

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Η κινάση Chk1 προστατεύει από τις χρωματινικές  
γέφυρες φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη BLM στη  
Σερίνη 502 και εμποδίζοντας την αποικοδόμηση της.**

---

ΔΑΝΔΟΥΛΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής και επιστημονικά υπεύθυνος: κ.Γεώργιος Ζάχος

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>2</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>3</b>
<b>ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ</b>	
<b>SUMMARY</b>	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>6</b>
<b>ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>10</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>12</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>23</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ</b>	<b>25</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>33</b>

## **Ευχαριστίες**

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθ. Γεώργιο Ζάχο για τις πολύτιμες συμβουλές και τα σχόλια του πάνω σε αυτή τη μελέτη. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Ελένη Πετσαλάκη, καθώς και τους καθηγητές Ειρήνη Αθανασάκη και Γεώργιο Μαυροθαλασσίτη.*

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

## Summary

DNA bridges represent incompletely segregated chromosomal DNA, connecting the poles of the two daughter cells during anaphase. If unresolved, DNA bridges can be fragmented during cytokinesis leading to chromosomal instability. Bloom's syndrome protein, BLM, is localized in anaphase bridges and this localization is required for their resolution.

Here, we show that Chk1 inhibition leads to BLM proteosomal degradation during interphase and higher frequency of chromatin bridges in anaphase. Chk1 constitutively phosphorylates BLM at Serine 502 (S502) *in vivo* and phosphorylated BLM localises to chromatin bridges. Mutation of Serine 502 of BLM to a phospho-mimicking BLM-S502D, in which S502 is mutated to aspartic acid, stabilises BLM and prevents chromatin bridges in Chk1 deficient cells. In addition, Cullin 3 ubiquitin ligase associates with wild-type but not BLM-S502D and Cullin 3 depletion stabilises BLM and rescues BLM localisation to chromatin bridges after Chk1 inhibition.

These results suggest that Chk1 phosphorylates BLM at Serine 502 to inhibit Cullin 3-mediated BLM degradation by proteasome during interphase. We propose that Chk1 prevents DNA bridges in anaphase by stabilising BLM.

## Περίληψη

Οι γέφυρες DNA αποτελούν μη σωστά διαχωρισμένο χρωμοσωμικό DNA που συνδέει τους πόλους των δύο θυγατρικών κυττάρων, κατά την ανάφαση της μίτωσης. Αν δεν επιλυθούν, είναι δυνατόν να σπάσουν κατά την κυτταροκίνηση οδηγώντας σε χρωμοσωμική αστάθεια. Η ελικάση BLM εντοπίζεται στις γέφυρες DNA και είναι απαραίτητη για την επίλυση τους.

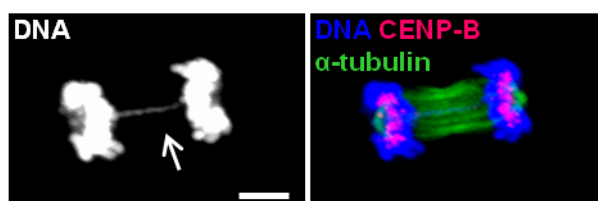
Στην παρούσα μελέτη, δείχνουμε ότι αναστολή της κινάσης Chk1 οδηγεί σε αποικοδόμηση της BLM από το πρωτεάσωμα στη μεσόφαση, και σε αύξηση των γεφυρών χρωματίνης στην ανάφαση. Η Chk1 φωσφορυλιώνει συνεχώς την BLM στη Σερίνη 502 *in vivo* και η φωσφορυλιωμένη BLM εντοπίζεται στις γέφυρες DNA στην ανάφαση. Κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη BLM στην οποία η Σερίνη 502 έχει μεταλλαχθεί σε ασπαραγινικό οξύ, ώστε να μιμείται τη φωσφορυλιωμένη BLM στη Σερίνη 502 (S502D BLM), εμφανίζουν σταθερά επίπεδα της BLM και προστασία έναντι των χρωματινικών γεφυρών, όταν αναστέλλουμε την Chk1. Επίσης, η Cullin 3 λιγάση ουβικυτίνης αλληλεπιδρά μόνο με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και όχι με την μεταλλαγμένη S502D BLM, ενώ με μείωση της Cullin 3 τα επίπεδα της BLM δεν ελαττώνονται και η πρωτεΐνη εντοπίζεται στις γέφυρες χρωματίνης έπειτα από αναστολή της Chk1.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η κινάση Chk1 φωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη BLM στη Σερίνη 502, εμποδίζει την πρόσδεση της Cullin 3 στη BLM και την αποικοδόμηση της από το πρωτεάσωμα. Προτείνουμε λοιπόν, ότι η Chk1 προστατεύει από τις γέφυρες DNA στην ανάφαση μέσω σταθεροποίησης της BLM πρωτεΐνης.

## Εισαγωγή

Αποτυχία εξάλειψης γεγονότων ανασυνδυασμού ή των ενδιάμεσων δομών της αντιγραφής, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία γεφυρών DNA κατά την ανάφαση της μίτωσης (Chan et al., 2007). Ως χρωματινική γέφυρα ορίζεται μία συνεχής γραμμή χρωματίνης που συνδέει τις δύο μάζες του DNA (Gisselsson, 2008) (Εικόνα 1). Αν δεν επιλυθούν οι χρωματινικές γέφυρες, είναι πιθανό να σπάσουν σε ένα ή περισσότερα κομμάτια κατά την κυτταροκίνηση, οδηγώντας σε χρωμοσωμική αστάθεια (Hoffelder et al., 2004) ή να εμποδίσουν την ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης, δημιουργώντας διπύρηνα κύτταρα (Steigemann et al., 2009). Η ελικάση BLM, μεταλλαγές της οποίας προκαλούν το σύνδρομο Bloom στον άνθρωπο (German, 1993), εντοπίζεται στις αναφασικές γέφυρες και ο εντοπισμός αυτός απαιτείται για την επίλυση τους ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός (Chan et al., 2007).

### BE cells, control



**Εικόνα 1:** Εικόνα από συνεστιακή μικροσκοπία σε BE κύτταρα, στην οποία παρουσιάζεται ένα κύτταρο στην ανάφαση της μίτωσης που φέρει μία γέφυρα DNA. Με βέλος δείχνεται η γέφυρα. Κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA, πράσινο:  $\alpha$ -tubulin. Η κλίμακα είναι 5 $\mu$ m.

Το σύνδρομο Bloom (Bloom's Syndrome) είναι μια σπάνια, αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική αστάθεια, αυξημένη ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchanges, SCEs) και προδιάθεση για ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου (German, 1993). Το γονίδιο που είναι μεταλλαγμένο στο σύνδρομο Bloom, *BLM*, εδράζεται στο χρωμόσωμα 15 στον άνθρωπο και κωδικοποιεί ένα πεπτιδίο 1417 αμινοξέων το οποίο περιέχει μοτίβα που έχουν ομολογία με μοτίβα των RecQ ελικασών (Ellis et al., 1995). Η πρωτεΐνη BLM είναι μία ATP εξαρτώμενη 3'-5' DNA ελικάση και μία DNA εξαρτώμενη ATPase (Karow et al., 1997). Είναι πυρηνική πρωτεΐνη, που εντοπίζεται στα PML (promyelocytic leukemia) nuclear bodies (Ishov et al., 1999), στον πυρηνίσκο και σε ένα υποσύνολο τελομερών (Yankiwski et al., 2000).

Υπάρχουν τρία γνωστά πρωτεϊνικά σύμπλοκα στα οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχει η BLM: το BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex (Wang et al., 2000), ένα σύμπλοκο που συνδέεται με τα τελομερή (telomere associated complex) σε αθανατοποιημένα κύτταρα στα οποία λείπει η τελομεράση (Bhattacharyya et al., 2009) και το BTB (BLM, topoisomerase IIIa, BLAP75) πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο καταλύει μια διαδικασία η οποία ονομάζεται

double Holliday junction solution, απαραίτητη για τον τερματισμό των αντιδράσεων ομόλογου ανασυνδυασμού (Raynard et al., 2006). Τα επίπεδα της ενδογενούς BLM ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Κατά την G1 φάση τα επίπεδα της πρωτεΐνης είναι χαμηλά, ενώ αυξάνονται στο τέλος της S και στη G2/M φάση (Dutertre et al., 2000; Gharibyan and Youssoufian, 1999).

Ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου, η BLM φωσφορυλιώνεται από διαφορετικές κινάσες. Στην S φάση, φωσφορυλιώνεται από την ATR (ataxia telangiectasia and *rad3*<sup>+</sup> related) κινάση σε δύο κατάλοιπα, Θρεονίνη 99 και 122 (Thr99, Thr122), στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης. Παρουσία υδροξυουρίας (hydroxyurea, αναστέλλει την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου κατά την S φάση), η πρωτεΐνη BLM φωσφορυλιώνεται από την ATR κινάση, ενεργοποιώντας το S phase checkpoint (Davies et al., 2004). Παρουσία ακτινοβολίας, η BLM φωσφορυλιώνεται στη Thr99 από την κινάση ATM (Ataxia telangiectasia mutated), προστατεύοντας με τον τρόπο αυτό από χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Beamish et al., 2002). Σπασίματα στη διπλή έλικα (double-strand breaks) του DNA οδηγούν σε φωσφορυλίωση της BLM στη Thr99 από την ATM κινάση έχοντας σαν αποτέλεσμα την μετατόπιση της πρωτεΐνης από τα PML bodies στα σημεία βλαβών DNA, όπου συνεντοπίζεται με την γ-H2AX ιστόνη (DNA damage marker) (Rao et al., 2005). Η κινάση Chk1 φωσφορυλιώνει την BLM στη Σερίνη 646 συνεχώς *in vivo*, αυξάνοντας τον εντοπισμό της στα PML bodies. Παρουσία βλαβών DNA η φωσφορυλίωση στη θέση αυτή αναστέλλεται έχοντας ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της πρωτεΐνης από τα PML bodies και τον πυρηνίσκο, και την μεταφορά της στα σημεία βλαβών του DNA (Kaur et al., 2010).

Κατά τη διάρκεια της μίτωσης η BLM υπέρ φωσφορυλιώνεται. Η Cdc2 φωσφορυλιώνει την BLM στη Σερίνη 714 και τη Θρεονίνη 766, αποκλείοντας την από το nuclear matrix για να εμποδίσει την παρεμβολή της στις διαδικασίες της μίτωσης (Bayart et al., 2006). Επίσης φωσφορυλιώνεται από την κινάση του spindle assembly checkpoint (SAC), MPS1, στη Σερίνη 144 πιθανώς για να εμποδίσει πρόωμη έξοδο από τη μίτωση (Leng et al., 2006).

Η πρωτεϊνική κινάση Checkpoint kinase 1 (Chk1) ανήκει στην οικογένεια των κινασών Σερίνης/Θρεονίνης και είναι απαραίτητη για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση, παρουσία βλαβών DNA (Walworth et al., 1993). Ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης στη Σερίνη 345 και 317 (Ser345, Ser317) από τις κινάσες ATR/ATM, παρουσία βλαβών του DNA (Liu et al., 2000). Ενεργοποίηση της Chk1, παρουσία βλαβών DNA οδηγεί σε φωσφορυλίωση της Cdc25A φωσφατάσης. Η Cdc25A καταστρέφεται μέσω του πρωτεασώματος, με αποτέλεσμα την αναστολή των Cdk1 και Cdk2 κινασών και το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην S φάση. Όταν υπάρχουν βλάβες DNA, η Chk1 φωσφορυλιώνει την WEE1 κινάση, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την Cdk1 και την απενεργοποιεί. Απενεργοποίηση της Cdk1 οδηγεί σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση (Smith et al., 2010). Επίσης, η Chk1 φωσφορυλιώνει την Cdc25C, η οποία δεσμεύεται από τις 14-3-3 πρωτεΐνες και μεταφέρεται εκτός πυρήνα. Η απομάκρυνση της Cdc25C από τον πυρήνα, εμποδίζει την ενεργοποίηση της Cdk1 και το διαδοχικό σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση. Τέλος, η Chk1 ελέγχει την είσοδο στην μίτωση

φωσφορυλιώνοντας την Cdc25B στα κεντροσώματα, Η φωσφορυλίωση αυτή απενεργοποιεί την Cdc25B και οδηγεί σε αναστολή του συμπλόκου Cdk1/CyclinB (Smith et al., 2010).

Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου η Chk1 ρυθμίζει την αντιγραφή του DNA στην S φάση, την είσοδο στη μίτωση και το spindle checkpoint στην M φάση. Στην S φάση, η Chk1 ρυθμίζει το turnover της Cdc25A φωσφατάσης μέσω φωσφορυλίωσης σε τέσσερα κατάλοιπα Σερίνης (Sorensen et al., 2003). Αποικοδόμηση της Cdc25A μέσω του πρωτεασώματος, οδηγεί σε απενεργοποίηση της CDK2 και σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου. Αναστολή της Chk1 έχει ως αποτέλεσμα την πρόωμη εκπυροκρότηση νέων σημείων έναρξης της αντιγραφής, αύξηση του ρυθμού σύνθεσης DNA, αποσταθεροποίηση των δομών της αντιγραφής και συσσώρευση double-strand breaks (Feijoo et al., 2001; Syljuasen et al., 2005). Επομένως η Chk1 προστατεύει από βλάβες DNA, διατηρώντας το φυσιολογικό ρυθμό σύνθεσης του DNA και σταθεροποιώντας τις δομές της αντιγραφής. Στην G2 φάση, η Chk1 εμποδίζει την είσοδο στη μίτωση προτού να ολοκληρωθεί η αντιγραφή του DNA. Η Chk1 εντοπίζεται στα κεντροσώματα όπου φωσφορυλιώνει την Cdc25B. Η φωσφορυλίωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της Cdc25B και τη διαδοχική αναστολή του Cdk1/Cyclin B συμπλόκου (Kramer et al., 2004).

Κατά τη διάρκεια της μίτωσης η Chk1 είναι απαραίτητη για το σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και τη λειτουργία του spindle checkpoint. Η Chk1 ρυθμίζει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων μέσω φωσφορυλίωσης της Aurora B (Peddibhotla et al., 2009; Zachos et al., 2007). Η φωσφορυλιωμένη Aurora B στρατολογεί την πρωτεΐνη του spindle checkpoint BubR1 στους κινητοχώρους. Αναστολή της Chk1 οδηγεί σε μη σωστό εντοπισμό των Aurora B και BubR1, αυξάνοντας τα ποσοστά των μη σωστά διαχωρισμένων χρωμοσωμάτων και την αστάθεια του γονιδιώματος (Zachos et al., 2007). Η Chk1 φωσφορυλιώνει την Aurora B στη Σερίνη 331 προκαλώντας την ενεργοποίηση της και την επιδιόρθωση των μη διπολικά προσδεδωμένων κινητοχώρων. Η μεταλλαγή της Σερίνη 331 της Aurora B σε Αλανίνη οδηγεί σε λανθασμένο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, δημιουργία πολυπύρηνων κυττάρων, μειωμένο εντοπισμό της BubR1 στους κινητοχώρους και έξοδο από τη μίτωση παρουσία ταξόλης, η οποία σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους (Petsalaki et al., 2011; Petsalaki and Zachos, 2013).

Η πρωτεΐνη Cullin 3 (CUL3) είναι μία E3 λιγάση ουβικυτίνης, η οποία στοχεύει υποστρώματα για καταστροφή στο πρωτεάσωμα, προσθέτοντας ομάδες ουβικυτίνης στις πρωτεΐνες-στόχους. Στα μετόζωα υπάρχουν πέντε κατηγορίες E3 ubiquitin λιγασών (CUL1-CUL5). Η διαδικασία προσθήκης των ομάδων ουβικυτίνης στα υποστρώματα-στόχους περιλαμβάνει τρεις τάξεις διαφορετικών ενζύμων E1, E2, E3. Η ουβικυτίνη ενεργοποιείται μέσω του ενζύμου E1 (ubiquitin-activating enzyme), χρησιμοποιώντας ATP για να δεσμεύσει την ομάδα της ουβικυτίνης με θειοεστερικό δεσμό. Η ενεργοποιημένη ουβικυτίνη μεταφέρεται στη συνέχεια σε ένα ένζυμο E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), το οποίο αλληλεπιδρά με τις E3 λιγάσες ουβικυτίνης (ubiquitin-protein ligases) που δεσμεύουν το υπόστρωμα. Στη συνέχεια η ουβικυτινιλιωμένη πρωτεΐνη μεταφέρεται στο πρωτεάσωμα όπου και καταστρέφεται (Bosu and Kipreos, 2008; Pintard et al., 2004).

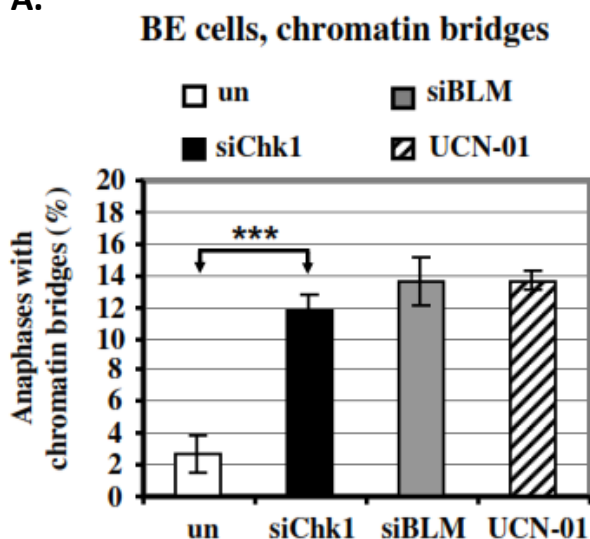


Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, δείχνουμε ότι η κινάση Chk1 φωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη BLM στη Σερίνη 502. Η φωσφορυλίωση αυτή σταθεροποιεί την BLM εμποδίζοντας την πρόσδεση της Cullin 3 (αλλά όχι των Cullin 1,2,4A,4B,5) και την αποικοδόμηση της BLM από το πρωτεάσωμα. Η φωσφορυλιωμένη BLM εντοπίζεται στις αναφασικές γέφυρες και συμμετέχει στην επίλυση τους. Προτείνουμε λοιπόν, ένα καινούριο μηχανισμό μέσω του οποίου η Chk1 προστατεύει έναντι των γεφυρών DNA στην ανάφαση της μίτωσης. Τα αποτελέσματα αυτά δημοσιεύτηκαν πρόσφατα στο περιοδικό *Journal of Cell Science* (Petsalaki et al., 2014).

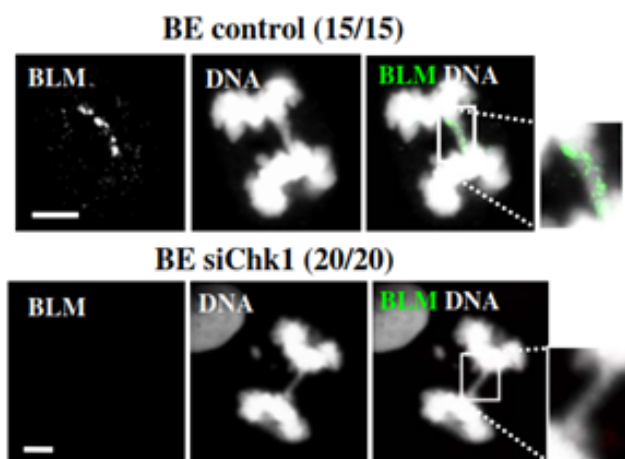
## Προκαταρκτικά αποτελέσματα – Σκοπός

Προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν από άλλους στο εργαστήριο μας, έδειξαν ότι ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου (BE κύτταρα) τα οποία επώαστηκαν με τον αναστολέα της Chk1, UCN-01, ή με siRNA εναντίον της Chk1, παρουσίασαν αύξηση στις χρωματινικές γέφυρες (13,7% ή 11,8% αντίστοιχα) στην ανάφαση σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου (2,7%). Επίσης, αύξηση στις χρωματινικές γέφυρες παρατηρήθηκε και έπειτα από επώαση των κυττάρων με siRNA εναντίον της BLM (13,6%; Εικόνα 2A). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, η Chk1 προστατεύει από το σχηματισμό χρωματινικών γεφυρών στην ανάφαση. Σε κύτταρα αγρίου τύπου, η πρωτεΐνη BLM εντοπίζεται κατά μήκος της γέφυρας DNA (Εικόνα 2B). Αντίθετα, σε κύτταρα BE που επιμολύνθηκαν με siRNA εναντίον της Chk1 και αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία δεν είναι δυνατός ο εντοπισμός της BLM στις γέφυρες DNA (Εικόνα 2B). Η πρωτεΐνη Chk1 λοιπόν, είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της BLM στις γέφυρες χρωματίνης.

A.



B.



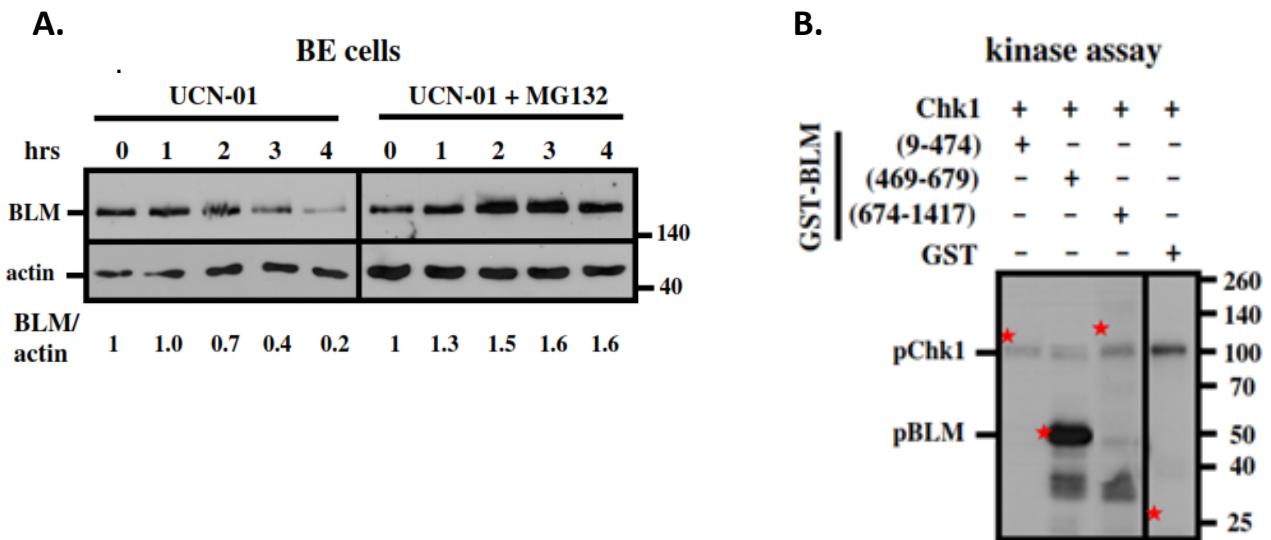
**Εικόνα 2: Η Chk1 προστατεύει από τις χρωματινικές γέφυρες στην ανάφαση.**

(A) Συχνότητα αναφάσεων με γέφυρες DNA σε BE κύτταρα untreated ή κύτταρα έπειτα από επιμόλυνση με siRNA εναντίον της Chk1 ή της BLM, ή επώαση με UCN-01 (n>100).

(B) Εικόνες από συνεστιακή μικροσκοπία σε BE κύτταρα control ή κύτταρα έπειτα από επώαση με UCN-01. Πράσινο: BLM, άσπρο: DNA. Η κλίμακα είναι 5µm.

Για να προσδιοριστεί η σημασία της Chk1 στη σταθερότητα της BLM, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα BE τα οποία επώαστηκαν με τον αναστολέα της Chk1 ή/και τον αναστολέα του πρωτεασώματος, MG-132. Δείχθηκε λοιπόν ότι έπειτα από αναστολή της Chk1, τα επίπεδα της ενδογενούς BLM μειώνονται (Εικόνα 3A). Αντίθετα, παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος τα επίπεδα της ενδογενούς BLM παραμένουν σταθερά με προσθήκη UCN-01 (Εικόνα 3A). Άρα η Chk1 φωσφορυλιώνοντας την BLM, σταθεροποιεί τα επίπεδα της και εμποδίζει την καταστροφή της από το πρωτεάσωμα.

Προκειμένου να εντοπιστεί η θέση στην οποία η Chk1 φωσφορυλιώνει την BLM, glutathione sepharose beads συζευγμένα με τμήματα της πρωτεΐνης BLM (GST-BLM<sup>9-474</sup>, GST-BLM<sup>469-679</sup>, GST-BLM<sup>674-1417</sup>) χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα της Chk1 σε *in vitro* δοκιμασία κινάσης (kinase assay). Το τμήμα της BLM που φωσφορυλιώνει η Chk1 είναι το 469-679 όπως φαίνεται στην Εικόνα 3B. Η φωσφορυλιωμένη GST-BLM<sup>469-679</sup> αναλύθηκε με Liquid Chromatography – Mass Spectrometry και η Σερίνη 502 της BLM αναγνωρίστηκε ως θέση φωσφορυλίωσης της Chk1.



**Εικόνα 3: Η Chk1 σταθεροποιεί την BLM μέσω φωσφορυλίωσης στη Σερίνη 502.**

(A) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western της ενδογενούς BLM και της ακτίνης, σε BE κύτταρα έπειτα από επώαση με UCN-01 παρουσία MG-132, για τις ώρες που αναγράφονται.

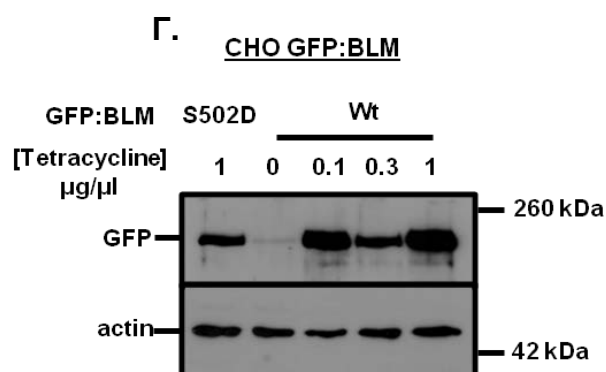
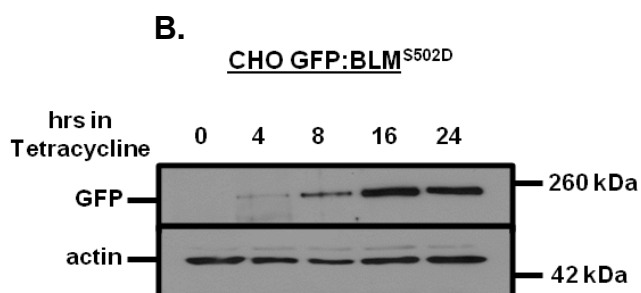
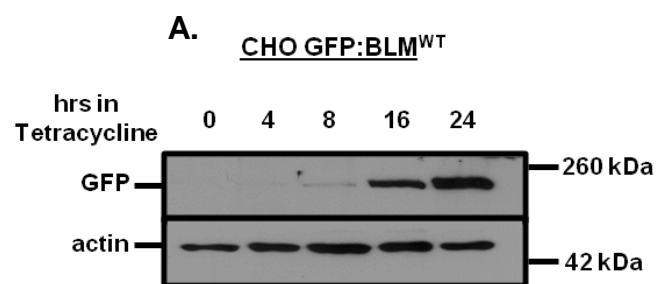
(B) Chk1 *in vitro* kinase assay. 10µg υποστρώματος (GST-BLM ή GST) χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντίδραση. Η ανάλυση έγινε με αυτοραδιογραφία. Με αστερίσκους υποδεικνύονται τα προβλεπόμενα μοριακά βάρη.

Σκοπός της μεταπτυχιακής μου διατριβής, ήταν η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της φωσφορυλιωμένης BLM στη Σερίνη 502 από την Chk1.

## Αποτελέσματα

### Δημιουργία κυτταρικών σειρών

Για να μελετήσουμε τον ρόλο της φωσφορυλίωσης της BLM στη Σερίνη 502, κατασκευάσαμε σταθερές κυτταρικές σειρές σε Chinese hamster ovary (CHO) κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν την αγρίου τύπου (wt) GFP:BLM ή την μεταλλαγμένη στη Σερίνη 502 σε ασπαραγινικό οξύ (S502D) GFP:BLM. Η επαγωγή του διαγονιδίου γίνεται με προσθήκη τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων (TRex σύστημα) (Εικόνα 4A κα 4B). Για την επαγωγή του διαγονιδίου τα CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> επωάζονταν με 300 ng/μl τετρακυκλίνης, ενώ τα CHO GFP:BLM<sup>S502D</sup> με 1 μg/μl τετρακυκλίνης για 16 ώρες. Η συγκέντρωση και ο χρόνος επώασης του φαρμάκου επιλέχθηκαν έτσι ώστε να είναι παρόμοια η έκφραση του διαγονιδίου στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 4Γ).



#### Εικόνα 4: Χαρακτηρισμός των GFP:BLM κυτταρικών σειρών

(A,B) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western της GFP:BLM (GFP) και ακτίνης στα CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> ή GFP:BLM<sup>S502D</sup> κύτταρα, έπειτα από επαγωγή του διαγονιδίου με 300ng/μl ή 1μg/μl τετρακυκλίνης αντίστοιχα, για τις ώρες που αναγράφονται .

(Γ) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot της GFP:BLM (GFP) και ακτίνης στα CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> ή GFP:BLM<sup>S502D</sup> κύτταρα, για διαφορετικές συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης.

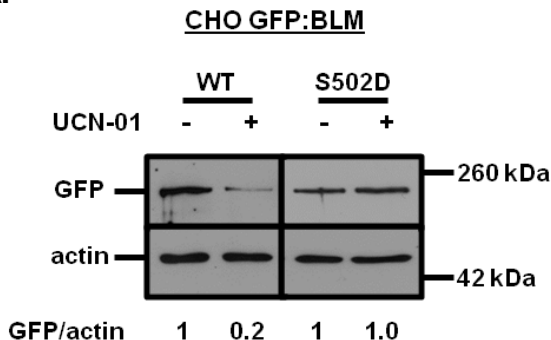
#### Η φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502 σταθεροποιεί την BLM και εμποδίζει τον σχηματισμό γεφυρών στην ανάφαση

Για να διερευνήσουμε τη σημασία της φωσφορυλίωσης για τα επίπεδα της πρωτεΐνης BLM, CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> και GFP:BLM<sup>S502D</sup> κύτταρα επωάστηκαν με τον αναστολέα της Chk1, UCN-01, για 8 ώρες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot). Με την προσθήκη του αναστολέα τα επίπεδα της wt πρωτεΐνης μειώθηκαν 5 φορές σε σχέση με τα untreated κύτταρα, εν αντιθέσει με τη μεταλλαγμένη BLM τα επίπεδα της οποίας δεν επηρεάζονται από την προσθήκη του φαρμάκου (Εικόνα 5A). Άρα, η Chk1 φωσφορυλιώνει τη BLM στη Σερίνη 502 και η φωσφορυλίωση αυτή σταθεροποιεί τα επίπεδα της BLM.

Στη συνέχεια, με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου ελέγχθηκε ο εντοπισμός της πρωτεΐνης σε untreated κύτταρα CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> και GFP:BLM<sup>S502D</sup>, αλλά και σε κύτταρα έπειτα από επώαση με UCN-01. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα επωάστηκαν με τον αναστολέα της Chk1 για 8 ώρες και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες για παρατήρηση. Έπειτα από αναστολή της Chk1 η αγρίου τύπου GFP:BLM δεν εντοπίζεται στις γέφυρες χρωματίνης (Εικόνα 5B). Αντίθετα, η GFP:BLM<sup>S502D</sup> εντοπίζεται στις χρωματινικές γέφυρες παρουσία UCN-01 (Εικόνες 5Γ). Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η φωσφορυλίωση της BLM από την Chk1 στη Σερίνη 502 είναι απαραίτητα για τον εντοπισμό της BLM στις γέφυρες DNA.

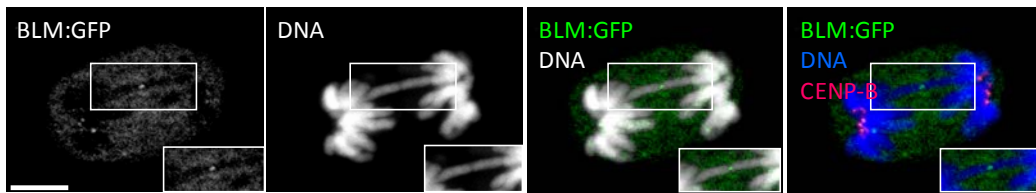
Επίσης, με αναστολή της Chk1 το ποσοστό των χρωματινικών γεφυρών στην ανάφαση αυξάνεται στο 19% στα CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> σε σύγκριση με τα control κύτταρα που είναι στο 2%. Στα CHO GFP:BLM<sup>S502D</sup> με προσθήκη UCN-01 δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστό των DNA γεφυρών (Εικόνα 5Δ). Επομένως, η φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502 της BLM προστατεύει από τον σχηματισμό χρωματινικών γεφυρών.

A.

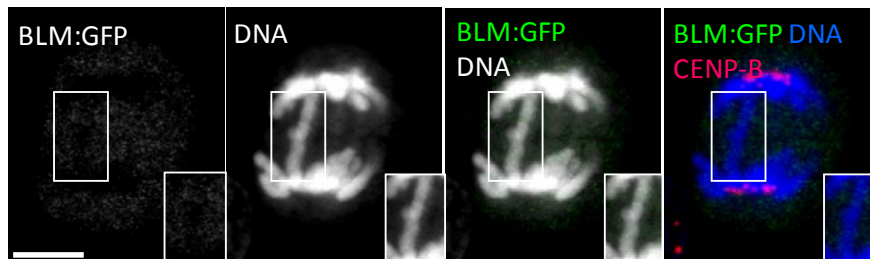


B.

CHO GFP:BLM<sup>WT</sup>

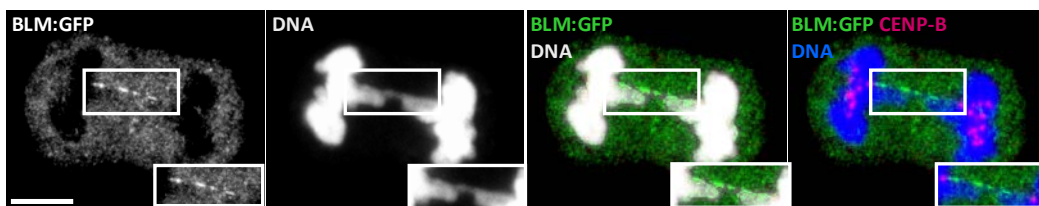


CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> + UCN-01

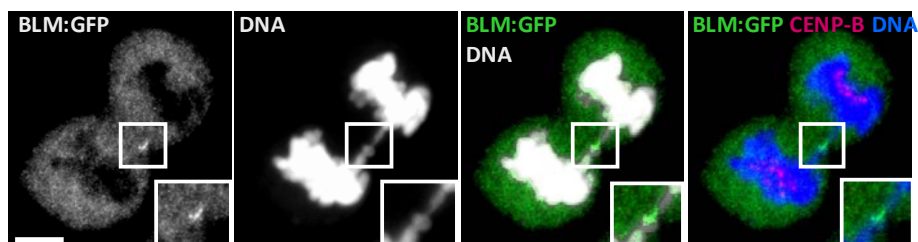


Γ.

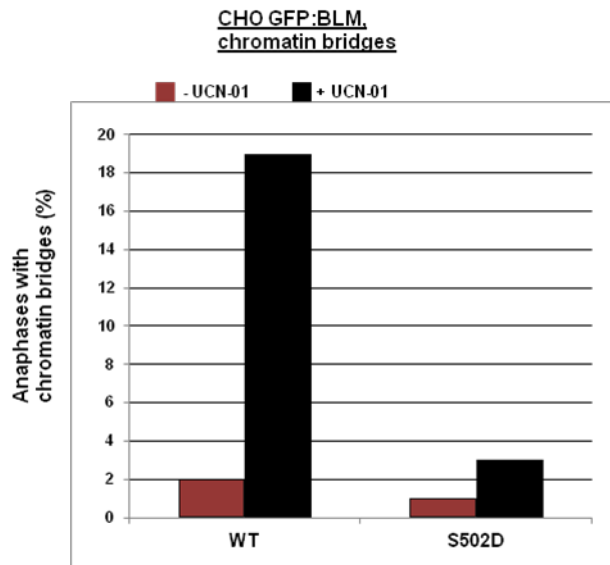
CHO GFP:BLM<sup>S502D</sup>



CHO GFP:BLM<sup>S502D</sup> + UCN-01



Δ.



**Εικόνα 5: Η Chk1 σταθεροποιεί την BLM και εμποδίζει το σχηματισμό γεφυρών DNA στην ανάφαση, μέσω φωσφορυλίωσης στη Σερίνη 502.**

**(Α)** Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western της GFP:BLM (GFP) και της ακτίνης, σε CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> ή CHO GFP:BLM<sup>S502D</sup> κύτταρα έπειτα από επαγωγή με τετρακυκλίνη (16 ώρες) και επώαση (ή μη) με UCN-01 (8 ώρες), n=100.

**(Β,Γ)** Εικόνες από συνεστιακή μικροσκοπία σε CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> ή CHO GFP:BLM<sup>S502D</sup> κύτταρα έπειτα από επαγωγή με τετρακυκλίνη (16 ώρες) και επώαση (ή μη) με UCN-01 (8 ώρες). Πράσινο: GFP:BLM, κόκκινο: CENP-B, μπλε: DNA. Η κλίμακα είναι 5 μm.

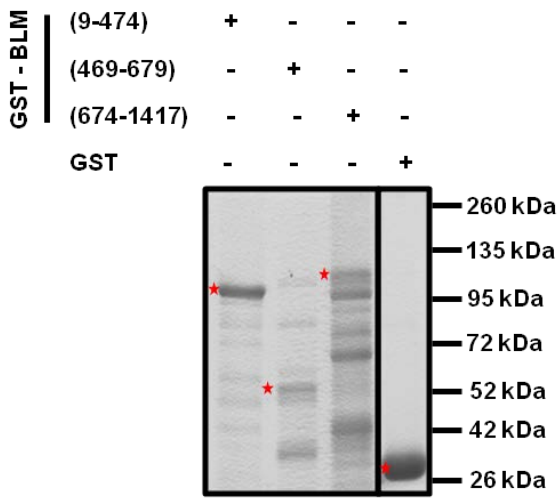
**(Δ)** Συχνότητα αναφάσεων με γέφυρες DNA σε CHO GFP:BLM<sup>WT</sup> ή CHO GFP:BLM<sup>S502D</sup> κύτταρα έπειτα από επαγωγή με τετρακυκλίνη (16 ώρες) και επώαση (ή μη) με UCN-01 (8 ώρες).

### **Η ενδογενής Chk1 αλληλεπιδρά με την BLM στα αμινοξικά κατάλοιπα 469-679**

Προκειμένου να δούμε αν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της ενδογενούς Chk1 και της BLM, φτιάξαμε GST fusion πρωτεΐνες (GST-BLM<sup>WT</sup>, GST-BLM<sup>9-474</sup>, GST-BLM<sup>469-679</sup>, GST-BLM<sup>674-1417</sup>) που χρησιμοποιήθηκαν σε GST pull down assays (Εικόνες 6A και 6B). Πιο συγκεκριμένα, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από CHO κύτταρα επωάστηκαν O/N (over night) με GST beads συζευγμένα με την αγρίου τύπου BLM, καθώς και με διάφορα τμήματα της. Την επόμενη μέρα τα δείγματα αναλύθηκαν με Western blot. Βρέθηκε λοιπόν ότι η Chk1 αλληλεπιδρά με την αγρίου τύπου BLM και κυρίως με το 469-679 τμήμα της BLM (Εικόνα 6Γ).

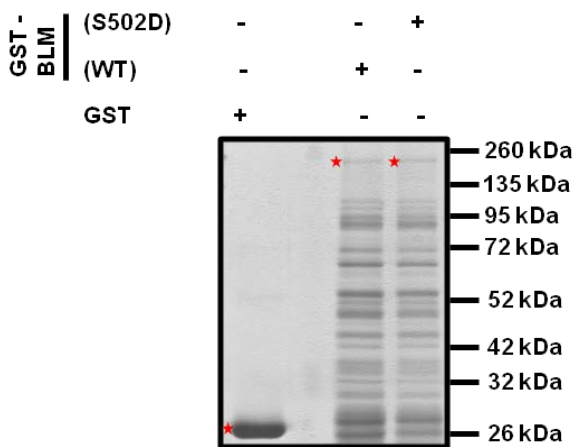
**A.**

Coomassie staining



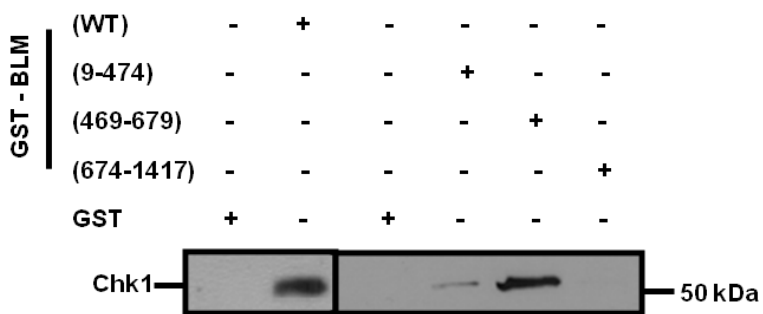
**B.**

Coomassie staining



**Г.**

BE cells, GST-BLM pull down





## Εικόνα 6: Αλληλεπίδραση Chk1 με GST-BLM<sup>469-679</sup>

(A,B) Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος των GST-BLM ή GST πρωτεϊνών προσδεμένων σε glutathione sepharose beads. Με αστερίσκους υποδεικνύονται τα προβλεπόμενα μοριακά βάρη.

(Γ) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από CHO κύτταρα επωάστηκαν με GST-BLM ή GST προσδεμένα σε 10μg glutathione sepharose beads, και αναλύθηκαν με Western blot για ανίχνευση της Chk1.

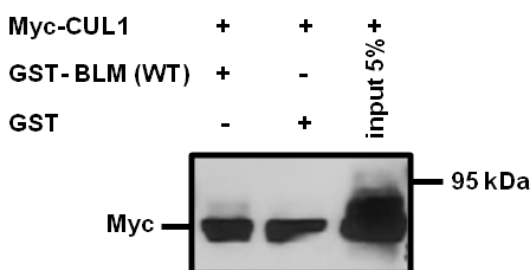
## H Cullin 3 λιγάση ουβικυτίνης αλληλεπιδρά με την BLM.

Η BLM αποικοδομείται μέσω του πρωτεασώματος (Εικόνα 3A). Προκειμένου λοιπόν να προσδιορίσουμε ποια E3 λιγάση ουβικυτίνης προσδένεται στην BLM, οι ανθρώπινες cullins (1,2,3,4A,4B,5) σημασμένες με επίτοπο myc (myc-tagged human cullins) εκφράστηκαν σε CHO κύτταρα και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε GST pull down assays με την πλήρους μήκους BLM. Με βάση τα αποτελέσματα που συγκεντρώσαμε φαίνεται ότι η μοναδική cullin που αλληλεπιδρά ειδικά με την full-length GST-BLM<sup>WT</sup> είναι η Cullin 3 (Εικόνα 7; A-Z).

Η Cullin 3 αλληλεπιδρά κυρίως με το καρβοξυτελικό τμήμα της BLM στα αμινοξικά κατάλοιπα 674-1417 (Εικόνα 8A). Για να δούμε αν η αλληλεπίδραση της cullin 3 με την BLM επηρεάζεται από την φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα CHO τα οποία επιμολύνθηκαν με myc-tagged cullin 3. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα κύτταρα συλλέχθηκαν και επωάστηκαν με glutathione sepharose beads προσδεμένα σε GST-BLM<sup>WT</sup>, GST-BLM<sup>S502D</sup> ή GST. Αναλύοντας τα δείγματα με Western blot, είδαμε ότι η cullin 3 αλληλεπιδρά με την αγρίου τύπου BLM, ενώ η αλληλεπίδραση εξαφανίζεται όταν η επώαση γίνεται με τη μεταλλαγμένη GST-BLM<sup>S502D</sup> (Εικόνα 8B). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, η φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502 της BLM από την Chk1, εμποδίζει την πρόσδεση της cullin 3.

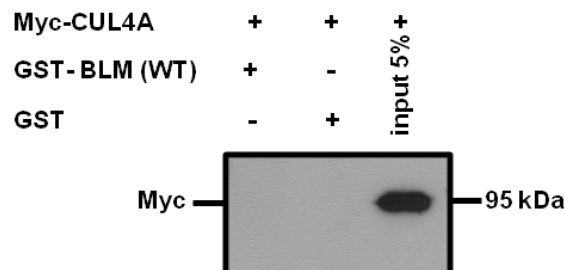
A.

### GST- BLM pull down. Myc-Cul1

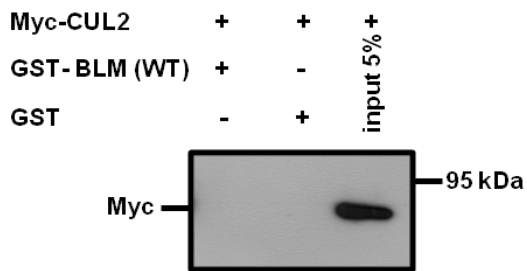


Δ.

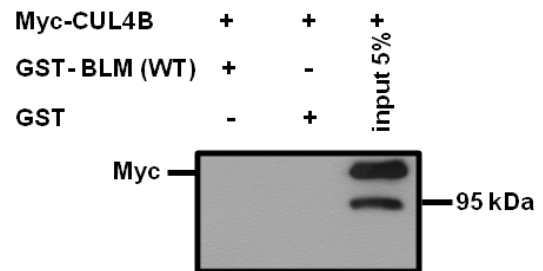
### GST- BLM pull down. Myc-Cul4A



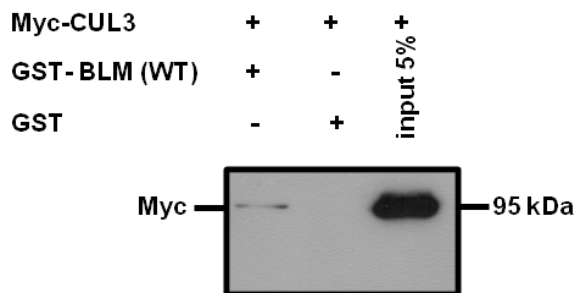
**B.** GST-BLM pull down. Myc-Cul2



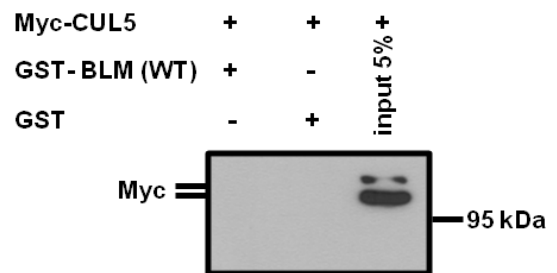
**E.** GST-BLM pull down. Myc-Cul4B



**Γ.** GST-BLM pull down. Myc-Cul3



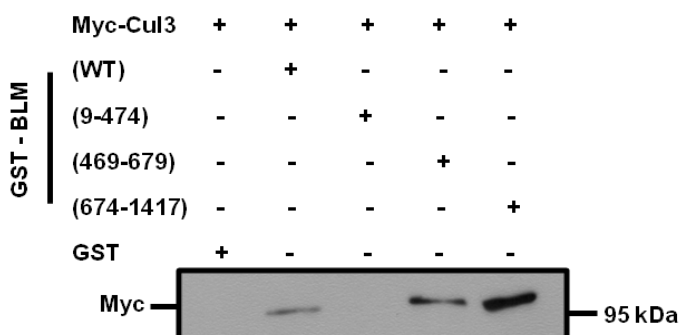
**Z.** GST-BLM pull down. Myc-Cul5



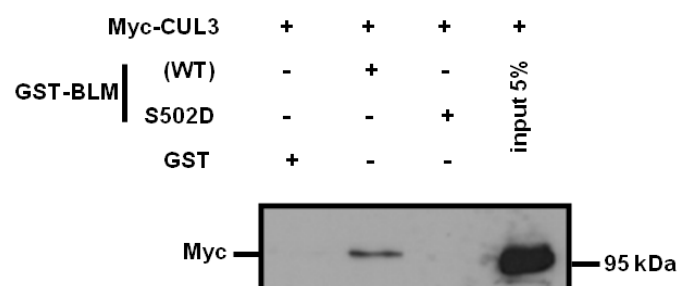
**Εικόνα 7:** Η Cullin 3 λιγάση ουβικιτίνης αλληλεπιδρά με την BLM.

(A-Z) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από CHO κύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί με Myc-tagged Cullin 1 (Myc-CUL1; A), Cullin 2 (Myc-CUL2; B), Cullin 3 (Myc-CUL3; Γ), Cullin 4A (Myc-CUL4A; Δ), Cullin 4B (Myc-CUL4B; E), ή Cullin 5 (Myc-CUL5; Z) επώαστηκαν με 10 μg glutathione sepharose beads προσδεμένα σε GST-BLM<sup>WT</sup> ή GST. Η ανάλυση έγινε με ανίχνευση του επιτόπου Myc με Western blot.

**A.** GST-BLM pull down



**B.** CHO cells. GST-BLM pull down. Myc-Cul3



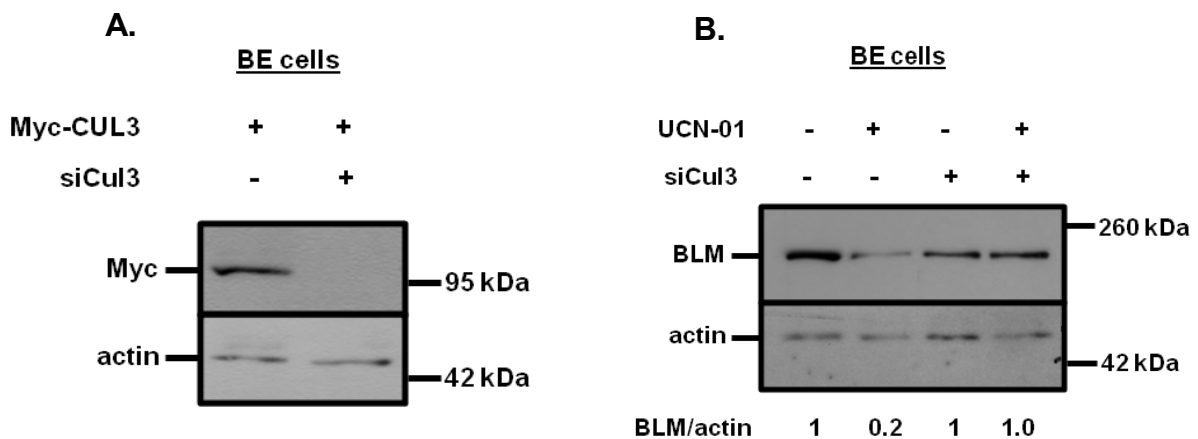
**Εικόνα 8: Η cullin 3 αλληλεπιδρά με την αγρίου τύπου GST-BLM, αλλά όχι με την GST-BLM<sup>S502D</sup>.**

(A) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από CHO κύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί με Myc-tagged Cullin 3 επωάστηκαν με 10 µg glutathione sepharose beads προσδεμένα σε GST-BLM<sup>WT</sup>, GST-BLM<sup>S502D</sup> ή GST. Η ανάλυση έγινε με ανίχνευση του επιτόπου Myc με Western blot.

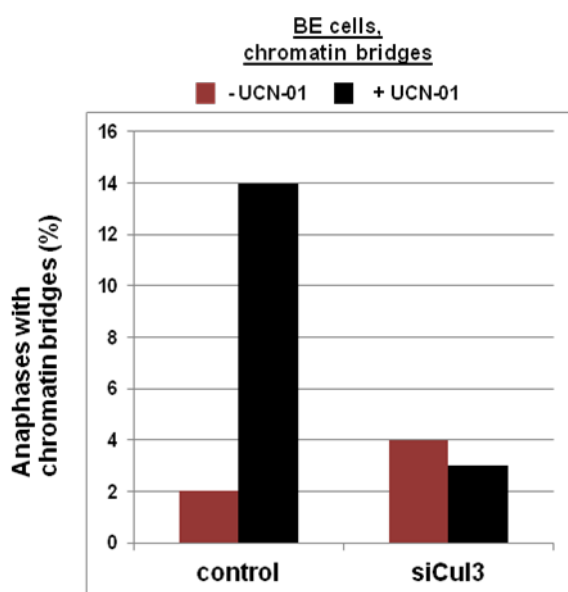
(B) Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από CHO κύτταρα τα οποία είχαν διαμολυνθεί με Myc-tagged Cullin 3 επωάστηκαν με 10 µg glutathione sepharose beads προσδεμένα σε GST-BLM ή GST. Η ανάλυση έγινε με ανίχνευση του επιτόπου Myc με Western blot.

**Μείωση της Cullin 3 εμποδίζει την αποικοδόμηση της BLM έπειτα από αναστολή της Chk1**

Κύτταρα BE επιμολύνθηκαν με siRNA για την Cullin 3 (Εικόνα 9A). Την επόμενη μέρα προσθέσαμε UCN-01 για 8 ώρες στα κύτταρα και αναλύσαμε τα δείγματα με Western blot. Στα δείγματα που προσθέσαμε UCN-01 τα επίπεδα της πρωτεΐνης μειώθηκαν 5 φορές σε σύγκριση με τα control κύτταρα (untreated). Στα δείγματα όμως που εκτός από προσθήκη UCN-01, είχαμε απαλείψει την Cullin 3 με siRNA τα επίπεδα της πρωτεΐνης παρέμειναν σταθερά (Εικόνα 9B). Επίσης, με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας μετρήσαμε το ποσοστό το γεφυρών στην ανάφαση σε control κύτταρα, κύτταρα που επωάστηκαν με UCN-01 ή/και επιμολύνθηκαν με siRNA εναντίον της Cullin 3. Παρατηρούμε λοιπόν ότι μείωση της Cullin 3 εμποδίζει τη δημιουργία γεφυρών σε κύτταρα που έχουμε αναστείλει την Chk1 σε σύγκριση με τα control κύτταρα (Εικόνα 9Γ). Συμπερασματικά λοιπόν, η φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502 από την Chk1 σταθεροποιεί την BLM, εμποδίζοντας την πρόσδεση της Cullin 3.



Γ.



**Εικόνα 9: Με απαλοιφή της Cullin 3 εμποδίζεται η καταστροφή της BLM έπειτα από προσθήκη UCN-01 στα κύτταρα.**

(A) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western του επιτόπου Myc και της ακτίνης σε κύτταρα BE που εκφράζουν Myc-Cullin 3 και διαμολύνθηκαν (ή όχι) με Cullin 3 siRNA.

(B) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western της BLM και της ακτίνης σε κύτταρα BE που διαμολύνθηκαν (ή όχι) με siRNA κατά της Cullin 3 και επώαστηκαν (ή όχι) με UCN-01 για 8 ώρες.

(Γ) Συχνότητα αναφάσεων με γέφυρες DNA σε BE κύτταρα έπειτα από διαμόλυνση (ή όχι) με siCul3 και επώαση (ή μη) με UCN-01 (8 ώρες).

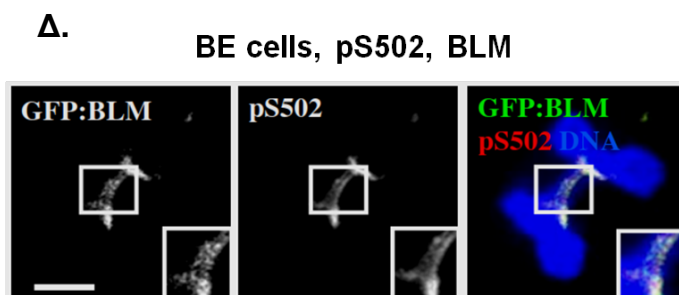
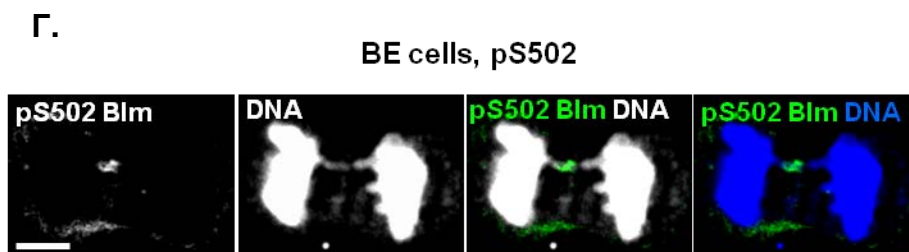
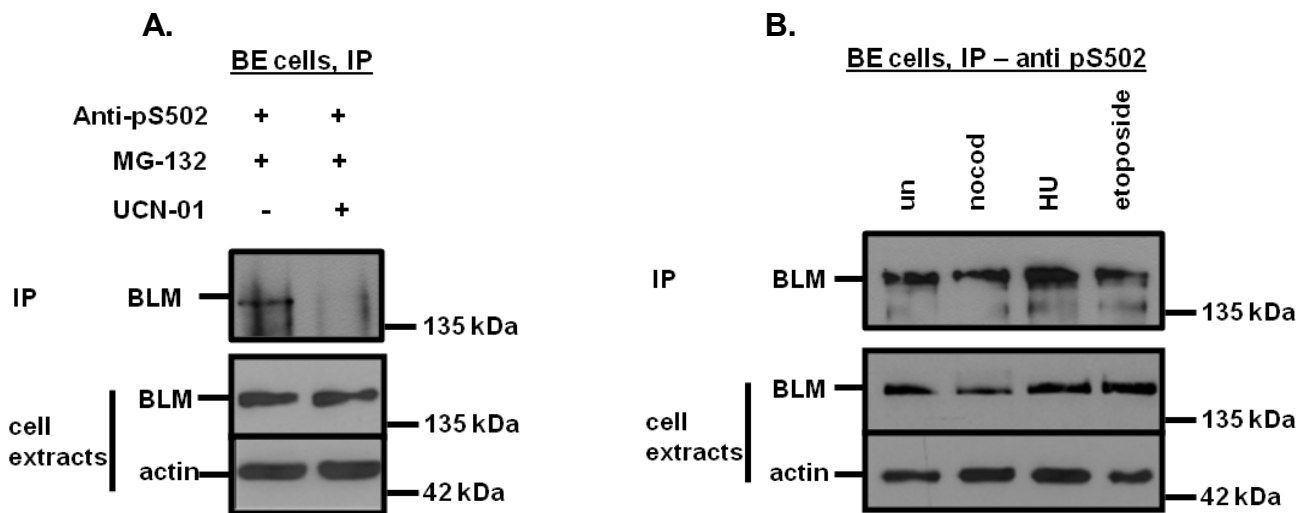
### **Η φωσφορυλίωση της BLM στη Σερίνη 502 από την Chk1 είναι συνεχής σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.**

Για να μελετήσουμε περαιτέρω την φωσφορυλίωση της BLM από την Chk1, δημιουργήσαμε ένα φωσφοαντίσωμα εναντίον της φωσφορυλιωμένης Σερίνης 502 (pS502). Το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του αντισώματος είναι το FV[pS]SNWAETPRLGKC της ανθρώπινης BLM (GenScript).

Αρχικά ελέγξαμε αν το φωσφοαντίσωμα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Κύτταρα BE επώαστηκαν με τον αναστολέα της Chk1 (UCN-01) παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος (MG-132) για 8 ώρες και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με το φωσφοαντίσωμα. Ο αναστολέας του πρωτεασώματος χρησιμοποιήθηκε για να μη καταστραφεί η ενδογενής πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με Western blot. Στα δείγματα που είχε γίνει επώαση με UCN-01 δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της BLM, σε σύγκριση με τα control στα οποία η φωσφορυλιωμένη BLM κατακρημνίστηκε με το φωσφοαντίσωμα και ανιχνεύτηκε στο Western blot (Εικόνα 10A). Άρα το φωσφοαντίσωμα προσδένεται ειδικά στη φωσφορυλιωμένη Σερίνη 502 της BLM.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε το κατά πόσο η φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502 είναι συνεχής ή συμβαίνει μόνο κατά τη μίτωση. BE κύτταρα επώαστηκαν για 16 ώρες με nocodazole (σταμάτημα κυτταρικού κύκλου στη μίτωση), ή Hydroxyurea (σταμάτημα κυτταρικού κύκλου στην S φάση), ή etoposide (παράγοντας που προκαλεί βλάβες στο DNA), τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και επώαστηκαν με το φωσφοαντίσωμα O/N. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης παραμένουν σταθερά, άρα η φωσφορυλίωση από την Chk1 λαμβάνει χώρα σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 10B).

Τέλος, BE κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, βάφτηκαν με το φωσφοαντίσωμα και παρατηρήθηκαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο. Η φωσφορυλιωμένη BLM ανιχνεύεται στις γέφυρες DNA (Εικόνα 10Γ). Έπειτα από επιμόλυνση των κυττάρων με το GFP:BLM πλασμίδιο είναι δυνατός και ο συνεντοπισμός της φωσφορυλιωμένης στη Σερίνη 502 BLM με την ολική BLM (Εικόνα 10Δ).



**Εικόνα 10: Η Σερίνη 502 της BLM φωσφορυλιώνεται συνεχώς από την Chk1.**

**(Α)** Επάνω πλαίσια: Immunoprecipitation assay (IP; Δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης) με το φωσφοαντίσωμα για την pS502 σε κύτταρα που επωάστηκαν με MG-132 ή/και UCN-01 για 8 ώρες. Κάτω πλαίσια: Western blot ανάλυση για BLM και ακτίνη.

**(Β)** Επάνω πλαίσια: Immunoprecipitation assay (IP; Δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης) με το φωσφοαντίσωμα για την pS502 σε κύτταρα που επωάστηκαν (ή όχι) με nocodazole, hydroxyurea, etoposide για 16 ώρες. Κάτω πλαίσια: Western blot ανάλυση για BLM και ακτίνη.

**(Γ)** Εικόνα από συνεστιακή μικροσκοπία σε BE κύτταρα που βάφουμε με αντίσωμα για την φωσφορυλιωμένη Σερίνη 502. Πράσινο: pS502 BLM, μπλε: DNA. Η κλίμακα είναι 5μm.

**(Δ)** Εικόνα από συνεστιακή μικροσκοπία σε BE κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το GFP:BLM πλασμίδιο. Βάφουμε με αντίσωμα για την φωσφορυλιωμένη Σερίνη 502 και αντίσωμα για την ολική BLM. Κόκκινο: pS502 BLM, πράσινο: GFP:BLM. μπλε: DNA. Η κλίμακα είναι 5μm

## Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η BLM είναι μία 3'-5' ελικάση, η οποία εντοπίζεται στις γέφυρες DNA κατά την ανάφαση. Ο εντοπισμός αυτός απαιτείται για την επίλυση των χρωμοσωμικών γεφυρών (Chan et al., 2007). Στην παρούσα μελέτη δείχνουμε ότι σε κύτταρα στα οποία αναστέλλεται η κινάση Chk1, η πρωτεΐνη BLM δεν εντοπίζεται στις γέφυρες DNA με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ποσοστό των αναφασικών γεφυρών σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα.

Για να μελετήσουμε τη σχέση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, δημιουργήσαμε σταθερές κυτταρικές σειρές σε Chinese hamster ovary (CHO) κύτταρα οι οποίες εκφράζουν την αγρίου τύπου BLM συζευγμένη με GFP (Green Fluorescence Protein), GFP:BLM<sup>WT</sup>, καθώς και την μεταλλαγμένη στη Σερίνη 502 σε ασπαραγινικό οξύ BLM, GFP:BLM<sup>S502D</sup>. Η επαγωγή των διαγονιδίων γίνεται με προσθήκη τετρακυκλίνης για 16 ώρες στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα της Chk1, UCN-01, για 8 ώρες και στη συνέχεια αναλύθηκαν τα επίπεδα της BLM καθώς και ο εντοπισμός της στις γέφυρες DNA. Τα πειράματα έδειξαν ότι, αναστέλλοντας την ενεργότητα της Chk1, τα επίπεδα της αγρίου τύπου BLM (GFP:BLM<sup>WT</sup>) μειώνονται, η πρωτεΐνη δεν εντοπίζεται στις χρωμοσωμικές γέφυρες και το ποσοστό των γεφυρών αυξάνεται κατά την ανάφαση. Αντίθετα, τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν την μεταλλαγμένη GFP:BLM<sup>S502D</sup> δεν παρουσιάζουν κάποια αλλαγή στα επίπεδα της πρωτεΐνης ή στον εντοπισμό της παρουσία UCN-01. Άρα η φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502 από την Chk1 ρυθμίζει τα επίπεδα της BLM, και είναι απαραίτητη για την επίλυση των γεφυρών DNA κατά την ανάφαση.

Προκειμένου να δούμε σε ποιο τμήμα της BLM γίνεται η αλληλεπίδραση με την Chk1, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από CHO κύτταρα επώαστηκαν με glutathione sepharose GST:BLM beads. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η Chk1 αλληλεπιδρά κυρίως με το 469-679 τμήμα της BLM. Στη συνέχεια, θελήσαμε να εξακριβώσουμε ποια λιγάση ουβικυτίνης είναι υπεύθυνη για την καταστροφή της BLM μέσω του πρωτεασώματος. Για το σκοπό αυτό οι ανθρώπινες Cullins (1,2,3,4A,4B,5) εκφράστηκαν σε CHO κύτταρα και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε GST pull down assays. Βρέθηκε λοιπόν ότι η Cullin 3 αλληλεπιδρά με την GST:BLM, αλληλεπίδραση που εξαφανίζεται όταν η επώαση γίνεται με τη μεταλλαγμένη GST:BLM<sup>S502D</sup>. Επίσης, σε κύτταρα BE στα οποία είχε ανασταλεί η Chk1 τα επίπεδα της ενδογενούς BLM μειώνονταν 5 φορές, ενώ όταν γινόταν ταυτόχρονη απαλοιφή της Cullin 3 με siRNA τα επίπεδα παρέμεναν σταθερά. Συμπεραίνουμε λοιπόν με βάση τα παραπάνω ότι η φωσφορυλίωση της BLM στη Σερίνη 502 από την Chk1 εμποδίζει την πρόσδεση της Cullin 3 και σταθεροποιεί την πρωτεΐνη BLM.

Επίσης, για να μελετήσουμε τη φωσφορυλίωση της BLM από την Chk1, δημιουργήσαμε αντίσωμα για τη φωσφορυλιωμένη Σερίνη 502. Το φωσφοαντίσωμα ελέγχτηκε για την ειδικότητα του να προσδένει μόνο την φωσφορυλιωμένη BLM και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και συνεστιακής μικροσκοπίας. Με χρήση φαρμάκων που σταματούν τα κύτταρα σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, επώαση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με το φωσφοαντίσωμα και ανάλυση των

αποτελεσμάτων με Western blot, είδαμε ότι η φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502 ανιχνεύεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Η κινάση Chk1 φωσφορυλιώνει κατάλοιπα Σερίνης ή Θρεονίνης που εντοπίζονται στο μοτίβο R/K-X-X-(S/T)\*, όπου X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ και με αστερίσκο υποδεικνύεται το κατάλοιπο που φωσφορυλιώνει η Chk1 (Hutchins et al., 2000). Η Σερίνη 502 της BLM αποτελεί μη τυπική θέση για φωσφορυλίωση από την Chk1, καθώς δεν εντοπίζεται στο συγκεκριμένο μοτίβο. Στον παρελθόν όμως, έχουν περιγραφεί περιπτώσεις πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνονται σε κατάλοιπα Σερίνης εκτός του μοτίβου φωσφορυλίωσης της Chk1 (Gonzalez et al., 2003; Shieh et al., 2000). Επίσης, η Σερίνη 502 της BLM είναι συντηρημένη στα θηλαστικά, άρα είναι πιθανό η φωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο, να είναι σημαντική για την λειτουργία της BLM και σε άλλους οργανισμούς. Δείξαμε ακόμα, ότι η Chk1 φωσφορυλιώνει την BLM στη Σερίνη 502 σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 10B). Μπορούμε να υποθέσουμε λοιπόν, ότι ίσως η φωσφορυλίωση στη Σερίνη 502 της BLM, να επηρεάζει και άλλες λειτουργίες της BLM εκτός της προστασίας έναντι των γεφυρών χρωματίνης.

Αποτυχία ολοκλήρωσης της κυτταροκίνησης μπορεί να οδηγήσει σε τετραπλοειδία, κατάσταση που συμβάλλει στο σχηματισμό καρκίνου (Caldwell et al., 2007). Ο σωστός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων απαιτείται για την σωστή ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης (Eggert et al., 2006). Η μελέτη μας λοιπόν, προτείνει ένα νέο μηχανισμό μέσω του οποίου η Chk1 προστατεύει από το σχηματισμό χρωμοσωμικών γεφυρών στην ανάφαση, εμποδίζοντας την καταστροφή της BLM στην μεσόφαση. Αναλυτικότερα, η Chk1 σταθεροποιεί την BLM στη μεσόφαση μέσω φωσφορυλίωσης στη Σερίνη 502, εμποδίζοντας την πρόσδεση της Cullin 3 και την αποικοδόμηση της BLM από το πρωτεάσωμα. Η φωσφορυλιωμένη BLM εντοπίζεται στις γέφυρες DNA κατά την ανάφαση.



## **Μέθοδοι και Υλικά**

### **Κυτταροκαλλιέργεια**

Τα BE κύτταρα (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου) καλλιεργήθηκαν σε DMEM θρεπτικό μέσο, το οποίο περιείχε 10 % fetal bovine serum, 2 mM γλουταμίνη, 30 µg/ml πενικιλίνη και 50 µg/ml στρεπτομυκίνη, στους 37° C με 5 % CO<sub>2</sub>.

Τα CHO κύτταρα (καρκινικά κύτταρα από τις ωθήκες hamster) καλλιεργήθηκαν σε HAM's F12 θρεπτικό μέσο, το οποίο περιείχε 10 % fetal bovine serum, 2 mM γλουταμίνη, 30 µg/ml πενικιλίνη και 50 µg/ml στρεπτομυκίνη, στους 37° C με 5 % CO<sub>2</sub>.

### **Δημιουργία κυτταρικών σειρών**

Για τη δημιουργία επαγόμενων GFP:BLM<sup>wt</sup> και GFP:BLM<sup>S502D</sup> κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα TREx-CHO, στα οποία γίνεται επαγωγή του γονιδίου επιλογής έπειτα από προσθήκη τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν σταθερά ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί τον Tet repressor μαζί με το pTk-Hyg πλασμίδιο επιλογής.

Αναλυτικότερα, τα κύτταρα στήθηκαν μια μέρα πριν την επιμόλυνση τους με το πλασμιδιακό DNA, σε πυκνότητα 90 %. Για την επιμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Xfect<sup>TM</sup> Transfection Reagent. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και διαλύθηκαν σε 5ml θρεπτικό. 150 µl, 300 µl και 600 µl από τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 150 mm, με 30 ml θρεπτικού στο οποίο είχε προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (Hygromycin) και Fungizone. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 37° C για μία εβδομάδα.

Μία εβδομάδα μετά, τα κύτταρα ελέχθηκαν για το σχηματισμό μοναδιαίων αποικιών. Οι κλώνοι που είχαν σχηματιστεί μεταφέρθηκαν από τα τρυβλία σε 24-well plates με την ακόλουθη διαδικασία. Με λαβίδα τοποθετήθηκε γύρω από κάθε κλώνο γυάλινο ring διαμέτρου 48 mm με τη βοήθεια βαζελίνης, ώστε να υπάρχει μόνωση. Τα κύτταρα σηκώθηκαν από το τρυβλίο με τη χρήση θρυψίνης και μεταφέρθηκαν σε 24-well plate μαζί με 1 ml θρεπτικό.

Όταν μεγάλωσαν οι αποικίες, μεταφέρθηκαν σε 2×35 mm dishes η κάθε μία. Μόλις γέμισαν τα πιάτα προστέθηκε στο ένα από τα δύο τετρακυκλίνη και την επόμενη μέρα συλλέχτηκαν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με Western Blot με σκοπό να βρεθούν αποικίες που να εκφράζουν σταθερά το διαγονίδιο.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Το GFP:BLM<sup>wt</sup> cDNA που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των κυτταρικών σειρών απομονώθηκε με PCR. Ως υπόστρωμα για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το pCS2 GFP/BLM πλασμίδιο.

Οι συνθήκες της PCR ήταν:

- a) 94° C για 2 min
  - b) 94° C για 1 min
  - c) 55° C για 1 min
  - d) 68° C για 6 min
  - e) 68° C για 10 min
  - f) 4° C
- } × 29 κύκλους

και οι primers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Primer eGFP:BLM sense	5' atatggtaccatggtgagcaagggcgccg 3'
Primer 2	5' atgcggccgcaagacagtctgtcttggtgag 3'
Primer 3	5' atgcggccgccccagtgtcatctactgctc 3'
Primer eGFP:BLM anti-sense	5' caatgcggccgcttatgagaatgcatatgaagg 3'

Μια τυπική αντίδραση PCR αποτελείται από:

- 1 μl από κάθε dNTP (10 mM stock)
- 0.5 μl Pfu Polymerase
- 5 μl Pfu buffer (10 x)
- 1 μl (50-500 ng) template DNA
- 5 μl primer 1 (10 μM stock)
- 5 μl primer 2 (10 μM stock)
- 5 μl enhancer (10 x)
- 1 μl MgSO από stock 50 mM
- Αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 50 μl

Το προϊόν της PCR αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στο pcDNA5 FRT/TO πλασμίδιο με τη χρήση των KpnI και NotI περιοριστικών ενζύμων. Αρχικά, κλωνοποιήθηκε το πρώτο μισό τμήμα της BLM χρησιμοποιώντας τους primers eGFP:BLM sense και primer 2. Στη συνέχεια, κλωνοποιήθηκε το δεύτερο μισό τμήμα της BLM χρησιμοποιώντας τους primers 3 και eGFP:BLM anti-sense. Έπειτα έγινε επιμόλυνση του πλασμιδίου, σε TReX-CHO κύτταρα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

### **Δημιουργία σημειακής μεταλλαγής**

Το pcDNA5 FRT/TO πλασμίδιο που έφερε τη σημειακή μεταλλαγή στη Σερίνη 502 της BLM σε ασπαραγινικό οξύ (D), δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit.

Οι συνθήκες της PCR ήταν:

- a) 95° C για 30 sec
  - b) 95° C για 30 sec
  - c) 55° C για 1 min
  - d) 68° C για 10,5 min
- } × 15 κύκλους

Η αντίδραση περιελάμβανε:

- 5 µl Reaction buffer
- 1 µl (50 ng) dsDNA template (eGFP:BLM<sup>WT</sup>/pcDNA5 FRT/TO)
- 1.25 µl (125 ng) primer #1 (sense S502D)
- 1.25 µl (125 ng) primer #2 (antisense S502D)
- 1 µl dNTP mix
- ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 50 µl
- 1 µl PfuUltra HF DNA polymerase (2.5 U/µl)

Primer 1 S502D sense	5' caataccatttacagaagtcctttgtagatagcaactgggctga 3'
Primer 2 S502D anti-sense	5 tcagcccagttgctatctacaaaggacttctgtaaatgggtattg' 3'

Στο προϊόν της PCR έγινε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο DpnI, προκειμένου να κοπεί το πατρικό υπερελικωμένο DNA. Το ένζυμο κόβει μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA μόνο, οπότε δεν επηρεάζει το προϊόν της αντίδρασης. Στη συνέχεια, με το DNA της παραπάνω αντίδρασης μετασχηματίστηκαν σε XL1-Blue competent cells. Τα XL1-Blue competent cells ξεπάγωσαν αργά στον πάγο. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50 µl βακτηρίων σε ένα παγωμένο 15 ml falcon. Στη συνέχεια 2 µl από το DNA που επωάστηκε με DpnI μεταφέρθηκε στο falcon με τα βακτήρια. Το δείγμα ανακατεύτηκε και επωάστηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα ακολούθησε heat shock στους 42° C για 45 sec και μετά το δείγμα τοποθετήθηκε στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκαν 0.5 ml SOC ζεσταμένο στους 37° C και το δείγμα επωάστηκε για 1 ώρα στους 37° C υπό ανάδευση στις 225-250 rpm. Έπειτα 250 µl από το μίγμα απλώθηκαν σε πιάτο αμπικιλίνης και επωάστηκαν στους 37° C για περισσότερες από 16 ώρες.

Με την ίδια διαδικασία, δημιουργήθηκε και το πλασμίδιο pGEX 4T1/eGFP:BLM<sup>S502D</sup> που χρησιμοποιήθηκε στα GST pull down assays.

### Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Ο τρόπος λύσης των κυττάρων διέφερε ανάλογα με τη μετέπειτα χρήση των πρωτεϊνών που συλλέγονταν.

Για GST pull down ή Immunoprecipitation assays, τα κύτταρα συλλέγονταν σε 1ml IP/Kinase buffer [50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1 mM Na Fluoride (NaF), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM Na Orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin]. Η λύση των κυττάρων γινόταν με υπερήχους (3 παλμοί, για 10 sec ο κάθε παλμός). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνταν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο από κάθε δείγμα μεταφερόταν σε νέα eppendorf tubes, για περαιτέρω χρήση.

Για ανάλυση με Western blot, τα κύτταρα λύονταν σε κρύο διάλυμα Whole Cell Extract (WCE), (10 mM EGTA, 20 mM Hepes, 5 mM EDTA, 0.4 M KCl, 10 % glycerol, 0.4 % Triton X-100, 1 mM DTT, 5 mM Na Fluoride, 50 µg/ml PMSF, 1 mM Na Orthovanadate, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Aprotinin, 1 mM Benzamidine) και

αφήνονταν για 30 λεπτά στον πάγο ώστε να γίνει η λύση. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο από κάθε δείγμα μεταφερόταν σε νέα erpendorf tubes, για περαιτέρω χρήση ή φυλασσόταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Παραγωγή GST fusion πρωτεϊνών προσδεδεμένων σε glutathione sepharose.**

Καλλιέργειες βακτηρίων BL-21 που περιείχαν το επιθυμητό πλασμίδιο μεγάλωναν σε 100 ml L-broth με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Όταν η οπτική πυκνότητα της βακτηριακής καλλιέργειας ήταν περίπου 0.5, προσθέταμε 0.1 mM IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside). Στη συνέχεια, βάζαμε την καλλιέργεια στους  $16^{\circ}\text{C}$  για 16-18 ώρες.

Την επόμενη μέρα φυγοκεντρούσαμε τα κύτταρα στις 3200 rpm για 10 λεπτά και επαναδιαλύαμε το ίζημα σε NETN buffer [100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8.0, 0.5 % NP-40, 1 mM PMSF, 5  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 5  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin].

Η λύση των κυττάρων γινόταν με υπερήχους (3 παλμοί, για 10 sec ο κάθε παλμός). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνταν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο από κάθε δείγμα μεταφερόταν σε νέα erpendorf tubes. Κάθε 3 ml από το βακτηριακό εκχύλισμα επωάζονταν με 150  $\mu\text{l}$  glutathione sepharose beads (+ 150  $\mu\text{l}$  NETN buffer). Η επώαση γινόταν για 1 ώρα στους  $4^{\circ}\text{C}$  και μετά φυγοκεντρούνταν στις 3000 rpm για 3 λεπτά. Τέλος, τα beads πλένονταν 6 φορές με 500  $\mu\text{l}$  NETN buffer και φυλάσσονταν στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Ο έλεγχος (ποιοτικός και ποσοτικός) των πρωτεϊνών που ήταν προσδεδεμένες πάνω στα beads γινόταν με coomassie staining. Δηλαδή τρέχαμε μία ποσότητα από τα beads σε SDS gel πολυακρυλαμίδης (η πυκνότητα του gel άλλαζε κάθε φορά ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που αναλύονταν), στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μονιμοποιούνταν πάνω στο gel με το fixation buffer που περιείχε 40 % μεθανόλη και 7 % οξικό οξύ. Έπειτα το gel βαφόταν O/N με 20 ml Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate και 5 ml μεθανόλη. Την επόμενη μέρα γινόταν τα πλυσίματα του gel με 25 % μεθανόλη.

### **GST pull down assay**

Για τα GST pull down πειράματα κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης (900  $\mu\text{g}$ -2 mg) επωαζόταν με συγκεκριμένη ποσότητα (1-25  $\mu\text{l}$ ) από τα beads (ανάλογα με το πείραμα που εκτελούνταν κάθε φορά). Η επώαση γινόταν O/N (over night) στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Την επόμενη μέρα τα beads πλένονταν 3 φορές με 500  $\mu\text{l}$  IP/kinase buffer και αναλύονταν με Western Blot.

### **Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών**

Για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης (900  $\mu\text{g}$ -2 mg) επωαζόταν με συγκεκριμένη ποσότητα (1-10  $\mu\text{g}$ ) αντισώματος. Η επώαση γινόταν από 3 ώρες μέχρι O/N στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια, γινόταν επώαση με 15  $\mu\text{l}$  Protein A/G PLUS-Agarose beads για 1 ώρα στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθούσαν 3 πλυσίματα με 500  $\mu\text{l}$  IP/kinase buffer και τα δείγματα αναλύονταν με Western blot.

## **Ανάλυση πρωτεΐνων**

Οι πρωτεΐνες αναλύονταν σε κατάλληλης πυκνότητας SDS gel πολυακρυλαμίδης [Resolving gel: 40 % acrylamide mix, 1.5 M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% ammonium persulfate, TEMED, dH<sub>2</sub>O. Stacking gel: 40 % acrylamide mix, 1 M Tris pH 6.8, 10% SDS, 10% ammonium persulfate, TEMED, dH<sub>2</sub>O].

Στα δείγματα πριν φορτωθούν στο gel προσθέταμε SDS sample buffer με DTT, τα βράζαμε για 5-8 λεπτά και τα φορτώναμε στα πηγαδάκια του gel μαζί με protein marker. Τα gels τοποθετούνταν σε ειδικές δεξαμενές (BIO-RAD) με Tris Glycine Running buffer (25 mM Tris, 0.1% SDS, 0.19 M glycine) και έτρεχαν προς το θετικό πόλο με σταθερή τάση 180 V. Στη συνέχεια, γινόταν η μεταφορά πρωτεΐνων σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με semi-dry transfer, σε Transfer buffer pH 9.2 (47.8 mM Tris, 39 mM glycine, 1.28 mM SDS, 10 % methanol). Η μεταφορά των πρωτεΐνων γινόταν για 1.5-2 ώρες (ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης) στα 20 V.

Μετά τη μεταφορά η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωαζόταν για 1 ώρα με 5 % γάλα σε TBS-Tween pH 7.4 (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20) για να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε φωσφοαντίσωμα το μπλοκάρισμα έγινε με 5 % BSA σε TBS-Tween. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωαζόταν με τα κατάλληλα αντισώματα διαλυμένα σε 1 % γάλα ή BSA σε TBS-Tween στους 4° C για 16 ώρες. Την επόμενη μέρα γινόταν τα πλυσίματα με TBS-Tween (1x10 min και 2x5 min πλυσίματα) και έπειτα η μεμβράνη επωαζόταν με τα κατάλληλα αντισώματα (1:6000 αραιωμένα) συνδεδεμένα με HRP σε 1 % γάλα ή BSA σε TBS-Tween. Ακολουθούσαν 3 πλυσίματα και ανάλυση με ECL detection kit.

## **Επώσεις κυττάρων με φάρμακα**

*Επώαση με τετρακυκλίνη.* Για την επαγωγή των διαγονιδίων, τα TREx CHO GFP:BLM<sup>wt</sup> ή GFP:BLM<sup>S502D</sup> κύτταρα επώαστηκαν για 16 ώρες με 300 ng/ml ή 1 µg/ml τετρακυκλίνη, αντίστοιχα. Μετά της 16 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιούνταν με 4 % PFA (παραφορμαλδεΰδη) για παρατήρηση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας.

*Επώαση με UCN-01.* Τα κύτταρα επωάζονταν με τον αναστολέα της Chk-1 κινάσης, UCN-01, για 8 ώρες και στη συνέχεια είτε μονιμοποιούνταν για παρατήρηση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας είτε λύονταν τα κύτταρα και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνταν για GST pull down ή IP assays και ανάλυση με Western blot.

*Επώαση με MG-132.* Τα κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα του πρωτεασώματος, MG-132, για 8 ώρες. Στη συνέχεια έγινε η λύση των κυττάρων με υπερήχους σε 1ml IP/Kinase buffer και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με το αντίσωμα για τη φωσφορυλιωμένη Σερίνη 502 (pS502) O/N. Την επόμενη μέρα προσθέσαμε τα protein A/G beads και έγινε ανάλυση των δειγμάτων με Western blot.

*Επώαση με nocodazole, etoposide, hydroxyurea.* Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα φάρμακα nocodazole, etoposide, HU για 16 ώρες. Το nocodazole προκαλεί από-πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων με αποτέλεσμα τα κύτταρα να σταματούν στην προμετάφαση της μίτωσης. Το etoposide προκαλεί single- and double-strand breaks (αναστέλλει την τοποϊσομεράση) και η HU εμποδίζει την σύνθεση του DNA και τα

κύτταρα σταματούν στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Μετά της 16 ώρες, συλλέχθηκαν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με Western blot.

### **Συνεστιακή μικροσκοπία**

Η μονιμοποίηση των κυττάρων γινόταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με πολυλυσίνη. Το διάλυμα μονιμοποίησης ήταν 4 % PFA σε Cytoskeletal buffer pH 6.1 (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 5 mM PIPES, 5.5 mM glucose). Η μονιμοποίηση έγινε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια οι μεμβράνες έγιναν διαπερατές με 0.5 % Triton X-100 σε Cytoskeletal buffer.

Τα κύτταρα επώαστηκαν αρχικά με 1 % BSA PBS για να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Στη συνέχεια έγινε η χρώση των κυττάρων με τα κατάλληλα αντισώματα 1:100 αραιωμένα σε 1 % BSA PBS για 1 ώρα στους 37° C. Μετά την 1 ώρα γινόταν τα πλυσίματα με PBS (προθερμασμένο) και στη συνέχεια επώαση με τα δεύτερα αντισώματα για 45 λεπτά στους 37° C. 3 ακόμα πλυσίματα με PBS, mounting με Vectashield και varnish με διάφανο βερνίκι για μόνωση. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες φυλάσσονται στους 4° C μέχρι την παρατήρηση.

Στην περίπτωση χρήσης του φωσφοαντισώματος pS502 τα κύτταρα επώαστηκαν με 0.5 % CHAPS σε διάλυμα PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES pH 7.0, 10 mM EGTA, 4 mM MgSO) το οποίο περιείχε 100 nM Microcystin για να απενεργοποιηθούν οι φωσφατάσες. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με PFA in PHEM για 10 λεπτά και οι μεμβράνες έγιναν διαπερατές με 0.5 % Triton in PHEM για 2 λεπτά. Το staining έγινε με πολυκλωνικό φωσφοαντίσωμα pS502 final bleed σε 1:50 αραιώση, O/N.

### **Επιμόλυνση κυττάρων με siRNA**

Το siRNA έναντι της Cullin 3 εισήχθη σε κύτταρα CHO ή BE με παροδική διαμόλυνση χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο DUO. 10 μM από το siRNA (+ 2 μg από myc-Cullin3 πλασμίδιο) και 5 μl από το αντιδραστήριο διαλύθηκαν σε 190 μl και 195 μl Optimem αντίστοιχα, επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια αναμίχθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 20 λεπτά πριν προστεθούν στα κύτταρα.

### **Αντισώματα και πλασμίδια**

- *Santa Cruz*: Μονοκλωνικά αντισώματα για Chk1 (G-4), GST (B-14), Myc (9E10), BLM και πολυκλωνικά αντισώματα για CENP-B και GFP (FL).
- *Sigma*: Μονοκλωνικό αντίσωμα για την ακτίνη (AC-40).
- *Abcam*: Πολυκλωνικό αντίσωμα για την BLM.
- *GenScript*: Φωσφοαντίσωμα ειδικό για την φωσφορυλιωμένη Σερίνη 502.

Τα πλασμίδια pcDNA3-myc3-CUL2 και pcDNA3-myc-CUL5 ήταν της Addgene. Το pcDNA5 FRT/TO ήταν της Invitrogen. Το PTK-Hygro ήταν των Agilent Technologies. Το pCMV-Myc-Cullin 1 ήταν δώρο από τον M. Masucci (Gastaldello et al., 2012), το pCS2/Cullin 3-myc από τον J. Singer (Wimuttisuk and Singer, 2007), το pcDNA/myc-His-Cul4B από τον Y. Gong (Zou et al., 2009), το pCS2/GFP-BLM από τον H. Yu (Ke et al., 2011) και το pGEX/BLM (1-1417) από τον S. Sengupta (Kaur et al., 2010).

### **Κύτταροκαλλιέργεια**

- *Invitrogen*: BL-21, TReX-CHO
- *Millipore*: MG-132
- *Sigma*: Etoposide, Hydroxyurea, Microcystin, UCN-01
- *AppliChem*: Nocodazole, PFA
- *Sigma*: Tetracycline
- *Biosera*: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Ham's F-12 medium, 200 L-Glutamine (100X), 0.05 % Trypsin, PenStrep (100X)
- *Gibco*: Fungizone, Hygromycin B
- *Clontech*: Xfect™ Transfection Reagent
- *SARSTEDT*: 24-well plates
- *Bellco Glass*: Γυάλινα rings διαμέτρου 48mm
- *CELLSTAR*: 2x35 mm dishes
- *VECTOR*: Vectashield
- *Thermo Scientific*: DUO
- *Santa Cruz*: siCul3

### **Ένζυμα και kits**

- *Minotech*: KpnI, NotI
- *Agilent Technologies*: QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit
- *Thermo scientific*: ECL detection kit

### **Χημικά και αντιδραστήρια**

- *Roth*: KCL, EDTA , glycerol, benzamidine, Tris, SDS, TEMED
- *Sigma*: PMSF, β-glycerophosphate, Triton X-100, Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate
- *AppliChem*: Hepes, NaCl, EGTA, NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Leupeptin, Aprotinin, methanol, 40 % acrylamide mix, 10 % ammonium persulfate
- *Fluka*: NP-40
- *Invitrogen*: Pfu polymerase, enhancer, dNTP's, Pfu polymerase buffer
- *MERCK*: Acetic acid
- *New England BioLabs*: DTT, SDS sample buffer
- *MELFORD*: IPTG

### Διάφορα

- *GE Healthcare*: glutathione sepharose beads, μεμβράνες νιτροκυτταρίνης
- *Santa Cruz*: Protein A/G PLUS-Agarose beads
- *Thermo Scientific*: protein marker

### Primers

Primer eGFP:BLM sense	5' atatggtaccatggtgagcaagggcgccg 3'
Primer 2	5' atcgggccgcaagacagtctgtcttgctgag 3'
Primer 3	5' atcgggccgccccagtgtcatctactgctc 3'
Primer eGFP:BLM anti-sense	5' caatcgggccgcttatgagaatgcatatgaagg 3'

Primer 1 S502D sense	5' caataccatttacagaagtcctttgtagatagcaactgggctga 3'
Primer 2 S502D anti-sense	5' tcagcccagttgctatctacaaaggacttctgaaatgggtattg' 3'



## Βιβλιογραφία

- Bayart, E., Dutertre, S., Jaulin, C., Guo, R.B., Xi, X.G., and Amor-Gueret, M. (2006). The Bloom syndrome helicase is a substrate of the mitotic Cdc2 kinase. *Cell Cycle* 5, 1681-1686.
- Beamish, H., Kedar, P., Kaneko, H., Chen, P., Fukao, T., Peng, C., Beresten, S., Gueven, N., Purdie, D., Lees-Miller, S., *et al.* (2002). Functional link between BLM defective in Bloom's syndrome and the ataxia-telangiectasia-mutated protein, ATM. *The Journal of biological chemistry* 277, 30515-30523.
- Bhattacharyya, S., Keirse, J., Russell, B., Kavcansky, J., Lillard-Wetherell, K., Tahmaseb, K., Turchi, J.J., and Groden, J. (2009). Telomerase-associated protein 1, HSP90, and topoisomerase IIalpha associate directly with the BLM helicase in immortalized cells using ALT and modulate its helicase activity using telomeric DNA substrates. *The Journal of biological chemistry* 284, 14966-14977.
- Bosu, D.R., and Kipreos, E.T. (2008). Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell division* 3, 7.
- Caldwell, C.M., Green, R.A., and Kaplan, K.B. (2007). APC mutations lead to cytokinetic failures in vitro and tetraploid genotypes in Min mice. *The Journal of cell biology* 178, 1109-1120.
- Chan, K.L., North, P.S., and Hickson, I.D. (2007). BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *The EMBO journal* 26, 3397-3409.
- Davies, S.L., North, P.S., Dart, A., Lakin, N.D., and Hickson, I.D. (2004). Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Molecular and cellular biology* 24, 1279-1291.
- Dutertre, S., Ababou, M., Onclercq, R., Delic, J., Chatton, B., Jaulin, C., and Amor-Gueret, M. (2000). Cell cycle regulation of the endogenous wild type Bloom's syndrome DNA helicase. *Oncogene* 19, 2731-2738.
- Eggert, U.S., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annual review of biochemistry* 75, 543-566.
- Ellis, N.A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocci, S., Proytcheva, M., and German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83, 655-666.
- Feijoo, C., Hall-Jackson, C., Wu, R., Jenkins, D., Leitch, J., Gilbert, D.M., and Smythe, C. (2001). Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *The Journal of cell biology* 154, 913-923.
- Gastaldello, S., Callegari, S., Coppotelli, G., Hildebrand, S., Song, M., and Masucci, M.G. (2012). Herpes virus deneddylases interrupt the cullin-RING ligase neddylation cycle by inhibiting the binding of CAND1. *Journal of molecular cell biology* 4, 242-251.
- German, J. (1993). Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine* 72, 393-406.
- Gharibyan, V., and Youssoufian, H. (1999). Localization of the Bloom syndrome helicase to punctate nuclear structures and the nuclear matrix and regulation during the cell cycle: comparison with the Werner's syndrome helicase. *Molecular carcinogenesis* 26, 261-273.
- Gisselsson, D. (2008). Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma* 117, 511-519.
- Gonzalez, S., Prives, C., and Cordon-Cardo, C. (2003). p73alpha regulation by Chk1 in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* 23, 8161-8171.
- Hoffelder, D.R., Luo, L., Burke, N.A., Watkins, S.C., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* 112, 389-397.

Hutchins, J.R., Hughes, M., and Clarke, P.R. (2000). Substrate specificity determinants of the checkpoint protein kinase Chk1. *FEBS letters* *466*, 91-95.

Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd, and Maul, G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *The Journal of cell biology* *147*, 221-234.

Kaur, S., Modi, P., Srivastava, V., Mudgal, R., Tikoo, S., Arora, P., Mohanty, D., and Sengupta, S. (2010). Chk1-dependent constitutive phosphorylation of BLM helicase at serine 646 decreases after DNA damage. *Molecular cancer research : MCR* *8*, 1234-1247.

Ke, Y., Huh, J.W., Warrington, R., Li, B., Wu, N., Leng, M., Zhang, J., Ball, H.L., and Yu, H. (2011). PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution. *The EMBO journal* *30*, 3309-3321.

Kramer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nature cell biology* *6*, 884-891.

Leng, M., Chan, D.W., Luo, H., Zhu, C., Qin, J., and Wang, Y. (2006). MPS1-dependent mitotic BLM phosphorylation is important for chromosome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 11485-11490.

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

Peddibhotla, S., Lam, M.H., Gonzalez-Rimbau, M., and Rosen, J.M. (2009). The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 5159-5164.

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

Petsalaki, E., Dandoulaki, M., Morrice, N., and Zachos, G. (2014). Chk1 protects against chromatin bridges by constitutively phosphorylating BLM serine 502 to inhibit BLM degradation. *Journal of cell science*.

Petsalaki, E., and Zachos, G. (2013). Chk1 and Mps1 jointly regulate correction of merotelic kinetochore attachments. *Journal of cell science* *126*, 1235-1246.

Pintard, L., Willems, A., and Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *The EMBO journal* *23*, 1681-1687.

Rao, V.A., Fan, A.M., Meng, L., Doe, C.F., North, P.S., Hickson, I.D., and Pommier, Y. (2005). Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase IIIalpha, and colocalization with gamma-H2AX after topoisomerase I-induced replication damage. *Molecular and cellular biology* *25*, 8925-8937.

Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvosome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *The Journal of biological chemistry* *281*, 13861-13864.

Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & development* *14*, 289-300.

Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research* *108*, 73-112.

Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer cell* *3*, 247-258.

Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* *136*, 473-484.

Syljuasen, R.G., Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2005). Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Molecular and cellular biology* *25*, 3553-3562.

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

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J., and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & development* *14*, 927-939.

Wimuttisuk, W., and Singer, J.D. (2007). The Cullin3 ubiquitin ligase functions as a Nedd8-bound heterodimer. *Molecular biology of the cell* *18*, 899-909.

Yankiwski, V., Marciniak, R.A., Guarente, L., and Neff, N.F. (2000). Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 5214-5219.

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

Zou, Y., Mi, J., Cui, J., Lu, D., Zhang, X., Guo, C., Gao, G., Liu, Q., Chen, B., Shao, C., *et al.* (2009). Characterization of nuclear localization signal in the N terminus of CUL4B and its essential role in cyclin E degradation and cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* *284*, 33320-33332.