

**SAP30L-VALKUAISEN
TUMAJYVÄSVUOROVAIKUTUSTEN TUTKIMINEN**

Laura Nieminen
syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen laitos
HemoRes-tutkimusryhmä
11/2010

Tiivistelmä

Tampereen yliopisto

Lääketieteen laitos

HemoRes tutkimusryhmä

NIEMINEN LAURA: SAP30L-VALKUAISEN TUMAJYVÄSVUOROVAIKUTUSTEN
TUTKIMINEN

Kirjallinen työ, 25 s.

Ohjaaja: LT, dosentti Olli Lohi

marraskuu 2010

Avainsanat: deasetylaatio, geenien ilmentyminen, HDAC

Syövässä geenien ilmentymisen säätely on usein häiriintynyt, mikä saa solut jakautumaan hallitsemattomasti. Transkriptio, eli DNA-ketjun mallin mukaan tapahtuva RNA-molekyylin rakentuminen, on tärkein tekijä, joka säätelee geenien ilmentymistä. Transkriptio on riippuvainen DNA:n pakkautumisasteesta, johon vaikuttaa DNA:n ympärillä olevien histoni-valkuaisien asetyloityminen. Asetyyliryhmien lisääminen histoneihin saa aikaan DNA:n rakenteen löystymisen ja aktiivisen transkription, kun taas niiden poistamisella on päinvastainen vaikutus. Histoneista asetyyliiryhmiä poistavat entsyymit ovat nimeltään histonideasetylaaseja (HDAC), jotka muodostavat muiden valkuaisien kanssa toiminnallisia yksiköitä, repressorikomplekseja. Yksi näistä komplekseista on nimeltään Sin3A-korepressorikompleksi. SAP30L (Sin3A-associated protein 30-like) on eräs sen uusimmista jäsenistä. Se osallistuu geenien ilmentymisen säätelyyn geenien vaimentamisen kautta. RNA-helikaasit puolestaan ovat valkuaisia, jotka osallistuvat solujen kasvuun ja jakautumiseen.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, sitoutuuko SAP30L RNA-helikaasi DDX56:n kanssa. Tämän selvittämiseksi käytettiin ns. pull-down-menetelmää, jossa solulysaatista ”kalastetaan” valkuaisia GST-SAP30L-fuusioproteiinilla. Tulokset analysoitiin Western Blotting -menetelmällä.

SAP30L sitoutuu DDX56:n kanssa, mutta vuorovaikutus on heikko. Tämän vuorovaikutuksen todellinen merkitys vaatii jatkotutkimuksia.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	4
1.1 Geenien ilmentymisen säätely.....	4
1.2 SAP30L.....	8
1.3 NOH61 eli DDX56	11
1.4 Tutkimuksen tavoitteet.....	12
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	13
2.1 GST (glutathioni S transferaasi) -fuusiovalkuaisen valmistus	13
2.2 Tuottovektorin valmistus	14
2.3 Transfektio	15
2.4 Solujen hajotus.....	15
2.5 GST pull-down	16
2.6 Western Blotting.....	16
3 TULOKSET	17
3.1 GST-fuusiovalkuaisen tuotto.....	17
3.2 Tuottovektorin valmistus	18
3.3 Transfektiot.....	18
3.4 Pull-down ja Western Blotting.....	19
4 POHDINTA	21
VIITTEET	23

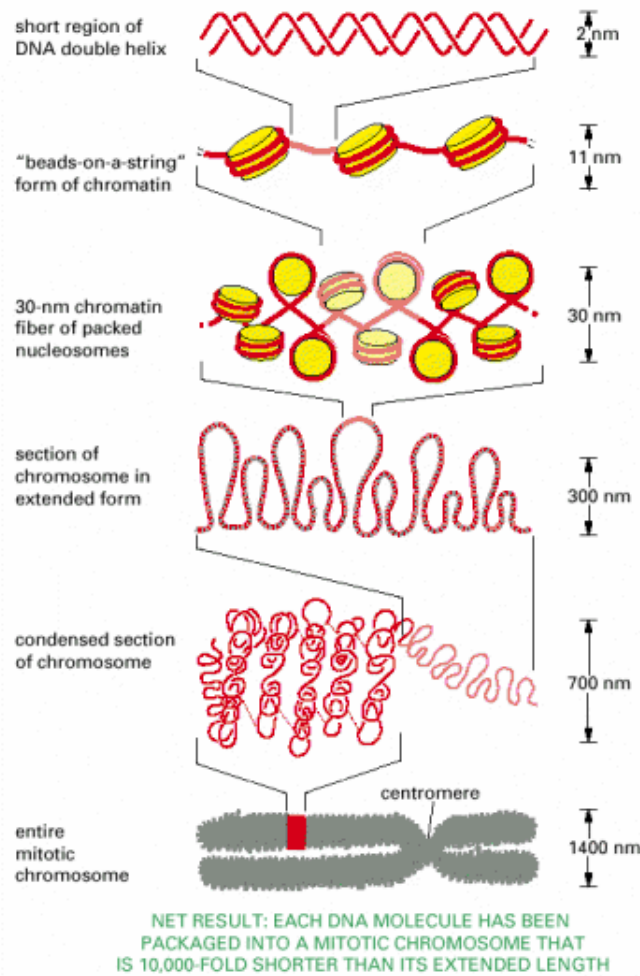
1 JOHDANTO

1.1 Geenien ilmentymisen säätely

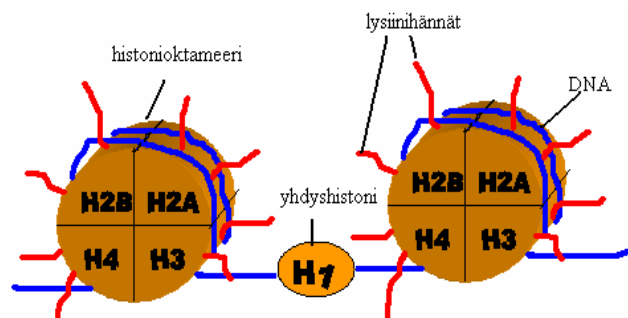
Solujen geneettinen materiaali, DNA, on solujen tumissa järjestäytyneenä kromatiiniksi, josta sitten muodostuvat kromosomit (kuva 1) (Alberts ym., 2002). Kromatiinin perustoistojakso on nukleosomi. Sen muodostavat kahdeksan histoni-molekyyliä (oktameeri) ja niiden ympärille kietoutunut DNA-kaksoiskierre, jota on 146 emäsparin (bp) verran (kuva 1). Histonit ovat pieniä emäksisiä valkuaisia, joilla on aminopäässään (N-terminus) lysiinihantä. Oktameerissä on neljä histoniparia: H3-H4 tetrameeri ja kaksi H2A-H2B dimeeriä. Nukleosomeja yhdistää vaihtelevan pituinen DNA-juoste, johon on kiinnittynyt histoni H1 (Strahl & Allis, 2000, Alberts ym., 2002).

DNA:n geneettinen koodi siirretään RNA:n muotoon transkriptiossa. RNA:ta voidaan sitten käyttää valkuaisaineiden muodostamiseen tapahtumassa, jota kutsutaan translaatioksi. Transkriptio on tärkein tekijä, joka säätelee geenien ilmentymistä eli geeniekspressiota. Kaiken transkriptionaalisen aktiivisuuden säätelyn perusta on transkriptioryhmien värväminen kohdegeenien luokse. (Hager ym., 2009.) On myös olemassa säätelyvalkuaisia, jotka sitoituessaan tietyille alueelle DNA:ssa estävät transkriptiota (Alberts ym., 2002). Transkriptiokoneisto sitoutuu tarkasti määriteltyihin sitoutumiskohtiin promootterialueelle ja säätelytekijät sitoutuvat erityisille valvonta-alueille joskus pitkänkin matkan päästä kohdegeneistä. Itse transkriptio on monimutkainen tapahtuma ja sisältää useita vaiheita, mikä johtaa lopulta RNA polymeraasin kiinnittymiseen transkriptoitavalle alueelle ja RNA-synteesiin. (Hager ym., 2009.)

A)



B)



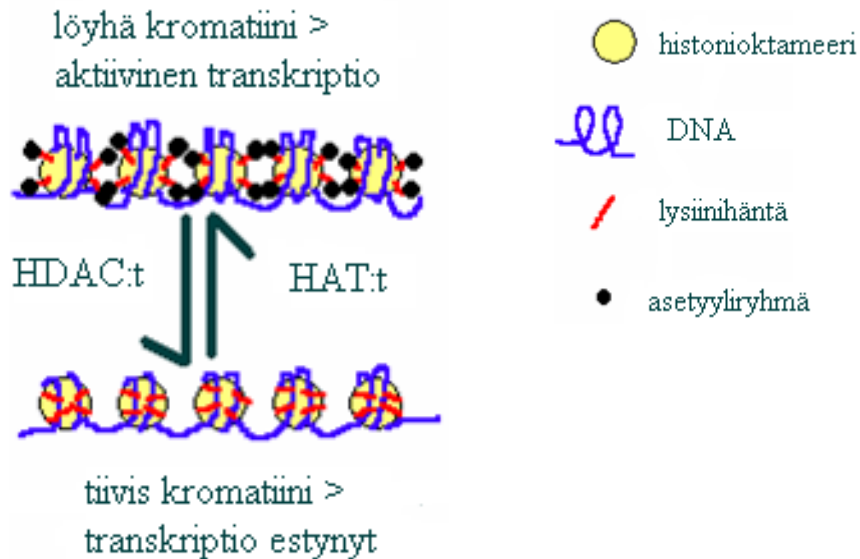
Kuva 1 A) DNA:n pakkautuminen kromosomeiksi. DNA:n kaksoiskierre kietoutuu histonien ympärille kromatiiniksi. Kromatiinissa on histonien lisäksi muitakin valkuaisia. Kromatiini pakkautuu edelleen, ja siitä muodostuvat kromosomit. Mitoottisessa kromosomissa DNA on pakkautunut n. 10 000 kertaa tiiviimmäksi. Kuva kirjasta *The Molecular Biology of the Cell*, kuva 4-55 (Alberts ym., 2002)

B) Nukleosomit. Kromatiinin perusyksikkö on nukleosomi, jossa histonioktameerin ympärille on kiertynyt 146 emäsparia DNA:n kaksoiskierrettä. Nukleosomeja yhdistää vaihteleva määrä DNA:ta ja ns. yhdyshistoni (linker histone). Histonien aminopäässä on lysinihännät. Kuva muokattu de Ruijter ym. (2003) artikkelin kuvasta.

Mitä löyhemmin DNA on pakkautunut, sitä paremmin sitä pystytään transkriптоimaan, kun taas tiiviisti pakattuun DNA:han transkription osallistuvat tekijät eivät pääse sitoutumaan (Allfrey ym., 1964, Kuo & Allis 1998). Soluissa on kahdenlaista kromatiinia: eukromatiinia ja heterokromatiinia (Jenuwein & Allis 2001). Eukromatiini on rakenteeltaan löyhempiä, kun taas heterokromatiini on hyvin tiivistä. Tämä johtuu kromatiinin erilaisesta pakkautumisesta histonien ympärille. (Allfrey 1964, Kuo & Allis 1998.) Siksi eukromatiinialueella sijaitsevat geenit ovat vilkkaan transkription kohteina, kun taas heterokromatiinialueilla on transkription suhteen hiljaista aluetta. Tiivistymisen ja löyhentymisen vaihtelulla säädellään transkriptiota. (Strahl & Allis, 2000)

DNA:n pakkautumisasteeseen voidaan vaikuttaa muokkaamalla histoneja (Allfrey ym., 1964, Kuo & Allis, 1998). Tähän mennessä histoneissa on raportoitu oleva yli 60 eri kohtaa, joita muunnellaan (Ikegami ym., 2009). Yleensä nämä kohdat sijaitsevat histonien aminopäissä. Kuten Kouzarides (2007) katsausartikkelissaan esitti, histoneja voidaan muokata mm. asetyloimalla, metyloimalla ja fosforyloimalla.

Asetyyliryhmiä histonien lysiinihäntiin liittävät histoniasetyylitransferaasit (histone acetyltransferase, HAT). (Wade 2001) Asetyyliryhmien lisääminen histonien aminopäiden lysiinitähteisiin saa aikaan DNA:n rakenteen löystymisen, kun taas niiden poistolla on päinvastainen vaikutus. Tämä perustuu varauksiin: DNA on negatiivisesti varautunut ja lysiinitähteet positiivisesti varautuneita, joten ne ”vetävät” toisiaan puoleensa. Kun lysiinitähteisiin liitetään negatiivinen asetyyliryhmä, ne ”hylkivät” DNA:ta, jolloin kromatiinin rakenne on löyhempiä. (Roth ym., 2001) Histoneista asetyyliryhmiä poistavat entsyymit ovat puolestaan nimeltään histonideasetylaaseja (histone deacetylase, HDAC) (de Ruijter ym., 2003). Alueet, joilta histonien asetyyliryhmät ovat poistettu, ovat tiiviimmin pakattuja ja niiden sisältämiä geenejä ei ilmennetä. Transkriptio estyy, koska nukleosomin tiivis rakenne estää transkription tarvittavan aloituskoneiston muodostumisen ja RNA-molekyylin valmistuksen aloittamisen (Ayer 1999, Grunstein 1997, Hebbes ym., 1998, Wade ym., 1997). (Kuva 2)



Kuva 2 Asetyloinnin ja deasetyloinnin vaikutus. Histonien lysinihänkien asetointi löystyttää DNA:n rakennetta ja johtaa siten transkriptioon. Asetyyliryhmien poisto puolestaan pakkaa DNA:n tiiviimmin histonien ympärille, jolloin transkriptio estyy. HDAC = histonideasetylaasi, HAT = histoniasetyylitransferaasi. Kuva muokattu de Ruijterin ym. (2003) artikkelin kuvasta.

Ihmisen kaikki solut ovat lähtöisin yhdestä hedelmöityneestä munasolusta ja sisältävät saman DNA-sekvenssin (poikkeuksena immuunisolut, jotka luopuvat osasta DNA:taan kehityksensä aikana). Kuitenkin eri solutyyppejä on lukuisia, ja niissä ilmennetään eri geenejä. Solujen erilainen kohtalo määräytyy erilaisen geenien ilmentymisen avulla ns. epigeneettisellä mekanismilla. Tällä tarkoitetaan sellaisia palautuvia muutoksia geenien ilmentymisessä, jotka eivät sisällä muutoksia DNA:n emäsjärjestyksessä (Ikegami ym., 2009). Epigeneettisiä muutoksia ovat DNA:n sytosiini-guaaniini(CpG)-saarekkeiden metylointi ja histonien kemialliset muokkaukset (Esteller, 2008). DNA:n metylaatioiden on osoitettu periytyvän mitoottisesti (Ikegami ym., 2009), mutta histonimuokkausten periytymisestä ei ole täyttä varmuutta.

Solujen erilaistumien vaatii siis muutoksia sekä DNA:n metyloitumisasteessa että histonien muokkaamisessa. Eri kudoksissa onkin havaittu olevan erilailla metyloituja DNA-alueita (geenit ja niiden säätelyelementit), joita kutsutaan nimellä T-DMRs (tissue dependent differentially methylated regions). DNA:n CpG-saarekkeiden metylointi johtaa alueen geenien vaimentumiseen, kun taas ei-metyloidut alueet ovat aktiiviseen transkriptioon kohteena (Kristensen ym., 2009). Histonien ja DNA:n kemialliset muutokset toimivat yhteistyössä: on osoitettu, että tietyn alueen DNA:n metylointi lisää

myös histonien deasetylaatiota sillä alueella, ja deasetylaation esto HDAC-estäjällä, trikostatiini A:lla (trichostatin A, TSA), aiheuttaa vähäisempää metylaatiota tietyissä geeneissä, kun taas yleiseen DNA:n metyloimisasteeseen sillä ei ollut vaikutusta (Ikegami ym., 2009).

Syövässä geenien ilmentyminen on poikkeavaa, koska geenien ilmentymisen säätely on häiriintynyt. Kasvurajoitegeenien ja solun erilaistumisessa tarvittavien geenien ilmentyminen on estynyt, joten solut alkavat jakautua hallitsemattomasti (Minucci ym., 2001). Histonien muokkaus ja DNA:n metylaatio ovat esimerkkejä epigeneettisistä muutoksista, joiden on osoitettu olevan osallisina syövän synnyssä ja etenemisessä (Esteller, 2008). Normaalisolun verrattuna syöpäsoluissa on 20–60 % vähemmän metyloituja CpG-saarekkeita (Esteller, 2005), ja tämän alimetylaation on havaittu lisääntyvän kasvaimen muuttuessa hyvänlaatuisesta esiasteesta levinneeksi syöväksi (Fraga et al., 2004). Alimetylaation todellinen merkitys syövän kehityksen kannalta on vielä epäselvä: aiheuttaako se kasvaimia vai lisääkö se vain riskiä saada niitä.

Epigeneettinen vaimentamistahtuma (epimutaatio) voi olla ensimmäinen tai toinen isku Knudsonin kahden iskun mallissa, jota käytetään selitettäessä syövän syntyä. Kasvurajoitegeeni menettää tehonsa, kun toinenkin alleeli on vaurioitunut mutaation kautta tai häviämällä, jolloin solu alkaa jakautua hallitsemattomasti (Esteller ym., 2001; Myöhänen ym., 1998). Monen suvuittain esiintyvän syövän taustalla onkin havaittu olevan kasvurajoitegeenien itusolumutaatioita (Kristensen ym., 2009). Histonien deasetyloimisasteen muuttumista puolestaan on havaittu leukemioissa (Minucci ym., 2001). Näyttäisi, että epimutaatiot ovat vain harvoin periytyviä ja ne periytyvät ei-mendeliaalisesti, toisin kuin normaalit epigeneettiset muutokset (Dobrovic ja Kristensen, 2009).

1.2 SAP30L

HDAC:t ovat entsyymejä, jotka muodostavat muiden proteiinien kanssa toiminnallisia yksiköitä, joita kutsutaan repressorikomplekseiksi (de Ruijter ym., 2003). Ihmiseltä on löydetty ainakin seitsemän HDAC-kompleksia. Yksi näistä on nimeltään Sin3A-korepressorikompleksi (SWI-independent 3 A). Sen keskeisin valkuainen on Sin3A,

joka on kuin lava, johon muut jäsenet kiinnittyvät (de Rujiter ym., 2003, Taunton ym., 1996, Zhang ym., 1997). Kompleksin jäsenillä on eri tehtäviä: osa sitoutuu DNA:han, jotkut osallistuvat kompleksin värväämiseen kohdegeenien luo ja jotkut osallistuvat itse deasetylointiin. Tämän kompleksin uusin jäsen on SAP30L.

SAP30L:n lähetti-RNA (mRNA) löydettiin, kun tutkittiin epiteelisolujen erilaistumista krypta - villus (ohutsuolen limakalvokuopake - nukkalisäke) -akselilla *in vitro* mesenkymaali-epiteliaalisoluviljelymallissa. Transformoivan kasvutekijä β :n (transforming growth factor- β , TGF- β) lisäys tähän solumalliin aiheutti tiettyjen proteiinien mRNA-tason nousemisen. Yksi näistä osoittautui aminohapposekvenssiltään 70-prosenttisesti identtiseksi ennestään tunnetun valkuaisen, SAP30:n (Sin3A-associated protein 30), kanssa, joten se nimettiin SAP30L:ksi (L = like) (Lindfors ym., 2003). SAP30:n löysivät Zhang ym. (1997), ja se on osa Sin3A-kompleksia, ja sen on osoitettu sitoutuvan Sin3A:han (Zhang ym., 1997, Zhang ym., 1998). SAP30- ja SAP30L-valkuaisista voidaan käyttää yhteisnimeä SAP30-perheen valkuaiset.

SAP30L-geeni sijaitsee kromosomissa 5q33.2. Se koostuu 183 aminohaposta, ja SAP30:een verrattuna siitä puuttuu 38 aminohappoa aminopäästä. Molemmissa on neljä eksonia (Lindfors ym., 2003). Korkeamäki ym. (2008) totesivat, että SAP30L:stä on eri muotoja eri eksoniyhdistelmillä, mikä johtuu mRNA:n vaihtoehtoista silmukoinnista.

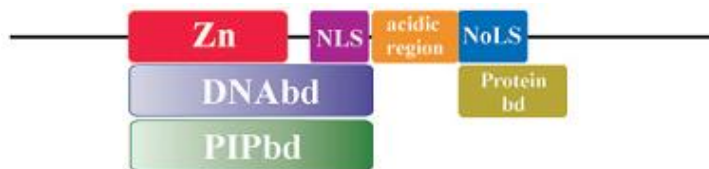
Myös SAP30L:n on osoitettu sitoutuvan mSin3A:han sekä *in vitro* että *in vivo*. Sitoutumiskohta on mSin3A:n PAH/HID-domeeni (paired amphipatic helix, histone deasetylase interacting domain), ja sitoutumisesta vastaa SAP30L:n karboksyyliipää. Karboksyyliipää on lisäksi vastuussa muistakin valkuaisien välisistä vuorovaikutuksista (Viiri ym., 2006).

SAP30L:n aminopää sisältää prosteettisen ryhmän (valkuaisaineeseen sitoutunut molekyyliosa, joka ei koostu aminohapoista), joka on sinkki-ioni (Zn^{2+}). Sen koordinoinnista vastaavat tähteet C-C-C-H (kysteiniit ja histidiini). Tämän jälkeen SAP30L:ssä on vesipakoinen ja monta emästä sisältävä jakso, joka taivuttaa DNA:ta ja sitoutuu siihen sekvenssistä riippumatta. DNA:han sitoutuva alue vuorovaikuttaa myös tiettyjen rasva-aineiden, monofosfoinositidien, kanssa. Monofosfoinositidit kilpailevat samasta sitoutumispaikasta DNA:n kanssa ja niiden läsnäolo johtaa vähentyneeseen

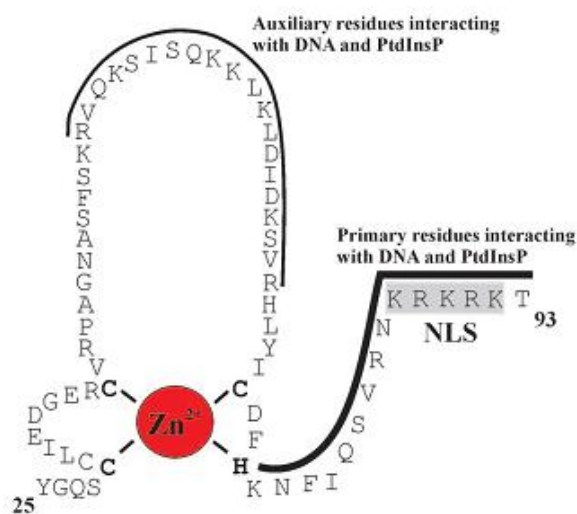
transkription repressioniin. DNA:han sitoutuvan alueen jälkeen on hapanta alue, joka osallistuu vuorovaikutukseen histonien kanssa. (Viiri ym., 2009a)

SAP30L sisältää myös signaalin, joka kohdentaa sen tumamatriksiin (nuclear matrix targeting signal, NMTS) sekä tuma- (nuclear localization signal, NLS=KRKRK) ja tumajyväsignaali (nucleolar localization signal, NoLS=R/K-R/K-X-R/K) (Viiri ym., 2006, Viiri ym., 2009a). NoLS on osa NMTS:ää. Valkuaisten väliset vuorovaikutukset ovat tärkeitä SAP30L:n oikealle sijoittumiselle tumassa (Viiri ym., 2009a). Kuvassa 3 on esitetty SAP30L:n rakenne.

A)



B)



Kuva 3 SAP30L:n rakenne. A) Aminopäässä sijaitsevat DNA:ta (DNAbd) ja monofosfoinositideja (PIPbd) sitova alue, joka osittain menee tumasignaalin (NLS) päälle, ja Zn^{2+} :aa koordinoiva alue. Hapanta aluetta seuraavat tumajyväsignaali (NoLS), joka on osa tumamatriksiin kohdentavaa signaalia (NMTS), ja valkuaisten väliseen vuorovaikutukseen tarvittava alue.

B) Alemmassa kuvassa on näytetty tarkemmin DNA:n ja monofosfoinositidien sitoutumiseen osallistuvat aminohapot, joista osa sijaitsee NLS:n kohdalla. Monofosfoinositidit (kuvassa PtdInsP) kilpailevat samasta sitoutumispaikasta DNA:n kanssa, ja siksi niiden läsnä ollessa repressorikompleksin sitoutuminen DNA:han on estynyt ja transkriptio aktiivisempaa. Kuvassa näkyvät myös aminohapot, jotka koordinoivat Zn^{2+} :n. Kuvat otettu Viirin ym. (2009a) artikkelista.

SAP30-perheen valkuaisien tehtäviin kuuluu Sin3A:n siirto tumajyväseen ja toimiminen transkription hiljentäjänä. Ne siis osallistuvat geenien ilmentymisen säätelyyn geenien vaimentamisen kautta. SAP30:n repressiokapasiteetti on kuitenkin vain puolet siitä, mitä SAP30L:n, ja SAP30L sijoittuu useammin tumajyväseen (Viiri ym., 2006).

SAP30L:n transkriptiorepressoriaktiivisuutta säätelee sen vaihtoehtoinen mRNA-silmukointi (Korkeamäki ym., 2008). Sen on havattu sitoutuvan *in vitro* paitsi Sin3A:n, myös HDAC1:n, HDAC2:n ja itsensä kanssa (Viiri ym., 2006) sekä vuorovaikuttavan geenien vaimentamiseen osallistuvien valkuaisien, DNA:n ja histonien kanssa (Viiri ym., 2006, Viiri ym., 2009a). Lisäksi Assmannin ym. (2006) tutkimusten mukaan se vuorovaikuttaa hermosolujen aksonien kimppuuntumiseen ja pidentymiseen osallistuvan valkuaisen (fasciculation and elongation protein zeta1, FEZ1) kanssa.

SAP30-perheeseen kuuluva valkuainen löytyy sekä eläimistä, kasveista, sienistä että joistain alkueliöistä. Homologisuustutkimuksilla on havaittu, että alempien eläinten SAP30-perheen valkuainen muistuttaa enemmän SAP30L:ää. Vain nisäkkäillä on genomissaan molemmat molekyylit, mutta kaloilta puuttuu SAP30. Näiden havaintojen perusteella SAP30L on evoluutiossa vanhempi (Lindfors ym., 2003, Viiri ym., 2009b). On esitetty, että SAP30 olisi kehittynyt SAP30L:stä kahdentumalla n. 450 milj. vuotta sitten (kalojen ilmestymisen jälkeen, mutta ennen sammakkoeläimiä). Kahdentumisen jälkeen toiseen kopioon (SAP30) alkoi kertyä mutaatioita, mikä on johtanut eroihin transkription vaimentamisessa ja sijoittumisessa solussa sekä siihen, että SAP30 liittyy heikommin tuman matriksiin kuin SAP30L (Viiri ym., 2009b).

1.3 NOH61 eli DDX56

Tutkiessaan tumajyvästen valkuaisainekoostumusta ihmisen keratinosyyteistä (sarveissolu) saadun cDNA-kirjaston (complementary DNA: soluista eristetyt mRNA:t on muutettu DNA:ksi, cDNA ei sisällä introneja) avulla Zirves ym. (2000) löysivät ennestään tuntemattoman valkuaisen. Tämän valkuaisen koko cDNA eristettiin ja puhdistettiin HeLa-soluista (ihmisen kohdunkaulasyövän soluja). Valkuaisen aminohappojärjestystä tutkimalla paljastui, että se kuuluu DEAD-box-valkuaisperheeseen (Zirves ym., 2000). Valkuaisperheen nimi tulee niiden sisältämästä konservoituneesta sekvenssistä: asparataatti-glutamaatti-alaniini-asparataatti (lyhenne

DEAD). (Fuller-Pace 1994, Linder, 2006). Valkuainen nimettiin NOH61:ksi (nucleolar helicase of 61 kDa) ja se tunnetaan myös nimellä DDX56, jota tässä tekstissä käytetään (DDX on DEAD-box-valkuaisperheen tunnus). DDX56 on siis 61,5 kDa:n kokoinen ja sen on osoitettu sijoittuvan tumajyväseen (Zirwes ym., 2000).

DEAD-box-valkuaisperheen jäsenet ovat adenosiinitrifosfaatista (ATP) riippuvaisia RNA-helikaaseja, eli ne muuntavat RNA:n rakennetta käyttäen energianlähteenä ATP:tä. RNA-helikaasit näyttäisivät liittyvät solun tapahtumiin, joissa tarvitaan RNA:n sekundaarirakenteen muokkausta, kuten translaation alkaminen, RNA:n silmukointi ja ribosomien ja silmukointikompleksien kokoaminen. Joidenkin jäsenten oletetaan olevan osallisina alkionkehityksessä, siittiöiden kehityksessä sekä solujen jakautumisessa ja kasvussa. (Fuller-Pace, 1994, Linder, 2006) DEAD-box-valkuaisperheen jäsenten on myös havaittu vuorovaikuttavan transkriptiotekijöiden ja tumareseptorien kanssa ja siten osallistuvan transkription voimistamiseen tai hiljentämiseen. Osa on ollut jopa välttämättömiä transkription vaimentamisessa (Gordin ym., 2006).

DDX56:lla onkin osoitettu olevan ATPaasi-aktiivisuutta, ja se osallistuu ribosomien kokoamiseen, etenkin 60S-alayksikön, mutta se ei ole enää läsnä valmiissa ribosomeissa (Zirwes ym., 2000).

1.4 Tutkimuksen tavoitteet

Aikaisemmissa tutkimuksissa etsimme HeLa-solujen tumajyväsistä SAP30L-valkuaisen kanssa sitoutuvia proteiineja. HeLa-solujen tumajyväslysaatista ”kalastettiin” valkuaisia (ns. pull-down menetelmä) käyttäen GST-SAP30L100–183- fuusiovalkuaista ”syöttinä”. Tällä menetelmällä löytyneet valkuaiset identifioitiin massapektrometrialla. Massapektrometria tunnisti näytteistä yhteensä 8 eri proteiinia, joista kolme valittiin tarkemman tutkimuksen kohteeksi. Tässä työssä keskityttiin yhteen noista kolmesta valkuaisista (DDX56) ja tutkimuksen tarkoituksena on selvittää tämän sitoutumisen laatua.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 GST (glutationi S transferaasi) -fuusiovalkuaisen valmistus

SAP30L100–183 cDNA kloonattiin pGEX-4T-1-vektoriin (Amersham Biosciences). Tämä tuottovektori transformoitiin *E. coli* BL21 -bakteerikantaan valmistajan ohjeiden mukaan. Näin saatiin valmiiksi tuottovektori, josta syntyy SAP30L-valkuaisen karboksyyliipää (aminohapot 100–183) yhdistettynä GST-valkuaiseen. Kontrollina toimi pelkkä vektori (GST). Bakteerikannoista tehtiin säilömistä varten glyseroliputket, joita säilytettiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.

Glyseroliputkista otettiin pieni nokare bakteerikasvustoa, joka laitettiin kasvamaan Luria-Bertani broth (LB) -liuokseen (omat liuokset molemmille), johon oli lisätty $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ampicilliiniä, yli yön $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:een. Tätä bakteerikasvatusta lisättiin 1:50 tuoreeseen 500 ml:n LB-ampicilliini-liuokseen ja laitettiin kasvamaan $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:een. Kun bakteerit saavuttivat logaritmisen kasvun vaiheen (OD (optical density) $600\text{ nm:ssä} = 0,6$), liuokseen lisättiin isopropyli- β -D-thiogalaktopyranosiidiä (IPTG) pitoisuuteen 1 mM , mikä käynnistää yllä mainittujen vektorien koodaamien valkuaisen tuoton, ja jatkettiin kasvatusta $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa kolme tuntia.

Bakteerit erotettiin kasvatusliuoksesta sentrifugoimalla $5\text{ }000\text{ x g}$ 15 min $+4^{\circ}\text{C}$:ssa. Supernatantti (pohjasakan päällä oleva nestekerros) kaadettiin pois ja pelletit (pohjasakka) luotettiin 20 ml:aan fosfaatti-puskuroitua suolaliuosta (phosphate-buffered salinem, PBS), johon oli lisätty proteaasiestäjiä (estävät valkuaisen hajoamista) (Complete® Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), ja annettiin olla jäällä 30 min . Genomisen DNA:n hajoittamiseksi suoritettiin sonikointi $5\text{ x }15\text{ s}$ 5 mm:n kärjellä. Tämän jälkeen lisättiin 25 ml PBS:tä, jossa oli $0,2\text{ }\%$ TritonX-100:aa ja proteaasiestäjiä (Roche). Lisäksi lisättiin DNAasi I:stä ja RNAasi A:ta (entsyymejä, jotka hajottavat DNA:ta ja RNA:ta) pitoisuuteen $5\text{ }\mu\text{g/ml}$. Sitten sekoitettiin tasosekoittajalla 100 rpm 10 min $+20^{\circ}\text{C}$:ssa, jonka jälkeen sentrifugoitiin $3\text{ }000\text{ x g}$ 30 min $+4^{\circ}\text{C}$:ssa. Valkuaiset ajautuivat supernatanttifaasiin. Supernatantit kerättiin ja 1 M ditionitriolia (DTT) lisättiin pitoisuuteen 1 mM .

Fuusiovalkuaiset puhdistettiin muista valkuaisista Glutationi Sepharose 4B -"helmillä" (Pharmacia Biotech, Amersham Biosciences). Helmiä lisättiin valkuaisliuokseen ja annettiin olla kieputuksessa +4 °C:ssa kaksi tuntia. Helmet ja niihin kiinnittyneet fuusiovalkuaiset kerättiin sentrifugoimalla 500 x g 5 min +4 °C:ssa. Helmiä pestiin viisi kertaa PBS:llä, pesujen välissä kieputus 1 min huoneenlämmössä ja sentrifugointi 500 x g, 5 min, +4 °C:ssa. Lopuksi lisättiin 1 ml PBS:ää.

2.2 Tuottovektorin valmistus

DDX56:n cDNA tilattiin I.M.A.G.E:lta (klooni 3456547). cDNA oli IRAT-plasmidissa ampisilliiniresistenssigeenin sisältävässä bakteerikannassa. Bakteereita laitettiin kasvamaan LB-ampisiilliini-liuokseen yli yön +37 °C:een. Kasvatuksesta eristettiin plasmidi-DNA Miniprep Kitin ohjeiden mukaan (Qiagen).

DDX56:n cDNA:ta monistettiin PCR:llä (polymeraasiketjureaktio). Käytetyt alukkeet olivat F 5' GAC TGA ATT CAT GGA GGA CTC TGA AG 3' ja R 5' CTG AGG ATC CTC CGG AGG GCT TGG 3' (Sigma, e@sy oligo). Alukkeet laimennettiin steriiliin veteen pitoisuuteen 20 mM. PCR-reaktiossa käytettiin lisäksi Invitrogenin 10 x AccuPrimeTM PCR Buffer I -liuosta, joka sisältää puskurin ja nukleotidit sekä AccuPrimeTM Pfx DNA polymeraasia. PCR-ohjelma oli seuraava: 95 °C:ssa 2 min, jota seurasi 30 kierrosta 95 °C:ssa 30 s, 55 °C:ssa 30 s ja 68 °C:ssa 2 min.

Koko PCR-näyte ajettiin 1-prosenttiselle agarosigeelille. Ajon jälkeen geeliltä leikattiin irti DDX56:n cDNA:n sisältävä pala, joka puhdistettiin QIAquick Gel Extraction Kitin (Qiagen) ohjeiden mukaan. cDNA oli tarkoitus kloonata pcDNA3.1 myc-his-vektoriin EcoRI- ja BamHI-kohtien väliin. pcDNA3.1 myc-his -vektori on yleinen vektori, jota käytetään geenien ilmentämiseen nisäkässoluissa. Sekä pcDNA3.1 myc-his -vektori että DDX56 cDNA käsiteltiin katkaisusynteimeillä (EcoRI ja BamHI) (Fermentas). Puskurina käytettiin 10 x Tango Bufferia (Fermentas) ja reaktio tehtiin valmistajan ohjeiden mukaan.

Tämän jälkeen näytteet puhdistettiin PCR Purification Kitin (Qiagen) ohjeiden mukaan. Katkaistulle pcDNA3.1 myc-his -vektorille tehtiin lisäksi CIAP-käsittely (calf intestine alkaline phosphatase, vasikan suolen emäksinen fosfataasi), jotta vektorin päät eivät liimautuisi toisiinsa. Tämän jälkeen cDNA ja vektori yhdistettiin T4-ligaasilla yön yli huoneenlämmössä. Syntynyt tuottovektori siirrettiin (transformoitiin) TOP10-bakteerisoluihin (Invitrogen) valmistajan ohjeiden mukaan. Transformoituja soluja kasvatettiin ensin 1 h S.O.C-liuoksessa (rikas kasvatusliuos bakteereille, ei sisällä antibiootteja) (Invitrogen) +37 °C:ssa, jonka jälkeen ne maljattiin LB-ampisillini-maljoille.

Maljalle muodostuneista pesäkkeistä poimittiin yksi ja se laitettiin kasvamaan yön yli LB-amp-liuokseen. Kasvatusliuoksista eristettiin plasmidi käyttäen GeneJET Miniprep Kitiä (Fermentas). Sekvensoimalla varmistettiin, että plasmidi sisälsi oikean sekvenssin. Sekvensointiin käytettiin BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitiä (Applied Biosystems).

2.3 Transfektio

HeLa-soluja (ihmisen kohdunkaulasyövän soluja) kasvatettiin soluviljelykaapissa (+37 °C:ssa 5 % CO₂) RPMI 1640-elatusaineessa (Gibco), johon oli lisätty penisilliiniä, 10 % naudan sikiön seerumia (fetal bovine serum, FBS) (Gibco) ja L-glutamiinia. Kun malja oli n. 70 % täynnä, suoritettiin transfektio FuGENE6®:lla (Roche) valmistajan ohjeiden mukaan. cDNA:na käytettiin DDX56-pcDNA-plasmidia.

2.4 Solujen hajotus

Ensin kaadettiin elatusaine pois ja solut pestiin kaksi kertaa kylmällä PBS:llä. Sitten lisättiin lyysipuskuria (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA:ta, 0,5 % Igepal), jossa oli Complete®-proteaaasi-inhibiittoreita (Roche). Solut irrotettiin alustastaan raaputtamalla ja hajotettiin vetämällä ruiskun läpi. Liuoksen annettiin olla jäällä 30 min, jonka jälkeen sentrifugoitiin 10 000 x g 20 min +4 °C:ssa. Supernatantti (= solulysaatti) otettiin talteen.

2.5 GST pull-down

Solulysaattiin lisättiin puhdistettua fuusiovalkuaista ja annettiin olla kieputuksessa yön yli +4 °C:ssa. Negatiivisena kontrollina käytettiin solulysaattia, johon oli lisätty pelkkää GST:tä. Näytteitä sentrifugoitiin 470 xg +4 °C:ssa 5 min ja supernatantti poistettiin. Helmiä pestiin neljä kertaa lyysipuskurilla ja kerran PBS:llä (molempiin oli lisätty Complete ®-proteaaasi-inhibiittorit (Roche)). Pesujen välissä suoritettiin kieputus +4 °C:ssa 10 min ja fuugaus 470 x g +4 °C:ssa 5 min. Supernatantit poistettiin. Lopuksi pelletit resuspensoitiin 20 µl:aan Laemmliä.

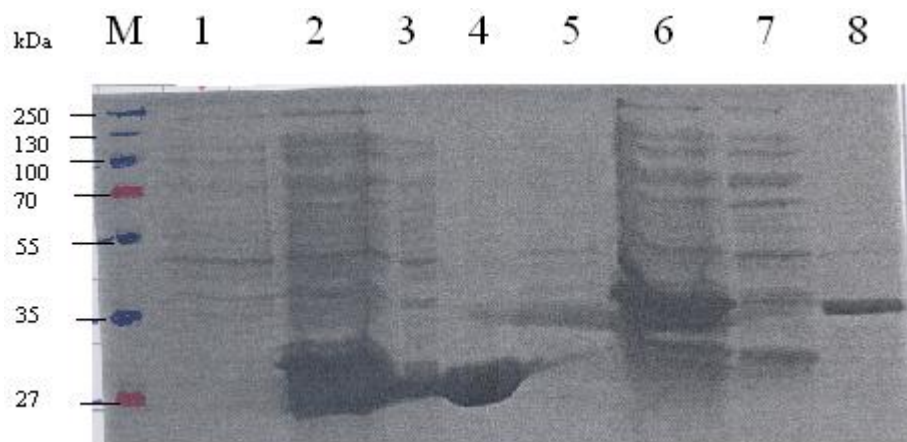
2.6 Western Blotting

Valkuaiset eroteltiin 10-prosenttisella SDS-PAGE-geelillä (BioRad) ja ne siirrettiin nitroselluloosakalvolle (Amersham Biosciences) Semi-Dry Blot -laitteen avulla. Kalvoa pidettiin ensin primaarivasta-aineessa, joka oli hiiressä tuotettu anti-cmyc 1:2 000 (Santa Cruz) (pcDNA sisältää myc-vasta-aineen sitoutumiskohdan). Tämän jälkeen kalvo siirrettiin sekundaarivasta-aineeseen (kanissa tuotettu anti-mouse, johon oli liitetty piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase, HRP) 1:2 500, DAKO (p0260)). Proteiinien havaitsemiseen käytettiin omatekoista ECL-liuosta ("tehostusliuos": 11 mg p-hydroksi-kumariinihappoa liuotettuna 10 ml:aan dimetyylisulfoksidia ja "valotusliuos": 200 ml 0,1 M Tris-Cl pH 6.8, jossa 50 mg Na-luminolia ja 62 µl 30-prosenttista H₂O₂).

3 TULOKSET

3.1 GST-fuusiovalkuaisen tuotto

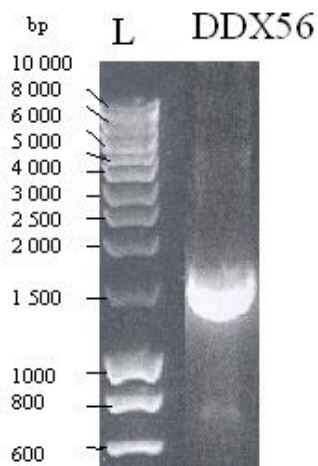
Bakteerikasvatuksesta otettiin näytteet ennen IPTG:n lisäämistä ja IPTG:n lisäämisen jälkeen. Otettiin myös supernatanttinäyte Glutationi Sepharose 4B -helmien lisäämistä seuranneen sentrifugoinnin jälkeen ja lopulta näyte, kun puhdistus oli suoritettu. Tuotto ja puhdistus onnistuivat hyvin: puhdistetussa näytteessä on runsaasti fuusioproteiinia eikä juuri mitään muuta, kun taas supernatanttinäytteessä fuusioproteiinia on hyvin vähän. Kuvassa 4 on ajettu geelille edellä mainitut fuusioproteiinin tuotossa otetut näytteet ja geeli on värjätty Coomassie Brilliant Blue -nimisellä väriaineella.



Kuva 4 Fuusiovalkuaisen tuotto ja puhdistus. Näytteet on otettu seuraavasti (1–4 GST ja 5–8 GST-SAP30L100–183): M = molekyylipainomerkki, ilmoittaa arvioidut molekyylipainot kilodaltonneina. 1 ja 5 ovat näytteitä, jotka on otettu ennen IPTG:n lisäämistä, näytteet 2 ja 6 on otettu IPTG:n lisäyksen jälkeen, 3 ja 7 ovat supernatanttinäytteitä, 4 ja 8 ovat puhdistettua näytettä. Näyte 8 sisältää vain GST-SAP30L100–183 fuusiovalkuaista, eikä näytteeseen 7 ole jäänyt juuri yhtään fuusiovalkuaista. Myös GST-näyte (4) on puhdas.

3.2 Tuottovektorin valmistus

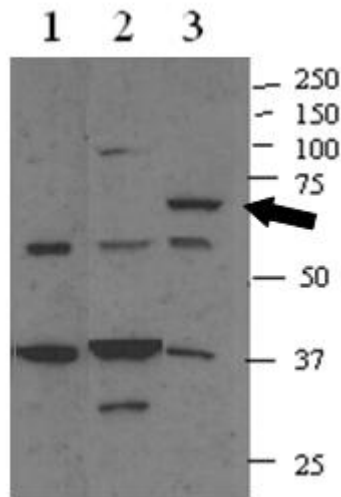
DDX56:n cDNA monistettiin plasmidista PCR:n avulla. Kuvassa 4 on esitetty PCR-reaktion ajo geelille. PCR on onnistunut hyvin: tuotetta on runsaasti ja sen kokoista kuin pitääkin (DDX56 on 1 641 bp).



Kuva 5 PCR. L = DNA hyperladder (kertoo DNA:n koon emäspareissa), bp = emäspari. DDX56 on monistunut PCR:llä.

3.3 Transfektiot

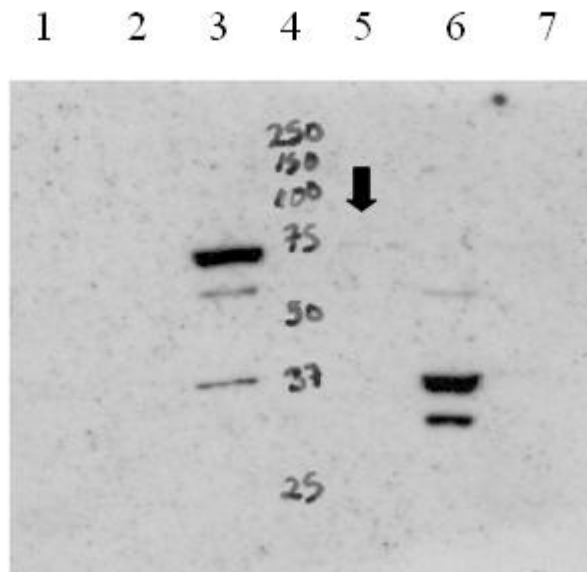
DDX56:n transfektointi HeLa-soluihin onnistui joka kerta. Transfektion tulokset on esitetty kuvassa 6. Transfektion onnistuminen varmistettiin Western Blotting -menetelmällä ennen kuin suoritettiin pull-down.



Kuva 6 Transfektio. Blottaus on tehty anti-myc-vasta-aineella. 1 on pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoitujen HeLa-solujen lyaatti (negatiivinen kontrolli). Ylimääräiset viivat (jotka näkyvät myös sarakkeissa 2 ja 3) 37 kDa:n kohdalla ja hieman 50 kDa:n yläpuolella johtuvat vasta-aineen reagoinnista lyaatin immunoglobuliinien kanssa. 2:n alin on SAP30Lmyc-his (positiivinen kontrolli Western Blottingin onnistumiselle). 3 on DDX56- pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoitujen HeLa-solujen lyaatti. Sivussa on esitetty arvioidut molekyylipainot. Pelkkä DDX56 olisi 61,5 kDa, mutta nyt siinä on lisäksi myc-his-”häntä”, joka on n. 3 kDa. Siten sarakkeen 3 ylin viiva on DDX56 (nuoli). Transfektio on siis onnistunut.

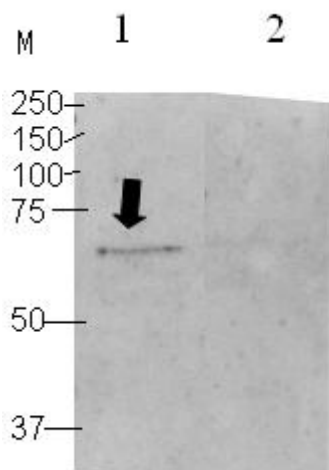
3.4 Pull-down ja Western Blotting

Pull-downiin käytettiin syötteinä GST:tä ja GST-SAP30L100–183:a, joilla kalasteltiin valkuaisia DDX56- pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoitujen solujen lyaatista. Pull-down koe toistettiin useampaan kertaan. Tässä on esitetty tulokset kahdesta eri pull-downista. (Kuvat 7 ja 8). Kuvassa 7 yksi näyte on pelkkää solulysaattia, n. 2 % pull-downissa käytetyn solulysaatin kokonaismäärästä. Negatiivisina kontrolleina käytettiin pull-downeja, joissa lyaattina oli pelkällä pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoituja soluja (kalastamiseen oli käytetty sekä GST:tä että GST-SAP30L100–183:a). Positiivisena kontrollina (Western Blotting onnistunut) käytettiin SAP30L-myc-his:llä transfektoitua solulysaattinäytettä (kuten kuvassa 6). GST:llä ei saatu kalastettua mitään DDX56- pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoidusta solulysaatista, mutta GST-SAP30L100–183:lla saadaan kalastettua valkuainen, joka vastaa kooltaan DDX56-myc-his-valkuaista. Myös kuvassa 8 on esitetty pull-down, jossa DDX56-myc-his-valkuainen on saatu kalastettua GST-SAP30L100–183:lla.



Kuva 7 Pull-down 1

Sarakkeessa 1 on GST:llä ja sarakkeessa 2 GST-SAP30L100–183:lla kalastettua pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoitua solulysaattia. 3 = DDX56-pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoitu solulysaatti. 4 = arvioidut molekyylipainot (kDa). Sarakkeissa 5 ja 7 on käytetty DDX56- pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoitua solulysaattia syötteinä GST-SAP30L100–183 ja GST. Sarake 6 on kontrolli Western Blottingin onnistumiselle (alin viiva on SAP30L-myc-his valkuainen). Sarakkeessa 5 näkyy viiva samalla kohtaa kuin sarakkeessa 3 (nuoli), tosin huomattavasti ohuempana ja haaleampana. Myös kontrolli (SAP30L-myc-his) näkyy. Muissa sarakkeissa ei näy mitään. Ylimääräiset viivat (37:n ja n. 55:n kohdalla) sarakkeissa 3 ja 6 johtuvat vasta-aineen reagoinnista lyaatin immunoglobuliinin kanssa.



Kuva 8 Pull-down 2 (Huom! kuvassa vain osa geelistä) Tässä on tehty uusi pull-down. M = arvioidut molekyylipainot (kDa). Kummassakin sarakkeessa on käytetty DDX56-pcDNA3.1 myc-his:llä transfektoitua lyaattia. 1:ssä syöttinä on ollut GST-SAP30L100–183 ja 2:ssa GST. Nyt näkyy selkeämpi viiva kohdassa, joka vastaa DDX56-myc-hisin kokoa (nuoli).

4 POHDINTA

Kuvien (7 ja 8) perusteella DDX56 näyttäisi olevan kalastettavissa SAP30L100–183:lla pull-downnissa, mutta interaktio on heikko kuvassa 7, etenkin jos sitä vertaa solulysaattisarakkeessa olevaan valkuaismäärään, vaikka siinä on vain 2 % pull-downiin käytetystä solulysaattimäärästä. Tietenkään jokaista solulysaatissa ollutta DDX56-valkuaisista tuskin olisi saatu millään menetelmällä kalastettua, mutta vuorovaikutuksen olisi voinut olettaa olevan vahvempi. Sitoutumisen näkyminen heikkona voisi viitata siihen, että kyseessä ei ole kovin voimakas vuorovaikutus, jolloin osa DDX56-valkuaisista irtoaa pull-downin pesuissa. Voi myös olla, että jostain syystä vain pieni osa kaikista solulysaatissa olleista DDX56-valkuaisista sitoutuu SAP30L100–183:n kanssa. Lisäksi pull-down toistettiin useampaan kertaan, mutta aina DDX56:sta ei saatu kalastettua.

DDX56:n emäsjärjestys varmistettiin sekvensoimalla, ja myös tuotettu valkuainen ajautui geelillä oikeaan kohtaan. GST-SAP30L100–183 fuusiovalkuainen puolestaan oli samaa, jota oli käytetty aikaisemmassa massaspektrometriatyössä.

Tässä työssä käytettiin solulysaattia, josta sitten DDX56:sta kalastettiin, kun taas massaspektrometriaa (josta DDX56 havaittiin) varten eristettiin tumajyväset. Tällä on voinut olla jotain vaikutusta, sillä tumajyväsen ulkopuoliset valkuaiset voivat häiritä sitoutumista. On myös mahdollista, joskin ei todennäköistä, että DDX56:n myc-häntä vaikuttaisi jotenkin proteiinien väliseen vuorovaikutukseen esim. peittämällä tai häiritsemällä sitoutumista.

Sekä SAP30L että DDX56 sijoittuvat tumajyväseen (Viiri ym., 2006; Zirwes ym., 2000). SAP30L:n tehtävä on vakauttaa Sin3A-HDAC-kompleksia vuorovaikuttamalla useiden tekijöiden kanssa, mikä johtaa transkription vaimentumiseen. SAP30L:n toimintaa säätelevät monofosfoinosidit. (Viiri ym., 2006, Viiri ym., 2009a.) DDX56:n on puolestaan osoitettu osallistuvan ribosomien kokoamiseen (Zirwes ym., 2000).

Mikäli nämä kaksi valkuaisista toimivat yhdessä, SAP30L voisi olla osallisena ribosomaalisen RNA:n (rRNA) transkriptiossa ja siten vaikuttaa ribosomien muodostumiseen. Lisäksi useiden DEAD-box-perheeseen kuuluvien RNA-helikaasien

on kuvattu osallistuvan transkriptioon (Gordin ym., 2006, Linder 2006), joten myös DDX56:llä voisi olla osuutensa transkription säätelyssä.

Tämän vuorovaikutuksen merkityksen selvittämiseksi voitaisiin tutkia, vaikuttaako SAP30L jotenkin DDX56:n ATPaasi-aktiivisuuteen tai ribosomien kokoamiseen. Myös DDX56:n vaikutusta SAP30L:n välittämään transkription vaimentamiseen voitaisiin tutkia.

VIITTEET

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed, Garland Science, New York, 2002 pp. 191-234, 375-452.

Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 1964;51:786–794.

Assmann EM, Alborghetti MR, Camargo ME, Kobarg J. FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *J Biol Chem*. 2006;281:9869-9881.

Ayer DE. Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol*. 1999;9:193-198.

Dobrovic, A., Kristensen, L.S. DNA methylation, epimutations and cancer predisposition. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2009;41:34–39.

Esteller, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2005;45:629–656.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-1159.

Esteller, M., Fraga, M.F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A.K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y.J., Ramus, S., Benitez, J., Caldes, T., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Launonen, V., Canal, M.J., Rodriguez, R., Capella, G., Peinado, M.A., Borg, A., Aaltonen, L.A., Ponder, B.A., Baylin, S.B., Herman, J.G. DNAmethylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum. Mol. Genet*. 2001;10:3001–3007.

Fraga, M.F., Herranz, M., Espada, J., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Erkek, E., Bozdogan, O., Peinado, H., Niveleau, A., Mao, J.H., Balmain, A., Cano, A., Esteller, M. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res*. 2001;64:5527–5534.

Fuller-Pace, F.V. RNA helicases: modulators of RNA structure. *Trends Cell Biol*. 1994;4: 271–274.

Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*. 2006;367:17-37.

Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389:349-352.

Hager GL, McNally JG, Misteli T. Transcription dynamics. *Mol Cell*. 2009;35:741-753.

Hebbes T R, Thorne A W, Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J*. 1988;7:1395–1402.

Ikegami K, Ohgane J, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. *Int J Dev Biol.* 2009;53:203-214.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293:1074-1080.

Korkeamäki H, Viiri K, Kukkonen MK, Mäki M, Lohi O. Alternative mRNA splicing of SAP30L regulates its transcriptional repression activity. *FEBS Lett.* 2008;582:379-384.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128:693-705.

Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol.* 2009;625:131-142.

Kuo MH, Allis AC. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays.* 1998;20:615-626.

Linder P. Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* 2006;34: 4168–4180.

Lindfors K, Viiri KM, Niittynen M, Heinonen TY, Mäki M, Kainulainen H. TGF-beta induces the expression of SAP30L, a novel nuclear protein. *BMC Genomics.* 2003;4:53.

Minucci S, Nervi C, Lo Coco F, Pelicci PG. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene.* 2001;20:3110-3115.

Myöhänen, S.K., Baylin, S.B., Herman, J.G. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res.* 1998;58: 591–593.

Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:81-120.

de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 2003;370:737-749.

Strahl BD, Allis DC. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000;403:41-45.

Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p. *Science.* 1996;272:408-411.

Wade PA, Pruss D, Wolffe AP. Histone acetylation: chromatin in action. *Trends in Biochemical Sciences.* 1997;22:128-132.

Viiri KM, Korkeamäki H, Kukkonen MK, Nieminen LK, Lindfors K, Peterson P, Mäki M, Kainulainen H, Lohi O. SAP30L interacts with members of the Sin3A corepressor complex and targets Sin3A to the nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:3288-3298.

Viiri KM, Jänis J, Siggers T, Heinonen TY, Valjakka J, Bulyk ML, Mäki M, Lohi O. DNA-binding and -bending activities of SAP30L and SAP30 are mediated by a zinc-dependent module and monophosphoinositides. *Mol Cell Biol.* 2009a;29:342-356.

Viiri KM, Heinonen TY, Mäki M, Lohi O. Phylogenetic analysis of the SAP30 family of transcriptional regulators reveals functional divergence in the domain that binds the nuclear matrix. *BMC Evol Biol.* 2009b;9:149.

Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell.* 1997;89:357-364.

Zirwes RF, Eilbracht J, Kneissel S, Schmidt-Zachmann MS. A Novel Helicase-Type Protein in the Nucleolus: Protein NOH61. *Mol Biol Cell.* 2000;11:1153–1167.