



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

### **Διπλωματική εργασία**

Δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής για την επαγόμενη έκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1 του ανθρώπου σε κύτταρα θηλαστικών

*Creation of a recombinant plasmid for the inducible expression of the human protein FRA10AC1 in mammalian cells*

**ΑΝΘΟΥΛΑ ΚΡΟΜΕΛ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ,  
ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ &  
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Λάρισα, 2016

# ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ):** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ:** Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

# Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Σαραφίδου Θεολογία, επίκουρο Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών για την ανάθεση του θέματος, το ενδιαφέρον αλλά και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την πραγματοποίηση της πτυχιακή μου εργασίας καθώς και για όλες τις χρήσιμες συμβουλές που μου παρείχε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Γαλλιοπούλου Ελένη για την υπομονή, την πολύτιμη βοήθεια καθώς και τον χρόνο που δέχθηκε για την εκπαίδευσή μου κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές της κατά στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει κατά τη διάρκεια των σπουδών μου καθώς και για την αμέριστη υποστήριξή τους σε κάθε μου επιλογή.

# Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Εύθραυστες θέσεις στα χρωμοσώματα.....	4
1.1.1 Συνήθεις εύθραυστες θέσεις.....	4
1.1.2 Σπάνιες εύθραυστες θέσεις.....	5
1.1.3 Κλινική σημασία.....	6
1.1.4 Κληρονομικό πρότυπο των εύθραυστων θέσεων.....	7
1.2 Σπάνια εύθραυστη θέση <i>FRA10A</i> .....	7
1.2.1 Παθολογικός φαινότυπος και εύθραυστη θέση <i>FRA10A</i> .....	8
1.2.2 Το γονίδιο <i>FRA10AC1</i> .....	9
1.2.3 Πρότυπο έκφρασης.....	9
1.2.4 Η πρωτεΐνη <i>FRA10AC1</i> .....	10
1.2.5 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της <i>FRA10AC1</i> .....	10
1.3 Μηχανισμός συναρμογής.....	12
1.3.1 Συσχέτιση συναρμογής με την μεταγραφή και επεξεργασία του mRNA.....	14
1.3.2 Συσχέτιση συναρμογής με την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα.....	15
1.4 ΣΚΟΠΟΣ.....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1 Πλασμιδιακές κατασκευές και πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης.....	18
2.1.1 pcDNA 3.1 His C/ <i>FRA10AC1</i> .....	18
2.1.2 pcDNA 4/TO.....	19
2.2 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού.....	21
2.3 Αντίδραση σύνδεσης.....	23
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	24
2.5 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός προϊόντων πέψης.....	26
2.6 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια δεκτικών βακτηρίων <i>E. coli</i> στελέχους <i>DH5a</i> .....	27
2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα.....	28
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	29

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
3.1 Υποκλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> στο φορέα pcDNA 4TO.....	33
3.1.1 Απομόνωση του cDNA του γονιδίου <i>FRA10AC1</i> .....	35
3.1.2 Πέψη του φορέα pcDNA 4TO.....	36
3.1.3 Αντίδραση σύνδεσης pcDNA 4TO με ένθεμα-cDNA <i>FRA10AC1</i> .....	39
3.2 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια βακτηρίων.....	39
3.3 Μελλοντικές χρήσης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *FRA10A*, η οποία ανήκει στις σπάνιες χρωμοσωματικές εύθραυστες θέσεις που εμφανίζονται όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο, χαρτογραφείται στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 και αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη αυτοσωματική σπάνια εύθραυστη θέση στο γονιδίωμα του ανθρώπου. Η εύθραυστη αυτή θέση οφείλεται στην επέκταση πάνω από 200 φορές της πολυμορφικής επανάληψης CGG στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *FRA10AC1*, η οποία οδηγεί στην υπερμεθυλίωση της περιοχής. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες η εμφάνιση της *FRA10A* σε άτομα-φορείς σχετίζεται με νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες χωρίς όμως να έχει επιβεβαιωθεί οριστικά αυτή η συσχέτιση. Το γονίδιο *FRA10AC1* εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη 315 αμινοξέων η οποία αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής και αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συναρμογή, στη μεταγραφή και την έξοδο του ώριμου mRNA από τον πυρήνα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία μιας πλασμιδιακής κατασκευής έτσι ώστε να είναι εφικτή η επαγόμενη έκφραση της πρωτεΐνης *FRA10AC1* του ανθρώπου σε κύτταρα θηλαστικών. Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA 4TO-*FRA10AC1*, που περιέχει κλωνοποιημένο το πλήρους μήκους cDNA σε σύντηξη με τους επιτόπους πολυιστιδίνης και Xpress που προέρχονται από τον φορέα pcDNA-3.1 His C. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ελεγχόμενη μέσω του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη έκφραση του γονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών μετά τη δημιουργία σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς η οποία ήδη φέρει ενσωματωμένη στο γονιδίωμα το πλασμίδιο που παράγει τον καταστολέα της τετρακυκλίνης. Συνεπώς η κατασκευή που δημιουργήθηκε θα είναι χρήσιμη για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης *FRA10AC1* σε κύτταρα θηλαστικών με γενικότερο σκοπό την κατανόηση της λειτουργίας της.

# ABSTRACT

*FRA10A* rare chromosomal fragile site is located in the human chromosomal region 10q23.3 and is expressed when cells are cultured in absence of folate acid. This fragile site is the most prevalent among the rare folate-sensitive autosomal fragile sites in the human genome and is caused by a dramatic expansion of a trinucleotide CGG repeat located in the 5' UTR of the *FRA10AC1* gene. This expansion, leads to the hypermethylation of this region and to gene silencing. According to studies, fragile site might be associated with mental retardation and developmental abnormalities, however this relation has not yet been confirmed. The *FRA10AC1* gene is expressed in all tissues and encodes a 315 amino acid nuclear spliceosomal protein which interacts with proteins involved in splicing, transcription and mature mRNA export from the nucleus.

The purpose of this study was the generation of a recombinant plasmid for the inducible expression of the human protein FRA10AC1 in mammalian cells. Specifically, the full-length cDNA fused to the 6-His and Xpress epitopes, originated from the pcDNA-3.1 His C vector was cloned into the pcDNA 4TO vector. The recombinant plasmid can be used for the inducible expression of the gene in mammalian cells, controlled by the antibiotic tetracycline after the development of a stable transfected cell line which already contains the vector that produces the tetracycline repressor. Thus, this construct will be useful for functional studies of the FRA10AC1 protein in mammalian cells.

# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## 1.1 Εύθραυστες θέσεις στα χρωμοσώματα

Συγκεκριμένες χρωμοσωματικές θέσεις οι οποίες εμφανίζουν θραύσεις κατά τη μετάφραση της μίτωσης, όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλούνται εύθραυστες θέσεις. Αυτό συμβαίνει λόγω αποτυχίας συμπύκνωσης της χρωματίνης. Μέχρι σήμερα περισσότερες από 120 εύθραυστες χρωμοσωμικές θέσεις έχουν ταυτοποιηθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι εύθραυστες αυτές θέσεις χωρίζονται σε δυο κύριες κατηγορίες, με βάση τη συχνότητά τους στον πληθυσμό, στις σπάνιες και στις συνήθειες. Επιπλέον, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν και με βάση τον τρόπο επαγωγής τους (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ, το οποίο δρα ως συνένζυμο σε αντιδράσεις μεταφοράς στη σύνθεση πουρινών, δηλαδή είναι απαραίτητο για την σύνθεση του DNA και ιδιαίτερα σημαντικό για την γρήγορη κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη (N.Γαλανοπούλου, 2011). Εύθραυστες θέσεις επάγονται και με την προσθήκη δισταμικίνης A (distamycin A), που είναι ένα αντιβιοτικό που δεσμεύεται στη μικρή αύλακα του DNA και κυρίως στα ζεύγη A-T (Baraldi *et al.* 2004). Επίσης εύθραυστες θέσεις προκαλούνται και από την βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU), που αποτελεί ανάλογο της θυμιδίνης και μπορεί να ενσωματωθεί στο νεοσυντιθέμενο DNA (κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου), υποκαθιστώντας την θυμιδίνη. Επειδή η BrdU μπορεί να αντικαταστήσει την θυμιδίνη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις. Οι περισσότερες από τις συνήθειες εύθραυστες θέσεις επάγονται από την αφιδοχολίνη (aphidocolin), η οποία έχει αντιμιτωτικές ιδιότητες καθώς είναι ισχυρός και ειδικός αναστολέας της DNA πολυμεράσης (Baranovskiy A. *et al.* 2014). Τέλος, εύθραυστες θέσεις επάγονται και από την 5-αζακυτιδίνη (5-azacytidine) ένα χημικό ανάλογο της κυτιδίνης, το οποίο ενσωματώνεται στο DNA και αναστέλει την μεθυλίωσή του (Christman JK. 2002).

### 1.1.1 Συνήθειες εύθραυστες θέσεις

Οι συνήθειες εύθραυστες θέσεις αποτελούν χαρακτηριστικό των χρωμοσωμάτων όλων των ανθρώπων (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί κυτταρογενετικά 89 συνήθειες εύθραυστες θέσεις στο γονιδίωμα του ανθρώπου, με μεταβλητή συχνότητα και επίπεδα έκφρασης, οι οποίες χαρτογραφούνται σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από γονιδιωματική αστάθεια, ιδιαίτερα σε καρκινικά κύτταρα (Sutherland & Baker 2000). Έχει δειχθεί ότι, μετά από *in vitro* επαγωγή, οι εύθραυστες θέσεις συχνά εμπλέκονται σε απαλοιφές,

διπλασιασμούς και μετατοπίσεις και παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων. Επιπλέον έχουν περιγραφεί συγκεκριμένες ασυνήθεις δευτεροταγείς δομές οι οποίες είναι δυνατόν να διαταράξουν την αντιγραφή του DNA και την ακετυλίωση των ιστονών με συνέπεια να εμποδίζεται η συμπύκνωση της χρωματίνης (Zlotorynski *et al.* 2003, Pichiorri *et al.* 2008). Οι περισσότερες συνήθεις εύθραυστες θέσεις επάγονται από την αμφιδοχολίνη, ενώ άλλες από την BrdU ή την 5-αζακυτιδίνη (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008).

### 1.1.2 Σπάνιες εύθραυστες θέσεις

Οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις εμφανίζονται σε αρκετά μικρότερο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού (<5%) σε σχέση με τις συνήθεις. Μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 30 σπάνιες θέσεις των οποίων η συχνότητα ποικίλλει ανά τις μελέτες (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008). Οι περισσότερες από τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις εκδηλώνονται όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν απουσία φυλλικού οξέος είτε με την προσθήκη αναστολέων του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος (**Πίνακας 1**). Μέχρι σήμερα, έχουν κλωνοποιηθεί οκτώ σπάνιες εύθραυστες θέσεις οι οποίες είναι ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ και δύο που εκδηλώνονται παρουσία δισταμικίνης ή/και BrdU (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008).

**Πίνακας 1 : Κατηγορίες σπάνιων εύθραυστων θέσεων**

Classification of rare fragile sites		
Sub-group	Fragile site	Location
Folate sensitive (n=24)	FRA1M	1p21.3
	FRA2A	2q11.2
	FRA2B	2q13
	FRA2K	2q22.3
	FRA2L	2p11.2
	FRA5G	5q35
	FRA6A	6p23
	FRA7A	7p11.2
	FRA8A	8q22.3
	FRA9A	9p21
	FRA9B	9q32
	FRA10A	10q23.3
	FRA11A	11q13.3
	FRA11B	11q23.3
	FRA12A	12q13.1
	FRA12D	12q24.13
	FRA16A	16p13.11
	FRA18C	18q22.1
	FRA19B	19p13
	FRA20A	20.11.23
	FRA22A	22q13
	FRAXA	Xq27.3
	FRAXE	Xq28
	FRAXF	Xq28
Distamycin A-inducible (n=3)	FRA8E	8q24.1
	FRA11I	11p15.1
Distamycin A/BrdU inducible (n=2)	FRA16E	16p12.1
	FRA16B	16q22.1
BrdU requiring (n=2)	FRA17A	17p12
	FRA10B	10q25.2
	FRA12C	12q24.2

(από T. Lukusa & J. Fryns 2008)

Οι σπάνιες εύθραυστες περιοχές συχνά αποτελούνται από επαναλήψεις νουκλεοτιδίων. Είναι επιρρεπείς σε αυθόρμητη θραύση κατά τη διάρκεια της μίτωσης και εντοπίζονται συχνά σε γονίδια. Η πιο γνωστή σπάνια εύθραυστη ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ θέση είναι η *FRAXA* που χαρτογραφείται στη ζώνη Xq27.3 και συνδέεται με το σύνδρομο εύθραυστου X, την πιο κοινή αιτία κληρονομικής νοητικής υστέρησης. Η μοριακή ανάλυση αυτής της θέσης έδειξε ότι η εκδήλωσή της οφείλεται στην επέκταση πολυμορφικών τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων του τύπου (CGG)<sub>n</sub> που εντοπίζονται στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου *FMR1* (Verkerk, *et al.* 1991). Η αλληλουχία CGG είναι ιδιαίτερα πολυμορφική στο γενικό πληθυσμό (Hagerman R.J. 2002). Η επέκταση της αλληλουχίας CGG σε πλήρη μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση και μεταγραφική απενεργοποίηση του γονιδίου με αποτέλεσμα τη μη παραγωγή της αναμενόμενης πρωτεΐνης FMRP (Garber K. *et al.* 2006).

Ακολούθως, προσδιορίστηκε ότι η μοριακή βάση των σπάνιων εύθραυστων θέσεων αυτής της κατηγορίας είναι παρόμοια, δηλαδή ότι όλες οφείλονται στην επέκταση επαναλήψεων του τύπου (CGG)<sub>n</sub> ή (CCG)<sub>n</sub> και σε ορισμένες περιπτώσεις, η επέκταση των επαναλήψεων πέραν ενός αριθμού βρέθηκε ότι συνδέεται με την υπερμεθυλίωση της περιοχής και την επακόλουθη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου (Sutherland & Richards 1995). Η μοριακή ανάλυση και άλλων εύθραυστων θέσεων (πχ. *FRA10B* και *FRA16B*) οι οποίες προκαλούνται από βρωμοδεοξουριδίνη ή δισταμικίνη A έδειξε ότι σχετίζονται με την επέκταση, έως και αρκετών kb, μινι-δορυφορικών επαναλήψεων πλούσιων σε A-T οι οποίες δείχνουν να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές που αναστέλλουν την αντιγραφή του DNA (T. Lukusa & J.P. Fryns 2008).

### 1.1.3 Κλινική σημασία

Οι συνήθεις εύθραυστες θέσεις δεν έχει βρεθεί να σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για κάποια διαταραχή, καθώς υπάρχουν σε όλους τους ανθρώπους (Kim Debacker and R. Frank Kooy 2007). Όσον αφορά τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις, μόνο δύο από αυτές, η *FRAXA* και η *FRAXE*, που χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα X, έχουν συσχετιστεί σαφώς με παθολογικό φαινότυπο νοητικής υστέρησης (Verkerk *et al.* 1991). Για τις υπόλοιπες σπάνιες εύθραυστες θέσεις, υπάρχουν διάφορες μελέτες που αναφέρουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισής τους σε άτομα με διάφορες διαταραχές, κυρίως νοητική υστέρηση, χωρίς όμως να υπάρχει σαφής συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου. Ορισμένες μάλιστα έχουν βρεθεί σε

ομοζυγωτία (*FRA10B*, *FRA16B* και *FRA17A*) σε άτομα που δεν παρουσιάζουν κάποιο παθολογικό φαινότυπο (Sutherland 1981) γεγονός που δείχνει ότι αυτές οι θέσεις δεν επηρεάζουν τη λειτουργία γονιδίων υπεύθυνων για την ανάπτυξη (Sutherland & Baker 2000). Παρόλα αυτά, ορισμένες σπάνιες εύθραυστες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ δεν έχουν βρεθεί σε ομοζυγωτία, ενώ με βάση τη συχνότητα των ετερόζυγων ατόμων θα έπρεπε να υπάρχουν. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει ότι πιθανώς τα ομόζυγα άτομα δεν επιβιώνουν (Sutherland & Baker 2000).

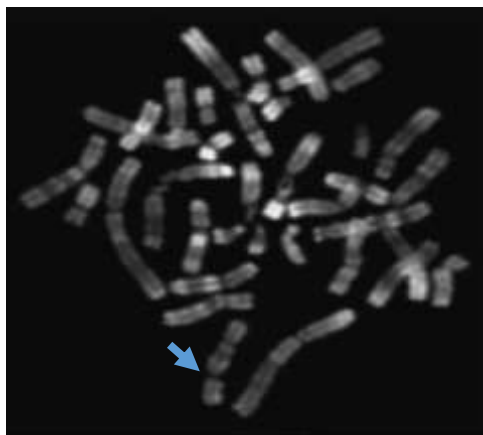
#### **1.1.4 Κληρονομικό πρότυπο των εύθραυστων θέσεων**

Ενώ οι συχνές εύθραυστες θέσεις είναι παρούσες σε όλα τα χρωμοσώματα, οι σπάνιες εύθραυστες θέσεις είτε κληρονομούνται από έναν από τους γονείς ή εμφανίζονται *de novo* (Sutherland G.R. 1985). Το πρότυπο κληρονομικότητας μπορεί να εξηγηθεί σε μοριακό επίπεδο από την περιστασιακή ασταθή κληρονομικότητα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Οι επαναλήψεις είναι πολυμορφικές και κληρονομούνται σταθερά από τη πλειοψηφία του πληθυσμού. Σε μια σπάνια μειοψηφία ατόμων, οι επαναλήψεις υπερβαίνουν ένα όριο μεγέθους και προκαλούν αξιοσημείωτη αστάθεια στο χρωμόσωμα κατά τη μεταβίβαση από γενιά σε γενιά. Βρέθηκε ότι η αύξηση των επαναλήψεων των αλληλουχιών είναι πολύ πιο συχνές από ότι η μείωσή τους και η αστάθεια συχνά εξαρτάται από το φύλο του γονέα που μεταβιβάζει την αντίστοιχη αλληλουχία με τη μητρική κληρονόμηση να είναι πολύ πιο συχνή στην αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων (Sutherland G.R. 1985).

#### **1.2 Σπάνια εύθραυστη θέση *FRA10A***

Στις σπάνιες αυτοσωματικές εύθραυστες θέσεις ανήκει και η *FRA10A* η οποία βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q23.3 (**Εικ. 1**) και εμφανίζεται όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν απουσία φυλλικού οξέος στο θρεπτικό μέσο. Η *FRA10A* είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη σπάνια εύθραυστη θέση στο γονιδίωμα του ανθρώπου με συχνότητα 1 στα 500 άτομα (Sarafidou *et al.* 2004). Επίσης σε όλες τις περιπτώσεις που έγινε έλεγχος της γονεϊκής προέλευσης της *FRA10A*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κληρονόμησή της ήταν μητρικής προέλευσης (Sutherland 1982 & 1985, Kahkonen *et al.* 1989).

Ο εντοπισμός της εύθραυστης θέσης *FRA10A* οδήγησε στην κλωνοποίηση του γονιδίου *FRA10AC1*, βάσει της χρωμοσωματικής του θέσης και του εντοπισμού της πολυμορφικής επανάληψης (CGG)η στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του. Όπως ισχύει και για τις άλλες εύθραυστες θέσεις αυτής της κατηγορίας, η κυτταρογενετική έκφραση της *FRA10A* οφείλεται στην επέκταση πάνω από 200 φορές της πολυμορφικής επανάληψης (CGG)η η οποία οδηγεί στην υπερμεθυλίωση της περιοχής, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη καταστολή της μεταγραφής του αντίστοιχου αλληλομόρφου (Sarafidou *et al.* 2004).



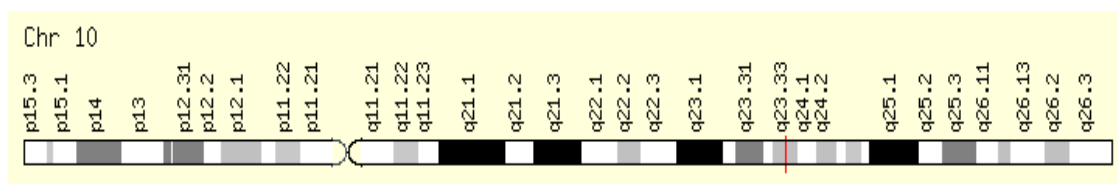
**Εικόνα 1:** Σπάνια αυτοσωμική εύθραυστη θέση *FRA10A* στο χρωμόσωμα 10q23.3 (Sarafidou *et al.* 2004).

### 1.2.1 Παθολογικός φαινότυπος και εύθραυστη θέση *FRA10A*

Η παρουσία της εύθραυστης θέσης *FRA10A* δεν έχει συσχετιστεί με συγκεκριμένο παθολογικό φαινότυπο μέχρι σήμερα. Παρόλα αυτά, διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η έκφρασή της μπορεί να σχετίζεται με νοητική υστέρηση και αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως δυσμορφικά χαρακτηριστικά, μικρό ανάστημα και δυσχέρεια λόγου (Mavrou *et al.* 1991, Petit *et al.* 1986, Sutherland 1982 & 1985, Kahkonen *et al.* 1989, Sarafidou *et al.* 2004). Σε κάποιες μελέτες, η *FRA10A* ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στα προσβεβλημένα άτομα (Sutherland 1985, Petit *et al.* 1986, Mavrou *et al.* 1991) ενώ σε άλλες εντοπίστηκαν και ορισμένα υγιή άτομα-φορείς (Sutherland 1982, Kahkonen *et al.* 1989, Sarafidou *et al.* 2004), γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει ότι η ετεροζυγωτία αυτής της θέσης δεν συσχετίζεται απαραίτητα με παθολογικό φαινότυπο. Εναλλακτικά, αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη διεισδυτικότητα του παθολογικού φαινοτύπου στον πληθυσμό έτσι ώστε να μην εμφανίζονται σε ένα ποσοστό ατόμων-φορέων τα κλινικά συμπτώματα όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των ατόμων που πάσχουν από το σύνδρομο του εύθραυστου Χ.

### 1.2.2 Το γονίδιο *FRA10AC1*

Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφήθηκε στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23.3 του ανθρώπου (**Εικ. 2**). Περιέχει 19 εξόνια και εκτείνεται σε μήκος περίπου 35 kb. Το εξόνιο 1 αντιστοιχεί στην 5' αμετάφραστη περιοχή και περιλαμβάνει τις τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (CGG)<sub>n</sub>. Οι επαναλήψεις αυτές είναι πολυμορφικές στον γενικό πληθυσμό και κυμαίνονται από 8 έως 14. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται στην αρχή του εξονίου 2 και το κωδικόνιο λήξης στο τελευταίο εξόνιο με προσανατολισμό της μεταγραφής από το τελομερές προς το κεντρομερές. Από τα 19 εξόνια τα 5 υπόκεινται σε εναλλακτική συναρμογή (Sarafidou *et al.* 2004).



**Εικόνα 2:** Το γονίδιο *FRA10AC1* χαρτογραφείται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 10, στην περιοχή 10q23.33 ( από GeneCards, Human Gene Database).

### 1.2.3 Πρότυπο έκφρασης

Μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν την παρουσία ενός κύριου μεταγράφου του γονιδίου *FRA10AC1* περίπου 1,45 kb το οποίο εντοπίστηκε σε όλους τους ιστούς ενήλικων ατόμων παρουσιάζοντας υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε όργανα με υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα (εγκέφαλος, καρδιά, σκελετικοί μυς, ήπαρ, νεφρό). Όλοι οι άλλοι ιστοί εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα εκτός των λευκοκυττάρων, στα οποία η έκφραση ήταν μόλις ανιχνεύσιμη. Με αντίστροφη μεταγραφή συζευγμένη με PCR (RT-PCR) επιβεβαιώθηκε ότι το γονίδιο εκφράζεται παντού και ανιχνεύονται εναλλακτικά μετάγραφα σε μερικούς ιστούς, ιδιαίτερα στην ωοθήκη και στους όρχεις. Μετά από ανάλυση της αλληλουχίας δείχθηκε ότι τα μετάγραφα αυτά οφείλονται στην εναλλακτική συναρμογή των εξονίων 13-16 (Sarafidou *et al.* 2004). Σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων από τα πέντε είδη εναλλακτικών μεταγράφων που υπάρχουν έδειξε ότι η ακολουθία των αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο είναι διαφορετική. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να υποδεικνύει αντίστοιχο αριθμό ισομορφών της πρωτεΐνης *FRA10AC1* (Sarafidou *et al.* 2004).

#### 1.2.4 Η πρωτεΐνη FRA10AC1

Το κύριο μετάγραφο του γονιδίου *FRA10AC1* κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη 315 αμινοξέων με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 37,5 kD. Η *FRA10AC1* περιέχει αρκετές θέσεις για φωσφορυλίωση σερίνης και ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού στην περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 223-238 και 245-262 ενσωματωμένα μέσα σε μια μεγαλύτερη περιοχή πλούσια σε λυσίνη (αμινοξέα 129-269) (Sarafidou *et al.* 2004). Ο πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα στο πυρηνόπλασμα, δείχθηκε τόσο για την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μετά από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών, όσο και για την ενδογενή πρωτεΐνη, η οποία ανιχνεύθηκε με ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα (Sarafidou *et al.* 2004).

##### ➤ Ορθόλογα της πρωτεΐνης FRA10AC1

Η πρωτεΐνη *FRA10AC1* είναι συντηρημένη μεταξύ των ειδών και εμφανίζει ορθόλογα σε πλήθος ζωικών και φυτικών ευκαρυωτικών οργανισμών. Αναλυτικότερα, η ακολουθία της πρωτεΐνης του ανθρώπου είναι ταυτόσημη κατά 86% με την ακολουθία της ορθόλογης πρωτεΐνης του ποντικού και παρουσιάζει ομολογία 92%. Επίσης, παρουσιάζει ομοιότητα 35% με την ορθόλογη πρωτεΐνη του φυτού *Arabidopsis thaliana* καθώς και του *C. elegans*. Η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης (αμινοξέα 105-240) εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό ταυτότητας (45 έως 67%) με τα υπόλοιπα ορθόλογα. Παρόλα αυτά κανένα από τα ορθόλογα μόρια δεν έχει μελετηθεί λειτουργικά και δε φέρει κάποιο χαρακτηριστικό πρότυπο που να εντάσσει την πρωτεΐνη σε συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών.

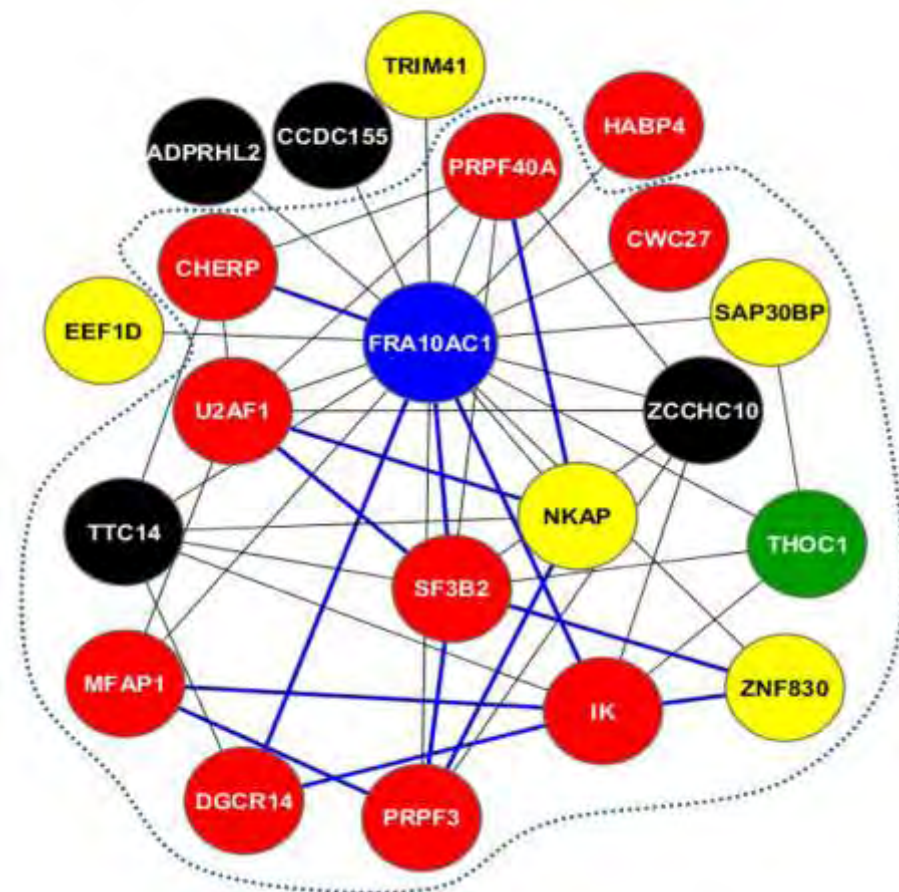
#### 1.2.5 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1

Η πρωτεΐνη *FRA10AC1*, σύμφωνα με πειραματικές μελέτες ταυτοποίησης αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, συνκατακρήμνισης και ανοσοκατακρήμνισης αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη *DGCR14* και την *SAP145* (Εικ. 3). Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η κεντρική περιοχή της *FRA10AC1* (αμινοξέα 96-253), η οποία είναι και αυτή που εμφανίζει την υψηλότερη συντήρηση μεταξύ των ορθολόγων μορίων, αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή της *DGCR14* (αμινοξέα 294-472) η οποία περιέχει ένα μοτίβο coiled-coil, δομή που συμμετέχει σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Το γονίδιο *DGCR14* έχει

ταυτοποιηθεί αρχικά ως πιθανό υποψήφιο για το σύνδρομο DiGeorge, ένα σύνδρομο με κύριο χαρακτηριστικό τις καρδιακές ανωμαλίες οι οποίες συνοδεύονται από χαρακτηριστικό προσωπείο (Rizzu *et al.* 1996, Gong *et al.* 1997). Αντίστοιχα η πρωτεΐνη SAP145 κωδικοποιείται από το γονίδιο *SF3B2* και αποτελεί συστατικό του συμπλόκου U2 snRNP και βοηθάει το σύμπλοκο αυτό να συνδεθεί στο πρόδρομο mRNA κατά την διαδικασία της συναρμογής (Gozani *et al.* 1996). Οι πρωτεΐνες DGCR14 και SAP145 προσδιορίστηκαν ως συστατικά του σωματίου συναρμογής και πιο συγκεκριμένα του συμπλόκου C (Bessonov *et al.* 2010). Επομένως, εξετάζοντας τις δύο αυτές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 εξάγεται το συμπέρασμα ότι πιθανώς και η FRA10AC1 σχετίζεται με τη διαδικασία της συναρμογής ή με κάποια άλλη λειτουργικά σχετιζόμενη διαδικασία. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της καθώς έχει εντοπιστεί στο πυρηνόπλασμα (Sarafidou *et al.* 2004).

Εκτός από τις DGCR14 και SAP145, βάσει πειραμάτων μεγάλης κλίμακας με το σύστημα δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα, η πρωτεΐνη FRA10AC1 φαίνεται να αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην ρύθμιση της μεταγραφής, (**Εικ. 3**) όπως α) ο NKAP B) η πρωτεΐνη Zinc finger 830, η οποία δρα ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου καθώς συμμετέχει στην διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος καθώς κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου εμποδίζει την κατάρρευση της διχάλας αντιγραφής του DNA και συμμετέχει στην ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Uniprot Database), γ) η TRIM41 η οποία συμμετέχει στην ουβικουϊτίνωση άλλων πρωτεϊνών και λειτουργεί ως E3 λιγάση που καταλύει την ουβικουϊτίνωση και αποικοδόμηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Uniprot Database), δ) η THOC1 (**Εικ. 3**) που είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική έξοδο του πολυαδενυλιωμένου mRNA από τον πυρήνα καθώς αποτελεί συστατικό του υποσυμπλόκου THO του συμπλόκου TREX το οποίο θεωρείται ότι συνδέει την μεταγραφή του mRNA, με την επεξεργασία και την έξοδο από τον πυρήνα (Uniprot Database).



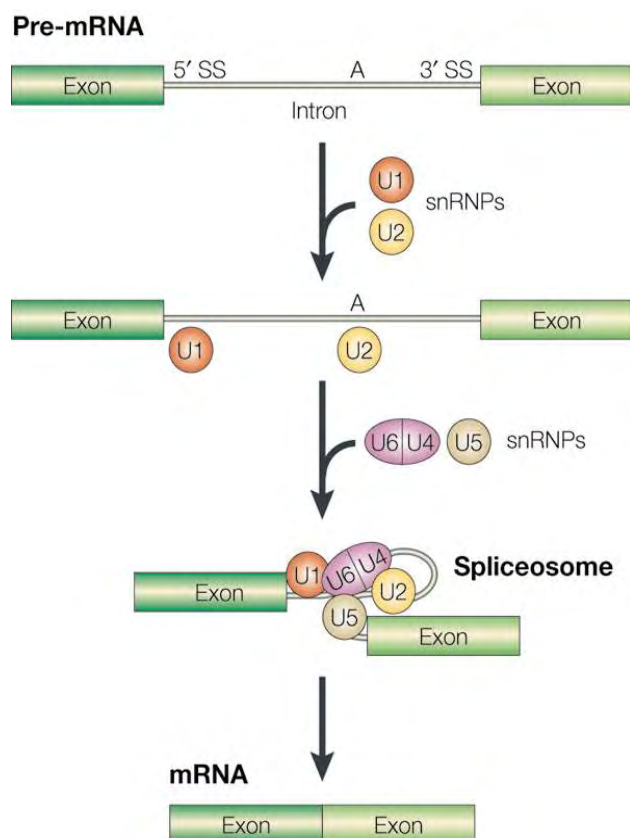


**Εικόνα 3: Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης FRA10AC1.** Μέσα στον κύκλο βρίσκονται οι πρωτεΐνες που αποτελούν συστατικά του σωματίου συναρμογής. Παρουσιάζονται οι παράγοντες συναρμογής (κόκκινο), οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ρύθμιση της μεταγραφής (κίτρινο), η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την έξοδο του ώριμου mRNA από τον πυρήνα (πράσινο) και πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας (μαύρο). Οι έντονες γραμμές υποδηλώνουν αξιόπιστες αλληλεπιδράσεις που ταυτοποιήθηκαν με περισσότερες από μια πειραματικές μεθόδους (από Galliourouli *et al.* ESHG, 2015).

### 1.3 Μηχανισμός συναρμογής

Η συναρμογή αποτελεί το στάδιο επεξεργασίας του RNA κατά το οποίο απομακρύνονται τα ιντρόνια και συνενώνονται τα εξώνια. Έτσι, ολοκληρώνεται η διαδικασία ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA) σε mRNA και το μόριο είναι πλέον έτοιμο να μεταφραστεί. Η συναρμογή του RNA είναι μία πολύπλοκη διεργασία που γίνεται από το σωματίο συναρμογής που είναι σύμπλοκο πρωτεϊνών και μικρών μορίων RNA το οποίο συναρμολογείται διαδοχικά πάνω στο πρόδρομο mRNA (**Εικ. 4**). Η συναρμογή λαμβάνει χώρα στον πυρήνα παράλληλα με τις άλλες τροποποιήσεις του νεοσυντιθέμενου RNA. Το μετάγραφο καλύπτεται στο 5' άκρο, πολυαδενυλιώνεται στο 3' άκρο και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα διαμέσου των πυρηνικών πόρων (Lewin B. 2004).

Αναλυτικότερα η ωρίμανση αρχίζει με την αναγνώριση της 5' θέσης διάσπασης από την U1 snRNP και τον σχηματισμό του συμπλόκου E. Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει την υπομονάδα U1 snRNP, τον παράγοντα συναρμογής U2AF και μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών SR οι οποίες συνδέουν τους δύο αυτούς παράγοντες. Ένας επιπλέον παράγοντας συναρμογής είναι ο SF1 ο οποίος συνδέει τον παράγοντα U2AF στο U1 snRNP. Το σύμπλοκο E μετατρέπεται σε πρόδρομο σύμπλοκο A με την πρόσδεση της υπομονάδας U2 snRNP. Η πρόσδεση των U5 και U4/U6 μετατρέπει το σύμπλοκο A στο σωματίο συναρμογής, το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για τη συναρμογή. Έπειτα από αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων δημιουργείται δομή ενδομοριακής θηλιάς στο εσωτερικό του U6 snRNA. Οι δομικές αυτές αλλαγές οδηγούν στο σχηματισμό του συμπλόκου C (U2, U5, U6) κατά το οποίο πραγματοποιείται το πρώτο καταλυτικό βήμα της συναρμογής για το πρόδρομο mRNA (Lewin B. 2004).

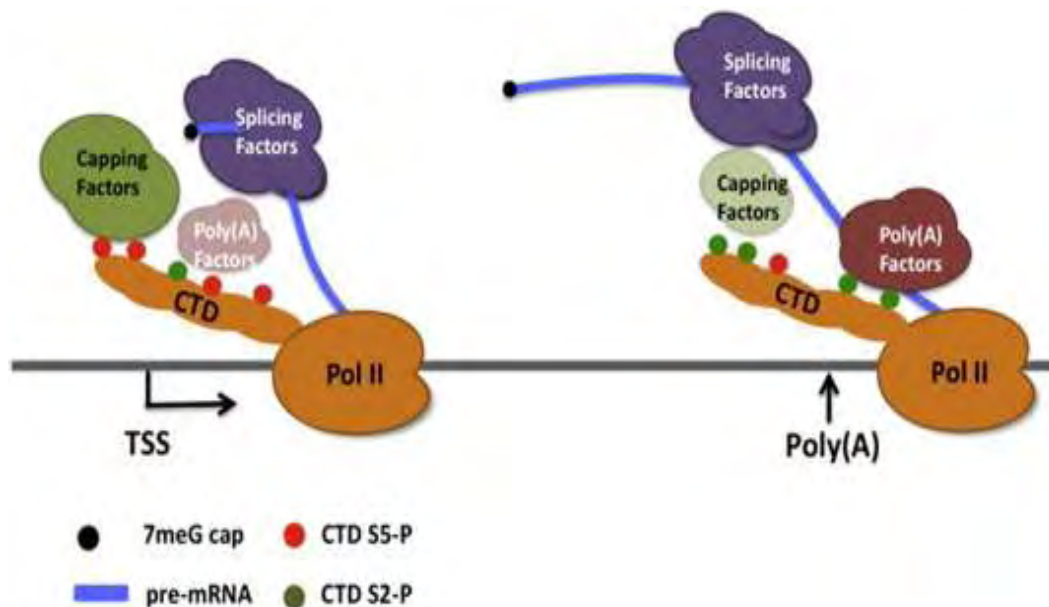


Nature Reviews | Neuroscience

**Εικόνα 4:** Μονοπάτι για την συγκρότηση του σωματίου συναρμογής (από Dredge K. *et al.* 2001).

### 1.3.1 Συσχέτιση συναρμογής με την μεταγραφή και επεξεργασία του mRNA

Η συναρμογή δεν είναι μια αυτόνομη διαδικασία, αλλά αντ' αυτού σχετίζεται λειτουργικά και με άλλες διαδικασίες επεξεργασίας του RNA όπως η μεταγραφή και η έξοδος από τον πυρήνα. Έτσι, τα κύρια βήματα επεξεργασίας του mRNA όπως η προσθήκη καλύπτρας, η συναρμογή και η πολυαδενυλίωση, πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με την μεταγραφή και όχι μετά από αυτήν. Για να πραγματοποιηθεί αυτό σημαντικό ρόλο παίζει η RNA πολυμεράση II (pol II), η οποία περιέχει το καρβοξυτελικό άκρο (CTD) που απαιτείται για όλες τις κύριες αντιδράσεις επεξεργασίας του mRNA και για την στρατολόγηση των παραγόντων συναρμογής στην περιοχή της μεταγραφής. Η συν-μεταγραφική φύση της ωρίμανσης του mRNA σημαίνει ότι το φυσιολογικό υπόστρωμα των παραγόντων επεξεργασίας δεν είναι ένα πλήρους μήκους ελεύθερα διαχεόμενο πρόδρομο mRNA, αλλά ένα σύμπλοκο επιμήκυνσης της μεταγραφής με ένα αυξανόμενο RNA. Το «εργοστάσιο mRNA» (Εικ. 5) είναι ένα χρήσιμο μοντέλο για το πώς συμβαίνουν οι διαδικασίες της μεταγραφής, επιμήκυνσης και επεξεργασίας του RNA την ίδια χρονική στιγμή και στο ίδιο σημείο μέσα σε ένα δυναμικό μακρομοριακό σύμπλοκο που περιλαμβάνει τόσο παράγοντες σύνθεσης αλλά και επεξεργασίας του mRNA (Saldi T. *et al.* 2016).



**Εικόνα 5: Το «εργοστάσιο mRNA».** Σύζευξη της μεταγραφής με την επεξεργασία του πρόδρομο mRNA μέσα σε ένα σύμπλοκο το οποίο περιλαμβάνει τόσο συστατικά σύνθεσης αλλά και επεξεργασίας του mRNA. Η στρατολόγηση των παραγόντων επεξεργασίας του mRNA γίνεται μέσω δυναμικών αλληλεπιδράσεων με την περιοχή CTD (από Saldi T. *et al.* 2016).

Οι παράγοντες επεξεργασίας του mRNA αλληλεπιδρούν μεταξύ τους έτσι ώστε να ελέγχει ο ένας την λειτουργία του άλλου. Πιο συγκεκριμένα το U1 snRNP και τα συστατικά του ρυθμίζουν αρνητικά την πολυαδενυλίωση του προδρόμου mRNA, μια λειτουργία που είναι απαραίτητη για την προστασία της ακεραιότητας του mRNA, για τη ρύθμιση του μήκους του και για την κατεύθυνση της μεταγραφής. Επιπλέον, φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μεταξύ παραγόντων συναρμογής και παραγόντων επεξεργασίας του 3'-άκρου στο τελευταίο εξόνιο. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν την συναρμογή και την επεξεργασία του 3'-άκρου. Ως εκ τούτου, η συναρμογή και η επεξεργασία του 3'-άκρου ρυθμίζονται με πολλούς τρόπους μέσα από ένα δίκτυο αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών (Daisuke Kaida, 2016).

### **1.3.1 Συσχέτιση συναρμογής με την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα**

Μετά τη σύνθεση και την ωρίμανσή του, το mRNA εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με την μορφή ενός ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου. Το σωματίο συναρμογής παρέχει το αρχικό σημείο αλληλεπίδρασης με τους παράγοντες εξόδου και πιο συγκεκριμένα μέσω του πρωτεϊνικού συμπλόκου EJC το οποίο προσδένεται στο mRNA μετά την συναρμογή. Το EJC περιλαμβάνει μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζεται οικογένεια REF. Οι πρωτεΐνες REF προσδένονται σε έναν παράγοντα εξόδου από τον πυρήνα ο οποίος με την σειρά του συνδέεται με τον πυρηνικό πόρο οδηγώντας στην έξοδο του ώριμου mRNA από τον πυρήνα (Lewin, 2004).

#### 1.4 ΣΚΟΠΟΣ

Η εργασία ανήκει στην γενικότερη προσπάθεια κατανόησης της λειτουργίας της πρωτεΐνης FRA10AC1 του ανθρώπου. Η FRA10AC1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *FRA10AC1* που χαρτογραφείται στην εύθραυστη χρωμοσωματική θέση *FRA10A* στην περιοχή 10q23.3. η οποία έχει συσχετιστεί με φαινότυπο ήπιας νοητικής υστέρησης. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί συστατικό του σωματίου συναρμογής και αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συναρμογή, στη μεταγραφή και την έξοδο του ώριμου mRNA από τον πυρήνα. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία μιας πλασμιδιακής κατασκευής έτσι ώστε να είναι εφικτή η επαγόμενη έκφραση της πρωτεΐνης FRA10AC1 του ανθρώπου σε κύτταρα θηλαστικών και πιο συγκεκριμένα, η δημιουργία ανασυνδυασμένου πλασμιδίου που να περιέχει κλωνοποιημένο το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου σε σύντηξη με τους επιτόπους πολυιστιδίνης και Xpress που προέρχονται από τον φορέα pcDNA-3.1 His C, στον φορέα pcDNA 4TO. Το ανασυνδυασμένο αυτό πλασμίδιο να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ελεγχόμενη μέσω του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη έκφραση του γονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών μετά τη δημιουργία σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς η οποία θα φέρει ενσωματωμένο στο γονιδίωμά της το πλασμίδιο που παράγει τον καταστολέα της τετρακυκλίνης. Συνεπώς η κατασκευή που θα δημιουργηθεί να είναι χρήσιμη για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης FRA10AC1 σε κύτταρα θηλαστικών με απώτερο σκοπό την κατανόηση της λειτουργίας της.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Πλασμιδιακές κατασκευές και πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης

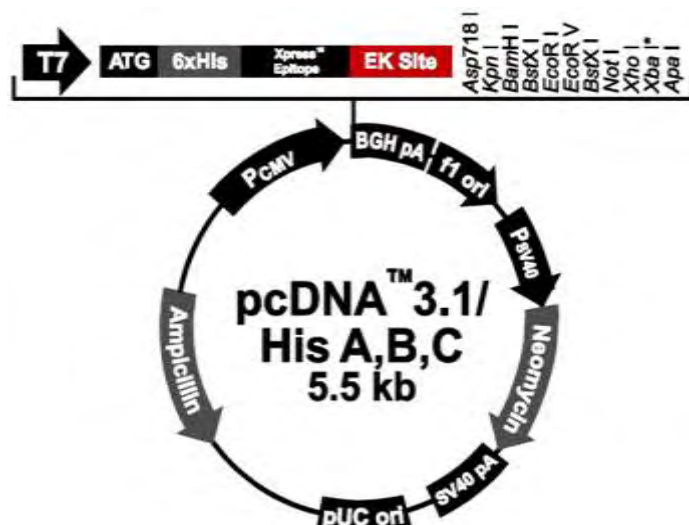
Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά μόρια DNA, μήκους λίγων χιλιάδων ζευγών βάσεων. Σε κάθε βακτηριακό κύτταρο μπορεί να υπάρχουν από ένα έως αρκετές εκατοντάδες πλασμίδια και αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του βακτηρίου-ξενιστή. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε πολλά αντίγραφα ανά κύτταρο. Περιέχουν ένα τουλάχιστον γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, γεγονός που είναι απαραίτητο για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων που περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Εκτός από την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, έχουν κι άλλες ιδιότητες, όπως είναι η δυνατότητα να μεταβολίζουν τη λακτόζη γεγονός που επιτρέπει την επιλογή των βακτηριακών αποικιών που περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια υπό τη δράση κατάλληλων υποστρωμάτων (Watson *et al.* 2007). Οι πλασμιδιακοί φορείς χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA.

### 2.1.1 pcDNA 3.1 His C/*FRA10AC1*

Αυτό το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιλαμβάνει το φορέα pcDNA 3.1 His C, μεγέθους 5.5kb ο οποίος έχει σχεδιαστεί για υψηλού επιπέδου έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών καθώς φέρει τον ισχυρό υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (human cytomegalovirus immediate-early promoter, CMV). Ο φορέας είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε οι χιμαιρικές πρωτεΐνες να φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο: (α) έναν επίτοπο πολυιστιδίνης (6xHis epitope) και (β) έναν επίτοπο για το αντίσωμα Xpress (Xpress epitope). Άλλα στοιχεία του φορέα είναι: μια περιοχή με πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων (multiple cloning site) που χρησιμεύει στην κλωνοποίηση του επιθυμητού cDNA, μια θέση έναρξης της αντιγραφής (ρUC origin) για τον πολλαπλασιασμό σε βακτηριακά κύτταρα (κυρίως *E. coli*) και γονίδια ανθεκτικότητας για τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (για την επιλογή του φορέα σε βακτηριακά κύτταρα) και νεομυκίνη (για την επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων θηλαστικών) (**Εικ. 6**).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει το cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1* κλωνοποιημένο μεταξύ των ενζύμων περιορισμού *BamHI-EcoRI* του φορέα pcDNA 3.1 His C. Αντίστοιχα, η συγκεκριμένη πλασμιδιακή κατασκευή είχε δημιουργηθεί από μία άλλη που έφερε το cDNA πλήρους μήκους στον φορέα pGEM\_T\_Easy μετά από αντίστροφη μεταγραφή συζευγμένη με PCR με τους εκκινητές **F** (CGG/GATCCGAAAGGATGCATGGT

CATG) και **R4** (CGG/AATTCGAAACAAATCCTGAAAATACTC) σε cDNA από όρχεις ανθρώπου (οι εκκινητές φέρουν θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού *Bam*HI και *Eco*RI αντίστοιχα).



**Εικόνα 6:** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA 3.1 His C (από Invitrogen, Cat. No. V385-20).

### 2.1.2 pcDNA 4/TO

Ο pcDNA 4/TO είναι ένας φορέας 5.1kb ο οποίος χρησιμοποιείται για την ελεγχόμενη μέσω του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη (μόνιμη ή παροδική) έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών τα οποία είναι διαμολυσμένα και με το πλασμίδιο pcDNA 6/TR. Πιο συγκεκριμένα, ο φορέας pcDNA 4/TO φέρει 2 ρυθμιστικές περιοχές τετρακυκλίνης (tetracyclin operator 2, TetO<sub>2</sub>) στον υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (**Εικ. 8**) (Andersson *et al.* 1989). Σε αυτές τις ρυθμιστικές περιοχές προσδένονται 2 ομοδιμερή μόρια καταστολέων τετρακυκλίνης, τα οποία εκφράζονται από το πλασμίδιο pcDNA 6/TR (Postle *et al.* 1984). Έτσι, όταν έχει κλωνοποιηθεί το επιθυμητό cDNA στον pcDNA 4/TO, σε κύτταρα θηλαστικών διαμολυσμένα και με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA 4/TO και με το πλασμίδιο pcDNA 6/TR:

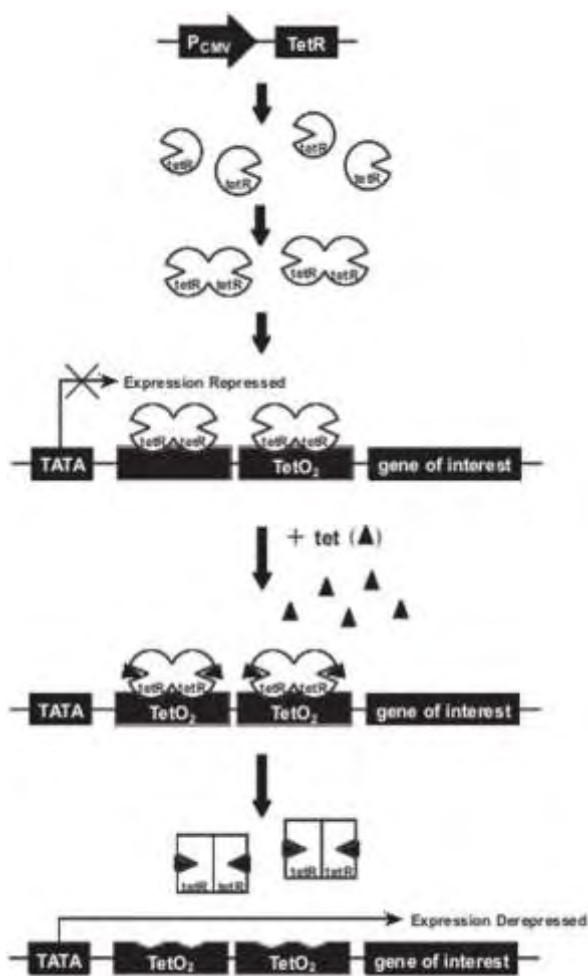
(α) **απουσία τετρακυκλίνης** στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, οι καταστολείς συνδέονται στις ρυθμιστικές περιοχές TetO<sub>2</sub> του pcDNA 4/TO και δεν επιτρέπεται με αυτό τον τρόπο η έκφραση του γονιδίου (Hillen and Berens, 1994),

(β) **παρουσία τετρακυκλίνης** στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, αυτή προσδένεται με υψηλή συγγένεια σε κάθε καταστολέα (με αναλογία 1:1 μόριο) και προκαλεί



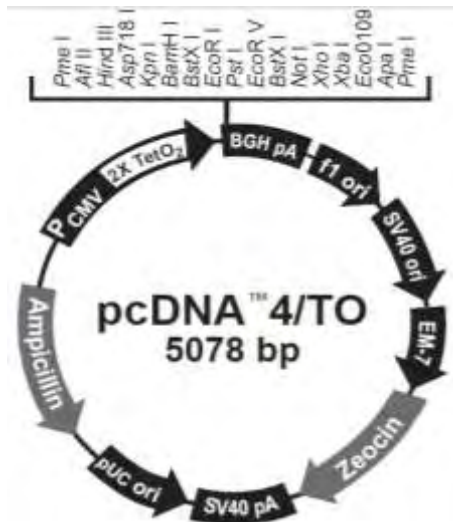
αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωσή του που τον καθιστά ανίκανο να προσδεθεί στις ρυθμιστικές περιοχές του TetO<sub>2</sub> του pcDNA 4/TO. Με αυτό τον τρόπο το γονίδιο είναι ελεύθερο να μεταγραφεί (Yao *et al.* 1998) (Εικ. 7).

Το παραπάνω σύστημα έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών που εξαρτάται από την τετρακυκλίνη ονομάζεται T-Rex System.



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση του συστήματος επαγόμενης έκφρασης γονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών (από Invitrogen, Cat. No. K1020-01).

Το ένθεμα-cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1* που απομονώθηκε από τον φορέα pcDNA 3.1 His C κλωνοποιήθηκε στον φορέα pcDNA 4/TO στην περιοχή του πολυσυνδέτη, στις θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού *HindIII* και *EcoRI* (Εικ. 8).



**Εικόνα 8:** Σχεδιαγραμματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA 4/TO (από Invitrogen, Cat. No. V1020-20).

## 2.2 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Η τεχνολογία του ανασυνδευόμενου DNA αποτελεί τη βάση της κλωνοποίησης. Κλωνοποίηση είναι η τεχνική με την οποία ένα συγκεκριμένο ξένο τμήμα DNA παράγεται σε μεγάλες ποσότητες αφού πρώτα εισαχθεί σε έναν κατάλληλο φορέα (π.χ. πλασμίδιο) και μετασχηματιστεί σε κύτταρα ξενιστή, όπως σε ένα βακτήριο. Οι τεχνικές του ανασυνδευόμενου DNA βασίζονται στη χρήση ειδικών ενζύμων που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια, και η φυσιολογική τους λειτουργία είναι να προστατεύουν τους μικροοργανισμούς αυτούς από την εισβολή ξένου DNA μεθυλιώνοντας τις θέσεις στόχους των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και να τεμαχίζουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις (Watson *et al.* 2007). Τα ένζυμα περιορισμού κόβουν δίκλινα μόρια. Καθένα αναγνωρίζει ακολουθίες 4-8 νουκλεοτιδίων που έχουν ένα άξονα συμμετρίας και κόβουν το DNA μέσα σε αυτές τις ακολουθίες. Οι θέσεις αυτές καλούνται «θέσεις περιορισμού». Τα διαφορετικά είδη των βακτηρίων έχουν διαφορετικά ένζυμα περιορισμού. Οι ακολουθίες που αναγνωρίζονται είναι συνήθως παλίνδρομα. Δηλαδή οι αλληλουχίες στους δυο κλώνους DNA είναι ίδιες στο σημείο αναγνώρισης όταν διαβάζονται στην κατεύθυνση 5' → 3' στον κάθε κλώνο. Ανάλογα με τον τρόπο πέψης, τα ένζυμα περιορισμού δημιουργούν τμήματα DNA με συμπληρωματικά (κολλώδη) ή τυφλά (λεία) άκρα (Watson *et al.* 2007).

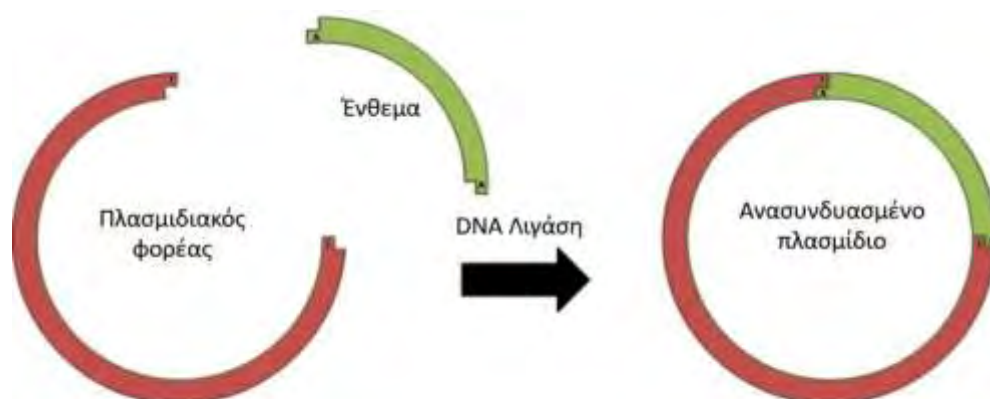
Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν πέψεις με ένζυμα περιορισμού σε πλασμιδιακό φορέα και ανασυνδυασμένο πλασμίδιο προκειμένου να απομονωθεί το ένθεμα και να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση καθώς και σε όλους τους ελέγχους που έγιναν προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ενθέματος. Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις άριστες συνθήκες στις οποίες λειτουργεί ένα ένζυμο (θερμοκρασία, pH, μοριακότητα ρυθμιστικού διαλύματος σε άλατα). Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *EcoRI* (αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-G|AATTC - 3') και το *HindIII* (αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-A|AGCTT-3). Ο τεμαχισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με περίσσεια ενζύμου σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

- Για την διπλή πέψη του ενθέματος από τον φορέα pcDNA 3.1 His C χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες σε τελικό όγκο πέψης 100 μl.
  - ✓ 38 μl DNA (7 μg)
  - ✓ 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα NEB Buffer 3.1 (New England Biolabs, B7203S)
  - ✓ 7 μl ένζυμο *HindIII* (R0104S), (20 units/μl)
  - ✓ 5 μl ένζυμο *EcoRI* (R0101S), (20 units/μl)
  - ✓ 40 μl αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O
  
- Για την πέψη του φορέα pcDNA 4TO χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες σε τελικό όγκο πέψης 300 μl.
  - ✓ 60 μl DNA (48 μg)
  - ✓ 30 μl ρυθμιστικό διάλυμα NEB Buffer 2.1 (New England Biolabs, B7202S)
  - ✓ 9 μl ένζυμο *HindIII* (20 units/μl)
  - ✓ 201 μl αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O
  
- Για την πέψη του φορέα pcDNA 4TO/*HindIII* χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες σε τελικό όγκο πέψης 250 μl.
  - ✓ 96 μl DNA (16 μg)
  - ✓ 25 μl ρυθμιστικό διάλυμα Buffer *EcoRI* (B0101S),
  - ✓ 8 μl ένζυμο *EcoRI* (20 units/μl)
  - ✓ 129 μl αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O

Τα ένζυμα περιορισμού προστίθενται στο τέλος και η επώαση πραγματοποιείται ολονύκτια στους 37°C για καλύτερα αποτελέσματα.

### 2.3 Αντίδραση σύνδεσης (ligation)

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης στην οποία χρησιμοποιούνται ένζυμα που ονομάζονται λιγάσες. Οι λιγάσες έχουν την ιδιότητα να επανενώνουν τα τμήματα DNA που έχουν προέλθει από πέψη με ένζυμα περιορισμού. Έτσι δημιουργούνται νέα μόρια DNA που περιέχουν τμήματα από διαφορετικές πηγές (**Εικ. 9**) (Watson *et al.* 2007). Για τη σύνδεση γραμμικών μορίων DNA χρησιμοποιείται η λιγάση του DNA του βακτηριοφάγου T4, η οποία καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των νουκλεοτιδίων στο DNA (Weiss *et al.* 1968).



**Εικόνα 9:** Διαδικασία σχηματισμού ανασυνδυασμένου πλασμιδίου μέσω της αντίδρασης σύνδεσης.

- Για την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε:
  - ✓ 1 μl (150 ng) γραμμικό πλασμιδιακό DNA (φορέας → pcDNA 4TO)
  - ✓ 3 μl (500 ng) γραμμικό ένθεμα DNA (ένθεμα → *FRA10AC1*)
  - ✓ 0.6 μl ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης
  - ✓ 0.5 μl T4 DNA λιγάση (350 units/μl) (Takara, No. 2011A)
  - ✓ 1.4 μl αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 6 μl

Το ένζυμο προστέθηκε τελευταίο και η αντίδραση σύνδεσης επωάστηκε ολονύκτια στους 4°C.

Για τον υπολογισμό των κατάλληλων συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων λήφθηκαν υπόψη τα εξής: α) Για προεξέχοντα άκρα και προσανατολισμένη κλωνοποίηση, η αναλογία ελεύθερων άκρων των μορίων του φορέα προς τα μόρια του ενθέματος κυμαίνεται σε 1:1 με 1:10. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία επιλέχθηκε η αναλογία φορέας: ένθεμα = 1:3.

## 2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (πολυσακχαρίτης που παράγεται από φύκη) είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA και αυτό γιατί είναι απλή, γρήγορη στην εφαρμογή και αρκετά ευαίσθητη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να διαχωριστούν τα τμήματα του DNA που έχουν προκύψει από τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού.

Πιο αναλυτικά τα νουκλεϊκά οξέα κινούνται στο πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Συγκεκριμένα, τα νουκλεϊκά οξέα, τα οποία είναι φορτισμένα αρνητικά σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων, κινούνται προς την άνοδο (θετικός πόλος) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους (τα μόρια μικρότερου μήκους κινούνται ταχύτερα από τα μόρια μεγαλύτερου μήκους). Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων που σχηματίζονται στο πήκτωμα, άρα και το μέγεθος των τμημάτων DNA που μπορούν να διαχωριστούν κινούμενα μέσα από αυτούς. Όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της χρησιμοποιούμενης αγαρόζης τόσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των πόρων του σχηματιζόμενου πλέγματος. Ο ρυθμός μετακίνησης εξαρτάται και από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως η διαμόρφωση του μορίου, η θερμοκρασία, το είδος του χρησιμοποιούμενου μέσου, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος και το μέγεθος της εφαρμοζόμενης τάσης.

Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα διαφορετικά μόρια DNA καθώς μετακινούνται σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές του πηκτώματος, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA. Δηλαδή, με την ηλεκτροφόρηση επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ενός μίγματος γραμμικών μορίων DNA σε ζώνες. Οι ζώνες δεν είναι ορατές κατά την πορεία της ηλεκτροφόρησης, γίνονται όμως ορατές με προσθήκη στο πήκτωμα μιας χρωστικής που δεσμεύεται στο DNA το βρωμιούχο αιθίδιο και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (Sambrook, et. al. 1989).

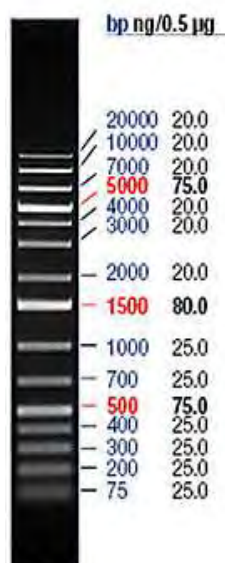
### ➤ Κατασκευή πηκτώματος αγαρόζης:

1. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα με συγκεντρώσεις αγαρόζης από 1-2 % ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που έπρεπε να διαχωριστούν, με ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. (από πυκνό διάλυμα 50xTAE με σύσταση: 200 mM Tris hydroxymethyl aminomethane, 200 mM οξικό οξύ και 1 mM EDTA pH 8.0).

2. Το διάλυμα με την αгарόζη και το 1xTAE ζεσταίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται σε μέτρια έως υψηλή ισχύ έως ότου η αгарόζη διαλυθεί πλήρως.
3. Αφήνεται η αгарόζη να κρυώσει (στους ~60°C) και στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,1 μg/ml. Ανακινείται το διάλυμα ώστε να αναμιχθεί πλήρως το βρωμιούχο αιθίδιο στο διάλυμα.
4. Το διάλυμα της αгарόζης τοποθετείται στο κατάλληλα συναρμολογημένο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης (περιέχει χτένα για τη δημιουργία των πηγαδιών) και αφήνεται μέχρι να πήξει η αгарόζη.
5. Αφού στερεοποιηθεί, τοποθετείται το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει διάλυμα 1x TAE.
6. Αφαιρείται προσεκτικά η χτένα φροντίζοντας να παραμείνουν ανέπαφα τα πηγάδια, στα οποία τοποθετούνται στη συνέχεια τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα.
7. Στα δείγματα DNA που θα ηλεκτροφορηθούν προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης, προκειμένου η ηλεκτροφόρηση να παρακολουθείται στο ορατό φως και 30% γλυκερόλης προκειμένου το δείγμα να «βυθίζεται» στον πυθμένα των πηγαδιών του πηκτώματος.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιείται και για τον αδρό ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων DNA σε σχέση με κάποιον ποσοτικοποιημένο μάρτυρα (Ladder), ο οποίος περιέχει κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης. Η ποσοτικοποίηση στηρίζεται στην οπτική εκτίμηση του φθορισμού που παράγεται από τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου υπό υπεριώδες φως. Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται στα μόρια των νουκλεϊκών οξέων σε ποσότητα ανάλογη της συγκέντρωσής τους. Έτσι, μέσω της σύγκρισης του φθορισμού που εκπέμπεται από το άγνωστο δείγμα με τον φθορισμό που εκπέμπει το δείγμα γνωστής συγκέντρωσης και μεγέθους (σύγκριση της έντασης της ζώνης του υπό εξέταση μορίου DNA σε σχέση με την ένταση των ζωνών του DNA αναφοράς), επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση του άγνωστου δείγματος.

Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ο Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder ο οποίος αποτελείται από θραύσματα DNA μεγέθους 75 έως 20.000 bp (**Εικ. 10**).



**Εικόνα 10:** Μάρτυρας μοριακών μεγεθών, ο οποίος αποτελείται από μείγμα κομματιών DNA γνωστού μεγέθους (1 kb DNA ladder).

## 2.5 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός προϊόντων πέψης

Τα μόρια του DNA είναι δυνατόν να απομονωθούν από το πήκτωμα αγαρόζης και επομένως, η ηλεκτροφόρηση ενός μείγματος θραυσμάτων DNA αποτελεί παράλληλα και έναν τρόπο παρασκευής μεμονωμένων θραυσμάτων υψηλής καθαρότητας, υπό την προϋπόθεση βέβαια ότι οι ζώνες διαχωρίζονται στο πήκτωμα επαρκώς η μία από την άλλη. Όταν τα αρχικά μόρια DNA έχουν πολύ μεγάλο μέγεθος, όπως π.χ. συμβαίνει όταν αναλύονται δείγματα γονιδιωματικού DNA, τότε τα θραύσματα που παράγονται από την επεξεργασία με περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι πάρα πολλά, οπότε δεν σχηματίζονται ευδιάκριτες ζώνες κατά την ηλεκτροφόρησή τους, αλλά ένα μεγάλο συνεχές ίχνος. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία τα θραύσματα ήταν ξεκάθαρα καθώς αποτελούνταν από δύο τμήματα DNA, συνεπώς ήταν εύκολος ο διαχωρισμός τους. Έτσι για την απομόνωση των τμημάτων DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, διαχωρίστηκε το αντίστοιχο τμήμα του πηκτώματος με τη χρήση μιας καθαρής λεπίδας κάτω από υπεριώδες φως και το DNA απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Macherey-Nagel (Nucleospin Gel and PCR Clean-up, REF 740609.250).

## 2.6 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια δεκτικών βακτηρίων *E. coli* στελέχους *DH5a*

Μετασχηματισμός είναι ο μηχανισμός εκείνος κατά τον οποίον το βακτήριο δέχεται τμήματα ελεύθερου DNA προερχόμενα από άλλη πηγή (πλασμίδια). Λίγα βακτήρια είναι ικανά να προσλάβουν εξωγενές DNA *in vivo*, δηλαδή να είναι δεκτικά κύτταρα. Τα περισσότερα είδη βακτηρίων έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνουν και να ενσωματώνουν DNA από το θρεπτικό υλικό τους. Τις περισσότερες όμως φορές το «ξένο» DNA αποικοδομείται στην προσπάθεια ενσωμάτωσής του στο βακτήριο. Σε άλλες περιπτώσεις και υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ιδιαίτερα όταν το DNA είναι πλασμιδιακό, μπορεί να ενσωματωθεί στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων. Η πλήρης ενσωμάτωσή του επιτυγχάνεται με την προσωρινή αλλαγή της θερμοκρασίας (θερμικό σοκ) από τους 37°C στους 42°C.

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά βακτήρια *E.coli DH5a* τα οποία αποτελούν το κύριο στέλεχος βακτηρίων το οποίο χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό κατά την κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς καθώς η απόδοσή τους είναι αρκετά υψηλή.

Αναλυτικότερα τα βήματα της διαδικασίας μετασχηματισμού με θερμικό σοκ είναι (Sambrook *et al.* 1989):

1. Μεταφορά ενός δείγματος δεκτικών κυττάρων *E.coli DH5a* (Invitrogen, Cat. No 18265-017) από τους -80°C σε φρέσκο πάγο.
2. Επώαση για περίπου 10 min μέχρι να πραγματοποιηθεί η τήξη του δείγματος.
3. Προσθήκη του πλασμιδιακού DNA σε ποσότητα περίπου 10 ng και ήπια ανάδευση.
4. Επώαση σε πάγο για 15 min, κατά την οποία το DNA έρχεται σε επαφή με τα βακτήρια.
5. Τοποθέτηση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90 sec και άμεση μεταφορά στον πάγο όπου παραμένει για 1 min με αποτέλεσμα τα βακτήρια να υφίστανται θερμικό σοκ προκειμένου να δεχθούν το πλασμίδιο στο εσωτερικό τους.
6. Προσθήκη 1 ml υγρού LB, ήπια ανάδευση και επώαση για τουλάχιστον 1h στους 37°C ώστε να εκφραστεί το γονίδιο ανθεκτικότητας του πλασμιδίου.
7. Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκειμένου θρεπτικού υλικού αφήνοντας ελάχιστη ποσότητα για την επαναιώρηση της πελλέτας των κυττάρων.



9. Επίστρωση των κυττάρων σε αποστειρωμένο και στεγνό τρυβλίο Petri το οποίο περιείχε στερεό θρεπτικό μέσο LB.
10. Επώαση στους 37°C για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων.

Για να παρασκευαστεί στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν 10 gr LB Agar (Scharlau, 01-385) σε 250 ml H<sub>2</sub>O. Το μίγμα αποστειρώνεται και προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό και στην συγκεκριμένη περίπτωση αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100 μg/ml και τοποθετείται σε 10 τρυβλία Petri όπου στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την ανάκτηση μεγαλύτερης ποσότητας DNA, απομονώθηκε δείγμα από τις μοναδιαίες αποικίες που αναπτύχθηκαν και ακολούθησε επανακαλλιέργεια βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth (Scharlau, 02-385) (σύστασης: 10 gr ανά λίτρο casein-tryptone, 5 gr ανά λίτρο εκχύλισμα ζύμης, 10 gr NaCl ανά λίτρο). Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν 5 gr LB και 200 ml H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίστηκε στο 7-7,5 με διάλυμα NaOH. Ακολούθησε αποστείρωση και προσθήκη αμπικιλίνης συγκέντρωσης 100 μg/ml.

## 2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα

Για την απομόνωση καθαρού πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep.) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης. Η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA που απομονώνεται με αυτή την μέθοδο εξαρτάται από τον αριθμό αντιγράφων του πλασμιδίου και είναι της τάξεως των αρκετών μg (Sambrook *et al.* 1989). Συνήθως η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για τον ταυτόχρονο έλεγχο πολλών βακτηριακών αποικιών προκειμένου να εντοπιστούν τα κύτταρα εκείνα που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

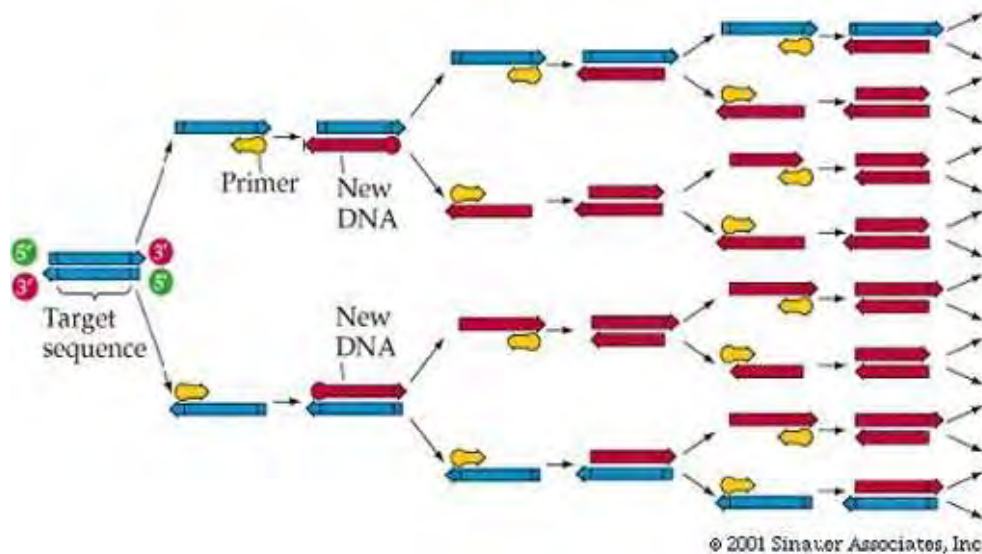
Πιο συγκεκριμένα η πορεία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

1. Μια μοναδιαία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. Coli* στελέχους *DH5a* μεταφέρεται υπό στείρες συνθήκες σε 2-3 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB που περιέχει το αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη 100 μg/ml) και επωάζεται στους 37°C ολονύκτια υπό συνεχή ανάδευση.
2. Μεταφορά 1,5 ml της υγρής καλλιέργειας σε σωλήνα eppendorf.
3. Τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 3000 rpm για 30 min στους 4 °C για να διαχωριστούν από το θρεπτικό μέσο.
4. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 300 μl διαλύματος P1 το οποίο περιέχει 15mM Tris-Cl, pH=8 και 10mM EDTA, pH=8. Η επαναιώρηση γίνεται με vortex μέχρι να μην φαίνονται συσσωματώματα κυττάρων.

5. Προσθήκη 300 μl διαλύματος αποδιάταξης P2 το οποίο περιέχει 200mM NaOH και 1% SDS και προκαλεί λύση των βακτηριακών κυττάρων.
6. Ακολουθεί ήπια ανάδευση (όχι vortex) και επώαση για 5 min μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
7. Προσθήκη 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος P3 το οποίο περιέχει 3M οξικό κάλιο, pH 5,5 που προκαλεί γρήγορη ουδετεροποίηση του διαλύματος.
8. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση στον πάγο για 20 min.
9. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm στους 4°C για 15 min.
10. Στην συνέχεια γίνεται συλλογή του υπερκείμενου προσπαθώντας να μην συλλεχθούν άσπρα συσσωματώματα και επαναληπτική φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
11. Μεταφορά του υπερκείμενου, το οποίο περιέχει το δείγμα DNA, σε καθαρά σωληνάκια eppendorfs.
12. Κατακρήμιση του πλασμιδιακού DNA με την προσθήκη ισοπροπανόλης (0,8 του όγκου του υπερκείμενου), ανάδευση, επώαση για 15 min στον πάγο και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4°C για 20 min.
13. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, στο ίζημα προστίθεται παγωμένη αιθανόλη 70% για έκπλυση της ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 min. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε καλά το ίζημα.
14. Επαναδιάλυση του DNA σε διπλά απιονισμένο νερό (ποσότητα του νερού ανάλογη με πελλέτα).
15. Επώαση στους 37 °C μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.

## 2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis. (Mullis, K.B. 1990). Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η αλληλούχηση κ.ά. Η PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (Εικ. 11).



**Εικόνα 11:** Τα στάδια της PCR (από Palumbi S. *et al.* 1996).

- 1. Αποδιάταξη:** Οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 95°C για περίπου 15 sec έως 1 min. Προηγουμένως υπάρχει και ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης περίπου 5 min.
- 2. Υβριδοποίηση εκκινητών:** Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65°C για περίπου 40 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
- 3. Επιμήκυνση:** Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται συνήθως 35 φορές.

Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους. Τα βασικά συστατικά για μια PCR είναι: DNA πολυμεράση, ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος, ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, Mg<sup>2+</sup> και νουκλεοτίδια (dNTPs). Συνεπώς η αποτελεσματικότητα της PCR εξαρτάται από τα παραπάνω συστατικά καθώς και από την θερμοκρασία και την διάρκεια των κύκλων.

Στην παρούσα εργασία, η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA, από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και η ύπαρξη του γονιδίου που μας ενδιαφέρει. Πιο συγκεκριμένα για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι ήταν ειδικά σχεδιασμένοι έτσι ώστε να αναγνωρίζουν συμπληρωματικά

αλληλουχίες του γονιδίου *FRA10AC1* και να το ενισχύουν. Πιο συγκεκριμένα ο εμπρόσθιος εκκινητής με αλληλουχία 5'-ACT AAG CTT AGG ATG CAT GGT CAT GGA GGC-3' υβριδοποιείται στα 18 πρώτα νουκλεοτίδια του γονιδίου από το κωδικόνιο έναρξης και ο ανάστροφος 5'-GGC TCT AGA TCA TAG AAA CAA ATC CTG AAA ATA CTC A-3' στα τελευταία 27 νουκλεοτίδια του γονιδίου έως και το κωδικόνιο λήξης. Οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών είναι  $T_m=61.4^{\circ}\text{C}$  και  $T_m=58.3^{\circ}\text{C}$  αντίστοιχα. Το μέγεθος που ενισχύεται είναι 948 bp. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $95^{\circ}\text{C}$  για 3 min για το αρχικό στάδιο αποδιάταξης και στην συνέχεια για 15 sec. Ακολούθησε το στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών στους  $62^{\circ}\text{C}$  για 45 sec και το στάδιο επιμήκυνσης στους  $72^{\circ}\text{C}$  για 1 min. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους.

Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες σε κάθε δείγμα:

Υλικά	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα
Buffer (Kapa Biosystems, 1003)	10x	1x	2.5 $\mu\text{l}$
dNTPs	10mM	0.2mM	0.5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (KB 1001)	50mM	1mM (0.5mM)	0.5 $\mu\text{l}$
εμπρόσθιος εκκινητής	50 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$	1 $\mu\text{mol}$	0.5 $\mu\text{l}$
ανάστροφος εκκινητής	50 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$	1 $\mu\text{mol}$	0.5 $\mu\text{l}$
Taq DNA Polymerase (KE 1000)	5u/ $\mu\text{l}$	1u	0.2 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	-	-	έως 25 $\mu\text{l}$
Συνολικός όγκος	-	-	25 $\mu\text{l}$

Χρησιμοποιήθηκαν 7 δείγματα για ενίσχυση, από τα οποία το ένα ήταν ο θετικός μάρτυρας για το *FRA10AC1* συγκέντρωσης 10 ng/ $\mu\text{l}$  από τον οποίο χρησιμοποιήθηκε 1 $\mu\text{l}$  και ένας αρνητικός μάρτυρας ο οποίος δεν περιείχε καθόλου DNA. Τα υπόλοιπα δείγματα αντιστοιχούν σε διάφορες ποσότητες DNA το οποίο απομονώθηκε από την αποικία 18 των μετασχηματισμένων βακτηρίων και πιο συγκεκριμένα: 0.5  $\mu\text{l}$  DNA, 1  $\mu\text{l}$  DNA, 2  $\mu\text{l}$  DNA, 3  $\mu\text{l}$  DNA και 4  $\mu\text{l}$  DNA.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

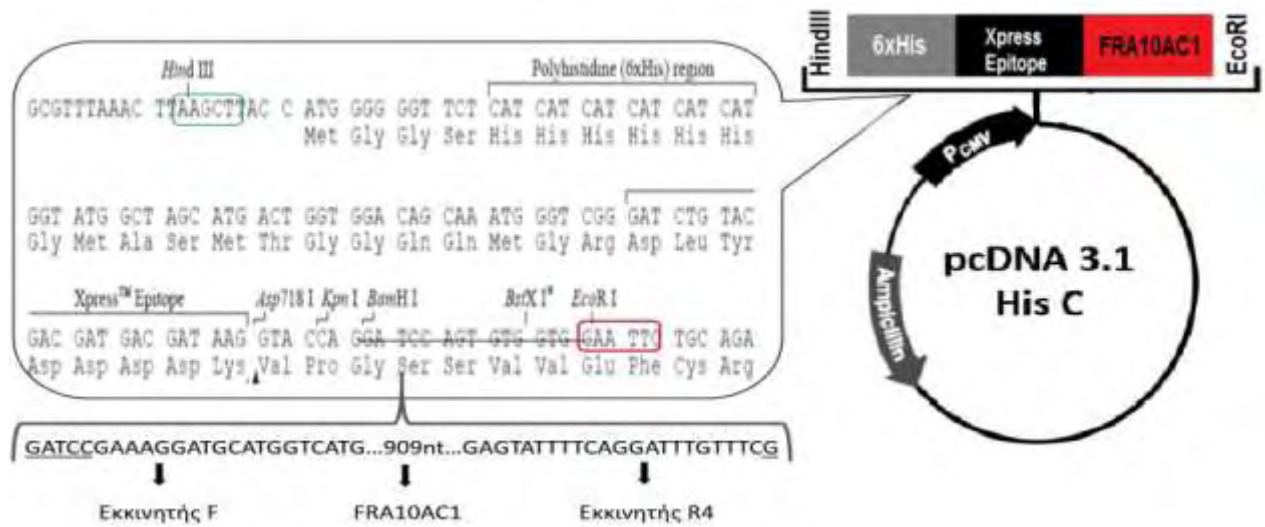
### 3.1 Υποκλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* στο φορέα pcDNA 4TO

Στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση του cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1* του ανθρώπου από τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA 3.1 His C στον φορέα pcDNA 4TO, ο οποίος φέρει δύο ρυθμιστικές περιοχές τετρακυκλίνης (TetO<sub>2</sub>) όπου προσδένονται ομοδιμερή μόρια καταστολέων, απουσία τετρακυκλίνης, τα οποία εμποδίζουν την έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου. Ενώ παρουσία τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, αυτή προσδένεται στους καταστολείς και έτσι επιτρέπεται η μεταγραφή του γονιδίου. Το cDNA εξήχθη από τον pcDNA 3.1 His C μαζί με τους επιτόπους πολυιστιδίνης και Xpress που επιτρέπουν τον εντοπισμό και τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης από την ενδογενή με την χρήση των αντίστοιχων αντισωμάτων ή βάσει μεγέθους. Αυτό επιτυγχάνεται διότι βρίσκονται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης (**Εικ. 12**).

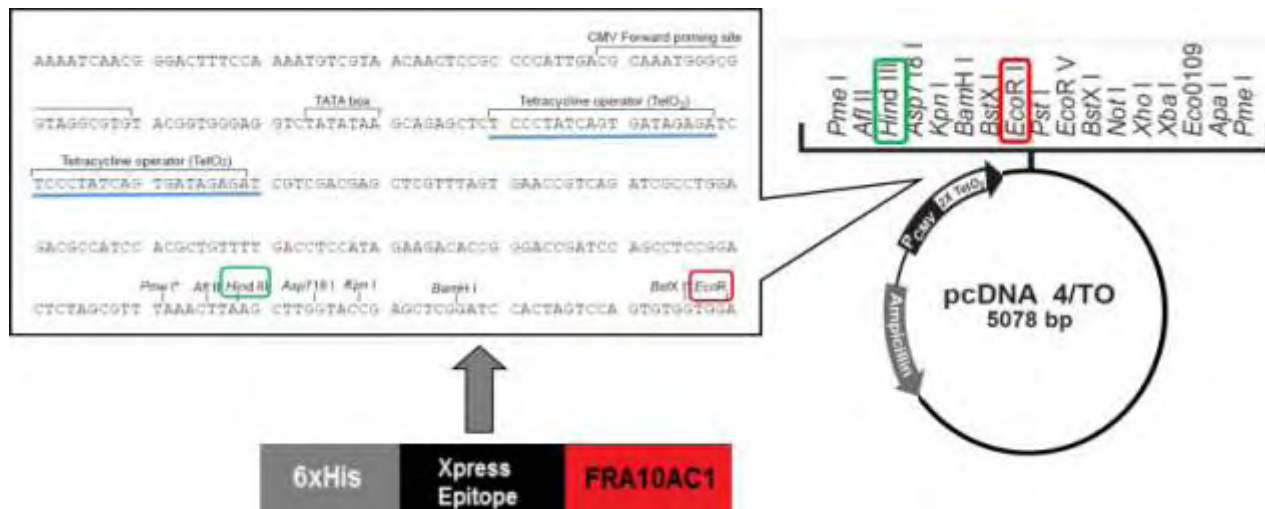
Συνοπτικά τα στάδια της υποκλωνοποίησης φαίνονται στην **Εικ. 12** και περιλαμβάνουν:

- Διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *HindIII* και *EcoRI* στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA 3.1 His C τα οποία κόβουν ανοδικά των επιτόπων και στο 3' άκρο του cDNA αντίστοιχα, [η θέση περιορισμού *EcoRI* δεν υπάρχει στο cDNA του *FRA10AC1* αλλά προστέθηκε στο cDNA του πριν την κλωνοποίησή του στον φορέα pcDNA 3.1 His C, με PCR με την χρήση κατάλληλου εκκινητή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) οποίος ήταν σχεδιασμένος με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει στα άκρα του θέση αναγνώρισης για την συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση]. Συνεπώς η *EcoRI* αναγνωρίζει την θέση που έχει ο πολυσυνδέτης του pcDNA 3.1 HisC.
- Διαδοχική πέψη του φορέα pcDNA 4TO με τα ίδια ένζυμα.
- Αντίδραση σύνδεσης με τα τελικά προϊόντα των πέψεων και μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.
- Έλεγχος των αποικιών με πέψη και PCR στο πλασμιδιακό DNA των μετασχηματισμένων βακτηρίων με σκοπό την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων μορίων.

A



B



**Εικόνα 12: Κλωνοποίηση του cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1*, μαζί με τους επίτοπους του pcDNA 3.1 His C στον φορέα pcDNA 4TO.**

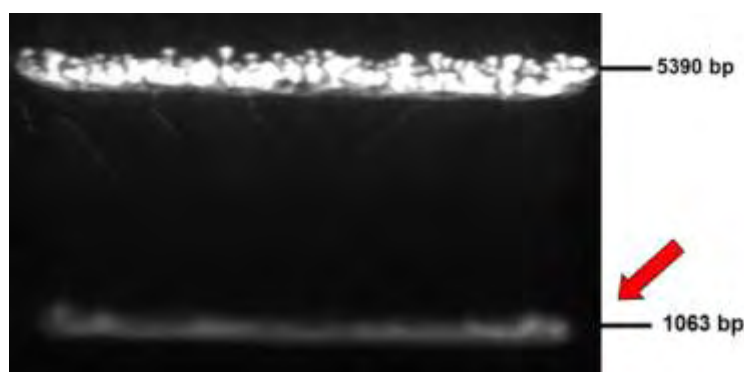
**A.** Απεικονίζεται, στον φορέα pcDNA 3.1 His C, η κατασκευή που θα χρησιμοποιηθεί στην υποκλωνοποίηση και περιέχει έναν επίτοπο πολυιστιδίνης, έναν επίτοπο για το αντίσωμα Xpress και το cDNA. Επίσης διακρίνονται τα άκρα της κατασκευής που αντιστοιχούν στις θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού *HindIII* και *EcoRI* με τις οποίες θα εξαχθεί το ένθεμα (πράσινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα).

**B.** Παρουσιάζεται στον φορέα pcDNA 4TO η αλληλουχία του TetO<sub>2</sub> (μπλε), η περιοχή του πολυσυνδέτη και οι θέσεις όπου θα εισαχθεί το ένθεμα.

### 3.1.1 Απομόνωση του cDNA του γονιδίου *FRA10AC1*

Για την απομόνωση του ενθέματος από τον φορέα pcDNA 3.1 His C πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *HindIII* και *EcoRI*. Τα ένζυμα επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η απομόνωση και των επιτόπων του pcDNA 3.1 His C εκτός από το cDNA αλλά και να σχηματιστούν μόρια τα οποία θα φέρουν στα άκρα τους θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού για την επόμενη κλωνοποίηση.

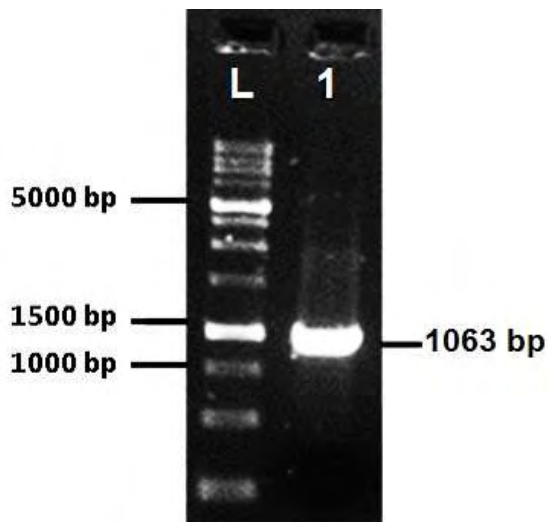
Για την διπλή πέψη χρησιμοποιήθηκαν 7 µg πλασμιδιακού DNA. Για τον έλεγχο ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, με όλη την ποσότητα από την πέψη (**Εικ. 13**) και στην συνέχεια απομόνωση του τμήματος DNA που αντιστοιχεί στο ένθεμα από το πήκτωμα αγαρόζης. Διαχωρίστηκε το αντίστοιχο τμήμα του πηκτώματος και έγινε απομόνωση του προϊόντος από το πήκτωμα αγαρόζης με το αντίστοιχο πρωτόκολλο (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Από τον καθαρισμό ανακτήθηκαν 30 µl δείγματος, το οποίο με φωτομέτρηση έδειξε συγκέντρωση 160 ng/µl, συνεπώς η συνολική ποσότητα DNA αντιστοιχεί σε περίπου 4,8 µg.



**Εικόνα 13: Απομόνωση του cDNA πλήρους μήκους του γονιδίου *FRA10AC1*.** Η ηλεκτροφόρηση της πέψης της πλασμιδιακής κατασκευής με *HindIII* και *EcoRI* σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% δείχνει δύο ζώνες. Στην πάνω ζώνη διακρίνεται ο φορέας pcDNA 3.1 His C μεγέθους 5390 bp και στην κάτω ζώνη το ένθεμα που περιλαμβάνει και τους επιτόπους του pcDNA 3.1 His C μεγέθους 1063 bp.

Για την επιβεβαίωση της απομόνωσης του ενθέματος από το πήκτωμα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% παρουσία δείκτη γνωστών μοριακών μεγεθών (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Φαίνεται η αναμενόμενη ζώνη μεγέθους 1063 bp που αντιστοιχεί στο ένθεμα (**Εικ. 14**). Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 3 µl δείγματος τα οποία αντιστοιχούν σε περίπου 500 ng.



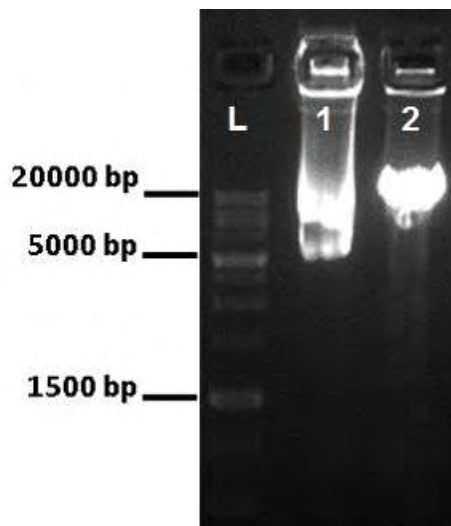


**Εικόνα 14:** Έλεγχος της απομόνωσης του ενθέματος από το πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. **L)** Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών **1)** Φαίνεται η αναμενόμενη ζώνη του ενθέματος μεγέθους 1063 bp, με άκρα *HindIII* και *EcoRI*.

### 3.1.2 Πέψη του φορέα pcDNA 4TO

Εφόσον το cDNA που απομονώθηκε έφερε στα άκρα του θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού *HindIII* και *EcoRI*, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ένζυμα έτσι ώστε να δημιουργηθούν τα ίδια κολλώδη άκρα για την αντίδραση σύνδεσης με τον φορέα pcDNA 4TO. Στην περίπτωση του φορέα η διπλή πέψη πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Πρώτα με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HindIII* (**Εικ. 15**) και στη συνέχεια με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* (**Εικ. 16**). Ο λόγος που δεν πραγματοποιήθηκαν οι πέψεις σε ένα στάδιο όπως στην προηγούμενη διαδικασία είναι ότι στον συγκεκριμένο φορέα οι δύο θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων *HindIII* και *EcoRI* απέχουν μεταξύ τους μόλις 41 bp. Συνεπώς το προϊόν της μονής πέψης θα είχε ίδια κινητικότητα με αυτό της διπλής πέψης (5078 bp και 5037 bp αντίστοιχα). Άρα η διαδοχική πέψη δεν θα πρόσφερε κάποια πληροφορία και απλώς θα αποτελούσε επιπλέον βήμα.

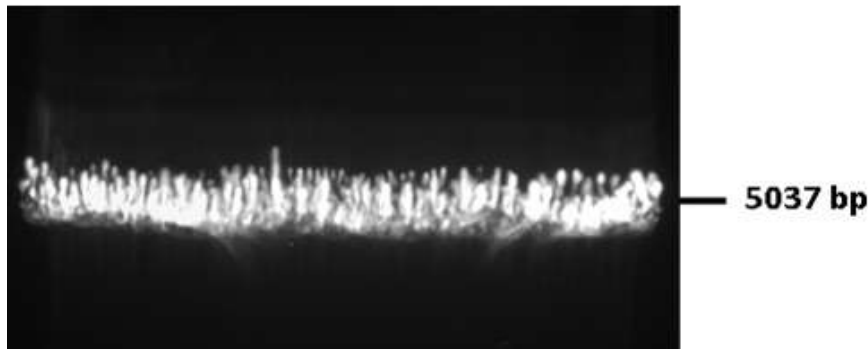
Όσον αφορά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού *HindIII* χρησιμοποιήθηκαν 48 µg DNA. Ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος με φαινόλη και χλωροφόρμιο και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (**Εικ. 15**).



**Εικόνα 15:** Έλεγχος της πέψης του φορέα rcDNA 4TO με το ένζυμο περιορισμού *HindIII*. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. **L)** Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών **1)** Άκοπος φορέας rcDNA 4TO. **2)** Γραμμικός φορέας rcDNA 4TO με *HindIII*.

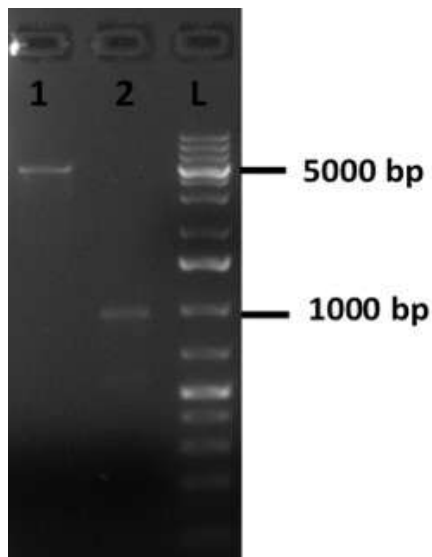
Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης έδειξε διαφορετική ζώνη μεγέθους στο πήκτωμα αγαρόζης μεταξύ του φορέα rcDNA 4TO πριν και μετά την πέψη (**Εικ. 15**). Αυτό οφείλεται στο ότι αρχικά ο φορέας ήταν κυκλικό μόριο το οποίο μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού *HindIII* γίνεται γραμμικό. Τα μόρια με διαφορετική διαμόρφωση μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα στο πήκτωμα. Συνεπώς αναμένεται οι ζώνες να παρατηρούνται σε μέγεθος 5078 bp που αντιστοιχούν στον αρχικό φορέα. Παρόλα αυτά στην συγκεκριμένη περίπτωση ο φορέας απεικονίζεται να αντιστοιχεί σε μεγέθη γύρω στα 20000 bp, πολύ μεγαλύτερα δηλαδή από τα αναμενόμενα. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα οφείλεται στην πολύ μεγάλη ποσότητα και πιθανώς στην μειωμένη καθαρότητα του δείγματος.

Από το καθαρισμένο προϊόν της πέψης με το ένζυμο *HindIII* χρησιμοποιήθηκαν 16 µg DNA για δεύτερη πέψη με το ένζυμο *EcoRI* σε τελικό όγκο 250 µl. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση ολόκληρης της ποσότητας της πέψης, σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% και καθαρισμός του προϊόντος από το πήκτωμα αγαρόζης, με το αντίστοιχο πρωτόκολλο (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Από τον καθαρισμό ανακτήθηκαν 45 µl από τον φορέα rcDNA 4TO. Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του δείγματος η οποία έδειξε συγκέντρωση 150 ng/µl, συνεπώς η συνολική ποσότητα DNA είναι 6,7 µg.



**Εικόνα 16: Απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα pcDNA 4TO.** Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Απεικονίζεται ο φορέας pcDNA 4TO μεγέθους 5037 bp με άκρα *HindIII* και *EcoRI*.

Εν συνεχεία, πριν την αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιήθηκε μια τελική ηλεκτροφόρηση (**Εικ. 17**) των τμημάτων από τις παραπάνω πέψεις, σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Η ηλεκτροφόρηση αυτή πραγματοποιήθηκε για να προσδιοριστούν τα μεγέθη καθώς και αν η ποσότητα DNA που απομονώθηκε, του ενθέματος και των φορέων, είναι αρκετή ώστε να ακολουθήσει η αντίδραση σύνδεσης. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 300 ng DNA (2 μl από τα 45 μl) από τον φορέα pcDNA 4TO και 320 ng (2 μl από τα 30 μl) από το ένθεμα. Όπως φαίνεται και από την ηλεκτροφόρηση (**Εικ. 17**) τα μεγέθη των τμημάτων που απομονώθηκαν είναι τα σωστά καθώς αντιστοιχούν στο ένθεμα μεγέθους 1063 bp και στον φορέα 5037 bp.



**Εικόνα 17: Έλεγχος των πέψεων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%.** 1) Ο φορέας pcDNA 4TO μετά την πέψη με τα ένζυμα *HindIII* και *EcoRI*. 2) Ένθεμα μεγέθους 1063 bp που περιέχει το cDNA του γονιδίου *FRA10AC1*. L) Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών.

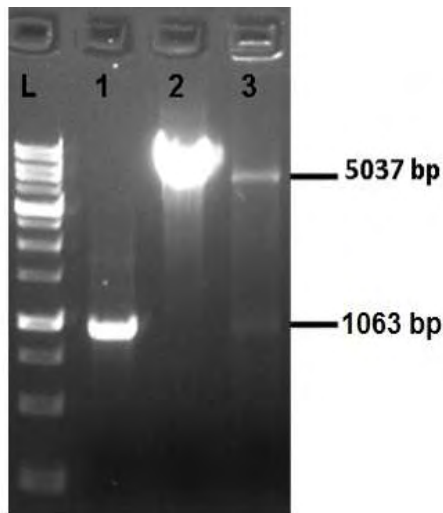
### 3.1.3 Αντίδραση σύνδεσης pcDNA 4TO με ένθεμα-cDNA *FRA10AC1*

Τελικά από τις παραπάνω διαδικασίες σύμφωνα με τις φωτομετρήσεις αποκτήθηκε ποσότητα 4,8 µg ενθέματος *FRA10AC1* μεγέθους 1063 bp και 6,7 µg φορέα pcDNA 4TO μεγέθους 5037 bp. Η ποσότητα ήταν επαρκής για την συνέχιση των πειραμάτων. Έτσι, τα προϊόντα των πέψεων χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις σύνδεσης (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση σύνδεσης ήταν περίπου 500 ng από το ένθεμα (160 ng/µl x 3 µl) και 150 ng από τον πλασμιδιακό φορέα (150 ng/µl x 1 µl).

### 3.2 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια βακτηρίων

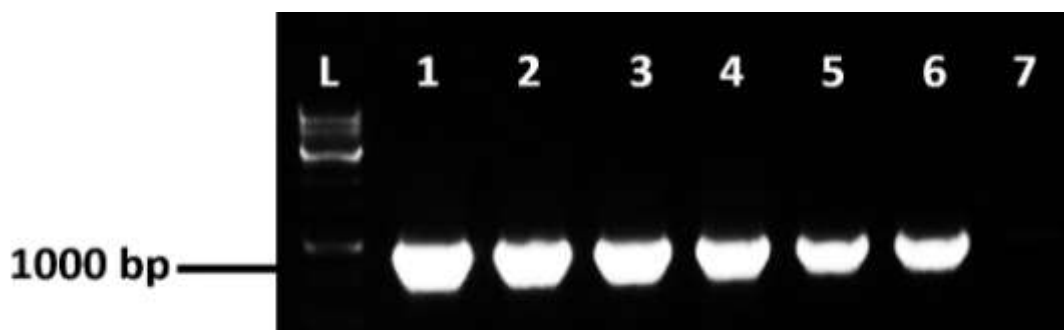
Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* στελέχους *DH5a* με τα ανασυνδισμένα πλασμίδια. Στην συνέχεια τα βακτηριακά κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας με στερεό θρεπτικό υλικό (LB-άγαρ) και αντιβιοτικό επιλογής αμπικιλίνη (100µg/ml) και επώαστηκαν ολονύκτια στους 37°C. Αναπτύχθηκαν αρκετές μοναδιαίες αποικίες, από τις οποίες επιλέξαμε τυχαία 19 για επιπλέον καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) που περιείχε πάλι το αντιβιοτικό αμπικιλίνη ίδιας συγκέντρωσης και επώαση υπό ανάδευση στους 37°C ολονύκτια. Τέλος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και στην συνέχεια έλεγχος των ανασυνδυσμένων μορίων με διπλή πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* και *HindIII*, που κόβουν εκατέρωθεν αυτού, για εντοπισμό του ενθέματος.

Από τα 19 δείγματα που ελέγχθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, μόνο ένα περιείχε το ανασυνδισμένο πλασμίδιο, το δείγμα 18 στο οποίο μετά την πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα εμφάνισε τα αναμενόμενα τμήματα DNA, δηλαδή 1063 bp το ένθεμα και 5037 bp ο φορέας pcDNA 4TO (**Εικ. 18**).



**Εικόνα 18:** Έλεγχος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% **L)** Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών. **1)** Ένθεμα-cDNA *FRA10AC1* μεγέθους 1063 bp με άκρα *HindIII-EcoRI*. **2)** Φορέας pcDNA 4TO *HindIII-EcoRI*. **3)** Δείγμα 18 μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *HindIII-EcoRI*.

Για επιπλέον επιβεβαίωση του ενθέματος ακολούθησε PCR (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) στο δείγμα 18 με τους κατάλληλους εκκινητές οι οποίοι ήταν ειδικά σχεδιασμένοι έτσι ώστε να ενισχύουν το γονίδιο *FRA10AC1*. Πιο συγκεκριμένα ο εμπρόσθιος εκκινητής υβριδοποιείται στο κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου και ο ανάστροφος στα τελευταία 27 νουκλεοτίδια του cDNA έως και το κωδικόνιο λήξης. Συνεπώς το μέγεθος που ενισχύεται είναι 948 bp. Η PCR πραγματοποιήθηκε με διάφορες ποσότητες του δείγματος 18. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν ένας θετικός μάρτυρας οποίος είναι ένα άλλο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιέχει το cDNA του γονιδίου *FRA10AC1* και ένας αρνητικός μάρτυρας ο οποίος δεν περιέχει δείγμα DNA. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως πράγματι το δείγμα 18 περιέχει το ένθεμα καθώς έχει ενισχυθεί σε όλα τα επιμέρους δείγματα και φαίνεται ξεκάθαρα η ζώνη μεγέθους περίπου 1000 bp (948 bp) που ταυτίζεται με τον θετικό μάρτυρα (**Εικ. 19**).



**Εικόνα 19:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR. **L)** Δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών **1)** Θετικός μάρτυρας **2-6)** Διάφορες συγκεντρώσεις του δείγματος 18 **7)** Αρνητικός μάρτυρας.

### 3.3 Μελλοντικές χρήσης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Το ανασυνδυασμένο πλέον πλασμίδιο *pcDNA 4TO-FRA10AC1* που δημιουργήθηκε, περιέχει κλωνοποιημένο το πλήρους μήκους *cDNA* σε σύντηξη με τους επιτόπους πολυιστιδίνης και *Xpress* που προέρχονται από τον φορέα *pcDNA-3.1 His C*. Πλέον το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ελεγχόμενη μέσω του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών μετά τη δημιουργία σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς η οποία ήδη φέρει ενσωματωμένο στο γονιδίωμα το πλασμίδιο που παράγει τον καταστολέα της τετρακυκλίνης και η οποία είναι ήδη διαθέσιμη. Η επαγόμενη έκφραση επιτυγχάνεται διότι φέρει δύο ρυθμιστικές περιοχές τετρακυκλίνης στον υποκινητή (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Έτσι απουσία τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων, εμποδίζεται η έκφραση του διαγονιδίου, ενώ παρουσία τετρακυκλίνης το γονίδιο είναι ελεύθερο να μεταγραφεί. Συνεπώς η κατασκευή που δημιουργήθηκε θα είναι χρήσιμη για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης *FRA10AC1* σε κύτταρα θηλαστικών.

# BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Baraldi PG, N nez Mdel C, Espinosa A, Romagnoli R. "Distamycin A as stem of DNA minor groove alkylating agents". *Curr Top Med Chem*. 2004;4(2):231-9.
2. Baranovskiy G Andrey., Nigar D. Babayeva, Yoshiaki Suwa, Jianyou Gu, Youri I. Pavlov and Tahir H. Tahirov "Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin" *Nucleic Acids Res*. 2014 Dec 16; 42(22): 14013–14021.
3. Christman JK. "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy". *Oncogene*. 2002 Aug 12;21(35):5483-95.
4. Debacker K, Winnepeninckx B, Longman C, Colgan J, Tolmie J, Murray R, van Luijk R, Scheers S, Fitzpatrick D, Kooy F. "The molecular basis of the folate-sensitive fragile site FRA11A at 11q13." *Cytogenet Genome Res*. 2007; 119(1-2):9-14. Epub 2007 Dec 14.
5. Dredge B. Kate, Polydorides D. Alexandros & Darnell B. Robert "The splice of life: Alternative splicing and neurological disease" *Nature Reviews Neuroscience* 2, 43-50 January 2001, doi:10.1038/35049061
6. Galliopoulou E., Gioutlakis A., Mamuris Z., Klapa M.I., Moschonas N.K., Sarafidou T. "The protein-protein interaction network of the human spliceosome", *The European Human Genetics Conference*, 2015.
7. Gong W, Emanuel BS, Galili N, Kim DH, Roe B, Driscoll DA, Budarf ML. "Structural and mutational analysis of a conserved gene (DGS1) from the minimal DiGeorge syndrome critical region." *Hum Mol Genet*. 1997 Feb; 6(2):267-76.
8. Gozani O, Feld R, Reed R. "Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A." *Genes Dev*. 1996 Jan 15; 10(2):233-43.
9. Hagerman, R.J. (2002) Physical and behavioral phenotype. In Hagerman, R.J. and Hagerman, P.J. (eds.), *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research*. 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MA, pp. 3-109.
10. Kaida D, 'The reciprocal regulation between splicing and 3'-end processing' *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016 Jul;7(4):499-511.
11. K hkonen M, Tengstr m C, Alitalo T, Matilainen R, Kaski M, Airaksinen E. "Population cytogenetics of folate-sensitive fragile sites. II. Autosomal rare fragile sites." *Hum Genet*. 1989 Apr; 82(1):3-8.
12. Lukusa T, Fryns JP. "Human chromosome fragility." *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan; 1779(1):3-16. Epub 2007 Dec 3.

13. Mavrou A, Syrrou M, Tsenghi C, Metaxotou C. "Autosomal folate sensitive fragile sites in normal and mentally retarded individuals in Greece." *Am J Med Genet.* 1991 Feb-Mar; 38(2-3):437-9.
14. Mullis KB. "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction." *Ann Biol Clin (Paris).* 1990; 48(8):579-82.
15. Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56-65).
16. Palumbi S. R. (1996) Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In *Molecular Systematics*, 2nd ed., Hillis, D.M., C. Moritz, B.K. Mable (eds.) Pp. 205-247. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
17. Petit P, Fryns JP, van den Berghe H, Hecht F. "Population cytogenetics of autosomal fragile sites." *Clin Genet.* 1986 Feb; 29(2):96-100.
18. Pichiorri F, Ishii H, Okumura H, Trapasso F, Wang Y, Huebner K. "Molecular parameters of genome instability: roles of fragile genes at common fragile sites." *JCell Biochem.* 2008 Aug 1; 104(5):1525-33.
19. Rizzu P, Lindsay EA, Taylor C, O'Donnell H, Levy A, Scambler P, Baldini A. "Cloning and comparative mapping of a gene from the commonly deleted region of DiGeorge and Velocardiofacial syndromes conserved in *C. elegans*." *Mamm Genome.* 1996 Sep;7(9):639-43.
20. Saldi T, Cortazar M, Sheridan R, Bentley D. 'Coupling of RNA Polymerase II Transcription Elongation with Pre-mRNA Splicing' *J Mol Biol.* 2016 Jun 19;428(12):2623-35.
21. Sarafidou T, Kahl C, Martinez-Garay I, Mangelsdorf M, Gesk S, Baker E, Kokkinaki M, Talley P, Maltby EL, French L, Harder L, Hinzmann B, Nobile C, Richkind K, Finnis M, Deloukas P, Sutherland GR, Kutsche K, Moschonas NK, Siebert R, Gécz 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." *Genomics.* 2004 Jul;84(1):69-81.
22. Sutherland GR, Baker E. "The clinical significance of fragile sites on human chromosomes." *Clin Genet.* 2000 Sep;58(3):157-61.
23. Sutherland GR, Richards RI. "The molecular basis of fragile sites in human chromosomes." *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Jun;5(3):323-7. Review.
24. 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.
25. Sutherland GR. "Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics." *Ann Hum Genet.* 1985 May;49(Pt 2):153-61.



26. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. "Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome." *Cell*. 1991 May 31;65(5):905-14.
27. Yao F1, Svensjö T, Winkler T, Lu M, Eriksson C, Eriksson. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther*. 1998 Sep 1;9(13):1939-50.
28. Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J, Ben-Porat N, Ozeri E, Hershberg R, Levi A, Scherer SW, Margalit H, Kerem B. "Molecular basis for expression of common and rare fragile sites." *Mol Cell Biol*. 2003 Oct; 23(20):7143-51.

#### ➤ **BIBΛΙΑ**

- ❖ "Ανασυνδυασμένο DNA" (Watson, Caudy, Myers, Witkowski 2007)
- ❖ "Molecular Cloning" (Sambrook, Fritsch, Maniatis 1989)
- ❖ "Genes VIII", (Benjamin Lewin 2004)
- ❖ "Διατροφή και Χημεία τροφίμων" (Γαλανοπούλου Ν, Ζαμπετάκης Γ, Μαυρή Μ, Σιαφάκα Α, 2011)

#### ➤ **ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ**

- ❖ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
- ❖ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- ❖ <http://www.uniprot.org>
- ❖ [www.genecards.org](http://www.genecards.org)