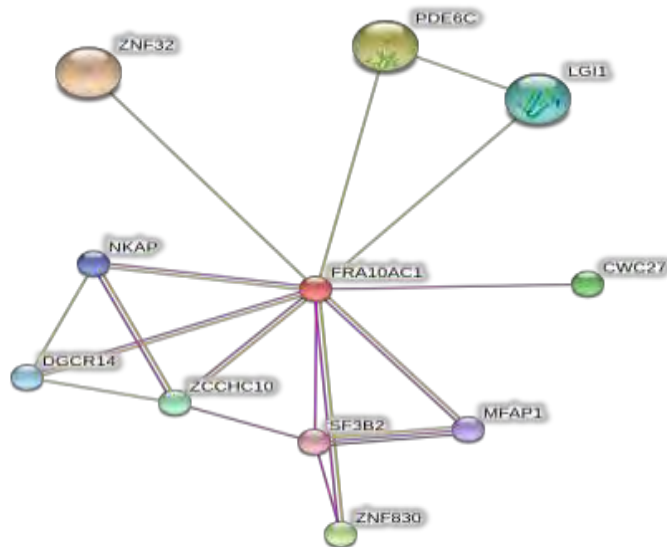


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ
ΤΗΣ FRA10A1**



ΑΡΓΥΡΑΚΗ ΣΤΥΛΙΑΝΗ – ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

‘Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1’

Study of FRA10AC1 protein interactions

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- 1. Μαμούρης Ζήσης:** Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2. Σαραφίδου Θεολογία:** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3. Μπαλατσός Νικόλαος :** Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πίνακας περιεχομένων

1.	Εισαγωγή	1
1.1	Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις	1
1.1.1	Σπάνιες εύθραυστες θέσεις	1
1.1.2	Κλινική σημασία των εύθραυστων θέσεων	2
1.1.3	Κλινική σημασία της FRA10A	3
1.1.4	Συχνές εύθραυστες θέσεις	4
1.2	Το γονίδιο FRA10AC1	4
1.3	Η πρωτεΐνη FRA10AC1	4
1.4	Σκοπός της εργασίας	7
2.	Υλικά και μέθοδοι	8
	Υλικά	8
2.1	Κλώνος cDNA του γονιδίου <i>MFAP1</i>	8
2.2	Φορέας pmCherry C ₁	8
2.3	Θρεπτικό LB	10
2.4	Αντιβιοτικό καναμυκίνη	10
	Μέθοδοι	10
2.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	10
2.6	Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου <i>MFAP1</i>	12
3.	Αποτελέσματα-Συζήτηση	18
3.1	Αποτελέσματα Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	18
3.2	Αποτελέσματα πέψων	20
3.3	Αποτελέσματα για την αντίδραση σύνδεσης	20
4.	Βιβλιογραφία	23

Περίληψη

Το γονίδιο FRA10AC1 εντοπίζεται στην σπάνια εύθραστη χρωμοσωματική θέση του ανθρώπου 10q23, η οποία σχετίζεται με διανοητική καθυστέρηση και αναπτυξιακές δυσλειτουργίες στα άτομα-φορείς. Η εμφάνιση της FRA10A προκαλείται από την έντονη επέκταση της τρινουκλεοτιδικής επανάληψης CGG, η οποία οδηγεί στην υπερμεθυλίωση της περιοχής και την αποσιώπηση του γονιδίου. Το γονίδιο FRA10AC1 κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας. Μέσω του συστήματος δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα (Y2H), ταυτοποιήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 με τις DGCR14 και SAP145, οι οποίες εντοπίζονται στο πυρηνόπλασμα ως συστατικά του σωματίου συναρμογής. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η FRA10AC1 πιθανόν να συμμετέχει στην διαδικασία της συναρμογής.

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του γονιδίου MFAP1, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στο σωματίο συναρμογής. Στην συνέχεια είχε προγραμματιστεί η μελέτη αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών FRA10AC1 και MFAP1 μέσω της ανάλυσης FRET.

ABSTRACT

The FRA10AC1 gene is located on the rare chromosomal position 10q23, which has been associated with mental dysfunction and developmental disorders in carriers. The appearance of fragile site FRA10A is caused by the over-expansion of the CGG motif, which then will ultimately result in hypermethylation of the area and the silencing of the gene. The FRA10AC1 gene encodes for a nuclear protein of unknown function. Through the Y2H system, two different interactions were able to be identified: FRA10AC1- DGCR14 and FRA10AC1- SAP145. DGCR14 and SAP145 are both located in the nucleoplasm and are considered to be part of the spliceosome. One could only assume then, that FRA10AC1 might as well play a role in the process of splicing.

The main purpose of this study was the cloning of the MFAP1 gene, which encodes for a vital compound of the spliceosome. In addition to that, the examination of the interactions between FRA10AC1 and MFAP1 had been scheduled to be done, taking advantage of the FRET method.

1. Εισαγωγή

1.1 Εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις

Οι εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις είναι κληρονομήσιμες περιοχές στα χρωμοσώματα του ανθρώπου στις οποίες εμφανίζονται χάσματα ή θραύσματα όταν τα χρωμοσώματα κατά τη μετάφραση εκτίθενται σε συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας.

Ανάλογα με τη συχνότητα έκφρασής τους στον πληθυσμό διακρίνονται σε συνήθεις και σπάνιες.

1.1.1 Σπάνιες εύθραυστες θέσεις

Συναντώνται σε ένα μικρό ποσοστό του πληθυσμού (<5 %). Ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας στις οποίες επάγονται, διακρίνονται σε εύθραυστες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ και σε μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ (δηλαδή επάγονται από άλλες συνθήκες).

Η πλειοψηφία των σπάνιων εύθραυστων θέσεων ανήκουν στην πρώτη κατηγορία και εμφανίζονται με την καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό το οποίο είτε έχει ανεπαρκείς ποσότητες φυλλικού οξέος και θυμιδίνης είτε είναι εμπλουτισμένο σε αναστολείς μεταβολισμού του φυλλικού οξέος ή της σύνθεσης θυμιδίνης.

Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί 7 σπάνιες εύθραυστες θέσεις ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ: οι *FRAXA*, *FRAXE*, *FRAXF*, *FRA16A*, *FRA11B*, *FRA10A*, *FRA12A*, *FRA11A*. Όλες αυτές έχει βρεθεί ότι αντιπροσωπεύουν γενετικούς τόπους με μεταλλάξεις επέκτασης τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων CCG/CGG σε νησίδα CpG. Στο γενικό πληθυσμό ο αριθμός των επαναλήψεων είναι περιορισμένος σε μέγεθος. Η επέκταση όμως των επαναλήψεων CGG έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση των εύθραυστων θέσεων.

Αυτές οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες υφίστανται διαδοχικές αυξήσεις στον αριθμό των αντιγράφων, πιθανόν λόγω ολίσθησης της DNA πολυμεράσης και λαθών κατά την αντιγραφή. Αυτή η αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων δεν σχετίζεται με κλινικά συμπτώματα (στάδιο προμετάλλαξης). Η επέκταση των επαναλήψεων CGG γίνεται ασταθής και κληρονομείται στις επόμενες γενιές. Μόλις ο αριθμός των αντιγράφων επεκταθεί αρκετά (<230 επαναλήψεις για τη *FRA10A*) υπάρχει μεγάλη πιθανότητα για εκδήλωση ασθενειών (πλήρης μετάλλαξη).

Όσον αφορά τις μη ευαίσθητες στο φυλλικό οξύ εύθραυστες θέσεις, αυτές επάγονται από τη δισταμικίνη A ή από τη βρωμοδεοξουριδίνη (ανάλογο της θυμίνης) η οποία ενσωματώνεται στην αλληλουχία του DNA και μπορεί να

σταματήσει την αντιγραφή του. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται 7 εύθραυστες θέσεις: οι FRA8E, FRA10B, FRA111, FRA12C, FRA16E, και FRA17A.

1.1.2 Κλινική σημασία των εύθραυστων θέσεων

Έχει αποδειχθεί ότι, μετά από *in vitro* επαγωγή, οι εύθραυστες θέσεις σχετίζονται συχνά με ελλείψεις και μεταθέσεις, ανταλλαγές αδελφών χρωματίδων και ενδοχρωμοσωμικές ενισχύσεις γονιδίων. Κατ' επέκταση, διαπιστώθηκε η εμπλοκή τους στην *in vivo* δημιουργία διπλασιασμών και ενισχύσεων ή στις χρωμοσωμικές αλλαγές που συνδέονται με εκ γενετής διαταραχές (Lukusa & Fryns J.P., 2008).

Η δυσλειτουργία των γονιδίων που ευθύνονται για την ανάπτυξη και λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος σχετίζεται με σοβαρές κλινικές διαταραχές. Αρχικά, ο ρόλος των εύθραυστων θέσεων στις ανθρώπινες γενετικές διαταραχές είχε περιοριστεί στο σύνδρομο του εύθραυστου X, που συνδέεται με τη σπάνια εύθραυστη θέση FRAXA στο χρωμόσωμα X, και σε μια ήπια μορφή νοητικής υστέρησης, όχι φυλοσύνδετη, που συνδέεται με μια άλλη σπάνια εύθραυστη θέση, FRAXE (Savelyeva et al, 2006). Το σύνδρομο του εύθραυστου X είναι η πιο συχνή οικογενής μορφή νοητικής υστέρησης, με παρουσία κλινικών συμπτωμάτων σε όλους τους άρρενες φορείς. Ωστόσο, μια τρίτη ευαίσθητη στο φυλλικό οξύ σπάνια εύθραυστη θέση, η αυτοσωμική FRA11B, αποδείχτηκε πως εμπλέκεται στη δημιουργία μη φυσιολογικών απογόνων και συσχετίστηκε με το σύνδρομο Jacobsen. Για τις υπόλοιπες σπάνιες εύθραυστες θέσεις, δεν εμφανίζεται σαφή συσχέτιση με παθολογικό φαινότυπο (Lukusa & Fryns J.P., 2008). Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι, τρεις σπάνιες αυτοσωματικές εύθραυστες θέσεις, οι FRA10B, FRA16B, FRA17A, έχουν βρεθεί και σε ομοζυγωτία η οποία δεν προσδίδει κάποιο παθολογικό φαινότυπο, υποδεικνύοντας ότι οι συγκεκριμένες θέσεις δεν επηρεάζουν τη λειτουργία γονιδίων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη (Sutherland & Baker 2000). Ωστόσο, η ταυτοποίηση της θέσης FRA13A μέσα στο γονίδιο της νευροβεακίνης (*neurobeachin*) αποκαλύπτει τον πιθανό ρόλο και των συνήθων εύθραυστων θέσεων στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Savelyeva et al, 2006), με συσχέτιση του FRA6E με το νεανικό πάρκινσον και του FRA13A με τον αυτισμό.

Επιπρόσθετα, οι εύθραυστοι τόποι, κυρίως οι συνήθεις, φαίνεται πως συνδέονται με τις *in vivo* χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που εμφανίζονται σε διάφορους καρκίνους (Lukusa & Fryns J.P., 2008). Πολλές μελέτες έχουν αποκαλύψει μια αξιοσημείωτη συσχέτιση μεταξύ της τοποθεσίας των εύθραυστων θέσεων και των θέσεων όπου παρατηρούνται οι βλάβες στα καρκινικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι στο 52% των ζευγών γονιδίων που εμπλέκονται στις μεταθέσεις στον καρκίνο, τα σημεία θραυσμάτων τοποθετούνταν στις εύθραυστες θέσεις. Τα

αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η χρωμοσωμική ευθραυστότητα, κυρίως στις εύθραυστες θέσεις, μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία υβριδικών μεταγράφων στα καρκινικά κύτταρα (Lagana et al, 2010), καθώς και σε *in vivo* ελλείψεις ή μεταθέσεις σε διαφόρους τύπους όγκων (Lukusa & Fryns J.P., 2008). Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός εύθραυστων θέσεων περιέχουν γονίδια, που κωδικοποιούνται από πολύ μεγάλες γενωμικές περιοχές. Πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται σε μεταθέσεις που εμφανίζονται στον καρκίνο τοποθετούνται μέσα στις εύθραυστες θέσεις. Αυτό συχνά καταλήγει στην έκφραση μεταλλαγμένων ογκογονιδίων ή στην απουσία έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμβάλλοντας στην έναρξη του καρκίνου και υπογραμμίζοντας το ρόλο των εύθραυστων θέσεων στον καρκίνο (Lagana et al, 2010).

Όσον αφορά τις σπάνιες εύθραυστες θέσεις FRAXA και FRAXE χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα X και η κλινική τους σημασία είναι γνωστή. Και οι δύο προκαλούν την εμφάνιση διανοητικής καθυστέρησης. Πιο συγκεκριμένα η εύθραυστη θέση FRAXA συνδέεται με την εμφάνιση του συνδρόμου εύθραυστου X, την πιο συνηθισμένη μορφή σοβαρής διανοητικής καθυστέρησης σε οικογένειες. Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο FMR1 είναι ελαττωματικό σε αυτή την περίπτωση και εμπλέκεται στο 10-20 % όλων των μορφών διανοητικής καθυστέρησης συνδεδεμένων με το X χρωμόσωμα. Αντίθετα η FRAXE σχετίζεται με μια ήπιας μορφής διανοητική καθυστέρηση και το ελαττωματικό γονίδιο είναι το FMR2. Και στις δύο περιπτώσεις η επέκταση των CGG επαναλήψεων που βρίσκονται στα νησίδα CpG των αντίστοιχων γονιδίων οδηγεί στην υπερμεθυλίωσή τους με αποτέλεσμα της απορύθμιση της έκφρασής τους και την αποσιώπησή τους.

1.1.3 Κλινική σημασία της FRA10A

Η εμφάνιση της εύθραυστης θέσης FRA10A δεν έχει συσχετιστεί με κάποιο παθολογικό φαινότυπο. Παρόλα αυτά διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση της FRA10A στη χρωμοσωματική περιοχή 10q23-q24 μπορεί να συνδέεται με ογκογένεση, την εμφάνιση νοητικής υστέρησης, νευρολογικές διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια και αναπτυξιακές ανωμαλίες. Υπολογίζεται ότι 1/500 άτομα εκδηλώνουν την εύθραυστη θέση FRA10A. Σε ετερόζυγα άτομα δεν υπάρχει κάποιος ξεκάθαρος φαινότυπος για αυτήν. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της FRA10A μπορεί να σχετίζεται με ήπια νοητική υστέρηση (Εικόνα 7), αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως δυσμορφικά χαρακτηριστικά, μικρό ανάστημα, υποσπαδία και δυσχέρεια λόγου (Mavrou et al. 1991, Petit et al. 1986, Sutherland 1982 & 1985, Kahkonen et al. 1989, Sarafidou et al. 2004).

1.1.4 Συχνές εύθραυστες θέσεις

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 80 συχνές εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις. Αυτές είναι περιοχές με αυξημένη πιθανότητα γενετικής αστάθειας και εντοπίζονται σε όλα τα άτομα σαν τμήμα της δομής των φυσιολογικών χρωμοσωμάτων. Κατηγοριοποιούνται σε 3 ομάδες: αυτές που επάγονται από αφιδικολίνη(αναστολέας DNA πολυμεράσης), αυτές που επάγονται από 5-αζακυτιδίνη και αυτές από βρωμοδεοξυουριδίνη.

Προς το παρόν έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί σε μοριακό επίπεδο 13 συχνές εύθραυστες χρωμοσωματικές θέσεις. Όλες αυτές επάγονται από την αφιδικολίνη και είναι περιοχές πλούσιες σε δινοκλεοτίδια AT.

1.2 Το γονίδιο *FRA10AC1*

Η έκφραση της εύθραυστης θέσης *FRA10A* προκαλείται από την επέκταση της πολυμορφικής επανάληψης CGG. Οι επαναλήψεις CGG είναι ασταθείς και ο αριθμός τους, στο γενικό πληθυσμό, ποικίλει από 8 μέχρι 13. Όμως στους φορείς της *FRA10A* η επανάληψη επεκτείνεται κατά περίπου 200 φορές με αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση της περιοχής και τη μεταγραφική αποσιώπηση του αντίστοιχου αλληλομόρφου του γονιδίου *FRA10AC1*.

Μέσω χαρτογράφησης FISH και κλωνοποίησης σε κλώνο BAC βρέθηκε ότι το γονίδιο *FRA10AC1* εκτείνεται σε μια περιοχή περίπου 50 kb, η οποία εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3. Το γονίδιο βρίσκεται μεταξύ του γονιδίου *PDE6C* το οποίο κωδικοποιεί την φωσφοδιεστεράση 6C και του γονιδίου *LG1* που σχετίζεται με μια μορφή επιληψίας.

Το γονίδιο *FRA10AC1* αποτελείται από 19 εξόνια, 4 από τα οποία (13, 14, 15, 16) υπόκεινται σε εναλλακτική συναρμογή. Η πολυμορφική επανάληψη CGG εντοπίζεται στο εξόνιο 1 στην 5' αμετάφραστη περιοχή και είναι τμήμα του νησιδίου CpG. Το πλήρες μήκος cDNA του γονιδίου περιλαμβάνει 1334 bp.

Μέσω ανάλυσης Northern, εντοπίστηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου σε ιστούς όπως η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, ο εγκέφαλος, το ήπαρ, το πάγκρεας ενώ χαμηλότερη έκφραση σε σπλήνα, θύμο, πλακούντα και πνεύμονες.

1.3 Η πρωτεΐνη *FRA10AC1*

Το γονίδιο *FRA10AC1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 315 αμινοξέων με μοριακή μάζα 37,55 kD. Η *FRA10AC1* είναι μια φωσφοπρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία η οποία εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα. Ορθόλογα μόρια εντοπίστηκαν σε ζωικούς

και φυτικών, αποκλειστικά ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Σε όλα αυτά τα ορθόλογα παρουσιάζεται μια υψηλά συντηρημένη επικράτεια στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης. Επιπλέον περιέχει ένα διμερές σήμα πυρηνικού εντοπισμού στην περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 223 – 238 και 245 – 262 η οποία ανήκει σε μια ευρύτερη περιοχή πλούσια σε λυσίνη. Κανένα από τα ορθόλογα μόρια δεν έχει μελετηθεί λειτουργικά και δε φέρει κάποιο χαρακτηριστικό μοτίβο που να εντάσσει την πρωτεΐνη σε συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών. Ωστόσο, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη δεν εντοπίζεται σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, πιθανώς υποδεικνύει ότι σχετίζεται με μία λειτουργία που αφορά αποκλειστικά τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Sarafidou et al. 2004)

Δεδομένου αφενός ότι δεν είναι γνωστή η βιολογική λειτουργία καμιάς από τις ορθόλογες πρωτεΐνες και αφετέρου ότι η FRA10AC1 δε διαθέτει κάποιο χαρακτηριστικό μοτίβο, οι πληροφορίες σχετικές με τις αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 με άλλα πρωτεϊνικά μόρια είναι σημαντικές για τη διαλεύκανση του βιολογικού της ρόλου. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζεται το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, με το οποίο εξετάζονται αποκλειστικά δυαδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Το σύστημα αυτό αποτελείται από μία επικράτεια δέσμησης του DNA (DB), μια πρωτεΐνη μεταγραφικό ενεργοποιητή η οποία είναι ενωμένη με μία πρωτεΐνη "X" (αποτελεί το δόλωμα) και μία ξεχωριστή επικράτεια μεταγραφικής ενεργοποίησης συνδεδεμένη με μία πρωτεΐνη "Y" (αποτελεί το θηρευτή). Όταν το DB-X και το AD-Y εκφράζονται μαζί στον πυρήνα των κυττάρων της ζύμης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών X-Y σχηματίζουν ένα λειτουργικό μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ενεργοποιεί γονίδια αναφοράς.

Βέβαια όταν εφαρμόζεται το σύστημα 2 υβριδίων της ζύμης ένας αριθμός αλληλεπιδράσεων δεν εντοπίζεται ή προκύπτουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα καθώς ο εξαναγκαστικός υποκυτταρικός εντοπισμός του δολώματος – θηρευτή αποκλείει κάποιες αλληλεπιδράσεις ή δημιουργεί αλληλεπιδράσεις που δεν λαμβάνουν χώρα *in vivo*. Επιπλέον, πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που απαιτούν συγκεκριμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις δεν θα ανιχνευθούν από το

σύστημα των δύο υβριδίων (Y2H) αν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τέτοιες τροποποιήσεις δεν εντοπίζονται στον πυρήνα της ζύμης.

Λόγω των παραπάνω γεγονότων το σύστημα αυτό εμφανίζει ένα ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που περιορίζουν τον αριθμό των πιθανών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Βέβαια μπορεί να προκύψουν και ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Παρόλο που πλήθος δεδομένων από πειράματα μεγάλης κλίμακας (high-throughput) πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων υπάρχουν σε αντίστοιχες βάσεις δεδομένων, τα δεδομένα αυτά δεν μπορούν να θεωρηθούν πλήρως αξιόπιστα γιατί παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και αντιπροσωπεύουν ένα σχετικά μικρό ποσοστό του συνόλου των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου (Von Mering et al. 2002, Suthram et al. 2006). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να εφαρμόζονται συνδυαστικά, στοχευμένα πειράματα μικρής κλίμακας, τα αποτελέσματα των οποίων να επιβεβαιώνονται με συμπληρωματικές προσεγγίσεις.

Σε αυτό το πλαίσιο, με το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα και με πειράματα συνκατακρήμνισης (pull-down) ταυτοποιήθηκε ότι η FRA10AC1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες DGCR14 και SAP145. Ειδικότερα για τις πρωτεΐνες FRA10AC1 και DGCR14 προσδιορίστηκαν και οι περιοχές αλληλεπίδρασής τους. Επιπλέον, τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων είναι σε συμφωνία με τον υποκυτταρικό εντοπισμό στο πυρηνόπλασμα των τριών πρωτεϊνών FRA10AC1, DGCR14 και SAP145, ο οποίος εξετάστηκε σε κύτταρα HeLa (Sarafidou et al, υπό συγγραφή).

Η κλωνοποίηση βάσει θέσης χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος για τη χαρτογράφηση του γονιδίου DGCR14 στην κρίσιμη περιοχή για το σύνδρομο DiGeorge (22q11.2), με κύριο χαρακτηριστικό τις καρδιακές ανωμαλίες που συνοδεύονται με χαρακτηριστικό προσωπίο (Gong W et al. 1997). Μέχρι τώρα, δεν υπάρχουν μελέτες που να προσδιορίζουν λειτουργικά το ρόλο της πρωτεΐνης DGCR14. Ωστόσο, υπάρχουν πληροφορίες από βιοχημικά πειράματα απομόνωσης του σωματίου συναρμογής και χαρακτηρισμού των συστατικών του με

φασματομετρία μάζας που υποδεικνύουν την πιθανή λειτουργία της πρωτεΐνης. Έτσι, από πέντε ανεξάρτητες μελέτες, η DGCR14 προσδιορίστηκε κατ' επανάληψη ως πρωτεΐνη-συστατικό του σωματίου συναρμογής (Rappsilber et al. 2002, Zhou et al. 2002, Makarova et al. 2004, Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010) και μάλιστα ως συστατικό του συμπλόκου C (Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010).

Όσον αφορά την πρωτεΐνη SAP145, αυτή κωδικοποιείται από το γονίδιο SF3B2 και αποτελεί την υπομονάδα 2 του παράγοντα συναρμογής 3b, ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου του σωματίου συναρμογής. Και η πρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη-συστατικό του σωματίου συναρμογής σε όλες τις μελέτες που περιλαμβάνουν βιοχημικά πειράματα απομόνωσης του σωματίου συναρμογής και χαρακτηρισμού των συστατικών του με φασματομετρία μάζας (Rappsilber et al. 2002, Zhou et al. 2002, Jurica et al. 2002, Hartmuth et al. 2002, Makarov et al. 2002, Makarova et al. 2004, Chen et al. 2007, Herold et al. 2008, Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010) και μάλιστα επίσης ως συστατικό του συμπλόκου C (Jurica et al. 2002, Herold et al. 2008, Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010).

Με βάση τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της FRA10AC1 γίνεται αντιληπτό ότι ίσως αυτή σχετίζεται με τη διαδικασία της συναρμογής. Μάλιστα ταυτοποιήθηκε και η ίδια ως συστατικό του σωματίου συναρμογής, και ειδικότερα του συμπλόκου C (Bessonov et al. 2008, Bessonov et al. 2010). Το γεγονός αυτό συνάδει με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της και με το ότι η πρωτεΐνη είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι οποίοι, σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς, χρησιμοποιούν τη διαδικασία της συναρμογής για την ωρίμανση των πρόδρομων μορίων mRNA.

1.4 Σκοπός της εργασίας

Αρχικός σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση των γονιδίων FRA10AC1 & MFAP, καθώς και ο έλεγχος της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης μέσω της μεθόδου FRET. Ωστόσο, λόγω πίεσης χρόνου, ήταν δυνατή η ολοκλήρωση μόνο του πρώτου εκ των δύο τμημάτων του πειράματος.

2. Υλικά και μέθοδοι

Υλικά

2.1 Κλώνος cDNA του γονιδίου *MFAP1*

Χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος cDNA με ID 6200464 και Cat. No. MHS6278-202760123 της εταιρείας DHARMACON ο οποίος περιέχει το πλήρους μήκους cDNA του γονιδίου *MFAP1* στον φορέα pCMV-SPORT6.

Η κωδική αλληλουχία του cDNA του γονιδίου φαίνεται παρακάτω. Σε αυτήν σημειώνονται με έντονα γράμματα η αλληλουχία έναρξης και λήξης της μετάφρασης ενώ με υπογράμμιση ο εμπρόσθιος και ο ανάστροφος εκκινητής. Το τμήμα του cDNA κλώνου που ενισχύθηκε με PCR είναι οι 1314 bp μεταξύ των αλληλουχιών έναρξης και λήξης της μετάφρασης.

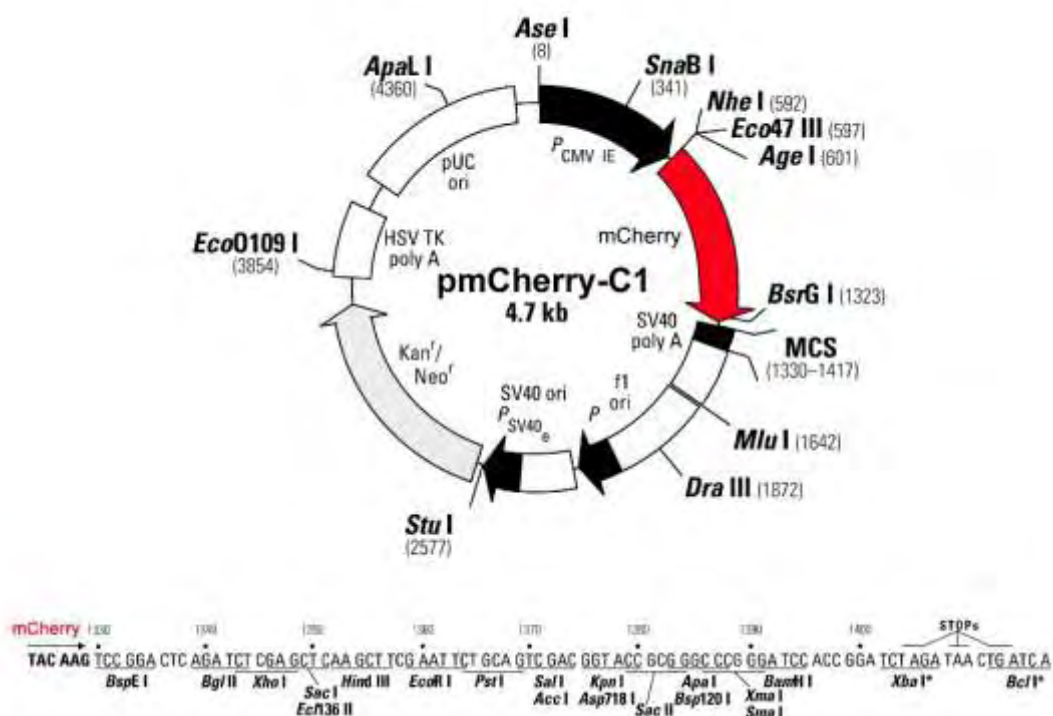
```
121 atgtcggtcc caagcgctct catgaagcaa cgcgccattc agtctacggc  
181 tggggccgtc ccagttcgca atgagaaagg tgagatttca atggaaaaag tgaaggtaaa  
241 gcgttatgtg tccggaaaaa ggccagacta tgcccctatg gagtcctcag atgaggagga  
301 tgaagaattt cagttcatta agaaagccaa agaacaagaa gcagagcctg aggaacagga  
361 ggaggattca tccagtgacc cccggctacg gcgtttacag aaccgtatta gtgaagatgt  
421 ggaagagaga ttggctcgac atcgaaaaat agtggaacct gaagtggtag gagagagtga  
481 ctcaagaagta gaaggagatg cttggcgcac ggaacgagaa gacagcagtg aagaagagga  
541 ggaggaatt gatgatgagg aaatagagcg gcggcgtggc atgatgcgtc agcagacaca  
601 ggagagaaaa aatgaagaga tggaaagtcac ggaagtggaa gatgagggtc gttctggaga  
661 ggagtcagaa tcagagtctg agtatgaaga gtacacagac agtgaagatg agatggagcc  
721 tcgccttaag ccagcttca ttcgaaagaa ggaccgagtg acagttcaag aacgtgaagc  
781 cgaagcattg aaacagaagg agctggagca ggaagcaaaa cgcattggctg aggaaagcgc  
841 caagtacaca ctcaagattg tcgaagagga aaccaaaaaa gagctggaag agaacaagcg  
901 atccctggct gcattggatg cactcaatac tgatgatgaa aatgatgagg aggaatatga  
961 ggcattgaaa gttcagagac taaaaagaat caagagggac agagaagatc gagaagcgc  
1021 tgagaaggag aaagcagaaa ttgaacgcat gcgaaacctg actgagggaag agaggagagc  
1081 tgaacttcgg gcaaacggca aagtcattac caacaaagct gtttaaggga aatacaagtt  
1141 cttacagaag tattatcacc ggggtgcctt cttcatggat gaggatgaag aagtatacaa  
1201 gagagatttc agcgcctccta ccctggagga tcatttcaat aaaaccattc ttcctaaagt  
1261 catgcaggtc aagaactttg gacgctcagg tcgcaccaa tacactcacc ttgtggatca  
1321 agataccacc tcctttgact cagcttgggg ccaagagagt gcccagaaca caaagttctt  
1381 caaacaaaag gcagctgggg tacgagatgt atttgagcgg ccattgcca agaagcggaa  
1441 aactacctag ggtccaactg cttattcttc caactgtgga acacaagggg agtctcagca
```

2.2 Φορέας pmCherry C₁

Είναι φορέας κλωνοποίησης μεγέθους 4722bp (Εικ. 1) στον οποίο τα cDNAs μπορούν να εκφραστούν σε κύτταρα θηλαστικών και έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να εκφράζει μία πρωτεΐνη στο καρβοξυτελικό άκρο σε σύντηξη με τη φθορίζουσα

πρωτεΐνη Cherry στο αμινοτελικό. Τα κύρια στοιχεία που περιέχει αυτός ο φορέας είναι:

- Θέση πολυσυνδέτη MCS η οποία έχει αλληλουχίες που αναγνωρίζονται και κόβονται από διάφορα ένζυμα περιορισμού. Η καθεμιά συναντάται μόνο μια φορά στον φορέα.
- Γονίδιο mCherry το οποίο όταν εκφράζεται παράγεται κόκκινη φθορίζουσα χρωστική.
- Γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη - νεομυκίνη το οποίο χρησιμοποιείται για να επιλέξουμε τα κύτταρα που μετασηματίστηκαν ή διαμολύνθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει το αντιβιοτικό καναμυκίνη ή νεομυκίνη.
- Θεση έναρξης της αντιγραφής σε βακτήρια
- Υποκινητής CMV ισχυρής έκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών



Εικόνα 1: Χάρτης και αλληλουχία του πολυσυνδέτη του pmCherry C₁

2.3 Θρεπτικό LB

Για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού υλικού πρέπει να προστεθούν 40g LB άγαρ (Cat. No 01-385, Sharlau Microbiology) σε τελικό όγκο 1000ml. Για τελικό όγκο 100ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 4g στην κωνική φιάλη. Το μείγμα αποστειρώθηκε, προστέθηκε σε αυτό αντιβιοτικό και τοποθετήθηκε σε τρυβλία Petri όπου στερεοποιήθηκε.

Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού υλικού πρέπει να προστεθούν 15g LB Broth (Cat. No 02-384, Sharlau Microbiology) σε τελικό όγκο 1000ml. Έγινε αποστείρωσή του μείγματος και προστέθηκε αντιβιοτικό.

2.4 Αντιβιοτικό καναμυκίνη

Η αρχική συγκέντρωση του αντιβιοτικού είναι 30mg/ml ενώ η τελική του συγκέντρωση είναι 30μg/ml. Άρα τελικά χρησιμοποιήθηκαν σε 50ml διαλύματος 50 μl καναμυκίνης.

Μέθοδοι

2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η εισαγωγή του πλασμιδιακού φορέα pmCherry C₁ σε βακτηριακά κύτταρα ώστε να παραχθεί σε μεγάλη ποσότητα και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επόμενα στάδια της εργασίας. Αφού γίνει ο μετασχηματισμός των βακτηρίων, ακολουθεί καλλιέργειά τους ώστε να πολλαπλασιαστούν και να επιλεγούν τα μετασχηματισμένα. Στη συνέχεια θα γίνει η απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA από αυτά τα κύτταρα.

2.5.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τον pm Cherry C1

Μετασχηματισμός είναι η διαδικασία κατά την οποία τα βακτήρια προσλαμβάνουν ελεύθερο DNA. Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιούνται κυρίως τρεις τρόποι το θερμικό σοκ, ηλεκτρικό σοκ και η διαφορά στη συγκέντρωση αλάτων. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά στελέχη DH5a και ο μετασχηματισμός τους έγινε με θερμικό σοκ.

Η διαδικασία είναι η εξής :

-Τοποθετήθηκε στον πάγο το δείγμα με τα δεκτικά κύτταρα της εταιρίας TaKaRa Cat. No. 9057

- Προστέθηκαν 100-200 ng DNA (pmCherry C1) και ακολούθησε ήπια ανάδευση.
- Επώαση για 20 min στον πάγο.
- Θερμικό σοκ 1 min και 30 sec στους 42 °C στο υδατόλουτρο και μετά ξανά στον πάγο.
- Προστέθηκε 1ml LB υγρό και έγινε ήπια ανάδευση.
- Επώαση για 1 ώρα στους 37 °C ώστε να εκφραστεί το γονίδιο ανθεκτικότητας και να επιβιώσουν τα μετασχηματισμένα βακτήρια στο θρεπτικό υλικό με την καναμυκίνη.
- Φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 10 min.
- Αφαίρεση υπερκλειμένου και επαναιώρηση της πελλέτας βακτηρίων.
- Επίστρωση των βακτηρίων σε τρυβλίο το οποίο περιέχει θρεπτικό LB άγαρ με αντιβιοτικό.
- Ολονύκτια επώαση στους 37 °C.

2.5.2 Καλλιέργεια βακτηρίων

Η καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών DH5a γίνεται με σκοπό τον πολλαπλασιασμό αυτών των βακτηρίων που έχουν μετασχηματιστεί.

Από το τρυβλίο στο οποίο έχουν αναπτυχθεί αποικίες βακτηρίων επιλέχθηκε 1 αποικία και μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα με 2-3 ml υγρό θρεπτικό LB και 50 μl αντιβιοτικό καναμυκίνη συγκέντρωσης 30μg/ml. Έγινε επώαση για 12 ώρες στους 37 °C στις 210 rpm.

Η καλλιέργεια βακτηρίων από το σωληνάκι προστέθηκε στην κωνική φιάλη των 500 ml με το LB θρεπτικό και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 12 ώρες στις 210 rpm.

2.5.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα βακτήρια συλλέχθηκαν σε πελέττα με φυγοκέντρηση για 30 min στις 3000 rpm. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του QIAGEN plasmid maxi kit Cat. No. 12162.

2.6 Κλωνοποίηση του cDNA του γονιδίου MFAP1

Η κλωνοποίηση είναι μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τα εξής βήματα : αρχικά γίνεται η επιλογή του τμήματος DNA που θα κλωνοποιηθεί. Στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκε το cDNA του γονιδίου *MFAP1*. Στη συνέχεια θα πρέπει να εισαχθεί σε κατάλληλο φορέα. Για να γίνει αυτό, το cDNA ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το cDNA και ο φορέας θα πρέπει να έχουν κατάλληλα άκρα ώστε να ακολουθήσει αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους. Τα άκρα αυτά θα δημιουργηθούν μέσω πέψης με ένζυμο περιορισμού, οι αλληλουχίες των οποίων έχουν τοποθετηθεί στα 5' άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR. Τέλος αφού πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης θα γίνει μετασχηματισμός βακτηρίων.

2.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, ώστε να παραχθεί σε μεγάλη ποσότητα και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια: την αποδιάταξη του DNA, την πρόσδεση των εκκινητών σε κάθε έναν από τους κλώνους DNA και την επιμήκυνση των εκκινητών. Για την PCR απαιτούνται τα εξής αντιδραστήρια: εκκινητές, ένζυμο Taq πολυμεράση, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ρυθμιστικό διάλυμα, ιόντα μαγνησίου ($MgCl_2$).

Εκκινητές: Είναι μόρια ολιγονουκλεοτιδίων που κατασκευάζονται τεχνητά. Οι εκκινητές για το cDNA του γονιδίου *MFAP1* σχεδιάστηκαν ώστε να μην συμπεριλαμβάνεται η αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης αφού περιέχεται ήδη στον pmCherry C₁. Η ακολουθία του εμπρόσθιου (forward) εκκινητή ξεκινάει αμέσως μετά την αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης και περιέχει 19 νουκλεοτίδια που υβριδοποιούνται με το cDNA και φέρει στο 5' άκρο του αλληλουχία αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο *XhoI*. Αντίστοιχα ο ανάστροφος (reverse) εκκινητής ξεκινάει από την αλληλουχία λήξης και φέρει αλληλουχία αναγνώρισης από το *BamHI*. Αυτά τα ένζυμα περιορισμού δεν κόβουν μέσα στον φορέα. Υπάρχουν επιπλέον νουκλεοτίδια στο 5' κάθε εκκινητή επειδή είναι απαραίτητα ώστε τα ένζυμα περιορισμού *BamHI* και *XhoI* να κόψουν στις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν καθώς αυτές είναι στα άκρα.

Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από το *XhoI* είναι *BamHI* αντίστοιχα είναι:

5'...CTCGAG...3' και 5'...CCTAGG...3'
3'...GAGGTC...5' 3'...GGATCC...5'

Και οι αλληλουχίες των εκκινήτων οι ακόλουθες :

MFAP1_F 5' CAGCG CTCGAG TCGGTCCCAAGCGCTCTCATG 3' T_m=60°C

MFAP1_R 5' CAGCC GGATCC CTAGGTAGTTTTCCGCTTCTTG 3' T_m=62°C

Αρχικά προηγήθηκε PCR σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ποσότητες (gradient PCR), ώστε να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την PCR που θα ακολουθήσει. Τελικά επιλέχθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες:

300ng (3μl) DNA από το MFAP1

95 °C 3 min

95 °C 15 sec

64 °C 40 sec για 35 κύκλους

73 °C 1 min

72 °C 3 min

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl με τους εξής όγκους & ποσότητες αντιδραστηρίων:

Ρυθμιστικό διάλυμα : 5μl (10x)

MgCl₂: 1 μl (25mM)

dNTPs: 1 μl (10mM το καθένα)

Fw: 1 μl (50pmol/μl)

Rv: 1 μl (50pmol/μl)

Taq: 0,2 μl (5u/μl)

H₂O : 37,8 μl

2.6.2 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Σκοπός των πέψεων με ένζυμα περιορισμού είναι να δημιουργηθούν τα επιθυμητά άκρα στις αλληλουχίες που θα κοπούν. Τα ένζυμα αυτά προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να

προστατεύουν από την είσοδο ξένου τμήματος DNA. Αναγνωρίζουν και κόβουν συγκεκριμένες αλληλουχίες 4 – 8 bp με κατεύθυνση 5' προς 3' οι οποίες συνήθως είναι παλίνδρομες.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XhoI. Αρχικά έγινε φωτομέτρηση του προϊόντος PCR και του πλασμιδιακού φορέα ώστε να είναι γνωστές οι ποσότητες του DNA και να προσαρμοστούν ανάλογα οι ποσότητες από τα αντιδραστήρια που θα χρησιμοποιηθούν για τις πέψεις. Μετά από κάθε πέψη γινόταν καθαρισμός των προϊόντων και ηλεκτροφόρηση τους. Συνολικά έγινε πέψη 30μg του προϊόντος PCR προκειμένου να δημιουργηθούν άκρα BamHI.

Αντιδραστήρια για πέψη του MFAP1 με BamHI

DNA: 120 μl (30 μg)

Ρυθμιστικό διάλυμα Cutsmart (x10) NEB: 25μl

BamHI: 3 μl (20 u/μl)

H₂O: 102 μl

V_{τελ} = 250 μl

Έγινε ολονύκτια επώαση τους 37⁰ C.

Η ίδια διαδικασία έγινε και για την πέψη του φορέα pmCherry και χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες αντιδραστηρίων:

DNA : 200 μl (120 μg)

Ρυθμιστικό διάλυμα Cutsmart (x10) NEB: 60μl

BamHI: 10 μl (20 u/μl)

H₂O: 330 μl

V_{τελ} = 600 μl

Έγινε ολονύκτια επώαση στους 37⁰ C.

Ακολούθησε καθαρισμός και πέψη με XhoI:

Αντιδραστήρια για πέψη του MFAP1 με XhoI

DNA : 25 μ l (8,4 μ g)

Ρυθμιστικό διάλυμα Cutsmart NEB: (10x) 15 μ l

XhoI: 2 μ l (20 u/ μ l)

H₂O: 108 μ l

Ντελ = 150 μ l

Ολονύκτια επώαση στους 37⁰ C.

Αντιδραστήρια για πέψη του pmCherry C1 με XhoI

DNA : 160 μ l (96 μ g)

Ρυθμιστικό διάλυμα Cutsmart NEB: (10x) 40 μ l

XhoI: 7 μ l (20 u/ μ l)

H₂O: 193 μ l

Ντελ = 400 μ l

Ολονύκτια επώαση στους 37⁰ C.

2.6.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση προϊόντος PCR

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων μακρομορίων. Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε πήκτωμα. Ως αποτέλεσμα τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια (όπως το DNA) μετατοπίζονται προς το θετικό πόλο. Ο ρυθμός με τον οποίο μετατοπίζεται το DNA εξαρτάται κυρίως από το μέγεθός του, τη διαμόρφωσή του, τη συγκέντρωση της αγαρόζης και την τάση του ηλεκτρικού πεδίου.

Παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης 1 % ως εξής :

- Σε μια κωνική φιάλη προστέθηκαν 50-60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE (1x).
- Ζυγίστηκαν 0,3 gr αγαρόζης και ακολούθησε ανάδευση της κωνικής φιάλης.
- Το διάλυμα της κωνικής φιάλης θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να γίνει ομοιογενές.

- Στη συνέχεια προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,1 μg/ml.
- Το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετήθηκε σε καλούπι μέχρι να πήξει.
- Τοποθέτηση του πηκτώματος σε συσκευή και ηλεκτροφόρηση.
- Συλλογή των κατάλληλων τμημάτων DNA με τη βοήθεια μια λεπίδας και υπό την έκθεση υπεριώδους ακτινοβολίας.
- Καθαρισμός του PCR προϊόντος με το kit Macherey – Nagel Cat. Number 740609250 “ PCR clean up”.

Ο μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε είναι από την εταιρία Invitrogen με Cat. No. 1515-016.

2.6.4 Αντίδραση σύνδεσης

Η αντίδραση σύνδεσης (ligation) είναι η διαδικασία κατά την οποία τα άκρα 2 τμημάτων DNA ενώνονται μεταξύ τους με το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του υδροξυλίου του 3' άκρου του ενός τμήματος DNA με την φωσφορική ομάδα του 5' άκρου του άλλου. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων που λέγονται λιγάσες. Στη συγκεκριμένη εργασία η αντίδραση σύνδεσης έγινε ώστε να ενσωματωθεί το cDNA του MFAP1 στον pm Cherry στη θέση του πολυσυνδέτη. Πριν την αντίδραση σύνδεσης έγινε φωτομέτρηση του φορέα pm Cherry και του ενθέματος αφού είχε γίνει πέψη τους με τα παραπάνω ένζυμα περιορισμού.

Μετά την αντίδραση σύνδεσης ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων και καλλιέργειά τους σε τρυβλία Petri. Την επόμενη μέρα και αφού έχουν αναπτυχθεί αποικίες βακτηρίων γίνεται απομόνωση πλσμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής κλίμακας. Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι να ελεγχθούν ποια από τα βακτήρια έχουν προσλάβει το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο. Υπολογίστηκε η ποσότητα του ενθέματος (MFAP1) που χρησιμοποιήθηκε με τη βοήθεια του εξής τύπου (από την εταιρία για τη λιγάση PROMEGA No 180A):

$$\frac{\text{Ποσότητα του φορέα που θα χρησιμοποιηθεί} * \text{μέγεθος του ενθέματος}}{\text{μέγεθος του φορέα}} * \frac{\text{ένθεμα}}{\text{φορέας}} =$$

$$\frac{1500\text{ng} * 1,3\text{kb}}{4,2\text{kb}} * \frac{1}{1} = 464 \text{ ng}$$

Τελικά, η αντίδραση σύνδεσης περιέχει:

pmCherry: 5 μl (2μg)

MFAP: 1,5 μl (0,438 μg)

Ρυθμιστικό διάλυμα: (10x) 1 μl

T₄ Λιγάση Promega: 1μl (20 u/μl)

H₂O: 1,5 μl

V_{τελ} =10 μl

Επώαση για 16 ώρες στους 37 °C.

2.6.5 Μετασηματισμός βακτηρίων με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο

Έγινε μετασηματισμός μιας ποσότητας βακτηριακών στελεχών *E. coli* DH5α (Cat.# 9057 TaKaRa) με τον pmCherry C1.

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον πάγο. Στη συνέχεια έγινε ανάμειξη των κυττάρων και προσθήκη της αντίδρασης σύνδεσης. Ακολούθησε επώαση για 30' και θερμικό σοκ σε θερμοκρασία 42 °C για 45 ". Τα κύτταρα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στον πάγο για 1-2 '. Προστέθηκε θρεπτικό μέσο SOC (super optimal broth) μέχρι τελικό όγκο 1ml. Το περιεχόμενο επώαστηκε στους 37 °C για 1 ώρα.

Παρασκευάστηκε το θρεπτικό υλικό για την επίστρωση του τρυβλίου με 4 gr LB άγαρ σε 100 ml νερό και προστέθηκαν 100 μl αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100 μg/ml. Όταν το θρεπτικό μέσο στερεοποιήθηκε στο τρυβλίο επιστρώθηκε με τα μετασηματισμένα βακτήρια. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 37 °C.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μικρής κλίμακας

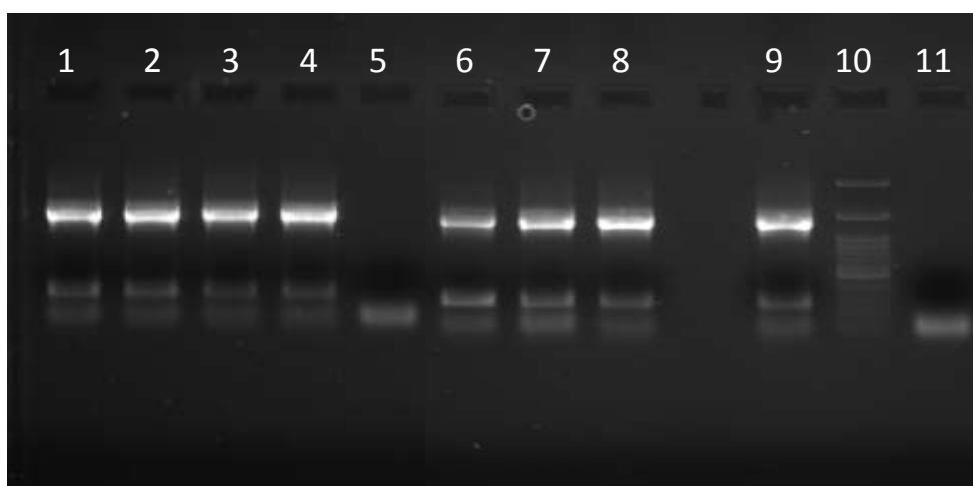
- Καλλιέργεια σε LB υγρό και αντιβιοτικό καναμυκίνη(τελικής συγκέντρωσης 30 μg/ml) για 12 -16h στις 210 rpm στους 37 °C.
- Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm (για falcon ή 13000 rpm για tubes) για 30' στους 4 °C και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- Προσθήκη 300 μl P₁ επαναδιάλυση της πελλέτας βακτηρίων.
- Προσθήκη λυσοζύμης και επώαση για 20' σε πάγο.
- Προσθήκη 300 μl P₂ και ανακάτεμα μέχρι να γίνει διαυγές και αφήνεται για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 300 μl P₃ ανάδευση και επώαση για 15' σε πάγο.
- Φυγοκέντρηση για 20' στις 3000 rpm (για falcon) στους 4 °C και συλλέγεται το υπερκείμενο.

- Ξανά φυγοκέντρηση για 20' ώστε το υπερκείμενο να είναι καθαρό και συλλέγεται.
- Προσθήκη 0,8 % του όγκου ισοπροπανόλη, ανάδευση, επώση για 15' σε πάγο και φυγοκέντρηση για 20'.
- Προσθήκη 70 % αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 10'.
- Αφαίρεση υπερκείμενου επώση στους 50 °C για να στεγνώσει το ίζημα και έπειτα προσθήκη δις απεσταγμένου H₂O.
- Επώση με 100 µg/ml RNAase στους 37 °C
- Επώση για 2h με πρωτεΐνάση K 100 µg/ml σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (1x 0,02 SDS, 50mM Tris -Cl pH=7,5, 100mM NaCl, 2mM EDTA pH=7,5) στους 55 °C

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

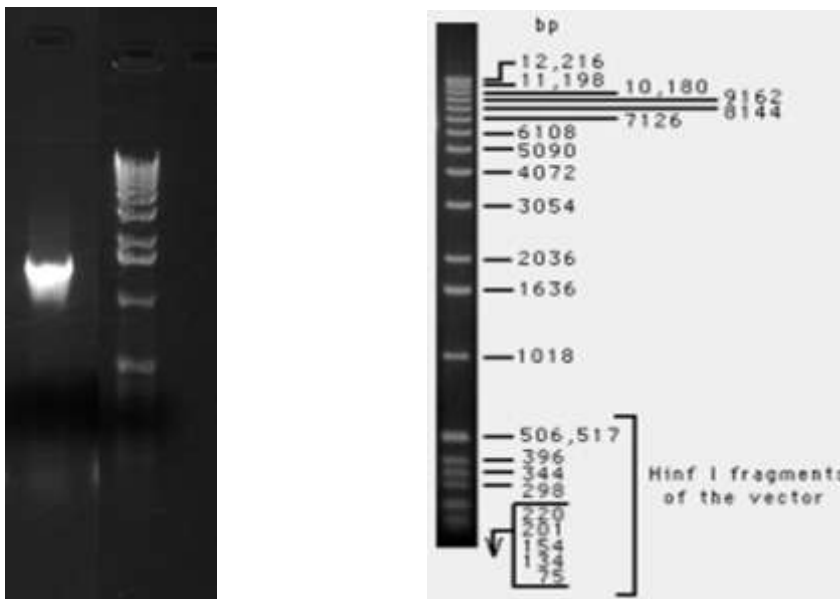
3.1 Αποτελέσματα Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η PCR έγινε για την παρασκευή μεγάλης ποσότητας του ενθέματος προς κλωνοποίηση, δηλ. του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του cDNA του γονιδίου MFAP1. Υπολογίστηκε η θερμοκρασία υβριδοποίησης για κάθε εκκινητή. Δοκιμάστηκε ένα εύρος θερμοκρασιών γύρω από τη θερμοκρασία υβριδισμού (gradient PCR) κάθε εκκινητή (58, 60, 62, 64 °C) και 2 διαφορετικές ποσότητες DNA (100 & 300ng) (Εικόνα 2) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το πλήρους μήκους cDNA (βλ. Υλικά & Μέθοδοι).



Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γονιδίου MFAP1 σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ποσότητες (1: 100ng μl 60^o C, 2: 100ng 62^o C, 3. 100ng 64^o C, 4. 100ng 66^o C, 5. αρνητικός μάρτυρας, 6. 300ng 60^o C, 7. 300ng 62^o C, 8. 300ng 64^o C, 9. 300ng 66^o C, 10. μάρτυρας μοριακού μεγέθους (Ladder), 11. αρνητικός μάρτυρας

Όπως φαίνεται από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης τα αποτελέσματα της PCR είναι σχετικά συγκρίσιμα. Επίσης το προϊόν που παράγεται είναι στο αναμενόμενο μέγεθος (περίπου 1300bp). Τελικά επιλέχθηκε η θερμοκρασία 64^o C ως πιο αυστηρή. Στην εικόνα 3 φαίνεται η τελική PCR με βάση τις συνθήκες που επιλέχθηκαν.



Εικόνα 3: Αριστερά, ηλεκτρόφηση του προϊόντος στις τελικές συνθήκες PCR.

Δεξιά, ο μάρτυρας μοριακού μεγέθους.

3.2 Αποτελέσματα πέψεων

Ακολούθησε πέψη τόσο του προϊόντος της PCR όσο και του φορέα pm Cherry με BamHI, ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός των προϊόντων από την αγαρόζη. Στη συνέχεια έγινε ποσοτικοποίηση και πέψη με XhoI για να δημιουργηθούν τα αντίστοιχα άκρα.

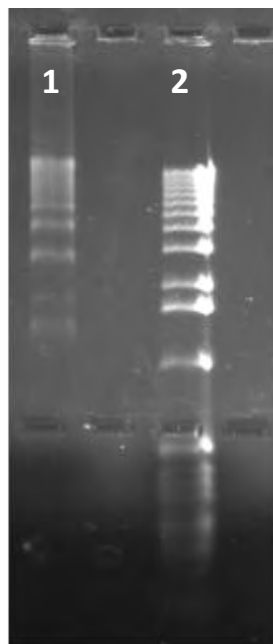
3.3 Αποτελέσματα για την αντίδραση σύνδεσης

Η ποσοτικοποίηση του ενθέματος και του φορέα έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

pmCherry : 310ng/μl 4722 bp

MFAP1 : 339,4 ng/μl 1314 bp

Μετά την αντίδραση που έγινε όπως περιγράφηκε στις Μεθόδους πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σύνδεσης (Εικόνα 5):



Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σύνδεσης (1: Προϊόντα σύνδεσης του pm Cherry C1 με το MFAP1, 2: Μάρτυρας μοριακού μεγέθους)

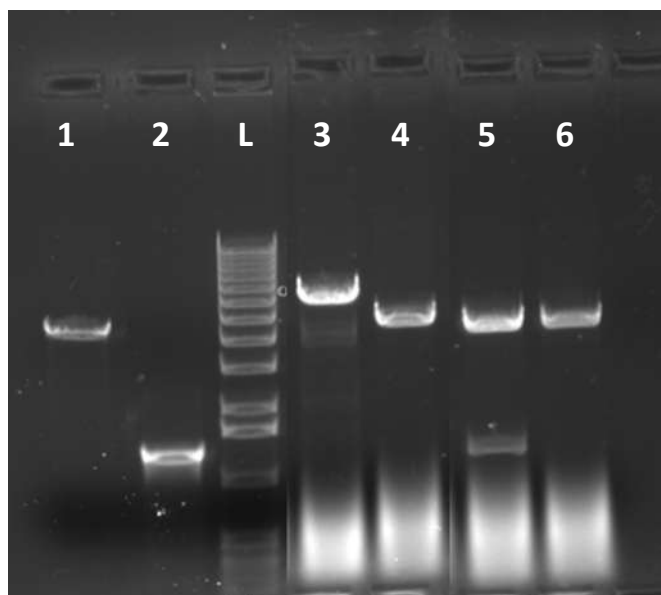
Στην εικόνα 5 φαίνεται ότι παρήχθησαν προϊόντα μεγαλύτερου μεγέθους από το ένθεμα και τον φορέα και γι αυτό η αντίδραση κρίθηκε επιτυχής. Έτσι ακολούθησε το επόμενο στάδιο, ο μετασχηματισμός των βακτηρίων με την

αντίδραση σύνδεσης. Από τον μετασηματισμό προέκυψαν περίπου 10 αποικίες οι οποίες καλλιεργήθηκαν ώστε να απομονωθεί πλασμιδιακό DNA (Εικ. 6).



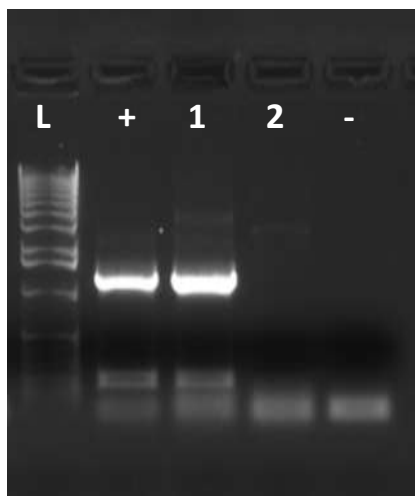
Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, ενδεικτικά από δύο αποικίες.

Στη συνέχεια έγινε δοκιμαστική πέψη και PCR ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει το ένθεμα (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης (1: Πλασμιδιακός φορέας pm Cherry C1, 2: Προϊόν PCR MFAP1, 3 & 4: pm Cherry C1 με MFAP1 κομμένο με BamHI από 2

διαφορετικές αποικίες, 5 & 6 pm Cherry C1 με MFAP1 κομμένο με XhoI από 2 διαφορετικές αποικίες)



Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για το MFAP1.

Όπως φαίνεται στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης, το MFAP1 υπάρχει στη μία αποικία (1) ενώ στην άλλη δεν ανιχνεύτηκε (2). Αφού υπάρχει έστω και σε μία αποικία, αυτό σημαίνει ότι η διαδικασία της κλωνοποίησης ήταν επιτυχής.

Το επόμενο βήμα είναι η αλληλούχηση του ενθέματος του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Εφόσον επιβεβαιωθεί η αλληλουχία, ο κλώνος θα ελεγχθεί με παροδική διαμόλυνση σε κύτταρα θηλαστικών και ακόλουθη μικροσκοπία φθορισμού ως προς την ικανότητα έκφρασης της χμαιορικής πρωτεΐνης MFAP-Cherry. Τελικά αυτό το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα χρησιμοποιηθεί σε πείραμα FRET μαζί με το πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη FRA10AC1-GFP ώστε να ελεγχθεί η μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

Η FRET είναι μια διαδικασία κατά την οποία γίνεται μεταφορά ενέργειας από ένα χρωμοφόρο, το οποίο εκπέμπει προς ένα δεύτερο που βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από αυτό. Ο μηχανισμός αυτής της μεθόδου εμπλέκει ένα δότη φθορισμοφόρου σε διεγερμένη κατάσταση ο οποίος μπορεί να μεταφέρει την ενέργεια διέγερσής του σε ένα κοντινό δέκτη – χρωμοφόρο μέσω αλληλεπιδράσεων διπόλου – διπόλου. Η μέθοδος αυτή είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση μοριακών αλληλεπιδράσεων και τον προσδιορισμό της απόστασης μεταξύ βιομορίων τα οποία έχουν σημειωθεί με τα φθορισμοφόρα του δότη και του δέκτη. Η απόσταση γύρω από την οποία μπορεί να γίνει μεταφορά ενέργειας είναι περιορισμένη γύρω στα 10 nm.

4. Βιβλιογραφία

1. Bessonov S, Anokhina M, Krasauskas A, Golas MM, Sander B, Will CL, Urlaub H, Stark H, Lührmann R. "Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis." *RNA*. 2010 Dec; 16(12):2384-403. Epub 2010 Oct 27.
2. Bessonov S, Anokhina M, Will CL, Urlaub H, Lührmann R. "Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core." *Nature*. 2008 Apr 17; 452(7189):846-50. Epub 2008 Mar 5.
3. Gong W, Emanuel BS, Galili N, Kim DH, Roe B, Driscoll DA, Budarf ML. "Structural and mutational analysis of a conserved gene (DGSI) from the minimal DiGeorge syndrome critical region." *Hum Mol Genet*. 1997 Feb; 6(2):267-76.
4. Hartmuth K, Urlaub H, Vornlocher HP, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R. "Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24; 99(26):16719-24. Epub 2002 Dec 11.
5. Herold N, Will CL, Wolf E, Kastner B, Urlaub H, Lührmann R. "Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes." *Mol Cell Biol*. 2009 Jan; 29(1):281-301. Epub 2008 Nov 3.
6. Jurica MS, Licklider LJ, Gygi SR, Grigorieff N, Moore MJ. "Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis." *RNA*. 2002 Apr; 8(4):426-39.
7. Kähkönen M, Tengström 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.
8. Kim Debacker and R. Frank Kooy "Fragile sites and human disease " *Human Molecular Genetics*, 2007
9. T Lukusa, J.P. Fryns " Human chromosome fragility " *Biochimica et Biophysica Acta* 1779 (2008) 3-16
10. Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, Lührmann R. "Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome." *Science*. 2002 Dec 13; 298(5601):2205-8. Epub 2002 Oct 31.
11. Makarova OV, Makarov EM, Urlaub H, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R. "A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing." *EMBO J*. 2004 Jun 16; 23(12):2381-91. Epub 2004 Jun 3.
12. Marc Vidal, Michael E. Cusick, and Albert-László Barabási "Interactome Networks and Human Disease " *Cell*. 2011 March 18 ; 144 (6): 986-998
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. Michael E. Cusick¹, Niels Klitgord, Marc Vidal, and David E. Hill
Interactome: gateway into systems biology Human Molecular Genetics, 2005
15. Petit P, Fryns JP, van den Berghe H, Hecht F. "Population cytogenetics of autosomal fragile sites." Clin Genet. 1986 Feb; 29(2):96-100.
16. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. "Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome." Genome Res. 2002 Aug; 12(8):1231-45.
17. Theologia Sarafidou, Christina Kahl, Isabel Martinez-Garay, Marie Mangelsdorf, Stefan Gesk, Elizabeth Baker, Maria Kokkinaki, Polly Talley, Edna L. Maltby, Lisa French, Lana Harder, Bernd Hinzmann, Carlo Nobile, Kathy Richkind, Merran Finnis, European Collaborative Consortium for the Study of ADLTE, Panagiotis Deloukas, Grant R. Sutherland, Kerstin Kutsche, Nicholas K. Moschonas, Reiner Siebert, Jozef Géczy " Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein" Genomic 84 (2004) 69-81
18. Sutherland GR, Baker E. "The clinical significance of fragile sites on human chromosomes" Clin Genet 2000 : 58:157-161
19. Suthram S, Shlomi T, Ruppin E, Sharan R, Ideker T. "A direct comparison of protein interaction confidence assignment schemes." BMC Bioinformatics. 2006 Jul 26; 7:360.
20. Von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P. "Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions." Nature. 2002 May 23; 417(6887):399-403. Epub 2002 May 8.
21. Wang S, Chen JZ, Zhang Z, Gu S, Ji C, Tang R, Ying K, Xie Y, Mao Y. "Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK)." Mol Biol Rep. 2003 Mar; 30(1):53-60.
22. Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R. "Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome." Nature. 2002 Sep 12; 419(6903):182-5.
23. Διαδίκτυο:
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html>