ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Ρόλος της τουμπουλίνης και επίδραση ταξανών και παραγώγων τους στην οργάνωση, λειτουργικότητα και δυναμική του πυρηνικού φακέλου

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΚΟΥΜΙΑΝΑΚΗ ΑΝΤΩΝΙΑ

Ηράκλειο 2007

Τριμελής επιτροπή:

Επιβλέπων καθηγητής – Καθ. Γεωργούλιας Βασίλειος 2° μέλος – Καθ. Γεωργάτος Σπυρίδων 3° μέλος –Επίκ. Καθ. Θεοδωρόπουλος Παναγιώτης

Επταμελής επιτροπή:

Γεωργούλιας Β., Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Παν. Κρήτης Γεωργάτος Σ., Καθηγητής Βιολογίας, Παν. Ιωαννίνων Θεοδωρόπουλος Π., Επ. Καθηγητής Βιοχημείας, Παν. Κρήτης Στουρνάρας Χ., Καθηγητής Βιοχημείας, Παν. Κρήτης Τσίκαρης Β., Καθηγητής Χημείας, Παν. Ιωαννίνων Καρδάσης Δ., Αν. Καθηγητής Βιοχημείας, Παν. Κρήτης Μαυρουδής Δ., Αν. Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Παν. Κρήτης

Ευχαριστίες εκφράζονται στη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και στην Ευρωπαϊκή Ένωση για την χρηματοδότηση του έργου στο πλαίσιο του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ376

Στους γονείς μου Γιώργο και Μαρία και στον αδερφό μου Νικόλα...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για την καθοδήγηση και για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τη διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους για την κρίση αυτής της διατριβής.

Στον επίκουρο καθηγητή κ. Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο εκφράζω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου για την φιλοξενία που μου παρείχε στο εργαστήριο του καθώς και για την πολύτιμη και ουσιαστική καθοδήγηση, για την συμπαράστασή του, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Η συμβολή του στην παρούσα εργασία ήταν καθοριστικής σημασίας. Δεν θα ξεχάσω ποτέ τις πολύωρες συζητήσεις μας μέσα από τις οποίες βελτιώθηκα ως επιστήμονας αλλά και ως άνθρωπος, καθώς και την προθυμία του να μου προσφέρει βοήθεια σε κάθε δύσκολη στιγμή.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Δήμητρη Καρδάση και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Γιώργο Μαυροθαλασσίτη για την ουσιαστική καθοδήγηση τους σε θέματα μοριακής βιολογίας, καθώς και για τη φιλοξενία που μου παρείχαν στα εργαστήρια τους. Επίσης, τον καθηγητή κ. Ηλία Καστανά για την συνεισφορά του, όσον αφορά στην στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων. Τον καθηγητή κ. Σπύρο Γεωργάτο καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου του για την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν κατά την παραμονή μου στα Ιωάννινα. Τον υπεύθυνο του εργαστηρίου Advanced Light Microscopy Core Facility (EMBL, Germany) Dr. Rainer Pepperkok, καθώς και το μέλος του εργαστηρίου Stefan Terjung, για την φιλοξενία και την καθοδήγηση που μου ποροξφεραν κατά την παραμονή μου στο EMBL.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη του εργαστηρίου Χαρά Πολιουδάκη και Έλενα Τσαγγαρίδου για την άψογη συνεργασία μας, για τις πολύτιμες συζητήσεις μας, επιστημονικές και μη, για την προθυμία τους να με βοηθήσουν αλλά και για την ψυχολογική στήριξη σε όλες τις δύσκολες στιγμές. Όλα αυτά τα χρόνια μοιραστήκαμε χαρές και λύπες και μέσα από αυτή τη διαδικασία ήρθαμε πολύ κοντά. Αυτές μου έμαθαν πως ότι δεν μας σκοτώνει μας κάνει πιο δυνατούς. Ελπίζω να μην το ξεχάσω στα χρόνια που θα ακολουθήσουν.

Τί να πω για το φαινόμενο Μιχάλης Βερυκοκάκης! Από την πρώτη στιγμή που τον γνώρισα κατάλαβα ότι είχα να κάνω με έναν ιδιαίτερο άνθρωπο. Καλλιέργεια, ήθος, μεγαλοψυχία και απέραντη καλοσύνη είναι κάποια από τα στοιχεία της προσωπικότητάς του. Ένα χαμόγελό του αρκούσε για να σταματήσω να γκρινιάζω. Τον ευχαριστώ πολύ για την αισιοδοξία και τη θετική στάση που μου μετέδωσε όλα αυτά τα χρόνια αλλά και για το ότι ήταν δίπλα μου όταν τον χρειάστηκα.

Στους συναδέλφους και αγαπημένους φίλους Κώστα Θεοδωράκη, Μαρίνα Βιδάκη και Μαρκέλλα Κατίδου έχω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την απεριόριστη στήριξη που μου προσέφεραν και για την προθυμία τους να με βοηθήσουν. Με έκαναν πάντα να νιώθω μέλος και του εργαστηρίου τους, μου χάρισαν τη φιλία τους και μου έδωσαν την ευκαιρία να γνωρίσω ανθρώπους με μεγαλείο ψυχής.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω θερμά το Γιώργο Διαλυνά. Δεν ξέρω αν θα τα είχα καταφέρει στη Γερμανία χωρίς αυτόν. Με ηρεμούσε και μου έδινε κουράγιο όταν ήμουν έτοιμη να καταρρεύσω. Του ζητάω συγνώμη για όλα όσα χρειάστηκε να υπομείνει εξαιτίας μου. Ήρωας και ο Γιωργάκης!!

Στο Χαρίλαο Γκίνη χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη φιλία του αλλά και για την επιστημονική συμβολή του στην εργασία μου.

Ευχαριστώ πολύ την Ελευθερία Βασιλάκη και την Έφη Θυμιακού για την άψογη συνεργασία μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζουν και οι φίλοι μου Μελίνα, Γιώργος, Στέλλα, Δέσποινα και Μαρία γιατί στάθηκαν δίπλα μου και κατάφεραν να με υπομείνουν όλα αυτά τα χρόνια μετατρέποντας την απόγνωση και την απελπισία μου σε χαμόγελο και αισιοδοξία.

Τέλος ευχαριστώ θερμά, τους γονείς μου Γιώργο και Μαρία, τον αδερφό μου Νικόλα και τη γιαγιά μου Χαρούλα για την αγάπη και την κατανόησή τους όλα αυτά τα χρόνια. Η ψυχολογική και οικονομική στήριξη που μου προσέφεραν καθώς και η ζεστή αγκαλιά τους ήταν καθοριστικής σημασίας για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής την οποία και τους αφιερώνω...

MENA

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	Ι
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	II
SUMMARY	IV
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. Σύσταση, Δομή και Δυναμική των Μικροσωληνίσκων	1
2. Πρωτεΐνες συνδεόμενες με τους μικροσωληνίσκους	5
3. Είδη και ισότυποι τουμπουλίνης	8
4. Εντοπισμός και πιθανή λειτουργία της τουμπουλίνης στον πυρήνα	13
ευκαρυωτικών κυττάρων	
5. Αντιμιτωτικά φάρμακα που συνδέονται με μικροσωληνίσκους:ταξάνες και	16
αλκαλοειδή της Vinca	
6. Δομή του πυρήνα και οργάνωση της χρωματίνης	25
7. Δομή, Σύσταση και Οργάνωση Πυρηνικού Φακέλου	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
1. Υλικά	48
2. Παρασκευαστικές Μέθοδοι	50
2.1. Απομόνωση πυρήνων	50
 Από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας 	50
 Από ηπατοκύτταρα αρουραίων 	51
2.2. Παρασκευή πυρηνικών φακέλων	51
 Από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας 	51
 Από πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίου 	52
2.3. Απομόνωση ιστονών από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας	52
2.4. Απομόνωση υπερακετυλιωμένων και φωσφορυλιωμένων ιστονών	53
από κύτταρα HeLa	
2.5. Παρασκευή μεσοφασικού κυτταροπλάσματος από κύτταρα HeLa	53
2.6. Απομόνωση τουμπουλίνης από εγκέφαλο χοίρου	54
2.7. Καθαρισμός της τουμπουλίνης από τις MAPs	55
 Ενεργοποίηση ιονανταλλακτικής ρητίνης 	55
 Απομόνωση καθαρής τουμπουλίνης 	55

2.8. Απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών από βακτήρια	56
 Απομόνωση πρωτεϊνών συζευγμένων με GST 	56
 Απομόνωση πρωτεϊνών συζευγμένων με ουρά ιστιδινών (His tagged) 	56
 Απομόνωση ανασυνδυασμένων ιστονών H3 και H4 	57
3. Μοριακές Μέθοδοι	58
3.1. Πλασμιδιακές κατασκευές	58
3.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	58
3.3. Απομόνωση DNA από παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης	60
3.4. Καλλιέργεια βακτηρίων Escherichia coli (E.coli)	60
3.5. Μετασχηματισμός (transformation) βακτηρίων DH10B της <i>Ε. Coli</i>	60
3.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής	61
κλίμακας (miniprep procedure)	
3.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης	61
κλίμακας (large scale plasmid DNA preparation)	
4. Βιοχημικές Μέθοδοι	62
4.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών	62
4.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου	62
(SDS-PAGE)	
 Προετοιμασία δειγμάτων 	62
 Προετοιμασία πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου 	63
 Προετοιμασία πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό 	63
των α- και β-υπομονάδων της τουμπουλίνης	
 Ηλεκτροφόρηση 	63
 Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου 	63
4.3. Ανοσοαποτύπωση-Western Blot	64
 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 	64
 Διαδικασία ανοσοανίηνευσης 	64
 Αποιιάκουνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίγνευσης 	65
4.4. Ανοσοαποτύπωση μετά από επίστοωση (Overlav blot)	65
4.5. Πέψη προηνικών φακέλων με πρωτεάσες	66
4.6. Πέψη τουμπουλίνης με την πρωτεάση σαπτιλισίνη (subtilisin)	66
4.7. Πρωτεόλυση της ανασυνδυασμένης ιστόνης Η3 με σφαιρίδια τρυψίνης	66

4.8. Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών με πυρηνικούς φακέλους	67
4.9. Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης	67
5. Κυτταρικές Μέθοδοι	68
5.1. Κυτταροκαλλιέργειες	68
5.2. Επίδραση φαρμάκων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές	68
5.3. Μέτρηση του αριθμού κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	69
5.4. Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης	70
5.5. Μελέτη του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής	71
5.6. Έμμεσος ανοσοφθορισμός	71
5.7. Παροδική επιμόλυνση (transient transfection) κυττάρων HeLa	73
5.8. Μέτρηση της έντασης φθορισμού παροδικά επιμολυσμένων κυττάρων	73
5.9. Πειράματα ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοδιάχυση	74
(FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching)	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	77
1. Μελέτη της υποκυτταρικής εντόπισης της τουμπουλίνης	77
1.1. Υποκυτταρική εντόπιση της ενδογενούς τουμπουλίνης	77
με έμμεσο ανοσοφθορισμό	
1.2. Υποκυτταρική εντόπιση GFP-βΙΙ- και GFP-βΙV-τουμπουλίνης	79
σε παροδικά επιμολυσμένα κύτταρα HeLa	
 Δυναμική των ισομορφών GFP-τουμπουλίνης 	82
1.3. Μηχανισμός της πυρηνικής εντόπισης της τουμπουλίνης	85
 Η αμινοξική αλληλουχία της τουμπουλίνης εμπεριέχει σήματα πυρηνικής 	85
εξόδου (NES)	
 Η exportin-1 εμπλέκεται στην έξοδο GFP-ισομορφών της β-τουμπουλίνης 	86
από τον πυρήνα	
 Η ενδογενής διαλυτή τουμπουλίνη συγκεντρώνεται στον πυρήνα κυττάρων 	89
HeLa σε συνθήκες αποπολυμερισμού και παρουσία λεπτομυκίνης Β	
2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της διαλυτής τουμπουλίνης με	94
τον πυρηνικό φάκελο	
2.1. Σύνδεση της τουμπουλίνης σε πυρηνικούς φακέλους	94
πτηνών και θηλαστικών	
2.2. Σύνδεση της τουμπουλίνης στον πυρηνικό φάκελο μέσω της ιστόνης Η3	96

2.3. Χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης τουμπουλίνης-Η3	97
 Η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά και με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στην H3 	97
 Η τουμπουλίνη συνδέεται στην ουρά της H3 και ανεξάρτητα από την 	99
ύπαρξη φορτίων και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων	
 Η Η3 συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην α-τουμπουλίνη και 	101
ανεξάρτητα της ύπαρξης αρνητικών φορτίων	
2.4. Ρόλος της διαλυτής τουμπουλίνης στη σύνδεση της ετεροχρωματίνης	103
στον πυρηνικό φάκελο	
3. Συγκριτική μελέτη της δράσης πακλιταξέλης και συνθετικών	108
παραγώγων της σε κύτταρα θηλαστικών	
3.1. Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από την επίδραση	108
ταξόλης και ταξόλης συνδεδεμένης με συνθετικά πεπτίδια	
3.2. Μελέτη της επίδρασης ταξόλης και ταξόλης συνδεδεμένης με συνθετικά	110
πεπτίδια στον κυτταρικό κύκλο	
3.3. Μορφομετρική ανάλυση πυρήνων και εκτίμηση βλαβών του πυρηνικού	111
φακέλου κυττάρων HeLa και DU μετά τη δράση ταξόλης και ταξόλης	
συνδεδεμένης σε συνθετικά πεπτίδια	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
ΣΥΝΟΨΗ	127
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	128



Οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται από ετεροδιμερή α,β-τουμπουλίνης, αποτελούν μια από τις κύριες δομές του κυτταροσκελετού και διαδραματίζουν σημαντικό οργανωτικό και λειτουργικό ρόλο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αντικαρκινικά φάρμακα της οικογένειας των ταξανών όπως η ταξόλη, συνδέονται με μεγάλη συγγένεια στην τουμπουλίνη κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και προκαλούν μεταξύ άλλων βλάβες στην οργάνωση του πυρηνικού φακέλου. Η τουμπουλίνη ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, όπου βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία μεταξύ διαλυτής και πολυμερισμένης μορφής. Εντούτοις, σε πρόσφατες μελέτες έχει δειχθεί ότι η τουμπουλίνη εντοπίζεται επίσης στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων. Αν και έχει εξακριβωθεί η εντόπιση και δράση στον πυρήνα πολλών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (π.χ ακτίνη), δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν στους μοριακούς μηχανισμούς που εξασφαλίζουν την πυρηνική ή κυτταροπλασματική εντόπιση της τουμπουλίνης. Ως εκ τούτου, θα μελετηθεί με in vitro και in vivo προσεγγίσεις ο μηχανισμός που ρυθμίζει την υποκυτταρική κατανομή της τουμπουλίνης σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Δεδομένου ότι, σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι η διαλυτή τουμπουλίνη συνδέεται σε πυρηνικούς φακέλους με περιφερική ετεροχρωματίνη και αναστέλλει τη σύνδεση της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1, θα διερευνηθούν με in vitro προσεγγίσεις τα συστατικά του πυρηνικού φακέλου στα οποία συνδέεται η πρωτεΐνη καθώς και ο πιθανός ρόλος που διαδραματίζει στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης της περιφερικής ετεροχρωματίνης με το φάκελο. Τέλος, θα μελετηθεί in vitro η δράση συνθετικών παραγώγων ταξόλης τα οποία εμφανίζουν βελτιωμένη διαλυτότητα στο νερό, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στον κυτταρικό κύκλο, στη μορφολογία του πυρήνα και στην αρχιτεκτονική του πυρηνικού φακέλου ανθρώπινων καρκινικών σειρών.



Οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται από ετεροδιμερή α, β-τουμπουλίνης και αποτελούν μια από τις κύριες δομές του κυτταροσκελετού και διαδραματίζουν σημαντικό οργανωτικό και λειτουργικό ρόλο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αν και θεωρείται κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η τουμπουλίνη έχει επίσης εντοπιστεί στον πυρήνα ζωϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια. Από μελέτες σε καρκινικά ιστολογικά παρασκευάσματα έχει προταθεί ότι η κύρια πυρηνική ισομορφή είναι η βΙΙ-τουμπουλίνη. Μελετήσαμε ως εκ τούτου, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, τον μηχανισμό που ρυθμίζει την κατανομή της τουμπουλίνης σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Αρχικά εξετάσαμε τόσο την εντόπιση της ενδογενούς, διαλυτής α,β- και βΙΙ-τουμπουλίνης, όσο και τουμπουλίνης συζευγμένης με GFP, συγκεκριμένα της GFP-βΙΙ-, GFP-βΙV- και GFP-ΔβΙΙ-τουμπουλίνης (απαλοιφή των αμινοξέων 232-266 τα οποία αντιστοιχούν σε τρία σήματα πυρηνικής εξόδου της GFP-βΙΙτουμπουλίνης). Βρήκαμε ότι όλες οι GFP-πρωτεΐνες εντοπίζονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Η πυρηνική συσσώρευση είναι αυξημένη στην περίπτωση της GFP-ΔβΙΙτουμπουλίνης, όπως επίσης και της GFP-βΙΙ- και GFP-βΙV-τουμπουλίνης μετά από επώαση των κυττάρων με λεπτομυκίνη Β. Επίσης, η ενδογενής διαλυτή τουμπουλίνη συγκεντρώνεται στον πυρήνα σε συνθήκες αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και γαμηλής θερμοκρασίας, ενώ η έξοδος της πρωτεΐνης αναστέλλεται μερικώς από την λεπτομυκίνη Β. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η είσοδος της τουμπουλίνης στον πυρήνα πραγματοποιείται με παθητική διάχυση, η συσσώρευσή της οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με συστατικά του πυρήνα πιθανότατα την ιστόνη H3 και ότι η έξοδός της στο κυτταρόπλασμα είναι ενεργητική και πραγματοποιείται, τουλάχιστον μερικώς από την exportin-1.

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει δειχθεί ότι η διαλυτή τουμπουλίνη συνδεόμενη σε πυρηνικούς φακέλους με περιφερική ετεροχρωματίνη αναστέλλει τη σύνδεση της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1. Διερευνήσαμε ως εκ τούτου, την αλληλεπίδραση της τουμπουλίνης με συγκεκριμένες πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου και διαπιστώσαμε ότι η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά και με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο με την ιστόνη H3. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση δεν εξαρτάται από την παρουσία επιπλέον αρνητικών φορτίων και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην αμινο-τελική περιοχή της ιστόνης καθώς και από την ύπαρξη αλυσίδων πολυγλουταμικού στο καρβοξυ-τελικό άκρο της τουμπουλίνης. Επιπρόσθετα, η τουμπουλίνη αναστέλλει τη σύνδεση της H21 και στον LBR και αποτρέπει το σχηματισμό του συμπλόκου HP1, LBR και core ιστονών. Επομένως, η τουμπουλίνη θα μπορούσε να ρυθμίζει την σύνδεση/αποσύνδεση της HP1 με τον πυρηνικό φάκελο.

II

Η πακλιταξέλη (ταξόλη) αποτελεί το πιο διαδεδομένο αντικαρκινικό φάρμακο και χρησιμοποιείται ευρέως στην θεραπεία ανθρώπινων καρκινωμάτων. Ένα από τα μειονεκτήματα του φαρμάκου είναι η χαμηλή διαλυτότητά του στο νερό αλλά και στους περισσότερους φαρμακευτικά αποδεκτούς διαλύτες. παρούσα Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά ανάλογα ταξόλης τα οποία περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα ταξόλης συνδεδεμένα σε ένα συνθετικό φορέα Ac-[Lys-Aib-Cys(CH2CO-2'-paclitaxel)]n-NH2 n=2, 3, 4), ο οποίος βελτιώνει την διαλυτότητα της ταξόλης στο νερό. Η μελέτη της επίδρασης της ταξόλης και των παραγώγων της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανθρώπινων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων έδειξε ότι το ανάλογο με τα 4 αντίγραφα της ταξόλης αναστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων συγκρινόμενο με τα άλλα συνθετικά παράγωγα και την ταξόλη. Η δράση του συγκεκριμένου αναλόγου όσον αφορά στο σταμάτημα κυττάρων στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου καθώς και στη δημιουργία πολυπύρηνων κυττάρων που εμφανίζουν ασυνέχεια στην πυρηνική περιφέρεια, βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της ταξόλης. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι το συνθετικό ανάλογο της ταξόλης εμφανίζει αυξημένη βιολογική δραστικότητα συγκρινόμενο με την ταξόλη.



Microtubules are composed of α,β -tubulin heterodimers and are involved in the organization and function of eukaryotic cells. Although tubulin is considered as a cytoplasmic protein, there are reports supporting the presense of tubulin in nuclei of cultured animal cells. Earlier immunocytochemical studies suggest that *βII*-tubulin is the main nuclear isoform. We therefore investigated, using different techniques, the mechanism that regulates the sub-cellular localization of tubulin in human carcinoma cell lines. We examined the localization of either endogenous soluble α,β -tubulin or GFP-tagged β II-, $\Delta\beta$ II (deletion from the sequence of *βII-tubulin* of amino acids 232-266 corresponding to three putative NESs) and BIV-tubulin and we found that were located in both nucleus and cytoplasm. The abundance of tubulin in the nucleus was greater in the case of GFP- $\Delta\beta$ II-tubulin. The accumulation in the nucleus of GFP-tagged isoforms BII- and BIV-tubulin was increased when cells have been treated with leptomycin B. Moreover, endogenous soluble tubulin was accumulated in the nucleus under depolymerization conditions of microtubules and low temperature, whereas its nuclear export was partially inhibited by leptomycin B. These results suggest that soluble tubulin a) enters the nucleus by passive diffusion, b) is accumulated in the nucleus by its interaction with nuclear components, probably H3 and c) is exported in the cytoplasm by an active mechanism, which is partially dependent on exportin-1.

We have previously shown that binding of soluble tubulin to the nuclear envelope / peripheral heterochromatin inhibits the association of heterochromatin protein 1 (HP1) with the nuclear envelope. Therefore, we investigated the interaction of tubulin with nuclear envelope proteins and we found that tubulin binds in a specific and dose-dependent manner to histone H3. Post-translational modifications in the amino-terminal domain of H3 and polyglutamic stretches in the carboxy-terminal domain of tubulin are not required for this interaction. Moreover, tubulin inhibits binding of H3 to all HP1 variants and LBR, prevents formation of the multi-component complex consisting of LBR, HP1 and core histones and, therefore, might act as a regulator for the association/dissociation of HP1-enriched heterochromatin to the nuclear envelope.

Paclitaxel (taxol) is the most important anticancer drug that is widely used in the treatment of human carcinomas. A disadvantage of this drug is the low solubility in water and in most pharmaceutically acceptable solvents. In this work we used analogues in which multiple copies of paclitaxel were covalently bound to synthetic carriers (Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-paclitaxel)]_n-NH₂, n=2, 3, 4) aiming the improvement of the water solubility.

IV

We found that Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-paclitaxel)]₄-NH₂ inhibited the proliferation of cancer cells more potently than other synthetic analogues and paclitaxel. Moreover, the effectiveness of Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-paclitaxel)]₄-NH₂ on cell cycle arrest at G2/M phase and the production of multinucleated cells which often presented nuclear envelope discontinuity, was greater compared to paclitaxel. In conclusion, our results indicate an improved biological activity of the synthetic analogue, compared to paclitaxel.



1. Σύσταση, Δομή και Δυναμική των Μικροσωληνίσκων

Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν μια από τις κύριες δομές του κυτταροσκελετού και διαδραματίζουν σημαντικό οργανωτικό και λειτουργικό ρόλο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Συμμετέχουν σε μεγάλο αριθμό λειτουργιών του κυττάρου στις οποίες περιλαμβάνονται, η κίνηση των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η ενδοκυττάρια μεταφορά καθώς και η διαμόρφωση της μορφολογίας του κυττάρου (Desai and Mitchison, 1997).

Τα πολυμερή των μικροσωληνίσκων σχηματίζονται από υπομονάδες τουμπουλίνης (tubulin), η καθεμία από τις οποίες είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο παρόμοιες σφαιρικές πρωτεΐνες που ονομάζονται *α-τουμπουλίνη* και *β-τουμπουλίνη* και συνδέονται ισχυρά μεταξύ τους με μη ομοιοπολικούς δεσμούς (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1. Δομή της τουμπουλίνης από κρυσταλλογραφικές μελέτες παρουσία ταζόλης. Η τουμπουλίνη αποτελείται από δύο μονομερή την α-τουμπουλίνη (επάνω) και την βτουμπουλίνη (κάτω) με σχεδόν ταυτόσημη δομή. Κάθε μονομερές σχηματίζεται από δύο βπτυχωτά φύλλα (πράσινο χρώμα) τα οποία περιστοιχίζονται από έλικες (μπλε χρώμα) και περιλαμβάνει μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου (ροζ χρώμα). Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζεται το μόριο της τάζόλης (Lawrence Berkeley Laboratory, 1998).

Οι υπομονάδες της τουμπουλίνης επιστοιβάζονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς και σχηματίζουν το τοίχωμα του κυλινδρικού κοίλου μικροσωληνίσκου, που αποτελείται από 13 παράλληλα πρωτοινίδια (protofilaments), δηλαδή γραμμικές αλυσίδες υπομονάδων τουμπουλίνης σε όλο το μήκος των οποίων εναλλάσσονται υπομονάδες α- και β-τουμπουλίνης. Κάθε πρωτοινίδιο έχει μια δομική πολικότητα: η α-τουμπουλίνη εκτίθεται

στο ένα άκρο το οποίο ονομάζεται αρνητικό «πλήν» και η β-τουμπουλίνη στο άλλο το οποίο ονομάζεται θετικό «συν» (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Πολυμερισμός μικροσωληνίκων. Τα ετεροδιμερή α- και β-τουμπουλίνης συναθροίζονται έτσι ώστε να σχηματιστεί ο πυρήνας του μικροσωληνίσκου. Μετά την εμπυρήνωση ακολουθεί επιμήκυνση του μικροσωληνίσκου και στα δύο άκρα έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας κύλινδρος που αποτελείται από 13 παράλληλα πρωτοινίδια. Κάθε μικροσωληνίσκος περιέχει ένα θετικό (+) και ένα αρνητικό άκρο(-) το οποίο εκτείθεται στο διαλύτη (Jordan and Wilson, 2004).

Αυτή η πολικότητα είναι ίδια σε όλα τα πρωτοινίδια και προσδίδει δομική πολικότητα στον μικροσωληνίσκο ως σύνολο. Το γεγονός αυτό, δηλαδή ότι η δομή του έχει μια συγκεκριμένη κατεύθυνση, με δύο άκρα τα οποία έχουν διαφορετική χημική σύσταση και συμπεριφέρονται διαφορετικά, είναι κρίσιμο τόσο για τη συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων όσο και για τη λειτουργία τους (Downing, 2000; Nogales, 2000).

In vivo, η εμπυρήνωση και η οργάνωση των μικροσωληνίσκων πραγματοποιείται από εξειδικευμένα κέντρα οργάνωσης (microtubule organizing centers, MTOCs), τα οποία ελέγχουν τον αριθμό, την εντόπιση και τον προσανατολισμό των μικροσωληνίσκων στο κυτταρόπλασμα (Bergen et al., 1980). Σε ένα τυπικό ζωϊκό κύτταρο, οι μικροσωληνίσκοι οργανώνονται από μια μικρή δομή που βρίσκεται στη μια πλευρά του πυρήνα και ονομάζεται κεντροσωμάτιο. Τα κεντροσωμάτια περιέχουν μεγάλο αριθμό δακτυλίων που εμπεριέχουν ένα άλλο είδος τουμπουλίνης, την γ-τουμπουλίνη. Κάθε δακτύλιος γτουμπουλίνης χρησιμεύει ως θέση εκκίνησης ή θέση εμπυρήνωσης (nucleation site) για την ανάπτυξη ενός μικροσωληνίσκου, όπου προστίθενται τα διμερή της αβ-τουμπουλίνης με ένα τέτοιο προσανατολισμό ώστε το πλην άκρο κάθε μικροσωληνίσκου να ενσωματώνεται στο κεντροσωμάτιο και η ανάπτυξη να γίνεται μόνο στο συν άκρο, δηλαδή το άκρο που εκτείνεται προς την περιφέρεια του κυττάρου (Nogales, 2000). Με τον τρόπο αυτό

οργανώνονται συστοιχίες μικροσωληνίσκων που απλώνονται ακτινωτά σε όλο το κυτταρόπλασμα και δημιουργούν ένα σύστημα τροχιών, κατά μήκος των οποίων μπορούν να μετακινηθούν κυστίδια, οργανίδια και άλλα συστατικά του κυττάρου (Stearns et al., 1991).

Οι μικροσωληνίσκοι είναι δυναμικές δομές οι οποίες μπορούν να μεταπίπτουν από μια φάση ανάπτυξης σε μια φάση συρρίκνωσης και το αντίθετο, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Nogales, 2000). Οι λειτουργίες που επιτελούν στα κύτταρα καθορίζονται και ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από την δυναμική του πολυμερισμού τους (Waterman-Storer and Salmon, 1997). Μόλις ένας μικροσωληνίσκος εμπυρηνωθεί, το συν άκρο του συνήθως αυξάνει από το κέντρο οργάνωσης προς τα έξω με την προσθήκη υπομονάδων. Στη συνέχεια υφίσταται μια αλλαγή που προκαλεί τη γρήγορη συρρίκνωσή του με απώλεια υπομονάδων από το ελεύθερο άκρο του. Μπορεί να συρρικνωθεί μερικώς και στη συνέχεια να αυξηθεί πάλι ή μπορεί να εξαφανιστεί τελείως και να αντικατασταθεί από ένα νέο μικροσωληνίσκο που θα δημιουργηθεί από τον ίδιο δακτύλιο γ-τουμπουλίνης. Αυτή η συμπεριφορά είναι γνωστή ως δυναμική αστάθεια και πηγάζει από την εγγενή ικανότητα των μορίων της τουμπουλίνης να δεσμεύουν και να υδρολύουν GTP (Desai and Mitchison, 1997). Κάθε ελεύθερο διμερές τουμπουλίνης περιέχει ένα ισχυρά συνδεδεμένο μόριο GTP που υδρολύεται σε GDP (το οποίο παραμένει ισχυρά συνδεδεμένο) αμέσως μετά την προσθήκη της υπομονάδας σε έναν αυξανόμενο μικροσωληνίσκο. Τα μόρια της τουμπουλίνης που είναι συνδεδεμένα με GTP συγκροτούνται αποτελεσματικά στο τοίχωμα του μικροσωληνίσκου ενώ εκείνα που περιέχουν GDP έχουν διαφορετική διαμόρφωση και συνδέονται λιγότερο ισχυρά μεταξύ τους (Nogales, 2001). Όταν ο πολυμερισμός γίνεται γρήγορα, τα μόρια της τουμπουλίνης προστίθενται στο άκρο του μικροσωληνίσκου με μεγαλύτερη ταχύτητα από την ταχύτητα υδρόλυσης του προσδεδεμένου GTP με αποτέλεσμα το άκρο του μικροσωληνίσκου να αποτελείται αποκλειστικά από υπομονάδες τουμπουλίνης που περιέχουν GTP. Επειδή οι συγκεκριμένες υπομονάδες συνδέονται ισχυρά μεταξύ τους, σχηματίζουν ένα κάλυμμα στο άκρο του μικροσωληνίσκου, γνωστό ως κάλυμμα GTP (GTP cap), το οποίο εμποδίζει τον αποπολυμερισμό. Έτσι ο αναπτυσσόμενος μικροσωληνίσκος, ο οποίος μπορεί να αποπολυμεριστεί μόνο με απώλεια υπομονάδων από το ελεύθερο άκρο του, θα συνεχίσει να αυξάνει (Nogales, 2001). Σε μερικές περιπτώσεις όμως, ειδικά όταν η αύξηση είναι αργή, οι υπομονάδες με κάλυμμα GTP υδρολύουν το GTP σε GDP πριν από την προσθήκη νέων υπομονάδων GTP-τουμπουλίνης με αποτέλεσμα τα ελεύθερα άκρα των πρωτοινιδίων να αποτελούνται από υπομονάδες GDP-τουμπουλίνης, οι οποίες συνδέονται λιγότερο ισχυρά μεταξύ τους, γεγονός που ευνοεί τον αποπολυμερισμό (Εικόνα 3). Τα μόρια της GDP-

τουμπουλίνης που απελευθερώνονται κατά τον αποπολυμερισμό, προστίθενται στο απόθεμα των μη πολυμερισμένων μορίων στο κυτταροδιάλυμα. Στη συνέχεια, ανταλλάσουν το προσδεδεμένο GDP με GTP και έτσι είναι πάλι διαθέσιμα να προστεθούν σε έναν άλλο μικροσωληνίσκο που βρίσκεται στη φάση της ανάπτυξης.



Εικόνα 3. Δυναμική αστάθεια του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και κάλυμμα (Cap) GTP. Το νουκλεοτίδιο GTP υδρολύεται σε GDP και (Pi) καθώς οι υπομονάδες τουμπουλίνης προστίθενται στα άκρα των μικροσωληνίσκων. Η υδρόλυση προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση των μορίων τουμπουλίνης, οι οποίες αποσταθεροποιούν το πολυμερές με αποτέλεσμα την βράχυνση και την καταστροφή του μικροσωληνίσκου. Το άκρο ενός μικροσωληνίσκου το οποίο περιλαμβάνει τουμπουλίνη συνδεδεμένη με GTP είναι σταθερό και προστατευμένο (capped) έναντι στον αποπολυμερισμό (Jordan and Wilson, 2004).

Οι μικροσωληνίσκοι εκτός από τη δυναμική αστάθεια επιδεικνύουν, *in vivo* και *in vitro*, και μια δεύτερη δυναμική συμπεριφορά, η οποία καλείται *treadmilling* και αφορά στην μεταφορά υπομονάδων τουμπουλίνης στο συν άκρο και ταυτόχρονη απώλεια διμερών από το πλην άκρο του μικροσωληνίσκου, χωρίς να παρατηρείται αλλαγή στο μήκος του. Η ιδιότητα αυτή των μικροσωληνίσκων οφείλεται στην ύπαρξη διαφορετικών κριτικών συγκεντρώσεων των υπομονάδων τουμπουλίνης στα δύο άκρα. Ως κριτική συγκέντρωση ορίζεται η συγκέντρωση των ελεύθερων διμερών τουμπουλίνης που βρίσκονται σε ισορροπία με τα δύο άκρα του μικροσωληνίσκου (**Εικόνα 4**) (Margolis and Wilson, 1998; Panda et al., 1999; Rodionov and Borisy, 1997; Shaw et al., 2003).



<u>**Εικόνα 4.</u>** Treadmilling. Ετεροδιμερή τουμπουλίνης μεταφέρονται στο συν άκρο του μικροσωληνίσκου με παράλληλη απώλεια υπομονάδων από το πλην άκρο. Το μήκος του μικροσωληνίσκου παραμένει αμετάβλητο (Jordan and Wilson, 2004).</u>

Η δυναμική των μικροσωληνίσκων ρυθμίζεται περαιτέρω από ενδοκυττάριους μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν μεταβολή των επιπέδων έκφρασης διαφορετικών ισοτύπων τουμπουλίνης, έλεγχο της πτύχωσης των μονομερών υπομονάδων, σχηματισμό λειτουργικών διμερών, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις υπομονάδες τουμπουλίνης, εμπυρήνωση των μικροσωληνίσκων και αλληλεπίδραση αυτών με κυτταρικούς παράγοντες (CLIP-170, STOP, EMAP, stathmin, katanin, Kin I κινησίνες) που σταθεροποιούν ή αποσταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους (Cassimeris, 2002; Galmarini et al., 2003; Luduena, 1998; Maney et al., 2001; McNally et al., 2002; Ohi et al., 2003; Spittle et al., 2000; Verdier-Pinard et al., 2003).

2. Πρωτεΐνες συνδεόμενες με τους μικροσωληνίσκους

Η λειτουργική ποικιλότητα των μικροσωληνίσκων επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της τουμπουλίνης με ένα μεγάλο αριθμό βοηθητικών πρωτεϊνών (Desai and Mitchison, 1997), οι οποίες διακρίνονται: (α) στις πρωτεΐνες κινητήρες (motors), οι οποίες μετακινούνται κατά μήκος των μικροσωληνίσκων χρησιμοποιώντας την ενέργεια που προκύπτει από την υδρόλυση του ATP, (β) στις δομικές MAPs (Microtubule Associated Proteins), οι οποίες δεσμεύονται στους μικροσωληνίσκους, τους σταθεροποιούν και προάγουν τον σχηματισμό τους, (γ) στις πρωτεΐνες που συνήθως δεν καλούνται MAPs αλλά συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους και μπορούν να απομονωθούν με αυτούς (Gπρωτεΐνες, κινάσες, ριβονουκλεοπρωτεΐνες) και δ) στις πρωτεΐνες που προκαλούν αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (Carman et al., 1998; Feng et al., 1999; Garnier et al., 1998; Guha et al., 1998; Haga et al., 1998; Mandelkow and Mandelkow, 1995; Pitcher et al., 1998; Roychowdhury et al., 1999). Οι MAPs ρυθμίζουν τη σταθερότητα και τη δυναμική των μικροσωληνίσκων και είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση πρωτεϊνών στον κυτταροσκελετό (Verdier-Pinard et al., 2003). Η περιοχή δέσμευσης των MAPs στους πολλαπλούς ισοτύπους της α- και β-τουμπουλίνης, βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο τους όπου και εντοπίζονται οι σημαντικότερες διαφορές στην ακολουθία τους (Luduena, 1998). Αν και η σύνδεση των MAPs με τους μικροσωληνίσκους ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης τους, υπάρχουν ενδείξεις ότι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις υπομονάδες της τουμπουλίνης μπορούν επίσης να επηρεάσουν την παραπάνω αλληλεπίδραση (Boucher et al., 1994).

Πρωτεΐνες Κινητήρες

Οι πρωτεΐνες κινητήρες δεσμεύονται στους μικροσωληνίσκους και χρησιμοποιούν την ενέργεια που προέρχεται από επαναλαμβανόμενους κύκλους υδρόλυσης του ΑΤΡ για να μετακινούνται σταθερά προς μια κατεύθυνση. Ταυτόχρονα, προσδένουν και άλλα κυτταρικά συστατικά όπως κυστίδια ή οργανίδια και έτσι μεταφέρουν το φορτίο αυτό κατά μήκος των ινιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σύμπλοκα που αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες και πολλές μικρότερες ελαφριές αλυσίδες. Κάθε βαριά αλυσίδα περιέχει μια σφαιρική κεφαλή η οποία αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους και στην οποία προσδένεται το ΑΤΡ. Η ουρά συνδέεται σταθερά με συγκεκριμένα συστατικά του κυττάρου, όπως κυστίδια ή οργανίδια, ενώ οι σφαιρικές κεφαλές είναι ένζυμα που υδρολύουν το ΑΤΡ (ΑΤΡάσες). Η υδρόλυση του ΑΤΡ παρέχει την ενέργεια για μια σειρά αλλαγών της διαμόρφωσης της κεφαλής με ένα μηχανισμό σύνδεσης, απελευθέρωσης και επανασύνδεσης στους μικροσωληνίσκους, ο οποίος της επιτρέπει να μετακινείται κατά μήκος τους (Caviston and Holzbaur, 2006; Downing, 2000).Οι πρωτεΐνες κινητήρες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις κινησίνες (kinesins) οι οποίες μετακινούνται κυρίως προς το συν άκρο (μακριά από το κεντροσωμάτιο, προς την περιφέρεια) και τις δυνεΐνες (dyneins) που κινούνται προς το πλην άκρο (προς το κεντροσωμάτιο).

Η οικογένεια των κινησινών αριθμεί πάνω από 45 πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται σε κύτταρα θηλαστικών. Όλα τα μέλη περιέχουν μια κοινή ομόλογη περιοχή με την οποία δεσμεύονται στους μικροσωληνίσκους, ενώ διαφοροποιούνται σημαντικά στα τμήματα εκείνα τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση και τη μεταφορά του εκάστοτε φορτίου. Οι κινησίνες, βάσει των ομοιοτήτων που εντοπίζονται στην αμινοξική τους ακολουθία ταξινομούνται σε 14 υποοικογένειες. Η εκτεταμένη ποικιλότητα έχει ως αποτέλεσμα την εξειδικευμένη δράση των κινησινών στη μεταφορά φορτίων (Miki et al., 2005). Αν και οι περισσότερες πρωτεΐνες της οικογένειας των κινησινών, όπως η κινησίνη-1 μετακινούνται προς το συν άκρο των μικροσωληνίσκων, αρκετά μέλη, όπως για παράδειγμα η KIFC2 η

οποία ανήκει στην οικογένεια της κινησίνης-14, κατευθύνονται προς το αντίθετο, πλην άκρο (Vale, 2003).

Σε αντίθεση με τις κινησίνες, μια μόνο μορφή κυτταροπλασματικής δυνεΐνης είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά πολλών και διαφορετικών φορτίων κατά μήκος των μικροσωληνίσκων με κατεύθυνση το πλην άκρο. Προκειμένου να επιτελέσει τη λειτουργία της η δυνεΐνη χρησιμοποιεί το βοηθητικό σύμπλοκο δυνακτίνης (Schroer, 2004). Αν και θεωρείται η κύρια πρωτεΐνη η οποία κατευθύνει την μεταφορά οργανιδίων προς το πλην άκρο των μικροσωληνίσκων, από πρόσφατες μελέτες προκύπτει ότι το σύμπλοκο δυνεΐνη-δυνακτίνη μπορεί να κινηθεί και προς τις δύο κατευθύνσεις (Mallik et al., 2005).

Πρωτεΐνες που σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους

Οι πρωτεΐνες που σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους και προάγουν τον πολυμερισμό τους αναφέρονται ως "structural MAPs" γιατί μπορούν να συν-απομονωθούν με την τουμπουλίνη μετά από αρκετούς κύκλους πολυμερισμού και αποπολυμερισμού (Mandelkow et al., 1993). Πρόκειται για θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται στο αρνητικά φορτισμένο καρβοξυτελικό άκρο της τουμπουλίνης, το οποίο εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια των μικροσωληνίσκων. Η εξουδετέρωση των φορτίων ευνοεί τον πολυμερισμό των υπομονάδων της τουμπουλίνης. Στην οικογένεια των MAPs ανήκουν οι Tau, STOP, EMAP, MAP1A και MAP1B, MAP2 και MAP4, οι οποίες περιέχουν ένα συντηρημένο καρβοζυτελικό άκρο μέσω του οποίου δεσμεύονται στους μικροσωληνίσκους. Σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, κινάσες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα στην παραπάνω περιοχή με αποτέλεσμα την αποσύνδεση ή την απενεργοποίηση των MAPs και την αύξηση της δυναμικής αστάθειας των μικροσωληνίσκων (Drewes et al., 1998). Η πρωτεΐνη STOP, η οποία ρυθμίζεται από την καλμοδουλίνη, σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους σε συνθήκες γαμηλής θερμοκρασίας ή παρουσία φαρμάκων αποπολυμερισμού. Η STOP εντοπίζεται στους νευρώνες όπου η σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωστή ανάπτυξη των δενδριτών (Guillaud et al., 1998). Η πρωτεΐνη EMAP συνδέεται σε διμερή ελεύθερης τουμπουλίνης αλλά και σε μικροσωληνίσκους όπου προάγει την σταθεροποίηση τους. Αντίθετα με τις κλασσικές MAPs, η δέσμευση της EMAP δεν επηρεάζεται από την απομάκρυνση του καρβοξυτελικού άκρου της τουμπουλίνης από το ένζυμο subtilisin (Hamill et al., 1998).

Εισαγωγή

Πρωτεΐνες που προκαλούν αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων

Οι πρωτεΐνες Katanin, Spastin, Fidgetin, Op18 ή Stathmin, XKCM1 και XKIF2 ανήκουν στους κυτταρικούς παράγοντες οι οποίοι προκαλούν αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων. Η δράση τους στηρίζεται σε τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι πρωτεΐνες Katanin, Spastin και Fidgetin κόβουν τους μικροσωληνίσκους με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων άκρων τα οποία στερούνται την ύπαρξη GTP καλύμματος (Ahmad et al., 1999; McNally, 1998; Zhang et al., 2007). Η Op18 προάγει την υδρόλυση του GTP και εξαλείφει το σταθεροποιητικό GTP κάλυμμα (Belmont et al., 1996; Howell et al., 1999) ενώ οι XKCM1 και XKIF2 προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση της τουμπουλίνης οι οποίες αποσταθεροποιούν το δίκτυο των μικροσωληνίσκων (Desai et al., 1999; Walczak et al., 1996).

3. Είδη και ισότυποι τουμπουλίνης

Υπάρχουν πολλαπλοί α- και β- ισότυποι (~ 450 αμινοξέα ο καθένας), οι οποίοι αν και εμφανίζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ των διαφόρων ειδών (θηλαστικά, πτηνά), επιδεικνύουν διαφορές στην ακολουθία του καρβοξυτελικού τους άκρου όσον αφορά το ίδιο είδος. Πιο συγκεκριμένα, στα σπονδυλωτά έχουν βρεθεί επτά λειτουργικά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν επτά διαφορετικούς ισοτύπους β-τουμπουλίνης. Ένα από τα επτά γονίδια εκφράζεται μόνο στα πτηνά (cb5) σε αντίθεση με τα υπόλοιπα τα οποία εκφράζονται και στα θηλαστικά. (Sullivan, 1988). Όπως προκύπτει από την ακολουθία των αμινοξέων τους, οι συγκεκριμένοι ισότυποι εμφανίζουν υψηλή ομολογία και διαφέρουν μόνο σε ποσοστό 4-16%. Οι διαφορές εντοπίζονται μεταξύ των τελευταίων δεκαπέντε αμινοξέων και σε μικρότερη έκταση στα αμινοξέα 35, 55-57 και 124 (Burns, 1990; Sullivan, 1988). Οι Sullivan και Cleveland επινόησαν ένα σύστημα ταξινόμησης των ισοτύπων της βτουμπουλίνης, το οποίο βασίζεται στην διαφορετική αμινοξική αλληλουχία του καρβοξυτελικού τους άκρου (Cleveland, 1986; Sullivan, 1988). Οι συγκεκριμένες περιοχές διαφέρουν μεταξύ των ισοτύπων τουμπουλίνης ενός είδους, ενώ εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στον ίδιο ισότυπο μεταξύ διαφορετικών ειδών (άνθρωπος, ποντίκι) (Πίνακας 1 και 2A).

Isotype	Gene/ protein	C-terminal isotype defining sequence	Expression
Class I	cβ7 mβ5 rbt. 3 hβ1	EEEEDFGEEAEEEA	Constitutive; many tissues
Class 11	cβ1/cβ2 mβ2 rbt. 1 hβ2 pore. βA bov. β1	DEQGEFEEEGEEDEA EG	Major neuronal; many tissues
Class III	cβ4 hβ4 porc. βB bov. β2	EEEGEMYEDDEEESEQGAK EEEGEMYEDDEEESESQGPK	Minor neuronal; neuron specific
Class IVa	mβ4 rbt. 2 h5β	EEGEFEEEAEEËVA	Major neural; brain specific
Class IVb	cβ3 mβ3 hβ2	EEEGEFEEEAEEEAE EEEGEFEEEAEEEVA	Major testes; many tissues
Class V	c <i>β</i> 5	NDGEEEAFEDDEEEINE	Minor constitutive; absent from neurons
Class VI	cβ6 mβ1	DVEEYEEAEASPEKET GLEDSEEDAEEAEVEAEDKDH	Major erythrocyte/platelets; hematopoiesis specific

<u>Πίνακας 1.</u> Ισότυποι της β-τουμπουλίνης στα σπονδυλωτά. Ταξινόμηση και πρότυπα έκφρασης των ισοτύπων β-τουμπουλίνης οι οποίοι εκφράζονται στα σπονδυλωτά (Sullivan, 1988).

A.

Class	Mouse	Human ^b
I	ATAEEEEDFGEEAEEEA	ATAEEEEDFGEEAEEEA
п	ATADEQGEFEEEEGEDEA	ATADEQGEFEEEEGEDEA
III	ATAEEEGEMYEDDEDESE-	ATAEEEGEMYEDDE E ESE-
	RQGPK	SQGPK
IVa	ATAEEGEFEEEAEEEVA	ATAEEGEFEEEAEEEVA
IVb	ATAEEEGEFEEEAEEEVA	ATAEEEGEFEEEAEEEVA
VI	VRAGLEDSEEDAEEAEVE-	AKAVLEEDEEVTEEAEMEP-
	AEDKDH	EDK G H

1		•	
	D	Þ	
	-		1

Class	Mouse	Human	Patterns of expression
I	mβ5	HM40 (100) ^d	Constitutive; predominant isotype in many cell lines
II ^{b,c}	mβ2	Ηβ9 (100)	Major isotype of neurons; low levels in lung, kidney, spleen, stomach and thymus; increased levels in prostate adenocarcinoma
III ^{b,c}	mβ6	Ηβ4 (99)	Neurons; Sertoli cells of testis; increased levels in some tumors compared to normal tissue
IVa ^{b,c}	mβ4	H5β (100)	Brain-specific
IVb ^{b,c}	mβ3	Ηβ2 (100)	Constitutive with highest levels in testis
VI	mβl	Ηβ1 (91)	Hematopoiesis-specific cell types

Πίνακας 2. Ισότυποι της β-τουμπουλίνης στα θηλαστικά. (Α) Διαφορές στην αμινοζική ακολουθία του καρβοζυτελικού άκρου μεταζύ των ισοτύπων β-τουμπουλίνης που εκφράζονται στο ποντίκι και στον άνθρωπο (**B**) Ταζινόμηση και πρότυπα έκφρασης των ισοτύπων της βτουμπουλίνης στο ποντίκι και στον άνθρωπο (Burkhart et al., 2001).

Τα πρότυπα έκφρασης των ισοτύπων της β-τουμπουλίνης μεταβάλονται σε σχέση με τον τύπο του ιστού, καθώς και το στάδιο της κυτταρικής διαφοροποίησης (Πίνακας 2B) (Burkhart et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, οι ισότυποι ΙΙΙ, ΙVa και VI εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση έκφρασης σε αντίθεση με τους Ι και IVb που αποτελούν κυρίαρχο συστατικό των μικροσωληνίσκων σε πολλές κυτταρικές σειρές. Ο ισότυπος ΙΙ εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο αλλά και σε χαμηλότερα επίπεδα σε διάφορους ιστούς (Cowan et al., 1983; Panda et al., 1994; Sullivan and Cleveland, 1986). Σε ανθρώπινους όγκους έχουν εντοπισθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ισοτύπων ΙΙ (Ranganathan et al., 1997) και ΙΙΙ (Furuhata et al., 1993; Katsetos et al., 1991).

Στην περίπτωση της α-τουμπουλίνης έχουν ταυτοποιηθεί επτά λειτουργικά γονίδια στο ποντίκι, τα οποία κωδικοποιούν έξι πολυπεπτιδικούς ισοτύπους, καθώς και έξι γονίδια στο κοτόπουλο τα οποία κωδικοποιούν έξι ισομορφές αντίστοιχα. Οι ισομορφές της ατουμπουλίνης εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στα διαφορετικά είδη θηλαστικών, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες στα πτηνά, οι οποίες εμφανίζουν ανομοιογένεια συγκρινόμενες με εκείνες των θηλαστικών αλλά και μεταξύ τους. Οι διαφορές εντοπίζονται, όπως και στην περίπτωση της β-τουμπουλίνης, στα τελευταία δεκαπέντε αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο, καθώς και μεταξύ των καταλοίπων 35 και 60 στην αμινοτελική περιοχή (Πίνακας 3).

Gene*	C-terminal sequence	Expression
mal, hbal, ral, cha2, porc. α	DYEEVGVDSVEGEGEEEGEEY	Major neural/neural development; many tissues
ma2, hka1, raT26, cha1	DYEEVGVDSVEGEGEEEGEEY	Major neural/constitutive; many tissues
m26, ch23	DYEEVGADSAEGDDEGEEY	Minor constitutive; many tissues
mz3/7, h2α	DYEEVGVDSVEAEAEEGEEY	Major testes; testes specific
ma4, ha44, mfa	DYEEVGIDSYEDEDEGEE	Minor constitutive; many tissues; untranslated in testes
mg(testes)	GYEEVGMGSVEAEGEEEDRNTSCCIMFSSSIGNR	Testes/haploid specific
cal	DYEEVGVDSVEGEGEEEGEEY	Major brain; many tissues
ca2	DYDEEATDLFEDENEAGS	Testis specific
cz3	DYEEVGRNSADGGEFEE	Minor constitutive
cx:5	DYEEVGLDSYEDEEEGEE	Minor; many tissues
ca/8	DYEEVGTDSMDGEDEGEEY	Minor constitutive; many tissues
cæ4	DYEEVGTDSFEDENDEE	?

<u>Πίνακας 3.</u> Ταξινόμηση και πρότυπα έκφρασης των ισοτύπων α-τουμπουλίνης στα σπονδυλωτά. Τροποποιημένο από (Sullivan, 1988).

Οι ισότυποι της τουμπουλίνης μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω με μια σειρά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αμινοξέων όπως φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, πολυγλουταμιλίωση και πολυγλυκιλίωση στο καρβοξυτελικό άκρο της α- και βτουμπουλίνης. Τροποποιήσεις όπως η προσθήκη ή η αφαίρεση καταλοίπων τυροσίνης (detyrosination/tyrosination) και η απομάκρυνση του προτελευταίου κατάλοιπου γλουταμικού οξέος, πραγματοποιούνται στην υπομονάδα της α-τουμπουλίνης (Luduena, 1998; MacRae, 1997).

Το 1976, οι Fulton και Simpson πρότειναν ότι η ύπαρξη πολλαπλών γονιδίων τουμπουλίνης, τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικά λειτουργικά πολυπεπτίδια, προσδίδει συγκεκριμένες ιδιότητες στο σχηματιζόμενο μικροσωληνίσκο. Η ταυτοποίηση γονιδίων τα οποία εκφράζουν διαφορετικούς ισότυπους α- και β-τουμπουλίνης ενίσχυσε την παραπάνω θεωρία. Μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών έδειξαν ότι οι μικροσωληνίσκοι αποτελούνταν από όλες τις ισομορφές που εκφράζονταν στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (Lewis et al., 1987; Lopata and Cleveland, 1987) και ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, όπως είναι η διαφοροποίηση των νευρώνων, προτιμάται ένας ισότυπος για τη δημιουργία των μικροσωληνίσκων, ενώ αποκλείονται όλοι οι υπόλοιποι (Falconer et al., 1992; Joshi and Cleveland, 1989). Η λειτουργική σημασία της ποικιλομορφίας των ισομορφών της τουμπουλίνης παραμένει άγνωστη, με εξαίρεση το γεγονός ότι συγκεκριμένοι ισότυποι

ενσωματώνονται σε μικροσωληνίσκους διαφόρων οργανιδίων (Luduena, 1998). Η προτίμηση αυτή σε συνδυασμό με την έκφραση συγκεκριμένων MAPs μπορεί να σχετίζεται με διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ συγκεκριμένων ισοτύπων και των πρωτεϊνών αυτών, όπως για παράδειγμα η σύνδεση της μεταβλητής περιοχής της β-τουμπουλίνης με τις πρωτεΐνες MAP-2 και tau (Cross et al., 1991; Maccioni et al., 1989). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της α- και β- τουμπουλίνης μπορούν να επηρεάσουν την παραπάνω σύνδεση και ως εκ τούτου πιθανολογείται ότι οι διαφορές μεταξύ των ισοτύπων της τουμπουλίνης παρέχουν τον μηχανισμό για εξειδικευμένη δέσμευση των MAPs (Bonnet et al., 2001; Boucher et al., 1994). Από την in vitro ανάλυση απομονωμένων ισοτύπων β-τουμπουλίνης φαίνεται ότι η δυναμική των μικροσωληνίσκων καθώς και η αλληλεπίδραση τους με αντιμιτωτικούς παράγοντες, εξαρτάται από τη σύστασή τους σε συγκεκριμένες ισομορφές (Banerjee and Luduena, 1992; Derry et al., 1997; Panda et al., 1994). Για παράδειγμα, μικροσωληνίσκοι οι οποίοι περιέχουν αβΙΙΙ-τουμπουλίνη είναι πιο δυναμικοί σε σγέση με εκείνους που αποτελούνται από αβΙΙ-, αβΙV-τουμπουλίνη ή μίγμα αυτών (Banerjee et al., 1990; Lu and Luduena, 1994). Επιπλέον, μικροσωληνίσκοι που προκύπτουν από πολυμερισμό τουμπουλίνης, η οποία απομονώθηκε από κύτταρα HeLa (80% αβΙ, 20% αβΙV) εμφανίζονται λιγότερο δυναμικοί συγκρινόμενοι με εκείνους που σχηματίζονται από τουμπουλίνη (58% αβΙΙ, 25% αβΙΙΙ, 14% αβΙV και 3% αβΙ) προερχόμενη από εγκέφαλο βοός (Newton et al., 2002).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα εκφράζονται εκτός από την α- και β-τουμπουλίνη και άλλα είδη της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πέντε ακόμα μέλη της οικογένειας, τα οποία είναι οι τουμπουλίνες γ, δ, ε, ζ και η (Chang and Stearns, 2000; Dutcher, 2001; Oakley, 2000; Oakley and Oakley, 1989; Vaughan et al., 2000). Η γτουμπουλίνη εμφανίζει ομολογία με την α- και β-τουμπουλίνη σε ποσοστό ~ 30% και έχει εντοπιστεί σε μεγάλο αριθμό ευκαρυωτικών οργανισμών στην περιοχή του κεντροσωματίου, αλλά και σε άλλα κέντρα οργάνωσης μικροσωληνίσκων όπως είναι οι πόλοι της μιτωτικής ατράκτου στο μύκητα και το βασικό σωμάτιο (basal body). Η δ-τουμπουλίνη εντοπίζεται στο κεντροσωμάτιο ή στο basal body, η ε-τουμπουλίνη στο κεντροσωμάτιο ενώ η ζ-τουμπουλίνη εντοπίζεται στο basal body. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δεδομένα για τον εντοπισμό της ητουμπουλίνης. Εκτός του ρόλου που διαδραματίζει η γ-τουμπουλίνη στην εμπυρήνωση των μικροσωληνίσκων, πολύ λίγα είναι γνωστά για τις λειτουργίες των υπολοίπων μελών της οικογένειας (Burns, 1995).

4. Εντοπισμός και πιθανή λειτουργία της τουμπουλίνης στον πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων

Η ύπαρξη β-τουμπουλίνης στον πυρήνα κυττάρων θηλαστικών (3T3 και CHO) αναφέρθηκε για πρώτη φορά περίπου 27 χρόνια πριν (Armbruster et al., 1983; Menko and Tan, 1980). Επειδή η τουμπουλίνη αποτελεί την βασική δομική οντότητα των μικροσωληνίσκων και θεωρείται ως εκ τούτου αποκλειστικά κυτταροπλασματική πρωτεΐνη στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η πυρηνική εντόπιση και λειτουργία της τουμπουλίνης δεν έχουν γίνει μέχρι σήμερα απόλυτα αποδεκτές από την επιστημονική κοινότητα.

Μελέτες της ομάδας του R. Luduena, υποστηρίζουν ότι η τουμπουλίνη που εντοπίζεται στον πυρήνα αποτελείται αποκλειστικά από τον ισότυπο βΙΙ (Walss-Bass et al., 2002). Αρχικά, η πυρηνική εντόπιση της ενδογενούς βΙΙ-τουμπουλίνης τεκμηριώθηκε με πειράματα ανοσοσφθορισμού και ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας, καθώς και από το γεγονός ότι σημασμένη κολχικίνη αλλά και φθορίζοντα διμερή αβΙΙ-τουμπουλίνης, τα οποία εισήχθησαν στα κύτταρα με μικροενέσεις, εντοπίστηκαν στον πυρήνα μεσαγγειακών κυττάρων από νεφρό αρουραίου (Walss-Bass et al., 2001; Walss et al., 1999). Αντίθετα, οι ισότυποι βΙ και βΙV εντοπίστηκαν κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση βΙΙ-τουμπουλίνης, α-τουμπουλίνης και κολχικίνης, ανιχνεύθηκε στην περιοχή των πυρηνίσκων. Η ικανότητα δέσμευσης κολχικίνης υποδεικνύει ότι η πυρηνική τουμπουλίνη, πιθανότατα υφίσταται με τη μορφή λειτουργικών διμερών αβΙΙ τουμπουλίνη ενδεχόμενα να αποτελεί ένα νέο κυτταρικό πληθυσμό, η ύπαρξη του οποίου ενισχύει την υπόθεση, ότι διαφορετικοί ισότυποι τουμπουλίνης εκτελούν συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες (Walss-Bass et al., 2003; Walss et al., 1999).

Από μια άλλη μελέτη της ίδιας ομάδας εντοπίστηκε τουμπουλίνη στον πυρήνα μεγάλου αριθμού ανθρώπινων κυτταρικών σειρών από καρκίνο του νευρογλοιακού, του μαστού, του προστάτη και του τραχήλου της μήτρας (LNCaP, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, Cale 18, C6 T98G, HeLa) αλλά όχι στον πυρήνα φυσιολογικών κυτταρικών σειρών όπως HDF (human dermal fibroblasts), HSK (fibroblasts from baby foreskin), μαστού (MCF-10F), οστεοβλαστών και μυικών κυττάρων (506) (Walss-Bass et al., 2002). Η βΙΙ-τουμπουλίνη ανιχνεύθηκε στο πυρήνα των παραπάνω καρκινικών σειρών σε αντίθεση με τους ισοτύπους βΙ, βΙΙΙ και βΙV οι οποίοι εντοπίστηκαν αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε εκτομές καρκινικών ιστών από ανθρώπινους όγκους, βρέθηκε βΙΙ-τουμπουλίνη στον πυρήνα στο 75% των περιπτώσεων που εξετάστηκαν, ενώ η συχνότητα εμφάνισης του ισοτύπου βΙΙ σχετίζονταν σε μεγάλο

βαθμό με τον τύπο του καρκίνου (Yeh et al., 2004). Ο συνδυασμός των παραπάνω δεδομένων θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η ύπαρξη πυρηνικής τουμπουλίνης σχετίζεται σε κάποιο βαθμό με τον γρήγορο ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης (Floege et al., 1991; Walss-Bass et al., 2003).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η βΙΙ-τουμπουλίνη εντοπίζεται στον πυρήνα είναι άγνωστος. Η βΙΙ-τουμπουλίνη αποτελεί μέρος της μιτωτικής ατράκτου καθώς και του μεσοσωματίου στη μίτωση, ενώ εικάζεται ότι εισέρχεται στον πυρήνα μετά την τελόφαση (Walss-Bass et al., 2001). Είναι πιθανό, ότι μετά την κυτταρική διαίρεση η τουμπουλίνη παγιδεύεται στον μεσοφασικό πυρήνα συνδεόμενη με την χρωματίνη έτσι ώστε να είναι διαθέσιμη κατά τη διάρκεια της μίτωσης όπου μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της διαδικασίας (Xu and Luduena, 2002). Η υπόθεση αυτή στηρίζεται από το γεγονός ότι η τουμπουλίνη αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη in vitro (Mithieux et al., 1986). Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός εντόπισης της τουμπουλίνης στον πυρήνα είναι η μεταφορά της διαμέσου των πυρηνικών πόρων. Δεδομένα από πειράματα μικροενέσεων δείχνουν ότι τα διμερή αβΙΙ μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα μεσαγγειακών κυττάρων (Walss-Bass et al., 2001). Από την ανάλυση της ακολουθίας των αμινοξέων της βΙΙ-τουμπουλίνης δεν προκύπτει η ύπαρξη σημάτων πυρηνικής εισόδου (NLS) (Ovechkina et al., 2003), γεγονός που παραπέμπει στην ύπαρξη άλλων μηχανισμών μεταφοράς της στον πυρήνα. Η απουσία NLS υποδεικνύει την πιθανή σύνδεση της τουμπουλίνης με μια βοηθητική πρωτεΐνη μεταφοράς, η οποία περιέχει μια τέτοια ακολουθία. Η πρωτεΐνη MIP (microtubule assembly inhibitor protein), η οποία δεσμεύεται στην τουμπουλίνη in vitro και εντοπίζεται στον πυρήνα θα μπορούσε να δρα με τον τρόπο αυτό (Kotani et al., 1988). Στο μύκητα A. nidulans, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της τουμπουλίνης στο πυρηνόπλασμα, ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια της μεσόφασης και της μίτωσης (Ovechkina et al., 2003). Η συγκέντρωση της τουμπουλίνης στους μεσοφασικούς πυρήνες παραμένει γαμηλή μέγρι την έναρξη της μίτωσης, όπου και μεταφέρεται ταχύτατα στον πυρήνα έτσι ώστε τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο πυρηνόπλασμα να αυξηθούν σημαντικά (τα επίπεδα της τουμπουλίνης στον πυρήνα αυξάνονται τρεις φορές σε σχέση με τη μεσόφαση). Μετά το τέλος της μίτωσης, η τουμπουλίνη εξέρχεται από τον πυρήνα. Δεδομένης της απουσίας NLS στην ακολουθία της α- και β-τουμπουλίνης στον A. nidulans, είναι πιθανή η αλληλεπίδραση της τουμπουλίνης με μια ή περισσότερες πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν ένα τέτοιο σήμα προκειμένου να μετακινηθεί μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα (Ovechkina et al., 2003). Τέτοιου τύπου υποβοηθούμενη ενεργητική μεταφορά έχει αναφερθεί για τον σακχαρομύκητα S. cerevisiae,

όπου η είσοδος της γ-τουμπουλίνης στον πυρήνα μεσολαβείται από την Spc98p, πρωτεΐνη η οποία διαθέτει NLS στην ακολουθία της (Pereira et al., 1998).

Εκτός από το μηχανισμό εισόδου στον πυρήνα, άγνωστη παραμένει και η φυσιολογική σημασία της ύπαρξης πυρηνικής τουμπουλίνης. Η τουμπουλίνη έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη in vitro (Mithieux et al., 1986). Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με τις λειτουργίες της βΙΙ στον πυρήνα.

Η Fibrillarin (FIB) είναι μια RNA μεθυλοτρανσφεράση η οποία βρίσκεται στην περιοχή του πυρηνίσκου όπου λαμβάνει χώρα η σύνθεση του ριβοσωμικού RNA, καθώς και στα σωμάτια Cajal. Μεταξύ των πρωτεΐνών που συνδέονται με την FIB ανήκουν και οι τουμπουλίνες α3 και β1. Αν και ο ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί, εικάζεται ότι εμπλέκονται στη μεταφορά του συνδεόμενου με την FIB πρωτεϊνικού συμπλόκου σε περιοχές του πυρήνα όπως οι πυρηνίσκοι, τα σωμάτια Cajal και το πυρηνόπλασμα (Yanagida et al., 2004).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση αλλά και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Επίσης εμπλέκεται σε ανθρώπινους καρκίνους, όπου η ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα Notch N1IC (Notch 1 receptor intracellular domain) μπορεί να δρα ως ογκογόνο ή ως καταστολέας της ογκογένεσης. Η N1IC εντοπίζεται στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων. Πρόσφατα *in vitro* πειράματα τεκμηρίωσαν την αλληλεπίδραση της βΙΙ-τουμπουλίνης με την N1IC περιοχή του υποδοχέα Notch στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν πιθανό ρόλο της πυρηνικής τουμπουλίνης στον έλεγχο της ογκογένεσης μέσω της αλληλεπίδρασης της με τον ενεργοποιημένο Notch 1 υποδοχέα (Yeh et al., 2004).

Πρόσφατες μελέτες οδήγησαν στην απομόνωση του παράγοντα ASC-2 (activating signal cointegrator 2) ο οποίος εντοπίζεται σε ανθρώπινους καρκίνους και προκαλεί γονιδιακή ενεργοποίηση μέσω πυρηνικών υποδοχέων ή άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Ο ASC-2 αποτελεί συστατικό ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου μεγέθους 2 MDa (ASCOM, ASC-2 complex) το οποίο απομονώθηκε απο πυρήνες κυττάρων HeLa. Μεταξύ των πρωτεϊνών που σχηματίζουν το παραπάνω σύμπλοκο συμπεριλαμβάνονται η α- και β-τουμπουλίνη (Goo et al., 2004).

Τέλος, υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται στον πυρήνα στη μεσόφαση και συνδέονται με τα χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Earnshaw and Bernat, 1991). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν πρωτεΐνες όπως η mitosin, η Numa, η p62 καθώς και οι INCENP's (inner centromere proteins) (Saredi et al., 1996; Warner and Sloboda, 1999;

Zhu et al., 1997). Πιο συγκεκριμένα, οι παραπάνω πρωτεΐνες ελευθερώνονται στην πρόφαση συνδέονται με τα χρωμοσώματα στη μετάφαση, αποσυνδέονται στην ανάφαση όπου και συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου καθώς και με το μεσοσωμάτιο και στη συνέχεια αναδιοργανώνονται στον πυρήνα καθώς ξεκινάει ένας καινούργιος κυτταρικός κύκλος.

Η τουμπουλίνη δεν είναι η μόνη κυτταροσκελετική πρωτεΐνη η οποία έχει εντοπισθεί στον πυρήνα. Πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η ακτίνη, η tau και η μυοσίνη I (Bremer et al., 1981; Greenwood and Johnson, 1995; Nowak et al., 1997), καθώς και πρωτεΐνες των πλακών εστιακής πρόσφυσης (focal adhesion) οι οποίες συνδέονται με τον κυτταροσκελετό όπως η Abl tyrosine Kinase, η ICAP-1a (integrin-cytoplasmic-domain-associated protein-1a) καθώς και πρωτεΐνες με LIM περιοχές (Hervy et al., 2006), έχει βρεθεί ότι εντοπίζονται και λειτουργούν στον πυρήνα.

5. Αντιμιτωτικά φάρμακα που συνδέονται με μικροσωληνίσκους: ταξάνες και αλκαοειδή της Vinca

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροσωληνίσκοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μίτωση, κατά τη διάρκεια της οποίας τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα ενός κυττάρου διαχωρίζονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Ένας μεγάλος αριθμός χημικών ουσιών οι οποίες δεσμεύονται στην διαλυτή τουμπουλίνη και/ή στην τουμπουλίνη των μικροσωληνίσκων, αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση δρώντας στην δυναμική των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, δηλαδή στην ταχύτητα αύξησης ή συρρίκνωσης καθώς και στο ρυθμό μετάβασης από μια φάση αύξησης σε μια φάση συρρίκνωσης (Giannakakou et al., 2000; Jordan and Wilson, 1998).

Τα κύτταρα αναπαράγονται διεκπεραιώνοντας μια συγκεκριμένη ακολουθία γεγονότων κατά τη διάρκεια της οποίας διπλασιάζουν το περιεχόμενο τους και στη συνέχεια διαιρούνται σε δύο νέα θυγατρικά κύτταρα. Αυτός ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης, είναι γνωστός ως κυτταρικός κύκλος (cell cycle) και αποτελεί το βασικό μηχανισμό αναπαραγωγής όλων των έμβιων όντων.

Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων διαιρείται σε τέσσερα διακριτά στάδια ή φάσεις (Εικόνα 5). Στα περισσότερα κύτταρα η φάση της μίτωσης (φάση M) αποτελεί ένα πολύ μικρό κλάσμα του κυτταρικού κύκλου, ενώ η μεγαλύτερη σε διάρκεια περίοδος, η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο φάσεις M, καλείται μεσόφαση (interface) και αποτελείται από τις υπόλοιπες τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.


Εικόνα 5. Κυτταρικός κύκλος. Σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου των ευκαρυωτικών κυττάρρων.

Κατά τη διάρκεια της φάσης S (φάση σύνθεσης), το κύτταρο αντιγράφει το DNA. Το διάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης Μ και στην αρχή της σύνθεσης του DNA καλείται G1 φάση ενώ το μεσοδιάστημα μετά το τέλος της φάσης S και πριν από την αρχή της φάσης Μ καλείται G2 φάση. Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης το κύτταρο συνεχίζει να μεταγράφει τα γονίδια του, να συνθέτει πρωτεΐνες και να αυξάνεται σε μάζα. Επιπλέον, οι φάσεις G1 και G2 προσφέρουν επιπρόσθετο χρόνο στο κύτταρο για να αυξηθεί και να διπλασιάσει τα κυτταροπλασματικά οργανίδιά του. Κατά τη διάρκεια της φάσης Μ η αύξηση του κυττάρου σταματά και ακολουθεί η διαίρεση του κυττάρου μια διεργασία γνωστή ως μίτωση. Πριν από την έναρξη της μίτωσης, κάθε χρωμόσωμα έχει αντιγραφεί και αποτελείται από δύο ταυτόσημες χρωματίδες (αδελφές χρωματίδες), οι οποίες είναι ενωμένες σε όλο το μήκος τους με αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνειά τους. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, οι αδερφές χρωματίδες διαχωρίζονται και μετατρέπονται σε ανεξάρτητα θυγατρικά χρωμοσώματα που έλκονται στους αντίθετους πόλους του κυττάρου από τη μιτωτική άτρακτο. Πιο συγκεκριμένα, στην πρόφαση τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και η μιτωτική άτρακτος αρχίζει να συναρμολογείται έξω από τον πυρήνα. Κατά την προμετάφαση, ο πυρηνικός φάκελος αποδομείται και οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου έρχονται σε επαφή με τα χρωμοσώματα και προσδένονται σε αυτά μέσω εξειδικευμένων πρωτεϊνικών συμπλόκων, που αποκαλούνται κινητόχωροι. Στη μετάφαση τα χρωμοσώματα συγκεντρώνονται στον ισημερινό της ατράκτου, δηλαδή στο μέσον της

απόστασης ανάμεσα στους πόλους της. Κατά την ανάφαση, οι δύο αδελφές χρωματίδες κάθε αντιγραμμένου χρωμοσώματος διαχωρίζονται συγχρονισμένα και έλκονται από την άτρακτο στους δύο αντίθετους πόλους του κυττάρου, ώστε να σχηματιστούν δύο θυγατρικά χρωμοσώματα. Οι μικροσωληνίσκοι των κινητοχώρων βραχύνονται και ταυτόχρονα οι πόλοι της ατράκτου απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο. Οι δύο αυτές διεργασίες συμβάλλουν στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Κατά τη διάρκεια της τελόφασης τα θυγατρικά χρωμοσώματα έχουν διαχωριστεί σε δύο ομάδες, μια σε κάθε πόλο της ατράκτου. Γύρω από κάθε ομάδα χρωμοσωμάτων ανασυγκροτείται το πυρηνικό περίβλημα ώστε να σχηματισθούν δύο νέοι θυγατρικοί πυρήνες. Η φάση Μ δεν περιλαμβάνει απλώς το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και το σχηματισμό νέων πυρήνων. Αποτελεί επίσης τη χρονική περίοδο κατά τη διάρκεια της οποίας τα συστατικά του κυττάρου (μεμβράνες, κυτταροσκελετός, οργανίδια, διαλυτές πρωτεΐνες) κατανέμονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Στη φάση της κυτταροκίνησης, το κυτταρόπλασμα διαιρείται στα δύο από τον συσταλτικό δακτύλιο ακτίνης και μυοσίνης που περισφίγγει το κύτταρο για να δημιουργήσει δύο θυγατρικά κύτταρα.

Οι διάφορες φάσεις της μίτωσης παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση των φάσεων της μίτωσης (α) πρόφαση (β) προμετάφαση (γ) μετάφαση (δ) ανάφαση (ε) τελόφαση και (στ) κυτταροκίνηση.

Τα αντιμιτωτικά φάρμακα τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως και με μεγάλη επιτυχία στην θεραπεία του καρκίνου, παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 4. Οι αντιμιτωτικές ουσίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτές που αποσταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους αναστέλλοντας σε μεγάλες συγκεντρώσεις τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και στις ουσίες που σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους και προάγουν τον

πολυμερισμό τους. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αλκαλοειδή της *Vinca* (vinblastine, vincristine vinorelbine, vindesine και vinflunine), η κολχικίνη (colchicine) και οι cryptophycins, halichondrins, estramustine και combretastatins, ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται ήδη ή βρίσκονται σε στάδιο κλινικής μελέτης, στην θεραπεία του καρκίνου (Jordan et al., 1991). Στις ουσίες που σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους ανήκουν οι ταξάνες, όπως η πακλιταξέλη (paclitaxel ή Taxol) και η δοσιταξέλη (docetaxel ή Taxotere), οι εποθιλόνες (epothilones) και άλλες ουσίες όπως discodermolide, eleutherobins, sarcodictyins, laulimalide, rhazinalam, στεροειδή και polyisoprenyl benzophenones (Jimenez-Barbero et al., 2002; Jordan et al., 2002).

<u>Πίνακας 4.</u> Αντιμιτωτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου (Jordan and Wilson, 2004).

Binding domain	Related drugs or analogues	Therapeutic uses		
<i>Vinca</i> domain	Vinblastine (Velban)	Hodgkin's disease, testicular germ-cell cancer		
	Vincristine (Oncovin)	Leukaemia, lymphomas		
	Vinorelbine (Navelbine)	Solid tumours, lymphomas, lung cancer		
	Vinflunine	Bladder, non-small-cell lung cancer, breast cancer		
	Cryptophycin 52	Solid tumours		
	Halichondrins (such as E7389)	-		
	Dolastatins (such as TZT-1027)	Potential vascular-targeting agent		
	Hemiasterlins (such as HTI-286)	-		
Colchicine domain	Colchicine	Non-neoplastic diseases (gout, familial Mediterranean fever)		
	Combretastatins (AVE8062A, CA-1-P, CA-4-P, <i>N</i> -acetylcolchicinol- <i>O</i> -phosphate, ZD6126)	Potential vascular-targeting agent		
	2-Methoxyestradiol	-		
	Methoxybenzene- sulphonamide (such as ABT-751, E7010)	Solid tumours		
Taxane site	Paclitaxel (Taxol), TL00139 and other analogues of paclitaxel	Ovarian, breast and lung tumours, Kaposi's sarcoma; trials with numerous other tumours		
	Docetaxel (Taxotere)	Prostate, brain and lung tumours		
	Epothilones (such as BMS- 247550, epothilones B and D)	Paclitaxel-resistant tumours		
	Discodermolide	-		
Other microtubule binding sites	Estramustine	Prostate		

Οι χημειοθεραπευτικές ιδιότητες των παραπάνω ουσιών, αρχικά αποδώθηκαν στην επίδραση τους στη συνολική μάζα του πολυμερούς. Εντούτοις, τα φάρμακα θα έπρεπε να χορηγούνται σε πολύ υψηλές δοσολογίες προκειμένου να επηρεάσουν το βαθμό

πολυμερισμού της τουμπουλίνης. Για το λόγο αυτό η δράση των παραπάνω παραγόντων αποδόθηκε κυρίως στην καταστολή της δυναμικής των μικροσωληνίσκων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ακινητοποίηση των διαιρούμενων κυττάρων στην μετάφαση και την ενεργοποίηση της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) (Jordan et al., 1996).

Αλκαλοειδή της Vinca

Τα αλκαλοειδή της vinca τα οποία απομονώθηκαν ως φυσικά προϊόντα από τα φύλλα του φυτού Catharanthus roseus, ανήκουν στην κατηγορία των αντιμιτωτικών φαρμάκων και έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην θεραπεία του καρκίνου εδώ και σαράντα χρόνια (Gerzon, 1980). Τα μέλη της οικογένειας συνδέονται στην τουμπουλίνη αλλά και στους μικροσωληνίσκους. Πιο συγκεκριμένα η βινβλαστίνη συνδέεται στη β-υπομονάδα των διμερών της διαλυτής τουμπουλίνης σε μια διακριτή περιοχή (vinca-binding domain) (**Εικόνα 7A**) (Bai et al., 1990). Η συγκεκριμένη σύνδεση είναι γρήγορη και αντιστρεπτή και πιθανότατα προκαλεί τέτοιες αλλαγές στη διαμόρφωση της τουμπουλίνης έτσι ώστε να παρεμποδίζεται η σύνδεση των διμερών μεταξύ τους (Jordan and Wilson, 1990). Το αλκαλοειδές συνδέεται επίσης στους μικροσωληνίσκους (**Εικόνα 7B**).



Εικόνα 7. (Α) Περιοχή δέσμευσης του φαρμάκου βινβλαστίνη (ροζ χρώμα) στη β-υπομονάδα του ετεροδιμερούς της τουμπουλίνης (**B**) Η βινβλαστίνη συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στο συν άκρο των μικροσωληνίσκων (Downing, 2000; Jordan and Wilson, 2004).

Από in vitro μελέτες προκύπτει ότι δεσμεύεται με πολύ μεγάλη συγγένεια σε διμερή τα οποία βρίσκονται στα άκρα των μικροσωληνίσκων και λιγότερο ισχυρά σε διμερή κατά μήκος του πολυμερούς. Η δέσμευση ενός ή δύο μορίων βινβλαστίνης ανά μικροσωληνίσκο

είναι αρκετή για να προκαλέσει μείωση της δυναμικής αστάθειας και του treadmilling κατά 50% χωρίς αξιοσημείωτο αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (Jordan et al., 1986; Singer et al., 1989).

Τα αλκαλοειδή της Vinca σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (π.χ. 10-100nM σε κύτταρα HeLa) προκαλούν αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και καταστροφή της μιτωτικής ατράκτου, με αποτέλεσμα το σταμάτημα των διαιρούμενων καρκινικών κυττάρων στη μίτωση (Jordan et al., 1991). Σε χαμηλές, κλινικά χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις (IC₅₀ 0.8nM σε κύτταρα HeLa), μεταβάλλουν την δυναμική αστάθεια χωρίς να αποπολυμερίζουν τους μικροσωληνίσκους, προάγουν την ακινητοποίηση των κυττάρων στην μετάφαση και ενεργοποιούν την διαδικασία της απόπτωσης (Jordan et al., 1991).

Ταξόλη και παράγωγα

Η ταξόλη η οποία αποτελεί το πλέον διαδεδομένο αντικαρκινικό φάρμακο της οικογένειας των ταξανών, απομονώνεται από το φλοιό του ήμερου έλατου *Taxus brevifolia* (Wani et al., 1971) και χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών, του μαστού, του πνεύμονα και του ρινοφάρυγγα (Rowinsky and Donehower, 1995). Η ταξόλη ανήκει στην οικογένεια των διτερπενίων του ταξανίου (ταξάνες) η οποία αριθμεί πάνω από 300 μέλη. Η ολική σύνθεση της ένωσης επιτεύχθηκε το 1994 (Nicolaou et al., 1994) και οδήγησε στην παραγωγή μεγάλου αριθμού αναλόγων ταξόλης. Η ταξόλη παρασκευάζεται εμπορικά, με ενζυματική μετατροπή διαφόρων ταξανών οι οποίες απομονώνονται ως φυσικά προϊόντα από τις βελόνες φυτών *Taxus*, σε 10-deacetylbaccatin III η οποία αποτελεί πρόδρομη ένωση στη σύνθεση του φαρμάκου (**Εικόνα 8**) (Bertinato et al., 1996).



Εικόνα 8. (A) Δομή του αντιμιτωτικού φαρμάκου ταζόλη (B) Δομή της πρόδρομης ένωσης μπακατίνης-ΙΙΙ στη σύνθεση του φαρμάκου (Baloglu and Kingston, 1999).

Οι ταξάνες συνδέονται ασθενώς σε διμερή διαλυτής τουμπουλίνης ενώ αντίθετα συνδέονται απ'ευθείας και με πολύ μεγάλη συγγένεια με την τουμπουλίνη κατά μήκος των μικροσωληνίσκων (σταθερά σύνδεσης της τάξεως των 10⁻⁶-10⁻⁷M). Από πρόσφατες μελέτες προκύπτει ότι στη σύνδεση της ταξόλης συμμετέχουν περισσότερα από ένα τμήματα του μορίου της τουμπουλίνης, καθώς η περιοχή αυτή έχει ταυτοποιηθεί με μεγάλη ακρίβεια μετά τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής παρουσία ταξόλης (Nogales et al., 1995). Το σημείο πρόσδεσης της ταξόλης βρίσκεται στην β-υπομονάδα του διμερούς και εντοπίζεται στην εσωτερική επιφάνεια του μικροσωληνίσκου σε μια περιοχή η οποία σχηματίζεται από αρκετά υδρόφοβα κατάλοιπα (**Εικόνα 9**). Βρίσκεται στην ενδιάμεση περιοχή της πρωτεΐνης (αμινοξέα 207-384) και είναι σε επαφή με τον Μ-βρόχο. Ο δακτύλιος C3' του φαρμάκου συνδέεται με τα 31 αμινοτελικά κατάλοιπα της β-τουμπουλίνης, ενώ ο δακτύλιος C2' με τα κατάλοιπα 219-233 (Downing, 2000).



B.



<u>Εικόνα 9.</u> (A) Περιοχή δέσμευσης του μορίου της ταζόλης (κίτρινο χρώμα) στη β-υπομονάδα του ετεροδιμερούς της τουμπουλίνης (B) Η ταζόλη (κόκκινο χρώμα) συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στην εσωτερική επιφάνεια των μικροσωληνίσκων και καταστέλλει την δυναμική τους (Jordan and Wilson, 2004; Nogales, 2000).

Η ταξόλη θεωρείται ότι αποκτά πρόσβαση στα σημεία σύνδεσης με την τουμπουλίνη μέσω των διακυμάνσεων στο δίκτυο των μικροσωληνίσκων ή με διάχυση μέσα από μικρά ανοίγματα (Nogales, 2001).

Σε κυτταρικό επίπεδο η ταξόλη διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη λόγω του υδροφοβικού της χαρακτήρα. Στο κυτταρόπλασμα δεσμεύεται με μεγάλη συγγένεια στη β-τουμπουλίνη στην εσωτερική επιφάνεια των μικροσωληνίσκων, γεγονός που έχει ως

αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση τους καθώς και την αύξηση του βαθμού πολυμερισμού, δηλαδή τη συνολική μάζα πολυμερούς που σχηματίζεται τελικά σε δεδομένη συγκέντρωση τουμπουλίνης. Πιθανότατα, η δέσμευση του φαρμάκου επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση της τουμπουλίνης η οποία μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού αυξάνει την συγγένεια μεταξύ γειτονικών μορίων πρωτεΐνης (Nogales, 2001). Δεδομένου ότι η ταξόλη βρίσκεται σε στενή επαφή με την M-loop της τουμπουλίνης, στην οποία οφείλονται οι περισσότερες πλευρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτοινιδίων, μπορεί να υποτεθεί ότι η δέσμευση του φαρμάκου σταθεροποιεί μια διαμόρφωση η οποία προάγει τις πλευρικές συνδέσεις (Downing, 2000). Επίσης, έχει προταθεί ότι αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης στην περιοχή δέσμευσης της ταξόλης όπως για παράδειγμα η σταθεροποίηση των ελικών Η1 και Η7, επιδρούν στην περιοχή δέσμευσης του νουκλεοτιδίου και εξουδετερώνουν αλλαγές που επάγονται από την απώλεια του γ φωσφορικού (Amos and Lowe, 1999).

Σε κάθε μόριο τουμπουλίνης υπάρχει ένα σημείο δέσμευσης της ταξόλης και ως εκ τούτου αύξηση του βαθμού πολυμερισμού προϋποθέτει σύνδεση του φαρμάκου στην τουμπουλίνη με στοιχειομετρία 1:1. Έτσι, προκειμένου να αυξηθεί ο βαθμός πολυμερισμού ενός τυπικού μικροσωληνίσκου ο οποίος περιέχει περίπου 10.000 μόρια τουμπουλίνης, απαιτείται η δέσμευση 5.000 μορίων ταξόλης (Jordan and Wilson, 2004). Σε αντίθεση με το μεγάλο αριθμό μορίων ταξόλης που απαιτείται για την αύξηση της μάζας του πολυμερούς, αρκεί ένας μικρός αριθμός μορίων προκειμένου να σταθεροποιηθεί η δυναμική των μικροσωληνίσκων χωρίς αύξηση του βαθμού πολυμερισμού (Derry et al., 1995).

Η δράση της ταξόλης σε κυτταρικό επίπεδο ποικίλλει και εξαρτάται από τη δοσολογία και το θεραπευτικό σχήμα. Η ταξόλη όταν χορηγηθεί σε συγκεντρώσεις της τάξεως των nM για 20h, προκαλεί ένα παρατεταμένο μιτωτικό block χωρίς να επηρεάζει το βαθμό πολυμερισμού, με αποτέλεσμα την ακινητοποίηση των διαιρούμενων κυττάρων στη μετάφαση και την ενεργοποίηση της απόπτωσης (Jordan et al., 1996; Yeung et al., 1999). Αρχικά το φαινόμενο αυτό είχε αποδοθεί στο γεγονός ότι οι ταξάνες μέσω της σταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων, αλλοιώνουν τη δομή και τη συμμετρία της μιτωτικής ατράκτου εμποδίζοντας έτσι τη μεταφορά των χρωματίδων στους πόλους των διαιρούμενων κυττάρων. Από μελέτες προκύπτει ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες η μιτωτική άτρακτος έχει φυσιολογική μορφολογία ενώ δεν παρατηρείται αύξηση στη μάζα των μικροσωληνίσκων (Jordan et al., 1993). Επίσης, η μη στοιχειομετρική δέσμευση της ταξόλης έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της δυναμικής των μικροσωληνίσκων (Derry et al., 1995). Με βάση αυτά τα δεδομένα διατυπώθηκε η άποψη ότι το μιτωτικό block οφείλεται κυρίως στην καταστολή της δυναμικής των μικροσωληνίσκων και έχει ως

αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης (Jordan et al., 1996; Yeung et al., 1999).

Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (επώαση κυττάρων με 5-50μΜ ταξόλης για χρονικά διαστήματα έως 72h), η ταξόλη αυξάνει σημαντικά το βαθμό πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων, οδηγεί στο σχηματισμό δεσμίδων, γεγονός που αναστέλλει την είσοδο στην S φάση και κατά συνέπεια τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει τη νέκρωση των κυττάρων (Yeung et al., 1999). Σε υψηλές συγκεντρώσεις ταξόλης προάγεται η σύνθεση και η απελευθέρωση κυτοκινών όπως του TNFa (Tumor Necrosis Factor-a) (Burkhart et al., 1994) και ιντερλευκινών (IL8) (Lee et al., 1996) και ενεργοποιείται η παραγωγή οξειδίου του αζώτου (Mullins et al., 1998). Η ταξόλη αυξάνει εμμέσως τη φωσφορυλίωση της κινάσης raf-1, η οποία ενεργοποιείται και κατόπιν φωσφορυλιώνει τον παράγοντα bcl-2. Η φωσφορυλίωση του bcl-2 πιθανότατα προκαλεί τη διάσπαση συμπλόκων bcl-2/bax, γεγονός που αναστέλλει την αντιαποπτωτική δράση της πρωτεΐνης και ενεργοποιεί την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) των καρκινικών κυττάρων (Haldar et al., 1997). Η επώαση των κυττάρων με υψηλές συγκεντρώσεις ταξόλης για μικρό χρονικό διάστημα (2h) έχει ως αποτέλεσμα το σταμάτημα των κυττάρων στη G2/M ή στην Μ φάση και την ενεργοποίηση διαδικασιών που προκαλούν νέκρωση των κυττάρων (Michalakis et al., 2007; Michalakis et al., 2005). Επομένως η κυτταροτοξικότητα των ταξανών οφείλεται σε κυτταρικά γεγονότα ή σήματα που ενεργοποιούν την διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) αλλά και σε διαδικασίες που προκαλούν νέκρωση των κυττάρων.

Η δράση της ταξόλης προκαλεί αλλαγές στην μορφολογία και την αρχιτεκτονική του πυρήνα. Κύτταρα τα οποία έχουν επωαστεί με ταξόλη σε συγκεντρώσεις της τάξεως των nM για χρονικό διάστημα ενός κυτταρικού κύκλου (20h, κύτταρα HeLa) αναπτύσσουν πυρήνες ανώμαλου σχήματος (λοβωτούς πυρήνες και πολυπύρηνα κύτταρα) (Jordan et al., 1996). Η επώαση με μεγάλες συγκεντρώσεις ταξόλης (μM) για σύντομο χρονικό διάστημα (2h) έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πολυπύρηνων κυττάρων καθώς και κυττάρων τα οποία δεν έχουν ολοκληρώσει τη φάση της κυτοκίνησης (Michalakis et al., 2007; Michalakis et al., 2005). Επίσης, μελέτες της ομάδας μας έχουν δείξει ότι η ταξόλη επηρεάζει την αρχιτεκτονική του πυρηνικού φακέλου, καθώς σε όλες τις φαρμακευτικά αποτελεσματικές συγκεντρώσεις παρατηρούνται κύτταρα με ελλείμματα στην πυρηνική λάμινα και στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη καθώς και εκτεταμένη συσσωμάτωση των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων και αναστολή της πυρηνο-κυτταροπλασματικής κυκλοφορίας. Κύτταρα τα οποία έχουν επωαστεί με ταξόλη και περιέχουν βλάβες στον πυρηνικό φάκελο παραμένουν

ζωντανά 24 ώρες μετά την απομάκρυνση του φαρμάκου, αλλά αδυνατούν να εισάγουν στον πυρήνα πυρηνόφιλες πρωτεΐνες όπως ο μεταγραφικός παράγοντας NFkB γεγονός που οδηγεί τα κύτταρα στην απόπτωση (Theodoropoulos et al., 1999).

Τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων ισοτύπων της β-τουμπουλίνης καθώς και μεταλλάξεις στην τουμπουλίνη φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση ανθεκτικότητας στη δράση των αντιμιτωτικών φαρμάκων (Burkhart et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, στις κυτταρικές σειρές J774.2 (ποντικού), A549 (καρκίνου πνεύμονα), K562 (λευχαιμίας), οι οποίες εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην ταξόλη, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ισοτύπων βΙΙ (Haber et al., 1995), βΙ, βΙΙ, βΙΙΙ, βΙVα (Kavallaris et al., 1997), και βΙVα αντίστοιχα (Jaffrezou et al., 1995). Από παρόμοιες μελέτες στην κυτταρική σειρά DU-145 (καρκίνου προστάτη) προκύπτει αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των ισοτύπων βΙΙΙ και βΙVα, η οποία συνδέεται με την ανθεκτικότητα στον αντιμιτωτικό παράγοντα εστραμουστίνη (Ranganathan et al., 1996). Επίσης στην κυτταρική σειρά 1Α9 (καρκίνου ωοθηκών) η οποία εμφανίζει ανθεκτικότητα στην ταξόλη ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στην β-τουμπουλίνη ενώ δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των ισοτύπων (Giannakakou et al., 1997).

Λόγω της ευρύτατης αντικαρκινικής δράσης της η ταξόλη έχει καταστεί το πλέον διαδεδομένο αντικαρκινικό φάρμακο. Οι αυξημένες ανάγκες, η μικρή περιεκτικότητα της ταξόλης στο φλοιό του Taxus Brevifolia, η αναγκαιότητα καταστροφής του δέντρου για την απομόνωσή της και η δυσκολία καθαρισμού της από το εκχύλισμα του μίγματος τερπενοειδών θέτουν επιτακτικά το πρόβλημα αναζήτησης άλλων πηγών. Μια ενναλακτική λύση σε αυτά τα προβλήματα έδωσε η συνθετική παρασκευή παραγώγων ταξόλης με σημαντική αντικαρκινική δράση.

6. Δομή του πυρήνα και οργάνωση της χρωματίνης

Ο πυρήνας (Εικόνα 10) είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο επειδή ελέγχει όλες τις κυτταρικές διεργασίες. Περιβάλλεται από ένα πυρηνικό περίβλημα (πυρηνικός φάκελος) το οποίο διαπερνούν κατά διαστήματα τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (NPCs). Ο ρόλος των πόρων είναι να διεκπεραιώνουν την ενεργή και ελεγχόμενη μεταφορά από και προς το κυτταρόπλασμα. Το πυρηνικό περίβλημα αποτελεί συνέχεια του ενδοπλασματικού δικτύου και υποστηρίζεται από το δίκτυο ενδιαμέσων ινιδίων της πυρηνικής λάμινας, το οποίο σχηματίζει μια λεπτή στοιβάδα που βρίσκεται κάτω από την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Το εσωτερικό του πυρήνα αποτελείται από το πυρηνόπλασμα, το οποίο περιέχει τη

χρωματίνη, έναν η περισσότερους πυρηνίσκους καθώς και συστατικά στοιχεία όπως ιόντα, πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια (Burke and Stewart, 2002; Lamond and Earnshaw, 1998).



<u>Εικόνα 10.</u> Δομή του πυρήνα των κυττάρων. Ο πυρήνας περιβάλλεται από τον πυρηνικό φάκελο τον οποίο διαπερνούν κατά διαστήματα τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων. Το εσωτερικό του πυρήνα αποτελείται από το πυρηνόπλασμα,, την χρωματίνη και τους πυρηνίσκους (M. Ruiz LadyofHats, 2006).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα εξαιρετικά επιμήκη, δίκλωνα μόρια του DNA αλληλεπιδρούν με εξειδικευμένες πρωτεΐνες, οι οποίες διπλώνουν και συσκευάζουν τις λεπτές ίνες του DNA σε μια πιο συμπαγή δομή, τα χρωμοσώματα, τα οποία χωρούν μέσα στον πυρήνα και διαμοιράζονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα σε κάθε κυτταρική διαίρεση. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της μεσόφασης το γενετικό υλικό απαντάται ως ένα σύμπλοκο DNA και πρωτεϊνών το οποίο αποκαλείται χρωματίνη. Η βασική υπομονάδα της γρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα που ακολουθεί ένα κοινό δομικό πρότυπο σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο όρος νουκλεόσωμα αναφέρεται στον πυρήνα του νουκλεοσώματος μαζί με ένα γειτονικό συνδετικό DNA. Ο πυρήνας ενός νουκλεοσώματος (Εικόνα 11) αποτελείται από ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από οκτώ μόρια ιστονών (δύο μόρια από κάθε ιστόνη) και ένα τμήμα δίκλωνου DNA μήκους περίπου 146 ζευγών νουκλεοτιδίων (Mosammaparast et al., 2002). Οι ιστόνες είναι μικρές πρωτεΐνες μοριακού βάρους 11-16 kDa (102-135 αμινοξέα), οι οποίες περιέχουν μεγάλο ποσοστό θετικά φορτισμένων αμινοξέων (λυσίνη και αργινίνη) και ανήκουν στις πλέον συντηρημένες από εξελικτική άποψη ευκαρυωτικές πρωτεΐνες (Bottomley, 2004). Τα θετικά φορτία βοηθούν τις ιστόνες να συνδεθούν ισχυρά με τον αρνητικά φορτισμένο σακχαροφωσφορικό σκελετό του DNA, άσχετα από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Υπάρχουν πέντε τύποι ιστονών οι οποίες χωρίζονται σε δύο ομάδες, στις ιστόνες του νουκλεοσώματος (core histones) H3, H4, H2A, H2B και στη συνδετική (linker) ιστόνη H1. Οι νουκλεοσωματικές ιστόνες είναι υπεύθυνες για την περιέλιξη του DNA στο νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελεί το πρώτο και πιο βασικό επίπεδο συσκευασίας της χρωματίνης. Αρχικά σχηματίζονται διμερή H2A/H2B και τετραμερή H3/H4, τα οποία στη συνέχεια συνδέονται έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα οκταμερές ιστονών (Adams and Kamakaka, 1999). Το κέντρο του νουκλεοσώματος καταλαμβάνεται από ένα τετραμερές ιστονών (H3-H4)₂, ενώ στις δύο άκρες εντοπίζονται αντίστοιχα δύο διμερή των ιστονών H2A-H2B. Το οκταμερές των ιστονών σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό πυρήνα γύρω από τον οποίο περιελίσσεται η δίκλωνη έλικα του DNA (**Εικόνα** 12).



<u>Εικόνα 11.</u> Δομή του πυρήνα του νουκλεοσώματος. Μοντέλο της δομής του πυρήνα του νουκλεοσώματος, το οποίο περιλαμβάνει τις πυρηνικές (core) ιστόνες και το περιελιγμένο DNA (T. Richmond, 1997).



<u>Εικόνα 12.</u> Σχηματική παράσταση της οργάνωσης των ιστονών του πρωτεϊνικού πυρήνα (core) του νουκλεοσώματος (Molecular Biology of the Cell, 4^{th} Edition, Alberts et al., Gaarland Science, 2001).

Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με συνδετικό DNA (linker DNA) στο οποίο συνδέεται ένα μόριο ιστόνης (H1) και το μήκος του ποικίλλει από 8 bp έως και 114 bp ανά νουκλεόσωμα.

Τη δομή των ιστονών χαρακτηρίζουν τρία δομικά μοτίβα: (α) το κεντρικό τμήμα (histone fold), το οποίο αποτελείται από τρεις α-έλικες οι οποίες συνδέονται με δύο θηλειές και εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις των ιστονών μεταξύ τους (σχηματισμός ετεροδιμερών H2A-H2B και H3-H4) αλλά και με το DNA, (β) τα εκτός ελίκων τμήματα (extra-fold structured elements) που ποικίλουν σε κάθε ιστόνη, και (γ) οι εύκαμπτες αμινοτελικές «ουρές» που επίσης ποικίλουν σε μήκος από 13 έως 42 αμινοξέα. Η ουρά των ιστονών αποτελείται από βασικά αμινοξέα, τα οποία προεξέχουν από την επιφάνεια του νουκλεοσώματος και υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικουιτινιλίωση, σουμοϋλίωση και η απακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης των ιστονών, αποτελούν τις πιο καλά μελετημένες τροποποιήσεις και σχετίζονται με μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή αντίστοιχα. Με την ακετυλίωση εξουδετερώνονται τα θετικά φορτία στις πλευρικές αλυσίδες των λυσινών, με αποτέλεσμα την μείωση των ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με το DNA γεγονός που διεκολύνει την πρόσβαση μεταγραφικών παραγόντων στο DNA.

Η χρωματίνη αποτελεί μια δυναμική δομή η οποία συμπυκνώνεται και διπλώνεται (και αντίστροφα) με ρυθμιζόμενο τρόπο, έτσι ώστε να διευθετεί ποικίλες διεργασίες όπως είναι η μεταγραφή, η αντιγραφή και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων (Kruhlak et al., 2001; Verreault, 2000). Από εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας προκύπτει ότι στο πρώτο επίπεδο συμπύκνωσης η χρωματίνη οργανώνεται σε δομές που περιγράφονται από τον όρο "χάντρες κομπολογιού" (beads-on-a-string) που αποτελούν την ίνα των 10nm. Τα νουκλεοσώματα της ίνας των 10nm επιστοιβάζονται το ένα πάνω στο άλλο και σχηματίζουν μια πιο συμπαγή δομή, την ίνα των 30nm. Η δομή αυτή επιτυγχάνεται μέσω της ιστόνης Η1, η οποία τα φέρνει κοντά σε μια επαναληπτική συστοιχία (Fletcher and Hansen, 1996). Η ίνα της χρωματίνης των 30nm μπορεί να συμπυκνωθεί ακόμα περισσότερο κατά τη διάρκεια της μίτωσης, έτσι ώστε να σχηματιστεί το μιτωτικό χρωμόσωμα (**Εικόνα 13**). Καθώς τα χρωμοσώματα γίνονται πιο συμπαγή, η σύνθεση του RNA σταματά, με αποτέλεσμα την μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων (Gebara et al., 1997; Gottesfeld and Forbes, 1997; Gottesfeld et al., 1994; Leresche et al., 1996; Roussel et al., 1996).



<u>Εικόνα 13.</u> Οργάνωση της χρωματίνης. Σχηματική παράσταση των διαφορετικών επιπέδων οργάνωσης και συσκευασίας της χρωματίνης ενός μεταφασικού χρωμοσώματος (The major chromatin structures, Richard Wheeles, 2005).

Μετά το τέλος της μίτωσης, τα θυγατρικά κύτταρα διαχωρίζονται, οι πυρηνικές μεμβράνες ανασχηματίζονται και τα μιτωτικά χρωμοσώματα ξεδιπλώνονται σε μια λιγότερο συμπυκνωμένη μορφή. Ωστόσο, η χρωματίνη ενός μεσοφασικού χρωμοσώματος δεν εμφανίζει τον ίδιο βαθμό συμπύκνωσης σε όλη την έκταση του χρωμοσώματος. Η πιο συμπυκνωμένη μορφή της μεσοφασικής χρωματίνης αποκαλείται ετεροχρωματίνη και όπως και στην περίπτωση της μιτωτικής χρωματίνης, είναι μεταγραφικά ανενεργή (Braunstein et al., 1993; Jeppesen and Turner, 1993). Η υπόλοιπη μεσοφασική χρωματίνη, η οποία υπάρχει σε ποικίλες πιο εκτεταμένες μορφές, αποκαλείται ευχρωματίνη (Hebbes et al., 1994; Hebbes et al., 1988). Υπερακετυλιωμένες ιστόνες σχετίζονται με την μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη, σε αντίθεση με τις υποακετυλιωμένες οι οποίες εντοπίζονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές. Επομένως, η ακετυλίωση των ιστονών αποτελεί μέρος μιας διαδικασίας, η οποία διαφοροποιεί τις ευχρωματινικές από τις ετεροχρωματινικές και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων (Hong et al., 1993; Tse et al., 1998; Ura et al., 1997; Weintraub, 1985).

Ο πυρηνίσκος είναι η πιο ευδιάκριτη δομή σε ένα μεσοφασικό πυρήνα, περιέχει μεγάλες ποσότητες RNA και ο λειτουργικός του ρόλος είναι η κατασκευή του ριβοσωματικού RNA. Περιέχει μια ινώδη περιοχή (fibrillar region) στην οποία συναθροίζονται χρωμοσώματα που περιέχουν γονίδια για το ριβοσωματικό RNA. Τα γονίδια αυτά μεταγράφονται στον πυρηνίσκο, όπου επίσης συναρμολογούνται οι ριβοσωματικές υπομονάδες, χρησιμοποιώντας ριβοσωματικές πρωτεΐνες που έχουν εισαχθεί από το κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια εξέρχονται από τον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων (Lamond and Earnshaw, 1998).

7. Δομή, Σύσταση και Οργάνωση του Πυρηνικού Φακέλου

Ο πυρηνικός φάκελος (nuclear envelope) περιβάλλει τα στοιχεία του πυρήνα και αποτελείται από την εσωτερική (inner nuclear membrane, INM) και εξωτερική πυρηνική μεμβράνη (outer nuclear membrane, ONM), τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (nuclear pore complexes, NPCs) και την πυρηνική λάμινα. Στα τρία κλασσικά συστατικά του πυρηνικού φακέλου προστίθεται και ένα τέταρτο, η χρωματίνη (**Εικόνα 14**) (Burke and Stewart, 2002).



Εικόνα 14. Δομή και σύσταση του πυρηνικού φακέλου. Ο πυρηνικός φάκελος αποτελείται από τέσσερα δομικά συστατικά (α) τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (NPCs, μωβ χρώμα), (β) την εσωτερική και την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη (κίτρινο χρώμα), (γ) το δίκτυο των λαμινών (πράσινο χρώμα) (δ) την περιφερική χρωματίνη (καφέ χρώμα) (Burke and Stewart, 2002).

Επομένως, η περιφέρεια στο εσωτερικό του πυρήνα οργανώνεται με συμμετοχή τεσσάρων κύριων κατηγοριών πρωτεϊνών: τις λαμίνες, τις πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, τις πρωτεΐνες των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων καθώς και τις πρωτεΐνες της περιφερικής χρωματίνης.

Ο πυρηνικός φάκελος ρυθμίζει την κυκλοφορία των μακρομορίων ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα και παρέχει θέσεις δέσμευσης στην χρωματίνη και τον κυτταροσκελετό. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων εξασφαλίζει την σωστή τοποθέτηση του πυρήνα μέσα στα κύτταρα, αλλά και των χρωμοσωμάτων μέσα στον πυρήνα ρυθμίζοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Ο πυρηνικός φάκελος δεν είναι στατικός αλλά αντίθετα αναδιαμορφώνεται συνέχεια, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, όπου υποβάλλεται σε έναν πλήρη κύκλο αποσύνθεσης και επανασχηματισμού (Hetzer et al., 2005; Schirmer and Gerace, 2005).

Εσωτερική Πυρηνική μεμβράνη (INM)

Στις πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που έχουν μελετηθεί εκτενώς, ανήκουν ο LBR (lamin B receptor), η LAP1, η LAP2, η εμερίνη και η MAN1.

Ο LBR είναι η πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη της INM και εκφράζεται σε όλα τα μετάζωα. Αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε στα ερυθροκύτταρα των πτηνών. Αποτελείται από μια επιμήκη αμινοτελική περιοχή, επτά ή οχτώ υδρόφοβα διαμεμβρανικά τμήματα και μια καρβοξυτελική ουρά (Worman et al., 1990; Worman et al., 1988). Το αμινοτελικό τμήμα του μορίου εκτείνεται στο πυρηνόπλασμα και περιλαμβάνει εκτεταμένες περιοχές που αποτελούνται από εναλλασόμενες σερίνες και αργινίνες (SR motifs) οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τις κινάσες SRPK1 και cdc2 (Nikolakaki et al., 1997; Nikolakaki et al., 1996). Από in vitro μελέτες προκύπτει ότι ο LBR μπορεί να σχηματίσει ολιγομερή μέσω της αμινοτελικής του περιοχής (Makatsori et al., 2004) και αποτελεί μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει τις λαμίνες Α και Β, μια ειδική κινάση (LBR κινάση), την διαμεμβρανική πρωτεΐνη p18 καθώς και την p32/p34 (Simos and Georgatos, 1992; Simos and Georgatos, 1994). Η κινάση του LBR είναι όμοια με την κινάση SRPK1 η οποία φωσφορυλιώνει αλληλουχίες SR. Η φωσφορυλίωση των SR έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της p32/p34 από το σύμπλοκο, αλλά δεν επηρεάζει τη σύνδεση των λαμινών. Η p18 έχει δομική ομοιότητα με τους υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών, εκφράζεται σε περιορισμένο αριθμό καλά διαφοροποιημένων κυττάρων και συνδέεται in vitro με τον LBR και τις λαμίνες τύπου B (Simos et al., 1996).

Η LAP1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου ΙΙ. Αποτελείται από μια καρβοξυτελική περιοχή που εκτείνεται στον περιπυρηνικό χώρο, μια κεντρική διαμεμβρανική περιοχή και ένα αμινοτελικό τμήμα προς την πλευρά του πυρηνοπλάσματος. Έχει τρείς ισομορφές, τις LAP1A, B και C, οι οποίες προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγραφήματος του γονιδίου της LAP1. Η LAP1C εκφράζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων σε αντίθεση με τις άλλες δύο ισομορφές, οι οποίες εκφράζονται σε καλά διαφοροποιημένα κύτταρα (Foisner and Gerace, 1993).

Όπως ο LBR έτσι και η LAP1 έχει προταθεί ότι αποτελεί συστατικό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει λαμίνες τύπου Β, καθώς και μια κινάση της οποίας η λειτουργία εξαρτάται από ιόντα ασβεστίου (Maison et al., 1997). Από την ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας προκύπτει ότι στο αμινοτελικό άκρο των LAP1A και

LAP1B περιέχεται περιοχή coiled-coil μήκους 27 αμινοξέων, η οποία πιθανότα εμπλέκεται στο σχηματισμό ομο-διμερών (Martin et al., 1995) Μελέτες με ηλεκτρονική μικροσκοπία υποδεικνύουν το σχηματισμό συστάδων LAP1, οι οποίες κατανέμονται κατά μήκος του πυρηνικού φακέλου (Maison et al., 1997).

Η LAP2 είναι επίσης μια πολυμορφική πρωτεΐνη. Εναλλακτικό μάτισμα του ίδιου γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία τριών ισομορφών στο άνθρωπο (LAP2a, β, γ) και επτά στον ποντικό (LAP2a, β, β΄, γ, δ, ε, ζ). Οι ισομορφές β, β΄, γ, δ, ε είναι πρωτεΐνες τύπου ΙΙ οι οποίες διαθέτουν μια κεντρική διαμεμβρανική περιοχή, το αμινοτελικό τους άκρο εκτείνεται στο πυρηνόπλασμα, ενώ το καρβοξυτελικό τους άκρο εντοπίζεται στον περιπυρηνικό χώρο. Από τις LAP2a και ζ απουσιάζει η διαμεμβρανική περιοχή, επομένως οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται στο πυρηνόπλασμα. Το αμινοτελικό άκρο της LAP2β έχει μήκος περίπου 400 αμινοξέων σε αντίθεση με εκείνο των ισομορφών γ, δ και ε το οποίο είναι κατά πολύ μικρότερο. Η LAP2a διαφέρει κατά πολύ από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, έχοντας διατηρήσει μόνο ένα μικρό τμήμα της αμινοτελικής περιοχής της LAP2β (Dechat et al., 2000). Όπως και στην περίπτωση του LBR και της LAP1, η LAP2β συνδέεται με λαμίνες τύπου Β. Η μιτωτική φωσφορυλίωση της LAP2β έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της από τις λαμίνες (Maison et al., 1997). Η LAP2β συμμετέχει στο σχηματισμό ενός μεγάλου μεγέθους πρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει τις λαμίνες τύπου Β, την εμερίνη, τον LBR και την HA95 (Martins et al., 2000).

Η εμερίνη περιλαμβάνει ένα αμινοτελικό τμήμα πλούσιο σε σερίνες το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή του πυρηνοπλάσματος, μια διαμεμβρανική περιοχή καθώς και ένα βραχύ καρβοξυτελικό άκρο το οποίο εκτείνεται στον περιπυρηνικό χώρο. Το σύμπλοκο της εμερίνης περιλαμβάνει τον LBR, την LAP2β καθώς και λαμίνες τύπου B. Επιπλέον η εμερίνη συνδέεται με λαμίνες τύπου A (Clements et al., 2000; Martin et al., 1995).

Η MAN1 αποτελείται από δύο διαμεμβρανικά τμήματα, καθώς και από μια μακριά αμινοτελική περιοχή και ένα βραχύ καρβοξυτελικό άκρο τα οποία εκτείνονται στο πυρηνόπλασμα (Lin et al., 2000). Όπως προκύπτει από ανάλυση της ακολουθίας των αμινοξέων, η MAN1 μοιράζεται με την LAP2 και την εμερίνη ένα τμήμα 40 περίπου αμινοξέων με χαρακτηριστική δομή (LEM module).

Σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων και πυρηνοπλασματική κυκλοφορία

Τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων αποτελούν τα κανάλια μεταφοράς των μακρομορίων μέσα ή έξω από τον πυρήνα (Nuclear pore complexes, NPCs). Τα NPCs αποτελούν πρωτεϊνικές δομές οι οποίες διαπερνούν την λιπιδική διπλοστοιβάδα του

πυρηνικού φακέλου. Η συνολική τους μάζα είναι περίπου 125MDa στα σπονδυλωτά και 66MDa στο σακχαρομύκητα. Ένας πυρήνας σπονδυλωτού περιέχει περίπου 2.000 NPCs σε αντίθεση με τον μικρότερου μεγέθους πυρήνα του σακχαρομύκητα ο οποίος περιέχει περίπου 200 NPCs (Adam, 2001). Τα NPCs (**Εικόνα 15**) συγκροτούνται από 50 τουλάχιστον διαφορετικές πρωτεΐνες, τις νουκλεοπορίνες (Nups), οι οποίες βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα και διευθετούνται έτσι ώστε να προκύψει ένα κανάλι με συμμετρία όγδοης τάξης ως προς τον κεντρικό άξονα του πόρου (Pante and Aebi, 1996). Έτσι ο βασικός σκελετός του συμπλόκου αποτελείται από οκτώ ακτινωτούς σχηματισμούς οι οποίοι δημιουργούν ένα κεντρικό κανάλι και καταλήγουν σε δύο δακτυλίους, έναν κυτταροπλασματικό και ένα πυρηνοπλασματικό, από τους οποίους εκφύονται ινίδια.



<u>Εικόνα 15.</u> Σχηματική παράσταση της δομής του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου (Nakielny and Dreyfuss, 1999)..

Το σημείο στο οποίο συναντώνται η εσωτερική και εξωτερική πυρηνική μεμβράνη ονομάζεται μεμβράνη των πόρων και περιέχει ειδικές πρωτεΐνες όπως η gp210 και η POM121, οι οποίες συγκρατούν το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα των πόρων στη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Lyman and Gerace, 2001). Η κύρια λειτουργία των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων είναι η ρύθμιση της επικοινωνίας μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Η διακίνηση μορίων διαμέσου των πόρων γίνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις. Πρωτεϊνικά μόρια από το κυτταροδιάλυμα εισέρχονται στον πυρήνα, ενώ μόρια RNA και ριβοσωμικές υπομονάδες που συντίθενται στον πυρήνα, εξέρχονται προς το κυτταρόπλασμα. Επομένως τα NPCs είναι εξειδικευμένα κανάλια μεταφοράς μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η μετακίνηση των μακρομορίων από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα, τα οποία παρέχουν ένα σημαντικό σημείο ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων (Adam, 2001). Κάθε πόρος περιέχει έναν ή περισσότερους υδρόφιλους διαύλους μέσω των οποίων μικρά υδατοδιαλυτά μόρια διακινούνται ελεύθερα και μη επιλεκτικά μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Επίσης ιόντα, μεταβολίτες και πρωτεΐνες μεγέθους μικρότερου από 9nm σε διάμετρο ή 30-40KDa σε μάζα, μπορούν να διαπεράσουν τα NPCs με απλή διάχυση. Η εξειδικευμένη μεταφορά των μακρομορίων μεσολαβείται από διαλυτούς παράγοντες (μεταφορείς) οι οποίοι αλληλεπιδρούν με συστατικά των NPCs (νουκλεοπορίνες) και μετακινούνται μέσω των καναλιών από και προς τον πυρήνα (Suntharalingam and Wente, 2003). Οι μεταφορείς στην πλειοψηφία τους ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που αναφέρονται ως "karyopherins" (οικογένεια karyopherin-β) η οποία αριθμεί 20 μέλη στον άνθρωπο και 14 μέλη στον σακχαρομύκητα. Οι μεταφορείς που εμπλέκονται στην είσοδο μορίων στον πυρήνα καλούνται "importins" ενώ εκείνες που μεσολαβούν στην έξοδο μορίων χαρακτηρίζονται ως "exportins" (Πίνακας 5) Η importin-β η οποία ανακαλύφθηκε πρώτη, είναι το πιο καλά χαρακτηρισμένο μέλος της οικογένειας και για το λόγο αυτό οι karyopherins αναφέρονται και ως "importin-β like proteins" (Kuersten et al., 2001; Pemberton and Paschal, 2005).

<u>Πίνακας 5.</u> Μέλη της οικογένειας Karyopherin-β στον άνθρωπο και στον σακχορομύκητα (Pemberton and Paschal, 2005).

Human	Cargo	Yeast	Cargo	Essential gene
Import				
Importin-β1	Many cargoes, cargoes with basic NLSs via karyopherin α, UsnRNPs via snurportin	Кар95	Many cargoes including those with basic NLS via karyopherin α	Yes
Karyopherin-82	hnRNPA1, histones, ribosomal proteins	Kap104	Nab2, Hrp1	ts
Transportin SR1 Transportin SR2	SR proteins HuR	Mtr10/Kap111	Npl3, Hrb1	ts
Importin 4	Histones, ribosomal proteins	Kap123	Ribosomal proteins, histones	No
Importin 5	Histones, ribosomal proteins	Kap121	Ribosomal proteins, histones, Pho4, others	Yes
Importin 9	Histones, ribosomal proteins	Kap114	TBP, histones, Nap1p	No
Importin 7	HIV RTC, Glucocorticoid receptor, ribosomal proteins	Nmd5/Kap119	TFIIS, Hog 1, others	No
		Sxml/Kap108	Lhp1, ribosomal proteins	No
Importin 8	SRP19			
Importin 11	UbcM2, rpL12			No
		Kap122	TFIIA	
Export				
Crm1	Leucine rich NES cargoes	Crml	Leucine rich NES cargoes	Yes
Exportin-t	tRNA	Los1	tRNA.	No
CAS	Karyopherin α	Cse1	Karyopherin α	Yes
Exportin 4	elF-5 A			
Exportin 5	microRNA precursors			
Exportin 6	Profilin, actin			
Exportin 7	p50Rho-GAP, 14-3-38			
Import/Export				
Importin 13	Rbm8, Ubc9, Pax6 (import) eIF-1 A (export)			
		Msn5	Pho4, others including phosphorylated proteins (import) Replication protein A complex (export)	No
Uncharacterized			-	
RanBP6	undefined			
RanBP17	undefined			
		Kap120	undefined	No

Η δέσμευση των karyopherins με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά φορτία τους πραγματοποιείται μετά από αναγνώριση συγκεκριμένων σημάτων πυρηνικής εισόδου (NLS)

ή εξόδου (NES) (Fried and Kutay, 2003; Weis, 2003). Σε κάποιες περιπτώσεις η σύνδεση του μεταφορέα με το φορτίο του δεν γίνεται απ'ευθείας αλλά με τη μεσολάβηση βοηθητικών πρωτεϊνών. Η πιο καλά χαρακτηρισμένη βοηθητική πρωτεΐνη είναι η karyopherin-a (καλείται και importin-a). Οι πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν κλασσικού τύπου σήματα πυρηνικής εντόπισης αναγνωρίζονται αρχικά από την importin-α και στη συνέχεια σχηματίζεται το σύμπλοκο importin-α:importin-β:πρωτεΐνη. Η importin-α αλληλεπιδρά απ'ευθείας με το NLS ενώ η importin-β προσδένει την πρωτεΐνη στα NPCs μέσω αλληλεπίδρασης με την importin-α και με συστατικά του συμπλόκου των πόρων (Conti and Izaurralde, 2001; Goldfarb et al., 2004). Τα κλασσικά NLSs (Πίνακας 6) χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά στο Τ αντιγόνο του SV40 (Kalderon et al., 1984) και στη νουκλεοπλασμίνη (Robbins et al., 1991), περιέχουν δε μια ή δύο συστοιχίες βασικών αμινοξέων τα οποία διαχωρίζονται από ένα σύνδεσμο αντίστοιχα.

<u>Πίνακας 6.</u> Κανονικού τύπου σήματα πυρηνικής εισόδου (NLSs) (Mattaj and Englmeier, 1998).

Protein/signal	Nature of signal	Import receptor (plus adaptor)
SV40 large T antigen (simple basic NLS)	PKKKRKV Short sequences containing a single cluster of basic amino acids, often preceded by an acidic amino acid or a proline residue	Import in β together with members of the import in α family
Nucleoplasmin (bipartite basic NLS)	<u>KRPAATKKAGQAKKKK</u> Two interdependent clusters of basic amino acids separated by a flexible spacer (21); neutral and acidic residues flanking the motif contribute (282)	Importin β together with members of the importin α family

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η importin-β εκτός από την μεταφορά πρωτεϊνών μεσολαβεί και στην είσοδο στον πυρήνα των εμπλουτισμένων σε ουριδίνη RNAs (UsnRNAs) μέσω αλληλεπίδρασης με την βοηθητική πρωτεΐνη snurportin-1 η οποία αναγνωρίζει την τριμεθυλιωμένη γουανοσίνη (m₃GpppN) (Huber et al., 1998). Επίσης, η importin-β έχει τη δυνατότητα μεταφοράς στον πυρήνα χωρίς τη μεσολάβηση βοηθητικών παραγόντων, πρωτεϊνών που δεν φέρουν κλασσικά NLSs (core ιστόνες, ριβοσωμικές πρωτεΐνες, Smad, HIV Rev) (Henderson and Percipalle, 1997; Jakel and Gorlich, 1998; Muhlhausser et al., 2001; Xiao et al., 2000). Επίσης, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την importin-β μεταφέρουν στον πυρήνα πρωτεϊνικά μόρια μέσω αναγνώρισης μη κλασσικών σημάτων πυρηνικού εντοπισμού. Για παράδειγμα, η transportin μεταφέρει στον πυρήνα την ριβονουκλεοπρωτεΐνη A1 μέσω αναγνώρισης της ακολουθίας M9, η οποία αποτελείται από 38 αμινοξέα εμπλουτισμένα σε κατάλοιπα γλυκίνης και αρωματικών αμινοξέων και στερείται βασικού χαρακτήρα (Pollard et al., 1996). Σε αντιστοιχία με τις importins, οι exportins αναγνωρίζουν συγκεκριμένα σήματα πυρηνικής εξόδου (NES). Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα είναι τα υδροφοβικά NESs, τα οποία περιέχουν τρία ή τέσσερα υδρόφοβα κατάλοιπα και ακολουθούν τον τύπο L-X₂₋₃-(F, I, L,V, M)-X₂₋₃-L-X-(L, I) (Mattaj and Englmeier, 1998). Στην κατηγορία μεταφορέων εξόδου ανήκουν πρωτεΐνες όπως η CRM1 η οποία αποτελεί το πιο καλά χαρακτηρισμένο μέλος και αναγνωρίζει σήματα εξόδου εμπλουτισμένα σε κατάλοιπα λευκίνης (π.χ. η snurportin-1 μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της CRM1) (Paraskeva et al., 1999; Stade et al., 1997), η CAS η οποία μεταφέρει την importin-α στο κυτταρόπλασμα (Kutay et al., 1997) και η exportin-t η οποία μεταφέρει tRNA (Kutay et al., 1998).

Οι αλληλεπιδράσεις των Karyopherins με τα αντίστοιχα φορτία τους ρυθμίζεται κυρίως από την πρωτεΐνη Ran (Fried and Kutay, 2003; Weis, 2003). Η Ran είναι μέλος της οικογένειας Ras (μικρού μεγέθους GTPases) και αποτελεί απαραίτητο συστατικό πολλών μονοπατιών της πυρηνοκυτταροπλασματικής μεταφοράς τα οποία εξαρτώνται από την παρουσία GTP. Η Ran στον πυρήνα είναι συνδεδεμένη με GTP ενώ στο κυτταρόπλασμα με GDP. Η ασυμμετρία αυτή, η οποία επιτυγχάνεται με τη βοήθεια παραγόντων που ρυθμίζουν τον κύκλο της Ran, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τον προσανατολισμό της μεταφοράς. (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Ο κύκλος της Ran. Η σύνδεση της Ran με GTP ή GDP καθορίζεται από την ασύμμετρη κατανομή ρυθμιστικών παραγόντων στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων (Kuersten et al., 2001)

Η RanGDP συνδεόμενη με τον παράγοντα NTF2 μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Στη συνέχεια ο παράγοντας RCC1 (RanGEF, Ran GDT-GTP

exchange factor) ο οποίος συνδέεται στην χρωματίνη προάγει την αποσύνδεση του GDP από την RanGDP και κατά συνέπεια την δέσμευση του GTP. Όταν η Ran εξέρχεται από τον πυρήνα, η πρωτεΐνη RanGAP (RanGTPase-activating protein) σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες RanBP1 και RanBP2 προάγει την υδρόλυση του GTP, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της RanGTP στο κυτταρόπλασμα να διατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (**Εικόνα 16**) (Gorlich and Kutay, 1999; Yoneda, 2000).

Ένα απλοποιημένο μοντέλο, που αναπαριστά δύο κλασσικά μοναπάτια μεταφοράς από και προς τον πυρήνα πρωτεϊνών που περιέχουν NESs και NLSs παρουσιάζεται στην εικόνα 17 (Kumar et al., 2006). Οι importins δεσμεύουν το φορτίο-στόχο τους στο κυτταρόπλασμα μέσω αναγνώρισης του αντίστοιχου NLS και το σχηματιζόμενο σύμπλοκο μεταφέρεται στον πυρήνα μέσω αλληλεπιδράσεων με νουκλεοπορίνες των NPCs. Στη συνέχεια η RanGDP μετατρέπεται σε RanGTP προάγοντας έτσι την απελευθέρωση του φορτίου. Το σύμπλοκο importin-RanGTP μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου λαμβάνει χώρα η υδρόλυση του GTP. Στην περίπτωση της εξόδου από τον πυρήνα, η σύνδεση της RanGTP στην αντίστοιχη exportin ενισχύει την σύνδεσή της με το μεταφερόμενο μόριο. Η υδρόλυση του GTP σε GDP στο κυτταρόπλασμα έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση του μορίου και την επαναφορά του υποδοχέα μεταφοράς στον πυρήνα (Kuersten et al., 2001; Pemberton and Paschal, 2005).



Εικόνα 17. Σχηματική παράσταση ενός απλοποιημένου μοντέλου μηχανισμών μεταφοράς μέσα και έζω από τον πυρήνα πρωτεϊνών που περιέχουν NLS ή NES (Kumar et al., 2006).

Η πυρηνική έξοδος πρωτεϊνών μέσω της exportin-1 (CRM1) αναστέλλεται από τη λεπτομυκίνη B (LMB). Πρόκειται για ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ το οποίο απομονώθηκε από τον μύκητα Streptomyces sp. και δρα ως αναστολέας της μεταφοράς έξω από τον πυρήνα πρωτεϊνών που φέρουν σήματα εξόδου (NESs) εμπλουτισμένα σε λευκίνη (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995). Ο μηχανισμός της αναστολής περιλαμβάνει απ'ευθείας σύνδεση της LMB με την exportin-1 και την επαγώμενη παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της exportin με το αντίστοιχο NES. Η σύνδεση της LMB με την exportin-1 περιλαμβάνει το κατάλοιπο κυστεΐνης 529 της πρωτεΐνης (Kudo et al., 1999). Εκτός από τη λεπτομυκίνη B, η ratjadone καθώς και παράγωγα αυτής προκαλούν επίσης αναστολή της πυρηνικής εξόδου πρωτεϊνών που περιέχουν στην ακολουθία τους κλασσικά NESs (Koster et al., 2003). Ο μηχανισμός δράσης της ratjadone περιλαμβάνει την exportin-1 και δεν διαφέρει από εκείνον της λεπτομυκίνης (Meissner et al., 2004). Η δομή των δύο ενώσεων παρουσιάζεται στην **εικόνα** 18.



<u>Εικόνα 18.</u> Δομή των αναστολέων πυρηνικής εξόδου λεπτομυκίνη B και ratjadone A (Kumar et al., 2006).

Σε αντίθεση με τους αναστολείς πυρηνικής εξόδου, δεν έχουν αναφερθεί ενώσεις που να προκαλούν αναστολή της εισόδου στον πυρήνα.

Πυρηνική λάμινα

Ο όρος πυρηνική λάμινα αναφέρεται σε ένα οργανωμένο δισδιάστατο δίκτυο ενδιαμέσων ινιδίων, τα οποία καλύπτουν και στηρίζουν την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Πρόκειται για ένα ορθοκανονικό πλέγμα, το οποίο αποτελείται από ενδιάμεσα ινίδια λαμινών. Αντίστοιχα με τις άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό ενδιαμέσων ινιδίων, το μόριο των λαμινών περιλαμβάνει μια μικρή αμινοτελική κεφαλή, ένα μεσαίο τμήμα με χαρακτηριστική ελίκωση coiled-coil και μια καρβοξυτελική ουρά. Οι περιοχές

coiled-coil δύο μορίων λαμίνης συνδέονται παράλληλα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολικών διμερών, τα οποία στη συνέχεια διατάσσονται αντιπαράλληλα και δημιουργούν πολυμερή. Τα πολυμερή με τη σειρά τους διατάσσονται αντιπαράλληλα και συνδέονται εγκάρσια μεταξύ τους (Stuurman et al., 1998).

Οι λαμίνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις τύπου Α και τύπου Β ανάλογα με τη δομή και το πρότυπο έκφρασής τους. Οι λαμίνες τύπου Β εκφράζονται από τα διαφορετικά γονίδια *LMNB1* και *LMNB2* τα οποία κωδικοποιούν τη λαμίνη B1 καθώς και τις λαμίνες B2 και B3 αντίστοιχα. Αντίθετα τέσσερεις τουλάχιστον λαμίνες τύπου Α (Α, ΑΔ10, C, C2) λαμβάνονται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου *LMNA*. Οι λαμίνες τύπου Β εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα σε αντίθεση με τις τύπου Α οι οποίες εντοπίζονται μόνο σε καλά διαφοροποιημένα κύτταρα (Broers and Ramaekers, 2004).

Διαφορετικού τύπου λαμίνες φαίνεται να έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τον βαθμό διαφοροποίησης, τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν και την τοπολογία τους. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι λαμίνες τύπου Β είναι απαραίτητες για την επιβίωση ενός οργανισμού σε αντίθεση με τις λαμίνες Α που πιθανόν εξυπηρετούν πιο εξειδικευμένες λειτουργίες (Pekovitc et al., 2007). Μια κατηγορία ασθενιών γνωστών ως λαμινοπάθειες (μυική δυστροφία Emery-Dreifuss), προκαλούνται από μεταλλάξεις στη λαμίνη Α ή σε πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά, όπως η εμερίνη (Bonne et al., 2000).

Όλες οι λαμίνες τύπου Β καθώς και η λαμίνη Α, μεταφράζονται ως προλαμίνες (pre-lamins) και περιέχουν στο καρβοξυτελικό άκρο μια χαρακτηριστική ακολουθία CaaX (cysteine-aliphatic-aliphatic-any amino acid) η οποία υφίσταται τρεις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχικά ισοπρενυλίωση της κυστεΐνης, πρωτεολυτική απομάκρυνση των τριών καρβοξυτελικών αμινοξέων (aaX) και καρβοξυμεθυλίωση της ισοπρενυλιωμένης κυστεΐνης. Οι λαμίνες τύπου Α υφίστανται μια επιπλέον μετα-μεταφραστική τροποποίηση που οδηγεί στην απομάκρυνση του ισοπρενυλιωμένου καρβοξυτελικού άκρου (Mattout et al., 2006; Scaffidi and Misteli, 2006; Weber et al., 1989).

Η λάμινα συνδέεται με τον πυρηνικό φάκελο μέσω των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών LBR, LAP1, LAP2 εμερίνη και MAN1 (Georgatos, 2001). Η ενσωμάτωση των νεοσυντιθέμενων λαμινών υποβοηθείται από την παρουσία της ακολουθίας CaaX. Στη μεσόφαση η σύνδεση με το φάκελο, αλλά και η συγκρότηση ή η αναδιάταξη των ινιδίων ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Με την έναρξη της μίτωσης, η υπερφωσφορυλίωση των λαμινών προκαλεί εξασθένηση των

αλληλεπιδράσεων λαμίνης-λαμίνης και σταδιακό αποπολυμερισμό της λάμινας (Stuurman et al., 1998).

Εξωτερική πυρηνική μεμβράνη (ΟΝΜ)

Από πρόσφατες μελέτες προκύπτει ότι η εξωτερική πυρηνική μεμβράνη περιέχει μοναδικές πρωτεΐνες, οι οποίες μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης συνδέουν τον περιφερικό σκελετό του πυρήνα με τον κυτταροσκελετό.

Στα θηλαστικά, η έκφραση πολλαπλών ισομορφών των πρωτεϊνών nesprin-1 (CPG2/syne-1/myne-1/enaptin) και nesprin-2 (syne-2/NUANCE) οφείλεται σε δύο γονίδια (Worman and Gundersen, 2006). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν ορθόλογα της ANC-1 του *Caenorhabditis elegans*, η οποία διασυνδέει τον πυρήνα με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Starr and Han, 2002). Η δομή τους περιλαμβάνει ένα διαμεμβρανικό τμήμα, μια αμινοτελική περιοχή η οποία αποτελείται από μεταβλητό αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων σπεκτρίνης, και μια συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή η οποία καλείται KASH (Klarsicht, ANC-1 και Syne homology) (Zhang et al., 2001). Οι μεγαλυτέρου μεγέθους ισομορφές των nesprin-1 και nesprin-2, περιέχουν στο αμινοτελικό άκρο μια περιοχή με ομολογία calponin, η οποία αποτελεί θέση δέσμευσης της ακτίνης, και εντοπίζονται αποκλειστικά στην εξωτερική πυρηνική μεμβράνη. Λόγω μεγέθους δεν μπορούν να διαχυθούν μέσω των καναλιών των πυρηνικών πόρων σε αντίθεση με τις μικρότερου μεγέθους nesprins (<60 KDa), οι οποίες εντοπίζονται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Από αρκετές μελέτες έχει προταθεί ότι οι nesprins συνδέονται στις λαμίνες τύπου Α και ότι η εντόπιση τους στον πυρηνικό φάκελο εξαρτάται από τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Με βάση αυτή τη θεωρία, μπορεί να εξηγηθεί η εντόπιση των μικρού μεγέθους ισομορφών στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Αντίθετα, είναι αδύνατη η σύνδεση πρωτεϊνών της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης με τις λαμίνες. Η πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου UNC-84 (C. elegans), η οποία ανήκει στην οικογένεια των SUNs (Sad, UNC-84 domain proteins) απαιτείται για τον εντοπισμό της ANC-1 στην πυρηνική περιφέρεια (Malone et al., 1999). Μια δεύτερη SUN πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου, η SUN-1 ή matefin (C. elegans), είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της ZYG-12 (C. elegans) στον πυρηνικό φάκελο (Malone et al., 2003). Η ZYG-12 είναι μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται στην πρόσδεση των κεντροσωματίων στον πυρήνα, καθώς και στην πυρηνική εντόπιση της δυνεΐνης. Οι δύο SUN πρωτεΐνες (UNC-84, SUN-1) εντοπίζονται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Η οικογένεια των SUN πρωτεϊνών είναι συντηρημένη και στα μετάζωα. Στα θηλαστικά χαρακτηρίστηκε η πρωτεΐνη SUN-2 η οποία εντοπίζεται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (Hodzic et al., 2004). Από μελέτες προκύπτει ότι οι καρβοζυτελικές περιοχές των nesprin-1 και nesprin-2, οι οποίες εκτείνονται στον περιπυρηνικό αυλό, αλληλεπιδρούν με την καρβοζυτελική περιοχή της SUN-1, η οποία επίσης εκτείνεται στην περιπυρηνική αύλακα (Padmakumar et al., 2005). Οι πυρηνοπλασματικές περιοχές των SUN-1 και SUN-2 μπορούν να συνδεθούν με λαμίνες τύπου Α και σε μικρότερο βαθμό με λαμίνες τύπου Β (Crisp et al., 2006). Επομένως, οι SUN πρωτεΐνες συγκρατούν τις μεγάλου μεγέθους ισομορφές των nesprins στην εξωτερική περιοχή. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται μια σύνδεση του τύπου πυρηνική περιφέρεια-INM-ONM-κυτταροσκελετός (**Εικόνα 19**).



<u>Εικόνα 19.</u> Σχηματική παράσταση των συατατικών του πυρηνικού φακέλου, καθώς και της αλληλεπίδρασης των μεγάλου μεγέθους nesprins με τις πρωτεΐνες SUN (Worman and Gundersen, 2006).

Επίσης από πρόσφατες μέλετες σε κύτταρα θηλαστικών περιγράφονται δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν για πρώτη φορά την άμεση σύνδεση της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού. Πιο συγκεκριμένα ένα μεγάλο μέρος της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης του πυρηνικού φακέλου εμερίνης, εντοπίζεται στην εξωτερική πυρηνική μεμβράνη όπου συνδέεται απ'ευθείας με τους μικροσωληνίσκους. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του κεντροσωματίου στον πυρηνικό φάκελο (Salpingidou et al., 2007). Τα ευρήματα αυτά ενισχύονται από προηγούμενες μελέτες οι οποίες έδειξαν συνεντοπισμό της εμερίνης με την β-τουμπουλίνη σε μιτωτικά κύτταρα (Dabauvalle et al., 1999), καθώς και τη συσσώρεση της στους κινητοχώρους κοντά στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου κατά τη διάρκεια της επανασυγκρότησης του πυρηνικού φακέλου (Haraguchi et al., 2000).

Αλληλεπιδράσεις πυρηνικού φακέλου και χρωματίνης

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των πρωτεϊνών της INM, είναι οι μεγάλου μεγέθους πυρηνοπλασματικές περιοχές οι οποίες περιέχουν αλληλουχίες που τροποποιούνται από διάφορες κινάσες καθώς και coiled-coil μοτίβα (LAP1, LAP2, MAN1, εμερίνη) μέσω των οποίων μπορούν να σχηματίσουν ομο- και ετερο-διμερή *in vivo*. Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο και συνδέονται με την πυρηνική λάμινα και με πρωτεΐνες της χρωματίνης όπως είναι η HP1 (heterochromatin protein 1), ο παράγοντας BAF (barrier– to autointegration factor) και η HA95 (**Εικόνα 20**) (Furukawa, 1999; Georgatos, 2001; Martin et al., 1995; Martins et al., 2000; Orstavik et al., 2000; Seki et al., 2000; Zheng et al., 2000).



Εικόνα 20. Τοπολογία και οργάνωση πρωτεϊνών της έσω πυρηνικής μεμβράνης. (Α) Σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά δομικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά γνωστών διαμεμβρανικών πρωτεινών της έσω πυρηνικής μεμβράνης. Τα υδρόφιλα άκρα (ακανόνιστες γραμμές) εκτείνονται στο πυρηνόπλασμα και την περιπυρηνική περιοχή, ενώ οι υδρόφοβες περιοχές (κύλινδροι) διασχίζουν την έσω πυρηνική μεμβράνη (**B**) Υποθετικό μοντέλο πρωτεινικών συμπλόκων της έσω πυρηνικής μεμβράνης τα οποία αποτελούνται από ολιγομερή μεμβρανικών πρωτεινών, ρυθμιστικά ένζυμα και στοιχεία συνδεδεμένα με την χρωματίνη (Georgatos, 2001).

Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και της χρωματίνης έχουν διπλή σημασία. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεση των πρωτεϊνών αυτών στη συμπυκνωμένη χρωματίνη παρέχει την κινητήρια δύναμη για την ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου μετά το τέλος της μίτωσης (Georgatos and Theodoropoulos, 1999). Επιπρόσθετα, η σύνδεση χρωματινικών περιοχών στον φάκελο έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική τους αποσιώπηση (Andrulis et al., 1998). Πιθανότατα στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη συγκεντρώνονται παράγοντες οι οποίοι προκαλούν αλλαγή στη δομή της χρωματίνης.

Η ΗΡ1 είναι συστατικό της ετεροχρωματίνης και εμπλέκεται στην αποσιώπηση γονιδίων. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις διαφορετικοί ισότυποι hHP1a, HP1β και HP1γ, οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Οι αντίστοιχοι ισότυποι στο ποντίκι είναι οι mHP1a, M31 και M32. Η HP1 περιέχει δύο δομικές περιοχές οι οποίες καλούνται chromodomain (CD) και chromo shadow domain (CSD) αντίστοιχα (Jones, 2000). Αποτελέσματα από βιοχημικές μελέτες υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση της HP1 με στοιχεία του πυρηνικού φακέλου, όπως ο LBR. Πειράματα two hybrid έδειξαν άμεση αλληλεπίδραση του CSD τμήματος της HP1 με τον LBR (Ye et al., 1997) ενώ με πειράματα συγκατακρήμνισης έχει δειχθεί έμμεση αλληλεπίδραση της HP1 και του LBR μέσω των ιστονών H3 και H4 και σχηματισμό του τετραμερούς συμπλόκου HP1-H3/H4-LBR (Polioudaki et al., 2001) (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21. Υποθετικό μοντέλο του συμπλέγματος LBR-ιστονών-HP1 σύμφωνα με το οποίο ο LBR και η HP1 συνδέονται μέσω ενός ολιγομερούς H3/H4 (τετραμερές) (Polioudaki et al., 2001).

Συμπερασματικά, οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, πιθανότατα δεν βρίσκονται διασκορπισμένες, αλλά οργανώνονται σε μεγάλα συμπλέγματα τα οποία περιλαμβάνουν είτε ένα είδος διαμεμβρανικής πρωτεΐνης σε πολυμερική μορφή, είτε συνδυασμούς διαφορετικών μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς επίσης χρωματίνη και ενζυμικά συστήματα.

Διάσπαση και επανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου

Ο πυρηνικός φάκελος των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων αποδομείται στην αρχή της μίτωσης, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου με τα χρωμοσώματα και επανασυγκροτείται γύρω από τις αδελφές χρωματίδες στα τελευταία στάδια της κυτταρικής διαίρεσης (Gonczy, 2002). Η αποδόμηση του φακέλου αρχίζει στις πρώιμες φάσεις της πρόφασης και περιλαμβάνει τον αποπολυμερισμό της λάμινας, την θραυσματοποίηση και απομάκρυνση των πυρηνικών μεμβρανών από την χρωματίνη καθώς και την αποσυναρμολόγηση των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων (Aitchison and Rout, 2002). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η διάσπαση του πυρηνικού φακέλου αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών. Από πειράματα κλασσικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, τα οποία πραγματοποιήθηκαν 43 χρόνια πριν, είχε προταθεί ότι η διάσπαση του πυρηνικού φακέλου σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους, δεδομένης της στενής σύνδεσης της ατράκτου με τον φάκελο καθώς και της παρουσίας εγκολπώσεων κοντά στα κεντροσωμάτια (Robbins and Marcus, 1964). Από μεταγενέστερες μελέτες προτάθηκε ότι οι συγκεκριμένες εγκολπώσεις αποτελούν περιοχές στις οποίες οι μικροσωληνίσκοι που αναπτύσσονται από τα κεντροσωμάτια πιέζουν αντιδιαμετρικά τον πυρηνικό φάκελο δημιουργώντας εντομές (Georgatos et al., 1997). Από πρόσφατες μελέτες σε ζωντανά κύτταρα βρέθηκε ότι οι παραπάνω εντομές σχηματίζονται όταν οι μικροσωληνίσκοι της μιτωτικής ατράκτου πιέζουν την πυρηνική μεμβράνη προς την κατεύθυνση των κεντροσωματίων. Η επακόλουθη διάτρηση του φακέλου λαμβάνει χώρα όχι στις περιοχές των εγκολπώσεων αλλά στην αντίθετη πλευρά του πυρήνα όπου η τάση είναι μεγαλύτερη. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι ο κινητήρας δυνεΐνη, εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά του πυρηνικού φακέλου πριν από τη διάσπαση του, όπου συνδεόμενος με την πρωτεΐνη δυνακτίνη πιέζει τις πυρηνικές μεμβράνες καθώς και άλλα στοιχεία του πυρηνικού φακέλου κατά μήκος των μικροσωληνίσκων προς την πλευρά των κεντροσωματίων (Beaudouin et al., 2002; Salina et al., 2002). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα προτάθηκε ένας νέος μηγανισμός για τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου. Στο συγκεκριμένο μοντέλο, η δυνεΐνη μεταφέρεται στον φάκελο κατά τη διάρκεια της πρόφασης. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη κινείται προς τα κεντροσωμάτια μεταφέροντας κατά μήκος των μικροσωληνίσκων συστατικά του πυρηνικού φακέλου. Το γεγονός αυτό δημιουργεί εγκολπώσεις στην περιοχή των κεντροσωματίων, ενώ παράλληλα ασκείται πίεση προς την αντίθετη πλευρά του φακέλου με αποτέλεσμα τη διάτρησή του και στη συνέχεια την διάσπασή του (Εικόνα 22). Η πυρηνική λάμινα αποπολυμερίζεται με ρυθμιζόμενο τρόπο. Στην αρχή της πρόφασης αποπολυμερίζονται οι λαμίνες τύπου Α και διαχέονται στο πυρηνόπλασμα ενώ ακολουθεί η διαλυτοποίηση των λαμινών τύπου B (Georgatos et al., 1997). Τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων αποσυναρμολογούνται και τα συστατικά του πυρηνοπλάσματος και του κυτταροπλάσματος αναμειγνύονται, καθώς εξαφανίζεται η διαμερισματοποίηση του κυττάρου, προκειμένου να σχηματιστεί η μιτωτική άτρακτος (Hetzer et al., 2005). Ο αποπολυμερισμός της λάμινας αποτελεί προϋπόθεση για τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου σε μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία μαζί με τα συστατικά του πυρήνα διασκορπίζονται στο κυτταρόπλασμα (Georgatos et al., 1997). Τα μεμβρανικά κυστίδια "ταξιδεύουν" προς τους πόλους του κυττάρου διαγεόμενα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Ellenberg et al., 1997; Sasagawa et al., 1999; Vigers and Lohka, 1991) ή συνδεόμενα με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου. Έχει βρεθεί ότι συγκεκριμένες νουκλεοπορίνες, όπως το σύμπλοκο Nup107-160, συνδέονται με τον κινητόχωρο κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (Belgareh et al., 2001; Enninga et al., 2003; Loiodice et al., 2004; Salina et al., 2003). Επίσης η Nup358 συνδεόμενη με την RanGAP εντοπίζεται στον κινητόχωρο και σε συγκεκριμένες περιοχές της ατράκτου (Joseph et al., 2002). Σε μιτωτικά κύτταρα τα οποία διαθέτουν ανέπαφο σύστημα μικροσωληνίσκων, το μεγαλύτερο μέρος των κυστιδίων λαμίνες τύπου B-LAP1C παραμένει συνδεδεμένο με την μιτωτική άτρακτο (Maison et al., 1997).

Ο πυρηνικός φάκελος ανασυγκροτείται στο τελικό στάδιο της μίτωσης (τελόφαση), όπου τα συστατικά του πυρηνοπλάσματος και του κυτταροπλάσματος διαχωρίζονται και γύρω από κάθε ομάδα χρωμοσωμάτων δημιουργείται ένα πυρηνικό περίβλημα έτσι ώστε να σχηματιστούν δύο θυγατρικοί πυρήνες. Στη φάση αυτή, οι πρωτεϊνικές υπομονάδες των ενδιαμέσων ινιδίων που είχαν φωσφορυλιωθεί κατά την πρόφαση, αποφωσφορυλιώνονται και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν την πυρηνική λάμινα (Gerace and Blobel, 1980; Steen et al., 2000). Στη συνέχεια γύρω από τα χρωμοσώματα συναθροίζονται κυστίδια της πυρηνικής μεμβράνης τα οποία αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες της χρωματίνης. Έχει προταθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην χρωματίνη και σε πρωτεΐνες της ΙΝΜ παρέχουν την κινητήριο δύναμη για τη συναρμολόγηση του πυρηνικού φακέλου μετά το τέλος της μίτωσης (Georgatos and Theodoropoulos, 1999).



Εικόνα 22. Μηχανισμός της διάσπασης του πυρηνικού φακέλου στην αρχή της μίτωσης (a) Τα χρωμοσώματα έχουν διπλασιαστεί και βρίσκονται σε μη-συμπυκνωμένη μορφή. Επίσης, έχουν διπλασιαστεί τα κεντροσωμάτια τα οποία βρίσκονται έξω από τον πυρήνα (b) Η πρωτεΐνη κινητήρας δυνεΐνη συγκεντρώνεται στην εξωτερική επιφάνεια του πυρηνικού φακέλου και αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους (c) Η δυνεΐνη τραβάει τα συστατικά του πυρηνικού φακέλου κατά μήκος των μικροσωληνίσκων προς τα κεντροσωμάτια (d) Η πίεση που ασκείται προς την αντίθετη από την περιοχή των κεντροσωματίων πλευρά του πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα τη διάτρηση της πυρηνικής μεμβράνης (e) Μετά τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα συνδέονται με τους μικροσωληνίσκους και διαχωρίζονται.(Salina et al., 2002)

Πολλές πρωτεΐνες της INM συνδέονται με συστατικά της χρωματίνης όπως είναι η HP1 (heterochromatin protein 1), ο BAF (barrier-to autointegration factor) και η HA95 (Georgatos, 2001). Από μελέτες προκύπτει ότι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη LBR, η οποία συνδέεται στην HP1 απαιτείται για την πρόσδεση των μεμβρανικών κυστιδίων στην χρωματίνη *in vitro* (Collas et al., 1996; Pyrpasopoulou et al., 1996). Η HP1 πιθανότατα συμμετέχει στην ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου μετά το τέλος της μίτωσης, διευκολύνοντας τη συσσώρευση των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Πεπτίδια που περιέχουν το τμήμα πρόσδεσης της HP1β (M31) στον πυρηνικό φάκελο, αναστέλλουν την συγκέντρωση των λαμινών τύπου B και της LAP2β γύρω από τα χρωμοσώματα συμπεριφερόμενα ως dominant negative mutants. Επίσης, οι HP1 πρωτεΐνες διαχωρίζονται από τους πόλους των χρωμοσωμάτων κατά το χρονικό διάστημα που οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης συσσωρεύονται στην περιοχή (Kourmouli et al., 2000).

Επίσης, ο συνεντοπισμός πολλών πρωτεϊνών του φακέλου με μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου και οι βλάβες του πυρηνικού φακέλου που προκύπτουν όταν μεταβάλεται η δυναμική των μικροσωληνίσκων παρουσία αντιμιτωτικών φαρμάκων κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Maison et al., 1997; Theodoropoulos et al., 1999) δείχνουν τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι μικροσωληνίσκοι στην συγκρότηση ενός λειτουργικού πυρηνικού φακέλου.

YAIKA KAI MIEDOAOI

1. Υλικά

Όλα τα κοινά αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και δεν αναφέρονται ήταν αναλυτικής καθαρότητας και προέρχονται από τις εταιρείες Merck (Darmstradt, Germany), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Biorad (Palo Alto, CA, USA), Fluka (Switzerland) και Riedel del Haen (Switzerland).

Οι κυτταρικές σειρές HeLa, MCF-7 και Ishikawa προέρχονται από την ATCC (American Type Culture Collection). Η σειρά DU-145 ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή Ηλία Καστανά (Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης). Η προμήθεια των θρεπτικών υλικών, ορού εμβρύου βοός (FBS), πενικιλλίνης/στρεπτομυκίνης και θρυψίνης έγινε από την εταιρεία Gibco-BRL Co, MD, USA.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης και έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι:

- Anti-histone H3 (C-16) goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, USA
- Anti-pan-Acetyl (C2) goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, USA
- Anti-a-tubulin, monoclonal, (Clone DM1A), Sigma-Aldrich, Germany
- Anti-β-tubulin, monoclonal, (Clone TUB2.1), Sigma-Aldrich, Germany
- Anti-β-tubulin isotype I,monoclonal, (Clone SAP.4G5), Sigma-Aldrich, Germany
- Anti-β-tubulin isotype I & II, monoclonal, (Clone JDR 3B8), Sigma-Aldrich, Germany
- Anti-β-tubulin isotype, III monoclonal, (Clone SDL.3D10), Sigma-Aldrich, Germany
- Anti-β-tubulin isotype IV, monoclonal, (Clone ONS.1A6), Sigma-Aldrich, Germany
- Anti-Acetylated-tubulin, monoclonal, (Clone 6-11B-1), Sigma-Aldrich, Germany
- Anti-lamin B, rabbit polyclonal, (Theodoropoulos et al., 1999)
- Αυτοάνοσος ορός 184, Human, (Theodoropoulos et al., 1999)

Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα δευτερογενή αντισώματα:

- Anti-mouse Ig, Horseradish Peroxidase, Amersham Biosciences, UK
- Anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase, Amersham Biosciences, UK
- Anti-goat Ig, Horseradish Peroxidase, Amersham Biosciences, UK

Στα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα σημασμένα δευτερογενή αντισώματα:

- Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, Molecular Probes, USA
- Alexa Fluor 488, goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Molecular Probes, USA
- Alexa Fluor 555, goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, Molecular Probes, USA
- Alexa Fluor 555, goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Molecular Probes, USA
- Anti-human FITC, IgG, INOVA Diagnostics, USA

Τα cDNAs των γονιδίων της τουμπουλίνης *Tubb2a* και *Tubb2c* (BC055441 και BC019829 αντίστοιχα) αγοράσθηκαν από την εταιρεία Genome Cube (Germany) και για την κλωνοποίηση τους χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C1 της Clontech (California, USA).



Polylinker:

CTGTAC AA	GTCCGGAC' BspEI	IC <u>AGATCT</u> Bg II X	<u>CGAG</u> CTC Tho I Sac I	AAGCTTC Hind III	GAATT <u>C</u> EcoR I	<u>TGCAG</u> TCGAC Pst I Sal I/Acc I	1374
<u>GGTACCGC</u> KpnI Sacl	<u>GG</u> G <u>CCC</u> GG I Apal I Xmal/Sn	<u>GATCC</u> ACC SamH I .a I	GGA <u>TCTA</u> Xba	GATAAC <u>1</u>	EGATCAI Bell	AATCAGCCAT	1428

2. Παρασκευαστικές Μέθοδοι

Η συγκεκριμένη ενότητα περιλαμβάνει μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και παρασκευή διαφόρων τύπου υλικών όπως κυτταρικά οργανίδια, κυτταρικές δομές και μακρομόρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* και *in vivo* μελέτες μας.

2.1. Απομόνωση πυρήνων

Από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας

Για την απομόνωση πυρήνων ελήφθησαν 80-100ml αίματος γαλοπούλας και αραιώθηκαν σε διάλυμα 1X PBS που περιείγε 2mM EDTA έτσι ώστε να παρεμποδιστεί η πήξη. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 3.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος CENTRA CL3R) και στη συνέχεια αναρροφήθηκε το υπερκείμενο υγρό που αντιστοιχεί στο πλάσμα. Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιήθηκαν τρία πλυσίματα των ερυθροκυττάρων με παγωμένο 1X PBS. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση το υπερκείμενο υγρό αναρροφήθηκε, το ίζημα των ερυθροκυττάρων αραιώθηκε σε αναλογία 1:10 με διάλυμα λύσης (5mM Na₃PO₄, 2mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF) και επωάστηκε υπό ανάδευση για 10 λεπτά στον πάγο. Τα λυμένα ερυθροκύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34) για 1 λεπτό στους 4°C. Το ίζημα των μεμβρανοσκελετικών δομών των ερυθροκυττάρων επαναδιαλύθηκε με 10 όγκους διαλύματος λύσης και ακολούθησε η χρήση υπερήχων (cycle1, amplitude 70, 35 δευτερόλεπτα) ώστε να γίνει περαιτέρω τεμαχισμός και απομάκρυνση των πλασματικών μεμβρανών. Η επαναφυγοκέντρηση του υλικού σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 3.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C, είχε ως αποτέλεσμα την καθίζηση των πυρήνων και τον διαγωρισμό τους από τις πλασματικές μεμβράνες που παρέμειναν στο υπερκείμενο υγρό. Οι πυρήνες επαναδιαλύθηκαν στο διάλυμα λύσης σε αναλογία 1:5 και πέρασαν δυο φορές μέσα από σύριγγα της οποίας η βελόνα είχε καμφθεί. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος λύσης και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησαν δύο πλυσίματα με παγωμένο διάλυμα λύσης και το ίζημα (πυρήνες) φυλάχθηκε στους -80° C.

Από ηπατοκύτταρα αρουραίων

Οι πυρήνες από ηπατοκύτταρα αρουραίων παρασκευάστηκαν σύμφωνα με μια τροποποιημένη μέθοδο των (Dwyer and Blobel, 1976). Το ήπαρ δέκα νεαρών αρουραίων τοποθετήθηκε σε παγωμένο 1X PBS και στη συνέχεια τεμαχίστηκε στους 4°C σε πολύ μικρά τμήματα. Το υλικό μεταφέρθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο όπου μετρήθηκε ο όγκος του και ακολούθησε προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος ομογενοποίησης 0.25M steak (0.25M σακχαρόζη, 12.5mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 1mM PMSF, $2\mu g/ml \lambda \epsilon u \pi \epsilon \pi \tau i v \eta$, $1\mu g/ml \pi \epsilon \pi \sigma \tau \alpha \tau i v \eta$, $2\mu g/ml \alpha \pi \rho \sigma \tau i v i v \eta$, $1\mu g/ml \alpha v \tau i \pi \alpha i v \eta$). To μείγμα ομογενοποιήθηκε 15 φορές στις 1.700 στροφές ανά λεπτό, φιλτραρίστηκε για να απομακρυνθούν τεμάχια ιστού και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 2.500 στροφές ανά λεπτό στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34). Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε όγκο διαλύματος 0.25M steak ίσο με τον αρχικό όγκο του ομογενοποιήματος, ομογενοποιήθηκε 5 φορές στις 1.700 στροφές ανά λεπτό και στη συνέχεια αναμείχθηκε με δύο όγκους διαλύματος 2.3M steak (2.3M σακχαρόζη, 12.5mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 1mM PMSF, 2µg/ml λευπεπτίνη, 1µg/ml πεπστατίνη, 2µg/ml απροτινίνη, 1µg/ml αντιπαΐνη). Ακολούθησε φυγοκέντρηση πάνω από στρώμα 5ml πυκνού διαλύματος (2.3M steak) στις 25.000 στροφές ανά λεπτό για 1 ώρα στους 4°C (φυγόκεντρος Beckman, κεφαλή SW-28). Το ίζημα (πυρήνες) επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα 0.25M steak και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Eppendorf). Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, οι πυρήνες φυλάχθηκαν στους -80°C. Εκτός των φυγοκεντρήσεων, οι υπόλοιποι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν στον ψυχρό θάλαμο (cold room).

2.2. Παρασκευή πυρηνικών φακέλων

Από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας

Πυρήνες από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά με 0.1mg/ml DNaseI (250U) σε διάλυμα 10mM Na₃PO₄, 2mM MgCl₂, 10% v/v σακχαρόζη, 1mM PMSF, 1mM DTT. Τα διαλυτά τμήματα της χρωματίνης απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS34) για 10 λεπτά στους 4°C. Η συγκεκριμένη πέψη επαναλήφθηκε άλλη μια φορά. Το ίζημα των πυρηνικών φακέλων εκχυλίστηκε με διάλυμα υψηλού άλατος (2M KCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM DTT, 1mM PMSF) και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές ανά λεπτό
(φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34) για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά την απομάκρυνση μεγάλου μέρους των ιστονών, το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε παγωμένο νερό και φυγοκεντρήθηκε όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Περαιτέρω εκχύλιση των πυρηνικών φακέλων με διάλυμα ουρίας (8M ουρία, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των λαμινών. Οι πυρηνικοί φάκελοι ελήφθησαν με υπερφυγοκέντρηση του μείγματος στις 40.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Beckman, κεφαλή 70.1Ti) για 1 ώρα στους 18°C. Ακολούθησε ένα πλύσιμο με παγωμένο νερό, φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Eppendorf) και φύλαξη των ιζημάτων στους -80°C.

Από πυρήνες ηπατοκυττάρων αρουραίου

Οι πυρήνες από ηπατοκύτταρα 10 αρουραίων διαλύθηκαν σε 5ml διαλύματος A (0.1mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 2µg/ml λευπεπτίνη, 1µg/ml πεπστατίνη, 2µg/ml απροτινίνη, 1µg/ml αντιπαΐνη) και στη συνέχεια προστέθηκαν 15ml διαλύματος B (10% σακχαρόζη, 20mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 2µg/ml λευπεπτίνη, 1µg/ml πεπστατίνη, 2µg/ml απροτινίνη, 1µg/ml αντιπαΐνη). Στο μείγμα προστέθηκαν 500μl διαλύματος DNase I (2mg/ml DNase I σε 1X PBS, 1.3mM PMSF), ακολούθησε επώαση 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση και στη συνέγεια φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34). Η πέψη με τη DNase I επαναλήφθηκε με διάλυμα ίδιας σύστασης αλλά pH 7.5. Το ίζημα των πυρηνικών φακέλων εκχυλίστηκε με διάλυμα υψηλού άλατος (1M KCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM DTT, 1mM PMSF) και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34) για 15 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος των πυρηνικών φακέλων σε παγωμένο νερό και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Eppendorf). Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα δείγματα φυλάγθηκαν στους -80° C.

2.3. Απομόνωση ιστονών από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας

Ίζημα πυρήνων από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα 0.34M σουκρόζη, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM MgCl₂, 0.5mM PMSF. Από το μείγμα ελήφθησαν 10μl, αραιώθηκαν σε 1M NaOH και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (OD) στα 260nm (10 μονάδες OD αντιστοιχούν σε 1mg χρωματίνης/ml ή σε 6mg DNA/ml). Ακολούθησε

φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Eppendorf) και οι πυρήνες επαναδιαλύθηκαν σε 0.2M H₂SO₄ έτσι ώστε η συγκέντρωση χρωματίνης να είναι 4mg/ml (για 12mg χρωματίνης απαιτούνται 3ml διαλύματος 0.2M H₂SO₄). Το μείγμα επωάστηκε για 4 ώρες στους 4°C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε όπως προηγούμενα. Ακολούθησε συλλογή του υπερκειμένου, προσθήκη οκτώ όγκων ακετόνης και επώαση για 16 ώρες στους -20°C. Το ίζημα των ιστονών συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34), επαναδιαλύθηκε σε νερό και φυλάχθηκε στους -80°C.

2.4. Απομόνωση υπερακετυλιωμένων και υπερφωσφορυλιωμένων ιστονών από κύτταρα HeLa

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 100mm (10 τρυβλία) και στη συνέχεια επωάστηκαν με 1000ng/ml TSA ή 100nM ταξόλης για 20 ώρες στους 37°C, δηλαδή σε συνθήκες υπερακετυλίωσης ή υπερφωσφορυλίωσης, αντίστοιχα. Μετά την παρέλευση των 20 ωρών, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και πλύθηκαν τρεις φορές με παγωμένο 1X PBS. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε με προσθήκη 500μl διαλύματος 0.2M H_2SO_4 . Το μείγμα επωάστηκε για 4 ώρες στους 4°C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Eppendorf) .Ακολούθησε συλλογή του υπερκειμένου, προσθήκη οκτώ όγκων ακετόνης και επώαση για 16 ώρες στους -20°C. Το ίζημα των ιστονών συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34), επαναδιαλύθηκε σε νερό και φυλάχθηκε στους -80°C.

2.5. Παρασκευή μεσοφασικού κυτταροπλάσματος από κύτταρα HeLa

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 100mm, συλλέχθηκαν με τη χρήση θρυψίνης, πλύθηκαν με θρεπτικό υλικό ώστε να απενεργοποιηθεί και να απομακρυνθεί η θρυψίνη και στη συνέχεια επωάστηκαν στους 37°C για 45 λεπτά, με θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε 20μM κυτοχαλασίνη B και 1μM νοκοδαζόλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1.400 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά στους 4°C και πλύσιμο των κυττάρων δύο φορές με κρύο διάλυμα 1X PBS και μια φορά με κρύο διάλυμα KHM (78mM KCl, 50mM Hepes-KOH pH 7.4, 4mM MgCl₂, 10mM EGTA, 1mM PMSF, 1mM DTT). Στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος KHM που περιείχε 1μM νοκοδαζόλη και 2μg/ml λευπεπτίνη, 1μg/ml πεπστατίνη, 2μg/ml απροτινίνη, 1μg/ml

αντιπαΐνη και ακολούθησε λύση της πλασματικής μεμβράνης με ομογενοποιητή Dounce (περίπου 1.500 χτυπήματα) στους 0°C. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στις 40.000 στροφές ανά λεπτό για 1 ώρα στους 4°C (φυγόκεντρος Beckman, κεφαλή TLS-55) και στη συνέχεια έγινε συλλογή της υγρής φάσης η οποία συνιστά το διαλυτό μεσοφασικό κυτταρόπλασμα.

2.6. Απομόνωση τουμπουλίνης από εγκέφαλο χοίρου

Για την απομόνωση της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη ο εγκέφαλος ενός χοίρου, ο οποίος τοποθετήθηκε σε παγωμένο 1X PBS και στη συνέχεια τεμαχίστηκε στους 4°C (ψυχρός θάλαμος) σε πολύ μικρά τμήματα. Η συγκεκριμένη διαδικασία, πρέπει να πραγματοποιηθεί σε χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο των δύο ωρών από τη θανάτωση του ζώου και τη συλλογή του εγκεφάλου (μεταφορά στον πάγο), προκειμένου να αποφευχθεί η πρωτεόλυση της πρωτεΐνης. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε με προσθήκη 0.5ml/g φρέσκου διαλύματος ομογενοποίησης (100mM PIPES pH 6.9, 2mM MgSO₄, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 2µg/ml λευπεπτίνη, 1µg/ml πεπστατίνη) το οποίο περιείχε 1mM MgATP. Ακολούθησε υπερφυγοκέντρηση του ομογενοποιήματος στις 27.000 στροφές ανά λεπτό για 1 ώρα στους 4°C (φυγόκεντρος Beckman, κεφαλή SW-28). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος πολυμερισμού PMG (80mM PIPES pH 6.9, 2mM MgSO₄, 1mM EGTA, 60% v/v γλυκερόλη) και MgGTP σε τελική συγκέντρωση 0.2mM. Το μείγμα επωάστηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 45 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 29.000 στροφές ανά λεπτό για 45 λεπτά στους 25°C (φυγόκεντρος Beckman, ρότορας 70.1Ti). Στη συνέχεια τα ιζήματα της πολυμερισμένης πρωτεΐνης επαναδιαλύθηκαν σε όγκο διαλύματος αποπολυμερισμού PM (100mM PIPES pH 6.9, 2mM MgSO₄, 1mM EGTA) ίσο με το 1/5 του όγκου του αρχικού ομογενοποιήματος, το οποίο περιείχε GTP σε τελική συγκέντρωση 0.2mM. Ακολούθησε ομογενοποίηση (ομογενοποιητής Dounce τύπου A), επώαση για 30 λεπτά στον πάγο ώστε να αποπολυμεριστεί η πρωτεΐνη και φυγοκέντρηση στις 29.000 στροφές ανά λεπτό για 45 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Beckman, ρότορας 70.1 Ti). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος πολυμερισμού PMG καθώς και GTP σε τελική συγκέντρωση 0.2mM. Το μείγμα επωάστηκε στους 37°C για 45 λεπτά (δεύτερος κύκλος πολυμερισμού της τουμπουλίνης) και φυγοκεντρήθηκε στις 29.000 στροφές ανά λεπτό για 45 λεπτά στους 25°C (φυγόκεντρος Beckman, ρότορας 70.1Ti). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα ιζήματα (πολυμερισμένη τουμπουλίνη) φυλάχθηκαν στους -80°C.

2.7. Καθαρισμός της τουμπουλίνης από τις MAPs

Ενεργοποίηση ιονανταλλακτικής ρητίνης

Σε 9g φωσφοσελουλόζης (Whatman P-11, Whatman International Ltd Maidstone England) προστέθηκαν 200ml NaOH 0.1N, το μείγμα αναδεύτηκε για 5 λεπτά και ακολούθησε διήθηση για την απομάκρυνση του υγρού. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι η τιμή pH του εναιωρήματος να είναι μεγαλύτερη από 12. Η ρητίνη πλύθηκε με 400ml νερό και στη συνέχεια προστέθηκαν 200ml HCl 0.1N. Το μείγμα αναδεύτηκε για 5 λεπτά και ακολούθησε διήθηση για την απομάκρυνση του υγρού. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι η τιμή pH του εναιωρήματος να είναι μικρότερη από 3. Ακολούθησε έκπλυση με 400ml νερό, προσθήκη 200ml διαλύματος 0.1M MgSO₄, ανάδευση για 5 λεπτά και διήθηση. Στη συνέχεια προστέθηκαν στη ρητίνη 200ml διαλύματος 250mM PIPES pH 6.7, 10mM EGTA, 5mM MgSO₄ (10X Column buffer) και το μείγμα αναδεύτηκε για 15 λεπτά. Ακολούθησε διήθηση, προσθήκη 200ml διαλύματος 1X Column Buffer, ανάδευση για 5 λεπτά μέτρηση και ρύθμιση του pH με NaOH 10N στο 6.6. Η ρητίνη τελικά μεταφέρθηκε σε στήλη και ισορρόπησε για 24 ώρες στους 4°C.

Απομόνωση καθαρής τουμπουλίνης

Η ρητίνη φωσφοσελουλόζης εξισορροπήθηκε με διέλευση αρχικά 5ml διαλύματος 1X Column Buffer, 0.5mM GTP, 1mM DTT και στη συνέχεια 5ml διαλύματος 1X Column Buffer, 0.5mM MgGTP, 1mM DTT. Τα ιζήματα της πολυμερισμένης τουμπουλίνης διαλύθηκαν σε 1X Column Buffer, 0.2mM GTP και το μείγμα αφού ομογενοποιήθηκε, επωάστηκε για 30 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε στις 29.000 στροφές ανά λεπτό για 45 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Beckman, ρότορας 70.1Ti). Το υπερκείμενο μετά την προσθήκη MgGTP και DTT σε τελικές συγκεντρώσεις 0.5mM και 1mM αντίστοιχα, τοποθετήθηκε στο πάνω μέρος της στήλης και στη συνέχεια ελήφθησαν κλάσματα όγκου 500μl. Στα δείγματα μετρήθηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης και εκείνα που περιείχαν τουμπουλίνη αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE προκειμένου να διαπιστωθεί η απομάκρυνση των MAPs. Αφού προστέθηκε 0.5mM MgGTP (τελική συγκέντρωση 1mM) τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C.

2.8. Απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών από βακτήρια

Απομόνωση πρωτεϊνών συζευγμένων με GST

Η παραγωγή και απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών GST έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των (Smith and Johnson, 1988). Βακτηριακή καλλιέργεια (50ml) του στελέχους BL21(DE3) των βακτηρίων Ε. Coli τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με τα πλασμίδια pGEX-4T-1HP1α, pGEX1HP1β, pGEX1HP1γ (παραγωγή των συζευγμένων με GST πρωτεϊνών hHP1a, β, γ) επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Το θρεπτικό υγρό καλλιέργειας (LB) που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 1% w/v τρυπτόνη, 0.5% w/v εκχύλισμα μαγιάς, 1% w/v NaCl και 50µg/ml αμπικιλλίνη. Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώθηκε σε όγκο 500ml και επωάστηκε στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει την τιμή 0.6. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με 0.1mM IPTG (isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside) στους 30° C για 3 ώρες. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SLA-3000) για 10 λεπτά στους 4°C και τα βακτήρια λύθηκαν σε 5ml διαλύματος MTPBS (1X PBS, 1.3mM PMSF, 0.1mM μερκαπτοαιθανόλη) με χρήση υπερήχων (3 x 10sec). Ακολούθησε προσθήκη 1% Triton X-100 και φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34). Στη συνέχεια το υπερκείμενο επωάστηκε με σφαιρίδια γλουταθειόνης (GST-beads, Glutathione Sepharose 4B, Amersham) εξισορροπημένων με το παραπάνω διάλυμα (MTPBS, 1% Triton X-100) για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, τα σφαιρίδια μεταφέρθηκαν σε στήλη, πλύθηκαν με το ίδιο διάλυμα (30ml) και ακολούθησε έκλουση της πρωτεΐνης με διάλυμα 10mM ανηγμένης γλουταθειόνης, 50mM Tris-HCl pH 8.0. Για την απομάκρυνση της γλουταθειόνης έγινε διαπίδυση των πρωτεϊνών σε κατάλληλο διάλυμα ανάλογα με την μετέπειτα χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες δοκιμασίες.

Απομόνωση πρωτεϊνών συζευγμένων με ουρά ιστιδινών (His tagged)

Βακτηριακή καλλιέργεια (50ml) του στελέχους BL21(DE3) των βακτηρίων *Ε. Coli* τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με τα πλασμίδια pET-25bHP1β και pET-16LBR (παραγωγή των συζευγμένων με ουρά ιστιδινών πρωτεϊνών hHP1β και αμινοτελική περιοχή του hLBR) επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Το θρεπτικό υγρό καλλιέργειας (LB) που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 1% w/v τρυπτόνη, 0.5% w/v εκχύλισμα μαγιάς, 1% w/v NaCl και 50μg/ml αμπικιλλίνη. Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώθηκε σε όγκο 500ml και επωάστηκε στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει την τιμή 0.6. Η επαγωγή

της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε με 1mM IPTG για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SLA-3000) για 10 λεπτά στους 4°C και τα βακτήρια λύθηκαν σε 5ml διαλύματος λύσης (50mM NaCl, 10% v/v γλυκερόλη, 25mM Tris-HCl pH 7.3, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 10mM μερκαπτοαιθανόλη) και επωάστηκαν για 1ώρα στους 4°C. Ακολούθησε διάσπαση των βακτηριακών τοιχωμάτων με υπερήχους (6 x 10sec), προσθήκη 1% Triton X-100, 2mM MgCl₂, 20µg/ml DNase I και επώαση για 15 λεπτά στους 4°C. Το υλικό φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34) και συλλέχθηκε η υγρή φάση η οποία αραιώθηκε 1:1 με διάλυμα 50mM NaCl, 10% v/v γλυκερόλη, 25mM Tris-HCl pH 7.3, 1mM PMSF. Στη συνέχεια προστέθηκε ιμιδαζόλη σε συγκέντρωση 5mM και το μείγμα επωάστηκε για 1 ώρα στους $4^{\circ}C$ με σφαιρίδια νικελίου $(Ni^{+2}-NTA-Agarose, Qiagen)$ που είχαν προηγουμένως πλυθεί με νερό και εξισορροπηθεί με το παραπάνω διάλυμα. Μετά την επώαση τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με 100ml διαλύματος 50mM NaCl, 20mM ιμιδαζόλη, 10% v/v γλυκερόλη, 25mM Tris-HCl pH 7.3, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 10mM μερκαπτοαιθανόλη, τοποθετήθηκαν σε στήλη και ακολούθησε έκλουση της πρωτεΐνης με διάλυμα 50mM NaCl, 250mM ιμιδαζόλη, 10% v/v γλυκερόλη, 25mM Tris HCl pH 7.3, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 10mM μερκαπτοαιθανόλη. Ακολούθησε διαπίδυση σε κατάλληλο, για την εκάστοτε χρησιμοποιούμενη δοκιμασία, ρυθμιστικό διάλυμα.

Απομόνωση ανασυνδυασμένων ιστονών Η3 και Η4

Βακτήρια του στελέχους BL21(DE3) τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με τα πλασμίδια των ανασυνδυασμένων ιστονών H3 και H4 (pET3dH3 και pET3aH4 αντίστοιχα) καλλιεργήθηκαν σε 50ml LB για 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώθηκε σε όγκο 500ml και τα βακτήρια αναπτύχθηκαν στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει την τιμή 0.6. Η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών έγινε με 1mM IPTG για 3 ώρες στους 37°C. Τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν στις 5.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SLA-3000) για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με προσθήκη διαλύματος αποδιάταξης (7M Υδροχλωρική γουανιδίνη, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM DTT) και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά στους 18°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αραιώθηκε 20 φορές με διάλυμα SAU-0 (7M ουρία, 20mM οξικό νάτριο pH 5.2, 5mM μερκαπτοαιθανόλη, 1mM EDTA). Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε στήλη που περιείχε σφαιρίδια σεφαρόζης τα οποία είχαν προηγουμένως ενεργοποιηθεί με 15ml διαλύματος SAU-0. Η έκλουση των πρωτεϊνών έγινε αρχικά με 4ml διαλύματος SAU-400

(7Μ ουρία, 400mM NaCl, 20mM οξικό νάτριο pH 5.2, 5mM μερκαπτοαιθανόλη, 1mM EDTA) και στη συνέχεια με 4ml διαλύματος SAU-600 (7M ουρία, 600mM NaCl, 20mM οξικό νάτριο pH 5.2, 5mM μερκαπτοαιθανόλη, 1mM EDTA). Ακολούθησε διαπίδυση των δειγμάτων σε νερό και φύλαξη στους -80°C.

3. Μοριακές Μέθοδοι

3.1. Πλασμιδιακές κατασκευές

GFP-βII, GFP-βIV GFP-ΔβΙΙ-τουμπουλίνης, Για την παρασκευή και κατασκευάστηκαν τα πλασμίδια pEGFPβII, pEGFPβIV και pEGFPΔβII, αντίστοιχα. Το cDNA της βΙΙ και βΙV-τουμπουλίνης πολλαπλασιάστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα πλασμίδια pCMV-Sport6TUBB2 και pCMV-Sport6TUBB4 και τους εκκινητές 5'-GCG GAA TTC CAT GCG CGA GAT CGT GCA CAT CC-3' (sence) και 5'-ATT CCG CGG TTC TCA AGC CTC ATC TTC ACC C-3' (antisence) για τη βΙΙ-τουμπουλίνη και 5'-GCG GAA TTC CAT GAG GGA AAT CGT GCA CTT GC-3' (sence) και 5'-ATT CCG CGG TGA CGT AAG GCT CTA GGC CAC C-3' (antisence) για τη βΙV-τουμπουλίνη, αντίστοιχα. Για την απαλοιφή της περιοχής 232-266 από την βΙΙ-τουμπουλίνη πραγματοποιήθηκαν δύο PCR αντιδράσεις. Ως εκμαγείο για κάθε μια αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pEGFPβΙΙ. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-GCG GAA TTC CAT GCG CGA GAT CGT GCA CAT CC-3' (sence) και 5'-GGT CAG AGG TGC AAA GCC TGG CAT GGC TGA CAC CAG GTG GTT GAG ATG-3' (antisence) ενώ στη δεύτερη οι 5'-GAT CTC AAC CAC CTG GTG TCA GCC ATG CCA GGC TTT GCA CCT CTG ACC-3' (sence) και 5'-ATT CCG CGG TTC TCA AGC CTC ATC TTC ACC C-3' (antisence). Τα προϊόντα των δύο αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για μια τρίτη αντίδραση PCR (overlap extention PCR), χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους 5'-GCG GAA TTC CAT GCG CGA GAT CGT GCA CAT CC-3' (sence) και 5'-ATT CCG CGG TTC TCA AGC CTC ATC TTC ACC C-3' (antisence). Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50μl, όπου περιέχονταν lng πλασμιδίου, 10pmol από κάθε εκκινητή, 0.3mM δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), 2.5U Taq πολυμεράσης και 1X του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου. Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο:

1. 94°C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα

- 2. 94°C για 1 λεπτό
- 3. 62°C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
- 4. 72°C για 2 λεπτά
- 5. 35 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
- 6. 72°C για 3 λεπτά
- 7. 4°C
- 8. Τέλος

Το προϊόν της PCR περιέχει μια SacII και μια EcoRI περιοχή και κλωνοποιήθηκε στο φορέα pEGFP-C1 με χρήση των παραπάνω περιοριστικών ενζύμων. Οι αντιδράσεις πέψης του ενθέματος και του φορέα με τα συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα έγιναν σε τελικό όγκο 20μl και επωάστηκαν για 4 ώρες στους 37°C. Το μείγμα περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, το ένζυμο και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Το DNA από τα μείγματα των πέψεων απομονώθηκε με χρήση του kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) με βάση την πειραματική διαδικασία απομόνωσης που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρία. Οι αντιδράσεις σύνδεσης (ligation) έγιναν σε τελικό όγκο 20μl. Το μείγμα περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, ένζυμο T4 DNA λιγάση και 1X του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος. Οι επωάσεις πραγματοποιήθηκαν για 16 ώρες στους 4°C.

3.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1% σε διάλυμα 1X TAE (50X TAE: 2M Tris-HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για τη ρύθμιση του pH). Συγκεκριμένα, το μείγμα TAE και αγαρόζης θερμάνθηκε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και στη συνέχεια προστέθηκε 1X βρωμιούχο αιθίδιο (10.000X stock). Το DNA ηλεκτροφορήθηκε στα 100V σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1X TAE. Η αποτύπωση του αποτελέσματος έγινε με έκθεση της πηκτής σε UV ακτινοβολία και φωτογράφηση με κάμερα.

3.3. Απομόνωση DNA από παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης

Τα ενθέματα που προέκυψαν από PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης και οι ζώνες αφαιρέθηκαν από την πηκτή με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια όγκου 1.5ml. Στη συνέχεια το DNA απομονώθηκε με χρήση του kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) ακολουθώντας την πειραματική διαδικασία απομόνωσης που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρία.

3.4. Καλλιέργεια βακτηρίων Escherichia coli (E. coli)

Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν στους 37°C σε μορφή αιωρήματος μέσα σε δοχείο (κωνική φιάλη ή δοκιμαστικό σωλήνα) υπό συνεχή και έντονη ανάδευση ώστε να επιτυγχάνονται καλές αερόβιες συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε είναι το LB (1% w/v τρυπτόνη, 0.5% w/v εκχύλισμα μαγιάς, 1% w/v NaCl και 50µg/ml αμπικιλλίνη ή 50µg/ml καναμυκίνη). Για την καλλιέργεια σε στερεό μέσο χρησιμοποιήθηκαν τα τρυβλία Petri με LB-άγαρ παρουσία 50µg/ml αμπικιλλίνης ή 50µg/ml καναμυκίνης. Για την ανάπτυξη των βακτηριακών αποικιών, μικρή ποσότητα από υγρή καλλιέργεια περιορισμένης κλίμακας απλώθηκε στο τρυβλίο με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 14-16 ώρες. Για τη δημιουργία αποθεμάτων ίσοι όγκοι βακτηρίων αναμείχθηκαν με γλυκερόλη και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C.

3.5. Μετασχηματισμός (transformation) βακτηρίων DH10B της E. coli

Για το μετασχηματισμό βακτηρίων DH10B (competent cells, κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν), αναμείχθηκαν (σε σωληνάριο 1.5ml) 100μl βακτηρίων με 20μl της αντίδρασης σύνδεσης (ligation). Το μείγμα παρέμεινε στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια τα βακτήρια υπέστησαν θερμικό σοκ στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου LB, επώαση στους 37°C για 1 ώρα και φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά. Για τη ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών, το ίζημα των βακτηρίων επαναδιαλύθηκε σε 100μl θρεπτικού υλικού LB, απλώθηκε σε τρυβλίο LB-άγαρ με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C.

3.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure)

Οι αποικίες ελήφθησαν από το τρυβλίο με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες και καλλιεργήθηκαν σε 2ml LB-αντιβιοτικό, για 16 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Από κάθε καλλιέργεια ελήφθη 1.5ml και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος Eppendorf). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 600μl διαλύματος λύσης (8% σουκρόζη, 5% Triton-X 100, 500mM EDTA pH 8.0, 50mM Tris-HCl pH 7.5), προστέθηκαν 30μl λυσοζύμης (10mg/ml), ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά (φυγόκεντρος Eppendorf). Το ίζημα απομακρύνθηκε με οδοντογλυφίδα και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίστηκε με 600μl παγωμένης ισοπροπανόλης. Τα δείγματα παρέμειναν για 30 λεπτά στους -20°C και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος Eppendorf). Το DNA πλύθηκε με 600μl διαλύματος 75% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος Eppendorf). Μετά την αναρρόφηση της αλκοόλης, τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και το DNA επαναδιαλύθηκε σε 30μl αποστειρωμένου απεσταγμένου (nanopure) νερού που περιείχε RNase (10mg/ml).

3.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale plasmid DNA preparation)

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, USA). Συγκεκριμένα τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια των 250ml για 16 ώρες και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 5.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SLA-3000) για 10 λεπτά στους 4°C. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10ml διαλύματος P1 (resuspension buffer: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, RNase 100µg/ml) και λύθηκαν με προσθήκη 10ml διαλύματος P2 (lysis buffer: NaOH 0.2M, 1% w/v SDS) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA κατακρημνίστηκαν με 10ml κρύου διαλύματος P3 (neutralization buffer: 3M οξικό οξύ pH 5.5) και επώαση για 20 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34), απομακρύνθηκαν πρωτεΐνες, χρωμοσωμικό DNA κατ κυτταρικά υπολείμματα. Παράλληλα η στήλη Qiagen-tip 500 εξισορροπήθηκε με 10ml διαλύματος QBT (equilibration buffer: 50mM MOPS pH 7.0, 0.75M NaCl, 0.15% v/v Triton X-100, 15% v/v αιθανόλη). Το υπερκείμενο διαβιβάστηκε στη στήλη, ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με 30ml διαλύματος QC (wash buffer: 50mM MOPS pH 7.0, 1M NaCl, 15% v/v αιθανόλη) την κάθε φορά και τέλος έκλουση του DNA με 15ml διαλύματος QF (elution buffer: 10mM Tris-HCl pH 8.5, 1.25M NaCl, 15% v/v αιθανόλη). Το DNA κατακρημνίστηκε από το διάλυμα έκλουσης με προσθήκη 10.5ml ισοπροπανόλης και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34). Το ίζημα πλύθηκε με διάλυμα 70% αιθανόλης, ξηράνθηκε και επαναδιαλύθηκε σε TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε με φωτομέτρηση στα 260nm ενώ η ποιότητά του εκτιμήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

4. Βιοχημικές μέθοδοι

4.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος Bradford (Bradford, 1976), η οποία στηρίζεται στο σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων και μορίων χρωστικής Coomasie brilliant blue, τα οποία απορροφούν σε μήκος κύματος 595nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με μέτρηση της απορρόφησης δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης BSA (αλβουμίνη ορού βοός).

4.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν από την ηλεκτροφόρηση διαλύθηκαν σε αποδιατακτικό διάλυμα (4X Laemmli buffer:250mM Tris-HCL pH 6.8, 9.2% w/v SDS, 40% v/v γλυκερόλη. 0.2% w/v Bromophenol blue, 100mM DTT) και στη συνέχεια θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Προετοιμασία πηκτής SDS- πολυακρυλαμιδίου

Για την προετοιμασία των δύο επιμέρους πηκτωμάτων (επιστοίβαξης και διαχωρισμού), αναμείχθηκαν όλα τα συστατικά των διαλυμάτων εκτός του APS και του TEMED τα οποία λειτουργούν σαν καταλύτες για την έναρξη και τη διατήρηση του πολυμερισμού αντίστοιχα και προστέθηκαν στο τέλος. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στον κενό χώρο που δημιουργείται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών που διαχωρίζονται με τμήματα πλαστικού (spacers) πάχους 1.5mm. Αρχικά μεταφέρεται το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel: 8-15% v/v διάλυμα πολυακρυλαμιδίου, 25% v/v ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού, 0.1% v/v APS, 0.05% v/v TEMED) και αφού πολυμεριστεί προστίθεται το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel: 4.5% v/v διάλυμα πολυακρυλαμιδίου, 25% v/v ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης, 0.1% v/v APS, 0.1% v/v ΤΕΜΕD) μέσα στο οποίο τοποθετήθηκε το χτένι για το σχηματισμό των θέσεων στις οποίες θα γίνει η τοποθέτηση των διαλύματος επιστοίβαξης είναι 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS και 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS, αντίστοιχα.

Προετοιμασία πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό των α- και βυπομονάδων της τουμπουλίνης

Για την προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιείται η διαδιακασία που περιγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά ότι το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού περιέχει 1.5M Tris-HCl pH 9.5. Δεδομένου ότι η β-τουμπουλίνη είναι πιο όξινη, με την αύξηση της τιμής του pH του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των δύο υπομονάδων της πρωτεΐνης

Ηλεκτροφόρηση

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων με σύριγγα Hamilton στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί, στο δοχείο ηλεκτροφόρησης προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X Electrophoresis buffer: 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0.1% w/v SDS). Στην περίπτωση των πηκτωμάτων μεγάλου μεγέθους εφαρμόζεται σταθερή τάση 200V (45mA) ενώ στα μικρού μεγέθους 150V (30mA).

Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών, μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα χρώσης (50% v/v μεθανόλη, 12% v/v οξικό οξύ, 0.1% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250) για 15-30 λεπτά. Η απομάκρυνση της χρωστικής

πραγματοποιήθηκε με τοποθέτηση της πηκτής σε διάλυμα 10% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ, όπου παρέμεινε υπό συνεχή ανάδευση έως ότου γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες.

4.3. Ανοσοαποτύπωση-Western Blot

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες μετά τον διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PROTRAN 0.2μm, Whatman, Schleicher & Scuell, Germany) με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 23V για 2-3 ώρες. Το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε περιέχει 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0.1% w/v SDS και 20% v/v μεθανόλη.

Διαδικασία ανοσοανίχνευσης

Η μέθοδος της ανοσοανίχνευσης στηρίζεται στη σύνδεση ενός ειδικού αντισώματος με το αντίστοιχο αντιγόνο το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο στη μεμβράνη. Αρχικά, η μεμβράνη στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες επωάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7.4, 155mM NaCl και 0.1% v/v Tween-20, 1% v/v ζελατίνη από δέρμα ψαριού (blocking buffer) για 16 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έτσι ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αραιώθηκε κατάλληλα σε διάλυμα blocking, τρεις εκπλύσεις διάρκειας 10 λεπτών η κάθε μια με σκοπό την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντισώματος και στη συνέχεια επώαση για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα blocking. Ακολούθως, η μεμβράνη πλύθηκε όπως αναφέρεται παραπάνω και επωάστηκε για 5 λεπτά με το αντιδραστήριο εμφάνισης. Στη συνέχεια εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ για χρόνο που εξαρτάται από την ένταση του σήματος της χημειοφωταύγειας. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών έγινε με το Molecular Analyst Software (BioRad, Palo Alto, CA, USA). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα στις αντίστοιχες αραιώσεις.

Αραιώσεις
1:1000
1:500
1:500
1:500
1:500
1:500

anti-H3	1:500
anti-acetylated H3	1:1000
Δευτερογενή Αντισώματα	Αραιώσεις
anti-mouse HRP	1:10000
anti-rabbit HRP	1:10000
anti-goat HRP	1:10000

Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης

Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε διάλυμα 62.5 mM Tris HCl pH 6.7, 2% w/v SDS, 100mM β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμάνθηκε για 30 λεπτά στους 50°C. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις διάρκειας 10 λεπτών με 20mM Tris-HCl pH 7.4, 155mM NaCl και 0.1% v/v Tween-20 (washing buffer) και επανάληψη της διαδικασίας ανοσοανίχνευσης.

4.4. Ανοσοαποτύπωση μετά από επίστρωση (Overlay blot)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση πρωτεινικών αλληλεπιδράσεων. Το πρωτεϊνικό δείγμα αναλύθηκε με SDS-PAGE και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθησε δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με διάλυμα 20mM Tris HCl pH 7.4, 150mM NaCl και 0.1% v/v Tween-20, 1% v/v ζελατίνης (blocking buffer) για 16 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5-24μg/ml) πρωτεΐνης (τουμπουλίνη ή ιστόνη H3) σε διάλυμα επίστρωσης (20mM Tris HCl pH 7.4, 150mM-1M NaCl, 1% v/v Tween-20, 1% v/v ζελατίνη). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις με blocking buffer για την απομάκρυνση της μη δεσμευμένης πρωτεΐνης και ακολούθησε η γνωστή διαδικασία της ανοσοανίχνευσης με τη χρήση ειδικού αντισώματος για την τουμπουλίνη ή την H3 όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω.

4.5. Πέψη πυρηνικών φακέλων με πρωτεάσες

Πυρηνικοί φάκελοι ερυθροκυττάρων γαλοπούλας διαλύθηκαν σε 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10% v/v σακχαρόζη, 0.1% v/v ζελατίνη από δέρμα ψαριού, σε τελική συγκέντρωση 1.0mg/ml και επωάστηκαν με διάλυμα ενζύμων θρυψίνης-χυμοθρυψίνης (τελική συγκέντρωση 0.16mg/ml) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η ενζυμική δράση διακόπηκε με προσθήκη στο διάλυμα 1.3mM PMSF, 1% v/v ζελατίνη, 2μg/ml λευπεπτίνη, 1μg/ml πεπστατίνη, 2μg/ml απροτινίνη, 1μg/ml αντιπαΐνη. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Eppendorf), πλύθηκαν με το παραπάνω διάλυμα και φυλάχθηκαν στος -80°C.

4.6. Πέψη τουμπουλίνης με την πρωτεάση σαπτιλισίνη (subtilisin)

Διάλυμα τουμπουλίνης (τελική συγκέντρωση 1mg/ml) σε MEM (50mM MES pH 6.8, 2mM EDTA, 2mM MgCl₂, 1mM MgGTP) επωάστηκε με subtilisin (τελική συγκέντρωση 5μg/ml) για 10, 20, 30 και 40 λεπτά στους 30 και 37 °C. Η δράση του ενζύμου σταμάτησε με την προσθήκη 10mM PMSF και αποδιατακτικού διαλύματος (Laemmli buffer). Τα δείγματα αφού θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά, αναλύθηκαν με SDS-PAGE.

4.7. Πρωτεόλυση της ανασυνδυασμένης ιστόνης Η3 με σφαιρίδια θρυψίνης

Σφαιρίδια θρυψίνης (40μl) πλύθηκαν τρεις φορές με παγωμένο 1X PBS. Ακολούθησε προσθήκη 250μl διαλύματος ιστόνης H3 συγκέντρωσης 2mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH 7.5 και επώαση στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την παρέλευση 2, 5, 10, 20 και 25 λεπτών επώασης, ελήφθησαν 50μl εναιωρήματος και προστέθηκαν 30μl μείγματος 2μg/ml αναστολέων πρωτεασών (λευπετίνη, πεπστατίνη, απροτινίνη, αντιπαΐνη). Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Eppendorf). Στο υπερκείμενο υγρό προστέθηκαν 50μl Laemmli buffer, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια αναλύθηκαν σε SDS-PAGE ή φυλάχθηκαν στους -80°C.

4.8. Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών με πυρηνικούς φακέλους

Πυρηνικοί φάκελοι από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (30μg) ή πρωτεολυτικό υπόλοιπο της αντίστοιχης ποσότητας, επωάστηκαν με 40μg τουμπουλίνης σε διάλυμα 25mM PIPES pH 6.9, 1μM νοκοδαζόλη, 0.2mM PMSF, 1mM DTT, 2μg/ml λευπεπτίνη, 1μg/ml πεπστατίνη, 2μg/ml απροτινίνη, 1μg/ml αντιπαΐνη. Ο όγκος της αντίδρασης προσαρμόστηκε στα 100μl και η επώαση έγινε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι φάκελοι απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση στα 12.000g για 30 λεπτά στους 4°C, πλύθηκαν με το παραπάνω διάλυμα και επαναφυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις παραπάνω συνθήκες (πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις). Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και τα ιζήματα τα οποία αντιστοιχούν στους πυρηνικούς φακέλους και τις πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν σε αυτούς διαλύθηκαν σε 30μl Laemmli buffer και αναλύθηκαν με SDS-PAGE ή ανοσοαποτύπωση.

4.9. Συγκατακρήμνιση πρωτεϊνών με σφαιρίδια γλουταθειόνης

Αρχικά τα σφαιρίδια γλουταθειόνης (GST-beads, Glutathione Sepharose 4B, Amersham) πλύθηκαν τρεις φορές με 1X PBS και αδρανοποιήθηκαν με διάλυμα 1% ζελατίνη σε 1X PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με 1X PBS, εξισορρόπηση των σφαιριδίων με διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 1% v/v Triton X-100, 10% v/v σουκρόζη, 0.2mM PMSF, 1mM DTT και στη συνέχεια επώαση στο ίδιο διάλυμα με 15μg GST-πρωτεϊνών, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως, τα σφαιρίδια πλύθηκαν δύο φορές με το παραπάνω διάλυμα και επωάστηκαν 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση με 5-100μg πρωτεϊνών σε διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7.4, 500mM NaCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 1% v/v Triton X-100, 10% v/v σουκρόζη, 0.2mM PMSF, 1mM DTT. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν επτά εκπλύσεις με το ίδιο διάλυμα, προσθήκη 30μl Laemmli buffer, θέρμανση για 5 λεπτά στους 95°C και συλλογή του υπερκειμένου υγρού. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE.

5. Κυτταρικές Μέθοδοι

5.1. Κυτταροκαλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HeLa (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας), DU (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από αδενοκαρκίνωμα προστάτη), MCF-7 (ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα μαστού) και Ishikawa (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία Petri 100mm στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO2. Τα HeLa και DU αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's MEM (4.500mg/L γλυκόζη, L-γλουταμίνη) το οποίο περιέχει 10% v/v FBS (fetal bovine serum), 1% v/v πυρουβικό νάτριο, 1% v/v πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη, τα MCF-7 σε Dulbecco's MEM-Ham's F-12, το οποίο περιέχει 10% v/v FBS, 10ng/ml ινσουλίνη, 1% v/v πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη ενώ τα Ishikawa καλλιεργήθηκαν σε MEM-EARLE το οποίο περιέχει 10% v/v FBS, 1% v/v L-γλουταμίνη, 1% v/v πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη και 1% v/v μη απαραίτητα αμινοξέα. Προκειμένου να επανακαλλιεργηθούν, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο μετά από επώαση με διάλυμα θρυψίνης-EDTA για 5 λεπτά στους 37°C. Η θρυψίνη αδρανοποιήθηκε με ίσο όγκο θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 1.400 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος Kubota 2100). Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία ώστε να επανακαλλιεργηθούν.

5.2. Επίδραση φαρμάκων σε καρκινικές κυτταρρικές σειρές

Στα φάρμακα που μελετήθηκαν ανήκουν η εμπορικά διαθέσιμη ταξόλη (Taxol^R 30mg/5ml, Bristol-Myers Squibb Company, USA) καθώς και τα συνθετικά ανάλογα αυτής (**Εικόνα 23**), τα οποία αντιστοιχούν στον τύπο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]_n-NH₂ όπου n=2, 3, 4 μόρια ταξόλης και παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας με υπεύθυνο τον καθηγητή ΒασίλειοΤσίκαρη (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων). Κύτταρα HeLa, DU και MCF-7 καλλιεργήθηκαν σε κανονικές συνθήκες σε τρυβλία, φλάσκες ή γυάλινες καλυπτρίδες, ανάλογα με τον μετέπειτα χειρισμό. Κυτταρικές συγκεντρώσεις (1nM-20nM) ταξόλης ή παραγώγων της για το χρονικό διάστημα των 24 ώρων. Μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε κανονικές συνθήκες καλλιέρνεις για 24, 48 ή 72 ώρες.



Εικόνα 23. Δομή του συνθετικού αναλόγου της ταξόλης που αντιστοιχεί στον τύπο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂

5.3. Μέτρηση του αριθμού κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας, αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο μετά από επώαση με διάλυμα θρυψίνης-EDTA για 5 λεπτά στους 37°C. Η θρυψίνη αδρανοποιήθηκε με ίσο όγκο θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 1.400 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (φυγόκεντρος Kubota 2100). Στη συνέχεια το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού. Από το διάλυμα των κυττάρων ελήφθησαν 10μl τα οποία μεταφέρθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Το αιμοκυτταρόμετρο περιλαμβάνει τέσσερεις περιοχές μέτρησης οι οποίες ορίζονται από ένα πλαίσιο εμβαδού 1mm². Το ύψος του κάθε πλαισίου κάτω από την καλυπτρίδα που καλύπτει την περιοχή εισαγωγής του δείγματος είναι 0.1mm. Επομένως ο όγκος του κυτταρικού διαλύματος σε κάθε μια από τις τέσσερεις περιοχές μέτρησης είναι 0.1mm³ ή 0.0001ml. Μετά την εισαγωγή του δείγματος, μετρήθηκαν τα κύτταρα που περιέχονται σε κάθε περιοχή και ο συνολικός τους αριθμός διαιρέθηκε με το τέσσερα (αριθμός κυττάρων ανά 0.0001ml) και πολλαπλασιάστηκε με 10⁴ έτσι ώστε να υπολογισθεί ο αριθμός των κυττάρων ανά ml διαλύματος. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων της καλλιέργειας υπολογίσθηκε πολλαπλασιάζοντας με τον τελικό όγκο του διαλύματος (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Σχηματική παράσταση του αιμοκυτταρομέτρου Neubauer

5.4. Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυζης

Η μελέτη της επίδρασης φαρμάκων στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έγινε με χρωματομετρική μέθοδο με χρήση του αντιδραστηρίου MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide). Κύτταρα HeLa, DU και MCF-7 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε τρυβλία 24 οπών (24 well plates). Ο αρχικός αριθμός των κυττάρων ήταν 20.000 κύτταρα/οπή για τα HeLa και 25.000 κύτταρα/οπή για τα DU και MCF-7. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις του κάθε φαρμάκου το οποίο είχε αραιωθεί κατάλληλα σε θρεπτικό υλικό. Μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 72 ώρες. Ακολούθησε απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη 0.5ml διαλύματος MTT (0.5mg/ml σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS) σε κάθε οπή και επώαση για 3 ώρες στους 37 °C. Το MTT προσλαμβάνεται από ζωντανά λειτουργικά κύτταρα και δημιουργεί κρυσταλλικές δομές κυανού χρώματος, οι οποίες διαλύονται με προσθήκη 0.5ml ισοπροπανόλης και συνεχή έντονη ανάδευση. Η απορρόφηση του έγχρωμου διαλύματος που προκύπτει μετά την επαναδιάλυση των κρυστάλλων, μετρήθηκε σε φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 630nm.

5.5. Μελέτη του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής.

Κύτταρα HeLa και DU καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες εμβαδού 25cm² για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του κάθε φαρμάκου το οποίο είχε αραιωθεί κατάλληλα σε θρεπτικό υλικό. Μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες. Ακολούθησε χρώση των κυττάρων με το αντιδραστήριο COULTER-DNA Prep (Coulter, Miami FL) το οποίο χρησιμοποιείται για την ποσοτική μέτρηση του DNA με κυτταρομετρία ροής. Η μέτρηση βασίζεται στην ικανότητα του ιωδιούχου προπιδίου να δεσμεύεται στοιχειομετρικά με το DNA. Ο φθορισμός από κάθε βαμμένο κύτταρο μετράται καθώς αυτό περνάει μέσα από την ακτίνα λέιζερ του κυτταρομετρητή ροής. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα διαλύθηκαν με προσθήκη 15μl DNA-Prep LRP (περιέχει απορρυπαντικά για τη διάνοιξη οπών) και αναδεύτηκαν για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε προσθήκη 1ml DNA-Prep Stain (περιέχει 50μg/ml ιωδιούχο προπίδιο) και στη συνέχεια ανάλυση των δειγμάτων στον κυτταρομετρητή ροής (Epics Elite model flow cytometer coulter, Miami FL). Σε κάθε πείραμα αναλύθηκαν 10.000 κύτταρα και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα WinMDI 2.8.

5.6. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε καλυπτρίδες 18X18mm και αφού πλύθηκαν με 1X PBS, ακολούθησε μονιμοποίησή τους με διάλυμα φορμαλδεΰδης (4% ή 1% σε 1X PBS) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε ορισμένες περιπτώσεις η μονιμοποίηση έγινε με παγωμένη μεθανόλη ή αιθανόλη για 5 λεπτά στους -20°C. Για την απενεργοποίηση της φορμαλδεΰδης τα κύτταρα επωάστηκαν με διάλυμα 20mM γλυκίνη σε 1X PBS (Quench) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προκειμένου να διανοιχτούν οπές στις κυτταρικές μεμβράνες, ώστε να γίνει δυνατή η είσοδος του αντισώματος αλλά και να αποφευχθεί η δέσμευσή του σε μη ειδικές θέσεις, τα κύτταρα επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 1X PBS, 0.2% Triton X-100, 0.5% ζελατίνη δέρματος ψαριού και 2mM MgCl₂ (blocking buffer). Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων με το πρωτογενές αντίσωμα για 45 λεπτά. Η επώαση έγινε τοποθετώντας 50μl κατάλληλα αραιωμένου αντισώματος σε blocking buffer πάνω σε κάθε καλυπτρίδα. Κατόπιν τα δείγματα εκπλύθηκαν με blocking buffer για 10 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί το αντίσωμα που δεν έχει συνδεθεί ειδικά. Ακολούθησε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 45 λεπτά και στη συνέχεια τρεις εκπλύσεις με 1X PBS για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε χρώση των πυρήνων των κυττάρων με χρήση

κατάλληλων γρωστικών ουσιών όπως είναι το DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole), το PI (Propidium Iodide) ή το TO-PRO-3 iodide. To DAPI (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) γρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0.004mg/ml σε 1X PBS και τα κύτταρα επωάστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρώση των πυρήνων με TO-PRO-3 (Molecular Probes, USA) έγινε μετά από αραίωση 1:1000 σε 1X PBS και επώαση των κυττάρων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν από τη γρώση με PI (Research Organics, USA), τα κύτταρα επωάστηκαν με διάλυμα RNase συγκέντρωσης 0.2mg/ml σε 1X PBS για χρονικά διαστήματα που εξαρτώνται από το μέσο μονιμοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα τα οποία μονιμοποιήθηκαν με 4% F.A επωάστηκαν με την RNase για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν η μονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε με MeOH η επώαση με την RNase διήρκησε 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ΡΙ χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0.02mg/ml και τα κύτταρα επωάστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι παραπάνω χρωστικές διαφέρουν ως προς τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στο φάσμα φθορισμού. Τα δείγματα εκτιμήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (TCS-NT Laser Scanning microscope, Leica) με χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού HCX PL APO 40x/1.25. Τα αντισώματα (πρωτογενή και δευτερογενή) και οι αντίσοτιχες αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού είναι τα εξής.

Πρωτογενή Αντισώματα	Αραιώσεις
----------------------	-----------

anti-β-tubulin	1:200
anti-βI-tubulin	1:200
anti-βII-tubulin	1:200
anti-βIII-tubulin	1:200
anti-βIV-tubulin	1:200
anti-acetylated-tubulin	1:200
anti-a-tubulin	1:100
anti-LmB	1:500
αυτοάνοσος ορός 184	1:80

Δευτερογενή Αντισώματα	Αραιώσεις		
anti-mouse FITC	1:200		
anti-mouse Alexa 488	1:500		
anti-mouse Rhodamine	1:200		
anti-mouse Alexa 555	1:500		
anti-rabbit Alexa 555	1:500		

5.7. Παροδική επιμόλυνση (transient transfection) κυττάρων HeLa

Οι παροδικές επιμολύνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης ιζήματος DNA και φωσφορικού ασβεστίου $Ca_3(PO_4)_2$. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 οπών (6-well plate) σε αραίωση $2x10^5$ ανά οπή, 24 ώρες πριν από την επιμόλυνση. Παρασκευάστηκαν διαλύματα που περιείχαν 3μg πλασμιδίου έκφρασης, 15.5μl 2M CaCl₂ και ποσότητα ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 125μl. Στη συνέχεια τα διαλύματα προστέθηκαν στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε ίσο όγκο 2X Hepes Buffered Saline (2X HBS: 42mM Hepes pH 7.1, 274mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM Na₂HPO₄7H₂O, 12mM δεξτρόζη). Μετά την παρέλευση 20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν στάγδην σε κάθε οπή, ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 3, 6,24, 48 ή 72 ώρες.

5.8. Μέτρηση της έντασης φθορισμού παροδικά επιμολυσμένων κυττάρων

Η μέτρηση της έντασης φθορισμού στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα κυττάρων HeLa τα οποία επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια των GFP-βII και GFPβIV ισομορφών της τουμπουλίνης έγινε με τη χρήση προγράμματος MATLAB (The Mathworks, Inc, MA, USA). Πιο συγκεκριμένα, σε φωτογραφίες κυττάρων που προήλθαν μετά από παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, μετρήθηκε η ένταση φθορισμού στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα συγκεκριμένου κυττάρου, μιας προεπιλεγμένης κυκλικής περιοχής η οποία αντιστοιχεί σε 200 pixels και στη συνέχεια υπολογίσθηκαν οι λόγοι της πυρηνικής έντασης προς την κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού. Για κάθε χειρισμό (διαφορετικά χρονικά διαστήματα έκφρασης) μετρήθηκαν οι

λόγοι της έντασης φθορισμού σε τουλάχιστον 100 διαφορετικά κύτταρα και έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το Microshoft Excel.

5.9. Πειράματα ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοδιάχυση (FRAP, Fluoresence Recovery After Photobleaching)

Τα πειράματα FRAP πραγματοποιήθηκαν στο EMBL (Heidelberg) στο εργαστήριο Advanced Light Microscopy Core Facility (ALMF). Mia $\alpha\pi\delta$ τις εφαρμογές της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι η μελέτη της κινητικής πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα με την μέθοδο FRAP. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη συσχέτιση του φαινομένου της φωτοδιάχυσης φθορισμογόνων δειγμάτων με την κινητική τους. Η κινητικότητα και η διάχυση ενός μορίου στο κυτταρικό περιβάλλον επηρεάζεται από το μέγεθός του, τις αλληλεπιδράσεις του με άλλους παράγοντες και το ιξώδες του κυτταρικού περιβάλλοντος (τύπος Stokes/Einstein). Για τα πειράματα FRAP, κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε τρυβλία 10mm τα οποία φέρουν γυάλινη καλυπτρίδα. Ακολούθησε παροδική επιμόλυνση με τα πλασμίδια pEGFPβΙΙ και pEGFPβΙV (μέθοδος CaCl₂) για 16 ώρες στους 37°C. Τα πειράματα FRAP πραγματοποιήθηκαν την επόμενη μέρα, μετά από 3 ώρες έκφρασης σε θρεπτικό υλικό χωρίς το δείκτη κόκκινο της φαινόλης (δείκτης pH) και χωρίς να προηγηθεί μονιμοποίηση των κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο LSM510 (Carl Zeiss, Inc) με λέιζερ Argon/Krypton, στο οποίο είχε προσαρμοστεί θάλαμος, η θερμοκρασία του οποίου ρυθμίστηκε και παρέμεινε σταθερή στους 37°C. Επίσης, το μικροσκόπιο ήταν εξοπλισμένο με το φίλτρο AOTF (acousto-optical tunable filter) μέσω του οποίου μεταβάλλεται στιγμιαία η ισχύς της ακτινοβολίας laser από την χαμηλή ένταση που απαιτείται για την απεικόνιση (4-8% της μέγιστης τιμής) σε υψηλή ένταση (100% της μέγιστης τιμής) που απαιτείται για την φωτοδιάχυση. Για τα πειράματα FRAP χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: Ελαιοκαταδυτικός φακός μεγέθυνσης Plan-Neofluor 63x/1.25, συχνότητα σάρωσης του δείγματος και προς τις δυο κατευθύνσεις (bi-directional mode) από την ακτίνα του leiser 1400Hz, ανάλυση εικόνας 256x256 pixel, διαστολέας ακτίνας (beam expander) στην τιμή 3, διάφραγμα ακτίνας (pinhole) πλήρως ανοιχτό, ισχύς ακτίνας laser στο 4-8% της μέγιστης ισχύος σε όλη την διάρκεια του πειράματος, εκτός από την στιγμή της φωτοδιάχυσης που χρησιμοποιούμε μέγιστη ισχύ (100%). Με τις παραπάνω παραμέτρους αυτόματα προκύπτει η λήψη εικόνων κάθε 0.208 msec. Μια απλή Ζ-τομή ελήφθη πριν και μετά τη φωτοδιάχυση, η οποία πραγματοποιήθηκε σε μια κυκλική περιοχή με διάμετρο 1μm που ορίστηκε για ανάλυση (ROI: region of interest) σε κάθε κύτταρο, με το λέιζερ στα 488nm να έχει ρυθμιστεί στη μέγιστη ισχύ του. Οι συνθήκες της φωτοδιάχυσης (bleach) και η ROI διατηρήθηκαν σταθερές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Πριν την φωτοδιάχυση ελήφθησαν 50 εικόνες (pre-bleach images), ακολούθησε στιγμιαία φωτοδιάχυση και στη συνέχεια λήψη 350-500 εικόνων μετά την φωτοδιάχυση (post-bleach images). Ακολούθως, ορίζονται ακόμη δυο ROIs: το σύνολο της περιοχής που κατανέμεται η πρωτεΐνη που αναλύεται, καθώς και μια περιοχή στην οποία δεν εντοπίζεται η πρωτεΐνη ώστε να καταγραφεί ο θόρυβος (background). Οι συγκεκριμένες περιοχές χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των δεδομένων (data normalization). Η κανονικοποίηση των δεδομένων, με χρήση της περιοχής ενδιαφέροντος (I_t), της συνολικής περιοχής κατανομής της πρωτεΐνης (T_t), και της περιοχής μη-εντόπισης της πρωτεΐνης (BG) γίνεται σε τέσσερα βήματα ως εξής:

α) Αφαιρείται ο θόρυβος (background subtraction), υπολογίζοντας για κάθε χρονικό σημείο
t,

$$(I_t - BG) \& (T_t - BG)$$

β) Ορίζεται το σήμα φθορισμού που χάθηκε, υπολογίζοντας για κάθε χρονικό σημείο t,

$$(T_{\text{prebleach}} - BG) / (T_t - BG)$$

γ) Διορθώνεται το σήμα του φθορισμού που χάνεται λόγω της φωτοδιάχυσης από την ακτινοβολία χαμηλής έντασης που χρησιμοποιείται για την λήψη των εικόνων, υπολογίζοντας για κάθε χρονικό σημείο t,

$$(I_t - BG)(T_{\text{prebleach}} - BG)/(T_t - BG)$$

δ) Ορίζεται το σχετικό σήμα φθορισμού στην περιοχή φωτοδιάχυσης, υπολογίζοντας για κάθε χρονικό σημείο t,

$$(T_{\text{prebleach}} - BG)(I_t - BG)/(T_t - BG)(I_{\text{prebleach}} - BG)$$

Μετά την κανονικοποίηση προκύπτει ένα γράφημα (**Εικόνα 25**) που απεικονίζει το σήμα του φθορισμού στην περιοχή της φωτοδιάχυσης ως συνάρτηση του χρόνου. Από το γράφημα υπολογίζεται ο χρόνος ημι-ανάκτησης (recovery half-time), δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται ώστε ο φθορισμός στην περιοχή της φωτοδιάχυσης να πάρει το $\frac{1}{2}$ της μέγιστης τελικής τιμής. Όσο μικρότερη τιμή έχει αυτή η παράμετρος τόσο μεγαλύτερη η κινητική του μορίου που αναλύεται. Ακόμη συγκρίνεται η τελική τιμή του φθορισμού (I_E) στην περιοχή φωτοδιάχυσης με την τιμή πριν την φωτοδιάχυση (I_I). Στην περίπτωση που I_I > I_E προκύπτει το συμπέρασμα ότι μέρος (I_I – I_E) του πληθυσμού των μορίων της πρωτεΐνης που αναλύεται είναι σταθερά συνδεδεμένο σε κάποια σταθερή δομή (immobile fraction, F_1) και το υπόλοποιπο (I_E) διαχέεται (mobile fraction, F_m), ενώ όταν $I_I = I_E$ προκύπτει το συμπέρασμα ότι το σύνολο του πληθυσμού των μορίων της πρωτεΐνης που αναλύουμε διαχέεται ελεύθερα.



Εικόνα 25. Γράφημα κανονικοποιημένης καμπύλης πειράματος FRAP

Οι εντάσεις φθορισμού προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό LSM (Carl Zeiss Inc, Laser Scanning Microscope, LSM 510, Version 4.0). Οι εικόνες ελήφθησαν σε μορφή tiff και επεξεργάστηκαν στο Adobe Photoshop (Adobe System Inc, Version 5.0). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το Microsoft Excel. Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων ελήφθησαν διαγράμματα της έντασης (0-1 αυθαίρετες μονάδες - arbitary units) σαν συνάρτηση του χρόνου (Microsoft Excel). Στη συνέχεια υπολογίστηκε η παράμετρος $t_{1/2}$ που αντιστοιχεί στο χρόνο (sec) στον οποίο η τιμή της έντασης είναι ίση με 0.5 (αυθαίρετες μονάδες - arbitary units).

AMOTTEATEZMATA

1. Μελέτη της υποκυτταρικής εντόπισης της τουμπουλίνης

Η τουμπουλίνη, αν και θεωρείται κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, εντοπίζεται στον πυρήνα ζωϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια καθώς και στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων σε ιστολογικά παρασκευάσματα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ανοσοχημικές μεθόδους έχει προταθεί ότι η βΙΙ-τουμπουλίνη είναι η πυρηνική ισομορφή. Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά στον μηχανισμό της πυρηνικής εντόπισης της τουμπουλίνης σε συνδυασμό με την εξακριβωμένη εντόπιση και δράση στον πυρήνα πολλών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (π.χ ακτίνη), μας οδήγησαν στο να μελετήσουμε τον μηχανισμό που ρυθμίζει την υποκυτταρική κατανομή της ενδογενούς και της GFPτουμπουλίνης.

1.1 Υποκυτταρική εντόπιση της ενδογενούς τουμπουλίνης με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα και διαφορετικούς τρόπους μονιμοποίησης των παρασκευασμάτων μελετήσαμε αρχικά με ανοσοφθορισμό την υποκυττάρια εντόπιση της β-τουμπουλίνης και του βΙΙ ισοτύπου σε διάφορες κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός σε ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa), προστάτη (DU-145) και ενδομητρίου (Ishikawa), τα οποία μονιμοποιήθηκαν με τρεις διαφορετικούς τρόπους (4% F.A, 100% MeOH, 100% EtOH).

Τα αποτελέσματα δείχνουν (Εικόνα 26Α) ότι η ισομορφή βΙΙ ανιχνεύεται στον πυρήνα όλων των κυττάρων. Ειδικότερα, στα κύτταρα HeLa και Ishikawa εντοπίζεται στον πυρήνα ανεξάρτητα από το μέσο μονιμοποίησης των κυττάρων, ενώ στα κύτταρα DU κυρίως μετά από μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% F.A. Η ενδογενής β-τουμπουλίνη, εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των παραπάνω κυτταρικών σειρών και ανεξάρτητα από το μέσο μονιμοποίησης (Εικόνα 26Β).



Εικόνα 26. Η τουμπουλίνη εντοπίζεται στον πυρήνα κυττάρων θηλαστικών. Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυττάρων DU, HeLa και Ishikawa, τα οποία μονιμοποιήθηκαν με 4% φορμαλδεύδη (F.A), μεθανόλη (MeOH) και αιθανόλη (EtOH) και επωάστηκαν (A) με αντίσωμα για την βΠ-τουμπουλίνη (πράσινο) (B) με αντίσωμα για την β-τουμπουλίνη (πράσινο). Η χρώση του πυρήνα έγινε με Topro (κόκκινο).

1.2. Υποκυτταρική εντόπιση GFP-βΙΙ- και GFP-βΙV- τουμπουλίνης σε παροδικά επιμολυσμένα κύτταρα HeLa

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο κυτταρικός εντοπισμός GFP-τουμπουλίνης σε κύτταρα HeLa. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ισομορφές της β-τουμπουλίνης, η βΙΙ (πυρηνική) και η βΙV (κυτταροπλασματική), οι οποίες αρχικά συζεύχθηκαν με την GFP πρωτεΐνη και στη συνέχεια εκφράστηκαν παροδικά σε κύτταρα HeLa. Για να διαπιστωθεί αν η GFP-βΙΙ- και βΙVτουμπουλίνη συμπεριφέρονται όπως η ενδογενής τουμπουλίνη και συνεχίζουν να διατηρούν την ικανότητα πολυμερισμού και ενσωμάτωσης στους μικροσωληνίσκους, μελετήθηκε ο εντοπισμός των δύο ισοτύπων σε μιτωτικά κύτταρα, μετά από 24 ώρες έκφρασης (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Κατανομή των GFP-βΙΙ και GFP-βΙV ισοτύπων της τουμπουλίνης στις φάσεις της μίτωσης. HeLa κύτταρα τα οποία επιμολύνθηκαν παροδικά με GFP-βΙΙ και GFP-βΙV τουμπουλίνη καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με 4% F.A και επωάστηκαν με αντίσωμα για την λαμίνη B (κόκκινο). Οι φωτογραφίες που παρουσιάζονται λήφθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού και δείχνουν την κατανομή των δύο ισοτύπων σε όλες τις φάσεις της μίτωσης.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 27 οι δυο ισομορφές ενσωματώνονται σε χαρακτηριστικές δομές των διαφόρων φάσεων της μίτωσης, όπως τα κεντροσωμάτια και οι μιτωτικοί μικροσωληνίσκοι στην πρόφαση, η μιτωτική άτρακτος στην μετάφαση και την ανάφαση και το μεσοσωμάτιο στην τελόφαση.

Στα μεσοφασικά κύτταρα η GFP-τουμπουλίνη ανιχνεύεται και κατανέμεται σχεδόν ομοιόμορφα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων με εξαίρεση την περιοχή των πυρηνίσκων (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Κατανομή GFP-τουμπουλίνης στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα μεσοφασικών κυττάρων. Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν παροδικά με GFP-βII τουμπουλίνη και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν με 4% F.A. Η τουμπουλίνη κατανέμεται αρκετά ομοιόμορφα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, όπως προκύπτει από το διάγραμμα της έντασης φθορισμού σε συνάρτηση με την απόσταση (σε pixels) μέσα στο κύτταρο, το οποίο υπολογίστηκε με το πρόγραμμα Image-Pro.

Η παρατήρηση μεγάλου αριθμού κυττάρων έδειξε ότι το ποσοστό έκφρασης κάθε ισομορφής καθώς και το εύρος της συγκέντρωσής της σε κυτταρόπλασμα και πυρηνόπλασμα διαφέρει μεταξύ των επιμολυσμένων κυττάρων. Προκειμένου να προσδιοριστεί το εύρος της πυρηνικής συσσώρευσης των βΙΙ και βΙV ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων, μετρήθηκε σε εκατό κύτταρα η ένταση φθορισμού μιας περιοχής συγκεκριμένου μεγέθους στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα της έκφρασης των πρωτεϊνών (3, 6, 24, 48 και 72 ώρες). Στη συνέχεια υπολογίσθηκαν οι λόγοι της πυρηνικής έντασης προς την κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού, όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις (0.15 έως 1.25) μεταξύ κυττάρων που εκφράζουν τον ίδιο ισότυπο για μια δεδομένη χρονική στιγμή (**Εικόνα 29A**). Από την ανάλυση της μέσης τιμής των μετρήσεων αυτών φαίνεται ότι η κινητική της πυρηνικής εντόπισης, εξαρτάται από τον ισότυπο της β-τουμπουλίνης (**Εικόνα 29B**). Η βΙV συγκεντρώνεται στον πυρήνα πιο γρήγορα από την βΙΙ μετά από 6 ώρες έκφρασης ενώ αντίθετα εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα σε μικρότερες ποσότητες από την βΙΙ μετά την παρέλευση 48 και 72 ωρών έκφρασης των γονιδίων. Οι παραπάνω διαφορές μεταξύ των δύο ισοτύπων είναι στατιστικά σημαντικές και θα μπορούσαν να αποδωθούν σε διαφορετικές ταχύτητες μετακίνησής τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα καθώς και στον τύπο και στην ένταση των αλληλεπιδράσεων τους με συστατικά του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα.



Μέση τιμή των λόγων πυρηνική/κυτταρόπλασματική ร์งระยะๆ ตุดออาสุเอย์ 0,4 0,35 β IV tb 0,3 0 10 20 30 40 50 60 70 80 Διάρκεια έκφρασης γονιδίων (ώρες)

Εικόνα 29. Η πυρηνική εντόπιση της GFP-τουμπουλίνης εξαρτάται από τον ισότυπο και από τη διάρκεια έκφρασης των γονιδίων. (Α) Αντιπροσωπευτικοί λόγοι (0.1893-1.2328) της πυρηνοπλασματικής προς την κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού. Η ένταση φθορισμού μιας περιοχής συγκεκριμένων διαστάσεων (κόκκινος κύκλος) μετρήθηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα μεσοφασικών κυττάρων μετά από 3, 6, 24, 48 και 72 ώρες έκφρασης. (Β) Διάγραμμα που παρουσιάζει διακυμάνσεις των μέσων τιμών της πυρηνοπλασματικής προς την κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού σε συνάρτηση με την διάρκεια έκφρασης της βΙΙ- και βΙV-τουμπουλίνης.

Δυναμική των ισομορφών GFP-τουμπουλίνης

Προκειμένου να μελετηθεί η δυναμική συμπεριφορά (κινητικότητα) των ισοτύπων βΙΙ και βΙV της τουμπουλίνης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα παροδικά επιμιλυσμένων κυττάρων HeLa. Με την συγκεκριμένη διαδικασία, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και μέθοδοι», μελετάται η κινητική συμπεριφορά σημασμένων μακρομορίων, δηλαδή η ταχύτητα με την οποία διαχέονται σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα. Στον πίνακα 7 συνοψίζονται δεδομένα από πειράματα FRAP της δυναμικής των πρωτεινών GFP, RFP και GFP ισομορφών της τουμπουλίνης στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα κυττάρων HeLa. Χαρακτηριστικές εικόνες και διαγράμματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στην εικόνα 30.

Πίνακας7. Δεδομένα από πειράματα FRAP της δυναμικής συμπεριφοράς των ισοτύπων GFPβΙΙ και GFP-βΙV-τουμπουλίνης καθώς και των πρωτεϊνών GFP και RFP. Το **n** αντιστοιχεί στον αριθμό των πειραμάτων FRAP που πραγματοποιήθηκαν, το κινητό κλάσμα στο ποσοστό της φθορίζουσας πρωτεΐνης που διαχέεται ελεύθερα και το **t1**/2 στο χρόνο ημιανάκτησης της έντασης φθορισμού.

Πρωτεΐνες	Εντοπισμός	n	Κινητό κλάσμα	t1/2 (κινητό	Εύρος
			(% Ποσοστό)	κλάσμα)	τιμών t1/2
GFP-ßII	πυρήνας	30	96.5 ± 2.6	$1.3s \pm 0.2s$	1.0s - 1.5s
	κυτταρόπλασμα	30	95.6 ± 3.9	$2.2s \pm 0.8s$	1.2s - 3.4s
GFP- <i>βIV</i>	πυρήνας	30	95.3 ± 4.4	$1.3s \pm 0.3s$	1.0s - 2.0s
	κυτταρόπλασμα	30	<i>92.2</i> ± <i>4.9</i>	$2.0s \pm 0.4s$	1.3s - 2.8s
GFP	πυρήνας	15	98.3 ± 2.2	$0.6s \pm 0.2s$	0.4s - 0.8s
RFP	πυρήνας	16	<i>97.1</i> ± <i>3.1</i>	$0.6s \pm 0.2s$	0.4s - 0.8s



πυρηνική βII-tubulin pre-bleach bleach post-bleach



κυτταροπλασματική βΙV-τουμπουλίνη pre-bleach bleach postbleach

B.



πυρηνική βΙV-τουμπουλίνη pre-bleach bleach postbleach





Εικόνα 30. Δυναμική των ισοτύπων της β-τουμπουλίνης. Πειράματα FRAP σε κύτταρα HeLa μετά από 6-12 ώρες έκφρασης. Τα διαγράμματα αναπαριστούν την ένταση του φθορισμού σε συνάρτηση με τον χρόνο σε δευτερόλεπτα. Οι χρόνοι ημιανάκτησης της έντασης φθορισμού (t1/2) αναγράφονται στα αντίστοιχα διαγράμματα (A) Πειράματα FRAP στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα κυττάρων HeLa τα οποία εκφράζουν GFP-βII-τουμπουλίνη (B) Πειράματα FRAP στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα κυττάρων HeLa τα εκφράζουν GFP-βIV-τουμπουλίνη (Γ) Πειράματα FRAP στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα κυττάρων HeLa τα οποία υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες GFP και RFP αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και οι δύο ισότυποι εμφανίζουν πολύ μεγάλη κινητικότητα, καθώς το μεγαλύτερο μέρος της έντασης φθορισμού (περίπου 95%) ανακτάται σε χρόνους μικρότερους από δύο λεπτά, τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό 92.2-96.6 (κινητό κλάσμα) της τουμπουλίνης μετακινείται και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα λόγω ταγείας σύνδεσης και αποσύνδεσης με κυτταρικά συστατικά, η δε ταχύτητα μετακίνησης είναι μεγάλη γιαυτό και καταγράφονται σχετικά μικροί χρόνοι ημιανάκτησης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η τουμπουλίνη δεν είναι ενσωματωμένη σε κυτταρικές δομές. Η κυτταροπλασματική β-τουμπουλίνη είναι λιγότερο κινητική συγκρινόμενη με την πυρηνική τουμπουλίνη, με χρόνους ημιανάκτησης της έντασης φθορισμού οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά. Αυτό πιθανότατα οφείλεται, σε ισχυρότερη σύνδεση της τουμπουλίνης με συστατικά του κυτταροπλάσματος. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι, σε κάθε περίπτωση υπάρχει ένα μικρό ποσοστό τουμπουλίνης (7.8-3.5) που βρίσκεται ενσωματωμένο σε δομές του κυττάρου, το οποίο αντιστοιχεί στο ακίνητο κλάσμα και του οποίου η ένταση φθορισμού δεν ανακτάται. Η μεγάλη κινητικότητα, καθώς και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στην κυτταροπλασματική και την πυρηνική τουμπουλίνη δεν οφείλονται σε φωτοδιάσπαση η στην αποκοπή της β-τουμπουλίνης από την

GFP πρωτεΐνη, δεδομένου ότι σε ανάλογα πειράματα με GFP και RFP οι χρόνοι ημιανάκτησης της έντασης φθορισμού στον πυρήνα ήταν σημαντικά μικρότεροι από εκείνους των ισοτύπων της τουμπουλίνης. Επίσης, οι διαφορές αυτές μεταξύ της GFP και των GFP ισομορφών της τουμπουλίνης δείχνουν ότι τα μόρια της τουμπουλίνης δεν διαχέονται ελεύθερα στο κύτταρο αλλά πιθανότατα συνδέονται με κυτταρικά συστατικά αλλά και μεταξύ τους.

1.3. Μηχανισμός της πυρηνικής εντόπισης της τουμπουλίνης

Η αμινοζική αλληλουχία της τουμπουλίνης εμπεριέχει σήματα πυρηνικής εξόδου (NES) Όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η τουμπουλίνη δεν περιέχει στην ακολουθία της κανονικά σήματα πυρηνικής εισόδου (NLS) (Ovechkina et al., 2003; Schwarzerova et al., 2006), τα οποία περιλαμβάνουν θετικά φορτισμένες λυσίνες και αργινίνες και αντιστοιχούν στον τύπο Pro-Lys-Lys-Arg-Lys-Val (Kalderon et al., 1984). Μελετήσαμε ως εκ τούτου, την συμμετοχή σημάτων NES στη πυρηνική εντόπιση της ενδογενούς και σημασμένης με GFP τουμπουλίνης σε κύτταρα HeLa. Οι ακολουθίες αμινοξέων που χαρακτηρίζονται ως NES, αντιστοιχούν στον τύπο Z-X(1-4)-J-X(2-3)-Z-X-Z, όπου το Z μπορεί να είναι λευκίνη (L), ισολευκίνη (Ι) ή βαλίνη (V), το J μπορεί να αντιστοιχεί σε Z, μεθειονίνη (Μ) ή φαινυλαλανίνη (F) και το X σε οποιοδήποτε αμινοξύ (Mattaj and Englmeier, 1998). Οι αμινοξικές ακολουθίες της βΙΙ- και βΙV-τουμπουλίνης εξετάστηκαν προκειμένου να εξακριβωθεί η ύπαρξη σημάτων εξόδου από τον πυρήνα (NES). Σε κάθε ακολουθία ταυτοποιήθηκαν πέντε συντηρημένα NES, από τα οποία τα τέσσερα εντοπίστηκαν στη μέση του μορίου (αμινιξέα 205-266) ενώ το πέμπτο εντοπίστηκε στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 41-50) (**Εικόνα 31**).



Εικόνα 31. Η τουμπουλίνη περιέχει σήματα πυρηνικής εξόδου (NES). Εντοπισμός των αμινοζικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε σήματα πυρηνικής εισόδου βάσει του τύπου Ζ-X(1-4)-J-X(2-3)-Z-X-Z, στην ακολουθία της βΙΙ- και βΙV-τουμπουλίνης.

Η exportin-1 εμπλέκεται στην έξοδο GFP-ισομορφών της β-τουμπουλίνης από τον πυρήνα

Η πρωτεΐνη μεταφοράς exportin 1/CRM1, συνδέεται με τα NES και διαμεσολαβεί στην έξοδο πρωτεϊνών από τον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων. Ο μεταβολίτης λεπτομυκίνη B (LMB) συνδεόμενος με την CRM1, αναστέλλει τη σύνδεση της τελευταίας με τα NES και κατά συνέπεια παρεμποδίζει την έξοδο από τον πυρήνα πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο μονοπάτι (Nobuaki, K., 1999). Προκειμένου να διερευνηθεί η εμπλοκή της CRM1 στην πυρηνική κατανομή της β-τουμπουλίνης, κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια pEGFPβII και pEGFPβIV και στη συνέχεια επωάστηκαν με LMB για 3 ώρες στους 37°C. Για να ελέγξουμε τη δράση της LMB χρησιμοποιήσαμε κύτταρα HeLa τα οποία επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο pEGFPERF (Le Gallic et al., 2004) και ακολούθως επωάστηκαν με LMB για 1 ώρα στους 37°C. Οπως φαίνεται στην **εικόνα 32** η LMB αναστέλλει πλήρως την έξοδο του GFP-ERF από τον πυρήνα.



<u>Εικόνα 32.</u> Η λεπτομυκίνη Β αναστέλλει την έξοδο του ERF από τον πυρήνα. Υποκυτταρικός εντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα ERF σε παροδικά επιμολυσμένα κύτταρα HeLa απουσία ή παρουσία λεπτομυκίνης Β (10nM).

Από τον υπολογισμό των λόγων της πυρηνικής προς την κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού καθώς και της μέσης τιμής των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν, προκύπτει μια στατιστικά σημαντική αύξηση της πυρηνικής βΙΙ και βΙV-τουμπουλίνης μετά από την επώαση των κυττάρων με τη λεπτομυκίνη Β (Εικόνα 33). Αν και η πυρηνική συσσώρευση της τουμπουλίνης αυξάνεται παρουσία λεπτομυκίνης Β, φαίνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης παραμένει στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση της με άλλα κυτταρικά συστατικά καθώς και στον ρυθμό εξόδου της πρωτεΐνης από τον πυρήνα.


Εικόνα 33. Η έξοδος της GFP -τουμπουλίνης από τον πυρήνα ρυθμίζεται μερικώς από την exportin-1. Στα ιστογράμματα παρουσιάζονται τα επίπεδα της μέσης τιμής των λόγων πυρηνοπλασματική προς κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού σε HeLa κύτταρα τα οποία εκφράζουν GFP-βΙΙ- και GFP-βΙV-τουμπουλίνη απουσία (μπλε) ή παρουσία (κόκκινο) λεπτομυκίνης B (1-nM) για 3 ώρες.

Το γεγονός ότι η έξοδος της GFP-τουμπουλίνης από τον πυρήνα ρυθμίζεται μερικώς από την exportin-1, σε συνδυασμό με τον εντοπισμό στην πρωτεΐνη πέντε αμινοξικών ακολουθιών οι οποίες αντιστοιχούν σε κλασσικού τύπου σήματα πυρηνικής εισόδου, μας οδήγησε στην περαιτέρω μελέτη της λειτουργικότητας των παραπάνω σημάτων. Προκειμένου να προσδιοριστεί το NES που μεσολαβεί για την έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα, δημιουργήσαμε ένα κλώνο βΙΙ-τουμπουλίνης ο οποίος στερείται της ακολουθίας των αμινοξέων 232-266 (ΔβΙΙ-τουμπουλίνη), τα οποία αντιστοιχούν σε τρία γειτονικά NESs στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1 (Εικόνα 34). Για να ελέγξουμε την επίδραση της απουσίας των τριών σηματοδοτικών αλληλουχιών χρησιμοποιήσαμε κύτταρα HeLa τα οποία επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο pEGFPΔβΙΙ και στη συνέχεια μελετήσαμε την πυρηνική συσσώρευση της τουμπουλίνης μετά από 3 και 24 ώρες έκφρασης.



<u>Εικόνα 34.</u> Η GFP-ΔβΙΙ-τουμπουλίνη περιέχει δύο σήματα πυρηνικής εξόδου (NES).

Από τον υπολογισμό των λόγων της πυρηνικής προς την κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού καθώς και της μέσης τιμής των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν, προκύπτει

μια σημαντική αύξηση της πυρηνικής GFP-ΔβΙΙ-τουμπουλίνης συγκρινόμενη με την GFPβΙΙ-τουμπουλίνη (**Εικόνα 35**). Επίσης, παρατηρήθηκαν μικρότερες διακυμάνσεις (0,8-1,6) στους λόγους πυρηνικής/κυτταροπλασματικής GFP-ΔβΙΙ-τουμπουλίνης σε σχέση με εκείνους που υπολογίστηκαν για την GFP-βΙΙ-τουμπουλίνη (0,19-1,23). Από τα δεδομένα αυτά φαίνεται ότι η απουσία των τριών σημάτων NES επιφέρει συσσώρευση της τουμπουλίνης στον πυρήνα και ως εκ τούτου συμπεραίνεται ότι τα NES 3, 4 και 5 πιθανότατα εμπλέκονται στο μηχανισμό εξόδου της πρωτεΐνης.



<u>Εικόνα 35.</u> Η πυρηνική εντόπιση της GFP-βΙΙ και GFP-ΔβΙΙ τουμπουλίνης. **Α.** Αντιπροσωπευτικοί λόγοι της πυρηνοπλασματικής προς την κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού. Η ένταση φθορισμού μιας περιοχής συγκεκριμένων διαστάσεων (κόκκινος κύκλος) μετρήθηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα μεσοφασικών κυττάρων μετά από 3ώρες έκφρασης. **Β.** Στα ιστογράμματα παρουσιάζονται τα επίπεδα της μέσης τιμής των λόγων πυρηνοπλασματική/κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού σε HeLa κύτταρα τα οποία εκφράζουν GFP-βΙΙ (μπλε) και GFP-ΔβΙΙ-τουμπουλίνη (πράσινο). Οι μετρήσεις έγιναν μετά από 3 και 24ώρες έκφρασης



Η ενδογενής διαλυτή τουμπουλίνη συγκεντρώνεται στον πυρήνα κυττάρων HeLa σε συνθήκες αποπολυμερισμού και παρουσία λεπτομυκίνης B.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της ενδογενούς τουμπουλίνης μελετήθηκε σε συνθήκες αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων προκειμένου να αυξηθεί σημαντικά η ποσότητα των διαλυτών διμερών. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 4 ώρες στους 4°C παρουσία νοκοδαζόλης (επώαση για 1 ώρα με συγκέντρωση 33μM και στη συνέχεια επώαση για 3 ώρες με συγκέντρωση 0.33μM). Για τον εντοπισμό της τουμπουλίνης μετά την παρέλευση των τεσσάρων ωρών, πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με τη χρήση αντισωμάτων εδικών για την α- ή τη β-τουμπουλίνη (**Εικόνα 36**).



Εικόνα 36. Η ενδογενής διαλυτή τουμπουλίνη συσσωρεύεται στον πυρήνα σε συνθήκες αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων. Κύτταρα HeLa επωάστηκαν με νοκοδαζόλη στους 4°C για 4 ώρες, μονιμοποιήθηκαν με 4% F.A και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα (πράσινο) για την α- (πάνω σειρά) ή την β- (κάτω σειρά) τουμπουλίνη. Η χρώση του πυρήνα έγινε με Topro (κόκκινο). Η δεξιά στήλη «merge» δείχνει εικόνες που προήλθαν από τη συγχώνευση των αντίστοιχων εικόνων τουμπουλίνης και Topro.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στις παραπάνω συνθήκες αποπολυμερισμού τα διμερή διαλυτής α,β-τουμπουλίνης συγκεντρώνονται στον πυρήνα των περισσοτέρων κυττάρων (82% των κυττάρων εμφανίζουν έντονη πυρηνική χρώση). Η πυρηνική τουμπουλίνη είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη στο πυρηνόπλασμα ενώ δεν εντοπίζεται στην περιοχή των πυρηνίσκων. Όταν τα κύτταρα επιστρέψουν σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας (θρεπτικό υλικό χωρίς νοκοδαζόλη, 37°C) το φαινόμενο αντιστρέφεται. Τα διαλυτά ετεροδιμερή της

τουμπουλίνης πολυμερίζονται ξανά προς σχηματισμό μικροσωληνίσκων ενώ παράλληλα δεν ανιχνεύεται τουμπουλίνη στον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 37).



Εικόνα 37. Μεταφορά της πυρηνικής τουμπουλίνης στο κυτταρόπλασμα. Εντοπισμός της ενδογενούς τουμπουλίνης σε κύτταρα HeLa τα οποία καλλιεργήθηκαν σε κανονικές συνθήκες για 1 ώρα μετά από επώαση με νοκοδαζόλη στους 4°C.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες η τουμπουλίνη μεταφέρεται στον πυρήνα με παθητική διάχυση μέσω των πυρηνικών πόρων, ενώ εξέρχεται ενεργητικά στο κυτταρόπλασμα. Η είσοδος της τουμπουλίνης στον πυρήνα θα μπορούσε να αποδοθεί σε αύξηση του μεγέθους του καναλιού των πόρων στις δεδομένες συνθήκες, ενώ η συγκέντρωση και η παραμονή της σχετίζεται πιθανότατα με τη σύνδεση της με πυρηνικά συστατικά.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η έξοδος της τουμπουλίνης από τον πυρήνα εξαρτάται από τη CRM1, κύτταρα HeLa επωάστηκαν για 4 ώρες στους 4°C παρουσία νοκοδαζόλης και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες στους 37°C σε θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε νοκοδαζόλη (0.33μM) παρουσία ή απουσία λεπτομυκίνης B (10nM) (Εικόνα 38). Από την παρατήρηση μεγάλου αριθμού κυττάρων υπολογίσαμε ότι η τουμπουλίνη παραμένει στον πυρήνα σημαντικού αριθμού κυττάρων (ποσοστό 40%) στην περίπτωση που η επώαση πραγματοποιείται παρουσία λεπτομυκίνης B. Στην αντίθεση περίπτωση (απουσία λεπτομυκίνης B) δεν υπήρξαν κύτταρα με πυρηνική εντόπιση τουμπουλίνης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η έξοδος της διαλυτής ενδογενούς τουμπουλίνης από τον πυρήνα.



Εικόνα 38. Η έξοδος της ενδογενούς διαλυτής τουμπουλίνης από τον πυρήνα εξαρτάται από την παρουσία λεπτομυκίνης B. Κύτταρα HeLa επωάστηκαν με νοκοδαζόλη για 4 ώρες στους 4°C και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες στους 37° σε θρεπτικό υλικό που περιείχε νοκοδαζόλη (0.33μM) απουσία (-LMB) ή παρουσία (+LMB) λεπτομυκίνης B. Ακολούθησε μονιμοποίηση με 4% F.A και ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για την βτουμπουλίνη (πράσινο). Η χρώση του πυρήνα έγινε με Topro (κόκκινο). Η δεζιά στήλη «merge» δείχνει εικόνες που προήλθαν από τη συγχώνευση των αντιστοίχων εικόνων τουμπουλίνης και Topro.

Προκειμένου να διερευνηθεί το ενδεχόμενο η είσοδος της τουμπουλίνης στον πυρήνα να οφείλεται σε βλάβη του πυρηνικού φακέλου, εξετάστηκε η ακεραιότητα του φακέλου με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας αντισώματα που συνδέονται ειδικά με την λαμίνη B ή με τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 39, κύτταρα HeLa τα οποία επωάστηκαν με νοκοδαζόλη στους 4°C και περιέχουν τουμπουλίνη στον πυρήνα δεν εμφανίζουν ασυνέχεια στην πυρηνική λάμινα (A) ενώ παράλληλα τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων βρίσκονται ομοιόμορφα κατανεμημένα στην πυρηνική περιφέρεια (B). Επομένως, η είσοδος της τουμπουλίνης στον πυρήνα δεν αποδίδεται σε βλάβη την οποία έχει υποστεί ο πυρηνικός φάκελος στις δεδομένες συνθήκες. Εντούτοις, σε μεμονωμένες περιπτώσεις στις οποίες εμφανίστηκαν στην περιφέρεια ελλείμματα στην πυρηνική λάμινα, παρατηρήθηκε ότι η τουμπουλίνη συνεχίζει να παραμένει συγκεντρωμένη στον πυρήνα (Εικόνα 39Γ). Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι η συσσώρευση της τουμπουλίνης στον πυρήνα οφείλεται στην σύνδεση της με συστατικά του πυρήνα. Πειράματα *in vitro*, που παρουσιάζονται στην επόμενη ενότητα αποτελεσμάτων (ενότητα 2) δείχνουν ότι η πρωτεΐνη που διαμεσολαβεί στην σύνδεση της τουμπουλίνης με την χρωματίνη είναι η H3.



B.

Г.





Εικόνα 39. Η ακεραιότητα του πυρηνικού φακέλου διατηρείται σε συνθήκες αποπολυμερισμού. Κύτταρα HeLa επωάστηκαν με νοκοδαζόλη για 4 ώρες στους 4°C. Ακολούθησε μονιμοποίηση με 4% F.A και διπλός ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για την βτουμπουλίνη (κόκκινο) και την λαμίνη B (lam.B, πράσινο) (A),(Γ) ή τους πυρηνικούς πόρους (αυτοαντίσωμα s184, πράσινο) (B). Η χρώση του πυρήνα έγινε με Topro (μπλε).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ενότητας συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Η ενδογενής βΙΙ-τουμπουλίνη εντοπίζεται ανοσοιστοχημικά στο πυρήνα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών
- Ισότυποι της ενδογενούς τουμπουλίνης, που εντοπίζονται ανοσοιστοχημικά τόσο στον πυρήνα (βΙΙ) όσο και στο κυτταρόπλασμα (βΙV), όταν συζευχθούν με GFP και εκφραστούν παροδικά σε κύτταρα HeLa κατανέμονται και στα δυο κυτταρικά διαμερίσματα. Οι δύο ισότυποι διαφέρουν ως προς το εύρος της πυρηνικής εντόπισης ενώ εμφανίζουν παρόμοια δυναμική συμπεριφορά in vivo.
- Η GFP-ΔβΙΙ-τουμπουλίνη εμφανίζει αυξημένη πυρηνική συσσώρευση σε παροδικά επιμολυσμένα κύτταρα HeLa συγκρινόμενη με τις GFP-βΙΙ- και GFP-βΙVτουμπουλίνη.
- Η ενδογενής διαλυτή τουμπουλίνη συσσωρεύεται με παθητική μεταφορά στον πυρήνα κυττάρων HeLa σε συνθήκες αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και χαμηλής θερμοκρασίας. Το φαινόμενο αντιστρέφεται όταν τα κύτταρα επιστρέφουν σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας ενώ δεν αντιστρέφεται πλήρως παρουσία λεπτομυκίνης B, ενός εδραιωμένου αναστολέα της CRM1 που διαμεσολαβεί στην ρυθμιζόμενη μεταφορά έξω από τον πυρήνα μορίων που φέρουν ειδικές αλληλουχίες (NES).

2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της διαλυτής τουμπουλίνης με τον πυρηνικό φάκελο

2.1. Σύνδεση της τουμπουλίνης σε πυρηνικούς φακέλους πτηνών και θηλαστικών

Από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (Kourmouli et al., 2001) έχει βρεθεί ότι η τουμπουλίνη δεσμεύεται σε πυρηνικούς φακέλους οι οποίοι απομονώθηκαν από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας. Προκειμένου να διερευνηθεί αν η τουμπουλίνη συνδέεται σε πρωτεϊνικά συστατικά του φακέλου πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγκατακρίμνησης με ακέραιους πυρηνικούς φακέλους με περιφερική ετεροχρωματίνη από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (TNEPHs) και ηπατοκύτταρα αρουραίου (RNEPHs) καθώς και με πρωτεολυμένους φακέλους μετά από πέψη με τα ένζυμα θρυψίνη και χυμοθρυψίνη (pTNEPHs και pRNEPHs αντίστοιγα). Οι μεμβράνες αυτές οι οποίες παρασκευάζονται σε μορφή κυστιδίων, διασπώνται περαιτέρω με χρήση υπερήχων. Με τη διαδικασία αυτή η πυρηνοπλασματική επιφάνεια εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά των κυστιδίων. Οι πυρηνικοί φάκελοι επωάστηκαν σε ισοτονικές συνθήκες με διαλυτή τουμπουλίνη [(παρουσία (ctb) ή απουσία των MAPs (ptb)] προερχόμενη από εγκέφαλο χοίρου. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και το ίζημα που περιελάμβανε τις μεμβράνες και ότι συγκατακρημνίστηκε μαζί τους, εκπλύθηκε ώστε να απομακρυνθεί το μη ειδικά δεσμευμένο υλικό. Στη συνέχεια αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε χρώση με Coomassie blue ή μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα για την τουμπουλίνη.



<u>Εικόνα 40.</u> Η τουμπουλίνη συνδέεται σε πυρηνικούς φακέλους πτηνών και θηλαστικών. (A) SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Blue. Παρουσιάζεται το ενδιαφέρον τμήμα της πηκτής (B) Ανίχνευση της πρόσδεσης της τουμπουλίνης σε πυρηνικούς φακέλους με ανοσοαποτύπωση

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων (Εικόνα 40) εξάγεται το συμπέρασμα ότι η τουμπουλίνη συνδέεται και στα δύο είδη πυρηνικών φακέλων στις δεδομένες συνθήκες, ενώ αντίθετα δεν δεσμεύεται στις πρωτεολυμένες μεμβράνες. Επομένως, η παρουσία της τουμπουλίνης στο ίζημα οφείλεται στην αλληλεπίδραση της με μια ή περισσότερες πρωτεΐνες των φακέλων και όχι σε μη ειδική κατακρήμνιση λόγω μειωμένης διαλυτότητας.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η τουμπουλίνη η οποία απομονώνεται από κύτταρα ή ιστό είναι ένα μίγμα διαφορετικών ισοτύπων της πρωτεΐνης του οποίου η σύσταση διαφέρει ανάλογα με την πηγή προέλευσης. Επίσης, εκτός από τη σύσταση, διαφέρουν και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των διαφόρων ισοτύπων ανάλογα με το είδος του κυττάρου/ιστού από το οποίο προέρχονται. Προκειμένου να διερευνηθεί αν στον πυρηνικό φάκελο συνδέονται συγκεκριμένοι ισότυποι τουμπουλίνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγκατακρήμνισης πυρηνικών φακέλων με τουμπουλίνη προερχόμενη από εγκέφαλο χοίρου ή από κυτταρόπλασμα κυττάρων HeLa. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε



Εικόνα 41. Οι ισότυποι της β-τουμπουλίνης συνδέονται στον πυρηνικό φάκελο. Πρόσδεση ισοτύπων τουμπουλίνης προερχόμενης από (A) Κύτταρα HeLa (HeLa tb) ή (B) από εγκέφαλο χοίρου (tb) σε πυρηνικούς φακέλους (NEPH) από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας όπως αυτή ανιχνεύεται με ανοσοαποτύπωση με ειδικά αντισώματα για κάθε ισότυπο.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα (Εικόνα 41) υποδεικνύουν ότι όλοι οι ισότυποι τουμπουλίνης έχουν τη δυνατότητα να συνδεθούν στον πυρηνικό φάκελο. Επομένως, η πρόσδεση στο φάκελο συγκεκριμένων ισοτύπων εξαρτάται πιθανότατα από την αφθονία

τους στο μείγμα καθώς και από την ύπαρξη συγκεκριμένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

2.2. Σύνδεση της τουμπουλίνης στον πυρηνικό φάκελο μέσω της ιστόνης Η3

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα συστατικά του πυρηνικού φακέλου τα οποία εμπλέκονται στην παραπάνω αλληλεπίδραση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης μετά από επίστρωση (overlay blot) χρησιμοποιώντας διαλυτή και καθαρή από MAPs τουμπουλίνη από εγκέφαλο χοίρου. Πιο συγκεκριμένα, πυρηνικοί φάκελοι από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας και από ηπατοκύτταρα αρουραίου αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθησε επώαση με διάλυμα τουμπουλίνης συγκέντρωσης 3μg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα επίστρωσης (overlay buffer) το οποίο περιείχε 300mM ή 600mM NaCl και ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα για την τουμπουλίνη.



Εικόνα 42. Η τουμπουλίνη συνδέεται στην ιστόνη Η3. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση με πυρηνικούς φακέλους (NEPH) και διαλυτή τουμπουλίνη από εγκέφαλο χοίρου (tb). Πυρηνικοί φάκελοι από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (TNEPH) και ηπατοκύτταρα αρουραίου (RNEPH) αναλύθηκαν σε SDS-PAGE (αριστερή εικόνα), μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάστηκαν με διάλυμα τουμπουλίνης (3µg/ml) το οποίο περιείχε 300 ή 600mM NaCl (αριστερή εικόνα).

Όπως φαίνεται (Εικόνα 42), η τουμπουλίνη συνδέεται με την ιστόνη H3 και σε μικρότερη έκταση με την ιστόνη H5 όταν η επώαση πραγματοποιείται σε 300mM NaCl. H σύνδεση με την H3 διατηρείται σε συνθήκες αυξημένης ιονικής ισχύος (600mM NaCl), σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση H5-τουμπουλίνης η οποία δεν υφίσταται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση άλατος. Δεδομένου ότι οι ιστόνες είναι βασικές πρωτεΐνες και η τουμπουλίνη περιέχει όξινα κατάλοιπα, η παραπάνω σύνδεση θα μπορούσε να αποδοθεί σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Εντούτοις, η τουμπουλίνη δεν συνδέεται στην H4 η οποία είναι η πιο βασική από τις ιστόνες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η σύνδεση της H3 με την τουμπουλίνη δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την παρουσία φορτίων στις δύο πρωτεΐνες.

2.3. Χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης τουμπουλίνης-Η3

Η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά και με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στην Η3

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η ειδικότητα της παραπάνω σύνδεσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση σε δείγματα τα οποία περιείχαν ισομοριακές ποσότητες νουκλεοσωματικών ιστονών (H3, H2A, H2B, H4) οι οποίες απομονώθηκαν από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας, καθώς και αυξανόμενες ποσότητες των πρωτεϊνών BSA και GST. Η επώαση των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε με διάλυμα τουμπουλίνης συγκέντρωσης 3μg/ml σε συνθήκες αυξημένης ιονικής ισχύος (600mM και 1M NaCl).



Εικόνα 43. Η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά με την ιστόνη H3. Πειράματα επίστρωσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ιστόνες από πυρήνες ερυθροκυττάρων γαλοπούλας (δείγμα 3) και ιστόνες παρουσία αυζανομένων ποσοτήτων BSA και GST (δείγματα 1, 2, 4). Το ηλεκτροφορητικό προφίλ των πρωτεϊνών παρουσιάζεται στο αριστερό τμήμα της εικόνας. Οι μεμβράνες επωάστηκαν με τουμπουλίνη (3μg/ml) σε 600mM NaCl (μεσαίο τμήμα) ή 1M NaCl (δεξιό τμήμα της εικόνας).

Από τα αποτελέσματα (Εικόνα 43) εξάγεται το συμπέρασμα ότι η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά με την ιστόνη H3 στις συγκεκριμένες συνθήκες, ανεξάρτητα από την παρουσία των μεγαλυτέρων ποσοτήτων των BSA και GST.

Για να εξακριβωθεί αν η σύνδεση της τουμπουλίνης στην H3 γίνεται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση σε δείγματα τα οποία περιείχαν ισομοριακές ποσότητες νουκλεοσωματικών ιστονών από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας. Οι μεμβράνες επωάστηκαν με διαλύματα τουμπουλίνης αυξανόμενων συγκεντρώσεων οι οποίες κυμαίνονταν από 0.5 έως 18μg/ml, παρουσία 300mM NaCl. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά στην H3 και όπως προκύπτει από τα αντίστοιχα διαγράμματα, η σύνδεση αυτή εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης και τελικά φτάνει σε κορεσμό (Εικόνα 44).



<u>Εικόνα 44.</u> Η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά και με δοσοεξαρτώμενο τρόπο στην Η3. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση σε νουκλεοσωματικές ιστόνες από ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (input) χρησιμοποιώντας αυζανόμενες συγκεντρώσεις τουμπουλίνης (πάνω) και ποσοτικός προσδιορισμός της πρόσδεσης της τουμπουλίνης (κάτω). Η καμπύλη δείχνει την εξάρτηση της πρόσδεσης της τουμπουλίνης από την συγκέντρωσή της. Η ένταση της χρώσης των ζωνών της ανοσοαποτύπωσης ποσοτικοποιήθηκε με Image Analysis.

Σε προηγούμενες μελέτες μας έχουμε δείξει ότι οι ιστόνες H3 και H4 διαμεσολαβούν στη σύνδεση της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1 με την πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου LBR (Polioudaki et al., 2001) και ότι η παρουσία διαλυτής τουμπουλίνης αναστέλλει τη σύνδεση της HP1β στον πυρηνικό φάκελο (Kourmouli et al., 2001). Ως εκ τούτου, οι μελέτες μας επικεντρώθηκαν στον περαιτέρω χαρακτηρισμό της σύνδεσης της τουμπουλίνης με τις ιστόνες H3 και H4. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση σε δείγματα τα οποία περιείχαν ισομοριακές ποσότητες

ανασυνδυασμένων (μη-τροποποιημένων μετα-μεταφραστικά) ιστονών H3 και H4. Οι μεμβράνες επωάστηκαν με διαλύματα τουμπουλίνης συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από 0.5 έως 24μg/ml παρουσία 300mM ή 600mM NaCl.

Τα αποτελέσματα δείχνουν (Εικόνα 45) ότι η σύνδεση Η3-τουμπουλίνης δεν εξαρτάται από την ύπαρξη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στο μόριο της ιστόνης και ότι η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά και με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο με την ιστόνη H3 παρουσία 300mM ή 600mM NaCl. Αν και η τουμπουλίνη, σε υψηλές συγκεντρώσεις και σχετικά χαμηλή ιονική ισχύ (300mM NaCl), συνδέεται ασθενώς στην H4, η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση εξαφανίζεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση άλατος (600mM NaCl).



Εικόνα 45. Η τουμπουλίνη συνδέεται με ειδικό και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στην ανασυνδυασμένη ιστόνη H3. Πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση με ανασυνδυασμένες ιστόνες rH3 και rH4 (input) και αυξανόμενες συγκεντρώσεις τουμπουλίνης σε διαφορετικές συνθήκες ιονικής ισχύος (επάνω) και τα αντίστοιχα διαγράμματα πρόσδεσης της τουμπουλίνης σε συνάρτηση με την συγκέντρωσή της (κάτω). Η ένταση της χρώσης των ζωνών της ανοσοαποτύπωσης ποσοτικοποιήθηκε με Image Analysis.

Η τουμπουλίνη συνδέεται στην ουρά της Η3 και ανεξάρτητα από την ύπαρξη φορτίων και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων

Προκειμένου να προσδιοριστεί η περιοχή της H3 (κεντρικό τμήμα ή ουρά) στην οποία προσδένεται η τουμπουλίνη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επίστρωσης

χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ακέραιη ή μερικώς πρωτεολυμένη ανασυνδυασμένη ιστόνη H3. Αρχικά, δείγματα ακέραιας ιστόνης καθώς και ιστόνης η οποία επωάστηκε με σφαιρίδια θρυψίνης, αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με διάλυμα τουμπουλίνης συγκέντρωσης 3µg/ml παρουσία 300mM NaCl και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για τουμπουλίνη. Από τα αποτελέσματα (Εικόνα 46) φαίνεται ότι στις δεδομένες συνθήκες, η τουμπουλίνη δεν συνδέεται αποτελεσματικά με το κεντρικό τμήμα της H3 αλλά αντίθετα αλληλεπιδρά ισχυρά με την ακέραιη H3 και με πρωτεολυτικά τμήματα τα οποία περιλαμβάνουν το κεντρικό τμήμα και μέρος της ουράς της πρωτεΐνης.



Εικόνα 46. Η τουμπουλίνη συνδέεται στην περιοχή της ουράς της ιστόνης H3. Δείγματα ανασυνδυασμένης ιστόνης H3 (rH3) και μερικώς πρωτεολυμένης με σφαιρίδια τρυψίνης ανασυνδυασμένης ιστόνης H3 (dig.rH3) αναλύθηκαν σε SDS-PAGE, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάστηκαν με τουμπουλίνη 3μg/ml σε 300mM NaCl (overlay blot). Ο αστερίσκος υποδηλώνει το κεντρικό τμήμα της H3

Για να προσδιοριστεί αν η παρουσία στην Η3 συγκεκριμένων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων καθώς και επιπλέον αρνητικών φορτίων λόγω υπερφωσφορυλίωσης και υπερακετυλίωσης επιδρά στη σύνδεσή της με την τουμπουλίνη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επίστρωσης χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη και εμπορικά διαθέσιμη τροποποιημένη H3 καθώς και ιστόνες από κύτταρα HeLa, τα οποία επωάστηκαν με ταξόλη και τριχοστατίνη-Α (TSA) έτσι ώστε να αυξηθεί η μιτωτική φωσφορυλίωση και η ακετυλίωση των ιστονών, αντίστοιχα. Η επώαση της μεμβράνης έγινε με διάλυμα τουμπουλίνης συγκέντρωσης 3µg/ml παρουσία 300mM NaCl και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τουμπουλίνη. Τα επίπεδα της ακετυλίωσης ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα για την ακετυλιωμένη Η3. Τα αποτελέσματα δείχνουν (Εικόνα 47) ότι η παρουσία τροποποιήσεων και επιπλέον αρνητικών φορτίων στην Η3, λόγω της υπερφωσφορυλίωσης ή της υπερακετυλίωσής της επηρεάζουν αλλά δεν αναστέλλουν την αλληλεπίδρασή της με την τουμπουλίνη, υποδεικνύοντας ότι η σύνδεση τουμπουλίνης-H3 εξαρτάται μερικώς από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.



Εικόνα 47. Η τουμπουλίνη συνδέεται στην ιστόνη Η3 ανεξάρτητα από την ύπαρξη αρνητικών φορτίων και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. (Α) Ηλεκτροφορητικό προφίλ ανασυνδυασμένης ιστόνης Η3 (1), τροποποιημένης εμπορικά διαθέσιμης ιστόνης Η3 (2), ιστονών από κύτταρα HeLa (3), υπερφωσφορυλιωμένων (4) και υπερακετυλιωμένων (5) ιστονών από κύτταρα HeLa (B) Πείραμα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση με τουμπουλίνη (3μg/ml τουμπουλίνη, 300mM NaCl) (Γ) Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για ακετυλιωμένη Η3.

Η Η3 συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην α-τουμπουλίνη και ανεξάρτητα της ύπαρζης αρνητικών φορτίων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η τουμπουλίνη αποτελείται από δύο παρόμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες την α- και τη β-τουμπουλίνη. Προκειμένου να εξεταστεί αν η H3 συνδέεται με την ίδια συγγένεια στις δύο υπομονάδες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση σε δείγματα τουμπουλίνης, τα οποία αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης έτσι ώστε να διαχωριστούν οι δύο υπομονάδες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθησε επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης H3 (6,12,18µg/ml) παρουσία 300 ή 600mM NaCl και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την ιστόνη.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 48 δείχνουν ότι η H3 συνδέεται και στις δυο υπομονάδες, αν και με μεγαλύτερη συγγένεια στην α-τουμπουλίνη. Η προτίμηση της H3 για την α-υπομονάδα φαίνεται ξεκάθαρα από τα πειράματα σύνδεσης που

πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες αυξημένης ιονικής ισχύος (600mM NaCl), όπου η H3 συνδέεται περίπου οκτώ φορές περισσότερο στην α-τουμπουλίνη σε σχέση με την βτουμπουλίνη.



Εικόνα 48. Η ιστόνη Η3 συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην α-τουμπουλίνη. Ίσες ποσότητες α- και β-τουμπουλίνης (input) μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης Η3 σε διαφορετικές συνθήκες ιονικής ισχύος. Η ένταση της χρώσης των ζωνών της ανοσοαποτύπωσης ποσοτικοποιήθηκε με Image Analysis.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η παρουσία αλυσίδων πολυγλουταμικού οξέος στο καρβοξυτελικό άκρο των δύο υπομονάδων της τουμπουλίνης επηρεάζει τη σύνδεση με την H3, έγιναν πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ακέραιη και μερικώς πρωτεολυμένη τουμπουλίνη. Η πρωτεΐνη επωάστηκε με το ένζυμο subtilisin έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι αλυσίδες πολυγλουταμικού από την α- και β-τουμπουλίνη. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάστηκαν με H3 (6μg/ml) παρουσία 300mM NaCl. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με ειδικό αντίσωμα για την ιστόνη.





Εικόνα 49. Η ιστόνη Η3 συνδέεται στην τουμπουλίνη ανεξάρτητα από την παρουσία αλυσίδων πολυγλουταμικού στο καρβοζυτελικό άκρο. (Α) Ηλεκτροφορητικό προφίλ των υπομονάδων της α- και β-τουμπουλίνης κατά τη διάρκεια της πέψης με το ένζυμο substilisin σε θερμοκρασία 30°C (1) ή 37°C (2) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Στην εικόνα φαίνονται οι ακέραιες υπομονάδες (int.) και οι μερικώς πρωτεολυμένες (dig.). (**B**) Ηλεκτροφορητικό προφίλ (SDS-PAGE) τριών διαφορετικών ποσοτήτων ακέραιων (tb) και μερικώς πρωτεολυμένων (dig. tb) υπομονάδων α- και β-τουμπουλίνης οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης με επίστρωση (overlay H3). Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάστηκαν με ανασυνδυασμένη H3 (6μg/ml σε 300mM NaCl).

Από τα αποτελέσματα (Εικόνα 49) φαίνεται ότι η H3 συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην α-τουμπουλίνη, όπως και ότι η απομάκρυνση των αλυσίδων πολυγλουταμικού οξέος δεν καταργεί τη συγκεκριμένη σύνδεση. Επομένως η ανιονική, καρβοξυτελική περιοχή της τουμπουλίνης πιθανότατα δεν αποτελεί περιοχή δέσμευσης της H3.

2.4. Ρόλος της διαλυτής τουμπουλίνης στη σύνδεση της ετεροχρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο

Από πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας (Polioudaki et al., 2001) έχει βρεθεί ότι οι ιστόνες H3 και H4 διασυνδέουν την ετεροχρωματινική πρωτεΐνη HP1 με την διαμεμβρανική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου LBR, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός τετραμερούς συμπλόκου. Προκειμένου να διερευνηθεί αν η διαλυτή τουμπουλίνη επηρεάζει το σχηματισμό του παραπάνω συμπλόκου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγκατακρήμνισης. Πιο συγκεκριμένα, οι συζευγμένες με GST πρωτεΐνες HP1a, HP1β, HP1γ και NtLBR (υδατοδιαλυτό αμινοτελικό κομμάτι το οποίο αντιστοιχεί σε ολόκληρη την πυρηνοπλασματική περιοχή του LBR), δεσμεύτηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και επωάστηκαν με ανασυνδυασμένη ιστόνη H3, απουσία ή παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων διαλυτής τουμπουλίνης προερχόμενης από εγκέφαλο χοίρου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 50.



Εικόνα 50. Η τουμπουλίνη αναστέλλει τη σύνδεση της ιστόνης Η3 στις πρωτεΐνες ΗΡ1 και στον LBR (A) 15μg ανασυνδυασμένης ιστόνης Η3 (rH3) επωάστηκαν με HP1a-GST (HP1a), HP1β-GST (HP1β) και HP1γ-GST (HP1γ) παρουσία 5μg (tb5μg) ή 15μg (tb15μg) διαλυτής τουμπουλίνης σε 500mM NaCl. Οι πρωτεΐνες που συγκατακρημνίστηκαν με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης αναλύθηκαν σε SDS-PAGE (B) Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών που συγκατακρημνίστηκαν με τον NtLBR-GST (NtLBR) μετά από επώαση με 15μg ανασυνδυασμένης ιστόνης Η3 (rH3) παρουσία αυζανομένων ποσοτήτων τουμπουλίνης (5-100μg) σε 300mM NaCl.

Οπως φαίνεται στο πλαίσιο **A** της **εικόνας 50**, η H3 συνδέεται με την ίδια συγγένεια και στις τρεις ισομορφές της HP1. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση αναστέλλεται σε μεγάλο

βαθμό, όταν η επώαση πραγματοποιείται παρουσία αυξανομένων ποσοτήτων διαλυτής τουμπουλίνης. Παρόμοια αναστολή παρατηρήθηκε και στη σύνδεση της H3 με τον LBR παρουσία τουμπουλίνης (Εικόνα 50B). Επομένως, η διαλυτή τουμπουλίνη αναστέλλει με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τη σύνδεση της HP1 και του LBR με την ιστόνη H3.

Από την εικόνα 50Α φαίνεται ότι παράλληλα με την H3 συγκατακρημνίστηκε μικρή ποσότητα τουμπουλίνης. Δεδομένου ότι, η τουμπουλίνη δεν συνδέεται με τις πρωτεΐνες HP1 και GST και δεν καθιζάνει λόγω μειωμένης διαλυτότητας στις δεδομένες συνθήκες (Εικόνα 51), το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην σύνδεση της τουμπουλίνης με την H3.



<u>Εικόνα 51.</u> Η τουμπουλίνη δεν συνδέεται με τις πρωτεΐνες HP1 και GST. 15μg διαλυτής τουμπουλίνης επωάστηκαν με τις πρωτεΐνες HP1β-GST και GST δεσμευμένες σε σφαιρίδια γλουταθειόνης παρουσία 500mM NaCl. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE.

Η επίδραση της τουμπουλίνης στο σχηματισμό του τετραμερούς συμπλόκου (HP1-H3/H4-LBR), διερευνήθηκε με πειράματα συγκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας τις πρωτεΐνες GST-NtLBR, His-HP1β και τις ανασυνδυασμένες ιστόνες H3 και H4, παρουσία ή απουσία τουμπουλίνης (**Εικόνα 52**). Η επώαση του μονιμοποιημένου σε σφαιρίδια γλουταθειόνης NtLBR με τις ιστόνες H3/H4 είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου NtLBR-H3/H4. Στη συνέχεια, μετά την προσθήκη της His-HP1β δημιουργήθηκε το τετραμερές σύμπλοκο HP1-H3/H4-NtLBR. Στην περίπτωση που το σύμπλοκο NtLBR-H3/H4 είχε προεπωαστεί με τουμπουλίνη πριν από την προσθήκη της His-HP1β, παρατηρήθηκε αναστολή της σύνδεσης της τελευταίας και κατά συνέπεια μη σχηματισμός του συμπλόκου HP1-H3/H4-NtLBR.



Εικόνα 52. Η τουμπουλίνη αναστέλλει τη σύνδεση του LBR και της ΗΡ1β με τις ιστόνες Η3/Η4. Ανάλυση σε SDS-PAGE των πρωτεϊνών που συγκατακρημνίζονται με τον NtLBR-GST (NtLBR). Σφαιρίδια γλουταθειόνης-NtLBR επωάστηκαν με 30μg ιστονών H3/H4 παρουσία 300mM NaCl. Το σύμπλοκο NtLBR-H3/H4 επωάστηκε με 45μg His-HP1β (NtLBR-H3/H4+ HisHP1β) ή με 150 μg τουμπουλίνης και ακολούθως με 45μg His-HP1β (NtLBR-H3/H4+tb+ HisHP1β).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ενότητας συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Η τουμπουλίνη συνδέεται σε πυρηνικούς φακέλους πτηνών και θηλαστικών μέσω της ιστόνης Η3. Η σύνδεση αυτή είναι ειδική (απουσία σύνδεσης με άλλες ιστόνες και πρωτεΐνες του φακέλου) και δοσοεξαρτώμενη. Η τουμπουλίνη συνδέεται στην ουρά της ιστόνης Η3 και ανεξάρτητα από την ύπαρξη επιπλέον αρνητικών φορτίων και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ενώ η Η3 συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην α-τουμπουλίνη και ανεξάρτητα της ύπαρξης αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων
- Η τουμπουλίνη αναστέλλει τη σύνδεση της H3 στις τρεις ισομορφές της HP1 και στον LBR καθώς και το σχηματισμό του συμπλόκου HP1-H3/H4-NtLBR.

Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να έχουν μεγάλη σημασία *in vivo* κατά την διαδικασία της διάσπασης και επανασυγρότησης του πυρηνικού φακέλου στη μίτωση. Συγκεκριμένα, η διαλυτή τουμπουλίνη της οποίας η συγκέντρωση αυξάνεται στην πρόφαση/προμετάφαση θα μπορούσε πιθανά να ρυθμίζει την αποσύνδεση της χρωματίνης από τον φάκελο και την συμπύκνωσή της, ενώ η μείωση της συγκέντρωσής της στην τελόφαση να επιτρέπει την σύνδεση κυστιδίων του πυρηνικού φακέλου στην χρωματίνη και τη δημιουργία του πυρηνικού φακέλου.

Συγκριτική μελέτη της δράσης πακλιταξέλης και συνθετικών παραγώγων της σε κύτταρα θηλαστικών

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά ανάλογα ταξόλης τα οποία περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα ταξόλης συνδεδεμένα σε ένα συνθετικό φορέα. Ο φορέας, ο οποίος σχηματίζεται από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες –Lys-Aib-Cys-, χρησιμοποιήθηκε σκόπιμα επειδή παρέχει την ειδική χημεία που απαιτείται για την σύνδεση πολλαπλών μορίων ταξόλης μέσω θειοαιθερικών δεσμών και αυξάνει την διαλυτότητα στο νερό. Ο έλεγχος της βιολογικής δραστικότητας της ταξόλης και συνθετικών παραγώγων της, περιλαμβάνει εκτίμηση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μελέτη της επίδρασης στον κυτταρικό κύκλο αλλά και στη μορφολογία του πυρήνα, καθώς και εκτίμηση των βλαβών που έχουν επέλθει στην αρχιτεκτονική του πυρηνικού φακέλου.

3.1. Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από την επίδραση ταξόλης και ταξόλης συνδεδεμένης με συνθετικά πεπτίδια

Η μελέτη της επίδρασης της ταξόλης και των παραγώγων της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανθρώπινων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa), προστάτη (DU-145) και μαστού (MCF-7) έγινε με χρωματομετρική μέθοδο με τη χρήση του αντιδραστηρίου MTT. Για κάθε κυτταρική σειρά υπολογίσθηκε το IC₅₀ (συγκέντρωση φαρμάκου στην οποία αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε ποσοστό 50%) στις δεδομένες συνθήκες (Πίνακας 8).

<u>Πίνακας</u>	<u>8.</u> Oı	τιμές Ι	C 50 που	υπολογία	θηκαν γ	νια την	ταξόλη	ι και	τα παράγα	υγα Α	Ac-[Lys-A	ib-
Cys(CH2	<i>CO-2'</i> -	-taxol)	$n-NH_2$	τα οποία	φέρουν	συνδεά	δεμένα	δυο	(dimeric),	τρία	(trimeric,) ή
τέσσερα (tetra) _l	μόρια τ	αξόλης.									

	Ταξόλη	Dimeric	Trimeric	Tetra
Hela	1.29nM	1.31nM	1.70nM	0.96nM
DU	2.67nM	2.85nM	3.88nM	1.30nM
MCF-7	0.90nM	0.62nM	3.00nM	0.64nM

Όπως προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων όλα τα ανάλογα εμφανίζουν IC₅₀ της τάξεως των nM. Εντούτοις, το ανάλογο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄ -NH₂ αναστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων

συγκρινόμενο με τα άλλα συνθετικά παράγωγα και την ταξόλη. Στην εικόνα 53 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της ταξόλης και του παραγώγου tetra στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό HeLa και DU κυττάρων εκφραζόμενα ως ποσοστό ζωντανών κυττάρων συγκρινόμενα με καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες χωρίς την επίδραση φαρμάκων.



Εικόνα 53. Βιωσιμότητα κυττάρων Hela και DU τα οποία επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις ταξόλης και του συνθετικού αναλόγου της tetra. Παρουσιάζονται τα ποσοστά των ζωντανών κυττάρων HeLa και DU σε καλλιέργειες που επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ταξόλης και tetra παραγώγου για 24 ώρες και στη συνέχεια σε κανονικές συνθήκες απουσία φαρμάκων για 72 ώρες. «initial», είναι ο αρχικός (πριν την επώαση με τα φάρμακα) πληθυσμός ζωντανών κυττάρων κυττάρων και ασοστά των ζωντανών κυττάρων σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν απουσία φαρμάκων και ορίζεται ως το 100% των ζωντανών κυττάρων.

Η ανασταλτική δράση του αναλόγου στον πολλαπλασιασμό κυττάρων HeLa και DU είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ταξόλη, ειδικά στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (**Εικόνα 53**). Πιο συγκεκριμένα, το ανάλογο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂ είναι περισσότερο δραστικό από την ταξόλη όταν χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 1-10nM σε DU κύτταρα σε αντίθεση με τα HeLa κύτταρα όπου η δραστικότητα είναι μεγαλύτερη μόνο στις συγκεντρώσεις 1nM και 3nM. Επίσης, στα κύτταρα του προστάτη το παράγωγο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂ εμφανίζει κυτταροτοξική δράση (ποσοστό ζωντανών κυττάρων μικρότερο συγκριτικά με το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στον αρχικό πληθυσμό) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (10nM) σε σχέση με την ταξόλη (20nM).

3.2. Μελέτη της επίδρασης ταξόλης και ταξόλης συνδεδεμένης με συνθετικά πεπτίδια στον κυτταρικό κύκλο

Προκειμένου να εξηγήσουμε την αυξημένη ανασταλτική δράση του παραγώγου Tetra στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μελετήσαμε αρχικά με κυτταρομετρία ροής την επίδραση της ταξόλης και του παραγώγου της στον κυτταρικό κύκλο κυττάρων HeLa και DU. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τις ίδιες συγκεντρώσεις (3nM και 10nM) ταξόλης και Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂. Μετά την παρέλευση των 24 ωρών τα φάρμακα απομακρύνθηκαν και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 επιπλέον ώρες. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 9).

<u>Πίνακας 9.</u> Ποσοστά κυττάρων HeLa και DU στην G2/M φάση μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις (3nM, 10nM) ταξόλης και παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂ (Tetra) για 24 ώρες (24h) και καλλιέργεια σε κανονικές συνθήκες για επιπλέον 24 ώρες (24h+24h). Το «control» αναφέρεται σε κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε κανονικές συνθήκες απουσία φαρμάκων.

Φάρμακο/Συγκέντρωση	Hela		DU	
	24h	24h+24h	24h	24h+24h
Ταξόλη/3nΜ	11	12	26	23
Ταξόλη/10nΜ	41	23	48	26
Tetra/3nM	19	20	30	32
Tetra/10nM	52	47	60	54
Control	20	19	26	24

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται (Πίνακας 9), ότι επώαση των κυττάρων παράγωγο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂ (Tetra) με το σε συγκέντρωση 10nM για 24 ώρες προκαλεί ακινητοποίηση μεγαλύτερου ποσοστού κυττάρων στην G2/M φάση και στις δύο κυτταρικές σειρές απ' ότι η ταξόλη κάτω από τις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης και χρόνου επώασης. Επιπρόσθετα, μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων και καλλιέργεια των κυττάρων για 24 ώρες (24h+24h), κύτταρα τα οποία είγαν επωαστεί με το ανάλογο παρέμειναν στην G2/M φάση σε αντίθεση με εκείνα που είχαν επωαστεί με ταξόλη, τα οποία ολοκλήρωσαν τον κύκλο και ως εκ τούτου εμφανίζουν παρόμοια ποσοστά κυττάρων στην G2/M με τα δείγματα ελέγχου (control, κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα απουσία φαρμάκων). Η επώαση και των δύο κυτταρικών σειρών με ταξόλη ή το παράγωγο Tetra, σε συγκέντρωση 3nM δεν προκαλεί σταμάτημα των κυττάρων στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου. Ως εκ τούτου η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ταξόλης και του παραγώγου της δεν μπορεί να αποδωθεί σε αλλαγές που επέργονται στη συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου.

3.3. Μορφομετρική ανάλυση πυρήνων και εκτίμηση βλαβών του πυρηνικού φακέλου κυττάρων HeLa και DU μετά τη δράση ταζόλης και ταξόλης συνδεδεμένης σε συνθετικά πεπτίδια

Έχει παρατηρηθεί ότι πολλά από τα κύτταρα στα οποία έχει επιδράσει ταξόλη αναπτύσσουν πυρήνες ανώμαλου σχήματος (λοβωτοί και πολυπύρηνοι), οι οποίοι παρουσιάζουν ελλείματα στην πυρηνική λάμινα και ανομοιόμορφη κατανομή των πυρηνικών πόρων (Michalakis et al., 2005; Theodoropoulos et al., 1999). Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό η μορφολογία του πυρήνα και η ακεραιότητα του πυρηνικού φακέλου κυττάρων HeLa και DU τα οποία επωάσθηκαν με 3nM ταξόλης ή Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂ για 24 ώρες και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία φαρμάκων για 24 ώρες. Στις **Εικόνες 54 και 55** παρουσιάζονται τυπικές φωτογραφίες κυττάρων μετά από χρώση της πυρηνικής λάμινας και των μικροσωληνίσκων και παρατήρηση των δειγμάτων στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

Η παρατήρηση σημαντικού αριθμού κυττάρων έδειξε ότι ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων HeLa και DU εμφανίζεται με πυρήνες ανωμάλου σχήματος οι οποίοι συχνά παρουσιάζουν ασυνέχεια στην πυρηνική περιφέρεια. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος πιθανότατα προκύπτει από ατέλειες στην κυτταρική διαίρεση, όπως η ανώμαλη κυτοκίνηση

και η έκτοπη εντόπιση των συστατικών του πυρηνικού φακέλου (Βλέπε Εικόνες 54Α και 55Α κάτω σειρά).

Στη συνέχεια εξετάσθηκε μεγάλος αριθμός κυττάρων (500 κύτταρα) HeLa και DU τα οποία επωάσθηκαν με 3nM ταξόλης ή Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂ για 24 ώρες και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό απουσία φαρμάκων για 24 ώρες και καταμετρήθηκαν τα μεσοφασικά κύτταρα με πυρήνες κανονικού σχήματος, λοβωτού σχήματος καθώς και κύτταρα με πολλαπλούς πυρήνες. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστά του κάθε φαινοτύπου σε σχέση με το σύνολο των κυττάρων που μετρήθηκαν και παρουσιάζονται στον **πίνακα 10**.

<u>Πίνακας 10.</u> Μορφομετρική ανάλυση πυρήνων κυττάρων HeLa και DU μετά από επώαση με 3nM ταξόλης και παραγώγου tetra για 24 ώρες και καλλιέργεια σε κανονικές συνθήκες για επιπλέον 24 ώρες.

	Ποσοστά κυττάρων με συγκεκριμένο φαινότυπο					
Φάρμακο/Κυτταρική σειρά	Φυσιολογικά	Λοβωτά	Πολυπύρηνα			
Ταξόλη/Hela	23	63	14			
Tetra/Hela	17	53	30			
Ταξόλη/DU	14	81	5			
Tetra/DU	6	68	26			

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν, ότι η έκταση των βλαβών που προκύπτουν από τη δράση του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂ στη μορφολογία του πυρήνα είναι μεγαλύτερη συγκρινόμενη με αυτή της ταξόλης και στις δύο κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα, ενώ η πλειοψηφία των κυττάρων και στις δύο κυτταρικές σειρές εμφανίζεται με πυρήνες ανωμάλου σχήματος μετά από επώαση με ταξόλη ή το συνθετικό παράγωγο της, το ποσοστό των πολυπύρηνων κυττάρων και στις δύο κυτταρικές σειρές είναι μεγαλύτερο στην περίπτωση του αναλόγου της ταξόλης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ενότητας δείχνουν ότι το συνθετικό ανάλογο της ταξόλης εμφανίζει αυξημένη δραστικότητα όσον αφορά στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού διαφορετικών καρκινικών σειρών σε σχέση με την ταξόλη, η οποία πιθανότατα οφείλεται στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου σε συγκεκριμένη φάση (G2/M) καθώς και στην αύξηση του αριθμού των πολυπύρηνων κυττάρων.



Εικόνα 54. Επίδραση της ταξόλης και του συνθετικού αναλόγου tetra στη μορφολογία του πυρήνα και στην ακεραιότητα του πυρηνικού φακέλου κυττάρων HeLa. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες κυττάρων HeLa τα οποία επωάστηκαν με 3nM ταξόλης (A) ή παραγώγου tetra (B) για 24 ώρες και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε κανονικές συνθήκες για 24 ώρες. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% F.A και ακολούθησε διπλός ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για τη λαμίνη B (lamin B, πράσινο) και την β-τουμπουλίνη (tubulin, κόκκινο). Η χρώση του πυρήνα έγινε με Topro (μπλε).



Εικόνα 55. Επίδραση της ταξόλης και του συνθετικού αναλόγου tetra στη μορφολογία του πυρήνα και στην ακεραιότητα του πυρηνικού φακέλου κυττάρων DU. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες κυττάρων DU τα οποία επωάστηκαν με 3nM ταξόλης (A) ή παραγώγου tetra (B) για 24 ώρες και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε κανονικές συνθήκες για 24 ώρες. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% F.A και ακολούθησε διπλός ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για τη λαμίνη B (lamin B, πράσινο) και την β-τουμπουλίνη (tubulin, κόκκινο). Η χρώση του πυρήνα έγινε με Topro (μπλε).



Βιβλιογραφικά δεδομένα της τελευταίας δεκαετίας υποστηρίζουν επαρκώς την άποψη ότι πρωτεΐνες οι οποίες θεωρούνται αποκλειστικά κυτταροπλασματικές, όπως η ακτίνη και οι πρωτεΐνες των πλακών εστιακής πρόσφυσης, εντοπίζονται και στον πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων. Η ακτίνη βρίσκεται σε δυναμική ισσοροπία μεταξύ της πολυμερισμένης (filamentous actin) και της μονομερούς μορφής (globular actin) και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Εντούτοις, από πρόσφατες μελέτες έχει τεκμηριωθεί ο εντοπισμός και η δράση στον πυρήνα της ακτίνης καθώς και πρωτεϊνών που σχετίζονται με αυτή, όπως η μυοσίνη και οι Arp's (Gonsior et al., 1999; Pederson and Aebi, 2002; Pederson and Aebi, 2005). Οι πρωτεΐνες των πλακών εστιακής πρόσφυσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγκυροβόληση των κυτταρικών υποστρωμάτων, στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ιντεγκρινών και στην δυναμική ισσοροπία της ακτίνης (Zamir and Geiger, 2001). Τα μέλη της οικογένειας αυτής, τα οποία περιέχουν σήματα πυρηνικής εισόδου ή εξόδου και εντοπίζονται στον πυρήνα παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Protein	Physiological stimulus	Cytoplasmic accumulation	Nuclear accumulation	LeptomycinB nuclear accumulation
Zyxin				+
-	Vaccinia virus	_	+	
	Papillomavirus, HPV 6E6 protein	-	+	
	Mechanical	-	+	
	Mechanical	+	-	
	Atrial natriuretic peptide	-	+	
LPP				+
TRIP6				+
Paxillin				+
	Cell spreading	+	-	
Hic-5	Oxidative stress	-	+	+
CRP2	Differentiation	+	-	
FHL2				+
	Rho activation	-	+	
FHL3	Fibronectin adhesion	+	-	+
ICAP-1α	Fibronectin adhesion	-	+	
c-Abl				+
	Fibronectin adhesion	+	-	
	DNA damage	-	+	
Bcr-Abl				+

<u>Πίνακας 11.</u> Υποκυτταρική εντόπιση πρωτεϊνών των πλακών εστιακής πρόσφυσης (Zamir and Geiger, 2001)

Η τουμπουλίνη, η οποία αποτελεί το βασικό συστατικό των μικροσωληνίσκων, έχει επίσης εντοπιστεί στο μεσοφασικό πυρήνα κυττάρων θηλαστικών. Πιο συγκεκριμένα, διάφορες μελέτες, χρησιμοποιώντας έμμεσο ανοσοφθορισμό με ειδικά αντισώματα για τους ισοτύπους της β-τουμπουλίνης, έχουν δείξει την ύπαρξη τουμπουλίνης στον πυρήνα

μεσοφασικών κυττάρων θηλαστικών (Goo et al., 2004; Walss-Bass et al., 2001; Walss-Bass et al., 2002; Walss et al., 1999; Xu and Luduena, 2002; Yeh et al., 2004). Ειδικότερα, αποτελέσματα της ομάδας του R. Luduena υποστηρίζουν ότι η βΙΙ-τουμπουλίνη είναι η κύρια πυρηνική ισομορφή και ότι οι ισότυποι βΙ, βΙΙΙ και βΙV εντοπίζονται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα. Το γεγονός ότι συγκεκριμένες ισομορφές εντοπίζονται σε συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα θα μπορούσε να αποδοθεί στις δεδομένες συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας, όπως το μέσο μονιμοποίησης των κυττάρρων και η ειδικότητα των αντισωμάτων για συγκεκριμένους επιτόπους. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την περιγραφή ενός μονοκλωνικού αντισώματος για την ακτίνη, το οποίο αναγνωρίζει διαφορετικούς επιτόπους ανάλογα με το μέσο μονιμοποίησης. Το συγκεκριμένο αντίσωμα αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη διαμόρφωση της ακτίνης η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα αλλά όχι στο κυτταρόπλασμα, όταν η μονιμοποίηση των κυττάρων πραγματοποιείται με φορμαλδεΰδη. Αντίθετα, όταν η μονιμοποίηση πραγματοποιείται με μεθανόλη, ο επίτοπος του αντισώματος εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλσμα (Gonsior et al., 1999).

Ως εκ τούτου, μελετήσαμε αρχικά με ανοσοφθορισμό την υποκυτταρική εντόπιση της ενδογενούς β- και βΙΙ-τουμπουλίνης σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (HeLa, DU, Ishikawa) χρησιμοποιώντας διάφορα μέσα μονιμοποίησης (4% F.A, 100% MeOH, 100% EtOH) των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η ισομορφή βΙΙ εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων HeLa και Ishikawa ανεξάρτητα από το μέσο μονιμοποίησης. Στα κύτταρα DU η τουμπουλίνη ανιχνεύεται στον πυρήνα μετά από μονιμοποίηση με 4% F.A. Η ενδογενής β-τουμπουλίνη εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των παραπάνω κυτταρικών σειρών και ανεξάρτητα από το μέσο μονιμοποίησης. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συμφωνούν με τα ήδη υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν την βΙΙ-τουμπουλίνη ως την κύρια πυρηνική ισομορφή.

Προκειμένου να μελετηθεί η κυτταρική εντόπιση της τουμπουλίνης με μια επιπλέον τεχνική, πραγματοποιήσαμε πειράματα παροδικής επιμόλυνσης σε κύτταρα HeLa με τους ισοτύπους της β-τουμπουλίνης (βΙΙ και βΙV) οι οποίοι έχουν συζευχθεί με την πρωτεΐνη GFP. Η GFP-τουμπουλίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες για την παροδική ή μόνιμη επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (θηλαστικά, φυτά, σκουλίκι, αμοιβάδα, μύκητες) (Carminati and Stearns, 1997; Kimble et al., 1990; Ovechkina et al., 2003; Salaycik et al., 2005; Schwarzerova et al., 2006; Strome et al., 2001). Με εξαίρεση μια μελέτη στο *C. elegans* (Strome et al., 2001), όπου εκφράστηκε GFP β-τουμπουλίνη σε έμβρυα, σε όλες τις υπόλοιπες χρησιμοποιήθηκαν ισότυποι α-τουμπουλίνης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι και οι δύο ισότυποι της βτουμπουλίνης συγκεντρώνονται στον πυρήνα κυττάρων HeLa χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην εντόπιση τους σε μεσοφασικά και μιτωτικά κύτταρα καθώς και στη δυναμική τους συμπεριφορά. Αν και η παραμονή της βΙΙ-τουμπουλίνης στον πυρήνα μετά την παρέλευση 48 και 72 ωρών έκφρασης είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη της βΙV, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα μας δεν μπορούν να υποδείζουν την βΙΙτουμπουλίνη ως την μοναδική ισομορφή η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα κυττάρων θηλαστικών. Δεδομένου ότι, στην αμινοξική ακολουθία των ισοτύπων της τουμπουλίνης δεν ανιχνεύονται αλληλουχίες που να αντιστοιχούν σε κλασσικά σήματα πυρηνικής εισόδου (NLS), η συσσώρευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα πιθανότατα υποβοηθείται και κατευθύνεται από την αλληλεπίδραση της με μια ή περισσότερες πρωτεΐνες που περιέχουν NLS. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται από παρατηρήσεις σε άλλα είδη ευκαρυωτικών κυττάρων. Στο μύκητα A. nidulans, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της τουμπουλίνης στο πυρηνόπλασμα, ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια της μεσόφασης και της μίτωσης (Ovechkina et al., 2003). Η συγκέντρωση της τουμπουλίνης στους μεσοφασικούς πυρήνες παραμένει γαμηλή μέγρι την έναρξη της μίτωσης, όπου και μεταφέρεται ταγύτατα στον πυρήνα έτσι ώστε τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο πυρηνόπλασμα να αυξηθούν σημαντικά (τα επίπεδα της τουμπουλίνης στον πυρήνα αυξάνονται τρεις φορές σε σχέση με τη μεσόφαση). Μετά το τέλος της μίτωσης, η τουμπουλίνη εξέρχεται από τον πυρήνα. Δεδομένης της απουσίας NLS στην ακολουθία της α- και β-τουμπουλίνης στον A. nidulans, είναι πιθανή η αλληλεπίδραση της τουμπουλίνης με μια ή περισσότερες πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν ένα τέτοιο σήμα προκειμένου να μετακινηθεί μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα (Ovechkina et al., 2003). Επιπρόσθετα, υποβοηθούμενη ενεργητική μεταφορά έχει αναφερθεί στο σακχαρομύκητα S. cerevisiae, όπου η είσοδος της γ-τουμπουλίνης στον πυρήνα μεσολαβείται από την Spc98p, η οποία διαθέτει NLS στην ακολουθία της (Pereira et al., 1998). Επίσης, η γ-τουμπουλίνη εντοπίζεται στον πυρήνα κυττάρων Vicia faba στη G2 φάση (Binarova et al., 2000).

Ο πυρηνικός εντοπισμός της τουμπουλίνης θα μπορούσε να σχετισθεί με το ρόλο της Ran, η οποία μεσολαβεί στη μεταφορά πολλών πρωτεϊνών μέσα ή έξω από τον πυρήνα κυττάρων θηλαστικών, μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς εξόδου ή εισόδου (Azuma and Dasso, 2000; Quimby et al., 2000). Επίσης, η Ran διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όπου ελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες στον πυρήνα και ενεργοποιεί την εμπυρήνωση των μικροσωληνίσκων στα κεντροσωμάτια (Carazo-Salas et al., 2001; Wilde and Zheng, 1999). Πιο συγκεκριμένα, η Ran με τη μορφή Ran-GTP

ενεργοποιεί την αποδέσμευση από την importin-β πρωτεϊνών οι οποίες προάγουν τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, όπως οι Numa και TPX2 (Gruss et al., 2001; Nachury et al., 2001; Wiese et al., 2001). Η TPX2 κατά τη διάρκεια της μεσόφασης εντοπίζεται στον πυρήνα, όπου είναι δεσμευμένη με την importin-α η οποία με τη σειρά της συνδέεται με την importin-β. Με την έναρξη της μίτωσης, η Ran-GTP συνδέεται στο σύμπλοκο των importins και προκαλεί την απελευθέρωση της TPX2, η οποία προάγει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η κυτταρική εντόπιση της ενδογενούς διαλυτής τουμπουλίνης σε συνθήκες αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων (επώαση με νοκοδαζόλη στους 4°C) έτσι ώστε να αυξηθεί η ποσότητα των ελεύθερων διμερών της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τουμπουλίνη συγκεντρώνεται στον πυρήνα κυττάρων HeLa στις δεδομένες συνθήκες όπου και παραμένει συνδεδεμένη με πυρηνικά συστατικά ακόμα και όταν υπάρχουν βλάβες στον πυρηνικό φάκελο. Το φαινόμενο αντιστρέφεται όταν τα κύτταρα επιστρέψουν σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας. Παρόμοια αποτελέσματα με τα δικά μας έχουν αναφερθεί στα φυτά όπου η ενδογενής, αλλά και η GFP α-τουμπουλίνη, συγκεντρώνονται στον πυρήνα κυττάρων καπνού σε καλλιέργεια όταν αυτά επωαστούν σε χαμηλή θερμοκρασία και κατανέμονται στο κυτταρόπλασμα όταν τα κύτταρα επιστρέψουν σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας (Schwarzerova et al., 2006). Εξαιτίας της συσσώρευσης της πρωτεΐνης στον πυρήνα σε συνδυασμό με την χαμηλότερη συγκέντρωση της στο κυτταρόπλασμα, προτάθηκε ότι η τουμπουλίνη πιθανότατα συνδέεται σε ένα ή περισσότερα πυρηνικά συστατικά και ότι η συγκεκριμένη σύνδεση είναι αρκετά ισχυρή από τη στιγμή που διατηρείται κατά την απομόνωση πυρήνων. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται από ευρήματα της παρούσας μελέτης που δείχνουν την ισχυρή και ειδική in vitro σύνδεση της τουμπουλίνης με την H3.

Η μεταφορά των διμερών τουμπουλίνης στον πυρήνα των κυττάρων HeLa δεν μπορεί να αποδοθεί σε ενεργητική μεταφορά μέσω των πόρων του πυρηνικού φακέλου εξαιτίας του μεγέθους του ετεροδιμερούς (110 KDa) και δεδομένου ότι, σε χαμηλές θερμοκρασίες δεν θα μπορούσε να λειτουργήσει ένα τέτοιο σύστημα. Μόρια μεγέθους περίπου 50 KDa δεν μπορούν να διαπεράσουν το κεντρικό κανάλι μεταφοράς των πόρων με παθητική διάχυση. Η μαζική αύξηση της ποσότητας των ελευθέρων, διαλυτών διμερών τουμπουλίνης στο κυτταρόπλασμα, η οποία προκύπτει από τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων στους 0°C έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Δεδομένου ότι οι μεταβολές στη θερμοκρασία επάγουν αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες (ρευστότητα) των

βιολογικών μεμβρανών των ζωντανών κυττάρων (Los and Murata, 2004; Orvar et al., 2000), η είσοδος της τουμπουλίνης στον πυρήνα θα μπορούσε να αποδοθεί σε επαγώμενες αλλαγές στη διαμόρφωση των μεμβρανών. Πιθανότατα, η μεταφορά της τουμπουλίνης στον πυρήνα σε χαμηλή θερμοκρασία θα πρέπει να σχετίζεται με διαστολή του κεντρικού καναλιού του πυρηνικού πόρου στις δεδομένες συνθήκες, ενώ η συσσώρευση της πρωτεΐνης πιθανότατα οφείλεται στην αλληλεπίδραση της με πυρηνικά συστατικά. Αν και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να συνδέουν την αλλαγή στο μέγεθος των πυρηνικών πόρων με τις χαμηλές θερμοκρασίες, έχει βρεθεί ότι οι διαστάσεις του κεντρικού καναλιού μεταφοράς ποικίλουν ανάλογα με την φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση κολλοειδών σωματιδίων χρυσού επικαλλυμένων με πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν κλασσικά σήματα πυρηνικής εισόδου (NLSs), προσδιορίστηκε ότι τα ανώτατο όριο για την πυρηνική μεταφορά μέσω του πόρου σε φυσιολογικά διαιρούμενα BALB/c 3T3 κύτταρα είναι 250Å. Η τιμή αυτή μπορεί να μειωθεί στα 100Å σε κύτταρα που βρίσκονται ακινητοποιημένα στη μεσόφαση (Feldherr and Akin, 1991) ή να αυξηθεί κατά περίπου 40Å όπως στην περίπτωση διαφοροποιημένων κυττάρων BALB/c 3T3 που έχουν μολυνθεί με τον ιό SV40 (Feldherr et al., 1992). Αλλαγές αυτού του εύρους, θα μπορούσαν να μεταβάλλουν τις ταχύτητες μεταφοράς μεγάλων σε μέγεθος μορίων. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το λειτουργικό μέγεθος του καναλιού μεταφοράς των πόρων κυττάρων BALB/c 3T3 είναι σημαντικά μεγαλύτερο μια ώρα μετά την ανάφαση (αφού έχει ολοκληρωθεί ο επανασχηματισμός του πυρηνικού φακέλου) σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα (Feldherr and Akin, 1993). Επίσης, οι ταχύτητες διάχυσης σε κύτταρα HeLa είναι μεγαλύτερες κατά τη διάρκεια της πρώτης και της πέμπτης ώρας μετά την έναρξη της ανάφασης, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι πόροι είναι πιο διαπερατοί κατά τη διάρκεια ή μετά τον επανασχηματισμό του πυρηνικού φακέλου (Feldherr and Akin, 1990).

Η συσσωρευμένη στον πυρήνα τουμπουλίνη μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όταν τα κύτταρα επιστρέφουν σε κανονικές συνθήκες καλλέργειας (37 °C). Η γρήγορη έξοδος της τουμπουλίνης από τον πυρήνα κατά τη διάρκεια των πρώτων λεπτών της θέρμανσης η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί σε απλή διάχυση λόγω αύξησης της θερμοκρασίας (η διάχυση επηρεάζεται σε μικρό βαθμό από τη θερμοκρασία), υποδεικνύει την ύπαρξη ενός λειτουργικού και εξειδικευμένου μηχανισμού μεταφοράς της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, ο οποίος αναστέλλεται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας. Η εξέταση των αμινοξικών ακολουθιών των ισοτύπων τουμπουλίνης για την ύπαρξη σημάτων πυρηνικής εξόδου (NES), οδήγησε στην εύρεση πέντε σηματοδοτικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν

σε NES, οι οποίες είναι συντηρημένες σε όλες τις ισομορφές. Η ύπαρξή τους υποδεικνύει ότι η έξοδος της τουμπουλίνης από τον πυρήνα πραγματοποιείται πιθανότατα μέσω ενός μηχανισμού μεταφοράς ο οποίος περιλαμβάνει τους πυρηνικούς πόρους και διαλυτά στοιχεία όπως μεταφορείς, Ran και RanGAP (Dasso, 2002). Η πρωτεΐνη μεταφοράς exportin-1/CRM1, συνδέεται με τα NES και διαμεσολαβεί στην έξοδο πρωτεϊνών από τον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων. Ο μεταβολίτης λεπτομυκίνη Β συνδεόμενος με την exportin-1, αναστέλλει τη σύνδεση της με τα NES και κατά συνέπεια την έξοδο από τον πυρήνα πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο μονοπάτι. Προκειμένου να διερευνηθεί η εμπλοκή της exportin-1 στην πυρηνική κατανομή της τουμπουλίνης, εξετάστηκε η επίδραση της λεπτομυκίνης Β στην πυρηνική εντόπιση της ενδογενούς β-τουμπουλίνης, της GFP-βΙΙ και GFP-βΙV-τουμπουλίνης. Η αύξηση, σε όλες τις περιπτώσεις, της πυρηνικής εντόπισης της τουμπουλίνης υποδεικνύει ότι η έξοδος της διαλυτής τουμπουλίνης από τον πυρήνα πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος εξαρτάται τουλάχιστον μερικώς από την exportin-1. Εντούτοις, αν και η πυρηνική συσσώρευση της τουμπουλίνης αυξάνεται παρουσία λεπτομυκίνης Β, η μεγαλύτερη ποσότητα παραμένει στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η πυρηνική έξοδος της τουμπουλίνης δεν αναστέλλεται επαρκώς. Πιθανότατα, η μεταφορά της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα γίνεται μέσω ενός μηγανισμού ο οποίος περιλαμβάνει και άλλες exportins. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η ακτίνη, της οποίας η πυρηνική συσσώρευση αυξάνεται παρουσία λεπτομυκίνης Β, εξέρχεται τελικά στο κυτταρόπλασμα μέσω της exportin-6 (Stuven et al., 2003). Επίσης, η σημαντική αύξηση της συσσώρευσης στον πυρήνα τουμπουλίνης από την οποία έχει κοπεί τμήμα 34 αμινοξέων (232-266) που αποτελεί την αλληλουχία των τριών μη-κλασσικών σημάτων NES (NES-3, -4 και -5) της β-τουμπουλίνης, υποστηρίζει σε μεγάλο βαθμό την λειτουργικότητα των αμινοξικών αυτών των περιοχών ως ΝΕS. Στο μέλλον, εκτός από την επιβεβαίωση της λειτουργικότητας των υπολοίπων NES θα πρέπει να προσδιοριστούν οι πρωτεΐνες που συνδέονται με την τουμπουλίνη και υποβοηθούν την μεταφορά της μέσα και έξω από τον πυρήνα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η βΙΙ-τουμπουλίνη θεωρείται ως η κύρια ισομορφή στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων σε καλλιέργεια. Επομένως η διαδικασία μέσω της οποίας η βΙΙ-τουμπουλίνη εντοπίζεται στον πυρήνα θα πρέπει να είναι ειδική για το συγκεκριμένο ισότυπο. Μια πιθανή ερμηνεία για την παραμονή των διμερών αβΙΙ-τουμπουλίνης στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων είναι η ενδεχόμενη τροποποίηση πρωτεΐνης ή πρωτεϊνών που μεσολαβούν στην μεταφορά της τουμπουλίνης εκτός του πυρήνα. Επίσης, η

τροποποίηση της βΙΙ-τουμπουλίνης από κάποιο ένζυμο (π.χ πρωτεϊνική κινάση) θα μπορούσε να αποτρέψει την έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα μεσοφασικών κυττάρων. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός πιθανότατα συμβαίνει κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του πυρηνικού φακέλου στους δύο νέους θυγατρικούς πυρήνες μετά το τέλος της μίτωσης, όπου αναδιοργανώνονται οι μικροσωληνίσκοι και η χρωματίνη και εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα η περίσσεια της διαλυτής τουμπουλίνης. Η παρουσία περιορισμένων ποσοτήτων πυρηνικής τουμπουλίνης θα μπορούσε να αποδοθεί επίσης στη παθητική ή υποβοηθούμενη μεταφορά της στον πυρήνα καθώς και στη δέσμευση στη χρωματίνη μετά το σχηματισμό των θυγατρικών πυρήνων.

Οι πληροφορίες για τη δράση της τουμπουλίνης στον πυρήνα είναι πολύ περιορισμένες και υποθετικές από τη στιγμή που βασίζονται σε in vitro προσεγγίσεις (Kourmouli et al., 2001; Yanagida et al., 2004; Yeh et al., 2004). Η τουμπουλίνη θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως "passenger" πρωτεΐνη η οποία συγκρατείται στον πυρήνα μέχρι την έναρξη της μίτωσης, όπου και ελευθερώνεται στην πρόφαση για να διαδραματίσει συγκεκριμένο ρόλο κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Μετά το τέλος της μίτωσης η τουμπουλίνη πιθανόν να αναδιοργανώνεται και στον πυρήνα μέχρι την έναρξη ενός νέου κυτταρικού κύκλου. Στις πρωτεΐνες που γαρακτηρίζονται ως passengers ανήκουν η mitosin, NuMA και η p62. Η mitosin εντοπίζεται στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της S φάσης ενώ μεταφέρεται στα κεντρομερίδια, στην μιτωτική άτρακτο και το μεσοσωμάτιο κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όπου θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της κυτταρικής διαίρεσης. Η NuMA ανιχνεύεται στον πυρήνα στη μεσόφαση ενώ κατά τη διάρκεια της μίτωσης συμμετέχει στην οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου. Η p62 εντοπίζεται επίσης στον πυρήνα στη μεσόφαση ενώ ανιχνεύεται στη μιτωτική άτρακτο και το μεσοσωμάτιο στη μίτωση όπου η παρουσία της θεωρείται απαραίτητη για την ομαλή έκβαση της κυτταρικής διαίρεσης (Saredi et al., 1996; Warner and Sloboda, 1999; Zhu et al., 1997).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι παρατηρήσεις μας μοιάζουν αρκετά με εκείνες που έχουν δημοσιευτεί για μια άλλη σημαντική κυτταροσκελετική πρωτεΐνη, την ακτίνη, η οποία εντοπίζεται και δρα στον πυρήνα. Αρχικά, βρέθηκε ότι η ακτίνη συγκεντρώνεται στον πυρήνα μετά από επώαση με DMSO ή μετά από θερμικό σοκ. Σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας, επάγεται η αποδιοργάνωση των δομών της ακτίνης και η πυρηνική συσσώρευση της πρωτεΐνης με τη μορφή ράβδων, σε ποσοστό μεταξύ 5% και 90% των κυττάρων που εξαρτάται από την κυτταρική σειρά (Iida et al., 1986). Αργότερα,
δημοσιεύτηκε ότι η έξοδος της ακτίνης από τον πυρήνα αποτελεί ένα νέο μηχανισμό ο οποίος ρυθμίζει τον υποκυττάριο εντοπισμό της (Wada et al., 1998). Στη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε ότι η ακτίνη περιέχει δύο αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη οι οποίες λειτουργούν ως σήματα πυρηνικής εξόδου. Μονομερής ακτίνη, η οποία ενέθηκε στον πυρήνα μεταφέρθηκε στο κυτταρόπλασμα με ένα μηχανισμό εξαρτώμενο από την λεπτομυκίνη Β, ενώ η επώαση κυττάρων με το μεταβολίτη ανέστειλε την έξοδο της ενδογενούς ακτίνης από τον πυρήνα αυξάνοντας την συσσώρευση της. Τέλος, η ακτίνη εμπλέκεται σε λειτουργίες του πυρήνα οι οποίες περιλαμβάνουν αναδιοργάνωση της χρωματίνης, ενεργοποίηση γονιδίων, μεταγραφή mRNA και μεταφορά στο κυτταρόπλασμα (Pederson and Aebi, 2005).

Συμπερασματικά, δείξαμε για πρώτη φορά την επαγώμενη από τη χαμηλή θερμοκρασία συσσώρευση της τουμπουλίνης στον πυρήνα κυττάρων θηλαστικών καθώς και την εξαρτώμενη από την παρουσία σημάτων πυρηνικής εξόδου μεταφορά της στο κυτταρόπλασμα. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα υποδεικνύουν ένα μηχανισμό ο οποίος ρυθμίζει την κυτταρική κατανομή της διαλυτής τουμπουλίνης και εξαρτάται από την ποσότητα της πρωτεΐνης, την διάχυσή της στο πυρηνόπλασμα μέσω των πόρων, τη δέσμευσή της σε συστατικά της χρωματίνης και την ενεργή έξοδό της από τον πυρήνα με την συμμετοχή της exportin-1.

Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει δειχθεί ότι η ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (HP1) συνδέεται στον πυρηνικό φάκελο που περιέχει περιφερική ετεροχρωματίνη και ότι η τουμπουλίνη συνδεόμενη στον πυρηνικό φάκελο αναστέλλει την πρόσδεση της HP1β (Kourmouli et al., 2001). Εχουμε δείξει επίσης ότι η HP1β σχηματίζει σύμπλοκο με τις ιστόνες H3/H4 και την διαμεμβρανική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου LBR. Στο συγκεκριμένο σύμπλοκο οι πρωτεΐνες HP1 και ο LBR συνδέονται άμεσα με τις H3 και H4, αλλά όχι μεταξύ τους (Polioudaki et al., 2001). Καθώς οι ιστόνες είναι οργανωμένες σε νουκλεοσώματα, είναι πιθανό οι H3 και H4 να διαμεσολαβούν στη σύνδεση των νουκλεοσωμάτων με τον LBR και την HP1.

Η ΗΡ1 αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της ιστόνης H3 (Nielsen et al., 2001). Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στην αμινοτελική περιοχή της H3 επηρεάζουν την συγκεκριμένη αλληλεπίδραση, επάγοντας πιθανότατα αύξηση ή μείωση της συγγένειας της HP1 για την κεντρική περιοχή της H3 (histone fold) (Fischle et al., 2005). Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η τρι-μεθυλίωση της αμινοτελικής περιοχής της H3 στη

λυσίνη 9 αποτελεί αναγκαία και ικανή συνθήκη για την σύνδεσή της με την HP1 (Lachner et al., 2001). Όμως, πρόσφατα *in vitro* και *in vivo* δεδομένα αποδεικνύουν ότι η HP1β συνδέεται στοιχειομετρικά και ειδικά με το κεντρικό τμήμα κυρίως της μη-τροποποιημένης H3 (Dialynas et al., 2006).

Από την παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε ότι, το κύριο συστατικό πυρηνικού φακέλου/περιφερικής ετερογρωματίνης στο οποίο συνδέεται η τουμπουλίνη είναι η ιστόνη Η3. Πιο συγκεκριμένα, η τουμπουλίνη συνδέεται κυρίως στην ιστόνη Η3 και σε πολύ μικρότερη έκταση στην ιστόνη Η5. Επειδή οι ιστόνες είναι βασικές πρωτεΐνες και η τουμπουλίνη περιέχει στην ακολουθία της πολλά όξινα κατάλοιπα, η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση θα μπορούσε να αποδοθεί στην ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Εντούτοις, η τουμπουλίνη δεν συνδέεται με την πιο βασική ιστόνη Η4. Η ειδικότητα της σύνδεσης με την H3, ενισχύεται επιπλέον από τα αποτελέσματα πειραμάτων σύνδεσης με νουκλεοσωματικές ιστόνες και αυξανόμενες συγκεντρώσεις τουμπουλίνης σε διαφορετικές συνθήκες ιονικής ισχύος, από τα οποία προκύπτει ότι η τουμπουλίνη συνδέεται στην Η3 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση δεν εξαρτάται από την ύπαρξη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην Η3 και δεν αναστέλλεται από την ύπαρξη επιπλέον αρνητικών φορτίων στην Η3, καθώς και από την παρουσία αλυσίδων γλουταμινικού οξέος στο καρβοξυτελικό άκρο της τουμπουλίνης. Τα αποτελέσματά μας ενισχύονται από προηγούμενες παρατηρήσεις μας (Kourmouli et al., 2001), όπου διαπιστώσαμε ότι η ανασταλτική δράση της τουμπουλίνης στην πρόσδεση της ΗΡ1β σε τμήματα πυρηνικών φακέλων δεν είναι ένα αμιγώς ηλεκτροστατικό φαινόμενο και δεν οφείλεται σε χαοτροπικούς παράγοντες. Ειδικότερα είχε βρεθεί ότι αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως η ηπαρίνη ή επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα γλουταμικού οξέος δεν αναστέλλουν τις αλληλεπιδράσεις πυρηνικού φακέλου-ΗΡ1β και ότι σε συνθήκες όπου το pH του διαλύματος βρίσκεται κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της HP1β και της τουμπουλίνης αντίστοιγα, η τελευταία συνεγίζει να διατηρεί τις ανασταλτικές της ιδιότητες.

Η διαλυτή, μη πολυμερισμένη τουμπουλίνη βρίσκεται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα. Παλαιότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι ένα ηπατοκύτταρο περιέχει κατά μέσο όρο 3.1 x 10⁷ διμερή τουμπουλίνης, από τα οποία το 15% είναι ενσωματώμενο σε μικροσωληνίσκους (Reaven et al., 1977). Αν και το ποσοστό της πολυμερισμένης τουμπουλίνης μπορεί να είναι μεγαλύτερο σε κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια (έως 62% σε επιθηλιακά κύτταρα από νεφρό χοίρου), η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της διαλυτής τουμπουλίνης είναι της τάξης του 1mg/ml, δηλαδή μεγαλύτερη από την κριτική

συγκέντρωση πολυμερισμού (Zhai and Borisy, 1994). Μια στιγμιαία αύξηση στη συγκέντρωση της διαλυτής τουμπουλίνης αναμένεται στη φάση μεταξύ πρόφασης και προμετάφασης, όπου το δίκτυο των μικροσωληνίσκων καταστρέφεται και αρχίζει η συγκρότηση της μιτωτικής ατράκτου. Στο μεταβατικό αυτό στάδιο η διαλυτή τουμπουλίνη αποκτά πρόσβαση σε ενδοπυρηνικές δομές, δεδομένου ότι ο συνδυασμός μιτωτικής υπερφωσφορυλίωσης και μηχανικών πιέσεων προκαλεί την αποσυναρμολόγηση του πυρηνικού φακέλου (Georgatos and Theodoropoulos, 1999).

Ενα σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής είναι ότι η τουμπουλίνη αναστέλλει την σύνδεση της H3 σε όλους τους ισότυπους της HP1 και στον LBR, καθώς και τον σχηματισμό του συμπλόκου που περιλαμβάνει τον LBR, την HP1 και τις ιστόνες H3/H4. Ως εκ τούτου, η πρόσδεση της τουμπουλίνης στον πυρηνικό φάκελο θα μπορούσε να παρεμποδίζει πρόωρες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην χρωματίνη και σε τμήματα της πυρηνικής μεμβράνης, κατά την διάρκεια των αρχικών σταδίων της κυτταρικής διαίρεσης. Η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή η αποσύνδεση της τουμπουλίνης από μεμβρανικά κυστίδια θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί στα επόμενα στάδια της μίτωσης, όπου η μιτωτική άτρακτος έχει αναπτυχθεί πλήρως, η μάζα της πολυμερισμένης τουμπουλίνης επανέργεται στα μεσοφασικά επίπεδα και η συγκέντρωση της διαλυτής τουμπουλίνης μειώνεται (Zhai and Borisy, 1994). Με τον τρόπο αυτό οι πρόδρομες δομές του πυρηνικού φακέλου θα επανακτούσαν την ικανότητα τους να συνδεθούν με την πρωτεΐνη HP1, διευκολύνοντας έτσι την επανασυγκρότηση του πυρήνα. Επομένως, η διαλυτή τουμπουλίνη θα μπορούσε να επιδρά στην σύνδεση/αποσύνδεση της εμπλουτισμένης σε ΗΡ1 ετεροχρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο και να θεωρηθεί ένας σημαντικός "διακόπτης" ο οποίος ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις πυρηνικού φακέλου και χρωματίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Η ταξόλη (πακλιταξέλη) θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα αντικαρκινικά φάρμακα και χρησιμοποιείται ευρέως στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα και του τραχήλου της μήτρας (Rowinsky and Donehower, 1995). Η αντικαρκινική δράση του φαρμάκου βασίζεται στην ικανότητα του, να προάγει τον πολυμερισμό και την σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων, να προκαλεί ακινητοποίηση των κυττάρων στη G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου, να επάγει αλλαγές στην οργάνωση και τη λειτουργία του πυρηνικού φακέλου καθώς και να προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο (Blagosklonny and Fojo, 1999; Theodoropoulos et al., 1999). Σημαντικό πρόβλημα στη χρήση του φαρμάκου σε

κλινικό επίπεδο, είναι η χαμηλή διαλυτότητα του στο νερό (<4µg/ml) αλλά και στους περισσότερους φαρμακευτικά αποδεκτούς διαλύτες (Nicolaou et al., 1993; Nuijen et al., 2001). Συνήθως παρέχεται διαλυμένη σε ένα μέσο το οποίο περιέχει Cremophor EL (polyethoxylated castor oil), το οποίο έχει αναφερθεί ότι προκαλεί παρενέργειες (Gelderblom et al., 2001). Εξαιτίας της μεγάλης σημασίας του φαρμάκου σε κλινικό επίπεδο, ένας μεγάλος αριθμός ερευνητικών προσπαθειών κατευθύνεται στην εύρεση νέων μεθόδων για την ημισυνθετική ή ολική σύνθεση της ταξόλης ή στην ανάπτυξη παραγώγων με βελτιωμένη διαλυτότητα στο νερό, αυξημένη αντικαρκινική δράση και ευκολότερη πρόσληψη από τα κύτταρα (Lee et al., 1999; Niethammer et al., 2001). Από μελέτες δομήςδραστικότητας προέκυψε ότι οι ομάδες υδροξυλίου της ταξόλης στις θέσεις 2' και 7' μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση εστερικών παραγώγων (Lee et al., 2002). Αν και οι τροποποιήσεις στην 2' θέση έχουν ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της ικανότητας προαγωγής του πολυμερισμού της τουμπουλίνης, τα συγκεκριμένα παράγωγα διατηρούν την κυτταροτοξικότητα τους και την *in vivo* αντικαρκινική δράση (Ueda et al., 1994). Επιπλέον, εστέρες που δημιουργούνται στην 2' θέση είναι πιο ασταθείς από εκείνους στη θέση 7' και ως εκ τούτου, η συγκεκριμένη ιδιότητα δίνει τη δυνατότητα παραγωγής ανενεργών προφαρμάκων, τα οποία υδρολύονται in vivo με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενεργής ταξόλης (Deutsch et al., 1989). Οι παραπάνω παρατηρήσεις, οδήγησαν στη σύνθεση ενός μεγάλου αριθμού παραγώγων στα οποία η ταξόλη συνδέεται με μοριακούς μεταφορείς όπως είναι το φυλικό οξύ καθώς και πεπτίδια εμπλουτισμένα σε αργινίνη, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό και υψηλότερους χρόνους ημίσιας ζωής (Chen et al., 2005; Kirschberg et al., 2003; Lee et al., 2002; Wang et al., 2006)

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα ταξόλης, τα οποία περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα ταξόλης συνδεδεμένα σε ένα συνθετικό φορέα. Ο φορέας, ο οποίος σχηματίζεται από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες –Lys-Aib-Cys-, χρησιμοποιήθηκε σκόπιμα επειδή παρέχει την ειδική χημεία που απαιτείται για την σύνδεση πολλαπλών μορίων ταξόλης μέσω θειοαιθερικών δεσμών και αυξάνει την διαλυτότητα στο νερό. Πιο συγκεκριμένα, οι αμινομάδες των πλευρικών αλυσίδων της λυσίνης παρέχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό, ενώ η ομάδα Aib προσδίδει ιδιότητες έλικας στον φορέα, με αποτέλεσμα την αποφυγή των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συνδεδεμένων μορίων ταξόλης, γεγονός που διευκολύνει την δέσμευση στην τουμπουλίνη (Toniolo et al., 2001). Η βιολογική δραστικότητα των συνθετικών αναλόγων της ταξόλης εκτιμήθηκε αρχικά ως προς την ικανότητα τους να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό ανθρωπίνων

επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων (HeLa, DU και MCF-7). Αν και όλα τα παράγωγα εμφάνισαν IC₅₀ της τάξεως των nM, το ανάλογο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-paclitaxel)]₄-NH₂ έδειξε τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα παράγωγα και την ταξόλη, ειδικότερα όταν χρησιμοποιήθηκε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Προκειμένου να διευκρινιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου το συγκεκριμένο παράγωγο είχε αυξημένη κυτταροτοξική δραστικότητα, διερευνήθηκε η επίδραση του αναλόγου και της ταξόλης στον κυτταρικό κύκλο καθώς και στη μορφολογία του πυρήνα και την οργάνωση του πυρηνικού φακέλου. Η επώαση των κυττάρων με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (3nM) ταξόλης ή του παραγώγου της δεν προκάλεσε το σταμάτημα των κυττάρων στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου. Είναι γνωστό, ότι κύτταρα τα οποία επωάζονται με ταξόλη καταφέρνουν να ολοκληρώσουν τον κυτταρικό κύκλο όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φαρμάκου δεν επαρκεί για να σταθεροποιήσει τους μικροσωληνίσκους. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται συχνά σε κύτταρα τα οποία έχουν σταματήσει στην G2/M φάση και στη συνέχεια καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό απουσία φαρμάκου ή σε κύτταρα τα οποία επωάζονται με χαμηλές συγκεντρώσεις ταξόλης (Jordan et al., 1996; Theodoropoulos et al., 1999). Όμως, πολλά τα κύτταρα που είγαν επωαστεί με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των φαρμάκων ανέπτυξαν πολλαπλούς ή λοβωτούς πυρήνες, με ανώμαλη κατανομή των πυρηνικών πόρων και ασυνέχεια στην πυρηνική λάμινα, φαινότυπος που έχει περιγραφεί για διάφορες κυτταρικές σειρές οι οποίες έχουν επωαστεί είτε με μικρές συγκεντρώσεις ταξόλης για 20-24 ώρες ή με μεγάλες συγκεντρώσεις ταξόλης για 2 ώρες (Michalakis et al., 2005; Theodoropoulos et al., 1999). Επώαση των κυττάρων με το παράγωγο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-paclitaxel)]₄-NH₂ είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μεγαλυτέρου αριθμού κυττάρων με πολλαπλούς πυρήνες σε σχέση με την ταξόλη, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν. Η επώαση με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10nM) ταξόλης ή του παραγώγου της Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-paclitaxel)]₄-NH₂ προκάλεσε ακινητοποίηση των κυττάρων HeLa και DU στην G2/M φάση. Το ποσοστό των κυττάρων που παρέμειναν στην G2/M φάση μετά την απομάκρυνση των φαρμάκων ήταν μεγαλύτερο όταν τα κύτταρα είχαν επωαστεί με το παράγωγο της ταξόλης. Συμπερασματικά, αν και όλα τα συνθετικά παράγωγα ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το παράγωγο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-paclitaxel)]₄-NH₂ εμφάνισε βελτιωμένη βιολογική δραστικότητα συγκρινόμενο με την ταξόλη, σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του προστάτη και τραχήλου της μήτρας.



Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι η τουμπουλίνη εντοπίζεται στον πυρήνα ανθρώπινων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων, όπου και παραμένει συνδεδεμένη με πυρηνικά συστατικά. Στη συγκεκριμένη μελέτη, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά η επαγώμενη από τη χαμηλή θερμοκρασία πυρηνική συσσώρευση της ενδογενούς διαλυτής τουμπουλίνης. Η είσοδος της πρωτεΐνης στο πυρήνα στις δεδομένες συνθήκες οφείλεται σε παθητική διάχυση μέσω του κεντρικού καναλιού των πόρων ενώ η συσσώρευσή της αποδίδεται στην σύνδεση της με συστατικά του πυρήνα, όπως η χρωματίνη. Η μεταφορά της τουμπουλίνης στο κυτταρόπλασμα σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας, γίνεται με ρυθμιζόμενο τρόπο μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος περιλαμβάνει λειτουργικά σήματα πυρηνικής εξόδου και μερική τουλάχιστον συμμετοχή της exportin-1. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η κατανομή της τουμπουλίνης στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων, ρυθμίζεται από ένα μηχανισμό ο οποίος εξαρτάται από την ποσότητα της διαλυτής πρωτεΐνης, τη μεταφορά της στον πυρήνα, τη δέσμευσή της στη χρωματίνη και την ενεργή μεταφορά της στο κυτταρόπλασμα.

Από in vitro πειράματα βρέθηκε ότι η τουμπουλίνη συνδέεται ειδικά και με δοσοεξαρτώμενο τρόπο στην ιστόνη H3, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό της χρωματίνης. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση δεν εξαρτάται από την ύπαρξη μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων και επιπλέον αρνητικών φορτίων στην H3, καθώς και από την παρουσία αλυσίδων γλουταμινικού οξέος στο καρβοξυτελικό άκρο της τουμπουλίνης. Επίσης, ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής είναι ότι η τουμπουλίνη αναστέλλει την σύνδεση της H3 σε όλους τους ισότυπους της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1 και στον LBR, καθώς και τον σχηματισμό του συμπλόκου που περιλαμβάνει τον LBR, την HP1 και τις ιστόνες H3/H4. Επομένως, η διαλυτή τουμπουλίνη θα μπορούσε να ρυθμίζει την σύνδεση/αποσύνδεση της εμπλουτισμένης σε HP1 ετεροχρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Τέλος, το συνθετικό ανάλογο της ταξόλης Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-paclitaxel)]₄-NH₂ εκτός από βελτιωμένη διαλυτότητα στο νερό εμφανίζει και αυξημένη βιολογική δραστικότητα συγκρινόμενο με την ταξόλη. Πιο συγκεκριμένα, το παράγωγο της ταξόλης αναστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων και προκαλεί ακινητοποίηση των κυττάρων στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και αύξηση του αριθμού των πολυπύρηνων κυττάρων και των βλαβών στην πυρηνική περιφέρεια.

BIBAIOITPAIDIA

Adam, S. A. (2001). The nuclear pore complex. *Genome Biol* **2**, REVIEWS0007. Adams, C. R. and Kamakaka, R. T. (1999). Chromatin assembly: biochemical

identities and genetic redundancy. Curr Opin Genet Dev 9, 185-90.

Ahmad, F. J., Yu, W., McNally, F. J. and Baas, P. W. (1999). An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *J Cell Biol* 145, 305-15.

Aitchison, J. D. and Rout, M. P. (2002). A tense time for the nuclear envelope. *Cell* **108**, 301-4.

Amos, L. A. and Lowe, J. (1999). How Taxol stabilises microtubule structure. *Chem Biol* **6**, R65-9.

Andrulis, E. D., Neiman, A. M., Zappulla, D. C. and Sternglanz, R. (1998). Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* **394**, 592-5.

Armbruster, B. L., Wunderli, H., Turner, B. M., Raska, I. and Kellenberger, E. (1983). Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and histone 2B in isolated membrane-depleted nuclei, metaphase chromatin, and whole Chinese hamster ovary cells. *J Histochem Cytochem* **31**, 1385-93.

Azuma, Y. and Dasso, M. (2000). The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 302-7.

Bai, R. L., Pettit, G. R. and Hamel, E. (1990). Binding of dolastatin 10 to tubulin at a distinct site for peptide antimitotic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites. *J Biol Chem* **265**, 17141-9.

Baloglu, E. and Kingston, D. G. (1999). A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III. *J Nat Prod* **62**, 1068-71.

Banerjee, A. and Luduena, R. F. (1992). Kinetics of colchicine binding to purified beta-tubulin isotypes from bovine brain. *J Biol Chem* **267**, 13335-9.

Banerjee, A., Roach, M. C., Trcka, P. and Luduena, R. F. (1990). Increased microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of beta-tubulin. *J Biol Chem* **265**, 1794-9.

Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R. and Ellenberg, J. (2002). Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell* **108**, 83-96.

Belgareh, N., Rabut, G., Bai, S. W., van Overbeek, M., Beaudouin, J., Daigle, N., Zatsepina, O. V., Pasteau, F., Labas, V., Fromont-Racine, M. et al. (2001). An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J Cell Biol* **154**, 1147-60.

Belmont, L., Mitchison, T. and Deacon, H. W. (1996). Catastrophic revelations about Op18/stathmin. *Trends Biochem Sci* 21, 197-8.

Bergen, L. G., Kuriyama, R. and Borisy, G. G. (1980). Polarity of microtubules nucleated by centrosomes and chromosomes of Chinese hamster ovary cells in vitro. *J Cell Biol* 84, 151-9.

Bertinato, P., Sorensen, E. J., Meng, D. and Danishefsky, S. J. (1996). Studies toward a Synthesis of Epothilone A: Stereocontrolled Assembly of the Acyl Region and Models for Macrocyclization. *J Org Chem* **61**, 8000-8001.

Binarova, P., Cenklova, V., Hause, B., Kubatova, E., Lysak, M., Dolezel, J., Bogre, L. and Draber, P. (2000). Nuclear gamma-tubulin during acentriolar plant mitosis. *Plant Cell* **12**, 433-42.

Blagosklonny, M. V. and Fojo, T. (1999). Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int J Cancer* **83**, 151-6.

Bonne, G., Mercuri, E., Muchir, A., Urtizberea, A., Becane, H. M., Recan, D., Merlini, L., Wehnert, M., Boor, R., Reuner, U. et al. (2000). Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol* **48**, 170-80.

Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P. and Larcher, J. C. (2001). Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem* **276**, 12839-48.

Bottomley, M. J. (2004). Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO Rep* **5**, 464-9.

Boucher, D., Larcher, J. C., Gros, F. and Denoulet, P. (1994). Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry* **33**, 12471-7.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D. and Broach, J. R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev* 7, 592-604.

Bremer, J. W., Busch, H. and Yeoman, L. C. (1981). Evidence for a species of nuclear actin distinct from cytoplasmic and muscles actins. *Biochemistry* **20**, 2013-7.

Broers, J. L. and Ramaekers, F. C. (2004). Dynamics of nuclear lamina assembly and disassembly. *Symp Soc Exp Biol*, 177-92.

Burke, B. and Stewart, C. L. (2002). Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 575-85.

Burkhart, C. A., Berman, J. W., Swindell, C. S. and Horwitz, S. B. (1994). Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity. *Cancer Res* **54**, 5779-82.

Burkhart, C. A., Kavallaris, M. and Band Horwitz, S. (2001). The role of betatubulin isotypes in resistance to antimitotic drugs. *Biochim Biophys Acta* 1471, O1-9.

Burns, R. G. (1990). Stoichiometry of estramustine phosphate binding to MAP2 measured by the disassembly of chick brain MAP2:tubulin microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* **17**, 167-73.

Burns, R. G. (1995). Analysis of the gamma-tubulin sequences: implications for the functional properties of gamma-tubulin. *J Cell Sci* 108 (Pt 6), 2123-30.

Carazo-Salas, R. E., Gruss, O. J., Mattaj, I. W. and Karsenti, E. (2001). Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat Cell Biol* **3**, 228-34.

Carman, C. V., Som, T., Kim, C. M. and Benovic, J. L. (1998). Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* **273**, 20308-16.

Carminati, J. L. and Stearns, T. (1997). Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol* **138**, 629-41.

Cassimeris, L. (2002). The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 18-24.

Caviston, J. P. and Holzbaur, E. L. (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* 16, 530-7.

Chang, P. and Stearns, T. (2000). Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat Cell Biol* **2**, 30-5.

Chen, X., Plasencia, C., Hou, Y. and Neamati, N. (2005). Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. *J Med Chem* **48**, 1098-106.

Clements, L., Manilal, S., Love, D. R. and Morris, G. E. (2000). Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 709-14.

Cleveland, D. W. (1986). A Cellular Structure: The Cytoskeleton. *Science* **233**, 1436.

Collas, P., Courvalin, J. C. and Poccia, D. (1996). Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. *J Cell Biol* **135**, 1715-25.

Conti, E. and Izaurralde, E. (2001). Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 310-9.

Cowan, N. J., Dobner, P. R., Fuchs, E. V. and Cleveland, D. W. (1983). Expression of human alpha-tubulin genes: interspecies conservation of 3' untranslated regions. *Mol Cell Biol* **3**, 1738-45.

Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P. D. and Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* **172**, 41-53.

Cross, D., Dominguez, J., Maccioni, R. B. and Avila, J. (1991). MAP-1 and MAP-2 binding sites at the C-terminus of beta-tubulin. Studies with synthetic tubulin peptides. *Biochemistry* **30**, 4362-6.

Dabauvalle, M. C., Muller, E., Ewald, A., Kress, W., Krohne, G. and Muller, C. R. (1999). Distribution of emerin during the cell cycle. *Eur J Cell Biol* **78**, 749-56.

Dasso, M. (2002). The Ran GTPase: theme and variations. Curr Biol 12, R502-8.

Dechat, T., Korbei, B., Vaughan, O. A., Vlcek, S., Hutchison, C. J. and Foisner, R. (2000). Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3473-84.

Derry, W. B., Wilson, L. and Jordan, M. A. (1995). Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* **34**, 2203-11.

Derry, W. B., Wilson, L., Khan, I. A., Luduena, R. F. and Jordan, M. A. (1997). Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry* **36**, 3554-62.

Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83-117.

Desai, A., Murray, A., Mitchison, T. J. and Walczak, C. E. (1999). The use of Xenopus egg extracts to study mitotic spindle assembly and function in vitro. *Methods Cell Biol* **61**, 385-412.

Deutsch, H. M., Glinski, J. A., Hernandez, M., Haugwitz, R. D., Narayanan, V. L., Suffness, M. and Zalkow, L. H. (1989). Synthesis of congeners and prodrugs. 3. Water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity. *J Med Chem* **32**, 788-92.

Dialynas, G. K., Makatsori, D., Kourmouli, N., Theodoropoulos, P. A., McLean, K., Terjung, S., Singh, P. B. and Georgatos, S. D. (2006). Methylation-independent binding to histone H3 and cell cycle-dependent incorporation of HP1beta into heterochromatin. *J Biol Chem* **281**, 14350-60.

Downing, K. H. (2000). Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 89-111.

Drewes, G., Ebneth, A. and Mandelkow, E. M. (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* 23, 307-11.

Dutcher, S. K. (2001). The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 49-54.

Dwyer, N. and Blobel, G. (1976). A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol* **70**, 581-91.

Earnshaw, W. C. and Bernat, R. L. (1991). Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma* 100, 139-46.

Ellenberg, J., Siggia, E. D., Moreira, J. E., Smith, C. L., Presley, J. F., Worman, H. J. and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* 138, 1193-206.

Enninga, J., Levay, A. and Fontoura, B. M. (2003). Sec13 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and stably interacts with Nup96 at the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* **23**, 7271-84.

Falconer, M. M., Echeverri, C. J. and Brown, D. L. (1992). Differential sorting of beta tubulin isotypes into colchicine-stable microtubules during neuronal and muscle differentiation of embryonal carcinoma cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **21**, 313-25.

Feldherr, C. M. and Akin, D. (1990). EM visualization of nucleocytoplasmic transport processes. *Electron Microsc Rev* **3**, 73-86.

Feldherr, C. M. and Akin, D. (1991). Signal-mediated nuclear transport in proliferating and growth-arrested BALB/c 3T3 cells. *J Cell Biol* 115, 933-9.

Feldherr, C. M. and Akin, D. (1993). Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. *Exp Cell Res* **205**, 179-86.

Feldherr, C. M., Lanford, R. E. and Akin, D. (1992). Signal-mediated nuclear transport in simian virus 40-transformed cells is regulated by large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11002-5.

Feng, Y., Hodge, D. R., Palmieri, G., Chase, D. L., Longo, D. L. and Ferris, D. K. (1999). Association of polo-like kinase with alpha-, beta- and gamma-tubulins in a stable complex. *Biochem J* 339 (Pt 2), 435-42.

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. and Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475-83.

Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H. and Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116-22.

Fletcher, T. M. and Hansen, J. C. (1996). The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **6**, 149-88.

Floege, J., Topley, N., Hoppe, J., Barrett, T. B. and Resch, K. (1991). Mitogenic effect of platelet-derived growth factor in human glomerular mesangial cells: modulation and/or suppression by inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* **86**, 334-41.

Foisner, R. and Gerace, L. (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* **73**, 1267-79.

Fried, H. and Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1659-88.

Furuhata, S., Kameya, T., Toya, S. and Frankfurter, A. (1993).

Immunohistochemical analysis of 61 pituitary adenomas with a monoclonal antibody to the neuron-specific beta-tubulin isotype. *Acta Neuropathol (Berl)* **86**, 518-20.

Furukawa, K. (1999). LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci* **112** (**Pt 15**), 2485-92.

Galmarini, C. M., Kamath, K., Vanier-Viornery, A., Hervieu, V., Peiller, E., Falette, N., Puisieux, A., Ann Jordan, M. and Dumontet, C. (2003). Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. *Br J Cancer* **88**, 1793-9.

Garnier, C., Barbier, P., Gilli, R., Lopez, C., Peyrot, V. and Briand, C. (1998). Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 414-9.

Gebara, M. M., Sayre, M. H. and Corden, J. L. (1997). Phosphorylation of the carboxy-terminal repeat domain in RNA polymerase II by cyclin-dependent kinases is sufficient to inhibit transcription. *J Cell Biochem* **64**, 390-402.

Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K. and Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer* **37**, 1590-8.

Georgatos, S. D. (2001). The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *Embo J* 20, 2989-94.

Georgatos, S. D., Pyrpasopoulou, A. and Theodoropoulos, P. A. (1997). Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *J Cell Sci* **110** (**Pt 17**), 2129-40.

Georgatos, S. D. and Theodoropoulos, P. A. (1999). Rules to remodel by: what drives nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **9**, 373-81.

Gerace, L. and Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**, 277-87.

Giannakakou, P., Sackett, D. and Fojo, T. (2000). Tubulin/microtubules: still a promising target for new chemotherapeutic agents. *J Natl Cancer Inst* 92, 182-3.

Giannakakou, P., Sackett, D. L., Kang, Y. K., Zhan, Z., Buters, J. T., Fojo, T. and Poruchynsky, M. S. (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* 272, 17118-25.

Giodini, A., Kallio, M. J., Wall, N. R., Gorbsky, G. J., Tognin, S., Marchisio, P. C., Symons, M. and Altieri, D. C. (2002). Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* **62**, 2462-7.

Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T. and Adam, S. A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* **14**, 505-14.

Gonczy, P. (2002). Nuclear envelope: torn apart at mitosis. *Curr Biol* 12, R242-4. Gonsior, S. M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B. M. and

Hinssen, H. (1999). Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci* **112** (**Pt 6**), 797-809.

Goo, Y. H., Na, S. Y., Zhang, H., Xu, J., Hong, S., Cheong, J., Lee, S. K. and Lee, J. W. (2004). Interactions between activating signal cointegrator-2 and the tumor suppressor retinoblastoma in androgen receptor transactivation. *J Biol Chem* 279, 7131-5.

Gorlich, D. and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-60.

Gottesfeld, J. M. and Forbes, D. J. (1997). Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem Sci* 22, 197-202.

Gottesfeld, J. M., Wolf, V. J., Dang, T., Forbes, D. J. and Hartl, P. (1994). Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIIB component. *Science* **263**, 81-4.

Greenwood, J. A. and Johnson, G. V. (1995). Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp Cell Res* **220**, 332-7.

Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. (2001). Ran induces

spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* **104**, 83-93.

Guha, S., Manna, T. K., Das, K. P. and Bhattacharyya, B. (1998). Chaperone-like activity of tubulin. *J Biol Chem* 273, 30077-80.

Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechere, L. and Job, D. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J Cell Biol* **142**, 167-79.

Haber, M., Burkhart, C. A., Regl, D. L., Madafiglio, J., Norris, M. D. and Horwitz, S. B. (1995). Altered expression of M beta 2, the class II beta-tubulin isotype, in a murine J774.2 cell line with a high level of taxol resistance. *J Biol Chem* **270**, 31269-75.

Haga, K., Ogawa, H., Haga, T. and Murofushi, H. (1998). GTP-binding-proteincoupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin. *Eur J Biochem* 255, 363-8.

Haldar, S., Basu, A. and Croce, C. M. (1997). Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* 57, 229-33.

Hamill, D. R., Howell, B., Cassimeris, L. and Suprenant, K. A. (1998). Purification of a WD repeat protein, EMAP, that promotes microtubule dynamics through an inhibition of rescue. *J Biol Chem* **273**, 9285-91.

Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y. and Hiraoka, Y. (2000). Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J Cell Sci* **113** (Pt 5), 779-94.

Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W. and Crane-Robinson, C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *Embo J* 13, 1823-30.

Hebbes, T. R., Thorne, A. W. and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* **7**, 1395-402.

Henderson, B. R. and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* **274**, 693-707.

Hervy, M., Hoffman, L. and Beckerle, M. C. (2006). From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 524-32.

Hetzer, M. W., Walther, T. C. and Mattaj, I. W. (2005). Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 347-80.

Hodzic, D. M., Yeater, D. B., Bengtsson, L., Otto, H. and Stahl, P. D. (2004). Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem* **279**, 25805-12.

Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P. and Bradbury, E. M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* **268**, 305-14.

Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M. and Cassimeris, L. (1999). Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Mol Biol Cell* **10**, 105-18.

Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M. and Luhrmann, R. (1998). Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *Embo J* 17, 4114-26.

Iida, K., Iida, H. and Yahara, I. (1986). Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* **165**, 207-15.

Jaffrezou, J. P., Dumontet, C., Derry, W. B., Duran, G., Chen, G., Tsuchiya, E., Wilson, L., Jordan, M. A. and Sikic, B. I. (1995). Novel mechanism of resistance to paclitaxel (Taxol) in human K562 leukemia cells by combined selection with PSC 833. *Oncol Res* 7, 517-27.

Jakel, S. and Gorlich, D. (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J* **17**, 4491-502.

Jeppesen, P. and Turner, B. M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* **74**, 281-9.

Jimenez-Barbero, J., Amat-Guerri, F. and Snyder, J. P. (2002). The solid state, solution and tubulin-bound conformations of agents that promote microtubule stabilization. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2**, 91-122.

Jones, D. T. (2000). A practical guide to protein structure prediction. *Methods Mol Biol* 143, 131-54.

Jordan, M. A., Margolis, R. L., Himes, R. H. and Wilson, L. (1986). Identification of a distinct class of vinblastine binding sites on microtubules. *J Mol Biol* 187, 61-73.

Jordan, M. A., Ojima, I., Rosas, F., Distefano, M., Wilson, L., Scambia, G. and Ferlini, C. (2002). Effects of novel taxanes SB-T-1213 and IDN5109 on tubulin polymerization and mitosis. *Chem Biol* **9**, 93-101.

Jordan, M. A., Thrower, D. and Wilson, L. (1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res* **51**, 2212-22.

Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D. and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9552-6.

Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H. and Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* **56**, 816-25.

Jordan, M. A. and Wilson, L. (1990). Kinetic analysis of tubulin exchange at microtubule ends at low vinblastine concentrations. *Biochemistry* **29**, 2730-9.

Jordan, M. A. and Wilson, L. (1998). Use of drugs to study role of microtubule assembly dynamics in living cells. *Methods Enzymol* **298**, 252-76.

Jordan, M. A. and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**, 253-65.

Joseph, J., Tan, S. H., Karpova, T. S., McNally, J. G. and Dasso, M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol* **156**, 595-602.

Joshi, H. C. and Cleveland, D. W. (1989). Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *J Cell Biol* **109**, 663-73.

Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. and Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**, 33-8.

Katsetos, C. D., Herman, M. M., Frankfurter, A., Uffer, S., Perentes, E. and Rubinstein, L. J. (1991). Neuron-associated class III beta-tubulin isotype, microtubuleassociated protein 2, and synaptophysin in human retinoblastomas in situ. Further immunohistochemical observations on the Flexner-Wintersteiner rosettes. *Lab Invest* 64, 45-54.

Kavallaris, M., Kuo, D. Y., Burkhart, C. A., Regl, D. L., Norris, M. D., Haber, M. and Horwitz, S. B. (1997). Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* 100, 1282-93.

Kimble, M., Dettman, R. W. and Raff, E. C. (1990). The beta 3-tubulin gene of Drosophila melanogaster is essential for viability and fertility. *Genetics* **126**, 991-1005.

Kirschberg, T. A., VanDeusen, C. L., Rothbard, J. B., Yang, M. and Wender, P. A. (2003). Arginine-based molecular transporters: the synthesis and chemical evaluation of releasable taxol-transporter conjugates. *Org Lett* **5**, 3459-62.

Koster, M., Lykke-Andersen, S., Elnakady, Y. A., Gerth, K., Washausen, P., Hofle, G., Sasse, F., Kjems, J. and Hauser, H. (2003). Ratjadones inhibit nuclear export by blocking CRM1/exportin 1. *Exp Cell Res* 286, 321-31.

Kotani, S., Ikai, A., Kawai, G., Maekawa, S., Yokoyama, S. and Sakai, H. (1988). Microtubule-assembly inhibitor protein. Its distribution, localization and physicochemical properties. *Eur J Biochem* **176**, 573-80.

Kourmouli, N., Dialynas, G., Petraki, C., Pyrpasopoulou, A., Singh, P. B., Georgatos, S. D. and Theodoropoulos, P. A. (2001). Binding of heterochromatin protein 1 to the nuclear envelope is regulated by a soluble form of tubulin. *J Biol Chem* **276**, 13007-14.

Kourmouli, N., Theodoropoulos, P. A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A. S., Cowell, I. G., Singh, P. B. and Georgatos, S. D. (2000). Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *Embo J* **19**, 6558-68.

Kruhlak, M. J., Hendzel, M. J., Fischle, W., Bertos, N. R., Hameed, S., Yang, X. J., Verdin, E. and Bazett-Jones, D. P. (2001). Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J Biol Chem* 276, 38307-19.

Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9112-7.

Kuersten, S., Ohno, M. and Mattaj, I. W. (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol* 11, 497-503.

Kumar, S., Saradhi, M., Chaturvedi, N. K. and Tyagi, R. K. (2006). Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview. *Mol Cell Endocrinol* **246**, 147-56.

Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. and Gorlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**, 1061-71.

Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. and Gorlich, D. (1998). Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* **1**, 359-69.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-20.

Lamond, A. I. and Earnshaw, W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* **280**, 547-53.

Le Gallic, L., Virgilio, L., Cohen, P., Biteau, B. and Mavrothalassitis, G. (2004). ERF nuclear shuttling, a continuous monitor of Erk activity that links it to cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 24, 1206-18.

Lee, J. S., Komaki, R., Morice, R. C., Ro, J. Y., Kalapurakal, S. K., Schea, R., Murphy, W. K., Shin, D. M., Fox, N. T., Walsh, G. L. et al. (1999). A pilot clinical laboratory trial of paclitaxel and endobronchial brachytherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Semin Radiat Oncol* 9, 121-9.

Lee, J. W., Lu, J. Y., Low, P. S. and Fuchs, P. L. (2002). Synthesis and evaluation of taxol-folic acid conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorg Med Chem* **10**, 2397-414.

Lee, L. F., Schuerer-Maly, C. C., Lofquist, A. K., van Haaften-Day, C., Ting, J. P., White, C. M., Martin, B. K. and Haskill, J. S. (1996). Taxol-dependent transcriptional activation of IL-8 expression in a subset of human ovarian cancer. *Cancer Res* 56, 1303-8.

Leresche, A., Wolf, V. J. and Gottesfeld, J. M. (1996). Repression of RNA polymerase II and III transcription during M phase of the cell cycle. *Exp Cell Res* **229**, 282-8.

Lewis, S. A., Gu, W. and Cowan, N. J. (1987). Free intermingling of mammalian beta-tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell* **49**, 539-48.

Ligon, L. A., Shelly, S. S., Tokito, M. and Holzbaur, E. L. (2003). The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization. *Mol Biol Cell* **14**, 1405-17.

Lin, F., Blake, D. L., Callebaut, I., Skerjanc, I. S., Holmer, L., McBurney, M. W., Paulin-Levasseur, M. and Worman, H. J. (2000). MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* **275**, 4840-7.

Loiodice, I., Alves, A., Rabut, G., Van Overbeek, M., Ellenberg, J., Sibarita, J. B. and Doye, V. (2004). The entire Nup107-160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis. *Mol Biol Cell* **15**, 3333-44.

Lopata, M. A. and Cleveland, D. W. (1987). In vivo microtubules are copolymers of available beta-tubulin isotypes: localization of each of six vertebrate beta-tubulin isotypes using polyclonal antibodies elicited by synthetic peptide antigens. *J Cell Biol* **105**, 1707-20.

Los, D. A. and Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta* 1666, 142-57.

Lu, Q. and Luduena, R. F. (1994). In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 269, 2041-7.

Luduena, R. F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* **178**, 207-75.

Lyman, S. K. and Gerace, L. (2001). Nuclear pore complexes: dynamics in unexpected places. *J Cell Biol* 154, 17-20.

Maccioni, R. B., Vera, J. C., Dominguez, J. and Avila, J. (1989). A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch Biochem Biophys* **275**, 568-79.

MacRae, T. H. (1997). Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 244, 265-78.

Maison, C., Pyrpasopoulou, A., Theodoropoulos, P. A. and Georgatos, S. D. (1997). The inner nuclear membrane protein LAP1 forms a native complex with B-type lamins and partitions with spindle-associated mitotic vesicles. *Embo J* **16**, 4839-50.

Makatsori, D., Kourmouli, N., Polioudaki, H., Shultz, L. D., McLean, K., Theodoropoulos, P. A., Singh, P. B. and Georgatos, S. D. (2004). The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *J Biol Chem* **279**, 25567-73.

Mallik, R., Petrov, D., Lex, S. A., King, S. J. and Gross, S. P. (2005). Building complexity: an in vitro study of cytoplasmic dynein with in vivo implications. *Curr Biol* 15, 2075-85.

Malone, C. J., Fixsen, W. D., Horvitz, H. R. and Han, M. (1999). UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during C. elegans development. *Development* **126**, 3171-81.

Malone, C. J., Misner, L., Le Bot, N., Tsai, M. C., Campbell, J. M., Ahringer, J. and White, J. G. (2003). The C. elegans hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell* **115**, 825-36.

Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. (1995). Microtubules and microtubuleassociated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 72-81.

Mandelkow, E. M., Biernat, J., Drewes, G., Steiner, B., Lichtenberg-Kraag, B., Wille, H., Gustke, N. and Mandelkow, E. (1993). Microtubule-associated protein tau, paired helical filaments, and phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* **695**, 209-16.

Maney, T., Wagenbach, M. and Wordeman, L. (2001). Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem* **276**, 34753-8.

Margolis, R. L. and Wilson, L. (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *Bioessays* **20**, 830-6.

Martin, A. C., Toda, K., Stirk, H. J. and Thornton, J. M. (1995). Long loops in proteins. *Protein Eng* 8, 1093-101.

Martins, S. B., Eide, T., Steen, R. L., Jahnsen, T., Skalhegg, B. S. and Collas, P. (2000). HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics. *J Cell Sci* **113** Pt **21**, 3703-13.

Mattaj, I. W. and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.

Mattout, A., Dechat, T., Adam, S. A., Goldman, R. D. and Gruenbaum, Y. (2006). Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 335-41.

McNally, F. (1998). Purification and assay of the microtubule-severing protein katanin. *Methods Enzymol* **298**, 206-18.

McNally, K. P., Buster, D. and McNally, F. J. (2002). Katanin-mediated microtubule severing can be regulated by multiple mechanisms. *Cell Motil Cytoskeleton* **53**, 337-49.

Meissner, T., Krause, E. and Vinkemeier, U. (2004). Ratjadone and leptomycin B block CRM1-dependent nuclear export by identical mechanisms. *FEBS Lett* **576**, 27-30.

Menko, A. S. and Tan, K. B. (1980). Nuclear tubulin of tissue culture cells. *Biochim Biophys Acta* 629, 359-70.

Michalakis, J., Georgatos, S. D., de Bree, E., Polioudaki, H., Romanos, J., Georgoulias, V., Tsiftsis, D. D. and Theodoropoulos, P. A. (2007). Short-term exposure of cancer cells to micromolar doses of paclitaxel, with or without hyperthermia, induces longterm inhibition of cell proliferation and cell death in vitro. *Ann Surg Oncol* 14, 1220-8.

Michalakis, J., Georgatos, S. D., Romanos, J., Koutala, H., Georgoulias, V., Tsiftsis, D. and Theodoropoulos, P. A. (2005). Micromolar taxol, with or without hyperthermia, induces mitotic catastrophe and cell necrosis in HeLa cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 56, 615-22.

Miki, H., Okada, Y. and Hirokawa, N. (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* **15**, 467-76.

Mithieux, G., Roux, B. and Rousset, B. (1986). Tubulin-chromatin interactions: evidence for tubulin-binding sites on chromatin and isolated oligonucleosomes. *Biochim Biophys Acta* 888, 49-61.

Mosammaparast, N., Ewart, C. S. and Pemberton, L. F. (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *Embo J* **21**, 6527-38.

Muhlhausser, P., Muller, E. C., Otto, A. and Kutay, U. (2001). Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep* **2**, 690-6.

Mullins, D. W., Burger, C. J. and Elgert, K. D. (1998). Tumor growth modulates macrophage nitric oxide production following paclitaxel administration. *Int J Immunopharmacol* **20**, 537-51.

Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R. and Weis, K. (2001). Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell* **104**, 95-106.

Nakatani, Y., Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Tagami, H. and Almouzni, G. (2004). Two distinct nucleosome assembly pathways: dependent or independent of DNA synthesis promoted by histone H3.1 and H3.3 complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **69**, 273-80.

Newton, C. N., DeLuca, J. G., Himes, R. H., Miller, H. P., Jordan, M. A. and Wilson, L. (2002). Intrinsically slow dynamic instability of HeLa cell microtubules in vitro. *J Biol Chem* 277, 42456-62.

Nicolaou, K. C., Riemer, C., Kerr, M. A., Rideout, D. and Wrasidlo, W. (1993). Design, synthesis and biological activity of protaxols. *Nature* **364**, 464-6.

Nicolaou, K. C., Yang, Z., Liu, J. J., Ueno, H., Nantermet, P. G., Guy, R. K., Claiborne, C. F., Renaud, J., Couladouros, E. A., Paulvannan, K. et al. (1994). Total synthesis of taxol. *Nature* **367**, 630-4.

Nielsen, A. L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J. A., Remboutsika, E., Chambon, P. and Losson, R. (2001). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* 7, 729-39.

Niethammer, A., Gaedicke, G., Lode, H. N. and Wrasidlo, W. (2001). Synthesis and preclinical characterization of a paclitaxel prodrug with improved antitumor activity and water solubility. *Bioconjug Chem* **12**, 414-20.

Nikolakaki, E., Meier, J., Simos, G., Georgatos, S. D. and Giannakouros, T. (1997). Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34(cdc2). *J Biol Chem* **272**, 6208-13.

Nikolakaki, E., Simos, G., Georgatos, S. D. and Giannakouros, T. (1996). A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *J Biol Chem* 271, 8365-72.

Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* **69**, 277-302.

Nogales, E. (2001). Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**, 397-420.

Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Luduena, R. F. and Downing, K. H. (1995). Structure of tubulin at 6.5 A and location of the taxol-binding site. *Nature* **375**, 424-7.

Nowak, G., Pestic-Dragovich, L., Hozak, P., Philimonenko, A., Simerly, C., Schatten, G. and de Lanerolle, P. (1997). Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. *J Biol Chem* 272, 17176-81.

Nuijen, B., Bouma, M., Schellens, J. H. and Beijnen, J. H. (2001). Progress in the development of alternative pharmaceutical formulations of taxanes. *Invest New Drugs* **19**, 143-53.

Oakley, B. R. (2000). An abundance of tubulins. Trends Cell Biol 10, 537-42.

Oakley, C. E. and Oakley, B. R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of Aspergillus nidulans. *Nature* **338**, 662-4.

Ohi, R., Coughlin, M. L., Lane, W. S. and Mitchison, T. J. (2003). An inner centromere protein that stimulates the microtubule depolymerizing activity of a KinI kinesin. *Dev Cell* **5**, 309-21.

Orstavik, S., Eide, T., Collas, P., Han, I. O., Tasken, K., Kieff, E., Jahnsen, T. and Skalhegg, B. S. (2000). Identification, cloning and characterization of a novel nuclear protein, HA95, homologous to A-kinase anchoring protein 95. *Biol Cell* **92**, 27-37.

Orvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F. and Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J* 23, 785-94.

Ovechkina, Y., Maddox, P., Oakley, C. E., Xiang, X., Osmani, S. A., Salmon, E. D. and Oakley, B. R. (2003). Spindle formation in Aspergillus is coupled to tubulin movement into the nucleus. *Mol Biol Cell* **14**, 2192-200.

Padmakumar, V. C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A. A., Gotzmann, J., Foisner, R. and Karakesisoglou, I. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci* 118, 3419-30.

Panda, D., Miller, H. P., Banerjee, A., Luduena, R. F. and Wilson, L. (1994). Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11358-62.

Panda, D., Miller, H. P. and Wilson, L. (1999). Rapid treadmilling of brain microtubules free of microtubule-associated proteins in vitro and its suppression by tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12459-64.

Pante, N. and Aebi, U. (1996). Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **31**, 153-99.

Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R. and Gorlich, D. (1999). CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol* **145**, 255-64.

Pederson, T. and Aebi, U. (2002). Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol* **140**, 3-9.

Pederson, T. and Aebi, U. (2005). Nuclear actin extends, with no contraction in sight. *Mol Biol Cell* **16**, 5055-60.

Pemberton, L. F. and Paschal, B. M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* **6**, 187-98.

Pereira, G., Knop, M. and Schiebel, E. (1998). Spc98p directs the yeast gammatubulin complex into the nucleus and is subject to cell cycle-dependent phosphorylation on the nuclear side of the spindle pole body. *Mol Biol Cell* **9**, 775-93.

Pitcher, J. A., Hall, R. A., Daaka, Y., Zhang, J., Ferguson, S. S., Hester, S., Miller, S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Barak, L. S. (1998). The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J Biol Chem* 273, 12316-24.

Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P. A., Singh, P. B., Giannakouros, T. and Georgatos, S. D. (2001). Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep* **2**, 920-5.

Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* 86, 985-94.

Pyrpasopoulou, A., Meier, J., Maison, C., Simos, G. and Georgatos, S. D. (1996). The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *Embo J* **15**, 7108-19.

Quimby, B. B., Wilson, C. A. and Corbett, A. H. (2000). The interaction between Ran and NTF2 is required for cell cycle progression. *Mol Biol Cell* **11**, 2617-29. Ranganathan, S., Dexter, D. W., Benetatos, C. A., Chapman, A. E., Tew, K. D. and Hudes, G. R. (1996). Increase of beta(III)- and beta(IVa)-tubulin isotopes in human prostate carcinoma cells as a result of estramustine resistance. *Cancer Res* **56**, 2584-9.

Ranganathan, S., Salazar, H., Benetatos, C. A. and Hudes, G. R. (1997). Immunohistochemical analysis of beta-tubulin isotypes in human prostate carcinoma and benign prostatic hypertrophy. *Prostate* **30**, 263-8.

Reaven, E. P., Cheng, Y. and Miller, M. D. (1977). Quantitative analysis of tubulin and microtubule compartments in isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol* **75**, 731-42.

Robbins, E. and Marcus, P. I. (1964). Mitotically Synchronized Mammalian Cells: a Simple Method for Obtaining Large Populations. *Science* **144**, 1152-3.

Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-23.

Rodionov, V. I. and Borisy, G. G. (1997). Microtubule treadmilling in vivo. *Science* 275, 215-8.

Roussel, P., Andre, C., Comai, L. and Hernandez-Verdun, D. (1996). The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* **133**, 235-46.

Rowinsky, E. K. and Donehower, R. C. (1995). Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* 332, 1004-14.

Roychowdhury, S., Panda, D., Wilson, L. and Rasenick, M. M. (1999). G protein alpha subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem* **274**, 13485-90.

Salaycik, K. J., Fagerstrom, C. J., Murthy, K., Tulu, U. S. and Wadsworth, P. (2005). Quantification of microtubule nucleation, growth and dynamics in wound-edge cells. *J Cell Sci* **118**, 4113-22.

Salina, D., Bodoor, K., Eckley, D. M., Schroer, T. A., Rattner, J. B. and Burke, B. (2002). Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell* 108, 97-107.

Salina, D., Enarson, P., Rattner, J. B. and Burke, B. (2003). Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J Cell Biol* 162, 991-1001.

Salpingidou, G., Smertenko, A., Hausmanowa-Petrucewicz, I., Hussey, P. J. and Hutchison, C. J. (2007). A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *J Cell Biol* **178**, 897-904.

Saredi, A., Howard, L. and Compton, D. A. (1996). NuMA assembles into an extensive filamentous structure when expressed in the cell cytoplasm. *J Cell Sci* 109 (Pt 3), 619-30.

Sasagawa, S., Yamamoto, A., Ichimura, T., Omata, S. and Horigome, T. (1999). In vitro nuclear assembly with affinity-purified nuclear envelope precursor vesicle fractions, PV1 and PV2. *Eur J Cell Biol* **78**, 593-600.

Scaffidi, P. and Misteli, T. (2006). Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* **312**, 1059-63.

Schirmer, E. C. and Gerace, L. (2005). The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends Biochem Sci* **30**, 551-8.

Schroer, T. A. (2004). Dynactin. Annu Rev Cell Dev Biol 20, 759-79.

Schwarzerova, K., Petrasek, J., Panigrahi, K. C., Zelenkova, S., Opatrny, Z. and Nick, P. (2006). Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma* **227**, 185-96.

Seki, N., Ueki, N., Yano, K., Saito, T., Masuho, Y. and Muramatsu, M. (2000). cDNA cloning of a novel human gene NAKAP95, neighbor of A-kinase anchoring protein 95 (AKAP95) on chromosome 19p13.11-p13.12 region. *J Hum Genet* **45**, 31-7.

Shaw, S. L., Kamyar, R. and Ehrhardt, D. W. (2003). Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science* **300**, 1715-8.

Simos, G. and Georgatos, S. D. (1992). The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *Embo J* **11**, 4027-36.

Simos, G. and Georgatos, S. D. (1994). The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett* **346**, 225-8.

Simos, G., Maison, C. and Georgatos, S. D. (1996). Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian erythrocyte nuclear envelope. *J Biol Chem* 271, 12617-25.

Singer, W. D., Jordan, M. A., Wilson, L. and Himes, R. H. (1989). Binding of vinblastine to stabilized microtubules. *Mol Pharmacol* **36**, 366-70.

Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.

Spittle, C., Charrasse, S., Larroque, C. and Cassimeris, L. (2000). The interaction of TOGp with microtubules and tubulin. *J Biol Chem* **275**, 20748-53.

Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. and Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041-50.

Starr, D. A. and Han, M. (2002). Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* **298**, 406-9.

Stearns, T., Evans, L. and Kirschner, M. (1991). Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65, 825-36.

Steen, R. L., Martins, S. B., Tasken, K. and Collas, P. (2000). Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* **150**, 1251-62.

Strome, S., Powers, J., Dunn, M., Reese, K., Malone, C. J., White, J., Seydoux, G. and Saxton, W. (2001). Spindle dynamics and the role of gamma-tubulin in early Caenorhabditis elegans embryos. *Mol Biol Cell* **12**, 1751-64.

Stuurman, N., Heins, S. and Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* **122**, 42-66.

Stuven, T., Hartmann, E. and Gorlich, D. (2003). Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *Embo J* 22, 5928-40.

Sullivan, K. F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol* 4, 687-716.

Sullivan, K. F. and Cleveland, D. W. (1986). Identification of conserved isotypedefining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4327-31.

Suntharalingam, M. and Wente, S. R. (2003). Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell* **4**, 775-89.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51-61.

Theodoropoulos, P. A., Polioudaki, H., Kostaki, O., Derdas, S. P., Georgoulias, V., Dargemont, C. and Georgatos, S. D. (1999). Taxol affects nuclear lamina and pore complex organization and inhibits import of karyophilic proteins into the cell nucleus. *Cancer Res* **59**, 4625-33. **Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. and Peggion, C.** (2001). Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C alpha-tetrasubstitution). *Biopolymers* **60**, 396-419.

Tse, C., Fletcher, T. M. and Hansen, J. C. (1998). Enhanced transcription factor access to arrays of histone H3/H4 tetramer.DNA complexes in vitro: implications for replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12169-73.

Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G. and Wolffe, A. P. (1997). Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *Embo J* **16**, 2096-107.

Vale, R. D. (2003). Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism. *J Cell Biol* 163, 445-50.

Vaughan, S., Attwood, T., Navarro, M., Scott, V., McKean, P. and Gull, K. (2000). New tubulins in protozoal parasites. *Curr Biol* **10**, R258-9.

Verdier-Pinard, P., Wang, F., Burd, B., Angeletti, R. H., Horwitz, S. B. and Orr, G. A. (2003). Direct analysis of tubulin expression in cancer cell lines by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* 42, 12019-27.

Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev* 14, 1430-8.

Vigers, G. P. and Lohka, M. J. (1991). A distinct vesicle population targets membranes and pore complexes to the nuclear envelope in Xenopus eggs. *J Cell Biol* **112**, 545-56.

Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M. and Nishida, E. (1998). Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *Embo J* 17, 1635-41.

Walczak, C. E., Mitchison, T. J. and Desai, A. (1996). XKCM1: a Xenopus kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* **84**, 37-47.

Walss-Bass, C., Kreisberg, J. I. and Luduena, R. F. (2001). Mechanism of localization of betaII-tubulin in the nuclei of cultured rat kidney mesangial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **49**, 208-17.

Walss-Bass, C., Kreisberg, J. I. and Luduena, R. F. (2003). Effect of the antitumor drug vinblastine on nuclear betaII-tubulin in cultured rat kidney mesangial cells. *Invest New Drugs* **21**, 15-20.

Walss-Bass, C., Xu, K., David, S., Fellous, A. and Luduena, R. F. (2002). Occurrence of nuclear beta(II)-tubulin in cultured cells. *Cell Tissue Res* **308**, 215-23.

Walss, C., Kreisberg, J. I. and Luduena, R. F. (1999). Presence of the betall isotype of tubulin in the nuclei of cultured mesangial cells from rat kidney. *Cell Motil Cytoskeleton* **42**, 274-84.

Wang, S., Zhelev, N. Z., Duff, S. and Fischer, P. M. (2006). Synthesis and biological activity of conjugates between paclitaxel and the cell delivery vector penetratin. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 2628-31.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. and McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. *J Am Chem Soc* **93**, 2325-7.

Warner, A. K. and Sloboda, R. D. (1999). C-terminal domain of the mitotic apparatus protein p62 targets the protein to the nucleolus during interphase. *Cell Motil Cytoskeleton* 44, 68-80.

Waterman-Storer, C. M. and Salmon, E. D. (1997). Microtubule dynamics: treadmilling comes around again. *Curr Biol* **7**, R369-72.

Weber, K., Plessmann, U. and Traub, P. (1989). Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett* **257**, 411-4.

Weintraub, H. (1985). Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states. *Cell* 42, 705-11.

Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**, 441-51.

Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. and Taylor, S. S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82, 463-73.

Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Merdes, A. and Zheng, Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* **291**, 653-6.

Wilde, A. and Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* **284**, 1359-62.

Worman, H. J., Evans, C. D. and Blobel, G. (1990). The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J Cell Biol* 111, 1535-42.

Worman, H. J. and Gundersen, G. G. (2006). Here come the SUNs: a nucleocytoskeletal missing link. *Trends Cell Biol* 16, 67-9.

Worman, H. J., Yuan, J., Blobel, G. and Georgatos, S. D. (1988). A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8531-4.

Xiao, Z., Liu, X. and Lodish, H. F. (2000). Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem* 275, 23425-8.

Xu, K. and Luduena, R. F. (2002). Characterization of nuclear betaII-tubulin in tumor cells: a possible novel target for taxol. *Cell Motil Cytoskeleton* **53**, 39-52.

Yanagida, M., Hayano, T., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Natsume, T., Isobe, T. and Takahashi, N. (2004). Human fibrillarin forms a sub-complex with splicing factor 2-associated p32, protein arginine methyltransferases, and tubulins alpha 3 and beta 1 that is independent of its association with preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* **279**, 1607-14.

Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J. C. and Worman, H. J. (1997). Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem* **272**, 14983-9.

Yeh, T. S., Hsieh, R. H., Shen, S. C., Wang, S. H., Tseng, M. J., Shih, C. M. and Lin, J. J. (2004). Nuclear betaII-tubulin associates with the activated notch receptor to modulate notch signaling. *Cancer Res* 64, 8334-40.

Yeung, T. K., Germond, C., Chen, X. and Wang, Z. (1999). The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 398-404.

Yoneda, Y. (2000). New steps toward the nucleocytoplasmic traffic of macromolecules. *Cell Struct Funct* **25**, 205-6.

Zamir, E. and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114, 3583-90.

Zhai, Y. and Borisy, G. G. (1994). Quantitative determination of the proportion of microtubule polymer present during the mitosis-interphase transition. *J Cell Sci* **107** (**Pt 4**), 881-90.

Zhang, D., Rogers, G. C., Buster, D. W. and Sharp, D. J. (2007). Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *J Cell Biol* 177, 231-42.

Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A. and Shanahan, C. M. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci* 114, 4485-98.

Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M. S., Mizuuchi, K., Krause, M. and Craigie, R. (2000). Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8997-9002.

Zhu, X., Ding, L. and Pei, G. (1997). Carboxyl terminus of mitosin is sufficient to confer spindle pole localization. *J Cell Biochem* 66, 441-9.