



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς *HeLa* που υπερεκφράζει επαγωγίμα το γονίδιο *DGCR14* του ανθρώπου

Study of the stably transfected *HeLa* cell line which inducibly overexpresses the human gene *DGCR14*

ΝΙΚΟΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ & ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Λάρισα
Ιούνιος 2016

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής
Ζωικών Πληθυσμών (Επιβλέπουσα)

Ζήσης Μαμούρης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

Καλλιόπη Λιαδάκη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής
Φαρμακολογίας

Ευχαριστίες

Πριν από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Σαραφίδου Θεολογία, επίκουρο Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία και να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ειλικρινά την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Γαλλιοπούλου Ελένη για την υπομονή και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για την εκπαίδευσή μου σε όλο το εργαστηριακό κομμάτι αυτής της εργασίας καθώς επίσης για την ενθάρρυνση και τις χρήσιμες συμβουλές που μου παρείχε.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στην οικογένεια μου που με εμπιστεύτηκε και με στήριξε με κάθε δυνατό τρόπο σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	[6]
2. ASTRACT.....	[7]
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	[8]
1. Το γονίδιο <i>DGCR14</i>	[9]
2. Η πρωτεΐνη DGCR14.....	[11]
3. Λειτουργικός ρόλος της πρωτεΐνης DGCR14.....	[11]
1. DGCR14 και η πιθανή συσχέτιση με νευροψυχιατρικές και νευρολογικές διαταραχές.....	[11]
2. DGCR14 και το σωματίο συναρμογής	[13]
3. Ο ρόλος της πρωτεΐνης DGCR14 στα T _H 17-λεμφοκύτταρα.....	[14]
4. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης DGCR14	[15]
1. Πρωτεϊνική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης DGCR14 με την πρωτεΐνη FRA10AC1.....	[16]
5. Τεχνολογίες Λειτουργικής Γονιδιωματικής.....	[17]
4. ΣΚΟΠΟΣ.....	[19]
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	[20]
1. Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών <i>HeLa</i>	[21]
1. Κυτταρικές σειρές θηλαστικών.....	[21]
2. Διατήρηση κυτταροκαλλιιεργειών.....	[23]
3. Κρυοδιατήρηση κυττάρων.....	[24]
4. Επανακαλλιέργεια	[26]
5. Μέτρηση κυττάρων για επίστρωση τρυβλίων.....	[26]
6. Συλλογή κυττάρων.....	[28]
2. Απομόνωση γενετικού υλικού.....	[28]
3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	[29]
4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	[30]
5. Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών (ανάλυση Western).....	[31]
1. Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS- PAGE.....	[32]
2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	[35]
3. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη (transfer).....	[35]
4. Ανοσοανίχνευση.....	[37]
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	[39]
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	[47]

1. Περίληψη

Το γονίδιο DGCR14 χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 22q11.2 και κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη. Έχει αναφερθεί ως πιθανό υποψήφιο γονίδιο για το σύνδρομο DiGeorge και συσχετίζεται με νευροψυχιατρικές και νευρολογικές διαταραχές. Επίσης, έχει προσδιοριστεί ως συστατικό του σωματιδίου συναρμογής και πιο συγκεκριμένα ως συστατικό του συμπλόκου C. Τέλος, η DGCR14 φαίνεται να δρα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής των T_H17-λεμφοκυττάρων, συμμετέχοντας πιθανώς με αυτό τον τρόπο στον μηχανισμό της αυτοανοσίας. Μελέτες αποδεικνύουν την άμεση αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης DGCR14 με την πρωτεΐνη FRA10A, η οποία χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3. Η έκφραση της πρωτεΐνης FRA10A μπορεί να σχετίζεται με νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες ενώ λόγω της αλληλεπίδρασης της με την DGCR14, φαίνεται και αυτή να αποτελεί συστατικό του μηχανισμού συναρμογής και γενικότερα, του μεταβολισμού του RNA. Η παρούσα εργασία αφορά την μελέτη μιας σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς *HeLa* που υπερεκφράζει επαγώγιμα το γονίδιο *DGCR14* του ανθρώπου, αποτελώντας ένα βήμα για το γενικότερο επιχείρημα προσδιορισμού του ρόλου αυτού του γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, μελετώνται οι συνθήκες που συμβάλλουν στην υπερέκφραση του γονιδίου *DGCR14* όπως η συγκέντρωση του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη που χορηγείται στα κύτταρα *HeLa* και ο χρόνος επαγωγής της έκφρασης της DGCR14 μετά την χορήγηση δοξυκυκλίνης και μέχρι την συλλογή των κυττάρων.

2. Abstract

DGCR14 gene is mapped in the chromosomal region 22q11.2 and encodes a nuclear protein. It has been reported as a possible candidate gene for DiGeorge syndrome and is associated with neuropsychiatric and neurological disorders. Moreover, it has been identified as a component of the spliceosome C complex. Finally, DGCR14 appears to act as a transcriptional coactivator of T_H17 cells, thus playing possibly a role in the autoimmune system. Studies demonstrate that DGCR14 interacts with FRA10A protein, which is mapped in the chromosomal region 10q23.3. The expression of FRA10A protein may associate with mental and developmental defects and also seems to be a component of the splicing mechanism and, more generally, the RNA metabolism due to its interaction with DGCR14. This thesis involves the study of a stable transfected *HeLa* cell line which overexpresses *DGCR14* gene in an inducible way and provides a step in understanding the role of this gene. Particularly, this study examines the conditions which contribute to the overexpression of *DGCR14* gene such as the concentration of doxycycline antibiotic administered in *HeLa* cells and the time needed to induce *DGCR14* expression after administration of doxycycline.

3.Εισαγωγή

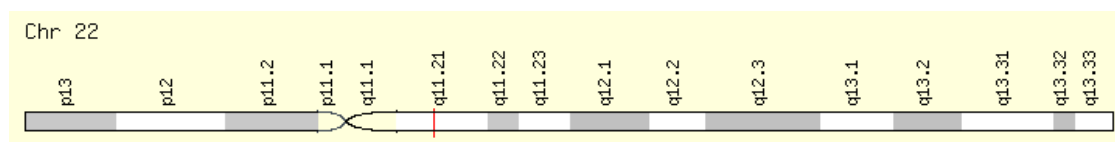
3.1 Το γονίδιο *DGCR14*

Το γονίδιο *DGCR14* πρωτομελετήθηκε ως ένα από τα υποψήφια γονίδια για την εμφάνιση του συνδρόμου μικροελλείματος 22q11.2 (22q11.2 Deletion Syndrome) (Gong et al., 1997, Rizzu et al., 1996). Πρόκειται για μια χρωμοσωμική ανωμαλία που παρατηρείται με συχνότητα εμφάνισης 1 ανά 400 νεογνά, ενώ αποτελεί την δεύτερη πιο κοινή αιτία αναπτυξιακής καθυστέρησης και συγγενών παθήσεων της καρδιάς μετά το σύνδρομο Down (Kobrynski & Sullivan, 2007, Lindsay, 2001). Παρουσιάζει ετερογενή ή ποικίλο κλινικό φαινότυπο, που μπορεί να κυμαίνεται από ήπιος έως σοβαρός (Wilson et al., 1994). Ο πολύπλοκος αυτός φαινότυπος του συνδρόμου περιλαμβάνει συγγενείς καρδιοπάθειες (77% των περιπτώσεων), ανωμαλίες της υπερώας, ήπια δυσμορφία προσώπου και ανωμαλίες σπονδύλων. Το 75% των ασθενών εμφανίζουν ανοσολογική ανεπάρκεια, που οφείλεται σε απλασία / υποπλασία του θύμου και τους καθιστά ευπαθείς σε διάφορες λοιμώξεις. Οι ασθενείς έχουν επίσης υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης μιας αυτοάνοσης νόσου, όπως ιδιοπαθούς θρομβοπενικής πορφύρας και νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας. Η αναπτυξιακή καθυστέρηση είναι συχνή ενώ παρατηρούνται και μαθησιακά προβλήματα και / ή ψυχιατρικές διαταραχές (διαταραχή υπερκινητικότητας και ελλειμματικής προσοχής, σχιζοφρένεια). Στις περισσότερες περιπτώσεις, το σύνδρομο οφείλεται στην διαγραφή 3 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων (Mb) στη χρωμοσωμική περιοχή 22q11.2, η οποία εμπεριέχει κατ'εκτίμηση 30 γονίδια, ενώ περίπου 8% των ασθενών φέρει μια μικρότερη έλλειψη 1.5Mb (υποπεριοχή της 3Mb με κοινό το 5' σημείο θραύσης), η οποία περιλαμβάνει 24 γονίδια (Kobrynski & Sullivan, 2007, Prasad et al., 2008). Το έλλειμμα οφείλεται σε ανασυνδυασμό μη αλληλόμορφων αλληλουχιών στις μειωτικές διαιρέσεις κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης ή της ωογένεσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται για *de novo* έλλειψη, ενώ στο 10% των περιπτώσεων κληρονομείται από έναν ήπια επηρεασμένο γονέα, συμπεριφερόμενο έτσι ως αυτοσωμικό-κυρίαρχο χαρακτηριστικό (Lindsay, 2001). Το ευρύ φάσμα του κλινικού φαινοτύπου περιλαμβάνει κάποια σύνδρομα που στο παρελθόν είχαν χωριστεί σε διακριτά σύνδρομα (π.χ., υπερωιο-καρδιο-προσωπικό σύνδρομο, καρδιοπροσωπικό σύνδρομο και σύνδρομο DiGeorge) ενώ είναι πλέον γνωστό ότι είναι αιτιολογικά ταυτόσημα και αναφέρονται ως σύνδρομο μικροελλείματος 22q11.2. Στο σύνδρομο DiGeorge οφείλει το όνομα του το γονίδιο *DGCR14* καθώς αποτελεί ακρωνύμιο για το «DiGeorge Critical Region 14», δηλαδή την ελάχιστη περιοχή του χρωμοσώματος 22 ετερόζυγη έλλειψη της οποίας εντοπίζεται στο 90% των πασχόντων ατόμων (Emanuel, 2008, Kobrynski & Sullivan, 2007; Lindsay, 2001).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το *DGCR14* απασχόλησε ιδιαίτερα τους ερευνητές εξαιτίας της χρωμοσωμικής του θέσης η οποία έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση του συνδρόμου μικροελλείματος 22q11.2. Αρχικά, το πρότυπο έκφρασης του *DGCR14* συνηγορούσε υπέρ της υπόθεσης ότι το γονίδιο συνεισφέρει στην εμφάνιση του φαινοτύπου του συνδρόμου, καθώς οι περιοχές με την υψηλότερη έκφραση (καρδιά, εγκέφαλος, φαρυγγικά τόξα, θύμος αδένας, νεφρά) είναι όργανα που επηρεάζονται στο σύνδρομο μικροελλείματος 22q11.2 (Lindsay et al., 1998). Ωστόσο σε μεταγενέστερη μελέτη αποδείχθηκε ότι η ετερόζυγη έλλειψη του *DGCR14* δεν φαίνεται να σχετίζεται με την πρόκληση των κύριων

χαρακτηριστικών του συνδρόμου (Lindsay et al., 1999). Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο με το οποίο έφερε ετερόζυγη έλλειψη της περιοχής που περιλαμβάνει 18 ορθόλογα γονίδια (συμπεριλαμβανομένου και του *DGCR14*) από τα 24 που λείπουν στους ασθενείς με το 1.5Mb έλλειμμα και οι μύες εμφάνισαν καρδιαγγειακά προβλήματα παρόμοια με αυτά του φαινοτύπου του συνδρόμου. Αυτές οι καρδιαγγειακές ανωμαλίες διορθώνονταν σε μύες που έφεραν την 1.5Mb έλλειψη στο ένα χρωμόσωμα και ταυτόχρονα έναν αμοιβαίο διπλασιασμό στο άλλο. Ο διπλασιασμός αποκαθιστούσε την δοσολογία των γονιδίων της περιοχής εκτός όμως από τα δύο γονίδια που βρίσκονται στα 5' και 3' άκρα της, δηλαδή του *DGCR14* και του *UFD1I*. Επομένως, ως κυρίως υπεύθυνο για τον παθολογικό φαινότυπο του μικροελλείμματος 22q11.2 εντοπίστηκε ένα άλλο γονίδιο, το οποίο επίσης χαρτογραφείται στην περιοχή αυτή, το *TBX-1* που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας T-box και φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη της δομής της καρδιάς, των παραθυρεοειδών αδένων, του θύμου και του προσώπου. Έλλειψη ή ενίσχυση αυτού του γονιδίου (Liao et al., 2004, Lindsay et al., 2001), καθώς και μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί σε άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο αλλά δεν φέρουν κάποιο μικροέλλειμμα στην περιοχή (Yagi et al., 2003), σχετίζονται ισχυρά με τον παθολογικό φαινότυπο του συνδρόμου (Huh & Ornitz, 2010).

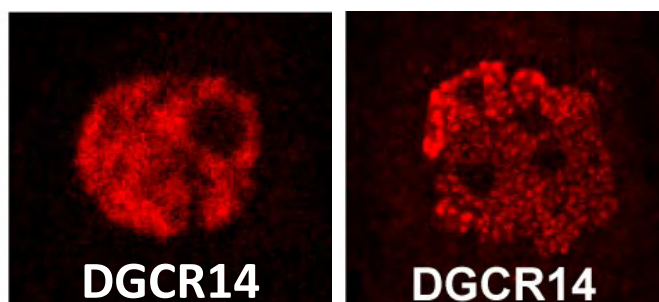
Το γονίδιο *DGCR14* χαρτογραφείται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 22, στην περιοχή 22q11.2 (Εικ. 1) και καλύπτει μία γονιδιωματική περιοχή μήκους 11kb. Αποτελείται από 10 εξώνια και 9 ιντρόνια. Το μέγεθος των εξωνίων ποικίλει, από 96 bp (εξώνιο 3) έως 170 bp (εξώνιο 4), με εξαίρεση το τελευταίο εξώνιο που είναι το μεγαλύτερο (541 bp) και περιέχει μια κωδική περιοχή μεγέθους 280 bp και την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-untranslated region, UTR) μεγέθους 261 bp. Αντίστοιχα, το μέγεθος των ιντρονίων ποικίλει, από 92 bp (ιντρόνιο 2) και 2513 bp (ιντρόνιο 3). Το cDNA του *DGCR14* έχει μήκος 1.7kb. Έχουν εντοπιστεί δύο μεταγράφα μεγέθους 2kb και 3kb, τα οποία ίσως προκύπτουν λόγω διαφορετικών σημάτων πολυαδενυλίωσης και όχι λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους όρχεις και στον εγκέφαλο. Η σχετική αφθονία των δύο μεταγράφων ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών ιστών αλλά και εντός του ίδιου ιστού. Αναπτυξιακά, το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό από τα πρωταρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και συγκεκριμένα από την στιγμή που αρχίζουν να αναπτύσσονται τα φαρυγγικά τόξα (Lindsay et al., 1998). Το γονίδιο φαίνεται να είναι μοναδικό στον άνθρωπο αφού δεν έχουν βρεθεί παράλογα γονίδια (Gong et al., 1997; Lindsay et al., 1998).



Εικόνα 1: Το γονίδιο *DGCR14* χαρτογραφείται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 22, στην περιοχή 22q11.21
[GeneCards, Human Gene Database]

3.2 Η πρωτεΐνη DGCR14

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) του γονιδίου *DGCR14* αποτελείται από 1428bp και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 476 αμινοξέων με μοριακό βάρος 52.568 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο 7.06. Περίπου το 40% των αμινοξέων είναι υδρόφοβα. Έχουν βρεθεί περιοχές πλούσιες σε προλίνη τόσο στο αμινοτελικό (αμινοξέα 1–20, 98–146) όσο και στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (αμινοξέα 308–346). Η ακραία καρβοξυτελική περιοχή (421–471) είναι πλούσια στα αμινοξέα προλίνη και σερίνη/θρεονίνη σε ποσοστό 17% και 32% αντίστοιχα. Αν και η λειτουργία των συγκεκριμένων περιοχών είναι άγνωστη, έχει βρεθεί ότι οι πλούσιες σε προλίνη και σερίνη/θρεονίνη περιοχές μπορεί να δρουν ως θέσεις ενεργοποίησης της μεταγραφής (Gong et al., 1997). Η πρωτεΐνη DGCR14 έχει εντοπιστεί στον πυρηνόπλασμα (Εικ.2). Στο καρβοξυτελικό της άκρο φέρει μια δομή σπειροειδούς έλικας (coiled-coil domain) μέσω της οποίας δημιουργούνται πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Gong et al., 1997, Lindsay et al., 1998). Ορθόλογα μόρια έχουν ταυτοποιηθεί αποκλειστικά σε ευκαριωτικούς οργανισμούς, κυρίως πολυκύτταρους. Οι ορθόλογες πρωτεΐνες στα *C. elegans* (Ess2) και *D. melanogaster* (Es2) έδειξαν ταυτότητα 30% και 34.4%, και ομολογία 53% και 72.5% αντίστοιχα (Gong et al., 1997; Lindsay et al., 1998).



Εικόνα 2 : Εντοπισμός της πρωτεΐνης DGCR14 στο πυρηνόπλασμα σε κύτταρα *HeLa* μετά από παροδική διαμόλυνση και ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με αντίσωμα [αδημοσίευτα αποτελέσματα]

3.3 Λειτουργικός ρόλος της πρωτεΐνης DGCR14

3.3.1 DGCR14 και η πιθανή συσχέτιση με νευροψυχιατρικές και νευρολογικές διαταραχές

Ενώ η ετερόζυγη έλλειψη του *DGCR14* δεν φαίνεται να συνεισφέρει στα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου μικροελλείμματος, η ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου σε μυσ καταλήγει σε θνησιμότητα μετά την εμβρυονική μέρα 9 (E9), υποδεικνύοντας ότι το *DGCR14* είναι απαραίτητο για την βιωσιμότητα και την ανάπτυξη του εμβρύου (Gong et al., 1997). Κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης (περίπου E7-E11), τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε περιοχές όπως τα φαρρυγγικά τόξα, το νευροεπιθήλιο, το νευροεξώδερμα, συμπεριλαμβανομένου του θύλακος Rathke (Rathke's pouch) ο οποίος αναπτυσσικά

θα δώσει την αδενοϋπόφυση, τονίζουν την σημαντικότητα του *DGCR14* στην ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα. Σε ένα μετέπειτα αναπτυξιακό στάδιο, η υψηλή έκφραση του *DGCR14* στην πρόσθια γέφυρα είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος καθώς η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε σεροτονινεργικούς νευρώνες. Το σεροτονινεργικό σύστημα αποτελείται από ομάδες νευρώνων οι οποίοι προβάλλουν σε όλον τον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό. Μέρος αυτού του συστήματος νευρώνων αποτελεί και ο έσω πυρήνας ραφής (Median Raphe Nuclei, MRN) ο οποίος αναπτύσσεται στην περιοχή της πρόσθιας γέφυρας κατά τα στάδια E11-E12, και δείχνει κατανομή παρόμοια με την έκφραση του *DGCR14* σε ισοδύναμα αναπτυξιακά στάδια. Η σύμπτωση της θέσης και του χρόνου, υποδηλώνει ότι τα κύτταρα που εκφράζουν το *DGCR14* στην γέφυρα μπορεί να είναι νευρώνες του MRN ή εναλλακτικά μπορεί να αλληλεπιδρούν με αυτούς τους νευρώνες. Σε κάθε περίπτωση, φαίνεται να υπάρχει ισχυρή σύνδεση μεταξύ του *DGCR14* και ανάπτυξης του σεροτονινεργικού συστήματος (Lindsay et al., 1998).

Το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης του *DGCR14* στον εγκέφαλο, καθώς και η υψηλή συντήρηση που παρουσιάζει, υποδεικνύουν ότι το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητο για την φυσιολογική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Αυτό τονίζεται και από το γεγονός ότι το ορθόλογο μόριο στην *D.melanogaster* χαρτογραφείται σε μία χρωμοσωμική θέση, μεταλλάξεις της οποίας έχουν ως αποτέλεσμα δομικές διαταραχές στο κεντρικό νευρικό σύστημα, και συγκεκριμένα επηρεάζουν την μάθηση (Strauss & Heisenberg, 1993). Επιπροσθέτως, η σύνδεσή του με το σεροτονινεργικό σύστημα, διαταραχές του οποίου έχουν συσχετιστεί με ένα ευρύ φάσμα νευροψυχιατρικών και νευρολογικών διαταραχών, μπορεί να θεωρηθεί σύμφωνη με την αντίστοιχη εμφάνιση μαθησιακών δυσκολιών, διανοητικής καθυστέρησης και νευροψυχιατρικών ασθενειών όπως σχιζοφρένεια, ψυχώσεων και διπολικής διαταραχής σε ένα πολύ σημαντικό ποσοστό ατόμων που πάσχουν από το σύνδρομο μικροελλείμματος 22q11.2 (Gothelf et al., 2008). Επιπλέον, σύμφωνα με μία μελέτη, η παρουσία τριών συγκεκριμένων πολυμορφισμών στον υποκινητή παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική ενεργότητα του γονιδίου *DGCR14* και έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση σχιζοφρένειας. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε πληθυσμό 250 Κινέζων ώστε να αποφευχθούν τυχόν αρνητικώς θετικά αποτελέσματα λόγω πληθυσμιακής διαστρωμάτωσης (population stratification). Έτσι βρέθηκαν 3 διαφορετικοί πολυμορφισμοί SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), οι οποίοι εμφανίζονταν τόσο στους ασθενείς με σχιζοφρένεια όσο και στον έναν τουλάχιστον από τους γονείς τους. Δύο από αυτούς τους πολυμορφισμούς SNPs πιθανώς επηρεάζουν θετικά την μεταγραφή του γονιδίου *DGCR14*, αφού εντοπίζονται σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή, και παρουσιάζουν γενετική προδιάθεση εκδήλωσης σχιζοφρένειας (Wang et al., 2006).

Συνδυαστικά, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα πιθανώς υποδεικνύουν την συσχέτιση μεταξύ της πρωτεΐνης DGCR14 και της φυσιολογικής ανάπτυξης και λειτουργίας του νευρικού συστήματος, με τυχόν αλλαγές στο γονίδιο να φαίνεται να σχετίζονται με νευροψυχιατρικές και νευρολογικές διαταραχές.

3.3.2 Η πρωτεΐνη DGCR14 αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής

Επιπλέον πληροφορίες για το λειτουργικό ρόλο της πρωτεΐνης DGCR14 προέρχονται από πειράματα απομόνωσης του σωματίου συναρμογής και των υποσυμπλόκων του, κατά τα οποία ταυτοποιήθηκε ως συστατικό του σωματίου συναρμογής (spliceosome) και πιο συγκεκριμένα ως συστατικό του συμπλόκου C (Ilagan et al., 2009, Ilagan et al., 2013, Bessonov et al., 2008, Bessonov et al., 2010, Schmidt et al., 2014), του συμπλόκου P (Ilagan et al., 2013) καθώς και του συμπλόκου B-activation (Bessonov et al., 2010). Το σωματίο συναρμογής αποτελεί ένα μεγάλο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο συναρμολογείται σε κάθε ιντρόνιο από πέντε μικρά πυρηνικά RNPs (small nuclear RNPs, snRNPs) και ένα μεγάλο αριθμό βοηθητικών πρωτεϊνών. Η κύρια κατηγορία του σωματίου συναρμογής αποτελείται από τα U1, U2, U4, U5 και U6 snRNPs και είναι υπεύθυνο για την συναρμογή σχεδόν όλων των ιντρονίων στα μετάζωα. Ο γενικός μηχανισμός της συναρμογής περιλαμβάνει δύο διαδοχικές αντιδράσεις μετεστεροποίησης κατά τις οποίες απομακρύνονται τα ιντρόνια και παράλληλα συνδέονται τα αντίστοιχα εξώνια (Patel et al., 2003). Η συμμετοχή της στο σωματίο συναρμογής είναι εξελικτικά συντηρημένη καθώς η αντίστοιχη πρωτεΐνη έχει απομονωθεί από το σύμπλοκο C της *D.melanogaster* και του *C. elegans* (Herold et al., 2009).

Επιπλέον, σύμφωνα με μία ακόμη μελέτη έχει αποδειχθεί η συσχέτιση της DGCR14 με τη διασφάλιση της σωστής συναρμογής του mRNA, σε περιπτώσεις όπου υπάρχει εναλλακτική θέση συναρμογής ή βασίζεται σε μη κανονικές αλληλουχίες. Πιο συγκεκριμένα, η απώλεια της λειτουργίας της DGCR14 στον *Caenorhabditis elegans* σε συνδυασμό με μια μετάλλαξη που επηρεάζει την συναρμογή της πρωτεΐνης DLK, καταστέλλει την πρωτεΐνη RPM-1, η οποία ελέγχει οργάνωση των συνάψεων (Kentaro et al., 2014). Η πρωτεΐνη DLK (Dual-Leucine zipper Kinase MAPKKK) φαίνεται να παίζει ρόλο στην συναπτογένεση και την ανάπτυξη του άξονα στον *Caenorhabditis elegans* αλλά και σε άλλους οργανισμούς. Συγκεκριμένα στον *C. elegans*, η πρωτεΐνη DLK-1 όχι μόνο ρυθμίζει τον σχηματισμό των συνάψεων και την μορφολογία του άξονα, αλλά ταυτόχρονα και την αναγέννηση του άξονα επηρεάζοντας της σταθερότητα των mRNA (Dong et al., 2009). Η πρωτεΐνη RPM-1 είναι μια E3 λιγάση της ουβικουιτίνης που ρυθμίζει την οργάνωση και την σταθερότητα των προσυναπτικών άκρων αλλά και του άξονα τόσο σε αισθητικούς όσο και σε κινητικούς νευρώνες (Schaefer et al., 2000, Zhen et al., 2000). Ο κύριος στόχος της πρωτεΐνης RPM-1 είναι η πρωτεΐνη DLK-1. Έτσι ελέγχοντας τα επίπεδα της DLK-1, η RPM-1 διατηρεί την δραστηριότητα του καταρράκτη που πυροδοτεί η DLK-1, σε επιθυμητά επίπεδα. Αυτή η αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού DLK λόγω αποικοδόμησης μέσω ουβικουιτίνης είναι συντηρημένη σε νευρώνες θηλαστικών (Collins et al., 2006; Jin and Garner, 2008; Lewcock et al., 2007). Μια σημειακή μετάλλαξη στο τρίτο ιντρόνιο της DLK-1 οδηγεί στην εμφάνιση ενός πρόωρου κωδικωνίου λήξης πριν την περιοχή ενεργότητας κινάσης της DLK-1. Αυτή όμως η μετάλλαξη από μόνη της δεν μπορεί να προκαλέσει καταστολή της πρωτεΐνης RPM-1. Επιπλέον, μη νοηματική μετάλλαξη της DGCR14 φαίνεται να ενισχύει την ολοκληρωτική απώλεια της λειτουργίας της DLK-1. Έτσι, διπλά μεταλλάγματα της πρωτεΐνης DGCR14 και της DLK-1 φαίνεται να καταστέλλουν την πρωτεΐνη RPM-1,

αποδεικνύοντας τον ρόλο της πρωτεΐνης DGCR14 στην διασφάλιση της ακριβούς συναρμογής των mRNAs όταν η θέση συναρμογής είναι αλλαγμένη ή βασίζεται σε μη κανονικές αλληλουχίες (Kentaro et al., 2014). Η πρωτεΐνη DGCR14 ίσως παίζει πλεοναστικό ή βοηθητικό ρόλο μαζί με άλλα συστατικά του συμπλόκου C στην διασφάλιση της ακριβούς συναρμογής των mRNAs. Έλλειψη του γονιδίου *DGCR14* μπορεί να συνεισφέρει στην εξέλιξη της παθογένειας των ασθενών λόγω λανθασμένης συναρμογής. Πράγματι, μία ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων που σχετίζονται με πλήθος γενετικών ασθενειών στον άνθρωπο, αναφέρει πως περίπου το 15% όλων αυτών των μεταλλάξεων μπορεί να οδηγούν σε προβλήματα στην συναρμογή των mRNAs (Krawczak et al., 1992).

Ωστόσο, η απομόνωση της DGCR14 από το σύμπλοκο C δεν συνεπάγεται απαραίτητα την συμμετοχή της στην κατάλυση της συναρμογής. Τα τελευταία χρόνια γίνεται ολοένα και πιο φανερό το γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμμετέχουν στα διαφορετικά στάδια μεταβολισμού του mRNA και μεταφοράς στο κυτταρόπλασμα, είναι συνδεδεμένα τόσο μεταξύ τους όσο και με την διαδικασία της μεταγραφής (Luna et al., 2008; Reed, 2003; Sommer & Nehrbass, 2005). Η επικοινωνία αυτών των πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, αν και όχι υποχρεωτική, υπάρχει για την ρύθμιση, την διόρθωση και την βελτιστοποίηση της γονιδιακής έκφρασης *in vivo* με έναν δυναμικό και χωρο-χρονικά συντονισμένο τρόπο.

3.3.3 Ο ρόλος της πρωτεΐνης DGCR14 στα T_H17-λεμφοκύτταρα

Τα T_H17-λεμφοκύτταρα είναι προ-φλεγμονώδη T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα που χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ιντερλευκίνης 17 (IL17). Παίζουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των παθογόνων από τις επιφάνειες των βλεννογόνων, αλλά έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις διαταραχές. Βασικός ρυθμιστής των T_H17-λεμφοκυττάρων φαίνεται να είναι ο υποδοχέας RORγ (retinoid-related orphan nuclear receptor gamma) (Ivanov et al., 2006).

Ο υποδοχέας RORγ, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Rorc*, αποτελεί μέλος της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες και ελέγχει την μεταγραφή γονιδίων μέσω της σύνδεσης του, με την μορφή μονομερούς, σε στοιχεία απόκρισης ROR (ROREs) (Medvedev et al. 1996). Ρυθμίζει τον καρδιακό ρυθμό, την ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων και την ομοιοστάση των λιπιδίων και της γλυκόζης (Jetten et al, 2009). Επειδή τα T_H17-λεμφοκύτταρα παίζουν κεντρικό ρόλο στην εκδήλωση αυτοάνοσων ασθενειών, η καταστολή της έκφρασης του υποδοχέα RORγ είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη θεραπειών για T_H17-μεσολαβούμενες αυτοάνοσες ασθένειες όπως η πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Solt et al., 2011, Wang et al., 2010, Kumar et al., 2010).

Παρά το γεγονός ότι η πρωτεΐνη DGCR14 δεν διαθέτει κάποια γνωστή λειτουργική επικράτεια, φαίνεται να δρα ως συνενεργοποιητής της λειτουργίας του υποδοχέα RORγ στα T_H17-λεμφοκύτταρα με την μεσολάβηση του N-τελικού της άκρου. Σε κυτταρικές σειρές T_H17-λεμφοκυττάρων φαίνεται να υπάρχει αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης RORγ καθώς και του mRNA της ιντερλευκίνης 17α (IL17α). Η

υπερέκφραση του γονιδίου *DGCR14* ενισχύει την RORγ-εξαρτώμενη μεταγραφική δραστηριότητα και διευκολύνει την κυτταρική διαφοροποίηση των T_H17-λεμφοκυττάρων. Αντίθετα, η καταστολή του γονιδίου *DGCR14* μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της Il17α. Τα παραπάνω αποδεικνύουν τον ρόλο της πρωτεΐνης DGCR14 ως μεταγραφικό συνενεργοποιητή των T_H17-λεμφοκυττάρων (Ichiro Takada, 2015).

Γενικά, η ρύθμιση της μεταγραφής πραγματοποιείται από σύμπλοκα που επάγουν παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης ή ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες (Rosenfeld et al., 2006). Η πρωτεΐνη DGCR14 δεν φαίνεται να έχει γνωστές επικράτειες για τέτοιου είδους παράγοντες ή ένζυμα. Ωστόσο έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες BAZ1B, SHPRH και RSK2. Η πρωτεΐνη BAZ1B αποτελεί υπομονάδα των ATP-εξαρτώμενων παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (ATP-dependent chromatin remodelers) και συμμετέχει στην μεταγραφή και την επιδιόρθωση βλαβών του DNA (Barnett et al., 2011). Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση και ενεργοποίηση του υποδοχέα RORγ (Ichiro Takada, 2015). Η πρωτεΐνη SHPRH είναι μια E3 λιγάση της ουβικουτίνης και εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA (Unk et al. 2006). Η πρωτεΐνη RSK2 αποτελείται από μια ομάδα κινασών σερίνης /θρεονίνη και παίζει ρόλο στον καταρράκτη σηματοδότησης των κινασών ύστερα από ενεργοποίηση από κάποιο μιτογόνο (Romeo et al., 2012). Οι παραπάνω πρωτεΐνες συνδέονται με την πρωτεΐνη DGCR14 στον υποκινητή της Il17α. Τα παραπάνω αποδεικνύουν την σημαντικότητα των πρωτεϊνών DGCR14/RSK2/BAZ1B στην διαφοροποίηση των T_H17-λεμφοκυττάρων και κατ'επέκταση στις αυτοάνοσες ασθένειες (Ichiro Takada, 2015).

3.4 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης DGCR14

Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις αποτελούν μια σημαντική παράμετρο για την κατανόηση της λειτουργίας των βιομορίων διότι οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους χωρίς να αλληλεπιδράσουν με άλλα μακρομόρια. Έτσι, η ταυτοποίηση των φυσικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, των συμπλόκων καθώς και η δυναμική των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένο χώρο και χρόνο, σε επίπεδο κυττάρου ή οργανισμού, είναι σημαντική για την κατανόηση της πρωτεϊνικής λειτουργίας, των βιοχημικών μονοπατιών και δικτύων στα οποία ανήκουν και μακροπρόθεσμα στην κατανόηση της συντονισμένης λειτουργίας των «πρωτεϊνικών μηχανών» και της αποτελεσματικής κυτταρικής λειτουργίας (Figeys, 2008). Επίσης, αυτές οι πληροφορίες είναι περισσότερο απαραίτητες κυρίως όταν δεν υπάρχουν στοιχεία για την υποθετική πρωτεϊνική λειτουργία όπως στις περιπτώσεις στις οποίες η πρωτεΐνη δεν περιέχει ένα καλά χαρακτηρισμένο μοτίβο ή στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες για την λειτουργία της από τα ορθόλογα μόριά της. Συνεπώς, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιομορίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην πλειοψηφία των κυτταρικών διαδικασιών. Αυτή η γνώση, δηλαδή του ρόλου και των συνεπειών των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αξιοποιείται στη λειτουργική γονιδιωματική και στη συστημική βιολογία (Figeys 2008).

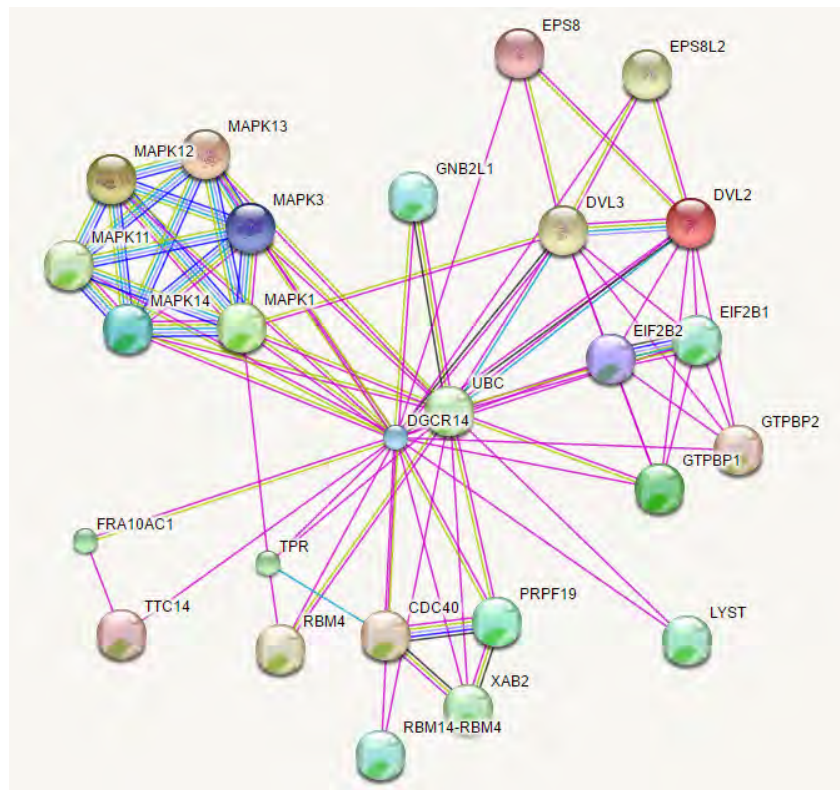
Από πειράματα ταυτοποίησης αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, συνκατακρήμνισης και ανοσοκατακρήμνισης

υποδεικνύεται η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης DGCR14 με πλήθος άλλων πρωτεϊνών όπως η πρωτεΐνη RMBP4 (RNA Binding Motif Protein 4), η οποία είναι ένας παράγοντας που προσδένεται στο RNA και συμμετέχει στην εναλλακτική συναρμογή (Lin et al., 2014) και στην ρύθμιση της μετάφρασης (Brudecki et al., 2013). Επίσης, φαίνεται να υπάρχει αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη PRP19 (pre-mRNA processing factor 19), η οποία πιθανώς υποβοηθά την πρόσδεση και την λειτουργία του σωματίου συναρμογής (Grote et al., 2010) καθώς και με την πρωτεΐνη TTC14 (tetratricopeptide repeat domain 14), η οποία έχει άγνωστη μέχρι στιγμής λειτουργία (Εικ. 3).

3.4.1 Πρωτεϊνική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης DGCR14 με την πρωτεΐνη FRA10AC1

Η πρωτεΐνη DGCR14 φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα και με την πρωτεΐνη FRA10AC1 (αδημοσίευτα αποτελέσματα) (Εικ. 3). Η πρωτεΐνη FRA10AC1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *FRA10AC1*, το οποίο εντοπίζεται στην εύθραυστη θέση *FRA10A*. Η *FRA10A* ανήκει στις σπάνιες αυτοσωματικές εύθραυστες θέσεις που εμφανίζονται όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο. Η *FRA10A* χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 και η έκφρασή της επάγεται από την επέκταση μίας πολυμορφικής επανάληψης CGG η οποία εντοπίζεται στην 5' UTR του γονιδίου *FRA10AC1* (Sarafidou et al., 2004). Μέχρι τώρα, η εμφάνιση της θέσης *FRA10A* δεν έχει συσχετιστεί με συγκεκριμένο παθολογικό φαινότυπο. Ωστόσο, έχουν γίνει διάφορες μελέτες που δείχνουν ότι η έκφρασή της μπορεί να σχετίζεται με νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες. Όπως και η DGCR14 έτσι και η FRA10AC1 έχει απομονωθεί ως συστατικά του σωματίου συναρμογής και ειδικότερα του υποσυμπλόκου συμπλόκου C (Ilagan et al., 2009, Ilagan et al., 2013, Bessonov et al., 2008, Bessonov et al., 2010, Schmidt et al., 2014), του υποσυμπλόκου P (Ilagan et al., 2013) καθώς και του υποσυμπλόκου B-activation (Bessonov et al. 2010). Επιπλέον, και οι δύο πρωτεΐνες εντοπίζονται στον πυρήνα όπου και πραγματοποιείται η διαδικασία της συναρμογής για την ωρίμανση των πρόδρομων μορίων mRNA.

Η συσχέτιση των πρωτεϊνών DGCR14 και FRA10AC1 με το μηχανισμό συναρμογής και, γενικότερα, με την επεξεργασία και την ρύθμιση του RNA είναι ενδιαφέρουσα επειδή πλέον αρκετές πρωτεΐνες-συστατικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων φαίνεται να παίζουν ρόλο σε διάφορες νευρολογικές διαταραχές (Fen-Biao Gao et al., 2014). Αυτά τα δεδομένα ενισχύουν την πιθανή συσχέτιση της FRA10AC1 με το φαινότυπο της νοητικής υστέρησης που παρατηρείται στα άτομα-φορείς της εύθραυστης θέσης *FRA10A*.



Εικόνα 3: Δίκτυο πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης DGCR14

[GeneCards, Human Gene Database]

3.5 Τεχνολογίες Λειτουργικής Γονιδιωματικής

Η γονιδιωματική (Genomics) είναι ο τομέας της γενετικής που εφαρμόζει την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, μεθόδους αλληλούχισης DNA (DNA sequencing methods) και βιοπληροφορικής (bioinformatics) για την αλληλούχιση, την οργάνωση και ανάλυση της δομής και της λειτουργίας γονιδιωμάτων (National Human Genome Research Institute, 2010-11-08). Ασχολείται επίσης με την ανάλυση της έκφρασης, δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα, που αναφέρεται ως πρωτεομική (proteomics), και με τη μελέτη βιοχημικών διαδικασιών και των μεταβολιτών τους σε ένα κύτταρο, πληθυσμό κυττάρων, ενός ιστού, ενός οργάνου ή και ενός οργανισμού, που αναφέρεται ως μεταβολωμική (metabolomics) (Chaston J et al., 2012). Η λειτουργική γονιδιωματική περιλαμβάνει την έκφραση και λειτουργία γονιδίων (και πρωτεϊνών) καθώς και τις αλληλεπιδράσεις τους. Κύριο χαρακτηριστικό της λειτουργικής γονιδιωματικής είναι η εφαρμογή μεθόδων γονιδιωματικής υψηλής απόδοσης και ανάλυσης (genome-wide approach involving high-throughput methods), αντί μιας προσέγγισης σε επίπεδο απλών γονιδίων ('gene-by-gene' approach) για τη μελέτη προτύπων γονιδιακής έκφρασης σε διάφορες συνθήκες. Τέτοιες προσεγγίσεις αποτελούν οι μικροσυστοιχίες DNA σε συνδυασμό με τη βιοπληροφορική. Η μελέτη των μεταγραφικών προτύπων αναφέρεται στο σύνολο των μορίων RNA - mRNA, rRNA, tRNA, και μη-κωδικών (non-coding) RNA (transcriptome) που μεταγράφονται σε ένα κύτταρο ή σε έναν πληθυσμό κυττάρων (transcriptomics). Η αλληλούχιση αυτών των μεταγραφημάτων

είναι δυνατή με την τεχνολογία RNAseq. Σκοπός της λειτουργικής γονιδιωματικής είναι η κατανόηση της σχέσης μεταξύ του γονιδιώματος ενός οργανισμού και του φαινοτύπου. Μπορεί να εφαρμοστεί και στο επίπεδο DNA για τη χαρτογράφηση γενετικών αλληλεπιδράσεων και την ταυτοποίηση λειτουργικών στοιχείων σε κωδικές και μη-κωδικές περιοχές του γονιδιωματικού DNA [The ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) project]. Άλλες τεχνικές της λειτουργικής γονιδιωματικής που αποσκοπούν στην απώλεια της λειτουργίας γονιδίων, συμπεριλαμβάνουν την μεταλλαξιγένεση (mutagenesis) που αναφέρεται στην απάλειψη ενός ή περισσότερων γονιδίων (gene knockout), ή στη διάρρηξη της συνέχειας ενός ή περισσότερων γονιδίων (gene disruption), και την παρεμβολή με RNAi (RNA interference) που αναφέρεται στην αποσιώπηση ή τη μειωμένη ρύθμιση της έκφρασης ενός ή περισσότερων γονιδίων (siRNA ή ShRNA) (Pevsner J, 2009).

4. Σκοπός

Σε αυτό το πλαίσιο, της λειτουργικής ανάλυσης γονιδίων σε μεγάλη κλίμακα εντάσσεται και η συγκεκριμένη εργασία. Ειδικότερα, η εργασία αφορά τη διαταραχή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *DGCR14* του ανθρώπου, μέσω υπερέκφρασης του με απώτερο στόχο τη μελέτη των αποτελεσμάτων στην κυτταρική φυσιολογία, στο επίπεδο του μεταγραφώματος, πρωτεϊνώματος και μεταβολώματος. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού χρησιμοποιείται μια σταθερή κυτταρική σειρά *HeLa* που υπερεκφράζει επαγωγίμα το γονίδιο *DGCR14* του ανθρώπου με ρύθμιση μέσω του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (ανάλογο της τετρακυκλίνης). Αυτή η κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε, σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου, με την παροδική διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* με πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν το πλήρες μήκος cDNA του γονιδίου *DGCR14*. Έτσι, γίνεται μια προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών που συμβάλλουν στην υπερέκφραση του γονιδίου *DGCR14*. Μεταξύ αυτών των συνθηκών συγκαταλέγονται α) η συγκέντρωση του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη που χορηγείται στα κύτταρα *HeLa* και β) ο χρόνος επαγωγής της έκφρασης της *DGCR14* μετά την χορήγηση δοξυκυκλίνης και μέχρι την συλλογή των κυττάρων.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών *HeLa*

5.1.1 Κυτταρικές σειρές θηλαστικών

Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές αποτελούνται από αθάνατα καρκινικά κύτταρα που έχουν ληφθεί απευθείας από τον πάσχοντα οργανισμό ή από καλλιεργούμενα κύτταρα που έχουν υποστεί κάποια αλλαγή και συμπεριφέρονται ως καρκινικά (μετασχηματισμένα, transformed). Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά *HeLa*, η οποία αποτελεί την πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά που καλλιεργήθηκε στο εργαστήριο και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα. Τα κύτταρα *HeLa* απομονώθηκαν για πρώτη φορά από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας από μια 31-χρονη γυναίκα, την Henrietta Lacks, η οποία τελικά απεβίωσε. Αυτά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και κύριο χαρακτηριστικό τους, όπως και των υπόλοιπων καρκινικών κυττάρων, είναι η παρουσία του ενζύμου τελομεράση σε ενεργή μορφή κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, η οποία εμποδίζει την βράχυνση των τελομερών. Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα αυτά μπορούν να ξεπεράσουν τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων που τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να υποστούν, πριν γεράσουν.

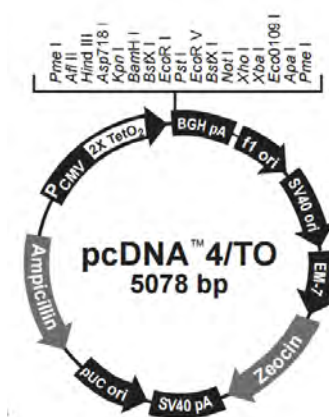
Τα κύτταρα *HeLa* αναπτύσσονται προσκολλημένα, σχηματίζοντας μονοστοιβάδες (adherent cells), σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοειδούς (Fetal Bovine Serum, FBS) και αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη (1% streptomycin-penicillin) ώστε να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση από μικροοργανισμούς. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας περιλαμβάνει τον έλεγχο του μεγέθους της κυτταρικής μονοστοιβάδας και την ανανέωση του θρεπτικού μέσου κάθε 3 με 4 ημέρες. Το θρεπτικό μέσο DMEM περιέχει διάφορα θρεπτικά υλικά για το κύτταρο όπως αμινοξέα, γλυκόζη, βιταμίνες και άλλα ανόργανα συστατικά για τη ρύθμιση του pH ενώ ο ορός εμβρύου βοειδούς FBS παρέχει στα κύτταρα αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες για την ενίσχυση των μηχανισμών κυτταρικής διαίρεσης. Τα κύτταρα προσαρτώνται σε στερεό υπόστρωμα και αναπτύσσονται σε κατάλληλα δοχεία κυτταροκαλλιέργειας (φλάσκες T-75cm² ή T-25 cm²) που τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία περιβάλλοντος (37°C), κατάλληλα επίπεδα CO₂ (5%) και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας.

Κατά την καλλιέργεια των κυττάρων υπάρχει πιθανότητα να προκύψουν προβλήματα που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη βακτηρίων, μυκήτων ή ζυμών που ωστόσο μπορούν να εντοπιστούν εύκολα με γυμνό μάτι μέσω της παρατήρησης των αλλοιώσεων που προκαλούν στην κυτταροκαλλιέργεια. Αντίθετα, τυχόν μόλυνση από ιούς ή μυκόπλασμα, δεν είναι ορατή και για αυτό απαιτούνται ειδικές μέθοδοι ανίχνευσης, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Έτσι λοιπόν, για να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις των κυττάρων από μικροοργανισμούς θα πρέπει ο χειρισμός των κυττάρων να γίνεται σε άσηπτες συνθήκες. Για την επίτευξη άσηπτων συνθηκών χρησιμοποιείται εστία καθέτου νηματικής ροής (hood) στην οποία πραγματοποιείται φιλτράρισμα του αέρα. Επίσης θα πρέπει ο χώρος εργασίας και τα υλικά να είναι αποστειρωμένα με 70% αιθανόλη ενώ είναι απαραίτητη η χρήση γαντιών. Όλα τα παραπάνω πραγματοποιούνται σε

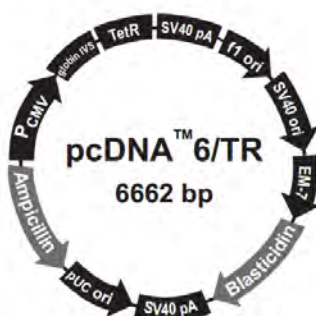
ειδικά διαμορφωμένο χώρο (cell culture room) για την εξασφάλιση όλων των απαραίτητων προϋποθέσεων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μια σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά *HeLa*, η οποία περιλαμβάνει πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *DGCR14* του ανθρώπου υπό τον έλεγχο ενός συστήματος επαγωγίμης έκφρασης που βασίζεται στην τετρακυκλίνη. Το επαγωγίμο από τετρακυκλίνη σύστημα γονιδιακής έκφρασης παρέχει τη δυνατότητα ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης της μεταγραφής ενός γονιδίου με την παρουσία ή όχι του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη ή άλλων παραγώγων της τετρακυκλίνης όπως η δοξυκυκλίνη (Doxycycline, Dox). Το σύστημα αυτό επιτρέπει την αξιολόγηση του ρόλου μιας επιλεγμένης πρωτεΐνης, η οποία θεωρείται ότι εμπλέκεται στην αιτιολογία ειδικών παθολογιών. Έτσι λοιπόν, με την χρήση ενός τέτοιου συστήματος μπορεί να πραγματοποιηθεί ελεγχόμενη έκφραση μιας πρωτεΐνης, όπως η *DGCR14*, για τον αξιολόγηση του λειτουργικού ρόλου της πρωτεΐνης.

Ειδικότερα, η σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά *HeLa* είναι διπλά διαμολυσμένη, αφού τα κύτταρα φέρουν στο γονιδίωμα τους ένα πλασμίδιο pcDNA 6TR (Εικ. 4), που κωδικοποιεί έναν καταστολέα της τετρακυκλίνης και ένα πλασμίδιο pcDNA 4TO (Εικ. 5), στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *DGCR14* και επίσης φέρει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες στις οποίες προσδένεται ο καταστολέας. Το πλασμίδιο pcDNA 4TO χρησιμοποιείται για την ελεγχόμενη μέσω του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών τα οποία είναι διαμολυσμένα και με το πλασμίδιο pcDNA 6TR. Το πλασμίδιο pcDNA 6/TR περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό βλαστισιδίνη (blastsidin) ενώ το πλασμίδιο pcDNA 4TO περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη (zeocin). Επομένως η σταθερά διαμολυσμένη με τα δυο πλασμίδια κυτταρική σειρά *HeLa* εμφανίζει ανθεκτικότητα και στα δύο αντιβιοτικά, βλαστισιδίνη και ζεοσίνη.



Εικόνα 4: Το πλασμίδιο pcDNA 4TO με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη.
[Invitrogen Life Technologies, www.lifetechnologies.com)]



Εικόνα 5: Το πλασμίδιο pcDNA 6/TR με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό βλαστισιδίνη. [Invitrogen Life Technologies, www.lifetechnologies.com)]

5.1.2 Διατήρηση κυτταροκαλλιιεργειών

Τα κύτταρα μετά από 3-4 ημέρες καλλιέργειας φθάνουν στην λογαριθμική ή εκθετική φάση ανάπτυξης, η οποία χαρακτηρίζεται από έντονο πολλαπλασιασμό, αφού μετά από κάθε διαίρεση των κυττάρων (χρόνος γενεάς) ο αριθμός τους διπλασιάζεται. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής τα κύτταρα μπορούν να υποστούν αλλαγές στο μέγεθος ενώ στο τέλος της φάσης παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης λόγω εξάντλησης του θρεπτικού μέσου και λόγω συγκέντρωσης στο υλικό προϊόντων ανταλλαγής της ύλης, βλαπτικών για τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Όταν τα κύτταρα φθάσουν στην φάση αυτή καλύπτουν περίπου το 80% της διαθέσιμης επιφάνειας, και τότε κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση της ανακαλλιέργειας. Αυτό γίνεται για να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση των τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού καθώς και για την προσθήκη θρεπτικών συστατικών για την διατήρηση του αριθμού των κυττάρων σε επιθυμητά επίπεδα, αφού η υπέρμετρη αύξηση του αριθμού τους μπορεί να δράσει ανασταλτικά στην ανάπτυξη επάγοντας μηχανισμούς απόπτωσης. Για τις προσκολλημένες στο υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειες όπως τα κύτταρα *HeLa*, η ανακαλλιέργεια τους προϋποθέτει προηγουμένως την αποκόλληση τους από την επιφάνεια της φλάσκας. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, για την αποκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το παγκρεατικό ένζυμο, θρυψίνη, η οποία είναι μία πρωτεάση σερίνης που διασπά πεπτιδικούς δεσμούς.

Η διαδικασία της αποκόλλησης των κυττάρων (θρυψινοποίηση) είναι η εξής:

- Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται με αναρρόφηση μέσω γυάλινης πιπέτας Pasteur.
- Τα κύτταρα εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Saline, PBS) για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων από νεκρά κύτταρα.
- Προστίθεται θρυψίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xPBS σε κατάλληλη αραιώση 1:10 και τα κύτταρα επωάζονται για περίπου 2 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο.

- Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο για την επίβλεψη της πορείας της αποκόλλησης, η οποία υποβοηθείται συνήθως με ελαφρό χτύπημα της φλάσκας για να σπάσουν τα συσσωματώματα.

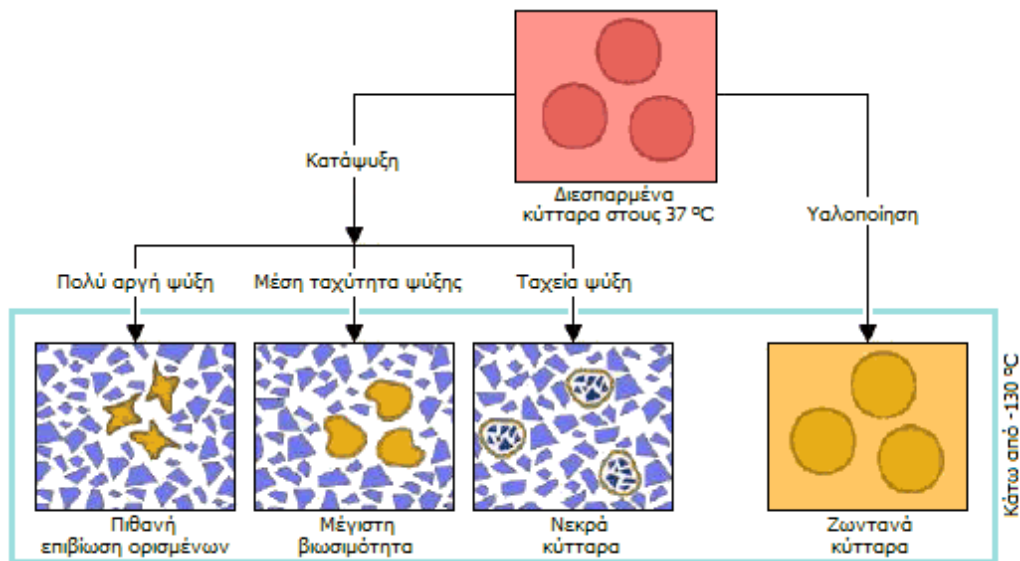
Προστίθεται προθερμασμένο (37°C) θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με FBS και τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Το θρεπτικό μέσο DMEM αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης έναντι των πρωτεϊνών των κυττάρων αφού το ένζυμο δρα πλέον έναντι των πρωτεϊνών του θρεπτικού μέσου.

- Η προσθήκη πραγματοποιείται μόλις γίνει η αποκόλληση όλων των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας.

5.1.3 Κρυοδιατήρηση κυττάρων

Η κρυοδιατήρηση ή κρυοσυντήρηση είναι μία διαδικασία όπου τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε θερμοκρασίες -70°C έως -80°C σε υπερκαταψύκτες ή και μέχρι τους -196°C σε υγρό άζωτο, προκειμένου να διατηρηθούν βιώσιμα. Όταν τα κύτταρα ψύχονται αναπτύσσονται ενδοκυτταρικά κρύσταλλοι πάγου. Καθώς η ψύξη συνεχίζεται, τα κύτταρα συντρίβονται μέσα σε θυλάκια πυκνού αλατούχου διαλύματος. Το τελευταίο είναι αποτέλεσμα της πύκνωσης του αρχικού υδατικού διαλύματος, καθώς το νερό μετατρέπεται σε πάγο και απομακρύνεται. Επομένως, η ψύξη ουσιαστικά συντρίβει τα κύτταρα καταστρέφοντας τις μεμβράνες, αλλά επίσης μπορεί να προκαλέσει αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών (λόγω της δέσμευσης μορίων νερού στο πάγο), που με τη σειρά της μπορεί να είναι καταστροφική για το κύτταρο. Αντίθετα ο σχηματισμός πάγου εξωκυτταρικά, ιδίως αν συμβεί προοδευτικά, μπορεί να μην είναι επικίνδυνος για το κύτταρο.

Προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες επιβίωσης των κυττάρων μετά από κρυοδιατήρηση, χρησιμοποιούνται διάφορες κρυοπροστατευτικές ουσίες. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO) αποτελεί μια εξαιρετική κρυοπροστατευτική ουσία, η οποία έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να διέρχεται με μεγάλη ταχύτητα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και ταυτόχρονα δεν εμφανίζει τοξικότητα. Τα υδατικά διαλύματα κρυοπροστατευτικών ουσιών κάνουν το νερό να σκληρύνει κατά τη ψύξη σαν γυαλί, χωρίς να σχηματίζει κρυστάλλους οι οποίοι θα κατέστρεφαν τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται υαλοποίηση (vitrification) (Εικ. 6). Έτσι, καθώς μειώνεται η θερμοκρασία, υδατικά διαλύματα κρυοπροστατευτικών ουσιών καθίστανται σταδιακά πιο πυκνόρρευστα μέχρι πλήρους στερεοποίησης. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να καταψυχθούν σταδιακά στους -80°C και να στερεοποιηθούν σε μια πλήρως υαλοποιημένη κατάσταση χωρίς την εμφάνιση κρυστάλλων. Όσο μικρότερος είναι ο ρυθμός ψύξης μέχρι την επίτευξη της υαλοποίησης, τόσο ελαχιστοποιούνται οι βλάβες στα ψυχόμενα κύτταρα (Εικ. 4). Ένας τυπικός (αργός) ρυθμός ψύξης για πολλά κύτταρα θηλαστικών, όπως τα κύτταρα *HeLa*, είναι περίπου 1 °C / λεπτό.



Εικόνα 6: Επίδραση της υαλοποίησης και της κατάψυξης, όπως και της ταχύτητας κατάψυξης πάνω στη βιωσιμότητα των κυττάρων [Martinenaitė E, Tavenier J (Roskilde University): "Cryonics", Dec. 2010].

Η κρυοδιατήρηση πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης (~80% κάλυψη της διαθέσιμης επιφάνειας, για κύτταρα που αναπτύσσονται σχηματίζοντας μονοστοιβάδα) με την εξής διαδικασία:

- Διαδοχικές πλύσεις με 1x PBS
- Διαδικασία της θρυψινοποίησης
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 7 min στις 1200 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επαναιώρηση της πελλέτας των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με FBS (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη). Προστίθεται αρχικά μικρή ποσότητα θρεπτικού μέσου για την επαναδιάλυση της πελλέτας των κυττάρων και έπειτα προστίθεται και η υπόλοιπη ποσότητα.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 20% DMSO (σε DMEM με 10% FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη). Η προσθήκη του διαλύματος αυτού γίνεται σταγόνα-σταγόνα με συνεχή ανάδευση έτσι ώστε να αποφευχθεί το οσμωτικό σοκ και να ελαχιστοποιηθεί η αύξηση της θερμοκρασίας που προκαλείται από την διάλυση του DMSO.
- Μεταφορά του δείγματος σε κατάλληλο φιαλίδιο (cryovial) το οποίο, για λόγους μόνωσης, τυλίγεται με χαρτί.
- Επώαση για 20-30 min στους -20°C.
- Παραμονή του δείγματος στους -80°C ολονύκτια και αποθήκευση σε δεξαμενή υγρού αζώτου (-196 °C ως -156 °C).

5.1.4 Επανακαλλιέργεια

Η πιθανότητα επιβίωσης των κυττάρων μετά το πάγωμα δεν καθορίζεται μόνο από τον ρυθμό παγώματός, αλλά και από τον ρυθμό ξεπαγώματος. Αντίστοιχα, αργός θα πρέπει να είναι και ο ρυθμός επαναφοράς του καταψυχθέντος υλικού σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την επανακαλλιέργεια, τα κύτταρα που έχουν παραμείνει παγωμένα ακόμα και για μεγάλο χρονικό διάστημα, μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 37°C όπου και αναδεύονται ήπια μέχρι την πλήρη τήξη του θρεπτικού μέσου (1-2 min). Η διαδικασία γίνεται όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός ενδοκυτταρικών κρυστάλλων κατά τη διαδικασία της ενυδάτωσής τους. Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα στην οποία έχει ήδη προστεθεί θρεπτικό μέσο DMEM (με 10% FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη).

5.1.5 Μέτρηση κυττάρων για επίστρωση τρυβλίων

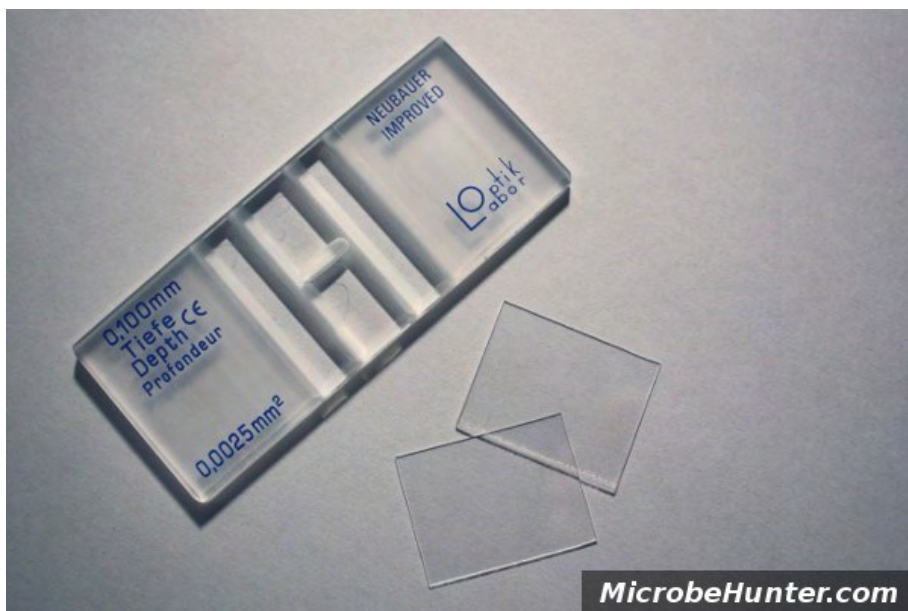
Για την επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία, που διευκολύνουν τους πειραματικούς χειρισμούς, είναι απαραίτητη προηγουμένως η μέτρηση τους για την εκτίμηση της ποσότητας που θα επιστρωθεί κάθε φορά ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Η συγκέντρωση των κυττάρων προσδιορίζεται με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer), η χρήση του οποίου είναι άμεση, απλή και οικονομική (Εικ. 5). Η διαδικασία μέτρησης στοχεύει στην μέτρηση αντιπροσωπευτικού δείγματος κυττάρων πάνω στην πλάκα.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές διαθέτει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm (εμβαδόν 1mm²). Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες ισαπέχουσες γραμμές (απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm), με βάση τις οποίες καθορίζεται εάν τα κύτταρα βρίσκονται εντός ή εκτός του τετραγώνου. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα διαιρείται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Το επίπεδο του διαβαθμισμένου πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από δύο παράλληλες προεξοχές, τις «ράχες» του αιμοκυτταρόμετρου, στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Ανάμεσα στην εξωτερική πλευρά της τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και στις «ράχες» όπου στηρίζεται η καλυπτρίδα, υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια στην οποία εισάγεται το κυτταρικό ελαιώρημα και απλώνεται με τριχοειδικά φαινόμενα στην διαβαθμισμένη επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου (Εικ. 6). Επειδή ο όγκος που καταλαμβάνει το κυτταρικό ελαιώρημα σε καθένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 1mm² ή 1×10^4 , ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων γίνεται ως εξής:

$$\text{Αριθμός κυττάρων/ml} = \text{μέσος αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο} \times 1 \times 10^4$$

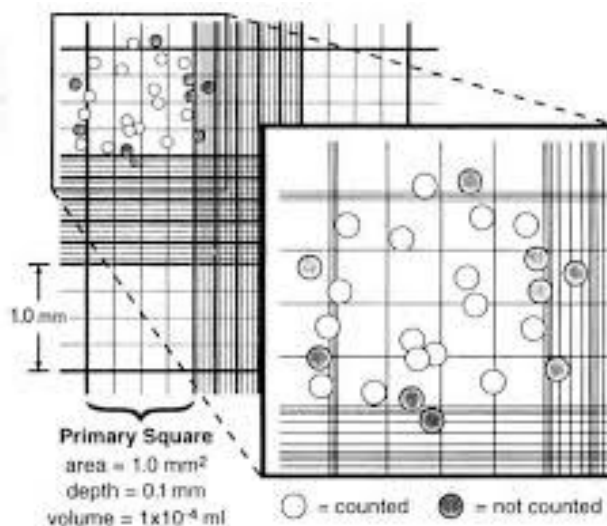
Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Θρυψινοποίηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού.
- Μεταφορά 10μl από το εναιώρημα, στην κοίλη επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου.
- Μέτρηση των κυττάρων με παρατήρηση στο μικροσκόπιο και υπολογισμός του αριθμού τους στο εναιώρημα.
- Ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων προς ανάπτυξη στο τρυβλίο, υπολογίζεται και μεταφέρεται η κατάλληλη ποσότητα εναιωρήματος σε αυτό.



Εικόνα 5: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer [MicrobeHunter Microscopy Magazine]

<http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>



Εικόνα 6: Τετραγωνισμένο πλέγμα στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer για την μέτρηση των κυττάρων [National Science Foundation, Counting Cells with a Hemocytometer Protocol, October 2006]

5.1.6 Συλλογή κυττάρων

Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε για την χρήση τους στην ανάλυση Western έτσι ώστε να μελετηθεί το προφίλ έκφρασης της πρωτεΐνης DGCR14. Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής:

- Θρυψινοποίηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού.
- Τα κύτταρα συλλέγονται σε falcon 15ml αφού προηγηθεί καλό ανακάτεμα με την βοήθεια πιπέτας.
- Φυγοκέντρηση 7 min στις 13000 rpm.
- Επαναρρόφηση του θρεπτικού υλικού αφήνοντας ελάχιστη ποσότητα για επαναδιάλυση.
- Μεταφορά κυττάρων σε erpendorf και φυγοκέντρηση 7 min στις 13000 rpm.
- Επαναρρόφηση του θρεπτικού υλικού.
- Φύλαξη των πελλετών στους -80°C.

5. 2 Απομόνωση γενετικού υλικού

Από τα κύτταρα που συλλέγονται, ένας μικρός αριθμός κυττάρων φυλάσσεται σε ξεχωριστό erpendorf ώστε να πραγματοποιηθεί έλεγχος για τυχόν ύπαρξη μυκοπλάσματος. Το μυκόπλασμα (mycoplasma) είναι ένα γένος βακτηρίων που δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα σε αντίθεση με τα κοινά βακτήρια. Χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, είναι ανεπηρέαστα από πολλά κοινά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη και τα αντιβιοτικά β-λακτάμης, τα οποία στοχοποιούν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Τέτοιου είδους βακτήρια δεν μεγαλώνουν σε αποικίες και έτσι δεν

είναι ορατά με γυμνό μάτι παρατηρώντας την καλλιέργεια αλλά ούτε ορατά στο μικροσκόπιο. Στα πρώτα στάδια της μόλυνσης, επικάθονται στην κυτταρική μεμβράνη, χωρίς όμως να δρουν τοξικά και χωρίς να προκαλούν αλλαγές στο pH. Στην συνέχεια όμως, αναστέλλουν τον μεταβολισμό των κυττάρων συνθέτοντας πυρηνικά οξέα τα οποία προκαλούν χρωμοσωμικές εκτροπές και αλλαγές στην αντιγονικότητα των μεμβρανών. Ένας αποτελεσματικός τρόπος ανίχνευσης του γενετικού υλικού του μυκοπλάσματος είναι μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Ωστόσο, για να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση θα πρέπει να έχει προηγηθεί η απομόνωση του γενετικού υλικού των κυττάρων. Αυτή πραγματοποιήθηκε με κατάλληλο κιτ απομόνωσης DNA από κύτταρα (NucleoSpin Tissue, 740952.50) της εταιρίας Nachevey Nagel.

5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) πραγματοποιείται για την ανίχνευση γενετικού υλικού του μυκοπλάσματος γεγονός που θα σηματοδοτούσε την ύπαρξη μόλυνσης της κυτταροκαλλιέργειας και την επακόλουθη ανάγκη για θεραπεία των κυττάρων με κατάλληλο και αποτελεσματικό αντιβιοτικό. Η τεχνική της PCR επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* χαρακτηριστικών αλληλουχιών DNA, στην συγκεκριμένη περίπτωση DNA του μυκοπλάσματος, από ελάχιστες αρχικές ποσότητες του δείγματος. Η χρήση δύο πλευρικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (5' και 3' primers), μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους επιμήκυνσής τους με τη βοήθεια μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, παρέχει τελικά την εκλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Η εκλεκτικότητα συνεπάγεται του σχεδιασμού των εκκινητών, που βασίζεται στις γνωστές αλληλουχίες εκατέρωθεν της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί, ώστε να είναι ειδικοί προς αυτή. Έτσι καθορίζονται τα άκρα του επιθυμητού τμήματος. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι βακτηριακής προέλευσης εφόσον απομονώνεται από το θερμοφίλο *Thermus aquaticus* (Taq πολυμεράση) γεγονός που της προσδίδει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες (έως 95°C). Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί το στάδιο της αντιγραφής από την πολυμεράση είναι απαραίτητη η προσθήκη διαλύματος 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζινουκλεοτιδίων (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου καθώς και διάλυμα ιόντων Mg^{2+} , ενώ για την συμπλήρωση του τελικού όγκου προστίθεται αποστειρωμένο νερό (Πίνακας 1). Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, ένωσης και αντιγραφής από την πολυμεράση πραγματοποιούνται σε ειδική PCR συσκευή, γνωστή ως θερμικός κυκλοποιητής, που προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια που επαναλαμβάνονται κυκλικά (45 κύκλοι). Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής: 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου, 3) Επέκταση των εκκινητών (extension). Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 95°C για 15min προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA. Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 55°C και έτσι επιτυγχάνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις

συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'. Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας η προθρομβίνη για να διασφαλίσουμε την πιστότητα της αντίδρασης.

Πίνακας 1 : Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά την αντίδραση PCR.

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου (Buffer)	10x
Διάλυμα ιόντων Mg^{2+} ($MgCl_2$)	25 mM
Μίγμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)	2mM το καθένα
Forward primer	50pmol/μl
Reverse primer	50pmol/μl
Taq polymerase	5units/μl

5.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την αντίδραση PCR πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να οπτικοποιηθούν τα αποτελέσματα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα μετακίνησης των γραμμικών δίκλωνων μορίων DNA σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, σύμφωνα με το φορτίο και το μέγεθος τους. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται λόγω του ηλεκτρικού πεδίου κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια προς τα ηλεκτρόδια της ανόδου της ηλεκτροφορητικής συσκευής, με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του μοριακού τους βάρους. Ένας άλλος περιοριστικός παράγοντας της ταχύτητας μετακίνησης των μορίων, είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Συνδυαστικά, όσο μεγαλύτερα είναι τα μόρια τόσο πιο αργά μετακινούνται διαμέσου μικρών πόρων. Η συγκέντρωση της αγαρόζης (φυτικός πολυσακχαρίτης) που χρησιμοποιείται καθορίζει το μέγεθος των πόρων της πηκτής και συνεπώς ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης από την ένταση του ρεύματος που παρέχεται, με αποτέλεσμα να μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης όταν αυξάνεται η τάση (volts) που εφαρμόζεται. Οι ζώνες του DNA που προκύπτουν από τον διαχωρισμό χρωματίζονται ώστε να είναι ορατές. Η μέθοδος χρώσης του DNA συνίσταται σε έκθεσή του σε μικρές συγκεντρώσεις μιας χρωστικής, του

βρωμιούχου αιθιδίου , που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και φθορίζει κάτω από υπεριώδεις φως. Έτσι, η ύπαρξη ζωνών υποδηλώνει την παρουσία του DNA του μυκοπλάσματος και άρα είναι ενδεικτική της μόλυνσης των κυττάρων από το βακτήριο.

Για την κατασκευή του πηκτώματος αγαρόζης χρησιμοποιούνται:

- Αγαρόζη (σε κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τη σύσταση του πηκτώματος)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE που προκύπτει από την αραιώση πυκνού διαλύματος 50 x TAE με την εξής σύσταση:
 - 200 mM Tris
 - 200 mM οξικό οξύ
 - 1 mM EDTA pH 8.0

Το διάλυμα ζεσταίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού ώστε να λιώσει η αγαρόζη και στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,1 µg/ml. Το πήκτωμα αφήνεται για κάποιο χρονικό διάστημα μέχρι να στερεοποιηθεί και στην συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Η τάση που εφαρμόζονται είναι 100-150V.

5.5 Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών (ανάλυση Western)

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τα μοριακά βάρη, τα ισοηλεκτρικά σημεία, τις αλληλεπιδράσεις ή ακόμα και την ποσοτική εκπροσώπηση ορισμένων πρωτεϊνών, όχι όμως και την ταυτοποίησή τους. Συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν μετά το διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, στην περίπτωση που υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα έναντι αυτών των πρωτεϊνών. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από σύνθετα δείγματα πρωτεϊνών είναι αυτή του ανοσοαποτυπώματος κατά Western. Το ανοσοαποτύπωμα των πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης και την ανίχνευσή τους με κατάλληλα σημασμένα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα (ανοσοανίχνευση). Στην παρούσα εργασία η μέθοδος αυτή στοχεύει στην ανίχνευση τόσο της ανασυνδυασμένης όσο και της ενδογενούς πρωτεΐνης DGCR14. Για την ανάλυση και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Raymond & Weintraub 1959).

5.5.1 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE

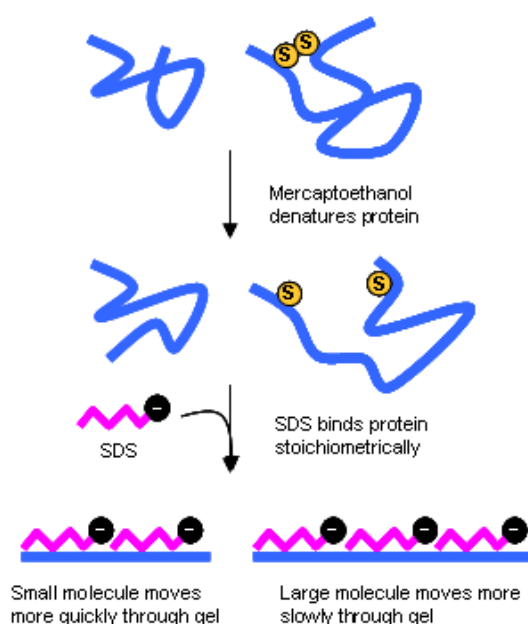
Τα πρωτεϊνικά μόρια, όπως και κάθε άλλο φορτισμένο σωματίδιο, μετακινούνται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες, ως φορτισμένα σωματίδια, έχουν την ιδιότητα να διαχωρίζονται καθώς κινούνται δια μέσου των πόρων ενός πηκτώματος, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η διεύθυνση της κινήσεως των μορίων προς το θετικό ή αρνητικό πόλο εξαρτάται από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα (v), εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου, (E) και από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, (q), σχέση που δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$v = \frac{E \times q}{f}$$

όπου f είναι παράγοντας της εξίσωσης που εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα της πρωτεΐνης, όπως επίσης και το ιξώδες της πηκτής όπου κινείται η πρωτεΐνη. Το πολυακρυλαμίδιο, που χρησιμοποιείται συνήθως για τις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών, παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως είναι η χημική αδράνεια, η αντοχή σε υψηλή θερμοκρασία, και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των ηλεκτροφορήσεων. Η δημιουργία των πηκτών πολυακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται με τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου, ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), και του N,N -μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου, (bis-ακρυλαμιδίου) ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NHCO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Η αναλογία με την οποία χρησιμοποιούνται τα δυο υλικά είναι 29:1 w/w. Το bis-ακρυλαμίδιο, συντελεί στο σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών του ακρυλαμιδίου. Κατ' αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται ένα τριδιάστατο πολυμερές πλέγμα, το μέγεθος των πόρων του οποίου εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού και είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των μονομερών του ακρυλαμιδίου. Γενικά, πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Σαν δότης των ελευθέρων ριζών χρησιμοποιείται το υπερθειικό αμμώνιο, (Ammonium Persulfate, APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$). Στη συνέχεια προστίθεται ο φωτοχημικός καταλύτης N,N,N,N -τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο, (TEMED), ο οποίος αποσυνθέτει το υπερθειικό ιόν και δίνει μια ελεύθερη ρίζα, ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + e^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{\cdot-}$), η οποία διαδίδεται σε άλλα μόρια ακρυλαμιδίου προς σχηματισμό του πολυμερούς. Έτσι, σχηματίζεται ένα πλέγμα που αποτελείται από πόρους μέσα στους οποίους κινούνται οι πρωτεΐνες. Οι μικρές σε μέγεθος πολυπεπτιδικές αλυσίδες μετακινούνται εύκολα διά μέσου των πόρων του πηκτώματος ενώ οι μεγαλύτερες μένουν στην κορυφή, κοντά στο σημείο εκκίνησης.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία SDS (SDS-PAGE) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος διαχωρισμού ενός μίγματος πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι το δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS) και η

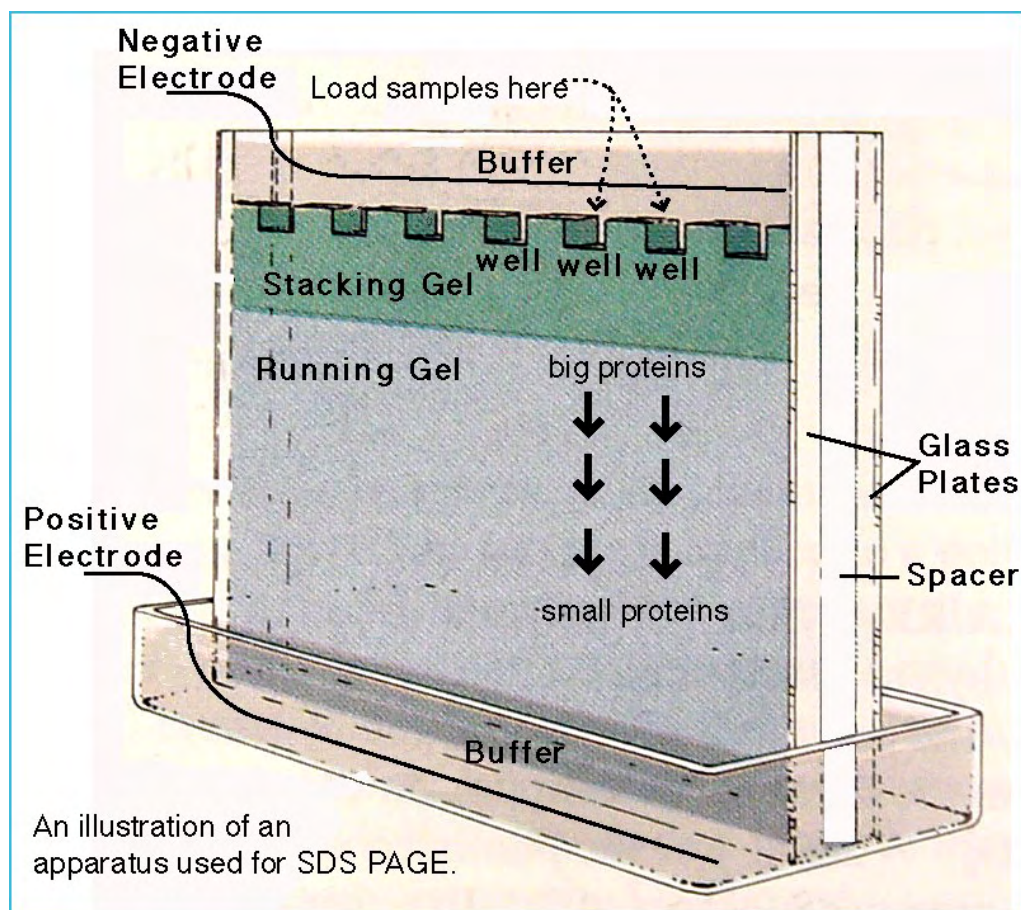
μερκαπτοαιθανόλη. Το SDS αποτελεί ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο έχει διπλό ρόλο. Έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε πρωτεΐνες με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και να τις αποδιατάσει, με αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες να αποκτούν αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο άσχετα με το δικό τους αρχικό φορτίο. Η δέσμευση του SDS στα αμινοξέα της πρωτεΐνης οδηγεί στην καταστροφή της φυσικής δομής της πρωτεΐνης η οποία παίρνει την μορφή ελάσματος. Έτσι, δημιουργούνται επιμήκη μόρια, αρνητικά φορτισμένα, με συγκεκριμένη δομή. Η πλήρης αποδιάταξη πραγματοποιείται με την επίδραση της μερκαπτοαιθανόλης (από το διάλυμα Laemmli) η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων καθώς και με τη θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C (Εικ. 7).



Εικόνα 7: Συνεισφορά της μερκαπτοαιθανόλης και του απορρυπαντικού SDS στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών [Stephen Gallik, Ph. D., CellBiologyOLM].

Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίστηκε το πήκτωμα ήταν ένα «σάντουιτς» επίπεδων τζαμιών. Τα τζάμια τοποθετούνται σε ένα στήριγμα (casting frame). Το πήκτωμα αποτελείται από δύο φάσεις:

- την ανώτερη φάση πακεταρίσματος (stacking gel) στην οποία πραγματοποιείται η ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο
- την υποκείμενη φάση διαχωρισμού (separating gel), στην οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών (Εικ. 8)



Εικόνα 8: Πήκτωμα ευθυγράμμισης (stacking gel) και πήκτωμα διαχωρισμού (separating/running gel)

[School of chemistry and biochemistry, Georgia Institute of Technology, Spring 2001]

Πρώτα παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), συγκέντρωσης 10% και μετά παρασκευάζεται το πήκτωμα ευθυγράμμισης (stacking gel), συγκέντρωσης 4,5%. Οι ποσότητες των συστατικών των πηκτωμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Ποσότητες των συστατικών των πηκτωμάτων διαχωρισμού (separating gel) και ευθυγράμμισης (stacking gel).

	Πήκτωμα ευθυγράμμισης	Πήκτωμα διαχωρισμού
Ακρυλαμίδα/δισακρυλαμίδα [από πυκνό διάλυμα (29:1)]	1,5 ml	5 ml
1,25 M Tris-Cl pH 8,8	1 ml	4.5 ml
20% SDS	50 µl	75µl
20% APS	50 µl	75 µl
99% TEMED	20 µl	7,5 µl
H₂O	7,4	5,4 ml

5.5.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμειγνύονται με διάλυμα "φόρτωσης" πρωτεϊνών, 5X Laemmli (loading buffer), που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμαίνονται για 10 min σε θερμοκρασία βρασμού (100 °C). Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες, καθώς ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση δεσμών (υδρογόνου, ιοντικών, υδρόφοβων και Van der Waals αλληλεπιδράσεων), ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών.

Το διάλυμα 5X Laemmli έχει την ακόλουθη σύσταση:

- 200 mM Tris-HCl pH 6,8
- 8% SDS
- 40% γλυκερόλη
- 20% β-μερκαπτοαιθανόλη
- 0,4% μπλε της βρωμοφαινόλης

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 min. Τα δείγματα τοποθετούνται σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (wells) που δημιουργούνται στο πήκτωμα ευθυγράμμισης με τη χρήση ειδικής «χτένας», όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό (Εικ.). Η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, με σταθερή ένταση πεδίου 13 mA παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Running Buffer). Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών MWD03 Nippon Genetics Tris-Glycine 4-20%.

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x Tris-γλυκίνης προήλθε από αρχικό διάλυμα 10x με την εξής σύσταση:

- 250mM Tris
- 1,92M γλυκίνη
- 1 % SDS

Η ηλεκτροφόρηση συνεχίζεται μέχρι η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (συστατικό του διαλύματος Laemmli) να περάσει το τέλος του πηκτώματος και να προχωρήσει στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (~4h).

5.5.3 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη (transfer)

Πρόκειται για μια εξειδικευμένη μέθοδο που επιτρέπει την ανίχνευση των καθηλωμένων πρωτεϊνών με χρήση κατάλληλων πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται μεταφορά των πρωτεϊνών, από πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (western blotting). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη πολυβινυλιδενικού φθοριδίου (Polyvinylidene fluoride, PVDF). Η κίνηση επιτυγχάνεται με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται με τη μορφή συμπλόκου

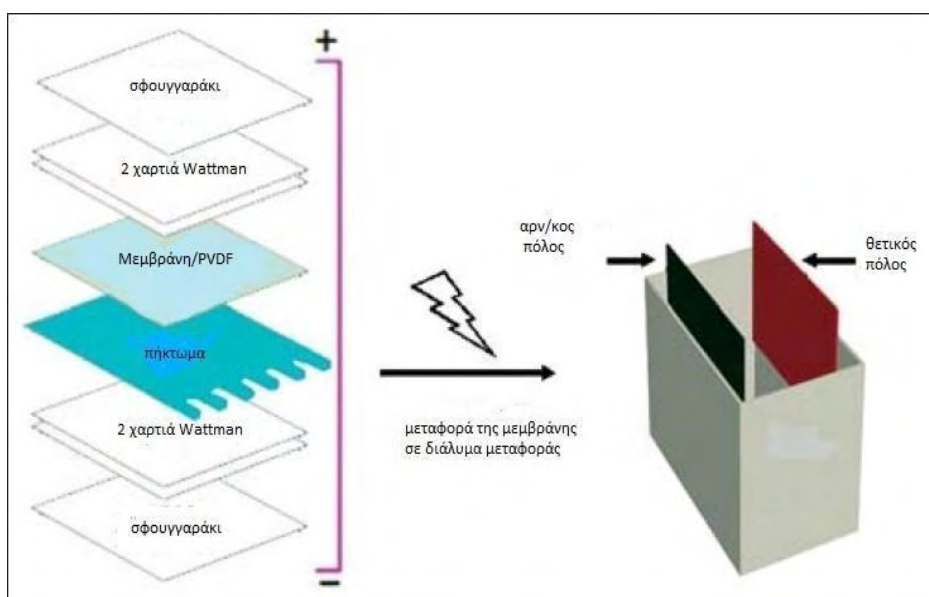
με το SDS, οπότε το σύμπλοκο είναι αρνητικά φορτισμένο. Επομένως, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, το σύμπλοκο κινείται προς την άνοδο, εξέρχεται από το πήκτωμα και τελικά καθιλώνεται στο πλέγμα της μεμβράνης, εξαιτίας υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Επειδή όμως οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται από το πήκτωμα δεν είναι αρκετές για να καλύψουν όλες τις κενές θέσεις της μεμβράνης, μετά την μεταφορά οι κενές θέσεις καλύπτονται με μία άσχετη πρωτεΐνη, π.χ. ορό γάλακτος. Στο επόμενο στάδιο οι πρωτεΐνες που βρίσκονται ακινητοποιημένες πάνω στην μεμβράνη αντιδρούν με τα ειδικά αντισώματα και μετά με τα αντι-αντισώματα, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ένα ένζυμο, συνήθως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση.

Αναλυτικά η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη έχει ως εξής:

- Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-PAGE αφαιρείται το πήκτωμα από το καλούπι αποκόπτοντας την ανώτερη φάση του πηκτώματος (stacking gel). Παραμένει μόνο το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) του οποίου μετρούνται οι διαστάσεις του και σημειώνεται η αρχή του.
- Το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 1x (transfer buffer) το οποίο είναι ίδιο με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και περιέχει επιπλέον 20% μεθανόλη.
- Κόβονται στις διαστάσεις του πηκτώματος 4 κομμάτια χαρτιού Wattman 3MM και τοποθετούνται σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer).
- Κόβεται κομμάτι της μεμβράνης PVDF στις διαστάσεις του πηκτώματος και ακολουθεί εξισορρόπηση της μεμβράνης PVDF σε μεθανόλη για 5 sec. Ύστερα τοποθετείται και αυτή στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς.
- Στην κασέτα της ηλεκτρομεταφοράς (gel holder cassette) τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά τα εξής:
 - Στον αρνητικό πόλο ένα σφουγγάρι (sponge pad) το οποίο έχει εμποτιστεί σε dH_2O
 - 2 χαρτιά Wattman 3MM
 - το πήκτωμα
 - η μεμβράνη PVDF
 - 2 χαρτιά Wattman 3MM
 - Στον αρνητικό πόλο ένα σφουγγάρι το οποίο έχει εμποτιστεί σε dH_2O

Το χαρτί Wattman και το σφουγγάρι λειτουργούν ως απορροφητικά μέσα, προκαλώντας την μεταφορά του διαλύματος προς αυτά διαμέσου του πηκτώματος και της μεμβράνης. Επίσης, δίνεται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε η επαφή μεταξύ του πηκτώματος και της μεμβράνης να είναι άμεση και χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων, που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η διαδικασία φαίνεται διαγραμματικά στην εικόνα 9.

- Η παραπάνω διάταξη τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροφορείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 1x στους 4 °C σε σταθερή ένταση πεδίου 110mA ολονύκτια (O/N).



Εικόνα 9: Διαδικασία ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Mahmood and Yang, 2012).

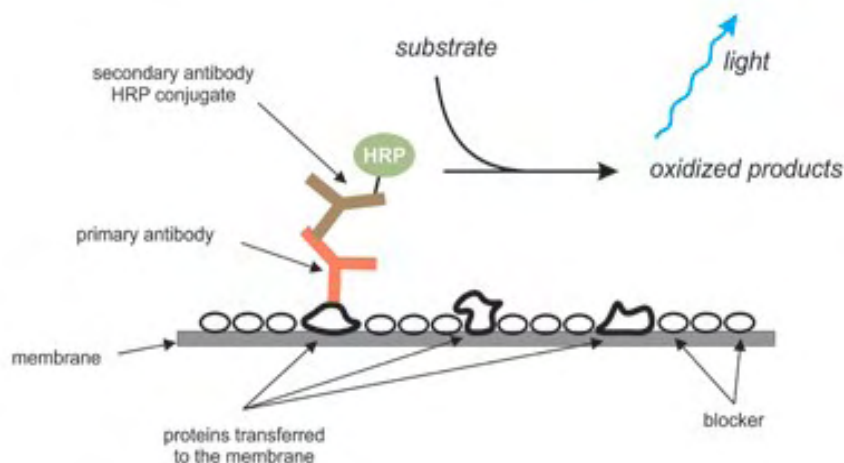
5.5.4 Ανοσοανίχνευση

Η ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών επάνω στη μεμβράνη PVDF πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης χημειοφωταύγειας. Ως χημειοφωταύγεια ορίζεται η εκπομπή φωτός σαν αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης. Πρόκειται για μία αρκετά ευαίσθητη τεχνική κατά την οποία ένα δευτερογενές αντίσωμα εκτός του ότι αναγνωρίζει και δεσμεύεται με το πρώτο, ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα, συζευγνύεται ομοιοπολικά με ένα ένζυμο-δείκτη το οποίο αντιδρώντας με το εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα, δημιουργεί ένα έγχρωμο προϊόν (Εικ. 10). Στην παρούσα μελέτη, η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το Chemiluminescent HRP Substrate LumiSensor kit της εταιρίας GenScript, ενώ το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν σημασμένο με το ένζυμο HRP. Συγκεκριμένα, η τεχνική της ανοσοανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης DGCR14 και της γ-τουμπουλίνης για τον έλεγχο της ποσότητας των πρωτεϊνών των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε ορός που προέρχεται από κουνέλι ανοσοποιημένο στο ανθρώπινο γονίδιο *DGCR14* σε τελική αραίωση 1:10000 και μονοκλωνικό αντίσωμα α-γ-τουμπουλίνης που προέρχεται από ποντίκι ανοσοποιημένο στο ανθρώπινο γονίδιο της γ-τουμπουλίνης σε τελική αραίωση 1:2500. Το δεύτερο αντίσωμα έναντι α) στον ορό από κουνέλι ανοσοποιημένο στο ανθρώπινο γονίδιο *DGCR14*, ήταν anti-rabbit σε τελική αραίωση 1:15000 ενώ έναντι β) στο αντίσωμα α-γ-τουμπουλίνης που προέρχεται από ποντίκι, ήταν anti-mouse σε τελική αραίωση 1:1000.

Η μεθοδολογία αναλυτικά έχει ως εξής:

- Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, πραγματοποιείται μία πλύση με TBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris).
- Στην συνέχεια, η μεμβράνη PVDF επώζεται σε παρεμποδιστικό διάλυμα (blocking buffer) TBSTM για τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να καλυφθούν οι ελεύθερες θέσεις της. Το διάλυμα TBSTM περιέχει TBS 0,1%, Tween-20 και 5% αποβουτυρωμένο γάλα-σκόνη.
- Ακολουθεί 1 πλύση 5 min με TBS.
- Έπειτα προστίθεται το 1^ο αντίσωμα σε TBSTM στην κατάλληλη αραιώση (1:10000 για το α-DGCR14 και ολονύκτια επώαση σε κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο με σταθερή θερμοκρασία στους 4 °C (cold room), υπό συνεχή και αργή ανάδευση.
- Πραγματοποιούνται 3 πλύσεις από 10 min με TBST.
- Προστίθεται το 2^ο αντισώματος (HRP-linked Antibody) σε TBSTM στην κατάλληλη αραιώση α- rabbit HRP (αραιώση 1:15000) και ακολουθεί επώαση 1h σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή και αργή ανάδευση.
- Πραγματοποιούνται 3 πλύσεις από 10 min με TBST
- Η μεμβράνη επώζεται με τα υποστρώματα για την υπεροξειδάση (Horse Radish Peroxidase, HRP) σε αναλογία 1:1 για 3 min στο σκοτάδι.
- Στο τέλος η μεμβράνη τοποθετείται σε μηχάνημα FluorChem™ E System της εταιρίας Protein Simple για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων μετά από έκθεση 10 min περίπου.

Ακολουθεί η ίδια διαδικασία για την ανίχνευση της γ-τουμπουλίνης με την διαφορά ότι αρχική πλύση γίνεται με PBS και οι επόμενες με PBST. Επιπλέον, το παρεμποδιστικό διάλυμα είναι PBSTM που περιέχει PBS , 0,1% Tween-20 και 5% αποβουτυρωμένο γάλα-σκόνη και τα αντισώματα για την γ- τουμπουλίνη είναι αραιωμένα σε PBSTM. Συγκεκριμένα, το 1^ο αντίσωμα είναι α-γ-tubulin σε αραιώση 1:2500 σε PBSTM και το 2^ο αντίσωμα είναι α-mouse HRP σε αραιώση 1:1000 σε PBSTM.



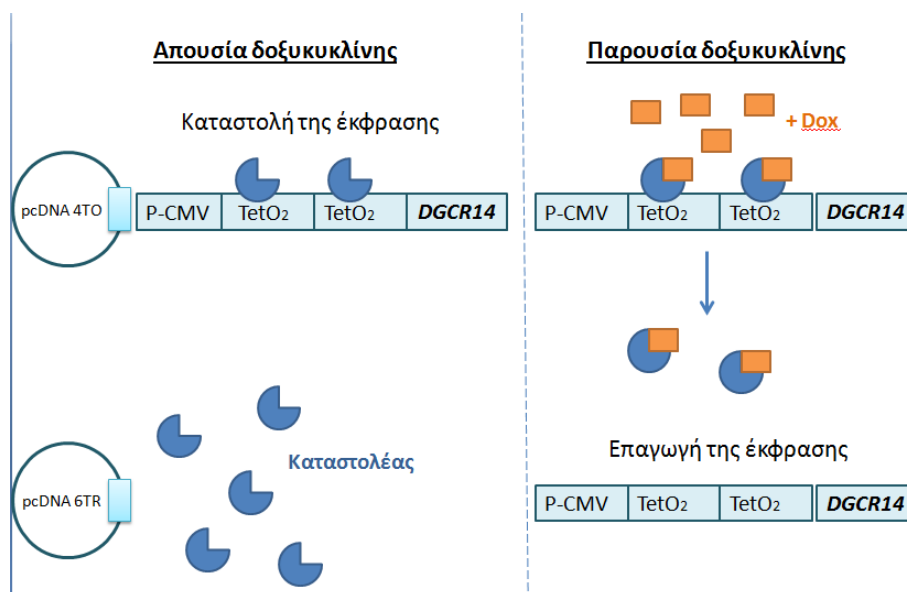
Εικόνα 10: Ανίχνευση χημειοφωταύγειας κατά την ανάλυση Western.
<http://www.westernblotreagents.com/chemiluminescence/>

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μια σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά *HeLa* η οποία περιλαμβάνει πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *DGCR14* του ανθρώπου υπό τον έλεγχο ενός συστήματος επαγωγίμης έκφρασης που βασίζεται στην τετρακυκλίνη. Σκοπός ήταν η μελέτη της επαγωγίμης υπερέκφρασης του γονιδίου ώστε στην συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της επίδρασης στα επίπεδα έκφρασης άλλων γονιδίων και τυχόν αλλαγών που θα συμβούν στην φυσιολογία των κυττάρων.

Ειδικότερα, η σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά *HeLa* είναι διπλά διαμολυσμένη, αφού τα κύτταρα φέρουν στο γονιδίωμα τους ένα πλασμίδιο pcDNA 6TR, που κωδικοποιεί έναν καταστολέα της τετρακυκλίνης και ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA 4TO, στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *DGCR14*. Το πλασμίδιο pcDNA 4TO χρησιμοποιείται για την ελεγχόμενη μέσω του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών τα οποία είναι διαμολυσμένα και με το πλασμίδιο pcDNA 6TR. Πιο συγκεκριμένα, το πλασμίδιο pcDNA 4TO φέρει ρυθμιστικές περιοχές τετρακυκλίνης (tetracycline operator, TetO), στις οποίες προσδένεται ο καταστολέας, που εκφράζεται από το πλασμίδιο pcDNA 6TR. Έτσι, όταν έχει κλωνοποιηθεί το επιθυμητό γονίδιο (διαγονίδιο), στην προκειμένη περίπτωση το γονίδιο *DGCR14*, στο pcDNA 4TO, σε κύτταρα θηλαστικών διαμολυσμένα και με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA 4TO και με το πλασμίδιο pcDNA 6TR τότε (Εικόνα 11):

- i. Απουσία τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, ο καταστολέας συνδέεται στη ρυθμιστική περιοχή TetO του pcDNA 4TO και δεν επιτρέπεται με αυτόν τον τρόπο η έκφραση του γονιδίου *DGCR14*.
- ii. Παρουσία τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, αυτή προσδένεται με υψηλή συγγένεια στον καταστολέα και προκαλεί αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωσή του, που τον καθιστά ανίκανο να προσδεθεί στη ρυθμιστική περιοχή TetO του pcDNA 4TO. Με αυτό τον τρόπο το γονίδιο *DGCR14* είναι ελεύθερο να εκφραστεί εφόσον ο υποκινητής του γονιδίου μένει ελεύθερος και η RNA πολυμεράση μπορεί να προσδεθεί και να αρχίσει την μεταγραφή του γονιδίου.



Εικόνα 11: Σύστημα επαγόμενης έκφρασης με δοξυκυκλίνη του γονιδίου *DGCR14* σε κύτταρα *HeLa* που φέρουν ενσωματωμένα στο γονιδίωμα τους τα πλασμίδια pcDNA 4TO και pcDNA6TR.

Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος #37 από την σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά *HeLa* που φέρει το διαγονίδιο για την υπερέκφραση του γονιδίου *DGCR14*. Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου κύτταρα *HeLa* στο ρόλο του αρνητικού μάρτυρα για την παρατήρηση της ενδογενούς πρωτεΐνης.

Για τον έλεγχο της επαγωγίμης υπερέκφρασης του γονιδίου *DGCR14* χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό δοξυκυκλίνη που αποτελεί ένα συνθετικό ανάλογο της οικογένειας των τετρακυκλινών. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε χορήγηση της δοξυκυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και για διαφορετικό χρόνο επαγωγής της έκφρασης μέχρι την συλλογή των κυττάρων. Ο έλεγχος των επιπέδων υπερέκφρασης τόσο της ανασυνδυασμένης όσο και της ενδογενούς πρωτεΐνης *DGCR14* έγινε με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (ανάλυση Western).

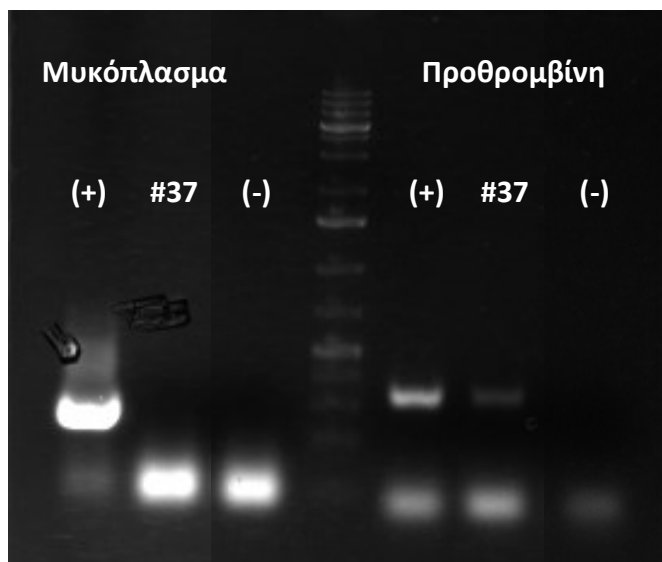
Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκε δοκιμή με την χορήγηση δοξυκυκλίνης σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10ng/ml, 20ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml και 200ng/ml σε κύτταρα του κλώνου #37 που είναι και οι προτεινόμενες από τη βιβλιογραφία. Στο ίδιο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του κλώνου #37 στα οποία δεν χορηγήθηκε καθόλου δοξυκυκλίνη καθώς και κύτταρα *HeLa* ως θετικός μάρτυρας. Ο χρόνος επαγωγής της έκφρασης από την δοξυκυκλίνη ήταν 24 ώρες μέχρι την συλλογή των κυττάρων. Στα αποτελέσματα φάνηκε πως η υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *DGCR14* ήταν τόσο υψηλή που δεν φαινόταν η ενδογενής πρωτεΐνη. Κάτι τέτοιο αντιπροσωπεύει μια ακραία κατάσταση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις περιπτώσεις που επιθυμούμε

να παραγάγουμε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε μεγάλη ποσότητα π.χ. για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων της με άλλες πρωτεΐνες.

Ωστόσο, παρά την υψηλή υπερέκφραση της πρωτεΐνης DGCR14, δεν φάνηκε κάποια σαφή διαφορά όσον αφορά την έκφρασή της στα κύτταρα στα οποία είχαν χορηγηθεί διαφορετικές συγκεντρώσεις δοξυκυκλίνης. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της δοξυκυκλίνης ήταν τόσο μεγάλες ώστε να προκαλούν κορεσμό του συστήματος υπερέκφρασης και άρα σε κάθε περίπτωση να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή έκφραση της πρωτεΐνης.

Συνεπώς, η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων δοξυκυκλίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 αφού ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της δοξυκυκλίνης το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης παραμένει το ίδιο.

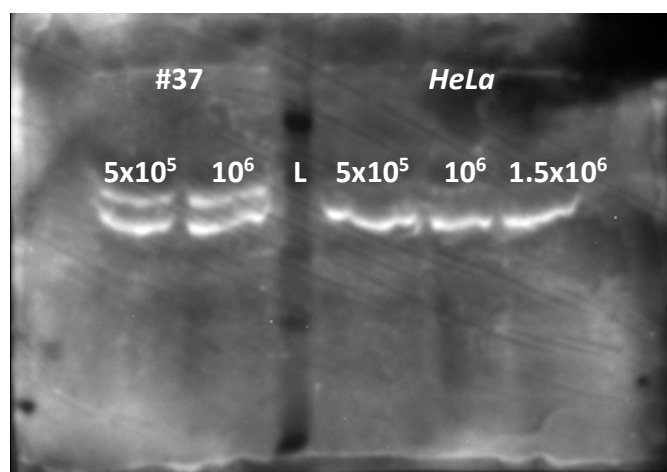
Έτσι στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η δοκιμή αρκετά μικρότερων συγκεντρώσεων δοξυκυκλίνης για τον έλεγχο της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 καθώς και διαφορετικοί χρόνοι επαγωγής της έκφρασης μέχρι την συλλογή των κυττάρων. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των κυττάρων του κλώνου #37 για τυχόν παρουσία μυκοπλάσματος με ανάλυση PCR. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας η προθρομβίνη για να διασφαλιστεί η πιστότητα της αντίδρασης καθώς και ένας θετικός και αρνητικός μάρτυρας. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως τα κύτταρα είναι καθαρά από μυκόπλασμα (Εικ. 12) και άρα μπορεί να συνεχιστεί περαιτέρω η πειραματική διαδικασία.



Εικόνα 12: Έλεγχος μυκοπλάσματος. Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται ο θετικός μάρτυρας, δείγμα από τα κύτταρα του κλώνου #37 και ο αρνητικός μάρτυρας. Η προθρομβίνη χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας.

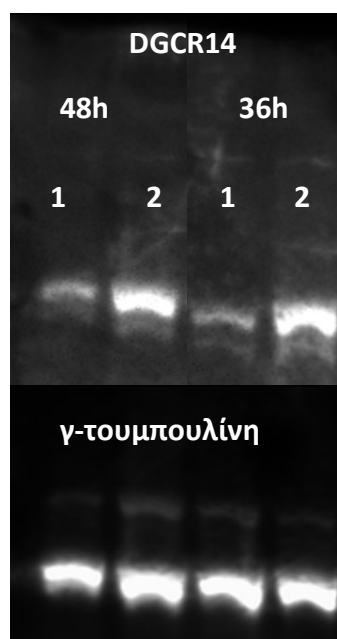
Σε πρώτο στάδιο έγινε ένα δοκιμαστικό πείραμα ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματική λειτουργία του αντισώματος α-DGCR14 και να εκτιμηθεί ο αριθμός των κυττάρων που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια. Χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός αριθμός κυττάρων του κλώνου #37 καθώς και κυττάρων *HeLa*. Για να εξασφαλισθεί η σωστή σύγκριση όσον αφορά την υπερέκφραση του γονιδίου *DGCR14* μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών χορήγησης της δοξυκυκλίνης χρησιμοποιήθηκε η γ-τουμπουλίνη ως εσωτερικός μάρτυρας. Έτσι στην ανάλυση Western έγινε χρήση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης DGCR14 και αντισώματος έναντι της γ-τουμπουλίνης για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνών των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ορός που προέρχεται από κουνέλι ανοσοποιημένο στο ανθρώπινο γονίδιο *DGCR14* σε τελική αραίωση 1:10000 και αντίσωμα α-γ-τουμπουλίνης που προέρχεται από ποντίκι ανοσοποιημένο στο με την γ-τουμπουλίνη του ανθρώπου σε τελική αραίωση 1:2500.

Οι ποσότητες των κυττάρων που δοκιμάστηκαν ήταν 5×10^5 και 10^6 κύτταρα από τον κλώνο #37 και 5×10^5 , 10^6 και 1.5×10^6 κύτταρα *HeLa* χωρίς τη προσθήκη δοξυκυκλίνης. Όσον αφορά τον κλώνο #37, από τα αποτελέσματα παρατηρούμε σχεδόν παρόμοια έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 σε σύγκριση με την ενδογενή πρωτεΐνη. Η διαφορά στην έκφραση της DGCR14 μεταξύ των διαφορετικών ποσοτήτων κυττάρων δεν είναι σημαντική (Εικ. 13). Αυτή η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 που παρατηρήθηκε πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι ο καταστολέας του συστήματος της τετρακυκλίνης δεν είναι πλήρως αποτελεσματικός και πιθανόν επιτρέπεται σε μικρό βαθμό η έκφραση του γονιδίου. Επίσης, η έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης από τα κύτταρα *HeLa* δεν εμφάνισε ανιχνεύσιμη διαφορά μεταξύ των διαφορετικών ποσοτήτων κυττάρων (Εικόνα 13). Έτσι διαπιστώθηκε ότι το αντίσωμα α-DGCR14 λειτουργεί ικανοποιητικά σε διαφορετικό εύρος αριθμού κυττάρων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειράματα.



Εικόνα 13 : Έλεγχος της αποτελεσματικής λειτουργίας του αντισώματος α-DGCR14
Χρήση διαφορετικού αριθμού κυττάρων του κλώνου #37 (5×10^5 και 10^6) και κυττάρων *HeLa* (5×10^5 , 10^6 και 1.5×10^6) χωρίς χορήγηση δοξυκυκλίνης

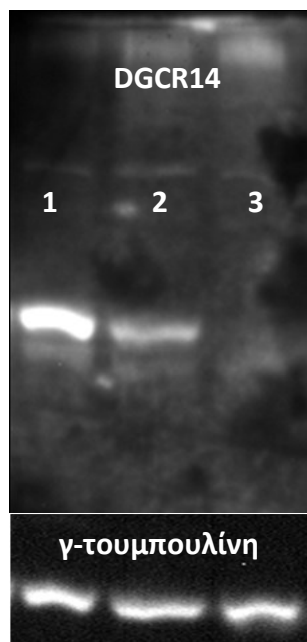
Στην συνέχεια, επιλέχθηκε η χορήγηση δύο χαμηλότερων, από τις προηγούμενες, συγκεντρώσεων δοξουκυκλίνης 0,5ng/ml και 0,001ng/ml και διαφορετικοί χρόνοι επαγωγής της έκφρασης της DGCR14, 36 και 48. Από την ανάλυση Western φάνηκε πως η υπερέκφραση της πρωτεΐνης DGCR14 είναι μεγαλύτερη όταν χορηγείται δοξουκυκλίνη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (0,5ng/ml). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών χρόνων επαγωγής με δοξουκυκλίνη. Τόσο στις 36 ώρες όσο και στις 48 ώρες τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης παραμένουν τα ίδια. Για εξοικονόμηση χρόνου, επιλέχθηκε η δράση της δοξουκυκλίνης για 36 ώρες (Εικ. 14). Η γ-τουμπουλίνη χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας που αποδεικνύει πως σε κάθε περίπτωση έχει χρησιμοποιηθεί παρόμοιος αριθμός κυττάρων, δηλαδή παρόμοια ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και άρα μπορεί να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων δοξουκυκλίνης για την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης DGCR14.



Εικόνα 14: Χορήγηση στα κύτταρα *HeLa* συγκεντρώσεων δοξουκυκλίνης 0,001ng/ml (1) και 0,5ng/ml (2) για 36 και 48 ώρες επαγωγής της έκφρασης της DGCR14 μέχρι τη συλλογή των κυττάρων. Η γ-τουμπουλίνη χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας.

Ακολούθως δοκιμάστηκε επιπλέον και μία ενδιάμεση, των δύο προηγούμενων, συγκέντρωση δοξουκυκλίνης. Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε ήταν αυτή των 0,05ng/ml και συγκρίθηκε με την συγκέντρωση 0,001ng/ml που είχε χρησιμοποιηθεί και στο προηγούμενο πείραμα. Το χρονικό διάστημα επαγωγής της έκφρασης με δοξουκυκλίνη ήταν 36 ώρες μέχρι τη συλλογή των κυττάρων. Από την ανάλυση Western φάνηκε υπερέκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 σε σύγκριση με την ενδογενή. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 είναι σαφώς μεγαλύτερη όταν χορηγείται δοξουκυκλίνη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (0,05ng/ml) (Εικ. 15). Τα κύτταρα *HeLa* χρησιμοποιούνται

σαν αρνητικός μάρτυρας και ύστερα από την ανάλυση Western φαίνεται να εκφράζουν μόνο την ενδογενή πρωτεΐνη DGCR14 (Εικ. 15).



Εικόνα 15: Χορήγηση σε κύτταρα του ανασυνδυασμένου κλώνου #37 συγκεντρώσεων δοξυκυκλίνης 0,05ng/ml (1) και 0,001ng/ml (2) για 36 ώρες επαγωγής της έκφρασης της DGCR14 μέχρι τη συλλογή των κυττάρων. Χρησιμοποιούνται αγρίου τύπου κύτταρα *HeLa* χωρίς δοξυκυκλίνη (3) ως αρνητικός μάρτυρας. Η γ-τουμπουλίνη χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας.

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε πως το σύστημα επαγωγίμης έκφρασης με δοξυκυκλίνη είναι πιο ευαίσθητο όταν χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού σε σύγκριση με υψηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες προκαλούν κορεσμό του συστήματος. Έτσι, όπως φάνηκε και στα παραπάνω πειράματα, είναι δυνατή η παρατήρηση της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 σε σύγκριση με την ενδογενή, με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση της δοξυκυκλίνης αλλά όχι από τον χρόνο επαγωγής της έκφρασης,

Συμπεράσματα

- Η χορήγηση δοξουκυκλίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις σχετίζεται με την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 αναλογικά.
- Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της δοξουκυκλίνης τόσο πιο έντονη είναι η υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14.
- Η χορήγηση δοξουκυκλίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν σχετίζεται με την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης DGCR14 αναλογικά λόγω πιθανώς κορεσμού του συστήματος της τετρακυκλίνης που χρησιμοποιείται για την επαγωγίμη υπερέκφραση της πρωτεΐνης DGCR14.
- Δεν εντοπίζεται κάποια διαφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης στα δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα επαγωγής της έκφρασης με την δοξουκυκλίνη μέχρι την συλλογή των κυττάρων.

7. Βιβλιογραφία

1. Barnett C, Krebs JE. 2011. WSTF does it all: a multifunctional protein intranuclear transcription, repair, and replication. *Biochem Cell Biol* 89:12–23.
2. Bessonov S, Anokhina M, Krasauskas A, Golas MM, Sander B, Will CL, Urlaub H, Stark H, Lührmann R (2010). Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA* 16 (12): 2384-403.
3. Bessonov S, Anokhina M, Will CL, Urlaub H, Lührmann R (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* 452 (7189): 846-50.c complex
4. Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, El Gazzar M., 2013, MicroRNA-146a and RBM4 form a negative feed-forward loop that disrupts cytokine mRNA translation following TLR4 responses in human THP-1 monocytes. , *Immunol Cell Biol*, Sep;91(8):532-40.
5. Chaston J, Douglas AE (Aug 2012). "Making the most of "omics" for symbiosis research". *The Biological Bulletin* 223 (1): 21–9. PMC 3491573. PMID 22983030.
6. Coletta, A., Pinney, J. W., Solís, D. Y. W., Marsh, J., Pettifer, S. R., & Attwood, T. K. (2010). Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles. *BMC Systems Biology*, 4, 43.
7. Collins, C.A., Wairkar, Y.P., Johnson, S.L., and DiAntonio, A. (2006). Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron* 51, 57–69.
8. Debacker K, Winnepenninckx B, Longman C, Colgan J, Tolmie J, Murray R, van Luijk R, Scheers S, Fitzpatrick D, Kooy F. "The molecular basis of the folate-sensitive fragile site FRA11A at 11q13." *Cytogenet Genome Res*. 2007; 119(1-2):9-14. Epub 2007 Dec 14.
9. DePristo M, Zilversmit M, Hartl D: On the abundance, amino acid composition, and evolutionary dynamics of low-complexity regions in proteins. *Gene*. 2006, 378: 19-30. 10.1016/j.gene.2006.03.023
10. Dong Yan, Zilu Wu, Andrew D. Chisholm, Yishi Jin. 2009. The DLK-1 Kinase Promotes mRNA Stability and Local Translation in C. elegans Synapses and Axon Regeneration *Cell* 138, 1005–1018
11. Douni, E., et al., In *Methods in Molecular Medicine: Tumor Necrosis Factor*.
12. Emanuel, B. S. (2008). Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 14(1), 11–8.
13. Fen-Biao Gao, J. Paul Taylor, RNA metabolism in neurological disease, *Brain Research*, Volume 1584, 10 October 2014, Pages 1–2.
14. Figeys D. "Mapping the human protein interactome." *Cell Res*. 2008 Jul; 18(7):716-24. Review.
15. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, et al. "Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox." *Cell*. 1991 Dec 20; 67(6):1047-58.
16. Gong, W., Emanuel, B. S., Galili, N., Kim, D. H., Roe, B., Driscoll, D. a, & Budarf, M. L. (1997). Structural and mutational analysis of a conserved gene (DGS1) from the minimal DiGeorge syndrome critical region. *Human Molecular Genetics*, 6(2), 267–76.
17. Gothelf, D., Schaer, M., & Eliez, S. (2008). Genes, brain development and psychiatric phenotypes in velo-cardio-facial syndrome. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 14(1), 59–68.

18. Grote M¹, Wolf E, Will CL, Lemm I, Agafonov DE, Schomburg A, Fischle W, Urlaub H, Lührmann R., 2010, Molecular architecture of the human Prp19/CDC5L complex., *Mol Cell Biol.*, May;30(9):2105-19.
19. Herold, N., Will, C. L., Wolf, E., Kastner, B., Urlaub, H., & Lührmann, R. (2009). Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 29(1), 281–301.
20. Hewett DR, Handt O, Hobson L, Mangelsdorf M, Eyre HJ, Baker E, Sutherland GR, Schuffenhauer S, Mao JI, Richards RI. "FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis." *Mol Cell*. 1998 May; 1(6):773-81.
21. Huh, S.-H., & Ornitz, D. M. (2010). Beta-catenin deficiency causes DiGeorge syndrome-like phenotypes through regulation of Tbx1. *Development (Cambridge, England)*, 137(7), 1137–47.
22. Ilagan JO, Chalkley RJ, Burlingame AL, Jurica MS (2013). Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation. *RNA* 19 (3): 400-12.
23. Ilagan J, Yuh P, Chalkley RJ, Burlingame AL, Jurica MS (2009). The role of exon sequences in C complex spliceosome structure. *J Mol Biol* 394 (2): 363-75.
24. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 T helper cells. *Cell* 126:1121–1133.
25. Jetten AM. 2009. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal* 7:e003.
26. Jin, Y., and Garner, C.C. (2008). Molecular mechanisms of presynaptic differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 237–262.
27. Jones C, Slijepcevic P, Marsh S, Baker E, Langdon WY, Richards RI, Tunnacliffe A. Physical linkage of the fragile site FRA11B and a Jacobsen syndrome chromosome deletion breakpoint in 11q23.3. *Hum Mol Genet.* 1994 Dec; 3(12):2123-30.
28. Kähkönen M, Tengström C, Alitalo T, Matilainen R, Kaski M, Airaksinen E. "Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. II. Autosomal rare fragile sites." *Hum Genet.* 1989 Apr; 82(1):3-8.
29. Kentaro Noma, Alexandr Goncharov, Yishi Jin. 2014. Systematic Analyses of rpm-1 Suppressors Reveal Roles for ESS-2 in mRNA Splicing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, Vol.198,1101–1115
30. Knight SJ, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, Pointon J, Middleton-Price HR, Barnicoat A, Pembrey ME, et al. "Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRA10B mental retardation." *Cell*. 1993 Jul 16; 74(1):127-34.
31. Kobrynski, L. J., & Sullivan, K. E. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*, 370(9596), 1443–52.
32. Kobrynski, L. J., & Sullivan, K. E. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*, 370(9596), 1443–52.
33. Krawczak, M., J. Reiss, and D. N. Cooper, 1992 The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum. Genet.* 90: 41–54.
34. Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI. "Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n." *Science*. 1991 Jun 21; 252(5013):1711-4.

35. Kumar N, Lyda B, Chang MR, Lauer JL, Solt LA, Burris TP, Kamenecka TM, Griffin PR. 2012. Identification of SR2211: a potent synthetic RORgamma-selective modulator. *ACS Chem Biol* 7:672–677.
36. Kumar N, Solt LA, Conkright JJ, Wang Y, Istrate MA, Busby SA, Garcia-Ordenez RD, Burris TP, Griffin PR. 2010. The benzenesulfoamide T0901317 [*N*-(2,2,2-trifluoroethyl)-*N*-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide] is a novel retinoic acid receptor-related orphan receptor- α /gamma inverse agonist. *Mol Pharmacol* 77:228–236.
37. Lewcock, J.W., Genoud, N., Lettieri, K., and Pfaff, S.L. (2007). The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics. *Neuron* 56, 604–620.
38. Liao, J., Kochilas, L., Nowotschin, S., Arnold, J. S., Aggarwal, V. S., Epstein, J. a, ... Morrow, B. E. (2004). Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage. *Human Molecular Genetics*, 13(15), 1577–85.
39. Lin JC, Lin CY, Tarn WY, Li FY., 2014, Elevated SRPK1 lessens apoptosis in breast cancer cells through RBM4-regulated splicing events., *RNA*, Oct;20(10):1621-31.
40. Lindsay, E. a, Botta, a, Jurecic, V., Carattini-Rivera, S., Cheah, Y. C., Rosenblatt, H. M. Baldini (1999). Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature*, 401(6751), 379–83.
41. Lindsay, E. a, Harvey, E. L., Scambler, P. J., & Baldini, a. (1998). ES2, a gene deleted in DiGeorge syndrome, encodes a nuclear protein and is expressed during early mouse development, where it shares an expression domain with a Goosecoid-like gene. *Human Molecular Genetics*, 7(4), 629–35.
42. Lindsay, E., Vitelli, F., Su, H., & Morishima, M. (2001). Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*, 409(6836), 97–101.
43. Lukusa T., Fryns JP. " Human chromosome fragility". *Biochimica Biophysica Acta*. 2008 Jan 1779(1):3-16. Epub 2007 Dec 3.
44. Luna, R., Gaillard, H., González-Aguilera, C., & Aguilera, A. (2008). Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma*, 117(4), 319–31.
45. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci* 2012;4:429-34
46. Makarova, O. V, Makarov, E. M., Urlaub, H., Will, C. L., Gentzel, M., Wilm, M., & Lührmann, R. (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *The EMBO Journal*, 23(12), 2381–91.
47. Marchesan, D., Rutberg, M., Andersson, L., Asp, L., Larsson, T., Medvedev A, Yan ZH, Hirose T, Giguere V, Jetten AM. 1996. Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR gamma and characterization of its response element. *Gene* 181:199–206.
48. National Human Genome Research Institute (2010-11-08). "A Brief Guide to Genomics". Genome.gov. Retrieved 2011-12-03.
49. Nancarrow JK, Kremer E, Holman K, Eyre H, Doggett NA, Le Paslier D, Callen DF, Sutherland GR, Richards RI. "Implications of FRA16A structure for the mechanism of chromosomal fragile site genesis." *Science*. 1994 Jun 24; 264(5167):1938-41.
50. Parrish JE, Oostra BA, Verkerk AJ, Richards CS, Reynolds J, Spikes AS, Shaffer LG, Nelson DL. "Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE." *Nat Genet*. 1994 Nov;8(3):229-35.
51. Patel, A. a, & Steitz, J. a. (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(12), 960–70.

52. Prasad, S. E., Howley, S., & Murphy, K. C. (2008). Candidate genes and the behavioral phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 14(1), 26–34.
53. Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A., & Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research*, 1231–1245.
54. Pevsner J, (2009), *Bioinformatics and functional genomics* (2nd ed.), Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
55. Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(3), 326–331.
56. Rizzu, P., Lindsay, E. a, Taylor, C., O'Donnell, H., Levy, a, Scambler, P., & Baldini, a. (1996). Cloning and comparative mapping of a gene from the commonly deleted region of DiGeorge and Velocardiofacial syndromes conserved in *C. elegans*. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 7(9), 639–43.
57. Romeo Y, Zhang X, Roux PP. 2012. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J* 441:553–569. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20110289>.
58. Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20:1405–1428.
59. Sarafidou T, Kahl C, Martinez-Garay I, Mangelsdorf M, Gesk S, Baker E, Kokkinaki M, Talley P, Maltby EL, French L, Harder L, Hinzmann B, Nobile C, Richkind K, Finnis M, Deloukas P, Sutherland GR, Kutsche K, Moschonas NK, Siebert R, Gécz J; European Collaborative Consortium for the Study of ADLTE. "Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein." *Genomics*. 2004 Jul;84(1):69-81.
60. Schaefer, A.M., Hadwiger, G.D., and Nonet, M.L. (2000). rpm-1, a conserved neuronal gene that regulates targeting and synaptogenesis in *C. elegans*. *Neuron* 26, 345–356.
61. Schmidt C, Grønborg M, Deckert J, Bessonov S, Conrad T, Lührmann R, Urlaub H (2014). Mass spectrometry-based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic labeling (SILAC), chemical labeling (iTRAQ), and label-free spectral count. *RNA* 20 (3): 406-20.
62. Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, Istrate MA, Kamenecka TM, Roush WR, Vidovic D, Schurer SC, Xu J, Wagoner G, Drew PD, Griffin PR, Burris TP. 2011. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* 472:491–494.
63. Sommer, P., & Nehrbass, U. (2005). Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(3), 294–301.
64. Strauss, R., & Heisenberg, M. (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(5), 1852–61.
65. Sutherland GR, "Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites". *Am J Hum Genet*. 1982 May 34(3):452-8
66. Sutherland GR, "Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics". *Am J Hum Genet*. 1985 May 49(Pt 2):153-61
67. Takada I. 2015. DGCR14 induces Il17a gene expression through the ROR/BAZ1B/RSKS2 complex. *Mol Cell Biol* 35:344–355.
68. Tatham, a S., & Shewry, P. R. (2000). Elastomeric proteins: biological roles, structures and mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(11), 567–71.

69. Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(10), 527–33.
70. Unk I, Hajdu I, Fatyol K, Szakal B, Blastyak A, Bermudez V, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S, Haracska L. 2006. Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18107–18112.
71. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. "Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome." *Cell*. 1991 May 31;65(5):905-14.
72. Wang Y, Kumar N, Nuhant P, Cameron MD, Istrate MA, Roush WR, Griffin PR, Burris TP. 2010. Identification of SR1078, a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors RORalpha and ROR gamma. *ACS Chem Biol* 5:1029–1034.
73. Wang, H., Duan, S., Du, J., Li, X., Xu, Y., Zhang, Z., ... He, L. (2006). Transmission disequilibrium test provides evidence of association between promoter polymorphisms in 22q11 gene DGCR14 and schizophrenia. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 113(10), 1551–61.
74. Wilson D.I., Cross I.E., Wren C., Scambler P.J., Burn J., Goodship J. Minimum prevalence of 22q11 deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 1994;55 (suppl.): A975.
75. Winnepeninckx B, Debacker K, Ramsay J, Smeets D, Smits A, FitzPatrick DR, Kooy RF. "CGG-repeat expansion in the DIP2B gene is associated with the fragile site FRA12A on chromosome 12q13.1." *Am J Hum Genet.* 2007 Feb;80(2):221-31. Epub 2006 Dec 12.
76. Yagi, H., Furutani, Y., Hamada, H., Sasaki, T., Asakawa, S., Minoshima, S., & Ichida, F. (2003). Mechanisms of disease Role of TBX1 in human del22q11 . 2 syndrome, 362, 1366–1373.
77. Yu S, Mangelsdorf M, Hewett D, Hobson L, Baker E, Eyre HJ, Lapsys N, Le Paslier D, Doggett NA, Sutherland GR, Richards RI. "Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat." *Cell*. 1997 Feb 7; 88(3):367-74.
78. Zhen, M., Huang, X., Bamber, B., and Jin, Y. (2000). Regulation of presynaptic terminal organization by *C. elegans* RPM-1, a putative guanine nucleotide exchanger with a RING-H2 finger domain. *Neuron* 26, 331–343.
79. Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P., & Reed, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419(6903), 182–5.