

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

“ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ”

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΕΦΑΛΑ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα εργαστήρια Βιολογίας, Βιολογικής χημείας και Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής και στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Σπουδών “Βιοτεχνολογία”.

Το πρόγραμμα είχε διάρκεια τέσσερα εξάμηνα, κατά τα οποία πραγματοποιήθηκαν οι εξής εργασίες:

1) “Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 σε καρκίνο του μαστού με τη μέθοδο DGGE”. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Βασιλικής Μαλάμου-Μήτση και της υποψήφιας Διδάκτορος Χριστιάννας Ζαχαρίου.

2) “Εκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsp70 και hsc70 με το σύστημα βακίλλοιού σε κύτταρα εντόμων”. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Λαζαρίδη.

3) “Απομόνωση πρωτεϊνικού παράγοντα, που συμμετέχει στο μηχανισμό αντοχής του βακτηρίου Zygomonas mobilis, σε θεραπευτικά υλικά με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης”. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας κ. Άννας Κούκκου.

4) “Μελέτη του ρόλου της παραθυμοσίνης στην αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης”. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας κ. Θωμαΐδας Παπαμαρκάκη, του υποψήφιου Διδάκτορα κ. Goran Martic και της Διδάκτορος κ. Ζωής Καρέτσου.

Ευχαριστώ όλους τους επιβλέποντες και διδάσκοντες του προγράμματος, που συμμετείχαν στην εκπόνηση της παρούσας της διατριβής. Ευχαριστώ επίσης, τον Λέκτορα κ. Άγγελο Περυσινάκη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευστάθιο Χατζηλουκά, την υποψήφια Διδάκτορα Νατάσσα Χριστογιάννη και την τεχνικό υποστήριξης Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα για την βοήθειά τους, κατά την εκπόνηση αυτών των εργασιών.

Ιδιαίτερα ευχαριστήρια απευθύνω στον (επίτιμο) Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σέκερη για την ηθική του συμπαράσταση κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος θέλω να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον Κώστα Κουμουνδούρο και την Βαγγελιώ Λουρίδα για την πολύπλευρη συμπαράστασή τους, καθώς και σε όλους τους φίλους, που βρίσκονταν κοντά μου, κατά τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

*Αφιερώνεται
στην οικογένειά μου*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας

“Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 σε καρκίνο του μαστού με τη μέθοδο DGGE”

Εισαγωγή.....	2
Υλικά και Μέθοδοι.....	9
Αποτελέσματα.....	15
Συζήτηση.....	18
Βιβλιογραφία.....	20

Εργαστήριο Βιολογίας

“Εκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsp70 και hsc70 με το σύστημα βακιλλοϊού σε κύτταρα εντόμων”

Εισαγωγή.....	24
Υλικά και Μέθοδοι	27
Αποτελέσματα.....	34
Συζήτηση.....	40
Βιβλιογραφία	42

Εργαστήριο Χημείας

“Απομόνωση πρωτεϊνικού παράγοντα που συμμετέχει στο μηχανισμό αντοχής του βακτηρίου *Zymomonas mobilis* σε θρεπτικά υλικά με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης”

Εισαγωγή.....	45
Υλικά και Μέθοδοι.....	50
Αποτελέσματα.....	55
Συζήτηση.....	59
Βιβλιογραφία.....	61

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας

“Μελέτη του ρόλου της παραθυμοσίνης στην αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης”

Εισαγωγή.....	67
Υλικά και Μέθοδοι.....	72

	Σελίδα
Αποτελέσματα.....	83
Συζήτηση.....	93
Βιβλιογραφία	96

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**“Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 σε καρκίνο του μαστού με
τη μέθοδο DGGE”**

Επίβλεψη:

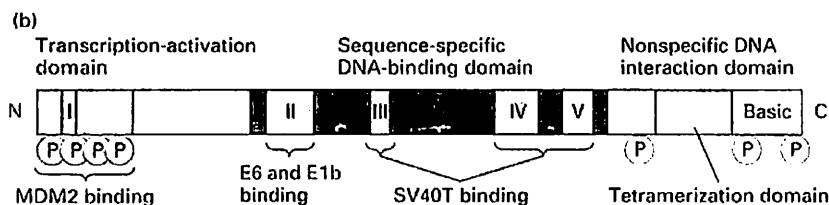
Β. Μαλάμου Μήτση (Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής)

Χ. Ζαχαρίου (Υποψήφια διδάκτορας)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια διατηρούν τον έλεγχο του κύκλου της κυτταρικής ανάπτυξης, της αντιγραφής του DNA και τον διαχωρισμό των δύο νέων κυττάρων από το θυγατρικό τους. Όταν η λειτουργία αυτών των γονιδίων διαταραχθεί δημιουργούνται κύτταρα που αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και η πιθανότητα για μετάπτωσή τους σε καρκινικά κύτταρα αυξάνει ραγδαία. Το p53 γονίδιο είναι το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1979. Έχει βρεθεί ότι η p53 πρωτεΐνη δεν λειτουργεί σωστά σε πολλούς τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα στους μισούς περίπου τύπους καρκίνου έχει βρεθεί ότι η p53 είναι ανενεργής εξαιτίας μεταλλάξεων στο γονίδιό της.

Δομή της p53 και του γονιδίου της: Η πρωτεΐνη p53 είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 53 kDa αποτελείται από 393 αμινοξέα (Lamb and Crawford 1986), και δομικά μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερις περιοχές (Εικόνα 1). Η μια περιοχή περιλαμβάνει το αμινοτελικό της άκρο (αμινοξέα 1-42), που είναι πλούσιο σε όξινα αμινοξέα και αποτελεί την περιοχή της μεταγραφικής ενεργοποίησης και καταστολής. Η δεύτερη περιοχή (αμινοξέα 355-367) περιλαμβάνεται στο καρβοξυτελικό άκρο, πλούσιο σε βασικά αμινοξέα και συμμετέχει στη DNA και RNA πρόσδεση. Η τρίτη περιοχή (αμινοξέα 324-355) περιλαμβάνεται επίσης στο καρβοξυτελικό άκρο και είναι η περιοχή ολιγομερισμού. Η τέταρτη περιοχή (αμινοξέα 102-292) είναι η κεντρική συντηρημένη περιοχή του γονιδίου, όπου εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης του DNA καθώς και η πλειονότητα των μεταλλάξεων (Levine A. J. et al., 1991).



Εικόνα 1: Δομή της πρωτεΐνης p53. Φωσφορυλίωση σταθεροποιεί την πρωτεΐνη. Η MDM2 Ρυθμίζει την κανονική λειτουργία της p53. Πρόσδεση των ιικών πρωτεϊνών E6 του ιού HPV και της E1b του αδενοϊού και του μεγάλου T αντιγόνου του SV40, αναστέλλουν την δραστηριότητα της p53.

Η p53 πρωτεΐνη είναι ένα τετραμερές με τέσσερις όμοιες υπομονάδες που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό του άκρο. Μια μη νοηματική σημειακή μετάλλαξη

σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα του p53 σε ένα κύτταρο μπορεί να καταργήσει τη λειτουργικότητά του, γιατί ουσιαστικά όλα τα ολιγομερή θα περιέχουν τουλάχιστον μια μη λειτουργική υπομονάδα, έτσι ώστε να μη μπορούν να δράσουν σαν μεταγραφικοί παράγοντες (Lodish et al. Molecular cell biology, Fourth Edition, 2000).

Στο αμινοτελικό άκρο της η p53 διαθέτει μια θέση πρόσδεσης για την πρωτεΐνη MDM2 (Εικόνα 1). Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει την έκφραση του άγριου (wild) τύπου της p53. Συγκεκριμένα προσδένεται στο αμινοτελικό άκρο της p53 καταστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση της p21 και άλλων γονιδίων και μεσολαβεί στην αποδόμηση της p53. Έτσι η MDM2 αναστέλλει την ικανότητα της p53 να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο ή να οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Lodish et al. Molecular cell biology, Fourth Edition, 2000).

Το γονίδιο της p53 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 p13.1 και αποτελείται από 11 εξόνια και 10 ιντρόνια (Mc Bride et al., 1986). Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου της p53 σε θηλαστικά, αμφίβια, πουλιά και ψάρια αποκάλυψε πέντε υψηλά συντηρημένες περιοχές, εκ των οποίων οι τέσσερις εμπεριέχονται στα εξόνια 5 έως 8 του γονιδίου (Soussi T. et al., 1990). Αυτές οι περιοχές αντιστοιχούν στα εξής κωδικόνια: περιοχή II-κωδικόνια 117-142, περιοχή III-κωδικόνια 171-181, περιοχή IV-κωδικόνια 234-258 και περιοχή V-κωδικόνια 270-286. οι περιοχές III, IV και V εμπεριέχονται στις δύο περιοχές πρόσδεσης του μεγάλου T αντιγόνου του SV40 (Jenkins J. R. 1988) (Εικόνα 1).

Ενεργοποίηση της p53: Η p53 ενεργοποιείται μόνο όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε καταστάσεις στρες, όπως γ ακτινοβολία, θερμότητα και χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Η ενεργός p53 πρωτεΐνη σταματά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών, αναστέλλοντας τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Σε πολλές περιπτώσεις οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση, προκειμένου να προστατέψει τον οργανισμό από κάποια κυτταρική βλάβη, που δεν διορθώνεται μέσω άλλων μηχανισμών επιδιόρθωσης. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον τρία μονοπάτια ενεργοποίησης της πρωτεΐνης p53: 1) DNA καταστροφή, η οποία μπορεί να προκληθεί από ιονίζουσα ακτινοβολία. Στην περίπτωση αυτή η ενεργοποίηση της p53 εξαρτάται από δύο πρωτεϊνικές κινάσες, την ATM και την Chk2. Η ATM ενεργοποιείται από θραύσεις της διπλής έλικας του DNA και η Chk2 από την ATM. Η ATM φωσφορυλιώνει την p53 και την σταθεροποιεί. 2) Λανθασμένα αυξητικά σήματα, όπως αυτά που προέρχονται από την έκφραση των ογκογονιδίων Ras και Myc. Στην

περίπτωση αυτή η ενεργοποίηση της p53 εξαρτάται από την πρωτεΐνη p14^{ARF}, η οποία προσδένεται στην MDM2 και αναστέλλει τη δράση της (Sherr C. J. and Weber. J. D. 2000). 3) Επαγωγή της p53 μπορεί να γίνει και από χημειοθεραπευτικά φάρμακα, υπεριώδη ακτινοβολία και αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών. Το μονοπάτι αυτό διαχωρίζεται από τα άλλα γιατί δεν συμμετέχουν σε αυτό η ATM, η Chk2 και η p14^{ARF}, ενώ υπάρχει πιθανότητα συμμετοχής της κινάσης ATR και της καζεϊνικής κινάσης II (Meek. D. W. 1999) (Εικόνα 2).

Ρόλος της p53: Ενώ η φωσφορυλίωση του αμινοτελικού άκρου της p53, από διάφορες κινάσες, προσδίδει σταθερότητα στο μόριό της, η ακετυλίωση λυσινών και/ή η φωσφορυλίωση σερινών στο καρβοξυτελικό άκρο της, επάγουν την πρόσδεση DNA. Με την ενεργοποίησή της η άγριου τύπου πρωτεΐνη αποκτά ενεργότητα πρόσδεσης DNA ειδική ως προς την αλληλουχία του. Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων έχουν ταυτοποιηθεί σαν μεταγραφικοί στόχοι της p53 (WS el-Deiry, 1998). Τα γονίδια αυτά κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες (Εικόνα 2):

1) Αναστολείς του κυτταρικού κύκλου. Σε καταστάσεις στρες όπως DNA καταστροφή ή ιονίζουσα ακτινοβολία, η p53 ενεργοποιεί άμεσα την έκφραση της p21^{WAF1}, έναν αναστολέα των κινασών του κυτταρικού κύκλου (CDKs). Έτσι η p21^{WAF1} αναστέλλει τη μετάπτωση του κυττάρου από την G1 στην S φάση. Στα επιθηλιακά κύτταρα η p53 ενεργοποιεί την 14-3-3sigma (σ) πρωτεΐνη, μεταφέρει το σύμπλοκο κυκλίνης B1-CDK1 στο κυτταρόπλασμα και έτσι το κύτταρο παγιδεύεται στην φάση G2 (Chan T. A. et al. 1999, Laronga et al. 2000). Άλλοι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου, που μεταγραφικά ενεργοποιούνται από την p53, είναι οι GADD45 και η BTG.

2) Επαγωγείς της απόπτωσης: Προαποπτωτικές πρωτεΐνες έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούνται από την p53. Τέτοιες είναι η Bax πρωτεΐνη, για την οποία έχει βρεθεί ότι σε μερικά είδη ανθρώπινων κυττάρων το γονίδιό της στη ρυθμιστική περιοχή του διαθέτει μια θέση πρόσδεσης της p53 (Reed J. C. 1999), η NOXA και η P53AIP1 (Oda E. et al. 2000, Oda K. et al. 2000). Και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και όταν υπερεκφράζονται επάγουν την απόπτωση του κυττάρου. Επίσης η PIDD είναι η πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσα πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από την p53 (LinY. et al. 2000).

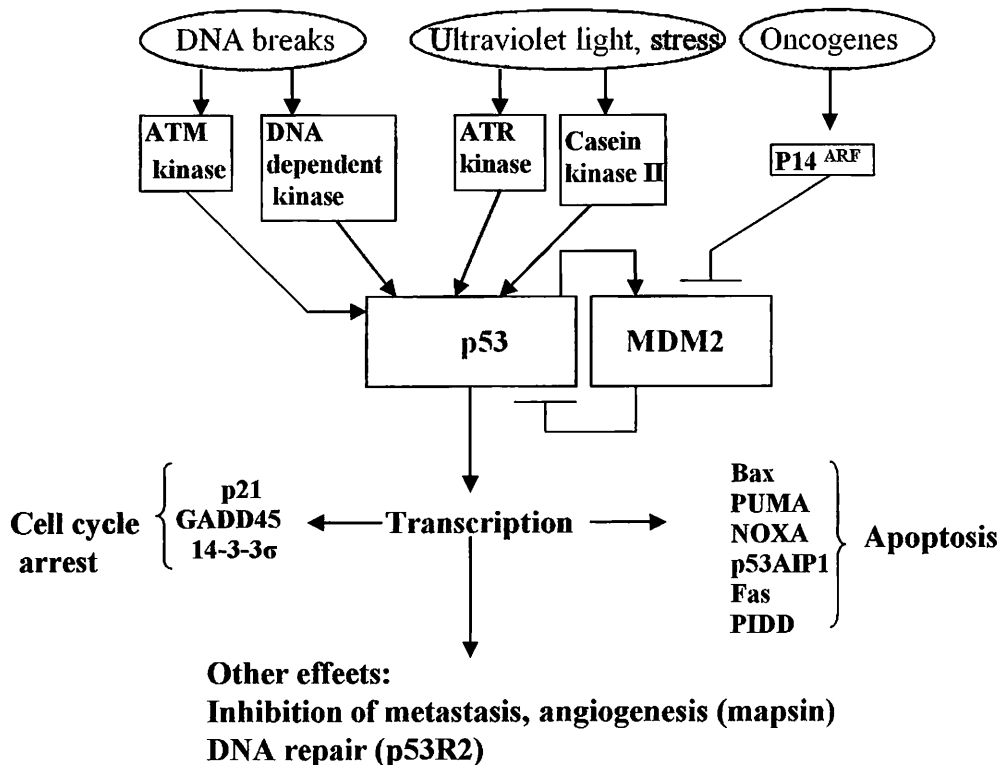
3) Επιδιόρθωση DNA: Η p53 έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της γενετικής σταθερότητας, επάγοντας έναν μεγάλο αριθμό από γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι

της ριβονουκλεοτιδικής ρεδουκτάσης p53R2, που η μεταγραφή του επάγεται μετά από βλάβη στο DNA (Tanaka H. et al. 2000).

4) Αναστολείς της αγγειογένεσης και της μετάστασης: Έχει αποδειχθεί ότι η φυσιολογική p53 ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που αναστέλλουν την δημιουργία νέων αγγείων γύρω από κακοήθεις όγκους (El-Deiry et al. 1998, Hendrix M. J. 2000). Ένα τέτοιο γονίδιο είναι του αναστολέα της σερινικής πρωτεάσης (maspin), η οποία αναστέλλει την αγγειογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση, καθώς και της KAI1, η οποία είναι αναστολέας της μετάστασης.

Η φυσιολογική p53 μπορεί επιπλέον να αλληλεπιδράσει με διάφορες ικές ογκοπρωτεΐνες, οι οποίες όμως την οδηγούν στη λειτουργική της απενεργοποίηση και την εξάλειψη της ογκοκατασταλτικής της δράσης. Τέτοιες είναι οι E6 και E7 ογκοπρωτεΐνες του ιού HPV και το μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40 (Ozgun and Butel 1995) (Εικόνα 1). Επίσης έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά και με κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως η MDM2 και οι hsc70s (Pinhasi-Kimhi et al. 1990).

Εικόνα 2: Ενεργοποίηση και στόχοι της p53.



Μεταλλάξεις του p53 και καρκίνος του μαστού: Το γονίδιο της p53 είναι ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια σε διάφορους τύπους ανθρώπινου καρκίνου με ποσοστό μεταλλάξεων 50% σε όλους τους τύπους καρκίνου. Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53 είναι σχεδόν πάντοτε ελαττωματικές ως προς την πρόσδεση DNA και έτσι ως προς την ενεργοποίηση γονιδίων (Sigal A. et al. 2000). Η αναλογία των παρανοηματικών μεταλλάξεων (missense mutations), που οδηγούν σε υποκαταστάσεις αμινοξέων στην p53, είναι πολύ υψηλότερη από αυτές που παρατηρούνται σε άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια (Hussain S.P. et al. 2000). Περισσότερες από 85% των μεταλλάξεων του p53 είναι παρανοηματικές και παρατηρούνται μεταξύ των εξονίων 5 και 8 (κωδικόνια 110 έως 307), με πολύ μεγάλη συχνότητα στις υψηλά συντηρημένες περιοχές του γονιδίου της p53 (Hollstein et al. 1994) (Εικόνα 3).

Απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) στο γονίδιο της p53, στα νεοπλασματικά κύτταρα πρωτοπαθούς καρκίνου μαστού, είναι αρκετά συχνές, περίπου στο 30-40% των περιπτώσεων και συνοδεύονται συνήθως από μεταλλάξεις του υπολειπόμενου γονιδίου (Davidoff A. M. et al., 1991, Ozburn and Butel 1995).

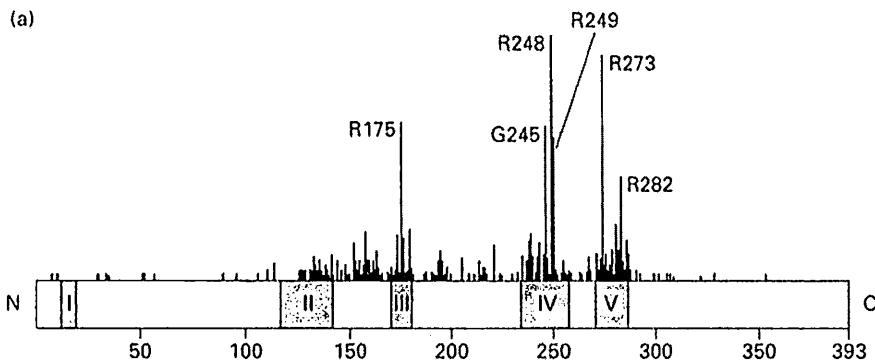
Μεταλλάξεις στη γαμετική βλαστική σειρά είναι πολύ πιο σπάνιες και σε μια τέτοια μετάλλαξη οφείλεται το σύνδρομο Li-Fraumeni. Τα άτομα με το σύνδρομο αυτό έχουν μια μετάλλαξη στο ένα αλληλόμορφο του p53 και παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν και δεύτερη μετάλλαξη στο φυσιολογικό γονίδιο του p53 σε διάφορα σωματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων κακοήθων νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του μαστού (Malkin D. et al. 1990).

Από διάφορες μελέτες έχει ταυτοποιηθεί ότι οι μεταλλάξεις σε κωδικόνια του p53 σε καρκίνους του μαστού αντιστοιχούν σε σωματικές γενετικές αλλαγές. Πράγματι, έχει αποκαλυφθεί με μετα-αναλύσεις ότι, κατά προσέγγιση μόνο το 20% των περιπτώσεων εκφράζουν μεταλλαγμένη p53 (Pharoah P. D. et al. 1999). Σε άλλες μελέτες αναζητείται σε πιο από τα στάδια της διεργασίας της καρκινογένεσης παρατηρούνται οι μεταλλάξεις του γονιδίου της p53. Σε καρκινώματα του δωδεκαδακτύλου χαμηλής επιθετικότητας (low-grade), για παράδειγμα, δεν ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο p53, ενώ σε υψηλής επιθετικότητας (high-grade) είναι πολύ συνηθισμένες (Done S. J. et al., 2001).

Αν και η συχνότητα των μεταλλάξεων του p53 στο καρκίνο του μαστού είναι περίπου 20% (Pharoah P. D. et al. 1999), σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου

μαστού, εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα. Για παράδειγμα έχει βρεθεί αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων του p53 σε καρκίνους του μαστού που συνοδεύονται από γενετικές μεταλλάξεις στα γονίδια του BRCA1 και BRCA2 (Smith P. D. et al., 1999, Phillips K. A. et al., 1999). Επίσης στα τυπικά μυελοειδή καρκινώματα του μαστού μεταλλάξεις του p53 παρατηρούνται στο 100% των περιπτώσεων (De Cremoux P. et al. 1999).

Η προγνωστική αξία του p53 έχει μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο του μαστού. Ο προσδιορισμός του είδους των μεταλλάξεων στο p53 έχει μεγάλη σημασία για να αξιολογηθεί η κλινική πορεία ενός νεοπλασματος. Είναι γνωστό ότι η κλινική πορεία μπορεί να κυμαίνεται από ήπιη έως θανατηφόρα. Μελέτες στις λειτουργικές περιοχές μεταλλαγμένου γονιδίου p53 σε καρκίνους μαστού αποκάλυψαν ότι: α) Μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης του ψευδραργύρου συσχετίζονται με βραχύτερη επιβίωση (Gentile M. et al., 1999). β) Μεταλλάξεις στις συντηρημένες περιοχές II και V συσχετίστηκαν με χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με μεταλλάξεις που επηρεάζουν την περιοχή σύνδεσης του DNA (Berns E. M. et al., 1998). Επιπλέον, η ανίχνευση μεταλλάξεων του p53 στη γαμετική σειρά είναι σημαντική για την αναγνώριση ασθενών που ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου ανάπτυξης νεοπλασίας (Beck J. S. et al., 1993).



Εικόνα 3: Μεταλλάξεις σε ανθρώπινους όγκους που απενεργοποιούν τη λειτουργία της p53. Οι 5 συντηρημένες περιοχές (I-V) της p53 δείχνονται με χρωματιστά κουτιά, ενώ η συχνότητα των μεταλλάξεων με κάθετες γραμμές. Η συχνότητα των μεταλλάξεων συγκεντρώνεται στις συντηρημένες περιοχές.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της παρουσίας ή μη μεταλλάξεων στα εξόνια 5 έως 8 του γονιδίου p53. Οι περιοχές αυτές των εξονίων θεωρούνται ως οι κύριες περιοχές συσσώρευσης μεταλλάξεων σε καρκίνους του μαστού. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση DNA από ιστικά δείγματα μαστού.

Απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε σε 12 δείγματα από πρωτοπαθή καρκινώματα μαστού και στα αντίστοιχα 12 φυσιολογικά δείγματα, σύμφωνα με το πακέτο υλικών QIAamp DNA Mini kit (Tissue Protocol), της Qiagen:

Ποσότητα ιστού (~50 mg) τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια και τοποθετείται σε σωληνάριο eppendorf, όπου προστίθενται 360 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL και 40 μl πρωτεϊνάσης K. Το μίγμα επωάζεται στους 56 C μέχρι να διαλυθεί τελείως. Στη συνέχεια προστίθενται 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL και μετά από καλή ανάδευση το μίγμα επωάζεται στους 70 C για 10 λεπτά. Για την καταβύθιση του DNA προστίθενται 420 μl καθαρής αιθανόλης και το μίγμα μεταφέρεται προσεκτικά σε στήλη φυγοκέντρησης (QIAamp spin column). Με φυγοκέντρηση το DNA δεσμεύεται στη μεμβράνη πυριτικού οξέος της στήλης. Ακολουθεί έκπλυσή του αρχικά με 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 και στη συνέχεια με 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2. Έκλυση του DNA πραγματοποιείται με επώαση της μεμβράνης για 1 λεπτό με 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AE, δύο φορές, και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίζονται φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με βάση τη σχέση: οπτική πυκνότητα (O.D.₂₆₀)=1 αντιστοιχεί σε 50 μg δίκλωνου DNA ανά ml διαλύματος. Η καθαρότητα του διαλύματος DNA προσδιορίζεται από το λόγο O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ και θεωρείται καθαρό όταν η τιμή είναι μεγαλύτερη του 1,6.

2.2 Ενίσχυση των εξονίων 5 έως 8 του γονιδίου p53 με την αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Για την πολλαπλή αντιγραφή της cDNA αλληλουχίας των εξονίων 5 έως 8 του γονιδίου p53, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε ιστικά δείγματα μαστού (καρκινικά και παρακείμενα φυσιολογικού ιστού).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Εξόνιο 5a:

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

Antisense primer: 5'-(CG-clamp)-TGG CGC GGA CGC GGG TGC CG-3'

Εξόνιο 5b:

Sense primer: 5'-(CG- clamp)-TTC CAC ACC CCC GCC CGG CA-3'

Antisense primer: 5'-CTG GGG ACC CTG GGC AA-3'

Εξόνιο 6:

Sense primer: 5'-(CG- clamp)-GAG ACG ACA GGG CTG GTT-3'

Antisense primer: 5'-CCA CTG ACA ACC ACC CTT-3'

Εξόνιο 7:

Sense primer: 5'-(CG- clamp)-TGG CTC TGA CTG TAC CAC-3'

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

Εξόνιο 8:

Sense primer: 5'-(CG- clamp)-ATC CTG AGT GGT AAT CT-3'

Antisense primer: 5'-TAC CTC GCT TAG TGC TCC-3'

Όπως φαίνεται σε κάθε ζεύγος εκκινητών ο ένας από τους δύο πριμοδότες έχει στο 5' άκρο του ένα τμήμα 40 νουκλεοτιδίων με 100% περιεκτικότητα σε GC (GC clamp). Έτσι προσδίδεται στα PCR προϊόντα μια GC ουρά 40 βάσεων στο 5' άκρο τους, η οποία διευκολύνει την ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο DGGE, που περιγράφεται παρακάτω.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που φαίνονται στον πίνακα 1, ενώ οι συνθήκες για τη PCR αντίδραση κάθε εξονίου φαίνονται παρακάτω:

Θερμική αποδιάταξη (denaturation): 95°C , (1min)

Πρόσδεση εκκινητών (annealing) : 58°C, (1,5 min) για τα εξόνια 5b, 6, 7, 8 και
55°C, (1,5 min) για το εξόνιο 5a

Επιμήκυνση αλυσίδων (elocation) : 70°C , (2min)

Αριθμός θερμικών κύκλων : 35

Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης μετά την ολοκλήρωση των 35 κύκλων παραμένουν για 5 λεπτά στους 70°C για την ολοκλήρωση της επιμήκυνσης τους και φυλάσσονται στους 4°C.

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις αντίδρασης
DNA εκμαγείο	300ng
RCR buffer 10x	1x
dNTP	0,2mM
MgCl ₂	1,5mM για τα εξόνια 5a, 6, 8 και 1,25mM για τα 5b, 7
Εκκινητής 3' άκρου	25 pmol/μl
Εκκινητής 5' άκρου	25 pmol/μl
BSA	0,2 mg/ml
Φορμαμίδιο	2,5% για τα εξόνια 6, 8 και 5% για τα 5, 7
Taq πολυμεράση	2,5 Units
ddH ₂ O	Μέχρι όγκου 50μl
Συνολικός όγκος	50μl

2.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης.

Για τον έλεγχο της ορθότητας των προϊόντων της αντίδρασης PCR, ποσότητά τους ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Η πηκτή παρασκευάζεται με προσθήκη 2% w/v αγαρόζης σε διάλυμα TBE (0,0089 M Tris-HCl, 0,089 M βορικό οξύ, 0,002 M EDTA), ενώ για την παρατήρηση του DNA προστίθεται στην πηκτή, πριν την στερεοποίηση της, βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml. Τα προϊόντα της PCR αναμιγνύονται σε αναλογία 5:1 με διάλυμα 6x LB (30% γλυκερόλη, 0,25% μπλε βρωμοφαινόλης) και ηλεκτροφορούνται στην πηκτή με σταθερή τάση 80 volts. Η παρατήρηση του DNA γίνεται με έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 με ηλεκτροφόρηση σε κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων (D.G.G.E.).

Η ηλεκτροφόρηση σε κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE) είναι μια τεχνική που επιτρέπει τη γρήγορη ανίχνευση απλών αλλαγών βάσεων (αντικατάσταση, αφαίρεση, πρόσθεση), καθώς επίσης και μικρά ελλείμματα μερικών δεκάδων βάσεων στο μόριο του DNA. Η τεχνική βασίζεται στο διαχωρισμό δύο τύπων δίκλωνου μορίου DNA, φυσιολογικού και μεταλλαγμένου, σε πήκτωμα

ακρυλαμιδίου, που περιέχει αποδιατακτικές ουσίες, ουρία και φορμαμίδιο, με συγκεκριμένη κλίση συγκέντρωσης.

Ο διαχωρισμός των δύο μορίων του DNA γίνεται σύμφωνα με τη θερμοκρασία αποδιάταξής τους (T_m), που εξαρτάται από τη συχνότητα των βάσεων A-T και G-C. Ως θερμοκρασία αποδιάταξης ορίζεται η θερμοκρασία, όπου χάνεται η μισή ελικοειδής δομή του DNA. Έτσι όταν δύο όμοια τμήματα DNA, που διαφέρουν μόνο σε μια απλή βάση νουκλεοτιδίου, ηλεκτροφορηθούν σε πηκτή ακρυλαμιδίου με αποδιατακτικούς παράγοντες, αρχικά θα κινηθούν σε σταθερή τροχιά. Καθώς όμως κινούνται σε μια κρίσιμη αποδιατακτική συγκέντρωση, μια ειδική περιοχή μέσα στην έλικα του DNA, που ονομάζεται πλαίσιο (domain), αποδιατάσσεται και παράγει μερικά αποδιαταγμένο DNA. Αυτό συνοδεύεται από μια ξαφνική μείωση της κινητικότητας του DNA, η οποία οφείλεται ακριβώς στα παρακλάδια που δημιουργούνται από την αποδιάταξή του. Κατά συνέπεια τα δύο τμήματα θα ακινητοποιηθούν σε διαφορετικά σημεία του πηκτώματος, που θα αντιστοιχούν στις διαφορετικές T_m που παρουσιάζουν.

Το μέγεθος των πολλαπλασιασμένων με PCR τμημάτων DNA που μπορούν να αναλυθούν σε ένα τέτοιο πήκτωμα ακρυλαμιδίου, ποικίλουν από 100 μέχρι 1000 ζεύγη βάσεων.

Αλλαγές βάσης ή μικρά ελλείμματα βάσεων στην άκρη του τμήματος DNA δεν είναι δυνατό να ελεγχθούν με ηλεκτροφόρηση DGGE, γιατί, καθώς το DNA αποδιατάσσεται, υφίσταται πλήρη διάσπαση με πλήρη αποχωρισμό των δύο κλώνων του. Το πρόβλημα αυτό λύνεται αν στο ένα από τα δύο ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές της αντίδρασης PCR προστεθεί ένα τμήμα αποτελούμενο από 5 μέχρι 65 νουκλεοτίδια, που να περιέχει αποκλειστικά νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης. Το τμήμα αυτό λειτουργεί σαν σφιγκτήρας στην άκρη του DNA που πολλαπλασιάζεται με PCR και προσδίδει στο προϊόν υψηλή T_m . Με αύξηση της T_m , το DNA προφυλάσσεται από την πλήρη αποδιάταξή του, ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση μεταλλάξεων σε ποσοστό που αγγίζει το 100%.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν τα εξόνια 5 έως 8 του γονιδίου της p53 για τυχόν μεταλλάξεις με ηλεκτροφόρηση DGGE. Για κάθε εξόνιο η βαθμίδωση των αποδιατακτικών παραγόντων της πηκτής διαφέρουν, όπως επίσης και η συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου της πηκτής. Στον πίνακα 2 φαίνονται οι συνθήκες αποδιάταξης και οι συγκεντρώσεις της πηκτής.

Πίνακας 2: Συνθήκες αποδιάταξης των εξονίων στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Εξόνια	Ακρυλαμίδιο (%)	Εύρος αποδιάταξης (%)
5a	8	55-65
5b	6	60-80
6	6	50-70
7	8	50-75
8	8	50-75

Για τη δημιουργία της πηκτής χρησιμοποιείται η συσκευή βαθμίδωσης συγκέντρωσης της BIO-RAD. Αρχικά ετοιμάζονται τα δύο διαλύματα stock των αποδιατακτικών παραγόντων. Το πρώτο με 0% αποδιατακτικούς παράγοντες (40% ακρυλαμίδιο, 1x TAE: 40mM Tris, 20mM Acetic acid, 1mM EDTA pH8.3) και το δεύτερο με 80% αποδιατακτικούς παράγοντες (40% ακρυλαμίδιο, 1x TAE, 32% φορμαμίδιο, 5,6 M ουρία).

Σε δύο σωληνάρια universal τοποθετούνται οι αντίστοιχοι όγκοι των δύο διαλυμάτων stock, ώστε με μετά την ανάμιξή τους με τη συσκευή της Biorad, να δημιουργηθεί η επιθυμητή βαθμίδωση στη συγκέντρωση των αποδιατακτικών παραγόντων. Στο διάλυμα με 80% αποδιατακτικούς παράγοντες προστίθενται προαιρετικά 150μl Dcode dye Solution ανά 5 ml διαλύματος για να μπορεί να γίνει οπτική παρατήρηση στη διαβάθμιση της πυκνότητας των αποδιατακτικών παραγόντων. Για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου, σε κάθε διάλυμα προστίθεται N, N, N, N-τετραμέθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED, BIO-RAD) και υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) σε τελική συγκέντρωση 0,09%. Στη συνέχεια τα διαλύματα αυτά τοποθετούνται στη συσκευή βαθμίδωσης συγκέντρωσης της Biorad και αναμιγνύονται για την παρασκευή της πηκτής.

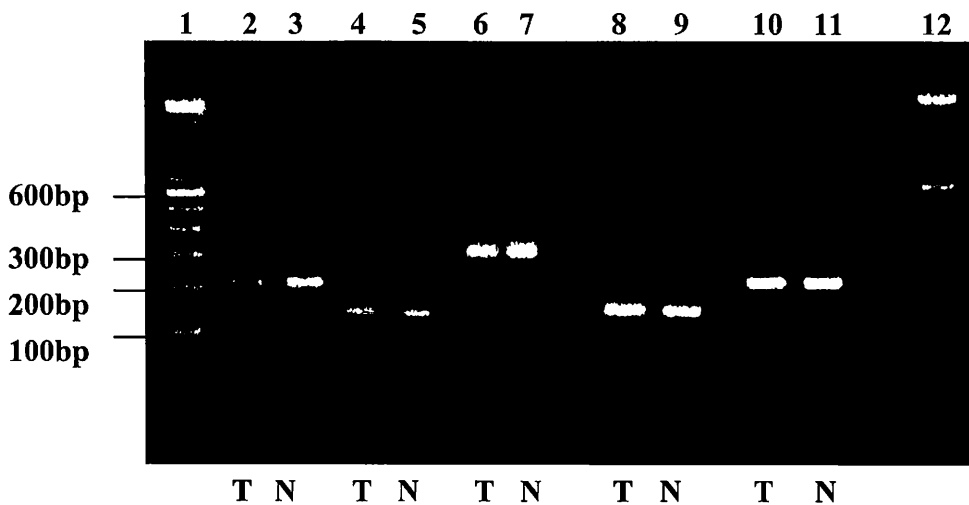
Για τη ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στην πηκτή χρησιμοποιείται η αντίστοιχη συσκευή ηλεκτροφόρησης της BIO-RAD (Dcode Universal Detection System). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1x θερμαίνεται στη συσκευή ηλεκτοφόρησης στους 60 C. 20μl από τα προϊόντα της PCR αναμιγνύονται σε αναλογία 5:1 με διάλυμα φόρτωσης 6x (30% γλυκερόλη, 0,25% κυανού βρωμοφαινόλης) και τοποθετούνται στην πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με εφαρμογή τάσης 65 volt για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια η πηκτή εμβαπτίζεται σε

διάλυμα TAE με βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 10μg/μl για 15 λεπτά και η παρατήρηση του DNA γίνεται με υπεριώδη ακτινοβολία.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ενίσχυση των εξονίων 5 έως 8 του γονιδίου p53 αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Από 12 χειρουργικά δείγματα καρκίνου μαστού, ελήφθησαν αφενός δείγματα καρκινικού ιστού από τον πρωτοπαθή όγκο (Τα) και αφετέρου δείγματα από τον παρακείμενο φυσιολογικό αδένα (Ν). Η εξαγωγή DNA από τα δείγματα αυτά έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 2.1. Στη συνέχεια το DNA από κάθε δείγμα υπέστη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για την ενίσχυση των εξονίων 5a, 5b, 6, 7 και 8 του γονιδίου p53, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2. Τα αποτελέσματα της PCR για κάθε εξόνιο, μετά από ηλεκτροφόρησή τους, σε πηκτή αγαρόζης 2% φαίνονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% των εξονίων 5a, 5b, 6, 7 και 8 του γονιδίου p53, μετά από ενίσχυσή τους με αντίδραση PCR.

Διαδρομές 1, 12: Δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 100bp.

Διαδρομές 2, 3: Εξόνιο 5b από καρκινικό T και φυσιολογικό N ιστό, με μοριακό βάρος 208bp.

Διαδρομές 4, 5: Εξόνιο 5a από καρκινικό T και φυσιολογικό N ιστό, με μοριακό βάρος 158bp.

Διαδρομές 6,7: Εξόνιο 6 από καρκινικό T και φυσιολογικό N ιστό, με μοριακό βάρος 270bp.

Διαδρομές 8, 9: Εξόνιο 7 από καρκινικό T και φυσιολογικό N ιστό, με μοριακό βάρος 163bp.

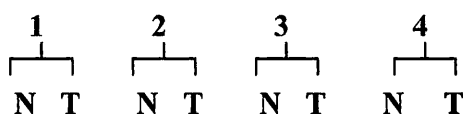
Διαδρομές 10, 11: Εξόνιο 8 από καρκινικό T και φυσιολογικό N ιστό, με μοριακό βάρος 191bp.

Το αναμενόμενο μοριακό βάρος για κάθε εξόνιο είναι: Για το εξόνιο 5a 158bp, για το 5b 208bp, για το 6 270bp, για το 7 163bp και για το 8 191bp, τα οποία συμπίπτουν με τα μοριακά βάρη των εξονίων που ηλεκτροφορήθηκαν.

3.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53 με τη μέθοδο D.G.G.E.

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της p53, έγινε έλεγχος στα ενισχυμένα με PCR εξόνια 5 έως 8, όπου παρατηρούνται οι περισσότερες μεταλλάξεις σε μια πληθώρα νεοπλασμάτων, με ηλεκτροφόρησή τους σε κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων (D.G.G.E.). Ελέγχθηκαν 12 δείγματα DNA από καρκινικούς ιστούς μαστού, καθώς επίσης και το DNA από τον αντίστοιχο παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, για να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός των σωματικών από τις γενετικές μεταλλάξεις και τον πολυμορφισμό του γονιδίου p53.

Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο των μεταλλάξεων στα εξόνια 5 έως 8 του p53, σε αυτά τα 12 δείγματα DNA, έδωσαν μια ετερόζυγη μετάλλαξη στο εξόνιο 5a του δείγματος 3, όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Η ηλεκτροφόρηση αυτή έγινε σε 8% πηκτή πολυακρυλαμίδιου και με βαθμίδωση αποδιατακτικών παραγόντων 60-65%.



Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση D.G.G.E. του εξονίου 5a φυσιολογικού N και καρκινικού T DNA, τεσσάρων δειγμάτων (1, 2, 3, 4).

Οι δύο ζώνες που εμφανίζονται στην ετερόζυγη μετάλλαξη του καρκινικού DNA του δείγματος 3, αντιστοιχούν σε ομοδιμερή μόρια DNA. Η κάτω ζώνη αντιστοιχεί σε φυσιολογικού τύπου αλληλόμορφο ομοδιμερές, ενώ η επάνω σε ομοδιμερές μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

Τα ομοδιμερή αυτά μόρια δημιουργούνται κατά την αντίδραση PCR με επαναδιατάξεις (annealing) των συμπληρωματικών μονόκλωνων μορίων DNA, ενώ, 'όταν υπάρχει μετάλλαξη, είναι δυνατό να δημιουργηθούν επαναδιατάξεις και μη συμπληρωματικών τμημάτων (ετεροδιμερή μορια). Τα ετεροδιμερή μόρια έχουν

πάντα μικρότερη T_m από οποιοδήποτε ομοδιμερές, επειδή έχουν μεγαλύτερη χημική αστάθεια. Έτσι στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων μπορούν να σχηματιστούν τέσσερις ευδιάκριτες ζώνες: φυσιολογικού τύπου ομοδιμερή, ομοδιμερή μετάλλαξης και δύο διαφορετικές ζώνες ετεροδιμερών.

Σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα που ελέγχθηκαν δεν ανιχνεύτηκε άλλη μετάλλαξη.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Περισσότερες από 1000 μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινους καρκίνους, ενώ μια από τις πιο κοινές γενετικές αλλαγές, η οποία συσχετίζεται με την καρκινογένεση, είναι η μετάλλαξη του γονιδίου p53. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο του p53 κωδικοποιεί την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 53 kDa, που αποτελεί σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ενώ συμμετέχει και στην διαδικασία της απόπτωσης. Αναλύσεις έχουν δείξει ότι στο μεγαλύτερο ποσοστό ανθρώπινων καρκίνων που περιέχουν ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του p53, το φυσιολογικό αλληλόμορφο χάνεται κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου (Levine A. J. et al., 1991). Αυτές οι έρευνες ενισχύουν την άποψη ότι ολοκληρωτική απενεργοποίηση του φυσιολογικού p53 είναι απαραίτητη για την καρκινική εξαλλαγή, ενώ μεταλλαγμένες μορφές του p53 επιφέρουν ένα πλεονέκτημα για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

Απενεργοποίηση και μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 προκύπτει δια μέσου διαφόρων μηχανισμών, όπως απώλεια των αλληλόμορφων του γονιδίου στο 17p13.1 χρωμόσωμα, ελλείψεις, ενθέσεις, σημειακές μεταλλάξεις ή σχηματισμός συμπλόκων με ικές ή κυτταρικές πρωτεΐνες.

Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53 είναι σχεδόν πάντοτε ελαττωματικές ως προς την πρόσδεση DNA και έτσι ως προς την ενεργοποίηση γονιδίων. Η αναλογία των παρανοηματικών μεταλλάξεων (missense mutations), που οδηγούν σε υποκαταστάσεις αμινοξέων, στην p53 είναι πολύ υψηλότερη από αυτές που παρατηρούνται σε άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Περισσότερες από 85% των μεταλλάξεων του p53 είναι παρανοηματικές και παρατηρούνται μεταξύ των εξονίων 5 και 8 με πολύ μεγάλη συχνότητα στις υψηλά συντηρημένες περιοχές του γονιδίου p53.

Πρόσφατη μελέτη στον καρκίνο του μαστού (Alsner J. et al. 2000), αποκάλυψε ότι μεταλλάξεις της p53 σε αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση του DNA, συσχετίζονται με πολύ επιθετικούς καρκίνους, ενώ μη λειτουργικές (null) μεταλλάξεις και άλλες παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις συσχετίζονται με ενδιάμεσο κλινικό φαινότυπο. Περίπου το 20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού περιέχουν μια μετάλλαξη στα εξόνια 5 έως 8 του γονιδίου p53 (Powell B. et al., 2000).

Στην προσπάθεια διαλεύκανσης της συσχέτισης των μεταλλάξεων του p53 γονιδίου με τον καρκίνο του μαστού, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην

ανίχνευση της παρουσίας ή μη μεταλλάξεων στα εξόνια 5 έως 8 του γονιδίου p53 σε 12 δείγματα καρκινικών ιστών μαστού. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Η τεχνική αυτή επιτρέπει την ανίχνευση απλών αλλαγών βάσεων (αντικατάσταση, αφαίρεση, πρόσθεση), καθώς και μικρά ελλείμματα μερικών δεκάδων βάσεων στο μόριο του DNA.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι από τα 12 καρκινικά δείγματα μαστού που μελετήθηκαν, μόνο το ένα παρουσίασε μια μετάλλαξη στο εξόνιο 5a. Για να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς τον συσχετισμό μεταλλάξεων του γονιδίου p53 με τον καρκίνο του μαστού, πρέπει να αναλυθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων, ώστε να είναι δυνατή η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Alsner J, Yilmaz M, Guldborg P, Hansen LL, Overgaard J. 2000.** Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 6(10):3923-31.
2. **Beck JS, Kwitek AE, Cogen PH, Metzger AK, Duyk GM, Sheffield VC. 1993.** A denaturing gradient gel electrophoresis assay for sensitive detection of p53 mutations. *Hum Genet.* 91(1):25-30.
3. **Berns EM, van Staveren IL, Look MP, Smid M, Klijn JG, Foekens JA. 1998.** Mutations in residues of TP53 that directly contact DNA predict poor outcome in human primary breast cancer. *Br J Cancer.* 77(7):1130-6.
4. **Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1999.** 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature.* 401(6753):616-20.
5. **Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. 1991.** Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(11):5006-10.
6. **de Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind'homme B, Martin E, Sastre-Garau X, Magdelenat H, Fourquet A, Soussi T. 1999.** p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 91(7):641-3.
7. **Done SJ, Eskandarian S, Bull S, Redston M, Andrulis IL. 2001.** p53 missense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst.* 93(9):700-4.
8. **el-Deiry WS. 1998.** Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.* 8(5):345-57. Review.
9. **el-Deiry WS. 1998.** p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 227:121-37. Review.
10. **Gentile M, Bergman Jungstrom M, Olsen KE, Soderkvist P, Wingren S. 1999.** p53 and survival in early onset breast cancer: analysis of gene mutations, loss of heterozygosity and protein accumulation. *Eur J Cancer.* 35(8):1202-7.
11. **Hendrix MJ. 2000.** De-mystifying the mechanism(s) of maspin. *Nat Med.* 6(4):374-6.
12. **Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC. 1994.** Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 22(17):3551-5.

13. **Hussain SP, Harris CC. 2000.** Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutat Res.* 462(2-3):311-22. Review
14. **Jenkins JR, Chumakov P, Addison C, Sturzbecher HW, Wade-Evans A. 1988.** Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J Virol.* 62(10):3903-6.
15. **Lamb P, Crawford L. 1986.** Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 6(5):1379-85
16. **Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. 2000.** Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem.* 275(30):23106-12.
17. **Levine AJ, Momand J, Finlay CA. 1991.** The p53 tumour suppressor gene. *Nature.* 351(6326):453-6. Review.
18. **Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. E. 2000.** *Molecular Cell Biology.* Forth Edition. W. H. Freeman and Company.
19. **Malkin D, Li PP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Neison CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Talnsky MA, et al. 1990.** Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 250(4985):1233-8. Erratum in: *Science.* 1993 Feb 12;259(5097):878.
20. **McBride OW, Merry D, Givol D. 1986.** The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(1):130-4.
21. **Meek DW. 1999.** Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene.* 18(53):7666-75. Review.
22. **Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. 2000.** Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 288(5468):1053-8.
23. **Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. 2000.** p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell.* 102(6):849-62.
24. **Ozgun MA, Butel JS. 1995.** Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis. *Adv Cancer Res.* 66:71-141. Review.
25. **Pharoah FD, Day NE, Caldas C. 1999.** Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 80(12):1968-73.

26. **Phillips KA, Nichol K, Ozcelik H, Knight J, Done SJ, Goodwin PJ, Andrulis IL. 1999.** Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations. *J Natl Cancer Inst.* 91(5):469-73.
27. **Powell B, Soong R, Iacopetta B, Seshadri R, Smith DR. 2000.** Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 6(2):443-51.
28. **Reed JC. 1999.** Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 17(9):2941-53. Review.
29. **Sherr CJ, Weber JD. 2000.** The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 10(1):94-9. Review.
30. **Sigal A, Rotter V. 2000.** Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* 60(24):6788-93. Review.
31. **Smith PD, Crossland S, Parker G, Osin P, Brooks L, Waller J, Philp E, Crompton MR, Gusterson BA, Allday MJ, Crook T. 1999.** Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. *Oncogene.* 18(15):2451-9.
32. **Soussi T, Caron de Fromentel C, May P. 1990.** Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene.* 5(7):945-52. Review.
33. **Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y. 2000.** A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature.* 404(6773):42-9.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

“Έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsp70 και hsc70 με το σύστημα βακιλλοϊού σε κύτταρα εντόμων”

Επιβλέπων: Αναπλ. Καθηγητής Λαζαρίδης Ιωάννης

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με την κυτταρική απόκριση στο θερμικό σοκ έγιναν το 1962, όταν εντοπίστηκε μια καινούρια μορφή διογκωμάτων στα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων της *Drosophila*, μετά από προσωρινή έκθεση σε αυξανόμενες τιμές θερμοκρασιών (Ritossa, 1962). Οι μελέτες που ακολούθησαν αποκάλυψαν ότι όλοι οι οργανισμοί, από τα βακτήρια μέχρι τα φυτά και τον άνθρωπο, διαθέτουν έναν μηχανισμό άμυνας και προστασίας των κυττάρων τους έναντι διαφόρων επιβλαβών παραγόντων, όπως το θερμικό σοκ, το αλκοόλ, οι αναστολείς του μεταβολισμού, τα βαρέα μέταλλα και το οξειδωτικό στρες (Lindquist, 1986, Morimoto, 1993). Σε μοριακό επίπεδο η κυτταρική απόκριση σε καταστάσεις στρες συνίσταται κυρίως στην επαγωγή της σύνθεσης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (hsps) οι οποίες είναι εντυπωσιακά διατηρημένες ανάμεσα στα είδη (Lindquist, 1986, Wu, 1995, Morimoto 1998). Ο ρόλος των παραγόμενων hsps στην κυτταρική προστασία αποδόθηκε στη δράση τους ως μοριακών συνοδών (molecular chaperones), που υποβοηθούν τις λανθασμένα αναδιπλούμενες πρωτεΐνες να αποκτήσουν τη σωστή τρισδιάστατη δομή τους (Hightower, 1980, Peiham, 1984). Ορισμένα μέλη όμως της οικογένειας των hsps παράγονται και σε φυσιολογικές συνθήκες και φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και τη μεταφορά τους μέσω βιολογικών μεμβρανών (Hartl, 1996).

Οι hsps κατατάσσονται με βάση το μοριακό τους βάρος στις έξι παρακάτω οικογένειες: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 και small hsps. Οι γονιδιακές αυτές οικογένειες περιλαμβάνουν μέλη που εκφράζονται αδιάφορα και μέλη των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται επαγωγικά (De Maio, 1999). Για παράδειγμα, η Hsp70 οικογένεια, της οποίας τα μέλη παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομολογίας στην αλληλουχία τους, περιλαμβάνει την hsp70, η οποία εκφράζεται αποκλειστικά σε καταστάσεις στρες, την hsc70, η οποία δεν επάγεται σε καταστάσεις στρες αλλά εκφράζεται αδιάφορα, την Grp78, της οποίας η έκφραση ρυθμίζεται από τα επίπεδα γλυκόζης σε φυσιολογικές καταστάσεις στο κύτταρο, και την mtp70. Οι hsp70 και hsc70 εντοπίζονται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, η Grp78 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ η mtp70 εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο (De Maio, 1999, Jolly and Morimoto, 2000).

Όσον αφορά τη μοριακή ανατομία τους οι hsp70s περιέχουν μια πολύ καλά συντηρημένη αμινοτελική περιοχή 44 kd, με ασθενή δράση ATPάσης (Chappel et al, 1987, Wang et Lee, 1993) και καλά συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο, μοριακού βάρους 28 kd, το οποίο αποτελεί την περιοχή πεπτιδικής πρόσδεσης (Wang et al, 1993). Οι hsp70s παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συγγένειας πρόσδεσης για υδρόφοβα πεπτιδία και αυτή η συγγένεια αυξάνει μετά την μετατροπή του ATP σε ADP (McCarty et al., 1995). Έτσι ο μηχανισμός δράσης τους μπορεί να περιγραφεί ως εξής: Αρχικά υδρόφοβες πρωτεΐνες προσδένονται αντιστρεπτά με το σύμπλεγμα Hsp70-ATP. Η υδρόλυση του ATP επάγει την αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης και αυξάνει την συγγένεια της Hsp70 με το υπόστρωμά της, ώστε να σχηματιστεί ένα σταθερό σύμπλεγμα υπόστρωμα-Hsp70-ADP. Είναι γνωστό ότι οι Hsp70s έχουν βοηθητικές συνοδούς πρωτεΐνες (cochaperones) DnaJ τύπου, όπως η Hsp40, οι οποίες διαθέτουν μια περιοχή J, που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή τους με τις hsp. Οι DnaJ πρωτεΐνες επάγουν τη χαμηλή ενεργότητα ATPάσης των Hsp70s και έτσι μετατρέπουν την προσωρινή αλληλεπίδραση της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης σε σταθερό σύμπλεγμα πολυπεπτιδίου-Hsp70-ADP. Στη συνέχεια ένας αριθμός βοηθητικών πρωτεϊνικών συνοδών, όπως και οι Hip και Horp, μετατρέπουν το ADP σε ATP και το σύμπλεγμα Hsp70-ATP απελευθερώνεται από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα, το οποίο οδηγείται σε σωστή αναδίπλωση (Pilon and Schekman, 1999).

Ένας από τους σημαντικότερους ρόλους των hsp70s είναι η προστασία του κυττάρου από το θερμικό σοκ, η οποία επιτυγχάνεται με την σύνδεση των hsp70s με τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες, με την αποτροπή δημιουργίας πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Gething et al., 1992). Πρέπει να τονισθεί ότι οι hsp70s φαίνεται να αποτρέπουν την συσσωμάτωση αναδιπλούμενων πεπτιδίων και κατά την ενδοκυτταρική τους μετατόπισή τους (Bukau and Horwich 1998). Η έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες έχει σαν αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική μετατόπιση των hsp70s από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και τη συσσώρευσή τους στους πυρηνίσκους, χωρίς όμως να έχει ακόμα διευκρινιστεί η βιολογική σημασία του παραπάνω εντοπισμού (Welch et al. 1984). Αυξημένα ποσοστά έκφρασης των μελών της Hsp70 οικογένειας έχουν παρατηρηθεί σε υψηλής επιθετικότητας κακοήθης όγκους (Ciocca et al., 1993, Santarosa et al., 1997). Η μοριακή βάση της υπερέκφρασης των Hsps σε καρκινικά κύτταρα δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα (Morimoto, 1991). Ένας πιθανός ρόλος τους στην ογκογένεση μπορεί να θεωρηθεί η δράση τους σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δημιουργία

καρκίνου, όπως πρωτεΐνες ογκογονιδίων. Η hsp70 έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες των ικόν ογκογονιδίων E1A του αδενοϊού και το μεγάλο T αντιγόνο του SV40, καθώς επίσης και με το κυτταρικό c-myc (Sawai et al., 1989, Koskinen et al., 1991). Επίσης οι hsp70 και hsc70 αλληλεπιδρούν με μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη και την αυξάνουν τον χρόνο ημιζωής της (Finlay et al., 1988). Τέλος οι Hsp70s μπορούν να μπλόκάρουν τη διαδικασία της απόπτωσης κυττάρων σε καταστάσεις στρες με διάφορους τρόπους, όπως αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των κασπασών μέσω του κυτοχρώματος c, μπλοκάροντας μεταβολικούς δρόμους καθοδικά της ενεργότητας των κασπασών και αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των SARKs/JNKs κινασών, οι οποίες ενεργοποιούν την οδό των κασπασών με φωσφορύλιωση (Jolly and Morimoto, 2000). Τέλος έχει αναφερθεί ότι σε μερικά κύτταρα όγκων οι Hsps (Hsp70, Hsp90) εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια, όπου παίζουν το ρόλο αντιγόνου ή πιο πιθανό το ρόλο των αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων (Suto et al., 1995, Ferrarini et al., 1992, Multhoff et al., 1995).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsc70 και hsp70 σε ευκαριωτικά κύτταρα εντόμων sf9 με το σύστημα έκφρασης βακιλλοϊού Bac to Bac (Life Technologies), για περαιτέρω απομόνωση και καθαρισμό τους, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

2.1.1 Μέθοδοι κλωνοποίησης

Σκοπός ήταν η δημιουργία των φορέων έκφρασης pFASTBACHTa-Huhsc70 και pFASTBACHTb-Myhsp70, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο BAC TO BAC σύστημα έκφρασης με βακιλλοϊό (GIBCO BRL, Life Technologies).

Τα γονίδια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ hsp70 και hsc70 εξάχθηκαν με περιοριστικές πέψεις από τα πλασμίδια pQE-30-Myhsp70 και pProEX HTa-Huhsc70 αντίστοιχα. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για το γονίδιο Myhsp70 οι *Hind*III και *Bam*HI, ενώ για το γονίδιο Huhsc70 οι *Nco*I και *Xho*I. Με τα αντίστοιχα ένζυμα επώαστηκαν και οι φορείς κλωνοποίησης pFASTBAC HTb και pFASTBAC HTa. Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 100 μl στους 37°C με ποσότητα DNA 10 μg. Ακολούθησε ηλεκτοφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (10μg/μl), και τα προκύπτοντα θραύσματα εντοπίστηκαν μετά από έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία. Εξαγωγή των επιθυμητών θραυσμάτων DNA από την πηκτή, έγινε με τη χρήση του πακέτου υλικών της QIAGEN, Plasmid Purification Kit. Η ανασύνδεση των θραυσμάτων έγινε με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Για την αντίδραση ανασύνδεσης χρησιμοποιήθηκαν 100ng φορέα και τρεις δοκιμαστικές ποσότητες ενθέματος σε αναλογίες 1/1, 2/1 και 6/1 με την ποσότητα του φορέα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl με προσθήκη 1μl T4 DNA λιγάσης (10u/μl).και 1μl ATP (10mM), στους 16°C ολονύχτια. Μια παράλληλη αντίδραση απουσία ενθέματος πραγματοποιήθηκε σαν μάρτυρας.

Ακολούθησε μετασχηματισμός των επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* MC1061 με τους πιθανά ανασυνδυασμένους φορείς: Τα βακτήρια ανασύρθηκαν από βαθιά κατάψυξη (-80°C) και ξεπάγωσαν ήπια σε πάγο. Έγινε προσθήκη της μισής ποσότητας του μίγματος ανασύνδεσης σε όγκο κυττάρων 200μl και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια έγινε σπορά των βακτηριακών κυττάρων σε προθερμασμένα τρυβλία με θρεπτικό υλικό Luria Agar (LA: 1% w/v τρυπτόνη, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1% w/v NaCl, 1,5% w/v άγαρ) και 100μg/ml αμικιλίνη. Μετά από ολονύχτια επώαση αναπτύχθηκαν με τη μορφή αποικιών, μόνο τα βακτήρια που είχαν μετασχηματιστεί με τον φορέα, ο οποίος φέρει

το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη. Ακολούθησε απομόνωση αυτών των πλασμιδιακών κατασκευών σε μικρή και στη συνέχεια σε μεγάλη κλίμακα, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων DH10Bac του *E.coli*, και την απομόνωση του ανασυνδυασμένου βακεμιδίου από αυτά.

2.1.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα (mini, large preparation)

Μετά τον μετασχηματισμό των MC1061 επιδεκτικών κυττάρων με τους ανασυνδυασμένους φορείς, 5-10 αποικίες από τα τρυβλία επιλογής ενοφθαλμίστηκαν, κάθε μια ξεχωριστά, σε 3 ml LB (1% w/v τρυπτόνη, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1% w/v NaCl) εμπλουτισμένου με 100μg/ml αμπικιλίνη, για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση υπό ανάδευση στους 37 C. 1,5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε μικροσωληνάριο και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.000 rpm, 5 min). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 0,5 ml διαλύματος STE (0,1 M NaCl, 10mM TrisHCl pH8, 1mM EDTA pH8). Μετά από φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστέθηκαν διαδοχικά 100μl διαλύματος I (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH8, 10 mM EDTA), 200μl διαλύματος II (200 mM NaOH, 1% SDS) και 150 μl διαλύματος III (2,5 mM NaAc, pH4,8). Μετά από ήπια ανάδευση τα μίγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (13000rpm, 10min, 4 C), το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια και προστέθηκε σε αυτό ίσος όγκος φαινόλης. Μετά από ήπια ανάμιξη και φυγοκέντρηση το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου. Με φυγοκέντρηση διαχωρίστηκε το υπερκείμενο, το οποίο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και προστέθηκαν 500μl ισοπροπανόλης. Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στους -70 C ώστε να κατακρημνιστεί το DNA, φυγοκέντρηση (12000rpm, 10 min) και το ίζημα εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Το DNA επαναιωρήθηκε σε 20μl TE pH8 (10 mM Tris-Cl pH8, 1 mM EDTA).

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: 100μl από θετικά εξακριβωμένη καλλιέργεια μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκε για να μολύνει 500ml LB με 50μg/ml αμπικιλίνη. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση με ανάδευση στους 37 C και φυγοκέντρηση (5000rpm, 15min, 4 C, Sorvall). Μετά από επαναιώρηση σε 25ml TE και φυγοκέντρηση (5000rpm, 15min, 4 C), προστέθηκαν 40 ml διαλύματος I και 4mg/ml λυσοζύμη. Ακολούθησε

επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και προσθήκη 60 ml διαλύματος II, 60 ml διαλύματος III και το μίγμα επώαστηκε 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντρηση (5000rpm, 45min, 4 C) το υπερκείμενο διηθήθηκε, ώστε να απομακρυνθούν οι μεμβράνες, και ξαναφυγοκεντρήθηκε 30min. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 100ml ισοπροπανόλης και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Το ίζημα αφού στέγνωσε επαναδιαλύθηκε σε 9,5ml TE pH8. Σε αυτό προστέθηκαν 10,2gr CsCl και φυγοκεντρήθηκε (10000rpm, 10min, 20 C), ώστε να ιζηματοποιηθούν πρωτεΐνες και λιπίδια. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 600ml 10mg/ml BET και μετρήθηκε ο δείκτης διάθλασης ο οποίος ρυθμίστηκε με προσθήκη CsCl, έτσι ώστε να βρίσκεται μεταξύ 1392-1396. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος τουλάχιστον 16 ώρες (45000rpm, 20 C, κεφαλή T1V65, Beckman). Η ζώνη του DNA αφαιρέθηκε με σύριγγα και σε αυτήν προστέθηκε ίσος όγκος βουτανόλης. Από τις δύο φάσεις που δημιουργούνται η οργανική δεσμεύει τη χρωστική BET και αφαιρείται. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τόσες φορές ώστε να απομακρυνθεί τελείως η χρωστική από την υδατική φάση, στην οποία στη συνέχεια προστέθηκε dH₂O μέχρι όγκου 7ml και 7ml ισοπροπανόλης. Μετά από επώαση για μια ώρα στους -80 C, ώστε να καταβυθιστεί το DNA και φυγοκέντρηση (10000rpm, 30min, 4 C, Sorvall) το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 400 μl TE pH8 και σε αυτό προστέθηκαν 20μl 5M NaCl και 1 ml αιθανόλη 70%. Με επώαση 30 λεπτών στους -80 C καταβυθίστηκε το DNA, το οποίο αφού εκπλύθηκε με αιθανόλη 70% επαναιωρήθηκε σε 500μl TE pH8. Η καθαρότητα και η συγκέντρωσή του υπολογίστηκαν φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε με βάση τη σχέση: οπτική πυκνότητα (O.D.₂₆₀)=1 αντιστοιχεί σε 50 μg δίκλωνου DNA ανά ml διαλύματος. Η καθαρότητα του διαλύματος DNA προσδιορίστηκε από το λόγο O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ και θεωρήθηκε καθαρό όταν η τιμή ήταν μεγαλύτερη του 1,6.

2.2 ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΝΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά εντόμων *Spodoptera frugiperda* Sf9 (ATCC, No CRL-1711). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Sf900 II (GIBCO^{BRL}, Life Technologies) με 10% FCS. Στο θρεπτικό υλικό, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με γλουταμίνη 2mM, προστέθηκαν 100 U/ml πενικιλίνης και 100 U/ml στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε κλίβανο 27 C, χωρίς παροχή οξυγόνου.

2.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΕΜΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΙΛΛΟΙΩΝ

Για τη διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο BAC TO BAC Baculovirus Expression Systems, της GIBCO BRL, Life Technologies. Ανασυνδυασμένοι βακιλλοϊοί παράγονται με δύο βήματα: Α) Το προς μελέτη γονίδιο κλωνοποιείται καθοδικά ενός υποκινητή βακιλλοϊού, συνήθως του δυνατού υποκινητή πολυεδρίνης του *A.californica* ιού πολυέδρωσης (AcNPV). Οι φορείς που χρησιμοποιούνται για αυτήν την κλωνοποίηση είναι οι pFASTBAC™. Β) Το προκύπτον πλασμίδιο παρουσιάζεται σε κύτταρα (εντόμων sf9 ή βακτηριακά DH10BAC) που διαθέτουν κυκλικό ιικό γενομικό DNA (βακεμίδιο), και πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός *in vivo*, έτσι ώστε το ετερόλογο γονίδιο να εισαχθεί στο γένωμα του ιού.

2.3.1 Μετάθεση και δημιουργία ανασυνδυασμένων βακεμιδίων

Η παραγωγή ανασυνδυασμένων βακεμιδίων πραγματοποιήθηκε στα επιδεικτικά κύτταρα DH10BAC του *E.coli*. Τα βακτήρια ανασύρθηκαν από βαθιά κατάψυξη (-80°C) και ξεπάγωσαν ήπια σε πάγο. Έγινε προσθήκη 1ng πλασμιδιακού DNA σε όγκο κυττάρων 200μl και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια έγινε σπορά των βακτηριακών κυττάρων σε προθερμασμένα τρυβλία με θρεπτικό υλικό LA (1% w/v τρυπτόνη, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1% w/v NaCl, 1,5 % άγαρ). Τα τρυβλία περιείχαν 50 μg/ml καναμυκίνη (ανθεκτικότητα από το helper), 10 μg/ml τετρακυκλίνη (ανθεκτικότητα από το βακεμίδιο) και 7 μg/ml γενταμυκίνη (ανθεκτικότητα από τον φορέα), ενώ στην επιφάνειά τους είχαν τοποθετηθεί 50μl 100mM του επαγωγέα IPTG και 30μl 100 μg/μl Xgal. Τα τρυβλία επώαστηκαν ολονυχτίως στους 37 C και για δύο ώρες στους 4 C για την ανάπτυξη χρώματος. Τα βακτήρια με το ανασυνδυασμένο βακεμίδιο έδωσαν άσπρο χρώμα, τα οποίο επιβεβαιώθηκε με νέα επίστρωση σε τρυβλία.

2.3.2 Απομόνωση ανασυνδυασμένου βακεμιδίου

Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου βακεμιδίου από τις λευκές αποικίες έγινε με βάση το πρωτόκολλο BAC TO BAC Baculovirus Expression Systems, της GIBCO BRL, Life Technologies για απομόνωση σε μικρή κλίμακα πλασμιδίων μεγάλου μοριακού βάρους (>100Kb) ως εξής:

Κάθε επιλεγμένη λευκή αποικία αναπτύχθηκε ολονύχτια με ανάδευση στους 37°C σε 2 ml LB θρεπτικό μέσο, με 50 µg/ml καναμυκίνη, 10 µg/ml τετρακυκλίνη, 7 µg/ml γενταμυκίνη. 1,5 ml από κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε (12000rpm, 1 min) και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0,3 ml διαλύματος I (15mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A). Ακολούθησε προσθήκη 0.3 ml διαλύματος II (0.2 N NaOH, 1% SDS) και επώαση του μίγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν έγινε προσθήκη 0.3 ml καυστικού νατρίου (pH5,5) και επώαση σε πάγο για 5 λεπτά. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (12000rpm, 10 min) και στο υπερκείμενο προστέθηκε σε 0,6 ml απόλυτης ισοπροπανόλης. Το διάλυμα τοποθετήθηκε στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε (12000rpm, 15 min) σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα DNA εκπλύθηκε δύο φορές με 70 % αιθανόλη και διαλύθηκε σε 40µl TE pH8. Με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,5% με βρωμιούχο αιθίδιο 0.5 µg/ml επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη DNA μεγάλου μοριακού βάρους.

Η μετάθεση του προς μελέτη γονιδίου στο DNA του βακεμιδίου, επιβεβαιώθηκε με PCR. Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 5 µl απομονωμένου βακεμιδίου, 4 µl 5ng/ml πρότυπων εκκινητών pUC/M13 (πρόσθιου M13 for και ανάστροφου M13 rev), 1 µl dNTPs 100mM και ρυθμιστικό διάλυμα σε τελικό όγκο 50 µl. Στην αντίδραση προστέθηκε 1 µl πολυμεράσης Expand Long Template Taq (Roche) 2.5 U, που επιτρέπει την ενίσχυση μεγάλου μοριακού βάρους εκμαγείων, μετά από ενεργοποίηση 3 min στους 100 C.

Οι συνθήκες για τη PCR αντίδραση φαίνονται παρακάτω:

Θερμική αποδιάταξη (denaturation): 94°C , (1min)

Πρόσδεση εκκινητών (annealing) : 60°C , (1 min)

Επιμήκυνση αλυσίδων (elagation) : 72°C , (5 min)

Αριθμός θερμικών κύκλων : 25

Τα προϊόντα PCR ηλεκτοφορήθηκαν σε 0,7 % πηκτή αγαρόζης και ελέγχθηκε το μέγεθος τους.

2.3.3 Διαμόλυνση Sf9 κυττάρων με ανασυνδυασμένο βακεμίδιο και δημιουργία ανασυνδυασμένων βακιλλοϊών

Για την διαμόλυνση των Sf9 κυττάρων με το ανασυνδυασμένο βακεμίδιο και την παραγωγή ανασυνδυασμένων βακιλλοϊών, κύτταρα Sf9 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 10 cm (9x10⁵ κύτταρα/τρυβλίο), 24 περίπου ώρες πριν τη διαμόλυνση. Για κάθε φρεάτιο, 5 µl ανασυνδυασμένου βακεμιδίου αραιώθηκαν σε 300 µl θρεπτικού

μέσου χωρίς ορό και αντιβιοτικά. Επίσης 18 μl μείγματος λιπιδίων CELLEFFECTIN Reagent 1mg/ml (GIBCO BRL, Life Technologies) αραιώθηκαν με 300 μl θρεπτικού μέσου χωρίς ορό και αντιβιοτικά. Τα δύο διαλύματα αναμίχθηκαν και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Το μείγμα προστέθηκε στα κύτταρα με 3 ml θρεπτικού μέσου χωρίς ορό και αντιβιοτικά. Το θρεπτικό μέσο αλλάχτηκε μετά από 5 ώρες και προστέθηκε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό αλλά με αντιβιοτικά, και τα κύτταρα επωάστηκαν 72 ώρες στους 27°C. Ακολούθησε συλλογή των ανασυνδυσασμένων σωματιδίων του ιού, από το υπερκείμενο της καλλιέργειας. Για τη δημιουργία αποθέματος ανασυνδυσασμένου ιού, ποσότητα υπερκείμενου των καλλιιεργειών φυγοκεντρήθηκε ήπια (500 g, 5 min) και το υπερκείμενο φυλάχτηκε στους 4°C σε σκοτεινό δοχείο.

2.4 ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.4.1 Ηλεκτοφόρηση πηκτής δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα που περιείχαν τις υπερεκφρασμένες υπό μελέτη πρωτεΐνες hsc70 και hsp70 παρασκευάστηκαν ως εξής: Κύτταρα Sf9 καλλιιεργήθηκαν σε τρυβλία 12 φρεατίων και επιμολύνθηκαν σε διάφορες ποσότητες ανασυνδυσασμένου βακιλλοϊού (5μl, 10μl, 20μl). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με απόξυση σε 24, 72 και 48 ώρες από τη στιγμή της επιμόλυνσης και φυγοκεντρήθηκαν (500g, 5 min). Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 50 μl διαλύματος λύσης (50 mM Tris-HCl pH8.5, 5 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 100 mM KCl, 1mM PMSF, 1% Nonidet P-40). Μετά από ήπια ανάδευση το παρασκεύασμα φυγοκεντήθηκε (10000g, 10 min) για απομάκρυνση των κυτταρικών μεμβρανών. Το υπερκείμενο εκχύλισμα συλλέχθηκε για έλεγχο του περιεχομένου του σε πρωτεΐνη με ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση.

Για την ανοσοαποτύπωση της πρωτεΐνης hsc70 ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Οι πρωτεΐνες των προς εξέταση κυτταρικών εκχυλισμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική 10% SDS-πολυακρυλαμιδίου. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτική τοποθετήθηκε πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2 μm, η οποία προηγουμένως είχε επωαστεί για 10 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς (1,46 gr Tris-HCl, 0,73 gr γλυκίνη, 50 ml μεθανόλη 20%, στα 250 ml). Η μεμβράνη και η πηκτική τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε τέσσερα διηθητικά χαρτιά Whatman 3mm, τα

οποία εμποτίστηκαν με το διάλυμα μεταφοράς, και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στη συσκευή μεταφοράς. Στο σύστημα εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο 15 Volts, για μια ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη μεταφορά της η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα 1x PBS και 5% άπαχο γάλα-Carnation (blocking buffer) για 2 ώρες, για να μπλοκαριστούν οι κενές θέσεις της. Η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα πλύσης (1xPBS, 0,1% Tween) και ακολούθησε επώασή της με το αντίσωμα anti-Hsc70 (rat) σε αραιώση 1:5000 για μια ώρα. Μετά την έκπλυσή της τρεις φορές για πέντε λεπτά με διάλυμα πλύσης, η μεμβράνη επώασθηκε με το δεύτερο αντίσωμα anti rat IgG-AP, σε αραιώση 1:10000 για 45 λεπτά. Ακολούθησε έκπλυσή της με διάλυμα πλύσης και η εμφάνιση των προϊόντων έγινε με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

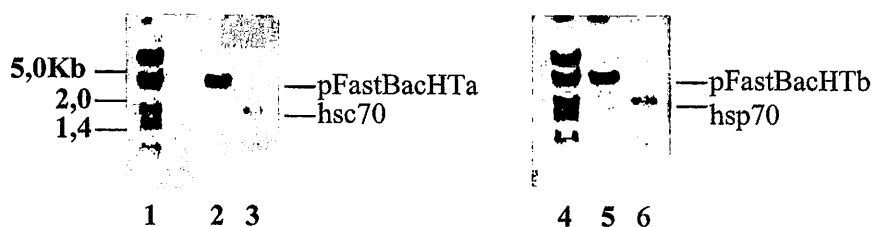
Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς pFASTBAC HT με τους οποίους παράγονται πρωτεΐνες με υπολείμματα ιστιδίνης, ώστε να καθαρίζονται εύκολα με χρωματογραφία αγκιστείας (Ni-NTA αραρόζης), ενώ οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν ήταν οι hsc70 και hsp70.

3.1 Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών

Οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν ήταν οι pFastBacHTa-Huhsc70 και pFastBacHTb-Myhsp70.

Η cDNA αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Huhsc70 απομονώθηκε από τον φορέα pProEX Hta-Huhsc70 με περιοριστική πέψη με τα ένζυμα NcoI και XhoI. Με αντίδραση ανασύνδεσης η αλληλουχία αυτή εισάχθηκε στον φορέα pFastBacHTa, ο οποίος είχε υποστεί περιοριστική πέψη με τα ίδια ένζυμα. Με τον ίδιο τρόπο η αντίστοιχη αλληλουχία για την πρωτεΐνη Myhsp70 απομονώθηκε από τον φορέα pQE30-Myhsp70 με περιοριστική πέψη με τα ένζυμα HindIII και BamHI και εισάχθηκε στον φορέα pFastBacHTb στις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις.

Στην εικόνα 1 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση 1μl από τις αλληλουχίες των φορέων και των ενθεμάτων, μετά τις περιοριστικές πέψεις και την απομόνωσή τους από πηκτή αραρόζης. Η αναλογία τους, που όπως φαίνεται είναι 1/100, ένθεμα/φορέας και για τις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις ανασύνδεσης.



Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση σε 0.8% πηκτή αραρόζης των γονιδίων hsc70 και hsp70 και των πλασμιδίων pFastBacHTa και FastBacHTb μετά από περιοριστικές πέψεις.

Διαδρομές 1,4: λDNA/EcoRI/HindIII ladder

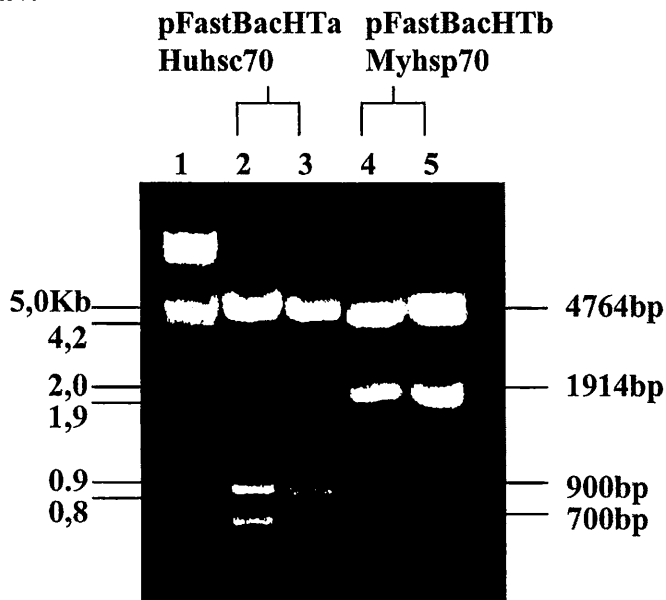
Διαδρομή 2: Πλασμίδιο pFastBacHTa μετά από πέψη με NcoI/XhoI (4778bp)

Διαδρομή 3: Hu hsc70 με πέψη με NcoI/XhoI (1940bp)

Διαδρομή 5: Πλασμίδιο pFastBacHTb μετά από πέψη με BamHI/HindIII (4764bp)

Διαδρομή 6: My hsp70 με πέψη με BamHI/HindIII (1914bp)

Οι ανασυνδυασμένοι φορείς επιλέχθηκαν με μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων MC1061 και ανάπτυξή τους σε τρυβλία με 100μg/ml αμπικιλίνη. Ως αρνητικός μάρτυρας για κάθε κατασκευή χρησιμοποιήθηκε ένα τρυβλίο με MC1061 κύτταρα μετασχηματισμένα μόνο με τον φορέα, στο οποίο δεν αναπτύχθηκαν αποικίες. Το DNA των πλασμιδιακών κατασκευών απομονώθηκε από καλλιέργειες μικρής κλίμακας μετασχηματισμένων κυττάρων και ελέγχθηκε με πέψεις με τα ένζυμα HindIII και BamHI για την pFastBacHTb-Myhsp70 κατασκευή και το HindIII για την pFastBacHTa-Huhsc70 κατασκευή. Από τις καλλιέργειες των θετικών αποικιών χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ως εμβολίασμα για καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και απομονώθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές σε μεγαλύτερη ποσότητα. Έγινε έλεγχος των κατασκευών με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες με την απομόνωση μεγάλης κλίμακας και έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,8% (εικόνα 2). Ο pFastBacHTaHuhsc70 φορέας έχει τρεις περιοριστικές θέσεις για την HindIII και με πέψη παρουσιάζει τρία θραύσματα, μοριακών βαρών 700bp, 900bp και 5100bp. Ο pFastBacHTbMyhsp70 φορέας με πέψη με τα ένζυμα HindIII και BamHI δίνει δύο θραύσματα με μοριακά βάρη 4764bp και 1914bp. Τα μοριακά στην εικόνα 2 συμπίπτουν με τα αναμενόμενα, γεγονός που επιβεβαιώνει την ορθότητα των κατασκευών.



Εικόνα 2: Ηλεκτοφόρηση σε πηκτή 0,8% αγαρόζης πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας μετασχηματισμένων κυττάρων MC1061.

Διαδρομή 1: λDNA/HindIII/EcoRI ladder

Διαδρομές 2,3: Φορέας pFastBacHTaHuhsc70 μετά από πέψη με HindIII

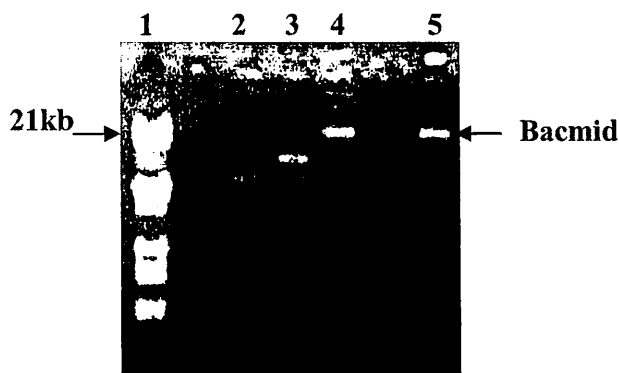
Διαδρομές 4, 5: Φορέας pFastBacHTbMyhsp70 μετά από πέψη με HindIII/BamHI

3.2 Παραγωγή ανασυνδυασμένων βακεμιδίων

Οι πλασμιδιακές κατασκευές pFastBacHTaHuhsc70 και pFastBacHTbMyhsp70 χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματίσουν κύτταρα DH10BAC του *E.coli*. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα, που περιέχουν και το ανασυνδυασμένο βακεμίδιο με τις αλληλουχίες της hsc70 και hsp70, απομονώθηκαν από τρυβλία με αντιβιοτικά καναμυκίνη, γενταμυκίνη και τετρακυκλίνη και επίστρωση από IPTG και Xgal, ως λευκές αποικίες. Ακολούθησε μικρής κλίμακας απομόνωση DNA μεγάλου μοριακού βάρους (ανασυνδυασμένο βακεμίδιο), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2, και η ύπαρξή του επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,5%, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.

Το ανασυνδυασμένο βακεμίδιο σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης αναγνωρίζεται από μια ζώνη με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 23 kb. Στην εικόνα 3 η ζώνη αυτή φαίνεται στις διαδρομές 4, 5, των οποίων το DNA έχει απομονωθεί από λευκές αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων με pFastBacHTaHuhsc70. Στη διαδρομή 3 παρουσιάζεται ως αρνητικός μάρτυρας το DNA που απομονώθηκε από μια μπλε αποικία των ίδιων κυττάρων, στην οποία δεν έχει γίνει ανασυνδυασμός του βακεμιδίου με την αλληλουχία της hsc70. Επίσης ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο DNA μη μετασχηματισμένων κυττάρων (διαδρομή 1).

Για την hsp70 δεν λήφθηκαν λευκές αποικίες στα πλαίσια αυτής της εργασίας.



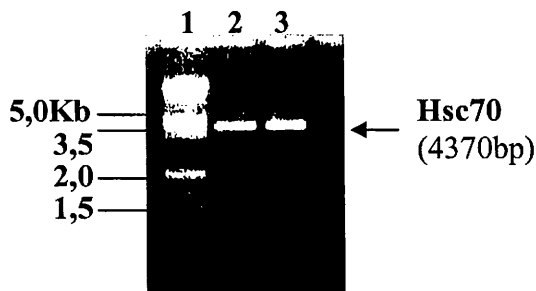
Εικόνα 3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 0,5% αγαρόζης του απομονωμένου σε μικρή κλίμακα βακεμιδίου.

Διαδρομή 1: λDNA/HindIII/EcoRI ladder

Διαδρομές 2, 3: Αρνητικοί μάρτυρες, μη ανασυνδυασμένο βακεμίδιο

Διαδρομή 4, 5: Ανασυνδυασμένο με το DNA της hsc70 βακεμίδιο

Η μετάθεση του προς μελέτη γονιδίου της *hsc70* στο DNA του βακεμιδίου, επιβεβαιώθηκε με PCR όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: PCR ανάλυση του ανασυνδυασμένου με το γονίδιο *hsc70* βακεμιδίου.

Διαδρομή 1: λDNA/HindIII/EcoRI ladder

Διαδρομές 2, 3: Ενισχυμένο τμήμα DNA με το γονίδιο της *Hsc70* (4370bp)

Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης το αναμενόμενο μέγεθος για ένα PCR προϊόν βακεμιδίου που έχει ανασυνδυαστεί με έναν pFastBacHT φορέα είναι 2340bp. Το γονίδιο της *hsc70* έχει μέγεθος 1940bp. Επομένως το αναμενόμενο μέγεθος του PCR προϊόντος του ανασυνδυασμένου βακεμιδίου με την *hsc70* αλληλουχία είναι $2340+1940=4370$ bp, όπως επιβεβαιώνεται στην εικόνα 6.

Το απομονωμένο, ανασυνδυασμένο με την αλληλουχία της *hsc70*, βακεμίδιο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη διαμόλυνση sf9 κυττάρων και την υπερέκφραση της *hsc70* πρωτεΐνης σε αυτά.

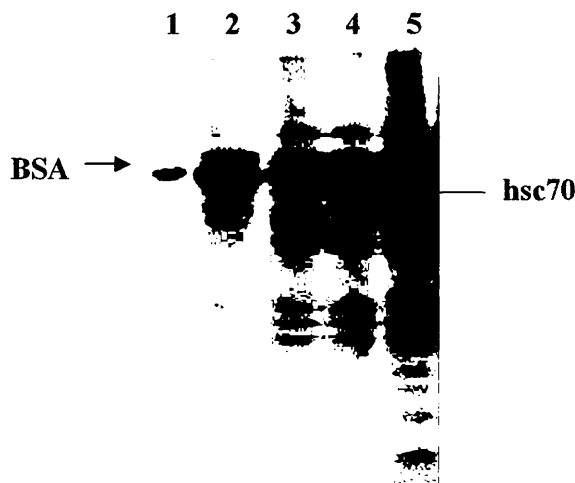
3.3 Παραγωγή ανασυνδυασμένου βακιλλοϊού. Υπερέκφραση της *hsc70* πρωτεΐνης σε sf9 κύτταρα εντόμου.

Το ανασυνδυασμένο βακεμίδιο με την *hsc70* αλληλουχία χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση sf9 κυττάρων εντόμων με CELLEFFECTIN Reagent, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.3, και την συλλογή ανασυνδυασμένων σωματιδίων βακιλλοϊού 72 ώρες μετά την διαμόλυνση. Το απόθεμα αυτό των σωματιδίων ιού χρησιμοποιήθηκε για νέα μόλυνση sf9 κυττάρων και έλεγχο της έκφρασης της *hsc70* πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών και χρώση πρωτεϊνών με coomassie blue.

Για τη διαδικασία αυτή κύτταρα sf9 καλλιεργήθηκαν τρύβλιο 12 θέσεων και μόλυνθηκαν σε τρεις αραιώσεις ανασυνδυασμένου ιού: 5 μl, 10 μl και 20 μl από το

απόθεμα του ιού. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε τρεις χρόνους επώασης: 12, 48 και 72 ώρες, ώστε να βρεθούν οι καλύτερες συνθήκες για την έκφραση της hsc70 πρωτεΐνης.

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.1 και αρχικά ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου 10% και χρώση με coomassie blue. Στις 12 και στις 48 ώρες με την τεχνική αυτή δεν παρατηρήθηκε ζώνη πρωτεΐνης, που να φανερώνει την έκφραση της hsc70 (64 kDa). Στις 72 ώρες όμως, όπως φαίνεται στην εικόνα 5, εμφανίστηκε μια μικρή μπάντα με μοριακό βάρος λίγο μικρότερο των 67 kDa της BSA (διαδρομή 1) και με εμβολίασμα ιού 10μl (διαδρομή 3) και 20μl (διαδρομή 4), που πιθανόν να αντιστοιχεί στην hsc70. Στη διαδρομή 2, όπου το εμβολίασμα ήταν 5 μl, δεν παρουσιάστηκε αντίστοιχη ζώνη, όπως επίσης τέτοια ζώνη δεν εμφανίζεται ούτε στο εκχύλισμα sf9 κυττάρων χωρίς ιό (διαδρομή 5/αρνητικός μάρτυρας).



Εικόνα 5: Έλεγχος έκφρασης της hsc70 μετά από μόλυνση 72 ωρών sf9 κυττάρων με διάφορες ποσότητες ανασυνδυασμένου βακιλλοϊού.

Διαδρομή 1: Διάλυμα BSA πρωτεΐνης (67 kDa)

Διαδρομή 2: Κυτταρικό εκχύλισμα μετά από μόλυνση με 5μl ιού

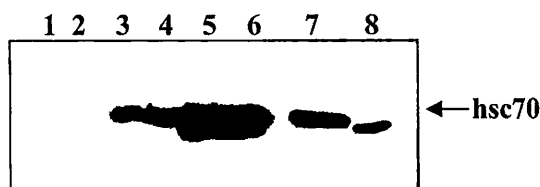
Διαδρομή 3: Κυτταρικό εκχύλισμα μετά από μόλυνση με 10μl ιού

Διαδρομή 4: Κυτταρικό εκχύλισμα μετά από μόλυνση με 20μl ιού

Διαδρομή 5: Κυτταρικό εκχύλισμα sf9 κυττάρων (αρνητικός μάρτυρας)

Επιβεβαίωση της έκφρασης της hsc70 έγινε με ανοσοαποτύπωση (Western blotting). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, με βάση τα αποτελέσματα της χρώσης με coomassie blue, αυτά που εμβολιάστηκαν με 10 και 20

μl ιού αλλά με επώαση 24, 48 και 72 ώρες με τον ιό. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το anti-Hsc70 (rat) και το anti rat IgG-AP, όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.4.1, ενώ στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες κυτταρικών εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6: Έλεγχος της έκφρασης της hsc70 σε κύτταρα sf9 μετά την επιμόλυνση τους με διάφορες ποσότητες ανασυνδυασμένου βακιλλοϊού, με ανοσοαποτύπωση.

Διαδρομές 1,2: Εκχυλίσματα sf9 κυττάρων που υπέστησαν επιμόλυνση με 10μl και 20μl ιού αντίστοιχα, για 24 ώρες.

Διαδρομές 3,4: Εκχυλίσματα sf9 κυττάρων που υπέστησαν επιμόλυνση με 10μl και 20μl ιού αντίστοιχα, για 48 ώρες.

Διαδρομές 5, 6: Εκχυλίσματα sf9 κυττάρων που υπέστησαν επιμόλυνση με 10μl και 20μl ιού αντίστοιχα, για 72 ώρες.

Διαδρομή 7: hsc70 καθαρή πρωτεΐνη (θετικός μάρτυρας).

Διαδρομή 8: Εκχύλισμα CV1 κυττάρων που έχουν ενδογενή hsc70 (θετικός μάρτυρας).

Όπως παρατηρείται στην εικόνα αυτή, στις 24 ώρες (διαδρομές 1, 2) δεν υπάρχει έκφραση της hsc70. Σήμα όμως εμφανίζεται και στις 48 ώρες (διαδρομές 3, 4) και στις 72 ώρες (διαδρομές 5, 6). Η έκφραση της πρωτεΐνης είναι μεγαλύτερη ποσοτικά στις 72 ώρες, ενώ δεν φαίνεται να υπάρχει ποσοτική διαφορά στην έκφραση ανάλογα την ποσότητα του εμβολιάσματος του ιού. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν καθαρισμένη με χρωματογραφία αγγιστείας hsc70 (διαδρομή 7) και εκχύλισμα CV1 κυττάρων (διαδρομή 8), τα οποία διαθέτουν ενδογενή hsc70. Το σήμα της ενδογενούς hsc70 εμφανίζεται λίγο χαμηλότερα, γιατί στο μόριό της δεν έχει τα υπολείμματα ιστιδίνης. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα sf9 κυττάρων, τα οποία δεν έχουν ενδογενή hsc70 και δεν έδωσαν σήμα στην ανοσοαποτύπωση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκφρασης βακιλλοϊού Bac toBac (Gibco BRL, Life Technologies) για την έκφραση των πρωτεϊνών hsc70 και hsp70 σε ευκαριωτικά κύτταρα εντόμου sf9. Με το σύστημα αυτό παράγονται ανασυνδυασμένοι βακιλλοϊοί, αντικαθιστώντας το γονίδιο πολυεδρίνης του ιού με το προς μελέτη γονίδιο με ομόλογο ανασυνδυασμό, οι οποίοι στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για την μόλυνση ευκαριωτικών κυττάρων εντόμων.

Για το σκοπό αυτό αρχικά έγινε κλωνοποίηση των προς μελέτη γονιδίων σε φορείς έκφρασης pFastBacTM. Συγκεκριμένα το γονίδιο της Huhsc70 (1940bp) απομονώθηκε από τον φορέα pProEX Hta-Huhsc70 με περιοριστική πέψη με τα ένζυμα NcoI και XhoI και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις του πλασμιδίου pFastBacHTa. Αντίστοιχα το γονίδιο της Myhsp70 (1914bp) απομονώθηκε με περιοριστική πέψη με τα ένζυμα HindIII και BamHI από τον φορέα pQE30-Myhsp70 και κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις του πλασμιδίου pFastBacHTb. Οι κατασκευές αυτές, pFastBacHTa-Huhsc70 και pFastBacHTb-Myhsp70, χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό MC1061 κυττάρων του E.coli και την απομόνωσή του σε μεγάλη κλίμακά.

Ακολούθησε η δημιουργία ανασυνδυασμένων βακεμιδίων με μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων DH10BAC του E.coli, που περιέχουν το βακεμίδιο, με τις κατασκευές pFastBacHTa-Huhsc70 και pFastBacHTb-Myhsp70. Η επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων έγινε με καλλιέργεια των κυττάρων σε τρυβλία με αντιβιοτικά καναμυκίνη, γενταμυκίνη και τετρακυκλίνη και επίστρωση με IPTG και Xgal. Οι αποικίες που εμφανίστηκαν με άσπρο χρώμα επιλέχθηκαν για την απομόνωση του ανασυνδυασμένου βακεμιδίου. Για την Hsp70 δεν λήφθηκαν λευκές αποικίες στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Από τις λευκές αποικίες που λήφθηκαν μετά το μετασχηματισμό με την pFastBacHTa-Huhsc79 κατασκευή, έγινε απομόνωση του πιθανά ανασυνδυασμένου βακεμιδίου σε μικρή κλίμακα για DNA μεγάλου μοριακού βάρους. Ο έλεγχος για την ύπαρξη DNA μεγάλου μοριακού βάρους (το βακεμίδιο έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 135 kb) έγινε με ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης. Η ύπαρξη επιβεβαιώθηκε με την εμφάνιση μια ζώνης με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 23 kb. Επειδή όμως υπήρξαν λευκές αποικίες που δεν εμφάνισαν αντίστοιχη ζώνη και για επιβεβαίωση της μετάθεσης τους γονιδίου της Hsc70 στο βακεμίδιο έγινε έλεγχος με

PCR. Με την PCR ενισχύθηκε ένα κομμάτι μοριακού βάρους 4370bp που με βάση το πρωτόκολλο αντιστοιχεί σε τμήμα βακεμιδίου που περιέχει το γονίδιο της Hsc70.

Το ανασυνδυασμένο με την αλληλουχία της Hsc70 βακεμίδιο χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων εντόμων sf9 και τη δημιουργία αποθέματος ανασυνδυασμένων ικών σωματιδίων. Στη συνέχεια έγινε μόλυνση sf9 κυττάρων με διάφορες ποσότητες ικών σωματιδίων και συλλογή των κυττάρων σε τρεις χρόνους επώασης, 24, 48 και 72 ώρες, ώστε να ελεγχθούν οι καλύτερες συνθήκες για την έκφραση της πρωτεΐνης. Ο έλεγχος της έκφρασης έγινε με δύο τρόπους: 1) Με ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμίδου των κυτταρικών εκχυλισμάτων και χρώση με coomassie blue. Με τη χρώση αυτή δεν φάνηκε να υπάρχει έκφραση της Hsc70 στις 24 και 48 ώρες, με καμία ποσότητα εμβολιάσματος ιού. Φάνηκε όμως μια μικρή ζώνη με μοριακό βάρος 64 kDa στις 72 ώρες και με εμβολίασμα ιού 10 και 20 μ l από το απόθεμα. 2) Με ανοσοαποτύπωση (Western blotting). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν μετά από επώαση 24, 48 και 72 ωρών με δύο ποσότητες εμβολιάσματος ιού, με βάση τα αποτελέσματα της χρώσης με coomassie blue, 10 και 20 μ l. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το anti-Hsc70 (rat) και το anti rat IgG-AP και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις 24 ώρες δεν έγινε έκφραση της πρωτεΐνης. Στις 48 και 72 ώρες παρουσιάστηκε σήμα, αλλά η έκφραση της Hsc70 στις 72 ώρες ήταν μεγαλύτερη. Το ποσό του αρχικού εμβολιάσματος του ιού δεν φάνηκε να επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης.

Η έκφραση της Hsc70 σε μεγάλα ποσοστά είναι αναμενόμενη, αφού το προς μελέτη γονίδιο κλωνοποιήθηκε καθοδικά του δυνατού υποκινητή της πολυεδρίνης και αντικατέστησε το γονίδιο της πολυεδρίνης στο γένωμα του ιού. Ο βακκιλοϊός ακολουθεί λυτικό κύκλο και η πολυεδρίνη χρησιμοποιείται από τον ιό για την προστασία των σωματιδίων του από πρωτεόλυση, μέσα στον αποσυντιθέμενο ιστό. Η πολυεδρίνη έτσι εκφράζεται στα όψιμα στάδια της μόλυνσης, όπου γίνεται η σύνθεση των ικών σωματιδίων. Η πολυεδρίνη δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ιού σε καλλιεργούμενα κύτταρα.

Η Hsc70, όπως και οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη εκφραστεί με το σύστημα του βακίλλοιου, εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα και μπορεί εύκολα να καθαριστεί με χρωματογραφία αγχιστείας Ni-NTA αγαρόζης, αφού περιέχει υπολείμματα ιστιδίνης, και να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειράματα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ** (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*. 248:850-4.
2. **Bukau B, Horwich AL** (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92:351-66. Review.
3. **Chappell TG, Konforti BB, Schmid SL, Rothman JE.** (1987). The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem*. 262:746-51.
4. **Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL.** (1993) Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst*. 85:570-4.
5. **De Maio A.** (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*. 11:1-12. Review.
6. **Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ.** (1988). Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol*. 8:531-9.
7. **Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C.** (1992). Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer*. 51:613-9.
8. **Gething MJ, Sambrook J** (1992). Protein folding in the cell. *Nature*. 355:33-45. Review.
9. **Hartl FU.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381:571-9. Review
10. **Hightower LE.** (1980). Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J Cell Physiol*. 102:407-27.
11. **Jolly C, Morimoto RI.** (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*. 92:1564-72. Review
12. **Koskinen PJ, Sistonen L, Evan G, Morimoto R, Alitalo K.** (1991). Nuclear colocalization of cellular and viral myc proteins with HSP70 in myc-overexpressing cells. *J Virol*. 65:842-51.
13. **Lindquist S.** (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem*. 55:1151-91.

14. **McCarty JS, Buchberger A, Reinstein J, Bukau B.** (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J Mol Biol.* 249:126-37.
15. **Morimoto RI.** (1991) Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells.* 3:295-301. Review.
16. **Morimoto RI.** (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science.* 259:1409-10. Review.
17. **Morimoto RI.** (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12:3788-96. Review.
18. **Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD.** (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer.* 61:272-9.
19. **Peiham, H.R.B.** (1984). Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO Journal,* 3:30095-3100.
20. **Pilon M, Schekman R.** (1999). Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell.* 97:679-82. Review.
21. **Rittossa F. A** (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Expertia,* 18:571-3.
22. **Santarosa M, Favaro D, Quaia M, Galligioni E.** (1997). Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients. *Eur J Cancer.* 33:873-7.
23. **Sawai ET, Butel JS.** (1989). Association of a cellular heat shock protein with simian virus 40 large T antigen in transformed cells. *J Virol.* 63:3961-73.
24. **Suto R, Srivastava PK.** (1995). A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* 269:1585-8.
25. **Wang C, Lee MR.** (1993). High-level expression of soluble rat hsc70 in *Escherichia coli*: purification and characterization of the cloned enzyme. *Biochem J.* 294 :69-77.
26. **Welch WJ, Feramisco JR.** (1984). Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J Biol Chem.* 259(7):4501-13.
27. **Wu C.** (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:441-69. Review.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**“Απομόνωση πρωτεϊνικού παράγοντα που συμμετέχει στο μηχανισμό
αντοχής του βακτηρίου *Zygomonas mobilis* σε θρεπτικά υλικά με
υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης”**

Επιβλέπουσα: Επικ. Καθηγήτρια Κούκκου Άννα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το βακτήριο *Zymomonas mobilis* είναι αρνητικό κατά Gram και δυνητικά αναερόβιο. Το πρώτο στέλεχος απομονώθηκε πρώτη φορά το 1911 από τους Baker και Hillier, οι οποίοι του απέδωσαν την “ασθένεια του μηλίτη οίνου” (cider sickness), κατά την οποία το βακτήριο αναπτύσσεται στον αποθηκευμένο μηλίτη και παράγει μεγάλες ποσότητες ακαταλδεϋδης, η οποία αλλοιώνει τη γεύση του. Στη συνέχεια απομονώθηκαν και άλλα στελέχη από μηλίτες (Millis 1951), ζύθο (Shimwell 1950), χυμό σακχαροκάλαμου (Gonzales de Lima 1972), χυμό φοινικόδεντρου (Swings et al, 1977), μέλι (Ruiz-Argueso et al. 1975).

Το βακτήριο παρουσιάζει μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω του ότι παρουσιάζει αυξημένη παραγωγικότητα σε αιθανόλη σε σύγκριση με άλλους παραδοσιακούς ζυμομύκητες και γύρω στις 3-5 φορές μεγαλύτερη έναντι του ζυμομύκητα *S. cerevisie* (Rogers et al. 1982, Lawford and Ruggiero 1990, Garro et al. 1995). Επίσης το *Z. mobilis* έναντι των άλλων ζυμομυκήτων έχει το πλεονέκτημα ότι παράγει λιγότερη βιομάζα και δεν απαιτεί οξυγόνο για την ανάπτυξή του (Buchholz et al. 1987). Το *Z. mobilis* χρησιμοποιείται σε βιοαντιδραστήρες συνεχούς ζύμωσης με αποδόσεις μετατροπής 97% της θεωρητικής τιμής και συγκεντρώσεις αιθανόλης μέχρι και 12% (Doelle et al. 1985). Ένα βασικό πλεονέκτημα των κυττάρων του *Z. mobilis* για τη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, είναι η ικανότητά τους να παρουσιάζουν κροκίδωση. Έτσι αποφεύγεται το δαπανηρό στάδιο της φυγοκέντρωσης για το διαχωρισμό των κυττάρων από το υπερκείμενο (Rogers et al. 1982, Pahla et al. 1997).

Το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον *Z. mobilis* δεν περιορίζεται όμως μόνο στην παραγωγή αιθανόλης. Χρησιμοποιείται επίσης στην παραγωγή οπανοειδών, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ενώσεις για την παρασκευή φαρμάκων. Τα οπανοειδή αποτελούν βασικό συστατικό της λιπιδικής μεμβράνης των κυττάρων του βακτηρίου (Rohmer et al. 1979). Επίσης έχει αναφερθεί η παραγωγή ενώσεων υψηλής αξίας κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου σε χυμούς αγροτικών προϊόντων (Kolios et al. 1989). Τέλος το *Z. mobilis* χρησιμοποιείται και για τη συνεχή παραγωγή γλυκονικού οξέος και σορβιτόλης (Ro and Kim 1991, Wisbeck et al. 1997).

Το κύριο μειονέκτημα του *Z. mobilis* ως εργαλείο βιοτεχνολογίας είναι ότι αναπτύσσεται σε περιορισμένο αριθμό υποστρωμάτων. Το μειονέκτημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση της γενετικής μηχανικής, για την έκφραση

ετερόλογων γονιδίων στο βακτήριο, και με μεταλλαξιγένεση, για την δημιουργία νέων στελεχών που δεν θα έχουν τους περιορισμούς του φυσικού στελέχους.

Το *Z. mobilis* καταβολίζει μόνο γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη χρησιμοποιώντας τη γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff, παράγοντας αιθανόλη και CO₂. Καμία άλλη πηγή άνθρακα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το βακτήριο (Conway 1992).

Για τον καταβολισμό της σακχαρόζης το βακτήριο χρησιμοποιεί τρία ένζυμα, : 1) μια εξωκυτταρική λεβανσακχαράση (LevU ή SacB), η οποία καταλύει την παραγωγή λεβάνης (πολυμερή φρουκτόζης) και γλυκόζης 2) μια εξωκυτταρική ινβερτάση (InvB ή SacC), η οποία καταλύει την παραγωγή γλυκόζης και φρουκτόζης και 3) μια ενδοκυτταρική ινβερτάση (InvA ή SacA), της οποίας ο ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί (Park et al. 1983, Viikari 1984, Preziosi et al. 1990, Yanasse et al. 1992). Με τα ένζυμα αυτά το βακτήριο μετατρέπει τη σακχαρόζη σε γλυκόζη, φρουκτόζη, ενώ μέσω αυτής της διαδικασίας παράγονται και κάποια παραπροϊόντα Ένα τέτοιο παραπροϊόν είναι η λεβάνη, ενώ όταν το θρεπτικό μέσο είναι σακχαρόζη ή μίγμα γλυκόζης-φρουκτόζης, παράγεται σορβιτόλη ως παράγωγο καταβολισμού της φρουκτόζης,. Η σορβιτόλη παράγεται σε ποσοστά πάνω από 11% της αρχικής ποσότητας της σακχαρόζης (Barrow et al. 1984, Viikari 1984, Bringer-Meyer 1985) και μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου με ένα σύστημα ενεργού μεταφοράς και δεν μεταβολίζεται περαιτέρω (Loos et al. 1994).

Για τον καταβολισμό της γλυκόζης το *Z. mobilis* χρησιμοποιεί ένα σύστημα διευκολυνόμενης διάχυσης υψηλής ταχύτητας και χαμηλής συγγένειας, με το οποίο η γλυκόζη μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου ακολουθεί την γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff (Di Marko and Romano 1985). Το γονίδιο του μεταφορέα της γλυκόζης GLF έχει απομονωθεί (Barnell et al. 1992).

Με το ίδιο σύστημα διευκολυνόμενης διάχυσης, μέσω του μεταφορέα GLF, μεταφέρεται και η φρουκτόζη στο εσωτερικό του κυττάρου, για να ακολουθήσει περαιτέρω τη γλυκολυτική πορεία, αλλά ο μεταφορέας δείχνει μια σαφή προτίμηση στη γλυκόζη. Ο μεταφορέας GLF έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει και άλλα σάκχαρα (Di Marko and Romano 1985, Parker 1997).

Μερικά από τα κύρια χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Z. mobilis* είναι η αντοχή του σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, πάνω από 13% w/v (Rogers et al. 1982) και η ανθεκτικότητά του σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Όλα τα στελέχη αναπτύσσονται σε 20% w/v γλυκόζη, ενώ υπάρχουν στελέχη που αναπτύσσονται σε

40% w/v γλυκόζη, αφού περάσουν μια μεγάλη φάση εφησυχασμού (Swings and Delay 1977, Sprenger 1996). Αντίθετα το βακτήριο δεν παρουσιάζει καμία ανθεκτικότητα σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις, που προέρχονται από υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (Swings and Delay 1977). Η ανθεκτικότητα του σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης έχει αποδοθεί στη σύσταση της λιπιδικής μεμβράνης του βακτηρίου, η οποία παρουσιάζει μεγάλη περιεκτικότητα σε σπαναειδή και βαξενικό οξύ, ενώσεις που δρουν ως μεμβρανικοί σταθεροποιητές (Rohmer et al. 1979), ισχυροποιώντας τις δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των λιπιδίων, ώστε να μειώνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης σε μικρά μόρια (Bringer et al. 1985).

Για την μελέτη και την εκμετάλλευση του *Z. mobilis* έχουν δημιουργηθεί διάφορα στελέχη είτε με μεταλλαξιγένεση, είτε με την έκφραση ετερόλογων γονιδίων. Ένα τέτοιο στέλεχος είναι το CU1, το οποίο είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, ενώ αναπτύσσεται σε μέσο με 2% w/v γλυκόζη και παρουσιάζει μειωμένη παραγωγικότητα σε αιθανόλη σε σχέση με το φυσικό στέλεχος (Drainas et al. 1984). Το στέλεχος αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο στην προσπάθεια διευκρίνησης του μηχανισμού ανθεκτικότητας του φυσικού βακτηρίου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Άλλα μεταλλαγμένα στελέχη είναι στελέχη θερμοανθεκτικά (Berthelin et al 1985), ανθεκτικά στο αλάτι και σε χαμηλό pH (Ingram 1984), στελέχη χωρίς δραστικότητα γλυκοκινάσης και φωσφοφρουκτοκινάσης (Di Marko and Romano 1985, Bringer-Meyer et al. 1985), ευαίσθητα στην υπερϊώδη ακτινοβολία (Vartholomatos et al. 1990), ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις οξικού οξέος (Joachimstahl et al. 1998), μεταλλάγματα κροκιδώσης (Doelle and Greenfield 1985). Τα μεταλλαγμένα στελέχη όμως παρουσιάζουν φαινοτυπική αστάθεια.

Η έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο *Z. mobilis* επιτυγχάνεται με βακτηριακή σύζευξη γιατί οι κλασικές μέθοδοι μετασχηματισμού δεν έχουν μεγάλη συχνότητα (Yanase et al. 1986, Okamoto and Nakamura 1991, Lam et al. 1993). Με αυτόν τον τρόπο έχουν δημιουργηθεί στελέχη που αναπτύσσονται σε νέα υποστρώματα όπως μελοβιόζη (Yanase et al. 1990), άμυλο (Brestic et al. 1990), ξυλόζη (Zhang et al. 1995), μαννόζη (Weisser et al. 1996) και αραβινόζη (Deanda et al. 1996). Επίσης με την έκφραση ετερόλογων γονιδίων δημιουργήθηκαν στελέχη που παρήγαγαν νέα προϊόντα, όπως L-αλανίνη (Uhlenbusch et al. 1991), β-καροτένια (Misawa et al. 1991) και πρωτεΐνη παγοπυρήνωσης (Drainas et al. 1995, Varsaki et al. 1998).

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας του βακτηρίου σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Η ανάπτυξή του σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης ή μιγμάτων γλυκόζης και φρουκτόζης έχει αποδοθεί στη συσσώρευση σορβιτόλης, η οποία δημιουργεί μεγάλη οσμωτική πίεση στο εσωτερικό του κυττάρου αντισταθμίζοντας την εξωτερική πίεση (Leigh et al. 1984, Loos et al. 1994). Η συσσώρευση σορβιτόλης όμως, όταν μόνη πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη, είναι πολύ μικρή (Viikari 1984). Επίσης έχει βρεθεί ότι καμία άλλη ουσία δεν παράγεται σε σημαντικές ποσότητες, που να εξισορροπεί την εσωτερική με την εξωτερική οσμωτική πίεση του βακτηριακού κυττάρου (Loos et al. 1994). Μια πιθανή εξήγηση της ανάπτυξης του βακτηρίου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι η γρήγορη εξισορρόπηση της εσωτερικής με την εξωτερική πίεση του κυττάρου με τη γρήγορη μεταφορά της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω του μεταφορέα GLF γλυκόζης (Di Marko and Romano 1985, Struch et al. 1991). In vivo πειράματα όμως έδειξαν ότι η συγκέντρωση γλυκόζης στα κύτταρα είναι πολύ μικρότερη από την εξωτερική (Hermans 1992). Επομένως ο μηχανισμός αυτός είναι ανεξάρτητος από τους μηχανισμούς οσμωρύθμισης, που χρησιμοποιεί το βακτήριο στην περίπτωση που το θρεπτικό υλικό περιέχει φρουκτόζη ή σακχαρόζη, ενώ είναι μάλλον ανεξάρτητος από τη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης του (Douka et al. 1999).

Περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Zymomonas mobilis*, σε θρεπτικά υλικά που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, έδειξε ότι ένας πρωτεϊνικός παράγοντας είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης (Douka et al. 1999). Τα κύτταρα αγρίου τύπου του *Z. mobilis* αναπτύσσονται εκθετικά και παρουσιάζουν μια φάση εφησυχασμού 3 ωρών, όταν μεταφέρονται από θρεπτικό υλικό με 2 % w/v γλυκόζη σε θρεπτικό υλικό με 10% w/v γλυκόζη. Το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 παρουσιάζει μια φάση εφησυχασμού πάνω από 20 ώρες, υπό τις ίδιες συνθήκες. Βρέθηκε ότι το στέλεχος CU1Rif2 αναπτύσσεται σε 10 % γλυκόζη χωρίς περίοδο εφησυχασμού, όταν στο ίδιο θρεπτικό υλικό κύτταρα αγρίου τύπου είχαν επωαστεί για τρεις ώρες και απομακρύνθηκαν στην αρχή της εκθετικής τους φάσης. Η ανάπτυξη του CU1Rif2 σε 10 % γλυκόζη που έχει προεπωαστεί με κύτταρα αγρίου τύπου ανατρέπεται με θέρμανση ή με κατεργασία με πρωτεάσες στο θρεπτικό υλικό. Έτσι προτάθηκε ότι ένας πρωτεϊνικός παράγοντας, ευάλωτος στη θερμοκρασία παράγεται, μέσω κάποιου άγνωστου ρυθμιστικού μηχανισμού, από το φυσικό στέλεχος, και ενεργοποιεί την ανάπτυξη του CU1Rif2 σε θρεπτικά υλικά με 10 %

γλυκόζη. Το σηματοδοτικό μόριο για τη σύνθεση του πρωτεϊνικού παράγοντα είναι η γλυκόζη (Douka et al. 1999).

Βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αναπλήρωση της ανθεκτικότητας του βακτηρίου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, βρίσκονται σε ένα σύμπλεγμα (gene cluster) τεσσάρων κωδικευουσών περιοχών (ORF1-4), οι οποίες είναι πολύ πιθανό να συμμεταγράφονται ως ένα αυτόνομο οπερόνιο. Ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν είναι άγνωστος. Πιθανόν τα γονίδια αυτά να κωδικεύουν πρωτεΐνες, που συμμετέχουν σε μια θεωρητική σηματοδοτική πορεία, με σηματοδοτικό μόριο τη γλυκόζη, και να ρυθμίζουν την παραγωγή ή τη λειτουργία του παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης των κυττάρων του βακτηρίου σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης, ενώ παράλληλα ρυθμίζουν και τη σύνθεση της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξηθεί στο θρεπτικό μέσο. Για τις πρωτεΐνες αυτές δεν έχουν βρεθεί ομολογίες με άλλες πρωτεΐνες (Douka et al. 1999).

Εντοπισμός και απομόνωση του πρωτεϊνικού παράγοντα, που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ανάπτυξης του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, και προσδιορισμός της χημικής του φύσης, θα αποτελούσε ένα σημαντικό βήμα στην διευκρίνιση του παραπάνω ρυθμιστικού μηχανισμού.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η απομόνωση του πρωτεϊνικού παράγοντα, που συμμετέχει στο μηχανισμό ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το φυσικό στέλεχος ATCC10988 του *Z. mobilis*, το οποίο αναπτύσσεται και σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, και το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 (Drainas et al. 1984), το οποίο είναι ευαίσθητο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη (20 µg/ml). Το στέλεχος αυτό αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει 2% w/v γλυκόζη, ενώ δεν αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό μέσο που περιέχει 10 % γλυκόζη. Σε υγρό θρεπτικό μέσο με 10% γλυκόζη παρουσιάζει μια περίοδο εφησυχασμού 22 ωρών.

2.2 Θρεπτικά υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) πλήρες θρεπτικό υλικό για το *Z. mobilis* (Zymo Broth, Z.B.) με περιεκτικότητες 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 0,1% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1% KH_2PO_4 w/v ,0.05% w/v MgSO_4 β) ελάχιστο θρεπτικό υλικό για το *Z. mobilis* με περιεκτικότητες 0,1% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% w/v KH_2PO_4 , 0,1% w/v K_2HPO_4 , 0,05% w/v NaCl . Ως πηγή άνθρακα και στα δύο παραπάνω υποστρώματα προστίθεται γλυκόζη στην επιθυμητή ποσότητα (2% ή 10% w/v). Για την παρασκευή στερεών θρεπτικών υλικών στα παραπάνω υγρά θρεπτικά υλικά προστίθεται και 2% αγαρόζη.

2.3 Ανάπτυξη καλλιέργειών

Οι υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου *Z. mobilis* αναπτύσσονται στους 30 C χωρίς ανάδευση. Μονές αποικίες γίνονται ορατές σε στερεό θρεπτικό υλικό μετά από 3-6 μέρες από τη μέρα του εμβολιασμού των κυττάρων.

2.4 Έλεγχος ύπαρξης του πρωτεϊνικού παράγοντα

Σύμφωνα με ένα προτεινόμενο μοντέλο του παρόντος εργαστηρίου, ο πρωτεϊνικός παράγοντας παράγεται εξωκυττάρια από το φυσικό στέλεχος ATCC10988 και συμμετέχει στον μηχανισμό ανθεκτικότητας του βακτηρίου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Για τον έλεγχο της ύπαρξης του πρωτεϊνικού παράγοντα γίνονται βιολογικά τεστ αναπλήρωσης του μεταλλαγμένου στελέχους CUIRif2, σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης ως εξής:

Σε 3 ml ελάχιστου θρεπτικού υλικού με 10 % γλυκόζη επώζονται κύτταρα αγρίου τύπου ATCC10988 για τρεις ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα απομακρύνονται με φιλτράρισμα, χρησιμοποιώντας φίλτρα πόρων 0,45 μm. Στο φιλτραρισμένο υπερκείμενο εμβολιάζονται 300μl προκαλλιέργειας CUIRif2, η οποία βρίσκεται σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Η ύπαρξη του παράγοντα πιστοποιείται με την ανάπτυξη της καλλιέργειας του μεταλλαγμένου στελέχους, χωρίς τη φάση εφησυχασμού των 22 ωρών. Ως μάρτυρας (control) χρησιμοποιείται μια καλλιέργεια CUIRif2 σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με 10% γλυκόζη και το ίδιο εμβολίασμα. Επίσης για τον έλεγχο της ορθότητας των στελεχών και την σύγκριση της ανάπτυξης χρησιμοποιούνται καλλιέργειες σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο με 2% και 10% γλυκόζη και των δύο στελεχών ATCC10988 και CUIRif2, με την ίδια αναλογία υποστρώματος (3 ml) εμβολιάσματος (300 μl).

2.5 Παραγωγή εξοκυττάρων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (σε μεγάλη κλίμακα)

Για την ποσοτική απομόνωση του πρωτεϊνικού παράγοντα, αναπτύσσονται καλλιέργειες του φυσικού στελέχους ATCC10988, και ο παράγοντας απομονώνεται με επώαση 2 λίτρων ελάχιστου θρεπτικού υλικού με 10% γλυκόζη με κύτταρα αγρίου τύπου, για τρεις ώρες, ως εξής:

Από στερεή καλλιέργεια εμβολιάζονται κύτταρα σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού με 2% γλυκόζη. Μετά από επώαση στους 30 C, γίνεται ανακαλλιέργεια σε 200 ml ελάχιστου θρεπτικού υλικού με 2% γλυκόζη μέχρι πλήρους αναδιπλασιασμού των κυττάρων. Ακολουθεί ανακαλλιέργεια 1 l ελάχιστου θρεπτικού υλικού με 2% γλυκόζη. Τα κύτταρα συλλέγονται, στο τέλος της εκθετικής τους φάσης, με φυγοκέντρηση και προστίθενται σε 2 l ελάχιστου θρεπτικού υλικού με 10% γλυκόζη για τρεις ώρες.

Το θρεπτικό υλικό των 2 λίτρων, με περιεκτικότητα 10% σε γλυκόζη, μετά την επώαση με τα βακτηριακά κύτταρα, φυγοκεντρείται στα 6000 rpm (*Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge, Germany, κεφαλή GSA*) για 20 λεπτά στους 4 C. Το υπερκείμενο φιλτράρεται, με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm, για την απομάκρυνση εναπομείναντων κυττάρων και ακολουθεί διαπίδυση για την απομάκρυνση της περίσσειας γλυκόζης.

2.5.1 Διαπίδυση

Για την απομάκρυνση της περίσσειας γλυκόζης, το υπερκείμενο της καλλιέργειας 2 λίτρων με 10% γλυκόζη, τοποθετείται σε μεμβράνη κυτταρίνης (SERVA 44126, regenerated cellulose, MWSO 12000-19000), η οποία έχει ενεργοποιηθεί προηγουμένως με εμβάπτισή της για 30 λεπτά σε απιονισμένο νερό. Η μεμβράνη με το υπερκείμενο βυθίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM με pH7, και επώάζεται για 24 περίπου ώρες στους 4 C, αφού γίνει αλλαγή του διαλύματος δύο φορές μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα.

2.5.2 Υπερδιήθηση

Μετά τη διαπίδυση το υπερκείμενο των 2 λίτρων τοποθετείται στη μεγάλη συσκευή υπερδιήθησης (Amicon) για να συμπυκνωθεί. Η συσκευή διαθέτει μεμβράνη PM 10 (millipore), η οποία ενεργοποιείται με εμβάπτισή της σε απιονισμένο νερό για μια ώρα. Όταν ο όγκος του υπερκείμενου φτάσει τα 150 ml περίπου, αυτό μεταφέρεται στη μικρή συσκευή υπερδιήθησης (Amicon) και αφού ο όγκος του φτάσει τα 4 ml περίπου, συλλέγεται και φυλάσσεται στους 4 C, για επαναχρησιμοποίηση.

2.6 Χρωματογραφία στήλης ιοντοανταλλαγής DEAE-sepharose CL-6B με διάλυμα έκλουσης αυξανόμενης ιοντικής ισχύος

Για τον εντοπισμό του αναζητούμενου πρωτεϊνικού παράγοντα το συμπύκνωμα του εκχυλίσματος της μεγάλης κλίμακας 2 λίτρων, διαχωρίζεται με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε στήλη DEAE-sepharose (Pharmacia). Με τη μέθοδο αυτή οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες του συμπυκνώματος της μεγάλης κλίμακας προσδένονται στα θετικά φορτισμένα σφαιρίδια σεφαρόζης της στήλης και με αυξανόμενες συγκεντρώσεις άλατος απομονώνονται διάφορα κλάσματα πρωτεϊνών.

Το υλικό της στήλης είναι DEAE-sepharose CL-6B (code no: 17-0710-01) ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα πακεταρίσματος της στήλης είναι Tris-HCl 20mM, pH7,6. Στην στήλη προστίθενται 2 ml από το συμπύκνωμα των 4 ml της υπερδιήθησης. Στη συνέχεια η στήλη πακετάρεται με ροή 4 ml/min και προστίθενται σε αυτήν 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος και συλλέγονται 10 κλάσματα των 2,5 ml ως μάρτυρες (control). Ακολουθεί η προσθήκη 5 ml από κάθε διάλυμα συγκέντρωσης KCl με ροή 2 ml/min και η συλλογή πρωτεϊνικών κλασμάτων 1 ml. Τα διαλύματα

KCl που προστίθενται έχουν συγκεντρώσεις 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM και 300 mM, ενώ συλλέγονται συνολικά 30 κλάσματα του 1 ml.

Για κάθε κλάσμα γίνεται προσδιορισμός της περιεκτικότητας του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της απορρόφησής του στα 280 nm. Επίσης για κάθε κλάσμα αυξανόμενης συγκέντρωσης άλατος γίνεται έλεγχος της ύπαρξης του αναζητούμενου παράγοντα με βιολογικά τεστ (παράγραφος 2.4).

2.7 Ηλεκτροφόρηση πηκτής δωδεκυλοθειικού-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Για τα κλάσματα της χρωματογραφίας, που με τα βιολογικά τεστ δείχνουν ότι αναπληρώνουν το στέλεχος CUIRif2 σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (10%), γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών που περιέχουν, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 12% SDS-PAGE.

Η πηκτή παρασκευάζεται ως εξής: Αρχικά παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (separating buffer) πυκνότητας 12% αναμιγνύονται 4 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου:δισ ακρυλαμιδίου (29:1), 2,5 ml διαλύματος 1,5 M Tris pH8,8, 100 ml 10% SDS, ενώ λίγο πριν την απόχυση του διαλύματος διαχωρισμού στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, προστίθενται 50 ml 10% APS και 20 ml TEMED. Ο συνολικός όγκος του διαλύματος διαχωρισμού είναι 20 ml και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό. Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου ακολουθεί η προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος επιστοιβάσης (stacking). Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με προσθήκη 0,85 ml ακρυλαμιδίου:δισ ακρυλαμιδίου (29:1), 1,3 ml 0,5 M Tris pH6,8, 50 ml 10% SDS, 2,8 ml dd H₂O και λίγο πριν την απόχυσή του στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθενται 20 ml 10% APS και 5 ml TEMED. Το διάλυμα αφήνεται μέχρι να πολυμεριστεί το ακρυλαμίδιο.

Για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running) 1x SDS (72,5 gr γλυκίνη, 7,5 gr SDS και 15 gr Tris base σε 5 lt d H₂O) με το οποίο πληρούται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Από κάθε κλάσμα φορτώνονται στην πηκτή 10 ml και ηλεκτροφορούνται στα 120 volts, ενώ στη συνέχεια η πηκτή υφίσταται χρώση με νιτρικό άργυρο για την εμφάνιση των πρωτεϊνών της.

2.8 Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο (silver staining)

Για την χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της BIO-RAD:

Σταθεροποίηση: Η πηκτή τοποθετείται σε διάλυμα σταθεροποίησης (50% μεθανόλης και 10% οξικού οξέος και 10% συμπυκνωμένου διαλύματος σταθεροποίησης) για 30 λεπτά, ώστε να σταθεροποιηθούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια εκπλένεται δύο φορές με απιονισμένο νερό επί 20 λεπτά κάθε φορά.

Χρώση και ανάπτυξη χρώματος: Για τη χρώση και την εμφάνιση των πρωτεϊνών, η πηκτή εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης και ανάπτυξης, (2,5 ml silver complex solution, 2,5 ml reduction modelator, 2,5 ml development reagent, 17,5 ml H₂O και 25 ml development accelerator solution), μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεΐνες (τουλάχιστον 20 λεπτά).

Τερματισμός της ανάπτυξης χρώματος: Αφού εμφανιστούν οι πρωτεΐνες, η αντίδραση ανάπτυξης χρώματος, σταματά με την προσθήκη διαλύματος 5% οξικού οξέος. Η πηκτή εκπλένεται με νερό για 5 λεπτά και φυλάσσεται.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση του πρωτεϊνικού παράγοντα που συμβάλλει στην ανάπτυξη του *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης σε μεγάλη κλίμακα (2 l).

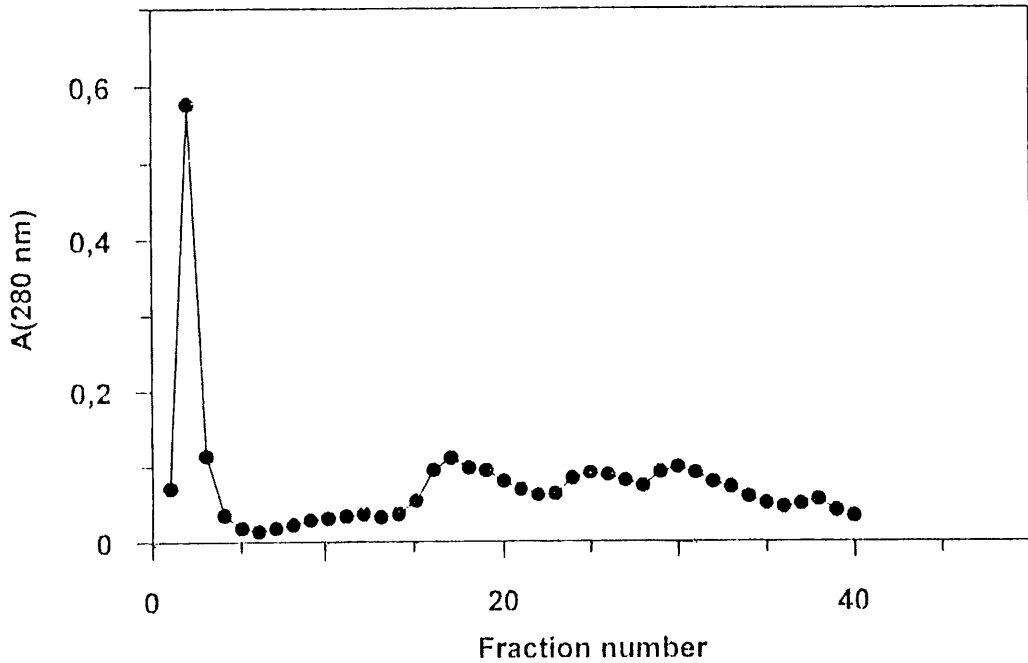
Για την απομόνωση του αναζητούμενου πρωτεϊνικού παράγοντα έγιναν ανακαλλιέργειες του φυσικού στελέχους ATCC10988 σε θρεπτικά υλικά με 2% γλυκόζη όγκου 10 ml, 200 ml και 1 λίτρο, με εμβολιάσματα κάθε φορά 10% του όγκου κάθε καλλιέργειας, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5. Στη συνέχεια η καλλιέργεια του 1 λίτρου φυγοκεντρήθηκε, υπό στείρες συνθήκες, και τα κύτταρα επωάστηκαν για τρεις ώρες σε 2 λίτρα ελάχιστου θρεπτικού υλικού με 10% γλυκόζη, για την παραγωγή του αναζητούμενου παράγοντα. Στη συνέχεια το επωασμένο με βακτηριακά κύτταρα θρεπτικό υλικό των 2 λίτρων φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο διηθήθηκε, για την απομάκρυνση εναπομεινάντων κυττάρων. Ακολούθησε διαπίδυση του για την απομάκρυνση της περίσσειας γλυκόζης και υπερδιήθηση, μέχρι τελικού όγκου 4 ml, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 2.5.1 και 2.5.2.

Το συμπύκνωμα αυτό αναλύθηκε με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής DEAE-σεφαρόζη (παράγραφος 2.6). 2 ml του συμπυκνώματος προστέθηκαν στη στήλη. Στη συνέχεια προστέθηκαν 25 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα πακεταρίσματος της στήλης για το οποίο λήφθηκαν κλάσματα των 2,5 ml. Ακολούθησε προσθήκη των διαλυμάτων KCl με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος και η λήψη κλασμάτων του ενός ml. Για τον έλεγχο της περιεκτικότητας τους σε πρωτεΐνες έγινε φωτομέτρησή τους στα 280 nm και τα αποτελέσματά της φαίνονται στη εικόνα 1

Για τον έλεγχο της ύπαρξης κλάσματος, που περιέχει τον αναζητούμενο πρωτεϊνικό παράγοντα, έγιναν βιολογικά τεστ με το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2 σε όλα τα κλάσματα. Βρέθηκε ότι τα κλάσματα 24, 25 και το 1 αναπλήρωναν το CU1Rif2 σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης (10%).

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 12% SDS-πολυακρυλαμιδίου 10 μl από κάθε κλάσμα που αναπλήρωνε το μεταλλαγμένο στέλεχος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 2. Στο κλάσμα 25 (διαδρομή 3) παρατηρείται η ύπαρξη μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 18000 dalton, η οποία αντιστοιχεί πιθανότατα στον αναζητούμενο παράγοντα. Για το κλάσμα 24 η αντίστοιχη ζώνη είναι πολύ αχνή, επομένως η πρωτεΐνη είναι πολύ λιγότερη. Στο κλάσμα 1 (διαδρομή 6) διακρίνεται μια ακόμα πιο αχνή ζώνη της πρωτεΐνης αυτής, γεγονός που πρέπει να οφείλεται στο

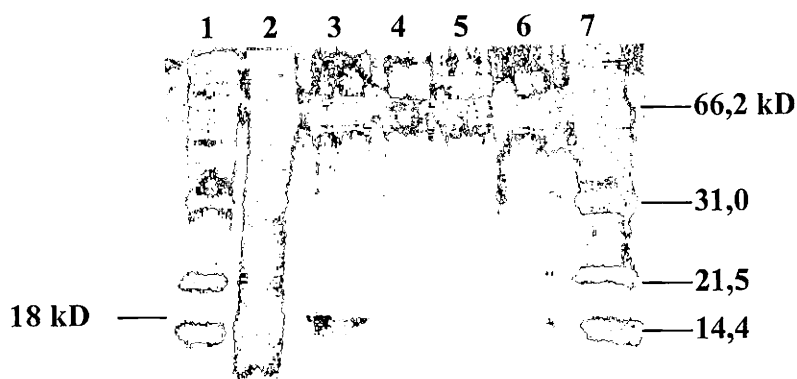
ότι ο πιθανός παράγοντας δεν προσδέθηκε ποσοτικά με τη στήλη και μικρή ποσότητά του παρασύρθηκε από το διάλυμα πακεταρίσματος της στήλης.



Εικόνα 1: Γραφική παράσταση της απορρόφησης στα 280 nm των κλασμάτων της χρωματογραφίας DEAE-sephrose.

Τα 10 πρώτα κλάσματα αντιστοιχούν στο διάλυμα πακεταρίσματος της στήλης, μετά την προσθήκη δείγματος, και τα υπόλοιπα, ανά 5, στα διαλύματα KCl 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM.

Στο κλάσμα 23 (διαδρομή 5), που δεν αναπλήρωσε το CU1Rif2 στα βιολογικά τεστ, δεν παρουσιάζεται τέτοια πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη 18000 dalton απομονώθηκε ποσοτικά από το κλάσμα 25 με συγκέντρωση άλατος 150 mM. Η αναπλήρωση του στελέχους CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και στα κλάσματα 24 και 1, που η περιεκτικότητα στην πρωτεΐνη αυτή είναι ελάχιστη, μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι ο παράγοντας μπορεί να δράσει και σε πολύ μικρές ποσότητες.



Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 12% SDS-πολυακυλαμιδίου των πρωτεϊνικών κλασμάτων, που αναπληρώνουν το στέλεχος CU1Rif2 σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Διαδρομές 1, 7: πρότυπο μοριακών βαρών 161-0304, BIO-RAD

Διαδρομή 2: 10 μl συμπυκνώματος υπερδιήθησης.

Διαδρομή 3: 10 μl κλάσματος 25, που αναπλήρωνε το CU1Rif2. Παρουσιάζεται μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 18 kDa.

Διαδρομές 4, 6: 10 μl κλασμάτων 24 και 1 αντίστοιχα, που αναπλήρωναν το CU1Rif2.

Διαδρομή 5: 10 μl κλάσματος 23, που δεν αναπλήρωνε το CU1Rif2.

3.3 Επαναληπτικά τεστ απομόνωσης του πρωτεϊνικού παράγοντα.

Για τη εγκυρότητα των παραπάνω αποτελεσμάτων, που υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός εξωκυττάριου πρωτεϊνικού παράγοντα 18000 dalton, που συμμετέχει στο μηχανισμό αντοχής του βακτηρίου *Z. mobilis* σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, έγιναν επαναληπτικά τεστ απομόνωσης του παράγοντα αυτού, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.

Στη συνέχεια ακολούθησε έλεγχος της επίδρασης του ποσοστού των εμβολιασμάτων του στελέχους αγρίου τύπου, στην διαδικασία παραγωγής του παράγοντα. Συγκεκριμένα έγινε εμβολιασμός 5%, 10% και 20%, σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό 200 ml με 10% γλυκόζη, του ATCC10988 και έλεγχος της ανάπτυξης των βακτηρίων με φωτομέτρηση, ενώ λήφθηκαν δείγματα 3 ml του επωαζόμενου θρεπτικού υλικού με βακτήρια ανά μισή ώρα. Στο υπερκείμενο των κλασμάτων αυτών έγιναν βιολογικά τεστ και βρέθηκε ότι, με εμβολίασμα 5% η αναπλήρωση του μεταλλαγμένου στελέχους CU1Rif2 επιτυγχάνεται στο κλάσμα των 3.30 ωρών, ενώ με εμβολίασμα 10% τα βιολογικά τεστ βγήκαν θετικά στις 3 ώρες, όπου τα κύτταρα έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται. Επομένως επιβεβαιώθηκε ότι ο αναζητούμενος

πρωτεϊνικός παράγοντας παράγεται από τα κύτταρα του ATCC10988, ύστερα από επώαση τριών ωρών σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό με 10% γλυκόζη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το βάκτηριο *Zymomonas mobilis* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που αναπτύσσεται σε υποστρώματα, που ως μόνη πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται γλυκόζη, φρουκτόζη ή σακχαρόζη. Για τον καταβολισμό αυτών των σακχάρων χρησιμοποιείται η γλυκολυτική πορεία Entner-Doudoroff και παράγεται αιθανόλη και CO₂. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η ανθεκτικότητα του βακτηρίου σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης και μιγμάτων φρουκτόζης και γλυκόζης έχει μελετηθεί διεξοδικά και οφείλεται στη συσσώρευση μιας συμβατής διαλυμένης ουσίας, της σορβιτόλης, στο εσωτερικό του κυττάρου. Έτσι εξισορροπείται η εσωτερική με την εξωτερική πίεση του κυττάρου. Ο μηχανισμός αυτός δεν ισχύει στην περίπτωση υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο γιατί δεν παράγεται καμία ουσία αντίστοιχη της σορβιτόλης στο κύτταρο. Ο μηχανισμός αυτός είναι επομένως ανεξάρτητος από τους μηχανισμούς οσμωρύθμισης του κυττάρου, ενώ έχει βρεθεί ότι είναι ανεξάρτητος από τη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης του κυττάρου.

Στο παρόν εργαστήριο έχει βρεθεί, ότι τα βακτηριακά κύτταρα εκκρίνουν σε θρεπτικό μέσο με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, έναν πρωτεϊνικό παράγοντα. Ο πρωτεϊνικός αυτός παράγοντας είναι πιθανό προϊόν ενός ρυθμιστικού συστήματος, όπου η γλυκόζη είναι το σηματοδοτικό μόριο. Ένα σύμπλεγμα τεσσάρων γονιδίων (ORF1-4), με πιθανή δομή οπερονίου έχει εντοπισθεί. Οι πρωτεΐνες των γονιδίων αυτών έχουν άγνωστη μέχρι σήμερα λειτουργία, αλλά θεωρούνται υπεύθυνες για την αναπλήρωση του ρυθμιστικού αυτού συστήματος, ενώ παράλληλα θεωρούνται ότι ρυθμίζουν και τη σύνθεση του μεταφορέα της γλυκόζης και της γλυκοκινάσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό. (Douka et al., 1999).

Στην παρούσα εργασία, στα πλαίσια διευκρίνησης του παραπάνω μηχανισμού, έγινε προσπάθεια απομόνωσης ενός εξωκυττάρου πρωτεϊνικού παράγοντα, που συμμετέχει στον μηχανισμό ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Z. mobilis*, σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η απομόνωση έγινε από το υπερκείμενο ελάχιστου θρεπτικού υλικού με 10% γλυκόζη 2 λίτρων, που επώαστηκε για τρεις ώρες με το φυσικό στέλεχος ATCC10988. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε, φιλτραρίστηκε, υπέστη διαπίδυση για την απομάκρυνση της γλυκόζης, και συμπυκνώθηκε με υπερδιήθηση. Το συμπύκνωμα υπέστη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής DEAE-σεφαρόζη. Με βιολογικά τεστ με το μεταλλαγμένο στέλεχος CU1Rif2, εντοπίστηκαν τα κλάσματα

της χρωματογραφίας που το αναπλήρωναν. Μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 18000 dalton εντοπίστηκε σε κλάσμα των 150 mM KCl της χρωματογραφίας με ηλεκτοφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου των κλασμάτων που αναπλήρωναν το μεταλλαγμένο στέλεχος. Στα άλλα κλάσματα η πρωτεΐνη αυτή ήταν ελάχιστη γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι η ύπαρξη του παράγοντα δεν είναι ανάγκη να είναι ποσοτική, αλλά η ύπαρξη του και μόνο μπορεί να σηματοδοτεί την έναρξη σειράς αντιδράσεων στο κύτταρο, που να ρυθμίζουν την αντοχή του σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Ακολούθησε μια σειρά από επαναληπτικά πειράματα απομόνωσης του πρωτεϊνικού παράγοντα, που έγιναν σε ελάχιστα θρεπτικά υλικά 200 ml με 10% γλυκόζη, με ελέγχους στους χρόνους επώασης με τα βακτήρια αγρίου τύπου ATCC10988 και της ποσότητας των εμβολιασμάτων τους. Επιβεβαιώθηκε ότι ο παράγοντας εντοπίζεται στις τρεις περίπου ώρες επώασης με βακτηριακά κύτταρα, μόλις δηλαδή αρχίσει η ανάπτυξη των κυττάρων.

Η εύρεση της αλληλουχίας αμινοξέων του διάχυτου πρωτεϊνικού παράγοντα θα δώσει τη δυνατότητα να απομονωθεί το γονίδιο που τον κωδικοποιεί και μπορεί να συμβάλει στη διεκρίνιση του μηχανισμού ανθεκτικότητας στη γλυκόζη.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Afedra A. S. and C. Drainas.** 1987. Expression and stability of a recombinant plasmid in *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 133:27-134.
2. **Barnell WG, Liu J, Hesman TL, O'Neill MC, Conway T.** 1992. The *Zymomonas mobilis* glf, zwf, edd, and glk genes form an operon: localization of the promoter and identification of a conserved sequence in the regulatory region. J Bacteriol. 174(9):2816-23.
3. **Barrow KD, Collins JG, Norton RS, Rogers PL, Smith GM.** 1984. ³¹P nuclear magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. J Biol Chem. 10;259(9):5711-6.
4. **Berthelin B., J. Zucca, J. F. Mescle.** 1985. Selection et analyse de mutants thermotolerants de *Zymomonas mobilis* producteurs d ethanol. Can. J. Microbiol. 31:934-937.
5. **Brestic-Goachet N. P. Gunasekaran, B. Cami and J. Baratti.** 1990. Transfer and expression of a *Bacillus licheniformis* α -amylase gene in *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 153:219-225.
6. **Bringer-Mayer S., T. Hartner, K. Poralla and H. Sahm.** 1985. *Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization. Appl. Microbiol. Biotechnol.
7. **Bringer S., T. Hartner, K. Poralla and H. Sahm.** 1985. Influence of ethanol on the hopanoid content and fatty acid pattern in batch and continuous cultures. Arch. Microbiol. 140:312-316.
8. **Buchholz S. E., M. M. Dooley and D. E. Eveleigh.** 1987. *Zymomonas*-an alcoholic enigma. Trends Biotechnol. 5:199-204.
9. **Conway T.** 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol Rev. 9(1):1-27. Review.
10. **Deanda K, Zhang M, Eddy C, Picataggio S.** 1996. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. Appl Environ Microbiol. 62(12):4465-70.
11. **Di Marko A. A. , A. H. Romano.** 1995. D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Aool. Environ Microbiol. 44:385-418.

12. **Doelle H. W. and P. F. Greenfield.** 1985. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:405-410.
13. **Douka E, Koukkou AI, Vartholomatos G, Frillingos S, Papamichael EM, Drainas C.** 1999 A *Zymomonas mobilis* mutant with delayed growth on high glucose concentrations. *J Bacteriol.* 181(15):4598-604.
14. **Drainas C., M. A. Typas and J. R. Kinghorn.** 1984. A derivative of *Zymomonas mobilis* ATCC10988 with impaired ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 6:37-42.
15. **Drainas C, G. Vartholomatos and N. Panopoulos.** 1995. The ice nucleation gene for *Pseudomonas syringae* as sensitive gene reporter for promoter analysis in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 61:273-277.
16. **Garro O. A., E. Rodriguez, R. Palacios Unda and D. A. S. Callieri.** 1995. Mathematical modeling of the alcoholic fermentation of glucose by *Zymomonas mobilis*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 63:367-373.
17. **Gonzales de Lima, O., I. E. Schumacher and J. M. Dearaujo.** 1972. New observations about the antagonistic effects of *Zymomona mobilis*. *J. Biotechnol.* 1:219-228.
18. **Hermans M.** 1992. Ph.D. thesis. University of Dusseldorf, Dusseldorf, Federal Republic of Germany.
19. **Ingram L. O., V. C. Oarey, M. Dombeck A. S. Holt, W. A. Holt, Y. A. Osman, and S. K. Walia.** 1984. Biochemical and genetic improvement of *Zymomonas mobilis*. *Biomass.* 6:131-143.
20. **Joachimstahl Y., C. Davis and J. R. Broach.** 1998. Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisie* requires signaling through the RAS pathway. *EMBO J.* 17:6942-6951.
21. **Kolios G., M. Lekka, M. Typas and C. Drainas.** 1989. Biocoverion of fruit and sugar beet extracts by *Zymomonas mobilis* to ethanol and other chemicals. *J. Ferm. Bioeng.* 67:363-365.
22. **Lam C. K., P. O. Mullan and D. E. Eveleigh.** 1993. Transformation of *Zymomonas mobilis* by electroporation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:305-308.
23. **Lawford H. G. and A. Ruggiero.** 1990. Production of fuel alcohol by *Zymomonas mobilis*: effect of pH on maintenance and growth-associated metabolism. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12:206-211.

24. **Leigh D. R. K. Scopes and P. L. Rogers.** 1984. A proposed pathway for sorbitol in *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:413-415.
25. **Loos H. , R. Kramer, H. Sahm and G. A. Sprenger.** 1994. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentration of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. J. Bacteriol. 176:7688-7693.
26. **Millis, N. F.** 1951. Some bacterial fermentations of cider. Ph.D. thesis, University of Bristol, Bristol, UK.
27. **Misawa N, Yamano S, Ikenaga H.** 1991. Production of beta-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*. Appl Environ Microbiol. 57(6):1847-9.
28. **Okamoto T., and K. Nakamura.** 1992. Simple and highly efficient transformation method for *Zymomonas mobilis*: Electroporation. Bisci. Biotech. Biochem. 56:833.
29. **Palha M. A. P. F., C. E. Lopes and N. Pereira Jr.** 1997. Ethanol stimulates the flocculation of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 19:499-501.
30. **Park Y. K., Mortatitti M. P. L., Sato H. H.** 1983. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. Bitech. Lett. 5:515-518.
31. **Parker C., N. Peekhaus, X. Zhang and T. Conway.** 1997. kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose co metabolism by *Zymomonas mobilis*. Appl. Environm. Microbiol. 63:3519-3525.
32. **Preziosi L., Michel G. P. F., Baratti J.** 1990. Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*. Can. J. Microbiol. 36:159-163.
33. **Rogers P. L., K. J. Lee, M. L. Skonticki and D. E. Tribe.** 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Adv. Biochem. Eng. 23:37-84.
34. **Ro H. S., and H. S. Kim.** 1991. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. Enzyme Microb. Technol. 13:920-924.
35. **Rohmer M, Bouvier P, Gurisson G.** 1979. Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(2):847-51.

36. **Ruiz-Argueso, T. and Rodriguez-Navarro.** 1975. Microbiology of ripening honey. *Appl. Microbiol.* 30:893-896.
37. **Shimwell, J. L.** 1950. *Saccharomonas*, a proposed new genus for bacteria producing a quantitative alcoholic fermentation of glucose. *J. Int. Brew. London* 56:170-182.
38. **Sprenger G. A.** 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic pathway with some scenic routes. *FEMS Microbiol. Lett.* 145:301-307.
39. **Struch T., B. Neuss, S. Briger-Meyer and H. Sahn.** 1991. Osmotic adjustment *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:518-523.
40. **Swings J, De Ley J.** 1977 The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol Rev.* 41(1):1-46. Review.
41. **Uhlenbusch I, Sahn H, Sprenger GA.** 1991. Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine. *Appl Environ Microbiol.* 57(5):1360-6.
42. **Varsaki A., A. S. Afedra, G. Vartholomatos, G. Tegos and C. Drainas.** 1998. Production of ice nuclei from two recombinant *Zymomonas mobilis* gene of *Pseudomonas syringae*. *Biotechnol. Lett.* 20:647-651.
43. **Vartholomatos G., M. A. Typas, and C. Drainas.** 1993. An ultraviolet-sensitive of *Zymomonas mobilis* affecting the stability of its natural plasmid pZMO2. *PLASMID.* 29:10-18.
44. **Viikari L.** 1984. Formation of lenan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:118-123.
45. **Weisser P, Kramer R, Sprenger GA .** 1996. Expression of the *Escherichia coli* *pmi* gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker. *Appl Environ Microbiol.* 62(11):4155-61.
46. **Wisbeck E., M. M Silveira, J. Ninow and R. Jonas.** 1997. Evaluation of flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. *J. Basic microbial.* 36:445-449.
47. **Yanase H., T. kotani and K. Tonomura.** 1986. Transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid DNA. *Agric. Biol. Chem.* 50:3139-3144.

48. **Yanase H., M. Masuda, T Tamaki and K. Tonomura.** 1990. Expression of the *Escherichia coli* alpha-galactosidase and lactose permease genes in *Zymomonas mobilis*. and raffinose fermentation. J. Ferment. Bioeng. 70:1-6.
49. **Yanase H., M. Iwata, R. Nakahigashi, K. kita,N. Kato and K. Tonomura.** 1992. Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:1332-1337.
50. **Zhang M., C. Eddy, K. Deanda, M. Finkelstein and S. Picataggio.** 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolic pathway in ethanolgenic *Zymomonas mobilis*. Science. 267:240-243.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**“Μελέτη του ρόλου της παραθυμοσίνης στην αναδιοργάνωση της
δομής της χρωματίνης”**

Επίβλεψη:

Θωμάς Παπαμαρκάκη (Επικ. Καθηγήτρια)

Goran Martic (Υποψήφιος διδάκτορας)

Ζωή Καρέτσου (Διδάκτωρ)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα ευκαριωτικά κύτταρα το γενομικό DNA σχηματίζει συμπυκνωμένες δομές με πρωτεΐνες δημιουργώντας το σύμπλεγμα της χρωματίνης. Το βασικό δομικό στοιχείο της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, ενώ ανώτερες δομές αποτελούν το ινίδιο χρωματίνης 30 nm και τα ινίδια χρωμονημάτων. Το νουκλεόσωμα αποτελείται από DNA 147 bp, το οποίο δημιουργεί υπερέλικα 1,7 φορές γύρω από ένα οκταμερές “πυρηνικών” ιστονών (core histones: H2A, H2B, H3, H4). Σε κάθε νουκλεόσωμα υπάρχουν δύο αντίγραφα των πυρηνικών ιστονών (Luger et al., 1997). Κάθε πυρηνική ιστόνη διαθέτει δύο διαφορετικές λειτουργικές περιοχές. Μια για τις αλληλεπιδράσεις ιστόνης-ιστόνης και ιστόνης-DNA μέσα στο νουκλεόσωμα, και τις περιοχές “ουράς” στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο τους (“tail” domains), οι οποίες περιέχουν θέσεις για μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση (Luger et al., 1997) και παίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση της δομής της χρωματίνης (Wolffe, 1998). Επιπλέον η χρωματίνη περιέχει και τις συνδετικές ιστόνες (H1, H5) οι οποίες προσδένονται στο συνδετικό DNA 20 bp μεταξύ των νουκλεοσωμάτων, και το προστατεύουν από πέψη με νουκλεάσες ή από την πρόσδεση άλλων ιστονών σε αυτό. Η δομή των συνδετικών ιστονών διαφέρει από την δομή των πυρηνικών ιστονών, αλλά επίσης διαθέτουν μια κεντρική περιοχή και τις περιοχές “ουράς” (“tail” domains), στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό τους άκρο (Parseghian et al., 2001). Μόνο η κεντρική τους περιοχή συμμετέχει στην πρόσδεσή τους στα νουκλεοσώματα, ενώ οι περιοχές “ουράς”, υφίστανται ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, παίζοντας έτσι έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση της χρωματίνης (Ramakrishanan, 1997).

Έχει αποδειχθεί ότι οι ουρές των πυρηνικών ιστονών, περισσότερο από αυτές των συνδετικών ιστονών, είναι απολύτως απαραίτητες για την τοπική και συνολική συμπύκνωση της χρωματίνης (Carruthers and Hansen, 2000). Οι συνδετικές ιστόνες θεωρείται ότι σταθεροποιούν ανώτερες δομές χρωματίνης, εξουδετερώνοντας το φορτίο του συνδετικού DNA, μέσω του υψηλά θετικά φορτισμένου καρβοξυτελικού άκρου τους (Wolffe and Hayes, 1999). Εκτός από την εξουδετέρωση του φορτίου οι συνδετικές ιστόνες παρουσιάζουν ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και DNA –πρωτεΐνης (Zlatanova et al., 2000).

Οι μηχανισμοί αναδιοργάνωσης της χρωματίνης περιλαμβάνουν μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των ιστονών, όπως ακετυλίωση, φωσφορυλίωση και

μεθυλίωση των αμινοτελικών τους άκρων, και πολύ-ADP-ριβοζυλίωση, οι οποίες τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης, και επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων. Για παράδειγμα η ακετυλίωση των αμινοτελικών άκρων των πυρηνικών ιστονών έχει αποδειχθεί ότι επάγει την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (Lodish et al., 2000), ενώ η παρουσία πολυμερών ADP-ριβόζης στην συνδετική ιστόμη H1 αλλάζει το φορτίο της επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις H1-H1 και H1-DNA, που είναι απαραίτητες για την οργάνωση της χρωματίνης (Poirier et al., 1982). Επίσης έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδράσεις συνδετικών ιστονών με όξινης πρωτεΐνης συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι *in vitro* η H1 αλληλεπιδρά με την προθυμοσίνη α, μια όξινη πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Paramarcaki and Tsolas, 1994).

Στη τελευταία κατηγορία ανήκει και η παραθυμοσίνη, μια μικρή όξινη πρωτεΐνη, με ισοηλεκτρικό σημείο pI 4,15, μοριακού βάρους 11,5 kDa και 101 αμινοξέα, η οποία αλληλεπιδρά με την H1 (Kondili et al., 1996). Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε αρχικά από θύμο αδένος επίμοσος (Haritos et al, 1985), ενώ αργότερα απομονώθηκε και από άλλους ιστούς επίμοσος, καθώς και από ιστούς ανθρώπου, βοός, χοίρου, αιγός, και ποντικού. Είναι μια υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη και παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε διάφορους ιστούς και τύπους κυττάρων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις εντοπίζεται στο συκώτι, στον εγκέφαλο, στα επινεφρίδια και στους λείους μυς. Μικρές ποσότητες υπάρχουν στους σκελετικούς μυς και στο λιπώδη ιστό, ενώ τα ερυθροκύτταρα δεν περιέχουν παραθυμοσίνη. (Brand et al., 1991; Brand et al., 1986).

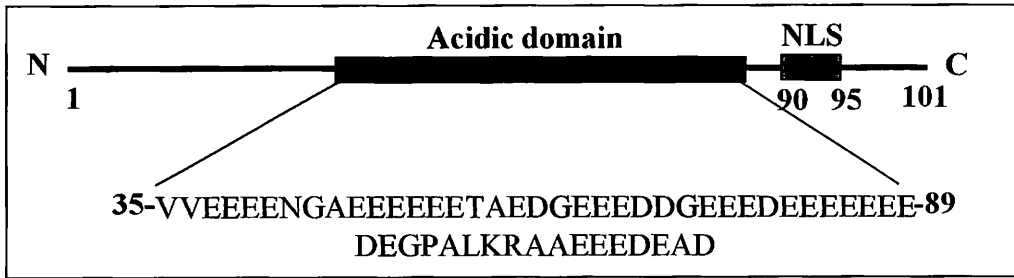
Υποκυτταρική εντόπιση παραθυμοσίνης

Ο εντοπισμός της παραθυμοσίνης μέσα στο κύτταρο παραμένει υπό έρευνα. Στα περισσότερα κύτταρα που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα, ενώ εντοπίστηκε στον πυρήνα ανώριμων κυττάρων της εντερικής βλεννογόνου και των κυττάρων του παγκρεατικού πόρου.(Brand et al., 1991). Επιπλέον έρευνα απέδειξε ότι η ενδοκυττάρια κατανομή της παραθυμοσίνης εξαρτάται από το στάδιο διαφοροποίησης του κυττάρου (Trometer et al., 1996). Έτσι, με βάση την ίδια έρευνα, η πρωτεΐνη εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα αδιαφοροποίητων και έντονα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, όπως τα COS, τα HeLa S3, ωοκύτταρα *Xenopus* (Clinton et al., 1991), ενώ στα αντίστοιχα διαφοροποιημένα κύτταρα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η μετατόπιση της παραθυμοσίνης στον πυρήνα επιτυγχάνεται με ενεργητική μεταφορά, με πιθανή αλληλουχία οδηγό (NLS) το διμερές εξαπεπτίδιο

PKRQKT, που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της (αμινοξέα 90-95) και το τριπεπτίδιο RKR που εντοπίζεται εννιά αμινοξέα ανοδικά του εξαπεπτιδίου (αμινοξέα 78-80) (Trompeter et al., 1996). Πιθανή απάντηση στο ερώτημα γιατί η παραθυμοσίνη εντοπίζεται τελικά στα περισσότερα κύτταρα στο κυτταρόπλασμα, αποτελεί η εκδοχή ότι στα διαφοροποιημένα κύτταρα, η πρωτεΐνη προσδένεται με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμποδίζουν την αλληλεπίδραση της περιοχής πυρηνικού εντοπισμού (NLS) της με τις ιμπορτίνες (Görllich et al., 1994). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η παραθυμοσίνη λόγω του μικρού της μεγέθους μπορεί να μετατοπισθεί στον πυρήνα με παθητική διάχυση, δηλαδή χωρίς τη συμμετοχή του NLS, αλλά με πολύ μικρότερη αποτελεσματικότητα (Trompeter et al., 1996).

Σχέση δομής και λειτουργίας της παραθυμοσίνης

Ανάλυση της σύστασης των αμινοξέων της έδειξε ότι αποτελείται από μεγάλο αριθμό όξινων υπολειμμάτων, ενώ απουσιάζουν η ιστιδίνη, η ισολευκίνη, θειούχα και αρωματικά αμινοξέα (Haritos et al., 1985). Η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης εμπεριέχει κατά πλειοψηφία τα όξινα αμινοξέα ασπαρτικό και γλουταμικό, ενώ σε μικρότερο ποσοστό παρουσιάζονται γλυκίνη, αλανίνη, θρεονίνη και ασπαραγίνη (Frangou-Lazaridis et al. 1988), όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Στο καρβοξυτελικό άκρο αυτής της όξινης περιοχής υπάρχουν δύο ειδικές θέσεις δέσμευσης ιόντων Zn^{2+} (Brand et al., 1988). Είναι γνωστό ότι τέτοιες όξινες περιοχές είναι κοινές σε πυρηνικές πρωτεΐνες, των οποίων ο βιολογικός ρόλος εντοπίζεται στην συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση των νουκλεοσωματίων (Earnshaw, 1987). Επιπλέον σε πειράματα *in vitro*, έχει αποδειχθεί ότι πολυγλουταμικές περιοχές (polyGlu) συναρμολογούν νουκλεοσωμικούς πυρήνες, απουσία παραγόντων που φυσιολογικά συμμετέχουν σε αυτήν τη διαδικασία (assembly factors), σε φυσιολογική ιονική ισχύ, οργανώνοντας τις ιστόνες σε οκταμερή και μεταφέροντας τες στο DNA (Stein et al., 1979). Παρόμοιες όξινες περιοχές παρουσιάζονται σε διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες, όπως η νουκλεοπλασμίνη και η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας 1 (HMG1), η προθυμοσίνη α, ο ρόλος των οποίων συνδέεται με την οργάνωση της χρωματίνης (Earnshaw et al., 1987; Karetsou et al, 1998). Η νουκλεοπλασμίνη για παράδειγμα, διευκολύνει τη μεταφορά των ιστονών στο DNA, κατά τη διαδικασία σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων (Earnshaw et al., 1980) και διευκολύνει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στο νουκλεοσωμικό DNA σε ωοκύτταρα *Xenopus* (Chen et al., 1980).



Σχήμα 1: Δομή της παραθυμοσίνης

Επίσης έχει αποδειχθεί ότι και η παραθυμοσίνη συνδέεται με την ιστόνη H1 (Kondili et al., 1996). Η ιστόνη H1 είναι υπεύθυνη για την οργάνωση των ανώτερων δομών της χρωματίνης και επηρεάζει την *in vitro* αντιγραφή του DNA και της χρωματίνης (Halmer et al., 1995). Έτσι δημιουργούνται ερωτήματα για τη συμμετοχή της παραθυμοσίνης σε μηχανισμούς αναδιοργάνωσης της χρωματίνης.

Βιολογική δράση παραθυμοσίνης

Η βιολογική λειτουργία της παραθυμοσίνης παραμένει αδιευκρίνιστη. Αρχικά προτάθηκαν διάφορες λειτουργίες που σχετίζονται με τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της, όπως ανοσολογική δράση (Haritos et al., 1985). Αργότερα μελέτες έδειξαν ότι απενεργοποιεί αντιστρεπτά την φωσφοφρουκτοκινάση (Brand et al., 1986). Επίσης έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με διάφορα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Τέτοια ένζυμα που βρέθηκαν να προσδέονται *in vitro* με την παραθυμοσίνη, μέσω των περιοχών πρόσδεσης Zn^{2+} , είναι τα γλυκολυτικά ένζυμα εξοκινάση, γλυκοκινάση, φωσφοφρουκτοκινάση-1 και L πυροσταφυλική κινάση, το ένζυμο γλυκονογέννεσης 1,6-διφωσφορική φωσφατάση της φρουκτόζης, τα ένζυμα διπλής κατεύθυνσης αλδολάση και γλυκεριναλδευδική-3-φωσφορική δευδρογονάση, και δύο ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις αποχωρισμού από την πορεία της γλυκόλυσης και της γλυκονογέννεσης τη γλύκοζο-6-P αφυδρογονάση και τη γλύκερο-3-φωσφορική αφυδρογονάση (Brand et al., 1991).

Ωστόσο σειρά μελετών έδειξε ότι η παραθυμοσίνη μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου (Watts et al., 1990; Clinton et al., 1991; Trompeter et al., 1996) υποδεικνύοντας και έναν πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Ένας ρόλος που προτάθηκε ήταν η σύνδεσή της με συστατικά του πυρήνα, ώστε να επιτυγχάνεται η κατακράτησή της σε αυτόν (Trompeter et al. 1996). Αυτή η μετατόπιση στον πυρήνα σχετίζεται επίσης με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μέτρηση των επιπέδων της παραθυμοσίνης σε καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς έδειξε αυξημένα επίπεδα

στους πρώτους σε σχέση με τους δεύτερους (Trompeter et al., 1996; Brand et al., 1991; Tsitsiloni et al., 1993). Ένας άλλος ρόλος που προτάθηκε για την παραθυμοσίνη είναι η πιθανή συμμετοχή της στο μηχανισμό μεταφοράς στο πυρήνα πρωτεϊνών που δεν έχουν NLS. Επίσης η διαφορετική θέση της στο κύτταρο ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης του, υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή της στη διαδικασία αυτή (Trompeter et al., 1996). Η παραθυμοσίνη φαίνεται επιπλέον να σχετίζεται με την πρόμνη αντιγραφή του DNA (Vareli et al., 2000). Τέλος, σε πρόσφατη έρευνα αποδείχθηκε ότι η παραθυμοσίνη αναστέλλει την πρόσδεση του γλυκοκορτικοειδούς υποδοχέα (GR) στον πυρήνα, μέσω της όξινης περιοχής της (poly(Glu)) (Okamoto et al., 2000). Οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και υποκινούν τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Έτσι σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα η παραθυμοσίνη πιθανώς να επιταχύνει τη διαδικασία πολλαπλασιασμού, αναστέλλοντας τη δράση των γλυκοκορτικοειδών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

- *Έλεγχος της πρωτεϊνικής περιοχής της παραθυμοσίνης που συνδέεται με ιστόνη H1 με χρωματογραφία αγκιστείας.*
- *Μελέτη του ρόλου της παραθυμοσίνης στον μηχανισμό αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης.*

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

Κατασκευή συστημάτων έκφρασης της προθυμοσίνης και παραθυμοσίνης.

Οι φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο pGEX-4T-3 και ο Flag-CMV-2 (*Eastman Kodac Company*) για την υπερέκφραση σε κύτταρα θηλαστικών. Η μήτρα του γονιδίου της παραθυμοσίνης ήταν ο pCMV-ParaT ενώ η μήτρα γονιδίου της προθυμοσίνης ήταν ο pFlag-ProTα.

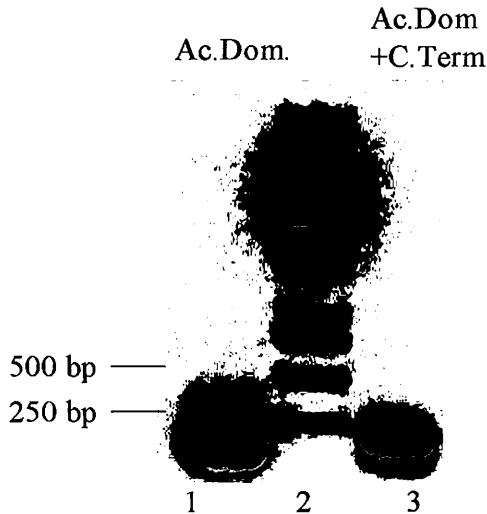
2.1.1 Ενίσχυση των cDNA αλληλουχιών που κωδικοποιούν την όξινη περιοχή και την όξινη περιοχή με το καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου της παραθυμοσίνης. Μέθοδος της αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Για την πολλαπλή αντιγραφή της cDNA αλληλουχίας που περιέχει την κωδικοποιούσα περιοχή σχεδιάστηκαν δύο εκκινητές (primers) εισάγοντας ταυτόχρονα και δύο θέσεις περιοριστικής πέψης για τα ένζυμα *EcoRI* και *XhoI*. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pCMV-ParaT.

Οι συνθήκες για τη PCR αντίδραση φαίνονται παρακάτω:

Θερμική αποδιάταξη (denaturation): 94°C , (45 sec)
 Πρόσδεση εκκινητών (annealing) : 50°C , (60 sec)
 Επιμήκυνση αλυσίδων (elocation) : 68°C , (60 sec+5 sec)
 Αριθμός θερμικών κύκλων : 30

Τα προϊόντα PCR (162 bp για την όξινη περιοχή και 198 bp για την όξινη με την αμινοτελική περιοχή της παραθυμοσίνης) αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1 %), όπως φαίνεται στην σχήμα 2, και έγινε εξαγωγή του DNA από την πηκτική (*QIAGENE, Plasmid Purification Kit*).



Σχήμα 2: Ενίσχυση των κωδικοποιητών περιοχών Para 35-89aa και Para 35-101aa με την τεχνική PCR.

Διαδρομή 1: Para 35-89aa 162 bp

Διαδρομή 2: Para 35-101aa 198 bp

Διαδρομή 3: 1Kb DNA ladder

2.1.2 Μέθοδοι κλωνοποίησης

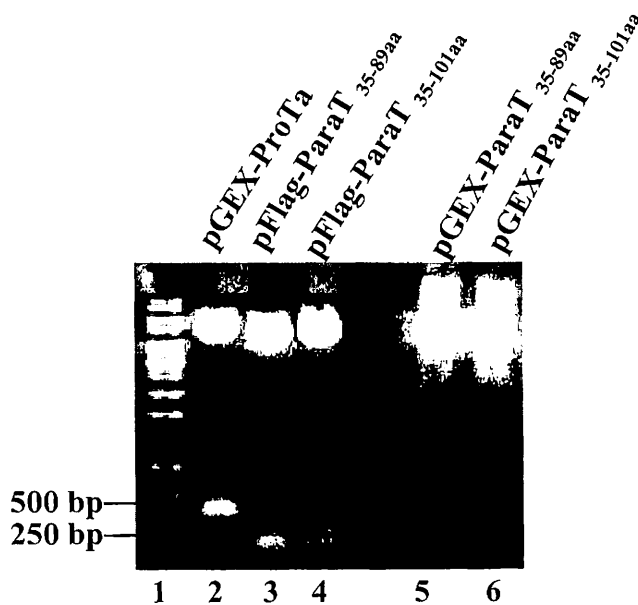
Σκοπός μας ήταν η δημιουργία των φορέων έκφρασης GST-ParaT35-89aa, GST-ParaT35-101aa, GST-ProTα, pFlag-ParaT35-89aa και pFlag-ParaT35-101aa.

Αρχικά έγινε πέψη των προϊόντων DNA του PCR (2.1.1), καθώς και των φορέων κλωνοποίησης pGEX-4T-3 και Flag-CMV-2 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* και *XhoI*. Από το πλασμίδιο pFlag-ProTα έγινε εξαγωγή του γονιδίου ProTα, μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *SmaI*, ενώ με τα αντίστοιχα ένζυμα υπέστη πέψη και ο φορέας pGEX-4T-3. Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 20 μl στους 37°C. Ακολούθησε ηλεκτοφόρηση σε πηκτή 0.8% αγαρόζη και εξαγωγή του DNA (*QIAGEN*, *Plasmid Purification Kit*). Στη συνέχεια έγινε ανασύνδεση (ligation) των τμημάτων με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Για την αντίδραση της ανασύνδεσης χρησιμοποιήθηκαν 10 ng ενθέματος και 20ng φορέα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 10 μl με προσθήκη T4 DNA λιγάσης (1μl, 1u/μl), στους 16°C επί 18 ώρες.

Ακολούθησε μετασχηματισμός των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL-1 Blue του *E.coli* με τους μετασχηματισμένους φορείς: Τα βακτήρια ανασύρθηκαν από βαθιά κατάψυξη (-80°C) και ξεπάγωσαν σε πάγο. Έγινε προσθήκη του ανασυνδυσμένου φορέα (10-20 ng) σε όγκο κυττάρων 80μl, ανάμιξη και επώαση για 30 min στον πάγο. Έπειτα τα βακτήρια υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ για ένα λεπτό στους 42°C και το κυτταρικό εναιώρημα εμβολιάστηκε σε 250 μl θρεπτικό υλικό Luria Bertani (LB: 1% w/v τρυπτόνη, 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1% w/v NaCl). Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση 30 λεπτά στους 37°C και τα βακτηριακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και 75 μg/ml αμικιλίνης. Μετά

από ολονύχτια επώαση αναπτύχθηκαν με τη μορφή αποικιών μόνο τα βακτήρια, τα οποία είχαν μετασχηματιστεί με τον φορέα, ο οποίος φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμικικιλίνη.

Το DNA των φορέων απομονώθηκε από καλλιέργειες μικρής κλίμακας μετασχηματισμένων κυττάρων και ελέγχθηκε με πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* και *XhoI* για τους φορείς με τις αλληλουχίες της παραθυμοσίνης και με *BamHI* και *EcoRI* για τους φορείς της προθυμοσίνης. Από τις καλλιέργειες των θετικών αποικιών χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ως εμβολίασμα για καλλιέργειες μεσαίας κλίμακας, για την απομόνωση μεγαλύτερης ποσότητας DNA. Έγινε έλεγχος με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα, που χρησιμοποιήθηκαν στη μικρή κλίμακα, και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 1% αγαρόζης 5μg πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από καλλιέργειες μεσαίας κλίμακας μετασχηματισμένων κυττάρων XL1Blue. Διαδρομές 1: 1kb DNA ladder. Διαδρομή 2: Θραύσματα pGEX-ProTa πλασμιδίου μετά από πέψη με *EcoRI* και *XhoI*. Διαδρομή 3: pFlag-ParaT35-89aa με πέψη με *EcoRI* και *BamHI*. Διαδρομή 4: pFlag-ParaT35-101aa με πέψη με *EcoRI* και *BamHI*. Διαδρομή 5: pGEX-ParaT35-89aa με πέψη με *EcoRI* και *XhoI*. Διαδρομή 6: pGEX-ParaT35-101aa με πέψη με *EcoRI* και *XhoI*.

Αυτές οι πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων BL21DE του *E.coli* και την επαγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών, καθώς και για τη διαμόλυνση κυττάρων HeLa.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E.coli* σε μικρή και μεσαία κλίμακα (*mini, midi preparation*)

Μετά τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τους ανασυνδυασμένους φορείς, 5-10 αποικίες από τα τρυβλία επιλογής ενοφθαλμίστηκαν, κάθε μια ξεχωριστά, σε 3 ml LB με 75 μg/ml αμπικιλίνη. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση, υπό ανάδευση, στους 37°C. 1.5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωληνάριο erpendorf και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.500 rpm, 5min). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος P₁ (50 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, 100 μg/ml Rnase A) και στο εναιώρημα προστέθηκαν διαδοχικά τα διαλύματα P₂ (200 mM NaOH, 1% SDS) και P₃ (3 M οξικό κάλιο, pH 5.5). Μετά από ήπια ανάδευση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.500 rpm, 5min). Το ίζημα που αποτελείται από το χρωμοσωμικό DNA και τα κυτταρικά υπολείματα απομακρύνθηκε. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούργιο erpendorf. Το πλασμιδιακό DNA καταβυθίστηκε με την προσθήκη 1 ml παγωμένης αιθανόλης (-20°C) στο υπερκείμενο και φυγοκέντρωση (13.500 rpm, 20min). Ακολούθησε πλύση του DNA με 500 μl αιθανόλης 70% v/v, φυγοκέντρωση (13.500 rpm, 10min) και επαναιώρηση του ιζήματος σε 30 μl ddH₂O.

Για την παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα έγινε χρήση του πακέτου υλικών *midi preparation, QIAGENE plasmid purification kit*. Χρησιμοποιήθηκε 1ml από εξακριβωμένα θετική καλλιέργεια μικρής κλίμακας. Το απομονωμένο DNA επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Η καθαρότητα και η συγκέντρωσή του υπολογίστηκαν φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε με βάση τη σχέση: οπτική πυκνότητα (O.D.₂₆₀)=1 αντιστοιχεί σε 50 μg δίκλωνου DNA /ml διαλύματος. Η καθαρότητα του διαλύματος DNA προσδιορίστηκε από το λόγο O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ και θεωρήθηκε καθαρό όταν O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ =1.8.

2.2.ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ. ΠΑΡΟΔΙΚΕΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΕΙΣ (TRANSFECTION).

2.2.1 Κυτταρική σειρά και συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας.

Χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa. Τα κύτταρα αυτά έχουν μορφολογία επιθηλίου και το όνομά τους προέρχεται από ασθενή (Henrietta Lacks, 1951) με καρκίνωμα μήτρας. Καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), στο οποίο προστέθηκε στο 10% ορός εμβρύου βοός (FBS) και το οποίο εμπλουτίστηκε με L-γλουταμίνη σε τελική συγκέντρωση 4 mM. Στο θρεπτικό προστέθηκαν τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37 C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂.

2.2.2 Παροδικές διαμολύνσεις

Για τη διαμόλυνση των κυττάρων HeLa ακολουθήθηκε η μέθοδος του φωσφορικού ασβεστίου:

Τα κύτταρα αναπτύσσονται, μια μέρα πριν τη διαμόλυνση, προσκολλούμενα είτε σε καλυπτρίδες τοποθετημένες σε τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών των 24 θέσεων είτε σε τρυβλία των 6 θέσεων, μέχρι να καλυφθεί το 60-70% της επιφάνειάς τους. Κατόπιν απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται νέο (900 μl για 24 well plate, 2.7 ml για 6 well plate). Ακολουθεί προσθήκη του συμπλέγματος διαμόλυνσης και διασπορά του στα κύτταρα. Το σύμπλεγμα διαμόλυνσης παρασκευάζεται ως εξής: Το DNA αραιώνεται σε αποστειρωμένο νερό και προστίθεται διάλυμα 2.5 M CaCl₂. Το διάλυμα του DNA προστίθεται σε 2x HEPES-buffered saline (HeBS) solution (16.4 g NaCl, 11.2 g HEPES, 0.21g NaHPO₄, 1 lt H₂O) αναμιγνύεται αμέσως για 5 sec. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να κατακρημνιστεί το DNA.

Γίνεται επώαση των κυττάρων με το σύμπλεγμα διαμόλυνσης για 16 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα πλένονται 2 φορές με διάλυμα PBS και προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα συλλέγονται στις 40 περίπου ώρες από τη στιγμή της διαμόλυνσης τους.

Παρακάτω φαίνεται η σύσταση του συμπλέγματος διαμόλυνσης:

	24 well plate(100μl)	6 well plate(300 μl)
DNA	3 μg	6 μg
Sterile H ₂ O	45 μl	135 μl
CaCl ₂ 2.5M	5 μl	15 μl
HeBS 2x	50 μl	150 μl

2.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ GST ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ GST-ParaT. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥΣ ΜΕ ΙΣΤΟΝΕΣ. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΑΓΑΡΟΖΗΣ-ΓΑΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ.

Μια αποδοτική μέθοδος για την υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης και τον μετέπειτα καθαρισμό της, είναι η σύντηξή της με την τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης (GST). Η γενική στρατηγική που ακολουθείται για τον καθαρισμό της είναι η δέσμευση της GST χιμαιρικής πρωτεΐνης σε στήλη ακινητοποιημένης γλουταθειόνης, η απομάκρυνση του μη δεσμευμένου εκχυλίσματος, και τελικά η έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη. Για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης με ιστόνες γίνεται μια επιπλέον επώαση των δεσμευμένων χιμαιρικών πρωτεϊνών με ιστόνες πριν την έκλυσή τους από τη στήλη.

2.3.1 Επαγωγή-Έκφραση χιμαιρικών πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν ήταν οι εξής: GST, GST-ProTa, GST-ParaT, GST-Ac.Dom. (GST-ParaT_{35-89aa}), GST-Ac.Dom.+C.term. (GST-ParaT_{35-101aa}), GST-N.term. (GST-ParaT_{1-34aa}). Οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράστηκαν στα επιδεικτικά κύτταρα BL(21)DE του βακτηρίου E.coli. Τα βακτήρια αυτά μετασχηματίστηκαν, ώστε να φέρουν τα ανασυνδυασμένα pGEX πλασμίδια. Η πρωτεϊνική έκφραση από αυτό το πλασμίδιο υπόκειται του ελέγχου του υποκινητή tac (tac promoter), ο οποίος επάγεται χρησιμοποιώντας το ανάλογο της λακτόζης IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside). Οι επαγόμενες από το IPTG βακτηριακές καλλιέργειες διευκολύνουν την υπερέκφραση των GST χιμαιρικών πρωτεϊνών.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Επώαση καλλιέργειας μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων BL21DE όγκου 400 ml LB με αντιβιοτικό αμπικιλίνη 100μg/μl στους 37 C. Όταν η απορρόφηση έφτασε την τιμή 0,6 ($OD_{600nm}=0,6$) δηλαδή στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 300 μM.
- Ακολούθησε περαιτέρω επώαση στους 37 C για δύο ακόμη ώρες ώστε να υπερεκφραστούν οι GST χμιαϊκές πρωτεΐνες.
- Μετά το πέρας των δύο ωρών τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, στα 6000 rpm (*Sorvall* RC-5B, κεφαλή GSA) για 15 λεπτά στους 4 C.
- Το ίζημα επαναδιαλύθηκε, στον πάγο, σε 7ml διαλύματος (sonication buffer: 50mM Tris PH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % NP40, 0,3 μM aprotin, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin, 2 μM refabloc).
- Ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους σε 3 παλμούς των 10 δευτερολέπτων κάθε φορά (*Branson Digital Sonifier^b 250-D*, USA).
- Το εκχύλισμα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 12000 rpm (*Sorvall*, κεφαλή SS-34) για 30 λεπτά, στους 4 C.
- Το υπερκείμενο εκχύλισμα της φυγοκέντρωσης, το οποίο περιέχει τις χμιαϊκές πρωτεΐνες, συλλέχθηκε σε σωληνάρια και αποθηκεύτηκε στους -80 C.

Οι χμιαϊκές πρωτεΐνες επωάστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης και η έκφρασή τους ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% SDS-πολυακρυλαμίδιου.

2.3.2 Έλεγχος της έκφρασης των χμιαϊκών πρωτεϊνών. Χρωματογραφία αγγιστείας με σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Για τον έλεγχο της έκφρασης των χμιαϊκών πρωτεϊνών, 50 μl και 100 μl από το εκχύλισμα κάθε πρωτεΐνης, επωάστηκε με 20 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης, για μια ώρα στους 4 C. Τα σφαιρίδια στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και από το υπερκείμενο εκχύλισμα συλλέχθηκε δείγμα 30 μl για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Ακολούθησε πλύση τους τρεις φορές με διάλυμα πλύσης (sonication buffer: 100mM NaCl, 50mM Tris pH 8, 0.5% Nonidet P-40, 1mM EDTA, 0.3 μM aprotin, 1 μM pepstatin, 1 μM leupeptin). Από την πρώτη πλύση συλλέχθηκε δείγμα 30 μl για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, ενώ ηλεκτροφορήθηκαν και οι πρωτεΐνες που δεσμεύθηκαν στα σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των χμιαϊκών πρωτεϊνών με ιστόνες, έγινε επώαση τους με σφαιρίδια γλουταθειόνης για μια ώρα στους 4 C. Ακολούθησε

πλύση των σφαιριδίων με διάλυμα πλύσης (150 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 7.6, 1% Nonidet P-40, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.3 μM aprotin, 1 μM pepstatin, 1 μM leupeptin) και επώασή τους με τα διαλύματα των ιστονών (σε συγκεντρώσεις 250 mM και 500 mM NaCl και προσθήκη BSA 2 μg/μl) H1, H2A, H2B, H3, H4 για μια ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια ηλεκτροφορήθηκαν σε 15% SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.

2.4 ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.4.1 Ανοσοφθορισμός

Μετασχηματισμένα κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν προσκολλούμενα σε καλυπτρίδες. Κατόπιν απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και το κυτταρικό ταπήτιο πλύθηκε δύο φορές με PBS 1x. Ακολούθησε σταθεροποίηση των κυττάρων με εμβάπτιση των καλυπτρίδων σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 3% σε PBS επί 20 λεπτά και προσθήκη διαλύματος 20 mM NH₄Cl σε PBS για 10 λεπτά για να εξουδετερωθεί η περίσσεια της παραφορμαλδεΰδης. Μετά από πλύση με PBS οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0,1% Triton X-100 σε PBS, για δύο λεπτά προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να γίνει διαπερατή. Στη συνέχεια, αφού τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS, επώαστηκαν με το διάλυμα δέσμησης (Blocking Buffer: FCS 10% σε PBS) για μια ώρα, με σκοπό την ελαχιστοποίηση των μη ειδικών συνδέσεων. Ακολούθησε προσθήκη αντισώματος σε κατάλληλη αραίωση (anti-Flag με αραίωση 1:1000 ή anti-ParaT με αραίωση 1:100) σε διάλυμα δέσμησης και επώαση για μια ώρα. Το αντίσωμα αφαιρέθηκε και το ταπήτιο πλύθηκε τρεις φορές με PBS. Κατόπιν τα κύτταρα επώαστηκαν επί μια ώρα με αντιορό αιγός, έναντι ανοσοσφαιρίνων κουνελιού ή ποντικού συνδεδεμένο με TRITC ή FITC, σε αραίωση 1:200. Τα κύτταρα ξεπλήθηκαν τρεις φορές με PBS και οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, με τη βοήθεια 5μl διαλύματος Moviol/Darco. Ο φθορισμός παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο NIKON.

2.4.2 Ηλεκτροφόρηση πηκτής δωδεκυλθειϊκού- πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), ενεργοποίηση μεμβράνης και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting).

Το κυτταρικό εκχύλισμα παρασκευάστηκε ως εξής:

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 6 εκ. και μετασχηματίστηκαν με τις μεθόδους του φωσφορικού ασβεστίου (2.2.2). Κατόπιν το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και το ταπήτιο πλύθηκε δύο φορές με PBS. Με προσθήκη 300μl PBS και απόξυση τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο και μεταφέρθηκαν σε eppendorfs, όπου έγινε προσθήκη του διαλύματος λύσης (1% NP 40, 137 mM NaCl, 5mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM β-glycerophosphate, 5 mM NaF, 0.3 μM aporprotin, 1 μM pepstatin, 1 μM leupeptin). Έγινε επώαση στον πάγο για 15 λεπτά, ακολούθησε φυγοκέντρηση (13000 rpm, 1min) στους 4 C και μετρήθηκε η περιεχόμενη πρωτεΐνη στο υπερκείμενο με τη μέθοδο Bradford. Τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους -20 C.

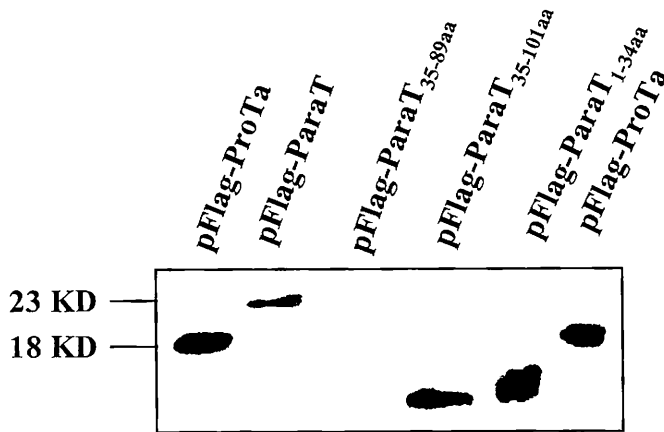
Επειδή οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν ήταν χαμηλού μοριακού βάρους, προηγήθηκε της ανασοαποτύπωσης ενεργοποίηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, με διάμετρο πόρων 0,2 μm (BA-S 83 Reinforced nitrocellulose NC, Schleicher & Shuell, Germany), ώστε οι πρωτεΐνες να συνδέονται ομοιοπολικά με αυτήν, ως εξής: 1,5 ml διβινυλσουλφόνης προστέθηκαν σε 3 ml διμέθυλφορμαμίδιου. Το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε 25 ml NaHCO₃/Na₂CO₃ pH 10,5. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης σε αυτό το διάλυμα, για μια ώρα. Στη συνέχεια ξεπλύθηκε με νερό τρεις φορές για 5 λεπτά και επώαστηκε για 30 λεπτά σε διάλυμα 1% αιθυλενοδιαμίνης. Κατόπιν ξεπλύθηκε ξανά τρεις φορές με νερό και επώαστηκε για 15 λεπτά σε διάλυμα 1% v/v γλουταραλδεΰδης σε 0,5M NaHCO₃/Na₂CO₃ pH 10,5. Ακολούθησε έκπλυσή της με νερό.

Για την ανοσοαποτύπωση της προθυμοσίνης, της παραθυμοσίνης και των πρωτεϊνικών τμημάτων της ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Οι πρωτεΐνες των προς εξέταση κυτταρικών εκχυλισμάτων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική 15% SDS-πολυακρυλαμίδιου. Η πηκτική τοποθετήθηκε πάνω στην ενεργοποιημένη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2 μm. Η μεμβράνη και η πηκτική τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε δύο διηθητικά χαρτιά Whatman 3mm και στη συνέχεια στο ειδικό πλαίσιο της συσκευής μεταφοράς (BioRad). Το όλο σύστημα βυθίστηκε στο διάλυμα μεταφοράς (20mM CH₃COONa pH 4,5) και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο 70 mA, για μια ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη μεταφορά της η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα 1x PBS, 0,1% Tween, 5% γάλα για 12 ώρες, (blocking buffer) για να μπλοκαριστούν οι κενές θέσεις της. Ακολούθησε επώαση με το αντίσωμα anti-Flag (mouse) σε αραιώση 1:2000 για μια ώρα. Μετά την έκπλυση της τρεις φορές για πέντε λεπτά με blocking buffer, επώασθηκε με το δεύτερο

αντίσωμα anti mouse HRP, σε αραιώση 1:5000. Τελικά η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα 1x PBS, 0,1% Tween και η εμφάνιση του προϊόντος έγινε με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Amersham).

Οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν ήταν η pFlag-ParaT και τα θραύσματα της, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η pFlag-ProTα, όπως φαίνεται στο σχήμα 4. Η pFlag-ParaT_{35-89aa} δεν έδωσε σήμα σε αυτό το πείραμα γιατί η ποσότητά της ήταν πολύ μικρή. Η έκφρασή της επιβεβαιώθηκε σε περαιτέρω πειράματα.



Σχήμα 4: Έλεγχος της έκφρασης των χημειοφωταύγειων πρωτεϊνών pFlag-ParaT και των θραυσμάτων της σε HeLa κύτταρα με ανοσοαποτύπωση (western blotting).

2.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται αλληλεπίδραση σπερματικής χρωματίνης με πρωτεΐνες. Ο πυρήνας σπέρματος καθίσταται διαπερατός σε πρωτεΐνες και παρατηρείται η επίδραση τους στο φαινόμενο της αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης. Αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη παρουσιάζει μεγαλύτερο μέγεθος πυρήνα σε σύγκριση με τη συμπυκνωμένη, μετά από χρώση της και παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Matsumoto et al. 1999). Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η παραθυμοσίνη, η SET, η BSA και η GST.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Σε συνολικό όγκο διαλύματος 10 μl προστέθηκαν, 1 μl πυρήνων σπέρματος σε κατάλληλη αραιώση, ώστε να μπορεί να γίνει καταμέτρηση πυρήνων, 1 μl

διαλύματος A (80 mM Hepes pH 7,5, 80 mM KCl, 200 mM sucrose), 1 μ l sucrose 2,3 mM, 1 μ l MgCl₂ 20 mM, 1 μ l McNap (55 μ l H₂O, 3 μ l MgCl₂ 1M, 1 μ l DTT 1M, 30 μ l χλωραμφαινικόλη 1M, 1 μ l ATP 3mM, 1 μ l κινάση χλωραμφαινικόλης) και 5 μ l πρωτεΐνης με περιεκτικότητα 10 μ g.

Ακολούθησε επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου και λήφθηκαν δείγματα 1 μ l σε μια και σε δύο ώρες. Τα δείγματα αυτά αναμείχθηκαν με 1 μ l διαλύματος που περιείχε χρωστική για το DNA (mounting solution: 10 μ g Hoechst, 50% glycerol, 7,4% HCHO σε PBS) και επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Έγινε παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού, λήφθηκαν φωτογραφίες και το μέγεθος των πυρήνων μετρήθηκε με το πρόγραμμα AutocCAD.

2.6 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε δείγματα κυτταρικών εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) ως εξής:

Ποσότητα δείγματος αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 800 μ l. Ακολούθησε προσθήκη 200 μ l αντιδραστηρίου Bio-Rad και επώαση του δείγματος για 5 λεπτά. Η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε στα 595 nm. Η ποσότητα της πρωτεΐνης του δείγματος προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας γνωστές ποσότητες πρωτεΐνης ορού βοός, (BSA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

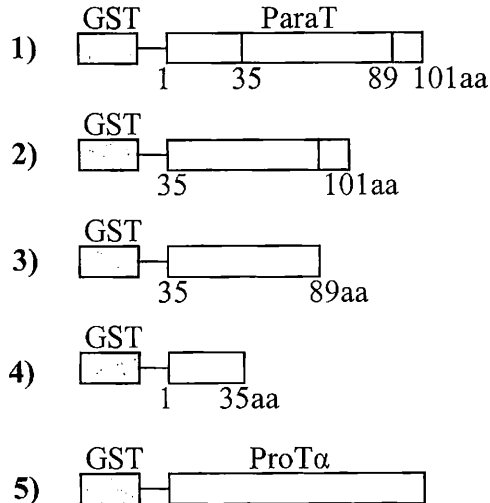
3.1 ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΘΥΜΟΣΙΝΗΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΙΣΤΟΝΗ Η1.

3.1.1 Έκφραση και απομόνωση της GST-ParaT και των πρωτεϊνικών περιοχών της.

Είναι γνωστό ότι η παραθυμοσίνη συνδέεται με την ιστόνη H1 (Kondili et al. 1996). Για να γίνει ο έλεγχος της πρωτεϊνικής περιοχής της παραθυμοσίνης με την οποία συνδέεται με την ιστόνη H1 με χρωματογραφία αγγιστείας, προηγήθηκε η έκφραση των χμαιρικών GST πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν ήταν οι GST, GST-ProTα, GST-ParaT, GST-Ac.Dom. (GST-ParaT₃₅₋₈₉), GST-Ac.Dom.+C.term. (GST-ParaT₃₅₋₁₀₁), GST-N.term. (GST-ParaT₁₋₃₄) (σχήμα 5).

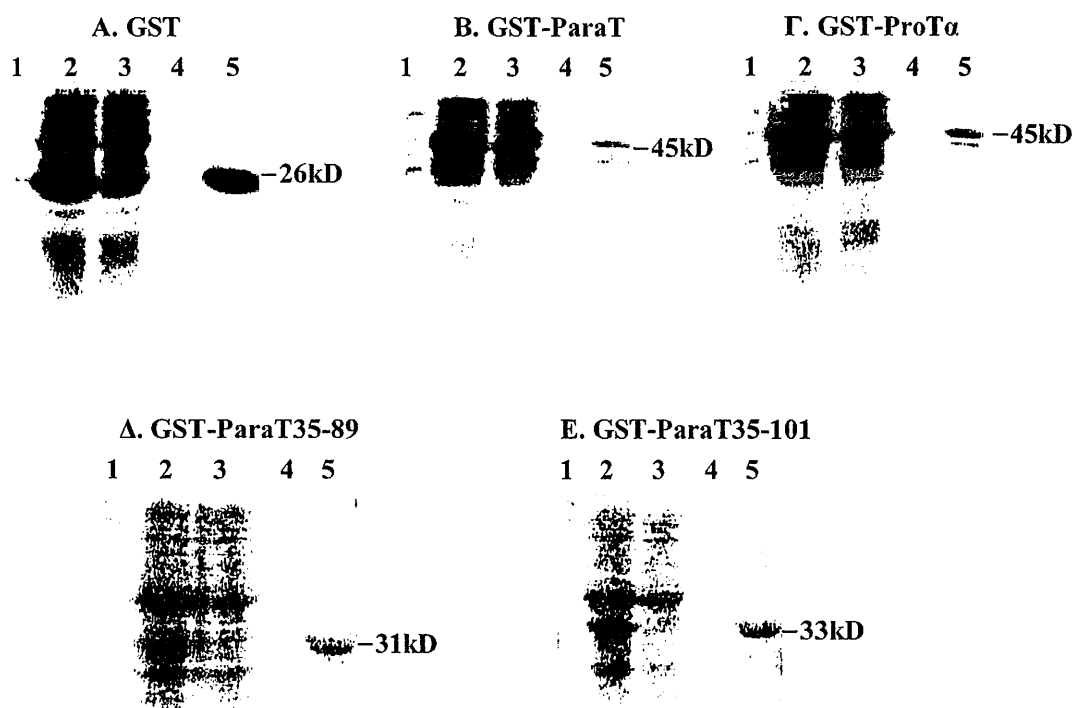
Σχήμα 5: Χμαιρικές GST-πρωτεΐνες



Η έκφρασή τους έγινε με μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα BL21DE, με βάση τα πρωτόκολλα των παραγράφων 2.3.1 και 2.3.2. Οι χμαιρικές αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και προσδένονται, μέσω του πρωτεϊνικού τους τμήματος GST, με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης αραρόζης. Για τον έλεγχο της έκφρασής τους λήφθηκε δείγμα 30 μl από τα εκχύλισμα κάθε πρωτεΐνης για SDS ηλεκτροφόρηση,

ενώ 50 μ l από κάθε εκχύλισμα επώαστηκε με σφαιρίδια γλουταθειόνης για 1 ώρα στους 4 C. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας αυτής, παρουσιάζονται στο σχήμα 6.

Στο σχήμα αυτό φαίνεται ότι έχει επιτευχθεί έκφραση των πρωτεϊνών, αφού όπως πιστοποιείται από τη διαδρομή 5 των φωτογραφιών, κάθε πρωτεΐνη που δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, εμφανίζει το αναμενόμενο μοριακό βάρος στην SDS-ηλεκτροφόρηση.



Σχήμα 6: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 15% SDS πολυακρυλαμιδίου των πρωτεϊνών A. GST, B. GST-ParaT Γ. GST-ProTa Δ. και E. GST-Para (fragments), μετά από χρωματογραφία με σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Διαδρομή 1: 5 μ l prestained marker.

Διαδρομή 2: 30 μ l πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν από την επώασή του με σφαιρίδια γλουταθειόνης

Διαδρομή 3: 30 μ l πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, μετά από την επώασή του με σφαιρίδια γλουταθειόνης

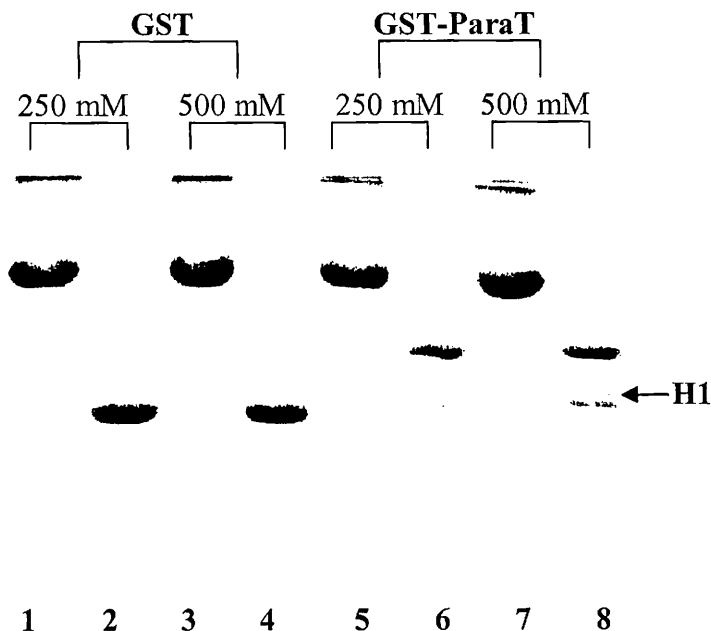
Διαδρομή 4: 30 μ l διαλύματος πλύσης των σφαιριδίων γλουταθειόνης, μετά την επώασή τους με τις πρωτεΐνες.

Διαδρομή 5: Πρωτεΐνη που δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης A. GST 26 kDa, B. GST- ParaT 45 kDa, Γ. GST- ProTa 45 kDa, Δ. και E. GST- ParaT 31 kDa και 33 kDa.

3.1.2 Έλεγχος του πρωτεϊνικού τμήματος με το οποίο η παραθυμοσίνη συνδέεται με την ιστόνη H1.

Για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης του πρωτεϊνικού τμήματος, με το οποίο η παραθυμοσίνη συνδέεται με την H1 ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά εκχυλίσματα των χμαιορικών πρωτεϊνών (παράγραφος 3.1.1) επώαστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης για μια ώρα στους 4 °C, ώστε οι πρωτεΐνες να προσδεθούν σε αυτά, και στη συνέχεια επώαστηκαν με τα διαλύματα των ιστονών, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.3.2. Τα αποτελέσματα ελέγχθησαν με ηλεκτοφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% και χρώση με Coomassie blue.

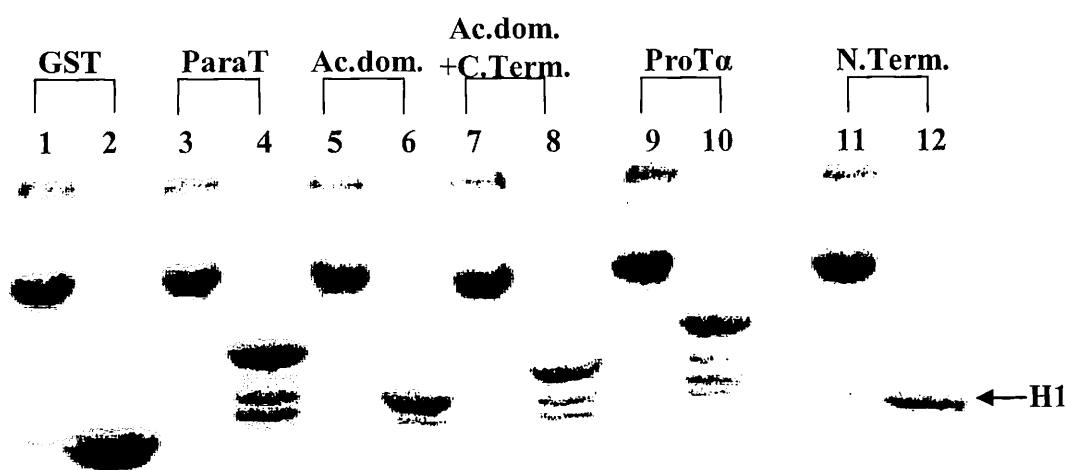
Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με την συνδετική ιστόνη H1, ελέγχθηκε σε δύο συγκεντρώσεις NaCl, 250 mM και 500 mM (Polioudaki et al 2001), ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε αλληλεπίδραση της GST των χμαιορικών πρωτεϊνών με ιστόνες (σχήμα 7).



Σχήμα 7: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% των πρωτεϊνών GST και GST-ParaT, μετά από αλληλεπίδρασή τους με διαλύματα ιστόνης H1 σε συγκεντρώσεις 250 mM NaCl και 500 mM NaCl, με χρωματογραφία αγκιστείας. Διαδρομές 1, 3: 10 μl διαλύματος ιστόνης H1 στις δύο συγκεντρώσεις άλατος, μετά την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη GST. Διαδρομές 2, 4: GST πρωτεΐνη που δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, μετά την αλληλεπίδρασή της με τα δύο διαλύματα ιστόνης H1. Διαδρομές 5, 7: 30 μl διαλύματος ιστόνης H1 στις δύο συγκεντρώσεις άλατος, μετά την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη GST-ParaT. Διαδρομές 6, 8: GST-ParaT που δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, μετά την αλληλεπίδρασή της με H1 στις δύο συγκεντρώσεις NaCl.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν η πρωτεΐνη GST, η οποία δεν αλληλεπιδρά με ιστόνες. Παρατηρείται ότι η GST και στις δύο συγκεντρώσεις άλατος δεν συνδέεται με την H1 (διαδρομές 2, 4), ενώ η ιστόνη παραμένει στο διάλυμα αλληλεπίδρασης (διαδρομές 1, 3). Επίσης η H1 παρουσιάζει σύνδεση με την GST-ParaT και στις δύο συγκεντρώσεις άλατος, με μια πιο ποσοτική σύνδεση στα 500 mM NaCl (διαδρομές 6, 8). Η H1 όμως εμφανίζεται στο διάλυμα μετά την αλληλεπίδραση στα 250 mM (διαδρομή 5), όχι όμως και στο διάλυμα των 500 mM (διαδρομή 8). Επομένως στα 500 mM NaCl η H1 συνδέεται ποσοτικά με την παραθυμοσίνη, χωρίς η GST να επηρεάζει την αλληλεπίδραση αυτή.

Με συγκέντρωση 500 mM NaCl ακολούθησε έλεγχος του πρωτεϊνικού τμήματος, με το οποίο η παραθυμοσίνη συνδέεται με την H1. Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία αγκιστείας με τα χημικά GST πρωτεϊνικά τμήματα της παραθυμοσίνης και επώασή τους με διάλυμα ιστόνης H1 (4 μg/10 μl). Στο σχήμα 8 φαίνονται τα αποτελέσματα της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης.



Σχήμα 8: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 12% SDS-πολυακρυλαμιδίου της GST-ParaT και των πρωτεϊνικών θραυσμάτων της, μετά από αλληλεπίδρασή τους με H1 σε συγκέντρωση 500 mM NaCl.

Διαδρομές 1, 3, 5, 7, 9, 11: 10 μl διαλύματος ιστόνης, μετά την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη.

Διαδρομές 2, 4, 6, 8, 10: Πρωτεΐνη που δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης και έχει αλληλεπιδράσει με την ιστόνη H1.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν η πρωτεΐνη GST, η οποία δεν αλληλεπιδρά με ιστόνες, και η παραθυμοσίνη και η προθυμοσίνη, οι οποίες συνδέονται με την H1. Παρατηρείται ότι στα πρωτεϊνικά τμήματα Ac. Dom. και Ac.Dom.+C. Term. η σύνδεση της ιστόνης H1 είναι ποσοτική (διαδρομές 6, 8), ενώ στα αντίστοιχα διαλύματα ιστόνης δεν εμφανίζεται καθόλου H1 (διαδρομές 5, 7). Για το πρωτεϊνικό θραύσμα N.term. η αλληλεπίδραση με βάση τη διαδρομή 12 δεν είναι σαφής, γιατί η ζώνη της πρωτεΐνης συμπίπτει με της H1. Όμως στο διάλυμα αλληλεπίδρασης παρατηρείται ποσότητα H1 (διαδρομή 11), γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το N.term. δεν συνδέεται ποσοτικά τουλάχιστον με την H1. Επομένως το πρωτεϊνικό τμήμα με το οποίο η παραθυμοσίνη συνδέεται με την ιστόνη H1 είναι το Ac.Dom (ParaT_{35-89aa}).

3.1.3 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της παραθυμοσίνης με της ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4.

Με την συγκέντρωση 500 mM NaCl ακολούθησε έλεγχος της πιθανής αλληλεπίδρασης της παραθυμοσίνης με τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν σύνδεση των ιστόνων H3 και H4 με την παραθυμοσίνη, ενώ δεν παρατηρήθηκε σύνδεση των H2A και H2B με αυτή. Τα πειράματα αυτά χρειάζονται περαιτέρω διευκρίνιση, γιατί οι χρώσεις των ιστονών δεν ήταν ευδιάκριτες.

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΑΡΑΘΥΜΟΣΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΑΠΟΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.

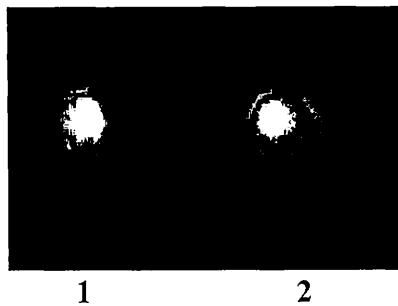
3.2.1 *In vitro* πειράματα αλληλεπίδρασης της παραθυμοσίνης με σπερματική χρωματίνη.

Το φαινόμενο αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης σχετίζεται άμεσα με την αλλαγή στο μέγεθος του πυρήνα στα σπερματικά κύτταρα. Η χρωματίνη στα κύτταρα αυτά είναι εξαιρετικά συμπυκνωμένη και έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για πολλές μελέτες. Για παράδειγμα η νουκλεοπλασμίνη είναι η πρώτη πρωτεΐνη-συνοδός ιστονών που ανακαλύφθηκε (Laskey et al., 1978), ενώ είναι και η πρώτη πρωτεΐνη, η οποία φάνηκε να κατέχει τον ενεργό ρόλο στην αποσυμπύκνωση της σπερματικής

χρωματίνης σε ωοκύτταρα *Xenopus laevis* (Ohsumi and Katagiri, 1991, Philpott, et al., 1991). Επίσης έχει βρεθεί με τη μέθοδο αποσυμπύκνωσης σπερματικής χρωματίνης σε κύτταρα *Xenopus*, ότι η όξινη πρωτεΐνη TAF-I, η οποία εντοπίζεται στα σωματικά κύτταρα και προσδένεται με ιστόνες, συμμετέχει στο φαινόμενο της αποσυμπύκνωσης, μέσω της όξινής του περιοχής (Matsumoto et al., 1999).

Πειράματα αποσυμπύκνωσης σπερματικής χρωματίνης μέσω της παραθυμοσίνης, έδειξαν μια σημαντική αύξηση του μεγέθους των σπερματικών πυρήνων, μετά την επώαση αυτών με την πρωτεΐνη (Martic et al, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

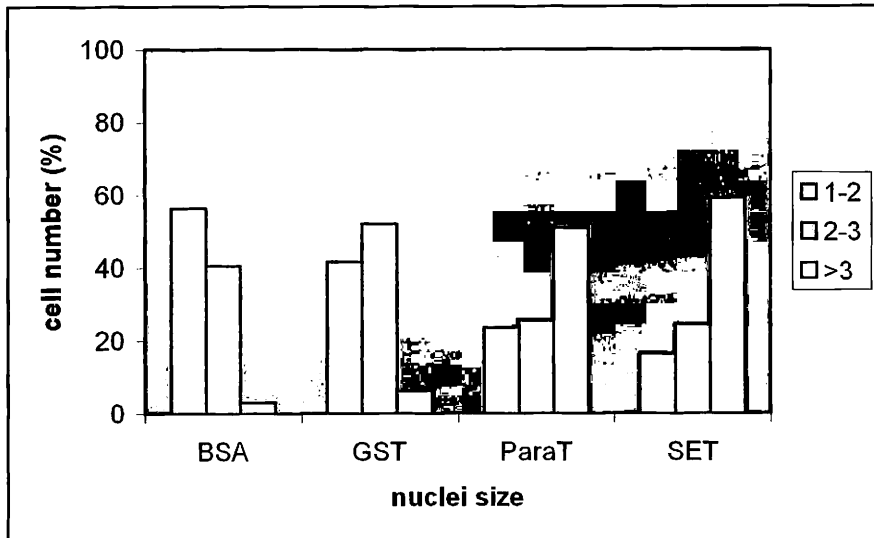
Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, τα επόμενα πειράματα αποσυμπύκνωσης σπερματικής χρωματίνης έγιναν μετά από αλληλεπίδραση 10 μ g των πρωτεϊνών παραθυμοσίνη, SET, BSA και GST με πυρήνες ανθρώπινου σπέρματος. Λήφθηκαν φωτογραφίες σε μικροσκόπιο φθορισμού, στις δύο ώρες επώασης, (σχήμα 9) και μετρήθηκε το μέγεθος των πυρήνων του σπέρματος με το πρόγραμμα AutoCAD. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες BSA και GST, που είναι γνωστό ότι δεν είναι πυρηνικές πρωτεΐνες και δεν συμμετέχουν στο φαινόμενο της αποσυμπύκνωσης.



Σχήμα 9: Πυρήνες ανθρώπινου σπέρματος με συμπυκνωμένη (1) και με αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη μετά από επώαση με την παραθυμοσίνη (2).

Η κατανομή του μεγέθους των πυρήνων για τις πρωτεΐνες αυτές (σχήμα 10), δείχνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πυρήνων έχει μέγεθος μεταξύ 1 έως 3, ενώ πολύ λίγοι είναι οι πυρήνες που παρουσιάζονται διογκωμένοι με μέγεθος >3 (περίπου 4%). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η πυρηνική πρωτεΐνη SET, η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης, και επηρεάζει τη δομή των νουκλεοσωμάτων. Επίσης, η SET έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί ένα πυρηνικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα με ομόλογά της, που προσδένεται στις ιστόνες και έτσι

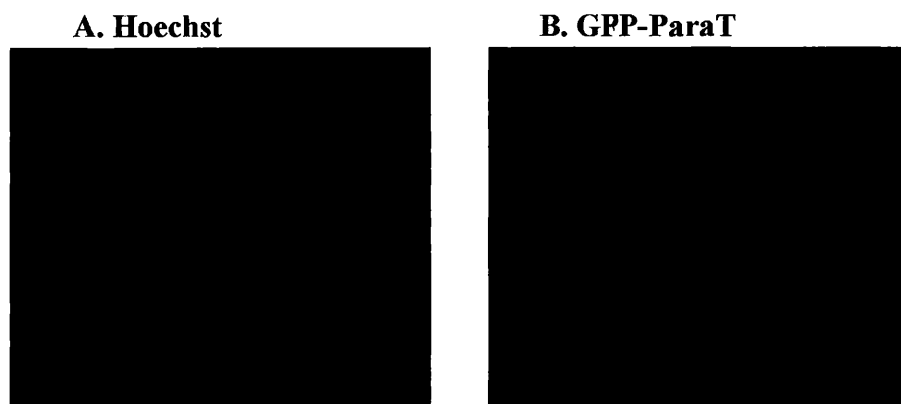
αναστέλλεται η δράση των μεταγραφικών συνενεργοποιητών CBP/p300 και PCAF ως ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (Seo et al. 2002). Με την πρωτεΐνη αυτή οι σπερματικοί πυρήνες παρουσιάζουν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους μέγεθος >3, γεγονός που συνοδεύεται από αποσυμπύκνωση χρωματίνης. Για την παραθυμοσίνη παρατηρείται μια κατανομή παρόμοια με αυτήν της πρωτεΐνης SET. Παρατηρείται ένα ποσοστό 60% περίπου με σπερματικούς πυρήνες με μέγεθος >3. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και η παραθυμοσίνη πιθανώς να εμπλέκεται στο φαινόμενο της αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης.



Σχήμα 10: Κατανομή μεγέθους σπερματικών πυρήνων μετά από αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες BSA, GST, ParaT και SET.

3.2.2 *In vivo* πειράματα με μετασηματισμένα HeLa κύτταρα, που αποδεικνύουν τη συμμετοχή της παραθυμοσίνης στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης.

Παροδικές διαμολύνσεις κυττάρων θηλαστικών με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της παραθυμοσίνης, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή επάγει την διόγκωση των πυρήνων, γεγονός το οποίο υποδηλώνει τη συμμετοχή της στην αποσυμπύκνωση της χρωματινικής δομής (Martic et al, αδημοσίευτα αποτελέσματα) (Σχήμα 11).



Σχήμα 11: A. Πυρηνική χρώση με Hoechst πυρήνων κυττάρων HeLa.

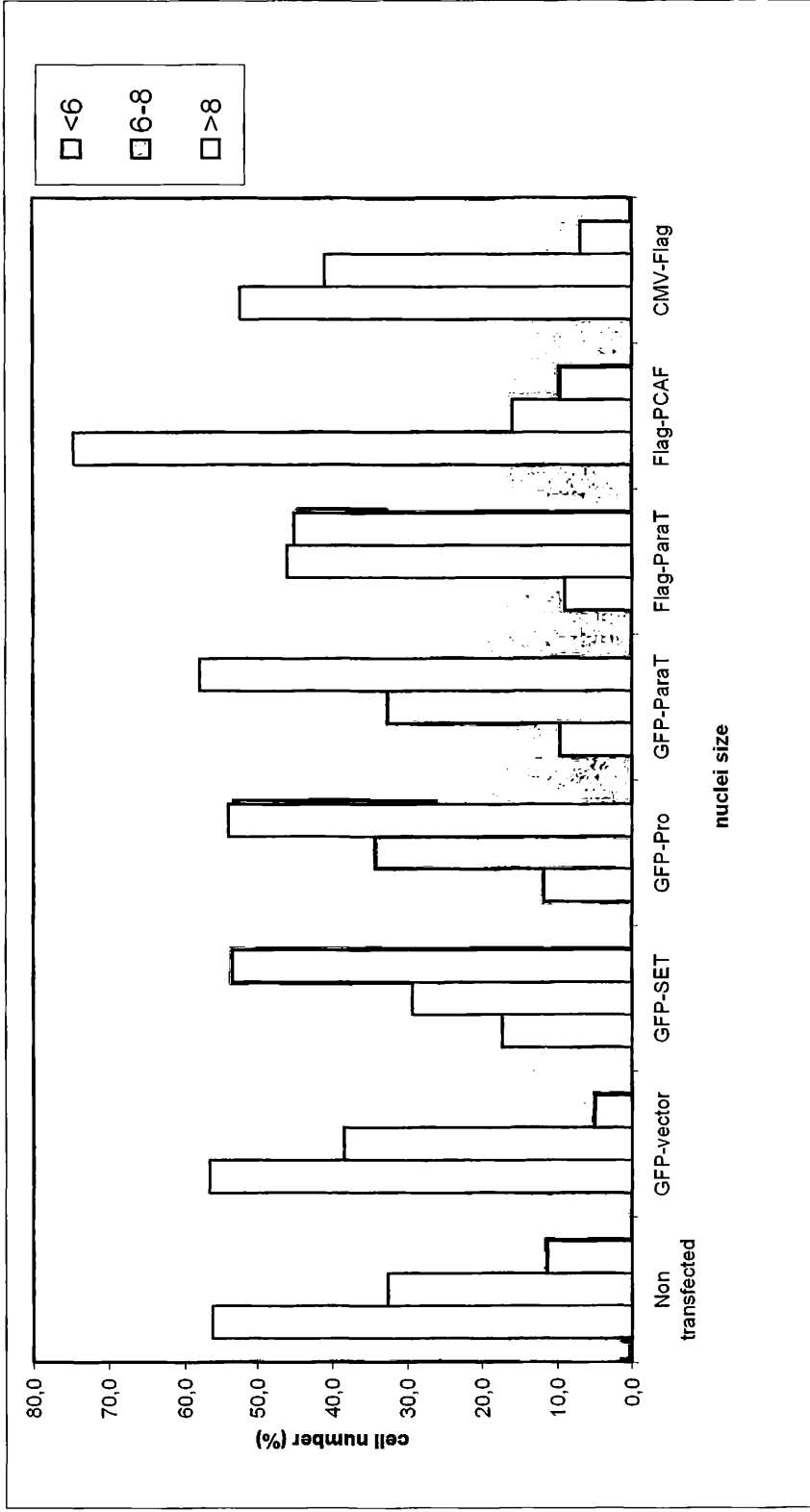
B. Φθορισμός της GFP-ParaT σε δύο μετασηματισμένα κύτταρα.

Προκειμένου να ελεγχθεί η εγκυρότητα των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων, έγινε μια σειρά πειραμάτων με μετρήσεις του μεγέθους πυρήνων HeLa κυττάρων. Ανθρώπινα κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε πολυτρυβλία των 24 θέσεων. Στη συνέχεια τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό DNA, με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2, ώστε να εκφράσουν τις εξής πρωτεΐνες: GFP-ParaT, GFP-SET, GFP-ProTα, GFP-PCAF, GFP, Flag-ParaT και επίτοπος Flag. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν επώαστηκαν με αντισώματα και έγινε χρώση των πυρήνων τους με διάλυμα Hoechst, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.1. Ο φθορισμός παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο και λήφθηκαν φωτογραφίες, από τις οποίες μετρήθηκε το μέγεθος των πυρήνων τους με το πρόγραμμα AutoCAD. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο σχήμα 12, όπου έχει γίνει κατανομή στο μέγεθος των πυρήνων για κάθε είδος μετασηματισμένων κυττάρων ως εξής: <6, 6-8, >8.

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που υπερέκφραζαν τη GFP και τον επίτοπο Flag, καθώς και μια μεταλλαγμένη ανενεργή μορφή της Flag-

PCAF, μιας πυρηνικής πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί έναν μεταγραφικό συνενεργοποιητή (Xie et al., 2002, Lehremann et al., 2002), καθώς και μη μετασηματισμένα κύτταρα. Σε αυτά παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πυρήνων έχουν μέγεθος <6 , ενώ το ποσοστό με μέγεθος >8 είναι ελάχιστο. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που υπερέκφραζαν τις χμαιοτικές με GFP πρωτεΐνες ProTa και SET, που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην διαδικασία αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης. Σε αυτά παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πυρήνων έχουν μέγεθος >8 , γεγονός που επιβεβαιώνει ότι υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών οδηγεί σε αποσυμπύκνωση τη χρωματίνη και έντονη μεταγραφική δραστηριότητα. Η υπερέκφραση της χμαιοτικής παραθυμοσίνης (GFP-ParaT, Flag-ParaT) παρουσιάζει παρόμοια κατανομή με τους θετικούς μάρτυρες, δηλαδή οι πυρήνες εμφανίζονται με μέγεθος >8 σε ποσοστό γύρω στο 55 %. Είναι χαρακτηριστικό να αναφερθεί ότι τα μετασηματισμένα κύτταρα με τις χμαιοτικές πρωτεΐνες ParaT, SET και ProTa, που παρουσίασαν το μεγαλύτερο ποσοστό σε πυρήνες με μέγεθος μεγαλύτερο του 8, παρουσίαζαν αδρή χρώση με Hoechst στους διογκωμένους πυρήνες τους, ενώ η χρώση στους υπόλοιπους πυρήνες ήταν κανονική. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι το DNA σε αυτούς τους πυρήνες βρίσκεται σε έντονη αποσυμπύκνωση, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι και η παραθυμοσίνη, όπως η SET και η ProTa, συμμετέχει στον μηχανισμό της αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης.

Περαιτέρω πειράματα με μέτρηση του μεγέθους σπερματικών πυρήνων που έχουν αλληλεπιδράσει με τις χμαιοτικές πρωτεΐνες pFlag-ParaT και τα θραύσματά της (παράγραφος 2.4.2), ίσως έδιναν περισσότερα δεδομένα για τον τρόπο που συμμετέχει η παραθυμοσίνη στο φαινόμενο αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης.



Σχήμα 12: Κατανομή μεγέθους πυρήνων μετασχηματισμένων κυττάρων HeLa, ώστε να υπερεκφράζουν διάφορες χμιαρικές με GFP και Flag πρωτεΐνες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό ότι η παραθυμοσίνη συνδέεται με την ιστόνη H1 (Kondili et al., 1996). Στη προσπάθεια διευκρίνησης του μηχανισμού αυτής της σύνδεσης, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι χμαιοτικές πρωτεΐνες GST-ParaT και τα θραύσματα GST-ParaT_{1-34aa}, GST-ParaT_{35-89aa} και GST-ParaT_{35-101aa} για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής περιοχής της παραθυμοσίνης, με την οποία συνδέεται με την ιστόνη H1 και για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων της με τις πυρηνικές πρωτεΐνες.

Για τα *in vitro* πειράματα εντοπισμού του πρωτεϊνικού τμήματος, με το οποίο η παραθυμοσίνη αλληλεπιδρά με την H1, χρησιμοποιήθηκαν οι παραπάνω απομονωμένες GST χμαιοτικές πρωτεΐνες. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η χρωματογραφία αγκιστείας με σφαιρίδια γλουταθειόνης. Αρχικά ρυθμίστηκαν οι συνθήκες χρωματογραφίας, ώστε να μην υπάρχει αλληλεπίδραση του GST τμήματος των χμαιοτικών πρωτεϊνών με ιστόνες. Γι' αυτό το σκοπό δεσμεύτηκε η GST-ParaT σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και στη συνέχεια έγινε αλληλεπίδρασή της με H1 σε συγκεντρώσεις 250 mM και 500 mM NaCl, ώστε να ορισθεί η βέλτιστη συγκέντρωση άλατος για αυτήν την αλληλεπίδραση. Βρέθηκε ότι σε συγκέντρωση 500 mM NaCl η GST δεν συνδέεται με την H1, ενώ γίνεται ποσοτική σύνδεση της H1 με την παραθυμοσίνη.

Για τον έλεγχο του πρωτεϊνικού τμήματος, με το οποίο η παραθυμοσίνη αλληλεπιδρά με την H1, αφού δεσμεύτηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης οι χμαιοτικές πρωτεΐνες GST-ParaT, GST-ParaT₁₋₃₄, GST-ParaT₃₅₋₈₉ και GST-ParaT₃₅₋₁₀₁, επώαστηκαν με διάλυμα ιστόνης H1. Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων σε SDS-PAGE των σφαιριδίων γλουταθειόνης έδειξαν ότι στα πρωτεϊνικά τμήματα ParaT₃₅₋₈₉ και ParaT₃₅₋₁₀₁ η σύνδεση της ιστόνης H1 είναι ποσοτική. Αντίστοιχα για το τμήμα ParaT₁₋₃₄ φάνηκε ότι δεν υπήρχε σύνδεση με την H1. Επομένως το συμπέρασμα είναι ότι το πρωτεϊνικό τμήμα με το οποίο η παραθυμοσίνη συνδέεται με την H1 είναι το ParaT₃₅₋₈₉, δηλαδή η κεντρική όξινη περιοχή της. Έτσι επιβεβαιώνονται άμεσα προηγούμενα πειραματικά δεδομένα, στα οποία μελέτη τις ανταγωνιστικής συμπεριφοράς όξινων πολυγλουταμικών περιοχών στην σύνδεση της παραθυμοσίνης με την H1, είχε διατυπωθεί η άποψη ότι η όξινη περιοχή της παραθυμοσίνης συμμετέχει στην αλληλεπίδραση αυτή (Kondili et al., 1996).

Είναι γνωστό ότι τέτοιες όξινες περιοχές είναι κοινές σε πυρηνικές πρωτεΐνες, των οποίων ο βιολογικός ρόλος εντοπίζεται στην συναρμολόγηση και

αποσυναρμολόγηση των νουκλεοσωματίων (Earnshaw, 1987). Παρόμοιες όξινες περιοχές παρουσιάζονται σε διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες, όπως η νουκλεοπλασμίνη η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας 1 (HMG1) και η προθυμοσίνη α, ο ρόλος των οποίων συνδέεται με την οργάνωση της χρωματίνης (Earnshaw et al., 1987; Karetsov et al., 1998). Αυτά τα δεδομένα οδήγησαν στη διεξαγωγή μιας σειράς *in vitro* πειραμάτων με σπερματικούς πυρήνες για τον έλεγχο της συμμετοχής της παραθυμοσίνης στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης. Επώαση της παραθυμοσίνης και της πρωτεΐνης SET με σπερματικά κύτταρα και μέτρηση του μεγέθους των πυρήνων τους έδειξε ότι ένα ποσοστό πυρήνων γύρω στο 60% παρουσιάζει μέγεθος μεγαλύτερο του 3, ενώ στους αρνητικούς μάρτυρες GST και BSA το ποσοστό αυτό ήταν μόλις 4%. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή οι σπερματικοί πυρήνες διογκώνονται λόγω της αποσυμπύκνωσης που υφίσταται η χρωματίνη τους. Η SET είναι γνωστό ότι είναι μια όξινη πρωτεΐνη που αποτελεί έναν ρυθμιστή της δομής της χρωματίνης και επάγει την αποσυμπύκνωση της χρωματινικής δομής (Matsumoto et al., 1999). Συμπερασματικά λοιπόν, αφού και η παραθυμοσίνη παρουσιάζει όμοια κατανομή στους πυρήνες με την SET, πρέπει με κάποιον τρόπο να εμπλέκεται στο φαινόμενο αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης.

Για επιβεβαίωση αυτής της παρατήρησης έγινε μια σειρά *in vivo* πειραμάτων, στα οποία ανθρώπινα κύτταρα HeLa μετασχηματίστηκαν, ώστε να υπερεκφράζουν τις εξής χιμαιρικές πρωτεΐνες: GFP-ParaT, GFP-SET, GFP-ProTα, GFP-PCAF, GFP, Flag-ParaT και Flag. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και μετρήθηκε το μέγεθος των πυρήνων στα μετασχηματισμένα κύτταρα, τα οποία επιλέχθηκαν με βάση τον φθορισμό της GFP ή με τον ανοσοφθορισμό με anti-Flag αντίσωμα για τον επίτοπο Flag. Παρατηρήθηκε ότι για τις χιμαιρικές πρωτεΐνες SET και ProTα, που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης, παρατηρήθηκε ένα ποσοστό διογκωμένων πυρήνων με μέγεθος μεγαλύτερο του 8 γύρω στο 55%, ενώ για τους αρνητικούς μάρτυρες, που ήταν οι πρωτεΐνες GFP, GFP-PCAF (ανενεργή μορφή), Flag καθώς και μη μετασχηματισμένα κύτταρα το αντίστοιχο ποσοστό ήταν μόλις 6%. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να επιβεβαιώσει το συμπέρασμα ότι η παραθυμοσίνη εμπλέκεται με κάποιον τρόπο στο φαινόμενο αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης.

Με δεδομένο ότι πρωτεΐνες με όξινες περιοχές έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στην οργάνωση της δομής της χρωματίνης θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι με παρόμοιους μηχανισμούς θα μπορούσε να συμμετέχει στο φαινόμενο αυτό και η

παραθυμοσίνη. Μια όξινη πρωτεΐνη, η οποία παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα στη δομή με την παραθυμοσίνη, είναι και η προθυμοσίνη α.. Η ομοιότητά τους εντοπίζεται κυρίως στην αμινοτελική και κεντρική-όξινη περιοχή τους (Frangou-Lazaridis et al. 1988). Η προθυμοσίνη, παρά το γεγονός ότι δεν συνδέεται σταθερά με την χρωματίνη, τροποποιεί τη σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη (Karetsou et al. 1998). Με έναν αντίστοιχο μηχανισμό θα μπορούσε να συμμετέχει και η παραθυμοσίνη στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης.

Επιπλέον πειράματα για την επίδραση της παραθυμοσίνης στην σύνδεση της H1 με τη χρωματίνη θα έδιναν μια πιο σαφή ένδειξη του ρόλου της στο φαινόμενο της αποσυμπύκνωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Brand I.A, Heinickel A (1991).** Key enzymes of carbohydrate metabolism as targets of the 11.5-kDa Zn(2+)-binding protein (parathymosin). *J. Biol. Chem.* 266:20984-9.
2. **Brand I.A., Heinickel A., Söling H.D. (1991)** Localization of a 22,5 kDa Zn²⁺-binding protein (parathymosin) in different rat tissues. Cell type-specific distribution between cytosol and nuclear compartment *European Journal of Biology*, 54, 157-165.
3. **Brand I.A, Heinickel A, Kratzin H, Soling HD (1988).** Properties of a 19-kDa Zn²⁺-binding protein and sequence of the Zn²⁺-binding domains. *Eur J Biochem.* 177:561-568.
4. **Brand I.A., Söling H.D. (1986)** Zn²⁺-dependent reversible inactivation of rat liver phosphofructokinase-1. Purification of inactivating protein and characterization of inactivation reaction. *J. Biol. Chem.* 261, 5892-5900
5. **Carruthers L. M., Hansen J. C. (2000).** The core histone N-termini function independently of linker histones during chromatin condensation. *J Biol Chem.* 275: 37825-37290.
6. **Chen H, Li B, Workman JL (1994).** A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosomes and factor-induced nucleosome disassembly. *EMBO J.* 13:380-90.
7. **Clinton, Frangou-Lazaridis M., Panneerselvam C., Horecker B.L. (1989)** The sequence of human kidney cDNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 855-862.
8. **Clinton, Frangou-Lazaridis M., Panneerselvam C., Horecker B.L. (1989)** Prothymosin α and parathymosin : mRNA and polypeptide levels in rodent tissues, *Arch.Biochem. Biophys.* 269, 256-263.
9. **Clinton M, Graeve L, el-Dorry H, Rodriguez-Boulan E, Horecker BL (1991).** Evidence for nuclear targeting of prothymosin and parathymosin synthesized in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:6608-6612
10. **Eschenfeldt WH, Berger SL (1986).** The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 9403-7.

11. **Earnshaw WC. (1987).** Anionic regions in nuclear proteins *J Cell Biol.* 105:1479-82.
12. **Earnshaw WC, Honda BM, Laskey RA, Thomas JO (1980).** Assembly of nucleosomes: the reaction involving X. laevis nucleoplasmin. *Cell.* 21:373-83.
13. **Frangou-Lazaridis M, Clinton M, Goodall GJ, Horecker BL (1988)** Prothymosin alpha and parathymosin: amino acid sequences deduced from the cloned rat spleen cDNAs. *Arch Biochem Biophys.* 263:305-10.**Gorlich D, Prehn S, Laskey RA, Hartmann E (1994).** Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell.* 79:767-78.
14. **Halmer L, Gruss C. (1995).** Influence of histone H1 on the in vitro replication of DNA and chromatin. *Nucleic Acids Res.* 23:773-8
15. **Haritos A.A. , Salvin S.B. Blacher R, Stein Shorecker B.L.(1985)** Parathymosin α : a peptide from rat tissues with structural homology with structural homology to prothymosin α , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1050-1053.
16. **Jakel S, Albig W, Kutay U, Bischoff FR, Schwamborn K, Doenecke D, Gorlich D (1999).** The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.* 18:2411-23.
17. **Karetsou Z, Sandaltzopoulos R, Frangou-Lazaridis M, Lai CY, Tsolas O, Becker PB, Papamarcaki T. (1998).** Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucleic Acids Res.* 26:3111-8
18. **Kondili K, Tsolas G, Papamarcaki T. (1996).** Selective interaction between parathymosin and histone H1. *Eur J Biochem.* 242:67-74.
19. **Laskey R. A., B. M. Honda, A. D. Millis, and J. T. Finch (1978).** Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histone and transfers them to DNA. *Nature* 275:7253-7256.
20. **Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A (2002).** Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res.*;86:41-65. Review.
21. **Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. E. 2000.** *Molecular Cell Biology.* Forth Edition. W. H. Freeman and Company.

22. **Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997).** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389:251-60.
23. **Matsumoto K, Nagata K, Miyaji-Yamaguchi M, Kikuchi A, Tsujimoto M (1999).** Sperm chromatin decondensation by template activating factor I through direct interaction with basic proteins. *Mol Cell Biol*. 19: 6940-52.
24. **Ohsumi K. and C. Katagiri (1991).** Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation and protamine removal from toad sperm nuclei: involvement of nucleoplasmin. *Dev. Biol*. 148:295-305.
25. **Okamoto K, Isohashi F. (2000).** Purification and primary structure of a macromolecular-translocation inhibitor II of glucocorticoid-receptor binding to nuclei from rat liver. Inhibitor II is the 11.5-kDa Zn²⁺-binding protein (parathymosin). *Eur J Biochem*. 267:155-62.
26. **Papamarcaki T, Tsolas O (1994) .** Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett*. 345:71-5.
27. **Parseghian MH, Hamkalo BA. (2001).** A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: an elusive cast of characters and their characteristics. *Biochem Cell Biol*.79: 289-304. Review.
28. **Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, Giannakouros T, Georgatos SD (2001).** Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep*. 2: 920-5.
29. **Philpott A., Leno, G.H., Laskey, R. A. (1991).** Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell* 65:569-578.
30. **Poirier G. G., de Murgia G., Jongstra-Bilen J., Niedergang C., Mandel P. (1982).** Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79: 3423-3427.
31. **Ramakrishnan V. (1997).** Histone H1 and chromatin higher-order structure. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 7:215-30. Review.
32. **Seo SB, Macfarlan T, McNamara P, Hong R, Mukal Y, Heo S, Chakravarti D (2002).** Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex. *J Biol Chem*. 277:14005-10.

33. **Stein A, Whitlock JP Jr, Bina M (1979).** Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin in vitro at physiological ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:5000-4.
34. **Szabo P., Clinton M., Horecker B.L. (1989)** Localization of gene coding for parathymosin to chromosome 17 in humans. *Cytogenet. Cell Genet.* 50, 91-92.
35. **Trompeter HI, Soling H.D. (1992)** Cloning and characterization of a gene encoding the 11,5 kDa zinc-binding protein (parathymosin- α). *FEBS Lett.* 298, 245-248.
36. **Trompeter HI, Blankenburg G, Brugger B, Menne J, Schiermeyer A, Scholz M, Soling HD (1996).** Variable nuclear cytoplasmic distribution of the 11.5-kDa zinc-binding protein (parathymosin-alpha) and identification of a bipartite nuclear localization signal. *J Biol Chem.* 271:1187-93.
37. **Trompeter HI, Schiermeyer A, Blankenburg G, Hennig E, Soling HD (1999).** Factors involved in the cell density-dependent regulation of nuclear/cytoplasmic distribution of the 11.5-kDa Zn(2+)-binding protein (parathymosin-alpha) in rat hepatocytes. *J Cell Sci.* 112: 4113-22.
38. **Tsitsiloni GE, Stiakakis J, Koutselinis A, Gogas J, Markopoulos C, Yialouris P, Bekris S, Panoussopoulos D, Kiortsis V, Voelter W. (1993).** Expression of alpha-thymosins in human tissues in normal and abnormal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9504-7.
39. **Vareli K, Frangou-Lazaridis M, van der Kraan I, Tsolas O, van Driel R (2000).** Nuclear distribution of prothymosin alpha and parathymosin: evidence that prothymosin alpha is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication. *Exp Cell Res.* 257:152-61.
40. **Watts JD, Cary PD, Sautiere P, Crane-Robinson C (1990).** Thymosins: both nuclear and cytoplasmic proteins. *Eur J Biochem.* 192:643-51.
41. **Wolffe A.P., Hayes J. J. (1999).** Chromatin Disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 27:711-720.
42. **Xie AY, Bermudez VP, Folk WR (2002).** Stimulation of DNA replication from the polyomavirus origin by PCAF and GCN5 acetyltransferases: acetylation of large T antigen. *Mol Cell Biol.* 22:7907-18.
43. **Zlatanova J, Caiafa P, van Holde K, (2000).** Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *FASEB J.* 14: 1697-1704.