



1329

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΠΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ. ΠΑΓΟΥΛΑΤΟΣ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ ΤΩΝ 70kDa

ΙΩΑΝΝΗΣ Γ. ΣΑΪΝΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



242/2002

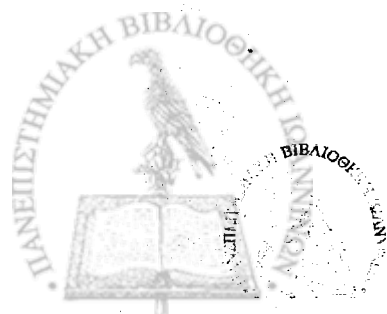


Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. ΙΩΑΝΝΗΣ ΛΑΖΑΡΙΔΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**
- 2. ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΠΑΓΟΥΛΑΤΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΜΕΛΟΣ)**
- 3. ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΜΕΛΟΣ)**



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. ΙΩΑΝΝΗΣ ΛΑΖΑΡΙΔΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**
- 2. ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΠΑΓΟΥΛΑΤΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΜΕΛΟΣ)**
- 3. ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΜΕΛΟΣ)**
- 4. ΟΡΕΣΤΗΣ ΤΣΟΛΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΜΕΛΟΣ)**
- 5. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΡΑΪΝΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΜΕΛΟΣ)**
- 6. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΜΕΛΟΣ)**
- 7. ΖΑΧΑΡΙΑΣ ΣΚΟΥΡΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΜΕΛΟΣ)**

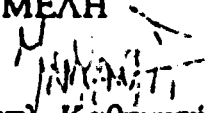


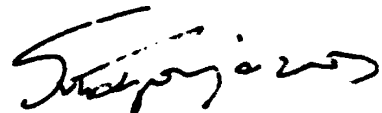
ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

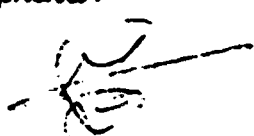
Εγινε σύσκεψη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής στις 28 Σεπτεμβρίου 1999 και ώρα 11.00, στην αίθουσα διδασκαλίας αριθ. 8 της Ιατρικής Σχολής, μετά από πρόσκληση του Επιβλέποντος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Λαζαρίδη, για την διαδικασία αξιολόγησης και κρίσης της διδακτορικής διατριβής του κου Ιωάννη Σαΐνη, με θέμα: " Απομόνωση και χαρακτηρισμός γονιδίων της 70 kd οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ ".

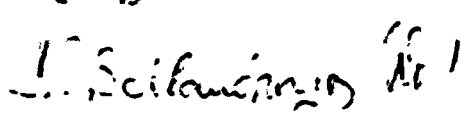
Προσήλθε ο κος Ιωάννης Σαΐνης, ο οποίος ανέπτυξε το θέμα της διατριβής του, του έγιναν ερωτήσεις από την Επιτροπή και απεχώρησε. Στην συνέχεια η Επιτροπή έκρινε το πρωτότυπο του περιεχομένου της διατριβής, την ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, καθώς και την επάρκεια του υποψηφίου στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής του. Ακολούθησε ψηφοφορία, όπου εγκρίθηκε η διδακτορική διατριβή με το βαθμό " ΑΡΙΣΤΑ ".

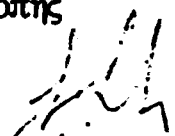
ΤΑ ΜΕΛΗ


Αναπλ. Καθηγητής Ι. Λαζαρίδης
Παν/μίου Ιωαννίνων
Επιβλέπων

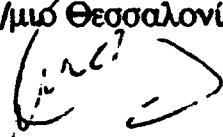

Καθηγητής Γερ. Παγουλάτος
Παν/μίου Ιωαννίνων
Μέλος της Συμβουλευτικής
Επιτροπής


Επίκ. Καθηγητής Χ. Αγγελίδης
Μέλος της Συμβουλευτικής
Επιτροπής


Καθηγητής Ν. Βαμβακόπουλος
Παν/μιο Λαρίσης


Καθηγητής Ζ. Σκούρας
Παν/μιο Θεσσαλονίκης


Καθηγητής Ο. Τσόλας
Παν/μιο Ιωαννίνων


Καθηγητής Κ. Δραΐνας
Παν/μιο Ιωαννίνων



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Άμεσος επιβλέπων ήταν ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Λαζαρίδης Ιωάννης, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για το αμείωτο ενδιαφέρον του, τις πολύτιμες συμβουλές του και τη συμπαράσταση που μου παρείχε στην επίλυση των προβλημάτων που παρουσιάστηκαν κατά την εκπόνηση της διατριβής. Τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας Καθηγητή κ. Παγουλάτο Γεράσιμο, μέλος της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη συμβολή του στην πρόοδο αυτής της μελέτης. Τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας κ. Χαράλαμπο Αγγελίδη, ευχαριστώ για το ενδιαφέρον του και τη βοήθειά του στη επίλυση σημαντικών προβλημάτων που προέκυψαν καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν και την υπομονή που επέδειξαν προκειμένου να κρίνουν αυτή την εργασία.

Απευθύνω επίσης τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή κ.Τζαβάρα Θεόδωρο, για το ενδιαφέρον του και τη βοήθειά του όποτε και αν του ζητήθηκε, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ματθόπουλο Δημήτριο για το φιλικό ενδιαφέρον του για την πορεία της εργασίας μου, την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Σύρρου Μαρία για τη βοήθειά της σε ζητήματα μικροσκοπικών παρατηρήσεων, την Λέκτορα κ. Ρούσου Ειρήνη, καθώς και τους συναδέλφους του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας Καλογερά Χρυσούλα, Νόβα Χριστίνα, Ευταξία Σοφία και Μποζίδη Πέτρο για την ηθική τους συμπαράσταση τόσο απαραίτητη για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ επίσης, την κ. Οικονόμου Βασιλεία, κ. Τσουμάνη Ανδρομάχη και κ. Έξαρχο Ιωάννη για την βοήθειά τους στην επίλυση καθημερινών προβλημάτων και για την εκδήλωση των φιλικών τους αισθημάτων.

Τέλος ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ιδιαιτέρως την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Φράγκου-Λαζαρίδη για το ενδιαφέρον της και την ηθική συμπαράσταση, καθώς επίσης και την Δρ. Βαρέλη Κατερίνα τόσο για τη βοήθειά της στη μελέτη των κυτταρικών κύκλων, όσο και για την υπομονή που επέδειξε.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελίδα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1	Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ	1
1.2	Μεταγραφική ρύθμιση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μοριακού βάρους 70 kd	3
1.3	Μεταφραστική ρύθμιση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μοριακού βάρους 70 kd	7
1.4	Βιολογικός ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μοριακού βάρους 70 kd	7
1.5	Μοριακή ανατομία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μοριακού βάρους 70 kd	9
1.6	Ο ιός Simian Vacuolating virus 40, SV40	10
1.7	Ο ρόλος του T αντιγόνου, του ιού SV40, στον κυτταρικό μετασχηματισμό	13
1.8	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιικών γονιδιακών προϊόντων και πρωτεϊνών θερμικού σοκ	14
1.9	Σκοπός της εργασίας	17

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΝΟΤΗΤΑ Α: ΒΑΣΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA

2.1	Κλωνοποίηση DNA	18
2.2	Βακτηριακά στελέχη-Συνθήκες καλλιέργειας	19
2.3	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	20
2.3.1	Παρασκεύασμα DNA μικρής κλίμακας	20
2.3.2	Παρασκεύασμα DNA μεγάλης κλίμακας	21



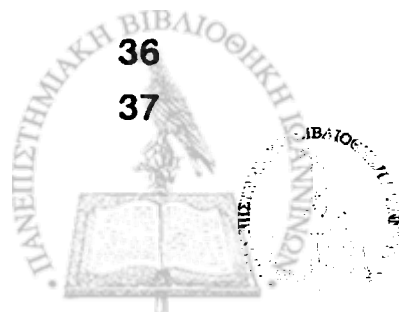
2.4	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	
	Ανάκτηση φραγμάτων DNA	22
2.5	Σήμανση DNA με τη μέθοδο της μετάφρασης εγκοπής (nick translation)	23
2.6	Ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (DNA sequencing)	24
2.7	Ακίνητοποίηση DNA σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (DNA immobilization)	25

ΕΝΟΤΗΤΑ Β: ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ cDNA **ΣΕ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ λ ΦΑΓΩΝ**

2.8	Ο λ ZAP II φάγος-βιβλιοθήκη cDNA με φορέα κλωνοποίησης τον λ ZAP II φάγο	27
2.9	Βακτηρικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία κλωνοποίησης	27
2.10.	Υλικά ανάπτυξης βακτηρίων	28
2.11	Αναζήτηση σε βιβλιοθήκη συμπληρωματικού DNA	29

ΕΝΟΤΗΤΑ Γ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ **ΚΑΙ ΠΟΛΥΑΔΕΝΥΛΙΩΜΕΝΟΥ RNA** **ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ mRNA** **ΕΠΙΛΟΓΗ mRNA ΜΕ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ** **ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ in vitro**

2.12	Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικές σειρές και ιστούς	33
2.13	Επιλογή πολυαδενυλιωμένου RNA (poly A selection)	34
2.14	Ηλεκτροφόρηση RNA και αποτύπωση κατά Northern	34
2.15	Επιλογή RNA με υβριδισμό σε φίλτρο (Hybrid RNA selection)	36
2.16	Μεταγραφή-Μετάφραση in vitro	37



**ΕΝΟΤΗΤΑ Δ: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΗ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ**

2.17	Εκχύλιση πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα	41
2.18	Σήμανση πρωτεϊνών in vivo	41
2.19	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE	42
2.20	Φλουορογραφία	43
2.21	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)	43
2.22	Ανοσοκαθίζηση (Immunoprecipitation)	44
2.23	Ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών με ανοσοφθορισμό	45

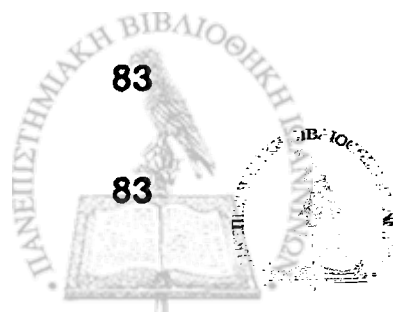
**ΕΝΟΤΗΤΑ Ε: ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ
ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ**

2.24	Συνθήκες και βασικές αρχές κυτταρικής καλλιέργειας	46
2.25	Κυτταρικές σειρές	46
2.26	Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας	47
2.27	Συνθήκες ανάπτυξης και αποθήκευσης κυτταρικών σειρών	48
2.28	Συγχρονισμός κυτταρικών σειρών	
2.28.1	Συγχρονισμός με στέρηση και επανατροφοδότηση ορού	49
2.28.2	Συγχρονισμός με διπλή αναστολή θυμιδίνης	49
2.29	Επίδραση θερμικού σοκ σε κυτταρικούς πληθυσμούς	50
2.30	Μόλυνση κυτταρικών σειρών με ιούς	50



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1	Πρώτη αναζήτηση στη βιβλιοθήκη (first screen) ενός cDNA κλώνου που να κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη Μοριακού Βάρους 72 kd που επάγεται από τον ιό SV 40	52
3.2	Ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του κλώνου 538 που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη Μοριακού Βάρους 72 kd που επάγεται από τον ιό SV 40	61
3.3	In vitro μεταγραφή - μετάφραση του κλώνου 538	63
3.4	Κλωνοποίηση του κύρια θερμικά επαγώμενου γονιδίου (hsp70) του πιθήκου	63
3.5	Ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του κλώνου 1101 που κωδικοποιεί για μια θερμικά επαγώμενη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 70 kd	66
3.6	Μελέτη των επιπέδων mRNA των γονιδίων hsc70 και hsp70 σε ιστούς ποντικού	72
3.7	Χαρακτηρισμός των hsc70 και hsp70 σε συνθήκες παρατεταμένου θερμικού σοκ	72
3.8	Μελέτη της ιικής επαγωγής των γονιδίων hsp70 και hsc70 του πιθήκου	75
3.9	Μελέτη των επιπέδων mRNA των γονιδίων hsc70 και hsp70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70	77
3.9.1	Επίπεδα mRNA των γονιδίων hsc70 και hsp70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα CV1	79
3.9.2	Επίπεδα mRNA των γονιδίων hsc70 και hsp70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα HeLa	81
3.10	Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και των ιικών μολύνσεων	81
3.11	Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 κατά την διάρκεια ιικών μολύνσεων	83
3.11.1	Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 κατά την διάρκεια παραγωγικής ιικής μόλυνσης	83



3.11.2	Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 κατά την διάρκεια μη παραγωγικής ιικής μόλυνσης	86
3.11.3	Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 σε επιτρεπτικά και μη επιτρεπτικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τα πρώιμα γονίδια του ιού SV40	89
3.11.4	Σύγκριση της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 μετά από θερμικό σοκ σε σχέση με την ενδοκυττάρια κατανομή μετά από ιική μόλυνση επιτρεπτικών κυττάρων με το SV40 ιό	92
3.12	Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών της hsc70 και ιικών γονιδιακών προϊόντων	92
3.13	Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και πρώιμων ιικών γονιδιακών προϊόντων κατά την διάρκεια παραγωγικής ιικής μόλυνσης με τον ιό SV40	95
3.14	Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και πρώιμων ιικών γονιδιακών προϊόντων κατά την διάρκεια μη παραγωγικής ιικής μόλυνσης με τον ιό SV40	96
3.15	Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ της hsc70 και όψιμων ιικών γονιδιακών προϊόντων κατά την διάρκεια παραγωγικής ιικής μόλυνσης με τον ιό SV40	101
3.16	Επίδραση INF-γ σε μολυσμένα επιτρεπτικά κύτταρα και ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc - T αντιγόνου	101
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ		105
5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ		114
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		118
7. ΕΙΚΟΝΕΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΑ		137
8. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ		140
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ		143



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

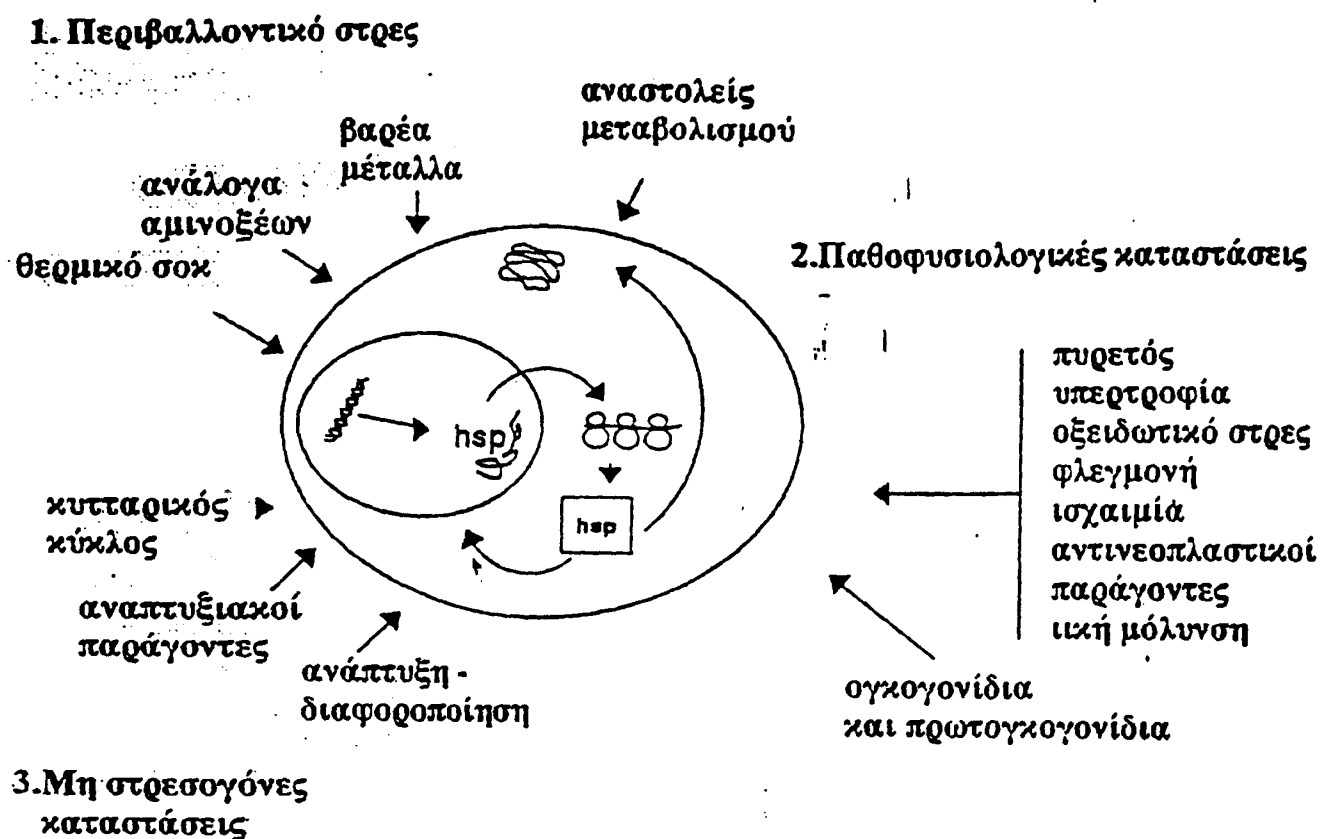


ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ

Όλοι οι οργανισμοί που μελετήθηκαν μέχρι σήμερα, από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο, βρέθηκε ότι αντιδρούν στην αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, επάγοντας τη σύνθεση ενός σχετικά μικρού αριθμού πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάστηκαν πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins ή hsps). Με βάση τη μοριακή τους μάζα οι πρωτεΐνες αυτές ταξινομήθηκαν σε τρεις κύριες κατηγορίες που αντιστοιχούν στις οικογένειες των 90-110 kd, των 70 kd και των 30-40 kd (74, 75). Η επαγωγή μελών της κύριας και καλύτερα μελετημένης οικογένειας των 70 kd hsps βρέθηκε ότι προκαλείται όχι μόνον ύστερα από θερμικό σοκ αλλά και ύστερα από επίδραση μιας σειράς φυσικών και χημικών παραγόντων όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 (87). Ειδικότερα, στην περίπτωση της επαγωγής από ιούς, έχει αποδειχθεί ότι οι DNA ιοί έχουν την ικανότητα επαγωγής των πρωτεϊνών αυτών (60, 92, 116, 120, 121, 127). Η επαγόμενη από πλειάδα στρεσογόνων παραγόντων έκφραση των hsps οδήγησε στην υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν σε ένα γενικότερο κυτταρικό προστατευτικό μηχανισμό.

Η μελέτη της απόκρισης των οργανισμών στο θερμικό στρές ξεκίνησε το 1962, όταν περιγράφηκε μια νέα ομάδα διογκωμάτων (puffs) στα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων της δροσόφιλας (*Drosophila busckii*) η οποία επαγόταν τόσο ύστερα από θερμικό στρές όσο και ύστερα από επίδραση δινιτροφαινόλης και σαλικιλικού νατρίου (114). Το 1974 οι Tissières και συνεργάτες συνέδεσαν την εμφάνιση των διογκωμάτων αυτών με τη σύνθεση ενός μικρού αριθμού νέων πρωτεϊνών (146) ανοίγοντας έτσι τον δρόμο για τη μοριακή ανάλυση του φαινομένου. Ακολούθησε η κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ της δροσόφιλα (7, 78), η μελέτη της οργάνωσής τους στο γένωμα (78) και τέλος η αποκάλυψη και ο χαρακτηρισμός των ρυθμιστικών τους αλληλουχιών καθώς και των παραγόντων μεταγραφής, οι οποίοι εμπλέκονται στην μεταγραφική τους ρύθμιση (97, 98, 158). Σε σύντομο χρονικό διάστημα, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ ειδών τόσο διαφορετικών μεταξύ τους όπως το βακτήριο *E. coli* (10) η όρνιθα (86) και ο άνθρωπος (159).



Σχ.1: Σχηματική σύνοψη των συνθηκών που επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (84).

Στην οικογένεια των επαγόμενων από θερμικό σοκ πρωτεϊνών, προστέθηκαν με βάση τις ομολογίες τους τόσο σε επίπεδο DNA όσο και σε επίπεδο αμινοξικών αλληλουχιών και πρωτεΐνες οι οποίες δεν παρουσιάζουν θερμική επαγωγή και ονομάσθηκαν συγγενείς των θερμικά επαγόμενων πρωτεϊνών (Heat shock cognate proteins ή hscs).

Η ύπαρξη των συγγενικών αυτών γονιδίων (hscs), η επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα των hsp, η έκφραση των hsp γονιδίων κατά την εμβρυογένεση καθώς και η διαφορική τους έκφραση σε ιστούς χωρίς την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (74).

Στο ερώτημα του βιολογικού ρόλου των πρωτεϊνών θερμικού σοκ σημαντικά βήματα έγιναν στη δεκαετία του 1980. Η παρατήρηση ότι η μεγάλη πλειοψηφία των στρεσογόνων παραγόντων συμπεριλαμβανομένης και της θερμοκρασίας οδηγεί στην παραγωγή πρωτεϊνών μερικώς ή ολικώς μετουσιωμένων, οδήγησε στην υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ δρώντας ως συνοδοί (chaperones) υποβοηθούν τις λανθασμένα αναδιπλούμενες πρωτεΐνες, να αποκτήσουν τη σωστή τρισδιάστατη διαμόρφωσή τους (11, 47, 103). Η υπόθεση αυτή που υποστηρίζεται από μία πλειάδα πειραματικών δεδομένων αποτελεί σήμερα την επικρατούσα άποψη σχετικά με τη βιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

1.2. Μεταγραφική ρύθμιση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μοριακού βάρους 70 kd

Η γονιδιακή οικογένεια των 70 kd hsp αποτελείται τόσο από μέλη τα οποία είναι θερμικώς επαγόμενα (hsp70s), όσο και από μέλη τα οποία επάγονται ελαφρώς ή και καθόλου μετά από επίδραση θερμικού σοκ (hsc70s). Σύγκριση των γονιδίων αυτών με τα ομόλογα γονίδια άλλων ειδών αποκαλύπτει την τεράστια μεταξύ τους ομοιότητα. Είναι εντυπωσιακό ότι η ομοιότητα μεταξύ της βακτηριακής dnaK (ομόλογης της hsp70 των ευκαρυωτικών κυττάρων) και της hsp70 της δροσόφιλας είναι 48%, η δε ομοιότητα μεταξύ της hsp70 της δροσόφιλας και της hsp70 του ανθρώπου είναι 72% (10, 49). Αν και η ομοιότητα εκτείνεται σε όλο το μήκος των μορίων, είναι μεγαλύτερη στο αμινοτελικό άκρο και στην κεντρική περιοχή, ενώ οι μεγαλύτερες αποκλίσεις εντοπίζονται στο

καρβοξυτελικό άκρο. Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των θερμικά επαγόμενων γονιδίων της οικογένειας των 70kd που έχουν κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα, είναι η ανυπαρξία ιντρονίων. Το χαρακτηριστικό αυτό το οποίο είναι σπάνιο στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οδήγησε στην υπόθεση ότι η απαίτηση του κυττάρου για γρήγορη έκφραση των hsp70s μετά από θερμικό σοκ, υλοποιείται τόσο με την αυξημένη ταχύτητα μεταγραφής όσο και με την παράκαμψη μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων (45). Αντίθετα, τα γονίδια των hsc70s που έχουν κλωνοποιηθεί και που δεν επάγονται μετά από θερμικό σοκ περιέχουν ιντρόνια (35), γεγονός που ενίσχυσε την παραπάνω υπόθεση.

Η μελέτη των υποκινητικών περιοχών των hsp70s απέδειξε την ύπαρξη διαφορετικών ρυθμιστικών στοιχείων και πιο συγκεκριμένα, ενός στοιχείου TATA (-28), μίας περιοχής πλούσιας σε G και C (-49), ενός στοιχείου CCAAT (-67) και ενός στοιχείου HSE (heat shock element) το οποίο και αποτελεί την κύρια ρυθμιστική υποκινητική περιοχή (101, 43, 49).

Η μεταγραφή των hsp70s γονιδίων μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 100 φορές μετά από θερμικό σοκ και υπεύθυνος για αυτή την επαγωγή είναι ο μεταγραφικός παράγοντας HSTF (Heat Shock Transcription Factor), ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην HSE αλληλοδιαδοχή του υποκινητή των γονιδίων (41).

Το στοιχείο HSE αποτελείται από μια σειρά αντίστροφων επαναλήψεων της αλληλοδιαδοχής nGAAn οι οποίες ποικίλουν σε αριθμό και θέση ανάλογα με την προέλευση του γονιδίου (160). Πιο συγκεκριμένα, το HSE του γονιδίου hsp70 του βατράχου *Xenopus* περιέχει τρεις επαναλήψεις και βρίσκεται μεταξύ των θέσεων -260 και -100 ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής (14), το HSE του γονιδίου hsp70 κότας περιέχει δύο αλληλεπικαλυπτόμενες επαναλήψεις μεταξύ των θέσεων -70 και -100 (86), ενώ το HSE του γονιδίου hsp70 του ανθρώπου περιέχει δύο επαναλήψεις και βρίσκεται μεταξύ των θέσεων -107 και -68 (49). Αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου G στην θέση 2 της επαναλαμβανόμενης μονάδας nGAAn απενεργοποιεί το HSE (160), ενώ αντίθετα υποκαταστάσεις του νουκλεοτιδίου A στις θέσεις 3 και 4 έχουν βρεθεί σε λειτουργικά HSE (1, 104).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα με εξαίρεση τους μύκητες ο HSTF συντίθεται αδιάφορα και εντοπίζεται σαν μονομερές τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (62, 165). Όταν τα κύτταρα



εκτεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες, τα μονομερή μόρια του HSTF μετατρέπονται σε τριμερή και συσσωρεύονται στον πυρήνα όπου και συνδέονται με το HSE (122, 136, 156). Στους μύκητες (*Saccharomyces cerevisiae* και *Kluyveromyces lactis*) ο HSTF βρίσκεται συνεχώς συνδεδεμένος με το HSE σαν τριμερές τόσο κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και κάτω από συνθήκες στρες και η ενεργοποίησή του επιτυγχάνεται μετά από φωσφορυλίωση σε θέσεις σερίνης και θρεονίνης (134, 135, 137). Φωσφορυλίωση του HSTF παρατηρείται και στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, εξαρτάται όμως από το στρες και συνεπάγεται αύξηση της μεταγραφικής του ικανότητας (1, 66, 136).

Μια σειρά από πειραματικά δεδομένα υποδεικνύει ότι οι hsp70s ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων τους μέσω ενός μηχανισμού αναδραστικής αναστολής (1, 2, 8, 26, 88, 89). Πιο συγκεκριμένα προσθήκη hsp70 σε κυτταρικά εκχυλίσματα που περιέχουν ενεργοποιημένο HSTF βρέθηκε ότι αναστέλλει την πρόσδεσή του στο HSE (2) και μία ανάλογη αναστολή παρατηρήθηκε σε εκχυλίσματα κυττάρων που υπερέκφραζαν αδιάφορα την hsp70 (77, 89). Τέλος η ανίχνευση συμπλεγμάτων μεταξύ της hsp70 και της τριμερούς μορφής του HSTF, οδήγησε στην υπόθεση ότι η παραπάνω σύνδεση έχει ως αποτέλεσμα την ανενεργοποίηση του HSTF (2, 8). Πρέπει επίσης να τονισθεί και η πιθανή εμπλοκή της hsp90 στο μηχανισμό αυτορύθμισης του γονιδίου της hsp70, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την ανενεργή μορφή του HSTF (8, 91), χωρίς όμως να είναι ικανή να ρυθμίζει *in vivo* την ενεργότητά του (89). Συσχετίζοντας τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να προταθεί ένα μοντέλο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης των hsp70s, σύμφωνα με το οποίο ο HSTF σταθεροποιείται υπό φυσιολογικές συνθήκες στην ανενεργό μονομερή μορφή του συνδεόμενος παροδικά με την hsp90. Έκθεση των κυττάρων σε θερμικό σοκ προκαλεί συσσώρευση μετουσιωμένων ή ελλιπώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες ανταγωνιζόμενες με τον HSTF για σύνδεση στην hsp90 προκαλούν την απελευθέρωσή του, που έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό τριμερών, την πρόσδεση στο HSE και την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου hsp70. Η ταχεία συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων hsp70 οι οποίες υπερβαίνουν τις κυτταρικές ανάγκες για υποβοηθούμενη αναδίπλωση των μετουσιωθέντων πρωτεϊνών οδηγεί στην δημιουργία συμπλόκων hsp70/HSTF με αποτέλεσμα την ανενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής και την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου hsp70. Παρά το γεγονός ότι

παραμένει αδιευκρίνηστο το αν η ανενεργοποίηση του HSTF από την hsp70 οφείλεται στην μετατροπή της τριμερούς μορφής σε ανενεργό μονομερή ή στην αναστολή της σύνδεσης της ενεργού μορφής του στο HSE (110), το περιγραφέν μοντέλο φαίνεται σήμερα αρκετά πιθανό.

Αντίθετα από το θερμικό σοκ η μεταγραφική επαγωγή των hsp70s υπό την επίδραση χημικών παραγόντων στρες όπως το αρσενικό και το σαλκυλικό οξύ φαίνεται να εμπλέκει την παρουσία τουλάχιστον ενός επιπλέον παράγοντα μεταγραφής ο οποίος βρέθηκε να είναι αδιάφορα συνδεδεμένος στο HSE και ονομάσθηκε CHBF (77).

Η μεταγραφική επαγωγή των hsp70s από DNA ογκογόνους ιούς βρέθηκε ότι οφείλεται στη δράση των πρώιμων προϊόντων τους (60, 92, 121). Στην περίπτωση του αδενοϊού αποδείχθηκε ότι το ογκογονίδιο E1A είναι ικανό να επάγει τη μεταγραφή της hsp70 έστω και απουσία των ανοδικών ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου (132). Για την παραπάνω επαγωγή βρέθηκε ότι απαιτείται η ύπαρξη μόνο του στοιχείου TATA, γεγονός που υποδεικνύει ότι το ογκογονίδιο δρα επαγωγικά μέσω βασικών μεταγραφικών παραγόντων όπως ο TFIID (132). Ανάλογη φαίνεται να είναι και η περίπτωση του αντιγόνου T του ιού SV40 το οποίο προκειμένου να επαγάγει την μεταγραφή του γονιδίου hsp70 απαιτεί την παρουσία 84 μόνον βάσεων ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής που δεν περιλαμβάνουν το HSE (106, 144).

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των hsp70s στο επίπεδο της μεταγραφής βρέθηκε ότι επηρεάζεται και από μια σειρά κυτταρικών ογκογονιδίων και αντιογκογονιδίων όπως το *c-myc*, το *c-myb* και το *p53*. Πιο συγκεκριμένα το *c-myc* βρέθηκε ότι επάγει την μεταγραφή του γονιδίου hsp70 πιθανόν εξ αιτίας της ικανότητάς του να προσδένεται στην υποκινητική του περιοχή (143), ενώ τα *c-myb* και *p53* φαίνεται να λειτουργούν ως μεταγραφικός ενεργοποιητής και ανενεργοποιητής αντίστοιχα αν και δεν προσδένονται σε καμιά περιοχή του υποκινητή του γονιδίου hsp70 (3, 38, 56).

Συμπερασματικά, μπορούμε να τονίσουμε το γεγονός ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των hsp70s αποτελεί ένα πολύπλοκο φαινόμενο, το οποίο επιστρατεύει μηχανισμούς που εξαρτώνται τόσο από τη φύση του ερεθίσματος όσο και από τις κυτταρικές ανάγκες.



1.3. Μεταφραστική ρύθμιση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, μοριακού θάρους 70kd

Παρά το γεγονός ότι το θερμικό σοκ προκαλεί σημαντική καταστολή της μετάφρασης τόσο στο επίπεδο της επιμήκυνσης όσο και στο επίπεδο της έναρξης (9), τα mRNAs των hsp70s μεταφράζονται επιλεκτικά και καθίστανται τα κύρια προϊόντα της πρωτεϊνοσύνθεσης σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών (75). Η ικανότητα αυτή των hsp70 mRNAs φαίνεται ότι οφείλεται στο 5' μη μεταφραζόμενο άκρο τους (5'UTR) δεδομένου ότι χιμαιρικά mRNA που προκύπτουν από την σύνδεση του 5' άκρου του γονιδίου hsp70 που περιείχε το UTR με κωδικοποιούσες αλληλοδιαδοχές άλλων γονιδίων βρέθηκε ότι μεταφράζονται αποτελεσματικά σε υψηλές θερμοκρασίες (15, 34). Εκτός όμως από την καθοριστική παρουσία των 5' UTR η μεταφραστική ικανότητα των hsp70 mRNAs σε συνθήκες θερμικού σοκ φαίνεται ότι εξαρτάται από την παρουσία ή την ενεργοποίηση ενός αριθμού αγνώστων μέχρι σήμερα κυτταρικών παραγόντων που υποβοηθούν αποτελεσματικά την επιλεκτική μετάφρασή τους (162, 163).

1.4. Βιολογικός ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μοριακού θάρους 70kd

Η υποκυτταρική θέση των hsp70s εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αν και έχει αναφερθεί η παρουσία μικρών ποσοτήτων των πρωτεϊνών αυτών τόσο στον πυρήνα όσο και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (102, 148). Η έκθεση όμως των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα την εντυπωσιακή πυρηνική μετακίνηση των hsp70s, οι οποίες συσσωρεύονται κυρίως στους πυρηνίσκους και ανιχνεύονται στο αδιάλυτο κλάσμα του πυρηνοπλάσματος (57, 152, 154). Επαναφορά των κυττάρων σε φυσιολογικές θερμοκρασίες οδηγεί τις hsp70s στο κυτταρόπλασμα με παράλληλη αποκατάσταση των μορφολογικών βλαβών που παρατηρούνται στους πυρηνίσκους κατά το θερμικό σοκ (69, 103, 149, 155). Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην πρόταση σύμφωνα με την οποία οι hsp70s προστατεύουν το κύτταρο και ιδιαίτερα τους πυρηνίσκους από το θερμικό σοκ, συνδεόμενες με μετουσιωθείσες πρωτεΐνες και αποτρέποντας ή ελαχιστοποιώντας τη συσσωμάτωση και ανενεργοποίησή τους (40). Η ικανότητα των hsp70s να αποδιοργανώνουν υδρόφοβα πρωτεϊνικά συμπλέγματα τα οποία σχηματίζονται τόσο ύστερα από θερμικό σοκ όσο και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (69, 103), ενίσχυσε σημαντικά την παραπάνω πρόταση.

Η εμπλοκή των hsp70s στη διαδικασία των πρωτεϊνικών αναδιπλώσεων αποδείχθηκε και με βάση ευρήματα που έδειξαν ότι οι hsp70s προσδένονται τόσο στις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, τις οποίες και προστατεύουν από τυχόν ακατάλληλες αναδιπλώσεις (12), όσο και σε μετουσιωθείσες ή λανθασμένα αναδιπλωθείσες πρωτεΐνες τις οποίες και διατηρούν σε μια κατάσταση συμβατή με την σωστή μελλοντική τους αναδίπλωση (23, 32). Οι βιολογικές αυτές δράσεις των hsp70s απεδείχθη ότι είναι ATP - εξαρτώμενες, στη βάση του γεγονότος ότι η πρόσδεση ATP στις hsp70s συνεπάγεται χαλαρή σύνδεση του μορίου με το μετουσιωμένο υπόστρωμα, ενώ αντίθετα η ADP μορφή των hsp70s οδηγεί σε σταθεροποίηση της παραπάνω σύνδεσης (12, 13, 133). Τέλος πρέπει να αναφερθεί και η καταλυτική συνεισφορά ενός αριθμού βοηθητικών πρωτεϊνικών συνοδών (co-chaperones) όπως οι DnaJs, Hip και Hor, οι οποίες φαίνεται ότι ρυθμίζουν τις παραπάνω συνδέσεις στο επίπεδο της αναγνώρισης, πρόσδεσης και απελευθέρωσης του υποστρώματος (44, 142). Παράλληλα με τις περιγραφείσες λειτουργίες τους οι hsp70s φαίνεται ότι εμπλέκονται και στους μηχανισμούς μετακίνησης πρωτεϊνών διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών (23). Η εμπλοκή τους αυτή αποδείχθηκε ότι αφορά τόσο την πυρηνική μεμβράνη (46, 53, 65, 94, 129, 130) όσο και τις μεμβράνες των μιτοχονδρίων (32) και του ενδοπλασματικού δικτύου (23). Τέλος, η πολυλειτουργικότητα των hsp70s επεκτείνεται και στην συμμετοχή τους στο μονοπάτι της λυσοσωμικής αποικοδόμησης πρωτεϊνών (22, 145).

Ένας από τους σημαντικότερους βιολογικούς ρόλους των hsp70s είναι η καθοριστική συμμετοχή τους στο φαινόμενο της κυτταρικής θερμοανθεκτικότητας. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές που παράγουν διαφορετικές ποσότητες hsp70s, απέδειξαν ότι η κυτταρική θερμοανοχή είναι ευθέως ανάλογη των ενδοκυττάρων επιπέδων των hsp70s (70). Επιπλέον η θερμοανθεκτικότητα κυττάρων τα οποία ενέθηκαν με αντισώματα κατά των hsp70s βρέθηκε ότι μειώνεται δραματικά (113), ενώ παράλληλα κυτταρική διαμόλυνση με περίσσεια DNA που περιείχε το HSE και κατά συνέπεια ανέστειλε ανταγωνιστικά την θερμικά επαγόμενη μεταγραφή των hsp70s, είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θερμοευαίσθητων κυτταρικών στελεχών (55). Τέλος, η αδιάφορη υπερέκφραση hsp70 σε κυτταρικές σειρές και οργανισμούς βρέθηκε ότι οδηγεί στη δημιουργία θερμοανθεκτικών κλώνων (5, 6, 71). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιλογή κυττάρων με αυξημένη θερμοανοχή, ύστερα από διαδοχικές εκθέσεις σε υψηλές θερμοκρασίες



και η συνακόλουθη μελέτη τους, απέδειξε ότι τα επίπεδα της hsc70 ήταν σημαντικά αυξημένα (67).

Η σχέση των hsp70s με την κυτταρική ανάπτυξη αν και δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί πλήρως φαίνεται ότι είναι υπαρκτή (99). Για παράδειγμα έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του γονιδίου hsp70 ρυθμίζεται κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με μεταγραφική κορύφωση στην είσοδο των κυττάρων στην S φάση (83, 131). Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι κύτταρα μετασχηματισμένα με ογκογονίδια παράγουν αυξημένα σε σχέση με τα πατρικά τους ποσά hsp70s, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή των πρωτεϊνών αυτών στις συχνές κυτταρικές διαιρέσεις (85). Με βάση τα όσα περιγράφηκαν παραπάνω και με δεδομένη την εντυπωσιακή ομολογία τους δεν έχουν μέχρι σήμερα παρατηρηθεί παρά μόνο ελάχιστες λειτουργικές διαφορές ανάμεσα στην hsc70 και την hsp70. Η πιο σημαντική από αυτές αφορά τη συμμετοχή της hsc70 και όχι της hsp70 στη διαδικασία ενδοκύττωσης μέσω του συστήματος των καλυμένων κυστιδίων (coated pits) δεδομένου ότι μόνον η hsc70 βρέθηκε ότι συνδέεται με τα τρισκέλια της κλαθρίνης (19). Ανάλογη ειδικότητα υποστρώματος φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση προστασίας της τοποϊσομεράσης I από θερμικά επαγώμενη μετουσίωση κατά την οποία μόνον η hsc70 και όχι η hsp70 είναι ικανή να συνδεθεί με το ένζυμο και να καταλύσει την επανενεργοποίησή του (25).

1.5. Μοριακή ανατομία των πρωτεϊνών θερμικού σοκ μοριακού βάρους 70kd

Η καταλυτική συμμετοχή της hsc70 στη διαδικασία αποικοδόμησης της κλαθρίνης από τα καλυμένα κυστίδια κατά την ενδοκύττωση, αποτέλεσε την πρώτη αποκαλυφθείσα λειτουργική δράση μέλους της hsp70 οικογένειας (19, 20). Η ενεργότητα αυτή αποδείχθηκε ότι απαιτεί υδρόλυση ATP και στη συνέχεια βρέθηκε ότι η hsc70 εμφανίζει ασθενή δράση ATPάσης η οποία πυροδοτείται ύστερα από τη πρόσδεση πεπτιδίων στο μόριό της (31, 48, 151). Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στη διερεύνηση της δομής της hsc70 και παρατηρήθηκε ότι η πέψη του μορίου με χυμοθριψίνη παράγει ένα θραύσμα 44 kd που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο και παραμένει ενεργό ως προς την υδρόλυση ATP με ταχύτητα ταυτόσημη αυτής του συνολικού μορίου (20). Η τρισδιάστατη δομή του θραύσματος αυτού αποκαλύφθηκε στη συνέχεια με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και βρέθηκε ότι το αμινοτελικό άκρο της hsc70 αποτελείται από δύο περιοχές

β-πτυχωτών επιφανειών ανάμεσα στις οποίες προσδένεται το ATP (37, 82). Παράλληλα αποκαλύφθηκε ότι το καρβοξυτελικό άκρο της hsc70 μοριακού βάρους περίπου 28 kD είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση της κλαθρίνης (150, 151), χαρακτηρίστηκε ως περιοχή πεπτιδικής πρόσδεσης (peptide binding domain) του μορίου και βρέθηκε ότι αποτελείται από μια περιοχή πτυχωτών επιφανειών και μία περιοχή α-ελίκων (Σχήμα 2).

Η αποκάλυψη της βασικής μοριακής δομής των hsp70s στην οποία στηρίχθηκε και η απομόνωσή τους από κυτταρικά εκχυλίσματα δεδομένης της ικανότητάς τους να προσδένονται σε σφαιρίδια αγαρόζης-ATP (153), οδήγησε στη μελέτη των χαρακτηριστικών περιοχών τους. Παρά το γεγονός ότι μετάλλαξη ελλείψεως των αμινοξέων 415-479 καθιστούσε την hsp70 ανίκανη να μετακινηθεί στον πυρήνα του κυττάρου ύστερα από θερμικό σοκ, η περιοχή αυτή δεν κατέσκει δυνατόν να χαρακτηριστεί σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) δεδομένου ότι το μεταλλαγμένο μόριο έχασε την ικανότητά του να συνδέεται με ATP και απεδείχθη ότι ήταν λανθασμένα αναδιπλωμένο (84). Τέλος αποδείχθηκε ότι η περιοχή σύνδεσης με ATP δεν είναι απαραίτητη για την απόκτηση κυτταρικής θερμοανθεκτικότητας (72) αλλά η παρουσία της αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έξοδο της hsp70 από τον πυρήνα κατά τη διάρκεια της ανάνηψης από το θερμικό σοκ (84).

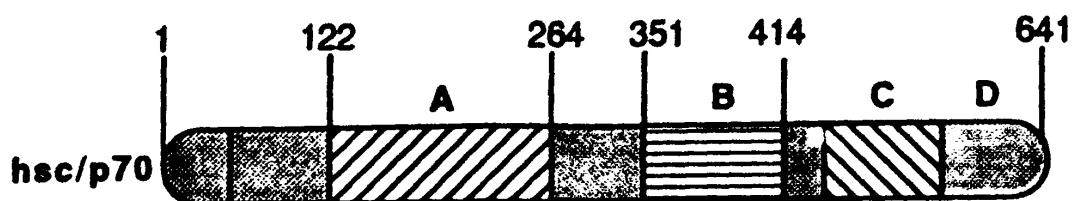
1.6. Ο ιός Simian Vacuolating virus 40, SV40

Ο DNA ογκογόνος ιός SV40 ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1950 ως μολυσματικός παράγοντας εμβολίων κατά της πολιομυελίτιδας, που παρασκευάστηκαν από πρωτογενείς καλλιέργειες νεφρικών κυττάρων πιθήκων *Rhesus* και *M.cynomolgus* (68). Ονομάστηκε SV40 (Simian Vacuolating virus) επειδή στα κύτταρα τα οποία μολύνει προκαλεί δημιουργία κυστιδίων (vacuoles) στο κυτταρόπλασμά τους (68, 147).

Ο ιός SV40 αποτελείται από ένα κυκλικό δίκλωνο DNA μεγέθους 5243 ζευγών βάσεων (bp) το οποίο τυλίγεται γύρω από τα οκταμερή των κυτταρικών ιστονών και περιβάλλεται από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο, που απαρτίζεται από τρεις δομικές πρωτεΐνες τις VP1, VP2 και VP3 (68, 147).

Το γονιδίωμα του SV40 είναι οργανωμένο σε δύο μεταγραφικές ενότητες ίσου περίπου μεγέθους. Η πρώτη ενότητα κωδικοποιεί τα πρώιμα γονίδια του ιού, τα οποία εκφράζονται αμέσως μετά την μόλυνση και δημιουργούν τα





Σχ.2: Λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών hsc70 και hsp70.

- A, Περιοχή σύνδεσης με ATP.
 - B, Περιοχή σημαντική για τη δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης.
 - C, Περιοχή σύνδεσης με πεπτίδια (peptide binding domain) και υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης.
 - D, Περιοχή που εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις με συμπαραγόντες (cofactors).
- Οι αριθμοί δηλώνουν αμινοξέα.

καρκινικά αντιγόνα (tumor antigens) ή απλώς T αντιγόνα. Η μεταγραφή της ενότητας αυτής γίνεται κατά την φορά των δεικτών του ωρολογίου παράγοντας ένα αρχικό μεταγράφημα, το οποίο μετά από διαφορικό μάτισμα (differential splicing) δίνει γένεση σε δύο mRNAs που αντιστοιχούν στο μεγάλο T και στο μικρό t αντιγόνο. Η δεύτερη ενότητα κωδικοποιεί τα όψιμα γονίδια του ιού τα οποία εκφράζονται μετά τον διπλασιασμό του DNA, ρυθμίζονται μεταγραφικά από την παρουσία του T αντιγόνου και δημιουργούν τις καψιδιακές ή δομικές πρωτεΐνες. Η μεταγραφή της ενότητας αυτής γίνεται με φορά αντίθετη των δεικτών του ωρολογίου και το παραγόμενο μοναδικό αρχικό μεταγράφημα αφού υποστεί διαφορική διασύνδεση δίνει γένεση σε τρία mRNAs που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 (68, 147). Οι δύο μεταγραφικές ενότητες του ιικού γονιδιώματος διαχωρίζονται από μια περιοχή 300bp περίπου, η οποία περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλοδιαδοχές που είναι απαραίτητες τόσο για τον διπλασιασμό του ιικού DNA (σημείο έναρξης αναδιπλασιασμού) όσο και για την έναρξη ή την καταστολή της ιικής γονιδιακής μεταγραφής (36, 68).

Ο διπλασιασμός του ιικού DNA πυροδοτείται από τη σύνδεση του T αντιγόνου στην αλληλοδιαδοχή II (CAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTG) της ρυθμιστικής περιοχής και πραγματοποιείται με διπλή κατεύθυνση. Τα νεοσυντιθέμενα μόρια DNA συμπυκνώνονται σε νουκλεοσώματα με τη βοήθεια των κυτταρικών ιστονών αμέσως μετά τον διπλασιασμό (68). Η παρουσία του T αντιγόνου, το οποίο αποτελεί το πρώτο συντιθέμενο ιικό προϊόν, ρυθμίζει την μεταγραφική ικανότητα του ιού μέσω της σύνδεσής του στην αλληλοδιαδοχή I (GTGAGGAGGCTTTTGGAGGCCT) της ρυθμιστικής περιοχής του ιικού DNA. Η πρόσδεση αυτή λειτουργεί κατασταλτικά για τη μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων με συνέπεια την ελεγχόμενη παραγωγή T αντιγόνου (36, 68, 147). Τα όψιμα ιικά γονίδια των οποίων η μεταγραφή ρυθμίζεται από το T αντιγόνο και πραγματοποιείται μετά τον διπλασιασμό του DNA μεταφραζόμενα παράγουν πολύ μεγάλες ποσότητες καψιδιακών πρωτεϊνών που στη συνέχεια πακετάρουν το ιικό γονιδίωμα (68).

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι ο λυτικός κύκλος του ιού περιλαμβάνει προσκόληση στη μεμβράνη του επιτρεπτικού κυττάρου μέσω της VP1, μεταφορά των ιικών σωματιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου με ενδοκύττωση και προώθηση στον πυρήνα με ταυτόχρονη αποβολή του καψιδίου. Η διαδικασία δημιουργίας νέων ιικών σωματιδίων ολοκληρώνεται στον πυρήνα και ο ιός



απελευθερώνεται από τα κύτταρα με έναν μηχανισμό ο οποίος δεν είναι μέχρι σήμερα πλήρως αποσαφηνισμένος (68, 147).

1.7. Ο ρόλος του αντιγόνου T του ιού SV40 στον κυτταρικό μετασχηματισμό

Ο λυτικός κύκλος ζωής του ιού που περιγράφηκε προηγουμένως αφορά τη μόλυνση κυττάρων νεφρών πιθήκου (επιτρεπτικά κύτταρα) στα οποία ο ιός είναι ικανός να αναπαραχθεί. Αντίθετα, μόλυνση άλλου είδους κυττάρων (π.χ. ποντικού ή ανθρώπου) με τον ιό SV40 δεν οδηγεί σε λύση αλλά σε μετασχηματισμό. Στην περίπτωση αυτή μετά τη μόλυνση των κυττάρων παρατηρείται έκφραση του αντιγόνου T, το γονιδίωμα όμως του ιού δεν διπλασιάζεται και γονιδιακά προϊόντα των όψιμων γονιδίων δεν ανιχνεύονται (μη επιτρεπτικά κύτταρα). Παρόλα αυτά το κύτταρο ενεργοποιεί τον μηχανισμό διπλασιασμού του DNA του, παράγοντας ένζυμα που σχετίζονται με τον διπλασιασμό σε μεγάλες ποσότητες και οδηγείται τελικά σε διαίρεση. Σ'έναν μικρό αριθμό κυττάρων, το ιικό γονιδίωμα ενσωματώνεται στο κυτταρικό DNA. Στα κύτταρα αυτά το αντιγόνο T παράγεται συνεχώς με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται σε συνεχείς κύκλους διπλασιασμού (68, 147).

Το μεγάλο αντιγόνο T του ιού SV40, το οποίο και αποτελεί τον κύριο παράγοντα κυτταρικού μετασχηματισμού, έχει γίνει αντικείμενο εκτενούς μελέτης τα τελευταία 40 χρόνια και έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα πολυλειτουργικό μόριο που εκδηλώνει τις λειτουργίες του μέσω αλληλεπιδράσεων με κυτταρικές πρωτεΐνες. Το αντιγόνο T είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 708 αμινοξέα και μέσα στο κύτταρο υπόκειται σε τροποποιήσεις, οι οποίες σχετίζονται με τις διαφορετικές του δράσεις. Μια αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο του T αντιγόνου είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του στον πυρήνα (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val). Το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) του αντιγόνου T είναι από τις καλύτερα μελετημένες και χαρακτηρισμένες αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (17, 36, 46). Στο αντιγόνο T έχουν χαρτογραφηθεί δύο θέσεις πρόσδεσης με πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αντιογκογονίδια και η ικανότητά του να συνδέεται με τις πρωτεΐνες αυτές βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της μετασχηματιστικής του δράσης. Η πρώτη περιοχή εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 103-107, και αποτελεί θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRB) καθώς και των συγγενών της πρωτεϊνών p130 και p107.

(30, 164). Η δεύτερη περιοχή εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 351-626 και περιλαμβάνει δύο περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης p53 (61) (σχήμα 3).

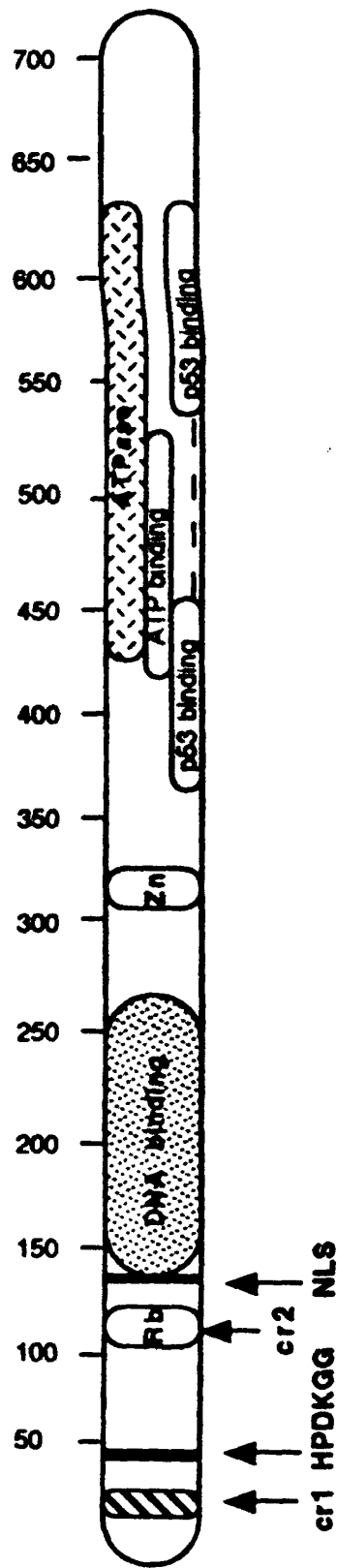
Το αμινοτελικό άκρο του μορίου (αμινοξέα 1-82) αποτελεί την περιοχή που είναι απαραίτητη τόσο για τον διπλασιασμό του ιού όσο και για τον κυτταρικό μετασχηματισμό (107). Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή αυτή συμμετέχει καταλυτικά στα φαινόμενα της μεταγραφικής ρύθμισης (108), του εξαμερισμού του αντιγόνου T προκειμένου να προσδεθεί στο σημείο έναρξης του DNA αναδιπλασιασμού (100, 107), της συναρμογής του ιικού σωματιδίου (138) καθώς και στη ρύθμιση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των Rb πρωτεϊνών (140).

1.8. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιικών γονιδιακών προϊόντων και πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Η πρώτη παρατήρηση η οποία οδήγησε στον πιθανό συσχετισμό μεταξύ ιικών γονιδιακών προϊόντων και πρωτεϊνών θερμικού σοκ έγινε το 1988 (157). Μέχρι τότε ήταν γνωστό ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ συσσωρεύονται στον πυρήνα μόνο μετά από ένα θερμικό σοκ. Οι White et al. όμως παρατήρησαν ότι μετά από μόλυνση κυττάρων Hela με αδενοϊό, σ'έναν αριθμό κυττάρων, το πρώιμο ιικό ογκογονίδιο E1A συνεντοπίζεται με πρωτεΐνες θερμικού σοκ στον πυρήνα. Το αποτέλεσμα ήταν σημαντικό αν αναλογισθεί κανείς ότι εκτός από την επαγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ που προκαλείται από την E1A, η μόλυνση με αδενοϊό έχει ως αποτέλεσμα και την ενδοκυττάρια ανακατανομή των hsp70s όπως και στο θερμικό σοκ. Ο συνεντοπισμός αυτός οδήγησε στην υπόθεση ότι πιθανόν να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ E1A και πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Πράγματι μετά από ανοσοκαθίζηση με τη χρήση αντισώματος έναντι της E1A, στο ανοσοίζημα ανιχνεύθηκαν και πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Η παρατήρηση αυτή άνοιξε τον δρόμο για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και γονιδιακών προϊόντων διαφόρων ιών.

Το 1989 οι Sawai και Butel (123) με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του T αντιγόνου του ιού SV40, σε εκχυλίσματα μετασχηματισμένων με το αντιγόνο αυτό κυττάρων BALBc/3T3 παρατήρησαν στο ανοσο-ίζημα την παρουσία μίας πρωτεΐνης Μοριακού Βάρους 73kd που αναγνωρίστηκε ως hsc70. Η ίδια ομάδα κατάφερε στη συνέχεια με χρήση μεταλλαγμένων μορφών αντιγόνου T να προσδιορίσει την περιοχή πρόσδεσης της hsc70 στο αμινοτελικό άκρο του μορίου και πιο συγκεκριμένα μεταξύ των αμινοξέων 1-97 (125). Πολύ πρόσφατα η





ΣΧ.3: Διαγραμματική απεικόνιση του T αντιγόνου, μιας ικής πρωτεΐνης 708 αμινοξέων. Οι αλληλουχίες cr1, HPDKGG, cr2 (Rb) είναι καλά συντηρημένες σε όλα τα γνωστά T αντιγόνα των ιών της οικογένειας polyoma. Η περιοχή NLS αναφέρεται σε μια ομάδα 7 αμινοξέων (PKKKRKV) υπεύθυνων για τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης. Στο διάγραμμα σημειώνονται επίσης οι περιοχές που είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση με το DNA (DNA binding), το πρότυπο δακτύλων ψευδαργύρου (Zn), οι αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για τη σύνδεση με το ATP (ATP binding), η περιοχή με δράση ATPάσης (ATPase) και η περιοχή σύνδεσης με το p53 (p53 binding) (139).

πρωτεϊνική επαφή T αντιγόνου/hsc70 επιβεβαιώθηκε και από άλλες ερευνητικές ομάδες οι οποίες απέδειξαν την καθοριστική συμμετοχή της αμινοξικής αλληλουχίας HPDK του αντιγόνου T στην παραπάνω πρόσδεση (59, 139). Η αλληλουχία αυτή που ονομάσθηκε πλαίσιο J (J box) εξαιτίας του γεγονότος ότι απαντάται στην περιοχή J των πρωτεϊνών της DnaJ οικογένειας και είναι απόλυτα συντηρημένη, θεωρήθηκε ότι πιθανόν προσδίδει στο αντιγόνο T χαρακτηριστικά βοηθού πρωτεϊνικού συνοδού (58). Επίσης πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τόσο η hsc70 όσο και η hsp70 αλληλεπιδρούν με το πυρηνικό αντιγόνο του ιού Epstein-Barr τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (63), γεγονός που υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ με τα ογκογονίδια DNA ογκογόνων ιών είναι ένα γενικότερο φαινόμενο.

Παράλληλα με αυτές τις μελέτες, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ συσχετίσθηκαν και με τα προϊόντα όψιμων ιικών γονιδίων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αλληλεπιδράσεις μεταξύ της hsp70 και των καψιδιακών πρωτεϊνών του ιού Sindbis, του ιού της στοματίτιδας (Vesicular stomatitis virus), του αδενοϊού τύπου 5, του ιού της πολιομυελίτιδας, του ιού coxsackievirus και του ιού vaccinia (54, 80, 81). Η hsc70 έχει παρατηρηθεί ότι αλληλεπιδρά με τα όψιμα γονιδιακά προϊόντα τόσο RNA ιών (rabies virus, vesicular stomatitis virus, Newcastle disease virus, influenza A virus), όσο και DNA ιών όπως ο ιός του πολυώματος και της ηπατίτιδας (27, 79, 93, 115). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών θερμικού σοκ και όψιμων ιικών γονιδιακών προϊόντων αποτελούν αποδείξεις για πιθανό ρόλο των πρωτεϊνών αυτών κατά την όψιμη φάση της ιικής μόλυνσης και την ολοκλήρωση του ιικού κύκλου ζωής.

Στην περίπτωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ογκογονιδίων και πρωτεϊνών θερμικού σοκ έγιναν υποθέσεις με βάση τόσο τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών θερμικού σοκ όσο και των ιικών ογκογονιδίων. Πιο συγκεκριμένα για την περίπτωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της hsc70 και του αντιγόνου T προτάθηκε η συμμετοχή της hsc70 στο σύμπλεγμα διπλασιασμού του ιικού γονιδιώματος (18). Βασικό επιχείρημα υπέρ αυτής της άποψης είναι η γνωστή λειτουργικότητα που έχει αποδοθεί στο αμινοτελικό άκρο του αντιγόνου T. Πράγματι, το αμινοτελικό άκρο είναι σημαντικό για τον διπλασιασμό του ιικού DNA και ως εκ τούτου η σύνδεση της hsc70 πάνω στην αμινοτελική περιοχή του T αντιγόνου δεν μπορεί να είναι άσχετη με τις βιολογικές ενεργότητες που έχουν αποδοθεί στην περιοχή αυτή. Την άποψη αυτή ενισχύει και το γεγονός ότι ο



βακτηριοφάγος λ απαιτεί για τον διπλασιασμό του την ύπαρξη λειτουργικής DnaK, η οποία είναι το προκαρυωτικό ομόλογο των hsp70s (73). Ένας άλλος πιθανός ρόλος της αλληλεπίδρασης hsc70/T μπορεί να σχετίζεται με τις γενικότερες λειτουργίες, οι οποίες έχουν αποδοθεί στην hsc ως μεσολαβητή ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών επαφών. Πιθανόν λοιπόν η σύνδεση hsc/T να σχετίζεται με τη μεταφορά του αντιγόνου T από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μιας και έχει δειχθεί ότι τουλάχιστον *in vitro* η hsc70 συμμετέχει στην μεταφορά πρωτεϊνών που περιέχουν NLS στον πυρήνα των κυττάρων (94).

1.9 Σκοπός της Εργασίας

Η έναρξη της παρούσης Εργασίας βασίσθηκε σε παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε επαγωγή μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 72 kd μετά από μόλυνση κυττάρων CV1 με τον ογκογόνο ιό SV40. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε να επάγεται σε μικρό ποσοστό και ύστερα από θερμικό σοκ, θεωρήθηκε ότι πιθανόν αποτελεί μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70 kd. Επειδή οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ αυτής της οικογένειας ήταν αντικείμενο του άμεσου ενδιαφέροντός μας, αποφασίσαμε να κλωνοποιήσουμε το cDNA που κωδικοποιεί για την παραπάνω πρωτεΐνη.

Μετά το πέρας της κλωνοποίησης, η προσπάθειά μας εστιάσθηκε στον βιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής κατά τη διάρκεια λυτικής μόλυνσης με τον ιό SV40.

Τα αποτελέσματα της μελέτης εκτίθενται αναλυτικά στο κεφ.3 της παρούσης Εργασίας και ο συσχετισμός τους με αποτελέσματα άλλων ερευνητικών ομάδων στο κεφ.4.



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΝΟΤΗΤΑ Α : ΒΑΣΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA

2.1.Κλωνοποίηση DNA

Η κλωνοποίηση ευκαριωτικού DNA σε πλασμιδιακούς φορείς έγινε με τις κλασικές μεθόδους μοριακής βιολογίας (117). Πιο συγκεκριμένα, τόσο ο πλασμιδιακός φορέας, όσο και το προς ένθεση τμήμα ευκαρυωτικού DNA επωάσθηκαν στους 37°C μέχρι πλήρους πέψης παρουσία των ανάλογων περιοριστικών ενζύμων και ρυθμιστικών διαλυμάτων. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν (κεφ.2.4) σε πηκτή αγαρόζης (1% w/v) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (10 $\mu\text{g/ml}$) και τα προκύπτοντα θραύσματα εντοπίσθηκαν μετά από έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV transilluminator, UV products Inc.). Τα μεγέθη των θραυσμάτων προσδιορίσθηκαν με βάση την θέση δεικτών (1kb ladder, BioRad) οι οποίοι ηλεκτροφορήθηκαν παράλληλα με τα δείγματα. Τα προς σύνδεση θραύσματα του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση ευκαρυωτικού DNA εκλούσθηκαν από την πηκτή με την μέθοδο Geneclean (κεφ.2.4) και επαναιωρήθηκαν σε 10 μl T.E.(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.6).

Η αντίδραση συνδέσεως πραγματοποιήθηκε σε Θερμοκρασία Δωματίου (Θ.Δ.) για 12 περίπου ώρες σε τελικό όγκο 10 μl παρουσία 1 μl DNA λιγάσης (10 units), 1 μl 10 mM ATP και ποσοτήτων ενθέματος και φορέα σε αναλογία 3/1 περίπου. Μία παράλληλη αντίδραση απουσία ενθέματος πραγματοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η επιλογή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου έγινε μετά από μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηρίων (κεφ 2.2). Πιο συγκεκριμένα 900 μl διαλύματος 100 mM CaCl_2 προστέθηκαν σε 100 μl αιωρήματος επιδεκτικών βακτηρίων στους 40°C και το προκύπτον αιώρημα διαιρέθηκε σε όγκους των 100 μl . Σε κάθε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα προστέθηκε κατόπιν το ήμισυ του προϊόντος της αντίδρασης σύνδεσης ή ποσότητα 1 ng καθαρού πλασμιδίου (θετικός μάρτυρας) ή ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας) και οι μικροσωλήνες επωάσθηκαν για 20 min στον πάγο. Στην συνέχεια, οι μικροσωλήνες μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο των 45°C και επωάσθηκαν για 1 min. Μετά το πέρας της επώασης οι μικροσωλήνες ξανατοποθετήθηκαν στον πάγο και



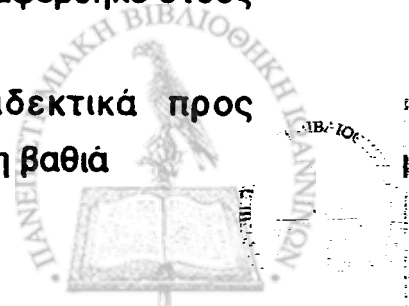
εμπλουτίσθηκαν με 1 ml διαλύματος LB (0.5% yeast extract, 1% bactotryptone, 0.5% NaCl). Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα και διασπορά ποσοτήτων 50 - 200 μl σε τρυβλία που περιείχαν στερεοποιημένο LB. και ανάλογο αντιβιοτικό για την επιλογή μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανάποδα σε κλίβανο των 37°C και επωάσθηκαν για τουλάχιστον οκτώ ώρες. Μετά το πέρας της επώασης οι ορατές βακτηριακές αποικίες χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πλασμιδίων.

2.2. Βακτηριακά στελέχη - Συνθήκες καλλιέργειας

Το βακτηριακό στέλεχος MC1061 το οποίο αποτελεί τροποποιημένη μορφή του βακτηριδίου *E.coli* [hsdR mrcB araD139 Δ(araABC-leu)7679 Δlacx74 galU galK rpsLthi] χρησιμοποιήθηκε ως φορέας ανάπτυξης των προς μελέτη πλασμιδίων, εξαιτίας της ικανότητάς του να παράγει μεγάλες συγκριτικά ποσότητες πλασμιδιακού DNA όταν μετασχηματισθεί. Το στέλεχος αυτό αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό LB, το οποίο εμπλουτίσθηκε με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά έτσι ώστε να επιλεγούν τα μετασχηματισθέντα βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα όταν ο πλασμιδιακός φορέας καθιστούσε τα βακτήρια ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, τότε η ανάπτυξη και η επιλογή των μετασχηματισθέντων βακτηριδίων έγινε σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία αμπικιλίνης (100 μg/ml) ενώ όταν ο φορέας καθιστούσε τα βακτήρια ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη, το μέσο επιλογής που χρησιμοποιήθηκε ήταν LB εμπλουτισμένο με 50 μg/ml τετρακυκλίνης. Τα θρεπτικά υλικά αποστειρώθηκαν και διατηρήθηκαν σε Θ.Δ. μέχρι τη χρήση. Για την ανάπτυξη στερεών καλλιεργειών σε τρυβλία Petri, προσετέθει άγαρ σε ποσοστό 1.5% w/v και μετά την αποστείρωση το θρεπτικό υλικό εκχύθηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία.

Η προσθήκη αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό των βακτηριακών καλλιεργειών έγινε όταν η θερμοκρασία του υλικού ήταν μικρότερη από τους 55°C. Η μακροπρόθεσμη αποθήκευση των βακτηριακών στελεχών έγινε σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες με την προσθήκη 0.8 ml καλλιέργειας και 0.2 ml αποστειρωμένης γλυκόζης κάτω από ασυπτικές συνθήκες. Το μίγμα αυτό αναδεύτηκε και αφού τοποθετήθηκε στους -20°C για 24 ώρες, μεταφέρθηκε στους -70°C.

Προκειμένου να παρασκευασθούν βακτήρια επιδεκτικά προς μετασχηματισμό, ένας μικρός όγκος βακτηρίων ανασύρθηκε από τη βαθιά



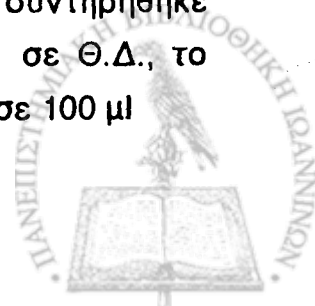
κατάψυξη (-70°C) και προστέθηκε σε 25 ml διαλύματος 2 x LB παρουσία 0.2 % γλυκόζης. Ακολούθησε επώαση, υπό ανάδευση στους 37°C , για 12 περίπου ώρες και 1 ml της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για να μολύνει 100 ml του ίδιου διαλύματος. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 37°C μέχρι η καλλιέργεια να βρεθεί σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Η παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης έγινε αποσπώντας κατά τακτά χρονικά διαστήματα δείγματα 1 ml καλλιέργειας και μετρώντας την οπτική τους πυκνότητα στα 600 nm. Όταν η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων έφθασε στο 0.5 η καλλιέργεια μεταφέρθηκε στους 0°C για δύο ώρες. Κατόπιν μοιράσθηκε σε σωλήνες Corex των 30 ml και φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm επί 5 min στους 4°C . Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το μικροβιακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 ml/ σωλήνα διηθημένου διαλύματος CB pH 5,5 (100 μM CaCl_2 , 70 mM MnCl_2 , 40mM NaAc) και παρέμεινε στους 0°C για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 5 ml διαλύματος CB / σωλήνα. Ακολούθως προστέθηκε όγκος 1.15 ml γλυκερόλης 87% στάγδην υπό ανάδευση και το παρασκεύασμα μοιράστηκε σε όγκους 100 μl σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες και αποθηκεύθηκε στους -70°C .

Ενα μέρος των βακτηρίων ελέγχθηκε για την ικανότητα του να μετασχηματίζεται χρησιμοποιώντας γνωστές πλασμιδιακές συγκεντρώσεις. Η παρασκευή θεωρήθηκε επαρκής όταν η συχνότητα μετασχηματισμού κυμαινόταν μεταξύ $0,6 - 3 \times 10^9$ αποικίες / μg DNA.

2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

2.3.1 Παρασκεύασμα DNA μικρής κλίμακας

Για να παρασκευαστεί DNA σε μικρή ποσότητα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα μετά τον μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηρίων $10 - 16$ αποικίες από την επιφάνεια του τρυβλίου ενοφθαλμίσθηκαν, κάθε μία ξεχωριστά, σε 5 ml θρεπτικού υλικού LB με αντιβιοτικό και επώασθηκαν υπό ισχυρή ανάδευση στους 37°C για 12 περίπου ώρες. Ακολούθως αιώρημα 1,5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα ενώ το υπόλοιπο των καλλιεργειών συντηρήθηκε στους 4°C . Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (2 min, 12.000 rpm) σε Θ.Δ., το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl



διαλύματος I (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA). Στο διάλυμα προστέθηκαν 200 μl φρέσκου διαλύματος II (1% SDS σε 0,2 M NaOH) και 150 μl διαλύματος III (3 M οξικό νάτριο, pH 4,8). Το προκύπτον διάλυμα αναδεύτηκε ισχυρά και φυγοκεντρήθηκε όπως προηγουμένως. Το ίζημα απομακρύνθηκε, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα και εκχυλίσθηκε δύο φορές με ίσο όγκο κορεσμένης φαινόλης και μία φορά με διάλυμα χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (49/1). Η εκχύλιση έγινε με ισχυρή ανάμιξη, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση της οργανικής φάσης. Η προκύπτουσα υδατινή φάση μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και το πλασμιδίο καταβυθίστηκε με την προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης και επώαση για 15 λεπτά στους -70°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (5 min, 12.000 rpm), έκπλυση του DNA με 70% αιθανόλη και ξήρανση του ιζήματος σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού (Speed Vac. concentrator SVC100H SAVANT). Το αποξηραμένο ίζημα επαναιωρήθηκε σε 20 μl T.E. και ελέγχθηκε με πέψη παρουσία των ανάλογων περιοριστικών ενζύμων. Πριν την ηλεκτροφόρηση έγινε επώαση του δείγματος με ριβονουκλεάση A (1 μg/μl, 10 min, Θ.Δ.) για την αποικοδόμηση του βακτηριακού RNA. Με την ηλεκτροφόρηση ταυτοποιήθηκε το σωστό μέγεθος του ενθέματος και επιλέχθηκε η βακτηριακή καλλιέργεια που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας πλασμιδιακού DNA.

2.3.2 Παρασκεύασμα DNA μεγάλης κλίμακας

Για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας πλασμιδίου, 1 ml από την εξακριβωμένα θετική καλλιέργεια, ενοφθαλμίσθηκε σε ένα λίτρο LB-αντιβιοτικού και επώασθηκε υπό ισχυρή ανάδευση στους 37°C για τουλάχιστον 10 ώρες. Ακολούθως τα βακτήρια συνελέγησαν με φυγοκέντρηση. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 20 ml ψυχρού διαλύματος I (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) και στο προκύπτον εναιώρημα προστέθηκαν 20 ml διαλύματος I εμπλουτισμένου με 5 mg/ml λυσοζύμης. Ακολούθησε προσθήκη 60 ml διαλύματος II (1% SDS σε 0,2 M NaOH), ανάμιξη και προσθήκη 60 ml ψυχρού διαλύματος III (3M οξικό νάτριο, pH 4,8). Το προκύπτον αιώρημα επώασθηκε για 10 λεπτά στους 40°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο δοχείο και το πλασμιδιακό DNA καταβυθίστηκε με την προσθήκη 80ml ισοπροπανόλης και επώαση 15 λεπτών σε Θ.Δ.. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (30 min, 10.000 rpm) σε Θ.Δ.

Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 8.5 ml T.E. pH 7,6 και μεταφέρθηκε σε σωλήνα Corex των 30ml. Ακολούθησε προσθήκη 9.0 g CsCl, ανάμιξη και επώαση για 20 min σε Θ.Δ.. Ο δείκτης διάθλασης του διαλύματος ελέγχθηκε σε διαθλασίμετρο και αφού ρυθμίστηκε στο 1.3960 προστέθηκαν 500 ml 10 mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο. Το προκύπτον αιώρημα μεταφέρθηκε σε αμπούλες VTi 65 οι οποίες ασφαλίσθηκαν με θερμοκόλληση και φυγοκεντρήθηκαν σε κεφαλή VTi 65 στις 45000 rpm και στους 20° C για 16 - 18 ώρες. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, η ζώνη εστιασμού του πλασμιδιακού DNA εντοπίσθηκε με την χρήση λυχνίας υπεριώδους φωτός (Model UVSL-58, Ultra Violet Products) και ανασύρθηκε με σύριγγα των 5 ml.

Το πλασμίδιο μεταφέρθηκε σε σωλήνα Corex και καθαρίσθηκε ύστερα από εκχυλίσσεις με ίσο όγκο βουτανόλης κορεσμένης με νερό (ddH₂O). Στο διαυγές διάλυμα προστέθηκαν 6 ml T.E και το DNA κατακρημνίσθηκε με 8 ml ισοπροπανόλης στους - 70° C επί 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (10000 rpm, 30 min στους 40C), ξήρανση και επαναιώρηση του ιζήματος σε 300 ml T.E. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και επακολούθησε δεύτερη κατακρύμνηση με την προσθήκη 10 ml 5M NaCl, 900 ml αιθανόλης στους - 70° C. Τελικά το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm για 20 min, το ίζημα εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη, ξηράνθηκε στον φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού και επαναιωρήθηκε σε 500 ml T.E.

Η ποσότητα του απομονωμένου DNA υπολογίσθηκε φωτομετρικά, με μέτρηση στα 260 nm και με βάση την σχέση: Μία μονάδα οπτικής πυκνότητας αντιστοιχεί με DNA 50 µg /ml. Τέλος το παρασκευασθέν DNA ελέγχθηκε με πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης. Ανάκτηση θραυσμάτων DNA.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πηκτές 0,8%-1% (w/v) αγαρόζης σε TBE (0,089 M Tris, 0,089 M βορικό οξύ, 0,002 M EDTA). Μετά το βρασμό προστέθηκε στο διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml δημιουργήθηκε επίπεδη πηκτή σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα DNA αναμίχθηκαν σε αναλογία 5:1 με διάλυμα 6xLB (30% γλυκερόλη, 0,25% μπλέ της βρωμοφαινόλης) και ηλεκτροφορήθηκαν σε TBE παράλληλα με δείγμα DNA δεικτών (1 kb ladder ή 200bp-12.000bp ladder, BRL).



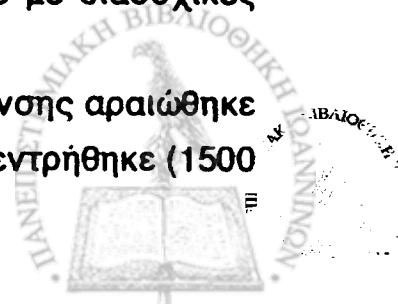
Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε Θ.Δ. υπό σταθερή τάση και ακολούθησε παρατήρηση της πηκτής σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV transiluminator, Ultra Violet Products inc).

Η ανάκτηση θραυσμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης έγινε με χρήση του πακέτου υλικών (kit) GeneClean (BIO 101, Inc. PO Box 2284, La Jolla) σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία: Η ζώνη εστιασμού του συγκεκριμένου τμήματος DNA αφαιρέθηκε από την πηκτή και τοποθετήθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Στη συνέχεια προστέθηκε 0,9 ml ιωδιούχου νατρίου και 0,1 ml τροποποιητή του TBE (TBE modifier), το δείγμα θερμάνθηκε για πέντε λεπτά στους 55°C, μεταφέρθηκε στους 0-4°C και εμπλουτίστηκε με 15 μl σφαιριδίων υάλου. Μετά από παραμονή για πέντε λεπτά στους 0-4°C το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (30 sec, 12.000 rpm) και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις κάτω από τις ίδιες συνθήκες, τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν σε 15 μl H₂O και θερμάνθηκαν για πέντε λεπτά στους 55°C. Μετά από φυγοκέντρωση σε Θ.Δ. (1 min, 12.000 rpm) το υπερκείμενο που περιείχε το εκλουσθέν DNA μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα και θεωρήθηκε έτοιμο για χρήση.

2.5. Σήμανση DNA με τη μέθοδο της μετάφρασης εγκοπής (nick translation)

Η ραδιενεργός σήμανση τμημάτων DNA έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μετάφρασης εγκοπής, γνωστής ως nick translation (113). Για τις αντιδράσεις σήμανσης χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών της Amersham (Amersham kit). Σε μια τυπική αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες DNA περίπου 250 ng ενώ η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl, στους 14°C επί 2,5 ώρες. Τα σημανθέντα, με ³²P dCTP, θραύσματα DNA διαχωρίστηκαν από τα μη ενσωματωμένα dNTPs με τη χρήση στήλης μοριακού ηθμού G50. Η κατασκευή των στηλών έγινε ως εξής: σύριγγες ινσουλίνης αποχωρίστηκαν από τις βελόνες και στο μπροστινό τους τμήμα προσετέθει υαλοβάμβακας ο οποίος συμπίεσθηκε με το έμβολο. Μετά την απόρριψη του εμβόλου στη σύριγγα προσετέθει εναιώρημα G50 σε T.E. το οποίο και πακεταρίσθηκε με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και πληρώσεις στις 1500 rpm επί 3 min.

Το προς καθαρισμό διάλυμα DNA της αντίδρασης σήμανσης αραιώθηκε σε τελικό όγκο 150 μl με T.E., τοποθετήθηκε στη στήλη και φυγοκεντρήθηκε (1500



rpm, 3min) σε Θ.Δ.. Το έκλουσμα με τα σημασμένα θραύσματα DNA, μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και η απόδοση της αντίδρασης σήμανσης υπολογίσθηκε μετά από μέτρηση 1 μl του εκλούσματος σε μετρητή ραδιενέργειας και με αναγωγή των κτύπων που μετρήθηκαν ανά μg DNA (μέτρηση Cerenkof). Η ειδική ενεργότητα των μορίων ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν κυμάνθηκε μεταξύ 5×10^8 και 10^{10} cpm/μg DNA. θραύσματα με απόδοση $<2 \times 10^8$ cpm/μg δεν χρησιμοποιήθηκαν.

2.6. Ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (DNA sequencing)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA ήταν η μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (Chain Termination Method) ή διδεοξική μέθοδος (119) και το πακέτο υλικών ήταν της USB (USB sequenase version 2.0 DNA sequencing kit). Σε κάθε αντίδραση ανάγνωσης αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκαν 3-5 μg πλασμιδιακού DNA το οποίο είχε παρασκευασθεί όπως περιγράφηκε (κεφ. 2.3.2) και 200-250 ng πριμοδοτικής αλληλουχίας.

Το DNA μετουσιώθηκε με προσθήκη 0.1 όγκων διαλύματος 2 M NaOH, 2 mM EDTA και επώαση στους 37°C για 30 min. Το μίγμα κατόπιν ουδετεροποιήθηκε με 0.1 όγκους 3M οξικού νατρίου pH 4.5 - 5.5 και το DNA απομονώθηκε ύστερα από καθίζηση σε με 2-4 όγκους αιθανόλης (-70°C, για 15 min). Μετά την καθίζηση το DNA φυγοκεντρήθηκε, το ίζημα εκπλύθηκε μία φορά με 70% αιθανόλη και επαναιωρήθηκε σε 7 μl απεσταγμένο νερό.

Στο μετουσιωμένο DNA (7 μl) προστέθηκαν 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (Reaction Buffer) και 1μl διαλύματος πριμοδοτικής αλληλουχίας σε T.E. που περιείχε 200-250ng πριμοδοτικών αλληλοδιαδοχών. Το μίγμα θερμάνθηκε στους 65°C για 2 min και αφέθηκε να κρυώσει αργά για περισσότερο από 30 min, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανόπτωση (annealing). Στο μίγμα της αντίδρασης ανόπτωσης (10 μl) προστέθηκαν 1 μl 0.1 M DTT, 2 μl αραιωμένο 1:5 διάλυμα σήμανσης (μίγμα dNTPs), 0.5 μl ^{35}S dATP και 2 μl αραιωμένη 1:8 Sequenase (τελικός όγκος 15.5 μl). Ακολούθησε επώαση 5 min σε Θ.Δ. μετά το πέρας της οποίας, ποσότητες 3.5 μl μίγματος μεταφέρθηκαν σε 4 μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 2.5 μl μίγματος dNTPs με ένα από τα ddNTPs και είχαν προθερμανθεί στους 37°C για ένα λεπτό.

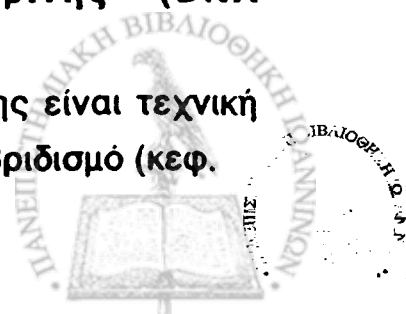


Τα προκύπτοντα μίγματα επωάσθηκαν στους 37°C για 10 λεπτά και οι αντιδράσεις τερματίσθηκαν με την προσθήκη 4 μl διαλύματος τερματισμού (95% φορμαμίδιο, 20 mM EDTA, 0.05% μπλέ της βρωμοφαινόλης, 0.05% Xylene Cyanol). Η αποθήκευση των τελικών προϊόντων, μέχρι την ηλεκτροφόρησή τους έγινε στους -20°C.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων έγινε σε πηκτή ακρυλαμίδιου υψηλής διαχωριστικής ικανότητας υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε ακρυλαμίδιο ήταν 5% και η παρασκευή της πραγματοποιήθηκε με ανάμιξη 7.6 gr ακρυλαμίδιου, 0.4 gr δις-ακρυλαμίδιο, 50 gr ουρία (τελική συγκέντρωση ουρίας στο διάλυμα 8.3 M), 10 ml 10xTBE και 40 ml dd H₂O. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση (περίπου 30 min σε Θ.Δ.), το διάλυμα διηθήθηκε (φίλτρο 0.45 nm) και απαερώθηκε. Κατόπιν προστέθηκε υπό ανάδευση 1 ml διαλύματος 10% υπερθειικού αμμωνίου, 25 μl TEMED και η προκύπτουσα πηκτή αποχύθηκε προσεκτικά μεταξύ των πλακών της ηλεκτροφορητικής συσκευής (33 x 42 cm, BRL Sequencing apparatus). Η πηκτή αφέθηκε να πολυμερισθεί σε Θ.Δ. για 20-30 min. Κατόπιν μεταφέρθηκε στους 40°C για χρήση μετά από 2 ώρες. Το σύστημα πλακών-πηκτής τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προηλεκτροφορήθηκε επί 30 min στα 1500 volt. Τα προς ανάλυση δείγματα DNA θερμάνθηκαν στους 100°C για 5 min και 2.5 μl από το καθένα ηλεκτροφορήθηκε υπό τάση 1200 volt. Η θερμοκρασία της πηκτής διατηρήθηκε στους 50°C περίπου καθ'όλη την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πλάκες αποχωρίσθηκαν και η πηκτή αφού μονιμοποιήθηκε με ψεκασμό διαλύματος 5% οξικού, 10% μεθανόλης προσκολήθηκε με επαφή σε 3MM χαρτί ίσου μεγέθους. Στην συνέχεια μεταφέρθηκε στον ξηραντήρα όπου και ξηράνθηκε υπό κενό σε θερμοκρασία 80°C επί 90min. Μετά την ξήρανση μεταφέρθηκε σε κασσέτα αυτοραδιογραφίας και κάτω από συνθήκες συσκότισης μετά την τοποθέτηση φιλμ η κασσέτα σφραγίσθηκε, μεταφέρθηκε στους -70°C και το φιλμ εμφανίσθηκε μετά από 12-16 ώρες περίπου.

2.7 Ακίνητοποίηση DNA σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (DNA immobilization on filters)

Η ακίνητοποίηση DNA πάνω σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης είναι τεχνική χρήσιμη και απαραίτητη με εφαρμογές όπως, η επιλογή RNA με υβριδισμό (κεφ.



2.15) όταν το φίλτρο με το ακινητοποιημένο DNA επωαστεί με εκχύλισμα ολικού κυτταρικού ή πυρηνικού RNA σημασμένου ή μη. Το υβριδοποιημένο RNA μπορεί να εκλουσθεί και να χρησιμοποιηθεί σε *in vitro* συστήματα μετάφρασης (δες *in vitro* translation) ή αν είναι ραδιενεργά σημασμένο να παραμείνει στο φίλτρο και να ανιχνευθεί με αυτοραδιογραφία όπως π.χ. στην περίπτωση μελέτης της πυρηνικής μεταγραφής (Run on transcription assay).

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για την ακινητοποίηση του DNA πάνω στα φίλτρα ήταν η ακόλουθη: Προετοιμάστηκε διάλυμα 1N NaOH και ελέγχθηκε το pH (pH=14). Ένα ml του διαλύματος αυτού προστέθηκε σε 9 ml διαλύματος T.E. pH 7.5 και το pH του νέου διαλύματος ελέγχθηκε να είναι περίπου 13. Φίλτρο νιτροκυτταρίνης κόπηκε στο μέγεθος της συσκευής dot blot και αφού ενεργοποιήθηκε με σύντομο εμβαπτισμό σε dd H₂O τοποθετήθηκε στη συσκευή. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε στο 1 ml/min και συνολικά 20 ml 6xSSC πέρασαν από κάθε οπή της συσκευής ξεπλένοντας τα φίλτρα.

Τα δείγματα του DNA προετοιμάσθηκαν ως εξής: ποσότητα DNA ίση με 125 µg αραιώθηκε σε T.E και στο διάλυμα προστέθηκε ποσότητα διαλύματος 1N NaOH έτσι ώστε ο τελικός όγκος να γίνει 2 ml και η τελική συγκέντρωση NaOH 0.1 N. Κατόπιν σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν άλλα 8 ml 0.1 N NaOH οπότε ο τελικός όγκος κάθε δείγματος έγινε 10 ml. Το κάθε δείγμα μοιράσθηκε σε πέντε σωλήνες με 2 ml διαλύματος (25 µg DNA) ο καθένας. Οι σωλήνες επώαστηκαν στους 100°C επί 8 min και μεταφέρθηκαν απ'ευθείας στον πάγο όπου προστέθηκαν 2 ml 1.5 Hepes pH 7.12 και 4 ml 12 x SSC (τελική συγκέντρωση 6xSSC) σε καθέναν απ' αυτούς. Αμέσως μετά τα δείγματα φορτώθηκαν στη συσκευή. Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα (25µg DNA σε όγκο 8 ml) φορτώθηκε σε μία οπή της συσκευής. Ακολούθησε έκπλυση των φίλτρων με 5 ml 6xSSC ανά οπή. Μετά το τέλος της έκπλυσης, τα τμήματα της νιτροκυτταρίνης που αντιστοιχούσαν στις οπές απ' όπου έγινε η απόχυση των δειγμάτων κόπηκαν κατά το δυνατόν στις διαστάσεις των οπών, ξηράνθηκαν πάνω σ'ένα διηθητικό χαρτί 3MM και επώαστηκαν στους 80°C επί δύο ώρες. Με το τέλος της επώασης τα φίλτρα θεωρήθηκαν έτοιμα για χρήση, είτε άμεσα είτε ύστερα από αποθήκευση σε ξηρό μέρος.



ΕΝΟΤΗΤΑ Β : ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ cDNA ΣΕ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ Λ ΦΑΓΩΝ

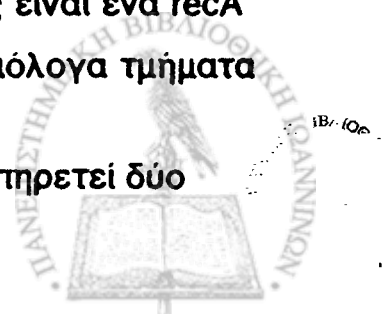
2.8. Βιβλιοθήκη cDNA με φορέα κλωνοποίησης τον φάγο λ ZAPII.

Ο λ ZAP είναι ένας φορέας εισδοχής (insertion vector), βιοτεχνολογικό παράγωγο του φάγου λ, εξοπλισμένο με πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης εσωτερικά μιάς πλασμιδιακής αλληλουχίας, η οποία μπορεί να αποκοπεί από το γονιδίωμα του φάγου *in vivo* και να μετατραπεί σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript SK. Το πλασμίδιο pBluescript, στο οποίο βρίσκεται κλωνοποιημένο το ένθεμα DNA αποκόπτεται από το γονιδίωμα του φάγου παρουσία των f1 ή M13 βοηθών φάγων. Ο λ ZAP περιέχει δύο αλληλουχίες, I και T, εκατέρωθεν της πλασμιδιακής αλληλουχίας στην κεντρική του περιοχή, απαραίτητες για την έναρξη I (initiation) και λήξη T (termination) της σύνθεσης της αλυσίδας + των βοηθών φάγων. Ο λ ZAPII φάγος είναι παράγωγο του λZAP με την μόνη διαφορά ότι η Sam100 μετάλλαξη έχει απαλειφθεί. Η αλλαγή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον καλύτερο πολλαπλασιασμό του φάγου στα κύτταρα ξενιστές. Η βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη ήταν βιβλιοθήκη με φορέα κλωνοποίησης τον φάγο λ ZAPII. Συγκεκριμένα, τα DNA ενθέματα στη βιβλιοθήκη αυτή ήταν cDNA που προήλθαν από την ανάστροφη μεταγραφή πολυαδενυλιωμένου RNA κυττάρων COS. Τα ενθέματα κλωνοποιήθηκαν στον λ ZAPII στην θέση EcoRI. Το μέσο μέγεθος των cDNA ενθεμάτων σύμφωνα με τους κατασκευαστές (Stratagene λZAPII cloning kit) ήταν 1 kb.

2.9 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία κλωνοποίησης.

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία κλωνοποίησης ήταν το XL1-Blue. Το XL1-Blue είναι ένα στέλεχος του *E.coli* με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό ως στέλεχος για κλωνοποίηση με φορέα τον φάγο λ. Ο φάγος λ πολλαπλασιάζεται αποτελεσματικά στα κύτταρα του στελέχους αυτού παράγοντας γαλάζιες (οι μη ανασυνδυασμένοι φάγοι) και λευκές πλάκες (οι φάγοι που έχουν ανασυνδυασθεί). Το στέλεχος είναι ένα *recA*⁻ στέλεχος πράγμα που σημαίνει ότι αδυνατεί να ανασυνδυάσει ομόλογα τμήματα DNA, αδυναμία χρήσιμη στην κλωνοποίηση γονιδίων.

Το πλασμίδιο F που περιέχεται στο στέλεχος αυτό, εξυπηρετεί δύο



σκοπούς. Κατ'αρχήν το πλασμίδιο F περιέχει την μετάλλαξη ΔM15 του *lacZ* γονιδίου απαραίτητη για την ύπαρξη α-συμπληρωματικότητας του αμινοτελικού άκρου του γονιδίου *lac Z* που βρίσκεται στον φάγο λ ZAP. Η ταυτόχρονη έκφραση αυτών των δύο μεταλλαγμάτων του *lacZ* γονιδίου απαιτείται για τον σχηματισμό λειτουργικής β γαλακτοσιδάσης από τον λ ZAP φορέα. Η είσοδος ενός cDNA κλώνου στην περιοχή κλωνοποίησης (polylinker) εσωτερικά του γονιδίου *lacZ* καταστρέφει την έκφραση του γονιδίου αυτού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση λευκών πλακών σε καλλιέργειες βακτηρίων μολυσμένων με φάγους ή λευκών αποικιών σε καλλιέργειες βακτηρίων μετασχηματισμένων με φαγίδια. Οι πλάκες που προέρχονται από φάγους που δεν έχουν ανασυνδυασθεί θα είναι γαλάζιες ενώ το ίδιο θα συμβαίνει και με αποικίες βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν από μη ανασυνδυασμένα φαγίδια. Η δεύτερη λειτουργία του πλασμιδίου F οφείλεται στο ότι περιέχει γονίδια για την έκφραση των βακτηριακών συζευκτικών τριχιδίων (F pili) που είναι απαραίτητα για τη μόλυνση των βακτηρίων αυτών με ινώδεις φάγους (f1 ή M13 φάγους). Η αποκοπή ενός ενθέματος cDNA από τον λZAPII φάγο - φορέα απαιτεί τη συμμόλυνση με έναν ινώδη βοηθό φάγο. Το βακτηριακό στέλεχος XL1-Blue περιέχει το F πλασμίδιο το οποίο είναι απαραίτητο τόσο για την επιλογή των ανασυνδυασμένων με βάση το χρώμα (color selection) όσο και για τη διαδικασία εξαγωγής του πλασμιδίου *in vivo* (*in vivo excision*). Τέλος το πλασμίδιο F περιέχει τον καταστολέα *lac* (*lac Iq* γονίδιο) με συνέπεια να αναστέλλει τη μεταγραφή από τον υποκινητή του γονιδίου *lacZ* απουσία του επαγωγέα IPTG. Ο καταστολέας αυτός είναι απαραίτητος για τη ρύθμιση της έκφρασης χιμαιρικών πρωτεϊνών (fusion proteins) που πιθανόν να είναι τοξικές για το βακτήριο. Επίσης στο πλασμίδιο F εντοπίζεται το γονίδιο Tn10 το οποίο προσδίδει στο βακτήριο ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Στις διαδικασίες κλωνοποίησης που δεν σχετίζονταν με βακτηριοφάγους, χρησιμοποιήσαμε το βακτηριακό στέλεχος MC1061 το οποίο δίνει μεγάλες ποσότητες πλασμιδιακού DNA όταν μετασχηματισθεί και μάλιστα υψηλότερης καθαρότητας απ' ότι το στέλεχος XL1Blue.

2.10 Υλικά ανάπτυξης βακτηρίων

Το βακτηριακό στέλεχος XL1Blue αναπτύσσεται κανονικά σε θρεπτικό μέσο LB (1% NaCl, 1% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast Extract). Επειδή όμως το πλασμίδιο F μπορεί να χαθεί εύκολα, κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων σε υγρή



καλλιέργεια προσθέτουμε στο καλλιεργητικό υλικό και τετρακυκλίνη (15 $\mu\text{g/ml}$). Καλλιέργειες κυττάρων XL1Blue που χρησιμοποιήθηκαν για σπορά φάγων επιλέγησαν αρχικά σε θρεπτικό υλικό LB/tet και κατόπιν αναπτύχθηκαν σε L.B. παρουσία μαλτόζης και MgSO_4 (L.B., 0.2% μαλτόζη, 10 mM MgSO_4). Βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται παρουσία μαλτόζης απορροφούν τον βακτηριοφάγο λ πιο αποτελεσματικά και αυτό γιατί το σάκχαρο επάγει το οπερόνιο της μαλτόζης (maltose operon), το οποίο περιέχει το γονίδιο *lam B* που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα του φάγου λ.

Το βακτηριακό στέλεχος MC1061 αναπτύσσεται και αυτό σε LB. Για την επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε LB εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό ανάλογα με το πλασμίδιο-φορέα. Αν ο φορέας καθιστούσε τα βακτήρια ανθεκτικά στην αμπικιλίνη χρησιμοποιήθηκε LB/amp (LB, 50-100 $\mu\text{g/ml}$ amp) ενώ αν ο φορέας μετέφερε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, τα βακτήρια επιλέχθηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία τετρακυκλίνης (LB, 15 $\mu\text{g/ml}$ tet).

2.11 Αναζήτηση σε βιβλιοθήκη συμπληρωματικού DNA

Η τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης έγινε ως εξής: Βακτηριακά κύτταρα *E.coli* του στελέχους XL1-Blue διεσπάρησαν αραιά (100-500 κύτταρα / τρυβλίο) σε τρυβλία L.B. που περιείχαν 50 $\mu\text{g/ml}$ τετρακυκλίνη. Μετά από επώαση 16 ωρών στους 37°C επιλέχθηκε μια βακτηριακή αποικία η οποία και ενοφθαλμίστηκε σε 5 ml θρεπτικού υλικού L.B. εμπλουτισμένου με 0.2% (w/v) μαλτόζη και 10 mM MgSO_4 και αφέθηκε να αναπτυχθεί στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να γίνει 0.8. Ταυτόχρονα έγιναν αραιώσεις 10^{-2} - 10^{-8} της βιβλιοθήκης σε τελικό όγκο 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος SM (5.8 gr NaCl, 2.0 gr MgSO_4 , 50 ml Tris-Cl pH7.5, 5 ml 2% gelatin w/v/ liter). Οι αραιώσεις αυτές αναμίχθηκαν με 600 ml της βακτηριακής καλλιέργειας και το προκύπτον αιώρημα επωάσθηκε στους 37°C υπό ανάδευση για 10 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί η προσρόφηση του φάγου. Στην συνέχεια τα μολυσμένα βακτήρια αναμίχθηκαν με 8 ml άγαρ επικάλυψης (0.7% αγαρόζη σε LB), το οποίο ήταν διατηρημένο σε υγρή κατάσταση μέσα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 48°C και το προκύπτον αιώρημα εκχύθηκε σε τρυβλίο διαμέτρου 150 mm το οποίο είχε εκ των προτέρων επιστρωθεί με 20 ml στερεού θρεπτικού υλικού (L.B., 0.2% (w/v) μαλτόζη, 10mM MgSO_4 , 0.7% άγαρ). Τα τρυβλία επωάσθηκαν στους 37°C για 8-10 ώρες και

ακολουθώς μετρήθηκαν οι σχηματισθείσες πλάκες και υπολογίσθηκε ο τίτλος της βιβλιοθήκης σε μονάδες σχηματισμού πλακών ανά κυβικό εκατοστό διαλύματος βιβλιοθήκης (pfu/ml).

Η αναζήτηση κλώνων έγινε ύστερα από διασπορά 20 τρυβλίων με 50.000 pfu το καθένα (100 μ l από 10^{-5} αραιώση της βιβλιοθήκης) και οι δημιουργηθείσες πλάκες μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης ως εξής: Για κάθε τρυβλίο χρησιμοποιήθηκαν δύο φίλτρα, το αυθεντικό και το αντίγραφο του τα οποία τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του τρυβλίου καλύπτοντας τη βακτηριακή στοιβάδα και προσρόφησαν τους φάγους παθητικά με επαφή 2 και 4 λεπτών αντίστοιχα. Ο προσανατολισμός των φίλτρων πάνω στο τρυβλίο κατέστη δυνατός με τρύπημα του αυθεντικού φίλτρου με βελόνα στην περιφέρειά του κατά τη διάρκεια της προσρόφησης των φάγων και με ταυτόχρονο τρύπημα στις ίδιες θέσεις του αγαρ του τρυβλίου. Το φίλτρο αντίγραφο απλώς τρυπήθηκε και αυτό στις ίδιες θέσεις κατά τη διάρκεια της προσρόφησης των φάγων. Μετά την προσρόφηση των φάγων, τα φίλτρα τοποθετήθηκαν, με την πλευρά που δεν ήρθε σε επαφή με τους φάγους σε διηθητικό χαρτί 3MM εμποτισμένο σε 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH και αφέθηκαν επί 2 min. Ακολούθησε ουδετεροποίηση του pH των φίλτρων με την τοποθέτησή τους σε διηθητικό χαρτί 3MM εμποτισμένο σε διάλυμα 1.5M NaCl, 0.5M Tris-Cl, pH 8.0. Τέλος, τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί 3MM εμποτισμένο σε 0.2 M Tris-HCl pH7.5, 2xSSC επί 30 sec για ένα σύντομο ξέπλυμα και στη συνέχεια τα φίλτρα αφέθηκαν να στεγνώσουν σε στεγνό διηθητικό χαρτί 3MM. Τα φίλτρα επώασθηκαν επί 2 ώρες σε κλίβανο θερμοκρασίας 80° C ώστε να ακινητοποιηθεί το DNA και μετά την επώαση αυτή διατηρήθηκαν σε Θ.Δ. και ξηρό περιβάλλον μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα τρυβλία τυλίχθηκαν σε παραφίλμ και αποθηκεύθηκαν στους 4°C.

Για τον προϋβριδισμό τα φίλτρα υγροποιήθηκαν σε διάλυμα προϋβριδισμού (2 x Pipes pH6.5, 50% απιονισμένο φορμαμίδιο, 0.5% SDS) θερμοκρασίας 45° C και εγκλείσθηκαν ανά πέντε σε σάκκους που περιείχαν 10 ml διαλύματος προϋβριδισμού εμπλουτισμένου με 1 μ g/μl προβρασμένου DNA σπέρματος σολωμού και οι σάκκοι ασφαλίσθηκαν αεροστεγώς. Ο προϋβριδισμός πραγματοποιήθηκε στους 45° C σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση για 18 ώρες. Μετά το τέλος του προϋβριδισμού το διάλυμα προϋβριδισμού απομακρύνθηκε και τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε νέους σάκκους επώασης. Το διάλυμα υβριδισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο με το διάλυμα προϋβριδισμού. Το DNA σπέρματος



σολωμού μαζί με τον ραδιενεργό ανιχνευτή βράστηκαν επί 3 min πριν τοποθετηθούν στο διάλυμα υβριδισμού. Συνολικά χρησιμοποιήθηκε τόσο DNA σπέρματος σολωμού, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1μg/μl ενώ ο ραδιενεργός ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση υβριδισμού αντιστοιχούσε σε 2 - 5x10⁷ cpm. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε στους 45^o C υπό ανάδευση για περισσότερο από 18 ώρες. Οι εκπλύσεις των φίλτρων εξαρτήθηκαν από την αυστηρότητα των συνθηκών που θέλαμε να ακολουθήσουμε. Γενικά, κατά την πρώτη αναζήτηση στη βιβλιοθήκη, ακολουθήσαμε συνθήκες χαμηλής αυστηρότητας οι οποίες έγιναν αυστηρότερες, όταν επιστρέψαμε στη βιβλιοθήκη με σκοπό την αναζήτηση DNA κλώνων πλήρους μεγέθους (full length) χρησιμοποιώντας ως ραδιενεργούς ανιχνευτές μικρότερα κομμάτια DNA των ίδιων κλώνων. Πιο συγκεκριμένα τα φίλτρα τοποθετήθηκαν μετά τον υβριδισμό σε δοχείο με διάλυμα έκπλυσης, το οποίο περιείχε SSC και SDS σε συγκεντρώσεις ανάλογες με τον βαθμό αυστηρότητας (βλέπε παρακάτω) και το δοχείο εμβαπτίσθηκε σε υδατόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας όπου και επώασθηκε υπό ανάδευση. Γενικά η ελάττωση της συγκέντρωσης SSC στο διάλυμα έκπλυσης και η αύξηση της θερμοκρασίας έκπλυσης συνεπάγονται αύξηση των συνθηκών αυστηρότητας.

Κατά την πρώτη αναζήτηση στη βιβλιοθήκη οι εκπλύσεις που πραγματοποιήσαμε ήταν οι ακόλουθες : i) 2 x SSC, 0.1% SDS επί 30 min στους 45^oC , ii) 0.2 x SSC, 0.1% SDS επί 30min στους 45^oC, iii) 0.1xSSC, 0.1% SDS επί 30 min στους 45^o C. Σε περιπτώσεις που η αυστηρότητα των συνθηκών έπρεπε να είναι υψηλή, η θερμοκρασία κατά τις εκπλύσεις αυξανόταν με ανώτερο το όριο των 65^o C. Μεταξύ διαδοχικών εκπλύσεων η ποσότητα της παραμένουσας στα φίλτρα ραδιενέργειας ελέγχθηκε με μετρητή GEIGER (Series 900 mini monitor, mini instruments L.T.D. U.K.) και εκτιμήθηκε μ' αυτόν τον τρόπο η αποτελεσματικότητα των εκπλύσεων. Μετά το τέλος των εκπλύσεων, τα φίλτρα στέγνωσαν σε Θ.Δ., τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί 3MM και εκτέθηκαν σε ακτινογραφικό φιλμ στους -70^oC για 16 τουλάχιστον ώρες. Οι θετικές πλάκες εντοπίσθηκαν ύστερα από προσανατολισμό των ακτινογραφικών φιλμ πάνω στα τρυβλία και απομονώθηκαν με αποκοπή της περιοχής (διαστάσεων 1 cm²) και μεταφορά σε αποστειρωμένο σωλήνα που περιείχε 1 ml SM ρυθμιστικό διάλυμα και μία έως δύο σταγόνες χλωροφόρμιο. Οι σωλήνες αφέθηκαν στους 40^oC για περισσότερο απο 12 ώρες για την απελευθέρωση των φάγων.



Ακολούθησε επανάληψη της όλης διαδικασίας (second screen) με στόχο την τελική απομόνωση του θετικού κλώνου. Συνοπτικά έγινε τιτλοδότηση του παρασκευάσματος και σπορά βακτηρίων μολυσμένων με φάγους σε τρυβλία των 10 cm όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Ο αριθμός των rfu ανά τρυβλίο υπολογίστηκε να κυμανθεί μεταξύ 50 και 80. Η διαδικασία της προσρόφησης των φάγων πάνω στα φίλτρα, η επεξεργασία των φίλτρων, ο προϋβριδισμός, ο υβριδισμός, η έκθεση και η εμφάνιση των φίλμ έγιναν σύμφωνα με τη διαδικασία που ήδη περιγράφηκε. Η θετική πλάκα μετά την αποκοπή της από το άγαρ τοποθετήθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου και απελευθερώθηκε ο προς αναζήτηση φάγος.

Η εξαγωγή του DNA ενθέματος έγινε *in vivo* (*in vivo* excision) ως εξής: Σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα των 12 ml προστέθηκαν 200 μl υγρής καλλιέργειας βακτηρίων του στελέχους XL1-Blue τα οποία ανασύρθηκαν από καλλιέργεια οπτικής πυκνότητας 1, 200 μl αιωρήματος λZAPII φάγου (περίπου 10^5 φαγικά σωματίδια) και 1 μl αιωρήματος βοηθού φάγου R408 (τίτλος: $> 10^6$ rfu/ml). Το προκύπτον μίγμα επώασθηκε στους 37°C για 15 min και στη συνέχεια αφού προστέθηκαν 5 ml 2xYT θρεπτικού υλικού (1% NaCl, 1% Yeast extract, 1.6% Bactotryptone), η επώαση συνεχίστηκε υπό ανάδευση για τρεις ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, το μίγμα θερμάνθηκε στους 70°C για 20 min και φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 5 min σε Θ.Δ.. Από το προκύπτον υπερκείμενο (το οποίο αποθηκεύθηκε στους 4°C) όγκοι 10 μl και 20 μl αραιώσεως 10^{-2} μεταφέρθηκαν σε φυγοκεντρικούς σωλήνες 12 ml, οι οποίοι περιείχαν 200 μl καλλιέργειας βακτηρίων XL1-Blue που ανασύρθηκαν από καλλιέργεια οπτικής πυκνότητας 1 και επώασθηκαν υπό ανάδευση στους 37°C για 15 min. Ακολούθησε σπορά όγκων 1-100 μl σε τρυβλία L.B/amp και επώαση σε κλίβανο των 37°C για τουλάχιστον 12 ώρες. Οι προκύπτουσες αποικίες οι οποίες περιείχαν το φαγίδιο pBluescript σε δίκλωνη μορφή (ds DNA) με το DNA ένθεμα απομονώθηκαν και αποθηκεύθηκαν όπως έχει περιγραφεί.



ΕΝΟΤΗΤΑ Γ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΟΛΥΑΔΕΝΥΛΙΩΜΕΝΟΥ RNA. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ mRNA. ΕΠΙΛΟΓΗ mRNA ΜΕ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ. ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ - ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ *in vitro*.

2.12 Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικές σειρές και ιστούς

Ολικό RNA από κυτταρικούς πληθυσμούς και από ιστούς παρασκευάσθηκε σύμφωνα με την μέθοδο AGPC (24). Για την εκχύλιση RNA χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα D (4 M ισοθειοκυανιούχος γουανιδίνη, 25 mM κιτρικό νάτριο pH 7,0, 0,5% Sarkosyl, 0,1 M 2-μερκαπτοαιθανόλη), σε αναλογία 0,5 ml διαλύματος D / $1-2 \times 10^6$ κύτταρα ή 1 ml διαλύματος D/100 mg ιστού.

Στην περίπτωση των κυττάρων, μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και την έκπλυσή τους με PBS προσετέθει διάλυμα D στο κυτταρικό ταπήτιο, το οποίο μετά από σύντομη ανακίνηση μεταφέρθηκε σε σωλήνα Corex των 15 ml. Στην περίπτωση των ιστών μετά την προσθήκη διαλύματος D ακολούθησε ομογενοποίηση σε Polytron στο μέγιστο των στροφών (2x30 sec) και το αιώρημα μεταφέρθηκε σε σωλήνα Corex των 15ml. Ακολούθως για κάθε όγκο διαλύματος D προστέθηκαν κατά σειρά και με ανάδευση: 0,1 όγκοι οξικό νάτριο 2M pH 4.0, 1 όγκος φαινόλης και 0,2 όγκοι χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης 49 / 1(v / v). Το ομογενοποίημα παρέμεινε στους 40°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 20 min στις 10.000 rpm στους 40°C. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα Corex και το RNA καταβυθίσθηκε με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και παραμονή στους -70°C για δύο ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως και το ίζημα αφού επαναδιαλύθηκε σε 0,3-0,5 ml διαλύματος D μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Η δεύτερη καταβύθιση του RNA έγινε με προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης και παραμονή του δείγματος στους -70°C για δύο ώρες. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (20 min, 12.000 rpm) σε Θ.Δ. και εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Ακολούθησε ξήρανση του RNA και επαναδιάλυσή του σε d.d H₂O (0,3-0,5 ml).

Η ποσότητα του απομονωμένου RNA υπολογίσθηκε φωτομετρικά, με μέτρηση στα 260 nm και με βάση την σχέση: 1 μονάδα οπτικής πυκνότητας αντιστοιχεί σε 40 µg RNA/ml. Η καθαρότητα του RNA από πιθανές πρωτεϊνικές προσμίξεις υπολογίσθηκε επίσης φωτομετρικά με μέτρηση στα 260 nm και στα 280 nm. Όταν ο λόγος των μετρήσεων 260 nm / 280 nm ήταν μεγαλύτερος από

1,7 το RNA θεωρήθηκε ικανοποιητικής καθαρότητας. Τέλος, η αποθήκευση του RNA έγινε στους -20°C .

2.13 Επιλογή πολυαδενυλιωμένου RNA (poly A selection)

. Η επιλογή πολυαδενυλιωμένου RNA από διάλυμα συνολικού κυτταρικού RNA, έγινε με την τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας ως εξής: 200 mg ολιγο dT κυτταρίνη σε ξηρή μορφή διαλύθηκαν σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος A (20 mM TrisCl pH7.6, 500 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS) και το αιώρημα τοποθετήθηκε σε στήλη Biorad. Ακολούθησαν εκπλύσεις με 3 ml dd H₂O, 3 ml 0.1 NaOH, 5 mM EDTA, 3ml H₂O και 5 ml διάλυμα A. Η στήλη υπερπληρώθηκε με 2.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος A (τελικός όγκος = περίπου 0.8 ml) και αποθηκεύθηκε σε Θ.Δ.. Το προς επιλογή εκχύλισμα ολικού RNA αραιώθηκε με την προσθήκη ίσου όγκου 2x διαλύματος A έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 2 ml και στο δείγμα προσετέθησαν 0.5μl (10 μονάδες) αναστολέος ριβονουκλεασών (Προσοχή: αν το προς επιλογή RNA επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί για μεταγραφή *in vitro* τότε ο αναστολέας ριβονουκλεασών ήταν πρωτεΐνη και όχι χημικό παράγωγο). Το δείγμα θερμάνθηκε στους 70°C για 5 min και αμέσως μεταφέρθηκε στον πάγο. Τοποθετήθηκε στην στήλη και το έκλουμα συλλέχθηκε σε σωλήνα Corex, θερμάνθηκε στους 70°C , μεταφέρθηκε στον πάγο και επαναεκλούσθηκε. Στη συνέχεια η στήλη εκπλύθηκε με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος A και 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος B (20 mM TrisCl pH7.6, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS). Το polyA mRNA που είχε δεσμευτεί στην στήλη εκλούσθηκε με 3 ml H₂O και συνελέγει σε σωλήνα Corex των 15 ml. Ακολούθησε καθίζηση με την προσθήκη 400 μl 5 M NaCl, 8 ml αιθανόλης και παραμονή στους -70°C για τρεις ώρες. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 min στις 10000 rpm, το ίζημα ξηράνθηκε υπό κενό, επαναιωρήθηκε σε 50 μl T.E. και μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Η ποσότητα του πολυA RNA εκτιμήθηκε φωτομετρικά και ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης με χρήση δεικτών γνωστών ποσοτήτων.

2.14 Ηλεκτροφόρηση RNA και αποτύπωση κατά Northern.

Ηλεκτροφόρηση RNA

Η ηλεκτροφόρηση του RNA έγινε σε πηκτή αγαρόζης/φορμαλδεΰδης (0,8% w/v - 2,2 M), ως εξής: Η αγαρόζη (0,8% w/v) προσετέθει σε διάλυμα MOPS



(20 mM MOPS pH 7.0, 1 mM EDTA, 5 mM οξικό νάτριο) και διαλύθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων υπό ανάδευση. Στη συνέχεια το διάλυμα εψύχθει σε Θ.Δ. μέχρι τους 55°C, μεταφέρθηκε σε απαγωγό εστία όπου προσετέθει φορμαλδεΰδη (2,2 M) και βρωμιούχο αιθίδιο (10 µg/µl). Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος, δημιουργία οριζόντιας πηκτής σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία είχε προηγουμένως παραμένει σε διάλυμα 0.1 N NaOH για δύο ώρες τουλάχιστον.

Ποσότητες RNA (10-20µg) οι οποίες ήταν διαλυμένες σε d.d H₂O ή σε 70% αιθανόλη, ξηράνθηκαν υπό κενό και τα ιζήματα αιωρήθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης (1xMOPS, 2,2M φορμαλδεΰδη, 50% φορμαμίδιο). Ακολούθησε επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις υποδοχές της πηκτής αφού αναμίχθηκαν σε αναλογία 6/1 (v/v) με διάλυμα χρωστικής 6 x RNA L.D. (40% γλυκερόλη, 0,2% μπλέ της βρωμοφαινόλης). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε Θ.Δ. με σταθερή τάση 90 Volt για 2 έως 10 ώρες ανάλογα με το μέγεθος της πηκτής και επακολούθησε παρατήρηση σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για έλεγχο του παρασκευάσματος.

Η μεθοδολογία της ηλεκτροφόρησης τροποποιήθηκε στις περιπτώσεις που η ποσότητα του RNA ήταν μικρότερη από 10 µg σύμφωνα με τη μέθοδο του Gong (42). Στις περιπτώσεις αυτές το βρωμιούχο αιθίδιο δεν προσετέθει στην πηκτή αλλά σε κάθε δείγμα ξεχωριστά πριν τη μετουσίωση στους 65 °C. Με την τροποποίηση αυτή γίνονται ορατές ποσότητες RNA < 0.5 µg.

Αποτύπωση κατά Northern

Για την αποτύπωση κατά Northern το ηλεκτροφορηθέν RNA μεταφέρθηκε με παθητική διάχυση από την πηκτή σε μεμβράνη Nylon Hybond N. Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 10xSSC (1xSSC: 0,15 M NaCl, 15 mM κιτρικό νάτριο) μετά από 12-20 ώρες ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος. Για την σταθεροποίηση των μορίων του RNA στη μεμβράνη, ακολούθησε έκθεση για δύο λεπτά σε υπεριώδη ακτινοβολία και επώαση για δύο ώρες στους 80°C.

Ο προϋβριδισμός της μεμβράνης έγινε με επώαση σε διάλυμα αποτελούμενο από: 57,8% φορμαμίδιο, 0,11% SDS, 6,9x SSC, 2,31 mM NaH₂PO₄, 21,3 mM Na₂HPO₄, 1,15x Denharts (1x Denharts: 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, 0,02% πολυβινyl-πιρολιδόνη) και σε αναλογία 5 ml/ 15 cm² μεμβράνης. Στο διάλυμα προσετέθει 0,1 mg/ml DNA σπέρματος σολωμού που είχε μετουσιωθεί μετά από βρασμό στους 100°C για δύο λεπτά. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε πλαστικό σάκκο ο οποίος σφραγίσθηκε αεροστεγώς και επωάσθηκε στους 42°C για 12

τουλάχιστον ώρες.

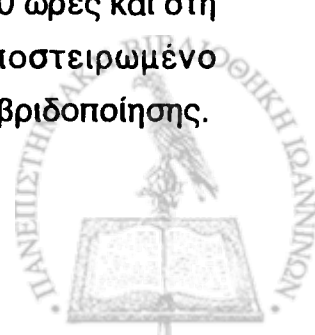
Μετά την ολοκλήρωση της επώασης αφαιρέθηκε το διάλυμα προϋβριδισμού και αντικαταστάθηκε με διάλυμα υβριδισμού το οποίο παρασκευάστηκε ως εξής: ποσότητα ανιχνευτή (5×10^6 cpm/ml διαλύματος υβριδισμού) προσετέθει σε 2 ml διαλύματος TE, μαζί με DNA από σπέρμα σολωμού (0,1 mg/ml). Το προκύπτον μίγμα επώασθηκε στους 100°C για δύο λεπτά και μεταφέρθηκε σε διάλυμα που περιείχε: 73% φορμαμίδιο, 0,14% SDS, 2,9x SSC, 2,92 mM NaH_2PO_4 , 47,23 mM Na_2HPO_4 , 14,41 mM EDTA, 1,46x Denharts. Το προκύπτον διάλυμα υβριδισμού αναδεύτηκε και μεταφέρθηκε στο σάκκο που περιείχε τη μεμβράνη. Ο σάκκος σφραγίστηκε αεροστεγώς και ακολούθησε υβριδισμός με επώαση για τουλάχιστον 16 ώρες στους 42°C υπό ανάδευση.

Μετά το τέλος του υβριδισμού το ραδιενεργό υλικό αφαιρέθηκε και η έκπλυση της μεμβράνης έγινε διαδοχικά σε διάλυμα (100 ml): 6x SSC για 10 λεπτά σε Θ.Δ., 2x SSC, 0.1% SDS για 20 λεπτά στους 42°C , 0,2x SSC, 0.1% SDS για 20 λεπτά στους 48°C , 0,1x SSC, 0.1% SDS για 20 λεπτά στους 55°C . Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι οποίες απαιτούσαν αυξημένη αυστηρότητα λόγω μη ειδικής υβριδοποίησης, η έκπλυση έγινε σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (μέχρι 65°C). Ακολούθησε έκθεση ακτινογραφικού φιλμ έναντι της μεμβράνης στους -70°C για 12 ώρες και εμφάνιση.

Για την αφαίρεση του ανιχνευτή και επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης, έγινε τρεις φορές έκπλυση σε 1% SDS σε H_2O , στους 100°C για 10 λεπτά και 2 εκπλύσεις με H_2O στους 100°C για 10 λεπτά. Η αφαίρεση του ανιχνευτή ελέγχθηκε με έκθεση της μεμβράνης σε ακτινογραφικό φιλμ για 48 ώρες τουλάχιστον.

2.15 Επιλογή RNA με υβριδισμό σε φίλτρο (Hybrid RNA selection).

Η επιλογή ενός συγκεκριμένου mRNA, από έναν πληθυσμό συνολικού κυτταρικού mRNA, έγινε ως εξής: φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης (Hybond N) τοποθετήθηκαν σε συσκευή minifold και πλύθηκαν υπό κενό με 5 ml διαλύματος. Στην συνέχεια ποσότητα φαγιδίου pBluescript με το ανασυρθέν ένθετο επώασθηκε στους 100°C για 10 min και προσροφήθηκε στα φίλτρα (25 μg /φίλτρο) υπό κενό. Το DNA ακινητοποιήθηκε στα φίλτρα με επώαση στους 80°C για 1.30 ώρες και στη συνέχεια πέντε φίλτρα επιλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο φυγοκεντικό σωλήνα και πλύθηκαν δύο φορές με 1 ml διαλύματος υβριδοποίησης.



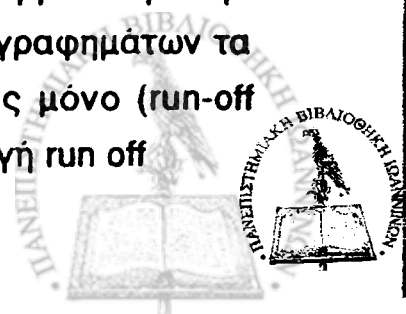
Στον σωλήνα προσετέθησαν 500μl διαλύματος υβριδισμού στα οποία είχαν επαναιωρηθεί 200 μl κυτταρικού polyA RNA και το προκύπτον αιώρημα επώασθηκε για έξι ώρες στους 37°C υπό ανάδευση.

Μετά το τέλος της επώασης τα φίλτρα ξεπλύθηκαν 10 φορές με 1 ml 1xSSC, 0.5% SDS στους 60°C επί 15 min τη φορά, τρεις φορές με 2 mM EDTA pH8 σε Θ.Δ. επί 15 min τη φορά και μία φορά με 2 mM EDTA στους 60°C επί 5 min. Τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες, αιωρήθηκαν σε 300 μl 1 mM EDTA και επώαστηκαν επί 90 min στους 100°C. Οι σωλήνες αμέσως μετά την επώαση τοποθετήθηκαν στους -70°C. Μετά πάροδο 30 min ανασύρθηκαν, επώαστηκαν στους 4°C για 15 min, αφαιρέθηκαν τα φίλτρα και ακολούθησε καθίζηση του RNA με την προσθήκη 30 μl 3M οξικού καλίου, 900 μl αιθανόλης και επώαση στους -70°C για τρεις ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 30 min σε μικροφυγόκεντρο (12000rpm, Θ.Δ.), πλύσιμο του ιζήματος με 70% αιθανόλη και επαναιώρησή του σε 5 μl d.d H₂O.

2.16 Μεταγραφή-μετάφραση *in vitro* (*in vitro* transcription-translation)

Το φαγίδιο pBluescript, όπως έχει ήδη αναφερθεί, περιλαμβάνει στις αλληλουχίες του κλωνοποιημένους τους υποκινητές για την σύνδεση των RNA πολυμεράσων T3 και T7. Οι υποκινητές αυτοί βρίσκονται δεξιά και αριστερά της περιοχής κλωνοποίησης των cDNA. Τα μεταγραφήματα RNA, ενθεμάτων κλωνοποιημένων σε φορείς που περιέχουν θέσεις σύνδεσης είτε για την T3 είτε για την T7 RNA πολυμεράση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών όπως πειράματα υβριδοποίησης κατά Southern και Northern, S1 ανάλυση ή ανάλυση με RNAση A. Επιπρόσθετα τα μεταγραφήματα RNA μπορούν να μεταφραστούν σε *in vitro* συστήματα για να χαρακτηρισθούν οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν.

Προετοιμασία DNA υποστρώματος: Όταν η παρουσία αλληλουχιών του φορέα (pBluescript) δεν δημιουργεί προβλήματα σε εφαρμογές που ακολουθούν την περάτωση της αντίδρασης μεταγραφής (π.χ *in vitro* translation), τότε τα RNA μπορούν να συντεθούν χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα της αντίδρασης ένα ακέραιο πλασμίδιο. Εναλλακτικά, το πλασμίδιο μπορεί να ευθυγραμμιστεί με την δράση ενός περιοριστικού ενζύμου με σκοπό την παραγωγή μεταγραφημάτων τα οποία να περιέχουν αλληλουχίες της κλωνοποιημένης περιοχής μόνο (run-off transcripts). Για να προετοιμάσουμε ένα πλασμίδιο για την παραγωγή run off



μεταγραφημάτων, κάνουμε πέψη του πλασμιδίου με ένα κατάλληλο ένζυμο περιορισμού. Τέτοια ένζυμα είναι αυτά τα οποία αφήνουν μετά την πέψη 5' προεξέχοντα άκρα. Έχει παρατηρηθεί ότι παρόλο που οι T3 και T7 RNA πολυμεράσες έχουν υψηλή εξειδίκευση και χρησιμοποιούν μόνο τους δικούς τους υποκινητές, μη ειδική έναρξη της μεταγραφής μπορεί να συμβεί από το τέλος του υποστρώματος DNA. Αυτό είναι ιδιαίτερα πιθανό αν το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για τον ευθυγραμμισμό του πλασμιδίου αφήνει 3' προεξέχοντα άκρα. Σε περίπτωση που αδυνατούμε να αποφύγουμε τη χρήση τέτοιων ενζύμων, τότε είναι απαραίτητο να συμπληρώσουμε (Fill in) τα άκρα ώστε να τα μετατρέψουμε σε τυφλά (Blunt ends).

Στην παρούσα εργασία 10 µg φαγίδιο pBluescript που περιείχε το προς μεταγραφή ένθετο cDNA πέφθηκε με το κατάλληλο ένζυμο καθοδικά του ενθέματος και παρήχθει ένα ευθύγραμμο DNA υπόστρωμα. Μία μικρή ποσότητα του παρασκευάσματος ηλεκτροφορήθηκε για να επιβεβαιωθεί η πλήρης πέψη. Μετά την ολοκλήρωση της πέψης προσετέθει 1µl 1mg/ml πρωτεΐνωση K και ακολούθησε επώαση επί 30 min στους 37°C ώστε να καταστραφούν τόσο οι RNAσες όσο και το περιοριστικό ένζυμο. Ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο δύο φορές, με χλωροφόρμιο μία και καθίζηση με αιθανόλη. Το ίζημα του ευθυγραμμισμένου DNA επαναιωρήθηκε σε T.E.

Αντίδραση RNA πολυμερισμού

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, σύντομα μετά την έναρξη της μεταγραφής, προστίθεται στο 5' άκρο του νεοπαραγόμενου μορίου RNA, μία σύνθετη μεθυλιωμένη δομή η οποία ονομάζεται κάλυμα (cap). Η δομή αυτή είναι μία 7-μεθυλογουανοσίνη (m7G), η οποία συνδέεται με κατεύθυνση 5'→5' στο αρχικό νουκλεοτίδιο της αλυσίδας RNA. Οι T3 και T7 πολυμεράσες ενσωματώνουν το 5' 7meGppp'5G ανάλογο του cap με αποτελεσματικότητα >95% χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα pBluescript φαγίδια. Η πρόσθεση του cap αναλόγου σε μεταγραφήματα παραγόμενα *in vitro*, επάγει την αντίδραση έναρξης της μεταγραφής από την πολυμεράση με αποτέλεσμα την αύξηση του τελικά παραγόμενου προϊόντος κατά δύο φορές.

Στην παρούσα μελέτη ο πολυμερισμός του RNA από τις T3 και T7 RNA πολυμεράσες έγινε ταυτόχρονα με την προσθήκη του cap σε μία αντίδραση η οποία περιγράφεται παρακάτω. Σε ένα μικροσωλήνα προσετέθησαν με την ακόλουθη σειρά: 5 µl 5 x διάλυμα μεταγραφής (200 mM Tris pH7.5, 250 mM NaCl,



40 mM $MgCl_2$, 10 mM Σπερμιδίνη), 1 μg ευθυγραμμισμένο υπόστρωμα DNA, 1 μl rNTPs (10 mM rUTP, 10 mM rCTP, 10 mM rATP, 3 mM rGTP), 2.5 μl ανάλογο cap (5' 7meGppp5'G), 1 μl DTT (0.75M DTT), 1 μl RNAsin (από ανθρώπινο πλακούντα), 10 μονάδες T3 ή T7 RNA πολυμεράσης, d.d H_2O ελεύθερο από RNAσες μέχρι τελικού όγκου 25 μl και το μίγμα επώασθηκε στους 37°C επί 30 min.

Το υπόστρωμα DNA αφαιρέθηκε μετά το τέλος της αντίδρασης με προσθήκη 10 μονάδων DNAσης (RNase free DNase) και επώαση επί 5 min στους 37°C. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη 100 μl dd H_2O και το δείγμα εκχυλίστηκε με 125 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο. Ακολούθησε καθίζηση του RNA με την προσθήκη 12 μl 3 M οξικού καλλίου pH 5.0 και 400 μl 100% αιθανόλης στους -20°C επί 30 min. Μετά το τέλος της καθίζησης ακολούθησε φυγοκέντρηση επί 20 min σε μικροφυγόνετρο στους 4°C και στη μέγιστη ταχύτητα. Το ίζημα πλύθηκε μία φορά με 80% αιθανόλη, ξηράνθηκε και επαναιωρήθηκε σε 25 μl T.E.

Η ποσότητα του *in vitro* παραχθέντος RNA εκτιμήθηκε με φωτομέτρηση. Η παραγωγή όμως μεταγραφημάτων πλήρους μεγέθους μπορεί να ελεγχθεί μόνο με ηλεκτροφόρηση. Για το λόγο αυτό μία κατά προσέγγιση εκτίμηση του μεγέθους των μεταγραφημάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Μετάφραση *in vitro* μεταγραφήματος

Για τη μετάφραση των *in vitro* παραχθέντων RNAs χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο που προτείνουν οι κατασκευαστές (Amersham) και το οποίο αναπτύσσεται παρακάτω: Τα αντιδραστήρια ανασύρθηκαν από την κατάψυξη (-70°C) και αφέθηκαν να υγροποιηθούν αργά στον πάγο. Το RNA υπόστρωμα (τόσο RNA που είχε παραχθεί *in vitro* όσο και mRNA που είχε εκχυλισθεί από κύτταρα και είχε καθαρισθεί από στήλη ολίγο dT), θερμάνθηκε στους 67°C επί 10 min και αμέσως τοποθετήθηκε στον πάγο. Η μεταχείριση αυτή είναι απαραίτητη γιατί αυξάνει την απόδοση της μετάφρασης ιδιαίτερα σε mRNA πλούσια σε περιοχές GC, καταστρέφοντας τις δευτεροταγείς δομές των περιοχών αυτών. Μετά την υγροποίηση των αντιδραστηρίων και την περιγραφείσα προετοιμασία των δειγμάτων προσθέσαμε σ' ένα μικροσωλήνα: 35 μl εκχύλισμα δικτυοκυττάρων, 7 μl H_2O , 1 μl αναστολέα πρωτεασών (RNAsin 40 $\mu g/ml$), 1 μl μίγματος αμινοξέων χωρίς μεθειονίνη (1 mM), 2 μl RNA υπόστρωμα σε H_2O και 4 μl [^{35}S] μεθειονίνη (10 mCi/ml). Ο τελικός όγκος του διαλύματος ήταν 50 μl και η τελική συγκέντρωση της [^{35}S] μεθειονίνης 0.8 mCi/ml.

Το μίγμα επωάσθηκε στους 30°C επί 60 min και η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε σε SDS PAGE ή σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (κεφ.2.19 και 2.20)



ΕΝΟΤΗΤΑ Δ: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.

2.17 Εκχύλιση πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα

Η κυρίως χρησιμοποιηθείσα, στην παρούσα μελέτη, μέθοδος εκχύλισης πρωτεϊνών από ευκαρυωτικά κύτταρα, στηρίχθηκε στη χρήση του μη ιονικού απορρυπαντικού NP40. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα που αναπτύσσονταν σε μονοστιβάδα (περίπου 5×10^6 κύτταρα/τρυβλίο) ξεπλύθηκαν με PBS και αφού συλλέχθηκαν σε 4 ml PBS, μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min στις 2000 rpm, επαναιώρηση σε 1 ml PBS και μεταφορά σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Τα κύτταρα επαναϊζηματοποιήθηκαν με φυγοκέντρηση 20 sec σε μικροφυγόκεντρο και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα λύσης A (20 mM Tris pH7.5, 5 mM MgAc, 120 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5% NP40) παρουσία 1mM PMSF. Το εναιώρημα αναδεύθηκε ισχυρά και επωάσθηκε στον πάγο για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min και μεταφορά του υπερκείμενου (κυτταρικό εκχύλισμα) σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Με την μέθοδο αυτή, εκχυλίσθηκαν κυρίως κυτταρόπλασματικές πρωτεΐνες. Για την εκχύλιση και των πρωτεϊνών του πυρήνα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε αντί του διαλύματος A, διάλυμα RIPA (1% TritonX-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5mM EDTA, 25mM Tris 7.5, 0.1% SDS και 1mM PMSF).

2.18 Σήμανση πρωτεϊνών *in vivo*.

Η ιχνηθέτηση των πρωτεϊνών έγινε τόσο στους 37°C όσο και στους 42.5°C (συνθήκες θερμικού σοκ) χρησιμοποιώντας 20 μ Ci [35 S]-μεθειονίνης (>800Ci/mmol) ανά 5×10^6 κύτταρα. Για καλύτερη ενσωμάτωση της ραδιενεργού μεθειονίνης χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης κυττάρων, χαμηλής περιεκτικότητας σε μεθειονίνη (1 ml αμινοξέα 10x, 1 ml EBSS 10x, 0.5 ml NaHCO₃ 7%, 100 μ l βιταμίνες 100x, 2 μ l Μεθειονίνη 100x, 0.7 ml FCS, 6.7 ml ddH₂O). Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και η κυτταρική στιβάδα καλύφθηκε με θρεπτικό υλικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ψυχρή μεθειονίνη, το οποίο είχε εμπλουτισθεί με ραδιενεργό [35 S]-μεθειονίνη (1500 μ l θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 20 μ Ci [35 S]-μεθειονίνη / τρυβλίο διαμέτρου 10 cm).

Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας (37°C) ή υδατόλουτρο (42.5°C) για 90 min και συλλογή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (κεφ.2.17).

Η ραδιενεργή ενσωμάτωση [³⁵S]-μεθειονίνης στις πρωτεΐνες του εκχυλίσματος μετρήθηκε με καθίζηση μέρους του εκχυλίσματος (1/10 του συνολικού παρασκευάσματος) με τριχλωροξικό οξύ (TCA Precipitation). Πιο συγκεκριμένα σε 5εμl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος προστέθηκε 1 ml 10% τριχλωροξικό οξύ και το διάλυμα επώαστηκε για 10 min στον πάγο. Ακολούθησε διήθηση μέσω φίλτρου Whatman GF/C διαμέτρου 2.5 cm σε κατάλληλη συσκευή (Millipore, 1225 Sampling Manifold, Cat.No 0M033). Το φίλτρο εκπλύθηκε δύο φορές με 5% TCA, ξηράνθηκε στους 80°C, τοποθετήθηκε σε σωλήνα υγρού σπινθηρισμού που περιείχε 5 ml διάλυμα 0.5% PPO, 0.03% σε τολουόλη και μετρήθηκε σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (Packard Liquid Scintillation 3255).

2.19 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS- PAGE

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Laemmli (64) σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών. Οι χρησιμοποιηθείσες πηκτές αποτελούνταν από δύο μέρη: Από την πηκτή επιστοίβαξης με μεγάλο μέγεθος πόρων και την πηκτή διαχωρισμού με μικρότερο μέγεθος πόρων. Η πηκτή επιστοίβαξης (20%) παρασκευάστηκε με ανάμιξη 6.8 ml H₂O, 1.7 ml 30% ακρυλαμίδιο, 1.25 ml Tris 1 M, 0.1 ml 10% SDS, 0.1 ml 10% APS, 0.01 ml TEMED (τελικός όγκος 10 ml). Η πηκτή διαχωρισμού (10%) παρασκευάστηκε με ανάμιξη 4 ml H₂O, 3.3 ml 30% ακρυλαμίδιο, 2.5 ml Tris 1.5 M, 0.1 ml 10% SDS, 0.1 ml 10% APS, 0.004 TEMED (τελικός όγκος 10 ml). Τα μίγματα των δύο πηκτών απαερώθηκαν και πολυμερίστηκαν με προσθήκη TEMED. Ο πολυμερισμός της πηκτής έγινε σε Θ.Δ. για 20-40 λεπτά. Τα δείγματα ξηράνθηκαν σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού, επαναιωρήθηκαν σε 20-30 μl ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (0,0625 M Tris-HCl pH 6.8, 3% w/v SDS, 10% v/v γλυκερόλη, 5% v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0,01% κυανό της βρωμοφαινόλης) και θερμάνθηκαν για πέντε λεπτά στους 100°C. Ακολούθως φορτώθηκαν στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώθηκε σε ~400 Vh σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,196 M γλυκίνη, 0,1% w/v SDS). Η χρώση της πηκτής έγινε για δύο ώρες υπό ανάδευση σε διάλυμα



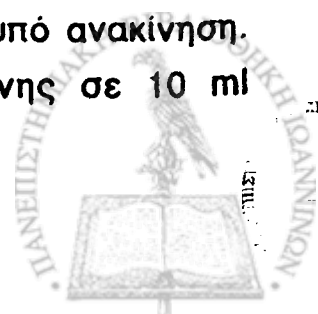
χρωστικής (0,25% w/v Coomassie Brilliant Blue, 9,2% v/v οξικό οξύ, 45,4% v/v μεθανόλη). Ο αποχρωματισμός έγινε υπό ολονύκτια ανάδευση σε διάλυμα αποχρωματισμού (25% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ).

2.20 Αυτοραδιογραφία-Φλουορογραφία

Σε περίπτωση που τα δείγματα των ηλεκτροφορηθέντων πρωτεϊνών ήταν ραδιενεργά σημασμένα τότε η παρατήρηση έγινε με αυτοραδιογραφία. Για το σκοπό αυτό η πηκτή ξηράνθηκε σε συσκευή ξήρανσης υπό κενό (Biorad model 1125B), και μετά την ξήρανση τοποθετήθηκε σε κασσέτα, ακτινογραφικό φιλμ εξετέθη έναντι της πηκτής στους -70°C και ακολούθησε εμφάνιση της ακτινογραφίας. Η ενίσχυση ασθενών ραδιενεργών σημάτων έγινε με φλουορογραφία. Συγκεκριμένα, η πηκτή επωάσθηκε σε εικοσαπλάσιο όγκο DMSO υπό ανακίνηση επί 30 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές και ακολούθησε τρίτη επώαση σε τετραπλάσιο όγκο διαλύματος 20% PPO σε DMSO επί τρεις ώρες. Με το τέλος της τρίτης επώασης η πηκτή ξεπλύθηκε σε dd H_2O και επωάσθηκε σε εικοσαπλάσιο όγκο dd H_2O υπό ανακίνηση για 30 min. Κατόπιν η πηκτή τοποθετήθηκε σε χαρτί διηθητικό 3MM, ξηράνθηκε και αυτοραδιογραφήθηκε όπως προηγουμένως. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ έναντι της πηκτής εξαρτήθηκε από τα cpm των δειγμάτων που ηλεκτροφορήθηκαν. (Ενδεικτικά πηκτές μίας διάστασης με 90000 cpm/δείγμα, εκτέθηκαν 24 ώρες, ενώ πηκτές δύο διαστάσεων με τα ίδια cpm αρχικού δείγματος εκτέθηκαν 12 μέρες).

2.21. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Για την ανοσοαποτύπωση, το διάλυμα των πρωτεϊνών ηλεκτροφορήθηκε σε SDS-PAGE όπως περιγράφηκε και μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πηκτές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Tris- γλυκίνης- μεθανόλης επί 15 min. Ακολούθησε αποτύπωση των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης με τη χρήση συσκευής ημί-ξηρης μεταφοράς (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad). Μετά το πέρας της μεταφοράς, ακολούθησε χρώση της πηκτής σε διάλυμα χρώσης (κεφ.2.19) ενώ η μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης τοποθετήθηκε σε 10 ml διαλύματος μπλοκαρίσματος (5% σκόνη μη λιπαρού γάλακτος σε PBS) και επωάσθηκε για δύο ώρες τουλάχιστον υπό ανακίνηση. Ακολουθούθησαν τρεις πεντάλεπτες εκπλύσεις της μεμβράνης σε 10 ml διαλύματος PBS, 0.05% Tween-



20 και τοποθέτηση σε σάκκο επώασης ο οποίος περιείχε αντίσωμα της προς ανίχνευση πρωτεΐνης αραιωμένο ανάλογα με τον τίτλο του σε 5 ml διαλύματος 5% BSA σε PBS.

Στην συνέχεια ο σάκκος επώασης σφραγίσθηκε αεροστεγώς τοποθετήθηκε μεταξύ γυάλινων πλακών και επωάσθηκε υπό ανακίνηση για 1 ώρα. Ακολούθησε απόσυρση της μεμβράνης και τρεις πεντάλεπτες εκπλύσεις με 10 ml PBS, 0.05% Tween υπό ανακίνηση.

Η μεμβράνη επανατοποθετήθηκε σε σάκκο επώασης που περιείχε αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών του είδους προέλευσης του πρώτου αντισώματος αραιωμένο ανάλογα σε 5 ml διαλύματος μπλοκαρίσματος συνδεδεμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP) και ο σάκκος επανασφραγίσθηκε, τοποθετήθηκε μεταξύ γυάλινων πλακών και επωάσθηκε για 45 min υπό ανακίνηση. Μετά το πέρας της επώασης ακολούθησαν τρεις πεντάλεπτες εκπλύσεις με διάλυμα PBS, 0.05% Tween-20 και ανίχνευση της πρωτεΐνης με την μέθοδο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL).

2.22 Ανοσοκαθίζηση (Immunoprecipitation)

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της ανοσοκαθίζησης σε συνδυασμό με SDS-PAGE και Western blot για την μελέτη πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών προϊόντων των κλωνοποιημένων γονιδίων και πρωτεϊνών κυτταρικής ή ιικής προέλευσης. Τυπικά σε 200- 400 ml κυτταρικού εκχυλίσματος το οποίο παρασκευάσθηκε όπως προαναφέρθηκε (κεφ. 2.17) προσετέθησαν 2-100 ml αντισώματος (ανάλογα με τον τίτλο του αντισώματος) και ακολούθησε επώαση με περιστροφή (end over end) στους 4°C για χρονικό διάστημα από 1 έως 12 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης, προσετέθησαν 15 ml πρωτεΐνης A συνδεδεμένης σε σφαιρίδια σεφαρόζης ή πρωτεΐνης G συνδεδεμένης σε σεφαρόζη και η επώαση συνεχίσθηκε για μία επιπλέον ώρα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 500rpm επί 30 sec σε Θ.Δ., ξέπλυμα των σφαιριδίων τρεις φορές με το ανάλογο διάλυμα λύσης και επαναιώρησή τους σε 25 ml διαλύματος φόρτωσης (κεφ.2.19). Τα επαναιωρημένα σφαιρίδια θερμάνθηκαν στους 100°C για 5 min, φυγοκεντρήθηκαν για 20 sec σε Θ.Δ. και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αποτέλεσε το ανοσοίζημα.

Παρατηρήσεις: Παρόλο που η τεχνική είναι απλή, τόσο στη σύλληψη



όσο και στην εφαρμογή της, όπως φαίνεται στην περιγραφή που προηγήθηκε, ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών παραμέτρων έχει επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα. Οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των αλάτων, το είδος του απορρυπαντικού, η παρουσία δισθενών ιόντων και το pH του διαλύματος λύσης είναι μερικές σημαντικές παράμετροι που καθορίζουν το αποτέλεσμα. Γενικά, συγκεντρώσεις αλάτων μεταξύ 0-1M, μη ιονικών απορρυπαντικών μεταξύ 0.1-2%, ιονικών απορρυπαντικών μεταξύ 0.01-0.5, δισθενών ιόντων μεταξύ 0-10mM και pH μεταξύ 6-9, πρέπει να συνδυαστούν ώστε να προκύψει το θεμιτό αποτέλεσμα.

2.23 Ενδοκυττάριος εντοπισμός πρωτεϊνών με ανοσοφθορισμό.

Τα προς μελέτη κύτταρα αναπτύχθηκαν σε μονοστιβάδα προσκολλημένα σε καλυπτρίδες 2x2 cm που είχαν τοποθετηθεί σε τρυβλία 20 cm². Το καλλιεργητικό υλικό αφαιρέθηκε και το κυτταρικό ταπήτιο πλύθηκε δύο φορές με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (11,5 g/L Na₂HPO₄, 2,96 g/L NaH₂PO₄·2H₂O, 5,84 g/L NaCl). Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με προσθήκη 10 ml μεθανόλης/ακετόνης 1/1 (v/v), και τοποθέτηση του τρυβλίου για 10 λεπτά στους -20°C. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων με PBS και ενυδάτωση με προσθήκη 10 ml PBS και επώαση για 10 λεπτά σε Θ.Δ. Η κυτταρική μεμβράνη έγινε διαπερατή μετά από επώαση της καλυπτρίδας σε PBS, 0.4% Triton X-100 για 10 λεπτά και τα κύτταρα αφού ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS, επώασθηκαν σε διάλυμα BB (20 mM HEPES pH 7,9, 0,25 M KCl, 1% BSA, 0,1% ζελατίνη, 0,02% NaN₃, 0,1% Triton X-100) για 15 λεπτά σε Θ.Δ. Η προσθήκη αντισώματος στην καλυπτρίδα έγινε με αραιώση 1:20 σε BB και επώαση για μία ώρα σε Θ.Δ. Στη συνέχεια, το αντίσωμα αφαιρέθηκε και το ταπήτιο ξεπλύθηκε τρεις φορές με BB (5 λεπτά την κάθε φορά). Τέλος προσετέθει αντιορός κατσίκας έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένος με FITC (Sigma) σε αραιώση 1:100 σε BB και ακολούθησε επώαση για μία ώρα. Το ταπήτιο ξεπλύθηκε τρεις φορές με BB (10 λεπτά την κάθε φορά) και τρεις φορές με PBS (5 λεπτά την κάθε φορά). Η καλυπτρίδα μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και ακολούθησε παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Microphot-FXA) και φωτογράφιση σε φιλμ Fujicolor 400 ASA.



ΕΝΟΤΗΤΑ Ε: ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ.

2.24 Συνθήκες και βασικές αρχές κυτταρικής καλλιέργειας.

Όλες οι καλλιέργειες κυτταρικών σειρών έγιναν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο (cell culture room) ο οποίος διατηρούνταν στείρος χάρη στη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Για την αποφυγή μολύνσεων όλοι οι χειρισμοί, οι σχετικοί με τα κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν σε εστία κάθετης νηματικής ροής (GELMAN Instrument Laminar Air Flow class 100), η οποία παρέχει περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Nuaire, Autoflow, CO₂ Water-Jacketed Incubator) σταθερής θερμοκρασίας 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με την περίπτωση φιάλες (flasks), τρυβλία και πολυτρυβλία μιας χρήσης. Όλα τα γυαλικά που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στους 121°C σε αυτόκαυστο (DrMorand S.A., Switzerland). Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Olympus IM), ενώ η μακρόχρονη συντήρησή τους έγινε σε δοχείο υγρού αζώτου (-192°C).

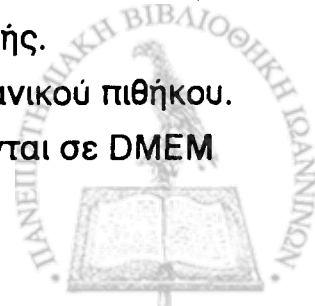
2.25 Κυτταρικές σειρές.

Οι πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών και για τις συνθήκες ανάπτυξής τους αντλήθηκαν από την Αμερικανική Κυτταρική Συλλογή (American Type Culture Collection, ATCC). Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι οι εξής:

HeLa: Ανθρώπινη κυτταρική σειρά που προέρχεται από ασθενή με καρκίνωμα μήτρας. Τα κύτταρα έχουν μορφολογία επιθήλιου και αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% FCS, προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα.

NIH3T3: Κυτταρική σειρά από έμβρυο ποντικού. Προέρχεται από υποκλωνοποίηση της σειράς Swiss/3T3 και έχει χαρακτηριστικά ινοβλαστών. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε DMEM με 10% FCS προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα και παρουσιάζουν αναστολή της ανάπτυξης λόγω επαφής.

CV1: Κυτταρική σειρά που προέρχεται από νεφρό πράσινου Αφρικανικού πιθήκου. Τα κύτταρα παρουσιάζουν μορφολογία ινοβλαστών και αναπτύσσονται σε DMEM



εμπλουτισμένο με 10% FCS, προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα.

COS: Κυτταρική σειρά με μορφολογία ινοβλαστών που προέρχεται από μετασχηματισμό των κυττάρων CV1 με στέλεχος του ιού SV40. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υλικό DMEM με 10% FCS προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα.

Balbc/3T3: Κυτταρική σειρά από έμβρυο ποντικού. Τα κύτταρα έχουν μορφολογία ινοβλαστών και είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε αναστολή του διπλασιασμού τους λόγω επαφής. Μετασχηματίζονται σε καλλιέργεια πολύ εύκολα με τον ιό SV40.

2.26 Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας

Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (Sigma). Το θρεπτικό υλικό διαλύθηκε υπό ανάδευση σε H₂O με ταυτόχρονη προσθήκη όξινου ανθρακικού νατρίου NaHCO₃ (3,7 g/L) και στη συνέχεια αποστειρώθηκε με διήθηση σε συσκευή της MILLIPORE (cat. no. XX6700P10) με τη βοήθεια προφίλτρων (MILLIPORE: Filter type AP cat, no. AP 1504200) και φίλτρων (MILLIPORE: Filter type HA 0,45 μm cat. no. HATF04700), και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 40C μέχρι τη χρησιμοποίησή του. Πριν τη χρησιμοποίηση το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με L-γλουταμίνη (Sigma), σε τελική συγκέντρωση 4 mM για το DMEM. Για την εξασφάλιση της στειρότητας του μέσου προστέθηκε αντιβιοτικό Garamycin (Gentamicin sulfate, Schering-Plough) σε τελική συγκέντρωση 80 μg/ml και μυκητοκτόνο Funzizone (Amphotericin B, Sigma) σε τελική συγκέντρωση 500 μg/ml. Για την αποστείρωση της γλουταμίνης χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα 0,2 μm Sartorius (Sartorius AG D-3400, Gottingen Germany).

Tris Buffer: Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Για την έκπλυση των επιθηλιακών και ινοβλαστικών κυττάρων, κυρίως πριν την επίδραση θρυψίνης, χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris χωρίς Ca⁺⁺ και Mg⁺⁺, pH 7,2 (139 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,37 mM Na₂HPO₄.H₂O, 0,44 mM KH₂PO₄, 4,16 mM NaHCO₃, 5,56 mM γλυκόζη). Μετά την παρασκευή του το διάλυμα αποστειρώθηκε με διήθηση σε συσκευή MILLIPORE και διατηρήθηκε στους -200C μέχρι τη χρησιμοποίηση.



Ορός FCS

Σε όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες το θρεπτικό μέσο εμπλουτίστηκε με ορό. Μη ταυτοποιημένα ακόμη συστατικά του ορού, κυρίως αναπτυξιακοί παράγοντες (growth factors), είναι αναγκαία για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξαιρετική πηγή των παραγόντων αυτών θεωρείται ο ορός από έμβρυο μόσχου (Fetal Calf Serum) ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Seromed, Sera Lab, Gibco BRL). Η συγκέντρωση του ορού στο θρεπτικό μέσο ήταν 10% εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

2.27 Συνθήκες ανάπτυξης και αποθήκευσης κυτταρικών σειρών.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μονοστιβάδες πυκνότητας $0,2 - 0,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml και επανακαλλιεργήθηκαν ως εξής: Μετά την δημιουργία πλήρους ταπητίου αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα Tris. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα θρυψίνης 0,25% (Gibco BRL) έτσι ώστε να καλύπτει την επιφάνεια του ταπήτιου και ακολούθησε επώαση για ένα λεπτό περίπου σε Θ.Δ. με ταυτόχρονη παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Μόλις τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια του τρυβλίου αφαιρέθηκε το διάλυμα θρυψινοποίησης και προστέθηκε DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS. Τα κυτταρικά συσσωματώματα διαλύθηκαν με τη βοήθεια πιπέτας και μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Η αποθήκευση των κυττάρων έγινε σε υγρό άζωτο (-192°C) σε υλικό που αποτελείται από 90% FCS και 10% DMSO (Ferak) που είχε αποστειρωθεί με διήθηση σε φίλτρα με διάμετρο πόρων $0,2 \mu\text{m}$ (Sartorius). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε εκθετική φάση ανάπτυξης και αποθηκεύθηκαν σε πυκνότητα $0,5 - 1 \times 10^7$ κύτταρα/ml ως εξής: Το υλικό της καλλιέργειας απομακρύνθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με Tris Buffer, επαναιωρήθηκαν σε 1,5 ml υλικού αποθήκευσης και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες ψύξης (Cryovials) οι οποίοι αρχικά τοποθετήθηκαν για 24-48 ώρες στους -70°C και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο δοχείο υγρού αζώτου (-192°C). Για την επαναζωογόνηση των κυττάρων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Τα κύτταρα ($0,5 - 1 \times 10^7$ κύτταρα/ml) ανασύρθηκαν από το υγρό άζωτο, μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία 37°C , επαναιωρήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό και καλλιεργήθηκαν σε συγκεντρώσεις $0,2 - 1 \times 10^6$ κύτταρα /ml θρεπτικού υλικού.



2.28 Συγχρονισμός κυτταρικών σειρών.

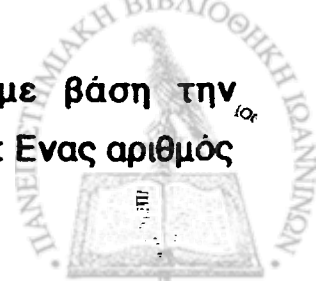
2.28.1 Συγχρονισμός με στέρηση και επανατροφοδότηση ορού.

Αυτή η μέθοδος συγχρονισμού στηρίζεται στο γεγονός ότι η δραστική μείωση ή η πλήρης απουσία ορού, για μικρό χρονικό διάστημα, αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων (φάση G_0) χωρίς επιπτώσεις στην βιωσιμότητά τους (83). Στην παρούσα μελέτη τα κύτταρα αναπτύχθηκαν μέχρι τη δημιουργία πλήρους ταπητίου. Αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκε νέο που δεν περιείχε ορό. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 36 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Tris και συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση. Η σπορά των συλλεχθέντων κυττάρων έγινε σε αναλογία 1:2 σε σχέση με την αρχική καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό που ήταν εμπλουτισμένο με 10% FCS και η προκύπτουσα καλλιέργεια θεωρήθηκε συγχρονισμένη στην φάση G_0 . Η πορεία του συγχρονισμού ελέγχθηκε με μέτρηση της ενσωμάτωσης $[3H]$ θυμιδίνης.

2.28.2. Συγχρονισμός με διπλή αναστολή θυμιδίνης.

Αυτή η μέθοδος συγχρονισμού στηρίζεται στο γεγονός ότι η ύπαρξη περίσσειας θυμιδίνης στο καλλιεργητικό υλικό αναστέλλει τη νουκλεοτιδική ρεδουκτάση με αποτέλεσμα την αναστολή του διπλασιασμού του DNA. Για το λόγο αυτό η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά στο τέλος της φάσης G_1 (90). Στην παρούσα μελέτη έγινε σπορά των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό και σε αναλογία 8×10^5 κύτταρα / 83 cm^2 . Μετά από 24 ώρες αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκε καινούργιο που περιείχε 2 mM θυμιδίνη (Sigma). Ακολούθησε επώαση 20 ωρών αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και πλύσιμο των κυττάρων τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα Tris. Στην συνέχεια προστέθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς θυμιδίνη και τα κύτταρα επώασθηκαν για 8 ώρες. Ακολούθησε δεύτερη αναστολή με την προσθήκη 2 mM θυμιδίνης και επώαση των κυττάρων για 14 ώρες. Τα κύτταρα απελευθερώθηκαν μετά από τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα Tris και προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού χωρίς θυμιδίνη. Η πορεία του κυτταρικού κύκλου ελέγχθηκε με μέτρηση της ενσωμάτωσης $[3H]$ θυμιδίνης και με παρατήρηση των μιτωτικών πυρήνων στο μικροσκόπιο.

Ο έλεγχος της πορείας του κυτταρικού κύκλου με βάση την ενσωμάτωση $[3H]$ θυμιδίνης στο διπλασιαζόμενο DNA έγινε ως εξής: Ένας αριθμός



κυττάρων αντίστοιχος με την προς συγχρονισμό καλλιέργεια, σπάρθηκε σε πολυτρυβλία ή σε μικρά τρυβλία και ιχνηθετήθηκε με προσθήκη 1 μCi [μεθυλ- ^3H] θυμιδίνης (25 Ci/mmol) στο θρεπτικό υλικό και επώαση για 30 λεπτά. Στην συνέχεια, απομακρύνθηκε το ραδιενεργό θρεπτικό υλικό μέσο και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα Tris. Ακολούθησε εκχύλιση με προσθήκη 1ml διαλύματος TES pH 7,4 (0,1 M Tris, 0,002 M EDTA, 0,6% SDS), επώαση στους 0-4°C για 10 λεπτά, κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 20% TCA, επώαση 10 λεπτών στους 0-4°C και τέλος διήθηση του ιζήματος με φίλτρο Whatman GF/A, το οποίο ξεπλύθηκε στη συνέχεια δυο φορές με 10 ml 5% TCA και μία φορά με 10 ml αιθανόλη και στεγνώθηκε σε κλίβανο 37°C. Τέλος το φίλτρο τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο μέτρησης στο οποίο προστέθηκαν 10 ml υγρού σπινθηρισμού (4 g/L PPO, 0,1 g/L POPOP, 1l τουλουόλη) και ακολούθησε μέτρηση της ραδιενέργειας σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού β ακτινοβολίας της Packard Instrument Co, model 3255 (Downers Grove, IL).

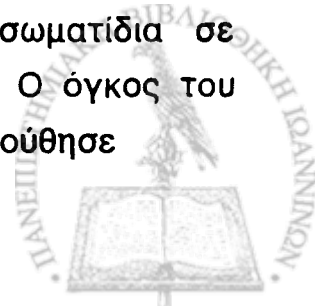
2.29 Επίδραση θερμικού σοκ σε κυτταρικούς πληθυσμούς.

Για να επιτύχουμε συνθήκες θερμικού σοκ οι κυτταρικές καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο (Julabo, 7A) που σταθεροποιήθηκε σε θερμοκρασία 42,5°C. Σε αυτή την θερμοκρασία τα κύτταρα διατηρήθηκαν για χρονικά διαστήματα 1-10 ώρες ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες. Η επίδραση του θερμικού σοκ έγινε σε κύτταρα ανεπτυγμένα σε πλήρες ταπήτιο. Περίπου δύο ώρες πριν το θερμικό σοκ αφαιρέθηκε το παλιό θρεπτικό υλικό και η καλλιέργεια εμπλουτίστηκε με καινούργιο.

2.30 Μόλυνση κυτταρικών σειρών με ιούς.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν ιικές μολύνσεις με δύο DNA ογκογόνους ιούς, τον ιό SV40 και το αδενοϊό (Ad5), τόσο σε επιτρεπτικά (CV1 για τον SV40 και HeLa για τον αδενοϊό) όσο και σε μη επιτρεπτικά κύτταρα.

Η διαδικασία μόλυνσης ήταν και για τους δύο ιούς η ίδια. Συνοπτικά, το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αφαιρέθηκε και τα κύτταρα επανατροφοδοτήθηκαν με θρεπτικό υλικό, χωρίς ορό, στο οποίο ήταν αραιώμενα ιικά σωματίδια σε αναλογία 50 μονάδες σχηματισμού πλακών/κύτταρο (pfu/cell). Ο όγκος του θρεπτικού υλικού ήταν ο μικρότερος δυνατός (1-2 ml/83 cm²). Ακολούθησε



επώαση των κυττάρων για 90 λεπτά ώστε να ολοκληρωθεί η προσρόφηση του ιού από τα κύτταρα και στη συνέχεια προστέθηκε θρεπτικό υλικό με ορό έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση ορού στο καλλιεργητικό υλικό να είναι 5%. Η επώαση συνεχίστηκε για χρονικά διαστήματα ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες και ο έλεγχος της πορείας της ιικής μόλυνσης έγινε με τη ανίχνευση των ιικών προϊόντων. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες κύτταρα τα οποία υπέστησαν ψευδή ιική μόλυνση, δηλαδή υπέστησαν την ίδια μεταχείριση χωρίς όμως την παρουσία ιικών σωματιδίων.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

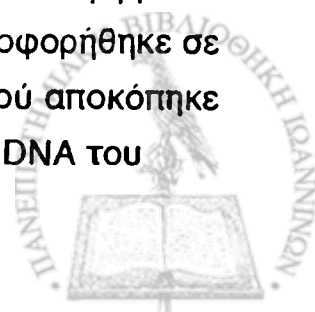


ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Πρώτη αναζήτηση στη βιβλιοθήκη (first screen) ενός κλώνου cDNA που να κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη Μοριακού Βάρους 72 kd που επάγεται από τον ιό SV40.

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας απέδειξαν ότι η μόλυνση κυττάρων CV1 με τον ιό SV40 έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή όχι μόνον της κύριας θερμικά επαγόμενης 70 kd πρωτεΐνης (hsp70), αλλά και μιας άλλης πρωτεΐνης μοριακής μάζας περίπου 72 kd. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε να επάγεται σε μικρό ποσοστό και ύστερα από θερμικό σοκ, θεωρήθηκε ότι πιθανόν αποτελεί μέλος της οικογένειας των hsp70s. Στην προσπάθειά μας να απομονώσουμε το cDNA που κωδικοποιεί την παραπάνω πρωτεΐνη αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε ως ανιχνευτή το ήδη κλωνοποιημένο ανθρώπινο cDNA της hsp70, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η ομολογία των γνωστών μελών της οικογένειας hsp70 είναι πολύ μεγάλη. Επίσης, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε βιβλιοθήκη cDNA από κύτταρα COS με φορέα κλωνοποίησης τον φάγο λZAPII. Τα κύτταρα COS (κύτταρα νεφρών πιθήκου μετασχηματισμένα με το T αντιγόνο του ιού SV40) επιλέχθηκαν γιατί σ'αυτά, τα επίπεδα της ιικά επαγόμενης πρωτεΐνης είναι υψηλά και κατά συνέπεια η πιθανότητα επιτυχούς απομόνωσης του cDNA που την κωδικοποιεί αυξημένη. Η επιλογή του φάγου λZAPII ως φορέα κλωνοποίησης στηρίχθηκε στην ικανότητά του για *in vivo* εξαγωγή του ενθέματος cDNA διευκολύνοντας πολύ τη διαδικασία της υποκλωνοποίησης σε πλασμιδιακό φορέα.

Έχοντας υπόψιν τα παραπάνω, αφού έγινε τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης όπως περιγράφηκε (κεφ.2.11) ακολούθησε σπορά συνολικά 10⁶ μονάδων σχηματισμού πλακών σε 10 τρυβλία των 100 mm (10⁴ rfu/τρυβλίο). Μετά την ανάπτυξη των πλακών ακολούθησε μεταφορά τους σε φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης και προϋβριδισμός στις συνθήκες που περιγράφηκαν (κεφ.2.11). Ως ανιχνευτής κατά τον υβριδισμό χρησιμοποιήθηκε το DNA του γονιδίου που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη hsp70 (ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του Dr.Morimoto) το οποίο αποκόπηκε από τον φορέα του (PAT) μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BamH1 και HindIII. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης και η ζώνη που αντιστοιχεί στο hsp70 γονίδιο αφού αποκόπηκε από την πηκτή καθαρίστηκε με σφαιρίδια υάλου (κεφ.2.4). Ποσότητα DNA του



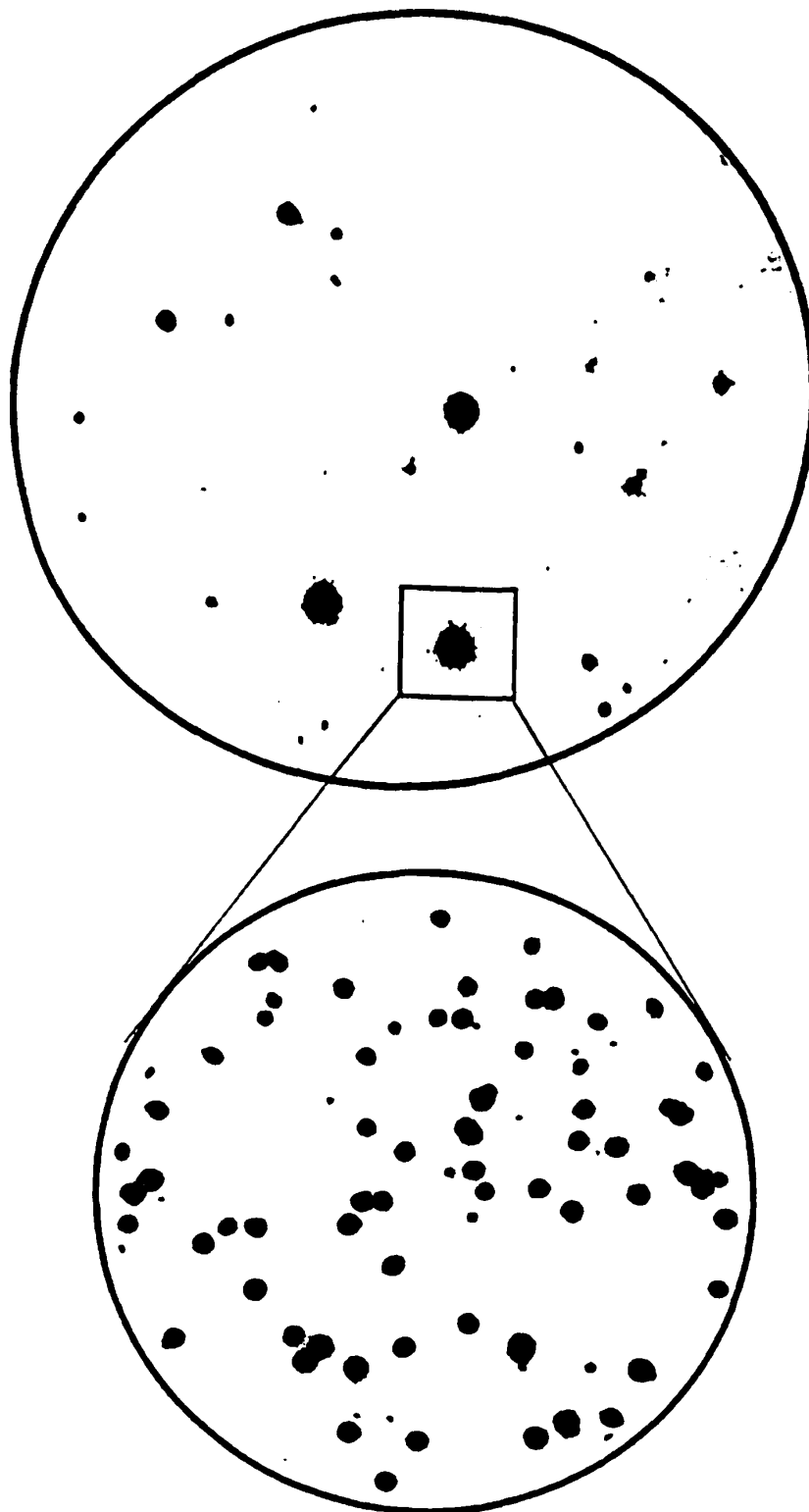
γονιδίου hsp70 ίση με 200 ng σημάνθηκε με την τεχνική της μετάφρασης εγκοπής (nick translation), καθαρίστηκε από στήλη μοριακού ηθμού G50 και η ειδική του ενεργότητα μετρήθηκε σε συσκευή υγρού σπινθηρισμού (κεφ.2.5). Σημασμένο DNA ειδικής ενεργότητας 10^9 cpm/μgr DNA χρησιμοποιήθηκε στον υβριδισμό των φίλτρων σε αναλογία 10^7 cpm ανά φίλτρο και σε συγκέντρωση $1 - 5 \times 10^6$ cpm ανά ml διαλύματος υβριδισμού.

Επειδή, η ομολογία του ανιχνευτή με το προς αναζήτηση γονίδιο ήταν άγνωστη, μετά το πέρας του υβριδισμού ακολούθησαν εκπλύσεις των φίλτρων σε συνθήκες χαμηλής αυστηρότητας και φιλμ εκτέθηκαν έναντι των φίλτρων επί μία και δύο μέρες. Μετά την εμφάνιση, εντοπίστηκαν 25 θετικές πλάκες και περιοχές 1 cm^2 περιφερειακά των θετικών πλακών αποκόπηκαν από τα τρυβλία. Επειδή στις περιοχές αυτές περιέχεται μεγάλος αριθμός πλακών, για την απομόνωση της θετικής πλάκας σε καθαρή μορφή ακολούθησε και δεύτερος κύκλος απομόνωσης. Στον δεύτερο αυτό κύκλο απομόνωσης (second screen) ακολουθήσαμε την ίδια ακριβώς διαδικασία και τελικά οι 25 θετικοί κλώνοι απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή (Εικ.1).

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης των θετικών κλώνων, έγινε *in vivo* εξαγωγή - αποκοπή του φαγιδίου rBluescript από τον φάγο - φορέα (κεφ.2.11). Το φαγίδιο rBluescript, περιέχει και το cDNA ένθεμα του κάθε κλώνου, κλωνοποιημένο σε θέση δράσης για το περιοριστικό ένζυμο EcoR1. Στόχος της όλης διαδικασίας είναι, η αποκοπή του φαγιδίου rBluescript, με το κλωνοποιημένο σ' αυτό cDNA ένθεμα και ο αυτόνομος πλέον πολλαπλασιασμός του σε βακτήρια XL1 - Blue. Η *in vivo* εξαγωγή του ενθέματος πραγματοποιήθηκε με ταυτόχρονη μόλυνση βακτηρίων XL1- Blue τόσο με το φάγο - φορέα του κλωνοποιημένου cDNA ενθέματος όσο και με τον βοηθό φάγο R408. Στο εσωτερικό των κυττάρων XL1 - Blue, τόσο ο φάγος λ ZAPII όσο και ο φάγος βοηθός R408 πολλαπλασιάζονται αυτόνομα. Η κατασκευή όμως του λ ZAPII είναι τέτοια ώστε τελικά με την δράση πρωτεϊνών του βοηθού φάγου πάνω στο γυμνό DNA του φάγου - φορέα να αποκόπτεται η κεντρική του περιοχή (κεφ.2.8). Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει το cDNA ένθεμα κλωνοποιημένο στο φαγίδιο rBluescript. Το rBluescript με το κλωνοποιημένο cDNA ένθεμα πακετάρεται από τις καψιδιακές πρωτεΐνες του βοηθού φάγου και απελευθερώνεται στο θρεπτικό μέσο με την λύση των κυττάρων XL1-Blue.

Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόσθηκε για κάθε κλώνο χωριστά. Μία



**A****B**Εικ.1:

A. Αυτοραδιογραφία φίλτρου, με πλάκες φάγων, μετά από επώαση με τον ραδιενεργό ανιχνευτή (First screen).

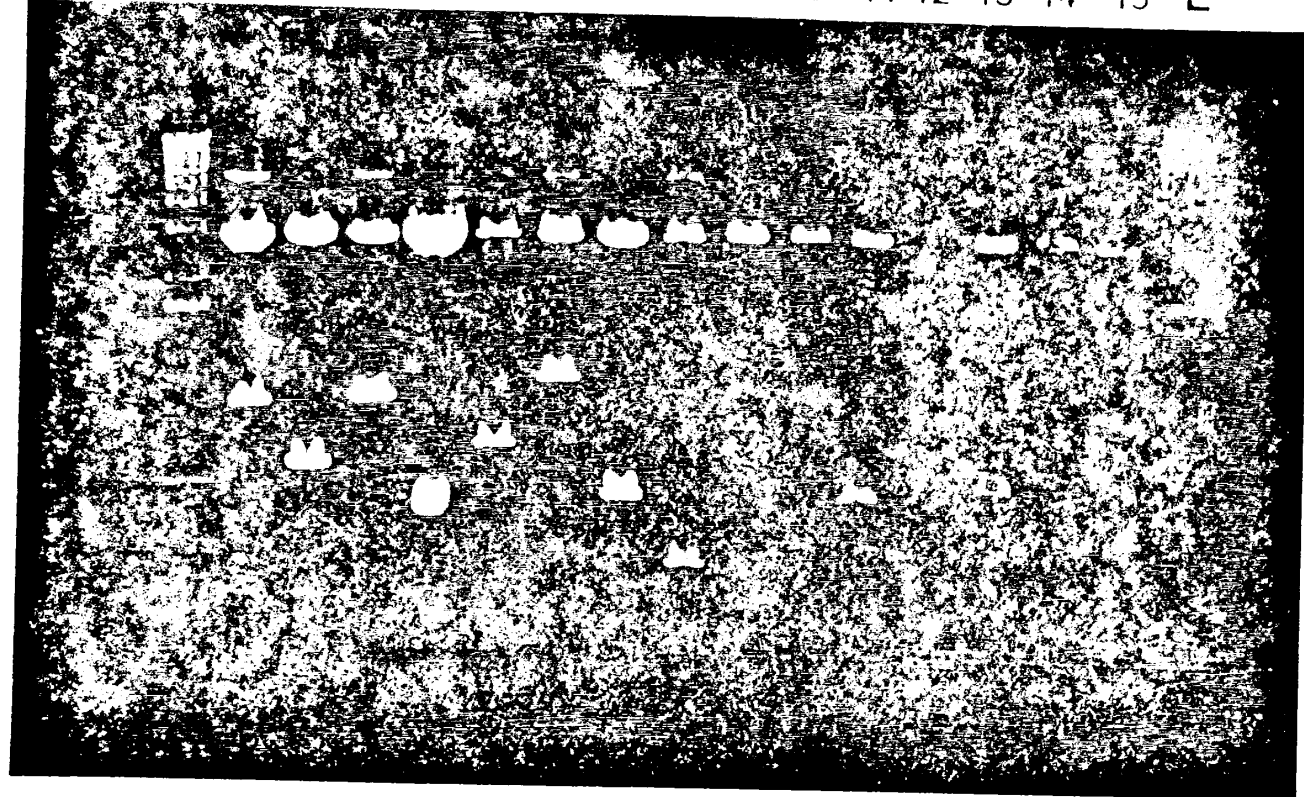
B. Η περιοχή που ορίζεται με το τετράγωνο στην εικ.Α, μεγέθους 1cm^2 αραιώθηκε και επανασπάρθηκε. Ακολούθησε υβριδισμός και αυτοραδιογραφία (Second screen). Στην εικ.Β οι πλάκες είναι πλέον τόσο αραιές ώστε μπορεί να απομονωθεί μια θετική πλάκα σε καθαρή μορφή.



αποικία από κάθε κλώνο ανασύρθηκε από το τρυβλίο, αναπτύχθηκε σε υγρή καλλιέργεια LB/amp και από αυτήν παρασκευάσθηκε DNA μικρής κλίμακας (κεφ.2.3.1). Ακολούθησε πέψη του φαγιδιακού DNA με EcoRI και απελευθέρωση του ενθέματος. Τα ενθέματα DNA των κλώνων αναλύθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (κεφ.2.4) και τα μεγέθη τους βρέθηκε ότι κυμαίνονταν μεταξύ 0.2 και 1.1 kb (Εικ.2). Με δεδομένο ότι το αναζητούμενο cDNA κωδικοποιεί πρωτεΐνη M.B 70-72kd, συμπεραίνουμε ότι κανένας από τους κλώνους που απομονώθηκαν δεν ήταν πλήρους μεγέθους.

Σ'όλες τις παρασκευές DNA μικρής κλίμακας από κύτταρα XL1-Blue, μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, εμφανίζεται μία ζώνη DNA μεγέθους 7kb περίπου. Η προέλευση της ζώνης αυτής είναι άγνωστη ενώ επανειλημμένες πέψεις με διάφορα περιοριστικά ένζυμα έδειξαν ότι δεν σχετίζεται με το DNA ένθεμα αλλά οφείλεται στην μόλυνση από DNA χρωμοσωμικής ή το πιθανότερο πλασμιδιακής προέλευσης (εξαιτίας της ύπαρξης του πλασμιδίου F). Για τον λόγο αυτό προκειμένου να παρασκευάσουμε πλασμίδιο απαλλαγμένο από DNA μολύνσεις μετασχηματίσαμε βακτήρια MC1061 (τα οποία δεν περιέχουν το πλασμίδιο F) με καθαρισμένο από διαβάθμιση CsCl DNA όλων των κλώνων. Η απομόνωση DNA μικρής ή μεγάλης κλίμακας από τα βακτήρια αυτά μας έδωσε την δυνατότητα να παρασκευάσουμε πλασμίδιο καθαρό από οποιαδήποτε πρόσμιξη με αδιάφορα κομμάτια DNA. Έτσι λοιπόν μετά από κάθε κύκλο *in vivo* εξαγωγής ενθέματος σε XL1-Blue κύτταρα, ακολουθήσαμε πάντα και ένα επιπλέον στάδιο μετασχηματισμού κυττάρων MC1061 με υψηλής καθαρότητας φαγιδιακό DNA που εκχυλίσθηκε από τα κύτταρα XL1Blue.

Ο αρχικός μας στόχος, όπως αναφέρθηκε, ήταν η κλωνοποίηση ενός cDNA με χαρακτηριστικά έντονης ιικής και μικρής θερμικής επαγωγής. Βασιζόμενοι στα χαρακτηριστικά αυτά προχωρήσαμε στον έλεγχο της έκφρασης των 25 αυτών κλώνων με αποτύπωση κατά Northern (κεφ.2.14). Συγκεκριμένα, εκχυλίσθηκε RNA από κύτταρα COS και CV1 όπως επίσης και από κύτταρα COS και CV1 που υπέστησαν θερμικό σοκ σε θερμοκρασία 42.5°C επί 1:30 ώρες (κεφ.2.12 και κεφ.2.29). Τα RNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή όπως περιγράφηκε στις μεθόδους (κεφ.2.14), χρωματίσθηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο, φωτογραφήθηκαν και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης όπου και μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε προϋβριδισμός και υβριδισμός με ανιχνευτές τα ραδιενεργά σημασμένα ενθέματα όλων των κλώνων. Με τον τρόπο αυτό



Εικ.2: Παρασκευή DNA μικρής κλίμακας ενός αριθμού κλώνων. Πέψη του DNA με EcoRI. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης. Τα DNA ενθέματα κυμαίνονται μεταξύ 0.2 και 1.1kb.
 L: ladder, (Μίγμα τμημάτων DNA με πρότυπα μοριακά βάρη).

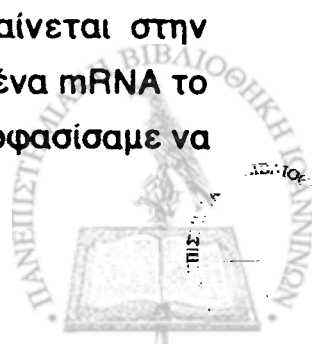


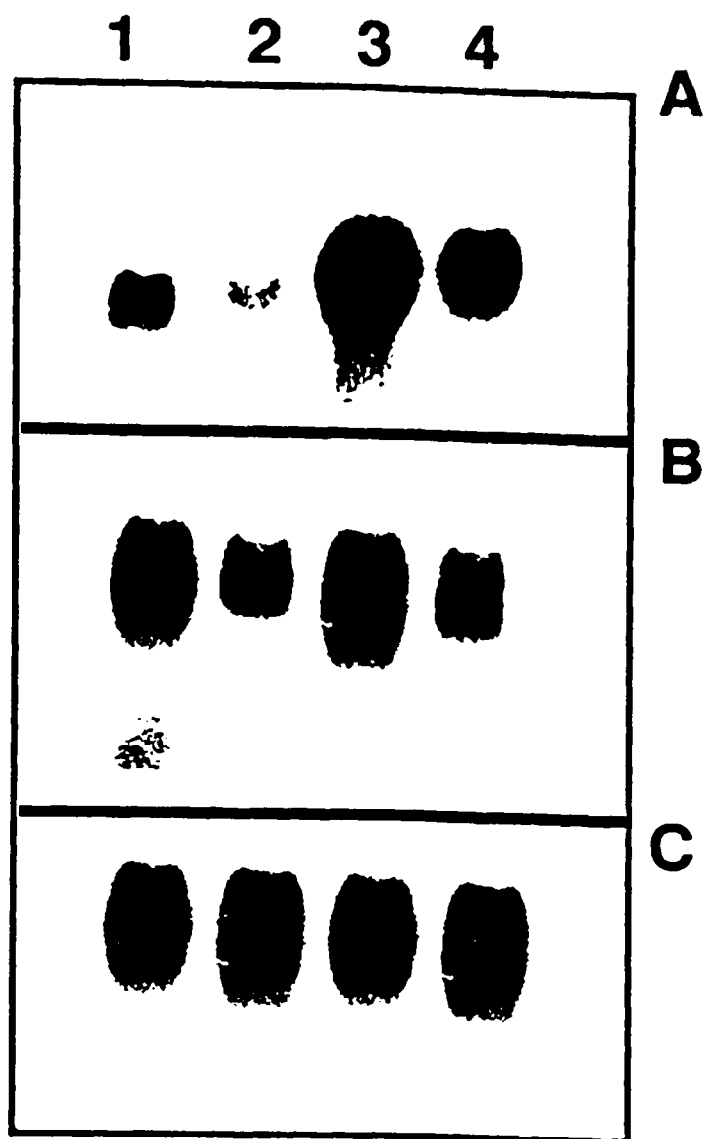
ελέγχθηκαν τα επίπεδα των RNA που αντιστοιχούν σε καθένα από τα κλωνοποιημένα ενθέματα. Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες εντοπίσθηκε ένας μεγάλος αριθμός κλώνων με καθαρό πρότυπο έντονης θερμικής επαγωγής, μικρός αριθμός κλώνων με πρότυπο ιικής επαγωγής (υψηλότερα επίπεδα RNA σε COS κύτταρα) ενώ δεν έλλειψαν και κλώνοι με αδιάφορη έκφραση ως προς τις παραμέτρους που εξετάσαμε (Εικ.3). Επίσης όλα τα mRNA που υβριδοποίησαν οι κλώνοι που εξετάσθηκαν βρέθηκαν να έχουν μέγεθος 2.500 περίπου βάσεων, δηλαδή μεγέθη αναμενόμενα για RNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες M.B. 70-72 kd.

Με βάση τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού επιλέχθηκαν δύο κλώνοι, για περαιτέρω μελέτη: α) ένας κλώνος μεγέθους 500bp περίπου με χαρακτηριστικά έντονης ιικής επαγωγής και μικρής θερμικής επαγωγής και β) ένας κλώνος μεγέθους 750-800 bp με χαρακτηριστικά έντονης θερμικής επαγωγής.

Η πιστοποίηση του γεγονότος ότι ο πρώτος κλώνος αποτελεί μέρος του cDNA που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 72 kd έγινε με την χρήση της τεχνικής της επιλογής RNA με υβριδισμό σε φίλτρο σε συνδυασμό με μετάφραση *in vitro* (κεφ.2.15 και κεφ.2.16). Συγκεκριμένα, DNA του κλώνου αυτού ακινητοποιήθηκε πάνω σε φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης. Στη συνέχεια παρασκευάσθηκε συνολικό RNA από κύτταρα COS και από το παρασκεύασμα αυτό απομονώθηκε πολυαδενυλιωμένο mRNA (κεφ.2.13) με χρήση στήλης πολυμερισμένης δεοξυθυμίνης (oligo dT). Ακολούθησε υβριδοποίηση των μεμβρανών με το πολυαδενυλιωμένο mRNA των COS κυττάρων και το υβριδοποιηθέν mRNA εκχυλίσθηκε από τα φίλτρα και μεταφράστηκε *in vitro* σε σύστημα εκχυλίσματος δικτυοκυττάρων κουνελιού. Παράλληλα polyA mRNA τόσο από κύτταρα COS όσο και από κύτταρα COS που είχαν υποστεί θερμικό σοκ επί 1:30 ώρες μεταφράστηκαν *in vitro* και χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες στην ηλεκτροφόρηση που ακολούθησε (κεφ.2.16). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε φλουороγραφία έκθεση και εμφάνιση του φιλμ μετά από δύο μέρες (κεφ.2.19 και κεφ.2.20). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού έδειξαν ότι το mRNA που υβριδοποιεί τον απομονωθέντα κλώνο δίνει ένα μόνο προϊόν μοριακού βάρους 72 kd (Εικ.4).

Με δεδομένη την ιική επαγωγή του κλώνου, όπως φαίνεται στην αποτύπωση κατά Northern (Εικ.3) και την ικανότητά του να επιλέγει ένα mRNA το οποίο μεταφράζεται σε πρωτεΐνη μοριακού βάρους 72 kd (Εικ.4), αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στην απομόνωση του cDNA πλήρους μεγέθους.





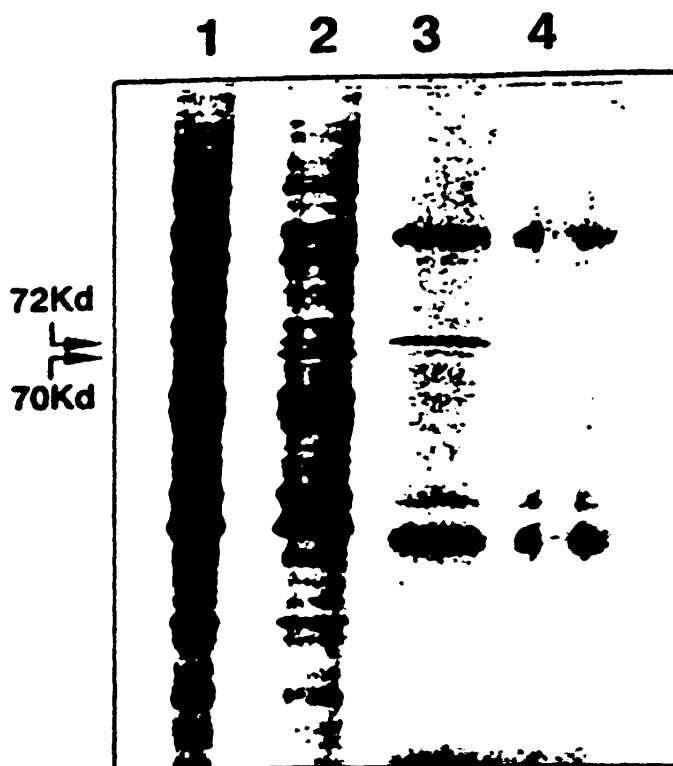
Εικ.3: Ανάλυση κατά Northern μερικών από τους κλώνους που απομονώθηκαν.

A. Κλώνος με πρότυπο έντονης θερμικής επαγωγής.

B. Κλώνος με χαρακτηριστικά ιικής επαγωγής.

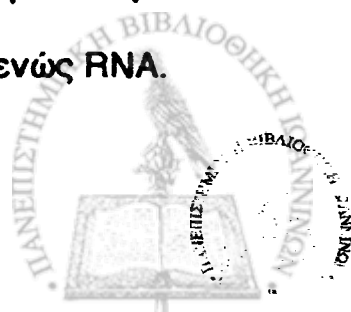
C. Κλώνος με αδιάφορη έκφραση ως προς τα χαρακτηριστικά που μελετούμε.

1. COS RNA, 2. CV1 RNA, 3. COS HS RNA, 4. CV1 HS RNA.



Εικ.4: Επιλογή RNA με υβριδισμό σε φίλτρο - Μετάφραση *in vitro* .

1. Πρωτεΐνες από COS κύτταρα σημασμένες *in vivo* με ^{35}S Meth.
2. Πρωτεΐνες από COS κύτταρα που είχαν υποστεί προηγουμένως θερμικό σοκ επί 1.30 ώρες. Οι πρωτεΐνες σημάνθηκαν *in vivo* με ^{35}S Meth.
3. *In vitro* μετάφραση του RNA που επιλέχθηκε με βάση την ομολογία του με τον κλώνο 538.
4. Πείραμα μάρτυρας. *In vitro* μετάφραση χωρίς να προστεθεί εξωγενώς RNA.



Η αναζήτηση του πλήρους μεγέθους cDNA έγινε με τη χρησιμοποίηση του απομονωθέντος κλώνου ως ραδιενεργού ανιχνευτή στην ίδια βιβλιοθήκη. Συνολικά εξετάσθηκαν 1×10^6 πλάκες. Με δεδομένη αυτή τη φορά την 100% ομολογία του ραδιενεργού ανιχνευτή με τον προς αναζήτηση κλώνο οι συνθήκες προϋβριδισμού, υβριδισμού και εκπλύσεων των φίλτρων ήταν οι αυστηρότερες δυνατές. Μετά την ολοκλήρωση της αναζήτησης, απομονώθηκαν συνολικά 15 κλώνοι. Έγινε *in vivo* εξαγωγή των ενθεμάτων τους σε κύτταρα XL1-Blue και εκτιμήθηκε το μέγεθος των κλώνων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Δύο από τους απομονωθέντες κλώνους (538 και 516) βρέθηκαν να έχουν μέγεθος περίπου 2.5 kb και ως εκ τούτου θεωρήθηκαν ως πιθανοί κλώνοι πλήρους μεγέθους. Με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων εκτιμήθηκε ότι οι κλώνοι 538 και 516 δεν είναι μόνο μεγαλύτεροι από τους υπόλοιπους δεκατρείς αλλά επίσης ότι εμπεριέχουν και τις αλληλουχίες των άλλων κλώνων (overlapping clones).

Ακολούθησε έλεγχος των κλώνων τόσο ως προς την ικκή όσο και ως προς την θερμική τους επαγωγή με αποτύπωση κατά Northern. Κύτταρα COS και CV1 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ στους 42.5°C και εκχυλίσθηκε RNA από αυτά. Επίσης RNA εκχυλίσθηκε από κύτταρα COS και CV1 (κύτταρα μάρτυρες). Τα RNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης υπό αποδιατακτικές συνθήκες και αφού χρωματίσθηκαν και φωτογραφήθηκαν, μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης όπου και μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε προϋβριδισμός και υβριδισμός στις συνθήκες που αναφέρθηκαν, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές τα ενθέματα DNA των κλώνων, τα οποία σημάνθηκαν ραδιενεργά με την μέθοδο μετάφρασης εγκοπής (nick translation). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι όλοι οι κλώνοι που απομονώθηκαν είχαν ένα πρότυπο έντονης ικκής επαγωγής (υψηλότερα ποσοστά mRNA σε κύτταρα COS) σε συνδυασμό με ελαφρά αύξηση των επιπέδων mRNA μετά από θερμικό σοκ.

Οι δύο από τους κλώνους που αναφέρθηκαν (538 και 516) μεγέθους 2.5 kb περίπου ο καθένας εξετάσθηκαν περαιτέρω γιατί ήταν και οι μόνοι κλώνοι με πιθανότητα να είναι κλώνοι πλήρους μεγέθους. Για το σκοπό αυτό έγινε ανάγνωση της αλληλουχίας 200-300 βάσεων από τα άκρα κάθε κλώνου με την Διδεοξική μέθοδο (κεφ.2.6). Σύγκριση των αλληλουχιών των δύο κλώνων μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο κλώνος 538 είναι μεγαλύτερος από τον κλώνο 516 κατά 15 βάσεις και επίσης ότι ο κλώνος 538 εμπεριέχει τον 516.



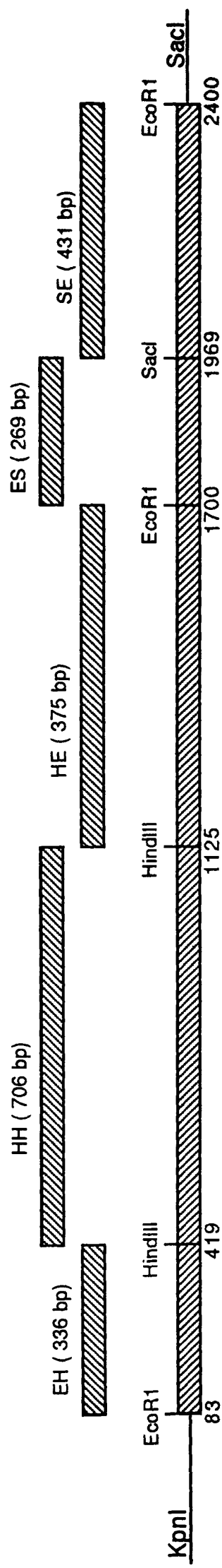
3.2 Ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του κλώνου 538 που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μοριακού θάρους 72 kd που επάγεται από τον ιό SV 40.

Επειδή το μέγεθος του κλώνου 538 ήταν περίπου 2.5 kb, η ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί με υπόστρωμα ολόκληρο το cDNA, γιατί η μέθοδος ανάγνωσης της αλληλουχίας που χρησιμοποιήσαμε είχε τη δυνατότητα ανάγνωσης 300 - 400 bp από τα άκρα μιας αλληλουχίας DNA.

Έτσι προχωρήσαμε στην υιοθέτηση μιας στρατηγικής υποκλωνοποίησης που περιλάμβανε κοπή του προς ανάγνωση DNA σε μικρότερα τμήματα, κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών σε pBluescript και ανάγνωση της αλληλουχίας των ενθεμάτων των προκύπτοντων πλασμιδίων.

Πιο συγκεκριμένα, ο κλώνος 538 αρχικά υποβλήθηκε σε μια σειρά από πέψεις με ένζυμα περιορισμού ώστε να κατασκευασθεί ένας κατά το δυνατόν πιο λεπτομερής περιοριστικός χάρτης του ενθέματος DNA (Εικ.5). Με βάση τον χάρτη αυτόν, το cDNA κόπηκε με περιοριστικά ένζυμα σε πέντε θραύσματα των 300 - 700 bp περίπου (EH, HE, ES, SE, HH). Το καθένα από αυτά τα τμήματα υποκλωνοποιήθηκε στο φαγίδιο pBluescript σε θέσεις εσωτερικά της περιοχής κλωνοποίησης (polylinker). Τα φαγίδια pBluescript με τα κλωνοποιημένα τμήματα του κλώνου 538 χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματίσουν βακτήρια MC1061. Ακολούθησε παρασκευή πλασμιδιακών DNA μεγάλης κλίμακας σε διαβάθμιση πυκνότητας CsCl (κεφ.2.3.2) και τα προκύπτοντα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων των DNA ενθεμάτων τους. Για κάθε υποκλωνοποιημένο τμήμα του κλώνου 538 έγιναν δύο αντιδράσεις ανάγνωσης των βάσεων του, χρησιμοποιώντας πριμοδοτικές αλληλουχίες εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης. Μ'αυτό τον τρόπο διαβάστηκαν και οι δύο αλυσίδες του DNA των τμημάτων EH, HE, ES, SE και HH και επιβεβαιώθηκε πλήρως η πιστότητα των αλληλουχιών. Ο συνδυασμός των αλληλουχιών όλων των τμημάτων DNA αποτελεί τη συνολική αλληλουχία του κλώνου 538 (η DNA αλληλουχία του κλώνου 538 στο Παράρτημα Α).

Μελέτη της αλληλουχίας σε υπολογιστή (πρόγραμμα: DNA strider) έδειξε ότι η αλληλουχία περιλαμβάνει 3 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORF) εκ των οποίων το ένα μπορεί να μεταφρασθεί σε μία πρωτεΐνη μεγέθους 72 kd. Σύγκριση της αλληλουχίας του κλώνου 538 με αλληλουχίες γνωστών γονιδίων



Εικ.5: Περιοριστικός χάρτης του κλώνου 538.
 Η αρίθμηση έγινε με βάση το cDNA που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη hsc70.

έδειξε ότι ο κλώνος 538 είναι ομόλογος με το γονίδιο της hsc70 πρωτεΐνης (heat shock cognate 70) του ανθρώπου (35).

Συγκεκριμένα, ο κλώνος 538 βρέθηκε να έχει 98% ομολογία με το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη hsc70 ενώ σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας οι δύο πρωτεΐνες έχουν ομολογία 99.6 % (Εικ.6).

Συνεπώς καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο κλώνος 538 κωδικοποιεί την hsc70 του πιθήκου. Η αλληλουχία των βάσεων του κλώνου 538 κατατέθηκε στην τράπεζα πληροφοριών του EMBL (EMBL Data Bank) με κωδικό X 73685.

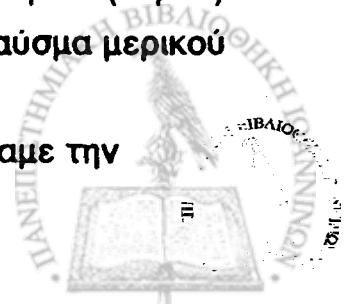
3.3 *In vitro* μεταγραφή - μετάφραση του κλώνου 538.

Θέλοντας να ελέγξουμε την ικανότητα του κλώνου 538 να παράγει μία πρωτεΐνη μεγέθους 72 kd, προχωρήσαμε σε *in vitro* μεταγραφή - μετάφρασή του (κεφ.2.16). Για τον σκοπό αυτό έγινε πέψη φαγιδιακού DNA του κλώνου 538 καθοδικά της θέσης κλωνοποίησης του ενθέματος με το ένζυμο *Bam* HI το οποίο αφήνει μετά την πέψη 5' προεξέχοντα άκρα, προϋπόθεση αναγκαία για την παραγωγή μεταγραφημάτων πλήρους μεγέθους κατά την διαδικασία της μεταγραφής *in vitro* με την βοήθεια της RNA πολυμεράσης. Ακολούθησε μεταγραφή *in vitro* και μετάφραση του παραχθέντος RNA σε ένα εκχύλισμα δυκτιδκυττάρων κουνελιού παρουσία ραδιενεργά σημασμένης μεθειονίνης όπως περιγράφηκε (κεφ.2.16). Το παραχθέν ραδιενεργό προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή ακρυλαμιδίου και το μέγεθός του εκτιμήθηκε μετά από σύγκριση με γνωστά πρωτεϊνικά Μοριακά Βάρη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών απέδειξαν ότι πράγματι, ο κλώνος 538 κωδικοποιεί για πρωτεΐνη μεγέθους περίπου 72 kd (Εικ.7).

3.4 Κλωνοποίηση του κύρια θερμικά επαγώμενου γονιδίου (hsp70) του πιθήκου.

Ο ένας από τους δύο κλώνους (κλώνος 11) που απομονώθηκαν μετά την πρώτη αναζήτηση στη βιβλιοθήκη και που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη είχε χαρακτηριστικά έντονης θερμικής επαγωγής. Η πιθανότητα ο κλώνος αυτός να κωδικοποιεί για την κύρια θερμικά επαγώμενη πρωτεΐνη του πιθήκου (hsp70) θεωρήθηκε μεγάλη, αλλά το μήκος του (750-800 bp) υποδεικνυε θραύσμα μερικού μεγέθους (partial clone).

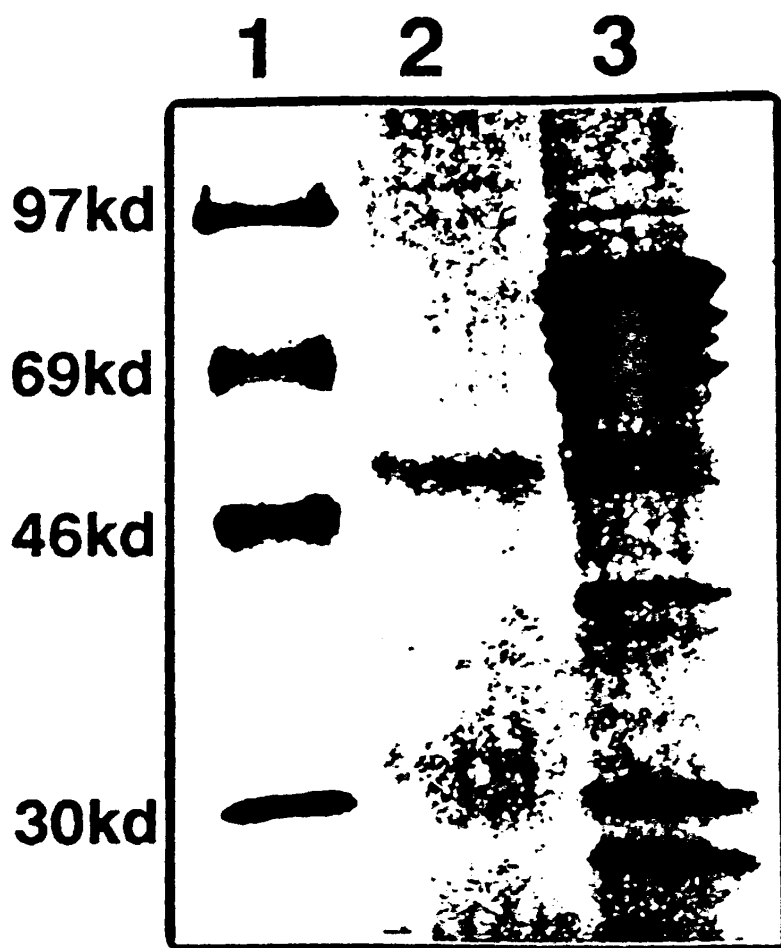
Για την απομόνωση κλώνου πλήρους μεγέθους επαναλάβαμε την



	10	20	30	40	50
538	MSKGPVAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAA				
hsc70	MSKGPVAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAA				
	60	70	80	90	100
	KNQVAMNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGE				
	KNQVAMNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGE				
	120	130	140	150	160
	TKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAEAYLGKTVTNAVVTVPAYFNDSQRQRQATKDAKT				
	TKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAEAYLGKTVTNAVVTVPAYFNDSQRQRQATKDAKT				
	170	180	190	200	210
	IAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFE				
	IAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFE				
	230	240	250	260	270
	VKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAEFKRKHKKDISENKRAVRRLRTACERAKRT				
	VKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAEFKRKHKKDISENKRAVRRLRTACERAKRT				
	280	290	300	310	320
	LSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDK				
	LSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKPLRDAKLDK				
	340	350	360	370	380
	SQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGD				
	SQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGD				
	390	400	410	420	430
	KSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTIPTKQTQFTTYSNQPVG				
	KSENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTIPTKQTQFTTYSNQPVG				
	450	460	470	480	490
	LIQVYEGERAMTKDNNLLQKFELTGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVSAVDK				
	LIQVYEGERAMTKDNNLLQKFELTGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVSAVDK				
	500	510	520	530	540
	STGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKADEKQORDKVSSKNSLESYAFN				
	STGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKADEKQORDKVSSKNSLESYAFN				
	560	570	580	590	600
	MKATVEDEKLQGGKINDEDKQKILDKCNEIINWLDKNQTAEKEEFEHQKELEKVC				
	MKATVEDEKLQGGKINDEDKQKILDKCNEIINWLDKNQTAEKEEFEHQKELEKVC				
	610	620	630	640	
	NPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPPGGASSGPTIEEVD				
	NPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD				

Εικ.6: Σύγκριση της hsc70 του πιθήκου (538) με την hsc70 του ανθρώπου.





Εικ.7: *In vitro* μεταγραφή - μετάφραση του κλώνου 538.

1.Πρότυποι πρωτεϊνικοί δείκτες Μοριακών Βαρών.

2.Πείραμα μάρτυρας. Μετάφραση σε εκχύλισμα δικτυοκυττάρων χωρίς να προστεθεί εξωγενώς RNA.

3.*In vitro* μετάφραση RNA που παρήχθη επίσης *in vitro* χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το cDNA του κλώνου 538.



αναζήτηση στη βιβλιοθήκη χρησιμοποιώντας ως ραδιενεργό ανιχνευτή το DNA ένθεμα του κλώνου 11. Με δεδομένη αυτή τη φορά την 100% ομολογία του κλώνου 11 με τους προς αναζήτηση κλώνους οι συνθήκες υβριδισμού και εκπλύσεων των φίλτρων ήταν αυστηρότερες απ' ό,τι την πρώτη φορά. Ο αριθμός των πλακών που εξετάσθηκαν ήταν και αυτή τη φορά υψηλός. Συνολικά έγινε σπορά 10^6 rfu, μεταφορά σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης, σταθεροποίηση των πλακών, προϋβριδισμός, υβριδισμός και εκπλύσεις των φίλτρων. Τελικά απομονώθηκαν 4 κλώνοι σε καθαρή μορφή μετά από ένα δεύτερο κύκλο της όλης διαδικασίας (second screen). Έγινε *in vivo* εξαγωγή του ενθέματός τους σε κύτταρα XL1-Blue και εκτιμήθηκε το μέγεθος των κλώνων όπως προηγουμένως. Ο ένας απ' αυτούς τους κλώνους (κλώνος 1101) βρέθηκε να έχει μέγεθος περίπου 2.5 kb και ως εκ τούτου θεωρήθηκε πιθανόν να είναι κλώνος πλήρους μεγέθους. Με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και την κατασκευή χαρτών περιορισμού εκτιμήθηκε ότι ο κλώνος 1101 δεν ήταν μόνο μεγαλύτερος από τους άλλους 3 αλλά περιείχε και τις αλληλουχίες των υπολοίπων κλώνων (overlapping clones).

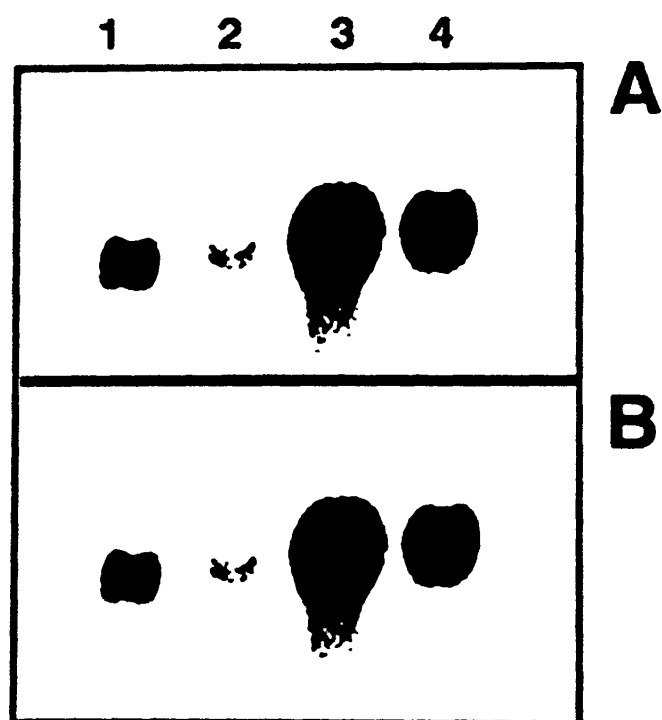
Ακολούθησε έλεγχος των κλώνων όπως και προηγουμένως με αποτύπωση κατά Northern. Κύτταρα COS και CV1 υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ στους 42.5°C και RNA εκχυλίσθηκε από αυτά. Επίσης RNA εκχυλίσθηκε από κύτταρα COS και CV1 (κύτταρα μάρτυρες). Τα RNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αгарόζη υπό αποδιατακτικές συνθήκες και αφού χρωματίσθηκαν και φωτογραφήθηκαν, μεταφέρθηκαν σε φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης όπου και μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε προϋβριδισμός και υβριδισμός στις συνθήκες που αναφέρθηκαν, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές τα DNA ενθέματα των κλώνων τα οποία σημάνθηκαν ραδιενεργά με τη μέθοδο μετάφρασης εγκοπής (nick translation).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών απέδειξαν ότι όλοι οι κλώνοι που απομονώθηκαν είχαν ένα πρότυπο έντονης θερμικής επαγωγής και τα ραδιενεργά σημασμένα ενθέματα υβριδοποιούσαν RNA μεγέθους 2.5 kb περίπου (Εικ.8).

3.5 Ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του κλώνου 1101 που κωδικοποιεί για μια θερμικά επαγόμενη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 70 kd.

Ο κλώνος 1101, υποβλήθηκε σε μια σειρά από πέψεις με ένζυμα





Εικ.8: Ανάλυση κατά Northern δύο θερμικά επαγόμενων κλώνων.
1.COS RNA, 2.CV1 RNA, 3.COS HS RNA, 4.CV1 HS RNA

περιορισμού ώστε να κατασκευασθεί ένας κατά το δυνατόν πιο λεπτομερής περιοριστικός χάρτης του DNA ενθέματος (Εικ.9). Με βάση τον χάρτη αυτόν το DNA ένθεμα του κλώνου κόπηκε με περιοριστικά ένζυμα σε τέσσερα θραύσματα των 450 - 800 bp. Το καθένα από αυτά τα τμήματα υποκλωνοποιήθηκε στο φαγίδιο pBluescript σε θέσεις εσωτερικά της περιοχής κλωνοποίησης (polylinker). Τα φαγίδια pBluescript με τα κλωνοποιημένα θραύσματα του κλώνου 1101 χρησιμοποιήθηκαν για να μετασχηματίσουν βακτήρια MC1061. Ακολούθησε παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας σε διαβάθμιση CsCl και το καθαρό πλέον φαγιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA ενθέματός του.

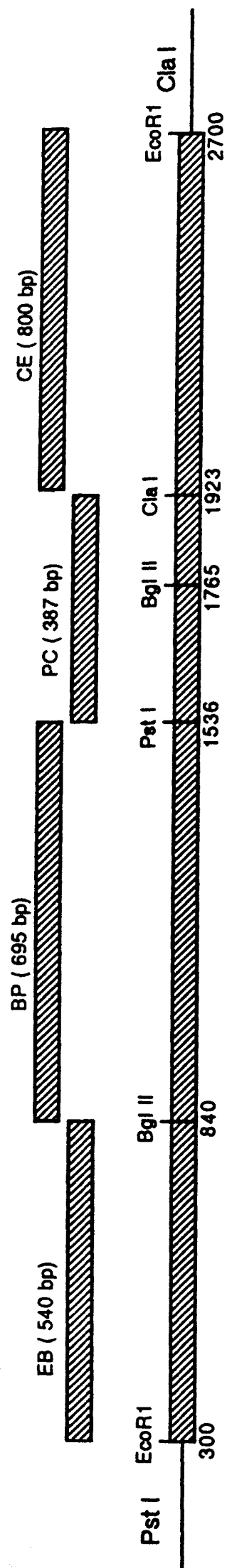
Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων ήταν η διδεδοξική μέθοδος ή μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (κεφ.2.6). Για κάθε υποκλωνοποιημένο θραύσμα του κλώνου 1101 έγιναν δύο αντιδράσεις ανάγνωσης των βάσεων του, χρησιμοποιώντας πριμοδοτικές αλληλουχίες εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης. Μ'αυτό τον τρόπο διαβάστηκαν και οι δύο αλυσίδες του DNA και έτσι επιβεβαιώθηκε πλήρως η αλληλουχία του DNA του κάθε θραύσματος. Ο συνδυασμός των αλληλουχιών όλων των DNA θραυσμάτων μας επέτρεψε να οριστικοποιήσουμε τη συνολική αλληλουχία του κλώνου 1101 (η DNA αλληλουχία του κλώνου 1101 στο Παράρτημα Β).

Σύγκριση της αλληλουχίας του κλώνου 1101 με αλληλουχίες γνωστών γονιδίων επιβεβαίωσε τις αρχικές εκτιμήσεις ότι ο κλώνος αυτός αποτελεί ομόλογο του ανθρώπινου γονιδίου που κωδικοποιεί για την hsp70. Μελέτη της αλληλουχίας σε υπολογιστή (πρόγραμμα: DNA Strider) έδειξε ότι η αλληλουχία περιλαμβάνει τρία ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORF) εκ των οποίων το ένα μπορεί να μεταφρασθεί σε μία πρωτεΐνη μεγέθους 70 kd.

Συγκεκριμένα το γονίδιο που κωδικοποιεί για την hsp70 του πιθήκου (κλώνος 1101) βρέθηκε να έχει ομολογία 97% με το γονίδιο της ανθρώπινης hsp70 ενώ σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας οι δύο πρωτεΐνες βρέθηκε ότι παρουσιάζουν 97.7 % ομολογία (Εικ.10). Η αλληλουχία των βάσεων του κλώνου 1101 κατατέθηκε στην τράπεζα πληροφοριών του EMBL (EMBL Data Bank) και έχει τον κωδικό X. 70684.

Τέλος σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των απομονωθέντων κλώνων 538 (hsc70) και 1101 (hsp70) έδειξε 82.6% ομολογία (Εικ.11).





Εικ.9: Περιριστικός χάρτης του κλώνου 1101.
 Η αρίθμηση των βάσεων έγινε με βάση το cDNA του γονιδίου που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη hsp70.

```

      10      20      30      40      50
1101  MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAA
      |||||
Hsp70 MAKAAAVGIDLGTTYSCVGVGQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAA
      60      70      80      90      100     110
      KNQVALNPQNTVFDKRLIGRKF GDPVVQSDMKHWP FQVINDGDKPKVQVSYKGE
      |||||
      KNQVALNPQNTVFDKRLIGRKF GDPVVQSDMKHWP FQVINDGDKPKVQVSYKGE
      120     130     140     150     160
      TKAFYPEEISSMVLTKMKEIAEADLGYPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIA
      |||||
      TKAFYPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGYPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIA
      170     180     190     200     210     220
      GLNVLRIINEP TRT- IAYALDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVK
      |||||
      GLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVK
      230     240     250     260     270
      ATAGDTTWV-EDFDNRLVNHFEVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRLRTACERAKRTLS
      |||||
      ATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFEVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRLRTACERAKRTLS
      280     290     300     310     320     330
      SSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDDKA
      |||||
      SSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLD-KA
      340     350     360     370     380
      QIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDLNKSINPDEAVAYGA AVQAA ILMGDK
      |||||
      QIHDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDLNKSINPDEAVGYGA AVQAA ILMGDK
      390     400     410     420     430     440
      SENVQDLLLLDVAPLSLGLETPGGVMTALIKRNSTIPTKQTQIFTTYS DNQPGVL
      |||||
      SENVQDLLLLDVAPLSLGLETAGGVMTALIKRNSTIPTKQTQIFTTYS DNQPGVL
      450     460     470     480     490
      IQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAGVPQIEVTFEIDANGILNVTATDKST
      |||||
      IQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAGVPQIEVTFDIDANGILNVTATDKST
      500     510     520     530     540     550
      GKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEA EKYKA EDEVQRERVS AKNALESYALNMK
      |||||
      GKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEA EKYKA EDEVQRERVS AKNALESYAFNMK
      560     570     580     590     600
      SAVEDEGLKGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLA EKDEF EHKRKELEQVCNP
      |||||
      SAVEDEGLKGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLA EKDEF EHKRKELEQVCNP
      610     620     630
      IISGLYQGGGGPGPGGFGAQGPKGSGSGPTIEEVD
      |||||
      IISGLYQGAGGPGPGGFGAQGPKGSGSGPTIEEVD

```

Εικ.10: Σύγκριση της hsp70 (1101) του πιθήκου με την hsp70 του ανθρώπου.



	10	20	30	40	50
HSC 70	MSKGPVAGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAA				
HSP 70	MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAA				
	60	70	80	90	100
	KNQVAMNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVNDAGRPKVQVSYKGE				
	KNQVALNPQNTVFDKRLIGRRFGDPVVQSDMKHTPFQVINDGDKPKVQVSYKGE				
	120	130	140	150	160
	TKSFYPEEVSSMVLTKMKEIAEAYLGKTVTNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIA				
	TKAFYPEEISSMVLTKMKEIAEADLGYPTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIA				
	170	180	190	200	210
	GLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVK				
	GLNVLRIINEPTRT-IAYALDRTGKGERNVLIFJLGGGTFDVSILTIDDGIFEVK				
	230	240	250	260	270
	STAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAEFKRKHKKDISENKRAVRRLRTACERAKRTLS				
	ATAGDTTWV-EDFDNRLVNHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRLRTACERAKRTLS				
	280	290	300	310	320
	SSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSQ				
	SSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQ				
	340	350	360	370	380
	IHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKS				
	IHDVLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNGRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKS				
	390	400	410	420	430
	ENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKPNTTIPTKQTQFTTYSNQPGLI				
	ENVQDLLLLDVAPLSLGLETPGGVMTALIKPNSTIPTKQTQIFTTYSNQPGLI				
	450	460	470	480	490
	QVYEGERAMTKDNNLLQKFELTGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVSADKST				
	QVYEGGRAMTKDNNLLGRFELSGIPPAP-GVPQIEVTFEIDANGILNVTATDKST				
	500	510	520	530	540
	GKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDEKQDKVSSKNSLESYAFNMK				
	GKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDQVQRRVSANKNALESYALNMK				
	560	570	580	590	600
	ATVEDEKLQKINDEDKQKILDKCNEIINWLDKNQTAEKEEFEHQKELEKVCNP				
	SAVEDEGLKGKISEADKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNP				
	610	620	630	640	
	IITKLYQSAGG-MPGGMPGGFPGGGAPPPGGASSGPTIEEVD				
	IISGLYQGGGGPGGGFGAQQPKGG----SG--SGPTIEEVD				

Εικ.11: Σύγκριση μεταξύ της hsc70 (538) και της hsp70 (1101) του πιθήκου.



3.6. Μελέτη των επιπέδων mRNA των γονιδίων hsc70 και hsp70 σε ιστούς ποντικού.

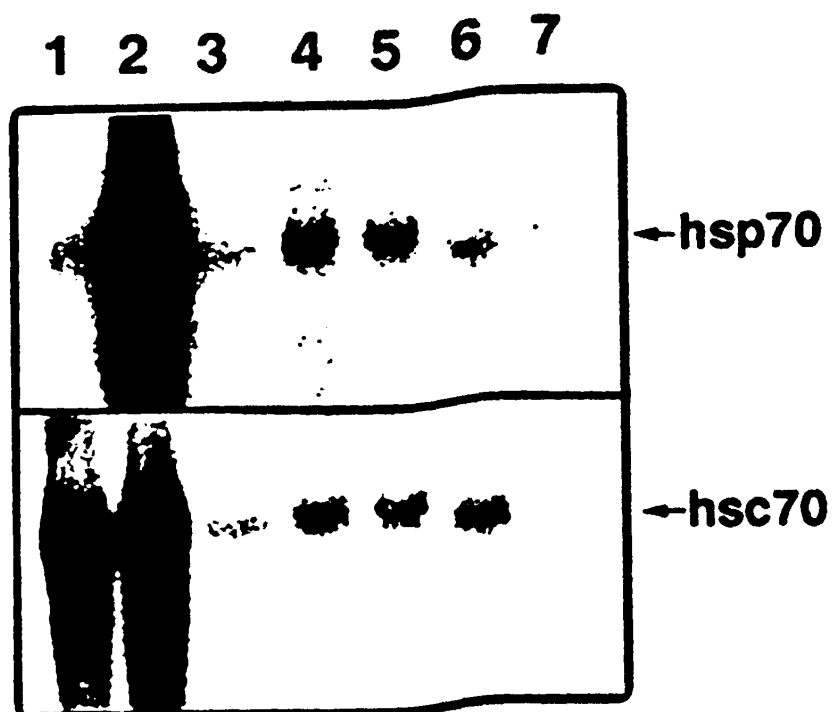
Μετά την απομόνωση των cDNA που κωδικοποιούν τόσο για την κύρια ιικά επαγόμενη (hsc70), όσο και για την κύρια θερμικά επαγόμενη πρωτεΐνη του πιθήκου (hsp70) προχωρήσαμε σε ανίχνευση των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν στα γονίδια αυτά μελετώντας έναν αριθμό ιστών ποντικού. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αποτύπωση κατά Northern. Για την ανίχνευση των επιπέδων mRNA, συνολικό RNA εκχυλίσθηκε από νεφρό, καρδιά, εγκέφαλο, συκώτι, σπλήνα και πνεύμονες (κεφ.2.12). RNA από κύτταρα μάρτυρες CV1 και από κύτταρα CV1 που υπέστησαν θερμικό σοκ ελέγχθηκαν παράλληλα με τα RNA ιστικής προέλευσης.

Όπως φαίνεται στην Εικ.12 τα επίπεδα mRNA για το γονίδιο hsc70 είναι υψηλότερα στα νεφρά, στην καρδιά και τον εγκέφαλο, λίγο χαμηλότερα στο συκώτι, ενώ δεν είναι ανιχνεύσιμα στον σπλήνα και στους πνεύμονες. Το ίδιο πρότυπο έκφρασης ισχύει και για το γονίδιο που κωδικοποιεί για την hsp70. Ακόμη όμως και τα υψηλότερα επίπεδα που παρατηρούνται στους ιστούς είναι σαφώς χαμηλότερα από τα επίπεδα που ανιχνεύονται στην κυτταρική σειρά. Αυτό πιθανόν να σχετίζεται με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού που είναι σαφώς υψηλότερος σε μια κυτταρική σειρά σε σχέση με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυτταρικών πληθυσμών στους εν λόγω ιστούς.

3.7 Χαρακτηρισμός των hsc70 και hsp70 σε συνθήκες παρατεταμένου θερμικού σοκ.

Ο επιπλέον χαρακτηρισμός των απομονωθέντων cDNA συνεχίστηκε με την μελέτη της έκφρασής τους κάτω από συνθήκες παρατεταμένου θερμικού σοκ. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα CV1 υπέστησαν θερμικό σοκ στους 42.5°C επί 1:30, 3:00, 6:00 και 9:00 ώρες. Από αυτά εκχυλίσθηκε RNA και 25 µg από κάθε περίπτωση ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης υπό αποδιατακτικές συνθήκες όπως περιγράφηκε. Ακολούθησε Northern blot χρησιμοποιώντας ως ραδιενεργούς ανιχνευτές τα ενθέματα των κλώνων 1101 και 538. Όπως φαίνεται στην Εικ.13 το γονίδιο της hsp70 (κλώνος 1101) επάγεται έντονα από τις 1:30 ώρες ενώ η συσσώρευση του mRNA που αντιστοιχεί σε αυτό συνεχίζεται μέχρι και τις εννέα ώρες. Αντίθετα για το hsc70 γονίδιο (κλώνος 538) παρατηρούμε μια μικρή επαγωγή τρεις ώρες μετά την έναρξη του θερμικού σοκ, και έκτοτε τα επίπεδα του

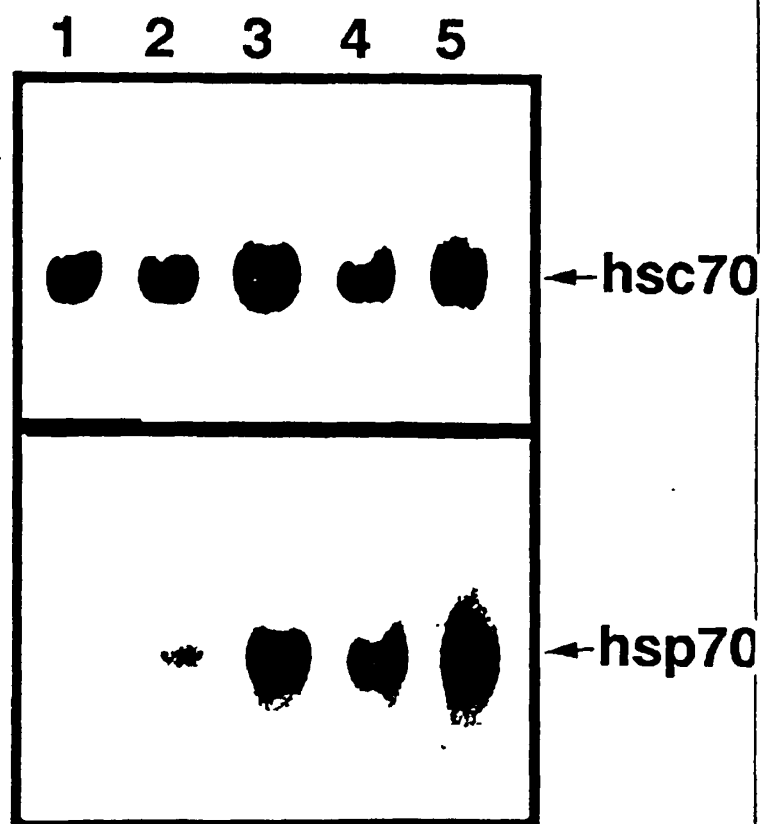




Εικ.12: Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, της κατανομής σε ιστούς, του mRNA που αντιστοιχεί τόσο στην hsp70 (κλώνος 1101) όσο και στην hsc70 (κλώνος 538).

1. RNA από κύτταρα CV1.
2. RNA από κύτταρα CV1 που έχουν υποστεί θερμικό σοκ επί 1.30 ώρες.
3. RNA από νεφρά ποντικού.
4. RNA από εγκέφαλο ποντικού.
5. RNA από ήπαρ ποντικού.
6. RNA από καρδιά ποντικού.
7. RNA από πνευμόνι ποντικού.





Εικ.13: Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70(κλώνος 1101) μετά από παρατεταμένο θερμικό σοκ.

1,2,3,4,5 : RNA από κύτταρα CV1 μετά από 0, 1.30, 3.00, 6.00 και 9.00 ώρες θερμικού σοκ (42.5^o C) αντίστοιχα.

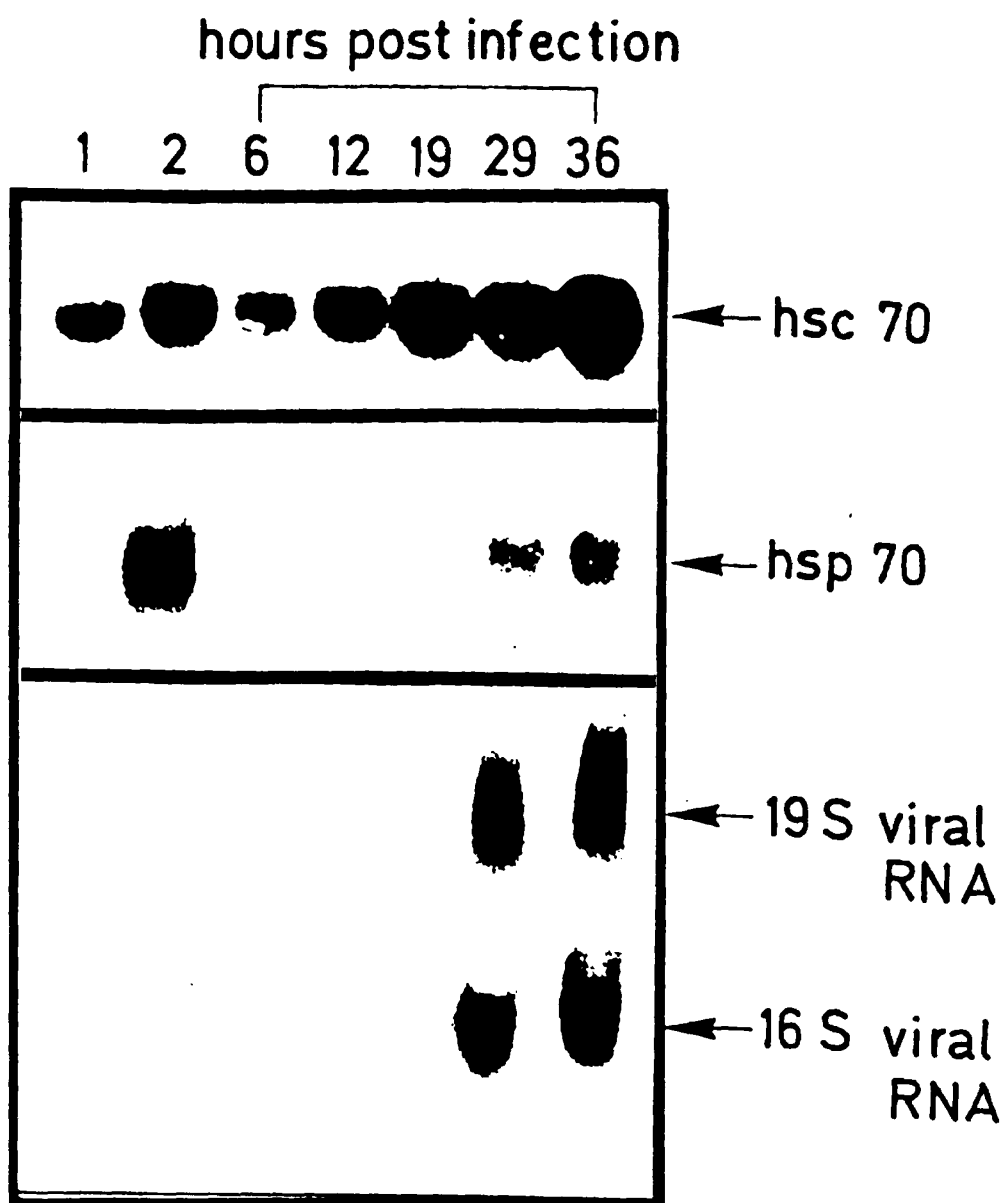
μηνύματος παραμένουν σταθερά μέχρι και τις εννέα ώρες.

3.8. Μελέτη της ιικής επαγωγής των γονιδίων hsp70 και hsc70 του πιθήκου

Η έκφραση των δύο γονιδίων ελέγχθηκε κατά την διάρκεια λυτικής μόλυνσης κυττάρων CV1 με τον ιό SV40 (κεφ.2.30). Συγκεκριμένα, καλλιέργειες CV1 κυττάρων μολύνθηκαν με 50 rfu/κύτταρο, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (κεφ.2.30), και η μόλυνση αφέθηκε να προχωρήσει μέχρι την λύση των κυττάρων. Σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της μόλυνσης ένα τρυβλίο μολυσμένων κυττάρων με τον ιό SV40 (περίπου 5×10^6 κύτταρα) χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση συνολικού RNA με τις μεθόδους που περιγράφηκαν. Συνολικά, εκχυλίσθηκε RNA 0, 6, 12, 19, 29 και 36 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης και 25 μ g από την κάθε παρασκευή ηλεκτροφορήθηκαν υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή αгарόζης. Ακολούθησε Northern blot όπως περιγράφηκε χρησιμοποιώντας ως ραδιενεργούς ανιχνευτές τα ενθέματα των κλώνων 538 και 1101. Για να βεβαιωθούμε ότι η μόλυνση ήταν παραγωγική και για να διαχωρίσουμε ταυτόχρονα την πρώιμη από την όψιμη φάση της, μία μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των προϊόντων των όψιμων γονιδίων που κωδικοποιούν για τις καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού SV40.

Όπως φαίνεται στην Εικ.14, παρατηρείται έντονη συσσώρευση mRNA του γονιδίου hsc70 (κλώνος 538) πολύ νωρίς κατά την διάρκεια της μόλυνσης και πιο συγκεκριμένα κατά τα πρώτα στάδια της ιικής μόλυνσης και πριν την έναρξη της έκφρασης των όψιμων γονιδίων. Η επαγωγή του γονιδίου είναι εμφανής από τις 12 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης. Αντίθετα, τα επίπεδα mRNA που αντιστοιχούν στο hsp70 γονίδιο (κλώνος 1101) ανιχνεύονται αργότερα και πιο συγκεκριμένα μετά από 19 ώρες από την έναρξη της μόλυνσης. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι, υπάρχει μία χρονική υστέρηση της επαγωγής του γονιδίου hsp70 σε σχέση με την επαγωγή του γονιδίου hsc70 κατά την διάρκεια της παραγωγικής ιικής μόλυνσης των κυττάρων CV1 με τον ιό SV40.

Το ερώτημα που προέκυψε από την μελέτη της επαγωγής του γονιδίου hsc70 κατά την διάρκεια λυτικής μόλυνσης κυττάρων CV1 ήταν το κατά πόσον το φαινόμενο αυτό είναι γενικότερο ή απλώς περιορίζεται στο σύστημα CV1/SV40. Για να απαντήσουμε στο ερώτημα αυτό, εξετάσαμε ένα ακόμη σύστημα λυτικής ιικής μόλυνσης. Συγκεκριμένα επιλέξαμε το σύστημα Hela /



Εικ.14: Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70 (κλώνος 1101) κατά τη διάρκεια λυτικής μόλυνσης κυττάρων CV1 με τον ιό SV40.

1. Συνολικό εκχύλισμα RNA από κύτταρα CV1.

2. Συνολικό εκχύλισμα RNA από κύτταρα CV1 που έχουν υποστεί θερμικό σοκ (42.5°C) επί 1.30 ώρες.

6-12. Συνολικό εκχύλισμα RNA μολυσμένων κυττάρων CV1 6,12,19,29 και 36 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης.

Προς επιβεβαίωση της ολοκληρωμένης πορείας του λυτικού κύκλου χρησιμοποιήσαμε ως δείκτη την εμφάνιση των μεταγραφμάτων της όψιμης περιοχής του ιού (19S και 16S μεταγραφήματα).

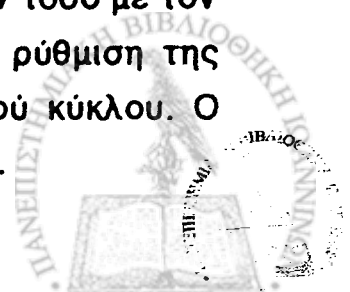


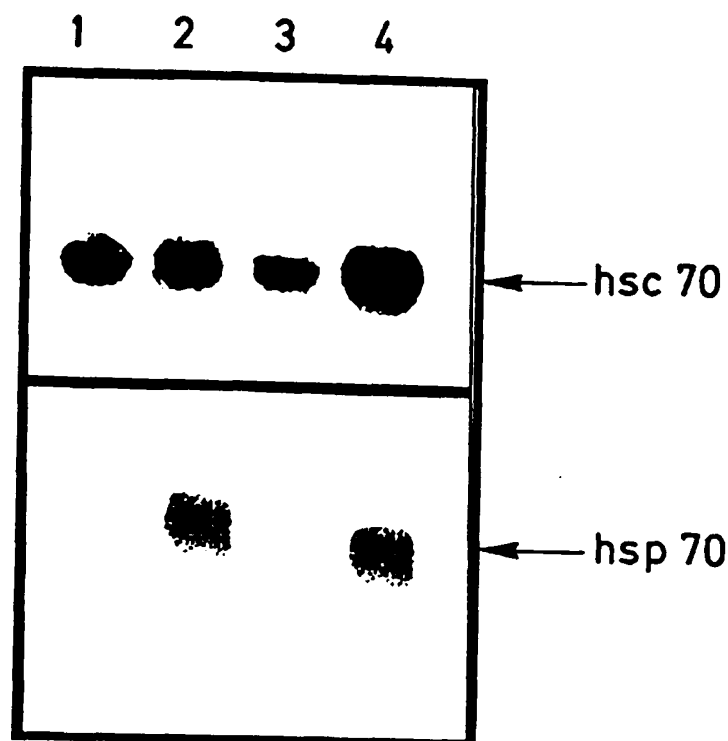
αδενοϊού. Τα κύτταρα HeLa είναι ανθρώπινα κύτταρα και ο αδενοϊός είναι DNA ογκογόνος ιός που προκαλεί την λύση τους, ενώ παράλληλα έχει την ικανότητα να μετασχηματίζει κύτταρα μη ανθρώπινης προέλευσης. Ως εκ τούτου επιλέξαμε το σύστημα HeLa / αδενοϊού θεωρώντας το αντίστοιχο του συστήματος CV1 / SV40 στον άνθρωπο.

Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με αδενοϊό (50 pfu/κύτταρο) και μελετήθηκε η επαγωγή των γονιδίων hsc70 και hsp70 όπως προηγουμένως. Συγκεκριμένα, εκχυλίσθηκε RNA από κύτταρα HeLa και από κύτταρα HeLa 48 ώρες μετά από μόλυνσή τους με αδενοϊό. Εικοσιπέντε μικρογραμμάρια RNA απ' την κάθε παρασκευή ηλεκτροφορήθηκαν υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή αγαρόζης. Ακολούθησε Northern blot όπως περιγράφηκε, χρησιμοποιώντας ως ραδιενεργούς ανιχνευτές τα ενθέματα των κλώνων 538 και 1101. Για τον έλεγχο της πορείας του λυτικού κύκλου σ' αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήσαμε ένα RNA αποτύπωμα το οποίο υβριδοποιήθηκε με ραδιενεργά σημασμένο το γονίδιο E2 της όψιμης περιοχής του αδενοϊού. Όπως φαίνεται στην Εικ.15, τα επίπεδα mRNA τόσο του γονιδίου hsc70 (538) όσο και του γονιδίου hsp70 (1101) επάγονται κατά την διάρκεια του λυτικού κύκλου με εντονότερη την επαγωγή του γονιδίου hsc70. Κατά συνέπεια συμπεράναμε ότι το φαινόμενο της επαγωγής του hsc70 γονιδίου δεν περιορίζεται μόνο στο σύστημα CV1 / SV40 αλλά επεκτείνεται και στο σύστημα HeLa / αδενοϊού.

3.9. Μελέτη των επιπέδων mRNA των γονιδίων hsc70 και hsp70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70.

Είναι γνωστό ότι ένας από τους κύριους στόχους των DNA ογκογόνων ιών είναι ο διπλασιασμός του γενετικού τους υλικού και για την επίτευξη του στόχου αυτού, προτρέπουν τα μολυσμένα κύτταρα να προχωρήσουν στην S φάση του κύκλου τους (95, 147). Οι DNA ογκογόνοι ιοί επάγουν την είσοδο των κυττάρων στην S φάση με την επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επειδή το γονίδιο της hsc70, όπως δείξαμε προηγουμένως, επάγεται μετά από μόλυνση επιτρεπτικών κυττάρων τόσο με τον ιό SV40 όσο και με τον αδενοϊό θελήσαμε να ελέγξουμε την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου αυτού κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Ο έλεγχος αυτός έγινε τόσο σε κύτταρα CV1 όσο και σε κύτταρα HeLa.





Εικ.15: Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70 (κλώνος 1101) μετά από ιική μόλυνση HeLa κυττάρων με τον Αδενοϊό (Ad5).

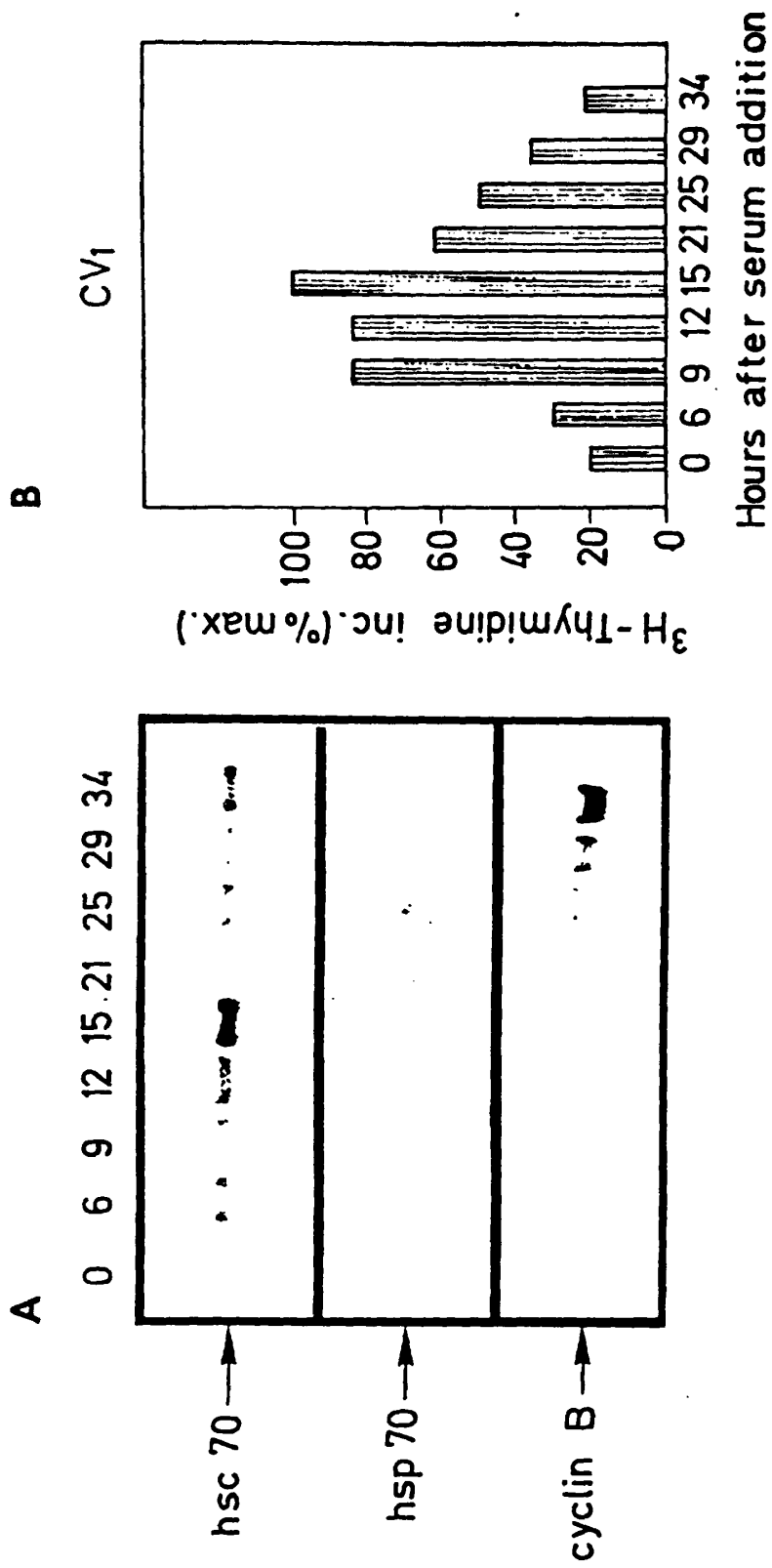
1. Συνολικό εκχύλισμα RNA από κύτταρα HeLa.
2. Συνολικό εκχύλισμα RNA από κύτταρα HeLa που έχουν υποστεί θερμικό σοκ (42.50°C) επί 1.30 ώρες.
3. Συνολικό εκχύλισμα RNA από κύτταρα HeLa κατά την έναρξη της μόλυνσης (χρόνος 0).
4. Συνολικό εκχύλισμα RNA από κύτταρα HeLa 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης με τον Αδενοϊό (Adeno 5).

3.9.1. Επίπεδα mRNA των γονιδίων hsc70 και hsp70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα CV1.

Κύτταρα CV1 συγχρονίσθηκαν όπως περιγράφεται στις μεθόδους (κεφ.2.28.1). Ο έλεγχος του συγχρονισμού έγινε με τη μέτρηση της ενσωμάτωσης ^3H θυμιδίνης σε χρονικά διαστήματα 3-4 ωρών. Η μέτρηση της ενσωμάτωσης ^3H θυμιδίνης στο DNA των συγχρονισμένων κυττάρων μας βοήθησε στη διάκριση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου θεωρώντας ως S φάση τον χρόνο κατά τον οποίο είχαμε τη μέγιστη ενσωμάτωση ^3H θυμιδίνης. Σε κάθε χρονική στιγμή μαζί με τη μέτρηση της ενσωμάτωσης ^3H θυμιδίνης, εκχυλίζαμε και RNA από συγχρονισμένα κύτταρα (5×10^6 κύτταρα σε κάθε χρόνο). Το απομονωθέν RNA, ηλεκτροφορήθηκε και ακολούθησε αποτύπωση κατά Northern. Οι ραδιενεργοί ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ενθέματα των κλώνων 538 και 1101. Ένα πανομοιότυπο RNA αποτύπωμα υβριδοποιήθηκε με το ραδιενεργά σημασμένο γονίδιο της κυκλίνης B, επιτρέποντας έτσι τον καλύτερο χαρακτηρισμό των φάσεων. Το γονίδιο της κυκλίνης B επιλέχθηκε γιατί χαρακτηρίζει τη μετάβαση από την S στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου. Με τον συνδυασμό λοιπόν ενσωμάτωσης ^3H θυμιδίνης και μελέτης της επαγωγής του γονιδίου της κυκλίνης B ελέγχθηκε διπλά η πορεία του κυτταρικού κύκλου.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA του γονιδίου hsc70 ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Εικ.16). Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το γονίδιο hsc70 αρχίζει να επάγεται έξι ώρες μετά την επανατροφοδότηση με ορό και παρουσιάζει μέγιστη συσσώρευση στην φάση S (15 ώρες μετά την επανατροφοδότηση), η οποία μάλιστα συμπίπτει με το μέγιστο της φάσης αυτής (Εικ.16B). Καθώς τα κύτταρα οδεύουν προς την μίτωση παρατηρείται σταδιακή μείωση του μηνύματος της hsc70. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου hsp70 βρέθηκαν να είναι επίσης ρυθμιζόμενα κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Εικ.16A). Η μέγιστη συσσώρευση όμως του μηνύματος της hsp70 παρατηρήθηκε στα όρια S/G2 (25 ώρες μετά την επανατροφοδότηση με ορό) και όχι στην S φάση όπως η hsc70. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματά μας και στην περίπτωση που ως μέθοδος συγχρονισμού χρησιμοποιήθηκε η διπλή αναστολή θυμιδίνης.





Εικ.16:

A. Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70 (κλώνος 1101) κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα CV1.

Η πορεία του κυτταρικού κύκλου ελέγχθηκε με παράλληλη μελέτη των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν στην κυκλίνη B. Είναι γνωστό ότι η κυκλίνη B επάγεται στα τελευταία στάδια ολοκλήρωσης του κυτταρικού κύκλου (φάση G2/M).

B. Παρακολούθηση της πορείας του κυτταρικού κύκλου με τη μέτρηση της ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης.

3.9.2. Επίπεδα mRNA των γονιδίων hsc70 και hsp70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα HeLa.

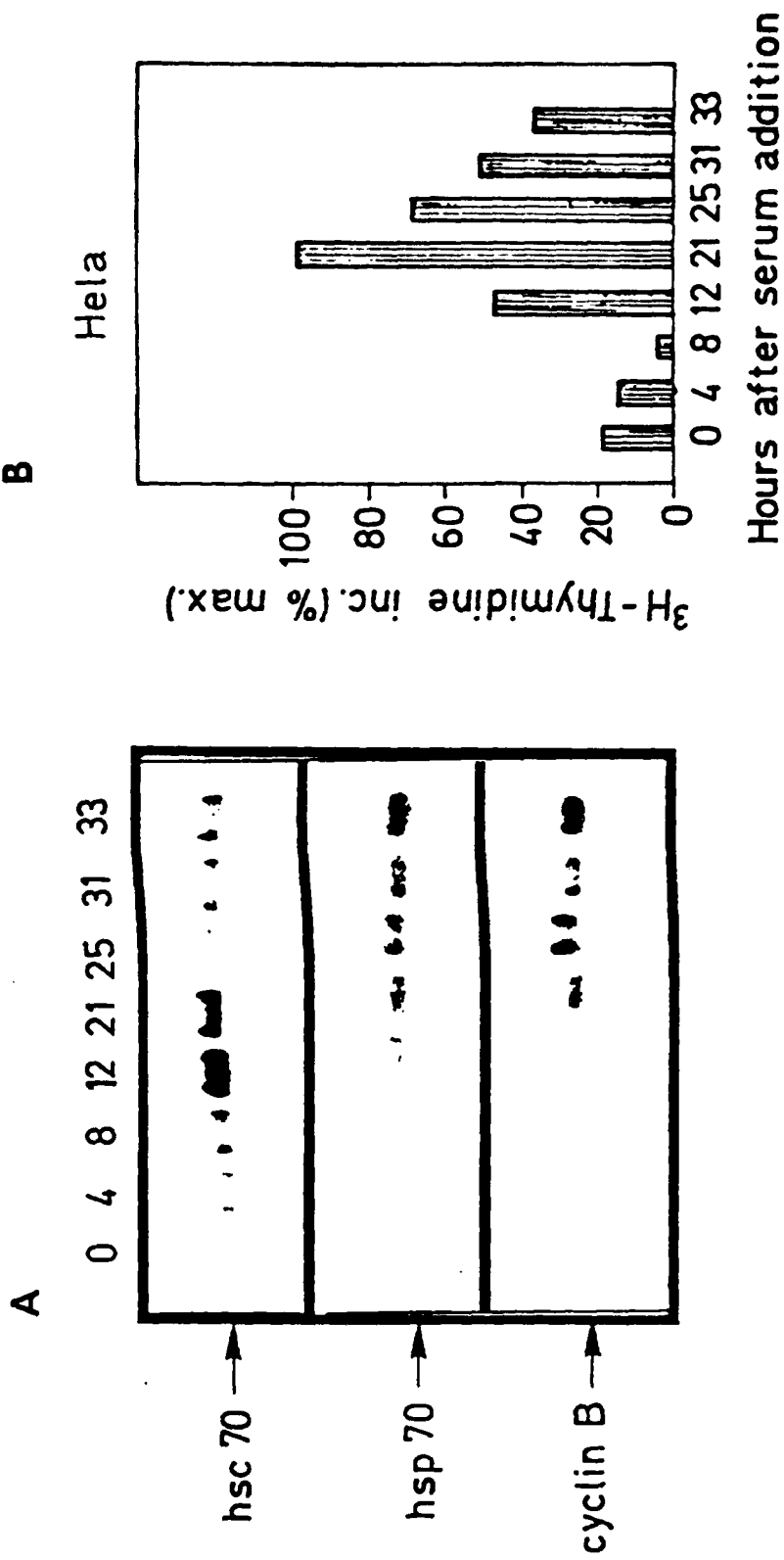
Επεκτείνοντας τη μελέτη κυτταρικών κύκλων προχωρήσαμε σε συγχρονισμό κυττάρων HeLa με την ίδια μέθοδο της στέρησης και της επανατροφοδότησης με ορό. Ο συγχρονισμός των κυττάρων, ο χαρακτηρισμός των φάσεων, η εκχύλιση του RNA και η αποτύπωση κατά Northern έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως για την περίπτωση των κυττάρων CV1.

Στην Εικ.17 αποτυπώνονται τα αποτελέσματα μιας τέτοιας πειραματικής διαδικασίας. Όπως και στην περίπτωση των κυττάρων CV1, έτσι και εδώ παρατηρούμε συσσώρευση του μηνύματος του γονιδίου hsc70 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και πιά συγκεκριμένα στο μέγιστο της φάσης S όπως αυτή ορίζεται με βάση την ενσωμάτωση ^3H θυμιδίνης. Η μέγιστη συσσώρευση για το μήνυμα της hsp70 παρατηρείται και στην περίπτωση του συγχρονισμού των κυττάρων HeLa, στα όρια S/G2. Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων αυτών καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η έκφραση των γονιδίων hsc70 και hsp70 ρυθμίζεται κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με τρόπο που επιτρέπει την εύκολη διάκρισή τους.

3.10 Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και των ιικών μολύνσεων.

Με δεδομένη τη ρύθμιση του γονιδίου hsc70 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, θελήσαμε να ελέγξουμε την πιθανότητα, να συνοδεύεται η επαγωγή του γονιδίου hsc70 κατά τη διάρκεια της φάσης S από μία μετακίνησή της αντίστοιχης πρωτεΐνης στον πυρήνα του κυττάρου, όπως έχει ήδη αναφερθεί για την hsp70 (84).

Για τον λόγο αυτό κύτταρα CV1 συγχρονίσθηκαν όπως και προηγουμένως με τη μέθοδο της στέρησης και επανατροφοδότησης με ορό και η πορεία του κυτταρικού κύκλου ελέγχθηκε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης ^3H θυμιδίνης. Σε χρονικά διαστήματα 0, 12, 24 και 36 ωρών μετά την επανατροφοδότηση με ορό που αντιστοιχούν στις φάσεις G0, G1, S και G2/M ανασύρθηκαν πλακίδια από τα τρυβλία καλλιέργειας. Τα προσκολλημένα στα πλακίδια κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, όπως περιγράφηκε στις μεθόδους (κεφ.2.23), και ακολούθησε ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας το ειδικό για την hsc70 αντίσωμα SPA 815 (Stressgene). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών



Εικ.17:

A. Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70 (κλώνος 1101) κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα HeLa.

Η πορεία του κυτταρικού κύκλου ελέγχθηκε με παράλληλη μελέτη των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν στην κυκλίνη B. Είναι γνωστό ότι η κυκλίνη B επάγεται στα τελευταία στάδια ολοκλήρωσης του κυτταρικού κύκλου (φάση G2/M).

B. Παρακολούθηση της πορείας του κυτταρικού κύκλου με τη μέτρηση της ενσωμάτωσης τριτωμένης θυμιδίνης.

έδειξαν ότι η hsc70 παραμένει κυτταροπλασματική καθ'όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Εικ.18).

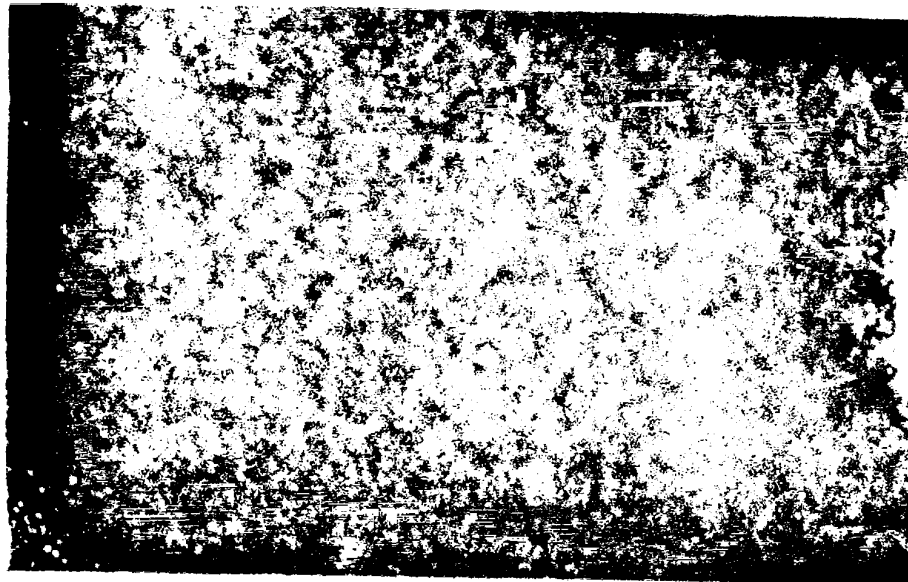
3.11 Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 κατά την διάρκεια ιικών μολύνσεων.

Η εντυπωσιακή επαγωγή του γονιδίου hsc70 στη διάρκεια του λυτικού κύκλου του SV40 αποτέλεσε μία παρατήρηση χωρίς διευκρινισμένη βιολογική σημασία. Δεδομένου όμως ότι τα προϊόντα των πρώιμων γονιδίων του SV40 καθώς και το πακετάρισμα του ιού πραγματοποιούνται στον πυρήνα του κυττάρου, θεωρήσαμε ότι πιθανός συνεντοπισμός της hsc70 με ιικές πρωτεΐνες θα υποδείκνυε κάποιον βιολογικό ρόλο για την hsc70 κατά την διάρκεια της μόλυνσης. Θέλοντας λοιπόν να προσεγγίσουμε το αναπάντητο αυτό ερώτημα προχωρήσαμε στη μελέτη με ανοσοφθορισμό της ενδοκυττάριας θέσης της hsc70 σε: α) επιτρεπτικά κύτταρα μολυσμένα με τον ιό SV40, δηλαδή σε κύτταρα που λύονται από τον ιό και β) μη επιτρεπτικά κύτταρα μολυσμένα με τον ιό SV40, δηλαδή σε κύτταρα τα οποία ο ιός είναι ανίκανος να λύσει, αλλά ικανός να μετασχηματίσει.

3.11.1. Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 κατά την διάρκεια παραγωγικής ιικής μόλυνσης.

Κύτταρα CV1 μολύνθηκαν με 50 pfu/ κύτταρο, όπως περιγράφηκε, και ακολούθησε ανοσοφθορισμός σε χρονικά διαστήματα 0, 15, 24, 36, 48 και 72 ωρών μετά την έναρξη της μόλυνσης. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίστηκε αδρά η πρώιμη (χρόνοι 0 και 15 ώρες μετά την μόλυνση) από την όψιμη (48 και 72 ώρες μετά την μόλυνση) φάση. Ως δείκτης της μόλυνσης σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το T αντιγόνο του ιού SV40 το οποίο και ανιχνεύθηκε με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το ειδικό για το T αντιγόνο μονοκλωνικό αντίσωμα Pab 419. Για την ανίχνευση της hsc70 χρησιμοποιήσαμε το μονοκλωνικό αντίσωμα SPA 815. Όπως φαίνεται στην Εικ.19Α κατά την έναρξη της μόλυνσης (μηδέν ώρες), σε όλα τα κύτταρα η hsc70 εντοπίσθηκε στο κυτταρόπλασμα. Δεκαπέντε ώρες μετά την μόλυνση ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων παρουσίασε θετική πυρηνική χρώση για την hsc70, ενώ 48 ώρες μετά την μόλυνση, η hsc70 εντοπίσθηκε στον πυρήνα του συνόλου σχεδόν των κυττάρων (Εικ.19Β). Αντίστοιχα, η παρουσία του T αντιγόνου ανιχνεύθηκε 15

A



B



C



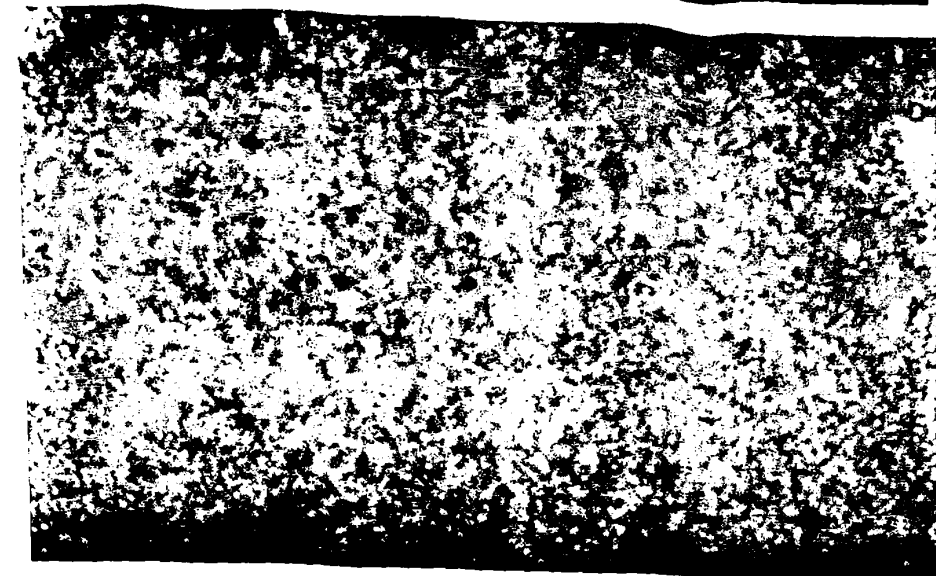
Εικ 18: Μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 κατά τη διαρi κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα CV1.

A. φαση G1 του κυτταρικού κύκλου.

B φαση S.

C φαση G2/M.





αυταρξιας κατανομης της hsc70 κατα τη διαρκεια λυτικ
CV1 με τον ιό SV40.

έναρξη της μόλυνσης.

μετά την έναρξη της μόλυνσης.

σμός του T αντιγόνου 48 ώρες μετά την έναρξη τ



ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης. Η πρόοδος της μόλυνσης οδήγησε όπως αναμενόταν, σε αύξηση του αριθμού των κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση για το T αντιγόνο και 48 ώρες μετά την έναρξη, το σύνολο των μολυσμένων κυττάρων (90% περίπου του συνολικού πληθυσμού) βρέθηκαν να περιέχουν στον πυρήνα τους τόσο το T αντιγόνο όσο και την hsc70 (Εικ.Β και C). Τα αποτελέσματα αυτά μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι σε επιτρεπτικά κύτταρα μετά από μόλυνση με τον ιό SV40 παρουσιάζεται συνεντοπισμός της hsc70 με το T αντιγόνο του ιού στον κυτταρικό πυρήνα.

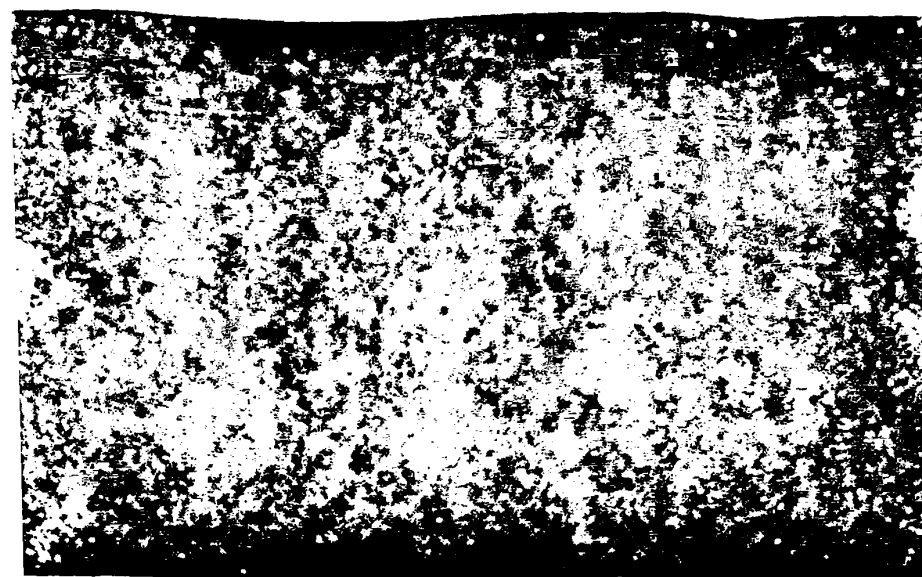
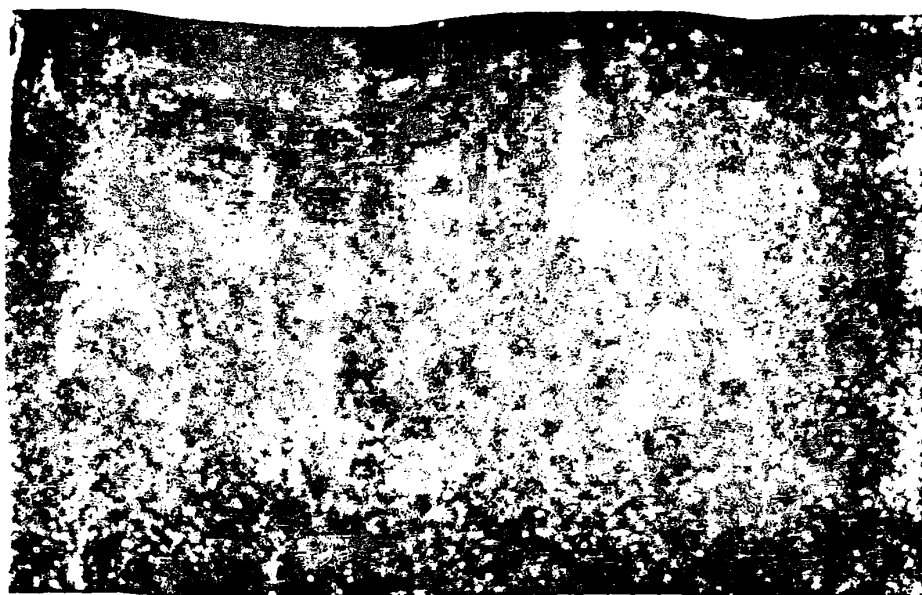
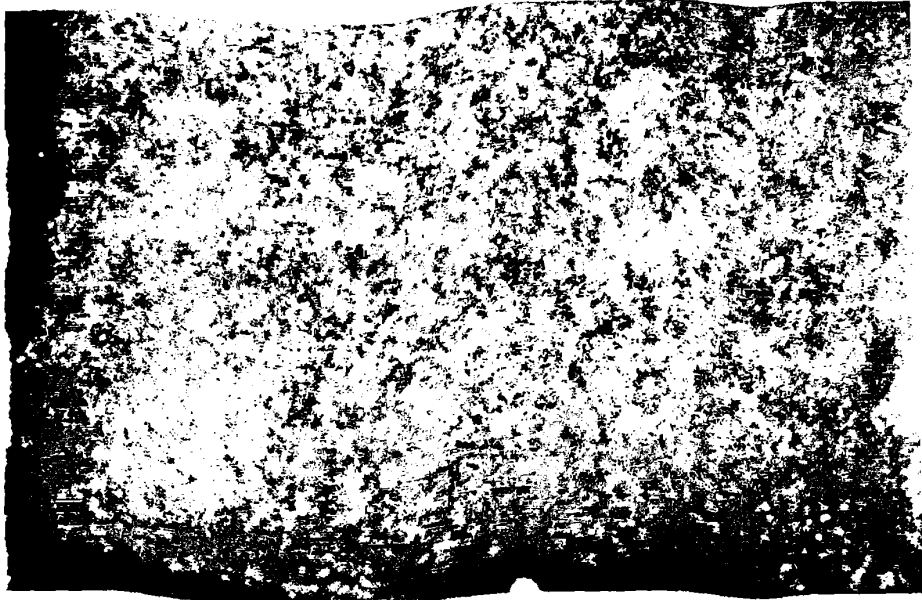
3.11.2 Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 κατά τη διάρκεια μη παραγωγικής ιϊκής μόλυνσης.

Το αποτέλεσμα της μετακίνησης της hsc70 στον πυρήνα επιτρεπτικών κυττάρων κατά την διάρκεια του λυτικού κύκλου του SV40 ιού σε συνδυασμό με τον σταθερό κυτταροπλασματικό εντοπισμό της στην διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ενδοκυττάρια αυτή μετακίνηση έχει άμεση σχέση με την ιϊκή μόλυνση. Το νέο ερώτημα όμως που προέκυψε αφορούσε το αν η μετακίνηση αυτή στον πυρήνα σχετίζεται με τα ιϊκά γονίδια που εκφράζονται κατά την πρώιμη φάση της μόλυνσης (μεγάλο T αντιγόνο και μικρό t αντιγόνο του ιού) ή αν σχετίζεται με άλλες παραμέτρους της ιϊκής μόλυνσης.

Για να απαντήσουμε στο ερώτημα αυτό επιλέξαμε κυτταρικές σειρές τις οποίες ο ιός μολύνει, αλλά αδυνατεί να λύσει. Σε αυτές τις κυτταρικές σειρές, έχουμε παραγωγή των προϊόντων των πρώιμων γονιδίων του ιού χωρίς παραγωγή των προϊόντων των όψιμων γονιδίων. Δύο τέτοιες κυτταρικές σειρές είναι τα κύτταρα NIH/3T3 και τα κύτταρα Balbc/3T3 (κεφ.2.25). Έτσι λοιπόν κύτταρα NIH/3T3 και Balbc/3T3 μολύνθηκαν με τον ιό και 48 ώρες μετά την μόλυνση ελέγχθηκε ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της hsc70 με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα SPA815. Ως δείκτης της μόλυνσης χρησιμοποιήθηκε το μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40 το οποίο σημάνθηκε με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το ειδικό για το T αντιγόνο μονοκλωνικό αντίσωμα Pab419. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 20 και 21, 48 ώρες μετά την μόλυνση το 50-70% των κυττάρων βρέθηκε να εκφράζει το T αντιγόνο του ιού SV40. Παρόλα αυτά όμως τόσο στα κύτταρα NIH/3T3 (Εικ.20) όσο και στα κύτταρα BalBc/3T3 (Εικ. 21) η hsc70 παρέμεινε κυτταροπλασματική.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα





ενδοκυτταριας κατανομης της hsc70 κατα τη διαρκεια
πικων για τον ιο SV40 κυτταρων NIH3T3.

ατα την έναρξη της μόλυνσης.

3 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης.

τοπισμός του T αντιγόνου 48 ώρες μετά την έναρξη



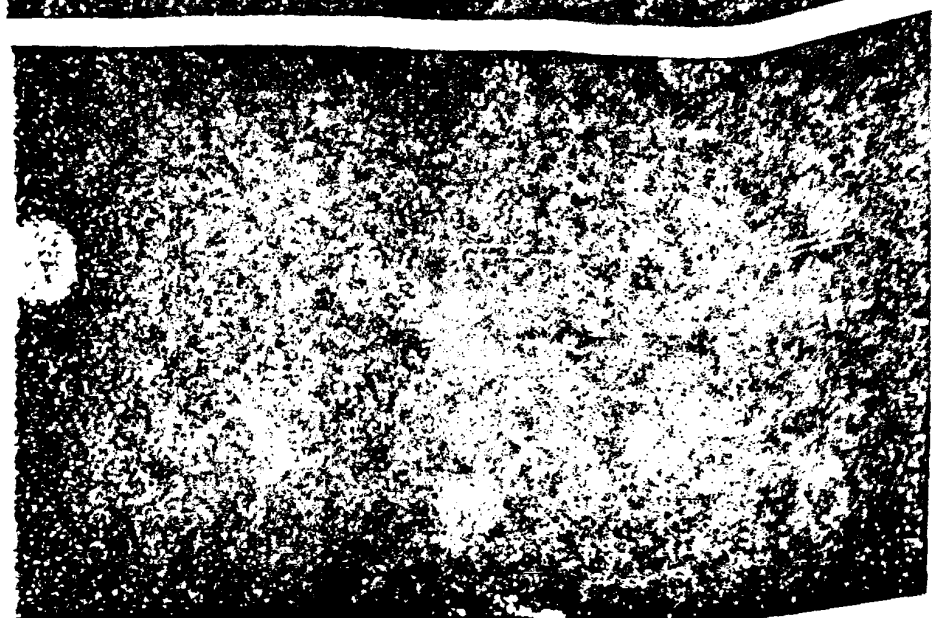
Α



Β



Γ



Εικ.21: Μελέτη της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 κατά τη διάρκεια μόλυνσης μη επιτρεπτικών για τον ιό SV40 κυττάρων BALBc/3T3.
Α. Κυττάρα BALBc/3T3 κατά την έναρξη της μόλυνσης.
Β. Κυττάρα BALBc/3T3 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης.
Γ. Ενδοκυττάριος εντοπισμός του T αντιγόνου 48 ώρες μετά την έναρξη μόλυνσης.



ότι η hsc70 δεν μετακινείται στον πυρήνα μη επιτρεπτικών κυττάρων που μολύνονται με τον ιό SV40. Αντίθετα, η μετακίνηση της hsc70 στον πυρήνα επιτρεπτικών κυττάρων μετά από μόλυνση με τον SV40 ιό πιθανόν να σχετίζεται με το συνολικό φαινόμενο της παραγωγικής ιικής μόλυνσης.

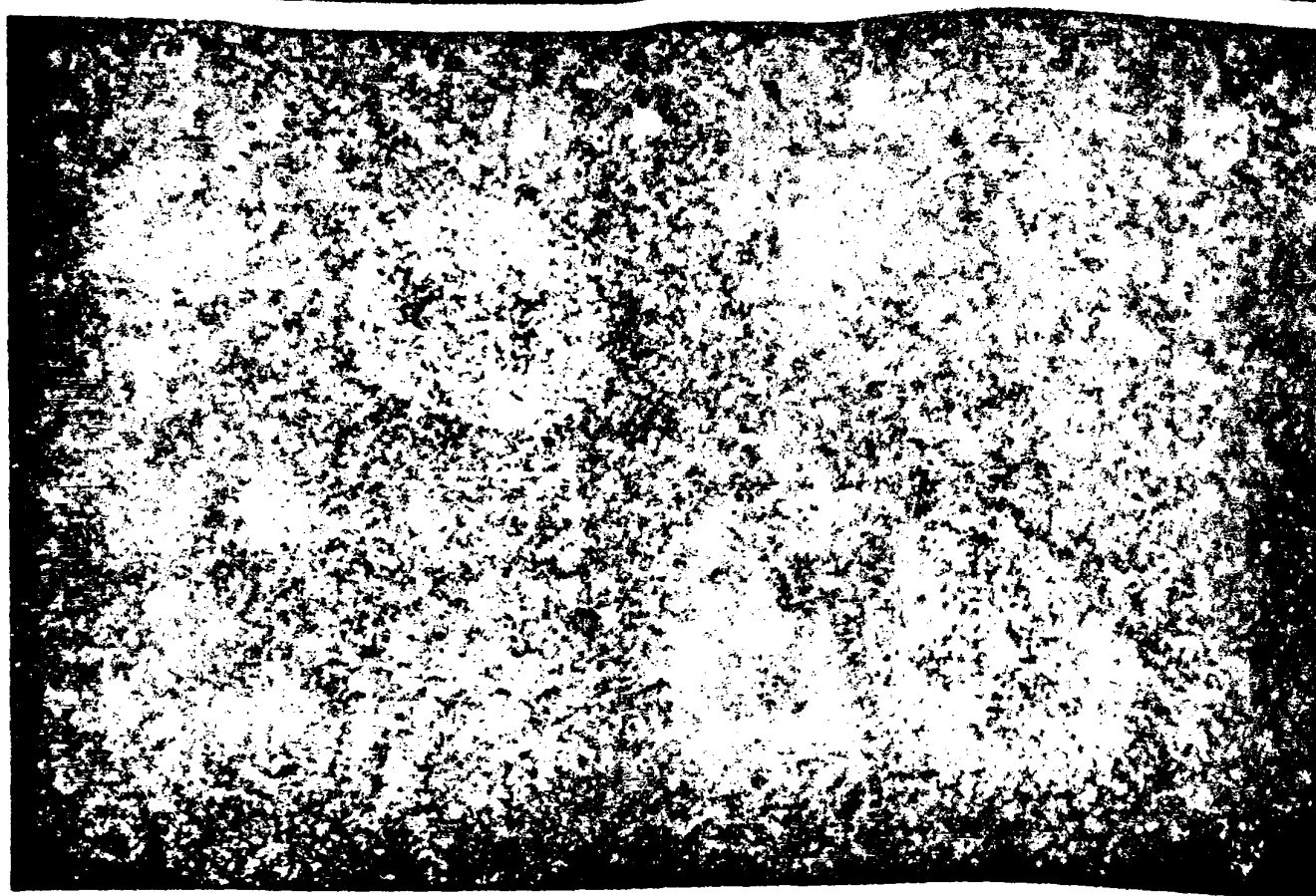
3.11.3 Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 σε επιτρεπτικά και μη επιτρεπτικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τα πρώιμα γονίδια του ιού SV40.

Δεδομένου ότι στα μη επιτρεπτικά κύτταρα ο ιός αδυνατεί να διπλασιασθεί και εκφράζει μόνον τα πρώιμα γονίδιά του, η παρουσία των προϊόντων των γονιδίων αυτών, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, δεν φαίνεται να είναι ικανή να οδηγήσει στην πυρηνική μετακίνηση της hsc70. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματά μας δεν μπορούν να αποκλείσουν το ενδεχόμενο σύμφωνα με το οποίο η μετακίνηση της hsc70 στα επιτρεπτικά κύτταρα οφείλεται στη δράση των πρώιμων γονιδίων, όταν αυτά εκφράζονται σε ένα διαφορετικό κυτταρικό περιβάλλον απ'αυτό των μη επιτρεπτικών κυττάρων.

Στην προσπάθειά μας να διαλευκάνουμε το ενδεχόμενο αυτό, ελέγξαμε την ικανότητα των πρώιμων γονιδίων του ιού SV40 να προκαλούν μετακίνηση της hsc70 στον πυρήνα επιτρεπτικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας κύτταρα COS τα οποία είναι σταθερά μετασχηματισμένα με ένα ελλειματικό στέλεχος του ιού SV40 στην περιοχή της έναρξης του διπλασιασμού. Κατά συνέπεια τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τα πρώιμα γονίδια του SV40, ενώ δεν εκφράζουν τα γονίδια της όψιμης περιοχής του. Επίσης ελέγξαμε την ενδοκυττάρια θέση της hsc70 σε μη επιτρεπτικά κύτταρα NIH3T3 σταθερά μετασχηματισμένα με τον ιό SV40. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι στα κύτταρα COS η hsc70 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα παρόλο που τα κύτταρα παρουσιάζουν θετική πυρηνική χρώση για το T αντιγόνο του ιού SV40 (Εικ.22). Στα μετασχηματισμένα με τον ιό κύτταρα NIH3T3 η hsc70 βρέθηκε να είναι επίσης κυτταροπλασματική (Εικ.23).

Κατά συνέπεια, η έκφραση των πρώιμων γονιδίων του ιού SV40, τόσο σε επιτρεπτικά όσο και σε μη επιτρεπτικά κύτταρα, δεν φαίνεται να είναι ικανή για την μεταφορά της hsc70 στον πυρήνα.





Εικ. 22:

A. Ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 σε κύτταρα COS.

B. Ενδοκυττάρια κατανομή του T αντιγόνου στα ίδια κύτταρα





οκυττάρια κατανομή της hsc70 σε κύτταρα NIH3T3 σταθερά
χηματισμένα με το T αντιγόνο του ιού SV40 (NIH3T3/T).

οκυττάρια κατανομή του T αντιγόνου στα ίδια κύτταρα (NIH3T3/T).



3.11.4 Σύγκριση της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 μετά από θερμικό σοκ σε σχέση με την ενδοκυττάρια κατανομή μετά από ιική μόλυνση επιτρεπτικών κυττάρων με το SV40 ιό.

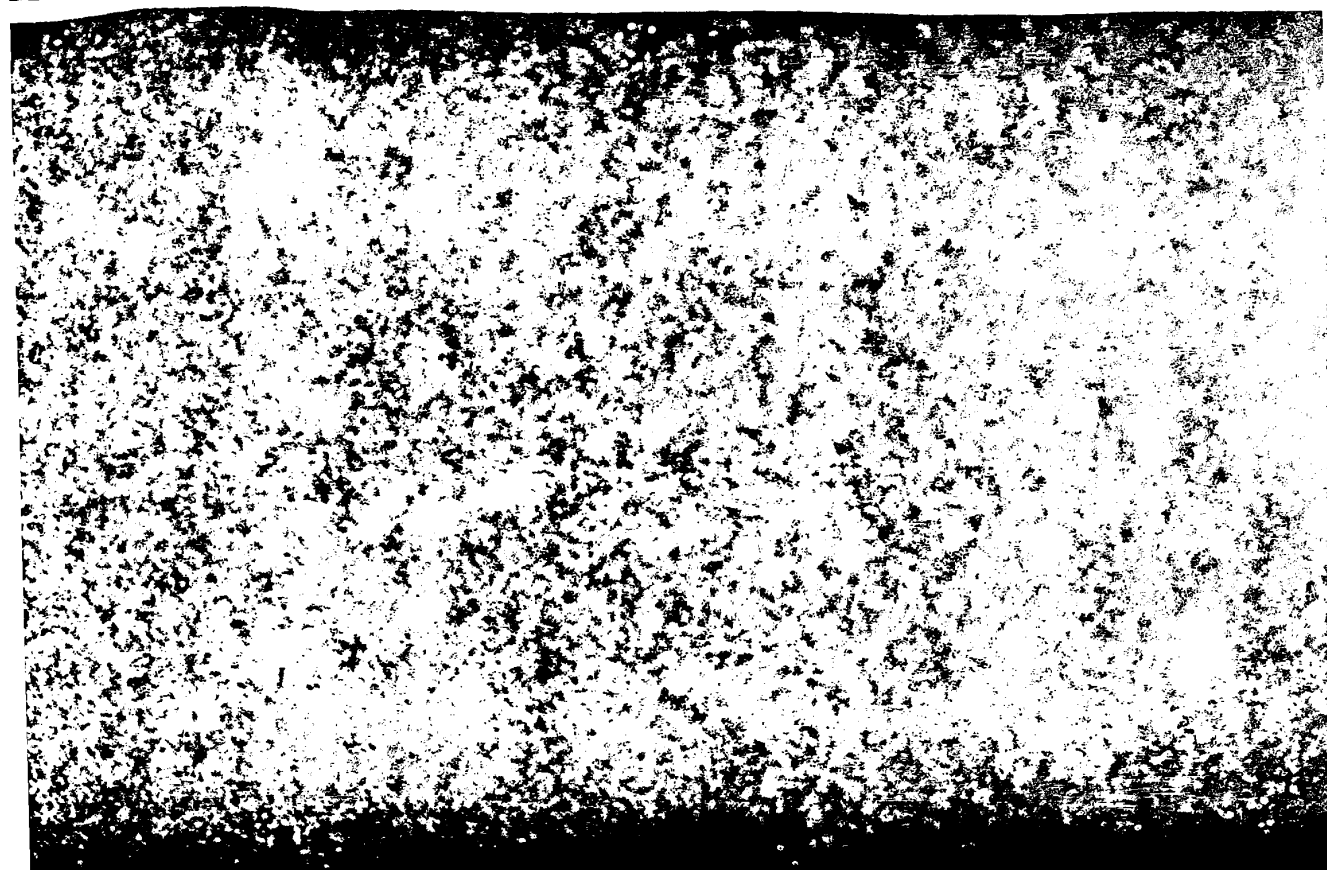
Είναι γνωστό ότι το θερμικό σοκ προκαλεί μετακίνηση τόσο της hsp70 όσο και της hsc70 στον πυρήνα και μάλιστα συσσωρεύει το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών αυτών στους πυρηνίσκους (152, 154). Συγκρίνοντας πειραματικά την ενδοκυττάρια μετακίνηση της hsc70 σε κύτταρα CV1 που μολύνθηκαν με τον ιό SV40, παρατηρήσαμε ότι ο ενδοπυρηνικός εντοπισμός της hsc70 παρουσιάζει ένα διαφορετικό πρότυπο από τον αντίστοιχο του θερμικού σοκ. Πιο συγκεκριμένα η hsc70 βρέθηκε να είναι διάχυτη στο πυρηνόπλασμα, ενώ απουσιάζει πλήρως από τους πυρηνίσκους των μολυσμένων κυττάρων (Εικ.24).

Η διαφορετική αυτή κατανομή υποδεικνύει πιθανώς ένα ρόλο της hsc70 κατά την διάρκεια της μόλυνσης διαφορετικό από τον ρόλο της ίδιας πρωτεΐνης στην διάρκεια του θερμικού σοκ.

3.12. Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών της hsc70 και ιικών γονιδιακών προϊόντων.

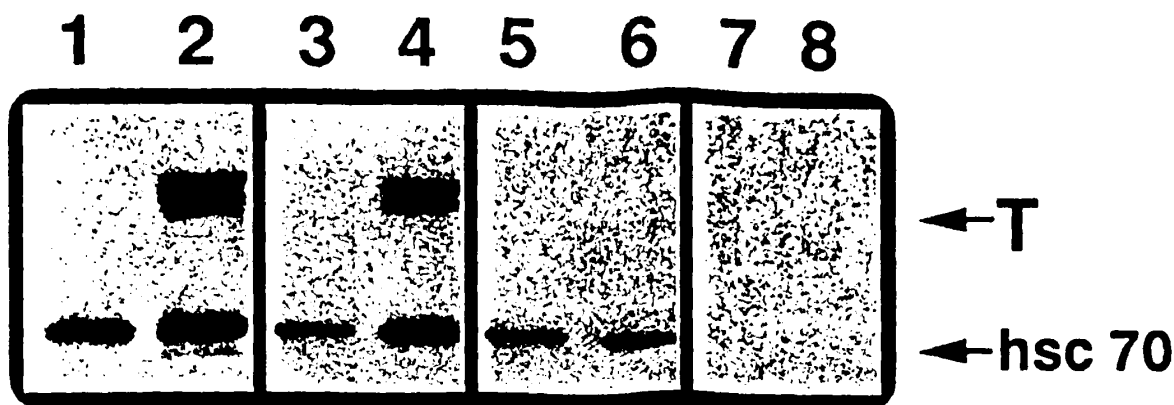
Η ανίχνευση πιθανών πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ της hsc70 και ιικών πρωτεϊνών επιχειρήθηκε αρχικά με ανοσοκαθίζηση χρησιμοποιώντας το ειδικό για το T αντιγόνο μονοκλωνικό αντίσωμα Pab419. Για το σκοπό αυτό κύτταρα CV1 μολύνθηκαν με τον ιό SV40, κυτταρικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την μόλυνση και ακολούθησε ανοσοκαθίζηση με το μονοκλωνικό αντίσωμα όπως περιγράφηκε (κεφ.2.22). Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα 0, 15, 24, 36 και 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης A και η ιζηματοποίηση των συμπλεγμάτων έγινε με την χρήση πρωτεΐνης A- σεφαρόζης. Τα ανοσοϊζήματα ελέγχθηκαν με αποτύπωμα Western, για την ανίχνευση τόσο του T αντιγόνου όσο και της hsc70, όπως περιγράφηκε (κεφ.2.21). Τα αποτελέσματα ενός τέτοιου πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 25 και δείχνουν ότι η hsc70 ανοσοκαθιζάνει με το αντι-T αντίσωμα ακόμη και στα εκχυλίσματα των κυττάρων που δεν εκφράζουν T αντιγόνο (Εικ.25, γραμμή 3). Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων αυτών μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η hsc70 κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε, ανοσοκαθιζάνει συνδεόμενη μη ειδικά με την πρωτεΐνη A των σφαιριδίων σεφαρόζης (Εικ.25 γραμμή 5 και 6).





ση της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 σε κύτταρα CV1 μετά από:
ώρες μόλυνσης με τον ιό SV40.
ώρες θερμικού σοκ στους 42.50 C.





Εικ.25: Μη ειδική σύνδεση της hsc70 με το σύμπλεγμα σεφαρόζης - πρωτεΐνης A.

1. και 2. : Εκχυλίσματα κυττάρων CV1 πριν και μετά από 48 ώρες μόλυνσης με τον ιό SV40.

3. και 4. : Ανοσοκαθίζηση, στα εκχυλίσματα 1 και 2 αντίστοιχα, με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του T αντιγόνου (Pab416). Παρατηρούμε στη διαδρομή 3 ότι η hsc70 εντοπίζεται σε ανοσοϊζήμα εκχυλίσματος χρόνου 0, σε εκχύλισμα δηλαδή που δεν περιέχει T αντιγόνο.

5. και 6. : Ιζήματα που ανιχνεύονται σε σφαιρίδια σεφαρόζης - πρωτεΐνης A μετά από καθίζηση στα εκχυλίσματα 1 και 2 χωρίς τη χρήση αντισώματος.

7. και 8. : Ιζήματα που ανιχνεύονται σε σφαιρίδια σεφαρόζης - πρωτεΐνης G μετά από καθίζηση στα εκχυλίσματα 1 και 2 χωρίς τη χρήση αντισώματος.



Για την επίλυση του προβλήματος προχωρήσαμε σε αλλαγές των συνθηκών εκχύλισης των πρωτεϊνών όπως επίσης και σε αλλαγές του αδρανούς υλικού ιζηματοποίησης. Τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμών έδειξαν ότι:

α) Προεπάση των σφαιριδίων με το αντίσωμα για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 1:30 ωρών έχει ως αποτέλεσμα την κάλυψη όλων των θέσεων σύνδεσης πάνω στην πρωτεΐνη A και ως εκ τούτου μειώνει στο ελάχιστο την μη ειδική σύνδεση της hsc70 στο σύμπλεγμα σεφαρόζης - πρωτεΐνης A. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη των συνθηκών εκχύλισης των πρωτεϊνών και του χρόνου επώασης κατά την ανοσοκαθίζηση. β) Η αντικατάσταση του συμπλέγματος πρωτεΐνης A - σεφαρόζης με το σύμπλεγμα πρωτεΐνης G - σεφαρόζης έχει το ίδιο αποτέλεσμα με τους παραπάνω χειρισμούς (Εικ.25, γραμμή 7 και 8) και έτσι ως απλούστερη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στην περαιτέρω μελέτη σε περιπτώσεις που το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα ήταν μονοκλωνικό. Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα, προηγήθηκε πάντα προεπάση του αντισώματος με τα σφαιρίδια πρωτεΐνης A - σεφαρόζης επί 1:30 ώρες τουλάχιστον, πριν προστεθεί το σύμπλεγμα σεφαρόζης - πρωτεΐνης A - αντισώματος στο κυτταρικό εκχύλισμα.

3.13. Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και πρώιμων ιικών γονιδιακών προϊόντων κατά την διάρκεια παραγωγικής ιικής μόλυνσης με τον ιό SV40.

Έχοντας υπόψιν τα παραπάνω προχωρήσαμε σε μόλυνση CV1 κυττάρων με τον ιό SV40 και παρασκευή εκχυλισμάτων σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την έναρξη της μόλυνσης. Η ανοσοκαθίζηση έγινε με το αντίσωμα Pab419 έναντι του T αντιγόνου χρησιμοποιώντας σύμπλεγμα πρωτεΐνης G- σεφαρόζης. Ακολούθησε ανίχνευση τόσο του T αντιγόνου όσο και της hsc70 με αποτύπωμα κατά Western όπως περιγράφηκε (κεφ.2.21). Ως θετικός μάρτυρας της επιτυχούς διαδικασίας συνανοσοκαθίζησης χρησιμοποιήθηκε η ανίχνευση της πρωτεΐνης του Ρετινοβλαστώματος (Rb) στο ανοσοίζημα με Western blot και χρήση ειδικού κατά του Rb μονοκλωνικού αντισώματος (G3-245, Pharmingen). Το Rb είναι γνωστό και ευρύτατα αποδεκτό ότι συνανοσοκαθίζει με το T αντιγόνο του ιού SV40 (30).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν, όπως αναμενόταν ότι, το Rb συνανοσοκαθίζει με το T αντιγόνο στη διάρκεια της ιικής μόλυνσης

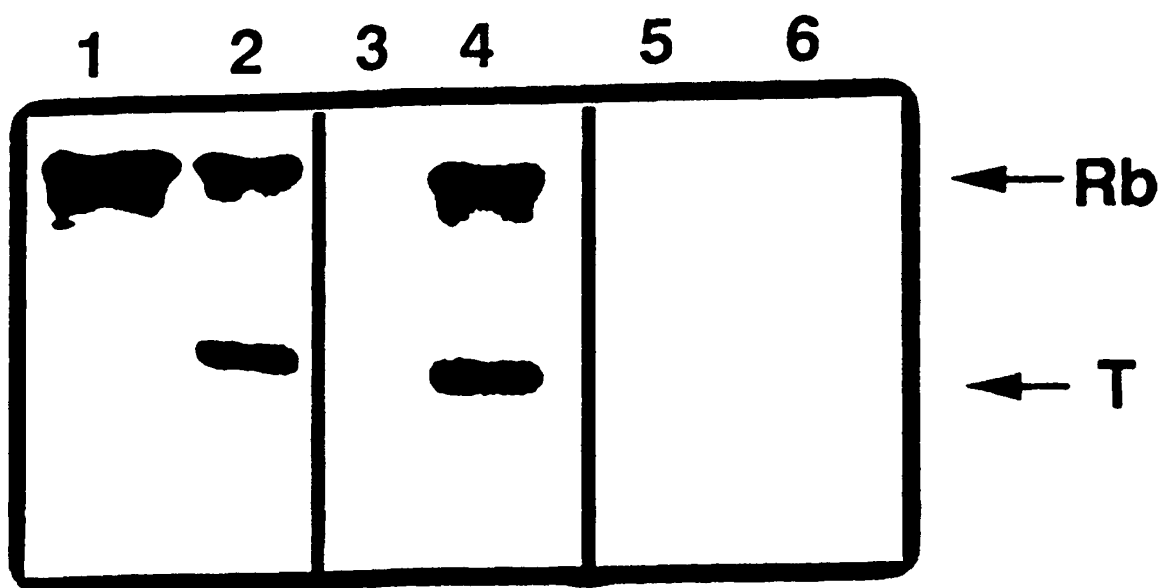
και μάλιστα ότι το σύμπλεγμα T- Rb είναι ανιχνεύσιμο 24 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης, χρονικό διάστημα που απαιτείται για την έναρξη της ανίχνευσης του T αντιγόνου (Εικ.26). Αντίθετα, δεν κατέσται δυνατή η ανίχνευση συμπλέγματος T αντιγόνου - hsc70 καθ' όλη την διάρκεια της ιικής μόλυνσης (Εικ. 27). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι κατά την διάρκεια παραγωγικής ιικής μόλυνσης δεν παρατηρείται σύνδεση T αντιγόνου- hsc70. Στην προσπάθειά μας να επιβεβαιώσουμε το παραπάνω συμπέρασμα, χρησιμοποιήσαμε το αντίσωμα SPA815 το οποίο αναγνωρίζει ειδικά την hsc70 και ανοσοκαθίζαμε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα μολυσμένα με τον ιό σε χρονικά διαστήματα 0, 12, 24 και 48 ωρών μετά την μόλυνση, όπως παραπάνω. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28 δεν ανιχνεύθηκε παρουσία T αντιγόνου στο ανοσοίζημα που προέκυψε από την καταβύθιση της hsc70, γεγονός που επιβεβαίωσε το αρχικό μας συμπέρασμα ότι οι δύο πρωτεΐνες δεν συνδέονται κατά την διάρκεια παραγωγικής ιικής μόλυνσης.

3.14. Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και πρώιμων ιικών γονιδιακών προϊόντων κατά την διάρκεια μη παραγωγικής ιικής μόλυνσης με τον ιό SV40.

Συνεχίζοντας την προσπάθεια ανίχνευσης συμπλόκου T αντιγόνου και hsc70, μελετήσαμε την πιθανότητα σύνδεσης των πρωτεϊνών αυτών σε μη επιτρεπτικά κύτταρα μολυσμένα με τον ιό SV40.

Για τον λόγο αυτό κύτταρα Balbc/3T3 και NIH3T3 μολύνθηκαν με τον ιό SV40 και παρασκευάσθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης. Ακολούθησε ανοσοκαθίζηση με το ειδικό για το T αντιγόνο αντίσωμα Pab419 στις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Τα ίδια δείγματα υπέστησαν ανοσοκαθίζηση στους ίδιους χρόνους και με το ειδικό για την hsc70 αντίσωμα SPA815. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η hsc70 ανοσοκαθίζει με το T αντιγόνο 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης (Εικ.29). Η ανίχνευση του συμπλέγματος κατέσται δυνατή τόσο στα ανοσοιζήματα που παρασκευάσθηκαν με την χρήση του αντισώματος Pab419 όσο και στα ανοσοιζήματα που παρασκευάσθηκαν με την χρήση του αντισώματος SPA815 (Εικ.29), υποδεικνύοντας πέραν αμφισβητήσεως, την συμπλοκή των πρωτεϊνών αυτών κατά την μόλυνση με ιό SV40 μη επιτρεπτικών κυττάρων.



**Εικ.26:**

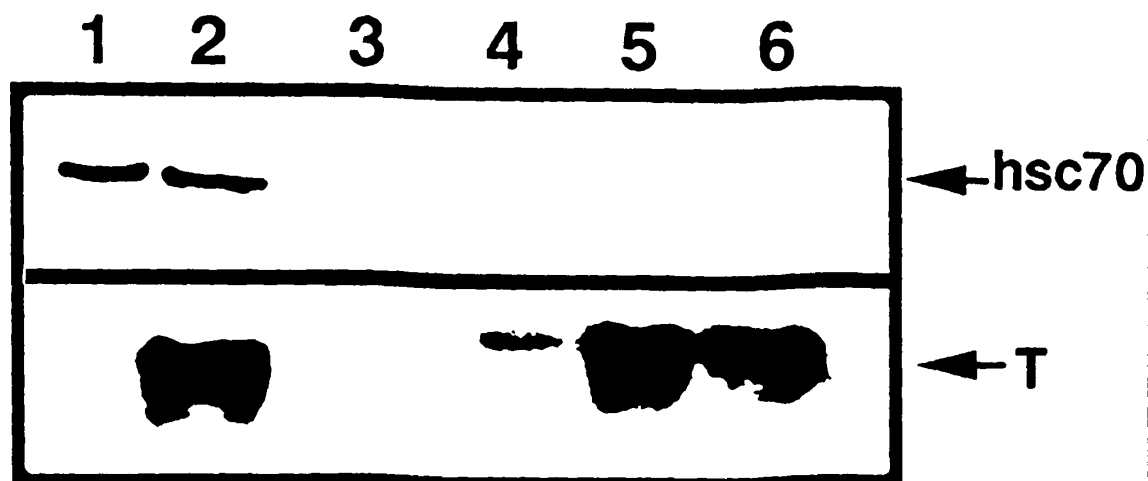
Ανοσοκαθίζηση σε εκχυλίσματα CV1 κυττάρων μετά από μόλυνση με τον ιό SV40, με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του T αντιγόνου του ιού. Ανίχνευση τόσο του T αντιγόνου όσο και του Rb.

1 και 2 : Εκχυλίσματα CV1 κυττάρων πριν και μετά από 48ώρες μόλυνσης με τον ιό SV40.

3 και 4 : Ανοσοκαθίζηση στα εκχυλίσματα 1 και 2 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του T αντιγόνου.

5 και 6 : Ιζήματα που ανιχνεύονται σε σφαιρίδια σεφαρόζης - πρωτεΐνης G μετά από επώαση των εκχυλισμάτων 1 και 2 χωρίς τη χρήση αντισώματος.





Εικ. : 27

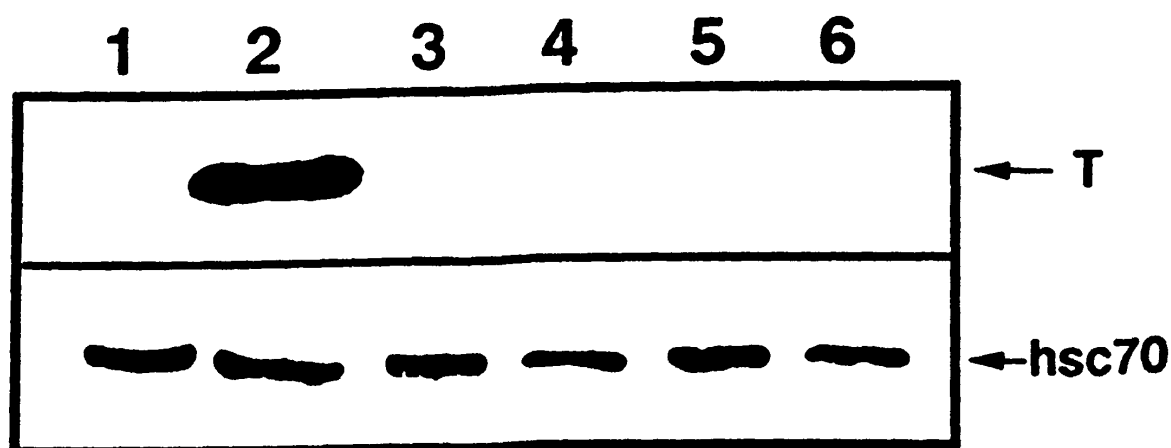
Ανοσοκαθίζηση σε εκχυλίσματα, μολυσμένων με τον ιό SV40 κυττάρων CV1, με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του T αντιγόνου (Pab 416). Ανίχνευση τόσο για T αντιγόνο όσο και για hsc70.

1. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα CV1.

2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα CV1 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης.

3, 4, 5, 6 : Ανοσοϊζήματα με τη χρήση του αντισώματος Pab416 σε εκχυλίσματα 0 12, 24 και 48 ωρών μετά την έναρξη της μόλυνσης αντίστοιχα.

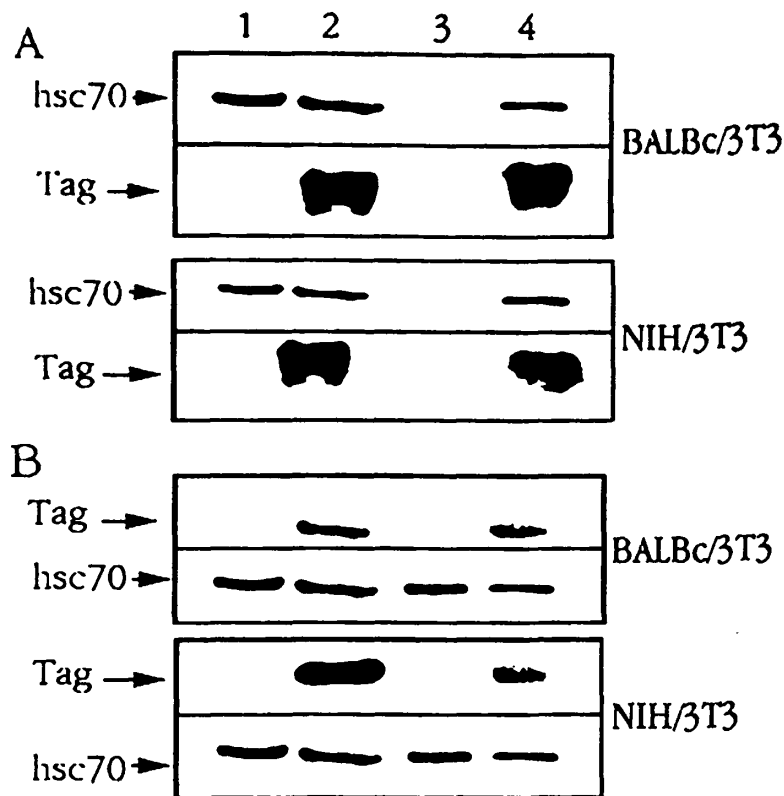




Εικ.28: Ανοσοκαθίζηση σε εκχυλίσματα μολυσμένων με τον ιό SV40 κυττάρων με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της hsc70 (SPA 815). Ανίχνευση τόσο για hsc70 όσο και για T αντιγόνο.

1. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα CV1.
2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα CV1 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης.
- 3, 4, 5, 6: Ανοσοϊζήματα με τη χρήση του αντισώματος SPA815 σε εκχυλίσματα 0,12,24 και 48 ωρών μετά την έναρξη της μόλυνσης αντίστοιχα.





Εικ.29: Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και T αντιγόνου σε μολυσμένα μη επιτρεπτικά κύτταρα.

A. Ανοσοκαθίζηση σε κύτταρα BALBc/3T3 και NIH/3T3 με τη χρήση αντισώματος ειδικού έναντι του T αντιγόνου (Pab416).

1. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BALBc/3T3 ή NIH/3T3 κυττάρων.

2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BALBc/3T3 ή NIH/3T3 κυττάρων που μολύνθηκαν επί 48 ώρες με τον ιο SV40.

3 και 4 : Ανοσοϊζήματα με τη χρήση του αντισώματος Pab416 στα εκχυλίσματα 1 και 2 αντίστοιχα.

B. Ανοσοκαθίζηση σε κύτταρα BALBc/3T3 και NIH/3T3 με τη χρήση αντισώματος ειδικού έναντι της hsc70 (SPA 815).

1. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BALBc/3T3 ή NIH/3T3 κυττάρων.

2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BALBc/3T3 ή NIH/3T3 κυττάρων που μολύνθηκαν επί 48 ώρες με τον ιο SV40.

3 και 4 : Ανοσοϊζήματα με τη χρήση του αντισώματος SPA815 στα εκχυλίσματα 1 και 2 αντίστοιχα.



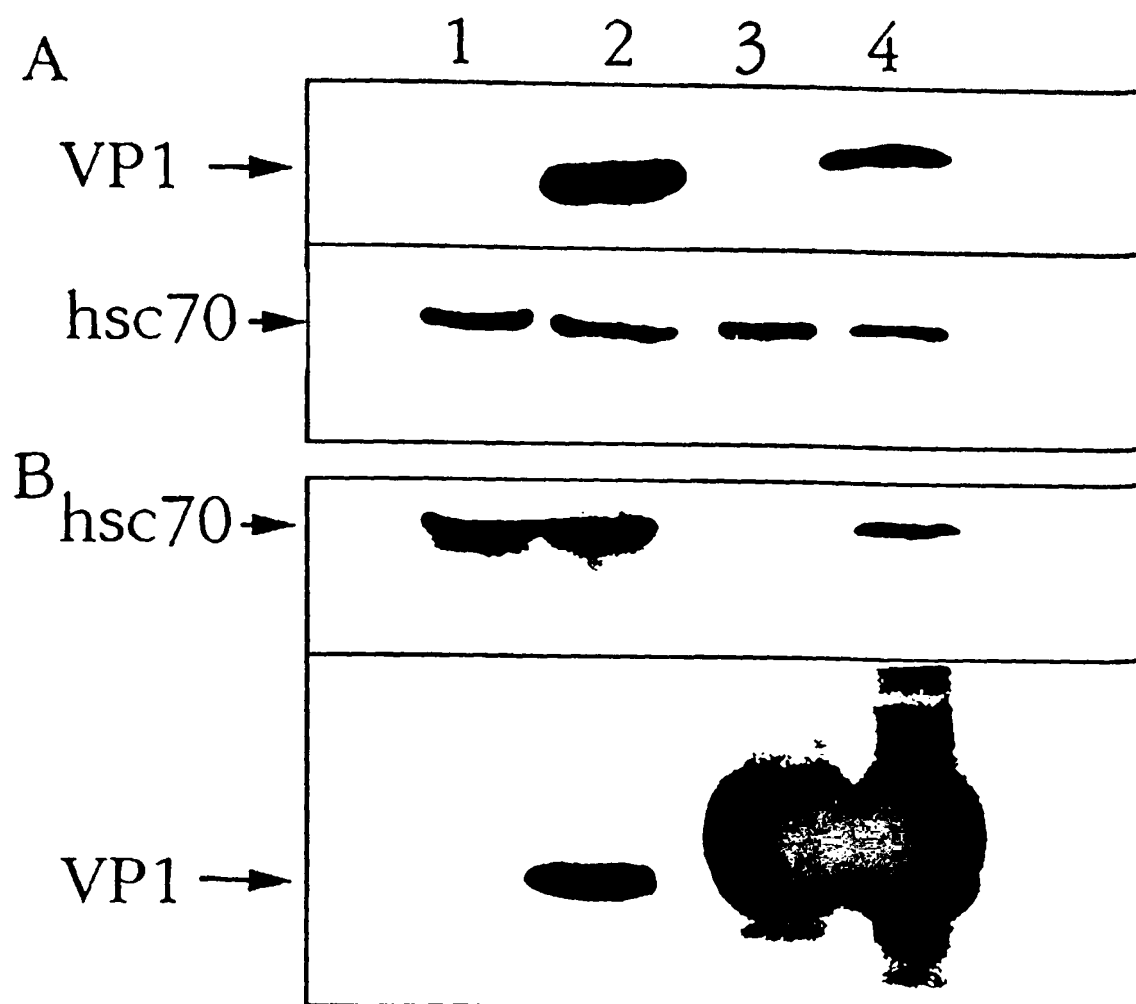
3.15. Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ της hsc70 και όψιμων ιικών γονιδιακών προϊόντων κατά την διάρκεια παραγωγικής ιικής μόλυνσης με τον ιό SV40.

Με δεδομένα αφ'ενός μεν την ανικανότητα της συμπλοκής T αντιγόνου-hsc70 σε μολυσμένα επιτρεπτικά κύτταρα και αφ'ετέρου τον συνεντοπισμό της hsc70 με το T αντιγόνο και την VP1 στον πυρήνα των κυττάρων αυτών εξετάσαμε την πιθανότητα δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ της hsc70 και της VP1. Για τον λόγο αυτόν κυτταρικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν 0 και 48 ώρες μετά από μόλυνση επιτρεπτικών κυττάρων CV1 με τον ιό SV40 και εξετάστηκαν με ανοσοκαθίζηση ως εξής: Ικανή ποσότητα πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης VP1 (ευγενική προσφορά της Dr. E.May) προεπωάσθηκε με τα σφαιρίδια πρωτεΐνης A - σεφαρόζης και προστέθηκε στο κυτταρικό εκχύλισμα. Ακολούθησε επώαση επί 5 ώρες και ανοσοκαθίζηση όπως περιγράφηκε παραπάνω (κεφ.2.22). Στα ίδια δείγματα, έγινε ανοσοκαθίζηση χρησιμοποιώντας και το ειδικό για την hsc70 αντίσωμα SPA815. Τα ανοσοιζήματα, διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και ελέγχθηκαν με αποτύπωμα Western χρησιμοποιώντας το ειδικό για την hsc70 μονοκλωνικό αντίσωμα SPA815 και το ειδικό για την VP1 πολυκλωνικό αντίσωμα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών απέδειξαν ότι η hsc70 ανοσοκαθίζει με την VP1 (Εικ. 30).

3.16. Επίδραση INF- γ επί μολυσμένων επιτρεπτικών κυττάρων και ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc - T αντιγόνου.

Η ύπαρξη συμπλέγματος μεταξύ hsc70 και T αντιγόνου σε μολυσμένα μη επιτρεπτικά κύτταρα και η ανυπαρξία αντίστοιχου συμπλέγματος σε επιτρεπτικά κύτταρα μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η ύπαρξη του συμπλέγματος πιθανόν να σχετίζεται με την ανικανότητα του ιού να διπλασιάζει το DNA του στα μη επιτρεπτικά κύτταρα. Για να ελέγξουμε την πιθανότητα αυτή, προχωρήσαμε σε επίδραση ιντερφερόνης (INF- γ) επί μολυσμένων επιτρεπτικών κυττάρων. Η INF- γ είναι ένας ευρύτατα γνωστός αντιϊικός παράγοντας, ο οποίος αναστέλλει τον ιικό διπλασιασμό (105). Πιο συγκεκριμένα, επιτρεπτικά κύτταρα CV1 μολύνθηκαν με τον ιό SV40 και ταυτόχρονα επωάσθηκαν με 500μονάδες INF- γ / ml καλλιέργειας. 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης παρασκευάστηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα στα οποία έγινε ανοσοκαθίζηση χρησιμοποιώντας το ειδικό κατά της hsc70 αντίσωμα SPA815. Τα ανοσοιζήματα, διαχωρίστηκαν με



Εικ.30: Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και της όψιμης πρωτεΐνης VP1 του ιού SV40.

A. Ανοσοκαθίζηση σε κύτταρα CV1 με τη χρήση αντισώματος ειδικού έναντι της hsc70 (SPA 815).

1. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα CV1 κυττάρων.

2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα CV1 κυττάρων που μολύνθηκαν επί 48 ώρες με τον ιό SV40.

3 και 4 : Ανοσοϊζήματα με τη χρήση του αντισώματος SPA815 στα εκχυλίσματα 1 και 2 αντίστοιχα.

B. Ανοσοκαθίζηση σε κύτταρα CV1 με τη χρήση αντισώματος ειδικού έναντι της VP1 (anti-VP1, πολυκλωνικό).

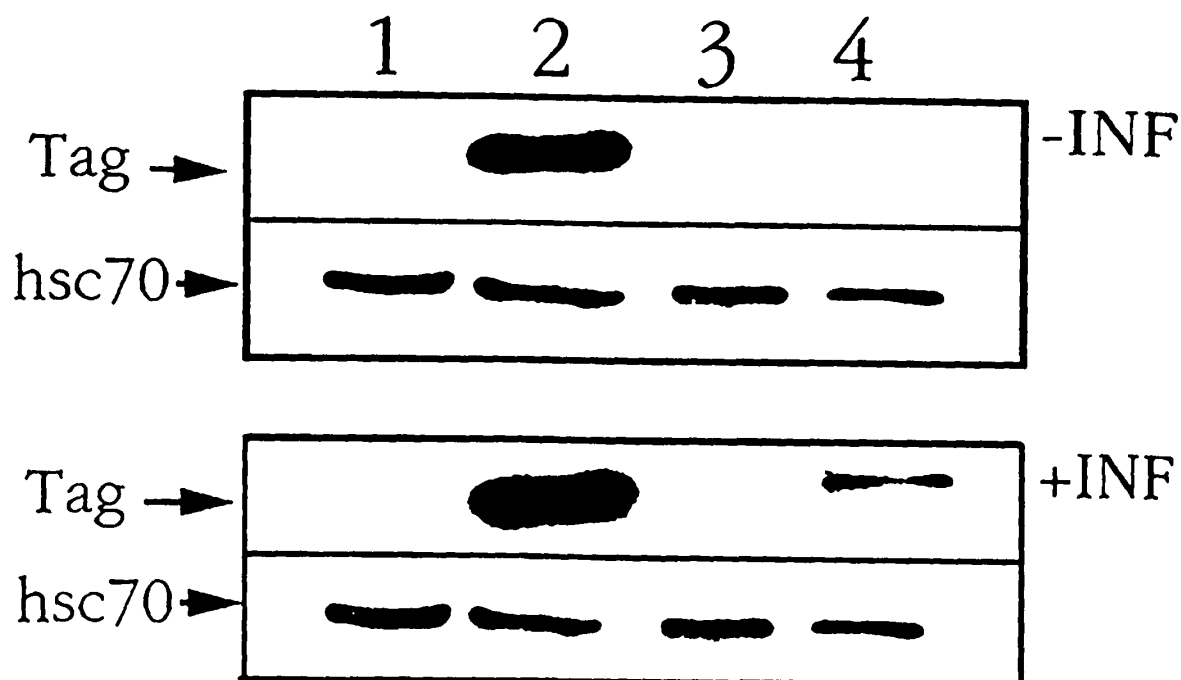
1. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα CV1 κυττάρων.

2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα CV1 κυττάρων που μολύνθηκαν επί 48 ώρες με τον ιό SV40.

3 και 4 : Ανοσοϊζήματα με τη χρήση του αντισώματος anti-VP1 στα εκχυλίσματα 1 και 2 αντίστοιχα.

2
9
8

[illegible]



Εικ.31: Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και T αντιγόνου σε μολυσμένα επιτρεπτικά κύτταρα CV1 τα οποία υπέστησαν παράλληλα επίδραση με INF- γ .

A. Ανοσοκαθίζηση σε κύτταρα CV1 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της hsc70 (SPA 815). (- INF)

1. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα CV1 κυττάρων.

2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα CV1 κυττάρων που μολύνθηκαν επί 48 ώρες με τον ιο SV40.

3 και 4 : Ανοσοϊζήματα με τη χρήση του αντισώματος SPA815 στα εκχυλίσματα 1 και 2 αντίστοιχα.

B. Ανοσοκαθίζηση σε κύτταρα CV1 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της hsc70 (SPA 815). (+ INF)

1. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα CV1 κυττάρων.

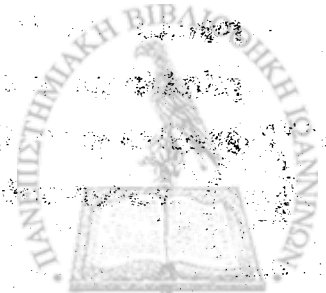
2. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα CV1 κυττάρων που μολύνθηκαν επί 48 ώρες με τον ιο SV40 ενώ παράλληλα τους χορηγήθηκε INF- γ .

3 και 4 : Ανοσοϊζήματα με τη χρήση του αντισώματος SPA815 στα εκχυλίσματα 1 και 2 αντίστοιχα.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αφορμή για την έναρξη της παρούσης εργασίας, αποτέλεσε παρατήρηση του εργαστηρίου μας σύμφωνα με την οποία, μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 72 kD επαγόταν τόσο σε CV1 κύτταρα μολυσμένα με τον ιό SV40, όσο και σε μετασχηματισμένα κύτταρα COS, τα οποία εκφράζουν αδιάφορα το T αντιγόνο του ιού (4). Η μικρή αλλά αισθητή επαγωγή της πρωτεΐνης αυτής μετά από θερμικό σοκ, σε συνδυασμό με την έντονη επαγωγή της σε μετασχηματισμένα και μολυσμένα με τον ιό SV40 κύτταρα, μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πιθανόν πρόκειται για πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των 70 kD πρωτεϊνών θερμικού σοκ και σχετίζεται τόσο με την έκφραση του ογκογονιδίου T όσο και με τον κύκλο ζωής του ιού SV40.

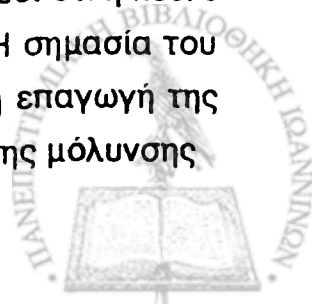
Με στόχο τη μελέτη των παραπάνω σχέσεων, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στην κλωνοποίηση του cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή, για να επιτύχουμε τον πλήρη χαρακτηρισμό της. Επιλέξαμε για την αναζήτηση μια cDNA βιβλιοθήκη κυττάρων COS με φορέα κλωνοποίησης τον φάγο λZAPII, στηριζόμενοι κυρίως στο γεγονός ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά είναι αυξημένα και στο γεγονός ότι το μέγεθος των ενθεμάτων του φάγου (1-10 kb) σε συνδυασμό με την ταχεία *in vivo* υποκλωνοποίησή τους, καθιστά τη διαδικασία ανεύρεσης και απομόνωσης ευκολότερη. Τέλος, η επιλογή του ανιχνευτή, στηρίχθηκε στην προσδοκόμενη συγγένεια της προς αναζήτηση πρωτεΐνης με τα μέλη της 70 kD οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ και για τον λόγο αυτόν προκρίναμε το καλά χαρακτηρισμένο cDNA του ανθρώπινου γονιδίου της hsp70 (49, 159). Υπό συνθήκες αναζήτησης χαμηλής αυστηρότητας οι απομονωθέντες κλώνοι δεν ήταν πλήρους μεγέθους (0.2-1.1 kb) αλλά είχαν τα χαρακτηριστικά του προς αναζήτηση cDNA, δεδομένου ότι υβριδοποιούσαν mRNA μεγέθους 2500 bp περίπου, του οποίου τα επίπεδα ήταν έντονα αυξημένα σε κύτταρα COS σε σχέση με τα πατρικά κύτταρα CV1.

Η ικανότητα ενός από τους παραπάνω κλώνους να κωδικοποιεί πρωτεΐνη μοριακού βάρους 72 kD περίπου μας οδήγησε στην επιλογή του ως ανιχνευτή και στην τελική απομόνωση cDNA πλήρους μεγέθους. Η αποκάλυψη του γεγονότος ότι το απομονωθέν cDNA κωδικοποιεί την hsc70 και η παράλληλη κλωνοποίηση cDNA πλήρους μεγέθους που κωδικοποιεί την hsp70, ολοκλήρωσε την προσπάθειά μας για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των δύο αυτών

cDNAs της 70 kD οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ από κύτταρα πιθήκου. Τα παραπάνω cDNAs είχαν ήδη κλωνοποιηθεί από άλλους οργανισμούς όπως ο άνθρωπος (35, 159), η δροσόφιλα (7, 10, 50, 78, 96), ο ζυμομύκητας (76) και το *E.coli* (39, 166). Η σύγκριση των ομολογιών τους, απέδειξε την αναμενόμενη εντυπωσιακή τους συντήρηση, δεδομένου ότι όσον αφορά την hsc70 παρατηρήσαμε ομολογία 99.6% μεταξύ ανθρώπου και πιθήκου και όσον αφορά την hsp70 η ομολογία βρέθηκε να είναι 97%. Τέλος, εντυπωσιακή ήταν η ομολογία μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα απομονωθέντα cDNAs των hsc70 και hsp70 (82.6%) υποδεικνύοντας την συγγενή λειτουργικότητα των παραπάνω πρωτεϊνών.

Η ιική επαγωγή της hsc70 απέτέλεσε αντικείμενο αλληλοαναιρούμενων ευρημάτων, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε, χωρίς να ταυτοποιηθεί, σε κύτταρα CV1 σαν αποτέλεσμα μόλυνσης με τον ιό SV40 (60), ενώ αντίθετα δεν παρατηρήθηκε σε κύτταρα HeLa που μολύνθηκαν με αδενοϊό (106). Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν πειστικά ότι και στα δύο αυτά κυτταρικά συστήματα η hsc70 επάγεται ύστερα από ιική μόλυνση. Η ασυμφωνία των συμπερασμάτων μας με τα αντίστοιχα των Phillips και συνεργατών (106) οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι, η μελέτη της επαγωγής της hsc70 από την ομάδα αυτή, στηρίχθηκε σε ευρήματα μετρήσεων της μεταγραφικής ταχύτητας (Transcription run on). Είναι επομένως πιθανόν, η hsc70 να συσσωρεύεται στα μολυσθέντα κύτταρα, όχι εξ αιτίας της αυξημένης ταχύτητας μεταγραφής του γονιδίου της, αλλά εξ αιτίας της αύξησης του χρόνου ημιζωής του παραγόμενου mRNA. Άλλωστε η ίδια ομάδα παρατηρεί αύξηση των επιπέδων του hsc70 mRNA ως αποτέλεσμα της ιικής μόλυνσης. Εναλλακτικά η ασυμφωνία αυτή των συμπερασμάτων μπορεί να οφείλεται στο είδος των κυττάρων και των χρησιμοποιηθέντων στελεχών ιών.

Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι, η ιική επαγωγή της hsc70 όχι μόνον αποτελεί ένα γενικό φαινόμενο που παρατηρείται σε κύτταρα που μολύνονται παραγωγικά από DNA ογκογόνους ιούς, αλλά υπακούει και σε μια κινητική συσσώρευσης σαφώς διακριτή από την αντίστοιχη της hsp70. Η χρονικά προηγούμενη επαγωγή της hsc70 σε σχέση με την hsp70, υποδεικνύει ότι η hsc70 αποτελεί τον πρώτο στόχο της ιικής επαγωγικής δραστηριότητας. Η σημασία του παραπάνω φαινομένου είναι δύσκολο να διευκρινισθεί. Πιθανώς, η επαγωγή της hsc70 να αποτελεί μέρος της κυτταρικής αντίδρασης στην πρόοδο της μόλυνσης.



ή στη δράση των ογκογονιδίων και η επακολουθούσα συσσώρευση της hsp70 να λειτουργεί συμπληρωματικά, δεδομένης της λειτουργικής συγγένειας των πρωτεϊνών αυτών. Εναλλακτικά, είναι πιθανόν η αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών να προκαλείται από τον ιό προκειμένου να υποβοηθηθεί η μελλοντική παραγωγή του ή η μετασχηματιστική δράση των ογκογονιδίων του.

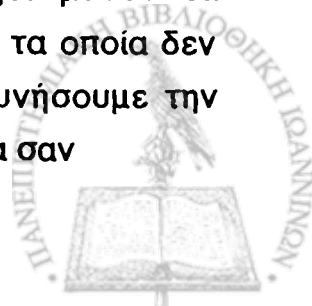
Δεδομένου ότι οι παραπάνω DNA ογκογόνοι ιοί οδηγούν τα κύτταρα που μολύνουν σε διπλασιασμό DNA (17, 21, 28, 33, 147), θεωρήσαμε σκόπιμο να μελετήσουμε την έκφραση των γονιδίων hsc70 και hsp70 κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι και τα δύο αυτά γονίδια ρυθμίζονται αυστηρά κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ότι, η επαγωγή της hsc70, η οποία παρουσιάζει μέγιστη συσσώρευση του μηνύματός της στα όρια της S και της G2 φάσης, προηγείται σαφώς της αντίστοιχης επαγωγής της hsp70. Αν και η ρύθμιση της hsc70 αποδεικνύεται για πρώτη φορά από τα ευρήματά μας, η εξάρτηση της έκφρασης της hsp70 από την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου είχε ήδη μελετηθεί και τα αποτελέσματά μας επιβεβαίωσαν τα ήδη δημοσιευθέντα ευρήματα (83, 131). Οι συγκριτικές παρατηρήσεις μας, που αποδεικνύουν ότι τόσο η hsc70 όσο και η hsp70 ρυθμίζονται κατά τον κυτταρικό κύκλο και επάγονται διαφορεικά ύστερα από ιική μόλυνση με σαφώς προηγούμενη την επαγωγή της hsc70 και στις δύο περιπτώσεις, μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η hsc70 αποτελεί τον πρώτο κυτταρικό στόχο του ιού, μεταξύ των μελών της 70 kd γονιδιακής οικογένειας.

Η ενδοκυττάρια θέση των hsp70s έχει βρεθεί ότι είναι κυτταροπλασματική κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, ύστερα όμως από θερμικό σοκ οι πρωτεΐνες αυτές μετακινούνται στον πυρήνα του κυττάρου και συσσωρεύονται στους πυρηνίσκους (152, 154). Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην πρόταση, σύμφωνα με την οποία, ένας από τους κύριους βιολογικούς ρόλους των hsp70s είναι η προστασία των πυρηνίσκων από το θερμικό σοκ (40, 104). Με βάση το γεγονός ότι και η ιική μόλυνση αποτελεί μια μορφή κυτταρικού στρες και δεδομένου ότι τα ευρήματά μας απέδειξαν την επαγωγή της hsc70 από τον ιό SV40, αποφασίσαμε να μελετήσουμε τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της hsc70 κατά την διάρκεια της μόλυνσης κυττάρων CV1 με τον ιό SV40. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν αναμφισβήτητα ότι η hsc70 μετακινείται στον πυρήνα των

μολυσμένων κυττάρων και η κινητική της συσσώρευσής της είναι τέτοια ώστε 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης, η hsc70 εντοπίζεται αποκλειστικά σχεδόν στον πυρήνα του συνόλου των μολυνθέντων κυττάρων. Τα ευρήματά μας αυτά συμφωνούν με τα ήδη δημοσιευθέντα αποτελέσματα ανάλογων μελετών που έγιναν για τον αδενοϊό και τον ιό του πολυώματος (27, 157). Φαίνεται λοιπόν ότι, η πυρηνική μετακίνηση της hsc70 ως αποτέλεσμα ιικής μόλυνσης αποτελεί ένα γενικό φαινόμενο, που χαρακτηρίζει τουλάχιστον τους DNA ογκογόνους ιούς. Επιπλέον, η παρατηρούμενη διάχυτη στικτή πυρηνική χρώση της hsc70 σε μολυνθέντα κύτταρα είναι σαφώς διαφορετική από την παρατηρούμενη ύστερα από θερμικό σοκ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση της hsc70 σε μολυσμένα κύτταρα είναι διαφορετική από την δράση σε κύτταρα που υπέστησαν θερμικό σοκ.

Μια από τις δραστηριότητες της hsc70 που έχουν μέχρι σήμερα περιγραφεί, αφορά στην καταλυτική της ικανότητα να υποβοηθά την μετακίνηση πυρηνόφιλων πρωτεϊνών (129, 130, 161). Δεδομένου ότι το T αντιγόνο του ιού SV40 το οποίο αποτελεί το κύριο πρώιμο εκφραζόμενο ιικό προϊόν θεωρείται πρότυπο πυρηνόφιλης πρωτεΐνης (46, 52), εξετάσαμε την πιθανότητα σύμφωνα με την οποία, η πυρηνική μετακίνηση της hsc70 μπορεί να οφείλεται στην συνοδευτική της δράση ως προς το T αντιγόνο. Τα αποτελέσματά μας όμως έδειξαν καθαρά ότι η μετακίνησή της στον πυρήνα του κυττάρου δεν οφείλεται στην παρουσία του T αντιγόνου. Τόσο σε μετασχηματισμένα κύτταρα, τα οποία εκφράζουν αδιάφορα το T αντιγόνο (π.χ. COS και NIH/3T3/T), όσο και σε μολυνθέντα μη επιτρεπτικά κύτταρα (π.χ. BALB/3T3, NIH/3T3) η ενδοκυττάρια θέση της hsc70 βρέθηκε ότι είναι κυτταροπλασματική ανεξάρτητα από τον χρόνο επώασης. Μετακίνηση της hsc70 στον πυρήνα παρατηρήθηκε μόνο ύστερα από μόλυνση επιτρεπτικών κυττάρων (CV1, COS).

Τα παραπάνω ευρήματα, συμφωνώντας με ήδη δημοσιευθέντα αποτελέσματα που αφορούν τον αδενοϊό (157), αποδεικνύουν ότι η πυρηνική μετακίνηση της hsc70 οφείλεται στην ιική μόλυνση και όχι στην παρουσία του T αντιγόνου. Επιπλέον όμως, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η ιικά επαγόμενη μετακίνηση της hsc70 στον πυρήνα χαρακτηρίζει μόνον τα επιτρεπτικά κύτταρα και δεν παρατηρείται σε μολυσμένα κύτταρα τα οποία δεν υποστηρίζουν την παραγωγή ιού. Τέλος, προκειμένου να διερευνήσουμε την πιθανότητα σύμφωνα με την οποία η hsc70 μετακινείται στον πυρήνα σαν

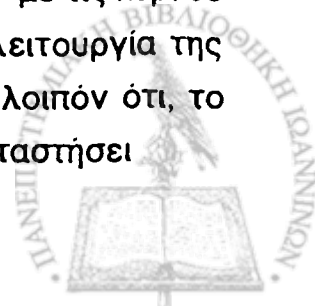


αποτέλεσμα της εισόδου των κυττάρων σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου, όπως αναφέρθηκε για την hsp70 (83), μελετήσαμε την ενδοκυττάρια θέση της κατά την διάρκεια του κύκλου και αποκαλύψαμε ότι η hsc70 παραμένει κυτταροπλασματική ανεξάρτητα από τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Καταλήξαμε συνεπώς στο συμπέρασμα ότι η πυρηνική μετακίνηση της hsc70 παρατηρείται στην όψιμη φάση της μόλυνσης επιτρεπτικών κυττάρων και σχετίζεται με την πρόοδο της ιικής μόλυνσης.

Τα ευρήματά μας, τα οποία προέκυψαν από τα περιγραφέντα πειράματα ενδοκυττάριου εντοπισμού της hsc70, συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι, αν και η hsc70 μπορεί να συμμετέχει στην πυρηνική μετακίνηση του T αντιγόνου, εν τούτοις η ίδια δεν φαίνεται να ακολουθεί *in vivo* την μετακίνηση του ογκογονιδίου. Επομένως, ο ενδοπυρηνικός εντοπισμός της ύστερα από μόλυνση επιτρεπτικών κυττάρων με τον ιό SV40, πρέπει να οφείλεται στην παρουσία άλλων ιικών πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα μπορεί να σχετίζεται με τα όψιμα ιικά γονιδιακά προϊόντα. Η παραδοχή αυτή ερμηνεύει εξ άλλου και την αδυναμία πυρηνικής μετακίνησης της hsc70 σε μη επιτρεπτικά κύτταρα δεδομένου ότι τα κύτταρα αυτά δεν επιτρέπουν την έκφραση των όψιμων ιικών πρωτεϊνών. Πράγματι, τα πειραματικά μας αποτελέσματα, που στηρίχθηκαν σε ανοσοκαθιζήσεις κυτταρικών εκχυλισμάτων με αντισώματα τόσο εναντίον της καψιδιακής πρωτεΐνης VP1 όσο και εναντίον της κυτταρικής hsc70, απέδειξαν την ύπαρξη συμπλέγματος hsc70 και VP1. Προσδέσεις της hsc70 με ιικές καψιδιακές πρωτεΐνες έχουν επανειλημένα αναφερθεί (27, 54, 80, 81) και η σημασία τους αποδόθηκε στην ικανότητα της hsc70 να λειτουργεί ως πρωτεϊνικός συνοδός, ο οποίος διευκολύνει την συγκρότηση των ιικών σωματιδίων (27, 54). Εναλλακτικά, θα μπορούσε να προταθεί ένας αντι-ιικός ρόλος για την hsc70, σύμφωνα με τον οποίο η πρόσδεσή της στις καψιδιακές πρωτεΐνες περιορίζει τη συμμετοχή τους στην συγκρότηση των ιικών σωματιδίων (80). Χωρίς να είναι δυνατός ο αποκλεισμός καμίας από τις παραπάνω υποθέσεις, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η ιική επαγωγή της hsc70 αν και οφείλεται στην έκφραση των πρώιμων ιικών προϊόντων, αποτελεί μία στρατηγική από την πλευρά του ιού, ο οποίος συσσωρεύει την hsc70 με σκοπό να τη χρησιμοποιήσει αργότερα κατά την διάρκεια της παραγωγικής ιικής μόλυνσης. Η συσσώρευση αυτή παραμένει

λειτουργικά αδρανής στην περίπτωση των μη επιτρεπτικών κυττάρων δεδομένου ότι, το κυτταρικό περιβάλλον δεν ευνοεί την έκφραση των όψιμων ιικών πρωτεϊνών. Για τον λόγο αυτό δεν παρατηρείται πυρηνική μετακίνηση της hsc70 στα μη επιτρεπτικά κύτταρα. Η πιθανότητα όμως σύμφωνα με την οποία η επαγωγή της hsc70, ως αποτέλεσμα της ιικής μόλυνσης ή της έκφρασης των πρώιμων ιικών ογκογονιδίων, αποτελεί ένα είδος αμυντικού κυτταρικού μηχανισμού δεν μπορεί να αποκλεισθεί, με βάση τόσο τα αποτελέσματά μας, όσο και με βάση τα μέχρι σήμερα συσσωρευθέντα ευρήματα. Η έκφραση με διαμόλυνση της VP1 σε επιτρεπτικά και μη επιτρεπτικά κύτταρα, ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων ιικών πρωτεϊνών και η συνακόλουθη μελέτη του ενδοκυττάριου εντοπισμού και των προσδέσεων της hsc70, θα αποτελούσαν κατά την γνώμη μας μελέτες που θα συνεισέφεραν σημαντικά στην διαλεύκανση των παραπάνω πιθανοτήτων.

Είναι γνωστό ότι, η πρόοδος της ιικής μόλυνσης σχετίζεται άμεσα με την έκφραση των πρώιμων ιικών ογκογονιδίων και όπως ήταν φυσικό, η σχέση της hsc70 με τα ιικά αυτά προϊόντα αποτέλεσε αντικείμενο έντονης ερευνητικής προσπάθειας. Παρά το γεγονός ότι ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των πρωτεϊνών αυτών δεν ευνοεί την αλληλεπίδρασή τους, δεδομένου ότι το T αντιγόνο εντοπίζεται κατά 95% περίπου στον πυρήνα ενώ η hsc70 εντοπίζεται κατά το ίδιο ποσοστό στο κυτταρόπλασμα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, πρόσδεση της hsc70 στο T αντιγόνο παρατηρήθηκε σε μετασχηματισμένα μη επιτρεπτικά κύτταρα (123, 125). Η σημασία της πρόσδεσης αυτής αποδόθηκε αρχικά στην ικανότητα της hsc70 να δρα ως πρωτεϊνικός συνοδός και κατά συνέπεια να καταλύει την μεταφορά του T αντιγόνου στον πυρήνα του κυττάρου. Περαιτέρω μελέτες σχετικές με την φύση της παραπάνω πρόσδεσης, απέδειξαν ότι δεν αφορά την hsp70 (53) και πραγματοποιείται μέσω της αμινοτελικής περιοχής του T αντιγόνου η οποία θεωρείται υπεύθυνη για τον κυτταρικό μετασχηματισμό (123, 124, 125). Πολύ πρόσφατα η αποκάλυψη της εντυπωσιακής ομολογίας του αμινοτελικού άκρου του T αντιγόνου με την περιοχή J της DnaJ οικογένειας πρωτεϊνών (59), οδήγησε στην επαναθεώρηση των παραπάνω επαφών, δεδομένου ότι η σύνδεση των DnaJs μέσω της περιοχής J με τις hsp70s είναι αποδεδειγμένη και καθοριστική για το σχηματισμό και την λειτουργία της μηχανής πρωτεϊνικών συνοδών (chaperone machine). Απεδείχθει λοιπόν ότι, το αμινοτελικό άκρο του T αντιγόνου (αμινοξέα 1-76) μπορεί να υποκαταστήσει



λειτουργικά την περιοχή J των DnaJ πρωτεϊνών (59) και ότι το τετραπεπτίδιο HPDK/R (αμινοξέα 42 - 45 του T αντιγόνου) είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση του T αντιγόνου στην hsc70 (18). Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην πρόταση σύμφωνα με την οποία ορισμένες πλευρές του ιικού κύκλου ζωής καθορίζονται από τις επαφές του T αντιγόνου με την hsc70 (18, 139, 164).

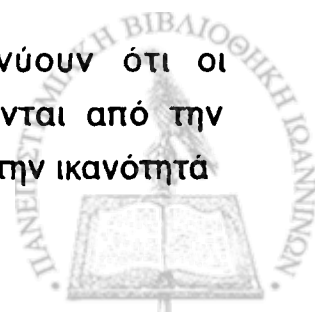
Πιο συγκεκριμένα, οι παραπάνω επαφές προτάθηκε ότι παίζουν ρόλο στη διαδικασία του αναδιπλασιασμού του DNA (18) και στη διαδικασία ανενεργοποίησης των πρωτεϊνών που αποτελούν μέλη της αντιογκογονιδιακής οικογένειας του ρετινοβλαστώματος (128, 141, 164). Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι παραπάνω μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε μη επιτρεπτικά κύτταρα, τα οποία μετασχηματίστηκαν σταθερά ή παροδικά με το T αντιγόνο ή τις μεταλλαγμένες μορφές του. Μόνον στην περίπτωση της μελέτης του ιικού αναδιπλασιασμού DNA χρησιμοποιήθηκαν επιτρεπτικά κύτταρα, χωρίς όμως στην περίπτωση αυτή να αποδεικνύεται η ύπαρξη συμπλέγματος μεταξύ hsc70 και T αντιγόνου (18).

Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι πράγματι το T αντιγόνο συμπλέκεται με την hsc70 όταν εκφράζεται, είτε αδιάφορα είτε ύστερα από μόλυνση, σε μη επιτρεπτικά κύτταρα. Όμως, η πρόσδεση αυτή δεν παρατηρείται σε μολυσμένα ή μετασχηματισμένα επιτρεπτικά για την ιική παραγωγή κύτταρα. Κατά συνέπεια, τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι, η δημιουργία του συμπλόκου μεταξύ hsc70 και T αντιγόνου φαίνεται να συνδέεται με την μετασχηματιστική δράση της ογκοπρωτεΐνης, ενώ η απουσία σύνδεσης hsc70 και T αντιγόνου σχετίζεται με την πρόοδο της ιικής μόλυνσης και φαίνεται να αποτελεί προϋπόθεση της ωρίμανσης του ιού και της επακόλουθης κυτταρικής λύσης. Η επαγωγή του ιικού αναδιπλασιασμού του DNA που παρατηρήθηκε από τους Campell και συνεργάτες (18) εξηγείται, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ως συνέπεια της παρουσίας ακέραιου τετραπεπτιδίου HPDK/R του T αντιγόνου και όχι ως συνέπεια της πρόσδεσης της hsc70. Η παρουσία του τετραπεπτιδίου αυτού, το οποίο αποτελεί και την θέση πρόσδεσης της hsc70 στο T αντιγόνο, βρέθηκε επίσης ότι είναι απαραίτητη για την αναστολή της δράσης των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος, παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται στο T αντιγόνο σε θέση ανεξάρτητη της θέσης πρόσδεσης της hsc70 (30, 139). Είναι επομένως πιθανόν η πρόσδεση της hsc70 στο T αντιγόνο σε μη επιτρεπτικά κύτταρα, να υποβοηθά τη δράση αυτής της ογκοπρωτεΐνης που οδηγεί σε κυτταρικό μετασχηματισμό. Από την

άλλη μεριά, η αδυναμία των επιτρεπτικών κυττάρων να υποστηρίξουν την δημιουργία συμπλόκου ανάμεσα στο T αντιγόνο και την hsc70 πιθανότατα επιτρέπει στα μέλη της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος να επιβάλλουν την αντιμετασχηματιστική τους δράση. Ένας ανάλογος μηχανισμός έχει άλλωστε ήδη περιγραφεί για την ιικά επαγόμενη κυτταρική απόπτωση σύμφωνα με τον οποίο, ενώ η μόλυνση φαίνεται να πυροδοτεί τη διαδικασία απόπτωσης, η έκφραση των ιικών ογκογονιδίων προκαλεί αναστολή του κυτταρικού θανάτου (29). Η μελέτη της εμπλοκής της hsc70 στο σύστημα αυτό θα προσέθετε, κατά την γνώμη μας, σημαντικά στοιχεία στην αποκρυπτογράφηση ενός γενικότερου μοντέλου, που αφορά την δράση των πρωτεϊνών αυτών σε σχέση με τον ιικό κύκλο ζωής. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι στα επιτρεπτικά κύτταρα η ωρίμανση του ιού, η οποία πραγματοποιείται βάσει ενός σχετικά άγνωστου μηχανισμού, απαιτεί την αναστολή της δημιουργίας συμπλέγματος μεταξύ του T αντιγόνου και της hsc70.

Η παρατηρηθείσα επαγωγή της δημιουργίας συμπλόκου T αντιγόνου και hsc70 σε μολυσμένα επιτρεπτικά κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία ιντερφερόνης - γ (INF-γ), ενδυναμώνει την υπόθεσή μας, ότι η πρόσδεση αυτή σχετίζεται με την αναστολή της ιικής ωρίμανσης. Είναι γνωστό ότι η κύρια αντιική δράση της ιντερφερόνης σχετίζεται με την ενεργοποίηση της PKR πρωτεϊνικής κινάσης, η οποία αναστέλλει την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης (118, 126). Είναι όμως επίσης γνωστό ότι το T αντιγόνο ανταγωνίζεται την ανασταλτική αυτή δράση της ιντερφερόνης (111). Κατά συνέπεια η εμφάνιση συμπλόκου μεταξύ T αντιγόνου και hsc70, μετά από επίδραση ιντερφερόνης γ (INF-γ) σε μολυσμένα επιτρεπτικά κύτταρα, πιθανόν να αποτελεί μέρος ενός αντι-ιικού κυτταρικού μηχανισμού ο οποίος επιδιώκει την αναστολή της ιικής ωρίμανσης. Εναλλακτικά, η παραπάνω σύνδεση μπορεί να αποτελεί μέρος μιας ιικής στρατηγικής με στόχο την εξουδετέρωση του ενεργοποιηθέντος (μέσω ιντερφερόνης) αντι-ιικού κυτταρικού μηχανισμού.

Τα παρουσιασθέντα αποτελέσματά μας, αποδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις της hsc70 με τις ιικές πρωτεΐνες καθορίζονται από την επιτρεπτικότητα του κυτταρικού περιβάλλοντος και κατά συνέπεια την ικανότητά



του να υποστηρίξει ή όχι την ιική ωρίμανση. Δεδομένης της εντυπωσιακής εξελικτικής συντήρησης της hsc70 και της απουσίας μεταμεταφραστικής τροποποίησής της, θεωρούμε ότι οι παρατηρηθείσες διαφορές δράσης της μεταξύ επιτρεπτικών και μη επιτρεπτικών κυττάρων δεν πρέπει να οφείλονται στο μόριο της hsc70 καθ'εαυτό. Αντίθετα, είναι γνωστό ότι το T αντιγόνο υπόκειται σε πολλές τροποποιήσεις, όπως οι φωσφορυλιώσεις τόσο σε θέσεις σερίνης όσο και σε θέσεις θρεονίνης (16, 109). Οι φωσφορυλιώσεις αυτές έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητες τόσο για τη μεταφορά του T αντιγόνου στον πυρήνα όσο και για την εκδήλωση της δράσης του ως βασικού παράγοντα του ιικού διπλασιασμού (51, 109). Είναι επομένως πιθανόν, οι τροποποιήσεις που υφίσταται το T αντιγόνο ειδικά στα επιτρεπτικά κύτταρα να μην ευνοούν την αναγνώριση του από την hsc70. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι, η ιντερφερόνη η οποία επάγει την πρόσδεση hsc70 και T αντιγόνου, εκδηλώνει την δράση της μέσω της ενεργοποίησης κινασών.

Συνεπώς, η αλυσίδα των γεγονότων που έπονται της ενεργοποίησης αυτής μπορεί να περιλαμβάνει φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση του T αντιγόνου, όπως πιθανώς συμβαίνει στα μη επιτρεπτικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την αναγνώριση του T αντιγόνου από την ενδογενή κυτταρική hsc70. Πειράματα προς την κατεύθυνση αυτή, καθώς και μελέτες *in vitro* που θα διερευνούσαν την σημασία της δημιουργίας του συμπλόκου hsc70/T αντιγόνου για τον ιικό διπλασιασμό, θα βοηθούσαν κατά την γνώμη μας σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου της hsc70 στον κύκλο ζωής του ιού SV40.



ΠΥΛΑΙΟ

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ



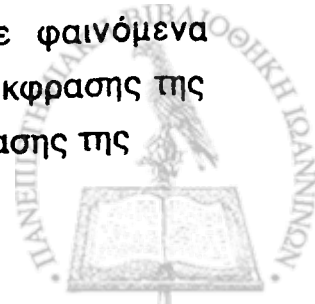
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριό μας, καθώς και από άλλες ερευνητικές ομάδες, αποκάλυψαν ότι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 72kDa επάγεται μετά από μόλυνση επιτρεπτικών κυττάρων CV1 με τον ιό SV40. Βρέθηκε επίσης ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής είναι αυξημένα σε κύτταρα COS (μετασχηματισμένα κύτταρα CV1 με το T αντιγόνο του ιού SV40) σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης σε προγονικά κύτταρα CV1. Η θερμική επαγωγή της πρωτεΐνης βρέθηκε να είναι μικρή έως αμελητέα. Κρίνοντας με βάση τα παραπάνω δεδομένα, καθώς επίσης και με αναφορές στη βιβλιογραφία περιπτώσεων επαγωγής πρωτεϊνών θερμικού στρες από DNA ογκογόνους ιούς, υποθέσαμε ότι η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός μας θα μπορούσε να είναι μια πρωτεΐνη θερμικού σοκ της οικογένειας των 70 kDa.

Με σκοπό την ταυτοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την εν λόγω πρωτεΐνη, ανατρέξαμε σε μια λ ZAPII cDNA βιβλιοθήκη από κύτταρα COS χρησιμοποιώντας ως ραδιενεργό ανιχνευτή το γονίδιο που κωδικοποιεί την κύρια θερμικά επαγόμενη ανθρώπινη πρωτεΐνη (hsp70). Απομονώθηκε ένας κλώνος μεγέθους 2.5 kb (κλώνος 538), ο οποίος μετά την ανάγνωση της αλληλουχίας του, αναγνωρίστηκε ως το ανάλογο της hsc70 στον πύθηκο. Απομονώθηκε επίσης και ένας κλώνος μεγέθους 2.5 kb (κλώνος 1101) ο οποίος μετά την πλήρη ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του, βρέθηκε ότι περιέχει όλη την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου που αντιστοιχεί στην κύρια θερμικά επαγόμενη πρωτεΐνη του πύθηκου (hsp70) και περιέχει μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες που εκτείνονται τόσο προς το 5' όσο και προς το 3' άκρο.

Χρησιμοποιώντας τα απομονωθέντα cDNAs, μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA που αντιστοιχούν στον κλώνο που κωδικοποιεί για την hsc70 του πύθηκου, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης κυττάρων CV1 με τον ιό SV40. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι, αν και τα δύο γονίδια (hsc70 και hsp70) είναι επαγόμενα κατά τη διάρκεια της ιικής μόλυνσης, η επαγωγή του γονιδίου της hsc70 προηγείται της αντίστοιχης επαγωγής του γονιδίου της hsp70.

Στη συνέχεια μελετήσαμε την σχέση της hsc70 με φαινόμενα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αποδείξαμε ότι η επαγωγή της έκφρασης της hsc70 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου προηγείται της έκφρασης της



hsp70.

Στην προσπάθειά μας να ερευνήσουμε το ρόλο της hsc70 στον κύκλο ζωής του ιού SV40, αποδείξαμε ότι η hsc70 μετακινείται στον πυρήνα επιτρεπτικών κυττάρων (CV1) μετά από μόλυνσή με τον ιό SV40. Η μετακίνηση δε αυτή παρατηρείται κατά τα τελικά στάδια της μόλυνσης. Αντίθετα, καμιά αλλαγή στην ενδοκυττάρια κατανομή της hsc70 δεν παρατηρήθηκε μετά από μόλυνση μη επιτρεπτικών κυττάρων (BALB/3T3, NIH/3T3) με τον ιό SV40. Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε ότι η hsc70 παραμένει κυτταροπλασματική καθ'όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Κατά συνέπεια συμπεράναμε ότι, η μετακίνηση της hsc70 στον πυρήνα κατά τη διάρκεια μόλυνσης επιτρεπτικών κυττάρων είναι ένα φαινόμενο που σχετίζεται με τον κύκλο ζωής του ιού SV40. Χρησιμοποιώντας τεχνικές έμμεσου ανοσοφθορισμού, σε κυτταρικές σειρές μετασχηματισμένων κυττάρων με το T αντιγόνο του ιού SV40, βρήκαμε ότι το T αντιγόνο του ιού από μόνο του δεν είναι ικανό να προκαλέσει μετακίνηση της hsc70 στον πυρήνα των κυττάρων. Βασιζόμενοι στο παραπάνω δεδομένο αποφασίσαμε να ερευνήσουμε την πιθανότητα ύπαρξης σχέσης μεταξύ hsc70 και όψιμων ιικών γονιδιακών προϊόντων. Έτσι αποδείξαμε ότι η hsc70 συνανοσοκαθίζει με την ιική καψιδιακή πρωτεΐνη VP1 σε εκχυλίσματα επιτρεπτικών κυττάρων (SV40) μετά από μόλυνσή τους με τον ιό SV40. Η ύπαρξη αυτού του συμπλέγματος υποδεικνύει ένα ρόλο για την hsc70 κατά τη διαδικασία της ιικής ωρίμανσης και συναρμολόγησης των ιικών καψιδίων.

Στη παρούσα μελέτη αποδείξαμε επίσης ότι η hsc70 σχηματίζει σύμπλεγμα με το T αντιγόνο του ιού μόνο σε μολυσμένα μη επιτρεπτικά κύτταρα. Καμία σύνδεση μεταξύ hsc70 και T αντιγόνου δεν παρατηρήθηκε σε μολυσμένα επιτρεπτικά κύτταρα.

Επίσης, η ιντερφερόνη γ, η οποία ως γνωστό αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του ιού, είναι ικανή να επάγει την δημιουργία συμπλέγματος T αντιγόνου/ hsc70 σε επιτρεπτικά κύτταρα. Ως εκ τούτου θα μπορούσε κανείς να συμπεράνει ότι η σύνδεση της hsc70 με το T αντιγόνο συμβάλλει στην αναστολή της ωρίμανσης του ιού SV40.



Summary

Studies in our laboratory and in other laboratories revealed that a 72kD protein in CV1 cells is SV40 inducible. We found that the basal levels of the above protein in COS cells (T antigen transformed CV1 cells) are high and we detected a mild induction after a heat treatment. On the basis of the above evidence and the reported observations of induction of stress genes by a variety of DNA tumor viruses, we suspected that the protein of our interest could be a heat shock protein.

In order to identify the gene, which encodes the virus inducible 72kD protein, we screened a COS cell λ ZAPII cDNA library with the human hsp70 gene as a probe. An isolated clone (538) with an insert of 2.5 kb, was fully sequenced and found to contain the entire coding region of the monkey hsc70 gene. Another clone (1101) with an insert of 2.5 kb was also isolated, fully sequenced and found to contain the entire coding region of the monkey hsp70 gene plus 5' and 3' flanking sequences.

Using the isolated monkey hsc70 and hsp70 cDNAs, we directly measured the hsc70 mRNA levels during the course of SV40 viral infection in CV1 cells. Our results indicate that although both genes are inducible by the early viral gene products, there seems to be a timely order of activation, with the hsc70 gene being the first to be stimulated.

We next investigated the cell cycle regulation of both hsc70 and hsp70 and we proved that cell cycle results in induction of the hsc70 gene expression prior to hsp70 stimulation.

Investigating the role of hsc70 in the SV40 life cycle, we proved that the protein translocates to the nucleus late during infection of permissive CV1 cells, in contrast to infected non permissive BALB/3T3 and NIH/3T3 cells in which hsc70 remains cytoplasmic. In addition, we observed that hsc70 remains cytoplasmic at all stages of the cell cycle. So, we concluded that, translocation of the protein to the nucleus during infection is a specific event related to SV40 life cycle. Using indirect immunofluorescence in T transformed cell lines we found that T antigen alone is unable to translocate hsc70 in to the nucleus. Based on the above results we decided to investigate possible interactions between



hsc70 and late viral products. Indeed, we found hsc70 to coimmunoprecipitate with the viral capsid protein VP1, indicating a role in the process of viral packaging.

In this study we demonstrate also that hsc70 forms a complex with T antigen only in infected non permissive cells and not in infected permissive cells.

Finally, we observed that interferon γ (INF- γ) treatment in permissive cells can induce complex formation between hsc70 and T antigen.





ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...
16. ...
17. ...
18. ...
19. ...
20. ...

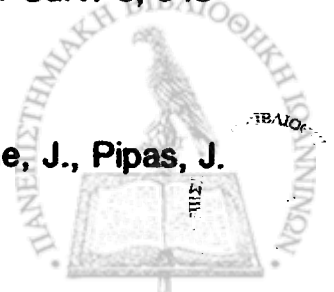
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abravaya, K., Philips, B. and Morimoto, R. I. (1991). Heat shock-induced interactions of heat shock transcription factor and the human hsp70 promoter examined by in vivo footprinting. *Mol. Cell. Biol.* 11, 586-589.
2. Abravaya, K., Myers, M. P., Murphy, S. P. and Morimoto, R. I. (1992). The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes and Dev.* 6, 1153-1164.
3. Agoff, S. N., Hou, J., Linzer, H. and Wu, B. (1993). Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 259, 84- 87.
4. Αγγελίδης Χ. (1989). Μελέτη της επίδρασης του θερμικού σοκ σε μολυσμένα και μετασχηματισμένα από τον ιό SV40 κύτταρα. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
5. Angelidis, C. E., Lazaridis, I. and Pagoulatos, G. N. (1991). Constitutive expression of heat shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *Eur. J. Biochem.* 199, 35- 39.
6. Angelidis, C. E., Nova, C., Lazaridis, I., Kontoyiannis, D., Kollias, G and Pagoulatos, G. N. (1996). Overexpression of hsp70 in transgenic mice results in increased cell thermotolerance. *Transgenics* 2, 111- 117.
7. Artavanis-Tsakonas, S., Schedl, P., Mirault, M. E., Moran, L. and Lis, J. (1979). Genes for the 70,000 dalton heat shock protein in two cloned *D.melanogaster* DNA segments. *Cell* 17, 9-18.
8. Baler, R., Welch, W. J. and Voellmy, R. (1992). Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins:hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell. Biol.* 117, 1151-1159.
9. Ballinger, D. G., and Pardue, M. L. (1983). The control of protein synthesis



during heat shock in *Drosophila* cells involves altered polypeptide elongation rates. *Cell* 33, 103-114.

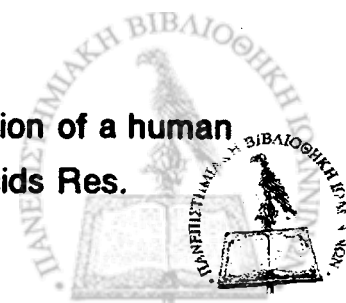
10. Bardwell. J. C. A. and Craig, E. A. (1984). Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat inducible *dnaK* gene are homologous *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 848-852.
11. Becker, J. and Graig, E. A. (1994). Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* 219, 11- 23.
12. Beckmann, R. P., Mizzen, L. A. and Welch, W. J. (1990). Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: implication for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854.
13. Beckmann, R. P., Lovett, M. and Welch, W. J. (1992). Examining the function and regulation of *hsp70* in cells subjected to metabolic stress. *J. Cell. Biol.* 117, 1137-1150.
14. Bienz, M., and Pelham, H. R. (1986). Heat shock regulatory elements function as inducible enhancer in the *Xenopus hsp70* gene and when linked to a heterologous promoter. *Cell* 45, 753-760.
15. Bonner, J. J., Parks, C., Parker-Thornburg, J., Mortin, M. M. and Pelham, H. R. B. (1984). The use of promoter fusions in *Drosophila* genetics: Isolation of mutations affecting the heat shock response. *Cell* 37, 979-991.
16. Borowiec, J.A., Dean, F. B., Bullock, P. A. and Hurwitz, J. (1990). Binding and unwinding- How T antigen engages the SV40 origin of DNA replication. *Cell* 60, 181-184.
17. Butel, J. S. (1986). SV40 large T-antigen: dual oncogene. *Cancer Surv.* 5, 343-365.
18. Campbell, K. S., Mullane, K. P., Aksoy, I. A., Stubdal, H., Zalvide, J., Pipas, J.



- M., Silver, P. A., Roberts, T. M., Schaffhausen, B. J. and DeCaprio, J. A. (1997). DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 largeT antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes and Dev.* **11**, 1098- 1110.
19. Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J. and Rothman, J. E. (1986). Uncoating ATPase is a member of the 70 Kilodalton family of stress proteins. *Cell* **45**, 3-13.
 20. Chappell, T. G., Konforti, B. B., Schid, S. L. and Rothman, J. E. (1987). The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 746-751.
 21. Chen, H., Campisi, J. and Padmanabhan, R. (1996). SV40 large T antigen transactivates the human cdc2 promoter by inducing a CCAAT box binding factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 13959- 13967.
 22. Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P. and Dice, J.F. (1989). A role for a 70kd heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* **246**, 382-385.
 23. Chirico, W. J., Waiters, M. G. and Blobel, G. (1988). 70kd heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**, 805-809.
 24. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
 25. Ciavarra, R. P., Goldman, C., Wen, K. K., Tedeschi, B. and Castora, F.J. (1984). Heat stress induces hsc70/nuclear topoisomerase I complex formation in vivo: Evidence for hsc70 mediated, ATP-independent reactivation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1751-1755.
 26. Craig, E.A., and Gross, C.A. (1991). Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.* **16**, 135-140.

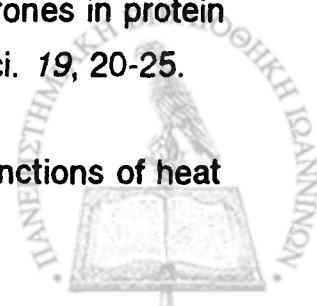


27. Cripe, T. P., Delos, S. E., Estes, P. A. and Garcea, R.L. (1995) In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J. Virol.* 69, 7807-7813.
28. Damania, B. and Alwine, J. C. (1996) TAF-like function of SV40 large T antigen. *Genes and Dev.* 10, 1369- 1381.
29. Debbas, M. and White, E. (1993). Wild type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes and Dev.* 7, 546- 554.
30. DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J-Y., Huang, C-M., Lee, W-H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D.M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275- 283.
31. DeLuca-Flaherty, C., McKay, D. B., Parham, P. and Hill, B.L. (1990). Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* 62, 875-887.
32. Deshaies, R. J., Koch, B. D., Weiner-Wasburne, M., Craig, E. and Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805.
33. Dickmanns, A., Zeitvogel, A., Simmersbach, F., Weber, R., Arthur, A. K., Dehde, S., Wildeman, A. G. and Fanning, E. (1994). The kinetics of Simian Virus 40-induced progression of quiescent cells into S phase depend on four independent functions of large T antigen. *J. Virol.* 68, 5496- 5508.
34. DiNocera, P.P. and Dawid, I. B. (1983). Transient expression of genes introduced into cultured cells of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7095-7098.
35. Dworniczak, B. and Mirault, M-E. (1987). Structure and expression of a human gene encoding for a 71kd heat shock 'cognate' protein. *Nucl. Acids Res.*



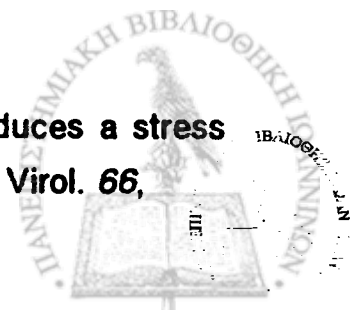
15, 5181-5197.

36. Fanning, E. and Knippers, R. (1992). Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 55-85.
37. Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C. and McKay, D.B. (1990). Three dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat shock cognate protein. *Nature* 346, 623-628.
38. Foos, G., Natour, S. and Klempnauer, K-H. (1993) TATA-box dependent trans-activation of the human HSP70 promoter by Myb proteins. *Oncogene* 8, 1775-1782.
39. Friedman, D. I., Olson, E.R., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I., and Banuett, F. (1984). Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage λ . *Microbiol. Rev.* 48, 299-325.
40. Gething, M. J. and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
41. Gilmour, D. S. and Lis, J. T. (1985). In vivo interactions of RNA polymerase II with genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2009-2018.
42. Gong, Z. (1992). Improved RNA staining in formaldehyde gels. *Biotechniques* 12, 74-75.
43. Greene, J. M. and Kingston, R. E. (1990). TATA-dependent and TATA independent function of the basal and heat shock elements of a human hsp70 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1319-1328.
44. Hartl, F. U., Hlodan, R. and Langer, T. (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* 19, 20-25.
45. Hendrick, J. P. and Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat



shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 349- 384.

46. Hicks, G. R. and Raikhel, N. V. (1995). Protein import into the nucleus: An integrated view. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 155- 188.
47. Hightower, L. E. (1980). Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. Cell. Physiol.* 102, 407-427.
48. Huang, S., Tsai, M. Y., Wu, W. and Wang, C. (1993). Aspartyl residue 10 is essential for ATPase activity of rat hsc70. *J. Biol. Chem.* 268, 2063-2068.
49. Hunt, C. and Morimoto, R. I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82, 6455-6459.
50. Ish-Horowicz, D. and Pinchin, S. M. (1980). Genomic organization of the 87A and 87Cl heat-induced loci of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 142, 231-245.
51. Jans, D. (1995). The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem. J.* 311, 705- 716.
52. Jarvis, D. L., Landford, R. E. and Butel, J. S. (1984). Structural comparisons of wild-type and nuclear transport-defective simian virus 40 large tumor antigens. *Virology* 134, 168-176.
53. Jeoung, D. I., Chen, S., Windsor, J. and Pollack, R. E. (1991). Human major HSP70 protein complements the localization and functional defects of cytoplasmic mutant SV40 T antigen in Swiss 3T3 mouse fibroblast cells. *Genes and Dev.* 5, 2235- 2244.
54. Jindal, S. and Young, R. A. (1992). Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of hsp70 with viral proteins. *J. Virol.* 66,



5357- 5362.

55. Johnston, R. N. and Kucey, B. L. (1988). Competitive inhibition of Hsp70 gene expression causes thermosensitivity. *Science* 242, 1551-1554.
56. Kanei- Ishii, C., Tanikawa, J., Nakai, A., Morimoto, R. I. and Ishii, S. (1997). Activation of heat shock transcription factor 3 by c-Myb in the absence of cellular stress. *Science* 277, 246- 248.
57. Kampinga, H. H., Brunsting, J. F. and Konings, A. W. T. (1992). Acquisition of thermotolerance induced by heat and arsenite in HeLa S3 cells: multiple pathways to induce tolerance? *J. Cell. Physiol.* 150, 406- 415.
58. Kelley, W. and Landry, S. J. (1994). Chaperone power in a virus? *Trends Biochem. Sci.* 19, 277- 278.
59. Kelley, W. L. and Georgopoulos, C. (1997). The T/t common exon of simian virus 40, JC, and BK polyomavirus T antigens can functionally replace the J-domain of the Escherichia coli DnaJ molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3679- 3684.
60. Khandjian, E. W. and Turler, H. (1983). Simian virus 40 and polyomavirus induce synthesis of heat shock proteins in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1- 8.
61. Kierstead, T. D. and Tevethia, M. J. (1993). Association of p53 binding and immortalization of primary C57BL/6 mouse embryo fibroblasts by using simian virus 40 T-antigen mutants bearing internal overlapping deletion mutations. *J. Virol.* 67, 1817-1829.
62. Kingston, R. E., Schuetz, T. J. and Larin, Z. (1987). Heat-inducible human factor that binds to a human hsp70 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1530-1534.
63. Kitay, M. K. and Rowe, D. T. (1996). Protein-protein interactions between

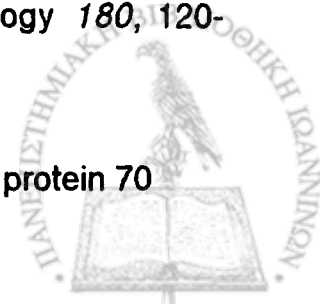


Epstein-Barr virus nuclear antigen-LP and cellular gene products: binding of 70-kilodalton heat shock proteins. *Virology* 220, 91- 99.

64. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680- 685.
65. Lamian, V., Small, G. M. and Feldherr, C. M. (1996). Evidence for the existence of a novel mechanism for the nuclear import of Hsc70. *Exp. Cell. Res.* 228, 84-91.
66. Larson, J. S., Schuetz, T. J. and Kingston, R. E. (1988). Activation in vitro of sequence specific DNA binding by a human regulatory factor. *Nature* 335, 372-375.
67. Laszlo, A. and Li, G. C. (1985). Heat resistant variants of chinese hamster fibroblasts altered in expression of heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8029-8033.
68. Levine, A. J. (1992). The DNA tumor viruses, pp 87-111. In *Viruses. A Scientific American Book*.
69. Lewis, M. J. and Pelham. H. R. B. (1985). Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70kD heat shock protein. *EMBO J.* 4, 3137-3143.
70. Li, G. C. and Werb, Z. (1982). Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3918-3922.
71. Li, G. C., Li, L., Liu, Y. K., Mark, J. Y., Chen, L. and Lee, W. M. F. (1991). Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70kd heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1681-1685.
72. Li, G. C., Li, L., Liu, R. Y., Rehman, M. and Lee, W. M. F. (1992). Hsp70

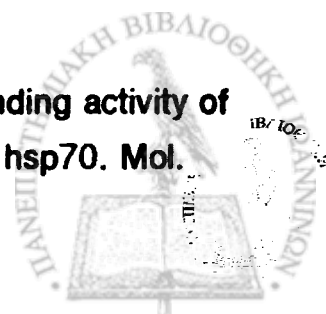
protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2036-2040

73. Liberek, K., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1988). Role of the *Escherichia coli* DnaJ and DnaK heat shock proteins in the initiation of bacteriophage λ DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6632-6636.
74. Lindquist, S. (1986). The heat shock response *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
75. Lindquist, S. (1980). Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: Implications for regulation. *Dev. Biol.* 77, 463-469.
76. Lindquist, S. and Graig, E. A.. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631- 677.
77. Liu, R. Y., Kim, D., Yang, S. H. and Li, G. C. (1993). Dual control of heat shock response: Involment of a constitutive heat shock element binding factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3078-3082.
78. Livak, K. J., Freund, R., Schweber, M., Wensing, P. C. and Meselson, M. (1978). Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5613- 5617.
79. Loffler-Mary, H., Werr, M. and Prange, R. (1997). Sequence- specific repression of cotranslational translocation of the Hepatitis B Virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology* 235, 144- 152.
80. Macejak, D. G. and Luftig, R. B. (1991). Association of hsp70 with the adenovirus type 5 fiber protein in infected Hep- 2 cells. *Virology* 180, 120-125.
81. Macejak, D. G. and Sarnow, P. (1992). Association of heat shock protein 70



with enderovirus capsid precursor P1 in infected human cells. *J. Virol.* 66, 1520- 1527.

82. McKay, D. B., Wilbanks, S. M., Flaherty, K. M., Ha, J-H., O'Brien, M. C. and Shirvanee, L. L. (1994). Stress proteins and their interactions with nucleotides. In: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 153- 177.
83. Milarski, K. L. and Morimoto, R. I. (1986). Expression of human hsp70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9517-9521.
84. Milarski, K. L. and Morimoto, R. I. (1989). Mutational analysis of the human HSP70 protein: Distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. *J. Cell. Biol.* 109, 1947-1962.
85. Mirechi, N. F. and Rossi, J. J. (1990). Use of polymerase chain reaction to detect the expression of the Mr 70,000 heat shock genes in control or heat shock leukemic cells as correlated to their heat response. *Cancer Res.* 50, 2877- 2884.
86. Morimoto, R. I., Hunt, C., Huang, S-Y., Berg, L. K. and Banerji, S. S. (1986). Organisation, nucleotide sequence, and transcription of the chicken hsp70 gene. *J. Biol. Chem.* 261, 12692-12699.
87. Morimoto, R. I. and Milarski, K. L. (1990). Expression and function of vertebrate hsp70 genes. In: *Stress proteins in biology and medicine*, Cold Spring Harbor, NY, pp.323-359.
88. Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259,1409-1410.
89. Mosser, D. D., Duchaine, J. and Massie, B. (1993). The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated in vivo by hsp70. *Mol.*



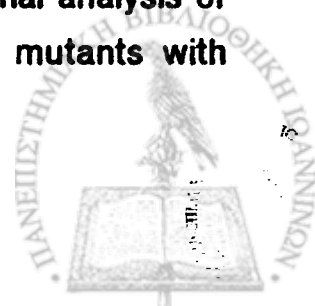
Cell. Biol. 13, 5427-5438.

90. Mudryj, M., Devoto, S. H., Hiebert, S. W., Hunter, T., Pines, J. and Nevins, J. R. (1991). Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell* 65, 1243-1253.
91. Nadeau, K., Das, A. and Walsh, C. T. (1993). Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl propyl isomerases. *J. Biol. Chem.* 268, 1479-1487.
92. Nevins, J. R. (1982). Induction of the synthesis of a mammalian 70 kd heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 29, 913-919.
93. Oglesbee, M., Ringler, S. and Krakowka, S. (1990). Interaction of canine distemper virus nucleocapsid variants with 70kd heat-shock proteins. *J. Gen. Virol.* 71, 1585-1590.
94. Okuno, Y., Imamoto, N. and Yoneda, Y. (1993). 70-kDa heat-shock cognate protein colocalizes with karyophilic proteins into the nucleus during their transport in vitro. *Exp. Cell. Res.* 206, 134- 142.
95. Pages, J., Manteuil, S., Stehelin, D., Fiszman, M., Marx, M. and Girard, M. (1973). Relationship between replication of SV40 DNA and specific events of the host cell cycle. *J. Virol.* 12, 99-107.
96. Palter, K. B., Watanabe, M., Stinson, L., Mahowald, A. P. and Craig, E. A. (1986) Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp70 cognate proteins. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1187- 1203.
97. Parker, C. S. and Topol, J. (1984). A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding activity. *Cell* 36, 357-369.
98. Parker, C. S. and Topol, J. (1984). A *Drosophila* RNA polymerase II



transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene. *Cell* 37, 253-262.

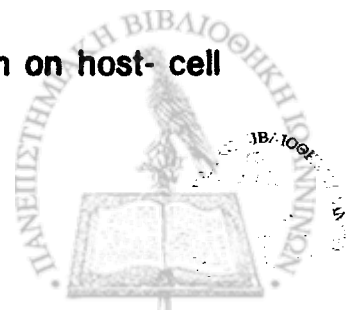
99. Pechan, P. M. (1991). Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Lett.* 280, 1-4.
100. Peden, K. W. C. and Pipas, J. M. (1992). Simian virus 40 mutants with aminoacids substitutions near the amino-terminus of large T antigen. *Virus Genes* 6, 107-118.
101. Pelham, H. R. (1982). A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell* 30, 517- 528.
102. Pelham, H. R. B. (1984). HSP70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* 3, 3095-3100.
103. Pelham, H. R. B. (1986). Speculations on the functions of the major heat shock and glucose regulated proteins. *Cell* 46, 959-961.
104. Perisic, O., Xiao, H. and Lis, J. T. (1989). Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to head-to-tail and tail-to-tail repeats of a conserved 5bp recognition unit. *Cell* 59, 797-806.
105. Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C. and Samuel, C.E. (1987). Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 727- 777.
106. Phillips, B., Abravaya, K. and Morimoto, R.I. (1991). Analysis of the specificity and mechanism of transcriptional activation of the human hsp70 gene during infection by DNA viruses. *J.Virol.* 65, 5608- 5692.
107. Pipas, J. M., Peden, K. W. C. and Nathans, D. (1983). Mutational analysis of simian virus 40 T antigen: isolation and characterization of mutants with deletions in the T-antigen gene. *Mol. Cell. Biol.* 3, 203-213.



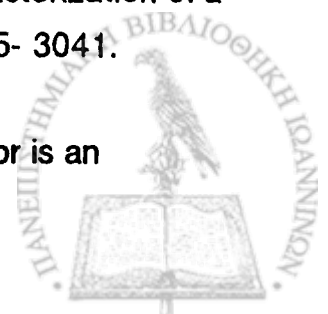
108. Porras, A., Bennett, J., Howe, A., Tokos, K., Bouck, N., Henglein, B., Sathyamangalam, S., Thimmapaya, B. and Rundel, K. (1996). A novel simian virus 40 early region domain mediates transactivation of the cyclin A promoter by small-t antigen and is required for transformation in small-t antigen-dependent assays. *J. Virol.* 70, 6902-6908.
109. Prives, C. (1990). The replication functions of SV40 T antigen are regulated by phosphorylation. *Cell* 61, 735-738.
110. Rabidran, S. K., Haroun, R. I., Clos, J. and Wu, C. (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* 259, 230-234.
111. Rajan, P., Swaminathan, S., Zhu, J., Cole, C. N., Barber, G., Tevethia, M. J. and Timmapaya, B. (1995). A novel translational regulation function for the simian virus 40 large T antigen gene. *J. Virol.* 69, 785- 795.
112. Riabowol, K. T., Mizzen, L. A. and Welch, W. J. (1988). Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242, 433- 436.
113. Rigby, P. W. J., Dieckman, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
114. Ritossa, F.M. (1962). A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573.
115. Sagara, J. and Kawai, A. (1992). Identification of heat shock protein 70 in the rabies virion. *Virology* 190, 845-848.
116. Sainis, I., Angelidis, C., Pagoulatos, G. and Lazaridis, I. (1994). The hsc70 gene which is slightly induced by heat is the main virus inducible member of the hsp70 gene family. *FEBS Letters* 355, 282- 286.



117. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
118. Samuel, C. E. (1993). The eIF- 2 alpha kinase, regulators of translation in eukaryotes from yeast to human. *J. Biol. Chem.* 268, 7603- 7606.
119. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463.
120. Santoro, M. G. (1996). Viral infection. In: *Stress inducible cellular Responses*. Birkhauser Verlag pp 339-340
121. Santomenna, L.D. and Colberg-Poley, A.M. (1990) Induction of cellular hsp70 expression by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 64, 2033- 2040.
122. Sarge, K., Murphy, S. P. and Morimoto, R.I. (1993). Activation of heat shock transcription by HSF1 involves oligomerization, acquisition of DNA binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1392-1407.
123. Sawai, E. T. and Butel, J.S. (1989). Association of a cellular heat shock protein with simian virus 40 large T antigen in transformed cells. *J. Virol.* 63, 3961-3973.
124. Sawai, E. T. and Butel, J.S. (1992). Epitope mapping and conformational analysis of SV40 T antigen deletion mutants. *Virology* 189, 782- 785.
125. Sawai, E. T., Rasmussen, G. and Butel, J. S. (1994). Construction of SV40 deletion mutants and delimitation of the binding domain for heat shock protein to the amino terminus of large T- antigen. *Virus Res.* 31, 367- 378.
126. Schneider, R. J. and Shenk, T. (1987). Impact of virus infection on host- cell protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 317- 332.

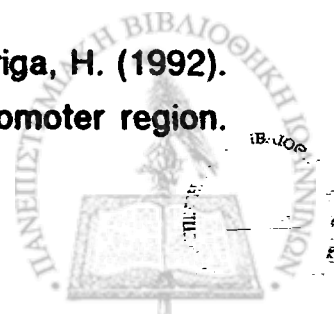


127. Sedger, L. and Ruby, J. (1994). Heat shock response to vaccinia virus infection. *J. Virol.* 68, 4685-4689.
128. Sheng, O., Denis, D., Ratnofsky, M., Roberts, T. M., DeCaprio, J. A., and Schaffhausen, B. (1997). The DnaJ domain of polyomavirus large T antigen is required to regulate Rb family tumor suppressor function. *J. Virol.* 71, 9410-9416.
129. Shi, Y. and Thomas, J.O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2186- 2192.
130. Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M. M., Nomura, M. and Goldfarb, S.D. (1996). In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: A role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell. Biol.* 135, 329- 339.
131. Simon, M. C., Kitchener, K., Kao, H. T., Hickey, E., Weber, L., Voellmy, R., Heintz, N. and Nevins, J.R. (1987). Selective induction of human heat shock gene transcription by the adenovirus E1A gene products, including the 12S E1A product. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2884-2890.
132. Simon, C. M., Fisch, T. M., Benecke, B. J., Nevins, J. R. and Heintz, N. (1988). Definition of multiple, functionally distinct TATA elements, one of which is a target in the hsp70 promoter for E1A regulation. *Cell* 52, 723- 729.
133. Skowyra, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1990). The *E.coli* dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat - inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis- Dependent manner. *Cell* 62, 939-944.
134. Sorger, P. K. and Pelham, H. R. B. (1987). Purification and characterization of a heat shock element binding protein from yeast. *EMBO J.* 6, 3035- 3041.
135. Sorger, P. K. and Pelham, H. R. B. (1988). Yeast heat shock factor is an

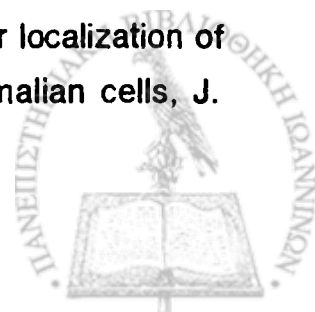


essential DNA- binding protein that exhibits temperature- dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855- 864.

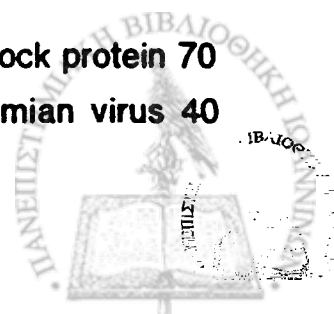
136. Sorger, P. K. and Nelson, H. C. M. (1989). Trimerization of yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59, 807-813.
137. Sorger, P. K. (1990). Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell* 62, 739-805.
138. Spence, S. L. and Pipas, J. M. (1994). SV40 large T antigen functions at two distinct steps in virion assembly. *Virology* 204, 200-209.
139. Srinivasan, A., McClellan, A. J., Vartikar, J., Marks, I., Cantapulo, P., Li, Y., Whyte, P., Runtell, K., Brodsky, J. L. and Pipas, J. M. (1997). The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4761- 4773.
140. Stubdal, H., Zalvide, J. and DeCaprio, J. (1996). Simian virus 40 large T antigen alters the phosphorylation state of the Rb-related proteins p130 and p107. *J. Virol.* 70, 2781-2788.
141. Stubdal, H., Zalvide, J., Campbell, K. S., Schweitzer, C., Roberts, T. M. and DeCaprio, J. (1997). Inactivation of pRb-related proteins p130 and p107 mediated by the J domain of Simian Virus 40 large T antigen. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4979- 4990.
142. Sugito, K., Yamane, M., Hattori, H., Hayashi, Y., Tohnai, I., Ueda, M., Tsuchida, N., Ohtsuka, K. (1995). Interaction between hsp70 and hsp40, eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ, in human cells expressing mutant-type p53. *FEBS Let.* 358, 161- 164.
143. Taira, T., Negishi, Y., Kihara, F., Iguichi-Arigo, S. M. M. and Ariga, H. (1992). c-myc protein complex binds to two sites in human hsp70 promoter region. *Bioch. Bioph. Acta* 1130, 166- 174.



144. Taylor, I. C. A., Solomon, W., Weiner, B. M., Paucha, E., Bradley, M., and Kingston, R.E. (1989). Stimulation of the human heat shock protein 70 promoter in vitro by simian virus 40 large T antigen. *J. Biol. Chem.* 264, 16160-16164.
145. Terlecky, S. R., Chiang, H. L., Olson, T. S., and Dize, J. F. (1992). Protein and peptide binding and stimulation of in vivo lysosomal proteolysis by the 73-kda heat shock cognate protein. *J. Biol. Chem.* 267, 9202-9209.
146. Tissieres, A., Mitcell, H. K. and Tracy, V.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84, 389-398.
147. Tooze, J. (1973). The molecular biology of tumor viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 823.
148. Velazquez. J. M., Sonoda, S., Bugaiski, G., Lindquist, S. (1983). Is the major *Drosophila* heat shock protein present in cells that have not been heat shocked? *J. Cell. Biol.* 96, 286-290.
149. Velasquez, J. M. and Lindquist, S. (1984). Hsp70: nuclear concentration during enviromental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 36, 655- 662.
150. Wang, C. and Lee, M.R. (1993). High-level expression of soluble rat hsc70 in *Escherichia coli*: purification and characterization of the cloned enzyme. *Biochem. J.* 294, 69-77.
151. Wang, T. F., Chang, J. and Wang,C. (1993). Idendification of the peptide binding domain of hsc70. *J. Biol.Chem.* 268, 26049-26051.
152. Welch, W. J. and Feramisco, J.R. (1984). Nuclear and nucleolar localization of the 72000 dalton heat shock protein in heat - shocked mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 259, 4501- 4510.



153. Welch, W. J. and Feramisco, J. R. (1985). Rapid purification of mammalian 70,000kd stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1229-1236.
154. Welch, W. J. and Suhan, J.P. (1986). Cellular and biochemical events in mammalian cells during and recovery from physiological stress. *J. Cell. Biol.* 103, 2035-2053.
155. Welch, W. J. and Mizzen, L. A. (1988). Characterization of the thermotolerant cell. Effects on the intracellular distribution of heat shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J. Cell. Biol.* 106, 1117-1130.
156. Westwood, J. T., Clos, J. and Wu, C. (1991). Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat shock factor. *Nature* 353, 822-827.
157. White, E., Spector, D. and Welch, W. (1988). Differential distribution of the adenovirus E1A proteins and colocalization of E1A with the 70- Kilodalton cellular heat shock protein in infected cells. *J. Virol.* 62, 4153- 4166.
158. Wu, C. (1985). An exonuclease protection assay reveals heat-shock element and TATA box DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. *Nature* 317, 84-87.
159. Wu. B., Hunt, C. and Morimoto, R. (1985). Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein Hsp70. *Mol. Cell. Biol.* 5, 330-341.
160. Xiao, H. and Lis, J.T. (1988). Germline transformation used to define key features of heat shock response elements. *Science* 239, 1139-1142.
161. Yang, J. and DeFranco, D.B. (1994). Differential roles of heat shock protein 70 in the in vitro nuclear import of glucocorticoid receptor and simian virus 40 large tumor antigen. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5088- 5098.



162. Yost, H. J., Petersen, R. B. and Lindquist, S. (1990a). RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response. *Trends in Genet.* 6, 223-227.
163. Yost, H. J., Petersen, R. B. and Lindquist, S. (1990b). Posttranscriptional regulation of heat shock protein synthesis in *Drosophila*. In: *Stress proteins in biology and medicine* Cold Spring Har Press pp 379-409.
164. Zalvide, J., Stubdal, H. and DeCaprio, J. A. (1998). The J domain of simian virus 40 large T antigen is required to functionally inactivate Rb family proteins. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1408- 1415.
165. Zimarino, V. and Wu, C. (1987). Induction of sequence specific binding of *Drosophila* heat shock activator protein without protein synthesis. *Nature* 327, 727-730.
166. Zyclicz, M., Ang, D., Liberek, K. and Georgopoulos, C. (1989). Initiation of λ DNA replication with purified host and bacteriophage-encoded proteins: the role of the dnaK, dnaJ and grpE heat shock proteins. *EMBO J.* 8, 1601-1608.



ΕΙΚΟΝΕΣ - ΣΧΗΜΑΤΑ ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ



ΣΧΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

- Σχήμα 1:** Σχηματική σύνοψη των συνθηκών που επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (με βάση τη δημοσίευση των Morimoto και Milarski 1990).
- Σχήμα 2:** Λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών hsc70 και hsp70.
- Σχήμα 3:** Σχηματική απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών του T αντιγόνου, του ιού SV40 (με βάση τη δημοσίευση των Srinivasan et al.1997).
- Εικόνα 1:** Αυτοραδιογραφία φίλτρων με πλάκες φάγων, μετά από επώαση με τον ραδιενεργό ανιχνευτή (first and second screen).
- Εικόνα 2:** Ηλεκτροφόρηση, σε πηκτή αγαρόζης, του DNA των κλώνων που απομονώθηκαν, μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoR1. Εκτίμηση του μεγέθους των ενθεμάτων.
- Εικόνα 3:** Ανάλυση κατά Northern μερικών από τους κλώνους που απομονώθηκαν κατά την πρώτη αναζήτηση στη βιβλιοθήκη.
- Εικόνα 4:** Επιλογή RNA με υβριδισμό σε φίλτρο (Hybrid RNA selection) - Μετάφραση του επιλεγέντος RNA in vitro.
- Εικόνα 5:** Περιοριστικός χάρτης του κλώνου 538.
- Εικόνα 6:** Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ της hsc70 του πιθήκου (κλώνος 538) και της ανθρώπινης hsc70.
- Εικόνα 7:** In vitro μεταγραφή και μετάφραση του κλώνου 538.
- Εικόνα 8:** Ανάλυση κατά Northern δύο θερμικά επαγόμενων κλώνων.
- Εικόνα 9:** Περιοριστικός χάρτης του κλώνου 1101.
- Εικόνα 10:** Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ της hsp70 του πιθήκου (κλώνος 1101) και της ανθρώπινης hsp70.
- Εικόνα 11:** Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ της hsc70 (κλώνος 538) και της hsp70 (κλώνος 1101) του πιθήκου.
- Εικόνα 12:** Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, της κατανομής σε ιστούς, του mRNA που αντιστοιχεί τόσο στην hsp70 (κλώνος 1101) όσο και στην hsc70 (κλώνος 538).
- Εικόνα 13:** Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsp70 (κλώνος 1101) όσο και στην hsc70

(κλώνος 538), μετά από παρατεταμένο θερμικό σοκ.

- Εικόνα 14:** Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70 (κλώνος 1101), κατά τη διάρκεια λυτικής μόλυνσης κυττάρων CV1 με τον ιό SV40.
- Εικόνα 15:** Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70 (κλώνος 1101), μετά από λυτική μόλυνση κυττάρων HeLa με τον Αδενοϊό (Ad5).
- Εικόνα 16:** Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70 (κλώνος 1101) κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα CV1.
- Εικόνα 17:** Μελέτη, με αποτύπωση κατά Northern, των επιπέδων mRNA που αντιστοιχούν τόσο στην hsc70 (κλώνος 538) όσο και στην hsp70 (κλώνος 1101) κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα HeLa.
- Εικόνα 18:** Μελέτη, με ανοσοφθορισμό, της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα CV1.
- Εικόνα 19:** Μελέτη, με ανοσοφθορισμό, της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 κατά τη διάρκεια λυτικής ιικής μόλυνσης κυττάρων CV1 με τον ιό SV40.
- Εικόνα 20:** Μελέτη, με ανοσοφθορισμό, της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 κατά τη διάρκεια ιικής μόλυνσης μη επιτρεπτικών για τον ιό SV40 κυττάρων NIH3T3.
- Εικόνα 21:** Μελέτη, με ανοσοφθορισμό, της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 κατά τη διάρκεια ιικής μόλυνσης μη επιτρεπτικών για τον ιό SV40 κυττάρων BALBc/3T3.
- Εικόνα 22:** Μελέτη, με ανοσοφθορισμό, της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 σε μετασχηματισμένα με το T αντιγόνο του ιού SV40 κύτταρα COS.
- Εικόνα 23:** Μελέτη, με ανοσοφθορισμό, της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 σε μετασχηματισμένα με το T αντιγόνο του ιού SV40 κύτταρα NIH3T3/T.



- Εικόνα 24:** Σύγκριση μεταξύ της ενδοκυττάριας κατανομής της hsc70 σε κύτταρα CV1 μετά από μόλυνση με τον ιό SV40 και μετά από θερμικό σοκ.
- Εικόνα 25:** Μη ειδική σύνδεση της hsc70 με το σύμπλεγμα σεφαρόζης - πρωτεΐνης A.
- Εικόνα 26:** Συνανοσοκαθίζηση T αντιγόνου - πρωτεΐνης του Ρετινοβλαστώματος (Rb) σε εκχυλίσματα κυττάρων CV1 τα οποία είχαν μολυνθεί με τον ιό SV40.
- Εικόνα 27:** Ανοσοκαθίζηση σε εκχυλίσματα μολυσμένων με τον ιό SV40 κυττάρων CV1 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του T αντιγόνου (Pab416). Ανίχνευση τόσο για T αντιγόνο όσο και για hsc70.
- Εικόνα 28:** Ανοσοκαθίζηση σε εκχυλίσματα μολυσμένων με τον ιό SV40 κυττάρων CV1 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της hsc70 (SPA 815). Ανίχνευση τόσο για hsc70 όσο και για T αντιγόνο.
- Εικόνα 29:** Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και T αντιγόνου σε μολυσμένα μη επιτρεπτικά κύτταρα (BALBc/3T3 και NIH/3T3).
- Εικόνα 30:** Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και της όψιμης πρωτεΐνης VP1 του ιού SV40 σε μολυσμένα επιτρεπτικά κύτταρα.
- Εικόνα 31:** Ανίχνευση πρωτεϊνικών επαφών μεταξύ hsc70 και T αντιγόνου σε μολυσμένα επιτρεπτικά κύτταρα CV1 τα οποία υπέστησαν παράλληλα επίδραση με INF-γ.

ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΙΣ

Αμινοξέα:

A ή Ala: αλανίνη
 B ή Asx: ασπαραγίνη/ασπαραγινικό οξύ
 C ή Cys: κυστείνη
 D ή Asp: ασπαραγινικό οξύ
 E ή Glu: γλουταμινικό οξύ
 F ή Phe: φαινυλαλανίνη
 G ή Gly: γλυκίνη
 H ή His: ιστιδίνη
 Hyp: υδροξυπρολίνη
 I ή Ile: ισολευκίνη
 K ή Lys: λυσίνη
 L ή Leu: λευκίνη
 M ή Met: μεθειονίνη
 N ή Asn: ασπαραγίνη
 P ή Pro: προλίνη
 Q ή Gln: γλουταμίνη
 R ή Arg: αργινίνη
 S ή Ser : σερίνη
 T ή Thr: θρεονίνη
 V ή Val: βαλίνη
 W ή Trp: τρυπτοφάνη
 Y ή Tyr: τυροσίνη
 Z ή Glx: γλουταμίνη/γλουταμινικό οξύ

E_I Amp: ampicillin, αμπικιλλίνη.
 APS: Ammonium Persulphate
 ATP: αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ

E_{II} Bluescript: Bluescript KS M13 (+).
 BSA: bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός.
 cDNA: complementary DNA, συμπληρωματικό DNA.
 c-myc: cellular myc, πρωτοογκογονίδιο c-myc
 cpm: counts per minute, αριθμός κρούσεων ανά λεπτό.



- dATP: τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη
- dCTP: τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη
- dGTP: τριφωσφορική δεοξυγουανίνη
- dTTP: τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη
- DDT: dithiotreitol, διθειοθρεϊτόλη.
- DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium, θρεπτικό υλικό DMED.
- DMSO: dimethyl sulphoxide, διμεθυλσουλφοξείδιο.
- DNAse: δεοξυριβονουκλεάση
- EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ.
- E1A: early region 1A, πρώιμη μεταγραφική μονάδα του αδενοϊού 1A.
- FCS: fetal calf serum, εμβρυϊκός ορός μόσχου.
- FITC: fluorescein isothiocyanate, ισοθειοκυανική φλουρεσκίνη.
- HEPES: (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethane-sulfonic acid]),
(N-[2-υδροξυαιθυλο] πιπεραζίνη-N-[2 αιθανο σουλφονικό οξύ]).
- HSE: ρυθμιστικό στοιχείο του θερμικού σοκ
- Hsc70: Heat shock cognate 70, πρωτεΐνη συγγενική
της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 70 kDa.
- Hsp 70: Heat shock protein 70, πρωτεΐνη του θερμικού σοκ 70 kDa.
- HSTF : μεταγραφικός παράγοντας του θερμικού σοκ
- kDa: kilodaltons, μονάδα μοριακής μάζας $\times 10^3$.
- LB: Luria-Bertani medium, θρεπτικό υλικό Luria-Bertani.
- LB amp: θρεπτικό υλικό Luria-Bertani με αμπικιλίνη.
- MB: μοριακό βάρος.
- Mops: 3-(N-morpholino) propanesulphonic acid,
3-(N-μορφολινο) προπανσουλφονικό οξύ.
- mRNA: messenger RNA, μήνυμα RNA.
- NP-40: Nonidet P-40 (octylphenoxy ethanol), οκτυφαινοξυ αιθανόλη.
- PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση πηκτής
πολυακρυλαμίδιου.
- PBS: phosphate buffer saline, φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.
- POPOP: (1,4-bis [5-phenyl-2-oxazolyl]-benzene; 2,2-p-phenylene bis
[5-phenyloxazole]), (1,4-δισ [5-φαινυλ-2-οξαζολυλ]-βενζο-2,
2-π-φαινυλενο δισ [5-φαινυλοξαζόλιο]).
- PPO: 2,5-diphenyloxazole, 2,5-διφαινυλοξαζόλιο.



- RNAse: ριβονουκλεάση
SDS: sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλικό νάτριο.
SV40: Simian Vacuolating virus
TCA: trichloroacetic acid, τριχλωρο οξικό οξύ.
TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine,
N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη.
VP1: Viral Protein 1, ιική καψιδιακή πρωτεΐνη
v/v: volume per volume, όγκος κατ' όγκο.
w/v: weight per volume, βάρος κατ' όγκο.

I

E

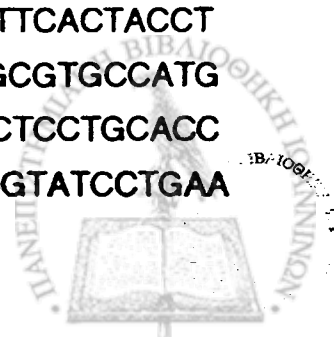
Ei



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

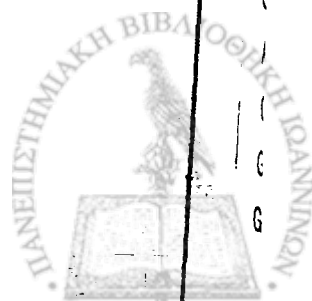
ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ 538 (HSC 70 ΠΙΘΗΚΟΥ)
X 73685, EMBL DATA BANK

CATGTCCAAGGGACCTGCAGTTGGTATTGATCTTGGCACCCACCTACTCTTGTGTGG
GTGTTTTCCAGCACGGAAAAGTAGAGATAATTGCCAATGATCAGGGAAACCGAACC
ACTCCAAGCTATGTTGCCTTTACGGACACTGAACGGTTGATCGGTGATGCTGCAAA
GAATCAAGTTGCAATGAACCCCAACACAGTTTTTCGATGCCAAACGTCTGATTG
ACGCAGATTTGATGATGCTGTTGTCCAGTCTGATATGAAGCATTGGCCCTTCATGG
TGGTGAATGATGCTGGCAGGCCCAAGGTCCAAGTAGAATATAAGGGAGAGACCAA
AAGCTTCTATCCAGAGGAGGTATCATCTATGGTTCTGACAAAGATGAAGGAAATTG
CAGAAGCCTATCTTGGGAAGACTGTTACCAATGCTGTGGTCACAGTGCCAGCTTAT
TTAATGATTCTCAGCGTCAGGCTACCAAAGATGCTGGAACCTATTGCTGGTCTCAAT
GTACTTAGAATTATTAATGAGCCAACTGCTGCTGCTATTGCTTACGGCTTAGACAAA
AAGGTTGGAGCAGAAAGAAACGTGCTCATCTTTGACCTGGGAGGTGGCACTTTTCG
ATGTGTCAATCCTCACTATTGAGGATGGAATCTTTGAGGTCAAGTCTACAGCTGGA
GACACCCACTTGGGTGGAGAAGATTTTGACAACCGAATGGTCAACCATTTTATTGC
AGAGTTCAAGCGCAAGCATAAGAAGGACATCAGCGAGAACAAGAGAGCTGTAAGA
CGCCTTCGTACTGCTTGTGAACGTGCTAAGCGTACGCTCTCTTCCAGCACCCAGGC
CAGTATTGAGATCGATTCTCTCTATGAAGGAATCGACTTCTATACCTCCATTACCCG
TGCCCGATTTGAAGAATTGAATGCTGACCTGTTCCGTGGCACCCCTGGACCCAGTAG
AGAAAGCCCTTCGAGATGCCAAACTAGACAAGTCACAGATTCATGATATTGTCCTG
GTTGGTGGTTCTACTCGTATCCCCAAGATTCAGAAGCTTCTCCAAGATTTCTTCAAC
GGAAAAGAAGTGAATAAGAGCATCAACCCTGATGAAGCTGTTGCTTATGGTGCAGC
TGTCAGGCAGCCATCTTGTCTGGAGACAAGTCTGAAAATGTTCAAGATTTGTTGC
TCTTGGATGTCACCTCCTCTTTCCCTTGGTATTGAAACTGCTGGTGGAGTAATGACTG
TCCTTATTAACGTAATACCACCATTCCTACCAAGCAGACACAGACCTTCACTACCT
ATTCTGACAACCAGCCTGGTGTGCTTATTCAGGTCTATGAAGGTGAGCGTGCCATG
ACCAAGGATAACAACCTGCTTGGCAAGTTTGAACCTCACGGGCATACCTCCTGCACC
CCGAGGTGTTCTCAGATTGAAGTCACTTTTGACATTGATGCCAATGGTATCCTGAA



TGTCTCTGCTGTGGACAAGAGTACAGGAAAAGAGAATAAGATTACTATCACTAATG
ACAAGGGCCGTTTGAGCAAGGAAGACATTGAACGTATGGTCCAGGAAGCTGAGAA
GTACAAAGCTGAAGATGAGAAGCAGAGGGACAAGGTATCATCAAAGAATTCACTT
GAGTCCTATGCATTCAACATGAAAGCAACTGTCGAAGATGAGAACTTCAAGGCAA
GATTAACGATGAGGACAAACAGAAGATTCTGGACAAGTGTAATGAAATTATCAACT
GGCTTGATAAGAATCAGACGGCTGAAAAGGAAGAGTTTGAACATCAGCAGAAAGA
GCTGGAGAAAGTTTGCAACCCCATCATCACCAAGCTGTACCAGAGTGCAGGAGGC
ATGCCAGGAGGAATGCCTGGGGGATTCCCTGGTGGTGGAGCTCCTCCCCCTGGTG
GTGCTTCCTCAGGGCCCCACTATTGAAGAGGTTGATTAAGCCAACCAAGTATAGGT
GTAGCATTGTTCCACACATTTAAAACATTTGAAGGACCTAAATTTGTAGTAAATTCT
GTGGCAGTTTTAAAAAGTTAAGCTGCTATAGTAAGTTACTGGGCATTCTCAATACTT
GAATATGGAACATGCACAGGGGAAGGAAATAACATTGCACTTTATAAACTGTATTG
TAAGTGGAATAATGCAAGGTCTTAATAAAACAATTTAAAATTGGCACC

* Σημειώνονται με έντονους χαρακτήρες, τα κωδικώνια έναρξης και λήξης, ενώ είναι υπογραμμισμένη η αλληλοδιαδοχή σήματος προσθήκης polyA.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

**ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΥ 1101 (HSP 70 ΠΙΘΗΚΟΥ)
X 70684, EMBL DATA BANK**

GAATTCGGTTTCTAGAGCGTGGCTCCCGTTGTCCCGAGGCTTCCCAGAGCGAACCT
GTGCGGCTGCAGGCACCAGCGCCGTTGAGTTTCCGGCGTTCCGGAGGACTGAGCT
CTTGTCACGGGTCCCGTCCGCCGTTTCCAGTCCCGAATCTCGGAGCGGACGAGAC
AGCAGGGCACCGGCATGGCCAAAGCCGCGGCGATCGGCATCGACCTGGGCACCA
CCTACTCCTGTGTGGGGGTGTTCCAGCACGGCAAGGTGGAGATCATCGCCAACGA
CCAGGGCAACCGCACCCACCCAGCTACGTGGCTTTCACAGACACCGAGCGGCTG
ATCGGGGATGCGGCCAAGAACCAGGTGGCGCTGAACCCGCGAGAACACCGTGTTTG
ACGCGAAACGGCTGATCGGCCGCAAGTTCGGCGACCCGGTGGTGACGTCGGACA
TGAAGCACTGGCCTTTCAGGTGATCAACGACGGAGACAAGCCCAAGGTGCAGGT
GAGCTACAAGGGGGAGACCAAGGCATTCTACCCTGAGGAGATCTCGTCCATGGTG
CTGACCAAGATGAAGGAGATCGCCGAGGCTGACCTGGGCTACCCGGTGACCAACG
CGGTGATCACCGTGCCGGCCTACTTCAACGACTCGCAGCGCCAGGCCACCAAGGA
TGCGGGGGGTGATCGCGGGTCTCAACGTGCTGCGGATCATCAACGAGCCCACGCGC
ACGATCGCCTACGCGCTGGACAGAACGGGCAAGGGGGAGCGCAACGTCCTGATC
TTTGACCTGGGTGGGGGCACCTTCGACGTGTCCATCCTGACGATCGACGACGGCA
TCTTCGAGGTGAAAGCCACGGCCGGGGACACCACCTGGGTGGAGGACTTTGACAA
CAGGCTGGTGAACCACTTCGTGGAGGAGTTCAAGAGAAAACACAAGAAGGACATC
AGCCAGAACAAAGCGAGCCGTGAGGCGGCTGCGCACCGCCTGCGAGAGGGCCAAG
AGGACCCTGTCGTCCAGCACCCAGGCCAGCCTGGAGATCGACTCCCTGTTTGAGG
GCATCGACTTCTACACGTCCATCACCAGGGCGAGGTTTCGAGGAGCTGTCCTCGGA
CCTGTTCCGAAGCACCCCTGGAGCCCGTGGAGAAGGCTCTGCGCGACGCCAAGCTG
GACAAGGCCCAGATCCACGACCTGGTCCTGGTCGGGGGCTCTACCCGCATCCCCA
AGGTGCAGAAGCTGCTGCAGGACTTCTTCAACGGGCGCGACCTGAACAAGAGCAT
CAACCCCGACGAGGCTGTGGCCTACGGGGCGGCGGTGCAGGCGGCCATCCTGAT
GGGGGACAAGTCCGAGAACGTGCAGGACCTGCTGCTGCTGGACGTGGCTCCGCT
GTCGCTGGGGCTGGAGACGCCAGGAGGCGTGATGACTGCCCTGATCAAGCGCAA



CTCCACCATCCCCACCAAGCAGACGCAGATCTTCACCACCTACTCGGACAACCAAC
 CCGGGGTGCTGATCCAGGTGTACGAGGGCGAGAGGGCCATGACGAAGGACAACA
 ATCTGCTGGGGCGCTTCGAGCTGAGCGGCATCCCTCCGGCCCCAGGCGTGCCCCA
 GATCGAGGTGACCTTCGAGATCGATGCCAACGGCATCCTGAACGTCACGGCCACG
 GACAAGAGCACCGGCAAGGCCAACAAGATCACCATCACCAACGACAAGGGCCGCC
 TGAGCAAGGAGGAGATCGAGCGCATGGTGCAGGAGGCAGAGAAGTACAAAGCGG
 AGGACGAGGTGCAGCGCGAGAGGGTGTGAGCCAAGAACGCCCTGGAGTCATACG
 CCCTCAACATGAAGAGCGCCGTGGAGGATGAGGGGCTCAAGGGCAAGATCAGCG
 AGGCCGACAAGAAGAAGGTGCTGGACAAGTGTCAAGAGGTCATCTCGTGGCTGGA
 TGCCAACACCCTGGCCGAGAAGGACGAATTTGAGCACAAGAGGAAGGAGCTGGA
 GCAGGTGTGTAACCCCATCATCAGCGGACTGTACCAGGGTGGGGGTGGTCCTGGG
 CCTGGCGGCTTCGGGGCTCAGGGTCCCAAGGGAGGGTCTGGGTCCGGCCCCACC
 ATTGAGGAGGTAGATTAGGACCTTGCTTCCTTATTATGTTTGTCTTTGAGGTGGAC
 TGTTTGA CTCAAGGACTTTGCTGCCGTTTTCCTATGTCATTTTTGCTTCAGCTCTTTG
 CTGCTTCACTTCTTTGTAAAGTTGTATCCTGATGGTAATTAGCTGGCTTCATTATTT
 GTAGTACAACCAATATGTTTATTAGCATTTCTTTGCATTTAATGTTGATACTGTAAGG
 GTGTTTCGTTCCCTTTAAATGAACCAACACTGCCACCTTCTGTACGAGTTCTTTCTTT
 CCTTCTTGCTTTGGGAAAACACCTACAAAGGGCCTTGGGGAATGTATGTTTTATAA
 TTTGTTTACTTAAATATGAAAAATAAAATGTTAAAGGAATTC

*Σημειώνονται με έντονους χαρακτήρες, τα κωδικώνια έναρξης και λήξης, ενώ είναι υπογραμμισμένη η αλληλοδιαδοχή σήματος προσθήκης polyA.

