

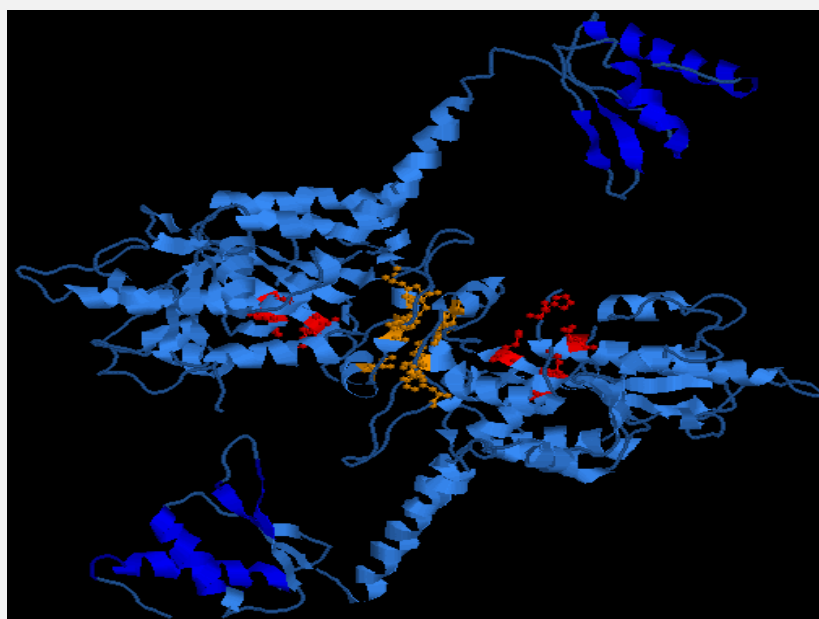
Τμήμα Βιοχημείας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»
Τμήμα Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Βιοχημεία-Βιοτεχνολογία



ΣΚΑΦΙΔΑ ΜΑΡΙΑ

“Μελέτες στον υποκυττάριο εντοπισμό της Πολυ(Α)-Εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης, PARN”



Λάρισα 2016

Λάρισα 2016

"Μελέτες στον υποκυττάριο εντοπισμό της Πολυ(Α)-Εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης, PARN"

"Studies on the subcellular localization of the Poly (A) -specific ribonuclease, PARN"

~ 2 ~

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Κοντού Μαρία, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Εικόνα εξωφύλλου

Κρυσταλλική δομή της nPARN (αμινοξέα 1-430). **Περιοχή νουκλεάσης**, **περιοχή R3H**, **περιοχή διμερισμού**(Wu et al., 2005).

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες:

Για την επιτυχή διεξαγωγή της μεταπτυχιακής μου εργασίας, οφείλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους αυτούς που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δε θα μπορούσε να διεκπεραιωθεί η παρούσα εργασία.

Παραθέτω τις ευχαριστίες μου καταρχάς στον επιβλέποντα καθηγητή μου Ν. Μπαλατσό, που με την εμπειρία, την καθοδήγηση και το αμέριστο ενδιαφέρον προς το αντικείμενό μου, βοήθησε τα μέγιστα στην αποσαφήνιση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων και την ορθή προσέγγιση του εγχειρήματος τούτου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Α. Κυρίτση για την σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων, που μέσα σε πνεύμα συνεργασίας και κοινής προοπτικής επετεύχθη σημαντικό μέρος της εργασίας αυτής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που στήριξε τις προσπάθειές μου και ενθάρρυνε τους κόπους μου μέχρι αυτό το σημείο. Θα ήταν επίσης παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω την Επίκουρο καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά για την παροχή του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C2, καθώς και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ιδιαίτερα το Λέκτορα Βιοχημείας κ. Ηλία Μυλωνή για την καταλυτική τους συνεισφορά στη λήψη των εικόνων μικροσκοπίας φθορισμού.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1. ‘‘RNAworld’’	10
1.2. Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.....	10
1.3. Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.....	10
1.4. Το 5’ άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.....	11
1.5. Το 3’ άκρο πολυαδενυλιώνεται.....	11
1.6. Αποικοδόμηση του mRNA - Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA.....	12
1.7. Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος της δραστη- τητάς τους.....	16
1.8. Η πολύ (A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN].....	17
1.9. Δομή της PARN και ο ρόλος της αργινίνης 99 (R99) και της γλουταμίνης 109 (Q 109).....	20
2.ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	25
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26

3. Κυτταρική σειρά-Χειρισμοί.....	26
3. Ανακαλλιέργεια Μονόστιβης καλλιέργειας.....	27
3.Συλλογή κυττάρων	27
3.1.1.Ψύξη κυττάρων.....	28
3.1.1.Υλικά-Αντιδραστήρια.....	28
3.1.1.Πρωτόκολλο Xfect-αντιδραστήριο επιμόλυνσης.....	29
3.1.2.Κλωνοποίηση βάσει πρωτοκόλλου του In-fusion HD cloning kit (Clontech).30	
3.1.3.Επιλογή και ενζυμική πέψη του φορέα κλωνοποίησης.....	31
3.1.4.Σχεδιασμός ειδικών PCR εκκινητών.....	33
3.1.5.Ενίσχυση του γονιδίου ενδιαφέροντος με απλή PCR.....	35
3.1.6.Καθορισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction).....	37
3.1.7.Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.....	38
3.1.8.Χημικός μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων XL I Blue (transformation).....	38
3.1.9.Επίστρωση τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και επιλογή των αποικιών που περιέχουν τον κλωνοποιημένο φορέα.....	40
3.2. Παρασκευή επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων(completent cells).....	40
3.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα(mini preparation).....	41

3.4. Μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων.....	42
3.5. Δοκιμασία υποκυτταρικού εντοπισμού της PARN αγρίου τύπου (wild type PARN-wtPARN) με αντίχνευση φθορισμού- Κυτταροχημεία.....	43
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
4.1.Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με πρόγραμμα MEGA 3.1.....	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στον καρκίνο, απορρυθμίζεται η σταθερότητα των mRNAs, και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση των προϊόντων ογκογονιδίων ή ακόμη και μείωση των ογκο-κατασταλτικών πρωτεϊνών. Η πολυ(A) ουρά των ώριμων ευκαρυωτικών mRNA διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην μεταφορά, την μετάφραση και την αποικοδόμησή τους, παρέχοντας ένα σημαντικό μέσο ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης και της σταθερότητας των mRNA. Οι απαδενυλάσες, είναι τα ένζυμα που αφαιρούν την πολυ(A) ουρά των ευκαρυωτικών mRNAs. Τα ένζυμα αυτά είναι ένας βασικός παράγοντας ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης καθώς, μέσω της βράχυνσης της πολυ(A) ουράς, ελέγχουν τη σταθερότητα των mRNA. Ο ρόλος αρκετών απαδενυλασών δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της κατανόησης του υποκυττάριου εντοπισμού της απαδενυλάσης PARN. Κλωνοποιήσαμε την PARN φυσικού τύπου (wild-type PARN) στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2 και στην συνέχεια, με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο διαμολύναμε καρκινικά κύτταρα NCI-H520. Ακολούθως, συγκρίναμε με τη βοήθεια μικροσκοπίας φθορισμού, τον υποκυτταρικό εντοπισμό της wild type PARN με αυτόν ενός μεταλλάγματος της PARN, του οποίου οι μεταλλάξεις φαίνεται πως επηρεάζουν τον ολιγομερισμό του ενζύμου.

ABSTRACT

In cancer, the stability of the mRNAs is deregulated, and can lead to increased composition of oncogene products, or even to the reduction of tumor suppressor proteins. The poly (A) tail of mature eukaryotic mRNA plays a key role in the transport, translation and their degradation , providing a major means for the control of protein synthesis control and the mRNA stability. The apadenylases are the enzymes that remove the poly (A) tail of eukaryotic mRNAs. These enzymes are a key factor in regulating gene expression as, through the shortening of the poly (A) tail, they control the stability of mRNA. The role of several apadenylason has not yet been clarified . This work is part of the understanding of the subcellular localization of apadenylasis PARN. We cloned PARN (wild-typePARN) to the plasmid vector pEGFP-C2 , and then , with the use of the recombinant plasmid we transfected cancer NCI-H520 cells. Next, using fluorescence microscopy, we compared the subcellular localization of wildtype PARN with that of a mutant of PARN , whose mutations appear to influence the oligomerization of the enzyme.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 «Ο κόσμος του RNA»

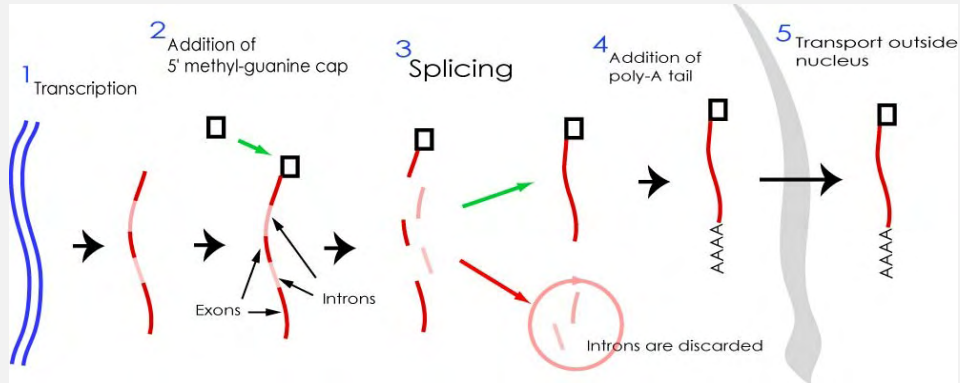
Το ριβονουκλεϊκό οξύ, RNA, χαρακτηρίστηκε ως ενδιάμεσο προϊόν της πρωτεϊνοσύνθεσης. Εμπλέκεται, σε πολλές λειτουργίες που αφορούν την γονιδιακή έκφραση. Συνεπώς μιλάμε για έναν ολόκληρο «κόσμο RNA», στον οποίο αρχικά το RNA ήταν το ενεργό συστατικό του μηχανισμού διατήρησης και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Αργότερα οι πρωτεΐνες υποβοήθησαν ή ανέλαβαν αποκλειστικά πολλές από αυτές τις λειτουργίες, γεγονός που είχε ως συνέπεια την αύξηση της προσαρμοστικότητας και πιθανόν της αποτελεσματικότητας.

1.2 Το mRNA παράγεται με μεταγραφή και μεταφράζεται.

Η διεργασία της μεταγραφής (*transcription*) παράγει ένα μονόκλωνο μόριο RNA όμοιο στην αλληλουχία με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA, ενώ η μετάφραση (*translation*) μετατρέπει ακολούθως τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA στην αλληλουχία αμινοξέων που αποτελούν μια πρωτεΐνη. Ένα μόριο mRNA δε μεταφράζεται σε ολόκληρο το μήκος του, αλλά κάθε mRNA περιέχει τουλάχιστον μία κωδική περιοχή (*coding region*), η οποία σχετίζεται με μια πρωτεϊνική αλληλουχία μέσω του γενετικού κώδικα: κάθε νουκλεοτιδική τριπλέτα (*κωδικόνιο*) της κωδικής περιοχής αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ. Μόνο η μία αλυσίδα του δίκλωνου DNA μεταγράφεται σε αγγελιαφόρο RNA. Η μία αλυσίδα του DNA η οποία κατευθύνει τη σύνθεση του mRNA δημιουργώντας ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων αποκαλείται αλυσίδα-μήτρα (*template strand*). Η αλυσίδα-μήτρα ,περιέχει αλληλουχία DNA ή RNA, που είναι συμπληρωματική με το mRNA ενώ η αλυσίδα του DNA που φέρει την ίδια αλληλουχία με το mRNA (με εξαίρεση ότι περιέχει T αντί για U) ονομάζεται κωδική αλυσίδα (*coding strand*).

1.3 Ωρίμανση και σταθερότητα mRNA.

Μετά τη σύνθεση του πρώιμου ευκαρυωτικού mRNA (pre-mRNA) ακολουθεί η ωρίμανση που δίνει το τελικό ώριμο mRNA. Η ωρίμανση περιλαμβάνει την προσθήκη του καλύμματος στο 5' άκρο (*capping*), την προσθήκη της πολυ(A) ουράς στο 3' άκρο (*polyadenylation*) και το μάτισμα (*splicing*) για την απομάκρυνση των εσονίων και τη συρραφή των εξονίων. Μόνο μετά την ολοκλήρωση όλων των τροποποιήσεων και της επεξεργασίας μπορεί το mRNA να εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Μόλις το mRNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα και μεταφράζεται.



Εικόνα 1: Στάδια ωρίμανσης ευκαρυωτικού mRNA

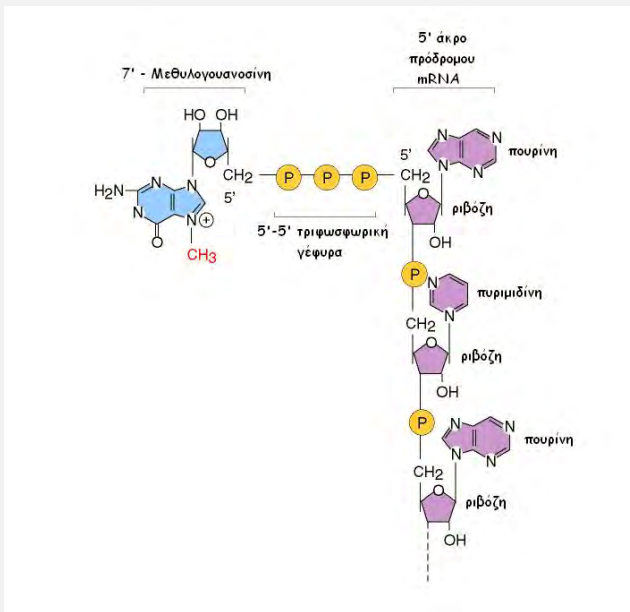
1.4 Το 5' άκρο του ευκαρυωτικού mRNA φέρει κάλυμμα.

Το 5' κάλυμμα σχηματίζεται με την προσθήκη μιας τριφωσφορικής γουανοσίνης (*GTP*) στην πρώτη βάση του μεταγράφου μέσω ενός 5'-5' δεσμού, που είναι ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνήθως μια πουρίνη, A ή G).

1.5 Το 3' άκρο πολυαδενυλιώνεται.

Τα πρόδρομα mRNAs λαμβάνουν στο 3' άκρο τους μια χαρακτηριστική αλληλουχία από 250-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης, γνωστής ως πολυ (A) ουρά.

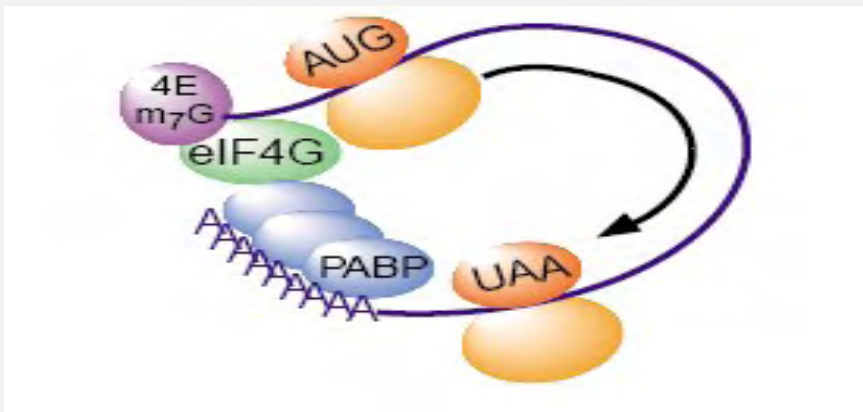
Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας για το mRNA. Προστατεύει το 3' άκρο του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος στο κυτταρόπλασμα και από αυτή ξεκινά και το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA. Στις διαδικασίες αυτές η πολυ(A) ουρά συμμετέχει κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών παραγόντων που προσδένονται σε αυτή, και κυρίως την πολυ(A) προσδεδεμένη πρωτεΐνη [*poly(A)-binding protein, PABP*].



Εικόνα 2: Το κάλυμμα στο 5' άκρο του mRNA

Ο βασικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι αφενός να προστατεύει την ίδια την ουρά από αποικοδόμηση και αφετέρου να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι την βιωσιμότητα του mRNA.

Εικόνα 3 : Η πρόσδεση της PABP στον παράγοντα έναρξης eIF4G δημιουργεί έναν κλειστό βρόχο (Mitchelletal., 2001).



1.6 Αποικοδόμηση του mRNA- Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA

Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης mRNA και στην αντιϊκή προστασία (Dykxhoometal., 2003· Maquatetal, 2000· Hoofvanetal, 1999). Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό

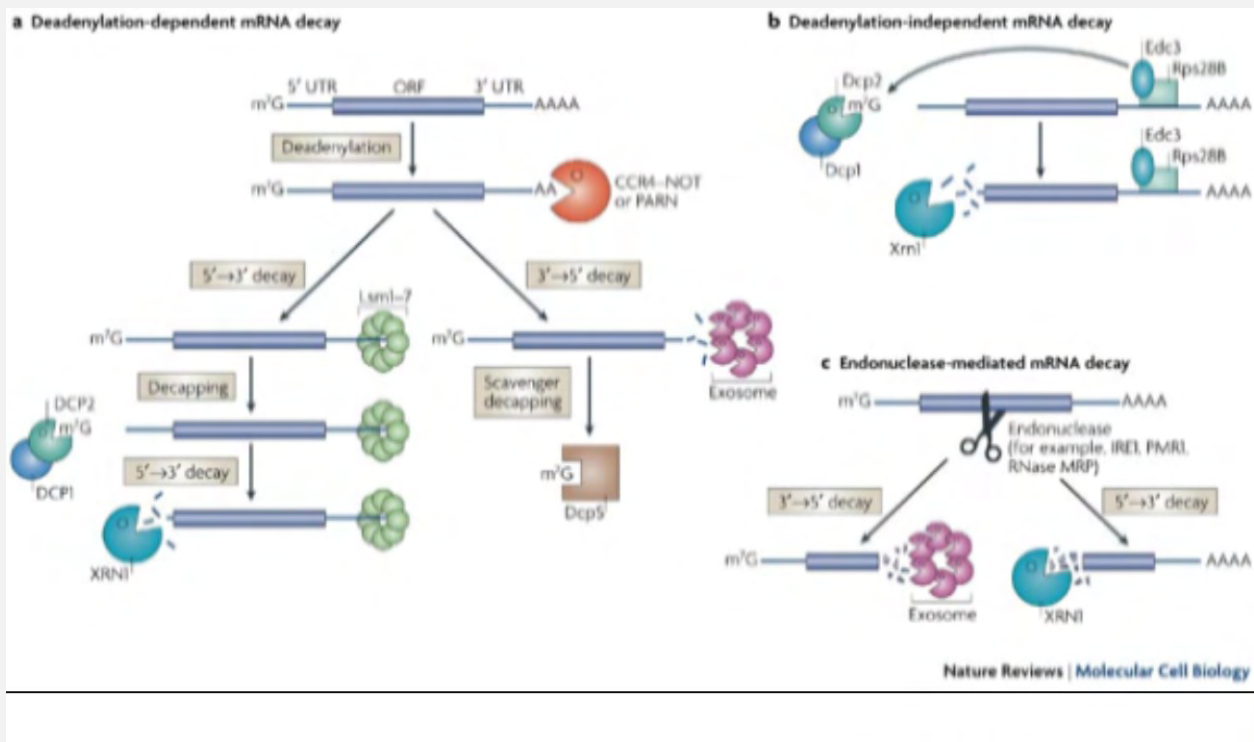
βήμα στην αποικοδόμηση των μορίων mRNA και την μεταφραστική αποσιώπηση. Η αποικοδόμηση του mRNA συνήθως ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ (A) ουράς στο 3' άκρο του (αποαδενυλίωση) από διάφορα ένζυμα, γνωστά ως αποαδενυλάσες (Tuckeretal., 2000· Mitchelletal., 2001). Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από την Xrn1p, μια 5'→3' εξωνουκλεάση. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών (Μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από την αποδενυλίωση) (Garneauetal., 2004, · Andersonetal., 1998· Chenetal., 2001· WangandKiledjian, 2001· Mukherjeeetal., 2002). Στην περίπτωση αυτή το κάλυμμα υδρολύεται από το DcpS (Liuetal., 2002).

Πίνακας 1: Τα δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNAs και οι κυριότεροι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτά (ενισχυτές και αναστολείς) (Meyeretal., 2004).

Reaction	Enzymes		Effectors
	Yeast	Mammals	
I deadenylation	<ul style="list-style-type: none"> • Pan2p/Pan3p • CCR4-NOT complex 	<ul style="list-style-type: none"> • Pan2/Pan3 • CCR4-NOT complex • PARN 	PABPC PABPC cap
IIa decapping	<ul style="list-style-type: none"> • Dcp1p/Dcp2p 	<ul style="list-style-type: none"> • Dcp1/Dcp2 	Edc1p; Edc2p; Edc3p; Pat1p; Lsm1-7; Dhh1p; PABPC
IIb cap hydrolysis	<ul style="list-style-type: none"> • Dcs1p 	<ul style="list-style-type: none"> • DcpS 	
III 5'-3' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> • Xrn1p 	<ul style="list-style-type: none"> • Xrn1 	
IV 3'-5' exonucleolytic decay	<ul style="list-style-type: none"> • exosome 	<ul style="list-style-type: none"> • exosome 	Ski2p; Ski3p; Ski7p; Ski8p

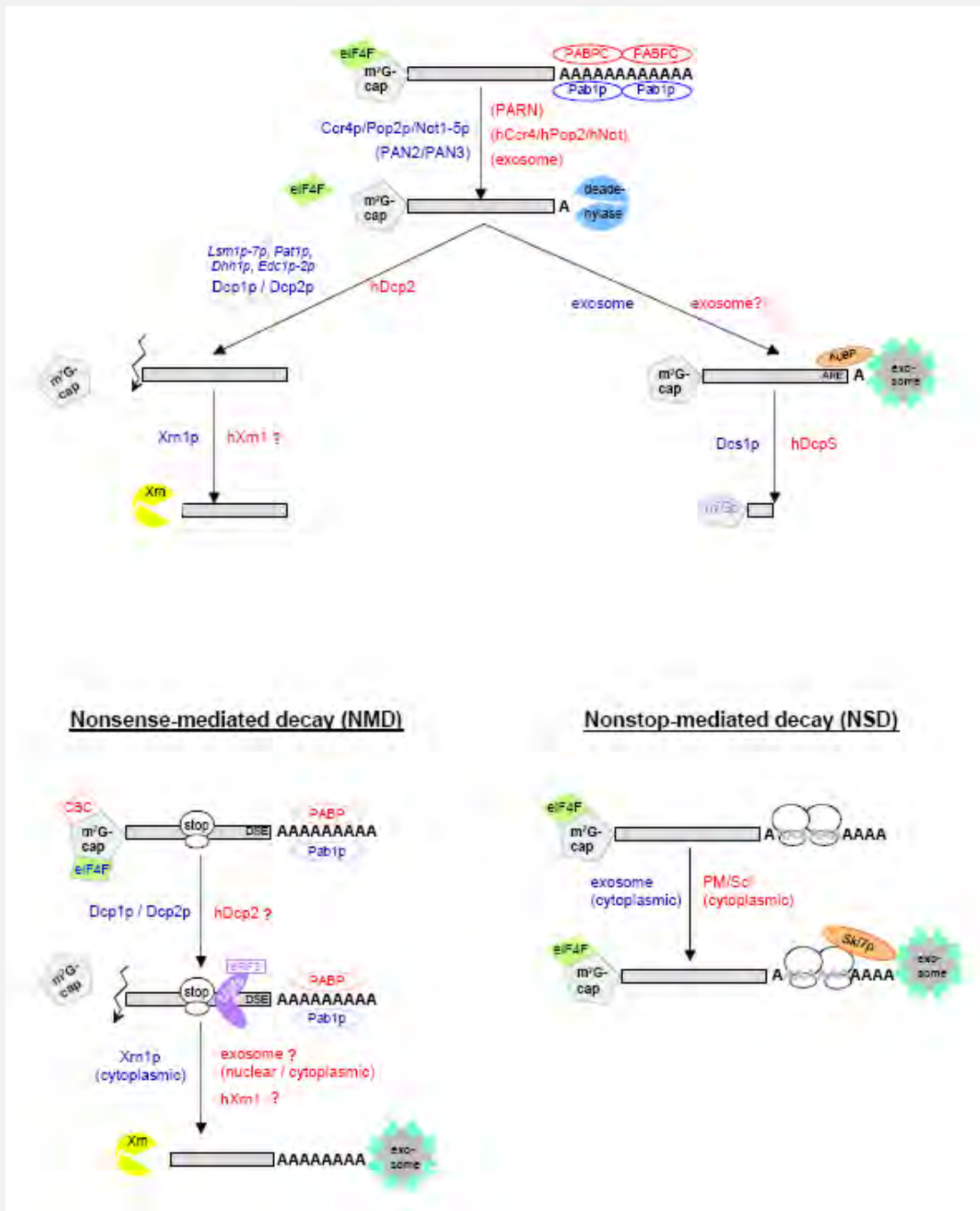
Παρόλα αυτά η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε από το μηχανισμό του RNAi (Μονοπάτι αποικοδόμησης μέσα από ενδονουκλεάσες) (Dodsonetal., 2002). Σ' αυτό το μονοπάτι και με τη δράση των ενδονουκλεασών παράγονται δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια. Επίσης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν πολύ γρήγορα ανώμαλα mRNAs χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs.

Εικόνα 4: Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNAs (Kim and Lee,2009, Goldstrohm and Wickens, 2008).



Όλα τα κύτταρα διαθέτουν συστήματα ελέγχου ποιότητας των νεοσυντιθέμενων mRNAs, έτσι ώστε να απομακρύνουν γρήγορα μόρια που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης (Moore et al., 2002). Με αυτόν τον τρόπο προστατεύονται από πιθανώς τοξικές πρωτεΐνες που θα παράγονταν με τη μετάφραση των ελαττωματικών μεταγράφων. Τρία μονοπάτια αποικοδόμησης ελαττωματικών mRNAs έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Στο πρώτο από αυτά, σε μια πορεία που αναφέρεται και ως μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (*nonsense-mediated decay, NMD*) τα mRNAs που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται. Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος σε μία διαδικασία η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (Muhlrad and Parker, 1994· Cao and Parker, 2003· Mitchell et al., 2003· Takahashi et al., 2003). Παρομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-τερματισμού (*non stop decay, NSD*) τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (Frisch meyer et al., 2002, Van Hoof et al., 2002). Τέλος, ανακαλύφθηκε (στη ζύμη) και η No-Go αποικοδόμηση (*no-godecay, NGD*)

στην οποία παρατηρείται ακινητοποίηση του ριβοσώματος στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Ως αποτέλεσμα πυροδοτείται η διαμεσολαβόμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και η απελευθέρωση του ριβοσώματος. Οι διαδικασίες παρουσιάζονται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 5):



Εικόνα 5: Τα mRNAs τα οποία δεν περιέχουν ή περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αποικοδομούνται ταχύτατα (Frischmeyer et al., 2002).

1.7. Αποαδενυλάσες-Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος δραστηριότητάς τους

Με τον όρο αποαδενυλάσες ονομάζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP. Κάθε είδος οργανισμού διαθέτει και διαφορετική γκάμα και αριθμό αποαδενυλασών. Η τεράστια ποικιλότητα και η ποικιλομορφία των αποαδενυλασών υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες αποαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs επιτάσσοντας τον έλεγχο τους στη δραστηριότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη, διαφορετικές αποαδενυλάσες μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Οι αποαδενυλάσες όπως αναφέρθηκε, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γενική διαδικασία επαναχρησιμοποίησης του mRNA. Επιτελούν όμως και αρκετούς εξειδικευμένους, ρυθμιστικούς ρόλους. Κάποιες είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάγματα άλλων επιφέρουν μια ποικιλία ενδιαφερόντων φαινοτύπων. Επιπλέον, συγκεκριμένες αποαδενυλάσες είναι απαραίτητες για συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες, γεγονός που αποδεικνύει πως ο έλεγχος ορισμένων mRNAs είναι καθοριστικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία αυτών των διεργασιών (Goldstrohm and Wickens, 2008, Parke and Song, 2004). Η ρύθμιση της δραστηριότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε καταστροφή και θάνατο του κυττάρου. Σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση. Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης ποικίλλει μεταξύ των διάφορων mRNAs. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από παράγοντες-ρυθμιστές οι οποίοι προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των mRNAs. Ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται συνήθως στις 3' αμετάφραστες περιοχές συγκεκριμένων mRNAs (3'-UTR) ενισχύουν την αποαδενυλίωση τους. Αυτά τα στοιχεία δεσμεύονται από παράγοντες οι οποίοι στρατολογούν συγκεκριμένες αποαδενυλάσες προωθώντας έτσι την αποαδενυλίωση. Τέτοια παραδείγματα παραγόντων που δεσμεύονται στις 3'-UTR περιοχές μορίων mRNA αποτελούν οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm and Wickens, 2008· Kadyrova et al., 2007· Hook et al., 2007). Εναλλακτικά, προώθηση της αποαδενυλίωσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω αλληλεπίδρασης της PABP και συγκεκριμένων αποαδενυλασών (π.χ η PABP στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την αποαδενυλίωση διεγείροντας την δραστηριότητα και την επεξεργαστικότητα κάποιων αποαδενυλασών (χαρακτηριστικότερο και μοναδικό γνωστό έως σήμερα παράδειγμα αποτελεί η PARN).

Πίνακας 2: Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών (Goldstrohm and Wickens, 2008).

		Οργανισμός					
		Sc	Ce	Dm	Xl	Mm	Hs
Οικογένεια DEDD	CNOT7/POP2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
Οικογένεια EEP	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	NOC	-	-	+	+	+	+
	2' PDE	-	+	+	+	+	+

1.8. Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN]

Η PARN αποτελεί την μοναδική ευκαριωτική ριβονουκλεάση με πολυ(A)αποικοδομητική ενεργότητα. Είναι η μόνη αποαδενυλάση που επιδρά άμεσα κατα την διάρκεια της υδρόλυσης της πολυ(A) ουράς και με την δομή της 5'-καλύπτρας και με τη πολυ(A) ουρά του mRNA (Dehlin et al. 2000· Gao et al.2000· Martinez et al. 2000, 2001). Η ιδιότητα αυτή υπαινίσσεται ότι η PARN συμμετέχει στον μεταβολισμό του mRNA και ότι είναι πιθανός ρυθμιστής των ευκαριωτικών κυττάρων mRNAs , αφού είναι τα μόνα που φέρουν καλύπτρα και πολυ(A)ουρά.

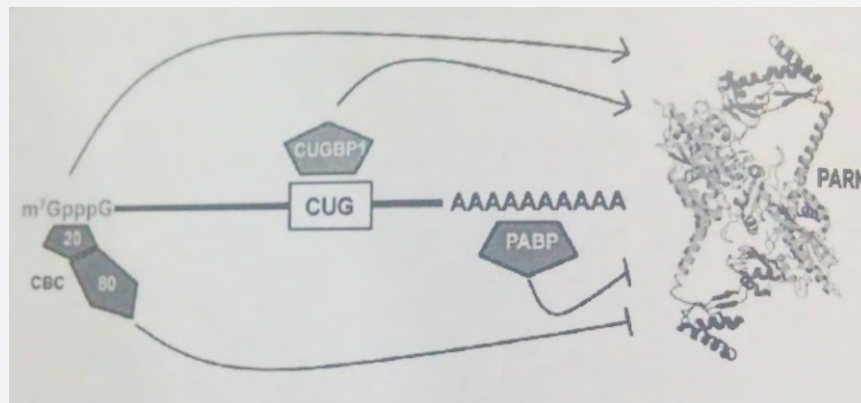
Η PARN απαρτίζεται από 639 αμινοξέα, με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 73,5 kDa (Korner et al. 1998, Martinez et al.2000). Ανήκει στην υπεροικογένεια DnaQ-like των 3'-5' εξωριβονουκλεασών (Korner et al. 1998, Mian 1997, Moser et al,1997), οι οποίες μοιράζονται έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα, που περιέχει το μοτίβο DEDD (πίνακας 1) αποτελούμενο από τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα Asp, Glu, Asp, και Asp (DEDD) (Marchler-Bauer et al. 2011, Zuo and Deatscher 2001), ενώ και η ιστιδίνη 377 συμπεριλαμβάνεται στα παραπάνω και έτσι η PARN ανήκει στην υποκατηγορία DEDDh (Wu et al., 2005). Η αμινοτελική περιοχή της φαίνεται να είναι η πιο συντηρημένη ανάμεσα στα ομόλογα της PARN στους οργανισμούς σε αντίθεση με την καρβοξυτελική. Η PARN έχει ενεργότητα εξαρτώμενη από δισθενή ιόντα Mg, απαιτεί ως υπόστρωμα μονόκλωνο RNA, με ελεύθερη ομάδα υδροξυλίου(-OH) στο 3'-άκρο του (Korner and Wahle 1997). Όσον αφορά στον υποκυττάριο εντοπισμό της PARN, μελέτες έχουν δείξει πως η PARN μπορεί να βρίσκεται μέσα στον πυρήνα, αλλά μετακινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Yamashita et al. 2005, Uhlen et al.2010). Μάλιστα φαίνεται πως στον *Xenopus laevis*, η PARN πλήρους μήκους απαντά σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα, ενώ μια βραχύτερη μορφή του ενζύμου, προϊόν πρωτεολυτικής δράσης, απαντά στο κυτταρόπλασμα (Copleand and

Wormington, 2001).

Μελέτες έχουν δείξει δύο επιπλέον εμφανή βιοχημικά χαρακτηριστικά της PARN: την επεξεργαστικότητα στον τρόπο δράσης της και την επίδραση στην ενεργότητα αποαδενύλασης από την 5'-m⁷G-καλύπτρα (Dehlin et al. 2000· Gao et al.2000· Martinez et al 2000,2001). Η επεξεργασία αναφέρεται, στην ενεργότητα ενζύμων που πραγματοποιεί συνεχώς την ίδια αντίδραση χωρίς το ένζυμο να αποσπάται από το σύμπλοκο με το υπόστρωμά του, σε κάθε κύκλο κατάλυσης (Nossal and Singer 1968).

Η PARN συμμετέχει σε αρκετούς κυτταρικούς μηχανισμούς και αποκρίσεις, όπως για παράδειγμα στη απόκριση στο στρές (Cevher et al. 2010, Reinhardt et al. 2010), στην αποικοδόμηση των πολλαπλά ματισμένων HIV-1 mRNAs κατά την μόλυνση από HIV-1(Zhu et al.2011). Επίσης μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πιθανός δείκτης της καρκινικής ανάπτυξης (Maragozidis et al. 2012).

Εκτός από την 5'-m⁷G-καλύπτρα και την πολύ (A) ουρά, η ρύθμιση της αποαδενύλασης φαίνεται να πραγματοποιείται και από άλλα *cis*-δραστικά στοιχεία όπως είναι τα: AU και GU, τα οποία είναι γνωστά ως AU-rich elements, ή AREs (Balatsos et al,2012· Garneau et al. 2007 · Goldstrohm & Wickens,2008· Parker & Song,2004· Zhang et al.2010).

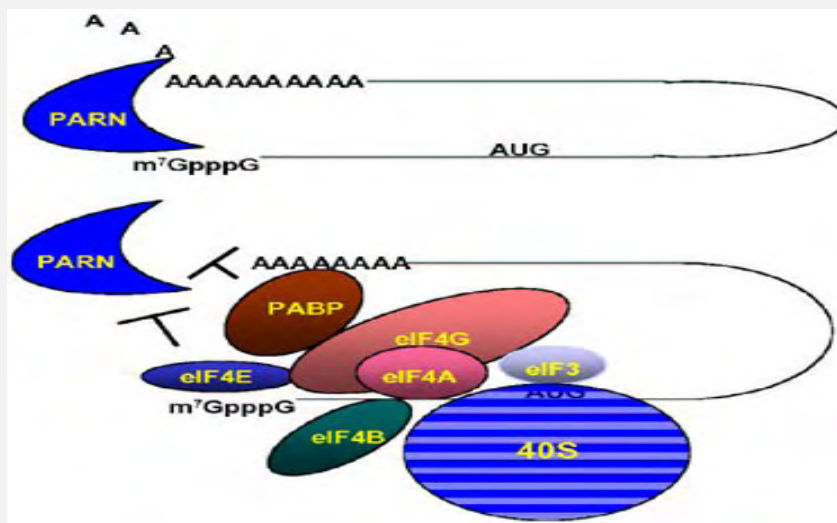


Εικόνα 6: Ρύθμιση της αποαδενύλασης μέσω από RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών (Virtanen et al.2013).

Στα παραπάνω στοιχεία, προσδένονται διάφορες RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες, που ενισχύουν ή αναστέλλουν την δράση της αποαδενύλασης. Στο κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη CBC (αναστολέας της PARN), αντικαθίστανται στο mRNA, από τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (Marcotrigiano et al. 1997), ο οποίος αποτελεί τμήμα του eIF4E συμπλόκου, ζωτικής σημασίας για την πιο αποτελεσματική έναρξη της μετάφρασης στους ευκαριώτες. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης PABP στην πολύ (A) ουρά, επίσης αναστέλλει την ενεργότητα της αποαδενύλασης. Συνεπώς

σχηματίζεται ένα σύμπλοκο PABP -πολύ (A) ουράς, το οποίο και παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση των αποαδενυλασών με το πολύ (A) υπόστρωμα (Bernstein et al. 1989·Copeland and Wormington 2001·Ford et al. 1999·Ford and Wilusz,1999· Kim & Richter, 2007· Wormington et al.1996).

Γνωρίζουμε ότι πολλά mRNAs στοιχεία ARE (πλούσια σε AU κατάλοιπα), αποτελούν πρωτοογκογονίδια (π.χ. c-myc, c-fos, c-jun), κυτταροκίνες (π.χ. TNF α), χυμοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Schoenberg & Maquat ·2012· Wilusz et al. 2001· Wu & Brewer, 2012).



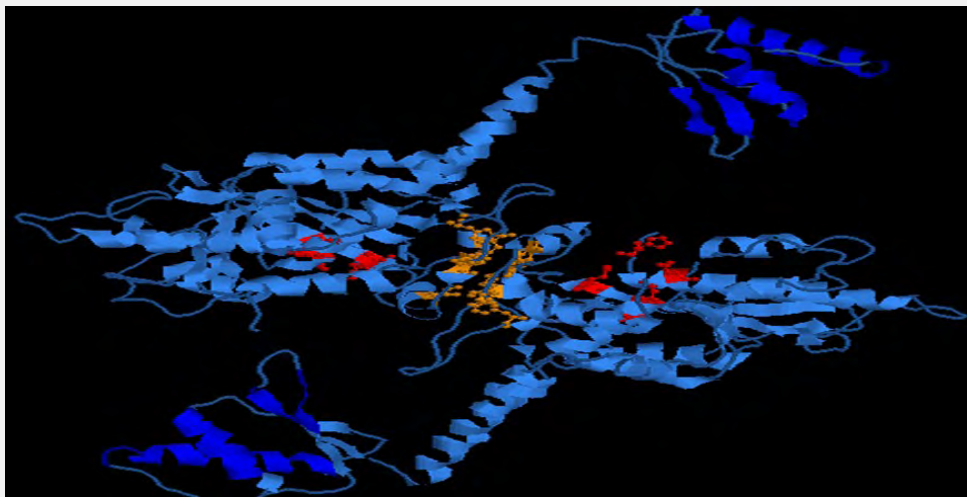
Εικόνα 7: Ρύθμιση της δράσης της PARN. Σημειώνεται ο ανασταλτικός ρόλος των eIF4E και PABP (Gao et al., 2000).

Συνεπώς, τα mRNAs ρυθμίζονται από τις ARE-συνδεδεμένες πρωτεΐνες, οι οποίες δρουν ως ενεργοποιητές ή πρωτεΐνες στρατολόγησης της αποαδενυλάσης (Lai et al.1999,2000,2003). Παράλληλα η ενεργότητα της αποαδενυλάσης συνδυασμένη με την αποσταθεροποιητική ικανότητα των PBRs, δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας και έτσι προκαλείται η αποκοδόμηση των mRNAs, που αποκωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, όπως : η IL-8 ,ο VEGF. Επίσης η PARN επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτο-ογκογονιδίων c-jun, και uPA, τα οποία είναι αυξημένα σε διάφορους τύπους καρκίνων (Ghou, et al.2006, Tran, et al. 2003). Η PARN αλληλεπιδρά με την CUG-BP, μια RNA-συνδεδεμένη πρωτεΐνη και έτσι αποσταθεροποιούνται τα ογκογόνα mRNAs(c-fos και TNF- α) (Moraes et al.2006).

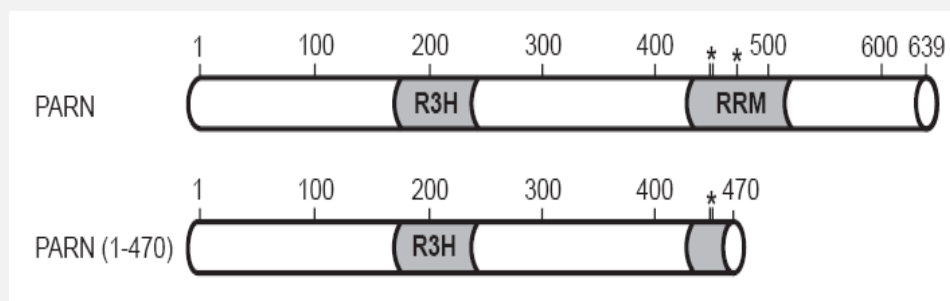
1.9. Δομή της PARN και ο ρόλος της αργινίνης 99 (R99) και της γλουταμίνης 109 (Q109)

Στην δομή της PARN, ο καταλυτικός πυρήνας της σχηματίζει μια αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα, που εντοπίζεται σε μια περιοχή, που ονομάζεται επικράτεια νουκλεάσης (Korner et al. 1998, Ren et al. 2002 a,b, Wu et al. 2005).

Εικόνα 8: Τρισδιάστατη διμερής δομή της ανθρώπινης αποαδενύλασης PARN.



Παράλληλα με την περιοχή της νουκλεάσης, δύο ακόμη νουκλεάσες με RNA, RRM (Copeland and Wormington 2001· Monecke et al. 2008· Nagata et al. 2008· Nilsson et al. 2007, Wu et al. 2009) και το μοτίβο αναγνώρισης RNA, που αναφέρεται ως περιοχή ή επικράτεια R3H (Wu et al. 2005). Η RRM περιοχή είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της 5'-m7G-καλύπτρας (Nilsson et al. 2007), ενώ η R3H για την σύνδεση της PARN στην πολυ(A) ουρά (Wu et al. 2005). Επίσης η RRM περιοχή σταθεροποιεί την συνολική τρισδιάστατη δομή της PARN (Zhang et al. 2007).



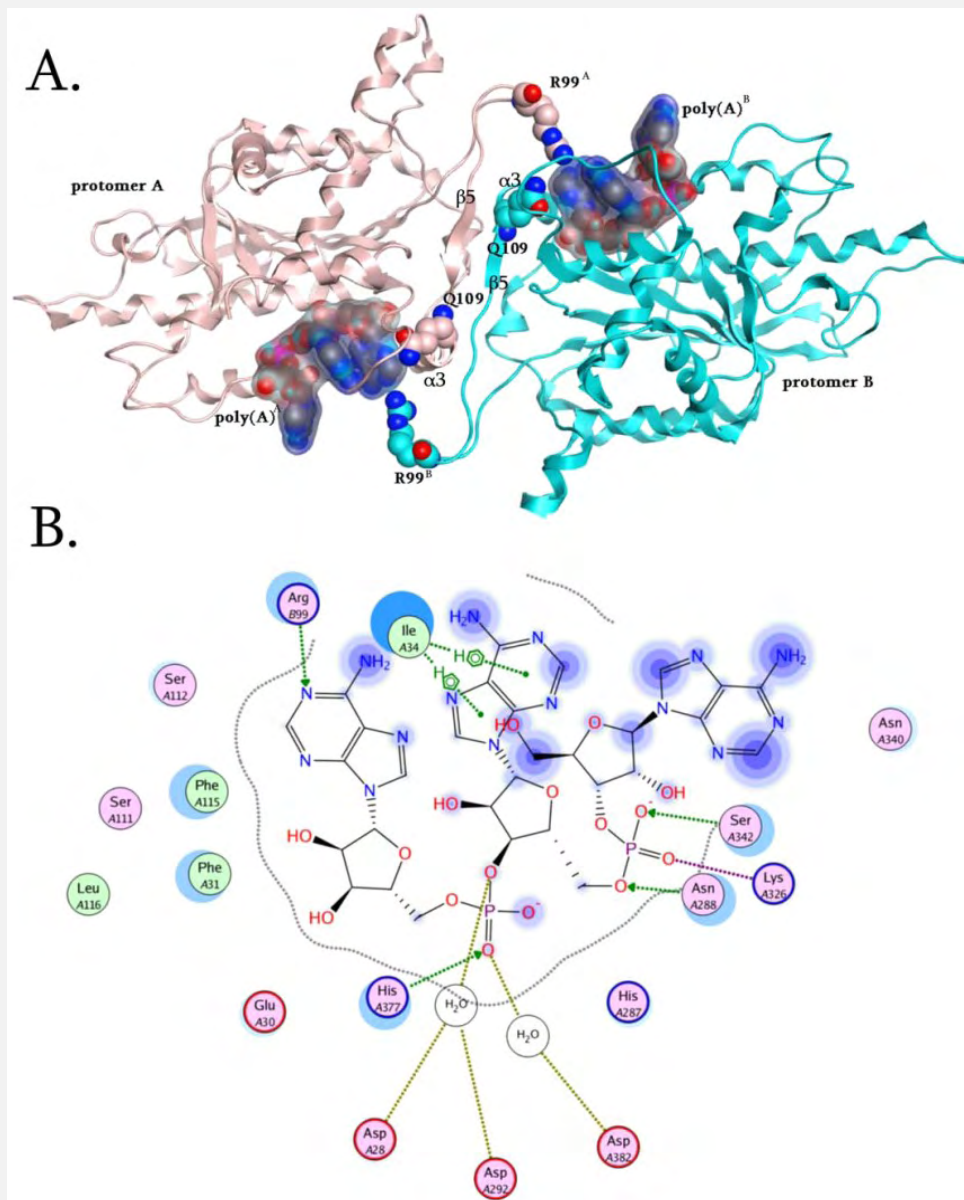
Εικόνα 9: Οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης PARN. Σημειώνονται οι RRM και R3H περιοχές. Με αστερίσκο δηλώνονται σημαντικά αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση του καλύμματος.

Η αποαδενυλάση σχηματίζει ένα ομοδιμερές πολύ καλά συνδεδεμένο, του οποίου οι υπομονάδες συγκρατούνται μεταξύ τους με έναν δισουλφιδικό δεσμό(...S—S) που ενώνει τις δυο περιοχές νουκλεάσης της PARN (Martinez et al.2000, · Wu et al. 2005,2209· Niedzwiecka et al.2011). Αυτός ακριβώς ο διμερισμός είναι απόλυτα ζωτικής σημασίας για την καταλυτική ικανότητα της PARN (Wu et al. 2005). Το τμήμα του mRNA που αποτελεί την 5'- m7G-καλύπτρα, θεωρείται ένας αλλοστερικός ρυθμιστής της ενεργότητας της αποαδενυλάσης γιατί: 1) η 5'- m7G-καλύπτρα επηρεάζει τον ρυθμό αποικοδόμησης της πολύ (A) ουράς από την αποαδενυλάση (Dehlin et al. 2000· Gao et al.2000· Martinez et al.2000, 2001), μέσω της ενίσχυσης της επεξεργασίας του ενζύμου (Martinez et al.2001), 2) και φυσικά λόγω της θέσης πρόσδεσης της 5'- m7G-καλύπτρας (Wu et al. 2009), που βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο της αποαδενυλάσης.

Εκτενής φυλογενετική ανάλυση, βασισμένη στο σύνολο των διαθέσιμων γονιδιωμάτων, έδειξε μια ευρεία κατανομή για την PARN στα ευκαρυωτικά είδη, και αποκάλυψε δομικά σημαντικά αμινοξέα, τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στη ρύθμιση του καταλυτικού μηχανισμού της PARN [50]. Συνολικά εντοπίστηκαν 32 ομόλογες πρωτεϊνικές αλληλουχίες της PARN στα γονιδιώματα των ειδών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ταξινομικές ευκαρυωτικές ομάδες (σύμφωνα με την ταξινομική βάση δεδομένων του NCBI). Ομόλογα της PARN δεν βρέθηκαν στο αρθρόποδο *Drosophila melanogaster* και στο μύκητα *S.Cerevisiae*, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια μπορεί να υπάρχουν σε αυτούς του δύο οργανισμούς για την αποικοδόμηση του πολυ(A). Παρόλα αυτά, οι θεωρούμενες ομόλογες αλληλουχίες της PARN ανιχνεύονται σε άλλα αρθρόποδα και μύκητες. Περαιτέρω, πρωτεϊνικά μοτίβα αντλούνται από πολλαπλές συστοιχίσεις των αμινοξικών αλληλουχιών της PARN. Εκτός από το συντηρημένο καταλυτικό μοτίβο (Asp29, Glu30, Asp292 και Asp382), ένα δεύτερο μοτίβο που περιέχει τα αμετάβλητα κατάλοιπα R99 και Q109 ανιχνεύθηκε μόνο στα μετόζωα. Μετά από προσεκτική εξέταση της πρωτοταγούς αλληλουχίας αμινοξέων των άλλων ειδών εκτός των μετοζών, βρέθηκε ότι στη γειτονική περιοχή της R99, είτε υπάρχουν κατάλοιπα Arg ή η Arg έχει αντικατασταθεί από την επίσης πολική Lys.

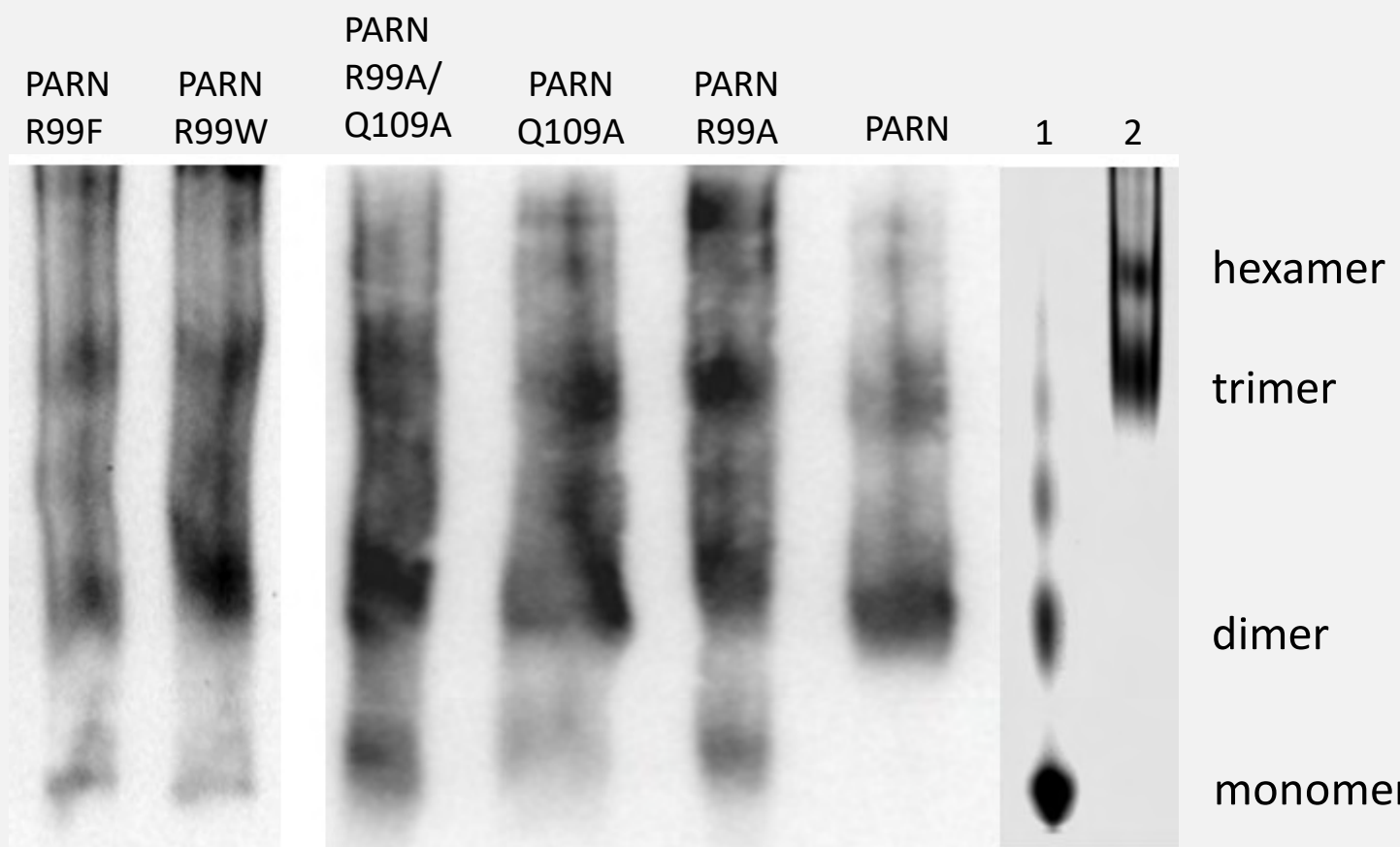
Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση, η έρευνα επικεντρώθηκε στους πιθανούς ρόλους των αμετάβλητων καταλοίπων R99 και Q109, εκτός των άλλων. Δομική υπέρθεση των δύο μονομερών της PARN και των δύο αντίστοιχων ολιγονουκλεοτιδίων πολυ(A) αποκάλυψε μικρές αποκλίσεις (max Ca RMSD <2Å). Η δομική ανάλυση *in silico* έδειξε ότι η R99 του μονομερούς Ala (R99A) υποστηρίζεται από το συμπληρωματικό μονομερές με συμμετρικό τρόπο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Συγκεκριμένα, η R99^A εκτείνεται μέσα στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας B, όπως και η

R99^B στο ενεργό κέντρο της αλυσίδας A. Αυτά τα κατάλοιπα Arg σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη βάση αδενίνης του τελευταίου 3' νουκλεοσιδίου της πολυ(A) αλυσίδας. Ο δεσμός υδρογόνου επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της ομάδας -NH₂ (δότης) της Arg και την ομάδα -N= (δέκτης) του δακτυλίου της αδενίνης (Εικόνα).). Η ουσιαστική συμβολή της R99 επιβεβαιώνεται επίσης από μελέτες μετάλλαξης στην α3 έλικα της PARN, η οποία σχηματίζει έναν ευέλικτο βρόχο, ο οποίος υποστηρίζει τον βρόχο που βρίσκεται η Arg του άλλου μονομερούς ώστε να βρίσκεται στην εγγύτητα της καταλυτικής περιοχής. Η βέλτιστη καταλυτική τοποθέτηση του σχιζόμενου δεσμού κατευθύνεται από την His377, η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της ομάδας -P=O του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Κατά συνέπεια, δεδομένου ότι η His377 και η R99 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το πρώτο νουκλεοσίδιο από διαφορετικές κατευθύνσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στην τρισδιάστατη του σταθεροποίηση και τοποθέτηση στο ενεργό κέντρο της PARN (Εικόνα 10B). Συμπερασματικά, η R99 μπορεί να αντιπροσωπεύει ακόμα ένα σημαντικό κατάλοιπο καθώς συνδέει τα δύο μονομερή, συμβάλλει στη συνολική σταθερότητα και κατευθύνει το υπόστρωμα σε μια βέλτιστη θέση για την αντίδραση διάσπασης [50]. Από την άλλη η Q109 βρίσκεται στις δύο αντιπαράλληλες έλικες β5 της ομοδιμερούς περιοχής επαφής. Δημιουργήθηκαν *in silico* μεταλλάξεις τόσο Q109A αλλά και Q109Trp για την κατανόηση του ρόλου της. Η πρώτη μετάλλαξη αποκάλυψε μια σημαντική απώλεια στο πακετάρισμα και στη σύνδεση των δύο σκελών β5 (4 φορές ενεργειακή απώλεια) ενώ το Q109Trp συνεχώς αποτυγχάνει της δημιουργίας του λόγω του ογκώδους υπολείμματος και δεν μπορεί να φιλοξενηθεί στην περιοχή διεπαφής ομοδιμερισμού της pARN (Εικόνα 10 A). Είναι επίσης προφανές πως το Q109 καθορίζει το σχήμα του καταλυτικού θύλακα που είναι διαθέσιμη για να φιλοξενήσει το υπόστρωμα πολυ(A).



Εικόνα 10 : Θέση της Αργινίνης 99 και Γλουταμίνης 109 στην PARN και πως την επηρεάζει [50].

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου οδήγησαν να εξεταστεί αν τα αμινοξέα αυτά επηρεάζουν τη δομή του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό εξατάστηκε η κατατομή των μεταλλαγμάτων χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως επηρεάζεται ο ολιγομερισμός της πρωτεΐνης· η μονομερής μορφή της πρωτεΐνης παρατηρείται σε όλες τις μεταλλαγμένες μορφές, ενώ δεν ήταν εμφανής στην αγρίου τύπου. Μορφές με αριθμό υπομονάδων μεγαλύτερο του 2 παρατηρούνται τόσο στις μεταλλαγμένες όσο και την φυσικού τύπου μορφές. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως η R99 και η Q109 επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία της PARN, με την πρώτη να έχει επηρεάζει πιο έντονα τη συμπεριφορά του ενζύμου (Laschou et al., in preparation).



Εικόνα 11: Επίδραση των μεταλλάξεων στον ολιγομερισμό της PARN. Ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες των PARN, PARN R99A, PARN Q109A, PARN R99A/Q109A, PARN R99F και PARN R99W. Διαδρομές, 1: Albumin bovine serum (monomer–dimer), 2: Urease (trimer–hexamer).

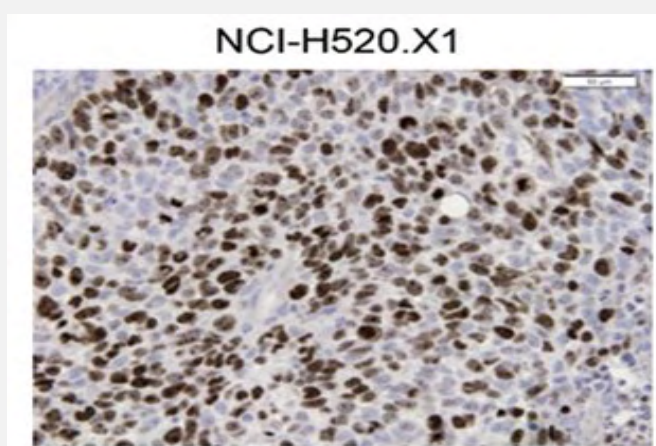
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της εργασίας είναι να συμβάλλει στην κατανόηση του ρόλου της δομής της PARN στον υποκυττάριο εντοπισμό της. Έτσι, στόχος της πειραματικής διαδικασίας ήταν η κλωνοποίηση του φυσικού τύπου της PARN (wild-type PARN) στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2 και ο έλεγχος της υποκυτταρικής της εντόπισης μετά από διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων NCI-H520. Παράλληλα, έγινε σύγκριση της υποκυτταρικής εντόπισης της PARN με την αντίστοιχη ενός μεταλλάγματος της PARN που φέρει διπλή μετάλλαξη δύο σημαντικών αμινοξέων της (R99 και Q109).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταρική σειρά - Χειρισμοί

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NCI-H520. Πρόκειται για ανθρώπινη κυτταρική σειρά από καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα. Τα κύτταρα της κυτταρικής αυτής σειράς σχηματίζουν μονόστιβες επιθηλιακές επιφάνειες στο ταπήτιο ανάπτυξης (Εικόνα 10).



Εικόνα 12: Κύτταρα NCI-H520

Απόψυξη κυττάρων

- 1) Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα από τους -80°C (ή υγρό άζωτο) όπου ήταν αποθηκευμένα, εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο (37°C) με ήπια ανάδευση.
- 2) Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με αιθανόλη (70%) εξωτερικά.
- 3) Ακολουθεί μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε φάλκον 15ml με επιπλέον προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού μέχρι τα 10ml.
- 4) Φυγοκέντρηση του αιωρήματος στις 1500rpm για 2min.
- 5) Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκειμένου, προκειμένου να αποβάλουμε το DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων και δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.
- 6) Προσθήκη 10 ml θρεπτικού RPMI (10% FBS) και μεταφορά σε T25 flask.
- 7) Επώαση των κυττάρων στους 37°C μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της φλάσκας.

- 8) Αφού η πληρότητα των κυττάρων φτάσει το 90-100%, μεταφέρουμε τα κύτταρα μετά από τρυψινοποίηση σε T75 flask.

Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι απαραίτητη η διαδικασία της τρυψινοποίησης. Για να προβούμε σε τρυψινοποίηση, η πληρότητα των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας ανάπτυξης θα πρέπει να είναι 90-100%. Έτσι λοιπόν ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- 1) Παρατηρούμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Ελέγχουμε και σημειώνουμε:
 - α. Μορφολογία κυττάρων και
 - β. Πληρότητα ταπητίου (confluency).
- 2) Απομακρύνουμε (με αναρρόφηση) το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
- 3 «Ξεπλένουμε» τα κύτταρα με διάλυμα PBS 1x (*).
- 4) Προσθέτουμε διάλυμα τρυψίνης-EDTA 0.05% (0.5ml για φιάλη 75cm²).
- 5) Ανακινούμε τη φιάλη έτσι ώστε το διάλυμα τρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο.
- 6) Μεταφέρουμε τα κύτταρα στον επωαστήρα (κλίβανος 37°C) για περίπου 1-2 min. Παρατηρούμε προσεκτικά το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο, και ελέγχουμε με ακρίβεια αν έχουν αποκτήσει σφαιρική μορφή.
- 7) Προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού RPMI, 1%, Antibiotic-antimycotic (10ml θρεπτικού για φιάλη 75cm²).
- 8) Επαναιωρούμε τα κύτταρα και τα διασπείρουμε ομοιόμορφα με πιπέτα (των 10ml).
- 9) Στο σημείο αυτό μπορούμε να χωρίσουμε τα κύτταρα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή απλά να απομακρύνουμε μέρος των κυττάρων στην ήδη υπάρχουσα φλάσκα.
- 10) Κάθε φορά που γίνεται η τρυψινοποίηση, καταγράφεται ως πέρασμα (π.χ. πέρασμα p25-passage 25).

(*) Σημείωση: το PBS διάλυμα που χρησιμοποιείται στον χειρισμό των κυττάρων, είναι φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο.

Συλλογή των κυττάρων

- 1)* Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x (3 φορές).
- 2)* Τρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω.

3)*Ομογενοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων με πιπετάρισμα σε PBS 1x (ή RPMI), και μεταφορά τους σε tubes 1,5ml.

4) Φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min στις 3000rpm στους 4°C.

5) Απομάκρυνση του υπερκείμενου προσεκτικά και φύλαξη του ιζήματος στους -80 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν πειραματικά.

* Τα βήματα 1-3 πραγματοποιούνται σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.

Ψύξη των κυττάρων

- 1) Τρυψινοποίηση κυττάρων.
- 2) Προσθήκη θρεπτικού υλικού (10ml για T75 flask).
- 3) Μεταφορά αιωρήματος σε φάλκον 15ml.
- 4) Φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 3min στους 6°C.
- 5) Μεταφορά στον απαγωγό και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 6) Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 1800μl RPMI (10%FBS).
- 7) Προσθήκη 200μl κρυοπροστατευτικού DMSO (τελικό κρυοπροστατευτικό διάλυμα 20% DMSO).
- 8) Μεταφορά σε cryovial.
- 9) Αργή ψύξη μέσα σε cryobox (1°C/1 min) στους -80°C.
- 10) Αποθήκευση στους -80°C ή σε υγρό άζωτο.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- ☑ Θρεπτικό υλικό: RPMI, 10% FBS, 1% Antibiotic-antimycotic
- ☑ PBS 1x (Phosphate Buffer Salts): 137mM NaCl, 2.7mm KCl, 4.3mM

Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄

- ☑ RPMI (Biosera)
- ☑ FBS (Biosera)
- ☑ Antibiotic-antimycotic (Gibco)
- ☑ DMSO (Sigma)
- ☑ Τρυψίνη (Biosera)
- ☑ EDTA (Merck)
- ☑ NaCl (Merck)
- ☑ KCl (Merck)

☑ Na₂HPO₄ (Merck)

☑ KH₂PO₄ (Merck)

3.1.1.Πρωτόκολλο διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων:

- 1) Πρώτο βήμα αποτελεί η τρυψινοποίηση των κυττάρων μιας T75 flask στην οποία η πληρότητα των κυττάρων είναι 95%-100%. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται μετά από μέτρηση σε πλάκα Neubauer, και σε αυτή τη φλάσκα μπορούν να φτάσουν ως και $42,5 \times 10^5$ κύτταρα.
- 2) Σε κάθε well ενός 12-well plate προσθέτουμε το 1/12 από τα παραπάνω τρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε σε κάθε well να έχουμε πληρότητα περίπου 90-95% (50.000 κύτταρα) μετά από 24h, μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.
- 3) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το X-fect reagent, το οποίο περιέχει το X-fect Polymer και το X-fect Reaction Buffer. Το X-fect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσώματα και επιτρέπει τη διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών με πολύ μεγάλη απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (στην περίπτωση μας μιλάμε για τους ανασυνδιασμένους φορείς pEGFP-C2). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και X-fect Polymer είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης.
- 4) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα X-fect mix σύμφωνα με τις εξής ενδείξεις:
 - α. DNA mix: 2μg πλασμιδίου σε 50μl X-fect Reaction Buffer ανά well
 - β. X-fect mix: 0,6μl X-fect Polymer σε 50μl X-fect Reaction Buffer ανά well
- 5) Παρασκευή του transfection mix: Αναμιγνύουμε τα DNA mix και X-fect mix και τα αφήνουμε να επωαστούν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1x (0,5ml) δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκηκωτικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (0,5ml RPMI/well).
- 7) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε το τελευταίο με κυκλικό τρόπο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 12-well plate να επωαστεί στους 37°C.
- 8) Μετά από 5-6h, απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το

αντικαθιστούμε μετά από δύο πλύσεις με 0,5ml PBS 1x, με 0,5ml φρέσκο RPMI (10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic) το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10μg/ml θρεπτικού υλικού).

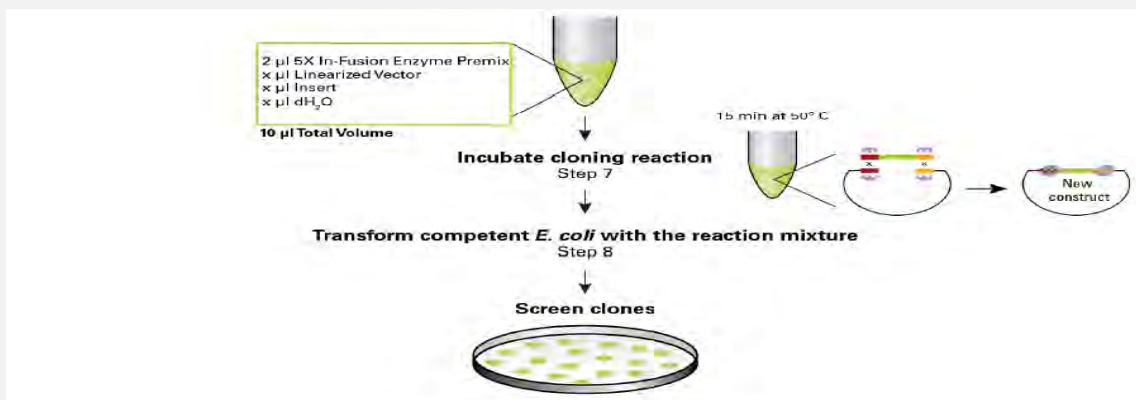
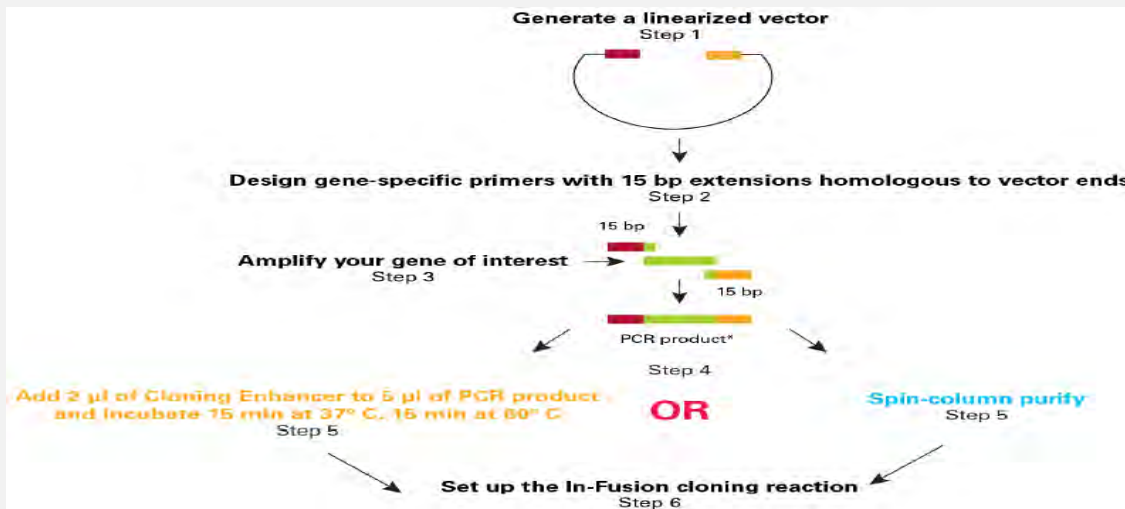
3.1.2 Κλωνοποίηση βάσει πρωτοκόλλου του In-fusion HD cloning kit (Clontech):

Για την κλωνοποίηση της PARN φυσικού τύπου (wtPARN) στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του In-fusion HD cloning kit. Το πρωτόκολλο αυτό είναι σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε έναν φορέα. Η τεχνολογία που χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ ενός τμήματος DNA και ενός γραμμικοποιημένου φορέα. Η αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού καταλύεται από το «In-fusion ένζυμο», μία ανασυνδυάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση κοινά άκρα των 15 bp που έχουν ο φορέας και το τμήμα DNA, το οποίο έχει ενισχυθεί με PCR με ειδικούς εκκινητές (για τον σχεδιασμό των ειδικών εκκινητών, βλ. παρ. 3.1.2).

Τα γενικά βήματα που ακολουθούμε για την κλωνοποίηση σύμφωνα με το πρωτόκολλο In-fusionHDcloning, είναι τα εξής :

- Επιλογή του κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης και προσδιορισμός της θέσης ένθεσης. Γραμμικοποίηση του φορέα με χρήση κατάλληλου ενζύμου περιορισμού (ενζυμική πέψη του φορέα).
- Σχεδιασμός ειδικών PCR εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Ο σχεδιασμός γίνεται ούτως ώστε οι εκκινητές να παράγουν μία επιπλέον αλληλουχία των 15 bp στα άκρα του γονιδίου-στόχος, η οποία θα είναι ομόλογη με τα άκρα του γραμμικοποιημένου φορέα.
- Ενίσχυση του τμήματος DNA με PCR χρησιμοποιώντας μία DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (high-fidelity DNA polymerase). Επαλήθευση ότι το γονίδιο έχει ενισχυθεί ειδικά, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.
- Απομόνωση του προϊόντος PCR και του προϊόντος πέψης από την πηκτή αγαρόζης (gel extraction).
- Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ του προϊόντος PCR και του γραμμικού φορέα. Επώαση της αντίδρασης για 15 min στους 50° C, και επακόλουθη τοποθέτηση στον πάγο.
- Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με την αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.

- Επίστρωση τρυβλίων με τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα.
- Επιλογή των αποικιών που περιέχουν τον κλωνοποιημένο φορέα.

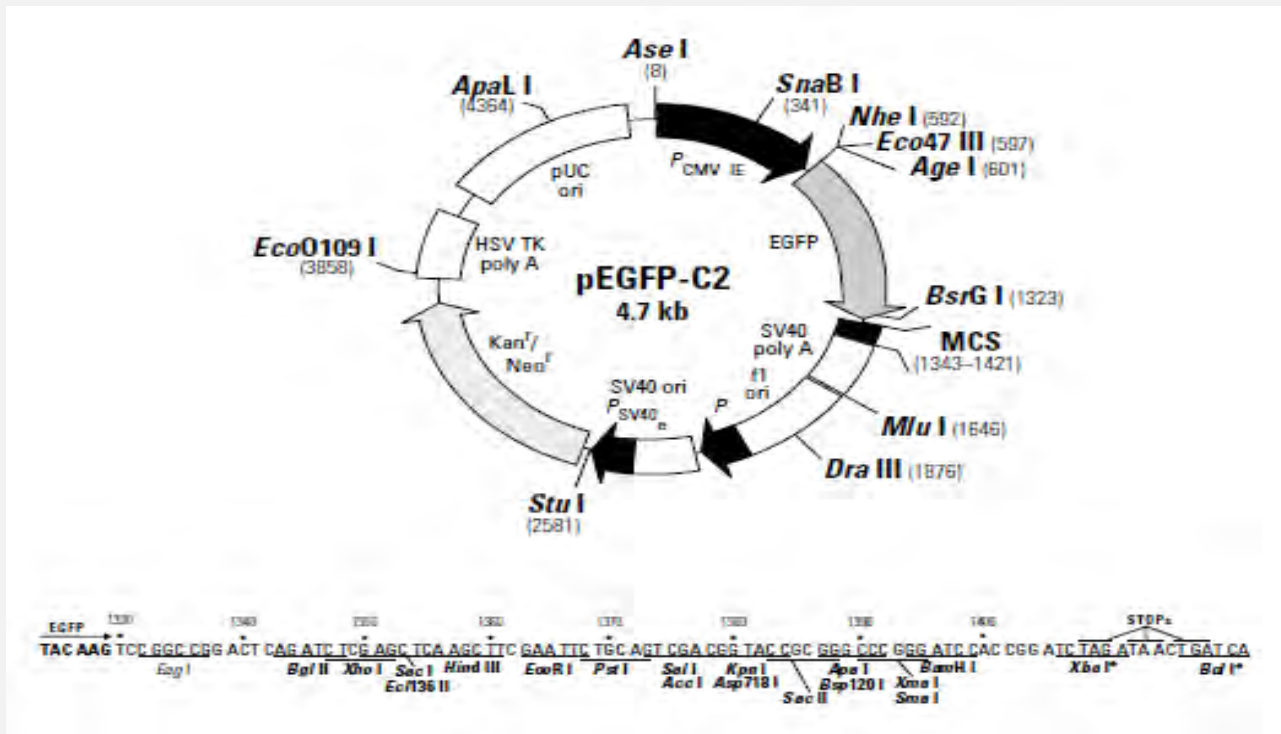


Εικόνα 13: Συνοπτική παρουσίαση του πρωτοκόλλου κλωνοποίησης.

3.1.3. Επιλογή και ενζυμική πέψη του φορέα κλωνοποίησης

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της PARN αγρίου τύπου είναι ο pEGFP-C2. Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας των 4,7 Kb κωδικοποιεί μια παραλλαγή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) αγρίου τύπου η οποία έχει βελτιστοποιηθεί προκειμένου να έχει εντονότερο φθορισμό και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών. Ειδικότερα, ο pEGFP-C2 (Εικόνα 2) κωδικοποιεί το GFP mut1 μετάλλαγμα, το οποίο φέρει τη διπλή αμινοξική αντικατάσταση Phe64>Leu64 και Ser65>Thr65. Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου της GFP περιέχει περισσότερες από 190 σιωπηλές μεταβολές βάσεων προκειμένου να ανταποκρίνεται καλύτερα στα ανθρώπινα κωδικόνια. Η περιοχή πολυσυνδέτης ή αλλιώς το multi

plecloning site (MCS) του φορέα βρίσκεται μεταξύ των κωδικών αλληλουχιών της GFP και του σήματος πολυαδενυλίωσης SV40 polyA. Τα γονίδια που κλωνοποιούνται στο MCS του φορέα, εκφράζονται ως καρβοξυτελική συνέχεια (fusion) της GFP με την προϋπόθεση πως δεν υπάρχουν παρεμβαλλόμενα κωδικόνια τερματισμού. Ο pEGFP-C2 φέρει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη για επιλογή σε καλλιέργειες στελεχών *E. Coli*, καθώς και γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη για επιλογή σε ευκαρυωτικές κυτταρικές καλλιέργειες. Ο εν λόγω πλασμιδιακός φορέας είναι κατάλληλος για πειράματα εντοπισμού της επιθυμητής πρωτεΐνης *in vivo*, με την προϋπόθεση ότι αυτή έχει εισαχθεί επιτυχώς στο καρβοξυτελικό άκρο της GFP.



Εικόνα 14: Ο χάρτης και το MCS του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C2

Η πέψη του φορέα κλωνοποίησης pEGFP-C2 έγινε με τη χρήση του ενζύμου περιορισμού EcoRI, το οποίο αναγνωρίζει μία μοναδική αλληλουχία στην περιοχή πολυσυνδέτη του πλασμιδίου. Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης πέψης, ορίστηκαν σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο TAKARA για το EcoRI, και φαίνονται στον Πίνακα 3. Οι όγκοι ορίστηκαν ώστε το υπόστρωμα DNA να έχει ποσότητα $\leq 1\mu\text{g}$.

10x H Buffer	2μl
Πλασμιδιακό DNA (pEGFP-C2)	10μl
ddH₂O	7μl
EcoR	1μl (15U)
Υτελ.	20μl

Πίνακας 3: Σύσταση ενζυμικής αντίδρασης πέψης του φορέα pEGFP-C2.

Στη συνέχεια έγινε επώαση της αντίδρασης στους 37 °C για 2 ώρες. Μετά τις 2 ώρες επώασης η αντίδραση περατώθηκε με προσθήκη loading buffer (6x), ώστε στον τελικό όγκο να έχουμε loading buffer (1x).

3.1.4. Σχεδιασμός ειδικών PCR εκκινήτων

Ο σχεδιασμός ορθών και ποιοτικών εκκινήτων είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της κλωνοποίησης με το HD-In Fusion cloning kit της Clontech. Οι In-Fusion PCR εκκινήτες πρέπει να σχεδιαστούν με τρόπο τέτοιο ώστε να παράγουν προϊόν ενίσχυσης PCR με άκρα ομόλογα με τα άκρα του επιθυμητού φορέα στη γραμμικοποιημένη του μορφή (μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες).

Κάθε In-Fusion εκκινήτης πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Το 5' άκρο κάθε εκκινήτη θα πρέπει να περιέχει 15 βάσεις ομόλογες με τις 15 βάσεις στο ένα άκρο του κομματιού DNA στο οποίο πρόκειται να εισαχθεί (π.χ. πλασμιδιακός φορέας).
- Το 3' άκρο κάθε εκκινήτη θα πρέπει να περιέχει αλληλουχία ειδική για το γονίδιο στόχο.
- Το 3' τμήμα κάθε εκκινήτη θα πρέπει να είναι ειδικό για το γονίδιο στόχο, να έχει GC περιεχόμενο 40-60%, μήκος 18-25 νουκλεοτίδια, T_m 58-65°C (η διαφορά της T_m μεταξύ Fwd και Rev δεν πρέπει να ξεπερνά τους 4°C. Η τιμή της T_m πρέπει να υπολογίζεται βάσει της γονιδιο-ειδικής αλληλουχίας του εκκινήτη).
- Θα πρέπει να αποφεύγεται η συμπληρωματικότητα εντός του ίδιου εκκινήτη, καθώς και μεταξύ των εκκινήτων.
- Οι εκκινήτες να είναι απομονωμένοι με HPLC ή desalted.

- Να έχει ελεγχθεί η ορθότητα και η εξειδίκευσή τους ως προς το γονίδιο-στόχος με BLAST.

Η Clontech παρέχει ένα δωρεάν εύχρηστο εργαλείο στην ιστοσελίδα της, με τη βοήθεια του οποίου μπορεί ο κάθε ενδιαφερόμενος απλά παρέχοντας την αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου, την αλληλουχία του φορέα στον οποίο επιθυμεί να εισάγετε γονίδιο καθώς και επιλέγοντας το ένζυμο περιορισμού με το οποίο θα πραγματοποιηθεί η γραμμικοποίηση του φορέα, μπορεί εύκολα και γρήγορα να σχεδιάσει εκκινητές κατάλληλους για χρήση με το HD-In Fusion cloning kit.

Με τη βοήθεια του παραπάνω εργαλείου σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές με Tm περίπου 65°C (με κόκκινο επισημαίνεται το τμήμα των εκκινητών που είναι ειδικό για την αλληλουχία του γονιδίου-στόχος),για την κλωνοποίηση του cDNA της PARN αγρίου τύπου στον γραμμικοποιημένο πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2 έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI:

FWD primer : CTC-AAG-CTT-CGA-ATT-ATG-GAG-ATA-ATC-AGG-AGC-AA

REV primer: GTC-GAC-TGC-AGA-ATT-TTA-CCA-TGT-GTC-AGG-AAC-TT

Στην παρακάτω εικόνα παρατίθεται ένα αδρό διάγραμμα κλωνοποίησης μετά και τον σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών.

1. PCR Product.

Fragment1(+) :
CTCAAGCTTCGAATTATGGAGATAATCAGGAGCAA.....AAGTTCCTGACACATGGTAA
AATTCTGCAGTCGAC
Fragment1(-) :
GAGTTCGAAGCTTAATACCTCTATTAGTCCTCGTT.....TTCAAGGACTGTGTACCATTTT
AAGACGTCAGCTG

2. Linearized vector

EcoR I EcoR I
Vector(+) : ...GCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCG
AATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATC....
Vector(-) : CGGCCTGAGTCTAGAGCTCGAGTTCGAAGCTTAA
GACGTCAGCTGCCATGGCGCCCGGGCCCTAG....

3. Annealing

Fragment1(+) : 5'-
CTCAAGCTTCGAATTATGGAGATAATCAGGAGCAA...AAGTTCCTGACACATGGTAAA
ATTCTGCAGTCGAC -3'

Fragment1(-) : 3'-
GAGTTCGAAGCTTAATACCTCTATTAGTCCTCGTT...TTCAAGGACTGTGTACCATTTTA
AGACGTCAGCTG -5'

Vector(+) :GCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCG -3' 5'-
AATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATC....

Vector(-) :CGGCCTGAGTCTAGAGCTCGAGTTCGAAGCTTAA -5'
3'- GACGTCAGCTGCCATGGCGCCCGGGCCCTAG....

Εικόνα 15: Διάγραμμα κλωνοποίησης της PARN στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2.

3.1.5. Ενίσχυση του γονιδίου ενδιαφέροντος με απλή PCR

Το cDNA της wtPARN ενισχύθηκε με απλή PCR, με τη χρήση του KAPA HiFi Hot Start Ready Mix PCR Kit, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το πλασμιδιακό DNA pET33b-wtPARN, τους ειδικούς εκκινητές και DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας. Η εν λόγω DNA πολυμεράση φέρει ένα αντίσωμα το οποίο αποδεσμεύεται από το ένζυμο όταν υποβληθεί απότομα σε υψηλή θερμοκρασία (hot start), με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η δράση του ενζύμου πριν ξεκινήσει η αντίδραση PCR, και ως εκ τούτου τη δημιουργία μη ειδικών προϊόντων.

Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης PCR φαίνονται στον **Πίνακα 4**:

2X KAPA HiFi Hot Start Ready Mix	25μl
Εκκινητής Fwd 10μM	1,5μl
Εκκινητής Rev 10μM	1,5μl
Πλασμιδιακό DNA (pet33b-wtPARN)	1μl
ddH₂O	21μl
Υτελ	50μL

Πίνακας 5: Σύσταση αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της PARN φυσικού τύπου.

Αρχική αποδιάταξη:	95°C	3min	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη:	98°C	20sec	
Υβριδοποίηση:	65°C	15sec	
Επέκταση:	72°C	2min	
Τελική επέκταση:	72°C	10min	
Αποθήκευση:	4°C		

Το θερμικό προφίλ της αντίδρασης PCR ήταν το ακόλουθο:

Σημείωση: Ο χρόνος επέκτασης, του πολυμερισμού δηλαδή του νεοσυντιθέμενου κλώνου DNA, εξαρτάται από το μήκος του τμήματος που ενισχύεται. Γενικά ισχύει ότι για κάθε 1kb DNA που ενισχύεται, ο χρόνος επέκτασης ισούται με ≈ 1 min.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%

Η επιβεβαίωση των ειδικών προϊόντων της PCR και της πέψης, έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1%. Το ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιήθηκε είναι το TAE 1x (διάλυση 1gr αγαρόζης σε 100 ml TAE 1x), ενώ έγινε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα 60V και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο loading buffer.

Υλικά:

- TAE 50x: Tris base 24,2% v/w, ακετοξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6
- Loading buffer 6x: Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM
- Αγαρόζη (Sigma)
- DNA μοριακός μάρτυρας 1Kb (Fermentas)
- Midori Green DNA stain (Nippon Genetics)
- Bromophenolblue (Research Organics)
- Xylene Cyanol (Merck)
- Γλυκερόλη(Panreac)

- EDTA (Merck)
- Tris (Merck)
- Ακετοξικό οξύ (Merck)

3.1.6. Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR και του προϊόντος της πέψης από την πηκτή αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels) έγινε με βάση το πρωτόκολλο In vitro gen Pure Link Quick Gel Extraction.

1) Εξαγωγή του τμήματος DNA- Διάλυση της πηκτής:

Αρχικά εξάγεται από την πηκτή αγαρόζης η ζώνη με το τμήμα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Η εξαγωγή πραγματοποιείται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο περιττός όγκος της πηκτής. Το κομμάτι αυτό διαλύεται σε buffer GS1 σε αναλογία 30μl buffer για κάθε 10mg πηκτής αγαρόζης (για πηκτή αγαρόζης μέχρι και 2%). Η διάλυση επιτυγχάνεται με θέρμανση της πηκτής στους 50°C για 15 λεπτά με ανάδευση κάθε 3 λεπτά. Αφού λιώσει η πηκτή, αφήνω στους 50°C για 5 λεπτά ακόμη. Παράλληλα προθερμαίνω το TE buffer στους 65-70° C.

2) Δέσμευση του DNA- Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

Το δείγμα φορτώνεται σε στήλη, η οποία τοποθετείται σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα. Ακολούθως, προστίθενται ακόμη 500μl GS1 buffer, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g και απομακρύνεται το έκλουσμα. Η στήλη επανατοποθετείται στο συλλεκτικό σωλήνα. Στη συνέχεια, προστίθενται 700μl buffer W9 (περιέχει αιθανόλη) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα.

3) Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης- Έκλυση του DNA

Τα δείγματα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 12000 x g με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του οποιουδήποτε buffer. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο γιατί έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της αιθανόλης που περιέχει το buffer W9, η οποία είναι πιθανόν να αναστείλει ακόλουθες αντιδράσεις. Ακολούθως, η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα (Recovery Tube) και προστίθενται 50μl του TE buffer που είχε προθερμανθεί. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της έκλυσης του DNA. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2

λεπτά στις 12000 x g. Το εκλούόμενο DNA φυλάσσεται στους -20°C.

3.1.7. Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, η διαδικασία κλωνοποίησης, αντί της «αντίδρασης λιγάσης», βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ του προϊόντος PCR και του γραμμικοποιημένου φορέα. Η αντίδραση καταλύεται από μία ανασυνδυάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα των 15bp που έχουν ο φορέας και το γονίδιο ενδιαφέροντος το οποίο έχει ενισχυθεί με PCR με ειδικούς εκκνητές. Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης, προκειμένου η απόδοση του ομόλογου ανασυνδυασμού να είναι υψηλή, ορίστηκε ως 3 προς 1 αντίστοιχα (wt PARN DNA: pEGFP-C2 DNA 3:1) σύμφωνα με το In-fusion HD cloning kit. Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού φαίνονται στον Πίνακα 6:

pEGFP-C2	1,25μl
wtPARN (100ng)	6,75μl
5x In-fusion HD Enzyme (35ng)	2μl
ddH₂O	-
Ντελ	10 μl

Πίνακας 6: Σύσταση αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού.

Στη συνέχεια έγινε επώαση της αντίδρασης στους 50 °C για 30min. Μετά τα 30min επώασης, η αντίδραση περατώθηκε με αποθήκευση στον πάγο (4 °C).

3.1.8. Χημικός μετασχηματισμός επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL1Blue (transformation).

- 1) Ξεπάγωμα 100 μl επιλεκτικών κυττάρων στον πάγο.
- 2) Προσθήκη 0,1-50 ng DNA (στην προκειμένη περίπτωση το προϊόν του ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ wt PARN και pEGFP-C2) στο vial με τα ξεπαγωμένα επιλεκτικά κύτταρα.
- 3) Μετά από ήπια ανάδευση πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30min.
- 4) Θερμικό σοκ (heat shock) στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα (sec). Η διάρκεια αυτού του βήματος

είναι μείζονος σημασίας για την επιτυχία του μετασχηματισμού.

5) Επώαση των κυττάρων στον πάγο για 1-2 λεπτά (min) και εν συνεχεία προσθήκη 900 μl προθερμανσμένου (στους 42°C) θρεπτικού υλικού SOC.

6) Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση (160-225 rpm).

7) Τέλος, επιστρώνονται 100μl της μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (στην περίπτωση των XL1Blue επιδεκτικών κυττάρων προσθέτουμε τετρακυκλίνη).

8) Τέλος, πραγματοποιείται επώαση του τρυβλίου στους 37 °C για 12-14 ώρες. Την επομένη, εφόσον υπάρχουν διακριτές αποικίες, ενοφθαλμίζουμε λίγες εξ αυτών σε 5 ml LB Broth περιέχοντα τετρακυκλίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ml. Οι υγρές αυτές καλλιέργειες επωάζονται O/N στους 37 °C, 210 rpm. Την επομένη, δημιουργούμε stock γλυκερόλης (700 μl κυττάρων + 300 μl αποστειρωμένη 50% γλυκερόλη) από τις συγκεκριμένες καλλιέργειες, τα οποία και φυλάσσονται στους -80 °C. Όλα τα βήματα της διαδικασίας μετασχηματισμού εκτελούνται υπό φλόγα.

Παρασκευή SOB medium (αρχικό):

Tryptone	20gr
Yeast extract	5gr
NaCl	0,5g
ddH2O	έως 980ml
Ντελ	980ml

Αφού παρασκευαστεί το παραπάνω διάλυμα, αποστειρώνεται και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη των παρακάτω συστατικών:

Παρασκευή SOB medium (τελικό διάλυμα):

Διάλυμα SOB (αρχικό)	980ml
MgCl ₂ (1M)	10ml
MgSO ₄ (1M)	10ml
Ντελ	1Lt

Το τελικό αυτό διάλυμα SOB αποθηκεύεται μέχρι χρήσης στους -20° C. Η παρασκευή του διαλύματος SOC γίνεται με προσθήκη στο διάλυμα SOB των παρακάτω συστατικών:

Παρασκευή SOC medium:

Διάλυμα SOB	990ml
Glucose (2M)	10ml
Ντελ	1Lt

3.1.9. Επίστρωση τρυβλίων με τα μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και επιλογή των αποικιών που περιέχουν τον κλωνοποιημένο φορέα.

Αφού πραγματοποιήθηκε ο μετασηματισμός, έγινε επίστρωση τρυβλίων (LB άγαρ, με προσθήκη καναμυκίνης σε $C_{τελ}=30 \mu\text{g/ml}$) με 50μl και 150μl μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων αντίστοιχα, υπό φλόγα, και επώασή τους στους 37° C για περίπου 12-16h. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, έγινε δημιουργία μικρών, υγρών βακτηριακών καλλιιεργειών με ενοφθαλμισμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία, σε LB broth (καναμυκίνη 30μg/ml) και επώασή τους στους 37 °C, υπό ανάδευση στις 210rpm, O/N.

Προκειμένου να επαληθεύσουμε ότι τα βακτηριακά κύτταρα μετασηματίστηκαν με τον κλωνοποιημένο φορέα pEGFP-C2—wtPARN και όχι με άδειο πλασμίδιο pEGFP-C2, το οποίο προκύπτει με επανακυκλοποίησή του, έγινε πέψη του πλασμιδιακού DNA μετά την ανάκτησή του με απομόνωση μικρής κλίμακας. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πηκτή αγαρόζης 1% και επιλογή των αντίστοιχων δειγμάτων που περιείχαν τον κλωνοποιημένο φορέα για αποστολή για αλληλούχιση.

3.2. Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (competent cells).

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CaCl_2 .

- Αρχικά σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB Broth ενοφθαλμίζονται τα κύτταρα που επιθυμούμε να καταστήσουμε επιδεκτικά. Στην περίπτωση των κυττάρων XL1Blue προστίθεται στο θρεπτικό υλικό και το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml). Οι υγρές καλλιέργειες έπειτα τοποθετούνται στους 37 °C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες (over night).
- Από την over night καλλιέργεια λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml θρεπτικό LB Broth. Έπειτα από ήπια ανάδευση, φωτομετρείται 1 ml από την καλλιέργεια στα 600 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD_{600}) πρέπει να είναι γύρω στο 0,04. Ακολούθως η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C και στις 210 rpm. Πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις άνα τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου η οπτική απορρόφηση είναι $OD_{600}=0,4-0,7$, καθώς τα κύτταρα στο σημείο εκείνο βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους.

- Τα 100 ml της καλλιέργειας των κυττάρων μοιράζονται σε δύο αποστειρωμένα και παγωμένα falcons των 50 ml (υπό φλόγα) και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίζημα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 30 ml διάλυμα MgCl₂-CaCl₂ (80 mM/20 mM) και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Τα falcons φυγοκεντρώνονται εκ νέου στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl₂ 0.1 M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
- Εισάγονται 70 µl DMSO σε κάθε falcon και ακολουθεί ανάδευση (το DMSO διατηρεί τα κύτταρα δεκτικά για περισσότερο διάστημα και εμποδίζει τυχόν διαφυγή των τμημάτων τους). Έπειτα αφήνονται στον πάγο για 15 λεπτά.
- Προστίθενται άλλα 70 µl DMSO στα falcons και αφού αναδευτούν, τοποθετούνται στον πάγο.
- Πολύ γρήγορα μοιράζεται η ποσότητα των επιδεκτικών κυττάρων (200 µl ανά σωλήνα των 1.5 ml) και τα aliquots τοποθετούνται προς φύλαξη στους -80 °C.

3.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Βακτηριακά κύτταρα (συνήθως από stock γλυκερόλης), συνήθως DH5α ή XL1Blue που φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο, ενοφθαλμίζονται σε 3ml LB broth που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργείων για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*, NucleoSpin Plasmid Quick Pure:

1) Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρώνονται για 30s στις 11000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.

2) Λύση των κυττάρων:

Προστίθενται 250µl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250µl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3

λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

3) Δέσμευση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin (Plasmid QuickPure σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρωση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

4) Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα.

5) Έκλυση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 x g. Το προϊόν της έκλυσης φυλάσσεται στους -20°C.

3.4. Μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης όλων των δειγμάτων DNA της παρούσας εργασίας έγινε με τη βοήθεια του Qubit DNA BR Assay kit (Invitrogen), που είναι σχεδιασμένο για αποκλειστική εφαρμογή στο φθορισμόμετρο Qubit 2.0. Το συγκεκριμένο kit προσφέρει πολύ υψηλή ακρίβεια αλλά και μεγάλο εύρος στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων.

Η προετοιμασία των δειγμάτων DNA προκειμένου να είναι δυνατή η φωτομέτρησή τους μετά από υποβολή τους στο φθορισμόμετρο Qubit, γίνεται ως εξής:

Παρασκευής του Qubit working solution:

DNA reagent: Qubit buffer = 1:200 (μl)

Παρασκευή τελικού διαλύματος DNA:

Δείγμα DNA: Qubit working solution = [1-20]:[199-180] μl

Η καμπύλη αναφοράς γίνεται με τη βοήθεια της παρασκευής και της φωτομέτρησης δύο δειγμάτων DNA γνωστής συγκέντρωσης, τα οποία παρέχονται από το Qubit DNA assay kit (Qubit DNA Standard #1, Qubit DNA Standard #2). Η αναλογία των δύο δειγμάτων προς το Qubit working solution, είναι 10:190 μl, αντίστοιχα.

Το τελικό διάλυμα DNA, αφήνεται να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) για 2min, ο οποίος είναι ο ελάχιστος απαιτούμενος χρόνος επώασης των δειγμάτων πριν την φωτομέτρηση, ενώ οι 3 ώρες θεωρούνται ο μέγιστος χρόνος επώασης μέσα στον οποίο το Qubit 2.0 Fluorometer μπορεί να δώσει αξιόπιστες τιμές.

3.5. Δοκιμασία υποκυτταρικού εντοπισμού της PARN αγρίου τύπου (wild type PARN-wtPARN) με ανίχνευση φθορισμού- Κυτταροχημεία

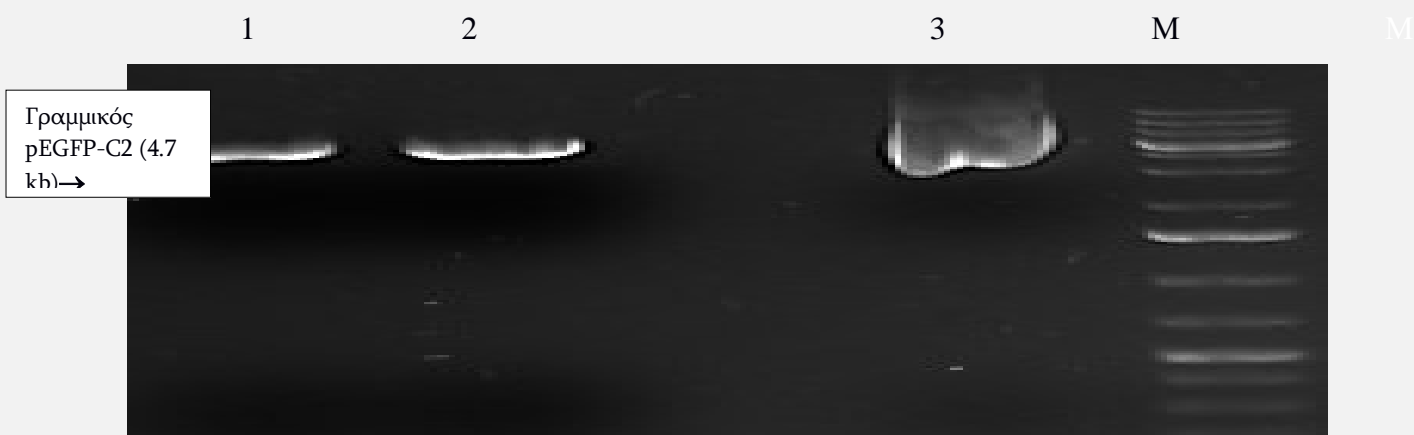
Πειραματική διαδικασία

- 1) Σε 2 πηγαδάκια (wells) ενός 24× well-plate τοποθετούνται καλυπτρίδες (coverslips). Τα πηγαδάκια αποστειρώνονται με έκθεση σε UV ακτινοβολία για 30 min, αφού προηγουμένως έχουν εκπλυθεί 2 φορές με Et OH 70 %. Η πλάκα ανάπτυξης κυττάρων (plate) τοποθετείται εντός του επωαστικού κλιβάνου (37°C, 5 % CO₂) μέχρι την ημέρα εφαρμογής του πρωτοκόλλου διαμόλυνσης.
- 2) Πρώτο βήμα στη διαδικασία της διαμόλυνσης αποτελεί η θρυψινοποίηση των κυττάρων (NCI-H520) μιας T25 flask, στην οποία η πληρότητα των κυττάρων είναι 95%-100%. Ακολουθεί υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων με τη χρήση μιας πλάκας Neubauer.
- 3) Σε κάθε well που φέρει καλυπτρίδα προσθέτουμε 15.000 θρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε σε κάθε well να έχουμε πληρότητα περίπου 50-70% μετά από ~24h επώασης στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδείκνυται για τη διαμόλυνση.
- 4) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το X-fect reagent, το οποίο περιέχει το X-fect Polymer και το X-fect Reaction Buffer. Το X-fect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσώματα και επιτρέπει τη διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών ικανοποιητική απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (Felger et al., 1994). Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και X-fect Polymer είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης.
- 5) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζουμε δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα X-fect mix σύμφωνα με τις εξής ενδείξεις: α. DNA mix: 1μg πλασμιδίου (pEGFP-C2-wtPARN ή pEGFP-C2-dmPARN) σε 25μl X-fect Reaction Buffer ανά well, β. X-fect mix: 0,3μl X-fect Polymer σε 25μl X-fect Reaction Buffer ανά well

- 6) Παρασκευή του transfection mix: Προσθέτουμε το DNA mix στο X-fect mix, πραγματοποιούμε vortex για 10 sec και τα αφήνουμε για επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Παράλληλα απομακρύνουμε από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και ξεπλένουμε τα κύτταρα με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1x (0,5ml) δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκητοκικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (0,25 ml RPMI/well).
- 8) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζουμε το τελευταίο με κυκλικό τρόπο στάγδην στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και αφήνουμε το 24-well plate να επωαστεί στους 37°C.
- 9) Μετά από 5-6h, απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστούμε μετά από δύο πλύσεις με 0,5ml PBS 1X, με 0,5ml φρέσκο RPMI (10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic).
- 10) 48h μετά τη διαμόλυνση τα 2 wells με τα διαμολυσμένα κύτταρα εκπλύνονται με PBS 1x και γίνεται σε αυτά προσθήκη διαλύματος PBS που περιέχει Hoechst 33342 (1:1000). Το Hoechst είναι μια χρωστική που εκπέμπει μπλέ φθορισμό όταν δεσμευτεί σε δίκλωνο DNA και χρησιμοποιείται συχνά στην μικροσκοπία φθορισμού για τον εντοπισμό των πυρήνων. Τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν στον κλίβανο παρουσία Hoechst, για περίπου 30 min. Ακολουθούν 2 πλύσεις των κυττάρων με PBS 1X.
- 11) Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της μονιμοποίησης. Από το στάδιο αυτό και έπειτα, δεν απαιτούνται στείρες συνθήκες. Η μονιμοποίηση γίνεται με την προσθήκη ψυχρής μεθανόλης (στους -20°C). Το 24-well plate ακολούθως τοποθετείται στους -20°C για 10 min.
- 12) Μετά από αναρρόφηση της μεθανόλης και 2 πλύσεις των μονιμοποιημένων πια κυττάρων με PBS 1X, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται (η επιφάνεια που φέρει τα κύτταρα "βλέπει" προς τα κάτω) με προσοχή με τη βοήθεια λαβίδας σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για τη στερέωση τους στην αντικειμενοφόρο πλάκα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS1X-γλυκερόλης 100% σε αναλογία 1:1. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται σε κασετίνα και σε σκοτεινό μέρος στους 4°C για τουλάχιστον 24 ώρες.
- 13) Στο τέλος πραγματοποιείται η μικροσκόπηση σε κατάλληλο μικροσκόπιο φθορισμού και η συλλογή εικόνων ((εικόνες 1 και 2) στα αποτελέσματα).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

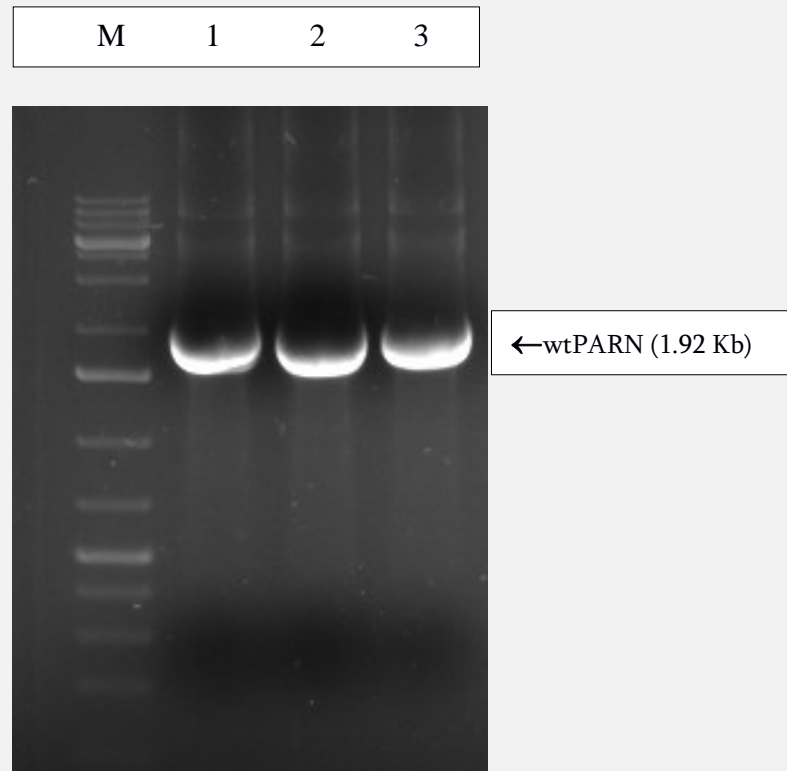
4.1. Αρχικά έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C2 με τη βοήθεια του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3., από υγρές καλλιέργειες μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο κυττάρων XL1Blue. Η επιβεβαίωση της απομόνωσης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Ακολούθησε η ενζυμική πέψη του φορέα pEGFP-C2 με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, προκειμένου να γραμμικοποιηθεί. Η EcoRI κόβει σε μια μοναδική θέση στην περιοχή πολυσυνδέτη του φορέα. Η επιβεβαίωση της πέψης έγινε και πάλι με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 15). Όπως μπορούμε να δούμε στην εικόνα, το αρνητικό control που χρησιμοποιήθηκε (άπεπτος φορέας), εμφανίζει ένα μικρό smear (διαδρομή 3), το οποίο οφείλεται στην διάφορες μορφές υπερ ελίκωσης στις οποίες μπορεί να βρίσκεται ο άκοπος, κυκλικός φορέας, σε αντίθεση με το γραμμικοποιημένο πλασμίδιο, το οποίο εμφανίζει μία ξεκάθαρη ζώνη κοντά στις 5kb.



Εικόνα 16: Αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης του προϊόντος της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C2, με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Διαδρομές 1,2: φορέας που έχει υποστεί πέψη. Διαδρομή 3: άπεπτος φορέας. M: ladder 1Kb.

Παράλληλα έγινε αντίδραση ενίσχυσης του cDNA της PARN φυσικού τύπου με απλή PCR. Το θερμικό προφίλ και τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης παρατίθενται στην παράγραφο 3.1.3. Ως υπόστρωμα για την αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET-33b που φέρει το cDNA της PARN. Οι εκκινητές ήταν ειδικά σχεδιασμένοι βάσει των οδηγιών της παραγράφου 3.1.2., έτσι ώστε να παράγουν στα άκρα του cDNA της PARN, τμήματα 15 bp ομόλογα προς τα άκρα του γραμμικοποιημένου, μετά από πέψη με EcoRI, φορέα pEGFP-C2. Η εικόνα που

προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αгарόζης 1,5 %, επιβεβαίωσε την ορθότητα της ενίσχυσης εφόσον είναι ευδιάκριτη μια ειδική ζώνη που αντιστοιχεί στις 1,92 kb, όσο, δηλαδή, είναι και το αναμενόμενο μέγεθος του cDNA της PARN (Εικόνα 17).



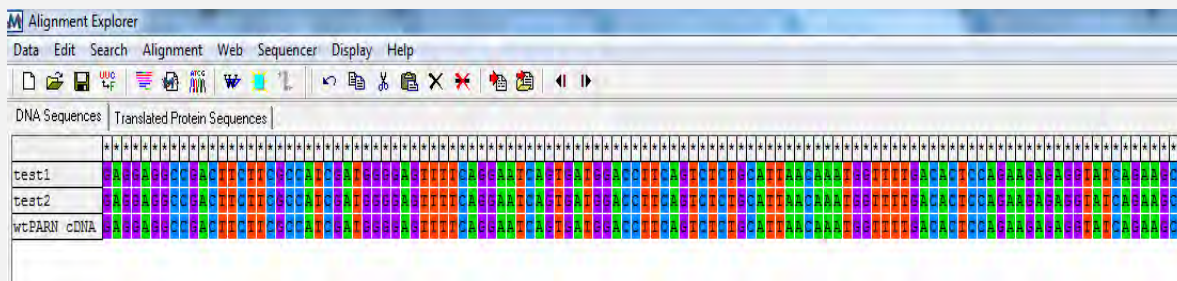
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αгарόζης 1,5%. Διακρίνεται καθαρά η ειδική ζώνη στις 1,92kb που αντιστοιχεί στο cDNA της PARN. M: μάρτυρας DNA 1Kb. Διαδρομές 1,2,3: Προϊόντα ενίσχυσης PCR.

Αφού επαληθεύτηκε η πέψη του πλασμιδίου pEGFP-C2 και η ενίσχυση του ειδικού προϊόντος της PCR, προβήκαμε σε ανάκτηση του DNA από την πηκτή αгарόζης χρησιμοποιώντας το PCR gel extraction clean-up kit (βλ. παρ. 3.1.4.). Στη συνέχεια, το DNA που ανακτήθηκε, φωτομετρήθηκε με τη βοήθεια του Qubitds DNA Broad Range Assay kit για προσδιορισμό της συγκέντρωσης του.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού, προκειμένου τα άκρα του γραμμικού πλασμιδίου pEGFP-C2 να ανασυνδυαστούν με τα ομόλογά τους άκρα όπως προστέθηκαν στο γονίδιο της wtPARN μετά από ενίσχυσή του με ειδικούς PCR εκκινητές (βλ. Εικόνα 3, παρ. 3.1.2). Τα επιμέρους συστατικά και οι συνθήκες της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού περιγράφονται στην παράγραφο 3.1.5. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως ο

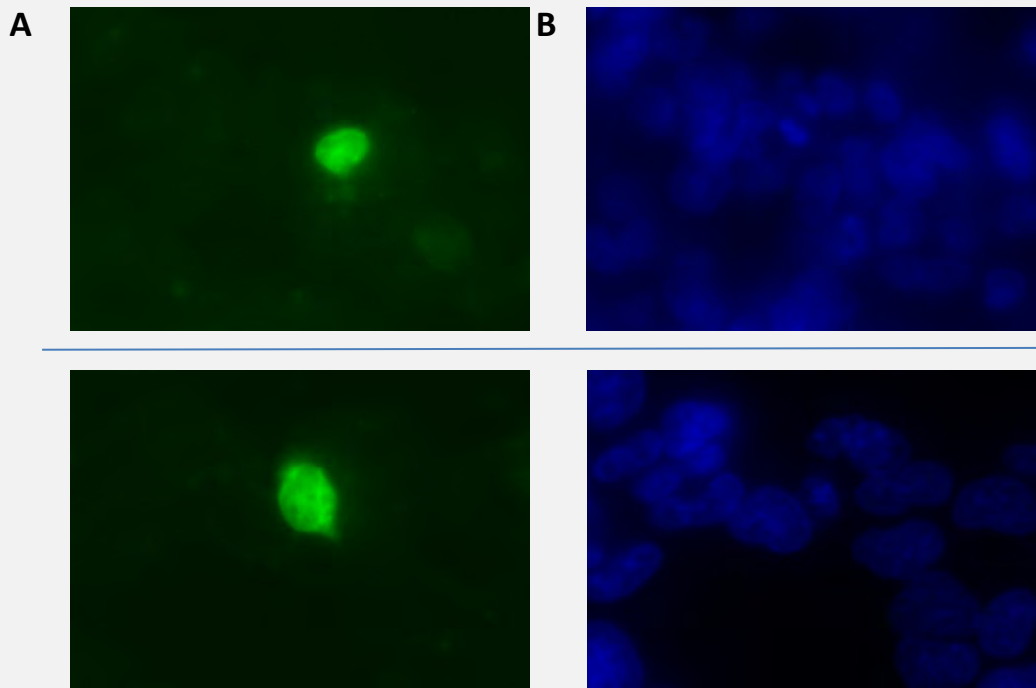
χρόνος επώασης ήταν 30 λεπτά, ενώ τηρήθηκε και η αναλογία 3:1 μεταξύ wtPARN DNA και pEGFP-C2 DNA.

Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue με 5μl του προϊόντος της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού σύμφωνα με την παρ. 3.1.6. Στη συνέχεια, έγινε επίστρωση τρυβλίων (LB άγαρ, με προσθήκη καναμυκίνης), υπό φλόγα, με 50μl και 150μl αντίστοιχα από την αντίδραση μετασχηματισμού, και επακόλουθη επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για περίπου 12-16h. Μετά το πέρας των 16 ωρών, έγινε δημιουργία μικρών βακτηριακών καλλιέργειών με ενοφθασμισμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία (συνολικά 5), σε LB broth (με καναμυκίνη) και επώασή τους στους 37 °C, υπό ανάδευση στις 210rpm, O/N. Από τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας. Το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε ηλεκτροφόρηση 1%. Ο έλεγχος της θετικότητας των πλασμιδίων (δηλαδή αν φέρουν το cDNA της PARN) έγινε με PCR. Από τα 5 δείγματα που ελέγχθηκαν, στα 2 είχαμε ειδική ενίσχυση προϊόντος στο αναμενόμενο μήκος των 1,92 Kb που αντιστοιχεί στο μέγεθος του cDNA της PARN. Τα δύο αυτά «θετικά» πλασμίδια στάλθηκαν για ανάλυση αλληλούχισης, η οποία και επιβεβαίωσε την επιτυχία της κλωνοποίησης της PARN αγρίου τύπου στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C2 (Εικόνα 18). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης (sequencing) έγινε με το πρόγραμμα MEGA 3.1.

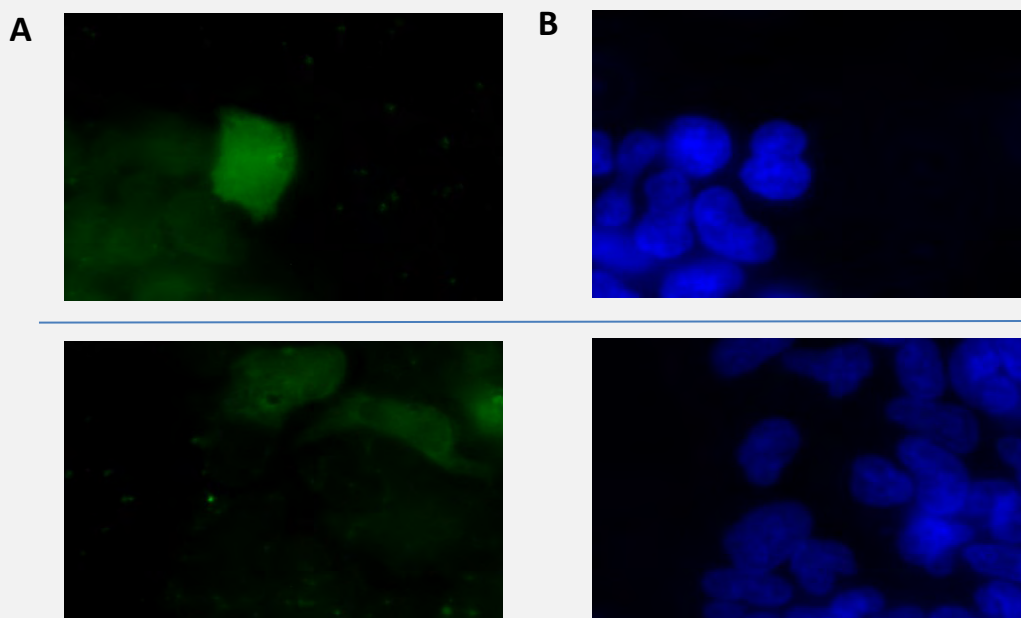


Εικόνα 18: Αποτελέσματα αλληλούχισης των 2 θετικών κλώνων (test 1 και 2). Από την αλληλούχισή τους με την αλληλουχία του cDNA της PARN αγρίου τύπου, όπως αυτή ανακτήθηκε από το NCBI, επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της ένθεσης στον φορέα pEGFP-C2. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ομοπαράθεση των αλληλουχιών και την ανάλυση των χρωματογραμμάτων είναι το MEGA 3.1.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση σε κύτταρα NCI-H520. Στη συνέχεια, ακολούθησε δοκιμασία υποκυτταρικού εντοπισμού με μικροσκοπία φθορισμού, με το πρωτόκολλο της σελίδας 43 (βλέπε εικόνες 1 και 2).



Εικόνα 1: Διερεύνηση της κυτταρικής εντόπισης της PARN αγρίου τύπου (wtPARN) σε κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με pEGFP-C2-wtPARN. (A) Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο φθορισμός που προέρχεται από την wtPARN και (B) με μπλέ χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων (χρώση Hoechst). Η μονιμοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με ψυχρή μεθανόλη.



Εικόνα 2: Διερεύνηση της κυτταρικής εντόπισης της PARN αγρίου τύπου (wtPARN) σε κύτταρα NCI-H520 διαμολυσμένα με pEGFP-C2-dmPARN. (A) Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο φθορισμός που προέρχεται από την dmPARN και (B) με μπλέ χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων (χρώση Hoechst). Η μονιμοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με ψυχρή μεθανόλη.

Από τις παραπάνω εικόνες διαπιστώνουμε πως τόσο η PARN φυσικού τύπου όσο και η dmPARN εμφανίζουν διάχυτο κυτταρικό φθορισμό δηλαδή, εντοπίζονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων NCI-H520. Εντούτοις, στις εικόνες που ελήφθησαν από τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με pEGFP-C2-dmPARN, φαίνεται πως το σήμα φθορισμού που λαμβάνουμε από τον πυρήνα είναι ασθενέστερο εν συγκρίσει με το αντίστοιχο σήμα από το κυτταρόπλασμα. Βέβαια, για να εξάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα για την επίδραση της διπλής μετάλλαξης R99A και Q109A στον υποκυτταρικό εντοπισμό της PARN, κρίνεται απαραίτητο να επαναληφθούν τα πειράματα κυτταροχημείας και σε άλλες κυτταρικές σειρές (π.χ. HeLa), να βελτιωθεί η απόδοση της διαμόλυνσης και να ληφθούν περισσότερες εικόνες από το μικροσκόπιο φθορισμού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, J.S.J. & Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17: 1497–1506 (1998).
- Balatsos et al. 2012
- Berndt et al. 2012
- Bernstein et al. 1989
- Cao, D. & Parker, R. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113: 533–545 (2003).
- Chen, C.Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464 (2001).
- Copeland, P.R. & Wormington, M. The mechanism and regulation of deadenylation: Identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7: 875–886 (2001).
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. & Wahle, E. Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19: 1079–1086 (2000).
- Dodson, R.E. & Shapiro, D.J. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 129–164 (2002).
- Frischmeyer, P.A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295: 2258–2261 (2002).
- Ford et al. 1999
- Ford and Wilusz 1999
- Gao, M, Fritz, D.T., Ford, L.P. & Wilusz, J. Interaction between a Poly(A)-Specific Ribonuclease and the 5' Cap Influences mRNA Deadenylation Rates *In Vitro*. *Mol. Cell* 5: 479-488 (2000).
- Garneau, N., Wilusz, J. & Wilusz, C. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 113–126(2007).
- Gevher et al. 2010
- Ghou et al. 2006
- Goldstrohm & Wickens. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Publishing Group* Vol 9:337-344 (2008).
- Hoof van, A. & Parker, R. The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* (1999).
- Hook, B., Goldstrohm, A. C., Seay, D. J. & Wickens, M. Two yeast PUF

proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282: 15430–15438 (2007).

- Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. Translational control of maternal cyclin B mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134: 1519–1527 (2007).
- Kim and Lee 2009
- Kim and Richter 2007
- Kiss et al. 2010
- Körner, C.G. & Wahle, E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 272: 10448–10456 (1997), (1997), (1998).
- Lai, W.S., Kennington, E.A. & Blackshear, P.J. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3798–3812 (2003), (1999), (2000).
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X. & Kiledjian, M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* 21: 4699–4708 (2002).
- Maragozidis et al. 2012
- Marchler- Bauer et al. 2011
- Marcotrigiano et al. 1997
- Martínez J., Ren Y., Thuresson, A., Hellman, U. Åström, J. & Virtanen, A. A 54- kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease. *J. Biol. Chem.* 275: 24222–24230 (2000).
- Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. & Virtanen, A. The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* 276: 27923–27929 (2001).
- Maquat, L.E. & Carmichael, G.G. Quality control of mRNA function. *Cell* 26: 173–176 (2000).
- Matera et al 2007
- Meyer, S. , Temme, C. & Wahle, E. Messenger RNA Turnover in Eukaryotes: Pathways and Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39:197–216 (2004)
- Mian 1997
- Mitchell, P. & Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 320–325 (2001).
- Mitchell, P. & Tollervey, D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* (2003).
- Monecke et al 2008
- Moore, M.J. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108: 431–434 (2002).

- Moraes et al 2006
- Moser et al 1997
- Muhlrاد, D. & Parker, R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578–581 (1994).
- Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* 21: 165–174 (2002).
- Nagata et al. 2008
- Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Balatsos, N.A., Kokkoris, K., Eriksson, J., Virtanen, A. A multifunctional RNA recognition motif (RRM) in poly(A)-specific ribonuclease (PARN) with cap and poly(A) binding properties. *J. Biol. Chem.* (2007).
- Nossal and Singer 1968
- Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 121–127(2004).
- Reinhardt et al. 2010
- Ren, Y.-G., Martínez, J. & Virtanen, A. Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe²⁺-mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 277: 5982–5987 (2002).
- Schoenberg and Maquat , 2012
- Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T. & Katada, T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 22: 3951–3959 (2003)
- Tran et al. 2003
- Tucker, M. & Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 571–595 (2000).
- Uhlen et al. 2010
- Van Hoof et al. 2002
- Virtanen et al. 2013
- Wang, Z. & Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107: 751–762 (2001).
- Wilusz et al. 2001
- Wormington et al. 1996
- Wu and Brewer 2012
- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E. & Song, H. Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J* 24: 4082-4093 (2005).

- Wu, M. et al. Structural basis of m⁷GpppG binding to Poly(A)-specific ribonuclease. *Structure* , 17: 276-286 (2009).
- Yamashita et al. 2005
- Zhang et al. 2007, 2010
- Zhu et al. 2011
- Zuo and Deatscher , 2001