



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

«ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
FRA10AC1»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
της
Χριστίνας Κ. Καραπούλιου

Επιβλέπων : Μαμούρης Ζήσης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:
Μαμούρης Ζ., Σαραφείδου Θ., Λιαδάκη Κ.

Λάρισα, Ιούλιος 2012

**«ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
FRA10AC1»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Σαραφίδου Θεολογία: Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

Λιαδάκη Καλλιόπη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Μαμούρη Ζήση τον οποίο θέλω να ευχαριστήσω για την άριστη συνεργασία μας. Ευχαριστώ θερμά την κ. Σαραφίδου, Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, για τη σωστή ερευνητική καθοδήγηση που προσέφερε στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Την ευχαριστώ ειλικρινά για την ακούραστη υπομονή της και τη συνεχή υποστήρηξή της, καθώς στάθηκε δίπλα μου όχι μόνο ως καθηγήτρια αλλά και πολύτιμος σύμβουλος. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω την κ. Λιαδάκη, Λέκτορα Βιοχημικής Φαρμακολογίας, για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή και τη συμβολή της στην ολοκλήρωση της εργασίας. Ευχαριστώ ακόμη την υποψήφια διδάκτορα Γαλλιοπούλου Ελένη για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κάθε φορά που τη χρειάστηκα και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Σταμάτη Κώστα, Γιαννούλη Θέμη, Γεωργίου Στέλλα για τη βοήθεια και συμπαράστασή τους. Τέλος, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που με βοήθησε να φτάσω μέχρι εδώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Εισαγωγικά
- 1.2 Εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις
- 1.3 Ταξινόμηση εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων
- 1.4 Μοριακή βάση εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων
- 1.5 Κλινική εκδήλωση εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων
- 1.6 Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*
- 1.7 Κλινική εκδήλωση της εύθραυστης θέσης *FRA10A*
- 1.8 Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση *FRA10A*
 - Γενωμική οργάνωση
 - Πρότυπο έκφρασης
 - Μοριακή βάση της εύθραυστης θέσης *FRA10A*
- 1.9 Η πρωτεΐνη *FRA10AC1*
- 1.10 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της *FRA10AC1*
- 1.11 Πιθανός λειτουργικός ρόλος της *FRA10AC1*
- 1.12 Λειτουργική ανάλυση γονιδίων σε κυτταρικό επίπεδο με «ομικές» τεχνολογίες
 - Γενωμική (Genomics)
 - Μεταγραφωμική (Transcriptomics)
 - Πρωτεωμική (Proteomics)
 - Μεταβολομική (Metabolomics)
- 1.13 Σκοπός της εργασίας

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ
 - 2.1.1 Κυτταρικές σειρές θηλαστικών
 - 2.1.2 Διαλύματα για ανάπτυξη και διατήρηση των κυττάρων
 - 2.1.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων *HeLa*
 - 2.1.4 Κρυοδιατήρηση κυττάρων *HeLa*
 - 2.1.5 Επανακαλλιέργεια κυττάρων *HeLa*
 - 2.1.6 Μέτρηση αριθμού κυττάρων *HeLa*
 - 2.1.7 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς *HeLa*
 - A) Επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικού-βλαστισιδίνης
 - B) Διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA 6TR
 - Γ) Επιλογή κλώνων κυττάρων *HeLa* ανθεκτικών στη βλαστισιδίνη
- 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA
 - 2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών δεκτικών κυττάρων *E. coli*

2.2.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA του φορέα pcDNA 6TR σε μεγάλη κλίμακα

2.2.4 Ποιοτικός έλεγχος DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.2.5 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

2.3 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ PCR (RT-PCR)

A) Απομόνωση και ποιοτικός έλεγχος ολικού RNA από κλώνους κυττάρων *HeLa*

B) Επεξεργασία του RNA με DNAση

Γ) Αντίστροφη μεταγραφή

Δ) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς *HeLa* που εκφράζει το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης *TetR*

3.2 Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης του καταστολέα της τετρακυκλίνης με αντίστροφη μεταγραφή συζευγμένη με PCR (RT-PCR)

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην περιοχή 10q23.3 της σπάνιας χρωμοσωματικής εύθραυστης θέσης *FRA10A* του ανθρώπου. Η εμφάνιση της *FRA10A* οφείλεται στην επέκταση των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (CGG)_n στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του *FRA10AC1*, προκαλώντας υπερμεθυλίωση της περιοχής και μεταγραφική καταστολή του γονιδίου. Έχει αναφερθεί ότι η εμφάνιση της *FRA10A* σχετίζεται με ήπια νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες των ατόμων φορέων. Το γονίδιο *FRA10AC1* εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και κωδικοποιεί τη συντηρημένη πυρηνική πρωτεΐνη FRA10AC1. Αν και η λειτουργία της είναι ακόμα άγνωστη, πιθανή είναι η εμπλοκή της στη διαδικασία συναρμογής ή/και πιθανόν σε άλλες στενά συσχετιζόμενες λειτουργίες.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εντάσσεται στο πλαίσιο της λειτουργικής ανάλυσης, και ειδικότερα της μελέτης του βιολογικού ρόλου του γονιδίου *FRA10AC1* σε κυτταρικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκε σταθερή κυτταρική σειρά *HeLa* που εκφράζει το γονίδιο του καταστολέα τετρακυκλίνης, *TetR*. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων *HeLa* με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA 6TR, ο οποίος περιέχει το γονίδιο *TetR*. Κατόπιν επιλέχθηκαν πέντε κλώνοι κυττάρων που εκφράζουν τον καταστολέα, απομονώθηκε RNA από τρεις από αυτούς και ακολούθησε επιβεβαίωση της υπερέκφρασης του καταστολέα μέσω RT-PCR. Διαπιστώθηκε υψηλότερη έκφραση του καταστολέα σε δύο κλώνους (#4, #5). Οι κλώνοι αυτοί μπορεί να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για την ένθεση στο γονιδίωμα ενός δευτέρου διαγονιδίου, που θα περιλαμβάνει το cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* ή short-hairpin RNAs (shRNAs) που θα στοχεύουν το γονίδιο αυτό. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να τροποποιηθεί μελλοντικά η ενεργότητα του γονιδίου *FRA10AC1*, με υπερέκφραση ή καταστολή του.

ABSTRACT

FRA10AC1 gene is mapped at 10q23.3 region at human chromosomal rare fragile site *FRA10A*. The expression of this fragile site is associated with the expansion of a (CGG)_n repeat located in the 5' UTR region of the gene, resulting in hypermethylation of the region and gene silencing. The clinical expression of carriers is mental retardation and developmental abnormalities. *FRA10AC1* is ubiquitously expressed and encodes for a conserved nucleoplasmic protein, FRA10AC1. Although its function remains unclear, it is possibly implicated in splicing or/and other related procedures.

This study belongs in the context of the *FRA10AC1* gene functional analysis at the cell level. On this account, a stable *HeLa* cell line was established that expresses tetracyclin repressor, *TetR*, gene. For this reason, the present work was focused on the generation of a primarily stable cell line that expresses Tet repressor gene, *TetR*. Firstly, plasmid vector pcDNA6TR, which contains *TetR* gene, was transfected into *HeLa* cells. The next step was the selection of five clones that express Tet repressor, the RNA isolation in three of them and RT-PCR analysis to ensure the expression of *TetR* gene. It was noticed highest expression of Tet repressor in two clones (#4, #5). These clones can be used then as hosts to stably express *FRA10AC1* cDNA or short-hairpin RNAs (shRNAs) for this gene. In this way, *FRA10AC1* activity can be modified, in the future, with overexpression or silencing.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικά

Η συγκεκριμένη εργασία εντάσσεται στο πλαίσιο της λειτουργικής μελέτης του γονιδίου *FRA10AC1*, με την αξιοποίηση «ομικών» τεχνολογιών, ώστε να διερευνηθεί το μεταγραφικό, πρωτεϊνικό και μεταβολικό πρότυπο ενός κυτταρικού μοντέλου με τροποποιημένη την ενεργότητα του γονιδίου με σκοπό να προσδιοριστεί το μοριακό φάσμα των συνεπειών της δυσλειτουργίας του. Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην σπάνια εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A* η οποία έχει συσχετισθεί με ήπια νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες. Έτσι, στην Εισαγωγή γίνεται μία σύνοψη για τις εύθραυστες θέσεις του γονιδιώματος του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένης και της *FRA10A*, ακολουθεί η περιγραφή των μέχρι τώρα δεδομένων που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του γονιδίου *FRA10AC1* και, τέλος, γίνεται μία πολύ γρήγορη ανασκόπηση των «ομικών» τεχνολογιών και των δυνατοτήτων που αυτές προσφέρουν.

1.2 Εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις

Οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα γονιδιωματικής αστάθειας (Smith *et al.* 2010). Η γονιδιωματική αστάθεια αναφέρεται στον αυξημένο ρυθμό μεταλλαγής που παίρνει τη μορφή χρωμοσωμικών ανωμαλιών, μεταθέσεων, θραύσεων, μικρών ή μεγάλων ενθέσεων ή ελλείψεων και αλλαγών στον αριθμό των βάσεων του DNA.

Υπάρχουν ποικίλοι τρόποι με τους οποίους μπορούν να προκληθούν θραύσματα στα χρωμοσώματα. Συγκεκριμένα, αυτά μπορεί να προέλθουν από παράγοντες που επηρεάζουν την πρωταρχική δομή της διπλής έλικας του DNA, είτε ενδογενείς όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, είτε εξωγενείς όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία. Οι εύθραυστες θέσεις είναι μη τυχαίοι χρωμοσωμικοί τόποι (Burrow *et al.* 2009) κατά μήκος του γονιδιώματος των θηλαστικών όπου παρατηρείται χρωμοσωματική ασυνέχεια ή και θραύση των χρωμοσωμάτων (Savelyeva *et al.* 2006). Οι θέσεις αυτές, είναι επιρρεπείς σε μεταλλάξεις και επιγενετικές αλλαγές και συνεπώς αποτελούν θερμά σημεία (hot spots) γονιδιωματικής αστάθειας.

Συγκεκριμένα, οι εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις ορίζονται ως περιοχές όπου η χρωματίνη δεν έχει συμπυκνωθεί σωστά και γι αυτό κυτταρογενετικά η εμφανίζονται ως «κενά» με ακραία εκδήλωση τη θραύση στα μεταφασικά χρωμοσώματα (Smith *et al.*, 2010). Εκδηλώνονται όταν τα διαιρούμενα κύτταρα

πληθυσμού (5%), κληρονομούνται με μενδελικό τρόπο (Burrow *et al.* 2009) και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν συσχετιστεί με διαταραχές. Αντίθετα, οι κοινές εύθραυστες θέσεις είναι παρούσες σε όλα τα άτομα και γι' αυτό θεωρούνται συστατικό της φυσιολογικής χρωμοσωμικής δομής (Lagana *et al.* 2010). Μέχρι σήμερα, περίπου 200 συνήθεις εύθραυστες θέσεις έχουν χαρτογραφηθεί στα λεμφοκύτταρα του ανθρώπου και 22 έχουν αναλυθεί σε μοριακό επίπεδο. Για ιστορικούς λόγους, οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις έχουν σχεδόν αποκλειστικά χαρτογραφηθεί και μελετηθεί στα λεμφοκύτταρα. Υπάρχει όμως η κοινή αντίληψη ότι οι ίδιες θέσεις εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, αλλά σε διαφορετικές συχνότητες (Debatisse *et al.* 2011).

Οι εύθραυστες θέσεις κάθε κατηγορίας ταξινομούνται περαιτέρω σύμφωνα με το συγκεκριμένο τρόπο επαγωγής τους *in vitro*, δηλαδή τις απαιτήσεις καλλιέργειας. Οι σπάνιες υποδιαιρούνται σε ευαίσθητες και μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ (Lukusa & Fryns 2008). Οι σπάνιες, ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ θέσεις επάγονται με:

- α)** απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.
- β)** αναστολείς του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος, όπως η μεθοτρεξάτη.
- γ)** αναστολείς της σύνθεσης τριφωσφορικής θυμιδίνης (dTTP), όπως η φθοροδεοξουριδίνη (FdU).

Όλοι αυτοί οι τρόποι επαγωγής επηρεάζουν το μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων και επομένως καταλήγουν στην αναστολή της σύνθεσης του DNA. Οι σπάνιες, μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις κατατάσσονται σε δύο ομάδες:

- α)** αυτές που επάγονται από τη δισταμυκίνη A, ένα μικρό ολιγοπεπτίδιο-αντιβιοτικό. Επιπλέον, μπορούν να επαχθούν και από τα ανάλογά της, βερενίλιο και νετροψίνη.
- β)** αυτές που επάγονται από βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU), ένα ανάλογο της θυμιδίνης που ενσωματώνεται στο DNA κατά την αντιγραφή και εμποδίζει τη σύνθεσή του.

Οι κοινές εύθραυστες θέσεις επάγονται από:

- α)** την αφιδικολίνη, έναν αναστολέα των DNA πολυμερασών α , δ και ϵ . Μπορούν, ακόμη, να επαχθούν με την προσθήκη φθοροδεοξουριδίνης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, προκαλώντας έλλειψη στη δεξαμενή των νουκλεοτιδίων. Σε κάθε περίπτωση η έκφραση των εύθραυστων θέσεων ενισχύεται με την απουσία φυλλικού οξέος από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας.
- β)** την 5-αζακυτιδίνη, ένα ανάλογο της κυτοσίνης, που ενσωματώνεται στο DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

γ) την βρωμοδεοξουριδίνη, η οποία μπορεί να επάγει την έκφραση τόσο των σπάνιων όσο και των κοινών εύθραυστων θέσεων. Ωστόσο, οι επαγόμενες από τη βρωμοδεοξουριδίνη κοινές θέσεις χαρτογραφούνται σε διαφορετικά σημεία του γονιδιώματος από τις αντίστοιχες σπάνιες (Schwartz *et al.* 2006).

Σε αντίθεση με τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις, η ευθραυστότητα σε μια κοινή εύθραυστη θέση πραγματοποιείται σε μια περιοχή εκατοντάδων κιλοβάσεων και όχι σε ένα συγκεκριμένο σημείο της αλληλουχίας του DNA (Savelyeva *et al.* 2005).

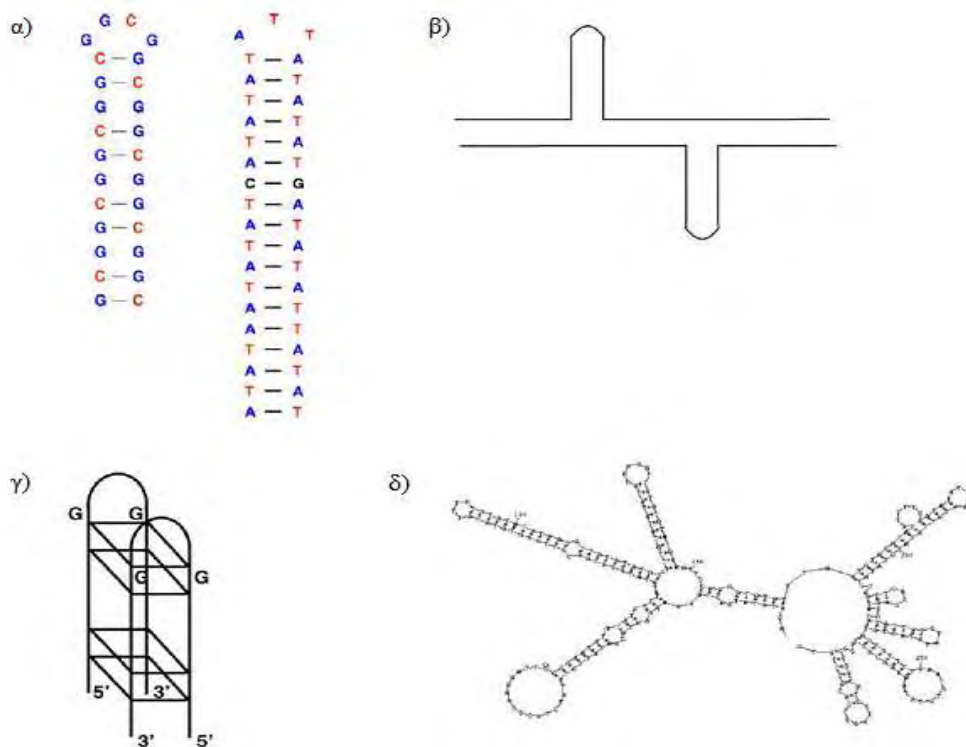
1.4 Μοριακή βάση εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων

Η συσχέτιση των εύθραυστων θέσεων με γενετικές ασθένειες του ανθρώπου και με τον καρκίνο τονίζει τη σημασία στη διερεύνηση της μοριακής βάσης των διαφόρων τύπων τους. Η έρευνα στο πεδίο αυτό είχε επικεντρωθεί κυρίως στην κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν ευθραυστότητα σε κάθε κατηγορία ξεχωριστά (Schwartz *et al.* 2006). Παρόλο που η μοριακή βάση των εύθραυστων θέσεων δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη, πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στη γονιδιωματική αστάθειά τους (Dillon *et al.* 2010).

Όσον αφορά τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις, και οι δύο ομάδες τους εμφανίζουν επέκταση ενός επαναλαμβανόμενου μοτίβου που εμφανίζει πολυμορφισμό στον αριθμό των αντιγράφων του στο γενικό πληθυσμό. Αυτές οι επεκτεινόμενες επαναλήψεις είναι τρινουκλεοτίδια CGG ή μινιδουροφόροι πλούσιοι σε δινουκλεοτίδια A/T και έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές που εμποδίζουν την πρόοδο της αντιγραφής (Schwartz *et al.* 2006). Οι δευτεροταγείς αυτές δομές μπορεί να είναι διαφόρων μορφών, όπως μη B-DNA δομές, δομές τετραελικοειδείς ή φουρκέτας, καθώς και δομές S DNA (slipped stranded DNA, SDNA), που απεικονίζονται στην Εικόνα 2.

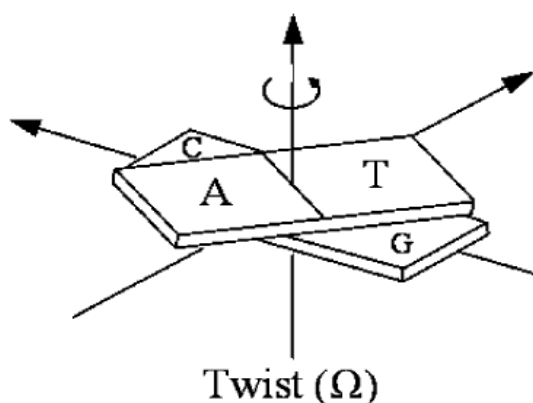
Οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις περιέχουν πολλές περιοχές με υψηλή ευκαμψία, δηλαδή δυνατότητα στροφής, που ονομάζονται κορυφές ευκαμψίας (Εικόνα 3). Οι περιοχές αυτές αποτελούνται από διακοπτόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε δινουκλεοτίδια AT ποικίλων μεγεθών, τις ονομαζόμενες νησίδες ευκαμψίας πλούσιες σε δινουκλεοτίδια AT. Αυτές οι νησίδες έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού ασυνήθιστων δευτεροταγών δομών DNA που παρεμποδίζουν την αντιγραφή και συμβάλλουν στο μηχανισμό ευθραυστότητας των συνήθων εύθραυστων θέσεων με τον ίδιο τρόπο όπως οι δευτεροταγείς δομές στις σπάνιες εύθραυστες θέσεις (Lukusa & Fryns, 2008).

Τι όμως κάνει τους πλούσιους σε A/T μινιδορυφόρους και τις επαναλήψεις CGG στις εύθραυστες θέσεις να διαφέρουν από τις άλλες επεκτεινόμενες επαναλήψεις που δεν παρουσιάζουν ευθραυστότητα; Η απάντηση στο ερώτημα αυτό παραμένει ακόμα άγνωστη, αλλά πολλές αιτιολογίες είναι πιθανές. Πρώτον, οι δευτεροταγείς δομές που σχηματίζονται στις άλλες επεκτεινόμενες επαναλήψεις θα μπορούσαν να είναι λιγότερο σταθερές ή πιο εύκολο να αποδιαταχθούν. Για το λόγο αυτό δε θα μπορούσαν να διαταράξουν την αντιγραφή. Δεύτερον, οι άλλοι τύποι επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών με δυνατότητα επέκτασης ίσως έχουν τη δυνατότητα να εκφράζουν ευθραυστότητα, κάτω όμως από συνθήκες που ακόμη δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Τέλος, οι επεκτεινόμενες επαναλήψεις CGG και οι επεκτεινόμενοι πλούσιοι σε A/T μινιδορυφόροι φαίνεται να έχουν χαμηλή αποτελεσματικότητα σχηματισμού νουκλεοσωμάτων.



Εικόνα 2: Οι δευτεροταγείς δομές DNA που μπορούν να σχηματιστούν στις εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις. **α)** Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες CGG και οι πλούσιοι σε A/T μινιδορυφόροι μπορούν να σχηματίσουν δομές φουρκέτας, **β)** Μια ειδική δευτεροταγή δομή του DNA (slipped stranded DNA, SDNA) που μπορούν να σχηματίσουν οι επαναλήψεις CGG, **γ)** Τετρα-ελικοειδείς δομές μπορούν να σχηματιστούν επίσης από τις επεκτεινόμενες αλληλουχίες CGG, **δ)** Μια προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή ενός μινιδορυφόρου πλούσιου σε A/T που εντοπίζεται σε μια συνήθη εύθραυστη θέση (Schwartz *et al.* 2006).

Αντίθετα, έχει βρεθεί πως άλλες επαναλαμβανόμενες επεκτάσεις, όπως οι αλληλουχίες CTG, αποτελούν πιο ευνοϊκές αλληλουχίες για σχηματισμό νουκλεοσωμάτων. Συνεπώς, οι πλούσιοι σε A/T μινιδορυφόροι και οι επεκτεινόμενες επαναλήψεις CGG ίσως παρεμβαίνουν στο φυσιολογικό πακετάρισμα της χρωματίνης. Αυτή η παρεμπόδιση της φυσιολογικής χρωματινικής δομής, κάτω από συνθήκες διαταραχής της αντιγραφής μπορεί να εκδηλωθεί ως σπασίματα στα μεταφασικά χρωμοσώματα, που αποτελούν τις εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις (Schwartz *et al.*, 2006).



Εικόνα 3: Απεικόνιση της δυνατότητας ευκαμψίας που παρουσιάζουν οι κορυφές ευκαμψίας των συνήθων εύθραυστων θέσεων (Schwartz *et al.* 2006).

Συμπερασματικά, συγκρίνοντας μοριακά τις διαφορετικές τάξεις των εύθραυστων θέσεων του ανθρώπου, αναμένονταν η ταυτοποίηση κοινών χαρακτηριστικών σε όλες, που πιθανώς να αποτελούσαν τις αναγκαίες προϋποθέσεις για τη διαταραχή της αντιγραφής και την έκφραση της ευθραυστότητας. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα όμως, γίνεται αντιληπτό ότι δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια κοινή ακολουθία-μοτίβο DNA για όλες τις ομάδες των εύθραυστων θέσεων. Ωστόσο, φαίνεται πως αναδύεται ένας κοινός μοριακός μηχανισμός που εξηγεί την ευθραυστότητά τους (Lukusa & Fryns 2008) και βασίζεται στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οι οποίες παρεμποδίζουν την αντιγραφή του DNA και την οργάνωση της χρωματίνης. Για αυτό το λόγο, όλες οι εύθραυστες θέσεις έχουν κοινά χαρακτηριστικά στην αλληλουχία τους, όπως υψηλή ευκαμψία του DNA, δυνατότητα σχηματισμού δευτεροταγών δομών και προδιάθεση σε ελαττωματικό πακετάρισμα χρωματίνης. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορούν να οδηγήσουν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε καθυστέρηση του τερματισμού της αντιγραφής και σε μη συμπυκνωμένη χρωματίνη κατά μήκος μεγάλων γενωμικών περιοχών, προκαλώντας την ευθραυστότητα (Schwartz *et al.* 2006). Τέλος, ένας επιπλέον παράγοντας που

αυξάνει δραματικά τα ‘σπασίματα’ στις εύθραυστες θέσεις φαίνεται πως είναι η απουσία πρωτεϊνών που σχετίζονται με το εξαρτώμενο από την κινάση ATR σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Η συγκεκριμένη κινάση είναι κυρίαρχο συστατικό σε αυτό το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, καθώς αντιλαμβάνεται και αποκρίνεται στις βλάβες του DNA. Έτσι, η απουσία της οδηγεί στα θραύσματα που εμφανίζονται στις θέσεις αυτές (Burrow *et al.* 2009).

1.5 Κλινική εκδήλωση εύθραυστων χρωμοσωμικών θέσεων

Αρχικά, ο ρόλος των εύθραυστων θέσεων στις γενετικές διαταραχές του ανθρώπου είχε περιοριστεί στο σύνδρομο του εύθραυστου X, που συνδέεται με τη σπάνια εύθραυστη θέση *FRAXA* στο χρωμόσωμα X, και σε μια ήπια μορφή νοητικής υστέρησης, που συνδέεται με μια άλλη σπάνια εύθραυστη θέση στο χρωμόσωμα X, την *FRAXE* (Savelyeva *et al.* 2006). Το σύνδρομο του εύθραυστου X είναι η πιο συχνή οικογενής μορφή νοητικής υστέρησης, με εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων σε όλους τους άρρενες φορείς. Στη συνέχεια δείχθηκε ότι μια τρίτη, ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ, σπάνια εύθραυστη θέση, η αυτοσωμική *FRA11B*, πιθανώς σχετίζεται με το σύνδρομο Jacobsen. Για τις υπόλοιπες σπάνιες εύθραυστες θέσεις, δεν έχει αποδειχθεί η συσχέτισή τους με κάποιο παθολογικό φαινότυπο (Lukusa & Fryns 2008). Ειδικότερα, τρεις σπάνιες αυτοσωματικές εύθραυστες θέσεις, οι *FRA10B*, *FRA16B*, *FRA17A*, έχουν βρεθεί και σε ομοζυγωτία η οποία δεν προσδίδει κάποιο παθολογικό φαινότυπο, υποδεικνύοντας ότι οι συγκεκριμένες θέσεις δεν επηρεάζουν τη λειτουργία γονιδίων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη (Sutherland & Baker 2000). Ωστόσο, η ταυτοποίηση της θέσης *FRA13A* μέσα στο γονίδιο της νευροβεακίνης (neurobeachin) αποκαλύπτει τον πιθανό ρόλο και των συνήθων εύθραυστων θέσεων στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Savelyeva *et al.* 2006), με συσχέτιση του *FRA6E* με το νεανικό πάρκινσον και του *FRA13A* με τον αυτισμό.

Επιπρόσθετα, οι εύθραυστες θέσεις, κυρίως οι συνήθεις, φαίνεται πως συνδέονται με τις *in vivo* χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που εμφανίζονται σε διάφορους καρκίνους (Lukusa & Fryns 2008). Πολλές μελέτες έχουν αποκαλύψει μια αξιοσημείωτη συσχέτιση μεταξύ της τοποθεσίας των εύθραυστων θέσεων και των θέσεων όπου παρατηρούνται οι βλάβες στα καρκινικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι στο 52% των ζευγών γονιδίων που εμπλέκονται στις μεταθέσεις στον καρκίνο, τα σημεία θραυσμάτων τοποθετούνταν στις εύθραυστες θέσεις. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η χρωμοσωμική ευθραυστότητα, κυρίως στις εύθραυστες θέσεις, μπορεί

να συμβάλλει στη δημιουργία υβριδικών μεταγράφων στα καρκινικά κύτταρα (Lagana *et al.* 2010), καθώς και σε *in vivo* ελλείψεις ή μεταθέσεις σε διαφόρους τύπους όγκων (Lukusa & Fryns 2008). Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός εύθραυστων θέσεων περιέχουν γονίδια, που κωδικοποιούνται από πολύ μεγάλες γενωμικές περιοχές. Πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται σε μεταθέσεις που εμφανίζονται στον καρκίνο, εντοπίζονται μέσα στις εύθραυστες θέσεις. Αυτό συχνά καταλήγει στην έκφραση μεταλλαγμένων ογκογονιδίων ή στην απουσία έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμβάλλοντας στην έναρξη του καρκίνου και υπογραμμίζοντας το ρόλο των εύθραυστων θέσεων (Lagana *et al.* 2010).

1.6 Η εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*

Στην ομάδα των σπάνιων αυτοσωμικών εύθραυστων θέσεων του ανθρώπου ανήκει και η χρωμοσωμική θέση *FRA10A*. Χαρτογραφείται στην περιοχή 23.3 του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 10, 10q23.3, και εκτείνεται σε μήκος ~50kb. Η συγκεκριμένη θέση συμπεριλαμβάνεται στις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, που εμφανίζονται όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο.

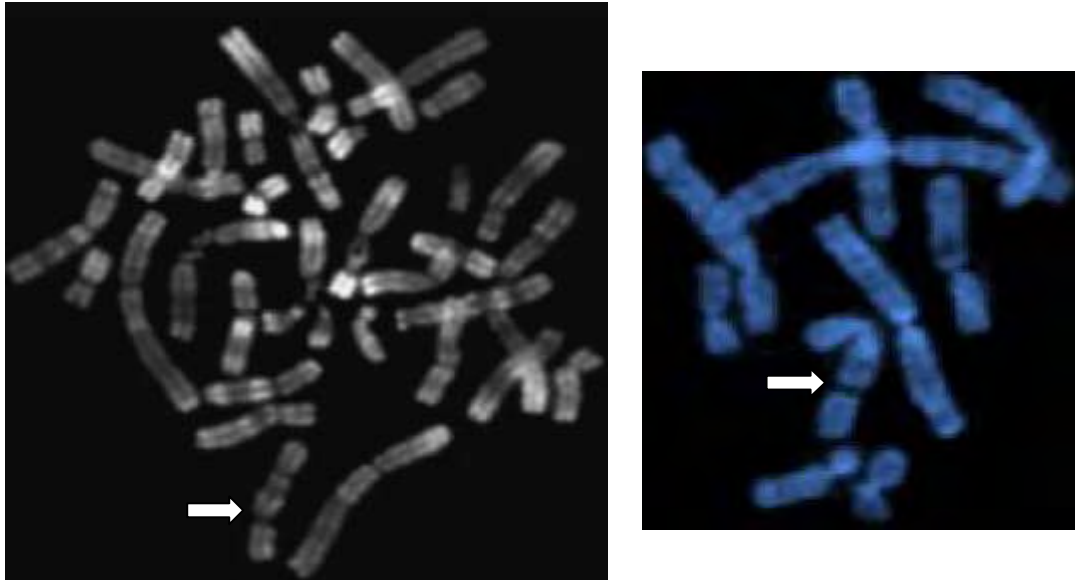
Από πληθυσμιακές μελέτες, φαίνεται ότι η *FRA10A* αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη αυτοσωματική ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ εύθραυστη θέση στο γονιδίωμα του ανθρώπου, με συχνότητα εμφάνισης 1 στα 500 άτομα. Παρόλα αυτά, η παρατηρούμενη συχνότητα ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών μελετών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ή στις διαφορές των μεθόδων που εφαρμόστηκαν (Sutherland, 1982).

Στην Εικόνα 4 απεικονίζεται η κυτταρογενετική έκφραση της θέσης *FRA10A* στην περιοχή 10q23.3 στα χρωμοσώματα ενός ατόμου, η οποία καταλήγει σε χρωμοσωμική θραύση του ενός ομολόγου στα δύο τρίτα των κυττάρων. Επιπρόσθετα, η *FRA10A* μπορεί να παρουσιαστεί κυτταρογενετικά με τη μέθοδο FISH (fluorescence in situ hybridization) σε μεταφασικά χρωμοσώματα.

1.7 Κλινική εκδήλωση της εύθραυστης θέσης *FRA10A*

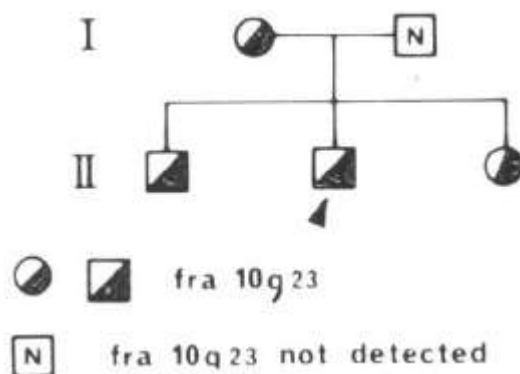
Μέχρι τώρα δεν έχει αποδειχθεί σαφώς η συσχέτιση της εμφάνισης κάποιας αυτοσωματικής ευαίσθητης στο φυλλικό οξύ εύθραυστης θέσης με συγκεκριμένο παθολογικό φαινότυπο. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της *FRA10A* μπορεί να σχετίζεται με ήπια νοητική υστέρηση (Εικόνα 5), αναπτυξιακές

ανωμαλίες, όπως δυσμορφικά χαρακτηριστικά, μικρό ανάστημα, υποσπαδία και δυσχέρεια λόγου (Mavrou *et al.* 1991, Petit *et al.* 1986, Sutherland 1982 & 1985, Kahkonen *et al.* 1989, Sarafidou *et al.* 2004).



Εικόνα 4: Κυτταρογενετική απεικόνιση (αριστερά) και χαρτογράφηση μέσω FISH (δεξιά) της σπάνιας εύθραυστης θέσης *FRA10A* (Sarafidou *et al.* 2004).

Τα συμπεράσματα αυτά προκύπτουν από μελέτες πληθυσμών μεταξύ ατόμων με νοητική υστέρηση σε σχέση με υγιή άτομα ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, με άτομα από το γενικό πληθυσμό που έχουν επιλεγεί τυχαία. Όπως σε όλες τις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις, η συχνότητα έκφρασης της *FRA10A* ήταν σημαντικά υψηλότερη στα άτομα με νοητική υστέρηση σε σχέση με τα φυσιολογικά (Kahkonen *et al.* 1989). Είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι, σε ορισμένες μελέτες η *FRA10A* ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στα προσβεβλημένα άτομα (Sutherland 1985, Petit *et al.* 1986, Mavrou *et al.* 1991) ενώ σε άλλες εντοπίστηκαν και ορισμένα υγιή άτομα-



Εικόνα 5: Οικογένεια με νοητική υστέρηση, στην οποία εκφράζεται η εύθραυστη θέση *FRA10A*. Το βέλος δείχνει το άτομο-δείκτη. Τα μαυρισμένα άτομα εμφανίζουν τον παθολογικό φαινότυπο, ενώ ο πατέρας στη γενιά I είναι φυσιολογικός (Sutherland, 1979).

φορείς (Sutherland 1982, Kahkonen *et al.* 1989, Sarafidou *et al.* 2004). Το γεγονός αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι η ετεροζυγωτία αυτής της θέσης δε συσχετίζεται με παθολογικό φαινότυπο. Μια άλλη εξήγηση του γεγονότος αυτού στηρίζεται στη μειωμένη διεισδυτικότητα του παθολογικού φαινοτύπου στον πληθυσμό, με αποτέλεσμα τα κλινικά συμπτώματα να μην εμφανίζονται σε ένα ποσοστό ατόμων-φορέων. Το φαινόμενο της μειωμένης διεισδυτικότητας έχει δειχθεί στην περίπτωση του συνδρόμου του εύθραυστου X που σχετίζεται με την εκδήλωση νοητικής υστέρησης κατά την εμφάνιση της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης *FRAXA* (Dobkin *et al.* 2000). Βέβαια, η συσχέτιση της *FRA10A* με το φαινότυπο της νοητικής υστέρησης μπορεί να οφείλεται σε μεροληψία κατά τη διαδικασία εξαγωγής της μελέτης (ascertainment bias), διότι στις περισσότερες μελέτες εξετάστηκαν άτομα προερχόμενα από συγκεκριμένα περιβάλλοντα (ιδρύματα περίθαλψης ατόμων με νοητική υστέρηση, σχολεία ειδικής εκπαίδευσης) και όχι τυχαίο δείγμα από το γενικό πληθυσμό (Petit *et al.* 1986). Πάντως, η τελική επιβεβαίωση της συσχέτισης ή μη απαιτεί τη μελέτη ενός οργανισμού-μοντέλου.

Για τις αυτοσωμικές ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις, στις οποίες ανήκει και η *FRA10A*, συνήθως εμφανίζεται μητρική κληρονομηση, παρόλο που η εμφάνιση αυτών των εύθραυστων θέσεων στα αρσενικά άτομα δεν είναι πιο δύσκολη σε σχέση με τα θηλυκά (Sutherland, 1985).

1.8 Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση *FRA10A*

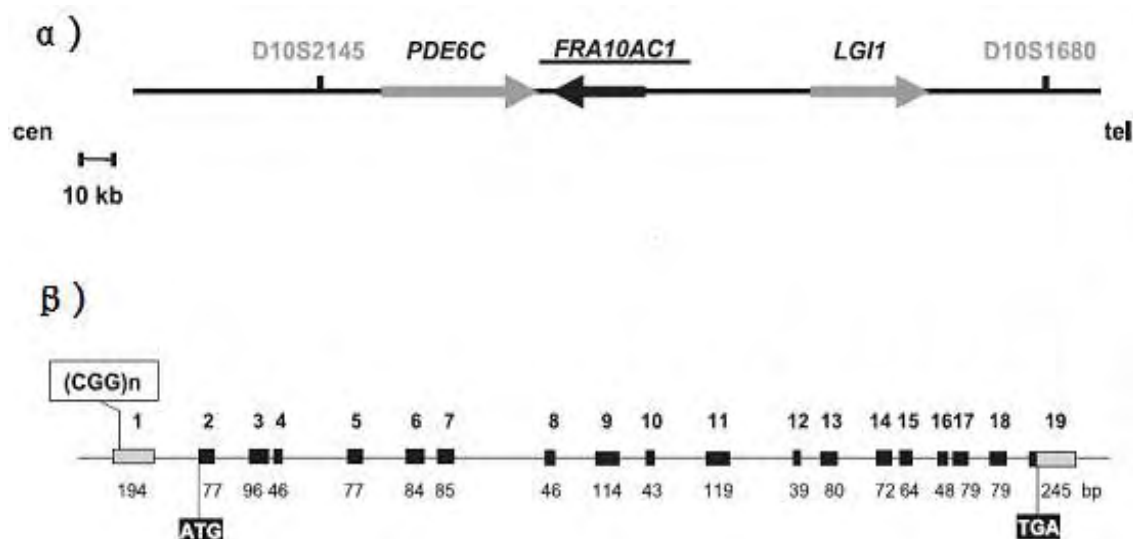
Η ταυτοποίηση της μοριακής βάσης της εύθραυστης θέσης *FRA10A* οδήγησε στον εντοπισμό ενός καινούριου γονιδίου, του *FRA10AC1*.

► Γενομική οργάνωση

Το γονίδιο *FRA10AC1* εκτείνεται σε μια περιοχή 33kb στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 του ανθρώπου και χαρτογραφείται ανάμεσα στο γονίδιο *PDE6C*, το οποίο κωδικοποιεί τη φωσφοδιεστεράση 6C και στο γονίδιο *LGII*, που σχετίζεται με μία αυτοσωμική επικρατής μορφή επιληψίας.

Ειδικότερα, αποτελείται από 19 εξόνια, τα τέσσερα από τα οποία, εξόνια 13, 14, 15 και 16, υπόκεινται σε εναλλακτική συναρμογή (splicing). Όλα τα όρια ιντρονίων ακολουθούν τον συμβατικό κανόνα AG/GT στη θέση που πραγματοποιείται η συναρμογή. Η μεταγραφή του γονιδίου πραγματοποιείται από το τελομερές προς το κεντρομέρος. Επιπρόσθετα, εντοπίζονται τρινουκλεοτιδικές

επαναλήψεις (CGG)_n στο εξόνιο 1, στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται στην αρχή του εξονίου 2 και το κωδικόνιο λήξης στο τελευταίο εξόνιο, το εξόνιο 19 (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Χαρτογράφηση και γενωμική οργάνωση του γονιδίου *FRA10AC1*.

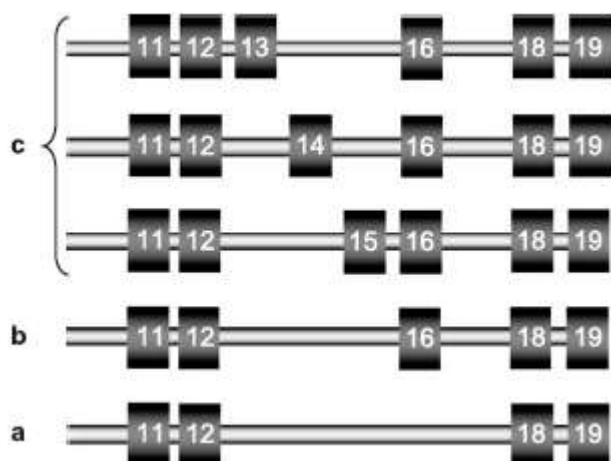
α) Παρουσιάζονται τα γονίδια *FRA10AC1*, *PDE6C*, *LGI1* (βέλη) καθώς και δύο μικροδορυφορικοί δείκτες. Ο προσανατολισμός 5'-3' του κάθε γονιδίου δίνεται από τον προσανατολισμό του κάθε βέλους. **β)** Η δομή εξονίων - ιντρονίων του γονιδίου *FRA10AC1*. Τα εξόνια παρουσιάζονται με κουτάκια, οι κωδικές περιοχές των εξονίων με μαύρο χρώμα, ενώ οι μη κωδικές περιοχές με γκρι. Ο αριθμός του κάθε εξονίου αναγράφεται από πάνω ενώ το μέγεθός του από κάτω. Απεικονίζονται επίσης το κωδικόνιο έναρξης και λήξης της μετάφρασης καθώς και η επανάληψη (CGG)_n (Sarafidou *et al.* 2004).

► Πρότυπο έκφρασης

Η ανάλυση Northern αποκαλύψε ότι το γονίδιο *FRA10AC1* είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς ενήλικων ατόμων. Συγκεκριμένα, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρουσίασαν όργανα με υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα, όπως εγκέφαλος, καρδιά, σκελετικοί μύς, ήπαρ και νεφροί, ενώ χαμηλότερη έκφραση παρουσίασαν όργανα όπως θύμος, σπλήνας, πλακούντας και πνεύμονας. Το πλήρες μήκος του cDNA του γονιδίου έχει μήκος 1344 bp.

Παράλληλα, έχει προσδιοριστεί η ύπαρξη πέντε εναλλακτικών μεταγράφων. Το κύριο μετάγραφο περιλαμβάνει τα εξόνια 1-12, 18 και 19. Ένα από τα εναλλακτικά μετάγραφα εντοπίστηκε σχεδόν σε όλους τους ιστούς και περιλαμβάνει τα εξόνια 13-16. Επιπλέον, βρέθηκαν τρία εναλλακτικά μετάγραφα αποκλειστικά στις γονάδες, που περιλαμβάνουν το εξόνιο 16 σε συνδυασμό με τα εξόνια 13, 14, 15

αντίστοιχα. Όλα αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα αντιστοιχούν σε διαφορετική ακολουθία αμινοξέων στο καρβοξυ-τελικό άκρο, καταλήγοντας πιθανόν σε αντίστοιχο αριθμό ισομορφών της πρωτεΐνης FRA10AC1, ετερογενών στο καρβοξυ-τελικό άκρο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των εναλλακτικών μεταγράφων a,b και c του γονιδίου *FRA10AC1* (αριστερά) και των παραγόμενων ισομορφών (κάτω) (Sarafidou *et al.* 2004).

FRA10AC1-3.3 ..EDSLLNGVMLFHPGWSAVARSQTLAAPASQVQTNNHYWRGVVC (313 aa)

FRA10AC1-3.2 ..EDSLLKTYFVGLLSESNEKTYM (292 aa)

FRA10AC1-3.1 ..EDSLLRRLMLEELQMFTWEKSERMGGKRLIIIGEELSANVTTLKL (315 aa)

FRA10AC1-2 ..EDSLLN (276 aa)

FRA10AC1-1 ..EDSLLRNSDEEESASESELWKGPLPETDEKSQEEEEDEYFQDLFL (315 aa)

► **Μοριακή βάση της εύθραυστης θέσης FRA10A**

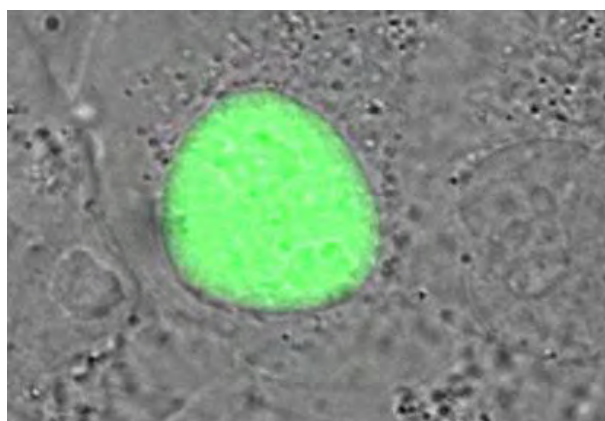
Η μοριακή βάση της εμφάνισης της σπάνιας εύθραυστης θέσης *FRA10A* είναι η επέκταση των ασταθών επαναλήψεων CGG οι οποίες εντοπίζονται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*. Οι συγκεκριμένες επαναλήψεις είναι όμοιες με αυτές που έχουν ταυτοποιηθεί και για τις άλλες πέντε ευαίσθητες στο φυλικό οξύ εύθραυστες θέσεις που έχουν κλωνοποιηθεί έως τώρα, *FRAXA*, *FRAXE*, *FRAXF*, *FRA11B* και *FRA16A*. Αποτελούν μέρος νησίδων CpG και είναι πολυμορφικές στο γενικό πληθυσμό, δηλαδή έχουν τη δυνατότητα επέκτασης.

Φυσιολογικά, έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα αλληλόμορφα (A1-A4) των 8, 9, 10 και 14 επαναλήψεων. Το πιο κοινό αλληλόμορφο, το A2, περιέχει 9 επαναλήψεις. Μέσω της μεθόδου PCR αποκαλύφθηκε πως τα άτομα που εκφράζουν την εύθραυστη

θέση *FRA10A* εμφανίζουν προϊόντα PCR μεγαλύτερου μεγέθους, γεγονός που δείχνει την επέκταση των επαναλήψεων αυτών. Ειδικότερα, οι επαναλήψεις CGG μπορούν να επεκταθούν έως και 200 φορές (600-700bp) και σε αυτό το μέγεθος υπερμεθυλιώνονται. Αυτό οδηγεί στη μεταγραφική καταστολή του αντίστοιχου αλληλομόρφου του γονιδίου *FRA10AC1*.

1.9 Η πρωτεΐνη FRA10AC1

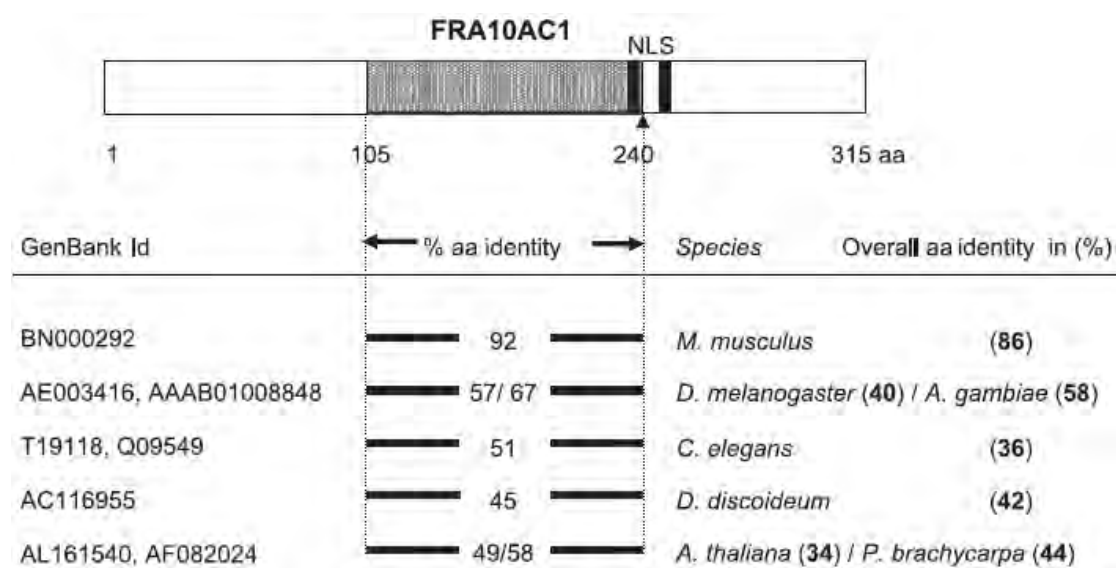
Το προϊόν της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* είναι μια πρωτεΐνη 315 αμινοξέων, με μοριακό βάρος μάζα 37.5 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο pI 8,25. Το καρβοξυτελικό της άκρο περιέχει πολλά κατάλοιπα σερίνης, τα οποία αποτελούν πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης. Δεν έχουν όμως βρεθεί ομοιότητες της *FRA10AC1* με άλλες γνωστές πρωτεϊνικές επικράτειες. Ωστόσο, έχει προσδιοριστεί *in silico* ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού, στην περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 223-238 και 245-262 και ανήκει σε μία ευρύτερη περιοχή-πλούσια σε λυσίνη (αμινοξέα 129-269). Ο πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης, και ειδικότερα ο εντοπισμός της στο πυρηνόπλασμα (Εικόνα 8), επιβεβαιώθηκε και πειραματικά, τόσο για την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μετά από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών, όσο και για την ενδογενή πρωτεΐνη, η οποία ανιχνεύθηκε με ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα.



Εικόνα 8: Υποκυτταρικός εντοπισμός της χημειρικής πρωτεΐνης FRA10AC1-GFP στον πυρήνα, με μικροσκόπιο φθορισμού. Το κύτταρο που απεικονίζεται είναι της σειράς COS-7 και έχει διαμολυνθεί παροδικά με το αντίστοιχο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (Sarafidou *et al.* 2004).

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 εμφανίζει ορθόλογα σε πλήθος ευκαρυωτικών, αποκλειστικά πολυκύτταρων, ζωικών και φυτικών οργανισμών, αλλά όχι σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, η ακολουθία της πρωτεΐνης του ανθρώπου είναι ταυτόσημη κατά 86% με την ακολουθία της ορθόλογης πρωτεΐνης του ποντικού και παρουσιάζει ομολογία της τάξεως του 92%. Επιπλέον, παρουσιάζει

ομοιότητα 35% με την ορθόλογη πρωτεΐνη του *C. elegans* και 58% με του *Anopheles gambiae*. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι πιθανόν υπήρξε κάποιο κοινό προγονικό γονίδιο πριν το διαχωρισμό των φυτών και των ζώων, το οποίο στη συνέχεια διαφοροποιήθηκε. Η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης (αμινοξέα 105-240) είναι αυτή που εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό ταυτότητας, που κυμαίνεται από 45 έως 67% με τα υπόλοιπα ορθόλογα μόρια (Εικόνα 9). Κανένα από τα ορθόλογα μόρια δεν έχει μελετηθεί λειτουργικά και δε φέρει κάποιο χαρακτηριστικό μοτίβο που να εντάσσει την πρωτεΐνη σε συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών. Ωστόσο, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη δεν εντοπίζεται σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, πιθανώς υποδεικνύει ότι σχετίζεται με μία λειτουργία που αφορά αποκλειστικά τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Sarafidou *et al.* 2004).



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της συντήρησης που εμφανίζει η πρωτεΐνη FRA10AC1 ανάμεσα στον άνθρωπο και άλλους πολυκύτταρους οργανισμούς. Πάνω παρουσιάζεται η κεντρική συντηρημένη περιοχή (αμινοξέα 105-240) με γκρι χρώμα. Το διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, αμινοξέα 223-238 και 245-262) παρουσιάζεται με δύο μαύρες ράβδους. Κάτω στα αριστερά δίνονται οι κωδικοί αριθμοί των ορθολόγων στη βάση δεδομένων GenBank. Στο μέσον απεικονίζεται η αμινοξική ομοιότητα μέσα στη συντηρημένη κεντρική περιοχή της FRA10AC1, ενώ το συνολικό ποσοστό ομοιότητας εμφανίζεται στα δεξιά (Sarafidou *et al.* 2004).

1.10 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1

Δεδομένου αφενός ότι δεν είναι γνωστή η βιολογική λειτουργία καμιάς από τις ορθόλογες πρωτεΐνες και αφετέρου ότι η FRA10AC1 δε διαθέτει κάποιο χαρακτηριστικό μοτίβο, οι πληροφορίες σχετικές με τις αλληλεπιδράσεις της

FRA10AC1 με άλλα πρωτεϊνικά μόρια είναι σημαντικές για τη διαλεύκανση του βιολογικού της ρόλου. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζεται το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, με το οποίο εξετάζονται αποκλειστικά δυαδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Παρόλο που πλήθος δεδομένων από πειράματα μεγάλης κλίμακας (high-throughput) πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων υπάρχουν σε αντίστοιχες βάσεις δεδομένων, τα δεδομένα αυτά δεν μπορούν να θεωρηθούν πλήρως αξιόπιστα γιατί παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και αντιπροσωπεύουν ένα σχετικά μικρό ποσοστό του συνόλου των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου (Von Mering *et al.* 2002, Suthram *et al.* 2006). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να εφαρμόζονται συνδυαστικά, στοχευμένα πειράματα μικρής κλίμακας, τα αποτελέσματα των οποίων να επιβεβαιώνονται με συμπληρωματικές προσεγγίσεις.

Σε αυτό το πλαίσιο, με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα και με πειράματα συνκατακρήμνισης (pull-down) ταυτοποιήθηκε ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες DGCR14 και SAP145. Ειδικότερα για τις πρωτεΐνες FRA10AC1 και DGCR14 προσδιορίστηκαν και οι περιοχές αλληλεπίδρασής τους. Έτσι, δείχθηκε ότι η τμήμα της FRA10AC1 που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 96-253 είναι αναγκαίο και επαρκές για την πρόσδεση με την DGCR14. Αυτή η περιοχή αντιστοιχεί στο τμήμα με το υψηλότερο ποσοστό συντήρησης μεταξύ των ορθολόγων μορίων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, και ταυτόχρονα περιλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα του σήματος πυρηνικού εντοπισμού. Η επικράτεια της DGCR14 η οποία είναι ικανή να αλληλεπιδρά με την FRA10AC1 περιλαμβάνεται στην αμινοξική ακολουθία 294-472, ενώ η ακολουθία 317-390 είναι απαραίτητη για την πρόσδεση μεταξύ των πρωτεϊνών. Το τμήμα αυτό περιέχει μια επικράτεια με διαμόρφωση σπειράματος (coiled-coil), μοτίβο το οποίο σχετίζεται με πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων είναι σε συμφωνία με τον υποκυτταρικό εντοπισμό στο πυρηνόπλασμα των τριών πρωτεϊνών FRA10AC1, DGCR14 και SAP145, ο οποίος εξετάστηκε σε κύτταρα *HeLa* (Sarafidou *et al.*, υπό συγγραφή).

Η κλωνοποίηση βάση θέσης χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος για τη χαρτογράφηση του γονιδίου *DGCR14* στην κρίσιμη περιοχή για το σύνδρομο DiGeorge (22q11.2), με κύριο χαρακτηριστικό τις καρδιακές ανωμαλίες που συνοδεύονται με χαρακτηριστικό προσωπείο (Gong W *et al.* 1997). Μέχρι τώρα, δεν υπάρχουν μελέτες που να προσδιορίζουν λειτουργικά το ρόλο της πρωτεΐνης

DGCR14. Ωστόσο, υπάρχουν πληροφορίες από βιοχημικά πειράματα απομόνωσης του σωματίου συναρμογής και χαρακτηρισμού των συστατικών του με φασματομετρία μάζας που υποδεικνύουν την πιθανή λειτουργία της πρωτεΐνης. Έτσι, από πέντε ανεξάρτητες μελέτες, η DGCR14 προσδιορίστηκε κατ' επανάληψη ως πρωτεΐνη-συστατικό του σωματίου συναρμογής (Rappsilber *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2002, Makarova *et al.* 2004, Bessonov *et al.* 2008, Bessonov *et al.* 2010) και μάλιστα ως συστατικό του συμπλόκου C (Bessonov *et al.* 2008, Bessonov *et al.* 2010).

Όσον αφορά την πρωτεΐνη SAP145, αυτή κωδικοποιείται από το γονίδιο *SF3B2* και αποτελεί την υπομονάδα 2 του παράγοντα συναρμογής 3b, ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου του σωματίου συναρμογής. Και η πρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη-συστατικό του σωματίου συναρμογής σε όλες τις μελέτες που περιλαμβάνουν βιοχημικά πειράματα απομόνωσης του σωματίου συναρμογής και χαρακτηρισμού των συστατικών του με φασματομετρία μάζας (Rappsilber *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2002, Jurica *et al.* 2002, Hartmuth *et al.* 2002, Makarov *et al.* 2002, Makarova *et al.* 2004, Chen *et al.* 2007, Herold *et al.* 2008, Bessonov *et al.* 2008, Bessonov *et al.* 2010) και μάλιστα επίσης ως συστατικό του συμπλόκου C (Jurica *et al.* 2002, Herold *et al.* 2008, Bessonov *et al.* 2008, Bessonov *et al.* 2010).

1.11 Πιθανός λειτουργικός ρόλος της FRA10AC1

Με βάση τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 γίνεται αντιληπτό ότι ίσως αυτή σχετίζεται με τη διαδικασία της συναρμογής. Μάλιστα ταυτοποιήθηκε και η ίδια ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, και ειδικότερα του συμπλόκου C (Bessonov *et al.* 2008, Bessonov *et al.* 2010). Το γεγονός αυτό συνάδει με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της και με το ότι η πρωτεΐνη είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι οποίοι, σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς, χρησιμοποιούν τη διαδικασία της συναρμογής για την ωρίμανση των πρόδρομων μορίων mRNA.

Η ένταξη της FRA10AC1 στη συγκεκριμένο βιολογική διεργασία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι μία ομάδα γονιδίων, που συσχετίζονται συχνά με νευρολογικές διαταραχές, συμμετέχουν στην επεξεργασία και τη μεταφορά του RNA. Έτσι, στο σύνδρομο του εύθραυστου X, που είναι και η πιο συχνή αιτία κληρονομήσιμης διανοητικής καθυστέρησης και

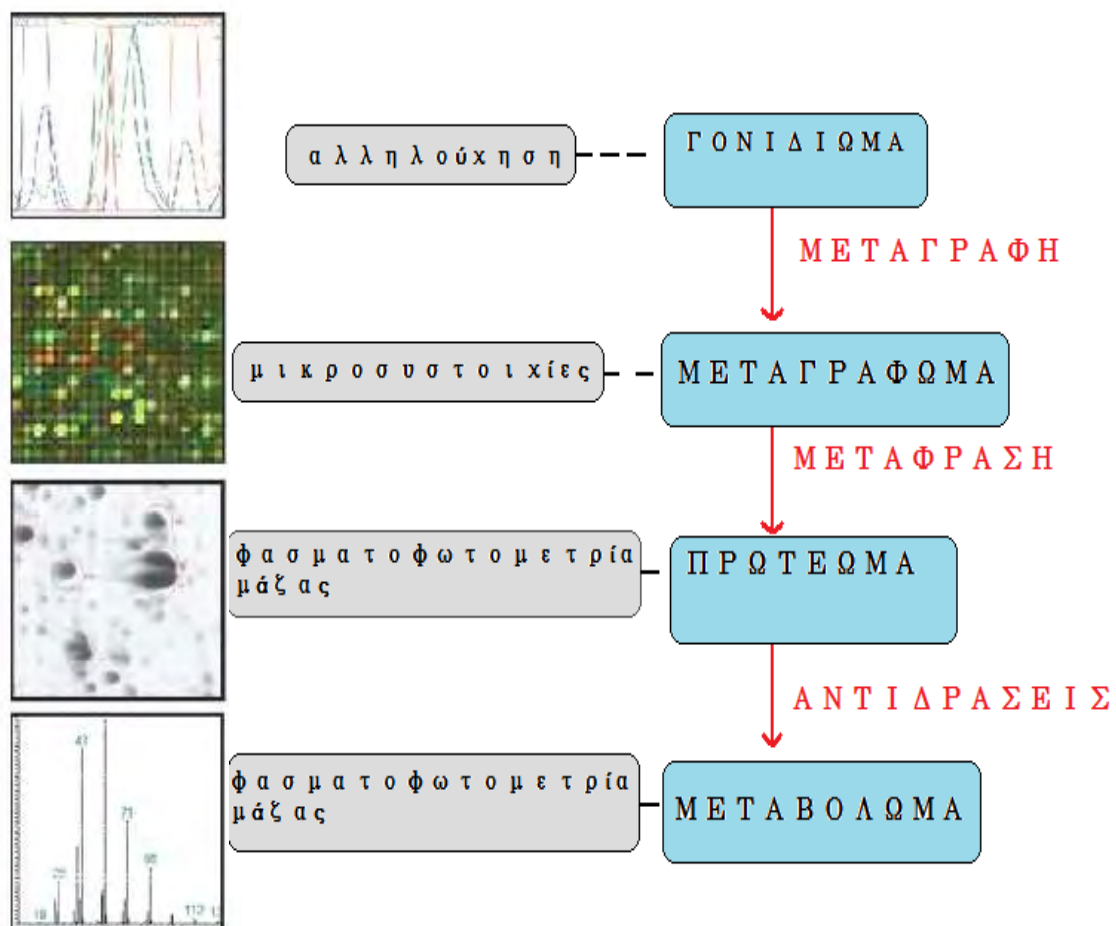
στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλεται στη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου *FMR1* λόγω επέκτασης της τρινουκλεοτιδικής επανάληψης CGG στο 5'UTR του και υπερμεθυλίωσης, βρέθηκε ότι η φυσιολογική λειτουργία της αντίστοιχης πρωτεΐνης FMRP, είναι η σύνδεσή της με συγκεκριμένα mRNAs και η ρύθμιση της μετάφρασής τους στους νευρώνες (Ule 2008). Αλλά και στην περίπτωση της μυοτονικής δυστροφίας (DM), μιας νευρομυϊκής νόσου που σε αρκετές περιπτώσεις συνοδεύεται από διανοητική καθυστέρηση (Dounioli *et al* 2009), η πιο κοινή μεταλλαγή είναι η επέκταση της επανάληψης CTG στο 3' UTR του γονιδίου *DMPK* που κωδικοποιεί μία κυτταροπλασματική πρωτεϊνική κινάση. Σε αυτήν την περίπτωση, η παθολογία σχετίζεται με το mRNA που φέρει την επέκταση και το οποίο ως ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο απορυθμίζει την εναλλακτική συναρμογή μιας συγκεκριμένης ομάδας μορίων mRNA. Στην περίπτωση μιας άλλης νευρομυϊκής νόσου, της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας (SMA), οι μεταλλαγές που έχουν ταυτοποιηθεί, αφορούν τον παράγοντα συναρμογής *SMN1*, που συμμετέχει στο σχηματισμό των snRNPs. Παρόμοια, πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο *FMR2* που χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση FRAXE, η οποία επίσης σχετίζεται με ήπια έως μέτρια διανοητική καθυστέρηση, κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που συνδέεται με RNA και πιθανώς συμμετέχει στη ρύθμιση της εναλλακτικής συναρμογής (Bensaid *et al* 2009). Τα παραπάνω παραδείγματα αφορούν μία σειρά από γονίδια που, όπως και το *FRA10A1*, εμφανίζουν ευρύτατο πρότυπο έκφρασης, παρόλο που οι διαταραχές της δυσλειτουργίας τους αφορούν σχεδόν αποκλειστικά το νευρικό σύστημα και σχετίζονται με ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που ρυθμίζουν την επεξεργασία και τη μεταφορά του RNA, γεγονός που ενισχύει ακόμη περισσότερο την υπόθεση της συσχέτισης του *FRA10A1* με τον παρατηρούμενο φαινότυπο φορέων της εύθραυστης χρωμοσωματικής θέσης FRA10A.

1.12 Λειτουργική ανάλυση γονιδίων σε κυτταρικό επίπεδο με «ομικές» τεχνολογίες

Τη σημερινή εποχή, η αποσαφήνιση των μηχανισμών με τους οποίους λειτουργούν τα πολύπλοκα βιολογικά συστήματα, όπως η μεταγραφή στα ζωντανά κύτταρα, η κυτταρική διαίρεση και ο κυτταρικός θάνατος, η απόκριση στα ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, η επικοινωνία μεταξύ των εκατομμυρίων κυττάρων του

ανθρώπινου εγκεφάλου, είναι μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για τους επιστήμονες.

Την τελευταία δεκαετία, ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών τεχνολογιών υψηλής απόδοσης έχει αναπτυχθεί, διευκολύνοντας την κατανόηση των ποικίλων μοριακών επιπέδων ενός κυττάρου. Οι πειραματικές αυτές τεχνικές διαφέρουν ριζικά από τις παραδοσιακές, χαμηλής απόδοσης τεχνολογίες, καθώς πρωτοτυπούν στον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνεται η πρόσβαση στα πειραματικά δεδομένα των βιολογικών επιστημών. Ειδικότερα, οι πρόσφατα αναπτυγμένες τεχνολογίες, που αναφέρονται ως «ομικές» τεχνολογίες (“-omics”), επιτρέπουν τον ολοκληρωτικό και ακριβή χαρακτηρισμό του γονιδιώματος, του μεταγραφώματος, του πρωτεώματος και του μεταβολώματος (εικόνα 10). Οδηγούν κατ’ επέκταση στη μελέτη των διαφόρων επιπέδων κυτταρικής λειτουργίας σε ευρεία κλίμακα. Το κοινό στοιχείο όλων αυτών των τεχνολογιών είναι ο υψηλός βαθμός αυτοματοποίησης (Fischer, 2005).



Εικόνα 10: Τα βασικά μοριακά επίπεδα ενός κυττάρου, μαζί με τις βιολογικές διαδικασίες που τα συνδέουν μεταξύ τους. Τα κουτάκια αριστερά δείχνουν αντιπροσωπευτικές για κάθε επίπεδο «ομικές» τεχνολογίες που μπορούν να ποσοτικοποιήσουν τα αντίστοιχα βιολογικά επίπεδα με έναν υψηλά αυτοματοποιημένο τρόπο (Fischer, 2005).

Σε αντίθεση με το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας της δεκαετίας του '50, που πρεσβεύει τη ροή πληροφοριών προς τη μία μόνο κατεύθυνση, σήμερα είναι γνωστό ότι οι λειτουργίες του κάθε επιπέδου είναι αποτέλεσμα της δυναμικής αλληλεπίδρασης με τα υπόλοιπα επίπεδα. Η μελέτη ενός μόνο γονιδίου, μεταγράφου, πρωτεΐνης, μεταβολίτη, αγνοώντας τον τρόπο με τον οποίο ενδεχομένως αλληλεπιδρά με άλλα βιομόρια στο ίδιο και στα υπόλοιπα επίπεδα, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια πολύτιμης πληροφορίας για τη λειτουργία του εκάστοτε βιομορίου (Hollywood, 2006). Για την ανάλυση της λειτουργίας του πρωτεϊνικού προϊόντος ενός γονιδίου είναι απαραίτητος ο συνδυασμός των πληροφοριών που μπορούν να αντληθούν από κάθε ολιστικό πρότυπο (Nielsen, 2003).

► **Γεωμική (Genomics)**

Η αντίληψη του γονιδιώματος αφορά τη μελέτη της δομής και λειτουργίας του συνόλου των γονιδίων ενός ζωντανού οργανισμού (Baer *et al.*, 1984). Χρειάστηκαν περίπου 25 χρόνια από την ανακάλυψη της δομής του DNA μέχρι την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων για την αλληλούχηση του γονιδιώματος (Sanger *et al.* 1997). Στο παρελθόν, η αλληλούχηση του DNA πραγματοποιούταν μέσω κλωνοποίησης με τη μέθοδο κατά Sanger. Σήμερα, οι υψηλής απόδοσης τεχνολογίες αλληλούχησης έχουν προκαλέσει επανάσταση στη βιολογική έρευνα. Οι τεχνολογίες αυτές μπορούν να παράγουν τόσα δεδομένα μέσα σε μία ημέρα, όσα εκατοντάδες αλληλουχήσεις DNA κατά Sanger, επιτρέποντας τον ταχύτατο καθορισμό της αλληλουχίας διαφορετικών γονιδιωμάτων και ειδών (Martinez-Gomez *et al.* 2012). Επιπλέον, οι μικροσυστοιχίες για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της γονοτυπικής ανάλυσης (Fischer, 2005).

► **Μεταγραφωμική (Transcriptomics)**

Το μεταγράφομα μπορεί να περιγραφεί στους ζωντανούς οργανισμούς ως το σύνολο όλων των τύπων μορίων RNA που εκφράζονται σε ένα κύτταρο, ιστό, ή ολόκληρο οργανισμό. Στην ουσία, αντανακλά τα γονίδια που εκφράζονται οποιαδήποτε χρονική στιγμή κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Fischer, 2005) και αποκαλύπτει πως η συνολική γονιδιακή έκφραση μεταβάλλεται στις αλλαγές της κυτταρικής ανάπτυξης, της φυσιολογίας και του περιβάλλοντος. Οι τεχνολογίες μικροσυστοιχιών DNA, επιτρέπουν τη συστηματική απόκτηση ποσοτικών

πληροφοριών για το μεταγραφικό επίπεδο όλων των γονιδίων σε ένα κύτταρο αλλά και για την εναλλακτική συναρμογή που αποτελεί πλέον κανόνα για τα γονίδια του ανθρώπου (Fischer, 2005).

► **Πρωτεωμική (Proteomics)**

Το πρωτέωμα αφορά το σύνολο όλων των πρωτεϊνών που είναι παρούσες σε ένα κύτταρο, ιστό ή ολόκληρο ζωντανό οργανισμό (Pandey and Mann, 2000). Περιλαμβάνει τη λειτουργική μελέτη των πρωτεϊνών και την ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Pukkila 2001). Εφόσον το πρωτέωμα ενός κυττάρου δεν είναι μια απλή αντανάκλαση του μεταγραφώματός του, απαιτούνται τεχνολογίες άμεσα βασισμένες στις πρωτεΐνες. Εκτός από τις μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών και τη φασματομετρία μάζας, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνολογία στη μελέτη του πρωτεώματος είναι η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D-gel electrophoresis, Martinez-Gomez *et al.* 2012).

► **Μεταβολομική (Metabolomics)**

Μεταβολομική είναι η μελέτη των μορίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό (μεταβολιτών) σε έναν ζωντανό οργανισμό (Martinez-Gomez *et al.* 2012). Αφορά τον καθορισμό της ικανότητας ενός κυττάρου, ιστού ή ολόκληρου οργανισμού να συνθέτει μικρά μόρια, δηλαδή μεταβολίτες (Fiehm, 2002). Σημαντικά βιολογικά γεγονότα μπορούν να εξηγηθούν μόνο σε μεταβολικό επίπεδο, όπως οι μηχανισμοί γονιδιακής ρύθμισης που ελέγχονται πρωταρχικά από τις κυτταρικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών. Σήμερα, η πιο χρήσιμη τεχνολογία μεταβολομικής είναι η χρωματογραφία αερίων σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS, Martinez-Gomez *et al.* 2012).

Η ταχύτατη ανάπτυξη των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης οδήγησε στην ανάγκη διαχείρισης των καινούριων δεδομένων, γεγονός που κατέστη εφικτό με την πρόοδο της επιστήμης της βιοπληροφορικής. Πολλά από αυτά τα δεδομένα, είναι καταχωρημένα σε δημόσιες, ελεύθερα προσβάσιμες βάσεις δεδομένων (Barga *et al.*, 2011; Morrison *et al.*, 2006).

1.13 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποτελεί κομμάτι της ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας για τη λειτουργική ανάλυση του γονιδίου *FRA10AC1* και τον προσδιορισμό του βιολογικού του ρόλου σε κυτταρικό επίπεδο. Αναλυτικότερα, στοχεύει στη δημιουργία εργαλείου για τη λειτουργική μελέτη του γονιδίου αξιοποιώντας τις «ομικές» τεχνολογίες, με σκοπό τη διερεύνηση του μεταγραφικού, πρωτεϊνικού και μεταβολικού προτύπου ενός κυτταρικού μοντέλου με τροποποιημένη την ενεργότητα του *FRA10AC1*. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό φάσμα των συνεπειών της δυσλειτουργίας του.

Ειδικότερα, η εργασία στοχεύει στη δημιουργία κυτταρικής σειράς *HeLa* στην οποία έχει ενσωματωθεί και εκφράζεται το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης TeTR. Η σταθερή αυτή κυτταρική σειρά θα χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την τροποποίηση της ενεργότητας (υπερέκφραση και καταστολή) του *FRA10AC1*, καθώς σε αυτή θα ενσωματωθεί επίσης και ένα διαγονίδιο που θα περιλαμβάνει το cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* ή short-hairpin RNAs (shRNAs) που θα στοχεύουν το γονίδιο αυτό.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

2.1.1 Κυτταρικές σειρές θηλαστικών

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά *HeLa*, η οποία προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου από αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας. Τα κύτταρα *HeLa* αναπτύσσονται σχηματίζοντας μονοστοιβάδες, σε φλάσκες ή τρυβλία. Ειδικότερα, η κυτταροκαλλιέργεια διατηρήθηκε σε φλάσκες (T-75 ή T-25), ενώ οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 3 ή 10 cm.

Η κυτταρική σειρά καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με εμβρυικό ορό βοοειδούς και αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη για αποφυγή μολύνσεων από μικροοργανισμούς.

Ο χειρισμός και η ανάπτυξη όλων των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο (cell culture room). Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο, στους 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Επίσης στον κλίβανο τοποθετείται αποστειρωμένο νερό σε ειδικό σκεύος το οποίο ανανεώνεται τακτικά.

Τα κύτταρα φυλάσσονται παροδικά σε θερμοκρασία -80°C, ενώ η μακροχρόνια συντήρησή τους γίνεται σε δεξαμενή υγρού αζώτου (-196°C ως -156°C). Η παρατήρηση των κυττάρων γίνεται σε οπτικό μικροσκόπιο.

2.1.2 Διαλύματα για ανάπτυξη και διατήρηση των κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- Θρεπτικό μέσο DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): με το θρεπτικό αυτό μέσο παρέχονται στα κύτταρα αμινοξέα, βιταμίνες καθώς και άλλα πρόσθετα συστατικά απαραίτητα για την καλλιέργειά τους. Διατηρείται στους 4°C και περιέχει 4,5g/L γλυκόζη, L- γλουταμίνη και πυροσταφυλικό οξύ (GIBCO, Cat. No.: 41966).
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X (Phosphate Buffered Saline): Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιείται για τις πλύσεις των κυττάρων, ώστε να διατηρείται σταθερό το pH. Διατηρείται στους 4°C. Έχει pH=7.4 και δεν περιέχει CaCl₂ και MgCl₂ (GIBCO, Cat No.: 10010).

- Παγκρεατικό ένζυμο θρυψίνη 1X (trypsin): το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται για τη θρυψινοποίηση των κυττάρων, με σκοπό την αποκόλλησή τους από την επιφάνεια ανάπτυξης κατά την ανακαλλιέργεια. Βρίσκεται σε μορφή διαλύματος με EDTA 10%. Χρησιμοποιείται σε τελική αραίωση 1:10 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, και διατηρείται στους -20°C (GIBCO, Cat No.: 15400-054).
- Κρυοπροστατευτικό μέσο DMSO (Dimethyl sulphoxide): χρησιμοποιήθηκε για την κρυοδιατήρηση των κυττάρων *HeLa* (SIGMA, Cat No.: D2650).
- FBS (Fetal Bovine Serum): έχει υψηλή περιεκτικότητα σε εμβρυϊκούς αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων. Προστίθεται σε τελική συγκέντρωση 10% στο θρεπτικό μέσο DMEM. Διατηρείται στους -20°C. (Cat. No.: 10270, GIBCO).
- Διάλυμα πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης (Penicyllin/Streptomycin): το διάλυμα αυτό περιέχει πενικιλίνη 10000 U/ml και στρεπτομυκίνη 10000 µg/ml. Προστίθεται σε τελική συγκέντρωση 1% στο θρεπτικό μέσο DMEM (τελική συγκέντρωση πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης 100 U/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα). Διατηρείται στους -20°C (GIBCO, Cat. No.: 15140).

2.1.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων *HeLa*

Ο διαχωρισμός και η συλλογή των κυττάρων γίνεται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους, δηλαδή όταν έχουν καλύψει ~80% της διαθέσιμης επιφάνειας και η ανάπτυξή τους δεν παρεμποδίζεται από την έλλειψη χώρου. Σε πολλά είδη κυττάρων, όταν παρατηρείται έλλειψη χώρου, αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και τροποποιούνται οι μεταβολικές τους διαδικασίες. Ορισμένα μάλιστα είδη κυττάρων όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη επιφάνεια για να προσκολληθούν, πεθαίνουν, αποκολλώνται και αιωρούνται στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Επομένως, η ανακαλλιέργειά τους θα πρέπει να πραγματοποιείται σε τακτά χρονικά διαστήματα (3-4 μέρες), έτσι ώστε να διασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμός των κυττάρων για πειράματα αλλά και η ομαλή τους ανάπτυξη. Η αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα καλλιέργειάς τους μπορεί να γίνει με μηχανικό τρόπο, με χημικά μέσα ή με ενζυμική δράση.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, για την αποκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η πρωτεάση θρυψίνη (διαλυμένη σε EDTA που είναι χηλικό αντιδραστήριο), η οποία πρωτεολύει τις πρωτεΐνες σε ειδικές θέσεις, μετά από τη λυσίνη ή την αργινίνη. Με τον τρόπο αυτό διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το στερεό τους υπόστρωμα, για να ακολουθήσει ανακαλλιέργεια (ή άλλοι πειραματικοί χειρισμοί). Η θρυψινοποίηση των κυττάρων έγινε ως εξής:

- Προθέρμανση σε υδατόλουτρο (37°C) των εξής: θρεπτικού μέσου DMEM εμπλουτισμένου με FBS και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, διαλύματος πλύσης PBS 1x και διαλύματος θρυψίνης (σε 1x PBS).
- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τα κύτταρα.
- Έκπλυση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1xPBS, pH 7,4.
- Επώαση με θρυψίνη σε κατάλληλη αραιώση 1:10 (~1 ml στη μικρή φλάσκα T-25, 3 ml στην T-75 και 2ml στο τρυβλίο), ήπια ανάδευση μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας ή του τρυβλίου και κατόπιν έντονη ανάδευση, μηχανικά με χτύπημα με το χέρι, προκειμένου να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων (3-5min συνολικά).
- Προσθήκη θρεπτικού DMEM (~5 ml στη μικρή φλάσκα T-25, ~10 ml στη μεγάλη T-75 και 5ml στο τρυβλίο), το οποίο περιέχει ορό. Με τον τρόπο αυτό, η θρυψίνη αποικοδομεί τις πρωτεΐνες του ορού και έτσι αναστέλλεται η δράση της έναντι των πρωτεϊνών των κυττάρων.
- Πιπετάρισμα για τη διάλυση τυχόν κυτταρικών συσσωματωμάτων που έχουν απομείνει.
- Τοποθέτηση της φλάσκας στον επωαστήρα αφήνοντας λίγο ανοικτό το καπάκι ώστε να είναι δυνατή η είσοδος CO_2 (εάν η φλάσκα δεν έχει φίλτρο).

2.1.4 Κρυοδιατήρηση κυττάρων *HeLa*

Η κρυοδιατήρηση των κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί με σταδιακή μετάβασή τους στην τελική θερμοκρασία κατάψυξης, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης, η κατάψυξή τους

επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός κρυοπροστατευτικού παράγοντα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Δύο πλύσεις με 1x PBS.
- Θρυψινοποίηση.
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση για 7 min στις 1000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Επαναιώρηση της πελλέτας των κυττάρων σε θρεπτικό DMEM εμπλουτισμένο με FBS και πενικιλίνη/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 DMEM με 20% DMSO. Η προσθήκη του διαλύματος αυτού γίνεται σταγόνα-σταγόνα με συνεχή ανάδευση. Αυτό συμβαίνει γιατί το DMSO, το οποίο χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό μέσο, όταν προστίθεται στα κύτταρα προκαλεί αύξηση θερμοκρασίας. Έτσι προστίθεται σταγόνα-σταγόνα προκειμένου η αύξηση αυτή να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, ενώ παράλληλα αποτρέπεται το οσμωτικό σοκ των κυττάρων.
- Μεταφορά του δείγματος σε κατάλληλο φιαλίδιο (cryovial) το οποίο, για λόγους μόνωσης, τυλίγεται με χαρτί.
- Επώαση για 1h στους -20°C .
- Παραμονή του δείγματος στους -80°C ολονύκτια.
- Αποθήκευση σε δεξαμενή υγρού αζώτου (-196°C ως -156°C), όπου τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν εκεί επ' αόριστον.

2.1.5 Επανακαλλιέργεια κυττάρων *HeLa*

Τα κύτταρα που έχουν αποθηκευτεί σε υγρό άζωτο μπορούν να επανακαλλιεργηθούν. Η διαδικασία αυτή γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες και όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου τα κύτταρα να μην εκτεθούν στο DMSO, το οποίο μπορεί να δράσει τοξικά, καθώς και για να αποφευχθεί ο σχηματισμός ενδοκυτταρικών κρυστάλλων κατά τη διαδικασία της ενυδάτωσής τους. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- Μεταφορά των κυττάρων από το υγρό άζωτο απευθείας στους 37⁰C. Ήπια ανάδευση μέχρι την πλήρη τήξη του θρεπτικού μέσου (1-2 min).
- Μεταφορά σε φλάσκα που έχει ήδη προστεθεί DMEM (με 10% FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη).
- Καλλιέργεια των κυττάρων σε επωαστήρα.

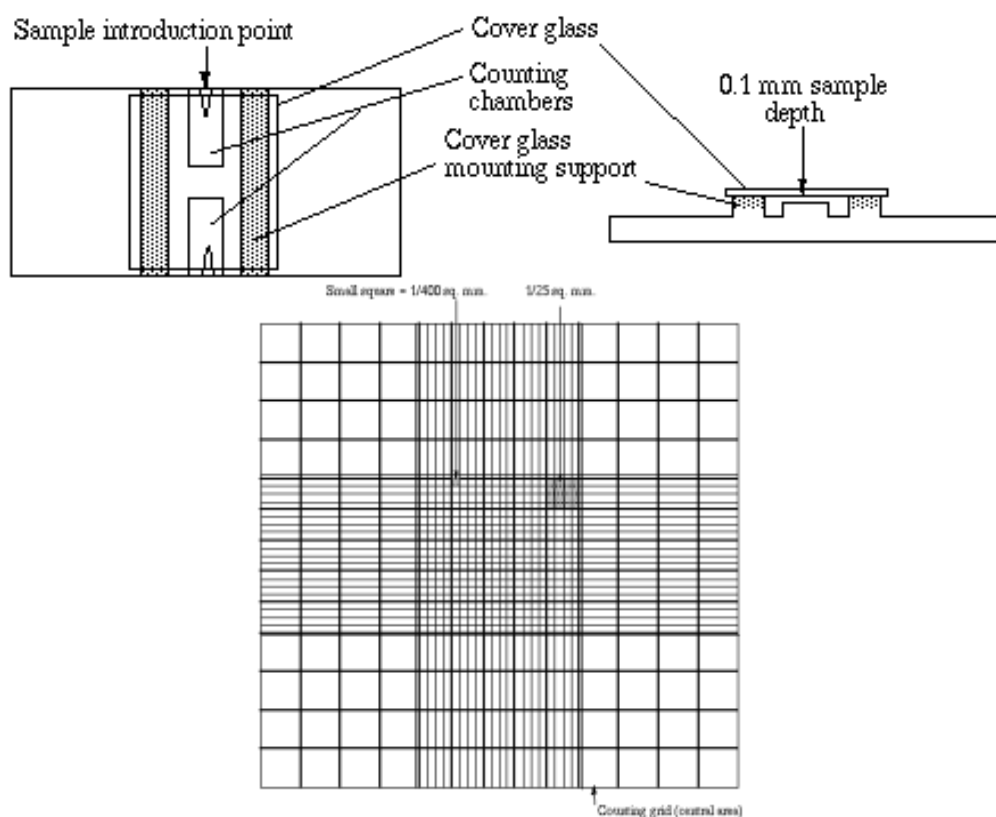
2.1.6 Μέτρηση αριθμού κυττάρων *HeLa*

Στις κυτταροκαλλιέργειες απαιτείται συχνά η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για το σκοπό αυτό είναι η χρήση του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer). Αποτελεί την πιο άμεση, απλή και οικονομική μέθοδο για τη μέτρηση κυττάρων. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των κυττάρων *HeLa* πριν τη διαμόλυνση.

Το αιμοκυτταρόμετρο (Εικόνα 11) είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα. Αποτελείται από δύο λείες επιφάνειες, καθεμία από τις οποίες διαθέτει διαγράμμιση τετραγωνισμένου πλέγματος. Το πλέγμα αυτό περιέχει εννέα κύρια τετράγωνα με εμβαδόν 1 mm² (δηλ. μήκος πλευράς 1 mm). Κάθε τετράγωνο ορίζεται από τρεις παράλληλες ισαπέχουσες γραμμές (απέχουν 2,5 μm), με βάση τις οποίες καθορίζεται εάν τα κύτταρα βρίσκονται εντός ή εκτός του τετραγώνου. Κάθε τετράγωνο διαιρείται επιπλέον σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα, ώστε να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται μόνο με βάση τα τέσσερα εξωτερικά-κύρια τετράγωνα, ενώ τα υπόλοιπα είναι διατεταγμένα σε μορφή ‘σταυρού’ και διαχωρίζουν τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες. Το διαβαθμισμένο πλέγμα με τα κύρια τετράγωνα βρίσκεται 0,1 mm χαμηλότερα από δύο παράλληλες προεξοχές, τις «ράχες» του αιμοκυτταρόμετρου, στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Ανάμεσα στην εξωτερική πλευρά της λείας τετραγωνισμένης επιφάνειας και στις «ράχες» όπου στηρίζεται η καλυπτρίδα υπάρχει μια αυλάκωση, στην οποία εισάγεται το κυτταρικό εναιώρημα και απλώνεται με τριχοειδείς δυνάμεις στη διαβαθμισμένη επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου. Επειδή ο όγκος που καταλαμβάνει το κυτταρικό εναιώρημα σε καθένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 0,1 mm³ ή 0,1μl, ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων γίνεται ως εξής (<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>):

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

Ο αριθμός των κυττάρων ανά τετράγωνο αντιστοιχεί στο μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων των τεσσάρων εξωτερικών-κύριω τετραγώνων.



Εικόνα 11: Απεικόνιση του αιμοκυτταρόμετρου (πάνω) και των τετραγώνων που περιέχει (κάτω). Φαίνεται το σημείο εισαγωγής του κυτταρικού εναιωρήματος sample introduction point). Απεικονίζονται επίσης τα τετράγωνα σε μορφή 'σταυρού' που διαχωρίζουν τα τέσσερα εξωτερικά-κύρια τετράγωνα που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων στο εναιώρημα (<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>).

Για τη μέτρηση των κυττάρων *HeLa* ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Πλύση των κυττάρων με 1x PBS.
- Επεξεργασία με θρυψίνη.
- Συλλογή των κυττάρων σε falcon με φυγοκέντρηση (8 min, 1000 rpm, RT).
- Προσεχτική αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Επαναιώρηση της πελέττας των κυττάρων σε 10ml θρεπτικό DMEM.
- Λήψη 10 μl από το εναιώρημα με τη χρήση πιπέτας και τοποθέτησή τους στην ειδική αυλάκωση του αιμοκυτταρόμετρου.
- Μέτρηση των κυττάρων που τοποθετούνται στα εξωτερικά-κύρια τετράγωνα με παρατήρηση στο μικροσκόπιο.
- Υπολογισμός του αριθμού τους στο εναιώρημα με βάση τον παραπάνω τύπο.

- Υπολογισμός και μεταφορά της κατάλληλης ποσότητας εναιωρήματος στο προς ανάπτυξη τριβλίο. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται με βάση τον επιθυμητό, για το πείραμα, αριθμό κυττάρων που πρέπει να τοποθετηθεί στο τριβλίο. Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκαν 10^6 κύτταρα ανά τριβλίο διαμέτρου 10cm ώστε να διαμολυνθούν στη συνέχεια με το φορέα pcDNA 6TR.

2.1.7 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς *HeLa*

Υπό κατάλληλες συνθήκες, μόρια ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA μπορεί να εισαχθούν και να ενσωματωθούν στον πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων όπου είναι δυνατόν να εκφραστούν. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η μελέτη της λειτουργίας και της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων. Η διαδικασία εισαγωγής γονιδίου σε κύτταρα ονομάζεται διαμόλυνση και η επακόλουθη έκφραση του γονιδίου μπορεί να είναι μόνιμη (stable), εφόσον το ξένο DNA ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα, ή παροδική (transient), εφόσον δεν ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα αλλά αποδομείται μετά την παρέλευση ενός μιτωτικού κύκλου (Watson *et al*, 2007).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, δημιουργήθηκε σταθερή κυτταρική σειρά *HeLa* που εκφράζει το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης (TetR). Το γονίδιο αυτό περιέχεται στο πλασμίδιο pcDNA 6TR, στο οποίο υπάρχει και το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό βλαστισιδίνη. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων *HeLa* με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA 6TR και επιλογή των κυττάρων που έλαβαν το πλασμίδιο με βλαστισιδίνη (<http://www.invitrogen.com>).

A) Επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικού-βλαστισιδίνης

Το πρώτο βήμα ήταν ο καθορισμός της ελάχιστης συγκέντρωσης βλαστισιδίνης που είναι ικανή να σκοτώσει τα κύτταρα εκείνα που δεν θα λάβουν το πλασμίδιο. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων βλαστισιδίνης για να καθοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (<http://www.invitrogen.com>, υποσημείωση: στο manual της εταιρείας οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις είναι λάθος, δηλ. αντί $\mu\text{g/ml}$ αναφέρονται ως mg/ml). Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Επίστρωση των κυττάρων *HeLa* σε τρυβλία (6 well plate), έτσι ώστε να καλύπτουν το ~25% της διαθέσιμης επιφάνειας καλλιέργειας. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν αραιά ώστε να μπορεί να δράσει η βλαστισιδίνη.
- Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού και προσθήκη θρεπτικού με βλαστισιδίνη (2,5ml/well) σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml, 15μg/ml και 20μg/ml.
- Αλλαγή του θρεπτικού με τη βλαστισιδίνη κάθε 4 μέρες για 2 εβδομάδες. Τα κύτταρα που είναι ευαίσθητα στη βλαστισιδίνη πεθαίνουν, αποκολλούνται από την επιφάνεια του τριβλίου και αιωρούνται στο θρεπτικό μέσο.

Η ελάχιστη συγκέντρωση βλαστισιδίνης που επιλέχθηκε και στην οποία πεθαίνουν όλα τα κύτταρα σε διάστημα 10 ημερών ήταν 10μg/ml.

B) Διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA 6TR

Σε πρώτο στάδιο, επανακαλλιεργήθηκαν κύτταρα *HeLa* (από υγρό άζωτο) σε μικρή φλάσκα. Κατόπιν, όταν τα κύτταρα έφθασαν σε κάλυψη 80-90%, έγινε θρυψινοποίηση, καταμέτρησή τους και επιστροφή 3 τρυβλίων διαμέτρου 10cm με 10^6 κύτταρα το καθένα.

Η διαμόλυνση των κυττάρων *HeLa* έγινε τόσο με κυκλικό υπερελικωμένο φορέα pcDNA 6TR, όσο και με γραμμικό, μετά από πέψη του με το ένζυμο περιορισμού *AhdI*. Η γραμμοποίηση του φορέα δεν αυξάνει την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης, αλλά τις πιθανότητες ενσωμάτωσης του φορέα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μη διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *TetR* ή άλλα στοιχεία που απαιτούνται για την έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών (<http://www.invitrogen.com>). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων και με το γονίδιο GFP, το οποίο χρησιμοποιήθηκε τόσο ως θετικός έλεγχος για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης με μικροσκόπιο φθορισμού όσο και ως αρνητικός έλεγχος για την επιβεβαίωση ότι όλα τα κύτταρα που δεν είναι ανθεκτικά τελικά δεν θα επιβιώσουν. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη συγκατακρήμιση του DNA με $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Με την προσθήκη του $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ στο διάλυμα του DNA δημιουργούνται σύμπλοκα (με τη μορφή λεπτών κρυστάλλων) μεταξύ του DNA και θετικών φορτισμένων μορίων-φορέων, τα οποία προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη και εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύτωση (Orgrantia & Chang, 1990).

Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε 24h μετά την επίστρωση των τριβλίων. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το παρακάτω:

- Αλλαγή θρεπτικού υλικού στα τρία τριβλία 1h- 2h πριν τη διαμόλυνση.
- Προετοιμασία των δειγμάτων σε falcons (τρία falcons, ένα για κάθε τριβλίο). Προσθήκη 20μg πλασμιδιακού (1 τριβλίο) ή γραμμικού (2 τριβλία) DNA και ρύθμιση του όγκου με νερό στα 450μl. Το DNA πρέπει να είναι άριστης ποιότητας όσον αφορά την καθαρότητά του.
- Προσθήκη επιπλέον σε κάθε falcon 50μl CaCl_2 2,5 M με καλή ανάμιξη του μίγματος.
- Σταδιακή προσθήκη με ταυτόχρονη ανάμιξη 500μl διαλύματος 2x HEBS (280mM NaCl, 50mM HEPES, 5mM Na_2HPO_4 , pH 7,12). Επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου για να σχηματιστούν τα σύμπλοκα DNA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Σε αυτό το χρόνο αυξάνει λίγο η θολότητα του δείγματος επειδή σχηματίζονται τα σύμπλοκα. Ωστόσο, τα σύμπλοκα δεν θα πρέπει να είναι ορατά γιατί τότε θα είναι υπερβολικά μεγάλα και δεν θα υπάρχει δυνατότητα φαγοκυττάρωσής τους. Επίσης, σε αυτό το στάδιο είναι σημαντικό να μην είναι υψηλή η θερμοκρασία του χώρου-σε αυτήν την περίπτωση μειώνεται ο χρόνος επώασης.
- Προσθήκη του μίγματος σταγόνα-σταγόνα στα κύτταρα.
- Επώαση των κυττάρων για 24h.
- Έκπλυση των κυττάρων δυο φορές με διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1xPBS και αλλαγή θρεπτικού μέσου DMEM (χωρίς βλαστιδίνη).
- Επώαση των κυττάρων για 24h στον κλίβανο.
- Θρυψινοποίηση για να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια του τριβλίου και να μειωθεί η κάλυψη για την προσθήκη της βλαστισιδίνης. Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα κάθε τριβλίου μοιράζονται σε 3 καινούρια τριβλία. Στο τριβλίο στο οποίο έγινε διαμόλυνση με το γονίδιο GFP, διατηρήθηκε μόνο το 1/3 των κυττάρων ενώ μικρός αριθμός τους (~50.000) προστέθηκε σε τριβλίο διαμέτρου 3cm μαζί με μια καλυπτρίδα, για την παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο φθορισμού.
- Αλλαγή θρεπτικού και προσθήκη θρεπτικού με αντιβιοτικό (βλαστισιδίνη) συγκέντρωσης 10μg/ml μετά από ~12h.
- Επώαση των κυττάρων και αλλαγή του θρεπτικού με το αντιβιοτικό κάθε ~3 μέρες, ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν από τη βλαστισιδίνη. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τρεις αλλαγές.

Γ) Επιλογή κλώνων κυττάρων *HeLa* ανθεκτικών στη βλαστισιδίνη

Η καλλιέργεια των κυττάρων *HeLa* σε θρεπτικό υλικό μαζί με το αντιβιοτικό οδηγεί στην ανάπτυξη εκείνων των κυττάρων που είναι ανθεκτικά στη βλαστισιδίνη, δηλαδή έχουν προσλάβει το φορέα pcDNA 6TR που φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αυτό. Τα κύτταρα *HeLa* που είναι ανθεκτικά στη βλαστισιδίνη απλώνονται στην επιφάνεια του τρυβλίου και σχηματίζουν αποικίες. Τα μη ανθεκτικά κύτταρα, πεθαίνουν, αποκολλούνται από την επιφάνεια του τρυβλίου και αιωρούνται στο θρεπτικό μέσο. Η επιλογή των κυττάρων που έχουν προσλάβει το φορέα μετά από διαμόλυνση έγινε ως εξής:

- Επιλογή αποικιών από κάθε τρυβλίο. Το συγκεκριμένο βήμα πραγματοποιείται στο μικροσκόπιο, όπου επιλέγονται μερικές αποικίες και σημειώνονται με μαρκαδόρο στην εξωτερική επιφάνεια του τρυβλίου.
- Αφαίρεση των γειτονικών κυττάρων από τις σημειωμένες αποικίες ώστε να μην συλλεχθούν και κύτταρα μη ανθεκτικά. Το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πλαστικού tip.
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από κάθε τρυβλίο και έκπλυση με 1x PBS. Απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος.
- Τοποθέτηση ειδικών αποστειρωμένων κυλίνδρων (cloning cylinders, Sigma, C1059-1EA, volume 150μl) πάνω από κάθε σημειωμένη αποικία, με τη χρήση λαβίδας. Αυτοί οι κύλινδροι έχουν μικρή διάμετρο (8mm), έτσι ώστε να περιβάλλουν κάθε σημειωμένη αποικία (Εικόνα 12). Στερεοποιούνται γύρω από την αποικία με τη βοήθεια βαζελίνης.



Εικόνα 12: Κύλινδρος απομόνωσης κλώνων.

- Προσθήκη 20μl θρυψίνης ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα της αποικίας από την επιφάνεια του τρυβλίου.
- Επώαση με τη θρυψίνη για ~5min στον κλίβανο. Ανάδευση του περιεχομένου κάθε κυλίνδρου με πιπετάρισμα.

- Προσθήκη ~100μl θρεπτικού με βλαστισιδίνη μέσα σε κάθε κύλινδρο που έχει θρυψίνη. Ήπια ανάδευση και μεταφορά σε 96- ή 24-well plates (ανάλογα με το μέγεθος της αποικίας).
- Επώαση των κυττάρων και αλλαγή του θρεπτικού κάθε 3 μέρες περίπου, ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA

Οι τεχνικές που αναφέρονται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν ώστε να απομονωθεί μεγάλη ποσότητα υπερκάθαρου πλασμιδιακού και γραμμικού DNA του φορέα pcDNA 6TR, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων *HeLa*.

2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών δεκτικών κυττάρων *E. coli*

Δεκτικό (competent) ονομάζεται ένα κύτταρο ικανό να δεχθεί εξωγενώς κάποιο μόριο DNA και να μετασηματιστεί. Λίγα στελέχη βακτηρίων είναι εγγενώς δεκτικά. Στα περισσότερα βακτήρια που φυσιολογικά έχουν την ικανότητα μετασηματισμού, η δεκτικότητα είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία. Η εύρεση μεθόδων επαγωγής της δεκτικότητας σε διάφορα βακτήρια απαιτεί μια σειρά πειραματικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν π.χ. ποικίλα θρεπτικά υλικά και συγκεκριμένη θερμοκρασία (Madigan *et al*, 2005).

Στο συγκεκριμένο πείραμα παρασκευάστηκαν δεκτικά κύτταρα *E.coli* του στελέχους *DH5a*. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Επίστρωση σε θρεπτικό LB agar κυττάρων *E. coli* στελέχους DH5a και ολονύκτια επώαση στους 37°C για την ανάπτυξη των βακτηριακών αποικιών.
- Επιλογή μιας μοναδιαίας αποικίας και ανάπτυξή της σε υγρό θρεπτικό LB στους 37°C για 18 ώρες. Μεταφορά 1 ml από την υγρή καλλιέργεια σε 100 ml θρεπτικού LB σε κωνική φιάλη του 1 lt. Επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση στις 200rpm, μέχρι τιμή οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) 0,7-0,8, ώστε τα κύτταρα να είναι σε εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Μεταφορά της υγρής καλλιέργειας από την κωνική φιάλη σε falcons των 50ml και επώαση σε πάγο για 10min.
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 20min σε θερμοκρασία 4°C.

- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση της πελέττας βακτηρίων σε 30ml παγωμένου διαλύματος 80 mM MgCl₂-20 mM CaCl₂. Επώαση σε πάγο για 20min.
- Επαναφυγοκέντρωση όπως προηγουμένως και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Επαναιώρηση της κάθε πελέττας σε 2ml παγωμένου διαλύματος 0,1M CaCl₂ και προσθήκη 70μl κρυοπροστατευτικού DMSO (Dimethyl sulfoxide).
- Ήπια ανάδευση και προσθήκη επιπλέον 70μl DMSO. Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένα erpendorfs. Συνολικά παρασκευάζονται ~20 aliquots, των 200μl το κάθε ένα, δεκτικών κυττάρων DH5a τα οποία φυλάσσονται στους -80°C.

2.2.2 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Μετασηματισμός είναι ο μηχανισμός κατά τον οποίον βακτηριακά δεκτικά κύτταρα δέχονται μόρια DNA από το περιβάλλον. Πηγή του DNA αποτελούν τα πλασμίδια. Σε λίγα μόνο βακτήρια παρατηρείται φυσικός μετασηματισμός υψηλής απόδοσης (Madigan *et al*, 2005). Η αποτελεσματικότητα του μετασηματισμού *in vitro* στα βακτήρια βελτιώνεται, αν πριν από την προσθήκη του πλασμιδιακού DNA τα κύτταρα υποβληθούν σε επεξεργασία με ορισμένα άλατα και υποστούν ένα σύντομο θερμικό σοκ (Watson *et al*, 2007).

Στην παρούσα εργασία μετασηματίστηκαν δεκτικά βακτήρια *E.coli* του στελέχους DH5a με πλασμιδιακό DNA του φορέα pcDNA 6TR, ώστε τελικά (βλ. επόμενη παράγραφο) να απομονωθεί μεγάλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA. Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Μεταφορά ενός δείγματος δεκτικών κυττάρων (~200μl) από τους -80°C σε πάγο.
- Επώαση για 10 min ώστε να πραγματοποιηθεί η τήξη του δείγματος.
- Προσθήκη λίγων ng πλασμιδιακού DNA πόσο??? και ήπια ανάδευση.
- Επώαση σε πάγο για 20 min, κατά την οποία το DNA έρχεται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη των δεκτικών βακτηρίων.
- Επώαση του δείγματος στους 42°C για 90 sec σε υδατόλουτρο και άμεση μεταφορά στον πάγο για 1 min. Έτσι τα βακτήρια υφίστανται θερμικό σοκ, ανοίγουν οι πόροι της κυτταρικής τους μεμβράνης και καθίσταται δυνατή η είσοδος του DNA στο εσωτερικό τους.

- Προσθήκη 1 mL υγρού θρεπτικού LB και επώαση για 1h στους 37°C ώστε να εκφραστεί το γονίδιο ανθεκτικότητας του πλασμιδίου στα βακτήρια και να είναι δυνατή η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων.
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT).
- Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού αφήνοντας ελάχιστη ποσότητα για την επαναιώρηση της πελλέτας των κυττάρων.
- Επίστρωση των κυττάρων σε αποστειρωμένο και στεγνό τρυβλίο Petri με το κατάλληλο αντιβιοτικό (το ίδιο με αυτό που περιέχει το πλασμίδιο).
- Επώαση στους 37°C ολονύκτια για την ανάπτυξη των βακτηριακών αποικιών.

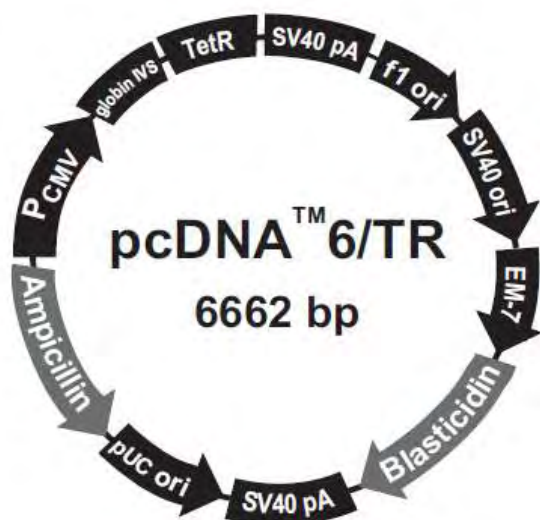
2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA του φορέα pcDNA 6TR σε μεγάλη κλίμακα

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA του φορέα pcDNA 6TR σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκε για τη δημιουργία επαρκούς αλλά και καθαρής ποσότητας DNA, που χρησιμοποιήθηκε για διαμόλυνση κυττάρων *HeLa*.

- Από τις μοναδιαίες αποικίες των μετασχηματισμένων βακτηρίων (βλ. προηγούμενη παράγραφο) επιλέχθηκε μία η οποία και καλλιιεργήθηκε σε 2 ml LB υγρού θρεπτικού υλικού με το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμικικιλίνη) στους 37°C μέχρι την εκθετική φάση.
- Εμβολιασμός 400 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με την καλλιέργεια από το προηγούμενο βήμα και ολονύκτια επώαση
- Μεταφορά της υγρής καλλιέργειας σε falcons 50ml (8 συνολικά) και συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 30min στους 4°C.
- Άμεση απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού και επαναιώρηση των κυττάρων σε διάλυμα P1 (15mM Tris-Cl pH=8, 10mM EDTA pH=8), (5 ml για κύτταρα που προέρχονται από 50 ml καλλιέργεια). Η επαναιώρηση γίνεται ήπια και πρέπει να είναι πλήρης ώστε να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων.
- Προσθήκη 5ml διαλύματος αποδιάταξης P2 (200mM NaOH, 1% SDS). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 5-10 min μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.

- Προσθήκη 5ml ρυθμιστικού διαλύματος P3 (3M οξικό κάλιο pH 5,5) για την αντίστοιχη εξουδετέρωση. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση στον πάγο για 15 min.
- Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 3000 rpm στους 4°C για 30 min.
- Συλλογή του υπερκείμενου αποφεύγοντας τα συσσωματώματα, διήθηση με υαλοβάμβακα και επαναληπτική φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρά falcons και κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με την προσθήκη ισοπροπανόλης (0,8 του όγκου του υπερκείμενου), ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 3000 rpm στους 4°C για 30 min.
- Έκπλυση του DNA με 70% αιθανόλη, ξήρανση της πελέττας και επαναδιάλυση σε ~0,5ml δις απιονισμένου νερού.
- Διαδοχικές εκχύσεις με φαινόλη-χλωροφόρμιο μέχρι να είναι εντελώς καθαρή η μεσόφαση.
- Συλλογή του υπερκείμενου το οποίο περιέχει το DNA και επανακατακρήμνιση με οξικό νάτριο (CH₃COONa, 1/10 του υπερκείμενου του διαλύματος) συγκέντρωσης 3M, pH=5.2 και απόλυτη αιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 70-75%.
- Ήπια ανάδευση και συλλογή του DNA με φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min στους 4°C
- Έκπλυση της πελέττας με 70% αιθανόλη, στέγνωμα και επαναδιάλυση συνολικά σε 1-2 ml δις απιονισμένο νερό.
- Επώαση με RNAση σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml για 1h στους 37°C.
- Επώαση με πρωτεϊνάση K σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml για 2h στους 55°C σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα 1x (50mM Tris.Cl, pH 7.5, 100mM NaCl, 0,02% SDS, 2mM EDTA).
- Επακόλουθη εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
- Συλλογή υπερκείμενου, προσθήκη απόλυτης αιθανόλης (2,5V) και συλλογή του DNA-ινιδίων που σχηματίζονται.
- Έκπλυση με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε ~2 ml δις- απιονισμένου νερού. Η ποσότητα του DNA εξαρτάται από τον αριθμό αντιγράφων του πλασμιδίου και είναι της τάξεως των λίγων mg.

➤ Ο φορέας pcDNA 6TR: Ο φορέας αυτός είναι ένα 'ρυθμιστικό' πλασμίδιο και χρησιμοποιείται συνδυαστικά με άλλα εργαλεία (Invitrogen) για την επαγόμενη έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου υπό τον έλεγχο του συστήματος της τετρακυκλίνης. Έχει μέγεθος 6,7 kb και εκφράζει σε υψηλά επίπεδα τον καταστολέα τετρακυκλίνης (Tet repressor, *TetR*) υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV του ανθρώπου (Εικόνα 13). Στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών μπορεί να επιτευχθεί σταθερή και υψηλή έκφραση του καταστολέα. Με τον τρόπο αυτόν, μπορεί να επιτευχθεί η επαγόμενη έκφραση ενός γονιδίου, διαμολύνοντας τα κύτταρα με ένα δεύτερο πλασμίδιο που φέρει το cDNA του υπό μελέτη γονιδίου υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που ρυθμίζεται από τον καταστολέα της τετρακυκλίνης. Το γονίδιο του καταστολέα TetR, που υπάρχει στο φορέα, προέρχεται από το τρανσποζόνιο *Tn10*. Η πρωτεΐνη του καταστολέα αποτελείται από 207 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 23 KDa. Το πλασμίδιο pcDNA 6TR περιέχει ακόμη τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη σε βακτήρια και βλαστισιδίνη σε κύτταρα θηλαστικών, (<http://www.invitrogen.com>).



Εικόνα 13: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pcDNA 6TR και τα στοιχεία που περιέχει (<http://www.invitrogen.com>).

CMV promoter: bases 232-819
 Rabbit β -globin intron II (IVS): bases 1028-1600
TetR gene: bases 1684-2340
 SV40 early polyadenylation sequence: bases 2346-2477
 f1 origin: bases 2897-3325
 SV40 promoter and origin: bases 3335-3675
 EM-7 promoter: bases 3715-3781
 Blastidicin resistance gene: bases 3782-4180
 SV40 early polyadenylation sequence: bases 4338-4468
 pUC origin: bases 4851-5521
bla promoter: bases 6521-6625 (complementary strand)
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 5666-6526 (complementary strand)

2.2.4 Ποιοτικός έλεγχος DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, το διαχωρισμό, τον έλεγχο ποιότητας και τον αδρό ποσοτικό προσδιορισμό μακρομορίων, όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες. Ηλεκτροφόρηση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα φορτισμένο μόριο θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή, επειδή η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό των μορίων (Berg *et al*, 2005). Βασική αρχή της μεθόδου είναι ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA, λόγω των φωσφορικών τους ομάδων, μετακινούνται μέσα στην πηκτή προς το θετικό πόλο εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα του DNA μέσα σε ένα πήκτωμα είναι συνάρτηση του μήκους τους, του φορτίου τους και της δομής τους. Τα μικρότερα τμήματα γενικά μετακινούνται γρηγορότερα από τα μεγάλα. Καθώς μετακινούνται, τα διαφορετικά μόρια DNA σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές, ανάλογα με το μέγεθός τους, περιοχές του πηκτώματος. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), μετά από προσθήκη στο πήκτωμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο παραμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και φθορίζει όταν διεγείρεται με UV.

Χρησιμοποιούνται διάφορα υλικά, ανάλογα με τα απόλυτα μεγέθη των τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν και τις σχετικές διαφορές μεγέθους μεταξύ τους. Τμήματα DNA που το μέγεθός τους διαφέρει κατά λίγες εκατοντάδες ζεύγη βάσεων είναι δυνατόν να διαχωριστούν αποτελεσματικά σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Όταν είναι απαραίτητο να διαχωριστούν μεταξύ τους μικρά τμήματα που διαφέρουν ακόμα και κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο, είναι απαραίτητη η χρήση πηκτωμάτων ακρυλαμίδης (Watson *et al*, 2007).

Στο παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού κυκλικού και γραμμικού-προϊόν πέψης φορέα pcDNA 6TR ώστε να ελεγχθεί η ποιότητά του και να γίνει μία αδρή ποσοτικοποίηση. Επειδή το μέγεθος του φορέα ήταν της τάξεων των Kb, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1%, καθώς η μικρή συγκέντρωση αγαρόζης επιτρέπει τη δημιουργία μεγάλων πόρων του σχηματιζόμενου πλέγματος και συνεπώς διευκολύνει τη μετακίνηση μεγάλων τμημάτων DNA. Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1% ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα και τοποθέτηση της ειδικής ‘χτένας’ που θα δημιουργήσει θέσεις-‘πηγάδια’ για τη τοποθέτηση του δείγματος.
- Ζύγιση 0,3 gr αγαρόζης και τοποθέτησή τους σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη 40 ml TAE 1x. Η σύσταση του πυκνού διαλύματος TAE 50x είναι: 200mM Tris, 200 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA pH 8.0.
- Βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων με συχνή ανάδευση.
- Ανακίνηση του διαλύματος μέχρι να κρυώσει.
- Προσθήκη 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου (από πυκνό διάλυμα 10mg/ml).
- Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο μέχρι να στερεοποιηθεί.
- Τοποθέτηση του πηκτώματος μαζί με τη μήτρα σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x ώστε να καλύπτει τα πηγιάδια.
- Ανάμειξη 3μl χρωστικής (loading buffer 6x, με σύσταση: γλυκερόλη 50%, 1 mM EDTA pH 8.0, μπλε της βρωμοφαινόλης 0,25%) με το διάλυμα DNA και εισαγωγή των δειγμάτων στα πηγιάδια της πηκτής. Τοποθετείται επιπλέον και ο μοριακός μάρτυρας (ladder) για τον προσδιορισμό του μεγέθους του DNA.
- Ρύθμιση της τάσης του ρεύματος στα 80-100V και έναρξη της ηλεκτροφόρησης.
- Παρατήρηση των ζωνών του DNA στη συσκευή UV μετά από περίπου 1-2h.

2.2.5 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η κλωνοποίηση επιτυγχάνεται με την τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA. Οι αντίστοιχες τεχνικές βασίζονται σε χρήση ειδικών ενζύμων που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια, και η φυσιολογική τους λειτουργία είναι να προστατεύουν τους μικροοργανισμούς αυτούς από την εισβολή ξένου DNA μεθυλιώνοντας τις θέσεις στόχους των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Χαρακτηριστικά των περιοριστικών ενδονουκλεασών είναι η αναγνώριση συνήθως παλίνδρομων θέσεων στο DNA, δηλαδή θέσεων στις οποίες η αλληλουχία στον κάθε κλώνο είναι η ίδια όταν διαβάζεται στην κατεύθυνση 5’ προς 3’. Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα ένζυμα αυτά είναι τεσσάρων έως οκτώ ζευγών βάσεων (Watson *et al.* 2007). Στη συγκεκριμένη εργασία, για τη γραμμοποίηση του φορέα pcDNA 6TR, χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ένζυμο περιορισμού:

- AhdI (5,000 U/ml, Cat. No. 0101108, BioLabs): το ένζυμο αυτό προέρχεται από ένα στέλεχος *E.coli* το οποίο φέρει κλωνοποιημένο το γονίδιο *AhdI*, από το *Aeromonas hydrophila*. Το ρυθμιστικό διάλυμα για το συγκεκριμένο ένζυμο είναι το 1X NEBuffer 4 (50mM potassium acetate, 20mM Tris-acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM DTT, pH 7.9), το οποίο προκύπτει με αραίωση από το 10X NEBuffer 4. Απαιτείται επιπλέον η προσθήκη BSA σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml, με αραίωση από το πυκνό διάλυμα 100X BSA. Η θερμοκρασία επώασης για την πέψη με το ένζυμο αυτό είναι 37⁰C.

2.3 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ PCR (RT-PCR)

Μετά τη δημιουργία της κυτταρικής σειράς *HeLa* που έχει ενσωματώσει τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA 6TR, σειρά έχει η επιβεβαίωση της έκφρασης του γονιδίου του καταστολέα της τετρακυκλίνης TetR, ο οποίος περιέχεται στο φορέα αυτό. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με αντίστροφη μεταγραφή συζευγμένη με PCR (RT-PCR). Η RT έγινε σε RNA που απομονώθηκε από τους θετικούς κλώνους και η PCR στόχευσε τμήμα του γονιδίου του TetR.

A) Απομόνωση και ποιοτικός έλεγχος ολικού RNA από κλώνους κυττάρων *HeLa*

Αρχικά, από τρεις κλώνους κυττάρων (2-4 x 10⁵ κύτταρα *HeLa*) που ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο pcDNA 6TR, απομονώθηκε ολικό RNA. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Συνοπτικά, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 1ml αντιδραστηρίου TRI (Sigma, T9424) και επαναδιάλυση με πιπετάρισμα.
- Φυγοκέντρηση σε 12000g για 10min στους 4⁰C και μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf.
- Επώαση σε RT για 5min και προσθήκη 200μl χλωροφορμίου, χωρίς ισοαμυλική αλκοόλη. Γρήγορη ανάδευση για 15 sec. Επώαση σε RT για 2-15min.
- Φυγοκέντρηση σε 12000g για 15min στους 4⁰C και μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό eppendorf.
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπανόλης, ανάδευση και επώαση σε RT για 5-10min.
- Φυγοκέντρηση σε 12000g για 10min στους 4⁰C. Αφαίρεση υπερκειμένου.

- Προσθήκη 75% αιθανόλης (λιγότερο από 1ml), ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση σε 7500g για 5min στους 4°C.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου με γυάλινη πιπέτα Pasteur, ξήρανση της πελέττας και επαναδιάλυση σε ~30μl απιονισμένο νερό, με πιπετάρισμα.
- Επώαση στους 55-60°C για 10-15min. Φύλαξη του RNA στους -80°C.

Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης RNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η διαδικασία είναι παρόμοια με την ηλεκτροφόρηση του DNA με μοναδική διαφορά τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x (Tris base 89mM, βορικό οξύ 89mM, EDTA pH=8 2mM). Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 2 από τα 30μl του ολικού RNA που απομονώθηκε. Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα προηγήθηκε θέρμανσή τους σε υδατόλουτρο στους 65°C για 15min, μεταφορά σε πάγο και στιγμιαία φυγοκέντρηση.

B) Επεξεργασία του RNA με DNAση

Στα απομονωμένα δείγματα RNA από κάθε κλώνο κυττάρων πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με το ένζυμο DNAση (DNase treatment), το οποίο αποικοδομεί το DNA. Η επεξεργασία αυτή απαιτείται για την απαλλαγή του RNA από τυχόν γονιδιωματικό DNA που έχει απομείνει μετά τη διαδικασία απομόνωσης και αποτελείται από τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 27μl απομονωμένου RNA (~50μg), 4μl DNase Buffer 10x, 1μl DNAσης I και ρύθμιση του όγκου στα 40μl με απιονισμένο αποστειρωμένο νερό.
- Επώαση στους 37°C για 30min.
- Προσθήκη 4μl από τον παράγοντα απενεργοποίησης της DNAσης (DNase Inactivation Reagent).
- Επώαση των δειγμάτων σε RT, με συνεχή ανάδευση για 3-4min.
- Φυγοκέντρηση σε 10.000g για 1,5min.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό eppendorf και φύλαξη του καθαρού πλέον RNA στους -80°C.

Γ) Αντίστροφη μεταγραφή

Κατά την αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το RNA για τη σύνθεση ενός κλώνου DNA, συμπληρωματικού με το RNA (μονόκλωνο cDNA). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η αντίστροφη μεταγραφάση. Στην εργασία αυτή το RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν ολικό RNA (4μg) από κύτταρα *HeLa*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στις οδηγίες της εταιρείας (Invitrogen) και ήταν η εξής:

- Προσθήκη σε καθαρά eppendorfs 4μg καθαρού RNA από κάθε κλώνο, 50μg τυχαίων εκκινητών (ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας) και νερού σε τελικό όγκο 15μl.
- Επώαση των δειγμάτων στους 70°C για 5min σε μηχανήμα PCR (θερμοκυκλοποιητής).
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο για 5min.
- Προσθήκη σε κάθε eppendorf των υπολοίπων αντιδραστηρίων και ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης στα 23μl: 4,6μl buffer RT (5x), 1,06μl dNTPs (10μM), 1,61μl DTT (0,1M), 0,2μl RNase inhibitor (40u/μl) και 0,53μl ενζύμου RT (200u/μl, SuperScript II Reverse transcriptase, 18064-014). Για τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια παρασκευάστηκε μίγμα (master mix).
- Επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 1h σε μηχανήμα PCR.
- Φύλαξη των προϊόντων της RT στους -80°C.

Δ) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για τη δημιουργία δίκλωνου DNA του γονιδίου TetR, κάθε προϊόν της RT υποβλήθηκε σε PCR. Για τη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που σχεδιάστηκαν ειδικά για το γονίδιο TetR και το ένζυμο Taq πολυμεράση. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Εκκινητές για το γονίδιο του καταστολέα τετρακυκλίνης TetR.

Η αλληλουχία των εκκινητών αυτών είναι:

Tet_F1: TGCCCTTTAGAAGGGGAAAG

Tet_R1: CACAGCGCTGAGTGATATAA

- Buffer Taq 10x: το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα χρησιμοποιείται μετά από αραιώση σε τελική συγκέντρωση 1x.

- MgCl₂ τελική συγκέντρωση 1,5mM
- dNTPs (νουκλεοτίδια) 10mM
- Taq πολυμεράση (1unit/ αντίδραση)

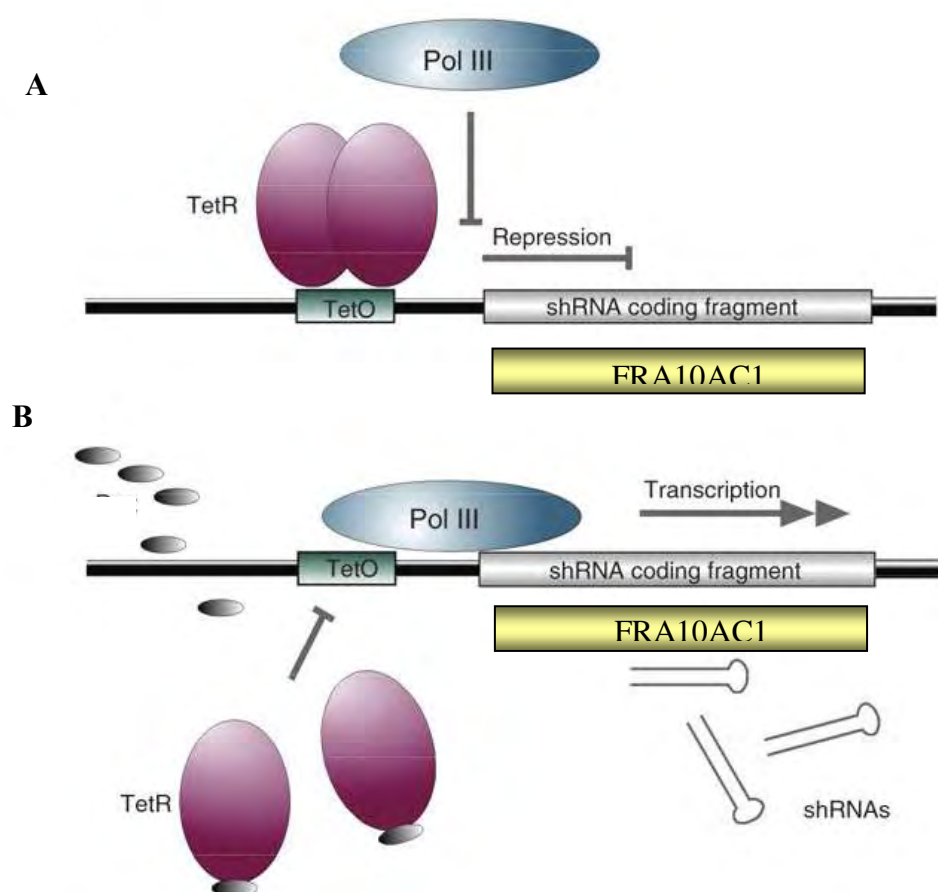
Κατά την αντίδραση πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι, με τις ακόλουθες συνθήκες:

<i>Αρχική αποδιάταξη:</i>	95 ⁰ C για 5min
<i>Αποδιάταξη:</i>	95 ⁰ C για 45sec
<i>Υβριδοποίηση εκκινήτων:</i>	62 ⁰ C για 45sec
<i>Επέκταση:</i>	72 ⁰ C για 45sec
<i>Τελική επέκταση:</i>	72 ⁰ C για 10min.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς *HeLa* που εκφράζει το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης *TetR*

Η κυτταρική σειρά *HeLa* στην οποία έχει ενσωματωθεί το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης αποτελεί σημαντικό εργαλείο που θα χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση της ενεργότητας (υπερέκφραση, καταστολή) του γονιδίου *FRA10AC1*. Ειδικότερα, σε αυτήν τη σειρά θα ενσωματωθεί επίσης και ένα διαγονίδιο που θα περιλαμβάνει το cDNA του γονιδίου ή short-hairpin RNAs (shRNAs) που θα στοχεύουν το *FRA10AC1*, υπό τον έλεγχο ενός κατάλληλα σχεδιασμένου υποκινητή, ο οποίος περιλαμβάνει θέσεις δέσμευσης για τον TetR. Έτσι, παρουσία του TetR, η έκφραση του γονιδίου ή των shRNAs καταστέλλεται. Αντίθετα όταν προστεθεί εξωγενώς τετρακυκλίνη, αυτή δεσμεύει τον καταστολέα και έτσι επιτυγχάνεται η έκφραση του γονιδίου ή των shRNAs (Εικόνα 14).



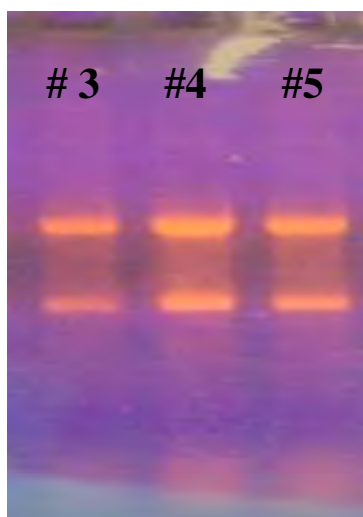
Εικόνα 14: (A) Απουσία τετρακυκλίνης, ο TetR συνδέεται στις αλληλουχίες του χειριστή TetO εμποδίζοντας τη σύνδεση της πολυμεράσης και συνεπώς την έκφραση του διαγονιδίου ή των shRNAs (B) Όταν προστεθεί τετρακυκλίνη, αυτή συνδέεται με τον TetR εμποδίζοντας τη σύνδεσή του με τον χειριστή TetO. Έτσι, η πολυμεράση συνδέεται στον υποκινητή και πραγματοποιείται η έκφραση του γονιδίου ή των shRNAs (προσαρμοσμένο από Kappel *et al*, 2007).

Παρόλο που η υπερέκφραση θα μπορούσε να επιτευχθεί και με παροδική διαμόλυνση, η προσέγγιση που ακολουθήθηκε παρουσιάζει το πλεονέκτημα της ελεγχόμενης υπερέκφρασης από όλα τα κύτταρα της καλλιέργειας. Αντίθετα, κατά την παροδική διαμόλυνση, το ποσοστό των κυττάρων που λαμβάνουν το διαγονίδιο είναι περιορισμένο και δύσκολα μπορεί να ξεπεράσει το 50%, γεγονός που μπορεί να συνεπάγεται «θόρυβο» ή χαμηλό σήμα κατά τα επόμενα πειράματα των «ομικών» τεχνολογιών.

Για τη δημιουργία της σταθερής κυτταρικής σειράς *HeLa* που εκφράζει το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης, *TetR*, πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με το φορέα pcDNA 6TR, ο οποίος περιέχει το γονίδιο *TetR*. Ακολούθησε η επιλογή των κυττάρων με βλαστισιδίνη (~10 μέρες), η συλλογή των αποικιών (5, #1, 3, 4, 5, 24) που σχηματίστηκαν, η επανακαλλιέργειά τους σε σταδιακά όλο και μεγαλύτερη επιφάνεια (παρουσία βλαστισιδίνης) και το πάγωμά τους από φλάσκα 75cm².

3.2 Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης του καταστολέα της τετρακυκλίνης με αντίστροφη μεταγραφή συζευγμένη με PCR (RT-PCR)

Για την επιβεβαίωση της έκφρασης του γονιδίου *TetR* εφαρμόστηκε RT-PCR σε τρεις από τους παραπάνω κλώνους. Έτσι, από αυτούς τους κλώνους (#3, 4 και 5) απομονώθηκε σε πρώτο στάδιο ολικό RNA, η ποιότητα του οποίου ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικόνα 15). Στην ηλεκτροφόρηση διακρίνονται οι δύο χαρακτηριστικές ζώνες του ριβοσωμικού RNA, γεγονός που υποδεικνύει ότι το RNA είναι ανέπαφο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για RT-PCR.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA από τους κλώνους κυττάρων *HeLa* 3, 4 και 5. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε περίπου το 1/15 του ολικού RNA (2 από τα 30μl). Οι δύο έντονες ζώνες που διακρίνονται σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν στο ριβοσωμικό RNA.

Στη συνέχεια ακολούθησε ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του RNA με φωτομέτρηση. Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει τις αντίστοιχες ποσότητες και το λόγο των τιμών οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 260 και 280nm.

Πίνακας 1: Ποσοτικοποίηση του RNA, πριν από την επεξεργασία με DNAση, από τους κλώνους 3, 4 και 5 με φωτομέτρηση.

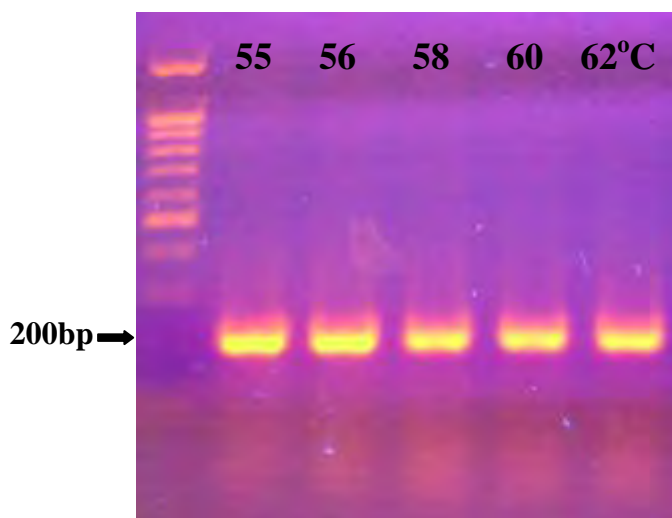
Φωτομέτρηση		
Κλώνοι-δείγματα RNA	Συγκέντρωση (ng/μl)	Λόγος 260nm/280nm
3	1858,6	1,62
4	2981,8	1,54
5	2481,1	1,54

Ωστόσο, επειδή κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA, συν-απομονώνεται και κάποια ποσότητα γενωμικού DNA, ακολούθησε επεξεργασία του απομονωμένου RNA με το ένζυμο DNAση και ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση (Πίνακας 2). Αυτή η επεξεργασία είναι απαραίτητη επειδή το DNA θα μπορούσε να δώσει ψευδώς θετικό σήμα κατά την PCR που εφαρμόζεται στο προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής. Γι αυτό άλλωστε και κατά την RT-PCR χρησιμοποιήθηκε, εκτός από τον κλασικό αρνητικό έλεγχο, και ως αρνητικός έλεγχος PCR με υπόστρωμα RNA (μετά την επεξεργασία με DNAση). Παρατηρούμε ότι μετά την επεξεργασία με DNAση, οι αντίστοιχες τιμές συγκέντρωσης είναι μικρότερες, γεγονός που κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην αποικοδόμηση του γενωμικού DNA που περιείχαν τα δείγματα.

Πίνακας 2: Ποσοτικοποίηση του RNA, πριν από την επεξεργασία με DNAση, από τους κλώνους 3, 4 και 5 με φωτομέτρηση.

Φωτομέτρηση		
Κλώνοι-δείγματα RNA	Συγκέντρωση (ng/μl)	Λόγος 260nm/280nm
1	1433,7	1,81
2	2138,7	1,84
3	1614,7	1,79

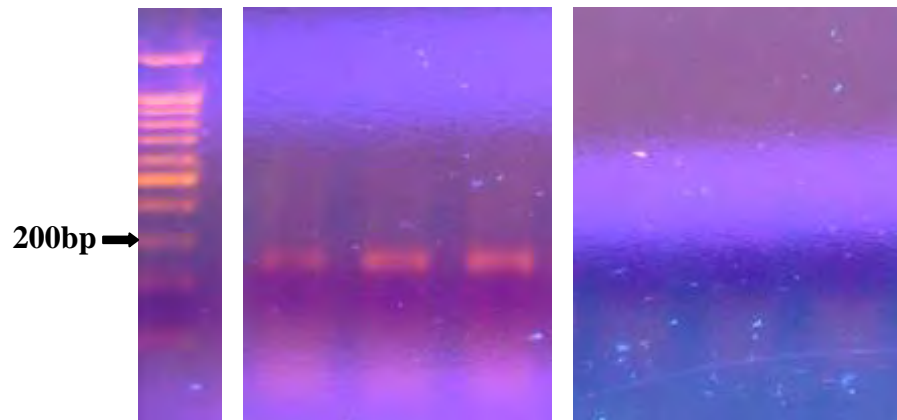
Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση cDNA με RT (Reverse Transcription) με μήτρα το ολικό RNA και με χρήση τυχαίων εκκινητών. Ακολούθησε PCR με ειδικό ζεύγος εκκινητών (F1, R1) για το γονίδιο *TetR*. Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών προσδιορίστηκε με PCR κλίσης θερμοκρασίας (gradient PCR), με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA του φορέα pcDNA 6TR που περιέχει το γονίδιο *TetR* (Εικόνα 16). Το αποτέλεσμα της PCR ήταν συγκρίσιμο σε όλες τις θερμοκρασίες που ελέγχθηκαν (55-62°C), οπότε επιλέχθηκε η υψηλότερη θερμοκρασία καθώς αντιστοιχεί στις πιο αυστηρές συνθήκες. Επίσης οι εκκινητές ελέγχθηκαν και ως προς την ποσότητα του υποστρώματος με την οποία δίνουν ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος, χρησιμοποιώντας ως ελάχιστη ποσότητα πλασμιδιακού DNA 0,1 ng, που προσομοιάζει την ποσότητα του υποστρώματος που θα υπάρχει στο προϊόν της RT (δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα). Η απόδοση της PCR ήταν ικανοποιητική και συγκρίσιμη σε όλες τις διαφορετικές ποσότητες (0,1-200ng). Αυτοί οι έλεγχοι ήταν απαραίτητοι ώστε τυχόν αρνητικό αποτέλεσμα στην RT-PCR να μην οφείλεται στις εφαρμοζόμενες συνθήκες.



Εικόνα 16: Προϊόντα PCR (209bp) του γονιδίου *TetR* σε διαφορετικές θερμοκρασίες με τους εκκινητές F1-R1, με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA του φορέα pcDNA 6TR. Αριστερά απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους με μεγέθη μήκους 100bp.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR με υπόστρωμα τα προϊόντα της RT (2μl από τα 23μl) για κάθε κλώνο αντίστοιχα. Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε για κάθε κλώνο το αρχικό RNA, σε συγκρίσιμη ποσότητα, το οποίο ενισχύθηκε παράλληλα (Εικόνα 17). Από το αποτέλεσμα αποδεικνύεται αφ' ενός η έκφραση του καταστολέα της τετρακυκλίνης σε όλους τους κλώνους και αφ' ετέρου η καθαρότητα του RNA όσον αφορά προσμίξεις με γενωμικό DNA. Οποιοσδήποτε κλώνος μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για την ένθεση στο γονιδίωμα του δεύτερου

διαγονιδίου. Γενικά, είναι προτιμότερο να επιλεγεί ο κλώνος με την υψηλότερη έκφραση του καταστολέα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε και στις τρεις αντιδράσεις RT, η ίδια ποσότητα αρχικού RNA. Έτσι, αν θεωρήσουμε ότι η απόδοση της RT και της PCR είναι ίδια, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι κλώνοι #4 και #5 εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση του καταστολέα και προτείνεται να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω. Ωστόσο, αυτό είναι εύκολο να ελεγχθεί με εσωτερικό control -δηλαδή ταυτόχρονη PCR για ένα γονίδιο που είναι γνωστό ότι εκφράζεται στα κύτταρα *HeLa*- ώστε να επιλεγεί αυτός με την υψηλότερη έκφραση του καταστολέα. Η προτεινόμενη PCR θα πρέπει να γίνει σε μη κορεσμένες συνθήκες- μικρό αριθμό κύκλων-ώστε να είναι η αντίδραση ακόμη στην εκθετική φάση.



Εικόνα 17: Προϊόντα PCR του cDNA του γονιδίου *TetR* για τους κλώνους κυττάρων 3, 4 και 5. Μετά τον ladder, ακολουθούν τα προϊόντα PCR των τριών κλώνων (209bp) και στη συνέχεια ο αρνητικός έλεγχος με PCR σε ολικό RNA από τους αντίστοιχους κλώνους. Αριστερά απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους με μεγέθη μήκους 100bp.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Δημιουργήθηκε σταθερή κυτταρική σειρά *HeLa* που εκφράζει το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης, *TetR*. Συνολικά συλλέχθηκαν πέντε αποικίες που έχουν ενσωματώσει το γονίδιο αυτό. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποτελεί σημαντικό εργαλείο που θα χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση της ενεργότητας (υπερέκφραση, καταστολή) του γονιδίου *FRA10AC1*. Ειδικότερα, σε αυτήν τη σειρά θα ενσωματωθεί επίσης και ένα διαγονίδιο που θα περιλαμβάνει το cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* ή short-hairpin RNAs (shRNAs) που θα στοχεύουν το γονίδιο αυτό. Με άλλα λόγια, θα συμβάλλει στην ευρύτερη λειτουργική ανάλυση του γονιδίου *FRA10AC1*, αξιοποιώντας τις «ομικές» τεχνολογίες για τη διερεύνηση του βιολογικού του ρόλου σε κυτταρικό επίπεδο.

- Επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση του καταστολέα της τετρακυκλίνης με αντίστροφη μεταγραφή συζευγμένη με PCR (RT-PCR) σε τρεις από τους συλλεγμένους κλώνους. Οποιοσδήποτε κλώνος από αυτούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για την ένθεση στο γονιδίωμα του δεύτερου διαγονιδίου. Ωστόσο, δύο κλώνοι (#4, #5) εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση του καταστολέα. Επειδή είναι προτιμότερο να επιλεγούν κλώνοι με την υψηλότερη έκφραση του καταστολέα, προτείνεται αυτοί οι δύο κλώνοι να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95.8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310, 207–211.

Barga, R., Howe, B., Beck, D., Browsers, S., Dobyns, W., Haynes, W., et al. (2011). Bioinformatics and data-intensive scientific discovery in the beginning of the 21st century. *OMICS: J Integrat Biol* 15, 199–201.

Bentley D. R., Deloukas P., Dunham A., French L., Gregory S. G., Humphray S.J., Mungall A.J., Ross M.T., Carter N.P., Dunham I., Scott C.E., Ashcroft K.J., Atkinson A.L., Aubin K., Beare D.M., Bethel G., Brady N., Brook J.C., Burford D.C., Burrill W.D, Burrows C., Butler A.P., Carder C., Catanese J.J., Clee C.M., Clegg S.M., Copley V., Coffey A.J, Cole C.G., Collins J.E, Conquer J.S., Cooper R.A., Culley K.M., Dawson E., Dearden F.L., Durbin R.M., Jong R.J., Dhami P.D., Earthrowl M.E., Edwards C.A., Evans R.S., Gillson C.J., Ghori J., Green L., Gwilliam R., Halls K.S., Hammond S., Harper G.L., Heathcote R.W., Holden J.L., Holloway E., Hopkins B.L., Howard P.J., Howell G.R., Huckle E.J., Hughes J., Hunt P.J., Hunt S.E., Izmajlowicz M., Jones C.A., Joseph S.S., Laird G., Langford C.F., Lehtinen M.H., Leversha M.A., McCann O.T., McDonald L.M., McDowall J., Maslen G.L., Mistry D., Moschonas N.K., Neocleous V., Pearson D.M., Phillips K.J., Porter K.M., Prathalingam S.R., Ramsey Y.H., Ranby S.A., Rice C.M., Rogers J., Rogers L.J., Sarafidou T., Scott D.J., Sharp G.J., Shaw-Smith C.J., Smink L.J., Soderlund C., Sotheran E.C. , Steingruber H.E., Sulston J.E., Taylor A., Taylor R.G., Thorpe A.A., Tinsley E., Warry G.L., Whittaker A., Whittaker P., Williams S.H., Wilmer T.E., Wooster R., Wright C.L. (2001). The physical maps for sequencing human chromosomes 1, 6, 9, 10, 13, 20 and X. *Nature*, Vol. 409.

Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L. (2005). Βιοχημεία, Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Bessonov S., Anokhina M., Krasauskas A., Golas M. M., Sander B., Will C. L., 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.

Bessonov S., Anokhina M., Will C. L., Urlaub H., Lührmann R. (2008) Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature*, 452(7189):846-50.

Burrow A.A, Williams L.E., Pierce L.C.T., Wang Y.H. (2009). Over half of breakpoints in gene pairs involved in cancer specific recurrent translocations are mapped to human chromosomal fragile sites. *BMC Genomics*, doi:10.1186/1471-2164-10-59.

Chen Y. I., Moore R. E., Ge H.Y., Young M. K., Lee T.D., Stevens S. W. (2007). Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res*, 35(12):3928-44.

Debatisse M., Tallec B.L., Letessier A, Dutrillaux B, Brison O. (2011). Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends in Genetics*, 1–11.

Dillon L.W., Burrow A.A., Wang Y.H. (2010). DNA Instability at Chromosomal Fragile Sites in Cancer. *Current Genomics*, 11, 326-337.

Dobkin C., Rabe A., Dumas R., El Idrissi A., Haubenstock H., Brown W. T. (2000) Fmr1 knockout mouse has a distinctive strain-specific learning impairment. *Neuroscience*, 100(2):423-9.

Fischer H.P. (2005). Towards quantitative biology: integration of biological information to elucidate disease pathways and to guide drug discovery. *Biotechnol Annu Rev.* 11:1-68.

Fiehm, O. (2002). Metabolomics—the link between genotype and phenotype. *Plant Mol Biol* 48, 155–171.

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 (DGSI) from the minimal DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet.* 1997, 6(2):267-76.

Hartmuth K., Urlaub H., Vornlocher H. P., Will C.L., Gentzel M., Wilm M., Lührmann R. (2002) Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinityselection method. *Proc Natl Acad Sci*, 99(26):16719-24.

Hollywood K., Brison D.R., Goodacre R. (2006). Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*, 6(17):4716-23.

Jurica M. S., Licklider L.J., Gygi S. R., Grigorieff N., Moore M.J. (2002). Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*, 8(4):426-39.

Kappel S., Matthess Y., Kaufmann M., Klaus Strebhardt (2007) Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression. *Nature Protocols* 2, 3257 – 3269.

Kähkönen M, Tengström C, Alitalo T, Matilainen R, Kaski M, Airaksinen E. (1989). Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. II. Autosomal rare fragile sites. *Hum Genet*, 82(1):3-8.

Lagana A., Russo F., Sismeiro C., Giugno R., Pulvirenti A., Ferro A. (2010). Variability in the Incidence of miRNAs and Genes in Fragile Sites and the Role of Repeats and CpG Islands in the Distribution of Genetic Material. *PLoS ONE* 5(6): e11166. doi:10.1371/journal.pone.0011166.

Lukusa T., Fryns J.P. (2008). Human chromosome fragility. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779, 3–16.

Madigan T.M., Martinko M.J., Parker J. (2005). Βιολογία των μικροοργανισμών, Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Makarov E. M., Makarova O. V., Urlaub H., Gentzel M., Will C. L., Wilm M., Lührmann R. (2002). Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science*, 298(5601):2205-8.

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. *EMBO J.*, 23(12):2381-91.

Martinez-Gomez P., Sanchez-Perez R., Rubio M. (2012). Clarifying Omics Concepts, Challenges, and Opportunities for Prunus Breeding in the Postgenomic Era. *Omics A Journal of Integrative Biology*, Volume 16, Number 5.

Mavrou A, Syrrou M, Tsenghi C, Metaxotou C. (1991). Autosomal folate sensitive fragile sites in normal and mentally retarded individuals in Greece." *Am J Med Genet.*, 38(2-3):437-9.

Morrison, N., Cochrane, G., Faruque, N., Tatusova, T., Taneo, Y., Hancocq, D., et al. (2006). Concept of sample in OMICS technology. *OMICS: J Integrat Biol* 10, 127–137.

Nielsen J. (2003). It is all about metabolic fluxes. *J. Bacteriol.* 185, 51. 7031–7035.

Orrantia E., Chang P.L. (1990). Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. *Exp Cell Res*, 190(2):170-4.

Pandey, A., and Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837–846.

Petit P, Fryns JP, van den Berghe H, Hecht F. (1986). Population cytogenetics of autosomal fragile sites. *Clin Genet.*, 29(2):96-100.

Pukkila, P.J. (2001). *Molecular Biology: The Central Dogma*. Encyclopedia of Life Sciences.

Rappsilber J., Ryder U., Lamond A. I., Mann M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12(8):1231-45.

Sanger, F., Air, B.G., Barrel, N.L., Brown, A.R., Coulson, J.C., Fiddes, C.A., et al. (1977). Nucleotide sequence of the bacteriophage phiX174 NDA. *Nature* 265, 687–695.

Sarafidou T, Apostolopoulou D, Katidou M, Moschonas N.K. (υπό συγγραφή). FRA10AC1 interacts with DGCR14, a spliceosomal component.

Sarafidou T., Kahl C., Martinez-Garay I., Mangelsdorf M., Gesk S., Baker E., Kokkinaki M., Talley P., Maltby E.L., French L., Harder L., Hinzmann B., Nobile C., Richkind K., Finnis K., Deloukas P., Sutherland R.G, Kutsche K., Moschonas KN., Siebert R., Gecz J. (2004). Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein. *Genomics* 84, 69–81.

- Savelyeva L., Sagulenko E., Schmitt G. J., Schwab M. (2006). Low-frequency common fragile sites: Link to neuropsychiatric disorders? Elsevier Ireland Ltd. doi:10.1016/j.canlet.2005.08.033.
- Schwartz M., Zlotorynski E., Kerem B. (2006). The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters* 232, 13–26.
- Smith C. L., Bolton A., Nguyen G. (2010). Genomic and Epigenomic Instability, Fragile Sites, Schizophrenia and Autism. *Current Genomics*, 11, 447-469.
- Sutherland GR. (1979). Heritable Fragile Sites on Human Chromosomes II. Distribution, Phenotypic Effects, and Cytogenetics. *Am J Hum Genet* 31:136-148.
- Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites. (1982) *Am J Hum Genet.*, 34(3):452-8.
- Sutherland GR. (1985). Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics. *Ann Hum Genet.*, 49(Pt 2):153-61.
- Sutherland GR., Baker E. 2000. The clinical significance of fragile sites on human chromosomes. *Clin Genet.*, 58(3):157-61.
- Suthram S., Shlomi T., Ruppin E., Sharan R., Ideker T. (2006). A direct comparison of protein interaction confidence assignment schemes. *BMC Bioinformatics*, 7:360.
- Ule J. (2008) Ribonucleoprotein complexes in neurologic diseases. *Curr Opin Neurobiol*, 18(5):516-23.
- Von Mering C., Krause R., Snel B., Cornell M., Oliver S. G., Fields S., Bork P. (2002). Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*, 417(6887):399-403.
- Watson JD, Witkowski JA, Myers RM, Caudy AA. (2007). Ανασυνδασμένο DNA, 1η Ελληνική Έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
- Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T.R., Fareed G.C., Richardson C.C. (1968). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem.* 10;243(17):4543-55.
- Zhou Z., Licklider L.J., Gygi S.P., Reed R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419(6903):182-5.

ΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

<http://www.invitrogen.com>

<http://www.promega.com>

<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>

