



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΟΣΚΑΣ**

**«ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ Α' ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ  
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NFY ΜΕ ΤΙΣ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ PML  
ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011-2012**

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

### **1) ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

### **2) ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

#### **2.1) PML Nuclear Bodies**

- Η PML πρωτεΐνη
- Οργάνωση και δομή των PML Nuclear Bodies

#### **2.2) Ο μεταγραφικός παράγοντας NFY**

- Οργάνωση, Δομή και Λειτουργία του NFY
- Η Α υπομονάδα του NFY (NFY-A)

#### **2.3) Η SUMO πρωτεΐνη**

### **3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1) Υλικά**

#### **3.2) Μέθοδοι**

### **4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **4.1) Πλασμιδιακές κατασκευές του NFY-A**

#### **4.2) Πλασμιδιακές κατασκευές της PML πρωτεΐνης**

#### **4.3) Μελέτη του NFY-A για πιθανή σουμοϋλίωση**

#### **4.4) In vivo συνεντοπισμός του NFY-A με την PMLIV ισομορφή**

#### **4.5) Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του NFY-A και in-vitro αλληλεπίδρασή του με την PML πρωτεΐνη**

### **5) ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## **1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

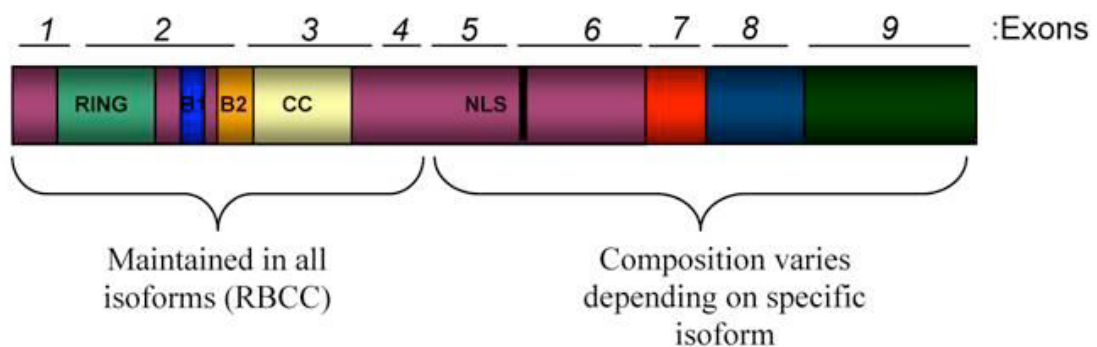
Η πρωτεΐνη PML εκφράζεται σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα και είναι υπεύθυνη για τη συγκρότηση των PML Nuclear Bodies. Τα PML NBs προσελκύουν αρκετές πυρηνοπλάσματικές πρωτεΐνες ρυθμίζοντας την ενεργότητά τους. Στην παρούσα μελέτη δείχνουμε ότι η A υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα NFY αλληλεπιδρά με τα PML NBs. Ο μεταγραφικός παράγοντας NFY αποτελείται από 3 υπομονάδες, προσδένεται σε CCAAT-boxes υποκινητών και ρυθμίζει πολλά γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Η αλληλεπίδραση του NFY-A με τα PML NBs γίνεται μέσω της πρωτεΐνης PML. Ωστόσο, για την αλληλεπίδραση των δύο, σημαντικό ρόλο παίζουν η ισομορφή της PML πρωτεΐνης καθώς και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις οποίες υπόκειται ο NFY-A. Στην παρούσα μελέτη αναδεικνύεται η αναγκαιότητα τροποποίησης του μεταγραφικού παράγοντα στο κυτταρικό περιβάλλον σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα.

## 2) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.1) PML Nuclear bodies

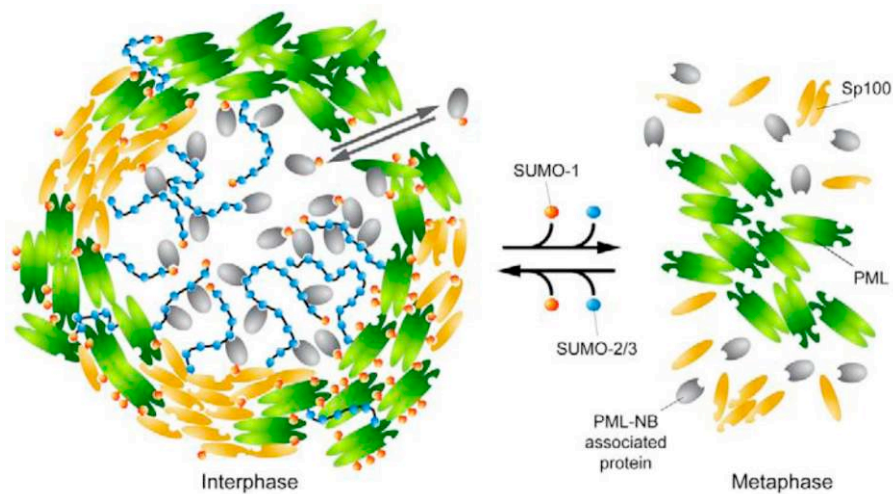
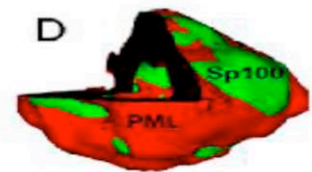
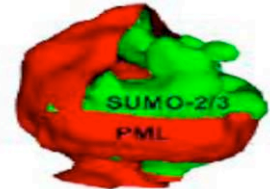
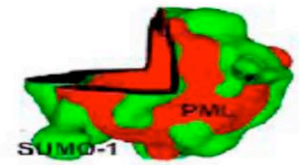
#### Η PML πρωτεΐνη

Η promyelocytic leukemia πρωτεΐνη ανακαλύφθηκε εξαιτίας του ρόλου της στην ογκογένεση της Οξείας Προμυελοκυτταρικής Λευχαιμίας (Acute Promyelocytic Leukemia, APL) <sup>(1)</sup> και αποτελεί αναγκαίο συστατικό για την συγκρότηση των PML nuclear bodies <sup>(2)</sup>. Συγκεκριμένα το PML γονίδιο εμπλέκεται σε μια χρωμοσωμική μετατόπιση με το γονίδιο του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος α (RAR-a) με αποτέλεσμα την έκφραση των συντηγμένων πρωτεϊνών PML- RAR-a και RAR-a-PML οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση της APL <sup>(3)</sup>. Το PML γονίδιο στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15 και συγκεκριμένα στην θέση 15q22. Το συνολικό μέγεθος του γονιδίου είναι 53.147 βάσεις και περιλαμβάνει 9 εξώνια <sup>(2)</sup>. Το PML γονίδιο ρυθμίζεται μεταγραφικά από ιντερφερόνες μέσω των μονοπατιών STAT και IRF <sup>(4)</sup> και από την p53 καθώς και από το Ras μονοπάτι του οποίου στόχος είναι η p53 <sup>(5)</sup>. Η μεταγραφική ρύθμιση από τις ιντερφερόνες εξαρτάται από το είδος του μονοπατιού που ενεργοποιείται και από τον κυτταρικό τύπο ενώ η ρύθμιση από την p53 είναι πάντα ενεργοποιητική. Το μετάγραφο του γονιδίου υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα στα εξώνια του καρβοξυτελικού άκρου και έτσι προκύπτουν 9 ισομορφές της PML πρωτεΐνης. Σε 8 ισομορφές υπάρχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού στο 5 εξώνιο ενώ σε μια απουσιάζει και αυτή εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα <sup>(2)</sup>. Όλες οι ισομορφές περιέχουν τα 4 πρώτα εξώνια τα οποία κωδικεύουν το RBCC μοτίβο της PML πρωτεΐνης που περιέχει μια περιοχή zinc-finger RING ακολουθούν 2 zinc-finger B Boxes και μια περιοχή coiled-coil. Το RBCC μοτίβο είναι απαραίτητο για τον ομολιγομερισμό της PML πρωτεΐνης και για τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες <sup>(6)</sup>. Πέραν της μετά-μεταγραφικής ρύθμισης γίνεται και μετά-μεταφραστική ρύθμιση στην PML πρωτεΐνη. Πολλαπλές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις της PML πρωτεΐνης όπως σουμυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικουιτινυλίωση και ακετυλίωση οδηγούν στην αλλαγή των επιπέδων της πρωτεΐνης και της ενεργότητας της. Η σουμυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στην συγκρότηση και των ολιγομερισμό της PML πρωτεΐνης στα PML- NBs καθώς και στην δυναμική των σωμάτων <sup>(7)</sup>. Η PML πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται μετά από καταστροφή του DNA και μετατοπίζεται στο πυρηνίσκο κατά την διάρκεια του S phase checkpoint και μετά από έκθεση σε γ- ακτινοβολία και οδηγεί σε απόπτωση <sup>(8)</sup>. Knock-out ποντίκια για το γονίδιο PML είναι βιώσιμα αλλά επιρρεπή σε αυθόρμητη η προκαλούμενη από παράγοντες καρκινογένεση.



## Οργάνωση και Δομή των PML Nuclear Bodies

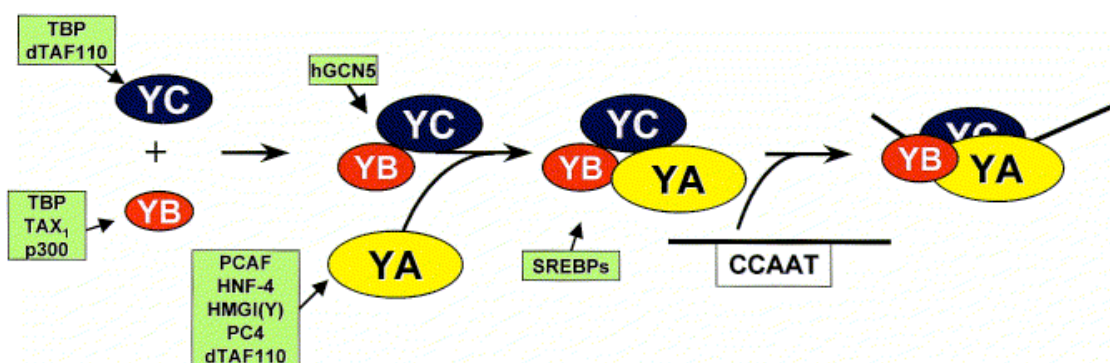
Τα PML NBs είναι ευδιάκριτες πυρηνικές δομές σφαιρικού σχήματος και διαμέτρου που ποικίλει από 0.2 έως 1 μm. Κάθε κύτταρο φέρει 1-30 PML NBs ανάλογα με τον τύπο του<sup>(9)</sup>. Η κατανομή τους είναι τυχαία καθώς είναι δυναμικές δομές που κινούνται μέσα στον πυρήνα και έρχονται σε άμεση επαφή με την χρωματίνη πχ σε γονίδια που έχει αναφερθεί ότι ελέγχουν την έκφραση τους και στα τελομερή κύτταρων που δεν έχουν ενεργή τελομερή. Η ισομορφή 5 της PML πρωτεΐνης εντοπίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα PML NBs και θεωρείται ως βασική ενώ απουσία της PML πρωτεΐνης δεν σχηματίζονται PML NBs. Για την δημιουργία τους αρχικά αλληλεπιδρούν οι RBCC περιοχές των PML πρωτεϊνών, στην συνέχεια σουμοϋλιώνονται και συνδέονται με τη SUMO μέσω των SUMO-interactive motifs και τέλος την ενσωμάτωση της Sp100<sup>(10)</sup>. Κατά την διάρκεια της μίτωσης η SUMO-1 και η Sp100 διαχέονται και τα PML NBs αποσταθεροποιούνται. Η PML η SUMO-1 και η Sp100 δημιουργούν τον φλοιό της σφαίρας πάχους 50-100 nm όπου η PML και η Sp100 λαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις ενώ οι SUMO-2/3 εντοπίζονται στο εσωτερικό. Στα PML NBs συνεντοπίζονται 80 περίπου πρωτεΐνες<sup>(11)</sup>. Η κινητική και η ποσότητα των πρωτεϊνών που εισέρχονται στα PML NBs επηρεάζεται από το ποσοστό SUMO-2/3 που υπάρχει στο εσωτερικό και είναι σαφώς μειωμένη σε σχέση με την ελεύθερη κίνηση τους στο πυρηνόπλασμα.



## 2.2) Ο μεταγραφικός παράγοντας NFY

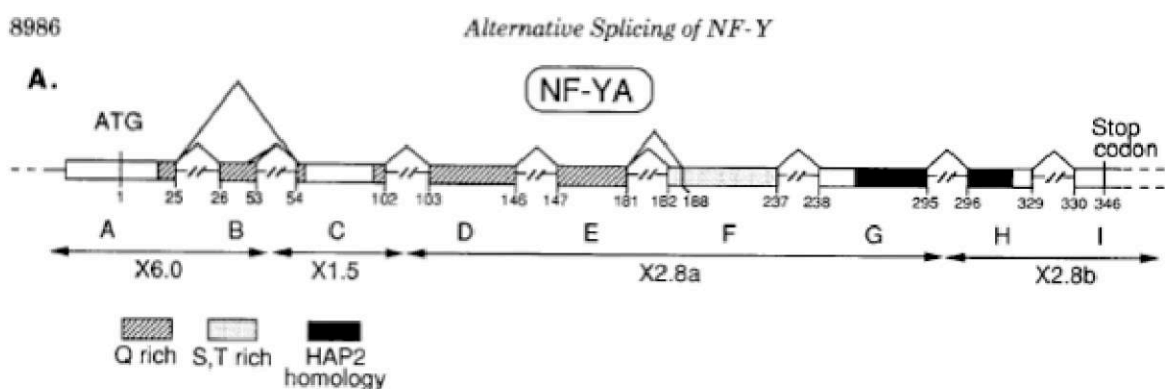
### Οργάνωση, Δομή και Λειτουργία του NFY

Ο NF-Y είναι ένα από τα κύρια μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται σε CCAAT-boxes<sup>(17)</sup>. Το CCAAT-box είναι μια αλληλουχία που εντοπίζεται στο 60% των ανθρώπινων υποκινητών (βιοπληροφορικά δεδομένα) -60 έως -100 βάσεις από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Αυτό το πεντανουκλεοτίδιο είναι εξελικτικά συντηρημένο στους υποκινητές· στους ευκαριώτες βρίσκεται κυρίως σε υποκινητές συστατικών επαγόμενων και υπεύθυνων για τον κυτταρικό κύκλο γονιδίων. Ο NF-Y αναγνωρίζει ειδικά τις consensus αλληλουχίες : 5'-CTGATTGGYYRR-3' ή 5'-YYRRCCAATCAG-3'. Η αναγκαιότητα ύπαρξης των εκατέρωθεν αλληλουχιών αυτού του μοτίβου ώστε να αναγνωριστούν από τον NF-Y τον κάνει να ξεχωρίζει από τους άλλους παράγοντες που προσδένονται σε CCAAT-boxes<sup>(18)</sup>. Άλλο χαρακτηριστικό του NF-Y είναι ότι η πρόσβαση του στις γενωμικές θέσεις εξαρτάται από την παρουσία μεθυλιωμένων ιστονών. Ο NF-Y είναι μια ετεροτριμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από 3 υπομονάδες : NF-YA, NF-YB and NF-YC<sup>(19)</sup>. Αρχικά ο NF-YB και ο NF-YC, οι οποίοι περιέχουν από ένα histone fold motif (HFM) 65 αμινοξέων, σχηματίζουν ένα διμερές και εν συνεχεία ο NF-YA σταθεροποιεί το σύμπλοκο ώστε να σχηματιστεί ένα τριμερές που θα προσδένεται με υψηλή συγγένεια στο DNA<sup>(20)</sup>. Ο NF-YB και ο NF-YC είναι μέλη των H2B και H2A οικογενειών αντίστοιχα. Τα HFM μοτίβα τους είναι ουσιώδη για την δημιουργία του διμερούς και την σύνδεση του NF-YA. Οι NF-YB και NF-YC περιέχουν εξελικτικά συντηρημένες λυσίνες και αργινίνες των H2B-H2A, οι οποίες αλληλεπιδρούν με το νουκλεόσωμα και χρειάζονται για την πρόσδεση στο DNA. Η ακετυλίωση των ιστονών έχει προταθεί ως ένα μηχανισμός με τον οποίο ο NF-Y ρυθμίζει την μεταγραφή εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων του με ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών όπως η p300/CBP και η GCN5/PCAF<sup>(21)</sup>. Οι περιοχές που ρυθμίζουν την δράση του NF-Y ως μεταγραφικό ενεργοποιητή βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο του NF-YA και στο καρβοξυτελικό του NF-YC<sup>(22)</sup>. Ο NF-Y δρα με το να αυξάνει την συγγένεια των γειτονικών μεταγραφικών παραγόντων με το DNA ή σε απουσία DNA με το να προσδένεται με διάφορους ενεργοποιητές. Η έκφραση του και η λειτουργική ενεργότητα του ρυθμίζονται είτε αρνητικά είτε θετικά μέσω ουβικουτινιλίωσης και ακετυλίωσης αντίστοιχα.. Ο NF-Y δρα είτε ως καταστολέας είτε ως ενεργοποιητής στα γονίδια που φέρουν CCAAT-boxes και ελέγχονται από αυτόν. Το μοντέλο δράσης του φαίνεται να είναι η ικανότητα του να αλλάζει την στερεοδομή της χρωματίνης όπου βρίσκεται ο στόχος του και έτσι να αυξάνεται η ενεργότητα των άλλων μεταγραφικών παραγόντων για τις αλληλουχίες πρόσδεσης τους<sup>(23)</sup>.



## Η Α-υπομονάδα του NFY (NFY-A)

Το γονίδιο του NFY-A βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στην θέση p21.3. Το γονιδιακό προϊόν φέρει 9 εξώνια και υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα του δεύτερου εξωνίου και έτσι προκύπτουν 2 ισομορφές: η long ισομορφή που έχει μέγεθος 347 αμινοξέα και η short ισομορφή που έχει μέγεθος 318 αμινοξέα. Η έκφραση των 2 ισομορφών είναι περίπου ίδια στην πλειοψηφία των κύτταρων. Ωστόσο η long ισομορφή εκφράζεται περισσότερο στους ινοβλάστες ενώ η short ισομορφή στα λεμφοκύτταρα<sup>(24)</sup>. Απενεργοποίηση του NF-YA γονιδίου σε knock-out ποντίκι οδηγεί στον θάνατο στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης. Εκτός από το εναλλακτικό μάτισμα τελευταία έχει περιγραφεί μετά-μεταφραστική τροποποίηση στο m-RNA του NFY-A από συγκεκριμένο mi-RNA της οικογένειας miR-169 στα φυτά<sup>(25)</sup>.



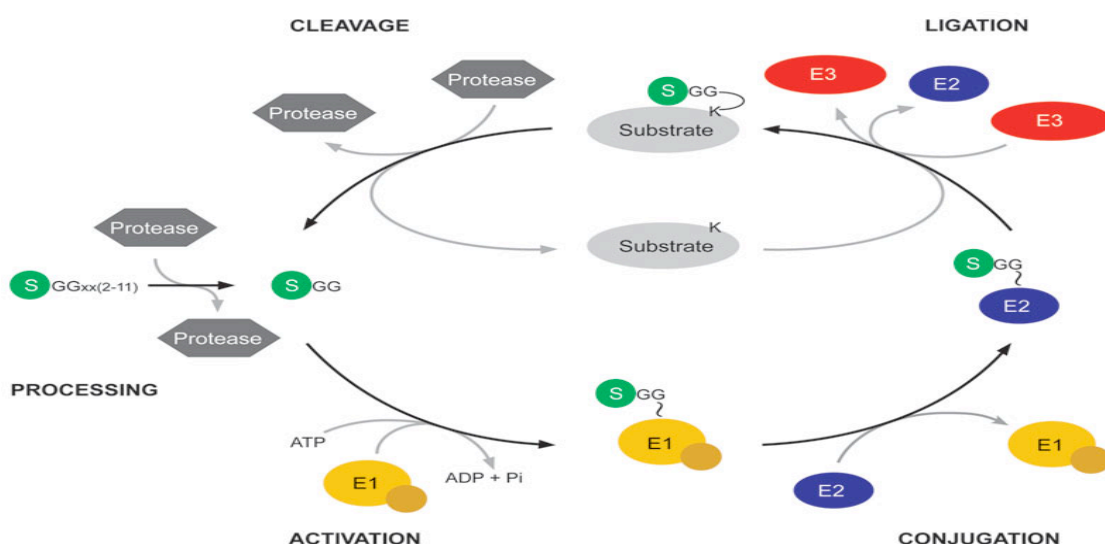
Η δομή της πρωτεΐνης έχει περιγραφεί ως εξής: στο αμινοτελικό άκρο υπάρχει μια περιοχή πλούσια σε γλουταμίνες σε ποσοστό ~35% η οποία καταλαμβάνει τα 5 πρώτα εξώνια και προσδίδει την μεταγραφική ενεργότητα στο μόριο, ακολουθεί μια περιοχή με υψηλό ποσοστό σε θρεονίνες και σερίνες στο 6 εξώνιο και στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται το HAP2 homology domain που εκτείνεται στα εξώνια 7 και 8. Το εξώνιο 7 κωδικεύει την περιοχή που είναι απαραίτητη για την σύνδεση του NFY-A με το διμερές NFY-B-NFY-C και το εξώνιο 8 κωδικεύει την περιοχή που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στο DNA. Ο NFY-A είναι ο παράγοντας που προσδίδει στο NFY την ειδικότητα πρόσδεσης στο συγκεκριμένο consensus μοτίβο καθώς οι NFY-B και NFY-C εξαιτίας των HFM μοτίβων που διαθέτουν μπορούν να προσδεθούν στο DNA αλλά όχι με υψηλή ειδικότητα<sup>(24)</sup>. Είναι γνωστές 2 μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που γίνονται στον NFY-A και ελέγχουν την δραστηριότητα του. Η πρώτη είναι η ουβικουιτινυλίωση η οποία οδηγεί στην καταστροφή του μορίου μέσω του μονοπατιού του πρωτεασώματος. Η ουβικουιτινυλίωση γίνεται στις λυσίνες 283, 289, 292 και 296. Στις ίδιες λυσίνες λαμβάνει χώρα και η ακετυλίωση της οποίας η δράση είναι αντίθετη από της ουβικουιτινυλίωσης και ενεργοποιητική. Συνεπώς αυτές οι 2 τροποποιήσεις ανταγωνίζονται για την σωστή ρύθμιση της ενεργότητας του NFY-A<sup>(26)</sup>.

### 2.3) Η SUMO πρωτεΐνη

Οι Small Ubiquitin-like Modifier ή SUMO πρωτεΐνες είναι μια οικογένεια μικρών πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένονται ομοιοπολικά σε άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου τροποποιώντας τη λειτουργία τους. Η σουμοϋλίωση είναι μετα-μεταφραστική τροποποίηση που εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως στην πυρηνική μεταφορά, την μεταφραστική ρύθμιση, την απόπτωση καθώς και στην σταθερότητα των πρωτεϊνών του κυττάρου<sup>(22)</sup>. Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες SUMO μοιάζουν με την ουβικιτίνη, η σουμοϋλίωση δεν χρησιμοποιείται για σήμανση πρωτεϊνών που προορίζονται για αποικοδόμηση. Αντίθετα, η σουμοϋλίωση μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα, όπως σε διαφορετικό εντοπισμό ή σύνδεση των πρωτεϊνών.

Υπάρχουν 3 διαφορετικές ισομορφές της SUMO πρωτεΐνης στον άνθρωπο. Η SUMO-1, η SUMO-2 και η SUMO-3. Οι SUMO-2/3 ισομορφές έχουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους και διαφέρουν αρκετά από την SUMO-1. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης οι SUMO-2/3 εντοπίζονται στο κεντρομερές και σε συσπειρωμένα χρωμοσώματα ενώ η SUMO-1 στη μιτωτική άτρακτο υποδεικνύοντας έτσι τη διακριτή λειτουργία κάθε ισομορφής στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου<sup>(23)</sup>. Οι τροποποιήσεις SUMO-2/3 φαίνεται να εμπλέκονται ιδιαίτερα σε απόκριση στο stress<sup>(24)</sup>. Οι SUMO-1 και οι SUMO-2/3 μπορούν να σχηματίσουν εναλλασσόμενες πρωτεϊνικές αλυσίδες, ωστόσο επειδή η SUMO-1 δεν περιέχει το SUMO μοτίβο που περιέχουν οι SUMO-2/3 φαίνεται ότι αυτές οι αλυσίδες τερματίζονται<sup>(25)</sup>.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες που υπόκεινται σε σουμοϋλίωση περιέχουν ένα τετραπεπτιδικό μοτίβο **Ψ-K-x-D/E** όπου **Ψ** είναι υδρόφοβο αμινοξικό κατάλοιπο, **K** είναι η λυσίνη που συνδέεται με τη SUMO πρωτεΐνη, **x** είναι οποιοδήποτε αμινοξύ, **D** ή **E** όξινο κατάλοιπο. Η προσκόλληση της SUMO στον στόχο γίνεται με τρόπο ανάλογο της ουβικιτίνης. Ένα καρβοξυτελικό πεπτιδίο αποκολλάται από τη SUMO μέσω μιας πρωτεάσης χρησιμοποιώντας ATP για να εμφανιστεί ένα μοτίβο δι-γλυκίνης. Στη συνέχεια η SUMO ενώνεται με το E1 ένζυμο (SUMO Activating Enzyme (SAE)) ένα ετεροδιμερές. Περνά μετά στο E2 συζευκτικό ένζυμο (Ubc9) και τέλος η E3 λιγάση συνδέει τη SUMO στην πρωτεΐνη στόχο. Το E2 είναι επαρκές για τη σουμοϋλίωση αρκεί να υπάρχει το απαραίτητο μοτίβο. Η E3 λιγάση αυξάνει την αποτελεσματικότητα της τροποποίησης ενώ σε κάποιες περιπτώσεις την προωθεί ακόμα και αν δεν υπάρχει το απαραίτητο αμινοξικό μοτίβο<sup>(22)</sup>.





## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1) Υλικά**

#### **Αντιδραστήρια και υλικά**

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών πειραμάτων προήλθαν από τις εξής εταιρίες: SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, BIORAD LABORATORIES, PROMEGA, QIAGEN, INVITROGEN.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και τα ένζυμα τροποποίησης νουκλεϊκών οξέων προήλθαν από τις εταιρίες: MINOTECH και NEW ENGLAND BIOLABS (NEB).

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν κολώνες NOUCLEOBOND ενώ για τον καθαρισμό των τμημάτων DNA από το πήκτωμα αραρόζης χρησιμοποιήθηκαν κολώνες NOUCLEOSPIN της εταιρείας MACHEREY-NAGEL.

Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της protein G agarose fast-flow (Cat # 16-266) της UPSTATE.

Οι αλληλουχίες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων καθώς και τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ι.Τ.Ε.

#### **Κυτταρικές σειρές**

Για τα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK 293.

#### **Στελέχη βακτηρίων**

Το βακτηριακό στέλεχος E.coli που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις το DH5α [SupE44 AlacU169 (φ80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1].

#### **Θρεπτικά μέσα**

Καλλιέργειες βακτηρίων: Η καλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertany) το οποίο περιέχει 1% τρυπτόνη (bacto tryptone), 0.5% εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και 1% NaCl, ενώ για τις στερεές καλλιέργειες προστίθεται επιπλέον 1.5% άγαρ.

Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων : Για τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο RPMI από τη εταιρία Gibco που περιείχε 10% FBS.

#### **Αντισώματα**

Anti-NFY-A

Anti-PML  
Anti-myc  
Anti-Jred  
Anti-Sumo  
Anti-GFP  
Anti-His

### 3.2) Μέθοδοι

#### **Αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα**

- X  $\mu$ l template
- 1/10 τελικού όγκου περιοριστικό ένζυμο
- 1/10 τελικού όγκου ρυθμιστικό διάλυμα H<sub>2</sub>O μέχρι επιθυμητό τελικό όγκο
- Επώαση για 1h σε θερμοκρασία 37 °C

#### **Αντίδραση Klenow**

- X  $\mu$ l template
- 1/10 τελικού όγκου ρυθμιστικό διάλυμα
- 1/10 τελικού όγκου dNTPs (σε περίπτωση που το περιοριστικό ένζυμο έχει αφήσει 5'προεξέχοντα άκρα τα οποίαθα πρέπει να συμπληρωθούν)
- 1/20 τελικού όγκου ένζυμο Klenow H<sub>2</sub>O μέχρι επιθυμητό τελικό όγκο
- Επώαση 10' min σε θερμοκρασία δωματίου
- Κατακρήμνιση DNA 1/10 όγκου CH<sub>3</sub>COONa 1/10 όγκου 100% αιθανόλη
- Επώαση 10' min σε θερμοκρασία -20 °C
- Φυγοκέντριση 10' min, 14.000 rpm, 4 °C
- Επαναδιαλυτοποίηση σε 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

#### **Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης**

- X  $\mu$ l template
- 1/10 τελικού όγκου ρυθμιστικό διάλυμα
- 1/10 τελικού όγκου ένζυμο SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)
- H<sub>2</sub>O μέχρι επιθυμητό τελικό όγκο
- Επώαση για 30' min σε θερμοκρασία 37 °C
- Επώαση για 30' min σε θερμοκρασία 65 °C (για απενεργοποίηση του ενζύμου)

## **Αντίδραση Ligation**

- X  $\mu$ l insert
- Y  $\mu$ l vector (οι όγκοι καθορίζονται έτσι ώστε η μοριακή αναλογία insert : vector να είναι 5:1 έως 10:1)
- εξαρτωμένη από το αν έχουμε η όχι sticky ends αντίστοιχα)
- 1/10 τελικού όγκου ρυθμιστικό διάλυμα
- 1/10 τελικού όγκου T4 DNA Ligase H<sub>2</sub>O μέχρι επιθυμητό τελικό όγκο
- Επώαση O/N σε θερμοκρασία 16 °C ή O/N σε θερμοκρασία δωματίου εξαρτωμένη από το αν έχουμε η όχι sticky ends αντίστοιχα

## **Μετασχηματισμός βακτηρίων**

- Μεταφορά ενός aliquot των 100  $\mu$ l από τους -80 °C στον πάγο και επώαση μέχρι να ξεπαγώσει
- Προσθήκη του 1/2 της ligation και επώαση για 30' min στον πάγο
- Heat shock: επώαση για 90" sec σε θερμοκρασία 42 °C
- επώαση για 2' min στον πάγο
- Προσθήκη 900  $\mu$ l θρεπτικού χωρίς αντιβιοτικό και επώαση για 30' min σε θερμοκρασία 37°C
- Plating σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό με αντιβιοτικό
- Επώαση O/N σε θερμοκρασία 37 °C

## **Απομόνωση πλασμιδίων Mini-Preps**

- Μεταφορά αποικιών από το τρυβλίο του μετασχηματισμού σε σωληνάκια υγρής καλλιέργειας τελικού όγκου 1ml Επώαση O/N σε θερμοκρασία 37 °C
- Μεταφορά καλλιιεργειών σε eppendorf.
- Φυγοκέντριση 15" sec, 14.000 rpm
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και διαλυτοποίηση πελέτας με Vortex
- Προσθήκη 100  $\mu$ l διαλύματος S1 και ανακίνηση για 5' min
- Προσθήκη 100  $\mu$ l διαλύματος S2 και ανακίνηση για 5' min
- Προσθήκη 100  $\mu$ l διαλύματος S3 και ανακίνηση για 5' min
- Φυγοκέντριση 10' min, 14.000 rpm
- Μεταφορά υπερκείμενου σε καινούργια eppendorf
- Προσθήκη 2,5 όγκων 100% αιθανόλης
- Φυγοκέντριση 2' min, 14.000 rpm
- Στέγνωμα πελέτας και επαναδιάλυση σε 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

## **Απομόνωση πλασμιδίων Maxi-Preps**

- Μεταφορά καλλιέργειών σε μπουκάλια.
- Φυγοκέντριση 10' min, 5.000 rpm, 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και διαλυτοποίηση πελέτας με Vortex.
- Προσθήκη 8 ml διαλύματος RES και ανακίνηση για 5' min.
- Προσθήκη 8 ml διαλύματος LYS και ανακίνηση για 5' min.
- Προσθήκη 8 ml διαλύματος NEU και ανακίνηση για 5' min.
- Εξισορρόπηση κολώνας με 12 ml διάλυμα EQU.
- Προσθήκη διαλύματος κυττάρων, RES, LYS, NEU στην κολώνα.
- Πλύσιμο κολώνας με 5 ml διάλυμα EQU
- Αφαίρεση φίλτρου
- Πλύσιμο κολώνας με 8 ml διάλυμα N3.
- Έκλυση πλασμιδίου με 5 ml διάλυμα N5.
- Προσθήκη 3,5 ml ισοπροπανόλη και ήπια ανάδευση.
- Φυγοκέντριση 30' min, 3.500 rpm, 4 °C.
- Στέγνωμα πελέτας και επαναδιάλυση σε 400-600 μl TE

## **Gel Extraction**

- Κόψιμο της επιθυμητής ζώνης από το πήκτωμα αγαρόζης
- Προσθήκη 2 όγκων της μάζας του πηκτώματος διαλύματος NT
- Επώαση για 10' min σε θερμοκρασία 65 °C μέχρι να λιώσει η αγαρόζη
- Μεταφορά στο κολωνάκι
- Φυγοκέντριση 1' min, 11.000 rpm απομακρύνουμε ότι περάσει από την κολώνα Προσθήκη 600 μl διαλύματος NT3
- Φυγοκέντριση 1' min, 11.000 rpm απομακρύνουμε ότι περάσει από την κολώνα
- Φυγοκέντριση 2' min, 11.000 rpm
- Προσθήκη 30 μl διαλύματος NE
- Επώαση 1' min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντριση 1' min, 11.000 rpm

## **Protein Extraction**

- Συλλογή και πλύσιμο κυττάρων με 1X PBS
- Φυγοκέντριση 1' min, 6.000 rpm
- Προσθήκη 5 όγκους της πελέτας διάλυμα EBC

- Προσθήκη 1/100 του τελικού όγκου NaF
- 1/100 του τελικού όγκου PMSF 1/500 του τελικού όγκου Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
- Επώαση για 20' min στο πάγο
- Φυγοκέντριση 10' min, 14.000 rpm, 4 °C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέα eppendorf

### **Western Blot Analysis**

- Προσθήκη loading buffer 5X στο πρωτεϊνικό διάλυμα και ηλεκτοφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE Transfer σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης O/N σε θερμοκρασία 4 °C
- Έλεγχος της μεμβράνης με χρώση Ponceau
- Πλύσιμο 3 X 5' min με TBST
- Επώαση 1h σε θερμοκρασία δωματίου με Blocking Buffer
- Επώαση 1h σε θερμοκρασία δωματίου με το πρώτο αντίσωμα
- Πλύσιμο 3 X 5' min με TBST
- Επώαση 1h σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα σε αραίωση 1:10.000
- Πλύσιμο 3 X 5' min με TBST
- Επώαση 5' min με το διάλυμα ECL στο σκοτάδι
- Εμφάνιση και επεξεργασία εικόνας με Scion Image και Adobe Photoshop CS3

### **Co-Immunoprecipitation Assay**

- Καθαρισμός 10 μl beads / πρωτεϊνικό διάλυμα (3 πλυσίματα με 1ml Wash Buffer, φυγοκέντριση 1' min, 6.000 rpm, 4 °C)
- Προσθήκη των beads στο πρωτεϊνικό διάλυμα και συμπλήρωση του όγκου με Wash Buffer ώστε ο τελικός όγκος να είναι ίσος με 250 μl
- Επώαση για 1 h σε θερμοκρασία 4 °C με συνεχή ανάδευση
- Φυγοκέντριση 2' min, 3.500 rpm, 4 °C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέα eppendorf
- Προσθήκη αντισώματος σε κατάλληλη αραίωση
- Επώαση O/N θερμοκρασία 4 °C με συνεχή ανάδευση
- Καθαρισμός 20 μl beads / πρωτεϊνικό διάλυμα (3 πλυσίματα με 1ml Wash Buffer, φυγοκέντριση 1' min, 6.000 rpm, 4 °C)
- Προσθήκη των beads στο πρωτεϊνικό διάλυμα
- Επώαση για 3 h σε θερμοκρασία 4 °C με συνεχή ανάδευση
- Φυγοκέντριση 2' min, 3.500 rpm, 4 °C

- Απομάκρυνση υπερκείμενου και πλύσιμο των beads (3 πλύσιμα με 1ml NETN φυγοκέντριση 2' min, 3.500 rpm, 4 °C)
- Προσθήκη 10 μl loading buffer και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-PAGE

## **GST-pulldown**

### **Σημείωση**

Για κάθε πρωτεΐνη υπό εξέταση χρειάζονται τρία δείγματα: Αλληλεπίδραση με τη GST-fused πρωτεΐνη, αλληλεπίδραση με σκέτη GST (negative control) και το 1/10 του όγκου της πρωτεΐνης ως αναφορά (input).

- 20 μl glutathione sepharose beads για κάθε δείγμα (on ice)
- 3 φορές πλύσιμο με 0.5 - 1 ml TEN/NP40 (ή όποιο buffer έχουν ήδη οι GST πρωτεΐνες μου)
- Προσθήκη GST πρωτεϊνών – Αραίωση αν χρειάζεται, μέχρι όγκου τουλάχιστον 200 μl
- Rotation, 1 h, cold room
- Spin down, 3000 rpm, 2 min, απόρριψη υπερκείμενου
- 2 φορές πλύσιμο με TEN/NP40
- Πλύσιμο με GST-wash
- Προσθήκη 200 μl GST-interaction & δειγμάτων. Ποσότητα ίση με το 1/10 κάθε δείγματος χωρίζεται στο στάδιο αυτό για να χρησιμοποιηθεί ως input στην ηλεκτροφόρηση αργότερα.
- Rotation, 3h, cold room
- Spin down, 3000 rpm, 2 min, απόρριψη υπερκείμενου
- 3 φορές πλύσιμο με GST-wash – Προσθήκη 10-20 μl buffer.
- Προσθήκη loading buffer, 5 min στους 100 °C, ηλεκτροφόρηση.

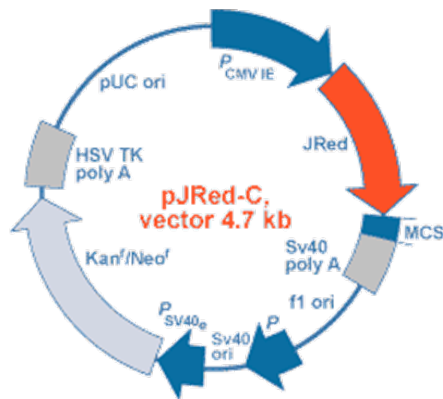
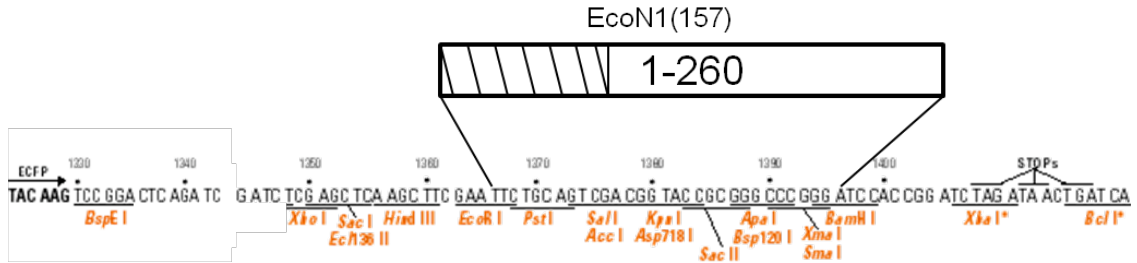
## **IPTG induction**

- Overnight καλλιέργεια βακτηρίων στους 37 °C με αντιβιοτικό (1:10000)
- Σε καθαρό LB (500ml) με αντιβιοτικό 1:10000 , μεταφέρουμε ποσότητα από την αρχική καλλιέργεια ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1:50
- Επώαση για 3h στους 37 °C μέχρι η OD= 0.4-0.6 (590nm)
- Προσθέτουμε IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM
- Επώαση στους 30 °C για 2-4h.
- Φυγοκέντριση για 10' στους 4 °C στις 5,000 rpm
- Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε TEN/NP40/BSA
- Sonication 2\*30sec
- Φυγοκέντριση για 10' στους 4 °C στις 14,000rpm

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

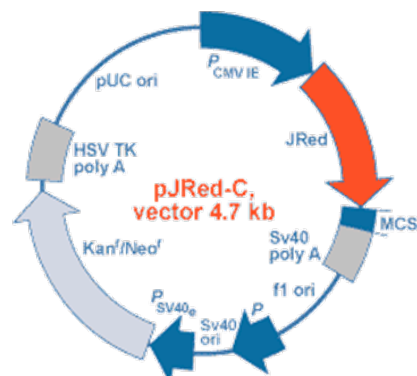
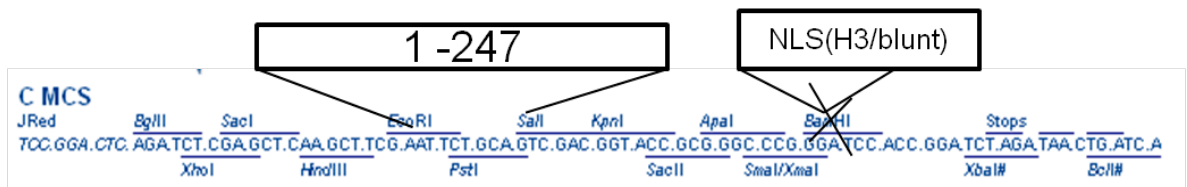
### 4.1) Πλασμιδιακές κατασκευές του NFY-A

- *157-260 NFY-A pJred*



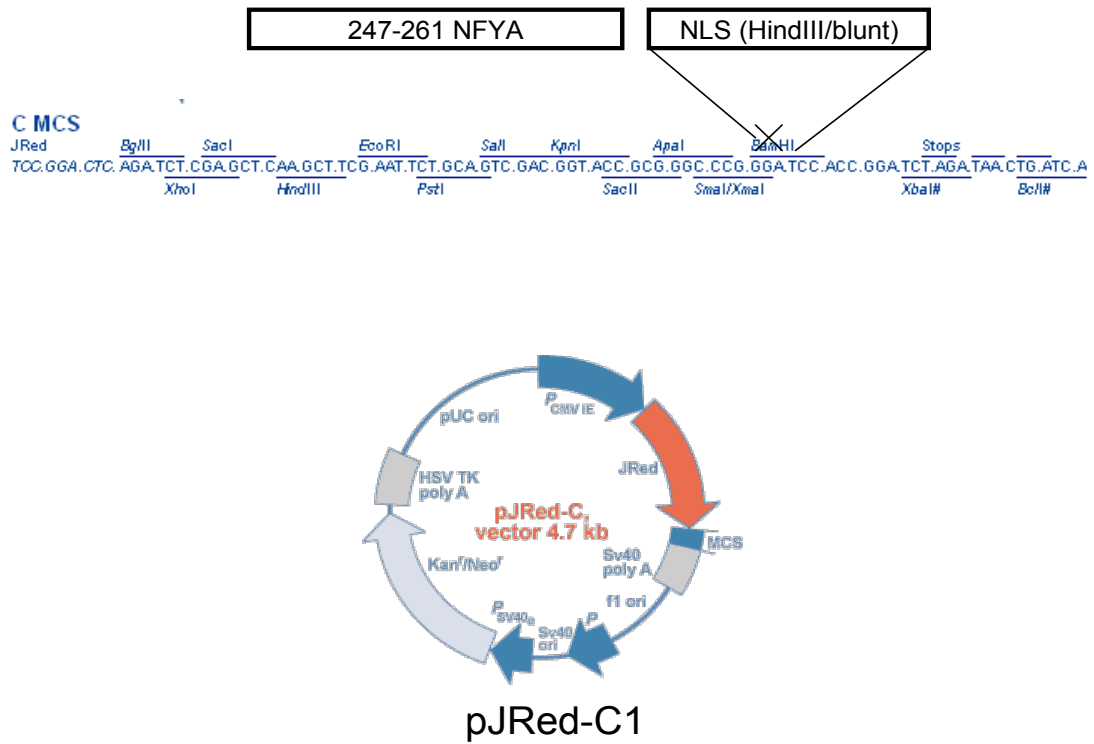
pJRed-C2

- *1-247 NFY-A pJRed + NLS*

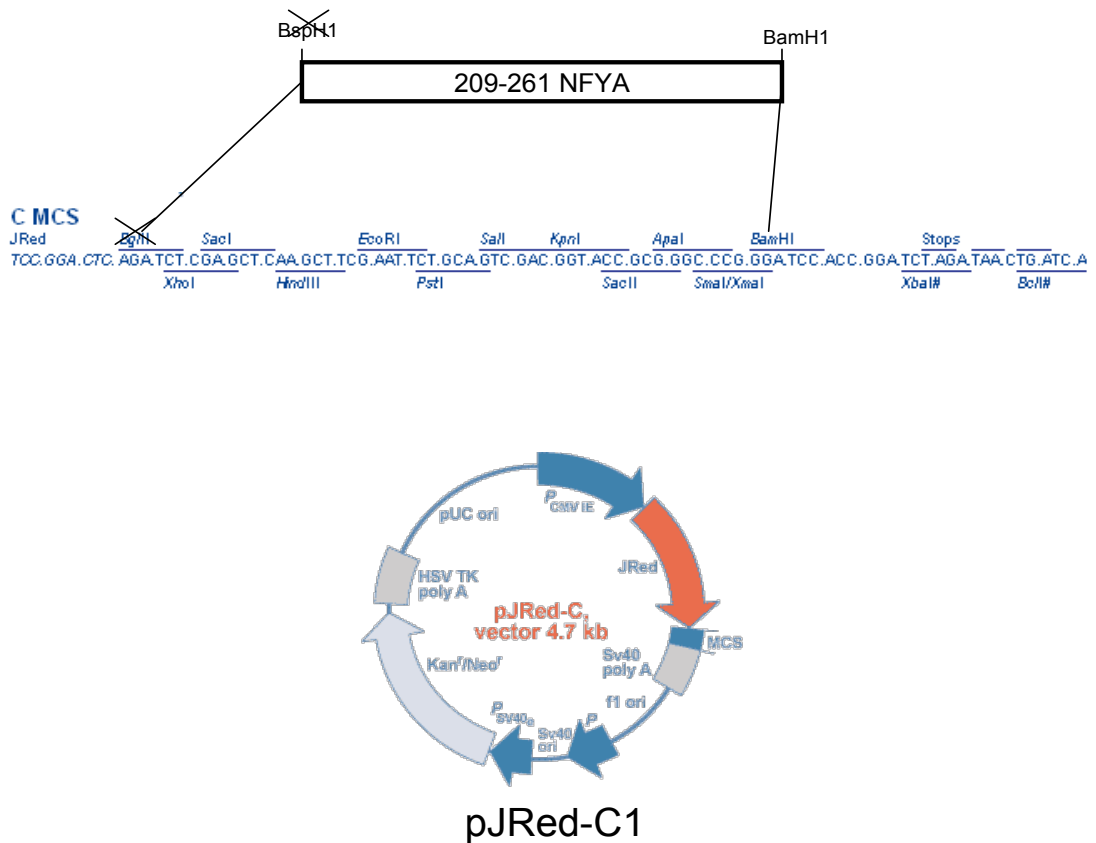


pJRed-C1

- 247-260 NFY-A pJred+ NLS

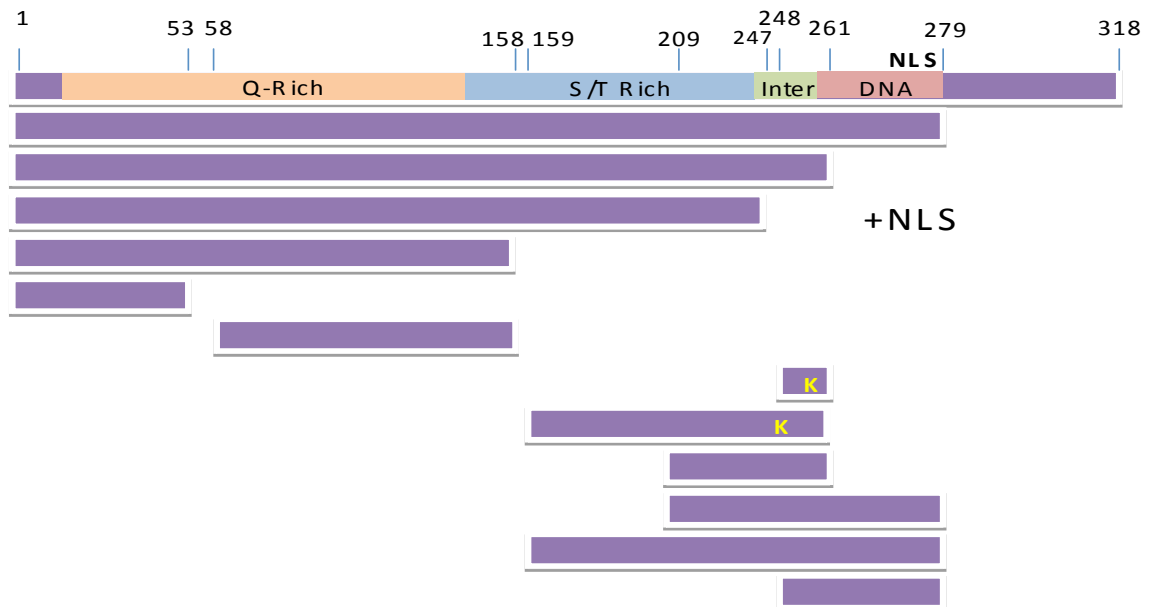


- 209-261 NFY-A pJred





Συνολικά, οι πλασμιδιακές κατασκευές του NFY-A σύμφωνα με την αμινοξική τους αλληλουχία είναι οι εξής:



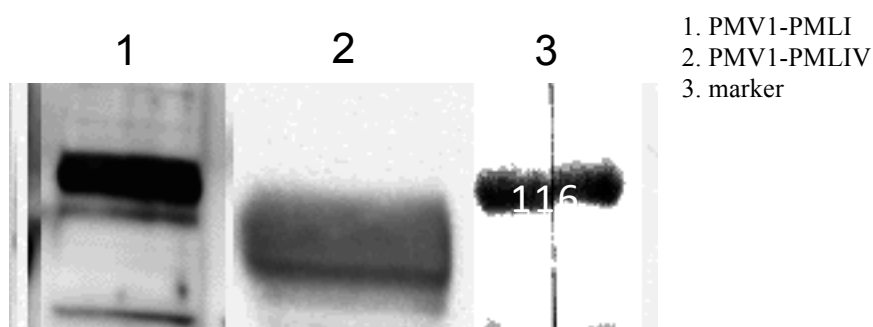
NFY-A construct	co-localization with PML
Full length (1-318)	+
1-279	+
1-261	+
1-247	-
1-247 + NLS	-
1-158	-
1-53	-
58-158	-
248-261	+/-
159-261	+
209-279	+
158-279	+

**Εικόνα 4.1.1) Πλασμιδιακές κατασκευές του NFY-A και συνεντοπισμός τους με την PML.**

#### 4.2) Πλασμιδιακές κατασκευές της PML πρωτεΐνης

1. PMV 1 – PMLI
2. PMV 1 - PMLIV

Σε πλασμίδιο PMV 1 που περιέχει την VP16 activation domain ενσωματώσαμε το γονίδιο της PML I και PML IV πρωτεΐνης. Μετά από υπερέκφραση των πλασμιδίων αυτών σε κύτταρα HEK 293 τα μελετήσαμε σε επίπεδο πρωτεΐνης και εξακριβώσαμε την ορθότητα των πλασμιδίων όσον αφορά το πλαίσιο ανάγνωσής τους και συνεπώς της έκφρασής τους.

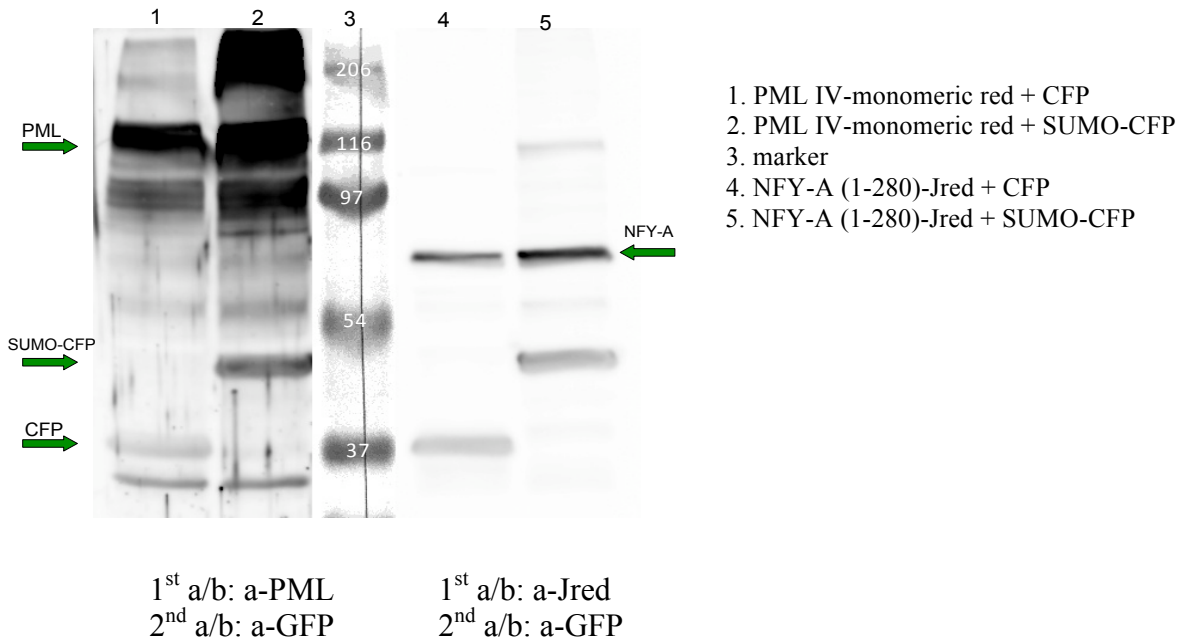


a/b: a-PML

**Εικόνα 4.2.1 : Western Blot των PMV1-PML I, PMV1- PML IV**

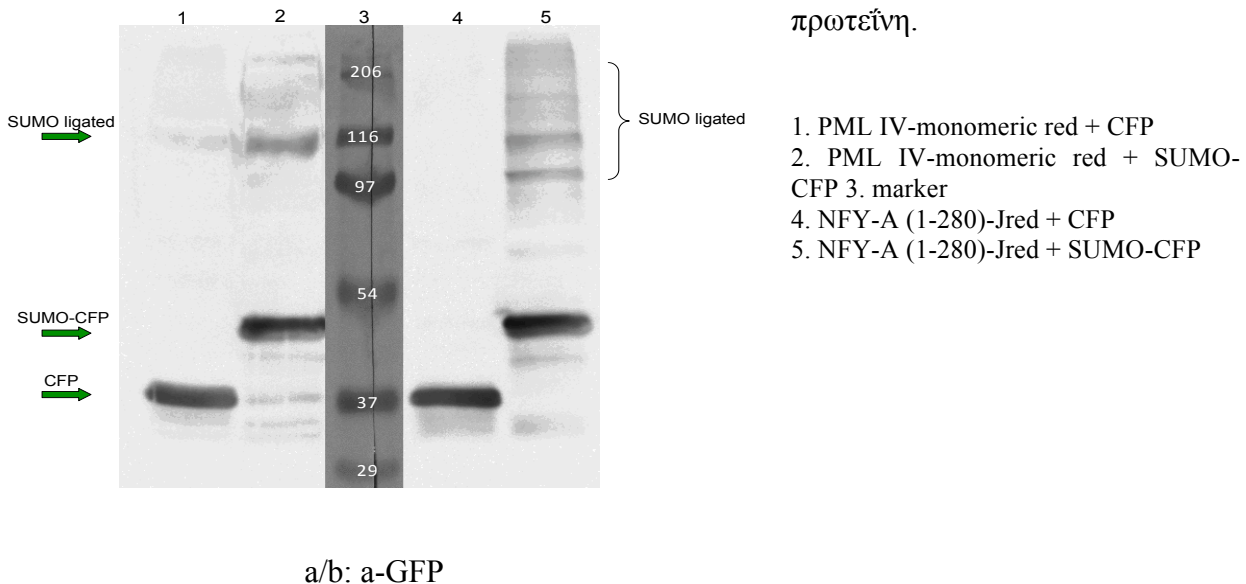
### 4.3) Μελέτη του NFY-A για πιθανή σουμοϋλίωση (SUMOylation)

Η NFY-A πρωτεΐνη περιέχει το τετραπεπτιδικό μοτίβο Ψ-K-x-D/E όπου η λυσίνη (K) βρίσκεται στο 284 αμινοξύ στην long ισομορφή και στο 255 στην short με την αλληλουχία 'AKLE'. Σε κύτταρα HEK 293 υπερεκφράσαμε την IV ισομορφή της PML και τον NFY-A μαζί με SUMO πρωτεΐνη. Μετά την απομόνωση πρωτεϊνών και διαχωρισμό τους σε SDS-page προκύπτει η σουμοϋλιομένη μορφή της PML IV και ο NFY-A να έχει αυξημένο μοριακό βάρος υποδηλώνοντας την πιθανή συγκόλληση του με πρωτεΐνες SUMO.



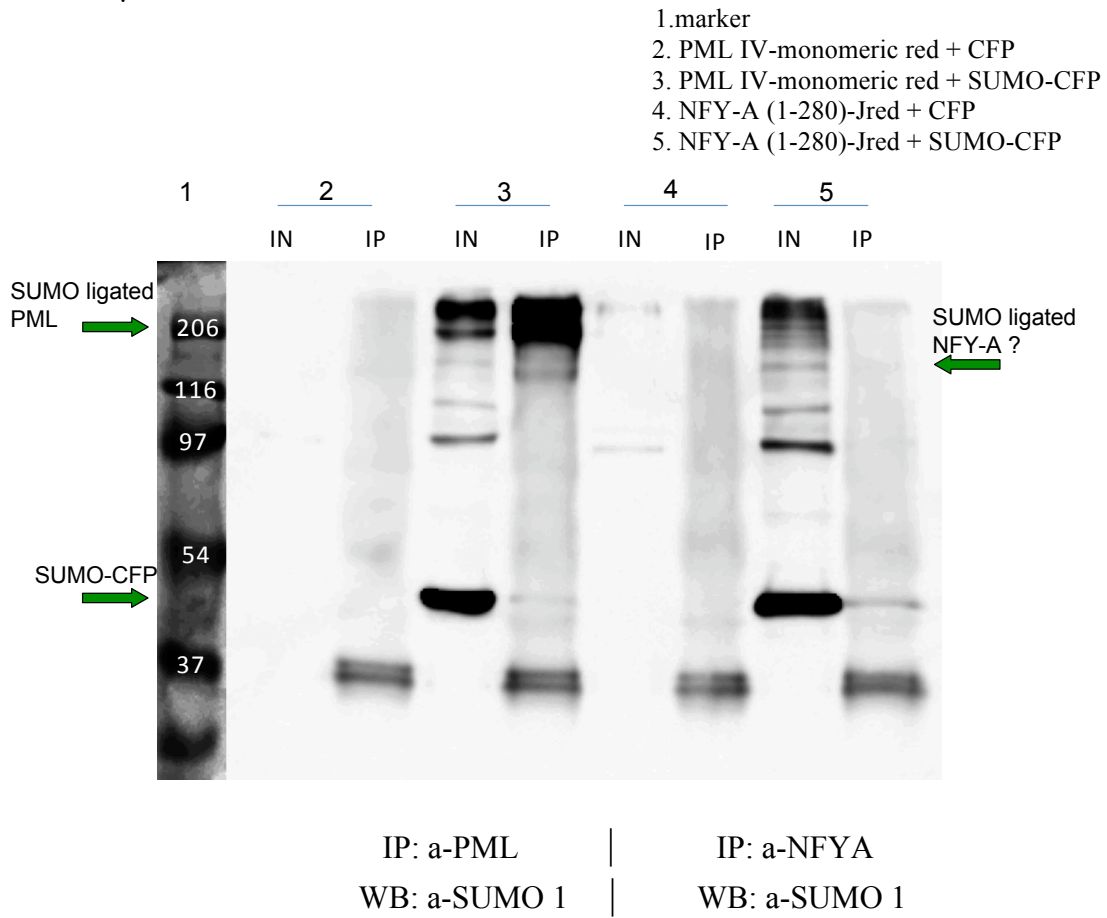
**Εικόνα 4.3.1: Western Blot της PML και του NFY-A για ανίχνευση σουμοϋλίωσης**

Στην ίδια μεμβράνη έγινε strip και ξαναχρησιμοποιήθηκε μόνο το a-GFP αντίσωμα για να φανεί καλύτερα η Sumo πρωτεΐνη.



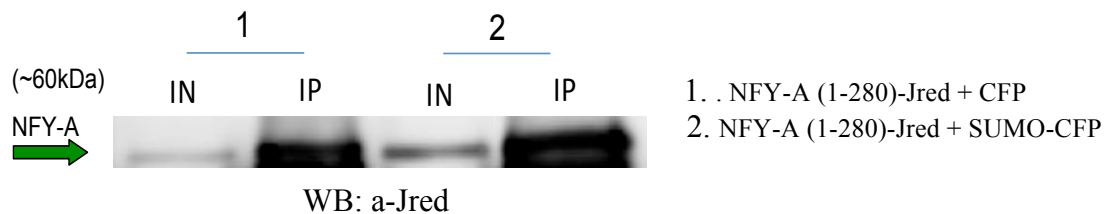
**Εικόνα 4.3.2: Western Blot της PML και του NFY-A με α-GFP**

Ως επαλήθευση αυτού του πειράματος έγινε συνανοσοκατακρήμνιση (Co-Immunoprecipitation) των δύο πρωτεϊνών χωρίς όμως να προκύπτει το επιθυμητό αποτέλεσμα.



**Εικόνα 4.3.3 : Co-Immunoprecipitation του NFY-A και της PML IV με SUMO πρωτεΐνη**

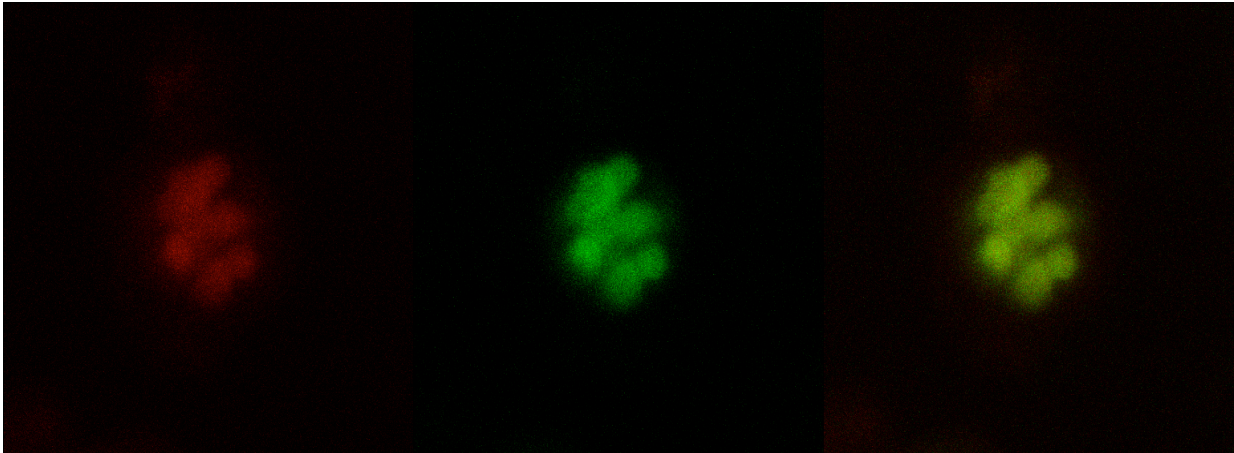
Στη συνέχεια, έγινε Western blot με α-NFY-A και επαληθεύτηκε η ύπαρξη του NFY-A στη συγκεκριμένη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.



**Εικόνα 4.3.4 Western Blot για τον NFY-A**

#### 4.4) In vivo συνεντοπισμός του NFY-A με την PML IV ισομορφή.

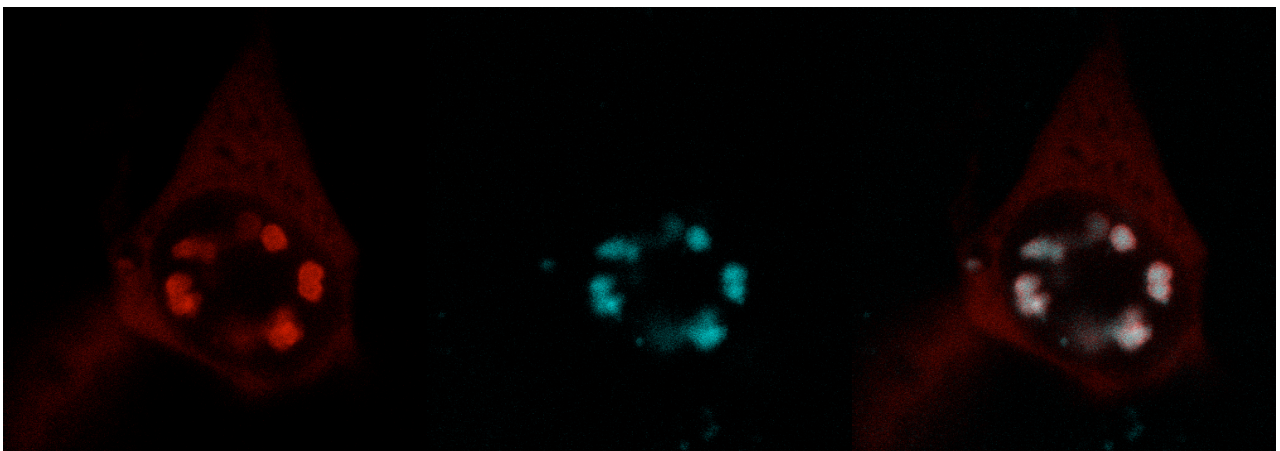
Μετά από διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK 293 με PML IV και NFY-A, αφού είχαν συντηχθεί με φθορίζουσα πρωτεΐνη, παρατηρήσαμε ότι: υπάρχει αυξημένος φθορισμός του NFY-A στα PML bodies που σημαίνει ότι υπάρχει συνεντοπισμός των σωματίων με τον μεταγραφικό παράγοντα NFY-A.



**Εικόνα 4.4.1:** Συνεντοπισμός του NFY-A-Jred με την PML IV-GFP.

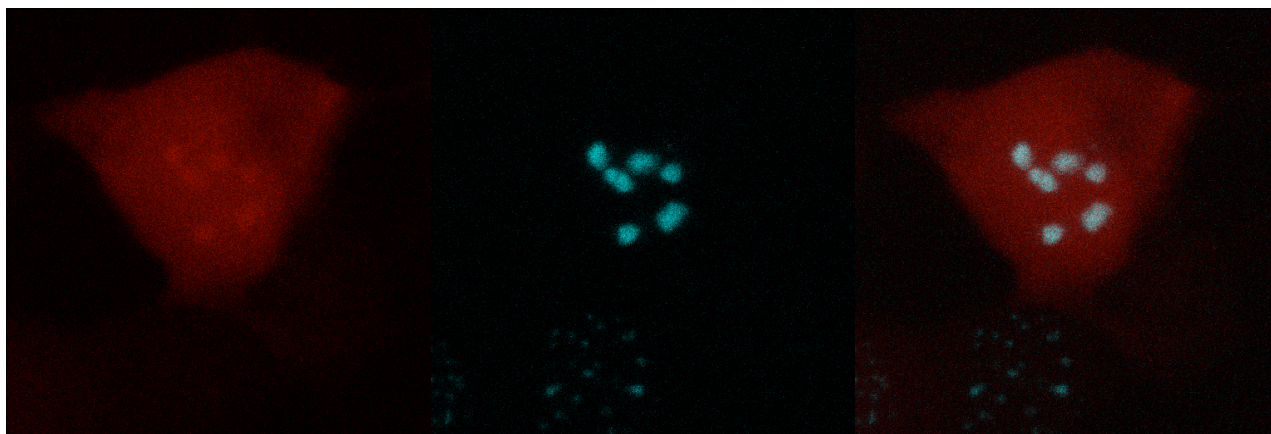
Υπερεκφράσαμε στα κύτταρα το pNFY-A-Jred και το pPML IV-GFP και παρατηρήσαμε ότι σχεδόν όλη η ποσότητα του NFY-A βρίσκεται δεσμευμένη στα PML NBs ωστόσο υπάρχει και ελεύθερη πρωτεΐνη στο πυρηνόπλασμα.

Στη συνέχεια εξετάσαμε ποια περιοχή του NFY-A οφείλεται για την είσοδο στον πυρήνα και τον συνεντοπισμό του με τα PML σωματίδια. Παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στα σημεία εντοπισμού του NFY-A ανάλογα με την αμινοξική του αλληλουχία.



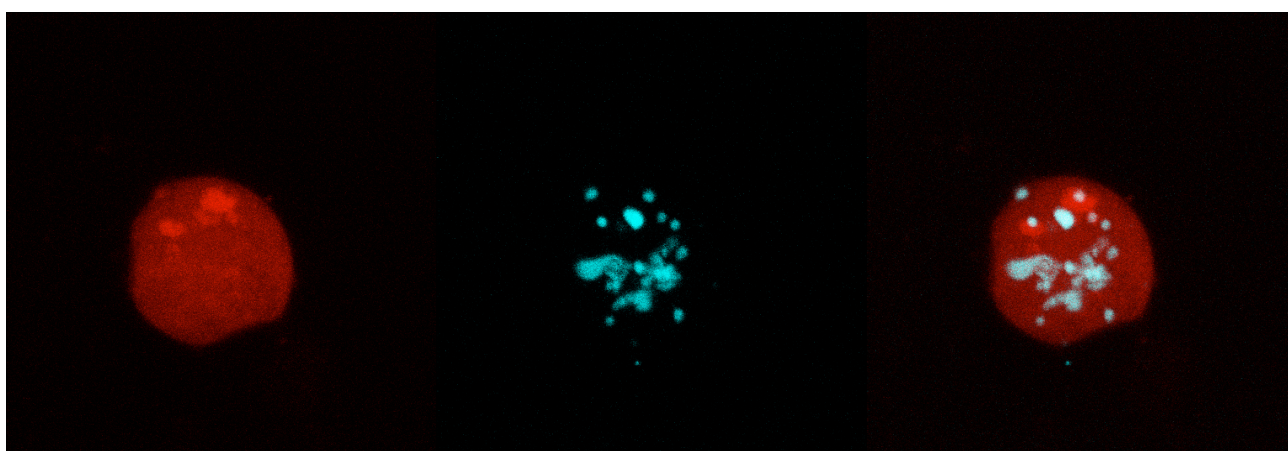
**Εικόνα 4.4.2 :** NFY-A(1-261)-Jred + PML IV-CFP.

Η ποσότητα του NFY-A που βρίσκεται στον πυρήνα είναι στα PML σωματίδια, ενώ κάποια σημαντική ποσότητα του βρίσκεται και στο κυτταρόπλασμα.



**Εικόνα 4.4.3 : NFY-A(247-261)-Jred + PML IV-CFP.**

Η ποσότητα του NFY-A που βρίσκεται στα PML NBs είναι λιγότερη από την αντίστοιχη του πυρηνοπλάσματος και του κυτταροπλάσματος. Άρα χρειάζεται τόσο η καρβοξυτελική όσο και η αμινοτελική περιοχή του NFY-A για την είσοδό του στον πυρήνα και τον συνεντοπισμό του στα PML σωματίδια.



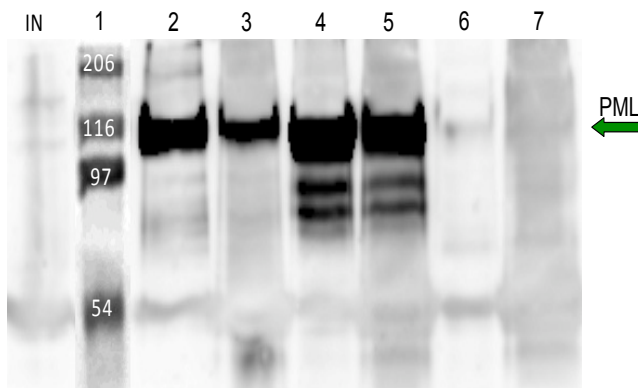
**Εικόνα 4.4.4 NFY-A(247-261)+NLS-Jred + PML IV-CFP.**

Ο NFY-A βρίσκεται συγκεντρωμένος στον πυρήνα αλλά δεν είναι πάνω στα PML NBs. Μπορεί η ύπαρξη του NLS να εξασφαλίζει την είσοδό του στον πυρήνα αλλά ο συνεντοπισμός του με τα PML σωματίδια απαιτεί και την ύπαρξη του αμινοτελικού άκρου του μεταγραφικού παράγοντα.

Οι εικόνες λήφθηκαν με το πρόγραμμα Lazer Sharp της ZEISS και επεξεργάστηκαν με το Volocity 5 της IMPROVISION

#### 4.5) Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του NFY-A και in-vitro αλληλεπίδρασή του με την PML.

Χρησιμοποιήσαμε τον NFY-A- Polyhistidine tag για να εξετάσουμε την αλληλεπίδραση του με την PML πρωτεΐνη. Ο NFY-A-His δεν υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως ουβικουτινίωση, ακετυλίωση ή πιθανή σουμοϋλίωση. Μετά από παροδική διαμόλυνση HEK 293 κυττάρων με PML IV-myc και PML III-myc, πραγματοποιήθηκε συνανοσοκατακρήμνιση των δύο πρωτεϊνών σε σφαιρίδια νικελίου (Ni).

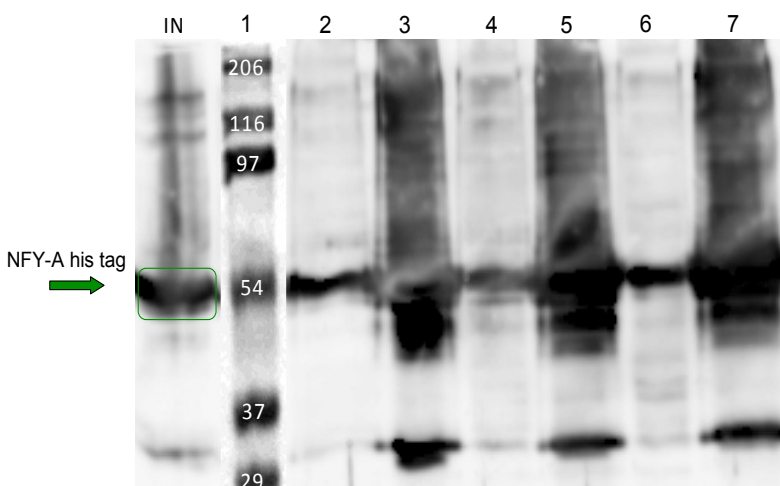


IN: NFY-A-His- beads (Ni)  
 1: marker  
 2: PML IV-myc –beads  
 3: PML IV-myc + NFY-A-His-  
 beads  
 4: PML III-myc– beads  
 5: PML III-myc +NFY-A-His-  
 beads  
 6: N.T cell extract-beads  
 7: N.T cell extract + NFYA-His  
 beads

a/b: a-myc

#### Εικόνα 4.5.1 : Co-Immunoprecipitation του NFY-A –His tag με την PML III και PML IV (a/b: a-myc).

Στις στήλες 2,4 η ύπαρξη PML δεν δικαιολογείται καθώς δεν μπορεί να συνενωθεί με τα σφαιρίδια Ni, συνεπώς το πείραμα δεν μπορεί να θεωρηθεί επιτυχές.



IN: NFY-A-His- beads (Ni)  
 1: marker  
 2: PML IV-myc –beads  
 3: PML IV-myc + NFY-A-His-  
 beads  
 4: PML III-myc – beads  
 5: PML III-myc +NFY-A-His-  
 beads  
 6: N.T cell extract-beads  
 7: N.T cell extract + NFYA-His  
 beads

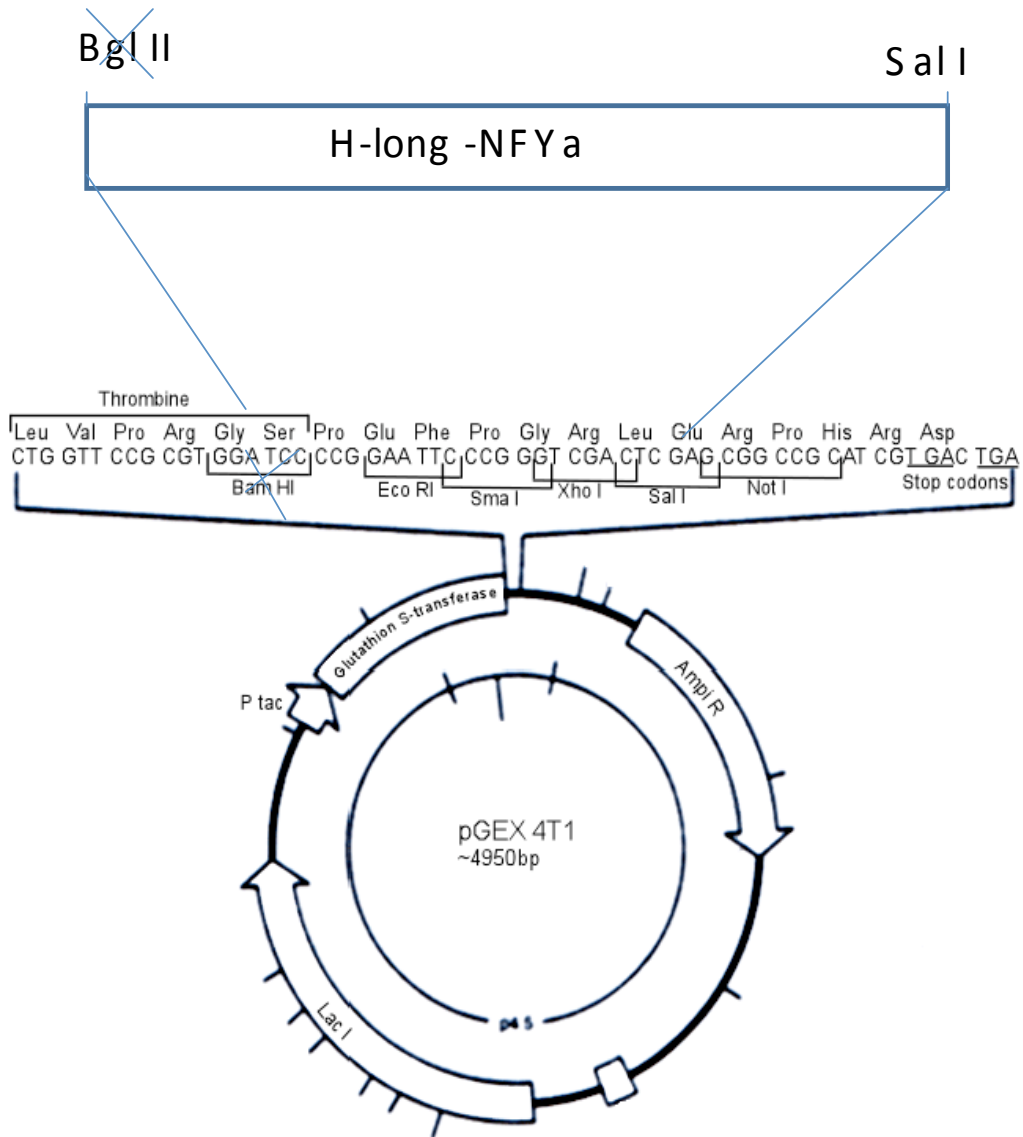
a/b: a-His

#### Εικόνα 4.5.2 : Co-Immunoprecipitation του NFY-A –His tag με την PML III και PML IV (a/b: a-His).

Ελέγχοντας για τον NFY-A με a-His στις στήλες 2,4,6 δεν έπρεπε να εμφανίζεται καμία ζώνη συνεπώς δεν μπορούμε να εμπιστευθούμε το συγκεκριμένο αποτέλεσμα.

Προκειμένου λοιπόν, να εξετάσουμε την αλληλεπίδραση του NFY-A με την PML IV κατασκευάσαμε το εξής πλασμίδιο

**pGEX 4T-1/ Human-long-NFY-A**





Πραγματοποιήσαμε τα εξής τρία διαφορετικά πειράματα.

- ✓ Σε βακτηριακή καλλιέργεια με το pGEX4T-1-NFY-A πλασμίδιο κάναμε επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης (IPTG). Η βακτηριακή πρωτεΐνη NFY-A με την Glutathione S-transferase domain (GST) χρησιμοποιήθηκε για GST-pulldown δοκιμή. Ταυτόχρονα, κάναμε υπερέκφραση της PML IV-myc σε HEK 293 κύτταρα και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα φορτώθηκε στην κολώνα γλουταθιόνης.
- ✓ Σε παράλληλο πείραμα έγινε, ξεχωριστά, παροδική διαμόλυνση HEK 293 κυττάρων με NFY-A-GFP, PML III-myc και PML IV-myc. Για τα δύο είδη πρωτεϊνών κάναμε συνανοσοκατακρήμνυση προκειμένου να εξετασθεί η αλληλεπίδραση των δύο όταν αυτά προέρχονται από διαφορετικά κύτταρα.
- ✓ Τέλος, σε κύτταρα HEK 293 υπερέκφρασαμε την PML III-myc μαζί με NFY-A-GFP και την PML IV-myc με τον NFY-A-GFP και με συνανοσοκατακρήμνυση πήραμε τα εξής αποτελέσματα.

IN 1: PML III-myc (input)

IN 2: PML IV-myc (input)

1: marker

2: NFY-A-GST + PML IV-myc extract

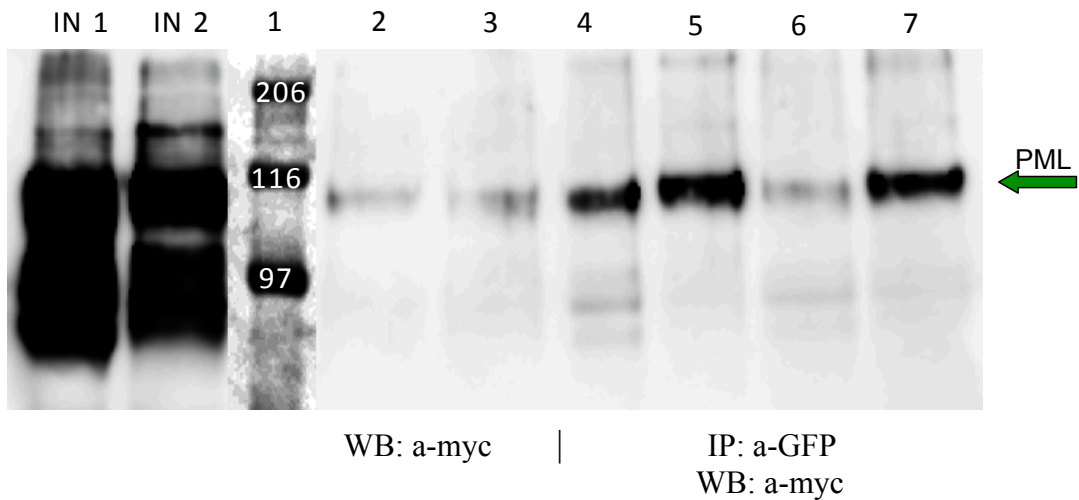
3: GST protein + PML IV-myc extract

4: NFY-A-GFP + PML III-myc extract

5: NFY-A-GFP + PML I-myc extract

6: NFY-A-GFP + PML III-myc

7: NFY-A-GFP + PML IV-myc

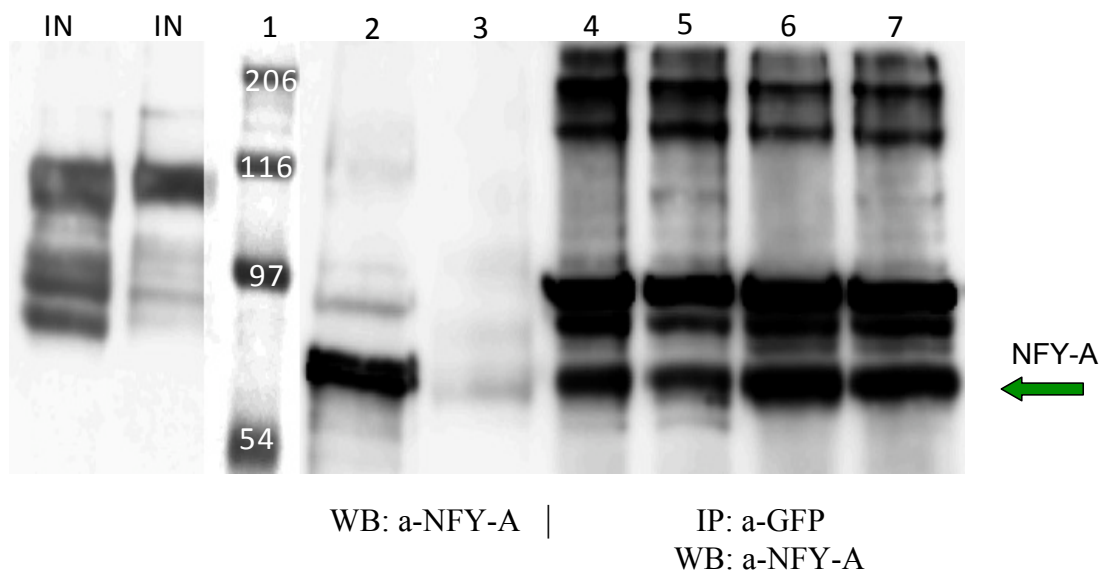


**Εικόνα 4.5.3 :** (2-3 lanes) GST-pulldown για τον NFY-A, (4-7 lanes) co-IP για την PML III και PML IV με τον NFY-A (a/b: a-myc).

Στη 2<sup>η</sup> στήλη φαίνεται ότι η PML IV δεν προσκολλάται στον μεταγραφικό παράγοντα σε αντίθεση με την 5<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> στήλη. Αντίστοιχα, στην 4<sup>η</sup> στήλη η PML III ενώνεται με τον NFY-A ενώ στην 6<sup>η</sup> λιγότερο έως καθόλου.

Για να επαληθεύσουμε την ύπαρξη του NFY-A σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήσαμε την ίδια μεμβράνη με α-NFY-A αφού πρώτα είχαμε κάνει strip.

- IN 1: PML III-myc (input)
- IN 2: PML IV-myc (input)
- 1: marker
- 2: NFY-A-GST + PML IV-myc extract
- 3: GST protein + PML IV-myc extract
- 4: NFY-A-GFP + PML III-myc extract
- 5: NFY-A-GFP + PML IV-myc extract
- 6: NFY-A-GFP + PML III-myc
- 7: NFY-A-GFP + PML IV-myc



**Εικόνα 4.5.4 :** (2-3 lanes) GST-pulldown για τον NFY-A, (4-7 lanes) co-IP για την PML III και PML IV με τον NFY-A (a/b: a-NFY-A).

## 5) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με άλλους συγγραφείς έχει αποδειχθεί ότι με τα PML NBs συνεντοπίζονται αρκετοί παράγοντες που σχετίζονται με τη μεταγραφική ρύθμιση<sup>(2)</sup>. Ένας ακόμη μεταγραφικός παράγοντας που αποτελεί στοιχείο των PML NBs είναι και η A υπομονάδα του NFY. Ο NFY-A συνεντοπίζεται με τα PML NBs με διαφορετική ένταση ανάλογα με την ισομορφή της PML που υπερεκφράζουμε, εμφανίζοντας αυξημένο συνεντοπισμό με τα PML NBs όταν υπερεκφράσουμε την PMLIV. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι υπερεκφράζοντας συγκεκριμένη μορφή της PML αλλάζει η στοιχειομετρία των των PML NBs με αποτέλεσμα να υπάρχουν αυξημένα ποσοστά της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης. Διαμολύνοντας κύτταρα με συγκεκριμένα κομμάτια του μεταγραφικού παράγοντα και της PMLIV παρατηρήσαμε ποια περιοχή του NFY-A οφείλεται για την αλληλεπίδρασή του με την PMLIV πρωτεΐνη. Η περιοχή 1-261 του NFY-A συνεντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό με τα PML NBs, ωστόσο υπάρχει και κάποια ποσότητα αυτού η οποία δεν εντοπίζεται στον πυρήνα. Αντίθετα, η περιοχή 247-261 του μεταγραφικού παράγοντα αλληλεπιδρά σε πολύ μικρό βαθμό με τα PML NBs καθώς μεγάλη ποσότητα αυτού βρίσκεται ελεύθερη στο πυρηνόπλασμα αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Ακόμη, μετά την προσθήκη σήματος πυρηνικού εντοπισμού στο ίδιο κομμάτι του NFY-A, μπορεί να εισέρχεται όλη η ποσότητα του στον πυρήνα χωρίς όμως αυτό να επαρκεί για συνεντοπισμό του με τα PML NBs. Συνεπώς η αλληλεπίδραση του NFY-A με τα PML NBs μέσω της PML πρωτεΐνης απαιτεί τόσο την καρβοξυτελική όσο και την αμινοτελική περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα.

Η αμινοξική αλληλουχία του μεταγραφικού παράγοντα NFY-A φαίνεται να υφίσταται μετα-μεταφραστική τροποποίηση από SUMO πρωτεΐνες κάτι που δεν έχει αποδειχθεί μέχρι στιγμής από έρευνες άλλων επιστημόνων. Η λυσίνη (K) στο 255 της short υπομονάδας του NFY-A φαίνεται να υπόκειται σε σουμοϋλίωση, κάτι που δείχθηκε με Western blot. Ωστόσο, στην επαλήθευση του πειράματος με συνανοσοκατακρήμνυση της PML και του NFY-A με SUMO πρωτεΐνες, μόνο στην πρώτη εντοπίστηκαν SUMO πρωτεΐνες.

Η χρησιμότητα λοιπόν της σουμοϋλίωσης για τον μεταγραφικό παράγοντα, μπορεί να έγκειται στην ικανότητα πρόσδεσής του στην PML πρωτεΐνη. Ορμώμενοι από αυτό, στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τον NFY-A-His, φάνηκε ότι η βακτηριακή έκφραση του NFY-A δεν οδηγεί σε αλληλεπίδραση αυτού με την PML πρωτεΐνη. Αντίθετα, η έκφραση του NFY-A σε ευκαρυωτικά κύτταρα στα οποία οι πρωτεΐνες υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως σουμοϋλίωση, καθιστά ικανό το μεταγραφικό παράγοντα να ενωθεί με την PML πρωτεΐνη και συνεπώς με τα PML σωματίδια.

## 6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. de The H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 1991
2. Bernardi R, Pandolfi P.P. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007
3. Kakizuka A, Miller W.H, Umesono K, Warrell R.P, Frankel S.R, Murty V.V, Dmitrovsky E, Evans R.M. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 1991
4. Stadler M, et al. Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferon is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* 1995
5. de Stanchina E, et al. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol. Cell* 2004
6. Jensen K, Shields C, Freemont P.S. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 2001
7. Duprez E, et al. SUMO-1 modification of acute promyelocytic leukemia protein PML: implication for nuclear localization. *J. Cell Sci.* 1999
8. Yang S, et al. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2 *Nature Cell Biology* 2002
9. Reineke E.L, Kao H.Y. Targeting promyelocytic leukemia protein: a mean to regulate PML Nuclear Bodies. *International Journal of Biological Sciences* 2009
10. Shen T, et al. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol. Cell* 2006
11. Lang M, et al. Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J. Cell Sci.* 2009
12. Mantovanni R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 1999
13. Bi W, et al. DNA binding specificity of the CCAAT-binding factor CBF/NFY. *J. Biol. Chem.* 1997
14. McNabb D.S, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Mol. Cell Biol.* 1997
15. Baxevanis A.D, et al. A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif *Nucleic Acid Res.* 1995
16. Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Op. Gen. Dev.* 1999
17. Liberati C, et al. NF-Y binding to twin CCAAT boxes: role of Q-rich domains and histone fold helices. *J. Mol. Biol.* 1999
18. Dooley K.A, et al. Sterol regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-coenzyme A Synthetase gene through a direct interaction between Sterol Regulatory Element Binding Protein and the trimeric CCAAT-binding factor/Nuclear factor Y. *J. Biol. Chem.* 1998
19. Li X.Y, et al. Intron-Exon Organization of the NF-Y Genes. *J. Biol. Chem.* 1992
20. Li W.X, et al. The *Arabidopsis* NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. *Plant Cell* 2008

21. Manni I, et al. Posttranslational regulation of NF-YA modulates NF-Y transcriptional activity. *Mol. Biol. Cell* 2008
22. Hay RT "SUMO: a history of modification". *Mol. Cell* 2005
23. Zhang XD, Goeres J, Zhang H, Yen TJ, Porter AC, Matunis MJ. "SUMO-2/3 Modification and Binding Regulate the Association of CENP-E with Kinetochores and Progression through Mitosis". *Mol Cell* 2008
24. Saitoh H, Hinchey J. "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3". *J Biol Chem.* 2000
25. Matic I, van Hagen M, Schimmel J, et al. "In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy". *Mol Cell Proteomics* 2008