

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ”



ΠΟΥΣΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ) "Βιοτεχνολογία" του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων την διετία 1998-2000. Η εργασία χωρίζεται σε τέσσερα κεφάλαια, ακολουθώντας τη σειρά των πειραματικών, θεματικών ενοτήτων που υλοποιήθηκαν αντίστοιχα στα εργαστήρια Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής, Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής, Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε τέσσερα διαδοχικά εξάμηνα, από τον Οκτώβριο του 1998 έως και τον Σεπτέμβριο του 2000. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα στα οποία γίνεται αναφορά στην εργασία αφορούν κυρίως την χρονική περίοδο 2000-2001, κατά την οποία ολοκληρώθηκε το αρχικό στάδιο της συγγραφής της μεταπτυχιακής εργασίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η βιοτεχνολογία είναι ένας νέος κλάδος της τεχνολογίας που συνεχώς αναπτύσσεται με σημαντικές εφαρμογές στη βιομηχανία και στην έρευνα. Σε ένα σύντομο ορισμό μπορούμε να αναφέρουμε ότι η βιοτεχνολογία περιλαμβάνει την ελεγχόμενη και σκόπιμη εφαρμογή απλών βιολογικών συστημάτων, όπως είναι ζωντανά κύτταρα ή συστατικά κυττάρων σε τεχνικά αξιοποιήσιμες διαδικασίες για την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας, καθώς και μιας σειράς εξειδικευμένων προϊόντων, όπως είναι το κιτρικό οξύ, αμινοξέα, ένζυμα, μονοκλωνικά αντισώματα, θεραπευτικές ουσίες. Παράλληλα η βιοτεχνολογία αξιοποιώντας τεχνικές της μοριακής βιολογίας και γενετικής παρείχε την δυνατότητα επέμβασης στο γενετικό υλικό των κυττάρων με σκοπό τη βελτίωση της παραγωγικότητας τους συστήματος.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει θέμα ‘ Βιοτεχνολογία’. Η μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης Ε.Π.Ε.Α.Κ. Βιοτεχνολογίας, Το πρόγραμμα υλοποιήθηκε στην Ιατρική σχολή με τη συνεργασία του εργαστηρίου βιοχημείας του τμήματος χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιτροπή επιλογής των μεταπτυχιακών φοιτητών του προγράμματος που αποτελείται από τον Αναπληρωτή καθηγητή βιολογίας κ. Ι. Λαζαρίδη, τον καθηγητή Θ. Φώτση, τον καθηγητή Κ. Δραΐνα (Εκλιπόν), που μου έκαναν την τιμή να συμμετέχω στο πρόγραμμα. Τους επιβλέποντες καθηγητές κάθε ενότητας, ξεκινώντας από την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ. Φράγκου, την καθηγήτρια κ. Μ. Μπάη (Εκλιπούσα), τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Θ. Τζαβάρα και τον καθηγητή κ. Κ. Δραΐνα (Εκλιπόν), οι οποίοι εμπνεύστηκαν και οργάνωσαν τις αντίστοιχες ενότητες της εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους διδάσκοντες του προγράμματος οι οποίοι προσπάθησαν να μεταλαμπαδεύσουν γνώση, αλλά και τους προβληματισμούς τους για την βιοτεχνολογία.

Θα ήθελα επιπροσθέτως να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, Διευθυντή του Π.Μ.Σ. για την ουσιαστική καθοδήγησή του στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής εργασίας.

Πολύτιμη ήταν και η συμβολή των Διδασκτόρων Κ. Βαρέλη και Κ. Λέτσα καθώς και των Υποψηφίων Διδασκτόρων Σ. Ευταξία και Ν. Χριστογιάννη στην εκπόνηση της εργασίας και τους ευχαριστώ θερμά. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Π. Μποζίδη για τις εύστοχες υποδείξεις του, καθώς και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις

κατά τη διάρκεια της εργασίας. Σημαντική ήταν η βοήθεια της παρασκευάστριας κ. Α. Χριστοδούλου του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά τη διάρκεια της εργασίας και την ευχαριστώ θερμά. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στα μέλη των εργαστηρίων Βιολογικής Χημείας, Παθολογικής Ανατομίας, Γενικής Βιολογίας και Βιοχημείας που συνεργάστηκα για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου Ελένη, τα παιδιά μου, που αφιερώνω αυτή εργασία, καθώς και τους γονείς μου για την ηθική αλλά και υλική συμπαράστασή τους προκειμένου απερίσπαστος να ολοκληρώσω με επιτυχία τις σπουδές μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

A. Εισαγωγή	
Μηχανισμός απόπτωσης –Σκοπός εργασίας.....	1
B. Υλικά-Μέθοδοι	
1. Υλικά.....	6
2. Μέθοδοι.....	6
2.1 Κυτταροκαλλιέργειες.....	6
2.1.1. Κυτταρικές σειρές.....	6
2.1.2. Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας.....	7
2.1.3 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας.....	9
2.1.4 Ανάπτυξη-Διατήρηση-Αποθήκευση κυττάρων.....	9
2.2. Μέθοδοι επαγωγής απόπτωσης.....	11
2.2.1. Επαγωγή απόπτωσης με στέρηση ορού.....	11
2.2.2 Επαγωγή απόπτωσης με θερμικό σοκ.....	12
2.2.3. Επαγωγή απόπτωσης με cis-platinum.....	12
2.3. Μέτρηση απόπτωσης.....	13
2.3.1. Μέτρηση απόπτωσης με τη μέθοδο SANDWICH ELISA κλπ.....	13
2.3.2. Μέθοδοι απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA-ηλεκτροφόρηση.....	15
Γ. Αποτελέσματα	
1. Μέτρηση απόπτωσης με μέθοδο <i>Elisa</i>	17
1.1..Μέτρηση απόπτωσης με στέρηση ορού.....	17
1.1 Μέτρηση απόπτωσης με θερμικό σοκ.....	22
2. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA-ηλεκτροφόρηση.....	23
Δ. Συζήτηση.....	24
E. Βιβλιογραφία.....	26

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

A. Εισαγωγή	
Μηχανισμός ρύθμισης κυτταρικού κύκλου-Σκοπός εργασίας.....	27
B. Υλικά-Μέθοδοι	
1.Υλικά.....	31
2. Μέθοδοι.....	32
2.1. Ανοσοϊστοχημική χρώση Αβιδίνης-Βιοτίνης.....	32
2.2. Ανοσοϊστοχημική χρώση Στρεπταβιδίνης-Βιοτίνης.....	34
2.3. Μέθοδος TUNEL.....	35
Γ. Αποτελέσματα	
1. Έκφραση πρωτεϊνών <i>p53</i> , <i>mdm-2</i> , <i>p21</i> στα T-λεμφώματα.....	38
2. Έκφραση πρωτεϊνών <i>ki-67</i> κυκλίνης A, B1, D1, p16 και Rb στα T-λεμφώματα.....	40
3. Αποπτωτικός Δείκτης.....	44
4.Συσχέτιση αποπτωτικού δείκτη-δείκτη πολλαπλασιασμού.....	45
5. Συσχέτιση ανώμαλου <i>p53</i> και <i>Rb</i> φαινότυπου με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	46
Δ. Συζήτηση.....	46
E. Βιβλιογραφία.....	52

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

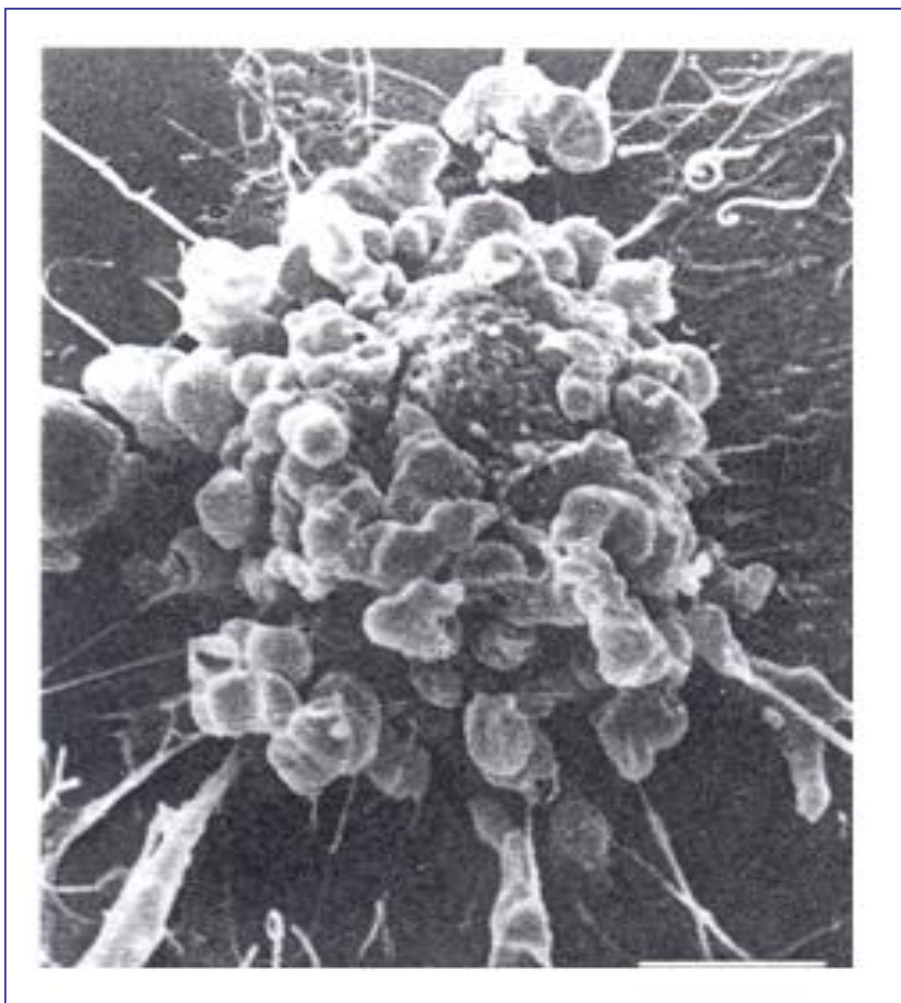
A. Εισαγωγή	
Ρετρομετάθεση	55
Ρετροτρανσποζόνια-οικογένεια <i>VL-30</i>	56
Λειτουργικά χαρακτηριστικά στοιχείου <i>VL-30</i>	58
B. Υλικά- Μέθοδοι	
1. Υλικά	61
2. Μέθοδοι	61
2.1. Βασικές τεχνικές κλωνοποίησης	61
2.1.1. Βακτηριακός μετασχηματισμός	61
2.1.2. Μικροαπομόνωση πλασμιδιακού DNA	62
2.1.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα	63
2.2. Ενζυμικός χειρισμός πλασμιδιακού DNA	65
2.2.1. Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	65
2.2.2. Επιδιόρθωση προεξεχόντων 3' ή 5' ακρων για τη δημιουργία 'τυφλών' ακρων χρησιμοποιώντας το KLENOW τμήμα της DNA Πολυμεράσης I	66
2.2.3. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης πλασμιδιακού φορέα με αλκαλική φωσφατάση	66
2.2.4. Σύνδεση ακρων πλασμιδιακού DNA με T4 DNA λιγάση	67
2.3. Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης	68
2.4. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με το πακέτο υλικών Gene clean II	68
Επιμόλυνση κυττάρων <i>NIH3T3</i> με τη μέθοδο φωσφορικού ασβεστίου	69
Γ. Αποτελέσματα	
1. Υποκλωνοποίηση στοιχείου <i>NVL-3*</i> στο πλασμιδιακό φορέα pBluescript	71
2. Υποκλωνοποίηση στοιχείου <i>NVL-3</i> στο πλασμιδιακό φορέα pBluescript	72
3. Κατασκευή ενός ανασυνδιασμένου στοιχείου <i>VL-30 (NVL-3*)</i> με το γονίδιο ανθεκτικότητας <i>neo</i>	73
4. Κατασκευή ενός ανασυνδιασμένου στοιχείου <i>VL-30</i> πλήρους μήκους (<i>NVL-3</i>) με το γονίδιο ανθεκτικότητας <i>neo</i>	74
5. Επιμόλυνση κυττάρων <i>NIH3T3</i> με το πλασμίδιο (<i>NVL-3*/tk neo/pSP73***</i>)	75
Δ. Συζήτηση	76
1. Δομή στοιχείου <i>VL-30/neo</i> στο γένωμα	78
2. Δομή στοιχείου <i>VL-30/neo</i> μετά από ρετρομετάθεση	78
E. Βιβλιογραφία	79

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

A. Εισαγωγή	
1. Γενικά	81
2. Τρανσποζόνια	81
3. Βακτηριακή σύζευξη	83
4. Τρανσποζονιακή μεταλλαξιγένεση	84
B. Υλικά-Μέθοδοι	
1. Υλικά	87
2. Μέθοδοι	89
2.1. Χειρισμός βακτηριακών καλλιιεργειών	89
2.1.1. Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων	89
2.1.2. Αποθήκευση κυττάρων	89
2.1.3. Βακτηριακή σύζευξη-μετάθεση	89
2.2. Μικροαπομόνωση πλασμιδιακού DNA	90
2.3. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA με μέθοδο Φαινόλης/χλωροφόρμιου	90
2.4. Μεταφορά DNA από πήγμα αγαρόζης σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης αποτύπωση Southern	92

2.4.1. Πέψη χρωμοσωμικού DNA.....	92
2.4.2. Διαδικασία μεταφοράς σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης.....	92
2.5. Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA	94
2.5.1. Απομόνωση ανιχνευτικού μορίου DNA με πέψη με το ένζυμο EcoRI	95
2.5.2. Καθαρισμός της ζώνης του DNA με Gene clean.....	96
2.5.3. Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA (Μέθοδος Dig).....	96
2.5.4. Διαδικασία χρώσης του φίλτρου.....	97
2.6. Μεταφορά και λύση αποικιών πάνω σε ναύλον φίλτρο για in situ υβριδισμό.....	98
2.7. Δοκιμή παγώματος σταγόνας (Freezing Droplet Test).....	99
Γ. Αποτελέσματα	
Εισαγωγή γονιδίου παγοπυρήνωσης (<i>inaZ</i>) στο αλόφιλο βακτήριο <i>H. Meridiana</i>	101
Δ. Συζήτηση.....	105
Ε. Βιβλιογραφία.....	109

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΗΣ ΚΑΙ ΕΥΚΟΛΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΤΗΣ
ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

κ. ΦΡΑΓΚΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς συχνά είναι αναγκαίο ένας αριθμός κυττάρων να καταστρέφεται, είτε διότι είναι σε περίσσεια και δυνητικά αποτελούν κίνδυνο για τη ομοιόσταση του ιστού, είτε διότι έχουν μολυνθεί από κάποιο ιό. Η διαδικασία που ακολουθείται ονομάζεται απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και πρόκειται για ένα καλά οργανωμένο πρόγραμμα που επιτρέπει σε κάθε οργανισμό να απομακρύνει γρήγορα και αποτελεσματικά τα κύτταρα-στόχους. Τα κύτταρα που πεθαίνουν με αυτό τον μηχανισμό παρουσιάζουν μια σειρά από κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός συντηρημένου μηχανισμού που όμως διαφέρει από τον παθολογικό νεκρωτικό θάνατο.

Μηχανισμός Απόπτωσης

Οι κύριες μορφολογικές μεταβολές που παρατηρούνται στην απόπτωση και χαρακτηρίζουν το φαινόμενο είναι: η συρρίκνωση του κυττάρου, η αποικοδόμηση όλων των υποκυτταρικών μεμβρανών, η συμπύκνωση της χρωματίνης, η διάσπαση του πυρήνα του κυττάρου σε θραύσματα, η δημιουργία προεκβολών στην κυτταρική μεμβράνη και αλλοίωση της διαπερατότητας της, η κατάτμηση του DNA σε ολιγονουκλεοσώματα και τελικά την δημιουργία αποπτωτικών σωμάτων, που είναι τμήματα κυτταροπλασματικής μεμβράνης περικλειόντα τμήματα κυτταροπλάσματος και πυρηνικών θραυσμάτων που φέρουν συμπυκνωμένη χρωματίνη (1).

Οι μεταβολές που συμβαίνουν κατά την απόπτωση είναι αποτέλεσμα της δράσης μιας συγκεκριμένης ομάδας μορίων που ονομάζονται κασπάσες (caspase: C: η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου, asp: διασπών τα υποστρώματά τους μετά από ασπαρτικό οξύ, ase: γνωστή κατάληξη ενζύμων). Πρόκειται για οικογένεια πρωτεϊνών που αριθμεί 14 μέλη με παρόμοια δράση σε διαφορετικούς οργανισμούς που παρουσιάζουν υψηλή συντήρηση. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν το αμινοξύ κυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο, παράγονται στο κύτταρο με την μορφή πρόδρομων μορίων (ζυμογόνα) και όταν ενεργοποιηθούν τα πρόδρομα μόρια, μέσα από διαδοχικές πρωτεολυτικές σχάσεις όπου η μια κασπάση ενεργοποιεί την άλλη δημιουργείται ένας καταρράκτης γεγονότων στο κύτταρο που οδηγεί στην απόπτωση. Τα μέλη της οικογένειας λοιπόν διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, που παρουσιάζουν μεταξύ τους δομικές διαφορές, τις τελεστικές κασπάσες και τις εναρκτήριες.

Οι εναρκτήριες με σημαντικότερες τις κασπάσες 8,9,10 δρούν ανοδικά του καταράκτη ενεργοποίησης συγκεντρώνοντας τα εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια

μηνύματα και μόλις ενεργοποιηθούν με τη σειρά τους ενεργοποιούν μέσω πρωτεολυτικής σχάσεις τις τελεστικές με σημαντικότερες τις κασπάσες 3, 6, 7, οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στο κύτταρο σε σχέση με τις εναρκτήριες.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν ότι το ένζυμο στην ενεργό μορφή του εμφανίζεται ως ετεροδιμερές, που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση δυο μικρών υπομονάδων των πρόδρομων μορίων σχηματίζοντας ένα τετραμερές με δυο καταλυτικές θέσεις. Η αναγνώριση του υποστρώματος πραγματοποιείται μέσω μιας αλληλουχίας τεσσάρων αμινοξέων μεταξύ του σημείου σχάσης και της περιοχής σύνδεσης του με τη μικρή υπομονάδα της ενεργού θέσης της κασπάσης. Η πρωτεολυτική σχάση πραγματοποιείται στη θέση αναγνώρισης Asp-Xxx(2,3).

Τα υποστρώματα των τελεστικών κασπασών διακρίνονται σε δυο κατηγορίες:

α. Σε πρωτεΐνες του μηχανισμού της απόπτωσης που ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται με πρωτεολυτική σχάση. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι για παράδειγμα τα προ- και αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 καθώς και οι πρωτεΐνες αναστολής της απόπτωσης (Inhibitors of Apoptosis Proteins: IAPs)(3).

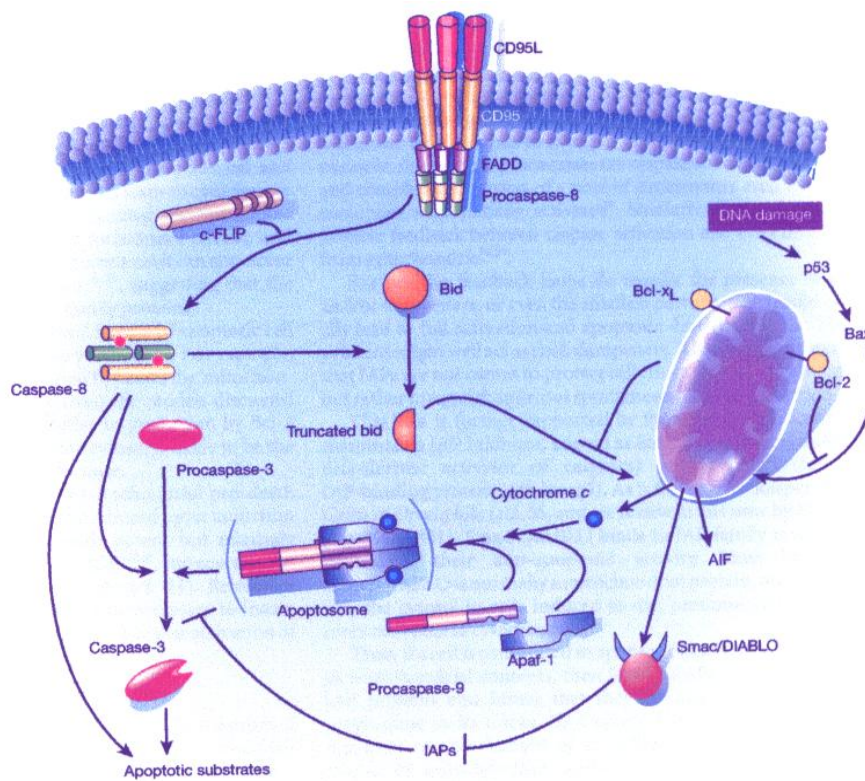
β. Σε δομικές πρωτεΐνες απαραίτητες για τη λειτουργία του κυττάρου, όπως είναι για παράδειγμα ο αναστολέας της πρωτεΐνης CAD (caspase activated DNase), που μετά την αποικοδόμηση του η πρωτεΐνη προκαλεί ενδονουκλεωσική σχάση του χρωμοσωμικού DNA παράγοντας τμήματα DNA με μέγεθος πολλαπλάσιου του μεγέθους 180bp, καθώς επίσης και των πρωτεϊνών σύνθεσης και επιδιόρθωσης του DNA (PARP, MCM-3). Οι πυρηνικές λαμίνες που η αποικοδόμηση τους οδηγεί στη συρρίκνωση του πυρήνα, ενώ αποικοδόμηση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, όπως είναι η ακτίνη και η β II-σπεκτρίνη οδηγεί σε απώλεια του σχήματος του κυττάρου. Η πρωτεΐνη PAK2 (p21 activated kinase) που η αποικοδόμηση της οδηγεί στην ενεργοποίηση της διόγκωσης της κυτταρικής μεμβράνης.

Η διαδικασία ενεργοποίησης των κασπασών πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης των εναρκτήριων μελών της οικογένειας. Για παράδειγμα η κασπάση 8 είναι εναρκτήριο κασπάση στην οδό του υποδοχέα θανάτου όπως είναι ο CD95 (Apo-1/Fas). Μόλις συνδεθεί στον υποδοχέα, το κατάλληλο πρόσδεμα τότε δημιουργείται ένα σηματοδοτικό σύμπλεγμα στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα που ονομάζεται disc (death-inducing signaling complex), το οποίο συγκεντρώνει αρκετά μόρια προ-κασπάσης 8. Οι πρωτεΐνες που συγκροτούν το σύμπλεγμα (FADD: Fas-associated death domain, TRADD) αλληλεπιδρούν μέσω ομόλογων περιοχών που ονομάζονται περιοχές θανάτου (DDs: death domains) και DEDs(death effector

domain). Η υψηλή τοπική συγκέντρωση των ζυμογόνων μορίων της κασπάσης 8 συνδυαζόμενη με την άμεση προσέγγιση των ζυμογόνων μεταξύ τους, οδηγεί στην ωρίμανση τους και στην ενεργοποίησή τους με πρωτεολυτική σχάση. Μόλις μια κασπάσης 8 ενεργοποιηθεί αποσυνδέεται από το σύμπλοκο για να προσδεθεί μια άλλη στη θέση της. Πιο σύνθετη είναι η πορεία ενεργοποίησης της κασπάσης 9, που συμμετέχει στην πορεία ενεργοποίησης της απόπτωσης από ενδοκυττάρια σήματα ως απόκριση σε κάποια μεταβολική διαταραχή ή σε σοβαρές βλάβες στο DNA. Στην πορεία αυτή σημαντικός είναι ο ρόλος του μιτοχόνδριου, όπου υπάρχουν ένα σύνολο προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών με σημαντικότερο το κυτόχρωμα c. Μελέτες έδειξαν ότι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτοσόλιο και η σύνδεσή του με τον παράγοντα Araf-1 (apoptosis factor-1) είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση της κασπάσης 9. Συνεπώς η κασπάση 9 δεν ενεργοποιείται μόνο με πρωτεολυτική σχάση, αλλά με την συγκρότηση ενός συμπλόκου με τον παράγοντα Araf-1 και το κυτόχρωμα c που ονομάζεται αποπτώσωμα (apoptosome)(1,3).

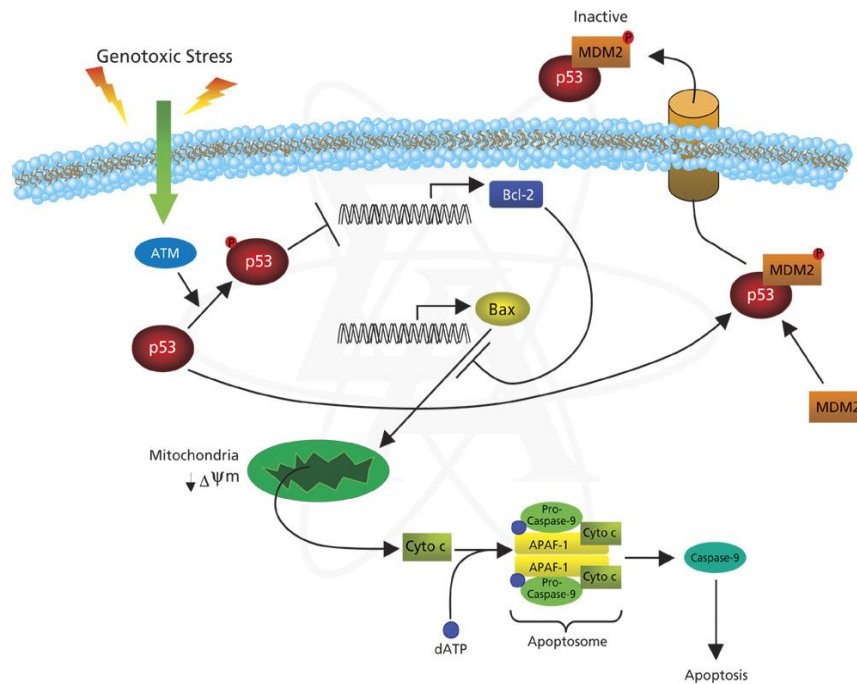
Κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες του μηχανισμού της απόπτωσης είναι τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 που αποτελούν τον συνδετικό κρίκο μεταξύ των τελεστικών μορίων του μηχανισμού της απόπτωσης και των σημάτων που τον ενεργοποιούν. Τα μέλη της οικογένειας ανάλογα με τη δραστηρότητά τους διακρίνονται σε αντι-αποπτωτικά (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, CED-9) αναστέλλοντας την απόπτωση και σε προ-αποπτωτικά (Bax, Bak, Bok, Bcl-X_s, Bik, Bim/Bod, Bad, Bid) που προωθούν τα μηνύματα απόπτωσης, κυρίως αναστέλλοντας τη δράση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας. Ο ρυθμιστικός ρόλος των Bcl-2 πρωτεϊνών υλοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης των μελών της οικογένειας, ειδικότερα οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-X_L σχηματίζουν ετεροδιμερή με τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας, ενώ οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας σχηματίζουν ετεροδιμερή με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, καθώς και ομοδιμερή. Συνεπώς η απόφαση για τη διακοπή ή την εξέλιξη του φαινομένου καθορίζεται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας. Παρ' όλα αυτά ο ρυθμιστικός ρόλος των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 δεν εξαντλείται μόνο στην αλληλεπίδραση των μελών της οικογένειας μεταξύ τους, αλλά κυρίως στην ρύθμιση της απελευθέρωσης προ-αποπτωτικών παραγόντων από το μιτοχόνδριο και κυρίως του κυτοχρώματος c στο κυτοσόλιο μέσω της δημιουργίας πόρων στην μεμβράνη του μιτοχόνδριου. (εικόνα 1)(4)

Εκτός από τα μέλη της οικογένειας Bcl-2, ρυθμιστικό ρόλο διατελεί και η πρωτεΐνη p53. Η δράση της πρωτεΐνης επάγεται μετά από σοβαρές βλάβες στο DNA και ανάλογα με τη σοβαρότητα του ερεθίσματος προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ή οδηγεί σε απόπτωση. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 πραγματοποιείται με τη βοήθεια μορίων αναγνώρισης όπως είναι η πρωτεΐνη ATM (Ataxia Telangiectasia-mutated gene), η οποία φωσφορυλιώνει την p53 προκαλώντας μεταβολή στη διαμόρφωσή της με αποτέλεσμα την σταθεροποίησή της. Στη συνέχεια η p53 επάγει παράγοντες που προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, όπως είναι η πρωτεΐνη p21, που είναι αναστολέας του συμπλόκου κυκλίνη/κυκλινοεξαρτώμενη κινάση και ρυθμίζει την μετάβαση στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Διαφορετικά ενεργοποιεί το μηχανισμό της απόπτωσης μέσω της επαγωγής πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον μηχανισμό της απόπτωσης, όπως είναι η πρωτεΐνη Bax, ο υποδοχέας θανάτου CD95 ή μέσω της μέσω της μιτοχονδρικής οδού. Μια ακόμη σημαντική πρωτεΐνη που επάγεται από την p53 είναι η mdm 2, που βοηθάει στην στόχευση της p53 στην πρωτεολυτική μηχανή με μεσολαβητή την ουμπικουϊτίνη. Δείχνοντας ότι η ενεργοποίηση της p53 είναι προσεκτικά ρυθμισμένη και παροδική (εικόνα 2)(4,5,6).



Εικόνα 1: Οι δυο κύριοι οδοί επαγωγής απόπτωσης μέσω της οικογένειας των υποδοχέων Death receptor (CD95) και του μιτοχονδρίου (M. Hengartner: Nature Vol 407, 2000)

Ανασταλτικό ρόλο στην εξέλιξη της απόπτωσης εκτός από τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 διατελεί και μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται (IAPs: inhibitors of apoptosis). Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ανταγωνιστικά κατά την ενεργοποίηση των κασπασών (κασπάση 3), ανταγωνιζόμενες τους αναστολείς τους Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) ή DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) (1).



Εικόνα 2: Ρυθμιστικός ρόλος της πρωτεΐνης p53, που επάγεται μετά από βλάβη στο DNA. Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη ATM (Ataxia Telangiectasia-mutated gene) και αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί την απόπτωση μέσω της πρωτεΐνης Bax, η οποία ενεργοποιεί την μιτοχονδριακή οδό.

Η συνεχής μελέτη για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού της απόπτωσης οδηγεί στην διεύρυνση του αριθμού των ουσιών που εμπλέκονται στην απόπτωση, είτε επάγοντας την απόπτωση είτε καταστέλλοντάς την.

Σκοπός εργασίας

Σκοπό της εργασίας είναι να αναπτυχθεί μια ευαίσθητη και εύκολη μέθοδος για την αναζήτηση νέων μορίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό της απόπτωσης

B. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

- Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν των εταιριών Merck, Sigma.
- Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι: G418 (geneticin), σε τελική συγκέντρωση 20mg/ml, Sigma), Garamycin σε τελική συγκέντρωση 80μg/ml, Gentamicin sulfate, Schering-Plough) και Amphotericin B σε τελική συγκέντρωση 500μg/ml, (Sigma)
- Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.1.1 Κυτταρικές σειρές

A. A2780-A2780CPR-A2780bcl-2/14,18.(Eliopoulos et al.(1995)]

A2780: Ανθρώπινη κυτταρική σειρά που προέρχεται από ασθενή με καρκίνο ωοθηκών (Ovarian carcinoma cell line)(7).

A2780CPR: Ανθρώπινη κυτταρική σειρά που αναπτύχθηκε μετά από έκθεση της A2780 (πατρική σειρά) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του κυτταροστατικού φαρμάκου cis-platin (*cis-diammine-dichloro-platinum II*) για περισσότερο από ένα χρόνο, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο φάρμακο(25).

A2780bcl-2/14,18: Πρόκειται για κυτταρική σειρά που προήλθε από την σειρά A2780 με επιμόλυνση από πλασμιδιακό φορέα (pCDj-bcl-2) ώστε να εκφράζεται εξωγενώς η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2(7).

Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται σε DMEM με 10% BS, ή 10% FCS, προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα. Για τα A2780bcl-2/14,18 απαιτείται προσθήκη του αντιβιοτικού G418 (geneticin)(100μg/ml) για διατήρηση των θετικών κλώνων.

B. (πληροφορίες από κατάλογο ATCC)

HL-60: Ανθρώπινη κυτταρική σειρά από περιφερειακά λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται σε RPMI 1640 με 20%BS ή 20%FCS.

U937: Ανθρώπινη κυτταρική σειρά που εκφράζει χαρακτηριστικά λεμφοκυττάρων, προέρχεται από ασθενή με διάχυτο ιστοκυτταρικό λέμφωμα. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται σε RPMI 1640 με 10% FCS.

Daudi: Ανθρώπινη κυτταρική σειρά που προέρχεται από ασθενή με λέμφωμα Burkitt. Πρόκειται για μία καλά χαρακτηρισμένη B λεμφοκυτταρική σειρά που ανιχνεύεται από το αντιγόνο EBNA του ιού Epstein Barr. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται σε RPMI 1640 με 20% FCS.

NIH3T3: Κυτταρική σειρά από έμβryo ποντικού. Προέρχεται από υποκλωνοποίηση της σειράς *swiss/3T3* και έχει χαρακτηριστικά ινοβλαστών. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε DMEM με 10% BS, ή 10% FCS προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα.

2.1.2 Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας.

Διάλυμα θρεπτικού υλικού (DMEM, RPMI 1640)

Τα διαλύματα (DMEM: Dulbecco's modification of minimal essential medium) και (RPMI 1640: Roswell Park Memorial institute) αποτελούν το βασικό θρεπτικό υλικό κυττάρων που αναπτύσσονται σε υγρή καλλιέργεια. Περιλαμβάνουν στη σύνθεση τους ανόργανα άλατα, αμινοξέα, βιταμίνες, γλυκόζη, με pH=7,2-7,4 που για την διατήρηση του προστίθεται NaHCO_3 3,7 g/l για το DMEM και 2,0 g/l για το RPMI 1640. Το NaHCO_3 του θρεπτικού υλικού σε συνδυασμό με την ατμόσφαιρα CO_2 του επωαστικού κλίβανου διατηρεί το pH σε φυσιολογικά επίπεδα pH=7,2-7,4. Επιπλέον το θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται με L-γλουταμίνη σε τελική συγκέντρωση 4mM για το DMEM και 2 mM για το RPMI. Για την εξασφάλιση της στειρότητας του μέσου προστίθεται πάντα πριν την χρησιμοποίηση του το αντιβιοτικό Garamycin σε τελική συγκέντρωση 80μg/ml και το μυκητοκτόνο Funzizone (Amphotericin B) σε τελική συγκέντρωση 500μg/ml.

Ορός:BS, FCS

Για την ανάπτυξη οποιασδήποτε κυτταρικής σειράς απαιτείται συνήθως ο εμπλουτισμός του βασικού κυτταρικού υλικού με ορό. Περιέχει συστατικά μη ταυτοποιημένα ακόμη απαραίτητα όμως για την ανάπτυξη των κυττάρων, όπως είναι οι αναπτυξιακοί παράγοντες (growth factors). Σημαντική πηγή των παραπάνω παραγόντων είναι ο ορός από έμβryo μόσχου (Fetal calf serum) που χρησιμοποιήθηκε (GibcoBRL). Το διάλυμα του ορού πριν χρησιμοποιηθεί απενεργοποιείται σε θερμοκρασία 58⁰C για 45 λεπτά αφού πρώτα αποψυχθεί σε υδατόλουτρο 37⁰C. Στη συνέχεια διατηρείται στους -20⁰C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Γλουταμίνη

Το διάλυμα L-γλουταμίνης (Sigma) που προσθέτουμε στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας παρασκευάζεται με διάλυση 5,8gr (200mM) στερεάς ουσίας σε 200ml δισαπισταγμένο H₂O. Ακολουθεί φιλτράρισμα με ειδικό φίλτρο(0,22μm, Millipore) και τη βοήθεια σύριγγας . Αποθηκεύεται σε όγκους 15ml σε δοχεία (Falkon) στους -20⁰C.

Διάλυμα Hanks balanced salt solution-Ca²⁺,Mg²⁺(HBSS)

Το ρυθμιστικό διάλυμα HBSS χρησιμοποιείται για την έκπλυση της καλλιέργειας από τυχόν υπολείμματα θρεπτικού υλικού, πριν τη επίδραση θρυψίνης. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με την διάλυση σε διπλά απεσταγμένο νερό των παρακάτω ουσιών:

<u>ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
NaCL	139mM (8,00gr/l)
KCL	5,4mM (0,40gr/l)
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,37mM (0,06gr/l)
KH ₂ PO ₄	0,44mM (0,06gr/l)
NaHCO ₃	4,16mM (0,35gr/l)
D-glucose	5,56mM (1,00gr/l)

Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 5x ρυθμίζεται το pH=7,2 και ακολουθεί αποστείρωση με διήθηση με τη συσκευή Millipore. Διατηρείται στους -20⁰C.

2.1.3 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Ο χειρισμός και η ανάπτυξη όλων των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένο εργαστηριακό χώρο (cell culture room) που διατηρείται στείρος χρησιμοποιώντας υπεριώδη ακτινοβολία. Οι χειρισμοί των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκαν σε εστία κάθετης νηματικής ροής (GELMAN instrument Laminar Air Flow class100), που παρέχει περιβάλλον στείρο για την αποφυγή μολύνσεων. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο, σταθερής θερμοκρασίας 37 °C και υγρασίας σε ατμόσφαιρα 5% σε CO₂ για την διατήρηση του pH του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας. Οι διάφορες κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε φιάλες (Nunc Roskilde). Τα γυάλινα και πλαστικά σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν για 30 λεπτά στους 121°C σε αυτόκαυστο.

2.1.4 Ανάπτυξη-Διατήρηση-Αποθήκευση Κυττάρων

Αποθήκευση

Οι κυτταρικές σειρές συντηρούνται με αποθήκευση σε υγρό άζωτο στους -192°C σε διάλυμα αποθήκευσης που αποτελείται από 10% DMSO, 90% BS /FCS , που έχει διηθηθεί με φίλτρο 0,22μm, Millipore. Τα κύτταρα συλλέγονται όταν βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και αποθηκεύονται σε πυκνότητα 0,5-1x10⁷ κύτταρα/ml. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Αρχικά απομακρύνεται το υλικό της καλλιέργειας, τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα HBSS
- επαναιωρούνται σε 1,2ml-1,5ml διαλύματος αποθήκευσης και τοποθετούνται σε σωλήνες ψύξης (Nunc: cryotube 1.0ml cat. No.375353).
- Η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται σταδιακά, αρχικά τοποθετούνται για 24-48 ώρες στους -80 °C και στη συνέχεια μεταφέρονται στο δοχείο υγρού αζώτου -192 °C.

Ανάπτυξη-Διατήρηση

Τα κύτταρα επανακαλλιεργούνται σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

- Αρχικά αναλαμβάνονται από το υγρό άζωτο και τοποθετούνται για 2 λεπτά σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C για να ξεπαγώσουν.
- Αραιώνονται με 8ml διαλύματος θρεπτικού υλικού χωρίς ορό και φυγοκεντρώνονται στις 800-1200/gpm για 10 λεπτά.
- Επαναιωρούνται σε 2ml θρεπτικού υλικού καλλιέργειας με ορό, αναδεύονται καλά

- Καλλιεργούνται σε φιάλη(φλάσκα) 25cm² συνολικού όγκου 10ml.

Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε σταθερό υπόστρωμα καλλιεργούνται σε χαμηλή πυκνότητα 0,2-0,5x10⁵ κύτταρα/ml. Όταν δημιουργήσουν πλήρες ταπήτιο για να επανακαλλιεργηθούν θρυψινοποιούνται, υφίστανται κατεργασία με το πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη, ώστε να αποκολληθούν από το στερεό υπόστρωμα που αναπτύσσονται, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
- Τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 3-4ml διάλυμα HBSS
- Προστίθεται 1ml θρυψίνη 0,25% (Gibco BRL) ώστε να καλυφθεί πλήρως το ταπήτιο και επιάζονται για 1-2 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο, ενώ ταυτόχρονα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

• Μόλις τα κύτταρα αποκολληθούν από την επιφάνεια της φιάλης η θρυψίνη απενεργοποιείται με προσθήκη θρεπτικού υλικού καλλιέργειας σε όγκο 3-4ml.

• Τα κυτταρικά συσσωματώματα διαλύονται με ανάδευση με πιπέτα (Pasteur), μετράται ο αριθμός και η βιωσιμότητα των κυττάρων, όπως περιγράφεται παρακάτω και τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πυκνότητα 0,5x10⁵ κύτταρα/ml.

Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε εναιώρημα καλλιεργούνται σε υψηλότερη πυκνότητα 0,5-1x10⁵ κύτταρα/ml, όταν ξεπεράσουν την πυκνότητα 1x10⁵ κύτταρα/ml επανακαλλιεργούνται ως εξής:

- Φυγοκέντριση για 10 λεπτά ενός 800-1200rpm.
- Επαναιωρούνται σε 3-4ml θρεπτικού υλικού αναδεύονται καλά με πιπέτα (Pasteur) και επανακαλλιεργούνται, αφού πρώτα μετρηθεί ο αριθμός και η βιωσιμότητα των κυττάρων ενός περιγράφεται παρακάτω.

Μέτρηση βιωσιμότητας

Η διάκριση των ζώντων κυττάρων επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μιας χρωστικής trypan blue, η οποία έχει την ικανότητα να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων και να τα χρωματίζει μπλε σκούρα, ενώ τα ζωντανά κύτταρα φαίνονται φωτεινά και διάφανα. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την δημιουργία ενός μίγματος από εναιώρημα κυττάρων σε όγκο 10μl και ίσο όγκο 10μl διαλύματος χρωστικής trypan blue (0,4% w/v σε φυσιολογικό ορό 0,9% NaCL). Το κυτταρικό εναιώρημα αναδεύεται καλά και τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer 0.100mm, 0.0025mm² και παρατηρείται στο

μικροσκόπιο(OLYMPUS CK2). Τα ζωντανά κύτταρα φαίνονται φωτεινά και διάφανα, μπλε σκούρα.

2.2 Μέθοδοι Επαγωγής απόπτωσης

2.2.1 Επαγωγή απόπτωσης με στέρηση ορού (8)

Αναφέρθηκε παραπάνω ότι για την ανάπτυξη των κυττάρων είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός του θρεπτικού υλικού με ορό. Πλήρης απουσία ορού για μικρό χρονικό διάστημα οδηγεί αρχικά σε αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και αν παραταθεί σε ενεργοποίηση της απόπτωσης. Η διαδικασία επαγωγής απόπτωσης με στέρηση ορού περιλαμβάνει την καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για χρονικό διάστημα 72 ωρών.

- Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε σταθερό υπόστρωμα, παραλαμβάνονται όταν βρίσκονται σε κατάσταση πλήρους ταπήτιου με την διαδικασία της θρυψινοποίησης και επανακαλλιεργούνται σε πυκνότητα (0.5×10^5 κύτταρα/ml) (κεφ 2.1.4).

- Στη συνέχεια μόλις τα κύτταρα προσκολληθούν στο σταθερό υπόστρωμα της φιάλη (φλάσκας), αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας παραλαμβάνονται από την ίδια καλλιέργεια με αυτά που θα υποστούν στέρηση ορού και επανακαλλιεργούνται (κεφ 2.1.4), χωρίς να αλλαχθεί περαιτέρω το θρεπτικό τους υλικό.

- Τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο. Μετά το πέρας 72 ωρών, τα κύτταρα συλλέγονται με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και μετράται η βιωσιμότητά τους. Το υπερκείμενο της καλλιέργειας, καθώς και τα διαλύματα από τις πλύσεις με HBSS συλλέγονται χωριστά και αποθηκεύονται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχουν νεκρά κύτταρα.

Στις κυτταρικές σειρές που αναπτύσσονται σε εναιώρημα

- Τα κύτταρα συλλέγονται όταν βρίσκονται σε κατάσταση πλήρους ανάπτυξης (πυκνότητα υψηλότερη από 1×10^5 κύτταρα/ml).

- Επανακαλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (βλέπε 2.1.4).

- Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας παραλαμβάνονται από την ίδια καλλιέργεια με αυτά που θα υποστούν στέρηση ορού και επανακαλλιεργούνται (κεφ 2.1.4)

- Τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο και μετά το πέρας 72 ωρών συλλέγονται και μετράται η βιωσιμότητά τους.
- Το υπερκείμενο της καλλιέργειας, καθώς και τα διαλύματα από τις πλύσεις με HBSS συλλέγονται χωριστά και αποθηκεύονται στους -20°C , προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχουν νεκρά κύτταρα.

2.2.2 Επαγωγή απόπτωσης με θερμικό σοκ (HEAT SHOCK)(9)

Τα κύτταρα σε συνθήκες καλλιέργειας φαίνεται ότι αντιδρούν κλιμακωτά σε οποιοσδήποτε μεταβολές των φυσιολογικών συνθηκών ανάπτυξης. Τέτοιες μεταβολές είναι η απουσία ορού, το θερμικό σοκ, η υποθερμία. Στην περίπτωση του θερμικού σοκ αν το επίπεδο του σοκ είναι χαμηλό τα κύτταρα επιβιώνουν, ενώ όμως αυξηθεί τότε ενεργοποιείται η απόπτωση και τα κύτταρα πεθαίνουν. Η διαδικασία επαγωγής απόπτωσης με θερμικό σοκ περιλαμβάνει την καλλιέργεια των κυττάρων σε 42°C για μια ώρα, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε εναιώρημα παραλαμβάνονται από την καλλιέργεια σε κατάσταση πλήρους ανάπτυξης (πυκνότητα υψηλότερη από 1×10^5 κύτταρα/ml) και επανακαλλιεργούνται (κεφ 2.1.4).
- Στη συνέχεια σφραγίζονται οι φιάλες(φλάσκες) με parafilm και βυθίζονται σε υδατόλουτρο 42°C για μια ώρα.
- Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για να αναρρώσουν για 6 ώρες. Ακολούθως συλλέγονται και μετράται η βιωσιμότητά τους.
- Το υπερκείμενο της καλλιέργειας συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -20°C , προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχουν νεκρά κύτταρα.

2.2.3 Επαγωγή απόπτωσης με την χημειοθεραπευτική ουσία cis-platinum (7)

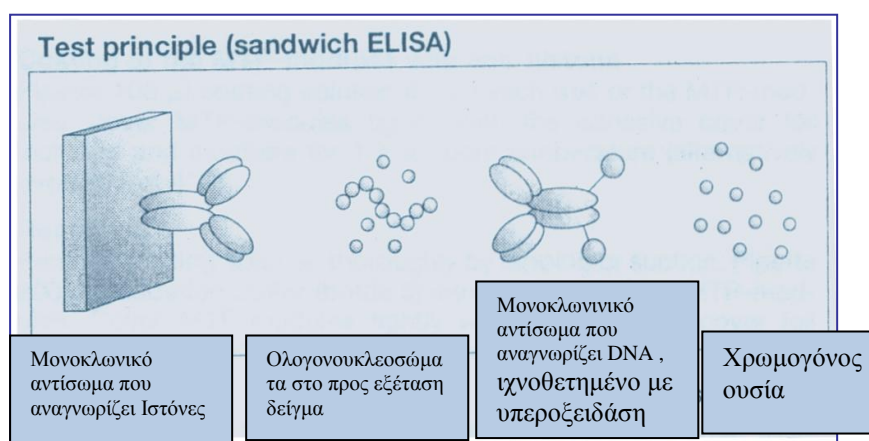
Η χημειοθεραπευτική ουσία cis-platinum(*cis-diammine-dichloro-platinum II*) χρησιμοποιείται για την θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου μεταξύ των οποίων είναι και ο καρκίνος των ωοθηκών. Η δράση του έγκειται στην δημιουργία σταυροδεσμών (28) στην ίδια ή και στις δυο αλυσίδες του DNA, προκαλώντας μεταβολές στην δομή του DNA και διακοπή της ανάπτυξης του κυττάρου. Αν δεν είναι δυνατή η επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA, τότε ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης.

Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει καλλιέργεια των κυττάρων σε ορισμένη συγκέντρωση του φαρμάκου με ταυτόχρονη εξέταση της βιωσιμότητας τους σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Αναλυτικότερα:

- Κύτταρα *A2780* παραλαμβάνονται από καλλιέργεια σε κατάσταση πλήρους ανάπτυξης και επανακαλλιεργούνται (κεφ 2.1.4).
- Μόλις τα κύτταρα προσκολληθούν στο σταθερό υπόστρωμα της φιάλης(φλάσκας) προστίθεται στο θρεπτικό τους μέσο η χημειοθεραπευτική ουσία *cis-platinum* σε συγκέντρωση $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$.
- Τα κύτταρα επωάζονται σε επωαστικό κλίβανο και σε 12, 24, 48, 72 ώρες μετράται η βιωσιμότητα των κυττάρων (κεφ 2.1.4).

2.3. Μέτρηση απόπτωσης

2.3.1 Μέτρηση απόπτωσης με τη μέθοδο SANDWICH ELISA KIT(kat.1.544.675 B.M.)



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της αρχής μεθόδου 'cell death detection ELISA'

Σε ένα κύτταρο από την ενεργοποίηση της απόπτωσης συμβαίνουν διάφορες μεταβολές, χαρακτηριστικές του φαινομένου. Τέτοιες μεταβολές είναι η δημιουργία προεκβολών στη κυτταρική μεμβράνη (blebbing), η συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος, η ενεργοποίηση ενδονουκλεασών που διασπών το δίκλωνο DNA του κυττάρου σε συγκεκριμένες θέσεις στην περιοχή σύνδεσης των νουκλεοσωμάτων, με αποτέλεσμα την δημιουργία μονο- και ολιγονουκλεοσωμάτων που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Για τη μέτρηση της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού Elisa τύπου sandwich (Εικόνα 2). Πρόκειται για μία μέθοδο φωτομετρικού ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού τύπου sandwich για ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό μονο- και ολιγονουκλεοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα κατά την επαγωγή της απόπτωσης.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο μονοκλωνικά αντισώματα από επίμυ που αναγνωρίζουν αντίστοιχα DNA και ιστόνες. Με αυτή την διαδικασία αυτό είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ύπαρξη μονο- και ολιγονουκλεοσωμάτων στο κυτταροπλασματικό κλάσμα που δημιουργείται κατά τη λύση του κυττάρου. Το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιούμε αναγνωρίζει τον πυρήνα των ιστονών και είναι ακινητοποιημένο σε ειδικό πλακίδιο, ενώ το δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει το DNA είναι ιχνηθετημένο με το ένζυμο υπεροξειδάση. Η τυποποιημένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας. Αναλυτικότερα η μέθοδος περιλαμβάνει την διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος των κυττάρων:

- Κύτταρα σε πλήθος 0.25×10^6 παραλαμβάνονται από την καλλιέργεια και τοποθετούνται σε ειδικό σωληνάκι μικροφυγόκεντρου τύπου (erpendorf).
- Στη συνέχεια λαμβάνονται 100μl κυτταρικού δείγματος και φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 1500rpm.
- Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 500μl διαλύματος επώασης. Το δείγμα επωάζεται για 30 λεπτά στους 4°C , αναδεύοντας (Vortex) μετά τα πρώτα 15 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 13000rpm.
- Το υπερκείμενο συλλέγεται (400μl) και 100μl του υπερκείμενου αραιώνονται με 400μl διαλύματος επώασης (διάλυμα A).
- Από το διάλυμα A προστίθενται 100μl στο πλακάκι για τον προσδιορισμό. Παράλληλα με τη διαδικασία προετοιμασίας του κυτταρικού δείγματος προετοιμάζεται το ειδικό πλακίδιο για την μέτρηση:
 - Αρχικά μονιμοποιείται το αντίσωμα των ιστονών με επώαση του πλακιδίου με 100μl διάλυμα επικάλυψης για 1ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Στη συνέχεια το διάλυμα απορρίπτεται και αμέσως προστίθενται 200μl διαλύματος επώασης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Το πλακίδιο εκπλένεται με 300μl διαλύματος έκπλυσης, δυο φορές και αμέσως προστίθεται το δείγμα (διάλυμα A σε όγκο 100μl) και ακολουθεί επώαση για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Στη συνέχεια το πλακίδιο εκπλένεται με 300μl διαλύματος έκπλυσης δυο φορές

- Ακολουθεί επώαση με 100μl διαλύματος σύζευξης, που περιέχει το σημασμένο αντίσωμα με το ένζυμο υπεροξειδάση (anti-DNA), για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Έκπλυση του πλακιδίου όπως παραπάνω

- Προσθήκη 100μl διαλύματος υποστρώματος (2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6)]) Το πλακίδιο επώάζεται υπό ανακίνηση για 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την εμφάνιση χρώματος και ακολουθεί φωτομέτρηση σε Elisa reader σε μήκος κύματος 405nm με τυφλό το διάλυμα του υποστρώματος.

2.3.2 Μέθοδος απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA- ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από κύτταρα σε καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη παρακάτω μέθοδο(Sambrook et al 1989):

- Συλλέγονται από υγρή καλλιέργεια 10^6 κύτταρα A2780
- Προστίθεται 250μl διάλυμα λύσης
- Ακολουθεί επώαση με 0.5μg/ml πρωτεΐνάση K για μια ώρα στους 50°C .
- Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με 0.5μg/ml RNase για 1ώρα στους 50°C
- Το διάλυμα που προκύπτει αποθηκεύεται στους 4°C

Η ηλεκτροφόρηση του DNA είναι μια συνήθης μέθοδος διαχωρισμού τμημάτων DNA και πραγματοποιείται σε πηκτή αγαρόζης. Η μετατόπιση του DNA εξαρτάται κυρίως από το μοριακό βάρος του DNA, από την συγκέντρωση της αγαρόζης τη διαφορά δυναμικού, τη δομή του DNA και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό 1xTBE. Μετά την διάλυση της αγαρόζης στο ρυθμιστικό, που πραγματοποιήθηκε με βρασμό του διαλύματος προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml) (Maniatis et.al second edition). Στη συνέχεια το διάλυμα της αγαρόζης αφήνεται να κρυώσει σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (minigel). Τα δείγματα του DNA που χρησιμοποιήθηκαν απομονώθηκαν με τη μέθοδο που περιγράφεται παραπάνω και πριν την ηλεκτροφόρηση προστέθηκε σε κάθε δείγμα διάλυμα χρωστικής 6xTypeIII. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή (minigel) με τροφοδοτικό EC-105 EC-Apparatus corporation σε σταθερή τάση 90 volt .

Διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση.-απομόνωση DNA

(Sambrook, Fritsch, Maniatis Molecular Cloning, Laboratory Manual Second Edition)

Διάλυμα TRIS-BORATE (TBE) (5X)

TRIS BASE: 54g (0.045M)
EDTA: 20ml (0.5M pH=8.0)
BORIC ACID: 27.5gr
Διατηρείται σε 25⁰C.

Διάλυμα χρωστικής 6xType III

Bromophenol Blue: 0.25%
Xylene cyanol FF : 0.25%
Glycerol in water : 30%
Διατηρείται στους 4⁰C

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου

Παρασκεύασμα 10mg/ml σε νερό
Διατηρείται στους 4⁰C

Διάλυμα Λύσης

EDTA. 10mM
Tris-HCL 50mM (pH=8.0)
N-Lauroyl-sarcosine 0.5%
Διατηρείται στους 4⁰C

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ (ELISA)

1.1 Επαγωγή απόπτωσης με στέρηση ορού

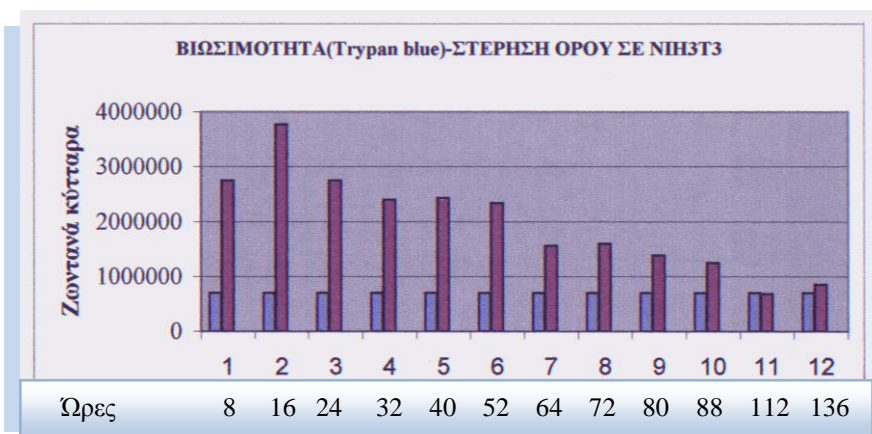
Προκειμένου να μελετηθεί η απόπτωση με ανοσοπροσδιορισμό τύπου Elisa έπρεπε να καθοριστούν δυο βασικές παράμετροι. Η πρώτη παράμετρος αφορά τον καθορισμό του χρόνου στέρησης ορού ώστε να επιτευχθεί επαγωγή απόπτωσης και η δεύτερη παράμετρος αφορά το προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν σε κάθε πείραμα, βασιζόμενη στη δυνατότητα της μεθόδου, να διακρίνει τα κύτταρα που πεθαίνουν με απόπτωση από αυτά που είναι ήδη νεκρά.

Για τον καθορισμό του χρόνου στέρησης ορού καλλιεργήθηκαν κύτταρα *NIH3T3* σε θρεπτικό υλικό με 0,25% ορό σε 12 φλάσκες και πληθυσμό 7×10^5 κύτταρα σε κάθε φλάσκα. Σε χρονικό διάστημα που φαίνεται στο πίνακα 1 πραγματοποιήθηκε μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων.

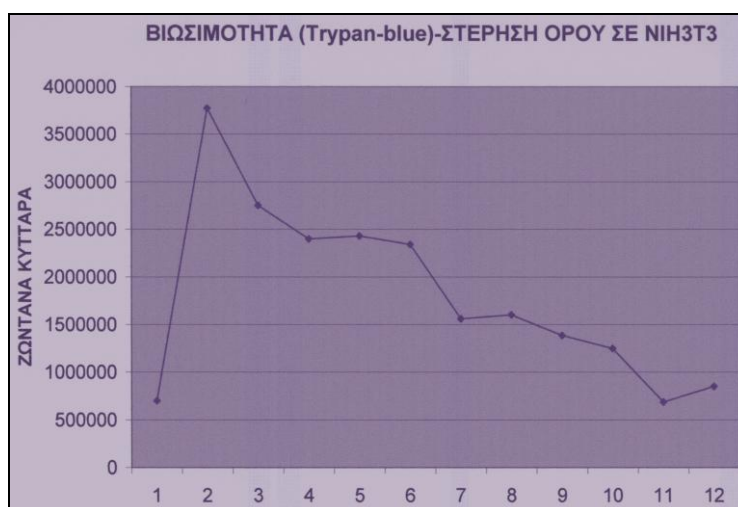
A/A	ΩΡΕΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
1	8	2750000
2	16	3775000
3	24	2750000
4	32	2400000
5	40	2430000
6	52	2340000
7	64	1560000
8	72	1600000
9	80	1385000
10	88	1250000
11	112	687500
12	136	850000

Πίνακας 1: Στέρηση ορού σε κύτταρα (*NIH3T3*)

Η διαγραμματική παράσταση των δεδομένων του πίνακα 1 φαίνεται στην Εικόνα 3,4 Από το διάγραμμα προκύπτει ότι ο χρόνος στέρησης ορού που απαιτείται για την μέτρηση της απόπτωσης είναι τρεις ημέρες (72 ώρες).



Εικόνα 3 : Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων Πίνακα 1, μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων *NIH3T3* με το χρόνο σε συνθήκες στέρησης ορού κόκκινου χρώματος στήλη (Δείγμα). Με μπλε χρώμα (Μάρτυρας) κύτταρα *NIH3T3* που αναπτύχθηκαν χωρίς στέρηση ορού



Εικόνα 4 : Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων Πίνακα 1, μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων *NIH3T3* με το χρόνο σε συνθήκες στέρησης ορού

Για τον καθορισμό του απαιτούμενου αριθμού κυττάρων, κύτταρα *A2780CPR* και *Daudi* υπέστησαν στέρηση ορού για τρεις ημέρες (72 ώρες).

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δυο κυτταρικές συγκεντρώσεις καθώς και δείγματα μάρτυρα, κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς στέρηση ορού, για κάθε περίπτωση, όπως φαίνεται στους πίνακες 2 και 3. Για την μέτρηση της απόπτωση χρησιμοποιήθηκε ανοσοπροσδιορισμός Elisa, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

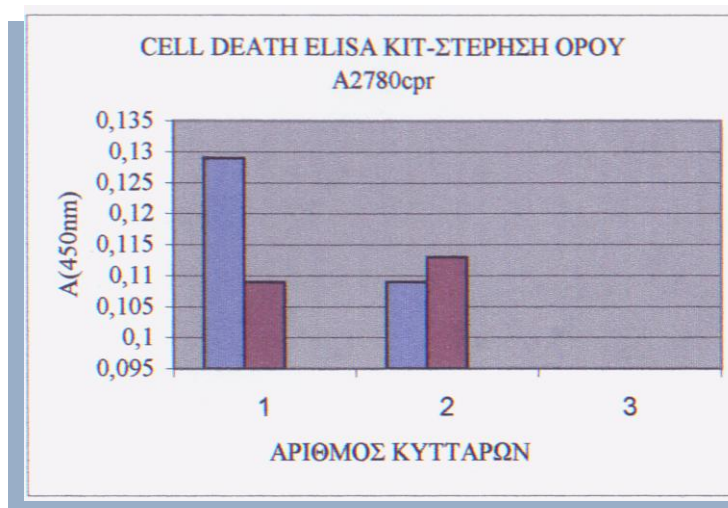
A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (A2780CPR)	ΜΑΡΤΥΡΑΣ A(405nm)	ΔΕΙΓΜΑ A(405nm)
1	2,5x 10 ⁵ /ml	0,129	0,108
2	5,0x 10 ⁵ /ml	0,109	0,110

Πίνακας 2: Αποτελέσματα μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα A2780CPR μετά από στέρηση ορού για 72 ώρες

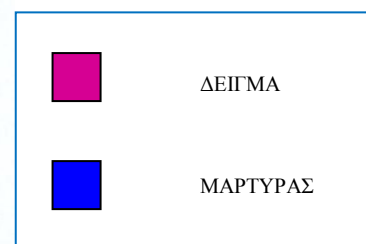
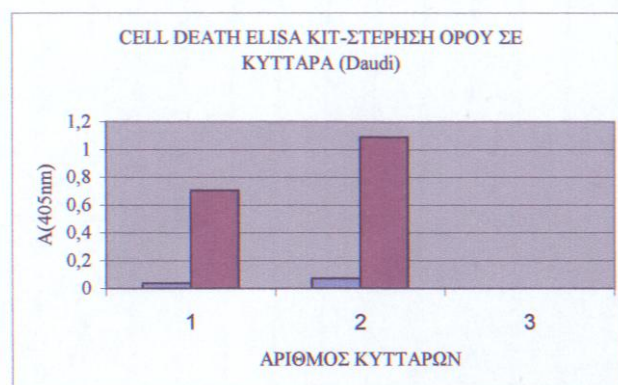
A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΜΑΡΤΥΡΑΣ A(405nm)	DAUDI A(405nm)
1	2,5x 10 ⁵ /ml	0,037	0,704
2	5,0x 10 ⁵ /ml	0,046	1,091

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα Daudi μετά από στέρηση ορού για 72 ώρες

Η απεικόνιση των δεδομένων των πινάκων 2,3 φαίνονται στην εικόνα 4,5.



Εικόνα 4 : Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα A2780CPR μετά από στέρηση ορού για 72 ώρες



Εικόνα 5 : Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα Daudi μετά από στέρηση ορού για 72 ώρες

Από την μελέτη των διαγραμμάτων προκύπτει ότι για τα μεν κύτταρα *Daudi* είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα μέτρησης της απόπτωσης και οι δυο κυτταρικές συγκεντρώσεις. Για τα κύτταρα *A2780CPR* δεν είναι δυνατό να συναχθεί συμπέρασμα για αυτές τις δυο κυτταρικές συγκεντρώσεις. Συνεπώς για την επαγωγή της απόπτωσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο στέρησης ορού θα απαιτηθούν τρεις ημέρες (72 ώρες) στέρησης ορού και για την μέτρηση της απόπτωσης με την μέθοδο του ανοσοπροσδιορισμού Elisa απαιτούνται συγκεντρώσεις κυττάρων $2,5 \times 10^5/\text{ml}$, $5,0 \times 10^5/\text{ml}$.

Ακολούθως μελετήθηκαν οι κυτταρικές σειρές *A2780*, *A2780CPR*, *A2780 Bcl-2/14*, *A2780 Bcl-2/18* και *Daudi*, *U937*. Τα κύτταρα σε συγκέντρωση $2,5 \times 10^5/\text{ml}$, $5,0 \times 10^5/\text{ml}$ υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού για 72 ώρες και η απόπτωση μετρήθηκε με την μέθοδο του ανοσοπροσδιορισμού (Elisa). Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 4 και 5 και στα αντίστοιχα διαγράμματα, εικόνα 5, 6.

A/A	ΔΕΙΓΜΑ ($2,5 \times 10^5$ κύτταρα/ml)	A (405nm)
1	Μάρτυρας	0,129
	A2780CPR	0,109
2	Μάρτυρας	0,034
	A2780 Bcl-2/14	0,183
3	Μάρτυρας	0,030
	A2780 Bcl-2/18	0,065
4	Μάρτυρας	0,045
	A2780	0,800

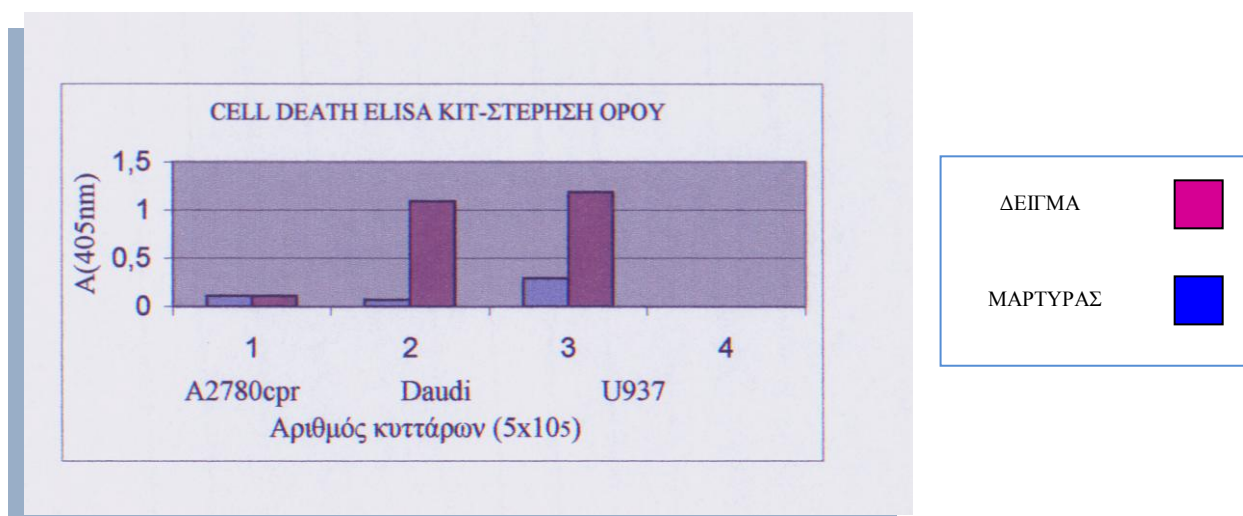
Πίνακας 4: Μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα *A2780*, *A2780CPR*, *A2780 Bcl-2* μετά από στέρηση ορού για 72 ώρες



Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα *A2780* μετά από στέρηση ορού για 72 ώρες

A/A	ΔΕΙΓΜΑ (5,0x 10 ⁵ κύτταρα/ml)	A (405nm)
1	Μάρτυρας	0,109
	A2780CPR	0.113
2	Μάρτυρας	0,046
	Daudi	1,091
3	Μάρτυρας	0,294
	U937	1,186

Πίνακας 5: Αποτελέσματα μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα *A2780CPR*, *Daudi*, *U937* μετά από στέρηση ορού για 72 ώρες



Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα *A2780CPR*, *Daudi*, *U937* μετά από στέρηση ορού για 72 ώρες

Από την εξέταση των διαγραμμάτων προκύπτει ότι από τις κυτταρικές σειρές *A2780*, *A2780CPR*, *A2780 Bcl-2/14*, *A2780 Bcl-2/18*, η σειρά *A2780*, που είναι η πατρική σειρά παρουσιάζει το μεγαλύτερο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων κατά την επαγωγή της απόπτωσης με στέρηση ορού σε σχέση με τις υπόλοιπες σειρές. Η σειρά *A2780CPR* δείχνει να μην ανταποκρίνεται στο ερέθισμα της στέρησης ορού, γεγονός που συμβαδίζει με τον ανθεκτικό χαρακτήρα της σειράς στην επαγωγή της απόπτωσης. Οι σειρές *A2780 Bcl-2/14*, *A2780 Bcl-2/18* παρουσιάζουν σημαντικό αριθμό αποπτωτικών κυττάρων σε χαμηλότερα επίπεδα όμως από την πατρική σειρά *A2780*.

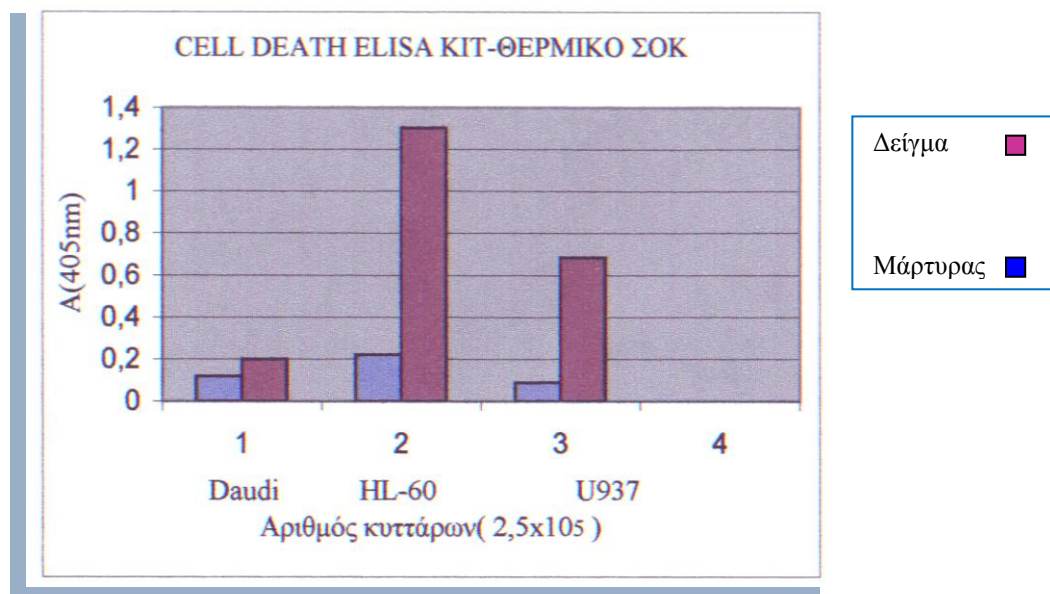
Υψηλοί αριθμοί αποπτωτικών κυττάρων εμφανίζονται στις κυτταρικές σειρές *Daudi*, *U937* με τη σειρά *U937* να παρουσιάζει τον υψηλότερο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων σε συνθήκες στέρησης ορού.

1.2 Επαγωγή απόπτωσης με θερμικό- σοκ

Η απόπτωση μελετήθηκε *in vitro* ακόμη σε συνθήκες θερμικού- σοκ. Για το σκοπό αυτό οι κυτταρικές σειρές *Daudi*, *HL-60*, *U937* υποβλήθηκαν σε θερμικό- σοκ όπως περιγράφεται στο σχετικό κεφάλαιο στα υλικά και μέθοδοι σε συγκέντρωση $2,5 \times 10^5$ κύτταρα/ml. Η απόπτωση μετρήθηκε με την μέθοδο του ανοσοπροσδιορισμού Elisa για κάθε κυτταρική σειρά συγκριτικά με κύτταρα τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ (μάρτυρας). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 6 και στο διάγραμμα, εικόνα 6.

A/A	ΔΕΙΓΜΑ($2,5 \times 10^5$ κύτταρα/ml)	A (405nm)
1	Μάρτυρας	0,118
	<i>Daudi</i>	0.199
2	Μάρτυρας	0,222
	<i>HL-60</i>	1,302
3	Μάρτυρας	0.088
	<i>U937</i>	0,685

Πίνακας 6: Αποτελέσματα μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα, *Daudi*, *HL-60*, *U937* μετά από Θερμικό σοκ



Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα *Daudi*, *HL-60*, *U937* μετά από θερμικό σοκ

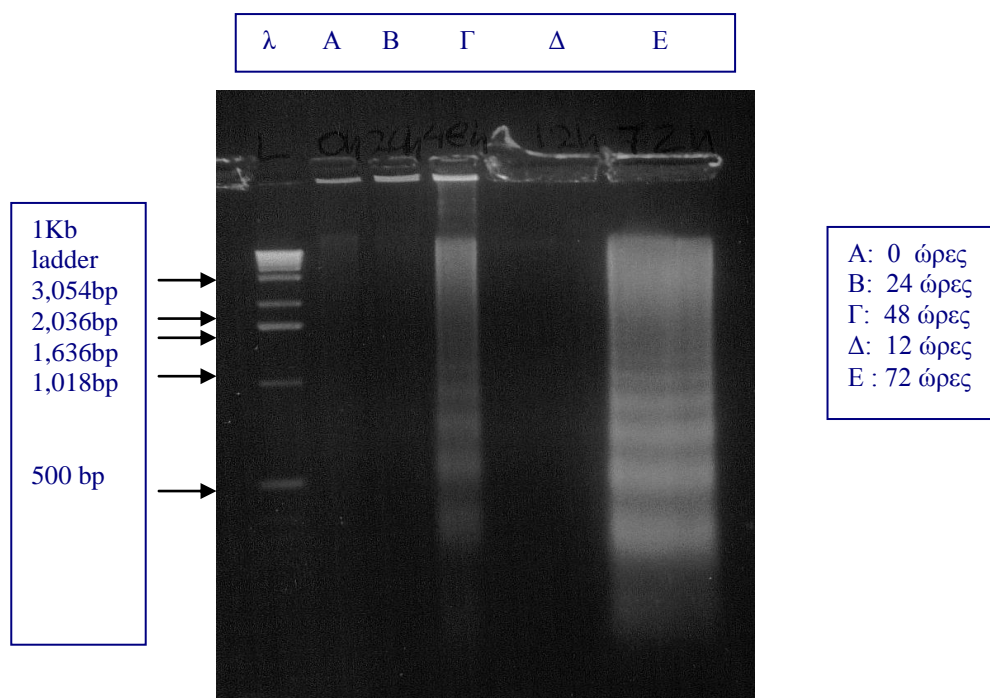
Από τη μελέτη του διαγράμματος προκύπτει ότι σε συνθήκες θερμικού-σοκ υψηλότερος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων παρατηρείται στην περίπτωση των κυττάρων *HL-60*. Σημαντικός αριθμός αποπτωτικών κυττάρων παρατηρείται και στην περίπτωση των

κυττάρων *U937*, ενώ η κυτταρική σειρά *Daudi* παρουσιάζει το μικρότερο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων.

2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA

Μια κλασική μέθοδος ποιοτικού προσδιορισμού της απόπτωσης που βασίζεται στον διαχωρισμό αποπτωτικών τμημάτων DNA είναι με χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζη. Η μέθοδος αυτή αποτελεί την πλέον κοινή μέθοδο για την μελέτη της απόπτωσης και βασίζεται στο κύριο βιοχημικό χαρακτηριστικό των αποπτωτικών κυττάρων, την ενδονουκλεοσωμική σχάση του DNA. Με την διαδικασία αυτή δημιουργούνται τμήματα DNA με μέγεθος πολλαπλάσιου του μεγέθους 180-200 bp και είναι δυνατόν τα τμήματα αυτά να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, δημιουργώντας σχήμα σκάλας (ladder-like).

Για την μελέτη της απόπτωσης με αυτή την μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *A2780* τα οποία υπέστησαν επαγωγή απόπτωσης με την χημειοθεραπευτική ουσία cis-platinum για 0, 12, 24, 48, 72 ώρες. Ακολούθησε απομόνωση των αποπτωτικών τμημάτων DNA από 10^6 κύτταρα που συλλέχθηκαν στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές, όπως περιγράφεται στο σχετικό πρωτόκολλο και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη (2%). Στην πηκτή προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr:0,5 μg/ml) (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Διαχωρισμός αποπτωτικών τμημάτων DNA από κύτταρα σε αγαρόζη

Από την ηλεκτροφόρηση (εικόνα 7) διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα *A2780* υφίστανται απόπτωση με την δράση της ουσίας cis-platinum μετά από έκθεση σε 48 και 72 ωρών,

όπως αποδεικνύεται από την χαρακτηριστική μορφή (ladder-like) που λαμβάνει το DNA από αυτά τα κύτταρα.

Α. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

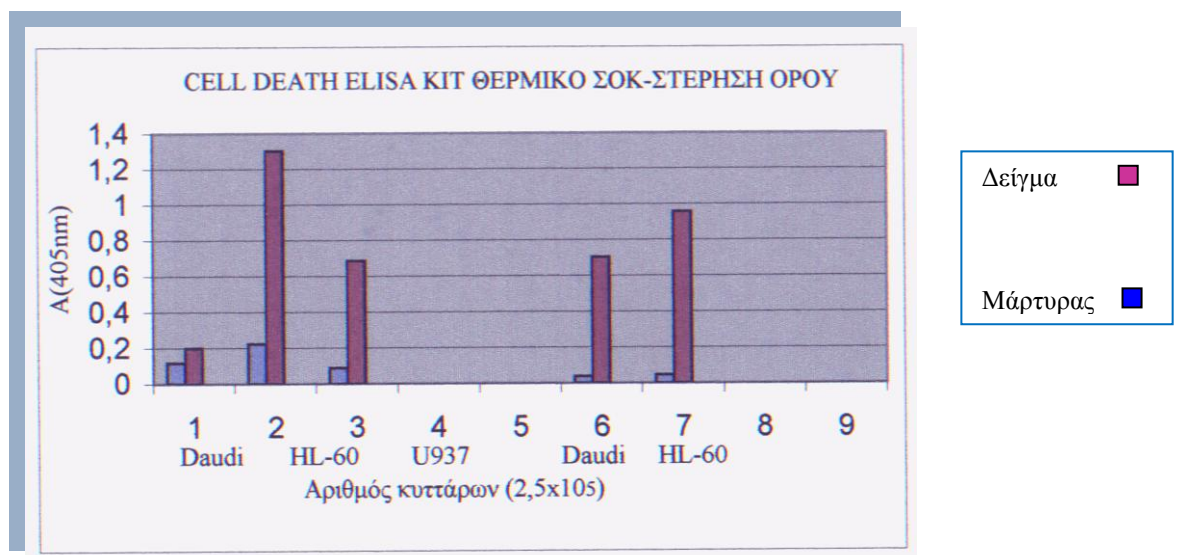
Σκοπός της εργασίας ήταν να αναπτυχθεί μια ευαίσθητη και εύκολη μέθοδος για την αναζήτηση νέων μορίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό της απόπτωσης

Επιλέχθηκαν για τη μελέτη οι κυτταρικές σειρές *NIH3T3*, *Daudi*, *HL-60*, *U937*, καθώς και οι σειρές *A2780*, ανθρώπινη κυτταρική σειρά που προέρχεται από ασθενή με καρκίνο ωοθηκών Ovarian carcinoma cell line, (7) .

Για την επαγωγή της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι στέρηση ορού(8) και θερμικού σοκ(9), που είναι απλοί και εύχρηστοι στην εργαστηριακή πρακτική, καθώς και η χημειοθεραπευτική ουσία cis-platinum(7)

Ο προσδιορισμός της απόπτωσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού Elisa τύπου sandwich, καθώς και με μέθοδο ποιοτικού προσδιορισμού της απόπτωσης που βασίζεται στον διαχωρισμό αποπτωτικών τμημάτων DNA χρησιμοποιώντας τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

Με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού Elisa τύπου sandwich, μετρήθηκε η απόπτωση, η οποία ενεργοποιήθηκε τόσο σε συνθήκες στέρησης ορού, όσο σε συνθήκες θερμικού σοκ σε κυτταρικές συγκεντρώσεις $2,5-5 \times 10^5$ κύτταρα/ml.



Εικόνα8: Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων μέτρησης Απόπτωσης με ανοσοπροσδιορισμό ELISA σε κύτταρα *Daudi*, *HL-60*, *U937* μετά από θερμικό σοκ και στέρηση ορού

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν κατά τον προσδιορισμό της απόπτωσης, που ενεργοποιήθηκε σε συνθήκες στέρησης όρου και θερμικού σοκ στις κυτταρικές σειρές που επιλέχθηκαν, όπως αποδίδονται στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 8), καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Τα κύτταρα *Daudi* είναι περισσότερο ανθεκτικά στην ενεργοποίηση της απόπτωσης σε συνθήκες θερμικού σοκ, από ότι σε συνθήκες στέρησης ορού.
2. Τα κύτταρα *Daudi* πεθαίνουν ευκολότερα με απόπτωση σε συνθήκες στέρησης ορού.
3. Τα κύτταρα *HL-60* οδηγούνται σε απόπτωση τόσο με στέρηση ορού, όσο και με θερμικό σοκ και υπερτερούν σε σύγκριση με τα κύτταρα *Daudi*, διότι δίνουν τη δυνατότητα επιλογής της μεθόδου επαγωγής απόπτωσης.

Η μέθοδος προσδιορισμού της απόπτωσης μέσω διαχωρισμού αποπτωτικών τμημάτων DNA με ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης, χρησιμοποιήθηκε μόνο στη περίπτωση επαγωγής απόπτωσης με τη χημειοθεραπευτική ουσία cis-platinum σε κύτταρα A2780 σε πληθυσμό 10^6 .

Η μέθοδος προσδιορισμού της απόπτωσης με ενζυμικό ανοσοπροσδιορισμού Elisa τύπου sandwich, που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία διακρίνεται στα παρακάτω:

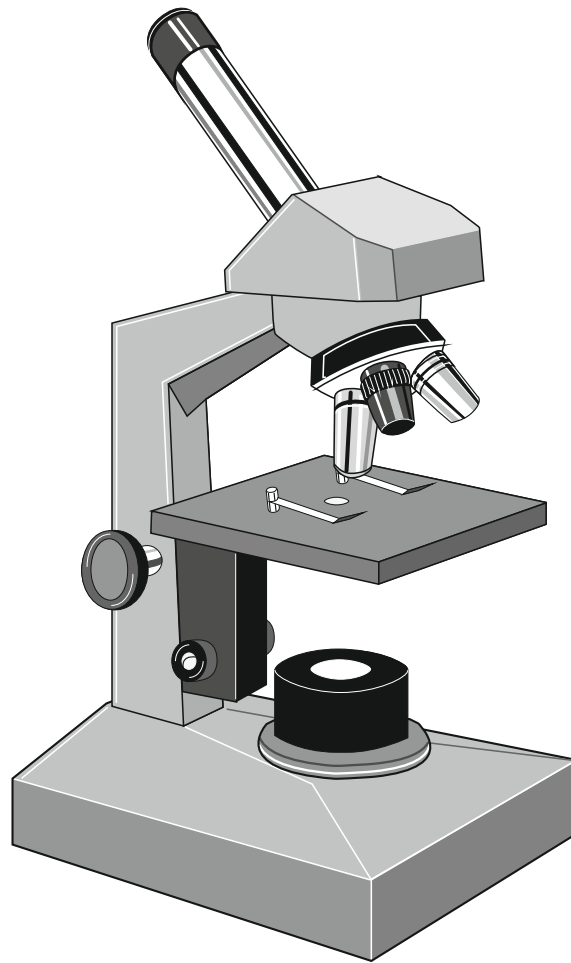
1. Προσδιορίζει τα νουκλεοσώματα που απελευθερώνονται στο κυτοσόλιο κατά την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μπορεί να διακρίνει κανείς σε συνθήκες *in vitro* τη απόπτωση από τη νέκρωση, σε αντίθεση με τη μέθοδο TUNEL και τη μέθοδο διαχωρισμό αποπτωτικών τμημάτων DNA με ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης,(DNA Laddering)(14).
2. Η μέθοδος προσδιορίζει ποσοτικά την απόπτωση με υψηλή ευαισθησία, κατά αντιστοιχία με τη μέθοδο TUNEL(terminal deoxyribo-nucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling)(10,11,14) και σε αντίθεση με τη μέθοδο διαχωρισμό αποπτωτικών τμημάτων DNA με ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης,(DNA Laddering), που προσδιορίζει ποιοτικά την απόπτωση.
3. Η μέθοδος είναι εύκολη στο χειρισμό, χωρίς να απαιτούνται ιδιαίτερα προπαρασκευαστικά στάδια ανάλογα με την κυτταρική σειρά που θα επιλεγεί(14).
4. Στην εκτέλεση των πειραμάτων με τη μέθοδο ανοσοπροσδιορισμού Elisa, απαιτείται η χρήση τυφλού δείγματος
5. Η μέθοδος ανοσοπροσδιορισμού Elisa, την εξέταση ταυτόχρονα πολλαπλών δειγμάτων (13, 14).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. M. C. Cummings, C. M. Winterford and N. Walker, *The Am. Journal of Surgical Pathology* 1997: 21(1), 88-101
2. M. Hengartner, *Nature* 2000: 407, 770-776
3. G. Nunez, M. A. Benedict, Y. Hu and N. Inohara, *Oncogene* 1998: 17,3237-3245
4. J. Reed, *Oncogene* 1998: 17,3225-3236.
5. C. Prives and P. Hall, *Journal of Pathology*, 1999: 187, 112-126
6. T. Rich, R. L. Allen, A. H. Wyllie, *Nature* 200: 407, 777-783. 7.
7. Eliopoulos A., Kerr D., Herod J., Hodgkins L., Krajewski S., Reed J., Young L., *Oncogene* 1995: 11, 1217-1228.
8. Borden L., B., K, CampbellDwyer J., E., Salvato S., M., *FEBS Lett* 1997: 418,30-34.
9. Samali A., Cotter G., T., *Exp. Cell Research* 1996: 223,163-170.
10. Padmini Salgame, Arun S. Varadhacary, Laura L. Primiano, John E. Fincke, Sylviane Muller and Marc Monestier, *Nucleic Acid Research* 1997: Vol 25, No3, 680-681
11. Jirina Prochazkova¹, Dana Kylarova¹, Pavel Vranka², and Vaclav Lichnovsky, *BioTechniques* 2003, 35:528-534
12. Deborah Ribble, Nathaniel B Goldstein, David A Norris and Yiqun G Shellman, *BMC Biotechnology* 2005, 5:12.
13. L Galluzzi, SA Aaronson, J Abrams, ES Alnemri, DW Andrews, EH Baehrecke, et al, *Cell Death Differ.* 2009 August ; 16(8): 1093–1107.
14. Clifton, N.J., *Methods in molecular biology* 2011.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ p53, mdm-2, p21/waF-1, ki67, ΚΥΚΛΙΝΗ Α, ΚΥΚΛΙΝΗ Β1, ΚΥΚΛΙΝΗ D1 ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΣΤΑ Τ-ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

κ. ΜΑΡΙΑ ΜΠΑΗ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

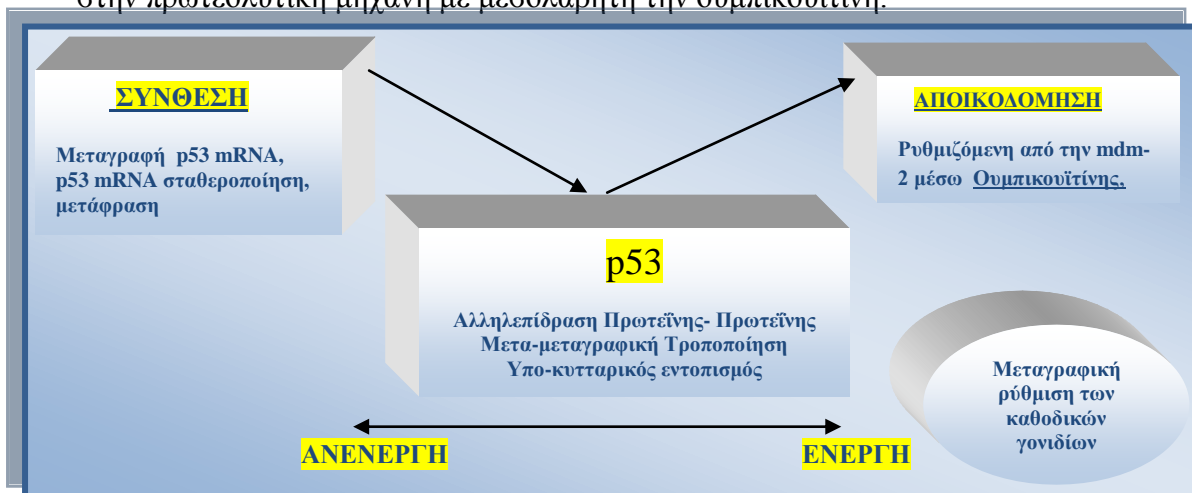
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γενικά

Υπάρχει μια πληθώρα ερευνητικών δεδομένων που υποδεικνύουν ότι διαταραχές των ρυθμιστικών μηχανισμών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως είναι το δίκτυο ελέγχου των πρωτεϊνών p53/mdm2/p21 και p16/Rb, σε συνδυασμό με άλλα εμπλεκόμενα μόρια (κυκλίνες, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, αναστολείς των κινασών) ενέχονται στην ογκογένεση των T-λεμφωμάτων (1,2,3). Τα T-λεμφώματα αποτελούν μια ετερογενή μορφολογική και ανοσολογική ομάδα κακοήθων νεοπλασμάτων που συνιστούν το 15-20% των μη-Hodgkin λεμφωμάτων (4).

Μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου

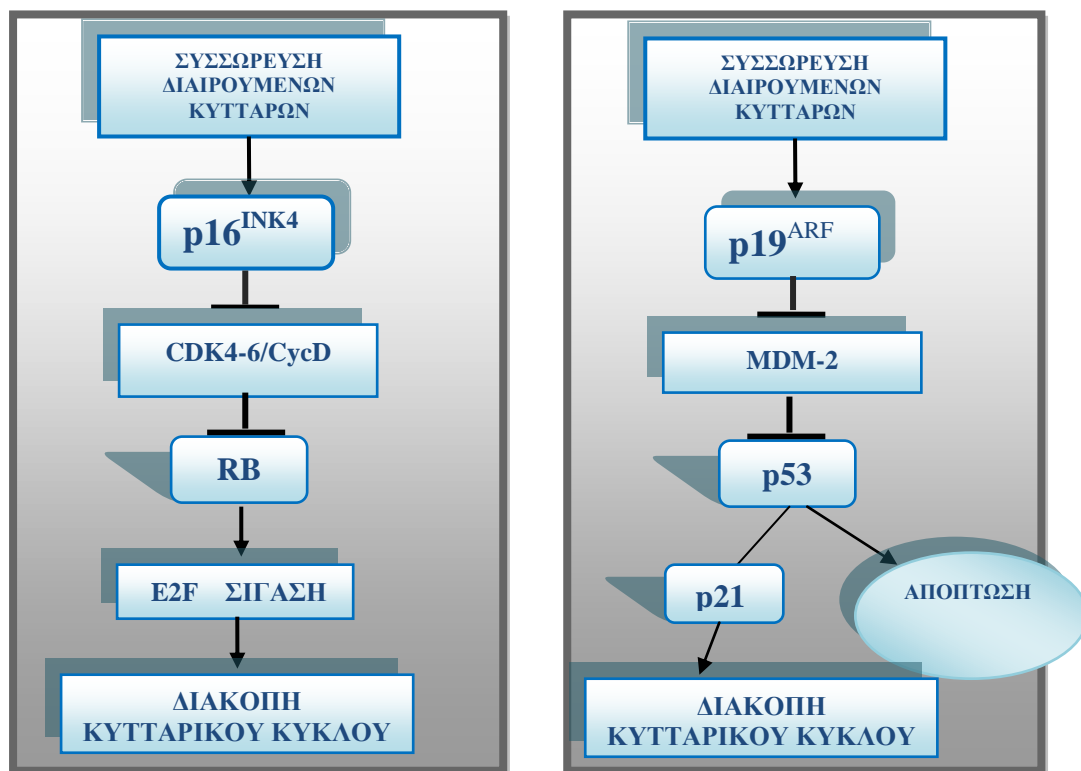
Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Η δράση του επάγεται από παράγοντες κυτταρικού στρες και ανάλογα με τη βαρύτητα του ερεθίσματος προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ή οδηγεί σε απόπτωση (5,6). Η διακοπή του κύκλου στη φάση G1 επιτυγχάνεται εν μέρει από τη δράση της πρωτεΐνης p21, που επάγεται από την πρωτεΐνη p53. Η πρωτεΐνη p21 είναι ο φυσικός αναστολέας του συμπλόκου κυκλίνη/κυκλινοεξαρτώμενη κινάση που ρυθμίζει τη μετάβαση στη φάση S (5). Η ενεργότητα και η σταθερότητα της πρωτεΐνης p53 ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως είναι η πρωτεΐνη mdm2 (7). Η πρωτεΐνη mdm2 υποβοηθά την στόχευση της p53 στην πρωτεολυτική μηχανή με μεσολαβητή την ουμπικουΐνη.



Εικόνα 1: Σχηματική απόδοση των επιπέδων ρύθμισης της πρωτεΐνης p53, μέσω της διαδικασίας ελέγχου της σύνθεσης και αποικοδόμησης με την μεσολάβηση της ουμπικουΐνης, ή επιπροσθέτως μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, με μετα-μεταγραφική τροποποίηση και μέσω ρύθμισης τους ενδοκυττάριου εντοπισμού της πρωτεΐνης. Με την παραπάνω διαδικασία ρύθμισης, η πρωτεΐνη p53 μπορεί να μετατραπεί από ανενεργή σε ενεργή οδηγώντας σε μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων

Επιπλέον, η mdm2 συνδέεται με την p53 και αναστέλλει την ικανότητα της να αλληλεπιδρά με την μεταγραφική συσκευή. Διακοπή της αλληλεπίδρασης της p53 με την mdm2 είναι πιθανό να σχετίζεται με την σταθεροποίηση της p53 μετά από κυτταρικό στρες ή γενετική αστάθεια (7,8,9).

Μεταλλάξεις της πρωτεΐνης p53 έχουν παρατηρηθεί στα κακοήθη λεμφώματα, συχνότερα στο λέμφωμα Burkitt και στην μετάπτωση των χαμηλού βαθμού κακοήθειας B-λεμφωμάτων σε υψηλού βαθμού κακοήθειας λεμφώματα (10,11,12,13,14). Σε αρκετές μελέτες περιγράφεται χαμηλό ποσοστό μεταλλάξεων του p53 γονιδίου και συχνή ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης, η οποία αντιστοιχεί στην έκφραση της σταθεροποιημένης αγρίου τύπου (wild type) πρωτεΐνης (15,13,14,16). Η ταυτόχρονη ανοσοϊστοχημική εκτίμηση των πρωτεϊνών p53 και p21 είναι δυνατό να βοηθήσει στη λήψη έμμεσων πληροφοριών όσον αναφορά την κατάσταση του γονιδίου δεδομένου ότι μόνο ο άγριος τύπος της πρωτεΐνης επάγει την πρωτεΐνη p21 (13). Η δυσλειτουργία του γονιδίου p53 έχει κυρίως μελετηθεί σε B-κυτταρικής αρχής κακοήθη λεμφώματα, ενώ μελέτες σε T-κυτταρικής αρχής κακοήθη λεμφώματα είναι σπάνιες(17,18). Στα κακοήθη T-λεμφώματα παρατηρείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 στο 20-30% των περιπτώσεων, ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου p53 είναι πολύ σπάνιες (10,19,20,15,21,22).



Εικόνα 2: Ρυθμιστικό δίκτυο των πρωτεϊνών p53/mdm2 και Rb/κυκλίνη D στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, μέσω της δράσης των πρωτεϊνών p16 και p19, αναστολέων του κυτταρικού κύκλου (INKA4 family)

Ένα κρίσιμο σημείο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου είναι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb (pRb), που οδηγεί στην απελευθέρωση/ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα E2F. Αυτός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εισόδου στην φάση S του κύκλου (23). Η φωσφορυλίωση της pRb πραγματοποιείται από το σύμπλοκο κυκλίνη-D/ CDK4 και αναστέλλεται από την πρωτεΐνη p16. Επομένως, οι πρωτεΐνες p16/κυκλίνη-D/pRb συγκροτούν ένα ρυθμιστικό δίκτυο του κυτταρικού κύκλου. Διαταραχές στην φωσφορυλίωση της pRb από την CDK4 οφειλόμενες είτε σε υπερέκφραση της κυκλίνης-D, είτε σε απώλεια της δραστηριότητας της p16 είναι δυνατό να οδηγήσουν σε διαταραχές της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (3). Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ένα πολύπλοκο δίκτυο που συνδέει άμεσα την δράση της pRb με αυτή της p53 μέσω της mdm2. Συγκεκριμένα, η pRb συμπλέκεται (σχηματίζει σύμπλοκο) με την mdm2 αναστέλλοντας την αντιαποπτωτική δράση της mdm2 στο δίκτυο της απόπτωσης που ενεργοποιείται από την p53. Επιπλέον, η σύνδεση της pRb με την mdm2 αναστέλλει την αποικοδόμηση της p53 μέσω της mdm2, ενώ δεν είναι δυνατό να αποτρέψει την αναστολή από την mdm2 της p53 εξαρτώμενης trans-ενεργοποίησης (24).

Στα κακοήγη λεμφώματα, μεταβολές στην δομή του γονιδίου p16 ή στην έκφραση της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης έχουν αναφερθεί με μεγαλύτερη συχνότητα στην T-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, στην T-λευχαιμία /λέμφωμα των ενηλίκων και στα B-λεμφώματα που έχουν μεταπέσει από χαμηλού σε υψηλού βαθμού κακοηθείας (25,26,27,28,29,30). Διαταραχές στην έκφραση της πρωτεΐνης Rb έχουν περιγραφεί σε ορισμένα υψηλού βαθμού κακοηθείας B-λεμφώματα (31,32,33,34,35).

Σημαντικά μόρια για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου είναι οι κυκλίνες, πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν την πρόοδο του κύκλου όταν συμπλέκονται με τις κινάσες τους (CDKs) (2). Οι κυκλίνες διακρίνονται σε δυο οικογένειες, την οικογένεια G1 που περιλαμβάνει τις κυκλίνες C, D1, D2, D3 και E, οι οποίες είναι αναγκαίες για την πρόοδο του κύκλου διαμέσου της φάσης G1 και την είσοδο στην φάση S, και την οικογένεια που περιλαμβάνει τις μιτωτικές κυκλίνες, A και B (B1 και B2). Η κυκλίνη A ρυθμίζει τον αναδιπλασιασμό του DNA στην φάση S, ενώ οι κυκλίνες B1 και B2 εξασφαλίζουν την μη αντιστρεπτή είσοδο στην μίτωση (36,37,38).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στα δίκτυα ρύθμισης των γονιδίων p53 και Rb και η συσχέτισή της με τον πολλαπλασιασμό, όπως αυτός καθορίζεται από την έκφραση των πρωτεϊνών Ki67, κυκλίνη A και κυκλίνη B1 σε 57 περιπτώσεις T-λεμφωμάτων για την αναζήτηση: α) των ανοσοϊστοχημικών διαταραχών των δικτύων ρύθμισης των γονιδίων p53 και Rb β) τον ανοσοϊστοχημικό καθορισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και γ). τη συσχέτιση των ευρημάτων με τους ιστολογικούς τύπους των T- λεμφωμάτων

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ**1. Υλικά**

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ιστοπαθολογικά δείγματα από 52 περιπτώσεις περιφερικών T-λεμφομάτων και 5 περιπτώσεις λεμφοβλαστικών T-λεμφομάτων που συγκεντρώθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, το Νοσοκομείο “Ευαγγελισμός” Αθηνών και το Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου (Πίνακας 1). Όλες οι περιπτώσεις ταυτοποιήθηκαν ανοσοφαινοτυπικά και διαπιστώθηκε ότι εξέφραζαν τουλάχιστον έναν T-κυτταρικό δείκτη (CD3, UCHL-1/CD45RO). Επιπλέον διαπιστώθηκε, ότι ήταν αρνητικές για B-κυτταρικούς δείκτες (L26/CD20, 4KB5/PANB). Η ταξινόμηση των περιπτώσεων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ταξινόμηση REAL (Revised European-American Lymphoma Classification) (17).

Πίνακας 1: Ιστολογική κατάταξη των T-λεμφομάτων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη

Ιστολογικός τύπος	Αριθμός δειγμάτων
1. Πρόδρομων T-κυττάρων	
Λεμφοβλαστικό λέμφωμα/λευχαιμία (T-LBL)	5
2 .Λεμφαδενικά	
Αγγειοανοσοβλαστικό T-λέμφωμα (AIL-TCL)	9
Περιφερικό T-λέμφωμα μη ειδικού τύπου (PTCL-NOS)	17
Αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα (ALCL nodal)	5
3. Εξωλεμφαδενικά	
Σπογγοειδής μυκητίαση (MF)	3
Πρωτοπαθές δερματικό αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα (ALCL cutaneous)	3
Μη αναπλαστικό πρωτοπαθές δερματικό T- λέμφωμα (TCL)	7
T-λέμφωμα σχετιζόμενο με εντεροπάθεια (ETCL)	1
Ηπατοσπληνικό T- γδ λέμφωμα (HPS γδ TCL)	1
Άλλα εξωλεμφαδενικά T-λεμφώματα (TCL)*	6
4. Σύνολο	57

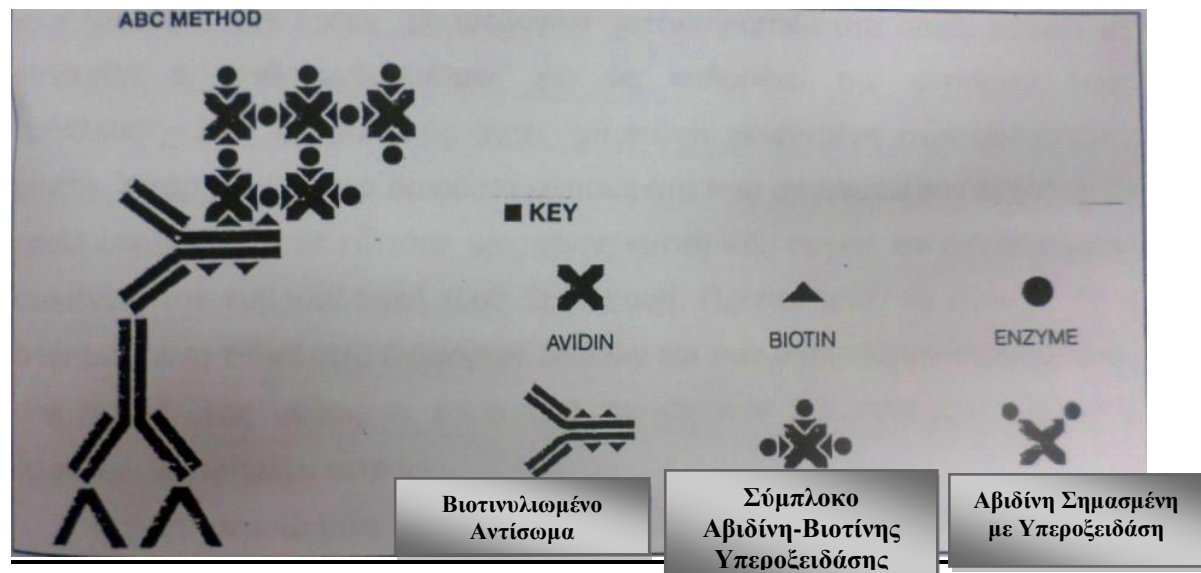
(*) 3 περιπτώσεις σε μυϊκό ιστό, 3 περιπτώσεις σε λιπώδη ιστό, 1 περίπτωση σε αμυγδαλή.

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και 5 περιπτώσεις αντιδραστικών λεμφαδένων οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες. Τα ιστολογικά δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε

φορμόλη. Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και η in-situ ανίχνευση της απόπτωσης με τη μέθοδο TUNEL πραγματοποιήθηκαν σε ιστολογικές τομές παραφίνης πάχους 4 μm .

2. Μέθοδοι

2.1 Ανοσοϊστοχημική χρώση αβιδίνης-βιοτίνης (ABIDIN-BIOTIN COMPLEX)



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση ανοσοϊστοχημικής χρώσης μέσω σχηματισμού συμπλόκου αβιδίνης-βιοτίνης.

Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό διαλυτού συμπλόκου μεταξύ του πρωταρχικού αντισώματος που αναγνωρίζει ένα κυτταρικό αντιγόνο και ενός συζευκτικού μορίου φορέα σημασμένου με το ένζυμο υπεροξειδάση. Ο σχηματισμός του συμπλόκου για την χρώση επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση ενός δεύτερου βιοτινυλιωμένου αντισώματος που αναγνωρίζει το αρχικό αντίσωμα και σε αυτό συνδέεται το ένζυμο που απαιτείται για τη χρώση μέσω δεσμού αβιδίνης-βιοτίνης (39). Με την προσθήκη της χρωμογόνου ουσίας 3,3-διαμινοβενζιδινο-τετραϋδροχλωρικό και H_2O_2 επιτυγχάνεται χρωστική αντίδραση ορατή στο μικροσκόπιο (Εικόνα 3). Αναλυτικότερα, οι ιστολογικές τομές παραφίνης τοποθετούνται ολονύκτια σε κλίβανο στους 67°C , στη συνέχεια αποπαραφινώνονται σε ξυλόλη και ενυδατώνονται σε αιθανόλες. Προκειμένου να αποκατασταθεί η αντιγονικότητα του ιστού τα δείγματα τοποθετούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος [(2,1%w/v)-κιτρικού νατρίου(0,1M)] και υφίστανται θερμική επεξεργασία σε φούρνο μικροκυμάτων (2x 15 λεπτά, 700Watt).

Η ενδογενής υπεροξειδάση απενεργοποιείται με επώαση των τομών σε διάλυμα 1% H₂O₂ σε μεθυλική αλκοόλη (30' θερμοκρασία δωματίου). Ακολουθεί επώαση με φυσιολογικό ορό (normal swine ή normal rabbit) (DAKO SA Lostrup Denmark, 1:50, 10').

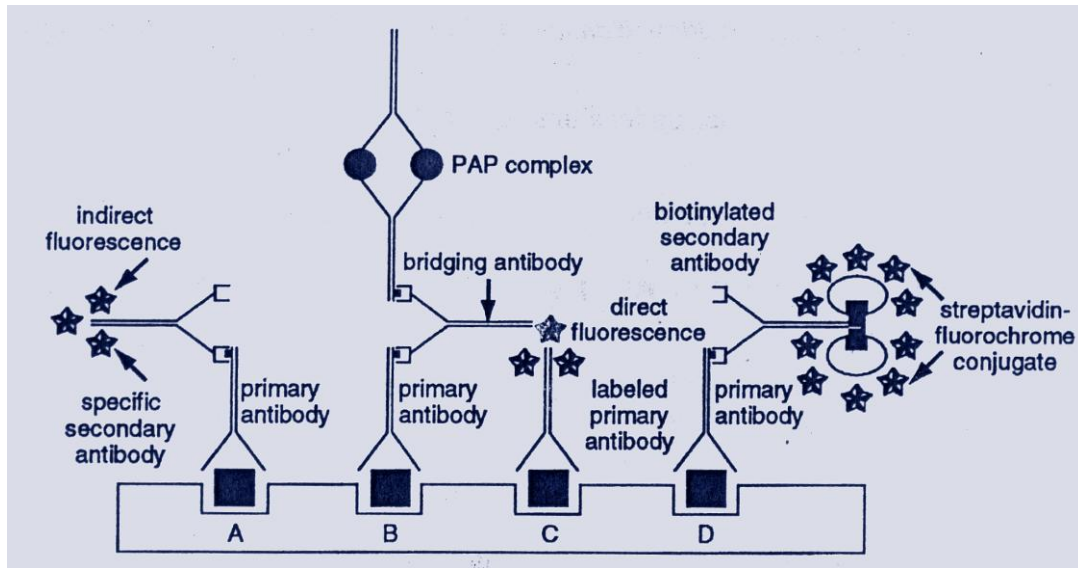
Προστίθεται ο πρωταρχικός αντιορός (αντίσωμα) σε προκαθορισμένη αραιώση και οι τομές επωάζονται (1h, θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια στους 4⁰C). Στη συνέχεια, προστίθεται το αντίσωμα [rabbit anti-mouse biotinylated (1:500, 30', DAKO) ή swine anti-rabbit biotinylated (1:500, 30', DAKO)]. Προστίθεται το διάλυμα ABC complex (πακέτο υλικών DAKO και οι τομές επωάζονται για 1 ώρα. Η χρωστική αντίδραση λαμβάνεται μετά από προσθήκη του χρωμογόνου 3,3-διαμινοβενζιδινο-τετραϋδροχλωρικό 0,1%w/v (S 3000, DAKO). Μεταξύ των σταδίων της χρώσης οι τομές εκπλένονται με TBS (2x5'). Ακολουθεί χρώση με διάλυμα αιματοξυλίνης 10% σε απεσταγμένο νερό (dH₂O), αφυδάτωση και κάλυψη των ιστολογικών τομών.

Η ανωτέρω μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών Rb (Rb1:Dako SA, 1:20) και Ki67 (18-20) (MIB-1:Immunotech Marseille France, 1:20).

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα TBS (TRIS-buffered saline, DAKO code no: s 3001):
TRIS- HCl 50 mM
NaCl 150 mM pH=7.6.
- Bovine Serum Albumin (Sigma):
1gr BSA σε 100ml TBS (1% w/v)
Το διάλυμα χρησιμοποιείται για αραιώσεις των αντισωμάτων
- Διάλυμα κιτρικού οξέος-κιτρικού νατρίου:
[9 ml (2.1%w/v) κιτρικό οξύ, 41ml κιτρικό νάτριο (0.1M)], αραιώση σε απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 500ml
- Διάλυμα ABC complex (πακέτο υλικών DAKO)
Αναμιγνύονται 5 μl A+5 μl B+1000 μl 1% BSA σε TBS. Προετοιμάζεται 1 ώρα πριν τη χρήση του και διατηρείται στους 4⁰ C.
- Διάλυμα DAB (DAKO S3000) (3,3-diaminobenzidine:C₁₂H₁₄N₄HCL)
Παρασκευάζεται με διάλυση μιας ταμπλέτας σε 10 ml TBS 0,1%w/v. Για τη χρώση χρησιμοποιούνται 2 ml από το διάλυμα και 15 μl 3% H₂O₂.

2.2 Ανοσοϊστοχημική χρώση μέθοδος στρεπταβιδίνης βιοτίνης (biotin-streptavidin) (kit: DAKO kat k 0690)



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση ανοσοϊστοχημικής χρώσης μέσω συζεύξης στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (D). Οι περιπτώσεις A, B, C που περιλαμβάνονται στο σχήμα αποδίδουν σχηματικά τις εναλλακτικές τεχνικές χρώσεων. Οι περιπτώσεις A, C περιγράφουν τεχνικές του άμεσου και έμμεσου ανοσοφθορισμού, αντίστοιχα και η περίπτωση B ανοσοενζυμική τεχνική (μέσω συμπλόκου υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης) (Current Protocols In Molecular Biology , Volume 2, Chapter 14, copyright 1996)

Η μέθοδος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (biotin-streptavidin) είναι εναλλακτική της τεχνικής που περιγράφηκε ανωτέρω (2.1). Το ένζυμο που απαιτείται για τη χρώση υπεροξειδάση είναι 'ιχνηθετημένο' με στρεπταβιδίνη. Για την επίτευξη της χρώσης απαιτείται σχηματισμός ενός συμπλόκου μεταξύ του πρωταρχικού αντισώματος που αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, του βιοτινυλιωμένου αντισώματος που συνδέεται με αυτό και του 'ιχνηθετημένου' με στρεπταβιδίνη ενζύμου υπεροξειδάση (Εικόνα 1). Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών p53 (DO-7, DAKO SA, 1:50), mdm2(21) (IF-2, Calbiochem NY, 1:50), κυκλίνης A (6E6, Novocastra, 1:10), κυκλίνης B1 (7A9, Novocastra, 1:10), κυκλίνης D1 (DCS-6, Novocastra, 1:20), p21/Waf-1 (EA-10, Calbiochem NY, 1:50) και p16 (F-12, Santa Cruz, 1:100) (41,42).

Η έκφραση της πρωτεΐνης p16 μελετήθηκε μόνο σε 39 περιπτώσεις T-λεμφωμάτων, διότι δεν υπήρχαν διαθέσιμες ιστολογικές τομές για τις υπόλοιπες περιπτώσεις. Θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις και αποτελούνταν από περιπτώσεις αντιδραστικών λεμφαδένων και Hodgkin λεμφωμάτων, όπου ήταν

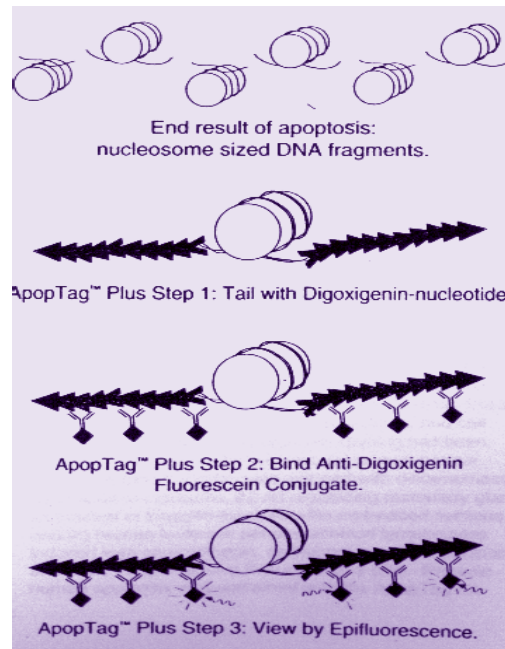
γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι εκφράζονται οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν (40). Για την αξιολόγηση της έκφρασης των πρωτεϊνών p53, mdm2, p21 και κυκλίνης D1 πραγματοποιήθηκε ημιποσοτική ανάλυση, χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό μεγάλης μεγέθυνσης (x400) και εκτιμώντας τουλάχιστον 5 οπτικά πεδία, με παρουσία αρκετών ανοσοθετικών κυττάρων. Η έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2, p21 και κυκλίνης D1 θεωρήθηκε ως “υψηλή έκφραση” ή “υπερέκφραση”, όταν ποσοστό μεγαλύτερο του 10% των νεοπλασματικών κυττάρων εμφάνιζαν ανοσοιστοχημική θετικότητα. Το όριο (cut-off) αυτό χρησιμοποιήθηκε διότι στους αντιδραστικούς λεμφαδένες (μάρτυρες) οι πρωτεΐνες αυτές ή δεν εκφράζονταν ή το επίπεδο έκφρασης ήταν μικρότερο του 10%. Συνεπώς, σε κάθε περίπτωση αξιολογήθηκε το εκατοστιαίο ποσοστό των θετικών κυττάρων και με βάση αυτό το ποσοστό οι περιπτώσεις διαχωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες έκφρασης: <10%, 10-25%, 25-50% και >50%.

Για την αξιολόγηση της έκφρασης των πρωτεϊνών Ki67, p16, pRb, κυκλίνης A και κυκλίνης B1 χρησιμοποιήθηκε ένα συνεχές σύστημα ανάλυσης, εφόσον έκφραση αυτών των πρωτεϊνών παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις των αντιδραστικών λεμφαδένων (μάρτυρες). Οι περιπτώσεις διαχωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες έκφρασης: <10%, 10-25%, 25-50%, >50%. Απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών pRb και p16 θεωρήθηκε όταν δεν παρατηρήθηκε ανοσοχρώση σε όλη την έκταση (διάχυτη απώλεια) ή περιοχικά (εστιακή απώλεια) του δείγματος. Η έκφραση των πρωτεϊνών pRb και p16 στα στρωματικά και ενδοθηλιακά κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως θετικός εσωτερικός μάρτυρας (30).

3. *In situ* ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων με τη μέθοδο TUNEL (terminal deoxyribo-nucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling)

Η ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων με τη μέθοδο TUNEL βασίζεται σε ένα από τα κύρια βιοχημικά χαρακτηριστικά του φαινομένου της απόπτωσης, την κατάτμηση του χρωμοσωμικού DNA σε νουκλεοσωμικά τμήματα μεγέθους πολλαπλάσιου του 180bp. Τα 3'-OH άκρα των DNA τμημάτων είναι ο στόχος της διαδικασίας της χρώσης. Συγκεκριμένα, για την επίτευξη της χρώσης χρησιμοποιείται το ένζυμο TdT (terminal deoxynucleotide transferase) που καταλύει την αντίδραση επιμήκυνσης ενός τμήματος DNA (μονόκλωνου-δίκλωνου) στο 3'-OH άκρο του. Το ένζυμο πραγματοποιεί την αντίδραση χωρίς την ύπαρξη αλυσίδας-εκμαγείο. Τα νουκλεοτίδια που ενσωματώνονται με αυτή τη διαδικασία σχηματίζουν ένα ετεροπολυμερές που αποτελείται από νουκλεοτίδια dATP και διγοξυγενίνη-11-dUTP

σε αναλογία τέτοια που να αναγνωρίζεται από ένα αντι-διγοξυγενίνη αντίσωμα. Το αντίσωμα φέρει το ένζυμο υπεροξειδάση το οποίο καταλύει την αντίδραση ανάδειξης χρώματος παρουσία της χρωμογόνου ουσίας 3,3-diaminobenzidine (Εικόνα 4) (43).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση μηχανισμού ανίχνευσης αποπτωτικών κυττάρων μέσω άμεσου φθορισμού των σημασμένων με διγοξυγενίνη τμημάτων γενομικού DNA (Oncor ApoTag Plus kit)

Για την *in situ* ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών Apotage, Oncor, Gaithersburg, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά, η πειραματική πορεία περιλαμβάνει αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των ιστολογικών τομών. Ακολουθεί πέψη με διάλυμα πρωτεϊνάσης K (20μg/ml, 25', 20°C). Η εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης πραγματοποιείται με κατεργασία των τομών με 1% H₂O₂ σε μεθυλική αλκοόλη (5', θερμοκρασία δωματίου). Ακολουθεί προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (75μl) και κάλυψη των τομών με ειδική καλυπτρίδα (15', θερμοκρασία δωματίου). Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα του ενζύμου TdT (54μl) και οι τομές επωάζονται (37 C⁰, 1h). Ακολουθεί έκπλυση με προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα (stop washing buffer, 10', θερμοκρασία δωματίου) και επώαση με αντίσωμα έναντι της διγοξυγενίνης σημασμένο με υπεροξειδάση (anti-digoxigenin peroxidase, 55μl, 30', θερμοκρασία δωματίου). Μεταξύ των σταδίων που έχουν περιγραφεί πραγματοποιείται έκπλυση των τομών με PBS. Η διαδικασία της χρώσης ολοκληρώνεται με προσθήκη του διαλύματος της χρωμογόνου ουσίας DAB (3,3-diaminobenzidine), διαλύματος αιματοξυλίνης (10% σε H₂O) και επικάλυψη των τομών.

Απαιτούμενα διαλύματα

- Αιθανόλη 70%
- Διάλυμα PBS(LIPSHAN IMMUNON)
Πυκνό διάλυμα PBS αραιώνεται σε 970ml απεσταγμένο H₂O.
- Διάλυμα Πρωτεΐνης Κ (20μgr/ ml)
Αραιώνονται 40μl (20μgr/ ml) σε 49,96 ml PBS
- Διάλυμα 3% H₂O₂
Παρασκευάζεται με προσθήκη 5 ml διαλύματος 30% H₂O₂ σε 45 ml PBS.
- Διάλυμα TdT
Παρασκευάζεται με ανάμιξη διαλύματος TdT με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης σε αναλογία 1:2.
- Διάλυμα STOP WASHING BUFFER
1ml διάλυμα και 34 ml απεσταγμένο H₂O.
- ΔΙΑΛΥΜΑ DAB 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAKO)
Προετοιμάζεται διάλυμα DAB 0.1%w/v (DAKO S3000) σε PBS και ακολουθεί αραιώση του διαλύματος με PBS σε αναλογία 1:8.

Χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες αντιδραστικοί λεμφαδένες και ως αρνητικοί μάρτυρες τομές στις οποίες παραλήφθηκε το ένζυμο. Αποπτωτικά θεωρήθηκαν τα TUNEL θετικά κύτταρα, αλλά και κύτταρα με μορφολογικούς χαρακτήρες απόπτωσης τα οποία ήταν TUNEL αρνητικά. Ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο με ανικειμενικό φακό x400. Μετρήθηκαν τα αποπτωτικά κύτταρα σε 10 τυχαίως επιλεγμένα οπτικά πεδία (περίπου 2000-5000 κύτταρα). Ο αποπτωτικός δείκτης καθορίστηκε από τον αριθμό των TUNEL θετικών κυττάρων σε σύνολο 100 ακέραιων κυττάρων.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας το chi-square test με διόρθωση Yate. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το test Fisher όταν οι περιπτώσεις ήταν λιγότερες από 5. Οι συντελεστές συσχέτισης Pearson και Spearman χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συσχέτισης μεταξύ δυο μεταβλητών παραγόντων. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά μόνο όταν $p < 0,05$.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

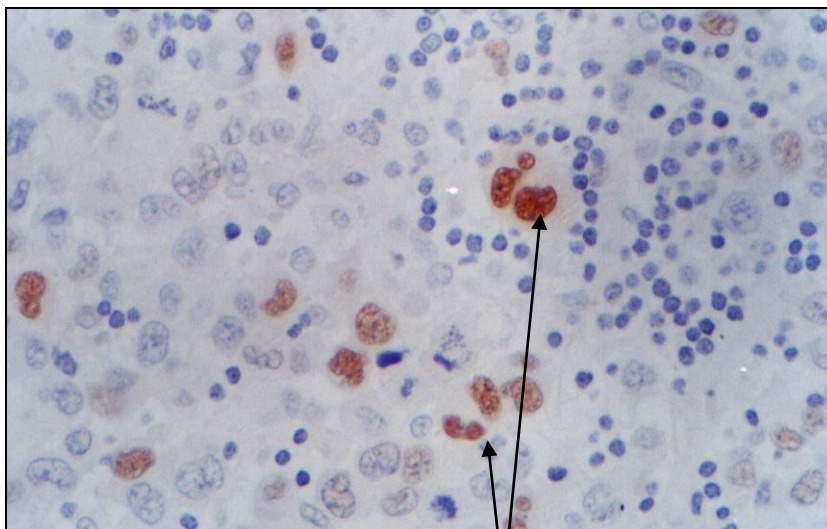
1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21 στα T-λεμφώματα

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21 παρουσιάζονται στους Πίνακες 2 και 3.

Ιστολογικός τύπος	P53	MDM2	P21
Πρόδρομων-άωρων κυττάρων			
T-LBL	0/5	0/5	0/5
Λεμφαδενικά			
AIL-TCL	0/9	0/9	0/9
PTCL-NOS	3/17	0/17	2/17
ALCL-nodal	5/5	2/5	5/5
Εξωλεμφαδενικά			
MF	0/3	0/3	0/3
ALCL-cutaneous	2/3	0/3	2/3
Cutaneous Non-ALCL	2/7	0/7	1/7
ETCL	0/1	0/1	0/1
HPS γδ TCL	0/1	0/1	0/1
Υπόλοιπα εξωλεμφαδενικά	0/6	0/6	0/6
Σύνολο	12/57	2/57	10/57

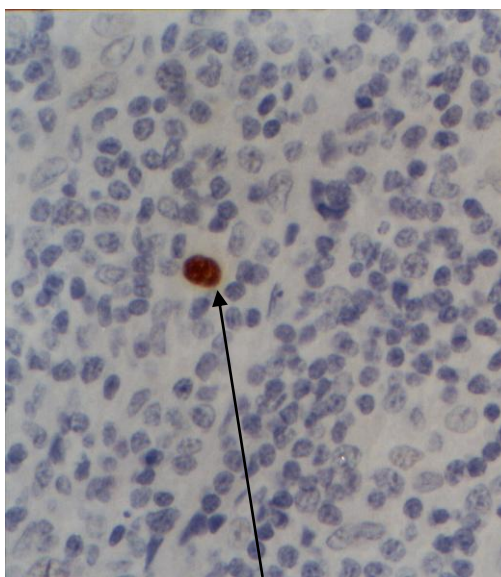
Πίνακας 2: Αποτελέσματα αξιολόγησης της έκφρασης των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21 στις περιπτώσεις των T-λεμφωμάτων που μελετήθηκαν. Υψηλή έκφραση ή υπερέκφραση των πρωτεϊνών θεωρήθηκε η παρουσία ανοσοϊστοχημικής θετικότητας σε ποσοστό >10% των νεοπλασματικών κυττάρων

Διαπιστώθηκαν υψηλά επίπεδα ταυτόχρονης έκφρασης των πρωτεϊνών p53 και p21 στις περιπτώσεις του λεμφαδενικού και δερματικού ALCL ενώ ή δεν εκφράζονταν ή εκφράζονταν σε χαμηλά επίπεδα στους υπόλοιπους ιστολογικούς τύπους των T-λεμφωμάτων (Πίνακας 2, Εικόνα 5). Υπερέκφραση της πρωτεΐνης mdm2 ανιχνεύθηκε μόνο στις 2/57 περιπτώσεις, οι οποίες ανήκαν στον ιστολογικό τύπο ALCL.



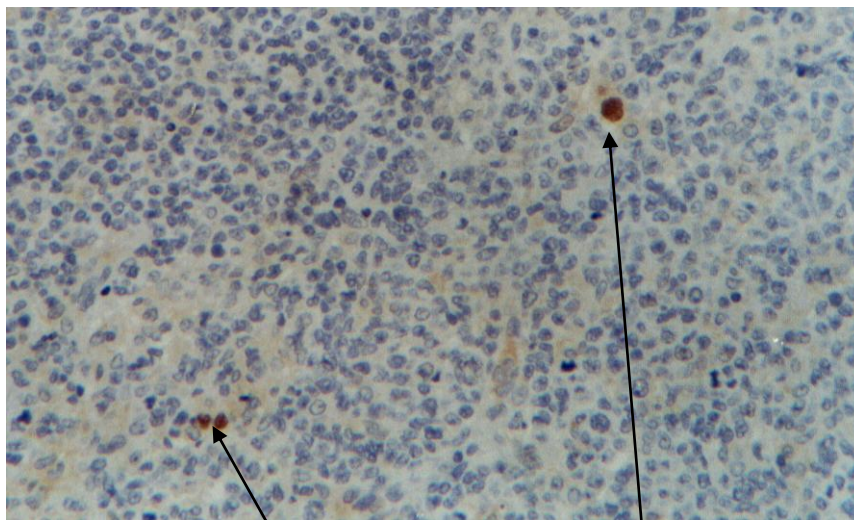
Εικόνα 5: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53 σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη, σε περίπτωση λεμφαδενικού ALCL T-λεμφώματος. Η έκφραση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται θετική

Αναλυτικότερα στα λεμφαδενικά και στα δερματικά T-λεμφώματα παρατηρήθηκε ταυτόχρονη υπερέκφραση των πρωτεϊνών p53 και p21 στις 7/8 περιπτώσεις. Σε 2 από αυτές τις 7 περιπτώσεις, διαπιστώθηκε ότι είχαμε p53+/p21+/ mdm2+ (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης mdm2 σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε περίπτωση λεμφαδενικού AIL-TCL T-λεμφώματος. Η έκφραση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται αρνητική.

Στα λεμφαδενικά περιφερικά T-λεμφώματα μη ειδικού τύπου, υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 ανιχνεύθηκε σε 3/17 περιπτώσεις. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p21 ανιχνεύθηκε σε 2/17, στις οποίες επιπλέον παρατηρήθηκε έκφραση



Εικόνα 7: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p21 σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε περίπτωση εξωλεμφαδενικού Τ-λεμφώματος.
Η έκφραση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται ως μη ειδική.

πρωτεΐνης p53. Στα δερματικά μη αναπλαστικά Τ-λεμφώματα διαπιστώθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 σε 2/7 περιπτώσεις και σε μια από αυτές παρατηρήθηκε και υπερέκφραση της πρωτεΐνης p21. Υπερέκφραση των πρωτεϊνών p53 και p21 δεν παρατηρήθηκε στις υπόλοιπες περιπτώσεις Τ-λεμφωμάτων που μελετήθηκαν (Εικόνα 7).

2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών Ki67,κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, p16 και pRb στα Τ-λεμφώματα

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών Ki67,κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, p16 και pRb παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών p53, mdm2, p21, p16, Rb, Ki67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D, στις περιπτώσεις Τ-λεμφωμάτων που μελετήθηκαν

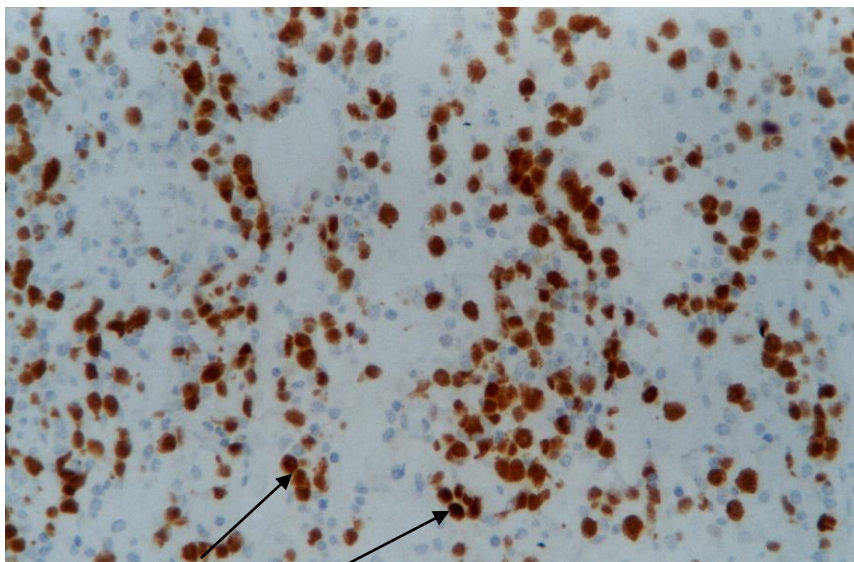
	<10%	10-25%	25-50%	>50%
p53	8*	9	3	-
p21	11*	10	-	-
mdm2	7*	2	-	-
Rb	1	32	21	-
p16**	-	19	17	3
Cyclin D1	2*	-	-	-
Cyclin A	15	31	11	-
Cyclin B1	27	14	6	-
Ki67	17	29	9	2

Σημείωση:

(*) οι περιπτώσεις αυτές θεωρείται ότι δεν υπερεκφράζουν την αντίστοιχη πρωτεΐνη.

(**) Η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης μελετήθηκε σε 39 περιπτώσεις. Σε δυο περιπτώσεις με επίπεδο έκφρασης 10-25% παρατηρήθηκε εστιακή απώλεια της έκφρασης.

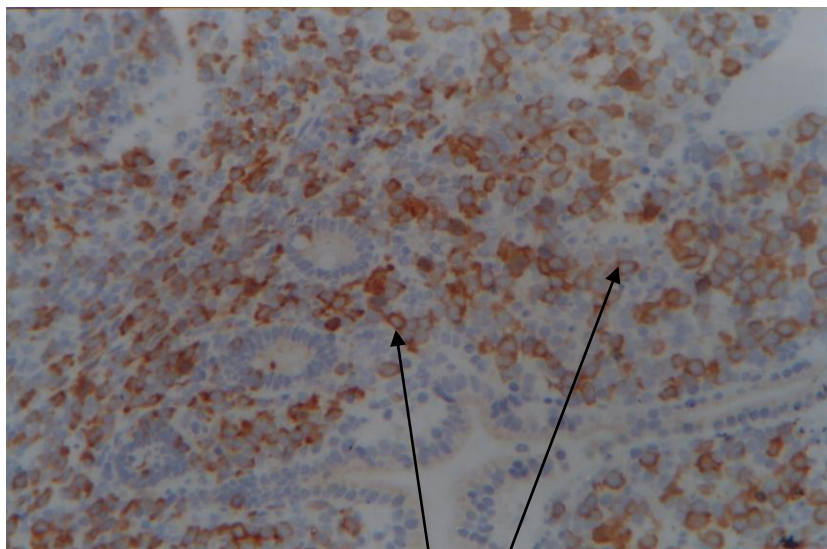
Έκφραση των πρωτεϊνών κυκλίνη A (Εικόνα 8), κυκλίνη B1(Εικόνες 9,10) και της πρωτεΐνης.Κi67 (Εικόνα 11) παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις (Πίνακας 3).



Εικόνα 8: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνη A σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε περίπτωση ETCL T-λεμφώματος. Η έκφραση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται θετική.

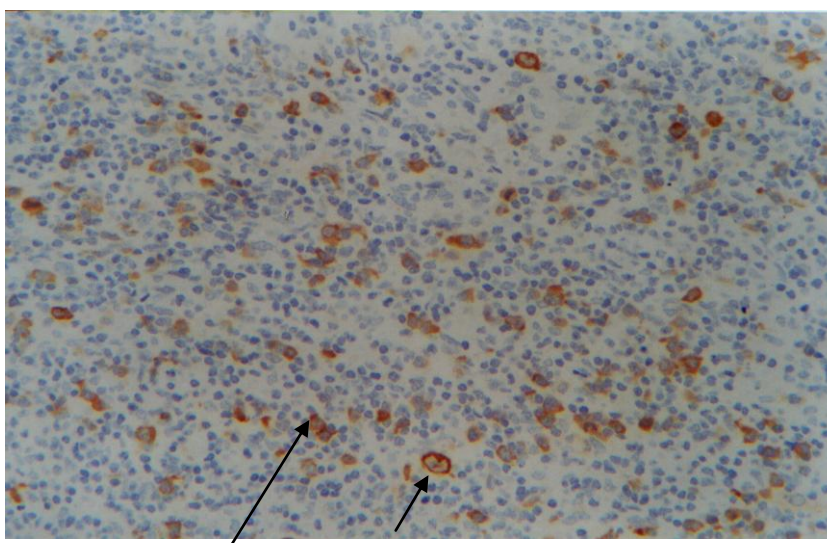
Ειδικότερα, οι περιπτώσεις των T- λεμφωμάτων που μελετήθηκαν διακρίθηκαν ανάλογα με τον δείκτη πολλαπλασιασμού σε:

- Περιπτώσεις με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (>25% θετικά κύτταρα): ALCL, T-LBL
- Περιπτώσεις με χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (<5% θετικά κύτταρα): MF, γδ hepatosplenic TCL
- Περιπτώσεις με ενδιάμεσο δείκτη πολλαπλασιασμού (5-25% θετικά κύτταρα): υπόλοιπες περιπτώσεις των T- λεμφωμάτων.



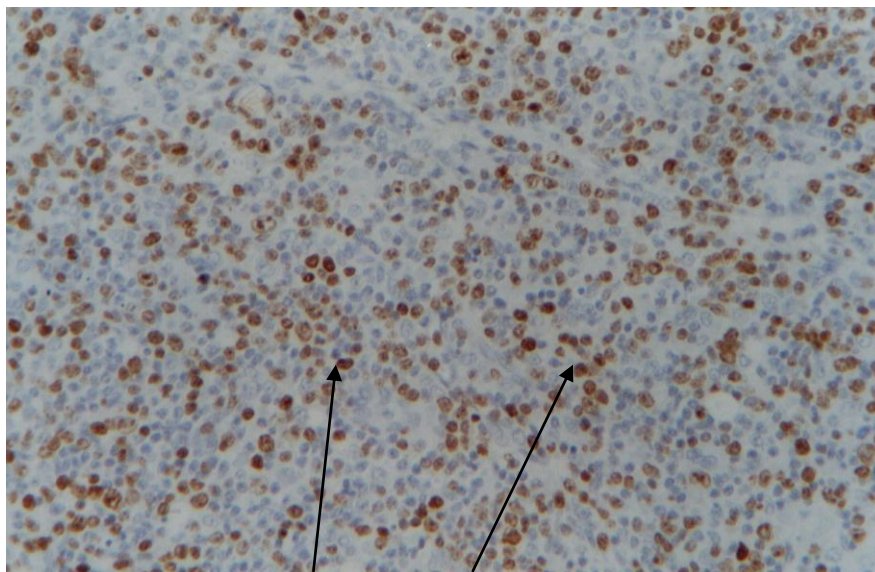
Εικόνα 9: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνη B1 σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε T-λέμφωμα σχετιζόμενο με εντεροπάθεια. Η έκφραση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται θετική

Η έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 κυμάνθηκε από (2-51%). Υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στο ALCL και χαμηλότερη (1,9%) στις περιπτώσεις MF.



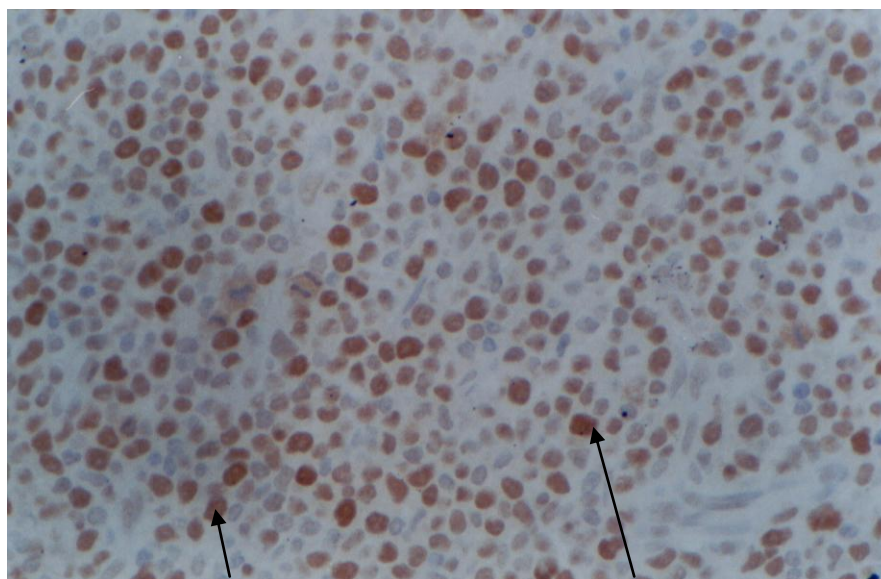
Εικόνα 10: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνη B1 σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε περίπτωση T-λεμφώματος. Η έκφραση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται ως μη ειδική.

Η έκφραση των πρωτεϊνών κυκλίνη A και κυκλίνη B1 αυξανόταν αναλογικά με την έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 και τα ποσοστά της κυμάνθηκαν μεταξύ 2-36% και 1-31%. Αντίστοιχα στις περιπτώσεις MF παρατηρήθηκαν τα χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης 1,4% και 1,1%



Εικόνα 11: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε περίπτωση PTCL- λεμφώματος. Η έκφραση της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται θετική.

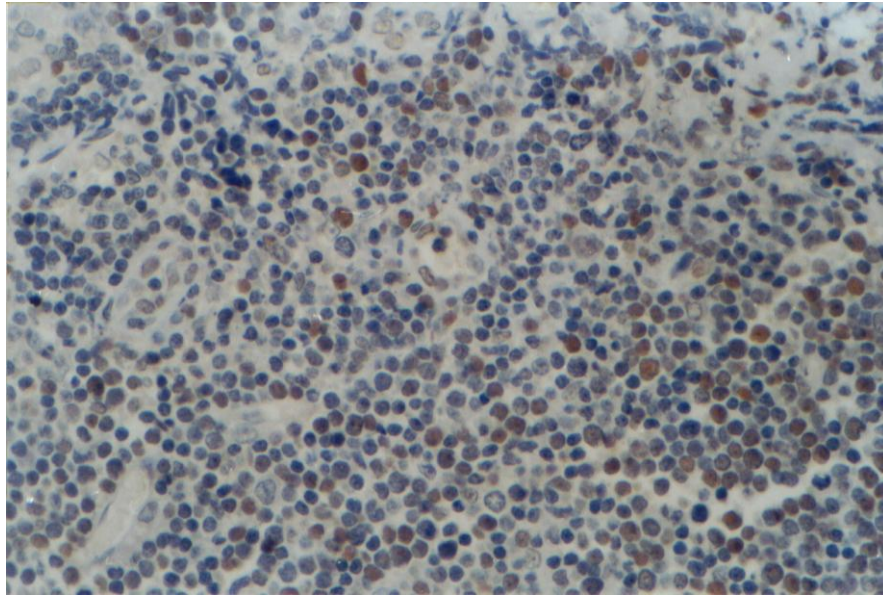
Έκφραση της pRb ανιχνεύτηκε σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις και μόνο σε μια περίπτωση MF ήταν αρνητική. Η έκφραση της pRb αυξάνονταν αναλογικά με αυτή των πρωτεϊνών Ki67, κυκλίνη A και κυκλίνη B1. Υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στο ALCL (μέση τιμή: 47,4%).



Εικόνα 12: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε περίπτωση PTCL- λεμφώματος Η έκφραση της πρωτεΐνης είναι διάχυτη (μη ειδική)

Απώλεια της έκφρασης της pRb παρατηρήθηκε στο λεμφαδενικό PTCL-NOS λέμφωμα [ενδιάμεσος δείκτης πολλαπλασιασμού (5-25%)], ενώ στο AIL λέμφωμα παρατηρήθηκε έκφραση της pRb κυρίως στα μεγάλα κύτταρα.

Στην περίπτωση της MF και του γδ ηπατοσπληνικού TCL, το 10% των νεοπλασματικών κυττάρων εμφάνιζαν έκφραση της pRb, όμως στις περιπτώσεις αυτές δεν θεωρήθηκε ότι υπήρχε απώλεια της έκφρασης διότι ο δείκτης πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων ήταν χαμηλός (<5%). Υπερέκφραση της κυκλίνης D1 δεν παρατηρήθηκε σε καμία από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν.

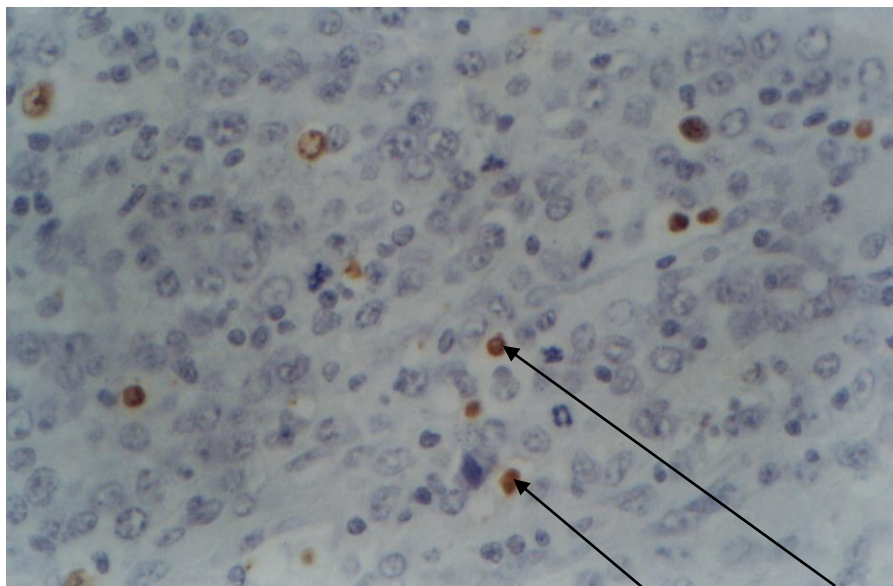


Εικόνα 13: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p16 (Υλικά-Μέθοδοι) σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε περίπτωση T- λεμφώματος Η έκφραση της πρωτεΐνης είναι σε φυσιολογικά επίπεδα.

Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p16 παρατηρήθηκε σε μια περίπτωση PTCL-NOS λεμφώματος. Στην περίπτωση αυτή, η απώλεια αφορούσε τα μεγάλα μεγέθους κύτταρα. Αυτά παρουσίασαν αυξημένο δείκτη πολλαπλασιασμού. Εστιακή απώλεια της έκφρασης παρατηρήθηκε σε δυο περιπτώσεις, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις η έκφραση της πρωτεΐνης θεωρήθηκε φυσιολογική. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της p16 ανιχνεύθηκαν στο ALCL (μέση τιμή: 49,2%).

3. Αποπτωτικός δείκτης (A.I.)

Με τη μέθοδο TUNEL μελετήθηκαν συνολικά 39 περιπτώσεις T-λεμφωμάτων και τα αποτελέσματα ήταν αξιολογήσιμα στις 35 από αυτές. Ειδικότερα, υψηλές τιμές A.I. παρατηρήθηκαν σε 4 περιπτώσεις λεμφαδενικών και 2 περιπτώσεις δερματικών ALCL λεμφωμάτων. Η τιμή του A.I. στις περιπτώσεις αυτές κυμάνθηκε από 1,1 έως 2,3. Σε 3 περιπτώσεις λεμφαδενικών PTCL-NOS και σε 1 περίπτωση δερματικού μη αναπλαστικού λεμφώματος ο AI ήταν >1, ενώ στις υπόλοιπες 26 περιπτώσεις T-λεμφωμάτων αυτός κυμάνθηκε από 0.1 έως 0.9.



Εικόνα 14: Ανοσοιστοχημική χρώση ανίχνευσης της απόπτωσης με τη μέθοδο TUNNEL (Υλικά-Μέθοδοι) σε τομή παραφίνης πάχους 4μ μετά από σταθεροποίηση του ιστού σε φορμόλη σε T- λέμφωμα.

3. Συσχέτιση μεταξύ αποπτωτικού δείκτη και δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Πίνακας 4: Αποτελέσματα εκτίμησης αποπτωτικού δείκτη και δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κάθε ιστολογικό τύπο των T-λεμφωμάτων που μελετήθηκαν.

	Αριθμός περιπτώσεων	A.I διακύμανση.	P.I (Ki67) διακύμανση.
Λεμφαδενικά			
AIL-TCL	9	0,1-0,9	7,6-12,3
PTCL-UC	16	0,4-1,7	11,3-39,5
ALCL	4	1,1-2,3	25,2-51
Εξωλεμφαδενικά			
ALCL cutaneous	2	1,2-1,3	25,7-45,6
Non- ALCL cutaneous pleomorphic	4	0,5-1,4	19,1-35,8
ETCL	1	0,4	24,4
Υπόλοιπα εξωλεμφαδενικά	3	0,6-0,9	16,8-39,7
Σύνολο	39	35	39

Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ A.I. και του δείκτη P.I. (Pearson συντελεστής $r=0,739$, Spearman συντελεστής $r=0,655$ και $p<0,001$) και στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ υψηλού A.I. ($A.I.>1$) και υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p53 ($p<0,01$).

5. Συσχέτιση του ανώμαλου (abnormal) p53 και pRb φαινότυπου με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Παρατηρήθηκαν οι ακόλουθοι ανώμαλοι φαινότυποι:

- α. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 σε 12 περιπτώσεις.
- β. Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης pRb σε 1 περίπτωση.
- γ. Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 σε 2 περιπτώσεις.

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις με ανώμαλο φαινότυπο παρατηρήθηκε μέτριος ή υψηλός δείκτης πολλαπλασιασμού. Οι μέσες τιμές των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Ki67, κυκλίνης A, κυκλίνης B1 στις 12 p53 θετικές περιπτώσεις ήταν υψηλότερες σε σχέση με τις 45 p53-αρνητικές περιπτώσεις. Η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 (>25%) παρουσίαζε στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση με την υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 ($p<0,001$) και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης pRb (>25%), ($p<0,001$).

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στα λεμφαδενικά και εξωλεμφαδενικά ALCL και χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα PTCL-NOS και στα μη αναπλαστικά λεμφώματα του δέρματος. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 δεν παρατηρήθηκε στους υπόλοιπους ιστολογικούς τύπους που μελετήθηκαν (T-LBL, AIL, MF, ETCL, άλλα περιφερικά T-λεμφώματα). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας (10,15,21,22), από την οποία προκύπτει ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 δε σχετίζεται συνήθως με μεταλλάξεις του γονιδίου στα T-λεμφώματα, αλλά με έκφραση του άγριου τύπου (wild type) της πρωτεΐνης p53 (22-25). Για να διερευνηθεί η άποψη αυτή μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης p21, η οποία είναι γνωστό ότι επάγεται από την άγριου τύπου πρωτεΐνη p53 (13,14), αναστέλλοντας την εξέλιξη του κύκλου κατά την μετάβαση από τη φάση G1 στην S (5). Παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης p21 σε όλες τις περιπτώσεις των ALCL. Η παρατήρηση αυτή στηρίζει την άποψη ότι η έκφραση της πρωτεΐνης p53 που ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά στα T-λεμφώματα οφείλεται στην άγριου τύπου πρωτεΐνη p53, η οποία είναι δυνατό να αυξήσει την έκφραση της πρωτεΐνης p21 (5). Η σταθεροποίηση της άγριου τύπου πρωτεΐνης p53 είναι δυνατό να οφείλεται: α) σε εξασθένηση της mdm2-εξαρτώμενης αποικοδόμησης της p53 και β) σε αναστολή της mdm2-εξαρτώμενης αρνητικής ρύθμισης της trans-ενεργοποίησης της p53 (24). Η εξασθένηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ mdm2 και p53 είναι δυνατό να συμβεί με δυο

μηχανισμούς: α) με ομοιοπολικής φύσης τροποποίηση των πρωτεϊνών (φωσφορυλίωση) και β) με επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης p19^{ARF}, που αποτελεί προϊόν του εναλλακτικού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου p16 (7). Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη p19^{ARF} συμπλέκεται με την mdm2 και αναστέλει την δράση της. Στα ALCL λεμφώματα παρατηρήθηκε υπερέκφραση των πρωτεϊνών p53 και p21 και υψηλός δείκτης πολλαπλασιασμού (υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών Ki67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1). Η επαγόμενη από την αγρίου τύπου p53 δράση της p21, θα έπρεπε να αναστείλει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όμως διαπιστώνεται ότι στα περιστατικά αυτά η δράση της p21 είναι εξασθενημένη και φαίνεται να αγνοείται. Η αδυναμία της πρωτεΐνης p21 να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι δυνατόν να οφείλεται είτε σε δομικές διαταραχές του γονιδίου, που όμως είναι εξαιρετικά σπάνιες στα κακοήθη νεοπλάσματα και δεν έχουν αναφερθεί σε T-λεμφώματα, είτε στην χαμηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση της πρωτεΐνης (5,16). Μελέτες in-vitro έχουν έδειξαν ότι όταν είναι χαμηλή η συγκέντρωση της πρωτεΐνης p21 επιτυγχάνεται ο σχηματισμός του συμπλόκου κυκλίνη D1/ Cdk4 με ενεργότητα κινάσης, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται πλήρης αναστολή σχηματισμού ενεργού συμπλόκου (44,45).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν δυο περιπτώσεις ALCL στις οποίες παρατηρήθηκε υπερέκφραση των πρωτεϊνών p53, p21 καθώς και της πρωτεΐνης mdm2. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (46,47), φαίνεται ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης mdm2 δεν αναστέλλει την εξαρτώμενη από το p53 trans-ενεργοποίηση. Ωστόσο στα συγκεκριμένα περιστατικά τα αυξημένα επίπεδα της έκφρασης της πρωτεΐνης mdm2 ίσως είναι επαρκή για την λειτουργική απενεργοποίηση της pRb, παρά το γεγονός ότι ανοσοιστοχημικά ανιχνεύθηκαν φυσιολογικά επίπεδα της pRb, αφού η mdm2 μπορεί να αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με την pRb. Η συγκεκριμένη διαπίστωση σε αυτά τα 2 περιστατικά ίσως είναι μια επιπλέον ένδειξη ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (48).

Στα ALCL δεν διαπιστώθηκε μόνο υψηλός δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και υψηλός δείκτης απόπτωσης. Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση των 35 περιπτώσεων των T-λεμφωμάτων έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ απόπτωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το εύρημα αυτό στηρίζει την κατά γενική ομολογία θεωρία ότι η απόπτωση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι αδιαχώριστα φαινόμενα στη νεοπλασματική ανάπτυξη (49,50). Συνεπώς είναι πιθανό στα ALCL η θεωρούμενη αδυναμία της υπερεκφραζόμενης αγρίου τύπου p53 να διακόψει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου είναι δυνατό να οδηγεί εναλλακτικά στην επαγωγή της

απόπτωσης (5). Αυτό επιτυγχάνεται τουλάχιστον εν μέρει από την p53, που επάγει την δράση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και μειώνει της δράσης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2. Η άποψη αυτή στηρίζεται από τα ευρήματα των Schlaije et al (1996) (51) σε ALCL. Είναι δυνατό η αναλογία των επιπέδων έκφρασης των p53/ p21 να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόφαση του κυττάρου για διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου και για απόπτωση, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι η απόπτωση υπερτερεί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και είναι ανεξάρτητη των επιπέδων της πρωτεΐνης p21 (5).

Παρότι σε όλες τις p53 θετικές περιπτώσεις ALCL παρατηρήθηκε συνέκφραση της p21, σε ένα λεμφαδενικό PTCL-NOS και σε 1 δερματικό μη αναπλαστικό λέμφωμα παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53, όχι όμως και της p21. Στην περίπτωση αυτή, είναι δυνατό η πρωτεΐνη p53 να είναι λειτουργικά ανενεργή οπότε να αδυνατεί να επάγει την έκφραση της p21. Όμως μεταλλάξεις του γονιδίου p53 είναι εξαιρετικά σπάνιες στο PTCL λέμφωμα (5). Μια άλλη υπόθεση είναι η αναστολή της τρανσενεργοποίησης από την πρωτεΐνη mdm2 που όμως στην περίπτωση αυτή βρίσκεται σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα ανοσοϊστοχημικά. Πράγματι, η σύνδεση της mdm2 με τη p53 αναστέλλει την εξαρτώμενη από την p53 τρανσενεργοποίηση, αλλά επειδή είναι δυνατό να αλληλεπιδρά με το mdm2 και η πρωτεΐνη pRb, που σημειωτέον εκφράζεται φυσιολογικά στην περίπτωση αυτή, δεν είναι δυνατή η επαγόμενη από την mdm2 αποικοδόμηση της p53 για αυτό και ανιχνεύεται (24).

Στην μελέτη αυτή, η έκφραση της πρωτεΐνης pRb αυξανόταν αναλογικά με την έκφραση των Ki67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1 σε όλες, εκτός από μια περίπτωση, (λεμφαδενικό PTCL-NOS). Το εύρημα αυτό στηρίζει την άποψη ότι η έκφραση της pRb ακολουθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ανάλογα συμπεράσματα έχουν αναφερθεί και στα B-λεμφώματα (31,35). Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης pRb έχει παρατηρηθεί μόνο σε ένα λεμφαδενικό λέμφωμα του τύπου PTCL-NOS [6% (1/17)]. Το λέμφωμα αυτό χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσους ρυθμούς πολλαπλασιασμού. Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί υψηλότερα ποσοστά απώλειας της έκφρασης του pRb [20% (10/45)], γεγονός που πιθανώς οφείλεται αποκλειστικά στην επιλογή των περιστατικών (22)

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η έκφραση της κυκλίνης D1 και πρωτεΐνης p16 που εμπλέκονται στο δίκτυο ρύθμισης κυκλίνη D1/ p16/ Rb. Το δίκτυο αυτό ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (3). Δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση της κυκλίνης D1 σε καμία από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Από την εξέταση της έκφρασης της p16

διαπιστώθηκε ότι σε 2/39 περιπτώσεις παρατηρήθηκε εστιακή απώλεια της έκφρασης. Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί εστιακή απώλεια της έκφρασης σε PTCL (7/14 περιπτώσεις) (30,52). Ακόμη, παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης και σε 2 περιπτώσεις ALCL λεμφώματος, σε μία δε από αυτές διαπιστώθηκε υπερμεθυλίωση του γονιδίου p16. Υπερμεθυλίωση του γονιδίου του p16 έχει διαπιστωθεί σε μελέτη σε σύνολο 3/20 περιπτώσεων TCL υψηλού βαθμού κακοήθειας που μελετήθηκαν (53). Σε μια ακόμη μελέτη αναφέρεται (54,55) υπερμεθυλίωση του γονιδίου p16, (μέθοδο RT-PCR) σε 1/7 PTCL και 1/2 ALCL με απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης. Στο άρθρο ανασκόπησης του Drexler (28) αναφέρεται απώλεια της έκφρασης της p16 σε 47/332 περιπτώσεις TCL (44 από αυτές ανήκαν στον τύπο της οξείας T-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας), ενώ σε άλλη μελέτη 27 περιπτώσεων PTCL δεν παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p16. Από την εκτίμηση των μέχρι τώρα δεδομένων συνάγεται το συμπέρασμα ότι: α) η απώλεια της έκφρασης της p16 δεν είναι συχνή στα PTCL λεμφώματα και β) η υπερμεθυλίωση του γονιδίου p16 αποτελεί την κύρια αιτία απενεργοποίησης του γονιδίου στα PTCL λεμφώματα, αφού δεν παρατηρούνται απαλείψεις ή μεταλλάξεις του γονιδίου. Για την διευκρίνιση της δομής του γονιδίου του p16, αλλά και της έκφρασης της πρωτεΐνης στα PTCL λεμφώματα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν δυο περιπτώσεις που μελετήσαμε με εστιακή απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p16, στις οποίες δεν διαπιστώθηκε απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης pRb, ούτε υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53. Εκτός τούτου, σε μια περίπτωση που παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης της pRb, δεν παρατηρήθηκε έκφραση της p53, ενώ σε 12 περιπτώσεις θετικής έκφραση της p53, διαπιστώθηκε και θετική έκφραση της pRb. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στα TCL υπάρχουν διαφορετικοί παθογενετικοί μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκεται είτε το δίκτυο του γονιδίου p53, είτε λιγότερο συχνά το δίκτυο γονιδίου Rb.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μελετών στις οποίες διερευνήθηκαν ενδεχόμενες διαταραχές των δικτύων ρύθμισης των pRb και p53 σε T-λεμφώματα και σε B-λεμφώματα προκύπτουν οι παρακάτω παρατηρήσεις: 1) Διαταραχές του δικτύου ρύθμισης p53/p21 παρατηρούνται συχνότερα σε υψηλού βαθμού κακοήθειας B-λεμφώματα και κυρίως εκείνα που μεταπίπτουν από χαμηλού σε υψηλού βαθμού κακοήθειας. Στις περιπτώσεις αυτές, η υπερέκφραση της p53 σχετίζεται με μεταλλάξεις του γονιδίου. Στα T-λεμφώματα, οι διαταραχές αυτού του δικτύου ρύθμισης είναι εξαιρετικά σπάνιες, παρατηρούνται μόνο στα ALCL λεμφώματα και δεν σχετίζονται με

μεταλλάξεις του γονιδίου (14,15,22). 2) Στο δίκτυο p16/Rb διαταραχές στην έκφραση των πρωτεϊνών παρατηρούνται επίσης σε σημαντικό ποσοστό στα υψηλού βαθμού κακοηθείας Β-λεμφώματα και μάλιστα εκείνα που προκύπτουν από μετάπτωση από χαμηλού βαθμού κακοηθείας λεμφώματα. Στις περιπτώσεις αυτές, παρατηρείται απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p16 λόγω υπερμεθυλίωσης του γονιδίου. . Ανάλογες διαταραχές στην έκφραση των πρωτεϊνών p16/Rb είναι σπάνιες στα Τ-λεμφώματα, και όταν παρατηρούνται, οφείλονται στην υπερμεθυλίωση του γονιδίου (32,53,30,22).

Στην παρούσα μελέτη έκφραση των πρωτεϊνών Ki67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1 ανιχνεύθηκε σε όλες τις περιπτώσεις (57) και ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης οι περιπτώσεις διακρίθηκαν σε τρεις κατηγορίες:

1) Περιπτώσεις με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (>25% θετικά κύτταρα): ALCL, T-LBL. 2) Περιπτώσεις με χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (<5% θετικά κύτταρα): MF, γδ ηπατοσπληνικό TCL. 3) Περιπτώσεις με ενδιάμεσο δείκτη πολλαπλασιασμού (5-25% θετικά κύτταρα): υπόλοιπες περιπτώσεις Τ- λεμφωμάτων. Ανάλογα είναι τα ευρήματα και στη διεθνή βιβλιογραφία (55).

Ενδιαφέρον στη μελέτη μας παρουσιάζουν 12 περιπτώσεις, στις οποίες παρατηρήθηκε υπερέκφραση της p53 και υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μέτριας-υψηλής έκφρασης της πρωτεΐνης Ki67 και της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p53 ($p < 0,001$). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης (22) και στηρίζει την υπόθεση ότι το p53 δίκτυο ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι διαταραγμένο στα Τ-λεμφώματα.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώνεται ότι στον τύπο του ALCL λεμφώματος παρατηρείται: α) υπερέκφραση των πρωτεϊνών p53 και p21, β) υπερέκφραση των πρωτεϊνών p16/pRb, γ) υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού και δ) υψηλός ρυθμός απόπτωσης. Συνεπώς στον τύπο αυτό του λεμφώματος συμπεραίνουμε ότι παρατηρούνται: α) διαταραχή στο δίκτυο ρύθμισης του φυσικού τύπου p53/p21 με αποτέλεσμα αδυναμία διακοπής του κυτταρικού κύκλου και αύξηση του ρυθμού της απόπτωσης και β) φυσιολογικό δίκτυο ρύθμισης των p16 /pRb. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις των Τ-λεμφωμάτων που μελετήθηκαν η υπερέκφραση των p53 και p21 ήταν σποραδική ή απύσχα, ενώ η υπερέκφραση του mdm2 δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο. Συνολικά ,ανοσοϊστοχημικές διαταραχές του δικτύου ρύθμισης Rb/p16/κυκλίνη D1 δεν ήταν συχνές στις περιπτώσεις των Τ-λεμφωμάτων που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, η έκφραση της πρωτεΐνης pRb ήταν φυσιολογική και σχετιζόταν με τον

ρυθμό πολλαπλασιασμού του νεοπλάσματος σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, ενώ εστιακή απώλεια της έκφρασης του p16 παρατηρήθηκε σε σπάνιες περιπτώσεις. Από τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώνεται ότι διαταραχές στην έκφραση της pRb ή της p16 ενέχονται σπάνια στην παθογένεση των T-λεμφωμάτων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώνεται ότι:

I. Στον τύπο του ALCL λεμφώματος παρατηρείται:

- α) υπερέκφραση των πρωτεϊνών p53 και p21,
- β) υπερέκφραση των πρωτεϊνών p16/pRb.
- γ) υψηλός ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού,
- δ) υψηλός ρυθμός απόπτωσης.

Συνεπώς στον τύπο αυτό του λεμφώματος, συμπεραίνουμε ότι παρατηρούνται: 1) διαταραχή στο δίκτυο ρύθμισης του φυσικού τύπου p53/p21 με αποτέλεσμα αδυναμία διακοπής του κυτταρικού κύκλου και αύξηση του ρυθμού της απόπτωσης και 2) φυσιολογικό δίκτυο ρύθμισης των p16 /pRb.

II. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις των T-λεμφωμάτων η υπερέκφραση των πρωτεϊνών p53 και p21 είναι σποραδική ή απύουσα, ενώ η υπερέκφραση του mdm2 δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο.

III. Συνολικά, ανοσοϊστοχημικές διαταραχές του δικτύου ρύθμισης Rb/p16/ κυκλίνη D1 δεν είναι συχνές στις περιπτώσεις των T-λεμφωμάτων που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, η έκφραση της πρωτεΐνης pRb ήταν φυσιολογική και σχετίζονταν με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού του νεοπλάσματος σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, ενώ εστιακή απώλεια της έκφρασης του p16 παρατηρήθηκε σε σπάνιες περιπτώσεις. Από τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώνεται ότι διαταραχές στην έκφραση της pRb ή της p16 ενέχονται σπάνια στην παθογένεση των T-λεμφωμάτων.

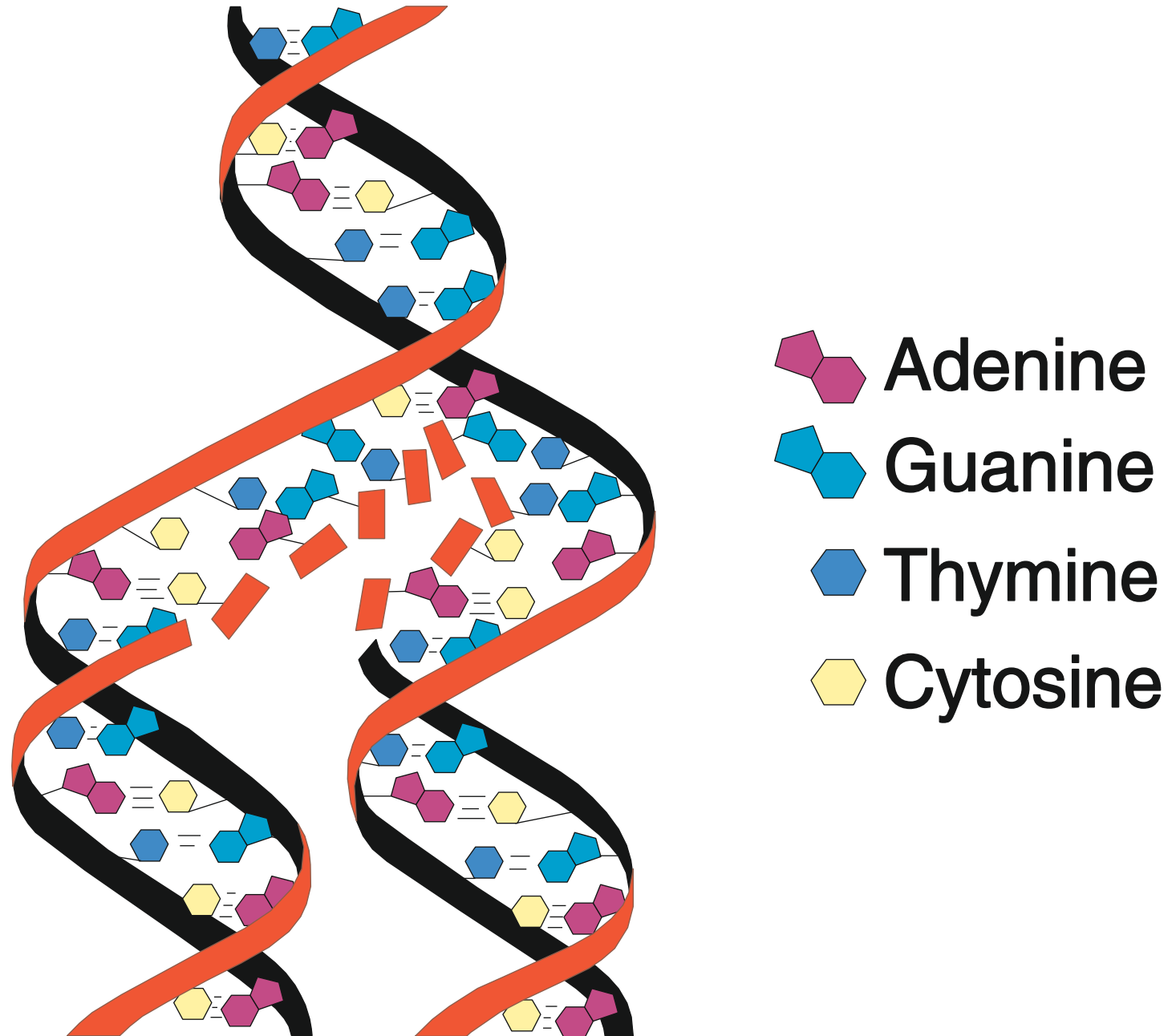
E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cordon-Cardo C. American Journal of Pathology (1995): 147, 545-560
2. Gillet C.E. and Barnes. Journal of clinical Pathology (Molecular Pathology). (1998): 51, 310-316
3. Liggett W. and Sidransky D. Journal of clinical oncology (1998): 16, 1197-1206
4. Αγνάντη Νίκη. Ειδική παθολογική Ανατομική (μέρος 1) Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (1999).
5. Cox L. S. Journal of Pathology (1997): 183, 134-140
6. Polyak K. Xia Y. Zweler J. Kinzler K. W. and Vogelstein B. Nature (1997):389,300-305
7. Prives C. and Hall P. Journal of Pathology (1999): 187, 112-126
8. Haupt Y. Maya R. Kazaz A. and Oren M. Nature (1997): 387, 296-299
9. Kubbutat M. H.G., Jones S. N. and Vousden K.H. Nature (1997): 387, 299-303
10. Cesarman E., Inghirami G., Chadburn A and Knowles D. M. American Journal of Pathology (1993): 143, 845-856
11. Sander CA., Yano T., Clark HM., Harris S., Longo D. L., Jaffe E.S. and Raffeld M. Blood (1993): 82, 1994-2004
12. Du M. Q., Peng H. Z., Singh N., Isaacson P. G. and Pan L. X. Blood (1995): 86, 4587-4593
13. Chilosi M., Doglionni C., Inghirami G., Krampera M., Nadal G., Rahal D., Scarpa A., et all. Blood (1996) : 88, 4012-4020
14. Villuendas R., Pezzella F., Gatter K., et all. Journal of Pathology (1997):181, 51-61
15. Matsushima A. Y., Caserman E., Chadburn A. and Knowles D. M. American Journal of Pathology (1994): 144, 573-584
16. Maesrto R., Doglioni C., Piccinin S., Vukosavljevic T., Gaspurott D., Gardone A. and Boiocchi M. Blood (1997): 89, 2523-2528.
17. Harris N. L., Jaffe E. S., Stein H. Warnke R. A., et all. Blood (1994): 84, 1361-1392
18. Gisselbrecht C., Gaulard P., Lepage E., Diebold J. Blood (1998):92, 77-82
19. Inghirami G., Macri L., Cesarman E., Chadburn A., Zhong J. and Knowles D. M. Blood (1994): 83, 3581-3590.
20. Kanavaros P., Ioannidou D., Tzardi M., Datsaris G., Katsantonis J., Delidis G. and Tosca A. Pathol. Res. Pract. (1994): 190, 767-774
21. Lauritzen A., Vejlsgraad G., Hou-Jensen K. and Ralfkiaer E. British Journal of Dermatology (1995):133, 32-36
22. Pescarmona E., Pignoloni P., Santangelo C., Naso G., Baroni C. D., et all. Journal of Pathology (1999): 188, 400-406.
23. Weinberg R. A. Cell (1995): 81, 323-330
24. Hsieh J. K., Chan F. S. G., O'Connor D. J., Mittnacht S., Zhong S. and Lu X. Molecular Cell (1999): 3, 181-193
25. Siebert R., Willers C. P. and Opalka B. Leuk. Lymphoma (1996): 23, 505-520
26. Herman J. G., Civic C. I., Issa J. P. J., Collector M. I., Sharkis S. J. and Baylin S. B. Cancer Research (1997): 57, 837-841.
27. Uchida T., Kinoshito T., Saito H. and Hotta T. Leuk. Lymphoma (1997): 24, 449-461.
28. Drexler P. Leukemia (1998): 12, 845-859

29. Geradts J., Andriko J. W. and Abbondanzo S. L. *American Journal of Clinical Pathology* (1998): 109, 669-674
30. Villuendas R., Sanchez-Beato M., Martinez J.C., Saez A., Martinez-Delgado B., Piris M., et all. *American Journal of Pathology*. (1998): 153, 887-897.
31. Martinez J. C., Piris M. A., Sanchez-Beato M., Villuendas R., Orradre J. L., Algara P., Sanchez-Verde L. and Martinez P. *Journal of Pathology* (1993): 169, 405-412.
32. Weide R., Tiemann M. and Pfluger K.H.. *Leukemia* (1994): 8, 97-101.
33. Zhu Y. M., Haynes A. P., Keith F. J. and Russell N. H.. *Leukemia Lymphoma* (1995):18, 61-67.
34. Grierson A. J., Hodgkins M. A., Hancock B.W., Goepel J. R., Royds J. and Goyus M. H.. *Leukemia Lymphoma*.(1996): 23, 353-363.
35. Jares P., Campo E., Pinyel M., Bosch E., Miguel R., Fernandez P.L., Sanchez-Beato M., Cardesa A., et all *American Journal of Pathology*. (1996): 148, 1591-1600.
36. Muller H., Lukas J., Schneider A., Warthoe P., Bartek J., Eilers M. and Strauss M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994): 91, 2945-2949.
37. Lundberg A. S., Weinberg R.A. *European Journal of Cancer* (1999): 35(4), 531-539
38. Hunter T. and Pines J., *Cell* (1991):66, 1071-1074
39. Forrest M. J. and Barnett D.. *European Journal of Haematology* (1989): 42, 67-71
40. Kanavaros P., Stefanaki S., Vlachonikolis J., Eliopoulos G., Kakolyris S., Rontogianni D., Gorgoulis V. and Georgoulis V.. *Histology and Histopathology* (2000): 15, 445-453.
41. Dutta A., Chandra R., Lorene M. and Lester S. L.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995): 92, 5386-5390.
42. Bodey B., Williams R. T., Carbonaro-Hall D. A., Horvath A., Tolo V. T., Luck J. V., Taylor C. R. and Hall F. L.. *Modern Pathology* (1994):7(8), 846-852.
43. Czader M., Mazur J., Pettersson M., Liliemark J., Stromberg M., Christenonson B., Porwit A., et all. *Cancer* (1996): 77, 1180-1188.
44. Labaer J., Garrett M. D. Stevenson L. F., Slingerland J. M., Sandhu C., Chou H. S., Fattey A. and Harlow E.. *Genes and development* (1997): 11, 847-862.
45. Wolfel T., Hauer M., Schneider J., Serrano M., Woljel C., Kiehmman-Heib E., De Plaen E., Hankein T., Meyer Zum Buschenfeld K. H. and Beach D.. *Science* (1995): 269,1281-1284.
46. Martinez J. C., Mateo M., Sanchez-Beato M., Villuendas R., Orradre J. L., Algara P., Sanchez-Verde L., Piris M.A., et all. *Journal of Pathology* (1995):177, 27-34.
47. Tzardi M., Kouvidou C., Panayiotides J., Stefanaki S., Koutsoubi K., Zois E., Rontogianni D., Eliopoulos G., Delides G. and Kanavaros P.. *Journal of Clinical Pathology (Mol. Pathology)* (1996): 49 M278-M283
48. Xiao Z. X., Chen J., Levine A. J., Modjtahedi N., Xing J., Sellers W., R. and Livingston D. M. . *Nature* (1995): 375, 694-698.
49. Du M., Singh N., Husseuin A., Isaacson P. G. and Pan L. X. . *Journal of Pathology* (1996): 178, 379-384
50. Kiberu S. W., Pringle J. H., Sobolewski S., Murphy P. Lauder I. . *Journal of Clinical Pathology (Mol. Pathology)* (1996): 49, M268-M272.

51. Schlaifer D., Krajewski S., Galoin S., Rigal-Huguet F., Laurent G., Massip P., Pris J., Delson G., Reed J. and Brousset P. . *American Journal of Pathology* (1996): 149, 177-185.
52. Pinyol M., Cobo F., Bea S., Jares P., Nayach I., Fernandez P. L., Montserrat E., Cardesa A. and Campo E. . *Blood* (1998): 91, 2977-2984.
53. Martinez-Delgado B., Fernandez-Piqueras J., Garcia M. J., Arranz E., Gallego J., Rivas C., Robledo M. and Benitez J.. *Leukemia* (1997): 11, 425-428.
54. Baur A. S., Shaw P., Burri N., Delacretaz F., Bosman F. T. and Chaubert P. . *Blood* (1999): 94, 1773-1781.
55. Otsuki T., Clark H. M., Wellmann A., Jaffe E. S. and Raffeld M. . *Cancer research* (1995): 55, 1436-1440.

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ VL-30 ΜΕ ΤΟ
ΓΟΝΙΔΙΟ neo



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

κ.ΤΖΑΒΑΡΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

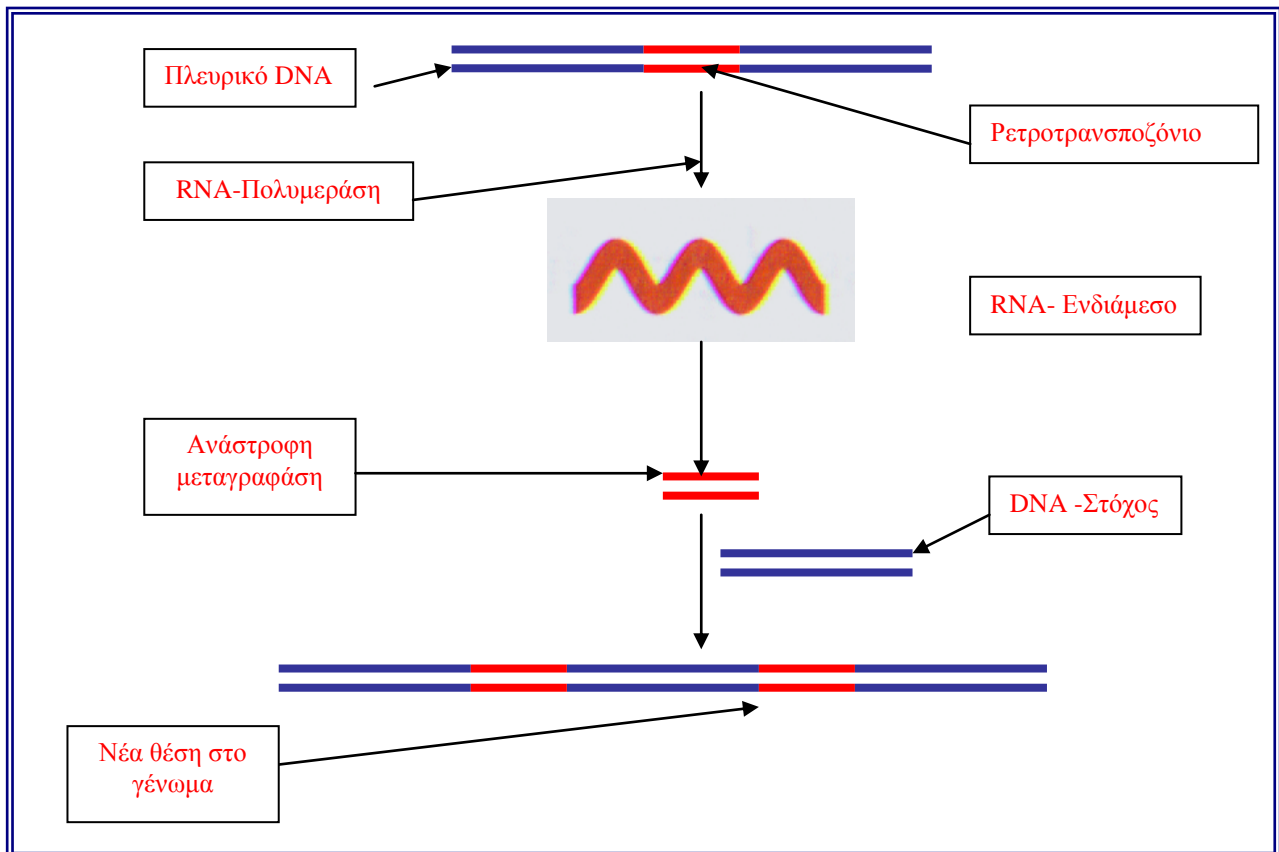
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Στο γένωμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, κυρίως των ανώτερων οργανισμών, ένα μεγάλο ποσοστό του, περίπου το 90%, δεν κωδικοποιεί πρώιμα mRNA ούτε κάποιο άλλο είδος RNA. Εντατικές έρευνες απέδειξαν ότι ένα τμήμα αυτού του μη λειτουργικού DNA αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA (repeated DNA) χαρακτηριστικές για κάθε οργανισμό. Πρόκειται για μη λειτουργικό DNA, διάσπαρτο, με την ικανότητα να μετακινείται ή να μετατίθεται. Μετά από έρευνες αποκαλύφθηκε ότι το τμήμα αυτό περιλαμβάνει κινητοποιήσιμα στοιχεία που δεν έχουν λειτουργικό ρόλο στο γένωμα παρά μόνο την διατήρησή τους. Διαπρεπείς μελετητές συνηγορούν στο ότι τα στοιχεία αυτά αποτελούν περίπου το 30% του ανθρώπινου γενώματος, επειδή συσσωρεύονται με μεγαλύτερο ρυθμό από αυτό που εξαλείφονται. Παρόλο που η παρουσία τους δεν συνδέεται με κάποιο συγκεκριμένο ρόλο η μετακίνησή τους προκαλεί πολλές φορές τυχαίες μεταλλάξεις, αν εισχωρήσουν σε μεταγραφική μονάδα ή μέσω της διαδικασίας του ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ δυο τέτοιων στοιχείων (1).

2. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ

Πρώτη ερευνήτρια που ανακάλυψε τα μεταθετά στοιχεία σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς ήταν η Barbara McClintock το (1940) κατά τη διάρκεια γενετικών πειραμάτων στο καλαμπόκι, χαρακτηρίζοντας τα ως γενετικές οντότητες με λειτουργικό ρόλο παρόμοιο με τα μεταθετά στοιχεία που απαντώνται στα βακτήρια. Εκτενείς έρευνες αποκάλυψαν τον μηχανισμό που τα στοιχεία αυτά μεταφέρονται από μια θέση του γενώματος σε μια άλλη. Ειδικότερα παρατήρησαν ότι το μεταθετό στοιχείο αρχικά μεταγράφεται και το μεταγράφημα περαιτέρω χρησιμοποιείται ως ενδιάμεσο μόριο, που με την σειρά του μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA με το ένζυμο ανάστροφη μεταγραφάση. Στη συνέχεια το νέο τμήμα ενσωματώνεται στο γένωμα σε άλλη θέση (4,6) (Εικόνα 1). Τα κινητά στοιχεία που μετατίθενται μέσω του μηχανισμού που περιγράφεται παραπάνω ονομάζονται ρετροτρανσποζόνια, ο δε μηχανισμός που μετατίθενται ονομάζεται ρετρομετάθεση. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο με συχνότητα 10^{-7} /κύτταρο/γενιά (5).



Εικόνα 1: Μηχανισμός ρετρομετάθεσης

3. ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ

Υπάρχουν δυο κατηγορίες ρετροτρανσποζονίων, η πρώτη που περιλαμβάνει τα ονομαζόμενα ιϊκά ρετροτρανσποζόνια, λόγω των ομοιοτήτων τους με το γένωμα των ρετροϊών. Συγκεκριμένα περιλαμβάνουν μακρές τελικές επαναλήψεις (LTRs) μοριακού μήκους 250-600bp που τα διαφοροποιούν από τη δεύτερη τα μη ιϊκά ρετροτρανσποζόνια που δεν παρουσιάζουν την ίδια οργάνωση στο γένωμά τους. Επιπλέον τα ιϊκά ρετροτρανσποζόνια δεν είναι δυνατό να σχηματίσουν ιϊκά σωματίδια λόγω απουσίας των ρετροϊικών γονιδίων ενν. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ιϊκών ρετροτρανσποζονίων είναι το στοιχείο *Ty* (5kb) που βρίσκεται στο *Saccharomyces cerevisiae* και το στοιχείο *coria* (5-8kb) στη δροσόφιλα. Η κατηγορία των μη ιϊκών ρετροτρανσποζονίων διακρίνεται σε δυο υποκατηγορίες. Τα στοιχεία LINES (long interspersed elements) με μέγεθος 6-7kb και τα στοιχεία SINES (Short interspersed elements) με μέγεθος 300bp (2,3).

4. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ VL30

Στο γένωμα των ανώτερων οργανισμών, όπως και στον επίμυ, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ενδογενών ρετροϊικών στοιχείων που έχει μελετηθεί εκτενώς αποκαλύπτοντας

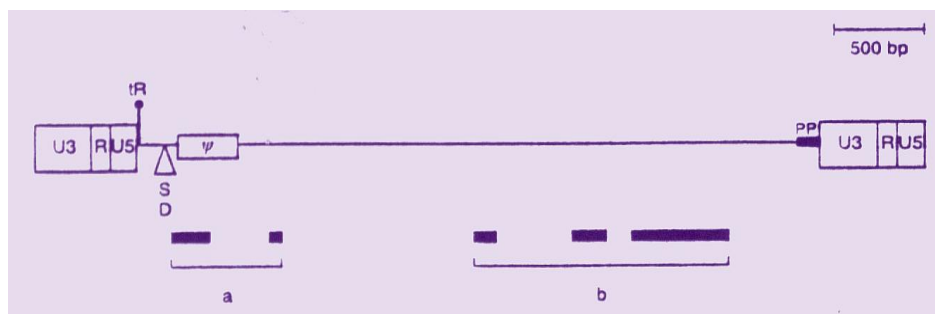
ένα αριθμό διακριτών οικογενειών μεταξύ των οποίων και η οικογένεια VL30 (πίνακας 1), που προσέλκυσε το ενδιαφέρον των ερευνητών για δυο κυρίως λόγους.

ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ ΣΤΟΙΧΕΙΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΟΪΩΝ	ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΣΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ (1)
GLN	20-50	NA(2)
MuRRS	50-100	NA
VL30	150-200	NA
ETn	200	NA
MuRVY	500	NA
MYS	500-1000	NA
IAP	1000	gag-pol

Σημείωση: 1. Αναφέρεται σε λειτουργικές πρωτεΐνες
2. NA: Προϊόν μη σχετιζόμενο με λειτουργική πρωτεΐνη

Πίνακας 1: Οικογένεια ρετροτρανσποζονίων στον Επίμυ

Πρώτον για την ποικιλία των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης του στοιχείου και δεύτερον για την ικανότητα του να μεταφέρεται εξωκυτταρικά μέσω ενός σχηματισμού ψευδοϊκού συμπλόκου με κάποιο ιό (τύπου-C) που συμμετέχει βοηθητικά στη διαδικασία. Επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την ενσωμάτωση του στοιχείου σε νέες θέσεις στο γένωμα (2). Η ονομασία του στοιχείου προήλθε από τα αρχικά των λέξεων ‘virus-like 30S’ λόγω του ότι παράγει ένα μεταγράφημα μεγέθους 30S (7). Ανάλυση της αλληλουχίας ενός μέλους της οικογένειας VL30, του στοιχείου NVL-3, αποκάλυψε τη δομική οργάνωση του στοιχείου που διαθέτει χαρακτηριστικά ρετροϊκού προιού. Συγκεκριμένα το γένωμα του στοιχείου μεγέθους 5kb βρίσκεται μεταξύ των μακρών τελικών επαναλήψεων (LTRs) που εμφανίζουν την τυπική οργάνωση U3-R-U5, που συναντάται σε ρετροϊούς, με μέγεθος 0.5 kb. Οι αλληλουχίες που βρίσκονται ανάμεσα στις περιοχές LTR διακρίνονται σε δυο ομάδες, τις περιοχές που παρουσιάζουν ομολογία με την περιοχή *gag* και στις περιοχές ομολογίας με την περιοχή *pol* των ρετροϊών. Επιπλέον, καθοδικά του 5’LTR υπάρχει θέση αναγνώρισης ενός συγκεκριμένου tRNA που απαιτείται για την έναρξη του πολλαπλασιασμού, ενώ ανοδικά του 3’ LTR υπάρχει μια πολυουρινική περιοχή που λειτουργεί ως πριμοδότης για την διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής. Περιλαμβάνεται ακόμη και μια περιοχή με σήμα πακεταρίσματος (περιοχή ψ) (Εικόνα 2)(2,8-13).



Εικόνα 2: Δομή ρετροτρανσποζόνιου VL-30

Όμως έρευνες απέδειξαν ότι τα στοιχεία VL30 είναι απίθανο να κωδικοποιούν οποιαδήποτε λειτουργική πρωτεΐνη από τις περιοχές gag, pol εξαιτίας της ύπαρξης μεγάλου αριθμού κωδικονίων τερματισμού σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (17). Συμπληρωματικές μελέτες της αλληλουχίας αποκάλυψαν τη μεγάλη ποικιλότητα των περιοχών LTR (14) παρόλο που εμφανίζουν πάντα την ίδια οργάνωση. Το γεγονός αυτό αποδίδεται από τους ερευνητές στο φαινόμενο του ανασυνδυασμού που συμβαίνει μεταξύ των περιοχών LTR από διαφορετικά στοιχεία VL30 που συνυπάρχουν στο γένωμα (15). Σε ανάλογα συμπεράσματα οδηγήθηκαν οι ερευνητές μετά από σύγκριση της αλληλουχίας στοιχείων VL30 από διαφορετικά στελέχη επίμυ. Παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση εκτενής ποικιλομορφία, ενώ, συγκριτικά με άλλα είδη τρωκτικών, οι περιοχές ομολογίας είναι περιορισμένες (16).

5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ VL30

Η μεταγραφή ενός στοιχείου VL30 ρυθμίζεται από την περιοχή U3 των LTR, που περιλαμβάνει χαρακτηριστικά λειτουργικά τμήματα εκκινήτη, επαυξηνητή και καταστολέα, ενώ σύμφωνα με το μοντέλο της ρετρομετάθεσης είναι απαραίτητη για την έναρξη της διαδικασίας (2). Μελέτες έδειξαν ότι δεν είναι μεταγραφικώς ενεργά όλα τα μέλη της οικογένειας VL30 γεγονός που αποδίδεται στην ανίσχυρη δραστικότητα εκκινήτη/επαυξηνητή που παρατηρείται σε κάποια από αυτά τα στοιχεία (12). Η έκφραση των μεταγραφικώς ενεργών στοιχείων VL30 είναι εκτενής σε όλους τους ιστούς του επίμυ, ενώ παρατηρείται εξειδίκευση στα επίπεδα της έκφρασης γεγονός που προδίδει την ύπαρξη ενός πολύπλοκου ρυθμιστικού προφίλ (18-24). Διαπιστώθηκε επιπλέον ότι το στοιχείο VL30 λειτουργεί ως δυνητικός ογκογενητικός παράγων όταν μολύνει κύτταρα σε σύμπλοκο με τον ιό MLV, καθιστώντας το στοιχείο VL30 βασικό ερευνητικό εργαλείο στη αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με αυτό σε καρκινικούς ιστούς (25).

Πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές παρέχουν νέα δεδομένα για τη δυναμική των στοιχείων VL30 και για την σημασία της ρετρομετάθεσης στους ευκαρυωτικούς

οργανισμούς. *In vitro* μελέτη έδειξε ότι είναι δυνατό να ανιχνευτούν φαινόμενα ρετρομετάθεσης του ανθρώπινου L1 μεταθετού στοιχείου και του στοιχείου VL30 από επίμυ σε ανθρώπινα ωοκύτταρα, μετά από μικροένεση σε αυτά κατάλληλων πλασμιδιακών κατασκευών. Σε αυτή τη μελέτη παρέχονται πειραματικά δεδομένα που τεκμηριώνουν την πιθανή συσχέτιση της ρετρομετάθεσης στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων και στη γονιμότητα(29).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα δυο εργασιών που μελετούν την συχνότητα ρετρομετάθεσης του στοιχείου VL30 τόσο σε μετασχηματισμένα κύτταρα NIH3T3 από τον ιό SV40, όσο και υπό την επίδραση του οξοβανάδιου, που αποτελεί την πιο συνήθη μορφή του βανάδιου στους ιστούς,

Στην πρώτη εργασία καταγράφεται ότι η συχνότητα ρετρομετάθεσης του στοιχείου VL30 αυξορυθμίζεται από το μεγάλο T- αντιγόνο του ιού SV40, δείχνοντας ότι η ρετρομετάθεση του στοιχείου VL30 και η κυτταρικός μετασχηματισμός από τον ιό SV40 παρουσιάζουν άμεση συσχέτιση (30). Αντίστοιχη αυξορύθμιση στη συχνότητα ρετρομετάθεσης του στοιχείου VL30 φαίνεται ότι επάγεται *in vitro* από το ιόν του οξοβανάδιου, που αποτελεί την πιο συνήθη μορφή του βανάδιου στους ιστούς, μέσω μηχανισμού απελευθέρωσης H₂O₂. Η διαπίστωση αυτή καταδεικνύει ότι η επαγόμενη ρετρομετάθεση του VL30 από το βανάδιο, μπορεί να αποτελεί ένα πιθανό μηχανισμό της βανάδιο-επαγόμενης καρκινογένεσης (31).

Η αυξημένη συχνότητα γεγονότων ρετρομετάθεσης του στοιχείου VL30 σε μεταμορφωμένα κύτταρα NIH3T3 από τον ιό SV40, είναι δυνατό να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα *in vitro* μελέτης (32). Στη συγκεκριμένη μελέτη γίνεται σαφές ότι η συνεχόμενη συσσώρευση ρετρομεταθετών στοιχείων VL30 στο γένωμα είναι δυνατό να προκαλέσει αστάθεια στο γένωμα, η οποία οδηγεί με τη σειρά της μέσω της επαγωγή της πρωτεΐνης p53 στην ενεργοποίηση μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου, ακολουθώντας τη μιτοχονδριακή οδό. Επιπλέον η δράση της πρωτεΐνης p53 οδηγεί με τη σειρά της σε καταστροφή του μιτοχονδρίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενεργών ριζών οξυγόνου που προκαλούν καταστροφή των λυσοσωμάτων και ενεργοποίηση των λυσοσωματικών πρωτεασών.

Στις τελευταίες μελέτες που αναφέρουμε παραπάνω, φαίνεται τα ρετροτρανσποζόνια δεν αποτελούν τελικά αδρανείς αλληλουχίες(αρχική θεώρηση), αλλά είναι στοιχεία που παρουσιάζουν συγκεκριμένο ρυθμιστικό ρόλο όσον αφορά τη τύχη του κυττάρου.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η κατασκευή ανασυνδυασμένων στοιχείων VL30 με το γονίδιο (neo) με δυο κυρίως ερευνητικές εφαρμογές.

1. Τα κατασκευασθέντα ανασυνδυασμένα στοιχεία θα χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της έκφρασης με αποτύπωση κατά Northern του συγκεκριμένου ρετρομεταθετού στοιχείου NVL-3, μέσω του γονιδίου αναφοράς (neo), που θα αντικατοπτρίζει συγχρόνως την έκφραση ενός πλήρους μήκους αλλά και τυπικά λειτουργικού στοιχείου VL30.
2. Η δεύτερη ερευνητική εφαρμογή αφορά την ανίχνευση της ρετρομετάθεσης των VL30 μέσω του γονιδίου αναφοράς (neo) με αποτύπωση κατά Southern. Συγκεκριμένα και οι δυο πλασμιδιακές κατασκευές φέρουν μια θέση περιορισμού BglII, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ρετρομεταθέσεων.

B. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της εργασίας είναι:

- Βακτηριακό στέλεχος *E.coli/MC1061*, καλλιεργείται σε θρεπτικό υλικό Luria-Broth(L-Broth) και επωάζεται ολονύκτια στους 37⁰C σε τροχιακό αναδευτήρα. Αποθηκεύεται στους -80⁰C σε διάλυμα γλυκερόλης 20% σε ειδικά σωληνάκια τύπου (nunk).
- Πλασμιδιακός φορέας pBluescript II KS (2,9kb)
- Κύτταρα *NIH3T3*: Κυτταρική σειρά από έμβρυο ποντικού. Προέρχεται από υποκλωνοποίηση της σειράς *swiss/3T3* και έχει χαρακτηριστικά ινοβλαστών. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε DMEM με 10% BS, ή 10% FCS προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα.
- Αντιβιοτικά: αμπικιλίνη (10mg/ml) και G418 (20mg/ml)
- Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων ήταν των εταιριών MERCK, SIGMA.
- Ένζυμα κλωνοποίησης της εταιρίας New England Biolabs Inc και Promega.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

2.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην ικανότητα των βακτηρίων να προσλαμβάνουν DNA από το περιβάλλον παρουσία δισθενών ιόντων. Στην προκειμένη περίπτωση για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται διάλυμα CaCl₂. Αναλυτικότερα προπαρασκευασμένα επιδεκτικά κύτταρα *MC1061* από τους -70⁰C αραιώνονται με διάλυμα CaCl₂ (100 mM) σε αναλογία 1:10 (100 μl κυτταρικό εναιώρημα και 900 μl CaCl₂), η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο. Ακολούθως 100 μl από το παραπάνω εναιώρημα μεταφέρονται σε σωληνάκι 10 ml τύπου (Corning) και στη συνέχεια προστίθενται 10 μl (100 ng) πλασμιδιακού DNA και τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 20-30 λεπτά.. Ακολουθεί θερμικό στρες (shock) για 1 λεπτό στους 37⁰C για να εισχωρήσει στα κύτταρα το πλασμιδιακό DNA. Τα κύτταρα τοποθετούνται στο πάγο για 2 λεπτά και επαναλαμβάνεται το θερμικό στρες (shock) για 1 λεπτό στους 45⁰C. Στη συνέχεια προστίθενται 1.4 ml L-broth και τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα στους 37⁰C για να αναπτυχθούν. Με το παραπάνω

εναιώρημα εμβολιάζονται τρυβλία L-broth με άγαρ που περιέχουν (100μg/ml) αντιβιοτικό ως δείκτη επιλογής με όγκους (25 μl, 50 μl, 100 μl, 200 μl). Τα τρυβλία αφήνονται για 10 λεπτά στους 25°C και τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο για ολονύκτια επώαση στους 37 °C.

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα CaCl₂
100 mM CaCl₂ διατηρείται στους (4 °C)
- Διάλυμα L-Broth
10g Bacto-Tryptone, 5g Yeast extract, 10g NaCl /1l d.H₂O

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης πριν την χρήση και διατηρείται σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου.

2.1.2 ΜΙΚΡΟΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας κλωνοποίησης είναι ο έλεγχος του πλασμιδιακού DNA των αποικιών των κυττάρων *MC1061* που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επιλογής αντιβιοτικού, λόγω της ανθεκτικότητας που παρέχει το πλασμίδιο. Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει αρχικά την καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό L-broth όγκου 3 ml με αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100μg/ml) των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο σε ειδικά αποστειρωμένα σωληνάκια. Τα σωληνάκια σφραγίζονται με parafilm και επωάζονται ολονύκτια στους 37°C σε τροχιακό αναδευτήρα. Στην συνέχεια από την υγρή καλλιέργεια κυττάρων λαμβάνεται δείγμα όγκου 1 ml σε σωλήνα (eppendorf). Το δείγμα φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο (eppendorf 5414) για 10 λεπτά σε 13000xg. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο διάλυμα και προστίθενται αρχικά 70 μl ρυθμιστικού διαλύματος stet και το διάλυμα αναδεύεται καλά μέχρι να διαλυτοποιηθεί το κυτταρικό ίζημα. Ακολούθως προστίθεται 25 μl λυσοζύμη (10mg/ml), το διάλυμα αναδεύεται καλά και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.. Στην συνέχεια υφίσταται βρασμό σε θερμική πλάκα (Stuart scientific) για 45 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 13000xg. Συλλέγεται το υπερκείμενο που περιέχει το πλασμιδιακό DNA σε καινούριο eppendorf. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται 100 μl προπαν-2-όλης, το διάλυμα αναδεύεται καλά και τοποθετείται σε καταψύκτη -70°C για 15 λεπτά. Αμέσως μετά φυγοκεντρείται σε 13000Xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα στεγνώνεται για

10 λεπτά σε ξηραντήρα κενού(speed vac savant svc 100h). Το ίζημα επαναιωρείται (πλασμιδιακό DNA) σε 20 µl αποστειρωμένο H₂O.

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα STET

Σακχαρόζη	8% (w/v)
Triton x-100	5% (w/v)
EDTA	50 mM (pH=8,0)
TRIS-HCl	50 mM (pH=8,0)

- Διάλυμα λυσοζύμης

Λυσοζύμη (SIGMA) 10mg/ml σε απεσταγμένο νερό.

2.1.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Η μέθοδος αυτή παρέχει την δυνατότητα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας βαθμίδωση πυκνότητας CsCl/EtBr (βρωμιούχου αιθιδίου). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω διαφοράς στο ποσοστό ενσωμάτωσης του βρωμιούχου αιθιδίου στο πλασμιδιακό DNA σε σχέση με το χρωμοσωμικό. Η ενσωμάτωση του βρωμιούχου αιθιδίου μειώνει την πυκνότητα του DNA και δεδομένου ότι το πλασμιδιακό DNA ενσωματώνει λιγότερο βρωμιούχο αιθίδιο από ότι το χρωμοσωμικό, το πλασμιδιακό DNA σχηματίζει ζώνες σε μια περιοχή με υψηλότερη πυκνότητα από ότι το χρωμοσωμικό. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώνεται με αυτή τη μέθοδο είναι εξαιρετικής καθαρότητας και σε σημαντικές ποσότητες για διάφορες εργαστηριακές εφαρμογές.

1 ml υγρής καλλιέργειας κυττάρων *MC1061* εμβολιάζεται σε 500 ml L-broth που περιέχει 100mg/ml αντιβιοτικό αμπικιλίνη επωάζεται ολονύκτια στους 37°C υπό τροχιακή ανάδευση. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 7000xg στους 4°C σε φυγόκεντρο τύπου SORVAL. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναιωρείται σε 20 ml διαλύματος TRIS-HCl/glucose/EDTA/lysozyme, το διάλυμα παραμένει στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 40 ml διαλύματος (0.2M NaOH-1%SDS) με ήπια ανάδευση (το διάλυμα γίνεται διαυγές). Στο διάλυμα προστίθενται ακόμα 30 ml διαλύματος (5M/3M) CH₃COOK και παρατηρείται ο σχηματισμός ιζήματος λευκού χρώματος. Το μίγμα παραμένει στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος για 10 λεπτά στους 7000xg στους 4°C.(το ίζημα που σχηματίζεται

αποτελείται από χρωμοσωμικό DNA και βακτηριακά κλάσματα). Το υπερκείμενο υγρό συγκεντρώνεται σε ογκομετρικό κύλινδρο διηθώντας το με πέντε φορές-διπλωμένη γάζα. Μετράται ο όγκος του διαλύματος μετά τη διήθηση, μεταφέρεται σε ειδικό σωληνάκι τύπου (corex) και ακολουθεί προσθήκη διαλύματος ισοπροπανόλης σε όγκο 0.6 όγκους διαλύματος ($V_{\text{ισοπροπανόλης}}=0.6V_{\text{διαλύματος}}$). Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 8000xg στους 4⁰C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρείται με 4,5 ml 1XTE και προστίθεται 4.8g CsCl και 340 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Μετράται ο δείκτης διάθλασης του μίγματος, που πρέπει να είναι 1.3890. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε 10000xg. Συλλέγεται το υπερκείμενο και τοποθετείται σε ειδικά σωληνάκια υπερφυγόκεντρου (millipore), τα οποία φυγοκεντρώνονται σε 45000 rpm (rotor head Vti65) για 16-18 ώρες. Μετά τη φυγοκέντρωση συλλέγεται η ζώνη του πλασμιδιακού DNA με σύριγγα όγκου 1ml κοντά σε λάμπα UV. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου (corning) και εκπλένεται με ίσο όγκο ισοπροπανόλης για την απομάκρυνση του βρωμιούχου αιθιδίου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 5-6 φορές και κάθε φορά προστίθεται 1XTE ώστε να διατηρηθεί ο όγκος του αρχικού διαλύματος σταθερός.

Το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με τα παρακάτω διαλύματα σε ειδικά σωληνάκια τύπου Corex:

DNA	X ml
H ₂ O	7,5-x ml
5M NaCl	1.5ml
τελικός όγκος	9 ml

Στην συνέχεια προστίθεται 15 ml ισοπροπανόλης, το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται στους -30⁰C για 30 λεπτά. Φυγοκεντρείται σε 10000xg για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα επαναιωρείται σε 300 μl 1XTE σε σωληνάκι τύπου erpendorf 5414. Το DNA κατακρημνίζεται με 0.3 M NaCl και διπλάσιο όγκο 100% αιθανόλης. Το διάλυμα επωάζεται στους -30⁰C για 30 λεπτά. Αμέσως μετά ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 16000xg για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται μια φορά με 640 μl 70% αιθανόλης. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 10 λεπτά σε φυγοκεντρικό

ξηραντήρα κενού (speed vac concentrator savant svc 100h). Στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρείται σε ~300 μl H₂O. Μόλις επαναιωρηθεί υπολογίζεται η συγκέντρωση του μετρώντας την O.D. στα 260 nm και αποθηκεύεται στους -20°C.

Απαιτούμενα διαλύματα

- TRIS-HCL/glucose/EDTA/lysozyme
 TRIS-HCL 25 Mm pH=8
 Γλυκόζη (glucose) 50 Mm
 EDTA 10 Mm
 Λυσοζύμη 5mg/ml
- NaOH-SDS(100ml) (προετοιμάζεται πριν την χρήση του)
 NaOH 0.2M
 SDS 1%
- 5M/3M CH₃COOK(100ml)

CH ₃ COOK	29.4g
CH ₃ COOH glacial	11ml
H ₂ O	μέχρι (100ml)

2.2 ENZYMΙΚΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

2.2.1 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες στο δίκλωνο μόριο του DNA και πέψη της αλυσίδας του DNA σε συγκεκριμένη θέση. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι:

DNA	4 μl(0,5-1μg)
10x ρυθμιστικό διάλυμα	2 μl
Ενδονουκλεάση(2U/μl)	2 μl (4U)
10x BSA(αν απαιτείται)	2 μl
H ₂ O	10 μl
Τελικός όγκος	20 μl

Το μίγμα επωάζεται ολονύκτια στους 37°C.

2.2.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΠΡΟΕΞΕΧΟΝΤΩΝ 3' Ή 5' ΑΚΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ 'ΤΥΦΛΩΝ' ΑΚΡΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ KLENOW

ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ DNA Πολυμεράσης I

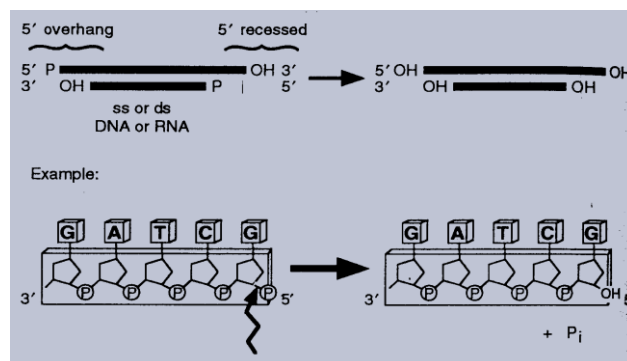
Το klenow τμήμα της DNA πολυμεράσης I προέρχεται από πρωτεολυτική σχάση της DNA πολυμεράσης I. Το μοριακό του βάρος είναι 76Kd και εμφανίζει δραστικότητα πολυμεράσης και 3'-5' εξωνουκλεάσης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι:

DNA	20 μ l (~10 μ g)
10x ρυθμιστικό διάλυμα klenow	3 μ l
2mM dNTPs	3 μ l
5U/ μ l klenow	3 μ l
H ₂ O	1 μ l
Τελικός Όγκος	30 μ l

Οι κύριες εφαρμογές του τμήματος klenow είναι αντιδράσεις απάλειψης προεξεχόντων 3' ή 5' άκρων με τη δημιουργία 'τυφλών' άκρων, σήμανση των 3' άκρων τμημάτων DNA. Το αντιδρών μίγμα παραμένει για 11 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά ακολουθεί καθαρισμός, ώστε να αποφευχθεί η δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης.

2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

Η αποφωσφορυλίωση του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιείται για να αποφευχθεί η συνένωση των άκρων του φορέα κατά την αντίδραση σύνδεσης των άκρων φορέα-ενθέματος. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό είναι η



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση αποφωσφορυλίωσης του 5'-άκρου τμήματος ss ή ds DNA ή RNA με αλκαλική φωσφατάση.

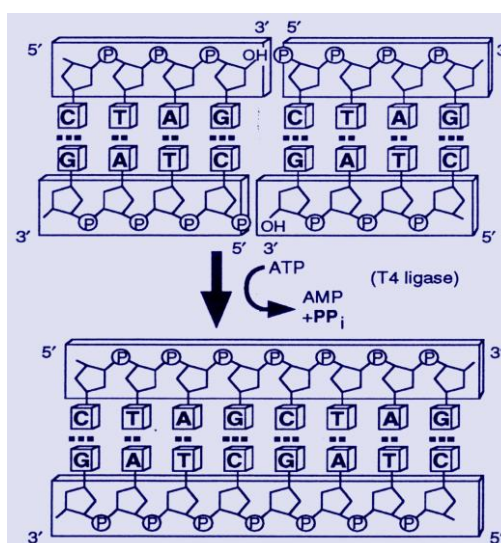
αλκαλική φωσφατάση που καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης μια φωσφορικής ομάδας από το 5'-άκρο τμημάτων DNA ή RNA (Εικόνα 3)

DNA(~4μg)	20μl
10x ρυθμιστικό διάλυμα CIAP	4 μl
20U/μl CIAP	2 μl
H ₂ O	14 μl
Τελικός Όγκος	40 μl

Το ένζυμο προστίθεται στο αντιδρών μίγμα σταδιακά. Προστίθενται κάθε φορά 0.5 μl από το διάλυμα του ενζύμου και το αντιδρών μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37⁰C. Ακολούθως προστίθενται 0.5 μl και το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά στους 56⁰C. Στη συνέχεια προστίθενται 0.5 μl και το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37⁰C. Προστίθενται ακόμα 0.5 μl και το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά στους 56⁰C. Με την διαδικασία αυτή αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

2.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΦΟΡΕΑ- ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ ΜΕ Τ4 DNA ΛΙΓΑΣΗ

Η DNA λιγάση καταλύει την αντίδραση σχηματισμού φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ 5'-φωσφορικού άκρου και 3'- υδροξυλικού άκρου. Η ενέργεια που απαιτείται για την αντίδραση προέρχεται από το ATP. Η λιγάση είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις σύνδεσης τμημάτων DNA με 'τυφλά' ή κολλώδη άκρα (Εικόνα 4). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:



Εικόνα 4: Αντίδραση σχηματισμού φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ 5'-φωσφορικού άκρου και 3'-υδροξυλικού άκρου με DNA λιγάση.

DNA φορέα (~X=50ng)	Ψ μl
DNA ενθέματος (~5Xng)	Z μl
10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	2μl
3U/μl Ta4 DNA λιγάση	1 μl
H ₂ O	20-(ψ+Z+3)μl
Τελικός Όγκος	20 μl

Η αναλογία που επιλέγεται κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του φορέα και του ενθέματος. Όταν ο φορέας έχει μεγαλύτερο μέγεθος από το ένθεμα τότε επιλέγεται η παραπάνω αναλογία, σε αντίθετη περίπτωση επιλέγεται η αντίστροφη αναλογία και όταν έχουν το ίδιο μέγεθος επιλέγεται αναλογία 1/1.

2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνει την παρασκευή πηκτής από αγαρόζη 0.9% σε 1xTBE. Στο πήγμα προστίθεται επίσης βρωμιούχο αιθίδιο (0.5μg/ml) και η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε οριζόντια συσκευή για μικρού μεγέθους πηκτές (minigel apparatus)(Biolabs).

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα 10x TBE(1L)
 TRIS-HCl 108g
 ΒΟΡΙΚΟ ΟΞΥ 55g
 EDTA 7.44g. Το pH ρυθμίζεται στο 8.0
- Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου: 10mg/ml σε d.H₂O
- Διάλυμα χρωστικής10x:
 Μπλέ της βρωμοφαινόλης, 0,4%
 Μπλέ του ξυλενίου 0,4%
 Ficoll. 25%

4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ GENECLEAN II(BIO 101)

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για καθαρισμό διαλυμάτων DNA η ζωνών DNA από πηκτή αγαρόζης και βασίζεται στην ικανότητα του DNA να προσδένεται σε εναιώρημα πορσελάνης. Η διαδικασία που ακολουθείται αρχίζει με την προσθήκη

διαλύματος NaI σε όγκο 3 φορές τον όγκο του διαλύματος. Στη συνέχεια προστίθεται εναιώρημα πορσελάνης (glassmilk) σε όγκο:

ΟΓΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ DNA ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ	ΟΓΚΟΣ GLASSMILK
500μl	<5μg	5 μl
500-1000 μl	<7.5 μg	10 μl
1ml	<12.5μg	20 μl
3ml	50 μg	100 μl

Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αναδεύοντας ήπια το μίγμα κάθε 1-2 λεπτά, ώστε το DNA να προσδεθεί στα τεμάχια πορσελάνης και αμέσως μετά το μίγμα φυγοκεντρείται για 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα. Απορρίπτεται το υπερκείμενο διάλυμα και το ίζημα εκπλένεται 3 φορές με 300 μl διαλύματος (new wash: πακέτο υλικών BIO101). Το ίζημα ξηραίνεται για 2-5 λεπτά σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτήρα κενού (speed vac concentrator savant svc 100h) και επαναιωρείται σε 20 μl dH₂O.

5 ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ NIH3T3 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΦΩΣΦΩΡΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό ενός ιζήματος που επικάθεται στην επιφάνεια της μονοστοιβάδας των κυττάρων. Το ίζημα περιλαμβάνει Ca₃(PO₄)₂ και DNA που δημιουργείται με ήπια ανάμιξη του ρυθμιστικού διαλύματος HEPES-NaCl με το διάλυμα που περιέχει CaCl₂ και DNA. Το ίζημα είναι ορατό στο μικροσκόπιο για αρκετές ώρες. Για αποτελεσματικότερη επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων το μέγεθος του ιζήματος δεν πρέπει να είναι πολύ μεγάλο, για το λόγο αυτό απαιτείται προσοχή στην ποσότητα του προς επιμόλυνση DNA, του DNA φορέα (carrier) και του pH. Η διαδικασία επιμόλυνσης αρχίζει με τη προετοιμασία της καλλιέργειας των κυττάρων NIH3T3. Συγκεκριμένα τα κύτταρα υφίστανται τρυψινοποίηση μόλις δημιουργήσουν πλήρες ταπήτιο από φλάσκα 75cm² και επανακαλλιεργούνται σε τρυβλίο 10cm. Το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με νέο 4 ώρες πριν την επιμόλυνση, ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται στη εκθετική φάση ανάπτυξης (κεφ 1). Στη συνέχεια ετοιμάζεται το μίγμα που περιέχει το προς επιμόλυνση DNA όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

DNA	2 µl (~5 µg)
DNA φορέα (Salmon Sperm DNA) (8µg/µl)	1.9 µl
0.1xTE	446µl
2.5M CaCl ₂	50 µl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	500 µl

Το διάλυμα τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου (coning) στο διάλυμα αυτό προστίθεται 2x HBS όγκου 500 µl στάγδην και υπό ανάδευση. Το διάλυμα που προκύπτει παραμένει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως προστίθεται στην καλλιέργεια υπό ήπια ανακίνηση ώστε να διαχυθεί στο θρεπτικό υλικό. Μετά από 30 λεπτά ελέγχεται στο μικροσκόπιο η καλλιέργεια για την ύπαρξη ιζημάτων. 24 ώρες αργότερα τρυψινοποιούνται και μεταφέρονται σε φλάσκα 150cm² όπου προστίθεται αντιβιοτικό επιλογής G418 (500µg/ml) για επιλογή κλώνων.

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα 2x HBS (100ml)

NaCl 280 mM

HEPES 50 mM

Na₂HPO₄ 1.5 mM

Το pH=7.12 ρυθμίζεται με 0.5N NaOH. Το διάλυμα φιλτράρεται και αποθηκεύεται στους (-20C⁰).

- Διάλυμα CaCl₂:

CaCl₂ 2.5 M

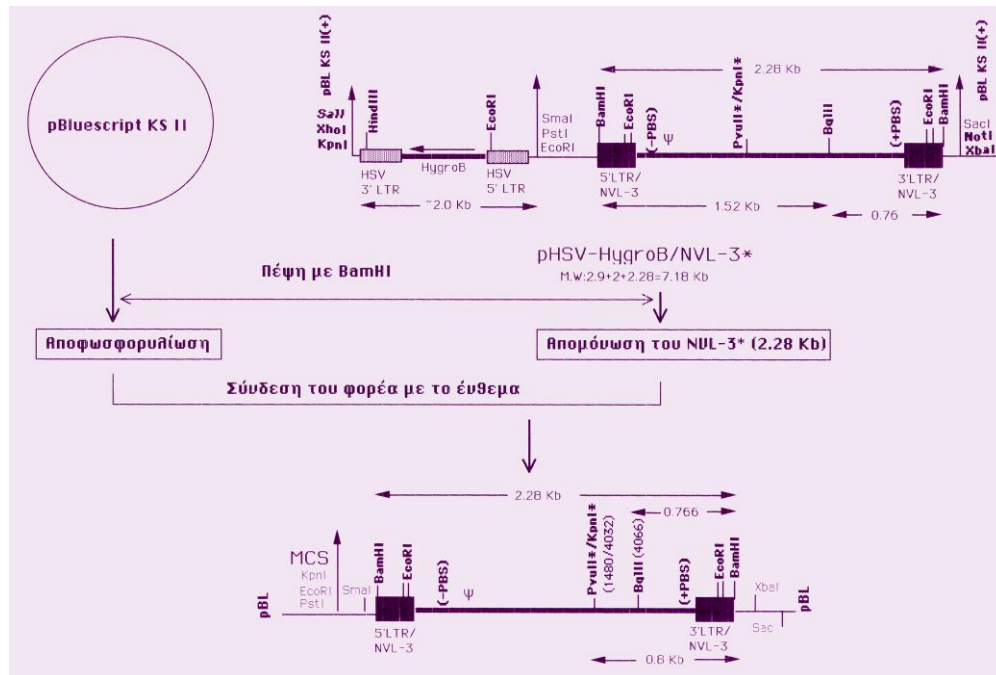
Το διάλυμα φιλτράρεται και αποθηκεύεται στους (4C⁰).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΪΟΥ NVL-3* ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ

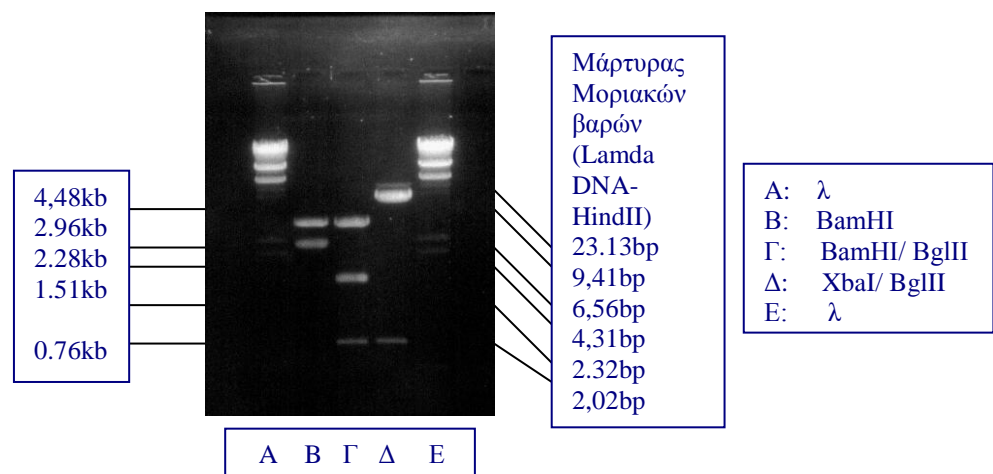
ΦΟΡΕΑ pBluescript.

Για την πραγματοποίηση της υποκλωνοποίησης επιλέχθηκε ο φορέας pBluescript KS (pBL), ο οποίος αρχικά υπέστη πέψη με το ένζυμο BamHI στην περιοχή



Εικόνα 5 : Διαγραμματική παρουσίαση της υποκλωνοποίησης του στοιχείου NVL-3* στο πλασμιδιακό φορέα pBluescript

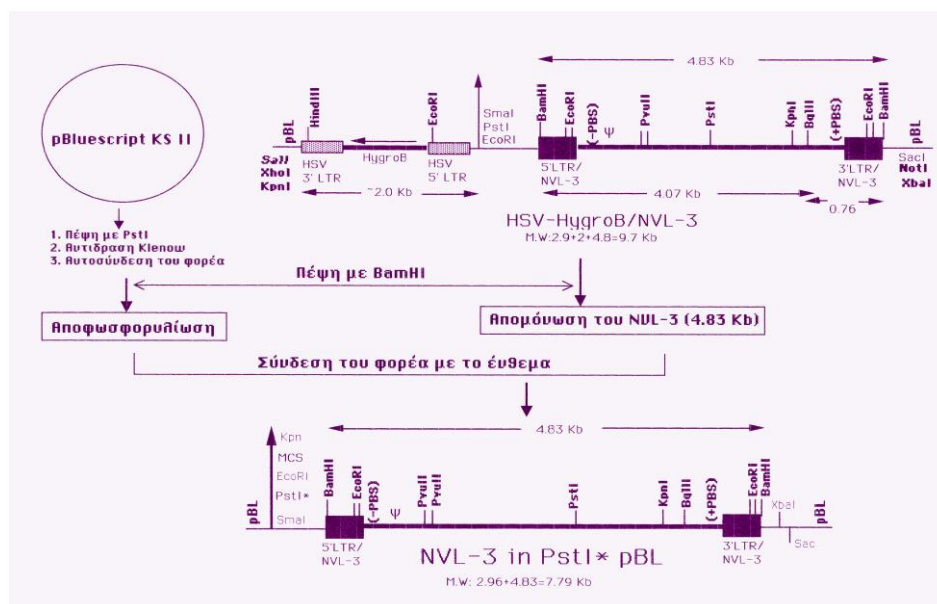
πολλαπλής κλωνοποίησης του φορέα και αποφωσφορυλίωση με το ένζυμο CIAP . Το στοιχείο NVL-3* αποτελεί ένα μικρότερου μεγέθους στοιχείο NVL-3 που δημιουργήθηκε με την αφαίρεση ενός τμήματος του NVL-3 μεταξύ των περιοριστικών θέσεων PvuII (1480) και KpnI (4032). Το στοιχείο απομονώθηκε από το πλασμίδιο HSV-HygroB/NVL-3* (7.18kb) με πέψη με το ένζυμο BamHI. Η σύνδεση φορέα pBL με το ένθεμα NVL-3* πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο T4 DNA



λιγάση (Εικόνα 5). Ακολούθησε βακτηριακός μετασχηματισμός και επιλογή κλώνων ανθεκτικών στην αμικιλίνη. Για την επιβεβαίωση της σύνδεσης του φορέα με το ένθεμα και εύρεση της κατεύθυνσης το νέο πλασμίδιο υπέστη πέψεις με τα ένζυμα BamHI, BamHI/BglII, XbaI/ BglII. Η πέψη με BamHI αποκαλύπτει τις αναμενόμενες ζώνες 2,96kb και 2,28 kb και πιστοποιεί την κλωνοποίηση του ενθέματος, όπως και η πέψη BamHI/BglII. Η πέψη με XbaI/ BglII καθορίζει την κατεύθυνση της κλωνοποίησης 4,48kb, 0,76kb όπως φαίνεται στην φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης.

2. ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ NVL-3 ΣΤΟΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pBluescript

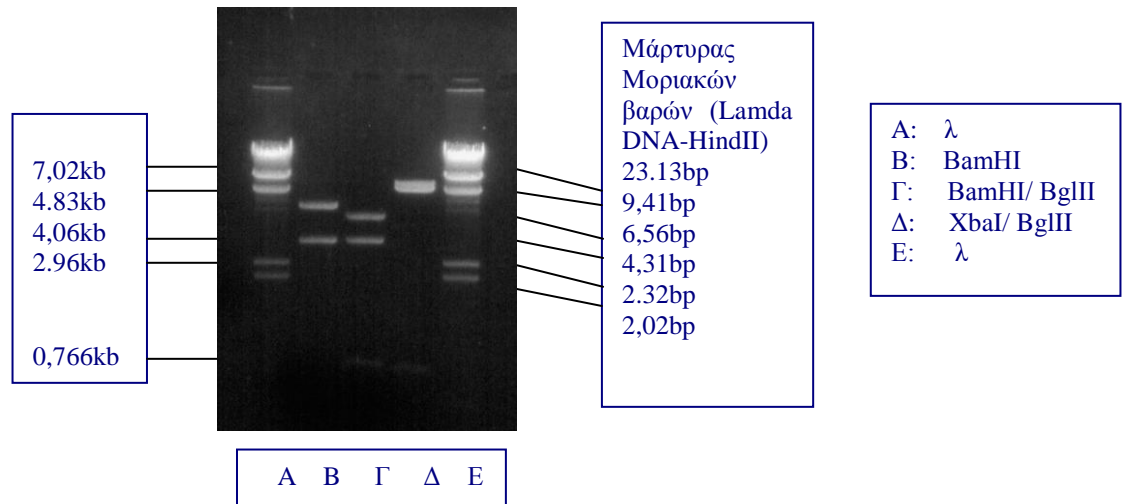
Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε στην κλωνοποίηση του στοιχείου NVL-3. Ειδικότερα ο φορέας που επιλέχθηκε είναι pBluescript KS που αρχικά υπέστη πέψη με το ένζυμο PstI, στη συνέχεια αντίδραση klenow και αντίδραση αυτοσύνδεσης με το ένζυμο T4 DNA λιγάση, ώστε να καταργηθεί η περιοριστική θέση του ενζύμου PstI. Ακολούθως ο φορέας υπέστη πέψη με το ένζυμο BamHI και αποφωσφορυλίωση με το ένζυμο CIAP. Το στοιχείο NVL-3 απομονώθηκε από το πλασμίδιο HSV-Hygro/NVL-3 (9,7kb) με πέψη με το ένζυμο BamHI. Η σύνδεση φορέα pBL με το ένθεμα NVL-3 πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο T4 DNA λιγάση (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Διαγραμματική παρουσίαση της κλωνοποίησης του στοιχείου NVL-3* στο πλασμιδιακό φορέα pBluescript

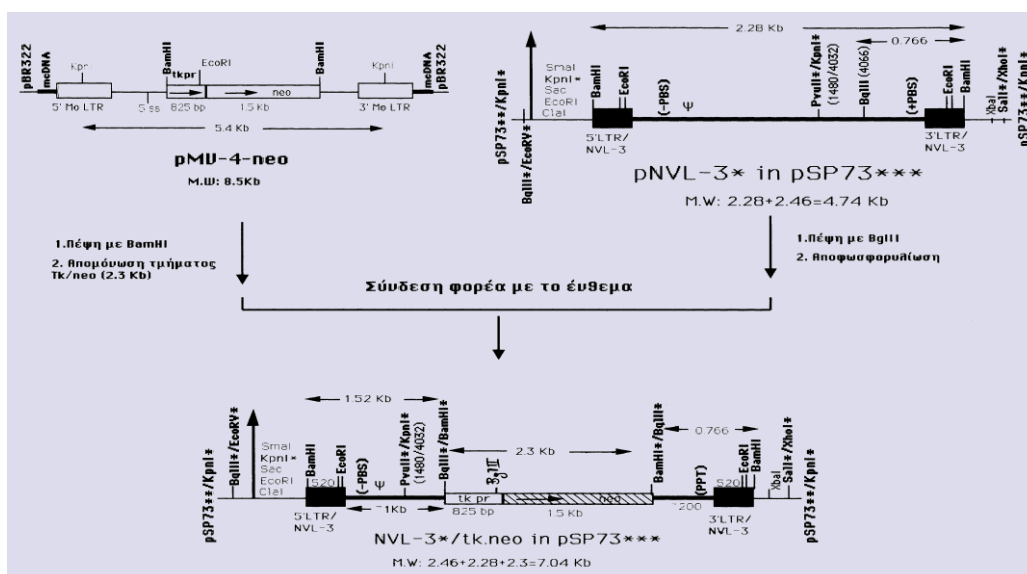
Ακολούθησε βακτηριακός μετασχηματισμός και επιλογή κλώνων ανθεκτικών στην αμικιλίνη. Για τη επιβεβαίωση της σύνδεσης φορέα με το ένθεμα και προσδιορισμό της κατεύθυνσης το πλασμίδιο (NVL-3/pBL) υπέστη πέψεις με τα ένζυμα BamHI,

BamHI /BglII, XbaI/ BglII. Η πέψη με BamHI αποκαλύπτει τις αναμενόμενες ζώνες 2,96kb και 4,03 kb και πιστοποιεί την κλωνοποίηση του ενθέματος, όπως και η πέψη BamHI/BglII. Η πέψη με XbaI/ BglII καθορίζει την κατεύθυνση της κλωνοποίηση 6,02 kb, 0,76 kb όπως φαίνεται στην φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης.



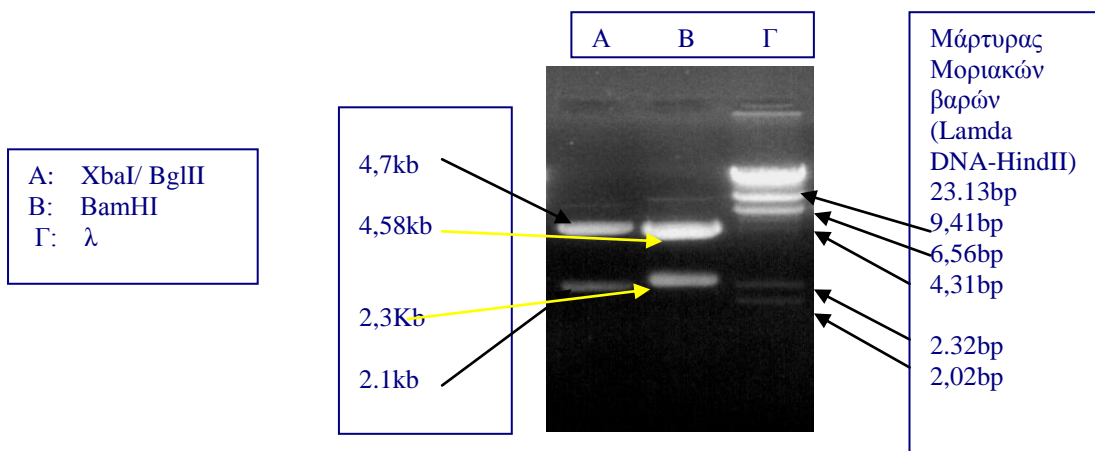
3. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΕΝΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ VL-30 (NVL-3*) ΜΕ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ neo

Για την πραγματοποίηση της υποκλωνοποίησης το πλασμίδιο που επιλέχθηκε ως φορέας του στοιχείου NVL-3* είναι το NVL-3*/pSP73*** (4.74kb). Το γονίδιο ανθεκτικότητας neo που θα κλωνοποιηθεί απομονώθηκε από το πλασμίδιο pMV-4-neo (9.7kb). Η έκφρασή του γονιδίου αναφοράς ρυθμίζεται από τον υποκινητή tk της θυμιδινικής κινάσης από τον ιό του έρπητα.. Αναλυτικότερα το πλασμίδιο NVL-3*/pSP73*** υπέστη πέψη με το ένζυμο BglII, που αναγνωρίζει μια περιοριστική



Εικόνα 7: Διαγραμματική παρουσίαση της κατασκευής του ανασυνδισμένου VL-30 (NVL3*) με το γονίδιο ανθεκτικότητας neo.

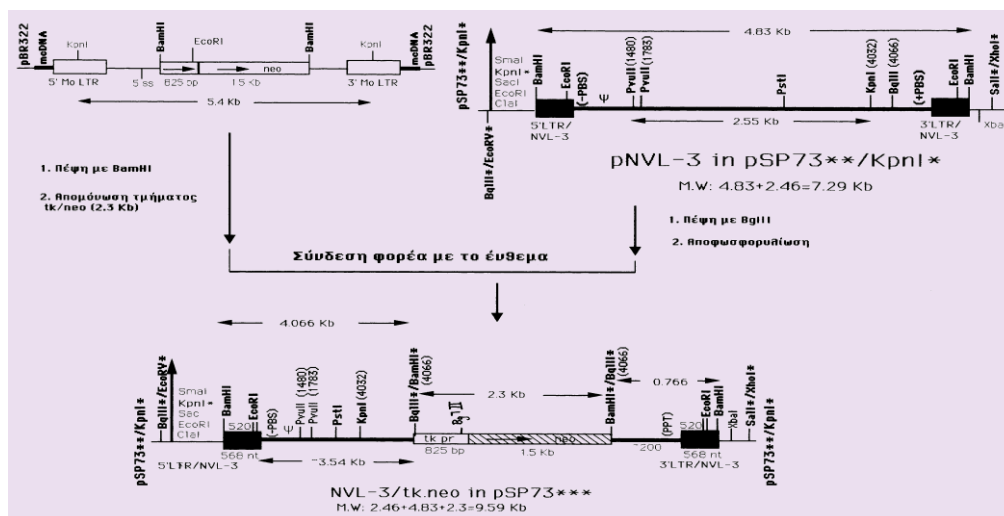
θέση στο πλασμίδιο μέσα στο στοιχείο NVL-3* στη θέση (4066). Ακολουθεί αποφωσφορυλίωση με το ένζυμο CIAP. Η απομόνωση του γονιδίου αναφοράς tk-neo 2,4kb πραγματοποιήθηκε με πέψη με το ένζυμο BamHI. Η σύνδεση φορέα με το ένθεμα tk-neo πραγματοποιήθηκε με την T4 DNA λιγάση (Εικόνα 7). Ακολούθησε βακτηριακός μετασχηματισμός και επιλογή κλώνων ανθεκτικών στην αμικικιλίνη. Για να ελεγχθεί η σύνδεση του φορέα με το ένθεμα και η σωστή κατεύθυνση το πλασμίδιο NVL-3*/tk-neo/pSP73*** υπέστη πέψεις με τα ένζυμα BamHI, XbaI/ BglIII. Η πέψη με BamHI παράγει τα τμήματα 4,58kb NVL-3*/tk-neo και 2,3kb φορέας pSP73*** και πιστοποιούν την κλωνοποίηση του ενθέματος tk-neo.



Η πέψη με XbaI/ BglIII πιστοποιεί με τα τμήματα 4,7kb και 2,1kb την κατεύθυνση της κλωνοποίησης, όπως φαίνεται στη φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης.

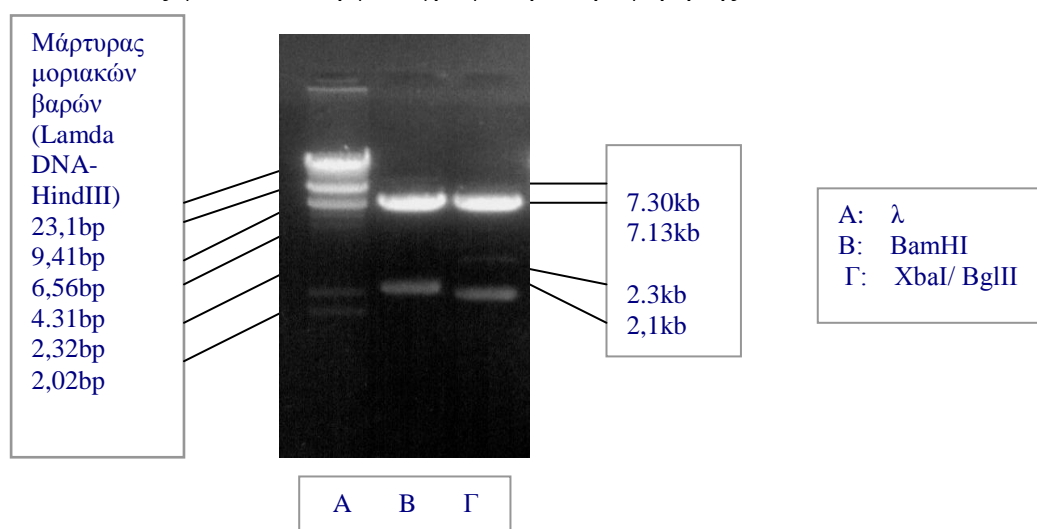
4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΕΝΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ VL-30 ΠΛΗΡΟΥΣ ΜΗΚΟΥΣ (NVL-3) ΜΕ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ neo

Η κατασκευή πραγματοποιήθηκε όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω, ως



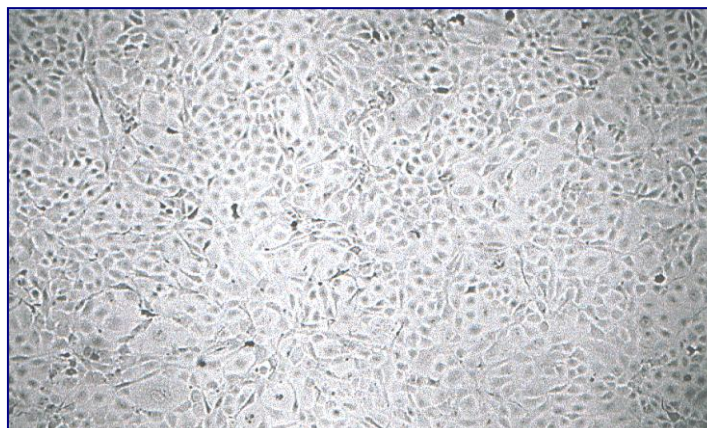
Εικόνα 8: Διαγραμματική παρουσίαση της κατασκευής του ανασυνδισμένου VL-30 (NVL-3) με το γονίδιο ανθεκτικότητας neo

φορέας του στοιχείου NVL-3 χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο NVL-3/pSP73*** 7,29kb. Το γονίδιο αναφοράς tk-neo απομονώθηκε από το πλασμίδιο pMV-4-neo 9.7kb, όπως φαίνεται στην (Εικόνα 8). Ακολούθησε βακτηριακός μετασχηματισμός και επιλογή κλώνων ανθεκτικών στην αμικικιλίνη. Για να πιστοποιηθεί η σύνδεση του φορέα με το ένθεμα και η σωστή κατεύθυνση το πλασμίδιο NVL-3/tk-neo/pSP73*** υπέστη πέψεις με τα ένζυμα BamHI, XbaI/BglII. Από την πέψη με BamHI προκύπτουν δυο τμήματα DNA με μοριακά βάρη 7,1kb και 2,3kb φορέας pSP73*** που πιστοποιούν την κλωνοποίηση του ενθέματος. Η πέψη με XbaI/BglII με μοριακά βάρη 7,3kb και 2,1kb δείχνουν την κατεύθυνση της κλωνοποίησης του ενθέματος tk-neo, όπως φαίνεται στη φωτογραφία ηλεκτροφόρησης.



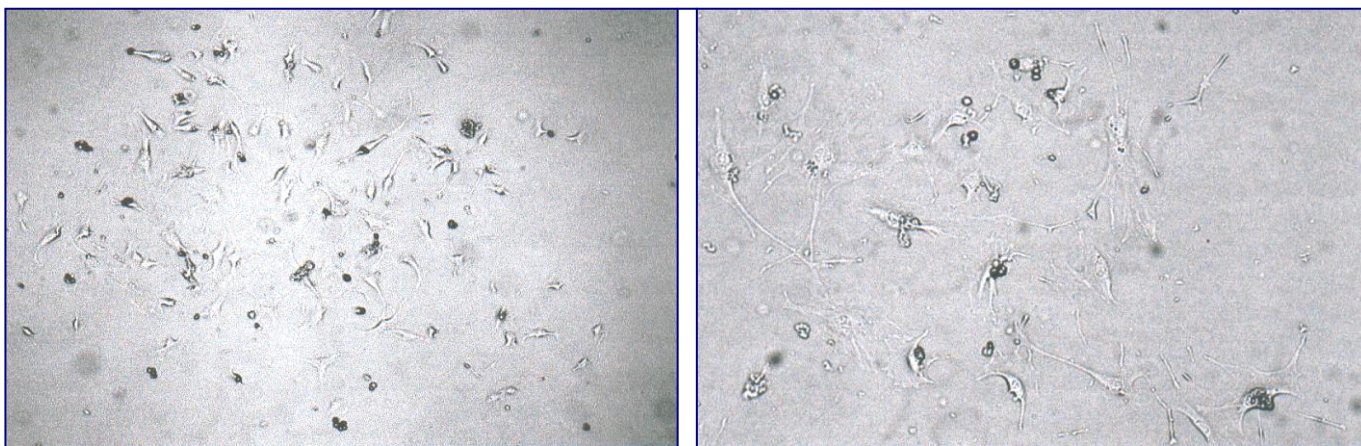
5. ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *NIH3T3* ΜΕ ΤΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ (NVL-3*/tk neo/pSP73*)**

Θελήσαμε να εισάγουμε την πλασμιδιακή κατασκευή pNVL-3*/tk neo/pSP73*** σε κύτταρα επίμυος *NIH3T3*. Κύτταρα *NIH3T3* (Εικόνα 9) εμβολιάστηκαν σε



Εικόνα 9: Κύτταρα *NIH3T3* σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% BS, FCS πριν την επιμόλυνση

τρυβλία 10cm, την επόμενη παρουσίαζαν πυκνότητα 70-80% και επιμολύνθηκαν με 20 µg της ανασυνδιασμένης κατασκευής με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου (βλέπε μεθόδους). Για την απομόνωση των θετικών κλώνων μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες επιλογής με την προσθήκη αντιβιοτικού G418 (500µg/ml) στο θρεπτικό υλικό τους. Μετά από καλλιέργεια 15 ημερών οι αποικίες που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό



Εικόνα10: Θετικές αποικίες κυττάρων *NIH3T3* σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% BS, FCS ανθεκτικές στο αντιβιοτικό G418

λόγω της ενσωμάτωσης του πλασμιδίου NVL-3*/tk neo/pSP73*** στο γένωμά τους φαίνονται στη (Εικόνα 10). Αναπτύχθηκαν συνολικά 18 αποικίες και από αυτές πέντε θετικές απομονώθηκαν με δακτυλίδια κλωνοποίησης από την καλλιέργεια (περίπου 200-250 κύτταρα), αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικό 50µg/ml, για να αναπτυχθούν γρήγορα και περίπου 2×10^6 κύτταρα αποθηκεύτηκαν στο υγρό άζωτο

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατασκευάστηκαν τέσσερα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το πλήρους μήκους στοιχείο VL-30 (NVL-3) και το αντίστοιχο ελλιπές (NVL-3*) χρησιμοποιώντας τους πλασμιδιακούς φορείς pBluescript KS, pSP73***. Στη συνέχεια σε δυο από αυτά τα πλασμίδια κλωνοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς neo που παρέχει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό νεομυκίνη (neo). Στην συνέχεια επιμολύνθηκαν κύτταρα επίμυος *NIH3T3* με την μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου με το πλασμίδιο NVL-3*/tk neo/pSP73*** και για την επιβεβαίωση της λειτουργικής ενσωμάτωσης του πλασμιδίου στο γένωμα των κυττάρων, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες επιλογής με την βοήθεια του αντιβιοτικού νεομυκίνη (neo). Αναπτύχθηκαν αποικίες και από αυτές πέντε θετικές απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν .

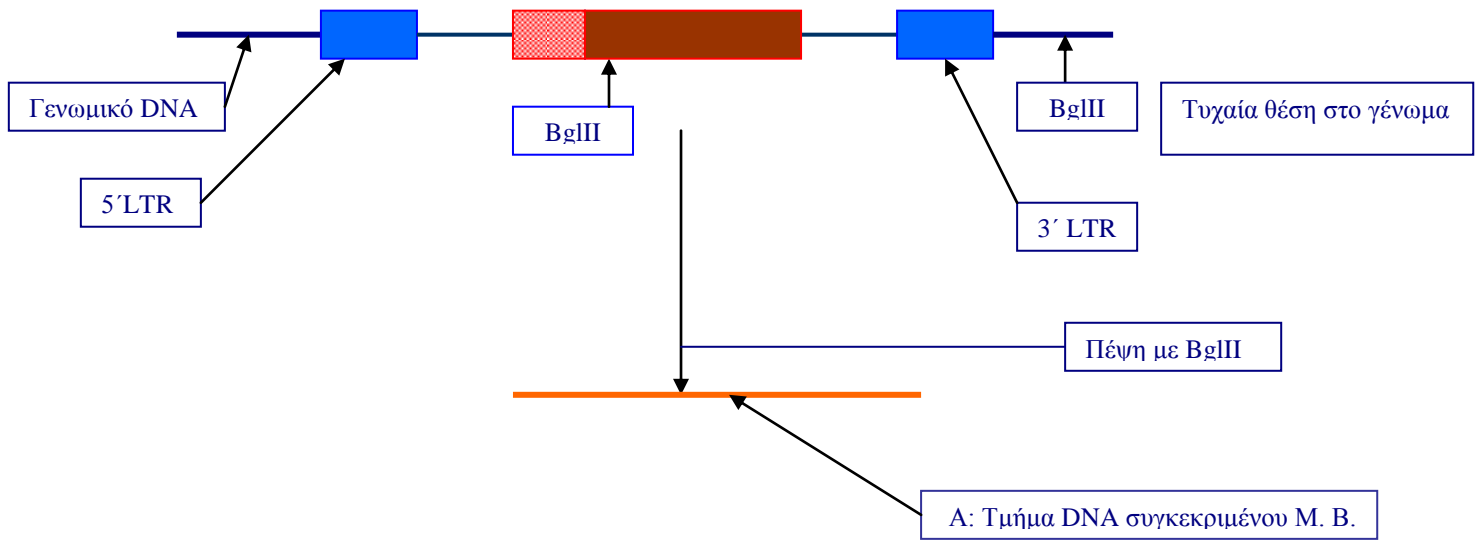
Ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η κατασκευή ανασυνδυασμένων στοιχείων VL30 με το γονίδιο (neo) με δυο κυρίως ερευνητικές εφαρμογές.

Το κύτταρο του επίμυος περιέχει 150-200 αντίγραφα της ρετρομεταθετικής οικογένειας VL30. Ορισμένα από αυτά έχουν μοριακό μήκος μικρότερο των 5 Kb και εκφράζονται σε επίπεδο RNA σε πολύ μικρότερα επίπεδα και μόνο στην περίπτωση του κυτταρικού μετασχηματισμού, όπως συμβαίνει με τον ογκογόνο ιό SV40. Επίσης ένας μεγάλος αριθμός στοιχείων VL30 φέρει σημαντικές μεταλλάξεις στα LTR που επηρεάζουν την έκφρασή τους. Αντίθετα το στοιχείο NVL-3 θεωρείται σήμερα το πλέον τυπικό και πλήρους μήκους μέλος της οικογένειας με το αναμενόμενο μοριακό μήκος μεταγραφήματος του 30S (29). Μελέτες έκφρασης των VL30, στο παρελθόν, αναφέρονται στο συνολικό περιεχόμενο των VL30 το κύτταρο του επίμυος. Τα κατασκευασθέντα ανασυνδυασμένα στοιχεία θα χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της έκφρασης με αποτύπωση κατά Northern του συγκεκριμένου ρετρομεταθετού στοιχείου NVL-3, μέσω του γονιδίου αναφοράς (neo), που θα αντικατοπτρίζει συγχρόνως την έκφραση ενός πλήρους μήκους αλλά και τυπικά λειτουργικού στοιχείου VL30.

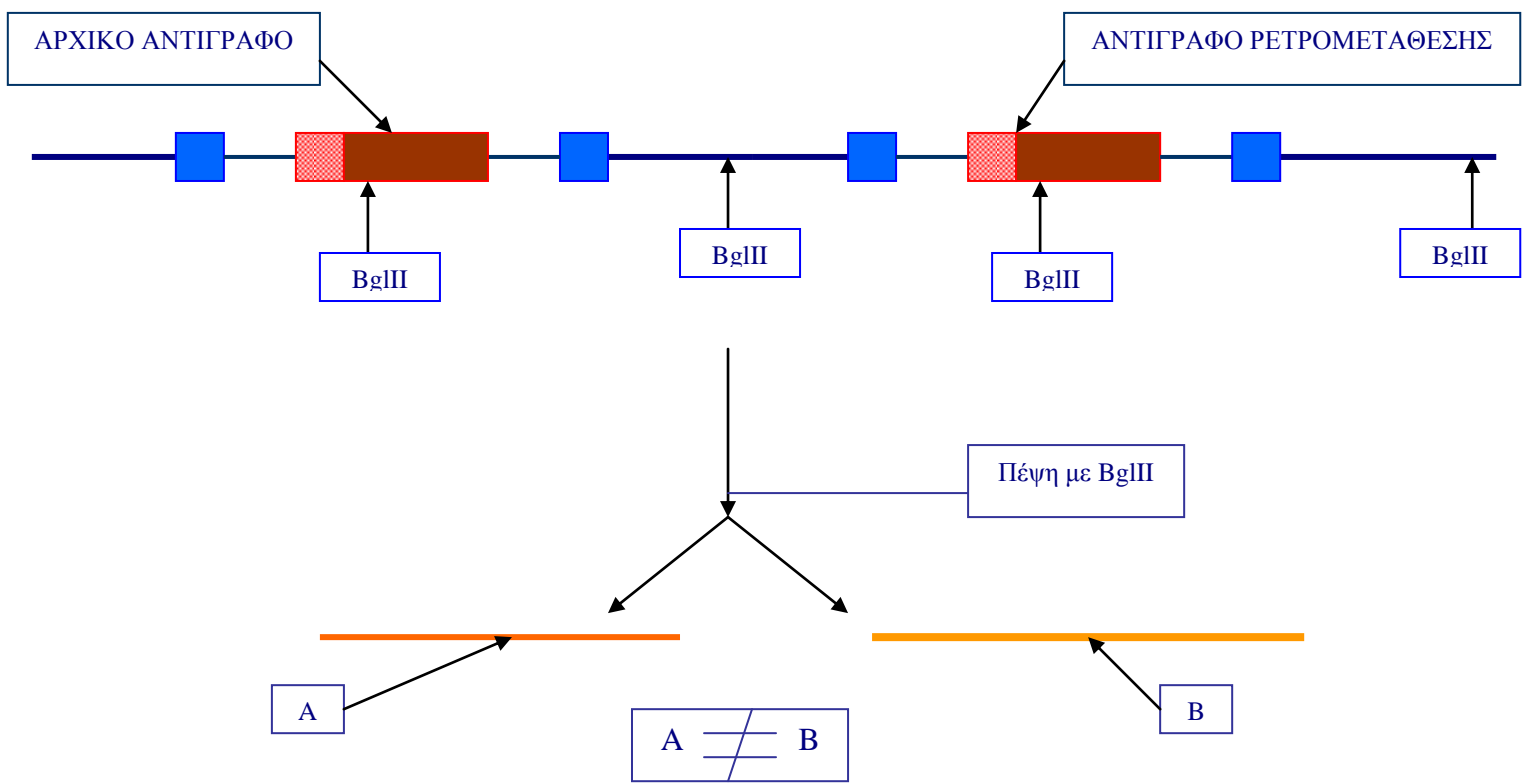
Η δεύτερη ερευνητική εφαρμογή αφορά την ανίχνευση της ρετρομετάθεσης των VL30 μέσω του γονιδίου αναφοράς (neo) με αποτύπωση κατά Southern. Συγκεκριμένα και οι δυο πλασμιδιακές κατασκευές φέρουν μια θέση περιορισμού BglIII, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ρετρομεταθέσεων.

Αναλυτικότερα, η εισαγωγή των κατασκευών στα κύτταρα επίμυος και η ανάλυση του DNA, από κλώνους που θα προκύψουν, με αποτύπωση κατά Southern θα δώσει συγκεκριμένου μοριακού βάρους δέσμη(ες) χρησιμοποιώντας ως μοριακό ανιχνευτή (probe) το γονίδιο (neo). Αν στους ίδιους κλώνους συμβούν γεγονότα ρετρομετάθεσης, μετά από τη επίδραση παραγόντων, τότε η ανάλυση κατά Southern θα ανιχνεύσει επιπρόσθετες δέσμες διαφορετικού μοριακού βάρους που θα πιστοποιούν την ύπαρξη ρετρομεταθέσεων (εικόνα 11). Η παραγωγή και ανίχνευση επιπρόσθετων δεσμών για την πιστοποίησης της ρετρομετάθεσης βασίζεται στην τυχαία ενσωμάτωση των ρετροϊικών αντιγράφων με συνέπεια η μοριακή απόσταση της θέσης BglIII στο γένωμα να ποικίλει.

1. ΔΟΜΗ VL30/neo ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ (ΧΩΡΙΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ)



2. ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης των VL30 μέσω του γονιδίου αναφοράς (neo) με αποτύπωση κατά Southern.

ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky L. S., Matsudaira P., Darnell J.(1998) Molecular Cell Biology 3rd edition:320-334. Scientific American Books.
2. Niel S.French, Norton D. J.(1997) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1352:33-47
3. T. Tzavaras, C. Kalogera, S. Eftaxia, S. Saragosti, G. Pagoulatos.(1998) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1442:186-198
4. Lower, R., Lower, J. R. (1996). *Proc .Natl.Acad.Sci. USA*.93,5177-5184
5. O. Heidmann, T. Heidmann.(1991)*Cell*, 64:159-170
6. J.D. Boeke,D.J. Garfinkel,C. A. Styles, G. R. Fink.(1985) *Cell*,40:491-500
7. Duesberg, P.H. and Scolnick, E. M.(1977)*Virology*, 83:211-216
8. Keshet, E. and Shaul, Y.(1981) *Nature*,289: 83-85
9. Hodgson, C.P.,Elder,P.K.,Ono, T., Foster, D. N. and Getz, M.J.(1983) *Mol. Cell.Biol.*,3:33-43
10. Itin, A. and Keshet, E.,(1983) *J. Virology*,47:656-659
11. Itin, A. and Keshet, E.,(1986)) *Mol. Cell.Biol.*,6:1276-1282
12. Rotman, G., Itin, A. and Keshet, E.,(1986) *Nucleic Acids Res*, 14:645-658
13. Lenormand, P.,Pribnow, D.,Rodland, K.D. and Magun, B. E.(1992) *Mol. Cell.Biol.*,12:2793-2803
14. Kuff, E.L.and Lueders, K.K.(1988)*Adv.Cancer Res*,51:183-276
15. Carter, A. T., Norton, J.D.and Avery, R.J.(1988) *Biochimica et Biophysica Acta*,951:130-138
16. Itin, A., Rotman, G. and Keshet, E.,(1983) *Virology*,127:374-384
17. S. E. Adams, P.D. Rathjen,C.A. Rathjen, C.A. Stanuay, S. M. Fulton, M. H. Malim, W. Wilson, J. Odgen, L. King,S. Kingsman, A.J. Kingsman,(1988) *Mol. Cell.Biol.*,8:2989-2998.
18. French, N. S. and Norton, J.D. (1994) *Biochimica et Biophysica Acta*,1219:484-492
19. Norton, J.D. and Hogan, B. L. M.(1988) *Dev. Biol.*,125:226-228
20. Foster, D. N., Schmidt, L.J., Hodgson, C.P., Moses, H. L. and Getz, M.J. (1982) *Proc .Natl.Acad.Sci. USA*,79:7317-7321
21. Signh, K. S. Saragosti and Botcham, M. (1985) *Mol. Cell.Biol.*,5:2590-2598
22. Park, D. J., Lim, R. W., and Kim, H. D. (1993) *Blood*, 82:77-83
23. Rodland, K.D. Pribnow, D. Lenormand, P.,Li-Ye Chen, S. and Magun, B. E (1993) *Mol. Endocrinol.*, 7:787-796
24. Harrigan, M. T., Baughman, G., Campbell, N. F.and Bourgeois, S. (1989) *Mol. Cell.Biol.*, 9:3438-3446
25. Van Lohuizen, M. and Berns, A. (1990) *Biochimica et Biophysica Acta*,1032:213-235
26. Tchenio, T. and Heidmann, T.(1991) *J. Virology*,65(4): 2113-2118
27. Tchenio, T. and Heidmann, T.(1992) *J. Virology*,66(3): 1571-1578
28. Ostertag, E.M., Eline, T., Park, L., Deberardinis, J. R., Moran, V. J. and Kazazian Jr, H. H.(2000) *Nucleic Acids Res*,28(6): 1418-1423.
29. Ioannis Georgiou, Dimitrios Noutsopoulos, Eftuxia Dimitriadou, Georgios Markopoulos, A. Apergi, L. Leandros, T. Vaxevanoglou, K. Pantos, M.Syrrou and T. Tzavaras. (2009)*Human Molecular Genetics*, vol 18(7): 1221-1228.
30. Dimitrios Noutsopoulos, G. Vartholomatos, N. Kolaitis and T. Tzavaras. (2006) *J. Moll. Biol.*361: 450-461.
31. Dimitrios Noutsopoulos, Georgios Markopoulos, M. Koliou, L. Dova, G. Vartholomatos, E. Kolettas and T. Tzavaras. (2007) *J. Moll. Biol.*374: 80-90.

32. Dimitrios Noutsopoulos, Georgios Markopoulos, G. Vartholomatos, N. Kolaitis and T. Tzavaras (2010) *Cell Research*, 20:553-562.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΑΓΟΠΥΡΗΝΩΣΗΣ *inaZ* ΣΤΟ
ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ ΤΟΥ ΑΛΟΦΙΛΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *H.MERIDIANA* ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ
ΤΗΣ ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΘΕΣΗΣ**



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**ΔΡΑΪΝΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

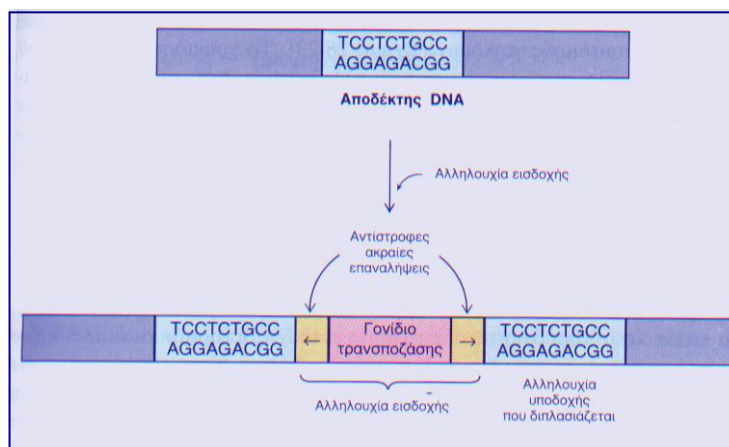
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΓΕΝΙΚΑ

Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι το κύριο βιολογικό υλικό στις περισσότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η ραγδαία όμως ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια κατέστησε επιτακτική την ανάγκη δημιουργίας τροποποιημένων προκαρυωτικών οργανισμών τόσο για τους σκοπούς της βασικής έρευνας, όσο και για αξιοποίηση τους στην βιομηχανία. Τα βιοχημικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι κυρίως κινητά γενετικά στοιχεία όπως είναι τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια, αλλά και οι φάγοι.

2. ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ

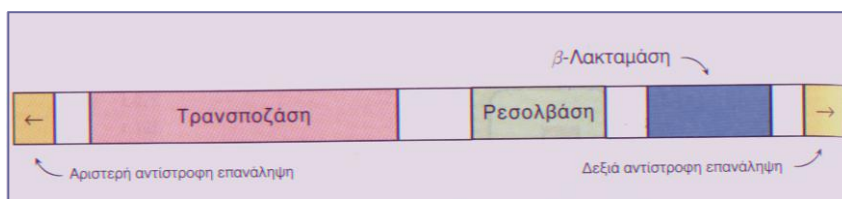
Εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία έχουν αποδειχθεί τα τρανσποζόνια κυρίως λόγω των εφαρμογών τους στην αναγνώριση γονιδίων, στο χαρακτηρισμό οπερόνιων, στην ανάλυση μεταγραφικών και μεταφραστικών ρυθμιστικών μηχανισμών(2,3). Οι εφαρμογές τους βασίζονται στην ικανότητά τους να μετακινούνται από μία θέση στο βακτηριακό χρωμόσωμα σε μία άλλη. Οι ερευνητές ονόμασαν το φαινόμενο αυτό μετάθεση και τα τρανσποζόνια μεταθετά στοιχεία. Διαπιστώθηκε επιπλέον ότι τα τρανσποζόνια είναι δυνατό να καταστήσουν τα γονίδια ικανά να μετακινούνται μεταξύ μη ομόλογων θέσεων στο DNA, αφού για την διαδικασία της μετάθεσης δεν απαιτείται εκτεταμένη ομολογία νουκλεοτιδικών αλληλουχιών(1,2). Τα απλούστερα



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση μετάθεσης αλληλουχίας εισδοχής που οδηγεί σε διπλασιασμό του αποδέκτη DNA (Stryer 2^η Έκδοση, Κεφ. 28)

τρανσποζόνια είναι οι αλληλουχίες εισδοχής (IS- insertion sequence) με μήκος περίπου 1Kb που συνήθως κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη την τρανσποζάση, ενώ υπάρχουν αλληλουχίες εισδοχής με μια ακόμη πρωτεΐνη αναγκαία για την κινητικότητά τους. Στα άκρα τους υπάρχουν αντίστροφες ακραίες επαναλήψεις 20 ζευγών βάσεων που βοηθούν στην δέσμευση της τρανσποζάσης κατά τη μετάθεση.

Η τρανσποζάση είναι εξειδικευμένη νουκλεάση που κατά την μετάθεση προκαλεί κοψίματα τόσο στο μόριο όσο και στην θέση υποδοχής. Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας σημαντικό ρόλο παίζουν η DNA πολυμεράση I και DNA λιγάση. Μετά από μελέτες διαπιστώθηκε ότι η θέση υποδοχής του τρανσποζόνιου διπλασιάζεται κατά την μετάθεση και βρίσκεται εκατέρωθεν του τρανσποζόνιου στο χρωμόσωμα (Εικόνα 1), επιπλέον η διπλασιασμένη θέση υποδοχής δεν έχει διάταξη αντίστροφης επανάληψης ούτε παρουσιάζει ομολογία με τις αντίστροφες ακραίες επαναλήψεις των IS(1,2). Εκτός από τις σειρές εισδοχής στο βακτηριακό χρωμόσωμα απαντώνται πιο σύνθετα τρανσποζόνια που περιέχουν γονίδια τα οποία συμμετέχουν και σε άλλες δράσεις εκτός της μετάθεσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα σύνθετου τρανσποζόνιου είναι το Tn3(2,4), που δομικά εμφανίζει την ίδια διάταξη με τις IS και ακολουθεί το ίδιο μοντέλο μετάθεσης. Επιπλέον περιλαμβάνει εκτός από το γονίδιο της τρανσποζάσης, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση το οποίο παρέχει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη και το γονίδιο της ρεσολβάσης που καταλύει το γενετικό ανασυνδυασμό μεταξύ δυο IS (Εικόνα 2).



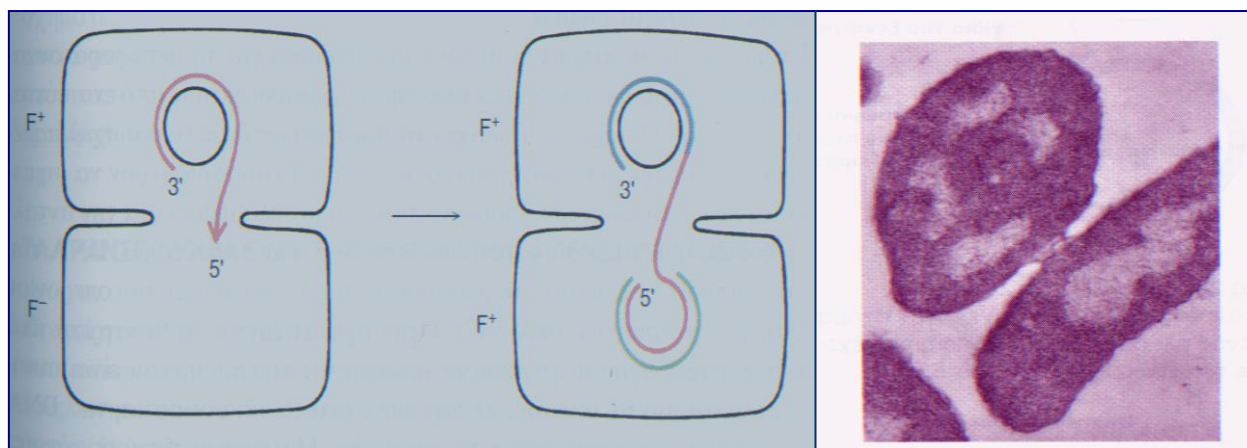
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του σύνθετου τρανσποζόνιου Tn3 που αποτελείται από γονίδια που κωδικοποιούν τρεις πρωτεΐνες (Strayer 2^η Έκδοση, Κεφ. 28)

Η μετάθεση συμβαίνει στα βακτήρια με μια συχνότητα της τάξης 10^{-6} ανά γενεά, ενώ το βακτηριακό χρωμόσωμα περιέχει πολλαπλά αντίγραφα μερικών σειρών εισδοχής, γεγονός που αναδεικνύει την δυναμική του βακτηριακού χρωμοσώματος. Μελέτες αποκάλυψαν τις δράσεις των μεταθετών γενετικών στοιχείων στο χρωμόσωμα ενός βακτηρίου που έχουν σχέση κυρίως τόσο με την επίδραση στην λειτουργικότητα των γονιδίων όσο και στην δομή του χρωμοσώματος. Η μετάθεση ενός στοιχείου IS είναι δυνατό να απενεργοποιήσει ένα γονίδιο αν συμβεί στο κωδικοποιούσα περιοχή ή να αυξήσει την έκφραση του αν η θέση υποδοχής του μεταθετού στοιχείου βρίσκεται κοντά σε κάποιο γονίδιο, αφού κάθε σειρά εισδοχής φέρει το δικό της εκκινήτη για την μεταγραφή του γονιδίου της τρανσποζάσης. Επιπλέον είναι δυνατό οι σειρές εισδοχής να προκαλέσουν ελλείμματα, αναστροφές και διπλασιασμό γονιδίων κυρίως μέσω της διαδικασίας του γενετικού ανασυνδυασμού(5,6,7).

Προκειμένου τα τρανσποζόνια να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για την γενετική 'βελτίωση' των βακτηρίων ήταν αναγκαίο να καθοριστεί ο τρόπος παράδοσης τους στο κύτταρο στόχος. Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον σκοπό αυτό είναι η μεταγωγή με τη βοήθεια φάγων και η βακτηριακή σύζευξη με τη βοήθεια κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων(8,9).

3.ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΣΥΖΕΥΞΗ

Το φαινόμενο της βακτηριακής σύζευξης ανακαλύφθηκε το 1946 και μετά από μελέτες αποδείχθηκε ότι ένα πλασμίδιο ο παράγων F είναι υπεύθυνος για την διεξαγωγή και ολοκλήρωσή της. Ειδικότερα βακτήρια που φέρουν τέτοιους παράγοντες συζευκτικούς(γενετικός δότης) είναι δυνατό να μεταφέρουν το πλασμίδιο αυτό μονόδρομα σε ένα άλλο βακτηριακό κύτταρο (γενετικός δέκτης). Αυτό επιτυγχάνεται με την προσέγγιση των δυο κυττάρων που πραγματοποιείται με τη βοήθεια φυλετικών τριχιδίων από το κύτταρο δότη και κατάλληλων υποδοχέων στο κύτταρο δέκτη. Στη συνέχεια το πλασμίδιο F υφίσταται πέψη από κατάλληλη νουκλεάση με αποτέλεσμα το ξεδίπλωμα της αλυσίδας του DNA, το 5' άκρο της κομμένης αλυσίδας εισέρχεται στο κύτταρο δέκτη σχηματίζοντας ένα κλειστό δίκλωνο μόριο(1) (Εικόνα 3, 4).



Εικόνα Σφάλμα! Άγνωστη παράμετρος αλλαγής.: Μοντέλο μεταφοράς αλυσίδων DNA από το κύτταρο δότη F⁺ στο κύτταρο δέκτη F⁻ κατά τη βακτηριακή σύζευξη. Ηλεκτρονιομικροκρογραφία κυττάρων E. coli σε επαφή κατά τη σύζευξη (Stryer 2^η Έκδοση, Κεφ. 28)

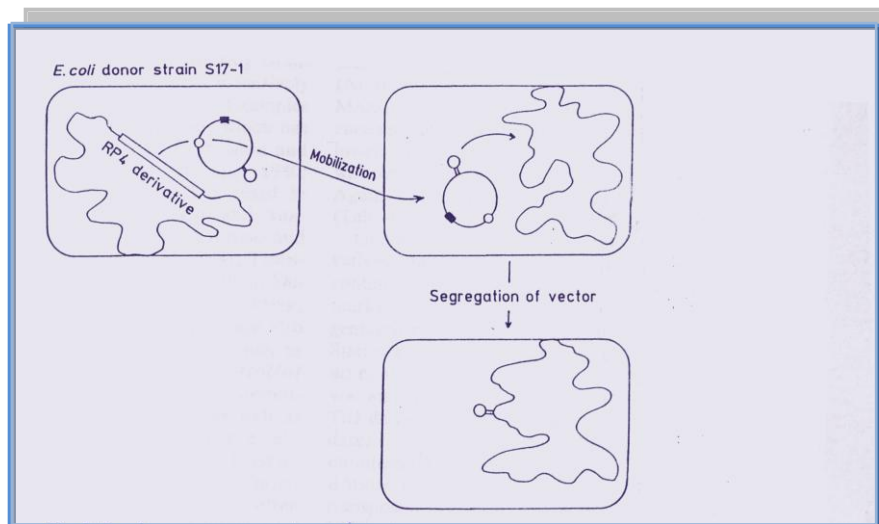
Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη και άλλων κινητικών στοιχείων, όπως είναι τα κινητοποιήσιμα πλασμίδια και τα συζευκτικά τρανσποζόνια(11), επιπλέον φώτισαν ορισμένα σημεία του μηχανισμού της σύζευξης(10). Το πλασμίδιο F για την διαδικασία της σύζευξης φέρει μια ομάδα γονιδίων που ονομάζονται tra γονίδια (5) κατά αντιστοιχία τα κινητοποιήσιμα πλασμίδια φέρουν ένα περιορισμένο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στην σύζευξη και ονομάζονται (mob)(6). Τα

κινητοποιήσιμα πλασμίδια απαιτούν για την υλοποίηση της σύζευξης την ύπαρξη ενός συζευκτικού πλασμιδίου για να παρέχει όλες τις αναγκαίες λειτουργίες που δεν κωδικοποιούν τα γονίδια (mob)(12-15). Το γενικό μοντέλο της σύζευξης περιλαμβάνει αρχικά το άνοιγμα της αλυσίδας του πλασμιδίου στη θέση (nic) της περιοχής (oriT)(16). Το άνοιγμα επιτυγχάνεται με τη δράση ενός συμπλόκου DNA-πρωτεΐνης που ονομάζεται ρηλαξόσωμα(17,18). Πρόκειται για ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα που στην περίπτωση του πλασμιδίου F αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια (tra)(19,20). Η σύνδεση του συμπλόκου με την περιοχή (oriT) πραγματοποιείται σταδιακά, πρώτα συνδέονται οι βοηθητικές πρωτεΐνες που καθοδηγούν την σύνδεση της ρηλαξάσης στην περιοχή (oriT) ολοκληρώνοντας την συγκρότηση του συμπλέγματος(21). Η συγκρότηση του συμπλέγματος στην περιοχή αυτή δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για να δράσει η ρηλαξάση πραγματοποιώντας την πέψη της αλυσίδας του DNA δημιουργώντας ένα (3'-OH) άκρο ελεύθερο και ένα (5'-P) άκρο προστατευμένο από την ρηλαξάση του συμπλέγματος(22). Στη συνέχεια πραγματοποιείται το ξεδίπλωμα της αλυσίδας του DNA για να δημιουργηθεί η μονή αλυσίδα που θα μεταφερθεί στο κύτταρο δέκτη και πραγματοποιείται από μια πρωτεΐνη του ρηλαξοσώματος με ενεργότητα ελικάσης και ΑΤΡασης(23). Η μονή αλυσίδα του πλασμιδίου μεταφέρεται στο κύτταρο δέκτη με προσανατολισμό 5' προς 3' σύμφωνα με το μηχανισμό αντιγραφικού κυλιόμενου κύκλου, όπου με τη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση III (16) παράγεται η μεταφερόμενη αλυσίδα στο κύτταρο δότη και η συμπληρωματική της αλυσίδα που μεταφέρθηκε στο κύτταρο δέκτη(24). Η μεταφορά πραγματοποιείται με την αλληλεπίδραση της μονής αλυσίδας του DNA με τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στην εσωτερική και εξωτερική πλευρά τη μεμβράνης και συγκροτούν το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ονομάζεται πυλίνη που φέρνει σε επαφή το δότη και τον δέκτη(25). Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την σύνδεση των άκρων της αλυσίδα του DNA στο κύτταρο δέκτη με τη δράση της ρηλαξάσης που είναι συνδεδεμένη με το (5'-P) άκρο. Ο τερματισμός της σύζευξης πιστεύεται ότι ρυθμίζεται από ένα τμήμα της περιοχής (oriT) πλησίον του σημείου (nic)(26).

4. ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ

Η άμεση εφαρμογή των τρανσποζονίων στην γενετική μηχανική έγινε εφικτή με την διαδικασία της τρανσποζονιακής μεταλλαξιγένεσης. Η μέθοδος αυτή υλοποιείται με τη χρησιμοποίηση δυο βασικών μεθοδολογιών. Της μεθοδολογίας της έμμεσης μεταλλαξιγένεσης(fragment-specific) που αφορά την μελέτη και απομόνωση

τρανσποζονιακών θέσεων εισδοχής σε ένα γονίδιο ή σε μια περιοχή του χρωμοσώματος του βακτηρίου. Για το σκοπό αυτό η περιοχή ή το γονίδιο κλωνοποιούνται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα που στη συνέχεια εισάγεται σε στέλεχος *E.coli* που έχει χρωμοσωμική θέση εισδοχής. Το τρανσποζόνιο εισάγεται στο *E.coli* είτε με μόλυνση με φάγο είτε με βακτηριακή σύζευξη. Οι φορείς μεταφοράς του τρανσποζόνιου επιλέγεται να μην είναι σταθεροί ώστε να συμβεί τρανσποζονίωση και να είναι δυνατή η απομόνωση θετικών κλώνων στο δείκτη επιλογής του τρανσποζόνιου. Για να εξεταστεί η τρανσποζονίωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα, ο φορέας μεταφέρεται σε ένα άλλο στέλεχος *E.coli* με βακτηριακή σύζευξη και απομονώνονται θετικοί κλώνοι στους δείκτες επιλογής του πλασμιδίου και του τρανσποζόνιου(27). Και της μεθοδολογίας της άμεσης τρανσποζονιακής μεταλλαξιγένεσης(γενική ή τυχαία) όπου το τρανσποζόνιο εισάγεται στο χρωμόσωμα ενός Gram-αρνητικού βακτηρίου και μελετώνται οι θέσεις



Εικόνα 4: Τυχαία τρανσποζονιακή μεταλλαξιγένεση ενός Gram-αρνητικού βακτηρίου. Φορέας του τρανσποζόνιου είναι ο pSUP που κινητοποιείται από το E. Coli S17-1 στέλεχος δότη στο Gram-αρνητικό βακτήριο (28).

ενσωμάτωσης του τρανσποζόνιου στο βακτηριακό χρωμόσωμα βοηθώντας στον εντοπισμό γονιδίων. Οι φορείς που χρησιμοποιούνται για την μεταφορά του τρανσποζόνιου ανήκουν στην οικογένεια των κινητοποιήσιμων πλασμιδίων IncP(pSUP) που για την πραγματοποίηση της σύζευξης απαιτούν την ύπαρξη του πλασμιδίου pRK2013. Η τρανσποζονίωση συμβαίνει επειδή ο πλασμιδιακό φορέας του τρανσποζόνιου δεν είναι δυνατό να αντιγραφεί στο νέο βακτηριακό φορέα και αποβάλλεται μέσω χωρισμού και οι θετικοί κλώνοι επιλέγονται σε συνθήκες επιλογής του δείκτη του τρανσποζόνιου(28).

Σκοπός της εργασίας είναι η εισαγωγή του γονιδίου παγοπυρήνωσης (*inaZ*) στο χρωμόσωμα του μέτρια αλόφιλου βακτήριου *H. Meridiana*. Για να μελετηθεί με τη βοήθεια της τρανσποζονιακής μεταλλαξιγένεσης για να μελετηθεί, αφενός η έκφραση ενός αντιγράφου του γονιδίου (*inaZ*) υπό τον έλεγχο διαφορετικών εκκινητών, αφετέρου να δημιουργηθεί ένα σύστημα κατάλληλο για την ανίχνευση και απομόνωση εκκινητών που επάγονται σε αλόφιλο περιβάλλον.

B. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ**1.ΥΛΙΚΑ**

- Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία είναι:

A/A	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
1	<i>E. coli/DH5a</i>	F ⁻ , φ80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rk ⁻ mk ⁻), supE44, relA1, deoR, D(lacZYA-argF) U169
2	<i>Halomonas meridiana/DSM5425</i>	ΆΓΡΙΟΣ ΤΥΠΟΣ

- Τα ανασυνδασμένα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

A/A	ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ(Kbp)	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ
1	pSUP102-GmTn1732	14,71	Cm ^r , Gm ^r , Km ^r , OriT, mob
2	pRK2013	4,80	Km ^r , tra ⁺
3	pSUP102-GmTn1732/PstI-Pbla-inaZ/EcoRI	19,4	Cm ^r , Gm ^r , Km ^r , OriT, mob, ice
4	pSUP102-GmTn1732/PstI-Ppdc-inaZ/EcoRI	18,53	Cm ^r , Gm ^r , Km ^r , OriT, mob, ice
5	pSUP102-GmTn1732/HpaI-inaZ/EcoRI	18,41	Cm ^r , Gm ^r , Km ^r , OriT, mob, ice

- Θρεπτικά υλικά

1. Luria-Broth(L.B.) για το *E. coli*

A/A	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	W/V
1	NaCl	1%
2	Yeast-extract	0,5%
3	Bacto-tryptone	1%

Μετά την ανάμιξη των παραπάνω συστατικών ρυθμίζεται το pH=7,5 με διάλυμα 1N NaOH και πριν χρησιμοποιηθεί σε υγρή καλλιέργεια αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο. Για την παρασκευή τρυβλίων προστίθεται 2% άγαρ και το μίγμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

2. SW30 για αλόφιλα βακτήρια (*Halomonas meridiana*)

A/A	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	g/l
1	NaCl	234
2	MgCl ₂ 6H ₂ O(*)	39
3	MgSO ₄ 7 H ₂ O	61
4	CaCl ₂ (*)	1
5	KCl	6
6	NaHCO ₃	0,2

(*)Σημείωση: Τα αντιδραστήρια αυτά ζυγίζονται και διαλυτοποιούνται ξεχωριστά και προστίθενται τελευταία πριν τη τελική ρύθμιση του όγκου (1lt).

Το SW30 φιλτράρεται με ειδική διάταξη χρησιμοποιώντας φίλτρο (Gelman science) διαμέτρου πόρων (0,45μm) και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο. Για την παρασκευή διαλυμάτων το SW30 αραιώνεται με d H₂O σε SW2 (2% v/v), σε SW10 (10% v/v), προστίθεται Yeast-extract (0,5%), ρυθμίζεται το pH=7,2 με διάλυμα 1N NaOH και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο. Για την προετοιμασία τρυβλίων SW2 προστίθεται επιπλέον 2% άγαρ και το μίγμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο.

- Αντιβιοτικά

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιβιοτικά:

A/A	ANTIBIOTIKO	<i>E. coli</i> (μg/ml)	<i>H. Elongata</i> (μg/ml)
1	Αμπικιλίνη(Amp)	100	100
2	Καναμυκίνη(km)	50	50
3	ΡΙφαμπικίνη(Rif)	20	20
4	Χλωραμφαινικόλη(cm)	20	20

Τα υδατικά διαλύματα των αντιβιοτικών αμπικιλίνη, καναμυκίνη αποστειρώνονται με φιλτράρισμα χρησιμοποιώντας φίλτρο διαμέτρου πόρων (0,45 μm), ενώ τα αιθανολικά διαλύματα των αντιβιοτικών ριφαμπικίνης και χλωραμφαινικόλης δεν φιλτράρονται. Τα διαλύματα αποθηκεύονται στους (-20⁰C).

- Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για παρασκευή των διαλυμάτων ήταν των εταιριών Merck, Sigma
- Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Amersham Life Sciences

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χειρισμός βακτηριακών καλλιέργειών

2.1.1 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

Για την καλλιέργεια των στελεχών *E.coli* και του αλόφιλου *H. meridiana* ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Αρχικά τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία θρεπτικού υλικού L-broth για τα στελέχη *E. coli* με (km) και SW2 για το αλόφιλο, που εμβολιάστηκαν από δείγμα φύλαξης στους -80°C . Επωάζονται στους 37°C ολονυκτίως για να αναπτυχθούν πλήρως. Οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται στους 4°C για 3 μήνες και ανανεώνεται η καλλιέργεια κάθε μήνα. Για την υγρή καλλιέργεια των στελεχών εμβολιάζεται το ανάλογο υγρό θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικό με μονή αποικία από την αντίστοιχη στερεή καλλιέργεια και επωάζεται ολονυκτίως σε τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C .

2.1.2 Αποθήκευση στελεχών

Για την διατήρηση των στελεχών για μεγάλο χρονικό διάστημα τα βακτηριακά στελέχη αποθηκεύονται στους -80°C χρησιμοποιώντας διάλυμα γλυκερόλης 100%.

2.1.3 Βακτηριακή σύζευξη- Μετάθεση

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των συζευκτικών και κινητοποιήσιμων πλασμιδίων να μεταφέρονται από το κύτταρο δότη που φέρει το πλασμίδιο σε ένα κύτταρο δέκτη. Η διαδικασία ενεργοποιείται όταν το κύτταρο δότης έρθει κοντά με το κύτταρο δέκτη. Για να συμβεί αυτό τα κύτταρα δότη και δέκτη διηθούνται με τη βοήθεια ειδικής διάταξης σε φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,20 μm και αφήνονται να αναπτυχθούν σε τρυβλίο ολονυκτίως. Αναλυτικότερα καλλιέργειες 30 ml (L-broth) *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και το βοηθητικό πλασμίδιο pRK2013 σε αντιβιοτικό (Km) και του αλόφιλου *H. meridiana* (SW2) αναπτύσσονται ολονύκτια σε τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C . Μετράται η οπτική πυκνότητα κάθε καλλιέργειας ώστε να μην ξεπερνάει την τιμή (O.D=0,5). Ακολούθως 200 μl από κάθε καλλιέργεια (*H. meridiana/ E. coli*-pRK2013/*E. coli*-ανασυνδυασμένο πλασμίδιο) τοποθετούνται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και φυγοκεντρούνται στις 6000 rpm για τρία λεπτά. Το ίζημα επαναιωρείται σε 1,0 ml SW2 για να απομακρυνθούν τα αντιβιοτικά και φυγοκεντρείται σε 6000 rpm για τρία λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl SW2 και με τη βοήθεια κατάλληλης

διάταξης που περιλαμβάνει ειδικό φίλτρο νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,20 μm διηθείται υπό κενό. Στην το φίλτρο τοποθετείται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό SW2 και επωάζεται ολονυκτίως στους 37⁰C σε επωαστικό κλίβανο. Μόλις τα μετασυζευγμένα κύτταρα αναπτυχθούν επαναιωρούνται σε 1,0 ml SW2, 100 μl από το κυτταρικό εναιώρημα αραιώνονται με 900μl SW1 και αναμιγνύονται καλά (1^η αραιώση). 100 μl από το νέο εναιώρημα αραιώνονται με 900 μl SW1 και αναμιγνύονται καλά (2^η αραιώση). 100 μl από κάθε αραιώση και από το αρχικό εναιώρημα καλλιεργούνται σε τρυβλία SW2 με Km (επιλογή του τρανσποζόνιου) και Rif (για επιλογή του αλόφилου στελέχους). Τα τρυβλία επωάζονται ολονυκτίως σε επωαστικό κλίβανο στους 30⁰C.

2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

(Jet quick spin column technique Genomed)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του πακέτου υλικών της Genomed. Συγκεκριμένα προετοιμάζεται βακτηριακή καλλιέργεια 3,0 ml, όπως περιγράφεται παραπάνω. 1,5 ml κυτταρικού εναιωρήματος τοποθετούνται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και φυγοκεντρώνται σε φυγόκεντρο erpendorf στις 12000 rpm για τρεις φορές. Ακολούθως το ίζημα επαναιωρείται σε 210 μl διαλύματος επαναιώρησης (G1: πακέτο υλικών Genomed) και αναδεύεται μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως. Στη συνέχεια προστίθεται 210 μl από το διάλυμα λύσης (G2: πακέτο υλικών Genomed), το εναιώρημα αναδεύεται ήπια και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για πέντε λεπτά. Αμέσως μετά προστίθεται 280 μl από το διάλυμα εξουδετέρωσης (G3: πακέτο υλικών Genomed) υπό ήπια ανάδευση και το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 12000rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA τοποθετείται σε ειδική στήλη (kit) που είναι προσαρμοσμένη σε σωληνάκι και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για ένα λεπτό. Το έκπλυμα της στήλης απορρίπτεται και στην στήλη προστίθενται 700 μl διαλύματος έκπλυσης και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για ένα λεπτό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μια ακόμη φορά και το πλασμιδιακό DNA ανακτάται από την στήλη με έκπλυση με 75 μl dH₂O σε σωληνάκι τύπου erpendorf μετά από φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για δυο λεπτά.

2.3 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA με μέθοδο Φαινόλης/χλωροφόρμιου

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να απομονωθεί χρωμοσωμικό DNA υψηλής καθαρότητας εξαιτίας της εκχύλισης του διαλύματος που περιέχει το DNA με

διάλυμα Φαινόλης/χλωροφόρμιου πριν την τελική κατακρύμνισή του. Αναλυτικότερα προετοιμάζεται βακτηριακή καλλιέργεια 11 ml, όπως περιγράφεται παραπάνω. 10 ml κυτταρικού εναιωρήματος φυγοκεντρώνται στις 12000 rpm για 20 λεπτά στους 4⁰C. Ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων σε 3ml διαλύματος Α και στην συνέχεια προστίθεται 500 μl διαλύματος Β, το διάλυμα αναδεύεται και αμέσως προστίθενται 1,2 ml διαλύματος Γ και το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται 600 μl 5%SDS και το διάλυμα αναδεύεται καλά για 10 δευτερόλεπτα. Ακολούθως προστίθεται 25 μl διαλύματος RNAase(10mg/ml) και το μίγμα επωάζεται για 1 ώρα στους 37⁰C. Στην συνέχεια προστίθεται 10 μl διαλύματος Πρωτεϊνάσης Κ(10mg/ml)) και το μίγμα επωάζεται για 1 ώρα στους 37⁰C. Ακολουθεί προσθήκη 4,5 ml φαινόλης και φυγοκέντριση για να διαχωριστούν οι φάσεις. Συλλέγεται η υδατική φάση (πάνω φάση) και επαναλαμβάνεται η διαδικασία αυτή για μια ακόμα φορά. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος μίγματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής 24:1, το μίγμα φυγοκεντρείται για να διαχωριστούν οι φάσεις και συλλέγεται η υδατική φάση. Στην εκχυλισμένη υδατική φάση προστίθενται 530μl 3M CH₃COONa pH=5,5 και 15 ml αιθανόλης. Το μίγμα ανακινείται ήπια ώστε να κατακρημνιστεί το χρωμοσωμικό DNA. Το DNA παραλαμβάνεται με γυάλινη πιπέτα pasteur, μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου erppendorf και προστίθεται 1,0 ml αιθανόλης 70%. Το διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού σε ξηραντήρα κενού(speed vac) και προστίθενται 500 μl TE(1:10) και αφήνεται ολονυκτίως να απαναιωρηθεί στους 4⁰C.

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα Α
10% Σουκρόζη
50 mM Tris pH=8,0
- Διάλυμα Β
Λυσοζύμη (10mg/ml)
250 mM Tris pH=8,0
- Διάλυμα Γ
100 mM EDTA pH=8,0

2.4. Μεταφορά DNA από πήγμα αγαρόζης σε φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης Αποτύπωση του DNA κατά Southern (Southern blotting)

2.4.1 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση χρωμοσωμικού DNA

Η πέψη του χρωμοσωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα BglII, PvuII. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει αρχικά συμπύκνωση του δείγματος του DNA όγκου 50 μl μέχρι ξηρού στον ξηραντήρα κενού(speed vac). Στη συνέχεια το DNA επαναιωρείται σε 15 μl TE₁₀ και προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

A/A	ΔΕΙΓΜΑ	ΟΓΚΟΣ(μl)
1	DNA	15
2	10x Buffer	3
3	BglII(10U/μl)	3(30U)
4	dH ₂ O	9
5	Τελικός όγκος	30

Επιπλέον επιλέγεται ως θετικός μάρτυρας το πλασμίδιο pSUP202GmTn1732 και αρνητικός μάρτυρας ένα οποιοδήποτε πλασμίδιο όπως είναι το pET3α, που υφίσταται πέψη με το ένζυμο BglII. Οι πέψεις πραγματοποιούνται ολονύκτια στους 37⁰C. Για την ηλεκτροφόρηση των πέψεων προετοιμάζεται πηκτή αγαρόζης 1% σε TBE και στα δείγματα προστίθεται 6 μl loading buffer (Κεφ. 3) στα 110 Volt.

2.4.2 Διαδικασία μεταφοράς του DNA σε φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης

Με την μέθοδο (Southern blotting) είναι δυνατή η μεταφορά τμημάτων του DNA από πηκτή αγαρόζης σε ειδικά φίλτρα όπως είναι το φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης. Η αποτύπωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια ανοδικής τριχοειδικής μεταφοράς από την πηκτή στο φίλτρο χρησιμοποιώντας διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατή η πρόσδεση του DNA στο φίλτρο και η μόνιμη ακινητοποίησή του πραγματοποιείται με την ακτινοβολία του φίλτρου με υπεριώδη ακτινοβολία στα (302 nm) για 3-4 λεπτά. Αναλυτικά η διαδικασία μεταφοράς περιλαμβάνει αρχικά την μεταφορά του πηγματος σε γυάλινο δοχείο που περιέχει ανάλογα με το μήκος του πηγματος 250-500 ml διαλύματος μετουσίωσης. Το διάλυμα αναδεύεται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά στη συνέχεια το πήγμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα εξουδετέρωσης ίδιου όγκου και αναδεύεται ήπια σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Στην συνέχεια σε γυάλινο δοχείο

συναρμολογείται η διάταξη μεταφοράς που αποτελείται από μια γυάλινη πλάκα στις διαστάσεις του πήγματος. Στην επιφάνεια της πλάκας τοποθετούνται τρία φύλλα από διηθητικό χαρτί whatman 3MM με πλάτος στις διαστάσεις του πήγματος και μήκος τέτοιο ώστε να σχηματίζουν σχήμα γέφυρας όταν τοποθετούνται στην πλάκα. Με τις άκρες τους να εφάπτονται στην βάση του δοχείου. Πριν τοποθετηθεί το πήγμα της αγαρόζης στο δοχείο προστίθεται αρκετή ποσότητα διαλύματος 10xSSC και αφήνεται να διαποτιστούν καλά τα φύλλα από χαρτί whatman. Οι φυσαλίδες από αέρα που τυχόν θα σχηματιστούν απομακρύνονται με γυάλινη ράβδο. Το πήγμα της αγαρόζης τοποθετείται πάνω στα φύλλα whatman ανεστραμένο προσεκτικά ώστε μα μην δημιουργηθούν φυσαλίδες από αέρα. Στην συνέχεια προστίθεται το φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης που είναι κατά 3 mm μεγαλύτερο, αφού πρώτα διαβραχεί σε διάλυμα 6 xSSC ενώ με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου απομακρύνονται οι φυσαλίδες του αέρα. Στην επιφάνεια του φίλτρου τοποθετούνται δυο φύλλα από χαρτί whatman 3MM στις διαστάσεις του πήγματος, αφού πρώτα διαβραχούν σε διάλυμα 6xSSC και με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου απομακρύνονται οι φυσαλίδες του αέρα. Επιπλέον στη επιφάνεια των φύλλων whatman 3MM τοποθετείται στρώμα απορροφητικού χαρτιού σε ύψος ~4cm και μια πλάκα από γυαλί καθώς επίσης και ένα βαρύ αντικείμενο ~0,5kg για να διατηρηθεί η ακεραιότητα της διάταξης. Η διαδικασία της μεταφοράς διαρκεί περίπου 20 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις ολοκληρωθεί η μεταφορά η διάταξη αποσυναρμολογείται προσεκτικά και σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις των φρεατίων στο φίλτρο, ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση των θέσεων των δειγμάτων κατά των υβριδισμό. Στη συνέχεια το φίλτρο εκπλένεται με διάλυμα 6xSSC για 5 λεπτά υπό ανάδευση και αφήνεται να στεγνώσει πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία για 4 λεπτά για να μονιμοποιηθεί η πρόσδεση του DNA με τη δημιουργία σταυροδεσμών στην επιφάνεια του φίλτρου.

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα μεταφοράς 20xSSC
 - 3 M Κιτρικό νάτριο
 - 3 M NaCl pH=7
- Διάλυμα μετουσίωσης
 - 0,5 N NaOH
 - 1,5 M NaCl

- Διάλυμα εξουδετέρωσης
1 M Tris pH=8
1,5M NaCl

2.5. Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA (Boehringer Mannheim cat. No. 1093657)

Η βασική αρχή την διαδικασίας του υβριδισμού στηρίζεται στην ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ μονόκλωνων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA ή RNA. Η έκταση της ομολογίας μεταξύ των αλυσίδων του υβριδίου καθορίζει τη σταθερότητά του και τις συνθήκες του υβριδισμού. Όταν η ομολογία είναι εκτεταμένη τότε ο υβριδισμός πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία (68⁰C) και χαμηλή συγκέντρωση αλάτων, ενώ σε αντίθετη περίπτωση επιλέγεται χαμηλή θερμοκρασία (42⁰C) και υψηλή συγκέντρωση αλάτων. Η χρησιμότητα της μεθόδου έγκειται στη δυνατότητα ανίχνευσης αλληλουχιών DNA χρησιμοποιώντας κατάλληλο ανιχνευτικό μόριο DNA (probe) μικρού μήκους σημασμένο με χρωμοφόρο ουσία (διγοξιγενίνη) ή με ραδιενεργά νουκλεοτίδια. Η διαδικασία του υβριδισμού περιλαμβάνει αρχικά την επώαση του φίλτρου σε γυάλινο κύλινδρο υβριδισμού με διάλυμα προυβριδισμού 20ml/ 100cm² σε θερμοκρασία (42⁰C) με ήπια ανακίνηση για 1-2 ώρες. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα υβριδισμού (2,5ml/100cm²) που φέρει το ανιχνευτικό μόριο (50ng/ml) μετουσιωμένο με βρασμό υδατόλουτρο για 10 λεπτά. Ο υβριδισμός πραγματοποιείται σε θερμοκρασία (42⁰C) με ήπια ανακίνηση για 20 ώρες. Στη συνέχεια το φίλτρο εκπλένεται με 50 ml διαλύματος A με ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθούν δυο πλύσεις με 50 ml διαλύματος B με ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία (42⁰C) για 20 λεπτά. Το φίλτρο είναι δυνατό να εμφανιστεί αμέσως ή αφού στεγνώσει να αποθηκευτεί και η εμφάνισή του να πραγματοποιηθεί αργότερα.

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα προυβριδισμού/υβριδισμού
SSC 5x
N-lauroylsarcosine 0,1%(w/v)
SDS 0,02%(w/v)
Αντιδραστήριο Blocking 1%

Για την παρασκευή του διαλύματος είναι αναγκαία η θέρμανσή του στους 50-70⁰c για μια ώρα μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως το αντιδραστήριο blocking. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -24⁰c . Το διάλυμα υβριδισμού παρασκευάζεται με την διάλυση του σημασμένου ανιχνευτικού μορίου DNA σε ορισμένο όγκο διαλύματος

προυβριδισμού και μετά των υβριδισμό φυλάσσεται, αφού είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί 5-8 φορές. Αποθηκεύεται στους -24°C .

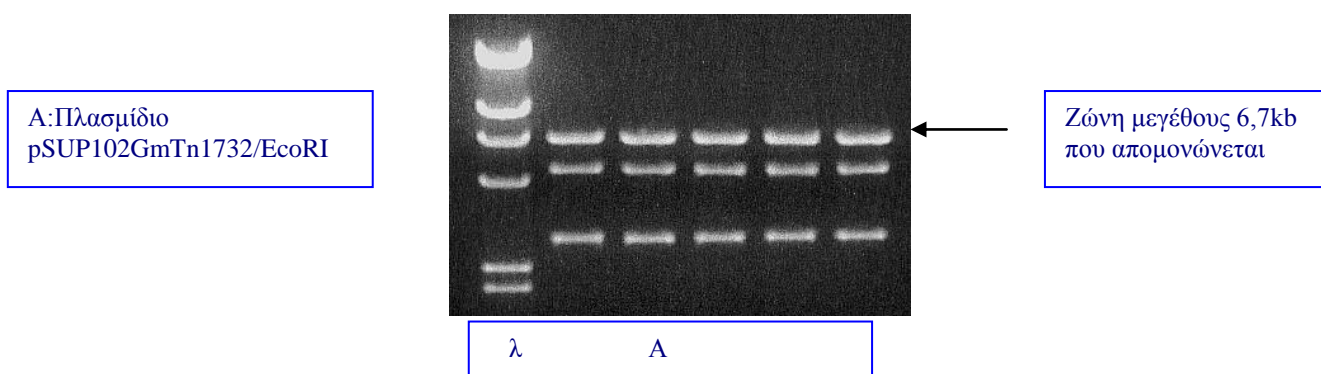
- Διάλυμα Α
2x SSC
0,1%(w/v) SDS
- Διάλυμα Β
0,1x SSC
0,1%(w/v) SDS

2.5.1. Απομόνωση του ανιχνευτικού μορίου DNA με πέψη με το ένζυμο EcoRI

Η διαδικασία της σήμανσης περιλαμβάνει αρχικά την πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pSUP102GmTn1732 με το ένζυμο EcoRI :

A/A	ΔΕΙΓΜΑ	ΟΓΚΟΣ(μl)
1	DNA	10
2	10x Buffer	5
3	EcoRI(12u/μl)	2,5(30 u)
4	d H ₂ O	32,5
5	Τελικός όγκος	50

Η πέψη πραγματοποιείται στους 37°C ολονυκτίως. Στην συνέχεια για την απομόνωση του τρανσποζόνιου Tn1732 που θα χρησιμοποιηθεί για την σήμανση πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε 0,9% αγαρόζη σε TBE (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση πέψης πλασμιδίου pSUP102GmTn1732

Από την πηκτή μετά την ηλεκτροφόρηση απομονώνεται η ζώνη μεγέθους 6,7 kb που αντιστοιχεί στο τρανσποζόνιο Tn1732.

2.5.2 Καθαρισμός της ζώνης του DNA με τη μέθοδο Geneclean II (BIO 101)

Η διαδικασία του καθαρισμού του DNA από την αгарόζη περιλαμβάνει αρχικά τη ζύγιση της αгарόζης για τον υπολογισμό του όγκου του NaI που θα προστεθεί. Στην συνέχεια προστίθενται δυο όγκοι NaI (2x βάρος της ζώνης της αгарόζης) και ακολουθεί θέρμανση στους 55⁰C για να διαλυτοποιηθεί η αгарόζη. Στη συνέχεια προστίθενται 15 μl silica matrix και το μίγμα αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αναδεύομενο κάθε 1-2 λεπτά. Στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 δευτερόλεπτα στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα εκπλένεται με 500 μl διαλύματος έκπλυσης και φυγοκεντρείται για 5 δευτερόλεπτα στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μια ακόμη φορά. Το ίζημα ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού και προστίθεται 12 μl dH₂O το μίγμα αφήνεται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται για 5 δευτερόλεπτα στις 12000 rpm. Συλλέγονται τα 10 μl σε σωληνάκι τύπου eppendorf. Η έκλυση με dH₂O επαναλαμβάνεται μια ακόμη φορά και συνολικά συλλέγονται 20 μl διαλύματος που περιέχει DNA. 5 μl από το δείγμα ηλεκτροφορούνται για έλεγχο της ποιότητας του DNA, ενώ τα υπόλοιπα θα χρησιμοποιηθούν για ιχνηθέτηση.

Απαιτούμενα διαλύματα

- Διάλυμα έκπλυσης
50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH=7,5
2,5 mM EDTA

2.5.7. Μη ραδιενεργός σήμανση του ανιχνευτικού μορίου DNA (Μέθοδος Dig) (Boehringer Mannheim cat. No. 1093657)

Η μέθοδος σήμανσης βασίζεται στην τυχαία ενσωμάτωση του επισημασμένου νουκλεοτιδίου digoxigenin-11-dUTP στο δίκλωνο μόριο του ανιχνευτή με τη δράση του ενζύμου Klenow (τμήμα της DNA πολυμεράσης I) και την ύπαρξη μικρών πριμοδοτικών εξανουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Αρχικά το δίκλωνο μόριο του ανιχνευτή υφίσταται μετουσίωση στο επόμενο στάδιο οι πριμοδοτικές αλληλουχιές συνδέονται στα μονόκλιωνα μόρια του ανιχνευτή με συνέπεια το ένζυμο Klenow να αναγνωρίσει τα δίκλιωνα τμήματα ως σημεία έναρξης του πολυμερισμού, συνθέτοντας τις νέες αλυσίδες ενσωματώνοντας το επισημασμένο νουκλεοτιδίου digoxigenin-11-dUTP στο δίκλωνο μόριο του ανιχνευτή. Αναλυτικότερα το δείγμα με το DNA του ανιχνευτή υφίσταται βρασμό για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο για

μετουσίωση του δίκλωνου μορίου και αμέσως μετά τοποθετείται για 10 λεπτά σε πάγο. Στην συνέχεια προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια

A/A	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ(μl)
1	DNA	15
2	Hexanukleotide mixture	4
3	dNTP labeling mixture	4
4	Klenow	2
5	dH ₂ O	5

Το μίγμα επωάζεται στους 37⁰C ολονυκτίως. Ακολούθως προστίθενται 2 μl EDTA (pH=8) 0,2M, 2,5 μl LiCl και 75 μl αιθανόλη 100% και το μίγμα αφήνεται για 30 λεπτά στους -80⁰C για να κατακτυμνιστεί το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντριση στους 12000 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl αιθανόλη 70% και φυγοκεντρείται στους 12000rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C. Ξηραίνεται στο ξηραντήρα κενού για 10 λεπτά και επαναιωρείται σε 50 μl TE₁₀. Στην συνέχεια το δείγμα του σημασμένου ανιχνευτικού μορίου προστίθεται σε 30 μl διαλύματος προυβριδισμού.

2.5.4 Διαδικασία χρώσης του φίλτρου

Η διαδικασία της χρώσης του φίλτρου πραγματοποιείται μετά τον υβριδισμό με το ανιχνευτικό μόριο DNA και περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα. Αρχικά το φίλτρο εκπλένεται με 100 ml διαλύματος A για ένα λεπτό υπό ήπια ανακίνηση. Ακολουθεί επώαση του φίλτρου με 100 ml διαλύματος B για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και γρήγορη έκπλυση με 100 ml διαλύματος A για ένα λεπτό υπό ήπια ανακίνηση. Στη συνέχεια το φίλτρο επωάζεται με 30 ml διαλύματος A που περιέχει 4 μl (150mU/ml) μίγματος αντισώματος(anti-digoxigenin) σημασμένου με αλκαλική φωσφατάση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το φίλτρο εκπλένεται δυο φορές με 100 ml διαλύματος A για 15λεπτά υπό ήπια ανακίνηση. Στην συνέχεια προστίθεται 50 ml διαλύματος 1x reaction buffer με Mg και το φίλτρο επωάζεται για 3 λεπτά. Το διάλυμα απορρίπτεται και προστίθεται 10 ml διαλύματος χρώσεις και το φίλτρο επωάζεται σε σκοτεινό χώρο μέχρι η χρώση να φτάσει σε επιθυμητά (εξετάζοντας το χρώμα του θετικού μάρτυρα). Αμέσως μετά το διάλυμα χρώσης απορρίπτεται και το φίλτρο εκπλένεται με 50 ml διαλύματος Γ.

Απαραίτητα διαλύματα• Διάλυμα Α(20°C)

100 mM Tris-HCl pH=7,5

150 mM NaCl

Διάλυμα Β(20°C)

Αντιδραστήριο blocking σε διάλυμα Α 0,5%

• Διάλυμα Γ(TE₁₀) 20°C)

10 mM Tris-HCl pH=8

1 mM EDTA

• 1x Reaction buffer

100 mM Tris-HCl pH=9,5

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂• Διάλυμα χρώσης(Kit)

Σε 20 ml διαλύματος 1x reaction buffer προστίθενται:

90μl NBT(4-Nitro-blue tetrazoliumchloride)

70μl X-Pho(5-Bromo-4-chloro-3-indol-phosphate)

2.6. Μεταφορά και λύση αποικιών πάνω σε ναύλον φίλτρο για in situ υβριδισμό

Η μέθοδος επιτρέπει τη μεταφορά σε ναύλον φίλτρο του DNA από μια αποικία, την πρόσδεσή του στο φίλτρο και την περαιτέρω ανάλυση του με τη μέθοδο του υβριδισμού. Αναλυτικότερα ναύλον φίλτρο στις διαστάσεις τρυβλίου τοποθετείται σε τρυβλίο με το κατάλληλα θρεπτικό υλικό. Στο φίλτρο τοποθετούνται με την βοήθεια αποστειρωμένης σφραγίδας οι αποικίες και αφήνονται να αναπτυχθούν ολονυκτίως σε επωαστικό κλίβανο στους 37⁰C. Στη συνέχεια το τρυβλίο αφήνεται για μια ώρα στους 4⁰C και στην συνέχεια τοποθετείται στην επιφάνεια φύλλου whatman 3MM που είναι διαποτισμένο με διάλυμα 10% SDS και επωάζεται για επτά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, όπου λαμβάνει χώρα η λύση των αποικιών. Ακολούθως πραγματοποιείται η επεξεργασία του φίλτρου με διάλυμα μετουσίωσης όπως παραπάνω και επωάζεται για επτά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια το φίλτρο τοποθετείται σε φύλλου whatman 3MM που είναι διαποτισμένο με διάλυμα εξουδετέρωσης και επωάζεται για επτά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν το

φίλτρο τοποθετείται σε φύλλου whatman 3MM που είναι διαποτισμένο με διάλυμα 2x SSC και επωάζεται για τρία λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Το φίλτρο αφήνεται να στεγνώσει σε διηθητικό χαρτί και το DNA που απομονώθηκε από κάθε αποικία μονιμοποιείται στο φίλτρο με ακτινοβολία σε υπεριώδη ακτινοβολία (320nm) για τέσσερα λεπτά. Ακολούθως το φίλτρο εκπλένεται με διάλυμα 3x SSC, 0,1% SDS για την απομάκρυνση του μη μονιμοποιημένου DNA. Η έκπλυση διαρκεί 3 ώρες στους 50⁰C σε γυάλινο κύλινδρο υβριδισμού. Οι διαδικασίες προυβριδισμού/ υβριδισμού πραγματοποιούνται όπως περιγράφηκε παραπάνω με μόνη διαφορά ότι όλες οι επωάσεις του φίλτρου πραγματοποιούνται στους 68 ⁰C.

Απαραίτητα διαλύματα

- Διάλυμα Μετουσίωσης
0,5 N NaOH
1,5 M NaCl
- Διάλυμα Εξουδετέρωσης
1,5 M NaCl
0,5 M Tris –HCl pH=8
1,0 mM EDTA

2.7. Δοκιμή παγώματος σταγόνας (Freezing Droplet Test)

Η μέθοδος βασίζεται στην δράση των γονιδίων παγοπυρήνωσης (*ina* ή *ice*) το προϊόν των οποίων καταλύει το σχηματισμό πάγου σε νερό υπό θερμοκρασίες κάτω του –1,5⁰C. Τα γονίδια αυτά απομονώθηκαν από φυτοπαθογόνα βακτήρια και εκφράζονται ετερόλογα ως γονίδια αναφοράς σε πολλά gram⁻ βακτήρια (29,30). Η δραστηριότητα των γονιδίων παγοπυρήνωσης προσδιορίζεται ποιοτικά και ποσοτικά με τις ακόλουθες διαδικασίες. Υγρή καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους που φέρει γονίδια παγοπυρήνωσης επωάζεται στους 24⁰C για 20 ώρες, ώστε να επαχθούν οι πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης. Στην συνέχεια δείγμα 100μl αραιώνεται χρησιμοποιώντας κατάλληλο μέσο, για το *E. coli* νερό, ενώ για το *H. meridiana* SW1 μέχρι την 10⁻⁸. Κατόπιν 20 σταγόνες όγκου 10 μl από την κάθε αραιώση τοποθετούνται σε επεξεργασμένο αλουμινόχαρτο που επιπλέει σε ειδικά ψυχόμενο λουτρό πολυαιθυλενογλυκόλης σε θερμοκρασία 9,2⁰C. Το αλουμινόχαρτο επεξεργάζεται με ψεκασμό με διάλυμα παραφίνης 2% σε ξυλένιο και στην συνέχεια θερμαίνεται για την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη.

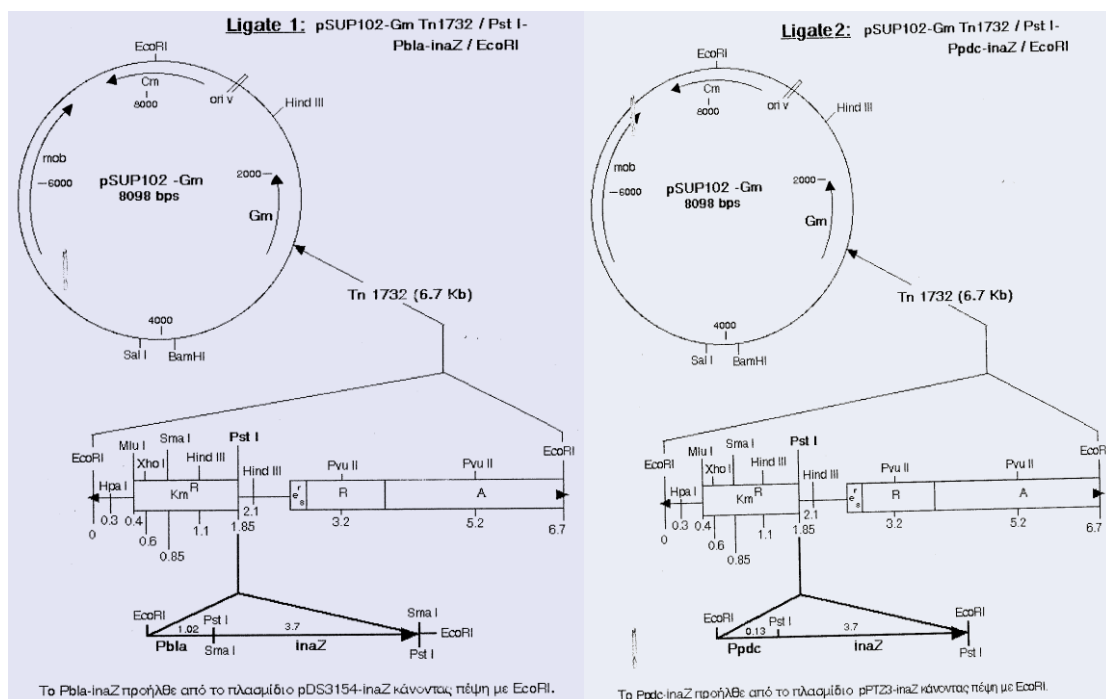
Για τον υπολογισμό της δραστηριότητας παγοπυρήνωσης μετρούμε τον αριθμό των παγωμένων σταγόνων κατά τη δοκιμή σε κάθε αραίωση.

Η δραστηριότητα των γονιδίων παγοπυρήνωσης υπολογίζεται από την εξίσωση του Vali [$\text{Log}(\text{ice nuclei/cell})$] και τη χρήση υπολογιστικού προγράμματος και εκφράζεται ως ο δεκαδικός λογάριθμος του αριθμού παγοπυρήνων ανά κύτταρο, που μετρούμε κατά τη δοκιμή για τις ολικές καλλιέργειες.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εισαγωγή γονιδίου παγοπυρήνωσης (*inaZ*) στο αλόφιλο βακτήριο *H. meridiana*

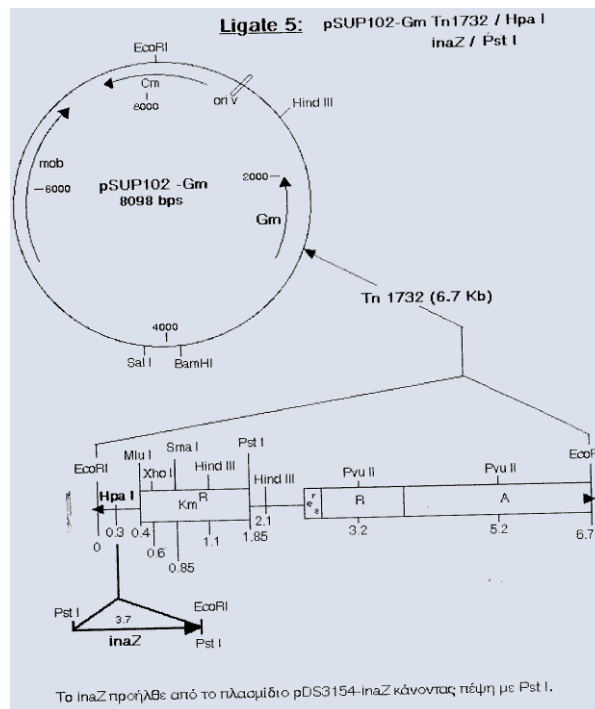
Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η εισαγωγή του γονιδίου παγοπυρήνωσης (*inaZ*) στο χρωμόσωμα του μέτρια αλόφιλου βακτήριου *H. meridiana* για να μελετηθεί, αφενός η έκφραση ενός αντιγράφου του γονιδίου (*inaZ*) υπό τον έλεγχο διαφορετικών εκκινητών, αφετέρου να δημιουργηθεί ένα σύστημα κατάλληλο για την ανίχνευση και απομόνωση εκκινητών που επάγονται σε αλόφιλο περιβάλλον. Η εισαγωγή του γονιδίου (*inaZ*) στο χρωμόσωμα του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια κατάλληλων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων φορέων του pL1:pSUP102-GmTn1732/PstI-Pbla-*inaZ*/EcoRI, pL2: pSUP102-GmTn1732/PstI-Ppdc-*inaZ*/EcoRI, pL3:(pSUP102-GmTn1732/HpaI-*inaZ*/EcoRI) (εικόνα 6,7). Το γονίδιο (*inaZ*) κλωνοποιήθηκε στο τρανσποζόνιο Tn1732 υπό την έλεγχο του εκκινητή Pbla(υποκινητής της β-λακταμάσης) και του Ppdc (υποκινητής της πυροσταφυλικής δικαρβοξυλάσης) καθώς και χωρίς υποκινητή. Το ανασυνδυασμένο τρανσποζόνιο κλωνοποιήθηκε στον " αυτόκτονο " φορέα pSUP102-Gm στην περιοριστική θέση EcoRI.



Εικόνα 6: Διαγραμματική Απεικόνιση κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα pL1 μέσω της κλωνοποίησης του Tn1732/Pst I-Pbla-*inaZ* στο φορέα PSUP102-Gm και του πλασμιδιακού φορέα pL2, μέσω της κλωνοποίησης του Tn1732/Pst I-Ppdc-*inaZ* στο φορέα PSUP102-Gm

Η μεταφορά των πλασμιδιακών φορέων στο *H. meridiana* πραγματοποιήθηκε με βακτηριακή σύζευξη και συνολικά από δυο βακτηριακές συζεύξεις συλλέχθηκαν από το, pL1=477 αποικίες, από το pL2=632 αποικίες και από το pL3=395 αποικίες.

Στην δεύτερη σύζευξη χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας pC: (pSUP102-Gm). Οι αποικίες των μετασυσζευγμένων κυττάρων εξετάστηκαν για να ανιχνευθούν οι αποικίες στις οποίες συνέβη η μετάθεση.



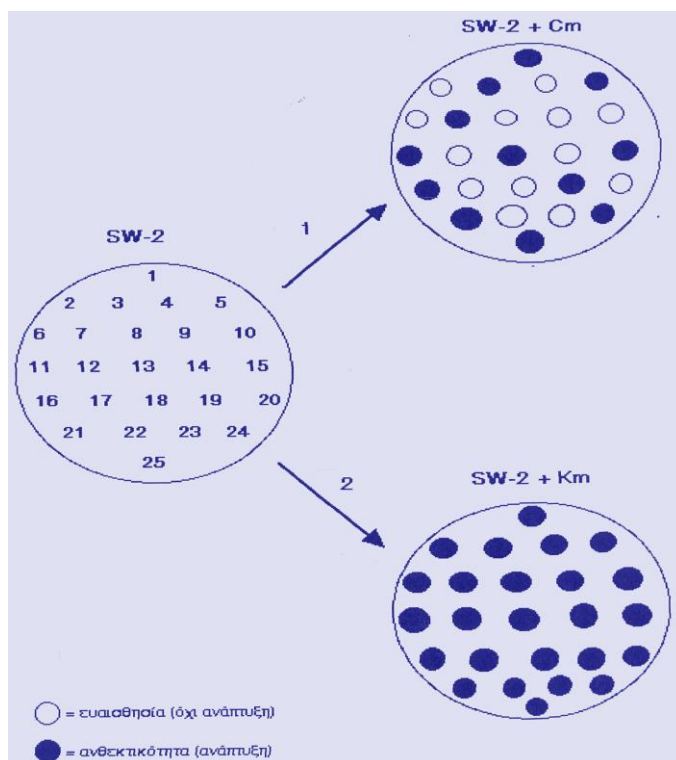
Εικόνα 7: Διαγραμματική Απεικόνιση κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα pL3 μέσω της κλωνοποίησης του Tn1732/Hpa I-inaZ στο φορέα PSUP102-Gm

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της αντιγραφικής μεταφοράς με βελούδα αναζητώντας αποικίες ευαίσθητες στην χλωραμφαινικόλη (δείκτης επιλογής φορέα pSUP102-Gm) και ταυτόχρονα ανθεκτικές στην καναμυκίνη (δείκτης επιλογής τρανσποζόνιου Tn1732) (Εικόνα 8).

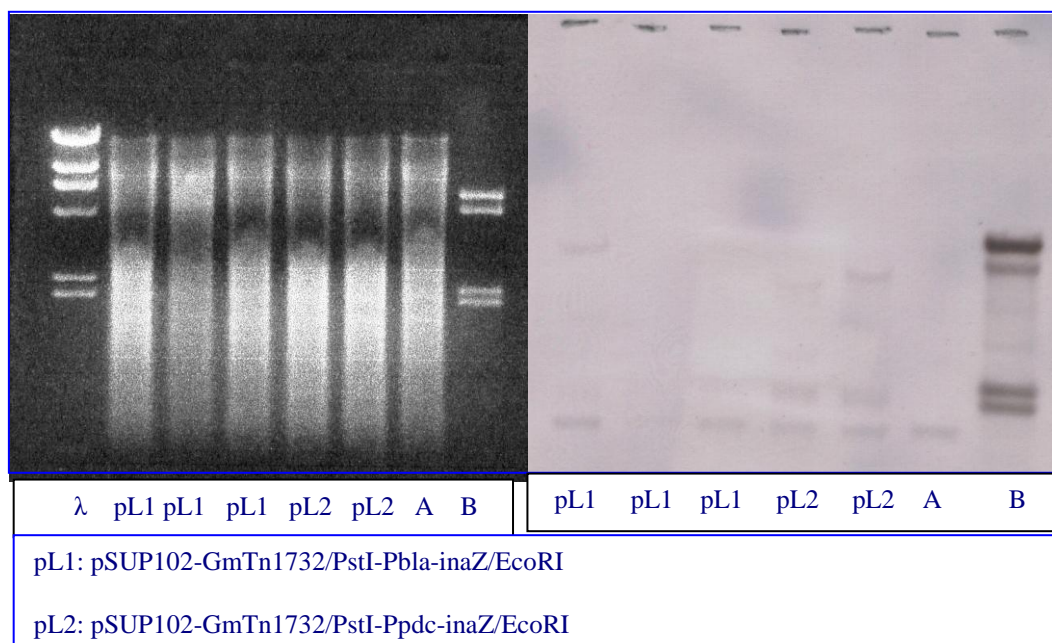
Ακολούθως οι αποικίες στις οποίες συνέβη μετάθεση εξετάστηκαν για την ύπαρξη χρωμοσωμικών ενσωματώσεων του Tn1732-inaZ. Αρχικά πραγματοποιήθηκε υβριδισμός in-situ με ανιχνευτή το μόριο dig-11-dUTP- Tn 1732, χωρίς να δώσει σαφές αποτέλεσμα και στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός της δραστηριότητας παγοπυρήνωσης όπως περιγράφεται στη μεθοδολογία. Από τα δείγματα που ελέχθησαν βρέθηκαν συνολικά 4 θετικές αποικίες για τον φορέα pL1, 9 θετικές αποικίες για τον φορέα pL2 και 4 θετικές αποικίες για τον φορέα pL3.

Για να διαπιστωθεί ότι η μετρούμενη δραστηριότητα προέρχεται από το ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα τρανσποζόνιο και όχι από την ύπαρξη πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από αυτές τις αποικίες και αποτύπωση κατά Southern και υβριδισμός με ανιχνευτή το μόριο dig-11-dUTP- Tn 1732. Χωρίς να ανιχνευτεί σήμα γεγονός που αποδίδεται στην απουσία πλασμιδιακού DNA.

Για περαιτέρω έλεγχο της ενσωμάτωσης, αλλά και του τρόπου ενσωμάτωσης απομονώθηκε χρωμοσωμικό DNA από τις θετικές αποικίες και υπέστη πέψη με το ένζυμο PvuII, το τρασποζόνιο Tn1732-inaZ, φέρει δυο θέσεις αναγνώρισης από το ένζυμο PvuII, Εικόνα 6,7.



Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση ελέγχου μετασυζευγμένων αποικιών στις οποίες έχει ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα του βακτηρίου του τμήματος Tn1732 *inaZ*. Οι αποικίες που αναζητούμε είναι ευαίσθητες στη γλωραμφαινικόλη και ανθεκτικές στην καναμυκίνη.



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαροζής χρωμοσωμικού DNA από θετικές αποικίες μετά από πέψη με Pvu II και στη συνέχεια υβριδισμός κατά Southern με ανιχνευτικό μόριο το dig-11-dUTP- Tn 1732.

Στη συνέχεια οι πέψεις ηλεκτροφορήθηκαν και πραγματοποιήθηκε αποτύπωση κατά Southern και υβριδισμός της μεμβράνης με ανιχνευτικό μόριο το dig-11-dUTP- Tn 1732. Ζώνες υβριδισμού εντοπίστηκαν στο χρωμοσωμικό DNA από τις θετικές αποικίες από τον φορέα pL1 και pL2, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της ενεργότητας παγοπυρήνωσης για τις θετικές αποικίες *H. meridiana* από τους φορείς pL1, pL2 και pL3, (Πίνακας 1).

A/A	ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	LOG(ICE NUCLEI/CELL)
1	pL1	1150000000	-2,41
2	pL1	1100000000	-2,71
3	pL1	770000000	-2,77
4	pL1	490000000	-2,19
5	pL2	330000000	-2,29
6	pL2	540000000	-3,06
7	pL2	250000000	-1,85
8	pL2	40000000	-1,52
9	pL2	330000000	-2,04
10	pL2	450000000	-2,30
12	pL2	100000000	-2,30
12	pL2	340000000	-3,32
13	pL2	570000000	-2,93
14	pL3	350000000	-1,70
15	pL3	300000000	-1,56
16	pL3	400000000	-2,11
17	pL3	67000000	-1,45

Πίνακας 1 : Ποσοτικός προσδιορισμός ενεργότητας παγοπυρήνωσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Vali [$\text{Log}(\text{ice nuclei}/\text{cell})$], μετρώντας τον αριθμό των παγωμένων σταγόνων σε κάθε αραιώση των θετικών στελεχών *H. meridiana*, στις οποίες έχει ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα του βακτηρίου το τμήματος Tn1732 *inaZ*

Υψηλότερες τιμές ενεργότητας παγοπυρήνωσης παρατηρήθηκαν στις θετικές αποικίες του φορέα pL3, φορέας χωρίς υποκινητή και η χαμηλότερες στις θετικές αποικίες του φορέα pL1, που φέρει υποκινητή Pbla(υποκινητής της β-λακταμάσης). Συγκρίνοντας επίσης τις τιμές ενεργότητας παγοπυρήνωσης από τις θετικές αποικίες των φορέων pL1 και pL2, φορέας με υποκινητή Ppdc (υποκινητής πυροσταφυλικής δικαρβοξυλάσης), διαπιστώνουμε ότι οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στο φορέα pL1, που φέρει υποκινητή Pbla(υποκινητής της β-λακταμάσης).

Α. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με τη διαδικασία της τρανσποζονιακής μεταλλαξιγένεσης κατέστη δυνατή η εισαγωγή του γονιδίου *inaZ* στο χρωμόσωμα του μέτρια αλόφιλου βακτηρίου *H. meridiana*, υπό τον έλεγχο των υποκινητών *Pbla*(υποκινητής της β-λακταμάσης), *Ppdc*(υποκινητής πυροσταφυλικής δικαρβοξυλάσης), καθώς και χωρίς υποκινητή. Το γονίδιο (*inaZ*) κλωνοποιήθηκε αρχικά στο τρανσποζόνιο Tn1732 και στη συνέχεια στο φορέα pSUP102-Gm, δημιουργώντας τους ανασυσνδασμένους φορείς pL1, pL2, pL3. Η μεταφορά των πλασμιδιακών φορέων στο *H. meridiana* πραγματοποιήθηκε μέσω βακτηριακής σύζευξης. Οι θετικές αποικίες που απομονώθηκαν μετά τη μετάθεση, στις οποίες παρατηρήθηκε ευαισθησία στη χλωραμφαινικόλη, δείκτη αντοχής του φορέα pSUP102-Gm και ταυτόχρονα ανθεκτικότητα στη καναμυκίνη, δείκτη επιλογής του τρανσποζονίου Tn1732-*inaZ*, εμφάνισαν ενσωματώσεις του τρανσποζονίου Tn1732-*inaZ* στο χρωμόσωμα τους, όπως διαπιστώθηκε μετά από ποιοτικό προσδιορισμό της ενεργότητας παγοπυρήνωσης και υβριδισμό κατά Southern.

Παράλληλα παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στη δραστικότητα παγοπυρήνωσης μεταξύ των θετικών αποικιών των φορέων pL1 και pL2, φορέας με υποκινητή *Ppdc* (υποκινητής πυροσταφυλικής δικαρβοξυλάσης). Οι χαμηλότερες τιμές ενεργότητας παγοπυρήνωσης παρατηρήθηκαν στο φορέα pL1, που φέρει υποκινητή *Pbla*(υποκινητής της β-λακταμάσης). Επιπλέον παρατηρήθηκε έκφραση στην περίπτωση του Tn1732-*inaZ* χωρίς υποκινητή γεγονός που αποδίδεται στην ενσωμάτωση του Tn1732-*inaZ* σε περιοχή κοντά σε υποκινητή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της ενσωμάτωσης του τρανσποζονίου στην τελευταία περίπτωση, όπου είναι δυνατό να οδηγήσει στην αποκάλυψη νέων υποκινητών, οι οποίοι είναι δυνατό να ενεργοποιούνται σε χαμηλές ή υψηλές συγκεντρώσεις άλατος.

Τα αλόφιλα βακτήρια αποτελούν μια ομάδα μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε περιβάλλον αλατότητας από 0,6M NaCl (αλατότητα θάλασσας) έως >5M NaCl (31). Ορισμένα από τα πιο συχνά παρατηρούμενα αλόφιλα βακτήρια είναι εκείνα τα οποία αναπτύσσονται σε αλυκές, όπως για παράδειγμα το *Halobacterium spp*, το *Salinibacter ruber*. Επίσης στα αλόφιλα βακτήρια έχει αποδοθεί εδώ και καιρό η αλλοίωση που παρατηρείται σε παρασκευάσματα από ψάρι ή από κρέας που διατηρούνται-ζυμώνονται με αλάτι (31).

Τις τελευταίες δεκαετίες μελετήθηκε η ικανότητα των αλόφιλων βακτηρίων να προσαρμόζονται σε περιβάλλον αλατότητας με τη βοήθεια μεθόδων κυτταρικής καλλιέργειας, και γενετικής μηχανικής. Από την έρευνα διαπιστώθηκε ότι η

ικανότητα προσαρμογής των αλόφιλων βακτηρίων βασίζεται στην εξισορρόπηση του οσμωτικού στρες από το εξωκυττάριο μέσο ανάπτυξης. Στα αλόφιλα βακτήρια η διαδικασία εξισορρόπηση του οσμωτικού στρες υλοποιείται με ενδοκυττάρια *de novo* συσσώρευση συμβατών διαλυμένων ουσιών, όπως η γλυκίνη, η βεταΐνη(31).

Τα μέτρια αλόφιλα βακτήρια αποτελούν μια ετερογενή ομάδα, αλόφιλων τα οποία σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση του Kushner αναπτύσσονται βέλτιστα σε περιβάλλον αλατότητας από 0,5-2,5M(32). Μέλη της ομάδας όπως τα *Halomonas Elongata*, *Salinivibrio costicola*, *Halomonas israelensis* έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς το μηχανισμό προσαρμογής σε περιβάλλον αλατότητας (32). Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι είναι δυνατό να εφαρμοστούν με επιτυχία στα μέτρια αλόφιλα βακτήρια τεχνικές γενετικής τροποποίησης (32), όπως ο μετασχηματισμός, η τρανσποζονιακή μεταλλαξιγένεση. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την μεταφορά και έκφραση στα βακτήρια *Halomonas Elongata*, *Halomonas meridian* και σε άλλα μέτρια αλόφιλα του γονιδίου *inaZ*, γονίδιο παγοπυρήνωσης, ως γονίδιο αναφοράς,(30) όπως ακριβώς υλοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία στο αλόφιλο *Halomonas meridian*.

Τα γονιδια παγοπυρήνωσης έχουν εντοπιστεί σε ορισμένα βακτηριακά είδη, όπως είναι το *Pseudomonas syringae*, *Ervinia herbicola*, *xanthomonas campestris* και άλλα. (33), τα οποία κωδικών τις αντίστοιχες πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης, *inaK*, *inaQ*, *inaV* και *inaZ* (34). Οι πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης χαρακτηρίζονται από την ικανότητας του να ενεργοποιούν ετερογενή κρυστάλλωση πάγου σε θερμοκρασίες μέχρι -2°C (35). Πρόκειται για μεγάλου μεγέθους πρωτεΐνες με υδρόφιλο χαρακτήρα, που αποτελούνται από υπομονάδες με μέγεθος 120 με 150kDa. Οι πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης φέρουν θέσεις πρόσδεσης με τον πάγο ώστε να δημιουργηθεί ένα πρότυπο πλέγμα πάγου από διατεταγμένα ελεύθερα μόρια νερού τα οποία στη συνέχεια θα δημιουργήσουν πυρήνες πάγου(36, 35). Μελετητές θεωρούν (36) ότι πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης συμβάλουν με τη δράσης τους στην επιβίωση του βακτηρίου, μέσω της ATP- εξαρτώμενης μεταφοράς τους στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη κατευθύνοντας το σχηματισμό πάγου στο εξωκυττάριο χώρο (36,37) και ταυτόχρονα παρέχουν χρόνο στο βακτήριο να προσαρμοστεί φυσιολογικά στο stress που προκαλείται από χαμηλές θερμοκρασίες. Οι πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης από μόνες τους παρουσιάζουν μικρή δραστηριότητα, ενώ όταν σχηματίσουν μεγάλες ομοιογενείς ομάδες, συγκροτώντας σημεία, θέσεις στην κυτταρική μεμβράνη παγοπυρήνωσης, επιτυγχάνουν συλλογικά να προσανατολίσουν μεγάλο αριθμό μορίων νερού, ώστε να επιταχύνουν το σχηματισμό πάγου (38, 39, 40).

Σε όλες τις περιπτώσεις βακτηρίων που εμφανίζουν ικανότητα παγοπυρήνωσης και μελετηθήκαν, η ικανότητα αυτή αποδόθηκε σε ένα γονίδιο με μέγεθος που κυμαίνεται από 3,2 μέχρι 5kb. Το γονίδιο φέρει εσωτερικά μια περιοχή που είναι υψηλά συντηρημένη και αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (41, 42, 43).

Η βακτηριακή παγοπυρήνωση, αποτελεί ένα μοναδικό φαινόμενο, το οποίο μπορεί εύκολα και με ακρίβεια να μετρηθεί. Επιπλέον λόγω της ικανότητας που εμφανίζουν οι πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης να συγκροτούν ομάδες στις θέσεις παγοπυρήνωσης και με αυτό τον τρόπο να πολλαπλασιάζουν την δραστικότητα παγοπυρήνωσης (Η δραστικότητα παγοπυρήνωσης αυξάνει ανάλογα με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών παγοπυρήνωσης, υψωμένη στο τετράγωνο) , καθιστούν το γονίδιο παγοπυρήνωσης ως ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη της μεταγραφικής δραστικότητας ενός άλλου γονιδίου στο οποίο θα ενσωματωθεί (44, 33).

Παράλληλα με τη βασική έρευνα των αλόφιλων βακτηρίων, διερευνήθηκαν και οι δυνατότητες αξιοποίησης τους στη βιοτεχνολογία. Τα αλόφιλα βακτήρια σε σύγκριση με τα υπόλοιπες ομάδες των ακραιόφιλων μικροοργανισμών, που αναπτύσσονται σε συνθήκες χαμηλών/υψηλών θερμοκρασιών και υψηλών τιμών pH, έχουν αξιοποιηθεί σε μικρότερο βαθμό (45) σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές . Τα αλόφιλα βακτήρια παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για βιοτεχνολογικές εφαρμογές διότι:

1. Αναπτύσσονται σε περιβάλλον υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται το ρίσκο επιμολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς στο μέσο ανάπτυξης.
2. Αναπτύσσονται σε απλά θρεπτικά μέσα, χρειάζονται μόνο πηγή άνθρακα και ενέργειας.
3. Τα εργαλεία γενετικής τροποποίησης που έχουν αναπτυχθεί σε μη αλόφιλα βακτήρια, είναι δυνατό να εφαρμοστούν και στα αλόφιλα, αποδεικνύοντας ότι ο γενετικός χειρισμός των αλόφιλων είναι σχετικά απλός (32).

Μια από τις πρώτες εφαρμογές των αλόφιλων βακτηρίων στη βιοτεχνολογία αποτελεί η παραγωγή και η χρησιμοποίηση των συμβατών διαλελυμένων ουσιών, που συμβάλουν στη ωσμωτική ισορροπία τους. Μία τέτοια ουσία είναι η εκτοΐνη, η οποία χρησιμοποιείται ως ενεργό συστατικό σε καλλυντικά σκευάσματα και σε προϊόντα περιποίησης της επιδερμίδας, καθώς και σε ιατρικά σκευάσματα (46). Επιπλέον η εκτοΐνη χρησιμοποιείται ως προστατευτική ουσία για βιομόρια σε εφαρμογές μοριακής βιολογίας, όπως είναι η τεχνική PCR και η DNA microarray (47, 48).

Μελέτες δείχνουν ότι αλόφιλα βακτήρια, όπως το *Halomonas sp.* σε συνεργασία με έξι τουλάχιστον βακτηριακά στελέχη, μεταξύ των οποίων και το *Marinobacter*

είναι δυνατό να αποικοδομήσουν διάφορους πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες σε περιβάλλον αλατότητας από 1% έως 17% NaCl. (45,49). Η δυνατότητα που εμφανίζουν τα αλόφιλα στην αποικοδόμηση πολυαρωματικών υδρογονανθράκων αποδεικνύεται εξαιρετικά χρήσιμη στην διαδικασία απορρύπανσης από πετρέλαιο των θαλασσών, ή εδαφών υψηλής αλατότητας, όπου τα υπόλοιπα βακτήρια αδυνατούν να λειτουργήσουν.

Επιπλέον μέτρια αλόφιλα βακτήρια, που απομονώθηκαν από το Great Salt Lake (Η.Π.Α) είναι δυνατό να δημιουργήσουν βιοφίλμ σε αντδραστήρα batch λειτουργίας και να επιφέρουν απομάκρυνση κατά 99% της φαινόλης που περιέχετε ως ρύπος στο αλατούχο μέσο ανάπτυξης αλλά και άλλων αρωματικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα το βενζοϊκό οξύ (45).

Μια ακόμα ενδιαφέρουσα εφαρμογή των αλόφιλων, που βρίσκεται υπό μελέτη είναι η παραγωγή βιοκαύσιμου (Biofuel) από βιομάζα αποτελούμενη από κυτταρίνη (45).

Βακτηρικά πολυμερή, όπως είναι οι πολυσακχαρίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν τασιενεργό δράση, λειτουργούν ως βιογαλακτωματοποιητές επιτυγχάνοντας να ενισχύουν τη διαδικασία ανάταξης του πετρελαίου. Με δεδομένο ότι τα κοιτάσματα πετρελαίου έχουν συνήθως μεγάλη περιεκτικότητα σε αλάτι, η χρήση ανθεκτικών στο αλάτι τασιενεργών ουσιών, παρουσιάζει πλεονεκτήματα. (32). Συνολικά έχουν απομονωθεί περισσότερα από 200 στελέχη, που παράγουν εξωκυττάρια πολυσακχαρίτες από πετρελαιοπηγές και από περιβάλλοντα που σχετίζονται με την παραγωγή πετρελαίου. Ο επικρατέστερος τύπος είναι ένα δυνητικά αναερόβιο είδος *Bacillus*. Επιπλέον και το *H. eurihalina* παράγει μεγάλη ποσότητα από ένα εξωκυττάριο πολυανιονικό πολυσακχαρίτη, ο οποίος είναι ένας ισχυρός βιογαλακτωματοποιητής (32). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί και στα ενδοκυττάρια πολυμερή, όπως οι πολυεστέρες, με κύριο εκπρόσωπο τα πολυυδροξυαλκανοϊκά(poly-β-hydroxyallanoates). Πρόκειται για πολυμερή βιοδιασπώμενα με ιδιότητες πλαστικών υλών. Ορισμένα αλόφιλα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως εξαιρετικοί παραγωγοί τέτοιων βιοπλαστικών ουσιών (45).

Τα αλόφιλα βακτήρια αποτελούν εξαιρετική πηγή ενζύμων, που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία απορρυπαντικών σε σκόνη, επιπλέον οι δευτερογενείς μεταβολίτες από αλόφιλους ακτινομύκητες αποτελούν τη βάση νέων αντιβιοτικών (45).

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stryer (third Edition), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
2. Claire M. Berg, Douglas E. Berg, and E. Groisman: Transposable elements and the genetic engineering of Bacteria(chapter 41)
3. Kleckner, N., J., Roth, and D. Bostein, *J. Mol. Biol* (1977);116:125-159
4. Balbas, P., Et al, *Gene* (1986); 50:3-40
5. Heffron, F. 1983. Tn3 and its relatives, p 223-260. In J. A. Shapiro (ed), *Mobile genetic elements*. Academic Press, Inc., New York.
6. Ahmed, A., *J. Mol. Biol.* (1984);178: 941-948
7. Klenckner, N.(1983), *TranspozomeTn10*, p: 261-298. In J. A. Shapiro (ed), *Mobile genetic elements*. Academic Press, Inc., New York.
8. Franklin, F., C., H., (1985), *Broad host range cloning vectors for Gram-negative bacteria*, p.165-184. In D. M. Glover(ed), *DNA cloning : a practical Approach*, vol 1. IRL Press Oxford
9. Reynolds, A., E., S., Mahadevan , J. Felton, and A. Wright, *Mol. Cell. Biol. New Ser* (1985); 20: 265-277
10. Erich Lanka, *Annu. Rev.,Biochem.*(1995); 64:141-169
11. Abigail A., Salyers, Nadja B., Shoemaker, Ann M., Stevens and Lhing-Yew Li, *Microbiological Reviews* (1995);59(4):579-590
12. Ippen-Ihler KA, Minkley EG Jr, *Annu. Rev. Genet*(1986); 20:593-624
13. Willettes N, Skurray R 1987. *Escherichia coli and salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, (ed) FC Niedhardt, pp1110-33, Washington DC: Am.Soc. Microbiol.
14. Guiney DG. 1993, *Bacterial conjugation*, ed DB Clewell, pp75-103. New York: Plenum
15. Pansegrau W., Lanka E., Barth PT, Figurski DH, Guiney DG, Hass D, Helinski DR, Schwab H., Stanisich VA, Thomas CM. 1994, *J. Mol. Biol.* 239:632-63
16. Willettes N., Wilkins BM., 1984. *Microbiol. Rev.* 48:24-41
17. Furste JP, Pansegrau W., Ziegelin G, Kroger M, Lanka E., 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1771-75
18. DB Clewell, Helinski DR, 1969. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62: 1159-66
19. Lovett MA, Helinski DR, 1975, *J. Biol. Chem.* 250: 8790-95
20. Ziegelin G, Furste JP, Lanka E, 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 11989-94
21. Guiney DG, Helinski DR, 1975, *J. Biol. Chem.* 250:8796-803
22. Blair DG, Helinski DR, 1975, *J. Biol. Chem.* 250: 8785-89
23. Geider K., Hoffmann-Berling H. 1981, *Annu. Rev. Biochem.* 50: 233-60
24. Lahue EE., Matson SW, 1988. *J. Biol. Chem.* 263: 3208-15
25. Durrenberger MB, Villiger W, Bachi T. 1991, *J. Struct. Biol.* 107:46-156
26. Bhattacharjee MK, Rao X-M, Meyer RJ, 1992. *J. Bacteriol.* 174: 6659-65
27. de Mendoza, D., H., C., Gramajo, and A. L. Rosa 1986. *Mol. Gen. Genet.* 205: 546-549
28. Berg. C. M., W., A., Whalen, and L. B., Archambault 1983, *J. Bacteriol.* 155: 1009-1014
29. Constantin Drainas, Georgios Vartholomatos and Nicholas J. Panopoulos, 1995. *Applied and environmental Microbiology*, p 273-277
30. Nikolaos Arvanitis, Carmen Vargas, Georgios Tegos, Angelos Perysinakis, Joaquin J., Nieto, Antonio Ventosa, and Constantin Drainas, 1995, *Applied and environmental Microbiology*, p 3821-25
31. Shiladitya DasSarma and Priya DasSarma, 2015, *Curr Opin Microbiol*, p120-126

32. Antonio Ventosa, Joaquin J. Nieto and Aharon Oren, 1998, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p.504-544.
33. S. E. Lindow, 1995, *Molecular Ecology*, p. 555-566.
34. Li Q, Yan Q, Chen J et al. *International Journal of Biological Science*, 2012; 8(8).
35. Kawahara H. 2008, *Cryoprotectants and ice-binding proteins*, pp.229-246
36. Xu H, Griffin M, Pattern CL, Glick BR. 1998, *Canadian Journal of Microbiology*, 44(1):64-73
37. Kajava A, Lindow SE, 1993, *Journal of Molecular Biology*, 232(3): 709-717.
38. Govindarajan AG, Lindow SE, 1988, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 85, 1334-1338
39. Burke Mj, Lindow SE, 1990, *Cryobiology*, 27, 80-84.
40. Gurian-Sherman D, Lindow SE, 1993, *FASEB journal*, 9, 1338-1343.
41. Warren G, Corotto L, Wolber P, 1986, *Nucleic Acidic Research*, 14, 8047-8060.
42. Warren G, Corotto L, 1989, *Gene*, 85, 239-242.
43. Zhao JI, Orser CS, 1990, *Molecular and General Genetics*, 223, 163-166
44. Lindgren PB, Frederick R, Govindarajan AG, Panopoulos NJ, Staskawicz B, Lindow SE, 1989, *EMBO journal*, 8, 1291-1301.
45. Yanhe Ma, Erwin A, Galinski, William D, Grant, Aharon Oren and Antonio Ventosa, 2010, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 6971-6981.
46. Graf, R., Anzali, J., Bunger, F., Pflucker and H. Driller, 2008, *Clinics Dermatol*, 26: 326-333.
47. Mascellani, N., X. Liu, S. Rossi, J. Marchesini, D. Valentini, D. Arcelli, C. Taccioli, M. H. Citterih, C.-G. Liu, R. Enagelisti, G. Russo, J. M. Santos, C. M. Crose, and S. Volinia, 2007, *BMC Biotechnol*, 7:82.
48. Schnoor, M., P. Voß, P. Cullen, T. Boking, H. J. Galla, E. A. Gallinski and S. Lorkowski, 2004, *Biophys. Res. Commun*, 322: 867-872.
49. Debajyoti Ghosal, shreya Ghosh, Tapan K. Dutta, and Youngho Ahn, 2016, *Front Microbiol*, 7: 1369

