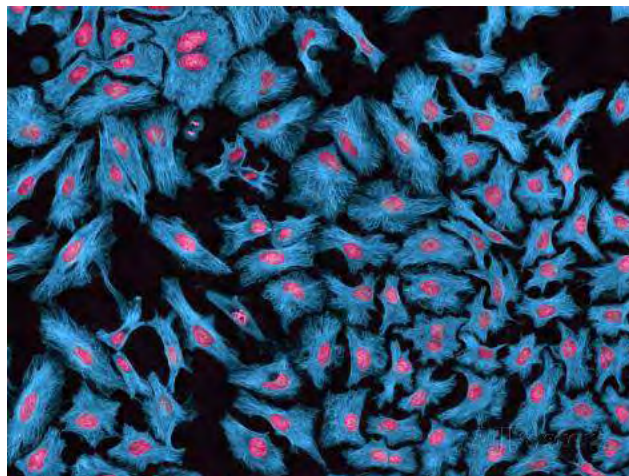


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή διατριβή

Δημιουργία μόνιμα διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς *HeLa* με τροποποιημένη έκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*



Καρακούση Πανδώρα

Δημιουργία μόνιμα διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς *HeLa* με τροποποιημένη έκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*

Creation of stable cell line HeLa with modified expression of
FRA10AC1

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΟΣΧΟΝΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ	Καθηγητής Ιατρικής Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής Σχολής του

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Επικούρου Καθηγήτριας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για τη σωστή ερευνητική της καθοδήγηση και για την άριστη συνεργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και τον Καθηγητή Ιατρικής Μοριακής Γενετικής Μοσχονά Νικόλας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Κώστα Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθειά του και τις χρήσιμες συμβουλές του, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Γιαννούλη Θέμη και Σαρρή Κωνσταντίνα για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε μέσα στο εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα Γαλλιοπούλου Ελένη για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, τις ιδιαίτερα χρήσιμες συμβουλές τους, οι οποίες ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και την υποστήριξή της.

Περίληψη

Η περιοχή FRA10A είναι η πιο συχνή, σπάνια εύθραυστη χρωμοσωματική θέση που συναντάται στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η περιοχή FRA10A χαρτογραφείται στο 10q23.3 και φαίνεται πως η έκφρασή της επάγεται από μια επέκταση μίας πολυμορφικής CGG επανάληψης μέσα στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου FRA10AC1 που φαίνεται να έχει καθολική έκφραση με αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση της περιοχής και τη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου. Το *FRA10AC1* δεν έχει ανιχνεύσιμα παράλογα γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα και είναι πολύ συντηρημένο στους πολυκύτταρους ευκαρυώτες, γεγονός που υποδεικνύει πως η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έχει βασικό βιολογικό ρόλο. Το FRA10AC1 κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας. Η θέση της πρωτεΐνης FRA10AC1 εμπλέκεται σε ένα υποδικτύο του πρωτεϊνικού μηχανισμού συναρμολόγησης πρώιμου mRNA με άμεση αλληλεπίδραση του FRA10AC1 με τη DGCR14 και τη SF3B2, δύο συστατικά του μηχανισμού συναρμολόγησης του πρώιμου mRNA.

Σε αυτήν την εργασία στο πλαίσιο της λειτουργικής μελέτης της πρωτεΐνης FRA10AC1 δημιουργήθηκε μια μόνιμα διαμολυσμένη κυτταρική σειρά *HeLa* με καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1*. Για την καταστολή δημιουργήθηκε ένα διαγονίδιο αποτελούμενο από τον πλασμιδιακό φορέα πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro και shRNA (TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1). Στη συνέχεια, με το διαγονίδιο πραγματοποιήθηκε μόνιμη διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* ώστε να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα τους και να δημιουργηθεί έτσι η μόνιμα διαμολυσμένη κυτταρική σειρά. Ο έλεγχος της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου ελέγχθηκε με τη μέθοδο Western. Οι επιλεγμένοι κυτταρικοί κλώνοι στους οποίους εκφράζεται η γενετική τροποποίηση του γονιδίου *FRA10AC1* θα χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικά πειράματα σε μεταγραφικό, πρωτεομικό και μεταβολικό επίπεδο κατά τη μελέτη λειτουργίας του γονιδίου *FRA10AC1* σε ολόκληρη την κυτταρική φυσιολογία.

Abstract

The FRA10A region is the most common, rare fragile site in the human genome. FRA10A is located in 10q23.3 and its expression is induced by an extension of the polymorphic CGG repeat within the 5'UTR of FRA10AC1 gene, which appears to be universally expressed resulting in the gene's hypermethylation and its transcriptional suppression. FRA10AC1 does not have traceable paralogs in the human genome and is also very conserved in multicellular eukaryotes, which indicates that its protein has a fundamental biological function. FRA10AC1 encodes a nuclear protein with an unknown function. The location of FRA10AC1 protein is involved in an interaction network of the pre-mRNA splicing protein mechanism. Within the network FRA10AC1 interacts directly with DGCR14 and SF3B2, which are components of the pre-mRNA splicing mechanism.

In this study, as part of the FRA10AC1 protein functional study, a stable cell line HeLa with modified expression of FRA10AC1 was created. The suppression was created by a transgene which consisted from a plasmid vector pLKO.1-puro and shRNA (TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1). Using the transgene a HeLa cell line was permanently modified. The suppression was inspected by Western. The FRA10AC1 genetically modified cellular clones will be used in future studies of transcriptomic, proteomic and metabolomic levels of FRA10AC1 gene.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις	10
1.2 Συνήθεις εύθραυστες θέσεις	10
1.3 Σπάνιες εύθραυστες θέσεις	10
1.4 Κλινική σημασία των εύθραυστων θέσεων	11
1.5 Η σπάνια εύθραυστη χρωμοσωματική θέση <i>FRA10A</i>	11
1.6 Το γονίδιο <i>FRA10AC1</i> χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση <i>FRA10A</i>	12
1.7 Η πρωτεΐνη <i>FRA10AC1</i>	14
1.8 Πιθανή λειτουργία της πρωτεΐνης <i>FRA10AC1</i>	14
1.9 Γονιδιακή έκφραση γονιδίων άγνωστης λειτουργίας	15
1.10 Μεταγονιδιακές τροποποιήσεις- έλεγχος της έκφρασης σε πολλαπλά επίπεδα	17
1.11 Σκοπός της εργασίας	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων	20
2.2 Βακτηριακά στελέχη	20
2.3 Πλασμιδιακοί φορείς	21

2.4	Μετασχηματισμός βακτηρίων	23
2.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	24
2.6	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	24
2.7	Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	25
2.8	Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	26
2.9	Κυτταρικές σειρές θηλαστικών	26
2.10	Διατήρηση κυτταροκαλλιιεργειών	26
2.11	Επανακαλλιέργεια	27
2.12	Κρυοδιατήρηση κυττάρων	27
2.13	Μέτρηση κυττάρων για επίστρωση τρυβλίων	28
2.14	Μόνιμη διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με πλασμιδιακό DNA	29
2.15	Συλλογή αποικιών	30
2.16	Συλλογή κυττάρων	31
2.17	Εκτίμηση συγκέντρωσης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bradford	31
2.18	Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό διάλυμα πηκτώματος πολυακρυλαμίδης	32
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
3.1	Απομόνωση και γραμμοποίηση πλασμιδιακού DNA του διαγονιδίου Plko.1-shRNA (<i>FRA10AC1</i>)	37
3.2	Δημιουργία σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς <i>HeLa</i>	37
3.3	Έλεγχος καταστολής του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> με ανάλυση Western	38

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις είναι συγκεκριμένοι κληρονομήσιμοι χρωμοσωμικοί τόποι, οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα μη τυχαίων θραυσμάτων, υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Αποτελούν συγκεκριμένες περιοχές χρωματίνης, οι οποίες αποτυγχάνουν να συμπυκνωθούν κατά τη μίτωση. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 120 εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις στο γονιδίωμα του ανθρώπου. Έχουν διαχωριστεί σε συνήθεις και σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις ανάλογα με την συχνότητα που εμφανίζονται στον πληθυσμό και κάθε κατηγορία υποδιαιρείται περαιτέρω με βάση την ειδική χημική επαγωγή της. Οι σπάνιες εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις έχουν συχνότητα στον πληθυσμό λιγότερο από 5% σε αντίθεση με τις συνήθεις που αποτελούν μέρος της χρωμοσωμικής δομής (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008).

1.2 Συνήθεις εύθραυστες θέσεις

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 90 συνήθεις εύθραυστες θέσεις στο γονιδίωμα του ανθρώπου με μεταβλητή συχνότητα και επίπεδα έκφρασης. Σε καλλιέργειες κυττάρων εκφράζονται όταν οι συνθήκες καλλιέργειας καταστέλλουν την αντιγραφή του DNA. Η κυτταρογενετική έκφραση των θέσεων αυτών είναι ορατή σε ευρείες χρωμοσωμικές περιοχές κλίμακας μεγαβάσεων.. Πολλές συνήθεις θέσεις έχουν ταυτοποιηθεί ως θραύσματα σε *in vivo* χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που σχετίζονται με τον καρκίνο. Φαίνεται πως πρόκειται για περιοχές γενωμικής αστάθειας, που οδηγεί σε απαλοιφές και μεταθέσεις στο DNA και παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων, πλασμιδίων ή ιογενών ενσωματώσεων και ενδοχρωμοσωμικών ενισχύσεων γονιδίων. Χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: σε αυτές που επάγονται από την αφιδοχολίνη, την 5-αζακυτιδίνη και την βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU). Σε μοριακό επίπεδο μέχρι τώρα έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί 13 θέσεις αυτής της κατηγορίας. Έτσι δείχθηκε ότι είναι σχετικά πλούσιες περιοχές σε A-T, χωρίς ωστόσο να εμφανίζουν επαναλαμβανόμενα μοτίβα. Επίσης, χαρακτηρίζονται από ασυνήθιστες

δευτεροταγείς δομές που διαταρράσουν την αντιγραφή του DNA. έχει αποδειχθεί *in vivo* πως επηρεάζεται η αναδίπλωση της χρωματίνης (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008).

1.3 Σπάνιες εύθραυστες θέσεις

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 31 σπάνιες εύθραυστες θέσεις με συχνότητα στον πληθυσμό που ποικίλλει στις διάφορες μελέτες. Υποδιαιρούνται σε αυτές που είναι ή όχι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ. Η πλειονότητα ανήκει στην πρώτη κατηγορία. Σε μοριακό επίπεδο έχουν χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής επτά σπάνιες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ: η *FRAXA* στην χρωμοσωμική περιοχή Χq27.3, η *FRAXE* στην Χq28, η *FRAXF* στην Χq28, η *FRA10A* στην 10q23.3, η *FRA11B* στην 11q23.3, η *FRA16A* στην 16p13.11, και η *FRA12A* στην 12q13.1. Η κοινή μοριακή βάση αυτών των θέσεων είναι η επέκταση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο DNA και κυρίως CGG τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις. Στην πλειοψηφία τους οι παραπάνω επαναλήψεις εντοπίζονται στις 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές (UTRs) των γονιδίων και ακολουθούν το μοτίβο της επέκτασης και υπερμεθυλίωσης που οδηγεί σε αποσιώπηση γονιδίων. Η πιο συχνή σπάνια εύθραυστη θέση αυτών που είναι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ είναι η *FRAXA* που χαρτογραφείται στη ζώνη Χq27.3 και σχετίζεται με το σύνδρομο του εύθραυστου Χ, την πιο κοινή αιτία οικογενούς νοητικής υστέρησης, που επηρεάζει περίπου 1/4000 αρσενικά και 1/6000 θηλυκά άτομα. Στα άτομα που εμφανίζουν αυτήν την εύθραυστη θέση, πραγματοποιείται μεταγραφική καταστολή του γονιδίου *FMR1* που εντοπίζεται σε αυτήν (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008).

1.4 Κλινική σημασία των εύθραυστων θέσεων

Οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις δεν συνδέονται άμεσα με συγκεκριμένες διαταραχές, αν και έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις, διότι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χρωμοσωμικής δομής και εμφανίζονται πολύ συχνά στον πληθυσμό.

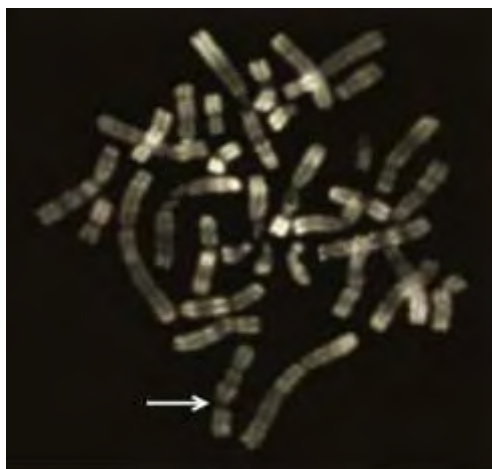
Όσον αφορά στις σπάνιες εύθραυστες θέσεις μόνο δύο ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ έχουν αποδεδειγμένη κλινική σημασία, η *FRAXA* και η *FRAXE*, στο χρωμόσωμα Χ, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με φαινότυπο νοητικής υστέρησης. Ορισμένες από τις υπόλοιπες σπάνιες εύθραυστες θέσεις που εξαρτώνται από φυλλικό οξύ έχουν συσχετιστεί σε ορισμένες μελέτες με παθολογικό φαινότυπο αν και δεν έχει αποδειχθεί για καμμία η άμεση συσχέτιση. Για τις μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ σπάνιες εύθραυστες θέσεις δεν έχουν δείχθει φαινοτυπικές συνέπειες. Μάλιστα έχουν ταυτοποιηθεί ομοζυγώτες για τρεις τέτοιες αυτοσωμικές θέσεις, τις *FRA10B*, *FRA16B* και *FRA17A* τα οποία δεν παρουσιάζουν κανένα παθολογικό φαινότυπο, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι τρεις εύθραυστες θέσεις δεν έχουν καμία κλινική σημασία. Επιπρόσθετα, οι φορείς της *FRA8E* που έχουν καταγραφεί έως σήμερα

ήταν υγιή άτομα, παρόλο που η αντίστοιχη γονιδιωματική περιοχή εμπλέκεται σε διάφορες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που σχετίζονται με το σύνδρομο Langer-Giedion (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008).

1.5 Η σπάνια εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A*

Η *FRA10A* είναι η σπάνια εύθραυστη θέση που, μεταξύ των αυτοσωματικών, συναντάται πιο συχνά στο ανθρώπινο γονιδίωμα, σε περίπου 1 στα 500 άτομα, χωρίς ωστόσο να έχουν ταυτοποιηθεί παθολογικοί φαινότυποι που να σχετίζονται με αξιοπιστία με την έκφρασή της. Η *FRA10A* χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 (εικόνα 1) και δείχθηκε πως η έκφρασή της επάγεται από την επέκταση μίας πολυμορφικής επανάληψης CGG η οποία εντοπίζεται στην 5'UTR του γονιδίου *FRA10AC1*. Η κυτταρογενετική έκφραση της *FRA10A* οδηγεί σε χρωμοσωμική θραύση περίπου στα 2/3 των κυττάρων της καλλιέργειας. Η χαρτογράφηση με FISH δείχνει πως ο *FRA10A* τύπος χαρτογραφείται σε μία περιοχή περίπου 50kb, με μία μοναδική (CGG)₈ επανάληψη να έχει ταυτοποιηθεί στο κεντρικό τμήμα αυτής της περιοχής (Sarafidou et. al. 2004)

Μέχρι τώρα, η εμφάνιση της θέσης *FRA10A* δεν έχει συσχετιστεί με συγκεκριμένο παθολογικό φαινότυπο. Ωστόσο, έχουν γίνει διάφορες μελέτες που δείχνουν ότι η έκφραση της θέσης *FRA10A* μπορεί να σχετίζεται με νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες. Ο συσχετισμός προέκυψε ύστερα από μελέτες όπου ελέγχθηκε η παρουσία εύθραυστων θέσεων στον καρυότυπο ατόμων με νοητική υστέρηση, υγιή ατόμων και τυχαίων ατόμων στον πληθυσμό (Sutherland 1982 και 1985, Sarafidou et.al. 2004). Επίσης σε ορισμένες μελέτες ανιχνεύθηκε η θέση *FRA10A* σε υγιή άτομα-φορείς, γεγονός που υποδεικνύει πως η ετεροζυγωτία της θέσης δεν συνδέεται με παθολογικό φαινότυπο (Sarafidou et.al. 2004).



Εικόνα 1: Κυτταρογενετικός εντοπισμός της σπάνιας εύθραυστης θέσης FRA10A. Φαίνεται η ζώνωση R των μεταφασικών χρωμοσωμάτων και η *FRA10A* ως ένα σαφές χάσμα (βέλος) στη χρωμοσωμική θέση 10q23.3 (Sarafidou et. al. 2004)

1.6 Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στην εύθραυστη θέση *FRA10A*

Στο πλαίσιο του προσδιορισμού της μοριακής βάσης της εύθραυστης θέσης *FRA10A*, εντοπίστηκε και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *FRA10AC1* βάση της χρωμοσωματικής του θέσης και του εντοπισμού της πολυμορφικής επανάληψης (CGG)_n στην 5' αμετάφραστη περιοχή του.

Η ενίσχυση με PCR των επαναλήψεων CGG στην περιοχή 5' UTR του *FRA10AC1* αποκάλυψε πως οι επαναλήψεις αυτές είναι πολυμορφικές στο γενικό πληθυσμό και άρα έχουν τη δυνατότητα επέκτασης. Συγκεκριμένα έχουν ταυτοποιηθεί 4 αλληλόμορφα με αριθμό επαναλήψεων 8, 9, 10 και 14. Ωστόσο, η κυτταρογενετική έκφραση της εύθραυστης θέσης προϋποθέτει δραματική επέκταση των παραπάνω επαναλήψεων κατά τουλάχιστον 200 φορές. Επίσης δείχθηκε ότι αυτή η επέκταση οδηγεί σε υπερμεθυλίωση της περιοχής. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας γονιδιωματικό DNA από φορείς της *FRA10A* και από άτομα ελέγχου το οποίο υπέστη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *HpaII* που είναι ευαίσθητο στην μεθυλίωση και *MspI* που δεν παρουσιάζει ευαισθησία. Ακολούθησε πέψη, PCR, Southern blot και υβριδοποίηση με ανιχνευτές GCC/GGC. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι οι επαναλήψεις CGG που έχουν επεκταθεί είναι υπερμεθυλιωμένες. Τα άτομα ελέγχου έδειξαν την παρουσία ενός μόνο φυσιολογικού αλληλομόρφου.

Με αντίστροφη μεταγραφή συζευγμένη με PCR (RT-PCR) ταυτοποιήθηκε το πλήρες μήκος cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* το οποίο έχει μέγεθος 1344bp και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 315 αμινοξέων. Το γονίδιο περιλαμβάνει 19 εξώνια, 4 εκ των οποίων υφίστανται εναλλακτική συναρμογή. Το γονίδιο εκτείνεται σε μια περιοχή περίπου 33kb και ο προσανατολισμός της μεταγραφής είναι από το τελομερές προς το κεντρομερές. Όλα τα όρια των ιντρονίων ακολουθούν τον κανόνα AG/GT. Οι επαναλήψεις (CGG)_n εντοπίζονται στο εξώνιο 1 στην 5' μη μεταφραζόμενη. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG εντοπίζεται στο εξώνιο 2 (Sarafidou et. al. 2004).

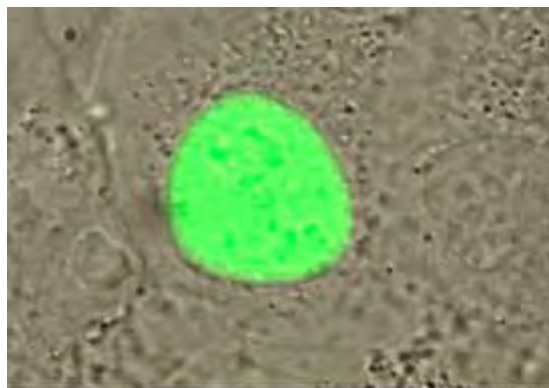
Η ανάλυση Northern έδειξε την παρουσία ενός μοναδικού μεταγράφου περίπου 1450bp το οποίο εντοπίστηκε σε όλους τους ιστούς δείχνοντας καθολική έκφραση του γονιδίου. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου εντοπίστηκαν στον εγκέφαλο, στην καρδιά, σε σκελετικούς μύες, στο συκώτι και στους νεφρούς ενώ χαμηλή έκφραση παρατηρήθηκε στο κόλον, στον θύμο αδένα, στον σπλήνα, στο

λεπτό έντερο, στον πλακούντα και στον πνεύμονα. Ωστόσο, με RT-PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδοποιούνται στα εξόνια 11 και 19 εντοπίστηκαν εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία, λόγω μεγέθους ή προτύπου έκφρασης δεν ταυτοποιήθηκαν με την ανάλυση Northern. Με το πείραμα αυτό και σε συνδυασμό με την αλληλούχηση βρέθηκαν πέντε εναλλακτικά μετάγραφα. Ένα από αυτά εντοπίστηκε σχεδόν σε όλους τους ιστούς και περιλαμβάνει τα εξόνια 13-16. Όλα αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα αντιστοιχούν σε διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων στο καρβοξυτελικό-άκρο.

Το *FRA10AC1* δεν έχει παράλογα γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα και είναι πολύ συντηρημένο στους πολυκύτταρους ευκαρυώτες, γεγονός που υποδεικνύει πως η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έχει πιθανώς βασικό βιολογικό ρόλο (Sarafidou et. al. 2004).

1.7 Η πρωτεΐνη FRA10AC1

Η πρωτεΐνη FRA10AC1 αποτελείται από 315 αμινοξέα και εντοπίζεται στον πυρήνα. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της προσδιορίστηκε σε κύτταρα COS-7 διαμολυσμένα με πλασμίδιο που εκφράζει την χιμαιρική πρωτεΐνη EGFP-FRA10AC1 (Εικ. 2). Επιπλέον, η ανάλυση έδειξε ότι σε περίπου 10% των διαμολυσμένων κυττάρων η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη παρουσιάζει ένα στικτό μοτίβο.



Εικόνα 2: Υποκυτταρικός εντοπισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης EGFP- FRA10AC1 με μικροσκοπία φθορισμού (T.Sarafidou et.al. 2004).

Η διερεύνηση της συντήρησης της FRA10AC1, που έγινε με έλεγχο βάσεων δεδομένων, έδειξε ότι η πρωτεΐνη του ανθρώπου παρουσιάζει 86% ταυτότητα και 92% ομολογία με την πρωτεΐνη του ποντικού. Επίσης οι δύο πρωτεΐνες έχουν το ίδιο μήκος και εντοπίζονται σε συνταινικές περιοχές. Η ανάλυση έδειξε επίσης μια πληθώρα ορθόλογων τόσο σε ζωικά όσο και σε φυτικά είδη. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν πως ένα κοινό προγονικό γονίδιο υπήρξε πριν το διαχωρισμό των

φυτών και των ζώων. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης παρουσιάζει ποσοστό ομοιότητας 45-67% σε όλα τα ορθόλογα που εξετάστηκαν, δείχνοντας έτσι μία υψηλά συντηρημένη περιοχή με πιθανώς σημαντική δράση (T.Sarafidou et.al. 2004).

1.8 Πιθανή λειτουργία της πρωτεΐνης FRA10AC1

Ο προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, η αναγνώριση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων και η χωροχρονική δυναμική τους είναι κρίσιμα για να γίνει κατανοητή η λειτουργία μιας πρωτεΐνης και των αντίστοιχων βιολογικών μονοπατιών που συμμετέχει. Ο προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών έχει ακόμα μεγαλύτερη σημασία όταν δεν υπάρχουν ενδείξεις για τη λειτουργία κάποιας πρωτεΐνης ή όταν η πρωτεΐνη δεν περιλαμβάνει κάποιο χαρακτηριστικό μοτίβο γνωστής λειτουργίας ή όταν δεν υπάρχουν πληροφορίες για το βιολογικό ρόλο κανενός από τα ορθόλογα μόρια.

Για να εξετασθεί η βιολογική λειτουργία της FRA10AC1, πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* και *in vivo* δοκιμών συμπληρωματικότητας τα αποτελέσματα των οποίων υποστηρίζουν την άμεση αλληλεπίδραση του FRA10AC1 με τη DGCR14 και τη SF3B2, δύο συστατικά του μηχανισμού ματίσματος του πρώιμου mRNA. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η FRA10AC1 πιθανώς εμπλέκεται στο μάτισμα του πρώιμου mRNA ή σε κάποιο άλλο συγγενικό μηχανισμό επεξεργασίας του RNA. Επιπλέον το δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών της FRA10AC1, κατασκευάστηκε από βιβλιογραφικά δεδομένα για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στον άνθρωπο σε συνδυασμό με δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ορθόλογων ζευγών πρωτεϊνών σε οργανισμούς μοντέλα. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η θέση της FRA10AC1 σε ένα υποδικτύο του πρωτεϊνικού μηχανισμού ματίσματος πρώιμου mRNA και μπορεί να ρίξει φως στο πως η FRA10AC1 μπορεί να συμμετέχει στην επεξεργασία του mRNA (Sarafidou).

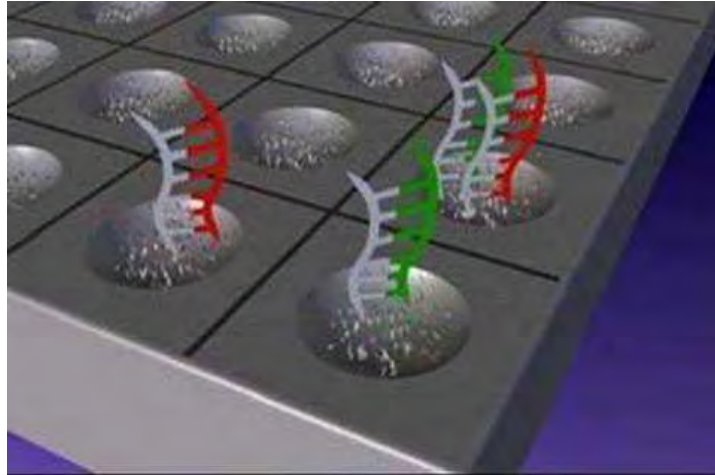
1.9 Γονιδιακή έκφραση γονιδίων άγνωστης λειτουργίας

Ένας από τους πιο άμεσους τρόπους για την ανακάλυψη και την λειτουργία ενός γονιδίου, είναι η παρατήρηση λειτουργιών ή του φαινοτύπου ενός οργανισμού, όταν αυτό το γονίδιο απουσιάζει. Είναι γνωστό ότι οι μεταλλάξεις μπορούν να διακόψουν φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες και εξαιτίας αυτού οι μεταλλάξεις αποτελούν το κλειδί στην κατανόηση της γονιδιακής λειτουργίας. Σήμερα, έχοντας διαθέσιμες υπεράριθμες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες σε δημόσιες βάσεις δεδομένων και προσθέτοντας κ άλλες μέρα με την ημέρα, η εξερεύνηση της λειτουργίας ενός γονιδίου μπορεί να ξεκινήσει με μία αλληλουχία. Όμως σε αυτήν την προσέγγιση η πρόκληση είναι η μετάφραση της αλληλουχίας σε λειτουργία. Για

να αντιμετωπιστεί άμεσα το πρόβλημα του πώς ένα γονίδιο λειτουργεί σε ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό η πιο αποτελεσματική προσέγγιση εμπλέκει την μελέτη μεταλλάξεων, οι οποίες προκαλούν είτε έλλειψη του γονιδίου είτε την έκφραση μιας τροποποιημένης εκδοχής του. Κάθε προσέγγιση για τον καθορισμό της λειτουργίας ενός γονιδίου, είτε ξεκινά από μία νουκλεοτιδική αλληλουχία είτε από τον ιδιαίτερο φαινότυπο του οργανισμού (THE CELL, Bruce Alberts 2007).

Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις με τις οποίες γίνεται η μελέτη των ανθρώπινων γονιδίων. Η πρώτη, η οποία βασίζεται στο γεγονός, ότι τα γονίδια και οι λειτουργίες τους έχουν διατηρηθεί τόσο πολύ κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, περιλαμβάνει την μελέτη λιγότερο πολύπλοκων οργανισμών και αποκαλύπτει κρίσιμες πληροφορίες σχετικά με παρόμοια γονίδια και διαδικασίες στους ανθρώπους. Πολλές μεταλλάξεις που δεν είναι θανατηφόρες, έχουν προκύψει τυχαία στον ανθρώπινο πληθυσμό. Η δεύτερη προσέγγιση περιλαμβάνει αναλύσεις φαινοτύπων των προσβεβλημένων ατόμων, συμπληρωματικά με μελέτες των κυτταροκαλλιεργειών τους, οι οποίες παρέχουν πολλές μοναδικές γνώσεις για σημαντικές ανθρώπινες κυτταρικές λειτουργίες (THE CELL, Bruce Alberts 2007).

Υπάρχουν διάφορες πειραματικές τεχνικές σήμερα ώστε να προσπαθήσει κάποιος να βρει τη λειτουργία ενός γονιδίου. Στην πρώτη προσέγγιση όπου μελετώνται οργανισμοί μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές όπως: σημειακές μεταλλάξεις ή έλεγχος συμπληρωματικότητας δύο μεταλλάξεων ώστε να βρεθεί εάν βρίσκονται στο ίδιο ή σε διαφορετικό γονίδιο οι οποίες πραγματοποιούνται κυρίως σε οργανισμούς μοντέλα που αναπαράγονται εύκολα και είναι επιδεκτικά σε γενετικό χειρισμό. Υπάρχουν όμως και άλλες πειραματικές προσεγγίσεις που το αρχικό δείγμα προέρχεται από άνθρωπο, παρατηρείται σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων και ο έλεγχος των αποτελεσμάτων γίνεται μόνο σε οργανισμούς μοντέλα. Επιπρόσθετα, τα γονίδια αναφοράς αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της τοποιστοειδικής και χρονοειδικής έκφρασης ενός γονιδίου. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι το υπό μελέτη γονίδιο μπορεί να αντικατασταθεί με ένα γονίδιο αναφοράς το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί είτε μέσω φθορισμού στο εσωτερικό του υπό μελέτη οργανισμού είτε μέσω ενζυμικής δραστηριότητας στο πρωτεϊνικό προϊόν του. Την επανάσταση όμως στην κατηγορία αυτή έφερε η ανακάλυψη της μεθόδου των μικροσυστοιχιών κατά την οποία μπορεί να ελεγχθεί η έκφραση πολλών γονιδίων ταυτόχρονα. Οι πλάκα των μικροσυστοιχιών είναι εμποτισμένη με έναν μεγάλο αριθμό θραυσμάτων DNA, που το καθένα περιέχει μια νουκλεοτιδική αλληλουχία που χρησιμεύει ως ανιχνευτής για ένα ειδικό γονίδιο (Εικ. 3). Η ακριβής αλληλουχία και αλλά και η θέση των ανιχνευτών είναι γνωστή ώστε αν γίνει υβριδοποίηση να ταυτοποιηθεί αμέσως το ειδικό γονίδιο που ψάχνουμε (THE CELL, Bruce Alberts 2007).



Εικόνα 3: Τα πειραματικά δείγματα (κόκκινο) αναμιγνύονται με ένα δείγμα αναφοράς θραυσμάτων cDNA επισημασμένο με διαφορετικό χρώμα φθορίζουσα χρωστική (πράσινη)

1.10 Μεταγονιδιακές τροποποιήσεις-έλεγχος της έκφρασης σε πολλαπλά επίπεδα

Επιπρόσθετα, με την συνεργασία μεθόδων όπως της στοχευμένης μετάλλαξης, του ανασυνδιασμένου DNA και της αντίστροφης γενετικής μπορεί να πραγματοποιηθεί η αναγνώριση της γονιδιακής λειτουργίας ξεκινώντας με βάση το γονίδιο. Οι τροποποιήσεις στο συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να είναι γενετική τροποποίηση που οδηγεί σε υπερέκφραση του γονιδιακού προϊόντος, γενετική τροποποίηση που οδηγεί στην αποσιώπηση του γονιδίου ή τροποποίηση που οδηγεί στην έκφραση σε λανθασμένο ιστό ή χρόνο. Η μέθοδος του RNAi είναι μια αποτελεσματική προσέγγιση για την καταστολή ενός γονιδίου.

Τα γενετικά τροποποιημένα γονίδια εισάγονται μέσω φορέων κλωνοποίησης σε κύτταρα ώστε να παρατηρηθεί η ανάπτυξή τους. Πρόκειται για μια μόνιμη διαμόλυνση των κυττάρων αυτών αφού για την κατανόηση του ρόλου και της λειτουργίας του υπό μελέτη γονιδίου σε ολόκληρη την κυτταρική φυσιολογία πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα σε τρία βασικά επίπεδα. Πρόκειται για ολοκληρωμένα πειράματα μεταγραφικών, πρωτεϊνικών και μεταβολικών αναλύσεων των μόνιμα γενετικά τροποποιημένων γενετικά κυτταρικών σειρών.

Στη συνέχεια, αφού ελεγχθούν οι διαφορές στα τρία επίπεδα που περιγράφηκαν παραπάνω θα πρέπει να πραγματοποιηθεί φαινοτυπικός έλεγχος σε ζωντανούς οργανισμούς. Έτσι ίσως επιτευχθεί η σύνδεση φαινοτύπου-γονοτύπου για το υπό μελέτη γονίδιο. Στην περίπτωση μελέτης ανθρωπίνων γονιδίων συνήθως χρησιμοποιούνται ποντικοί για τη μελέτη λόγω της μεγάλης ομοιότητας του γονιδιώματος του με αυτό του ανθρώπου (THE CELL, Bruce Alberts 2007).

Οι μεταγονιδιακές τροποποιήσεις είναι απαραίτητες ώστε να διαμορφώσει κάποιος μια σφαιρική άποψη για την ακριβή λειτουργία ενός γονιδίου μέσα σε ένα κύτταρο και κατά επέκταση σε ολόκληρο τον οργανισμό. Συμπερασματικά και για το γονίδιο *FRA10AC1* θα πραγματοποιηθούν πειράματα ελέγχου της έκφρασής του και σε μεταγονιδιακό επίπεδο. Οι αναλύσεις θα διεξαχθούν τόσο για την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου όσο και για την υπερέκφραση του γονιδίου με προσδοκία να αποκρυπτογραφηθεί η ακριβής λειτουργία του γονιδίου σε ολόκληρη την κυτταρική φυσιολογία.

1.11 Σκοπός της εργασίας

Η εργασία εντάσσεται στην ευρύτερη προσπάθεια λειτουργικής ανάλυσης της πρωτεΐνης *FRA10AC1* του ανθρώπου. Το γονίδιο *FRA10AC1* από το οποίο κωδικοποιείται η αντίστοιχη πρωτεΐνη χαρτογραφείται στο στην εύθραυστη χρωμοσωμική περιοχή *FRA10A* στην περιοχή 10q23.3.. Η περιοχή αυτή έχει συσχετιστεί με φαινότυπο νοητικής υστέρησης ακόμη και σε άτομα φορείς. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η *FRA10AC1* αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του σωματίου ματίσματος.

Ειδικότερα, η εργασία στοχεύει στη δημιουργία μιας μόνιμα διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς *HeLa* με τροποποιημένη έκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*. Πρόκειται δηλαδή για καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* σε κύτταρα *HeLa* με την εισαγωγή ενός διαγονιδίου. Το διαγονίδιο αποτελείται από τον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro και shRNA TRCN0000159265. Το shRNA στοχεύει στην κωδική περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1* (CDS) με μέσο ποσοστό καταστολής της έκφρασής του, 95%.

Στη συνέχεια, η μόνιμα διαμολυσμένη αυτή κυτταρική σειρά *HeLa* θα χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω μελέτη λειτουργίας του γονιδίου *FRA10AC1* σε ολόκληρη την κυτταρική φυσιολογία μέσω πειραμάτων σε μεταμεταγραφικό, πρωτεομικό και μεταβολικό επίπεδο. Τέλος, θα πραγματοποιηθεί η φαινοτυπική ανάλυση σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων ώστε να δημιουργηθεί ίσως μια σύνδεση γονοτύπου με παθολογικό φαινότυπο.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

ΥΛΙΚΑ

2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων

Η καλλιέργεια βακτηρίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απομονώσουμε μεγάλη ποσότητα ενός πλασμιδίου ή μετά τον μετασχηματισμό τους κατά την κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς. Όστε να επιλέξουμε τα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί.

Όλα τα υλικά έγιναν με δις-απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκαν σε κλίβανο ατμού. Σε κάθε περίπτωση προστίθενται μετά από την αποστείρωση το κατάλληλο αντιβιοτικό.

LB (Luria Bertani): Υγρό μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων.

Η σύσταση του είναι:

- 10 gr ανά λίτρο casein-tryptone
- 5 gr ανά λίτρο εκχύλισμα ζύμης
- 10 gr NaCl ανά λίτρο.

Το pH ρυθμίζεται στο 7-7,5 με διάλυμα NaOH.

Για να παρασκευαστεί στερεό θρεπτικό μέσο πρέπει να προστεθούν στα παραπάνω συστατικά 15 gr άγαρ (LB agar)/λίτρο. Το μίγμα αποστειρώνεται και τοποθετείται σε τρυβλία Petri όπου στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου (LB agar Cat. No 01-385, Sharlau Microbiology, LB υγρό Cat. No 02-384, Sharlau Microbiology).

Διάλυμα αντιβιοτικού: το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αμπικιλίνη. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml από αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 100 mg/ml.

2.2 Βακτηριακά στελέχη

DH5a: βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό κατά την κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς. Παρέχει δυνατότητα επιλογής των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων λόγω της μεταλλαγής στο γονίδιο *LacZ* που παρεμποδίζει την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Έτσι, τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια αποκαθιστούν στα μετασχηματισμένα βακτήρια την ενεργότητα του ενζύμου αφού παράγουν το α-πολυπεπτίδιο, καταβολίζεται το χημικό υπόστρωμα (X-gal) και εμφανίζονται με ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Αντίθετα στα μετασχηματισμένα βακτήρια που έχουν δεχθεί τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, το γονίδιο της β-γαλακτισιδάσης διακόπτεται και δεν μπορεί να μεταφραστεί σε β-γαλακτοσιδάση. Το αποτέλεσμα είναι ότι αυτές οι βακτηριακές αποικίες είναι λευκές, παρουσία X-gal (αδρανές χρωμογόνο υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση) (Miller J.H. 1972).

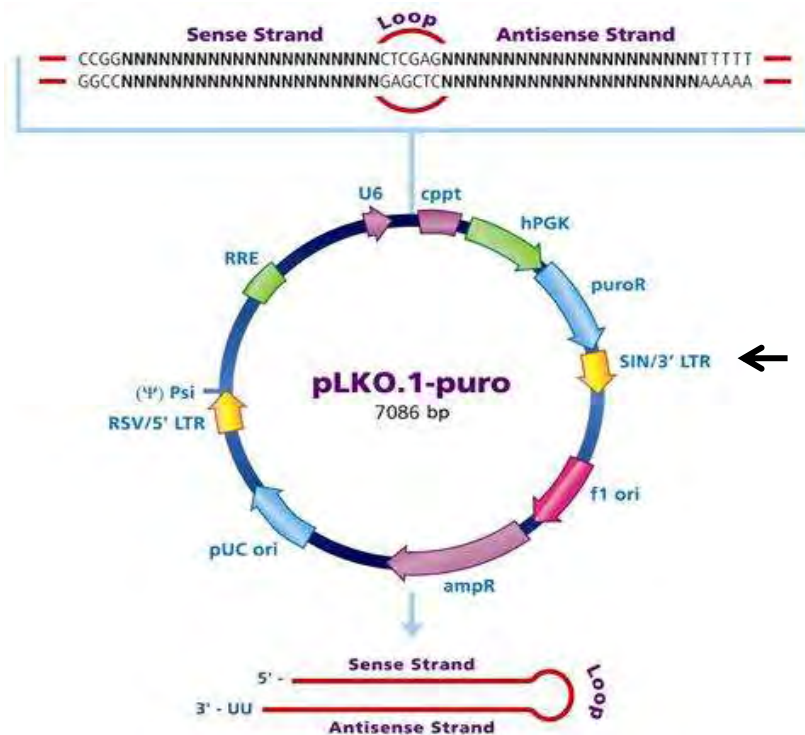
2.3 Πλασμιδιακοί φορείς

Τα βακτήρια διαθέτουν πλασμίδια, τα οποία έχουν τις κατάλληλες ιδιότητες για να λειτουργούν ως φορείς για την κλωνοποίηση τμημάτων εξωγενούς DNA σε αυτά. Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά μόρια DNA, μήκους μόλις λίγων χιλιάδων ζευγών βάσεων. Σε κάθε βακτηριακό κύτταρο μπορεί να υπάρχουν από ένα έως αρκετές εκατοντάδες πλασμίδια και αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του βακτηρίου-ξενιστή. Το γεγονός ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά βρίσκονται στα πλασμίδια και όχι στο χρωμοσωμικό DNA δεν είναι τυχαίο. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά προϋποθέτει σχετικά μεγάλες ποσότητες ενζύμων που τα καταστρέφουν. Επειδή όμως τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα βρίσκονται σε πλασμίδια, υπάρχουν σε πολύ περισσότερα αντίγραφα από ότι αν βρισκόταν στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Τα πλασμίδια, λόγω του μικρού τους μεγέθους και της παρουσίας σε αυτά γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, είναι ιδανικοί φορείς κλωνοποίησης. Επιπλέον, για όλα τα πλασμίδια είναι εύκολο να επιτευχθεί η απομόνωσή τους από τα βακτήρια (Watson et. al. 2007).

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pLKO.1-puro της εταιρίας Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>) μεγέθους 7086 (bp). Το shRNA που χρησιμοποιήθηκε και στοχεύει στην κωδική περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1* είναι το shRNA TRCN0000159265 μεγέθους 59 (bp) με την εξής αλληλουχία:

CCGGGAGACTTGCTAAGAAATACTACTCGAGTAGTATTTCTTAGCAAGTCTCTTTTTTG.

(Εικόνα 3).



Εικόνα 3: ο πλασμιδιακός φορέας pLKO.1-puro. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμικιλίνη και πουρομυκίνη (Amp και Puro) για την επιλογή του πλασμιδιακού φορέα σε βακτηριακά κύτταρα και σε ευκαρυωτικά κύτταρα αντίστοιχα. Επίσης, απεικονίζεται το σημείο όπου είναι ενσωματωμένη η αλληλουχία του shRNA που στοχεύει στο *FRA10AC1*.

Η πλασμιδιακή κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος είναι το πλασμίδιο pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control (SHCOO2, 7086bp) το οποίο φέρει αλληλουχία που δεν στοχεύει σε κανένα γνωστό γονίδιο κανενός είδους αλλά ενεργοποιεί το μηχανισμό του siRNA (Εικ. 4).



Εικόνα 4: Πλασμιδιακός φορέας pLKO.1-puro, ο οποίος φέρει αλληλουχία που δεν στοχεύει σε κανένα γνωστό γονίδιο για τα θηλαστικά.

ΜΕΘΟΔΟΙ

2.4 Μετασχηματισμός Βακτηρίων

Μετασχηματισμός είναι ο μηχανισμός κατά τον οποίον ένα βακτήριο δέχεται τμήματα ελεύθερου DNA προερχόμενα από άλλη πηγή (πλασμίδια). Λίγα βακτήρια είναι ικανά πρόσληψης εξωγενούς DNA *in vivo*, είναι δηλαδή επιδεκτικά κύτταρα (competent cells). Τα περισσότερα είδη βακτηρίων έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνουν και να ενσωματώνουν “ξένο” DNA από το θρεπτικό τους υλικό, το οποίο όμως αποδομείται στην προσπάθεια ενσωμάτωσής του στο βακτηριακό γονιδίωμα. Οι περισσότερες μέθοδοι βακτηριακού μετασχηματισμού βασίζονται στις παρατηρήσεις του Mendel και της Higa (1970), οι οποίοι έδειξαν ότι τα βακτήρια που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με παγωμένα διαλύματα CaCl_2 και στη συνέχεια θερμάνθηκαν για λίγο μπορούσαν να διαμολυνθούν ευκολότερα με το DNA του βακτηριοφάγου λ (Sambrook, 1989). Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια από τον Cohen, ο οποίος παρατήρησε πως η ικανότητα κυττάρων *E.coli* να προσλαμβάνουν πλασμιδιακό DNA βελτιώνεται με τα ιόντα Ca^{++} (Cohen et al, 1972). Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων επιτυγχάνεται με την προσωρινή αλλαγή της θερμοκρασίας (θερμικό σοκ) από του 37°C στους 42°C (Sambrook, et. al. 1989).

Στην παρούσα εργασία μετασχηματίστηκαν δεκτικά βακτήρια *E.coli* του στελέχους DH5a. Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Μεταφορά ενός δείγματος δεκτικών κυττάρων από τους -80°C σε πάγο.
- Επώαση για 10 min ώσπου να πραγματοποιηθεί η τήξη του δείγματος.
- Προσθήκη 10 ng πλασμιδιακού DNA και ήπια ανάδευση.
- Επώαση σε πάγο για 20 λεπτά, κατά την οποία το DNA έρχεται σε επαφή με τα βακτήρια.
- Τοποθέτηση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 42°C για 1 min και 30 δευτερόλεπτα και άμεση μεταφορά στον πάγο όπου παραμένει για 2 min με αποτέλεσμα τα βακτήρια να υφίσταται θερμικό σοκ.
- Προσθήκη 1ml υγρού LB με πολύ ήπια ανάδευση.
- Επώαση για 1h στους 37°C για την έκφραση του γονιδίου ανθεκτικότητας του πλασμιδίου.
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου για την επαναιώρηση της πελλέτας των κυττάρων.
- Επίστρωση των κυττάρων σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri το οποίο περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση ολονύχτια στους 37°C για την ανάπτυξη των μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.

2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί σε διαμόλυνση των κυττάρων *HeLa*, χρησιμοποιήθηκε το QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (cat. no. 12162) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας.

2.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους δεδομένου πως είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σε πήκτωμα, το DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, μετατοπίζεται προς την άνοδο όπου βρίσκεται ο θετικός πόλος. Ο ρυθμός μετατόπισης του DNA καθορίζεται από τις εξής παραμέτρους:

1. Από το μέγεθός του
2. Την διαμόρφωσή του (υπερελικωμένο, γραμμικό)
3. Την συγκέντρωση της αγαρόζης
4. Την τάση που εφαρμόζεται
5. Την σύσταση και την ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης.
6. Τη θερμοκρασία

Για την ανίχνευση του DNA χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθύδιο, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και να καθιστά το DNA ορατό υπό υπεριώδη ακτινοβολία (Sambrook, et. al. 1989).

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από φύκη. Τα πηκτώματα αγαρόζης δημιουργούνται σε καλούπια με τήξη της αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα (1xTAE) μέχρι να δημιουργηθεί ένα διαυγές, διαφανές διάλυμα. Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν πόρους, που το μέγεθος τους εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης.

Το διάλυμα της αγαρόζης ζεσταίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού ώστε να λιώσει η αγαρόζη και στη συνέχεια προστίθεται το βρωμιούχο αιθύδιο σε συγκέντρωση 0,1 µg/ml. Ύστερα, το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει επίσης ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Η διάρκεια και η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 1-2h και 100V αντίστοιχα.

Για το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν:

- Αγαρόζη (συγκέντρωσης 1% για ηλεκτροφόρηση DNA).
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE από πυκνό διάλυμα 50x [200mM Tris hydroxymethyl aminomethane 200mM CH₃COOH, 1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) pH 8.0]

2.7 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η κλωνοποίηση του DNA επιτυγχάνεται με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση ειδικών ενζύμων που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή ενζυμα περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά απομονώθηκαν από πρωκαρυωτικούς οργανισμούς και ο φυσιολογικός ρόλος είναι να προστατεύουν τους μικροοργανισμούς από την εισαγωγή ξένου DNA.

Τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ ζευγών βάσεων (bp). Μια συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης μεγέθους 4 bp συναντάται κατά μέσο όρο κάθε 256 bp. Έτσι, ένα ένζυμο που κόβει μια αλληλουχία τεσσάρων βάσεων παράγει πολύ περισσότερα και πολύ μικρότερα τμήματα DNA από ό,τι ένα ένζυμο που κόβει μια αλληλουχία 8 bp (Watson, 2007).

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο KpnI (Cat. No R0142S, New England Biolabs) για την πέψη του shRNA, με στόχο αυτό να γίνει γραμμικό. Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις κατάλληλες συνθήκες για το ένζυμο. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο είναι:

5'...GGTACC...3'

3'...CCATGG...5'

Το σημείο κοπής είναι στην 3' μακριά τερματική επανάληψη (LTR) στη θέση 1189 (εικόνα 3, μαύρο βέλος).

2.8 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για την απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης, τα αντίστοιχα τμήματα απομονώθηκαν με τη χρήση μια καθαρής λεπίδας υπό υπεριώδες φώς. Το DNA απομονώθηκε με το NucleonSpin Gel & PCR clean-up σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Macherey-Nagel (Cat.No 740609.250).

Καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών *HeLa*

2.9 Κυτταρικές σειρές θηλαστικών

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά *HeLa* η οποία προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου από αδenoκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας. Η κυτταρική σειρά καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με εμβρυικό ορό βοειδούς (10% FBS) και αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη (1% streptomycin-penicillin) για αποφυγή μολύνσεων από μικροοργανισμούς. Τα κύτταρα *HeLa* αναπτύσσονται σε κατάλληλη θερμοκρασία (37°C) και κατάλληλα επίπεδα CO₂ (5%) σχηματίζοντας μονοστοιβάδες.

2.10 Διατήρηση κυτταροκαλλιιεργειών

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε φλάσκες (T-75 ή T-25). Τα κύτταρα, όταν καλλιεργούνται σε στερεό υπόστρωμα και συλλέγονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή όταν η ανάπτυξή τους δεν παρεμποδίζεται από την έλλειψη χώρου. Όταν παρατηρείται έλλειψη χώρου, αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων και τροποποιούνται οι μεταβολικές τους διαδικασίες. Επομένως, η ανακαλλιέργειά τους θα πρέπει να πραγματοποιείται σε τακτά χρονικά διαστήματα (3-4 μέρες), έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμό κυττάρων για τα πειράματα αλλά και η ομαλή τους ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, για την αποκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η θρυψίνη που αποτελεί παγκρεατικό ένζυμο (διαλυμένο σε EDTA που είναι χηλικό αντιδραστήριο). Η αποκόλληση γίνεται ως εξής:

- i. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό
- ii. Προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Invitrogen-Life Technologies, 10270-106)
- iii. Προστίθενται θρυψίνη (GIBCO, Cat. no 15400-054) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xPBS σε κατάλληλη αραιώση 1:10
- iv. Προστίθενται θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένου με FBS το οποίο αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης. Η προσθήκη πραγματοποιείται μόλις γίνει η αποκόλληση όλων των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας (3-4 min).

2.11 Επανακαλλιέργεια

Κατά τη διαδικασία της επανακαλλιέργειας, κύτταρα που έχουν ψυχθεί και είναι παγωμένα ακόμη και για μεγάλο χρονικό διάστημα σε δεξαμενή υγρού αζώτου και πρόκειται να επανακαλλιεργηθούν μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Ακολουθεί ήπια ανάδευση μέχρι την πλήρη τήξη του θρεπτικού υλικού. Η διαδικασία γίνεται όσο το δυνατόν ταχύτερα και υπό άσηπτες συνθήκες για δύο λόγους. Ο ένας είναι προκειμένου τα κύτταρα να μην εκτεθούν στο κρυοπροστατευτικό μέσο (Dimethyl sulphoxide (DMSO), SIGMA, Cat. No D2650), το οποίο μπορεί να δράσει τοξικά. Ο δεύτερος είναι για να αποφευχθεί ο σχηματισμός ενδοκυτταρικών κρυστάλλων κατά τη διαδικασία της ενσωμάτωσής τους. Ακολουθεί μεταφορά στη φιάλη καλλιέργειας στην οποία έχει ήδη προστεθεί DMEM (με 10% FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη).

2.12 Κρυοδιατήρηση κυττάρων

Κατά τη διαδικασία της κρυοδιατήρησης των κυττάρων πραγματοποιείται η σταδιακή μετάβαση των κυττάρων στην τελική θερμοκρασία κατάψυξης, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους. Η κατάψυξή τους γίνεται με την εξής διαδικασία:

- i. Διαδοχικές πλύσεις με 1x PBS.
- ii. Θρυψινοποίηση των κυττάρων.
- iii. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1000rpm για 7 min.
- iv. Επαναδιάλυση της πελλέτας των κυττάρων, αρχικά σε μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM
- v. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 20% DMSO (σε DMEM με 10% FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) σταγόνα-σταγόνα με συνεχή ανάδευση έτσι ώστε να αποφευχθεί το οσμωτικό σοκ και να ελαχιστοποιηθεί η αύξηση της θερμοκρασίας που προκαλείται από την διάλυση του DMSO.

- vi. Μεταφορά του τελικού δείγματος σε κατάλληλα φιαλίδια (cryovial) τα οποία για μόνωση τυλίγονται σε χαρτί κρατώντας τα όρθια. Επώαση των κυττάρων παροδικά στους -20°C και μετά στους -80°C .
- vii. Αποθήκευση των δειγμάτων σε δεξαμενή υγρού αζώτου (-196°C ως -156°C).

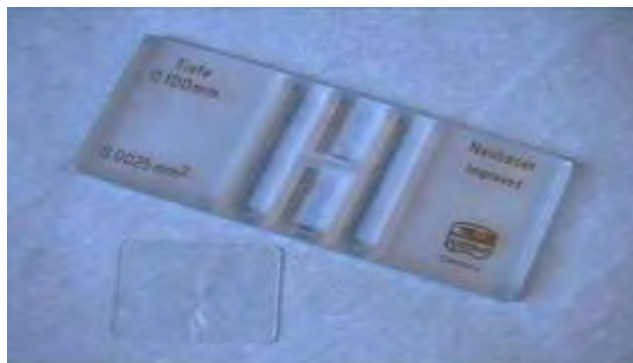
2.13 Μέτρηση κυττάρων για επίστρωση τρυβλίων

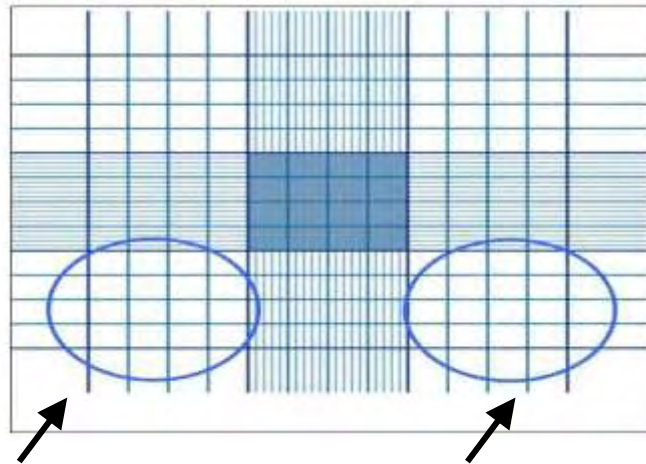
Η συγκέντρωση των κυττάρων προσδιορίζεται με την κυτταρομετρική πλάκα Neubauer. Η διαδικασία μέτρησης στοχεύει στην μέτρηση αντιπροσωπευτικού δείγματος κυττάρων πάνω στην πλάκα. Η μέτρηση γίνεται στα 25 κεντρικά μικρά τετράγωνα του πάνω και κάτω πλέγματος της πλάκας. Τα τετράγωνα οριοθετούνται μεταξύ τους από τριπλές γραμμές. Κάθε τετράγωνο περιέχει 16 μικρά τετραγωνάκια που οριοθετούνται με απλές γραμμές (Εικόνα 5). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- i. Θρυψινοποίηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο.
- ii. Μεταφορά 10μl από το εναιώρημα, στο αιμοκυτταρόμετρο. Έτσι, σε κάθε τετράγωνο εισάγεται 0,1 μl.

Σε κάθε τρυβλίο 10 cm τοποθετείται αριθμός κυττάρων= $1,3 \times 10^6$ κύτταρα. Αυτός είναι ο αριθμός των κυττάρων όπου τοποθετήθηκαν σε κάθε τρυβλίο για να πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση. Έτσι υπολογίζονται τα ml του εναιωρήματος των κυττάρων που θα τοποθετηθούν σε κάθε τρυβλίο.

- iii. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας εναιωρήματος σε τρυβλίο 10 cm.





Σε κάθε τετράγωνο εισάγεται 0.1 μl

Αριθμός κυττάρων: Μ.Ο κυττάρων στα 4 πεδία x 10^4 = κύτταρα/ml εναιωρήματος

Εικόνα 4: Τρόπος εκτίμησης του αριθμού των κυττάρων σε ένα εναιώρημα

2.14 Μόνιμη διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με πλασμιδιακό DNA

Η μελέτη της λειτουργίας και της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί αφού πρώτα αυτά ενσωματωθούν στον πυρήνα ευκαρυωτικών κυττάρων ως ανασυνδυασμένα μόρια. Η έκφραση του ανασυνδυασμένου DNA μπορεί να είναι μόνιμη (stable) εάν το ξένο DNA ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα ή παροδική σε περίπτωση μη ενσωμάτωσής του. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων *HeLa* με στόχο τη δημιουργία μιας σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς.

Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης του DNA με $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκων (με τη μορφή λεπτών κρυστάλλων) μεταξύ του DNA και θετικά φορτισμένων μορίων-φορέων, τα οποία προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη και εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύτωση. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ξεπάγωμα και καλλιέργεια κυττάρων *HeLa*.
2. Επίστρωση τρυβλίων διαμέτρου 10cm με $1,3 \times 10^6$ κύτταρα (κάλυψη ~40%) σε κάθε τρυβλίο.
 - Επώαση ~24h και αλλαγή θρεπτικού υλικού (DMEM με 10% FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) 1h-2h πριν τη διαμόλυνση
 - Προετοιμασία δειγμάτων με τελική ποσότητα πλασμιδιακού DNA 20 μg σε τελικό όγκο H_2O 450 μl.

- Προσθήκη 50 μl CaCl₂ 2M
- Προσθήκη 250 μl διαλύματος 2xHEBS (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM Na₂HPO₄, pH=7,12). Η προσθήκη γίνεται με προσοχή σταγόνα-σταγόνα ανακατεύοντας ταυτόχρονα. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων 20min σε θερμοκρασία δωματίου (σε περίπτωση θολερότητας, το DNA δεν είναι καθαρό).
- Προσθήκη του μίγματος στα κύτταρα
- 10-12h μετά τη διαμόλυνση γίνονται 2 πλύσεις με 1 x PBS και προσθήκη θρεπτικού υλικού {DMEM με 10% FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη}
- Επώαση 24h
- Θρυψινοποίηση για αραίωση του αριθμού των κυττάρων.
- Μετά από 12h ακολουθεί αλλαγή θρεπτικού και προσθήκη DMEM με 10% FBS, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη και αντιβιοτικό επιλογής (πουρομυκίνη, Cat. No P09620, SIGMA 10 mg/mL). Η τελική συγκέντρωση πουρομυκίνης που προστέθηκε ήταν 400 ng/ml.
- Επώαση των κυττάρων και αλλαγή του θρεπτικού υλικού με το αντιβιοτικό επιλογής κάθε 3 μέρες, για συνολικά περίπου 10 μέρες
- Συλλογή αποικιών

2.15 Συλλογή αποικιών

Τα κύτταρα που είναι ανθεκτικά στο γονίδιο επιλογής, την πουρομυκίνη, ως συνέπεια της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου, προσκολλώνται στον πυθμένα του τρυβλίου σχηματίζοντας αποικίες. Οι αποικίες αυτές αν και πολλές φορές είναι ορατές ακόμη και με γυμνό μάτι, μελετώνται με τη βοήθεια του μικροσκοπίου ώστε να γίνει η επιλογή τους. Οι επιθυμητές για συλλογή αποικίες σημειώνονται με μαρκαδόρο στην εξωτερική επιφάνεια του τρυβλίου και ύστερα ακολουθεί η διαδικασία συλλογής τους, η οποία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Έκπλυση των κυττάρων με 1xPBS
- Τοποθέτηση ειδικών αποστειρωμένων κυλίνδρων (εικόνα/cloning cylinders, Sigma, C1059-1EA, volume 150μl) πάνω από κάθε σημειωμένη αποικία με τη χρήση επίσης αποστειρωμένης λαβίδας. Η σταθεροποίηση των κυλίνδρων πραγματοποιείται με χρήση αποστειρωμένης βαζελίνης.
- Σε κάθε κύλινδρο προστέθηκαν 100μl θρυψίνης (συγκέντρωση 0,05%, 15400-054, Invitrogen) ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα της αποικίας από την επιφάνεια του τρυβλίου
- Ακολουθεί επώαση (5-10min)
- Συλλογή κυττάρων και καλλιέργεια παρουσία πουρομυκίνης σε τρυβλία 24-θέσεων και σταδιακά σε όλο και μεγαλύτερη επιφάνεια



Εικόνα 5: Κύλινδροι συλλογής αποικιών.

2.16 Συλλογή κυττάρων:

Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford και για την ανάλυση Western. Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής:

- I. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό
- II. Πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBS και στην 3^η γίνεται αποκόλληση των κυττάρων με ειδική ξύστρα.
- III. Συλλέγονται τα κύτταρα σε falcon 15ml.
- IV. Φυγοκέντρηση 8 min στις 1000 rpm.
- V. Φυγοκέντρηση και φύλαξη των πελλετών στους -80°C.

2.17 Εκτίμηση συγκέντρωσης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bradford

- Η πελλέτα των κυττάρων που προορίζεται για πρωτεϊνικό περιεχόμενο, επαναδιαλύεται σε 200μl RIPA {150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% δεοξυχολικό νάτριο ή DOC, 0.1% SDS (δωδεκυκλοθειικό νάτριο), 50 mM Tris, pH 8.0}
- Επώαση των δειγμάτων υπό ανάδευση στους 4°C ο/ν
- Φυγοκέντρηση για 2-3 min στις 13000rpm και συλλογή του υπερκειμένου.
- Άμεσο προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ή φύλαξη του υπερκειμένου στους -80 °C

Η Bradford βασίζεται στην πρόσδεση της μπλε χρωστικής Coomassie Brilliant G-250 με τις πρωτεΐνες και συγκεκριμένα σε βασικά αμινοξέα και αρωματικά υπολείμματα οξέων. Η χρωστική υπάρχει σε τρεις μορφές: κατιονική (κόκκινο), ουδέτερη (πράσινο) και ανιονική (μπλε). Υπό όξινες συνθήκες, η χρωστική είναι κατά κύριο λόγο στην πρωτονιωμένη ιονική μορφή (κόκκινο, $A_{\max} = 470 \text{ nm}$). Όταν δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες, μετατρέπεται σε μια σταθερή μη πρωτονιωμένη μορφή (μπλε,

$A_{\max} = 595 \text{ nm}$). Αυτή η μη πρωτονιωμένη μορφή της χρωστικής ανιχνεύεται στα 595nm έτσι ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών.

Αρχικά φτιάχτηκαν διαδοχικές συγκεντρώσεις BSA (χρησιμοποιήθηκαν 1-20 $\mu\text{g/ml}$) για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο 3ml από το δείγμα κυττάρων σε RIPA , 397 μl νερό και 100 μl χρωστική Bradford (Cat.No 500-0006 Bio-Rad). Στη συνέχεια, με φωτομέτρηση (595nm) μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των διαφορετικών διαλυμάτων BSA και των υπό μελέτη δειγμάτων. Σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση της μορφής $y=ax-b$ (όπου x η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και y οι τιμές της οπτικής πυκνότητας). Με βάση την εξίσωση βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών για τα αντίστοιχα δείγματα (shRNA για το FRA10AC1 και δείγμα ελέγχου).

2.18 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE

Για την ανάλυση και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Raymond & Weintraub 1959). Η παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS (δωδεκακυκλοθειικού νατρίου) στο πήκτωμα, στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης και το διάλυμα Laemmli που προστίθεται στα δείγματα έχει ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να αποδιατάσσονται και να φορτίζονται αρνητικά έτσι ώστε να διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλαιθυλένιο-1,2-διαμίνη) το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από APS. Έτσι, σχηματίζεται ένα πλέγμα που αποτελείται από πόρους μέσα στους οποίους κινούνται οι πρωτεΐνες. Γενικά, πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίστηκε το πήκτωμα ήταν ένα «σάντουιτς» επίπεδων τζαμιών. Τα τζάμια τοποθετούνται σε ένα στήριγμα (casting frame). Το πήκτωμα αποτελείται από δύο φάσεις:

- την ανώτερη (stacking gel) στην οποία πραγματοποιείται η ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο
- την υποκείμενη, δηλαδή το πήκτωμα ευθυγράμμισης (separating gel).

Πρώτα παρασκευάζεται το πήκτωμα ευθυγράμμισης (separating gel). Αυτό χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10%:

Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του είναι:

- ❖ 5 ml 10% ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη [από πυκνό διάλυμα 30% (29:1)]
- ❖ 4.5 ml 1,25 M Tris.Cl pH 8,8
- ❖ 75μl 20% SDS
- ❖ 75 μl 20% APS
- ❖ 7,5 μl 0,05% TEMED
- ❖ 5,4 ml H₂O

Μετά παρασκευάζεται η ανώτερη φάση του πηκτώματος (stacking gel), συγκέντρωσης 10%:

Οι συγκεντρώσεις των συστατικών του είναι:

- ❖ 1,5 ml 4,5% ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη [από πυκνό διάλυμα 30% (29:1)]
- ❖ 1 ml 1,25 M Tris-Cl pH 6,8
- ❖ 50 μl 20% SDS
- ❖ 50 μl 20% APS (Ammonium Persulfate)
- ❖ 20 μl 0,2% TEMED (N,N,N',N'- tetramethylethylene diamine) 7,4 ml H₂O

Για την προετοιμασία των δειγμάτων

Πραγματοποιείται αποδιάταξη τους με τη χρήση του διαλύματος 5X Laemmli, το οποίο έχει την ακόλουθη σύσταση:

- 200 mM Tris-Cl pH 6,8
- 8% SDS
- 40% γλυκερόλη
- 20% μερκαπτοαιθανόλη
- 0,4% μπλε βρωμοφαινόλη

Ακολουθεί θέρμανση στους 100°C για 10 min και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 min.

Τα δείγματα τοποθετούνται σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται στο πήκτωμα ευθυγράμμισης με τη χρήση ειδικής «χτένας», όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x Tris-γλυκίνης από αρχικό διάλυμα 10x με την εξής σύσταση:

- 250mM Tris
- 1,92M γλυκίνη
- 1% SDS

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με σταθερή ένταση πεδίου 13 mA μέχρι η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (συστατικό του διαλύματος Laemmli) να περάσει το τέλος του πηκτώματος και να προχωρήσει στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (~2,5h).

Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη (transfer)

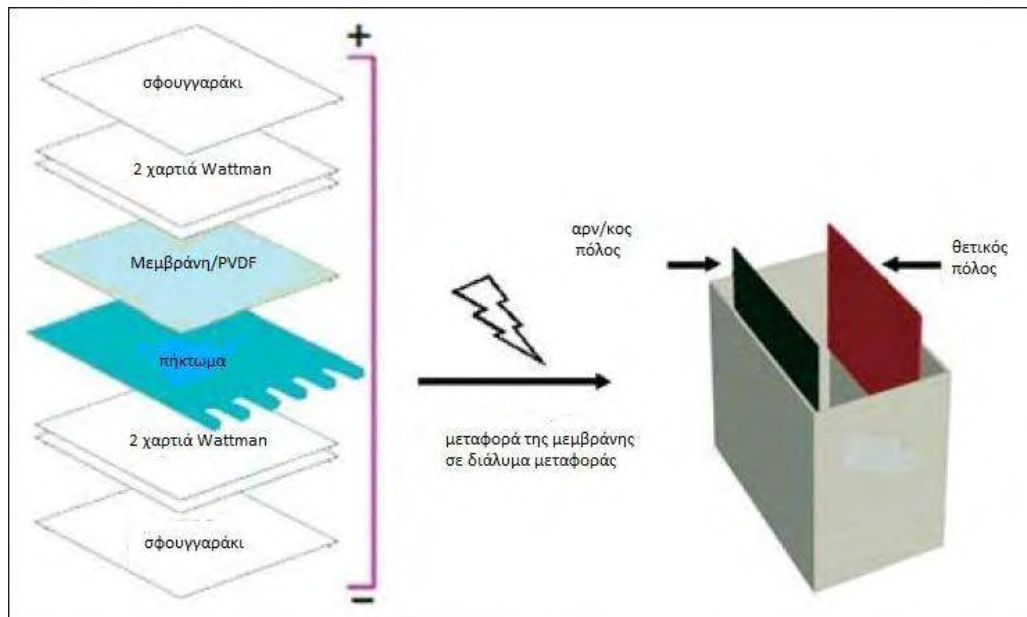
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται το πήκτωμα από το καλούπι αποκόπτοντας την ανώτερη φάση του πηκτώματος (stacking gel).
- Παραμένει μόνο το πήκτωμα ευθυγράμμισης (separating gel) του οποίου μετρούνται οι διαστάσεις του και σημειώνεται η αρχή του.
- Τοποθετείται σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) με την εξής σύσταση:
 - 250mM Tris
 - 1,92M γλυκίνη
 - 1% SDS
 - 20% μεθανόλη
- Κόβονται στις διαστάσεις του πηκτώματος 4 χαρτιά Wattman και τοποθετούνται σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer).
- Ακολουθεί εξισορρόπηση της μεμβράνης PVDF σε μεθανόλη.

Στην κασέτα της ηλεκτρομεταφοράς (gel holder cassette) τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά τα εξής:

- Στον αρνητικό πόλο ένα σφουγγάρι (sponge pad) το οποίο έχει εμποτιστεί σε dH₂O
- 2 χαρτιά wattman
- το πήκτωμα
- 2 χαρτιά wattman
- Στον αρνητικό πόλο ένα σφουγγάρι (sponge pad) το οποίο έχει εμποτιστεί σε dH₂O

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στους 4 °C σε σταθερή ένταση 110mA ολονύκτια (ο/ν).

Η διαδικασία φαίνεται στην Εικόνα 6



Εικόνα 6: Διαδικασία ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη.
Tahrin Mahmood and Ping-Chang Yang, 2012)

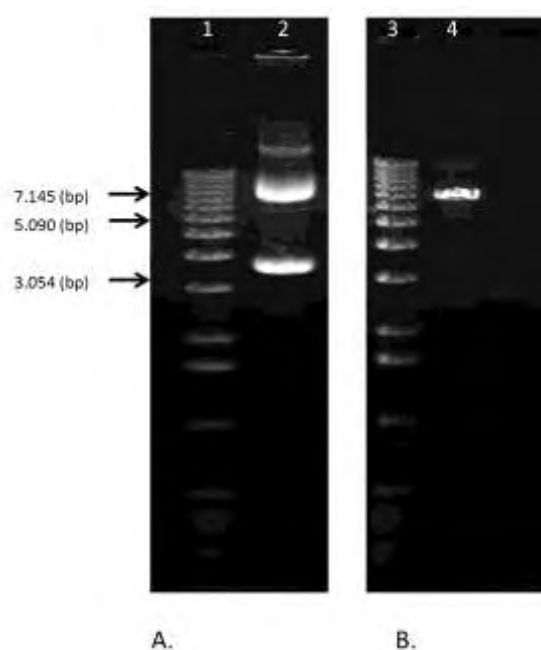
Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)

- Στη μεμβράνη προστέθηκε blocking buffer (TBSTM) για την αποφυγή μη ειδικών συνδέσεων του αντισώματος το οποίο περιέχει: TBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris) και 0.1% Tween 20 και 5 % αποβουτυρωμένο γάλα. Ακολουθεί επώαση 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- 1 πλύση με TBS
- Προσθήκη 1^{ου} αντισώματος σε TBSTM στην κατάλληλη αραιώση και ολονύκτια επώαση στους 4 °C. Ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήσαμε το α-HRP rabbit για το FRA διότι δημιουργήθηκε από ορό κουνελιού και α-HRP mouse για την ακτίνη (α-actin MAB1501, Chemicon).
- 3 πλύσεις με TBST
- Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος (HRP-linked Antibody) σε TBSTM στην κατάλληλη αραιώση και επώαση 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε 2^ο αντίσωμα που αναγνωρίζει συγκεκριμένο επίτοπο στο πρώτο αντίσωμα
- 3 πλύσεις με TBST
- Τοποθέτηση υποστρωμάτων για υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP) σε αναλογία 1:1 (Cat. No. L00221V300 Genscript)
- Τοποθέτηση της μεμβράνης σε ειδικό μηχάνημα για western και εμφάνιση των αποτελεσμάτων μετά από έκθεση σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και γραμμοποίηση πλασμιδιακού DNA του διαγονιδίου pLKO.1-shRNA (*FRA10AC1*)

Αρχικά έγινε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA του διαγονιδίου από τα κατάλληλα μετασηματισμένα βακτήρια (εικόνα 7 A). Το διαγονίδιο περιέχει τον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro της εταιρίας Sigma-Aldrich με το shRNA (TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1) μεγέθους 59 (bp). Το shRNA στοχεύει στην κωδική περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1* (CDS) με μέσο ποσοστό καταστολής της έκφρασής του, 95%. Στη συνέχεια το διαγονίδιο κόπηκε με την περιοριστική ενδονουκλεάση Kpn1 με στόχο να γίνει γραμμικό ώστε να είναι πιο εύκολη η ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα των κυττάρων. Ακολούθησε φωτομέτρηση ώστε να μετρηθεί η ποσότητα DNA του γραμμικού διαγονιδίου, η οποία είναι 300ng/μl (εικόνα 7 B).



Εικόνα 7 : 1. Δείκτης μοριακών μεγεθών, 2. πλασμιδιακό DNA (A) και 3. δείκτης μοριακών μεγεθών 4. γραμμικό διαγονίδιο (B). Το μέγεθος 7.145 (bp) αντιστοιχεί στο διαγονίδιο pLKO.1-shRNA (TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1).

3.2 Δημιουργία σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς *HeLa*

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά *HeLa* η οποία προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου από αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας. Εφόσον, έγινε η ανάπτυξη των κυττάρων *HeLa* πραγματοποιήθηκε η παροδική διαμόλυνσή τους με τη μέθοδο συγκατακρήμνισης του DNA με $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ με το γραμμικό διαγονίδιο σε συγκέντρωση 20μg. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας

στην πουρομυκίνη σε ευκαρυωτικά κύτταρα και έτσι επιλέχθηκε ως αντιβιοτικό επιλογής των διαμολυσμένων κυττάρων. Η επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης πουρομυκίνης έγινε έπειτα από έλεγχο κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα *HeLa*. Χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα διαφορετικές συγκεντρώσεις πουρομυκίνης σε τρυβλία 6 θέσεων (6 well plate, πίνακας 1). Ο πληθυσμός των κυττάρων σε κάθε πηγάδι θα πρέπει να είναι περίπου ~30% πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού έτσι ώστε να είναι δραστικό. Σε διάστημα 10 ημερών παρατηρήθηκε ότι η ελάχιστη ποσότητα πουρομυκίνης που απαιτείται για τον θάνατο όλων των κυττάρων είναι 400ng/ml.

Πίνακας 1: Έλεγχος κυτταροτοξικότητας κυττάρων *HeLa* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού πουρομυκίνης

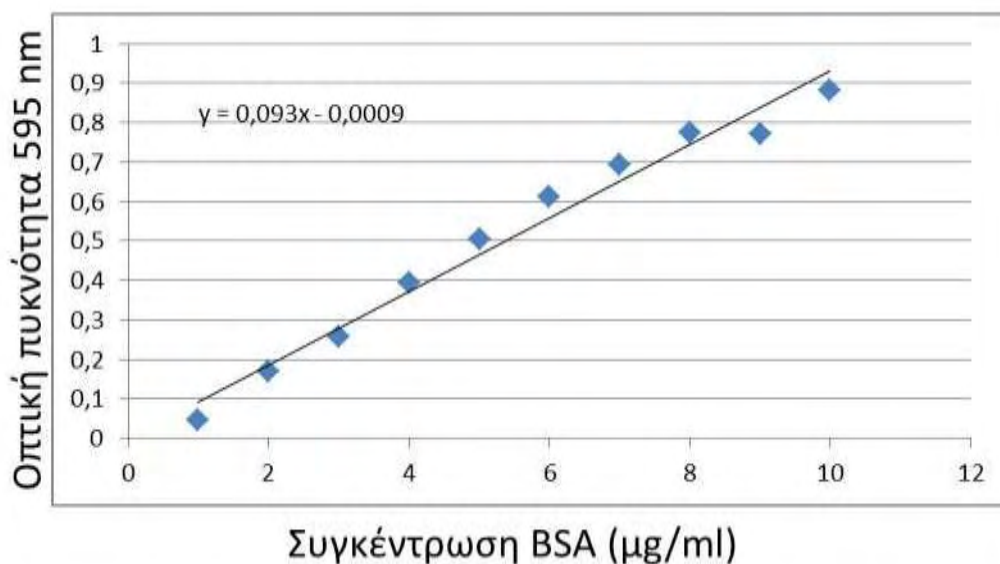
Τρυβλία 6 θέσεων	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Συγκέντρωση πουρομυκίνης (ng/ml)	0	100	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000

Τα κύτταρα *HeLa* που είναι ανθεκτικά στη πουρομυκίνη, ως συνέπεια της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου, προσκολλώνται στην επιφάνεια του τρυβλίου και σχηματίζουν αποικίες. Από το shRNA (TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1) συλλέχθηκαν συνολικά 7 αποικίες { shRNA(TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1) _1,2,3,4,5,6,7 } η καλλιέργεια των οποίων ξεκίνησε σε τρυβλίο 24 θέσεων (24 well plate) και συνεχίστηκε σε σταδιακά μεγαλύτερη επιφάνεια σε τρυβλίο 6 θέσεων (6 well plate), σε φλάσκα 25 cm² και φλάσκα 75 cm² όπου πραγματοποιήθηκε η κρυοδιατήρηση των κυττάρων. Έγινε συλλογή των κυττάρων από τα κύτταρα κάθε κλώνου ώστε να ελεγχθεί η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1*.

3.3 Έλεγχος της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου *FRA10AC1* με ανάλυση Western

Η ανάλυση Western πραγματοποιήθηκε για να γίνει έλεγχος του ποσοστού καταστολής. Για να υπολογιστούν τα επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης *FRA10AC1* που εκφράζεται στα κύτταρα που έχουν ενσωματώσει το γραμμικό διαγονίδιο plko.1-shRNA (*FRA10AC1*) απαιτείται να γίνει η σύγκριση τους με έναν θετικό μάρτυρα δηλαδή κύτταρα *HeLa* που δεν περιέχουν το διαγονίδιο. Για να γίνει η σύγκριση πρέπει να χρησιμοποιηθεί η ίδια ποσότητα πρωτεΐνης και από τα δυο δείγματα κυττάρων. Η Bradford πραγματοποιήθηκε για να μετρηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που έχουν τα δείγματα μας. Στην ανάλυση Western χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη ως εσωτερικός μάρτυρας έτσι ώστε να γίνει έλεγχος της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε.

Με μέθοδο Bradford κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη βάση των διαδοχικών πρότυπων συγκεντρώσεων BSA και των αντίστοιχων τιμών οπτικής πυκνότητας (εικόνα 8)



Εικόνα 8: Πρότυπη καμπύλη συγκεντρώσεων BSA

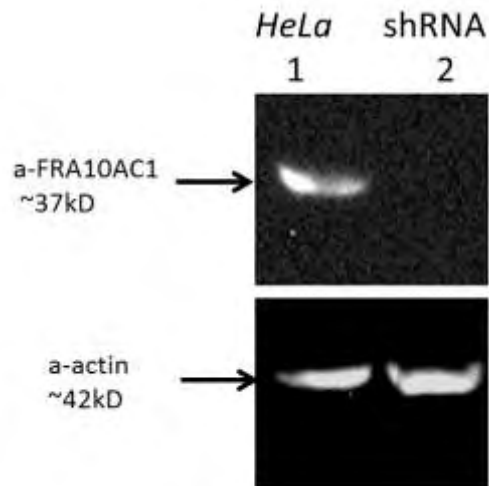
Παρατηρούμε ότι οι οπτικές πυκνότητες των πρότυπων συγκεντρώσεων αυξάνονται κλιμακωτά χωρίς να παρεκκλίνουν σημαντικά από την γραμμή τάσης. Επιπλέον οι οπτικές πυκνότητες των δειγμάτων μας ήταν 0,551 nm για το shRNA (TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1) και 0,428 nm για τα *HeLa* παρατηρήθηκε πως οι τιμές βρίσκονται μέσα στο εύρος των τιμών των πρότυπων συγκεντρώσεων. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση ώστε να πραγματοποιηθεί σωστή ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

Από την εξίσωση της καμπύλης βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις του shRNA (TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1) και των *HeLa* οι οποίες ήταν 11,5 μg/ml και 8,68 μg/ml αντίστοιχα. Συνεπώς η ποσότητα των δειγμάτων που ηλεκτροφορήθηκε τόσο για το θετικό μάρτυρα όσο και για το shRNA (TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1)_5 ήταν 200 ng.

Ακολούθησε ανάλυση Western με τη χρήση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε αραιώση 1:500 και αντίσωμα έναντι της ακτίνης σε αραιώση 1:1000, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποσότητας των πρωτεϊνών των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.

Έτσι έχοντας χρησιμοποιήσει την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης και στα δυο δείγματα παρατηρήσαμε τα ποσοστά έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης στα κύτταρα που περιέχουν το γραμμικό διαγονίδιο plko.1-shRNA (FRA10AC1) σε σύγκριση με τα

κύτταρα *HeLa* συμπεραίνοντας ότι η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου FRA10AC1 πραγματοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Ανάλυση Western: 1.Δείγμα *HeLa* και 2. shRNA(TRCN0000159265 NM_145246.2-585s1c1) _5.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αναζήτηση και η αποκρυπτογράφηση όλο και περισσότερων γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα θα μας βοηθήσει στην θεραπεία ή ακόμη και πρόληψη όλο και περισσότερων ασθενειών. Ο συσχετισμός φαινοτύπου ασθένειας με συγκεκριμένο γονότυπο ή έστω συγκεκριμένο μονοπάτι γονιδίων τις περισσότερες φορές γίνεται τυχαία για τον ανθρώπινο πληθυσμό, ύστερα από μελέτη ασθενών ή φορέων. Ωστόσο η εύρεση ίδιων συμπτωμάτων για την ίδια ασθένεια ή συμπτωμάτων που θα μπορούσαν να συνδεθούν είναι σπάνια και αυτό οφείλεται στο μικρό αριθμό απογόνων αλλά και στη μεγάλη χρονική απόσταση μεταξύ δυο γενεών. Έτσι τα γονίδια του ανθρώπου και οι περισσότερες ασθένειες εξετάζονται σε οργανισμούς μοντέλα είτε μέσω ορθόλογων γονιδίων. Το πρόβλημα όμως προκύπτει όταν η μελέτη ενός γονιδίου πραγματοποιείται από το μηδέν και δεν έχουν βρεθεί ορθόλογα σε άλλους οργανισμούς.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος μιας τέτοιας έρευνας πολλά υποσχόμενης για τη λειτουργία του γονιδίου *FRA10AC1* σε ολόκληρο τον ανθρώπινο οργανισμό. Το γονίδιο έχει χαρτογραφηθεί στην εύθραυστη θέση *FRA10A*. Η *FRA10A* χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 και η έκφραση της θέσης *FRA10A* μπορεί να σχετίζεται με νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες. Ο συσχετισμός προέκυψε ύστερα από μελέτες όπου ελέγχθηκε η παρουσία εύθραυστων θέσεων στον καρυότυπο ατόμων με νοητική υστέρηση, υγιή ατόμων και τυχαίων ατόμων στον πληθυσμό. Σε μελέτες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί υποστηρίζεται πως η πρωτεΐνη *FRA10AC1* εμπλέκεται στη συναρμολόγηση του πρώιμου mRNA ή σε κάποιο άλλο συγγενικό μηχανισμό επεξεργασίας του RNA.

Στην παρούσα μελέτη δημιουργήθηκε μια μόνιμα διαμολυσμένη σειρά μόνιμα διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς *HeLa* με καταστολή της έκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*. Η καταστολή πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή ενός διαγονιδίου, το οποίο αποτελείται από τον πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-*puro* και shRNA TRCN0000159265. Στα αποτελέσματα παρατηρήθηκε πως η καταστολή πραγματοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό ύστερα από σύγκριση με κύτταρα *HeLa* όπου δεν περιείχαν το διαγονίδιο. Μελλοντικά, ενδείκνυται η δημιουργία μια μόνιμα διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς με υπερέκφραση του γονιδίου *FRA10AC1*. Οι δυο αυτές κυτταρικές σειρές θα μελετηθούν σε τρία επίπεδα (μεταμεταγραφικό, πρωτεομικό και μεταβολικό). Μελλοντικός στόχος, αποτελεί και ο φαινοτυπικός έλεγχος με τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών ώστε να πραγματοποιηθούν τεστ συμπεριφοράς και διάφορα άλλα πειράματα για πιθανή συσχέτιση γονότυπου-φαινοτύπου. Ο τελικός στόχος είναι η ανακάλυψη της ακριβής λειτουργίας του γονιδίου *FRA10AC1* σε ολόκληρη την κυτταρική φυσιολογία και σε ολόκληρο τον οργανισμό καθώς και πιθανή συσχέτισή του με την νοητική υστέρηση.

Βιβλιογραφία

1. Cohen SN, Chang AC, Hsu L. " Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteriaQ genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA". Proc Natl Acad Sci U S A. 1972 Aug 69(8): 2110-4.
2. Lukusa T., Fryns JP. " Human chromosome fragility". Biochimica Biophysica Acta. 2008 Jan 1779(1):3-16. Epub 2007 Dec 3.
3. Mahmood T, Ping-Chang Yang "Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting". N Am J Med Sci. 2012 Sep; 4(9): 429–434.
4. Sarafidou T., Apostolopoulou D, Katidou M, Moschonas N.K. (υπό συγγραφή). FRA10AC1 interacts with DGCR14, a spliceosomal component
5. Sarafidou T, Kahl C, Martinez-Garay I, Mangelsdorf M, Gesk S, Baker E, Kokkinaki M, Talley P, L. Maltby E, French L, Harder L, Hinzmann B, Nobile C, Richkind K, Finnis M, Deloukas P, Sutherland GR, Kutsche K, Moschonas NK, Siebert R, Gecz J European Collaborative Consortium for the Study of ADLTE. " Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1,encoding a nuclear protein"
6. Sutherland GR, "Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites". Am J Hum Genet. 1982 May 34(3):452-8
7. Sutherland GR, "Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics". Am J Hum Genet. 1985 May 49(Pt 2):153-61

BIBΛΙΑ

- "Experiments in Molecular Genetics" J.H Miller, 1972
- " Ανασυνδυασμένο DNA" (Watson, Caudy, Myers, Witkowski 2007)
- "Molecular Cloning" (Sambrook, Fritsch, Maniatis 1989
- " Molecular Biology of THE CELL" (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts,Walter 2002)

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles>
- <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>