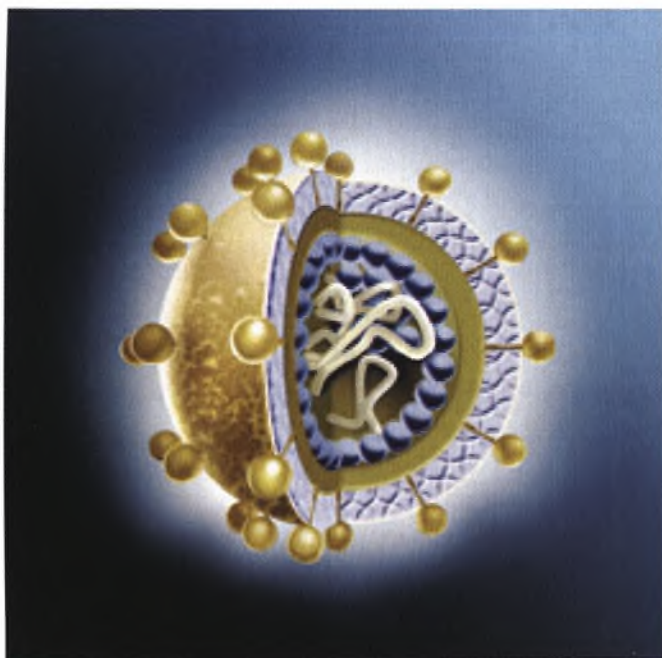


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Λειτουργική μελέτη του γονιδίου core του ιού της ηπατίτιδας C



Άιχερ Στεφανή

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ Μαρκουλάτος Π.

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8232/1
Ημερ. Εισ.: 27-04-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΑΙΧ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087087

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur, με επιβλέποντες τον Δρ. Κακκανά Αθανάσιο (Ε.Λ.Ε Β'), την Δρ. Μαυρομαρά Πηνελόπη (Ερευνήτρια Α') και υπεύθυνο καθηγητή τον Δρ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέποντες καθηγητές:

Δρ. Κακκανάς Αθανάσιος, Ε.Λ.Ε Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur.

Δρ. Παναγιώτης Μαρκουλάτος, Καθηγητής-Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δρ. Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας - Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

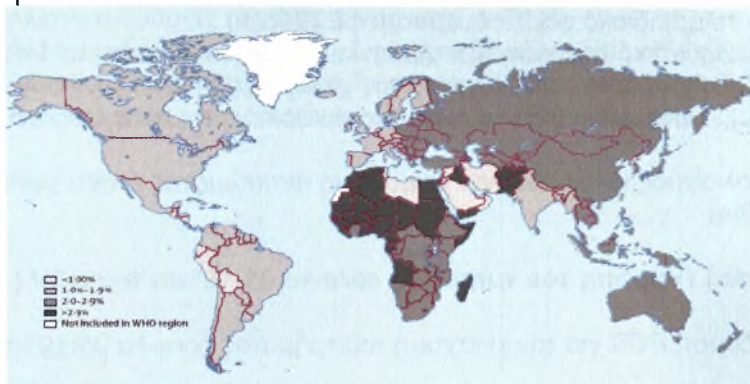
“Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κακκανά Αθανάσιο, Ε.Λ.Ε Β', που με την βοήθεια του, επιστημονική και ηθική, έγινε δυνατή η διεξαγωγή της διπλωματικής αυτής εργασίας στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μαυρομαρά Πηνελόπη (Ερευνήτρια Α') η οποία που έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία σε αυτό το εργαστήριο. Επιπλέον, ευχαριστήσω τον Δρ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη που ήταν ο υπεύθυνος καθηγητής αυτής της διπλωματικής εργασίας και με ενέπνευσε με την διδασκαλία του να ασχοληθώ με αυτό τον τομέα. Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur για τη βοήθεια τους”

1. Εισαγωγή	3-24
1.1. Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV)	3-5
1.2. Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C	5-6
1.3. Πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας C	6-7
1.4. Ο κύκλος ζωής του ιού της ηπατίτιδας C	7-9
1.5. Πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C	10-24
1.5.1. Ιδιότητες της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C	10-13
1.5.2. Πρωτεΐνη core και αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα	13-15
1.5.3. Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C	16-24
1.5.3.1. Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης core με RNA	16-17
1.5.3.2. Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης core με άλλες πρωτεΐνες του HCV	17-18
1.5.3.3. Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης core με κυτταρικές πρωτεΐνες	18-22
1.5.3.4. Ένα νέο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών core του HCV	23-24
2. Σκοπός της εργασίας	26
3. Υλικά και Μέθοδοι	28-54
3.1. Υλικά	28-36
3.1.1. Χημικές ουσίες	28
3.1.2. Αντιβιοτικά	28
3.1.3. Αντισώματα και adjuvant	28-29
3.1.4. Θρεπτικά υλικά	29
3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα	29-31
3.1.6. <i>E.coli</i> κυτταρικές σειρές	31
3.1.7. Πλασμιδιακοί φορείς	31-33
3.1.8. Στήλες χρωματογραφίας	34-35
3.1.9. Εκκινητές	35
3.1.10. Εκμαγεία για κλωνοποίηση	35-36
3.1.11. Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές	36
3.2. Μέθοδοι	37-54
3.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	37-38
3.2.2. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (ligation)	38
3.2.3. Απομόνωση κομματιών DNA από πήκτωμα ακρυλαμιδίου (DNA fragment extraction from acrylamide gels)	38-39
3.2.4. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης πλασμιδιακών φορέων (CIAP)	39
3.2.5. Προετοιμασία <i>E.coli</i> για μετασχηματισμό	39-40
3.2.6. Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation)	40
3.2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)	40-41
3.2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα, (large preparation) – Μέθοδος λύσης με άλαλι	41
3.2.9. Καθαρισμός DNA	41-43
3.2.10. Διαχωρισμός του DNA με βάση το μέγεθος	43-45
3.2.11. Πέψη με ένζυμα περιορισμού	45
3.2.12. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	46-47
3.2.13. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνη (Μέθοδος Transfer)	47-48
3.2.14. Western blotting (Τεχνική ανοσοαποτύπωσης)	48-49
3.2.15. Παραγωγή και καθαρισμός πρωτεϊνών core του HCV	49-51
3.2.16. Εμβολιασμοί κουνελιών για παραγωγή αντισώματος	51-52
3.2.17. Παροδικός μετασχηματισμός ευκαρυωτικών κυττάρων (polyplpus transfection)	52-53
3.2.18. Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων για Western blot	53-54
3.2.19. Ηλεκτρονικά προγράμματα	54

Αποτελέσματα	55-78
4.1. Προκαρυωτική έκφραση και παραγωγή αντισώματος έναντι των πρωτεϊνών core-1α 1-120αα και 91-191αα	55-71
4.1.1. Αντίδραση PCR για την ενίσχυση των τμημάτων core-1α 1-120αα (υδρόφιλη περιοχή της πρωτεΐνης) και core-1α 91-191αα (περιοχή της “mini-core”) της ηπατίτιδας C	56-57
4.1.2. Κλωνοποίηση των τμημάτων core-1α 1-120αα και core-1α 91-191αα της ηπατίτιδας C στον πλασμιδιακό φορέα pUC19	57-59
4.1.3. Κλωνοποίηση των τμημάτων core-1α 1-120αα και core-1α 91-191αα της ηπατίτιδας C στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET20b(+)	59-65
4.1.4. Προκαρυωτική έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών core-1α 1-120 και core-1α 91-191αα	
4.1.4.1. Προκαρυωτική έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης core-1α 1-120αα	65-66
4.1.4.2. Προκαρυωτική έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης core-1α 91-191αα	67-69
4.1.5. Εμβολιασμός κουνελιών για παραγωγή αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης core-1α 1-120αα	69-71
4.2. Ευκαρυωτική έκφραση του τμήματος core-1α 91-191αα του HCV (περιοχή “mini core”)	
4.2.1. Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του τμήματος core-1α 91-191αα του HCV	72
4.2.2. Κλωνοποίηση του τμήματος core-1α 91-191αα του HCV στον πλασμιδιακό φορέα pUC19	72-74
4.2.3. Κλωνοποίηση του τμήματος core-1α 91-191αα του HCV στον πλασμιδιακό φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης pCI	74-77
4.2.3. Έκφραση των τμημάτων 91-191αα, 1-120αα και 1-191αα του γονιδίου core του HCV σε κυτταρικές σειρές BHK-21	77-78
5. Συζήτηση	79-81
6. Βιβλιογραφία	83-86

1.1 Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV)

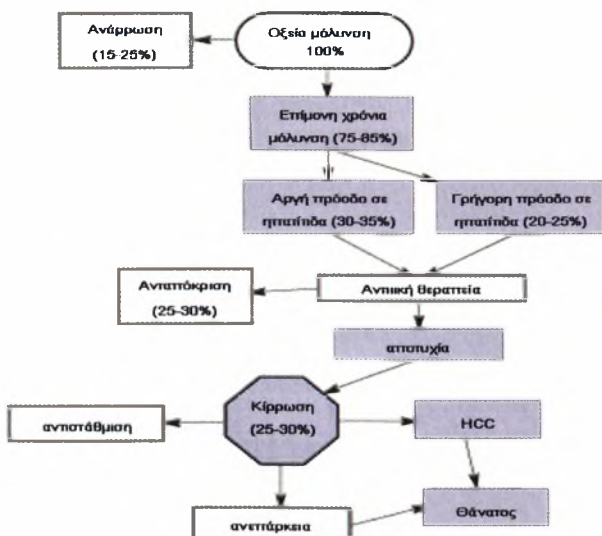
Είκοσι χρόνια μετά την ανακάλυψη του, ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) έχει μολύνει 170 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) υπολογίζει ότι το λιγότερο το 3% του παγκόσμιου πληθυσμού είναι χρόνια μολυσμένο με τον ιό της ηπατίτιδας C^[1]. Ο ιός της ηπατίτιδας C μεταδίδεται με άμεση επαφή με μολυσμένο αίμα ή προϊόντα του αίματος. Παρά τις εντατικές προσπάθειες, ένα προστατευτικό εμβόλιο δεν είναι ακόμα διαθέσιμο και οι θεραπευτικές δυνατότητες είναι περιορισμένες. Η παρούσα θεραπεία με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-α (PEG-IFN-α) σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη έχει ως αποτέλεσμα μια επίμονη ιολογική απόκριση στο 20–80% των ασθενών ανάλογα το γενότυπο του ιού^[2].



Εικόνα 1: Εκτίμηση της εξάπλωσης την μόλυνσης με τον ιό της ηπατίτιδας C στις χώρες μέλη του παγκόσμιου οργανισμού υγείας^[3].

Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό (~20%), των μολυσμένων ατόμων με τον ιό της ηπατίτιδας C μπορούν να λύσουν την μόλυνση φυσιολογικά. Παρόλο που μετά την αρχική μόλυνση με τον ιό αναπτύσσεται ειδική ανοσία, αυτή συχνά αποτυγχάνει να τον περιορίσει^[4-5]. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του ιού αυτού είναι ότι μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια μόλυνση την πλειονότητα των ασθενών (~80%), παρά το γεγονός ότι ανιχνεύεται και στοχεύεται από έμφυτους, κυτταρικούς και χημικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού^[6].

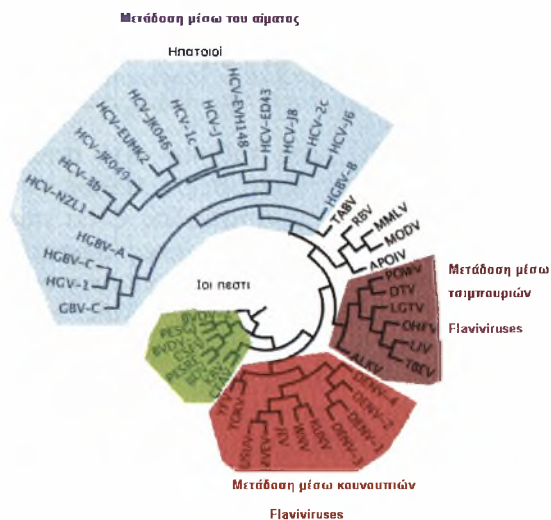
Ο ιός της ηπατίτιδας φαίνεται ότι έχει αναπτύξει πολλές στρατηγικές ενάντια στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Η μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C παρουσιάζει μια αργή κλινική πρόοδο. Άτομα με χρόνια μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C συχνά δε εμφανίζουν κανένα σύμπτωμα. Κάποιοι ασθενείς μπορεί να αναφέρουν μη ειδικά συμπτώματα όπως κόπωση, μυϊκοί πόνοι, ναυτία και ανορεξία. Σε ένα σημαντικό αριθμό χρόνια μολυσμένων ασθενών η ηπατική νόσο αναπτύσσεται αργά από ίνωση σε κίρρωση (σε μια περίοδο πάνω από 20-30 χρόνια) και τελικά οδηγεί σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) ή καρκίνο του ήπατος (Εικόνα 2). Κάποιοι από τους παράγοντες που επιταχύνουν την πρόοδο της ασθένειας της ηπατίτιδας C είναι η πρόσληψη αλκοόλ, η ηλικία μόλυνσης και η ταυτόχρονη μόλυνση από άλλους ιούς (πχ. HBV και HIV). Ο ιός της ηπατίτιδας C είναι ο κύριος λόγος για χρόνια ηπατίτιδα, κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) παγκοσμίως^[4-5].



Εικόνα 2: Η πρόοδος της μόλυνσης με τον ιό της ηπατίτιδας C και το ποσοστό των μολυσμένων ασθενών που αναπτύσσουν το κάθε στάδιο της ασθένειας. Περίπου το ένα τρίτο των ανθρώπων που υποφέρουν από οξεία μόλυνση λύνουν την μόλυνση. Αντίθετα τα δυο τρίτα δεν καταφέρνουν να λύσουν την μόλυνση και μπορεί να αναπτύξουν κίρρωση και αργότερα να πεθάνουν από επιπλοκές της κίρρωσης ή από καρκίνο του ήπατος (πχ ηπατοκυτταρικό καρκίνο)^[7].

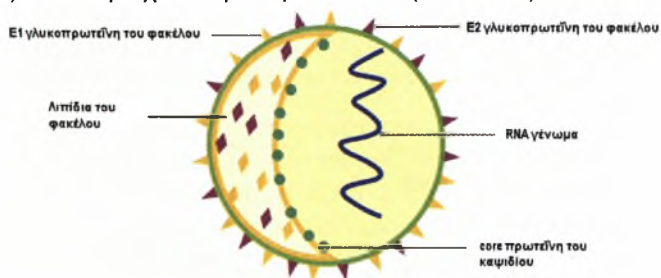
Ο ιός της ηπατίτιδας C ανήκει στην οικογένεια των Flaviviridae. Οι ιοί της οικογένειας αυτής διαδίδονται κυρίως μέσω των αρθρόποδων (κυρίως τσιμπούρια και κουνούπια) ή/και μέσω του αίματος και των παραγώγων του. Το όνομα της προέρχεται από τον ιό του κίτρινου πυρετού (flavus: κίτρινος στα λατινικά). Η οικογένεια των flaviών περιλαμβάνει τα ακόλουθα γένη (Εικόνα 3):

- ✓ Το γένος *Flavivirus* (ο ιός του κίτρινου πυρετού, διαφόρων τύπων, ο ιός του δυτικού Νείλου και του Δάγκειου πυρετού) – περιλαμβάνει 67 προσδιορισμένους ιούς ανθρώπων και ζώων.
- ✓ Το γένος *Hepacivirus* (ιός ηπατίτιδας C, GBV-C κα)
- ✓ Το γένος *Pestivirus* (ο ιός που προκαλεί διάρροια στα βοοειδή, η κλασική πανώλη ή τη χολέρα γουρουινιών) - περιέχει τους ιούς που μολύνουν άλλα θηλαστικά, εκτός των ανθρώπων.



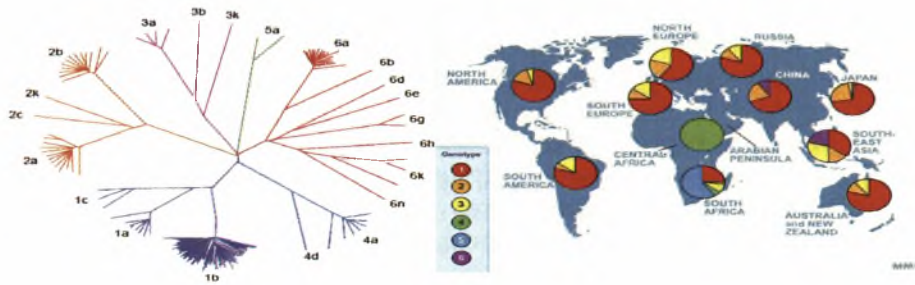
Εικόνα 3: Κλαδόγραμμα των ιών της οικογένειας των Flaviviridae. Διακρίνονται τα γένη *Flavivirus*, *Hepacivirus* και *Pestivirus*. Παρουσιάζεται επίσης ο τρόπος μετάδοσης των ιών αυτών.

Η οικογένεια των Flaviviridae, διαθέτει γραμμικά, μονόκλιωνα γονιδιώματα RNA θετικής πολικότητας, με μήκος 9.6-12.3 κιλοβάσεων. Τα 5'- άκρα κάποιων flaviviruses φέρουν ένα μεθυλιωμένο κάλυμμα (methylated nucleotide cap), ενώ άλλα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν μία εσωτερικής θέσης πρόσδεσης του ριβοσώματος (internal ribosome entry site - IRES). Τα ιοσώματα είναι σφαιρικά και διαθέτουν φάκελο, με διάμετρο περίπου 40-60 nm. Τα μέλη της οικογένειας Flaviviridae έχουν κοινά μερικά βασικά δομικά και ιολογικά χαρακτηριστικά. Είναι όλοι τυλιγμένοι με μια λιπιδιακή διπλοστοιβάδα στην οποία είναι αγκιστρωμένες μια ή περισσότερες πρωτεΐνες φακέλου (E1 και E2). Ο φάκελος περιβάλλει το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο αποτελείται από πολλαπλά αντίγραφα μιας μικρής βασικής πρωτεΐνης (core ή C), και περιέχει το γενωμικό RNA (Εικόνα 4)^[8].



Εικόνα 4: Μοντέλο της δομής του ιού της ηπατίτιδας C. Στην αριστερή πλευρά της εικόνας φαίνεται η επιφάνεια του ιοσώματος με τον φάκελο και τις γλυκοπρωτεΐνες (E1 και E2) και στην δεξιά πλευρά παρουσιάζεται το RNA γονιδίωμα που βρίσκεται ενκαψιδιωμένο από τις πρωτεΐνες του καψιδίου (core)^[8].

Ο HCV μπορεί να ταξινομηθεί σε έξι γενότυπους (Εικόνα 5) και να υποδιαιρεθεί σε τουλάχιστον σε 70 υπότυπους, οι οποίοι διαφέρουν περίπου 30% και 15% σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, αντίστοιχα. Ο υψηλός βαθμός γενετικής ετερογένειας σχετίζεται με την επιρροή σε λάθη RNA- εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και με τον υψηλό βαθμό αντιγραφής του ιού *in vivo*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι μολυσμένοι ασθενείς να διαθέτουν ένα πληθυσμό από ποικιλίες του ιού γνωστές ως quasispecies, οι οποίες εξελίσσονται σε απάντηση στις ποικίλες επιλεκτικές πιέσεις^[4].



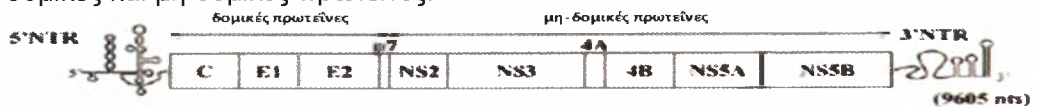
Εικόνα 5: Φυλογενετικό δέντρο των δημοσιευμένων ολόκληρων γονιδιωμάτων του ιού της ηπατίτιδας C (αριστερά). Στο φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζονται οι 169 ολόκληρες αλληλουχίες του HCV, που είναι διαθέσιμες από το Los Alamos Εθνικό Εργαστήριο (LANL) από την βάση δεδομένων για τον HCV. Οι αλληλουχίες του HCV χωρίζονται σε έξι διαφορετικές ομάδες (γενότυποι 1-6) και διαίρονται επιπλέον σε υπότυπους^[9]. Στην δεξιά εικόνα παρουσιάζεται η επικράτηση των έξι διαφορετικών γενότυπων παγκοσμίως^[10].

Οι γνώσεις μας για τον κύκλο ζωής του ιού της ηπατίτιδας C περιορίζονται λόγω της ανικανότητάς να καλλιεργηθεί ο ιός σε κυτταρική σειρά καθώς επίσης και από την έλλειψη μικρών-ζωικών μοντέλων. Ο κύκλος ζωής του ιού της ηπατίτιδας C θα πρέπει να γίνει καλύτερα κατανοητός έτσι ώστε να αναπτυχθούν νέες στοχευμένες φαρμακευτικές θεραπείες^[11].

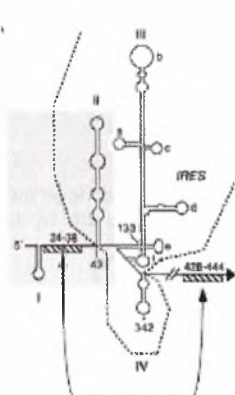
Πρόσφατα βρέθηκε ότι ένας κλώνος του γονοτύπου 2a, ο οποίος ονομάστηκε JFH-1^[106], μπορεί να αναπαράγεται σε Huh7 και άλλες κυτταρικές σειρές χωρίς την απαίτηση για τις προσαρμοστικές μεταλλάξεις. Δείχθηκε ότι κλωνοποιημένα γονιδιώματα του JFH-1 μετά από επιμόλυνση σε κύτταρα Huh7 παρήγαγαν ιό που μπορούσε να μολύνει άλλα κύτταρα Huh7, επιτρέποντας για πρώτη φορά μελέτες in vitro του πλήρους κύκλου ζωής του ιού. Ο ιός που παράγεται στην κυτταροκαλλιέργεια είναι μολυσματικός σε χιμπαντζήδες και στον άνθρωπο. Στα εκχυλίσματα των μολυσμένων αυτών κυττάρων μπορούν να βρεθούν όλες οι ιικές διαλυτές πρωτεΐνες.

1.2 Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C

Η δομική οργάνωση του γενώματος του HCV παρουσιάζεται στην Εικόνα 6. Το θετικής πολικότητας RNA του ιού περιλαμβάνει δυο αμετάφραστες περιοχές στα 5' και 3' άκρα (NTR) και μια εκτεταμένη μεταφραζόμενη περιοχή που περιέχει το εναρκτήριο κωδικόνιο και κωδικοποιεί μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια διασπάται από ιικές και κυτταρικές πρωτεάσες στις επιμέρους δομικές και μη-δομικές πρωτεΐνες.



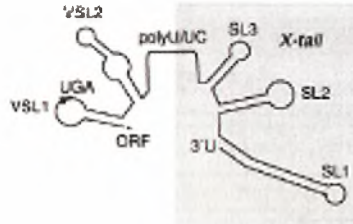
Εικόνα 6: Δομή του γενωμικού RNA του ιού της ηπατίτιδας C. Το θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA του HCV αποτελείται από την 5' αμετάφραστη περιοχή (5'NTR) (γραμμή), τις δομικές και μη-δομικές πρωτεΐνες τις πολυπρωτεΐνης που κωδικοποιούνται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (μέσα σε κουτί), και την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'NTR) (γραμμή). Η περιοχή της NS5B παρουσιάζεται επιμηκνυμένη τόσο ως κωδική περιοχή της πρωτεΐνης NS5B όσο και ως μια RNA αλληλουχία με πιθανή cis αλληλεπίδραση με στοιχεία του RNA^[14].



Η 5' αμετάφραστη περιοχή περιέχει περίπου 341 νουκλεοτίδια τοποθετημένα ανοδικά του εναρκτήριου κωδικονίου του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF). Είναι η πιο συντηρημένη περιοχή του γενώματος και περιέχει δομικές περιοχές, αριθμημένες από I έως IV, οι οποίες σχηματίζουν πολλές δομές στελέχους-βρόγχου και ένα ψευδοκομπο (Εικόνα 7)^[12]. Οι περιοχές II, III και IV μαζί με τα πρώτα 12 έως 30 nt της περιοχής που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη core αποτελούν την εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES-Internal Ribosome Entry Site) (Εικόνα 7)^[13]. Το IRES του ιού της ηπατίτιδας C έχει την δυνατότητα να σχηματίζει ένα σταθερό προ-εναρκτήριο σύμπλοκο με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα χωρίς την ανάγκη να χρησιμοποιηθούν όλοι οι κανονικοί μεταφραστικοί εναρκτήριοι παράγοντες, και αποτελεί το πρώτο βήμα για την μετάφραση της πολυπρωτεΐνης.

Εικόνα 7: Σχηματική παρουσίαση της 5' αμετάφραστης περιοχής (5'NTR) του HCV με τις δομές I έως IV. Οι ελάχιστες περιοχές που απαιτούνται για την αντιγραφή του RNA και την ενεργότητα του IRES παρουσιάζονται σε γκρι ορθογώνια και διακεκομμένες γραμμές, αντίστοιχα. Η δομή του ψευδοκομπο που δημιουργείται από το ζευγάρισμα των βάσεων ανάμεσα στην περιοχή του βρόγχου της δομής IIIf και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας που συνδέει τις περιοχές IIIf και IV επισημαίνεται με οριζόντιες γραμμές. Οι περιοχές που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις RNA:RNA μεγάλου μήκους παρουσιάζονται σε ένα ραβδωτό πλαίσιο και ένα βέλος^[18].

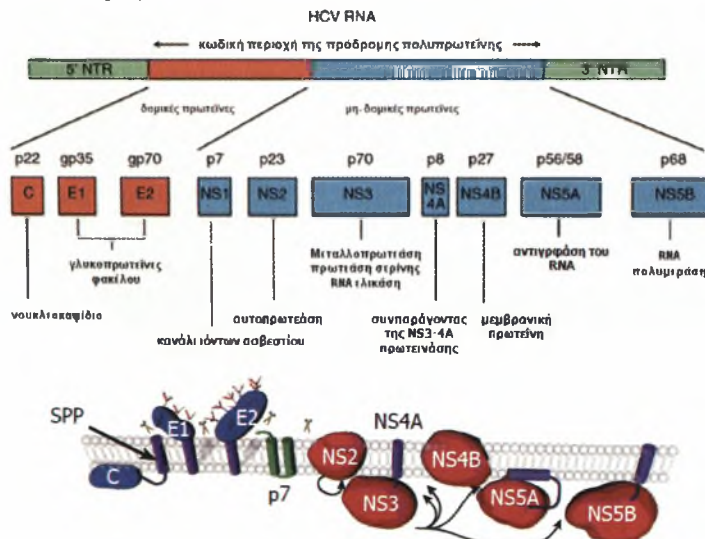
Η 3' αμετάφραστη περιοχή (3'NTR) περιέχει περίπου 225 νουκλεοτίδια. Είναι οργανωμένη σε τρεις περιοχές συμπεριλαμβανομένων από το 5' προς το 3', μια μεταβλητή περιοχή από περίπου 30-40 νουκλεοτίδια, μια μακριά poly(U)-poly(U/UC) περιοχή με ποικίλο μήκος και μια υψηλά διατηρημένη περιοχή 3'-άκρου από 98 νουκλεοτίδια (3'X περιοχή) η οποία περιέχει τρεις δομές stem-loop SL1, SL2 και SL3 (Εικόνα 8)^[15]. Η 3'αμετάφραστη περιοχή αλληλεπιδρά με την NS5B και με δυο από τις τέσσερις σταθερές δομές στελέχους-βρόγχου που τοποθετούνται στο 3' άκρο της περιοχής που κωδικοποιεί την NS5B^[14]. Η περιοχή 3' και 52 νουκλεοτίδια ανοδικά της poly(U/C) περιοχής βρέθηκε να είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του RNA, ενώ οι υπόλοιπες αλληλουχίες φαίνεται να ενισχύουν την ιική αντιγραφή^[16].



Εικόνα 8: Δομή της 3' αμετάφραστης περιοχής του ιού της ηπατίτιδας C Η δομή της 3' αμετάφραστης περιοχής (3'-NTR), που αποτελείται από μια μεταβλητή περιοχή με δομές στελέχους βρόγχου VSL1 και VSL2, το τμήμα πολυ(U/UC), και μια πολύ διατηρημένη αλληλουχία, την «ουρά»-X. Οι δομές στελέχους-βρόγχου είναι σύμφωνα με το μοντέλο των Blight and Rice (1997). Σημειώνεται επίσης το κωδικόνιο UGA στην κωδική περιοχή της πολυπρωτεΐνης στην περιοχή του βρόγχου VSL1^[16].

1.3 Πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας C

Το γένωμα του ιού της ηπατίτιδας C περιέχει ένα μεγάλο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που αποτελείται από 9024-9111 νουκλεοτίδια ανάλογα τον γενότυπο και κωδικοποιεί μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη που αποτελείται από περίπου 3010 αμινοξέα. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης περιέχει τουλάχιστον 11 πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των τριών δομικών πρωτεϊνών (C ή core, E1 και E2), μια μικρή πρωτεΐνη, την p7, της οποίας η λειτουργίες δεν έχει καθοριστεί ακόμα και 6 μη δομικές πρωτεΐνες (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B). Επίσης παράγεται η πρωτεΐνη F ή core+1 ή ARF^[107], η οποία πιθανόν είναι αποτέλεσμα εσωτερικής έναρξης της μετάφρασης μέσα στην κωδική περιοχή της core(Εικόνα 9, Πίνακας 1)^[18].



Εικόνα 9: (πάνω τμήμα) Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το γένωμα του ιού της ηπατίτιδας C. Το γένωμα του HCV περιέχει ένα μεγάλο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από περίπου 3010 αμινοξέα. Η μετάφραση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του ιού της ηπατίτιδας C πραγματοποιείται μέσω την 5' αμετάφραστης περιοχής (5' NTR) η οποία περιέχει περίπου 340 νουκλεοτίδια και λειτουργεί σαν εσωτερική θέση σύνδεσης του ριβοσώματος. Η πολυπρωτεΐνη διασπάται συν- και μετα μεταφραστικά από κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες σε τουλάχιστον 10 διαφορετικές πρωτεΐνες, με της δομικές πρωτεΐνες (core (C), E1 και E2) να βρίσκονται στο N-τελικό άκρο και τις μη-δομικές (NS2-5) πρωτεΐνες στον C-τελικό άκρο. Στην εικόνα παρουσιάζονται και οι πιθανές λειτουργίες των προϊόντων διάσπασης^[19]. (κάτω τμήμα) Η επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης και ο εντοπισμός των τουλάχιστον 10 πρωτεϊνών του HCV σε σχέση με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Τα φαλίδια αναφέρονται στις θέσεις κοπής από την ενδοπλασματική πεπτιδάση σινιάλου, το κυκλικό βέλος στην αυτοκαταλυτική διάσπαση της σύνδεσης NS2-NS και τα μαύρα βέλη στις θέσεις πέψης από το σύμπλοκο πρωτεασών NS3-NS4A. Το μεγάλο διαμεμβρανικό βέλος αντιστοιχεί στην διάσπαση από την πεπτιδάση σινιάλου και την αναδιευθέτηση των αντίστοιχων καρβοξυτελικών υδρόφοβων άκρων^[17].

Πρόσφατα στον κατάλογο των πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας C προστέθηκε και μια οικογένεια ισομορφών της πρωτεΐνης core, οι οποίες περιέχουν το C- τελικό άκρο της πρωτεΐνης core. Οι ισομορφές αυτές ποικίλουν στο μέγεθος από 8-14kDa και ονομάστηκαν πρωτεΐνες «mini-core». Θεωρείται ότι η μετάφραση τους ξεκινάει από μια εσωτερική θέση έναρξης στο αμινοξύ 91 της πρωτεΐνης core (για τις αλληλουχίες που έχουν ένα 91-AUG) ενώ για τις HCV αλληλουχίες που δεν περιέχουν AUG στο κωδικόνιο 91, πιστεύεται ότι η μετάφραση είτε ξεκινάει από ένα γειτονικό αμινοξύ ή από μη- κανονικό κωδικόνιο έναρξης. Το CUG είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα κανονικά αναρκτηρία κωδικόνια και είναι παρόν στο 95% όλων των αλληλουχιών του HCV καθοδικά του αμινοξέος 91^[20].

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας C και οι λειτουργίες τους στον κύκλο ζωής του ιού¹⁸

Πρωτεΐνες του HCV	Λειτουργία	Μοριακό βάρος
Core	Νουκλεοκαψίδιο	23(ανώριμη μορφή), 21(ώριμη μορφή)
F/ARF/core+1 πρωτεΐνη ^a	?	16-17
E1	Φάκελος, περιοχή σύντηξης	33-35
E2	Φάκελος, σύνδεση στον υποδοχέα, περιοχή σύντηξης?	70-72
p7	Κανάλι ιόντων ασβεστίου (viroporin)	7
NS2	Αυτοπρωτεάση	21-23
NS3	Τμήμα της NS2-3 και NS3-4A πρωτεϊνών, NTPάση/ελικάση	69
NS4A	Συμπαραγοντας της NS3-4A πρωτεϊνών	6
NS4B	Μεμβρανική πρωτεΐνη	27
NS5A	Αντιγραφή του RNA	56 (βασική μορφή) 58 (υπερφωσφορυλιωμένη μορφή)
NS5B	RNA- εξαρτώμενη RNA πολυμεράση	68

^aFrameshift/ εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης

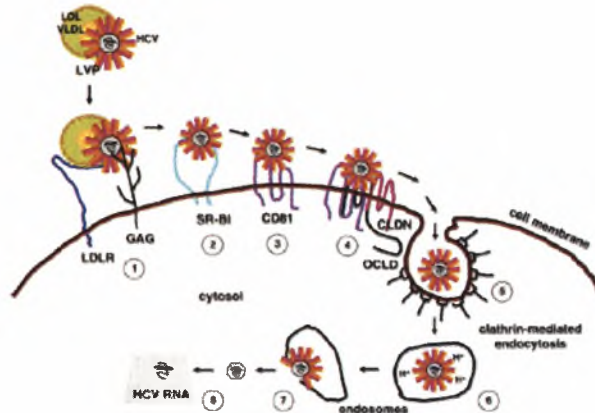
1.4 Κύκλος ζωής του ιού της ηπατίτιδας C

Προσκόλληση και είσοδος του ιού

Τα ιοσώματα του ιού της ηπατίτιδας C φαίνεται ότι εισέρχονται στο κύτταρο ξενιστή με μια διαδικασία που περιλαμβάνει μια σταδιακή προσκόλληση σε πολλούς παράγοντες εισόδου^[21]. Είναι πιθανόν κάθε βήμα να είναι απαραίτητο για να πραγματοποιηθεί το επόμενο, αλλά και για τον συντονισμό της διαδικασίας της εισόδου του ιοσώματος στο κύτταρο. Έχει αναφερθεί η συμμετοχή των πρωτεογλυκάνων^[22] και του υποδοχέα LDL (LDLR)^[23] ως παράγοντες προσκόλλησης έτσι ώστε να στρατολογηθεί ο ιός της ηπατίτιδας C στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, κάτι που συμφωνεί με το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες E1 και E2 είναι σημαντικά γλυκοσυλιωμένες^[21](Εικόνα 10, βήμα 1). Μετά την αρχική προσκόλληση στην μεμβράνη, τα σωματίδια του ιού φαίνεται να συνδέονται με υψηλή συγγένεια με παράγοντες εισόδου με ένα διαδοχικό τρόπο. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τον υποδοχέα scavenger BI (SR-BI), την τετρασπανίνη CD81 και πρωτεΐνες των στενοσυνδέσμων (TJ). Ο υποδοχέας SR-BI ανήκει στην οικογένεια των CD36 μεταφορέων λιπιδίων και ρυθμιστών της ομοίωσης των λιπιδίων και θεωρείται ότι είναι ο κύριος υποδοχέας των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL). Ο υποδοχέας SR-BI έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την διαλυτή E2 πρωτεΐνη με υψηλή συγγένεια^[24-25]. Μελέτες προτείνουν ότι οι υποδοχείς CD81 και SR-BI μπορεί να λειτουργούν συνεργιστικά μεσολαβώντας στην είσοδο του ιού της ηπατίτιδας C στο κύτταρο στόχο^[26]. Δύο πρωτεΐνες, που βρίσκονται στους στενοσυνδέσμους (TJ), η claudin (CLDN)^[27] και η occludin (OCLN)^[28], παίζουν ρόλο στην είσοδο του ιού της ηπατίτιδας C. Η OCLN φαίνεται να συνδέεται με την CLDN και να παίζει ρόλο στην διαπερατότητα των στενοσυνδέσμων. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η σύνδεση του ιοσώματος στην πρωτεΐνη CD81, προκαλεί αναδιάταξη της ακτίνης, μεσολαβούμενη από τις RhoGTPάσες και επιτρέπει την ακόλουθη κίνηση του σύμπλοκου ιοσώματος-CD81 στους στενοσυνδέσμους των ηπατοκυττάρων^[29]. Βρέθηκε επίσης, ότι η μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C αλλάζει την κατανομή των πρωτεϊνών των στενοσυνδέσμων, συμπεριλαμβανομένων των CLDN1, OCLN και ZO-1 μειώνοντας την συσσώρευση τους. Η OCLN παρουσιάζει μια σημαντική συσσώρευση

στο ενδοπλασματικό δίκτυο των μολυσμένων κυττάρων. Τόσο ο φυσιολογικός εντοπισμός, όσο και η οργάνωση των στενοσυνδέσμων ανακτάται με αντιική θεραπεία των κυττάρων^[30].

Τέλος, πρόσφατα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη EWI-2wint, ένα προϊόν διάσπασης της EWI-2 (συνδέεται με τον CD81), είναι ένας πιθανός αναστολέας την αλληλεπίδρασης E2-CD81^[31]. Παρόλο που η EWI-2wint εκφράζεται σε διάφορες κυτταρικές σειρές, δεν εκφράζεται σε ηπατικά κύτταρα. Για αυτό το λόγο είναι πιθανόν ο ηπατικός τροπισμός του ιού της ηπατίτιδας C να οφείλεται είτε στη παρουσία ενός ειδικού παράγοντα εισόδου, είτε στη απουσία ενός ειδικού αναστολέα της εισόδου^[32].



Εικόνα 10: Τα πιθανά βήματα για την είσοδο του ιού της ηπατίτιδας C στα ηπατοκύτταρα^[32].

Μετά την επιτυχημένη σύνδεση του ιού με τους παράγοντες εισόδου, ο ιός της ηπατίτιδας C φαίνεται να εισέρχεται στα κύτταρα με ενδοκύτωση μεσολαβούμενη από πρωτεΐνη κλαθρίνη (Εικόνα 10, βήμα 5)^[33-34]. Ο συνδυασμός αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς, το χαμηλό pH των ενδοσωμάτων (Εικόνα 10, βήμα 6), και η αμοιβαία συνεργασία των ιικών πρωτεϊνών E1 και E2, είναι πιθανόν να προκαλούν μια αλλαγή στην διαμόρφωση των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου, η οποία οδηγεί στην σύντηξη της μεμβράνης του ιού με την μεμβράνη του ενδοσώματος (Εικόνα 10, βήμα 7)^[35-37]. Αυτή η διαδικασία τελικά οδηγεί στην απελευθέρωση του νουκλεοκαπιδίου στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 10, βήμα 7).

Μετάφραση του γενώματος του ιού

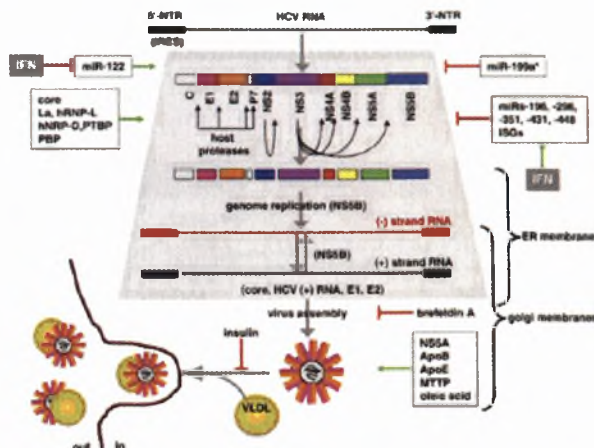
Η 5'-μη μεταφραζόμενη περιοχή (5'-NTR) του RNA του ιού της ηπατίτιδας C λειτουργεί σαν εσωτερική θέση σύνδεσης του ριβοσώματος (IRES)^[38], μια δομική περιοχή που αποτελείται από τέσσερις περιοχές οι οποίες είναι κρίσιμες για την ρύθμιση της μετάφρασης την πολυπρωτεΐνης και την ιική αντιγραφή (Εικόνα 9). Το IRES συνδέεται ακολούθως στην 40S ριβοσωμική υπομονάδα, στους ευκαρυωτικούς παράγοντες έναρξης 3 και 2, και στην 60S ριβοσωμική υπομονάδα με μια αντίδραση που εξαρτάται από GTP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του πρώτου πεπτιδικού δεσμού. Η ενεργότητα του IRES φαίνεται να τροποποιείται από ιικές^[39,108] και κυτταρικές (La, ετερόλογη ριβονουκλεοπρωτεΐνη L, poly-C και pyrimidine track-binding) πρωτεΐνες. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η ετερογενής (μη-καθαρή) ριβονουκλεοπρωτεΐνη D αυξάνει την ενεργότητα του IRES του ιού της ηπατίτιδας C μέσω σύνδεσης της στο τμήμα II της περιοχής στελέχους-βρόγχου της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής (5'-NTR)^[40]. Επιπλέον, το τμήμα I του IRES είναι ικανό να συνδέεται με ένα ειδικό για το ήπαρ microRNA (miR-122) το οποίο φαίνεται να ενισχύει την αντιγραφή του RNA του ιού της ηπατίτιδας C^[41].

Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη που δημιουργείται από την μετάφραση διασπάται από κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες^[38]. Κυτταρικές πρωτεάσες διασπούν τις δομικές πρωτεΐνες core, E1, E2 και p7, ενώ οι ιικές πρωτεάσες NS2/NS3 και NS3/4 δημιουργούν αντίστοιχα τις μη-δομικές πρωτεΐνες NS2 και NS3, και NS4A, NS4B, NS5A και NS5B^[32].

Αντιγραφή του γενώματος του ιού

Η αντιγραφή του γενώματος του ιού της ηπατίτιδας C θεωρείται ότι γίνεται μέσα σε σύμπλοκο που σχετίζονται σε τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και ξεκινάει με την RNA-εξαρτημένη RNA πολυμεράση (NS5B), η οποία μεσολαβεί στην σύνθεση της συμπληρωματικής αρνητικής αλυσίδας. Το σύμπλοκο, στην συνέχεια χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την σύνθεση της γενωμικής αλυσίδας RNA (θετική αλυσίδα) από το ίδιο ένζυμο (Εικόνα 11). Η συναρμολόγηση του σύμπλοκου αντιγραφής θεωρείται ότι ξεκινά στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου από την NS4B, μια

μεμβρανική πρωτεΐνη^[42]. Μελέτες του συμπλόκου αντιγραφής δείχνουν ότι η αντιγραφή του RNA του ιού της ηπατίτιδας C και των μη-δομικών πρωτεϊνών συνεντοπίζονται στις περιοχές των μεμβρανών του κυτταροπλάσματος. Οι μη-δομικές πρωτεΐνες σχηματίζουν σύμπλοκα τόσο στο ενδοπλασματικό δικτυό, όσο και τις μεμβράνες Golgi, και η αντιγραφή του RNA του ιού της ηπατίτιδας C πραγματοποιείται στις μεμβράνες του σωματιδίου Golgi^[43].

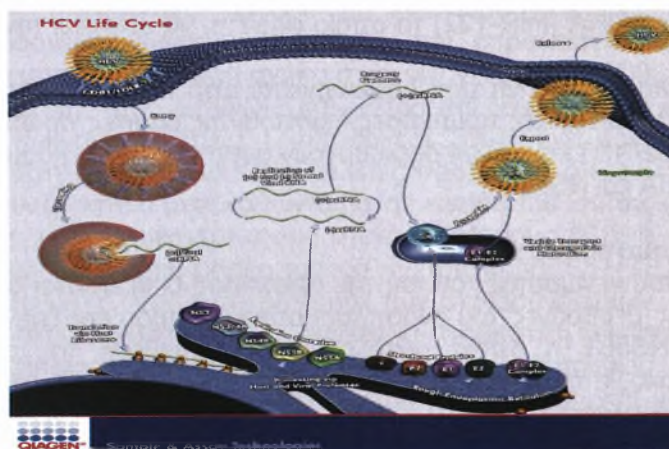


Εικόνα 11: Ο πιθανός μηχανισμός της αντιγραφής του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C^[32].

Η συναρμολόγηση των ισωμάτων

Ο μηχανισμός της συναρμολόγησης των ισωμάτων περιλαμβάνει: Τον ολιγομερισμό της καψιδιακής πρωτεΐνης και την αλληλεπίδραση της με τις περιοχές I και III (5'-NTR) καθώς και με τα νουκλεοτίδια 24 έως 41 του ιικού γενωμικού RNA. Ο ολιγομερισμός της πρωτεΐνης core φαίνεται ότι επιτυγχάνεται από τα αμινοξέα 72 έως 91 της πρωτεΐνης core^[45]. Μετά τον σχηματισμό του νουκλεοκαψιδίου, αυτό αλληλεπιδρά σε τις πρωτεΐνες του φακέλου E1 και E2 και εξέρχεται από το κύτταρο μέσω της πλασματικής μεμβράνης με εκβλάσηση. Με τον τρόπο αυτό συστατικά της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή παρουσιάζονται στην μεμβράνη του ιού^[46]. Η πρωτεΐνη NS5A επίσης φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αρχική φάση της συναρμολόγησης του ιού της ηπατίτιδας C λόγω της αλληλεπίδρασης της με την πρωτεΐνη core, μέσω μια ομάδας σερινών στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης NS5A^[47].

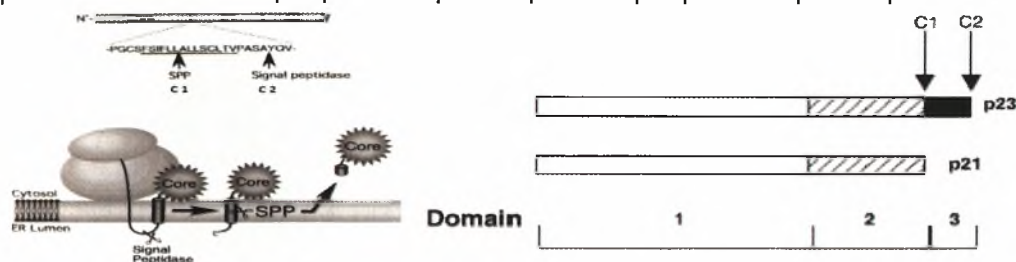
Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ο ιός της ηπατίτιδας C συναρμολογείται σε κυστίδια πλούσια σε λιποπρωτεΐνη ApoB και MTTP (μικροσωμική μεταφορική πρωτεΐνη τριγλυκεριδίων) και ότι η έκκριση του ιού εξαρτάται από τόσο την έκφραση της πρωτεΐνης ApoB, όσο και από τον σχηματισμό των ισωμάτων VLDL (Very-Low-Density Lipoproteins) σε τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου (Εικόνα 11)^[48]. Με τον τρόπο αυτό, ο ιός εκμεταλλεύεται το σύστημα έκκρισης λιποπρωτεϊνών/ χοληστερόλης έτσι ώστε να εξέλθει από τα ηπατικά κύτταρα, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με την χρήση υποδοχών, όπως ο LDLR και ο SR-BI, για την είσοδο στο κύτταρο^[49]. Επιπλέον, τα επίπεδα της πρωτεΐνης ApoE σχετίζονται με παραγωγή μολυσματικών ιών. Η λιποπρωτεΐνη ApoE είναι απαραίτητη για την μολυσματικότητα των ισωμάτων του ιού της ηπατίτιδας C και την παραγωγή τους και πιθανώς τα ιωσώματα συναρμολογούνται ως σωματίδια πλούσια σε λιποπρωτεΐνη ApoE (Εικόνα 11)^[50].



Εικόνα 12: Επισκόπηση του κύκλου ζωής του ιού της ηπατίτιδας C

1.5 Η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C

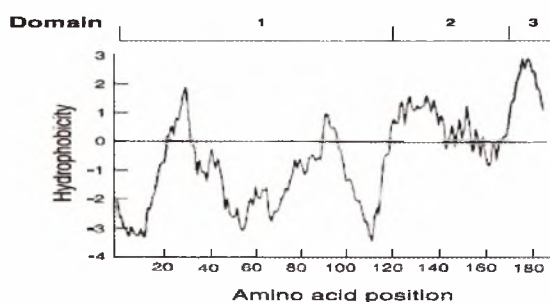
Τα πρώτα 191αα της πολυπρωτεΐνης του HCV αποτελούν την πρωτεΐνη του καψιδίου, core. Η πρωτεΐνη core της ηπατίτιδας C είναι μια πολύ βασική, RNA - συνδεδεμένη πρωτεΐνη με ένα βασικό N-τελικό άκρο και ένα υδρόφοβο C-τελικό άκρο. Σε ανθρώπινο ήπαρ μολυσμένο από τον ιό της ηπατίτιδας C, βρέθηκε ότι το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης core αντιστοιχεί σε 21kDa. Η μορφή αυτή αντιστοιχεί στα πρώτα 173 αμινοξέα της πολυπρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας C και είναι η ώριμη μορφή της πρωτεΐνης core. Η πρωτεΐνη core υφίσταται δυο τροποποιήσεις κατά την ωρίμανσή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο από κυτταρικές πεπτιδάσες σινιάλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της κυρίαρχης και ώριμης μορφής της core πρωτεΐνης (Εικόνα 13). Η πρώτη τροποποίηση γίνεται στη θέση 191 (C2), για να διασπαστεί από την γλυκοπρωτεΐνη του φακέκου E1, από την πεπτιδάση σινιάλου (signal peptidase). Στη συνέχεια, μια αλληλουχία σινιάλο που αποτελείται από 13 ή 18 κατάλοιπα αποκόπτεται από την πεπτιδάση πεπτιδίου σινιάλου (SPP) στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης core 191αα (C1, Εικόνα 13)^[51]. Η core πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας C μπορεί να φωσφορυλιωθεί in-vivo από την πρωτεϊνική κινάση A και την πρωτεϊνική κινάση C^[5].



Εικόνα 13: Διαδικασία ωρίμανσης της πρωτεΐνης core από κυτταρικές πρωτεάσες. Η πρωτεολυτική διάσπαση στη θέση C2 (αμινοξέα 191/192) δημιουργεί το N-τελικό κατάλοιπο της γλυκοπρωτεΐνης E1. Η επόμενη τροποποίηση συμβαίνει στη θέση C1 (πιθανός μεταξύ των αμινοξέων 173/174). Η πρωτεΐνες p23 και p21 είναι τα προϊόντα των διασπάσεων C2 και C1 αντίστοιχα^[52].

1.5.1 Ιδιότητες της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C

Η πρωτεΐνη core ανιχνεύεται κυρίως τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, σε κυτταρικά οργανίδια (μιτοχόνδρια, σύστημα Golgi), στο κυτταρόπλασμα (όπως σε σταγονίδια λιπιδίων), και στο περιπυρηνικό χώρο. Ο πυρηνικός εντοπισμός προκαλείται από την παρουσία τριών σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLS) σε μια ομάδα βασικών αα στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης core (Εικόνα 14 και 22)^[5].



Εικόνα 14: Διάγραμμα υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C^[52].

Οι αμινοξικές αλληλουχίες της πρωτεΐνης core είναι πολύ διατηρημένες και στους έξι γενότυπους του ιού της ηπατίτιδας C. Το μέγεθος της πρωτεΐνης core του ιού είναι ίδιο σε όλους του γενότυπους (573 νουκλεοτίδια) με ένα N-τελικό κωδικόνιο έναρξης και χωρίς κωδικόνια τερματισμού στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Ο πολυμορφισμός της πρωτεΐνης core προκύπτει μόνο από σημειακές αλλαγές (Εικόνα 15 και 16)^[98].

Η πρωτεΐνη core είναι καλύτερα διατηρημένη από άλλες δομικές και μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας C και ο πολυμορφισμός της είναι γνωστό ότι επηρεάζει την απόκριση των ασθενών σε αντιική θεραπεία. Για παράδειγμα σε ασθενείς που είναι μολυσμένοι από τον υπότυπο 1b, η αντικατάσταση της αργινίνης στη θέση 70 (Arg70) με γλουταμίνη (Gln70) και της λευκίνης στη θέση 91 (Leu91) με μεθιονίνη (Met 91), μειώνει την ιική απόκριση σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C στους οποίους χορηγείται σχήμα πεγκυλιωμένης(PEG)-ιντερφερόνης και ριμπαβιρίνης και αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου^[53].

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Genotype	ATGAGCAGcaaaTCCtAAACCTCAAGAAaAaCaaAcGTAACACaCCgcCGCCcaagGAcGcTcAAgTTCcCGGGGGTGGTcAGATCGTGGTGGAGGTTAcTcTcTCCGCC										
I/1a	gAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
I1/1b	GAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
I11/2a	AAa-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
IV/2b	AAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
2c	ACT-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
(V)/3a	AAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
4a	GAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
4b	GAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
4c	GAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
4d	GAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
4e	GAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
4f	GAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
5a	GAA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T
6a	ACT-A-C	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T	A-A-AA-T-T-T

Εικόνα 15: Ομοιοπαράθεση της πρότυπης αλληλουχίας του γονιδίου core του ιού της ηπατίτιδας C με αλληλουχίες των γονιδίων core από διαφορετικούς γενότυπους του ιού^[98]

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Genotype	MSTnPKPQRkTkrMnrRpkDvKfPggGvIGVGGY11PRRGPR1GVraTRRtSERSQPRGRROPiPkaRrpeGraweqPöyPWP1YgnEGGwWAGW								
I/1a	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
I1/1b	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
I11/2a	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
IV/2b	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
2c	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
(V)/3a	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
4a	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
4b	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
4c	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
4d	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
4e	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
4f	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
5a	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L
6a	N-K-NR-Q-V	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L	L-L-L

Εικόνα 16: Ομοιοπαράθεση της πρότυπης αμινοξικής αλληλουχίας του γονιδίου core του ιού της ηπατίτιδας C με αμινοξικές αλληλουχίες του γονιδίου core από διαφορετικούς γενότυπους του ιού^[98]

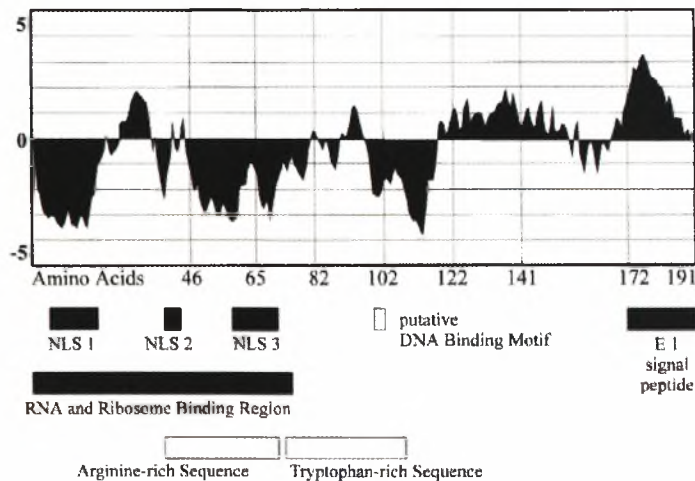
Η μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας και της υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης core είναι δυνατό να διαχωρίσει την πρωτεΐνη σε τρεις δομικές περιοχές (Εικόνα 17 και 18)^[52]. Η D1 περιοχή είναι μια η N-τελική υδρόφιλη περιοχή που αποτελείται από τα πρώτα 120αα, η D2 είναι υδρόφοβη περιοχή που αποτελείται από τα αμινοξέα 120-174 και η D3 που είναι πολύ υδρόφοβη περιοχή επίσης και αντιστοιχεί στα τελευταία 20 αμινοξέα της πρωτεΐνης core 23kDa. Η περιοχή D3 λειτουργεί σαν πεπτιδίο σινιάλο για την αποκοπή της πρωτεΐνης E1^[54-55].



Εικόνα 17: Περιοχές της core πρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας C^[60].

Η περιοχή D1 περιέχει αρκετά βασικά αμινοξέα που εμπλέκονται στην σύνδεση του RNA και στον πυρηνικό εντοπισμό (Εικόνα 18 και 22). Η περιοχή που εμπλέκεται στη σύνδεση του RNA εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 1-75αα, κάτι που φανερώνεται από μια ομάδα βασικών αμινοξέων με υψηλό βαθμό συντηρητικότητας (Εικόνα 16 και 18)^[5]. Τα τρία σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) της core αποτελούνται από αλληλουχίες πλούσιες σε αμινοξέα αργινίνη και λυσίνη (Εικόνα 18)^[59]. Έχει αναφερθεί ότι και τα NLS είναι ικανά να συνδέονται στην ιμφορτίνη και ότι το λιγότερο δυο σήματα NLS απαιτούνται για την αποτελεσματική πυρηνική τοποθέτηση της core. Μεταλλάξεις σε δυο αλληλουχίες NLS μπορεί να αναστέλλουν τις αλληλεπιδράσεις με την ιμφορτίνη 1, GTPase Ran, και/ή NTF2/ p10, οι οποίες απαιτούνται για την μεταφορά διαμέσου του συμπλόκου του πυρηνικού πόρου. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι η N-τελική περιοχή της πρωτεΐνης core είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της στον πυρήνα μέσω αλληλεπιδράσεων με τον ενεργοποιητή του πρωτεοσώματος PA28γ (Εικόνα 19)^[56].

Πρόσφατα, δύο ομάδες βασικών αμινοξέων που βρίσκονται στα 68 N-τελικά αα φαίνεται να παίζουν ένα κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό καψιδίου, ενώ η μη φορτισμένη περιοχή που βρίσκεται μεταξύ τους όχι^[57]. Το ότι το βασικό φορτίο του N-τελικού άκρου της πρωτεΐνης core του HCV είναι σημαντικό για τον σχηματισμό του καψιδίου σχετίζεται με μελέτες για τον σχηματισμό καψιδίων και άλλων RNA ιών. Επίσης, οι περισσότερες μελέτες για το σχηματισμό καψιδίων υποστηρίζουν ένα μοντέλο κατά το οποίο το θετικό φορτίο των πρωτεϊνών του καψιδίου αλληλεπιδρά μη-ειδικά με το RNA του ιού, που στη συνέχεια προωθεί τον σχηματισμό του καψιδίου. Είναι πιθανό η αλληλεπίδραση της core με κυτταρικούς παράγοντες να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ικανότητας σχηματισμού καψιδίων. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη core είναι γνωστό ότι εντοπίζεται σε σταγονίδια λιπιδίων σε κύτταρα θηλαστικών, κάτι που εξαρτάται από κατάλοιπα προλίνης στο C-τελικό άκρο της core^[51].



Εικόνα 18: Χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C. Στο πάνω τμήμα εμφανίζεται ένα διάγραμμα υδροφοβικότητας με κλίμακα Kyte-Doolittle από -5 έως +5 (οι θετικοί αριθμοί αντιστοιχούν την αύξηση της υδροφοβικότητας). Τα κάτω μέρη παρουσιάζει μερικά γνωστά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης core του HCV. Τα ανοιχτόχρωμα κουτιά αναπαριστούν συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας και τα σκούρα κουτιά περιγράφουν λειτουργίες που βρίσκονται σε συγκεκριμένες περιοχές της core: τρεις ανεξάρτητες αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLS), αλληλουχίες που απαιτούνται για μη-ειδική σύνδεση με RNA και σύνδεση με το ριβόσωμα *in-vitro*, το πεπτιδίο σινιάλο για την E1 που αποκόπτεται από την core *in vivo* και *in vitro*. Με ανοιχτόχρωμα κουτιά, παρουσιάζονται ένα πιθανό μοτίβο σύνδεσης στο DNA (SPRG) που βρίσκεται ανάμεσα στα 99 έως 102αα και μια συντηρημένη αλληλουχία πλούσια σε τρυπτοφάνες από τα 73 έως 108αα. Η πρωτεΐνη core μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε κατάλοιπα στις αμινοξικές αλληλουχίες σερίνης στις θέσεις 53,99 και 116 *in vivo* και *in vitro*^[61].

Τόσο οι μεμβρανοσύνδετες πρωτεΐνες core όσο και οι διαλυτές φαίνεται να υπάρχουν σαν διμερή ή πολυμερή. Σε *in vitro* συστήματα, συμπεριλαμβανόμενου του cell-free συστήματος ή σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών, βακτηριακών κυττάρων, κυττάρων εντόμων και κυττάρων ζύμης, η

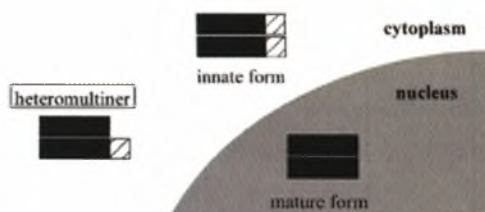
πρωτεΐνη core του HCV μπορεί να σχηματίζει σωματίδια που μοιάζουν με νουκλεοκαψίδια (nucleocapsid like particles/NLPs) [57].

Η περιοχή ανάμεσα στα αμινοξέα 82 και 102 της υδρόφιλης περιοχής D1 περιέχει μια αλληλουχία πλούσια σε τρυπτοφάνες (Εικόνα 18 και 22) και έχει προταχθεί ότι επιτρέπει στην πρωτεΐνη p21 core να αλληλεπιδρά με τον εαυτό της [61]. Αυτή η περιοχή (82-102aa), η οποία πιστεύεται ότι μεσολαβεί στον διμερισμό της core, μπορεί να μην είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του καψιδίου, αλλά να είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση της core με κυτταρικούς παράγοντες που ρυθμίζουν άλλες λειτουργίες [57].

Τα σταγονίδια λιπιδίων (lipid droplets) είναι ενδοκυτταρικά οργανίδια που εμπλέκονται στην αποθήκευση λιπιδίων, στην σηματοδότηση του κυττάρου και στη ρύθμιση της μεταφοράς ενδοκυτταρικών κυστιδίων. Αποτελούνται από ένα πυρήνα με ουδέτερα λιπίδια, όπου βρίσκονται κυρίως τριακυλογλυκερόλες και/ή εστέρες χοληστερόλης, καλυμμένα από μια μονοστιοβάδα φωσφολιπιδίων. Η στιοβάδα φωσφολιπιδίων καλύπτεται από ένα πρωτεϊνικό κάλυμμα. [62].

Η περιοχή D2 είναι υπεύθυνη για την σύνδεση της πρωτεΐνης core με τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, της εξωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες και τα σταγονίδια λιπιδίων [58, 51]. Η συσχέτιση μεταξύ του ιού της ηπατίτιδας C και των σταγονιδίων λιπιδίων προτάθηκε πρώτη φορά πριν από 10 χρόνια, όταν έγινε παραγωγή της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C in vitro σε διάφορους κυτταρικούς τύπους χρησιμοποιώντας ετερόλογα συστήματα έκφρασης. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη core είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και είτε συνδέεται με τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, είτε βρίσκεται στην επιφάνεια των σταγονιδίων λιπιδίων. Άλλες μελέτες αναφέρουν επίσης την παρουσία της πρωτεΐνης core στον πυρήνα ή στα μιτοχόνδρια. Η σύνδεση της πρωτεΐνης core με τα σταγονίδια λιπιδίων φαίνεται να παίζει ένα κεντρικό ρόλο στην παθογένεια του ιού της ηπατίτιδας C, προτείνοντας ότι η επαγόμενη από τον ιό στεάτωση μπορεί να είναι σημαντική για τον κύκλο ζωής του ιού. Μετά την ωρίμανσή της, η πρωτεΐνη core παραμένει συνδεδεμένη με την κυτταροπλασματική μονοστιοβάδα της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω της D2 υδρόφοβης περιοχής (κατάλοιπα 120 έως 173aa). Αυτό κάνει δυνατή την μετακίνηση της ώριμης core κατά μήκος αυτής της μονοστιοβάδας στην επιφάνεια των σταγονιδίων λιπιδίων [62].

Η D3 υδρόφοβη περιοχή θεωρείται υπεύθυνη για την σύνδεση της ανώριμης μορφής core (1-191aa) στο ενδοπλασματικό δίκτυο και για την παρεμπόδιση της μεταφοράς της πρωτεΐνης core στον πυρήνα [55]. Όταν HepG2 κύτταρα μετασχηματίζονται μόνο με την ώριμη πρωτεΐνη core (173aa), αυτή εντοπίζεται στον πυρήνα. Πιστεύεται ότι η απομάκρυνση του C-τελικού υδρόφοβου άκρου επιτρέπει την λειτουργία των τριών σιναλών πυρηνικού εντοπισμού (Εικόνα 19). Ο διαφορετικός υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών core 191aa και core 173aa προτείνει ότι η ανώριμη μορφή της πρωτεΐνης core επηρεάζει τον εντοπισμό της ώριμης μορφής [63].



Εικόνα 19: Εντοπισμός της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C. Η ανώριμη μορφή εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, η ώριμη μορφή στον πυρήνα και το ετεροπολυμερές στο κυτταρόπλασμα [63].

Η φωσφορυλίωση στη σερίνη-116 μπορεί να ρυθμίσει τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης core. Επίσης, μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης core γίνονται από την ιστική τρανσγλουταμινάση. Η ιστική τρανσγλουταμινάση καταλύει το σχηματισμό του γ-καρβοξυλ-ε-λυσίνης ισοπεπτιδικού δεσμού με την ένωση της γ-καρβοξαμινομάδας της γλουταμίνης με την αμινική ομάδα της λυσίνης. Έχει προταχθεί ένας πιθανός ρόλος για της ιστικής τρανσγλουταμινάσης στο σχηματισμό των διμερών της core [64,65].

1.5.2 Πρωτεΐνη core και αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα

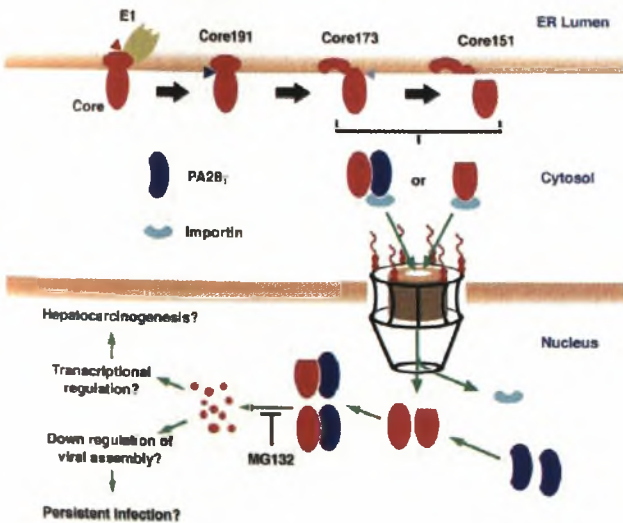
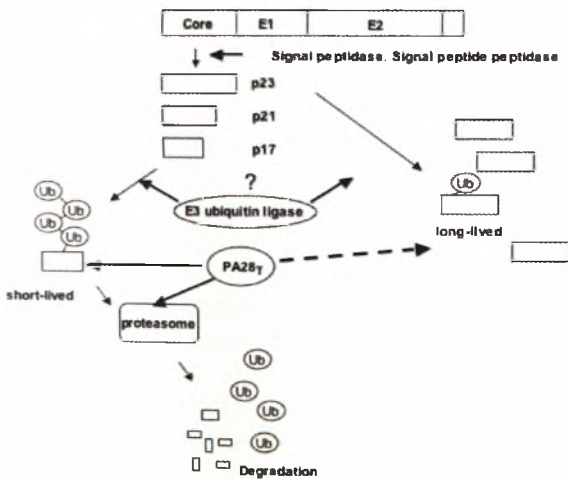
Το μονοπάτι της ουβικουιτίνωσης και αποικοδόμησης στο πρωτεόσωμα είναι το σημαντικότερο μονοπάτι αποικοδόμησης επιλεγμένων πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα και φαίνεται να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός κυτταρικής ρύθμισης. Η πρωτεΐνη core στοχεύεται για ουβικουιτίνωση και αποικοδόμηση από μια άγνωστη λιγάση της ουβικουιτίνης (Εικόνα 20). Το καρβοξυτελικό άκρο της

πρωτεΐνης core είναι σημαντικό για τη ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης^[66]. Όταν η πρωτεΐνη core εκφράζεται με κομμένο το καρβοξυτελικό άκρο, όπως η μορφή 1-173 (21kDa), είναι ασταθής^[56,66]. Ειδικοί αναστολείς πρωτεοσώματος σταθεροποιούν τις ασταθείς αυτές μορφές της core, κάτι που δείχνει ότι η μηχανή του πρωτεοσώματος είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης core. Αντίθετα, η ανώριμη μορφή της πρωτεΐνης core (1-191αα) έχει μεγάλη διάρκεια ζωής. Μόνο η ώριμη πρωτεΐνη core (χωρίς την περιοχή D3) μπορεί να πολύ-ουβικουτυλιωθεί, ενώ η ανώριμη και σταθερή μορφή της πρωτεΐνης core συνδέεται με ένα ή μερικά μόρια ουβικουτίνης^[66] (Εικόνα 20). Για να κατανοηθεί ο μηχανισμός ουβικουτινίωσης της πρωτεΐνης core, πρέπει να προσδιοριστεί μια συγκεκριμένη E3 λιγάσης της ουβικουτίνης που δρα στην πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C.

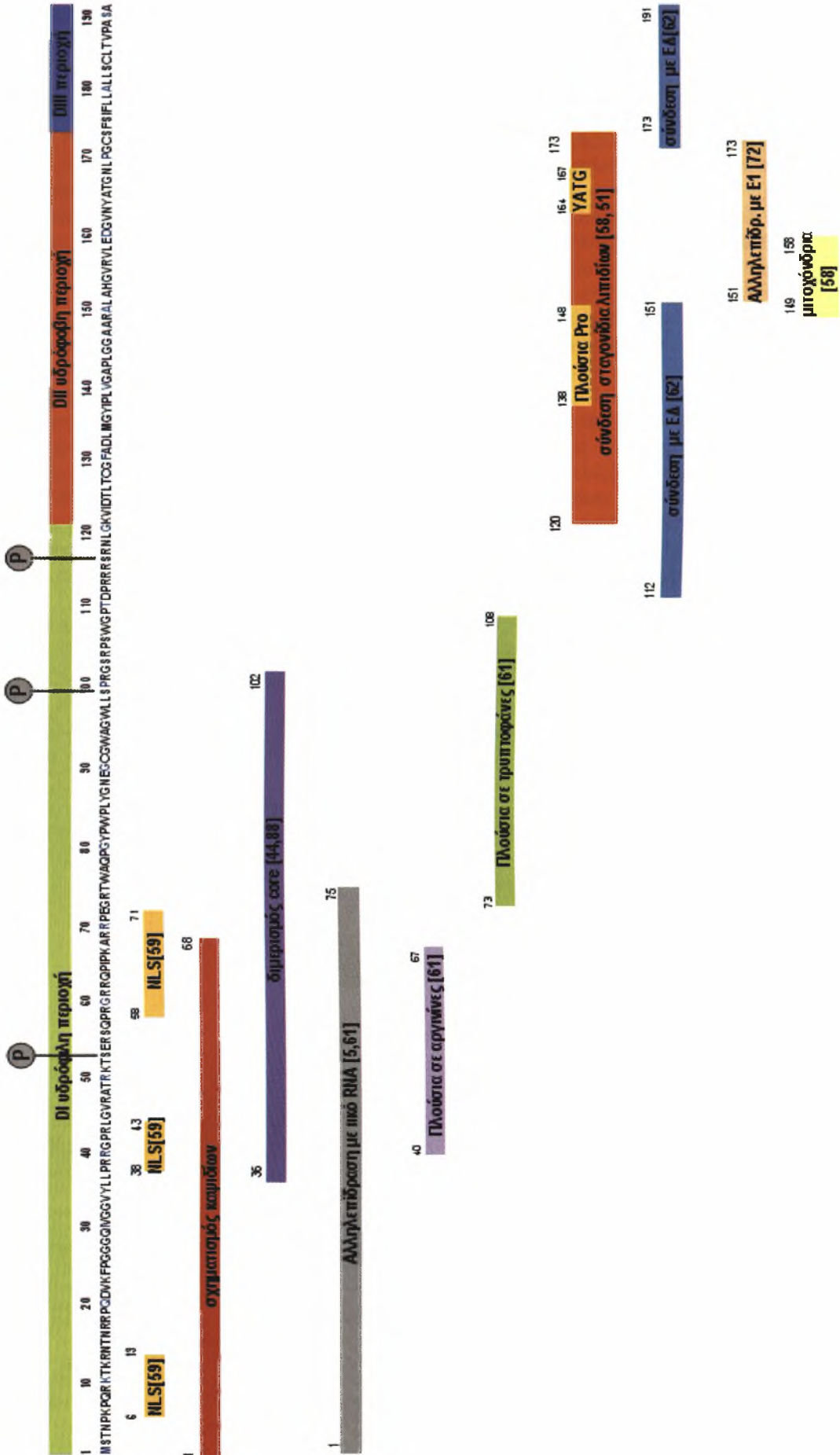
Η ώριμη πρωτεΐνη core μετατοπίζεται στον πυρήνα μέσω του πυρηνικού πόρου, πιθανόν ως σύμπλοκο με την ιμφορτίνη ή ως σύμπλοκο ιμφορτίνης και PA28γ. Η πρωτεΐνη core που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PA28γ (ενεργοποιητή του πρωτεοσώματος) στον πυρήνα αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα (Εικόνα 21)^[66]. Ο παράγοντας PA28γ μπορεί να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη core σε καλλιεργημένα κύτταρα, καθώς επίσης και στο ήπαρ διαγονιδιακών ποντικών και σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδας C. Ο PA28γ εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα όπου σχηματίζει ομοπολυμερή, τα οποία συνδέονται με το πρωτεόσωμα 20S και ενισχύουν την δράση του. Η υπερέκφραση του ενεργοποιητή PA28γ, προάγει την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης core, κάτι που δείχνει ότι ο παράγοντας PA28γ επηρεάζει την λειτουργία του πρωτεοσώματος και έτσι ρυθμίζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης core^[56]. Αυτή η αποικοδόμηση αναστέλλεται από τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132.

Η πυρηνική τοποθέτηση και το μονοπάτι ουβικουτινίωσης και αποικοδόμησης στο πρωτεόσωμα της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C, μπορεί να επάγει μια αρνητική ρύθμιση στη συναρμολόγηση του ιού, και μπορεί να είναι ένας μηχανισμός που εμπλέκεται στην επίμονη μόλυνση που προκαλείται από τον ιό της ηπατίτιδας C^[56].

Εικόνα 20: Ένα πιθανό μοντέλο της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C. Η σύνδεση μεταξύ της πρωτεΐνης core και της E1 διασπάται από μια πεπτιδάση σινιάλου, με αποτέλεσμα την παραγωγή της πρωτεΐνης core p23 (ανώριμη μορφή). Μια επιπλέον διάσπαση της πρωτεΐνης core p23 από την SPP έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της p21 μορφή της πρωτεΐνης core. Περαιτέρω τροποποιημένες μορφές της core πρωτεΐνης, όπως p17, παράγονται από τους άγνωστους μηχανισμούς. Η μορφή της core με κομμένο το καρβοξυτελικό άκρο πολύ-ουβικουτυλιώνεται από μια μη ταυτοποιημένη E3 λιγάση της ουβικουτίνης και στοχεύεται για αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα. Οι ανώριμες πρωτεΐνες core συνδέονται με ένα ή μερικά μόρια ουβικουτίνης και έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής. Ένας ενεργοποιητής του πρωτεοσώματος, PA28γ, ενισχύει την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης core^[66].



Εικόνα 21: Πιθανή πυρηνική μετατόπιση της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C εξαρτώμενη ή όχι από τον παράγοντα PA28γ και πιθανές δράσεις της πρωτεΐνης core. Η πρόδρομη πρωτεΐνη core του HCV (p23) αποκόπτεται από την πολυπρωτεΐνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο από μια πεπτιδάση σινιάλου (κόκκινο τρίγωνο) και μετά μια πεπτιδάση πεπτιδίου σινιάλου (μπλέ τρίγωνο) διασπά την C-τελική υδρόφοβη περιοχή, οδηγώντας στην δημιουργία της ώριμης core πρωτεΐνης (p21). Η ώριμη πρωτεΐνη core μετατοπίζεται στον πυρήνα μέσω του πυρηνικού πόρου, πιθανόν ως σύμπλοκο με την ιμφορτίνη ή ως σύμπλοκο ιμφορτίνης και PA28γ. Η πρωτεΐνη core που αλληλεπιδρά με το PA28γ στον πυρήνα αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα. Αυτή η αποικοδόμηση αναστέλλεται από τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132. Η πυρηνική τοποθέτηση και αποικοδόμηση της πρωτεΐνης core του HCV μπορεί να επάγει μια αρνητική ρύθμιση στη συναρμολόγηση του ιού, και μπορεί να είναι ένας μηχανισμός που εμπλέκεται στην μόλυνση του HCV^[56].



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση μερικών περιοχών του γονιδίου core του ιού της ηπατίτιδας C.

1.5.3. Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C

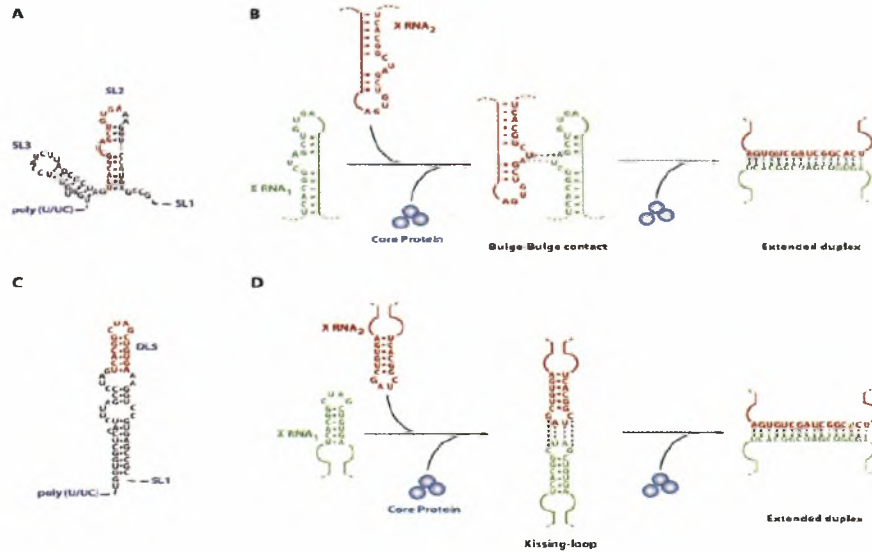
1.5.3.1 Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης core με RNA

Μια σημαντική λειτουργία της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C, εκτός από την δημιουργία του καψιδίου, είναι και η ενκαψιδίωση του RNA. Πολλοί ιοί θα ενκαψιδίωναν μη-ειδικά κυτταρικό RNA, εάν το ιικό γενωμικό RNA δεν είναι παρόν. Επιπλέον, πολλοί ιοί χρησιμοποιούν το RNA ως ικρίωμα για τη συναρμολόγηση, ή/και για να επικεντρώσουν τη διαδικασία συναρμολόγησης. Η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C φαίνεται να δρα με παρόμοιο τρόπο. Η περιοχή D1 της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C είναι εξαιρετικά υδρόφιλη, λόγω των πολλών βασικών αμινοξέων που βρίσκονται σε αυτήν την περιοχή. Τα βασικά αμινοξέα συχνά εμπλέκονται στη σύνδεση με νουκλεϊνικά οξέα επειδή το θετικό τους φορτίο μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικού σκελετό των νουκλεϊκών οξέων. Η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C συνδέεται με το RNA^[67,55, 68] και αυτή η σύνδεση εξαρτάται από το βασικό αμινοτελικό της άκρο (αμινοξέα 1-75)^[55]. Επιπλέον η πρωτεΐνη core έχει ενεργότητα σαπερόνης του RNA, κάτι που μπορεί να σημαίνει ότι η πρωτεΐνη core μπορεί να βοηθήσει στην αναδίπλωση του RNA και να επηρεάζει την ειδική ενκαψιδίωση του γενώματος του ιού^[70], αλλά και την αντιγραφή/μεταγραφή του ιού. Ενώ η άποψη ότι η πρωτεΐνη core δεσμεύει το RNA έχει καθιερωθεί, είναι ασαφές εάν δεσμεύει κατά προτίμηση το γενωμικό RNA του ιού της ηπατίτιδας C σε σχέση με κυτταρικά RNA μόρια. Η πρωτεΐνη core έχει βρεθεί ότι συνδέεται με ριβοσωμικό RNA^[55], με tRNA^[69], αλλά και με το γενωμικό RNA του ιού της ηπατίτιδας C^[70, 67, 69, 68].

Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5'NTR) του ιού της ηπατίτιδας C είναι υψηλά διατηρημένη σε όλα τα γενώματα που έχουν ταυτοποιηθεί και έχει προβλεφθεί ότι έχει έντονη δευτεροταγή δομή (Εικόνα 7). Το ιικό γονιδίωμα δεν περιέχει κάλυμμα και η 5' αμετάφραστη περιοχή έχει μια εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (IRES), η οποία επιτρέπει την έκφραση του ιικού γενώματος, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι καλύμματος. Πολλές ιικές καψιδιακές πρωτεΐνες έχουν μια υψηλή συγγένεια για συγκεκριμένες δομές μέσα στο δικό τους γενωμικό RNA, κάτι που τους επιτρέπει να δεσμεύσουν κατά προτίμηση το σωστό μόριο του RNA. Είναι ασαφές εάν η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C επιδεικνύει την υψηλότερη συγγένεια για το γενωμικό RNA του ιού. Έχει βρεθεί ότι η core πρωτεΐνη δεσμεύει ειδικά σε έναν ραδιενεργό επισημαντή (probe) που περιέχει την 5' αμετάφραστη περιοχή του γενωμικού RNA του ιού της ηπατίτιδας C^[67]. Παρόλο που η περιοχή του RNA που είναι υπεύθυνη για την σύνδεση με την πρωτεΐνη core δεν έχει ταυτοποιηθεί, η παρουσία εκτεταμένης δευτεροταγής δομής είναι τυπική στην αλληλεπίδραση πρωτεΐνης και αλληλουχίες RNA. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει πώς το γενωμικό RNA συσκευάζεται επιλεκτικά στα ιοσώματα. Αντίθετα, άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη core δεσμεύει εξίσου καλά τόσο το γενωμικό RNA του ιού της ηπατίτιδας C όσο και ετερόλογο RNA, προτείνοντας ότι η πρωτεΐνη core δεν έχει αρκετή ειδικότητα σύνδεσης έτσι ώστε να προάγει την ενκαψιδίωση του γενωμικού RNA^[55]. Εάν η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C δεν δεσμεύει ειδικά το γενωμικό RNA, τότε κάποιος άλλος μηχανισμός θα πρέπει να υπάρχει για να προωθήσει την ενκαψιδίωση του γονιδιώματος. Μια πιθανότητα είναι ότι η συναρμολόγηση συμβαίνει σε μικροπεριβάλλοντα που περιέχουν μόνο ένα είδος mRNA (πχ. το γενωμικό RNA του ιού της ηπατίτιδας C). Δυστυχώς, η ενκαψιδίωση του RNA δεν έχει αναλυθεί ακόμα από κοινού με τη συναρμολόγηση του ιού και έτσι παραμένει ασαφές ποια ακριβώς μόρια RNA ενκαψιδιώνονται και πώς η πρωτεΐνη core επιλέγει το RNA για την ενκαψιδίωση.

Έχει δειχτεί επίσης, ότι η 3' αμετάφραστη περιοχή του RNA του ιού της ηπατίτιδας C διμερίζεται *in vitro*, μια διαδικασία, η οποία υποβοηθάτε από την πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C (Εικόνα 23). Επιπλέον, στην αρχική αλληλεπίδραση RNA-RNA μεσολαβεί μια υψηλά διατηρημένη παλίνδρομη αλληλουχία μέσα στη δομή στελέχους-βρόγχου SL2 στην περιοχή X του RNA θετικής πολικότητας (Εικόνα 23). Ένα μοντέλο της διαδικασίας διμερισμού του RNA που επάγεται από την πρωτεΐνη core, παρουσιάζεται στη εικόνα 23. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η περιοχή X του RNA μπορεί να υιοθετήσει μια εναλλακτική διαμόρφωση με παρόμοια σταθερότητα, ενώ οι δομές SL3 και SL2 είναι συντηγμένες και δημιουργούν μια μονή μακριά δομή στελέχους-βρόγχου με δυο εσωτερικούς βρόγχους (Εικόνα 23C)^[92]. Σημειώνεται ότι τα δυο μοντέλα δεν είναι αμοιβαίως αποκλειόμενα καθώς η ενεργότητα σαπερόνης του RNA της πρωτεΐνης core μπορεί να αλλάξει την διαμόρφωση του μονομερούς RNA (και έτσι μπορεί να μετατοπίσει την ισορροπία μεταξύ των μορφών που παρουσιάζονται στην εικόνα 23A και C). Σε αυτή την εναλλακτική δομή, οι παλίνδρομες αλληλουχίες που απαιτούνται για τον διμερισμό της περιοχής X του RNA σχηματίζουν μια ανεξάρτητη δομή στελέχους-βρόγχου. Αυτή τη δομή

στελέχους-βρόγχου ονομάστηκε αλληλουχία συνδέσου διμερών (dimer linkage sequence ή DLS) όπως συμβαίνει και με τους ρετροϊούς.

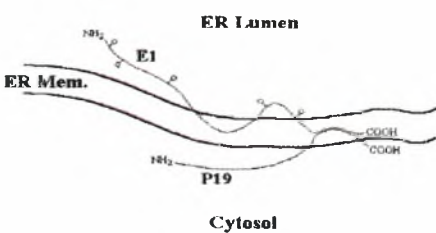


Εικόνα 23: Μοντέλα για τον διμερισμό της θετικής πολικότητας RNA του ιού της ηπατίτιδας C και η δράση της πρωτεΐνης core ως σαπερόνη. (A) Δομή του 3' X RNA όπως προτάχθηκε από τον Kolykhalov et al., και τους Ito και Lai. Η παλίνδρομη αλληλουχία παρουσιάζεται με κόκκινο. (B) Διμερισμός του X RNA που ξεκινάει από την αλληλουχία που παρουσιάζεται με κόκκινο στο (A). Αυτό το μοντέλο προτείνει δυο SL2 στελέχη ξεκινούν την αλληλεπίδραση από μια μικρή σύνδεση βρόγχος-βρόγχος, και ακολουθεί ο σχηματισμός ενός σταθερού εκτεταμένου δίκλωνου RNA που αποτελείται από 16 bp. (C) Μια εναλλακτική δομή του 3' X RNA που προτείνεται από του Yi και Lemon. Η προτεινόμενη DLS παρουσιάζεται με κόκκινο. (D) Μοντέλο kissing-loop που προτείνει ότι δυο DL παλίνδρομες αλληλουχίες ξεκινούν την αλληλεπίδραση με ένα μηχανισμό kissing-loop, ακολουθούμενο από τον σχηματισμό ενός σταθερού εκτεταμένου δίκλωνου RNA που αποτελείται από 16 bp^[70].

Για τον φυσιολογικό ρόλο του διμερισμού του ιού RNA μπορούν να γίνουν μόνο υποθέσεις, λόγω της έλλειψης ενός συστήματος καλλιέργεια του ιού της ηπατίτιδας C. Στα μολυσμένα κύτταρα, η θετικής (+) πολικότητας RNA αλυσίδα χρησιμοποιείται τόσο ως εκμαγείο για την σύνθεση του RNA (±) από την ιική RNA πολυμεράση NS5B, όσο και ως mRNA που κωδικοποιεί την ιική πολυπρωτεΐνη. Η περιοχή X την θετικής πολικότητας RNA πιθανός να περιέχει ένα υποκινητή για την σύνθεση του RNA (±), ο οποίος αναγνωρίζεται από την ιική RNA πολυμεράση NS5B. Επιπλέον, η περιοχή X έχει αναφερθεί ότι τροποποιεί την μετάφραση του RNA (+) του ιού της ηπατίτιδας C. Έτσι, ο διμερισμός του RNA μπορεί να είναι ένας τρόπος ρύθμισης της σύνθεσης του RNA (±) μέσω αλλαγών στην διαμόρφωση του υποκινητή, είτε θετικά παρέχοντας βοήθεια για την στρατολόγηση της ιικής RNA πολυμεράσης, είτε αρνητικά καλύπτοντας τον υποκινητή. Η τελευταία πιθανότητα μπορεί να αντιστοιχεί σε ένα μοριακό κλείσιμο, όπου ο διμερισμός της θετικής αλυσίδας μπορεί να διευκολύνει την μετάβαση από την σύνδεση (±) RNA στην ιική μετάφραση του RNA. Εναλλακτικά, ο διμερισμός του RNA του ιού της ηπατίτιδας C μπορεί να προκαλεί την απελευθέρωση της (+) αλυσίδας RNA από την μεταφραστική μηχανή και έτσι να διευκολύνει το πακετάρισμα της θετικής αλυσίδας RNA στα ιικά σωματίδια^[70].

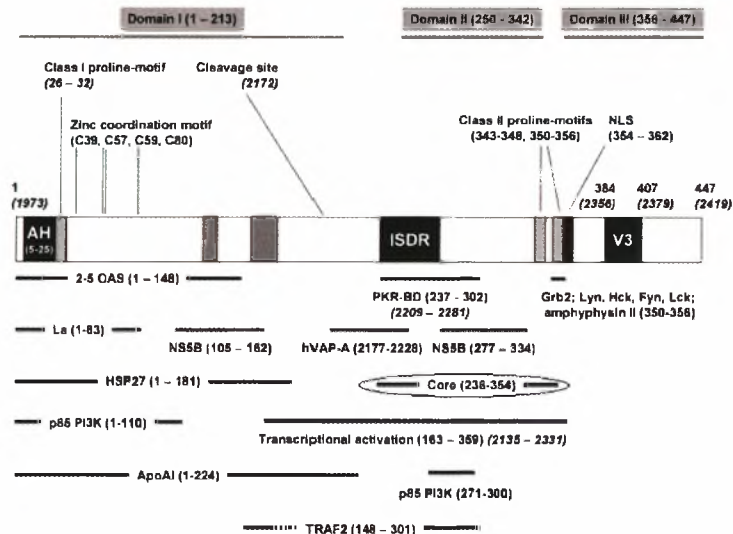
1.5.3.2 Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης core με άλλες πρωτεΐνες της ηπατίτιδας C

Η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C λόγω του ρόλου της ως καψιδιακή πρωτεΐνη θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με τις γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου E1 και E2^[52]. Μελέτες ανοσοκατακρύμησης από μια ομάδα ερευνητών εντόπισαν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην πρωτεΐνη core και την E1 γλυκοπρωτεΐνη. Η περιοχή της πρωτεΐνης core που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την E1 γλυκοπρωτεΐνη πιθανόν είναι η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 151 και 173^[72].



Εικόνα 24: Ένα πιθανό μοντέλο αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην πρωτεΐνη core και την πρωτεΐνη του φακέλου E1. Υπάρχουν πέντε πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης στην αλληλουχία της πρωτεΐνης E1 στα αμινοξέα 198, 211, 236, 307, και 327. Οι πολυσακχαρικές αλυσίδες παρουσιάζονται με μικρούς κύκλους. Η πρωτεΐνη core και η πρωτεΐνη E1 πιθανόν να αλληλεπιδρούν μέσω των υδρόφοβων περιοχών τους που βρίσκονται μέσα στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Σε αυτή την εικόνα η ώριμη πρωτεΐνη core (1-173aa) παρουσιάζεται να αλληλεπιδρά με την C-τελική υδρόφοβη περιοχή της πρωτεΐνης E1. Είναι πιθανό η πρωτεΐνη core να μπορεί να αλληλεπιδράσει επίσης με την ενδιάμεση υδρόφοβη περιοχή της E1 (αμινοξέα 260-290)^[72].

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο των δυο υβριδίων έχει αναφερθεί και η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης core και της πρωτεΐνης NS5A (αντιγραφή του RNA)^[73]. Η ελάχιστη περιοχή της NS5A που απαιτείται για την σύνδεση στην πρωτεΐνη core περιέχει τις περιοχές ISDR, PKR-binding και μια περιοχή πλούσια σε προλίνες. Είναι πιθανό όμως οι δυο πρωτεΐνες να σχηματίζουν σύμπλοκο μέσω άλλων πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη core έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με σταγονίδια λιπιδίων, ενώ η NS5A εντοπίζεται την περιπλασματική περιοχή. Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών core και NS5A για την συναρμολόγηση ή την αντιγραφή του ιού δεν είναι ακόμα κατανοητός. Η πρωτεΐνη core συνδέεται ειδικά στην 5' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδιώματος του ιού και πιθανόν να καταστέλλει την μετάφρασή της^[67]. Εναλλακτικά το σύμπλοκο πρωτεϊνών core-NS5A μπορεί να συνδέει την ιική αντιγραφή με την συναρμολόγηση του ιού, καθώς η NS5A εμπλέκεται στην αντιγραφή και η πρωτεΐνη core είναι μια νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη που συνδέεται στο ιικό RNA^[74].



Εικόνα 25: Οι τρεις δομικές περιοχές της πρωτεΐνης NS5A του ιού της ηπατίτιδας C. Παρουσιάζεται η αμινοτελική α-έλικα, η περιοχή ευαισθησίας στη ιντερφερόνη (ISDR), οι περιοχές πλούσιες σε προλίνη τάξης I και II και οι αλληλουχίες NLS. Επίσης παρουσιάζονται οι περιοχές σύνδεσης με διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης core^[99].

1.5.3.3 Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης core με κυτταρικές πρωτεΐνες

Λειτουργικές μελέτες σε αρκετές δημοσιεύσεις έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C μπορεί να επηρεάσει μια ποικιλία ενδοκυτταρικών μονοπατιών. Σε συστήματα καλλιέργειας ιστών, η πρωτεΐνη core μεταβάλλει τα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται σε αποπτωτικά γεγονότα^[75, 76] καθώς και τα επίπεδα έκφρασης ιικών και κυτταρικών υποκινητών^[77-78]. Επιπλέον, δυο σειρές διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν την πρωτεΐνη core μόνο στο ήπαρ αναπτύσσουν στεάτωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο^[79]. Αυτά τα στάδια της ασθένειας επικρατούν και σε ασθενείς μολυσμένους με τον ιό της ηπατίτιδας C και για αυτό το λόγο έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη core μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη στεάτωσης και ηπατοκυτταρικού καρκίνου^[5].

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται γονίδια και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, πρωτο-ογκογονίδια ή αντι-ογκογονίδια, μεταγραφικοί παράγοντες, αυξητικοί παράγοντες/ κυτοκίνες ή οι υποδοχείς τους είναι πιθανοί μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

*Μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο^[5]
(-), αναστολή, (+), ενεργοποίηση, (*) αλληλεπίδραση*

Γονίδιο/ πρωτεΐνη στόχος	Μόριο που αλληλεπιδρά	Αποτέλεσμα	Αναφορές
p53	(-) υποκινητής της p53	Καταστολή της απόπτωσης	Lee,2002
	(-) πρωτεΐνη p53	Ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης	Hassan, 2004
	(+) p53	Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανεξάρτητα από την έκφραση της p53: ρύθμιση των της ενεργότητας υποκινητή ανεξάρτητο από την p53.	Lu,1999,Otsuka, 2000, Siavoshhian, 2004, Yamanaka,2002
	(+)/(-) p53	Διπλό αποτέλεσμα της trans ενεργοποίησης, ανάλογα τα επίπεδα έκφρασης της core, που αυξάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.	Kao,2004
	(*) p53: συνεντοπισμός με την πρωτεΐνη p53		
p21/WAF1/cip1	(-)υποκινητή της p21, μέσω αναστολής του μονοπατιού TGF-β		Dubourdeau,2002Han,2002, Lee,2002, Jung 2001, Ray, 1998
	(+) έκφραση της p21 (από την ανώριμη μορφή της πρωτεΐνης core)	Αναστολή της κυτταρικής αύξησης μέσω ενεργοποίησης της p53	Lu, 1999, Otsuka,2000,Yamanaka, 2002
	(-)έκφραση της p21 (από την ώριμη μορφή της πρωτεΐνης core)	Μείωση της πρωτεΐνης p21 με τρόπο ανεξάρτητο του p53	Yamanaka, 2002
	(-) πρωτεΐνη p21	Αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Hassan, 2004
	(-)/(+) πρωτεΐνη p21	Αντιφατικά αποτελέσματα στην p21	Kwun, 2003
	(*) πρωτεΐνη p21	Σύμπλοκο με την p21 χωρίς επίδραση στην έκφραση της πρωτεΐνης p21	Wang, 2000 Siavoshian,2004
14-3-3 πρωτεΐνη	(+) μια έψιλον ισομορφή	Ενεργοποίηση της Raf-1 κινάσης: ρύθμιση της αύξησης των ηπατοκυττάρων	Aoki, 2000
κυκλίνη E	(+) κυκλίνη E	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	Cho, 2001
	(+) cdk2	Ενίσχυση της ενεργοποίησης	Hassan, 2004
p73	(*) διαφορετικές ισομορφές	Αναστολή της κυτταρικής αύξησης με τρόπο ανεξάρτητο απο την p53	Alisi, 2003

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

*Μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C που σχετίζονται με την απόπτωση^[5]
(-), αναστολή, (+), ενεργοποίηση, (*) αλληλεπίδραση*

Γονίδιο/ πρωτεΐνη στόχος	Μόριο που αλληλεπιδρά	Αποτέλεσμα	Αναφορές
Fas (CD95/APO1)	(+) καταρράκτης ευαισθητοποίησης του κυττάρου μέσω του FADD και απόπτωση επαγόμενη από TNF	Απόπτωση	Hahn,2000
TNF		Απόπτωση	Zhu, 1998
	(-) TNF-α	Δεν παρατηρήθηκε απόπτωση επαγόμενη από το TNF	Ray, 1998, Saito, 2006
	Επαγωγή παραγωγής αντισωμάτων TNF-α και Fas	Δεν παρατηρήθηκε ανασταλτική επίδραση στην απόπτωση	Dumoulin, 1999
TNF R1	FADD, TRADD,TRAF1	Απόπτωση	Zhu, 2001
	(*) TNF1 και TRADD	Ρύθμιση της σηματοδότησης TNF R1	You, 1999
Bax	(+) έκφραση της πρωτεΐνης Bax	Απόπτωση	Honda,2000
κασπάση-9	(+)Bcl-x(L)	Αναστολή της απόπτωσης μεσολαβόμενης από DCA	Hara, 2006
κασπάση-3	(-) πρωτεΐνη Bax		

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

*Μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C που είναι πρωτο-ογκογονίδια^[5]
(-), αναστολή, (+), ενεργοποίηση, (*) αλληλεπίδραση*

Γονίδιο/ πρωτεΐνη στόχος	Μόριο που αλληλεπιδρά	Αποτέλεσμα	Αναφορές
c-Myc	(+) c-Myc	Αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Honda, 2000, Kim, 1994, Siavoshian, 2004
c-jun	(+) c-jun	Αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Erhardt, 2002, Park, 2001, You, 1999
H-ras	(+) H-ras	Πολλαπλασιασμός: σχηματισμός καρκίνου σε αθυμικά ποντίκια	Ray, 1996
	(*) H-ras	Δεν παρατηρήθηκε μετασχηματισμός των κυττάρων	Chang, 1998
c-Fos	(-) υποκινητή του c-Fos	Απορρύθμιση της κυτταρικής αύξησης. Καμία επίδραση στο c-fos	Ray, 1995 Erhardt, 2002

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

*Μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C που είναι αντι-ογκογονίδια^[5]
(-), αναστολή, (+), ενεργοποίηση, (*) αλληλεπίδραση*

Γονίδιο/ πρωτεΐνη στόχος	Μόριο που αλληλεπιδρά	Αποτέλεσμα	Αναφορές
Rb	(-) πρωτεΐνη Rb	Μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Rb	Cho, 2001
	(+) Rb	Φοσφορυλίωση στοιχείων του μονοπατιού Rb/E2F	Cho, 2001 Hassan, 2004

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

<i>Μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C που είναι μεταγραφικοί παράγοντες⁵¹ (-), αναστολή, (+), ενεργοποίηση, (*) αλληλεπίδραση</i>			
Γονίδιο/πρωτεΐνη στόχος	Μόριο που αλληλεπιδρά	Αποτέλεσμα	Αναφορές
NF-κB	(+) NF-κB	Ενεργοποίηση του μονοπατιού MAP/ERK μέσω μεταγραφής του TNF-α	Sato, 2006 Soo, 2002
	(*) NF-κB		Liao, 2005
	(-) RelA/NF-κB από TNF-α		Zhu, 1998
AP-1	(+) AP-1	Αναστολή της ιντερλευκίνης 12 στα μακροφάγα- επιμονή της μόλυνσης	Eisen-Vandervelde, 2004, Erhardt, 2002
ATF-2		Δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση	Erhardt, 2002
E2F-1	(+) E2F-1	Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης, κυτταρικός πολλαπλασιασμός	Cho, 2001, Hassan 2004
LZIP	(-) LZIP	Απενεργοποιητική λειτουργία, κυτταρικός πολλαπλασιασμός	Sato, 2006 Soo, 2002
hnRNP	(*) hnRNP	Μεταγραφική ρύθμιση: η πρωτεΐνη core χαλαρώνει την καταστολή του hnRNP K πάνω στον υποκινητή του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης <i>in-vivo</i>	Hsieh, 1998
STAT3	(*) STAT3	Πολλαπλασιασμός, θετική ρύθμιση του Bcl-XL και της κυκλής D1: μετασχηματισμός των κυττάρων	Yoshida, 2002
Jak1/2-STAT	(+) Jak1/2 και STAT1 και STAT1-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση κάτω από το IFN-γ (-) Jak1/2 και STAT1 κάτω από IL-6 ενεργοποίηση	Διαφορετικά αποτελέσματα κάτω από το σήμα IL-6 και IFN-γ: διαφορετικό αποτέλεσμα την φωσφορύλιωση: τροποποίηση μεταγραφικών παραγόντων	Basu, 2002 Hosui, 2003

ΠΙΝΑΚΑΣ 7

<i>Μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core της ηπατίτιδας C που είναι αυξητικοί παράγοντες/ κυτοκίνες ή οι υποδοχείς τους⁵¹, (-), αναστολή, (+), ενεργοποίηση, (*) αλληλεπίδραση</i>			
Γονίδιο/πρωτεΐνη στόχος	Μόριο που αλληλεπιδρά	Αποτέλεσμα	Αναφορές
TGF-α	(+) TGF-α μέσω ενεργοποίησης του NF-κB	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός: ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK/ERK	Sato, 2006
TGF-β	(+) υποκινητής του TGF-β	Επιδείνωση της ίνωσης στο ήπαρ	Taniguchi, 2004
TNF	(+) JNK και IκB κινάσες επαγόμενες από το TNF	Ενεργοποίηση του NF-κB και AP-1	Park, 2001
IFN	(-) β-IFN	Καταστολή ενεργότητας	Kim, 1994
	(-) ISRE και GAS	Καταστολή της αντικής επίδρασης της IFN	Hiramatsu, 2006
	(+) 2'5'-OAS γονίδιο		Dansako, 2003
	(-) 2'5'-OAS γονίδια	Αναστολή της IFN-α- μεσολαβούμενης μεταγραφής αντιικών γονιδίων	De Lucas, 2005
IL-12	(-) mRNA IL-12p40 στα μακροφάγα	Αναστολή τους ανοσοποιητικού του ξενιστή	Eisen-Vandervelde, 2004
TNF R	TNF-α/ TNF R	Επαγωγή της ενεργότητας σύνδεσης του NF-κB στο DNA	You, 1999
	(*) TNFR	Τετραμερές σύμπλοκο: τροποποίηση της TNFR1 σηματοδότησης	Park 2001, Zhu 1998

ΠΙΝΑΚΑΣ 8

Μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C που είναι ένζυμα⁵⁾
(-), αναστολή, (+), ενεργοποίηση, (*) αλληλεπίδραση

Γονίδιο/πρωτεΐνη στόχος	Μόριο που αλληλεπιδρά	Αποτέλεσμα	Αναφορές
ERK	(+) ERK	Αύξηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Erhardt,2002, Hayashi, 2000
JNK	(+) JNK	Αύξηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Erhardt, 2002
	(+) JNK	Ενεργοποίηση του TNF-α επάγοντας τον JNK	Park, 2001
	(-) JNK	Απόπτωση	Zhu, 2001
MAP	(+) MAP	Αύξηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Erhardt,2002, Hayashi, 2000
MAPK/ERK	(+) MAPK/ERK	Αύξηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Sato, 2006
MKP-1	(+) MKP-1	Αύξηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Erhardt,2002, Hayashi, 2000
PKR	(*) PKR φωσφορύλιωση	Ενεργοποίηση/ αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού	Yan, 2007
RNA ελικάση CAP-Rf	(*) RNA ελικάση	Αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων του ξενιστή/ ρύθμιση του μεταβολισμού του RNA	Yeu, 1999
SKP2	(+) SKP2 γονίδιο	Κυτταρική αύξηση	Hassan 2004
DEAD box protein (DDX3)	(*) πιθανή RNA ελικάση	Άγνωστος ρόλος στον μεταβολισμό του RNA	Owsianka, 1999
Polymerase I και II	(*) Polymerase I και II	Ως ένα αποτέλεσμα καταστολής της p53	Kao, 2004

ΠΙΝΑΚΑΣ 9

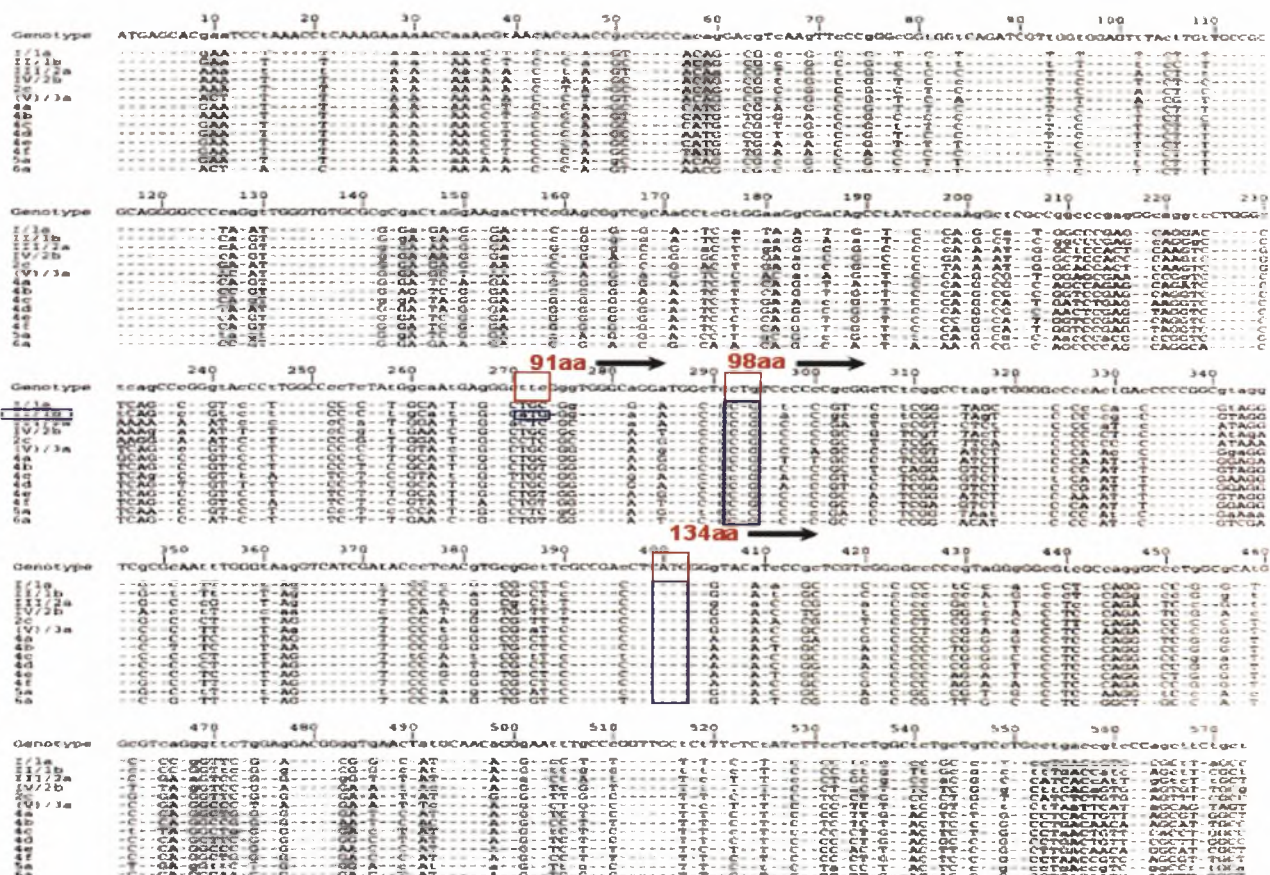
Άλλοι μοριακοί στόχοι της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C⁵⁾
(-), αναστολή, (+), ενεργοποίηση, (*) αλληλεπίδραση

Γονίδιο/πρωτεΐνη στόχος	Μόριο που αλληλεπιδρά	Αποτέλεσμα	Αναφορές
Apo AII	(*) Apo AII	Αλλαγή στον μεταβολισμό των λιπιδίων	Sabine 1999, Barda 1997
Rous sarcoma virus	(+) υποκινητή RSV LTR	Ενεργοποίηση ιικών υποκινητών	Kim, 1994, Ray, 1995
SV40	(+) SV40 early promoter	Ενεργοποίηση ιικών υποκινητών	Kim, 1994, Ray, 1995
HIV-1 LTR	(-)HIV-1 LTR promoter	Καταστολή της ενεργότητας	Ray, 1995
HBV	(-) HBV gene promoter	Καταστολή της ενεργότητας	Chen, 2003, Shih, 1995, Moradpour, 1996
β- ακτίνη	(-)β- ακτίνη	Καταστολή της ενεργότητας	Kim, 1994
Υποδοχέα του συμπληρώματος gC1gR	(*)gC1gR	Αναστολή του πολλαπλασιασμού των Tα- λεμφοκυττάρων	Kittlesen, 2000
CC chemikines RANTES και MCP-1	(+)/(-) υποκινητή των MCP-1 και RANTES	Διπλό αποτέλεσμα που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο	Soo, 2002

1.5.3.4 Ένα νέο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών core του ιού της ηπατίτιδας C

Πρόσφατα προστέθηκαν στη λίστα δυο επιπλέον λειτουργίες του γονιδίου core του ιού της ηπατίτιδας C. Η πρώτη είναι η ύπαρξη ενός μεταφραστικού σήματος που ενεργοποιεί μια εσωτερική έναρξη σύνδεσης της πρωτεΐνης στην κεντρική περιοχή του γονιδίου. Η δεύτερη είναι η παραγωγή μιας οικογένειας πρωτεϊνικών ισομορφών της πρωτεΐνης core που περιέχουν το C- τελικό τμήμα της πρωτεΐνης core. Οι ισομορφές αυτές ποικίλουν στο μέγεθος από 8-14kDa. Η παραγωγή των ισομορφών της πρωτεΐνης core από τους γενότυπους 1 και 2 του ιού της ηπατίτιδας C φανερώνει ότι η έκφραση τους είναι μια διατηρημένη ιδιότητα του γονιδίου core του ιού της ηπατίτιδας C. Σε ηπατικά κύτταρα Huh-7.5 που αντιγράφουν μολυσματικούς JFH-1 ανασυνδιασμένους ιούς, οι πρωτεΐνες mini-core, όπως ονομάστηκαν, εκφράζονται σε ποσά συγκρίσιμα με την ώριμη πρωτεΐνη p21 core. Η μελέτη της έκφρασης της p8 mini-core φανερώνει ότι το γονίδιο της core περιέχει ένα σήμα εσωτερικής έναρξης για σύνθεση μιας πρωτεΐνης. Η σύνθεση της πρωτεΐνης p8 ήταν συνεχής σε κύτταρα που μετασηματίστηκαν με μετάγραφα RNA στα οποία το εναρκτήριο AUG κωδικόνιο του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης, αντικαταστάθηκε με ένα κωδικόνιο λήξης UAG, ενώ η κανονική πρωτεΐνη p21 δεν παράγονταν. Η παραγωγή της πρωτεΐνης p8, απουσία της παραγωγή της p21, δείχνει ότι η p8 δεν μπορεί να είναι προϊόν αποκοπής της p21, και για αυτό θα πρέπει να προέρχεται από ένα ανεξάρτητο γεγονός έναρξης^[20].

Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης p8 πιστεύεται ότι βρίσκεται στο κωδικόνιο 91, τουλάχιστον για της αλληλουχίες που έχουν ένα 91-AUG (σχεδόν αποκλειστικά ο υπότυπος 1b). Σε άλλους υπότυπους, είναι πιθανό η εσωτερική έναρξη να συμβαίνει σε γειτονικό αμινοξύ. Το κωδικόνιο CUG είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μη- κανονικά εναρκτήρια κωδικόνια. Είναι πιθανό ότι το 98-CUG, το οποίο είναι παρόν στο 95% όλων των αλληλουχιών του ιού της ηπατίτιδας C, να προωθεί τη σύνθεση της πρωτεΐνης p8 σε κάποιες από τις αλληλουχίες ιών από τις οποίες λείπει το αμινοξύ 91-AUG. Η παραγωγή της πρωτεΐνης p8 πραγματοποιείται και όταν τροποποιηθεί το 91-AUG (σε αλληλουχίες στις οποίες υπάρχει), κάτι που φανερώνει ότι παρόλο που το AUG προτιμάτε, δεν είναι απαραίτητο στοιχεία για να συμβεί η εσωτερική έναρξη (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Ομοιοπαράθεση των αλληλουχιών του γονιδίου core από διάφορους γενότυπους του ιού της ηπατίτιδαςC. Παρουσιάζονται οι πιθανές θέσεις έναρξης των ισομορφών mini-core^[98].

Άλλα στοιχεία που πιθανόν συμβάλουν στην εσωτερική έναρξη περιλαμβάνουν και δομές του ιικού RNA. Η κεντρική περιοχή του γονιδίου core προβλέπεται ότι σχηματίζει ένα σταθερό τμήμα στελέχους-βρόγχου, τη δομή SL248, η οποία όμως δεν έχει επαληθευτεί πειραματικά. Χρειάζεται περισσότερη μελέτη για να καθοριστεί να τριτοταγής δομή σε αυτή τη περιοχή και για να κατανοηθεί πως τα ριβοσώματα που πραγματοποιούν την εσωτερική έναρξη στρατολογούνται από το RNA του ιού της ηπατίτιδας C. Πιθανόν τα ριβοσώματα να προσδένονται στο «συμβατό» IRES του ιού της ηπατίτιδας C και να φτάνουν στη εσωτερική θέση έναρξης με κάποιο μηχανισμό «γλιστρήματος» του ριβοσώματος (leaky scanning)^[80]. Εναλλακτικά, μπορεί να συνδέονται στο κεντρικό τμήμα του γονιδίου core με ένα μηχανισμό που περιγράφηκε πρόσφατα ως ribosomal clustering^[81] ή από ένα δεύτερο μη ταυτοποιημένο IRES^[20].

Η αμινοξική αλλαγή από 91-λευκίνη σε 91-μεθιονίνη σχετίζεται κλινικά με ανθεκτικότητα σε ιντερφερόνη αλλά και με υψηλό ιικό φορτίο σε ασθενείς από την Ιαπωνία με τον γενότυπο 1b του HCV^[82-84]. Μια εναλλακτική εξήγηση είναι ότι από την ενίσχυση των σημάτων έναρξης που συμβαίνει όταν δημιουργείται το κωδικόνιο 91-AUG δημιουργείται και/ή αυξάνεται η πρωτεΐνη ρ8. Ένα σήμα για εσωτερική έναρξη μπορεί να παρέχει ένα «απόθεμα» για τα κύρια έναρκτήρια κωδικόνια AUG, επιτρέποντας να συμβεί η σύνθεση της πολυπρωτεΐνης, ακόμα και κάτω από συνθήκες όπου το «συμβατό» IRES δεν μπορεί να λειτουργήσει. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι το RNA που προωθεί την έκφραση του ρ8 δεν απαιτεί την ύπαρξη του «συμβατού» IRES του HCV: το ρ8 εκφραζόταν από replicons στα οποία το γονίδιο core βρισκόταν καθοδικά από το IRES του EMCV και από in vitro μετάγραφα που δεν είχαν κανένα IRES. Προηγούμενες μελέτες είχαν επίσης προτείνει ότι ο ιός της ηπατίτιδας C μπορεί να διαθέτει πολλούς μηχανισμούς για την έναρξη της μετάφρασης^[85] και έχει προταθεί ότι η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών μπορεί να συμβεί και απουσία του λειτουργικού IRES^[86, 20].

Εάν η εσωτερική έναρξη είναι ένα σημαντικό βήμα για τον κύκλο ζωής του HCV, μπορεί να φαίνεται παράδοξο ότι το 91-AUG υπάρχει μόνο στις αλληλουχίες του γενότυπου 1b, παρόλα αυτά, το 91-AUG μπορεί να μην είναι η κύρια θέση εσωτερικής έναρξης. Αντίθετα, υπάρχει ένα συντηρημένο AUG κωδικόνιο στη θέση 134(Εικόνα 24). Η έναρξη σε από αυτή τη θέση μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μιας mini-core από την οποία απουσιάζουν οι επίτοποι που αναγνωρίζουν τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη^[20].

Για να βρεθούν οι πιθανές λειτουργίες που μπορεί να έχουν οι πρωτεΐνες mini-core, είναι χρήσιμο να συσχετιστούν με τις λειτουργίες της p21^[87]. Η περιοχή D1 περιέχει τα αμινοτελικά αμινοξέα από 1 έως 120. Το αμινοτελικό τμήμα της περιοχής D1 είναι ανάλογο με της νουκλεοκαψιδικές πρωτεΐνες των φλαβο-ιών, οι οποίες είναι πολύ βασικές πρωτεΐνες που συνδέονται στο RNA, και είναι τυπικά πολύ πιο μικρές από την πρωτεΐνη core p21 του ιού της ηπατίτιδας C. Η ενεργότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης core στο RNA βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 1 έως 75, η οποία είναι μια πολύ βασική περιοχή^[55]. Οι πρωτεΐνες mini-core επειδή ξεκινούν μετά από το κωδικόνιο 75 δεν αναμένεται να μπορούν να συνδέονται αποτελεσματικά το RNA. Για τις mini-core που ξεκινούν μετά το κωδικόνιο 91, δεν θα έχουν ολόκληρη ή την περισσότερη περιοχή της ομοτυπικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών core, η οποία βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 36 έως 91^[44] και 82 έως 102^[88]. Παρόλο που στις mini-cores απουσιάζει το μεγαλύτερο τμήμα της περιοχής 1, προβλέπεται ότι περιέχουν ολόκληρη την περιοχή DII (αμινοξέα 120 έως περίπου 173). Η περιοχή II είναι υδρόφοβη και μεσολαβεί σε αλληλεπιδράσεις με κυτταρικά οργανίδια. Ο εντοπισμός σε κυτταρικά σταγονίδια λιπιδίων σχετίζεται με ένα συντηρημένο μοτίβο προλίνων το οποίο περιέχει προλίνες στις θέσεις 138 και 143 και ένα μοτίβο YATG στα αμινοξέα 164 έως 167^[89]. Βασίζόμενοι στο περιεχόμενο της αμινοξικής αλληλουχίας, Οι πρωτεΐνες mini-core προβλέπεται να συνδέονται στα σταγονίδια λιπιδίων και έτσι μπορεί να παίρνουν μέρος σε κάποιες λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα εκεί, όπως εμπλέκεται και η αυθεντική πρωτεΐνη core p21. Αυτές οι λειτουργίες μπορεί να περιλαμβάνουν τροποποίηση των κυτταρικών αποθηκών σε λιπίδια καθώς και τροποποίηση της διαδικασίας συναρμολόγησης του ιού^[90, 54].

Εκτός από τα σταγονίδια λιπιδίων, η πρωτεΐνη core αλληλεπιδρά με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτή η αλληλεπίδραση μεσολαβεί από ένα συντηρημένο σινιάλο στα αμινοξέα 149 έως 158^[58]. Τα σήματα για εντοπισμό στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο βρίσκονται στα αμινοξέα 112 έως 152^[91, 51]. Τα μιτοχόνδρια παίζουν ένα κεντρικό ρόλο στην κυτταρική απόπτωση και οξειδωτικό στρες. Πολύ ιοί τροποποιούν την απόπτωση του κυττάρου αλληλεπιδρώντας με τα μιτοχόνδρια. Είναι πιθανό οι πρωτεΐνες mini-core να μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον ιό της ηπατίτιδας C και τα μιτοχόνδρια^[20].

2. Στόχοι της εργασίας

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η έκφραση της «υδρόφιλης» περιοχής της πρωτεΐνης core (1-120 αα, περιοχή D1), όσο και της θεωρούμενης mini-core πρωτεΐνης (91-191 αα, περιοχές D2, D3) του ιού της ηπατίτιδας C, σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης. Απώτερος στόχος είναι ο καθαρισμός των προκαρυωτικά εκφραζομένων πρωτεϊνών και η χρησιμοποίησή τους για την ανοσοποίηση πειραματοζώων με σκοπό την δημιουργία πολύκλωνων αντισωμάτων σε κουνέλια.

3.1. Υλικά

3.1.1 Χημικές ουσίες

Στερεές χημικές ουσίες (με αλφαβητική σειρά)

A : Agarose LE (Promega), Acrylamide (BDH), Ammonium peroxodisulfate (Fluka), Acid boric (Fluka)
B: Bromophenol blue (BioRad), Blue dextran (Sigma)
C: Calcium chloride 2-hydrate (Merck), Cesium chloride (AppliChem), Dextran (Sigma)
D: D-Glucose (BDH)
E: EDTA-Na₂ (BDH), Ethidium bromide (Sigma)
G: Glycine (BDH)
L: LB agar (Scharlau)
M: Magnesium acetate (BDH), Magnesium chloride (Merck), Magnesium sulfate (Sigma)
P: Potassium acetate (Merck), Potassium chloride (Merck), Potassium dihydrogen orthophosphate (Merck), Ponceau S (Sigma)
S: Sodium phosphate dibasic heptahydrate (Sigma-Aldrich), Sodium hydrogen carbonate (Merck), Sodium acetate (BDH), Sodium chloride (BDH), Sucrose (saccharose) (Merck)
T: Trizma base (Sigma), Trichloroacetic acid (Merck), Tryptone (Biokar Diagnostics)
Y: Yeast extract (Biokar Diagnostics)
X: Xylene cyanol FF (FisherBiotech), Xylene cyanole FF (Sigma)

Υγρές χημικές ουσίες

Acetic acid glacial (BDH), Acetone (Fluka), Dimethylsulfate (Fluka), Ethanol (BDH), Glycerol (BDH), Hydrochloric acid (BDH), Isopropanol (Labscan), Methanol (Labscan), Mercaptoethanol (Sigma), Temed (Biorad).

3.1.2. Αντιβιοτικά (Bristol-Myers Squib)

Αμπικιλίνη

Stock συγκέντρωση (αποθήκευση στους -20°C): 25mg/ml σε απιονισμένο νερό.
Στα 500ml στερεού θρεπτικού υλικού LB προστίθεται 1ml stock διαλύματος amp.
Στα 5ml υγρού θρεπτικού υλικού LB προστίθενται 5λ stock διαλύματος amp.

Τετρακυκλίνη

Συγκέντρωση stock (αποθήκευση στους -20°C): 5mg/ml σε αιθανόλη,
Στα 10ml υγρού θρεπτικού υλικού LB προστίθενται 26λ stock διαλύματος τετρακυκλίνης.

Χλωραμφαινικόλη

Συγκέντρωση stock (αποθήκευση στους -20°C): 34mg/ml σε αιθανόλη.
Στα 5ml στερεού ή υγρού θρεπτικού υλικού LB προστίθεται 5λ διαλύματος χλωραμφαινικόλης.

3.1.3. Αντισώματα και adjuvant

Anti-His pAb, Santa-Cruze

Πολύκλωνο αντίσωμα IgG κουνελιού, 200 µg/ml. Ο επίτοπος που αναγνωρίζει βρίσκεται στην περιοχή των πολύ-ιστιδινών των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης pET και Xpress.

Mouse Anti-Rabbit pAb, Dako

Πολύκλωνο αντίσωμα mouse anti-rabbit IgG/HRP, 1.3g/L.

Rabbit Anti-Human, Dako

Πολύκλωνο αντίσωμα Rabbit Anti-Human IgG/HRP, 1,3g/L.

Complete και incomplete adjuvant (Sigma)

Freund's adjuvant είναι ένα διάλυμα γαλακτοποίησης του αντιγόνου με ορυκτέλαιο, που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού. Η ονομαζόμενη ως complete μορφή (CFA ή FCA) αποτελείται από απενεργοποιημένα ή νεκρά μυκοβακτήρια, συνήθως *Mycobacterium tuberculosis* (το παθογόνο της φυματίωσης). Το Freund's complete adjuvant είναι αποτελεσματικό για την ενεργοποίηση της κυτταρομεσολαβούμενης ανοσίας και μπορεί να οδηγεί σε πιο αποτελεσματική παραγωγή των βασικών ανοσοσφαιρινών, αλλά αυτό το εξαρτάται από το ζώο μοντέλο που χρησιμοποιείται. Οι εμβολιασμοί με CFA πρέπει να είναι υποδόριες ή ενδοπεριτονιακές, γιατί οι ενδοδερμικές μπορεί να προκαλέσουν έλκωση στο δέρμα και νέκρωση. Οι ενδομυϊκοί εμβολιασμοί μπορεί να οδηγήσουν σε μόνιμη ή παροδική μυϊκή βλάβη, και οι ενδοφλέβιες μπορεί να προκαλέσουν πνευμονική εμβολή. Η ονομαζόμενη incomplete μορφή (IFA ή FIA) είναι το ίδιο ανοσοενισχυτικό, αλλά χωρίς τα συστατικά από το μυκοβακτήριο (απλά νερό σε ορυκτέλαιο). Η απουσία των μυκοβακτηρίων ελαχιστοποιεί τα side-effects. Για αυτό το λόγο, το Incomplete Freund's Adjuvant χρησιμοποιείται για αναμνηστικούς-ενισχυτικούς εμβολιασμούς. Τα αντιγόνα που βρίσκονται σε water-in-oil γαλακτώματα ενεργοποιούν μια δυνατή και μεγάλη διάρκειας ανοσολογική απάντηση κάτι που μπορεί να οφείλεται στην αργή απελευθέρωση του αντιγόνου.

3.1.4. Θρεπτικά υλικά

Στερό θρεπτικό υλικό LB (Laura-Bertani)

Στο 1L αποιονισμένο νερό προστίθεται 35gr LB-Agar σε μορφή σκόνης.

Στη συνέχεια αποστειρώνεται και όταν πέσει η θερμοκρασία του προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό. Σε κάθε τριβλίο Petri επιστρώνονται περίπου 50ml. Αφού στερεοποιηθεί, τα τριβλία αναστρέφονται και αφήνονται όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος αποθηκεύονται αναστραμμένα στους +4 °C.

Υγρό θρεπτικό υλικό LB (Laura-Bertani)

Στο 1L αποιονισμένο νερό προστίθενται:

10 gr Triptone,

5 gr NaCl

5 gr Yeast Extract.

Το διάλυμα αποστειρώνεται και όταν κρυώσει προστίθεται ή όχι το κατάλληλο αντιβιοτικό.

3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Sambrook-Fritsch-Maniatis)

Ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Υπάρχουν διάφορα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα πιο κοινά είναι: Tris οξικό EDTA (TAE) και Tris/Borate/EDTA (TBE). Το TAE έχει τη χαμηλότερη ρυθμιστική ικανότητα αλλά παρέχει καλύτερο διαχωρισμό για μεγαλύτερα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση και περισσότερο χρόνο, αλλά ένα καλύτερο διαχωρισμό. Ένα άλλο διάλυμα με πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα είναι το Loehnings buffer.

Ρυθμιστικά διαλύματα για ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης		
Διαλύματα	Working Solution	Stock Solution/Liter
TAE (1L)	0.5x	50x
	40mM Tris acetate	242gr Tris acetate
	1mM EDTA	57.1ml Glacial acetic acid 100ml EDTA 0.5M pH8
TBE (1L)	1x	10x
	10.8gr Tris base	108gr Tris base
	5.5gr Boric acid	55gr Boric acid
	4ml EDTA 0.5M pH8	40ml EDTA 0.5M pH8
Loehnings (1L)	0.5x	10x
	0.36M Tris base	43.76gr Tris base
	0.3M NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	46.91gr NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O
	0.009M EDTA	3.35gr ή 18ml 0.5M EDTA pH8

Το ρυθμιστικό διάλυμα TE

Το ρυθμιστικό διάλυμα TE είναι ένα διάλυμα που χρησιμοποιείται σε πρωτόκολλα που αφορούν DNA ή RNA. Το "TE" προέρχεται από το στοιχείο: Tris (ρυθμιστικό διάλυμα) και EDTA.Na₂, ένα χημικό μόριο, Το TE χρησιμοποιείται για να προστατεύει σχετικά το DNA ή RNA από την αποικοδόμηση.

Ρυθμιστικό διάλυμα TE, 1L	
Tris base 1M pH:8	10ml
EDTA 0.5M pH:8	2ml
Απιονισμένο νερό	82ml

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

Running buffer, 10X, 1L	
Trisma Base	30.3 g
γλυκίνη	144.1 g
SDS	10g
Απιονισμένο νερό	1L

Ρυθμιστικό διάλυμα για μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα ακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (transfer buffer)

Transfer buffer, 3L	
H ₂ O	2.4L
Trizma base	17.4mg
SDS	1.11mg
Glycine	8.4mg
Meth-OH	600ml

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS

Το ρυθμιστικό διάλυμα PBS είναι ένα αλατούχο διάλυμα που βοηθά στην σταθεροποίηση του pH. Η οσμωμοριακότητά του και η συγκέντρωση των ιόντων του είναι παρόμοια με αυτή του ανθρώπινου σώματος (ισότονο).

PBS 10X ,1L	
NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄ -H ₂ O (MW 137.99)	16.7g
KH ₂ PO ₄	2.4g
Απιονισμένο νερό	1L

Ρυθμιστικό διάλυμα για απομόνωση κομματιών DNA από πήκτωμα ακρυλαμιδίου

Elution buffer (200ml)	
Οξικό αμμώνιο 0,5M, MW 77	7.71gr
Οξικό μαγνήσιο 0,01M, MW 214	0.42gr
SDS 0,1%	2ml 10%
EDTA 0.1M	0.08 ml
απιονισμένο νερό	έως 200ml

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

SDS gel- loading buffer 2X	
50mM Tris Cl (pH 6.8)	
2% SDS	
0.1% μπλε της βρωμοφαινόλης	
10% γλυκερόλη	

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης DNA σε πηκτή αγαρόζης και ακρυλαμιδίου

Τα loading buffers για DNA είναι χρήσιμα επειδή είναι ορατά στο φυσικό φως και συνκαθίζουν με το DNA (που σημαίνει ότι κινούνται με την ίδια ταχύτητα με το DNA ενός ορισμένου

μήκους). Το κυανό της ξυλίνης και το μπλε της βρωμοφαινόλης και κοινά loading buffers και τρέχουν σχεδόν με την ίδια ταχύτητα όπως τα τμήματα DNA που έχουν μέγεθος 5000bp και 300bp αντίστοιχα.

3X gel Loading Buffers Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης DNA σε πηκτή αγαρόζης και ακρυλαμιδίου	
3X Buffer	Θερμοκρασία διατήρησης
0,5% bromophenol blue	Θερμοκρασία δωματίου
0.5% xylene cyanol FF	
75% γλυκερόλη	

3.1.6. *E.coli* κυτταρικές σειρές (Novagen)

BL21(DE3)pLysS

Τα BL21(DE3)pLysS *E.coli* κύτταρα είναι βακτήρια που περιέχουν στο χρωμοσωμικό τους DNA το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης που βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5* και το γονίδιο της T7 lysozyme στο pLysS πλασμίδιο. Η T7 RNA πολυμεράση εκφράζεται με την προσθήκη isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) το οποίο επάγει την υψηλού επιπέδου έκφραση πρωτεϊνών που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή T7 ο οποίος προέρχεται από φορείς έκφρασης (π.χ., pET). Το γονίδιο T7 lysozyme καταστέλλει την ενεργότητα της T7 RNA πολυμεράσης, και έτσι μειώνει το βασικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Αυτό είναι σημαντικό όταν η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι τοξική για τα κύτταρα *E.coli*. Έτσι η παρουσία του T7 lysozyme αυξάνει την ανθεκτικότητα των κυττάρων *E.coli* κυττάρων στην πιθανή τοξικότητα του παραγόμενου προϊόντος. Το pLysS πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφαινικόλη και μια p15A περιοχή αντιγραφής. Οι *E.coli* BL21(DE3)pLysS σειρές προέρχονται από *E. coli* B σειρές και έχουν απολέσει τόσο την πρωτεάση *lon* όσο και την μεμβρανική πρωτεάση *ompT* οι οποίες θα μπορούσαν να αποικοδομήσουν τις εκφραζόμενες πρωτεΐνες. Γενότυπος: F⁻, *ompT*, *hsdS_B* (r_B⁻, m_B⁻), *dcm*, *gal*, λ(DE3), pLysS, Cm^r.

XL-1 blue

Τα XL1-Blue κύτταρα επιτρέπουν την επιλογή μπλε-λευκών αποικιών για ανασυνδιασμένα πλασμίδια και είναι η βασικό στέλεχος που χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση ρουτίνας. Τα XL-1 cells είναι ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη και έχουν απολέσει την ενεργότητα της ενδονουκλεάσης (*endA*), κάτι που αυξάνει την ποιότητα του miniprep DNA. Επίσης έχουν χάσει την ικανότητα ανασυνδιασμού (*recA*), κάτι που αυξάνει την σταθερότητα του εισαγόμενου πλασμιδίου. Η *hsdR* μετάλλαξη προλαμβάνει την διάσπαση του κλωνοποιημένου DNA από το σύστημα ενδονουκλεασών *EcoK*. Τα γονίδια *lacIqΔM15* του επισώματος F['] επιτρέπει την επιλογή μπλε-λευκών αποικιών. Γενότυπος: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F['] *proAB lacIqΔM15 Tn10* (Tetr)].

DH5aF[']

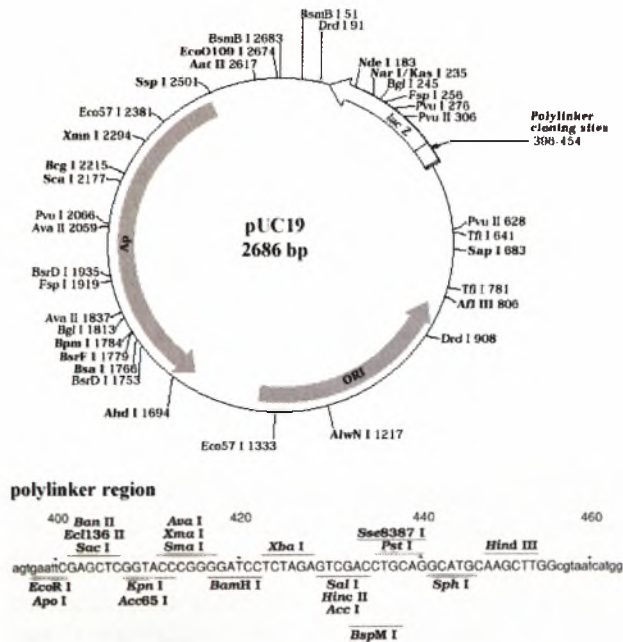
Τα DH5aF['] κύτταρα είναι ένα γνωστό στέλεχος *E.coli* που χρησιμοποιείται για κλωνοποιήσεις ρουτίνας. Επιτρέπει την επιλογή με μπλε-λευκές αποικίες, και οι μεταλλάξεις *recA1* και *endA1* αυξάνουν την σταθερότητα του ενθέματος και την ποιότητα του πλασμιδιακού DNA των minipreps. Γενότυπος: F['] *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17*(r_K⁺, λ⁻).

3.1.7. Πλασμιδιακοί φορείς

pUC19 (Novagen)

Ο pUC19 είναι ένα πλασμιδιακό φορέας κλωνοποίησης που δημιουργήθηκε από τον Messing και συνεργάτες στο πανεπιστήμιο της Καλιφόρνιας. Το p στο όνομα του φορέα προέρχεται από το plasmid και το UC από το πανεπιστήμιο στο οποίο δημιουργήθηκε. Είναι ένα κυκλικό δίκλωνο DNA και έχει μέγεθος 2686 ζεύγη βάσεων. Ο pUC19 είναι ένας από του πιο συχνά χρησιμοποιημένους φορείς κλωνοποίησης καθώς τα κύτταρα στα οποία εισέρχεται και πολλαπλασιάζεται μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από μη ανασυνδιασμένα κύτταρα, λόγω του διαφορετικού χρώματος των αποικιών πάνω

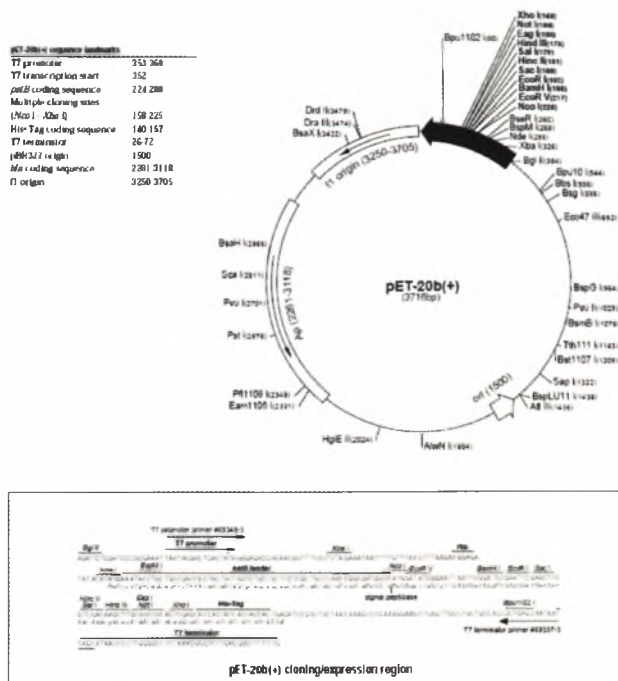
σε μέσο ανάπτυξης. Ο pUC19 αποτελείται από τα εξής γονίδια (Εικόνα 27): Ένα γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη, amp^R , ένα γονίδιο $lac Z$ (που κωδικοποιεί για την β-γαλακτοσιδάση) από το γένωμα του *E. coli*. Η πολλαπλή θέση κλωνοποίησης ή πολυσυνδέτης (multiple cloning site, MCS) είναι μέσα στο γονίδιο $lac Z$ (τα κωδικόνια 6-7 των $lac Z$ έχουν αντικατασταθεί από την MCS), όπου υπάρχουν πολλαπλές θέσεις για πέψεις για πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η περιοχή ori ή rep lication, rep προέρχεται από τον φορέα pMB1. Ο pUC19 φορέας κλωνοποίησης είναι μικρός αλλά μπορεί να αντιγράφεται σε πολλά αντίγραφα μέσα στο κύτταρο. Η ιδιότητα αυτή είναι αποτέλεσμα της έλλειψης του γονιδίου top και μιας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο rep του pMB1.



Εικόνα 27: Χάρτης του pUC19 και η πολλαπλή θέση κλωνοποίησης. Τα ένζυμα που έχουν μια μόνο θέση πέψης συμβολίζονται με έντονα γράμματα. Ο pUC19 μπορεί να δώσει περίπου 75 αντίγραφα σε κάθε κύτταρο στους 37°C και πάνω από 200 αντίγραφα σε ένα κύτταρο στους 42°C. Η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων ξεκινάει στο πρώτο T στην αλληλουχία... TCGCGCGTTT... και προάγει δεξιόστροφα γύρω από το μόριο με κατεύθυνση από το lac στο Ap .

pET20b(+)^(Novagen)

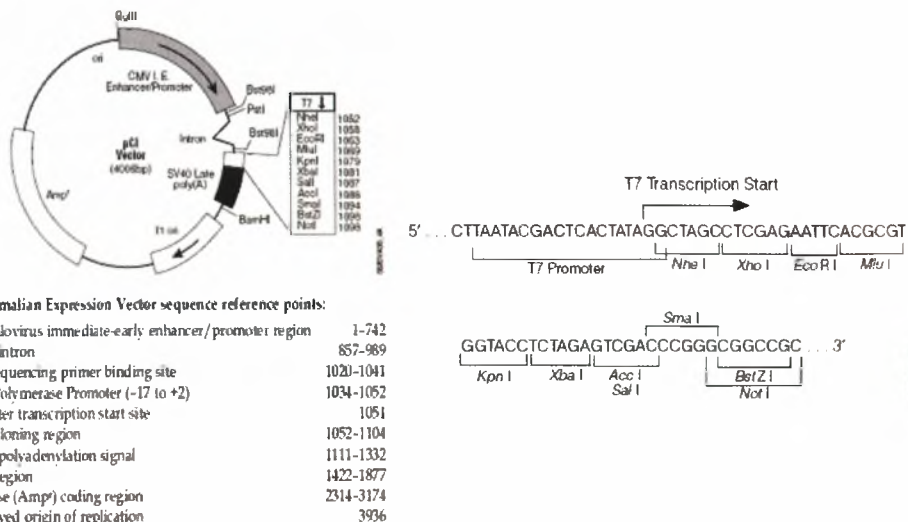
Ο πλασμιδιακός φορέας pET (3716bp) σχεδιάστηκε για να κάνει δυνατή τη γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας της επιθυμητής πρωτεΐνης. Αυτό το πλασμίδιο περιέχει ένα γονίδιο $lacI$ το οποίο κωδικοποιεί την κατασταλτική πρωτεΐνη του οπερονίου της λακτόζης lac , έναν T7 υποκινητή ειδικό μόνο για την T7 RNA πολυμεράση (όχι την βακτηριακή RNA πολυμεράση) η οποία δεν υπάρχει στο προκαρυωτικό γένωμα, έναν lac operator ο οποίος μπορεί να μπλοκάρει την μεταγραφή, μια περιοχή πολλαπλής θέσης κλωνοποίησης-πολυσυνδέτης, μια θέση f1 της αντιγραφής (έτσι ώστε το μονόκλωνο πλασμίδιο να μπορεί να παραχθεί όταν συν-μολύνεται με τον M13 βοηθητικό φάγο), ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, και μια θέση $ColE1$ της αντιγραφής. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b(+)^(Novagen) δεν διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης ($lacZ$), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με την μέθοδο της επιλογής των μπλε/άσπρων αποικιών. Αρχικά το επιθυμητό γονίδιο κλωνοποιείται στο pET πλασμίδιο στην περιοχή του πολυσυνδέτη. Ο υποκινητής T7 και ο lac operator βρίσκονται στο 5' του γονιδίου που εισάγεται. Ο pET-20b(+)^(Novagen) φορέας περιέχει ένα N-τελικό $pelB$ σιγνάλο για πιθανή περιπλασματική τοποθέτηση και μια επιπλέον C-τελική αλληλουχία His-Tag (κασέτα με έξι ιστιδίνες). Όταν η T7 RNA πολυμεράση είναι παρούσα και ο lac operator δεν καταστέλλεται, ξεκινά η μεταγραφή του επιθυμητού γονιδίου. Μετά από την κασέτα με τις έξι ιστιδίνες υπάρχει ένα κωδικόνιο λήξης. Η κασέτα των έξι ιστιδίνων στο C-τελικό άκρο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης με χρωματογραφία νικελίου η οποία τις δεσμεύει. Επιπλέον μπορεί να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση χρησιμοποιώντας τον T7 terminator primer.



Εικόνα 28: Ο pET-20b(+) πλασμιδιακός φορέας έκφρασης. Παρουσιάζεται ο υποκινητής της T7 RNA πολυμεράσης και ο πολυσυνδέτης (polylinker). Στο πολυσυνδέτη διακρίνονται και οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων NdeI και XhoI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποίηση στην συγκεκριμένη εργασία.

pCI (Promega)

Ο pCI είναι ένας πλασμιδιακός φορέας έκφρασης που έχει σχεδιαστεί για να προωθεί την ιδιόσυστατη έκφραση των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA στα κύτταρα θηλαστικών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για μόνιμη όσο και για παροδική έκφραση. Ο φορέας αυτός προέρχεται από τον pGEM-3Zf φορέα και για αυτό το λόγο μπορεί να αντιγράφεται πολλές φορές και περιέχει μια έναρξης της αντιγραφής του φάγου f1. Ο pCI φορέας έκφρασης περιέχει των ενισχυτή/υποκινητή των πρώιμων γονιδίων του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (CMV), ο οποίος επιτρέπει την ιδιόσυστατη έκφραση των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Καθοδικά της αλληλουχίας ενισχυτή/υποκινητή βρίσκεται ένα χιμαιρικό ιντρόνιο, του οποίου η παρουσία αυξάνει το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου. Ένας T7 υποκινητής βρίσκεται καθοδικά του ιντρονίου. Αυτός ο υποκινητής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση RNA μετάγραφων, χρησιμοποιώντας την RNA πολυμεράση. Η πολλαπλή θέση κλωνοποίησης βρίσκεται καθοδικά του T7 υποκινητή. Το αποτελεσματικό SV40 σήμα για πολλαδενυλίωση βρίσκεται στον pCI πλασμιδιακό φορέα. Τα σήματα πολλαδενυλίωσης προκαλούν τον τερματισμό της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II και οδηγούν την σύνθεση περίπου 200-250 κατάλοιπων αδενοσίνης στο 3' άκρο του RNA μετάγραφου.



Εικόνα 29: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα ευκαριωτικής έκφρασης pCI.

3.1.8 Στήλες χρωματογραφίας (QIA expressionist)

Η έκφραση και ο καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών διευκολύνουν την παραγωγή και τον λεπτομερή χαρακτηρισμό οποιασδήποτε πρωτεΐνης. Παρά την μεγάλη ποικιλία των συστημάτων ετερόλογης έκφρασης που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται αυτήν την στιγμή για να παραγάγουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, ο καθαρισμός των πρωτεϊνών που παράγονται μπορεί να είναι προβληματικός. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλασσικές τεχνικές καθαρισμού, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις οι τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA κάνουν δυνατή την κατασκευή των πρωτεϊνών σύντηξης (fusion proteins), στις οποίες συγκεκριμένες ετικέτες συγγένειας (affinity tags) προστίθενται πρωτεϊνική ακολουθία που μας ενδιαφέρει. Η χρήση αυτών των ετικετών συγγένειας απλοποιεί τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σύντηξης με την χρήση μεθόδων χρωματογραφίας συγγένειας.

Σύστημα QIA expressionist™

Το σύστημα QIA express® είναι βασισμένο στην επιλεκτικότητα και στη συγγένεια της στήλης συγγένειας QIAGEN, την κατοχυρωμένη με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μήτρα χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου nickel-nitilotriacetic acid (Ni-NTA) για τα βιομόρια που έχουν συντηχθεί με έξι διαδοχικά κατάλοιπα ιστιδινών. Η ουρά των έξι ιστιδινών (6xHis) μεσολαβεί στην σύνδεση με την στήλη Ni-NTA. Είναι φτωχό ανοσογόνο και σε pH 8.0 η ουρά είναι αφόρτιστη, και επομένως γενικά δεν επηρεάζει την έκκριση, τον εντοπισμό ή την αναδίπλωση την συντηγμένης πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Τις περισσότερες φορές, η αλληλουχία των 6xHis δεν παρεμβάλετε στην δομή και την λειτουργία της καθαρισμένης πρωτεΐνης όπως αποδείχτηκε από μια ποικιλία πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων ένζυμων, μεταγραφικών παραγόντων και εμβολίων. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της αλληλουχίας ιστιδίνης 6xHis είναι ότι επιτρέπει την ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε metalchelating επιφάνειες όπως η Ni-NTA HisSorb™ Strips ή Plates και επομένως διευκολύνει πολλές μελέτες αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Επιπλέον, Anti-His αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση της συντηγμένης πρωτεΐνης.

Υλικά της χρωματογραφίας Ni-NTA (QIAexpressionist)

Ni-NTA Agarose

Η Ni-NTA αγαρόζη αποτελείται από Ni-NTA συζευγμένη σε σεφαρόζη. Η υψηλή επιφανειακή συγκέντρωση του προσδέτη NTA είναι σημαντική για την πρόσδεση περίπου 5–10 mg 6xHis-συζευγμένης πρωτεΐνης σε κάθε ml ρεσίνης. Η αγαρόζη Ni-NTA είναι σταθερή και εύκολη στο χειρισμό. Το σύμπλοκο Νικελίου--NTA ρητίνη παρέχεται ως ένα 50% διάλυμα με αιθανόλη. Πλένεται με απιονισμένο νερό για να φύγει η αιθανόλη και το pH της ρυθμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα πριν από την χρήση.

Ρυθμιστικά διαλύματα για καθαρισμό σε συνθήκες αποδιάταξης

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης/πρόσδεσης, 1L :	
100mM NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	13,79gr (MW 137.99)
10mM Tris base pH8	1,214gr (MW 121.14)
8M ουρία	480gr (MW 60.06)
Διόρθωση του pH στο 8 με προσθήκη HCl ή άλλο Tris base (όχι NaOH)	
Ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος, 1L:	
100mM NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	13,79gr (MW 137.99)
10mM Tris base pH8	1,214gr (MW 121.14)
8M ουρία	480gr (MW 60.06)
Διόρθωση του pH στο 6,3 με προσθήκη HCl	
Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, 1L:	
100mM NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	13,79gr (MW 137.99)
10mM Tris base pH8	1,214gr (MW 121.14)
8M ουρία	480gr (MW 60.06)
Διόρθωση του pH στο 4,5 με προσθήκη HCl	

Λόγω της διάσπασης της ουρίας τα παραπάνω διαλύματα πρέπει να φτιάχνονται αμέσως πριν από την χρήση. Για να διαλυθεί πιο εύκολα η ουρία το διάλυμα της μπορεί να ζεσταθεί.

3.1.9 Εκκινητές (Invitrogen)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την δημιουργία των επιθυμητών κομματιών του γονιδίου της core (1-120αα και 91-191αα για ευκαρυωτική και προκαρυωτική έκφραση) αποτελούνται μια μικρή αλληλουχία συμπληρωματική με τα άκρα των περιοχών του γονιδίου της core που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Τα τρία ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στην εικόνα 30. Έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε τα κομμάτια DNA που θα προκύψουν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης να έχουν στο 5' άκρο τους θέση πέψης για το ένζυμο περιορισμού *NdeI* για τα δυο πρώτα ζευγάρια και για το ένζυμο *NheI* για το τρίτο ζευγάρι. Το 3' άκρο των εκκινητών περιέχει θέση πέψης για το ένζυμο *XhoI* για το πρώτο και τρίτο ζευγά και για το ένζυμο *HindIII* για το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών. Οι αλληλουχίες με τους μαύρους χαρακτήρες είναι πρόσθετες τεχνητές αλληλουχίες. Οι επισημασμένες αλληλουχίες είναι θέσεις κοπής ενζύμων περιορισμού. Με γκρι επισημαίνονται οι αλληλουχία πέψης του ενζύμου *NdeI*, με πράσινο του *XhoI*, με κίτρινο του *NheI* και με γαλάζιο του *HindIII*. Διακρίνεται το τεχνητό εναρκτήριο κωδικόνιο στις αλληλουχίες του εκκινητή core 1a 91-s και το τερματικό κωδικόνιο στην αλληλουχία του M1a-191as εκκινητή.

core1-s: 5'-ggaattccatagagcacgaat-3' Tm ,22mer
core120-as: 5'-cccaagcttacccaattggg-3' Tm ,22mer

core91-s: 5'-ccatatgtcgggtgggaggat-3' Tm 68°C, 23mer
core191-as: 5'-tgtgcccgcttcagcagcagc-3' Tm 70°C, 23mer

M1a-91a: 5'-ctagctagcatggggtgggaggatggctc-3' Tm ,30mer
M1a-191as: 5'-actgacacgggccaagtcggatcagcagc-3' Tm ,30mer

core 1a	-----ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAACGTAACACCAACCG	50
core1-s	GGAATTCATATGAGCACGAAT	22

core 1a	348 GGTCCGCAATTTGGGTAAAGGTCATCGATACCCCTTACGTCGGGCTTCGCCGACCTCATGG	408
core120-as	-----CCCAATTGGGTAGCTTGGG-----	21
	* ***** *	
core 1a	241 TACCCCTTGGCCCTCTATGGCAATGAGGGTTGCCGGTGGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCC	301
core91-s	-----CCATATGTCCGGGTGGGGCGGGAT-----	23

core 1a	517 CTTCTCTATCTTCTCTTGGCCCTGCTCTCTTGGCTGACTGTGCCCGCTTCAGCC-----	573
core191-as	-----TGTGCCCGCTTCAAGCGG-----	20

core 1a	241 TACCCCTTGGCCCTCTATGGCAATGAGGGTTGCCGGTGGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCC	301
M1a-91a	-----CTAGCTAGCATGGGGTGGGGCGGGATGGCTC-----	30
	* ***** *	
core 1a	523 CTATCTTCTCTTCTTGGCCCTGCTCTCTTGGCTGACTGTGCCCGCTTCAGCC-----	573
M1a-191as	-----TGACTGTGCCCGCTTCAAGCGG-----	30

Εικόνα 30: Οι αλληλουχίες των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική της PCR. Οι αλληλουχίες με τους μαύρους χαρακτήρες είναι πρόσθετες τεχνητές αλληλουχίες. Οι επισημασμένες αλληλουχίες είναι θέσεις κοπής ενζύμων περιορισμού. Με γκρι επισημαίνονται οι αλληλουχίες πέψης του ενζύμου *NdeI*, με πράσινο για το ένζυμο *XhoI*, με κίτρινο για το ένζυμο *NheI* και με γαλάζιο για το *HindIII*. Διακρίνεται το τεχνητό εναρκτήριο κωδικόνιο στις αλληλουχίες του εκκινητή core 1a 91-s και το τερματικό κωδικόνιο στην αλληλουχία του M1a-191as εκκινητή.

3.1.10. Εκμαγεία για κλωνοποίηση

Το εκμαγείο που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των περιοχών 1-120 αα και 1-191 αα για προκαρυωτική και ευκαρυωτική έκφραση είναι οι αλληλουχίες του γονιδίου της πρωτεΐνης core-1α του ιού της ηπατίτιδας C, οι οποίες είναι κλωνοποιημένες στα πλασμίδια ρHPI 8153, ρHPI 8161 και ρHPI 1327 (core1α 1-191αα). Στην εικόνα 31 παρουσιάζεται ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδίου core 1α του ιού της ηπατίτιδας C.

```

1  atgagcacga atcctaaaacc tcaaagaaa accaaacgta accccaaccg tcgcccacag 60
   tactcgtgct taggatttgg agtttctttt tggtttgcat tgtggttggc agcgggtgtc
61  gacgtcaaagt tcccggttgg cggtcagatc gttggttggag tttacttgtt gccgcgcagg 120
   ctgcagttca agggcccacc gccagtctag caaccaccctc aaatgaaaa cggcgcggtcc
121  gcccctagat tgggtgtgcg cgcgacgagg aagacttccg agcggtcgca accctcgaggt 180
   ccgggatcta acccacacgc gcgctgctcc ttctgaaggc tcgccagcgt tggagctcca
181  agacgtcagc ctatccccaa ggcacgtcgg cccgaggga ggacctggc tcagccggg 240
   tctgcagtcg gataggggtt ccgtgcagcc ggcctcccgt cctggacccg agtcgggccc
241  tacccttggc ccctctatgg caatgagggt tgcgggttggg cgggatggct cctgtctccc 300
   atgggaaccg gggagatacc gttactccca acgcccacccc gccctaccga ggacagaggg
301  cgtggctctc ggcctagctg gggcccaca gaccccggc gtaggtcgcg caattttgggt 360
   gaccgagag ccggatcgac cccgggtgt ctgggggccg catccagcgc gttaacccca
361  aaggtcatcg atacccttac gtgcggcttc gccgacctca tggggtacat accgctcgtc 420
   ttccagtagc tatgggaatg cacgccgaag cgcctggagt accccatgta tggcgagcag
421  ggcgcccctc ttggagggcg tgcagggcc ctggcgcatg gcgtccgggt tctggaagac 480
   ccggggggag aacctccgcg acggtcccgg gaccgcgtac cgcaggccca agaccttctg
481  ggcgtgaact atgcaacagg gaaccttcct ggttgctctt tctctatctt ccttctggcc 540
   ccgcacttga tacgttgtcc cttggaagga ccaacgagaa agagatagaa ggaagaccgg
541  ctgctctctt gcctgactgt gcccgcttca gcc 573
   gacgagagaa cggactgaca cgggcgaggt cgg

```

Εικόνα 31: Νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου core τύπου 1a του ιού της ηπατίτιδας C, που αποτελείται από 573bp (από το αρχείο του εργαστηρίου).

3.1.11. Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές

ΒΗΚ-21

Η κυτταρική σειρά ΒΗΚ-21 προέρχεται από νεφρό hamster ηλικίας μιας ημέρας. Η μορφολογία των κυττάρων είναι παρόμοια με ινοβλάστες. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υλικό DMEM με 10% FBS ελεύθερο από αντισώματα σε θερμοκρασία 37°C και συγκέντρωση CO₂ 5%, προσκολλημένα στο στρώμα κολλαγόνου της πλάκας. Για το πέρασμα των κυττάρων χρησιμοποιείται 0.25% τρυψίνη.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Υλικά:

Vent DNA πολυμεράση (New England Biolabs, 2000U/ml)	Ρυθμιστικά διαλύματα
Ένα unit της Vent DNA πολυμεράσης είναι η ποσότητα του ενζύμου που ενσωματώνει 10nmol dNTP σε acid-απορροφητικό υλικό σε 30 min στους 75° C.	Διατήρηση: 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM dithioerythritol, 0.1% Triton X-100 και 50%glycerol (v/v), pH 7.4 (-20° C).

Μέθοδος:

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την δημιουργία των επιθυμητών κομματιών του γονιδίου της core (1-120aa και 1-191aa) τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την κλωνοποίηση. Ως εκμαγείο χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pHPI 1327 για την ενίσχυση του τμήματος 1-120 και το πλασμίδιο pHPI 8153 για την ενίσχυση του τμήματος 1-191, τα οποία περιέχουν ολόκληρο το γονίδιο της core (1-191). Η αντίδραση περιέχει: πολυμεράση Vent (Roche), τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), εκκινητές (primers), το εκμαγείο pHPI 1327 ή pHPI 8153 και νερό. Οι εκκινητές αποτελούνται μια μικρή αλληλουχία συμπληρωματική με τα άκρα των περιοχών του γονιδίου της core που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Περιέχουν 22 περίπου νουκλεοτίδια και έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε τα κομμάτια που θα προκύψουν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης να έχουν στο 5' άκρο τους θέση πέψης για το ένζυμο περιορισμού *NdeI* και στο 3' άκρο τους θέση πέψης για το ένζυμο περιορισμού *HindIII* και *XhoI*. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στα στην ενότητα 3.1.9. Οι αντιδράσεις εισάγονται στη συσκευή PCR και αυτή ρυθμίζεται έτσι ώστε να πραγματοποιήσει τα πρόγραμμα που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Βήματα		core 1-120	core 1-191
Αρχικό βήμα αποδιάταξης	5 min	94°C	94°C
Αποδιάταξη	1 min	94°C	94°C
Υβριδισμός εκκινητών	30 sec	54°C	65,5°C
Επιμήκυνση	1 min	72°C	72°C
Τελικό βήμα επιμήκυνσης	10 min	72°C	72°C
Τελικό βήμα	∞	4°C	4°C
30 κύκλοι			
Υλικά		core 1-120	core 1-191
10Xbuffer		10λ	10λ
10 mM core91-s		-	2λ
10 mM core 191-as		-	2λ
10 mM core 1-s		2λ	-
10 mM core 120-as		2λ	-
100 mM MgSO ₄		6λ	3λ
10 mM dNTPs		5λ	5λ
Vent polymerase		0,2λ	0,2λ
10 ng /λ pHPI 8153		-	1λ
10 ng /λ pHPI 1327		1λ	-
H ₂ O		74λ	77λ
Total		100λ	100λ

Η συγκέντρωση του MgSO₄ που χρησιμοποιείται στις αντιδράσεις έχει βρεθεί ότι είναι η βέλτιστη από επιμέρους αντιδράσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις MgSO₄.

3.2.2. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (ligation reaction)

Η σύνδεση ενός τμήματος DNA με ένα πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των φωσφορικών ομάδων στα 5' άκρα και των υδροξυλομάδων στα 3' άκρα των δίκλωνων μορίων DNA. Το ένζυμο T4 DNA λιγάση (Roche) καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα σε 3'-υδροξυλικά και 5'- φωσφορικά άκρα δίκλωνων μορίων DNA με εκφυλισμένα ή τυφλά άκρα. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης μεταξύ ενός επιθυμητού γονιδίου και ενός πλασμιδιακού φορέα, είναι καλό τα δύο αυτά μόρια να είναι καθαρισμένα με κατακρύμνηση με αιθανόλη. Ο πλασμιδιακός φορέας πρέπει να έχει αποφωσφορυλιωμένα άκρα από την αλκαλική φωσφατάση. Η ποσότητα του ενθέματος που θα προστεθεί στην αντίδραση θα εξαρτηθεί και από την ένταση της ζώνης που δείχνει το κάθε μόριο κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Υλικά:

T4 DNA λιγάση (Roche, 1000U/ml)	Ρυθμιστικά διαλύματα
Ένα unit της λιγάσης T4 DNA είναι η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 nmol [³² P] πολυφωσφορικού σε Norit-απορροφητικό υλικό σε 20 min στους 37° C. (εκφυλισμένα άκρα) Ένα unit T4 DNA λιγάσης συνδέει πάνω από το 95% 1 mg λDNA κομμένο με <i>Hind</i> III σε 30 ml 1xligation buffer με επώαση στους 4° C για 16 h.	Διατήρηση: 20 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM dithioerythritol, 50% glycerol (v/v), pH 7.5 (4° C) Ligation buffer: για την T4 DNA λιγάση, 10X του διαλύματος: 660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , 10 mM dithioerythritol, 10 mM ATP, pH 7.5 (20° C)

Μέθοδος:

Σε 50 - 100 ng από το πλασμιδιακό DNA προσθέτουμε το ένθεμα DNA σε τριπλάσια μοριακή (όχι απαραίτητα ποσοτική) συγκέντρωση. Ένας καλός τρόπος υπολογισμού της ποσότητας του ενθέματος είναι ο τύπος:

$$\text{ng ενθεματος} = 3 \frac{(\text{ng φορεα} \times \text{μεγεθος}(Kbp) \text{ ενθεματος})}{\text{μεγεθος}(Kbp) \text{ φορεα}}$$

Οπότε προσθέτουμε ως εξής με τελικό όγκο 30λ:

1. dH₂O έτσι ώστε να έχουμε τελικό όγκο 30 μl
2. Πλασμιδιακό φορέα 50-100 ng
3. Ένθεμα όσο υπολογίστηκε
4. ligation buffer 10X, 3λ
5. T4 DNA λιγάση 100u (1u/μl), 3λ

Επώαση στους 16 °C όλη τη νύχτα (περίπου 20 ώρες)

3.2.3. Απομόνωση κομματιών DNA από πήκτωμα ακρυλαμιδίου (DNA fragment extraction from acrylamide gels)

Με την μέθοδο αυτή καθαρίζονται τα κομμάτια που θα χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση σύνδεσης μορίων (ligation reaction) από τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, τους εκκινήτες και το MgSO₄, το οποίο μπορεί να παρεμποδίσει την αντίδραση.

Μέθοδος:

1. Αρχικά όλη ζώνη της αντίδρασης PCR κόβεται από το πήκτωμα ακρυλαμιδίου TBE 5%. Η εξαγωγή πραγματοποιείται σε υπεριώδες φως με προσοχή έτσι ώστε να είναι όσο το δυνατόν λιγότερος ο όγκος του ακρυλαμιδίου που δεν περιέχει την ζώνη που μας ενδιαφέρει.
2. Το κομμάτι πήκτωματος τεμαχίζεται με ένα tip και διαλύεται σε μια ποσότητα elution buffer η οποία να το καλύπτει (περίπου 500λ) και αφήνεται όλη νύχτα στους 37°C.

- Μεταφορά του υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα 500λ elution buffer και επώαση για 2-4 ώρες στους 37°C.
- Μεταφορά του υπερκειμένου και διήθηση των δυο υπερκειμένων μέσα από ένα tip του οποίου τη μύτη έχει εφαρμοστεί μικρή ποσότητα υαλοβάμβακα εμποτισμένο με σιλικόνη. Με τον τρόπο αυτό η πηκτική παραμένει πάνω στον υαλοβάμβακα ενώ το elution buffer με το DNA περνάει από αυτόν.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται η μέθοδος της κατακρύμνησης με αιθανόλη (ενότητα 3.2.9).

3.2.4. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης πλασμιδιακών φορέων (SAP)

Η αλκαλική φωσφατάση SAP καταλύει την απομάκρυνση των 5' φωσφορικών ομάδων από DNA και RNA. Επειδή τα κομμάτια τα οποία έχουν αποφωσφορυλιωθεί από την αλκαλική φωσφατάση δεν διαθέτουν το 5' φωσφορικό άκρο που απαιτείται από την λιγάση, δεν μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται σε στρατηγικές κλωνοποίησης για να μειώσει την ποσότητα των μη ανασυνδισμένων- πατρικών πλασμιδίων. Αντίθετα από την αλκαλική φωσφατάση που προέρχεται από έντερο μοσχαριού (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP), η SAP μπορεί να απενεργοποιηθεί στους 65°C για 15 λεπτά. Το 1u είναι το ποσοτητα του ένζυμου που υδρολύει 1mmol p-nitrophenyl-phosphate σε p-nitrophenol σε 1min στους 37°C.

Υλικά:

Αλκαλική φωσφατάση (Roche)	Διάλυμα αποφωσφορυλίωσης
10000U/ml	10x0.5 M Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , pH 8.5, 20°C
Διατήρηση: 50mMKCl, 10mM tris/HCl (pH 8.2), 1mM MgCl ₂ , 0.1mM ZnCl ₂ και 50% glycerol στους -20°C	

Μέθοδος:

- Η αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού φορέα με ένζυμο περιορισμού καθαρίζεται με κατακρύμνηση με αιθανόλη και το DNA επαναδιαλύεται με:

Συστατικά	Ποσότητα
dH ₂ O	270λ
CIAP Buffer	30λ
Ένζυμο CIAP	0,5U/ μg DNA
Τελικός όγκος	περίπου 300λ

- Επώαση για 3 ώρες στους 37 °C/ 25min.
- Ακολουθεί καθαρισμός με κατακρύμνηση με αιθανόλη για να απομακρυνθούν όλα τα συστατικά της αντίδρασης CIAP.
- Μετά τον παραπάνω καθαρισμό μπορούμε να μετρήσουμε την συγκέντρωση του πλασμιδιακού φορέα και να ακολουθήσει η αντίδραση σύνδεσης μορίων (ligation reaction).

3.2.5. Προετοιμασία *E.coli*. για μετασχηματισμό

Μέθοδος:

- Εμβολιασμός βακτηριακών κυττάρων (DH5a, BL21 ή XL1 blue) σε ένα τριβλίο Petri με το κατάλληλο αντιβιοτικό ανάλογα την κυτταρική σειρά. Επώαση όλο το βράδυ στους 37°C.
- Εμβολιασμός μιας αποικίας σε 25ml LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση όλο το βράδυ στους 37°C.
- Εμβολιασμός της καλλιέργειας των 25ml σε 500ml LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό και επώαση στους 37°C μέχρι OD_{600nm}=0.5 (περίπου 1,5-2 ώρες).
- Πάγωμα των κυττάρων ανακινώντας την φλάσκα σε πάγο. Από αυτό σημείο είναι απαραίτητο να παραμένουν τα κύτταρα στο πάγο.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στους 4°C/5000rpm/10min.

- Επαναδιάλυση του ιζήματος με 250ml παγωμένου CaCl_2 0,1M (αποστειρωμένο). Αφήνονται στον πάγο για 20min.
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στους $4^\circ\text{C}/5000\text{rpm}/15\text{min}$
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με 25ml παγωμένου CaCl_2 0,1M (αποστειρωμένο). Αφήνονται στον πάγο για 2 ώρες.
- Προσθήκη 5ml αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%.
- Μοίρασμα των κυττάρων σε tube (500 μl σε κάθε ένα) και μεταφορά γρήγορα σε υγρό άζωτο. Απομάκρυνση από το υγρό άζωτο με μια λαβίδα και αποθήκευση στους -80°C .

3.2.6. Μετασχηματισμός των βακτηρίων (transformation)

Μέθοδος:

- Δεκτικά κύτταρα DH5I, XL1 blue ή BL21 stock (-80°C) τοποθετούνται σε πάγο.
- 100 μl διαλύματος βακτηρίων μεταφέρονται με στείρες συνθήκες σε πλαστικό σωλήνα των 15 ml. Προσθήκη του DNA που θέλουμε να εισάγουμε. Ο όγκος του DNA που θα προστεθεί δεν πρέπει να ξεπερνάει το 5 % του όγκου των δεκτικών κυττάρων (συνήθως όλη η αντίδραση ligation).
- Επώαση για 30 min στο πάγο.
- Heat-shock στο υδατόλουτρο στους 37°C για 2 min. Σε αυτό το στάδιο το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισέρχεται στα κύτταρα.
- Προσθήκη 2 ml φρέσκου, προζεσταμένου και αποστειρωμένου LB χωρίς αντιβιοτικό για να πολλαπλασιαστούν τα βακτήρια για 1 ώρα στους 37°C χωρίς επιλογή από αντιβιοτικό.
- Τα βακτήρια που έχουν προσλάβει πλασμίδιο που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, μπορούν να αναπτυχθούν σε υλικό με το αντιβιοτικό. Αν το πλασμίδιο που χρησιμοποιούμε κατέχει επίσης το σύστημα επιλογής άσπρων και μπλε αποικιών (π.χ. pUC19), τα μετασχηματισμένα κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο με το γονίδιο που εισάχθηκε μπορούν να διακριθούν από τα κύτταρα που έχουν το πλασμίδιο χωρίς το γονίδιο από το χρώμα της αποικίας πάνω στο στερεό θρεπτικό υλικό. Το γονίδιο *lac Z* του πλασμιδίου, του οποίου η σύνθεση μπορεί να επαχθεί με IPTG, είναι ικανό για να αντικαταστήσει την λειτουργία του μη λειτουργικού γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης του ξενιστή (μετάλλαξη lacZDM15). Παρουσία του IPTG στο μέσο ανάπτυξης, τα βακτήρια συνθέτουν και τα δυο ένζυμα. Τα δυο ένζυμα μαζί μπορούν να υδρολύσουν το X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside) και να σχηματιστούν μπλε αποικίες σε μέσο με X-gal. Η είσοδος του ξένου DNA στην περιοχή κλωνοποίησης (MCS) που είναι μέσα στο *lac Z* γονίδιο προκαλεί απενεργοποίηση β-γαλακτοσιδάσης. Έτσι τα βακτήρια που φέρουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια στην περιοχή κλωνοποίησης δεν μπορούν να υδρολήσουν το X-gal, με αποτέλεσμα να δημιουργούν λευκές (άχρωμες) αποικίες.

Επιστρώνουμε 80 μl 10 mg/ ml X- gal + 20 μl 100mM IPTG σε κάθε τρυβλίο, με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου pasteur και το τοποθετούμε τα τρυβλία σε σκοτεινό μέρος να απορροφηθεί το μείγμα. Κατόπιν, τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλία LB- άγαρ οπότε όσα έχουν παραλάβει πλασμίδιο και εκφράσει το γονίδιο ανθεκτικότητας πολλαπλασιάζονται περαιτέρω. Τα τρυβλία επωάζονται ανάποδα στους 37°C για 16 ώρες περίπου.

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

Υλικά:

Διάλυμα STET (διατηρείται στους 4°C)	Διάλυμα λυσοζύμης
8% Σουκρόζη	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stock λυσοζύμη, σε 0.25M Tris HCl (pH 8.0)
50mM Tris (pH 8.0)	
50mM EDTA (pH 8.0)	
5% Triton X-100	

Μέθοδος:

- 1,5 ml από καλλιέργεια βακτηρίων *E.coli* σε υγρό θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό που έχει επωαστεί όλη τη νύχτα στους 37°C με ανάδευση, μεταφέρεται σε eppendorf.
- Φυγοκέντρηση για 1min στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος με 400 μl διαλύματος STET.

4. Προσθήκη 30l λυσοζύμη και ανάδευση.
5. Βράσιμο για 1min.
6. Φυγοκέντρηση για 10min στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Απομάκρυνση του γλοιώδες ιζήματος με τη βοήθεια μυτερού εργαλείου.
8. Προσθήκη ίσου όγκου (400l) παγωμένης ισοπροπανόλης και ανάδευση.
9. Παραμονή για 15min στους -4 °C.
10. Φυγοκέντρηση για 10min στις 13000 rpm στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενο.
11. Ξήρανση του ιζήματος σε ξηραντήρα υπό κενό για 10min
12. Επαναδιάλυση με 100l H₂O

3.2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (large preparation) – Μέθοδος λύσης με αλκάλι

Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατή η απομόνωση μεγάλης ποσότητας καθαρού ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού DNA από τον κλώνο των μετασχηματισμένων κυττάρων που μας ενδιαφέρει.

Υλικά:

Διάλυμα I (100ml)	Διάλυμα II (100ml)	Διάλυμα III (100ml)	TE (1L)
1gr glucose 50mM	10ml SDS 10%	60ml KaCO 5M	10ml Tris pH8 1M
2.5ml Tris/HCl 1M	2ml NaOH 10N	11.5ml Οξικό οξύ	2ml EDTA pH8 0.5M
10ml EDTANa ₂ 0.5M pH8			

Μέθοδος:

1. 100ml από την υγρή καλλιέργεια στην οποία βρίσκονται ανεπτυγμένα τα κύτταρα (ύστερα από ενοφθαλμισμό αποικίας σε αυτή), εμβολιάζονται σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB (περίπου 350ml) με αμπικιλίνη (ή οποιοδήποτε άλλο αντιβιοτικό απαιτείται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου) σε κωνική φιάλη (500ml) και αφήνετε για επώαση με ανάδευση όλη τη νύχτα.
2. Μεταφορά όλης της καλλιέργειας σε ειδικά δοχεία (basket). Φυγοκέντρηση για απομονώσουμε το κυτταρικό ίζημα, στις 5000 rpm (υπό γωνία) για 15 min στους 4°C.
3. Απόρριψη του υπερκείμενο και επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος με 20 ml διαλύματος I. Αφήνουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 40 ml διαλύματος II και επώαση για 10 min στον πάγο.
5. Προσθήκη 45 ml διαλύματος III και επώαση για 30 min στον πάγο.
6. Φυγοκέντρηση για 30 min στις 10000 rpm (υπό γωνία), στους 4 °C.
7. Διήθηση του υπερκείμενου μέσα από μιας γάζας και μεταφορά σε νέα μικρότερα δοχεία.
8. Προσθήκη 0.6 του όγκου (60ml) ισοπροπανόλη (θερμοκρασία δωματίου), ανάδευση και επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Φυγοκέντρηση για 30 min στις 3000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Απόρριψη του υπερκείμενου, επαναδιάλυση του ιζήματος με 3 ml TE και μεταφορά σε πλαστικούς σωλήνες.

Ακολουθεί ο καθαρισμός με διαβάθμιση CsCl για να εμπλουτιστεί το πλασμιδιακό DNA, η εκχύλιση σε ισοπροπανόλη και η διαδικασία της διατήρησης (βλ καθαρισμός DNA).

3.2.9. Καθαρισμός DNA

Καθαρισμός κυκλικού DNA με διαβάθμιση Χλωριούχου Καισίου (CsCl)-Βρωμιούχου αιθιδίου

Στη παρούσα εργασία η τεχνική αυτή πραγματοποιήθηκε για τον καθαρισμό των ανασυνδιασμένων πλασμιδιακών φορέων μετά από την απομόνωση τους από τα κύτταρα (largepreps), όπου βρίσκονται διαλυμένοι σε 3ml TE έτσι ώστε να είναι καθαροί για μετασχηματισμό.

Μέθοδος:

1. Προσθήκη 4,6gr CsCl και ανάδευση. Για καλύτερη διάλυση του CsCl οι σωλήνες μπορούν να τοποθετηθούν για 5min στους 37°C και να αναδευτούν ξανά.
2. Προσθήκη 100l βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml) και ανάδευση (η διαδικασία αυτή γίνεται στο σκοτάδι)

3. Μεταφορά σε ειδικούς σωλήνες για υπερφυγοκέντρηση και προσθήκη TE με σύριγγα έτσι ώστε να γεμίσει ο σωλήνας.
4. Ισοστάθμιση των σωλήνων και υπερφυγοκέντρηση στις 55000rpm στους 20°C όλη τη νύχτα
5. Παρατήρηση των σωλήνων υπερφυγοκέντρησης δυο ζώνων (λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου) και ένα ιζήμα: η πάνω ζώνη αποτελείται από γραμμικό χρωμοσωμικό βακτηριακό DNA και κομμένο κυκλικό πλασμιδιακό DNA. Η κάτω ζώνη αποτελείται από κλειστό κυκλικό πλασμιδιακό DNA. Το βαθύ κόκκινο ιζήμα που σχηματίζεται αποτελείται από συμπλέγματα RNA και βρωμιούχου αιθιδίου, όπως επίσης και πρωτεϊνών.
6. Εισαγωγή στο πάνω μέρος του μπουκαλιού μια βελόνα (21- gauge) για να μπει αέρας. Με τη βοήθεια σύριγγας (με βελόνα 16- gauge) γίνεται μεταφορά σε σωλήνα της ζώνης με το κλειστό πλασμιδιακό DNA με προσοχή.

Ακολουθεί η εκχύλιση σε ισοπροπανόλη.

1. Προσθήκη ίσης ποσότητας ισοπροπανόλης και ανάδευση.
2. Απόρριψη της διαφανούς φάσης (οργανική φάση) για να απομακρυνθεί το βρωμιούδο αιθίδιο και διόρθωση του όγκου με νερό.
3. Προσθήκη ίσης ποσότητας ισοπροπανόλης και ανάδευση και επανάληψη των βημάτων 2 και 3 όσο χρειαστεί μέχρι να αποχρωματιστεί τελείως η οργανική φάση, που σημαίνει ότι έχει απομακρυνθεί όλο το βρωμιούδο αιθίδιο.

Ακολουθεί η διαδικασία της διαπήδησης:

1. Ξέπλυμα με νερό ενός κομματιού της ειδικής μεμβράνης κυτταρίνης και μεταφορά του εκχειλισμένου με ισοπροπανόλη διαλύματος στη μεμβράνη αφού σφραγιστεί.
2. Μεταφορά των μεμβρανών σε διάλυμα TE. Σε κάθε μεμβράνη αντιστοιχούν 500μλ TE.
3. Επώαση με ανάδευση 2 ώρες στους -4°C.
4. Αντικατάσταση με νέο διάλυμα TE και επανάληψη των βημάτων 3 και 4 μια φορά. Την τελευταία φορά αφήνω όλη την νύχτα στους -4°C με ανάδευση.

Καθαρισμός DNA με κατακρήμνιση με αιθανόλη (ethanol precipitation)

1. Μέτρηση του όγκου του DNA και προσθήκη 2,5 όγκους αιθανόλη 75% και 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa και ανάδευση.
2. Μεταφορά σε ξηρό πάγο για 30min. Κατά την διαδικασία της εφαρμογής στον ξηρό πάγο, η υδατική φάση διώχνει το DNA το οποίο κατακρημνίζεται ύστερα από τη φυγοκέντρηση. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος του DNA τόσο περισσότερο το αφήνω στον ξηρό πάγο
3. Φυγοκέντρηση στους 4°C με 12000rpm για 15min.
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου δυο φορές και ξήρανση του ιζήματος για 5min σε ειδικό ξηραντήρα.
5. Επαναδιάλυση του DNA με H₂O.

Εκχύλιση με φαινόλη

1. Μέτρηση του όγκου του DNA και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης και ανάδευση με voltex.
2. Φυγοκέντρηση στις 13200rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Μεταφορά της υδατινής φάσης όπου βρίσκεται το DNA σε ένα νέο erpendorf.

Εκχύλιση με χλοροφόρμιο

1. Μέτρηση του όγκου του DNA και προσθήκη ίσου όγκου χλοροφόρμιο και ανάδευση.
2. Μεταφορά της υδατινής φάσης όπου βρίσκεται το DNA σε ένα νέο erpendorf.

Καθαρισμός DNA με διάλυμα PEG 8000

Ο καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με διάλυμα PEG 8000 πραγματοποιείται για τον καθαρισμό των πλασμιδίων που θα χρησιμοποιηθούν για μετασχηματισμό ευκαρυωτικών κυττάρων. Η μέθοδο αυτή γίνεται μετά την μέθοδο για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (large preparation) – μέθοδος λύσης με αλκάλι (ενότητα 3.2.8).

1. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 3ml TE και προσθήκη ίσου όγκου παγωμένου 5M LiCl.
2. Ανάδευση με voltex και φυγοκέντρηση στις 3000rpm (υπό γωνία) για 10min στους 4°C.
3. Μεταφορά του υπερκείμενου σε και προσθήκη σε αυτό ίσου όγκου ισοπροπανόλη.
4. Ανάδευση με voltex και φυγοκέντρηση στις 3000rpm (υπό γωνία) για 10min στους 4°C.
5. Απόρριψη του υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος.
6. Επαναδιάλυση με 500μλ TE και προσθήκη ίσου όγκου NaCl 1,6M που περιέχει 13% w/v PEG 8000.

7. Ανάδευση και μεταφορά σε ξηρό πάγο για 10min.
8. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 30min στους 4°C.
9. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 400λ TE
10. Ακολουθεί μια εκχύλιση με φαινόλη, δυο εκχυλίσεις με χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
11. Το ίζημα επαναδιαλύεται με 500λ TE και ακολουθεί ο καθαρισμός με διαβάθμιση CsCl.

Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας low melting point αγαρόζη

Κατασκευή του πήκτωματος low melting αγαρόζης: Παρασκευάζεται 1% low melting αγαρόζη σε διάλυμα 1X TAE και το πήκτωμα μεταφέρεται στους 4°C για να πήξει. Στην low melting αγαρόζη δεν προστίθεται βρωμιούχο αιθύδιο. Όταν πήξει το πήκτωμα φορτώνονται τα δείγματα στα οποία έχει προστεθεί πολύ μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται χαμηλή τάση γιατί το πήκτωμα αυτό είναι πολύ ευαίσθητο και σε μεγαλύτερη τάση μπορεί να λιώσει. Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση κόβεται η μπάντα του δείγματος που μας ενδιαφέρει και μεταφέρεται σε ένα erpendorf. Ακολουθεί η παρακάτω επεξεργασία:

1. Επώαση στους 67°C για 10min.
2. Προσθήκη 10λ 5M NaCl και ίσου όγκου φαινόλης. Ανάδευση και φυγοκέντρηση για 15 min στις 16000rpm (υπό γωνία) σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Μεταφορά της διάφανης φάσης σε νέο erpendorf και προσθήκη 100λ TE στην κάτω φάση, Ανάδευση και φυγοκέντρηση για 15 min στις 16000rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μεταφορά της διάφανης φάσης στο ίδιο erpendorf με το βήμα 3 και ακολουθεί μια εκχύλιση με φαινόλη και μια με χλωροφόρμιο.
5. Στην συνέχεια πραγματοποιείται κατακρήμνιση με αιθανόλη.

3.2.10. Διαχωρισμός του DNA με βάση το μέγεθος

Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόσης

Η ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη είναι μια μέθοδο που χρησιμοποιείται στην βιοχημεία και μοριακή βιολογία για τον διαχωρισμό του DNA, ή του RNA με βάση το μοριακό βάρος. Αυτό επιτυγχάνεται από την κίνηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων νουκλεϊκού οξέος κατά μήκος μίας μήτρας αγαρόζης με ένα ηλεκτρικό πεδίο (electrophoresis). Τα μικρότερα κομμάτια κινούνται γρηγορότερα και μεταναστεύσουν περισσότερο από τα μεγαλύτερα. Η ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των μεγεθών των μορίων DNA μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού πχ για την κατασκευή χαρτών πέψης του κλωνοποιημένου DNA, για την ανάλυση των προϊόντων της PCR κ.α. Τα δείγματα μπορούν επίσης να απομονωθούν από το πήκτωμα αγαρόζης. Η απόσταση μεταξύ των ζωνών DNA ενός δεδομένου μήκους καθορίζεται από την συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Μετά από την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείτε σε έναν λαμπτήρα με υπεριώδη ακτινοβολία για να γίνουν ορατές οι ζώνες DNA. Το EtBr φθορίζει κοκκινοπορτοκαλί παρουσία του DNA. Η ζώνη DNA μπορεί επίσης να αποκοπεί από το πήκτωμα, και μπορεί έπειτα να διαλυθεί για να ανακτηθεί το καθαρισμένο DNA.

Υλικά:

Βρωιούχο αιθύδιο (EtBr)

10mg/ml σε H₂O, διατήρηση στους 4°C, μεταλλαξογόνο

Μέγεθος τμημάτων DNA και συγκέντρωση αγαρόζης	
% Standard αγαρόζη	Μεγέθη DNA που μπορούν να διαχωριστούν
0.5	700bp έως 25kb
0.8	500bp έως 15kb
1.0	2500bp έως 12kb
1.2	150bp έως 6kb
1.5	80bp έως 4kb

Μέθοδος:

Ο όγκος της αгарόζης και του ρυθμιστικού διαλύματος της συσκευής εξαρτώνται από το μέγεθος της συσκευής και το τελευταίο εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων αλλά και από τον όγκο τους (η κάθε συσκευή διαθέτει χτενάκια συγκεκριμένου μεγέθους όπου τα σχηματιζόμενα πηγαδάκια χωράνε συγκεκριμένα μl δείγματος). Σε γενικές γραμμές για το ρυθμιστικό διάλυμα TAE:

για 100ml gel αгарόζης (1%)

1gr αгарόζη + 2ml TAE buffer 50x + 98ml H₂O + 1l EtBr

για 100ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (running buffer)

1ml TAE buffer 50x + 99ml H₂O (στην ενότητα 3.1.5 παρουσιάζονται και άλλα ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης)

1. Θέρμανση του διαλύματος της αгарόζης με το ρυθμιστικό διάλυμα TAE buffer 1X μέχρι να βράσει και να διαλυθεί. Αφήνετε να κρυώσει και προσθήκη ~1μl EtBr 1% και ανάδευση.
2. Τοποθέτηση της αгарόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τις ειδικές χτένες και αφήνετε να πήξει.
3. Όταν πήξει, τοποθετείται στη συσκευή η συσκευή TAE buffer 0,5x ανάλογα με το μέγεθος της, μέχρι να καλυφθεί η αгарόζη και φορτώνονται τα δείγματα στις ειδικές υποδοχές (πηγαδάκια) του πηκτώματος. Στα δείγματα έχει προηγουμένως προστεθεί μικρή ποσότητα loading buffer (ενότητα 3.1.9). Φορτώνεται επίσης ο μάρτυρας μεγέθους (υπό γωνία) DNA.
4. Σύνδεση των ηλεκτροδίων της συσκευής ηλεκτροφόρησης με τη συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής όπου και κατευθύνονται τα δείγματα.
5. Εφαρμόζεται τάση ~120 V και μετά από 30 περίπου λεπτά είναι δυνατή η ανίχνευση του DNA με τη μορφή ζωνών κάτω από το υπεριώδες φως. Αφήνουμε να τρέψει όσο χρειάζεται για να μπορούν να διαχωριστούν καλά οι ζώνες.

Κάθετη ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου

Για την παρατήρηση και διαχωρισμό των πολύ μικροσκοπικών τμημάτων DNA χρησιμοποιείται συνήθως κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση DNA σε ακρυλαμίδιο αποτελεί επίσης ένα παρασκευαστικό στάδιο, ένα στάδιο καθαρισμού, αφού είναι δυνατό και να απομονωθεί η ζώνη DNA ενδιαφέροντος και να καθαριστεί από συστατικά προηγούμενων διεργασιών π.χ. Mg από την PCR αλλά και ένζυμα περιορισμού που μπορεί να προκαλέσουν πρόβλημα στην συνέχεια των πειραμάτων. Συνήθως χρησιμοποιείται η συγκέντρωση 5%.

Υλικά:

Για την παρασκευή του πηκτώματος ακρυλαμιδίου (20ml, 5%):

14.6ml H₂O

2ml 10x TBE

3.3ml Acrylamide mix

140λ 10% AMPS

8λ TEMED

Το TEMED προκαλεί τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και το AMPS είναι ο καταλυτής του TEMED.

Για 500ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE 1x (ενότητα 3.1.5)

50ml 10x TBE και 450ml H₂O

Μέθοδος:

1. Προσθήκη του διαλύματος ακρυλαμιδίου στην συσκευή, τοποθετείται η ειδική χτένα και αφήνετε να πήξει.
2. Μετά την πήξη, πληρώνεται η συσκευή με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και φορτώνονται με σύριγγας hamilton τα δείγματα στις υποδοχές (πηγαδάκια) του πηκτώματος αφού προηγουμένως έχει προστεθεί στα δείγματα μικρή ποσότητα loading buffer 6X.
3. Σύνδεση των ηλεκτροδίων της ηλεκτροφορητικής συσκευής με τη συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής όπου κατευθύνονται τα δείγματα τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα.
4. Εφαρμόζεται τάση ~120 V.
5. Απόχυση του ρυθμιστικού διαλύματος από τη συσκευή σε δοχείο και προσθήκη 100λ EtBr.
6. Παρατήρηση των ζωνών του DNA στο UV.

3.2.11. Πέψη με ένζυμα περιορισμού

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA μήκους τεσσάρων ως οχτώ νουκλεοτιδίων και κόβουν σε ειδικές θέσεις στο εσωτερικό ή σε γειτονικό σημείο της αλληλουχίας αναγνώρισης. Μια μονάδα (1U) περιοριστικής ενδονουκλεόσης είναι η ποσότητα του ένζυμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1μg DNA του φάγου λ σε χρόνο 60min. Γενικά, 1μg DNA θέλει 2-3U ένζυμου περιορισμού σε 10-20λ τελικού όγκου αντίδρασης για 1-2 ώρες πέψης. Η συγκέντρωση των αλάτων και η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται κάθε φορά είναι ειδικές για το ένζυμο και αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων. Ο όγκος του ένζυμου περιορισμού που προστίθεται δεν πρέπει να ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, γιατί η γλυκερόλη που περιέχει στο διάλυμα συντήρησης μπορεί να επηρεάσει την αντίδραση αρνητικά. Τα ονόματά των ενζύμων περιορισμού είναι συντμήσεις των ονομάτων των βακτηρίων από τα οποία έχουν απομονωθεί. Λόγω της συμπληρωματικότητας των αλυσίδων του DNA οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες κόβουν και τις δύο αλυσίδες.

Υλικά:

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, μαζί με της αλληλουχίες αναγνώρισης και τα ρυθμιστικά διαλύματα στα οποία δουλεύουν. Όλα τα ένζυμα και τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την New England Biolabs.

Ένζυμο περιορισμού	Θέση πέψης	Buffer New England Biolabs (NEBuffer)	Units	Θερμοκρασία πέψης
NdeI	5'...CA/TATG...3'	2 και 4	20000 U/ml	37°C
XhoI	5'...C/TCGAG...3'	2,3 και 4	20000 U/ml	37°C
XbaI	5'...T/CTAGA...3'	2	20000 U/ml	37°C
HindIII	5'...A/AGCTT...3'	2	20000 U/ml	37°C
NheI	5'...G/CTAGC...3'	1,2 και 4	10000 U/ml	37°C
ApaI	5'...GGGCC/C...3'	4	50000 U/ml	25°C
HincII	5'...GTY/RAC...3'	2, 3 και 4	10000 U/ml	37°C
ClaI	5'...AT/CGAT...3'	4	5000 U/ml	37°C
EcoRI	5'...G/AATTC...3'	1-4	20000 U/ml	37°C
KpnI	5'...GGTAC/C...3'	1	50000 U/ml	37°C
PvuII	5'...CAG/CTG...3'	1,2,3 και 4	50000 U/ml	37°C

NEBuffer 1 10X (pH 7.0 @ 25°C)	NEBuffer 2 10X (pH 7.9 @ 25°C)	NEBuffer 3 10X (pH 7.9 @ 25°C)	NEBuffer 4 10X (pH 7.9 @ 25°C)
10mM Bis Tris Propane -HCl	10mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl	20mM Tris-acetate
10mM MgCl ₂	10mM MgCl ₂	10mM MgCl ₂	10mM magnesium acetate
1mM dithiothreitol	50mM NaCl	100mM NaCl	50mM potassium acetate
	1mM dithiothreitol	1mM dithiothreitol	1mM dithiothreitol

Μέθοδος:

1. Σε σωλήνα erppendorf προστίθεται το DNA που πρόκειται να κοπεί, το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού, το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (NEBbuffer) και dH₂O αν χρειάζεται. Το ένζυμο περιορισμού προστίθεται πάντοτε τελευταίο.
2. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο 37° C ή άλλη θερμοκρασία ανάλογα με το ένζυμο για τα το λιγότερο 3 ώρες. Οι πέψεις μπορούν να γίνουν και περισσότερες ώρες άλλα είναι καλό σε αυτές τις περιπτώσεις οι πέψεις να γίνονται σε μεγάλο όγκο για να μην υπάρχουν προβλήματα λόγω εξάτμισης. Ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμίδιο ανάλογα με τα μεγέθη DNA που περιμένουμε.

3.2.12. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική κινητικότητά τους (μια λειτουργία του μήκους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή του μοριακού βάρους καθώς επίσης και της υψηλής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και άλλων παραγόντων). Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS, δειγμάτων που έχουν την ίδια αναλογία φορτίου και μάζας έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό με βάση το μέγεθος.

Υλικά

Resolving gel 15% (10ml)	Stacking gel 5% (3ml)	Running Buffer(500ml)
2.3ml H ₂ O	2.1ml H ₂ O	450ml H ₂ O
2ml 30% acrylamide mix	0.5ml 30% acrylamide mix	50ml Tris/glycine pH 8.8
2.5ml Tris/HCl pH 8.8	0.35ml Tris/HCl pH 6.8	
0.1ml 10% SDS	0.03ml 10% SDS	
0.1ml 10% ammonium persulfate	0.03ml 10% ammonium persulfate	
0.004ml TEMED	0.003ml TEMED	

Το διάλυμα των πρωτεϊνών που αναλύεται αναμιγνύεται αρχικά με SDS, ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που μετουσιώνει την δευτεροταγή δομή και τις μη-δισουλφιδικές- τριτοταγείς δομές, και προσδίδει αρνητικό φορτίο σε κάθε πρωτεΐνη. Το SDS δεσμεύεται σε αναλογία περίπου 1,4gr SDS ανά 1gr πρωτεΐνης (αν και οι αναλογίες δέσμευσης μπορούν να ποικίλουν από 1.1-2.2gr SDS/gr πρωτεΐνης), δίνοντας μια περίπου ομοιόμορφη αναλογία μάζας: φορτίο για τις περισσότερες πρωτεΐνες, έτσι ώστε η διαδρομή της μετανάστευσης μέσω του πηκτώματος μπορεί να θεωρηθεί ότι συνδέεται άμεσα με μόνο το μέγεθος της πρωτεΐνης.

Το stacking gel είναι ένα PAGE με μεγάλους πόρους. Αυτό το πήκτωμα προετοιμάζεται με ρυθμιστικό Tris/HCl pH 6,8 περίπου 2 μονάδες pH χαμηλότερα από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Tris/γλυκίνη). Αυτές οι συνθήκες παρέχουν ένα περιβάλλον κατάλληλο έτσι ώστε οι πρωτεΐνες με SDS συγκεντρώνονται σε διάφορες πτυχές και μια λεπτή γραμμή εκκίνησης. Αυτό το πήκτωμα απορρίπτεται από το τελικό πήκτωμα (Resolving gel). Το ύψος της περιοχής του stacking gel διατηρείται πάντα περισσότερο από το διπλό ύψος του όγκου του δείγματος που εφαρμόζεται.

Το resolving gel είναι ένα πήκτωμα με μικρούς πόρων πολυακρυλαμιδίου (μονομερές ακρυλαμιδίου 3 - 30%) που γίνεται χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl pH 8,8. Στο resolving gel τα μακρομόρια διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους. Τα Resolving gels έχουν μια βέλτιστη ικανότητα διαχωρισμού που είναι βασισμένη στην επι τοις εκατό συγκέντρωση των μονομερών που είναι παρόν στην αντίδραση πολυμερισμού, παραδείγματος χάριν ένα 8%, ένα 10% και ένα 12% resolving gel μπορεί αποτελεσματικά να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών μεταξύ, 24 - 205 kDa, 14-205 kDa, και 14-66 πρωτεΐνες kDa, αντίστοιχα.

Το APMS είναι ένας παράγοντας έναρξης του σχηματισμού του πηκτώματος. Το ποσοστό πολυμερισμού και οι ιδιότητες του προκύπτοντος πηκτώματος εξαρτώνται από τη συγκέντρωση AMPS και TEMED. Η αύξηση του ποσού AMPS και TEMED οδηγεί σε μια μείωση στο μέσο μήκος πολυμερών αλυσίδων, αύξηση στη θολούρα του πηκτώματος μια μείωση στην ελαστικότητα του.

Η 2-μερκαπτοαιθανόλη είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που χρησιμοποιείται για να διασπάσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, έτσι ώστε η πρωτεΐνη να είναι τελείως αποδιαταγμένη πριν φορτωθεί στο πήκτωμα. Το μπλε της βρομοφαινόλης (BPB) είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιημένη tracking χρωστική, επειδή είναι σταθερή σε αλκαλικό και ουδέτερο pH, είναι ένα μικρό μόριο, είναι ιονιζόμενη και αρνητικά φορτισμένη επάνω από το pH 4,6 και ως εκ τούτου κινείται προς την άνοδο. Όντας ένα μικρό μόριο, κινείται μπροστά από τα περισσότερα πρωτεΐνες. Όταν φθάσει στον ανοδικό άκρο της ηλεκτροφόρησης συνήθως η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται.

Μέθοδος:

Λύση κυττάρων

1. Προσθήκη στο κυτταρικό εκχύλισμα 100μl SDS gel- loading buffer 2X και περίπου 1μl μερκαπτοαιθανόλη.

2. Βράσιμο για 3min και τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα να φορτωθούν στο πήκτωμα. Ο βρασμός προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών ούτως ώστε ο διαχωρισμός τους να γίνει σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, το οποίο είναι αρνητικό εξαιτίας του SDS.

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

1. Παρασκευάζεται Resolving gel 15% και φορτώνεται στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προσθήκη μικρής ποσότητας αιθανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας του πηκτώματος.
2. Αφού πήξει, απομακρύνεται η αιθανόλη και τοποθετείται το Stacking gel 5%.
3. Όταν πήξει φορτώνονται τα δείγματα και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, στις ειδικές υποδοχές του πηκτώματος.
4. Προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης Tris/glycine 10X.
5. Ρύθμιση της τάσης.
6. Μετά το πέρας της διαδικασίας, μεταφέρουμε το πήκτωμα από την συσκευή σε λεκάνη με transfer buffer και ακολουθεί η διαδικασία του transfer (βλ παρακάτω).

3.2.13. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνη (Μέθοδος Transfer)

Προκειμένου να καταστούν προσιτές οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη για την ανίχνευση με αντισώματα, μεταφέρονται μέσα από το πήκτωμα πάνω σε μια μεμβράνη από νιτροκυτταρίνη. Η μεμβράνη τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα, και ένας σωρός από χάρτινα φίλτρα τοποθετούνται πάνω από αυτές (δύο σε κάθε πλευρά). Ο ολόκληρος σωρός (sandwich) τοποθετείται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (στη συσκευή transfer) σε ηλεκτρικό ρεύμα για να τραβήξει τις πρωτεΐνες από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι πρωτεΐνες κινούνται από μέσα από το πήκτωμα και επικάθονται επάνω στη μεμβράνη διατηρώντας την οργάνωση που είχαν μέσα στο πήκτωμα. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η μεταφορά των πρωτεϊνών σε επιφάνεια νιτροκυτταρίνης. Η πρωτεϊνική σύνδεση στην νιτροκυτταρίνη είναι βασισμένη σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, καθώς επίσης και ηλεκτρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και της πρωτεΐνης. Η σταθεροποίηση των δεσμών αυτών επιτείνεται και από την παρουσία της μεθανόλης του διαλύματος μεταφοράς. Η ομοιομορφία και η γενική αποτελεσματικότητα της μεταφοράς της πρωτεΐνης από το πήκτωμα στη μεμβράνη μπορούν να ελεγχθούν με το βάψιμο της μεμβράνης με Ponceau S (χρωστικές). Το Ponceau S είναι το πιο κοινό, λόγω της διαλυτότητας ύδατός του στο νερό που καθιστά ευκολότερο το ξέβγαμμα της μεμβράνης.

Υλικά:

Transfer Buffer (3L)	Ponceau S
2.4L H ₂ O	0.5% Ponceau S σε 7% Τριχλωροξικό Οξύ
17.4mg Trizma	
1.11mg SDS	
8.4mg Γλυκίνη	
600ml Μεθανόλη	

Μέθοδος:

1. Μετά το πέρας της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, γίνεται η μεταφορά του πηκτώματος από την συσκευή σε λεκάνη με transfer buffer και ακολουθεί η διαδικασία του transfer.
2. Τα χαρτιά Whattman που χρησιμοποιούνται (στο μέγεθος της μεμβράνης) εμποτίζονται με το transfer buffer. Το ίδιο γίνεται και για τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (στο μέγεθος της μεμβράνης).
3. Κατασκευάζεται το “σάντουιτς” πάνω στη ειδική συσκευή. Πάνω στο σκούρο σφουγγάρι τοποθετούνται διαδοχικά δύο χαρτιά Whattman, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και άλλα δύο χαρτιά Whattman και το ανοιχτόχρωμο σφουγγάρι. Το τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς με προσοχή ώστε η νιτροκυτταρίνη να είναι τοποθετημένη προς την άνοδο, γιατί οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες.
4. Η συσκευή πληρώνεται με transfer buffer.
5. Ρύθμιση της έντασης του ρεύματος στα 300mA και αφήνουμε τη συσκευή για 3h.
6. Μετά τη μεταφοράς πρωτεϊνών (transfer), ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Ponceau S ώστε να επιβεβαιωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών και να σημειωθούν οι θέσεις τους

μάρτυρα μοριακού βάρους. Η χρώση αυτή είναι παροδική και απομακρύνεται μετά από επαναλαμβανόμενες πλύσεις με νερό.

7. Ακολουθεί η τεχνική ανοσοαποτύπωσης τύπου Western.

3.2.14. Western blotting (Τεχνική ανοσοαποτύπωσης)

Η τεχνική Western blot είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών σε ένα δεδομένο δείγμα ομογενοποίησης ιστού ή άλλου εκχυλίσματος. Αρχικά γίνεται ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών για τον διαχωρισμό τους κάτω από φυσιολογικές ή αποδιαταχτικές συνθήκες. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται έπειτα σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπου εξετάζονται χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη στόχο. Η μέθοδος διαιρείται στα ακόλουθα στάδια: Κορεσμός(blocking) και ανίχνευση αντιγόνων. Η ανίχνευση υποδιαιρείται στα στάδια πρώτο αντίσωμα, δεύτερο αντίσωμα και εμφάνιση. Κατά την διαδικασία της ανίχνευσης η μεμβράνη "εξετάζεται" για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος με ένα τροποποιημένο αντίσωμα συνδεδεμένο με ένα ένζυμο αναφοράς, το οποίο όταν εκτίθεται σε κατάλληλο υπόστρωμα οδηγεί σε μια χρωμομετρική αντίδραση ή σε αντίδραση χημειοφωταύγειας. Για ποικίλους λόγους, αυτό πραγματοποιείται παραδοσιακά σε δύο στάδια, αν και υπάρχουν μέθοδοι με ένα μόνο βήμα ανίχνευσης για ορισμένες εφαρμογές.

Κορεσμός της Μεμβράνης (blocking)

Δεδομένου ότι στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης μπορεί να συνδεθεί οποιαδήποτε πρωτεΐνη, μετά την διαδικασία της μεταφοράς των πολυπεπτιδίων, πρέπει τα ενδιάμεσα «κενά» στην επιφάνειά της να καλυφθούν κατάλληλα από άλλη πρωτεΐνη που να είναι «αδρανής» στην αντίδραση ανίχνευσης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Μ' αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται επί της νιτροκυτταρίνης, η μη ειδική προσρόφηση των χρησιμοποιούμενων περαιτέρω αντισωμάτων. Η τεχνική αυτή επικάλυψη των κενών θέσεων γίνεται συνήθως με την χρησιμοποίηση αλβουμίνη από ορό βοοειδών, (Bovine serum albumin-BSA) ή διαλύματος που περιέχει αποβουτυρωμένο γάλα βοοειδών. (3% σε PBS – 0.01% απορρυπαντικού tween 20.) Οι επιλεγόμενες πρωτεΐνες των βοοειδών αποδεικνύονται συνήθως να μην αντιδρούν με τα περαιτέρω χρησιμοποιούμενα αντισώματα επιτυγχάνοντας μια «καθαρή» ανοσοαποτύπωση.

Ανίχνευση

Πρώτο αντίσωμα:

Μετά από το μπλοκάρισμα, ένα αραιό διάλυμα του πρώτου αντισώματος επωάζεται με τη μεμβράνη κάτω από την ελαφριά ανάδευση. Συνήθως, το διάλυμα αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (1X PBS) με 1% αποβουτυρωμένο γάλα και 0.01% απορρυπαντικό tween 20. Το διάλυμα του αντισώματος και η μεμβράνη επωάζονται ολονυκτίς στους 4°C.

Δεύτερο αντίσωμα:

Μετά από να ξέπλυμα της μεμβράνης για να απομακρυνθεί το μη-συνδεδεμένο πρώτο αντίσωμα, η μεμβράνη εκτίθεται σε ένα δεύτερο αντίσωμα, που συνδέεται σε μια χαρακτηριστική πλευρά του πρώτου αντισώματος. Αναφέρεται ως anti-rabbit, anti-human αντίσωμα κ.λπ. Προέρχονται από τις ζωικές πηγές (ή από ζωικές υβριδικές καλλιέργειες) και έτσι ένα anti-rabbit αντίσωμα θα δεσμεύσει οποιοδήποτε αντίσωμα προέρχεται από αρχικό αντίσωμα κουνελιού. Το δεύτερο αντίσωμα έχει συνήθως προσδεδεμένη μόριο βιοτίνης ή με ένα ένζυμο αναφοράς όπως η αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση από ραπανάκι (horseradish peroxidase). Αυτό γίνεται ώστε το δεύτερο αντίσωμα που θα συνδεθεί με το πρώτο αντίσωμα να δώσει ειδική αντίδραση που θα ενισχύσουν το σήμα του αποκαλυπτόμενου αντιγόνου. Συνήθως χρησιμοποιείται δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με horseradish peroxidase μαζί με έναν παράγοντα χημειοφωταύγειας. Το προϊόν της αντίδρασης παράγει βιοφωταύγεια ανάλογα με την ποσότητα της ανιχνευόμενης πρωτεΐνης. Ένα ευαίσθητο φύλλο φωτογραφικής ταινίας τοποθετείται ενάντια στη μεμβράνη, και η έκθεση στο φως από την αντίδραση δημιουργεί μια εικόνα των αντισωμάτων που δεσμεύονται στο μεμβράνη.

Υλικά:

Πρώτα αντισώματα	
Θετικός ορός ασθενούς	1/100 ή άλλη συγκέντρωση
Αρνητικός ορός ασθενούς	1/100
Αντι-ιστιδίνη (anti-His) αντίσωμα (Santa Cruz)	1/500

Άλλο αντίσωμα που αναφέρεται στα αποτελέσματα	
Δεύτερα αντισώματα	
Anti-human αντίσωμα (polyclonal rabbit, IgG/HRP, 1.3g/L, Dako)	1/1000 (1λ σε 1000λ Working solution)
Anti-rabbit αντίσωμα	1/1000
Working solution (100ml)	Saturation solution (100ml)
1% ξηρό γάλα χωρίς λιπαρά (1gr)	5% ξηρό γάλα χωρίς λιπαρά (5gr)
10% PBS 10X (10ml)	10% PBS 10X (10ml)
0.01%Tween	0.01%Tween

Μέθοδος:**A) Κορεσμός**

1. Παρασκευή του διαλύματος κορεσμού (saturation solution 5%)
2. Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, υπό ελαφριά ανάδευση, για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου.

B) Πρώτο αντίσωμα

1. Παρασκευή του working solution και προσθήκη σε αυτό του πρώτου αντισώματος (παραπάνω πίνακας). Επώαση με τη μεμβράνη όλο την νύχτα (16-18h), με ελαφριά ανάδευση στους 4°C.
2. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με τη χρήση του working solution με τέσσερα πλυσίματα. Τα πλυσίματα διαρκούν 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και ελαφριά ανάδευση.

Γ) Δεύτερο αντίσωμα

1. Προσθήκη στο working solution του δεύτερου αντισώματος (παραπάνω πίνακας). Επώαση με τη μεμβράνη για 1 ώρα, με ελαφριά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιούμε anti-human αντίσωμα το οποίο θα δεσμευτεί με το αντίσωμα του ορού. Τα αντισώματα αυτού του σταδίου έχουν συζευχθεί με υπεροξειδάση (Horse Radish Peroxidase) και χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1:1000.
2. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με τη χρήση του working solution με τρία πλυσίματα. Τα πλυσίματα διαρκούν 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και ελαφριά ανάδευση..

Δ) Εμφάνιση

1. Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα 1X PBS για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και ελαφριά ανάδευση.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης πάνω σε μια διαφάνεια και προσθήκη πάνω στη μεμβράνη ίσες ποσότητες διάλυμα υπεροξειδάσης και ενισχυτή (Super signal substrate thermoscientific^[109]) ανάλογα με της επιφάνεια της μεμβράνης έτσι ώστε να καλυφτεί όλη. Επώαση για 3 min.
3. Μεταφορά στην ειδικά κασετίνα εμφάνισης.
4. Μεταφορά σε σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης και τοποθέτηση ενός φιλμ ακριβώς πάνω από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το επώαση για 20-30 sec, ώστε να αποτυπωθεί το σήμα. Προσαρμόζουμε το χρόνο εκπομπής ανάλογα με το σήμα που παίρνουμε μετά από αυτή την πρώτη έκθεση. Συνεχίζουμε σε επόμενα φιλμ έτσι ώστε να παρθεί μια ικανοποιητική εικόνα.
5. Τα φιλμ για να εμφανιστούν μεταφέρονται διαδοχικά σε διάλυμα development, νερό και διάλυμα fixer. Μετά ξεπλένονται με νερό και αφήνονται να στεγνώσουν.

3.2.15. Παραγωγή και καθαρισμός πρωτεϊνών core του HCV**Υλικά:**

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης/πρόσδεσης (ενότητα 3.1.5)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος (ενότητα 3.1.5)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (ενότητα 3.1.5)
- Στήλης χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA (QIAGEN) (ενότητα 3.1.8)
- Bio Rad Protein Assay

Μέθοδος (παραγωγή και καθαρισμός της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης «υδρόφιλης» core τύπου 1α 1-120aa-His-tag):

Αρχικά πραγματοποιείται μετασχηματισμός BL21(DE3)plysS δεκτικών κυττάρων με το αντίστοιχο πλασμίδιο pET20b(+) το οποίο περιέχει την επιθυμητή πρωτεΐνη συντηγμένη με την κασέτα

των έξι ιστιδινών. Μια αποικία εμβολιάζεται σε 25ml LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη) και η καλλιέργεια μεταφέρεται στον ανακινούμενο επωαστήρα για περίπου 16 ώρες στους 37°C. Για την δημιουργία ενός crude extract από την καλλιέργεια των 25ml παραλαμβάνεται 1ml από την καλλιέργεια και φυγοκεντρείται για 1min στις 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται 100λ Loading Buffer για Western blot 2X και ανάδευση. Το crude extract διατηρείται στους -20°C. Στη συνέχεια 1ml από την καλλιέργεια των 25ml εμβολιάζεται σε πέντε φλάσκες οι οποίες περιέχουν 1L LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη). Οι καλλιέργειες μεταφέρονται στον επωαστήρα και αφήνονται να αναπτυχθούν ολονυκτίς στους 37°C. Τα κύτταρα *E. Coli* συλλέγονται με φυγοκέντρηση Ακολουθεί ο καθαρισμός των πρωτεϊνών core με την χρήση στήλης χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA.

Προετοιμασία της στήλης Ni-NTA:

1. Στο 1L καλλιέργειας αντιστοιχούν σε 0,5ml Ni-NTA στήλης. Για τα 5L καλλιέργειας χρησιμοποιούνται 2,5ml Ni-NTA τα οποία μεταφέρονται σε 50αρη Falcon (οι παρακάτω διεργασίες πραγματοποιούνται στο πάγο).
2. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 800rpm και απόρριψη υπερκείμενου.
3. Προσθήκη 10ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης/πρόσδεσης (8M ουρία, 0.1M NaH₂PO₄, 10mM Tris, pH8)
4. Ανακίνηση για 10min στους 4°C.
5. Φυγοκέντρηση για 5min στους 4°C στις 700rpm.
6. Απόρριψη του υπερκείμενου .
7. Επαναλαμβάνονται άλλες δυο φορές τα βήματα 2-5 και η στήλη είναι έτοιμη για χρήση.

Καθαρισμός των πρωτεϊνών core:

Ο καθαρισμός πραγματοποιείται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες με την χρήση πυκνού διαλύματος ουρίας με τροποποίηση της οξύτητάς του.

1. Φυγοκέντρηση των 5L καλλιέργειας στους 4°C για 15min στις 5000rpm.
2. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος με 50ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης/πρόσδεσης (8M ουρία, 0.1M NaH₂PO₄, 10mM Tris, pH8) στο πάγο.
3. Ανάδευση για μια ώρα στους 4 °C.
4. Μεταφορά του basket σε ένα δοχείο με πάγο και τοποθέτηση στο μηχάνημα υπερήχων για 10min. Οι υπέρηχοι χρησιμοποιούνται ως εξής: 30 δευτερόλεπτα off, 30 δευτερόλεπτα on για 10 λεπτά.
5. Ανάδευση στους 4°C για περίπου 16 ώρες.
6. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 60min στις 8000rpm.
7. Διήθηση του υπερκείμενου μέσα από μια γάζα.

Σύνδεση στη μεμβράνη:

8. Μεταφορά του διηθήματος στη έτοιμη για χρήση στήλη.
9. Ανάδευση σε κινούμενη ρόδα στους 4 °C για περίπου 16 ώρες.

Πλυσίματα:

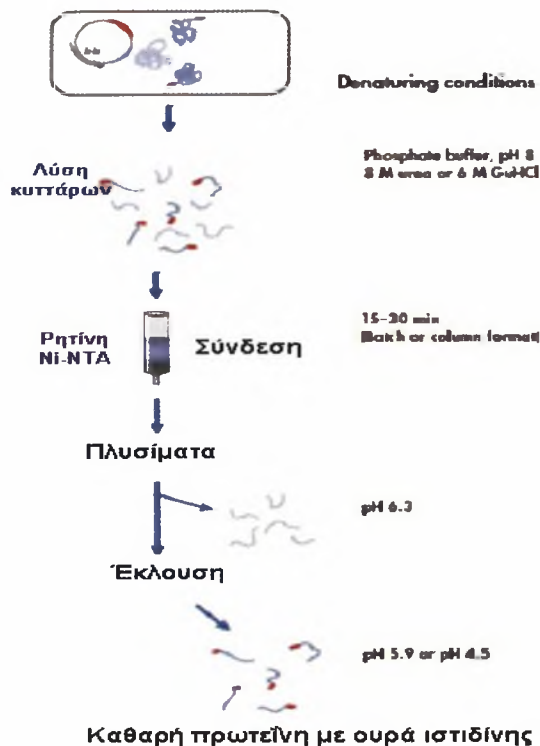
10. Φυγοκέντρηση για 3min στους 4°C στις 300rpm.
11. Μεταφορά του καφέ υπερκείμενου σε ένα Falcon.
12. Προσθήκη στη στήλη 10ml ρυθμιστικό διαλύματος πλυσίματος (8M ουρία, 0.1M NaH₂PO₄, 10mM Tris, pH6.3).
13. Ανακάτεμα σε ρόδα στους 4 °C για 10min.
14. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 5min στις 700rpm.
15. Απόρριψη σχεδόν όλου του υπερκείμενου και επανάληψη άλλες οκτώ άλλες οκτώ φορές των τεσσάρων τελευταίων βημάτων.

Έκλουση:

16. Όταν πραγματοποιηθούν και τα εννιά πλυσίματα γίνεται μεταφορά της κολώνας σε ένα eppendorf των 2ml. Επειδή στα τοιχώματα του Falcon έχουν κολλήσει πρωτεΐνες γίνεται προσθήκη 500λ (8M ουρία, , 0.1M NaH₂PO₄, 10mM Tris, pH6.3) ουρίας και προσπάθεια να μεταφερθούν και αυτές στη στήλη.
17. Προσθήκη στο eppendorf 500λ ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης(8M ουρία, , 0.1M NaH₂PO₄, 10mM Tris, pH4.5)
18. Ανακίνηση στην ρόδα στους 4 °C για 30min.
19. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 2min στις 4000rpm.
20. Μεταφορά σχεδόν όλου του υπερκείμενου σε ένα eppendorf (1ο έκλουσμα, fraction)
21. Επανάληψη των τριών τελευταίων βημάτων έως το έκλουσμα 8 όπου λόγω μεγάλης ποσότητας της στήλης μοιράζεται σε δυο eppendorf. Στη συνέχεια παραλαμβάνονται και άλλα εκλούσματα. Στο 8^ο έκλουσμα πραγματοποιείται μέτρηση των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford για να

παρατηρηθεί η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης μέχρι το έκλουσμα 8. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται είναι το Bio Rad Protein Assay, το οποίο αραιώνεται 1/5 για να χρησιμοποιηθεί. Σε μια πλάκα ELISA τοποθετούνται 100 μ l του αραιωμένου αντιδραστηρίου και προστίθενται 10 μ l από κάθε fraction. Χρησιμοποιείται επίσης και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς έκλουσμα. Παρατηρείται ότι η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης δεν μειώνεται. Οπότε επαναλαμβάνω πάλι τα τρία προηγούμενα βήματα για να παραλειφτούν και άλλα εκλούσματα.

22. Στη συνέχεια πραγματοποιείται Western blot για να ανιχνευτεί και να ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη που απομονώθηκε.



Εικόνα 32: Σχηματική παρουσίαση των βημάτων που ακολουθούνται για τον καθαρισμό πρωτεϊνών συντηγμένων με ουρά ιστιδινών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες.

3.2.16. Εμβολιασμοί κουνελιών για παραγωγή αντισώματος

Για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της καθαρισμένης από E.coli της ιικής πρωτεΐνης core τύπου 1a συνδεδεμένης στο αμινοτελικό της άκρο με μια συστοιχία 6 ιστιδινών χρησιμοποιούνται δυο νεαρά αρσενικά κουνέλια της φυλής New Zealand. Οι εμβολιασμοί γίνονται με μεσοδιάστημα εικοσιπέντε ημερών. Πριν το πρώτο εμβολιασμό παραλαμβάνεται μικρή ποσότητα αίματος για να χρησιμοποιηθεί ο ορός σαν αρνητικός δείκτης (control), πριν από την ανοσοποίηση τους.

1^{ος} εμβολιασμός

1. Προσθήκης σε ένα αποστειρωμένο falkon tube 1mg της καθαρισμένης πρωτεΐνης και ίσου όγκου adjuvant complete (Sigma). Ανάδευση με voltex για 30min.
2. Μεταφορά του μίγματος σε δυο γυάλινες αποστειρωμένες σύριγγες (μια για κάθε κουνέλι).
3. Η διεργασία συνεχίζεται στο χώρο των πειραματόζων σε ειδικό θάλαμο. Ακολουθεί ο εμβολιασμός του αντιγόνου στην πλάτη του ζώου με υποδόρια ένεση.

2^{ος} εμβολιασμός

1. Προσθήκης σε ένα αποστειρωμένο falkon tube 0,5mg της καθαρισμένης πρωτεΐνης και ίσου όγκου adjuvant incomplete (Sigma). Ανάδευση με voltex για 30min.
2. Μεταφορά του μίγματος σε δυο γυάλινες αποστειρωμένες σύριγγες (μια για κάθε κουνέλι).
3. Η διεργασία συνεχίζεται στο χώρο των πειραματόζων σε ειδικό θάλαμο, όπου γίνεται ο εμβολιασμός των κουνελιών με το αντιγόνο στην πλάτη του ζώου με υποδόρια ένεση.

3^{ος} εμβολιασμός

Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με τον δεύτερο εμβολιασμό.

Παραλαβή αίματος

20 ημέρες μετά το 3^ο εμβολιασμό. Η διαδικασία της παραλαβής του αίματος γίνεται στο χώρο των πειραματόζωνων. Παραλαμβάνονται περίπου 40ml από το αυτί του κάθε κούνελου. Το αίμα μεταφέρεται στους 4°C και παραμένει για τουλάχιστον 16 ώρες. Στη συνέχεια με προσεκτικές κινήσεις ξεκολλάμε το ίζημα από τα τοιχώματα του σωλήνα, χωρίς να διαταραχθεί η συνεκτικότητα του ιζήματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 3000rpm. Ο υπερκείμενος ορός συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -20°C.

4^{ος} εμβολιασμός

20 ημέρες μετά την παραλαβή του αίματος επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με τον δεύτερο εμβολιασμό και μετά από 25 ημέρες γίνεται μια δεύτερη παραλαβή αίματος.

3.2.17. Παροδικός μετασχηματισμός ευκαρυωτικών κυττάρων (polyplus transfection)

Η μέθοδο του παροδικού μετασχηματισμού βασίστηκε στη χρήση του αντιδραστηρίου jetPEI^[110] για DNA μετασχηματισμό ευκαρυωτικών κυττάρων. Το jetPEI συνδέεται με το DNA και σχηματίζει θετικά φορτισμένα σύμπλοκα, ικανά να αλληλεπιδράσουν με πρωτεογλυκάνες της επιφάνειας των κυττάρων. Από την στιγμή που θα συνδεθούν στην κυτταρική μεμβράνη, τα σύμπλοκα εσωτερικεύονται με ενδοκύτωση. Μέσα στα ενδοσώματα το DNA προστατεύεται από αποικοδόμηση από το jetPEI. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην ιδιότητα του πολυμερούς να δρα σαν «σφουγγάρι φορτίων», κάτι που ρυθμίζει το pH στο εσωτερικό των ενδοσωμάτων. Αυτός ο μηχανισμός τελικά οδηγεί σε ρήξη του ενδοσώματος και απελευθέρωση του DNA και των συμπλόκων στο κυτταρόπλασμα. Με αυτό τον τρόπο επιτρέπεται η μεταφορά του DNA στον πυρήνα και η επακόλουθη μεταγραφή του. Σε αυτό το πρωτόκολλο τα κύτταρα στρώνονται μια μέρα πριν τον μετασχηματισμό και τα σύμπλοκα προστίθενται ακολούθως σε κύτταρα που βρίσκονται σε υλικό το οποίο περιέχει ορό. Οι βέλτιστες συνθήκες για μετασχηματισμό με jetPEI είναι όταν τα κύτταρα καλύπτουν το 50-70% της επιφάνειας ανάπτυξης τους την μέρα του μετασχηματισμού. Η αλλαγή του υλικού γίνεται πριν ξεκινήσει το πείραμα. Το jetPEI είναι σταθερό παρουσία ορού και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί υλικό που περιέχει ορό κατά την διάρκεια του πειράματος.

Υλικά:

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι ποσότητες των κυττάρων και υλικών που προτείνονται για μετασχηματισμό ευκαρυωτικών κυττάρων με jetPEI.

Δοχείο καλλιέργειας	Αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων	Επιφάνεια ανά πηγάδι (cm ²)	Ποσότητα υλικού ανά πηγάδι ή πλάκα (ml)
384-πηγάδια	5000-10000	0,075	0,05-0,1
96-πηγάδια	10000-17000	0,3	0,1-0,2
48-πηγάδια	25000-50000	1	0,25-0,5
24-πηγάδια	50000-100000	1,9	0,5-1
12-πηγάδια	80000-200000	3,8	1-2
6-πηγάδια/ 35mm	200000-400000	9,4	2-4
6cm/ φλάσκα 25 cm ²	400000-800000	28	5-10
10cm/ φλάσκα 75 cm ²	1000000-2000000	78,5	10-15
14cm/ φλάσκα 153 cm ²	2000000-5000000	153	20-30

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι ποσότητες που προτείνονται και για άλλα συστήματα καλλιέργειας.

Δοχείο καλλιέργειας	Ποσότητα του DNA (μg)	Ποσότητα του jetPEI (μl)	Ποσότητα του διαλύματος NaCl 150mM για το DNA και το jetPEI (μl)	Συνολικός όγκος των συμπλόκων που προστίθενται σε κάθε πηγάδι
384-πηγάδια	0,1	0,2	5	10
96-πηγάδια	0,25	0,5	10	20
48-πηγάδια	0,5	1	25	50
24-πηγάδια	1	2	50	100
12-πηγάδια	2	4	50	100
6-πηγάδια/ 35mm	3	6	100	200
6cm/ φλάσκα 25 cm ²	5	10	250	500

10cm/ φλάσκα 75 cm ²	10-20	20-40	250	500
14cm/ φλάσκα 153 cm ²	20-30	40-60	500	1000

Μέθοδος:

Πρωτόκολλο μετασχηματισμού ευκαρυωτικών κυττάρων καλλιεργημένα σε πλάκα με 24 πηγάδια:

1. Για κάθε πηγάδι, διάλυση 1μg DNA σε 150mM NaCl με τελικό όγκο 50μl. Ανάδευση με voltex και ελαφρύ spin-down.
2. Για κάθε πηγάδι, διάλυση 2μl jetPEI σε 150mM NaCl με τελικό όγκο 50μl. Ανάδευση με voltex και ελαφρύ spin-down.
3. Προσθήκη του 50μl jetPEI διαλύματος στο διάλυμα 50μl του DNA. Ανάδευση με voltex και ελαφρύ spin-down.
4. Επώση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Για κάθε πηγάδι, προσθήκη του 100μl jetPEI/DNA μείγματος σταγόνα-σταγόνα στα καλλιεργούμενα κύτταρα στο 1ml D-MEM που περιέχει 10% FCS. Ομογενοποίηση ανακινώντας απαλά κυκλικά την πλάκα.
6. Μεταφορά στην πλάκας σε επωαστήρα για καλλιέργειες.

Η διαδικασία παρουσιάζεται και σχηματικά στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 33: Σχηματική παρουσίαση του μετασχηματισμού ευκαρυωτικών κυττάρων με την βοήθεια του jetPE αντιδραστηρίου.

3.2.18. Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων για Western blot**Υλικά:**

5X Lysis Buffer (1ml)	
TDR Buffer	850λ
Roch proteinase inhibitor tablet	143λ
PMSF 100mM	7λ

Μέθοδος:

48 ώρες μετά τον μετασχηματισμό των ευκαρυωτικών κυττάρων

1. Τα κύτταρα τοποθετούνται στο πάγο και απομακρύνεται το υλικό ανάπτυξής τους από το πηγάδι.
2. Σε κάθε πηγάδι προστίθεται 1x PBS ανάλογα το μέγεθος του πηγαδιού (πχ σε πλάκα με έξι πηγάδια προστίθενται 3ml 1x PBS, σε πλάκα με δώδεκα πηγάδια προστίθενται 2ml PBS 1x).
3. Το PBS Απομακρύνεται και προστίθενται 1ml PBS σε όλα τα πηγάδια επιπλέον.
4. Για κάθε πηγάδι: Με την βοήθεια ενός τιπ ξεκολλάμε τα κύτταρα από το κολλαγόνο του πηγαδιού και τα μεταφέρουμε σε ένα erpendorf 1,5ml. Προθέτουμε ξανά στο πηγάδι 500λ PBS 1x και μεταφέρουμε τα υπόλοιπα κύτταρα στο ίδιο erpendorf. Η διαδικασία αυτή γίνεται στο πάγο.
5. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 6000rpm για 10min στους 4°C.
6. Προσθήκη στο ίζημα 120λ 1x Lysis Buffer.
7. Ανάδευση για 30min στους 4°C.
8. Φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 30min στους 4°C.

9. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf και ακολουθεί η μέθοδος του Western blot, για την ανίχνευση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών σε καλλιεργούμενα κύτταρα.

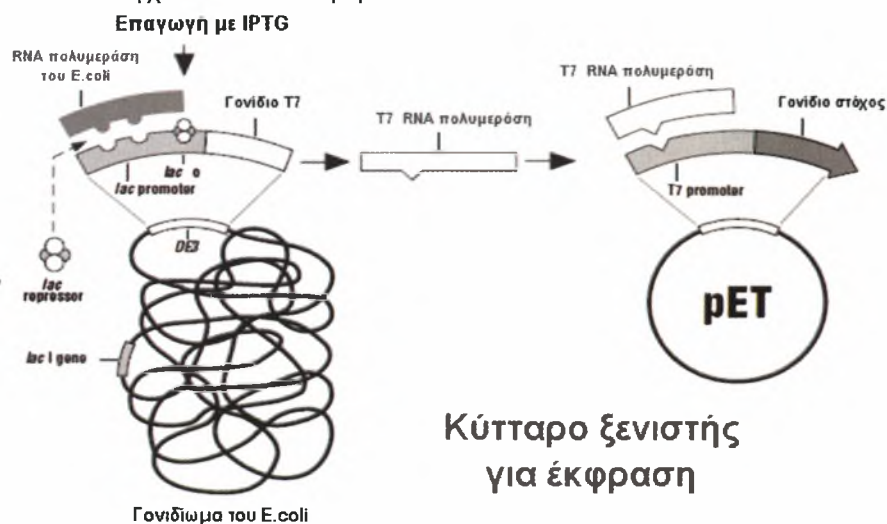
3.2.19. Ηλεκτρονικά προγράμματα

Τα ηλεκτρονικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία είναι το πρόγραμμα Profet, vector NTI και τα διαδικτυακά προγράμματα ClustalW/X, PI/MW και RNAfold^[100, 102-3, 105].

4. Αποτελέσματα

4.1. Προκαρυωτική έκφραση και παραγωγή αντισώματος έναντι των πρωτεϊνών core-1α 1-120αα και 91-191αα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα προκαρυωτικής έκφρασης pET. Το σύστημα αυτό είναι ένα από τα πιο ισχυρά συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για την κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών στο *E.coli*. Τα γονίδια στόχοι κλωνοποιούνται σε πλασμίδια pET υπό το έλεγχο των ισχυρών μεταγραφικών και μεταφραστικών σημάτων του βακτηριοφάγου T7. Η T7 RNA πολυμεράση είναι τόσο ειδική και ενεργή που όταν επάγεται πλήρως, σχεδόν όλα τα κύτταρα μετατρέπονται σε πηγές παραγωγής της πρωτεΐνης. Το επιθυμητό προϊόν μπορεί να αποτελέσει πάνω από 50% της ολικής πρωτεΐνης του κυττάρου μέσα σε λίγες ώρες μετά την επαγωγή. Παρόλο που αυτό το σύστημα είναι πολύ ισχυρό, είναι επίσης δυνατή η ελάττωση του επιπέδου έκφρασης, μειώνοντας την συγκέντρωση του επαγωγέα. Η μείωση του επιπέδου έκφρασης μπορεί να ενισχύσει το επίπεδο έκφρασης μερικών πρωτεϊνών στόχων. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος pET είναι η ικανότητα να διατηρείται η μεταγραφική αποσιώπηση του γονιδίου στόχου σε μη-επαγωγίμα στάδια. Τα γονίδια στόχοι αρχικά κλωνοποιούνται χρησιμοποιώντας ξενιστές που δεν περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, έτσι ελαχιστοποιείται η γενετική αστάθεια του πλασμιδίου λόγω της παραγωγής πρωτεϊνών πιθανόν τοξικών για τα κύτταρα ξενιστές. Όταν καθιερωθεί ο ξενιστής που δεν εκφράζει την πρωτεΐνη, η έκφραση του γονιδίου στόχου μπορεί να επαχθεί μεταφέροντας το πλασμίδιο σε ένα ξενιστή έκφρασης που περιέχει ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, υπό τον έλεγχο του υποκινητή lacUV5.



Εικόνα 34: Έκφραση του επιθυμητού γονιδίου χρησιμοποιώντας το σύστημα προκαρυωτικής έκφρασης pET. Το κύτταρο ξενιστής για έκφραση περιέχει ένα αντίγραφο της T7 RNA πολυμεράσης υπό το έλεγχο του υποκινητή lacUV5 και ένα αντίγραφο του γονιδίου lac I στο γονιδίωμα του.

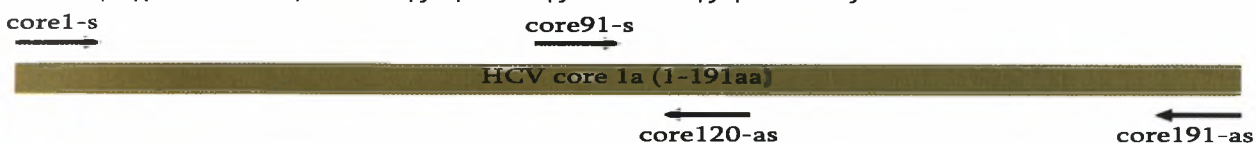
Η έκφραση του επιθυμητού γονιδίου επάγεται από την προσθήκη IPTG ή λακτόζης στην βακτηριακή καλλιέργεια. Παρόλο που σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι δυνατή η κλωνοποίηση κατευθείαν σε ξενιστές έκφρασης, αυτή η προσέγγιση δεν είναι συστήνεται ως γενική στρατηγική. Είναι διαθέσιμοι δυο τύποι T7 υποκινητών και ξενιστών που διαφέρουν στην περιορισμό των βασικών επιπέδων έκφρασης, παρέχοντας μεγάλη ικανότητα για βελτιστοποίηση της έκφρασης μιας μεγάλης ποικιλίας γονιδίων στόχων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pET20b(+) οποίος παρουσιάζεται στην ενότητα 3.1.7. Για την κλωνοποίηση των περιοχών 1-120αα και 91-191αα του γονιδίου core του ιού της ηπατίτιδας C χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία τα πλασμίδια pHP1 8153 και pHP1 1327, τα οποία περιέχουν όλο το γονίδιο της πρωτεΐνης core 1α του ιού της ηπατίτιδας C. Με αντίδραση PCR ενισχύθηκαν οι περιοχές 1-20αα και 91-191αα και στη συνέχεια με αντίδραση σύνδεσης μορίων (ligation) ενώθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pUC19, ο οποίος έχει προηγουμένως γίνει γραμμικός με το ένζυμο περιορισμού *HincII*. Τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια εισάγονται σε ξενιστές όπου και πολλαπλασιάζοντας, απομονώνονται, πέπτονται με τα κατάλληλα ένζυμα για απομόνωση

των επιθυμητών κομματιών και καθαρίζονται. Τα καθαρά πλέον τμήματα DNA εισάγονται με αντίδραση σύνδεσης μορίων στον πλασμιδικά φορέα έκφρασης pET20b(+) και ο ανασυνδιασμένος φορέας εισάγεται σε ξενιστές έκφρασης (BL21(DE3)plysS). Ακολουθεί η επαγωγή της έκφρασης των επιθυμητών πρωτεϊνών, ο καθαρισμός τους και ο εμβολιασμός σε κουνέλια για παραγωγή αντισωμάτων. Στη συνέχεια παρουσιάζεται όλη πειραματική διαδικασία και τα αποτελέσματα.

4.1.1. Αντίδραση PCR για την ενίσχυση των τμημάτων core-1a 1-120aa και core-1a 91-191aa του HCV

Το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών τμημάτων του γονιδίου της core-1a του ιού της ηπατίτιδας C. Τα τμήματα που θέλουμε να ενισχυθούν είναι: 1-120aa (1-360nt) και 91-191aa (273-573nt). Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε και στις πρώτες περιπτώσεις το πλασμίδιο pHPI 1327 και στην δεύτερη pHPI 8153, τα οποία περιέχουν όλο το γονίδιο της πρωτεΐνης core 1a της ηπατίτιδας C.



Εικόνα 35: Σχηματική παρουσίαση του γονιδίου core 1a της ηπατίτιδας C και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τμημάτων 1-120aa και 91-191aa.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος 1-120aa (1-360nt) είναι συμπληρωματικοί με την αρχή και το τέλος της περιοχής του γονιδίου που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Επίσης ο εκκινητής core1-s περιέχει αλληλουχίες για την δημιουργία της θέσης πέψης με το ένζυμο *NdeI* και ο core120-as περιέχει αλληλουχίες για την δημιουργία μιας θέσης πέψης για το ένζυμο *HindIII*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος 91-191aa είναι συμπληρωματικοί στην αρχή και στο τέλος της περιοχής κλωνοποίησης και ο εκκινητής core91-s περιέχει πρόσθετες αλληλουχίες για την δημιουργία της θέσης πέψης με το ένζυμο *NdeI* και ενός εναρκτήριου κωδικονίου ενώ ο εκκινητής core191-as περιέχει αλληλουχίες για την δημιουργία μιας θέσης πέψης για το ένζυμο *XhoI* (οι αλληλουχίες παρουσιάζονται στην εικόνα 36).

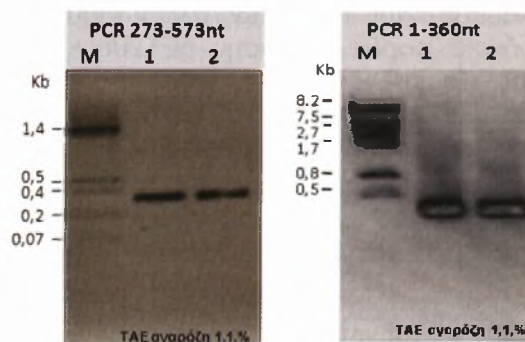
core 1a	-----ATGAGCAGCAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAAAGTAAACACCAACCG	50
core1-s	GGAAATCCATATGAGCAGCAAT-----	22

core 1a	348 GFTCGCGCAAATTTGGGTTAAGGTCATCGATAACCCCTTACGTGCGGGCTTCGCCGACCTCATGG	408
core120-as	-----CCCAAATTTGGGTTAAGCTTGGG-----	21
	* ***** *	
core 1a	241 TACCCTTGGCCCCCTCTATGCGCAATGAGGCTTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCTCCC	301
core91-s	-----CCAAATGTCGGGGTGGGCGGGAT-----	23

core 1a	517 CTTTCTCTATCTTCCTTCTGCGCCTGCTCTCTTGCCTGACTGTGCCCGCTTCAGCC	573
core191-as	-----TGTGCCCGCTTCAAGGG	20

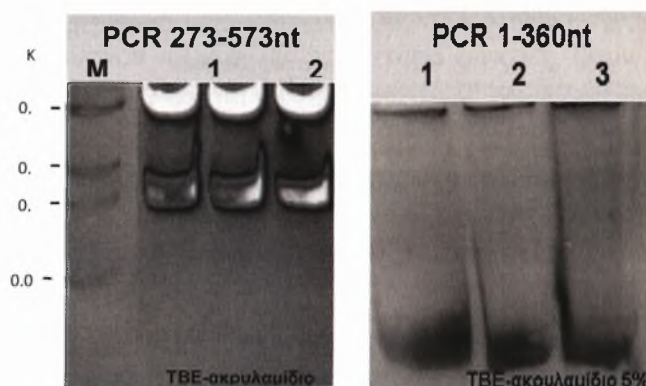
Εικόνα 36: Οι αλληλουχίες των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του τμήματος 1-120aa (core1-s και core120-as) και για του τμήματος 91-191aa (core91-s και core191-as). Οι αλληλουχίες με τους μαύρους έντονους χαρακτήρες είναι πρόσθετες τεχνητές αλληλουχίες. Οι επισημασμένες αλληλουχίες είναι θέσεις κοπής ενζύμων περιορισμού. Με γκρι επισημαίνονται οι αλληλουχίες πέψης του ενζύμου περιορισμού *NdeI*, με πράσινο οι αλληλουχίες πέψης του *XhoI* και με γαλάζιο του *HindIII*. Διακρίνεται το τεχνητό εναρκτήριο κωδικόνιο στις αλληλουχίες του εκκινητή core 1a 91-s.

Η αντίδραση έγινε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις $MgSO_4$ και βρέθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση για κάθε αντίδραση PCR (3λ 100mM $MgSO_4$ για την ενίσχυση του τμήματος 1-191 και 3λ 100mM $MgSO_4$ για την ενίσχυση του 1-120). Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές ώστε να υπάρχει αρκετή ποσότητα του ενισχυμένου τμήματος 273-573nt και 1-360nt. Μετά την ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πήκτωμα αгарόζης (TAE-αγαρόζη 1,1%). Τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων φαίνονται στην Εικόνα 37. Η εικόνα αυτή επιβεβαιώνει την ορθότητα της ενίσχυσης εφόσον παρατηρούνται οι ζώνες που αντιστοιχούν στα 300bp περίπου για το τμήμα 273-573 και 360nt για το τμήμα 1-360nt.



Εικόνα 37: Επιβεβαίωση της ορθότητας των PCR αντιδράσεων για την ενίσχυση των τμημάτων 273-573nt και 1-360nt του γονιδίου της core-1a του HCV.

Ακολούθησε καθαρισμός των ενισχυμένων τμημάτων DNA που αντιστοιχούν στις επιθυμητές ζώνες σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, σύμφωνα με τη μέθοδο απομόνωση κομματιών DNA από πήκτωμα ακρυλαμιδίου (ενότητα 3.2.3). Στη Εικόνα 38 παρουσιάζεται το πήκτωμα ακρυλαμιδίου στο οποίο έτρεξαν τα ενισχυμένα τμήματα DNA και στη συνέχεια απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν.



Εικόνα 38: Ηλεκτροφόρηση, των ενισχυμένων με PCR, τμημάτων 273-573nt και 1-360nt του γονιδίου core-1a του HCV για να ακολουθήσει καθαρισμός από πήκτωμα ακρυλαμιδίου TBE-PAGE 5%.

4.1.2. Κλωνοποίηση των τμημάτων core-1a 1-120aa και core-1a 91-191aa του HCV στον πλασμιδιακό φορέα pUC19

Στη συνέχεια ακολούθησε η κλωνοποίηση των τμημάτων 1-360nt και 273-573nt του γονιδίου core-1a της ηπατίτιδας C στον πλασμιδιακό φορέα pUC19, ο οποίος προηγουμένως πέπτεται με το περιοριστικό ένζυμο HincII, το οποίο δημιουργεί τυφλά άκρα στον γραμμικό πλέον πλασμιδιακό φορέα. Τα τμήματα που ενισχύθηκαν με PCR έχουν επίσης τυφλά άκρα τα οποία δημιούργησε η VntI πολυμεράση. Η αντίδραση σύνδεσης μορίων πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30λ και στους 16°C για περίπου 20 ώρες. Για αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε μια αντίδραση η οποία περιλάμβανε όλα τα συστατικά και των άλλων αντιδράσεων εκτός από τα ενισχυμένα τμήματα DNA του γονιδίου core (μόνο τον πλασμιδιακό φορέα pUC19). Οι συνθήκες των αντιδράσεων αυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Συστατικά των αντιδράσεων σύνδεσης μορίων για την κλωνοποίηση των τμημάτων 1-360nt και 273-573nt του γονιδίου core στον πλασμιδιακό φορέα pUC19.

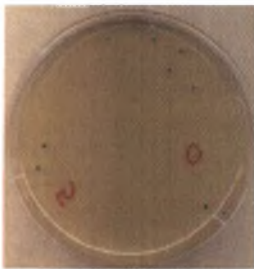
Αντίδραση ligation	pUC19 + 1-360nt	pUC19 + 273-573nt	Αρνητικό κοντρόλ
pUC19 HincII 1:15	1λ	1λ	1λ
1-120aa fragment	15λ	-	-
91-191aa fragment	-	2λ	-
10X buffer	3λ	3λ	3λ
Ligase	4λ	3λ	3λ
H ₂ O	7λ	21λ	24λ
Σύνολο	30λ	30λ	30λ

Έπειτα ακολουθεί ο μετασχηματισμός των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) στη *E.coli* κυτταρική σειρά DH5aF', τα οποία προηγουμένως έχουν γίνει δεκτικά με τη διαδικασία της επεξεργασίας με CaCl₂ (ενότητα 3.2.6). Μετά τον μετασχηματισμό τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C σε τριβλία άγαρ με αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml για περίπου 16 ώρες. Τα βακτήρια που θα αναπτυχθούν παρουσία της αμπικιλίνης θα είναι μόνο εκείνα που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο. Επίσης, με την προσθήκη X-gal και IPTG στα τριβλία άγαρ, συνήθως 100λ από το Master Mix (80λ X- gal + 100λ IPTG), πριν από την προσθήκη των μετασχηματισμένων κυττάρων, είναι δυνατή η επιλογή των λευκών αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο, έναντι των μπλε (Εικόνα 39). Οι αποικίες των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με το αρνητικό κοντρόλ θα πρέπει να είναι όλες μπλε αφού εκφράζεται το γονίδιο της γαλακτοζιδάσης στα ανέπαφα πλασμίδια.

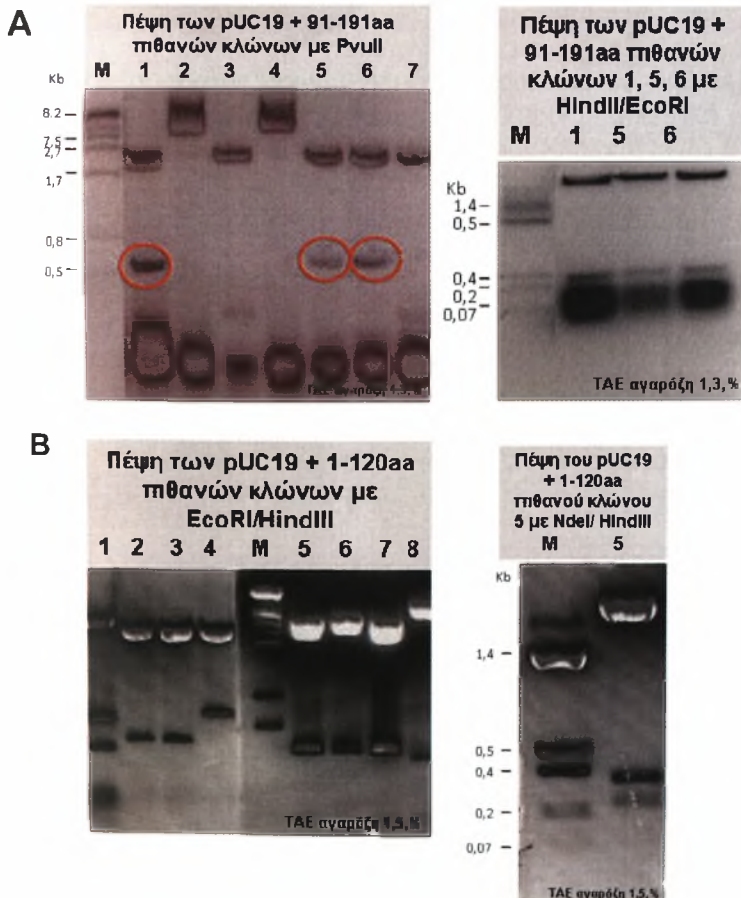
Για να απομονωθούν οι αποικίες που έχουν όντως το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (ενότητα 3.2.7) από τις επιλεγμένες λευκές αποικίες (7 αποικίες για το τμήμα 91-191aa και 8 αποικίες για το τμήμα 1-120aa) και έλεγχος των απομονωμένων πλασμιδίων με τη χρήση ένζυμων περιορισμού.

Για τα πλασμίδια pUC19 + 91-191aa αρχικά έγινε πέψη με το ένζυμο *PvuII*. Το πλασμίδιο pUC19 διαθέτει δύο θέσεις πέψης για το ένζυμο περιορισμού *PvuII*, δεξιά και αριστερά των αλληλουχιών που περιέχουν τις θέσεις κλωνοποίησης MCS. Το αυθεντικό *PvuII* – *PvuII* τμήμα έχει μεγεθος 322 βάσεις που μεγαλώνει σε μέγεθος ανάλογα με το εισαγόμενο τμήμα του DNA. Οι θετικοί κλώνοι που εντοπίστηκαν από αυτή την πέψη κόπηκαν στη συνέχεια με τα ένζυμα *HindIII* και *EcoRI* για να πιστοποιηθεί ότι μπορεί να γίνει απελευθέρωση του ιικού αυτού τμήματος του DNA με τα προαναφερόμενα ένζυμα, που θα χρησιμοποιηθούν αργότερα.

Για τα πλασμίδια pUC19 + 1-120aa αρχικά έγινε πέψη με τα ένζυμα *EcoRI/HindIII* και οι θετικοί κλώνοι που εντοπίστηκαν από αυτή την πέψη κόπηκαν στη συνέχεια με τα ένζυμα *NdeI* και *HindII*.

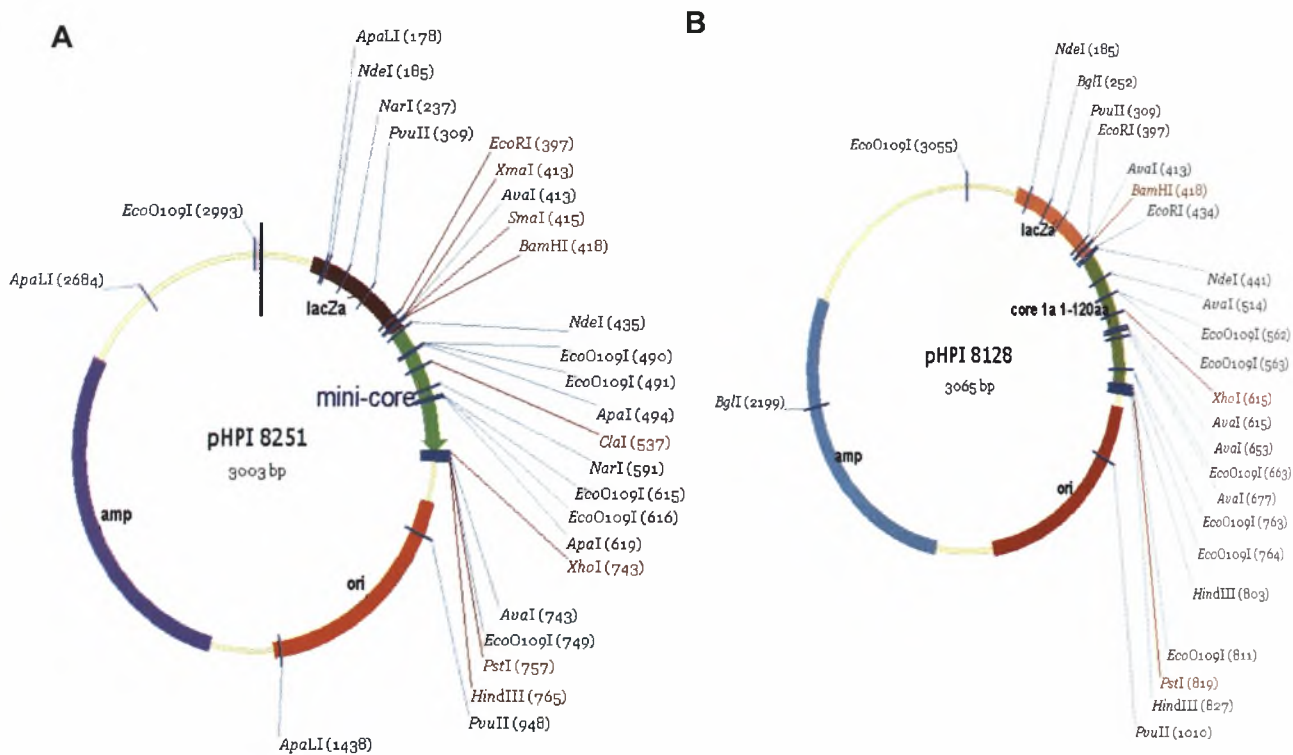


Εικόνα 39: Εικόνα του μετασχηματισμού των DH5aF' δεκτικών κυττάρων με την αντίδραση σύνδεσης μορίων του pUC19 (*HincII*) και το τμήμα του γονιδίου *core* 1α της ηπατίτιδας C 273-573nt.



Εικόνα 40: (A) Πέψη των *mini-preps* με ένζυμα περιορισμού. Αρχικά 7 *mini-preps* από τον μετασχηματισμό με το πλασμίδιο pUC19+ 91-191aa, κόπηκαν με το ένζυμο *PvuII*. Σύμφωνα με τους χάρτες των πλασμιδιακών φορέων και το μέγεθος του ενθέματος ένας θετικός κλώνος θα πρέπει να δίνει δύο ζώνες μεγέθους 639bp και 2364bp. Άρα πιθανοί θετικοί από την πρώτη πέψη είναι οι 1, 5 και 6. Οι θετικοί αυτοί κλώνοι πέπτονται με τα ένζυμα *HindIII/EcoRI* και οι αναμενόμενες ζώνες έχουν μέγεθος 358bp και 2645bp. Και οι τρεις αυτοί κλώνοι αποδίδουν τα σωστά μεγέθη κα πιθανός να είναι σωστοί. Ο προσανατολισμός του ενθέματος δεν μας αφορά σε αυτή τη φάση του πειράματος. (B) 8 *mini-preps* από τον μετασχηματισμό με το πλασμίδιο pUC19 + 1-120aa, κόπηκαν με τα ένζυμα *EcoRI/HindIII*. Σύμφωνα με τους χάρτες των πλασμιδιακών φορέων και το μέγεθος του ενθέματος ένας θετικός κλώνος θα πρέπει να δίνει δυο ζώνες μεγέθους 368bp και 2635bp. Άρα πιθανοί θετικοί από την πρώτη πέψη είναι οι 5, 6 και 7. Ο κλώνος 5 πέπτεται με τα ένζυμα *HindIII/NdeI* και οι αναμενόμενες ζώνες έχουν μέγεθος 360bp και 2643bp. Ο κλώνος 5 αποδίδει τα σωστά μεγέθη κα πιθανός να είναι σωστός.

Από αυτούς τους θετικούς κλώνους κατασκευάζονται stamps και αποστέλλονται στην Lark Technologies για αντιδράσεις αλληλούχησης, ώστε να πιστοποιηθεί η αυθεντικότητα των εισαχθέντων ιικών τμημάτων του DNA. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι για την κλωνοποίηση του τμήματος 91-191αα στον πλασμιδιακό φορέα pUC19, ο κλώνος 5 είναι πιο σωστός καθώς οι 1 και 6 έχουν μια σημειακή μετάλλαξη. Οπότε κατασκευάζεται χάρτης για το πλασμίδιο αυτό και ονομάζεται pHPI 8251. Επίσης πραγματοποιούμε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (large preparation) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.8. Με αυτόν τον τρόπο πολλαπλασιάζονται τα πλασμίδια και έτσι έχουμε μια σημαντική ποσότητα τους για να συνεχίσει η πειραματική διαδικασία. Την διαδικασία των largereps ακολουθεί ο καθαρισμός των πλασμιδίων με Χλωριούχο Καισίο όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.9 και υπολογισμός την συγκέντρωσης των δειγμάτων με φωτομέτρηση υπεριώδους στα 260nm. Η ορθότητα της φωτομέτρησης μπορεί να επαληθευτεί ηλεκτροφορώντας τα δείγματα σε μια πηκτή 1%) αγαρόζης (TAE 1X, και συγκρίνοντας την τιμή της φωτομέτρησης με την ένταση της ζώνης. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης για την κλωνοποίηση του τμήματος 1-120αα στον πλασμιδιακό φορέα pUC19, έδειξαν ότι ο κλώνος 5 είναι πιο σωστός οπότε κατασκευάζεται χάρτης και ονομάζεται pHPI 8128. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και για το pHPI 8251.

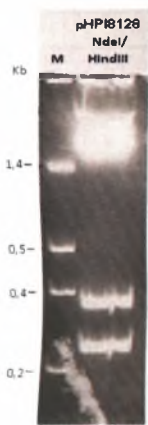


Εικόνα 41: Χάρτης των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν, A: pHPI 8251 το οποίο περιέχει τις αλληλουχίες 273-573nt του γονιδίου της core-1a του ιού της ηπατίτιδας C στο πλασμίδιο pUC19 και B: pHPI 8128 το οποίο περιέχει τις αλληλουχίες 1-360nt του γονιδίου της core στο πλασμίδιο pUC19.

4.1.3. Κλωνοποίηση των τμημάτων core-1a 1-120αα και core-1a 91-191αα του ιού της ηπατίτιδας C στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET20b(+)

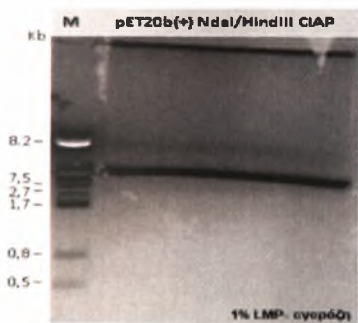
Μετά τον καθαρισμό των πλασμιδίων pHPI 8251 και 8128 πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα *NdeI* και *XhoI* για το pHPI 8251 και με *NdeI* και *HindIII* για το pHPI 8128 έτσι ώστε τα παραγόμενα τμήματα των επιθυμητών γονιδίων να εισαχθούν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET20b(+). Ο πλασμιδιακός φορέας επίσης πέπτεται με τα αντίστοιχα ένζυμα. Γίνεται πέψη 100μg από κάθε πλασμίδιο pHPI 8251 και 8128 σε τελικό όγκο 400λ για περίπου 20 ώρες στους 37 °C. Επίσης 10μg πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pET20b(+) πέπτονται σε τελικό όγκο 100λ για 20περίπου ώρες στους 37 °C για κάθε μια από τις δυο κλωνοποιήσεις. Οι πέψεις ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης για να διαπιστωθεί εάν πραγματοποιήθηκαν σωστά. Ακολουθεί η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης

πλασμιδιακών φορέων (CIAP) του κομμένου πλασμιδιακού φορέα pET20b(+) όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.4. Οι πέψεις των πλασμιδίων ρΗΡ1 8251 και 8128 ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου TBE 5% και απομονώνονται οι ζώνες των ενθεμάτων και γίνεται καθαρισμός σύμφωνα με τη μέθοδο απομόνωση κομματιών DNA από πήκτωμα ακρυλαμιδίου (ενότητα 3.2.3, Εικόνα 42).



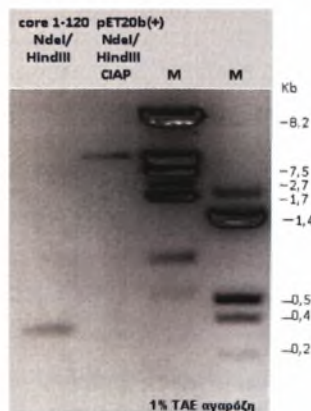
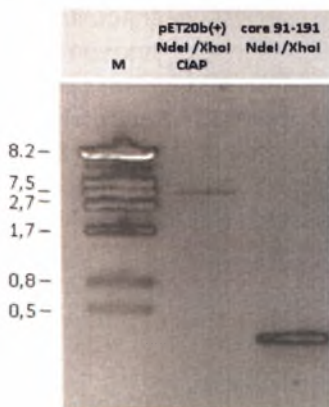
Εικόνα 42: Ηλεκτροφόρηση της πέψης του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου ρΗΡ1 8128 με τα ένζυμα NdeI/HindIII σε 5% TBE για απομόνωση και καθαρισμό της επιθυμητής ζώνης.

Ο κομμένος πλασμιδιακός φορέας pET20b(+) (NdeI/XhoI και CIAP ή NdeI/HindIII και CIAP) καθαρίζεται με την μέθοδο του καθαρισμού πλασμιδιακού DNA από low melting αгарόζη για απαλλαγεί το DNA από πρωτεΐνες των ενζύμων, έτσι ώστε να είναι όσο το δυνατό πιο καθαρό για την αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Εικόνα 43).



Εικόνα 43: Ηλεκτροφόρηση των πλασμιδιακών φορέων pET20b(+) κομμένοι με NdeI/HindIII και NdeI/XhoI σε low melting αгарόζη 1%, για καθαρισμό του πλασμιδιακού φορέα από πρωτεΐνες

Για να υπολογιστεί η ποσότητα του κάθε DNA που θα προστεθεί στην αντίδραση σύνδεσης μορίων ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αгарόζης 1%TAE τόσο ο καθαρισμένος πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pET20b(+) όσο και ίση ποσότητα των απομονωμένων και καθαρισμένων ενθεμάτων (ρΗΡ1 8251 NdeI/XhoI και ρΗΡ1 8128 NdeI/HindIII).



Εικόνα 44: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% TAE του pET20b(+) (NdeI/XhoI ή NdeI/HindIII και CIAP) μαζί με ίδια ποσότητα καθαρού κομματιού ρΗΡ1 8251 NdeI/XhoI και ρΗΡ1 8128 NdeI/HindIII για να υπολογιστεί η ποσότητα του κάθε DNA που θα προστεθεί στην αντίδραση σύνδεσης μορίων

Η αντίδραση σύνδεσης μορίων πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 30λ και στους 16°C για περίπου 20 ώρες. Για αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε μια αντίδραση η οποία περιλάμβανε όλα τα συστατικά και των άλλων αντιδράσεων εκτός από τα ενθέματα DNA του γονιδίου core (μόνο τον πλασμιδιακό φορέα pET20b(+)). Οι συνθήκες των αντιδράσεων αυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

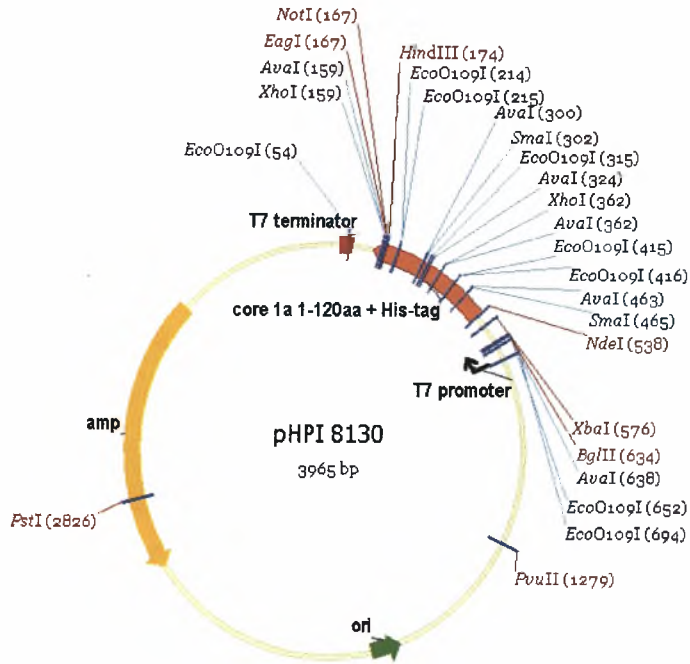
Συστατικά των αντιδράσεων σύνδεσης μορίων για την κλωνοποίηση των τμημάτων 1-360nt και 273-573nt του γονιδίου core-1α στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET20b(+)			
Αντίδραση ligation	pET20b(+)+ 1-306nt	pET20b(+)+ 273-573nt	Αρνητικό
pET20b(+)/NdeI/XhoI, CIAP, LMP αγαρόζη	5λ	5λ	5λ
pHPI 8128 NdeI/XhoI	2λ	-	-
pHPI 8251 NdeI/XhoI	-	2λ	-
10X buffer	3λ	3λ	3λ
Ligase	1λ	1λ	1λ
H ₂ O	24λ	24λ	29λ
Σύνολο	30λ	30λ	30λ

Ακολούθως πραγματοποιείται μετασχηματισμός των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης μορίων σε DH5aF' δεκτικά κύτταρα. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τριβλία άγαρ με αντιβιοτικό αμικικιλίνη με τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml κα επωάστηκαν στους 37°C για περίπου 16h. Επειδή ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pET-20b(+) δεν διαθέτει το σπερόνιο LacZ η επιλογή των αποικιών δεν μπορεί να γίνει με την μέθοδο των μπλε/λευκών αποικιών. Η εικόνα του μετασχηματισμού ήταν πολύ καλή καθώς το αρνητικό κοντρόλ δεν είχε καμία αποικία, και τα δυο ligation είχαν από 150 αποικίες περίπου το κάθε ένα. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Τα πλασμίδια από το μετασχηματισμό με ανασυνδιασμένα πλασμίδια pET20b(+) και 1-360nt του γονιδίου core του HCV κόβονται με τα ένζυμα NdeI/HindIII και οι πέψεις ηλεκτροφορούνται σε TAE αγαρόζη 1,4% (Εικόνα 45). Το αναμενόμενο μέγεθος των θετικών κλώνων είναι περίπου 360nt. Θετικοί κλώνοι όπως φαίνεται στην εικόνα είναι οι 2-5, 7-10 και 12.

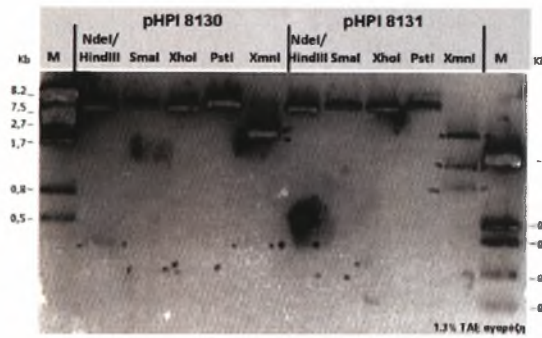


Εικόνα 45: 12 minipreps από τον μετασχηματισμό με το πλασμίδιο pET 20b (+) + 1-120aa, κόπηκαν με τα ένζυμα NdeI/HindIII. Σύμφωνα με τους χάρτες των πλασμιδιακών φορέων και το μέγεθος του ενθέματος ένας θετικός κλώνος θα πρέπει να δίνει ζώνη μεγέθους 360bp. Άρα πιθανοί θετικοί κλώνοι οι 2-5, 7-10 και 12.

Τυχαία επιλέγονται οι κλώνοι 4 και 12 και ονομάζεται pHPI 8130 και 8131. Για τα πλασμίδια αυτά κατασκευάζονται stamps και αποστέλλονται στην Lark Technologies για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι οι κλώνοι αυτοί έχουν σωστές αλληλουχίες. Οπότε κατασκευάζεται χάρτης για τα πλασμίδια pHPI 8130-1 (Εικόνα 46). Επίσης πραγματοποιούμε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (large preparation) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.8. Με αυτόν τον τρόπο πολλαπλασιάζονται τα πλασμίδια και έτσι έχουμε μια σημαντική ποσότητα τους για να συνεχίσει η πειραματική διαδικασία. Την διαδικασία των largereps ακολουθεί ο καθαρισμός των πλασμιδίων με Χλωριούχο Καίσιο, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.9 και υπολογισμός την συγκέντρωσης των δειγμάτων με φωτομέτρηση υπεριώδους στα 260nm. Η ορθότητα της φωτομέτρησης μπορεί να επαληθευτεί ηλεκτροφορώντας τα δείγματα σε μια πηκτική αγαρόζη και συγκρίνοντας την τιμή της φωτομέτρησης με την ένταση της ζώνης. Τέλος κατασκευάζεται ένα ενζυμικό προφίλ για τα πλασμίδια αυτά με τα ένζυμα NdeI/HindIII, SmaI, XhoI, PstI και XmnI (Εικόνα 47).



Εικόνα 46: Χάρτης των πλασμιδίων pHPI 8130-1 οι οποίοι περιέχουν τις αλληλουχίες 1-120aa του γονιδίου της core του HCV στο πλασμιδίο pET20b(+). NdeI/HindIII.



Εικόνα 47: Ενζυμικό προφίλ των πλασμιδίων pHPI 8130 και pHPI 8131 οι οποίοι περιέχουν τις αλληλουχίες 1-120aa του γονιδίου της core του HCV στο πλασμιδίο pET20b(+). NdeI/HindIII.

HCV-core-1a	ATGAGGCACGAATCCTAAACCTCAAGGAAAGAAACCAAAACGTAAACACCAACCGTGGCCACAG	60
HCV-core-1-360	ATGAGGCACGAATCCTAAACCTCAAGGAAAGAAACCAAAACGTAAACACCAACCGTGGCCACAG	60
HCV-core-1a	GACGTCAAAGTTCGGGCGGGGGGTCAGATCGTTGGGTGCAATTACTTGTTCGGCCGCGAGG	120
HCV-core-1-360	GACGTCAAAGTTCGGGCGGGGGGTCAGATCGTTGGGTGCAATTACTTGTTCGGCCGCGAGG	120
HCV-core-1a	GGCCCTAGATTGGGTGTCGGCCGACGAGGAGACTTCCGAGCGGTGGCAACCTCGAGGT	180
HCV-core-1-360	GGCCCTAGATTGGGTGTCGGCCGACGAGGAGACTTCCGAGCGGTGGCAACCTCGAGGT	180
HCV-core-1a	AGACGTCAGCCATCCCCAGGCGACGTCCGGCCGAGGCGAGGACCTGGGTTCAGCCCGGG	240
HCV-core-1-360	AGACGTCAGCCATCCCCAGGCGACGTCCGGCCGAGGCGAGGACCTGGGTTCAGCCCGGG	240
HCV-core-1a	TACCCCTGGCCCTCTATGGCAATGAGGCTTGGGGTGGGGCGATGGCTCCTCTCTCC	300
HCV-core-1-360	TACCCCTGGCCCTCTATGGCAATGAGGCTTGGGGTGGGGCGATGGCTCCTCTCTCC	300
HCV-core-1a	CGTGGCTCTGGGCTAGCTGGGGCCCAAGACCCTCCGGTGGGTGGCCCAATTTGGGT	360
HCV-core-1-360	CGTGGCTCTGGGCTAGCTGGGGCCCAAGACCCTCCGGTGGGTGGCCCAATTTGGGT	360
HCV-core-1a	AAGGTCATCGATACCTTADGTGGGCTTGGCCGACCTCATGGGTACAAACCCCTCTCT	420
HCV-core-1-360	AAGGTCATCGATACCTTADGTGGGCTTGGCCGACCTCATGGGTACAAACCCCTCTCT	369
HCV-core-1a	GGCGCCCTCTTGGAGGGCTCCAGGGCCCTGGCCCATGGCTCCGGGTCTGGGAAGAC	480
HCV-core-1-360	GGCGTGAACATAGCAACAGGAACCTTCCTGGTGGCTCTTCTCTATCTTCCTCTGGCC	540
HCV-core-1a	CTGCTCTCTTGGCTGACTGTGCCCGCTTCAGCC	573
HCV-core-1-360		

Εικόνα 48: Ομοιοπαράθεση του τμήματος 1-360nt του γονιδίου core-1a του HCV με ολόκληρο το γονίδιο core-1a. Οι μαρκαρισμένες αλληλουχίες είναι οι πρόσθετες τεχνητές αλληλουχίες που έχουν δημιουργηθεί λόγω της κλωνοποίησης στον προκαρυωτικό φορέα έκφρασης pET 20b(+).

```

rHPI-8130      MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSEERSQPRG  60
rHPI-8131      MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSEERSQPRG  60
core-1a       MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSEERSQPRG  60
*****

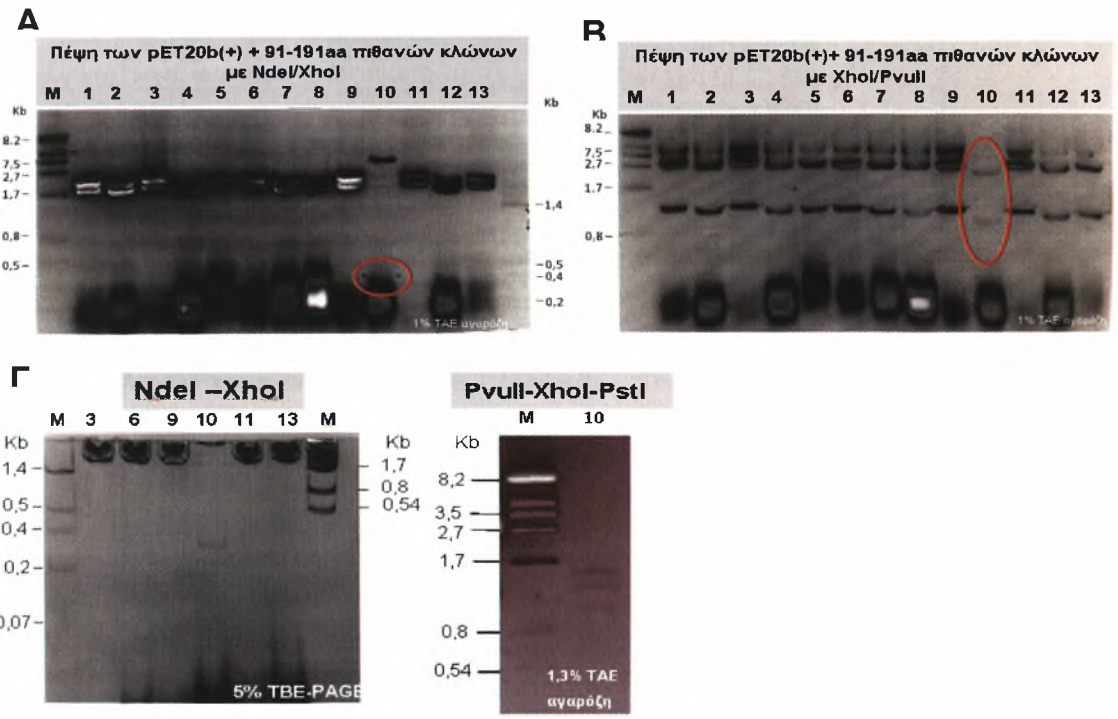
rHPI-8130      RRQPIPKARRPEGRTWVQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSPRGSRPSWGPTDPRRPSFNLG  120
rHPI-8131      RRQPIPKARRPEGRTWVQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSPRGSRPSWGPTDPRRPSFNLG  120
core-1a       RRQPIPKARRPEGRTWVQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSPRGSRPSWGPTDPRRPSFNLG  120
*****

rHPI-8130      ELAAALEHHHHHH----- 133
rHPI-8131      ELAAALEHHHHHH----- 133
core-1a       KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGGAPLGGAAARALAHGVRVLEDDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA  180
*               *

rHPI-8130      -----
rHPI-8131      -----
core-1a       LLSCLTVPASA 191
    
```

Εικόνα 49: Ομοιοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών που προκύπτουν από την μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου core-1a 1-120αα της HCV των πλασμιδίων rHPI 8130-8131 μαζί με ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου core-1a του ιού HCV. Επισημαίνονται με ανοικτό πλαίσιο τα πρόσθετα αμινοξέα που δημιουργήθηκαν στην χίμαιρα.

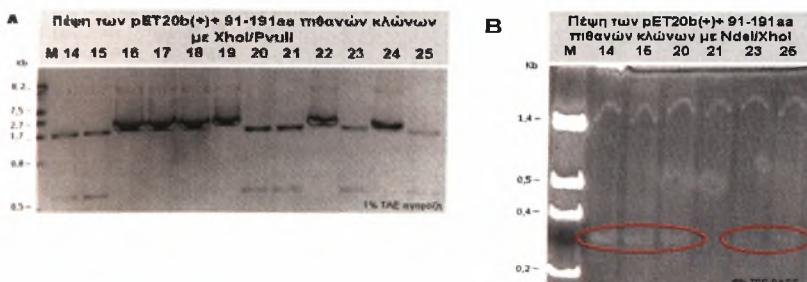
Αντίστοιχα, τα πλασμίδια από το μετασχηματισμό με ανασυνδιασμένα πλασμίδια rET20b(+) και 91-191nt του γονιδίου core του HCV κόβονται με τα ένζυμα NdeI/XhoI και PvuII/XhoI για να ταυτοποιηθεί ποιος κλώνος είναι ανασυνδιασμένος και το ένθεμα έχει το σωστό προσανατολισμό. Σύμφωνα με το χάρτη του πλασμιδίου rET20b(+) και το μέγεθος των ενθεμάτων οι αναμενόμενες ζώνες σε κάθε πέψη είναι για την πέψη NdeI/XhoI 308nt και 3586nt και για την πέψη PvuII/XhoI 1039nt και 2845nt (Εικόνα 50).



Εικόνα 50: Ηλεκτροφόρηση των πέψων με NdeI/XhoI (A) και XhoI/PvuII (B) των απομονωμένων πλασμιδίων με την μέθοδο για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα για την κλωνοποίηση του τμήματος 91-191αα του γονιδίου core του HCV. Η πέψη NdeI/XhoI (A) επαναλήφθηκε γιατί οι ζώνες από την εικόνα A δεν ήταν πολύ καθαρές. (Γ) Ο θετικός κλώνος 10 κόπηκε με τα ένζυμα PvuII/XhoI/PstI για βρεθεί ο προσανατολισμός του ενθέματος. Ο κλώνος 10 έχει όντως τον σωστό προσανατολισμό καθώς βλέπουμε τις αναμενόμενες ζώνες 1041nt, 1547nt και 1298nt.

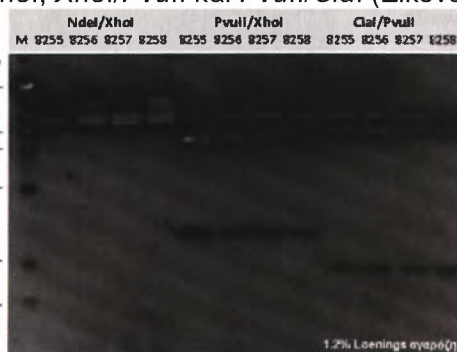
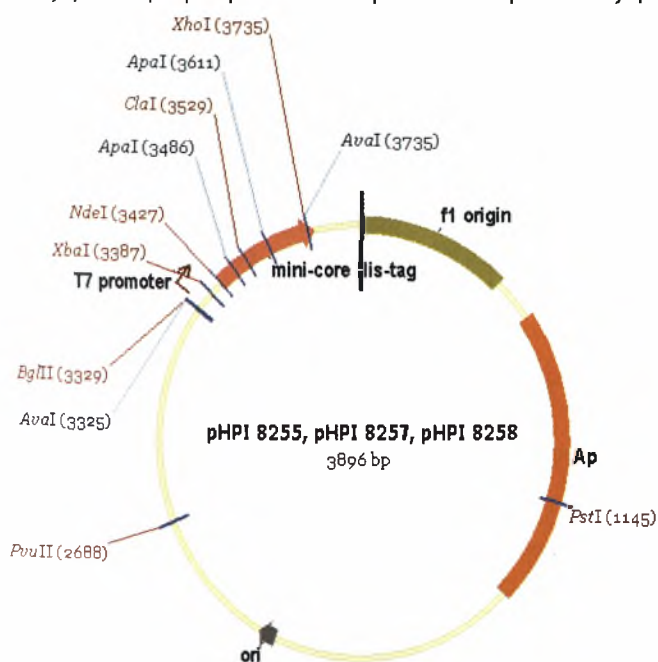
Ο κλώνος 10 φαίνεται ότι έχει να σωστά μεγέθη ζωνών. Για το λόγο αυτό κατασκευάζονται stamps και αποστέλλονται στην Lark Technologies για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι ο κλώνος 10 είναι όντως σωστός. Οπότε κατασκευάζεται χάρτης για το πλασμίδιο αυτό και ονομάζεται rHPI 8255 (Εικόνα 53). Επίσης πραγματοποιούμε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (large preparation) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.8. Με αυτόν τον τρόπο πολλαπλασιάζονται τα πλασμίδια και έτσι έχουμε

μια σημαντική ποσότητα τους για να συνεχίσει η πειραματική διαδικασία. Την διαδικασία των largescreens ακολουθεί ο καθαρισμός των πλασμιδίων με CICs όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.9 και υπολογισμός την συγκέντρωσης των δειγμάτων με φωτομέτρηση υπεριώδους στα 260nm. Η ορθότητα της φωτομέτρησης μπορεί να επαληθευτεί ηλεκτροφορώντας τα δείγματα σε μια πηκτική αγαρόζης και συγκρίνοντας την τιμή της φωτομέτρησης με την ένταση της ζώνης. Επειδή αρχικά μόνο ένα κλώνος από τους 13 ήταν θετικός (κλώνος 10), απομονώθηκαν επιπλέον αποικίες και ξανά έγινε η διαδικασία της απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (κλώνοι 14-26). Τα πλασμίδια πέπτονται με τα ένζυμα PvuII/XhoI και NdeI/XhoI. Τα αναμενόμενα μεγέθη των ζωνών είναι 1041nt και 2845 για την πέψη PvuII/XhoI, 308nt και 3586nt για την πέψη NdeI/XhoI.



Εικόνα 51: Ηλεκτροφόρηση των πέψεων των πιθανών κλώνων 14-25 με τα ένζυμα XhoI/PvuII (A) σε 1% αγαρόζη για την εύρεση επιπλέον θετικών κλώνων pET20b(+) + 91-191aa του γονιδίου core του HCV. (B) Οι κλώνοι 14, 15, 20, 21, 23 και 25 στη συνέχεια πέπτονται με τα ένζυμα NdeI/XhoI. Όλοι εκτός από τον 21 εμφανίζουν ζώνες στο αναμενόμενο μέγεθος.

Θετικοί κλώνοι βρέθηκε ότι είναι οι κλώνοι 14, 15, 20, 23 και 25. Από αυτούς επιλέγονται οι πρώτοι τρεις, για τους οποίους κατασκευάζονται stamps και αποστέλλονται στην Lark Technologies για αλληλούχηση. Ονομάζονται ως rHPI 8256-8. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι και οι κλώνοι rHPI 8267 και 8268 είναι σωστοί αλλά ο rHPI 8266 έχει μια παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο όγδο αμινοξύ. Κατασκευάζονται ο χάρτης των πλασμιδίων με το πρόγραμμα NTIvector (Εικόνα 54). Επίσης πραγματοποιούμε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.8. Την διαδικασία των largescreens ακολουθεί ο καθαρισμός των πλασμιδίων με CICs όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.9 και υπολογισμός την συγκέντρωσης των δειγμάτων με φωτομέτρηση υπεριώδους στα 260nm. Η ορθότητα της φωτομέτρησης μπορεί να επαληθευτεί ηλεκτροφορώντας τα δείγματα σε μια πηκτική 1%αγαρόζης (TAE 1X) και συγκρίνοντας την τιμή της φωτομέτρησης με την ένταση της ζώνης. Τέλος κατασκευάζεται ένα ενζυμικό προφίλ για τα πλασμίδια αυτά με τα ένζυμα NdeI/XhoI, XhoI/PvuII και PvuII/ClaI (Εικόνα 53).



Εικόνα 53: Ενζυμικό προφίλ των πλασμιδίων rHPI 8255-8258 οι οποίοι περιέχουν τις αλληλουχίες 91-191aa του γονιδίου της core του HCV στο πλασμίδιο pET20b(+) NdeI/XhoI.

Εικόνα 54: Χάρτης των πλασμιδίων rHPI 8255-8 οι οποίοι περιέχουν τις αλληλουχίες 91-191aa του γονιδίου της core του HCV στο πλασμίδιο pET20b(+) NdeI/XhoI.

```

pHPI-8255 TGC GGG TGG GCG GGA TGG CTC CTG TCT CCC CGT GGC TCT CGG CCT AGC TGG GGC CCC
pHPI-8256 ... .. GGA ... ..
pHPI-8257 ... ..
pHPI-8258 ... ..

pHPI-8255 ACA GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGC AAT TTG GGT AAG GTC ATC GAT ACC CTT ACG TGC GGC
pHPI-8256 ... ..
pHPI-8257 ... ..
pHPI-8258 ... ..

pHPI-8255 TTC GCC GAC CTC ATG GGG TAC ATA CCG CTC GTC GGC GCC CCT CTT GGA GGC GCT GCC AGG
pHPI-8256 ... ..
pHPI-8257 ... ..
pHPI-8258 ... ..

pHPI-8255 GCC CTG GCG CAT GGC GTC CGG GTT CTG GAA GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA GGG AAC CTT
pHPI-8256 ... ..
pHPI-8257 ... ..
pHPI-8258 ... ..

pHPI-8255 CCT GGT TGC TCT TTC TCT ATC TTC CTT CTG GCC CTG CTC TCT TGC CTG ACT GTG CCC GCT
pHPI-8256 ... ..
pHPI-8257 ... ..
pHPI-8258 ... ..

pHPI-8255 TCA GCC TGA
pHPI-8256 ... ..
pHPI-8257 ... ..
pHPI-8258 ... ..
    
```

Εικόνα 55: Ομοιοπαράθεση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης των πλασμιδίων pHPI 8255-8258 τα οποία περιέχουν την αλληλουχία 273-573nt του γονιδίου core-1a in-frame με την κασέτα ιστιδίων του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pET20b(+). Τα επισημασμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στα νουκλεοτίδια που προστέθηκαν στην επιθυμητή αλληλουχία. Στο πλασμίδιο pHPI 8256 φαίνεται μια μετάλλαξη στο όγδοο κωδικόνιο το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της Leu8 σε Gly8.

```

pHPI-8256 -----
pHPI-8257 -----
pHPI-8258 -----
pHPI-8255 -----
core-1a MSTNPKPQRKT KRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSERSQPRG 60

pHPI-8256 -----MCGWAGWLLSPRGSRPSSWGPTDPRRRSRNLG 31
pHPI-8257 -----MCGWAGWLLSPRGSRPSSWGPTDPRRRSRNLG 31
pHPI-8258 -----MCGWAGWLLSPRGSRPSSWGPTDPRRRSRNLG 31
pHPI-8255 -----MCGWAGWLLSPRGSRPSSWGPTDPRRRSRNLG 31
core-1a RRQPIKARRPEGRWVAQPGYWPVLYGNEGCGWAGWLLSPRGSRPSSWGPTDPRRRSRNLG 120
*****

pHPI-8256 KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA 91
pHPI-8257 KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA 91
pHPI-8258 KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA 91
pHPI-8255 KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA 91
core-1a KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA 180
*****

pHPI-8256 LLSCLTVPASALEHHHHHH 110
pHPI-8257 LLSCLTVPASALEHHHHHH 110
pHPI-8258 LLSCLTVPASALEHHHHHH 110
pHPI-8255 LLSCLTVPASALEHHHHHH 110
core-1a LLSCLTVPASA----- 191
*****
    
```

Εικόνα 56: Ομοιοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών που προκύπτουν από την μετάφραση των νουκλεοτιδίων αλληλουχιών (πρόγραμμα Prothet) του γονιδίου core-1a 91-191aa των πλασμιδίων pHPI 8255-8258 μαζί με ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου core-1a. Παρουσιάζεται η μετάλλαξη του πλασμιδίου pHPI 8256 στο όγδοο αμινοξύ και επισημαίνονται τα πρόσθετα αμινοξέα που δημιουργήθηκαν κατά την κατασκευή των πλασμιδίων για να είναι δυνατή η κλωνοποίηση, η έκφραση και ο καθαρισμός του τμήματος αυτού του γονιδίου core-1a του HCV.

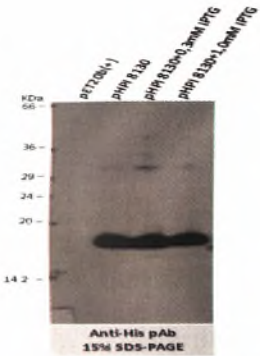
4.1.4. Προκαρυωτική έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών core-1a 1-120aa και core-1a 91-191aa

Μέχρι τώρα έχουν κατασκευαστεί δυο πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης, ένας για την παραγωγή του τμήματος 1-120aa του γονιδίου core της ηπατίτιδας C (pHPI 8130-1) και ένας για την παραγωγή του τμήματος 91-191aa (pHPI 8255-8).

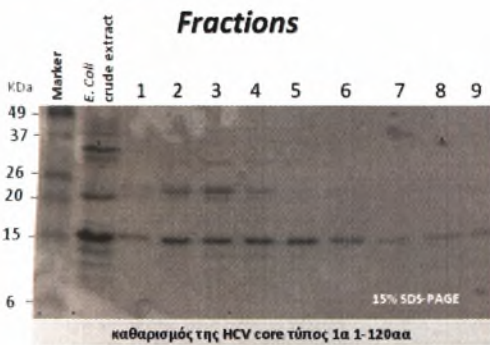
4.1.4.1. Προκαρυωτική έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης core-1a 1-120aa

Αρχικά γίνεται η επαγωγή της έκφρασης του τμήματος 1-120aa (pHPI 8130-1). Πραγματοποιείται μετασχηματισμός BL21 βακτηρίων με το πλασμίδιο pHPI 8130. Σαν αρνητικό κοντρόλ για την αντίδραση χρησιμοποιούνται BL21 βακτήρια που μετασχηματίζονται σε τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET20b(+). Η επαγωγή της έκφραση δοκιμάστηκε σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG 0,3 και 1,0 mM τελική συγκέντρωση. Αρχικά δυο φρέσκιες καλλιέργειες εμβολιάζονται σε LB θρεπτικό υλικό με αναλογία 1:20 και αφήνονται να μεγαλώσουν μέχρι OD_{600nm} 0,5. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη IPTG σε τελικές συγκεντρώσεις 0,3 και 1,0 mM αντίστοιχα. Τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν παρουσία του IPTG για 3 ώρες. 1ml από κάθε καλλιέργεια συλλέγεται και φυγοκεντρήται για να κατέβουν τα κύτταρα. Το ίζημα αναδιαλύεται 100λ 2X loading buffer και ακολουθεί η μέθοδος του Western blot. Ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιείται το anti-His (1/1000).

Το αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης που παράγεται από το πλασμιδιακό φορέα έκφρασης ρΗΡ1 8130 είναι περίπου $133aa \times 110 = 14630Da$. Από την εικόνα 57 φαίνεται ότι δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφορά στην επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης core 1-120aa σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG. Για το λόγο αυτό, ακολούθησε επαγωγή σε μεγάλη κλίμακα (5L καλλιέργειας) και στη συνέχεια ο καθαρισμός της παραγόμενης πρωτεΐνης όπως παρουσιάζεται στην ενότητα 3.2.15. Στην εικόνα 58 παρουσιάζονται μετά την μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη και βάψιμο με ronseau τα fractions που παραλείφθηκαν. Στην εικόνα 59 παρουσιάζονται μετά την μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη και βάψιμο με ronseau η καθαρισμένη πρωτεΐνη core 1-120aa και στην εικόνα 60 παρουσιάζονται Western blot με πρώτο αντίσωμα θετικό για τον ιό της ηπατίτιδας C ανθρώπινο ορό (1:200), αρνητικό για τον ιό της ηπατίτιδας C ανθρώπινο ορό (1:200) και anti-His (1:1000) πολυκλωνικό αντίσωμα.

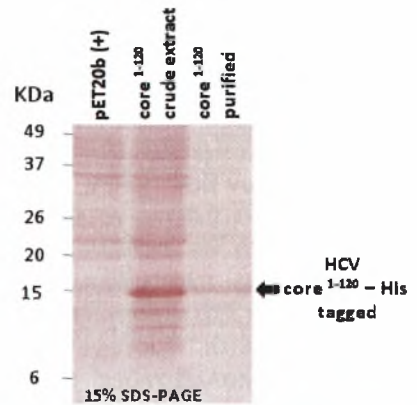


Εικόνα 57: Western blot για έλεγχο της επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης core 1a της ηπατίτιδας C 1-120aa από το πλασμιδιακό φορέα έκφρασης ρΗΡ1 8130, ο οποίος περιέχει το τμήμα 1-120aa του γονιδίου core in-frame σε μια ετικέτα ιστιδινών στο 3' άκρο του γονιδίου έτσι ώστε να είναι δυνατός ο καθαρισμός της πρωτεΐνης από στήλη χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA. Η επαγωγή γίνεται για 3 ώρες σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0,3mM και 0,1mM). Δεν παρατηρείται διαφορά στην επαγωγή σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG ούτε και απουσίας του. Anti-His πολυκλωνο αντίσωμα 1:1000.

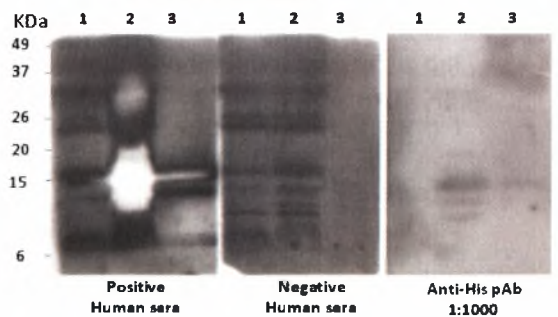


Εικόνα 58: Ηλεκτροφόρηση των εκλουσμάτων σε 15% SDS-PAGE, μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη και βάψιμο αυτής με ronseau. Παρατηρούμε την αύξηση της καθαρότητας καθώς και την μείωση της ποσότητας της πρωτεΐνης καθώς προχωράμε στα επόμενα εκλούσματα. Η διαδικασία έκλυσης σταμάτησε στο έκλουσμα 15 και τα εκλούσματα ενώθηκαν σε ένα.

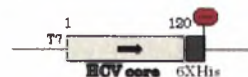
Εικόνα 59: Ηλεκτροφόρηση της καθαρής πλέον πρωτεΐνης core 1-120aa ενωμένη in-frame με την κασέτα ιστιδινών σε 15% SDS-PAGE, μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη και βάψιμο αυτής με ronseau. Παρατηρούμε την καθαρότητα της πρωτεΐνης σε σχέση με το αρχικό crude extract core 1-120 πριν τον καθαρισμό από την στήλη χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA.



Εικόνα 60: Western blot για ταυτοποίηση της πρωτεΐνης core 1a 1-120aa της ηπατίτιδας C. Ηλεκτροφόρηση έγινε σε 15% SDS-PAGE. Ως πρώτα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινος ορός θετικός για ηπατίτιδα C (1:200), ανθρώπινος ορός αρνητικός για ηπατίτιδα C (1:200) και anti-His rabbit πολυκλωνο αντίσωμα (1:1000). Ως δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν anti-human rabbit (IgG/HRP) πολυκλωνο αντίσωμα (1:1000) για της δυο πρώτες αντιδράσεις και anti-rabbit mouse πολυκλωνο αντίσωμα (1:1000) για την τελευταία ανίχνευση.



1: pET20b (+) *E. coli* crude extract
 2: *E. coli* expressing core 1-120 protein, crude extract
 3: core 1-120 purified protein



4.1.4.2. Προκαρυωτική έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης core-1α 91-191αα

Στη συνέχεια γίνεται η επαγωγή της έκφρασης του τμήματος 91-191αα της πρωτεΐνης core-1α του ιού της ηπατίτιδας C (rHPI 8255). Πραγματοποιείται μετασχηματισμός BL21 βακτηρίων με το πλασμίδιο rHPI 8255. Σαν αρνητικό κοντρόλ για την αντίδραση χρησιμοποιούνται BL21 βακτήρια που μετασχηματίζονται σε τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET20b(+). Η επαγωγή της έκφραση δοκιμάστηκε σε τρεις διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις IPTG 0,3, 0,5 και 1,0mM. Αρχικά δυο φρέσκιες καλλιέργειες εμβολιάζονται σε LB θρεπτικό υλικό με αναλογία 1:20 και αφήνονται να μεγαλώσουν μέχρι OD_{600nm} 0,5. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη IPTG σε τελικές συγκεντρώσεις 0,3 και 1,0mM αντίστοιχα. Τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν παρουσία του IPTG για 3 ώρες στους 37°C. 1ml από κάθε καλλιέργεια συλλέγεται και φυγοκεντρήται για να κατέβουν τα κύτταρα. Το ίζημα αναδιλύεται 100λ 2X loading buffer και ακολουθεί η μέθοδος του Western blot. Ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιείται το anti-His (1/1000). Το αναμενόμενο μέγεθος της πρωτεΐνης που παράγεται από το πλασμιδιακό φορέα έκφρασης rHPI 8255 είναι περίπου 110aa*110=12100Da. Μετά την εμφάνιση του Western blot δεν καταφέραμε να δούμε έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (30°C και 25°C) καθώς και σε λιγότερο χρόνο επαγωγής από 3 ώρες αλλά και πάλι δεν μπορέσαμε να δούμε έκφραση της πρωτεΐνης core 91-191αα-His tag.

Οι πιθανοί λόγοι της αποτυχίας επαγωγής της έκφρασης της ανασυνδιασμένης αυτής πρωτεΐνης είναι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, η τοξικότητα, η υδροφοβικότητα, η αστάθεια, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης, η αδιαλυτοτητά της και η δημιουργία σωματιδίων εγκλεισμού (The QIAexpressionist).

Η έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών μπορεί να επιβραδύνει την ανάπτυξη των κυττάρων ξενιστών. Τα υψηλά επίπεδα μεταγραφής μπορούν να οδηγήσουν σε αργή ανάπτυξη, και αυτό συμβαίνει λόγω των μεταβολικών απαιτήσεων για την μετάφραση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Προϊόντα γονιδίων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του ξενιστή συνήθως δεν είναι τοξικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Παραδείγματα τοξικών ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών περιλαμβάνουν μεμβρανικές πρωτεΐνες (η πρωτεΐνη core-1α 91-191-His tag περιέχει την περιοχή σύνδεσης σε στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σε σταγονίδια λιπιδίων, Εικόνα 22) ή πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το DNA ή παρεμβαίνουν στην μεταφορά ηλεκτρονίων (η πρωτεΐνη core-1α 91-191-His tag περιέχει την περιοχή σύνδεσης στα μιτοχόνδρια, Εικόνα 22). Πλασμίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι τοξικές έχουν γενικά χαμηλότερη αποτελεσματικότητα στο μετασχηματισμό των ξενιστών κυττάρων σε σχέση με το πατρικό φορέα, και τα μετασχηματισμένα κύτταρα που προκύπτουν περιέχουν συνήθως διαγραφές και μεταλλάξεις. Για να μειωθεί το αποτέλεσμα της τοξικότητας της πρωτεΐνης κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων, πριν την επαγωγή, το βασικό επίπεδο έκφρασης που συμβαίνει απουσία του επαγωγέα θα πρέπει να κατασταλεί όσο το δυνατό περισσότερο, και ο αριθμός των γενεών πριν από την επαγωγή θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Προβλήματα που σχετίζονται με την απώλεια του πλασμιδίου μπορεί να ξεπεραστούν μεγαλώνοντας τα κύτταρα με υψηλά επίπεδα αμπικιλίνης (200 μg/ml). Για ασταθή κατασκευάσματα έκφρασης, η αρχική overnight καλλιέργεια πρέπει να αποφεύγεται. Προτείνεται η χρήση αποικιών από φρέσκα τριβλία για την αρχική καλλιέργεια. Αυτές οι αρχικές καλλιέργειες πρέπει μετά να διαλύονται 20–50-φορές σε προξεσταμένο μέσο και να αναπτύσσονται σε ένα OD₆₀₀ 0.5 πριν την επαγωγή.

Ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες με υδρόφοβες περιοχές, όπως και η πρωτεΐνη core-1α 91-191-His tag συνήθως είναι τοξικές για τα κύτταρα ξενιστές, πιο πιθανόν λόγω την σύνδεσης ή της παρεμβολής της πρωτεΐνης με ζωτικά συστήματα μεμβρανών. Αλληλουχίες που κωδικοποιούν πεπτιδία σινιάλου ή διαμεμβρανικές περιοχές, εκτός αν υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, θα πρέπει να απομακρύνονται από το DNA που εισάγεται. Μια πιθανή λύση για αυτό το πρόβλημα είναι οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες να περιέχουν πεπτιδία σινιάλου, τα οποία στοχεύουν την πρωτεΐνη στο περιπλασματικό χώρο (όπως το rELB leader του πλασμιδίου pET20b(+), το οποίο όμως απουσιάζει από την παραγόμενη πρωτεΐνη για να μειωθεί να ποσοστό των ξένων αλληλουχιών στην πρωτεΐνη, αφού αυτή θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αντισωμάτων). Προτείνεται επίσης να χαμηλώνεται η θερμοκρασία ανάπτυξης στους 25°C πριν την επαγωγή.

Κάποιες πρωτεΐνες, κυρίως αυτές που είναι μικρότερες από 10 kDa, δεν είναι σταθερές στο *E. coli*, και μπορεί να αποικοδομούνται γρήγορα από πρωτεάσες. Αυτό μπορεί να ξεπεραστεί μειώνοντας την θερμοκρασία ανάπτυξης στους 30°C ή κάνοντας επαγωγή για λιγότερη ώρα.

Οι ευκαρυωτικές πρωτεΐνες που εκφράζονται ενδοκυτταρικά στα *E. coli* συχνά οδηγούν στη δημιουργία αδιάλυτων σωματιδίων εγκλεισμού. Η ενδομοριακή σύνδεση των υδρόφοβων περιοχών

κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στον σχηματισμό των σωματιδίων εγκλεισμού. Για πρωτεΐνες με κατάλοιπα κυστεινών, ο μη σωστός σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών στο κυτταρόπλασμα του *E. coli* μπορεί επίσης να οδηγεί στη μη- σωστή αναδίπλωση και στο σχηματισμό των σωματιδίων εγκλεισμού. Ένα πλεονέκτημα του συστήματος καθαρισμού QIAexpress είναι ότι οι συντηγμένες πρωτεΐνες με τις 6 ιστιδίνες στα αδιάλυτα σωματίδια μπορούν εύκολα να διαλυθούν με αποδιατακτικά όπως η 8M ουρία και να καθαριστούν με της μήτρες Ni-NTA. Ακόμα και όταν σχηματίζονται σωματίδια εγκλεισμού, κάποιες συντηγμένες πρωτεΐνες με 6 ιστιδίνες θα παραμείνουν στο κυτταρόπλασμα, από όπου και μπορούν να καθαριστούν. Ένα είναι επιθυμητή μεγαλύτερη ποσότητα συντηγμένης πρωτεΐνης, προτείνεται η μείωση της θερμοκρασία ανάπτυξης μετά την επαγωγή. Η θερμοκρασία ανάπτυξης, συνήθως επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα έκφρασης και την διαλυτότητα της πρωτεΐνης, και οι χαμηλές θερμοκρασίες θα μειώσουν τα επίπεδα έκφρασης, οδηγώντας και σε υψηλότερα ποσά διαλυτής πρωτεΐνης. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να αναπυχτούν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και η περίοδος έκφρασης να είναι ελάχιστη. Η συγκέντρωση του IPTG μπορεί να μειωθεί από 1mM έως 0.005mM, κάτι που μειώνει τα επίπεδα έκφρασης 90–95%.

Όσον αφορά το χαμηλό επίπεδο έκφρασης μπορεί να συμβεί αν η πρωτεΐνη είναι τοξική ή ασταθής. Σε κάποιες περιπτώσεις, το 5' άκρο της εισαγόμενης αλληλουχίας DNA μπορεί να κωδικοποιεί τμήματα που εμποδίζουν την μεταγραφή ή τη μετάφραση της πρωτεΐνης (π.χ. καλύπτοντας την αλληλουχία Shine-Dalgarno με δομές στελέχους- βρόγχου μέσω ανάστροφων επαναλήψεων). Αυτός είναι ένας πιθανός λόγος της μη-επιτυχής έκφρασης της πρωτεΐνης core-1a 91-191-His tag. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αλληλουχία που εκφράζεται θα πρέπει να ελέγχει και να τροποποιηθεί. Αρχικά έγινε έλεγχος των αλληλουχιών των πλασμιδίων για να βρεθεί αν υπάρχουν μεταλλάξεις ή διαγραφές στην αλληλουχία πριν το 5' άκρο του γονιδίου. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 61, οι αλληλουχίες των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν είναι σωστές εκτός από το πλασμίδιο 8256 το οποίο όμως δεν χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης.

	Xba I	RBS	start	
8258	--ACGGGTTTCCTCTAGATTAATTTTGTTTA	ACTTTAGGAAAGGCA	TATACATATATGCG	58
8257	GGGGGGTTTTCTCTAGATTAATTTTGTTTA	ACTTTAGGAAAGGCA	TATACATATATGCG	60
8256	--ACGGGTTTCCTCT--GATTAATTTTGTTTA	ACTT--AGGAAAGGCA	TATACATATATGCG	55

8258	GGTGGGCGGGA	TGGCTCCTGTCTCCC	CGTGGCTCTCGGCTAGCTGGGGCC	118
8257	GGTGGGCGGGA	TGGCTCCTGTCTCCC	CGTGGCTCTCGGCTAGCTGGGGCC	120
8256	GGTGGGCGGGA	TGGGCTCTCTCCC	CGTGGCTAGCTGGGGCC	115

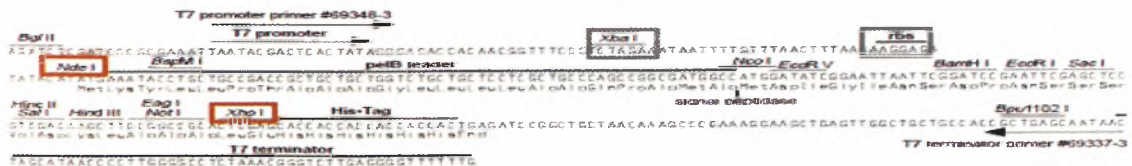
8258	CCGGGCTAGGTCGGCG	CAATTGGGTAAGGTCATCGATACC	CTTACGTGGGGCTTCGGCG	170
8257	CCGGGCTAGGTCGGCG	CAATTGGGTAAGGTCATCGATACC	CTTACGTGGGGCTTCGGCG	180
8256	CCGGGCTAGGTCGGCG	CAATTGGGTAAGGTCATCGATACC	CTTACGTGGGGCTTCGGCG	175

8258	ACCTCATGGGGTACAT	ACCBCCTGTCGGGCGCCCTCTGGAGGCGCTGCGGGCC	CTGG	238
8257	ACCTCATGGGGTACAT	ACCBCCTGTCGGGCGCCCTCTGGAGGCGCTGCGGGCC	CTGG	240
8256	ACCTCATGGGGTACAT	ACCBCCTGTCGGGCGCCCTCTGGAGGCGCTGCGGGCC	CTGG	235

8258	CGCATGGCGTCCGGGT	TCTGGTAGACGGCGTGAACT	ATGCACACGGGAACTTCC	298
8257	CGCATGGCGTCCGGGT	TCTGGTAGACGGCGTGAACT	ATGCACACGGGAACTTCC	300
8256	CGCATGGCGTCCGGGT	TCTGGTAGACGGCGTGAACT	ATGCACACGGGAACTTCC	295

8258	GCTCTTCTCTATCTT	CCCTTCGGCCCTGCTCTCTTGCCTGACTGT	GCCCGCTTCAGCCC	358
8257	GCTCTTCTCTATCTT	CCCTTCGGCCCTGCTCTCTTGCCTGACTGT	GCCCGCTTCAGCCC	360
8256	GCTCTTCTCTATCTT	CCCTTCGGCCCTGCTCTCTTGCCTGACTGT	GCCCGCTTCAGCCC	355

8258	TCGAGCACCAACCA	CCACCCATGA		384
8257	TCGAGCACCAACCA	CCACCCATGA		386
8256	TCGAGCACCAACCA	CCACCCATGA		381



Εικόνα 61: Ομοιοπαράθεση των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν για την έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης core 1a 91-191aa-His tag. Δεν παρατηρούνται μεταλλάξεις στις περιοχές πριν από το γονίδιο εκτός από το πλασμίδιο 8256. Στο κίτρινο τετράγωνο βρίσκονται οι αλληλουχίες που έχουν προστεθεί τεχνητά στο 3' άκρο του γονιδίου. Παρουσιάζεται επίσης η περιοχή κλωνοποίησης του πλασμιδικού φορέα προκατριωτικής έκφρασης pET20b(+) που χρησιμοποιήθηκε.

Μελετήθηκε περαιτέρω η περίπτωση η αλληλουχία που εισάγουμε στο πασμιδιακό φορέα pET20b(+), να παρεμποδίζει την λειτουργία της αλληλουχίας Shine-Dalgarno στο παραγόμενο mRNA, δημιουργώντας δευτεροταγή δομές που παρεμποδίζουν την πρόσδεση του ριβοσώματος, άρα και την έκφραση της πρωτεΐνης. Αρχικά έγινε ομοιοπαράθεση της αλληλουχίας του γονιδίου core 273-573nt με

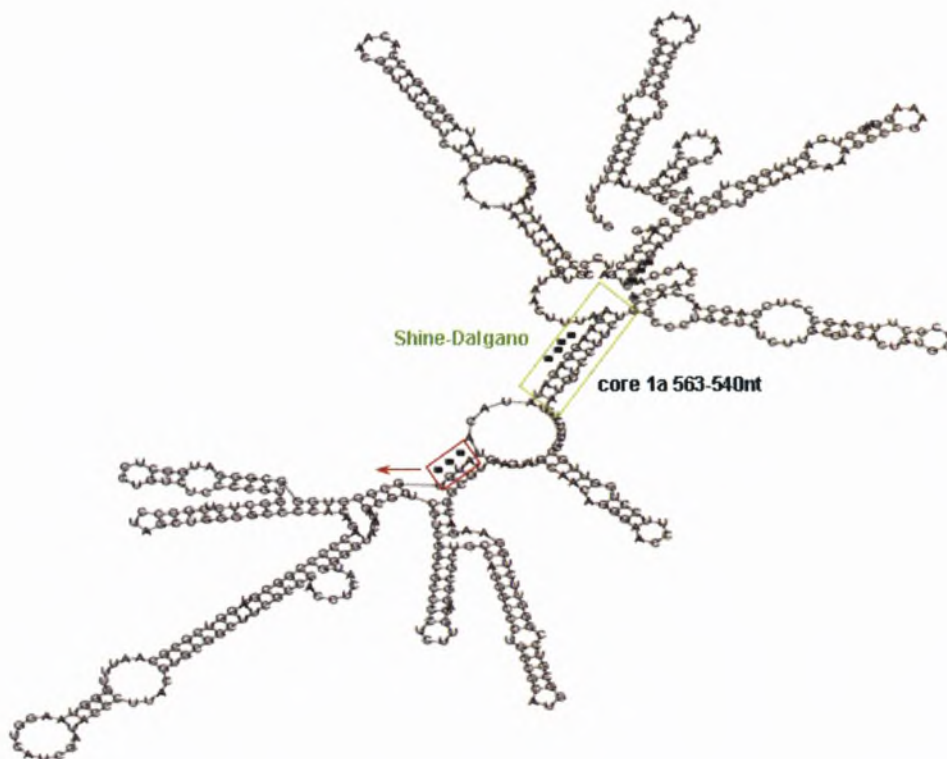
την αντίστροφη και συμπληρωματική αλληλουχία Shine-Dalgarno και βρέθηκε ότι υπάρχει ένα τμήμα στο τέλος της αλληλουχίας του γονιδίου core το οποίο θα μπορούσε να σχηματίσει μια δομή στελέχους με την αλληλουχία Shine-Dalgarno στο παραγόμενο mRNA (Εικόνα 62).

core91-191_from_pHPI_8255 Shine-Dalgarno	ATGTGCGGGTGGCGGGGATGGCTCTCTCTCCCCGTGGCTCTGGGCTA 50
core91-191_from_pHPI_8255 Shine-Dalgarno	CTGGGGCCCCACAGACCCCGGCGTACGTCGCGCAATTTGGGTAAAGTCA 100
core91-191_from_pHPI_8255 Shine-Dalgarno	TCGATACCCCTTACGTGGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATACCGCTC 150
core91-191_from_pHPI_8255 Shine-Dalgarno	GTCGGCGCCCTCTTTGGAGGGCGTCCACAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCG 200
core91-191_from_pHPI_8255 Shine-Dalgarno	GGTTCTGGAAAGACGGCGTGAACATATGCAACAGGGAACCTTCCTGGTTGCT 250
core91-191_from_pHPI_8255 Shine-Dalgarno	CTTCTCTAATTTCTCTTGGCCCTGCTCTCTTGCCTGACTGTGCCCGCT 300
core91-191_from_pHPI_8255 Shine-Dalgarno	TCAGCCCTCGAGGAGGACCCACCACCACCACCTGA 333

core 1a 563-540nt

Εικόνα 62: Ομοιοπαράθεση της αλληλουχίας του γονιδίου core-1a 91-191aa με την αντίστροφη και συμπληρωματική αλληλουχία του μοτίβου Shine-Dalgarno.

Στην συνέχεια έγινε πρόβλεψη της δομής του παραγόμενου mRNA από το πλασμίδιο pHPI 8265 το οποίο παρατέχει την χιμαιρική αυτή πρωτεΐνη, χρησιμοποιώντας το ηλεκτρονικό πρόγραμμα RNAfold web server και διαπιστώθηκε ότι πραγματικά η αλληλουχία 563-570 του γονιδίου core δημιουργεί μια δομή στελέχους με την αλληλουχία Shine-Dalgarno (Εικόνα 63). Πιθανόν αυτός να είναι ένας από τους λόγους που δεν μπορέσαμε να δούμε έκφραση αυτού του πλασμιδίου. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα μια πιθανή λύση είναι η χρήση διαφορετικών περιοχών κλωνοποίησης στο πλασμίδιο pET20b(+) και η χρήση του pelB leader του φορέα.



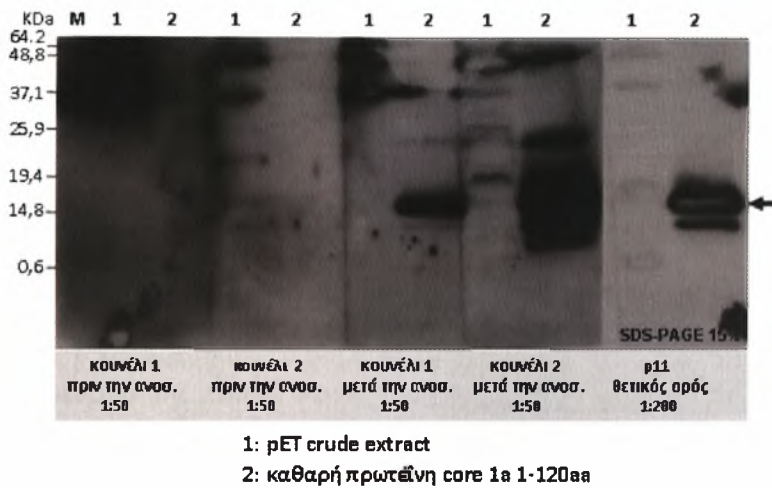
Εικόνα 63: Πρόβλεψη της δομής του mRNA που παράγεται από το πλασμίδιο pHPI 8265 και περιέχει τις αλληλουχίες της mini-core πρωτεΐνης συντηγμένες με την ουρά των έξι ιστιδινών. Παρατηρούμε στη δομή στελέχους που δημιουργείται μεταξύ της αλληλουχίας 563-540 του γονιδίου core 1a 91-191-His tag με την αλληλουχία του μοτίβου Shine-Dalgarno.

4.1.5. Εμβολιασμός κουνελιών για παραγωγή αντισώματος έναντι την «υδρόφυλης» πρωτεΐνης 1-120aa core-1a

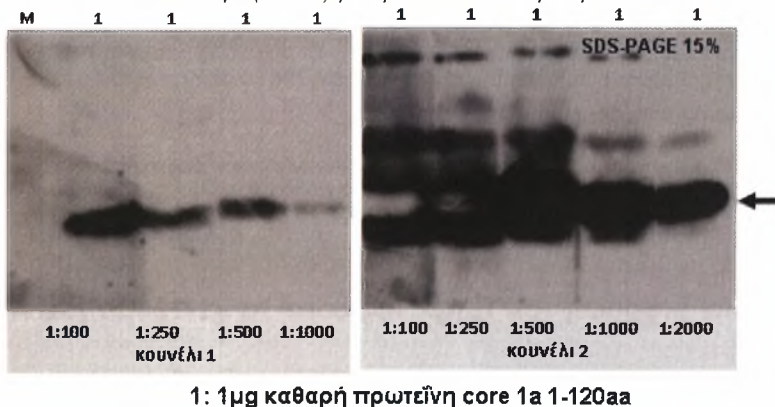
Για κάθε αντιγόνο χρησιμοποιούνται δυο κουνέλια New Zealand με ηλικία μικρότερη του ενός έτους. Οι εμβολιασμοί γίνονται με μεσοδιάστημα εικοσιπέντε ημερών. Πριν το πρώτο εμβολιασμό παραλαμβάνεται μικρή ποσότητα αίματος για να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικό κοντρόλ πριν από την ανοσοποίηση. Η διαδικασία των εμβολιασμών παρουσιάζεται στην ενότητα 3.2.16

Μετά την ολοκλήρωση των τριών πρώτων εμβολιασμών και το πέρας 20 ημερών γίνεται η παραλλαγή αίματος από κάθε κουνέλι (ενότητα 3.2.16). Τα αντισώματα που παράχτηκαν ελέγχονται με Western blot για το αν αναγνωρίζουν την καθαρή πρωτεΐνη core 1-120aa με την οποία εμβολιάστηκαν τα κουνέλια (Εικόνα 64). Παρατηρούμε ότι πριν την ανοσοποίηση δεν υπάρχουν αντισώματα έναντι στην πρωτεΐνη core 1a του ιού της ηπατίτιδας C. Μετά την ανοσοποίηση και τα δυο κουνέλι έχουν αντισώματα έναντι του αντιγόνου core 1a 1-120aa (Εικόνα 64). Παρατηρούμε ότι το κουνέλι δύο έχει μια πολύ δυνατή αντίδραση στο Western blot και εμφανίζει και περισσότερη μη-ειδική σύνδεση.

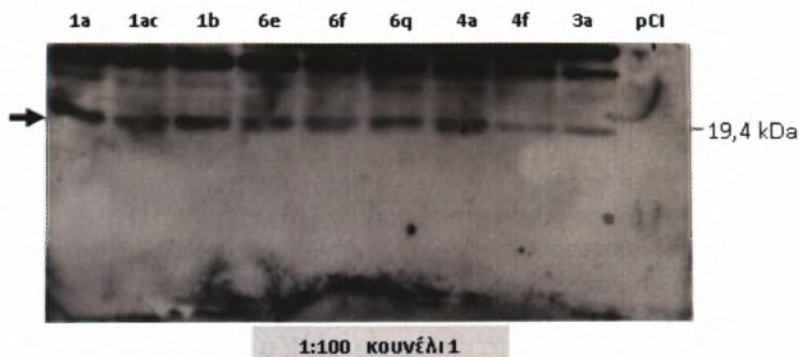
Στην συνέχεια έγινε μια τιτλοποίηση των αντισωμάτων για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση του αντισώματος που είναι ικανή να ανιχνεύσει με Western blot 1μg πρωτεΐνης core 1a 1-120aa (Εικόνα 65). Επίσης έγινε έλεγχος των αντισωμάτων για το αν είναι ικανά να αναγνωρίσουν πρωτεΐνες core από άλλους υπότυπους του ιού της ηπατίτιδας C. Χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια που εκφράζουν ολόκληρες τις πρωτεΐνες core (1-191aa) από τους υπότυπους 1a, 1ac, 1b, 6e, 6f, 6g, 4a, 4f και 3a, που παραχωρήθηκαν για τα πειράματα από τον Δρ Αθανάσιο Κακκανά, και μετασχηματίστηκαν ευκαρυωτικά κύτταρα WRL-68 σε πλάκα που περιέχει 12 πηγάδια (ενότητα 3.2.17) (Εικόνα 66).



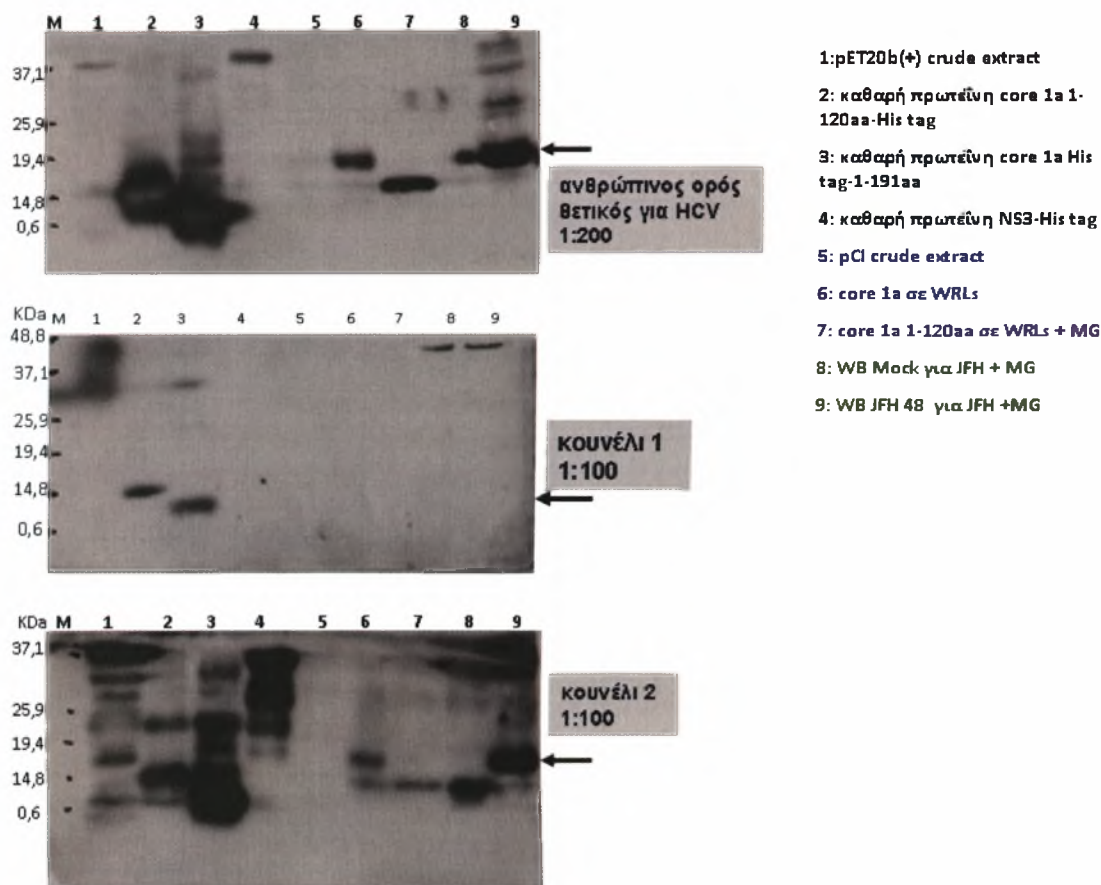
Εικόνα 64: Ανάλυση Western blot για τον έλεγχο του αντισώματος από τα κουνέλια 1 και 2. Στη θέση 1 φορτώνεται βακτηριακό εκχύλισμα (crude extract) από BL21 βακτήρια που περιέχουν το πλασμίδιο pET20b (+). Στη θέση 2 φορτώνεται 1μg καθαρισμένης πρωτεΐνης core 1a 1-120aa η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των κουνελιών. Τα πρώτα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο σχήμα. Ως δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν mouse anti-rabbit (IgG/HRP) πολύκλωνο αντίσωμα (1:1000) για της τρεις πρώτες αντιδράσεις και rabbit anti-human πολύκλωνο αντίσωμα (1:1000) για την τελευταία αντίδραση.



Εικόνα 65: Τιτλοποίηση της συγκέντρωσης του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης core 1a 1-120aa του ιού της ηπατίτιδας C. Για το αντίσωμα από το κουνέλι 1 χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 1:100, 1:250, 1:500 και 1:1000. Για το αντίσωμα από το κουνέλι 2 έγινε μια παραπάνω αραιώση (1:2000) γιατί στην εικόνα 64 φαίνεται ότι η αντίδραση που δεινή είναι πιο ισχυρή.



Εικόνα 66: Ανάλυση Western blot για τον έλεγχο της ικανότητας του αντισώματος από το κουνέλι 1 να αναγνωρίζει πρωτεΐνες core άλλων υπότυπων του ιού της ηπατίτιδας C. Χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδιασμένα πλασμίδια pCI που εκφράζουν ολόκληρες τις πρωτεΐνες core (1-191aa) από τους υπότυπους 1a, 1ac, 1b, 6e, 6f, 6g, 4a, 4f και 3a.



Εικόνα 67: Ανάλυση Western blot για τον έλεγχο της ικανότητας των πολύκλωνων αντισωμάτων από τα κουνέλια 1 και 2 να αναγνωρίζουν πρωτεΐνες core που παράγονται προκαρυωτικά, ευκαρυωτικά και από ένα μολυσματικό σύστημα (JFH). Χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδιασμένα πλασμίδια pCI που εκφράζουν ολόκληρη την πρωτεΐνη core 1a (1-191aa) και την πρωτεΐνη core 1-120aa σε WRL κύτταρα.

4.2. Ευκαρυωτική έκφραση του τμήματος core-1a 91-191aa του HCV

Στην εργασία αυτή κατασκευάστηκε ένας πλασμιδιακό φορέας ευκαρυωτικής έκφρασης ο οποίος περιέχει τις αλληλουχίες 273-573nt του γονιδίου core-1a της ηπατίτιδας C. Αρχικά έγινε PCR για την ενίσχυση του τμήματος αυτού του γονιδίου χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμίδιο pHPI 8161, το οποίο περιέχει ολόκληρο το γονίδιο core-1a. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί στα άκρα του τμήματος 273-573nt του γονιδίου core-1a και να δημιουργούν στο 5' άκρο θέση πέψης για το ένζυμο NheI και στο 3' άκρο μια θέση πέψης για το ένζυμο XhoI. Το ενισχυμένο τμήμα εισάχθηκε στη συνέχεια στον φορέα pUC19, ο οποίος έχει προηγουμένως γίνει γραμμικός με πέψη με το ένζυμο περιορισμού HincII. Τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια εισάγονται σε

ξενιστές όπου και πολλαπλασιάζοντας, απομονώνονται, πέπτονται με τα κατάλληλα ένζυμα για απομόνωση των επιθυμητών κομματιών και καθαρίζονται. Τα καθαρά πλέον τμήματα DNA εισάγονται με αντίδραση σύνδεσης μορίων στον πλασμιδιακό φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης pCI και ο ανασυνδιασμένος φορέας εισάγεται σε κύτταρα BHK21 και WRL. Ακολουθεί η ανίχνευση της έκφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης με την μέθοδο Western blot. Στη συνέχεια παρουσιάζεται όλη πειραματική διαδικασία και τα αποτελέσματα.

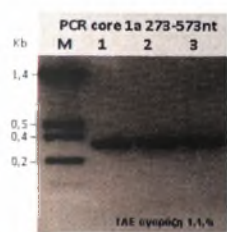
4.2.1. Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του τμήματος core-1α 91-191αα του HCV

Το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου core-1α του HCV. Το τμήμα που θέλουμε να ενισχυθεί είναι: 91-191αα (273-573nt). Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pHPI 8161, το οποίο περιέχει όλο το γονίδιο της πρωτεΐνης core 1α του HCV. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος 273-573nt είναι συμπληρωματικοί με την αρχή και το τέλος του γονιδίου στην περιοχή κλωνοποίησης. Επίσης ο M1a-91s εκκινητής περιέχει αλληλουχίες για την δημιουργία την θέσης πέψη με το ένζυμο NheI και ενός εναρκτήριου κωδικονίου και ο M1a-191as περιέχει νουκλεοτίδια για την δημιουργία μιας θέσης πέψης για το ένζυμο XhoI (Εικόνα 68).

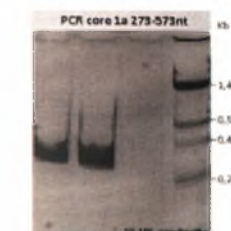
core 1a	241	301
M1a-91a	TA CCCTTGGCCCTCTA TGGCAATGA GGGTTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTCTCTCC	60
	-----CTAGCTAGCATGGGGTGGGCGGGATGGCTC-----	30
	* * * * *	
core 1a	523	573
M1a-191as	CTATCTTCCTTCTGGCCCTGCTCTCTTGCCTGACTGTGCCCGCTTCAGCC	50
	-----TGA CTGTGCCCGCTTCAGCCTAGG-----	30
	* * * * *	

Εικόνα 68: Οι αλληλουχίες των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική της PCR για την ενίσχυση του τμήματος 91-191αα του γονιδίου της core 1α με άκρα NheI/XhoI. Οι αλληλουχίες με τους μαύρους χαρακτήρες είναι πρόσθετες τεχνητές αλληλουχίες. Οι επισημασμένες αλληλουχίες είναι θέσεις κοπής ενζύμων περιορισμού. Με γκρι επισημαίνονται οι αλληλουχίες πέψης του ενζύμου NheI και με πράσινο για το ένζυμο XhoI. Διακρίνεται το τερματικό κωδικόνιο στην αλληλουχία του M1a-191as εκκινητή.

Η αντίδραση έγινε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις MgSO₄ και βρέθηκε ότι όλες οι αντιδράσεις δούλεψαν καλά. Τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων φαίνονται στην Εικόνα 69. Οι τρεις αντιδράσεις στη συνέχεια ενώθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 5% TBE για να ακολουθήσει η μέθοδο της απομόνωσης τμημάτων DNA από πήκτωμα ακρυλαμιδίου που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.3. Στη Εικόνα 70 παρουσιάζεται το πήκτωμα ακρυλαμιδίου που οποίο έτρεξαν τα ενισχυμένα τμήματα DNA και στη συνέχεια απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν.



Εικόνα 69: Επιβεβαίωση της ορθότητας των PCR αντιδράσεων για την ενίσχυση του τμήματος 273-573nt του γονιδίου της core-1α του HCV με άκρα NheI και XhoI.



Εικόνα 70: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, του ενισχυμένου με PCR, τμήματος 273-573nt του γονιδίου core-1α του HCV για να ακολουθήσει καθαρισμός από πήκτωμα ακρυλαμιδίου TBE-PAGE 5%.

4.2.2. Κλωνοποίηση του τμήματος core-1α 91-191αα του HCV στον πλασμιδιακό φορέα pUC19

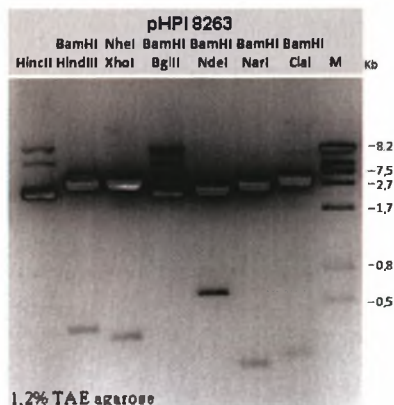
Στη συνέχεια ακολούθησε η κλωνοποίηση του ενισχυμένου τμήματος 273-573nt NheI και XhoI του γονιδίου core-1α του HCV στον πλασμιδιακό φορέα pUC19, ο οποίος προηγουμένως πέπτεται με το περιοριστικό ένζυμο HincII, το οποίο δημιουργεί τυφλά άκρα στον γραμμικό πλέον πλασμιδιακό φορέα.

Το τμήμα που ενισχύθηκε με PCR έχει επίσης τυφλά άκρα τα οποία δημιούργησε η Vent πολυμεράση. Το καθαρό προϊόν των αντιδράσεων PCR μετά από την απομόνωση του από πήκτωμα ακρυλαμιδίου 5% TBE, χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση ένωσης μορίων (ligation) με τον κομμένο με HincII πλασμιδιακό φορέα pUC19. Η αντίδραση σύνδεσης μορίων πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30λ και στους 16°C για περίπου 20 ώρες. Για αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε μια αντίδραση η οποία περιλάμβανε όλα τα συστατικά και των άλλων αντιδράσεων εκτός από το ενισχυμένο τμήμα DNA (μόνο τον πλασμιδιακό φορέα pUC19). Οι συνθήκες των αντιδράσεων αυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Συστατικά των αντιδράσεων σύνδεσης μορίων για την κλωνοποίηση του τμήματος 273-7-573nt του γονιδίου core-1α με άκρα NheI και XhoI στον πλασμιδιακό φορέα pUC19		
Αντίδραση ligation	pUC19 + 273-573nt NheI και XhoI	Αρνητικό κοντρόλ
pUC19 HincII 1:30	3λ	3λ
91-191aa fragment NheI και XhoI	4λ	-
10X buffer	3λ	3λ
Ligase	2λ	2λ
H ₂ O	18λ	22λ
Σύνολο	30λ	30λ

Έπειτα ακολουθεί ο μετασχηματισμός των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) σε κύτταρα DH5aF', τα οποία προηγουμένως έχουν γίνει δεκτικά με τη διαδικασία της επεξεργασίας με CaCl₂ (3.2.6). Μετά τον μετασχηματισμό τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C σε τριβλία άγαρ με αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml, για περίπου 16 ώρες. Τα βακτήρια που θα αναπτυχθούν παρουσία της αμπικιλίνης θα είναι μόνο εκείνα που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο. Επίσης, με την προσθήκη X-gal και IPTG στα τριβλία άγαρ είναι δυνατή η επιλογή των λευκών αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο, έναντι των μπλε. Οι αποικίες των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με το αρνητικό κοντρόλ θα πρέπει να είναι όλες μπλε αφού εκφράζεται το γονίδιο της γαλακτοζιδάσης στα ανέπταφα πλασμίδια.

Για να απομονωθούν οι αποικίες που έχουν όντως το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις επιλεγμένες λευκές αποικίες σε μικρή κλίμακα (10 αποικίες) και έλεγχος των απομονωμένων πλασμιδίων με τη χρήση ένζυμων περιορισμού. Για τα πλασμίδια pUC19 + 91-191aa αρχικά έγινε πέψη με τα ένζυμα NheI/XhoI. Οι πέψεις ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 5% TBE. Όλοι οι κλώνοι είναι θετικοί εκτός από τον 3. Επιλέγονται τυχαία οι κλώνοι 1,2 και 4. Από αυτούς τους θετικούς κλώνους κατασκευάζονται stamps και αποστέλλονται στην Lark Technologies για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι οι κλώνος 4 είναι πιο σωστός παρόλο που έχει μια μετάλλαξη στο τρίτο αμινοξύ και από τρυπτοφάνη σε κυστείνη (Εικόνα 72). Οπότε κατασκευάζεται χάρτης για το πλασμίδιο αυτό και ονομάζεται rHPI 8263 (Εικόνα 73). Το πλασμίδιο αυτό πέπτεται με ένζυμα περιορισμού και κατασκευάζεται το ενζυμικό προφίλ του (Εικόνα 71). Επίσης πραγματοποιούμε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.8.



Εικόνα 71: Ενζυμικό προφίλ του πλασμιδίου rHPI 8263 με τα ένζυμα HincII, BamHI/ HindIII, NheI/ XhoI, BamHI/ BglII, BamHI/ NdeI, BamHI/ NarI και BamHI/ ClaI. Τα αναμενόμενα μεγέθη είναι BamHI/ HindIII: 351bp και 2656bp, NheI/ XhoI: 311bp και 2696bp, BamHI/ BglII: , BamHI/ NdeI: 233bp και 2774bp, BamHI/ NarI: 175bp και 2832bp και BamHI/ ClaI: 121bp και 2886bp.

```

z4 -----
1a MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSERSQPRG 60
z1 -----
Z2 -----

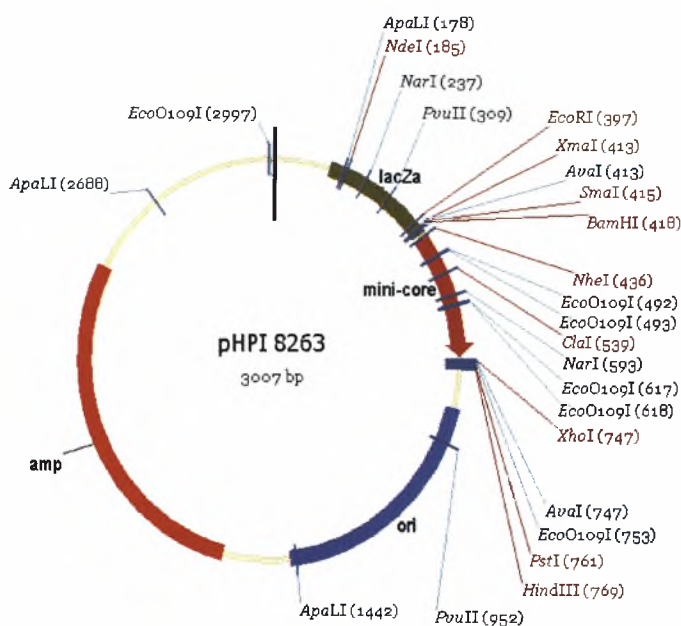
z4 -----MGCAGWLLSPRGRSPSWGPTDPRRRSRNLG 30
1a RRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSPRGRSPSWGPTDPRRRSRNLG 120
z1 -----MGWAGWLLSPRGRSPSWGPTDPRRRSRNLG 30
Z2 -----MGWAGWLLSPRGRSPSWGPTDPRRRSRNLG 30
      * * * * *

z4 KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLL- 89
1a KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLL- 179
z1 KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLL- 89
Z2 KVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLAG 90
      * * * * *

z4 --ALLS-CLTVPASA----- 101
1a --ALLS-CLTVPASA----- 191
z1 --ALLS-CLTVPASDLXRRX-----XEDPGTI- 113
Z2 PALLALCPLQPRLEGTKKGXPGYRARIEXPPX 122

```

Εικόνα 72: Ομοιοπαράθεση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης των κλώνων 1,2 και 4 με ολόκληρο το γονίδιο core 1a του ιού της ηπατίτιδας C. Παρατηρούνται οι μεταλλάξεις των 1 και 2 στο 3' άκρο καθώς και η σημειακή μετάλλαξη του 4 στο τρίτο αμινοξύ. Ο κλώνος 4 ονομάζεται ρΗΠΙ 8263.



Εικόνα 73: Χάρτης του πλασμιδίου που κατασκευάστηκε, ρΗΠΙ 8263, το οποίο περιέχει τις αλληλουχίες 273-573nt με άκρα NheI και XhoI του γονιδίου της core-1a του HCV στον πλασμιδιακό φορέα ρUC19.

4.2.3. Κλωνοποίηση του τμήματος core-1a 91-191aa του HCV στον πλασμιδιακό φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης ρC1

Μετά τον καθαρισμό των πλασμιδίου ρΗΠΙ 8263 πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα NheI/XhoI έτσι ώστε τα παραγόμενα τμήματα των επιθυμητών γονιδίων να εισαχθούν στον πλασμιδιακό φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης ρC1. Ο πλασμιδιακός φορέας επίσης πέπτεται με τα ίδια ένζυμα. Γίνεται πέψη 100mg από το πλασμίδιο ρΗΠΙ 8263 σε τελικό όγκο 500μl για περίπου 20 ώρες στους 37 °C. Επίσης 10mg πλασμιδιακού φορέα έκφρασης ρC1 πέπτονται σε τελικό όγκο 300μl για 20 περίπου ώρες στους 37 °C. Οι πέψεις ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης για να διαπιστωθεί εάν πραγματοποιήθηκαν σωστά. Ακολουθεί η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης πλασμιδιακών φορέων (CIAP) του κομμένου πλασμιδιακού φορέα ρC1 όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.4. Η πέψη του πλασμιδίου ρΗΠΙ 8263 ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου TBE 5%, απομονώνονται οι ζώνες του ενθέματος και γίνεται καθαρισμός σύμφωνα με τη μέθοδο απομόνωση κομματιών DNA από πήκτωμα ακρυλαμιδίου που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.3.

Ο κομμένος πλασμιδιακός φορέας ρC1 (NheI/XhoI και CIAP) καθαρίζεται με την μέθοδο του καθαρισμού πλασμιδιακού DNA από low melting αγαρόζη για απαλλαγεί το DNA από πρωτεΐνες, έτσι

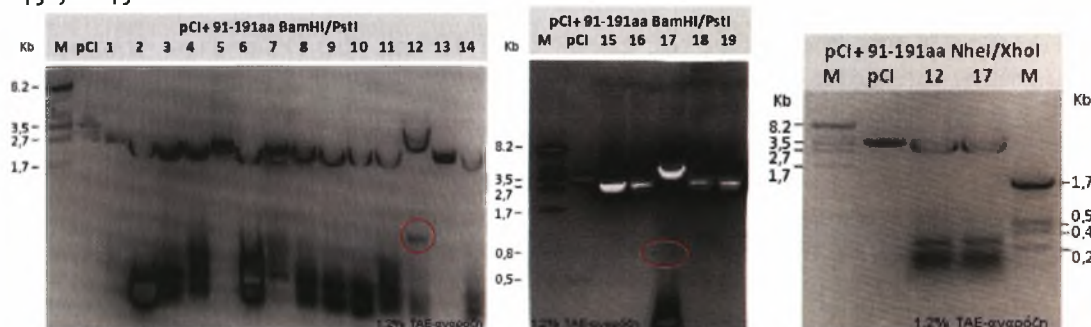
ώστε να είναι όσο το δυνατό πιο καθαρός για την αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA. Για να υπολογιστεί η ποσότητα του κάθε DNA που θα προστεθεί στην αντίδραση σύνδεσης μορίων ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% TAE τόσο ο καθαρισμένος πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pCI όσο και ίση ποσότητα του απομονωμένου και καθαρισμένου ενθεμάτος pHPI 8263 *NheI/XhoI*.

Η αντίδραση σύνδεσης μορίων πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 30λ και στους 16°C για περίπου 20 ώρες. Για αρνητικό κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε μια αντίδραση η οποία περιλάμβανε όλα τα συστατικά και εκτός από το ενθέμα DNA του γονιδίου core (μόνο τον πλασμιδιακό φορέα pCI). Οι συνθήκες των αντιδράσεων αυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

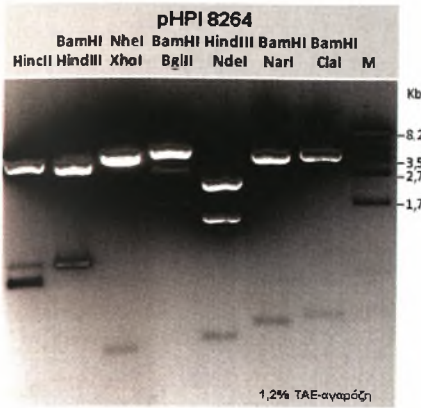
Αντίδραση ligation	pUC19 + 273-573nt <i>NheI</i> και <i>XhoI</i>	Αρνητικό κοντρόλ
pCI <i>NheI/XhoI</i>	1λ	1λ
pHPI 8263 <i>NheI</i> και <i>XhoI</i>	2λ	-
10X buffer	3λ	3λ
Ligase	2λ	2λ
H ₂ O	22λ	24λ
Σύνολο	30λ	30λ

Έπειτα ακολουθεί ο μετασχηματισμός των προϊόντων της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) σε κύτταρα DH5aF', τα οποία προηγουμένως έχουν γίνει δεκτικά με τη διαδικασία της επεξεργασίας με CaCl₂ (3.2.6). Μετά τον μετασχηματισμό τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C σε τριβλία άγαρ με αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml, για περίπου 16 ώρες. Τα βακτήρια που θα αναπτυχθούν παρουσία της αμπικιλίνης θα είναι μόνο εκείνα που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο.

Για να απομονωθούν οι αποικίες που έχουν όντως το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από επιλεγμένες αποικίες σε μικρή κλίμακα (19 αποικίες) και έλεγχος των απομονωμένων πλασμιδίων με τη χρήση ένζυμων περιορισμού. Γίνεται πέψη με τα ένζυμα BamHI/PstI. Οι πέψεις ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα TAE-αγαρόζης 1,2%. Οι κλώνοι 12 και 17 είναι θετικοί και πέπτονται επιπλέον με τα ένζυμα περιορισμού *NheI/XhoI*. Και οι δυο αυτοί κλώνοι δίνουν τα σωστά αναμενόμενα μεγέθη μπαντών (300bp) οπότε κατασκευάζονται stamps και αποστέλλονται στην Lark Technologies για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι και οι δυο κλώνοι είναι σωστοί (Εικόνες 76 και 77). Οπότε κατασκευάζεται χάρτης για τα πλασμίδια αυτά και ονομάζεται pHPI 8264-5 (Εικόνα 78). Επίσης πραγματοποιούμε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (large preparation) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.8. Την διαδικασία των largepreps ακολουθεί ο καθαρισμός των πλασμιδίων με CICs όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.9 και υπολογισμός την συγκέντρωσης των δειγμάτων με φωτομέτρηση υπεριώδους στα 260nm. Η ορθότητα της φωτομέτρησης μπορεί να επαληθευτεί ηλεκτροφορώντας τα δείγματα σε μια πηκτή αγαρόζης (TAE 1X, 1%) και συγκρίνοντας την τιμή της φωτομέτρησης με την ένταση της ζώνης.



Εικόνα 74: Ηλεκτροφόρηση των πέψεων με BamHI/PstI και των 19 κλώνων και NdeI/XhoI των κλώνων 12 και 17 των απομονωμένων πλασμιδίων με την μέθοδο για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation) για την κλωνοποίηση του τμήματος 91-191aa του γονιδίου core του HCV στον πλασμιδιακό φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης pCI. Οι κλώνοι 12 και 17 είναι σωστοί και ονομάζονται pHPI 8264 και pHPI 8265.



Εικόνα 75: Ενζυμικό προφίλ του πλασμιδίου pHP1 8264 το οποίο περιέχει τις αλληλουχίες 91-191α του γονιδίου της core του HCV στο πλασμίδιο pCI NheI/XhoI.

```

pHP18265 -----
pHP18264 -----
core-1a  ATGA GCA CGAAT CCTAAA CCTCAA GAAAA CCAA CGTAA CA CCAA CCGT CGCCCA CAG 60

pHP18265 -----
pHP18264 -----
core-1a  GACGT CAA GTT CCGGCT GCGCGT CAGT CCGT TGET GGA GTT TTA CTT GTT GCGCGCGA GGG 120

pHP18265 -----
pHP18264 -----
core-1a  GGGCCTA GATT GGGTGT GCGCGC GACGA GGA GA CTT CCGA GCGGT CCGCA CCT CCA GGT 180

pHP18265 -----
pHP18264 -----
core-1a  A GACGT CAG CCTAT CCCCRA GGCACGT CCGCCCGA GGGCA GGA CCT GGGCT CAG CCCC GGG 240

pHP18265 -----ATG- GGGT GGGCGGGAT GGCCT CCT GT CT CCG 30
pHP18264 -----ATG- GGGT GGGCGGGAT GGCCT CCT GT CT CCG 30
core-1a  TACCCCTT GGGCCCT CTA TGGCRA T GAGGTT TCGGGGT GGGCGGGAT GGCCT CCT GT CT CCG 300
          ** *****

pHP18265 CGTGGCTCTCGGCCCTA GCTGGGGCCCA CAGA CCCC GGGCCTA GGT CCGCCAA TTTGGGT 90
pHP18264 CGTGGCTCTCGGCCCTA GCTGGGGCCCA CAGA CCCC GGGCCTA GGT CCGCCAA TTTGGGT 90
core-1a  CGTGGCTCTCGGCCCTA GCTGGGGCCCA CAGA CCCC GGGCCTA GGT CCGCCAA TTTGGGT 360
          *****

pHP18265 AA GGT CAT CGATA CCCTTA CGT GCGGCTT CCGCCGA CCT CAT GGGGA CATA CCGCT CGT C 150
pHP18264 AA GGT CAT CGATA CCCTTA CGT GCGGCTT CCGCCGA CCT CAT GGGGA CATA CCGCT CGT C 150
core-1a  AA GGT CAT CGATA CCCTTA CGT GCGGCTT CCGCCGA CCT CAT GGGGA CATA CCGCT CGT C 420
          *****

pHP18265 GCGCGCCCTCTT GGA GGGCCT GCGA GGGCCCT GGGGCA TGGCCT CCGGGTT CT GGA GA C 210
pHP18264 GCGCGCCCTCTT GGA GGGCCT GCGA GGGCCCT GGGGCA TGGCCT CCGGGTT CT GGA GA C 210
core-1a  GCGCGCCCTCTT GGA GGGCCT GCGA GGGCCCT GGGGCA TGGCCT CCGGGTT CT GGA GA C 480
          *****

pHP18265 GGGCT GAA CTAT GCA CAGGGA CCTT CCGGTT GCT CTTT CT CTAT CTT CTT CTT CTT GGGC 270
pHP18264 GGGCT GAA CTAT GCA CAGGGA CCTT CCGGTT GCT CTTT CT CTAT CTT CTT CTT CTT GGGC 270
core-1a  GGGCT GAA CTAT GCA CAGGGA CCTT CCGGTT GCT CTTT CT CTAT CTT CTT CTT CTT GGGC 540
          *****

pHP18265 CTGCTCTCTTGCCTGACTGTGCCCGCTT CAGCC 303
pHP18264 CTGCTCTCTTGCCTGACTGTGCCCGCTT CAGCC 303
core-1a  CTGCTCTCTTGCCTGACTGTGCCCGCTT CAGCC 573
          *****
    
```

Εικόνα 76: Ομοιοπαράθεση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης των πλασμιδίων pHP1 8264-8265 τα οποία περιέχουν την αλληλουχία 273-573nt του γονιδίου core του HCV στον φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης pCI.

```

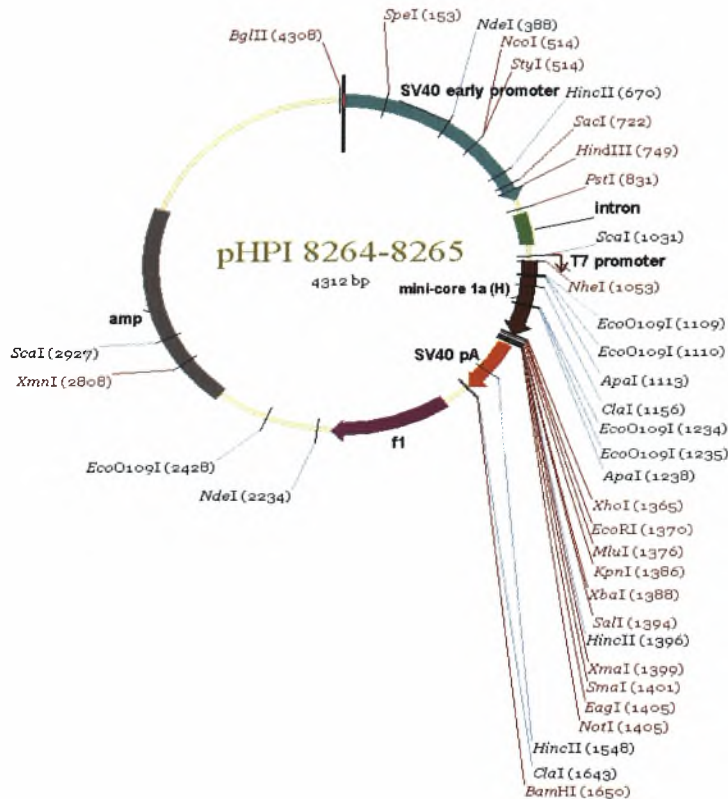
pHP18265 -----
pHP18264 -----
HCV-core-1a  MSTNPKPQRKT KRNTRRP QD VKFP GGGQ IVGGVYLLPRRGPR LGVRATRK TSE RS QPR G 60

pHP18265 -----MGWAGWLLSPRGSRPSWGP TDP RRRSRNL G 30
pHP18264 -----MGWAGWLLSPRGSRPSWGP TDP RRRSRNL G 30
HCV-core-1a  RRQP IP KARP EGR TWAQP GYPWPL YGNE GC GWA G WLLSPRGSRPSWGP TDP RRRSRNL G 120
          *****

pHP18265 KVID TL TCGFADLM GYIPLVGAPL GG AARAL AHGVRVLEDGVHYAT GNLP GCSF SIFLLA 90
pHP18264 KVID TL TCGFADLM GYIPLVGAPL GG AARAL AHGVRVLEDGVHYAT GNLP GCSF SIFLLA 90
HCV-core-1a  KVID TL TCGFADLM GYIPLVGAPL GG AARAL AHGVRVLEDGVHYAT GNLP GCSF SIFLLA 180
          *****

pHP18265 LLSCLTVPASA 101
pHP18264 LLSCLTVPASA 101
HCV-core-1a  LLSCLTVPASA 191
          *****
    
```

Εικόνα 77: Ομοιοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών που προκύπτουν από την μετάφραση των νουκλεοτιδίων αλληλουχιών του γονιδίου core-1a του HCV 91-191α των πλασμιδίων pHP1 8264-8265 μαζί με ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου core-1a του HCV.



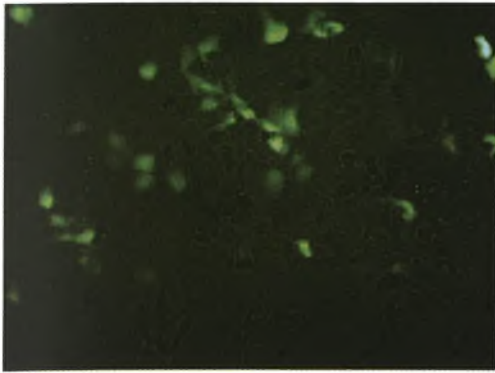
Εικόνα 78: Χάρτης των πλασμιδίων pHP1 8264-5, τα οποία περιέχουν τις αλληλουχίες 273-573nt του γονιδίου της core-1a του HCV με άκρα NheI και XhoI στον πλασμιδιακό φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης pCI.

4.2.4 Έκφραση των τμημάτων 91-191αα, 1-120αα και 1-191αα του γονιδίου core του HCV σε κυτταρικές σειρές BHK-21

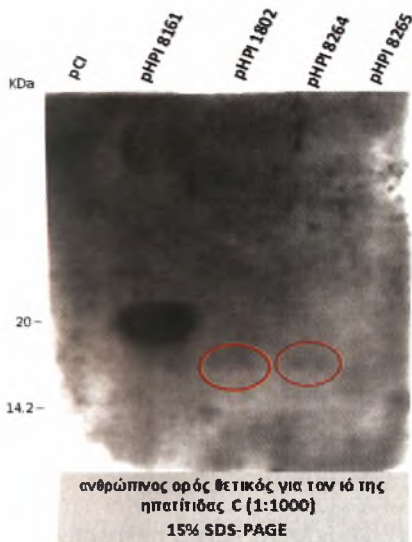
Μετά την κατασκευή του πλασμιδίου ευκαρυωτικής έκφρασης που περιέχει της αλληλουχίες 91-191αα του γονιδίου της core 1a του ιού της ηπατίτιδας C, έγινε παροδικός μετασχηματισμός ευκαρυωτικών κυττάρων BHK-21 για να ανιχνευτεί η έκφραση αυτού του τμήματος της πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που αναφέρεται στην ενότητα 3.2.17. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκα με 12 πηγάδια και όταν η πυκνότητα τους φτάσει περίπου το 80% πραγματοποιείται ο συν-μετασχηματισμός τους με 2μg πλασμιδίου έκφρασης και 0,3μg ενός πλασμιδίου που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού, του pGTK πλασμιδίου (Εικόνα 79).

Αρχικά μετασχηματίστηκαν κύτταρα BHK-21 και παρατηρήθηκε πολύ μικρή έκφραση και από τα δυο πλασμίδια pHP1 8264-5 (Εικόνα 80). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pHP1 1802, το οποίο κατασκευάστηκε από την Ελισάβετ Σέτρη- Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Το πλασμίδιο pHP1 1802 περιέχει τις αλληλουχίες του γονιδίου core 1a 1-120αα του ιού της ηπατίτιδας C στο πλασμίδιο pCI.

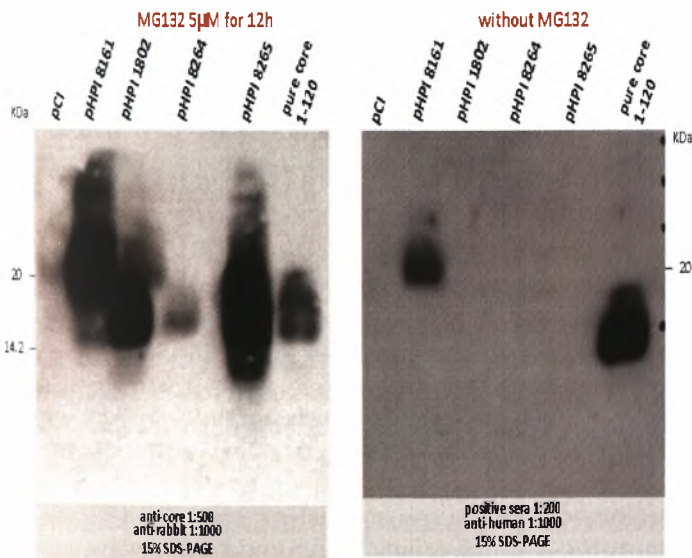
Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132, 12 ώρες μετά τον μετασχηματισμό και για 12 ώρες σε συγκέντρωση 5μM που αντιστοιχεί σε 1λ περίπου στα 10ml θρεπτικού υλικού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 81, όπου βλέπουμε ότι παρουσία του αναστολέα του πρωτεοσώματος είναι δυνατή η ανίχνευση της έκφρασης των πρωτεϊνών core 1-120αα (pHP1 1802) και core 91-191αα (pHP1 8264-5). Αυτά τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι οι κομμένες αυτές μορφές της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C έχουν μικρή διάρκεια ζωής και αποικοδομούνται πρωτεοσωμικά.



Εικόνα 79: Φωτογραφία των BHK-21 κυττάρων 12 ώρες μετά τον μετασχηματισμό. Η φωτογραφία είναι από μικροσκόπιο φθορισμού και παρατηρούμε την έκφραση της πρωτεΐνης GFP, η οποία χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού.



Εικόνα 80: Έκφραση της πρωτεΐνης core 91-191aa σε BHK-21 κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα στρώθηκαν σε πλάκα με 12 πηγάδια και μετασχηματίστηκαν όταν η πυκνότητάς τους ήταν 80%. 48 ώρες μετά το μετασχηματισμό τα κύτταρα λύθηκαν με το πρωτόκολλο για ανάλυση με Western blot όπως παρουσιάζεται στην ενότητα 3.2.18. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε 15% SDS-PAGE, ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε θετικός ανθρώπινος ορός (1:1000) και ως δεύτερο αντίσωμα rabbit anti-human πολυκλωνο αντίσωμα (1:1000). Στην εικόνα παρατηρούμε πολύ χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης core 91-191aa (rHPI 8264-5) καθώς και της core 1-120aa (rHPI 1802).



Εικόνα 81: Έκφραση της πρωτεΐνης core 91-191aa σε BHK-21 κυτταρικές σειρές παρουσία και απουσία του αναστολέα του πρωτεοσώματος MG 132. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκα με 12 πηγάδια και μετασχηματίστηκαν όταν η πυκνότητά τους ήταν 80%. 12 ώρες μετά το μετασχηματισμό εφαρμόστηκε στα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια rHPI 1802, 8264 και 8265, MG 132 με συγκέντρωση 5µM για 12 ώρες. Τα κύτταρα λύθηκαν με το πρωτόκολλο για ανάλυση με Western blot όπως παρουσιάζεται στην ενότητα 3.2.18. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε 15% SDS-PAGE και ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνο αντίσωμα ενάντια στην πρωτεΐνη core 1-179aa (1:500). Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε mouse anti-rabbit πολυκλωνο αντίσωμα (1:1000).

5. Συζήτηση

Η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C περιλαμβάνει τρεις διακριτές αμινοξικές περιοχές (Domains) προσδιοριζόμενες σαν D1 που είναι κατά βάση η υδρόφιλη περιοχή της (1 – 120 αα), D2 η ανυδρόφιλη περιοχή της (121 – 173 αα) και D3 ανυδρόφιλη περιοχή, η οποία αποκόπτεται από πρωτεάση κατά την ωρίμανσής της (174 - 191 αα).

Παράλληλα, δείχτηκε η ύπαρξη μιας δεύτερης ιικής πρωτεΐνης, που προέρχεται από τις ίδιες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν την core, στο ίδιο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και με ίδιο καρβοξυ- τελικό άκρο. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε mini-core. Σαν εναρκτήριο κωδικόνιο για τη mini-core πρωτεΐνη θεωρείται η μεθειονίνη – AUG (που απαντάται στις περισσότερες περιπτώσεις του υπότυπου 1b), ή λευκίνη – CUG (σ' όλους τους άλλους τύπους και υπότυπους του ιού), πιθανά σαν εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης. Η αλληλουχίες της πρωτεΐνης mini-core περιλαμβάνουν μικρό μέρος της υδρόφιλης περιοχής της core αλλά και ολόκληρη την λιπόφιλη περιοχή της. Η λειτουργία της δεύτερης αυτής πρωτεΐνης παραμένει άγνωστη και πιθανά υφίσταται την ίδια διαδικασία ωρίμανσης, με την αποκοπή της περιοχής D3 μετά την επίδραση της ίδιας πρωτεάσης. Η πρωτεΐνη mini-core, με πρώτη ματιά, ομοιάζει με την αυθεντική core, αλλά παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, που πιθανά αντικατοπτρίζονται και στην λειτουργία της. Αντίθετα με την αυθεντική core η πρωτεΐνη mini-core είναι κατά κύριο λόγο λιπόφιλη (πρωτοταγή δομή), με άμεσο πιθανό αποτέλεσμα την διαφορετική δευτεροταγή δομή και πιθανά τεταρτοταγή. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η διαφορά που παρουσιάζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο^[100] των πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη mini-core (pI: 9.49) παρουσιάζεται κατά 250 φορές πιο όξινη από την αυθεντική core (pI: 12.13). Αντίθετα, η μικρότερη σε μέγεθος «υδρόφιλη» core (1- 120 αα) πρωτεΐνη (pI:12.09) έχει παρόμοιο ισοηλεκτρικό σημείο με την αυθεντική core.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, για την μελέτη της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας C τύπου 1a, μελετήθηκαν επί μέρους η «υδρόφιλη» περιοχή της πρωτεΐνης core (1- 120 αα) αλλά και η πρωτεΐνη mini-core (91 – 191 αα). Τα τμήματα αυτά της πρωτεΐνης του ιού, εκφραστήκαν τόσο προκαρυωτικά, όσο και ευκαρυωτικά.

Η προκαρυωτική έκφραση των πρωτεϊνών «υδρόφιλη» core (1- 120 αα) και «mini core» (91 – 191 αα) του ιού της ηπατίτιδας C, έγινε με την χρησιμοποίηση του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pET20b(+). Στον πλασμιδιακό αυτό φορέα έκφρασης, οι ιικές αλληλουχίες συνδέονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε στο καρβοξυ- τελικό τους άκρο προστίθενται νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν για μια συνεχή αμινοξική αλληλουχία 6 ιστιδινών (His*tag motif), ακολουθούμενες από κωδικόνιο λήξης. Επίσης, οι ιικές αλληλουχίες στο 5' ακρο τους, δεν συνδέθηκαν με τις αλληλουχίες του pLB leader (μιας αμινοξικής αλληλουχίας –motif που δίνει την δυνατότητα στην παραγόμενη χιμαιρική πρωτεΐνη να οδηγηθεί στο περιπλάσμα, ώστε να είναι ευκολότερος ο καθαρισμός της). Με την κλωνοποίηση αυτή αποφεύχθηκε η σημαντική εισαγωγή «ξένων» βακτηριακών αλληλουχιών στην δομή της χίμαιρας, που πιθανά να αλλοίωναν την δευτεροταγή δομή της μικρής ιικής πρωτεΐνης. Τελικά, οι αλληλουχίες ιού βρέθηκαν κάτω από την μεταγραφική επίδραση του ισχυρού T7 βακτηριακού υποκινητή.

Η επαγωγή της έκφρασης της χιμαιρικής «υδρόφιλης» πρωτεΐνης core (1-120αα) έγινε επιτυχώς και σε πολύ μεγάλη ποσότητα, με την χρησιμοποίηση της βακτηριακής κυτταρικής σειράς BL21(DE3)pLysS (κατάλληλης για την έκφραση πρωτεϊνών στο σύστημα pET). Ακολούθησε καθαρισμός της πρωτεΐνης με την χρήση σήλης χρωματογραφίας σεφαρόζη*Νικελίου, όπου συνδέεται ισχυρά και με μεγάλη ειδικότητα η αμινοξική αλληλουχία των 6 ιστιδινών της χίμαιρας με πολλαπλούς δεσμούς Van der Waals. Η όλη διαδικασία εμπλουτισμού και καθαρισμού της πρωτεΐνης γίνεται σε αποδιατακτικές συνθήκες όπου επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση της εκλούμενης πρωτεΐνης(Εικόνα 59). Η καθαρισμένη πλέον «υδρόφιλης» πρωτεΐνη core μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης, ανοσοποίησης πειραματοζώων, σε *in vitro* πειράματα για την μελέτη των ιδιοτήτων της κα.

Αντίθετα, η επαγωγή της έκφρασης της χιμαιρικής «mini core» πρωτεΐνης core (91-191αα) δεν έγινε επιτυχώς. Οι πιθανοί λόγοι της μη-έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης παρουσιάστηκαν στην ενότητα 4.1.4.2. Αρχικά έγινε έλεγχος των αλληλουχιών των πλασμιδίων για να πιστοποιηθεί η ορθότητα των αλληλουχιών (μεταλλάξεις ή διαγραφές στην αλληλουχία πριν το 5' άκρο του γονιδίου, αλλά και εντός των αλληλουχιών του ιού). Όπως αποδείχτηκε η αλληλουχίες των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν είναι σωστές εκτός από ένα πλασμίδιο (pHP1 8256) το οποίο όμως δεν χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της έκφρασης. Κατόπιν δοκιμάστηκε η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης σε χαμηλότερες

θερμοκρασίες, σε διαφορετικούς χρόνους και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG, για να αποφευχθεί η πιθανή διάσπαση και αποδιάταξη της χωρίς πάλι επιτυχία.

Στους προκαρυώτες εμφανίζεται μια ειδική αλληλουχία νουκλεοτιδίων γνωστή ως Shine-Dalgarno motif που υποβοηθά την σύνδεση του ριβοσώματος πάνω στο mRNA, για την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω του εναρκτήριου κωδικόνιου. Ο μηχανισμός της σύνθεσης του 16S rRNA πραγματοποιείται μέσω της συμπληρωματικότητας της αλληλουχίας Shine-Dalgarno που βρίσκεται στο mRNA^[101]. Με μελέτες συγκριτικής ομοιοπαράθεσης βρέθηκε ότι οι αλληλουχίες που εισάγαγε στο πασμιδιακό φορέα pET20b(+), πιθανά να παρεμποδίζουν την λειτουργία της αλληλουχίας Shine-Dalgarno στο παραγόμενο mRNA, δημιουργώντας δευτεροταγής δομές, που παρεμποδίζουν την πρόσδεση του ριβοσώματος, άρα και την έκφραση της πρωτεΐνης (Εικόνα 62-63). Πράγματι, οι αλληλουχίες του γονιδίου core 273-573nt στο καρβοξυ- τελικό άκρο, ομοιάζουν με την αντίστροφη και συμπληρωματική αλληλουχία Shine-Dalgarno (Εικόνα 62) και πιθανόν σχηματίζουν μια δομή στελέχους με την αλληλουχία Shine-Dalgarno στο παραγόμενο mRNA (Εικόνα 63).

Η έκφραση της HCV πρωτεΐνης core σε καλλιεργούμενες ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές έγινε τόσο με την εισαγωγή ολόκληρου του γονιδίου, όσο και τμημάτων της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της «υδρόφιλης» περιοχής της πρωτεΐνης όπως επίσης και των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της θεωρούμενης mini-core πρωτεΐνης. Για την ευκαρυωτική έκφραση των ιικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pCI, στον οποίο οι αλληλουχίες του ιού βρίσκονται κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του CMV. Ειδικότερα για την έκφραση της mini-core πρωτεΐνης εισήχθη ένα τεχνητό κωδικόνιο έναρξης AUG (στη θέση 91 μια μεθειονίνη αντί της αυθεντικής λευκίνης). Στην περίπτωση της υδρόφιλης core χρησιμοποιήθηκε το αυθεντικό AUG. Και στα τρία πλασμίδια οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες προ του κωδικόνιου έναρξης, έχουν τροποποιηθεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να περιέχουν ένα αποτελεσματικό Kozak frame^[104], με σκοπό την καλύτερη έκφραση των ιικών πρωτεϊνών. Η μεταγραφή των ιικών αλληλουχιών τερματίζεται σε ένα τεχνητά εισαγόμενο κωδικόνιο λήξης στο τέλος της πρωτεΐνης. Τα τρία πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό επιτυχώς εκφράζουν τόσο την αυθεντική πρωτεΐνη core, όσο και την «υδρόφιλη» core και την mini-core πρωτεΐνη. Το πλασμίδιο που εκφράζει την «υδρόφιλη» core πρωτεΐνη είναι δωρεά από την Ελισάβετ Σέτρη- Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur. Το πλασμίδιο που εκφράζει την πλήρη μορφή της πρωτεΐνης core κατασκευάστηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur από τον Δρ. Κακκανά Αθανάσιο.

Οι ιικές πρωτεΐνες core εκφράστηκαν σε δυο κυτταρικές σειρές, σε κύτταρα τρωκτικών (BHK-21) και σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα (WRL-64). Η έκφραση των πρωτεϊνών παρατηρήθηκε με παροδικό μετασχηματισμό των κυτταρικών αυτών σειρών. Η πλήρης ιική core (full length) πρωτεΐνη σε αυτές τις συνθήκες, εκφράζεται σε μεγάλη ποσότητα που μπορεί να ανιχνευθεί με επιτυχία σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης (Εικόνα 80)^[95]. Περαιτέρω, η έκφραση της «υδρόφιλης» core και της mini-core πρωτεΐνης αποδείχτηκε χαμηλή, που όμως ενισχύεται όταν χρησιμοποιηθεί αναστολέας του πρωτεοσώματος στην κυτταροκαλλιέργεια (Εικόνα 81). Τα πειράματα αυτά μας δείχνουν ότι αντίθετα με την πλήρης core πρωτεΐνη που είναι σταθερή, η ευκαρυωτική έκφραση τμημάτων της («υδρόφιλης» core και της mini-core πρωτεΐνης) σε κύτταρα αποδεικνύεται ασταθής, πιθανόν λόγω ουβικουιτινίωσης και της αποικοδόμησης τους στο πρωτεόσωμα. Αποδεικνύεται δηλαδή σημαντική η ταυτόχρονη ύπαρξη και των τριών περιοχών (domains) της ιικής πρωτεΐνης για την σταθερότητά της.

Η επιτυχημένη έκφραση των ιικών core πρωτεϊνών που πιθανά τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά σε καλλιεργούμενα κύτταρα, μας δίνει περαιτέρω την δυνατότητα να μελετήσουμε λειτουργίες και τις βιοχημικές – βιολογικές ιδιότητες των πρωτεϊνών σε πιο φυσιολογική μορφή που πιστεύουμε ότι προσομοιάζει στην μορφή των πρωτεϊνών κατά της διάρκεια της μόλυνσης των κυττάρων από τον ιό.

Η πρωτεΐνη core εμπλέκεται σε ένα πολύ μεγάλο αριθμό βιοχημικών αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες ιικής ή κυτταρικής προέλευσης, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο πολλαπλά κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Πίνακες 2-7). Η αναδίπλωση της πλήρης μορφής διαφέρει σημαντικά από την αναδίπλωση των κολωβομένων μορφών, όπου προφανώς διαφορετικοί επίτοποι εκτίθενται προς το περιβάλλον με αποτέλεσμα διαφορετική αλληλεπίδραση με τις προαναφερόμενες πρωτεΐνες του ξενιστή. Η μελέτη των τριών core πρωτεϊνών, σε συνδυασμό ή κατά μόνας, μπορεί να μας αποκαλύψει τις ενεργές περιοχές της πρωτεΐνης όπως αυτές αλληλεπιδρούν.

Η προκαρυωτικά εκφρασμένη χιμαιρική «υδρόφιλη» πρωτεΐνη core (1-120aa), χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση κουνελιών με σκοπό την δημιουργία πολυκλωνικών αντισωμάτων (pAbs), έναντι της πρωτεΐνης αυτής. Για το σκοπό αυτό, η καθαρή «υδρόφιλη» πρωτεΐνη core εμβολιάστηκε στα

πειραματόζωα και ο ορός αυτών ελέγχθηκε για την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης αυτής. Δυο πειραματόζωα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισαν αντισώματα (Εικόνα 64). Τα αντισώματα αυτά ελεγχθήκαν με πειράματα ανοσοαποτύπωσης για την ικανότητα τους να ανιχνεύουν πρωτεΐνες core που εκφράζονται είτε προκαρυωτικά, είτε σε καλλιεργούμενα κύτταρα ή από μολυσματικό σύστημα ανασυνδισμένου ιού της ηπατίτιδας C (Εικόνα 67). Το μολυσματικό αυτό σύστημα είναι ένας κλώνος του γονοτύπου 2a, που ονομάστηκε JFH-1 και μπορεί να αναπαράγεται σε Huh7 και άλλες κυτταρικές σειρές χωρίς την απαίτηση για τις προσαρμοστικές μεταλλάξεις. Δείχθηκε ότι κλωνοποιημένα γονιδιώματα του JFH-1 μετά από επιμόλυνση σε κύτταρα Huh7 παρήγαγαν ιό που μπορούσε να μολύνει άλλα κύτταρα Huh7, επιτρέποντας για πρώτη φορά μελέτες *in vitro* του πλήρους κύκλου ζωής του ιού. Ο ιός που παράγεται στην κυτταροκαλλιέργεια είναι μολυσματικός σε χιμπαντζήδες και στον άνθρωπο. Στα εκχυλίσματα των μολυσμένων αυτών κυττάρων μπορούν να βρεθούν όλες οι ιικές διαλυτές πρωτεΐνες. Ένα τέτοιο εκχύλισμα κυττάρων ευγενώς παραχωρήθηκε για τα πειραματά μας από την Δρ. Νίκη Βασιλάκη-Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur.

Η ανοσολογική απόκριση των δυο πειραματόζωων ήταν διαφορετική. Το ένα πειραματόζωο έδωσε δυνατή ανοσολογική απάντηση ως προς την «υδρόφιλη» πρωτεΐνη core και τα παραγόμενα αντισώματα μπορούν να ανιχνεύσουν όλες τις core πρωτεΐνες στα προαναφερθέντα συστήματα έκφρασης. Επιπρόσθετα, τα πολυκλωνικά αντισώματα στο συγκεκριμένο πειραματόζωο μπορούν να ανιχνεύσουν την προκαρυωτικά εκφραζόμενη NS3-His*tag πρωτεΐνη, που χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας, που σημαίνει ότι παρήχθησαν ταυτόχρονα και αντισώματα έναντι στην τεχνητής καρβοξυ –τελικής αλληλουχίας των έξι ιστιδινών της χίμαιρας (Εικόνα 67). Αυτή η αντίδραση δεν ήταν αναμενόμενη, καθώς η αλληλουχία των έξι ιστιδινών δεν θεωρείται ανοσογόνος.

Στο άλλο πειραματόζωο η παραγωγή αντισωμάτων ήταν αξιοσημείωτα χαμηλή. Τα αντισώματα αυτά είχαν την ικανότητα να αναγνωρίσουν την προκαρυωτικά εκφραζόμενη πρωτεΐνη core και δεν ανίχνευαν την προκαρυωτικά εκφραζόμενη NS3-His*tag πρωτεΐνη, που χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας. Επίσης δεν κατορθώθηκε να ανιχνευθούν με αυτό το αντίσωμα οι ευκαρυωτικά και ιικά εκφραζόμενες core πρωτεΐνες (Εικόνα 67). Πιθανά, η αντίδραση των αντισωμάτων με τις ευκαρυωτικά είτε ιικά εκφραζόμενες core πρωτεΐνες είναι πολύ χαμηλή και μη ανιχνεύσιμη, είτε τα παραγόμενα αντισώματα αποτυγχάνουν να αναγνωρίζουν επιτόπους των πρωτεϊνών αυτών. Τα παραγόμενα πολύκλινα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα για την περαιτέρω μελέτη των HCV core πρωτεϊνών.

6. Βιβλιογραφία

- [1] **Alter, M.J.**, Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, 2007.
- [2] **Moradpour D, Blum HE.** A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver International* 2004
- [3] **Colin W Shepard et al**, Global epidemiology of hepatitis C virus infection, 2005.
- [4] **Dimitri Lavillette**, Characterization of Host-Range and Cell Entry Properties of the Major Genotypes and Subtypes of Hepatitis C Virus, *HEPATOLOGY* 2005,
- [5] **Kasprzak A, Adamek A.** 2007, Role of hepatitis C virus proteins (C, NS3, NS5a) in hepatic oncogenesis
- [6] **Meyer, M.F., et al.**, Clearance of low levels of HCV viremia in the absence of a strong adaptive immune response. *Virology*, 2007.
- [7] **Charles S. Lieber**, Alcohol and Hepatitis, 2001.
- [8] **Mónica Anzola and Juan José Burgos**, Hepatitis C virus (HCV): model structure and genome organisation 2003
- [9] **Joerg Timm, Michael Roggendorf**, Sequence diversity of hepatitis C virus: Implications for immune control and therapy, *World J Gastroenterol* 2007.
- [10] www.ontariohepatitis.com/devel2/images
- [11] **Perrault M, Pécheur El.**, The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership.
- [12] **Brown et al.**, 1992 Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNA.
- [13] **Honda et al.**, 1996 Structural Requirements for Initiation of Translation by Internal Ribosome Entry within Genome-Length Hepatitis C Virus RNA.
- [14] **Lee et al.**, cis-Acting RNA Signals in the NS5B C-Terminal Coding Sequence of the Hepatitis C Virus Genome, 2004.
- [15] **Tanaka et al.**, Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome, 1996
- [16] **Friebe and Bartenschlager**, 2002 Genetic Analysis of Sequences in the 3' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus That Are Important for RNA Replication.
- [17] **Jean Dubuisson**, Hepatitis C virus proteins, 2007.
- [18] **Bartenschlager et al.**, NOVEL INSIGHTS INTO HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND PERSISTENCE, 2004.
- [19] **Mónica Anzola and Juan José Burgos** Hepatitis C virus (HCV): model structure and genome organisation 2003.
- [20] **Francis J. et al.**, Internal Initiation Stimulates Production of p8 Minicore, a Member of a Newly Discovered Family of Hepatitis C Virus Core Protein Isoforms, *JOURNAL OF VIROLOGY*, 2009.
- [21] **Helle F, Dubuisson J**, Hepatitis C virus entry into host cells, 2008.
- [22] **Morikawa et al.**, 2007, The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles.
- [23] **Molina et al.**, 2007, The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus.
- [24] **Scarselli et al.**, 2002, The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus.
- [25] **Dreux et al.**, 2009, The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication.
- [26] **Zeisel et al.**, 2007 Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81.
- [27] **Evans et al.**, 2007 Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry.
- [28] **Ploss et al.**, 2009, Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells.
- [29] **Brazzoli et al.**, 2008, CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes.
- [30] **Liu et al.**, 2009, Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection.
- [31] **Rocha-Perugini et al.**, 2008, The CD81 Partner EWI-2wint Inhibits Hepatitis C Virus Entry.
- [32] **Gondeau et al.**, Cellular models for the screening and development of anti-hepatitis C virus agents, 2009.
- [33] **Blanchard et al.**, 2006, Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis.
- [34] **Meertens et al.**, 2006 Hepatitis C Virus Entry Requires a Critical Postinternalization Step and Delivery to Early Endosomes via Clathrin-Coated Vesicles.
- [35] **Bartosch et al.**, 2003a; Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor.
- [36] **Hsu et al.**, 2003; Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles.
- [37] **Tscherne et al.**, 2006, Time- and Temperature-Dependent Activation of Hepatitis C Virus for Low-pH-Triggered Entry.

- [38] **Suzuki et al.**, 2007; Hepatitis C viral life cycle.
- [39] **Boni et al.**, 2005 Hepatitis C Virus Core Protein Acts as a *trans*-Modulating Factor on Internal Translation Initiation of the Viral RNA.
- [40] **Paek et al.**, 2008, RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA.
- [41] **Randall et al.** 2007, Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication.
- [42] **Gao et al.**, 2004 Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft.
- [43] **Aizaki et al.**, 2004 Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts
- [44] **Matsumoto et al.**, 1996, Homotypic interaction and multimerization of the HCV core protein.
- [45] **Nakai et al.**, 2006 Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein.
- [46] **Murakami et al.**, 2006 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles.
- [47] **Masaki et al.**, 2008, Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles.
- [48] **Huang et al.** 2007, Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins.
- [49] **Nahmias et al.**, 2008, Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin.
- [50] **Jieyun Jiang and Guangxiang Luo**, 2009, Apolipoprotein E but Not B Is Required for the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles.
- [51] **Susuki**, 2005 Molecular Determinants for Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Core Protein
- [52] **J. McLauchlan**, 2000, REVIEW, Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes.
- [53] **Kobayayshi et. al**, 2009, Influence of Amino-Acid Polymorphism in the Core Protein on Progression of Liver Disease in Patients Infected With Hepatitis C Virus Genotype 1b.
- [54] **Shavinskaya et all.** 2007, Biosynthesis and Biochemical Properties of the Hepatitis C Virus Core Protein
- [55] **Santolini et al** 1994, The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for the efficient virus assembly.
- [56] **Moriishi et. al**, 2003, Proteasome Activator PA28 γ -Dependent Nuclear Retention and Degradation of Hepatitis C Virus Core Protein.
- [57] **Klein et al.**, 2005, Identification of Residues in the Hepatitis C Virus Core Protein That Are Critical for Capsid Assembly in a Cell-Free System.
- [58] **Schwer et al.**, 2004, Targeting the hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal Localization Motif.
- [59] **Suzuki** , 1995, Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted.
- [60] **Sarah L. Fishman et all** , 2009, Mutations in the Hepatitis C Virus core Gene Are Associated with Advanced Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma.
- [61] **Nolandt et al.**, 1997, Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains.
- [62] **Roingard and C. Hourieux**, 2007, REVIEW, Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis.
- [63] **Takayuki Yamanaka**, 2002 Innate form of HCV core protein plays an important role in the localization and the function of HCV core protein.
- [64] **Lu et al**, 2001, Post-translational modification of the hepatitis C virus core protein by tissue transglutaminase
- [65] **Lu et al**, 2002, Phosphorylation of hepatitis C virus core protein by protein kinase A and protein kinase C.
- [66] **Suzuki et al**, 2001, Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus.
- [67] **Fan et al.**, Specific in-vitro association between the hepatitis-C viral genome and core protein, 1999.
- [68] **Shimoike et al.**, 1999, Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation.
- [69] **Kunkel et al.**, 2001, Self-Assembly of Nucleocapsid-Like Particles from Recombinant Hepatitis C Virus Core Protein.
- [70] **Cristofari et al.**, to 2004, Hepatitis C Virus Core Protein is a potent nucleic acid chaperone that direct dimerization of the viral (+) strand RNA in vivo.
- [71] **Roland Ivanyi-Nagy**, 2006 Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions.
- [72] **SHIH-YEN LO**, 1996, Interaction between Hepatitis C Virus Core Protein and E1 Envelope Protein.
- [73] **Goh PY**, 2001, The Hepatitis C Virus Core Protein Interacts with NS5A and Activates Its Caspase-Mediated Proteolytic Cleavage.
- [74] **N. Irshad και Indranil Dhar**, Hepatitis C virus Core Protein: An Update on its Molecular Biology, Cellular Functions and Clinical Implications, 2006.
- [75] **Marusawa et al.**, 1999, Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation.

- [76] You et al., 1999, Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha.
- [77] Ray et al., 1998 Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity.
- [78] Ray et al., 1997 Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein
- [79] Moriya et al., 1998, The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice
- [80] Kosak, M. 2002, Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*
- [81] Chappell, S.A., et al. 2006. Ribosomal tethering and clustering as mechanisms for initiation
- [82] Akuta, N., F. Suzuki, Y. Kawamura, H. Yatsuji, H. Sezaki, Y. Suzuki, T. Hosaka, M. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Arase, K. Ikeda, and H. Kumada. 2007. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J. Hepatol.* **46**:403–410.
- [83] Akuta, N., F. Suzuki, Y. Kawamura, H. Yatsuji, H. Sezaki, Y. Suzuki, T. Hosaka, M. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Arase, K. Ikeda, and H. Kumada. 2007. Predictors of viral kinetics to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J. Med. Virol.* **79**:1686–1695.
- [84] Akuta, N., F. Suzuki, Y. Kawamura, H. Yatsuji, H. Sezaki, Y. Suzuki, T. Hosaka, M. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Arase, K. Ikeda, Y. Miyakawa, and H. Kumada. 2007. Prediction of response to pegylated interferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphisms in the viral core protein and very early dynamics of viremia. *Intervirology* **50**:361–368.1–3
- [85] Lancaster, A. M., E. Jan, and P. Sarnow. 2006. Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *RNA* **12**:894–902.25
- [86] Salahuddin. 2006. Discovery of significant variants containing large deletions in the 5'UTR of human hepatitis C virus (HCV). *Virol. J.* **3**:82.34
- [87] Hope, R. G., and J. McLauchlan. 2000. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J. Gen. Virol.* **81**:1913–1925.19
- [88] Nolandt, O., V. Kern, H. Muller, E. Pfaff, L. Theilmann, R. Welker, and H. G. Krausslich. 1997. Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. *J. Gen. Virol.* **78**:1331–1340.31
- [89] Hope, R. G., D. J. Murphy, and J. McLauchlan. 2002. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J. Biol. Chem.* **277**:4261–4270.20
- [90] Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M. J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:1200–1205.4
- [91] Suzuki, R., S. Sakamoto, T. Tsutsumi, A. Rikimaru, K. Tanaka, T. Shimoike, K. Moriishi, T. Iwasaki, K. Mizumoto, Y. Matsuura, T. Miyamura, and T. VOL. 83, 2009 HCV MINICORES: INTERNAL INITIATION OF THE p8 ISOFORM 3113
- [92] Yi, M. and Lemon, S.M. (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.*, **77**, 3557±3568.
- [93] A.Varaklioti, U. Georgopoulou, A. Kakkanas, L. Psaridi, M. Serwe, W. H. Caselmann, and P. Mavromara, Mutational Analysis of Two Unstructured Domains of the 59 Untranslated Region of HCV RNA (1998)
- [94] Panagiota Tsitoura, Urania Georgopoulou, Stephane Petres, Agoritsa Varakliotic, Anastasia Karafoulidou, Dimitra Vagenad, Constantina Politisd, Penelope Mavromara, Evidence for cellular uptake of recombinant hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles (2007)
- [95] Konstantina Katsarou, Elisavet Serti, Panagiota Tsitoura, Alexandros A. Lavdas, Agoritsa Varaklioti, Angela-Maria Pickl-Herk, Dieter Blaas, Devrim Oz-Arslan, Rong Zhu, Peter Hinterdorfer, Penelope Mavromara, Urania Georgopoulou, Green fluorescent protein-Tagged HCV non-enveloped capsid like particles: Development of a new tool for tracking HCV core uptake (2009)
- [96] Francesco Negro, Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection, 2006
- [97] Vinca Icard et al, Secretion of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins Depends on Assembly of Apolipoprotein B Positive Lipoproteins (2009)
- [98] JENS BUKH et al, Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes (1994)
- [99] Yupeng He, Kirk A. Staschke and Seng-Lai Tan, HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication (2005)
- [100] http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html
- [101] Shine J, Dalgarno L (1975). "Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes". *Nature* **254** (5495)
- [102] <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>
- [103] <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>
- [104] Kozak M (October 1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs". *Nucleic Acids Res.* **15** (20)
- [105] <http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX>
- [106] Wakita T, 2009, Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system.

-
- [107] **Niki Vassilaki, Penelope Mavromara**, 2009, The HCV ARFP/F/core+1 protein: Production and functional analysis of an unconventional viral product.
- [108] **Katerina I. Kalliampakou, Maria Kalamvoki and Penelope Mavromara**, 2005, Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein downregulates HCV IRES-dependent translation.
- [109] <http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=ProductFamily&ID=01041101>
- [110] www.polyplus-transfection.com

