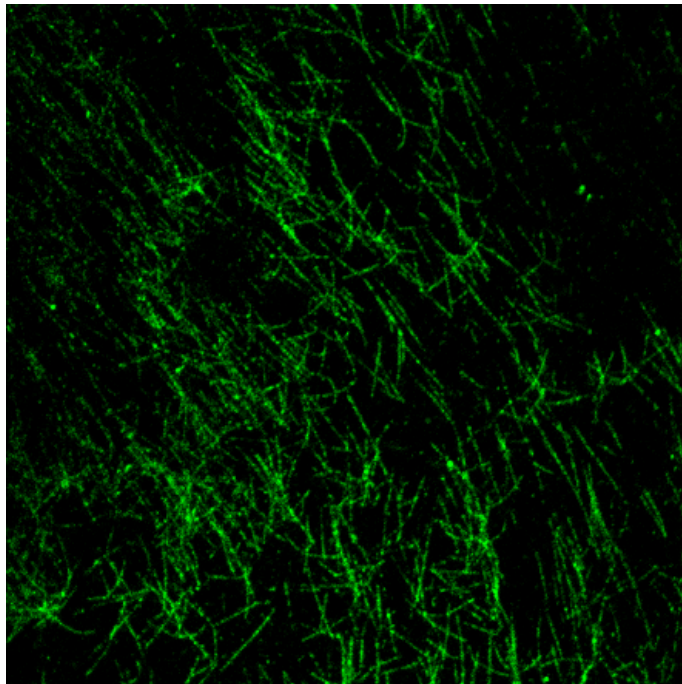
Εικόνα 8: a) SDS-PAGE ηλεκτροφορητική ανάλυση δοκιμής πρόσδεσης τουμπουλίνης από εγκέφαλο ποντικού σε ακέραιους πυρήνες. Τα δείγματα 1-3 είναι υπερκείμενα και τα 4-6 ιζήματα. Δείγματα 1/4: ακέραιοι πυρήνες και τουμπουλίνη, δείγματα 2/5: ακέραιοι πυρήνες, δείγματα 3/6: τουμπουλίνη, b) Ανάλυση με αποτύπωση τύπου western, χρησιμοποιώντας αντίσωμα για την δυνεΐνη

3.3 In vitro σύστημα μελέτης του ρόλου της $\beta 2$ -τουμπουλίνης και των πρωτεϊνών κινητήρων

Για να μελετήσουμε περαιτέρω την ιδιότητα σύνδεσης των πρωτεϊνών κινητήρων (δυνεΐνη, κινεσίνη), της $\beta 2$ -τουμπουλίνης και άλλων πυρηνικών πρωτεϊνών με τον

πυρηνικό φάκελο είναι απαραίτητη η χρήση της *in vitro* δοκιμής της κίνησης σε μικροσωληνίσκους.

Το πρώτο στάδιο αυτής της δοκιμής είναι ο πολυμερισμός των μικροσωληνίσκων σε γυάλινη επιφάνεια μιας αντικειμενοφόρου πλάκας, όπου έχει σχηματιστεί ένας θαλαμίσκος ροής. Κατόπιν προστίθενται τα εκχυλίσματα από διάφορα κυτταρικά κλάσματα (μιτωτικό και μεσοφασικό κυτταρόπλασμα, κυστίδια πυρηνικών φακέλων) και ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Η παραπάνω τεχνική δεν έχει ολοκληρωθεί αλλά σε πρώτη φάση όπου τουμπουλίνη από εγκέφαλο αρουραίου έχει πολυμεριστεί σε αντικειμενοφόρο και η ανίχνευση μικροσωληνίσκων έγινε με έμμεσο ανοσοφθορισμό.



Εικόνα 9: Έμμεσος ανοσοφθορισμός με χρήση αντισώματος για την β-τουμπουλίνη, για την ανίχνευση μικροσωληνίσκων που έχουν μονιμοποιηθεί σε γυάλινη καλυπτρίδα

4. Συζήτηση

Αρκετές από τις πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου συνδέονται περιστασιακά με τους μικροσωληνίσκους της πυρηνικής ατράκτου κατά την διάρκεια της μίτωσης προκειμένου να μοιραστούν στα δυο θυγατρικά κύτταρα με τρόπο ανάλογο με αυτόν που μοιράζονται τα χρωμοσώματα. Η πρόσδεση πρωτεϊνών του πυρήνα με την μιτωτική άτρακτο είναι πολύ εκλεκτική και δεν συμβαίνει για όλες τις πρωτεΐνες. Η μετακίνηση των πρωτεϊνών αυτών προς τους πόλους της μιτωτικής ατράκτου διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες κινητήρες και/ή λόγω της δυναμικής των μικροσωληνίσκων. Παρατηρήθηκε παραπάνω ότι η β2-τουμπουλίνη συγκεντρώνεται στην μιτωτική άτρακτο, στους αστέρες και στο μεσαίο σωματίο (midbody) έχοντας ενεργό ρόλο στον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, ενώ η παρουσία της στον πυρήνα κατά την μεσόφαση δεν φαίνεται να εξυπηρετεί μια προφανή λειτουργία του κυττάρου. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό της β-τουμπουλίνης που έχει συγγένεια για πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου εντοπίζεται στον πυρήνα κατά την μεσόφαση και μόλις το κύτταρο εισέλθει στην μίτωση να στρατολογείται άμεσα για τη συγκρότηση της μιτωτικής ατράκτου. Εκεί η β2-τουμπουλίνη χρησιμοποιείται ως συστατικό της μιτωτικής ατράκτου για τη μεταφορά των χρωμοσωμάτων, καθώς και κυστιδίων του πυρηνικού φακέλου και συστατικών του πυρηνοπλάσματος στους πόλους του κυττάρου.

Οι πρωτεΐνες κινητήρες όπως η δυνεΐνη, η κινεσίνη, κ.α. είναι μέρος του κυτταροσκελετού και συνδεδεμένες με τους μικροσωληνίσκους παίζουν ενεργό ρόλο στην μετακίνηση πρωτεϊνών. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει σύνδεση της δυνεΐνης με την έξω πυρηνική μεμβράνη, γεγονός που ενισχύει το συμπέρασμα ότι η δυνεΐνη έχει ρόλο κλειδί στην διάρρηξη του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της

πρόφασης και την αρχή της προμετάφασης. Το γεγονός ότι η δυνεΐνη δεν συνδέεται με την έσω πυρηνική μεμβράνη θέτει υπο αμφισβήτηση την πιθανότητα η μετακίνηση των συστατικών του πυρηνοπλάσματος να διαμεσολαβείται από την δυνεΐνη και ενισχύει την άποψη ότι η διαδικασία διαμεσολαβείται από την δυναμική των μικροσωληνίσκων. Προφανώς για να αποσαφηνιστεί το θέμα αυτό θα πρέπει να προστεθούν ακόμη αρκετά πειραματικά δεδομένα.

5. Βιβλιογραφία

1. Asai, D. J. & Koonce, M. P. The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution. *Trends Cell Biol.* 11, 196–202 (2001)
2. Bajer, A., and Mole' -Bajer, J. (1969). Formation of spindle fibers, kinetochore orientation, and behavior of the nuclear envelope during mitosis in endosperm. *Chromosoma* 27, 448–484
3. Banerjee A, Luduen~a RF. 1992. Kinetics of colchicine binding to purified b-tubulin isotypes from bovine brain. *J Biol Chem* 267:13335–13339
4. Banerjee A, Roach MC, Trcka P, Luduen~a RF. 1992. Preparation of a monoclonal antibody specific for the class IV isotype of b-tubulin. Purification and assembly of abII, abIII, and abIV tubulin dimers from bovine brain. *J Biol Chem* 267:5625–5630
5. Belgareh, N., Rabut, G., Bai, S.W., van Overbeek, M., Beaudouin, J., Daigle, N., Zatssepina, O.V., Pasteau, F., Labas, V., Fromont-Racine, M., et al. (2001). An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 154, 1147–1160
6. Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J., and De Mey, J.R. (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* 8, 541–544.
7. Chaudhary, N., and Courvalin, J.-C. (1993). Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J. Cell Biol.* 122, 295–306
8. Courvalin, J.C., Segil, N., Blobel, G., and Worman, H.J. (1992). The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 19035–19038

9. Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., and Ellenberg, J. (2001). Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J. Cell Biol.* 154, 71–84
10. Denoulet, P. (1990) *Science* 247, 83-85
11. Dustin, P. (1984) *Microtubules*, Springer-Verlag, Berlin
12. Edde', B., Rossier, J., Le Caer, J.-P., Desbruyeres, E., Gros, F., & Panda D. et al., (1994) *PNAS*, 91, 11358-62
13. Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Meth-Worman, H.J., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* 138, 1193–1206
14. Favreau, C., Worman, H.J., Wozniak, R.W., Frappier, T., and Courvalin, J.C. (1996). Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry* 35, 8035-8044
15. Foisner, R., and Gerace, L. (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73, 1267–1279
16. Georgatos, S.D., Pyrpasopoulou, A., and Theodoropoulos, P.A. (1997). Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *J. Cell Sci.* 110, 2129–2140
17. Gerace, L., and Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19, 277–287

18. Goldberg, M.W., and Allen, T.D. (1995). Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 301–309
19. Gönczy, P., Pichler, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. (1999). Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Cell Biol.* 147, 135–150
20. Gruenbaum, Y., Wilson, K.L., Harel, A., Goldberg, M., and Cohen, M. (2000). Review: nuclear lamins—structural proteins with fundamental functions. *J. Struct. Biol.* 129, 313–323
21. Heald, R., and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579–589
22. Hoyle, H. D., & Raff, E. C. (1990) *J. Cell Biol.* 111, 1009-1026
23. King, S. M. AAA domains and organization of the dynein motor unit. *J. Cell Sci.* 113, 2521–2526 (2000)
24. King, S. M. The dynein microtubule motor. *Biochim. Biophys. Acta* 1496, 60–75 (2000)
25. LeDizet, M., & Piperno, G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5720-5724
26. Lee, K.K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J., and Wilson, K.L. (2000). *C. elegans* nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 11, 3089–3099
27. Little M, Seehaus T. (1988), Comparative analysis of tubulin sequences, *Comp Biochem Physiol* 90B:655–670
28. Luduen~a, R. F. (1993) *Mol. Biol. Cell* 4, 445-457

29. Macaulay, C., Meier, E., and Forbes, D.J. (1995). Differential mitotic phosphorylation of proteins of the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* 270, 254–262
30. Matthews, K. A., Rees, D., & Kaufman, T. C. (1993) *Development* 117, 977-991
31. Mitchison T.J. & Kirschner. M. (1984a) *Nature* 312, 232-237
32. Mitchison T.J. & Kirschner. M. (1984a) *Nature* 312, 237-242
33. Mullins, F. H., Hargreaves, A. J., Li, J.-Y., Dahlstrom, A., & McLean, W. G. (1994) *J. Neurochem.* 62, 227-234
34. Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. & Koonin, E. V. AAA á : a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9, 27–43 (1999)
35. Paweletz, N., and Lang, U. (1988). Fine structural studies of early mitotic stages in untreated and nocodazole-treated HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* 47, 334–345
36. Peter M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., and Nigg, E.A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase- specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61, 591–602
37. Pfaller, R., Smythe, C., and Newport, J.W. (1991). Assembly/disassembly of the nuclear envelope membrane: cell cycle-dependent binding of nuclear membrane vesicles to chromatin in vitro. *Cell* 65, 209–217
38. Pfaller, R., and Newport, J.W. (1995). Assembly/disassembly of the nuclear envelope membrane. Characterization of the membrane-chromatin interaction using partially purified regulatory enzymes. *J. Biol. Chem.* 270, 19066–19072

39. Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, Giannakouros T, Georgatos SD Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1 EMBO Rep. 2001 Oct;2(10):920-5
40. Raybin, D., & Flavin, M. (1977) Biochemistry 16, 2189-2194
41. Reinsch, S., and Gönczy, P. (1998). Mechanisms of nuclear positioning. J. Cell Sci. 111, 2283–2295
42. Reinsch, S., and Karsenti, E. (1997). Movement of nuclei along microtubules in *Xenopus* egg extracts. Curr. Biol. 7, 211–214
43. Robbins, E., and Gonatas, N.K. (1964). The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cell cycle. J. Cell Biol. 21, 429–463
44. Sharma J, Luduen~a RF. 1994. Use of N,N'-polymethylene-bis(iodoacetamide) derivatives as probes for the detection of conformational differences in tubulin isotypes. J Prot Chem 13:165–176
45. Schwarz PM, Liggins JR, Luduen~a RF. 1998. b-tubulin isotypes purified from bovine brain have different relative stabilities Biochemistry 37:4687–4692
46. Stick, R., Angres, B., Lehner, C.F., and Nigg, E.A. (1988). The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B2 between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. 107, 397–406
47. Terasaki, M., Campagnola, P., Rolls, M.M., Stein, P.A., Ellenberg, J., Hinkle, B., and Slepchenko, B. (2001). A new model for nuclear envelope breakdown. Mol. Biol. Cell 12, 503–510
48. Thompson, W. C. (1982) Methods Cell Biol. 24, 235-255

49. Yang, L., Guan, T., and Gerace, L. (1997). Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J. Cell Biol.* 137, 1199–1210
 50. Ward, G.E., and Kirschner, M.W. (1990). Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* 61, 561–577
- Wilson, K.L. (2000). The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol.* 10, 125–129