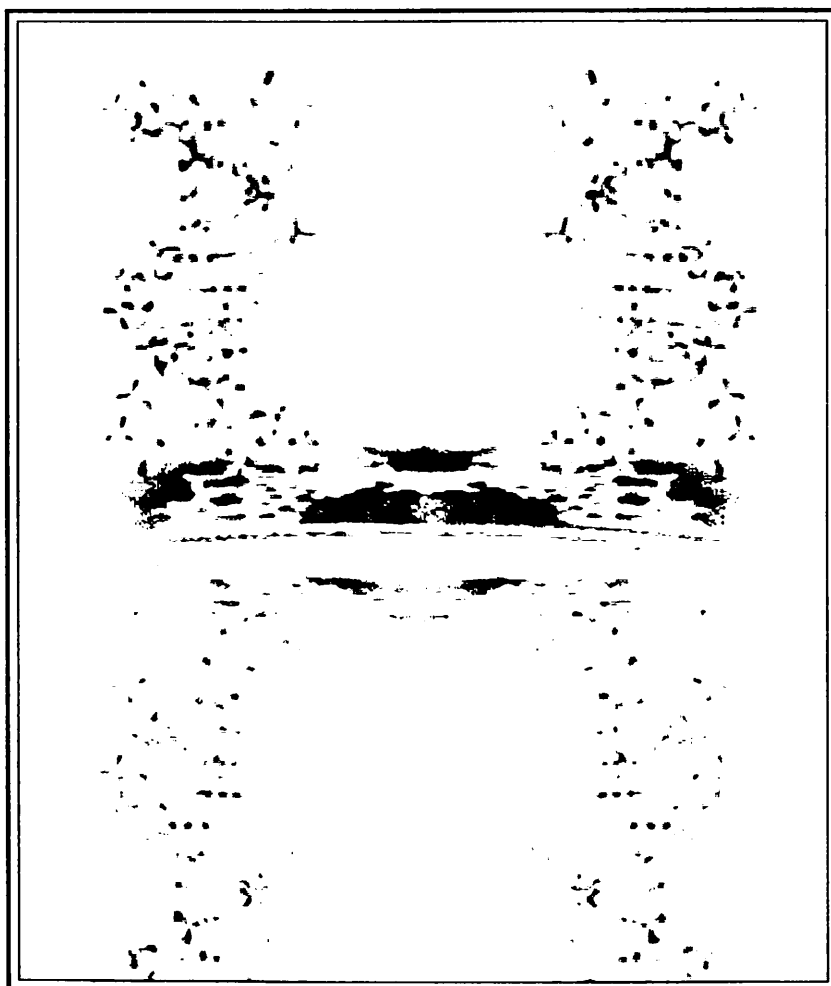


ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

## ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΑΡΑΤΖΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ



Ιωάννινα, 2002

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
**ΚΑΡΑΤΖΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ**

Ιωάννινα, 2002

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στην Ιατρική Σχολή και στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ». Αποτελείται από τέσσερις επιμέρους εργασίες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στα ακόλουθα εργαστήρια:

### **A) Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας (Ιατρική Σχολή)**

Στο εργαστήριο αυτό πραγματοποιήθηκε εξάμηνη εργασία με τίτλο: «Έκφραση δομών της Hsp70 του πιθήκου σε κύτταρα θηλαστικών» υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Χαράλαμπου Αγγελίδη και του υποψήφιου Διδάκτορα Πέτρου Μποζίδη.

### **B) Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας (Ιατρική Σχολή)**

Στο εργαστήριο αυτό πραγματοποιήθηκε εξάμηνη εργασία με τίτλο: «Μελέτη της υποπεριοχής IIIB της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού ως προς τη δραστικότητα GnSAF» υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Σεφεριάδη και της υποψήφιας Διδάκτορα Σωτηρίας Ταβουλάρη.

### **Γ) Εργαστήριο Βιοχημείας (Τμήμα Χημείας)**

Στο εργαστήριο αυτό πραγματοποιήθηκε εξάμηνη εργασία με τίτλο: «Έκφραση της υπερθερμόφιλης α-αμυλάσης του αρχαιοβακτηρίου *Pyrococcus woesei* σε μεσόφιλα βακτήρια» υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Δραΐνα και του υποψήφιου Διδάκτορα Γεώργιου Χιουρέα.

### **Δ) Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής (Ιατρική Σχολή)**

Στο εργαστήριο αυτό πραγματοποιήθηκε εξάμηνη εργασία με τίτλο: «Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 σε καρκίνο του μαστού με τη μέθοδο DGGE» υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Βασιλικής Μαλάμου-Μήτση και της υποψήφιας Διδάκτορα Χριστιάνας Ζαχαρίου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους του επιβλέποντες Καθηγητές και υποψήφιους Διδάκτορες για τη καθοδήγηση τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Επίσης θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη των εργαστηρίων για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας που μου προσέφεραν και ιδιαίτερα στο συνάδελφο Σωτήρη Τζάλλα για την πολύτιμη βοήθεια του στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια Διδάκτορα Σωτηρία Ταβουλάρη για τη συνεχή συμπαράσταση και υποστήριξη, καθώς επίσης και για τις άπειρες και γόνιμες συζητήσεις και συμβουλές, οι οποίες με βοήθησαν να κατανοήσω αλλά και να αγαπήσω την δουλειά αυτή.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο για την πολύτιμη βοήθεια και τις ουσιαστικές υποδείξεις του, καθώς επίσης και για το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη συνεχή συμπαράσταση και κατανόηση.

***Αφιερώνεται  
στους γονείς μου***

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

<b>1.</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>14</b>
3.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	14
3.2	Ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA σε πηκτική αгарόζης	15
3.3	Καθαρισμός θραυσμάτων DNA	15
3.4	Υποκλωνοποίηση των PCR προϊόντων στον πλασμιδιακό φορέα	15
3.5	Μετασχηματισμός βακτηρίων <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA	16
3.6	Επιλογή θετικών αποικιών	17
3.7	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	17
3.8	Διαμόλυνση κυττάρων πιθήκου CV1 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια	18
3.9	Ανίχνευση των ανασυνδυασμένων πεπτιδίων με φθορισμό	19
3.10	Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος από CV1 κύτταρα	19
3.11	Ανάλυση κατά Western	19
<b>4.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>21</b>
4.1	Παραγωγή των DNA αλληλουχιών των ATPase και PBD περιοχών του hsp70 γονιδίου	21
4.2	Υποκλωνοποίηση των δομών ATPase και PBD της πρωτεΐνης Hsp70 του πιθήκου	22
4.3	Διαμόλυνση κυττάρων πιθήκου CV1 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια	25
4.4	Ανάλυση της έκφρασης του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου PBD σε επιμολυσμένα κύτταρα CV1 με ανοσοαποτύπωση	26
<b>5.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>30</b>

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

<b>1.</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>34</b>
1.1	Ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροφινών (GnRH)	35
1.2	Παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin surge attenuating or inhibiting factor– GnSAF)	36
1.3	Η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA)	38
<b>2.</b>	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>39</b>
<b>3.</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>40</b>
3.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	40
3.2	Ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός θραυσμάτων DNA	40
3.3	Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς	41
3.4	Μετασχηματισμός βακτηρίων <i>E. coli</i>	41
3.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	42
3.6	Μετασχηματισμός του <i>Pichia pastoris</i>	42
3.7	Επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο σύστημα έκφρασης <i>Pichia pastoris</i>	43
3.8	Ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τα υπερκείμενα των καλλιέργειών	43
3.9	Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επιμύων	44
3.10	Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστηριότητας GnSAF	45
3.11	Συναγωνιστική μέθοδος ELISA για τη μέτρηση της LH	46
<b>4.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>47</b>
4.1	Κλωνοποίηση του καρβοξυτελικού άκρου της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού στην <i>E. coli</i>	47
4.2	Έκφραση στο <i>Pichia pastoris</i>	50
4.3	Ανίχνευση του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου από τα υπερκείμενα καλλιέργειών	51
4.4	Ανίχνευση δραστηριότητας GnSAF στα υπερκείμενα των κλώνων που εκφράζουν το ανασυνδυασμένο πεπτιδίο 490-585 της HSA	53
<b>5.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>59</b>

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

<b>1.</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>62</b>
1.1	Αμυλάσες	62
1.2	α-Αμυλάσες υπερθερμόφιλων αρχαιοβακτηρίων	63
<b>2.</b>	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>65</b>
<b>3.</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>66</b>
3.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πολλών σταδίων	66
3.2	Ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός θραυσμάτων DNA	69
3.3	Δημιουργία απότομων άκρων και περιοριστικές πέψεις του ενθέματος και του πλασμιδιακού φορέα	70
3.4	Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματισμός βακτηρίων <i>E.coli</i>	71
3.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας	71
<b>4.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>72</b>
4.1	Αντικατάσταση της σηματοδοτικής αλληλουχίας της α-αμυλάσης του <i>P. woesei</i> με τη σηματοδοτική αλληλουχία <i>gIII</i> που αναγνωρίζεται από <i>E. coli</i>	72
4.2	Κλωνοποίηση του ανασυνδυασμένου γονιδίου της α-αμυλάσης του <i>P. woesei</i> που φέρει τη σηματοδοτική αλληλουχία <i>gIII</i>	74
4.2.1	Δημιουργία απότομων άκρων στη μια θέση <i>PstI</i> του φορέα έκφρασης και εισαγωγή του προϊόντος του 2 <sup>ου</sup> σταδίου PCR στο φορέα έκφρασης μετά από την πλήρη πέψη τους με τα περιοριστικά ένζυμα <i>PstI</i> και <i>MluI</i>	75
4.2.2	Απευθείας εισαγωγή του προϊόντος του 2 <sup>ου</sup> σταδίου PCR στο φορέα έκφρασης μετά από μερική πέψη με το ένζυμο περιορισμού <i>PstI</i>	76
4.2.3	Επέκταση του προϊόντος του δευτέρου σταδίου PCR και εισαγωγή του στο φορέα έκφρασης στη θέση περιορισμού <i>PstI</i>	77
<b>5.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>83</b>



# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

<b>1.</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>86</b>
1.1	Πρωτεΐνη p53	86
1.2	Δομή της p53	86
1.3	Ρύθμιση της έκφρασης και λειτουργίας της p53	87
1.4	Βιολογικός ρόλος της p53	88
1.5	p53 και καρκίνος του μαστού	89
<b>2.</b>	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>91</b>
<b>3.</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>92</b>
3.1	Απομόνωση DNA από φρέσκα ιστικά δείγματα μαστού	92
3.2	Ενίσχυση των εξονίων 5 – 8 του γονιδίου p53 με τη μέθοδο της PCR	92
3.3	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53 με τη μέθοδο DGGE	94
<b>4.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>97</b>
4.1	Ενίσχυση των εξονίων 5 – 8 του γονιδίου της p53	97
4.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53 με τη μέθοδο DGGE	98
<b>5.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>102</b>

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**“ΕΚΦΡΑΣΗ ΔΟΜΩΝ ΤΗΣ HSP70 ΤΟΥ ΠΙΘΚΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ  
ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ”**

Επιβλέποντες :

Επίκ. Καθηγητής : Χ. Αγγελίδης

Υ/Δ : Π. Μποζίδης

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα κύτταρα, όλων των οργανισμών που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, αντιδρούν σε αιφνίδιες αλλαγές στο περιβάλλον με τη σύνθεση ενός μικρού σχετικά αριθμού πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάστηκαν πρωτεΐνες θερμικού σοκ (**Heat Shock Protein, HSPs**). Οι πρωτεΐνες αυτές προσδίδουν αυξημένη θερμοανθεκτικότητα (Angelidis *et al.*, 1991) καθώς και αντι-αποπτωτικότητα (Jaatella *et al.*, 1992) στα κύτταρα που υπερεκφράζονται. Σε μοριακό όμως επίπεδο έχει αποδειχθεί ότι δρουν ως μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) υποβοηθώντας τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να αποκτήσουν τη σωστή διαμόρφωση τους (Pelham *et al.*, 1986, Georgopoulos and Welch 1993). Με βάση τη μοριακή τους μάζα οι πρωτεΐνες αυτές ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες που αντιστοιχούν στις οικογένειες των 90-110 kDa, 70 kDa, 30-40 kDa (Lindquist S. 1986).

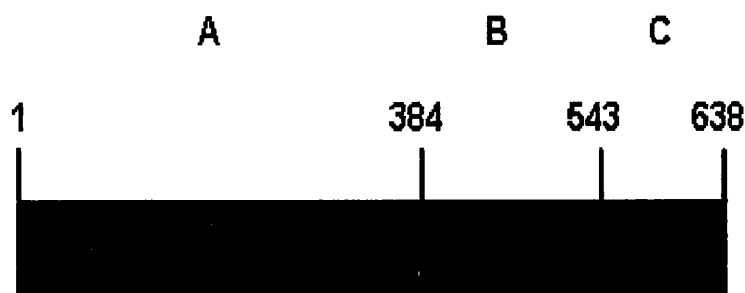
Η επαγωγή μελών της οικογένειας των 70 kDa (Hsp70s) παρατηρήθηκε ότι προκαλείται και μετά από έκθεση σε διάφορους χημικούς παράγοντες (ανάλογα αμινοξέων, αιθανόλη, βαριά μέταλλα, αναστολείς της δομής των μιτοχονδρίων κ.α.) (Lindquist, S. 1986). Η γονιδιακή οικογένεια των Hsp70s αποτελείται επίσης και από μέλη τα οποία επάγονται ελαφρώς ή και καθόλου μετά την επίδραση θερμικού σοκ και ονομάστηκαν συγγενείς των θερμικά επαγόμενων πρωτεϊνών (Heat Shock Cognate Proteins ή HSCs, Hendrick and Hartl, 1993).

Εξαιτίας της αφθονίας και της υψηλής επαγωγή στα κύτταρα μετά από θερμικό σοκ καθώς επίσης και εξαιτίας της εντυπωσιακής συντήρησης της αλληλουχίας τους στα διάφορα είδη (Hunt and Morimoto 1985), οι Hsp70s αποτελούν την κύρια και καλύτερα μελετημένη οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Όλα τα μέλη της οικογένειας των Hsp70 πρωτεϊνών αποτελούνται από τις εξής σημαντικές λειτουργικές περιοχές (Chappell *et al.*, 1987, Flaherty *et al.*, 1990) :

- μια υψηλά συντηρημένη ATP-άση περιοχή 44 kDa στο αμινοτελικό άκρο
- μια καρβοξυτελική περιοχή 28 kDa η οποία διαιρείται σε μια περιοχή πεπτιδικής πρόσδεσης 18 kDa υψηλά συντηρημένη (peptide binding domain) και μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή 10 kDa

Σύμφωνα με μελέτες, απαλείψεις των αμινοξέων που περιλαμβάνουν το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης Hsp70 καθιστούν αδύνατη την μετατόπιση της στον πυρήνα μετά από θερμικό σοκ. Πιθανώς το καρβοξυτελικό άκρο των Hsp70s είναι υπεύθυνο για τον πυρηνικό εντοπισμό των πρωτεϊνών αυτών σε συνθήκες θερμικού σοκ. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι οι αλληλουχίες που περιλαμβάνουν το αμινοτελικό άκρο των Hsp70s είναι υπεύθυνες για την σύνδεση των πρωτεϊνών αυτών με το ATP και την δομική τους ακεραιότητα (Milarski *et al.*, 1989).



**Εικόνα 1 :** Λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών Hsp70

**A:** περιοχή σύνδεσης με ATP (ATPase domain)

**B:** περιοχή σύνδεσης με πεπτιδία (peptide binding domain, PBD)

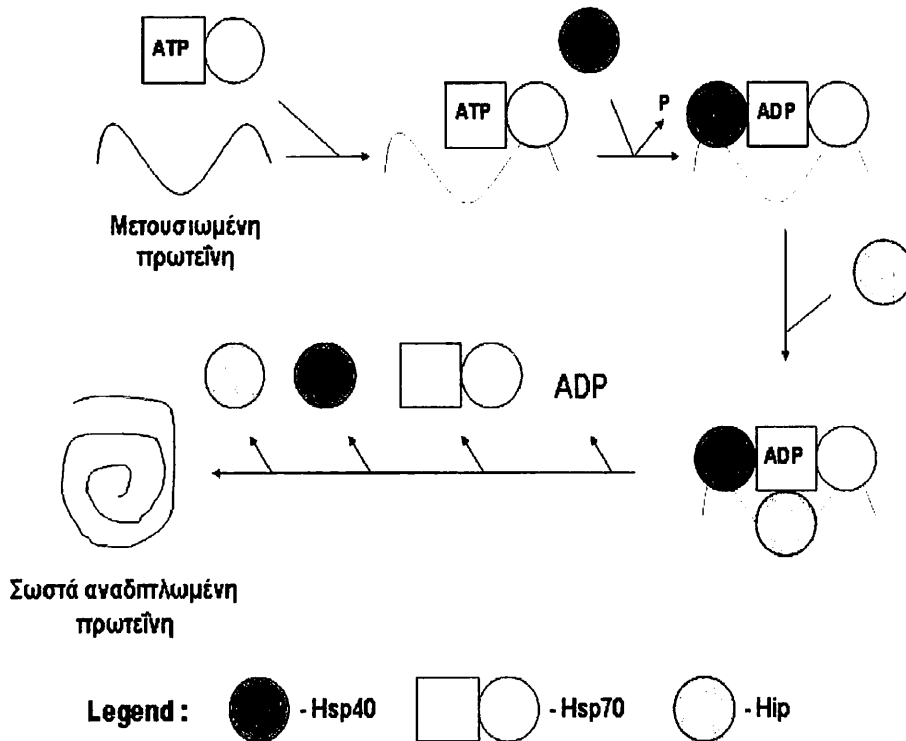
**C:** περιοχή που εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις με συμπαραγόντες (cofactors)

Οι αριθμοί δηλώνουν αμινοξέα

Η υποκυτταρική θέση των Hsp70s εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η έκθεση όμως των κυτάρων σε υψηλές θερμοκρασίες έχει σαν αποτέλεσμα την πυρηνική μετακίνηση των Hsp70s, οι οποίες συσσωρεύονται κυρίως στους πυρηνίσκους. Επαναφορά των κυτάρων σε φυσιολογικές θερμοκρασίες οδηγεί τις Hsp70s στο κυτταρόπλασμα με παράλληλη αποκατάσταση των μορφολογικών βλαβών που παρατηρούνται στους πυρηνίσκους κατά το θερμικό σοκ (Velasquez and Lindquist 1984, Welch and

Mizzen 1988). Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην πρόταση σύμφωνα με την οποία οι Hsp70s προστατεύουν το κύτταρο και ιδιαίτερα τους πυρηνίσκους από το θερμικό σοκ συνδεόμενες με μετουσιωθείσες πρωτεΐνες και αποτρέποντας τη συσσωμάτωσή τους (Gething and Sambrook 1992).

Όπως προαναφέρθηκε οι Hsp70s λειτουργούν σαν μοριακοί συνοδοί. Εμπλέκονται στη διαδικασία των πρωτεϊνικών αναδιπλώσεων τόσο των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων τις οποίες και προστατεύουν από τυχόν ακατάλληλες αναδιπλώσεις (Beckmann *et al.*, 1990) όσο και των μετουσιωμένων ή λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών τις οποίες και διατηρούν σε μια κατάσταση συμβατή με τη σωστή μελλοντική τους αναδίπλωση (Chirico *et al.*, 1988, Deshaies *et al.*, 1988). Οι βιολογικές αυτές δράσεις των Hsp70s είχε αποδειχθεί ότι είναι ATP εξαρτώμενες, με βάση το γεγονός ότι η πρόσδεση ATP με τις Hsp70s συνεπάγεται χαλαρή σύνδεση του μορίου με το υποστρώμα, ενώ αντίθετα η ADP μορφή των Hsp70s οδηγεί σε σταθεροποίηση της παραπάνω σύνδεσης (Beckmann *et al.*, 1992). Επίσης πρέπει να αναφερθεί και η καταλυτική συνεισφορά ενός αριθμού βοηθητικών πρωτεϊνικών συνοδών (co-chaperones) όπως οι Hsp40, Hip, Hor, οι οποίες φαίνεται ότι ρυθμίζουν τις παραπάνω συνδέσεις στο επίπεδο της αναγνώρισης, πρόσδεσης και απελευθέρωσης του υποστρώματος (Sugito *et al.*, 1995, Johnson *et al.*, 1998, Hohfeld *et al.*, 1995). Ο μηχανισμός λειτουργίας των Hsp70s ως μοριακοί συνοδοί στα ευκαρυωτικά κύτταρα απεικονίζεται στην **Εικόνα 2**.



**Εικόνα 2 :** Μηχανισμός λειτουργίας των Hsp70 μοριακών συνοδών στα ευκαρυωτικά κύτταρα (<http://pps98.cryst.bbk.ac.uk/assignments/projects/mak/action.htm>)

Επίσης βιοχημικά στοιχεία υποστηρίζουν ότι οι Hsp70s εμπλέκονται και στους μηχανισμούς μετακίνησης πρωτεϊνών διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών. Η εμπλοκή τους αυτή αποδείχθηκε ότι αφορά τόσο την πυρηνική μεμβράνη (Shi and Thomas 1992) όσο και τις μεμβράνες των μιτοχονδρίων (Deshaies *et al.*, 1988) και του ενδοπλασματικού δικτύου (Chirico *et al.*, 1988).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν :

- να κλωνοποιήσουμε τα τμήματα του hsp70 γονιδίου του πιθήκου που κωδικοποιούν για τις ATPase και PBD περιοχές στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pEGFP-C1 που εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
- να εκφράσουμε τις ATPase και PBD δομές σε ευκαρυωτικά κύτταρα πιθήκου CV1

Με τον τρόπο αυτό θα δημιουργηθεί ένα σύστημα μελέτης του κυτταρικού εντοπισμού και της λειτουργίας των δομών αυτών σε καταστάσεις θερμικού σοκ των κυττάρων.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την κατασκευή των φορέων έκφρασης μέρους του γονιδίου hsp70 του πιθήκου χρησιμοποιήθηκαν ειδικά επιλεγμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια και η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Η επιλογή αυτών των ολιγονουκλεοτιδίων προσδίδει DNA τμήματα που αντιστοιχούν στην ATPase δομή (από το νουκλεοτίδιο 99 ως το 1274) και στην καρβοξυτελική PBD δομή (από το νουκλεοτίδιο 1251 ως το 2092).

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το πλασμιδιακό DNA PBL Monkey-hsp70 1101 (Sainis *et al.*, 1994) και τους εκκινητές 5'-HindIII/Myhsp70 (Minotech), Myhsp70-NdeI-3' (Εργαστήριο Γ. Βιολογίας) και Myhsp70-NdeI-5 (Εργαστήριο Γ. Βιολογίας), 3'-BamI/ssr/p70 (Minotech) για την παραγωγή της ATPase και της PBD δομής αντίστοιχα. Η αλληλουχία των εκκινητών έχει ως εξής (με έντονα μπλε γράμματα παρουσιάζονται οι θέσεις περιορισμού) :

Για την ATPase δομή :

sense primer : 5' – GAG GAC TAA **GCT TTT** GTC ACG GGT – 3'

antisense primer : 5' – TTC TCG **CAT ATG** TCC CCC ATC AGG AT – 3'

Για την PBD δομή :

sense primer : 5' – GAT GGG GGA **CAT ATG** CGA GAA – 3'

antisense primer : 5' – AGT CCT TGG **ATC CAA** TAT TCC ACC TC – 3'

Οι συνθήκες που επιλέγηκαν ήταν για το στάδιο της μετουσίωσης του υποστρώματος 94 °C για 1 λεπτό, για το στάδιο της αναδιάταξης των εκκινητών 57 °C για 1 λεπτό και για την επιμήκυνση των ήδη υβριδοποιημένων εκκινητών 72 °C για 2 λεπτά, σε μια σειρά 35 επαναλαμβανόμενων κύκλων.

Ενδεικτικά αναφέρεται μια αντίδραση PCR σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιούνται : 100 ng/ml πλασμιδιακού DNA, 10X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM από το κάθε dNTP, 50 pmol από τον κάθε εκκινητή, 2,5 U Taq DNA πολυμεράση (Minotech) και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 μl.



### 3.2 Ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η πηκτή που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,8% (w/v) αγαρόζης σε διάλυμα TBE (89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 0,05 M EDTA pH 8.0). Τα δείγματα DNA αναμίχθηκαν σε αναλογία 5:1 με 6Χδιάλυμα φόρτωσης (30% γλυκερόλη και 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης) και ηλεκτροφορήθηκαν σε διάλυμα TBE υπό σταθερή τάση και παράλληλα με DNA γνωστών μοριακών βαρών.

Η παρατήρηση της πηκτής πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

### 3.3 Καθαρισμός θραυσμάτων DNA

Για τον καθαρισμό των θραυσμάτων DNA, οι ζώνες εστιασμού αφαιρέθηκαν από την πηκτή, προστέθηκαν 4,5 όγκοι διαλύματος NaI και 0,5 όγκοι TBE Modifier (διάλυμα συγκεντρωμένων αλάτων) και το δείγμα επώαστηκε στους 55 °C για 5 λεπτά ώστε να λιώσει. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10-15 μl κοκκίων πυριτίου (σίλικα) και μετά από ανάμιξη ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με ανάδευση κάθε 1-2 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 10-50 όγκους συγκεντρωμένου διαλύματος από NaCl/Ethanol/Νερό. Η διαδικασία του πλυσίματος έγινε τρεις φορές και η έκλουση του DNA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 10-15 μl νερού και επώαση στους 55 °C για 2-3 λεπτά.

Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο καθαρισμού του MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen).

### 3.4 Υποκλωνοποίηση των PCR προϊόντων στον πλασμιδιακό φορέα

Ο πλασμιδιακός φορέας και τα προς ένθεση DNA επώαστηκαν μέχρι πλήρους πέψης με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα στα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και ανακτήθηκαν από την πηκτή με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε.

Για την επίτευξη της σύνδεσης των PCR προϊόντων με το φορέα κλωνοποίησης δημιουργήθηκαν τυφλά άκρα με την μέθοδο προσθήκης νουκλεοτιδίων από την DNA πολυμεράση I (Fill in) : 0.1 - 4 µg από το κομμένο με ένα περιοριστικό ένζυμο DNA διαλύονται σε 1X διαλύματος (50 mM Tris – HCl pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub> & 1 mM DTT) και 50 µM από κάθε dNTP. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1 µ DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow Fragment) για κάθε µg DNA και ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στους 25 °C. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 10 mM EDTA και το δείγμα θερμάνθηκε για 10 λεπτά στους 75 °C.

Η σύνδεση των θραυσμάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 16 °C για 16 ώρες σε τελικό όγκο 20 µl που περιείχε 1U T4 DNA λιγάσης (New England Biolabs), 1X ligase buffer (50 mM HCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA, 50% glycerol), 10 mM ATP και ποσοτήτων ενθέματος και φορέα σε αναλογίες 1/2, 1/3, 1/5.

### 3.5 Μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

Για την δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5α του *E. coli*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στηρίζεται στη μέθοδο Inoue (Inoue *et al.*, 1990).

Κύτταρα καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό μέσο L-Broth (LB : 1% w/v βακτο-τρυπτόνη, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1% w/v NaCl) για 12-16 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν και καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό μέσο SOB (2% w/v βακτο-τρυπτόνη, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> και 10 mM MgSO<sub>4</sub>) στους 18 °C μέχρι οπτικής πυκνότητας 0,6. Στη συνέχεια επωάσθηκαν για 10 λεπτά στον πάγο και μετά από φυγοκέντρηση (4000 rpm, 10 min, 4 °C) και αφαίρεση του υπερκειμένου επαναιωρήθηκαν σε 80 ml παγωμένου διαλύματος TB (10 mM Pipes, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub> και 250 mM KCl). Ακολούθησε επώαση στον πάγο και επαναφυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε ήπια σε 20 ml παγωμένου διαλύματος TB που περιέχει 7% v/v DMSO. Τέλος τα κύτταρα μοιράσθηκαν ανά 200 µl σε μικροσωληνάρια τύπου Eppendorf και διατηρήθηκαν στους -80 °C.

Κατά το μετασχηματισμό προστέθηκαν, η μισή ποσότητα από τις αντιδράσεις σύνδεσης σε 200 µl επιδεκτικών κυττάρων. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 5 λεπτά στον πάγο, επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο (LB και 1,5% w/v άγαρ) που περιείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη (50 mg/ml) και αφέθηκαν για 16 ώρες στους 37 °C για την ανάπτυξη αποικιών.

### 3.6 Επιλογή θετικών αποικιών

Προκειμένου να επιλέξουμε τα μετασχηματισμένα βακτήρια, εφαρμόστηκε η μέθοδος Toothpick Plasmid Assay (Sambrook *et al.*, 1989) σύμφωνα με την οποία:

Οι προς έλεγχο αποικίες μεταφέρθηκαν με μικροπιπέτα Gilson σε αριθμημένο μικροσωληνάριο τύπου Eppendorf ενώ ταυτόχρονα το tip μεταφοράς χρησιμοποιήθηκε για μόλυνση ίδιας αρίθμησης σωληναρίου με 5 ml θρεπτικού υλικού. Σε κάθε μικροσωληνάριο τύπου Eppendorf προστέθηκαν 30 µl από το διάλυμα Toothpick lysis buffer (1.25 ml 1N NaOH, 0.25 ml 0.5M EDTA pH 8.0, 0.625 ml 10% SDS, 1.75 g Ficoll και 250 µl 1% Bromophenol blue dye) και τα δείγματα επωάστηκαν για 20 min στους 65 °C. Ακολούθησε επαναιώρηση και φυγοκέντρηση για 15 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 0.8% (w/v) πηκτική αγαρόζης, σε διάλυμα TBE.

Ο διαχωρισμός των θετικών από τις αρνητικές αποικίες έγινε με βάση την διαφορετική κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA ανάλογα με το μοριακό του βάρος.

### 3.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

#### α) Μικρής κλίμακας απομόνωση

Για μικροπαρασκευή πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σύντομη διαδικασία :

Θετικές αποικίες αναπτύχθηκαν σε 5 ml LB που περιείχε καναμυκίνη (50mg/ml) στους 37 °C για 12-16 ώρες και 1 ml εξ αυτών φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm. για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 70

μl διαλύματος STET (8% σουκρόζη, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA pH 8.0 και 50 mM Tris – HCl pH 8.0) και αφού προστέθηκαν 25 μl λυσοζύμης, ακολούθησε επώαση στους 100 °C για 45 δευτερόλεπτα. Μετά από φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος για 10 λεπτά στις 13000 rpm. έγινε συλλογή του υπερκείμενου, προσθήκη 100 μl ισοπροπανόλης και ψύξη για 15 λεπτά στους -70 °C. Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση και πλύσιμο με 70% αιθανόλη δύο φορές. Τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και το DNA επαναιωρήθηκε σε 20 μl νερό.

### β) Μεγάλης κλίμακας απομόνωση

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Plasmid Maxi Kit της εταιρίας Qiagen.

### **3.8 Διαμόλυνση κυττάρων πιθήκου CV1 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια**

Ένα πλήρες τρυβλίο των 10 cm με CV1 κύτταρα πιθήκου χωρίστηκε σε 2 τρυβλία. Μετά από 24 ώρες προετοιμάστηκαν τα ακόλουθα θρεπτικά υλικά για να είναι φρέσκα : 2.5 M CaCl<sub>2</sub> , 2X HEPES buffer saline (HBS) : 280 mM HEPES & 1.5 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0. & 0.1X TE pH 8.0. Ακολούθησε αποστείρωση με φίλτρα 0.22 μm. Σε ένα μικροσωληνάριο τύπου errendorf τοποθετήθηκαν 20μg από το πλασμίδιο και ο όγκος αυξήθηκε στα 450 μl με 0.1X TE. Προστέθηκαν 50 μl 2.5 M CaCl<sub>2</sub> και μετά από ανάδευση το δείγμα αφέθηκε για 5 λεπτά σε εστία κάθετης νηματικής ροής. Σε 500μl 2XHBS προστέθηκαν στάγδην 500 μl του πλασμιδίου με ταυτόχρονη ανάδευση. Το δείγμα αφέθηκε για 30 λεπτά στην εστία κάθετης νηματικής ροής για να γίνει καθίζηση. Όγκος 1 ml του πλασμιδιακού δείγματος σπάρθηκε σε τρυβλίο που περιέχει 9 ml θρεπτικό υλικό DMEM/7% FCS. Μετά από 4 ώρες πραγματοποιήθηκε σοκ γλυκερόλης προσθέτοντας 2,5-3 ml γλυκερόλη (87%) σε 1XHBS για 2-3 λεπτά. 48 ώρες μετά τα κύτταρα αραιώθηκαν 1/10 και στο θρεπτικό υλικό προστέθηκαν 600 μg/ml G418 για την επιλογή αποικιών. Την 6<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διαμόλυνση αυξήθηκε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού σε

800 µg/ml G418 για καλύτερη επιλογή. 17 – 18 ημέρες μετά τη διαμόλυνση επιλέχθηκαν τυχαίες αποικίες οι οποίες και αναπτύχθηκαν σε DMEM/FCS με την παρουσία 400-600 µg/ml G418.

### 3.9 Ανίχνευση των ανασυνδυσασμένων πεπτιδίων με φθορισμό

Η ανίχνευση των ανασυνδυσασμένων πεπτιδίων στα διαμολυνθέντα CV1 κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού (Nikon ECLIPSE E400) και ειδικών φίλτρων (B-2A: EX 450-490, DM 505, BA 520).

Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία των 5 cm και αμέσως πριν από τη λήψη των φωτογραφιών αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 5 ml PBS. Στις περιπτώσεις που απαιτείται η ανίχνευση των πρωτεϊνών σε κατάσταση θερμικού σοκ τα κύτταρα επωάζονται προηγουμένως στους 43 °C για 1,5 ώρα.

### 3.10 Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος από CV1 κύτταρα

Για την παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία (Zachayus *et al.*, 1996) : κύτταρα από ένα πλήρες 10 cm τρυβλίο φυγοκεντρήθηκαν σε διάλυμα PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) στους 4 °C για 10 λεπτά στα 1500 rpm. Στη συνέχεια αφού έγινε έκπλυση των κυττάρων με 1 ml PBS ξαναφυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στις 3000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 200 µl Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM KCl, 1 mM PMSF και 1% Nonidet P-40) και επωάστηκαν για 15 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε κατεργασία των κυττάρων με υπέρηχους (sonication στα 50 Watt, 2 με 3 φορές για 3-4 sec), φυγοκέντρηση στους 4 °C για 10 λεπτά και λήψη του υπερκλειμένου.

### 3.11 Ανάλυση κατά Western

Τα προς ανάλυση δείγματα αναμίχθηκαν με 5X διάλυμα φόρτωσης (1X sample buffer: 0,0625 M Tris-HCl, 3% SDS, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 0,01% Blue bromophenol) και αφού επωάστηκαν στους 100

°C 5 λεπτά διαχωρίστηκαν σε πηκτική ακρυλαμιδίου 10%, σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (0,025 M Tris-base, 0,192 M glycine, 0,1% SDS) υπό την επίδραση πεδίου σταθερής τάσης (80 V) για 1,5 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε ξηρή ηλεκτροφορητική μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό την επίδραση πεδίου σταθερής τάσης 150 mA για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα κορεσμού (PBS και 3% dry milk) επί 16 ώρες. Κατά το στάδιο αυτό δεσμεύονται οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις που θα μπορούσαν να αντιδράσουν ακολούθως με το αντίσωμα. Ακολούθησε έκπλυση της μεμβράνης με PBS και επώαση με το ειδικό αντίσωμα σε PBS/3% BSA για 1 ώρα.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την hsp70 (SPA810, Stressgene) σε αραιώση 1:2500. Η μεμβράνη επώαστηκε 3 φορές υπό ανάδευση με PBS/0,1% Tween-40 για 5 λεπτά την κάθε φορά. Στη συνέχεια επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα (Anti-mouse IgG – HRP) σε αραιώση 1:2500 σε PBS/2,5% dry milk. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science).

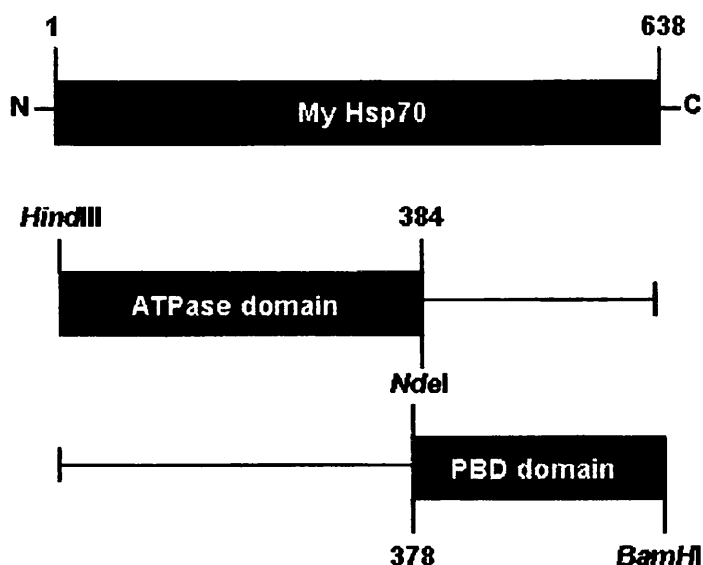
Η ίδια μεμβράνη ξαναχρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του χιμαιρικού PBD – GFP πολυπεπτιδίου. Μετά από επώαση της μεμβράνης εκ νέου σε διάλυμα κορεσμού (PBS και 3% dry milk) επί 16 ώρες χρησιμοποιήθηκε ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την GFP (Clontech) σε αραιώση 1:500. Ακολούθησε εκ νέου επώαση με το δεύτερο αντίσωμα στην ίδια αραιώση και οπτικοποίηση του αποτελέσματος.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Παραγωγή των DNA αλληλουχιών των ATPase και PBD περιοχών του hsp70 γονιδίου

Προκειμένου να επιτύχουμε την πολλαπλή αντιγραφή των περιοχών αυτών, εφαρμόσαμε τη μέθοδο της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη χρήση ειδικά επιλεγμένων εκκινητών. Συγκεκριμένα για την ATPase δομή ο 5' εκκινητής υβριδοποιούσε από την -81 bp ως την -57 bp και ο 3' εκκινητής από την 1068 bp ως την 1094 bp της αλληλουχίας του Myhsp70 γονιδίου. Για την PBD δομή ο 5' εκκινητής υβριδοποιούσε από την 1071 bp ως την 1094 bp και ο 3' εκκινητής από την 1887 bp ως την 1912 bp της αλληλουχίας του Myhsp70 γονιδίου.

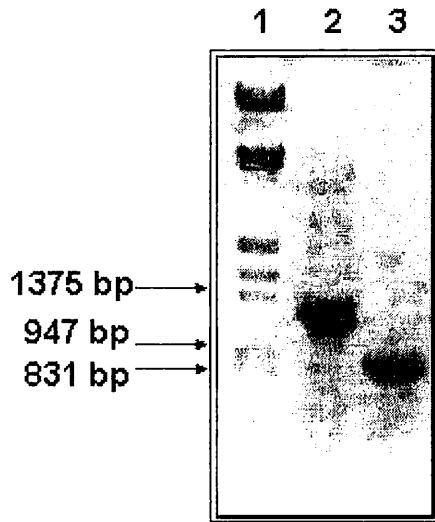
Ως υπόστρωμα για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε το πλασμιδιακό DNA PBL Monkey-hsp70 1101 που φέρει ολόκληρο το γονίδιο hsp70 (Sainis *et al.*, 1994). Στους εκκινητές του νοηματικού κλώνου εισαχθήκανε, για την ATPase δομή μια θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *HindIII* ενώ για την PBD μια θέση αναγνώρισης της *NdeI*. Αντίστοιχα στους εκκινητές του μη νοηματικού κλώνου εισαχθήκανε, για την ATPase η θέση αναγνώρισης της *NdeI* και για την PBD η *BamHI*.



**Σχήμα 1** : Απεικόνιση της πρωτεΐνης Myhsp70 καθώς και των περιοριστικών ενζύμων με τα οποία ανακτήθηκαν οι δομές ATPase και PBD με την μέθοδο της PCR. Οι αριθμοί δηλώνουν αμινοξέα.

Μετά την πολλαπλή αντιγραφή των ATPase και PBD δομών της MyHsp70 ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός των DNA PCR προϊόντων με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε (σελ. 15)

Στην **Εικόνα 3** φαίνονται τα προϊόντα PCR μετά από ηλεκτροφόρηση.



**Εικόνα 3** : Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης των PCR προϊόντων

Διαδρομή 1 : πρότυπα μοριακά βάρη

Διαδρομές 2 & 3 : προϊόντα PCR για την ATPase (1175 bp) και PBD δομή (843 bp) αντίστοιχα

#### 4.2 Υποκλωνοποίηση των δομών ATPase και PBD της πρωτεΐνης Hsp70 του πιθήκου

Για την επίτευξη της έκφρασης των ATPase και PBD δομών του γονιδίου hsp70 του πιθήκου, προχωρήσαμε στην κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών σε φορέα έκφρασης που εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη.

Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης που επιλέχθηκε ήταν ο pEGFP-C1 (Clontech) που έχει μέγεθος 4731 bp και φέρει τα εξής χαρακτηριστικά :

- κωδικοποιεί την GFPmut1 παραλλαγή του άγριου τύπου GFP γονιδίου η οποία δίνει καλύτερο φθορισμό και μεγαλύτερη έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης στα κύτταρα των θηλαστικών
- περιέχει τον πολυσυνδέτη με μοναδικές θέσεις περιορισμού μεταξύ της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του EGFP γονιδίου και του SV40 poly A. Τα γονίδια που εισάγονται εντός του πολυσυνδέτη εκφράζονται ως



χίμαιρες με το καρβοξυτελικό άκρο του EGFP χωρίς να παρεμβάλλονται κωδικόνια τερματισμού

- τα γονίδια που προσδίδουν στα βακτήρια ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και στα θηλαστικά ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418
- την περιοχή έναρξης της αντιγραφής του SV40 που επιτρέπει την αντιγραφή του πλασμιδίου σε κύτταρα θηλαστικών που εκφράζουν το T-αντιγόνο του SV40 και την ρUC που επιτρέπει την αντιγραφή στο *E.coli*
- τον υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (CMV IE-immediate early CMV)

Η υποκλωνοποίηση των δομών της Hsp70 σχεδιάστηκαν κατά τέτοιο τρόπο ούτως ώστε οι αλληλουχίες της GFP να είναι σε σωστό πλαίσιο ανάγνωσης με τις αλληλουχίες των δομών και να λαμβάνουμε έτσι χιμαιρικά προϊόντα που φθορίζουν όταν οι κατασκευές μας εκφράζονται σε κύτταρα.

Τα καθαρισμένα PCR προϊόντα προετοιμάστηκαν στη συνέχεια για κλωνοποίηση τους στο φορέα pEGFP-C1. Συγκεκριμένα έγινε πλήρης πέψη με το ένζυμο *NdeI* και στην συνέχεια δημιουργία τυφλών άκρων όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Ακολούθησε η τελική πέψη με το ένζυμο *HindIII* για το προϊόν PCR της ATPase και με το *BamHI* για το προϊόν της PBD.

Για το φορέα που χρησιμοποιήθηκε στη δημιουργία της κατασκευής με την ATPase δομή έγινε παράλληλη πέψη με τα ένζυμα *HindIII* και *SmaI* όπου το *SmaI* δημιουργεί τυφλά άκρα. Ενώ για τον φορέα της PBD κατασκευής έγινε πρώτα πέψη με το ένζυμο *EcoRI*, στη συνέχεια δημιουργία τυφλών άκρων και ακολούθησε η τελική πέψη με το ένζυμο *BamHI*.

Οι αντιδράσεις σύνδεσης των θραυσμάτων DNA με το φορέα πραγματοποιήθηκαν στους 16 °C με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης.

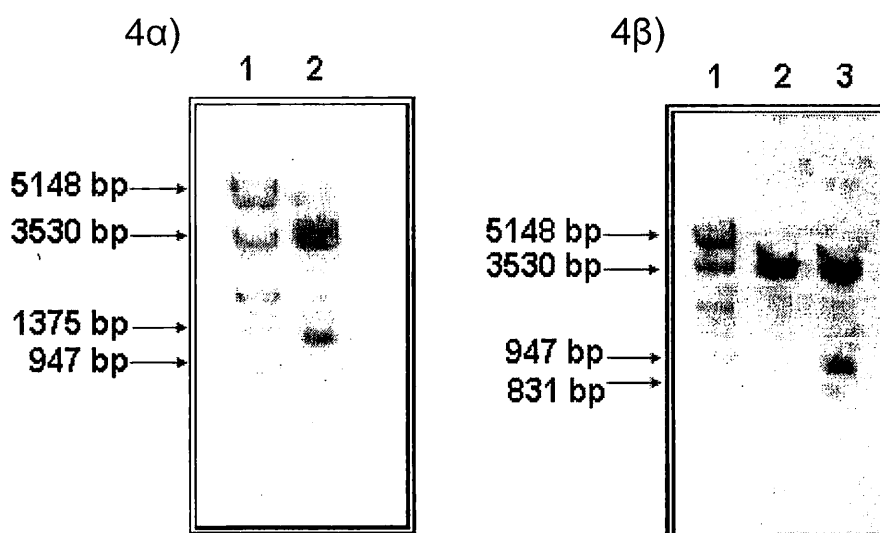
Ακολουθώντας την παραπάνω στρατηγική αναμέναμε να υποκλωνοποιήσουμε την ATPase και την PBD δομή της MyHsp70 στο πλασμίδιο pEGFP-C1 και στις θέσεις *HindIII* – *NdeI* και *NdeI* – *BamHI* αντίστοιχα (Σχήμα 1).

Ο μετασχηματισμός έγινε σε επιδεκτικά κύτταρα DH5α της *E. coli* και οι θετικές αποικίες επιλέχθηκαν με βάση την ανθεκτικότητα σε καναμυκίνη.

Έπειτα από απομόνωση DNA και διαγνωστική πέψη διαπιστώθηκε ότι αποκτήθηκαν οι επιθυμητές κατασκευές.

Συγκεκριμένα επώαση ενός κλώνου pEGFP-C1/ATPase με *HindIII* και *BamHI* προσδίδει τα αναμενόμενα θραύσματα (Εικόνα 4α) DNA, μεγέθους 4370 bp (φορέας) και 1175 bp (ένθεμα της ATPase δομής). Επίσης επώαση ενός κλώνου pEGFP-C1/PBD με *HindIII* και *BamHI* προσδίδει τα αναμενόμενα 4370 bp (φορέας) και 843 bp (ένθεμα της PBD δομής) DNA θραύσματα (Εικόνα 4β).

Στις Εικόνες 4α & 4β παρουσιάζονται τα θραύσματα DNA που προκύπτουν μετά από περιοριστική ανάλυση των μετασχηματισμένων πλασμιδίων και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.



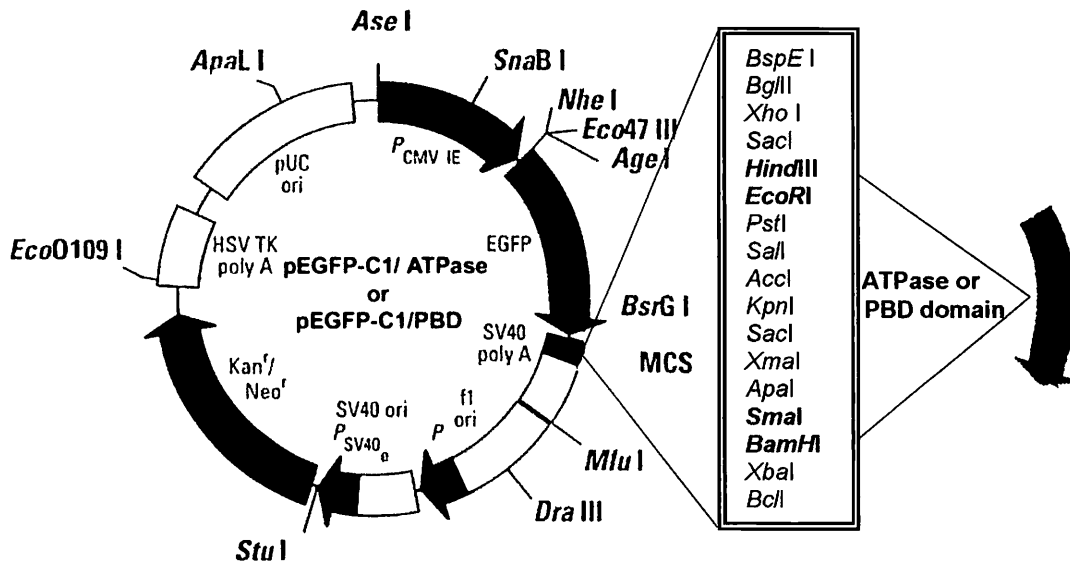
**Εικόνες 4α – 4β :** Περιοριστική ανάλυση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τα ένζυμα *HindIII* και *BamHI*

Διαδρομές α1 & β1 : πρότυπα μοριακά βάρη

Διαδρομή α2 : φορέας (4731 bp) και ένθεμα της ATPase δομής (1175 bp)

Διαδρομές β2 & β3 : «άκοπος» πλασμιδιακός φορέας, φορέας (4371 bp) και ένθεμα της PBD δομής (843 bp) αντίστοιχα

Στο **Σχήμα 2** απεικονίζονται τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pEGFP-C1/ATPase και pEGFP-C1/PBD.



**Σχήμα 2 :** Απεικόνιση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στην ATPase & PBD δομή της Hsp70 του πιθήκου. Στο σχήμα επίσης φαίνονται οι θέσεις ένθεσης των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για τα πεπτίδια αυτά.

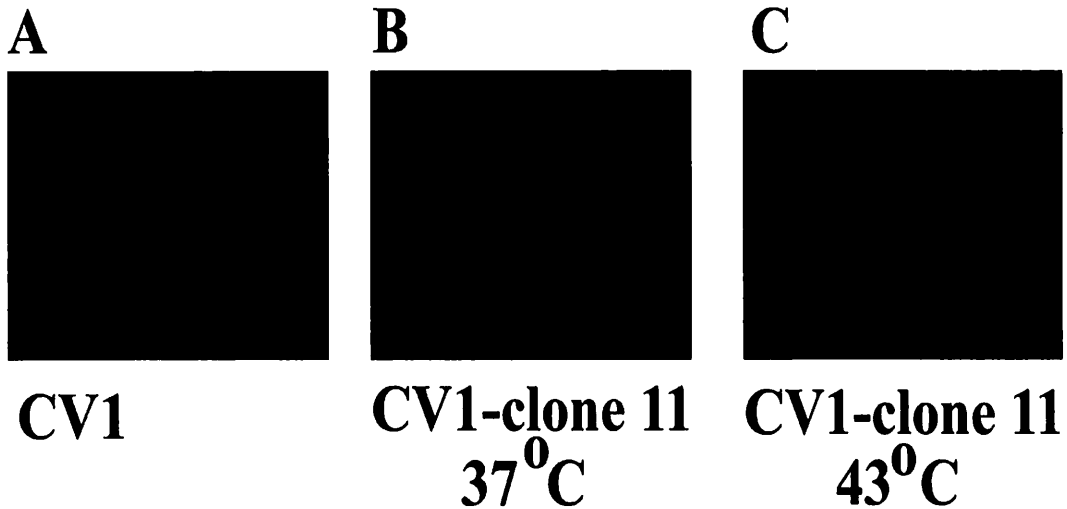
#### 4.3 Διαμόλυνση κυττάρων πιθήκου CV1 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Για τη έκφραση των ATPase και PBD δομών της πρωτεΐνης Hsp70 του πιθήκου πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των CV1 κυττάρων με το ρEGFP-C1/ATPase ή ρEGFP-C1/PBD πλασμίδιο.

Τα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο ρEGFP-C1/ATPase κύτταρα παρουσίασαν προβλήματα κατά την ανάπτυξη τους. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα να πεθαίνουν με συνέπεια την αδυναμία του περαιτέρω ελέγχου τους.

Τα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο ρEGFP-C1/PBD κύτταρα τα οποία παρουσίαζαν ικανοποιητική ανάπτυξη, μετά από επιλογή με το αντιβιοτικό G418 ελέγχθηκαν αν εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, που όπως προαναφέρθηκε είναι σε σύντηξη με τα πεπτίδια που κλωνοποιήσαμε στον φορέα έκφρασης, με την μέθοδο του φθορισμού.

Επίσης για να ελέγξουμε αν η εικόνα του φθορισμού αλλάζει μετά από θερμικό σοκ επωάσαμε τα κύτταρα στους 43 °C για 1,5 ώρα και τα παρατηρήσαμε ξανά στο μικροσκόπιο.



**Εικόνα 5 :** Έλεγχος του φθορισμού σε διαμολυσμένα CV1 κύτταρα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEGFP-C1/PBD

Εικόνα A : CV1 κύτταρα

Εικόνα B : διαμολυσμένα CV1 κύτταρα

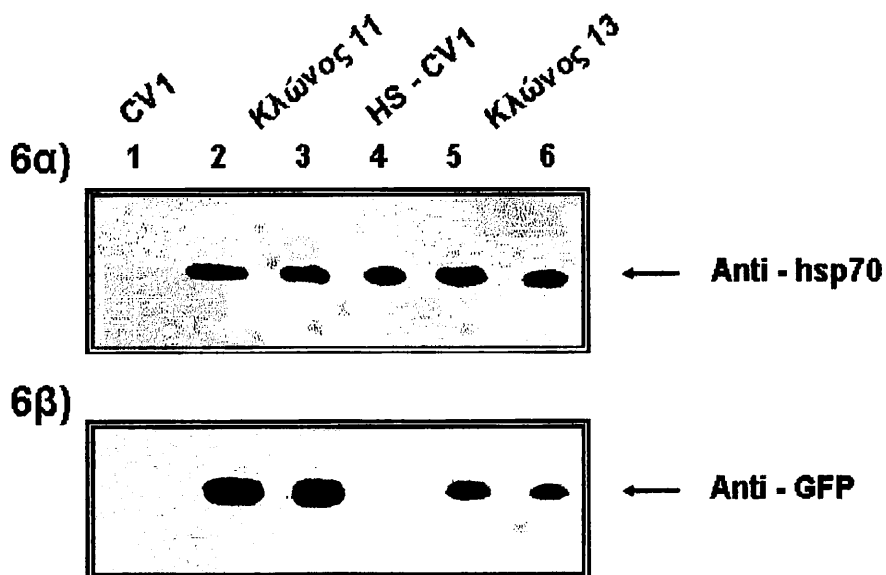
Εικόνα C : διαμολυσμένα CV1 κύτταρα μετά από θερμικό σοκ

Όπως παρατηρούμε στη **Εικόνα 5** ο φθορισμός στα διαμολυσμένα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί θερμικό σοκ εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και λιγότερο στον πυρήνα. Στα διαμολυσμένα κύτταρα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ παρατηρούμε μια ελαφρά αλλά εμφανή μετακίνηση του φθορισμού στον πυρήνα των κυττάρων.

#### 4.4 Ανάλυση της έκφρασης του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου PBD σε επιμολυσμένα κύτταρα CV1 με ανοσοαποτύπωση

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε αν η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη δημιουργεί χιμαιρική πρωτεΐνη με τη PBD δομή πραγματοποιήσαμε ανοσοαποτύπωση σε κυτταρικά εκχυλίσματα διαμολυσμένων κυττάρων. Αναλύθηκαν δύο κλώνοι CV1 κυττάρων επιμολυσμένων με το πλασμίδιο pEGFP-C1/PBD (11 και 13) χρησιμοποιώντας το αντίσωμα SPA810 που

αναγνωρίζει τον επίτοπο μεταξύ των καταλοίπων 437-504 της Hsp70 του πιθήκου καθώς και το αντίσωμα έναντι της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). Χρησιμοποιήθηκαν όγκοι 30 και 20 μl ολικού εκχυλίσματος από τους δύο κλώνους. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες 30 μl εκχυλίσματος από μη επιμολυσμένα CV1 κύτταρα καθώς επίσης και 30 μl εκχυλίσματος από μη επιμολυσμένα CV1 κύτταρα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ.



**Εικόνα 6 :** Ανάλυση κατά Western των κλώνων 11 και 13

**Εικόνα α :** Ανάλυση κατά Western με το αντίσωμα anti – hsp70

**Εικόνα β :** Ανάλυση κατά Western με το αντίσωμα anti – GFP

**Διαδρομή 1 :** 30 μl ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος κυττάρων CV1

**Διαδρομές 2 – 3 :** 30 και 20 μl ολικού εκχυλίσματος κυττάρων CV1 επιμολυσμένων με το πλασμίδιο pEGFP-C1/PBD (κλώνος 11)

**Διαδρομή 4 :** 30 μl ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος κυττάρων CV1 μετά από θερμικό σοκ

**Διαδρομές 5 – 6 :** 30 και 20 μl ολικού εκχυλίσματος κυττάρων CV1 επιμολυσμένων με το πλασμίδιο pEGFP-C1/PBD (κλώνος 13)

Με βάση την ανοσοαποτύπωση στην οποία χρησιμοποιούμε το αντίσωμα έναντι της Hsp70, παρατηρούμε ότι στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο pEGFP-C1/PBD ανιχνεύουμε μια ζώνη στο ίδιο μοριακό βάρος με την ενδογενή Hsp70 η οποία ανιχνεύεται στα CV1 κύτταρα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ (**Εικόνα 6α**). Η ζώνη όμως αυτή αντιστοιχεί στη χιμαιρική πρωτεΐνη μεταξύ της πρωτεΐνης GFP και της PBD δομής η οποία υπερεκφράζεται (**Εικόνα 6β**) διότι ανιχνεύεται και κατά την ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του anti – GFP αντισώματος.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Hsp70s είναι μια οικογένεια μοριακών συνοδών που αποτελούνται από δύο σημαντικές λειτουργικές περιοχές: η μία εντοπίζεται στο αμινοτελικό τους άκρο και έχει δράση ATP-άσης (ATPase domain) ενώ η δεύτερη εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο και είναι υπεύθυνη για την δέσμευση των πολυπεπτιδίων (peptide binding domain, PBD).

Όπως προαναφέρθηκε, οι Hsp70s υπό κανονικές συνθήκες εντοπίζονται σε χαμηλές ποσότητες στο κυτταρόπλασμα ενώ σε συνθήκες θερμικού σοκ επάγονται και μετακινούνται στον πυρήνα. Στην παρούσα εργασία στόχος μας ήταν να δημιουργήσουμε ένα σύστημα μελέτης του κυτταρικού εντοπισμού και της λειτουργίας των ATPase και PBD δομών της πρωτεΐνης Hsp70 του πιθήκου σε καταστάσεις “stress” των κυτάρων. Δεδομένου του ότι υπήρχε κλωνοποιημένη ολόκληρη η Hsp70, κλωνοποιήσαμε τα τμήματα του γονιδίου που περιλαμβάνουν την κωδικοποιούσα περιοχή των ATPase και PBD δομών στο φορέα έκφρασης pEGFP-C1. Ο φορέας αυτός καθιστά δυνατή την έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης σε σύντηξη με το προς μελέτη πεπτίδιο. Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πεπτιδίων έγινε σε κύτταρα πιθήκου CV1 προκειμένου να μελετηθεί εύκολα ο κυτταρικός εντοπισμός τους σε καταστάσεις stress χωρίς να χρησιμοποιούμε τη μέθοδο του φθορισμού με τη χρήση αντισωμάτων.

Στα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει την κωδικοποιούσα αλληλουχία της PBD, παρατηρήσαμε ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες ο φθορισμός εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα ενώ υπό συνθήκες θερμικού σοκ μετατοπίζεται ελάχιστα και στον πυρήνα.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι ο εντοπισμός του φθορισμού οφείλεται στην PBD δομή που είναι σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη πραγματοποιήσαμε ανοσοαποτύπωση σε κυτταρικά εκχυλίσματα επιμολυσμένων κυτάρων με τη χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει τον επίτοπο μεταξύ των καταλοίπων 437-504 της Hsp70 του πιθήκου καθώς και αντισώματος έναντι της GFP. Σύμφωνα με την ανοσοαποτύπωση η χιμαιρική πρωτεΐνη υπερεκφράζεται στα διαμολυσμένα κύτταρα.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε αποτελούν αρχικές συνθήκες stress και δεν μπορούν να μας δώσουν αρκετά σαφή αποτελέσματα. Έτσι για να μπορέσουμε όμως να αξιολογήσουμε σωστά τα αποτελέσματα μας, θα πρέπει να ελεγχθεί η μετατόπιση του φθορισμού σε διάφορες θερμοκρασίες stress καθώς επίσης και σε διάφορους χρόνους ώστε να έχουμε μια συνολική εικόνα μετατόπισης του φθορισμού.

Λόγω του ότι μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί το σήμα πυρηνικού εντοπισμού που ευθύνεται για την μετατόπιση των Hsp70 πρωτεϊνών σε καταστάσεις stress από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, η δημιουργία ενός τέτοιου συστήματος μελέτης των δομών της θα μπορούσε ίσως να βοηθήσει προς την κατεύθυνση ανίχνευσης του NLS. Επίσης θα μπορούσε να μελετηθεί ο ρόλος των δομών αυτών στα κύτταρα. Για παράδειγμα χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές χρώσης των κυττάρων θα μπορούσαμε να προσδιορίσουμε το ρόλο των δομών αυτών στην επιβίωση των κυττάρων που τις εκφράζουν μετά από καταστάσεις stress.

Η χρήση φθορίζουσών πρωτεϊνών (living colors proteins) για την δημιουργία ενός τέτοιου συστήματος είναι πολύ διαδεδομένη. Οι πρωτεΐνες αυτές όπως η GFP μειώνουν στο ελάχιστο το χρόνο οπτικοποίησης του αποτελέσματος και επιτρέπουν τη μελέτη της πορείας της χημεικής πρωτεΐνης σε ζωντανά κύτταρα.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Angelidis C.E., Lazaridis I., and Pagoulatos G.N. (1991) Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance, *Eur. J. Biochem.* **199**, 35-39
2. Beckmann R.P., Mizzen L.A., and Welch W.J. (1990) interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly, *Science* **248**, 850-854
3. Beckmann R.P., Lovett M., and Welch W.J. (1992) Examining the function and regulation of hsp70 in cells subjected to metabolic stress, *J. Cell Biol.* **117**, 1137-1150
4. Chappell T.G., Konforti B.B., Schmid S.L., and Rothman J.E. (1987) The ATPase core of a clathrin uncoating protein, *J. Biol. Chem.* **262**, 746-751
5. Chirico W., Waters M.G., and Blobel G. (1988) 70 K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes, *Nature* **332**, 805-810
6. Deshaies R.J., Koch B.D., Weiner-Wasburne M. Craig E., and Schekman R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides, *Nature* **332**, 800-805
7. Flaherty K.M., DeLuca-Flaherty C., and McKay D.B. (1990) Three dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein, *Nature* **346**, 623-628
8. Georgopoulos C., and Welch W.J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones, *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 601-634
9. Gething M.J., and Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell, *Nature* **355**, 33-45
10. Hendrick J.P., and Hartl F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins, *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384
11. Hohfeld J., Minami Y., and Hartl F.U. (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic hsc70/hsp40 reaction cycle, *Cell* **83**, 589-598



12. Hunt C., and Morimoto R.I (1985) Conserved features of eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human HSP70, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6455-6459
13. Inoue H., Nojima H., and Okayama H. (1990) High efficient transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* **96**, 23-28
14. Jaatella M., Wissing D., Baner P.A., and Li G.C. (1992) Major heat shock proteins 70 protect tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity, *EMBO J.* **11**, 3507-3512
15. Johnson B.D., Schumacher R.J., Ross E.D., and Toft D.O. (1998) Hop modulates hsp70/hsp90 interactions in protein folding, *J. Biol. Chem.* **273**, 3679-3686
16. Lindquist S. (1986) The heat shock response, *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 1151-1191
17. Milarski K.L., and Morimoto R.I (1989) Mutational analysis of the human hsp70 protein: Distinct domain for nucleolar localization and ATP-binding, *J. Cell Biol.* **109**, 1947-1962
18. Pelham H.R.B (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose regulated proteins, *Cell* **46**, 959-961
19. Sainis I., Angelidis C., Pagoulatos G., and Lazaridis I. (1994) The hsc70 gene which is slightly induced by heat is the main virus inducible member of the hsp70 gene family, *FEBS Letters* **355**, 282-286
20. Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor NY. p. 1.32
21. Shi Y. and Thomas J.O. (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-Kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate, *Mol. Cell Biol.* **12**, 2186-2192
22. Sugito K., Yamane M., Hattori H., Hayashi Y., Tohnai I., Ueda M., Tsuchida N., and Ohtsuka K. (1995) Interaction between hsp70 and hsp40, eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ, in human cells expressing mutant-type p53, *FEBS Lett.* **358**, 161-164
23. Velasquez J.M., and Lindquist S. (1984) Hsp70 : nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery, *Cell* **36**, 655-662

24. Weloh W.J., and Mizzen L.A (1988) Characterization of the thermotolerant cell. Effects on the intracellular distribution of heat shock protein 70 intermediate filaments and small nuclear ribonucleoprotein complexes, *J. Cell Biol.* **106**, 1117-1130
25. Zacharyus J.L., Benatmane S., and Plas C. (1996) Role of Hsp70 synthesis in the fate of the insulin-receptor complex after heat shock in cultured fetal hepatocytes, *J. Cell Biochem.* **61**, 216-229

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**“ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΟΠΕΡΙΟΧΗΣ IIIΒ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ  
ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΟΡΟΥ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ GnSAF”**

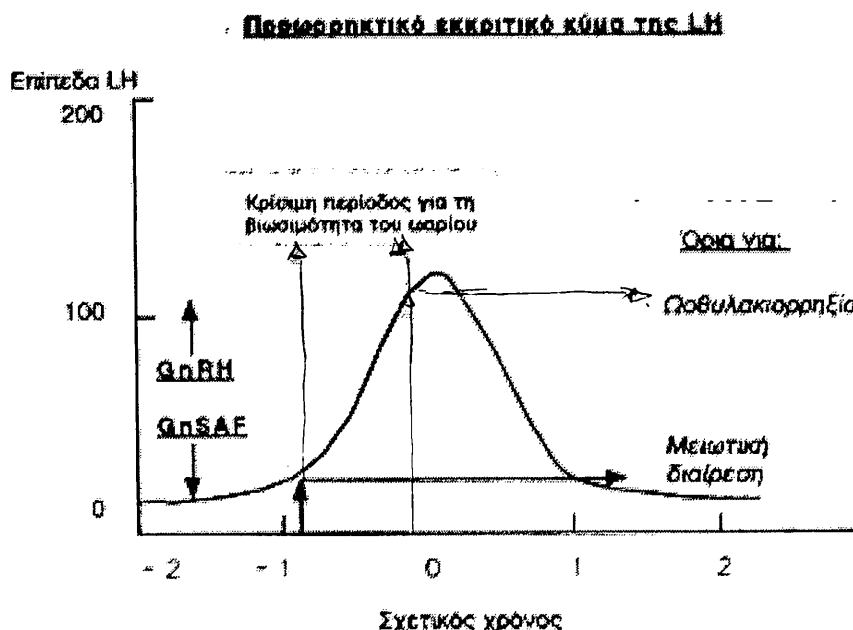
Επιβλέποντες :  
Καθηγητής : Κ. Σεφεριάδης  
Υ/Δ : Σ. Ταβουλάρη

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ρύθμιση του γεννητικού κύκλου στις γυναίκες καθορίζεται από μια σειρά πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ των ωθηκών και του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα.

Από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης εκκρίνονται οι γοναδοτροφίνες LH (ωχρινοτρόπος ορμόνη) και FSH (ωθυλακιοτρόπος ορμόνη) που δρουν στις ωθήκες ρυθμίζοντας τη λειτουργία τους. Οι γοναδοτροφίνες είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από μια α και μια β υπομονάδα. Η α υπομονάδα είναι κοινή μεταξύ της LH και της FSH ενώ η β είναι διαφορετική και καθορίζει την εξειδίκευση τους.

Για την ωρίμανση του ωθυλακίου και την επικείμενη ωθυλακιορρηξία κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο, απαραίτητη είναι η εμφάνιση του μεσοκύκλιου εκκριτικού κύματος της LH (**Εικόνα 1**). Έρευνες έχουν δείξει ότι τόσο για το μέγεθος του εκκριτικού αυτού κύματος όσο και για το πότε θα συμβεί ευθύνονται κυρίως η υποθαλαμική ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροφινών GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone), οι στεροειδείς ορμόνες των ωθηκών (οιστραδιόλη, προγεστερόνη) καθώς και ο μη-στεροειδής ωθηκικός παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροφινών GnSAF (Gonadotrophin surge attenuating factor).



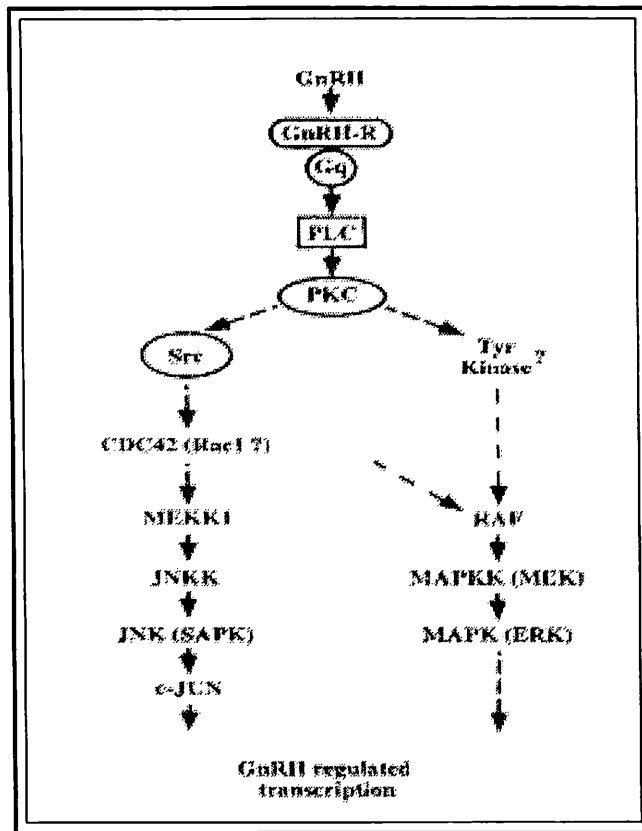
**Εικόνα 1 :** Σχηματική απεικόνιση του προωρηθητικού εκκριτικού κύματος της LH

## 1.1 Ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροφινών (GnRH)

Όπως προαναφέρθηκε, από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην εμφάνιση του κύματος των γοναδοτροφινών είναι η υποθαλαμική ορμόνη GnRH. Η έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο είναι παλμική και είναι καθοριστικής σημασίας για την έκκριση των γοναδοτροφινών από την υπόφυση. Έχει βρεθεί ότι, για τη φυσιολογική έκκριση των γοναδοτροφινών, η συχνότητα και το μέγεθος των παλμών πρέπει να κυμαίνονται εντός συγκεκριμένων (φυσιολογικών) ορίων (Naor *et al.*, 1982, Filicori *et al.*, 1989, Marshall & Griffin 1993).

Η GnRH είναι ένα δεκαπεπτίδιο που επιδρά στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, όπου ενώνεται με ειδικούς υποδοχείς που υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη. Όταν η GnRH δεσμεύεται στο υποδοχέα της επάγει την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την ετεροτριμερή πρωτεΐνη  $G_q$ . Η μετέπειτα μετάδοση του σήματος περιλαμβάνει την αύξηση του  $Ca^{2+}$ , την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης-C (PLC) και της πρωτεϊνικής κινάσης-C (PKC).

Πρόσφατες μελέτες για τη μεταγωγή σήματος από τη GnRH, έχουν πραγματοποιηθεί στις κυτταρικές σειρές γοναδοτρόπων κυττάρων αT3-1 και LβT2. Αυτές οι κυτταρικές σειρές δημιουργήθηκαν με καρκινογένεση σε διαγονιδιακά ποντίκια. Τα γοναδοτρόπα κύτταρα LβT2 εκφράζουν την α και β υπομονάδα της LH, σε αντίθεση με τα αT3-1 που εκφράζουν μόνο την α υπομονάδα, σε απόκριση στην παλμική επαγωγή της έκκρισης της LH με GnRH. Επιπλέον και οι δύο κυτταρικές σειρές εκφράζουν τους υποδοχείς της GnRH (GnRH-R). Μελέτες στην σειρά αT3-1 έδειξαν ότι η GnRH μπορεί να ενεργοποιεί την MAP κινάση ERK ελέγχοντας την έκφραση της α υπομονάδας της LH (Levi *et al.*, 1998). Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώθηκαν στην κυτταρική σειρά LβT2, όπου επιπλέον δείχθηκε ότι πραγματοποιείται από τη GnRH διαφορετική ενεργοποίηση των MAP κινασών, καθώς η JNK είναι αυτή που ελέγχει την έκφραση της β υπομονάδας της LH (Takeshi *et al.*, 2000).



**Εικόνα 2 :** Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος ERK και JNK μετά από επαγωγή με GnRH (Levi *et al.*, 1998)

## 1.2 Παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin surge attenuating factor – GnSAF)

Εδώ και μερικά χρόνια είναι γνωστό ότι οι γυναίκες που υποβάλλονται σε αγωγή χορήγησης εξωγενών γοναδοτροφινών για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, στα πλαίσια εξωσωματικής γονιμοποίησης, εκδηλώνουν σημαντική άμβλυνση του ενδογενούς κύματος της LH, παρά την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων οιστραδιόλης στο αίμα, που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι ικανές να προκαλέσουν την εμφάνιση του μεσοκύκλιου εκκριτικού κύματος της LH. Αν και αρκετές υποθέσεις έχουν προταθεί για να εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό, η επικρατέστερη από αυτές προτείνει ότι οι εξωγενείς γοναδοτροφίνες διεγείρουν τις ωοθήκες, οι οποίες με τη σειρά τους εκκρίνουν ένα παράγοντα, η δράση του οποίου είναι η άμβλυνση του εκκριτικού κύματος της LH. Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε παράγοντας

αναστολής (Sopelak & Hodgen 1984) ή άμβλυσης (Messinis & Templeton 1989) του μεσοκύκλιου κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotropin Surge Inhibiting or Attenuating Factor, **GnSIF** or **GnSAF**).

Ο GnSAF είναι ένας μη στεροειδής ωθητικός παράγοντας που δρα στην υπόφυση μειώνοντας την επαγόμενη από την GnRH έκκριση της LH χωρίς να επηρεάζει την βασική έκκριση των γοναδοτροφινών (Messinis & Templeton 1989, 1990, 1991). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να διατηρούνται χαμηλά τα επίπεδα της LH πριν από την εμφάνιση του εκκριτικού της κύματος.

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει για την απομόνωση και ταυτοποίηση του παράγοντα αυτού. Μεταξύ αυτών μόνο τρεις έχουν προχωρήσει μέχρι πλήρους καθαρισμού και μερικής ανάγνωσης της αλληλουχίας του πεπτιδίου. Η παλαιότερη από αυτές αναφέρει την απομόνωση κάποιου παράγοντα με δραστικότητα GnSAF από υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων Sertoli επιμύων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής ο παράγοντας είναι μια μονομερής πρωτεΐνη μοριακού βάρους 37 kDa και αλληλουχία αμινοτελικού άκρου SDXXPQL (Tio *et al.*, 1994).

Η επόμενη εργασία περιγράφει την απομόνωση μιας πρωτεΐνης με δραστικότητα GnSAF από χοίρειο ωοθυλακικό υγρό. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή ο παράγοντας είναι μια μονομερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 69 kDa και αλληλουχία αμινοτελικού άκρου SKPLAE (Danforth & Cheng 1995).

Στην πιο πρόσφατη μελέτη, απομονώθηκε από ωοθυλακικό υγρό γυναικών μια μονομερής πρωτεΐνη μοριακού βάρους 12,5 kDa, με δραστικότητα GnSAF. Η πρωτεΐνη αυτή είναι πιθανώς γλυκοζυλιωμένη, σταθερή στους 80 °C, με ισοηλεκτρικό σημείο μικρότερο του 5. Με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας θρυψινικών θραυσμάτων (ALEVDETYVPK, ALVELVK, AVMDDFAAFVEK) με φασματοσκοπία μάζας και το προσεγγιστικά υπολογιζόμενο μοριακό τους βάρος, το πεπτίδιο αυτό αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 490-585 της αλβουμίνης του ορού HSA (Pappa *et al.*, 1999a). Επιπλέον στην παραπάνω εργασία αναφέρεται ότι ολόκληρο το μόριο της αλβουμίνης δεν παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF.

Σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου όπου εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της εργασίας Pappa *et al.*, 1999a, το τμήμα DNA της HSA που κωδικοποιεί το καρβοξυτελικό άκρο της (κατάλοιπα 490-585) εκφράστηκε στο ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης-

έκκρισης *Pichia pastoris*. Υπερκείμενα κλώνων του *P. pastoris* που εκφράζουν το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο δείχθηκε ότι παρουσιάζουν δραστικότητα GnSAF.

### 1.3 Η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA)

Η αλβουμίνη είναι μια από τις πιο γνωστές και περισσότερο μελετημένες πρωτεΐνες. Είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 65 kDa και αποτελείται από 585 αμινοξέα. Αποτελεί το 60% των πρωτεϊνών του ορού του αίματος και είναι η πιο άφθονη διαλυτή πρωτεΐνη στο σώμα όλων των θηλαστικών. Το μόριο της αλβουμίνης έχει χαρακτηριστική διαμόρφωση δισουλφιδικών θηλειών (loops) οι οποίες επαναλαμβάνονται σε τριπλές. Έχει 9 τέτοιες θηλιές που σχηματίζονται από 19 δισουλφιδικούς δεσμούς (Peters T. Jr., 1996). Η αλβουμίνη αποτελείται από 3 περιοχές (domains I,II,III) οι οποίες είναι δομικά όμοιες. Κάθε περιοχή διακρίνεται σε δύο υποπεριοχές (subdomains A,B) οι οποίες σχηματίζονται από 3 ως 4 α-έλικες και ενώνονται μεταξύ τους με ένα μεγάλο τμήμα α-έλικας (He & Carter 1992, Carter & Ho 1994).

Πολλές αναφορές που αφορούν την καλύτερη γνώση της σχέσης δομής – λειτουργίας των διαφορετικών περιοχών της αλβουμίνης έχουν δημοσιευτεί στη βιβλιογραφία. Σε μια πρόσφατη μελέτη οι τρεις περιοχές της HSA (I, II, III) μελετήθηκαν σε ανασυνδυασμένη μορφή ύστερα από έκφραση στο ευκαρυωτικό σύστημα του *Pichia pastoris* (Dockal *et al.*, 1999). Σύμφωνα με την αναφορά αυτή, τα όρια μεταξύ των τριών δομικά όμοιων περιοχών της αλβουμίνης είναι τα εξής:

- **HSA-domain I** : περιλαμβάνει τα κατάλοιπα **1 – 197**
- **HSA-domain II** : περιλαμβάνει τα κατάλοιπα **189 – 385**
- **HSA-domain III** : περιλαμβάνει τα κατάλοιπα **381 – 585**

Το καρβοξυτελικό 95πεπτίδιο της HSA που απομονώθηκε από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό και παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF ουσιαστικά αντιστοιχεί στην υποπεριοχή IIIB της HSA (υπολογιστικό πρόγραμμα CATH, [www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath](http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath)).



## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία στόχος μας ήταν να εκφράσουμε στο ευκαρυωτικό σύστημα *Pichia pastoris* το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 490-585 της HSA ώστε να φέρει στο καρβοξυτελικό του άκρο τον επίτοπο του mhc και 6 κατάλοιπα ιστιδίνης.

Συγκεκριμένα προγραμματίστηκαν τα εξής στάδια :

1. Κλωνοποίηση του καρβοξυτελικού άκρου της αλβουμίνης του ορού μεταξύ των καταλοίπων 490-585
2. Έκφραση της πρωτεΐνης στο ζυμομύκητα *Pichia pastoris*
3. Ανίχνευση της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης από τα υπερκείμενα των καλλιεργειών
4. Έλεγχος της δραστικότητας της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την πολλαπλή αντιγραφή του DNA που κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό της άκρο της αλβουμίνης του ορού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε χρωμοσωμικό DNA από το στέλεχος GS115/Alb του *Pichia pastoris* που φέρει και εκφράζει το cDNA της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά επιλεγμένοι εκκινητές που εισάγουν συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών. Η αλληλουχία των εκκινητών έχει ως εξής (με μπλε χρώμα φαίνονται οι θέσεις περιορισμού) :

sense primer (HSAN) : 5'-TTT **GAA TTC** GCT CTG GAA GTC GAT GAA  
ACA TAC GTT CCC AAA GAG-3'

antisense primer (HSAC I) : 5'-AAA **AGC GGC CGC TAA** GCC TAA GGC  
AGC TTG ACT TGC AGC AAC AAG TTT-3'

Οι συνθήκες που επιλέγησαν ήταν, για τη θερμική αποδιάταξη του υποστρώματος, 94 °C για 2 λεπτά, για τη πρόσδεση των εκκινητών, 50 °C για 2 λεπτά και για την επιμήκυνση των αλυσίδων, DNA 72 °C για 1 λεπτό, σε μια σειρά 40 επαναλαμβανόμενων κύκλων.

Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν :

- 100 ng πλασμιδιακού DNA
- 50 pmol από τον κάθε εκκινητή
- 10X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης που περιέχει MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM)
- 2 mM από το κάθε dNTP (Gibco, BRL)
- 2,5 U από την υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση Pfu (Stratagene)
- αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 μl

#### 3.2 Ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός θραυσμάτων DNA

Η πηκτή που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA ήταν 1% (w/v) αγαρόζης σε διάλυμα TBE (89 mM Tris base, 89 mM boric

acid, 0,05 M EDTA, pH 8.0). Μετά από θέρμανση και προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml, τα δείγματα DNA αναμιγνύονται σε αναλογία 5 : 1 με 6Χδιάλυμα φόρτωσης (30% γλυκερόλη και 0,25% κυανού της βρωμοφαινόλης) και ηλεκτροφορούνται σε διάλυμα TBE υπό σταθερή τάση παράλληλα με δείγμα πρότυπων μοριακών βαρών.

Η παρατήρηση της πηκτής έγινε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας και για να ακολουθήσει ο καθαρισμός των θραυσμάτων DNA από την πηκτή αφαιρέθηκαν οι ζώνες εστιασμού.

Ο καθαρισμός έγινε με το πακέτο υλικών MinElute Gel Extraction της εταιρίας Qiagen.

### 3.3 Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

Ο πλασμιδιακός φορέας και το προς ένθεση DNA επωάζονται μέχρι πλήρους πέψης με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης και ανακτώνται από την πηκτή.

Η σύνδεση του θραύσματος DNA στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4 C° με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης (Stratagene) σε τελικό όγκο 20µl και σε αναλογία ενθέματος/φορέα 3 προς 1.

### 3.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli*

Ο μετασχηματισμός έγινε σε επιλεκτικά βακτηριακά *E. coli* κύτταρα του στελέχους Top10F' σύμφωνα με τη μέθοδο Inoue (Inoue *et al.*, 1990) (βλέπε σελ. 15).

Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, κατά το μετασχηματισμό προστέθηκε η μισή ποσότητα από τις αντιδράσεις σύνδεσης σε 200 µl επιλεκτικών κυττάρων. Τα κύτταρα αφέθηκαν για 5 λεπτά στον πάγο και σπάρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο χαμηλής αλατότητας (LB) που περιέχει το αντιβιοτικό ζεοκίνη (25 µg/ml).

### 3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

#### α) Μικρής κλίμακας απομόνωση

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών της εταιρίας Qiagen, QIAprep Spin Miniprep Kit.

#### β) Μεγάλης κλίμακας απομόνωση

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο Plasmid Maxi Kit της Qiagen.

### 3.6 Μετασχηματισμός του *Pichia pastoris*

Για την επίτευξη μετασχηματισμού του ζυμομύκητα *P. pastoris*, ευθυγραμμίζονται, με το ένζυμο *PmeI*, 3 µg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Ο μετασχηματισμός γίνεται σε κύτταρα του στελέχους GS115 του *P. pastoris* τα οποία γίνονται επιλεκτικά σύμφωνα με το πρωτόκολλο EasyComp της Invitrogen.

Η επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιήθηκε :

- ❖ Με βάση την ανθεκτικότητα τους σε ζεοκίνη
- ❖ Με πολλαπλή αντιγραφή του εξωγενούς DNA με PCR όπου ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής : 30 µl λυτικήση (3mg/ml) προστίθενται σε 10 µl διαλύματος μετασχηματισμένων κυττάρων από κάθε κλώνο και τα δείγματα επωάζονται στους 30 °C για 10 λεπτά. Μετά την επώαση ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων στους -80 C° για 10 λεπτά.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται αντίδραση PCR σε τελικό όγκο 100 µl με τη χρήση 5U/µl της Taq πολυμεράσης (Promega), τους ίδιους εκκινητές που χρησιμοποιούνται αρχικά και το κυτταρικό εκχύλισμα ως υπόστρωμα.

### 3.7 Επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδουασμένης πρωτεΐνης στο σύστημα έκφρασης *Pichia pastoris*

Οι κλώνοι που προέκυψαν από το μετασχηματισμό ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα παραγωγής της ανασυνδουασμένης πρωτεΐνης με επαγωγή της έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης με μεθανόλη μέσω του υποκινητή της οξειδάσης της μεθανόλης.

Αρχικά οι κλώνοι αναπτύσσονται σε 5ml θρεπτικού υλικού Buffered Glycerol-complex medium **BMGY** (1% εκχύλισμα ζύμης, 2% πεπτόνη, 100 mM φωσφορικό νάτριο pH=6, 1,34% YNB –yeast nitrogen base,  $4 \times 10^{-5}\%$  βιοτίνη, 1% γλυκερόλη) για 16 ώρες στους 30 °C, υπό ανάδευση σε επωαστήρα μέχρι οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600}$ ) 2-6. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (4000 rpm, 25 °C, 5 λεπτά) και επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό Buffered methanol-complex medium **BMMY** (1% εκχύλισμα ζύμης, 2% πεπτόνη, 100 mM φωσφορικό νάτριο pH=6, 1,34% YNB–yeast nitrogen base,  $4 \times 10^{-5}\%$  βιοτίνη, 0,5% μεθανόλη) μέχρι οπτικής πυκνότητας 1. Η ανάπτυξη των κυττάρων συνεχίζεται για 4 ημέρες υπό τις ίδιες συνθήκες ενώ κάθε 24 ώρες γίνεται συλλογή δείγματος της καλλιέργειας και προσθήκη μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση 0,5% v/v. Την 4<sup>η</sup> ημέρα η καλλιέργεια φυγοκεντρείται (4000 rpm, 4 °C, 10 λεπτά) και το υπερκείμενο συλλέγεται και διατηρείται στους -80 °C.

### 3.8 Ανίχνευση της ανασυνδουασμένης πρωτεΐνης από τα υπερκείμενα των καλλιεργειών

Η ανίχνευση της ανασυνδουασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε :

- Με 15% SDS-PAGE και χρώση με Coomassie blue
- Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blotting)

#### 1) SDS-PAGE

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε πηκτή ακρυλαμίδιου 15%. Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων ακολούθησε

ανάμιξη τους με 4X διάλυμα φόρτωσης και βρασμός για 5 λεπτά. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε 1X Electrode buffer (0,025 M Tris-base, 0,192 M γλυκίνη, 0,1% SDS) υπό την επίδραση πεδίου σταθερής τάσης (80 V). Μετά το πέρας του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού ακολούθησε χρώση του πηγματος με Coomassie blue.

## 2) Ανάλυση κατά Western

Τα προς ανάλυση δείγματα διαχωρίζονται σε 15% SDS-PAGE και μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πηγμα διαχωρισμού εξισοροπείται σε διάλυμα μεταφοράς (25mM Tris pH 8.3, 192 mM γλυκίνη και 20% v/v μεθανόλη) για 5 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε ενεργοποιημένη, με μεθανόλη, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, υπό την επίδραση πεδίου σταθερής τάσης (150 mA) για 3 ώρες.

Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα κορεσμού PBST (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% v/v Tween-20 και 5% dry milk) επί 16 ώρες. Κατά το στάδιο αυτό δεσμεύονται οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις που θα μπορούσαν να αντιδράσουν ακολούθως με το αντίσωμα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση της μεμβράνης με PBST και επώαση με το ειδικό αντίσωμα 9E10 (anti-myc, 1:2000 σε διάλυμα κορεσμού) για 1 ώρα και εν συνεχεία με το δεύτερο αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση σε αραίωση 1:5000. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος πραγματοποιείται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham Life Science).

## 3.9 Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επιμύων

Θηλυκοί επίμυες ηλικίας δύο μηνών θανατώνονται με αποκεφαλισμό και οι υποφύσεις τους συλλέγονται σε διάλυμα φωσφορικών DPBS που περιέχει 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 7,5 mM γλυκόζη. Αφού αφαιρεθεί η νευροϋπόφυση, η αδενοϋπόφυση τεμαχίζεται και εκπλένεται αρκετές φορές με διάλυμα DPBS που περιέχει 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 7,5 mM γλυκόζη και 0,1% BSA.

Ακολουθεί επώαση του ιστού για 10 λεπτά (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) υπό ανάδευση σε 15 ml DPBS (0,1% BSA, 7,5 mM γλυκόζη) στο οποίο προστίθεται 4,1 mg/ml τρυψίνη. Στη συνέχεια ο ιστός φυγοκεντρείται, το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί νέα επώαση με 15 ml DPBS που αυτή τη φορά περιέχει 2,5 mg/ml παγκρεατίνη.

Οι πρωτεάσες απενεργοποιούνται στη συνέχεια με προσθήκη θρεπτικού υλικού SFDM (DMEM/HAM's F-12, 0,1% BSA, 10μg/ml ινσουλίνη, 5μg/ml τρανσφερίνη, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου. Η επώαση πραγματοποιείται στους 37 °C για 15 λεπτά υπό ανάδευση.

Ο ιστός πλένεται αρκετές φορές με διάλυμα DPBS (0,1% BSA και 7,6x10<sup>-4</sup>% EDTA) και διασπάται σε 2-4 ml διαλύματος DPBS μέχρι να προκύψει θολό αιώρημα.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο ιστός επαναιωρείται σε 5ml SFDM όπου και γίνεται η τελική του διάσπαση.

Η βιωσιμότητα των κυττάρων ελέγχεται με χρώση trypan blue και πρέπει να ανέρχεται σε ποσοστό >95%. Αφού υπολογιστεί ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων, 200.000 κύτταρα επιστρώνονται ανά καλλιεργητικό φρεάτιο και επωάζονται σε κλίβανο 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> για 48 ώρες.

### 3.10 Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF

Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επίμυων πλένονται δύο φορές με θρεπτικό υλικό SFDM που δεν έχει ορό και επωάζονται εις τριπλούν με τις υπό έλεγχο ουσίες ή χωρίς αυτές (αρνητικοί μάρτυρες) σε SFDM για 48 ώρες (37 °C , 5% CO<sub>2</sub>). Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται, ακολουθεί έκπλυση με SFDM και επώαση με 0,1 μM GnRH συν τις υπό εξέταση ουσίες για 4 ώρες. Η δραστικότητα GnSAF προσδιορίζεται ως η αναστολή της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH στο διάστημα των 4 ωρών. Τα επίπεδα βασικής έκκρισης της LH προσδιορίζονται από τα υπερκείμενα που δεν έχουν επωαστεί με GnRH.

### 3.11 Συναγωνιστική μέθοδος ELISA για τη μέτρηση της LH

Αντιγόνο LH (rLH-I-10) 50 ng/ml, επιστρώνεται σε πλακίδια πολυστυρενίου σε τελικό όγκο 200μl ανά μικροφρεάτιο σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6-9,8. Ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4 °C και στη συνέχεια έκπλυση των φρεατίων 3 φορές με διάλυμα PBST (PBST-0,05% Tween 20).

Η δέσμευση των κενών θέσεων πραγματοποιείται με 1% BSA σε διάλυμα PBS για 2 ώρες στους 37 °C και ακολουθεί πλύση με PBST.

Παράλληλα προετοιμάζεται το συναγωνιστικό μίγμα ως εξής :

- Ποσότητα 30μl από τα άγνωστα δείγματα ή από δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις LH (rLH-RP-3) αραιώνονται σε διάλυμα PBST-0,5% BSA μέχρι τελικού όγκου 120 μl και αναμιγνύονται με ίσο όγκο αντιορού της LH (rLH-S-11) σε αραιώση 1:50000 σε διάλυμα PBST-0,5% BSA. Το μίγμα επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C.
- 100 μl από κάθε δείγμα τοποθετούνται εις διπλούν στα μικροφρεάτια και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4 °C.

Μετά από έκπλυση των πλακιδίων προστίθεται στα φρεάτια αντίσωμα anti rabbit IgG (Horseradish peroxidase conjugated) σε αραιώση 1:5000 σε PBST-0,5% BSA. Η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 37°C.

Στο τελευταίο στάδιο τοποθετείται στα φρεάτια όγκος 100 μl υποστρώματος υπεροξειδάσης (0,04% o-phenylenediamine, 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε διάλυμα 0,1M κιτρικών, 0,2M φωσφορικών και νερό σε αναλογία 1:1:2 μέρη). Το pH του τελικού διαλύματος είναι 5. Τα δείγματα επωάζονται για περίπου 30 λεπτά σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου και η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 50 μl 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Η απορρόφηση μετρείται σε μετρητή ELISA (Statfax-21000) και σε μήκος κύματος 492 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται μικροφρεάτιο στο οποίο δεν έχει γίνει επίστρωση με αντιγόνο και έχει προστεθεί μόνο το υπόστρωμα στο τελικό στάδιο (Pappa *et al.*, 1999b).



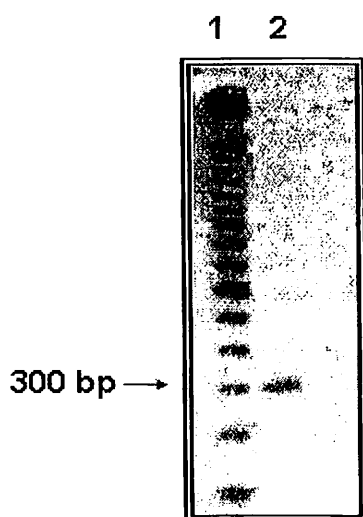
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως προαναφέρθηκε, σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου δείχθηκε ότι υπερκείμενα κλώνων *Pichia pastoris* που εκφράζουν το καρβοξυτελικό άκρο της αλβουμίνης (κατάλοιπα 490-585) παρουσιάζουν δραστικότητα GnSAF, ενώ υπερκείμενα που εκφράζουν ολόκληρο το μόριο της αλβουμίνης είναι ανενεργά. Καθότι δεν διατίθεται στο εμπόριο ειδικό αντίσωμα έναντι του πεπτιδίου αυτού και προκειμένου να επιτευχθεί η ανίχνευση και ο καθαρισμός του, στην παρούσα εργασία δημιουργήσαμε μια παραλλαγή, σύμφωνα με την οποία το πεπτιδίο φέρει στο καρβοξυτελικό του άκρο τον επίτοπο του *myc* και έξι κατάλοιπα ιστιδίνης. Ο φορέας έκφρασης που επιλέχθηκε και στο παρελθόν από το Εργαστήριο έχει την δυνατότητα να εκφράζει το ανασυνδυασμένο πεπτιδίο σε εκκρινόμενη μορφή ενώ ο μύκητας *P. pastoris* από μόνος του παράγει μικρό ποσό φυσικών εκκρινόμενων πρωτεϊνών, γεγονός που μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε και να μελετήσουμε το μόριο αυτό πιο εύκολα. Επιπλέον ο φορέας αυτός έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για την έκφραση της αλβουμίνης και των περιοχών της.

### 4.1 Κλωνοποίηση του καρβοξυτελικού άκρου της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού στην *E. coli*

Για την πολλαπλή αντιγραφή του τμήματος DNA που κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό άκρο της HSA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με υπόστρωμα χρωμοσωμικό DNA από το στέλεχος GS115/Alb του *P. pastoris*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν εισάγουν την θέση περιορισμού *EcoRI* στο 5' άκρο και τη θέση *NotI* στο 3' άκρο του προϊόντος PCR.

Στην **Εικόνα 3** παρουσιάζεται το προϊόν PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.



**Εικόνα 3 :** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του PCR προϊόντος

Διαδρομή 1 : πρότυπα μοριακά βάρη (100 bp DNA ladder, Gibco-BRL)

Διαδρομή 2 : προϊόν PCR (308 bp)

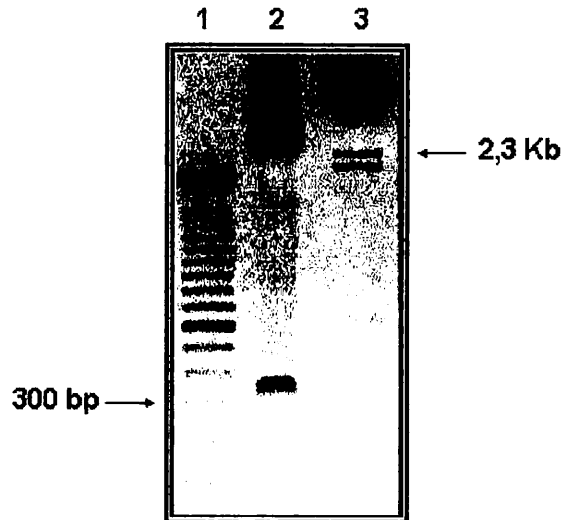
Για την έκφραση του καρβοξυτελικού άκρου της HSA χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης-έκκρισης ρPICZaA ο οποίος έχει μέγεθος 3600 bp.

Τα περιοριστικά ένζυμα που επιλέχθηκαν για την πλήρη πέψη του φορέα και του ενθέματος ήταν τα *EcoRI* και *NotI*.

Ο μετασχηματισμός έγινε σε επιδεκτικά *E. coli* κύτταρα του στελέχους Top10F και οι θετικές αποικίες επιλέχθηκαν με βάση την ανθεκτικότητα σε ζεοκίνη και με περιοριστική ανάλυση με τα ένζυμα *EcoRI* και *NotI*.

Στη συνέχεια η αλληλουχία του πλασμιδίου ελέγχθηκε πλήρως από τη θέση του σήματος έκκρισης ( $\alpha$ -factor) μέχρι την ουρά των 6 ιστιδινών σε αυτόματο αναλυτή (MWG-Biotech).

Στην **Εικόνα 4** φαίνονται τα περιοριστικά θραύσματα των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.



**Εικόνα 4 :** Περιοριστική ανάλυση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με τα ένζυμα *EcoRI* και *NotI*

Διαδρομή 1 και 3 : πρότυπα μοριακά βάρη (100 bp DNA ladder και Lambda DNA *HindIII* Digest, αντίστοιχα)

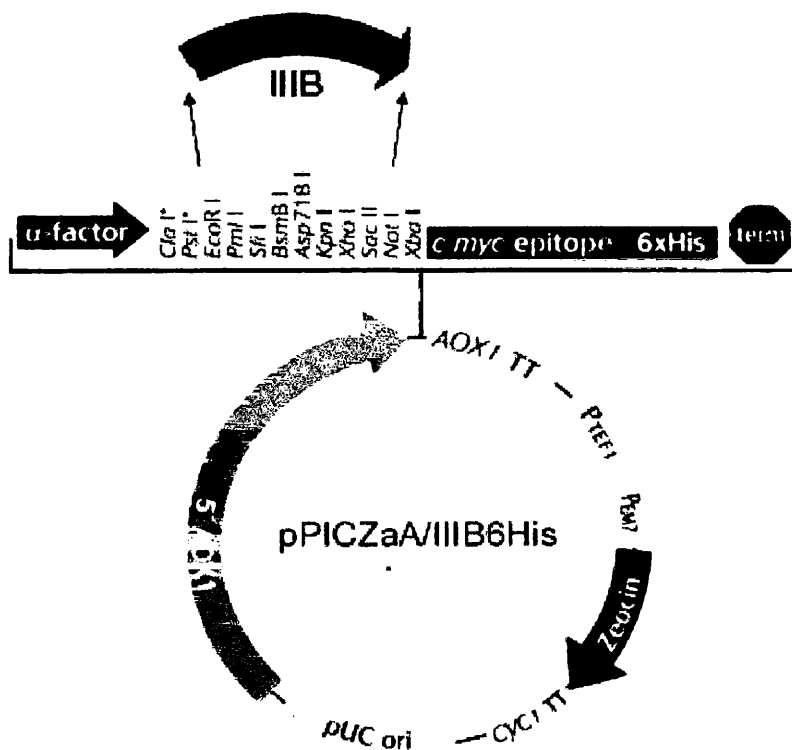
Διαδρομή 2 : ένθεμα (308 bp) και φορέας (3,6 Kb)

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο **pPICZaA/DIIIIB6His** που κατασκευάστηκε φέρει χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την υπερέκφραση του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου σε εκκρινόμενη μορφή στο *P. pastoris*.

Συγκεκριμένα περιέχει :

- ένα τμήμα 942 bp που περιέχει τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης (**AOX1**) και περιοχή ομολογίας που επιτρέπει την ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα του μύκητα με ομόλογο ανασυνδυασμό
- τη σηματοδοτική αλληλουχία του  **$\alpha$ -factor** του *S. cerevisiae* που επιτρέπει την έκκριση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης
- τον επίτοπο του **myc (c-myc)** που επιτρέπει την ανίχνευση της πρωτεΐνης με τη χρήση αντισώματος
- αλληλουχία έξι καταλοίπων ιστιδίνης (**6xHis**) που διευκολύνει τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη  $\text{Ni}^{2+}$

Στην **Εικόνα 5** απεικονίζεται το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZaA/DIIIIB6His.



**Εικόνα 5 :** Απεικόνιση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZaA/III B6His

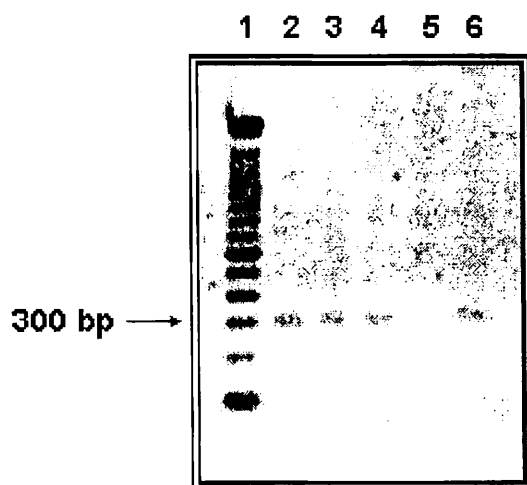
Στην Εικόνα φαίνεται η θέση εισαγωγής της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για το πεπτιδίο III B της HSA (μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *EcoRI* και *NotI*)

#### 4.2 Έκφραση στο *Pichia pastoris*

Το στέλεχος GS115 του *P. pastoris* μετασχηματίστηκε με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pPICZaA/DIII B6His μετά από ευθυγράμμιση του με το περιοριστικό ένζυμο *PmeI* το οποίο έχει μοναδική θέση αναγνώρισης στην περιοχή AOX1. Το ανασυνδυασμένο DNA ενσωματώνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό στο χρωμόσωμα του μύκητα έτσι ώστε να είναι εφικτή η επιλογή σταθερών κλώνων.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων πραγματοποιήθηκε με βάση την ανθεκτικότητα τους σε ζεοκίνη και με την τεχνική της PCR (Direct PCR screening) όπου ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα μετασχηματισμένων κυττάρων.

Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται ενδεικτικά ο έλεγχος 5 κλώνων με Direct PCR screening.



**Εικόνα 6 :** Έλεγχος μετασηματισμένων κλώνων με Direct PCR screening

Διαδρομή 1 : πρότυπα μοριακά βάρη ((100 bp DNA ladder)

Διαδρομές 2,3,4,6 : προϊόντα PCR (300 bp) που προκύπτουν από τους μετασηματισμένους κλώνους **15,16,17,18** αντίστοιχα

Διαδρομή 5 : μη μετασηματισμένος κλώνος

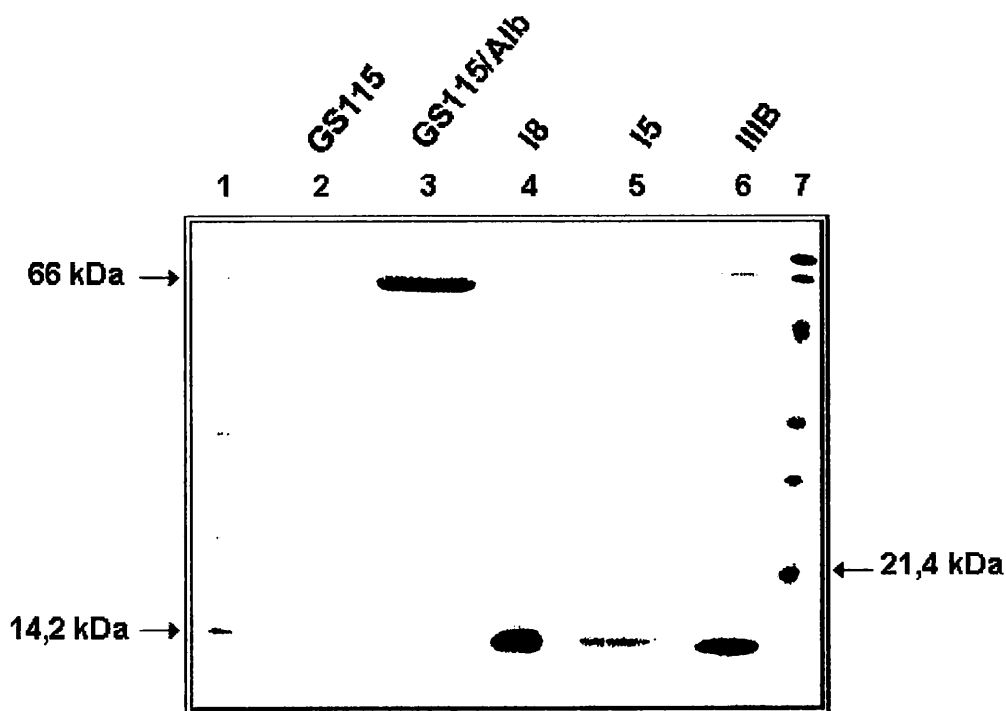
Οι θετικοί κλώνοι 15 και 18 επιλέχθηκαν προς επαγωγή της έκφρασης του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου. Η επαγωγή επιτυγχάνεται με προσθήκη μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων και τα υπερκείμενα συλλέγονται για την περαιτέρω ανίχνευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

### 4.3 Ανίχνευση του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου από τα υπερκείμενα καλλιιεργειών

Τα υπερκείμενα των κλώνων 15 και 18 συμπυκνώθηκαν με φίλτρα Amicon (Centrifrep, cut-off 10000) 10 φορές (από αρχικό όγκο 10 ml σε 1 ml) και αναλύθηκαν σε SDS-PAGE (15%). Ακολούθησε χρώση με Coomassie blue καθώς επίσης και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-myc 9E10 που αναγνωρίζει ως επίτοπο την αλληλουχία Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn του c-myc.

Όγκος 100 μl από τα συμπυκνωμένα υπερκείμενα των κλώνων 15 και 18 ηλεκτροφορήθηκε σε SDS-PAGE. Παράλληλα αναλύθηκαν ίσοι όγκοι υπερκειμένων από το αρχικό στέλεχος GS115 και από κλώνους του *P.*

*pastoris* που εκφράζουν την πλήρους μήκους αλβουμίνη και την υποπεριοχή IIIB χωρίς τον επίτοπο του *myc* και την ουρά των έξι ιστιδινών.



**Εικόνα 7 :** Ανάλυση σε 15% SDS-PAGE 100  $\mu$ l υπερκειμένων κλώνων του *P. pastoris* (πριν από συμπύκνωση)

Διαδρομή 1 και 7 : πρότυπα μοριακά βάρη

Διαδρομή 2 : αρχικό στέλεχος GS115

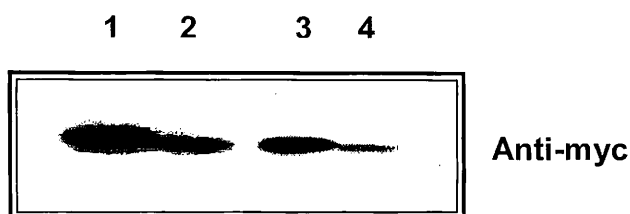
Διαδρομή 3 : κλώνος που εκφράζει ολόκληρο το μόριο της HSA

Διαδρομές 4 – 5 : κλώνοι που εκφράζουν το ανασυνδυασμένο πεπτιδίο IIIB/6His (18 και 15)

Διαδρομές 6 : κλώνος που εκφράζει το πεπτιδίο IIIB

Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 7** το αρχικό στέλεχος δεν παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης φυσικών εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Το ανασυνδυασμένο πεπτιδίο ανιχνεύεται στους κλώνους 15 και 18.

Ο κλώνος 18 επιλέχθηκε στη συνέχεια για ανάλυση κατά Western με το αντίσωμα 9E10 ώστε να επιβεβαιωθεί η υπερέκφραση. Αναλύθηκαν διαφορετικοί όγκοι (50,25 $\mu$ l) αρχικού και συμπυκνωμένου υπερκειμένου (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8 :** Ανάλυση κατά Western του κλώνου I8

Διαδρομές 1 – 2 : 50 και 25 μl συμπυκνωμένου υπερκειμένου (10X v/v)

Διαδρομές 3 – 4 : 50 και 25 μl αρχικού υπερκειμένου

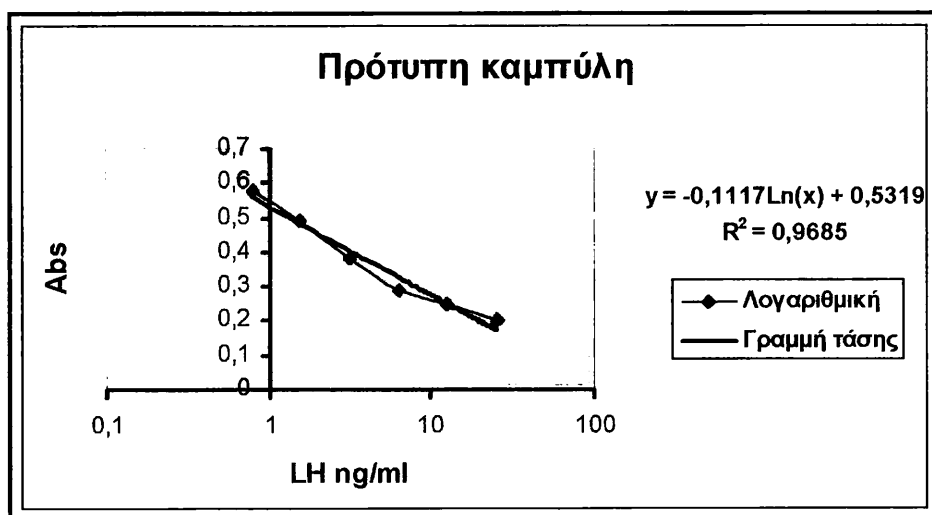
Με βάση την ανοσοαποτύπωση συμπεραίνουμε ότι το ανασυνδρασμένο πεπτίδιο υπερεκφράζεται και μπορεί να ανιχνευθεί στο υπερκείμενο του μύκητα χωρίς να απαιτείται η συμπύκνωση του.

#### **4.4 Ανίχνευση δραστικότητας GnSAF στα υπερκείμενα των κλώνων που εκφράζουν το ανασυνδρασμένο πεπτίδιο 490-585 της HSA**

Τα υπερκείμενα των κλώνων που εκφράζουν το ανασυνδρασμένο πεπτίδιο ελέγχθηκαν εις τριπλούν ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης θηλυκών επιμύων, ηλικίας δύο μηνών (Wistar). Χρησιμοποιήθηκαν 25 μl υπερκειμένων των κλώνων που εκφράζουν το πεπτίδιο IIIB/6His (I5 και I8) καθώς και κλώνων που εκφράζουν την HSA και το πεπτίδιο IIIB.

Η δραστικότητα GnSAF προσδιορίζεται ως η αναστολή της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH. Η μέτρηση της LH επιτεύχθηκε με συναγωνιστική ELISA.

Στο **Γράφημα 1** παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη και η εξίσωση του γραφήματος σύμφωνα με την οποία από τις τιμές της απορρόφησης υπολογίζεται η συγκέντρωση της LH των δειγμάτων.



**Γράφημα 1 :** Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού της συγκέντρωσης LH (ng/ml)

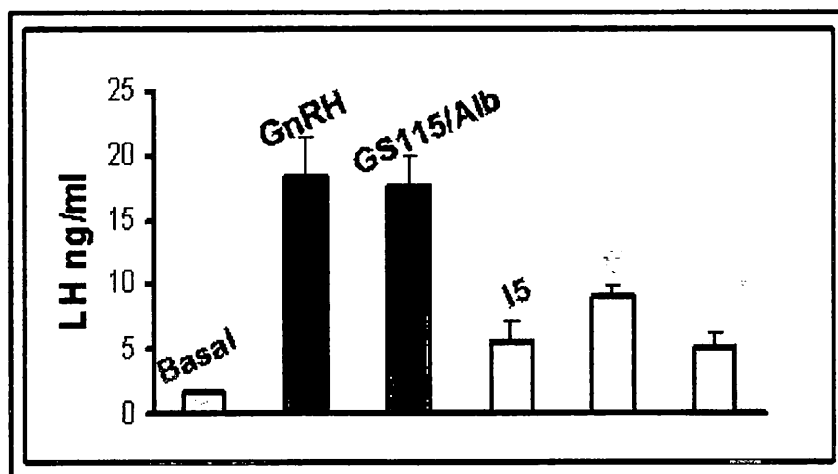
Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής γνωστές συγκεντρώσεις LH (ng/ml) : 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125 – 1,5625 – 0,78125

Στον **Πίνακα 1** και **Ιστόγραμμα 1** παρουσιάζονται οι τιμές της LH για κάθε δείγμα που ελέγξαμε, οι οποίες υπολογίστηκαν με βάση τις απορροφήσεις και την εξίσωση του προηγούμενου γραφήματος καθώς και οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση (SD) των τιμών.

	Control	GS15/ Alb	IS	IS	IS	IS
1 <sup>η</sup> Τιμή	1,30	16,03	20,23	4,18	9,97	4,13
2 <sup>η</sup> Τιμή	1,80	17,53	16,03	4,86	8,32	4,72
3 <sup>η</sup> Τιμή	1,77	21,73	16,60	7,48	8,49	6,34
Μέσος Όρος	1,62	18,43	17,62	5,50	8,92	5,06
SD	0,28	2,95	2,27	1,74	0,90	1,14

**Πίνακας 1 :** Απεικόνιση των τιμών LH των δειγμάτων που μετρήθηκαν με την μέθοδο της ELISA





**Ιστογράμμο 1 :** Μέσοι όροι με τυπική απόκλιση των τιμών του Πίνακα 1

Στον Πίνακα 2 εμφανίζεται η επί % αναστολή της έκκρισης της LH σύμφωνα με τον τύπο :

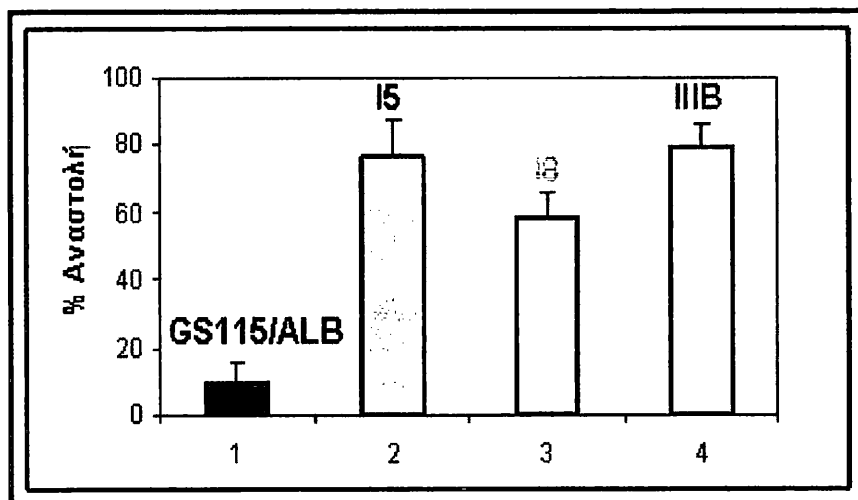
$$\{1-(A/B)\} \%$$

όπου  $A = LH \text{ (ng/ml)}_{\{GnRH + SAMPLE\}} - \overline{LH} \text{ (ng/ml)}_{BASAL}$

και  $B = LH \text{ (ng/ml)}_{GnRH} - \overline{LH} \text{ (ng/ml)}_{BASAL}$

% Αναστολή LH				
	GS115/Alb	15	18	III B
1 <sup>η</sup> Τιμή	3,2	85,0	50,3	85,4
2 <sup>η</sup> Τιμή	14,2	80,7	60,8	81,0
3 <sup>η</sup> Τιμή	11,9	65,2	65,7	72,3
Μέσος Όρος	9,3	76,9	58,3	79,3
SD	5,7	10,5	7,6	6,6

**Πίνακας 2 :** Επί τις % αναστολή της έκκρισης της LH, μετά από διέγερση με GnRH, υπό την επίδραση των προς μελέτη δειγμάτων (Οι τιμές προέρχονται από τον Πίνακα 1 με βάση τον τύπο που αναφέρεται στο κείμενο)



**Ιστόγραμμα 2 :** Μέσοι όροι με τυπική απόκλιση των τιμών του Πίνακα 2

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 και στο Ιστόγραμμα 2 η αναστολή της LH από υπερκείμενα των κλώνων I5 και I8 που εκφράζουν το ανασυνδυασμένο πεπτιδίο III B/6His είναι 76,9 και 58,3% αντίστοιχα. Αντίθετα παρατηρούμε ότι υπερκείμενο καλλιέργειας κλώνου που εκφράζει ολόκληρο το μόριο της αλβουμίνης είναι ανενεργό (αναστολή 9,3%).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροφινών GnSAF, παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο της γυναίκας. Παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, η ταυτοποίηση του GnSAF δεν έχει καταστεί δυνατή.

Σε προηγούμενη μελέτη (Pappa *et al.*, 1999), απομονώθηκε από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό το καρβοξυτελικό 95πεπτίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (υπομονάδα IIIB) το οποίο δείχθηκε ότι έχει δραστικότητα GnSAF. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η προηγούμενη παρατήρηση, το πεπτίδιο αυτό, μελετήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας και συγκεκριμένα εκφράστηκε στο ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης-έκκρισης *Pichia pastoris*. Δείχθηκε ότι υπερκείμενα κλώνων που εκφράζουν το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο παρουσιάζουν δραστικότητα GnSAF.

Προκειμένου να προχωρήσει και να διευκολυνθεί η μελέτη του πεπτιδίου αυτού, στην παρούσα εργασία το εκφράσαμε σε μια εναλλακτική μορφή έτσι ώστε να φέρει μια καρβοξυτελική ουρά με τον επίτοπο του myc και έξι κατάλοιπα ιστιδίνης.

Το σύστημα έκφρασης του *P. pastoris* που χρησιμοποιήσαμε, παρουσιάζει μεταξύ άλλων ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα: επιτρέπει την επαγόμενη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και την έκκριση της στο υπερκείμενο της καλλιέργειας όπου υπάρχουν πολύ χαμηλά ποσά φυσικών εκκρινόμενων πρωτεϊνών του μύκητα. Έτσι το υπερκείμενο περιέχει κυρίως την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με αποτέλεσμα να διευκολύνεται ο καθαρισμός της.

Δείξαμε ότι το εναλλακτικό αυτό πεπτίδιο είναι εξίσου δραστικό με το αρχικό, προκαλώντας αναστολή στην έκκριση της LH κατά 50% με 80% και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις περαιτέρω μελέτες. Ο επίτοπος του myc τον οποίο φέρει, επιτρέπει την ανίχνευση του με ανοσοαποτύπωση και οι έξι ιστιδίνες θα διευκολύνουν την πορεία καθαρισμού του χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ολόκληρο το μόριο της αλβουμίνης που προκύπτει με έκφραση στο ίδιο σύστημα είναι ανενεργό (αναστολή στην έκκριση της LH κατά 9%).

Προκειμένου να αξιολογηθούν σωστά τα παραπάνω αποτελέσματα, η υποπεριοχή IIIB της HSA θα πρέπει να καθαριστεί χρωματογραφικά και να ελεγχθεί η δραστικότητα GnSAF στο καθαρό παρασκεύασμα. Αυτό θα μας επιτρέψει να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα για το αν η δραστικότητα αυτή οφείλεται αποκλειστικά στο πεπτιδίο IIIB ή αν επηρεάζεται από αλληλεπιδράσεις του πεπτιδίου με άλλους παράγοντες που υπάρχουν στο υπερκείμενο των κυττάρων. Παράλληλα, θα πρέπει να προσδιοριστούν τα επίπεδα συγκεντρώσεων του πεπτιδίου που απαιτούνται για τη δραστικότητα.

Θα ήταν ενδιαφέρον, να ελεγχθεί κατ' αρχήν αν η περιοχή III της HSA είναι επίσης ενεργή και στη συνέχεια να προσδιοριστεί ο ελάχιστος αριθμός καταλοίπων της υπομονάδας IIIB που απαιτούνται για τη δραστικότητα. Επιπλέον, λόγω του ότι οι υποπεριοχές IB και IIB της αλβουμίνης παρουσιάζουν δομική ομοιότητα με την IIIB θα μπορούσαν να ελεγχθούν και αυτές ως προς τη δραστικότητα GnSAF.

Καθότι ο παράγοντας άμβλυσης του κύματος των γοναδοτροφινών παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της LH, η ταυτοποίηση του και η μελέτη του μηχανισμού δράσης του, θα δώσει πολλές απαντήσεις σε σημαντικά ερωτήματα σχετικά με τον αναπαραγωγικό κύκλο της γυναίκας. Τα αποτελέσματα της μελέτης του GnSAF θα μπορούσαν να συνδεθούν πιθανώς και με εφαρμογές στην τεχνητή γονιμοποίηση.

Παράλληλα η δράση GnSAF έχει συσχετιστεί με το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού, ενώ ολόκληρο το μόριο της δεν παρουσιάζει τέτοια δράση. Οι περιπτώσεις γνωστών πρωτεϊνών που τμήμα τους εμφανίζει διαφορετική λειτουργία έχουν ιδιαίτερο βιοχημικό ενδιαφέρον. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, αφορούν το εσωτερικό κομμάτι του πλασμινογόνου που έχει δράση αγγειοστατίνης (O'Reilly *et al.*, 1994) και το καρβοξυτελικό τμήμα του κολλαγόνου που εμφανίζει δράση ενδοστατίνης (O'Reilly *et al.*, 1997). Παρότι η αλβουμίνη θεωρείται από τις πλέον μελετημένες πρωτεΐνες, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η εξειδικευμένη λειτουργία του καρβοξυτελικού της άκρου.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Carter D.C. and Ho J.X. (1994) Structure of serum albumin, *Adv. Protein Chem.* **45**, 153-203
2. Danforth D.R. and Cheng C.Y. (1995) Purification of a candidate gonadotrophin surge-inhibiting factor from porcine follicular fluid, *Endocrinology* **136**, 1658-1665
3. Dockal M., Carter D.C., and Rucker F. (1999) The three recombinant domains of human serum albumin, *J. Biol. Chem.* **274**, 29303-29310
4. Filicori M., Flamigni C., Campaniello E., Ferrari P., Meriggiola M.C., Michelacci L., Pareschi A., Valdiserri A. (1989) Evidence for a specific role of GnRH pulse frequency in the control of the human menstrual cycle, *Am. J. Physiology* **257**, E930-936
5. He X.M. and Carter D.C. (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature* **358**, 209-215
6. Inoue H., Nojima H., and Okayama H. (1990) High efficient transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* **96**, 23-28
7. Marshall J.C. and Griffin M.L. (1993) The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation, *Hum Reprod. & Suppl.* **2**, 57-61
8. Messinis I.E. and Templeton A.A. (1989) Pituitary response to exogenous LHRH in superovulated women, *J. Reprod. Fertil.* **87**, 633-639
9. Messinis I.E. and Templeton A.A. (1990) In-vivo bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF), *Clin. Endocrinol.* **33**, 213-218
10. Messinis I.E. and Templeton A.A. (1991) Attenuation of gonadotrophin release and reserve in superovulated women by gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF), *Clin. Endocrinol.* **34**, 259-263
11. Naor Z., Childs G.V., Leifer A.M., Clayton R.N., Amsterdam A., Catt K.J. (1982) Gonadotrophin-releasing hormone binding and activation of enriched population of pituitary gonadotrophs, *Mol. Cell Endocrinol.* **25**, 85-97

12. Levi N.L., Hanoch T., Benard O., Rozenblat M., Harris D., Reiss N., Naor Z., and Seger R. (1998) Stimulation of Jun N-Terminal Kinase (JNK) by Gonadotrophin-Releasing Hormone in Pituitary  $\alpha$ T3-1 Cell Line is Mediated by Protein Kinase C, c-Src, and CDC42, *Molecular Endocrinology* **12**, 815-824
13. O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R., Folkman J. (1997) Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Cell* **88**, 277-285
14. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. (1994) Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell* **79**, 315-328
15. Pappa A., Seferiadis K., Fotsis T., Shevchenko A., Marselos M., Tsoias O., Messinis I.E. (1999a) Purification of a candidate gonadotrophin surge attenuating factor from human follicular fluid, *Human Reproduction* **14**, 1449-1456
16. Pappa A., Seferiadis K., Marselos M., Tsoias O., Messinis I.E. (1999b) Development and application of competitive ELISA assays for rat LH and FSH, *Theriogenology* **51**, 911-926
17. Peters T., Jr., (1996) All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, *Academic Press, Inc., Orlando, FL*.
18. Sopolak V.M. and Hodgen G.D. (1984) Blockade of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in monkeys: a nonsteroidal, antigenic factor in porcine follicular fluid, *Fertil. Steril.* **41**, 108-113
19. Tio S., Koppelaar D., Bardin C.W., Cheng C.Y. (1994) Purification of gonadotrophin surge-inhibiting factor from Sertoli cell-enriched culture medium, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1229-1236
20. Yokoi T., Ohmichi M., Tasaka K., Kimura A., Kanda Y., Hayakawa J., Tahara M., Hisamoto K., Kurachi H., and Murata Y. (2000) Activation of the Luteinizing Hormone  $\beta$  Promoter by Gonadotrophin-releasing Hormone Requires c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Protein Kinase, *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 21639-21647

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**“ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΘΕΡΜΟΦΙΛΗΣ  $\alpha$ -ΑΜΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ  
ΑΡΧΑΙΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *PYROCOCCUS WOESSEI* ΣΕ ΜΕΣΟΦΙΛΑ  
ΒΑΚΤΗΡΙΑ”**

Επιβλέποντες :  
Καθηγητής : Κ. Δραΐνας  
Υ/Δ : Γ. Χιουρέας

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Αμυλάσες

Οι αμυλάσες απαντώνται σε όλα σχεδόν τα είδη οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων αρχαιοβακτηρίων (π.χ. *Pyrococcus woesei*), ευβακτηρίων (π.χ. *Bacillus subtilis*), μυκήτων (π.χ. *Aspergillus oryzae*), φυτών (π.χ. *Oryza sativa*) και θηλαστικών (π.χ. *Homo sapiens*). Όμως τα ένζυμα αυτά έχουν μελετηθεί περισσότερο σε μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες). Μια σημαντική ομάδα αμυλασών που έχει ταυτοποιηθεί σε μικροοργανισμούς αφορά τις α-αμυλάσες.

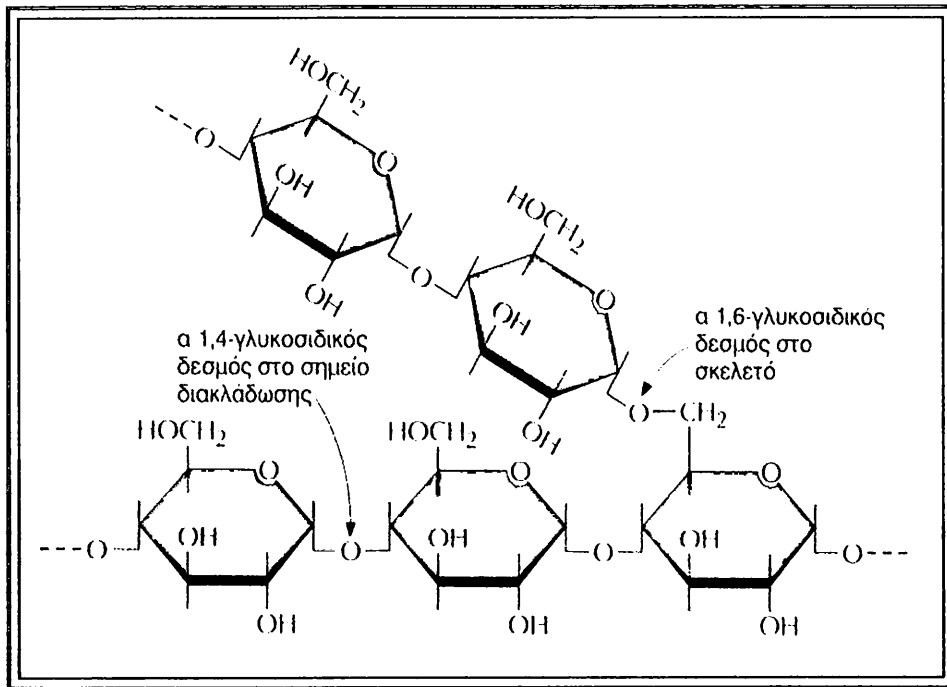
Οι α-αμυλάσες είναι εκκρινόμενα ένζυμα που λειτουργούν ως ενδογλυκοσιδάσες, υδρολύοντας α-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς από πολυμερή γλυκόζης (άμυλο, γλυκογόνο κλπ., **Εικόνα 1**) που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν από τα κύτταρα του οργανισμού ως μεταβολικές πηγές άνθρακα. Η α-αμυλολυτική δράση τους οδηγεί σε αρχική υδρόλυση των πολυμερών αυτών προς μίγμα κυρίως μαλτόζης (διμερούς), μαλτοτριόζης (τριμερούς) και α-δεξτρινών (διακλαδιζόμενων oligομερών). Στη συνέχεια άλλα εκκρινόμενα ένζυμα και αποδιακλαδωτικά ένζυμα με ενεργότητα α-1,6-γλυκοσιδάσης όπως η πουλουλανάση ολοκληρώνουν τη διάσπαση των μικρότερων πολυμερών προς μονομερή γλυκόζης, η οποία προσλαμβάνεται από τα κύτταρα (Pandey *et al.*, 2000).

Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σήμερα μεταξύ των σημαντικότερων ενζύμων στη βιοτεχνολογία εξαιτίας του ευρέως φάσματος πιθανών εφαρμογών τους. Βρίσκουν εφαρμογή σε ένα μεγάλο αριθμό βιομηχανικών διαδικασιών όπως στις βιομηχανίες τροφίμων και χαρτιού. Επίσης οι μικροβιακές αμυλάσες έχουν επιτυχώς αντικαταστήσει τη χημική υδρόλυση του αμύλου στις βιομηχανίες επεξεργασίας αμύλου (Pandey *et al.*, 2000).

Επιπλέον αμυλάσες που προέρχονται από υπερθερμόφιλους μικροοργανισμούς γενικά προτιμώνται καθώς οι εφαρμογές τους περιορίζουν στο ελάχιστο τον κίνδυνο μόλυνσεων και το χρόνο αντίδρασης εξασφαλίζοντας έτσι σημαντική οικονομία ενέργειας. Η υδρόλυση που



συμβαίνει κάτω από υψηλές θερμοκρασίες ελαχιστοποιεί τον πολυμερισμό της D-γλυκόζης σε ισομαλτόζη (Pandey *et al.*, 2000).



**Εικόνα 1 :** Δομή του αμύλου και του γλυκογόνου

Και τα δύο είναι πολυμερή γλυκόζης που διασπώνται από την α-αμυλάση και τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς τη συχνότητα των διακλαδώσεων τους

## 1.2 α-Αμυλάσες υπερθερμόφιλων αρχαιοβακτηρίων

Τα αναερόβια αρχαιοβακτήρια *Pyrococcus furiosus* (Faile and Stetter 1986) και *P. woesei* (Zillig *et al.*, 1987) εμφανίζουν τα βέλτιστα της ανάπτυξης τους στους 100 και 102 °C αντίστοιχα, αναπαριστώντας το φυσικό περιβάλλον για μια ομάδα από εξαιρετικά θερμοανθεκτικά ένζυμα. Λόγω της δυσκολίας που υπάρχει στην καλλιέργεια των υπερθερμόφιλων οργανισμών, οι πρωτεΐνες τους χρειάζεται να εκφράζονται σε μεσόφιλους ξενιστές πριν από την εφαρμογή τους για βιοτεχνολογικούς σκοπούς. Ένας μεγάλος αριθμός θερμοανθεκτικών ενζύμων (αμυλάσες, πουλουανάσες και ξυλανάσες) με πιθανές εφαρμογές σε βιομηχανίες βιομετατροπής αμύλου ή βιοαποχρωματισμού χαρτοπολτού έχουν εκφραστεί σε ενεργή μορφή σε μεσόφιλους μικροοργανισμούς. Για παράδειγμα, δύο διαφορετικές α-

αμυλάσες του *P. furiosus* έχουν κλωνοποιηθεί και εκφραστεί σε κύτταρα *E. coli* (Dong *et al.*, 1997α, Laderman *et al.*, 1993b, Jorgensen *et al.*, 1997) καθώς και σε μία περίπτωση σε κύτταρα *B. subtilis* (Jorgensen *et al.*, 1997).

Πρόσφατα, η α-αμυλάση του *P. woesei* κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε στην *E. coli* και στο μετρίως αλόφιλο βακτήριο *H. elongata* (Frillingos *et al.*, 2000). Η αμυλάση αυτή περιέχει στο αμινοτελικό της άκρο μια υδροφοβική σηματοδοτική αλληλουχία (signal sequence) 25 αμινοξέων υπεύθυνη για την έκκριση της στον *P. woesei* και τον *P. furiosus*. Σύμφωνα με την εργασία αυτή, η ανασυνδυασμένη α-αμυλάση του *P. woesei* μπορεί να εκφραστεί σε ενεργή μορφή σε μεσόφιλα και μετρίως αλόφιλα βακτήρια και εντοπίζεται στα μεμβρανικά κλάσματα. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ετερόλογα εκφραζόμενη α-αμυλάση παραμένει συνδεδεμένη με τα κύτταρα σε μια αδιάλυτη μορφή και δεν μπορεί να εκκριθεί στο υπερκείμενο των κυττάρων σε μεσόφιλους και μετρίως αλόφιλους οργανισμούς. Ωστόσο, η ενεργότητα της φυσικής α-αμυλάσης σε καλλιέργειες κυττάρων του *P. woesei* (Koch *et al.*, 1991) και του *P. furiosus* (Koch *et al.*, 1991) ανιχνεύτηκε εξωκυτταρικά.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι όμοια με εκείνα της έκφρασης της α-αμυλάσης του *P. furiosus* στην *E. coli* (Dong *et al.*, 1997α). Οι εξηγήσεις που δόθηκαν για την αδυναμία της έκκρισης της α-αμυλάσης του *P. woesei* στα υπερκείμενα κυττάρων μεσόφιλων και αλόφιλων οργανισμών, αφορούσαν την απουσία των απαραίτητων παραγόντων για την έκκριση της αμυλάσης στους ξενιστές αυτούς. Επίσης μια άλλη πιθανότητα είναι το ετερόλογα εκφραζόμενο ένζυμο να αναδιπλώνεται λανθασμένα δημιουργώντας έγκλειστα τα οποία παγιδεύονται στο μεμβρανικό ίζημα (Frillingos *et al.*, 2000).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία στόχος μας ήταν να εκφράσουμε την α-αμυλάση του υπερθερμόφιλου αρχαιοβακτηρίου *P. woesei* στο μεσόφιλο βακτήριο *E. coli* μετά από αντικατάσταση της σηματοδοτικής της αλληλουχίας με την σηματοδοτική αλληλουχία *gIII* η οποία χρησιμοποιείται συστηματικά για εκκρινόμενη έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στην *E. coli* (Boeke and Model 1982, Boeke *et al.*, 1982).

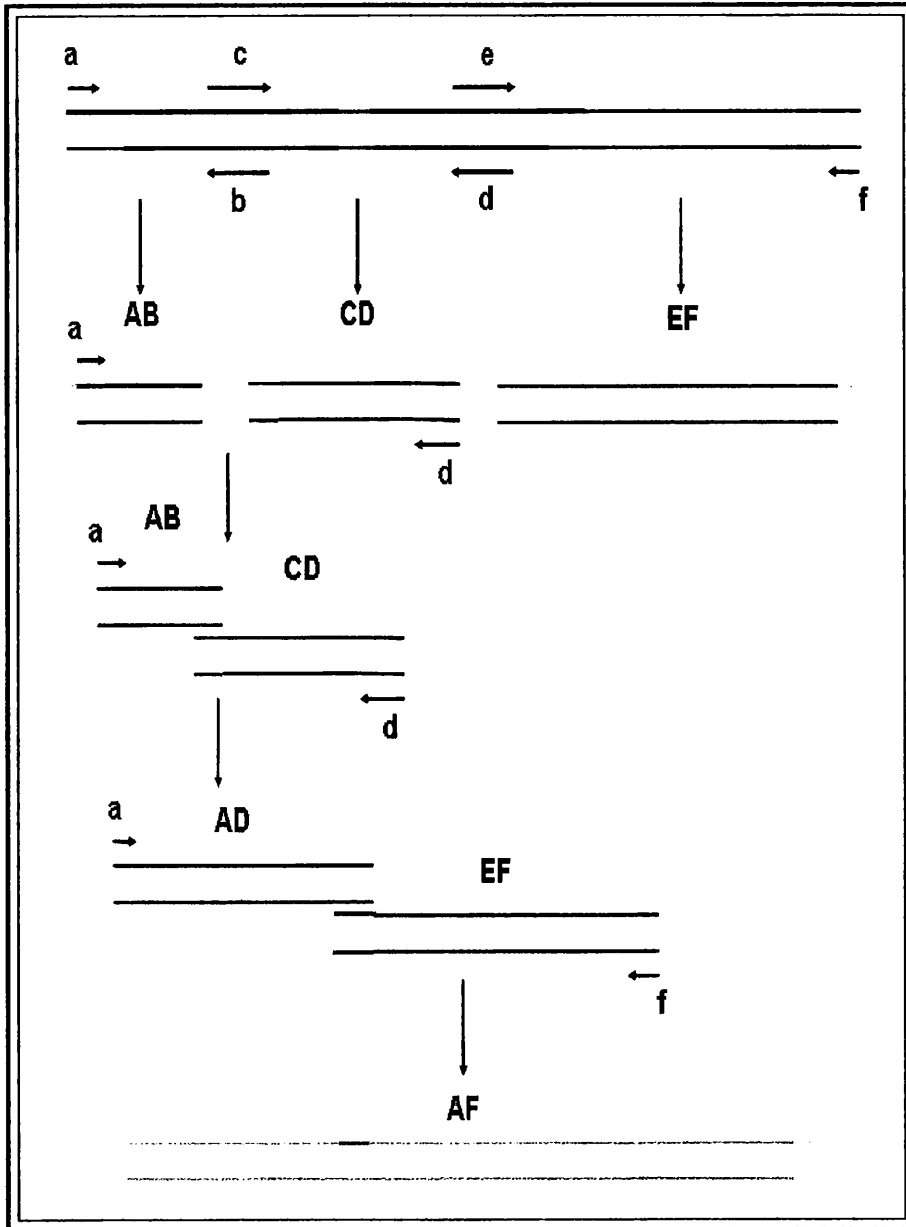
### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πολλών σταδίων

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) πολλών σταδίων χρησιμοποιεί συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια για να δημιουργήσει τμήματα DNA, από τα γονίδια στόχους, που φέρουν επικαλυπτόμενα άκρα (Ho *et al.*, 1989, Frillingos *et al.*, 1994). Τα τμήματα αυτά στη συνέχεια συνδυάζονται σε επόμενες αντιδράσεις σύντηξης, χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα όπου λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων τους υβριδίζουν και με τη χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων επεκτείνονται και δίνουν ένα προϊόν που αποτελείται από τα προηγούμενα τμήματα.

Πιο αναλυτικά όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 1** σε ένα 1<sup>ο</sup> στάδιο πραγματοποιούνται ξεχωριστές αντιδράσεις PCR όπου ενισχύονται διαφορετικά τμήματα του γονιδίου στόχου. Σε κάθε μια από τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα το γονίδιο-στόχος καθώς επίσης και συμπληρωματικοί εκκινητές (a.b.c.d.e.f.) που δημιουργούν τις επικαλύψεις βάσεων μεταξύ των τμημάτων (AB, CD, EF).

Σε επόμενα στάδια, τα προϊόντα PCR που προκύπτουν από την πρώτη σειρά αντιδράσεων καθαρίζονται και συνδυαζόμενα ανά δύο υποβάλλονται σε επόμενες αντιδράσεις PCR χωρίς να προστεθεί εκ νέου το αρχικό υπόστρωμα. Τα τμήματα αυτά λόγω επικαλύψεων υβριδίζουν με αποτέλεσμα να παίρνουμε ένα τελικό προϊόν (AF) που αποτελείται από τα τρία αρχικά (AB,CD, EF).



**Σχήμα 1 :** Σχηματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) πολλών σταδίων

Στο επάνω μέρος φαίνεται το 1<sup>ο</sup> στάδιο PCR κατά το οποίο προκύπτουν τα προϊόντα **AB**, **CD**, **EF**

Στη μέση φαίνεται το 2<sup>ο</sup> στάδιο PCR κατά το οποίο προκύπτει το προϊόν **AD**, από τα προϊόντα **AB** και **CD** λόγω επικάλυψης

Στο κάτω μέρος φαίνεται το 3<sup>ο</sup> στάδιο PCR κατά το οποίο προκύπτει το τελικό προϊόν **AF**, από τα προϊόντα **AD** και **EF** λόγω επικάλυψης

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την πολλαπλή αντιγραφή τμημάτων του γονιδίου της α-αμυλάσης του *Pyrococcus woesei*.

Αρχικά ενισχύθηκαν δύο τμήματα της α-αμυλάσης με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA από το πλασμίδιο pH515 της *E. coli* το οποίο φέρει ολόκληρο το γονίδιο της α-αμυλάσης μαζί με την σηματοδοτική της αλληλουχία. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά επιλεγμένοι συμπληρωματικοί εκκινήτες στους οποίους προστέθηκαν συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών. Οι θέσεις περιορισμού φαίνονται με έντονα μπλε γράμματα. Η αλληλουχία των εκκινήτων αυτών έχει ως εξής :

Για το τμήμα της α-αμυλάσης από το νουκλεοτίδιο 173 ως το 516 (344 bp):

- sense primer (**α-amy 1**) : 5'- CTA TAG CCA TAG CGC AAA ATA CTT  
G - 3'
- antisense primer (**α-amy 2**) : 5'- CCA CCA GCC CTG TGG TTT ATA  
AC - 3'

Για το τμήμα της α-αμυλάσης από το νουκλεοτίδιο 494 ως το τέλος της αλληλουχίας του γονιδίου (986 bp) :

- sense primer (**α-amy 3**) : 5' - GTT ATA AAC CAC AGG GCT GGT  
GG - 3'
- antisense primer (**α-amy 4**) : 5' - AAA **CTG CAG** TCA CCC AAC ACC  
ACA ATA - 3'

Επίσης ένα τρίτο τμήμα DNA που αποτελεί την επιθυμητή σηματοδοτική αλληλουχία και που χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα στάδια PCR, δημιουργήθηκε από δύο μονόκλινα συνθετικά συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια (MWG-Biotech AG). Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται εκτενώς για την έκφραση-έκκριση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στην *E. coli* και έχει ενσωματωθεί στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pBAD/gIII που διατίθεται από την Εταιρία Invitrogen. Το μήκος της ήταν 54 bp αλλά για να υπάρχει επικάλυψη βάσεων με τα τμήματα DNA της α-αμυλάσης που προέκυψαν με PCR προστέθηκαν στα άκρα της επιπλέον 23 bp. Οι μονόκλινες αυτές αλυσίδες επωάστηκαν για δύο λεπτά στους 94 °C και σταδιακά επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να υβριδίσουν.

Σε ένα επόμενο στάδιο PCR όπου επιδιώκεται η σύντηξη της σηματοδοτικής αλληλουχίας με το τμήμα της α-αμυλάσης των 344 bp (408 bp) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές :

- sense primer (**sigseq**) : 5' - AAA **CTG CAG** CAT GAA AAA ACT G-3'
- antisense primer : **α-amy 2**

Τέλος για τη σύντηξη του προϊόντος του προηγούμενου σταδίου PCR με το τμήμα της α-αμυλάσης των 986 bp (1385 bp) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές :

- sense primer : **sigseq**
- antisense primer : **α-amy 4**

Στα δύο τελευταία στάδια PCR, όπως προαναφέρθηκε, δεν προστίθεται εκ νέου το αρχικό υπόστρωμα.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν :

- 100 ng πλασμιδιακού DNA ή αντίστοιχες ποσότητες προϊόντων PCR μετά από καθαρισμό
- 50 pmol από τον κάθε εκκινητή
- 10X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης που περιέχει MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM)
- 0,25 mM από το κάθε dNTP
- 2,5 U από την Expand High Fidelity Taq πολυμεράση (Roche)
- αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 μl

### 3.2 Ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός θραυσμάτων DNA

Τα πηγάματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων DNA ήταν 0,8 και 1,5% (w/v) αγαρόζης σε διάλυμα TAE (40 mM Tris/acetate and 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O). Μετά από θέρμανση και προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml, τα δείγματα DNA αναμιγνύονται σε αναλογία 5:1 με 6Xδιάλυμα φόρτωσης (30% γλυκερόλη και 0,25% κυανού της βρωμοφαινόλης) και ηλεκτροφορούνται σε διάλυμα TAE υπό σταθερή τάση παράλληλα με δείγμα πρότυπων μοριακών βαρών.

Η παρατήρηση της πηκτικής έγινε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας και για να ακολουθήσει ο καθαρισμός των θραυσμάτων DNA από την πηκτική αφαιρέθηκαν οι ζώνες εστιασμού.

Για το καθαρισμό προστίθενται 2 όγκοι διαλύματος NaI 6 M και το δείγμα επωάζεται στους 55 °C για 5 λεπτά ώστε να λιώσει. Στη συνέχεια προστίθενται 10 µl κοκκίων πυριτίου (σίλικα) και μετά από ανάμιξη ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 1 λεπτό και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Η διαδικασία του πλυσίματος γίνεται δύο φορές με 0,5 ml διαλύματος έκπλυσης (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2,5 mM EDTA και 50% (v/v) ethanol) και ακολουθεί ξήρανση του δείγματος. Η έκλυση του DNA πραγματοποιείται με προσθήκη 10 µl νερού και επώαση στους 55 °C για 2-3 λεπτά.

### 3.3 Δημιουργία απότομων άκρων και περιοριστικές πέψεις του ενθέματος και του πλασμιδιακού φορέα

Για την δημιουργία απότομων άκρων χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA πολυμεράση (Promega) (Fill in). Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν :

- ✓ 4 – 6 µg από το κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο DNA
- ✓ 1X διαλύματος αντίδρασης
- ✓ 10X BSA (1 mg/ml)
- ✓ 50 µM από κάθε dNTP
- ✓ 1 U T4 DNA Polymerase για κάθε µg DNA
- ✓ αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20 µl

Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C και η αντίδραση σταματά με θέρμανση στους 75 °C για 10 λεπτά.

Για την πέψη του ενθέματος και του πλασμιδιακού φορέα χρησιμοποιούνται παράλληλα τα περιοριστικά ένζυμα *Pst*I και *Mlu*I (Amersham pharmacia biotech) με το ίδιο διάλυμα αντίδρασης (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl and 0,01% BSA) και επώαση στους 37 °C για 3 ώρες. Επίσης χρησιμοποιείται και αλκαλική φωσφατάση στο μίγμα περιοριστικής πέψης του φορέα ώστε να αποφευχθεί η ανασύνδεση πλασμιδιακών μορίων DNA.



### 3.4 Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli*

Η σύνδεση των θραυσμάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 16 °C για 16 ώρες σε τελικό όγκο 20 μl με την προσθήκη της T4 DNA λιγάσης (New England Biolabs), 10 mM ATP και ποσοτήτων ενθέματος και φορέα σε διάφορες αναλογίες.

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται σε επιδεκτικά βακτηριακά *E. coli* κύτταρα του στελέχους DH5α σύμφωνα με τη Μέθοδος Inoue (Inoue *et al.*, 1990). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, κατά το μετασχηματισμό προστίθεται η μισή ποσότητα από τις αντιδράσεις σύνδεσης σε 200 μl επιδεκτικών κυττάρων και μετά από επώαση στον πάγο για 5 λεπτά τα κύτταρα σπέρνονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB (1% Tryptone, 1% NaCl and 0,5% Yeast extract) που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 μg/ml).

### 3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών της εταιρίας Amersham, Jet - Prep Kit.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η α-αμυλάση του υπερθερμόφιλου αρχαιοβακτηρίου *Pyrococcus woesei* έχει μελετηθεί και στο παρελθόν από το εργαστήριο Βιοχημείας. Εκφράστηκε σε μεσόφιλους και μετρίως αλόφιλους ξενιστές, τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Halomonas elongata* αντίστοιχα, στα οποία όμως δεν διατήρησε τον εκκρινόμενο χαρακτήρα της και βρέθηκε εγκλωβισμένη στις κυτταρικές μεμβράνες (Frillingos *et al.*, 2000).

Στην παρούσα εργασία, στόχος ήταν η έκφραση της υπερθερμόφιλης α-αμυλάσης του *P. woesei* στο βακτήριο *E. coli* μετά από αντικατάσταση της σηματοδοτικής της αλληλουχίας με τη σηματοδοτική αλληλουχία *gIII* (Boeke and Model 1982, Boeke *et al.*, 1982). Η σηματοδοτική αυτή αλληλουχία χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε εκκρινόμενη μορφή, στον περιπλασμικό χώρο της *E. coli*. Ως φορέας έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pHS15*, ένα πλασμίδιο ικανό να αντιγράφεται σε κύτταρα *E. coli* και *H. elongata* (Vargas *et al.*, 1995) και στο οποίο έχει ήδη κλωνοποιηθεί το γονίδιο της α-αμυλάσης του *P. woesei* στην περιοριστική θέση *PstI* (**pHS15Pwo-amy**, Frillingos *et al.*, 2000).

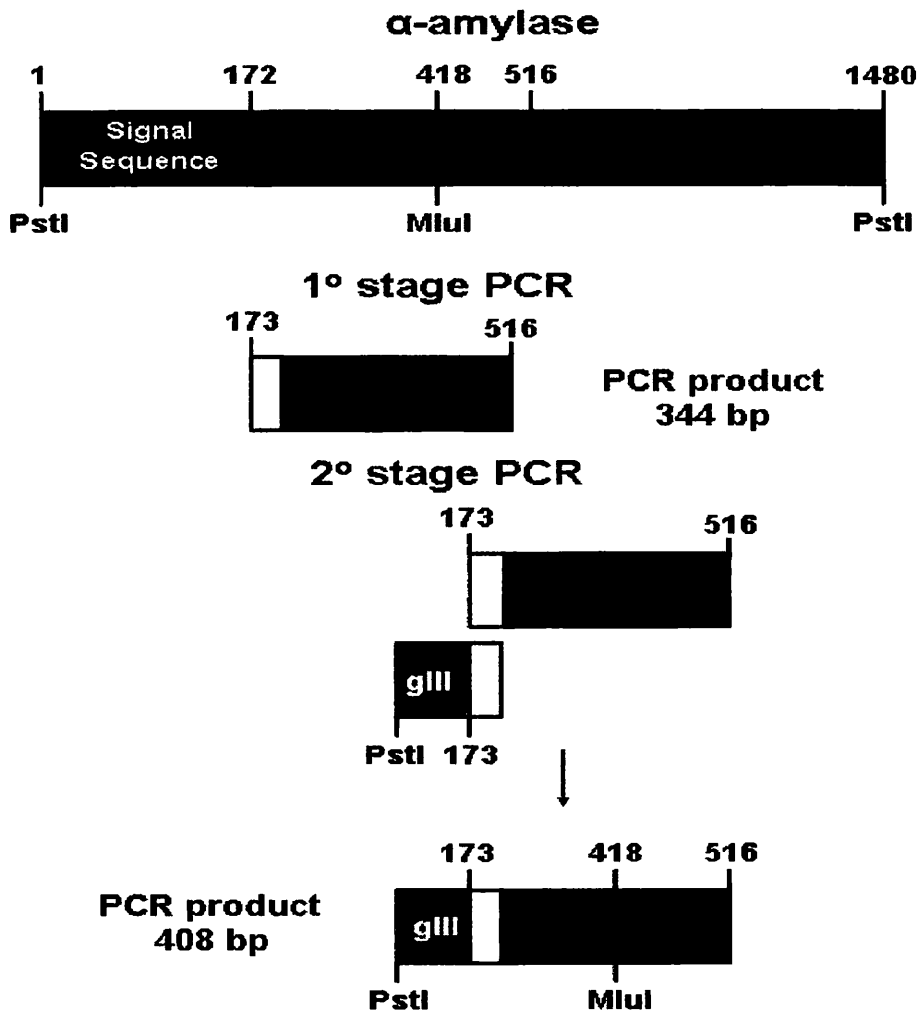
### 4.1 Αντικατάσταση της σηματοδοτικής αλληλουχίας της α-αμυλάσης του *P. woesei* με τη σηματοδοτική αλληλουχία *gIII* που αναγνωρίζεται από *E. coli*

Για την επίτευξη της αντικατάστασης της σηματοδοτικής αλληλουχίας της α-αμυλάσης του *P. woesei* με τη σηματοδοτική αλληλουχία *gIII* πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε δύο στάδια με τη χρήση συμπληρωματικών εκκινητών.

Κατά το πρώτο στάδιο ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου από το νουκλεοτίδιο 173, που αντιστοιχεί στο τέλος της ενδογενούς σηματοδοτικής αλληλουχίας, έως το νουκλεοτίδιο 516, ώστε το παραγόμενο προϊόν να περιέχει την περιοριστική θέση *MluI* (**Σχήμα 2**). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA από το πλασμίδιο *pHS15* το οποίο φέρει

ολόκληρο το μόριο της α-αμυλάσης (pHS15Pwo-amy) και το προϊόν που προέκυψε έχει μέγεθος 344 bp.

Κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε σύνδεση της σηματοδοτικής αλληλουχίας gIII, η οποία δημιουργήθηκε με τη χρήση δύο μονόκλωνων συνθετικών συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων που αφέθηκαν να υβριδίσουν σε κατάλληλη θερμοκρασία (σελ. 68), με το προϊόν PCR των 344 bp. Ο νοηματικός εκκινήτης (sense primer) που χρησιμοποιήθηκε στο δεύτερο στάδιο PCR εισάγει την θέση περιορισμού *Pst*I.



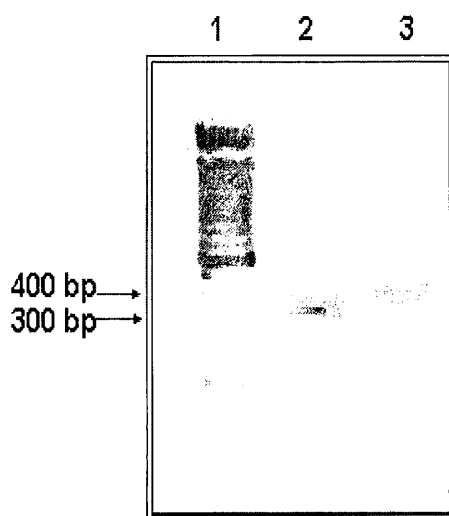
**Σχήμα 2 :** Σχηματική απεικόνιση της αλληλουχίας του γονιδίου της α-αμυλάσης του *P. woesei* καθώς και των προϊόντων από τα δύο στάδια PCR

Στο επάνω μέρος φαίνεται το 1° στάδιο PCR κατά το οποίο προκύπτει ένα προϊόν 344 bp από το γονίδιο της α-αμυλάσης του *P. woesei*

Στο κάτω μέρος φαίνεται το 2° στάδιο PCR κατά το οποίο προκύπτει, από τα προϊόντα των 344 bp και της σηματοδοτικής αλληλουχίας gIII (77 bp) λόγω επικάλυψης, ένα προϊόν 408 bp με την εισαγωγή της περιοριστικής θέσης *Pst*I στο 5' άκρο του

Μετά την πολλαπλή αντιγραφή των προϊόντων των δύο σταδίων PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός.

Στην **Εικόνα 1** φαίνονται τα προϊόντα PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.



**Εικόνα 1 :** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR

Διαδρομή 1 : πρότυπα μοριακά βάρη

Διαδρομή 2 : προϊόν PCR 1<sup>ου</sup> σταδίου (344 bp)

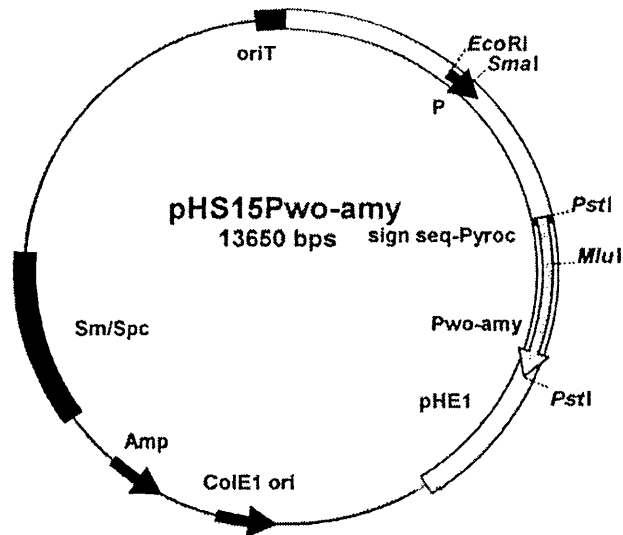
Διαδρομή 3 : προϊόν PCR 2<sup>ου</sup> σταδίου (408 bp)

#### 4.2 Κλωνοποίηση του ανασυνδυασμένου γονιδίου της α-αμυλάσης του *P. woesei* που φέρει τη σηματοδοτική αλληλουχία gIII

Για την έκφραση του ανασυνδυασμένου γονιδίου της α-αμυλάσης (2<sup>ο</sup> στάδιο PCR) χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης pHS15 στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί ήδη το γονίδιο της α-αμυλάσης του *P. woesei* (1480 bp) στην περιοριστική θέση *Pst*I, με συνολικό μέγεθος 13650 bp. Τα χαρακτηριστικά του φορέα είναι τα εξής (Vargas *et al.*, 1995) :

- φέρει το ευθυγραμμισμένο φυσικό πλασμίδιο pHE1 της *H. elongata* με όλες τις περιοριστικές του θέσεις
- περιέχει τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και αμπικιλίνη.
- περιλαμβάνει την περιοχή έναρξης της αντιγραφής ColE1 ori για την *E. coli* και την περιοχή έναρξης της αντιγραφής oriT για την *H. elongata*

- περιέχει δύο συνεχείς υποκινητές, ένα κεντρικό που λειτουργεί στην *E. coli* και ένα που είναι φυσικός στο πλασμίδιο ρHE1 και λειτουργεί και στην *E. coli* και στην *H. elongata*



**Εικόνα 2 :** Απεικόνιση του φορέα έκφρασης, των χαρακτηριστικών του και της θέσεως που έχει εισαχθεί το γονίδιο της α-αμυλάσης

4.2.1 Δημιουργία απότομων άκρων στη μια θέση *PstI* του φορέα έκφρασης και εισαγωγή του προϊόντος του 2<sup>ου</sup> σταδίου PCR στο φορέα έκφρασης μετά από την πλήρη πέψη τους με τα περιοριστικά ένζυμα *PstI* και *MluI*

Για την επίτευξη της εισαγωγής του 2<sup>ου</sup> σταδίου PCR στο φορέα έκφρασης ρHS15Pwo-amy, επιχειρήθηκε η καταστροφή της μιας *PstI* θέσης του πλασμιδίου ώστε να δημιουργηθεί μοναδικότητα της περιοριστικής αυτής θέσης και να διευκολυνθεί η αντίδραση ανασύνδεσης του ενθέματος με το φορέα. Αρχικά πραγματοποιείται μερική πέψη του πλασμιδίου με το ένζυμο *PstI* από την οποία προκύπτουν τα ακόλουθα θραύσματα εκ περιορισμού :

- Θραύσμα μεγέθους 13650 bp που προκύπτει από πέψη μόνο στην πρώτη θέση *PstI*
- Θραύσμα μεγέθους 13650 bp που προκύπτει από πέψη μόνο στην δεύτερη θέση *PstI*

- Θραύσμα μεγέθους 12170 bp που προκύπτει από πέψη και στις δύο θέσεις *Pst*I
- Θραύσμα μεγέθους 1480 bp που προκύπτει από πέψη και στις δύο θέσεις *Pst*I

Τα προϊόντα της μερικής πέψης διαχωρίζονται σε πηκτική αγαρόζης και μετά από καθαρισμό των θραυσμάτων μεγέθους 13650 bp ακολουθεί η αντίδραση δημιουργίας απότομων άκρων με χρήση της T4 DNA πολυμεράσης. Εν συνεχεία πραγματοποιείται πλήρης πέψη του πλασμιδίου και του προϊόντος του 2<sup>ου</sup> σταδίου PCR με τα ένζυμα *Pst*I και *Mlu*I.

Το προϊόν 2<sup>ου</sup> σταδίου PCR όπως παρουσιάζεται και στο **Σχήμα 2** κατασκευάστηκε έτσι ώστε να κλωνοποιηθεί στον φορέα έκφρασης στις θέσεις περιορισμού *Pst*I και *Mlu*I. Η θέση αναγνώρισης του ενζύμου *Pst*I εισήχθη στο 5' άκρο του PCR προϊόντος με κατάλληλους εκκινητές ενώ η θέση με *Mlu*I υπήρχε ήδη στο τμήμα της αλληλουχία του γονιδίου που ενισχύθηκε (θέση 418). Πλήρης πέψη με τα δύο αυτά ένζυμα μας δίνει ένα προϊόν 317 bp.

Η αντίδραση ανασύνδεσης του ενθέματος και του φορέα γίνεται με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης και ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται σε επιδεκτικά *E. coli* κύτταρα του στελέχους DH5α.

Με τον τρόπο αυτό δεν προέκυψαν μετασχηματισμένα κύτταρα. Η αντίδραση ανασύνδεσης πιθανώς να μην πραγματοποιήθηκε λόγω του ότι η T4 DNA πολυμεράση δεν δημιούργησε τα σωστά άκρα.

#### 4.2.2 Απευθείας εισαγωγή του προϊόντος του 2<sup>ου</sup> σταδίου PCR στο φορέα έκφρασης μετά από μερική πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Pst*I

Για να μπορέσουμε να επιτύχουμε την αντικατάσταση του τμήματος του γονιδίου από την 1<sup>η</sup> θέση *Pst*I ως την *Mlu*I με το 2<sup>ο</sup> στάδιο PCR κάναμε πλήρη πέψη του πλασμιδίου με το ένζυμο *Mlu*I και στη συνέχεια μερική πέψη με το ένζυμο *Pst*I και προσθήκη αλκαλικής φωσφατάσης. Τα τμήματα DNA που προκύπτουν από την μερική πέψη είναι τα ακόλουθα :

- Τμήματα DNA μεγέθους 13232 bp και 418 bp μετά από πέψη μόνο στην πρώτη θέση *Pst*I
- Τμήματα DNA μεγέθους 12588 bp και 1062 bp μετά από πέψη μόνο στην δεύτερη θέση *Pst*I

- Τμήματα DNA μεγέθους 12170 bp και 1480 bp μετά από πέψη και στις δύο θέσεις *Pst*I

Τα θραύσματα εκ περιορισμού διαχωρίζονται σε πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία ανασύνδεσης του ενθέματος με το κατάλληλο θραύσμα εκ περιορισμού του πλασμιδίου μεγέθους 13232 bp. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε σε επιδεκτικά *E. coli* κύτταρα του στελέχους DH5α.

Κατά το μετασχηματισμό δεν κατέστη δυνατό να προκύψουν ανασυνδασμένοι κλώνοι. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το DNA που προκύπτει από μερικές πέψεις και χρησιμοποιείται στις αντιδράσεις σύνδεσης αποτελεί μίγμα κομμένων και άκοπων μορίων. Αυτό οφείλεται στη δυσκολία διαχωρισμού των περιοριστικών θραυσμάτων λόγω του παραπλήσιου μοριακού τους βάρους. Έτσι η ποσότητα του επιθυμητού μορίου DNA είναι περιορισμένη και ως εκ τούτου μη ικανοποιητική για την αντίδραση σύνδεσης και για τον αποτελεσματικό μετασχηματισμό.

#### 4.2.3 Επέκταση του προϊόντος του δευτέρου σταδίου PCR και εισαγωγή του στο φορέα έκφρασης στη θέση περιορισμού *Pst*I

Μια τρίτη εκδοχή για την επίτευξη της έκφρασης της α-αμυλάσης με την σηματοδοτική αλληλουχία *gIII* σε κύτταρα *E. coli* ήταν να κλωνοποιηθεί ολόκληρο το γονίδιο στο φορέα έκφρασης *pHS15wo-amy* μετά από πλήρη πέψη του πλασμιδίου μόνο με το ένζυμο *Pst*I ώστε να αποφύγουμε τα προβλήματα των μερικών πέψεων.

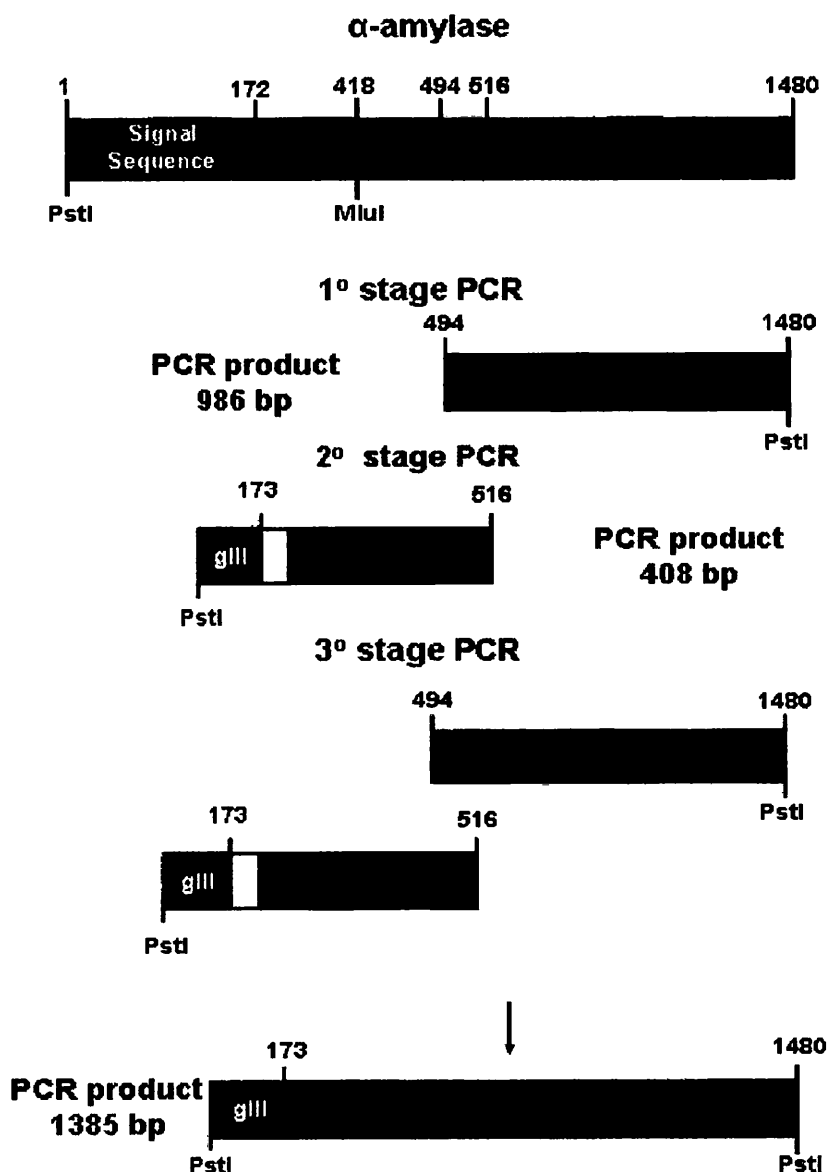
Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης :

- για την επέκταση του τμήματος της α-αμυλάσης από το νουκλεοτίδιο 494 ως το τέλος της αλληλουχίας του γονιδίου (προϊόν PCR 986 bp) με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA από το πλασμίδιο *pHS15Pwo-amy*
- για την σύντηξη του τμήματος αυτού με το προϊόν του 2<sup>ου</sup> σταδίου PCR.

Κατά τη σύντηξη του προϊόντος του 2<sup>ου</sup> σταδίου με το τμήμα της α-αμυλάσης των 986 bp (3<sup>ο</sup> στάδιο PCR) δεν προστίθεται εκ νέου πλασμιδιακό

υπόστρωμα και το προϊόν που προκύπτει (1385 bp) φέρει στα άκρα του την περιοριστική θέση *Pst*I.

Στο **Σχήμα 3** φαίνονται σχηματικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν.



**Σχήμα 3 :** Σχηματική απεικόνιση των προϊόντων τριών σταδίων PCR

Στο επάνω μέρος φαίνεται το 1<sup>ο</sup> στάδιο PCR κατά το οποίο προκύπτει ένα προϊόν 986 bp από το γονίδιο της α-αμυλάσης του *P. woesei* με την εισαγωγή της περιοριστικής θέσης *Pst*I στο 3' άκρο του

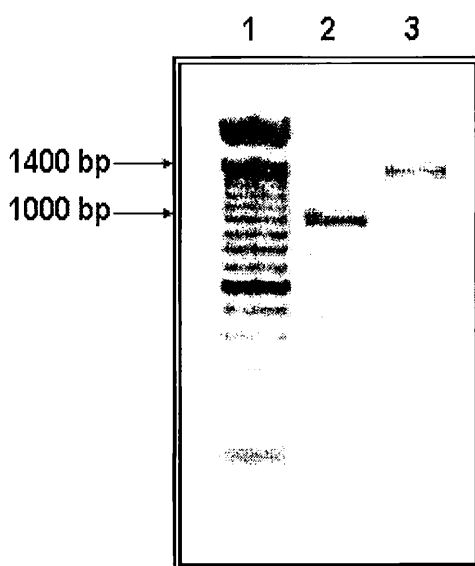
Στη μέση φαίνεται το 2<sup>ο</sup> στάδιο PCR το οποίο προέκυψε με τον τρόπο που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2**

Στο κάτω μέρος φαίνεται το 3<sup>ο</sup> στάδιο PCR κατά το οποίο προκύπτει, από τα προϊόντα των 986 bp και 2<sup>ου</sup> σταδίου λόγω επικάλυψης, το τελικό προϊόν των 1385 bp με την περιοριστική θέση *Pst*I στα άκρα του



Μετά την πολλαπλή αντιγραφή των προϊόντων PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και καθαρισμός.

Στην **Εικόνα 3** φαίνονται τα προϊόντα των 986 bp και του τρίτου σταδίου PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.



**Εικόνα 3 :** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR

Διαδρομή 1 : πρότυπα μοριακά βάρη

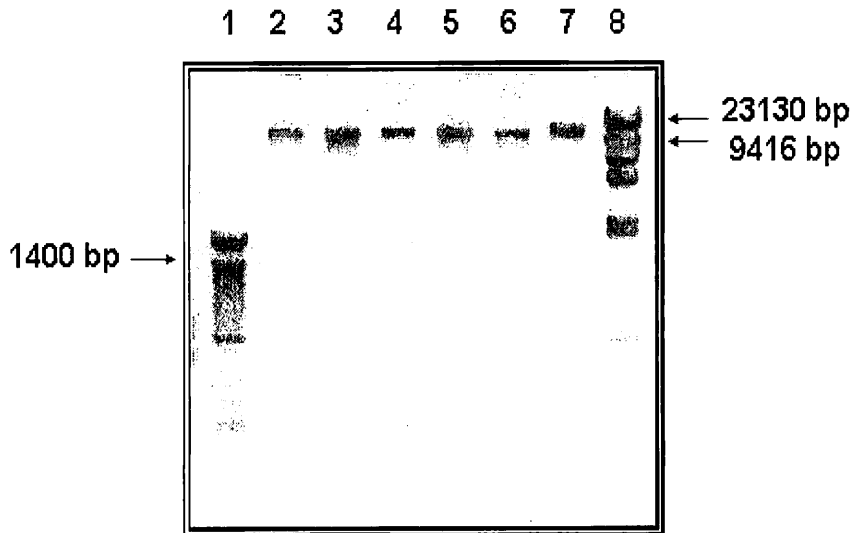
Διαδρομή 2 : προϊόν 1<sup>ου</sup> σταδίου PCR (986 bp)

Διαδρομή 3 : προϊόν 3<sup>ου</sup> σταδίου PCR (1385 bp)

Στη συνέχεια ακολούθησε πλήρης πέψη του ενθέματος και του φορέα έκφρασης με το ένζυμο *Pst*I καθώς και αποφωσφορυλίωση του φορέα με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης ώστε να αποφευχθεί η ανασύνδεση πλασμιδιακών μορίων DNA. Η ανασύνδεση τους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης και ο μετασχηματισμός έγινε σε επιδεκτικά *E. coli* κύτταρα του στελέχους DH5α. Οι αποικίες επιλέχθηκαν με βάση την ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA μικρής κλίμακας και περιοριστική ανάλυση με τα ένζυμα *Pst*I και *Mlu*I.

Από το μετασχηματισμό προέκυψαν αποικίες σε αναλογία περίπου 1:1 στα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το μίγμα της αντίδρασης ανασύνδεσης που περιέχει το ένθεμα και το φορέα, σε σχέση με τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το μίγμα αντίδρασης ανασύνδεσης που περιέχει μόνο το φορέα (αρνητικός μάρτυρας). Αναλύθηκαν 20 αποικίες οι οποίες

εμφάνιζαν την ίδια εικόνα με αυτές που παρουσιάζονται ενδεικτικά στην **Εικόνα 4**.



**Εικόνα 4** : Περιοριστική ανάλυση DNA τεσσάρων αποικιών με τα ένζυμα *Pst*I και *Mlu*I

Διαδρομές 1– 8 : πρότυπα μοριακά βάρη

Διαδρομή 4 : πλασμιδιακός φορέας ρHS15wo-amy μετά από πέψη με τα ένζυμα *Pst*I και *Mlu*I (θετικός μάρτυρας)

Διαδρομές 2–3–5–6 : πλασμιδιακό DNA από τέσσερις αποικίες μετά από πέψη με τα ένζυμα *Pst*I και *Mlu*I

Διαδρομή 7 : «άκοπος» πλασμιδιακός φορέας ρHS15Pwo-amy

Όπως παρατηρούμε στην παραπάνω εικόνα δεν κατέστη δυνατό να προκύψει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Τα θραύσματα που προκύπτουν μετά την περιοριστική ανάλυση των κλώνων αντιστοιχούν στον πλασμιδιακό φορέα ρHS15. Μια πιθανή εξήγηση για το γεγονός αυτό είναι η αδυναμία αποφωσφορυλίωσης του φορέα μετά την περιοριστική πέψη του με αποτέλεσμα την επανακυκλοποίηση του.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι α-αμυλάσες των υπερθερμόφιλων αρχαιοβακτηρίων *Pyrococcus furiosus* και *Pyrococcus woesei* έχουν εκφραστεί και στο παρελθόν σε μεσόφιλους και μετρίως αλόφιλους οργανισμούς {π.χ. *Escherichia coli* (Dong *et al.*, 1997α, Frillingos *et al.*, 2000, Jorgensen *et al.*, 1997), *Halomonas elongata* (Frillingos *et al.*, 2000), *Bacillus subtilis* (Jorgensen *et al.*, 1997)} στους οποίους όμως δεν διατήρησαν τον εκκρινόμενο χαρακτήρα τους. Μια πιθανή εξήγηση για το λόγο που συνέβη αυτό είναι το γεγονός ότι το γονίδιο της α-αμυλάσης φέρει μια σηματοδοτική αλληλουχία υπεύθυνη για την έκκριση της στα υπερθερμόφιλα αυτά αρχαιοβακτήρια η οποία όμως δεν αναγνωρίζεται από τα συστήματα έκκρισης των βακτηριακών ξενιστών, λόγω της ταξινομικής απόστασης μεταξύ Αρχαιοβακτηρίων και Ευβακτηρίων.

Μια προσέγγιση για την επίλυση του προβλήματος αυτού είναι η αντικατάσταση της ενδογενούς σηματοδοτικής αλληλουχίας με μια άλλη που θα αναγνωρίζει το κύτταρο-ξενιστής. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η έκφραση της α-αμυλάσης του *P. woesei* στο βακτήριο *E. coli* με τη χρήση της σηματοδοτικής αλληλουχίας gIII η οποία χρησιμοποιείται συστηματικά για την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε εκκρινόμενη μορφή στην *E. coli* (Boeke and Model 1982, Boeke *et al.*, 1982). Ως φορέας έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pHS15Pwo-amy (Frillingos *et al.*, 2000) ικανό να αντιγράφεται τόσο σε κύτταρα *E. coli* όσο και σε κύτταρα *H. elongata* (Vargas *et al.*, 1995).

Επιλέξαμε τρεις διαφορετικούς τρόπους (σελ. 75-80) για την επίτευξη της κλωνοποίησης της α-αμυλάσης μετά από αντικατάσταση της ενδογενούς σηματοδοτικής της αλληλουχίας στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης, με τους οποίους όμως δεν κατέστη δυνατό να προκύψουν ανασυνδυασμένοι κλώνοι. Ο τελευταίος τρόπος (*Επέκταση του προϊόντος του δευτέρου σταδίου PCR και εισαγωγή του στο φορέα έκφρασης στη θέση περιορισμού PstI*), με τον οποίο αποφεύγονται οι τεχνικές δυσχέρειες των μερικών πέψεων, προσφέρει μεγαλύτερες δυνατότητες επιτυχίας. Θα πρέπει όμως να αναφέρουμε ότι και με τις τρεις προσεγγίσεις δεν ήταν εφικτό να ελεγχθεί αν έχει εισαχθεί η σωστή περιοριστική θέση τα άκρα των προϊόντων PCR λόγω του ότι μετά την πέψη τους με το κατάλληλο ένζυμο απομακρύνονται ελάχιστες νουκλεοτιδικές

βάσεις με αποτέλεσμα να μην είναι ευδιάκριτη η διαφορά στο μοριακό τους βάρος.

Ένα πρώτο βήμα που θα πρέπει να γίνει για την επίτευξη του στόχου αυτού είναι η αλληλούχιση των προϊόντων PCR έτσι ώστε να ελεγχθεί αν έχουν τις σωστές θέσεις περιορισμού και αν αποτελούν την επιθυμητή αλληλουχία (δηλαδή την αλληλουχία του γονιδίου της α-αμυλάσης με την σηματοδοτική αλληλουχία *gIII* στο αμινοτελικό της άκρο). Επιπλέον μια ακόμη πιθανή λύση είναι η εισαγωγή του γονιδίου της α-αμυλάσης μετά από αντικατάσταση της σηματοδοτικής αλληλουχία στο αρχικό φορέα έκφρασης *pHS15* (δηλαδή αυτόν που δεν φέρει το γονίδιο της α-αμυλάσης του *P. woesei*). Αυτό θα διευκόλυνε τη διαδικασία κλωνοποίησης διότι στο φορέα αυτό μπορούμε να εισάγουμε το επιθυμητό προϊόν PCR δημιουργώντας στα άκρα του διαφορετικές θέσεις περιορισμού.

Όπως προαναφέρθηκε, λόγω της δυσκολίας που υπάρχει στην καλλιέργεια των υπερθερμόφιλων οργανισμών, οι πρωτεΐνες τους χρειάζεται να εκφράζονται σε μεσόφιλους ή/και αλόφιλους ξενιστές πριν από την εφαρμογή τους για βιοτεχνολογικούς σκοπούς. Οι οργανισμοί αυτοί επομένως μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την μαζική παραγωγή υπερθερμόφιλων αμυλασών έτσι ώστε τα ένζυμα αυτά να μπορέσουν να παρέχουν νέες εφαρμογές στη βιοτεχνολογία ως βιοκαταλύτες.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Boeke J.D., and Model P.A. (1982) A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage f1 gene III protein retains it in the membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5200-5204
2. Boeke J.D., Model P., and Zirinder N.D. (1982) Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane, *Mol. Gen. Genet.* **186**, 185-192
3. Dong G., Vieille C., Savchenko A., and Zeikus J.G. (1997a) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding extracellular  $\alpha$ -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme, *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3569-3576
4. Faila G. and Stetter K.G (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C, *Archives in Microbiology* **145**, 56-61
5. Frillingos S., Linden A., Niehaus F., Vargas C., Nieto J.J., Ventosa A., Antranikian G., and Drinas C. (2000) Cloning and expression of  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas eiongata*, *Journal of Applied Microbiology* **88**, 495-503
6. Frillingos S., Salin-Toth M., Persson B., and Kaback H.R. (1994) Cysteine-scanning mutagenesis of putative helix VII in the lactose permease of *Escherichia coli*, *Biochemistry* **33**, 8074-8081
7. Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* **77**, 51-59
8. Inoue H., Nojima H., and Okayama H. (1990) High efficient transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* **96**, 23-28
9. Jorgensen S., Vorgias C.E., and Antranikian G. (1997) Cloning, sequencing, characterization and expression of an extracellular  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in

*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *Journal of Biological Chemistry* **268**, 16335-16342

10. Koch R., Spreinat A., Lemke K., and Antranikian G. (1991) Purification and properties of a hyperthermoactive  $\alpha$ -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*, *Archives in Microbiology* **155**, 572-578
11. Laderman K., Asada K., Uemori T., Mukai H., Taguchi Y., Kato I., and Anfinsen C.B. (1993b)  $\alpha$ -Amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Cloning and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* **268**, 24402-24407
12. Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D., and Mohan R. (2000) Advances in microbial amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 135-152
13. Zillig W., Holz I., Klenk H.P., Trent J., Wunderl S., Janekovic D., Imsele E., and Haas B. (1987) *Pyrococcus woesei* sp. nov., an ultrathermophilic marine archaeobacterium, representing a novel order, Thermococcales, *Systematic Applied Microbiology* **9**, 62-70
14. Vargas C., Fernandez-Castillo R., Canovas D., Ventosa A., and Nieto J.J (1995) Isolation of cryptic plasmids from moderately halophilic eubacteria of the genus *Halomonas*. Characterization of a small plasmid from *H. elongata* and its use for shuttle vector construction, *Molecular and General Genetics* **223**, 335-341

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**“ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ p53 ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟ  
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DGGE”**

Επιβλέποντες :  
Καθηγήτρια : Β. Μαλάμου Μήτση  
Υ/Δ : Χ. Ζαχαρίου

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Πρωτεΐνη p53

Η καρκινογένεση χαρακτηρίζεται από μια σειρά γενετικών τροποποιήσεων που συμβαίνουν στα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια (Nigro *et al.*, 1989). Το πιο κοινά μεταλλαγμένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που συνδέεται με καρκίνους του ανθρώπου είναι το p53. Το γονίδιο αυτό ανακαλύφθηκε αρχικά (στα τέλη της δεκαετίας του 70) σαν ένα ογκογονίδιο προσδεδεμένο στο μεγάλο T- αντιγόνο σε μετασχηματισμένα με τον ιό SV40 κύτταρα (DeLee *et al.*, 1979). Κωδικοποιεί για μια φωσφορυλιωμένη πυρηνική πρωτεΐνη το μοριακό βάρος της οποίας υπολογίζεται στα 53 kDa.

## 1.2 Δομή της p53

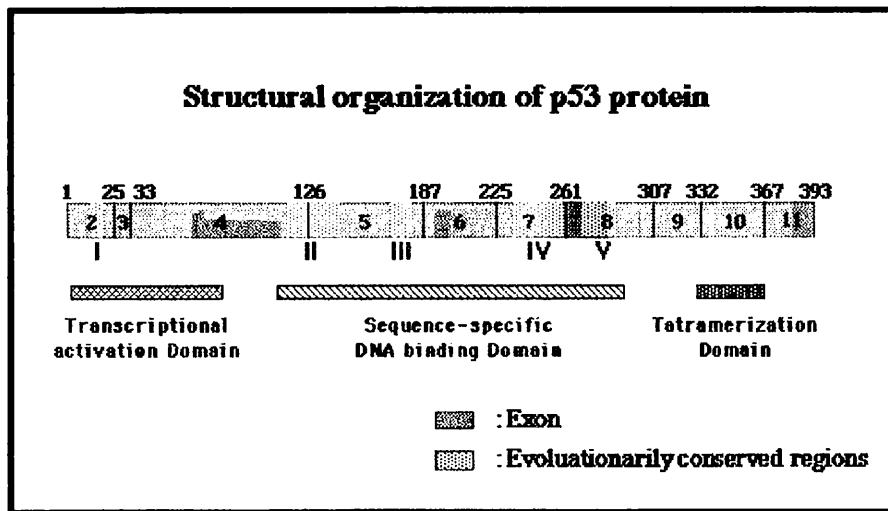
Το γονίδιο της p53 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13 και αποτελείται από 10 εξόνια. Η πρωτεΐνη συνίσταται από 393 αμινοξέα και υπάρχουν 5 περιοχές στην πρωτοταγή αλληλουχία των αμινοξέων της που είναι υψηλά συντηρημένες πιθανώς για την διατήρηση μιας απαραίτητης δομής ή/και λειτουργίας (Soussi *et al.*, 1987).

Το αμινοτελικό άκρο της p53 είναι πλούσιο σε όξινα αμινοξέα και περιέχει τη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης ενώ στο καρβοξυτελικό της άκρο υπερτερούν τα βασικά αμινοξέα. Επιπλέον στο καρβοξυτελικό της άκρο εντοπίζονται τρία σήματα πυρηνικής εντόπισης (NLS) και αλληλουχίες που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. Στην κεντρική συντηρημένη περιοχή εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Franks and Teich 1999, **Εικόνα 1**).

Η φωσφορυλίωση είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του φυσιολογικού ρόλου της p53. Το κατάλοιπο σερίνη 315 που βρίσκεται δίπλα στο επικρατές NLS, φωσφορυλιώνεται *in vivo* και *in vitro* από την p34<sup>cdc-2</sup> κινάση (Milner *et al.*, 1990) και μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή του υποκυτταρικού εντοπισμού και της βιολογικής ενεργότητας της p53 με ένα τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό κύκλο (Sturzbecher *et al.*, 1990).



Η ενεργός μορφή της p53 είναι ένα τετραμερές από τέσσερις όμοιες υπομονάδες που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό της άκρο. Μια μη νοηματική σημειακή μετάλλαξη στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα p53 σε ένα κύτταρο μπορεί να καταργήσει σχεδόν όλη την ενεργότητα p53 επειδή ουσιαστικά όλα τα ολιγομερή θα περιέχουν τουλάχιστον μία μη αποτελεσματική υπομονάδα.



**Εικόνα 1 :** Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής της p53

### 1.3 Ρύθμιση της έκφρασης και λειτουργίας της p53

Η πρωτεΐνη p53 εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε φυσιολογικά κύτταρα διότι είναι εξαιρετικά ασταθής και αποικοδομείται γρήγορα. Ενεργοποιείται μόνο σε καταστάσεις στρες όπως στην έκθεση σε UV ή γ-ακτινοβολία, υψηλή θερμοκρασία και χαμηλό οξυγόνο (Levine *et al.*, 1997). Μεταξύ των παραγόντων που οδηγούν στην ενεργοποίηση της p53 είναι και η υποξία (Hypoxia) που προκαλεί ασυνήθιστη γενωμική αστάθεια και υπερέκφραση των προϊόντων ογκογονιδίων.

Επιπλέον η δράση της p53 ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση της με διάφορες κυτταρικές και ιϊκές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε ότι αλληλεπιδράσεις της p53 με την πρωτεΐνη E6 του ιού HPV, το μεγάλο T- αντιγόνο του ιού SV40 ή την πρωτεΐνη MDM2 προκαλούν την απενεργοποίηση της (Ozbun & Butel 1995).

## 1.4 Βιολογικός ρόλος της p53

Παρότι η p53 έχει διάφορες λειτουργίες, η ικανότητα της να ενεργοποιεί τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων είναι η πιο σχετική ογκοκατασταλτική της λειτουργία. Μετά την ενεργοποίηση της επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα πολλών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων p21 (el-Deiry *et al.*, 1993, Harper *et al.*, 1993), mdm2 (Momand *et al.*, 1992) και bax (Miyashita & Reed 1995).

Πολλές μελέτες δείχνουν το ρόλο της p53 στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Καταστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση σε απόκριση σε βλάβες του DNA. Η βλάβη στο DNA από γ-ακτινοβολία ή άλλα στρες οδηγεί στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων κινασών (cdc2, DNA-PK κ.α) που φωσφορυλιώνουν την p53 με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και αξιοσημείωτη αύξηση στη συγκέντρωσή της. Η πιο σημαντική πρωτεΐνη που επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο και της οποίας η μεταγραφή επάγεται από την p53 είναι ο αναστολέας κυκλινών-κινασών **p21**, ο οποίος συνδέεται και αναστέλλει τα συμπλέγματα θηλαστικών κυκλινών-κινασών στη G1 φάση. Σαν αποτέλεσμα κύτταρα με βλάβες στο DNA σταματάνε στη G1 φάση μέχρι να επιδιορθωθεί η βλάβη, οπότε τα επίπεδα των p53 και p21 μειώνονται και τα κύτταρα προχωρούν στην S φάση (Franks and Teich 1999).

Σε εκτεταμένη βλάβη του DNA η p53 ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που οδηγούν στην απόπτωση. Η ενεργοποίηση της απόπτωσης έχει σαν αποτέλεσμα την προστασία των οργανισμών διότι εμποδίζεται η ανάπτυξη υψηλά μετασχηματισμένων καρκινικών κυττάρων. Ένας από τους γνωστούς μηχανισμούς με τους οποίους η p53 ενεργοποιεί την απόπτωση είναι μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως το bax το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση κασπασών και τελικά, θραυσμάτωση του DNA. Επιπλέον η p53 μπορεί να ρυθμίζει την απόπτωση των κυττάρων με μηχανισμούς που δεν εμπλέκουν τη βιολογική της δράση ως μεταγραφικό ενεργοποιητή γονιδίων, οι οποίοι δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί (Haupt *et al.*, 1997b).

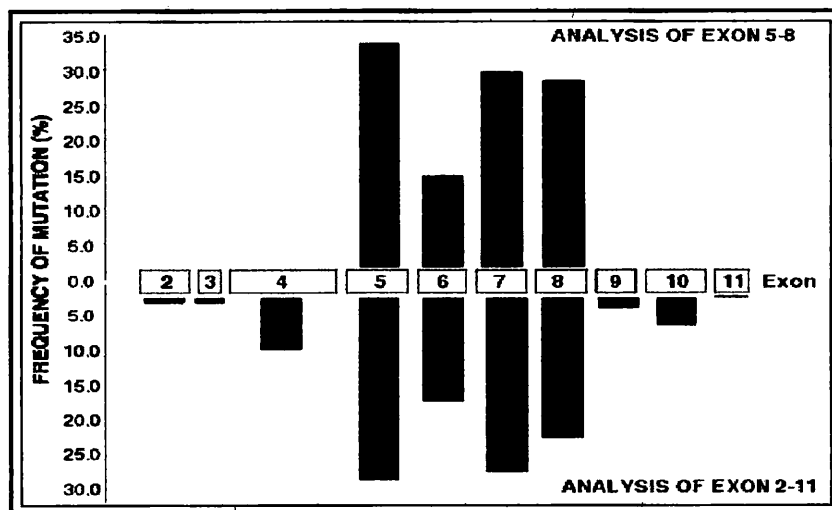
Η πρωτεΐνη p53 έχει επίσης εμπλακεί και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου από την G2 στην φάση M (Cross *et al.*, 1995, Fukasawa *et al.*, 1996). Κύτταρα που περιέχουν το άγριου τύπου γονίδιο της

p53 σταματούν την ανάπτυξη τους στη φάση G2 όταν εκτίθενται σε αναστολείς της ανάπτυξης της μιτωτικής ατράκτου όπως το nocadazole. Ωστόσο, υπό την απουσία του άγριου τύπου γονιδίου της p53, τα κύτταρα υποβάλλονται σε νέα DNA σύνθεση χωρίς να περάσουν διαμέσου της μίτωσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανευπλοειδών κυττάρων.

### 1.5 p53 και καρκίνος του μαστού

Όπως προαναφέρθηκε μεταλλάξεις στο γονίδιο της p53 είναι συχνά εμφανιζόμενες σε περιπτώσεις καρκινογένεσης. Σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν περιγραφεί σε πολλές νεοπλασίες περιλαμβανομένων αυτών του μαστού, του εντέρου, του ήπατος, της ωοθήκης, της ουροδόχου κύστης κ.α. (Nigro *et al.*, 1989, Levine *et al.*, 1991, Hollstein *et al.*, 1991, Hsu *et al.*, 1991). Επιπροσθέτως, μεταλλάξεις στη γαμετική σειρά του γονιδίου p53 έχειδειχθεί ότι είναι παρούσες σε ασθενείς με το γενετικό καρκινικό σύνδρομο Li-Fraumeni (Malkin *et al.*, 1990).

Ο καρκίνος του μαστού είναι από τις πιο μελετημένες περιπτώσεις νεοπλασίας διότι αποτελεί τον τρίτο πιο συχνά εμφανιζόμενο καρκίνο στο κόσμο. Εκτεταμένες μελέτες έχουν γίνει για την ανίχνευση και περαιτέρω μελέτη μεταλλάξεων σε πολλά γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση καθώς και στο γονίδιο της p53. Αν και μεταλλάξεις στο γονίδιο της p53 μπορούν να εμπλέκουν απαλείψεις και ανακατατάξεις, ένας κοινός τύπος μεταλλάξεων του είναι σημειακές (Levine *et al.*, 1991, Hollstein *et al.*, 1991). Η πλειονότητα των μη νοηματικών σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο αυτό εμφανίζεται στην κεντρική συντηρημένη περιοχή της πρωτεΐνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της p53 στο DNA (Hainaut *et al.*, 1997). Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 1** στην περιοχή αυτή ανήκουν τα εξόνια 5 – 8 και είναι αυτά που έχουν μελετηθεί περισσότερο. Στην **Εικόνα 2** εμφανίζεται η επί τις % συχνότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου p53 κατά μήκος των εξονίων του στο σύνολο των νεοπλασιών. Μελέτες που αναλύουν τα εξόνια 2 – 11 (κόκκινο χρώμα) συγκρίνονται με μελέτες που αναλύουν μόνο την κεντρική περιοχή (εξόνια 5 – 8, μπλε χρώμα). Όπως μπορούμε να διακρίνουμε η συχνότητα των μεταλλάξεων στα εξόνια 5 – 8 είναι αισθητά μεγαλύτερη σε σχέση με το σύνολο των υπόλοιπων εξονίων.



**Εικόνα 2 :** Συχνότητα (%) μεταλλάξεων του γονιδίου p53 κατά μήκος των εξονίων του σε διάφορες μορφές καρκίνου

Η δυνατότητα της αποτελεσματικής ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53 είναι πολύ σημαντική για δύο λόγους :

- η ανίχνευση μεταλλάξεων στη γαμετική σειρά του γονιδίου είναι σημαντική για την αναγνώριση ασθενών που ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου (high risk) ανάπτυξης νεοπλασίας
- η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου σε καρκινικά δείγματα είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της κλινικής σπουδαιότητας των μεταλλάξεων αυτών.

Έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε μικρά τμήματα DNA. Μια από τις πιο ευαίσθητες μεθόδους που μπορεί να ανιχνεύει αντικαταστάσεις βάσεων σε τμήματα DNA και που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση σε Βαθμιδωτό Πήκτωμα (Deraturing Gradient Gel Electrophoresis DGGE, Fischer and Lerman 1980).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53 σε δείγματα καρκίνου του μαστού τα οποία χορηγήθηκαν από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με επέκταση των εξονίων 5, 6, 7, 8 με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια με ανάλυση με την τεχνική DGGE.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Απομόνωση DNA από φρέσκα ιστικά δείγματα μαστού

Η απομόνωση DNA από φρέσκα ιστικά δείγματα πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit (Tissue Protocol). Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής :

Το ιστικό δείγμα (25mg) κόβεται σε μικρά τμήματα και στη συνέχεια τοποθετείται σε σωληνάρια τύπου erpendorf αφού πρώτα προστεθούν 180 μl διαλύματος ATL και 20 μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml). Ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση στους 56 °C μέχρι ο ιστός να διασπαστεί τελείως.

Στη συνέχεια μετά από έντονη ανάδευση προστίθενται 200 μl διαλύματος AL και το δείγμα επωάζεται ξανά στους 70 °C για 10 λεπτά. Ακολουθεί καταβύθιση του DNA με την προσθήκη 200 μl παγωμένης αιθανόλης (100%).

Το δείγμα μεταφέρεται σε στήλη και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε 8000 rpm. Αυτό επιτρέπει την πρόσδεση του DNA στη στήλη ενώ το διάλυμα απομακρύνεται. Ακολουθούν δύο πλύσεις στην πρώτη από τις οποίες χρησιμοποιείται το διάλυμα AW1 ενώ στη δεύτερη το AW2. Στην πρώτη πλύση το διάλυμα έκπλυσης απομακρύνεται με φυγοκέντρηση σε 8000 rpm για 1 λεπτό, ενώ στην δεύτερη σε 14000 rpm για 3 λεπτά.

Το DNA αποδεσμεύεται από τη στήλη με την προσθήκη 200 μl διαλύματος AE και συλλέγεται ύστερα από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και ήπια φυγοκέντρηση.

#### 3.2 Ενίσχυση των εξονίων 5 – 8 του γονιδίου p53 με τη μέθοδο της PCR

Για την πολλαπλή αντιγραφή των εξονίων 5 – 8 του γονιδίου p53 χρησιμοποιήθηκαν ειδικά επιλεγμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια και η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Η επιλογή αυτών των εκκινητών προσδίδει μια GC ουρά 40 βάσεων στο 5'- άκρο των προϊόντων PCR ώστε να είναι εφικτή η ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) που θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Η αλληλουχία των εκκινητών για καθένα από τα 4 εξόνια του γονιδίου έχει ως εξής :

### **Exon 5a**

sense primer : 5' - TTC CTC TTC CTG CAG TAC TC – 3'

antisense primer : 5' - (GC-clamp) - TGG CGC GGA CGC GGG TGC CG – 3'

### **Exon 5b**

sense primer : 5' - (GC-clamp) – TTC CAC ACC CCC GCC CGG CA – 3'

antisense primer : 5' - CTG GGG ACC CTG GGC AA – 3'

### **Exon 6**

sense primer : 5' - (GC-clamp) – GAG ACG ACA GGG CTG GTT – 3'

antisense primer : 5' - CCA CTG ACA ACC ACC CTT – 3'

### **Exon 7**

sense primer : 5' - (GC-clamp) – TGG CTC TGA CTG TAC CAC C – 3'

antisense primer : 5' - CAA GTG GCT CCT GAC CTG GA – 3'

### **Exon 8**

sense primer : 5' - (GC-clamp) – ATC CTG AGT AGT GGT AAT CT – 3'

antisense primer : 5' - TAC CTC GCT TAG TGC TCC CT – 3'

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν :

- 300 ng χρωμοσωμικού DNA
- 10X ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (1,25 mM για το εξόνιο 7)
- 0,2 mM από κάθε dNTP (Gibco, BRL)
- 25 pmol/μl από κάθε εκκινητή
- 0,2 mg/ml BSA
- 2,5% formamide για τα εξόνια 6,8 και 5% για τα 5,7
- 2,5 U Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen)
- αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 50 μl

Οι συνθήκες που επιλέγηκαν για το στάδιο της θερμικής αποδιάταξης του DNA, ήταν για όλα τα εξόνια 95 °C για 1 λεπτό, για το στάδιο της πρόσδεσης των εκκινητών, 58 °C (5β,6,7,8) και 56 °C (5α) για 1 λεπτό και για το στάδιο της επιμήκυνσης των αλυσίδων, DNA 70 °C (5α) και 72 °C (5β,6,7,8) για 1 λεπτό.

### 3.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53 με τη μέθοδο DGGE

Η μέθοδος DGGE είναι μια μέθοδος ηλεκτροφόρησης που μπορεί να ανιχνεύει αλλαγές μιας βάσεως σε τμήματα DNA. Η ευαισθησία της μεθόδου αυτής βασίζεται στην αρχή ότι η αποδιάταξη ή η τήξη της διπλής έλικας του DNA, με θερμοκρασία ή αποδιατακτικούς παράγοντες (ουρία, φορμαμίδιο) δεν συμβαίνει σε ένα βήμα. Αντίθετα, το DNA τήκεται κατά περιοχές. Καθώς η συγκέντρωση του αποδιατακτικού παράγοντα ή της θερμοκρασίας αυξάνεται η περιοχή με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε A+T βάσεις τήκεται πρώτη. Έτσι επειδή η σταδιακή αυτή τήξη είναι συνάρτηση της αλληλουχίας των βάσεων μια αλλαγή στην αλληλουχία συνήθως επιφέρει αλλαγή στο προφίλ της τήξης.

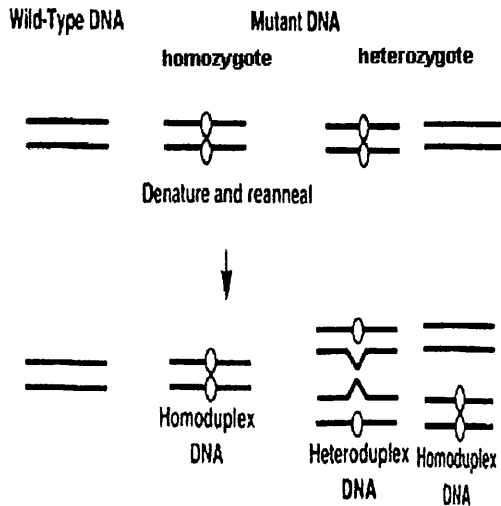
Οι μεταλλάξεις ανακαλύπτονται με βάση τη διαφορετική κινητικότητα του μεταλλαγμένου και άγριου τύπου DNA. Καλύτερη ανάλυση επιτυγχάνεται όταν τα μόρια δεν αποδιατάσσονται τελείως και όταν η περιοχή ανάλυσης ανήκει στην περιοχή με το χαμηλότερο σημείο τήξης. Η προσθήκη 30-40 GC βάσεων στον ένα εκκινήτη δημιουργεί μια περιοχή υψηλού σημείου τήξης και εξασφαλίζει ότι η περιοχή που αναλύεται βρίσκεται στην περιοχή με το χαμηλότερο σημείο τήξης και ότι το DNA θα παραμείνει μερικά δίκλωνο.

Ανάλογα με το αν έχουμε ετερόζυγα ή ομόζυγα άτομα κατά την επέκταση του DNA με την μέθοδο της PCR παίρνουμε διαφορετικά προϊόντα. Σε ομόζυγες καταστάσεις προκύπτουν μόνο ομόδιπλα μόρια DNA ενώ σε ετερόζυγες προκύπτουν τέσσερα διαφορετικά μόρια DNA (δύο ομόδιπλα και δύο ετερόδιπλα) όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3**.

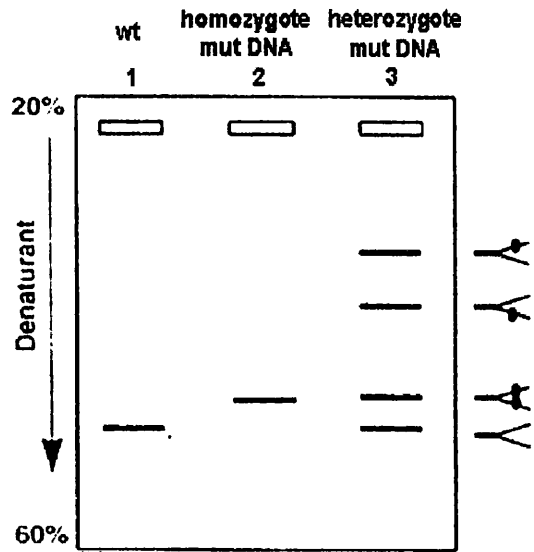
Στα ετερόδιπλα οι κλώνοι αποδιατάσσονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αποδιατακτικού με αποτέλεσμα να έχουν πάντα μικρότερη κινητικότητα από τα αντίστοιχα ομόδιπλα κάτω από ειδικές συνθήκες. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων είναι δυνατόν να δημιουργηθούν οι ζώνες που φαίνονται σχηματικά στην **Εικόνα 4**.



3)



4)



**Εικόνα 3 :** Επέκταση DNA με τη μέθοδο της PCR από

- Φυσιολογικό
- Ομοζυγώτη
- Ετεροζυγώτη

**Εικόνα 4 :** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων

Διαδρομή 1 : φυσιολογικός

Διαδρομή 2 : ομοζυγώτης

Διαδρομή 3 : ετεροζυγώτης

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος DGGE χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 5 – 8 του γονιδίου της p53.

Στον **Πίνακα 1** φαίνονται οι συνθήκες αποδιάταξης και η συγκέντρωση της πηκτής ακρυλαμιδίου για τα εξόνια 5 – 8 (Myers *et al.*, 1987).

Exons	Polyacrylamide gel (%)	Denaturant range (%)
5a	8	55 – 65
5b	6	60 – 80
6	6	50 – 70
7	8	50 – 75
8	8	50 – 75

**Πίνακας 1 :** Απεικόνιση των συνθηκών αποδιάταξης και της συγκέντρωσης του πηγματος ηλεκτροφόρησης ανάλογα με το εξόνιο που μελετάται

Για τη δημιουργία της πηκτής σε διάφορες αποδιατακτικές συνθήκες ετοιμάζονται πρώτα δύο διαλύματα με 0% και 80% αποδιατακτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται σαν stock.

Το 0% αποδιατακτικό διάλυμα περιέχει 40% ακρυλαμίδιο σε διάλυμα TAE (40 mM Tris, 20 mM Acetic acid, 1 mM EDTA pH 8.3), ενώ το 80% διάλυμα περιέχει 40% ακρυλαμίδιο σε διάλυμα TAE, 32% formamide και 5,6M ουρία. Τα διαλύματα αυτά φιλτράρονται σε φίλτρο 0,45 μ.

Για την ετοιμασία της πηκτής ακολουθούμε τα εξής στάδια :

- ✓ Σε δύο universal τοποθετούνται οι αντίστοιχοι όγκοι των υψηλής και χαμηλής πυκνότητας διαλυμάτων από τα stock διαλύματα ώστε να δημιουργηθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών παραγόντων
- ✓ Για να ελέγξουμε οπτικά το σχηματισμό της βαθμίδωσης προστίθενται 100 μl Dcode dye Solution ανά 5 ml διαλύματος υψηλής πυκνότητας.
- ✓ Στη συνέχεια προστίθενται N,N,N,N'-Tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED, BIO-RAD) και υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) σε τελική συγκέντρωση 0.09% (v/v).
- ✓ Τα διαλύματα αναδεύονται και είναι έτοιμα για την κατασκευή της πηκτής.

Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE) θερμαίνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Dcode Universal Mutation Deletion System, BIO-RAD) μέχρι τη θερμοκρασία των 60 °C. Όγκος 20 μl από τα προϊόντα PCR αναμιγνύονται σε αναλογία 5:1 με 6Xδιάλυμα φόρτωσης (30% γλυκερόλη και 0,25% κυανού της βρωμοφαινόλης) και τοποθετούνται στην πηκτή.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται για 12-18 ώρες στα 65 Volt και στη συνέχεια ακολουθεί χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml σε διάλυμα TAE για 15 λεπτά και οπτικοποίηση του αποτελέσματος σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Ενίσχυση των εξονίων 5 – 8 του γονιδίου της p53

Με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της PCR και ειδικά επιλεγμένα ολιγονουκλεοτίδια για την επίτευξη της πολλαπλής αντιγραφής των εξονίων του γονιδίου αυτού.

Η επιλογή των εκκινητών αυτών δίνει προϊόντα PCR που αντιστοιχούν στα εξόνια :

**5a** : 158 bp

**6** : 270 bp

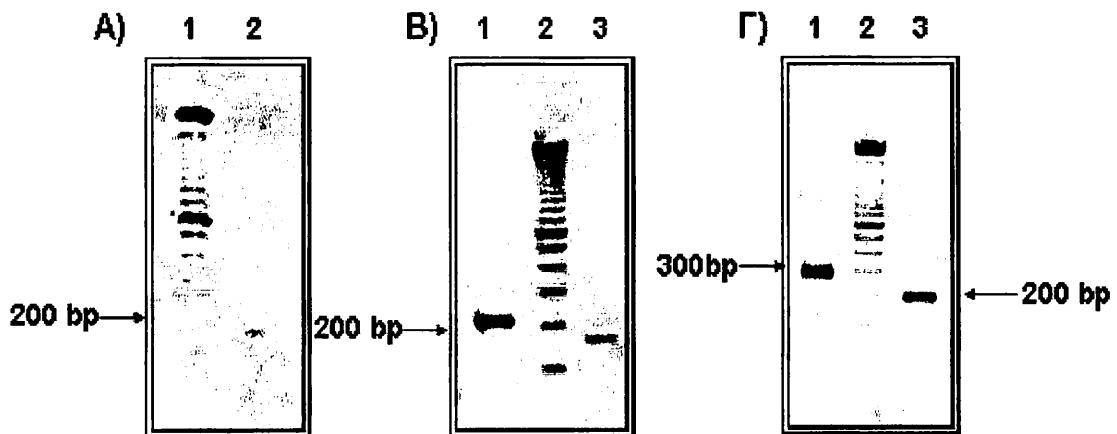
**8** : 191 bp

**5b** : 208 bp

**7** : 163 bp

Αναλύθηκαν και μελετήθηκαν συνολικά 13 δείγματα που προέρχονταν από καρκινικό και φυσιολογικό ιστό μαστού υπό τη μορφή φρέσκων παγωμένων δειγμάτων.

Στις **Εικόνες A – B – Γ** απεικονίζονται ενδεικτικά τα τμήματα DNA που προκύπτουν από την PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε 1,5% πηκτή αγαρόζης.



**Εικόνες A – B – Γ** : Απεικόνιση προϊόντων PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

**Διαδρομές A1 – B2 – Γ2** : πρότυπα μοριακά βάρη

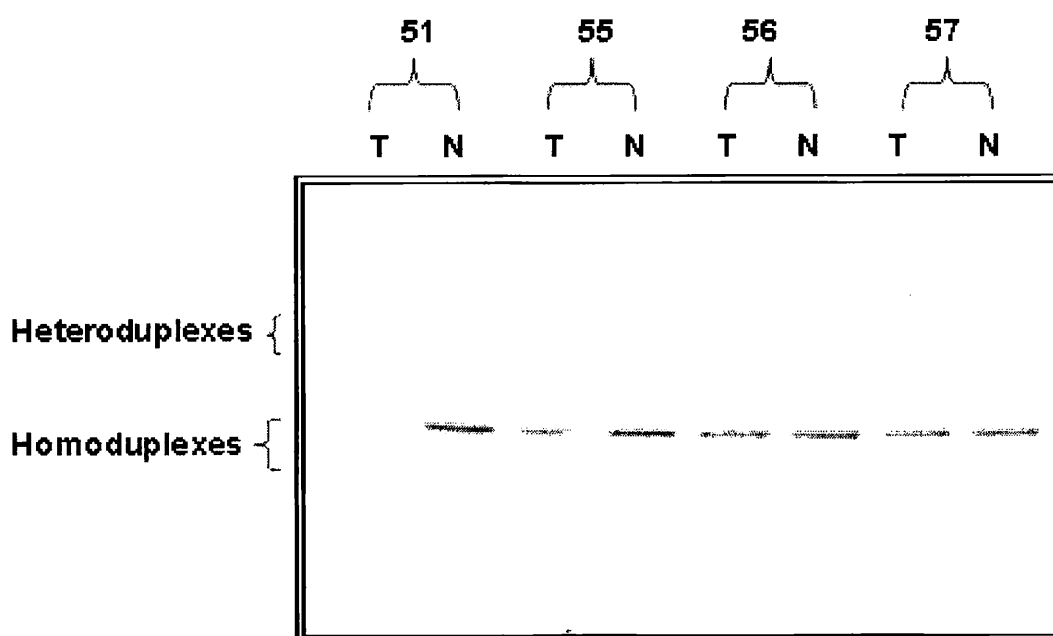
**Διαδρομή A2** : προϊόν PCR που αντιστοιχεί στο εξόνιο **5a** (158 bp)

**Διαδρομές B1 – B3** : προϊόντα PCR που αντιστοιχούν στα εξόνια **5b** (208 bp) και **7** (163 bp) αντίστοιχα

**Διαδρομές Γ1 – Γ3** : προϊόντα PCR που αντιστοιχούν στα εξόνια **6** (270 bp) και **8** (191 bp) αντίστοιχα

## 4.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53 με τη μέθοδο DGGE

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιείται η τεχνική DGGE για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53. Όπως προαναφέρθηκε, με την PCR ενισχύθηκαν πέντε τμήματα DNA που αντιστοιχούν στα 4 εξόνια του γονιδίου (5 – 8) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των τμημάτων αυτών σε πήγμα με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων ανάλογα με το εξόνιο που ανιχνεύεται. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται ενδεικτικά η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR του εξονίου 6 σε 6% πηκτή ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων 50 – 70%.



**Εικόνα Δ :** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου του **εξονίου 6** των δειγμάτων **51, 55, 56, 57**. (T: καρκινικό, N: φυσιολογικό)

Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα Δ** στο δείγμα **51** έχει ανιχνευτεί μετάλλαξη με την εμφάνιση των χαρακτηριστικών ετερόδιπλων και ομόδιπλων ζωνών στο καρκινικό δείγμα. Αντίθετα στα υπόλοιπα δείγματα δεν έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τα δείγματα που αναλύθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 2.

Α/Α	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ (ΕΞΟΝΙΑ)					ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ (ΕΞΟΝΙΑ)				
		5α	5β	6	7	8	5α	5β	6	7	8
1	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	51	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	53	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
9	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Πίνακας 2 :** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν για την ύπαρξη μεταλλάξεων στα εξόνια 5 – 8 του γονιδίου της p53 με τη μέθοδο DGGE

Όπως παρατηρείται από τον συγκεντρωτικό πίνακα, από τα δείγματα που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο εξόνιο 6 των δειγμάτων 51 και 53. Επίσης στο δείγμα 53 έχουμε την εμφάνιση των τεσσάρων χαρακτηριστικών ζωνών και στο DNA που απομονώθηκε και επεκτάθηκε με την PCR από τον φυσιολογικό ιστό.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μορφές καρκίνου σε όλο τον κόσμο. Παρότι οι περιπτώσεις εμφάνισης διηθητικού καρκίνου έχουν μειωθεί στο τελευταίο μισό του αιώνα λόγω της έγκαιρης διάγνωσης, το επίπεδο θνησιμότητας έχει παραμείνει σχετικά σταθερό. Παρά την εντατική έρευνα των τελευταίων χρόνων πολλά είναι τα ερωτηματικά σχετικά με τους μηχανισμούς που οδηγούν στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

Μεταλλάξεις που περιορίζουν ή τροποποιούν τη λειτουργία της πρωτεΐνης p53 είναι οι μόνες πιο κοινές γενετικές τροποποιήσεις που έχουν παρατηρηθεί σε ανθρώπινους καρκίνους. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της p53 συσχετίζονται ισχυρά με φτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν φυσιολογική p53 έχουν επιλεκτικό προβάδισμα ανάπτυξης και είναι πιο ανθεκτικά στην ιονίζουσα ακτινοβολία και σε μερικά από τα πιο συνηθισμένα αντικαρκινικά φάρμακα, σε σχέση με τα κύτταρα που έχουν φυσιολογική p53. Έτσι κύτταρα με μεταλλαγμένα p53 γονίδια αναμένονται να είναι κλινικός πιο επιθετικά.

Υπάρχουν άφθονες τεχνικές κατάλληλες για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλλαγών στην αλληλουχία ενός γονιδίου, πολλές όμως από τις οποίες δεν είναι ικανές να αναγνωρίζουν πολλές διαφορετικές αλλαγές βάσεων στην ίδια αλληλουχία. Το γεγονός ότι έχουν παρατηρηθεί περισσότερες από 300 μεταλλάξεις στο γονίδιο της p53 καθιστά απαραίτητη τη χρήση μιας μεθόδου που να μπορεί να ανιχνεύει πολλές διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις. Η τεχνική της DGGE που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν από άλλες ομάδες για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου αυτού στον καρκίνο του μαστού και αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε επέκταση τεσσάρων εξονίων (5 – 8) της p53 με την μέθοδο της PCR και στη συνέχεια ανάλυση των τμημάτων DNA που προκύπτουν με την μέθοδο DGGE. Τα εξόνια που επιλέχθηκαν να μελετηθούν αποτελούν σύμφωνα με την βιβλιογραφία την περιοχή του γονιδίου που εμφανίζονται ως επί το πλείστον οι μεταλλάξεις.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι από τα 13 καρκινικά δείγματα ισάριθμων ασθενών που αναλύθηκαν, βρέθηκαν μεταλλάξεις σε δύο δείγματα στο εξόνιο 6, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 15% επί του συνόλου. Στο ένα από αυτά βρέθηκε μετάλλαξη και στο αντίστοιχο φυσιολογικό δείγμα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε ανάμιξη καρκινικού και φυσιολογικού ιστού κατά τη λήψη των δειγμάτων ή σε πολυμορφισμό.

Για να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς το συσχετισμό των μεταλλάξεων του γονιδίου της p53 με τον καρκίνο του μαστού θα πρέπει να αναλυθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων ώστε να είναι εφικτή η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον θα πρέπει να ακολουθήσει ανάγνωση της αλληλουχίας των PCR προϊόντων ώστε να διευκρινισθεί αν συγκεκριμένες αντικαταστάσεις βάσεων σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου.

Παρότι οι τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων είναι χρονοβόρες και δεν μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη μπορούν να εξάγουν χρήσιμα συμπεράσματα για τη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cross S.M., Sanchez C.A., Morgan C.A., Schimke M.K., Ramel S., Idzerda R.L., Raskind W.H., and Reid B.J. (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint, *Science* **267**, 1353-1356
2. DeLeo A.B., Jay G., Appella E., Dubois G.C., Law L.W., and Old L.J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76**, 2420-2424
3. el-Deiry W.S., Tokino T., Veiculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., and Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* **75**, 817-825
4. Franks L.M. and Teich N.M. (1999) Cellular and Molecular Biology of Cancer, third edition
5. Fukasawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S., and Vande Woude G.F. (1996) Abnormal centrosome amplification in the absence of p53, *Science* **271**, 1744-1747
6. Hainaut P., Soussi T., Shomer B., et al. (1997) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects, *Nucleic Acids Res.* **25**, 151-157
7. Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., and Elledge S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell* **75**, 805-816
8. Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Kazaz A., Vousden K., and Oren M. (1997b) p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription-dependent and -independent mechanisms, *Leukemia* **11**, 337-339
9. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. (1991) p53 mutations in human cancers, *Science* **253**, 49-53
10. Hsu I.C., Metcalf R.A., Sun T., Welsh J.A., Wang N.J., Harris C.C. (1991) Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas, *Nature* **350**, 427-428



11. Levine A.J., Momand J., Finlay C. (1991) The p53 tumor suppressor gene, *Nature* **351**, 453-456
12. Levine A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* **88**, 323-331
13. Malkin D., Li F.P., Strong L.C., Flaumeni J.F., Nelson C.E., Kim D.H., Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z., Tainsky M.A., Friend S.H. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms, *Science* **250**, 1233-1238
14. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 mediated transactivation, *Cell* **69**, 1237-1245
15. Milner, J., Cook, A., and Mason, J. (1990) p53 is associated with p34<sup>cdc2</sup> in transformed cells, *EMBO J.* **9**, 2885-2889
16. Miyashita T. and Reed J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell* **80**, 293-299
17. Myers, R.M., Maniatis, T., and Lerman, T.S. (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis, *Methods Enzymol.* **155**, 501-517
18. Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Hotstetter R., Cleary K., Bigner S.H. et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse tumor types, *Nature* **342**, 705-708
19. Ozbun M.A., and Butel J.S. (1995) Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis, *Advances in Cancer Research* **66**, 71-141
20. Soussi, T., Caron de Fromental, C., Mechali, M., May, P., and Kress, M., (1987) Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53, *Oncogene* **1**, 71-78
21. Sturzbecher, H.W., Maimets, T., Chumakov, P., Brain, R., Addison, C., Simanis, V., Rudge, K., Philp, R., Grimaldi, M., Court, W., and Jenkins, J.R. (1990) p53 interacts with p34cdc2 in mammalian cells: implication for cell cycle control and oncogenesis, *Oncogene* **5**, 795-801

