

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης
FRA10AC1 του ανθρώπου σε ετερόλογο σύστημα



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΣΩΦΡΟΝΙΑΔΟΥ
ΛΑΡΙΣΑ
2017

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ: ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ:

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ:

Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια μου Σαραφίδου Θεολογία, αλλά και τον επιβλέπων καθηγητή Δημήτριο Λεωνίδα για την ανάθεση του θέματος και την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί τους. Όπως επίσης και για την πολύτιμη καθοδήγηση, τις συμβουλές, την υπομονή και την συνεισφορά της κυρίας Σαραφίδου στην ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να επισημάνω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτορα Γαλλιοπούλου Ελένη, για την πολύτιμη βοήθεια της, την καθοδήγηση, τον χρόνο που διέθεσε για την εκπαίδευσή μου, την ευχάριστη συντροφικότητά της, αλλά και την υπομονή που έδειξε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων αν σκεφτεί κανείς το χιούμορ και την απροσεξία που με διακατέχει. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τον υποψήφιο διδάκτορα Στραβοδήμο Γεώργιο, για όλη την καθοδήγηση, την ανιδιοτελής βοήθειά του, την υπομονή του φυσικά, την εξαιρετική παρέα του, αλλά και για όλες εκείνες τις πολύτιμες συμβουλές που μου χάρισε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την άριστη συνεργασία τους.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τους φίλους και συναδέλφους μου, Ανθούλα Κρόμελ και Αριστεΐδη Λέντζα για την ανεπανάληπτη συντροφιά τους και την οικογενειακή ατμόσφαιρα που δημιουργήσαμε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια με κάθε δυνατό τρόπο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	[5]
2. ABSTRACT.....	[6]
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	[7]
3.1 Εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις.....	[7]
3.1.1 Συνήθεις εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις.....	[7]
3.1.2 Σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις.....	[8]
3.2 Κλινική σημασία των εύθραυστων θέσεων.....	[8]
3.3 Η σπάνια εύθραυστη χρωμοσωμική θέση FRA10A.....	[9]
3.4 Το γονίδιο FRA10AC1.....	[10]
3.5 Η πρωτεΐνη FRA10AC1.....	[10]
3.5.1 Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης FRA10AC1 με άλλες πρωτεΐνες...[11]	
3.6 Μηχανισμός συναρμογής (splicing).....	[12]
3.6.1 Συμμετοχή της FRA10AC1 στο σωματίο συναρμογής.....	[13]
4. ΣΚΟΠΟΣ.....	[16]
5. ΥΛΙΚΑ.....	[17]
5.1 Αντιδραστήρια.....	[17]
5.2 Θρεπτικά Υλικά.....	[18]
5.3 Διαλύματα.....	[18]
5.4 Εκκινητές.....	[20]
5.5 Βακτηριακά στελέχη.....	[20]
5.6 Πλασμιδιακές κατασκευές.....	[21]
5.7 Πλασμιδιακοί φορείς.....	[22]
6. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	[24]
6.1 Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	[24]
6.2 Καλλιέργεια βακτηρίων σε τριβλία Petri.....	[24]
6.3 Μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργεια βακτηρίων.....	[24]
6.4 Μεγάλης κλίμακας υγρή καλλιέργεια βακτηρίων.....	[25]
6.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας υγρή καλλιέργεια και καθαρισμός.....	[25]
6.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης του DNA με φωτομέτρηση.....	[27]
6.7 Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	[27]
6.8 Αντίδραση σύνδεσης (ligation).....	[28]
6.9 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης για την ανάλυση του DNA.....	[29]
6.10 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	[30]
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	[32]
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	[46]
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	[47]

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *FRA10A* ανήκει στις σπάνιες χρωμοσωματικές εύθραυστες θέσεις και χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3. Η έκφρασή της προκαλείται από την επέκταση πολυμορφικών (CGG)₈₋₁₄ επανάληψεων που βρίσκονται εντός της 5' αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου *FRA10AC1*. Η πυρηνική πρωτεΐνη *FRA10AC1* που κωδικοποιείται από το γονίδιο εκφράζεται ευρέως σε ανθρώπινα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου. Με τις μέχρι τώρα μελέτες δεν έχει εξακριβωθεί η πλήρης λειτουργία της. Ωστόσο, σύμφωνα με αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία της συναρμογής και της μεταγραφής, έχει αναφερθεί ως μία πρωτεΐνη, της οποίας το γονίδιο πιθανώς συσχετίζεται με το φαινότυπο της νοητικής υστέρησης που παρατηρείται σε άτομα-φορείς της εύθραυστης θέσης *FRA10A*. Παρόλ' αυτά, είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ πολυκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών, υποδηλώνοντας έτσι ένα θεμελιώδη βιολογικό ρόλο για την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται.

Η παρούσα εργασία στοχεύει στην μελέτη έκφρασης σε τρία βακτηριακά στελέχη *E. Coli* της πρωτεΐνης *FRA10AC1*, αλλά και της περικομμένης στο καρβοξυτελικό άκρο κατά 60 αμινοξέα πρωτεΐνης *FRA10AC1*₁₋₂₅₅, έτσι ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την έκφρασή τους.

2. ABSTRACT

FRA10A rare chromosomal fragile site is located in the human chromosomal region 10q23.3. Its expression is induced by the expansion of a polymorphic (CGG)₈₋₁₄ repeat within the 5' untranslated region (UTR) of the *FRA10AC1* gene. Nuclear *FRA10AC1* protein encoded by the gene is widely expressed in human organs, including the brain. According to recent studies the full function of the protein is unclear. However, according to interactions with other proteins involved in splicing and transcription, it has been reported as a protein, whose gene is probably associated with the phenotype of mental retardation observed in individual carriers of fragile site *FRA10A*. Nevertheless, it is highly conserved among multi-cellular eukaryotes, thus suggesting a fundamental biological role for the encoded protein.

This work aims to study the expression profile in three bacterial strains from *E. Coli* of the *FRA10AC1* protein and the truncated at C-terminal by 60 residues protein *FRA10AC1*₁₋₂₅₅, to find suitable expression conditions.

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 Εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις

Σε πειράματα όπου ανθρώπινα κύτταρα, κατά τη μετάφραση της μίτωσης, αναπτύσσονται σε καλλιέργειες υπό συγκεκριμένες συνθήκες, και τα χρωμοσώματά τους μελετώνται στο μικροσκόπιο, έχει παρατηρηθεί ότι μερικά από αυτά αναπτύσσουν περιοχές που δεν υφίστανται χρώση (κενά) και οι οποίες ονομάζονται εύθραυστες θέσεις. Το χρωμόσωμα μπορεί να σπάσει αυθόρμητα σε μια θέση, με αποτέλεσμα να προκαλείται έλλειμμα της περιοχής από το σημείο της θραύσης ως το άκρο του χρωμοσώματος. Οι εύθραυστες θέσεις χαρακτηρίστηκαν ως κληρονομήσιμοι γενετικοί τόποι, οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα μη τυχαίων θραυσμάτων, υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Αποτελούν συγκεκριμένες περιοχές χρωματίνης, οι οποίες αποτυγχάνουν να συμπυκνωθούν κατά τη μίτωση. Με βάση τη συχνότητά τους στον πληθυσμό, διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, στις σπάνιες και στις συνήθειες. Επιπλέον, η κάθε κατηγορία υποδιαιρείται περαιτέρω με βάση τις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων που επάγουν την έκφραση τους. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις διακρίνονται στις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, που δρα ως συνέζυμο σε αντιδράσεις μεταφοράς στη σύνθεση πουρινών, και σε αυτές οι οποίες επάγονται με την προσθήκη δισταμικίνης A (distamycin A), ένα αντιβιοτικό που προσδένεται στη μικρή αύλακα του DNA και κυρίως σε AT-ζεύγη (Baraldi et al., 2004), ή/και βρωμο-δεοξυ-ουριδίνης (BrdU), ενός αναλόγου της θυμιδίνης που μπορεί να ενσωματωθεί στο νεοσυντιθέμενο DNA και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Οι περισσότερες από τις συνήθειες εύθραυστες θέσεις επάγονται από αφιδοχολίνη (aphidocolin), ενός αναστολέα της DNA πολυμεράσης (Baranovskiy et al., 2014), ενώ άλλες επάγονται από BrdU ή 5-αζακυτιδίνη (5-azacytidine), ένα χημικό ανάλογο της κυτιδίνης το οποίο δρα ως αναστολέας της μεθυλίωσης του DNA (Christman J.K., 2002).

3.1.1 Συνήθειες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις

Μέχρι τώρα, έχουν ταυτοποιηθεί κυτταρογενετικά 89 συνήθειες εύθραυστες θέσεις στο γονιδίωμα του ανθρώπου, με μεταβλητή συχνότητα και επίπεδα έκφρασης, οι οποίες χαρτογραφούνται σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από γονιδιωματική αστάθεια, ιδιαίτερα σε καρκινικά κύτταρα (Sutherland GR., Baker E., 2000). Η κυτταρογενετική έκφραση των θέσεων αυτών είναι ορατή σε ευρείες χρωμοσωμικές περιοχές κλίμακας μεγαβάσεων. Ωστόσο, δεν έχει προκύψει κάποιο αναγνωρίσιμο στοιχείο που να μπορεί να συσχετιστεί με την ευθραυστότητα σε αυτές τις περιοχές. Παρ' όλα αυτά, έχουν περιγραφεί συγκεκριμένα δομικά

χαρακτηριστικά, καθώς σχηματίζουν ασυνήθιστες δευτεροταγείς δομές, οι οποίες μπορούν να εμποδίσουν την αντιγραφή του DNA και την ακετυλίωση των ιστονών, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η συμπύκνωση της χρωματίνης (Pichiorri et al., 2008, Zlotorynski et al., 2003). Οι περισσότερες συνήθεις εύθραυστες θέσεις επάγονται από την αμφιδοχολίνη, ενώ άλλες από την BrdU ή την 5-αζακυτιδίνη (Lukusa T., Fryns JP., 2008).

3.1.2 Σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις

Οι σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις έχουν συχνότητα στον πληθυσμό λιγότερο από 5% σε αντίθεση με τις συνήθεις που αποτελούν μέρος της χρωμοσωμικής δομής (Lukusa T., Fryns JP., 2008). Έχουν ταυτοποιηθεί κυτταρογενετικά 31 σπάνιες θέσεις (Lukusa T., Fryns JP., 2008) στο γονιδίωμα του ανθρώπου με συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό που ποικίλλει στις διάφορες μελέτες από 1/769 (Quack et al., 1978) έως 1/15 (Petit et al., 1986). Σε μοριακό επίπεδο έχουν χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής δέκα σπάνιες εύθραυστες θέσεις, οκτώ από τις οποίες είναι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ (*FRAXA*, *FRAXE*, *FRAXF*, *FRA16A*, *FRA10A*, *FRA11B*, *FRA11A* και *FRA12A*) και δύο που εκδηλώνονται παρουσία δισταμικίνης ή/και βρωμο-δεοξυουριδίνης (*FRA10B* και *FRA16B*). Η πιο συχνή σπάνια εύθραυστη θέση, ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ, είναι η *FRAXA* που χαρτογραφείται στη ζώνη Xq27.3 και σχετίζεται με το σύνδρομο του εύθραυστου X, την πιο κοινή αιτία οικογενούς νοητικής υστέρησης. Σύμφωνα με μοριακές αναλύσεις αυτής της θέσης και ακολούθως των υπολοίπων, προσδιορίστηκε ότι η μοριακή βάση των σπάνιων εύθραυστων θέσεων *FRAXA*, *FRAXE*, *FRAXF*, *FRA10A*, *FRA12A* είναι παρόμοια και σχετίζεται με την επέκταση πολυμορφικών τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων του τύπου (CGG)_n. Στην πλειοψηφία τους εντοπίζονται στις 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές (UTRs) των γονιδίων και ακολουθούν το μοτίβο της επέκτασης και υπερμεθυλίωσης που οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή γονιδίων (Sutherland GR., Richards RI., 1995). Μέχρι τώρα, μόνο εκτεταμένες CGG-επαναλήψεις και περιοχές πλούσιες σε AT έχουν συσχετιστεί με κυτταρογενετική έκφραση των σπάνιων εύθραυστων θέσεων. Ωστόσο, και άλλες επαναλήψεις είναι σε θέση να εκφράσουν αυτήν την ευθραυστότητα, αλλά δεν είναι γνωστές οι συνθήκες που μπορούν να την προκαλέσουν (Kim Debacker, R. Frank Kooy, 2007).

3.2 Κλινική σημασία των εύθραυστων θέσεων

Μόνο σε δύο σπάνιες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ έχει αποδειχθεί η κλινική τους σημασία. Η έκφραση των *FRAXA* (Xq27.3) και *FRAXE* (Xq28) έχει συσχετιστεί με παθολογικό φαινότυπο νοητικής υστέρησης (Verkerk et al., 1991, Kremer et al., 1991, Oberle et al., 1991), ενώ οι εκφράσεις των *FRA10A* (10q23.3), *FRA12A* (12q13.1) και *FRA16A* (16p13.11) δεν έχουν

ακόμη αποδειχθεί ότι συσχετίζονται με οποιαδήποτε ασθένεια, αν και υπάρχουν πολλές ενδείξεις που παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισής τους σε άτομα με διάφορες διαταραχές, χωρίς όμως να υπάρχει πλήρης συσχετισμός γονοτύπου-φαινοτύπου (Sutherland GR., Baker E., 2000). Οι ομοζυγώτες των *FRA10B*, *FRA16B* και *FRA17A* έχουν αναγνωρισθεί ως φυσιολογικά άτομα, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι τρεις εύθραυστες περιοχές δεν έχουν κλινική σημασία. Επιπρόσθετα, οι φορείς της *FRA8E* που έχουν καταγραφεί έως σήμερα ήταν υγιή άτομα, παρόλο που η αντίστοιχη γονιδιωματική περιοχή εμπλέκεται σε διάφορες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (Lukusa T., Fryns JP., 2008). Τέλος, ορισμένες σπάνιες αυτοσωματικές εύθραυστες θέσεις-ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ δεν έχουν βρεθεί σε ομοζυγωτία, παρόλο που, με βάση τη συχνότητα των ετεροζυγωτών, τέτοια άτομα θα ήταν αναμενόμενο να ταυτοποιηθούν. Κάτι που πιθανόν υποδεικνύει ότι μία τέτοια κατάσταση δεν είναι συμβατή με τη ζωή (Sutherland GR., Baker E., 2000). Όσον αφορά τις συνήθεις εύθραυστες θέσεις, έχουν ενοχοποιηθεί ως ασταθείς περιοχές που μπορεί να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση γονιδίων σε καρκινικά κύτταρα (Lukusa T., Fryns JP., 2008).

3.3 Η σπάνια εύθραυστη χρωμοσωμική θέση *FRA10A*

Η *FRA10A* ανήκει στις σπάνιες αυτοσωματικές εύθραυστες θέσεις, είναι ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ, δηλαδή εμφανίζεται όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο, και χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3. Δείχθηκε πως η έκφρασή της επάγεται από την επέκταση μιας ενιαίας, πολυμορφικής επανάληψης (CGG)_n στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*. Ο αριθμός των επαναλήψεων ποικίλει στον πληθυσμό, από 8 έως 14, ενώ στα άτομα που εκφράζουν κυτταρογενετικά αυτήν την θέση ο αριθμός μπορεί να υπερβεί τις 200 επαναλήψεις, οι οποίες εμφανίζονται υπερμεθυλιωμένες. Αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη σπάνια εύθραυστη θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα (1 στα 500 άτομα) και μέχρι τώρα δεν έχουν ταυτοποιηθεί παθολογικοί φαινότυποι που να σχετίζονται με αυτήν. Ωστόσο, έχουν γίνει διάφορες μελέτες που δείχνουν ότι η έκφρασή της μπορεί να σχετίζεται με νοητική υστέρηση, ογκογένεση, νευρολογικές διαταραχές, αλλά και αναπτυξιακές ανωμαλίες (Mavrou et al., 1991, Kähkönen et al., 1986, Sutherland et al., 1982-1985, Sarafidou et al., 2004). Ο συσχετισμός προέκυψε ύστερα από μελέτες στις οποίες ελέγχθηκε η παρουσία εύθραυστων θέσεων στον καρυότυπο ατόμων με νοητική υστέρηση, υγιών ατόμων και ατόμων στον γενικό πληθυσμό που έχουν επιλεγεί τυχαία. Η θέση *FRA10A* ανιχνεύθηκε σε λίγες περιπτώσεις και σε υγιή άτομα-φορείς, γεγονός που υποδεικνύει ότι σε ετεροζυγωτία δεν συνδέεται με κανέναν παθολογικό φαινότυπο ή ότι ο φαινότυπος έχει ατελή διεισδυτικότητα (Kähkönen et al., 1989, Sarafidou et al., 2004).

3.4 Το γονίδιο *FRA10AC1*

Στο πλαίσιο του προσδιορισμού της μοριακής βάσης της εύθραυστης θέσης *FRA10A*, εντοπίστηκε και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *FRA10AC1*, για το οποίο ταυτοποιήθηκε το πλήρες μήκος cDNA του, το οποίο έχει μέγεθος 1344bp και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 315 αμινοξέων. Το γονίδιο περιλαμβάνει 19 εξόνια και εκτείνεται σε μια περιοχή 33kb, η οποία μεταγράφεται από το τελομερές προς το κεντρομερές. Όλα τα όρια των ιντρονίων ακολουθούν τον κανόνα AG/GT. Οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (CGG) εντοπίζονται στο εξόνιο 1 στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG εντοπίζεται στο εξόνιο 2. Επιπλέον, με ανάλυση Northern, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς ανιχνευτές οι οποίοι ανιχνεύουν τις πρώτες 616bp στο 5' άκρο του cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* και ένα μέρος της αλληλουχίας του εξονίου 19, βρέθηκε ότι το γονίδιο *FRA10AC1* είναι μεταγραφικά ενεργό σε όλους τους ιστούς ενήλικων ατόμων, δείχνοντας καθολική έκφραση του γονιδίου. Επίσης φάνηκε να έχει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε όργανα με υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα (εγκέφαλος, καρδιά, σκελετικοί μύς, ήπαρ). Ωστόσο, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στα εξόνια 11 και 19 εντοπίστηκαν 5 εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία, λόγω μεγέθους δεν ταυτοποιήθηκαν με την ανάλυση Northern. Όλα τα εναλλακτικά μετάγραφα αντιστοιχούν σε διαφορετική ακολουθία αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο, γεγονός που πιθανόν να επιβεβαιώνει την ύπαρξη αντίστοιχου αριθμού ισομορφών της πρωτεΐνης *FRA10AC1*. Τέλος, το γονίδιο *FRA10AC1* είναι εξαιρετικά συντηρημένο στην εξέλιξη των πολυκύτταρων ευκαρυωτών, γεγονός που υποδεικνύει πως η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έχει βασικό βιολογικό ρόλο, και δεν φαίνεται να έχει παράλογα γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Sarafidou et al., 2004).

3.5 Η πρωτεΐνη *FRA10AC1*

Το γονίδιο *FRA10AC1* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *FRA10AC1*, η οποία αποτελείται από 315 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 37,5 kDa. Με τις μέχρι τώρα μελέτες δεν έχει εξακριβωθεί η πλήρης λειτουργία της, αν και εμφανίζει ποικίλα ορθόλογα γονίδια σε πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης (αμινοξέα 105-240) είναι αυτή που εμφανίζει την υψηλότερη συντήρηση ανάμεσα στα ορθόλογα γονίδια, σε ένα ποσοστό 45 με 67%. Ωστόσο, σε κανένα από αυτά τα ορθόλογα γονίδια δεν έχει ταυτοποιηθεί η λειτουργία τους ή δεν φαίνεται να φέρουν κάποιο χαρακτηριστικό μοτίβο που να εντάσσει την πρωτεΐνη σε συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά, έχει προσδιοριστεί ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού, στις περιοχές των αμινοξέων 223-238 και 245-262, οι οποίες ανήκουν σε μια ευρύτερη περιοχή πλούσια σε λυσίνη (αμινοξέα 129-269), μετά από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών, τόσο για την ανασυνδυασμένη

πρωτεΐνη όσο και για την ενδογενή πρωτεΐνη, η οποία ανιχνεύθηκε με ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα (Sarafidou et al., 2004).

3.5.1 Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης FRA10AC1 με άλλες πρωτεΐνες

Ο προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (PPI), πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων καθώς και η χωροχρονική τους δυναμική είναι μεγίστης σημασίας για την κατανόηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών και των αντίστοιχων βιολογικών οδών τους, και μακροπρόθεσμα για την αποσαφήνιση της συντονισμένης οργάνωσης και αλληλεπίδρασης αυτών των πολύπλοκων βιολογικών δικτύων. Η ταυτοποίηση PPI είναι ακόμη πιο απαραίτητη όταν δεν υπάρχουν υποδείξεις για τη λειτουργία της υπό διερεύνηση πρωτεΐνης, όπως και στην περίπτωση των πρωτεϊνών που στερούνται μιας ήδη γνωστής περιοχής, ή όταν δεν υπάρχει καμία πληροφορία σχετικά με το βιολογικό ρόλο ενός από ορθόλογα τους. Τα τελευταία χρόνια έχουν συσσωρευτεί πολλά πειραματικά τεκμηριωμένα δεδομένα PPI που αφορούν το πρωτόμα οργανισμών μοντέλων, π.χ. *D. melanogaster*, *C. Elegans* (Gavin et al., 2002, Giot et al., 2003, Ito et al., 2001, Li et al., 2004, Uetz et al., 2000), αλλά και ανθρώπινου πρωτεώματος (Stelzl et al., 2005, Rual et al., 2005, Hegele et al., 2012), καθώς επίσης, έχουν γίνει προσπάθειες για την ανακατασκευή δικτύων πρωτεϊνών σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Η πλέον συνηθέστερη στρατηγική προσδιορισμού δυαδικών αλληλεπιδράσεων βασίζεται στο σύστημα «δυο-υβριδίων» στο ζωικό μοντέλο του σακχαρομύκητα (*Y2H*), είτε από μικρής είτε από μεγάλης κλίμακας πειράματα, σε συνδυασμό με προηγμένες μεθοδολογίες αλληλούχισης του γονιδιώματος (next generation sequencing).

Τα συνδυασμένα *in vitro* και *in vivo* αποτελέσματα που συμβάλουν στη διερεύνηση της λειτουργίας της FRA10AC1, υποδεικνύουν την άμεση αλληλεπίδραση της με δύο πρωτεΐνες, την DGCR14 και την SAP145, οι οποίες συμμετέχουν στον μηχανισμό συναρμογής του πρόδρομου mRNA. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η κεντρική περιοχή της FRA10AC1 (αμινοξέα 96-253) αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή της DGCR14 (αμινοξέα 294-472) (Sarafidou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αντίστοιχα η πρωτεΐνη SAP145 κωδικοποιείται από το γονίδιο *SF3B2* και αποτελεί συστατικό του συμπλόκου U2 snRNP και βοηθάει το σύμπλοκο αυτό να συνδεθεί στο πρόδρομο mRNA κατά την διαδικασία της συναρμογής (Gozani et al., 1996, Lardelli et al., 2010, Golas et al., 2003). Επιπροσθέτως, στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1 φαίνεται να ανήκουν και άλλες πρωτεΐνες που εντοπίζονται αποκλειστικά ή εν μέρει στον πυρήνα του κυττάρου. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες: Α) παράγοντες συναρμογής, όπως η πρωτεΐνη U2AF1, η οποία αναγνωρίζει συντηρημένες τερματικές AG 3'περιοχές συναρμογής (Wu et al., 1999), η πρωτεΐνη PRPF3, ένα συστατικό του τριμερές συμπλόκου (tri-snRNP) που αποτελείται από τις υπομονάδες U5 και U4/U6 snRNP (Maita et al., 2005), η πρωτεΐνη MFAP1, η οποία απαιτείται για την επεξεργασία του πρόδρομου mRNA στη *Drosophila* (Andersen et al., 2008),

καθώς και οι πρωτεΐνες IK, CHERP και HABP4, που επηρεάζουν την επιλογή των θέσεων συναρμογής (Spartz et al., 2004, Bressan et al., 2009, Sasaki et al., 2013). Β) πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη ρύθμιση της μεταγραφής, όπως η πρωτεΐνη NKAP, που ενεργοποιεί τον αναστολέα NF-kB (Chen et al., 2003) και η πρωτεΐνη SAP30BP, η οποία εμπλέκεται στη μεταγραφική καταστολή (Chen et al., 2010), και Γ) πρωτεΐνες που συμβάλουν στην εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα, όπως η πρωτεΐνη THOC1, ένα συστατικό του συμπλόκου THO (Cheng et al., 2006).

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η θέση της FRA10AC1 ανήκει σε ένα υποδίκτυο του πρωτεϊνικού μηχανισμού συναρμογής και μπορούν να συμβάλουν στο πώς η FRA10AC1 μπορεί να εμπλέκεται σε αυτόν ή σε κάποιο άλλο λειτουργικά συναφή μηχανισμό επεξεργασίας του RNA. Ωστόσο, η ακριβή θέση της στα σύμπλοκα συναρμογής και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της πρέπει να αναλυθούν περαιτέρω στο πλαίσιο ενός πιο διευρυμένου πρωτεϊνικού δικτύου. Μέχρι στιγμής, οι ποσοτικές βιοχημικές μελέτες των συμπλοκών συναρμογής δείχνουν ότι η FRA10AC1 είναι πιθανώς μία πρωτεΐνη που δεν έχει βασικό ρόλο στο σωματίο συναρμογής, με βάση την σχετικά χαμηλή συγκέντρωσή της στα αντίστοιχα παρασκευάσματα. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η FRA10AC1 ανιχνεύεται μόνο στα τελευταία σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής, δηλαδή τα καταλυτικά δραστικά σύμπλοκα συναρμογής Bact και C, καθώς και στο μετα-καταλυτικό σύμπλοκο P, θα μπορούσε να σημαίνει ότι πρόκειται για έναν προσαρμογέα ή μια ρυθμιστική πρωτεΐνη, η οποία πιθανώς συνδέει την διαδικασία της συναρμογής με άλλους κυτταρικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να συσχετιστεί με συγκεκριμένα ρυθμιστικά συστατικά, όπως μικρά RNAs, τα οποία ελέγχουν συντονισμένα τη μετα-μεταγραφική τύχη μορίων που σχετίζονται λειτουργικά με τα mRNAs. Παρά το γεγονός ότι η πρωτεΐνη FRA10AC1 στερείται χαρακτηριστικών μοτίβων πρόσδεσης RNA, αλληλεπιδρά άμεσα με γνωστά μόρια που περιέχουν (π.χ. SF3B2), ή πρόσφατα ταυτοποιημένες πρωτεΐνες δέσμησης RNA (π.χ. PRPF3). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη την πρόσφατη σημαντική αύξηση των πρωτεϊνών σύνδεσης του RNA, το οποίο περιλαμβάνει πλέον εκατοντάδες πρωτεΐνες που δεν αναμενόταν προηγουμένως να εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η FRA10AC1 θα μπορούσε επίσης να είναι μια πρωτεΐνη δέσμησης RNA (Sarafidou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

3.6 Μηχανισμός συναρμογής (splicing)

Στα γονίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών εμφανίζονται περιοχές με μεγάλη ετερογένεια ως προς το μέγεθος αλλά και τον αριθμό τους. Οι περιοχές αυτές αποκόπτονται από το mRNA με μια διαδικασία γνωστή ως συναρμογή ή ωρίμανση του mRNA (splicing), η οποία λαμβάνει χώρα στον πυρήνα. Η διαδικασία της συναρμογής επιτελείται από σωματίδια συναρμογής (spliceosomes), δηλαδή μακρομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών και μικρών μορίων RNAs (U

snRNAs, uridine-rich small nuclear RNAs) τα οποία συναρμολογούνται διαδοχικά πάνω στο πρόδρομο mRNA (Will C.L., Lührmann R., 2001). Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snRNPs) που συμμετέχουν στην συναρμογή χωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση τα αντίστοιχα U snRNAs που περιέχουν και αποτελούν το μείζον (U1, U2, U4/U6 και U5) και το ελάσσον σωματίο συναρμογής (U11, U12, U4atac, U6atac) (Sharp P.A., Burge C.B., 1997). Το σωματίο συναρμογής σχηματίζεται αρχικά πάνω στο πρόδρομο mRNA και οι υπομονάδες U snRNP αναγνωρίζουν τα όρια εξονίων-ιντρονίων και στρατολογούν τους παράγοντες που καταλύουν τη συναρμογή του πρόδρομου mRNA. Αυτή η στρατολόγηση γίνεται με συγκεκριμένη σειρά με αποτέλεσμα ο σχηματισμός του σωματίου συναρμογής να επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση των συστατικών του και την διαδοχική δημιουργία πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων (Lewin B., 2004). Το πρώτο βήμα για το μείζον σωματίο συναρμογής είναι ο σχηματισμός του συμπλόκου E, το οποίο περιλαμβάνει την υπομονάδα U1 snRNP και έπειτα μετατρέπεται σε πρόδρομο σύμπλοκο A με την πρόσδεση της υπομονάδας U2 snRNP (Lewin B., 2004, Green M.R., 1991, Guthrie C., 1991). Στο πρόδρομο αυτό σωματίο συνδέεται ένα τριμερές σύμπλοκο (tri-snRNP) που αποτελείται από τις υπομονάδες U5 και U4/U6 snRNP, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου B1. Παρά το γεγονός ότι όλα τα snRNPs είναι παρόντα στο σύμπλοκο B1, εξακολουθεί να είναι καταλυτικά αδρανές και απαιτείται ανακατατάξη των υπομονάδων του. Έτσι, με την αποσταθεροποίηση των υπομονάδων U1 και U4 snRNP μετατρέπεται στο σύμπλοκο B2 (ή B^{act}), το οποίο εν συνεχεία μετασχηματίζεται στο σύμπλοκο C, με την βοήθεια του οποίου πραγματοποιείται το καταλυτικό βήμα της συναρμογής. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις, στις οποίες πρέπει να λάβουν χώρα δομικές αναδιατάξεις για την τοποθέτηση του πρόδρομου mRNA στις σωστές ενεργές θέσεις (3' και 5' θέσεις συναρμογής), έτσι ώστε να απελευθερωθεί το ιντρόνιο και παράλληλα να συνδεθούν τα εξώνια. Τέλος, το σωματίο συναρμογής διασπάται και τα snRNPs ανακυκλώνονται για επόμενους γύρους συναρμογής (Lewin B., 2004, Green M.R., 1991, Guthrie C., 1991).

3.6.1 Συμμετοχή της FRA10AC1 στο σωματίο συναρμογής

Αρκετές πρωτεΐνες φαίνεται να αποτελούν τον πυρήνα του σωματίου συναρμογής και απαιτούνται για την ενεργοποίησή του (Bessonov et al., 2008). Το σωματίο συναρμογής υφίσταται σημαντικές αλλαγές στην πρωτεϊνική και ριβονουκλεϊκή σύσταση του κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της συναρμογής. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταβάσεις μεταξύ των διαφορετικών συμπλόκων είναι συχνά συνοδευόμενες από δραματικές ανακατατάξεις στις αλληλεπιδράσεις των συστατικών του σωματίου. Γνωρίζοντας τις πρωτεΐνες και την αντίστοιχη στοιχειομετρία τους σε κάθε στάδιο, είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και την ρύθμιση της συναρμογής. Οι πρωτεομικές αναλύσεις παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία και την ρύθμιση των πρωτεϊνικών

συμπλόκων. Με εφαρμογή ανεξάρτητων προσεγγίσεων, που στηρίζονται στις βασικές αρχές της τεχνικής φασματομετρίας μάζας (MS), έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των εν λόγω πρωτεϊνών. Επιπλέον, με την σήμανση των πρωτεϊνών με σταθερά ισότοπα ομαδοποιήθηκαν στα επιμέρους σύμπλοκα του σωματίου συναρμογής. Σύμφωνα με αποτελέσματα μόνο ένα πολύ μικρό υποσύνολο πρωτεϊνών (U snRNPs) παραμένει αμετάβλητο κατά τη μετάβαση από το σύμπλοκο B προς το σύμπλοκο C.

Όπως φαίνεται και στους πίνακες 3.6.1, 3.6.2 και 3.6.3 η πρωτεΐνη FRA10AC1 βρέθηκε σε χαμηλές ποσότητες ως συστατικό του σωματίου συναρμογής και πιο συγκεκριμένα στα επιμέρους σύμπλοκα B^{act} (Bessonon et al., 2010), C (Bessonon et al., 2008, Bessonon et al., 2010, Ilagan et al., 2013) και P (Ilagan et al., 2013), γεγονός που πιθανώς υποδηλώνει ότι σχετίζεται με το πρώτο καταλυτικό βήμα της διαδικασίας ή κάποια άλλη λειτουργία που συνδέεται στενά με αυτή τη διαδικασία.

Πίνακας 3.6.1: Πρωτεϊνική σύνθεση των συμπλόκων B και C του σωματίου συναρμογής.

Protein ^a				Number of peptides sequenced in B and C complex preparations ^b					1M Top Core	C ^d
	MW (kDa)	GenBank accession no.	B ^c	B #1	B #2	C #1	C #2			
Potential C-complex specific proteins ^f										
PPIG (SRcyp)	88.5	gi 42560244			2	22	14	36		
FAM50A (HXC-26,XAP-5)	40.1	gi 4758220				13	16	26		
FAM50B	38.6	gi 6912326				8	12			
C9orf78 (HSPC220, LOC51759)	33.7	gi 7706557				11	9	10		
C10orf4 (LOC118924, <u>FRA10AC1</u>)	37.5	gi 24432067				20	4	7		
CXorf56 (FLJ22965)	25.6	gi 11545813				17	34	23		
DGCR14	52.4	gi 13027630				5	4			
CCDC130	44.7	gi 13540614				6	5			
TOE1 (FLJ13949)	56.4	gi 156564398				2	2	3		
NKAP (FLJ22626)	47	gi 13375676				7	13			
ZCCHC10 (FLJ20094)	18.4	gi 8923106				4	10	10		
CDK10 (PISSLRE)	35.4	gi 16950647					10	10		
TTC14	88.2	gi 33457330					16	17		
WDR70	73.2	gi 8922301					1	5		
NFKBIL1 (IKBL)	43.1	gi 26787991				10		5		
JUP	81.6	gi 12056468				2		3		

Πίνακας 3.6.1: Οι πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) μετά από διαχωρισμό με SDS-PAGE (προσαρμοσμένος από Bessonon et al., 2008).

Πίνακας 3.6.2: Πρωτεϊνική σύνθεση των συμπλόκων B, Bact και C του σωματίου συναρμογής.

Protein	Genbank accession no.	kDa	B	B	B ^{act}	PM5-10	B ^{act} PM5-20	C MINX-GG	C PM5
Abundant first in C complex									
Abstrakt	gi 21071032	69.8		3		1	4	228	180
HSP70	gi 5123454	70	17	8				30	20
PPWD1 (KIAA0073, Cyp64)	gi 24308049	73.6					1	69	43
PPase-like 3b	gi 19557636	18.6					2	19	10
GClP p29 (ISAP29)	gi 46371998	28.7				14	11	74	31
DDX35	gi 20544129	78.9		7		9	23	31	24
C19orf29(NY-REN-24, cactin)	gi 126723149	88.6					1	66	71
PPIG (SRcyp)	gi 42560244	88.5		2		1	1	24	29
C10orf4(LOC118924, <u>FRA10AC1</u>)	gi 24432067	37.5					3	33	19
C1orf55 (FLJ 35382)	gi 148664216	39.3						46	29
C9orf78(HSPC220, LOC51759)	gi 7706557	33.7						10	12

Πίνακας 3.6.2: Οι πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) μετά από διαχωρισμό με SDS-PAGE (προσαρμοσμένος από Bessonov et al., 2010).

Πίνακας 3.6.3: Πρωτεϊνική σύνθεση των συμπλόκων C και P του σωματίου συναρμογής.

Acc	Gene symbol	aka	MW (kD)	C P	
				#unique-peptides	
Recruited at C					
Q95926	SYF2	ISAP29	28.7	14	13
Q9H5Z1	DHX35	KAIA0875	78.9	14	
Q8WUQ7	CACTIN	C19orf29	88.7	4	27
Q9UJV9	DDX41	Abstrakt	69.8	3	34
Q96DF8	DGCR14	DGSI	52.6	14	11
Q96BP3	PPWD1	KIAA0073	73.6	-	3
Q9H2H8	PPIL3	CypI	18.2	8	10
Q13427	PPIG	SR-Cyp	88.6	1	2
Q6IQ49	C1orf55		49.7	-	8
Q9NZ63	C9orf78	HSPC220	33.7	-	12
Q9Y421	FAM32A	OTAG12	13.2	7	10
Q14320	FAM50A	XAP-55	40.2	-	9
Q70Z53	<u>FRA10AC1</u>	C10orf4	37.5	7	4
Q9H5V9	CXorf56	FLJ22965	25.6		10
Q9BRX9	WDR83	MORG1	34.3	3	
Q96BZ8	LENG1		30.5	7	4
Q9UQ35	SRRM2	Srm300	299.6	41	47

Πίνακας 3.6.3: Οι πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας (MS/MS) μετά από διαχωρισμό με SDS-PAGE (προσαρμοσμένος από Hagan et al., 2013).

4. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία εντάσσεται στην ευρύτερη προσπάθεια λειτουργικής ανάλυσης της πρωτεΐνης FRA10AC1 του ανθρώπου. Ειδικότερα, η εργασία στοχεύει στην παραγωγή σε βακτήρια και στη βιοχημική απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης FRA10AC1 πλήρους μήκους (315 αμινοξέα) σε ποσότητα αρκετή για επόμενες μελέτες, π.χ. κρυστάλλωση, δοκιμές αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών κλπ., καθώς και της FRA10AC1₁₋₂₅₅, η οποία στερείται τα τελευταία 60 αμινοξέα της αρχικής πρωτεΐνης, επειδή το καρβοξυτελικό της άκρο φαίνεται να είναι πολύ όξινο ($pI \sim 3.70$) και ίσως προκαλούσε τοξικότητα στα βακτήρια. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού το DNA που κωδικοποιεί τις δύο πρωτεΐνες εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα *pGEX_6P_1* και μελετήθηκε η έκφρασή του σε τρεις κυτταρικές σειρές βακτηριακών στελεχών. Διεξήχθη προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών: της συγκέντρωσης του αντιδραστηρίου επαγωγής ισοπροπυλο β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη (IPTG) και της θερμοκρασίας επαγωγής της έκφρασης των πρωτεϊνών.

5. ΥΛΙΚΑ

5.1 Αντιδραστήρια

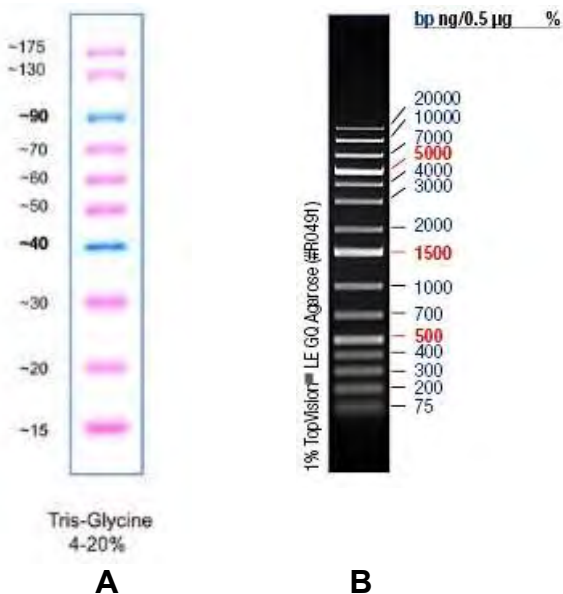
Για όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο H₂O. Όπου χρειαζόταν ακολουθούσε υγρή αποστείρωση σε κλίβανο για 40 min υπό πίεση 15 lb/in².

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες: *Bam*HI (New England Biolabs, R0136S), *Xho*I (New England Biolabs, R0146S)

Ένζυμα: Liquid RNase A (Macherey-Nagel, REF 740397), T4 DNA ligase (Takara, 2011A), Proteinase K (Macherey-Nagel, LOT P141006S)

Αντιβιοτικά: αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη

Οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του μεγέθους των πρωτεϊνών και των τμημάτων του DNA ήταν οι PiNK Prestained Protein Ladder (15-175 kDa) και GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (75-20000 bp) αντίστοιχα.



Εικόνα 5.1: Μάρτυρες μοριακών βαρών: PiNK Prestained Protein Ladder (A) και GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (B).

5.2 Θρεπτικά Υλικά

LB (Luria Bertani): Υγρό μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων, pH= 7,2 ± 0,2

10 gr NaCl ανά λίτρο

10 gr casein-tryptone ανά λίτρο

5 gr yeast-extract ανά λίτρο

Για τις στερεές καλλιέργειες προστίθενται στα παραπάνω 15 gr άγαρ/lιτ υλικού

LB agar Cat. No 01-385, Scharlau Microbiology, LB υγρό Cat. No 02-385, Scharlau Microbiology

5.3 Διαλύματα

Ρυθμιστικό διαλύμα 1×

- ❖ 0,02 % SDS
- ❖ 50 mM Tris-HCl (pH= 7.5)
- ❖ 100 mM NaCl
- ❖ 2 mM EDTA (pH= 7.5)

Ρυθμιστικό διαλύμα NEB Buffer 3.1 1×

- ❖ 100 mM NaCl
- ❖ 50 mM Tris-HCl (pH= 7.9)
- ❖ 10 mM MgCl₂
- ❖ 100 μg/mL BSA

Ρυθμιστικό διαλύμα Cut Smart Buffer 1×

- ❖ 50 mM Potassium Acetate
- ❖ 20 mM Tris-acetate (pH= 7.9)
- ❖ 10 mM Magnesium Acetate
- ❖ 100 μg/mL BSA

Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50×

- ❖ 200 mM Tris
- ❖ 200 mM CH₃COOH
- ❖ 1 mM EDTA (pH= 8.0)

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης δείγματος DNA (loading buffer)

- ❖ 25 mg μπλε χρωστική της βρωμοφαινόλης 0.25%
- ❖ 3 mL γλυκερόλη 30%

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% (100 mL)

- ❖ 29,2 g ακρυλαμίδιο
- ❖ 0,8 g N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο

Πήκτωμα διαχωρισμού 12% (separating gel, 10 mL)

- ❖ 4 mL διάλυμα ακρυλαμίδιου (30%)
- ❖ 100 μL 10% SDS
- ❖ 2,5 mL 1,5M Tris-HCl (pH 8.8)
- ❖ 4 μL N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο (TEMED)
- ❖ 100 μL 10% υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium PerSulfate, APS)

Πήκτωμα συμπύκνωσης 5% (stacking gel, 10 mL)

- ❖ 1,7 mL διάλυμα ακρυλαμίδιου (30%)
- ❖ 100 μL 10% SDS
- ❖ 1,25 mL 1M Tris-HCl (pH 6.8)
- ❖ 10 μL N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο (TEMED)
- ❖ 100 μL 10% υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium PerSulfate, APS)

Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Διάλυμα P1

- ❖ 15 mM Tris-HCl (pH= 8.0)
- ❖ 10 mM EDTA (pH= 8.0)

Διάλυμα P2

- ❖ 200 mM NaOH
- ❖ 1% SDS

Διάλυμα P3

- ❖ 3M CH₃COOK (pH=5.5)

5.4 Εκκινητές

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Lab supplies. Σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε με την αντίδραση PCR να σχηματιστεί cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1*.

Εμπρόσθιος (F)

5'- ACTAAGCTTAGGATGCATGGTCATGGAGGC -3'

με θερμοκρασία υβριδοποίησης Tm= 61.4 °C

Ανάστροφος (R)

5'- GGCTCTAGATCATAGAAACAAATCCTGAAAATACTCA -3'

με θερμοκρασία υβριδοποίησης Tm= 58.3 °C

5.5 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν ως ξενιστές στη παρούσα μελέτη είναι τα ακόλουθα:

Host Strain	Genotype	Description
Dh5-Alpha	F ⁻ dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi 1 gyrA96 relA1	higher stability and transformation by cloning procedures
BL21-Gold (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm ⁺ Tet ^r λ(DE3) endA Hte	high-level protein expression and easy induction
B834 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm ⁺ met λ(DE3)	high specific-activity labeling of target proteins
B834 pLysS (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm ⁺ met λ(DE3) pLysS (Cam ^R)	stabilizing recombinants encoding target proteins

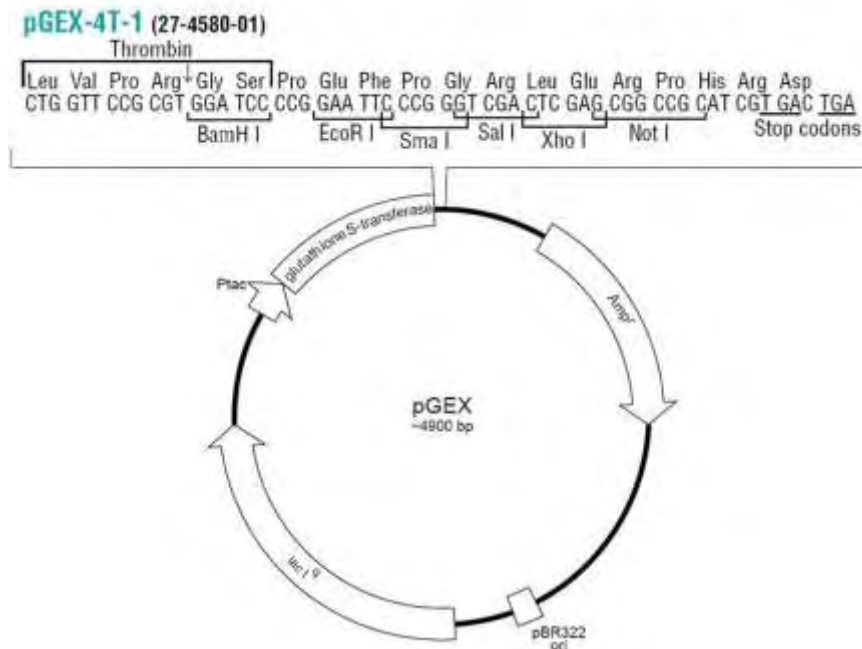
Dh5-Alpha (Dh5aTM Competent cells, Cat.No 18265-017, invitrogen): Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό κατά την κλωνοποίηση των τμημάτων cDNAs των γονιδίων *FRA10AC1* και *FRA10AC1*₁₋₂₅₅ σε πλασμιδιακούς φορείς *pGEX_6P_1*.

BL21-Gold (DE3), **B834 (DE3)**, **B834 pLysS (DE3)**: Στελέχη βακτηρίων που χρησιμοποιούνται για την υπερέκφραση χημικών πρωτεϊνών. Τα στελέχη αυτά διαθέτουν ένα παράγωγο του βακτηριοφάγου λ, τον βακτηριοφάγο DE3, που βρίσκεται σε λυσιγονία. Ο βακτηριοφάγος αυτός φέρει το γονίδιο της RNA πολυμεράσης T7 υπό τον έλεγχο του υποκινητή της λακτόζης (lacUV5), ο οποίος επάγεται με IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, σταθερό συνθετικό ανάλογο της λακτόζης). Η προσθήκη IPTG απενεργοποιεί τον καταστολέα της

λακτόζης και επάγει τη σύνθεση της β-γαλακτοζιδάσης, επάγοντας την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων που είναι υπό τον έλεγχο του οπερονίου της λακτόζης. Έτσι, προσθέτοντας IPTG σε κύτταρα μετασχηματισμένα με ένα πλασμίδιο που διαθέτει τον υποκινητή T7, παράγεται η RNA πολυμεράση T7 που με τη σειρά της μεταγράφει το γονίδιο που έχει κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο. Τα στελέχη B834 *rLysS* περιέχουν επιπλέον το πλασμίδιο *rLysS*, το οποίο φέρει τον παράγοντα που προσδίδει ανθεκτικότητα σε χλωραμφενικόλη και το γονίδιο της λυσοζύμης που εκφράζεται σε χαμηλά αλλά σταθερά επίπεδα. Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που διασπά ένα ειδικό δεσμό στο στρώμα πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος της *E. coli* (Inouye et al., 1973) και προσδένεται στην RNA πολυμεράση T7, εμποδίζοντας τη μεταγραφή της (Huang et al., 1999, X. Zhang et al., 1997). Έτσι, τα χαμηλά επίπεδα T7 RNA πολυμεράσης που υπάρχουν στο βακτήριο αναστέλλονται από τη λυσοζύμη. Συνεπώς, η παρουσία του πλασμιδίου *rLysS*, αυξάνει την ανοχή του λυσογόνου λDE3 για πλασμίδια που περιέχουν ενθέματα με τοξική δράση. Με αυτό το τρόπο, επιτυγχάνεται η υψηλή έκφραση πρωτεϊνών με τοξική δράση.

5.6 Πλασμιδιακές κατασκευές

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πλασμιδιακές κατασκευές: *pGEX_4T_1/FRA10AC1* που περιέχει το cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1* και *pGEX_4T_1/FRA10AC1₁₋₂₅₅* που περιέχει το cDNA του γονιδίου *FRA10AC1₁₋₂₅₅*. Το πλασμίδιο *pGEX_4T_1* περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (πολυσυνδέτης). Οι πλασμιδιακές κατασκευές περιέχουν τα τμήματα cDNAs ανάμεσα στις θέσεις των περιοριστικών ενδονουκλεασών *BamHI* και *EcoRI*, οι οποίες βρίσκονται στην περιοχή του πολυσυνδέτη και μετά την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη GST. Ο πλασμιδιακός φορέας *pGEX_4T_1* έχει μέγεθος 4969bp, περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του *lac*



οπερονίου και τον υποκινητή ΡΤac (Εικ. 5.2).

Εικόνα 5.3: Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης *pGEX_4T_1*: Σχηματικά φαίνονται ο υποκινητής του πλασμιδίου, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, η περιοχή έναρξης της αντιγραφής (*ori*), το γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του *lac* οπερονίου *lacI*, η περιοχή κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (*GST*), η περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (πολυσυνδέτης).

5.7 Πλασμιδιακοί φορείς

Οι φορείς *pGEX* μπορούν να εκφράσουν ξένα πεπτίδια τα οποία θα είναι συντηγμένα με την πρωτεΐνη τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GST*). Η πρωτεΐνη που παράγεται είναι κατά κανόνα διαλυτή και απομονώνεται εύκολα μετά από λύση των βακτηριακών κυττάρων, κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες. Αρχικά προσροφάται σε σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης και εκλύεται όταν προστεθεί ελεύθερη γλουταθειόνη σε περίσσεια.

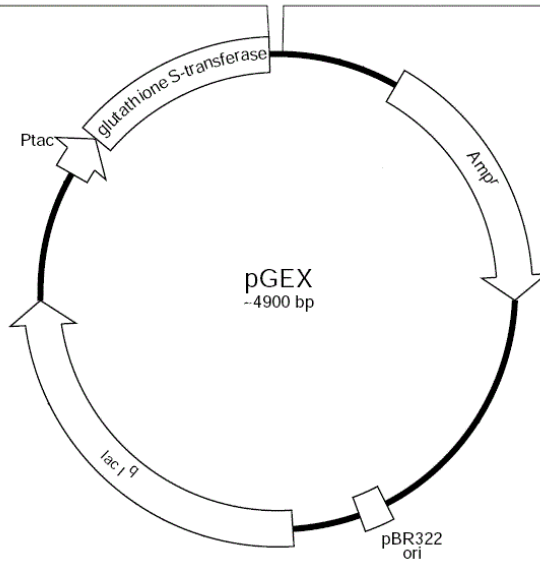
Πλασμιδιακός φορέας *pGEX_6P_1*

Το πλασμίδιο αυτό περιέχει την περιοχή κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (*GST*) στην 5' πλευρά της περιοχής πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (πολυσυνδέτης). Ο πλασμιδιακός φορέας *pGEX_6P_1* έχει μέγεθος 4984bp, περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του *lac* οπερονίου και τον υποκινητή ΡΤac. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας επιλέχθηκε διότι χρησιμοποιεί ένα σύστημα διάσπασης των χιμαιρικών *GST*-πρωτεϊνών μέσω της πρωτεάσης 3C (Εικ. 5.4).

pGEX-6P-1 (27-4597-01)

PreScission™ Protease

Leu	Glu	Val	Leu	Phe	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	His
CTG	GAA	GTT	CTG	TTC	CAG	GGG	CCC	CTG	GGA	TCC	CCG	GAA	TTC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	CGG	CCG	CAT
								BamH I	EcoR I			Sma I	Sal I	Xho I	Not I						



Εικόνα 5.4: Πλασμδιακός φορέας κλωνοποίησης pGEX_6P_1: Σχηματικά φαίνονται ο υποκινητής του πλασμιδίου, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη, η περιοχή έναρξης της αντιγραφής (ori), το γονίδιο για την έκφραση του καταστολέα του lac οπερονίου lacI, η περιοχή κωδικοποίησης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), η περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης (πολυσυνδέτης).

6. ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Λαμβάνονται από τους -80°C τα επιθυμητά βακτηριακά στελέχη τα οποία έχουν καταστεί ικανά προς μετασχηματισμό, και τοποθετούνται σε πάγο για 10 λεπτά. Σ' αυτά προστίθενται ανάλογη ποσότητα DNA και παραμένουν στον πάγο για 15 min. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβάλλονται σε "heat shock", δηλαδή τοποθετούνται στους 42°C για 90 sec. Επανατοποθετούνται στον πάγο για 1 λεπτό. Ακολουθεί προσθήκη 1 mL LB θρεπτικού μέσου (χωρίς αντιβιοτικό). Έπεται επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 1 ώρα.

6.2 Καλλιέργεια βακτηρίων σε τριβλία Petri

Στην συνέχεια τα κύτταρα υποβάλλονται σε "short spin" μέχρι 12000 rpm, ώστε να καθιζάνουν πλήρως. Ακολούθως, αφαιρείται το υπερκείμενο και τοποθετούνται 80 μL από το tube των μετασχηματισμένων κυττάρων, κατόπιν ανάδευσης αυτών ώστε να επαναδιαλυθούν όσα έχουν καθιζάνει, σε τριβλίο Petri που περιέχει το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και αντιβιοτικό επιλογής. Ο βρόχος ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί για το άπλωμα των κυττάρων στο τριβλίο Petri πυρακτώνεται και έπειτα τοποθετείται στο άκρο του τριβλίου Petri ώστε να κρυσώσει και στη συνέχεια χρησιμοποιείται. Τελικά, τα τριβλία Petri τοποθετούνται ανάποδα στους 37°C ολονύκτια.

6.3 Μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Τοποθετούνται από 6 mL LB θρεπτικού μέσου σε falcon των 15 mL, στα οποία έχει προστεθεί αμπικιλίνη συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Κατόπιν λαβάνονται μοναδιαίοι κλώνοι από τα τριβλία Petri με τη βοήθεια tip και τελικά τοποθετούνται στο υγρό θρεπτικό μέσο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 2 ώρες.

6.4 Μεγάλης κλίμακας υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Τοποθετούνται σε δίδλιτρες φλάσκες από 100 mL LB θρεπτικού μέσου, στις οποίες έχει προστεθεί αμπικιλίνη συγκέντρωσης 1 µg/mL. Κατόπιν αδειάζουμε τα falcon με τις αποικίες στο υγρό θρεπτικό μέσο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 15-16 ώρες.

6.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας υγρή καλλιέργεια και καθαρισμός

1) Μεταφέρονται κάθε 100 mL των υγρών καλλιεργειών σε 2 falcon των 50 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στα 3000 rpm, στους 4°C. Απόχυση υπερκείμενου και τοποθέτηση του ιζήματος των κυττάρων σε πάγο.

2) Επαναδιάλυση ιζήματος σε 10 mL του διαλύματος P1. Εν τω μεταξύ διεξάγεται η απόψυξη της λυσοζύμης.

3) Προσθήκη 10 µL λυσοζύμης από απόθεμα με συγκέντρωση 100 mg/ml, απαλό ανακάτεμα και επώαση σε πάγο για 20 λεπτά. Εν τω μεταξύ διεξάγεται η ψύξη του διαλύματος P3 στους 4°C.

4) Προσθήκη 10 mL του διαλύματος P2, το οποίο διασπά τις μεμβράνες, απαλό ανακάτεμα και παραμονή σε RT για 5 λεπτά.

5) Προσθήκη 10 mL του διαλύματος P3, το οποίο κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA. Γρήγορη ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 20 min.

6) Φυγοκέντρηση για 20 min, στα 3000 rpm, στους 4°C. Εφόσον απαιτείται το υπερκείμενο που φέρει το DNA μεταφέρεται κατόπιν φιλτραρίσματος με τη βοήθεια ειδικών φίλτρων (1MM Whatman), σε καθαρά φιαλίδια τύπου falcon των 50 mL. Εναλλακτικά, το υπερκείμενο μεταφέρεται άμεσα σε καθαρά falcon των 50 ml και ξαναφυγοκεντρείται για 15 λεπτά, στα 3000 rpm, στους 4°C. Ακολούθως μεταφέρεται και πάλι σε καθαρά falcon των 50 mL.

7) Προσθήκη 0,8% όγκου του υπερκείμενου ισοπροπανόλη και ανάδευση.

8) Επώαση σε πάγο για 15 λεπτά.

9) Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στα 3000 rpm, σε RT. Απόχυση υπερκείμενου.

10) Πλύση του ιζήματος με προσθήκη 70% αιθανόλης.

11) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 3000 rpm, σε RT. Απόχυση υπερκείμενου. Το ίζημα παραμένει σε RT για 20-30 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.

- 12) Επαναδιάλυση του ιζήματος με αποστειρωμένο ddH₂O. Το προκύπτον διάλυμα παραμένει για 1 ώρα στους 50°C.
- 13) Αναδιάλυση του ιζήματος με RNase A, συγκέντρωσης 100 µg/mL. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C.
- 14) Προσθήκη πρωτεΐνης K, συγκέντρωσης 100 µg/mL, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα 1x.
- 15) Προσθήκη ίσου όγκου μείγματος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλική αλκοόλη. Το μείγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για να αποφευχθεί η κατακρήμνιση αλάτων.
- 16) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 13000 rpm, σε RT.
- 17) Μεταφορά υδάτινης φάσης σε νέο φιαλίδιο τύπου errendorf και προσθήκη ίσου όγκου μείγματος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης και καλή ανάδευση.
- 18) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 13000 rpm, σε RT.
- 19) Μεταφορά υδάτινης φάσης σε νέο φιαλίδιο τύπου errendorf και προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος χλωροφορμίου.
- 20) Σύντομη φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στα 13000 rpm, σε RT.
- 21) Μεταφορά υδάτινης φάσης σε νέο φιαλίδιο τύπου errendorf και προσθήκη 1/10 του όγκου CH₃COONA συγκέντρωσης 3M, το οποίο κρυσταλλοποιεί το DNA. Εναλλακτικά, προσθήκη 1/10 του όγκου 0,2M NaCl.
- 22) Προσθήκη διπλάσιου όγκου 100% αιθανόλης (precooled) και ήπια ανακίνηση.
- 23) Επώαση για 20 λεπτά στους -80°C. Εναλλακτικά, στους -20°C ολονύκτια. Εφόσον κριθεί εφικτό, πραγματοποιείται συλλογή των νημάτων του DNA με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur.
- 24) Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, στα 13000 rpm, στους 4°C. Απόχυση υπερκειμένου.
- 25) Πλύση με προσθήκη 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 13000 rpm, στους 4°C.
- 26) Απόχυση του υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος για 5-10 min στους 55°C.
- 27) Προσθήκη κατάλληλου όγκου αποστειρωμένου ddH₂O.

6.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης του DNA με φωτομέτρηση

Λαμβάνεται 1 μL από το διαλυμα του DNA και προστίθονται 99 μl H_2O σε κυβέτα από χαλαζία. Το δείγμα φωτομετράται σε μήκος κύματος 260 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα H_2O 100 μL . Η συγκέντρωση δίνεται από τον παρακάτω τύπο: $\text{OD}_{260} \times \text{αραίωση} \times 50/1000 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

6.7 Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Η ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών έθεσε το θεμέλιο για τη δημιουργία των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή ξένου DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA, τεμαχίζουν σε συγκεκριμένο σημείο κάθε αλυσίδα αφήνοντας μονόκλινα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις. Ανάλογα με τον τρόπο πέψης, δημιουργούνται τυφλά ή συμπληρωματικά άκρα, τα οποία μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τις συμπληρωματικές βάσεις άλλων κομματιών DNA που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο. Σε αυτή την αρχή βασίζεται η διαδικασία της κλωνοποίησης, κατά την οποία κομμάτια DNA κόβονται ενζυματικά με ειδικά ένζυμα και ενώνονται σε φορείς κλωνοποίησης με στόχο την ευχερέστερη μελέτη τους ή εκμετάλλευσή τους.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πέψεις στις πλασμιδιακές κατασκευές *pGEX_4T_1/FRA10AC1* και *pGEX_4T_1/FRA10AC1₁₋₂₅₅*, με σκοπό να απομονωθούν τα ενθέματα καθώς και στον πλασμιδιακό φορέα *pGEX_6P_1*, με σκοπό να λάβει τα παραπάνω ενθέματα. Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις άριστες συνθήκες λειτουργίας των ενζύμων (pH, θερμοκρασία, μοριακότητα ρυθμιστικού διαλύματος σε άλατα). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *BamHI* (αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-G|GATCC-3') και *XhoI* (αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-C|TCGAG-3'). Ο τεμαχισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με περίσσεια ενζύμου (3-5units/ μg DNA) σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

❖ Για την διπλή πέψη του ενθέματος από τις πλασμιδιακές κατασκευές *pGEX_4T_1/FRA10AC1* και *pGEX_4T_1/FRA10AC1₁₋₂₅₅* χρησιμοποιήθηκαν σε τελικό όγκο πέψης 300 μL οι εξής ποσότητες:

- 1) 150 μL DNA (80 μg)
- 2) 30 μL ρυθμιστικού διαλύματος NEB Buffer 3.1
- 3) 8 μL ενζύμου *BamHI*
- 4) 5 μL ενζύμου *XhoI*
- 5) 107 μL αποστειρωμένο ddH_2O

❖ Για την πέψη του φορέα *pGEX_6P_1* χρησιμοποιήθηκαν σε τελικό όγκο πέψης 280 μL οι εξής ποσότητες:

- 1) 150 μL DNA (μg)
- 2) 28 μL ρυθμιστικού διαλύματος Cut Smart Buffer
- 3) 8 μL ενζύμου *BamHI*
- 4) 94 μL αποστειρωμένο ddH₂O

❖ Για την πέψη του γραμμικού φορέα *pGEX_6P_1/BamHI* χρησιμοποιήθηκαν σε τελικό όγκο πέψης 250 μL οι εξής ποσότητες:

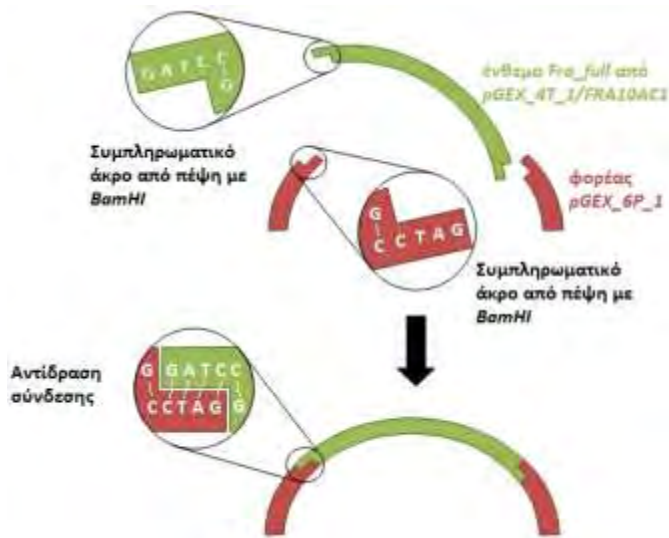
- 1) 100 μL DNA (100 μg)
- 2) 25 μL ρυθμιστικού διαλύματος Cut Smart Buffer
- 3) 9 μL ενζύμου *XhoI*
- 4) 116 μL αποστειρωμένο ddH₂O

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες προστίθενται στο τέλος κάθε πέψης και η επώαση πραγματοποιείται στους 37°C ολονύκτια.

6.8 Αντίδραση σύνδεσης (ligation)

Για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων σύνδεσης προστίθενται ειδικά ένζυμα στα προϊόντα των πέψεων, τα οποία ονομάζονται λιγάσες και έχουν την ικανότητα να επανενώνουν τα τμήματα DNA μέσω σχηματισμού δεσμών μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του ενός κλώνου και της δεοξυριβόζης του άλλου κλώνου (Εικ. 5.5). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η λιγάση του DNA του βακτηριοφάγου T4, η οποία καταλύει αυτούς τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των νουκλεοτιδίων στο DNA (Weiss et al.1968). Με αυτό το τρόπο δημιουργούνται καινούρια μόρια DNA που περιέχουν τμήματα από διαφορετικές πηγές (Watson et al. 2007).

Για τον υπολογισμό των κατάλληλων συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων λήφθηκε υπόψη πως η αναλογία των ελεύθερων άκρων των μορίων του φορέα προς τα μόρια του ενθέματος για προεξέχοντα άκρα και προσανατολισμένη κλωνοποίηση κυμαίνεται σε 1:1 με 1:10.



Εικόνα 5.5: Αντίδραση σύνδεσης: Η λιγάση ενώνει ομοιοπολικά τα συμπληρωματικά άκρα του ενθέματος *Fra_full* με του φορέα *pGEX_6P_1*, τα οποία προέκυψαν από τεμαχισμό με το ένζυμο *BamHI*.

6.9 Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης για την ανάλυση του DNA

Για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους παρασκευάζονται πηκτώματα αгарόζης 1-2% όπως περιγράφεται παρακάτω. Για παράδειγμα, για την παρασκευή 100 mL πηκτώματος αгарόζης 1% χρειάζεται 1 gr αгарόζης το οποίο διαλύεται σε 100 mL 1×TAE. Ακολούθως θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου πάρει βράση. Στη συνέχεια υφίσταται ανακίνηση ώστε να παραχθεί ένα πλήρως ομοιογενές μίγμα. Το διάλυμα παραμένει για μερικά δευτερόλεπτα σε RT και προστίθενται σε αυτό 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 0,1 μg/mL. Ακολουθεί ανακίνηση αυτού ώστε να αναμιχθούν πλήρως τα συστατικά του και απόχυση στο εκμαγείο. Έπειτα τοποθετούνται τα χτενάκια ώστε να σχηματισθούν τα πηγάδια. Το διάλυμα της αгарόζης παραμένει σε RT έως ότου στερεοποιηθεί (περίπου 30-45 min) και έπειτα απομακρύνονται προσεκτικά τα χτενάκια ώστε να παραμείνουν ανέπαφα. Στη συνέχεια, το εκμαγείο τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστίθεται ο απαραίτητος όγκος 1×TAE ώστε να επικαλυφθεί πλήρως το πήκτωμα αгарόζης. Στα επιθυμητά δείγματα DNA προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer), το οποίο περιέχει 0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης, προκειμένου να παρακολουθείται η ηλεκτροφόρηση σε ορατό φως και ακολούθως φορτώνονται στα πηγάδια που έχουν σχηματιστεί.

Εάν τα καλώδια τοποθετηθούν σωστά στη συσκευή ηλεκτροφόρησης θα σχηματιστούν φυσαλίδες στην άνοδο και στην κάθοδο λόγω ηλεκτρόλυσης. Το DNA ως αρνητικά φορτισμένο

λόγω των φωσφορικών ομάδων που φέρει κατευθύνεται προς την άνοδο, ενώ το βρωμιούχο αιθίδιο προς την κάθοδο. Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα DNA μέσω ενός πηκτώματος αγαρόζης εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος και το σχήμα τους. Γενικά, το πλασμιδιακό DNA εμφανίζεται σε τρεις διαμορφώσεις:

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation), στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο και αποτελεί την πιο συμπαγή του μορφή.
2. Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλινα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
3. Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλινα σπασίματα.

Τα μικρότερα τμήματα DNA διαπερνούν πιο γρήγορα τους πόρους της αγαρόζης από τα μεγαλύτερα. Τα τμήματα DNA τα οποία έχουν το ίδιο μέγεθος μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα λόγω διαφορών ως προς τη διαμόρφωσή τους. Για παράδειγμα το κυκλικό πλασμιδιακό DNA το οποίο έχει μεταβληθεί σε γραμμικό μόριο μέσω πέψης από ένα περιοριστικό ένζυμο παρουσιάζει ενδιάμεση κινητικότητα σε σχέση με την χαλαρή και την υπερελικωμένη δομή.

Η εικόνα του πηκτώματος της αγαρόζης γίνεται ορατή με την εκπομπή φωτός του οποίου το μήκος κύματος κυμαίνεται στο φάσμα του υπεριώδους (260-300 nm). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το φθορισμό του βρωμιούχου αιθιδίου και την εμφάνιση του τμήματος του DNA στο πηκτώμα ως μία φθορίζουσα μπάντα. Επίσης, μπορούμε να προσδιορίσουμε ποσοτικά τα δείγματα DNA σε σχέση με κάποιον ποσοτικοποιημένο μάρτυρα (Ladder), ο οποίος περιέχει κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης. Η ποσοτικοποίηση στηρίζεται στην οπτική εκτίμηση του φθορισμού που εκπέμπεται από το άγνωστο δείγμα με τον φθορισμό που εκπέμπει το δείγμα γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης.

6.10 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης διεξάγεται για τον έλεγχο μείγματος πρωτεϊνών ως προς την περιεκτικότητα σε ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη, αλλά και για να διαπιστωθεί αν στα εκλούσματα από τις στήλες Ni περιέχεται μόνο η επιθυμητή πρωτεΐνη καθώς και σε τι κατάσταση βρίσκεται. Το SDS δρα ως αποδιατακτικό απορρυπαντικό, το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται. Επομένως με την εφαρμογή μίας διαφοράς δυναμικού κατά μήκος του πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel) οι πρωτεΐνες μετακινούνται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο μέσω των πόρων

διαφορετικής διαμέτρου που σχηματίζονται σε όλο το μήκος του πηκτώματος κατά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Προκειμένου να ξεκινήσει η μετακίνηση όλων των πρωτεϊνών από το ίδιο «ύψος», τοποθετείται το πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Στο πήκτωμα πακεταρίσματος δημιουργούνται τα πηγαδάκια στα οποία φορτώνονται τα δείγματα. Εφόσον οι πρωτεΐνες ξεκινούν να τρέχουν ταυτόχρονα, οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους μετακινούνται ταχύτερα από αυτές μεγαλύτερου. Κι αυτό γιατί οι πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους διανύουν με μεγαλύτερη ευκολία τους σχηματιζόμενους πόρους του πηκτώματος ανεξάρτητα από το μέγεθος των διαμέτρων τους. Αφού στηθεί το εκμαγείο για την παρασκευή του πηκτώματος της SDS- πολυακρυλαμίδης προστίθεται σε αυτό νερό ώστε να ελεγχθεί αν υπάρχουν διαρροές. Ακολουθεί απόχυση του νερού και όσο απομένει συλλέγεται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Έπειτα παρασκευάζονται τα πηκτώματα πακεταρίσματος και διαχωρισμού σε δύο φιαλίδια τύπου falcon. Για την παρασκευή των δύο πηκτωμάτων απαιτούνται τα παρακάτω: α) για την παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού 12% λαμβάνονται σε στείρες συνθήκες 3,3 mL dH₂O, 2,5 mL Tris HCl 1,5M pH 8.8, 100 μl 10% SDS, 4 mL 30% acrylamide/Bis, 100 μl ammonium persulfate, 4 μl TEMED, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10 mL, β) για την παρασκευή πηκτώματος πακεταρίσματος 5% λαμβάνονται σε στείρες συνθήκες 6,8 mL dH₂O, 1,25 mL Tris HCl 0,5M pH 6.8, 100 μl 10% SDS, 1,7 mL 30% acrylamide/Bis, 100 μl ammonium persulfate, 10 μl TEMED, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται σε 10 mL. Τα δύο τελευταία συστατικά του δεύτερου πηκτώματος προστίθενται μετά την πήξη του πρώτου, το οποίο αμέσως μόλις παρασκευαστεί αποχύνεται με τη βοήθεια πιπέτας στο εκμαγείο μέχρι ένα ορισμένο ύψος. Η πήξη του πηκτώματος διαχωρισμού διαπιστώνεται από την πήξη της ποσότητας αυτού που παραμένει στο falcon. Μετά από την πήξη του πηκτώματος διαχωρισμού προστίθεται με τη βοήθεια πιπέτας το πήκτωμα πακεταρίσματος, στο οποίο τοποθετούνται τα χτενάκια. Αναμονή έως ότου πήξει και το πήκτωμα πακεταρίσματος. Εν τω μεταξύ ετοιμάζονται τα δείγματα τα οποία πρόκειται να φορτωθούν. Το heat block ρυθμίζεται στους 100°C αφού τοποθετηθεί dH₂O στις υποδοχές του, ώστε η θερμοκρασία να κατανέμεται ομοιόμορφα. Λαμβάνονται τα δείγματα από τους 4°C και υφίστανται ανακίνηση πριν από τη λήψη του επιθυμητού όγκου. Έπειτα προστίθενται 5 μl sample buffer 5x σε όλα τα δείγματα. Ακολουθεί σύντομη ανακίνηση των δειγμάτων και τοποθέτηση αυτών στο heat shock για 5 min. Έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο. Μετά από την πήξη του πηκτώματος πακεταρίσματος το εκμαγείο τοποθετείται σε δεξαμενή στην οποία προστίθεται το running buffer 1x. Ακολούθως αφαιρούνται τα χτενάκια και φορτώνονται 25 μl από το κάθε δείγμα σε κάθε βοθρίο και 5 μl marker. Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν η χρωστική φθάσει στο άκρο του τζαμιού. Έπειτα το πήκτωμα μεταφέρεται σε μεγάλο τριβλίο Petri, στο οποίο προστίθεται το διάλυμα χρώσης του πηκτώματος (stain buffer). Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για περίπου 1h. Έπονται πλύσεις του πηκτώματος με dH₂O και θέρμανση αυτού σε microwave για περίπου 4 min επί 5-6 φορές. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα αποχρωματισμού του πηκτώματος (destain buffer). Επώαση υπό ανάδευση σε RT ολονύκτια. Τελικά απομακρύνεται πλήρως το διάλυμα αποχρωματισμού του πηκτώματος με απόχυση και πλύσεις.

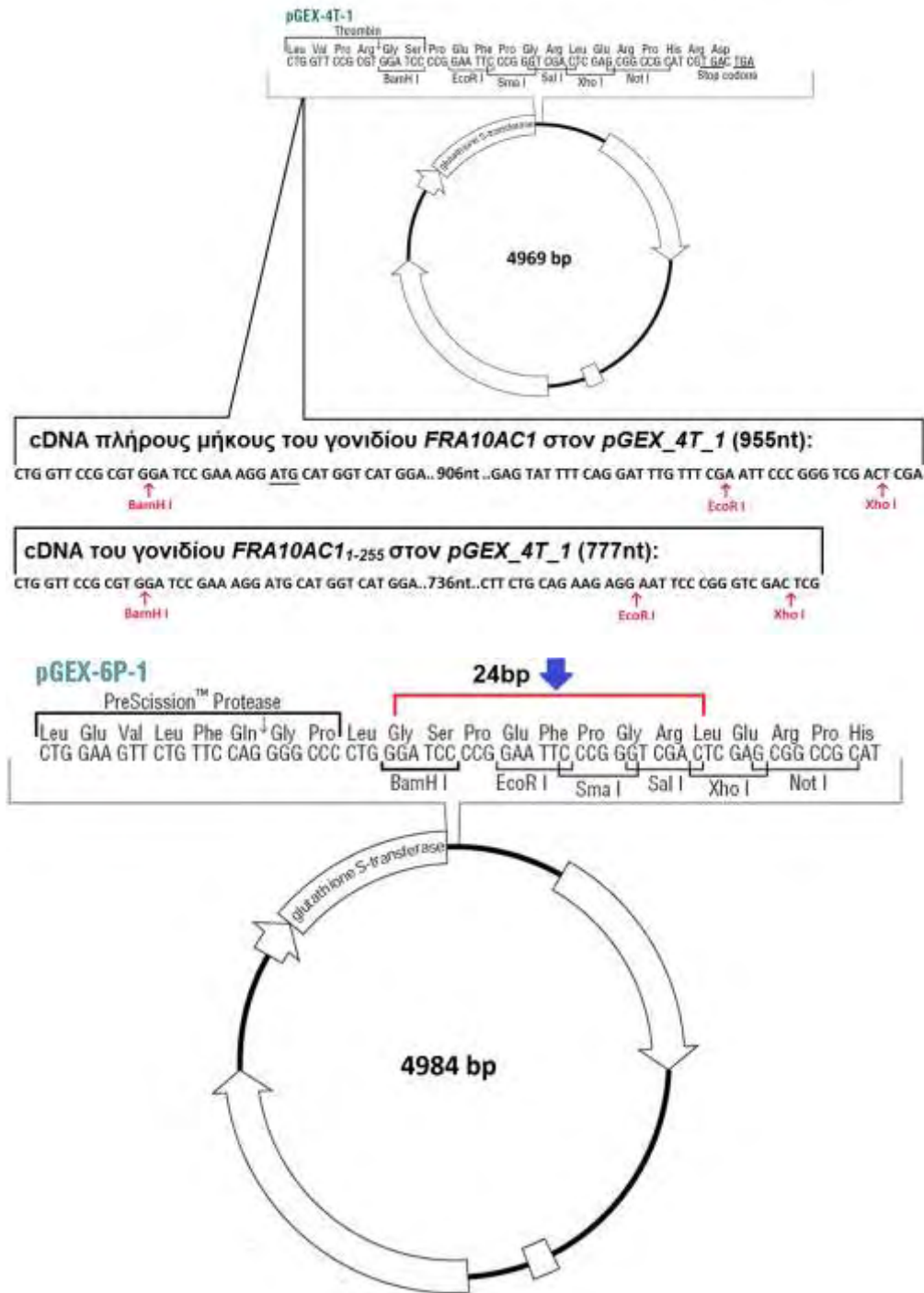
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σκοπός των πειραμάτων ήταν αρχικά η υποκλωνοποίηση των cDNAs (*FRA_full* και *FRA_Stul*) στον φορέα *pGEX_6P_1*, ώστε οι παραγόμενες πρωτεΐνες-στόχοι να εκφραστούν σε βακτήρια ως πρωτεΐνες σύντηξης με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (βλ. Σχέδιο Υποκλωνοποίησης). Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας επιλέχθηκε διότι χρησιμοποιεί ένα σύστημα διάσπασης των χιμαιρικών GST-πρωτεϊνών μέσω της πρωτεάσης 3C. Έχει ήδη γίνει βελτιστοποίηση της παραγωγής της συγκεκριμένης πρωτεάσης.

A. Υποκλωνοποίηση των cDNAs *FRA_full* και *FRA_Stul* στον φορέα *pGEX_6P_1*

Τα αντίστοιχα cDNAs ήταν ήδη κλωνοποιημένα στον φορέα *pGEX_4T_1* (βλ. Εικόνα ... από Υλικά και Μέθοδοι).

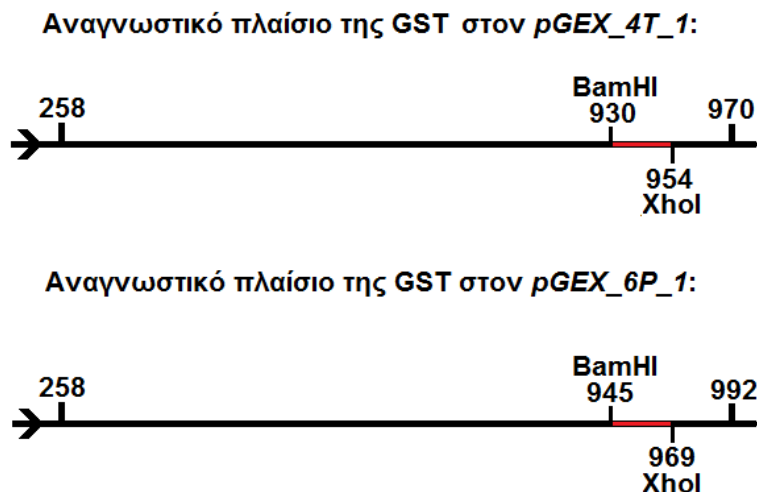
Σαν πρώτο στάδιο γίνεται διπλή πέψη των πλασμιδιακών κατασκευών *FRA_full_pGEX_4T_1*, που περιέχει το cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου και *FRA_Stul_pGEX_4T_1*, που περιέχει το cDNA του γονιδίου μέχρι το σημείο που πέπτει η περιοριστική ενδονουκλεάση *Stul* (νουκλεοτίδιο 777 του cDNA πλήρους μήκους μεγέθους 955 νουκλεοτίδια), με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *XhoI* (**βήμα 1**). Ακολουθεί πέψη του φορέα *pGEX_6P_1* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI* (**βήμα 2**) και εν συνεχεία, με την περιοριστική ενδονουκλεάση *XhoI* (**βήμα 3**). Έπειτα λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις σύνδεσης με τα προϊόντα από τα βήματα 1 και 3 (**βήμα 4**), και τα τελικά προϊόντα των αντιδράσεων μετασηματίζονται σε βακτηριακά στελέχη. Τέλος, με σκοπό την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιείται πέψη και PCR στο πλασμιδιακό DNA των μετασηματισμένων βακτηρίων (**βήμα 5**).



ΣΧΕΔΙΟ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ: Κλωνοποίηση των cDNAs του γονιδίου *FRA10AC1*, *FRA_full* μεγέθους 971bp και *FRA_Stul* μεγέθους 793bp στον φορέα *pGEX_6P_1*. Στο σχέδιο μεγενθύνεται η περιοχή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pGEX_4T_1*, όπου έχει κλωνοποιηθεί το ένθεμα-cDNA *FRA_full* μεγέθους 955 νουκλεοτιδίων με άκρα *BamHI-EcoRI* και το ένθεμα-cDNA *FRA_Stul* μεγέθους 793 νουκλεοτιδίων με άκρα *BamHI-EcoRI*. Με υπογράμμιση και μπλε βέλος τονίζεται η περιοχή που θα αποκοπεί από τον φορέα *pGEX_6P_1* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *XhoI* για να ενσωματωθεί το ένθεμα-cDNA *FRA_full* μεγέθους 971 νουκλεοτιδίων με άκρα *BamHI-XhoI*.

Βήμα 1 – Πέψη του φορέα *pGEX_4T_1*

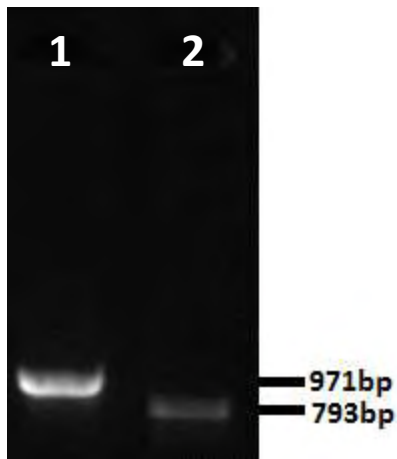
Αρχικά, έγινε διπλή πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων *FRA_full_pGEX_4T_1* και *FRA_Stul_pGEX_4T_1* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *XhoI*, με σκοπό την αποκοπή των ενθεμάτων-cDNAs από τις αρχικές πλασμιδιακές κατασκευές. Έτσι, τα cDNAs που απομονώνονται φέρουν στα άκρα τους θέσεις αναγνώρισης αυτών των περιοριστικών ενδονουκλεασών για την επόμενη κλωνοποίηση. Το αναγνωστικό πλαίσιο για την GST ταυτίζεται στις δύο πλασμιδιακές κατασκευές όπως φαίνεται παρακάτω:



Με κόκκινο υπογραμμίζονται οι περιοχές, οι οποίες αποκόπτονται από τις πλασμιδιακές κατασκευές και προστίθεται το αναγνωστικό πλαίσιο των cDNAs *FRA_full* και *FRA_Stul*. Συνεπώς, με το τελικό πλαίσιο ανάγνωσης θα παραχθούν χιμαιρικές πρωτεΐνες σύντηξης με την GST.

Η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε για τις πέψεις ήταν 80 μg *FRA_full_pGEX_4T_1* και 80 μg *FRA_Stul_pGEX_4T_1*. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5%, με όλη την ποσότητα από τις πέψεις αντίστοιχα και καθαρισμός. Η ποσότητα που ανακτήθηκε ήταν 500 ng/ μL για το *FRA_full* και 300 ng/ μL για το *FRA_Stul*, σύμφωνα με φωτομέτρηση των δειγμάτων. Μετά τον καθαρισμό είχαμε 30 μL από το καθένα, συνεπώς η συνολική ποσότητα ήταν **15 μg *FRA_full*** (500 ng \times 30 μL) και **9 μg *FRA_Stul*** (300 ng \times 30 μL), αρκετή για να προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα.

Η επιβεβαίωση της απομόνωσης των ενθεμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Χρησιμοποιήθηκε περίπου το 17% της συνολικής ποσότητας και των δύο ενθεμάτων (5 μL από τα 30 μL), δηλαδή 2,5 μg ενθέματος-*FRA_full* και 1,5 μg ενθέματος-*FRA_Stul*. Αναμένονται οι ζώνες 971bp για το ένθεμα-cDNA *FRA_full* και 793bp για το ένθεμα-cDNA *FRA_Stul* (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Έλεγχος της απομόνωσης των cDNAs του γονιδίου *FRA10AC1*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Φαίνεται η αναμενόμενη ζώνη του ενθέματος *FRA_full* πλήρους μήκους μεγέθους 971bp (1) και του *FRA_StuI* μεγέθους 793bp (2).

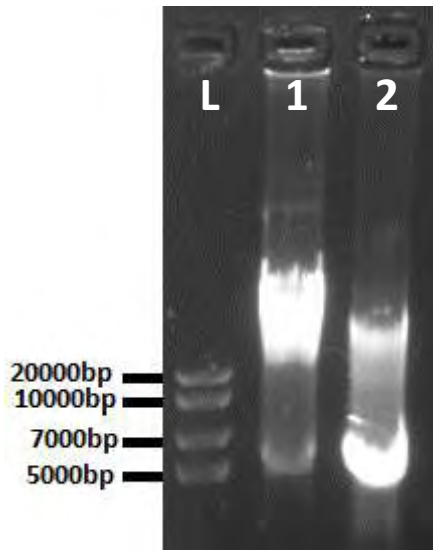
Βήμα 2 – Πέψη του φορέα *pGEX_6P_1* με *BamHI*

Καθώς τα cDNAs έφεραν στα άκρα τους θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *BamHI* (5' άκρο) και *XhoI* (3' άκρο), χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ένζυμα για την πέψη του φορέα *pGEX_6P_1* έτσι ώστε να δημιουργηθούν συμβατά κολλώδη άκρα για την αντίδραση σύνδεσης. Στην περίπτωση του φορέα η διπλή πέψη πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά, έγινε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI* (Εικ. 2) και καθαρισμός του προϊόντος και στη συνέχεια η δεύτερη πέψη με *XhoI* (Εικ. 3) και καθαρισμός του προϊόντος. Προηγήθηκε ποσοτικοποίηση του φορέα με φωτομέτρηση. Δεν ακολουθήθηκε ταυτόχρονη διπλή πέψη, διότι όπως φαίνεται και στο σχέδιο υποκλωνοποίησης οι θέσεις αναγνώρισης των δύο περιοριστικών ενδονουκλεασών στον φορέα *pGEX_6P_1* απέχουν μόλις 24bp. Συνεπώς δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιήσουμε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ότι πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η διπλή πέψη, καθώς οι αναμενόμενες ζώνες σε αυτή τη περίπτωση θα ήταν 24bp και 4960bp.

Όσο αφορά την διαμόρφωση του φορέα *pGEX_6P_1* μετά την εφαρμογή της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *BamHI*, εφόσον δημιουργεί δίκλωνη θραύση, είναι γραμμική.

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής οι διάφορες διαμορφώσεις που μπορεί να πάρει το πλασμιδιακό DNA τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Ο κυκλικός φορέας τρέχει ανάλογα με την διαμόρφωσή του, ενώ ο γραμμικός σύμφωνα με το μέγεθός του. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 300 μg του φορέα μεγέθους 4984bp. Αυτό που παρατηρούμε από τα αποτελέσματα είναι πως ο κυκλικός φορέας (δείγμα 1, Εικ.2) απεικονίζεται σε μια κύρια ζώνη

μεγέθους πάνω από 20000bp. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη διαμόρφωσή του η οποία προφανώς δεν είναι υπερελικωμένη. Ωστόσο, ο γραμμικός φορέας φαίνεται να βρίσκεται στην ζώνη που αντιστοιχεί στα 4984bp, κάτι αναμενόμενο εφόσον μετακινείται σύμφωνα με το μέγεθος (δειγμα 2, Εικ. 2).

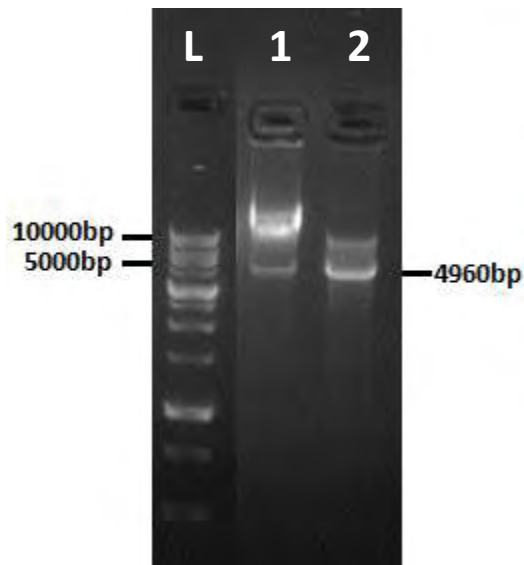


Εικόνα 2: Έλεγχος της πέψης του *pGEX_6P_1* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BamHI*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών 1) Κυκλικός φορέας *pGEX_6P_1* 2) *pGEX_6P_1* τεμαχισμένος με το ένζυμο *BamHI*.

Όλη η ποσότητα της πέψης καθαρίστηκε με φαινόλη (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Η ποσότητα που ανακτήθηκε μετά τον καθαρισμό του γραμμικού φορέα ήταν 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, σύμφωνα με φωτομέτρηση του δείγματος. Μετά τον καθαρισμό είχαμε 100 μL , συνεπώς η συνολική ποσότητα του γραμμικού φορέα ήταν **100 μg** (1 $\mu\text{g} \times 100 \mu\text{L}$), υπεραρκετή για να προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα.

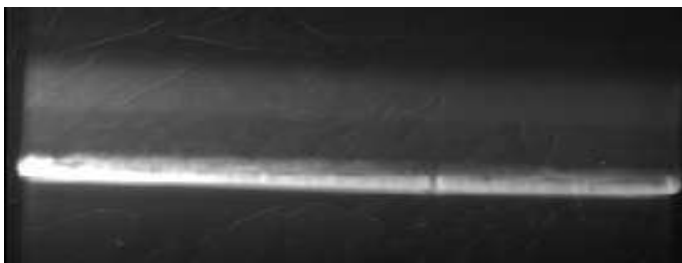
Βήμα 3 – Πέψη του φορέα *pGEX_6P_1/BamHI* με *XhoI*

Ως συνέχεια της προηγούμενης πέψης τα 100 μg του γραμμικού φορέα *pGEX_6P_1* τεμαχίστηκαν και με την περιοριστική ενδονουκλεάση *XhoI*, έτσι ώστε να δημιουργηθεί το απαιτούμενο άκρο για την υποκλωνοποίηση των cDNAs σε αυτόν. Όπως συζητήθηκε στο βήμα 2 οι αναμενόμενες ζώνες είναι μεγέθους: 4984bp για τον *pGEX_6P_1/BamHI* και 4960bp για τον *pGEX_6P_1/BamHI, XhoI* (Εικ. 3). Αυτή η διαφορά βέβαια δεν είναι δυνατόν να διακριθεί σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 3: Έλεγχος της διπλής πέψης του *pGEX_6P_1* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *XhoI*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών 1) Φορέας *pGEX_6P_1/BamHI* 2) *pGEX_6P_1* έπειτα από διπλή πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI-XhoI*.

Ακολούθησε δημιουργία παρασκευαστικού πηκτώματος αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, με όλη την ποσότητα από την διπλή πέψη (Εικ. 4) και καθαρισμός του φορέα *pGEX_6P_1* με κιτ (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Η ποσότητα που ανακτήθηκε ήταν 500 ng/μL, σύμφωνα με φωτομέτρηση του δείγματος. Μετά τον καθαρισμό είχαμε 50 μL, συνεπώς η συνολική ποσότητα του τεμαχισμένου φορέα ήταν **25 μg** (500 ng × 50 μL), αρκετή για να προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα.



Εικόνα 4: Απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα *pGEX_6P_1/BamHI, XhoI*.. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Απεικονίζεται ο φορέας *pGEX_6P_1* με άκρα *BamHI* και *XhoI*.

Βήμα 4 – Αντιδράσεις σύνδεσης

Μετά το πέρας των παραπάνω διαδικασιών, είχαμε συνολικά **12,5 µg** ενθέματος *FRA_full* πλήρους μήκους (25 µL), **7,5 µg** ενθέματος *FRA_Stul* (25 µL) και **25 µg** του τεμαχισμένου φορέα *pGEX_6P_1/BamHI, XhoI* (50 µL), μεγέθους 971bp, 793bp και 4960bp αντίστοιχα. Η ποσότητα ήταν επαρκής για την συνέχιση των πειραμάτων. Έτσι, τα προϊόντα των πέψεων χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις σύνδεσης.

Για την αντίδραση σύνδεσης *pGEX_6P_1 – FRA_full*:

- 1 µg από τον φορέα *pGEX_6P_1/BamHI, XhoI* (500 ng × 2 µL)
- 500 ng από το ένθεμα *FRA_full* (500 ng × 1 µL)

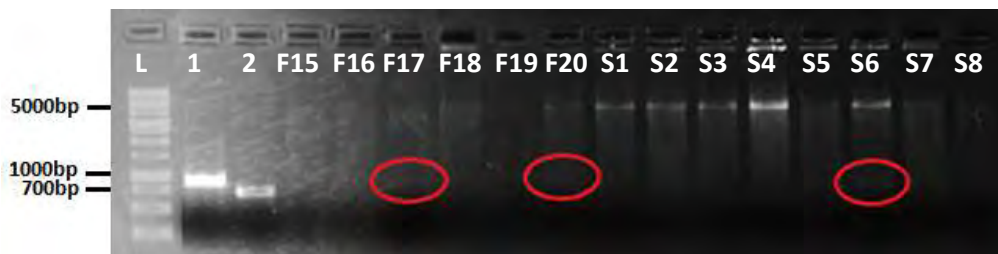
Για την αντίδραση σύνδεσης *pGEX_6P_1 – FRA_Stul*:

- 1 µg από τον φορέα *pGEX_6P_1/BamHI, XhoI* (500 ng × 2 µL)
- 450 ng από το ένθεμα *FRA_Stul* (300 ng × 1,5 µL)

Οι ποσότητες αυτές επιλέχθηκαν ώστε να έχουμε αναλογία άκρων 3:1

Βήμα 5 – Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

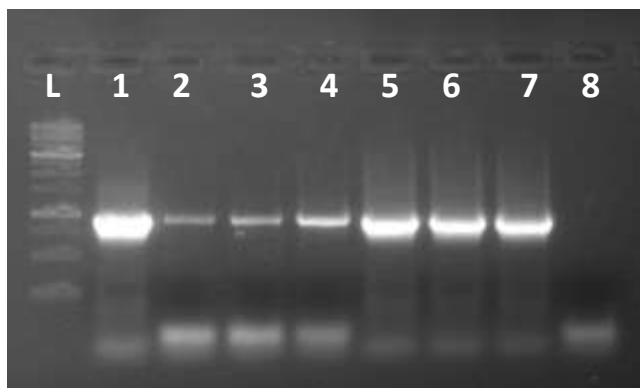
Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* στελέχους Dh5a και επίστρωση σε στερεό θρεπτικό μέσο με αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/µL. Έπειτα επώαστηκαν για 14-16 ώρες σε 37°C και από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέξαμε τυχαία 20 μοναδιαίες αποικίες από το τρυβλίο που περιείχε ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το ένθεμα *FRA_full* πλήρους μήκους και άλλες 20 μοναδιαίες αποικίες από αυτό που περιείχε ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το ένθεμα *FRA_Stul*. Τις τοποθετήσαμε για ανακαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό με αμπικιλίνη και ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από όλες τις αποικίες σε μικρή κλίμακα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), το οποίο τεμαχίστηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *XhoI*, με σκοπό να ταυτοποιήσουμε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης σε ποιες αποικίες εμφανίζεται ζώνη μεγέθους αντίστοιχου του ενθέματος *FRA_full* (971bp) και *FRA_Stul* (793bp), καθώς και του φορέα *pGEX_6P_1* (4960bp), τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν για σύγκριση μεγέθους (**Εικ. 5**).



Εικόνα 5: Έλεγχος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων έπειτα από πέψη πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Xho*I. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5%. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών 1) Ένθεμα-cDNA *FRA_full* 2) Ένθεμα-cDNA *FRA_Stul*. Ενδεικτικά δείγματα αποικιών που πιθανώς περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με το ένθεμα *FRA_full* (F15-F20) και με το ένθεμα *FRA_Stul* (S1-S8).

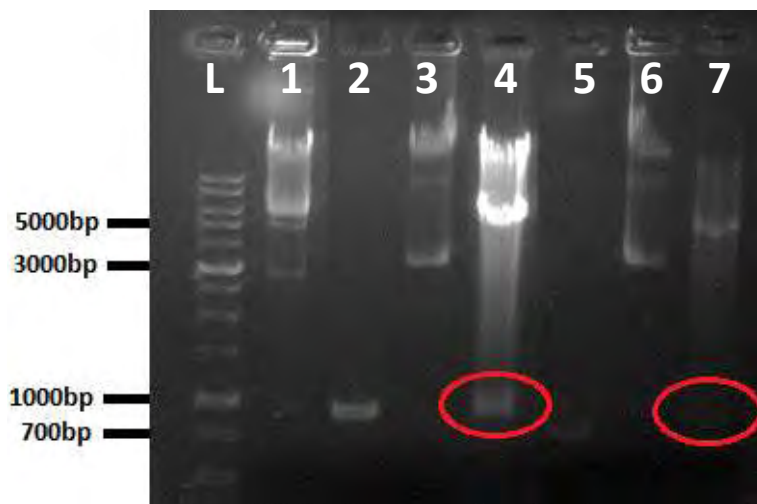
Όπως παρατηρούμε στην αποικία S6 φαίνεται αχνά η αναμενόμενη ζώνη μεγέθους 793bp, η οποία αντιστοιχεί στην ζώνη του ενθέματος *FRA_Stul*. Όσο αφορά τις αποικίες που περιέχουν το ένθεμα *FRA_full* δεν είναι σε καμία ξεκάθαρη η αναμενόμενη ζώνη μεγέθους 971bp. Παρ' όλα αυτά, επιλέξαμε τις αποικίες F17 και F20, στις οποίες φαίνεται σε πολύ μικρή ποσότητα το ένθεμα *FRA_full* για περαιτέρω ανάλυση με PCR.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σχεδιασμένοι έτσι ώστε να υβριδίζονται στην αρχή και στο τέλος του ενθέματος-cDNA του γονιδίου *FRA10AC1*. Σύμφωνα με το μέγεθος των εκκινητών η ζώνη που αναμένεται να φανεί μετά την ενίσχυση με PCR του ενθέματος-cDNA *FRA_full* είναι μεγέθους 970bp. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας. Ο θετικός μάρτυρας είναι άλλη πλασμιδιακή κατασκευή που περιέχει το ένθεμα *FRA-full*. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως και οι δύο αποικίες είναι θετικές και τα προϊόντα PCR ταυτίζονται σε μέγεθος με τον θετικό μάρτυρα και συνεπώς με το μέγεθος του ενθέματος *FRA_full* σε σχέση με τις πέψεις (**Εικ. 6**). Επιλέχθηκε τυχαία η αποικία F20 για τα επόμενα πειράματα έκφρασης της πρωτεΐνης σε βακτήρια.



Εικόνα 6: Επιβεβαίωση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με την μέθοδο PCR σε συγκεκριμένες αποικίες. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών 1) Θετικός μάρτυρας 2-4) 0,5, 1 και 3 μL από την αποικία F17 αντίστοιχα 5-7) 0,5, 1 και 3 μL από την αποικία F20 αντίστοιχα 8) Αρνητικός μάρτυρας.

Τέλος, ελέγχθηκαν οι δύο επιλεγμένες αποικίες F20 και S6 με διπλές πέψεις με τα αντίστοιχα ένζυμα κλωνοποίησης, με σκοπό να ταυτοποιηθεί η πιστότητα των παραπάνω διαδικασιών σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (Εικ. 7).



Εικόνα 7: Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στις αποικίες F20 και S6. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών 1) Κυκλικός φορέας *pGEX_6P_1* 2) Ένθεμα-cDNA *FRA_full* της αντίδρασης σύνδεσης 3) Πλασμιδιακό άκοπο DNA από την αποικία F20 4) Αποικία F20 μετά από διπλή πέψη *BamHI-XhoI* 5) Ένθεμα-cDNA *FRA_Stul* της αντίδρασης σύνδεσης 6) Πλασμιδιακό άκοπο DNA από την αποικία S6 7) Αποικία S6 μετά από διπλή πέψη *BamHI-XhoI*.

Αυτό που παρατηρούμε είναι η εμφάνιση της ζώνης 971 bp που αντιστοιχεί στο ένθεμα *FRA_full* στην αποικία F20 και της ζώνης 793bp που αντιστοιχεί στο ένθεμα *FRA_Stul* στην αποικία S6. Ωστόσο, οι δύο ζώνες φαίνεται να είναι λίγο μεγαλύτερες σε σχέση με τα

καθαρισμένα ενθέματα, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το πλασμιδιακό DNA δεν είναι πλήρως καθαρισμένο και έτσι καθυστερεί την κίνηση των ενθεμάτων. Αφού ταυτοποιήσαμε την ύπαρξη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στις εν λόγω αποικίες κάναμε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το αντίστοιχο πρωτόκολλο (βλ. Μέθοδοι), με σκοπό να πάρουμε σε μεγάλη ποσότητα τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

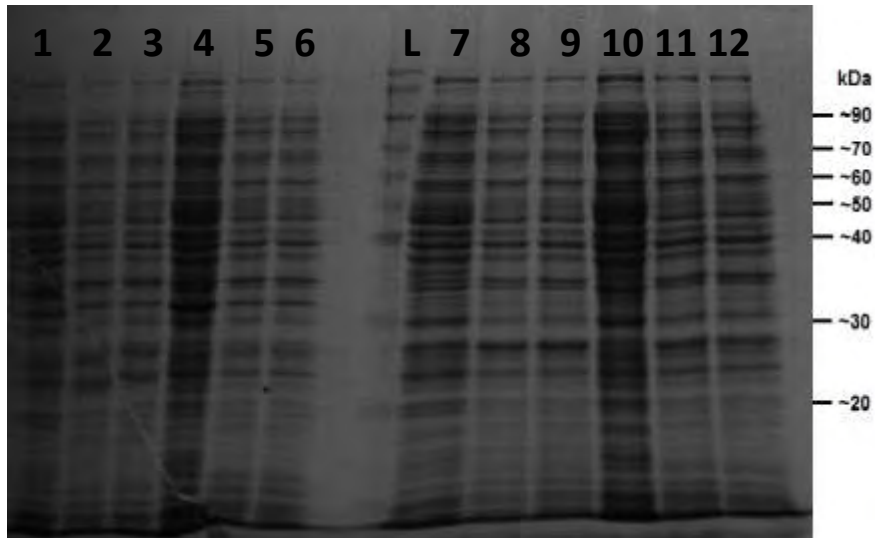
B. Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών FRA10AC1 και FRA10AC1₁₋₂₅₅

Σκοπός των πειραμάτων ήταν να χρησιμοποιήσουμε τα επιτυχώς ανασυνδυασμένα πλασμίδια, με σκοπό την παραγωγή κυτταρικών σειρών, στις οποίες θα υπερεκφράζονται οι χιμαιρικές πρωτεΐνες FRA10AC1 και FRA10AC1₁₋₂₅₅. Για τον σκοπό αυτό ελέγξαμε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, 18°C και 37°C και δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (IsoPropyl-beta-DThioGalactopyranoside), 0,5 mM και 1 mM για τον εντοπισμό των κατάλληλων συνθηκών.

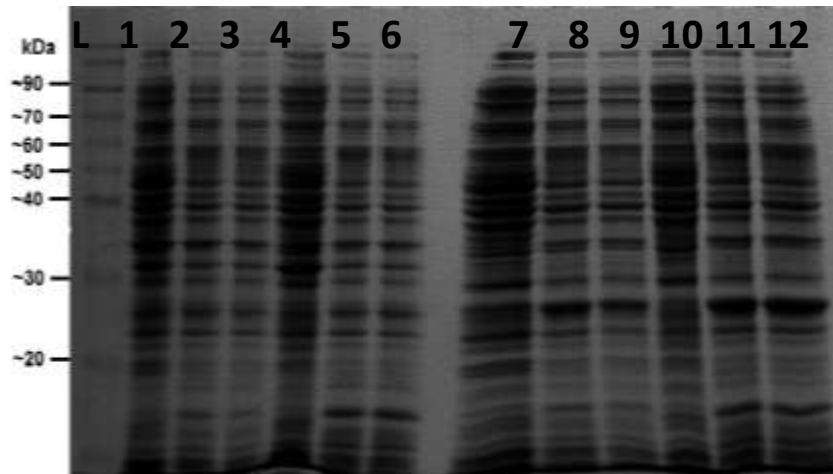
1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους *BL21 Gold* (DE3), *B834* (DE3) και *B834 pLysS* (DE3) με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια *pGEX_6P_1_FRA_full* και *pGEX_6P_1_FRA_Stul* σε ποσότητα 30μg το καθένα. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 14-16h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C
2. Μεταφέρθηκαν δύο μικρές αποικίες από τα παραπάνω τρυβλία σε 12 αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon που περιείχαν υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth και αμπικιλίνη τελικής συγκέντρωσης 50 μg/mL. Στις τέσσερις αποικίες που επιλέχθηκαν από τα τρυβλία των μετασχηματισμένων κυττάρων *B834 pLysS* προστέθηκε επιπλέον το αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη τελικής συγκέντρωσης 34 μg/mL, για να μπορέσει να διατηρηθεί η έκφραση του πλασμιδίου *pLysS*, το οποίο περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό
3. Επιλέχθηκε μία από τις δύο αποικίες της κάθε κυτταρικής σειράς για ανακαλλιέργεια σε 6 αποστειρωμένες φλάσκες σε όγκο 100 mL, που περιείχαν υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth και αμπικιλίνη, δύο εκ των οποίων περιείχαν επιπλέον χλωραμφενικόλη
4. Οι φλάσκες εμβολιάστηκαν με όγκο 1 mL από όλες τις υγρές καλλιέργειες των *B834*, *B834 pLysS* και *BL21 Gold* και επώαστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση
5. Οι καλλιέργειες παρακολουθήθηκαν και φωτομετρήθηκαν μέχρι να φτάσουν να έχουν $OD_{600nm} = 0.5-0.7$ A, όπου και θεωρείται, για τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη, πως οι καλλιέργειες θα βρισκόντουσαν στο μέγιστο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης
6. Μόλις η απορρόφηση των καλλιεργειών ήταν η κατάλληλη, μεταφέρθηκαν 15 mL από την κάθε καλλιέργεια σε 6 αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon (συνολικά 36 σωλήνες)

7. Έγινε προσθήκη IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,5 mM σε δύο από τους έξι σωλήνες της κάθε κυτταρικής σειράς και 1 mM αντίστοιχα
8. Έγινε επαγωγή της υπερέκφρασης για τους 3 από τους 6 σωλήνες της κάθε κυτταρικής σειράς για 3 ώρες στους 37°C, ενώ για τους υπόλοιπους για 14-16 ώρες στους 18°C υπό ανάδευση
9. Μετά το πέρας της επαγωγής οι καλλιέργειες των βακτηρίων φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm/4oC για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, καθώς αποτελεί το θρεπτικό μέσο και το κυτταρικό ίζημα φυλάχθηκε στους -80oC
10. Το κυτταρικό ίζημα εναποτίθηκε σε πάγο, έτσι ώστε να ξεπαγώσει ελαφρώς και να μπορέσει να είναι εύκολο στη μεταχείριση. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης
11. Στη συνέχεια, το διάλυμα των λυμένων κυττάρων υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στις 13000rpm/4oC για 30 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, συλλέχθηκε τόσο το ίζημα όσο και το υπερκείμενο και έγινε ανάλυση τους σε πηκτή υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) (Εικ.8, Εικ.9, Εικ.10, Εικ.11, Εικ.12, Εικ.13).

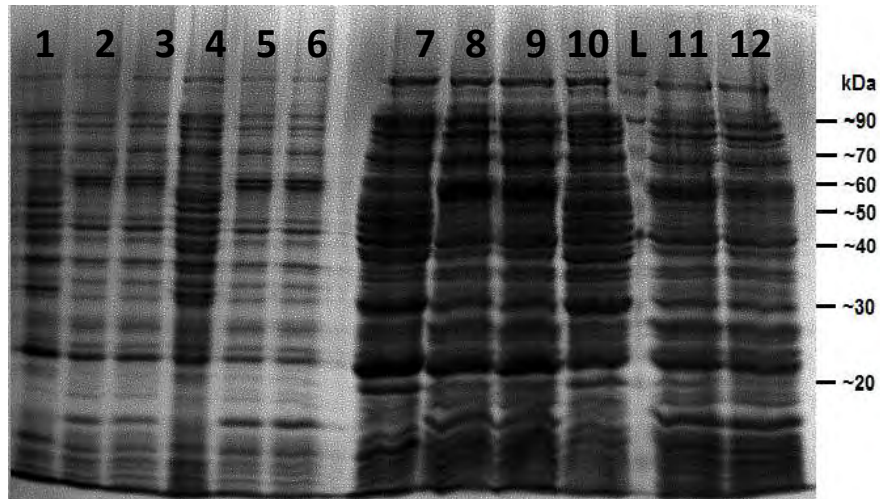
Γνωρίζουμε πως η πρωτεΐνη FRA10AC1 έχει μοριακή μάζα περίπου 38 kDa. Η FRA10AC1₁₋₂₅₅ αναμένεται να έχει μοριακή μάζα περίπου 31 kDa, έπειτα από πολλαπλασιασμό των αμινοξέων με το 120 που είναι το μέσο μοριακό βάρος του ενός αμινοξέος. Αντίστοιχα και για την πρωτεΐνη GST, η οποία έχει περίπου 255 νουκλεοτίδα, αναμένεται να έχει μοριακή μάζα περίπου 29 kDa. Συνεπώς οι ζώνες που περιμένουμε να δούμε υπερέκφραση είναι περίπου 67 kDa για την πρωτεΐνη FRA10AC1 και 60 kDa για την πρωτεΐνη FRA10AC1₁₋₂₅₅.



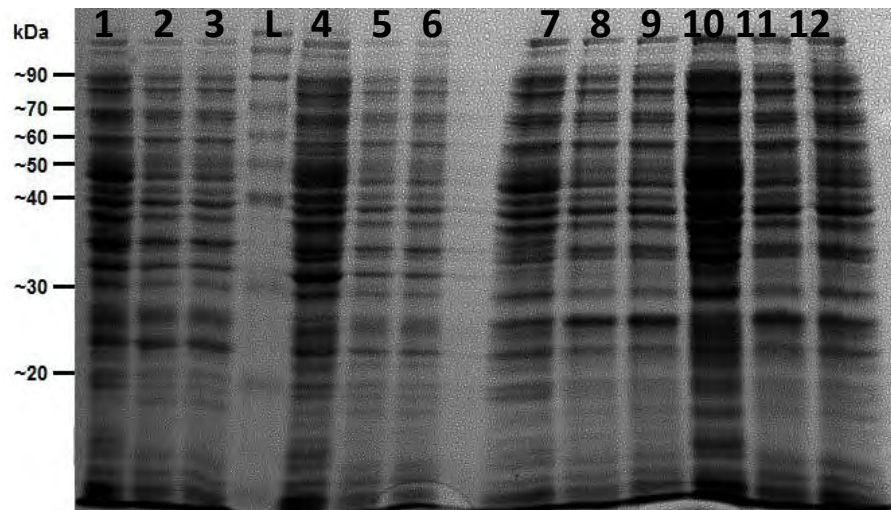
Εικόνα 8: Υπερέκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε βακτηριακά στελέχη *BL21 Gold*. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών **1-3)** Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **4-6)** Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **7-9)** Διαλυτές πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **10-12)** Διαλυτές πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα.



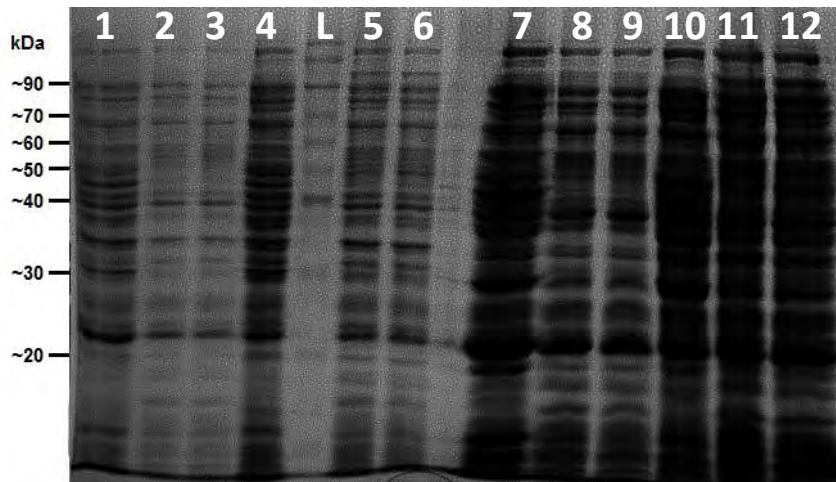
Εικόνα 9: Υπερέκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1₁₋₂₅₅ σε βακτηριακά στελέχη *BL21 Gold*. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών **1-3)** Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **4-6)** Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **7-9)** Διαλυτές πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **10-12)** Διαλυτές πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα.



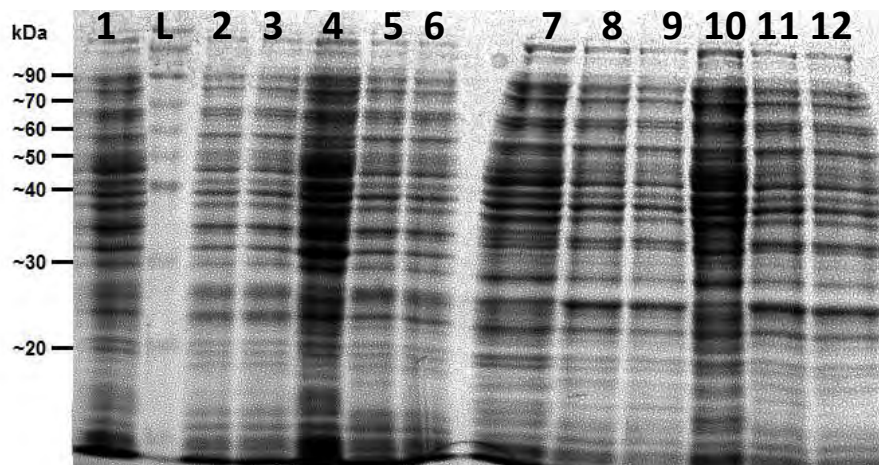
Εικόνα 10: Υπερέκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε βακτηριακά στελέχη B834. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών 1-3) Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα 4-6) Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα 7-9) Διαλυτές πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα 10-12) Διαλυτές πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα.



Εικόνα 11: Υπερέκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1₁₋₂₅₅ σε βακτηριακά στελέχη B834. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών 1-3) Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα 4-6) Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα 7-9) Διαλυτές πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα 10-12) Διαλυτές πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα.



Εικόνα 12: Υπερέκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε βακτηριακά στελέχη *B834 rLysS*. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών **1-3)** Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **4-6)** Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **7-9)** Διαλυτές πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **10-12)** Διαλυτές πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα.



Εικόνα 13: Υπερέκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1₁₋₂₅₅ σε βακτηριακά στελέχη *B834 rLysS*. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών **1-3)** Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **4-6)** Αδιάλυτες πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **7-9)** Διαλυτές πρωτεΐνες στους 37°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα **10-12)** Διαλυτές πρωτεΐνες στους 18°C χωρίς IPTG, με 0,5 mM IPTG και με 1 mM IPTG αντίστοιχα.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- ❖ Στην παρούσα εργασία σκοπός ήταν η παραγωγή σε βακτήρια και η βιοχημική απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πλήρους μήκους FRA10AC1, καθώς και της FRA10AC1₁₋₂₅₅. Έτσι, κλωνοποιήθηκαν τα αντίστοιχα cDNAs σε πλασμιδιακούς φορείς *pGEX_6P_1*.
- ❖ Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση συγκεκριμένων περιοριστικών ενδονουκλεασών στις αρχικές πλασμιδιακές κατασκευές, που περιείχαν τα αντίστοιχα cDNAs, και στον φορέα *pGEX_6P_1*. Τα τελικά προϊόντα ενώθηκαν σε αντιδράσεις σύνδεσης και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια ταυτοποιήθηκαν σε στελέχη βακτηρίων Dh5a.
- ❖ Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια *pGEX_6P_1_FRA_full* και *pGEX_6P_1_FRA_StuI* μετασηματίστηκαν σε 3 βακτηριακά στελέχη, *BL21 Gold* (DE3), *B834* (DE3) και *B834 pLysS* (DE3), με σκοπό την υπερέκφραση των αντίστοιχων χιμαιρικών πρωτεϊνών.
- ❖ Δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση πρωτεΐνης σε κανένα βακτηριακό στέλεχος και σε καμία θερμοκρασία. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός πως η πρωτεΐνη FRA10AC1 εκφράζεται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συνεπώς θα μπορούσε να είναι τοξική για τα βακτήρια. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται στις αναμενόμενες ζώνες. Πιο συγκεκριμένα, μερικές τεχνικές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επίτευξη αυτού του σκοπού, έπειτα από καθαρισμό της πρωτεΐνης με πρωτόκολλα καθαρισμού, όπως με στήλες συγγένειας, είναι οι εξής: χρήση ειδικού αντισώματος που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη FRA10AC1 και ανάλυση Western, μεθόδους που προσδιορίζουν την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης (φασματομετρία μάζας) καθώς και μελέτη του κρυσταλλικού πλέγματος μέσω της χρήσης ακτίνων Χ.
- ❖ Σε περαιτέρω μελέτες θα μπορούσαν να αναλυθούν οι πρωτεΐνες FRA10AC1 και FRA10AC1₁₋₂₅₅ και σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Andersen D.S., Tapon N., "Drosophila MFAP1 is required for pre-mRNA processing and G2/M progression." *J Biol Chem.* 2008, 283 (45): 31256-67.
2. Baraldi P.G., N nez Mdel C., Espinosa A., Romagnoli R., " Distamycin A as stem of DNA minor groove alkylating agents." *Curr Top Med Chem.* 2004; 4(2):231-9.
3. Baranovskiy A.G., Babayeva N.D., Suwa Y., Gu J., Pavlov Y.I., Tahirov T.H., " Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin." *Nucleic Acids Res.* 2014 Dec 16; 42(22):14013-21. doi: 10.1093/nar/gku1209. Epub 2014 Nov 27.
4. Bessonov S., Anokhina M., Krasauskas A., Golas M.M., Sander B., Will C.L., Urlaub H., Stark H., L hrmann R., "Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis." *RNA.* 2010 Dec; 16(12):2384-403. Epub 2010 Oct 27.
5. Bessonov S., Anokhina M., Will C.L., Urlaub H., L hrmann R., (2008). "Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core." *Nature.* 452 (7189): 846-50.
6. Bressan G.C., Quaresma A.J., Moraes E.C., Manfiolli A.O., Passos D.O., et al., "Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events." *FEBS J.* 2009, 276 (14): 3770-83.
7. Carla Schmidt, Mads Gr nberg, Jochen Deckert, Sergey Bessonov, Thomas Conrad, Reinhard L hrmann, Henning Urlaub, "Mass spectrometry - based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic labeling (SILAC), chemical labeling (iTRAQ), and label-free spectral count." *RNA Society.* 2014 Mar; 20(3): 406-420.
8. Chen D., Li Z., Yang Q., Zhang J., Zhai Z., et al., "Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB activation." *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 310 (3): 720-4.
9. Chen J., Li Y.M., Li J.F., Liu L.D., Liao Y., et al., "Transcriptional regulation by HSV-1 induced HTRP via acetylation system." *Virology.* 2010, 25 (6): 417-24.
10. Cheng H., Dufu K., Lee C.S., Hsu J.L., Dias A., et al., "Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA." *Cell.* 2006, 127 (7): 1389-400.
11. Christman J.K., " 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy." *Oncogene.* 2002 Aug 12; 21(35):5483-95.
12. Fen-Biao Gao, J. Paul Taylor, "RNA metabolism in neurological disease." *Brain Research*, Volume 1584, 10 October 2014, Pages 1-2.
13. Gavin A.C., B sche M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick J.M., Michon A.M., Cruciat C.M., Remor M., H fert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhse B., Leutwein C., Heurtier M.A., Copley R.R., Edelman A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Raida M., Bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G., Superti-Furga G., "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." *Nature.* 2002 Jan 10; 415(6868):141-7.
14. Giot L., Bader J.S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y., Hao Y.L., Ooi C.E., Godwin B., Vitols E., Vijayadamar G., Pochart P., Machineni H., Welsh M., Kong Y., Zerhusen B., Malcolm R., Varrone Z., Collis A., Minto M., Burgess S., McDaniel L., Stimpson E., Spriggs F., Williams J.,

- Neurath K., Ioime N., Agee M., Voss E., Furtak K., Renzulli R., Aanensen N., Carrolla S., Bickelhaupt E., Lazovatsky Y., DaSilva A., Zhong J., Stanyon C.A., Finley R.L. Jr, White K.P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R.A., McKenna M.P., Chant J., Rothberg J.M., "A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*." *Science*. 2003 Dec 5; 302(5651):1727-36. Epub 2003 Nov 6.
15. Golas M.M., Sander B., Will C.L., Lührmann R., Stark H. "Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b." *Science*. 2003, 300 (5621): 980-4.
 16. Gozani O., Feld R., Reed R., "Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A." *Genes Dev*. 1996 Jan 15; 10(2):233-43.
 17. Green M.R., "Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing." *Annu Rev Cell Biol*. 1991; 7:559-99.
 18. Guthrie C., "Messenger RNA splicing in yeast: clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein." *Science*. 1991 Jul 12; 253(5016):157-63.
 19. Hegele A., Kamburov A., Grossmann A., Sourlis C., Wowro S., Weimann M., Will C.L., Pena V., Lührmann R., Stelzl U., " Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome." *Mol Cell*. 2012 Feb 24; 45(4):567-80. doi: 10.1016/j.molcel.2011.12.034.
 20. Ilagan J.O., Chalkley R.J., Burlingame A.L., Jurica M.S., "Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation." *RNA*. 2013 Mar; 19(3): 400–412
 21. Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M., Sakaki Y., "A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 10; 98(8):4569-74. Epub 2001 Mar 13.
 22. Janine O. Ilagan, Robert J. Chalkley, A.L. Burlingame, Melissa S. Jurica, " Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation." *RNA Society*. 2013 Mar; 19(3): 400–412.
 23. Kähkönen M., Tengström C, Alitalo T, Matilainen R, Kaski M, Airaksinen E. "Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. II. Autosomal rare fragile sites." *Hum Genet*. 1989 Apr; 82(1):3-8.
 24. Kähkönen M., Leisti J., Thoden C.J., Autio S., "Frequency of rare fragile sites among mentally subnormal schoolchildren." *Clin Genet*. 1986, 1986;30:234–238
 25. Kremer E.J., Yu S., Pritchard M., Nagaraja R., Heitz D., Lynch M., Baker E., Hyland V.J., Little R.D., Wada M., "Isolation of a human DNA sequence which spans the fragile X." *Am. J. Hum. Genet*. 1991, 49, 656-661.
 26. Lardelli R.M., Thompson J.X., Yates J.R. 3rd, Stevens S.W., "Release of SF3 from the intron branchpoint activates the first step of pre-mRNA splicing." *RNA*. 2010, 16: 516-528.
 27. Leahy D.J., Hendrickson W.A., Aukhil I., Erickson H.P., "Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein." *Science*. 1992 Nov 6; 258(5084):987-91.
 28. Li S., Armstrong C.M., Bertin N., Ge H., Milstein S., Boxem M., Vidalain P.O., Han J.D., Chesneau A., Hao T., Goldberg D.S., Li N., Martinez M., Rual J.F., Lamesch P., Xu L., Tewari M., Wong S.L., Zhang L.V., Berriz G.F., Jacotot L., Vaglio P., Reboul J., Hirozane-Kishikawa T., Li Q., Gabel H.W., Elewa A., Baumgartner B., Rose D.J., Yu H., Bosak S., Sequerra R., Fraser A., Mango S.E., Saxton W.M., Strome S., Van Den Heuvel S., Piano F., Vandenhaute J., Sardet C., Gerstein M., Doucette-Stamm L., Gunsalus K.C., Harper J.W., Cusick M.E., Roth F.P., Hill D.E., Vidal M., "A map of the

- interactome network of the metazoan *C. elegans*." *Science*. 2004 Jan 23; 303(5657):540-3. Epub 2004 Jan 2.
29. Lukusa T., Fryns J.P. "Human chromosome fragility". *Biochimica Biophysica Acta*. 2008 Jan; 1779(1):3-16. Epub 2007 Dec 3.
 30. Maita H., Kitaura H., Ariga H., Iguchi-Ariga S.M., "Association of PAP-1 and Prp3p, the products of causative genes of dominant retinitis pigmentosa, in the tri-snRNP complex." *Exp Cell Res*. 2005, 302 (1): 61-8.
 31. Mavrou A., Syrrou M., Tsenghi C., Metaxotou C., "Autosomal folate sensitive fragile sites in normal and mentally retarded individuals in Greece." *Am J Med Genet*. 1991 Feb-Mar; 38(2-3):437-9.
 32. Oberle I., Rousseau F., Heitz D., Kretz C., Devys D., Hanauer A., Boue J., Bertheas M.F. and Mandel J.L., "Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome." *Science*. 1991, 252, 1097–1102.
 33. Petit P., Fryns J.P., van den Berghe H., Hecht F., "Population cytogenetics of autosomal fragile sites." *Clin Genet*. 1986 Feb; 29(2):96-100.
 34. Pichiorri F., Ishii H., Okumura H., Trapasso F., Wang Y., Huebner K., "Molecular parameters of genome instability: roles of fragile genes at common fragile sites." *J Cell Biochem*. 2008 Aug 1; 104(5):1525-33. doi: 10.1002/jcb.21560.
 35. Rual J.F., Venkatesan K., Hao T., Hirozane-Kishikawa T., Dricot A., Li N., Berriz G.F., Gibbons F.D., Dreze M., Ayivi-Guedehoussou N., Klitgord N., Simon C., Boxem M., Milstein S., Rosenberg J., Goldberg D.S., Zhang L.V., Wong S.L., Franklin G., Li S., Albala J.S., Lim J., Fraughton C., Llamosas E., Cevik S., Bex C., Lamesch P., Sikorski R.S., Vandenhaute J., Zoghbi H.Y., Smolyar A., Bosak S., Sequerra R., Doucette-Stamm L., Cusick M.E., Hill D.E., Roth F.P., Vidal M., "Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network." *Nature*. 2005 Oct 20; 437(7062):1173-8. Epub 2005 Sep 28.
 36. 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 M., Deloukas P., Sutherland G.R., Kutsche K., Moschonas N.K., Siebert R., Géczy J., European Collaborative Consortium for the Study of ADLTE. "Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein." *Genomics*. 2004 Jul; 84(1):69-81.
 37. Sasaki-Osugi K., Imoto C., Takahara T., Shibata H., Maki M., "Nuclear ALG-2 protein interacts with Ca²⁺ homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) Ca²⁺-dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1 (IP3R1) pre-mRNA." *J Biol Chem*. 2013 Nov 15; 288(46):33361-75. doi: 10.1074/jbc.M113.497479. Epub 2013 Sep 27.
 38. Sergey Bessonov, Maria Anokhina, Andrius Krasauskas, Monika M. Golas, Bjoern Sander, Cindy L. Will, Henning Urlaub, Holger Stark, and Reinhard Lührmann, "Characterization of purified human B^{act} spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis." *RNA Society*. 2010 Dec; 16(12): 2384–2403.
 39. Sharp P.A., Burge C.B., "Classification of introns: U2-type or U12-type." *Cell*. 1997 Dec 26; 91(7):875-9.

40. Spartz A.K., Herman R.K., Shaw J.E., "SMU-2 and SMU-1, *Caenorhabditis elegans* homologs of mammalian spliceosome-associated proteins RED and fSAP57, work together to affect splice site choice." *Mol Cell Biol.* 2004, 24 (15): 6811-23.
41. Stelzl U., Worm U., Lalowski M., Haenig C., Brembeck F.H., Goehler H., Stroedicke M., Zenkner M., Schoenherr A., Koeppen S., Timm J., Mintzlauff S., Abraham C., Bock N., Kietzmann S., Goedde A., Toksöz E., Droege A., Krobitsch S., Korn B., Birchmeier W., Lehrach H., Wanker E.E., "A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome." *Cell.* 2005 Sep 23; 122(6):957-68. Sutherland G.R., "Heritable fragile sites on human chromosomes." VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites. *Am J Hum Genet.* 1982; 34:452-458.
42. Sutherland G.R., Baker E., "The clinical significance of fragile sites on human chromosomes." *Clin Genet.* 2000 Sep; 58(3):157-61.
43. Sutherland G.R., Hecht F., "Fragile sites on human chromosomes." Oxford University Press; New York, New York: 1985.
44. Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T.A., Judson R.S., Knight J.R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamodar G., Yang M., Johnston M., Fields S., Rothberg J.M., "A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature.* 2000 Feb 10; 403(6770):623-7.
45. Verkerk A.J., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.F., Zhang F.P., "Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome." *Cell.* 1991, 65, 905-914.
46. Will C.L., Lührmann R., "Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function." *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Jun; 13(3):290-301. Review.
47. Wood W.B., "Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA." *J. Mol. Biol.* 1966 Mar; 16(1):118-133.
48. Wu S., Romfo C.M., Nilsen T.W., Green M.R., "Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35." *Nature.* 1999, 402(6763): 832-5.
49. Zlotorynski E., Rahat A., Skaug J., Ben-Porat N., Ozeri E., Hershberg R., Levi A., Scherer S.W., Margalit H., Kerem B., "Molecular basis for expression of common and rare fragile sites." *Mol Cell Biol.* 2003 Oct; 23(20):7143-51

BIBΛΙΑ

- ❖ "Genes VII", Benjamin Lewin 2004
- ❖ "Ανασυνδυσασμένο DNA", Watson, Caudy, Myers, Witkowski 2007

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

- ❖ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

- ❖ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- ❖ <https://www.addgene.org/vector-database>
- ❖ <https://www.merckmillipore.com>