

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
NS1 ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΑΡΒΟΪΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

ΦΙΛΙΠΠΟΥ ΑΡΤΕΜΙΣ

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

GILBERT LEONA

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	5
1.2. ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΠΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΣΤΗΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	6
1.3. ΟΙ ΒΑΚΟΥΛΟΪΟΙ ΩΣ ΟΧΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	7
1.4. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΟΥΛΟΪΟΥ	8
1.5. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΪΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΟΥ.....	10
1.6. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ AcMNPV ΒΑΚΟΥΛΟΪΟΥ	11
1.7. GP64/ GP64 null.....	12
1.8. ΠΑΡΒΟΪΟΙ.....	13
1.8.1. ΠΑΡΒΟΪΟΣ B-19.....	14
1.9. ΤΟ ΦΟΝΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ NS1	14
1.10. ΟΞΥΤΟΚΙΝΗ.....	15
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	16
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
3.1. Γενετική μηχανική στο γονιδίωμα των βακουλοϊών	17
3.1.1. Κλωνοποίηση του NS1 σε pFastBacDual πλασμίδιο	17
3.1.2. Δημιουργία GP64 null βακουλοϊκών κλώνων	18
PCR αντίδραση.....	21
Πλασμίδιο-φορέας	22
Καθαρισμός του πλασμιδίου	22
Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA	23
Πέψη του pIX4.0 πλασμιδίου.....	23
Ηλεκτροφόρηση του κυκλικού και γραμμικού pIX4.0 πλασμιδίου πήκτωμα αгарόζης	24
Αντίδραση ομοιοπολικής σύνδεσης φορέα-ενθέματος	24
Μετασηματισμός των EC100 κυττάρων, με την μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης	25
Μετασηματισμός των DH5a κυττάρων, με την μέθοδο του θερμικού σοκ	25
3.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΟΥΛΟΪΩΝ	26
1.1.1.....	26
3.3. ΤΟ ΒΑΚΟΥΛΟΪΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ.....	27
3.3.1. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑ TIMBERMAN	28
3.3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΒΑΚΟΥΛΟΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	29
3.3.3. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ <i>sf9</i> ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΒΑΚΟΥΛΟΜΙΔΙΑΚΟ DNA.....	29
3.3.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ ΤΩΝ ΙΩΝ (P1 VIRAL STOCK)	30
3.4.1. SDS-PAGE	31
3.4.2. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	32
3.4.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ P2 ΙΟΥΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ GP64.....	33
3.5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	34
3.5.1. ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	34
3.5.2. Μέθοδος φθορισμοενεργοποιούμενης κυτταρομετρίας ροής (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter)	34
3.5.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ eGFP ΚΑΙ NS1-eGFP ΣΕ HEPG2 ΚΥΤΤΑΡΑ	34

ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	35
3.6. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΑΓΩΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΤΟ NS1.....	36
3.6.1. Μελέτες σύνδεσης της αννεξίνης V σε προσβεβλημένα από τους ανασυνδιασμένους βακουλοϊούς HEPG2 και MDA-MD	36
3.6.2. ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	37
3.6.3. Ανίχνευση του κυτταρικού θανάτου με τη μέθοδο της συνεστιακής μικροσκοπίας χρησιμοποιώντας τα αντισώματα H2A.X και PARP-1.....	38
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
4.1. PCR.....	40
4.2. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΛΕΙΑ ΑΚΡΑ	40
4.3. SDS-PAGE ΚΑΙ WESTERN BLOT	41
4.4.. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ eGFP ΚΑΙ NS1-eGFP ΣΕ HEPG2 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	41
4.5. Πείραμα σύνδεσης αννεξίνης V και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής	43
4.6. Επανάληψη πειράματος σύνδεσης αννεξίνης V	45
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	47

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο απώτερος στόχος της θεραπείας του καρκίνου είναι ο μακροχρόνιος περιορισμός των κυττάρων του όγκου, χωρίς τοξικές επιδράσεις σε υγιείς ιστούς. Οι πιο κοινές θεραπείες που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του καρκίνου είναι το χειρουργείο, η ραδιοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Όλες αυτές είναι σχετικά μη-ειδικές θεραπείες και έχουν τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα (Rosenberg, S.A., 2001). Επομένως, οι στοχευμένες θεραπείες αρχίζουν πλέον να κερδίζουν έδαφος. Αυτές οι βιολογικά στοχευμένες θεραπείες είναι φάρμακα, των οποίων οι επιδράσεις στοχεύουν σε ένα συγκεκριμένο μόριο ή μόρια που εμπλέκονται στην αύξηση και πρόοδο του όγκου (Widakowich, C. et al., 2007). Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μια από τις υποσχόμενες νέες επιλογές για την θεραπεία του καρκίνου (Cross, D., and Burmester, J.K., 2006). Η πρώτη αποδεκτή κλινική δοκιμή που έκανε χρήση της γονιδιακής θεραπείας άρχισε το 1990. Στη μελέτη αυτή, το γονίδιο της απαμινάσης της αδενοσίνης μεταφέρθηκε στα T κύτταρα χρησιμοποιώντας ρετροϊκή μεταφορά (Blaese, R.M. et al., 1995). Η γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου έχει δύο κύριες προσεγγίσεις: ογκολυτική (ιο)θεραπεία και ανοσοθεραπεία (Cross, D., and Burmester, J.K., 2006).

Οι ογκολυτικοί φορείς χρησιμοποιούνται για να μολύνουν καρκινικά κύτταρα και να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω του πολλαπλασιασμού του ιού ή της έκφρασης κυτταροτοξικής πρωτεΐνης ή λόγω κυτταρικής λύσης (Cross, D., and Burmester, J.K., 2006, Donahue, J.M. et al., 2002). Το 1953 υπήρξε ένα παράδειγμα αναστολής της οξείας λευχαιμίας, επαγόμενη από την ανεμοβλογιά (Bierman, H.R. et al., 1953). Παρόμοιες αποκρίσεις συνέβησαν ακολουθώντας εμβολιασμό ασθενών με καρκίνο, καθώς ο εμβολιασμός με ευλογιά προκάλεσε την αναστολή της χρόνιας λευχαιμίας (Hansen, R.M., and Libnoch, J.A., 1978). Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην χρήση των ιών στην θεραπεία του καρκίνου. Υπάρχουν τουλάχιστον έξι διαφορετικά είδη ογκολυτικών ιών που έχουν εισαχθεί στις κλινικές δοκιμές. Το πρόβλημα με την χρήση των ογκολυτικών ιών είναι η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Έχει δειχθεί ότι η αποτελεσματικότητα των μεταφερόμενων σε όγκους ιών περιορίζεται από έμφυτες αντι-ιικές δραστηριότητες παρούσες στον ορό (Ikeda, K. et al., 1999). Άλλο ένα πρόβλημα που προέκυψε με την χρήση μη-γενετικά τροποποιημένων ογκολυτικών ιών, είναι η μη αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Liu, T.C., and Kirn, D., 2007). Για παράδειγμα σε μια κλινική δοκιμή με τον ιό της ασθένειας του Newcastle, στους περισσότερους ασθενείς δεν παρατηρήθηκε κάποια μετρήσιμη αναστολή (Pecora, A.L. et al., 2002). Επειδή οι μη-γενετικά τροποποιημένοι ογκολυτικοί ιοί δεν είχαν την δυνατότητα να επάγουν

μια ολοκληρωμένη και διαρκή αναστολή του όγκου, το επόμενο βήμα ήταν να τροποποιηθούν οι ιοί έτσι ώστε να εκφράζουν θεραπευτικά γονίδια. Αυτή η προσέγγιση εκμεταλλεύεται την δυνατότητα του ιού να μεταφέρει θεραπευτικά γονίδια στους ιστούς- στόχους. Τα μη-αναδιπλασιαζόμενα ιικά αυτά οχήματα μεταφοράς γονιδίου χρησιμοποιούνται συνήθως για την μεταφορά ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αντι-αγγειογενετικών γονιδίων ή γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα (Hermiston, T.W., and Kuhn, I., 2002).

1.2. ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΙΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΣΤΗΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Οι αδενοϊκοί φορείς (adenoviral vectors-Ad) έχουν υπάρξει το επίκεντρο της προσοχής κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών για τις πιθανές εφαρμογές τους στην γονιδιακή θεραπεία κατά του καρκίνου. Οι αδενοϊκοί φορείς έχουν πολλαπλά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλους φορείς, όπως την ικανότητα να προσβάλλουν διαιρούμενα αλλά και μη διαιρούμενα κύτταρα, την ευκολία του χειρισμού τους και την δυνατότητα παραγωγής τους σε υψηλούς τίτλους. Το κύριο μειονέκτημα των Ad φορέων είναι η προυπάρχουσα ανοσοποίηση της πλειονότητας του ανθρώπινου πληθυσμού και η άμεση ανάπτυξη ανοσοαπόκρισης ενάντια στον χορηγούμενο φορέα (Bangari, D.S., and Mittal, S.K., 2006, Rein, D.T. et al., 2006). Υπάρχουν περισσότεροι από 50 γνωστοί ορότυποι των ανθρώπινων αδενοϊών (HAds) και η πλειονότητα του ανθρώπινου πληθυσμού εκτίθεται σ'αυτούς, οδηγώντας στην ανάπτυξη αδενοϊκών ανοσοαποκρίσεων (Harvey, B.G. et al., 1999). Αυτό το πρόβλημα ξεπερνάται μερικώς τροποποιώντας τις πρωτεΐνες του καψιδίου του ιού (Roy, S. et al., 1998). Έχει δειχθεί ότι ένας αδενοϊκός φορέας, που κωδικοποιεί αλληλουχίες διαφορετικού οροτύπου έχει την ικανότητα να προσβάλλει το ήπαρ ποντικού που έχει προηγουμένως ανοσοποιηθεί από τον αρχικό αδενοϊκό ορότυπο (Roy, S. et al., 1998). Άλλο περιοριστικό βήμα για τους Ad φορείς είναι η διαθεσιμότητα σε υποδοχείς του ιού coxsackie-Ad (CARs), που είναι οι πρωταρχικοί υποδοχείς για Ad στα καρκινικά κύτταρα. Η έκφραση των CAR ενισχύει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της μεσολαβούμενης από αδενοϊούς γονιδιακής μεταφοράς και ο χειρισμός της έκφρασης του υποδοχέα μπορεί να χρησιμεύσει στην βελτίωση της μεταγωγής του Ad (Bergelson, J.M. et al., 1997)

Ένας άλλος ιός που χρησιμοποιείται στην γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου είναι ο αδενο-σχετιζόμενος ιός (adeno-associated virus-AAV), που ανακαλύφθηκε αρχικά σαν επιμόλυνση δειγμάτων Ad . Ο AAV ονομάστηκε έτσι όχι επειδή συγγενεύει με τους αδενοϊούς αλλά επειδή είναι ανίκανος να αντιγραφεί μόνος του και ένας συν-μολυσματικός βοηθητικός ιός, Ad ή ερπητοϊός, είναι απαραίτητος για την παραγωγική μόλυνση (Atchison, R.W. et al., 1965). Οι AAV ανήκουν

στην οικογένεια των *parvoviridae* και σε ξεχωριστό γένος ονομαζόμενο *dependovirus*. Οι ανασυνδυασμένοι αδено-σχετιζόμενοι φορείς μπορούν να μολύνουν αποτελεσματικά και να εκφράσουν το γονίδιο αναφοράς σε ανοσοδεκτικούς (immunocompetent) μυϊκούς ιστούς ποντικού με καμία ένδειξη ανοσοαπόκρισης (Xiao, X. et al., 1996). Ένας από τους κύριους περιορισμούς της βασισμένης σε AAV γονιδιακής θεραπείας είναι η μικρή χωρητικότητα συσκευασίας του ιού(περίπου 4.7 kb) (Dong, J.Y. et al., 1996).

Άλλος ένας μη-λυτικός ιός που χρησιμοποιείται στην γονιδιακή θεραπεία ανήκει στην ομάδα των ρετροϊών(retrovirus), που σε αντίθεση με τους AdV και τους AAV το γονιδίωμά τους είναι RNA. Αφού μολύνουν τα κύτταρα, χρησιμοποιούν την αντίστροφη μεταγραφάση τους για να μεταγράψουν το γονιδίωμα από DNA σε RNA. Στη συνέχεια, αυτό το ιικό DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή με την μορφή προιού, όπου παραμένει μόνιμα και αντιγράφεται μαζί με το DNA του ξενιστή σε κάθε κυτταρική διαίρεση. Έτσι σε αντίθεση με τους αδενοϊούς, που διατηρούνται ως εξωχρωμοσωμικά στοιχεία, οι ρετροϊοί, όπως και οι αδено-σχετιζόμενοι ιοί ενσωματώνονται στο γονιδίωμα.

1.3. ΟΙ ΒΑΚΟΥΛΟΪΟΙ ΩΣ ΟΧΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Οι βακουλοϊοί (baculoviruses) είναι ραβδόμορφοι ιοί (baculum στα λατινικά σημαίνει "ραβδί") (Miller, 1996), διπλής ταινίας DNA (dsDNA) ιοί που βρίσκονται στα έντομα. Ο πιο κοινός βακουλοϊός, ο πολυκαψιδιακός πολυεδροπηρηνικός ιός *Autographa californica*, (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus - AcMNPV) ανήκει στην οικογένεια των *Baculoviridae*, που χωρίζεται σε δύο γένη, τους *Granulovirus* και τους *Nucleopolyhedrovirus*. Οι πολυεδροπηρηνικοί ιοί (NPV's) έχουν πολλά ιϊκά σωματίδια στον ενδοπηρηνικό τους κρύσταλλο που ονομάζεται πολυέδρα, ενώ οι κοκκιώδεις ιοί (GV's) έχουν ένα ιϊκό σωματίδιο (Volkman et al., 1997). Ο AcMNPV εναποτίθεται κυρίως στα είδη των λεπιδόπτερων *Spodoptera frugiperda* και *Trichoplusia ni* ως έντομα ξενιστές. Το γένος *Nucleopolyhedrovirus* μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω σε δύο ομάδες βάση μορφολογίας, βασισμένες στον αριθμό των νουκλεοκαψιδίων ανά ιϊκό σωματίδιο. Ο μοναδικός-πολυεδροπηρηνικός (single-nucleopolyhedroviruses-SNPV) περιέχει ένα μοναδικό νουκλεοκαψίδιο ανά ιϊκό σωματίδιο, ενώ ο πολλαπλός-πολυεδροπηρηνικός (multiple-nucleopolyhedroviruses-MNPV) περιέχει πολλαπλά νουκλεοκαψίδια ανά ιϊκό σωματίδιο. Οι SNPVs και οι MNPVs μπορούν να περιέχουν πολλαπλά βίρια ανά σωματίδιο εγκλεισμού (inclusion body). Ο AcMNPV έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε γεωργικές εφαρμογές αλλά και στην μοριακή βιολογία. Από το 1940 χρησιμοποιείται στην γεωργία σαν εντομοκτόνο, καθώς

προτείνεται ως φυσικός ανασταλτικός παράγοντας των πληθυσμών των εντόμων, αφού προκαλεί παράλυση, αποσύνθεση και θάνατο της προσβεβλημένης προνύμφης. Η αποσύνθεση επιτρέπει την απελευθέρωση των απογονικών ιών από την βιομάζα του εντόμου. Τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιείται στην μοριακή βιολογία για την παραγωγή περίπλοκων ευκαρυωτικών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων εμβολίων. Ο AcMNPV απομονώθηκε αρχικά από το alfalfa looper (*Autographa californica*). Για ερευνητικούς σκοπούς συνήθως αναπτύσσεται σε κυτταροκαλλιέργειες εντόμων, που παρέχονται από ωοκύτταρα του είδους *Spodoptera frugiperda* (Fall Army worm, a moth, a pest).



Εικόνα 1: Alfalfa looper (από: ippc2.orst.edu/potato/alflooper.html)

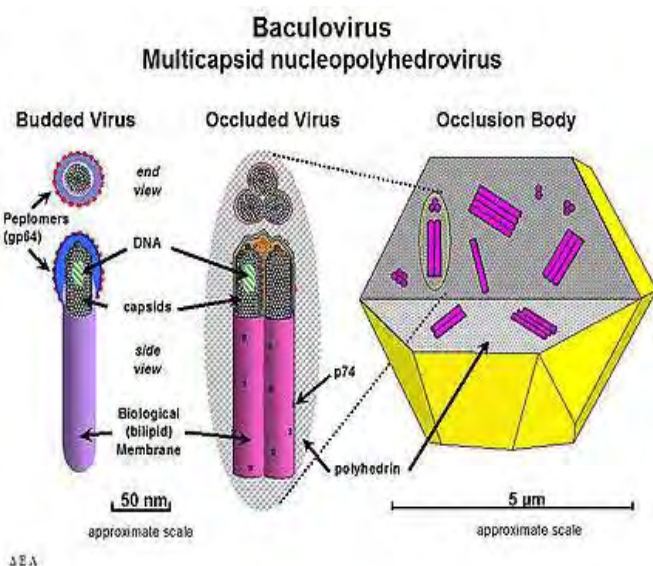
1.4. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΟΥΛΟΪΟΥ

Ο AcMNPV παράγει δύο τύπους μολυσματικών ιικών σωματίων, που αναφέρονται και ως φαινότυποι του: ο εγκλεισμένος ιός (occlusion derived virus-ODV) και ο βλαστάνων ιός (budded virus-BV) (εικόνα 2). Οι BV και ODV τύποι έχουν διακριτούς ρόλους στον κύκλο της ζωής του ιού και συναρμολογούνται από διαφορετικούς μηχανισμούς σε διαφορετικές περιοχές του μολυσμένου κυττάρου. ODV είναι η μορφή του ιού που παράγεται σε μετέπειτα στάδια της ιικής μόλυνσης και περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό σωματίο εγκλεισμού. Τα συστατικά του ιικού σωματίου προερχόμενο από εγκλεισμό είναι μήτρα κρυσταλλικής πρωτεΐνης, που περιβάλλει το νουκλεοκαψίδιο κάποιων ιών των εντόμων, όπως της οικογένειας των baculoviridae. Αυτοί συναρμολογούνται μέσα στον πυρήνα, όταν τα νουκλεοκαψίδια ενθυλακώνονται μέσα σε μεμβράνες που φαίνεται να προέρχονται από την πυρηνική μεμβράνη. Οι ODVs επιτρέπουν την οριζόντια μεταφορά του ιού από έντομο σε έντομο (εικόνα 3) και επιτρέπουν στον ιό να αντέχει ακόμη και σε ξηρό περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Παρά την εξαιρετική σταθερότητα

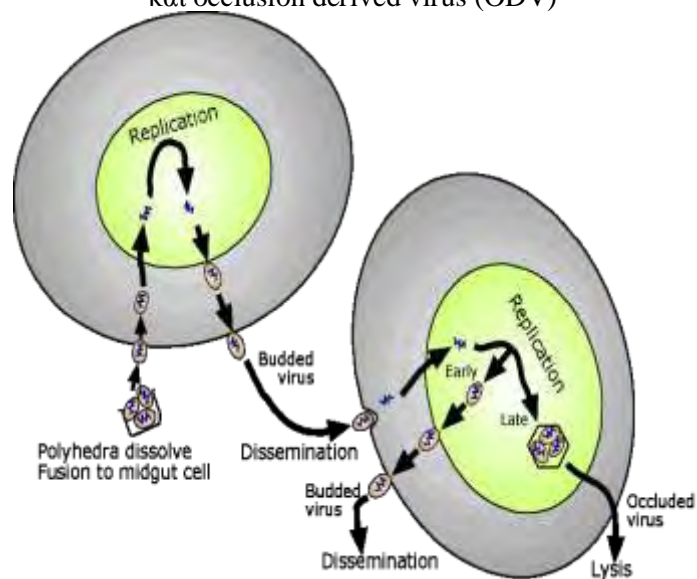
στο περιβάλλον, η μήτρα διαλυτοποιείται στην αλκαλική μεσεντερική περιοχή της προνύμφης, απελευθερώνοντας τους ιούς που στη συνέχεια εισέρχονται στα επιθηλιακά κύτταρα με διάχυση. Η δεύτερη μορφή του ιού, γνωστή και ως βλαστάνων ιός (BV), είναι υπεύθυνη για την δευτερογενή μόλυνση και επίσης την προσβολή κυτταροκαλλιιεργειών. Ο BV γενικά περιέχει ένα μοναδικό νουκλεοκαψίδιο και περιβάλλεται από φάκελο, που σχηματίζεται καθώς τα νουκλεοκαψίδια βλαστάνουν μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Ο BV του AcMNPV εισέρχεται με ενδοκύτωση μεσολαβούμενη από υποδοχέα, πιθανώς μέσω κυστιδίων κλαθρίνης. Αντιθέτως, ο ODV διαχέεται απευθείας μέσα στην πλασματική μεμβράνη στην επιφάνεια του κυττάρου.

Η μόλυνση κυτταροκαλλιιεργειών μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις: πρώιμη φάση κατά την οποία συντελείται ο αναδιπλασιασμός του DNA (0-6 ώρες p.i.), καθυστερημένη (6-24 ώρες p.i.) και πολύ καθυστερημένη φάση (18-24 έως 72 ώρες p.i.) (Miller 1996).

Στην τελευταία φάση, ο ODV περιβάλλεται από μία υψηλά εκφραζόμενη πρωτεΐνη ονομαζόμενη πολυεδρίνη για τον σχηματισμό των σωματίων εγκλεισμού. Σε πειράματα με κυτταροκαλλιιεργειες οι ODV δεν είναι απαραίτητοι, και στους βακουλοϊούς που χρησιμοποιούμε το γονίδιο της πολυεδρίνης έχει αντικατασταθεί με άλλα γονίδια.

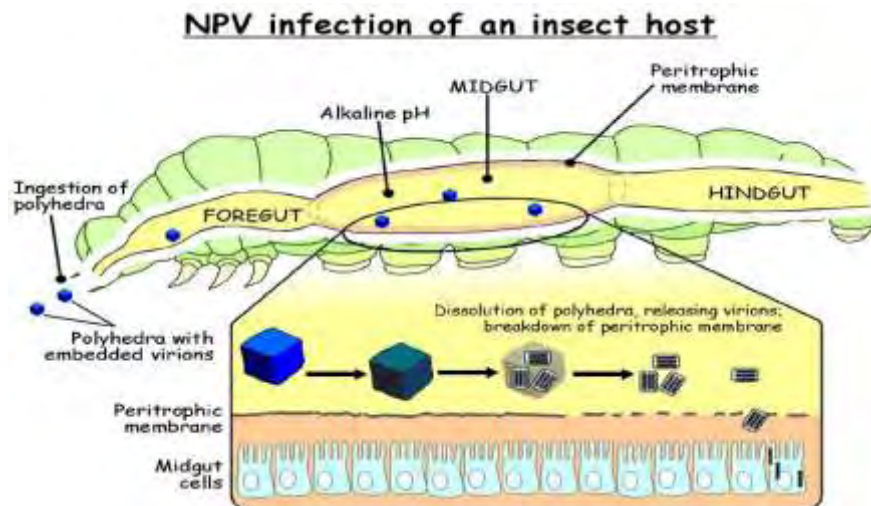


Εικόνα 2: οι δύο μολυσματικοί φαινότυποι ενός MNPV βακουλοϊού, budded virus (BV) και occlusion derived virus (ODV)



Εικόνα 3: συνοπτικό σχήμα της οριζόντιας ικής μεταφοράς.

Τα ODV σωματίδια είναι υπεύθυνα για την πρωτογενή μόλυνση του ξενιστή, καθώς συνήθως η προνύμφη του εντόμου τρώει φύλλα των φυτών που φιλοξενούν ODV (εικόνα 4). Τα ODV εισέρχονται και μολύνουν τα μεσεντερικά επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή και η μόλυνση οδηγεί στη συγκρότηση και την βλάστηση του BV από την βασική πλευρά των πολικών αυτών κυττάρων.



Εικόνα 4: Η διαδικασία μόλυνσης του εντόμου ξενιστή από NPV ιό.

1.5. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΪΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΟΥ

Το καψίδιο του ραβδόμορφου AcMNPV αποτελείται ως επί το πλείστον από την κυρίαρχη καψιδιακή πρωτεΐνη vp39. Το καψίδιο έχει ένα μέσο μέγεθος 20 x 260 nm. Μέσα στο καψίδιο, μαζί με την προσδένουσα σε DNA πρωτεΐνη p6.9, βρίσκεται το κυκλικό, διπλής αλυσίδας γένωμα του ιού. Το γένωμα έχει μήκος 134 kbp και περιέχει 154 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Το καψίδιο περιβάλλει ο λιπιδικός φάκελος, που διαφέρει στις BV και ODV δομές, και γύρω από τον φάκελο του ODV βρίσκεται η μήτρα της πολυεδρίνης.

Η BV μορφή του AcMNPV έχει δύο πρωτεΐνες στον φάκελό της. Η κύρια πρωτεΐνη είναι η gp64, μια μεμβρανική πρωτεΐνη που ο ιός χρησιμοποιεί για να εισέλθει στα κύτταρα αλλά και για να αποδράσει από τα ενδοσώματα. Ο BV χρησιμοποιεί επίσης την gp64 για να εισέλθει στα κύτταρα των θηλαστικών. Επίσης ο AcMNPV έχει μια λιγότερο γνωστή πρωτεΐνη στον φάκελό του, η Ac23, ένα κατάλοιπο της εξέλιξης των βακουλοϊών και ομόλογη των πρωτεϊνών διάχυσης (F πρωτεϊνών) που αξιοποιούνται από τα περισσότερα είδη βακουλοϊών. Δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τον ρόλο της Ac23. Knock out μεταλλάγματα είναι μολυσματικά, αν και λιγότερο θανατηφόρα για τα κύτταρα των εντόμων από τους ιούς αγρίου τύπου. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται

ότι προσδένεται στο DNA του πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, κάτι που δεν συμβαίνει με την gp64.

1.6. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ AcMNPV ΒΑΚΟΥΛΟΪΟΥ

Ο ιός των εντόμων, που ονομάζεται βακουλοϊός (baculovirus), χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή πρωτεϊνών. Προσβάλλει διάφορα αρθρόποδα (λεπιδόπτερα, υμενόπτερα, δίπτερα, νευρόπτερα, κολεόπτερα, τριχόπτερα, αραχνοειδή, ακάρεα κ.τ.λ) και οστρακόδερμα (crustacea). Οι βακουλοϊοί προσέλκυσαν την προσοχή των ερευνητών, διότι κατά τα όψιμα στάδια της μόλυνσης συνθέτουν ορισμένες πρωτεΐνες, όπως η πολυεδρίνη (polyhedrin), σε πολύ υψηλές ποσότητες. Η πολυεδρίνη είναι ιδιαίτερα σημαντική για την προστασία του ιού στη φύση, αλλά δεν είναι απαραίτητη όταν αυτός πολλαπλασιάζεται σε μια καλλιέργεια κυττάρων. Γι'αυτό και η αλληλουχία που κωδικοποιεί την πολυεδρίνη μπορεί να αντικατασταθεί από εξωγενή γονίδια, τα οποία με αυτόν τον τρόπο υπόκεινται στον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή της. Έτσι είναι δυνατόν να παραχθούν σε καλλιέργεια μεγάλες ποσότητες- ακόμη και milligram- επιθυμητών πρωτεϊνών. Μάλιστα οι πρωτεΐνες που συντίθενται από τον βακουλοϊό συνήθως υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση. Στον φορέα αυτό μπορούν να κλωνοποιηθούν πολύ μεγάλα τμήματα DNA, τα οποία εισάγονται στο ιικό γονιδίωμα μέσω ανασυνδυασμού. Οι επιστήμονες έχουν εκμεταλλευτεί την μεγάλη χωρητικότητα των βακουλοϊών για να συνθέσουν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, χρησιμοποιώντας ένα μόνο ανασυνδυασμένο φορέα. Για παράδειγμα, και οι πέντε πρωτεΐνες του ανθρώπινου μεταγραφικού παράγοντα TFIID εκφράστηκαν ταυτόχρονα στο ίδιο κυτταρικό περιβάλλον, αξιοποιώντας το σύστημα του βακουλοϊού, κι έτσι διαπιστώθηκε ότι έχουν την δυνατότητα να σχηματίσουν ένα λειτουργικό σύμπλοκο, μεγέθους 700 kD. Για τέτοιες ιδιαίτερα απαιτητικές εφαρμογές, που προϋποθέτουν τη συναρμογή πολλών διαφορετικών γονιδίων σε ένα τμήμα DNA, ήταν απαραίτητη η κατασκευή προηγμένων φορέων κατάλληλων για χρήση στην E.Coli, καθώς στο βακτήριο αυτό λαμβάνει χώρα η κατασκευή των ανασυνδυασμένων μορίων DNA. Ένας τέτοιος πολυχρηστικός φορέας είναι το βακουλομίδιο (bacmid), το οποίο μπορεί να δεχτεί αρκετά γονίδια και είναι ικανό να λειτουργήσει και ως βακουλοϊός, όταν μεταφερθεί με διαμόλυνση σε κύτταρα εντόμων, αλλά και να πολλαπλασιαστεί σαν ένα μεγάλο πλασμίδιο στην E.Coli.

Εκτός του ότι οι βακουλοϊοί αποτελούν ένα σημαντικό σύστημα έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα κύτταρα εντόμων, οι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί αποδεικνύουν ότι είναι πολλά υποσχόμενοι φορείς στην γονιδιακή θεραπεία. Οι βακουλοϊοί είναι ικανοί να μολύνουν κύτταρα θηλαστικών αλλά είναι ανίκανοι να αναδιπλασιάζονται μέσα σ'αυτά, καθιστώντας τους ασφαλείς

φορείς γονιδιακής θεραπείας, συγκρινόμενοι με τους παθογενικούς ομολόγους τους (Hu, Y.C., 2005, Kost, T.A. et al., 2005b). Οι βακουλοϊοί είναι επίσης ικανοί να προσβάλλουν διαιρούμενα και μη- διαιρούμενα κύτταρα (van Loo, N.D. et al., 2001).

Έχουν χρησιμοποιηθεί για *in vivo* γονιδιακή μεταφορά με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τους Ads (Airenne, K.J. et al., 2000). Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι ο βακουλοϊός με την βοήθεια του κατάλληλου ευκαρυωτικού υποκινητή είναι ικανός να μεταφέρει και να εκφράσει γονίδια στόχους επιτυχώς σε διάφορους τύπους κυττάρων θηλαστικών (Boyce, F.M., and Bucher, N.L., 1996, Condreay, J.P. et al., 1999). Οι βασικοί περιορισμοί προκύπτουν με τις ανοσοδιεγερτικές ικανότητες των βακουλοϊών (τόσο του έμφυτου όσο και του δευτερογενούς ανοσοποιητικού): απελευθέρωση κυτοκινών από μακροφάγα, αλληλεπίδραση των gp64 πρωτεϊνών που φέρουν μαννόζη με MRs, που εκφράζονται στην επιφάνεια δενδριτικών και μακροφάγων, η αναγνώριση της μαννόζης από Toll-like receptors, επαγωγή της IFN (Abe, T. et al., 2003). Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψη και η απενεργοποίησή τους από το σύστημα του συμπληρώματος, γεγονός που ελαχιστοποιείται δοσοεξαρτώμενα με μπλοκάρισμα του C5 παράγοντα (Hofmann, C., and Strauss, M., 1998). Έτσι οι βακουλοϊοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε γονιδιακή θεραπεία βασισμένη στη δράση του "φονικού" γονιδίου NS1 (που αναφέρεται παρακάτω) καθώς προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα ως φορείς γονιδιακής θεραπείας. Επίσης, το γονιδίωμα είναι μεγάλο, επομένως ο ιός μπορεί να φέρει πολλαπλά γονίδια ή μεγάλα ενθέματα καθώς και η κατασκευή και παραγωγή του ιού σε μεγάλους τίτλους είναι σχετικά εύκολη (Hu, Y.C., 2005).

1.7. GP64/ GP64 null

Η κύρια γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου, η GP64, έχει βρεθεί στους βακουλοϊούς των λεπιδόπτερων, όπως ο AcMNPV και ο OpMNPV. Αυτή η υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη σχηματίζει spike-like πεπλομερίδια (δομικές υπομονάδες του ελύτρου), που βρίσκονται κυρίως στο τέλος του ιϊκού σωματίου και ενσωματώνεται στα ιικά σωματίδια κατά την διάρκεια της "βλάστησής" τους (budding). Η GP64 ανήκει στην τάξη III των πρωτεϊνών διείσδυσης (penetrenes) (Courtney E.Garry & Robert F Garry. 2008) αποτελεί μεμβρανική πρωτεΐνη που έχει μια N-τελική σηματοδοτική αλληλουχία και μια διαμεμβρανική περιοχή (TM) δίπλα στο C-τελικό άκρο (Blissard & Rohrmann, 1989). Η γλυκοπρωτεΐνη είναι παρούσα σε τριμερική μορφή στην επιφάνεια του κυττάρου και του ιϊκού σωματιδίου (Oomens et al. 1995). Ο τριμερισμός που μεσολαβείται από την

περιοχή ολιγομερισμού (Monsma & Blissard 1995) είναι γρήγορη αλλά μη αποτελεσματική διαδικασία που περιλαμβάνει ενδομοριακό σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι μονομερείς πρωτεΐνες αποικοδομούνται μέσα στα κύτταρα ξενιστές. Η GP64 είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στον υποδοχέα του κυττάρου- ξενιστή (Hefferon et al. 1999). Είναι απαραίτητη και ταυτόχρονα επαρκής για την μεσολάβηση -εξαρτώμενης από το pH – μεμβρανικής διάχυσης κατά την διάρκεια της ενδοκύττωσης του βακουλοϊού (Blissard and Wenz 1992). Επίσης, η GP64 είναι απαραίτητη για την μεταβίβαση του BV από κύτταρο σε κύτταρο.

Ο ιός προσδένεται και εισέρχεται σε μη-στοχευμένα κύτταρα. Αυτό το χαρακτηριστικό του AcMNPV μπορεί να μην είναι επιθυμητό σε in vivo εφαρμογές που απαιτούν παράδοση του γονιδίου σε ειδικά κύτταρα-στόχους.

Πειράματα έχουν δείξει ότι η GP64 μπορεί να αντικατασταθεί από άλλες πρωτεΐνες του φακέλου. Όταν προστεθούν γονίδια που κωδικοποιούν την VSV-G (G protein from vesicular stomatitis virus) και F πρωτεΐνες βακουλοϊών χωρίς την έκφραση gr64 γονιδίου, έχει αποδειχτεί η διάσωση του gr64-null μεταλλάγματος. Ωστόσο αυτοί οι ιοί δεν είναι κατάλληλοι για στοχευμένη μεταγωγή, καθώς φαίνεται να έχουν ακόμη ευρύτερο ειδικό και ιστικό τροπισμό σε σχέση με τους ιούς με την ενδογενή GP64 πρωτεΐνη (Mangor, Monsma, Johnson & Blissard, 2000). Έτσι ένας gr64-null AcMNPV φορέας για στοχευμένη μεταγωγή θα μπορούσε πιθανώς να δημιουργηθεί συνδυάζοντας τροποποίηση στον ιικό φάκελο με στοχευμένα μόρια και υποκατάσταση της GP64 με μία λειτουργική ομόλογη πρωτεΐνη, που παρουσιάζει τον ελάχιστο τροπισμό στα κύτταρα των σπονδυλωτών.

1.8. ΠΑΡΒΟΪΟΙ

Είναι οι μικρότεροι από όλους τους ιούς, διαμέτρου μόνο γύρω στα 20 nm, έχουν εικοσαεδρική συμμετρία και γενετικό υλικό αποτελούμενο από απλή ταινία (ss DNA). Είναι οι μόνοι DNA-ιοί των οποίων το γένωμα είναι ss DNA. Φέρουν 32 καψομερίδια και δεν περιβάλλονται από έλυτρο και συνεπώς είναι ανθεκτικοί στις λιποδιαλυτικές ουσίες. Η αναπαραγωγή του DNA λαμβάνει χώρα στον πυρήνα ευπαθών κυττάρων, κατά προτίμηση ευρισκομένων σε φάση διαίρεσης. Εμφανίζουν το φαινόμενο εμμόνης στον ξενιστή μέσω του μηχανισμού ενσωμάτωσης του γενετικού τους υλικού στο γένωμα του κυττάρου.

1.8.1. ΠΑΡΒΟΪΟΣ B-19

Ο B19 ανθρώπινος, αυτόνομος παρβοϊός (του γένους *Erythrovirus*) προκαλεί το λοιμώδες εξάνθημα (erythema infectiosum), μια νόσο κυρίως της παιδικής ηλικίας που συνοδεύεται από λοίμωξη των ανώτερων αναπνευστικών οδών, πυρετό και αρθραλγίες. Η νόσος αυτή μπορεί να προκαλέσει ακόμη πιο σοβαρές επιπτώσεις στους ενήλικες και να σκοτώσει τα αγέννητα παιδιά. Έχει επίσης συνδεθεί με αυτοάνοσες καταστάσεις, όπως και με ασθένειες των νεφρών και του ήπατος. Το μέγεθος του ιού είναι μικρό (23nm), είναι μη-ενθυλακωμένος και έχει απλής ταινίας DNA (ssDNA) με μέγεθος περίπου 5.6 kb. Ένας υποκινητής και δύο σήματα πολυαδενυλίωσης οδηγούν στην παραγωγή 9 ικών μεταγράφων. Τρεις πρωτεΐνες, οι VP1, VP2 και η NS1, καθώς και δύο μικρότερες πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας μπορεί να αναγνωριστούν. Ο αναδιπλασιασμός του ιού εξαρτάται από τον κύκλο της ζωής του ξενιστή (φάση S).

1.9. ΤΟ ΦΟΝΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ NS1

Το "φονικό" γονίδιο που χρησιμοποιείται στην μελέτη αυτή, με σκοπό την εξολόθρευση των καρκινικών μαστικών κυττάρων, και περιέχεται στους ανασυνδυασμένους βακουλοϊούς κωδικοποιεί την **NS1 πρωτεΐνη του B19 παρβοϊού**. Η NS1 είναι μια πρωτεΐνη 77kDa που κωδικοποιείται από 671 αμινοξέα. Η επίδραση της έκφρασης της NS1 πρωτεΐνης σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών όπως τα HeLa και τα HepG2 αποδείχτηκε θανατογόνος (Op De Beeck & Caillet-Fauguet 1997, Poole et al.,2006). Η επαγόμενη από την B19 NS1 κυτταροτοξικότητα προκαλεί σημαντικές διαταραχές στον κυτταρικό κύκλο, που οδηγούν στην παύση στην G1 φάση. Βλάβη στο DNA στα αρχικά στάδια της G1 οδηγεί στην ενεργοποίηση του G1/S σημείου ελέγχου. Το σημείο αυτό ελέγχου θεωρείται ότι ευαισθητοποιείται άμεσα στην έλλειψη σε θρεπτικά συστατικά και στην ακεραιότητα του κυτταροσκελετού και του DNA. Οι μηχανισμοί αντιγραφής του DNA συσχετίζονται άμεσα με τους μηχανισμούς ενεργοποίησης του σημείου ελέγχου S, γι'αυτό και το σταμάτημα (arrest) στη φάση αυτή πραγματοποιείται ειδικά παρουσία DNA βλάβης. Παρατηρείται ότι σύλληψη (arrest) στην S φάση, όπως και στο G1/S σημείο ελέγχου, ενεργοποιεί μια stress-like αντίδραση που κινητοποιεί μονοπάτια επιδιόρθωσης και την σηματοδότηση πιθανώς για προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο παρουσία ανεπανόρθωτων προσβολών.

Το έμφυτο αποπτωτικό μονοπάτι (the intrinsic apoptotic pathway) είναι ένας ενεργειακά εξαρτώμενος μηχανισμός που μεσολαβεί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε περιπτώσεις έντονου κυτταρικού stress ή ανεπανόρθωτης DNA βλάβης.

Το μονοπάτι ενεργοποιείται από τα προ-αποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας και οδηγεί στην διάτριση των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση πρωτεϊνών, όπως το κυτόχρωμα C, στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα C αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Araf-1 (apoptosis promoting and initiating factor-1) και οδηγεί στην συναρμολόγηση ενός μεγάλου πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου, που ονομάζεται αποπτώσωμα (apoptosome).

Το αποπτώσωμα ενεργοποιεί κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, όπως η κασπάση 9, που διασπά την κασπάση 3, τον κεντρικό μεσολαβητή του αποπτωτικού καταρράκτη. Έπειτα ενεργοποιούνται άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεάσες και ξεκινά η οργανωμένη πέψη των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Η εξαρτώμενη από την B19 NS1 σύλληψη στην G1 φάση του κυττάρου, φαίνεται ότι εξαρτάται από την ικανότητα της πρωτεΐνης να ενεργοποιεί trans τον υποκινητή για το p21, δημιουργώντας ένα συμπλοκο με τον Sp1, ένα κυτταρικό μεταγραφικό παράγοντα, που επίσης εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του B19 P6 υποκινητή κατά την διάρκεια της παραγωγικής ιικής μόλυνσης. Η ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, αν και είναι απαραίτητη, ίσως δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός με τον οποίο η NS1 επάγει την απόπτωση. Η ενεργοποίηση του έμφυτου αποπτωτικού καταρράκτη συνιστά ότι η NS1 μπορεί να προκαλεί επιπρόσθετη ζημιά που δεν μπορεί να ξεπεραστεί από το κύτταρο, οδηγώντας την σύλληψη στο σημείο ελέγχου σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. (Poole et al., 2006, Poole et al, 2008).

Ήδη, βλάβη του DNA σε HepG2 κύτταρα ως απόκριση σε διαμόλυνση με πλασμίδιο που κωδικοποιεί την B19 NS1 έχει δειχθεί από τον Dr. Brian Poole.

1.10. ΟΞΥΤΟΚΙΝΗ

Έχει βρεθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα του μαστού (MDA-MB231, MCF7, T47D) υπερεκφράζουν τον υποδοχέα οξυτοκίνης (oxytocin-OT). Στη συγκεκριμένη μελέτη, θα γίνουν προσπάθειες αφαίρεσης του gr64 γονιδίου (gr64 null) για την αποφυγή της μη ειδικής πρόσδεσης του ανασυνδυασμένου βακουλοϊού (πρόσδεση σε μη-κύτταρα στόχους, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι τα κύτταρα του μαστού). Έτσι στο μέλλον θα επιχειρηθεί η κατασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που αποτελείται από το αμινοτελικό τμήμα της Ac23 και το πεπτίδιο της οξυτοκίνης ώστε οι στοχευμένοι, ανασυνδυασμένοι ιοί να προσδένονται, εισάγονται και να εκφράζουν το φονικό γονίδιο NS1 μόνο στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Απώτερος σκοπός των πειραμάτων της εργαστηριακής ομάδας είναι η ανάπτυξη βακυλοϊκού φορέα για την θεραπεία του καρκίνου, που στοχεύει ειδικά καρκινικά κύτταρα μαστού. Η υπόθεση είναι ότι ένας βακυλοϊός με στοχευτικό πεπτίδιο στην πρωτεΐνη του φακέλου του θα προσδεθεί στα κύτταρα στόχους πιο αποτελεσματικά από τον ιό αγρίου τύπου, θα διεισδύσει στο κύτταρο πιο αποτελεσματικά και επομένως θα σκοτώσει τα κύτταρα στόχους πιο ειδικά. Κάνοντας χρήση μεθόδων κλωνοποίησης και ομόλογου ανασυνδυασμού, η ερευνητική ομάδα σχεδιάζει να προσθέσει το πεπτίδιο στόχευσης (οξυτοκίνη) στο N-τελικό άκρο της Ac23 πρωτεΐνης του φακέλου. Μόλις ο βακυλοϊός βρεθεί στο εσωτερικό του κυττάρου στόχου, το φονικό γονίδιο που φέρει (NS1) θα εκφραστεί.

Στην παρούσα μελέτη, έγιναν προσπάθειες να αντικατασταθεί το γονίδιο grb4 από ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοσίνη για την δημιουργία grb4-null κλώνων. Έτσι θα αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του ιού.

Στην συνέχεια θα δημιουργηθούν κλώνοι ανασυνδυασμένων βακυλοϊών κάποιοι από τους οποίους φέρουν το φονικό γονίδιο. Ταυτόχρονα θα συγκριθεί η συμπεριφορά στοχευμένων και μη βακυλοϊών σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καθιερωμένες τεχνικές κλωνοποίησης και ανασυνδυασμού χρησιμοποιούνται για την δημιουργία ανασυνδυασμένων βακουλοϊών. Κυτταρομετρία ροής και χρώση ανοσοφθορισμού με συνεστιακή μικροσκοπία, από την άλλη, θα χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό της συμπεριφοράς των ανασυνδυασμένων βακουλοϊών.

3.1. Γενετική μηχανική στο γονιδίωμα των βακουλοϊών

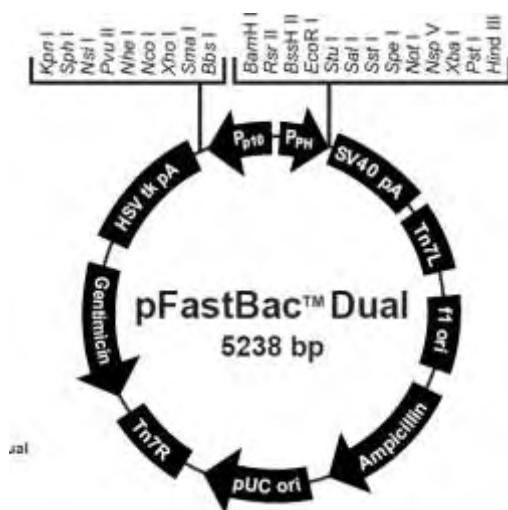
Η γενετική μηχανική στα βακτήρια χρησιμοποιώντας ομόλογο ανασυνδυασμό ονομάζεται ανασυνδυασμός. Η τεχνική του ανασυνδυασμού θα χρησιμοποιηθεί για την στοχευμένη απαλοιφή του GP64 γονιδίου από το γονιδίωμα του βακουλοϊού (GP64 null κλώνος). Το DNA που απαιτείται για τον ανασυνδυασμό και την αντικατάσταση του γονιδίου θα δημιουργηθεί με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

3.1.1. Κλωνοποίηση του NS1 σε pFastBacDual πλασμίδιο

Εναρκτήριο σημείο των πειραμάτων αποτέλεσε η δημιουργία του ανασυνδυασμένου βακουλοϊού που φέρει το NS1-eGFP γονίδιο κάτω από τον άμεσο πρώιμο υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Ο βακουλοϊός κλωνοποιήθηκε με το σύστημα Bac-to-Bac (Invitrogen) χρησιμοποιώντας το pFastBac πλασμίδιο όπως περιγράφεται παρακάτω. Το αποτέλεσμα είναι δύο νέες κατασκευές.

Δύο κατασκευές: (a) p \underline{CMV} \underline{EGFP} wtFastBacDual

(b) p \underline{CMV} \underline{EGFP} $\underline{NS1}$ FastBacDual



εικόνα 5: χάρτης του πλασμιδίου pFastBacDual

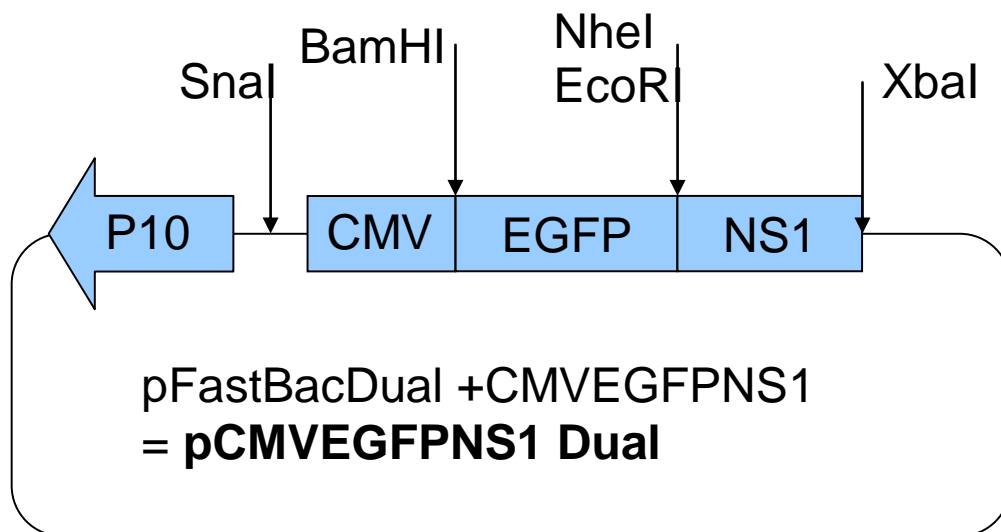
εικόνα 6: ο υποκινητής της πολυεδρίνης

απομακρύνθηκε με τα ένζυμα

περιορισμού SnaI και XbaI, στη θέση

του οποίου τοποθετήθηκαν οι νέες

κατασκευές, που κωδικοποιούν EGFP υπό τον CMV υποκινητή. Εδώ βλέπουμε το p \underline{CMV} \underline{EGFP} $\underline{NS1}$ ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

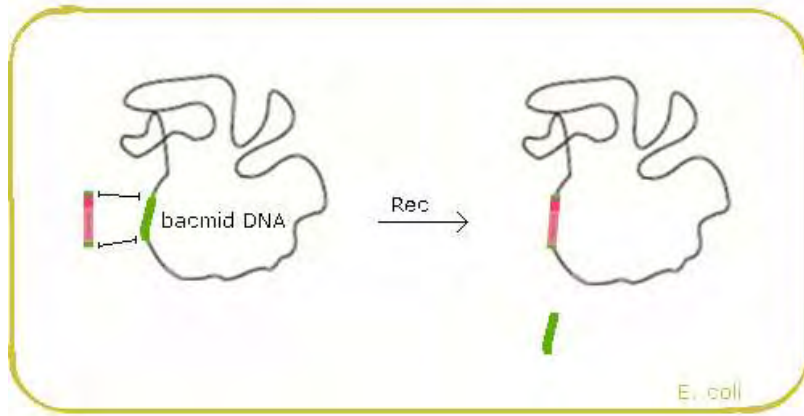


3.1.2. Δημιουργία GP64 null βακουλοϊκών κλώνων

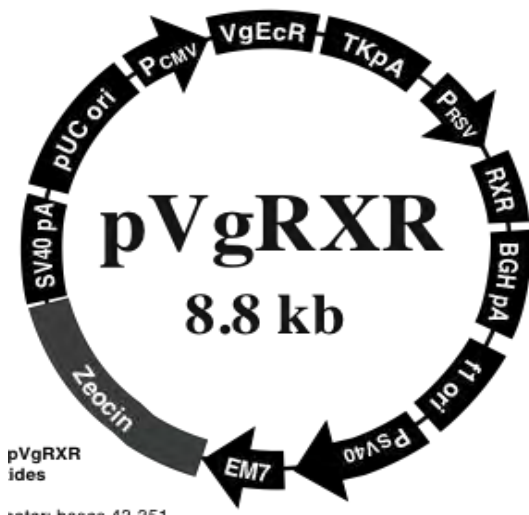
Για να επιτευχθεί η απαλοιφή του GP64 γονιδίου, θα δημιουργήσουμε μια DNA αλυσίδα που περιέχει ένα γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικό (δείκτης επιλογής) και που έχει εκατέρωθεν ομόλογες αλληλουχίες με τις αλληλουχίες που περιβάλλουν το GP64 γονίδιο. Αυτή η αλυσίδα θα χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια για την αντικατάσταση του GP64 γονιδίου στο βακουλομίδιο (bacmid) του βακουλοϊού με ομόλογο ανασυνδυασμό. Αφού λάβει χώρα ο ομόλογος ανασυνδυασμός, θα ασκηθεί πίεση με αντιβιοτικά για την επιλογή των gp64 null κλώνων.



Εικόνα 7: Η κασέτα έκφρασης που θέλουμε δημιουργήσουμε με PCR και ο ανασυνδυασμός της στο βακουλοϊκό DNA



Το βακουλομίδιο που χρησιμοποιούμε περιέχει ένα γονίδιο αντοχής στην καναμυκίνη και το βοηθητικό πλασμίδιο στην E. Coli περιέχει ένα γονίδιο αντοχής στην τετρακυκλίνη. Η στοχευμένη κατασκευή περιέχει ένα γονίδιο αντοχής στην αμπικιλίνη. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε για την gr64 null κατασκευή, ένα γονίδιο αντοχής στην ζεοσίνη (zeocin- Sh ble gene). Το γονίδιο αυτό περιέχονταν στο pVgRXR πλασμίδιο υπό τον βακτηριακό υποκινητή EM-7.



Εικόνα 8: Χάρτης του πλασμιδίου pVgRXR το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης θα περικλείει τον EM-7 υποκινητή και το γονίδιο ανθεκτικότητας στη ζεοσίνη. Ο EM-7 είναι συνθετικός προκαρυωτικός υποκινητής για την έκφραση του Sh-ble γονιδίου στην E.Coli.

Αρχικά σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την PCR.

Προωθητικός εκκινητής (gr64_zeo_forward), μήκος 67 bp, ποσοστό σε GC 41.8 %, $T_M=68.0$ °C

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ: 5'- TCT GGA TCG TAT AGA TCT TGC TAA GGT TGT GAG TTC AAG TCT CGC CTG AGG TTG ACA ATT AAT CAT C -3'

Οι πρώτες 50 βάσεις ανταποκρίνονται στις βάσεις 108021-108070 στο γονιδίωμα του AcMNPV , περιέχοντας 108 βάσεις, και το gr64 (tta, ουσιαστικά το τελευταίο κωδικόνιο του gr64, επειδή το gr64 γονίδιο διαβάζεται αντίστροφα). Οι τελευταίες 17 bp του εκκινητή ανταποκρίνονται στο αρχικό τμήμα του EM-7 υποκινητή στο pVgRXR.

Αντίστροφος εκκινητής (gp64_zeo_reverse), μήκος 72 bp, ποσοστό σε GC 44.4 %, $T_M=69.5$ °C

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ: 5' – TAC TAG TAA ATC AGT CAC ACC AAG GCT TCA ATA AGG
AAC ACA CAA GCA AGC TTA TCC TCA GTC CTG CTC CTC –3'

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ: 5' – GAG GAG CAG GAC TGA GGA TAA GCT TGC TTG TGT
GTT CCT TAT TGA AGC CTT GGT GTG ACT GAT TTA CTA GTA –3'

Οι τελευταίες 22 βάσεις του αντίστροφου εκκινητή (ή οι 22 πρώτες bp της συμπληρωματικής αλυσίδας) ανταποκρίνονται στο τελικό τμήμα του Sh ble γονιδίου, και τα 50 πρώτα ζευγάρια βάσεων στην καθοδική ομόλογη περιοχή του gp64 γονιδίου, βάσεις 109718-109767 του γονιδιώματος του *AcMNPV*.

Με τους εκκινητές αυτούς θα πάρουμε ένα PCR προϊόν 549 bp με την ακόλουθη αλληλουχία:

προωθητικός εκκινητής (ανοδική ομόλογη & αρχή του EM7): TCT GGA
TCG TAT AGA TCT TGC TAA GGT TGT GAG TTC AAG TCT CGC CTG AGG TTG
ACA ATT AAT CAT C

υπόλοιπη αλληλουχία του EM7 εκκινητή: CG GCATAGTATA TCGGCATAGT ATAATACGAC
AAGGTGAGGAACTAAACC

Sh ble: ATG GCC AAG TTG ACC AGT GCC GTT CCG GTG CTC ACC GCG CGC GAC GTC
GCC GGA GCG GTC GAG TTC TGG ACC GAC CGG CTC GGG TTC TCC CGG GAC TTC
GTG GAG GAC GAC TTC GCC GGT GTG GTC CGG GAC GAC GTG ACC CTG TTC ATC
AGC GCG GTC CAG GAC CAG GTG GTG CCG GAC AAC ACC CTG GCC TGG GTG TGG
GTG CGC GGC CTG GAC GAG CTG TAC GCC GAG TGG TCG GAG GTC GTG TCC ACG
AAC TTC CGG GAC GCC TCC GGG CCG GCC ATG ACC GAG ATC GGC GAG CAG CCG
TGG GGG CGG GAG TTC GCC CTG CGC GAC CCG GCC GGC AAC TGC GTG CAC TTt
GTG GCa

Συμπληρωματική αλυσίδα αντίστροφου εκκινητή (end of Sh ble and
flanking downstream): GAG GAG CAG GAC TGA GGA TAA GCT TGC TTG TGT
GTT CCT TAT TGA AGC CTT GGT GTG ACT GAT TTA CTA GTA

Επίσης πραγματοποιήθηκε BLAST του αναμενόμενου PCR προϊόντος με το γένωμα του *AcMNPV*. Βρέθηκε ότι δεν υπάρχει ομόλογη αλληλουχία εκτός από τις ομόλογες, περιβάλλουσες περιοχές που προσθέτουμε.

Το PCR προϊόν χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως ένθεμα με σκοπό να γίνει ομοιοπολική σύνδεση με γραμμοποιημένο πλασμίδιο-φορέα με λεία άκρα. Στην περίπτωση που η κλωνοποίηση δεν έχει αποτελέσματα, θα μπορούσε επίσης να γίνει χρήση της τεχνικής του ομόλογου ανασυνδυασμού. Ωστόσο είναι πιο βολική η μεσολάβηση πλασμιδίου φορέα, καθώς μπορεί να πολλαπλασιάζεται όποτε είναι αναγκαίο.

PCR αντίδραση

Η PCR διεξήχθη αρχικά με την "goTaq Hot start" πολυμεράση. Οι κύκλοι της αποτελούνταν από τα εξής βήματα

- αρχική (2 λεπτά) αποδιάταξη DNA (initial denaturation)- διαχωρισμός κλώνων- 98 °C
- (30 κύκλοι)
 1. (1 λεπτό) αποδιάταξη DNA (denaturation)- διαχωρισμός κλώνων- 98 °C
 2. (1 λεπτό) πρόσδεση εκκινητών (annealing temperature)- 76.5 °C

{5 °C χαμηλότερη από τη μέση θερμοκρασία των εκκινητών, που είναι 81.5 °C}

3. (1 λεπτό) επιμήκυνση (elongation)- 72°C
- (5 λεπτά) τελική επιμήκυνση (final elongation)
 - διατήρηση στους +4 °C

Τα “προϊόντα” της αντίδρασης της PCR τρέξαμε σε gel αγαρόζης, ωστόσο διαπιστώθηκε πως δεν υπήρχαν προϊόντα.

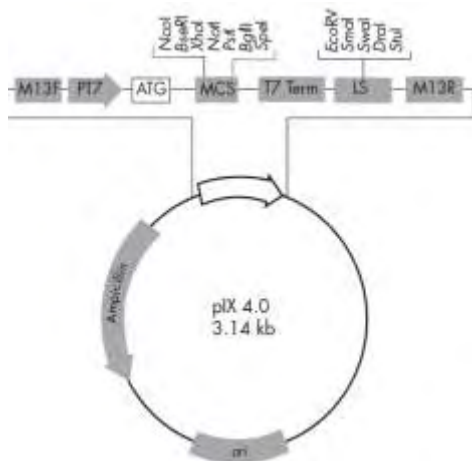
Χρησιμοποιήθηκε "10x Dream Taq DNA" πολυμεράση, με νέο πρωτόκολλο, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, πάλι χωρίς αποτέλεσμα. Ούτως ή άλλως όμως οι πολυμεράσες αυτές δεν ήταν κατάλληλες, διότι η κλωνοποίηση που ακολουθεί απαιτεί λεία άκρα, ενώ οι Taq έχουν την τάση να προσθέτουν ένα επί πλέον κατάλοιπο αδενοσίνης (A) στο 3' άκρο του προϊόντος που συντίθεται.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η "Platinum Pfu" πολυμεράση. Η πολυμεράση αυτή έχει δράση εξωνουκλεάσης με κατεύθυνση 3' προς 5' και δράση πολυμεράσης με κατεύθυνση 5' προς 3'. Παρουσία δεοξυριβονουκλεοτιδίων η δράση εξωνουκλεάσης με κατεύθυνση 3' προς 5' αποικοδομεί μονόκλινα 3' άκρα και σταματά μόλις βρει δίκλινο DNA, οπότε επικρατεί η δράση της πολυμεράσης. Χάρη στις δύο αυτές δράσεις η Pfu μετατρέπει και τους δύο τύπους προεξέχοντων άκρων σε λείους: συμπληρώνει προεξέχοντα 5' άκρα και αποικοδομεί προεξέχοντα 3' άκρα.

Πλασμίδιο-φορέας

Μετά την αντίδραση της PCR, τρέξαμε ένα gel αγαρόζης για να επιβεβαιώσουμε ότι το προϊόν της ενίσχυσης έχει το σωστό μέγεθος. Στη συνέχεια, κόψαμε το DNA από το gel και το καθαρίσαμε. Το PCR προϊόν θα αποτελέσει το **ένθεμα** για την ακόλουθη διαδικασία κλωνοποίησης.

Το πλασμίδιο φορέας που επιλέχθηκε ήταν το **pIX4.0**.



Εικόνα 7:Χάρτης του πλασμιδίου φορέα pIX4.0

θέση περιορισμού του ECORV στην LS περιοχή

Τα **pIX4.0** πλασμίδια πολλαπλασιάστηκαν σε DH5a κύτταρα από stock γλυκερόλης. Τα DH5a κύτταρα αναπτύχθηκαν κατά την διάρκεια της νύχτας για 16-18 h σε shaker στους 230 rpm, 37 °C, σε θρεπτικό μέσο LB που περιείχε επιλογή στο αντιβιοτικό αμικιλίνη (50 µg/ml).

Στελέχη *E. coli*, όπως τα DH5a, είναι ευαίσθητα στην αμικιλίνη, που παρεμποδίζει την σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και οδηγεί στην κυτταρική λύση. Ωστόσο πλασμίδια όπως το pIX4.0 που φιλοξενούν το γονίδιο ανθεκτικότητας σ' αυτό το αντιβιοτικό επιβιώνουν παρουσία αμικιλίνης, καθώς αυτό κωδικοποιεί για ένα ένζυμο (β-λαταμάση) που αποικοδομεί την αμικιλίνη. Κατ' αυτό τον τρόπο επιλέγονται βακτήρια που κατέχουν το πλασμίδιο αυτό.

Καθαρισμός του πλασμιδίου

Το πλασμίδιο απομονώθηκε από την βακτηριακή καλλιέργεια με το QIAGEN Plasmid MiniPrep Kit. Τα βήματα (σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή), περιλαμβάνουν τις παρακάτω βιολογικές διεργασίες.

Τα βακτηριακά κύτταρα διαχωρίζονται από το μέσο της καλλιέργειας με φυγοκέντρηση, σχηματίζοντας ίζημα στον πυθμένα του σωλήνα. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα επαναδιάλυσης. Τα βακτηριακά κύτταρα λύνονται με διάλυμα λύσης, που περιέχει SDS (sodium dodecyl sulphate, διαλύει τα μόρια λίπους) και βάση (αποδιατάσσει πρωτεΐνες και DNA). Στη συνέχεια, η χρήση διαλύματος ουδετεροποίησης ρίχνει σαν ίζημα τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες.

Το μεγαλύτερο χρωμοσωμικό DNA θα παραμείνει αποδιεταγμένο και σε μορφή ιζήματος και το μικρότερο πλασμιδιακό DNA θα επαναδιαταχθεί και θα παραμείνει στο διάλυμα. Το διάλυμα λύσης φυγοκεντρείται και τα τεμαχισμένα κύτταρα ή άλλα μη επιθυμητά υλικά (όπως βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA) βυθίζονται στον πυθμένα του σωλήνα ενώ το πλασμιδιακό DNA θα παραμείνει στο διάλυμα. Το περιέχον DNA διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη που περιέχει μεμβράνη silica gel. Η μεμβράνη αυτή προσδένει το πλασμιδιακό DNA υπό υψηλή συγκέντρωση άλατος. Πρωτεΐνες και άλλες ουσίες δεν προσδένονται στην μεμβράνη, και μπορούν να ξεπλυθούν με διάλυμα που περιέχει άλας και αλκοόλη.

Το προσδεδεμένο DNA εκλούεται σε μικρό όγκο H₂O.

Μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA

Η απόδοση της τεχνικής σε DNA μπορεί να καθοριστεί με πολλές διαφορετικές μεθόδους. Η πιο κοινή και ευκολότερη τεχνική για τον καθορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA είναι η απορρόφηση. Η απορρόφηση στα 260 nm (A_{260}) αποτελεί το μήκος κύματος όπου το DNA απορροφά το φως ισχυρότερα, και το αποτέλεσμα μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε την συγκέντρωση του διαλύματος. Έχει δειχθεί ότι, όταν η απορρόφηση καθαρού DNA διπλής έλικας στα 260 nm είναι 1.0, η συγκέντρωση DNA του διαλύματος είναι 50 μg/ml. Για DNA απλής αλυσίδας και RNA όταν $A_{260} = 1.0$, οι ισοδύναμες συγκεντρώσεις είναι 40 μg/ml.

Η καθαρότητα του DNA μπορεί να υπολογιστεί από το κλάσμα A_{260}/A_{280} επειδή οι πρωτεΐνες απορροφούν το φως κυρίως στα 280 nm. Για καθαρό DNA το κλάσμα A_{260}/A_{280} είναι 1.8 αλλά ένα κλάσμα A_{260}/A_{280} μεταξύ 1.7 και 2.0 γενικά αντιπροσωπεύει δείγμα DNA υψηλής ποιότητας. Η παρουσία πρωτεϊνών στο διάλυμα θα μειώσει το κλάσμα A_{260}/A_{280} κάτω από 1.8 και η παρουσία RNA θα αυξήσει το κλάσμα πάνω από 1.8.

Όπου απαιτείται ο καθορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας πλασμιδιακού ή άλλου DNA στα πειράματα αυτά, θα χρησιμοποιηθεί το φασματοφωτόμετρο NanoDrop.

Πέψη του pIX4.0 πλασμιδίου

Το ένζυμο περιορισμού ECORV επιλέχθηκε για την πέψη του πλασμιδίου, αφήνοντας λεία άκρα. Το EcoRV Fast Digest (Fast Digest Fermentas) θα μπορούσε να έχει δουλέψει ακόμα και με 5 λεπτά

χρόνο επώασης- σύμφωνα με το μέγεθός του και τις οδηγίες του κατασκευαστή- ωστόσο επώαστηκε για 30 λεπτά. Μετά, η αντίδραση πέψης υπέστη SAP για 1 h. Η χρήση SAP (alkaline phosphatase) μειώνει το ποσοστό των “άδειων” (χωρίς ένθεμα) φορέων κατά την κλωνοποίηση. Η επίδραση με SAP αφαιρεί εντελώς τα 5' φωσφορικά με μία απλή επώαση. Έτσι ο φορέας είναι ικανός να συνδεθεί ομοιοπολικά μόνο με το ένθεμα, εφόσον αυτό έχει 5' άκρο. Στη συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιείται τελείως με 15 λεπτά στους 65 °C. Το κομμένο πλασμίδιο καθαρίστηκε με το QIaqua kit , σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με το kit αυτό απομονώνουμε DNA που περιέχεται σε ένα διάλυμα με άλλες χημικές ενώσεις ή DNA που περιέχεται σε gel αгарόζης μετά από ηλεκτροφόρηση.

Ηλεκτροφόρηση του κυκλικού και γραμμικού pIX4.0 πλασμιδίου πήκτωμα αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης είναι μια κοινή μέθοδος διαχωρισμού του DNA με βάση το μέγεθός του. Αυτό επιτυγχάνεται όταν αρνητικά φορτισμένα μόρια νουκλεϊκού οξέος μετακινούνται σε πήκτωμα αгарόζης λόγω ηλεκτρικού πεδίου. Μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα προς τον θετικό πόλο, συγκριτικά με μακρύτερα μόρια. Τα μόρια οπτικοποιούνται με φως UV, εφόσον έχει προστεθεί στο πήκτωμα βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το EtBr προσδέεται ενδιάμεσα στις βάσεις του DNA και φθορίζει στη περιοχή του μήκους κύματος του UV. Ωστόσο είναι γνωστό πως το EtBr είναι καρκινογόνο και ο χειρισμός του γίνεται σε απαγωγό με χρήση γαντιών.

Ηλεκτροφορήθηκαν δύο δείγματα του πλασμιδίου (ένα κυκλικό και ένα γραμμικό, μετά από πέψη) σε πήκτωμα αгарόζης, για 60 λεπτά, 80V.

Κάθε πήκτωμα αгарόζης 0.8% προετοιμάστηκε ως εξής: 0.48gr ξηρής αгарόζης, 60ml 1xTAE buffer, 3μl EtBr

Το γραμμικό πλασμίδιο εξήχθη από το πήκτωμα, απομονώθηκε και καθαρίστηκε με το QIaqua kit και αποθηκεύτηκε στους +4 °C.

Αντίδραση ομοιοπολικής σύνδεσης φορέα-ενθέματος

Χρησιμοποιήθηκε ένα βασικό πρωτόκολλο για την κλωνοποίηση του δίκλωνου προϊόντος της PCR αντίδρασης στον πλασμδιακό φορέα pIX 4.0, στο οποίο έγιναν διάφορες τροποποιήσεις με σκοπό την βελτιστοποίηση και την επιτυχή κλωνοποίηση, με λεία άκρα.

- μέγεθος φορέα : 3.140 bp
- μέγεθος ενθέματος : 549 bp

Οι αναλογίες ένθεμα /φορέα που δοκιμάστηκαν είναι 3:1, 5:1 ακόμη και 10:1.

Το ένζυμο, του οποίου η δραστικότητα ομοιοπολικής ένωσης μεταξύ δίκλωνων τμημάτων DNA αξιοποιήθηκε, ήταν η T₄ DNA λιγάση(New England BioLabs).

Η αντίδραση ομοιοπολικής σύνδεσης ,τελικού όγκου 15 μl, αφέθηκε 1h , σε θερμοκρασία δωματίου, και στη συνέχεια αφέθηκε στους +4 °C για 1 ημέρα.

Στη συνέχεια, τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια είναι έτοιμα να εισαχθούν σε βακτηριακά κύτταρα με τη χρήση κάποιας μεθόδου κατάλληλης για συγκεκριμένο τύπο φορέα. Ο μετασχηματισμός της αντίδρασης σύνδεσης δοκιμάστηκε με δύο τρόπους: 1)θερμικό σοκ, και 2) ηλεκτροδιάτρηση.

Μετασχηματισμός των EC100 κυττάρων, με την μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης

50 μl των EC100 (ηλεκτροδεκτικό εμπορικό στέλεχος E.Coli- EPICENTRE BIOTECHNOLOGIES) κυττάρων αναμίχθηκαν με 1μl της κλωνοποίησης. Μετά την ηλεκτροδιάτρηση προστέθηκε 1ml S.O.C. Ακολούθως, 1h shaker, στις 230 rpm, 37 °C.

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με επιλογή στα αντιβιοτικά ζεοσίνη και αμπικιλίνη. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 16-18 ώρες στους 37 °C.

Μετασχηματισμός των DH5a κυττάρων, με την μέθοδο του θερμικού σοκ

50 μl των DH5a κυττάρων (από τους -80 °C) αποψύχθηκαν σε πάγο και αναμίχθηκαν με 10 μl της αντίδρασης σύνδεσης. Στη συνέχεια αφέθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Αμέσως μετά υπέστησαν ένα σύντομο θερμικό σοκ στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα, και 2 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl SOC και τα κύτταρα επωάστηκαν 1h σε shaker στις 230 rpm, στους 37 °C. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με επιλογή στα αντιβιοτικά ζεοσίνη και αμπικιλίνη. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 16-18 ώρες στους 37 °C.

Ταυτόχρονα, έγινε κλωνοποίηση αρνητικού και θετικού ελέγχου. Ο αρνητικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με πέψη του πλασμιδίου pIX4.0 και σύνδεσή του με την T₄ λιγάση, επίστρωση σε τρυβλίο με επιλογή στο αντιβιοτικό ζεοσίνη. Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών , που σημαίνει ότι η επιλογή ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη είναι αποδοτική. Ο θετικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με πέψη του πλασμιδίου pIX4.0 και σύνδεσή του με την T₄ λιγάση, επίστρωση

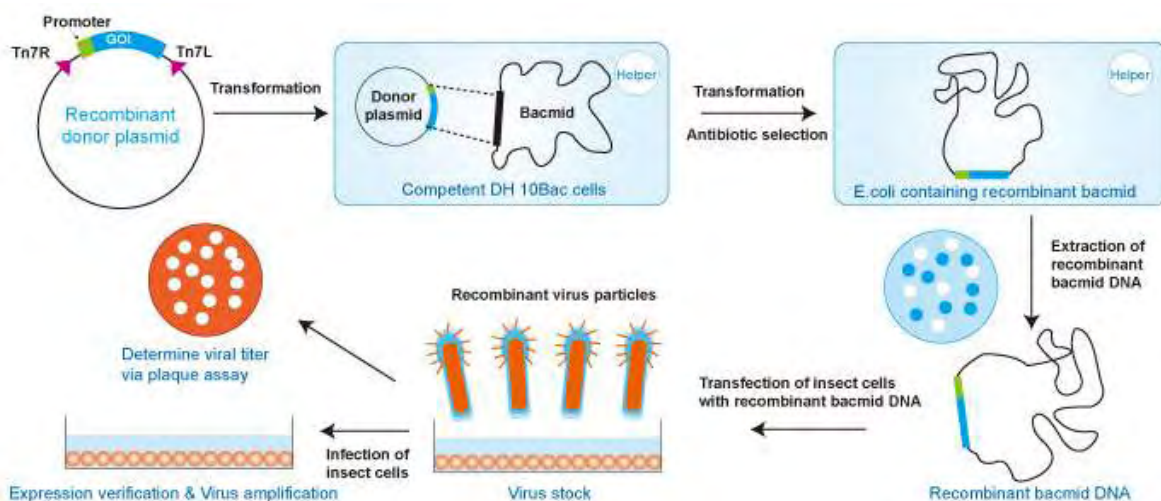
σε τρυβλίο με επιλογή στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη. Παρατηρήθηκαν αποικίες που σημαίνει ότι η T₄ λιγάση είναι δραστική.

Ωστόσο, τα μετασηματισμένα κύτταρα που περιείχαν τα κλωνοποιημένα πλασμίδια δεν αναπτύχθηκαν σε τρυβλία.

3.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ENTOMON ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΟΥΛΟΪΩΝ

Οι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί παρήχθησαν σε κύτταρα εντόμων του είδους *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9, Gibco-BRL, GrandIsland, NY). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια ελαιώρημα (2×10^6 κύτταρα/ml) σε κινούμενο επωαστήριο στους 28 °C, χρησιμοποιώντας ως μέσο το Insect-XPRESS™ (Bio-Whittaker, Lonza, MD).

Οι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί ετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα έκφρασης Bac-to-Bac, της εταιρείας Invitrogen. Τρίτης γενιάς ιοί συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 λεπτά. Στείρος ορός εμβρύου μοσχαριού (fetal bovine serum- FBS) (Gibco) προστέθηκε σε κάθε ιό, σε τελική συγκέντρωση 2,5 %, και εν συνεχεία το μελλοντικό υικό stock φιλτράρεται μέσα από 0.2 μm φίλτρο (Millipore, Billerica, MA) και φυλλάσσεται στους +4°C .



εικόνα 8: επισκόπηση του συστήματος έκφρασης Bac-to-Bac

- δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων δοτών

- μετασχηματισμός των pFastBac φορέων σε DH10Bac κύτταρα
- απομόνωση του ανασυνδυσμένου βακουλομιδιακού DNA
- διαμόλυνση των Sf9 κυττάρων με το ανασυνδυσμένο βακουλομιδιακό DNA

3.3. ΤΟ ΒΑΚΟΥΛΟΪΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Το βακουλοϊκό σύστημα έκφρασης παρέχει μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο για την παραγωγή ανασυνδυσμένων βακουλοϊών. Βασίζεται στην μετάθεση ειδικής θέσης (site-specific transposition) μιας κασσέτας έκφρασης στον shuttle φορέα ενός βαακουλοϊού (βακουλομίδιο) , που πολλαπλασιάζεται σε κύτταρα E.Coli.

Το σύστημα έκφρασης βακουλοϊών έχει χρησιμοποιηθεί από τους ερευνητές για την παραγωγή υψηλών επιπέδων (πάνω από 1000 mg/ml) καταλλήλως μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων (αναδίπλωση, δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, ολιγομερισμός, γλυκοσυλίωση, ακυλίωση, πρωτεολυτική διάσπαση), βιολογικά ενεργών και λειτουργικών ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών.

Το σύστημα αυτό εκμεταλλεύεται τις “θεση-κατευθυνόμενες” μεταθετές ιδιότητες του Tn7 τρανσποζονίου για να απλοποιήσει και να ενισχύσει την διαδικασία παραγωγής βακουλομιδιακού DNA. Η κασσέτα έκφρασης ανοδικά και καθοδικά περιβάλλεται από τις ομόλογες αλληλουχίες του Tn7, και επίσης περιέχει ένα γονίδιο αντοχής στην γκενταμυκίνη και ένα SV40 σήμα πολλαδενυλίωσης για τον σχηματισμό ενός mini Tn7.

Το δεύτερο κυρίαρχο συστατικό είναι το DH10Bac™ στέλεχος της *E. coli* που χρησιμεύει ως ο ξενιστής για την pFastBac™ κατασκευή μας, που περιέχει το γονίδιο που μας αφορά. Τα DH10Bac™ κύτταρα περιέχουν ένα βακουλοϊκό shuttle φορέα (bacmid) με μια a mini-attTn7 θέση στόχο και είναι βοηθητικό πλασμίδιο.

Μόλις το pFastBac™ -εκφράζον πλασμίδιο (πλασμίδιο “δότης”) μετασχηματιστεί στα DH10Bac™ κύτταρα, συμβαίνει μετάθεση μεταξύ του mini-Tn7 στοιχείου στον pFastBac™ φορέα και στην mini-attTn7 θέση-στόχο, που βρίσκεται στο βακουλομίδιο , ώστε να παραχθεί το ανασυνδυσμένο βακουλομίδιο.

Η μετάθεση αυτή λαμβάνει χώρα παρουσία των πρωτεϊνών μετάθεσης που παρέχονται από το βοηθητικό πλασμίδιο.

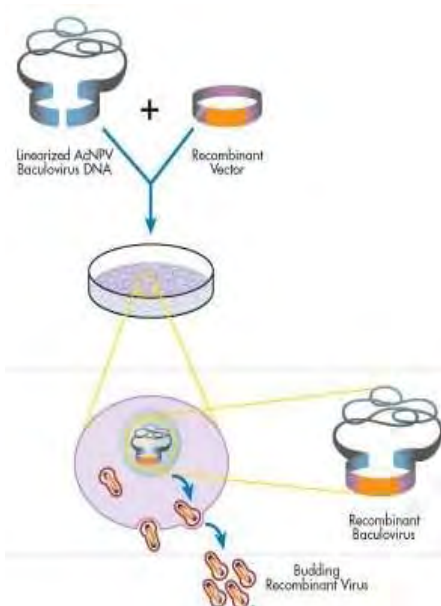
Μόλις διεξαχθεί η αντίδραση της μετάθεσης, θα απομονωθεί το υψηλού μοριακού βάρους

βακουλομιδιακό DNA και θα διαμολυνθούν με αυτό κυτταροκαλλιέργειες εντόμων, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο CellfectinR II για την παραγωγή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προκαταρκτικά πειράματα έκφρασης.

Στην συνέχεια το ικό stock ενισχύεται, και το υψηλού τίτλου stock μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μόλυνση κυττάρων εντόμων, και την υψηλής κλίμακας έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει.

3.3.1. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑ TIMBERMAN

25μl DHC10 κυττάρων (GibroBRL) αναμείχθηκαν αρχικά με 20 μl του CED βακουλομιδίου και ξεχωριστά με 5 μl του CEN βακουλομιδίου (το CEN περιέχει την CMV EGFP NS1 Dual κατασκευή, ενώ το CED την CMV EGFP w Bam HI Dual). Αφού αναμείχθηκαν, τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά και μετά από αυτό υπεβλήθησαν σε θερμικό σοκ για 45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 42°C και μετά τοποθετήθηκαν αμέσως στον πάγο για 2 λεπτά. 450 μl του μέσου S.O.C προστέθηκε σε κάθε δείγμα και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 4 ώρες σε κινούμενο επωαστήρα ,στις 225rpm και στους +37 °C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε LB τρυβλία που περιέχουν τα αντιβιοτικά καναμυκίνη-γκενταμυκίνη, τετρακυκλίνη καθώς και 100μl ,100 mM IPTG και 50 μl, 20 mg/ml Bluo-Gal. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 48 h στους +37C.



Εικόνα 9: παραγωγή ανασυνδυασμένου βακουλομιδιακού DNA

3.3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΒΑΚΟΥΛΟΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Αφού επιβεβαιώθηκαν οι πραγματικά λευκές αποικίες, μετά από 48 ώρες στους 37 °C, οι αποικίες αυτές απομονώθηκαν. 6 αποικίες από τον CED κλώνο και 6 αποικίες από τον CEND επιλέχθηκαν και επιστρώθηκαν εκ νέου σε τρυβλία (restreaked). Παράλληλα, κάθε αποικία εμβολιάστηκε μέσα σε 2ml LB που περιείχε 10μl (συγκέντρωσης 10mg/ml), καναμυκίνη 2μl, (συγκέντρωσης 7mg/ml), γκενταμυκίνη 4μl (συγκέντρωσης 5mg/ml), τετρακυκλίνη. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37° C μέχρι την στατική φάση για 24 ώρες υπό ανάδευση στις 250 rpm. Μετά από την ανάπτυξή τους, 2 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια, που έφερε τα βακουλομίδια, φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κυτταρικά ιζήματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 0.3 ml του διαλύματος I (15 mM Tris-HCl pH 0.8, 10 mM EDTA, 100 μg/ml RNase A). Στη συνέχεια, 0.3 ml διαλύματος II (0.2 N NaOH , 1% SDS) προστέθηκαν και αναδεύτηκαν ελαφρώς και τα εναιωρήματα επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν η όψη του διαλύματος μεταβλήθηκε από θολή σε σχεδόν διάφανη, προστέθηκαν 0.3 ml του διαλύματος III (3M potassium acetate, pH 5.5) , σχηματίστηκε παχύ λευκό ίζημα πρωτεΐνης και γενωμικού DNA της E.Coli και το τελικό εναιώρημα επώαστηκε στον πάγο για 5-10'. Μετά από άλλη μία φυγοκέντρηση (13000 rpm, 10 min RT), το υπερκείμενο αναμείχθηκε ήπια με 800 μl καθαρής ισοπροπανόλης. Οι σωλίνες αναποδογυρίστηκαν πολλές φορές και τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5-10'. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (1 λεπτό max), το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και 0.5 ml 70% αιθανόλης προστέθηκαν σε κάθε σωλήνα. Οι σωλίνες αναδεύτηκαν μερικές φορές για την απομάκρυνση του ιζήματος και μετά φυγοκεντρήθηκαν (1λεπτό max). Σε αποστειρωμένες συνθήκες, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και τα ανασυνδυασμένα βακουλομίδια αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. 40 μl αποστειρωμένου H₂O προστέθηκαν για να διαλυτοποιηθούν τα βακουλομίδια , που τελικά αποθηκεύτηκαν στους -20C.

3.3.3. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ Sf9 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΒΑΚΟΥΛΟΜΙΔΙΑΚΟ DNA

Για κάθε μια από τις κατασκευές, έξι θετικά βακουλομίδια χρησιμοποιήθηκαν για την διαμόλυνση Sf9 κυττάρων. Σε 6-well culture plate, καλλιεργήθηκαν 0.75 x10⁶ κύτταρα/ml σε μέσο χωρίς ορό (serum-free medium) τελικού όγκου 2ml (ESF921;Expression Systems LLC) και αφέθηκαν να

προσκολληθούν για 1 ώρα, στους +27 °C. Για κάθε βακυλομίδιο που συμμετέχει στην διαμόλυνση, προστέθηκαν 6 μl CellFECTIN σε 160 μl μέσου και τα μίγματα αφέθηκαν για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα όμως, 5μl κάθε βακυλομιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε, προστέθηκε σε 100μl μέσου. Μετά από χρόνο επώασης 45', τα μίγματα που περιέχουν CellFECTIN και τα μίγματα που περιέχουν βακυλομιδιακό DNA συνδυάστηκαν και αφέθηκαν για 1 ώρα. 0.8 ml μέσου καλλιέργειας προστέθηκε σε κάθε δείγμα, που περιέχει τα σύμπλοκα λιπιδίου-DNA και μετά αναμίχθηκαν ελαφρώς. Τα κύτταρα ελέγχθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί η προσκόλλησή τους, το μέσο που τα επικαλύπτει αφαιρέθηκε και τα σύμπλοκα λιπιδίου-DNA προστέθηκαν στα κύτταρα. Τα culture plates επώαστηκαν για 4 ώρες στους 27 C. Με το πέρας του χρόνου αυτού της επώασης, 1.5 ml μέσου προστέθηκαν σε κάθε πηγαδάκι. Οι κυτταροκαλλιέργειες συσκευάστηκαν σε ενυδατωμένη σακούλα και διατηρήθηκαν σε επωαστήρα για **72 h στους 27 °C**. Τα δείγματα ελέγχου της διαμόλυνσης αποτελούνταν από το θετικό control, που περιείχε κύτταρα και τον CE ιό(50μl, P3) και το αρνητικό control που περιέχει κύτταρα και την CellFECTIN.

Το αντιδραστήριο CellFECTIN είναι ένα λιπιδιακό εναιώρημα που εγκαθίσταται με τον χρόνο. Τα μόρια των λιπιδίων σχηματίζουν αυθόρμητα μια διπλοστοιβάδα γύρω από τα μόρια του DNA, δημιουργώντας λιποσώματα που στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα. Η επιφάνεια των κυττάρων είναι αρνητικά φορτισμένη, με συνέπεια τα θετικά φορτισμένα λιποσώματα να προσκολλώνται επάνω της. Κατόπιν τα κύτταρα προσλαμβάνουν αυτά τα σύμπλοκα λιπιδίων-DNA και ένας σημαντικός αριθμός από τα εισερχόμενα μόρια DNA καταλήγει στον πυρήνα.

3.3.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ ΤΩΝ ΙΩΝ (P1 VIRAL STOCK)

Μετά από 72 ώρες στους 27 °C (έχει διαπιστωθεί ότι οι -εξερχόμενοι μέσω εκβλάστησης- ιοί απελευθερώνονται στο μέσο 72 ώρες μετά την διαμόλυνση) ήταν δυνατόν να παρακολουθήσουμε μικροσκοπικά τα σημάδια της μόλυνσης αλλά και να σημειώσουμε διαφορές μεταξύ των controls (θετικό control: κύτταρα +CE ιός, αρνητικό control: κύτταρα +cellFECTIN) και των μολυσμένων με τα ανασυνδυασμένα βακυλομίδια κυτταρικά δείγματα. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν 2ml του μέσου που περιείχε ιούς από κάθε πηγαδάκι σε σωληνάκια erpendorf και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό, στις 13.000 στροφές/λεπτό (rpm). Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν σε διαφορετικά σωληνάκια και αποθηκεύτηκαν στους + 4 °C, προστατευμένα από το φως, για την αποφυγή της εξασθένησης της φθορίζουσας πρωτεΐνης EGFP. Τα υπερκείμενα διαλύματα περιέχουν P1 ιούς μαζί με μέσο καλλιέργειας για κύτταρα εντόμων, των CED, CEND, wt, (-), (+).

Το ποσό των κυττάρων που έχουμε στην διάθεσή μας στο στάδιο αυτό μετρήθηκε για να μεταβούμε στο επόμενο στάδιο της παραγωγής των P2 ιών και βρέθηκε ότι είναι 3.7×10^6 κύτταρα/ml.

Σε κάθε φιάλη των 25 cm^3 , πρέπει να περιέχονται 5ml κυττάρων και μέσου, καθώς επίσης και 100 μl P1 ιού, ενώ στο θετικό control μόνο 25 μl (επειδή ο ιός που χρησιμοποιήθηκε στην P1 φάνηκε να έχει ιδιαίτερα μολυσματικές ιδιότητες). Οι P2 ιοί συλλέχθηκαν 48 ώρες μετά την μόλυνση. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του ιού περίπου 100-φορές.

3.4.1. SDS-PAGE

SDS-PAGE είναι μία μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης που χρησιμοποιείται εκτενώς στην πρωτεϊνική χημεία. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, μέσα στο οποίο μεταναστεύουν οι πρωτεΐνες σε απόκριση σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Το πήκτωμα προετοιμάζεται πριν την χρήση με τον πολυμερισμό των μονομερών. Το μέγεθος των πόρων προσαρμόζεται έτσι ώστε να είναι αρκετά μικρό για να καθυστερεί την μετακίνηση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Η SDS-PAGE διαχωρίζει τις πρωτεΐνες ανάλογα με το μέγεθός τους, με τις μικρότερες πρωτεΐνες να μετακινούνται γρηγορότερα, παρέχοντας πληροφορίες για το μοριακό βάρος.

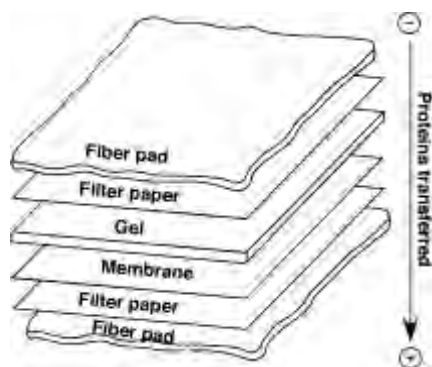
Πριν τρέξουν, τα δείγματα θερμαίνονται σε buffer, που περιέχει SDS και μερκαπτοαιθανόλη(ME). Το SDS είναι αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό, που προσδένεται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ενός μορίου SDS για κάθε δύο αμινοξικά κατάλοιπα, υπερκαλύπτοντας το φυσικό φορτίο της πρωτεΐνης. Η μερκαπτοαιθανόλη διασπάει τις δισουλφιδικές (S-S) διασυνδέσεις και η θέρμανση μαζί με το SDS αποδιατάσσει εντελώς την δομική αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Επομένως, οι πρωτεΐνες αποκτούν παρόμοια δομή και παρόμοια αναλογία φορτίου προς μάζα. Στο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (sample buffer), υπάρχει ένας ανιχνευτής, το μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), με τον οποίο σταματούμε την ηλεκτροφόρηση την κατάλληλη στιγμή. Η γλυκερόλη ή η σουκρόζη στο διάλυμα των δειγμάτων αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων, με συνέπεια την ευκολότερη φόρτωσή τους στα πηγαδάκια.

Οι πρωτεΐνες τρέχουν σε κάθετο πήκτωμα σε buffer ηλεκτροφόρησης. Το πήκτωμα χωρίζεται στο ανώτερο stacking πήκτωμα που έχει χαμηλό ποσοστό(4%), μεγάλους πόρους και χαμηλό pH (6.8) και στο διαχωριστικό πήκτωμα που έχει pH 8.8 και πολύ μικρότερους πόρους. Η πυκνότητα του χαμηλότερου πηκτώματος εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που διαχωρίζονται. Ο σκοπός του ανώτερου πηκτώματος είναι να συγκεντρώσει τα πρωτεϊνικά δείγματα σε ευθεία ζώνη πριν εισέλθουν στο διαχωριστικό πήκτωμα. Η συγκέντρωση επιτυγχάνεται λόγω διαφορών μεταξύ του ανώτερου και χαμηλότερου πηκτώματος και της ιονικής σύνθεσης.

Οι πρωτεΐνες κινούνται μέσα στο πήκτωμα όταν παρέχεται ένα ηλεκτρικό πεδίο. Εάν μια πρωτεΐνη έχει δύο ή περισσότερες πρωτεϊνικές υπομονάδες διαφορετικού μοριακού βάρους, κάθε υπομονάδα θα διαχωριστεί και μια διαφορετική μπάντα θα εμφανιστεί για την κάθε μία. Το μοριακό βάρος μιας άγνωστης πρωτεΐνης καθορίζεται συγκρίνοντας την κινητικότητα του δείγματος με την κινητικότητα γνωστών πρωτεϊνών (πρότυπο μοριακού βάρους), στην ίδια ηλεκτροφόρηση.

3.4.2. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Μετά τον διαχωρισμό, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για τον εντοπισμό των θέσεων των πρωτεϊνών με χρήση ειδικών αντισωμάτων.



Εικόνα 10: Η μέθοδος sandwich που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην μεμβράνη.

Για το μπλοκάρισμα των μη-ειδικών θέσεων σύνδεσης, η μεμβράνη επωάζεται π.χ. με διάλυμα γάλακτος.

Για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών (ειδικά αντιγόνα) κάνουμε χρήση αντισωμάτων και της μεθόδου έμμεσης χρώσης. Η μεμβράνη αρχικά επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα (που παράγεται σε ποντικό). Μετά την επώαση, η μεμβράνη ξεπλένεται για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου αντισώματος. Στη συνέχεια επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα που είναι συζεγμένο με ένα ένζυμο (ALP αλκαλική φωσφατάση), που προσδένεται στο πρωτογενές αντίσωμα. Αφού το δευτερογενές αντίσωμα ξεπλυθεί, τα αντισώματα μπορούν να οπτικοποιηθούν με διάφορες μεθόδους, π.χ. ενζυμική αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης.

3.4.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ Ρ2 ΙΟΥΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ GP64

Για την διερεύνηση της έντασης της ιϊκής μόλυνσης, αναλύσαμε την παραγωγή της gp64 πρωτεΐνης στα Sf9 κύτταρα εντόμων με ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-gp64. Η μέθοδος WB προσφέρει ειδικότητα και ικανότητα αναγνώρισης των εκφραζόμενων ιικών πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν κάνοντας χρήση ειδικών αντισωμάτων, ενάντια σε αυτές τις πρωτεΐνες. Η μακροσκοπική αναγνώριση της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος επιτυγχάνεται με ανοσοενζυμική δοκιμή.

Έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη, ότι μέγιστα -σταθερά επίπεδα της gp64 πρωτεΐνης παράγονται και διατηρούνται μεταξύ 36 και 72 ωρών μετά την διαμόλυνση (Gary W. Blissard & John R. Wenz, 1992).

Τα δείγματα για SDS-PAGE συλλέχθηκαν 72 h μετά την διαμόλυνση, με την αφαίρεση του μέσου, πλύσεις των κυττάρων με 1x phosphate buffer saline (PBS) και την αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη. Από αυτό το κυτταρικό διάλυμα 3ml χρησιμοποιήθηκαν για SDS-PAGE. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με τον ακόλουθο τρόπο. Κύτταρα μολυσμένα με τα CED, CEND βακουλομίδια και τα αγρίου τύπου pFastBacDuals καθώς και από μη μολυσμένα κύτταρα (controls) φυγοκεντρήθηκαν στις 2000rpm, 10', +4°C (Eppendorf centrifuge 5415D; Eppendorf, Hamburg, Germany) και τα ιζήματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1x Laemmli buffer και 5% β-μερκαπτοαιθανόλη [125 mM Tris, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue, pH 6.8] σε μία τελική συγκέντρωση 10.000 κύτταρα/μl. Στη συνέχεια, θερμάνθηκαν για λιγότερο από 10 λεπτά στους 99 °C, πριν την ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε ηλεκτροφορητικό ρυθμιστικό διάλυμα, σε κάθετο (1.5 mm) 5% stacking πήκτωμα και 12% πήκτωμα διαχωρισμού. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης ήταν της Bio Rad Laboratories.

Για την ανοσοαποτύπωση κατά Western, τρέξαμε 10μl του μάρτυρα μοριακού βάρους και 30μl του πρωτεϊνικού διαλύματος, από το κάθε διαμολυσμένο κυτταρικό διάλυμα, στην αντίστοιχη γραμμή (19 min, 100V + 50 min 180V) του πηκτώματος SDS-PAGE, 12% πολυακρυλαμίδη.

Τα πηκτώματα αποτυπώθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, χρησιμοποιώντας την συσκευή του western blot για 1ώρα /100 V. Μετά από αυτό, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρωματίστηκε με ponceau S (χρόνος επώασης 5 λεπτά) και ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό. Ο εμφανής τώρα μάρτυρας σημειώθηκε με ένα μολύβι. Η μεμβράνη επώαστηκε κατά την διάρκεια της νύχτας στους + 4 °C με 5% γάλα σε TBS-Tween. Την επόμενη μέρα, αφού πλύθηκε με TBS-Tween, επώαστηκε

για 1 ώρα με το αντι-grp64 πρωτογενές μονοκλωνικό ανίσωμα ποντικού. Η αναλογία της αραιώσης είναι 1:1000 (3μl αντισώματος σε 3000 μl του διαλύματος 5% γάλα σε TBS-Tween). Εν συνεχεία, τα μη δεσμευμένα ανισώματα απομακρύνθηκαν με πλύσεις 3x5 λεπτά με TBS-0.2% Tween .Το δευτερογενές αντίσωμα ήταν goat-anti-mouse ανοσοσφαιρίνη G_γ συζευγμένη με αλκαλική φωσφατάση, σε αναλογία 1:5000, αραιωμένο σε διάλυμα γάλακτος-TBS-Tween . Η μεμβράνη εξισσοροπήθηκε σε APA buffer για 5 λεπτά, με σκοπό την ανίχνευση της ανοσοενεργού πρωτεΐνης.

3.5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Η ανάλυση ποιοτικών δεδομένων διεξήχθη με πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας και η ανάλυση ποσοτικών δεδομένων διεξήχθη με πειράματα κυτταρομετρίας ροής.

3.5.1. ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Τα HepG2 κύτταρα είναι καρκινικά κύτταρα ήπατος. Καλλιεργήθηκαν στο μέσο EMEM (Eagles Minimum Essential Media), που είναι σύνθετο διάλυμα Earle's, εμπλουτισμένο με αμινοξέα, βιταμίνες και περιέχει 10% FCS (fetal calf serum), 1% L-γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη. Η ατμόσφαιρα ανάπτυξης των κυττάρων είναι υγρή, με 5% CO₂, στους 37 °C.

Τα MDA-MD-435S κύτταρα είναι καρκινικά κύτταρα του μαστού και καλλιεργήθηκαν στο μέσο Leibovitz's L-15 (2 mM L-glut) ενισχυμένο με 10% FCS, 1% πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη και 0.01mg/ml ινσουλίνη, σε απόλυτη απουσία του CO₂.

Η κυτταρική συγκέντρωση και βιωσιμότητα (με την μέθοδο του αποκλεισμού Trypan-blue) καταμετρήθηκε με τα πλακίδια Burker.

Οι συνθήκες εργασίας ήταν απόλυτα ασηπτικές, πάντα σε laminar flow, χρήση 70% αλκοόλης για αποστείρωση των εργαλείων και του χώρου καθώς και χρήση virkon για την αποφυγή υκών επιμολύνσεων.

3.5.2. Μέθοδος φθορισμοενεργοποιούμενης κυτταρομετρίας ροής (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter)

Τα κύτταρα που εκφράζουν EGFP μπορούν να απομονωθούν μαζικά με την βοήθεια ενός

συστήματος φθορισμοενεργοποιούμενης κυτταρομετρίας ροής. Το κυτταρικό εναιώρημα εισέρχεται στο κέντρο μιας στενής δέσμης υγρού, η οποία ρέει με μεγάλη ταχύτητα. Έτσι τα κύτταρα περνούν ,ένα κάθε φορά, μπροστά από μια πηγή λέιζερ που εκπέμπει ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, διεγείροντας την πρωτεΐνη EGFP στα κύτταρα που την εκφράζουν. Στη συνέχεια, τα κύτταρα, διέρχονται από μια κατάλληλη διάταξη, η οποία διακρίνει αυτά που εκφράζουν την φθορίζουσα πρωτεΐνη και τους προσδίδει ένα ασθενές, θετικό ηλεκτροστατικό φορτίο. Ακολούθως περνούν ανάμεσα από δύο φορτισμένες πλάκες, που είναι τοποθετημένες η μία απέναντι από την άλλη και λόγω του θετικού τους φορτίου, όσα κύτταρα εκφράζουν EGFP εκτρέπονται από την αρνητικά φορτισμένη πλάκα, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό τους από τα υπόλοιπα και την συλλογή τους.

Στις περιπτώσεις που κλωνοποιημένο γονίδιο στο γονιδίωμα του βακουλοϊού που διαμολύνει κύτταρα εκφράζεται σε αυτά , χρησιμοποιείται σαν δείκτης για τον εντοπισμό των κυττάρων που εκφράζουν την αντίστοιχη πρωτεΐνη, αφού προηγουμένως χρησιμοποιήσουμε το ειδικό αντίσωμα που την αναγνωρίζει.

3.5.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ eGFP ΚΑΙ NS1-eGFP ΣΕ HEPG2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της μεταγωγής των παραγόμενων ιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής. Η αποτελεσματικότητα της μεταγωγής προσδιορίστηκε για όλους τους ιούς και τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα και οι ποσότητες των ιών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τέτοιες ώστε να προκαλούν όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφη μεταγωγή.

Τα HepG2 κύτταρα "σπάρθηκαν" σε 6-well plates έτσι ώστε να είναι περίπου 500.000 κύτταρα/2ml σε κάθε πηγαδάκι και αναπτύχθηκαν όλη νύχτα σε συμπληρωμένο μέσο, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Για να επιτευχθεί αυτό, μετρήθηκαν τα κύτταρα που είχαμε ανά ml, χρησιμοποιώντας πλακίδιο Burker, και βρέθηκαν ότι είναι 5.05×10^6 κύτταρα/ml. Ταυτόχρονα, υπολογίζεται το ποσό των κυττάρων που χρειάζεται για 24 ml (12 πηγαδάκια, 2 ml κάθε πηγαδάκι). Είναι 6 εκατομμύρια κύτταρα και έτσι πήραμε από το 'stock' 1.2 ml κυττάρων και συμπληρώσαμε με 22.8 ml ηπατοκυτταρικού μέσου. Μετά από 24 ώρες της ανάπτυξης και προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων, αφαιρέθηκε το μέσο, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο PBS και προστέθηκαν τα διαλύματα βακουλοϊών, όπως φαίνεται παρακάτω.

100ml CED2	100ml CED5	Κύτταρα +500ml μέσο
500ml CED2	500ml CED5	

100ml CEND3	100ml CEND5	Κύτταρα +500ml μέσο
500ml CEND3	500ml CEND5	

MOI (multiplicity of infection) = 50. Τα κύτταρα αφέθηκαν βυθισμένα στο διάλυμα των βακουλιοϊών για 4 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Έχει διαπιστωθεί ότι σ'αυτές τις συνθήκες, η μεταγωγή είναι αποτελεσματικότερη. Έπειτα προστέθηκε καινούργιο μέσο και τα culture plates επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37C.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση (0.5% θρυψίνη EDTA (Gibco) σε PBS (Gibco)) 24 ώρες μετά την μεταγωγή. Στην συνέχεια προστέθηκαν 500μl μέσου και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά, στις 3000 rpm, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500 μl φρέσκου μέσου. Ακολούθησε η ίδια φυγοκέντρηση και προστέθηκε 1ml παγωμένου PBS σε κάθε σωληνάκι, φιλτράροντας ταυτόχρονα, για τον καλό διαχωρισμό των κυττάρων και την αποφυγή δημιουργίας θρόμβων για την κυτταρομετρία ροής που ακολουθεί.

3.6. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΑΓΩΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΤΟ NS1

Η αποτελεσματικότητα της NS1 επαγόμενης απόπτωσης μετρήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Αρχικά μετρήθηκε ο κυτταρικός θάνατος, αναλογικά με το ποσό του δείκτη κυτταρικού θανάτου, αννεξίνης V, που προσδέθηκε σε προσβεβλημένα κύτταρα.

Άλλος ένας τρόπος προσδιορισμού του κυτταρικού θανάτου ήταν με την χρήση αντισωμάτων, όπως το αντίσωμα της ιστόνης 2AX και της πολυμεράσης-1, που αποτελούν δείκτες βλάβης του DNA.

3.6.1. Μελέτες σύνδεσης της αννεξίνης V σε προσβεβλημένα από τους ανασυνδιασμένους βακουλιοϊούς HEPG2 και MDA-MD

Ένας τρόπος για την μέτρηση του κυτταρικού θανάτου είναι η ανάλυση πρόσδεσης της αννεξίνης V. Η αννεξίνη V είναι μια κυτταρική πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται σαν δείκτης για τον εντοπισμό των κυττάρων που έχουν φωσφατιδυλοσερίνη στην κυτταρική τους επιφάνεια, ένα χαρακτηριστικό που παρουσιάζεται στην απόπτωση, όπως και σε άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου.

Μετά από 48h από την ιική μεταγωγή των P3 ιών, τα 6-well plates που προορίζονται για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ελέγχθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο.

Τα πηγαδάκια που περιείχαν:

HepG2: ήταν πολύ γεμάτα και φαίνονταν υγιή χωρίς νεκρά κύτταρα στο αρνητικό control. Ωστόσο παρατηρήθηκαν ορισμένα νεκρά από αυτά που είχαν προσβληθεί με τον αγρίου τύπου ιό (WT), ενώ πολύ περισσότερα στο πηγαδάκι με τα κύτταρα που είχαν προσβληθεί με τον ανασυνδυασμένο βακουλοϊό που στην κατασκευή του περιείχε το NS1γονίδιο, ειδικά ο κλώνος CEND5.

MDA-MD: τα πηγαδάκια ήταν γεμάτα κύτταρα, που φαίνονταν επίσης υγιή. Παρατηρήθηκαν ορισμένα νεκρά στο αρνητικό control, στα προσβεβλημένα με WT ιό, CE's, και ίσως ορισμένα περισσότερα με τον CEND βακουλοϊό.

Τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και αποκολλήθηκαν με τρυψίνη. Μετά προστέθηκαν 500μl μέσου και τα κύτταρα μετρήθηκαν. Τα κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση. Για το πείραμα σύνδεσης της αννεξίνης V, 5×10^5 κύτταρα χρειάζονται να επαναδιαλυτοποιηθούν σε 500 μl AnnexinV Binding Buffer και 5 μl AnnexinV-PE, να επωαστούν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (στο σκοτάδι) και αμέσως να αναλυθούν με το κυτταρόμετρο ροής FACSCALIBUR (Becton-Dickinson).

3.6.2. ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Η συνεστιακή μικροσκοπία χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση μονιμοποιημένων ή ζωντανών κυττάρων. Μερικές φορές τα ιολογικά δείγματα είναι δύσκολο να μελετηθούν χρησιμοποιώντας συμβατική μικροσκοπία φθορισμού λόγω του πάχους και του μεγάλου μεγέθους των δειγμάτων. Στην μικροσκοπία φθορισμού, το δείγμα είναι πλήρως πεφωτισμένο (illuminated) από το διεγερμένο φως (excitation light), ώστε ολόκληρο το δείγμα να φθορίζει ταυτόχρονα. Αυτό συνεισφέρει σε θολό background στην εικόνα που προκύπτει.

Η μικροσκοπική τρύπα συνεισφέρει στην απόρριψη του φωτός φθορισμού που δεν προέρχεται από καλή εστίαση, π.χ. φως που προέρχεται από το πάνω και κάτω μέρος του εστιακού πλάνου. Έτσι, η εικόνα έρχεται από ένα πολύ λεπτό τμήμα του δείγματος (μικρό βάθος του πεδίου). Σαρώνοντας πολλές λεπτές περιοχές καθ'όλο το δείγμα, σχηματίζεται μια πολύ καθαρή, τριών διαστάσεων εικόνα του δείγματος.

Χρησιμοποιείται ένα laser, το οποίο παρέχει έντονη διέγερση του φωτός. Το laser σαρώνει το δείγμα μέσω καθρεφτών. Η χρωστική του δείγματος φθορίζει και το εκπεμπόμενο φως gets συσσωρεύεται από τους ίδιους καθρέφτες που χρησιμοποιούνται στην διέγερση. Τελικά, το εκπεμπόμενο φως εστιάζεται στην μικροσκοπική τρύπα, περνά μέσω αυτής και μετράται από έναν ανιχνευτή, π.χ. ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Έτσι κάθε δεδομένη στιγμή, παρατηρείται μόνο ένα σημείο του δείγματος. Ο ανιχνευτής είναι συνδεδεμένος με έναν υπολογιστή, που σχηματίζει την εικόνα, ένα pixel την φορά.

Έτσι, ενώ το συμβατικό μικροσκόπιο “βλέπει” έως εκεί που διεισδύει το φως, το συνεστιακό μικροσκόπιο σχηματίζει εικόνες ενός επιπέδου κάθε φορά.

3.6.3. Ανίχνευση του κυτταρικού θανάτου με τη μέθοδο της συνεστιακής μικροσκοπίας χρησιμοποιώντας τα αντισώματα H2A.X και PARP-1

Χρώση ανοσοφθορισμού μαζί με συνεστιακή μικροσκοπία χρησιμοποιήθηκαν για να παρατηρηθούν η πρόσδεση, η διείσδυση και η είσοδος στον πυρήνα των βακουλοϊών, καθώς και για να παρατηρήσουμε την έκφραση της NS1-eGFP. Επίσης μπορεί έτσι να μελετηθεί και η μορφολογία των προσβεβλημένων και αποπτωτικών κυττάρων αλλά και το ποσό των αποπτωτικών κυττάρων. Επίσης θα είμαστε σε θέση να παρατηρήσουμε εάν η έκφραση της NS1-eGFP εντοπίζεται χωρικά ή χρονικά με δείκτες καταστροφής του DNA καθώς επίσης και για το αν άλλα κυτταρικά συστατικά εμπλέκονται στην απόπτωση.

Ένα από τα πρωτογενή αντισώματα που θα χρησιμοποιήσουμε είναι ενάντια στην ιστόνη 2A.X, ένα από τα μέλη της οικογένειας των ιστονών H2A. Η ιστόνη αυτή υφίσταται εκτενή φωσφορυλίωση σε 1-3 λεπτά από την έναρξη της καταστροφής του DNA και οδηγεί στην δημιουργία εστιών στα σημεία που υπάρχουν σπασίματα.

Το αντίσωμα δημιουργήθηκε ενάντια σε ένα συνθετικό πεπτίδιο αποτελούμενο από τα τελευταία εννιά αμινοξέα της H2AX με φωσφο-Ser-139.

Το δεύτερο πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η πολυ(ADP-ριβόζη) πολυμεράση (Poly (ADP-ribose) Polymerase-1) μια προσδένουσα στο DNA πρωτεΐνη, εξαρτώμενη από ψευδάργυρο, που αναγνωρίζει διπλά σπασίματα στο DNA και πιστεύεται πως παίζει ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA. Ως δείκτης της απόπτωσης, η PARP διασπάται *in vitro* απο πολλές κασπάσες και *in vivo* από την κασπάση 3. Όντας μια πυρηνική πρωτεΐνη 116kDa, η PARP

διασπάται μεταξύ των αμινοξέων Asp214 και Gly215, παράγοντας τμήματα 29kDa και 85kDa.

Σε πειράματα χρώσης ανοσοφθορισμού με συνεστιακή μικροσκοπία, τα προσκολλημένα σε coverslips κύτταρα πλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA σε PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν με 1% PFA με PBS στους +4°C.

Έπειτα τα δείγματα πλύθηκαν δύο φορές με PBS, μία με 0.15% γλυκίνη (w/v) σε PBS για 10 min, και ξανά δύο φορές με PBS (15 λεπτά). Ως πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκε το H2AX, μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, σε αναλογία 1:200 (από τους +4 °C) και το PARP-1, μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού, σε αναλογία 1:300 (από τους -20 °C). Τα πρωτογενή αντισώματα αραιώθηκαν σε διάλυμα Triton-X- PBS (απουσία γλυκίνης) και αφέθηκαν να προσδεθούν στα δείγματα όλη τη νύχτα.

Τα δείγματα πλύθηκαν με Triton-X- PBS για 15 λεπτά, στο σκοτάδι, και στη συνέχεια προστέθηκαν τα δευτερογενή αντισώματα. Το ένα δευτερογενές αντίσωμα είναι αντι-ποντίκι και φθορίζει σε μήκος κύματος 594 και αντιστοιχεί σε κόκκινο ενώ το άλλο είναι αντι-κουνέλι και φθορίζει σε μήκος κύματος 633, που αντιστοιχεί στο βιολετί χρώμα. Και τα δύο δευτερογενή αντισώματα αραιώθηκαν σε αναλογία 1:200 και αφέθηκαν να προσδεθούν στο πρωτογενές αντίσωμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα πλύθηκαν με νερό και ακολούθησε χρώση Hoescht 33258 (1:1000 αραιώση, μπλε χρώμα) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα πλύθηκαν ξανά με νερό και ακολούθησε επικάλυψη των coverslips με Moviol – Dabco 25 mg/mL. Τα δείγματα φυλλάσσονται στους +4°C, οπτικοποιούνται με το συνεστιακό μικροσκόπιο (Olympus, Tokyo, Japan) και αναλύονται με το FV-10ASW software (Olympus, Tokyo, Japan). Οι εικόνες επεξεργάζονται με το λογισμικό ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. PCR

Έπειτα από πολλαπλές δοκιμές Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης, βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι της αντίδρασης και παράχθηκε ενισχυμένο προϊόν (εικόνα 11).

Platinum Pfu πολυμεράση

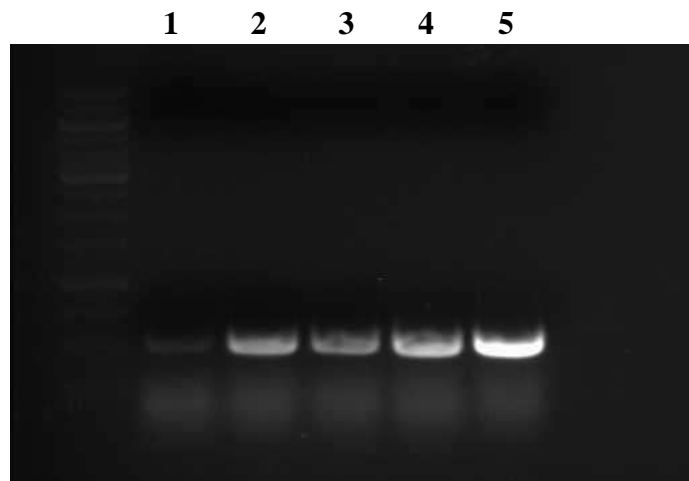
εκκινητές 2μl/αντίδραση

θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C

πρόσδεση εκκινητών :65 °C

συγκέντρωση *MgSO4* : διάφορες διαβαθμίσεις

1	2	3	4	5
2mM MgSO4	3mM MgSO4	4mM MgSO4	5mM MgSO4	2mM MgSO4
Template pVgRXR αραίωση 1:60				PCR προϊόν (γονίδιο ζεοσίνης)



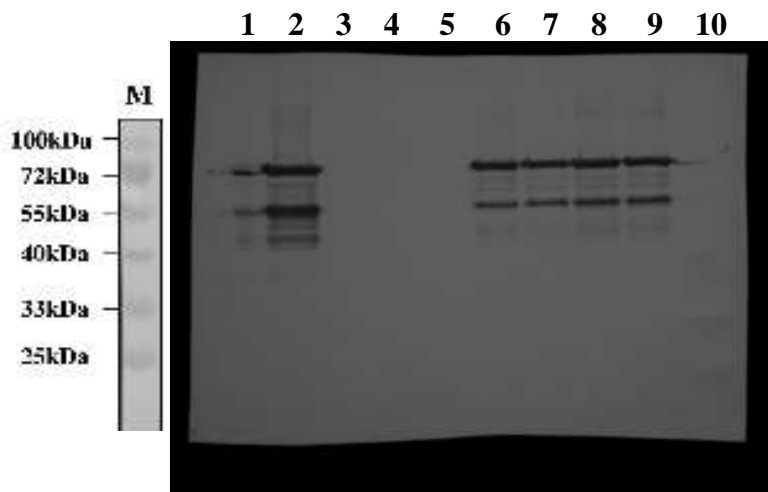
Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης. Το προϊόν της ενίσχυσης μετά από σύγκριση με τον μάρτυρα έχει το αναμενόμενο μήκος, 546bp.

4.2. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΛΕΙΑ ΑΚΡΑ

η κλωνοποίηση με λεία άκρα είναι και 50 φορές πιο αναποτελεσματική από την κλωνοποίηση με κολλώδη άκρα (sticky ends). Έγιναν προσπάθειες για βελτιστοποίηση των παραμέτρων του πρωτοκόλλου της ομοιοπολικής αντίδρασης σύνδεσης με λεία άκρα, χωρίς όμως αποτέλεσμα.

Στη συνέχεια των πειραμάτων, η απενεργοποίηση του γονιδίου θα προσπαθήσουν να επτευχθεί με κάποιο kit ανασυνδυασμού (Red/ET ρεκομπινάση) που θα εισάγει την λειτουργική κασσέτα απευθείας στην θέση-στόχο (target-locus) λόγω των ομόλογων περιοχών.

4.3. SDS-PAGE ΚΑΙ WESTERN BLOT



Εικόνα: Αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot της GP64 πρωτεΐνης που ανταποκρίνεται στη παραγωγή από τους αντίστοιχους ιούς SDS-PAGE molecular weight standards- Low Range /Cat. Number (161-0304) οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στα εξής: 1)Mp Marker 10 μl 2) positive control 3)negative control 4)WT1 5)WT2 6)CED2 7)CED5 8) CEND3 9)CEND5 10)Mp Marker

Στο παραπάνω ανοσοαποτύπωμα παρατηρούμε ότι εμφανίζονται δύο ξεχωριστές μπάντες όταν χρησιμοποιούμε το αντίσωμα έναντι στην gp64, σε non reducing SDS-PAGE, που αντιστοιχούν στις δύο ισομερείς τριμερείς μορφές της πρωτεΐνης (Markovic et. al.,1998) και εμφανίζονται συνήθως στα ανοσοαποτυπώματα με το συγκεκριμένο αντίσωμα. Δεν είναι γνωστό εάν οι δύο αυτές μπάντες, που προφανώς διαφέρουν στο πρότυπο των δισουλφιδικών δεσμών (Oomens et al., 1995), διαφέρουν και κατά κάποιο τρόπο στις λειτουργικές τους ιδιότητες. Ωστόσο, όπως αναμενόταν στο αρνητικό control δεν παρατηρούμε τίποτα. Αξιοπερίεγο είναι πως οι WT ιοί που χρησιμοποιήθηκαν (4 & 5) επίσης δεν εμφανίζουν την ύπαρξη της πρωτεΐνης, σε όσα western blots κι αν κάναμε.

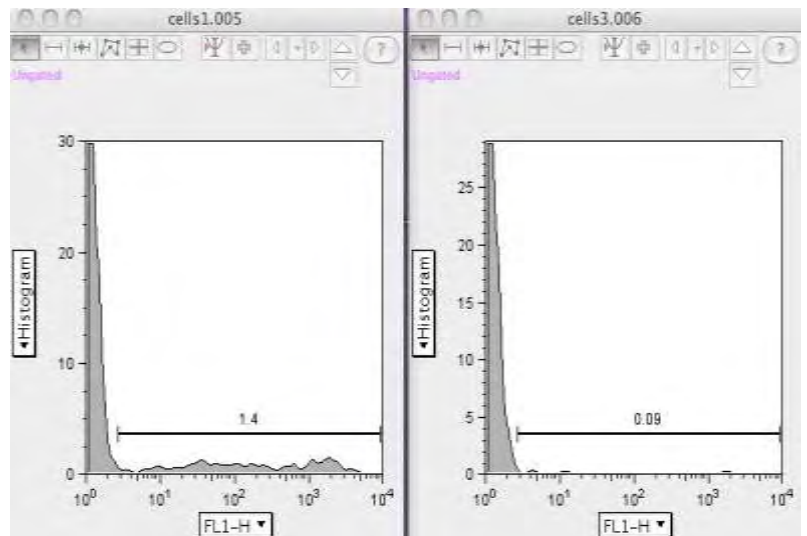
4.4.. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ eGFP ΚΑΙ NS1-eGFP ΣΕ HEPG2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Με την κυτταρομετρία ροής θα μετρήσουμε την ένταση της φθορίζουσας πρωτεΐνης EGFP. Τα HepG2 κύτταρα που μολύνθηκαν με τον ανασυνδυασμένο βακουλοϊό που περιέχει είτε την κατασκευή CED2 είτε την CED5 φθορίζουν εντονότερα (έως και 95%) σε σχέση με εκείνα που μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους βακουλοϊούς που περιέχουν είτε την CEND3 είτε την CEND5.

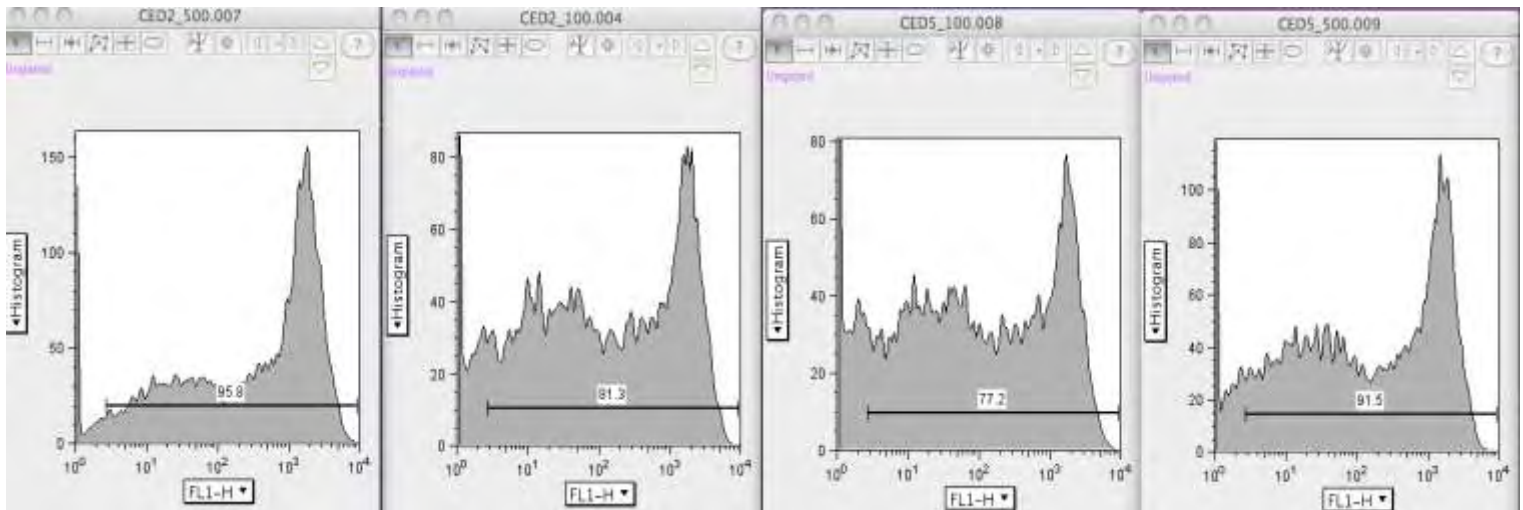
Επίσης παρατηρούμε ότι η μόλυνση με 500μl έναντι 100μl ιού αυξάνει τον φθορισμό περίπου 10%. Η δυνατότητα μεταγωγής του ιού μειώνεται περισσότερο από το μισό όταν εκφράζεται το γονίδιο NS1. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων διεξήχθη με το πακέτο λογισμικού “Flow jo” (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

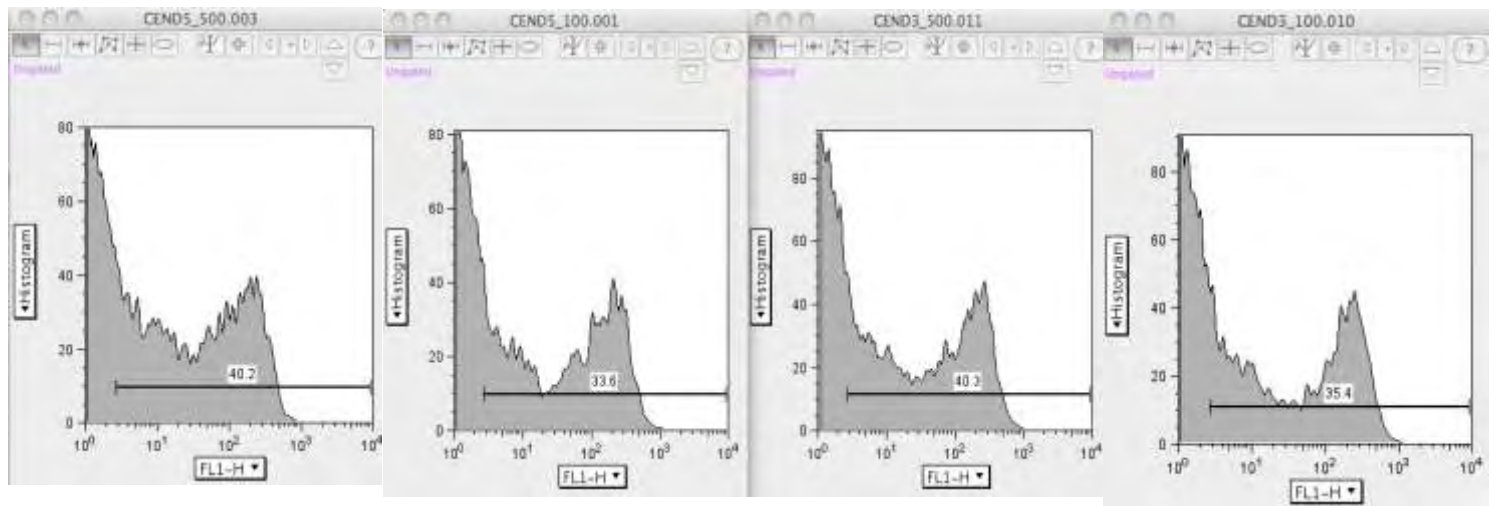
Πίνακας 1

	Cells gated	fluorescent
Cells 1	98.6%	1.4%
Cells 2	98.5%	0.09%
CED2-100	92.5%	81.3%
CED2-500	96.1%	95.8%
CED5-100	95%	77.2%
CED5-500	96.1%	91.5%
CEND3-100	97.7%	35.4%
CEND3-500	96.5%	40.3%
CEND5-100	96.8%	33.6%
CEND5-500	94%	40.2%



Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστά της εκφραζόμενης EGFP στον κυτταρικό πληθυσμό που μελετάται. Η αποτελεσματικότητα της μεταγωγής μετράται με την ανάλυση της έκφρασης της EGFP.



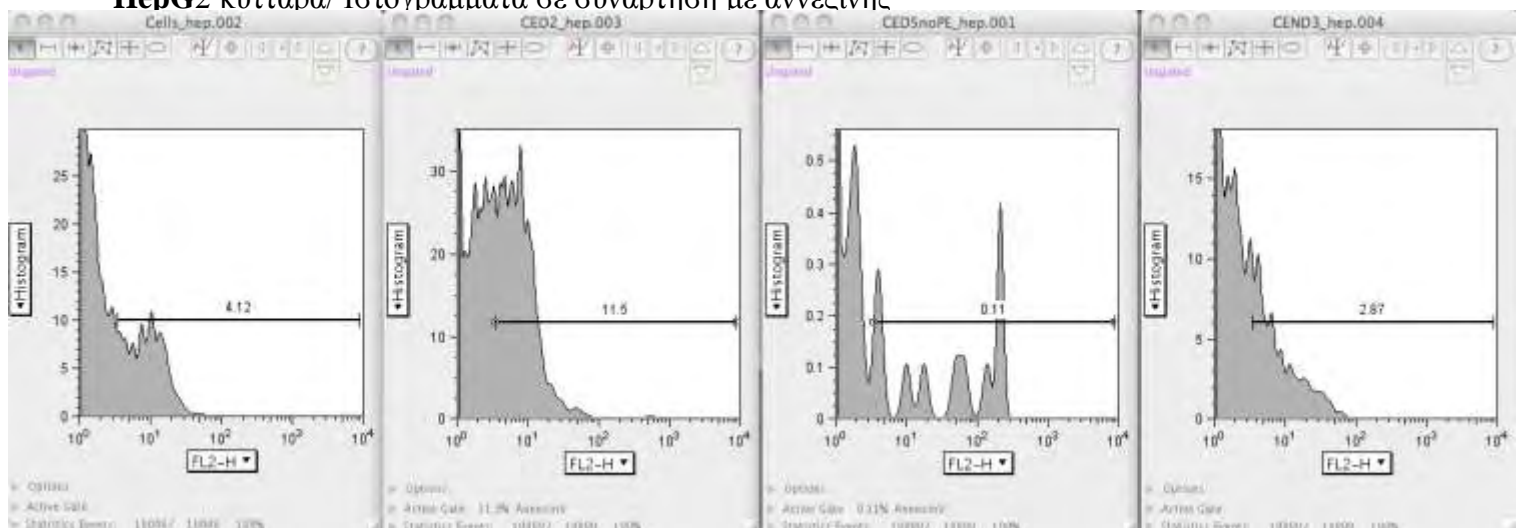


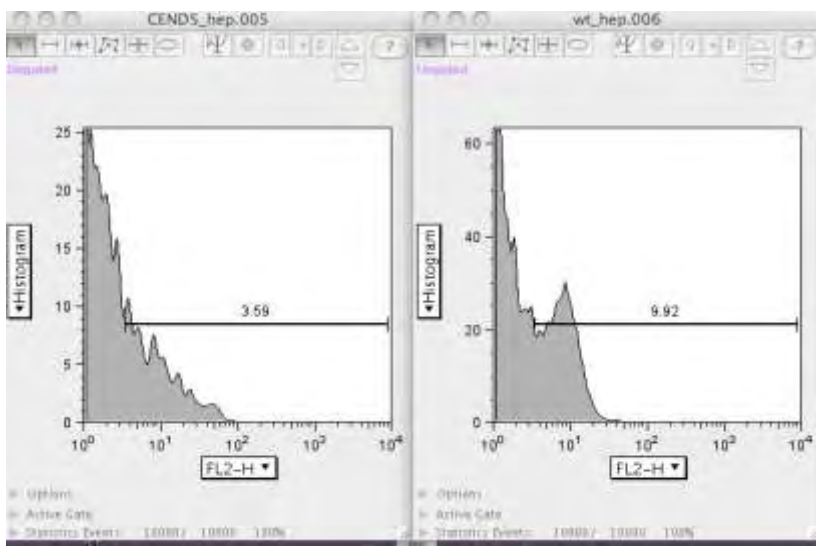
4.5. Πείραμα σύνδεσης αννεξίνης V και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής

Πίνακας 2

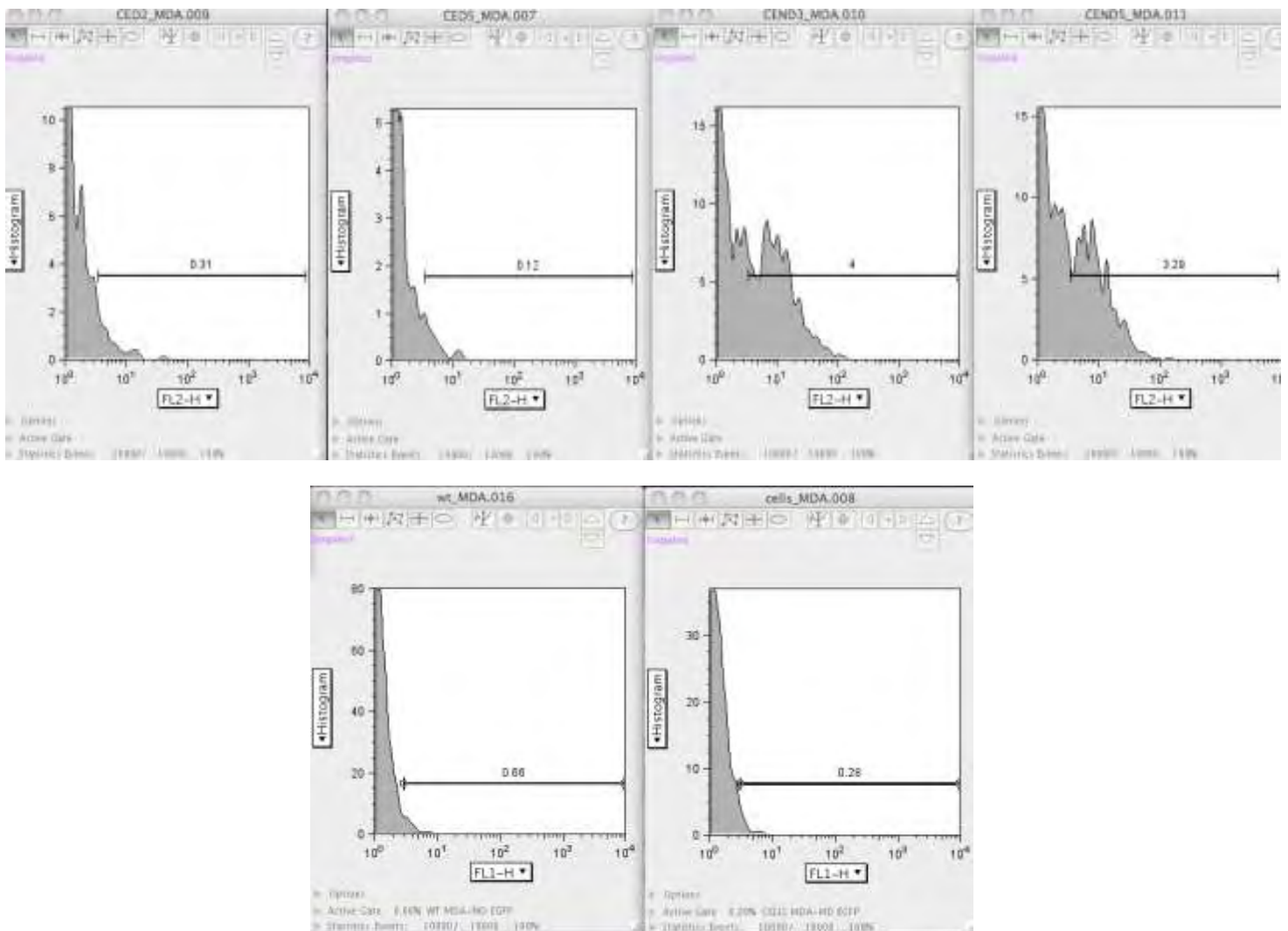
δείγμα	Συχνότητα κυττάρων(%)	Συχνότητα αννεξίνης V	Συχνότητα EGFP (%)
Κύτταρα HepG2	92.9	4.12	0.03
CED2	85.9	11.5	50.6
CED5	85.2	0.11	51.9
CEND3	74.5	2.87	63.7
CEND5	76.2	3.59	62.3
WT	87.6	9.92	0.22
mean	83.7	5.35	38.1
Std. Dev.	7.04	4.4	29.9

HepG2 κύτταρα/ Ιστογράμματα σε συνάρτηση με αννεξίνης





MDA-MD κύτταρα/ ιστογράμματα σε συνάρτηση με αννεξίνη



Όσο αφορά τα MDA-MD κύτταρα που μολύνθηκαν με τους ανασυνδυασμένους βακουλοϊούς CEND3 και CEND5, παρατηρείται κάποια αύξηση στην επαγωγή της απόπτωσης, εφόσον η αννεξίνη είναι 4 και 3.29 αντίστοιχα, σε σχέση με τις άλλες σχεδόν μηδενικές τιμές. Το ποσοστό του φθορισμού δεν είναι αξιοσημείωτο, ωστόσο η διαφορά είναι υπαρκτή.

4.6. Επανάληψη πειράματος σύνδεσης αννεξίνης V

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε ξανά με το πακέτο λογισμικού “Flow jo” (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

Οι πίνακες προέκυψαν από ιστογράμματα που έδωσε η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

Πίνακας 3

δείγμα	Συχνότητα αννεξίνης V	Συχνότητα EGFP (%)
Κύτταρα MDA-MD	0.24	1.32
CED2	0.58	9.99
CED5	0.06	10.58
CEND3	0.85	1.38
CEND5	0.79	1.17
WT	1.11	-

Δεν παρατηρείται ιδιαίτερη μεταγωγή των ιών στα MDA-MD στο συγκεκριμένο πείραμα.

Πίνακας 4

Name	Statistic	#Cells
hepG2-cells.010		10000
annexin V	4,48	448
CELLS	91,93	9193
EGFP	0,12	12
hepG2-ced2.011		10000
annexin V	3,88	388
CELLS	86,51	8651
EGFP	63,54	6354
hepG2-ced5_woPE.012		10000
annexin V	0,30	30
CELLS	85,31	8531
EGFP	70,29	7029
hepG2_wt.013		10000
annexin V	8,39	839
CELLS	82,41	8241
EGFP	0,46	46
hepG2_cend3.014		10000
annexin V	4,22	422
CELLS	83,54	8354
EGFP	18,35	1835
hepG2_cend5.015		10000
annexin V	7,17	717
CELLS	78,62	7862
EGFP	16,44	1644

Τα κύτταρα (αρνητικό control) όπως αναμενόταν δεν φθορίζουν. Επίσης η πρόσδεση της αννεξίνης, που είναι δείκτης της απόπτωσης αυξήθηκε έστω και ελάχιστα στα κύτταρα στα οποία εκφράζεται και δρα το NS1 γονίδιο.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πειράματα σε αρχικά στάδια έχουν δείξει ότι οι βακουλοϊοί που φέρουν το NS1 γονίδιο επάγουν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Τα HepG2 καρκινικά κύτταρα ήπατος επιτρέπουν την είσοδο των βακουλοϊών και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλά πειράματα απόπτωσης. Έχει επίσηςδειχτεί ότι ο βακουλοϊός προσδένεται, διεισδύει και σκοτώνει διαφορετικά τις καρκινικές σειρές. Σε κάποια κύτταρα παρατηρείται αποτελεσματική ιική μεταγωγή ενώ σε άλλα καθόλου. Τα πειράματα κατέδειξαν την “προτίμηση” των ανασυνδυασμένων και μη βακουλοϊών για τα HepG2 κύτταρα και την ελάχιστη μεταγωγή των MDA-MD καρκινικών σειρών. Κυτταρικές σειρές στις οποίες επιτρέπεται η διείσδυση του ιού θα υπέστησαν επίσης απόπτωση.

Για την επίτευξη του σκοπού των πειραμάτων, αναζητείται μια καρκινική σειρά που δεν επιτρέπει την μεταγωγή των Bvs. Έτσι θα ήταν ευκολότερο να παρατηρηθεί διαφορά στις διαδικασίες πρόσδεσης, εισόδου και θανάτου των κυττάρων αυτών. Αν και μέρος του σχεδίου είναι να αφαιρεθεί εντελώς το gp64, ώστε να αποφευχθεί η μη στοχευμένη είσοδος, είναι ευκολότερο να ξεκινήσουν τα πειράματα με βακουλοϊούς στους οποίους δεν έχει αδρανοποιηθεί το gp64. Τα κύτταρα που επιτρέπουν την είσοδο (για παράδειγμα τα HepG2 κύτταρα) θα υπάρχουν ως τα control των πειραμάτων και η παρουσία στοχευτικού πεπτιδίου πάνω στην Ac23 δεν αναμένεται να αλλάξει την ικανότητα διείσδυσης του ιού στα κύτταρα αυτά. Από την άλλη πλευρά, οι gp64-null βακουλοϊοί δεν αναμένεται να εισαχθούν σε οποιοδήποτε άλλο κύτταρο πέρα από εκείνα που εκφράζουν τον υποδοχέα του στοχευτικού πεπτιδίου (οξυτοκίνη).

Ωστόσο υπάρχει ένα πρόβλημα που μπορεί πιθανώς να προκύψει. Η GP64 είναι υπεύθυνη εκτός από την είσοδο στα κύτταρα και για την έξοδο από τα ενδοσώματα. Επομένως προκύπτει το ερώτημα: εάν αφαιρεθεί εντελώς το gp64 γονίδιο, ο βακουλοϊός θα παραμείνει στα ενδοσώματα ; θα μπορούσε η Ac23 να αναλάβει αυτό τον ρόλο; Ή η Ac23 έχει ήδη αποκλίνει τόσο πολύ εξελικτικά ώστε δεν λειτουργεί πλέον σαν πρωτεΐνη διάχυσης. Ή ακόμη κι αν διατηρεί αυτή την λειτουργία, υπάρχει περίπτωση το πεπτίδιο-στόχος να την αλλάξει τόσο ώστε να το παρεμποδίσει; Για την επίλυση όλων των ερωτημάτων, την απόκτηση περαιτέρω γνώσης πάνω στους μηχανισμούς διείσδυσης των βακουλοϊών και τον ειδικό ρόλο της Ac23, δεν μένει παρα να επαναληφθούν και να συνεχιστούν τα πειράματα προς αυτό τον σκοπό. Για την επίλυση αυτού του πιθανού προβλήματος, κάποιοι ερευνητές έχουν σχεδιάσει την ψευδοτύπηση του βακουλοϊού, γεγονός που συνεπάγεται την τοποθέτηση μιας άλλης πρωτεΐνης φακέλου στην θέση της GP64. Η πρωτεΐνη αυτή του φακέλου δεν θα επέτρεπε την είσοδο σε μια ποικιλία κυττάρων, αλλά θα έβγαζε τους βακουλοϊούς από τα ενδοσώματα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Watson, J., Caudy, A., Myers, R., Witkowski, I. Το ανασυνδυσασμένο DNA, Ακαδημαϊκές εκδόσεις
- Αθ. Τσότσος, Ιατρική ιολογία γενική-κλινική-εργαστηριακή, ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
- Heli Matilainen, 2005. Development of Baculovirus/ Display strategies towards targeting to tumor vasculature. Dissertation, University of Jyvaskyla 2005.
- Abe, T., H. Takahashi, H. Hamazaki, N. Miyano-Kurosaki, Y. Matsuura, and H. Takaku. 2003. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J.Immunol.* 171:1133-1139.
- Airene, K.J., M.O. Hiltunen, M.P. Turunen, A.M. Turunen, O.H. Laitinen, M.S. Kulomaa, and S. Yla-Herttuala. 2000. Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* 7:1499-1504.
- Mähönen, K. Makkonen, J. Laakkonen, T. Ihalainen, S. Kukkonen, M. Kaikkonen, M. Vihinen-Ranta. 2009. Culture medium induced vimentin reorganization associates with enhanced baculovirus-mediated gene delivery. *J. Biotechnology* 145: 111-119
- ATCHISON, R.W., B.C. CASTO, and W.M. HAMMON. 1965. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science.* 149:754-756.
- Bangari, D.S., and S.K. Mittal. 2006. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr:Gene Ther.* 6:215-226.
- Bergelson, J.M., J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, and R.W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* 275:1320-1323.
- BIERMAN, H.R., D.M. CRILE, K.S. DOD, K.H. KELLY, N.L. PETRAKIS, L.P. WHITE, and M.B. SHIMKIN. 1953. Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer.* 6:591-605. 51
- Blaese, R.M., K.W. Culver, A.D. Miller, C.S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J.J. Greenblatt, S.A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C.A. Mullen, W.J. Ramsey, L. Muul, R.A. Morgan, and W.F. Anderson. 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* 270:475-480.
- Blissard, G.W. & Rohrmann, G.F.1989. Location, sequence,transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of Orgia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology.* 170, 537-555.
- Blissard, G.W. & Wenz, J.R. 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH- dependent membrane fusion. *J.Virol.* 66, 6829-6835
- Boyce, F.M., and N.L. Bucher. 1996. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:2348-2352.
- P. Cassoni, Anna Sapino, F. Negro, G. Bussolati. 1994. Oxytocin inhibits proliferation pf human breast cancer cell lines. *Virchows Archives* 425: 467-472
- Condreay, J.P., S.M. Witherspoon, W.C. Clay, and T.A. Kost. 1999. Transient and stable gene

expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:127-132.

- Cross, D., and J.K. Burmester. 2006. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin.Med.Res.* 4:218-227. 52
- Donahue, J.M., J.T. Mullen, and K.K. Tanabe. 2002. Viral oncolysis. *Surg.Oncol.Clin.N.Am.* 11:661-680.
- Dong, J.Y., P.D. Fan, and R.A. Frizzell. 1996. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum.Gene Ther.* 7:2101-2112.
- Gary W. Blissard and John R. Wenz 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate ph-dependent membrane fusion . *Journal of Virology Vol 66, No 11*
- Courtney E Garry and Robert F Garry. 2008. Proteomics computational analyses suggest that baculovirus GP64 superfamily proteins are class III penetrenes. *Virology Journal* 5:28
- Goncalves, M.A. 2005. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol.J.* 2:43.
- Hansen, R.M., and J.A. Libnoch. 1978. Remission of chronic lymphocytic leukemia after smallpox vaccination. *Arch.Intern.Med.* 138:1137-1138. 53
- Harvey, B.G., S. Worgall, S. Ely, P.L. Leopold, and R.G. Crystal. 1999. Cellular immune responses of healthy individuals to intradermal administration of an E1-E3- adenovirus gene transfer vector. *Hum.Gene Ther.* 10:2823-2837.
- Hefferon, K.L., Oomens, A.G.,Monsma, S.A.,Finnerty, C.M. & Blissard, G.W. 1999. Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology.* 258, 455-468.
- Hermiston, T.W., and I. Kuhn. 2002. Armed therapeutic viruses: strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes. *Cancer Gene Ther.* 9:1022-1035.
- Hofmann, C., and M. Strauss. 1998. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther.* 5:531-536.
- Hu, Y.C. 2005. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol.Sin.* 26:405-416.
- Kitagawa, Tani, Chang Kwang Limn, Tomoko M. Matsunaga, Kohji Moriishi & Y. Matsuura. 2004. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J. Virol.* 79: 3639-3652
- Kost, T.A., J.P. Condreay, and D.L. Jarvis. 2005a. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* 23:567-575.
- Liu, T.C., and D. Kirn. 2007. Systemic efficacy with oncolytic virus therapeutics: clinical proof-of-concept and future directions. *Cancer Res.* 67:429-432.
- Mangor, J.T., Monsma, S.A., Johnson, M.C. & Blissard, G.W.2001. A GP64-null baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein. *J.Virol.* 75, 2544-2556
- Ingrid Markovic, Helena Pulyaeva, Alexander Sokoloff, Leonid Chernomordik. Membrane Fusion Mediated by Baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein

aggregates.

- Miller, L.K. 1996. Insect viruses . In fundamental virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 401-424
- Monsma, S.A. & Blissard, G.W. 1996. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J. Virol.* 70, 4607-4616
- Oomens, A.G., & Blissard, G.W. 1999. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa Californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology.* 254, 297-314
- Pecora, A.L., N. Rizvi, G.I. Cohen, N.J. Meropol, D. Sterman, J.L. Marshall, S. Goldberg, P. Gross, J.D. O'Neil, W.S. Groene, M.S. Roberts, H. Rabin, M.K. Bamat, and R.M. Lorence. 2002. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J. Clin. Oncol.* 20:2251-2266.
- Rosenberg, S.A. 2001. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature.* 411:380-384.
- Roy, S., P.S. Shirley, A. McClelland, and M. Kaleko. 1998. Circumvention of immunity to the adenovirus major coat protein hexon. *J. Virol.* 72:6875-6879.
- van Loo, N.D., E. Fortunati, E. Ehlert, M. Rabelink, F. Grosveld, and B.J. Scholte. 2001. Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J. Virol.* 75:961-970.
- Volkman, L.E. 1997. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. *Adv. Virus Res.* 48, 313-348
- Widakowich, C., G. de Castro Jr, E. de Azambuja, P. Dinh, and A. Awada. 2007. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *Oncologist.* 12:1443-1455.
- Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski. 1996. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J. Virol.* 70:8098-8108.