

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

**Μελέτη των μοριακών μηχανισμών απόκρισης στην υποξία:
Ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν
με τον HIF-1α με το σύστημα των δύο υβριδίων**

**Διπλωματική Εργασία
στο Εργαστήριο Βιοχημείας**

Εκπόνηση: Λυμπεροπούλου Αγγελική

Υπεύθυνοι: Ε. Γεωργάτσου
Γ. Σίμος

Τριμελής Επιτροπή: Ε. Γεωργάτσου
Γ. Σίμος
Α. Γερμενής

Λάρισα 2002-2003

αρ. εισ. 16/2003



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 1591/1
Ημερ. Εισ.: 31/1/2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2003
ΛΥΜ

Ευχαριστώ θερμά:

Την κα. Ε. Γεωργιάτσου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας, για όλα όσα μου δίδαξε και για την συμπαράσταση σε κάθε στάδιο της διπλωματικής εργασίας.

Την κα Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, για την δυνατότητα διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας στο εργαστήριο Βιοχημείας.

Τον κ. Γ. Σίμο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας, για την πολύτιμη συμβολή του.

Τον κ. Αν. Γερμενή, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας, ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής.

Τον κ. Εμμ. Βενιέρη, Ερευνητή στο εργαστήριο Βιοχημείας, που με καθοδήγησε σε όλη την διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Την κα Παρ. Μηνά, για τα υλικά και την βοήθεια που μου προσέφερε στα πλαίσια του διδακτορικού της.

Όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας για την συνεργασία και την φιλική τους διάθεση.

Τον Χαρ. Καραντώνη, διδάκτορα στο Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την συμπαράσταση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Περίληψη	2
Περίληψη στα αγγλικά (Summary)	3
Εισαγωγή	4-14
- Κυτταρική απόκριση στην υποξία	4-6
- HIF-1: δομή	6
- HIF-1: λειτουργία	7
- HIF-1α : ρύθμιση	8-10
- Μοριακές αλληλεπιδράσεις του HIF-1α	10-14
Σκοπός	15-17
ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Βασικά Στάδια Πειραματικής διαδικασίας	18-19
Υλικά και Μέθοδοι	20-40
- Υλικά	20-24
- Μέθοδοι	25-40
Αποτελέσματα	41-59
- Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων	41-48
- Έλεγχος φαινοτύπου	49-50
- cDNA βιβλιοθήκη	51-52
- Εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων	52-53
- Διάσωση πλασμιδιακού DNA και εύρεση της αλληλουχίας του	54-59
Σχολιασμός – Συζήτηση Αποτελεσμάτων	60-63
Παράρτημα	64-65
Βιβλιογραφία	66-71



ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όταν ένα κύτταρο βρεθεί σε κατάσταση υποξίας (μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου) αντιδρά ενεργοποιώντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για την επιβίωσή του σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου.

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 είναι ο κομβικός παράγοντας ρύθμισης της κυτταρική απόκρισης στην υποξία. Αποτελείται από δύο υπομονάδες (α και β) εκ των οποίων μόνο η μία (HIF-1α) ρυθμίζεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του οξυγόνου. Επομένως, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με πληθώρα μορίων και η λειτουργία του επηρεάζει πολλές καταστάσεις όπου η υποξία παίζει σημαντικό ρόλο, όπως είναι τα καρδιαγγειακά προβλήματα κι ο καρκίνος.

Στην παρούσα πειραματική εργασία, εφαρμόσαμε το σύστημα των δύο υβριδίων για να ανιχνεύσουμε αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες είναι δυνατό να επηρεάζουν την ενεργοποίησή του ή τον τρόπο δράσης του.

Αρχικά, κλωνοποιήσαμε μια επιλεγμένη υποπεριοχή του γονιδίου του HIF-1α στον πλασμιδιακό φορέα pGBT9, σε σύντηξη με την περιοχή δέσμευσης (BD-binding domain) του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (πλασμίδιο «δόλωμα»). Το στέλεχος του *Saccharomyces cerevisiae* PJ694A, που φέρει τα γονίδια αναφοράς HIS3, ADE2, LacZ, κάτω από τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα GAL4, μετασηματίστηκε με το πλασμίδιο «δόλωμα». Στη συνέχεια, κάθε ένα από τα μετασηματισμένα στελέχη, μετασηματίστηκε επιπλέον με μία βιβλιοθήκη cDNA από έμβρυο ποντικού. Το ετερογενές σύνολο των cDNA της βιβλιοθήκης περιέχεται στον πλασμιδιακό φορέα pVP16, σε σύντηξη με την περιοχή ενεργοποίησης (AD-activation domain) του μεταγραφικού παράγοντα VP16 (πλασμίδιο «λεία»).

Με την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων, διερευνήσαμε 16×10^6 , πιθανές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης «δόλωμα» (GAL4BD-HIF-1α) με τις πρωτεΐνες «λεία» (VP16AD-άγνωστη πρωτεΐνη), κι από αυτές επιλέχθηκαν 500 για περαιτέρω μελέτη και ταυτοποίηση. Έγινε ταυτοποίηση σε δύο από αυτές και μόνο για την μία, βρήκαμε ότι εμφανίζει ομολογία με το δυνητικό cDNA μιας πρωτεΐνης στον άνθρωπο, της KIAA0632.

SUMMARY

A cell under hypoxic conditions (low oxygen concentration) responds by activating the expression of certain genes, the products of which are necessary for its survival under oxygen low-level conditions.

Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1), is the nodal transcription factor that regulates the hypoxia cellular response. It consists of two subunits (α , β) of which only the one (HIF-1 α) is being regulated by the intracellular oxygen concentration. Thus, HIF-1 α interacts with many molecules and his function affects the conditions that hypoxia plays a great role, like heart attack and cancer.

In this essay, we used the two-hybrid system method to identify molecular interactions between HIF-1 α protein and other cellular proteins that may play a role in the induction or the function of HIF-1 α .

A specific domain of the HIF-1 α gene was cloned into the pGBT9 plasmid, downstream the GAL4 DNA binding domain (bait plasmid). This recombinant plasmid was then cloned into the PJ694A *Saccharomyces cerevisiae* strain that contains the reporter genes HIS3, ADE2, LacZ, under the control of the GAL4 binding site. Furthermore, each one of the recombinant strains was cloned with a cDNA library from a mouse embryo. All the different cDNA of the library had been cloned into the pVP16 plasmid, downstream the VP16 activation domain (prey plasmid).

Using the two-hybrid system method we managed to detect 16×10^6 possible interactions between the bait protein (GAL4BD-HIF-1 α) and the prey protein (VP16AD-unknown protein). We have chosen 500 of them for further analysis and identification. Two of them have been sequenced so far, of which only the one gave us a kind of similarity with a modal cDNA that refers to a human protein KIAA0632.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Απόκριση των κυττάρων στην υποξία

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την επιβίωση των ανώτερων οργανισμών. Στα θηλαστικά, η ανάπτυξη του καρδιαγγειακού, αιμοποιητικού και αναπνευστικού συστήματος παρέχει την ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και διανομής του σε κάθε κύτταρο του σώματος, ώστε να χρησιμοποιηθεί στην οξειδωτική φωσφορύλιωση και σε άλλες βιοχημικές αντιδράσεις.

Η έλλειψη οξυγόνου (υποξία) έχει σοβαρές επιπτώσεις στην λειτουργία των κυττάρων και θέτει σε κίνδυνο την επιβίωσή τους, κυρίως λόγω ανεπάρκειας ATP. Η υπερπαροχή οξυγόνου (υπεροξία), από την άλλη, είναι επίσης τοξική, ιδιαίτερα για τις μεμβράνες και το DNA λόγω της δημιουργίας δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS – Reactive Oxygen Species). Για το λόγο αυτό, η διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου αποτελεί απαραίτητη κυτταρική αλλά και συστηματική διαδικασία.

Τα κύτταρα των θηλαστικών αποκρίνονται στην υποξία με μείωση της δαπάνης ενέργειας και με αλλαγές της έκφρασης ορισμένων γονιδίων, που έχουν στόχο την αύξηση του αναερόβιου μεταβολισμού, της ερυθροποίησης, της αναπνοής, της αγγειοδιαστολής και της αγγειογένεσης (*Hochachka et al. 1996, Guillemain and Krasnow 1997, Ratcliffe et al. 1998, Semenza 1999 & 2001, Wenger 2000*).

Η επαγωγή από την υποξία των διαφορετικών αυτών γονιδίων (βλ. Πίνακα 1) φαίνεται ότι εξαρτάται από έναν κοινό μηχανισμό αίσθησης οξυγόνου και μεταγωγής σήματος, ο οποίος ενεργοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που επάγεται από την υποξία, τον HIF-1 (hypoxia inducible factor 1).

Πίνακας 1. Γονίδια που επάγονται από την υποξία μέσω του HIF-1 (πηγές: Semenza 1999 & 2001),

Προϊόν Γονιδίου	Λειτουργία	Βιβλιογραφία
Αδενυλική Κινάση 3	Μεταβολισμός Νουκλεοτιδίων	Wood et al, 1998
$\alpha_{1\beta}$ - αδρενεργικός υποδοχέας	Αγγειακός Τόνος	Eckhart et al, 1997
Αδρενομεδουλίνη	Αγγειακός Τόνος, Κυτταρική επιβίωση	Cormier-Regard et al., 1998
Αλδολάση Α (ALDA)	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al,1998 Ryan et al, 1998
Αλδολάση C	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al,1998
Ερυθροποιητίνη (EPO)	Ερυθροποίηση, Κυτταρική επιβίωση	Jiang et al,1996a
Μεταφορέας Γλυκόζης 1	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al1998a, Ryan et al 1998, Wood et al 1998
Μεταφορέας Γλυκόζης 3	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al 1998a, Ryan et al 1998, Wood et al 1998
Δεϋδρογενάση 3-P-Γλυκεραλδεϋδης	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al1998a Wood et al 1998
Οξυγενάση της Αίμης 1	Αγγειακός Τόνος, Κυτταρική επιβίωση	Lee et al 1997, Wood et al 1998
Εξωκινάση 1	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al1998a
Εξωκινάση 2	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al1998a
Ενδοθηλίνη 1	Αγγειακός Τόνος, Αναδόμηση	Hu et al, 1998
Ενολάση 1	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al1998a
Ινσουλινόμορφος Αυξητικός Παράγοντας 2 (IGF)	Κυτταρ. Πολ/σμός, Επιβίωση	Feldser et al 1999
IGF-Συνδεδεμένη Πρωτεΐνη 1	Κυτταρ. Πολ/σμός, Επιβίωση	Tazuke et al 1998
IGF-Συνδεδεμένη Πρωτεΐνη 2 & 3	Κυτταρ. Πολ/σμός, Επιβίωση	Feldser et al 1999
Γαλακτική δεϋδρογενάση Α	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al 1998a, Ryan et al 1998
Καρβονική Ανυδράση 9	Ρύθμιση pH	Wykoff C.C et al 2000
Συνθάση του Οξειδίου του Αζώτου	Αγγειακός Τόνος, Κυτταρική επιβίωση	Palmer et al 1998
NIP3	Απόπτωση	Bruick R. K., 2000
p21	Κυτταρ. Πολ/σμός,	Carmeliet et al,1998
p35srj	Ρύθμιση Λειτουργίας του Hif-1	Bhattacharya, 1999
Φωσφοφρουκτοκινάση L	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al 1998a
Φωσφογλυκερική Κινάση 1 (PGK1)	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Carmeliet et al,1998 Iyer et al 1998, Ryan et al 1998
Προϋλ-4-υδροξυλάση	Μεταβολισμός Κολλαγόνου	Takahashi Y. ,2000
Πυρουβική Κινάση M	Μεταβολισμός Γλυκόζης	Iyer et al 1998a
Τρανσφερίνη	Μεταβολισμός Σιδήρου	Rolfs et al 1997
Υποδοχέας Τρανσφερίνης	Μεταβολισμός Σιδήρου	Lok and Ponka, 1999 Tacchini L et al, 1999
Σερουλοπλασμίνη	Μεταβολισμός Σιδήρου	Mukhopadhyay, 2000
Αγγειακός Ενδοθηλιακός Παράγοντας (VEGF)	Αγγειογένεση, Κυτταρ. Επιβίωση	Carmeliet et al,1998 Iyer et al 1998 Ryan et al 1998
Υποδοχέας VEGF (Flt-1)	Αγγειογένεση	Gerber et al 1997

HIF-1: Δομή

Ο HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο υπομονάδες (α και β): HIF-1α (Mr 92670 Da, 826 aa) και HIF-1β ή ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator, Mr 91000-94000 Da, 774-789 aa) (*Wang et al 1995, Semenza 1999*). Δεν υπάρχει σε μονοκυττάριους οργανισμούς και ανήκει στην οικογένεια των bHLH-PAS (basic helix loop helix-PER-ARNT-SIM) μεταγραφικών παραγόντων (*Wang et al 1995a, Semenza 1999 & 2001*, βλ. Πίνακα 2).

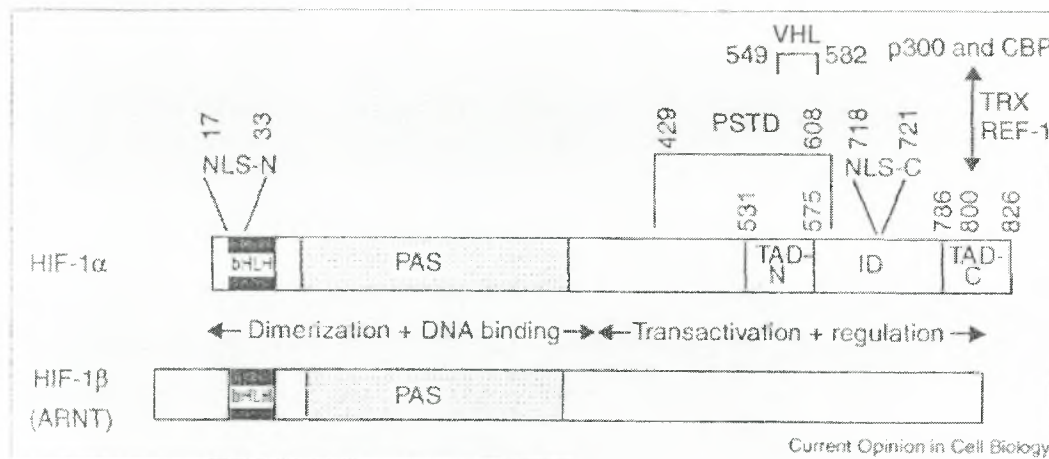
Πίνακας 2. Μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων bHLH-PAS που επάγονται από την υποξία.

α Υπομονάδες	β Υπομονάδες
HIF-1α	HIF-1β (ARNT)
HIF-2α	ARNT2
HIF-3α	ARNT3

Κάθε α υπομονάδα μπορεί να διμεριστεί με μία β, και το αντίστροφο.

Το γονίδιο του HIF-1α βρίσκεται στην χρωμοσωμική θέση 14q21-24 και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί βρίσκεται σε όλους τους ιστούς, με υψηλότερα επίπεδα στους νεφρούς και την καρδιά (*Hogenesch 1997*). Η πρωτεϊνική δομή του HIF-1α απεικονίζεται στην Εικόνα 1. Περιλαμβάνει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS, nuclear localization signals) που τον οδηγούν στον πυρήνα, ένα στο αμινοτελικό κι ένα στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 17-33 και 718-721 αντίστοιχα). Τις περιοχές bHLH και PAS (1-390 aa) (*Jiang et al 1996, Semenza 2001*), που είναι απαραίτητες για τον διμερισμό του με τον ARNT και την σύνδεση με το DNA. Δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TADN και TADC, transcription activation domains) προς το καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 531-575 και 786-826 αντίστοιχα), που συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση του μορίου με συνενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως οι: CBP/p300, SRC-1 και TIF-2 (*Pugh et al*

1997, Kallio et al 1998, Semenza 2000 & 2001). Μια ρυθμιστική περιοχή (ID, inhibitory domain, 575-786aa) που συμβάλλει στην σταθερότητα του μορίου και βρίσκεται μεταξύ των δύο TADs. Τέλος την PSTD (Pro-Ser-Thr rich protein stabilization domain, 429-608aa), γνωστή και σαν ODD (oxygen dependent degradation domain), περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του HIF-1α παρουσία οξυγόνου.



Εικόνα 1. Δομή του HIF-1. Οι υπομονάδες HIF-1α και HIF-1β με τις περιοχές bHLH και PAS που απαιτούνται για τον διμερισμό και την σύνδεση με το DNA. Επιπλέον στον HIF-1α, απεικονίζονται το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό σήμα εισόδου στον πυρήνα (NLS), οι περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TADs) και η πλούσια σε Pro-Ser-Thr περιοχή σταθεροποίησης (PSTD, επίσης γνωστή σαν ODD: oxygen dependent degradation domain). Απεικονίζονται τα σημεία αλληλεπίδρασης με τον VHL, την p300 και τον CBP. Το διπλό βέλος δείχνει ότι χρειάζεται πρώτα να οξειδωθεί η Cys800 από την θειορεδοξίνη (TRX) και τον παράγοντα REF-1 για να αλληλεπιδράσει η περιοχή TAD-C με τον p300 ή CBP. Δίνονται αριθμητικά τα σχετικά κατάλοιπα αμινοξέων.

Η δομή της πρωτεΐνης HIF-1β, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, μοιάζει με αυτή του HIF-1α, περιέχει κι αυτή στο μόριο της την περιοχή διμερισμού και σύνδεσης με το DNA, bHLH-PAS. Η σύνθεση του HIF-1β, σε αντίθεση με τον HIF-1α, είναι ανεξάρτητη από τις μεταβολές στην συγκέντρωση του οξυγόνου.

HIF-1: Λειτουργία

Ρόλος του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας, είναι η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων που αναγράφονται στον Πίνακα 1. Τα γονίδια αυτά, περιέχουν ένα ή

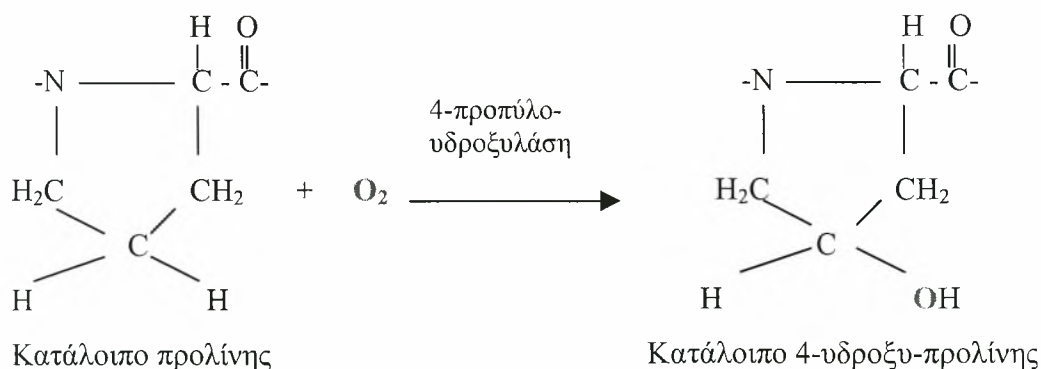
περισσότερα στοιχεία που αποκρίνονται στην υποξία, HRE (hypoxia response elements), στον προαγωγέα ή στον ενισχυτή τους, την 5'-RCGTG-3' νουκλεοτιδική αλληλουχία στην οποία συνδέεται ο HIF-1 και δρά ως μεταγραφικός παράγοντας (Semenza 2000 & 2001).

HIF-1α: Ρύθμιση:

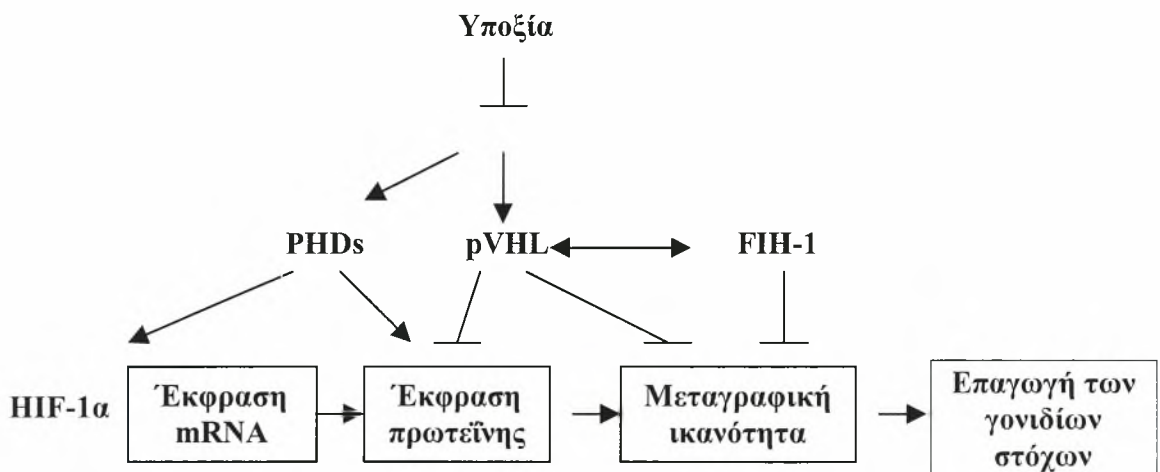
α) στο επίπεδο του χρόνου ημιζωής της πρωτεΐνης:

Ενώ ο HIF-1β εκφράζεται συνεχώς, ο HIF-1α επάγεται μόνο σε υποξικά κύτταρα και παρουσιάζει συνεχή αύξηση καθώς τα κύτταρα εκτίθενται σε συγκεντρώσεις οξυγόνου μικρότερες από 6%, δηλαδή σε μερική πίεση O₂ περίπου 40mm Hg, με μέγιστη απόκριση σε 0,5% συγκέντρωση O₂ (3mm Hg) (Jiang et al 1996).

Σε συνθήκες νορμοξίας ο HIF-1α αναγνωρίζεται από ένα σύμπλοκο που περιέχει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL (Von Hippel Lindau), συστατικό της E3 πρωτεΐνο-ουβικουϊτίνο-λιγάσης, ουβικουϊτινιώνεται άμεσα και αποικοδομείται μέσω της οδού του πρωτεασώματος (Salceda et al 1997, Huang LE et al 1998, Maxwell et al 1999). Απαραίτητη για την αναγνώριση και την ουβικουϊτινίωση του HIF-1α είναι η υδροξυλίωση δύο καταλοίπων προλίνης 402 και 564 αντίστοιχα, στην περιοχή ODD (Ivan et al 2001) από μια κυτταροπλασματική 4-προπύλο-υδροξυλάση (Ivan et al 2001, Jaakola et al 2001, Semenza 2002). Η αντίδραση που συμβαίνει είναι:



Οι προπύλο-υδροξυλάσες (PHDs) είναι ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των σιδήρο-2-οξυγλουταρυλο-οξυγενασών (Ivan *et al* 2001). Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου (PHD1, PHD2, PHD3) με ομόλογες πρωτεΐνες και σε άλλους οργανισμούς (Bruick & McKnight 2001). Υποστηρίζεται ότι είναι η ίδια, η κυτταροπλασματική 4-προπύλο-υδροξυλάση, η οποία απαιτεί μοριακό οξυγόνο και σίδηρο για την δράση της, ο αισθητήρας οξυγόνου που καθορίζει την ρύθμιση της σταθερότητας του HIF-1α και την απόκριση στην υποξία (βλ. Σχήμα 1). Πιο πρόσφατα δεδομένα (Huang J. *et. al* 2002), προτείνουν την PHD2 υδροξυλάση, ως την πιο πιθανή από τις τρεις παραπάνω ισομορφές, να καταλύει αυτήν την αντίδραση.



Σχήμα 1. Η έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α και η ενεργοποίηση της μεταγραφής του καθορίζονται από O₂ – εξαρτώμενα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και από αυξητικούς παράγοντες. Ο HIF-1α επάγεται από την υποξία (πάνω) σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Όπου: PHDs: προπύλο-υδροξυλάσες , pVHL: παράγοντας Von Hippel Lindau, FIH-1: υδροξυλάση της ασπαραγίνης.

β) στο επίπεδο της μετακίνησης στον πυρήνα:

Άγνωστος είναι ακόμη ο μηχανισμός σχετικά με την ρύθμιση της μεταφοράς του HIF-1α από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Δεν έχει βρεθεί ακόμη ποια ή ποιες πρωτεΐνες μπορεί να συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία.

γ) στο επίπεδο της μεταγραφικής ενεργότητας:

Σχετικά με το επίπεδο της ενεργοποίησης της μεταγραφικής ικανότητας του HIF-1α, πολύ πρόσφατα δεδομένα (*McNeill et al 2002, Kirsty et al 2002*) προτείνουν ότι την ρύθμιση καθορίζει η υδροξυλάση της ασπαραγίνης (FIH-1), η οποία ανήκει στην ίδια οικογένεια οξυγενασών με τις PHDs. Υδροξυλιώνει ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης στην θέση 803 του HIF-1α και εμποδίζει σε συνθήκες νορμοξίας την αλληλεπίδραση του παράγοντα CBP/p300 με τις περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TADC, TADN).

Μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης HIF-1α και άλλων πρωτεϊνών:

Η διαδικασία ενεργοποίησής του HIF-1α προϋποθέτει την μοριακή αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες. Κάποιες μοριακές αλληλεπιδράσεις είναι ήδη γνωστές, άλλες όμως παραμένουν αταυτοποιήτες, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα.

Οι μέχρι τώρα γνωστές μοριακές αλληλεπιδράσεις είναι:

1. HIF-1β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator)

Ο HIF-1α ετεροδιμερίζεται με τον HIF-1β ή αλλιώς ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator, δηλαδή μεταγωγέας στον πυρήνα του σήματος των άρυλο-υδρογονανθράκων), σχηματίζοντας τον HIF-1. Η περιοχή διμερισμού είναι από το αμινοξύ 1 έως το 390, δηλαδή η περιοχή bHLH-PAS και η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων, όχι όμως και για την μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα. (*Wang G.L. et al. 1995, Jiang B.H. et .al. 1996, Gassman et al 1997, Kallio et al 1998, Chilov et al 1999*).

2. pVHL (Von Hippel Lindau)

Αλληλεπιδρά με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη pVHL συστατικό της E3-ουβικουΐτινο-λιγάσης, όπως προαναφέρθηκε, σε συνθήκες νορμοξίας προκειμένου να πρωτεολυθεί. Για να συμβεί αυτή η αλληλεπίδραση, απαιτείται προηγουμένως η υδροξυλίωση των προλινών στις θέσεις 402 και 564, από μια κυτταροπλασματική 4-προπύλο-υδροξυλάση (*Ivan et al 2001, Michael Ohh et al 2000, Jaakkola P. et al 2001, Jung-Hyun Min et al 2002, Wal-Ching Hon 2002*).

3. CBP/p300 (Creb Binding Protein)

Ο CBP/p300 έχει δράση ακετυλοτρανσφεράσης (HAT), είναι συμπαράγοντας του μηχανισμού μεταγραφής στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με τον ήδη σταθεροποιημένο HIF-1α, σε συνθήκες υποξίας. Υποψήφιες περιοχές αμινοξέων γι' αυτήν την *in vitro* αλληλεπίδραση, σε πειράματα ανοσοκαθήλωσης και με την τεχνική των δύο υβριδίων, βρέθηκαν οι 531-784 και 786-826. Πιο συγκεκριμένα σε πειράματα των *Jie Gu et al 2000*, με την τεχνική RAMSY (PCR-mediated random mutagenesis screen in yeast), φαίνεται να παίζουν κύριο ρόλο η κυστεΐνη στη θέση 800 (Cys 800) και οι λευκίνες στις θέσεις 795, 818 και 822 αντίστοιχα. Ειδικότερα, για την Cys 800 στον HIF-1α βρέθηκε ότι πρέπει να είναι σε ανηγμένη μορφή για να αντιδράσει με τον CBP/p300. Η αναγωγή αυτή γίνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της θειορεδοξίνης (TRX-1) με τον παράγοντα Ref-1 (redox factor 1) ο οποίος βρίσκεται στον πυρήνα (*Xanthoudakis and Curran 1992*) και είναι ο τελευταίος, που μεταφέρει το θειο-αναγωγικό σήμα στην κυστεΐνη.

4. SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator) και TIF-2 (Transcription Intermediary Factor 2)

Ο SRC-1 και ο TIF-2 είναι συμπαράγοντες ενεργοποίησης της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του HIF-1α, όπως κι ο CBP/p300 (*Jie Gu 2000*). Για τον SRC-1, που έχει ιδιότητες ακετυλοτρανσφεράσης (HAT) (*Bannister et al 1996*), έχει δειχθεί με χρωματογραφία αγκιστείας ότι συνδέεται απευθείας και συνεχώς με τον CBP και λειτουργεί σαν γέφυρα μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων. Η ίδια

τεχνική χρησιμοποιήθηκε και για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του TIF-2, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των p160 μεταγραφικών παραγόντων (Voegel et al 1996), και βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον HIF-1α in vivo (Carrero Pillar et al 1999). Δεν έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής συγκεκριμένες θέσεις αμινοξέων στον HIF-1α που να αλληλεπιδρούν με τους δύο παραπάνω παράγοντες αλλά, υποψήφιες είναι οι περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TADC, TADN).

5. FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1)

Η FIH-1 αλληλεπιδρά in vitro με τον HIF-1α, στην περιοχή των αμινοξέων 531-826, σε πειράματα που έγιναν με χρωματογραφία αγκιστείας. Στο ίδιο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μόνο η περιοχή αμινοξέων του HIF-1α 576-784 (ID) για την οποία υπήρξε αλληλεπίδραση αλλά με μικρότερη αγκιστεία και αναφέρθηκε ότι η FIH-1 αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με τον VHL και τον HIF-1α σε διαφορετικά σημεία (Mahon P et al 2001). Πρόσφατα βρέθηκε (Kirsty et al 2002) ότι, η FIH-1 είναι η υδροξυλάση της ασπαραγίνης στη θέση 803 του HIF-1α (βλ. και σελ. 7) και ότι σε συνθήκες νορμοξίας εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τον CBP/p300 (McNeill et al 2002)

6. p53

Για την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 έχει βρεθεί από πειράματα σε καρκινικά κύτταρα ότι αλληλεπιδρά με την περιοχή των αμινοξέων 401-603 (ODD) του HIF-1α. Η αλληλεπίδραση συμβαίνει κατά την υποξία, προωθώντας την πρωτεόλυσή του HIF-1α μέσω μιας άλλης οδού, της Mdm-2-ουβικουϊτίνο λιγάσης. (Rajani Ravi et al 2000, Won G. et al 1998, Bech-Otschir et al 2001).

7. Jab 1 (Jun Activation Domain Binding Protein 1)

Η πρωτεΐνη Jab1, είναι συνενεργοποιητής του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 και ανταγωνίζεται την δράση της p53 σε συνθήκες υποξίας, σταθεροποιώντας τον HIF-1α. Χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων βρέθηκε ότι η Jab1 αλληλεπιδρά στην ίδια περιοχή με την p53 (401-603, ODD) και προωθεί την ενεργοποίησή του HIF-1α. (Moon-Kyoung Bae et al 2001).

8. hsp90 (Heat shock Protein 90)

Για την πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp90 που ανήκει στην οικογένεια των μοριακών συνοδών πρωτεϊνών οι απόψεις δίστανται. Κοινή παραδοχή σε όλες τις μελέτες είναι ότι συμβάλλει στην σταθεροποίηση του HIF-1α. Με ανοσοκατακρήμνιση, αναφέρθηκε από τους *Minet et al 1999*, ότι ο HIF-1α αλληλεπιδρά in vitro μέσω της περιοχής 1-330 αμινοξέων με την hsp90 και μόνο σε συνθήκες νορμοξίας. Αντίθετα, από τους *Katschinski et al 2002*, βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση συμβαίνει σε συνθήκες υποξίας και μόνο αν αυξηθεί η θερμοκρασία σε νορμοξία κι ότι η hsp90 προστατεύει τον HIF-1α. Από την άλλη μεριά, οι *Jennifer S. Isaaks et al 2002*, προτείνουν ότι, η hsp90 συνοδεύει τον HIF-1α και σε υποξία και σε νορμοξία, σταθεροποιώντας τον και σε περιπτώσεις έλλειψης του VHL.

9. p42/p44 MAPKs (Mitogen Activated Serine/Threonine Protein Kinases or ERKs)

Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται in vitro από τις κινάσες p42/p44 MAPKs στις αμινοξικές θέσεις 515 και 687. Η αλληλεπίδραση αυτή ευνοεί την ενεργοποίησή του και τον διμερισμό του με τον ARNT (*Richard et al 1999*).

10. HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4)

Με το σύστημα των δύο υβριδίων βρέθηκε ότι ο HNF4 αλληλεπιδρά in vitro σε συνθήκες υποξίας με την περιοχή PAS (106-526 αα) του HIF-1α και η αλληλεπίδραση αυτή, ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) (*Zhang W. et al 1999*).

11. ARD1

Η πρωτεΐνη ARD1, σε κύτταρα θηλαστικών, έχει δράση ακετυλοτρανσφεράσης (HAT). Πολύ πρόσφατα βρέθηκε από τους *Joo-Won Jeong et al 2002*, με το σύστημα των δύο υβριδίων ότι ο HIF-1α ακετυλιώνεται in vivo από τον ARD1 και με σημειακή μεταλλαξογένεση βρήκαν ότι η ακετυλίωση αυτή

συμβαίνει στην λυσίνη στη θέση 532 της περιοχής ODD. Υποστηρίζουν ότι, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα και είναι κριτικής σημασίας για την σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας και την μετέπειτα αλληλεπίδραση της με τον παράγοντα pVHL.

ΣΚΟΠΟΣ

Άμεσος στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση και η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α και είναι δυνατόν να επηρεάζουν την ενεργοποίηση του ή τον τρόπο δράσης του. Αποτελεί τμήμα των ερευνών που γίνονται στο Εργαστήριο Βιοχημείας, με μακροπρόθεσμο στόχο την κατανόηση του μηχανισμού ενεργοποίησης του HIF-1α σε διαφορετικά *in vivo* συστήματα και κάτω από διαφορετικά ερεθίσματα ή παθολογικές καταστάσεις. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο των δύο υβριδίων.

Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ:

Το σύστημα των δύο υβριδίων χρησιμοποιεί έναν γνωστό, μονοκύτταρο, ευκαρυωτικό οργανισμό τον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* και εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι, οι παράγοντες μεταγραφής φέρουν περιοχές που μπορούν να δράσουν ξεχωριστά. Αυτές είναι:

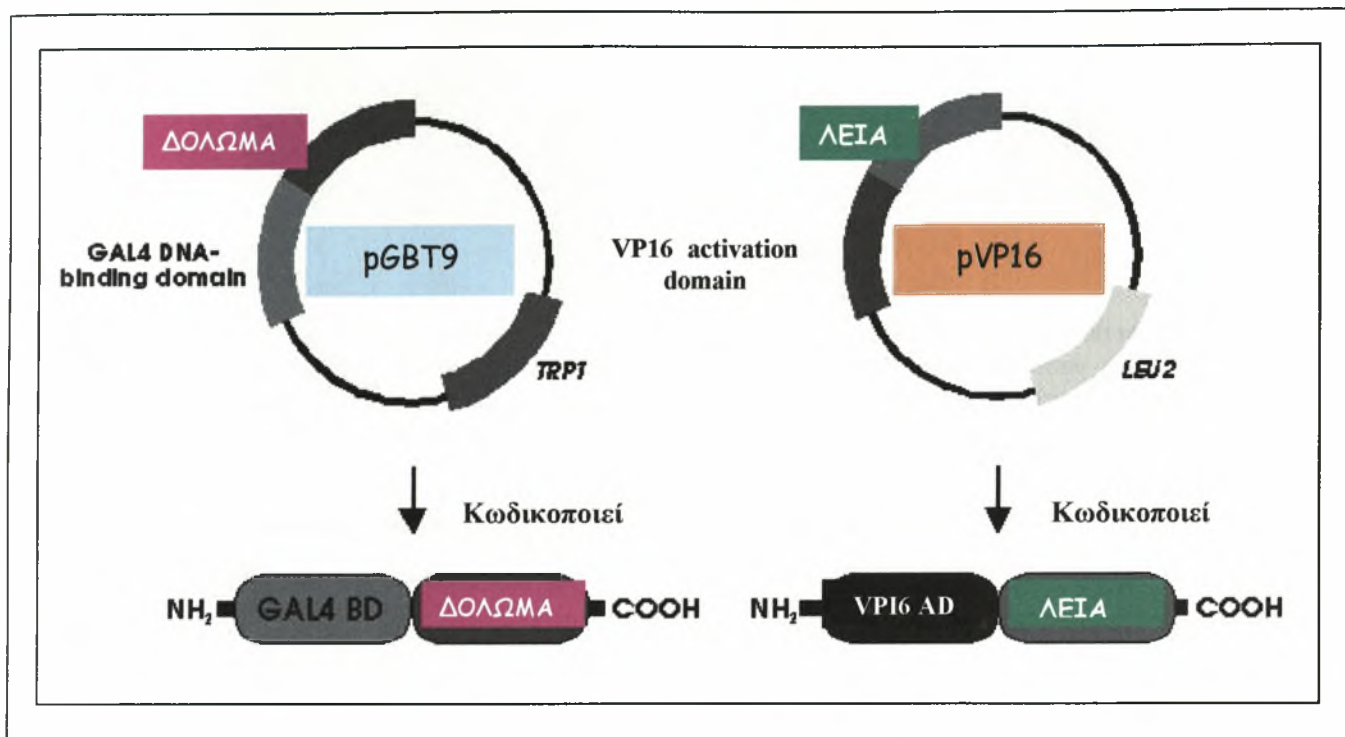
1. Οι περιοχές αναγνώρισης και πρόσδεσης (binding domain (BD)) σε συγκεκριμένες αλληλουχίες πέντε έως είκοσι νουκλεοτιδίων (binding site (BS)) στους υποκινητές των γονιδίων.
2. Οι περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (activation domain (AD)) που δρουν άμεσα ή έμμεσα με τα σύμπλοκα που δημιουργούνται από τις RNA πολυμεράσες στα σημεία έναρξης της μεταγραφής.

Οι περιοχές αναγνώρισης (BD) και ενεργοποίησης (AD) δεν χρειάζεται να προέρχονται από τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα για να δράσουν.

Το γονίδιο «δόλωμα» κλωνοποιείται στον πλασμιδιακό φορέα pGBT9 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), με αποτέλεσμα, όταν ο ανασυνδυασμένος φορέας βρεθεί σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* να εκφραστεί η χμιαϊκή πρωτεΐνη GAL4BD-δόλωμα.

Αντίστοιχα στον φορέα pVP16 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), κλωνοποιούνται τα πλασμίδια «λεία» με αποτέλεσμα, όταν ο ανασυνδυασμένος φορέας βρεθεί σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* να εκφραστεί η χμιαϊκή πρωτεΐνη VP16AD-λεία.

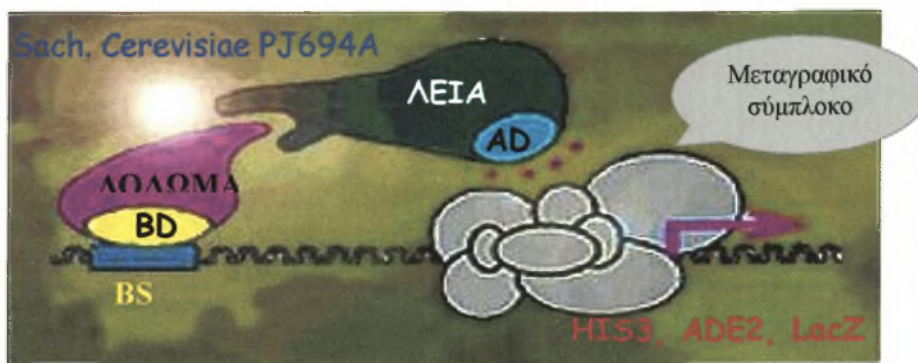
Οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς δίνονται σχηματικά στην Εικόνα 3.



Εικόνα 2. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δύο υβριδίων για την ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης δόλωμα (πλασμίδιο «δόλωμα», pGBT9) και των πρωτεϊνών που λείες (πλασμίδιο «λεία», pVP16). Στο σχήμα (κάτω) φαίνονται οι χημικικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται στην κάθε περίπτωση (βλ. κείμενο για περισσότερες λεπτομέρειες).

Το στέλεχος PJ694A του *Saccharomyces cerevisiae*, στο οποίο έχει γίνει εισαγωγή των γονιδίων αναφοράς HIS3, ADE2 και LACZ κάτω από τον έλεγχο του GAL4 -πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια στον υποκινητή τους φέρουν την ειδική αλληλουχία νουκλεοτιδίων (BS) την οποία αναγνωρίζει και προσδέεται με μεγάλη εξειδίκευση η περιοχή BD της πρωτεΐνης GAL4, όπως προαναφέρθηκε- αρχικά μετασχηματίστηκε με το πλασμίδιο «δόλωμα». Στη συνέχεια, κάθε ένα από τα μετασχηματισμένα στελέχη, μετασχηματίστηκε επιπλέον με τα πλασμίδια «λεία».

Μέσα στον πυρήνα του σακχαρομύκητα, έχει έρθει η χημικική πρωτεΐνη που φέρει την περιοχή πρόσδεσης (BD) της Gal4 και το «δόλωμα» κι έχει προσδεθεί στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων (BS) (βλ. Εικόνα 3). Εάν κι εφόσον, υπάρχει αλληλεπίδραση του «δολώματος» με την πρωτεΐνη «λεία», η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (AD) του VP16 που φέρει η τελευταία, θα έρθει κοντά στο σύμπλεγμα της μεταγραφής και θα έχουμε ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού του συστήματος των δύο υβριδίων, μέσα στον πυρήνα του κυττάρου του *S. cerevisiae*. Οι αλληλεπίδραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών προκαλεί ενεργοποίηση του μεταγραφικού συμπλόκου και έκφραση των γονιδίων αναφοράς. (βλ. κείμενο για περισσότερες λεπτομέρειες)

Τα διπλά πλέον μετασηματισμένα στελέχη που ενεργοποιούν τα γονίδια αναφοράς διαχωρίζονται βάση φαινοτύπου και για τα τρία γονίδια. Το γονίδιο HIS3 προσδίδει στα κύτταρα πρωτοτροφία στην ιστιδίνη και τα κύτταρα μπορούν να μεγαλώσουν σε περιβάλλον που περιέχει 3-αμινοτριαζόλη (AT), -έναν συναγωνιστικό αναστολέα του βιοσυνθετικού ενζύμου της ιστιδίνης. Το γονίδιο ADE2 προσδίδει στα κύτταρα πρωτοτροφία στην αδενίνη και οι αποικίες που δίνουν είναι άσπρες (αν δεν συμβαίνει αυτό, τότε οι αποικίες είναι κόκκινες). Τέλος, το γονίδιο LacZ προσδίδει στα κύτταρα την ικανότητα να παράγουν το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση και να υδρολύουν το υπόστρωμα στο οποίο μεγαλώνουν (X-gal) δίνοντας αποικίες με μπλε χρώμα (διαφορετικά, οι αποικίες είναι άσπρες).

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

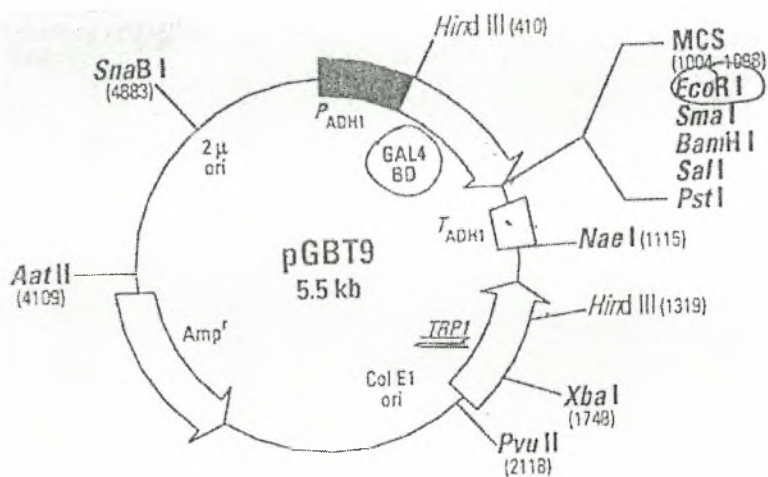
- Κλωνοποίηση της επιθυμητής περιοχής του HIF-1α στον φορέα pGBT9 (pGHF, πλασμίδιο «δόλωμα»).
- Μετασηματισμός του στελέχους PJ694A του *Saccharomyces cerevisiae* με το πλασμίδιο «δόλωμα».
- Παρασκευή DNA βιβλιοθήκης cDNA –pVP16 (πλασμίδιο «λεία»).
- Μετασηματισμός του στελέχους του *S.cerevisiae* PJ694A +[pGHF] με την βιβλιοθήκη.
- Επιλογή κυττάρου που εκφράζει τον συγκεκριμένο φαινότυπο (AT resistant)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ:

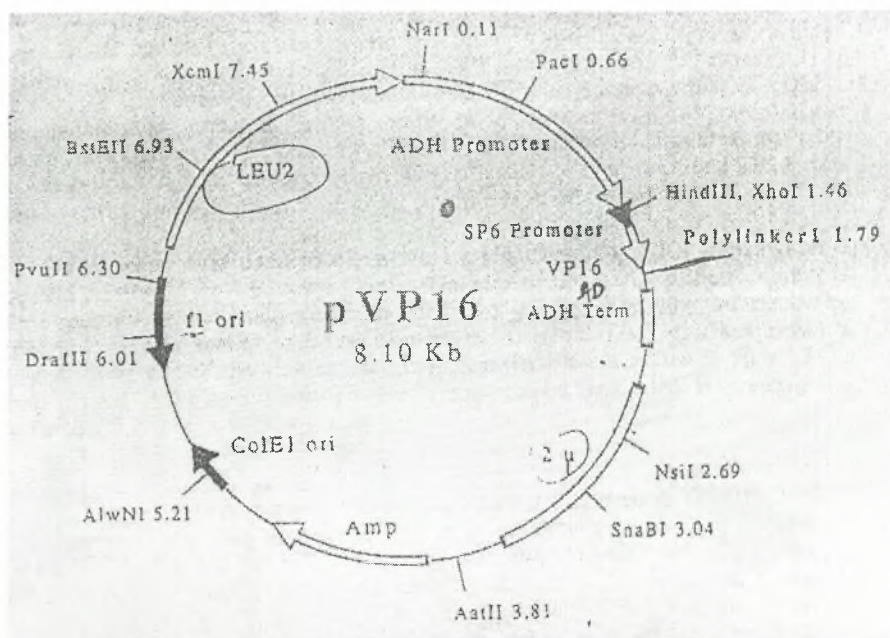
1) pGBT9



Εικόνα 4. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGBT9

- MCS: (Multiple Cloning Site) περιοχή κλωνοποίησης ξένου τμήματος DNA
- GAL4-BD: αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί για την περιοχή πρόσδεσης (DNA binding domain) του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.
- Amp^r: Γονίδιο που επιτρέπει την επιλογή βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν. Αποκτούν αντίσταση στην αμικιλίνη.
- TRP1: Γονίδιο που επιτρέπει την επιλογή κυττάρων που το περιέχουν. Προσδίδει πρωτοτροφία στο αμινοξύ τρυπτοφάνη

2) pVP16



Εικόνα 5. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pVP16

- polylinker (ή MCS): περιοχή κλωνοποίησης ξένου τμήματος DNA.
- VP16-AD: αλληλουχία που κωδικοποιεί για την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (activation domain) του μεταγραφικού παράγοντα VP16.
- Amp^r: Γονίδιο που επιτρέπει την επιλογή βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν. Αποκτούν αντίσταση στην αμικικιλίνη
- LEU2: Γονίδιο που επιτρέπει την επιλογή κυττάρων που το περιέχουν. Προσδίδει πρωτοτροφία στο αμινοξύ λευκίνη.

Στελέχη βακτηριακών κυττάρων E.coli που χρησιμοποιήθηκαν:

- Top 10
- KC8 (L-,W-,H-,U-)

Στέλεχος κυττάρων σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε:

- PJ694A που φέρει ενσωματωμένα στο γονιδίωμά του τα γονίδια αναφοράς LacZ, ADE2, HIS3

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- LB (για 1000 ml):
 - 10 gr bacto tryptone
 - 5 gr bacto yeast extract
 - 10 gr NaCl
 - για τριβλία: +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- YPD (για 1000 ml):
 - 20 gr glucose
 - 10 gr bacto yeast extract
 - 20 gr bacto peptone
 - για τριβλία: +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- SC (για 1000 ml):
 - 20 gr glucose
 - 1,7 gr yeast nitrogen base
 - 5 gr NH₄SO₄
 - 2 gr από μίγμα 17 αμινοξέων (δεν περιέχονται: υδροξυ-προλίνη, κυστίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, τρυπτοφάνη)
 - 350 μl NaOH 5 M (pH: 5.6)
 - για τριβλία: +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- SC X-gal τριβλία (1000 ml):
 - 20 gr glucose
 - 6,7 gr yeast nitrogen base
 - 2 gr από μίγμα 17 αμινοξέων (δεν περιέχονται: υδροξυ-προλίνη, κυστίνη, ιστιδίνη, λευκίνη τρυπτοφάνη)
 - 350 μl NaOH 5 M (pH: 5.6)
 - +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

- 50 ml KH_2PO_4 0,66 M
- 2 ml X-gal 20mg/ml

- M_9 τριβλία (1000 ml):
 - 750 ml ddH₂O
 - 200 ml 5xM₉
 - 2 ml MgSO₄ 1M
 - 0,1 ml CaCl₂ 1 M
 - 20 ml glucose 20%
 - +20 gr agar

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

Διάλυμα 5xM₉ (1000 ml):

- 42,5 gr Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 15 gr KH₂PO₄
- 2,5 gr NaCl
- 5 gr NH₄Cl
- 1000 ml ddH₂O

Υπόλοιπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα θρεπτικά υλικά:

ADE (166x) 0,17 gr/ 50 ml	URA (100x) 0,112 gr / 50 ml
---------------------------	-----------------------------

TRP (100x) 0,56gr / 50 ml	HIS 330x 1,048 gr/ 50 ml	LEU (90x) 1,18gr/ 50 ml
---------------------------	--------------------------	-------------------------

AT (3-AMINOTΡΙΑΖΟΛΗ) 2 M

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ

- Προσθέτουμε 2,5 όγκους αιθανόλης 100% στο διάλυμα νουκλεϊκών οξέων και το 1/10 του όγκου CH_3COONa 3M.
- Στους -20°C για 30 λεπτά τουλάχιστον.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στους 4°C σε 12000g.
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 500μl EtOH 70% και ξαναφυγοκεντρούμε στις παραπάνω συνθήκες.
- Ξηραίνουμε το ίζημα στον αέρα.

Το DNA μπορεί να επαναδιαλυθεί σε δις απεσταγμένο νερό ή σε ρυθμιστικό δ/μα TE και να διατηρηθεί στους -20°C .

Διάλυμα TE:

- Tris 10 mM pH.7,5
- EDTA 1 mM

2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΦΑΙΝΟΛΗΣ : ΧΛΩΡΟΦΟΡΜΙΟΥ ΚΑΙ ΧΛΩΡΟΦΟΡΜΙΟ

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το DNA και εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι, η αποπρωτεΐνωση γίνεται καλύτερα όταν χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες αντί για έναν.

- Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης : χλωροφόρμιου (1:1) με το διάλυμα νουκλεϊκού οξέος.
- Αναδεύουμε μέχρι το διάλυμα να γίνει ομοιογενές.
- Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στα 12000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγόκεντρου.
- Επαναλαμβάνουμε τα παραπάνω.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφόρμιου και επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρωση.
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωληνάκι.
- Ακολουθεί κατακρήμιση του DNA με αιθανόλη.

3. ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ:

Η ποσότητα κάθε ενζύμου που χρησιμοποιείται σε αντίδραση πέψης καθορίζεται από την ενεργότητά του (Unit/μl).

Οι αντιδράσεις που ακολουθούν αναφέρονται σε ένζυμο με ενεργότητα 20 Units/μl

A. ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΕΨΗ

- Η αντίδραση γίνεται στα 50 μl.
 - 5 μl πλασμιδιακό DNA (1μg/μl)
 - 2 μl ενζύμου
 - 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10x)
 - 0,5 μl BSA (100x) (όπου χρειάζεται)
 - 39 μl ddH₂O
- Επώαση στην καθορισμένη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία για 1 ώρα.

B. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΨΗ

- Η αντίδραση γίνεται στα 10 μl.:
 - 2 μl πλασμιδιακό DNA (1μg/μl)
 - 0,2 μl ενζύμου
 - 1 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10x)

- 0,1 μl BSA (100x) 10mg/ml (όπου χρειάζεται)
- 7 μl ddH₂O
- Επώαση στην καθορισμένη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία, για 1 ώρα.

Σημείωση: Η BSA είναι αλβουμίνη από ορό βοοειδούς.

4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1%

Για τον διαχωρισμό την ανίχνευση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA από 500 bp έως 7 kb.

- Διαλύουμε τόση ποσότητα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (βλ. στο τέλος της μεθόδου), ώστε η συγκέντρωσή της στον τελικό όγκο να είναι 1%.
- Ανακινούμε και θερμαίνουμε στους 100⁰ C.
- Όταν πέσει η θερμ/σία του διαλύματος στους 60⁰ C, προσθέτουμε τόσο όγκο 10 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου ώστε στο διάλυμα η συγκέντρωσή του να είναι 0,5 μg/ml
- Ρίχνουμε το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που φέρει τις κατάλληλες εγκοπές και περιμένουμε να πήξει.
- Προσθέτουμε TAE ώστε να καλυφθεί η πηκτή.
- Προσθέτουμε στο διάλυμα με το DNA τη χρωστική μπλε βρωμοφαινόλη (0,25%) η οποία είναι 7x σε σχέση με τον συνολικό όγκο.
- Φορτώνουμε το DNA στις εγκοπές της πηκτής.
- Συνδέουμε με ηλεκτρόδια την συσκευή και ηλεκτροφορούμε στα 100 V για 20 λεπτά τουλάχιστον.
- Τοποθετούμε την πηκτή πάνω από λάμπα που να εκπέμπει στο υπεριώδες και φωτογραφίζουμε με την ειδικό φωτογραφικό μηχάνημα Polaroid.

Διάλυμα 1x TAE:

- 4 mM Tris-acetate
- 1 mM EDTA

5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ “GEL EXTRACTION” ΤΗΣ QIAGEN

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό DNA από 70 bp έως 10 kb.

- Αφαιρούμε από την πηκτή αгарόζης το κομμάτι που περιέχει το DNA με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Ζυγίζουμε την ποσότητα που ανακτήσαμε και προσθέτουμε 3 όγκους διαλύματος QG.
- Επώαζουμε στους 50⁰ C για 10 λεπτά.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο με την ποσότητα που ζυγίσαμε ισοπροπανόλη.
- Περνάμε το διάλυμα από την ειδική στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
- Προσθέτουμε στη στήλη 0,5 ml διαλύματος QG και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
- Προσθέτουμε 0,75 ml διαλύματος PE και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
- Ξαναφυγοκεντρούμε την στήλη για 1 λεπτό για να διώξουμε τα υπολείμματα.
- Για την έκλυση του DNA προσθέτουμε 50μl ρυθμιστικού διαλύματος EB ή δις απεσταγμένο H₂O στο κέντρο της στήλης. Αφήνουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και ανακτούμε το DNA με φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα

6. ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗΝ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ CIP (Calf Intestinal alkaline phosphatase)

Για την αφαίρεση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλωνα ή δίκλωνα τμήματα DNA εμποδίζοντας την επανασύνδεσή τους.

- 1Unit ενζύμου καταλύει την αντίδραση 1pmole 5' φωσφορικών άκρων DNA.
- Στα 30 μl της αντίδρασης:
 - 20 μl DNA (660 ng)
 - 3 μl ρυθμιστικό διάλυμα NEB 3 (10x)
 - 1 μl CIP (10.000 Unit/ml)
 - 6 μl ddH₂O
- Επώαζουμε στους 37⁰ C για 30 λεπτά..

- Προσθέτουμε 5mM EDTA (pH: 8.0).
- Θερμαίνουμε για 10 λεπτά στους 75⁰ C.
- Εκχυλίσεις με φαινόλη : χλωροφόρμιο (1:1)
- Κατακρήμιση του DNA με αιθανόλη.

7. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ (ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ)

Η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ γειτονικών 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων.

- Στο 10μl της αντίδρασης έχουμε:
 - ισομοριακές ποσότητες πλασμιακού φορέα και ξένου τμήματος DNA.
 - 1 μl ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10 x)
 - 1 μl λιγάσης (0,1 Unit)
 - ddH₂O
- Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση όλη νύχτα στους 16⁰ C.

8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ (MINI PLASMID DNA PREPARATION):

A. ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΛΥΣΗΣ ΜΕ ΒΡΑΣΜΟ Ή STET-LYSOZYME METHOD

- Χρησιμοποιούμε 1,5 ml υγρής καλλιέργειας που έχουμε επώασει κατά την διάρκεια της νύχτας και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 10.000rpm.
- Προσθέτουμε στο ίζημα 200μl διαλύματος STET και αναδεύουμε.
- Επώαζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 5μl λυσοζύμης (10mg/ml).
- Επώαζουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Θερμαίνουμε στους 100⁰ C για 1 λεπτό.

- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 14000rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Κρατάμε το υπερκείμενο.
 - Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη
-

Διάλυμα STET:

- 0,1M NaCl
- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA (pH 8.0)
- 5% Triton X-100
- ddH₂O

Αποθηκεύεται σε πλαστικό μπουκάλι και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

B. “SPIN MINIPREP KIT PROTOCOL” ΤΗΣ QIAGEN

Για απομόνωση έως και 20μg πλασμιδιακού DNA από ολονύχτιες υγρές καλλιέργειες 1-5 ml κυττάρων E.coli σε θρεπτικό μέσο LB (Luria –Bertani medium).

- Επαναδιαλύουμε το βακτηριακό ίζημα της υγρής καλλιέργειας σε 250μl διαλύματος P1 + RNAase A
- Αναδεύουμε μέχρι τα κύτταρα να αιωρηθούν καλά και το διάλυμα να γίνει ομοιογενές.
- Προσθέτουμε 250μl διαλύματος P2 και ανακινούμε.
- Προσθέτουμε 350μl διαλύματος N3 και ανακινούμε.
- Φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά.
- Περνάμε το υπερκείμενο στις στήλες.
- Φυγοκεντρούμε για 30-60 δευτερόλεπτα και πετάμε το υγρό που διαπέρασε την στήλη.
- Ξεπλένουμε την στήλη με 0,5 ml διαλύματος PB και επαναφυγοκεντρούμε για 30-60 δευτερόλεπτα.
- Ξεπλένουμε την στήλη με 0,75 ml διαλύματος PE και ξαναφυγοκεντρούμε.

- Πετάμε το υγρό που διαπέρασε την στήλη και την φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό να φύγουν τα υπολείμματα.
- Για την έκλουση του DNA προσθέτουμε 50μl ρυθμιστικού διαλύματος EB ή δις απεσταγμένο H₂O στο κέντρο της στήλης. Αφήνουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και ανακτούμε το DNA με φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα

9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ – PEG

- Φυγοκεντρούμε τα 50 ml καλλιέργειας που έχουμε βάλει για επώαση από το προηγούμενο βράδυ σε θρεπτικό υγρό επιλογής.
- Προσθέτουμε 1 ml από το διάλυμα Α, αναδεύουμε και αφήνουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθέτουμε 2 ml από το διάλυμα Β, ανακινούμε και αφήνουμε για 5 λεπτά στον πάγο.
- Προσθέτουμε 1,5 ml από το διάλυμα Γ, ανακινούμε και αφήνουμε για 5 λεπτά στον πάγο. Παρατηρούμε ότι σχηματίζεται νεφελώδες ίζημα.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 10.000 rpm στους 4⁰ C.
- Περνάμε το υπερκείμενο από γάζα.
- Προσθέτουμε RNAase A σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml.
- Επωάζουμε για 20 λεπτά στους 37⁰ C.
- Εκχυλίσαις με φαινόλη : χλωροφόρμιο (1:1)
- Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη.
- Στεγνώνουμε το ίζημα από την αιθανόλη 70% και προσθέτουμε με την εξής σειρά:
 - 480μl δις απεσταγμένο H₂O
 - 120μl NaCl 4M
 - 600μl 13% PEG 8000.
 - Αφήνουμε στον πάγο για 2 ώρες.
- Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 12.000g.
- Προσθέτουμε αιθανόλη 70%.

- Στεγνώνουμε το ίζημα, διαλύουμε το DNA σε 50μl δις απεσταγμένο H₂O και διατηρούμε το διάλυμα στους -20°C.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Διάλυμα Α	Διάλυμα Β	Διάλυμα Γ
- 50 mM glucose	- 0,2 N NaOH	- 5 M CH ₃ COOK (pH: 5.8)
- 10 mM EDTA	- 1% SDS	
- 25 mM Tris-HCl (pH: 8.0)		

10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ “RESCUE” (GUTHRIE FINK – GUIDE TO YEAST GENETICS & MOLECULAR BIOLOGY)

- Βάζουμε για επώαση στους 30°C όλη νύχτα, υγρές καλλιέργειες με τα κύτταρα του σακχαρομύκητα σε θρεπτικό μέσο επιλογής (YPD ή SC – Ura).
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων που πήραμε από τις καλλιέργειες σε 200μl διαλύματος RESCUE.
- Προσθέτουμε αποστειρωμένους υάλινους κρυσταλλικούς κόκκους (glass beads, διαμέτρου 0,45 mm).
- Αναδεύουμε για 2 λεπτά
- Προσθέτουμε 200μl διάλυμα φαινόλης
- Αναδεύουμε για 1 λεπτό.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 4.000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υδατικό υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα μικροφυγόκεντρου, αποφεύγοντας να πάρουμε την μεσόφαση.
- Προσθέτουμε 200μl διαλύματος φαινόλης : χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1.
- Αναδεύουμε για 1 λεπτό.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 4.000 rpm.
- Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο σωλήνα μικροφυγόκεντρου.
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Για το διάλυμα RESCUE:

- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl (pH: 8.0)
- 1 mM EDTA
- 0,1% SDS

11. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (E.coli) ΔΕΚΤΙΚΩΝ (competent) ΣΤΗΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Με τον όρο δεκτικό κύτταρο (competent cell), εννοούμε τα βακτηριακά κύτταρα που έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν πολύ εύκολα ξένο και συγκεκριμένα πλασμιδιακό DNA. Με την μέθοδο που ακολουθεί μπορούμε να έχουμε μέχρι και 10^9 μετασηματισμένες αποικίες ανά μg DNA.

- Υγρή καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε 5ml θρεπτικό μέσο TYM με αντιβιοτικό επιλογής στους 37°C όλη νύχτα.
- Την επόμενη ημέρα, αραιώση 1:100 της καλλιέργειας σε τελικό όγκο 3 ml TYM με αντιβιοτικό επιλογής
- Επώαση στους 37°C για 2-3 ώρες.
- Νέα αραιώση 1:200 σε τελικό όγκο 50 ml TYM χωρίς αντιβιοτικό.
- Αφήνουμε την καλλιέργεια να μεγαλώσει έως ότου η απορρόφηση (OD) στα 590nm γίνει 0,35-0,4.
- Φυγοκεντρούμε στις 3000rpm για 5 λεπτά.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 1/2 του αρχικού όγκου διαλύματος TFB I
- Αφήνουμε στον πάγο για 10 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε στις 3000rpm για 5 λεπτά.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 1/25 του αρχικού όγκου διαλύματος TFB II.
- Αφήνουμε για 60 λεπτά στον πάγο.
- Μοιράζουμε από 200 μl του τελικού όγκου των κυττάρων σε σωλήνες μικροφυγόκεντρου και αποθηκεύουμε στους -80°C .

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

TYM	TFBI	TFBII
-2% tryptone	-30 mM KOAc	-10 mM MOPS
-0,5% yeast extract	-50 mM MnCl ₂	-75 mM CaCl ₂
-0,1 M NaCl	-100 mM KCl	-10 mM KCl
-10 mM MgSO ₄	.10 mM CaCl ₂	-20% glycerol
	.15% glycerol	(pH: 7.0)
	(pH: 7.0)	

12. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (E.coli TRANSFORMATION)

Χρησιμοποιήσαμε 1μg/μl πλασμιδιακού DNA στην κάθε αντίδραση μετασχηματισμού σε 200μl E.coli δεκτικών κυττάρων (competent cells). Τα κύτταρα είναι απαραίτητο να βρίσκονται συνεχώς στον πάγο.

- Επωάζουμε για 30 λεπτά στον πάγο.
- Αφήνουμε για 2 λεπτά στους 42⁰ C.
- Μεταφέρουμε αμέσως στον πάγο για 3 λεπτά.
- Προσθέτουμε 800μl υγρό LB
- Επωάζουμε στους 37⁰ C για 1 ώρα.
- Φυγοκεντρούμε για 7 δευτερόλεπτα.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο έως ότου περισσέψουν 100μl και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε αυτόν τον όγκο.
- Απλώνουμε σε τριβλία LB με αντιβιοτικό επιλογής και επωάζουμε στους 37⁰ C όλη νύχτα.

13. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ:

A. “QUICK AND EASY TRAF0 PROTOCOL” κατά Gietz & Woods (1994)

(www.umanitoba.ca/medicine/biochem/gietz/2HS.html)

Με την μέθοδο αυτή μπορούμε να μετασχηματίσουμε γρήγορα οποιοδήποτε κύτταρο σακχαρομύκητα. Χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις που δεν μας ενδιαφέρει να πάρουμε έναν ακριβή αριθμό αποικιών.

- Μαζεύουμε από ένα τριβλίο αποικίες του στελέχους (με scraper). 25 μl για την κάθε αντίδραση.
- Αιωρούμε σε 1ml δις απεσταγμένου H₂O.
- Φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 1 ml CH₃COOLi 100mM και επωάζουμε για 5 λεπτά στους 30⁰C.
- Μοιράζουμε τον όγκο που χρειάζεται για την κάθε αντίδραση (25 μl), σε διαφορετικά σωληνάκια μικροφυγόκεντρου.
- Φυγοκεντρούμε για 5 δευτερόλεπτα κι αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με την σειρά που δίνονται:

- 240 μl 50% (w/v) PEG 3350

- 36 μl CH₃COOLi 1M

- 50μl DNA από σπέρμα σολομού 2mg/ml (το οποίο πρώτα έχουμε θερμάνει στους 100⁰ C για τουλάχιστον 10 λεπτά) (βλ. παρασκευή στο τέλος της μεθόδου).

- 5 μl πλασμιδικαού DNA (από 100ng έως 5 μg)

- 20 μl δις απεσταγμένου H₂O

- Αναδεύουμε έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά.
- Επωάζουμε στους 42⁰ C για 20 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα σε μέγιστη ταχύτητα για 10 δευτερόλεπτα.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 200-400μl δις απεσταγμένου H₂O.

- Απλώνουμε το διάλυμα σε τριβλία επιλογής για το πλασμίδιο σε θρεπτικό μέσο SC.
- Οι αποικίες θα πρέπει να μεγαλώσουν σε 2 με 4 ημέρες στους 30⁰C.

B. “THE LiAc TRAF0 METHOD PAGE” κατά Gietz & Woods (1998)

(www.umanitoba.ca/medicine/biochem/gietz/2HS.html)

Το πρωτόκολλο αυτό ενδείκνυται για την τιτλοδότηση της «βιβλιοθήκης με τα ήδη μετασηματισμένα κύτταρα σακχαρομύκητα που φέρουν το πλασμίδιο «δόλωμα».

- Επώαζουμε σε 10 ml υγρής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο επιλογής SC στους 30⁰ C όλη νύχτα.
- Φωτομετρούμε την καλλιέργεια στα 600 nm και μεταφέρουμε ποσότητα αυτής σε 50 ml θρεπτικού YPAD ώστε ο αριθμός των κυττάρων στην τελευταία να είναι 5x10⁶/ml.
- Επώαζουμε σε αναδευτήρα στους 30⁰ C έως ότου να έχουμε 2x10⁷ κύτταρα/ml.
- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά στις 5.000rpm
- Ξεπλένουμε τα κύτταρα με 25 ml δις απεσταγμένου H₂O και ξαναφυγοκεντρούμε.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 1 ml CH₃COOLi 100mM.
- Φυγοκεντρούμε για 15 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε τελικό όγκο 500 μl CH₃COOLi 100mM και αναδεύουμε.
- Φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα.
- Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με την σειρά που δίνονται:
 - 240 μl 50% (w/v) PEG 3350
 - 36 μl CH₃COOLi 1M
 - 50μl DNA από σπέρμα σολομού 2mg/ml (το οποίο πρώτα έχουμε θερμάνει στους 100⁰ C για τουλάχιστον 10 λεπτά) (βλ. παρασκευή στο τέλος της μεθόδου).
 - X μl πλασμδικαού DNA (από 0,1-10 μg)
 - 34-X μl δις απεσταγμένου H₂O

- Αναδεύουμε το μίγμα έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά
- Επωάζουμε για 30 λεπτά στους 30⁰ C.
- Αφήνουμε για 30 λεπτά στους 42⁰ C.
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 6-8000 rpm για 10 δευτερόλεπτα.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 1 ml δις απεσταγμένου H₂O.
- Απλώνουμε 200μl σε τριβλία με θρεπτικό επιλογής SC και επωάζουμε για 2-4 ημέρες στους 30⁰ C.

Γ. “TWO HYBRID SYSTEM TRAF0 PROTOCOL” κατά Gietz & Woods (1999)

(www.umanitoba.ca/medicine/biochem/gietz/2HS.html)

Το πρωτόκολλο αναφέρεται στον μετασχηματισμό του στελέχους του σακχαρομύκητα που περιέχει το πλασμίδιο «δόλωμα», με καθορισμένη ποσότητα cDNA «βιβλιοθήκης» και σε συγκεκριμένη αντίδραση πολλαπλάσιας κλίμακας. Η αποδοτικότητα αυτής της αντίδρασης μπορεί να φτάσει τις 22.000.000 μετασχηματισμένες αποκίες.

- Επωάζουμε υγρή καλλιέργεια σε θρεπτικό επιλογής SC στους 30⁰ C όλη νύχτα. Ο όγκος της καλλιέργειας θα εξαρτηθεί από την κλίμακα που θα χρησιμοποιήσουμε:

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
Όγκος καλλιέργειας:	25 ml	50 ml	100 ml

- Φωτομετρούμε την καλλιέργεια στα 600 nm. Ο τίτλος των κυττάρων θα πρέπει να είναι 1-2 x 10⁷/ml.
- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά στις 5.000rpm και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε υγρό θρεπτικό μέσο YPAD, ώστε:

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
Όγκος καλλιέργειας ΥΡΑΔ:	25 ml	50 ml	100 ml
# απαιτούμενων κυττάρων:	$2,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$

- Επωάζουμε σε αναδευτήρα στους 30⁰ C έως ότου να έχουμε 2×10^7 κύτταρα/ml.
- Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια για 5 λεπτά στις 5.000rpm
- Ξεπλένουμε τα κύτταρα με το 1/2 του αρχικού τους όγκου δις απεσταγμένου H₂O και ξαναφυγοκεντρούμε.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων στον κατάλληλο όγκο CH₃COOLi 100mM.

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
100mM CH ₃ COOLi	3 ml	3 ml	6 ml

- Επωάζουμε για 15 λεπτά στους 30⁰ C και φυγοκεντρούμε.
- Στο ίζημα των κυττάρων προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με την σειρά που δίνονται:

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
50%(w/v) PEG 3350	2,4 ml	7,2 ml	14,4 ml
1M CH ₃ COOLi	360 μl	1,08 ml	2,16 ml
DNA από σπέρμα σολομού (2mg/ml)	500 μl	1,50 ml	3,00 ml
Πλασμιδιακό DNA βιβλιοθήκης	A μl	B μl	Γ μl
Δις απεσταγμένο H ₂ O	340-A μl	1,02-B ml	2,04 -C ml

- Αναδεύουμε το μίγμα έως ότου τα κύτταρα διαλυθούν καλά
- Επωάζουμε για 30 λεπτά στους 30⁰ C.
- Ο κατάλληλος χρόνος επώασης στους 42⁰ C είναι:

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
Χρόνος στους 42⁰ C :	30 λεπτά	40 λεπτά	45-60 λεπτά

- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 6-8000 rpm για 10 δευτερόλεπτα.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα στον κατάλληλο όγκο δις απεσταγμένου H₂O:

Πολ/σια κλίμακα αντίδρασης:	10 X	30 X	60 X
Όγκος dd H₂O:	10 ml	40 ml	40 ml

- Απλώνουμε σε τριβλία με θρεπτικό επιλογής SC και επωάζουμε για 3-5 ημέρες.

Διάλυμα DNA από σπέρμα σολωμού 2 mg/ml:

- 200 mg salomon sperm-DNA σε 50 ml TE (Tris 10mM, EDTA 10mM, SDS 0,1%)
- Προσθέτουμε 0,5 ml πρωτεΐνάση K (10μg/μl). Επώαση για 3 ώρες.
- Εκχυλίσεις με φαινόλη : χλωροφόρμιο.
- Κατακρήμιση με αιθανόλη.
- 10 ml ddH₂O.
- Ποσοτικοποίηση με φωτομέτρηση στα 260 και 280 nm.

Όλα τα διαλύματα που αναφέρονται στα τρία πρωτόκολλα πρέπει να αποστειρωθούν σε αυτόκαυστο πριν την χρήση

14. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA.

Η εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του πλασμιδιακού DNA έγινε με την μέθοδο των διδέοξυ-αναλόγων του Sanger από το Μικροβιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Κρήτης στο Ηράκλειο.

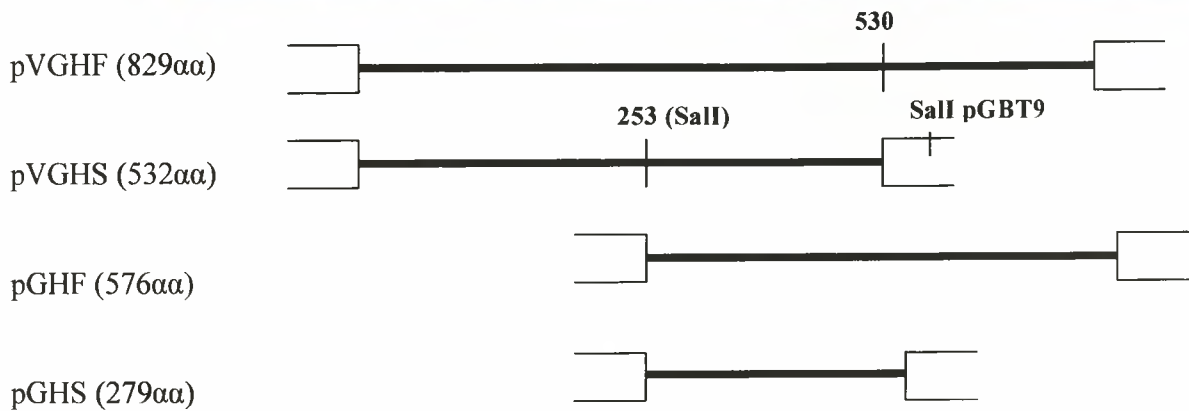
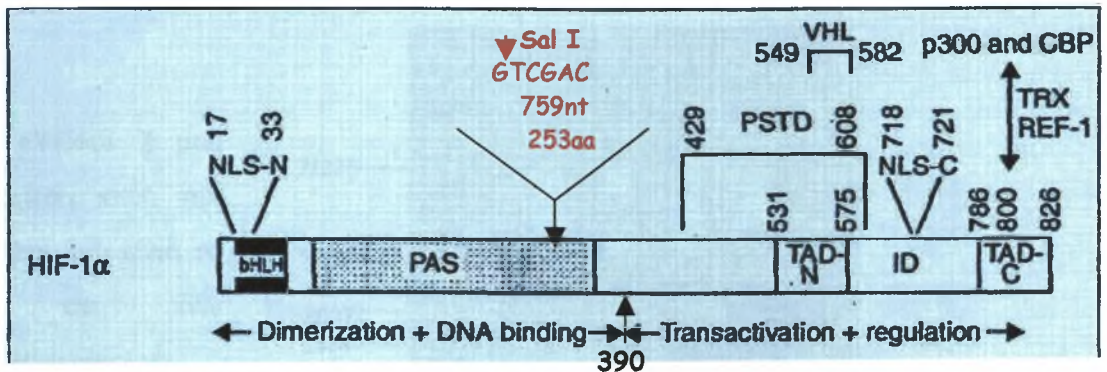
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το πειραματικό μέρος ξεκίνησε με τέσσερις πλασμιδιακές κατασκευές, της κας Παρασκευής Μηνά στα πλαίσια του διδακτορικού της στο εργαστήριο Βιοχημείας -ανά δύο όμοιες pVGHF 1, pVGHF 2 και pVGHS 1, pVGHS 2-αποτέλεσμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και κλωνοποίησης στο φορέα pGBT9. Συγκεκριμένα το DNA του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α έχει κλωνοποιηθεί στις θέσεις SmaI και BamHI του πλασμιδιακού φορέα pGBT9 πίσω από την περιοχή GAL4BD. Οι pVGHF1,2 κωδικοποιούν για ολόκληρη την πρωτεΐνη HIF-1α, ενώ από τις pVGHS1,2 έχει αφαιρεθεί το τμήμα του cDNA που κωδικοποιεί για την περιοχή αμινοξέων 530-826 (TADN, ID, TADC) (βλ. Σχήμα 2).

Οι κατασκευές αυτές δεν χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δύο υβριδίων, διότι βρέθηκε από τον κ. Εμμ. Βενιέρη, Ερευνητή στο εργαστήριο Βιοχημείας, ότι ενεργοποιούν από μόνες τους τα γονίδια αναφοράς (βλ.σελ.16-17 στον Σκοπό). Δεδομένου ότι, pVGHS 1, 2 δεν κωδικοποιούν για τις περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, υποθέσαμε ότι, υπάρχει πιθανόν διμερισμός των χμαιρικών πρωτεϊνών-«δόλωμα» με ενδογενείς μεταγραφικούς παράγοντες του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* μέσω της περιοχής διμερισμού και αλληλεπίδρασης, bHLH-PAS. (*Kelly A. Robinson & John M. Lopes, 2000*)

Επιλέξαμε να απομονώσουμε το τμήμα SalI, από τις παραπάνω τέσσερις κατασκευές, και να το κλωνοποιήσουμε στην θέση SalI του φορέα pGBT9 (βλ. χάρτη του πλασμιδίου στα Υλικά, σελ.20). Έτσι, οι νέες κατασκευές –που ονομάζονται pGHF 1, pGHF 2 και pGHS 1, pGHS 2, αντίστοιχα- δεν θα κωδικοποιούν για την περιοχή bHLH και ένα μεγάλο τμήμα της PAS περιοχής. (βλ. Εικόνα 6 και Σχήμα 2).

Εικόνα 6. Η πέψη με SalI αφαιρεί τα πρώτα 759 nt από τις κατασκευές δηλ. παράγεται η πρωτεΐνη HIF-1α χωρίς τα πρώτα 253 αα που αντιστοιχούν στην bHLH και σε ένα μεγάλο τμήμα της PAS περιοχής.



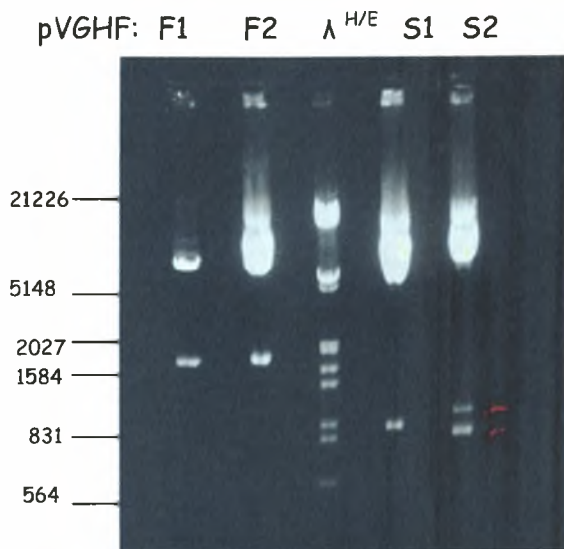
Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνικών παραγόντων που μας δίνουν οι πλασμιδιακές κατασκευές pVGHF, pVGHS, pGHF, pGHS αντίστοιχα. Με την έντονη μαύρη γραμμή απεικονίζεται το μέγεθος (η περιοχή) της πρωτεΐνης του HIF-1α που παράγεται στην κάθε περίπτωση. Η τετραγωνισμένη γραμμή αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα pGBT9.

A. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ pGHF ΚΑΙ pGHS

1) Πέψη των pVGHF 1, 2 και pVGHS 1, 2 με την ενδονουκλεάση περιορισμού SalI

Οι πλασμιδιακές κατασκευές επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση περιορισμού SalI (βλ. Μέθοδοι σελ. 26) και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν (βλ. Μέθοδοι σελ.27) σε πηκτή αгарόζης (Εικόνα 7).

Η κατασκευή pVGHS 2 μας δίνει δύο κομμάτια κατά την πέψη, αντί για ένα που είναι το αναμενόμενο και δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω.



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

pVGHF 1: 1μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall.
 pVGHF 2: 1μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall.
 λ^{H/E}: 2μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
 pVGHS 1: 1μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall.
 pVGHS 2: 1μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall.

2) Νέα πέψη των pVGHF 1, 2, pVGHS 1 και του φορέα pGBT9 με την ενδονουκλεάση περιορισμού Sall

Η πέψη αυτή γίνεται για :

1. να υπολογίσουμε εμπειρικά τις συγκεντρώσεις των πλασμιδιακών DNA που έχουμε.
2. να πάρουμε γραμμικό pGBT9 με συνεκτικά άκρα Sall.
3. επιβεβαίωση ότι έχουμε τα σωστά ενθέματα.

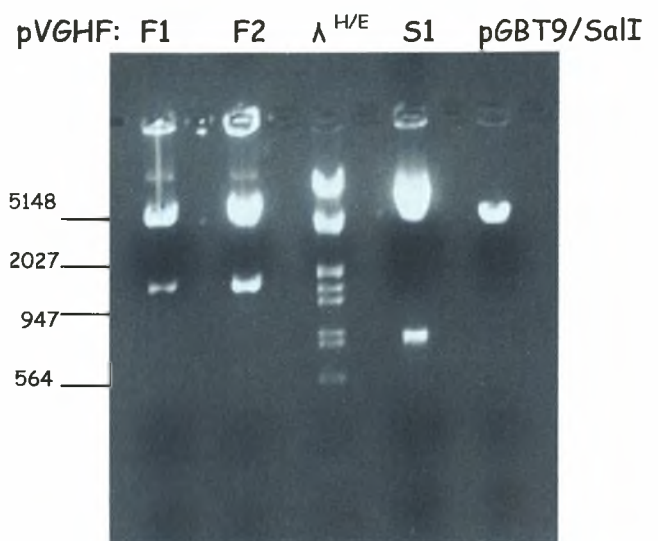
Αναμενόμενα μεγέθη των SalI

DNA κομματιών:

pVGHF 1, 2: 1734 bp

pVGHS 1: 837 bp

Γραμμικός pGBT9: 5500 bp



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%

pVGHF 1: 10μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με SalI.
pVGHF 2: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με SalI.
λ^{H/E}: 2μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
pVGHS 1: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με SalI.
pGBT9: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με SalI.

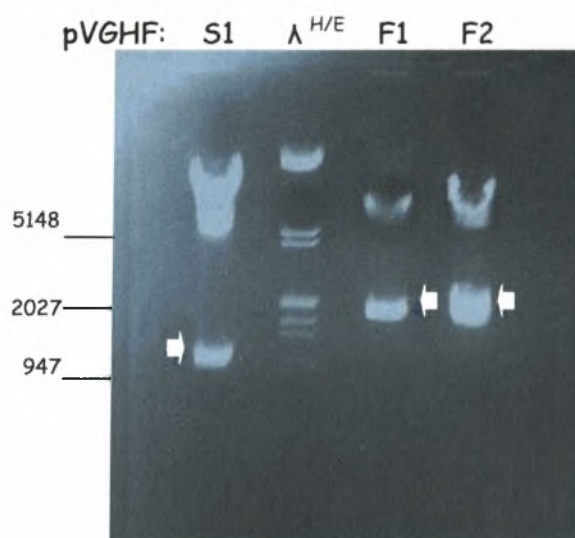
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι έχει γίνει πλήρη πέψη κι έχουμε πάρει τα αναμενόμενα κομμάτια.

Εμπειρικά οι συγκεντρώσεις που έχουμε είναι:

pVGHF 1:	85 ng/μl	pVGHF 2:	125 ng/μl
pVGHS 1:	250ng/μl	pGBT9SalI:	100 ng/μl

3) Απομόνωση των θραυσμάτων του HIF-1α από την πηκτική αγαρόζης και ποσοτικοποίησή τους

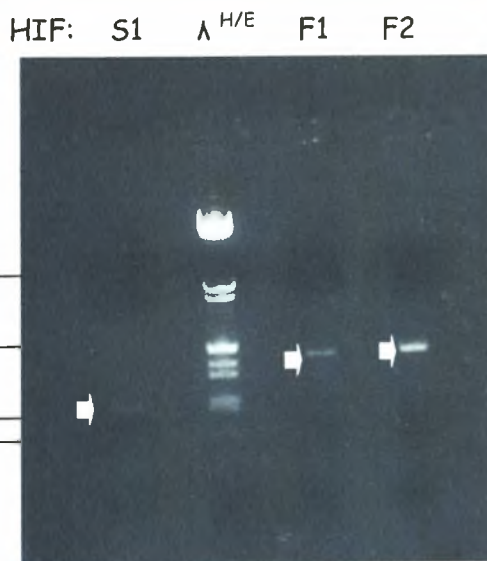
Είκοσι μl από την αντίδραση πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης. Οι ζώνες αγαρόζης που περιέχονται τα θραύσματα ενδιαφέροντος αποκόπηκαν από την πηκτική και τα DNA εκλούστηκαν με την μέθοδο “Gel extraction” της Qiagen (βλ. Μέθοδοι σελ. 28).



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%

pVGHS 1: 20μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall
 λ^{H/E}: 2μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
 pVGHF 1: 20μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall.
 pVGHF 2: 20μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall.

Ηλεκτροφορήσαμε το 1/10 της ποσότητας που ανακτήσαμε από την πηκτική για να κάνουμε εμπειρική ποσοτικοποίηση των ενθεμάτων με βάση των δείκτη μοριακών βαρών λ HindIII/EcoRI, του οποίου η συγκέντρωση είναι 250ng/μl και έχει μοριακό βάρος 48000 bp.



Εικόνα 10 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%

Για τα θραύσματα έχουμε:

HIF S 1:	3ng/μl (564 bp)
HIF F 1:	5ng/μl (947 bp)
HIF F 2:	10ng/μl (2027 bp)

HIF S 1: 1μl αντίδραση πέψης του DNA με Sall
 λ^{H/E}: 1μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
 HIF F 1: 1μl αντίδραση πέψης του DNA με Sall.
 HIF F 2: 1μl αντίδραση πέψης του DNA με Sall.

4) Αποφωσφορυλίωση του φορέα pGBT9 με άκρα Sall.

Ο κομμένος με το ένζυμο Sall, φορέας pGBT9 έχει συνεκτικά άκρα. Τον επεξεργαστήκαμε με την αλκαλική φωσφατάση CIP (calf intestinal alkaline phosphatase, 20.000 Units/ml) που αφαιρεί τις 5' φωσφορικές ομάδες, για να αποφύγουμε την συνένωση των άκρων του, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (σελ.28-29).

5) Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pGBT9 με άκρα Sall με τα αντίστοιχα θραύσματα του HIF-1α

Για τις τρεις αντιδράσεις σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση, που προέρχεται από τον βακτηριοφάγο T4 και καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ προεξέχοντων 3' υδροξυλικών και 5' φωσφορικών άκρων. Για την κάθε αντίδραση επώαστηκαν 45 ng αποφωσφορυλιωμένου pGBT9/Sall με 45 ng HIF F1, HIF F2 και HIF S1 αντίστοιχα όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (σελ.29).

6) Μετασηματισμός των κυττάρων E.coli με τα προϊόντα της σύνδεσης

Δεκτικά κύτταρα E.coli Top 10 (competent cells) μετασηματίστηκαν με τα προϊόντα της σύνδεσης όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (σελ.34). Η επώαση έγινε σε τριβλία LB που περιείχαν αντιβιοτικό ως μάρτυρα επιλογής του φορέα pGBT9 (βλ. στα Υλικά, σελ.22).

7) Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (mini preparation)

Οι μεμονωμένες αποικίες που πήραμε από τον μετασηματισμό μεγάλωσαν σε θρεπτικό υγρό LB με αμπικιλίνη στους 37⁰C σε αναδευτήρα όλη νύχτα.

Χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο STET- λυσοζύμης (βλ. Μέθοδοι σελ. 29-30) για να σπάσουμε τα κύτταρα των βακτηριδίων και να απομονώσουμε τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pGBT9 που προέκυψαν από την αντίδραση της σύνδεσης.

8) Ανάλυση με πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Η ανάλυση με διάφορα ένζυμα περιορισμού γίνεται για να ελέγξουμε:

1. αν έχει υπάρξει ένθεμα, και αν
2. έχει εισαχθεί με τον σωστό προσανατολισμό

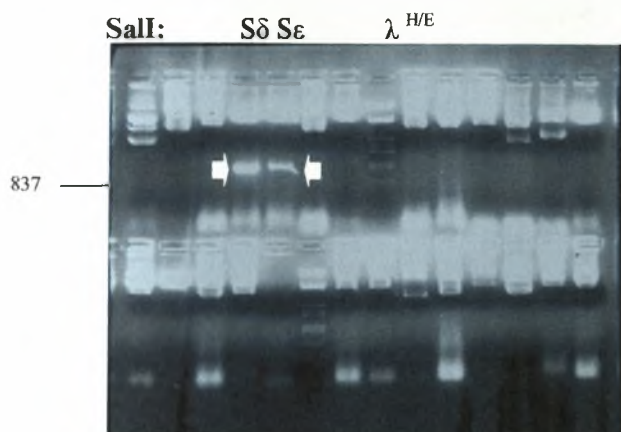
Για καλύτερη κατανόηση των κομματιών που αναμένουμε από την κάθε αντίδραση πέψης, συμβουλευτείτε τους χάρτες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στο Παράρτημα (Σχήμα 3 και Σχήμα 4 σελ. 65)

ΠΕΨΗ ΜΕ SalI

Από την πέψη με SalI (βλ. Μέθοδοι σελ. 26) αναμένουμε τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που φέρουν ενθέματα με τον σωστό προσανατολισμό να δώσουν τα εξής θραύσματα:

Για το pGHF → 1734 bp

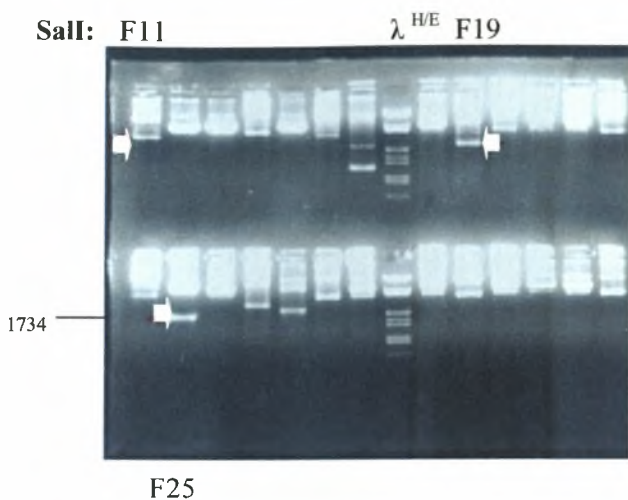
Για το pGHS → 837 bp



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%

pGH S δ: 2μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με SalI
pGH S ε: 2μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με SalI.
λ^{H/E}: 3μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών

Από την Εικόνα 11, φαίνεται να υπάρχει ένθεμα μόνο στα Sδ και Σε.



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

pGH F 11: 4μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall
 $\lambda^{H/E}$: 3μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
 pGH F19: 4μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall.
 pGH F25: 4μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με Sall.

Από την Εικόνα 12, φαίνεται να υπάρχει ένθεμα στα F11, F19 και F25. Για να επιβεβαιωθούμε ότι οι πλασμιδιακές αυτές κατασκευές φέρουν το επιλεγμένο DNA του HIF-1α που έχουμε εισάγει, με τον σωστό προσανατολισμό θα συνεχίσουμε την ανάλυση με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI και BamHI. (βλ. Μέθοδοι σελ 26)

ΠΕΨΗ ΜΕ EcoRI ΚΑΙ ΜΕ BamHI

Από την πέψη με EcoRI αναμένουμε τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που φέρουν ενθέματα με τον σωστό προσανατολισμό να δώσουν τα εξής θραύσματα:

Για το pGHF → ένα στα 604 bp κι ένα στα 252 bp

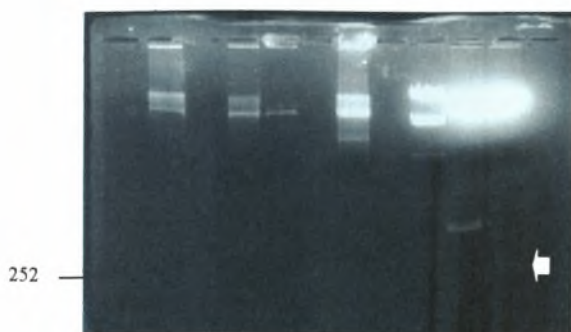
Για το pGHS → 252 bp

Από την πέψη με BamHI αναμένουμε τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που φέρουν ενθέματα με τον σωστό προσανατολισμό να δώσουν τα εξής θραύσματα:

Για το pGHF → 1731 bp

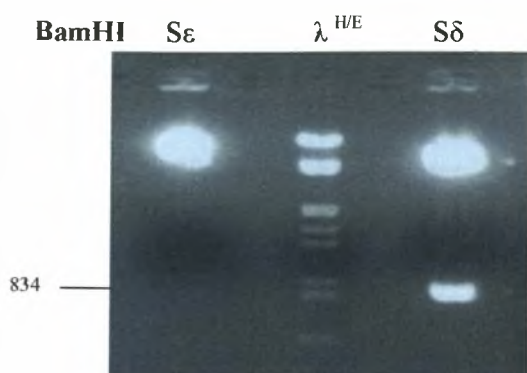
Για το pGHS → 834 bp

EcoRI S1 S3 S8 F2 $\lambda^{H/E}$ Sε Sδ



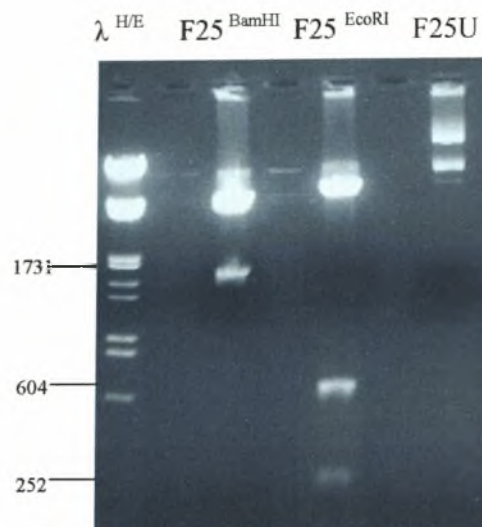
Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

pGH S 1: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI
 pGH S 3: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI
 pGH S 8: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI
 pGH F 2: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI
 $\lambda^{H/E}$: 4μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
 pGH S ε: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI
 pGH S δ: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%

ρGH S ε: 3μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με BamHI
 λ^{H/E}: 3μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
 ρGH S δ: 3μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με BamHI



Εικόνα 15 : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%

λ^{H/E}: 2μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
 ρGH F 25: 2μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με BamHI
 ρGH F25: 2μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με EcoRI
 ρGH F25 U: 2μl πλασμιδιακού DNA που δεν έχει υποστεί πέψη

Κάναμε ανάλυση με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού σε 60 δείγματα και πήραμε μόνο δύο ανασυνδυασμένα πλασμίδια με τον σωστό προσανατολισμό:

- Sδ (προέρχεται από το αρχικό pVGHS 1) που στο εξής θα λέγεται ρGHS
- F25 (προέρχεται από το αρχικό pVGHF 1) που στο εξής θα λέγεται ρGHF

Β. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝ ΟΙ ΝΕΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΑΠΟ ΜΟΝΕΣ ΤΟΥΣ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

1) Μετασηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Μετασηματίσαμε με τις νέες κατασκευές ρGHS και ρGHF, το στέλεχος PJ694A του *Saccharomyces cerevisiae*, που φέρει στο γονιδιώμα του τα γονίδια αναφοράς ADE2, HIS3 και LacZ. Η αντίδραση μετασηματισμού έγινε με βάση

το πρωτόκολλο “Quick & Easy Trafo” κατά Gietz και Woods (βλ. Μέθοδοι, σελ.35).

2) Έλεγχος φαινοτύπου του μετασχηματισμένου με τις κατασκευές μας στελεχούς

Τα στελέχη που προέρχονται από την αντίδραση μετασχηματισμού με το pGHF και με το pGHS ελέγχθηκαν για την έκφραση των γονιδίων αναφοράς και συγκεκριμένα του HIS3. Τέσσερις διαφορετικές αποικίες από κάθε αντίδραση μετασχηματισμού μεταφέρθηκαν σε τριβλίο –με υλικό χωρίς επιλογή- όπου μεγάλωσαν ως μάρτυρες και στελέχη που γνωρίζαμε ότι ενεργοποιούν ή όχι τα γονίδια αναφοράς. Για θετικό μάρτυρα χρησιμοποιούμε μετασχηματισμένο στέλεχος με την κατασκευή pVGHF 1 που ξέρουμε ότι ενεργοποιεί τα γονίδια αναφοράς και για αρνητικό δείκτη μετασχηματισμένο στέλεχος με τον φορέα pGBT9.

Μετά από επώαση του τριβλίου στους 30⁰C για τρεις ημέρες, τα στελέχη μεταφέρθηκαν με την μέθοδο του «πιστού αποτυπώματος» (replica plating) σε τριβλία με μέσο επιλογής:

SC	+HIS	-HIS	-HIS +5mM AT	-HIS +10mM AT
pGHS	+	-	-	-
pGHF	+	+/-	-	-
pVGHF	+	+	+	+
pGBT9	+	-	-	-

Όπου: +: μεγαλώνει, -: δεν μεγαλώνει, +/-: αναστέλλεται, W: τρυπτοφάνη, H: ιστιδίνη, A: αδενίνη, α: αδενίνη σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση (450μl/l), AT: αμινοτριαζόλη (βλ. στον Σκοπό σελ.17 και στα Υλικά σελ. 24)

Πίνακας 3. Έλεγχος του φαινοτύπου για το γονίδιο αναφοράς HIS3 στα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο δόλωμα στελέχη PJ694A του *Saccharomyces cerevisiae*

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 3 καταλήξαμε ότι οι κατασκευές δεν ενεργοποιούν από μόνες τους τα γονίδια αναφοράς αν μεγαλώνουν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 5mM 3-αμινοτριαζόλη (AT) (βλ. στον Σκοπό σελ.17 και στα Υλικά σελ. 24). Προχωρήσαμε στον έλεγχο της βιβλιοθήκης και στην εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων χρησιμοποιώντας μόνο την κατασκευή pGHF (στην οποία εμπεριέχεται το τμήμα της pGHS).

Γ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

cDNA «βιβλιοθήκη» αποκαλείται ένα ετερογενές σύνολο ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που το καθένα φέρει –στην περίπτωση μας στο φορέα pVP16- ένα διαφορετικό ένθεμα cDNA και το σύνολό τους αντιπροσωπεύει τα mRNA που εκφράζονται σε συγκεκριμένες συνθήκες –στην περίπτωση μας σε αγέννητο έμβρυο ποντικού 9.5 και 10.5 ημερών.

Η βιβλιοθήκη που μας δόθηκε (*Nikolakaki et al. 2001, Hollenberg et al. 1995*) έχει παρασκευαστεί με εισαγωγή $2,5 \times 10^6$ διαφορετικών cDNA (πολυπλοκότητα βιβλιοθήκης), 350 έως 700 νουκλεοτιδίων, στη θέση NotI του φορέα pVP16 (βλ. πλασμιδιακό χάρτη σελ.18 στα Υλικά).

Για να ενισχυθεί το DNA της βιβλιοθήκης πρέπει να πολλαπλασιαστούν τα βακτηριακά κύτταρα E.coli που περιέχουν καθένα από αυτά τα πλασμίδια. Δεδομένου ότι σε υγρή καλλιέργεια υπάρχει κίνδυνος κάποια από τα κύτταρα να υπέρ- ή υπό- πολλαπλασιαστούν με αποτέλεσμα τελικά να μην υπάρχει σωστή αντιπροσώπευση των διαφορετικών cDNA της βιβλιοθήκης, προτιμήσαμε την καλλιέργεια σε τριβλία όπου εκεί κάθε κύτταρο σχηματίζει μια αποικία και δεν ανταγωνίζεται με τα άλλα.

Η παρασκευή του πλασμιδιακού DNA της βιβλιοθήκης από τα κύτταρα E.coli, έγινε με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης που περιγράφεται στις Μεθόδους (σελ.31-32)

Α. ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

Έγινε έλεγχος της αποδοτικότητας του μετασηματισμού του στέλεχος PJ694A *S.cerevisiae* που ήδη περιέχει το πλασμίδιο «δόλωμα» pGHF, με την βιβλιοθήκη σύμφωνα με το πρωτόκολλο “The LiAc Trafo Method Page” κατά Gietz και Woods (βλ. Μέθοδοι, σελ. 36-37). Ο έλεγχος αυτός γίνεται για να καθορίσουμε ποια είναι η ελάχιστη ποσότητα DNA βιβλιοθήκης που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ώστε να είμαστε σίγουροι ότι έχουμε συμπεριλάβει στο πείραμά μας και τα $2,5 \times 10^6$ διαφορετικά cDNA –VP16 που περιέχονται στην βιβλιοθήκη μας.

μg DNA ΚΛΙΜΑΚΑ	0,1	0,2	0,4	1
1x	16.400	38.080	78.600	150.320
60x	984.000	2.284.800	4.716.000	9.019.200

Πίνακας 4. Αριθμός αποικιών που παίρνουμε από αντιδράσεις μετασηματισμού, του ήδη μετασηματισμένου με το πλασμίδιο pGHF στελέχους PJ694A του *Saccharmyces cerevisiae*, με την βιβλιοθήκη.

Στην πρώτη γραμμή αναγράφονται οι διαδοχικές ποσότητες DNA βιβλιοθήκης που χρησιμοποιήθηκαν, που αποτελούνται από μίγμα σε αναλογία 1:1 cDNA-VP16 βιβλιοθήκες ποντικού 9.5 και 10.5 ημερών. Στην δεύτερη γραμμή αναγράφεται ο αριθμός αποικιών που έχουμε από την κάθε αντίδραση (1x). Στην τρίτη γραμμή προβλέπεται ο αριθμός αποικιών που θα έχουμε εάν η κάθε αντίδραση (1x) γίνει σε πολλαπλάσια κλίμακα (60x).

Με βάση τον παρακάτω τύπο, υπολογίσαμε τον αριθμό των αποικιών που πρέπει να έχουμε από τον μετασηματισμό της βιβλιοθήκης.

(όπου P (πιθανότητα): 0,99

και n (αντιστοιχεί στην πολυπλοκότητα της βιβλιοθήκης): $2,5 \times 10^6$

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-1/n)}$$

Ο αριθμός αυτός είναι $N=11.512.926$. Χρειάζεται δηλαδή να διερευνηθούν $11,5 \times 10^6$ αποικίες για να είναι σίγουρο πως έχουμε εξαντλήσει το σύνολο της cDNA βιβλιοθήκης. Έτσι, καταλήξαμε να χρησιμοποιήσουμε ποσότητα DNA βιβλιοθήκης 0,4 μg και να κάνουμε δύο αντιδράσεις της κλίμακας (60x) στην αντίδραση μετασχηματισμού με την βιβλιοθήκη

E. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ

1) Μετασχηματισμός του *S.cerevisiae* PJ694A [pGHF] με την βιβλιοθήκη

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο “Two Hybrid System Trafo Protocol” κατά Gietz και Woods (βλ. Μέθοδοι, σελ.37-39), κάνοντας δύο αντιδράσεις σε κλίμακα (60 x). Απλώσαμε τα κύτταρα σε 30 τριβλία επιλογής (5 mM AT) κι επώασαμε για τέσσερις ημέρες στους 30⁰ C. Περιμένουμε σε αυτά τα τριβλία, να μεγαλώσουν μόνο τα κύτταρα στα οποία το γονίδιο HIS3 έχει ενεργοποιηθεί (και άρα επιβιώνει παρουσία AT) (βλ. στον Σκοπό σελ.17 και στα Υλικά σελ. 24), υποδηλώνοντας ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των χμαιοικών πρωτεϊνών δολώματος και λείας. Συγχρόνως, απλώσαμε υποσύνολα της βιβλιοθήκης $1/6 \times 10^3$, $1/3 \times 10^3$, $1/1,2 \times 10^3$, σε τριβλία χωρίς επιλογή για να εκτιμήσουμε την απόδοση του μετασχηματισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύνολο των μετασχηματισμένων κυττάρων είναι περίπου 16×10^6 , αριθμός που υπερκαλύπτει τον απαιτούμενο αριθμό κυττάρων για την πλήρη αντιπροσώπευση της βιβλιοθήκης.

2) Έλεγχος του φαινοτύπου των μετασχηματισμένων και με την βιβλιοθήκη στελεχών

Μετά από 3, 7 και 14 ημέρες έγινε μεταφορά 300, 150 και 150 αποικιών αντίστοιχα, των μετασχηματισμένων στελεχών που επιβιώνουν στο μέσο επιλογής, σε καινούργια τριβλία επιλογής (5 mM AT), ώστε μετά από τρεις ημέρες επώασης στους 30⁰ C, να εφαρμόσουμε την μέθοδο του «πιστού αποτυπώματος» (replica plating),

- για να επιβεβαιώσουμε ότι τα μετασχηματισμένα στελέχη ενεργοποιούν τα γονίδια αναφοράς
- για να ανιχνεύσουμε πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ του «δόλωματος» και της «λείας» και να μπορέσουμε να ιεραρχήσουμε τις αποικίες που έχουμε, ανάλογα με τον βαθμό ισχύος της αλληλεπίδρασης.

Στηριχθήκαμε στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς HIS3. Έγινε επιλογή σε τριβλία με αυξανόμενη ποσότητα 3-αμινοτριαζόλης (AT).

-AT αρ αποικ	5 mM AT	20 mM AT	50 mM AT	80 mM AT	120mM AT
300	123	80	57	23	17
150	58	45	27	12	8
150	70	35	30	15	5

Πίνακας 5. Έλεγχος του φαινοτύπου για το γονίδιο αναφοράς HIS3 στα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο δόλωμα και το πλασμίδιο λεία στελέχη PJ694A του *Saccharomyces cerevisiae*.

ΣΤ. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ «ΛΕΙΑ» ΑΠΟ ΤΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΜΥΚΗΤΑ

1) Διάσωση και παρασκευή του πλασμιδιακού DNA

Από τέσσερις κλώνους που μεγάλωναν κανονικά στα 80 mM AT επώασαμε υγρές καλλιέργειες σε SC χωρίς λευκίνη (L-) στους 30⁰C, όλη νύχτα. Στο υγρό μέσο προσθέσαμε τρυπτοφάνη με σκοπό να βοηθήσουμε τα κύτταρα του σακχαρομύκητα κατά τους διπλασιασμούς να χάσουν το πλασμίδιο «δόλωμα» (το οποίο τείνει να “χαθεί” από το κύτταρο εφόσον δεν υπάρχει πίεση (Trp-) για την διαίωσιση του κατά την μίτωση).

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο Rescue (βλ. Μέθοδοι, σελ. 32) για να απομονώσουμε το πλασμιδιακό DNA από τα κύτταρα σακχαρομύκητα..

2) Μετασηματισμός του πλασμιδιακού DNA σε E.coli KC8 δεκτικά κύτταρα (competent cells)

Δεκτικά κύτταρα E.coli KC8 (competent cells) (βλ. Υλικά, σελ.22) μετασηματίστηκαν με το πλασμιδιακό DNA όπως περιγράφεται στις Μεθόδους (σελ.34). Η επώαση έγινε σε τριβλία LB που περιείχαν αντιβιοτικό ως μάρτυρα επιλογής των φορέων pVP16 και pGBT9 (βλ. στα Υλικά, σελ.20-21).

3) Επιλογή του πλασμιδίου λεία

Οι μετασηματισμένες αποικίες μεταφέρθηκαν σε τριβλία με επιλογή για το αμινοξύ στο οποίο τα κύτταρα αποκτούν πρωτοτροφία όταν μετασηματισθούν με το πλασμίδιο «δόλωμα ή το πλασμίδιο «λεία» αντίστοιχα (βλ. στα Υλικά, σελ.20-21). Ο διαχωρισμός βασίζεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα που φέρουν το πλασμίδιο pVP16-λεία αποκτούν πρωτοτροφία για το αμινοξύ λευκίνη (L+), ενώ δεν επιβιώνουν σε θρεπτικό μέσο χωρίς τρυπτοφάνη (W-).

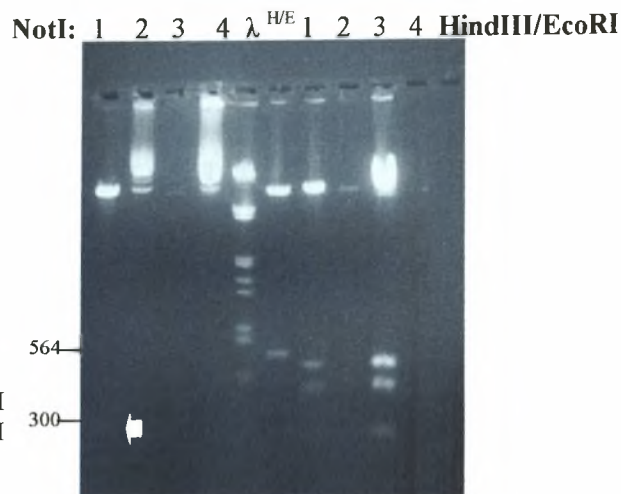
4) Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλιμακας

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο της αλκαλικής λύσης –PEG (βλ. Μέθοδοι, σελ.31-32) για τέσσερις κλώνους βακτηριακών κυττάρων που επώαστηκαν σε υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό επιλογής.

5) Ανάλυση του πλασμιδιακού DNA με πέψη με NotI και με HindIII/EcoRI.

Οι πλασμιδιακές κατασκευές επώαστηκαν με το ένζυμο NotI αλλά και με τα ένζυμα HindIII/EcoRI.(βλ. Μέθοδοι σελ.26). Όπως προαναφέρθηκε τα διαφορετικά cDNA

της βιβλιοθήκης, μήκους 350-700 νουκλεοτιδίων, έχουν εισαχθεί στην θέση NotI του πλασμιδιακού φορέα pVP16.



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%

- 1: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με NotI
- 2: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με NotI
- 3: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με NotI
- 4: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με NotI
- λ^{H/E}: 3μl DNA του μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών
- 1: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με HindIII/EcoRI
- 2: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με HindIII/EcoRI
- 3: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με HindIII/EcoRI
- 4: 5μl αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA με HindIII/EcoRI

Στην Εικόνα 16 τα δείγματα 1 και 3 που δεν φαίνονται καθαρά, περιέχουν ένθεμα στην θέση NotI, ενώ τα 2 και 4 όχι, είναι όμως ίδια μεταξύ τους από ότι φαίνεται μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού HindIII και EcoRI.

Ε. Εξακρίβωση της αλληλουχίας του ενθέματος που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη «λεία»

Έγινε εξακρίβωση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων για τα τρία πρώτα δείγματα DNA με την μέθοδο των διδέοξυ-αναλόγων του Sanger (βλ. Μέθοδοι σελ. 40). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο primer UP20 που δίνει την αλληλουχία της συμπληρωματικής αλυσίδας.

Αποτελέσματα πήραμε μόνο για τα δείγματα 1 και 3.

Για το δείγμα 1, η αλληλουχία είναι:

```
1 GGGGACTGTC TTAAGAWAGG AGAGAGAGGG AAATGCCACA AAATGCATTC
51 AATGTCGTTT CTAAAACAGA AGGTATTTGT TCCCAAATCT GTCTGAGTGC
101 CTAGTATTTT TTAATCAAAC AATGCAATCT GCATGGGTAG ATAAAGGTAG
151 ATTTGGTTTG TTGGTAGAGG CGCAAATGCC CATAATCCAT GCATGTTAAT
201 GCTGGTATCA ACTAGTATTA AGCCTATCAA CTTCCATGTT GCTTCTATCT
251 ATAATCCCAG CACTAAGGAG GCAGGAGGTG AGCGGCCGC
```

Για το δείγμα 3, η αλληλουχία είναι:

```
1 TGGACCGCGG TCCCTACGAC TCTMAMGACG CCTCACTAGG GGCTCGCCGC
51 TTAGAACGCT GAGAGCTGCA GGGGCTCGAG GCAGCCAGCG ATGGACCTCC
101 TAAGACTCTC CCGGCTCTTT TCCCGGTCCCC GCCCATAGG ACTGTCTGTC
151 CTTCAACACC TGGATCTTGT TGGATCAACC CGATGGACAG GAGGCAGGGA
201 GGGACCTGCA CGGCTGARAG CTGCCTTCTG CGGCTCCTCC TCCCCCGCTGC
251 CCCTGGGCAG GNANACCAGA AGGAAATGAG CAGCCTCGGC TCTGACTCCA
301 GTAAGCTCAG CACTGTGGCT CCCCAGGAGG AGGCAGAGGA AGAGAGCTTC
351 GGGAGCCTCT CTGGCAAATT CTCCTCCCGG AGGATATTCC ACAAGTCAAC
401 GGCTGAGCGG CCGC
```

Με έντονα γράμματα φαίνεται η περιοχή βάσεων που αναγνωρίζει η ενδονουκλεάση περιορισμού NotI.

Σχετικά με τις αμφοσημίες που υπάρχουν σε κάποια σημεία ισχύει, όπου:

S : αντιστοιχεί σε C ή G

M : αντιστοιχεί σε A ή C

R : αντιστοιχεί σε A ή G

N : αντιστοιχεί σε A ή C ή G ή T

Για το δείγμα 1, η μετάφραση της συμπληρωματικής αλληλουχίας δίνει τρία διαφορετικά πολυπεπτίδια ανάλογα με το αναγνωστικό πλαίσιο. Αυτά είναι:

Αναγνωστικό πλαίσιο Α:

```
SPPASLVLGL*IEATWKLIGLILVDTSINMHGLWAFAPLPTNQIYLYLPM
QIALFD*KILGTQTDLGTNTFCFRNDIECILWHFPLSPXLRQS
```

Αναγνωστικό πλαίσιο Β:

```
HLLPP*CWDY R*KQHGS**A*Y*LIPALTC MDYGHLRLYQQTKSTFIYPC
RLHCLIKKY*ALRQIWEQIPSVLETTLNAFCGISLSLLS*DSP
```

Και, αναγνωστικό πλαίσιο Γ:

```
TSCLLSAGIHDRSNMEVDRLNTS*YQH*HAWIMGICASTNKPNLPLSTHADCIV*LKNT
R HSDRFGNKYLLF*KRH*MHFVAFPSLSXLKTVP
```

Όπου υπάρχει αυτό το σήμα ,* σημαίνει ότι έχουμε κωδικόνιο τερματισμού (το οποίο σε πολλές περιπτώσεις, είναι πιθανό να οφείλεται σε κακή ανάγνωση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων).

Για τις τρεις παραπάνω αλληλουχίες, η αναζήτηση με ειδικά προγράμματα σε βάσεις δεδομένων δεν έδωσε καμία ομολογία με γνωστή πρωτεΐνη ή κάποιο προϊόν cDNA.

Για το δείγμα 3, η μετάφραση της συμπληρωματικής αλληλουχίας έδωσε τα εξής τρία διαφορετικά πολυπεπίδια ανάλογα με το αναγνωστικό πλαίσιο:

Αναγνωστικό πλαίσιο Α΄:

```
SAVDLWNILREENLPERLPKLSASSWGATVLSLLESEPRLLISFWXXCPGAAGEEEP
QKAAXSRAGPSLPPVHRVDPTRSRC*RTDSPMGRGPGKEPGES*EVHRWLPRAPAAL
SVLSGEPLVRRXXSRRDRGP
```

Αναγνωστικό πλαίσιο Β΄:

```
QPLTCGISSGRRICQRGSRSSLPLPPPGEPQC*AYWSQSRGCSFPSGXPAQGQRGRRSR
RRQLSAVQVPPCLLSIGLIQQDPGVEGQTVLWGGDREKSRESLRRSIAGCLEPLQLSA
F*AASP**GVXR VVGTA V
```

Και, αναγνωστικό πλαίσιο Γ΄:

```
SR*LVEYPPGGEFAREAPEALFLCLLLGSHSAELTGVRAEAAHFLLVXLPRGSGGGGA
AEGSXQPCRSLPASCPG*SNKIQVLKDRQSYGAGTGKRAGRVLGGPSLAAS
SPCSSQRSKR RAPSEASXES*GPRS
```

Για τις παραπάνω αλληλουχίες η αναζήτηση με ειδικά προγράμματα σε βάσεις δεδομένων έδωσε αποτέλεσμα μόνο για το αναγνωστικό πλαίσιο Α' που φαίνεται ότι είναι το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης.

Πρόκειται για δυνητικό προϊόν του cDNA με κωδικό 13435830 από *Mus musculus*. Είναι ομόλογο της δυνητικής πρωτεΐνης KIAA0632, που υπάρχει στον άνθρωπο, αλλά δεν είναι χαρακτηρισμένη ούτε είναι γνωστή η λειτουργία της (βλ. περισσότερες λεπτομέρειες στην Συζήτηση-Σχολιασμό Αποτελεσμάτων). Συγκεκριμένα η αλληλουχία της πρωτεΐνης KIAA0632 είναι:

```
AAGTGQGSPSECTAPDTSSPGGTGKPEMDFVRLARLFARARPMGLFILQHLDPCRAR
WAGGREGLMRPMWAPFSSSSSQLPLGQERQENTGSLGSDPSHSNSTATQEDEEEES
FGT LSDK YSSRRLFRKSAAQFHNLRFGERRDEQMEPEPKLWRGRRNTPYWYFLOCK
HLIKEGKLVEALDLFERQMLKEERLQPMESNYTVLIGGCGRVGYLKKAFNLYNQMK
KRDLEPSDATY T ALFNVCAESPWKDSALQSALKLRQQLQAKNFELNLKTYHALLKM
AAKCADLRMCLDVFKEIHKGHVVTEETFSFLLMGC IQDKKTGFRYALQVWRLMLS
LGLQPSRDSYNLLLVAARD CGLGDPQVASELLKPREEATVLQPPVSRQRPRTAQA
KAGNLM SAMLHVEALERQLFLEPSQALGPPEPPEARVPGKAQPEVDTKAEPSHTAAL
TAVALKPPPVELEVNLLTPGAVPPTVVSFGTVTTPADRLALIGGLEGFLSKMAEHRQQ
PDIRTLTLLAEVVESGSPAESLLLALLDEHQVEADLTFFN TLVRKKSKLGDLEGAKAL
LPVLAKRGLVPNLQTFCNLAIGCHRPK DGLQLLTDMKKSQVTPNTHIYSALINAAIRK
LN YTYLISILKDMKQNRVPVNEVVIRQLEFAAQYPPTFD RYQ GKNTYLEKIDGFRAY
YKQWLTVM PAEETPHPWQKFR TKPQGDQDTGKEADDGCALGGR
```

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εφαρμόσαμε το σύστημα των δύο υβριδίων για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ του επιλεγμένου τμήματος της πρωτεΐνης του HIF-1α και άλλων πρωτεϊνών. Συνολικά, διερευνήσαμε 16×10^6 μετασχηματισμένες αποικίες, αριθμός που υπερκαλύπτει την πολυπλοκότητα της cDNA βιβλιοθήκης που χρησιμοποιήσαμε. Επιλέξαμε από τα μετασχηματισμένα κύτταρα 500 αποικίες, που εμφάνιζαν φαινότυπο που υποδηλώνει αλληλεπίδραση του HIF-1α με κάποια πρωτεΐνη, για περαιτέρω έλεγχο και ταυτοποίηση.

Αυτές κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την πιθανή «ισχύ» αλληλεπίδρασης και από τις δύο πρώτες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία του (βλ. Μέθοδοι σελ. 40).

Για το ένα δείγμα (δείγμα 3, βλ. Αποτελέσματα σελ. 56-59), η αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων έδωσε 100% ομολογία με το δυνητικό προϊόν cDNA με κωδικό 13435830 από *Mus musculus*. Το προϊόν αυτό είναι ομόλογο με την δυνητική πρωτεΐνη KIAA0632 (βλ. Αποτελέσματα σελ. 58-59) στον άνθρωπο. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 727 αμινοξέων που παρουσιάζει ενδιαφέρον προς διερεύνηση μιας και η λειτουργία της είναι άγνωστη. Έχουν βρεθεί περίπου 100 παρόμοιοι cDNA κλώνοι που πιστεύεται ότι προέρχονται από τον εγκέφαλο και κωδικοποιούν για πρωτεΐνες *in vitro*.

Η πρωτεΐνη KIAA0632 δεν φαίνεται να έχει συγκεκριμένη αρχιτεκτονική δομή ή να περιέχει συντηρημένες αλληλουχίες που να προτείνουν κάποια πιθανή λειτουργία ή υποκυττάρια διαμερισματοποίησή της. Θα πρέπει, στην συνέχεια, να πιστοποιηθεί η αλληλεπίδρασή της με τον HIF-1α *in vitro* και *in vivo* σε κύτταρα θηλαστικών, προκειμένου να διερευνηθεί η βιολογική σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης.

Για το άλλο δείγμα, (δείγμα 1, βλ. Αποτελέσματα σελ. 56-59), οι βάσεις δεδομένων δεν προτείνουν καμιά ομολογία με αλληλουχίες που έχουν ήδη περιγραφεί. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην κακή ποιότητα της αλληλουχίας που έχουμε (και η οποία πρέπει να επαναληφθεί), είτε στο ότι η συγκεκριμένη

αλληλουχία είναι “artefact” κάποιου σταδίου της μεθόδου μας και δεν υπάρχει in vivo.

Αν και είναι ήδη γνωστές αρκετές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες (βλ. Εισαγωγή σελ.10-14), υπάρχουν ακόμα αλληλεπιδράσεις που παραμένουν άγνωστες, όπως για παράδειγμα η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη που ευθύνεται για την μεταφορά της πρωτεΐνης του HIF-1α από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Εξάλλου, η εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων συνεχίζει, μέχρι στιγμής, να δίνει νέες και σημαντικές αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες όπως είναι οι: Jab1 (*Moon-Kyoung Bae et al 2001*), FIH-1 (*Mahon P et al 2001, Kirsty et al 2002*), ARD1 (*Joo-Won Jeong et al 2002*), που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και μάλιστα για τον ARD1 κατά την συγγραφή αυτής της εργασίας.

Όσον αφορά την βελτίωση των αποτελεσμάτων μας, προτείνουμε:

1. Την δημιουργία μιας νέας κατασκευής, που να περιέχει την κατασκευή που χρησιμοποιήσαμε (pGHF) αλλά και ένα μεγαλύτερο μέρος από την περιοχή bHLH-PAS.
2. Ήδη έχουν ξεκινήσει οι πειραματικές διαδικασίες για την εφαρμογή του συστήματος των δύο υβριδίων στο τμήμα του cDNA του HIF-1α που κωδικοποιεί μόνο για την περιοχή bHLH-PAS της πρωτεΐνης. Έτσι, θα εξακριβώσουμε αν αυτή η περιοχή από μόνη της μπορεί να ενεργοποιήσει την μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς στο σύστημά μας. Εξάλλου για την συγκεκριμένη περιοχή της πρωτεΐνης δεν έχουν βρεθεί πολλές αλληλεπιδράσεις, εκτός του HIF-1β και της hsp90 (βλ. Εισαγωγή σελ. 10-14)
3. Σημαντικό θα ήταν να αποκτήσουμε, από εργαστηριακές ομάδες που κατέληξαν σε ανίχνευση πρωτεΐνης «λεία» με το σύστημα των δύο υβριδίων, το cDNA των πρωτεϊνών αυτών και να το χρησιμοποιήσουμε ως μάρτυρα της μεθόδου μας.
4. Σε συνέχεια με το προηγούμενο, έχοντας το cDNA μιας πρωτεΐνης που ξέρουμε ότι σίγουρα αλληλεπιδρά με τον HIF-1α μπορούμε να εφαρμόσουμε μια εναλλακτική μορφή του συστήματος των δύο υβριδίων για την ανίχνευση τρίτης αλληλεπιδρούσας πρωτεΐνης.

5. Θα μπορούσε να εφαρμοστεί το σύστημα των δύο υβριδίων χρησιμοποιώντας διαφορετική cDNA βιβλιοθήκη.
6. Η δυσκολία που συναντήσαμε στην τελική απομόνωση του πλασμιδίου «λεία» από τα μετασχηματισμένα στελέχη (το πλασμίδιο «δόλωμα», για κάποιο λόγο επικρατούσε), θα μπορούσε να ξεπεραστεί με την χρήση άλλου πλασμιδιακού φορέα κι όχι του pGBT9 για την κλωνοποίηση του cDNA του HIF-1α και κατά συνέπεια, και διαφορετικού στελέχους σακχαρομύκητα.

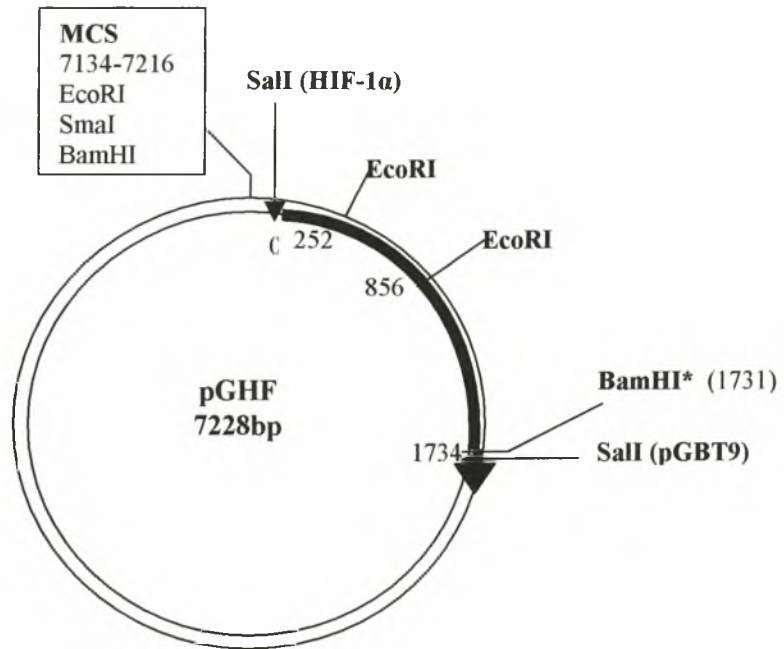
Φυσικά, υπάρχει ακόμη πειραματική εργασία και για τους υπόλοιπους 496 κλώνους που χρειάζεται να ταυτοποιηθούν.

Η ανίχνευση και η μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες, αποτελεί ένα μέρος της διερεύνησης του τρόπου με τον οποίο τα κύτταρα αποκρίνονται στην υποξία. Η απόκτηση νέας γνώσης σχετικά με τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες θα βοηθήσει στην κατανόηση και την αντιμετώπιση πολλών παθοφυσιολογικών καταστάσεων, όπως οι ισχαιμικές διαταραχές της καρδιάς, των πνευμόνων, του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς, ο καρκίνος και οι διαταραχές της εγκυμοσύνης (π.χ. καθυστέρηση της ενδομητρικής ανάπτυξης) (*Semenza 2001*).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

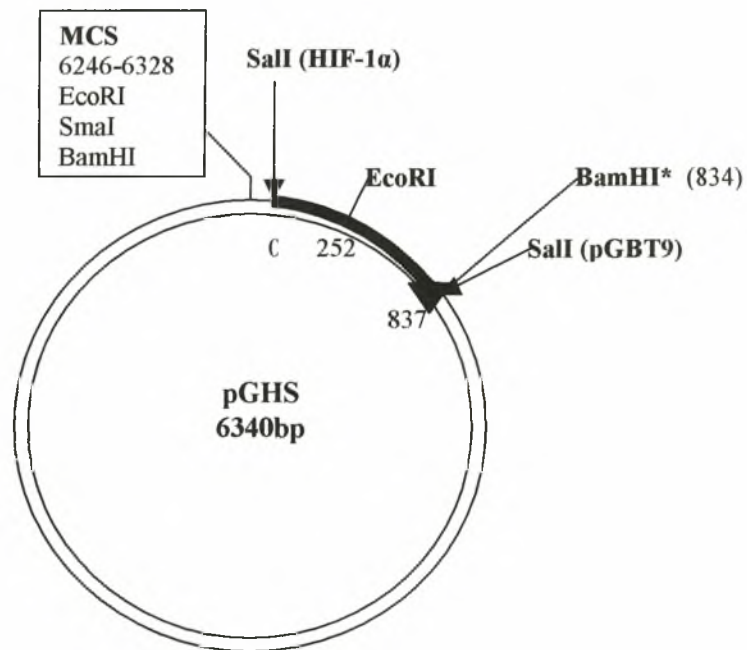
Σχήμα 3. Κατασκευή pGHF.

Χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιαδικού φορέα pGBT9 με το ένθεμα 1734 ζευγών βάσεων του HIF-1α. (βλ. Αποτελέσματα σελ. 41-42)
Η BamHI στη θέση 1731 έχει διατηρηθεί κατά την επεξεργασία της αρχικής κατασκευής pVGHF.



Σχήμα 4. Κατασκευή pGHS.

Χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιαδικού φορέα pGBT9 με το ένθεμα 837 ζευγών βάσεων του HIF-1α. (βλ. Αποτελέσματα σελ. 41-42)
Η BamHI στη θέση 834 έχει διατηρηθεί κατά την επεξεργασία της αρχικής κατασκευής pVGHS.



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bannister et al (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*. 384(6610), 641-3.
2. Bech-Otschir et al (2001) COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J*. 20(7), 1630-9.
3. Bhattacharya (1999) Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev*. 13, 64–75.
4. Bruick & McKnight (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 294(5545), 1337-40.
5. Bruick R.K. (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 9082–9087.
6. Carmeliet et al. (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485-490.
7. Carrero Pillar et al (1999) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to Hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol. & Cel. Biol*. 20(1), 403-415.
8. Chilov et al (1999) Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *J Cell Sci*. 112 (8),1203-12.
9. Cormier-Regard S. et al. (1998) Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *J.Biol. Chem*. 273, 17787–17792
10. . Eckhart A.D et al. (1997) Characterization of the α 1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9487–9492
11. Feldser D. et al (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia inducible factor 1 α and insulin like growth factor 2. *Cancer Res* 59, 3915-3918.
12. Gassmann et al (1997) Oxygen- and dioxin- regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int*. 51, 567-74

13. Gerber et al (1997) Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes: Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia, *J. Biol. Chem.* 272, 23659-23667.
14. Guillemin and Krasnow (1997) The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 89, 9-12
15. Hochachka et al. (1996) Unifying theory of hypoxia tolerance : molecular / metabolic rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. USA* 93, 9493-9498
16. Hogenesch (1997) Characterization of a subset of the helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 8581-8593
17. Hollenberg et al. (1995) Identification of a new family of tissue-specific basic-helix-loop-helix prpteins with a two hybrid system. *Mol. & Cel. Biol.* 15, 3813-3822.
18. Hu J. et al, (1998) Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 894-899.
19. Huang J. et al (2002) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 277(42), 39792-800
20. Huang LE et al (1998) Regulation of hypoxia inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7987-7992.
21. Ivan et al (2001) HIF-1 alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation : implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-8
22. Iyer et al (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149-162
23. Jaakkola P. et al (2001) Targeting of HIF-1 alpha to the von Hippel Lindau ubiqyitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-72.
24. Jennifer S. Isaaks et al (2002) Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-indepent Hypoxia inducible factor 1 α degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 29936-29944.

25. Jiang B.H. et al. (1996) Dimerization, DNA binding and transactivation properties of hypoxia inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 17771-17778
26. Jie Gu (2000) Molecular mechanisms of hypoxia inducible factor 1 α -p300 interaction. *J. Biol. Chem.* 276(5), 3550-3554
27. Joo-Won Jeong et al (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 111, 709-720.
28. Jung-Hyun Min et al (2002) Structure of an HIF-1 α -pVHL complex :Hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296, 1886-1889.
29. Kallio et al (1998) Signal transduction in hypoxic cells : inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia inducible factor 1 alpha. *EMBO J.* 17, 6573-86
30. Katschinski et al (2002) Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia inducible factor 1 alpha is dependent on heat shock protein 90 activity. *J. Biol. Chem.* 277, 9262-9267.
31. Kelly A. Robinson & John M. Lopes (2000) Saccharomyces cerevisiae basic-helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nuc. Acids Res.* 28, (7)1499-1505.
32. Kirsty et al (2002) Hypoxia inducible factor (HIF) Asparagine Hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the Cupin structural family. *J. Biol. Chem.* 277, 26351-26355
33. Lee et al (1997) Hypoxia-inducible factor 1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 5375-5381
34. Lok and Ponka (1999) Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J. Biol. Chem.* 274, 24147-24152.
35. McNeill LA (2002) Hypoxia inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyzes hydroxylation at the β -carbon of Asparagine -803. *Biochem J.* 367 (3), 571-5
36. Mahon P et al (2001) FIH-1 : a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 15, 2675-2686.
37. Maxwell et al (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia inducible factors for oxygen dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.

38. Michael Ohh et al (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature Cell Biol.* 2, 423-427.
39. Minet et al (1999) Hypoxia –induced activation of HIF-1 : role of HIF-1 α – Hsp90 interaction. *FEBS Letters* 460, 251-256.
40. Moon-Kyoung Bae et al (2001) Jab1 interacts directly with HIF-1 α and regulates its stability. *J. Biol. Chem.* 277 (1), 9-12
41. Mukhopadhyay et al (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J. Biol. Chem.* 275, 21048–21054
42. Nikolakaki et al. (2001) Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein-specific kinase 1 that interacts specifically with Scaffold Attachment Factor B. *J. Biol. Chem.* 276, 40175-40182.
43. Palmer *et al.* (1998) Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am. J. Physiol.* 274, L212–L219
44. Pugh et al (1997) Activation of hypoxia inducible factor 1 ; definiton of regulatory domains within the alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 11205-14.
45. Rajani Ravi et al (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 14, 34-44
46. Ratcliffe et al. (1998) Oxygen sensing, Hypoxia inducible factor 1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* 201, 1153-1162
47. Richard et al (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32631-7.
48. Rolfs et al (1997) Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 272, 20055–20062.
49. Ryan et al, (1998) HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 17, 3005-3015.
50. Salceda et al (1997) Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin proteasome system under normoxic conditions. *J. Biol. Chem.* 272, 22642-22647
51. Semenza (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia inducible factor 1. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 551-578

52. Semenza 2000 (a) HIF-1 and Human disease : one highly involved factor. *Genes Dev.* 14, 1983-1991)
53. Semenza 2000 (b) Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia inducible factor 1. *J. Clin. Inv.* 106, 809-812.
54. Semenza 2001(a) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Cur. Op. in Cell Biol.* 13, 167-171
55. Semenza 2001(b) Hypoxia inducible factor 1 : oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *TRENDS in Mol. Med.* 7, 345-350
56. Semenza (2002) Signal transduction to hypoxia inducible factor 1. *Biochem. Pharm.* 64, 993-998
57. Tacchini L et al, (1999) Transferrin receptor induction by hypoxia: HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 24142-24146.
58. Takahashi *et al.* (2000) Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase α (I) in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 275, 14139–14146.
59. Tazuke S.I. *et al.* (1998) Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10188–10193.
60. Voegel et al (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15(14), 3667-75
61. Wal-Ching Hon (2002) Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature* 417, 975-978.
62. Wang G.L. et al. (1995) Hypoxia inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5510-14
63. Wenger RH (1997) Oxygen(es) and the hypoxia inducible factor 1. *Biol. Chem* 378, 609-16.
64. Wenger (2000) Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation. *J. Exp. Biol.* 203, 1253-1263.
65. Won G. et al (1998) Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature* 392, 405-408.

66. Wood S.M. *et al.* (1998) Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 α -subunit (HIF-1 α): characterization of HIF-1 α -dependent and independent hypoxia-inducible gene expression. *J. Biol. Chem.* 273, 8360–8368
67. Wykoff C.C *et al* (2000) Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60, 7075–7083
68. Xanthoudakis and Curran (1992) Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* 11, 653-665
69. Zhang W. *et al* (1999) Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia. *J. Hum. Genet.* 44(5), 293-9



Στην οικογένειά μου και στον Ιωάννη Κομίτσα.

Λ Ή Ξ Η	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

~~Τηλ. 74.760 61~~ ΛΑΡΙΣΑ
2410-565077
265078



✓

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057251