

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200252



Αρ. εις:.....581.....2005



A

313

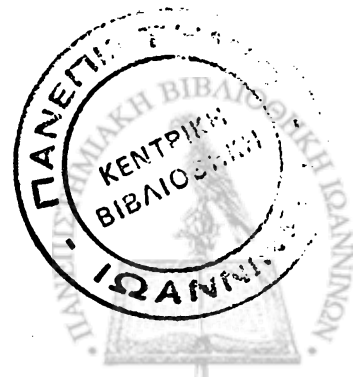
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝΑΣ ΓΕΩΡΓΑΤΟΣ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ HSP70
IN VITRO ΚΑΙ *IN VIVO*

ΠΕΤΡΟΣ Χ. ΜΠΟΖΙΔΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



[Faint, mostly illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ημερομηνία αίτησης: 26-6-1996

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 308α/17-9-1996

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Παγουλάτος Γεράσιμος, Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, μέλος
Λαζαρίδης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, μέλος
Αγγελίδης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, επιβλέπων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 1-4-1997

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 12-11-2004

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Τσιάνος Επαμεινώνδας, Καθηγητής Παθολογίας

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Παγουλάτος Γεράσιμος, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων, μέλος
Γεωργάτος Σπύρος, Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, μέλος
Καναβάρος Παναγιώτης, Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, μέλος
Σκούρας Ζαχαρίας, Καθηγητής Γενετικής, μέλος
Λαζαρίδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, μέλος
Τζαβάρας Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, μέλος
Αγγελίδης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, επιβλέπων

Βαθμός: Άριστα

Η Γραμματέας της Σχολής

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



Στους αγαπημένους μου γονείς
Ευτυχία και Χρήστο,
για την αμέριστη υποστήριξη τους.



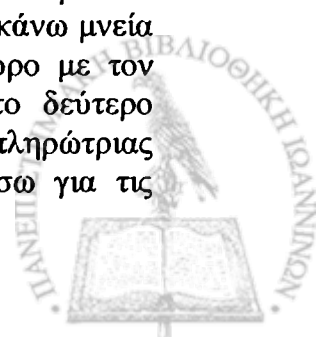
ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η άμεση επίβλεψη της, ανήκει στον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας, κ. Αγγελίδα Χαράλαμπο, τον οποίο και ευχαριστώ για την καθοριστική συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, τόσο όσον αφορά στην επιστημονική καθοδήγηση όσο και στην αντιμετώπιση των διαφόρων δυσκολιών που ανέκυψαν. Τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας, κ. Λαζαρίδη Ιωάννη, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής αυτής καθώς και για τις ατελείωτες ώρες συζητήσεων επί ποικίλων βιολογικών ερωτημάτων. Τον τέως Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας, Ομότιμο Καθηγητή Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων, κ. Παγουλάτο Γεράσιμο, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλλε και για το συνεχές ενδιαφέρον που επέδειξε για την εξέλιξη αυτής της μελέτης. Τον νυν Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας Καθηγητή, κ. Γεωργάτο Σπυριδώνα, μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, ευχαριστώ για το ενδιαφέρον του και για την δυνατότητα που μου παρείχε να ολοκληρώσω τη διατριβή μου απρόσκοπτα, μετά το διορισμό μου στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θέλω επίσης, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κ. Σκούρα Ζαχαρία, μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, καθώς και τον Καθηγητή Ανατομίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Καναβάρο Παναγιώτη, μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για τον χρόνο που διέθεσαν προκειμένου να αξιολογήσουν την παρούσα μελέτη.

Ευχαριστώ επίσης, τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας κ. Τζαβάρα Θεόδωρο, μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής και την Επίκουρη Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας κ. Σύρρου Μαρίκα για την καλή συνεργασία και την εποικοδομητική ανταλλαγή απόψεων, όλο αυτό το διάστημα. Επιπλέον, τον κ. Εξάρχου Ιωάννη, την κ. Τσουμάνη Ανδρομάχη, την κ. Γιώτη - Οικονόμου Βασιλεία και τον κ. Οικονόμου Χριστόδουλο, τους ευχαριστώ θερμά γιατί με τις συμβουλές τους, το ενδιαφέρον τους για τις προσωπικές δυσκολίες και την ηθική και ψυχολογική τους στήριξη μου πρόσφεραν δύναμη για την συνέχιση αυτής της πορείας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στους συναδέλφους υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας για την ηθική συμπαράσταση, για την άδολη συνεργασία και την φιλική και συντροφική ατμόσφαιρα όλα αυτά τα χρόνια. Μεταξύ αυτών ξεχωριστή για μένα θέση κατέχουν οι : Δρ. Σαΐνης Ιωάννης, ο κ. Τζάλλας Σωτήρης, η κ. Γιωτοπούλου Στέλλα και η κ. Σαλμά Αθανασία.

Ευχαριστίες, θέλω να απευθύνω, στο προσωπικό των «αδερφών» Εργαστηρίων, της Φυσιολογίας και της Βιολογικής Χημείας. Από το πρώτο, θα πρέπει να αναφερθώ στις χρήσιμες συμβουλές και την εν γένει συμπαράσταση της Επίκουρου καθηγήτριας κ. Βεζυράκη Πατρώνας, καθώς και την παραγωγική ανταλλαγή απόψεων με τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κωλλέτα Ευάγγελο. Δεν θα παραλείψω όμως, να κάνω μνεία στον αγαπητό συνάδερφο του ίδιου εργαστηρίου, Δρ. Θωμά Χριστόφορο με τον οποίο όλο αυτό το διάστημα είχαμε μια άψογη συνεργασία. Από το δεύτερο εργαστήριο, θα ήθελα να σταθώ αφενός στο πρόσωπο της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Φράγκου - Λαζαρίδη Μαρίας και να την ευχαριστήσω για τις



εύστοχες παρατηρήσεις της και την μεταβίβαση θετικής ενέργειας σε στιγμές αναγκαίες και αφετέρου στο πρόσωπο της συναδέρφου και φίλης κ. Ταβουλάρη Σωτηρίας για την ευχάριστη συνεργασία και τις πολύπλευρες συζητήσεις μας, σε ώρες επαγγελματικής αναμονής.

Τέλος, υπεράνω όλων θέλω να πω το απόλυτο ευχαριστώ στην συνάδερφο μου και νυν σύντροφο της ζωής μου κ. Ευταξία Σοφία για την επιστημονική βοήθεια και την ψυχολογική και ηθική στήριξη σε κάθε στάδιο αυτής της πορείας. Χωρίς τη δική της παρουσία αυτή η διδακτορική διατριβή δε θα ήταν δυνατόν να ολοκληρωθεί.

Εύχομαι σε όλους εκείνους του συναδέρφους, που δίνουν πραγματικά τον αγώνα τους, κοπιάζοντας πάνω από τους εργαστηριακούς πάγκους, ο δρόμος, για τη δική τους Ιθάκη, να είναι γλυκός, επιτυχής και σε αυτήν την περίπτωση σύντομος.

Π. Μποζίδης,
Ιωάννινα 2005



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1) Πρωτεϊνική αναδίπλωση (protein folding)	3
1.1.1) Πρωτεϊνική αναδίπλωση <i>in vitro</i>	3
1.1.2) Πρωτεϊνική αναδίπλωση <i>in vivo</i>	4
1.2) Μοριακοί συνοδοί	5
1.3) Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μοριακού βάρους 70kDa	7
1.4) Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μοριακού βάρους 40kDa	9
1.5) Δράση των πρωτεϊνών hsp40 στην hsp70 μηχανή αναδίπλωσης του προκαρυωτικού και του ευκαρυωτικού κυττάρου	11
1.6) Συμμετοχή των πρωτεϊνών hsp40 σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες	18
1.6.1) Ενδοκυττάρωση και εξωκυττάρωση	19
1.6.2) Ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών και βιογένεση οργανιδίων	20
1.6.3) Αποσυσσωμάτωση πρωτεϊνικών συμπλόκων και αναστολή σχηματισμού έγκλειστων σωματίων	23
1.7) Ειδικότητα της σχέσης πρωτεϊνών hsp40 και hsp70	25
1.8) Σκοπός της παρούσας μελέτης	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
2.1) <u>Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA</u>	33
2.1.1) Πλασμιδιακοί φορείς και βακτηριακά στελέχη ξενιστές	33
2.1.2) Θρεπτικά υλικά και συνθήκες καλλιέργειας βακτηρίων	35
2.1.3) Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικά προς μετασχηματισμό και μετασχηματισμός αυτών	35
2.1.4) Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA	36
2.1.5) Παρασκευή μεγάλης κλίμακας πλασμιδιακού DNA	37
2.1.6) Διαχωρισμός θραυσμάτων DNA κι ανάκτηση αυτών από πηκτική αгарόζης	38
2.1.7) Κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA (κλωνοποίηση)	39
2.1.8) Ανάγνωση αλληλουχίας βάσεων DNA (DNA sequencing)	40
2.1.9) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	41
2.2) <u>Τεχνικές παρασκευής και ανάλυσης RNA</u>	43
2.2.1) Παρασκευή ολικού πληθυσμού RNA	43
2.2.2) Ανάλυση κατά Northern	44
2.2.3) Δοκιμασία σταθερότητας μηνύματος (RNA stability assay)	46
2.2.4) <i>In vitro</i> συζευγμένη μεταγραφή-μετάφραση	46
2.3) <u>Αναζήτηση cDNA σε βιβλιοθήκες λ φάγων</u>	48
2.3.1) Βιβλιοθήκη cDNA με φορέα κλωνοποίησης τον λ ZAPII φάγο	48
2.3.2) Βακτηριακά στελέχη ξενιστές του λ ZAP II	49
2.3.3) Υλικά ανάπτυξης βακτηρίων	49
2.3.4) Αναζήτηση σε βιβλιοθήκη συμπληρωματικού DNA	50



2.3.5) Εξαγωγή DNA ενθέματος <i>in vivo</i> (<i>in vivo excision</i>)	51
2.4) <u>Τεχνικές παρασκευής και ανάλυσης πρωτεϊνών</u>	53
2.4.1) Παρασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτήρια	53
2.4.2) Ηλεκτροέκλυση πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου	56
2.4.3) Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων	57
2.4.4) Απομόνωση αντισώματος από αντιορό με χρωματογραφία αγγιστείας	58
2.4.5) Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών	59
2.4.6) Εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστούς θηλαστικών	60
2.4.7) Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών	60
2.4.8) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS	61
2.4.9) Αυτοραδιογραφία – Φλουορογραφία	61
2.4.10) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (<i>Western blot</i>)	62
2.4.11) Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών (<i>Immunoprecipitation</i>)	62
2.4.12) Ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (<i>Immunofluorescence</i>)	63
2.5) <u>Κυτταρικές καλλιέργειες</u>	65
2.5.1) Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας	65
2.5.2) Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας	65
2.5.3) Αποθήκευση κυτταρικών σειρών	66
2.5.4) Κυτταρικές σειρές	66
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
3.1) <u>Απομόνωση και χαρακτηρισμός του cDNA κλώνου της dj2</u>	69
3.1.1) Απομόνωση από βιβλιοθήκη cDNA κυττάρων πιθήκου, κλώνου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη dj2	69
3.1.2) Ανάλυση των απομονωθέντων κλώνων με χαρτογράφηση θέσεων περιοριστικών ενζύμων	71
3.1.3) Ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του κλώνου 5aI και χαρακτηρισμός του με την μέθοδο της αλληλούχησης	71
3.2) <u>Βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδίου hdj2</u>	80
3.2.1) Αναζήτηση του γονιδίου hdj2 σε γενωμικές βάσεις δεδομένων	80
3.2.2) Λομή του γονιδίου hdj2 και παραγόμενα μεταγραφήματα	81
3.2.3) Ανάλυση υποκινητικών στοιχείων του γονιδίου hdj2	82
3.2.4) Δυνατότητα παραγωγής ενός μεγαλύτερου μεταγραφήματος από το γονίδιο hdj2	83
3.3) <u>Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου dj2 σε κύτταρα και ιστούς</u>	88
3.3.1) Ανίχνευση δύο πληθυσμών μεταγραφημάτων του γονιδίου dj2 σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών	88
3.3.2) Διαφορετική κατανομή των δύο πληθυσμών μεταγραφημάτων του γονιδίου dj2 σε ιστούς ποντικού	90
3.3.3) Έλεγχος της σταθερότητας των δύο μεταγραφημάτων του γονιδίου dj2	90
3.3.4) <i>In vitro</i> μεταγραφή-μετάφραση του κλώνου 5aI	92



3.4)	<u>Παρασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Mydj2 σε E.coli και αντισώματος έναντι αυτής</u>	97
3.4.1)	Δημιουργία ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Mydj2 σε κύτταρα E.coli	97
3.4.2)	Παρασκευή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Mydj2 σε κουνέλια	101
3.5)	<u>Μελέτη της πρωτεΐνης Mydj2 σε κύτταρα και ιστούς</u>	103
3.5.1)	Μελέτη της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που επιδέχεται η πρωτεΐνη Mydj2	103
3.5.2)	Μελέτη των ολιγομερών μορφών της πρωτεΐνης Mydj2 με την χρήση ζωνόδους καθίζησης σε προκατασκευασμένη κλίση - συγκέντρωσης σουκρόζης	103
3.5.3)	Ενδοκυτταρική κατανομή των ισομορφών της πρωτεΐνης Mydj2 σε φυσιολογικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ	105
3.5.4)	Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Mydj2 σε φυσιολογικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ	107
3.5.5)	Διαφορική έκφραση της πρωτεΐνης Mydj2 σε ιστούς αρουραίου και ποντικού	109
3.5.6)	Αλληλεπίδρασεις της πρωτεΐνης Mydj2 με τις πρωτεΐνες συνοδούς της hsp70 κυτταροπλασματικής μηχανής	109
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	127
6.	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	131
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	135
8.	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	159



ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1) Πρωτεϊνική αναδίπλωση (protein folding)

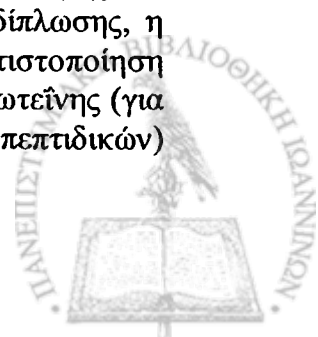
Ο όρος πρωτεϊνική αναδίπλωση αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία ένα πολυπεπτίδιο μετατρέπεται από μια γραμμική αλληλουχία αμινοξέων σε μια τρισδιάστατη δομή η οποία και αποτελεί την λειτουργική πρωτεΐνη. Ο όρος αυτός συμπεριλαμβάνει και την έννοια της επαναδίπλωσης (refolding) η οποία αναφέρεται σε πρωτεΐνες που έχουν χάσει την φυσική διαμόρφωσή τους λόγω μετουσίωσης (π.χ. μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες ή σε χημικούς παράγοντες) ή λόγω τροποποιήσεων που μπορεί να υφίστανται κατά τη διάρκεια μεταφοράς στον στόχο τους (translocation) και οι οποίες θα πρέπει να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση. Η κατανόηση της πορείας που ακολουθεί μια πρωτεΐνη προς την πλήρη αναδίπλωσή της καθώς και η περιγραφή των μηχανισμών και των παραγόντων που συμμετέχουν σε αυτήν αποτελούν ένα από τα βασικότερα πεδία της σύγχρονης Βιολογίας με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον.

1.1.1) Πρωτεϊνική αναδίπλωση *in vitro*

Η πρώτη διερεύνηση του παραπάνω θέματος προήλθε από τις εργασίες του Anfinsen (2) που αφορούσαν τη δυνατότητα αναστρέψιμης επαναδίπλωσης ενός χημικά μετουσιωμένου ενζυμικού υποστρώματος (ριβονουκλεάσης A) σε *in vitro* συνθήκες. Από τα πειράματα αυτά όπως και από εκείνα που αφορούσαν άλλες μικρές μονομερείς πρωτεΐνες (3,4) φάνηκε ότι η τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην πληροφορία που είναι αποθηκευμένη στην αλληλουχία των αμινοξέων της χωρίς να απαιτούνται άλλοι εξωτερικοί παράγοντες.

Η επαναδίπλωση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας *in vitro*, περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια. Αρχικά, οι υδρόφοβες περιοχές υποχωρούν μέσα σε χλίσια του δευτερολέπτου στο εσωτερικό του μορίου, ενώ ταυτόχρονα αρχίζουν να σχηματίζονται δευτεροταγείς δομές. Οι τελευταίες, αποτελούν το πλαίσιο στήριξης της τελικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης καθώς αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να καταλάβουν συγκεκριμένες θέσεις στον χώρο. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, το οποίο διαρκεί συνήθως δευτερόλεπτα ως και λεπτά, το πολυπεπτίδιο περνά μέσα από μια σειρά κινητικά καθορισμένων ενδιάμεσων μορφών. Το χαρακτηριστικό αυτών των μορφών, που καλούνται συμπαγή ενδιάμεσα (compact intermediates) (5, 6), είναι ότι διαθέτουν ένα εκτεταμένο αριθμό δευτεροταγών δομών αλλά υπολείπονται ενός σταθερού υδρόφοβου πυρήνα. Το αποτέλεσμα είναι να εκθέτουν στην επιφάνεια τους υδρόφοβα αμινοξέα τα οποία αλληλεπιδρούν με αντίστοιχα παρακείμενων μορίων τείνοντας έτσι προς τη συσσωμάτωση (aggregation) όπως ακριβώς και οι πλήρως μετουσιωμένες μορφές. Στα τελικά στάδια της αναδίπλωσης περιλαμβάνεται ο σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών (π.χ. δισουλφιδικός) οι οποίοι σταθεροποιούν συγκεκριμένες διαμορφώσεις.

Η πλήρης επαναδίπλωση εξαρτάται από θερμοδυναμικά κριτήρια (ΔG , S) και επηρεάζεται για το λόγο αυτό από τις πειραματικές συνθήκες. Για μια δεδομένη πρωτεΐνη, η φυσική διαμόρφωση αντιπροσωπεύει την κατάσταση της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας (7) σε αντίθεση με τις ενδιάμεσες μορφές και την μετουσιωμένη πρωτεΐνη, οι οποίες αντιστοιχούν σε καταστάσεις υψηλότερης ενεργειακής στάθμης και μεγαλύτερης δομικής ευελιξίας. Επομένως, σε ένα *in vitro* σύστημα αναδίπλωσης, η πρωτεΐνη υποβοηθείται στην ανάκτηση της τριτοταγούς της δομής με βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών, κυρίως, με μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (για αποφυγή των διαπεπτιδικών αλληλεπιδράσεων προς όφελος των ενδοπεπτιδικών)



καθώς και μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (προκειμένου να εξασθενίσουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις).

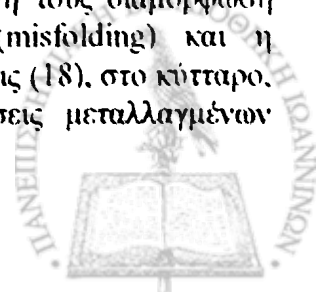
1.1.2) Πρωτεϊνική αναδίπλωση *in vivo*

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από τα *in vitro* πειράματα, προσφέρουν, αναφισβήτητα, σημαντικά στοιχεία στην κατανόηση του μηχανισμού της αναδίπλωσης. Από την άλλη όμως, γίνεται αντιληπτό, ότι οι πειραματικές συνθήκες *in vitro*, δεν μπορούν να περιγράψουν με ακρίβεια τη διαδικασία της αναδίπλωσης, των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών ή της επαναδίπλωσης των ημιδιπλωμένων (*semifolded*) ή λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (*misfolded*) που λαμβάνουν χώρα φυσιολογικά στο εσωτερικό του κυττάρου. Τούτο μπορεί να αποδοθεί στους παρακάτω λόγους:

1) Η αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης στο κύτταρο – σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στην επαναδίπλωση *in vitro* – είναι διαδικασία, αναγκαστικά συζευγμένη με τη βιοσύνθεση της, η οποία επιτελείται πάντα με συγκεκριμένη φορά (από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης). Το γεγονός αυτό, έχει ως αποτέλεσμα η πληροφορία της αναδίπλωσης να γίνεται διαθέσιμη τμηματικά, καθώς η αυξανόμενη αμινοξική αλληλουχία εξέρχεται του ριβοσώματος και αρχίζουν να σχηματίζονται οι πρώτες δευτεροταγείς δομές. Οι δομές αυτές, αναγκαστικά, καθυστερούν να επιτύχουν την πλήρη αναδίπλωσή τους, έως ότου, η ολοκληρωμένη λειτουργική περιοχή στην οποία ανήκουν, αναδυθεί από το ριβόσωμα (συνήθως 150 – 300 αα σε μήκος) (8,9). Στην περίπτωση των πολυλειτουργικών πρωτεϊνών, μάλιστα, ακόμη και μια λειτουργική περιοχή πλήρως αναδιπλωμένη, παραμένει σχετικά ασταθής, απουσία και των υπόλοιπων λειτουργικών περιοχών, που συμμετέχουν στην φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Έτσι, κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης, τα περισσότερα πολυπεπτίδια δεν είναι ικανά παρά να σχηματίζουν ατελείς δομές, μερικώς αναδιπλωμένες, που τυπικά, φέρουν υδρόφοβα αμινοξέα στην επιφάνεια τους και για αυτό είναι πολύ ευαίσθητα στη συσσωμάτωση (10,11).

2) Η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στο κύτταρο, προκειμένου να ολοκληρωθεί, θα πρέπει να ξεπεράσει το πρόβλημα του εξαιρετικά υψηλού συνωστισμού μακρομορίων στο κυτταρικό περιβάλλον. Ο μοριακός συνωστισμός (*molecular crowding*), ως έννοια, αναφέρεται στο γεγονός ότι ένα σημαντικότατο κλάσμα του κυτταρικού όγκου, καταλαμβάνεται από πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια, των οποίων η συνολική συγκέντρωση υπολογίζεται σε 340g/L. Η υψηλή αυτή συγκέντρωση αποτελεί και το λόγο, για τον οποίο, ο ενδοκυτταρικός χώρος είναι λιγότερο ανεκτικός στη συσσώρευση επιπλέον μακρομορίων (12). Αν μάλιστα, στον μοριακό συνωστισμό προστεθεί και η ιδιότητα των ριβοσωμάτων που μετέχουν στην μετάφραση να οργανώνονται σε πολυσώματα, αυξάνοντας έτσι ακόμη περισσότερο τη τοπική συγκέντρωση πρωτεΐνης, γίνεται εύκολα αποδεκτή η παραδοχή, σύμφωνα με την οποία οι σταθερές σύνδεσης μεταξύ των πολυπεπτιδίων στο κυτταρικό περιβάλλον είναι αρκετές τάξεις μεγέθους υψηλότερες, σε σύγκριση με αυτές που παρατηρούνται σε τεχνητές αντιδράσεις επαναδίπλωσης, στα πλαίσια ενός συστήματος *in vitro* (13,14).

Παρά, τις αντίξοες κυτταρικές συνθήκες, αποδεικνύεται και πειραματικά (15,16) ότι η αναδίπλωση των κυτταρικών πρωτεϊνών στο κύτταρο, αποτελεί μια πολύ πιο γρήγορη και αποτελεσματική διαδικασία, σε σύγκριση με την επαναδίπλωση στο δοκιμαστικό σωλήνα. Έτσι, περισσότερο από το 95% των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων, καταλήγουν τελικά να καταλάβουν την τριτοταγή τους διαμόρφωση (17), ενώ προβλήματα όπως η λανθασμένη αναδίπλωση (*misfolding*) και η συσσωμάτωση, τα οποία συμβαίνουν συχνά στις *in vitro* αντιδράσεις (18), στο κύτταρο, κάνουν την εμφάνισή τους σπανίως και μόνο στις περιπτώσεις μεταλλαγμένων



πρωτεϊνών ή σύνθεσης κάτω από συνθήκες στρες (π.χ υψηλές θερμοκρασίες). Η μεγάλη αυτή αποτελεσματικότητα που εμφανίζουν τα κύτταρα στο να αναδιπλώνουν επιτυχώς τις πρωτεΐνες τους, παρά το δυσμενές περιβάλλον, οφείλεται στη δράση μιας μεγάλης κατηγορίας πρωτεϊνών, που καλούνται μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones).

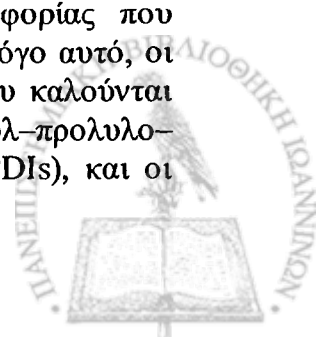
1.2) Μοριακοί συνοδοί

Ο όρος «μοριακός συνοδός» χρησιμοποιήθηκε, αρχικά, για την περιγραφή της λειτουργίας της νουκλεοπλασμίνης, μιας πυρηνικής πρωτεΐνης που διευκολύνει τη συγκρότηση της χρωματίνης, παρεμποδίζοντας ανορθόδοξες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονών και του DNA (19). Στη συνέχεια, ο όρος γενικεύτηκε περιλαμβάνοντας ένα μεγάλο σύνολο ετερόλογων αλλά λειτουργικά συσχετιζόμενων πρωτεϊνών οι οποίες υποβοηθούν την πρωτεϊνική αναδίπλωση και τη συγκρότηση άλλων πρωτεϊνών του κυττάρου (20). Προκειμένου μια πρωτεΐνη να χαρακτηριστεί ως μοριακός συνοδός, θα πρέπει να πληρεί τα εξής κριτήρια:

α) Δέσμευση σε πρωτεΐνες που εκθέτουν στην επιφάνεια τους υδρόφοβα αμινοξέα. Η βασική ιδιότητα κάθε μοριακού συνοδού είναι η ικανότητα του να αναγνωρίζει και να δεσμεύει μετουσιωμένα ή μερικώς αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια (εικ.1Α). Όπως ειπώθηκε και προηγούμενα κατά τα πρώιμα στάδια της *de novo* αναδίπλωσης ή όταν συμβεί λανθασμένη αναδίπλωση, υδρόφοβα αμινοξέα που κανονικά βρίσκονται στο εσωτερικό των πρωτεϊνών, εκτίθενται στην επιφάνεια αυτών, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να γίνονται ευαίσθητες σε συσσωμάτωση (εικ.1Ε) (21,22). Η πιθανότητα της συσσωμάτωσης μειώνεται σημαντικά καθώς οι μοριακοί συνοδοί συνδέονται με τις υδρόφοβες αυτές περιοχές αποτρέποντας έτσι τέτοιου είδους ενδοπεπτιδικών και διαπεπτιδικών αλληλεπιδράσεων (23).

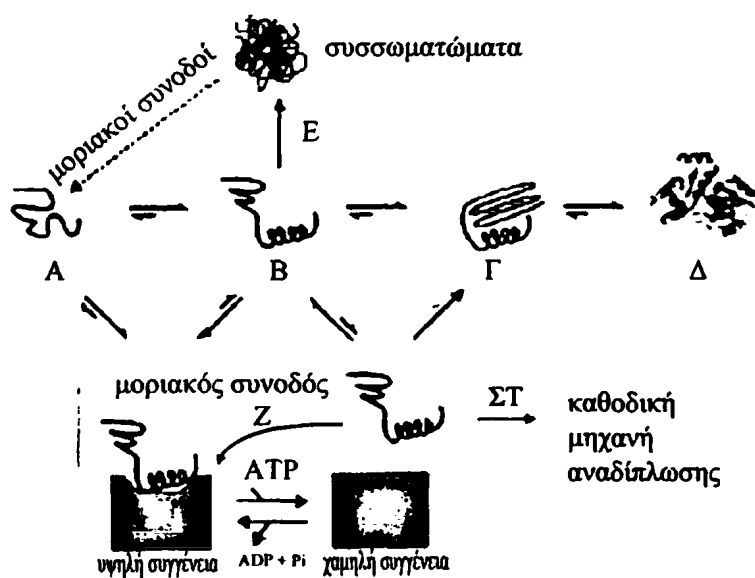
β) Ελεγχόμενη απελευθέρωση των προσδεδεμένων πολυπεπτιδίων. Η ικανότητα αυτή των μοριακών συνοδών, οφείλεται στη δυνατότητα που έχουν να κινούνται μεταξύ δύο εναλλακτικών καταστάσεων, μιας που έχει υψηλή συγγένεια για το υποστρώμα και μιας που έχει χαμηλή συγγένεια για αυτό. Η μετάβαση από την πρώτη στη δεύτερη κατάσταση, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του υποστρώματος και επιτυγχάνεται με κατανάλωση ενέργειας που προέρχεται από την υδρόλυση ATP (24). Η δράση ενός μοριακού συνοδού προϋποθέτει την κυκλική εναλλαγή των δύο αυτών καταστάσεων του, με επαγόμενο αποτέλεσμα την διαδοχική και αυστηρά ρυθμιζόμενη δέσμευση και αποδέσμευση του μετουσιωμένου υποστρώματος (εικ.1Ζ), μέχρι αυτό να αναδιπλωθεί (εικ.1Δ) ή να μεταφερθεί σε ένα άλλο συνοδό (εικ.1ΣΤ) (25,26).

γ) Επαγωγή αλλαγών στη δομή των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Οι μοριακοί συνοδοί, κατά τη διάρκεια αυτών των διαδοχικών κύκλων δέσμευσης-αποδέσμευσης του υποστρώματος, επάγουν αλλαγές στην διαμόρφωσή του. Παράδειγμα αυτής της δράσης τους, αποτελεί το ελεγχόμενο ξεδίπλωμα (unfolding) πολυπεπτιδίων, τα οποία έχουν εγκλωβιστεί είτε σε ενδιάμεσες μη παραγωγικές μορφές (εικ.1Β,1Γ) κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης, είτε σε συσσωματώματα μετά την πλήρη μετουσίωση τους και τα οποία θα πρέπει πρώτα να ξεδιπλωθούν πριν επιχειρηθεί πάλι η επαναδίπλωση τους (27,28,29). Εδώ θα πρέπει να τονιστεί, ότι οι μοριακοί συνοδοί δεν φέρουν καμμία ειδική ή συμπληρωματική πληροφορία για την αναδίπλωση του υποστρώματος, παρά μόνο διευκολύνουν την υλοποίηση της πληροφορίας που περιλαμβάνεται στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης-στόχου. Για τον λόγο αυτό, οι μοριακοί συνοδοί θα πρέπει να διακριθούν από τις πρωτεΐνες εκείνες που καλούνται «καταλύτες της αναδίπλωσης» (folding catalysts), όπως οι πεπτιδυλ-προλυλο-ισομεράσες (PPIases) και οι δισουλφιδο-ισομεράσες των πρωτεϊνών (PDIs), και οι



οποίες προωθούν αποφασιστικά τη διαδικασία της αναδίπλωσης με την cis/trans ισομερείωση των καταλοίπων προλίνης (30) και την ανακατάταξη των δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες (31), αντίστοιχα.

Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία των μοριακών συνοδών, είναι υψηλά συντηρημένες, με ευρεία κατανομή από τα βακτήρια ως τα κύτταρα των θηλαστικών. Ένα μεγάλο μέρος από αυτές αποτελούν οι πρωτεΐνες του στρες (stress proteins), οι οποίες παράγονται από τα κύτταρα σε υψηλές θερμοκρασίες ή μετά από έκθεση τους σε συγκεκριμένους φυσικούς και χημικούς παράγοντες. Το φαινόμενο αυτό, καλείται απόκριση θερμικού σοκ (heat shock response) ή απόκριση στρες (stress response) (32,33,34). Οι πρωτεΐνες αυτές, κατατάσσονται σε μεγάλες οικογένειες με βάση το μοριακό τους βάρος, εκ των οποίων οι σπουδαιότερες είναι οι οικογένειες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins ή hsp) των 100kDa, των 90kDa, των 70kDa, των 60kDa, των 40kDa καθώς και η οικογένεια των μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (35). Στις οικογένειες αυτές, περιλαμβάνονται πλέον και πολλά μέλη των οποίων η δράση είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Παρακάτω θα αναλυθεί ο συνδυαστικός ρόλος μελών των οικογενειών 70 και 40kDa.



Εικόνα 1. Πρωτεϊνική αναδίπλωση υποβοηθούμενη από μοριακούς συνοδούς. Τόσο η βιοσύνθεση πρωτεϊνών όσο και το κυτταρικό στρες μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία πολυπεπτιδίων τα οποία έχουν χάσει ή δεν έχουν χάσει τη τριτοταγή τους διαμόρφωση (A). Τα μόρια αυτά, θα πρέπει να αναδιπλωθούν μέσω διαφόρων ενδιάμεσων μορφών (B,Γ), μέχρις ότου φθάσουν την φυσική και ταυτόχρονα λειτουργική τους

διαμόρφωση (Δ). Οι ενδιάμεσες αυτές μορφές, είναι δυνατό να εκθέτουν στην επιφάνεια τους υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία και τις καθιστούν ευαίσθητες στη συσσωμάτωση (E). Οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν και συνδέονται με τις επιφάνειες αυτές και παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωσή τους. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν την ικανότητα κάποιων μοριακών συνοδών να επαναδιαλυτοποιούν πρωτεΐνες που είναι εγκλωβισμένες στα συσσωματώματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μια ATP-εξαρτώμενη αλλαγή στη διαμόρφωση του μοριακού συνοδού, σηματοδοτεί την αποδέσμευση του πολυπεπτιδίου, το οποίο βρίσκεται υπό αναδίπλωση. Κάποια από τα μόρια που αποδεσμεύονται, είναι σε θέση να καταλάβουν την ορθή τους διαμόρφωση χωρίς επιπλέον βοήθεια από τους μοριακούς συνοδούς, κάποια άλλα μεταφέρονται σε άλλη μηχανή αναδίπλωσης (ΣΤ), ενώ τέλος, τα υπολοίπωντα επαναδεσμεύονται στον ίδιο μοριακό συνοδό και συμμετέχουν σε ένα νέο κύκλο αναδίπλωσης (Z). (Με τροποποιήσεις, από Walter S. και Buchner J., 2002, Angew. Chem. Int. Ed. 41, 1101)



1.3) Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μοριακού βάρους 70kDa

Η οικογένεια hsp70 απαρτίζεται από υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες με δραστηριότητα ΑΤΡάσης, οι οποίες απαντώνται ευρέως στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (κυρίως ευβακτήρια) και στα περισσότερα διαμερίσματα των ευκαρυωτικών οργανισμών μεταξύ των οποίων το κυτταρόπλασμα, ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο.

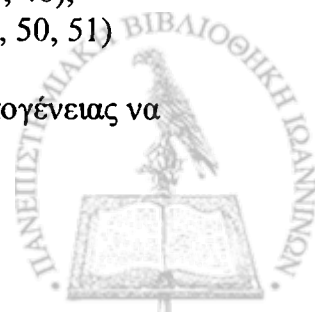
Όλα τα μέλη της οικογένειας hsp70 εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, που συνοψίζονται στην παρουσία δύο λειτουργικών περιοχών, μιας στο αμινοτελικό άκρο τους, που έχει δραστηριότητα ΑΤΡάσης και μοριακό βάρος 44kDa (36) και μιας στο καρβοξυτελικό άκρο αυτών που έχει μοριακό βάρος 25kDa (εικ 2Α). Η τελευταία, διαιρείται με τη σειρά της, σε μια υψηλά συντηρημένη περιοχή με ικανότητα δέσμευσης των πεπτιδίων-στόχων (peptide binding domain) και μοριακό βάρος 15kDa και σε μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή στο τελικό άκρο της πρωτεΐνης, μοριακού βάρους 10kDa (37, 38), στην οποία, όμως, δεν έχει αποδοθεί κάποιος αποσαφηνισμένος ρόλος, πέρα του ότι προσφέρει θέσεις πρόσδεσης κάποιων συμπαραγόντων, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Πρόσφατα, έγιναν γνωστές με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, οι τρισδιάστατες δομές των δύο αυτών περιοχών της hsp70 του E.coli, που καλείται DnaK. Έτσι αποκαλύφθηκε ότι το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (ATPase domain) αποτελείται από δύο υποπεριοχές β-πτυχωτών επιφανειών, που συνδέονται μεταξύ τους με δύο α-έλικες και όλες μαζί σχηματίζουν τη θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου (36,39,40) (εικ 2Α). Στη θέση αυτή, μπορεί να προσδέσεται είτε ΑΤΡ, είτε ΑΔΡ και μάλιστα, η φύση του δεσμευμένου νουκλεοτιδίου καθορίζει τις ιδιότητες δέσμευσης πολυπεπτιδίου, που διαθέτει το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Όσον αφορά την περιοχή πεπτιδικής πρόσδεσης, αυτή αποτελείται από δύο δομικές μονάδες, μια υδρόφοβη αύλακα, που σχηματίζεται από οχτώ αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και μια πιο ευκίνητη περιοχή α-έλικας. Το υπόστρωμα δεσμεύεται στο εσωτερικό της αύλακας, με τη βοήθεια υδρόφοβων κυρίως αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου και ακινητοποιείται εκεί, καθώς η α-έλικα επικάθεται στην κορυφή της αύλακας, σφραγίζοντάς την (38,41). Όπως αποδείχθηκε χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες πεπτιδίων, τα μέλη της οικογένειας αυτής, δεσμεύουν κατά προτίμηση μικρά υδρόφοβα πεπτίδια μήκους περίπου 4-5 αμινοξέων (42,43,44). Τέτοιες πεπτιδικές αλληλουχίες, που φυσιολογικά ανευρίσκονται στο εσωτερικό των πρωτεϊνών, εκτίθενται γενικά από πρωτεΐνες που έχουν χάσει την φυσική τους διαμόρφωση και για τις οποίες οι hsp70 εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια.

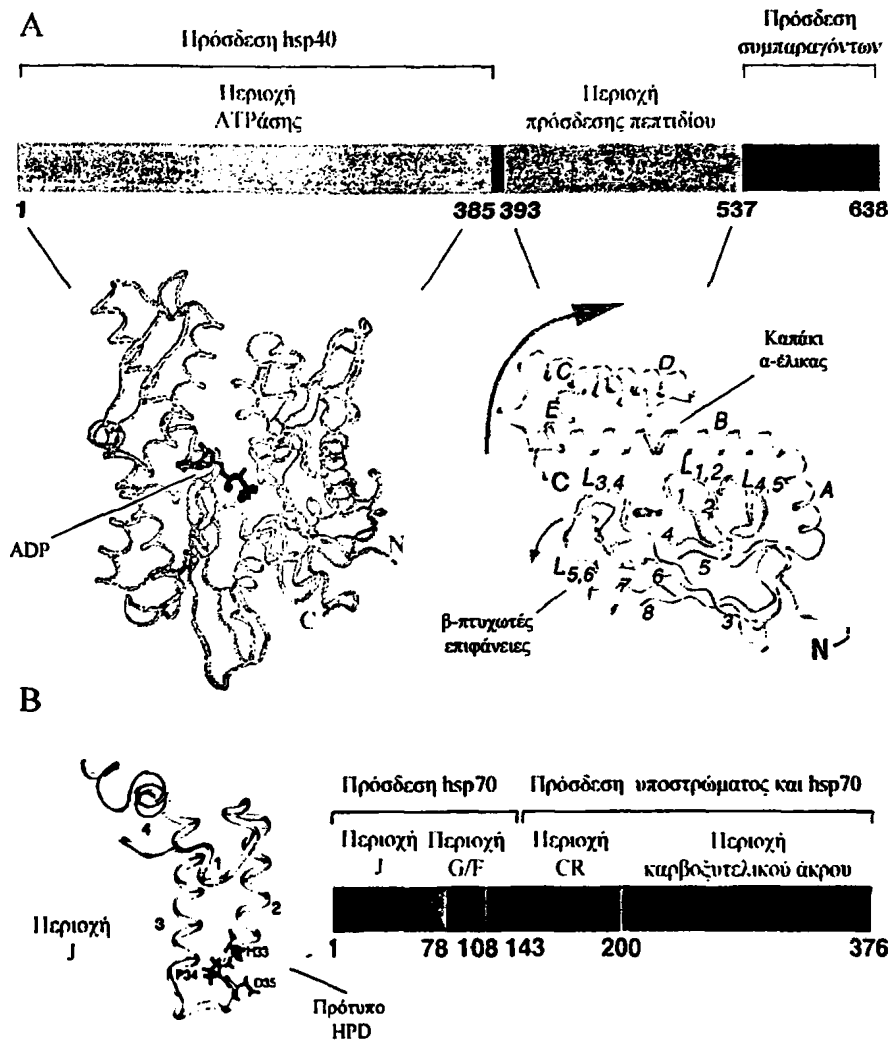
Τα δομικά χαρακτηριστικά των μελών της οικογένειας hsp70, που περιγράφηκαν παραπάνω, ερμηνεύουν σε ένα βαθμό τη δράση τους η οποία, αρχικά, συνδέθηκε με το θερμικό σοκ στα κύτταρα. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι η επαγωγή της έκφρασης τους είχε ως αποτέλεσμα, όχι μόνο την προστασία των μετουσιωμένων υποστρωμάτων από τη συσσωμάτωση, αλλά και την υποβοήθηση της επαναδίπλωσης των λανθασμένα αναδιπλούμενων υποστρωμάτων. Στη συνέχεια, έγινε φανερό, ότι οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν ουσιαστικά και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες σε μια σειρά κυτταρικών διεργασιών όπως είναι:

- α) η υποβοηθούμενη αναδίπλωση κάποιων νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών (45, 8),
- β) η μετακίνηση πολυπεπτιδίων δια μέσου μεμβρανών του κυττάρου (46, 47, 48),
- γ) η συγκρότηση και αποσυγκρότηση ολιγομερών πρωτεϊνικών μορφών (49, 50, 51)
- δ) η πρωτεολυτική αποικοδόμηση ασταθών πρωτεϊνών (52, 53).

Σύντομα, αποδείχθηκε ότι προκειμένου οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας να



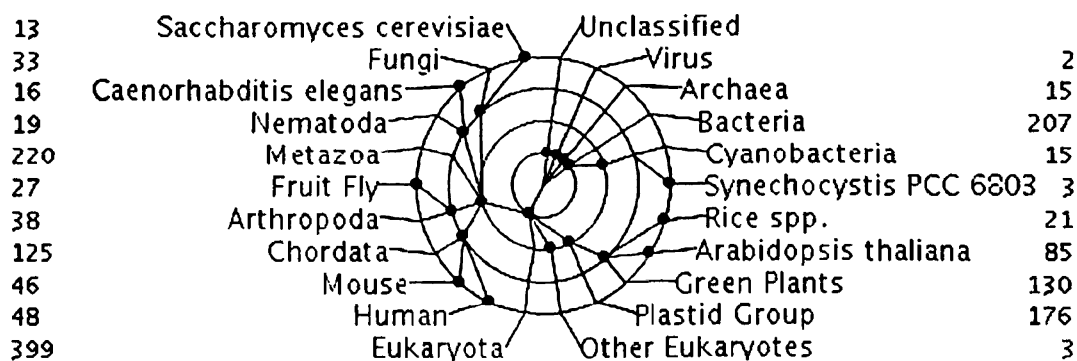
επιτελέσουν τις λειτουργίες τους, απαιτούν τη συμμετοχή και υποστήριξη και άλλων συμπαράγοντων, που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες μοριακών συνοδών, μεταξύ των οποίων τη σημαντικότερη αποτελούν οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μοριακού βάρους 40kDa.



Εικόνα 2. Δομή λειτουργικών περιοχών των μοριακών συνοδών hsp70 και hsp40. (A, πάνω) Οργάνωση περιοχών της βακτηριακής πρωτεΐνης DnaK (ομόλογης της hsp70 των θηλαστικών). Οι περιοχές ATPάσης και της πρόσδεσης πεπτιδίου χαρακτηρίζονται από δομές υψηλά συντηρημένες, μεταξύ όλων των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών πρωτεϊνών hsp70. (A, κάτω αριστερά) Παρουσιάζεται στον χώρο η περιοχή της ATPάσης της hsc70 του βοός, με δεσμευμένα ADP, Pi, ιόντα Mg^{2+} (μωβ) και δύο ιόντα K^+ (μπλε). (A, κάτω δεξιά) Απεικονίζεται στον χώρο η περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων της DnaK, όπου μπορούν να διακριθούν το δεσμευμένο πεπτιδικό υπόστρωμα (μικροί μπλε κύκλοι) και οι β-πτυχωτές επιφάνειες μαζί με τις θηλιές που σχηματίζουν την θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (πράσινο σε αντίθεση με το υπόλοιπο της περιοχής που απεικονίζεται με ανοιχτό μπλε). Η έλικα, που σχηματίζει το «κάλυμμα» της θέσης πρόσδεσης, θεωρείται ότι ανοίγει και κλείνει (πορτοκαλί βέλη) σε απόκριση ATP-εξαρτώμενων δομικών αλλαγών στην περιοχή της ATPάσης. (B, δεξιά) Οργάνωση των λειτουργικών περιοχών στη βακτηριακή DnaK. Περιοχή G/F: περιοχή Γλυκίνης-φαινυλαλανίνης περιοχή CR: περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες και δέσμευσης ιόντων Zn^{2+} . (B, αριστερά). Σχηματική αναπαράσταση της δομής της περιοχής J στον χώρο όπου μπορούν να διακριθούν οι πλάγιες αλυσίδες του τριπεπτιδικού προτύπου HPD, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με τις πρωτεΐνες hsp70. (Με τροποποιήσεις, από Bukau B. και Horwich AL., 1998, Cell 92,352-355)

1.4) Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ μοριακού βάρους 40kDa

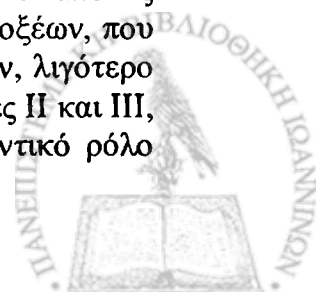
Η οικογένεια hsp40, η οποία αποτελείται από τουλάχιστον 600 μέλη, χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια (35). Το μοναδικό κριτήριο που απαιτείται για την κατάταξη μιας πρωτεΐνης στην ομάδα αυτή, είναι η παρουσία στην αλληλουχία της μιας λειτουργικής περιοχής μήκους ~70αα, γνωστής ως J (J domain), η οποία βρίσκεται συνήθως στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και η οποία έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει τη δραστηριότητα ΑΤΡάσης των πρωτεϊνών hsp70 (55,56). Η ιδιότητα αυτή δείχθηκε αρχικά για τη J domain του βακτηριακού μέλους της οικογένειας που καλείται DnaJ και η οποία συμμετέχει στη μηχανή αναδίπλωσης της DnaK (57).



Εικόνα 3. Στις βάσεις δεδομένων του EBI (European Informatics Institute) υπάρχουν καταχωρημένες οι αλληλουχίες περίπου 693 μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών hsp40. Παραπάνω παρατίθεται η αριθμητική τους κατάταξη στους διαφόρους οργανισμούς

Δομική ανάλυση της DnaJ, έδειξε ότι αυτή αποτελείται από τέσσερις συντηρημένες περιοχές, οι οποίες πιθανόν να αντανakλούν λειτουργικές περιοχές (εικ 2, B). Αναλυτικά αυτές έχουν ως εξής:

α) **J περιοχή.** Αποτελεί την καλύτερα συντηρημένη περιοχή μεταξύ των hsp40 πρωτεϊνών. Με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (58,59), δείχθηκε ότι έχει το σχήμα ενός προεκτεταμένου δακτύλου, ο οποίος διαμορφώνεται από τέσσερις α-έλικες. Οι δύο από αυτές (II και III), είναι μακρές και αντιπαράλληλες, περικλείουν ένα υδρόφοβο πυρήνα, ενώ στο άκρο τους φέρουν το λειτουργικά απαραίτητο πρότυπο των τριών αμινοξέων, ιστιδίνη(H)-προλίνη(P)-ασπαρτικό οξύ(D) (εικ 2B). Το πρότυπο αυτό (HPD motif), βρίσκεται σε όλες τις πρωτεΐνες DnaJ που έχουν βρεθεί ως σήμερα, και φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη δράση της J περιοχής, αφού μετάλλαξη σε οποιοδήποτε από τα τρία αυτά αμινοξέα, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία της πρωτεΐνης να διεγείρει τη δραστηριότητα ΑΤΡάσης της hsp70 (60). Η σταθεροποίηση των αντιπαράλληλων ελικών εξασφαλίζεται από την παρουσία των υπόλοιπων δύο βραχέων α-ελικών (I και IV), που καταλαμβάνουν θέσεις στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της J περιοχής αντίστοιχα, καθώς και από τις ενδοπεπτιδικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των υψηλά συντηρημένων αμινοξέων, που βρίσκονται προς το εσωτερικό του κυρίως σώματος του δακτύλου. Επιπλέον, λιγότερο συντηρημένα αμινοξέα, που απαντώνται στη θηλιά που σχηματίζουν οι έλικες II και III, όπως και εκατέρωθεν του τριπεπτιδίου HPD, θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο



στην ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων, μεταξύ μελών της οικογένειας και διαφόρων hsp70 πρωτεϊνών (61,62). Τέλος, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, αν η J περιοχή είναι επαρκής για την αλληλεπίδραση μεταξύ DnaJ και hsp70 πρωτεϊνών, αφού κάποιες αναφορές προτείνουν την εμπλοκή σε αυτή και της παρακείμενης G/F περιοχής (63,64).

β) **G/F περιοχή.** Η περιοχή αυτή, μήκους συνήθως 30 – 40αα, είναι πλούσια σε γλυκίνη και φαινυλαλανίνη (40% και 15% αντίστοιχα), ενώ ο λειτουργικός της ρόλος δεν είναι αποσαφηνισμένος. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι αποτελεί απλά ένα ευλύγιστο συνδέτη μεταξύ της J περιοχής (55,56) και του υπόλοιπου μορίου. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι, σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις, συμμετέχει αποφασιστικά στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης ολόκληρου του μορίου της DnaJ με τη DnaK, είτε άμεσα, ως συνδεόμενη η ίδια με τη DnaK (63,64), ρυθμίζοντας ταυτόχρονα την ειδικότητα αυτής της σχέσης (65), είτε έμμεσα, επηρεάζοντας τη διαμόρφωση της J περιοχής προκειμένου αυτή να γίνει κατάλληλη για σύνδεση με τη DnaK (66). Γενικά η δράση της, θεωρείται ενισχυτική προς αυτή της J περιοχής και περιορίζεται στις πρωτεΐνες hsp40 τύπου I και II, που θα αναφερθούν στη συνέχεια.

γ) **CR περιοχή.** Στη συνέχεια της G/F περιοχή βρίσκεται μια αλληλουχία πλούσια σε κυστεΐνες (Cystein Rich domain), στην οποία ανευρίσκεται το εξαιρετικά συντηρημένο αμινοξικό πρότυπο C-X-X-C-X-G-X-G (όπου C=κυστεΐνη, G= γλυκίνη, X=οποιοδήποτε αμινοξύ) να επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές. Μελέτες ανάλυσης βιοφυσικών δεδομένων (67,68), έδειξαν ότι το πρότυπο αυτό, είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό δύο δακτύλων Zn^{2+} , καθώς σε κάθε πρωτεϊνικό μόριο καθλώνονται δύο άτομα Zn^{2+} , με τη βοήθεια ατόμων θείου που ανήκουν σε γειτονικές κυστεΐνες. Μεταξύ, δε, των δύο δακτύλων Zn^{2+} σχηματίζεται ένας πυρήνας υδρόφοβων αμινοξέων. Πρόσφατη ανάλυση, με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, αποκάλυψε ότι η CR περιοχή διατάσσεται στο χώρο σε σχήμα V, με τον κάθε δάκτυλο Zn^{2+} να καταλαμβάνει τη θέση του σε κάθε μία από τις δύο πτέρυγες του σχήματος (69). Επιπλέον, δείχθηκε ότι η τοπολογία της τρισδιάστατης διαμόρφωσης της CR περιοχής, είναι μοναδική και χαρακτηριστική για τις πρωτεΐνες DnaJ και δεν προσομοιάζει με περιοχές κυστεϊνών άλλων πρωτεϊνών, που δεσμεύουν άτομα Zn^{2+} (69), όπως αρχικά είχε θεωρηθεί (68,70). Όπως αποδείχθηκε με την χρήση, είτε μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης, που έφεραν ελλείματα για την περιοχή αυτή (67), είτε με υπερέκφραση σε κύτταρα της περιοχής δακτύλου Zn^{2+} , απουσία των J και G/F περιοχών (68), η δομή αυτής της αλληλουχίας της DnaJ, αποτελεί τμήμα και όχι το σύνολο της περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος. Έτσι είναι εν μέρει υπεύθυνη, τουλάχιστον η περιοχή του πρώτου δακτύλου Zn^{2+} (71), για τις ιδιότητες μοριακού συνοδού που έχουν αποδοθεί στην πρωτεΐνη (72,73), ενώ σύμφωνα με πολύ πρόσφατα στοιχεία, η περιοχή του δεύτερου δακτύλου Zn^{2+} μπορεί να αποτελεί μια νέα θέση αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη DnaK (71).

δ) **Περιοχή καρβοξυτελικού άκρου.** Η περιοχή αυτή, αποτελεί τη λιγότερο συντηρημένη μεταξύ των μελών της οικογένειας hsp40. Ο ρόλος της εξακολουθεί να παραμένει αμφιλεγόμενος. Παρόλα αυτά, έχει δείχθει ότι τμήματα αυτής της περιοχής, είναι υπεύθυνα για τη δράση της DnaJ, όσον αφορά την αναγνώριση και δέσμευση των πεπτιδικών υποστρωμάτων και την περαιτέρω αναδίπλωση τους μέσω της DnaK. (74,75). Ο ρόλος της αυτός επιτυγχάνεται πιθανά μέσω συνεργασίας με τη CR περιοχή (67,76). Η παραδοχή αυτή, φαίνεται να ισχύει, μόνο όσον αφορά τις πρωτεΐνες hsp40 τύπου I, μια και σύμφωνα με κάποιες αναφορές, στις πρωτεΐνες hsp40 τύπου II (που δεν περιλαμβάνουν CR περιοχή), το καρβοξυτελικό άκρο αποδεικνύεται από μόνο του επαρκές στη δέσμευση μετουσιωμένου υποστρώματος (77). Φαίνεται, λοιπόν, ότι υπάρχουν δύο περιοχές σύνδεσης με το υπόστρωμα πάνω στην αλληλουχία των πρωτεϊνών hsp40: η μία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, αφορά όλους τους

τύπους των πρωτεϊνών αυτών (I,II,III) και αποτελεί θέση πρόσδεσης χαμηλής συγγένειας που απαιτείται για τη δράση τους ως συν-συνοδά μόρια. Η άλλη, βρίσκεται στο πρώτο δάκτυλο Zn^{2+} της περιοχής CR, μόνο, των πρωτεϊνών hsp40 τύπου I και αποτελεί θέση πρόσδεσης υψηλής συγγένειας. Η θέση αυτή, απαιτείται προκειμένου, μόνο, οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας, να παίζουν ρόλο μοριακού συνοδού, ανεξάρτητα από τη συνεργασία τους με πρωτεΐνες της οικογένειας hsp70 (71,78).

Με βάση την ομολογία που εμφανίζουν προς τις λειτουργικές περιοχές της βακτηριακής hsp40 (DnaJ), τα μέλη της οικογένειας που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα κατατάσσονται σε τρεις τύπους (79):

Τύπος I: περιλαμβάνει εκείνες τις πρωτεΐνες που περιέχουν όλες τις περιοχές που απαντώνται στην πρωτεΐνη DnaJ.

Τύπος II: περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που περιέχουν στην αλληλουχία τους, μόνο, τις περιοχές J (στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης όπως συμβαίνει και στη DnaJ) και G/F (αν και η τελευταία τείνει εδώ να έχει μεγαλύτερο μέγεθος και πιο ποικίλο περιεχόμενο σε κατάλοιπα γλυκίνης, σε σύγκριση με τις ομόλογες περιοχές των πρωτεϊνών τύπου I).

Τύπος III: ανήκουν οι πρωτεΐνες που φέρουν, μόνο, την περιοχή J, η οποία μπορεί να βρίσκεται σε διαφορετική θέση, πέραν του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης.

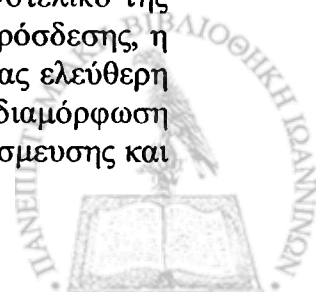
Παρόλες όμως τις διαφορές, που μπορεί να έχουν μεταξύ τους οι πρωτεΐνες hsp40 των διαφόρων τύπων, σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, η δράση τους είναι η ίδια και συνοψίζεται στη θετική ρύθμιση των πρωτεϊνών hsp70 μέσω των ATP-εξαρτώμενων κύκλων αναδίπλωσης των μετουσιωμένων υποστρωμάτων. Παρακάτω, θα γίνει η περιγραφή του τρόπου με τον οποίο λαμβάνει χώρα η ρύθμιση αυτή.

1.5) Δράση των πρωτεϊνών hsp40 στην hsp70 μηχανή αναδίπλωσης του προκαρυωτικού και του ευκαρυωτικού κυττάρου

Τα τελευταία χρόνια, βρίσκεται υπό εντατική εξέταση, τόσο η φύση όσο και η δράση κυτταρικών νανομηχανών που συγκροτούνται από μέλη των οικογενειών hsp70 και hsp40 καθώς και άλλους μοριακούς συνοδούς και συν-συνοδούς, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια. Αποδεικνύεται, δε, ότι η δράση αυτών των πρωτεϊνικών μηχανών είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο, μια και ο κύριος σκοπός τους είναι να βοηθούν τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες να λάβουν την φυσική τους διαμόρφωση και τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες να επανακτήσουν την λειτουργικότητά τους. Παρακάτω, γίνεται λεπτομερής αναφορά στο τρόπο με το οποίο δρα η νανομηχανή αναδίπλωσης της hsp70 στο προκαρυωτικό και στο ευκαρυωτικό κύτταρο, αντίστοιχα.

Προκαρυωτικό κύτταρο

Η απόπειρα αναδίπλωσης ενός πολυπεπτιδίου, από τον μοριακό συνοδό (DnaK), περιλαμβάνει, όπως ειπώθηκε παραπάνω, διαδοχικούς κύκλους δέσμησης και αποδέσμησης από το υπόστρωμα, οι οποίοι είναι ATP-εξαρτώμενοι. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η φύση του νουκλεοτιδίου (ATP ή ADP), που είναι κάθε στιγμή δεσμευμένο στην περιοχή ATPάσης της DnaK, καθορίζει την ικανότητα δέσμησης που διαθέτει το καρβοξυτελικό της άκρο (80). Έτσι, η δέσμηση ATP στο αμινοτελικό της άκρο, προκαλεί δομική αλλαγή που μεταφέρεται στη περιοχή πεπτιδικής πρόσδεσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα να αναστηκωθεί η τελική α -έλικά της, αφήνοντας ελεύθερη την υδρόφοβη αύλακα να δεχθεί το υπόστρωμα (81,82,83) (εικ 2A). Η διαμόρφωση αυτή, αντιπροσωπεύει για τον μοριακό συνοδό την κατάσταση γρήγορης δέσμησης και



γρήγορης απελευθέρωσης του υποστρώματος (84). Αντίθετα, η υδρόλυση του ATP από την ATPάση της DnaK και η δέσμευση σε αυτήν του ADP, προκαλεί το κλείσιμο της α-έλικας και την ταυτόχρονη συγκράτηση του υποστρώματος στην αύλακα. Στη διαμόρφωση αυτή, ο μοριακός συνοδός βρίσκεται στην κατάσταση αργής δέσμευσης και απελευθέρωσης του υποστρώματος, ενώ ταυτόχρονα, η συγγένεια προς το υποστρώμα αυξάνει σημαντικά. Γίνεται φανερό, λοιπόν, ότι η αντίδραση υδρόλυσης του ATP, αποτελεί τον μοριακό διακόπτη μεταξύ των δύο εναλλακτικών καταστάσεων των πρωτεϊνών hsp70 και παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών και των υποστρωμάτων τους (85). Ταυτόχρονα, η ταχύτητα υδρόλυσης με την οποία το ADP αντικαθιστά το ATP στην ίδια θέση της DnaK, αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα της ταχύτητας, με την οποία λαμβάνουν χώρα οι διαδοχικοί κύκλοι δέσμευσης-αποδέσμευσης του υποστρώματος από τον μοριακό συνοδό (86,87,88). Η ταχύτητα της αντίδρασης αυτής, αποδεικνύεται κρίσιμη παράμετρος κατά την αποφυγή συσσωμάτωσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Η συσσωμάτωση είναι μια διαδικασία εξαιρετικά γρήγορη, που λαμβάνει χώρα σε μια κλίμακα δευτερολέπτων, για αυτό προκειμένου να παρεμποδιστεί, θα πρέπει ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ hsp70 και πολυπεπτιδίων να είναι εξίσου γρήγορος. Έχει υπολογιστεί ότι, παρουσία ADP (ή απουσία νουκλεοτιδίου), η DnaK εμφανίζει σταθερές σύνδεσης με πεπτιδικά υποστρώματα που κυμαίνονται σε μια κλίμακα $10-100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (89). Αν υποθεθεί, ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ενός μετουσιωμένου πολυπεπτιδίου είναι $10\mu\text{M}$, τότε ο σχηματισμός του συμπλόκου θα απαιτήσει τουλάχιστον αρκετά λεπτά, χρόνος ανεπαρκής για την αποφυγή της συσσωμάτωσης του. Από την άλλη, στην κατάσταση της DnaK κατά την οποία το ATP είναι δεσμευμένο πάνω της, οι παραπάνω σταθερές επιταχύνονται κατά τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους. Παρά το γεγονός αυτό, η συγκράτηση του πολυπεπτιδίου πάνω στην DnaK, απαιτεί την μετατροπή της ATP μορφή της (μορφή χαμηλής συγγένειας για τα υποστρώματα), στην υψηλής συγγένειας ADP μορφή της μέσω της υδρόλυσης του ATP, από την ίδια την πρωτεΐνη. Επειδή όμως, η ενδογενής δραστηριότητα της ATPάσης όλων των πρωτεϊνών hsp70, έχει αποδειχθεί εξαιρετικά ασθενής (με ρυθμούς μετατροπής της τάξης του 0.02 έως 0.2min^{-1}) (90,81) και παρά το ότι η παρουσία μετουσιωμένου υποστρώματος την αυξάνει 2-10 φορές (91,87), στην πράξη αποδεικνύεται αδύναμη να ανταγωνιστεί, από μόνη της, τη ταχύτητα της αντίδρασης συσσωμάτωσης (72,73).

Ο μηχανισμός, όμως, της αναδίπλωσης προκειμένου να ολοκληρωθεί και να γίνει πιο αποτελεσματικός, πρέπει να συμπληρωθεί από τη δράση συν-συνοδών πρωτεϊνών, εκ των οποίων, οι σημαντικότερες είναι αυτές που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών hsp40. Πιο συγκεκριμένα, ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών συνοψίζεται στη σύζευξη της ρύθμισης του κύκλου της ATPάσης της hsp70, με τη δέσμευση και αναδίπλωση των πεπτιδικών υποστρωμάτων (57,92). Η σύζευξη αυτή, είναι σημαντική, γιατί αποτρέπει την επί ματαίω έναρξη των κύκλων της hsp70 απουσία υποστρώματος. Στην περίπτωση του συστήματος DnaJ-DnaK, έχει παρατηρηθεί ότι η DnaJ πέρα από τη δέσμευση της στην DnaK, έχει από μόνη της την ικανότητα να δεσμεύεται στα πολυπεπτίδια που αποτελούν υποστρώματα για την DnaK, και μάλιστα, με κινητική τόσο γρήγορη ώστε να αποτρέπει τη συσσωμάτωσή τους (68,72). Μάλιστα, πρόσφατες μελέτες (93), στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μια πλειάδα ολιγοπεπτιδίων που ήταν ακινητοποιημένα σε κυτταρίνη, δείχθηκε ότι DnaJ και DnaK αναγνωρίζουν κατά βάση το ίδιο πρότυπο υδρόφοβων και αρωματικών αμινοξέων, έχοντας ταυτόχρονα και κάποιες διαφορές. Οι διαφορές αυτές έγκεινται στα εξής:

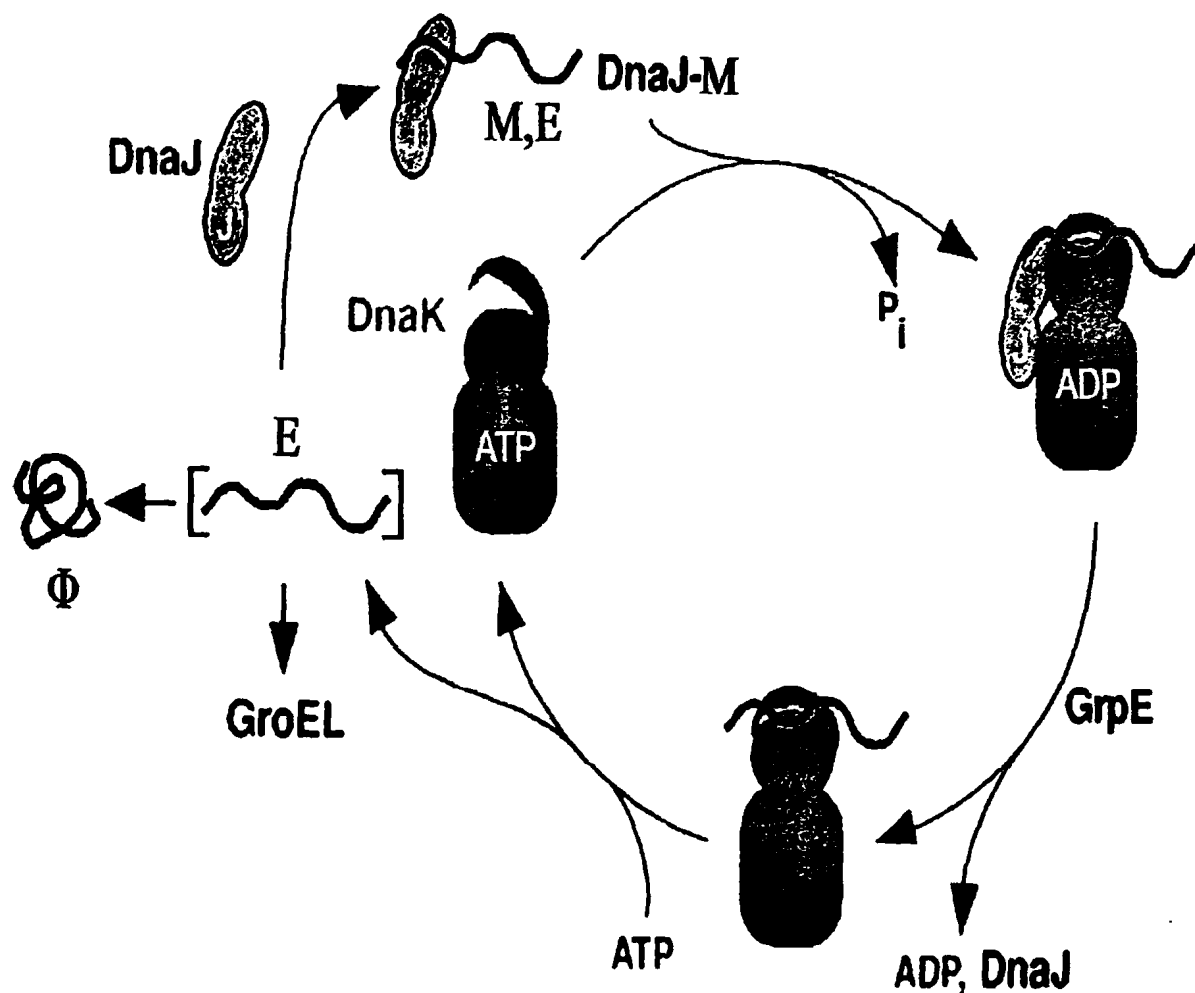
- Η DnaK δεσμεύει κατά προτίμηση υδρόφοβους πυρήνες μήκους 4-5 αμινοξέων. Η συγγένεια αυτή, αυξάνει αν εκατέρωθεν υπάρχουν περιοχές θετικά φορτισμένων

καταλοίπων. Η DnaJ δεσμεύεται στο ίδιο υδροφοβικό πρότυπο, που έχει όμως αυξημένο μήκος (περίπου οχτώ αμινοξέα).

- Η κλειστή αύλακα, που σχηματίζει η περιοχή πεπτιδικής πρόσδεσης της DnaK, είναι σε θέση να δεσμεύει, λόγω αρχιτεκτονικής, αλληλουχία αμινοξέων αποτελούμενη μόνο από σκελετό L-αμινοξέων τα οποία έχουν συγκεκριμένο προσανατολισμό. Αντίθετα, η DnaJ έχει την ικανότητα να δεσμεύει αλληλουχίες τόσο L- όσο και D-αμινοξέων, άσχετα από τη στερεοχημεία του σκελετού τους. Αυτό εξηγείται από την έλλειψη οποιασδήποτε κλειστής κοιλότητας στη δομή των περιοχών πεπτιδικής πρόσδεσης της DnaJ (CR και καρβοξυτελικό άκρο), που θα επέτρεπε επαφές με το σκελετό των προσδεδεμένων πεπτιδίων. Για το λόγο αυτό, προτείνεται ότι η DnaJ δρα ως ένας παράγοντας σάρωσης (scanning factor), που σκοπό έχει τον γρήγορο έλεγχο της επιφάνειας μιας πρωτεΐνης προκειμένου να εντοπίσει και να αλληλεπιδράσει με τις πλάγιες αλυσίδες των εκτιθέμενων υδροφοβων αμινοξέων, χωρίς να έχει την ικανότητα της πιο σταθερής και μόνιμης συγκράτησης τους, λειτουργία που διαθέτει η ενεργοποιημένη DnaK (ADP – μορφή).

Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να περιγραφεί το ισχύον μοντέλο της κυκλικής λειτουργίας της μηχανής αναδίπλωσης της DnaK (εικ. 4). Ο κύκλος ξεκινά με την αναγνώριση και την παροδική σύνδεση της DnaJ με τις ομάδες των υδροφοβων αμινοξέων που εμφανίζει το μετουσιωμένο πολυπεπτίδιο. Η συνέχιση του κύκλου μπορεί να γίνει με δύο εξίσου πιθανούς τρόπους, με τους οποίους η DnaJ καθοδηγεί το υπόστρωμα στη DnaK. Κατά τον πρώτο τρόπο, η αλληλεπίδραση της DnaJ, μέσω της περιοχής της J, με τη DnaK, κατευθύνει τη δεύτερη πάνω σε ένα υδροφοβο τμήμα με το οποίο η ίδια είναι ήδη προσδεδεμένη. Ταυτόχρονα, λαμβάνει χώρα αντίδραση μεταφοράς του πολυπεπτιδίου στην DnaK. Η μεταφορά αυτή, προκειμένου να πραγματοποιηθεί, απαιτεί την υδρόλυση του ATP από τη DnaK, η οποία είναι εξαρτώμενη από την παρουσία του συμπλόκου DnaJ-υποστρώματος. Ενώ η DnaK συνδέεται με το υδροφοβο τμήμα της μετουσιωμένης πρωτεΐνης, η DnaJ αποσυνδέεται από αυτό. Κατά το δεύτερο τρόπο, η DnaK συνδέεται με ένα γειτονικό αλλά διαφορετικό πεπτιδικό τμήμα της μετουσιωμένης πρωτεΐνης από αυτό στο οποίο έχει συνδεθεί η DnaJ. Η σύνδεση και της DnaK, δίνει το σήμα για την αλληλεπίδραση της με τη DnaJ και την απαραίτητη υδρόλυση του ATP, η οποία και πάλι εξαρτάται από την παρουσία του συμπλόκου DnaJ-υποστρώματος. Η υδρόλυση του ATP αλλάζει τη διαμόρφωση της DnaK και «κλειδώνει» το σύμπλοκο της με το υπόστρωμα. Σε κάθε περίπτωση, η μεταφορά του υποστρώματος στη DnaK και η μετατροπή αυτής στην ADP-μορφή της, μειώνει τη συγγένεια του συμπλόκου DnaK-υποστρώματος με την DnaJ και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αποσύνδεση της DnaJ από αυτό. Μετά την αποσύνδεση της DnaJ, στο σύμπλοκο DnaK-υποστρώματος προσδέεται μια άλλη πρωτεΐνη που καλείται GrpE και η οποία επάγει την απελευθέρωση του ADP από τη DnaK (94). Η απελευθέρωση αυτή, προκαλεί τη γρήγορη και αυθόρμητη επαναδέσμευση ATP στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, η οποία συνοδεύεται από ταυτόχρονη απελευθέρωση του υποστρώματος και της πρωτεΐνης GrpE (95,96). Έτσι ο μοριακός συνοδός (DnaK) επιστρέφει στην αρχική του κατάσταση, έτοιμος να ξεκινήσει ένα νέο κύκλο αναδίπλωσης. Όσον αφορά το υπόστρωμα, αν δεν έχει ήδη αποκτήσει την φυσική του διαμόρφωση, εμπλέκεται ξανά σε ένα νέο κύκλο αλληλεπίδρασης με την μηχανή της DnaK, ή δεσμεύεται από ένα άλλο σύστημα αναδίπλωσης του κυττάρου (π.χ. GroEL/ES) (97).





Εικόνα 4. Μοντέλο του κύκλου αντίδρασης της DnaK στο προκαρυωτικό κύτταρο. Στο βακτηριακό σύστημα αναδίπλωσης, ο κύκλος ξεκινά με την σύνδεση της DnaJ είτε με ένα μετουσιωμένο υπόστρωμα (M), είτε με μία ενδιάμεση μορφή (E). Η DnaK εισέρχεται στον κύκλο στην ATP-μορφή της, η οποία και χαρακτηρίζεται από ταχεία σύνδεση και αποσύνδεση με το υπόστρωμα. Η DnaJ δεσμεύεται στην DnaK και διεγείρει την μετατροπή του ATP σε ADP μέσω της ATPάσης της DnaK. Ταυτόχρονα, σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της DnaK με το πολυπεπτιδικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια, η GrpE προωθεί την απελευθέρωση του δεσμευμένου ADP από την DnaK. Ακόλουθη επαναδέσμευση του ATP πυροδοτεί την αποδέσμευση του πολυπεπτιδικού υποστρώματος σε μία ενδιάμεση μορφή αναδίπλωσης (I), η οποία μπορεί εναλλακτικά να λάβει χωρίς επιπλέον βοήθεια την φυσική της διαμόρφωση (Φ), να συμμετάσχει σε ένα κύκλο αλληλεπίδρασης με το σύστημα αναδίπλωσης της DnaK, είτε τέλος να μεταφερθεί σε ένα διαφορετικό σύστημα αναδίπλωσης (π.χ. GroEL/ES). (Από Frydman J., 2001, *Annu. Rev. Biochem.* 70,612)



Ευκαρυωτικό κύτταρο

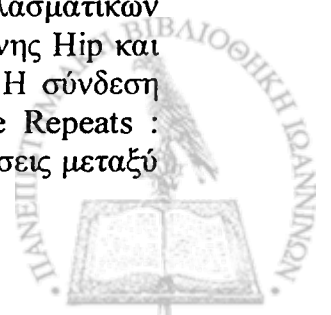
Η αποσαφήνιση του κύκλου του συστήματος DnaJ–DnaK στο βακτηριακό κύτταρο, παρείχε ένα γενικό μοντέλο για τη δράση όλων των αντίστοιχων συστημάτων που απαντώνται στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Ταυτόχρονα όμως, διαπιστώθηκαν και αποκλίσεις από το βασικό μοντέλο, οι οποίες προέρχονται από τη μελέτη κυρίως της δράσης της κυτταροπλασματικής μηχανής της hsp70 των κυττάρων των θηλαστικών, η οποία εμφανίζεται και περισσότερο πολύπλοκη (98) (εικ.5). Οι διαφορές αυτές μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

1. Όμοια προς τη βακτηριακή DnaJ, οι ομόλογες πρωτεΐνες hsp40 διεγείρουν τη δραστικότητα ATPάσης των κυτταροπλασματικών μελών της hsp70 οικογένειας, επάγοντας την μετάβαση αυτών στην ADP–μορφή τους, η οποία διαθέτει μεγαλύτερη συγγένεια για το υπόστρωμα. Παρόλα αυτά, στο βακτηριακό κύτταρο η συνεργιστική δράση των πρωτεϊνών DnaJ και GprE έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας της DnaK ως και 50 φορές (57,25). Αντίθετα, στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, οι πρωτεΐνες hsp40, απουσία πρωτεϊνών ομόλογων προς τη βακτηριακή GprE, είναι ικανές να επιτύχουν μια αύξηση της δραστικότητας της ATPάσης των πρωτεϊνών hsp70 μόνο 10 φορές (99). Αυτό σημαίνει ότι στο ευκαρυωτικό κύτταρο ο περιοριστικός παράγοντας στους διαδοχικούς κύκλους αναδίπλωσης, είναι η υδρόλυση του ATP και όχι η αποσύνδεση του ADP από τον μοριακό συνοδό (hsp70), όπως συμβαίνει για τη βακτηριακή DnaK (hsp70) (100,101). Το γεγονός αυτό, ενισχύεται και από την παρατήρηση ότι η ανταλλαγή ADP με ATP και η αποδέσμευση ενός πολυπεπτιδικού υποστρώματος μπορεί να συμβεί απουσία μιας ομόλογης προς τη GprE πρωτεΐνης (99).

2. Αν και το ελάχιστο σχήμα αντίδρασης hsp70–hsp40 είναι ικανό από μόνο του να φέρει εις πέρας ένα τμήμα των λειτουργιών της hsp70, στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα για τις περισσότερες λειτουργίες, απαιτείται η δράση επιπρόσθετων παραγόντων (102). Τέτοιοι είναι οι πρωτεΐνες: Hip (Hsps interacting protein), Hop (Hsps organizing protein), Chip (Carboxyl-terminus of Hsc70 interacting protein) καθώς και πρωτεΐνες της οικογένειας Bag (Bcl-2 associated athanogene) (εικ.5). Η ακριβής δράση των πρωτεϊνών αυτών είναι ακόμη υπό εντατική εξέταση, λαμβάνοντας όμως υπόψη τα δημοσιευμένα στοιχεία μπορούν να αναφερθούν συνοπτικά τα εξής:

- Στο ευκαρυωτικό σύστημα και παρουσία μόνο της hsp40, η ADP μορφή της hsp70 είναι ασταθής και καταλήγει, εάν δεν υπάρξει άλλη παρέμβαση, σε πρόωρη αποσυγκρότηση του συμπλέγματος hsp70–υποστρώματος (99). Η πρωτεΐνη Hip (ή αλλιώς p48), δεσμεύεται ειδικά στην περιοχή με λειτουργικότητα ATPάσης της hsp70. Η δέσμευση αυτή, έπεται της δράσης της hsp40 και μάλιστα εξαρτάται από αυτή. Το αποτέλεσμα της δέσμευσης, είναι η καθυστέρηση της απελευθέρωσης του ADP από την hsp70 και η σταθεροποίηση αφενός της ADP μορφής αυτής και αφετέρου του συμπλέγματος hsp70–υποστρώματος. Κατά αυτόν τον τρόπο, η Hip θεωρείται ότι επιμηκύνει το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η hsp70 αλληλεπιδρά σταθερά με το μετουσιωμένο υπόστρωμα ενισχύοντας έτσι την ικανότητα της για αναδίπλωση, ενώ ταυτόχρονα, της δίνει τον απαραίτητο χρόνο για την μεταφορά του υποστρώματος σε μια εναλλακτική μηχανή μοριακών συνοδών (π.χ. της hsp90), που μπορεί να βρίσκεται καθοδικά στην πορεία αναδίπλωσης (99,103,104).

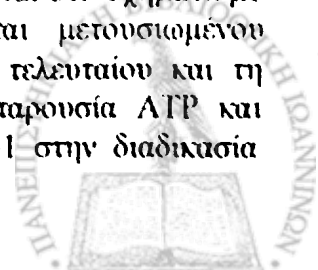
- Η πρωτεΐνη Hop, ή αλλιώς p60, έχει χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνη–προσαρμογέας (adaptor) (105), επειδή αποτελεί το φυσικό σύνδεσμο μεταξύ των κυτταροπλασματικών μηχανών αναδίπλωσης της hsp70 και της hsp90. Δρα καθοδικά της πρωτεΐνης Hip και συνδέεται επιλεκτικά με τις ADP μορφές των hsp70 και hsp90 (106). Η σύνδεση λαμβάνει χώρα μεταξύ διαφορετικών TPR περιοχών [Tetratric Peptide Repeats : εκφυλισμένες επαναλήψεις 34 αμινοξέων που υποβοηθούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ

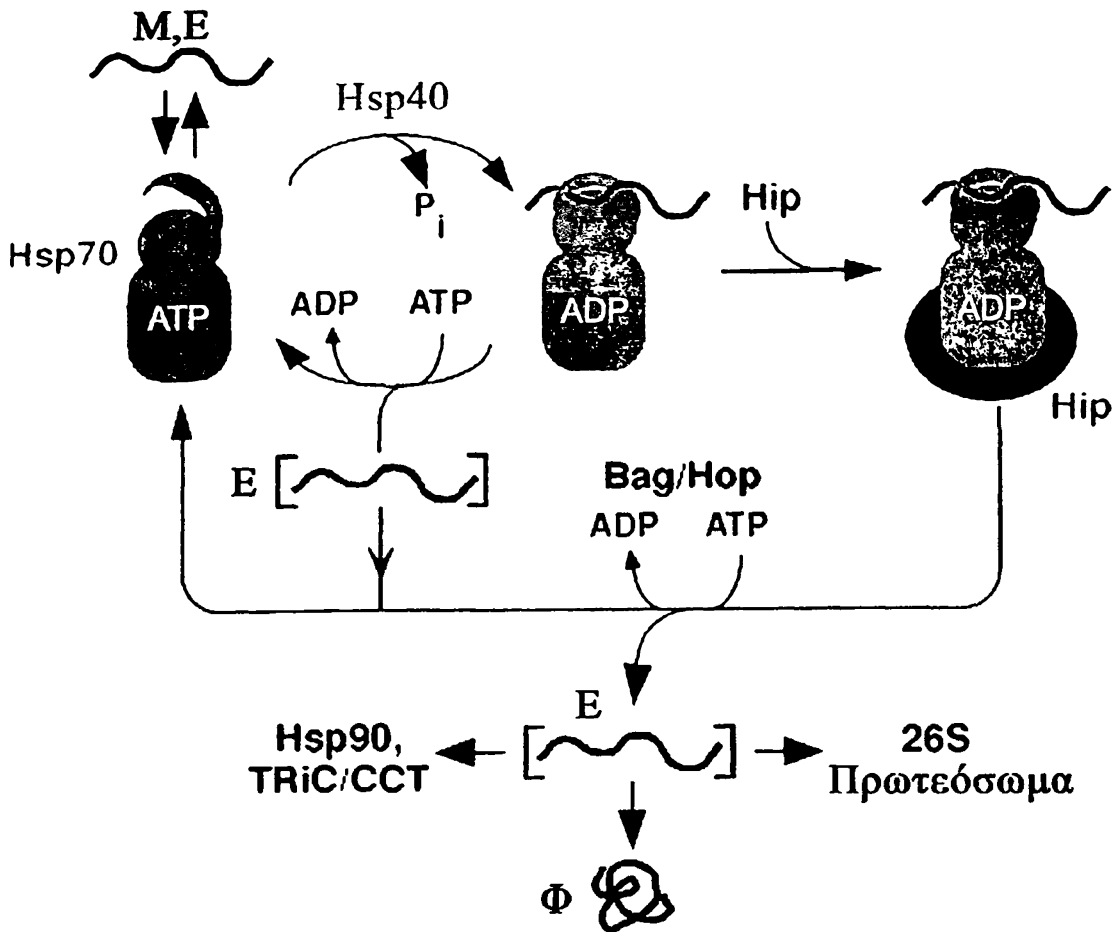


των μορίων που τις φέρουν (107)] της πρωτεΐνης Hop, με τα αμινοξικά πρότυπα EEVD που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών αυτών (108). Ο κύριος ρόλος της είναι η διευκόλυνση της μεταφοράς του μετουσιωμένου υποστρώματος μεταξύ των δύο μηχανών, ενώ αντιφατικές παραμένουν οι αναφορές που τη θέλουν να επάγει τη δραστηριότητα της ΑΤΡάσης της hsp70, λειτουργώντας ως ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίου (nucleotide exchange factor)-δράση ανάλογη της βακτηριακής GtrE (106,109).

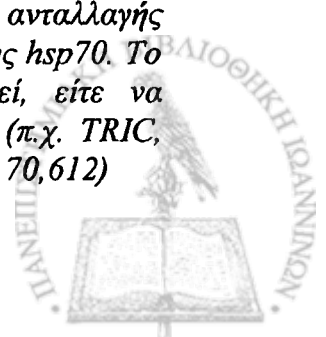
- Η πρωτεΐνη CHIP, αποτελεί μια ακόμη πρωτεΐνη που ανήκει στην μεγάλη ανομοιογενή κατηγορία των πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν στο μόριο τους περιοχές TPR. Μέσω των τριών περιοχών TPR, που βρίσκονται στο αμινοτελικό της άκρο, συνδέεται με την hsp70 και πιθανόν η σύνδεση αυτή προκαλεί το «πάγωμα» του κύκλου της ΑΤΡάσης της hsp70 και την αναστολή της ικανότητας της να επαναδιπλώνει τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες σε *in vitro* συνθήκες (110). Παρόλα αυτά, τελευταίες μελέτες (111) θέλουν τη Chip να ενισχύει την επαναδίπλωση πρωτεϊνών που υπέστησαν θερμική μετουσίωση, όταν βρίσκεται σε κατάσταση υπερέκφρασης σε κύτταρα θηλαστικών. Μάλιστα, η ενίσχυση, όπως δείχθηκε, επιτυγχάνεται μέσα από την αύξηση της ικανότητας επαναδίπλωσης που διαθέτει η hsp70, χωρίς να γίνεται ξεκάθαρο πως ακριβώς γίνεται αυτό. Το μόνο στοιχείο που επαναβεβαιώνεται, είναι ότι η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά επιλεκτικά με την ΑΤΡ μορφή της hsp70, όπως ακριβώς και η hsp40, με την οποία φαίνεται ότι δρα ανταγωνιστικά (111). Πέρα όμως από αυτή την ασαφή της δράση, το πιο ενδιαφέρον ίσως στοιχείο που έχει βρεθεί σχετικά με την πρωτεΐνη Chip είναι ότι στο καρβοξυτελικό της άκρο, φέρει τη περιοχή U-box (112), η οποία απαντάται επίσης σε πρωτεΐνες (113) που συμμετέχουν στο σύστημα ουμπικιτίνης-πρωτεοσώματος, το οποίο και αποτελεί το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης των πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα (114). Όπως έγινε φανερό (112,115, 116), μέσω αυτής της περιοχής η πρωτεΐνη Chip παίζει το ρόλο μιας E3 λιγάσης, η οποία ουμπικιτινώνει τα υποστρώματα των μοριακών συνοδών (hsp70, hsp90), καθώς και την ίδια την hsp70 (117), έτσι ώστε τα μεν πρώτα να μεταφερθούν στο πρωτεόσωμα για αποικοδόμηση, η δε τελευταία να υποβοηθήσει την μεταφορά αυτή. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα δεδομένα, μπορούμε τελικά να υποθέσουμε ότι η Chip, μαζί με την πρωτεΐνη Bag1 -που θα αναφερθεί στη συνέχεια- είναι οι συμπαραγόντες εκείνοι της hsp70 οι οποίοι συνδέουν άμεσα την κυτταροπλασματική μηχανή αναδίπλωσης της hsp70, με την κυτταροπλασματική μηχανή αποικοδόμησης μέσω πρωτεοσώματος στο ευκαρυωτικό κύτταρο (118).

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bag απαρτίζεται, προς το παρόν, από έξι μέλη τα οποία φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο τη λειτουργική περιοχή Bag. Αν και η περιοχή αυτή θεωρείται απαραίτητη για την άμεση αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με την ΑΤΡάση της hsp70 (119,120), μέχρι σήμερα αυτό έχει επιβεβαιωθεί σε *in vivo* πειράματα μόνο για τα τέσσερα (Bag-1,-3,-4 και -6) από τα έξι μέλη (121). Η Bag-1, είναι η πιο καλά μελετημένη, όσον αφορά τη δράση της στην κυτταροπλασματική μηχανή αναδίπλωσης των πρωτεϊνών hsp70, αν και οι διάφορες μελέτες προσφέρουν αποτελέσματα αντιφατικά για τη δράση αυτή. Έτσι, σύμφωνα με κάποιες μελέτες, η Bag-1 ασκεί αρνητική ρύθμιση στη λειτουργία των hsc70/hsp70, αφού σε *in vitro* πειράματα φάνηκε να αναστέλλει τη επαναδίπλωση τόσο θερμικά μετουσιωμένης λουσιφεράσης (120) όσο και χημικά μετουσιωμένης β-γαλακτοσιδάσης από τις hsc70/hsp70 (123). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η αναστολή αυτή οφείλεται στο σχηματισμό ενός σταθερού τριμερούς συμπλέγματος μεταξύ Bag-1, hsp70 και μετουσιωμένου υποστρώματος, το οποίο δεν επιτρέπει την απελευθέρωση του τελευταίου και τη συνέχιση της λειτουργίας της μηχανής της hsp70 ακόμη και παρουσία ΑΤΡ και πρωτεϊνών hsp40 (119). Η αρνητική επίδραση που έχει η Bag-1 στην διαδικασία





Εικόνα 5. Στο ευκαρυωτικό σύστημα αναδίπλωσης, όπως και στο προκαρυωτικό, οι ομόλογες προς τη βακτηριακή DnaJ πρωτεΐνες, αναλαμβάνουν να δεσμεύσουν τα μετουσιωμένα πεπτιδικά υποστρώματα (M) ή τις ενδιάμεσες μορφές αυτών και να προωθήσουν την αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες hsp70, αφού πρώτα διεγείρουν την μετάπτωση των τελευταίων, στην ADP-μορφή τους. Σε αντίθεση προς το βακτηριακό κύκλο, εδώ, η απελευθέρωση του ADP δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τον κύκλο όταν η hsp70 βρίσκεται σε σύμπλεγμα με την αντίστοιχη πρωτεΐνη hsp40. Αυτό συμβαίνει γιατί η ανταλλαγή του ADP με το ATP καθώς και η αποσύνδεση του πολυπεπτιδικού υποστρώματος λαμβάνουν χώρα απουσία μιας ομόλογης πρωτεΐνης προς τη βακτηριακή GrpE. Αυτός ο ελάχιστος κύκλος αντίδρασης, μπορεί να είναι επαρκής προκειμένου η hsp70 να φέρει εις πέρας πολλές από τις λειτουργίες της στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα.. Επιπλέον όμως, η ADP-μορφή της hsp70 μπορεί να σταθεροποιείται από την σύνδεση της με την πρωτεΐνη Hip και κατά τον τρόπο αυτό να αυξάνεται ο χρόνος ημιζωής του συμπλέγματος μοριακού συνοδού-υποστρώματος. Ακόλουθη αποσταθεροποίηση αυτού του συμπλέγματος είναι δυνατή χάρη στη δράση των πρωτεϊνών της οικογένειας Bag (και ίσως και της πρωτεΐνης Hop), οι οποίες δρουν είτε ως αρνητικοί ρυθμιστές της μηχανής αναδίπλωσης, είτε ως παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίου με αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις την επανακύκλωση της hsp70. Το απελευθερωμένο υπόστρωμα μπορεί στη συνέχεια είτε να αναδιπλωθεί, είτε να επαναδεσμευτεί στην hsp70 ή σε κάποια άλλη κυτταροπλασματική μηχανή (π.χ. TRiC, hsp90, 26S πρωτεόσωμα κ.α.). (Από Frydman J., 2001, *Annu. Rev. Biochem.* 70,612)

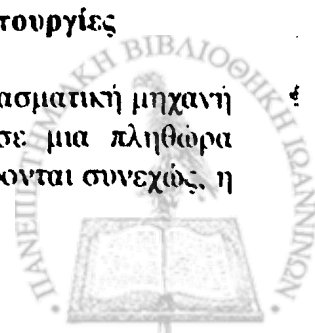


επαναδίπλωσης, ενισχύεται από το γεγονός ότι εμφανίζεται να δρα ανταγωνιστικά προς τη πρωτεΐνη Hip, η οποία επάγει τη διαδικασία αυτή, μια και οι δύο πρωτεΐνες φέρονται να έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενες θέσεις δέσμησης στο αμινοτελικό άκρο των hsc70/hsp70 (124). Σε αντιδιαμετρική θέση προς τα παραπάνω, άλλες αναφορές (125,126) θέλουν τη Bag-1 να διεγείρει τη υδρόλυση του ATP από την hsp70, καθώς επιταχύνει το ρυθμό ανταλλαγής του ADP με το ATP, δρώντας έτσι σαν ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων στον κύκλο δράσης της hsc70 ή της hsp70. Λόγω της δράσης της αυτής, πολλοί την έχουν χαρακτηρίσει ως τη GrpE των ευκαρυωτικών (127), παρόλο που εμφανίζει τόσο δομικές (127) όσο και λειτουργικές διαφορές από την αντίστοιχη βακτηριακή πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, ενώ η GrpE διεγείρει την απελευθέρωση τόσο του ATP όσο και του ADP από την DnaK, η Bag-1 αντιθέτως επάγει την απελευθέρωση μόνο του ADP από την ATPάση της hsp70 (128). Αν και απαιτούνται επιπλέον μελέτες, έχει υποστηριχθεί ότι η διαφορούμενη λειτουργία της πρωτεΐνης Bag-1, πότε ως θετικού και πότε ως αρνητικού ρυθμιστή των hsc70/hsp70, μπορεί να συσχετίζεται με τις διαφορετικές δράσεις των ισομορφών της ή και με τον χρόνο που αυτές εμπλέκονται στον μηχανισμό αναδίπλωσης (129). Πέρα από τον αντιφατικό ρόλο της Bag-1, ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων, τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη αυτή, σε συνδυασμό με τη πρωτεΐνη Chip, μπορεί να αποτελεί το ενδιάμεσο κρίκο που συνδέει τους μοριακούς συνοδούς με το σύστημα ουμπικιτίνης/πρωτεοσώματος (130). Το συμπέρασμα αυτό, προκύπτει από την παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη φέρει στο αμινοτελικό της άκρο μια λειτουργική περιοχή UBL (ubiquitin-like) η οποία είναι κατά ένα μέρος υπεύθυνη για τη σύνδεση της με το πρωτεόσωμα. Με αποδεδειγμένη την μεταφορά ουμπικιτινωμένου υποστρώματος από την hsp70 στην Bag-1, κάτω από *in vitro* συνθήκες (131), έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη Bag-1 παίζει το ρόλο ενός παράγοντα εκφόρτωσης (unloading factor) των υποστρωμάτων της hsp70 και προώθηση αυτών άμεσα στο πρωτεόσωμα (132).

Πρόσφατα, με βάση τις λειτουργίες των συν-συνοδών μορίων της κυτταροπλασματικής μηχανής της hsp70, οι οποίες και περιγράφηκαν παραπάνω, έχει αναπτυχθεί ένα μοντέλο (133) που δίνει απάντηση στο πώς ανώμαλες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από τη μηχανή αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού κυττάρου (εικ. 6). Σύμφωνα με αυτό, οι παράγοντες εκείνοι οι οποίοι εμπλέκονται στη διαδικασία επαναδίπλωσης μετουσιωμένων πρωτεΐνων είναι και εκείνοι που συμμετέχουν και στη διαδικασία επιλογής των πρωτεϊνών που πρόκειται να αποικοδομηθούν. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη σε μια ισορροπία μεταξύ της πρωτεϊνικής επαναδίπλωσης και της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης που καθορίζεται από τους συμπαραγόντες που κατά περίπτωση συνδέονται στην μηχανή της hsp70. Με αλλαγή της σύστασης αυτής της μηχανής, μέσω ανταγωνιστικών μορίων (π.χ. Hip εναντίον Bag και Hop εναντίον Chip) είναι δυνατό να αποφασιστεί το αν δεδομένο υπόστρωμα θα ακολουθήσει το δρόμο της επαναδίπλωσης ή το δρόμο της αποικοδόμησης (εικ.6). Ακόμη όμως και σε αυτό το μοντέλο, κεντρικός παραμένει ο ρόλος, στη ρύθμιση αυτής της μηχανής, των πρωτεϊνών της οικογένειας hsp40, μια και μέλη της οικογένειας αυτής είναι αναπόσπαστα τμήματα, τόσο της μηχανής αναδίπλωσης όσο και της μηχανής αποικοδόμησης.

1.6) Συμμετοχή των πρωτεϊνών hsp40 σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες

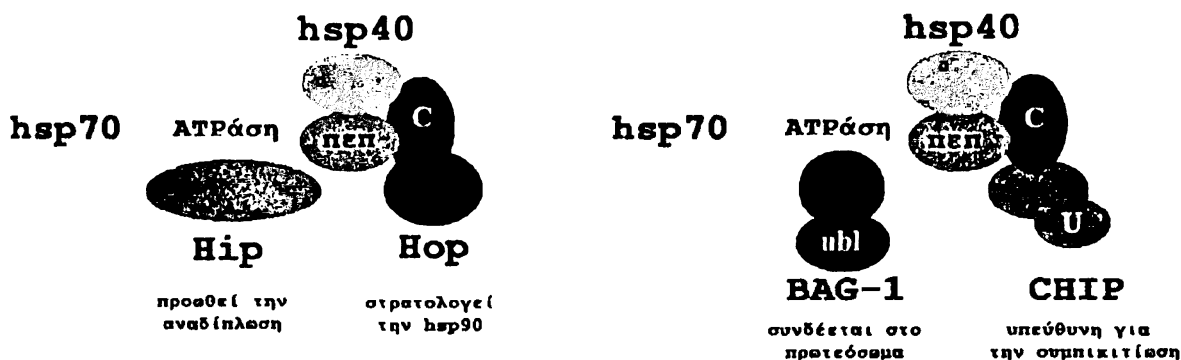
Πέρα από το βασικό ρόλο που διαδραματίζουν στην κυτταροπλασματική μηχανή αναδίπλωσης, οι πρωτεΐνες της οικογένειας hsp40 συμμετέχουν σε μια πληθώρα κυτταρικών φαινομένων. Σύμφωνα με τις πληροφορίες που συσσωρεύονται συνεχώς, η



ποικιλία αυτής της συμμετοχής οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ικανότητα που έχουν οι πρωτεΐνες αυτές, να προσελκύουν σε διάφορες θέσεις δράσης του κυττάρου, τα αντίστοιχα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hsp70, τα οποία και θα αποτελέσουν τους βασικούς διεκπαιρωτές της συγκεκριμένης λειτουργίας. Κατά ένα δευτερεύοντα λόγο, η ποικιλία αυτή μπορεί να ερμηνευτεί μέσα από ένα πιο αυτόνομο και ανεξάρτητο ρόλο που φαίνεται να παίζουν, τουλάχιστον ορισμένα μέλη της οικογένειας hsp40. Παρακάτω γίνεται αναφορά σε παραδείγματα κυτταρική δράσης των πρωτεϊνών αυτών.

Μηχανή αναδίπλωσης

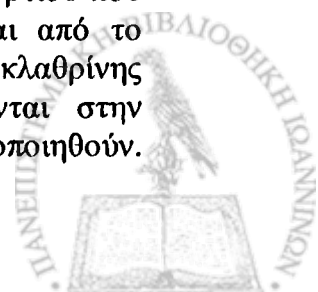
Μηχανή αποικοδόμησης



Εικόνα 6. Μοντέλο των μηχανών που είναι δυνατό να σχηματίζουν οι πρωτεΐνες hsp70. Δέσμευση διαφορετικών συμπαραγόντων στο αμινοτελικό άκρο της hsp70, καθώς και στο καρβοξυτελικό της μπορεί να καθορίζουν τη σύσταση μηχανών που εμπλέκονται είτε στην αναδίπλωση των πολυπεπτιδικών υποστρωμάτων είτε στην αποικοδόμηση αυτών. Οι συμπαραγόντες Hip και BAG-1, ανταγωνίζονται για αλληλοεπικαλυπτόμενες θέσεις δέσμευσης στην ΑΤΡάση της hsp70, ενώ οι Hop και CHIP, κάνουν το ίδιο προκειμένου να συνδεθούν με το καρβοξυτελικό άκρο αυτής. Παρόλα αυτά, συμπαραγόντες όπως οι πρωτεΐνες hsp40, συνεργάζονται σταθερά με τις πρωτεΐνες hsp70, τόσο στην αναδίπλωση όσο και στην αποικοδόμηση. (πεπ: περιοχή σύνδεσης πεπτιδίου της hsp70, ubl: περιοχή ubiquitin-like της BAG-1, U: U-box της CHIP). (Από Hohfeld J., Douglas M.C. και Patterson C., 2001, *EMBO reports* 2, 889)

1.6.1) Ενδοκυττάρωση και εξωκυττάρωση

Ενδοκυττάρωση: Όπως είναι γνωστό, η ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων, λαμβάνει χώρα σε ειδικές θέσεις της πλασματικής μεμβράνης, που καλούνται εσοχές καλυμμένες με κλαθρίνη (clathrin-coated pits). Από τις θέσεις αυτές, ξεκινά ο σχηματισμός των καλυμένων κυστιδίων (coated vesicles) με τη συγκρότηση των τρισκελίων της κλαθρίνης σε πολυεδρικά δικτυωτά σαν καλάθια, που περιλαμβάνουν τα συμπλέγματα μεταξύ των ανταπτινών (AP-2) με τους μεμβρανικούς υποδοχείς και του φορτίου που μεταφέρεται. Στο εσωτερικό του κυττάρου, τα κυστίδια απογυμνώνονται από το κάλυμα τους και συντήκονται με τα ενδοσώματα, καθώς το δικτυωτό της κλαθρίνης αποσυνγκροτείται στα συστατικά του μέρη, τα οποία επαναπροωθούνται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθούν.



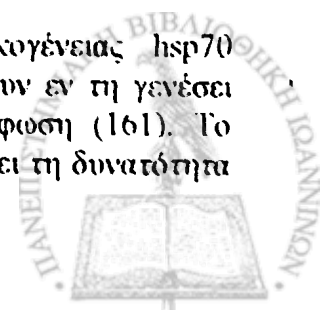
Σήμερα, είναι πλέον αποδεκτό, ότι τουλάχιστον για την αποσυγκρότηση των δικτυωτών της κλαθρίνης είναι υπεύθυνες κυρίως δύο πρωτεΐνες: η hsc70 και μια που ανήκει στην οικογένεια hsp40 και καλείται οξιλίνη (auxilin) (134,135,136,137). Σύμφωνα με το τρέχον μοντέλο, η οξιλίνη –η οποία ανήκει στις hsp40s τύπου III– είναι εκείνη που πρώτη δεσμεύεται στα δικτυωτά της κλαθρίνης και προσανατολίζει την hsc70 πάνω τους, μέσω της περιοχής J, ενώ ταυτόχρονα, διεγείρει τη δραστηριότητα ΑΤΡάσης του μοριακού συνοδού (138,139). Στη συνέχεια η hsc70 αναλαμβάνει τη διάσπαση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τρισκελίων της κλαθρίνης και τελικά την αποσυναρμολόγηση του δικτυωτού. Η hsc70 φέρεται να παραμένει συνδεδεμένη με τα αποσυγκροτημένα τρισκέλια της κλαθρίνης, ενώ η οξιλίνη ανακυκλώνεται σε διαδοχικούς κύκλους αποσυγκρότησης νέων καλαθιών κλαθρίνης (140).

Εξωκυττάρωση: Μια άλλη ομάδα πρωτεϊνών hsp40, τύπου III, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της εξωκυττάρωσης είναι οι csp (cysteine string proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές αρχικά βρέθηκαν στα νευρικά κύτταρα (141) και πιο συγκεκριμένα στην κυτταροπλασματική πλευρά των συναπτικών κυστιδίων (142), στη συνέχεια, όμως, ανακαλύφθηκε ότι αποτελούν συστατικά των εκκριτικών κυστιδίων διαφόρων εκκριτικών ιστών (143). Αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους δεν είναι γνωστός θεωρείται ότι οι csp προσανατολίζουν τη hsc70 στην κυτταροπλασματική πλευρά τόσο της πλασματικής μεμβράνης όσο και αυτής των συναπτικών κυστιδίων, προκειμένου να συντονίσουν από κοινού τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης, σε συνεργασία με άλλους παράγοντες που μένει να αποκαλυφθούν (144,145).

1.6.2) Ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών και βιογένεση οργανιδίων

Μεταφορά πρωτεϊνών σε οργανίδια του κυττάρου: Έχειδειχθεί, ότι μέλη της οικογένειας hsp40, δραματίζουν ενεργό ρόλο στην μεταφορά πρόδρομων πρωτεϊνικών μορφών στις μεμβράνες των κυτταρικών οργανιδίων (154). Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες ydj1 και hdj2, οι οποίες αποτελούν δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες hsp40 τύπου I, στον σακχαρομύκητα και στον άνθρωπο αντίστοιχα, εμπλέκονται στην μεταφορά πρόδρομων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Ε.Δ.) (155,156,157,158). Σε πειράματα με στελέχη σακχαρομύκητα, που έφεραν μεταλλάξεις για το γονίδιο της ydj1, δείχθηκε ότι ο μηχανισμός μεταφοράς των μιτοχονδριακών υποστρωμάτων βασίζεται στην ydj1 και ιδιαίτερα ότι η πρωτεΐνη αυτή δρα σε ένα μετα-μεταφραστικό στάδιο, που έχει να κάνει περισσότερο με τη διευκόλυνση της μετακίνησης των πρωτεϊνών αυτών, δια μέσω της μεμβράνης των μιτοχονδρίων (156). Όσον αφορά την hdj2, στοιχεία για το ρόλο της σε μια τέτοια μεταφορά προέρχονται από *in vitro* πειράματα (158,159). Σε αυτά, ελέγχθηκε η συμμετοχή της hdj2 στην είσοδο καθαρών ανασυνδυασμένων μιτοχονδριακών πρόδρομων πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (158). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η hdj2 παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της εισαγωγής, αλλά σε ένα πιο πρώιμο στάδιο σε σχέση με αυτό που εμπλέκεται η ydj1 και το οποίο έχει να κάνει κυρίως με την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, αμέσως μετά την μετάφραση της (158). Παρόλο λοιπόν που είναι αποδεκτή η σημασία των πρωτεϊνών αυτών στη μεταφορά πολυπεπτιδίων στα ενδοκυτταρικά οργανίδια, ακόμη δεν είναι κατανοητός ο μηχανισμός με τον οποίο συμμετέχουν στην μεταφορά αυτή. Δύο υποθέσεις υπάρχουν (160):

- Οι πρωτεΐνες hsp40 συνεργάζονται με πρωτεΐνες της οικογένειας hsp70 προκειμένου να εξασφαλίσουν ότι οι πρόδρομες πρωτεΐνες θα λάβουν εν τη γενέσει τους μια μερικώς αναδιπλωμένη και ικανή για εισαγωγή διαμόρφωση (161). Το ερώτημα που τίθεται εδώ, είναι πως η ίδια μηχανή (hsp70-hsp40) έχει τη δυνατότητα



να διακρίνει τις πρόδρομες πρωτεΐνες των οργανιδίων από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, τις οποίες και προωθεί στην πλήρη αναδίπλωση. Απάντηση σε αυτό το ερώτημα δόθηκε, τουλάχιστον όσον αφορά τις πρόδρομες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, μετά την ανακάλυψη των παραγόντων PBF (presequence binding factor) (162) και MSF (mitochondrial import stimulation factor) (163). Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζουν και δεσμεύονται στις προαλληλουχίες των πρόδρομων πρωτεϊνών και κατά αυτό τον τρόπο τις βοηθούν να διατηρούνται σε μια κατάσταση ικανή για είσοδο στα μιτοχόνδρια (146,147). Θεωρείται ότι, οι παράγοντες αυτοί, συνεργάζονται με τους μοριακούς συνοδούς, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί στις λεπτομέρειές του (148,149).

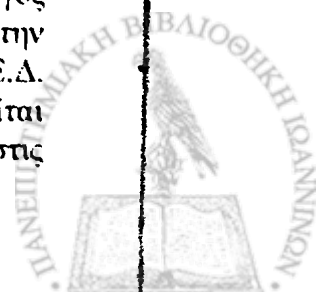
- Οι πρωτεΐνες hsp40 λειτουργούν από μόνες τους ως μοριακοί συνοδοί, που δεσμεύονται με τα υποστρώματα προς μεταφορά, αποτρέπουν την συσσωμάτωσή τους και τους εξασφαλίζουν μια διαμόρφωση ικανή για εισαγωγή στα οργανίδια. Η δυνατότητα που έχουν οι πρωτεΐνες αυτές, να αναδιπλώνουν από μόνες τους, τουλάχιστον μερικώς, μετουσιωμένα πολυπεπίδια, έχειδειχθεί για αρκετά μέλη αυτής της οικογένειας συμπεριλαμβανομένων και των ydj1 και hdj2 (75,163,164,165). Λόγω του ότι φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο το αμινοξικό πρότυπο CAAX (όπου C: κυστεΐνη, A: κάποιο από τα αλιφατικά αμινοξέα και X: οποιοδήποτε αμινοξύ), υφίστανται μετα-μεταφραστικής τροποποίησης με την προσθήκη, μέσω ενός θιεθερικού δεσμού, μιας ομάδας φαρνεσουλίου (ισοπρενοειδές λιπίδιο αποτελούμενο από 15 άτομα C) (166). Όπως είναι γνωστό, η τροποποίηση αυτή, καθιστά τις πρωτεΐνες που την φέρουν, ικανές να αγκυροβολούν στις μεμβράνες του κυττάρου (166). Η ικανότητα αυτή έχειδειχθεί για την πρωτεΐνη ydj1 (167). Το γεγονός αυτό κάνει πολύ πιθανό το ενδεχόμενο, οι φαρνεσυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών αυτών να είναι προσδεδεμένες στην κυτταροπλασματική πλευρά των οργανιδίων και να δέχονται τα υποστρώματα προς μεταφορά από τις αντίστοιχες κυτταροπλασματικές μη φαρνεσυλιωμένες μορφές τους, διαδραματίζοντας ένα πιο ενεργό ρόλο στη διάβαση των υποστρωμάτων μέσω των μεμβρανών. Έτσι, στις περιπτώσεις εκείνες, που αναστέλλονταν η φαρνεσυλίωση της πρωτεΐνης ydj1 (με μετάλλαξη στην τελική κυστεΐνη) υπήρχε σημαντική μείωση της μεταφοράς κάποιων υποστρωμάτων στα μιτοχόνδρια (156). Κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε για μια άλλη πρωτεΐνη hsp40 (τύπου II), που καλείται hsj1b. Η πρωτεΐνη αυτή, εκφράζεται επιλεκτικά στα νευρικά κύτταρα και εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του Ε.Δ., όπου είναι προσδεδεμένη, χάρη σε μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση του καρβοξυτελικού της άκρου, παρόμοια προς την φαρνεσυλίωση (168). Η hsj1b βρέθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση αλλά και στην μεταφορά της πρωτεΐνης ροδοψίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ανεξάρτητα μάλιστα από την παρουσία ή όχι μελών της οικογένειας hsp70 (168). Εναλλακτικά, σε μια θεώρηση που θέλει τις δύο παραπάνω υποθέσεις να αλληλοσυμπληρώνονται, οι τροποποιημένες μορφές hsp40 που είναι προσδεδεμένες στις μεμβράνες των οργανιδίων αποτελούν εστίες προσέλκυσης μορίων hsp70, τα οποία αναλαμβάνουν με τη βοήθεια των ακινητοποιημένων μορίων hsp40, να ξεδιπλώσουν τα πρόδρομα πρωτεϊνικά μόρια «in situ», προκειμένου να καταστούν ικανά να διαπεράσουν την μεμβράνη (169).

Δράση εντός του ενδοπλασματικού δικτύου: Η δράση των πρωτεϊνών hsp40 δεν περιορίζεται μόνο στην κυτταροπλασματική πλευρά των οργανιδίων του κυττάρου. Όπως είναι γνωστό, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στο Ε.Δ. δια μέσω ενός διαύλου της μεμβράνης αυτού, του οποίου το κεντρικό συστατικό είναι το ετεροτριμερές σύμπλεγμα Sec61 (170,171,172). Για μερικές πρωτεΐνες, η μεταφορά αυτή γίνεται ταυτόχρονα με την μετάφραση τους, ενώ για άλλες, η μεταφορά γίνεται μετά από την απελευθέρωση τους από τα ριβοσώματα. Όπως αρχικά δείχθηκε στο σακχαρομύκητα, τουλάχιστον για



την δεύτερη περίπτωση, απαιτείται η σύνδεση του συμπλέγματος Sec61 με ένα επιπλέον τετραμερές μεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα. Αυτό απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες Sec62 και Sec63, προκειμένου να σχηματιστεί το επταμερές σύμπλεγμα Sec, που αποτελεί το σύμπλεγμα μετατόπισης (translocon) (173,174). Η πρωτεΐνη Sec63 ανήκει στην οικογένεια hsp40, είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία φέρει τη λειτουργική περιοχή J προς τον αυλό του Ε.Δ. και παίζει καθοριστικό ρόλο στην μετατόπιση των πρωτεϊνών σε συνεργασία με μια πρωτεΐνη hsp70 του Ε.Δ., που καλείται Kar2 (175,176,177). Ο ρόλος της Sec63 φαίνεται να είναι αυτός μιας κλασικής πρωτεΐνης DnaJ, αφού σε *in vitro* πειράματα, έχει φανεί ότι η περιοχή της πρωτεΐνης που προβάλλει στον αυλό του Ε.Δ. και περιέχει την περιοχή J, είναι ικανή να προωθεί μια ATP-εξαρτώμενη αλληλεπίδραση με την Kar2, διεγείροντας τη δραστηριότητα ATPάσης που φέρει το αμινοτελικό της άκρο (178). Η αλληλεπίδραση αυτή, όμως, έχει άμεση σχέση με την μετατόπιση των πρωτεϊνών εντός του Ε.Δ. αφού μεταλλάξεις στη J λειτουργική περιοχή της Sec63 έχουν ως αποτέλεσμα, όχι μόνο την απώλεια αλληλεπίδρασης με την Kar2, αλλά και την παρεμπόδιση της μετατόπισης των πρωτεϊνών (179). Αν και ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός, θεωρείται πιο πιθανό ότι τα πολυπεπίδια εισέρχονται παθητικά, δια μέσω του καναλιού στον αυλό του Ε.Δ., υπό μερικώς αναδιπλωμένη διαμόρφωση. Εκεί, συγκρατούνται από μια σειρά διαδοχικών μορίων Kar2, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από τη Sec63, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται τοπισωγύρισμα προς την κυτταροπλασματική πλευρά (180). Εντός του αυλού του Ε.Δ. έχουν εντοπιστεί δύο ακόμη, διαλυτές αυτή την φορά, πρωτεΐνες hsp40, η Scj1 και η Jem1. Η Scj1 συνεργάζεται με την Kar2 στην αναδίπλωση και τη συγκρότηση πρωτεϊνών στο Ε.Δ. (181), ενώ και οι δύο φαίνεται ότι απαιτούνται στην διευκόλυνση της ανάδρομης μετατόπισης (retrograde translocation) υποστρωμάτων από το Ε.Δ. στο κυτταρόπλασμα. Τα υποστρώματα αυτά είναι συνήθως πρωτεΐνες που δεν μπορούν να λάβουν την ορθή τους διαμόρφωση και τα οποία μέσα από τη διαδικασία, που καλείται έλεγχος ποιότητας Ε.Δ. (ER quality control), οδηγούνται προς αποικοδόμηση (ER-associated degradation) (182). Οι πρωτεΐνες Scj1 και Jem1 φαίνεται ότι συμμετέχουν στην παρεμπόδιση της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών αυτών στον αυλό του Ε.Δ. και την προώθηση τους στο σύμπλεγμα ανάδρομης μετατόπισης (183), του οποίου συστατικό θεωρείται ότι αποτελεί και πάλι η πρωτεΐνη Sec63 (184).

Πρόσφατα, έχουν βρεθεί στο Ε.Δ. των θηλαστικών πέντε μέλη της οικογένειας hsp40, οι πρωτεΐνες: ERdj1/Mtj1, ERdj2/hSec63, ERdj3/HEDJ, ERdj4 και ERdj5. Από αυτές, με βάση τη δομή τους η ERdj1 (185) και η ERdj2 (186) φαίνεται να είναι ομόλογες προς την πρωτεΐνη Sec63 του σακχαρομύκητα, ενώ για την ERdj2 έχει δειχθεί ότι συνδέεται με πρωτεΐνες του συμπλέγματος μετατόπισης (187). Από την άλλη, η αλληλουχία της ERdj3 (188) έχει ομολογία προς την πρωτεΐνη Scj1 του σακχαρομύκητα, ενώ σε *in vitro* πειράματα, η πρωτεΐνη είχε την ικανότητα να δεσμεύεται στην πρωτεΐνη BiP (189) η οποία είναι ομόλογη της Kar2 στα κύτταρα των θηλαστικών. Όσον αφορά την ERdj4, φαίνεται ότι είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη στην οποία η λειτουργική περιοχή J προβάλλει στον αυλό του Ε.Δ., και τουλάχιστον σε *in vitro* συνθήκες, διεγείρει τη δραστηριότητα ATPάσης της BiP (190). Το τελευταίο, έχει δειχθεί και για την ERdj5 η οποία βρίσκεται στον αυλό του Ε.Δ. και πέρα από τη περιοχή J φέρει και μια περιοχή ομόλογη προς την περιοχή κατάλυσης του ενζύμου PDI (protein disulfide isomerase). Επίσης φέρει και μια περιοχή ομόλογη προς αυτή του ενζύμου θειορεδοξίνη (thioredoxin) (191). Αν και δεν είναι ακόμη κατανοητός ο λόγος της παρουσίας αυτών των περιοχών, με δεδομένο ότι το μεν PDI συμμετέχει στην οξειδωτική και την ισομερείωση των δισουλφιδικών δεσμών των πολυπεπτιδίων στο Ε.Δ. και η δε θειορεδοξίνη στην αναγωγή των ίδιων δεσμών στο κυτταρόπλασμα, θεωρείται πιθανό η ERdj5 να χρησιμοποιεί αυτές τις περιοχές προκειμένου να συνδράμει στις

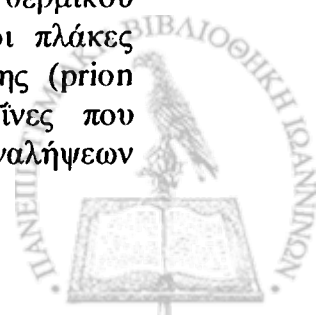


διαδικασίες της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και του ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών στο *E.Δ.* (191).

1.6.3) Αποσυσσωμάτωση πρωτεϊνικών συμπλόκων και αναστολή σχηματισμού έγκλειστων σωματίων

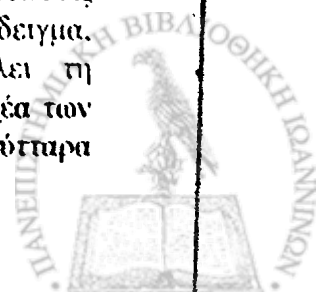
Πέρα από τις δύο βασικές λειτουργίες των μοριακών συνοδών που είναι: α) η αποφυγή της συσσωμάτωσης των μη αναδιπλωμένων πολυπεπτιδίων και β) η υποβοήθηση της σωστής αναδίπλωσης των μετουσιωμένων πρωτεϊνών, μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών *hsp40* συμμετέχουν και σε μια τρίτη λειτουργία, που τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί στη βιβλιογραφία και αφορά στην καταλυτική διαλυτοποίηση και επαναδίπλωση σταθερών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (192). Τα συσσωματώματα αυτά, θεωρείται ότι σχηματίζονται στο κύτταρο κάτω από έντονες συνθήκες στρες, όταν η χωρητικότητα των μηχανών αναδίπλωσης κορέννυται, με αποτέλεσμα οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες να συναθροίζονται σε μεγάλα αδιάλυτα σύμπλοκα. Όπως δείχθηκε όμως στο *E. coli*, η συσσωμάτωση αυτή είναι παροδική, αφού το αδιάλυτο κλάσμα εξαφανίζεται, μετά από μια μικρή περίοδο ανάκαμψης, χάρη στην επαναδίπλωση ή την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αυτών, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού αποσυσσωμάτωσης (*disaggregation*) (193,194). Στο προκαρυωτικό κύτταρο, διάφορα στοιχεία συνηγορούν στο ότι η επιχείρηση επαναδιαλυτοποίησης των συσσωματωμένων πρωτεϊνών, κατευθύνεται από σύστημα μοριακών συνοδών, που αποτελείται από την πρωτεΐνη *ClpB* (ανήκει στην οικογένεια *Hsp100*) και τις πρωτεΐνες *DnaK-DnaJ-GrpE* (194,195). Έτσι, σε ένα σύστημα *in vitro* αποσυσσωμάτωσης, οι παραπάνω πρωτεΐνες έδειξαν να είναι ικανές να καταλύουν την αποσυσσωμάτωση και την επαναδίπλωση μιας μεγάλης ποσότητας σταθερού συσσωματώματος, που είχε σχηματιστεί από την μετουσιωμένα μόρια μιτοχονδριακής μηλικής αφυδρογονάσης (196). Επιπλέον, με την χρήση ειδικών αναστολέων έναντι της *ClpB*, αποδείχθηκε ότι το σύστημα *DnaK-DnaJ-GrpE* έχει την ικανότητα να επαναδιαλυτοποιεί μικρά σταθερά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Αυτά, φυσιολογικά εκθέτουν στην επιφάνεια τους περισσότερες υδρόφοβες επιφάνειες, σε σχέση με τα μεγάλα αδιάλυτα συσσωματώματα, για την επαναδιαλυτοποίηση των οποίων, απαιτείται απαραίτητα η συνεργιστική δράση της *ClpB* (197). Το σημαντικότερο εύρημα ήταν, ότι ο πυρήνας της μηχανής αποδιοργάνωσης των συμπλόκων ήταν η *DnaK*, ενώ οι πρωτεΐνες *DnaJ*, *GrpE* καθώς και η *ClpB*, δρουν υποβοηθητικά, αφού η προσθήκη τους, απλά αυξάνει την αντίδραση της αποσυσσωμάτωσης (196). Επίσης, καμμία από τις παραπάνω πρωτεΐνες -όπως και μια σειρά άλλων μοριακών συνοδών που δοκιμάστηκαν- πλην της *DnaK*, δεν διαθέτει την ικανότητα από μόνη της να επανεργοποιεί σημαντική ποσότητα μηλικής αφυδρογονάσης, που είναι εγκλωβισμένη σε σταθερά συσσωματώματα (196). Επομένως, από τις τρέχουσες μελέτες στο προκαρυωτικό κύτταρο, προκύπτει ότι η πρωτεΐνη *DnaJ* στη λειτουργία της αποδιοργάνωσης των σταθερών συσσωματωμάτων περιορίζεται στον παραδοσιακό ρόλο της ως συν-συνοδού μορίου της *DnaK*, που διεγείρει την δραστηριότητα ΑΤΡάσης που φέρει η τελευταία.

Hsp40, έγκλειστα σωμάτια και παθολογία των κυττάρων των θηλαστικών: Στη συσσωματωμένη τους μορφή, οι ανενεργές πρωτεΐνες σχηματίζουν άλλοτε άμορφες δομές, όπως είναι τα έγκλειστα σωμάτια (*inclusion bodies*) ή τα κοκκία του θερμικού σοκ (*heat shock granules*) και άλλοτε διατεταγμένες ίνες όπως είναι οι πλάκες αμυλοειδούς (*amyloid plaques*) και τα σωματίδια μολυσματικής πρωτεΐνης (*prion particles*) (198,199,200). Παράδειγμα αποτελούν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που εμφανίζουν στην αλληλουχία τους επεκτάσεις, πέραν του φυσιολογικού, επαναλήψεων



του τριουκλεοτιδίου CAG το οποίο και κωδικοποιεί το αμινοξύ γλουταμίνη και οι οποίες συσσωματώνονται στο κύτταρο σε έγκλειστα σωμάτια. Δομές σαν και αυτές, χαρακτηρίζουν την παθολογία εννέα διαφορετικών νευροεκφυλιστικών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων των ασθενειών του Huntington, του Parkinson, του Alzheimer (201). Τα τελευταία χρόνια, με την χρήση βιοχημικών και ανοσοϊστοχημικών τεχνικών, έγινε αντιληπτό, ότι σε τέτοια σωμάτια, συνεντοπίζονται μια πληθώρα κυτταρικών πρωτεϊνών, όπως ουμπικιτίνη και συστατικά του πρωτεοσώματος (202,203), συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες (204), καθώς και μοριακοί συνοδοί (205). Από τους τελευταίους, μάλιστα, φαίνεται να επιστρατεύονται στα συσσωματώματα, μόνο, μέλη των οικογενειών hsp40 και hsp70 καθώς και η πρωτεΐνη του σακχαρομύκητα hsp104 (206) -η οποία ανήκει στην οικογένεια hsp100 και είναι ομόλογη της βακτηριακής ClpB- και για την οποία δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής κάποια ομόλογη στα κύτταρα των θηλαστικών. Στις περισσότερες αναφορές, εξετάζεται το αποτέλεσμα της δράσης του συστήματος hsp70/ hsp40 στην δημιουργία των εγκλειστων σωματίων καθώς και της τοξικότητας που αυτά προκαλούν, μετά από υπερέκφραση είτε ταυτόχρονα και των δύο πρωτεϊνών, είτε καθεμιάς χωριστά (207,208,209). Αποτελεί γενικευμένη παρατήρηση ότι η συνδυαστική υπερέκφραση και των δύο μοριακών συνοδών, παρόλο που δεν παρεμποδίζει δραστικά τον σχηματισμό των συσσωματωμάτων πολυγλουταμίνης (polyQ aggregates), καταστέλλει αποτελεσματικά την τοξικότητα τους (210). Η εξήγηση αυτού του γεγονότος, προέρχεται από *in vitro* πειράματα, στα οποία καθαρές πρωτεΐνες hsp40 και hsp70, είχαν τη δυνατότητα να καταστέλλουν κατά ένα ATP-εξαρτώμενο τρόπο τη συγκρότηση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης χαντινγκντίνης (huntingtin), σε διατεταγμένες ίνες αμυλοειδούς, αδιάλυτες σε SDS, και αντιθέτως, να επιτρέπουν το σχηματισμό άμορφων συσσωματωμάτων αυτής, διαλυτών σε SDS, τα οποία και παρέμεναν συνδεδεμένα με τους δύο συνοδούς (211). Τα αποτελέσματα αυτά, αναπαρήχθησαν τόσο σε κύτταρα θηλαστικών (212) όσο και σε μοντέλα μύγας (213), οπότε και επιβεβαιώθηκε ότι η ταυτόχρονη υπερέκφραση των δύο μοριακών συνοδών αυξάνει τη διαλυτότητα των συσσωματωμάτων πολυγλουταμίνης. Σύμφωνα λοιπόν με τη τρέχουσα άποψη, η εμπλοκή των hsp40 και hsp70 στα έγκλειστα σωμάτια, δρα αποτρεπτικά σε δύο κατευθύνσεις. Πρώτον, αποτρέπει την ανάληψη από τα μόρια της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης της β-πτυχωτής δομής, που οδηγεί στο διατεταγμένο ολιγομερισμό τους και τελικά στην αδιαλυτοποίησή τους. Δεύτερον, αποτρέπει τη συγκόλληση στα σωμάτια αυτά, βασικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως, οι CBP (CREB binding protein) (214) και TBP (TATA binding protein) (215) καθώς και συστατικών του πρωτεοσώματος (π.χ το ρυθμιστικό σύμπλοκο 19S) (216). Έτσι κατά αυτόν τον τρόπο, διευκολύνεται η εύρυθμη κυτταρική λειτουργία και η ομαλή ροή αποικοδόμησης των συσσωματωμένων πρωτεϊνών (210).

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι και σε αυτό το κυτταρικό φαινόμενο, τα μέλη της οικογένειας hsp40 διαδραματίζουν ρόλο υποβοηθητικό των πρωτεϊνών hsp70. Όμως, το ενδιαφέρον της μελέτης αυτών των νευροεκφυλιστικών ασθενειών σε μοριακό επίπεδο, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, είναι ότι συγκεκριμένα μέλη αυτής της οικογένειας, δύναται να έχουν ένα πιο δυναμικό και ανεξάρτητο ρόλο. Έτσι, σε μια πληθώρα αναφορών, η υπερέκφραση μόνο μιας πρωτεΐνης hsp40 (συνήθως της hsj2 ή της hsj1), έχει ως επακόλουθο, είτε την μείωση της απόπτωσης των κυττάρων (217), είτε την καταστολή του νευροεκφυλισμού (218) και σε ορισμένες περιπτώσεις την μείωση του μεγέθους των έγκλειστων σωματίων (219). Έτσι για παράδειγμα, υπερέκφραση της πρωτεΐνης hsj2, έχει τη δυνατότητα να καταστέλλει τη συσσωμάτωση δύο μεταλλαγμένων πολυγλουταμινικών πρωτεϊνών, του υποδοχέα των ανδρογόνων (220) και της πρωτεΐνης αταξίνης-1 (ataxin-1) (219) σε κύτταρα



θηλαστικών. Επίσης, η ίδια πρωτεΐνη καθώς και η h_h1, είναι ικανές από μόνες τους, όταν υπερεκφραστούν σε κύτταρα COS7 και σε νευρικά κύτταρα PC12 που υπερεκφράζουν την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αταξίνη-3 (ataxin-3), να καταστέλλουν το σχηματισμό συσσωματωμάτων αυτής (217). Στην ίδια μάλιστα μελέτη, η ταυτόχρονη υπερέκφραση της hsp70 δεν αύξησε το μέγεθος αυτής της καταστολής. Αντίστοιχα, όταν έγινε διαμόλυνση των παθολογικών κυττάρων με πλασμιδιακή κατασκευή η οποία κωδικοποιούσε μια μορφή της h_h2, η οποία δεν περιελάμβανε στην αλληλουχία της την λειτουργική περιοχή J (που όπως έχει προαναφερθεί επανειλημένως είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της με την hsp70), παρατηρήθηκε ότι η h_h2 διατηρούσε την ικανότητα καταστολής των συσσωματωμάτων (217). Όλα αυτά τα δεδομένα -λοιπόν, αφήνουν ανοιχτή την πιθανότητα η συμμετοχή συγκεκριμένων πρωτεϊνών hsp40, στο μηχανισμό αποσυσσώματωσης των πολυγλουταμινικών σωματίων, να μη βασίζεται μόνο στις αλληλεπιδράσεις τους με τις hsp70 αλλά και στην ικανότητα που έχουν οι πρωτεΐνες αυτές να δεσμεύουν και να παγιδεύουν τις μη ορθά αναδιπλωμένες πολυγλουταμινικές πρωτεΐνες κατά τη διαδικασία εξουδετέρωσης της τοξικότητας τους. Τέλος, η εξαιρετική σημασία που έχουν οι πρωτεΐνες hsp40 στην ομαλοποίηση αυτής της κυτταρικής δυσλειτουργίας, τις καθιστά μαζί με τις πρωτεΐνες hsp70 πιθανούς στόχους στην πορεία αντιμετώπισης της παθογένειας αυτού του είδους των νευροεκφυλιστικών ασθενειών (205).

1.7) Ειδικότητα της σχέσης πρωτεϊνών hsp40 και hsp70

Παρά το γεγονός ότι η σχέση μεταξύ των μελών της οικογένειας hsp40 και αυτών της οικογένειας hsp70 είναι καλά στοιχειοθετημένη, στο παρασκήνιο αυτής της συνεργασίας, παραμένει το σημείο που αφορά το βαθμό της ειδικότητας της. Από σποραδικές πληροφορίες που ανευρίσκονται στη βιβλιογραφία, καταδεικνύεται ότι συγκεκριμένες πρωτεΐνες hsp40 συνεργάζονται με συγκεκριμένες πρωτεΐνες hsp70, το οποίο ταυτόχρονα σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές πιθανόν να αποτελούν λειτουργικά αλληλεπιδρώντα σύμπλοκα, σε πραγματικές καταστάσεις μέσα στο κύτταρο (221,222).

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης τους προϋποθέτει την γνώση των σημείων επαφής μεταξύ των δύο ομάδων πρωτεϊνών. Όπως σημειώθηκε και προηγούμενα (βλ.εν. 1.4), απαραίτητη προϋπόθεση για την αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι η ύπαρξη στη λειτουργική περιοχή J της hsp40 ενός ακέραιου (και άκρως συντηρημένου μεταξύ των πρωτεϊνών hsp40) τριπεπτιδίου HPD (εικ. 2B). Επιπλέον, μελέτες με NMR στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι βακτηριακές DnaJ και DnaK (οι αντίστοιχες δηλαδή hsp40 και hsp70), έδειξαν ότι η αλληλεπιδρώσα επιφάνεια που λαμβάνει μέρος στην αντίδραση από την πλευρά του μορίου hsp40, μπορεί να αποτελείται μόνο από την αλληλουχία μεταξύ των καταλοίπων 2 και 35, τα οποία περιλαμβάνουν τα αμινοξέα της α-έλικας II και φυσικά το τριπεπτιδικό πρότυπο HPD (223). Από την άλλη, η θέση επαφής του τμήματος αυτού της περιοχής J με το μόριο της hsp70, εντοπίζεται σε μια σχισμή που διαμορφώνεται από δύο υποπεριοχές που έχουν δομή α-έλικας και βρίσκονται στο κέντρο της περιοχής με δραστηριότητα ΑΤΡάσης (224). Μεταλλάξεις των αμινοξέων εκατέρωθεν αυτής της σχισμής, μειώνουν δραματικά την ικανότητα της DnaK να συνδέεται με τη DnaJ (225).

Το ερώτημα όμως, ποιά είναι εκείνα τα αμινοξέα τα οποία είναι υπεύθυνα για την εξειδίκευση της σχέσης μεταξύ των δύο ομάδων πρωτεϊνών δεν έχει ακόμη απαντηθεί. Σε μια εργασία των Hennessy και συνεργατών, έγινε πολλαπλή αμινοξική αντιπαράθεση των περιοχών J, από 223 πρωτεΐνες hsp40, οι οποίες ανήκαν και στους τρεις τύπους κατάταξης (I,II,III) (226). Το συμπέρασμα που εξήχθη από τη σύγκριση, είναι ότι τα αμινοξέα της περιοχής αυτής, μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις



κατηγορίες. Στην πρώτη, ανήκουν αυτά που είναι άκρως απαραίτητα για τη συγκρότηση της δομής της λειτουργικής περιοχής και υψηλά συντηρημένα. Μεταξύ αυτών, συγκαταλέγονται το τριπεπτιδίο HPD καθώς και το τριπεπτιδίο KFK (όπου K=λυσίνη, F=φαινυλαλανίνη). Στη δεύτερη κατηγορία, ανήκουν τα αμινοξέα εκείνα, που είναι σημαντικά για την γενική αντίδραση αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες hsp70. Εδώ συμπεριλαμβάνονται, φυσικά, το τριπεπτιδίο HPD καθώς και συντηρημένα θετικά αμινοξέα (λυσίνες και αργινίνες), για τα οποία έχει αναφερθεί (225) ότι είναι σε θέση να αλληλεπιδρούν με αρνητικά αμινοξέα της περιοχής ATPάσης της hsp70. Τέλος, στην τελευταία ομάδα, κατατάσσονται τα αμινοξέα που πιθανά καθορίζουν την ειδικότητα της σχέσης μεταξύ των εν λόγω πρωτεϊνών. Αυτά, είναι τα λιγότερο συντηρημένα, τόσο μεταξύ των τριών τύπων κατάταξης I, II, III όσο και μεταξύ των πρωτεϊνών hsp40 που ανήκουν στον ίδιο τύπο. Παρόλο, που οι υποθέσεις που περιέχονται σε αυτή την μελέτη προέρχονται από θεωρητικές αναλύσεις, ταυτόχρονα, προσπαθούν να δώσουν εξήγηση στην ειδικότητα της σχέσης μεταξύ των πρωτεϊνών hsp40 και hsp70, η οποία και έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες. Έτσι, για παράδειγμα, όταν αντικαταστάθηκε η περιοχή J της πρωτεΐνης Sec63, είτε με αυτήν μιας κυτταροπλασματικής hsp40 του σακχαρομύκητα (*Sis1*), είτε αντίστοιχα, της μιτοχονδριακής αυτού (*Mdj1*), η πρώτη κατέστη ανενεργός (227). Η ενεργότητά της επανήλθε, μετά από υποκατάσταση τριών αμινοξέων στη J περιοχή του χιμαιρικού μορίου, αμινοξέων που υπάρχουν κανονικά στην περιοχή αυτή της φυσιολογικής πρωτεΐνης Sec63 (227). Επιπλέον, η εξειδίκευση της σχέσης μεταξύ Sec63 και Kar2, δείχθηκε με την χρήση ενός *in vitro* συστήματος πρωτεϊνικής μετατόπισης με το οποίο εξετάστηκε η δυνατότητα της Sec63 να συνεργάζεται πέρα από την hsp70 του Ε.Δ. και με την κυτταροπλασματική ή την μιτοχονδριακή ομόλογη της. Τα αποτελέσματα για τις δύο τελευταίες υπήρξαν αρνητικά, γεγονός που ερμηνεύεται μέσα από την αποτυχία της περιοχής J της Sec63 να αλληλεπιδρά με άλλες hsp70, πλην αυτής του Ε.Δ. (228,229).

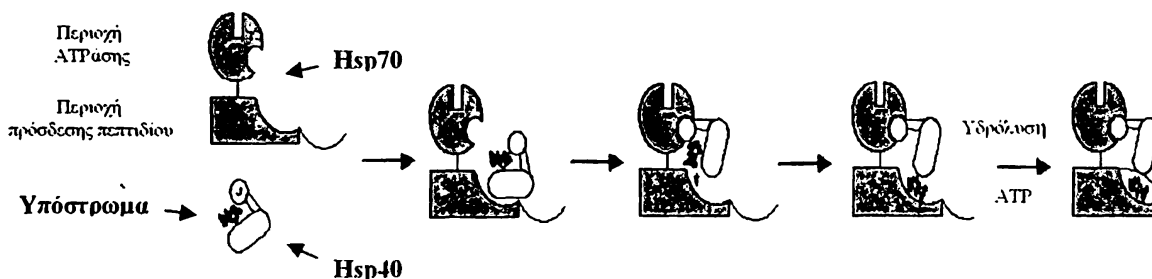
Αν και από τα προηγούμενα διαφαίνεται ότι η εν λόγω ειδικότητα καθορίζεται κυρίως από το συνεντοπισμό των πρωτεϊνών hsp40 και hsp70, αυτό δεν είναι απολύτως σωστό. Υπάρχουν αποδείξεις, ότι ακόμη και οι πρωτεΐνες hsp70 που εδράζουν στο ίδιο κυτταρικό διαμέρισμα, μπορεί να εμφανίζουν διαφορές στις αλληλεπιδράσεις τους με μέλη της οικογένειας hsp40. Στο σακχαρομύκητα για παράδειγμα, από τις δύο κατηγορίες κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών hsp70, τις Ssa και Ssb πρωτεΐνες, μόνο οι πρώτες, συνεργάζονται με την πρωτεΐνη Ydj1 (μια πρωτεΐνη της οικογένειας hsp40), στην παρεμπόδιση της συσσωμάτωσης μετουσιωμένων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, σε *in vitro* συνθήκες (230). Το αντίστροφο, δείχθηκε ότι ισχύει στο κυτταρόπλασμα των θηλαστικών κυττάρων, όσον αφορά την ικανότητα δύο πρωτεϊνών της οικογένειας των hsp40, δηλαδή των hdj1 και Ydj1, να αναπληρώνουν αποτελεσματικά τη δράση μιας άλλης κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης hsp40, της οξιλίνης, στην αποσυγκρότηση των δικτυωτών της κλαθρίνης, σε συνεργασία με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη hsc70. Όπως αποδείχθηκε, οι δύο αυτές πρωτεΐνες hsp40 ήταν όχι μόνο αναποτελεσματικές σε αυτή την υποκατάσταση αλλά μάλλον επέφεραν τα αντίθετα αποτελέσματα, καθώς ανέστειλαν την hsc70-εξαρτώμενη διαδικασία αποσυγκρότησης της κλαθρίνης (231). Τέλος, κάτι παρόμοιο, δείχθηκε ότι ισχύει και για τις κυτταροπλασματικές hsp40 στα κύτταρα θηλαστικών, τις hdj2 και hdj1, όσον αφορά τη συνεργασία τους με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη hsc70, για την μεταφορά πρόδρομων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και την αναδίπλωση χημικά μετουσιωμένης λουσιφεράσης (232). Στα πειράματα που έγιναν σε *in vitro* συνθήκες, φάνηκε ότι εκ των δύο, μόνο η hdj2 ήταν αποτελεσματική, στη διεκπεραίωση αυτών των λειτουργιών σε συνεργασία με τη hsc70 (232).



Εκτός από τις παραλλαγές των αμινοξέων, που παρατηρούνται στις ευαίσθητες περιοχές (π.χ. περιοχή J) και επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μελών των Hsp40 και Hsp70 οικογενειών, η υπόθεση των δύο σιγνάλων (two-signal hypothesis), έρχεται να εξηγήσει περαιτέρω, την ειδικότητα σύνδεσης των πρωτεϊνών αυτών (233). Σύμφωνα με αυτήν, υπάρχουν τουλάχιστον δύο επιφάνειες ελέγχου πάνω στην hsp70: μία για την αλληλεπίδραση με την περιοχή J, μέσω της περιοχής ATPάσης, και μία άλλη πιθανά για πρόσδεση του καρβοξυτελικού άκρου της hsp40 πάνω στην περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίου της hsp70 (εικ. 7). Αν και, καμμία από τις δύο τελευταίες δεν έχει με σαφήνεια προσδιοριστεί, υπάρχουν διάφορες παρατηρήσεις που στηρίζουν αυτήν την υπόθεση (54,122,150) και εφόσον είναι αληθινή μπορεί να ερμηνεύσει ικανοποιητικά το γιατί πρωτεΐνες hsp40, που εντοπίζονται στο ίδιο διαμέρισμα, εμφανίζουν διαφορές στις επιλογές τους για συνεργασία. Όπως είναι γνωστό, οι πρωτεΐνες αυτές, έχουν την μεγαλύτερη ομολογία τους εντός της περιοχής J (φθάνει σε περιπτώσεις και το 50%). Αντιθέτως, στο καρβοξυτελικό τους άκρο έχουν ελάχιστη ομολογία, εως καθόλου. Η έλλειψη αυτή, ερμηνεύεται ως ικανότητα διπλής εξειδίκευσης: εξειδίκευση σε διαφορετικά υποστρώματα και εξειδίκευση σε διαφορετικούς μοριακούς συνοδούς (233). Από τα παραπάνω, λοιπόν, προκύπτει ότι η ειδικότητα της σχέσης μεταξύ hsp40 και hsp70 πρωτεϊνών βασίζεται τόσο στον συνεντοπισμό στο ίδιο κυτταρικό διαμέρισμα, όσο και σε εξελικτικές διαφορές της αμινοξικής τους αλληλουχίας τουλάχιστον σε δύο διαφορετικές λειτουργικές περιοχές. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με παραδείγματα ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ μελών των δύο οικογενειών (ΠΙΝΑΚΑΣ 1).

1.8) Σκοπός της παρούσας μελέτης

Όπως γίνεται φανερό από τα παραπάνω, η μελέτη της δράσης της hsp70, προϋποθέτει την γνώση των συμπαραγόντων με τους οποίους συνεργάζεται καθώς και των σχέσεων που τις διέπει. Σκοπός αυτής της μελέτης, είναι ο χαρακτηρισμός και η μελέτη ενός νέου μέλους της οικογένειας των πρωτεϊνών hsp40 καθώς και η διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων αυτής, με μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hsp70.



Εικόνα 7. Σύμφωνα με την υπόθεση των δύο σιγνάλων, υπάρχουν δύο αλληλεπιδράσεις επιφάνειες μεταξύ των πρωτεϊνών hsp70 και hsp40. Η πρώτη, αφορά την περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίου της hsp70 και μια περιοχή προς το καρβοξυτελικό άκρο της hsp40, η οποία δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Η αλληλεπίδραση αυτή, θεωρείται ότι διεγείρει την μεταφορά υποστρώματος από την hsp40 στην hsp70. Η δεύτερη αλληλεπιδράση επιφάνεια, σχηματίζεται από τμήμα της περιοχής ATPάσης της hsp70 και από την περιοχή J της hsp40. Η δεύτερη αλληλεπίδραση θεωρείται ότι διεγείρει τη δραστηριότητα της ATPάσης και συνάμα το «κλείδωμα» του υποστρώματος στην περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίου της hsp70. (Από Suh W-C et al, 1999, J. Biol. Chem. 274, 30538)



ΠΙΝΑΚΑΣ 1 Μέλη των οικογενειών Hsp70 και Hsp40 και λειτουργίες αυτών

Οικογένεια πρωτεϊνών	Βακτήριο	Σακχαρομύκητας	Θηλαστικά
Hsp70 ΑΤΡάσες 70KDa, δεσμεύουν και σταθεροποιούν τμήματα υδροφοβων αμινοξέων που εκθέτουν στην επιφάνεια τους μεταοξειωμένες πρωτεΐνες	Κοτταρικό διαμέρισμα	Ssa 1-2 Αναδίπλωση πρωτεϊνών. Μετακίνηση πρόδρομων πρωτεϊνών στα οργανίδια του κυττάρου Ssa 3-4 Έκφραση μόνο κάτω από συνθήκες στρες. Ssb 1-2 Δέσμευση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στα ριβοσώματα	Hsc70 Δέσμευση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών. Αποσυγκρότηση δικτυωτών κλαθρίνης Hsp70 Επαγωγή της έκφραση της κάτω από συνθήκες στρες. Παρεμπόδιση της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών μετά από στρες
Hsp40 Συμπαράγοντες 40KDa που σταθεροποιούν τη σύνδεση Hsp70 – υποστρώματος	Μιτοχόνδριο Αυλός Ε.Δ. Κοτταρόπλασμα	Ssc1 Μετακίνηση πρόδρομων πρωτεϊνών εντός του μιτοχονδρίου και αναδίπλωση αυτών Kar2 Μετακίνηση πρόδρομων πρωτεϊνών εντός του Ε.Δ. και αναδίπλωση αυτών Ydj1 Σύνδεση στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Δράση μοριακού συνοδού. Συνεργάζεται με τις πρωτεΐνες Ssa	mtHsp70 (Gpr75) Bip (Gpr78) Δέσμευση μεταοξειωμένων πρωτεϊνών του Ε.Δ. Hdj2 Σύνδεση στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Συνεργάζεται με την πρωτεΐνη Hsc70 Hdj1 Έκφραση επαγόμενη μετά από στρες. Δέσμευση νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες Συνεργάζεται με τη Hsp70
	DnaJ	Sis1 Σύνδεση με το ριβόσωμα Συνεργάζεται με τις πρωτεΐνες Ssa	



Zuotin • Σύνδεση με το ριβόσωμα
 Συνεργάζεται με τις πρωτεΐνες
Ssb **Hdj3** Σύνδεση στις ενδοκυτταρικές
 μεμβράνες. Συνεργάζεται με
 την πρωτεΐνη **Hsc70**

Auxilin Αποσυγκρότηση δικτυωτών
 κλαθρίνης. Συνεργάζεται με
 την **Hsc70**

Μιτοχόνδριο **Tim44** Εισαγωγή πρόδρομων πρωτεϊνών
 στο μιτοχόνδριο. Συνεργάζεται με
 την **Ssc1**

Mdj1 Αναδίπλωση νεοεισαγόμενων
 πρωτεϊνών. Συνεργάζεται με
 την **Ssc1**

Μεμβράνη Ε.Δ. Sec63 Εισαγωγή πρόδρομων πρωτεϊνών
 στο Ε.Δ. Συμμετοχή στον έλεγχο
 ποιότητας του Ε.Δ. Συνεργάζεται
 με την **Kar2**

Αυλός Ε.Δ. Scj1 Αναδίπλωση νεοεισαγόμενων
 πρωτεϊνών. Συνεργάζεται με την
Kar2

Jem1 **ERdj5**

ERdj3 Αλληλεπιδρά με την **Bip**



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



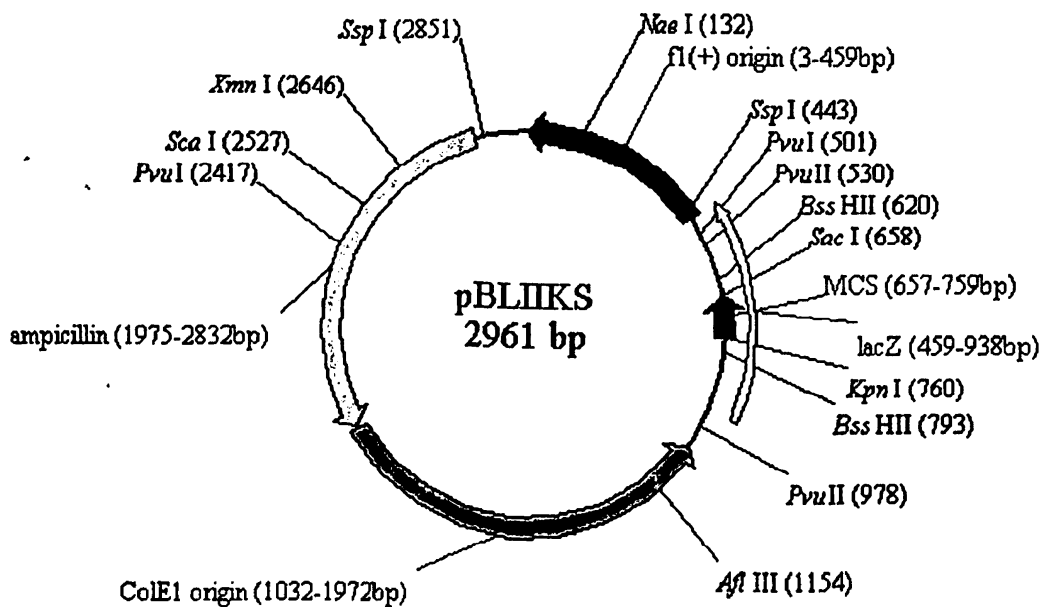
2.1) ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA

2.1.1) Πλασμιδιακοί φορείς και βακτηριακά στελέχη ξενιστές

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση ευκαρυωτικών γονιδίων είναι οι εξής:

α) **pBluescript SK και KS (Stratagene)**. Αυτά τα φαγίδια-φορείς (εικ. 8), που προέρχονται από τον φορέα pUC 19, προσφέρουν τις εξής δυνατότητες:

- περιοχή κλωνοποίησης (MCS), εκατέρωθεν της οποίας, βρίσκονται οι υποκινητές των T3 και T7 φάγων, δίνοντας τη δυνατότητα, της *in vitro* μεταγραφής του κλωνοποιημένου γονιδίου
- τμήμα του γονιδίου lacZ, το οποίο επιτρέπει τη δοκιμή α-συμπληρωματικότητας για την επιλογή των βακτηριακών αποικιών που φέρουν τους ανασυνδυασμένους φορείς με βάση το χρώμα τους (λευκό ή γαλάζιο)
- θέση έναρξης της αντιγραφής του ιώδους φάγου fl (fl origin), η οποία επιτρέπει την *in vivo* παραγωγή μονόκλωνων ανασυνδυασμένων φαγιδίων, όταν το κύτταρο ξενιστής που φέρει το φαγίδιο-φορέα pBluescript II συνμολυνθεί με ένα ιώδη βοηθό φάγο
- γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα έναντι στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη
- θέση έναρξης της αντιγραφής (ori), ColE1 που χρησιμοποιείται απουσία του βοηθού φάγου



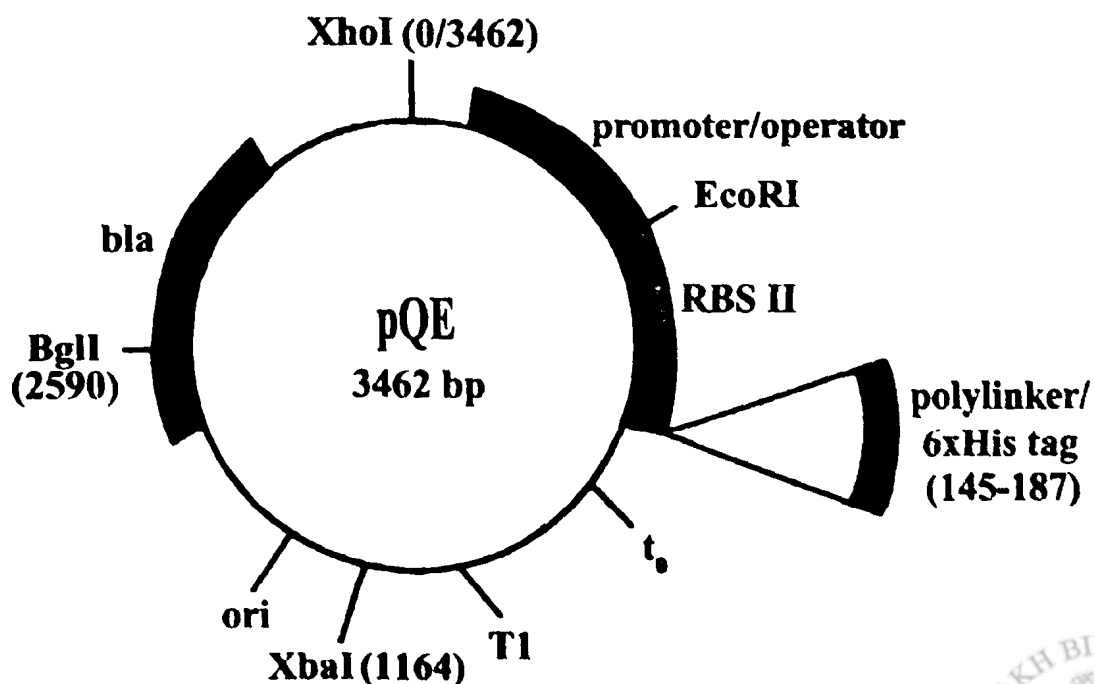
Εικ. 8 Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pBluescript II KS



Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως ξενιστές των φορέων pBluescript II, είναι τα MC1061 [*hsdR2 hsdM⁺ hsdS⁺ araD139 Δ(ara-leu)₇₆₉₇ Δ(LAC)_{x74} galE15 galK16 rpsL (Str^r) mcrA mcrB1*] και τα JM109 [*F' traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^q lacZΔM15/tecA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB) mcrA*]. Και τα δύο αυτά, που αποτελούν τροποποιημένες μορφές του βακτηρίου *E.coli*, χρησιμοποιήθηκαν εξαιτίας της ικανότητας τους να παράγουν συγκριτικά μεγάλες ποσότητες πλασμιδιακού DNA, όταν μετασχηματίζονται από τους παραπάνω φορείς

β) pQE (Qiagen). Οι φορείς αυτοί (εικ. 9), που ανήκουν στην οικογένεια πλασμιδίων pDS, χαρακτηρίζονται ως πλασμίδια χαμηλού αριθμού αντιγράφων και έχουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

- ρυθμιστικά στοιχεία που αποτελούνται από τον υποκινητή (promoter) του φάγου T5 (ο οποίος αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση του *E.coli*) και από δύο αλληλουχίες χειριστή (operator), στις οποίες προσδένεται ο καταστολέας lac, ο οποίος έτσι καταστέλλει αποτελεσματικά τον ισχυρό υποκινητή T5
- συνθετική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος, RBSII, που εξασφαλίζει υψηλούς ρυθμούς μετάφρασης
- αλληλουχία κωδικοποίησης έξι συνεχόμενων ιστιδινών είτε στο 5' είτε στο 3' άκρο της περιοχής κλωνοποίησης
- περιοχή κλωνοποίησης (polylinker) και κωδικά λήξης σε όλα τα αναγνωστικά πλαίσια
- δύο αλληλουχίες μεταγραφικού τερματισμού, η *t₀*, προερχόμενη από τον φάγο λάμδα και η T1, προερχόμενη από το οπερόνιο *trpB* του *E.coli*
- το γονίδιο της β-λακταμάσης (*bla*), το οποίο προσφέρει αντίσταση έναντι στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη
- θέση έναρξης της αντιγραφής (*ori*), ColE1



Εικ. 9 Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδιακού φορέα pQE



Τα βακτηριακά στελέχη, που χρησιμοποιήθηκαν ως ξενιστές των φορέων pQE, είναι τα M15[pREP4] και SG13009[pREP4], τα οποία βασίζονται στο στέλεχος K12 (NaI^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺) του βακτηρίου E.coli. Το χαρακτηριστικό των στελεχών αυτών, είναι ότι φέρουν το πλασμίδιο pREP4, το οποίο περιλαμβάνει το γονίδιο lacI που κωδικοποιεί για τον καταστολέα lac. Μετάλλαξη στο γονίδιο lacI (lacI^q) εξασφαλίζει την αδιάφορη έκφραση του καταστολέα lac, με αποτέλεσμα, τη συνεχή καταστολή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τους φορείς pQE. Η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται παρουσία του ισοπροπυλ-β-D-θιογαλακτοζιδίου (IPTG), το οποίο και δεσμεύεται στον καταστολέα lac και τον ανενεργοποιεί, επιτρέποντας έτσι στην RNA πολυμεράση του κυττάρου ξενιστή να δεσμευτεί στον υποκινητή T5 του φορέα pQE.

2.1.2) Θρεπτικά υλικά και συνθήκες καλλιέργειας βακτηρίων

Η καλλιέργεια των προαναφερθέντων βακτηριακών στελεχών έγινε τόσο σε υγρή όσο και σε στερεά μορφή. Και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο γνωστό ως Luria Bertani (LB) [1% (w/v) bactotryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl], το οποίο μετά την παρασκευή του αποστειρώθηκε και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ.), μέχρι την χρήση του.

Η ανάπτυξη των υγρών καλλιιεργειών έγινε σε ειδικό κλίβανο τροχιακής περιστροφής (model G25, Scientific Co. Inc.), στους 37°C και υπό έντονη ανάδευση (~200 rpm), ώστε να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος αερισμός των βακτηρίων.

Για την ανάπτυξη στερεών καλλιιεργειών σε τρυβλία Petri, στο LB προστέθηκε άγαρ σε ποσοστό 1.5% (w/v) και μετά την αποστείρωση του, εκχύθηκε στα στείρα τρυβλία. Η προσθήκη αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο, προκειμένου να επλεγούν οι μετασχηματισμένοι βακτηριακοί κλώνοι, έγινε αφού το υλικό αφέθηκε να ψυχθεί μέχρι τους ~50°C και όχι κάτω από τους 45°C, που είναι η θερμοκρασία στερεοποίησης του άγαρ. Η ανάπτυξη των αποικιών έγινε στους 37°C και για τουλάχιστον 12 h μετά την τοποθέτηση των τρυβλίων σε επωαστικό κλίβανο (Memmert).

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι συγκεντρώσεις εργασίας των πιο κοινών αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν:

	Συγκέντρωση αποθήκευσης (mg/ml)	Συγκέντρωση εργασίας (μg/ml)
Αμπικιλίνη	10	100
Καναμυκίνη	25	25
Τετρακυκλίνη	5	15

Τέλος, η μακροπρόθεσμη αποθήκευση των βακτηριακών στελεχών έγινε σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες, με την προσθήκη 0.85 ml καλλιέργειας και 0.15 ml αποστειρωμένης γλυκερόλης κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Το μίγμα αυτό αναδεύτηκε και αφού τοποθετήθηκε στους -20°C για 24 h μεταφέρθηκε συνέχεια στους -70°C.

2.1.3) Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικά προς μετασχηματισμό και μετασχηματισμός αυτών

Προκειμένου να παρασκευαστούν βακτηριακά κύτταρα επιδεκτικά προς μετασχηματισμό, ακολουθήθηκε η μέθοδος του Inoue (234), σύμφωνα με την οποία:



- Βακτηριακά κύτταρα (όγκου ~100 μ l) ανασύρονται από την βαθιά κατάψυξη (-70°C), προστίθενται σε 10 ml υγρού LB και καλλιεργούνται για περίπου 12 h
- με 5 ml της παραπάνω καλλιέργειας, μολύνονται 250 ml αποστειρωμένου διαλύματος SOB [2% (w/v) bacto-tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4] και ακολουθεί επώαση στις ίδιες συνθήκες, μέχρι η καλλιέργεια να βρεθεί σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Η παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης, γίνεται με λήψη, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, δειγμάτων του 1ml και μέτρησης της οπτικής πυκνότητας αυτών στα 600 nm. Όταν, η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας λάβει τη τιμή 0.6,
- ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 min
- στη συνέχεια, το εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένους φυγοκεντρικούς σωλήνες Corax των 30 ml και φυγοκεντρείται στις 5000 rpm, σε φυγοκεντρική κεφαλή SS34 (Sorval) για 10 min στους 4°C
- το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 20 ml αποστειρωμένου διαλύματος TB (10 mM pipes, 55 mM MnCl_2 , 15mM CaCl_2 , 250mM KCl), το οποίο έχει, προηγουμένως, ψυχθεί στους 4°C
- στο εναιώρημα, προστίθεται παγωμένο DMSO σε τελική συγκέντρωση 7%, αναδεύεται και μοιράζεται σε κλάσματα των 50–500 μ l τα οποία και αποθηκεύονται για μακροπρόθεσμη χρήση στους -70°C

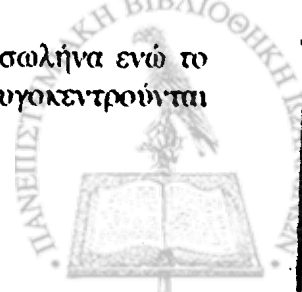
Τα υπερ-επιδεκτικά βακτήρια που παρασκευάζονται με την παραπάνω τεχνική, είναι 100–1000 φορές πιο επιδεκτικά σε μετασχηματισμό, σε σχέση με αυτά που παρασκευάζονται με την κοινή μέθοδο του ασβεστίου. Για το λόγο αυτό, ο μετασχηματισμός τους πραγματοποιείται με την εξής σύντομη διαδικασία:

- τα τρυβλία επιλογής (με LB και το αντίστοιχο αντιβιοτικό), πάνω στα οποία θα επιστρωθούν τα βακτήρια προς μετασχηματισμό, τοποθετούνται σε κλίβανο προκειμένου να προθερμανθούν στους 37°C
- ανασύρουμε από την βαθιά κατάψυξη (-70°C) τα υπερ-επιδεκτικά κύτταρα και τα αφήνουμε να αποψυχθούν στον πάγο
- προσθέτουμε στο υγρό εναιώρημα των κυττάρων ~ 10 ng του πλασμιδιακού φορέα με τον οποίο θα μετασχηματιστούν και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5 min
- το μίγμα, βακτηρίων-φορέα, μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες στο προθερμασμένο άγαρ και απλώνεται ομοιόμορφα πάνω σε αυτό (σπορά)
- ακολουθεί επώαση σε επωαστικό κλίβανο, στους 37°C , για την εμφάνιση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων

2.1.4) Παρασκευή μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA

Προκειμένου να παρασκευάσουμε πλασμιδιακό DNA μικρής ποσότητας, χρησιμοποιήσαμε τροποποίηση της μεθόδου της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων, των Ish-Horowitz και Burke (235), σύμφωνα με την οποία:

- μετά την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών αποικιών, 10–20 από αυτές μεταφέρονται, κάθε μία χωριστά και υπό ασηπτικές συνθήκες, από την επιφάνεια του τρυβλίου σε αντίστοιχο αριθμό πλαστικών σωληναρίων των 10 ml, τα οποία περιέχουν 5 ml LB και αντιβιοτικό. Ακολουθεί ανάπτυξη των βακτηρίων στους 37°C , υπό ανακίνηση
- 1.5 ml από κάθε καλλιέργεια, μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα ενώ το υπόλοιπο των καλλιεργειών συντηρείται στους 4°C . Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 min, στις 12000 rpm, σε $\Theta.\Delta.$



- το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 ml διαλύματος I (50 mM Glucose, 25 mM Tris – HCl pH 8.0, 10 mM EDTA). Στο εναιώρημα προστίθενται 200 ml διαλύματος II [0.2 N NaOH, 1% (w/v) SDS], 150 ml διαλύματος III (2.5M CH₃COONa) και το προκύπτον διάλυμα αναμιγνύεται ήπια
- ακολουθεί φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, όπου και εκχλύζεται με διπλάσιο όγκο διαλύματος, αποτελούμενο από ίσες ποσότητες εξισορροπημένης φαινόλης και διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμιλικής αλκοόλης (24:1). Η εκχύλιση γίνεται με έντονη ανάδευση και φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες
- η προκύπτουσα υδατινή φάση μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, όπου αναμιγνύεται με ίσο όγκο ισοπροπανόλης, προκειμένου να καταβυθιστεί το πλασμιδιακό DNA. Αμέσως, ακολουθεί φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες
- το ίζημα εκπλένεται σε 1 ml διαλύματος 70% αιθανόλης, επαναφυγοκεντρείται και ξηρένεται σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού (Speed Vac. Concentrator SVC100H SAVANT)
- το αποξηραμένο ίζημα επαναιωρείται σε 20 ml διαλύματος TE (10 mM Tris – HCl, 1 mM EDTA) και ελέγχεται, αφού υποστεί πέψη με ανάλογο περιοριστικό ένζυμο, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Πριν την ηλεκτροφόρηση, γίνεται επώαση του δείγματος με ριβονουκλεάση A (σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml), για 10 min σε Θ.Δ. προκειμένου να αποικοδομηθεί το βακτηριακό RNA

Μετά την πιστοποίηση αυτή, η καλλιέργεια των βακτηρίων που φέρουν τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα χρησιμοποιείται για την παρασκευή μεγάλης κλίμακας του συγκεκριμένου πλασμιδιακού DNA

2.1.5) Παρασκευή μεγάλης κλίμακας πλασμιδιακού DNA

• Η απομόνωση μεγάλης ποσότητας πλασμιδιακού DNA βασίζεται στην μέθοδο της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων, που περιγράφηκε παραπάνω, και έχει ως εξής:

- 500 ml LB/αντιβιοτικού ενοφθαλμίζονται με 100 ml της καλλιέργειας των βακτηρίων που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα που μας ενδιαφέρει και ακολουθεί επώαση στους 37⁰C υπό ανακίνηση
- την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια μοιράζεται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες των 250 ml και τα βακτήρια συλλέγονται με φυγοκέντριση σε κεφαλή GSA (SORVALL) στις 5500 rpm, για 15 min και στους 4⁰C
- το ίζημα των βακτηρίων επαναιωρείται σε 20 ml παγωμένου διαλύματος I-έτσι ώστε να μην υπάρχουν συσσωματώματα κυττάρων- και στο προκύπτον εναιώρημα προστίθενται αλλά 20 ml διαλύματος I, εμπλουτισμένου με 4 mg/ml λυσοζύμης. Ακολούθως, προστίθενται 60 ml διαλύματος II, το εναιώρημα αναμιγνύεται και προστίθενται 60 ml παγωμένου διαλύματος III
- μετά από 10 min επώασης στον πάγο, το αιώρημα υφίσταται φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες, όπως προηγουμένως, και το υπερκείμενο διηθείται με τη βοήθεια μουσελίνας και επαναφυγοκεντρείται
- το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο δοχείο και το πλασμιδιακό DNA αμέσως, καταβυθίζεται με την προσθήκη 80 ml ισοπροπανόλης και επώαση για 30 min σε Θ.Δ. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 30 min και το ίζημα επαναιωρείται σε 9.5ml διαλύματος TE, pH 8.0, και μεταφέρεται σε σωλήνα Corax των 30 ml. Στο διάλυμα προστίθενται 10.2 gr CsCl και μετά από έντονη ανάδευση λαμβάνει χώρα φυγοκέντριση στις 10.000 rpm για 10 min στους 20⁰C



- μετά την φυγοκέντρωση συλλέγεται με προσοχή το διαυγές διάλυμα του CsCl και του DNA και μεταφέρεται σε νέο Corex. Στο διάλυμα προστίθενται 600 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) και ελέγχεται ο δείκτης διάθλασης του σε διαθλασίμετρο (ATAGO Co). Μετά τη ρύθμιση αυτού, κοντά στην τιμή 1.394, το διάλυμα μοιράζεται σε αμπούλες των 5ml (BECKMAN), οι οποίες σφραγίζονται με θερμοκόλληση και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε κεφαλή VTI 65, στις 45000 rpm για 16 – 18 min στους 20°C
- μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, η ζώνη εστιασμού του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA εντοπίζεται, αφαιρείται με τη βοήθεια σύριγγας των 2.5 ml και μεταφέρεται σε Corex των 15 ml
- το βρωμιούχο αιθίδιο απομακρύνεται από το διάλυμα, μετά από διαδοχικές εκπλύσεις, με ίσο όγκο βουτανόλης κορεσμένης με νερό (ddH₂O). Στο τέλος αυτής της διαδικασίας και μετά την απόρριψη της τελικής οργανικής φάσης προκύπτει ένα διαυγές διάλυμα, του οποίου ο τελικός όγκος γίνεται 7 ml με προσθήκη νερού. Σε αυτά προστίθενται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και μετά την ανάμιξη το διάλυμα αφήνεται στους -70°C για 60 min, προκειμένου να κατακρημνιστεί το πλασμιδιακό DNA
- ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10000 rpm, για 30 min, στους 4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου, ξήρανση και επαναιώρηση του ιζήματος σε 400 μl διαλύματος TE, pH 8.0. Το διάλυμα μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου προστίθενται 20 μl NaCl (5M), 1000 μl αιθανόλης (100%) και αφήνεται στους -70°C για 30 min προκειμένου να κατακρημνιστεί το DNA.
- τελικά, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 12000 rpm για 10 min και το προκύπτον ιζήμα εκπλένεται με διάλυμα αιθανόλης (70%), ξηραίνεται στον φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού και επαναιωρείται σε 500 μl διαλύματος T.E.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του διαλύματος του απομονωμένου DNA γίνεται με φωτομέτρηση δείγματος αυτού, στα 260 nm και με βάση τη σχέση:

$$1 \text{ μονάδα οπτικής πυκνότητας} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$$

Ο έλεγχος της παρασκευής πραγματοποιείται μετά από πέψη του DNA με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

2.1.6) Διαχωρισμός θραυσμάτων DNA και ανάκτηση αυτών από πηκτή αгарόζης

Στο διαχωρισμό, μέσω ηλεκτροφόρησης, θραυσμάτων πλασμιδιακού DNA μεγέθους μικρότερου των 7 KB και μεγαλύτερου των 0.2 KB χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αгарόζης σε διάλυμα TBE [10.8% (w/v) Tris-HCl, 5.5% (w/v) boric acid, 20 mM EDTA] με συγκεντρώσεις από 0.8% ως 1.5% (w/v), σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Αγαρόζη (%)	Εύρος αποτελεσματικού διαχωρισμού γραμμικών θραυσμάτων DNA (KB)
0.7	12 ως 0.8
1.0	10 ως 0.5
1.2	7 ως 0.4
1.5	3 ως 0.2

Για την παρασκευή της πηκτής αгарόζης, το μίγμα αгарόζης/TBE θερμαίνεται μέχρι τους ~ 60°C και λίγο πριν την στερεοποίηση του (~50°C), προστίθεται ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml. Στη συνέχεια, το διάλυμα αφήνεται να δημιουργήσει επίπεδη πηκτή σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (π.χ. HORIZON 58, GIBCO BRL). Σαν διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται το TBE.

ενώ τα δείγματά DNA αναμιγνύονται, πριν την ηλεκτροφόρηση, με διάλυμα φόρτωσης (6X) [50% (v/v) glycerol, 0.1% (w/v) bromophenol blue σε αναλογία 5:1] και ηλεκτροφορούνται παράλληλα με δείγμα τμημάτων DNA πρότυπων μοριακών βαρών (1KB ladder, GIBCO BRL). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε Θ.Δ., υπό σταθερή τάση, και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV transilluminator, Ultra Violet Products Inc.)

Η ανάκτηση των θραυσμάτων DNA από την πηκτή αгарόζης έγινε με την βοήθεια του πακέτου υλικών (kit) Mini Elute Gel Extraction (QIAGEN) και σύμφωνα με τις υποδείξεις της κατασκευάστριας εταιρείας. Τα κύρια χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι τα εξής:

- Η ζώνη εστιασμού του θραύσματος DNA αφαιρείται από την πηκτή και τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου προστίθεται διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης χαοτροπικών αλάτων, με pH < 7,5. Ακολουθεί η διαλυτοποίηση της πηκτής, κατόπιν θέρμανσης του υλικού στους 50°C για 10 λεπτά, το DNA που απελευθερώνεται στο διάλυμα, δεσμεύεται μετά από σύντομη φυγοκέντρηση σε μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου και ακολουθεί στάδιο έκπλυσης για την απομάκρυνση των άχρηστων υλικών (π.χ. αгарόζης, ενζύμων, κ.α.), τα οποία δε δεσμεύονται στην μεμβράνη
- τέλος, το DNA εκλύεται από την μεμβράνη με τη βοήθεια διαλύματος χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων και με pH 8.5 μετά από σύντομη φυγοκέντρηση

2.1.7) Κατασκευή ανασυνδυσμένων μορίων DNA (κλωνοποίηση)

Με την βοήθεια ενδονουκλεασών και άλλων ενζύμων πραγματοποιήθηκε η κατασκευή ανασυνδυσμένων μορίων DNA (κλωνοποίηση) με την εξής διαδικασία:

- το προς ένθεση τμήμα DNA, όπως και ο πλασμιδιακός φορέας στον οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί, υφίστανται πέψη με ανάλογα περιοριστικά ένζυμα για τη δημιουργία συμβατών άκρων
- ο έλεγχος των προϊόντων της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και ακολουθεί απομόνωση αυτών όπως προαναφέρεται (εν. 2.1.6)
- πριν την αντίδραση σύνδεσης των θραυσμάτων DNA προηγείται αποφωσφορλίωση των άκρων του πλασμιδιακού φορέα, στην περίπτωση που αυτά είναι συμπληρωματικά (π.χ. μετά από πέψη με μόνο ένα περιοριστικό ένζυμο). Έτσι, εξασφαλίζεται ότι κατά την αντίδραση σύνδεσης αυτά δεν θα επανασυνδεθούν. Η απομάκρυνση των 5' φωσφορικών ομάδων από τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα, γίνεται με επώαση αυτού με κατάλληλη φωσφατάση (CIAP), στους 37°C, για 30 min. Την επώαση ακολουθεί ανενεργοποίηση του ενζύμου με προσθήκη διαλύματος EDTA, σε τελική συγκέντρωση 10 mM και θέρμανση στους 65°C
- κατά την αντίδραση σύνδεσης, ένθεμα και πλασμιδιακός φορέας, αναμιγνύονται σε αναλογία 3:1 και σε ποσότητες που καθορίζονται από την παρακάτω σχέση:

$$\frac{\text{ποσότητα φορέα (ng)} \times \text{μέγεθος ενθέματος (KB)}}{\text{μέγεθος φορέα (KB)}} \times \text{αναλογία μορίων ενθέματος φορέα} = \text{ποσότητα ενθέματος (ng)}$$

η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl, παρουσία 1μl DNA λιγάσης (5 u) και 1μl ATP (10 mM) για 12 h περίπου στους 16°C

- τα προϊόντα της σύνδεσης χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηρίων. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων που φέρουν



το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο γίνεται σε τρυβλία που φέρουν στερεό άγαρ και το ανάλογο αντιβιοτικό

2.1.8) Ανάγνωση αλληλουχίας βάσεων DNA (DNA sequencing)

Η ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA βασίστηκε στην μέθοδο του τερματισμού αλυσίδας (chain termination method) των Sanger, Niklen και Coulson (236) και πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του πακέτου υλικών της USB (sequenase version 2.0 DNA sequencing kit). Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος μπορεί να διαχωριστεί στα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA (denaturation)

Ποσότητα 1–8 μg δίκλωνου DNA, του οποίου οι βάσεις πρόκειται να αναγνωσθούν, αποδιατάσσεται προκειμένου να δημιουργηθούν μονόκλωνα μόρια DNA. Η αποδιάταξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος 2 M NaOH και 2 mM EDTA σε αναλογία 1:10 του όγκου του διαλύματος του DNA και επώαση στους 37°C για 30 min. Κατόπιν, το διάλυμα ουδετεροποιείται με προσθήκη 0.1 μg διαλύματος 3 M NaCOOH pH 4.5–5.5 και το αποδιατεταγμένο DNA καταβυθίζεται με 2 $\frac{1}{2}$ όγκους αιθανόλης (100%) στους -70°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα 70% αιθανόλης, ξήρανση και επαναιώρηση του DNA σε 7 μl απεσταγμένου νερού

2. Αντίδραση σύνδεσης του DNA και του εκκινητή (annealing)

Στο αποδιατεταγμένο DNA (7 μl) προστίθενται 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης και 25 ng εκκινητή, έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 10 μl . Το διάλυμα θερμάνθηκε στους 65°C για 2 min και αφέθηκε να κρυώσει αργά, για περισσότερο από 30 min, σε Θ.Δ.

3. Ραδιενεργός σήμανση του εκκινητή (labeling reaction)

Μόλις η θερμοκρασία του διαλύματος σύνδεσης φθάσει τους 30°C , προστίθενται 1 μl διαλύματος 0,1 M DTT, 2 μl αραιωμένου–σε αναλογία 1:5–διαλύματος μη ραδιενεργών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, 0,5 μl ^{35}S -dATP και 2 μl αραιωμένης–σε αναλογία 1:8–DNA πολυμεράσης (sequenase version 2.0). Ακολουθεί επώαση για 5 min, σε Θ.Δ.

4. Τερματισμός των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων (termination reactions)

Μετά το τέλος της επώασης, ποσότητες 3.5 μl του παραπάνω διαλύματος, μεταφέρονται σε τέσσερις μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες, που ο καθένας περιέχει διαφορετικό ddNTP σε μίγμα όγκου 2.5 μl με τα υπόλοιπα τρία dNTP και τα οποία είχαν προθερμανθεί στους 37°C , για ένα λεπτό. Ακολουθεί επώαση στους 37°C , για 5 min και οι αντιδράσεις τερματίζονται με την προσθήκη 4 μl διαλύματος τερματισμού (95% φορμαμίδιο, 20 mM EDTA, 0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,05% κυανόλη της ξυλόλης) και μεταφορά στον πάγο.

Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή υψηλής διαχωριστικής ικανότητας, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάζεται μίγμα αποτελούμενο από:

Ουρία	50 gr	(8.3 M)
TBE (10x)	10 ml	
30% ακρυλαμίδιο – 2% δις ακρυλαμίδιο	15 ml	(5%)
dH ₂ O	40 ml	



Το μίγμα αφήνεται να διαλυτοποιηθεί σε Θ.Δ., υπό ανάδευση, για περίπου 30 min. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται (με φίλτρο 0.45 nm) και μεταφέρεται στον πάγο όπου αμέσως προστίθενται 600 μl διαλύματος 10% AMPER και 40 μl TEMED. Ακολουθεί σύντομη ανάδευση και το διάλυμα χύνεται προσεκτικά μεταξύ των πλακών ηλεκτροφόρησης. Ο πολυμερισμός της πηκτής γίνεται σε Θ.Δ., για περίπου 30 min. Το σύστημα πλακών-πηκτής τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (BRL Sequencing apparatus) και ηλεκτροφορείται υπό σταθερή τάση 1800 Volt, έως ότου η θερμοκρασία της πηκτής ανέλθει στους 52°C περίπου. Πριν την ηλεκτροφόρησή τους, τα δείγματα θερμαίνονται στους 100°C για 2 min και ποσότητα 2.5 μl από το καθένα ηλεκτροφορείται, υπό μεταβαλλόμενη τάση, ανάλογα με τη θερμοκρασία της πηκτής, η οποία σε όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης διατηρείται στους 52°C.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πλάκες αποχωρίζονται και η πηκτική μονιμοποιείται με ψεκασμό διαλύματος 5% οξικού οξέος και 10% μεθανόλης. Στη συνέχεια η πηκτική προσκολλάται σε χαρτί 3MM και ξηραίνεται υπό κενό σε θερμοκρασία 80°C για περίπου 60 min σε ξηραντήρα (Biorad model 1125B). Στη συνέχεια, η ξηραμένη πηκτική εκτίθεται για ακτινογραφία, σε κασέτα ακτινογραφίας (KODAK X-OMATIC) με την χρήση φιλμ αυτοραδιογραφίας (KODAK X-OMATAR) για τουλάχιστον 12 h στους -70°C. Η εμφάνιση του φιλμ γίνεται με την βοήθεια του συστήματος KODAK (Kodak X Ray Developer, Kodak X Ray Fixer).

2.1.9) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε στους εξής πειραματικούς σκοπούς:

α) Κλωνοποίηση γονιδίων κυττάρων θηλαστικών σε κατάλληλους φορείς έκφρασης, προκειμένου να γίνει δυνατή η απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από βακτήρια

β) Δημιουργία ραδιενεργά σημασμένων μονόκλωνων τμημάτων των παραπάνω γονιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων τους

Σε κάθε περίπτωση, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελούνταν από τα εξής διαδοχικά στάδια:

I) Αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου μορίου DNA

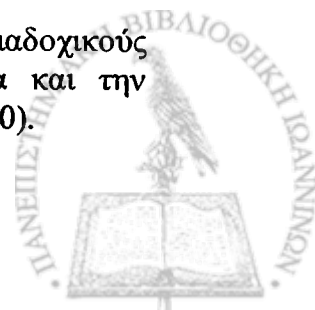
Κατά το στάδιο αυτό το δίκλωνο DNA εκμαγείο αποδιατάσσεται στους 94°C για περίπου 0.5–2 min

II) Σύνδεση (annealing) του DNA και των εκκινητών (primers)

Στο στάδιο αυτό, η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται μέχρι περίπου τους 50–60°C, έτσι ώστε να δοθεί η δυνατότητα στους εκκινητές να συνδεθούν με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες του DNA εκμαγείου. Η χρονική διάρκεια του σταδίου αυτού είναι ανάλογα 0.5–2 min

III) Επιμήκυνση (extension) των εκκινητών και σύνθεση νέων αλυσίδων. Στο στάδιο αυτό, η θερμοκρασία της αντίδρασης ανέρχεται και πάλι έτσι ώστε να λάβει τη τιμή της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου, που χρησιμοποιείται στον πολυμερισμό και που είναι συνήθως η Taq DNA πολυμεράση. Η χρονική διάρκεια αυτού του σταδίου εξαρτάται άμεσα από το επιδιωκόμενο μήκος του τελικού προϊόντος σε συνδυασμό με την αποδοτικότητα του ενζύμου, η οποία για το συγκεκριμένο ένζυμο ανέρχεται στις 1000 bp/min.

Η παραπάνω αντίδραση, αφού ολοκληρωθεί, επαναλαμβάνεται σε διαδοχικούς κύκλους, ο αριθμός των οποίων εξαρτάται κυρίως από την ποσότητα και την καθαρότητα του επιδιωκόμενου προϊόντος (συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 20–30).



Για την πραγματοποίηση μιας τυπικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά:

Συστατικά	Ποσότητες ανά αντίδραση (μl)
DNA εκμαγείο (10 ng/μl)	10.0
5' εκκινήτης (10 ng/μl)	10.0
3' εκκινήτης (10 ng/μl)	10.0
MgCl ₂ (25 mM)	10.0
PCR buffer (10x)	10.0
Taq DNA πολυμεράση (3 u/μl)	0.5
ddH ₂ O	45.5
Τελικός όγκος αντίδρασης	100.0

Τα παραπάνω υλικά τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάρια, όγκου 0.5ml, τα οποία εφάπτονται ακριβώς στο μπλοκ του θερμικού κυκλοποιητή (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler) στον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι πριν την έναρξη της κυρίως αντίδρασης, επιθέτουμε περίπου 100μl παραφινέλαιου πάνω στην επιφάνεια των διαλυμάτων και ακολουθεί θέρμανση αυτών, στους 95⁰C, για 5 min, προκειμένου ν' αποδιαταχθούν τα μόρια του DNA (hot start), ενώ στο τέλος των κύκλων πραγματοποιείται μια επιπλέον επάωση στους 72⁰C, διάρκειας 10 min, ώστε να δοθεί χρόνος στην Taq πολυμεράση να ολοκληρώσει την σύνθεση ατελώς συντετιθεμένων αλυσίδων.

Τα προκύπτοντα προϊόντα της αντίδρασης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.



2.2) ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA

2.2.1) Παρασκευή ολικού πληθυσμού RNA

Η απομόνωση ολικού πληθυσμού RNA από κύτταρα και από ιστούς έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Chomczynski και Sacchi (237). Σύμφωνα με αυτήν:

A) Στην περίπτωση των κυττάρων, αυτά αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρις ότου καταλαμβάνουν το 80%, περίπου, της επιφάνειας του ταπήτιου ενός τρυβλίου διαμέτρου 10 cm. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων με 10 ml (ανά έκπλυση) διαλύματος PBS (1X) (εν. 2.5.2β). Στη συνέχεια στο ταπήτιο προστίθεται 1 ml διαλύματος D [4M Guanidinium thiocyanate, 25 mM $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ pH 7.0, 0.5% (w/v) sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol] και τα κύτταρα αποκολλούνται μηχανικά από το ταπήτιο. Το εναιώρημα μοιράζεται σε δύο μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες οι οποίοι τοποθετούνται αμέσως στον πάγο

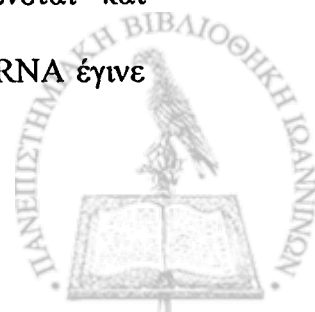
B) Στην περίπτωση των ιστών, 1 ml διαλύματος D προστίθεται ανά 100 mg βάρους ιστού και το εναιώρημα υφίσταται ομογενοποίηση, σε ομογενοποιητή DOUNCE. Ακολούθως, το ομογενοποίημα μοιράζεται σε δύο μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες οι οποίοι τοποθετούνται αμέσως στον πάγο

Η συνέχεια της διαδικασίας που είναι κοινή τόσο για τα κύτταρα όσο και για τους ιστούς προβλέπει τα εξής:

- Σε κάθε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα προσθέτουμε 100 μl διαλύματος οξικού νατρίου (2M), 1 ml φαινόλης και 200 μl διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (49:1) με την προαναφερθείσα σειρά
- Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για περίπου 15 sec και παραμονή στον πάγο για 15 min. Στη συνέχεια, το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στις 12000 rpm, για 20 min, στους 4°C
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα όπου προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης (100%) και ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA στους -20°C για 1 h
- Στη συνέχεια, το παγωμένο διάλυμα φυγοκεντρείται στις 12000 rpm, για 10 min, στους 4°C και το προκύπτον ίζημα επαναιωρείται σε 0.5 ml διαλύματος D. Το RNA κατακρημνίζεται για δεύτερη φορά και συλλέγεται όπως και προηγουμένως
- Τελικά, το ίζημα εκπλένεται με διάλυμα αιθανόλης (70%), ξηρύνεται και επαναδιαλύεται σε 100-200 μl ddH₂O

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του διαλύματος του απομονωμένου RNA έγινε με φωτομέτρηση δείγματος αυτού, στα 260nm και με βάση τη σχέση:

$$1 \text{ μονάδα οπτικής πυκνότητας} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$$



ενώ η ακεραιότητα του παρασκευάσματος ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.5%)

2.2.2) Ανάλυση κατά Northern

α) Ηλεκτροφόρηση RNA.

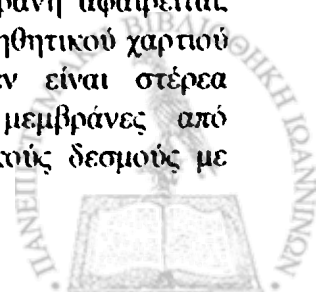
Προκειμένου να προχωρήσουμε σε ανάλυση κατά Northern το RNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης/φορμαλδεύδης (1%-6.1%). Η προετοιμασία της πηκτής γίνεται ως εξής: Ποσότητα αγαρόζης (1%) προστίθεται σε dH₂O και αφήνεται να διαλυθεί υπό θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων. Το προκύπτον διάλυμα ψύχεται σε Θ.Δ. μέχρι περίπου τους 60°C. Στη συνέχεια, προστίθεται ποσότητα διαλύματος MOPS (10X) ίση με το 1/10 του τελικού διαλύματος και ποσότητα φορμαλδεύδης (37%) έτσι ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 6.1%. Μετά και την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (10 µg/ml), το διάλυμα χρησιμοποιείται για την δημιουργία οριζόντιας πηκτής σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (BRL Life Technologies), η οποία προηγουμένως είχε παραμείνει σε διάλυμα NaOH (0.1 N) για τουλάχιστον 2 h.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, ποσότητες RNA (20-40 µg) ξηραίνονται υπό κενό και τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 20 µl διαλύματος φόρτωσης. Στη συνέχεια, τα δείγματα θερμαίνονται στους 65°C, για 15 min και τοποθετούνται στις υποδοχές της πηκτής αφού αναμιχθούν σε αναλογία όγκων 10:1 με κατάλληλο διάλυμα χρωστικής (10x). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε Θ.Δ. υπό σταθερή τάση 30V, για τουλάχιστον 12 h, ενώ ο έλεγχος του παρασκευάσματος γίνεται με παρατήρηση της πηκτής σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

Προκειμένου να προχωρήσουμε σε αποτύπωση κατά Northern η πηκτή εκπλένεται σε 300 ml dH₂O, για 30 min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η φορμαλδεύδη. Ακολουθεί παθητική μεταφορά από την πηκτή σε κατάλληλη μεμβράνη σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια.

β) Παθητική μεταφορά των θραυσμάτων από την πηκτή σε μεμβράνη (συνήθως νιτροκυτταρίνης).

Σε δοχείο, το οποίο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (0.5 M Na₂HPO₄·2H₂O, 0.5 M NaH₂PO₄·2H₂O), στερεώνεται γυάλινη πλάκα στην επιφάνεια της οποίας τοποθετούνται τρία φύλλα διηθητικού χαρτιού (Whatman 3MM), έτσι ώστε τα άκρα τους να είναι βυθισμένα στο διάλυμα. Τα φύλλα διαβρέχονται με το διάλυμα μεταφοράς και με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου αφαιρούνται προσεκτικά οι φυσαλίδες που εγκλωβίζονται μεταξύ των τριών φύλλων και της γυάλινης πλάκας. Επάνω στα υγρά φύλλα τοποθετείται η πηκτή ανεστραμμένη και απομακρύνονται οι φυσαλίδες όπως και προηγουμένως. Στην επιφάνεια της πηκτής τοποθετούνται διαδοχικά νάυλον μεμβράνη (Hybond N-AMERSHAM) και δύο φύλλα Whatman 3MM ιδίων διαστάσεων με την πηκτή, τα οποία προηγουμένως έχουν εμποτιστεί με το διάλυμα μεταφοράς. Αφαιρούνται και πάλι οι φυσαλίδες και στην επιφάνεια των φύλλων Whatman τοποθετείται παχύ στρώμα απορροφητικού χαρτιού καθώς και αντικείμενο βάρους 500 g περίπου. Σε αυτή τη διάταξη, η μεταφορά των θραυσμάτων γίνεται με παθητική διάχυση των μορίων προς την μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή είναι αργή, με αποτέλεσμα να απαιτούνται τουλάχιστον 16h για την ολοκλήρωση της. Στο τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη αφαιρείται, εκπλένεται με διάλυμα μεταφοράς και τοποθετείται στην επιφάνεια διηθητικού χαρτιού όπου αφήνεται να στεγνώσει. Στην φάση αυτή, το RNA δεν είναι στέρεα προσδεδεμένο πάνω στην μεμβράνη, μια και ειδικά με τις μεμβράνες από νιτροκυτταρίνη, τα μόρια του RNA δεν συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με



αυτή. Έτσι ακολουθεί μονιμοποίηση των μορίων πάνω στην μεμβράνη, που επιτυγχάνεται με θέρμανση αυτής στους 80°C, για 2 h, κατά την οποία απομακρύνεται το νερό και ταυτόχρονα σχηματίζονται υδρόφοβοι δεσμοί που συγκρατούν τα μόρια πάνω στην μεμβράνη.

γ) Παρασκευή ραδιενεργά σημασμένου μονόκλωνου DNA ανιχνευτή

Προκειμένου να εντοπιστούν τα τμήματα RNA που ενδιαφέρουν, με ανάλυση υβριδοποίησης, παρασκευάζεται ραδιενεργά σημασμένος ανιχνευτής χρησιμοποιώντας την μέθοδο μετάφρασης εγκοπής (nick translation).

Η τελευταία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του πακέτου υλικών της PROMEGA. Σε μια τυπική αντίδραση χρησιμοποιείται ποσότητα DNA εκμαγείου περίπου 50 ng ενώ αυτή γίνεται σε τελικό όγκο 25 μl, στους 15°C για 60 min. Τα σημανθέντα θραύσματα DNA διαχωρίστηκαν από τα μη ενσωματωμένα dNTPs, με την χρήση στήλης μοριακού ηθμού G50. Η κατασκευή των στηλών έγινε ως εξής: σύριγγες ινσουλίνης αποχωρίστηκαν από τις βελόνες και στο μπροστινό τους τμήμα προστέθηκε υαλοβάμβακας ο οποίος συμπιέστηκε με το έμβολο. Μετά την απόρριψη του εμβόλου, στην σύριγγα προστέθηκε εναιώρημα αποτελούμενο από Sephadex G50 σε TE, το οποίο και πακεταρίστηκε με διαδοχικές φυγοκεντρίσεις και πλήρώσεις στις 1500 rpm επί 3 min. Το προς καθαρισμό διάλυμα DNA, της αντίδρασης σήμανσης, αραιώθηκε σε τελικό όγκο 100 μl με TE, τοποθετήθηκε στη στήλη και φυγοκεντρήθηκε (1500 rpm, 3 min) σε Θ.Δ. και το έκλουσμα με τα σημασμένα θραύσματα DNA, συλλέχθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Δείγμα 1 μl από αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ειδικής ενεργότητας των μορίων ανιχνευτών μετά από μέτρηση της εκπομπής β-ακτινοβολίας σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (1500 Tri-card Packard CAMPERA Co.). Η ειδική ενεργότητα των μορίων DNA που τελικώς χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση υβριδισμού ήταν της τάξης του 10⁹-10¹⁰ cpm/μg.

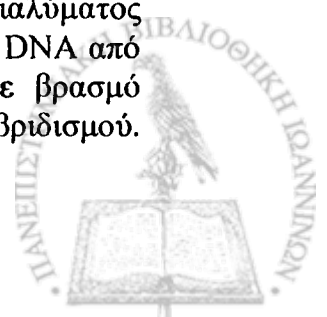
δ) Υβριδισμός του RNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή

Η διαδικασία υβριδισμού διακρίνεται σε τρία στάδια, που έχουν ως εξής:

- στάδιο προϋβριδισμού, κατά το οποίο η μεμβράνη επωάζεται με ένα διάλυμα το οποίο περιέχει παράγοντες (όπως διάλυμα Denhardt και αποδιατεταγμένο DNA σπέρματος σολωμού), οι οποίοι καλύπτουν θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης του DNA ανιχνευτή πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης.
- στάδιο υβριδισμού, κατά το οποίο η μεμβράνη επωάζεται στο ίδιο διάλυμα παρουσία αποδιατεταγμένου και ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή. Στη διάρκεια του σταδίου αυτού, το σημασμένο DNA δεν προσδέεται μόνο σε ομόλογες αλληλουχίες του ακινητοποιημένου RNA για τις οποίες έχει 100% συμπληρωματικότητα αλλά και σε άλλες λιγότερο ομόλογες
- στάδιο εκπλύσεων, κατά το οποίο η μεμβράνη εκπλένεται με μια σειρά διαλυμάτων, έτσι ώστε σταδιακά να απομακρυνθούν τα μόρια ανιχνευτή, τα οποία, είτε δεν προσδέθηκαν, είτε είναι μερικώς προσδεδεμένα στο ακινητοποιημένο DNA της μεμβράνης

Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

Η μεμβράνη διαβρέχεται με διάλυμα Triton X-100 (1%) και τοποθετείται σε μπουκάλα υβριδισμού (BIOMETRA). Προστίθενται 10 ml διαλύματος προϋβριδισμού, το οποίο περιέχει 100 μl διαλύματος αποδιατεταγμένου DNA από σπέρμα σολωμού (ssDNA, 10 mg/ml). Η αποδιάταξη του ssDNA γίνεται με βρασμό για 5 min και απότομη ψύξη στους 4°C, λίγο πριν την έναρξη του προϋβριδισμού.



Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε κλίβανο υβριδισμού (BIOMETRA OV3), υπό ήπια περιστροφή, για 4–6 h, στους 42°C.

Στη συνέχεια, προστίθεται το υπόλοιπο διάλυμα προϋβριδισμού (2ml) που περιέχει και το σημασμένο DNA, το οποίο έχει υποστεί, όμοια με την παραπάνω, διαδικασία αποδιάταξης και η επώαση συνεχίζεται για 16 h στις συνθήκες προϋβριδισμού. Οι βέλτιστες συνθήκες απαιτούν συγκέντρωση 5 ng/ml σημασμένου DNA, της τάξης του 1×10^6 cpm/ml.

Μετά το πέρας του υβριδισμού, η μεμβράνη υφίσταται διαδοχικές εκπλύσεις ως εξής:

- τρεις εκπλύσεις με διάλυμα SSC (2X) (3 M NaCl, 0.3 M $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ pH 7.0), για 2 min η κάθε μία, για την απομάκρυνση του αδέσμευτου σημασμένου DNA
- τρεις εκπλύσεις με διάλυμα SSC (0.1X)/SDS (0.5%), 20 min η κάθε μία, με σκοπό την απομάκρυνση του μη ειδικού υβριδισμού στους 60–65°C
- τρεις εκπλύσεις με διάλυμα SSC (0.1X), για να απομακρυνθεί το SDS

Τέλος, η μεμβράνη αφήνεται πάνω σε διηθητικό χαρτί Whatman 3MM, για 10 min περίπου, σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να στεγνώσει πλήρως.

ε) Αυτοραδιογραφία για τον εντοπισμό των θραυσμάτων εκείνων που έχουν ομολογία προς τον ανιχνευτή

Προκειμένου να εντοπιστούν οι ζώνες υβριδισμού, η μεμβράνη κλείνεται σε πλαστικό προστατευτικό περιτύλιγμα και ακολουθεί αυτοραδιογραφία όπως περιγράφεται στην εν. 2.1.8.

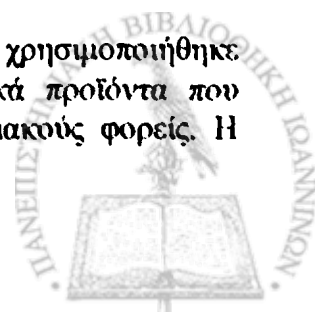
2.2.3) Δοκιμασία σταθερότητας μηνύματος (RNA stability assay)

Η σταθερότητα των υπό εξέταση μηνυμάτων ελέγχθηκε με την απομόνωση ολικού πληθυσμού RNA από κυτταρικές σειρές, μετά την χορήγηση ακτινομυκίνης D (Sigma). Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα τα οποία καταλαμβάνουν επιφάνεια ίση με το 70–80% της επιφάνειας του ταπήτιου στο οποίο αναπτύσσονται, εκπλένονται 2 φορές με 10ml διαλύματος PBS. Στη συνέχεια, στα τρυβλία όπου επρόκειτο να γίνει αναστολή της μεταγραφής προστίθεται θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με ακτινομυκίνη D σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml, ενώ στο τρυβλίο ελέγχου προστίθεται θρεπτικό μέσο με ίση ποσότητα διαλύτη της ακτινομυκίνης D (π.χ. DMSO). Ο έλεγχος της επίδρασης της ακτινομυκίνης D στα κύτταρα γίνεται στη βάση ενός χρονοδιαγράμματος που διαρκεί συνολικά 24 h. Σύμφωνα με αυτό, ανά δύο ώρες τρυβλίο το οποίο περιέχει ακτινομυκίνη D απομακρύνεται από τον επωαστικό κλίβανο, τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με 10 ml διαλύματος PBS, συλλέγονται και ακολουθεί η παρασκευή RNA κατά τα γνωστά

Για την εξέταση της σταθερότητας των μηνυμάτων που μας ενδιέφεραν, ίσες ποσότητες (20 µg) δειγμάτων ολικού RNA, τα οποία αντιστοιχούν στους χρόνους χορήγησης της ακτινομυκίνης D, ηλεκτροφορούνται σε πηκτική αгарόζης/φορμαλδεύδης και ακολουθεί ανάλυση κατά Northern.

2.2.4) *In vitro* συζευγμένη μεταγραφή-μετάφραση

Η αντίδραση της *in vitro* συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πιστοποιηθούν και χαρακτηριστούν τα πρωτεϊνικά προϊόντα που παράγονται από γονίδια κλωνοποιημένα σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Η



αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του πακέτου υλικών TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems (PROMEGA) και περιελάμβανε τα εξής βήματα:

- Η μεταγραφή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει γίνεται δυνατή εφόσον αυτό κλωνοποιηθεί καθοδικά θέσεων σύνδεσης είτε της T3 RNA πολυμεράσης είτε της T7. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τα φαγίδια pBluescript KS και SK, τα οποία όπως έχει αναφερθεί, φέρουν δεξιά και αριστερά της περιοχής κλωνοποίησης τους υποκινητές των T3 και T7 RNA πολυμερασών. Κατά την κλωνοποίηση λαμβάνεται φροντίδα, ώστε εντός της μεταγραφόμενης περιοχής και πριν της έναρξης της μετάφρασης, να μην παρεμβάλλονται κωδικά έναρξης της μετάφρασης, προκειμένου αφενός να αποφευχθεί μια πρόωρη έναρξη της μετάφρασης και αφετέρου μια αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ένα πρωτεϊνικό προϊόν διαφορετικού μεγέθους από το αναμενόμενο.
- Το DNA που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα, είναι υψηλής καθαρότητας, παρασκευασμένο με την μέθοδο του CsCl, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Στις αντιδράσεις της συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης χρησιμοποιείται κυκλικό πλασμιδιακό DNA αλλά εναλλακτικά χρησιμοποιείται και προϊόν PCR αντίδρασης, όπως και πλασμιδιακό DNA το οποίο έχει, προηγουμένως, ευθυγραμμιστεί μετά από πέψη με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο. Μάλιστα στην τελευταία περίπτωση, θα πρέπει να αποφεύγεται η επιλογή ενζύμου που αφήνει μετά από την πέψη 3' προεξέρχοντα άκρα, τα οποία πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από τις RNA πολυμεράσες ως θέσεις μη ειδικής έναρξης της μεταγραφής.
- Μια τυπική αντίδραση συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης περιλαμβάνει τα ακόλουθα υλικά τα οποία προστίθενται με τη σειρά που αναφέρεται

Συστατικά	Αντίδραση χρησιμοποιώντας [³⁵ S] μεθειονίνη
Εκχύλισμα δικτυοκυττάρων	25μl
Διάλυμα αντίδρασης TNT (25X)	2μl
Διάλυμα DNA εκμαγείου (0.5 μg/ml)	2μl
Αναστολέας ριβονουκλεασών (Rnasin, 40 u/μl)	1μl
Μίγμα αμινοξέων χωρίς μεθειονίνη (1 Mm)	1μl
[³⁵ S] μεθειονίνη (>1,000 Ci/mmol σε 10m Ci/ml)	2μl
ddH ₂ O ελεύθερο νουκλεασών, μέχρι τελικού όγκου	50μl
T3 ή T7 RNA πολυμεράση (20 u/μl)	1μl

Τα υλικά προστίθενται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα των 0.5 ml που διατηρείται στον πάγο. Αφού προστεθεί και η RNA πολυμεράση, το διάλυμα υφίσταται σύντομη φυγοκέντρηση και αμέσως τοποθετείται σε υδατόλουτρο, όπου ακολουθεί επώαση της αντίδρασης στους 30⁰C για 90 min

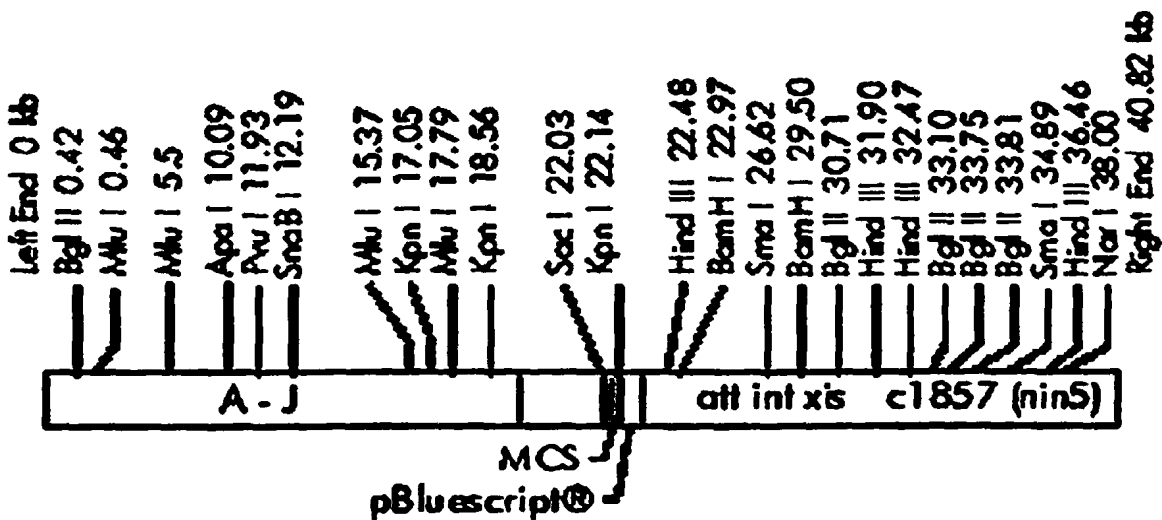
- Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδιου (βλ. εν. 2.4.8α). Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή υφίσταται φλουρογραφία (βλ. εν. 2.4.9), προκειμένου να ενισχυθεί το ασθενές σήμα των σημασμένων πρωτεϊνών, ξηρένεται και εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (KODAK X-OMATAR) για τουλάχιστον 24 h.



2.3) ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ cDNA ΣΕ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΕΣ λ ΦΑΓΩΝ

2.3.1) Βιβλιοθήκη cDNA με φορέα κλωνοποίησης τον λ ZAP II φάγο

Η βιβλιοθήκη (predigested LAMDA ZAP II/EcoRI cloning kit, STRATAGENE) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη περιελάμβανε cDNA τα οποία προήλθαν από ανάστροφη μεταγραφή πολυαδενυλιωμένου RNA, COS κυττάρων (βλ. εν. 2.36). Αυτά στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον φορέα λ ZAP II στην θέση EcoRI. Ο λ ZAP είναι ένας φορέας εισδοχής (insertion vector), βιοτεχνολογικό παράγωγο του λ φάγου, εμπλουτισμένος με πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης εσωτερικά μιας πλασμιδιακής αλληλουχίας, η οποία μπορεί να αποκοπεί από το γονιδίωμα του φάγου *in vivo* και να μετατραπεί σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript SK (εικ.10).



Εικ. 10 Περιοριστικός χάρτης του φορέα λ ZAP II

Εκατέρωθεν της πλασμιδιακής αλληλουχίας του λ ZAP II βρίσκονται οι αλληλουχίες I και T, οι οποίες είναι απαραίτητες για την έναρξη (I: initiation) και λήξη (T: termination) της σύνθεσης της + αλυσίδας των βοηθών φάγων. Τέλος, το μέσο μέγεθος των ενθεμάτων της συγκεκριμένης βιβλιοθήκης, σύμφωνα με τους κατασκευαστές, είναι 1 kb.



2.3.2) Βακτηριακά στελέχη ξενιστές του λ ZAP II

Κατά την ανάπτυξη της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος XL1-Blue του E.coli, στο οποίο ο λ φάγος πολλαπλασιάζεται αποτελεσματικά. Το στέλεχος αυτό προσφέρει τα εξής πλεονεκτήματα:

- είναι ένα *recA*⁻ στέλεχος, πράγμα που σημαίνει ότι αδυνατεί να ανασυνδυάσει ομόλογα τμήματα DNA, αδυναμία χρήσιμη στην κλωνοποίηση γονιδίων.
- περιέχει το F επίσωμα, το οποίο φέρει την μετάλλαξη ΔM15 του *lacZ* γονιδίου, απαραίτητη για την ύπαρξη α-συμπληρωματικότητας του αμινοτελικού άκρου του *lacZ* γονιδίου που βρίσκεται στον λ ZAP φάγο. 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, εσωτερικά του *lacZ* γονιδίου, καταστρέφει την έκφραση του γονιδίου αυτού. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα, την εμφάνιση λευκών πλακών σε καλλιέργειες βακτηρίων μετασχηματισμένων με φαγίδια. Οι πλάκες που προέρχονται από φάγους που δεν έχουν ανασυνδυαστεί θα είναι γαλάζιες, ενώ το ίδιο θα συμβαίνει και με αποικίες βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν από μη ανασυνδυασμένα φαγίδια. Η δεύτερη λειτουργία του βασίζεται στο ότι περιέχει γονίδια για την έκφραση των βακτηριακών συζευκτικών τριχιδίων (F pilli), που είναι απαραίτητα για την μόλυνση των βακτηρίων αυτών με ιώδεις φάγους (f1 ή M13). Η αποκοπή ενός cDNA ενθέματος από τον λ ZAP II (in vivo excision) απαιτεί την ταυτόχρονη μόλυνση με έναν ιώδη φάγο. Τέλος, το F επίσωμα περιέχει το γονίδιο *lac Iq* για την έκφραση του καταστολέα *lac*, ο οποίος αναστέλλει την μεταγραφή από τον υποκινητή του *lacZ* γονιδίου απουσία του επαγωγέα IPTG. Ο καταστολέας αυτός είναι απαραίτητος για τη ρύθμιση της έκφρασης χμιαϊκών πρωτεϊνών (fusion proteins) που πιθανόν να είναι τοξικές για το βακτήριο. Επίσης, στο F επίσωμα εντοπίζεται το Tn10 γονίδιο 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 μετασχηματιστεί και μάλιστα υψηλότερης καθαρότητας από ότι το στέλεχος XL1-Blue.

2.3.3) Υλικά ανάπτυξης βακτηρίων

Τα βακτηριακά στελέχη MC1061 και XL1-Blue αναπτύσσονται κανονικά σε θρεπτικό μέσο LB. Επειδή όμως το δεύτερο περιέχει το F επίσωμα το οποίο μπορεί να χαθεί εύκολα, κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών σε υγρή καλλιέργεια, προσθέτουμε στο καλλιεργητικό υλικό και τετρακυκλίνη (15 μg/ml). Έτσι, καλλιέργειες XL1-Blue κυττάρων, που χρησιμοποιήθηκαν για σπορά φάγων, επλέγονται αρχικά σε θρεπτικό υλικό LB/Tet και κατόπιν αναπτύσσονται σε LB παρουσία μαλτόζης και MgSO₄ (LB, 0.2% μαλτόζη, 10 mM MgSO₄). Βακτήρια που 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 λ φάγου.



2.3.4) Αναζήτηση σε βιβλιοθήκη συμπληρωματικού DNA

Η τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης έγινε ως εξής: Βακτηριακά κύτταρα E.coli του στελέχους XL1-Blue, σπείρονται αραιά (100-500 κύτταρα/τρουβλίο) σε τρυβλία LB που περιέχουν 15 µg/ml τετρακυκλίνη. Μετά από επώαση 16 h, στους 37°C, επιλέγεται μια βακτηριακή αποικία, η οποία ενοφθαλμίζεται σε 5 ml θρεπτικού υλικού LB εμπλουτισμένου με 0.2% (w/v) μαλτόζη και 10 mM MgSO₄ και αναπτύσσεται στους 37°C, υπό ανάδευση, μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να γίνει 0.8. Ταυτόχρονα, γίνονται αραιώσεις 10⁻²-10⁻⁸ της βιβλιοθήκης σε τελικό όγκο 100 µl ρυθμιστικού διαλύματος SM [0.58% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% (w/v) gelatin]. Οι αραιώσεις αυτές αναμιγνύονται με 600 µl της βακτηριακής καλλιέργειας και το προκύπτον αιώρημα επωάζεται στους 37°C, υπό ανάδευση, για 10 min, έτσι ώστε να επιτευχθεί η προσρόφηση του φάγου. Στη συνέχεια, τα μολυσμένα βακτήρια αναμιγνύονται με 8 ml άγαρ επικάλυψης (0.7% αγαρόζη σε LB), το οποίο είναι διατηρημένο σε υγρή κατάσταση μέσα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 48°C, και το προκύπτον αιώρημα εκχέεται σε τρυβλίο διαμέτρου 150 mm, το οποίο έχει, εκ των προτέρων, επιστρωθεί με 20 ml στερεού θρεπτικού υλικού (LB, 0.2% μαλτόζη, 10mM MgSO₄, 0.7% άγαρ). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C, για 8-10h. Ακολούθως, μετρούνται οι πλάκες και υπολογίζεται ο τίτλος της βιβλιοθήκης σε μονάδες σχηματισμού πλακών ανά κυβικό εκατοστό διαλύματος βιβλιοθήκης (pfu/ml).

Η αναζήτηση κλώνων γίνεται ύστερα από σπορά 20 τρυβλίων με 50.000 pfu το καθένα (100 µl από αραιώση της βιβλιοθήκης) και οι πλάκες μεταφέρονται σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης ως εξής:

- Για κάθε τρυβλίο χρησιμοποιούνται δύο φίλτρα, το αυθεντικό και το αντίγραφο του, τα οποία τοποθετούνται στην επιφάνεια του τρυβλίου καλύπτοντας την βακτηριακή στοιβάδα και προσροφούν τους φάγους παθητικά με επαφή 2 και 4 min αντίστοιχα. Ο προσανατολισμός των φίλτρων επιτυγχάνεται, τρυπώντας με βελόνα την περιφέρεια του αυθεντικού φίλτρου, κατά τη διάρκεια της προσρόφησης των φάγων.
- Μετά την προσρόφηση των φάγων, τα φίλτρα τοποθετούνται, με την πλευρά που δεν ήρθε σε επαφή με τους φάγους, σε χαρτί 3MM εμποτισμένο σε διάλυμα 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH, για 2 min, προκειμένου να επιτευχθεί η αποδιάταξη του DNA
- Ακολουθεί ουδετεροποίηση του pH των φίλτρων, με την τοποθέτησή τους σε χαρτί 3MM εμποτισμένο σε διάλυμα 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl, pH 8.0.
- Τέλος, τα φίλτρα τοποθετούνται σε χαρτί 3MM εμποτισμένο σε διάλυμα 0.2 M Tris -HCl pH 7.5, 2x SSC, επί 30 sec, για ένα σύντομο ξέπλυμα και στη συνέχεια τα φίλτρα στεγνώνουν σε χαρτί 3MM.

Τα φίλτρα επωάζονται επί 2 h, σε κλίβανο θερμοκρασίας 80°C, προκειμένου να ακινητοποιηθεί το DNA και διατηρούνται σε Θ.Δ. και ξηρό περιβάλλον, μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα τρυβλία τυλίγονται σε παραφίλμ και αποθηκεύονται στους 4°C.

Η διαδικασία προυβριδισμού και υβριδισμού πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2.2δ. Γενικά, κατά την πρώτη αναζήτηση στη βιβλιοθήκη ακολουθήσαμε συνθήκες χαμηλής αυστηρότητας, ενώ η δεύτερη αναζήτηση έγινε σε συνθήκες βαθμιαία πιο αυστηρές. Κατά την πρώτη αναζήτηση, οι εκπλύσεις που πραγματοποιούνται είναι οι ακόλουθες:

- 1) 2,0x SSC, 0.1% SDS για 30 λεπτά στους 45°C



II) 0,2x SSC, 0.1% SDS για 30 λεπτά στους 45°C

III) 0,1x SSC, 0.1% SDS για 30 λεπτά στους 45°C

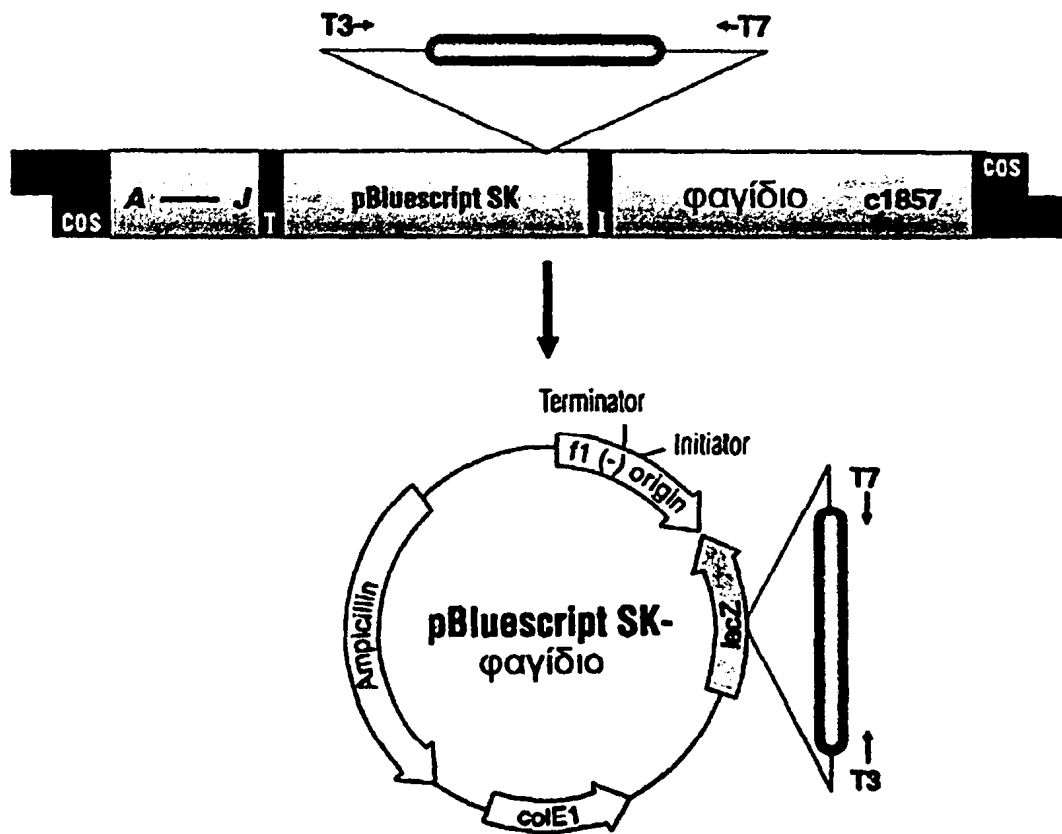
Στις περιπτώσεις που η αυστηρότητα των συνθηκών πρέπει να είναι υψηλή, η θερμοκρασία κατά τις εκπλύσεις αυξάνεται με ανώτερο το όριο των 65°C. Μεταξύ διαδοχικών εκπλύσεων, η ποσότητα της παραμένουσας στα φίλτρα ραδιενέργειας ελέγχεται με μετρητή GEIGER (Series 900 mini monitor, mini instruments L.T.D.) και εκτιμάται με αυτόν τον τρόπο η αποτελεσματικότητα των εκπλύσεων. Μετά το τέλος των εκπλύσεων, τα φίλτρα στεγνώνουν σε Θ.Δ., τοποθετούνται σε χαρτί 3MM και εκτίθενται σε ακτινογραφικό φιλμ στους -70°C για τουλάχιστον 16 h. Οι θετικές πλάκες εντοπίζονται ύστερα από προσανατολισμό των ακτινογραφικών φιλμ πάνω στα τρυβλία. Ακολούθως, απομονώνονται με αποκοπή της περιοχής (διαστάσεων 1 cm²) και μεταφέρονται σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα που περιέχει 1ml SM ρυθμιστικού διαλύματος και μία ως δύο σταγόνες χλωροφορμίου. Οι σωλήνες αφήνονται στους 4°C, για περισσότερο από 12 h, προκειμένου να απελευθερωθούν οι φάγοι.

Ακολουθεί επανάληψη της όλης διαδικασίας (second screen), με στόχο την τελική απομόνωση του θετικού κλώνου. Συνοπτικά, γίνεται τιτλοδότηση του παρασκευάσματος και σπορά βακτηρίων μολυσμένων με φάγους σε τρυβλία των 10 cm, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Ο αριθμός των rfu ανά τρυβλίο υπολογίζεται έτσι ώστε να κυμαίνεται μεταξύ 50 και 80. Η διαδικασία της προσρόφησης των φάγων πάνω στα φίλτρα, η επεξεργασία των φίλτρων, ο προυβριδισμός, ο υβριδισμός, η έκθεση και η εμφάνιση των φιλμ γίνονται σύμφωνα με τη διαδικασία που ήδη περιγράφηκε. Η θετική πλάκα μετά την αποκοπή της από το άγαρ τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα όπου και απελευθερώνεται ο προς αναζήτηση φάγος.

2.3.5) Εξαγωγή DNA ενθέματος *in vivo* (*in vivo excision*)

Η εξαγωγή του DNA ενθέματος (εικ. 11) έγινε *in vivo* ως εξής:
Σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα των 12 ml προστίθενται 200 μl υγρής καλλιέργειας βακτηρίων του στελέχους XL1-Blue (τα οποία ανασύρονται από καλλιέργεια οπτικής πυκνότητας 1), 200 μl αιωρήματος λ ZAP II φάγου (περίπου 10⁵ φαγικά σωματίδια) και 1 μl αιωρήματος βοηθού φάγου R408 (τίτλος: >10⁶ rfu/ml). Το προκύπτον μίγμα επώάζεται στους 37°C για 15 min και στη συνέχεια αφού προστεθούν 5 ml 2xYT θρεπτικού υλικού, η επώαση συνεχίζεται, υπό ανάδευση, για 3 h. Μετά το τέλος της επώασης, το μίγμα θερμαίνεται στους 70°C για 20 min και φυγοκεντρείται στις 4000 rpm, για 5 min, σε Θ.Δ. Από το προκύπτον υπερκείμενο, (το οποίο αποθηκεύτηκε στους 4°C) όγκοι 10 μl και 20 μl αραιώσεως 10⁻² μεταφέρονται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες των 12 ml, οι οποίοι περιέχουν 200 μl καλλιέργειας βακτηρίων XL1-Blue, που ανασύρονται από καλλιέργεια οπτικής πυκνότητας 1 και επώάζονται, υπό ανάδευση, στους 37°C, για 15 min. Ακολουθεί σπορά όγκων 1-100 μl σε τρυβλία LB/amp και επώαση σε κλίβανο των 37°C, για τουλάχιστον 12 ώρες. Οι προκύπτουσες αποικίες, οι οποίες περιέχουν το φαγίδιο pBluescript σε δίκλωνη μορφή (dsDNA) με το DNA ένθεμα, απομονώνονται και αποθηκεύονται όπως έχει περιγραφεί.





Εικ. 11 Εξαγωγή του πλασμιδίου pBluescript SK και του κλωνοποιημένου σ' αυτό DNA ενθέματος, μετά από ταυτόχρονο μετασχηματισμό βακτηρίων XL 1-Blue με τον βοηθό φάγο R408

2.4) ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

2.4.1) Παρασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε βακτήρια

Η παρασκευή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης έγινε με χρήση του βακτηριακού συστήματος υπερέκφρασης QIAGEN (QIAGEN), που περιελάμβανε τους φορείς έκφρασης pQE και τα στελέχη ξενιστές M15[pREP4] και SG13009[pREP4].

Κατά τη διαδικασία παρασκευής ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

α) Κλωνοποίηση cDNA στον φορέα έκφρασης pQE.

Η κλωνοποίηση έγινε με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 2.1.7 και αποσκοπούσε στην τελική παραγωγή μιας χίμαιρας πρωτεΐνης, η οποία να φέρει, είτε στο αμινοτελικό της άκρο, είτε στο καρβοξυτελικό της, μια επιπρόσθετη ουρά 6 ιστιδινών (6 x His tag). Η ορθότητα της κατασκευής ελέγχθηκε με αλληλούχιση των νουκλεοτιδικών της βάσεων (εν. 2.1.9)

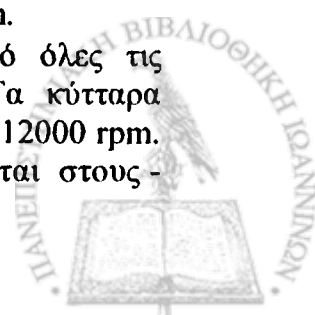
β) Μετασχηματισμός του ανασυνδυασμένου DNA σε στελέχη ξενιστές.

Ο μετασχηματισμός του ανασυνδυασμένου DNA, η επιλογή των θετικών βακτηριακών κλώνων παρουσία αντιβιοτικών, καθώς και η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA αυτών, έγινε σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις ενότητες 2.1.2 – 2.1.6

γ) Επιλογή μικρής κλίμακας, βακτηριακών κλώνων που υπερεκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μετά από επαγωγή με IPTG.

Προκειμένου να επιλέξουμε τους κλώνους εκείνους που εκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε μεγαλύτερη ποσότητα, ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

- μετά την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών αποικιών, 10–20 από αυτές μεταφέρονται, κάθε μία χωριστά και υπό ασηπτικές συνθήκες, από την επιφάνεια του τρυβλίου σε αντίστοιχο αριθμό φυγοκεντρικών σωληναρίων των 50 ml, τα οποία περιέχουν 20 ml LB καθώς και αμπικιλίνη (100 µg/ml) και καναμυκίνη (25 µg/ml). Ακολουθεί ανάπτυξη στους 37°C, για τουλάχιστον 12h
- Την επόμενη μέρα, χρησιμοποιούνται 5ml από κάθε ανεπτυγμένη αποικία για την μόλυνση ισάριθμων φλασκών που περιέχουν 100 ml LB και αντιβιοτικά. Ακολουθεί ανάπτυξη στους 37°C, υπό έντονη ανάδευση (200 rpm) και έλεγχος (ανά 30 min) της ανάπτυξης των αποικιών με μέτρηση στα 600 nm.
- Όταν, η οπτική απορρόφηση πάρει τη τιμή 0.6, λαμβάνεται από όλες τις αποικίες δείγμα 1 ml, σε χρόνο ακριβώς 0 h, πριν την επαγωγή. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στην Eppendorf, για 10 min, στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων φυλάγεται στους -



70°C. Στις φλάσκες προσθέτουμε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM, προκειμένου να επαχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών. Οι αποικίες επωάζονται για άλλες 4-5 h, ενώ κάθε μια ώρα λαμβάνονται δείγματα του 1ml και τα κύτταρα συλλέγονται και αποθηκεύονται με τον ίδιο τρόπο όπως και παραπάνω

- Μετά το τέλος της διαδικασίας, τα συλλεχθέντα ιζήματα μεταφέρονται στον πάγο και προσθέτονται σε καθένα από αυτά 100μl διαλύματος λύσης B (8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris – HCl pH 8) . Η λύση επιτυγχάνεται με διαδοχικές έντονες αναδεύσεις και επώαση για 10 λεπτά σε Θ.Δ. Οι βακτηριακές πρωτεΐνες τελικά, συλλέγονται μετά από φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 min στους 4°C. Σε καθένα εκχύλισμα των 100 μl προστίθενται 50 μl διαλύματος φόρτωσης (3x), ενώ ακολούθως αυτά θερμαίνονται στους 100°C και αναλύονται σε SDS-PAGE (εν. 2.4.8α)

δ) Έλεγχος της διαλυτότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

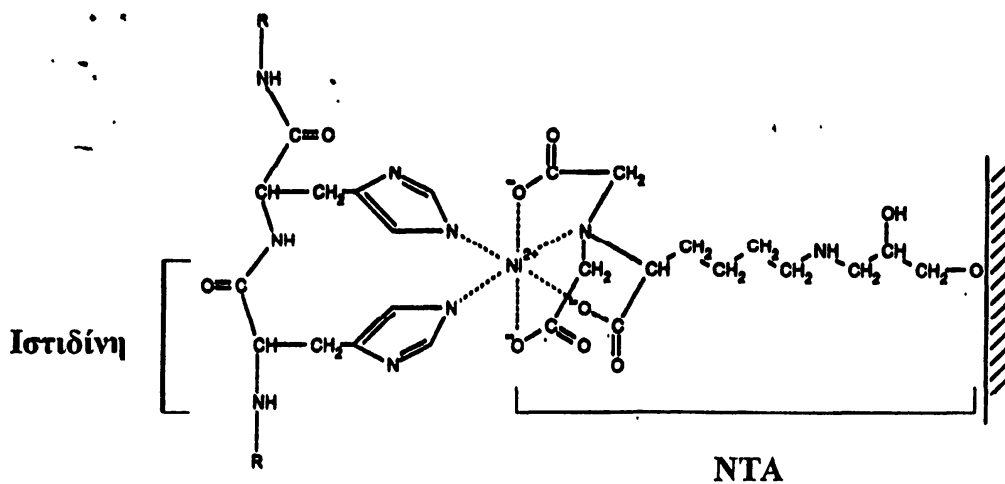
Μετά την απομόνωση των βακτηριακών κλώνων, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, προχωρήσαμε στον έλεγχο της διαλυτότητας αυτής, γεγονός που καθορίζει τις συνθήκες απομόνωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε μια παραγωγή μεγάλης κλίμακας. Ο παραπάνω έλεγχος γίνεται ως εξής:

- Ακολουθούνται τα πέντε πρώτα βήματα της προηγούμενης διαδικασίας ακριβώς όπως περιγράφηκαν
- Στη συνέχεια, τα συλλεχθέντα ιζήματα κυττάρων επαναιωρούνται σε 100 μl διαλύματος λύσης φυσικής διαμόρφωσης (διάλυμα SB) (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 0.3 M NaCl, 10mM imidazole) πρωτεΐνης, παρουσία 1 mg/ml λυσοζύμης, και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 min. Ακολούθως, τα δείγματα οδηγούνται σε συσκευή υπερήχων (Sonifier B12, BRANSON Co.), όπου δέχονται παλμούς των 3 sec στα 50 Watt. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές για κάθε δείγμα, με ενδιάμεση εναπόθεση στον πάγο. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12000 rpm, για 15 min, στους 4°C και συλλέγονται τα υπερκείμενα, τα οποία περιέχουν το σύνολο των διαλυτών πρωτεϊνών.
- Τα εναπομείναντα ιζήματα επαναιωρούνται σε 100 μl διαλύματος λύσης B. Το εναιώρημα αυτό περιέχει το σύνολο των αδιάλυτων πρωτεϊνών
- Τέλος, σε όλα τα εκχύλισματα προστίθεται ανάλογη ποσότητα διαλύματος φόρτωσης (3x)· αυτά θερμαίνονται στους 100°C και αναλύονται σε SDS-PAGE

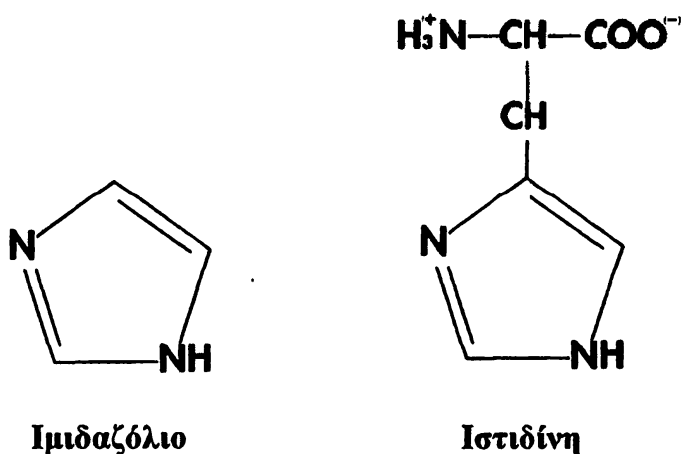
ε) Απομόνωση μεγάλης κλίμακας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης υπό συνθήκες φυσικής διαμόρφωσης.

Μετά τον παραπάνω έλεγχο, και αφού επιβεβαιωθεί ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη βρίσκεται σε διαλυτή φάση στο βακτηριακό κύτταρο, προχωρούμε σε καθαρισμό μεγάλης κλίμακας αυτής, υπό συνθήκες φυσικής διαμόρφωσης. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (immobilized-metal affinity chromatography-IMAC), με νιτριλοτριοξικό οξύ (nitrilotriacetic acid-NTA). Το NTA είναι μια τετραεδρική χηλική ένωση, η οποία καταλαμβάνει τέσσερις από τις έξι διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης του συνδεδεμένου ιόντος του νικελίου, αφήνοντας ελεύθερες δύο θέσεις οι οποίες αλληλεπιδρούν με τους δακτυλίους των πρόσθετων έξι ιστιδινών της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (εικ. 12). Η δέσμευση των πρωτεϊνών στη στήλη Ni-NTA είναι ανεξάρτητη της διαμόρφωσης τους και δεν επηρεάζεται από τις περισσότερες απορρυπαντικές και

μετουσιωτικές ουσίες. Τελικώς, οι δεσμευμένες στη στήλη Ni-NTA πρωτεΐνες εκλύονται παρουσία καθαρού ιμιδαζολίου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Ο δακτύλιος του ιμιδαζολίου είναι μέρος της δομής της ιστοιδίνης (εικ. 13) και γι αυτό σε υψηλές συγκεντρώσεις ανταγωνίζεται πιο αποτελεσματικά για τις ίδιες θέσεις δέσμευσης, την «ουρά» των έξι ιστοιδινών με την οποία δεσμεύονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.



Εικ. 12 Αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών καταλοίπων στην «ουρά» των 6 ιστοιδινών και στήλης Ni-NTA



Εικ. 13 Χημικές δομές ιστοιδίνης και ιμιδαζολίου

Η διαδικασία του καθαρισμού έχει ως εξής:

- 10-20 ml LB/αντιβιοτικών ενοφθαλμίζονται με αποικία βακτηρίων που παράγουν την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει και ακολουθεί ανάπτυξη στους 37°C για τουλάχιστον 12 h

- Η καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιείται για την επιμόλυνση ποσότητας 500 ml LB/αντιβιοτικών (σε αναλογία 1:50) και ακολουθεί ανάπτυξη στους 37°C και μέτρηση της OD στα 600 nm, ανά μία ώρα
 - Μόλις η OD πάρει την τιμή 0.6, προσθέτουμε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και επωάζουμε για άλλες 4 h
 - Μετά το τέλος της επαγωγής, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 5000 rpm, για 15 min, στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων μπορεί να αποθηκευτεί στους -70°C
 - Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε διάλυμα SB, σε αναλογία 2-5 vol./gr ιζήματος κυττάρων. Στο εναιώρημα προστίθενται ακόμη PMSF (0.1 mM) και λυσοζύμη (1 µg/ml) και ακολουθεί επώαση για 30 min στον πάγο
 - Ακολουθώντας, το εναιώρημα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων όπου δέχεται παλμούς των 10 sec στα 50 Watt. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 6 φορές με ενδιάμεσες εναποθέσεις των 10sec την φορά στον πάγο. Στο εναιώρημα προστίθενται RNase A (10 µg/ml) και DNase I (5 µg/ml) και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 min.
 - Το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 10000 rpm, για 20 min, στους 4°C. Το υπερκείμενο το οποίο συλλέγεται αποτελεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των βακτηρίων. Αυτό αναμιγνύεται με 2 ml καθαρού υλικού στήλης Ni-NTA, το οποίο, προηγούμενα, είχε εξισορροπηθεί με διάλυμα SB. Το μίγμα εκχυλίσματος-στήλης αναδεύεται με τη βοήθεια μαγνήτη, υπό χαμηλή ανάδευση (200 rpm), στους 4°C, για 60 min προκειμένου να επιτευχθεί η πρόσδεση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα σφαιρίδια Ni-NTA
 - Μετά την επώαση, το μίγμα εφαρμόζεται σε όρθιο πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα σε Θ.Δ. και αφήνεται να ηρεμήσει, έτσι ώστε τα σφαιρίδια να σχηματίσουν στήλη διαχωριζόμενα από την υπερκείμενη φάση, η οποία αποτελείται από τις πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν σε αυτά
 - Στη συνέχεια, η στήλη εκπλένεται διαδοχικά με 20 ml διαλύματος SB και 20 ml διαλύματος WB (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 0.3 M NaCl, 20mM imidazole). Τέλος, η έκλυση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών γίνεται με την χρήση ιμιδαζολίου σε διάλυμα WB αυξανόμενης συγκέντρωσης από 1-5M
- Ο έλεγχος της καθαρότητας και της ποσότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης γίνεται με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική SDS-πολυακρυλαμίδιου κατά τα γνωστά, αφού προηγούμενα, οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα κλάσματα έκλυσης υποστούν καθίζηση με την χρήση τριχλωροοξικού οξέος (TCA precipitation)

2.4.2) Ηλεκτροέκλυση πρωτεϊνών από πηκτική πολυακρυλαμίδιου

Είναι πιθανόν, κατά τη διαδικασία καθαρισμού μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, η έκλυση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει να συνοδεύεται από ταυτόχρονη έκλυση διάφορων ανεπιθύμητων πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή, έχουμε τη δυνατότητα να απομονώσουμε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, μετά από ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλυσης σε πηκτική SDS-πολυακρυλαμίδιου, ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

- Στα κλάσματα έκλυσης που περιέχουν ιμιδαζόλιο προστίθεται διάλυμα φόρτωσης 6x (σε αναλογία όγκων 1:6) και αυτά θερμαίνονται για 15 min στους 37°C και ακολουθεί SDS-PAGE



- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή χρωματίζεται σε υδατικό διάλυμα χρωστικής [Coomassie Brilliant Blue 0.25% (w/v)] για 30 min, υπό συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια, η πηκτή αποχρωματίζεται με διαδοχικές εκπλύσεις σε ddH₂O
- Όταν γίνει ορατή η ζώνη που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, αποκόπτεται από την πηκτή με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού και εγκλείεται σε σωλήνα διαπίδυσης, ο οποίος περιέχει 1 ml διαλύματος ηλεκτροέκλυσης [0.2 M Tris-acetate pH 7.4, 1% (w/v) SDS, 100 mM DTT] ανά 0.1 gr υγρού κομματιού πολυακρυλαμιδίου.
- Στη συνέχεια, ο σωλήνας διαπίδυσης τοποθετείται κάθετα μέσα σε οριζόντιο θάλαμο ηλεκτροφόρησης, ο οποίος πληρείται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης [50 mM M Tris-acetate pH 7.4, 0.1% (w/v) SDS, 0.5 mM sodium thioglycolate]. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 Volt για 3 h περίπου, στους 4⁰C
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή απομακρύνεται και το διάλυμα στο σωλήνα διαπίδυσης υφίσταται διαπίδυση έναντι διαδοχικών αλλαγών διαλύματος που περιέχει 0.2 M NaHCO₃ και 0.02% (w/v) SDS
- Το διάλυμα της καθαρής πρωτεΐνης, μετά τη διαπίδυση, υφίσταται λυοφιλικό σε συσκευή φυγοκέντρησης υπό κενό. Ακολούθως, η πρωτεΐνη επαναιωρείται σε 10 ml ddH₂O και υφίσταται δεύτερο λυοφιλικό.
- Τελικώς, η καθαρή πρωτεΐνη επαναιωρείται σε ddH₂O και σε όγκο ίσο με το 0.1 του όγκου του αρχικού κομματιού πολυακρυλαμιδίου από το οποίο προήλθε.
Σε αυτή την μορφή η πρωτεΐνη μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί ως αντιγόνο για την παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων.

2.4.3) Παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων

• Προετοιμασία του αντιγόνου.

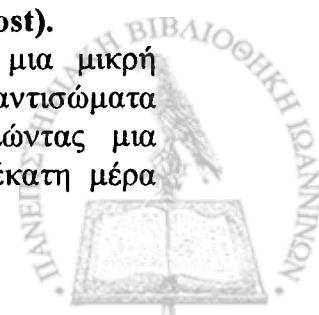
100 μg περίπου καθαρισμένης πρωτεΐνης επαναιωρούνται σε 1 ml ddH₂O. Σε αυτό, προστίθεται σταδιακά 1 ml ενισχυτικού υλικού πλήρους Freund's (CFA: Complete Freund's Adjuvant), υπό συνεχή έντονη ανάδευση, έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιόμορφο γαλακτώδες εναιώρημα (το CFA αποτελείται από έλαια που δεν μεταβολίζονται και περιέχει νεκρά βακτηριακά κύτταρα του στελέχους *M. tuberculosis*. Το υλικό αυτό είναι αποτελεσματικό στο να προκαλεί έντονη και μακράς διάρκειας ανοσοαπόκριση στον οργανισμό στον οποίο ενίεται). Το εναιώρημα λίγο πριν ενεθεί, οδηγείται σε συσκευή υπερήχων όπου δέχεται επαναλαμβανόμενους παλμούς των 3 sec στα 50 Watt. Τέλος, προκειμένου να ενεθεί, μεταφέρεται σε αποστειρωμένη σύριγγα του 1 ml (25 G), με ταυτόχρονη απομάκρυνση του αέρα και φυλάγεται στον πάγο.

• Υποδόρια ένεση του αντιγόνου-CFA σε κουνέλια.

Το μίγμα των 2ml του αντιγόνου-CFA ενίεται ραχιαία, στον υποδόριο ιστό ακριβώς κάτω από το δέρμα και κοντά στη βάση του κεφαλιού κουνελιού το οποίο, προηγούμενα, έχει ακινητοποιηθεί για το σκοπό αυτό σε ειδική παγίδα. Το υλικό ενίεται σε δόσεις των 400 μl περίπου, σε 4-5 διαφορετικά σημεία έτσι ώστε το αντιγόνο να συγκεντρωθεί στους πλησιέστερους τοπικούς λεμφαδένες.

• Δεύτερη ένεση αντιγόνου-CFA στα ανοσοποιημένα κουνέλια (Boost).

5-6 ημέρες μετά από την πρώτη ένεση του αντιγόνου, αρχίζει μια μικρή αύξηση των B λεμφοκυττάρων που φέρουν στην επιφάνεια τους αντισώματα ειδικά έναντι του αντιγόνου που ενέθηκε στον οργανισμό, προκαλώντας μια ασθενή ανοσολογική απόκριση, η οποία λαμβάνει την μέγιστη τιμή της τη δέκατη μέρα



περίπου μετά την ένεση. Εάν στο διάστημα αυτό, ο οργανισμός επανεκτεθεί στο ίδιο αντιγόνο, λαμβάνει χώρα εκθετική αύξηση των Β λεμφοκυττάρων που ειδικά αναγνωρίζουν το αντιγόνο αυτό.

Για τους παραπάνω λόγους, γίνεται μια δεύτερη ένεση του αντιγόνου-CFA στο ανοσοποιημένο κουνέλι, με τις ίδιες συνθήκες που γίνεται η πρώτη. 3-4 ημέρες μετά τη δεύτερη ένεση, η συγκέντρωση του πολυκλωνικού αντισώματος στον ορό αυξάνεται θεαματικά, λαμβάνοντας την μέγιστη τιμή της 10-14 ημέρες αργότερα.

- **Συλλογή ορού από αίμα ανοσοποιημένου κουνελιού**

14 ημέρες μετά τη δεύτερη ένεση, το ανοσοποιημένο κουνέλι ακινητοποιείται στην ειδική παγίδα και ξυρίζεται το τριχωτό ενός αυτιού του, έτσι ώστε να αποκαλυφθεί η φλέβα του. Στο αγγείο προκαλείται τοπικός ερεθισμός και διαστολή με τη βοήθεια ξυλόλης και θερμότητας από λαμπτήρα. Στη συνέχεια, το αγγείο κόβεται επιφανειακά και υπό γωνία 45° με αποστειρωμένο νυστέρι. Συλλέγονται 20-25 ml αίματος που ρέει στάγδην σε ειδικά φυγοκεντρικά σωληνάρια πήξης του αίματος, τα οποία οδηγούνται στους 4°C , για 24 h, προκειμένου να σχηματιστεί πήγμα. Κατόπιν, με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur το πήγμα αποκολλάται προσεκτικά από τα τοιχώματα των σωληναρίων και αυτά φυγοκεντρούνται στις 2000 στροφές στους 4°C για 30min έτσι ώστε να διαχωριστεί πλήρως ο ορός από το πήγμα. Τέλος, στον ορό μετά τη συλλογή του προστίθεται NaN_3 (0,02%) και διατηρείται στους 4°C .

2.4.4) Απομόνωση αντισώματος από αντιορό με χρωματογραφία αγκιστείας

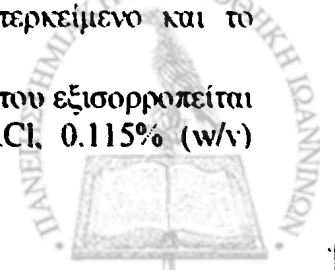
Προκειμένου από το συλλεχθέντα αντιορό να απομονωθεί το αντίσωμα έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης για την οποία έγινε η ανοσοποίηση του κουνελιού, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αγκιστείας, σύμφωνα με την μεθοδολογία των Harlow και Lane (4). Η διαδικασία συνίσταται στα εξής

- 500 μg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης επαναιωρούνται σε 0.5 ml διαλύματος σύζευξης (0.1 M HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF). Κατόπιν, 1ml υλικού χρωματογραφίας Affigel 10 (Biorad), ενεργοποιείται παρουσία 2- προπανόλης, εκπλένεται 3 φορές με ddH_2O και επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος σύζευξης. Το εναιώρημα του υλικού χρωματογραφίας αναμιγνύεται με το διάλυμα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου

- Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 rpm, για 1 min, απομακρύνεται το υπερκείμενο (μη συζευγμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη) και το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος I (1M Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF). Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται για μια φορά ακόμη και τελικώς το δείγμα αφήνεται στους 4°C για τουλάχιστον 18 h

- Την επόμενη μέρα, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 rpm, για 1 min και το ίζημα υφίσταται 3 διαδοχικές εκπλύσεις, με 1ml (ανά έκπλυση) ισοτονικού διαλύματος (διάλυμα II) [0.4% (w/v) NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mM PMSF]. Στη συνέχεια, το υλικό επωάζεται με 1 ml ισοτονικού διαλύματος, παρουσία BSA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$), στους 4°C , για τουλάχιστον 18 h. Κατόπιν, το δείγμα φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες, όπως και παραπάνω, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml ισοτονικού διαλύματος.

- Το υλικό Affigel 10-ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη πριν την χρήση του εξισορροπείται με 20 ml διαλύματος PBSw [0.8% (w/v) NaCl, 0.02% (w/v) KCl, 0.115% (w/v)



Na₂HPO₄, 0.04% K₂HPO₄]. Στη συνέχεια, επώάζεται με 4 ml αντιορού -στο οποίο, προηγούμενα, προστίθενται Tween-20 (0.1%) και PMSF (0.5 mM)- για 1 h, στους 4°C. Ακολούθως, το δείγμα τοποθετείται σε όρθιο αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα χρωματογραφίας όπου αφήνεται να σχηματίσει στήλη. Το υλικό εκπλένεται διαδοχικά με 20ml διαλύματος TBST [(20mM Tris-HCl pH 7.4, 0.9% (w/v) NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20)] και 20ml διαλύματος PBSw.

- Τα δεσμευμένα αντισώματα εκκλούνται με την χρήση διαλύματος 0.2 M γλυκίνης, 0.5 M NaCl, pH 2.3. Συλλέγονται 10 κλάσματα, όγκου 1ml το καθένα, σε σωληνάκια, στα οποία είχαν εισαχθεί 0.15 ml διαλύματος 1 M Tris pH 11.5, έτσι ώστε να εξουδετερωθεί αμέσως το όξινο pH των κλασμάτων που εκκλούνται από τη στήλη.

- Τα κλάσματα στα οποία έχει εκλουστεί το αντίσωμα προσδιορίζονται με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Τα κλάσματα στα οποία εντοπίστηκε το αντίσωμα ενοποιούνται και υφίστανται διαπίδυση έναντι PBSw στους 4°C για τουλάχιστον 24 h. Τέλος, το διάλυμα του καθαρού αντισώματος διατηρείται για μακρόχρονη αποθήκευση στους -70°C, παρουσία NaN₃ (0.02%).

2.4.5) Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα θηλαστικών

α) Συλλογή ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών

Προκειμένου να απομονωθεί συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεϊνών, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Κυτάρια που σχηματίζουν μονή στιβάδα σε τρυβλίο, αφήνονται να αναπτυχθούν, μέχρις ότου, καταλάβουν το 100% περίπου της επιφάνειας του ταπήτιου ενός τρυβλίου διαμέτρου 10 cm. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων, με 10 ml (ανά έκπλυση) διαλύματος PBS (1X) (βλ. εν. 2.34).

- Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται σε 5 ml διαλύματος PBS (1X) και μεταφέρονται σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 1500 rpm, σε Θ.Δ..

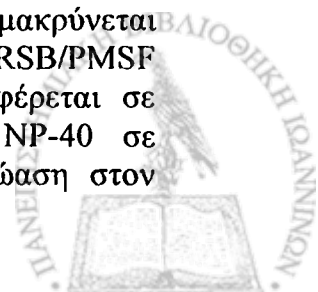
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1ml διαλύματος PBS (1X) και μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο, με τις ίδιες συνθήκες, όπως παραπάνω. Το υπερκείμενο αφαιρείται τελείως με αναρρόφηση υπό κενό και το ίζημα επαναιωρείται σε 300 μl διαλύματος RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS] παρουσία 1 mM PMSF, 1 μg/ml leupeptin και 1 μg/ml pepstatin.

- Το εναιώρημα επώάζεται για 15 min στον πάγο, με αναδεύσεις ανά 5 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm, για 15 min, στους 4°C. Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί και το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών, συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα.

β) Κλασμάτωση κυτταρικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών.

Στην περίπτωση που θέλουμε να διαχωρίσουμε τις κυτταροπλασματικές από τις πυρηνικές πρωτεΐνες των κυττάρων, ακολουθούμε τη διαδικασία κατά Penman S. (238) σύμφωνα με την οποία:

- Μετά τη συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται ενώ το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 500 μl διαλύματος RSB/PMSF (50:1) (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂) και μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα Eppendorf. Στο εναιώρημα προστίθεται NP-40 σε τελική συγκέντρωση 0.5%. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση στο vortex, επώαση στον



πάγο για 5 min και φυγοκέντρωση στην Eppendorf στις 2000 rpm για 2 min στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο και αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα I.

- Το ίζημα επαναιωρείται σε 250 μl RSB/PMSF και παρουσία Magic detergent [10% (w/v) Na-deoxycholate (SODC), 10% (v/v) Tween-40] σε τελική συγκέντρωση 12.6%. Το εναιώρημα αναδεύεται ισχυρά στο vortex και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες, όπως και προηγουμένως. Το υπερκείμενο αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα II. Τελικώς τα κλάσματα I και II μεταφέρονται στον ίδιο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, προκειμένου να αποτελέσουν το ολικό κυτταροπλασματικό κλάσμα των πρωτεϊνών.

- Το ίζημα, που έχει απομείνει, αποτελείται από τους καθαρούς πυρήνες των κυττάρων και επαναιωρείται σε 500 μl διαλύματος HSB (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 50 mM MgCl₂) παρουσία 10 μg DNase και 10 μg RNase. Το εναιώρημα των πυρήνων επώαζεται στους 37°C, για 30 min, και κατόπιν οι πυρήνες υφίστανται θραύση με την χρήση υπερήχων, με διαδοχικούς παλμούς των 5 sec στα 40 Watt. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12000 rpm, για 10 min, στους 4°C. Το υπερκείμενο, που απομονώνεται κατά αυτόν τον τρόπο, περιέχει τις διαλυτές πυρηνικές πρωτεΐνες

2.4.6) Εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστούς θηλαστικών

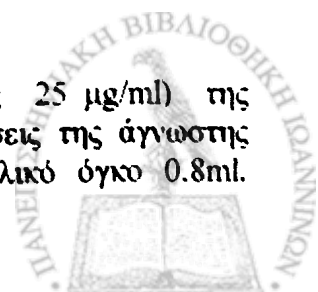
Προκειμένου να απομονωθούν πρωτεΐνες από ιστούς, ποσότητα από κάθε ιστό, ίση με 100 mg, μεταφέρεται σε αποστειρωμένο γυάλινο τρυβλίο petri όπου και τεμαχίζεται με νυστέρι, παρουσία 2 ml διαλύματος εκχύλισης [125 mM Tris - HCl pH 6.8, 1 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 24% (w/v) urea, 1mM PMSF, 1μg/ml leupeptin, 0.5 μg/ml pepstatin]. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο γυάλινο σωλήνα και ακολουθεί ομογενοποίηση του σε μηχανικό ομογενοποιητή, για 2 min περίπου, με ενδιάμεσες εναποθέσεις του στον πάγο προκειμένου να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του. Για την τελική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, το αιώρημα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων όπου και εφαρμόζονται σε αυτό διαδοχικοί παλμοί των 10 sec στα 50 Watt, οι οποίοι εναλλάσσονται με ισόχρονα διαστήματα εναπόθεσης στον πάγο και για συνολικό χρόνο 2 min. Μετά την εκχύλιση, ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12000 rpm, για 10 min, στους 4°C και συλλέγεται το υπερκείμενο.

2.4.7) Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών (Bio-Rad protein assay)

Η μέτρηση της ποσότητας των πρωτεϊνών, σε κάθε περίπτωση, έγινε με χρήση υλικών της εταιρείας Bio-Rad. Ο τρόπος υπολογισμού της πρωτεΐνης βασίζεται στην μέθοδο Bradford, κατά την οποία μια χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-250) αλλάζει μέγιστο απορρόφησης από τα 460 nm στα 595 nm, όταν αυτή δεσμευτεί σε μία πρωτεΐνη. Έτσι, μετρώντας σε ένα φασματοφωτόμετρο τις τιμές απορρόφησης στα 595 nm διαφορετικών αραιώσεων μιας πρωτεΐνης αγνώστου συγκέντρωσης και συγκρίνοντας αυτές με μια πρότυπη καμπύλη τιμών απορρόφησης, που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις μιας πρωτεΐνης (συνήθως καθαρής αλβουμίνης βοός), είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού μας διαλύματος.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Παρασκευάζουμε διαδοχικές αραιώσεις (από 1 μg/ml ως 25 μg/ml) της πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης, καθώς και κατάλληλες αραιώσεις της άγνωστης πρωτεΐνης. Όλες οι αραιώσεις γίνονται σε dH₂O και έχουν τελικό όγκο 0.8ml.



Ταυτόχρονα ετοιμάζουμε και ένα δείγμα που περιέχει μόνο dH₂O και το οποίο θα αποτελέσει τον μάρτυρα κατά την φωτομέτρηση.

- Στη συνέχεια, προσθέτουμε σε όλα τα δείγματα 0.2ml διαλύματος χρωστικής και τα αναδεύουμε ήπια αρκετές φορές
- Μετά από 5 min επώασης, ακολουθεί φωτομέτρηση (BECKMAN DU520) σε μήκος κύματος 595 nm και με δείγμα αναφοράς αυτό του μάρτυρα, κατασκευή πρότυπης καμπύλης και υπολογισμός της άγνωστης συγκέντρωσης.

2.4.8) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών, υπό μετουσιωτικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση μιας διαστάσεως σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS, σύμφωνα με την μέθοδο Laemmli (239).

Κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιείται σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζονται οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου, οι οποίες διακρίνονται σε δύο μέρη:

ι) την πηκτή επιστοίβαξης, με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5% [5% acrylamide mix, 0.13M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED] και μεγάλο μέγεθος πόρων και

ii) την πηκτή διαχωρισμού, με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 10% [10% acrylamide mix, 0.38M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED] και μικρότερο μέγεθος πόρων.

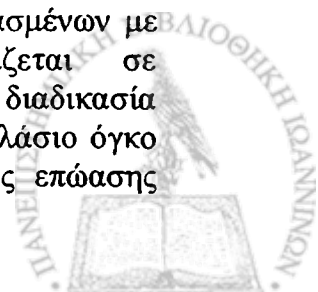
Τα μίγματα των δύο πηκτών, μετά την παρασκευή τους, πολυμερίζονται με προσθήκη TEMED (SIGMA). Ο πολυμερισμός της πηκτής έγινε σε Θ.Δ., για περίπου 30 min.

Πριν την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα ξηρένονται σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού, επαναιώρονται σε 20-30 μl διάλυμα φόρτωσης [62.5 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% (w/v) bromophenol blue] και θερμαίνονται για 5 min στους 100°C. Ακολούθως, φορτώνονται στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται σε περίπου 250 Vh σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25mM Tris-HCl, 192mM glycine, 0.1% SDS). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές με χρώση της πηκτής για 30 min, υπό ανάδευση, σε διάλυμα χρωστικής Coomassie [0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 9.2% (v/v) acetic acid, 45.4% methanol]. Ο αποχρωματισμός γίνεται, υπό ολονύκτια ανάδευση, σε διάλυμα αποχρωματισμού [25% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid].

2.4.9) Αυτοραδιογραφία - Φλουороγραφία

Στην περίπτωση που τα δείγματα των ηλεκτροφορηθέντων πρωτεϊνών ήταν ραδιενεργά σημασμένα, η αποτύπωση τους και η παρατήρηση τους έγινε με αυτοραδιογραφία. Για το σκοπό αυτό η πηκτή ξηραίνεται σε συσκευή ξήρανσης υπό κενό (Biogad model 1125B), τοποθετείται σε ακτινογραφική κασέτα με ακτινογραφικό φιλμ και εκτίθεται έναντι της πηκτής στους -70°C. Η εμφάνιση της ακτινογραφίας γίνεται όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.1.8.

Η ενίσχυση ασθενών ραδιενεργών σημάτων (π.χ. πρωτεϊνών σημασμένων με [³⁵S]) γίνεται με φλουορογραφία. Συγκεκριμένα, η πηκτή επωάζεται σε εικοσαπλάσιο όγκο DMSO υπό ανακίνηση επί 30 λεπτά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές και ακολουθεί τρίτη επώαση σε τετραπλάσιο όγκο διαλύματος 20% (w/v) PPO σε DMSO επί 3 h. Με το τέλος της τρίτης επώασης



η πηκτική ξεπλένεται αρκετές φορές σε dH₂O και τελικώς, επώαζεται σε εικοσαπλάσιο όγκο dH₂O υπό ανακίνηση για 30 min. Τέλος, η πηκτική τοποθετείται σε 3MM χαρτί, ξηραίνεται και αυτοραδιογραφείται, σύμφωνα με τα παραπάνω.

2.4.10) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και εφόσον λάβει χώρα η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, η πηκτική καταβυθίζεται σε διάλυμα μεταφοράς [0.58% (w/v) Tris-HCl, 0.292% (w/v) glycine, 20% (v/v) methanol] για 10 min, σε Θ.Δ.. Στο ίδιο διάλυμα μεταφέρονται και 4 κομμάτια απορροφητικού χαρτιού Whatmann 3MM, καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης Hybond C (AMERSHAM), τα οποία έχουν ακριβώς τις ίδιες διαστάσεις με αυτές της πηκτής.

Στη συνέχεια, και προκειμένου για πηκτές μικρών διαστάσεων (mini gels), τα κομμάτια τα εμποτισμένα με το διάλυμα μεταφοράς, φέρονται στην επιφάνεια του ακίνητου ηλεκτροδίου συσκευής ημι-ξηρής πρωτεϊνικής ηλεκτρομεταφοράς (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BIORAD) με την ακόλουθη σειρά: 2 κομμάτια χαρτιού Whatmann-μεμβράνη νιτροκυτταρίνης-πηκτική-2 κομμάτια χαρτιού Whatmann. Με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, απομακρύνουμε τις φυσαλίδες μεταξύ των κομματιών και εν συνεχεία εφαρμόζουμε στην επιφάνεια τους το δεύτερο ηλεκτρόδιο της συσκευής (αρνητικός πόλος). Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε σταθερή τάση 15 Volt, για 30 min. Μετά το τέλος αυτής, η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα PBSw (western blot, 1X) παρουσία σκόνης μη λιπαρού γάλακτος [3% (w/v)] και ακολουθεί επώαση σε Θ.Δ., για τουλάχιστον 2 h προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές σύνδεσης της μεμβράνης.

Ακολούθως, η μεμβράνη υφίσταται 2 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5min η κάθε μία, με 300 ml διαλύματος PBSw (1X). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαζεται με το ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε σε 10 ml διαλύματος PBSw (1X), παρουσία BSA [3% (w/v)], σε Θ.Δ., για τουλάχιστον 1 h, υπό ανακίνηση.

Μετά το τέλος της επώασης, η μεμβράνη υφίσταται δύο διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 min η κάθε μία, με 300 ml διαλύματος PBSw (1X), παρουσία Tween-20 [0.05% (w/w)], προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτοταγούς αντισώματος. Κατόπιν, η μεμβράνη επώαζεται με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών του είδους προέλευσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Η επώαση γίνεται σε 10 ml διαλύματος PBSw (1X), παρουσία σκόνης γάλακτος [2.5% (w/v)] και διαρκεί για 45 min σε Θ.Δ.. Το δευτεροταγές αντίσωμα, φέρει συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού (HRP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντίδραση χημειοφωταύγειας.

Μετά το τέλος και της δεύτερης επώασης, η μεμβράνη υφίσταται δύο εκπλύσεις με τις ίδιες συνθήκες, όπως παραπάνω, και ακολουθεί η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) και η ανίχνευση της πρωτεΐνης.

2.4.11) Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation)

Προκειμένου να ελέγξουμε τις ειδικές αλληλεπιδράσεις των προς εξέταση πρωτεϊνών χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της ανοσοκαθίζησης, σύμφωνα με την οποία πραγματοποιούμε τα εξής:

- Λαμβάνεται ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που καλύπτουν πλήρως την επιφάνεια του ταπητίου τρυβλίου διαμέτρου 10 cm (βλ.εν.2.4.5β)

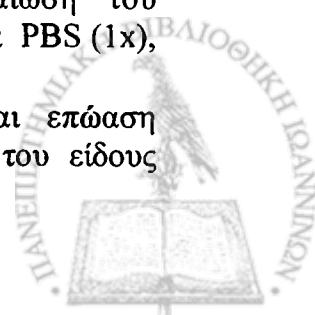


- Στο κυτταρικό εκχύλισμα προσθέτουμε 20 μl εναιώρηματος μίγματος πρωτεϊνών A και G (σε αναλογία 1:1) συνδεδεμένων σε σφαιρίδια σεφαρόζης. Ακολουθεί επώαση υπό ανακίνηση, στους 4°C για 2 h, προκειμένου να επιτευχθεί η προ-προσρόφηση του κυτταρικού εκχυλίσματος, κατά την οποία απομακρύνονται πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται μη ειδικά με τις πρωτεΐνες A και G.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500 rpm, στους 4°C, για 5 min. Συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, όπου προστίθεται ποσότητα 1 μg του αντισώματος έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης, καθώς και διάλυμα BSA (1 mg/ml) για την κάλυψη μη ειδικών θέσεων στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Το δείγμα επώαζεται υπό ανακίνηση, στους 4°C, για τουλάχιστον 12 h. Στο δείγμα προστίθενται 20 μl εναιώρηματος αποτελούμενο από σφαιρίδια σεφαρόζης και μίγμα πρωτεϊνών A/G και η επώαση συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες, για επιπλέον 2 h.
- Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 rpm, στους 4°C, για 5 min. Το υπερκείμενο (μη δεσμευμένη πρωτεΐνη) συλλέγεται, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας, για τον τελικό προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης που δεσμεύτηκε στο αντίσωμα. Το ίζημα, υφίσταται 3 διαδοχικές εκπλύσεις, με 1 ml διαλύματος RIPA κάθε φορά, και κάτω από τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης, όπως και προηγουμένως.
- Μετά το τέλος και της τρίτης φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 40 μl διάλυμα φόρτωσης SDS-PAGE (1.5X). Πριν την ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE, το δείγμα υφίσταται, αφενός μεν, βρασμό στους 100°C και ισχυρή ανάδευση ώστε να απελευθερωθεί η πρωτεΐνη από τα σφαιρίδια σεφαρόζης, αφετέρου δε, φυγοκέντρηση στις 12000 rpm, για 5 sec, σε μικροφυγόκεντρο Eppendorf έτσι ώστε να ιζηματοποιηθούν πάλι τα σφαιρίδια και να μείνουν στο υπερκείμενο οι πρωτεΐνες.

2.4.12) Ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (Immunofluorescence)

Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των εξεταζόμενων πρωτεϊνών κατέστη δυνατός με την χρήση της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού, σύμφωνα με την οποία, ακολουθούμε τα εξής:

- Κύτταρα τοποθετούνται πάνω σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες (2X2 cm) εντός τρυβλίου διαμέτρου 10 cm, σε πυκνότητα $2.5 \cdot 10^6$ κύτταρα/τρυβλίο και αφήνονται να αναπτυχθούν για 2 ημέρες.
- Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων, με 10 ml (ανά έκπλυση), διαλύματος PBS (1X). Κατόπιν, τα κύτταρα μονιμοποιούνται για 10 min με διάλυμα παραφορμαλδεύδης [2% (w/v) σε PBS)], σε Θ.Δ..
- Μετά την μονιμοποίηση τους, τα κύτταρα εκπλένονται 2-3 φορές με διάλυμα PBS (1X) και επώαζονται με παγωμένη καθαρή μεθανόλη για 3-5 min στους -20°C. Ακολουθεί ξανά έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS και επώαση αυτών με διάλυμα PBS (1X) παρουσία BSA [3% (w/v)] για 30-60 min, για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων.
- Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επώαζονται με κατάλληλη αραιώση του ειδικού αντισώματος -έναντι της πρωτεΐνης που εξετάζουμε- σε διάλυμα PBS (1X), παρουσία BSA [1% (w/v)], για 30-40 min στους 37°C.
- Ακολουθεί ξανά έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS και επώαση αυτών με κατάλληλη αραιώση αντισώματος, έναντι ανοσοσφαιρινών του είδους



προέλευσης του πρώτου αντισώματος, το οποίο είναι συνδεδεμένο με χρωμοφόρο ουσία (FITC). Η επώαση γίνεται στους 37°C και διαρκεί για 30-40 min

- Τέλος οι καλυπτρίδες εκπλένονται με διάλυμα PBS, μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και ακολουθεί παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nicon Microphot-FXA) και φωτογράφιση σε φιλμ Fujicolor 400 ASA.



2.5) ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.5.1) Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των διαφόρων κυτταρικών σειρών έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο (cell culture room), ο οποίος διατηρείται στείρος με χρήση υπεριάδους ακτινοβολίας. Προκειμένου να αποφευχθούν οι μολύνσεις, όλοι οι χειρισμοί, οι σχετικοί με τα κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν μέσα σε εστία νηματικής ροής (GELMAN Instrument Laminar Air Flow class 100). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Nuair, Autoflow, CO₂ Water- Jacketed Incubator) σταθερής θερμοκρασίας 37⁰C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Ανάλογα με τις απαιτήσεις, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φιάλες, τρυβλία ή σε πολυτρυβλία, όλα μιας χρήσης. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Olympus IM) ενώ η μακρόχρονη συντήρηση τους έγινε σε δοχείο υγρού αζώτου (-192⁰C).

2.5.2) Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας

α) 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 σε ddH₂O, με ταυτόχρονη προσθήκη όξινου ανθρακικού νατρίου NaHCO₃ (3.7 g/l). Στη συνέχεια αποστειρώθηκε με διήθηση σε συσκευή της MILIPORE (cat.no. XX6700P10) με τη βοήθεια προφίλτρων (MILIPORE: Filter type AP cat, no. AP1504200) και φίλτρων (MILIPORE: Filter type HA 0.45μm cat. no HATF04700) και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4⁰C. Πριν την χρησιμοποίηση του προστέθηκε σε αυτό L-γλουταμίνη (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 4 mM καθώς και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (SEROMED) σε συγκεντρώσεις 5 x 10⁴U και 5 x 10⁵μg αντίστοιχα ανά λίτρο.

β) Διάλυμα έκπλυσης (PBS)

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS), ελλειματικού σε ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺, pH 7.2: 139mM NaCl, 5.4mM KCl, 0.37mM Na₂HPO₄·H₂O, 0.44mM KH₂PO₄, 4.16mM NaHCO₃. Μετά την παρασκευή του, το διάλυμα αποστειρώνεται για 25min, στους 121⁰C, σε αυτόκαυστο (Dr Morand S.A., Switzerland) και διατηρείται στους 4⁰C.



γ) Ορός, FCS

Σε όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες το θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται αμέσως πριν την χρήση του με ορό εμβρύου βοός (Fetal Calf Serum- SEROMED, Sera Lab, GIBCO BRL). Η προσθήκη του ορού είναι απαραίτητη για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού υλικού με αναπτυξιακούς παράγοντες αναγκαίους για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

δ) Διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Trypsin/EDTA)

Η αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο των σκευών κυτταροκαλλιέργειας επιτυγχάνεται με την χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (Trypsin/EDTA solution, BIOCHROM KG, Berlin) 0.05%/0.02% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS ελλειματικό σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} .

2.5.3) Αποθήκευση κυτταρικών σειρών

Κατά την αποθήκευση των κυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία: Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με διάλυμα PBS (1X). Στη συνέχεια, προστίθεται στο ταπήτιο διάλυμα θρυψίνης και τα κύτταρα, μετά την αποκόλληση τους, συλλέγονται σε θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 rpm, για 5 min, σε Θ.Δ. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε κατάλληλο υλικό αποθήκευσης, το οποίο αποτελείται από FCS (90%) και DMSO (10%), ενώ η πυκνότητα των κυττάρων είναι $5-6 \times 10^6$ κύτταρα ανά 1ml υλικού αποθήκευσης. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάριο ψύξης (cryovial), το οποίο μεταφέρεται αρχικά στους $-70^{\circ}C$ για 24 h και στη συνέχεια σε δοχείο υγρού αζώτου ($-192^{\circ}C$).

2.5.4) Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι οι ακόλουθες:

1)CV1: Κυτταρική σειρά προερχόμενη από νεφρό πράσινου Αφρικανικού παθήκου. Τα κύτταρα έχουν μορφολογία ινοβλαστών και προσκολλώνται σε σταθερό υπόστρωμα, ενώ απαιτούν για την ανάπτυξη τους DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS.

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

3)HeLa: Κύτταρα προερχόμενα από καρκίνωμα τραχήλου της μήτρας ανθρώπου. Τα κύτταρα έχουν μορφολογία επιθηλίου και αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FCS προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα.

4)U937: Ανθρώπινη κυτταρική σειρά προερχόμενη από καρκινικά κύτταρα του υδροθώρακα. Τα κύτταρα, που είναι σχεδόν τριπλοειδή με το 70% αυτών να φέρουν 58 χρωμοσώματα καλλιεργούνται ως εναιώρημα σε θρεπτικό υλικό RPMI (GIBCO, BRL.) με 10% FCS.



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το Κέντρο μελετά και δημοσιεύει τα αποτελέσματα των ερευνών που διεξάγει ή συμμετέχει σε αυτές. Τα αποτελέσματα δημοσιεύονται στο Επιστημονικό Δελτίο του Κέντρου, το οποίο κυκλοφορεί δωρεάν. Το Δελτίο αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την προώθηση της έρευνας και της διδασκαλίας στην Ελλάδα και στο εξωτερικό. Τα άρθρα που δημοσιεύονται στο Δελτίο είναι το αποτέλεσμα της συλλογικής προσπάθειας των μελών του Κέντρου και των συνεργαζόμενων ερευνητών. Τα αποτελέσματα που δημοσιεύονται στο Δελτίο είναι το αποτέλεσμα της συλλογικής προσπάθειας των μελών του Κέντρου και των συνεργαζόμενων ερευνητών. Τα αποτελέσματα που δημοσιεύονται στο Δελτίο είναι το αποτέλεσμα της συλλογικής προσπάθειας των μελών του Κέντρου και των συνεργαζόμενων ερευνητών.



3.1) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ cDNA ΚΛΩΝΟΥ ΤΗΣ dj2

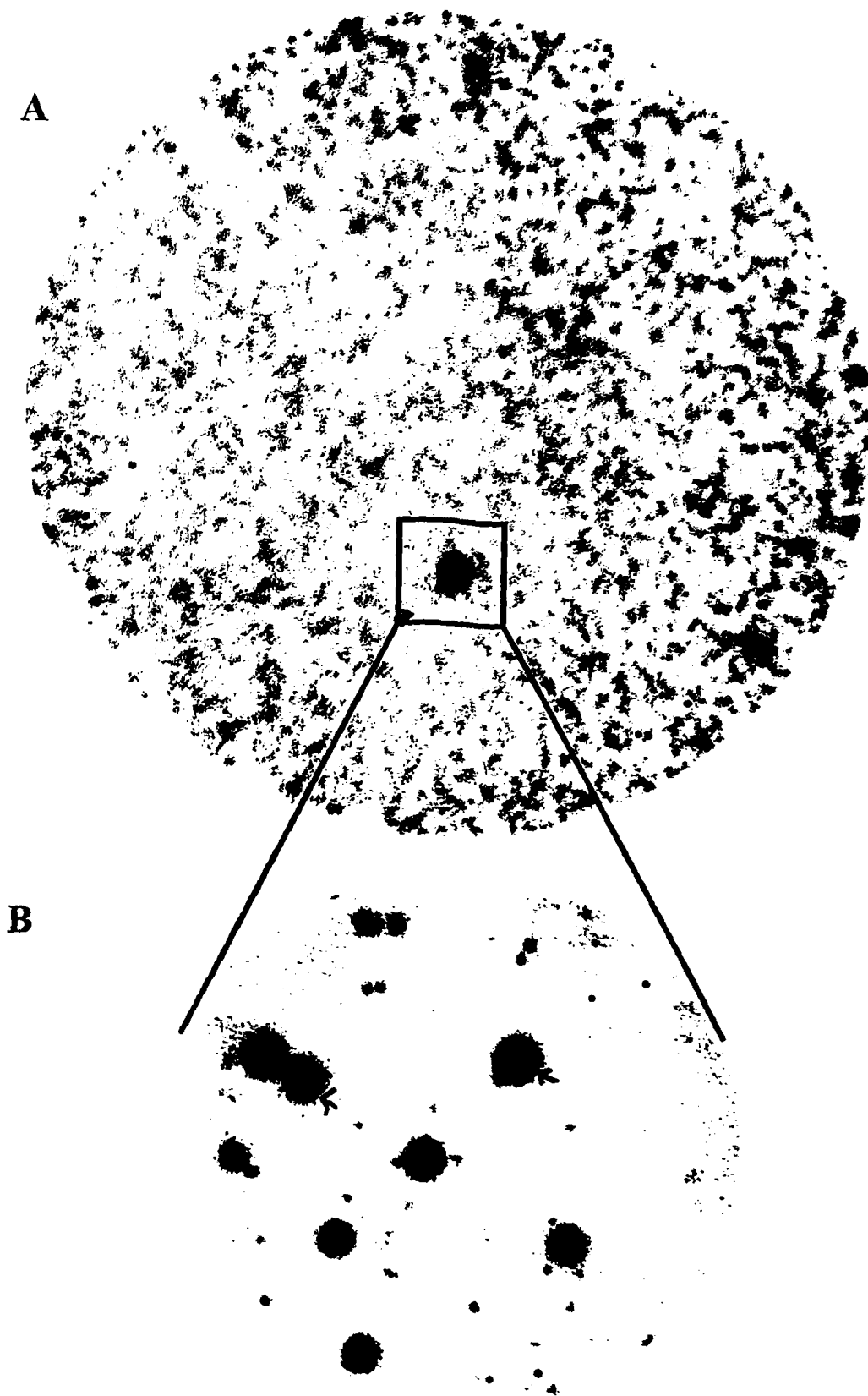
3.1.1) Απομόνωση από βιβλιοθήκη cDNA κυττάρων πιθήκου, κλώνου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη dj2

Η κλωνοποίηση του cDNA της dj2 έγινε με την χρήση μιας προπαρασκευασμένης cDNA βιβλιοθήκης από COS κύτταρα (predigested LAMDA ZAP II/EcoRI cloning kit, STRATAGENE). Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από το νεφρό του πράσινου πιθήκου (*Cercopithecus aethiops*) και είναι μετασχηματισμένα με ελλειματικό DNA του ιού SV40. Από την ίδια βιβλιοθήκη είχαν απομονωθεί στο εργαστήριο μας τα cDNAs των δύο κυτταροπλασματικών μελών της οικογένειας των hsp70 πρωτεϊνών, της hsc70 και της hsp70 (243).

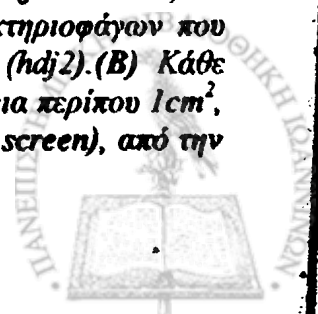
Η διαδικασία αναζήτησης στη βιβλιοθήκη έλαβε χώρα κατά τον τρόπο που περιγράφηκε (βλ.εν.2.19), ενώ για τον υβριδισμό χρησιμοποιήθηκε το cDNA που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη πρωτεΐνη dj2 (ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του καθηγητή S. Kato), μετά την αποκοπή του από τον πλασμιδιακό φορέα του (pBL-KS) με πέψεις στις θέσεις Sal I και NotI. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης και αφού ελέγχθηκε για το ορθό του μήκος (1435 bp), αποκόπηκε από την πηκτή και απομονώθηκε (βλ.εν.2.6). Στη συνέχεια, 200ng του καθαρισμένου DNA σημάνθηκε ραδιενεργά (dCTP-P³²) με την τεχνική της μετάφρασης εγκοπής (nick translation), καθαρίστηκε από στήλη μοριακού ηθμού G50 και η ειδική του ενεργότητα μετρήθηκε σε συσκευή υγρού σπινθηρισμού. Σημασμένο DNA (DNA ανιχνευτής), με ειδική ενεργότητα 10⁹ cpm και σε συγκέντρωση 1-5 X 10⁶ cpm ανά ml διαλύματος υβριδισμού, χρησιμοποιήθηκε για τον υβριδισμό των φίλτρων.

Μετά το πέρας του υβριδισμού, ακολούθησαν εκπλύσεις των φίλτρων, σε συνθήκες σχετικά υψηλής αυστηρότητας (χαμηλή συγκέντρωση αλάτων, υψηλή θερμοκρασία), καθώς αναμενόταν ότι η ομολογία του DNA ανιχνευτή με το προς αναζήτηση γονίδιο θα ήταν μεγάλη. Στη συνέχεια, τα φίλτρα εκτέθηκαν σε ακτινογραφικά φιλμ για 1 και 2 μέρες. Μετά την εμφάνιση των φιλμ, εντοπίστηκαν 13 θετικές πλάκες οι οποίες και απομονώθηκαν με αποκοπή, από το τρυβλίο, περιοχών εμβαδού 1cm², περιφερειακά των θετικών πλακών. Δεδομένου ότι σε κάθε μία από αυτές τις περιοχές περιέχονταν ένας μεγάλος αριθμός διαφόρων πλακών, ακολούθησε και ένας δεύτερος κύκλος απομόνωσης, προκειμένου να λάβουμε την κάθε μία θετική πλάκα σε καθαρή μορφή. Στο δεύτερο αυτό κύκλο απομόνωσης (second screen), ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία και τελικά οι 13 κλώνοι απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή (εικ. 14).





Εικ. 14 (A) Αυτοραδιογραφία φίλτρου, μετά από πρώτη επιλογή (first screen). Οι μαύρες κουκίδες αντιπροσωπεύουν πλάκες ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων που φέρουν αλληλουχίες ομόλογες προς αυτές του ραδιενεργού ανιχνευτή ($h\alpha j 2$). (B) Κάθε θετική πλάκα της πρώτης επιλογής απομονώνεται σε μια επιφάνεια περίπου 1cm^2 , η οποία χρησιμοποιείται σε μια δεύτερη διαδικασία επιλογής (second screen), από την οποία απομονώνονται οι θετικοί φάγοι.



Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης των θετικών κλώνων, έγινε *in vivo* εξαγωγή-αποκοπή του φαγιδίου pBluescript από τον φάγο-φορέα, για κάθε κλώνο ξεχωριστά. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η αποκοπή του φαγιδίου pBluescript με το κλωνοποιημένο σε 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 (λ ZAPII) όσο και με τον βοηθό φάγο R408. Στο εσωτερικό των κυττάρων XL1-Blue, οι δύο φάγοι 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. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει το cDNA ένθεμα, κλωνοποιημένο στο φαγίδιο pBluescript. Το pBluescript 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.

Στη συνέχεια, τα απομονωθέντα πλασμιδιακά DNA χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό βακτηρίων του στελέχους MC1061, τα οποία προσφέρουν υψηλότερης καθαρότητας φαγιδιακό DNA, σε μεγαλύτερες ποσότητες. Ακολούθησε η παρασκευή μεγάλης κλίμακας πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια MC1061, για καθένα από τους 13 κλώνους, με ταυτόχρονο καθαρισμό σε φυγοκέντρηση κλίσης πυκνότητας CsCl.

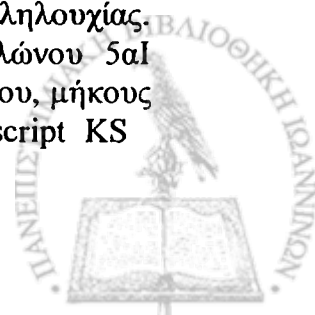
3.1.2) Ανάλυση των απομονωθέντων κλώνων με χαρτογράφηση θέσεων περιοριστικών ενζύμων

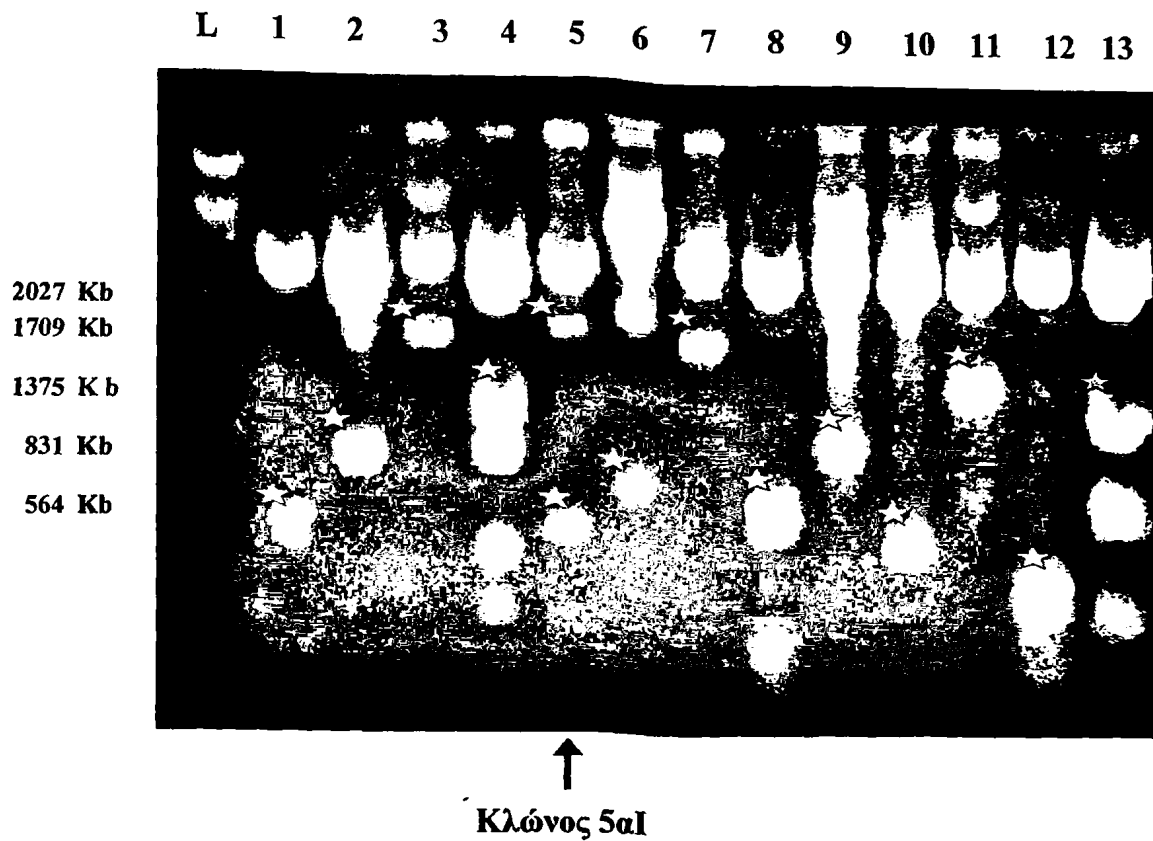
Προκειμένου να ανιχνευθούν άμεσα οι κλώνοι εκείνοι, οι οποίοι εμφάνιζαν μεγαλύτερη ομολογία προς τον ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε, εφαρμόστηκε χαρτογράφηση περιοριστικών θέσεων των πλασμιδιακών κλώνων, με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η επιλογή των ενζύμων έγινε με βάση τον χάρτη του cDNA που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη πρωτεΐνη dj2 -λόγω του αναμενόμενου μεγάλου βαθμού ομολογίας με αυτό του πηθήκου - και ήταν τέτοια, ώστε να περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία, είτε είχαν μοναδιαία θέση, είτε δεν είχαν καμμία θέση κοπής στο ανθρώπινο cDNA.

Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία για όλους τους κλώνους, διαπιστώθηκε γρήγορα ότι από τους 13 απομονωθέντες κλώνους (εικ. 15), μόνο ένας ακολουθούσε το περιοριστικό πρότυπο του ανθρώπινου cDNA. Στη συνέχεια, και κατά προτεραιότητα, έγινε η ανάγνωση των βάσεων του κλώνου αυτού, δηλαδή του 5aI, ενώ προς επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων έγινε σταδιακά η αλληλούχηση και των υπολοίπων κλώνων.

3.1.3) Ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του κλώνου 5aI και χαρακτηρισμός του με την μέθοδο της αλληλούχησης

Όπως διαπιστώθηκε κατά την χαρτογράφηση περιοριστικών θέσεων, το μήκος του ενθέματος του κλώνου 5aI ήταν περίπου 2.2 Kb. Η μέθοδος της αλληλούχησης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανάγνωση των βάσεων, είχε τη δυνατότητα ανάγνωσης 300-400 bp από τα άκρα μιας DNA αλληλουχίας. Επομένως, προκειμένου να αναγνωστεί το σύνολο των βάσεων του κλώνου 5aI έγιναν τέσσερις απαραίτητες υποκλωνοποιήσεις αντίστοιχων τμημάτων του, μήκους 300-700 bp, στην περιοχή κλωνοποίησης του φαγιδίου φορέα pBluescript KS

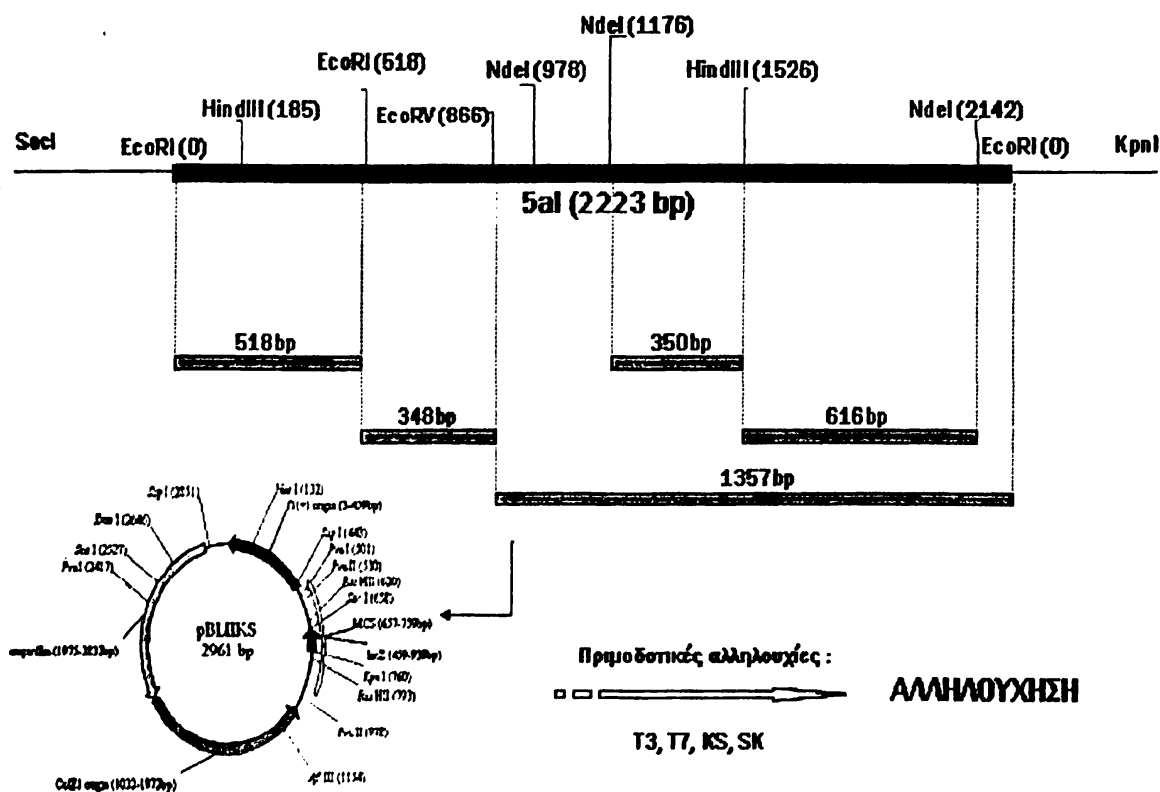




Εικ. 15 Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης. Τα θραύσματα προέρχονται από την πέψη των απομονωθέντων, από τη βιβλιοθήκη cDNA, κλώνων με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και κυμαίνονται μεταξύ 0.25 και 2kb. Διακρίνονται τα θραύσματα του κλώνου 5aI, που προκύπτουν μετά την πέψη του, μεγέθους 1705 bp και 518 bp αντίστοιχα. Με αστερίσκο σημειώνονται τα ενθέματα των κλώνων cDNA που εξετάστηκαν με αλληλούχηση των βάσεων τους. Η διαδρομή L (ladder) αντιπροσωπεύει μίγμα τμημάτων DNA με πρότυπα μοριακά βάρη.

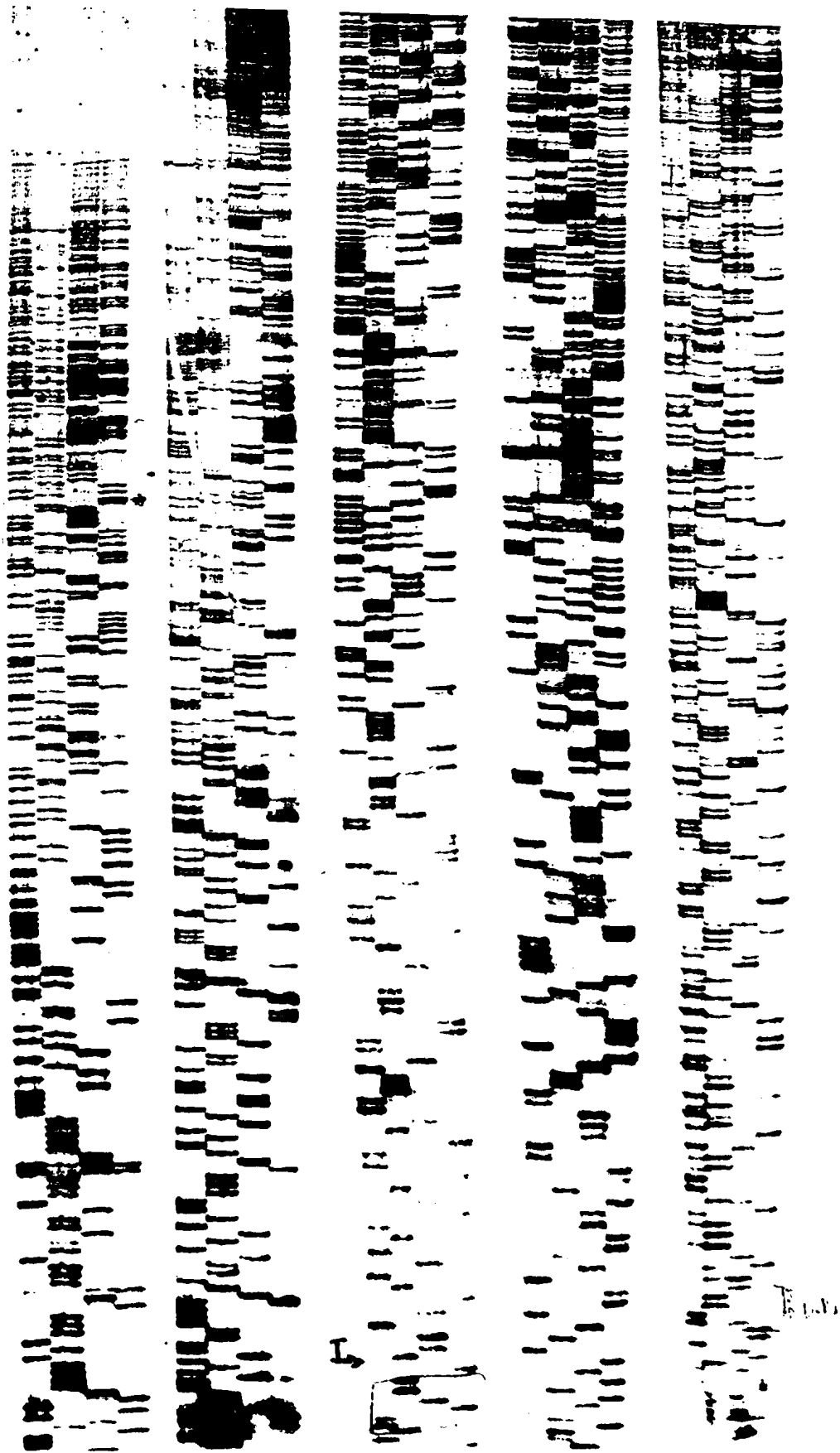
μετά από πέψη με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αναλυτικά, τα παραγόμενα τμήματα προς αλληλούχηση παρουσιάζονται στην εικ. 16.

Στη συνέχεια, ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* του στελέχους MC1061 με τα ανασυνδυασμένα φαγίδια και παρασκευή των πλασμιδιακών DNA μεγάλης κλίμακας σε διαβάθμιση CsCl. Τα προκύπτοντα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων, των DNA ενθεμάτων τους (εικ. 17). Χρησιμοποιώντας εκκινητές, εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης, έγιναν τουλάχιστον τέσσερις αντιδράσεις ανάγνωσης (δύο από κάθε κατεύθυνση) για κάθε ένα από τα υποκλωνοποιημένα τμήματα, έτσι ώστε να υπάρχει η μεγαλύτερη δυνατή βεβαιότητα για την ορθή αποτύπωση της αλληλουχίας των βάσεων του κλώνου 5aI. Μάλιστα, σε περιοχές όπου εξαιτίας της παρουσίας σειράς διαδοχικών βάσεων GC, η συμβατική μέθοδος αδυνατούσε να προσφέρει αξιόπιστο διαχωρισμό, λόγω του φαινομένου της συμπίεσης βάσεων, χρησιμοποιήθηκε εναλλακτική μέθοδος αλληλούχησης, βασισμένη στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

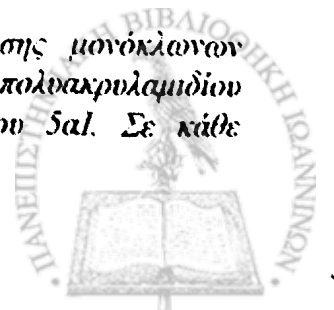


Εικ. 16 Σχηματική αναπαράσταση της υποκλωνοποίησης τμημάτων του κλώνου 5aI στον πλασμιδιακό φορέα pBL - KS, μετά από πέψη σε αντίστοιχες θέσεις περιοριστικών ενζύμων.



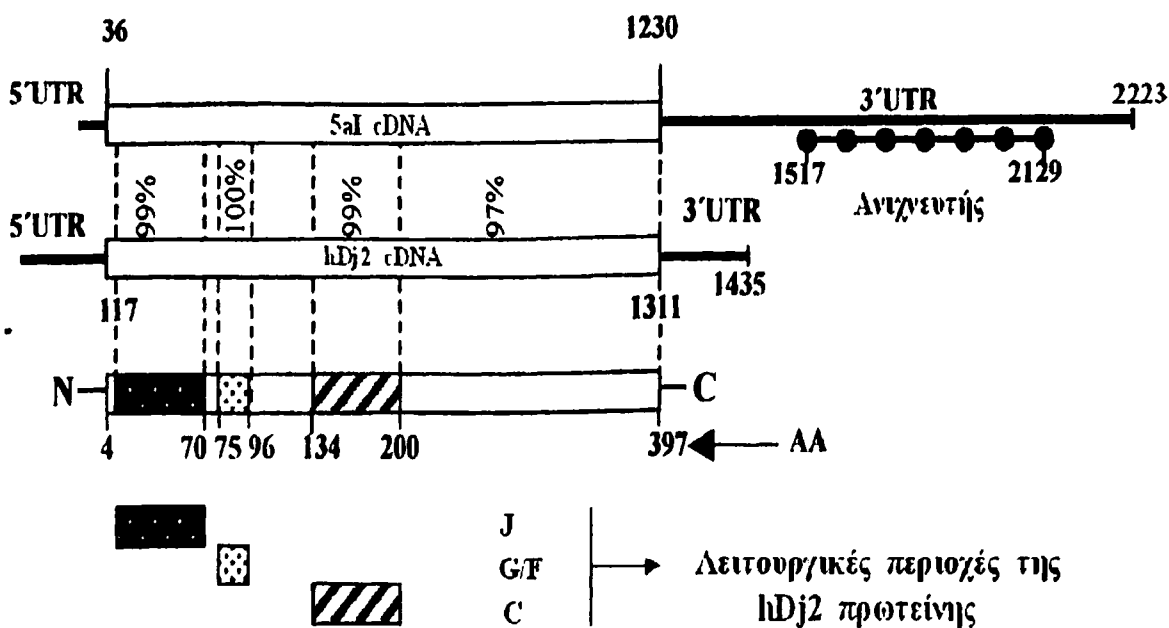


Εικ. 17 Αυτοραδιογραφία διαδοχικών διαδρομών ηλεκτροφόρησης μονόκλωνων θραυσμάτων DNA, ραδιενεργά σημασμένων, σε πηκτή ουρίας - πολυακρυλαμιδίου για την ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων του κλώνου 5a1. Σε κάθε διαδρομή είναι δυνατό να αναγνωσθούν 250-300 nt.



Μετά το τέλος της αλληλούχησης όλων των υποκλωνοποιημένων τμημάτων του κλώνου 5aI, αποδείχθηκε ότι το ακριβές μήκος του απομονωθέντος cDNA είναι 2223 bp, ενώ η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του, με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (BLAST), αποκάλυψε τα εξής:

- Ο κλώνος 5aI διαθέτει ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μήκους 397 αα, ξεκινώντας με το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG (στη θέση 36–38) και τελειώνοντας με το κωδικόνιο λήξης αυτής TAG (στη θέση 1228–1230) (εικ. 20)
- Σύγκριση μεταξύ του κλώνου 5aI και του ανθρώπινου cDNA, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη dj2 (βλ. εν. 3.6), δείχνει ότι το cDNA του πιθήκου αντιστοιχεί σε ένα μεγαλύτερο mRNA, το οποίο φέρει επιπρόσθετες αλληλουχίες μήκους 867 bp στη 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή του (εικ. 18). Επιπλέον, προσεκτική αντιπαράθεση των αλληλουχιών των δύο cDNA για τα τμήματα τους εκείνα, τα οποία κωδικοποιούν για τις χαρακτηρισμένες ως λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης dj2, αποκαλύπτει το μεγάλο βαθμό ομολογίας τους σε νουκλεοτιδικό επίπεδο (εικ. 21)



Εικ. 18 Σχηματική αναπαράσταση της σύγκρισης μεταξύ των cDNA του κλώνου 5aI και αυτού του γονιδίου της *hdj2* πρωτεΐνης. Δίνονται τα ποσοστά ομολογίας (%) σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, μεταξύ των δύο cDNA και για τις περιοχές τους εκείνες, που αντιστοιχούν στις λειτουργικές περιοχές (domains) της πρωτεΐνης *hdj2* (J: J domain, G/F: glycine / phenylalaline rich domain, C: cysteine rich domain).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο κλώνος 5aI αντιπροσωπεύει το πλήρες μεταγράφημα του γονιδίου της πρωτεΐνης dj2 για τα κύτταρα του πιθήκου. Η πλήρης αλληλουχία αυτού, κατατέθηκε στις 25/06/2001 στην ηλεκτρονική τράπεζα γονιδιωμάτων GenBank και αποθηκεύτηκε με κωδικό AF395203 (εικ.19). Στο τέλος αυτής της ενότητας, παρατίθεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία του κλώνου 5aI σε συγκριτική αντιπαράθεση προς αυτή του ανθρώπινου cDNA (εικ.21).



Nucleotide

Entry PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy Books

Search for

1: AF395203, Cercopithecus aethiops act...[gi:15028449] Links

LOCUS AF395203 2223 bp mRNA linear PRI 02-MAY-2002
DEFINITION Cercopithecus aethiops DnaJ-like protein (dj2) mRNA, complete cds.
ACCESSION AF395203
VERSION AF395203.1 GI:15028449
KEYWORDS
SOURCE Cercopithecus aethiops (African green monkey)
ORGANISM *Cercopithecus aethiops*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Cercopithecidae; Cercopithecinae; Cercopithecus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2223)
AUTHORS Bozidis, P., Lazaridis, I., Pagoulatos, G.N. and Angelidis, C.E.
TITLE MydJ2 as a potent partner of hsc70 in mammalian cells
JOURNAL Eur. J. Biochem. 269 (5), 1553-1560 (2002)
MEDLINE 21863262
PUBMED 11874471
REFERENCE 2 (bases 1 to 2223)
AUTHORS Bozidis, P.C., Lazaridis, I. and Angelidis, C.E.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-JUN-2001) Biology, Medical School, Ioannina 45110, Greece

FEATURES
source 1..2223
 /organism="Cercopithecus aethiops"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9534"
 /clone="5aI"
 /cell_line="COS I"
 /tissue_type="kidney"
gene 1..2223
 /gene="dj2"
CDS 36..1229
 /gene="dj2"
 /note="co-chaperone; 44.9 kDa non-farnesylated form; contains J-domain"
 /codon_start=1
 /product="DnaJ-like protein"
 /protein_id="AAK81721.1"
 /db_xref="GI:15028450"
 /translation="MVKETTYDVLGVKPNATOEELKKAYRKLALKYHPDKNPNEGKFKQISQAYEVLSDAKKRELYDKGGEQAIKECCAGGGPGSPMDIFDMFFGGGRMORER
 RGKNVVHQLSVTLEDLYNGATRKLALQKNVICDKCEGRGGKKGAVECCPNCRGTGMOI
 RIHQIGPGMVOQIQSVCMCEQGHGERISPKDRCKSCNGRKKIVREKKILBVHIDKGMKD
 GOKITFHGEGDORPGLPEPDIIVLQKDHAVFTRRGEDLFMCMDOIQLVREALGFOKPI
 ISTLDNRTIIVITSHPGQIVKHGDIKCVLNEGMPHYRRPYEKGRLLIEFKINFPENGF
 SPDKLSLLEKLLPERKEVEETDEMDQVELVDFDPNQERRRHYNGEAYEDDEHHPRGGV
 QCQTS"

ORIGIN

```

1 ctcacccacc ggcgtcagcg caccggcagt agaagatggt gaaagaaca acttactacg
61 atgtcttggg ggtcaaaccc aatgctactc aggaagaatt gaaaaaggct tataggaacc
121 tggccctgaa gtaccatccct gatangaatc caaatgaagg agagaagttt aacacagattt
181 ctcaagctta cgaagttctc tctgatgcaa agaaaaggga atgttatgac aaggaggag
241 aacaggcaat taaagggggt ggagcagggt gcggttttgg ccccccatg gacatcttg
301 atatgtctt tggaggaggg gaggaggatgc agagagaaa gaggaggcaa atgttgtac
361 atcagctctc agtaacccta gaagacttat ataatggtgc aacaagaaa ctggtcttgc
421 aaaaagtgt gatattgtgac aaatgtgaag gttagaggag taagaagaa cagtagagt
481 gctgtcccaa ttgccagggt actggaatgc aatagaatc tcatcagata ggacctgaa
541 taattcaaca aatcaatct atgtcagatg atgtccaaa ccatcagaa ccatcagc
601 ctaaaagatag atgtaaaagc tgcaatgaa ggaagatagt tccagagaa angatcttag
661 angttcatat tgacaaggc atgaaggatg gccagaagat aacattccat ggtgaaggag
721 accaagaacc aggactggg ccaggcgata tcatcattgt gttagatcag aaggaccatg
781 ctgtttttac tgcagcaggga gaagaccttt tcatgtgat ggacatacag ctggttgaa
841 cattgtgtgg cttccagaag ccgatatacca ctcttgacna ccgaaccata gctatcaact
901 ctcattccag tcaagatttc angcatggag atattaatg tgtactaaat gaaggcatgc
961 caatttatcg tngacctat gaaaagggtc gctaatcat cgnatttaag ataaacttc
1021 ctgagaaatgg cttctctctc cctgataaac tgtctttgct ggaanaactc ctaccgnaa
1081 ggaaggaggt ggaaggagct gatgagatgg atcaagtaga actggtggac ttgatccaa
1141 atcaggaaag acggcgccat tacaatggag aagcatatga ggatgatgaa catcatccca
1201 aggttgggtg tcaagtgtcag acctcttant gggccagtga ataacacaca ctctggcat
1261 ttaatgtgca ttagtgaata agtgaaggac tghtaatata atatgctcac tacttctct
1321 tttttttttt ttaatttttt aattatattc aattatattc tttttttttt tttttttttt
1381 caaatatana aactatnact ttacctata ttacctata ttacctata ttacctata
1441 ttttaatacct gtaaaaacta caaagaagtt cccctagcat ttctagcca acccttgtaa
1501 ttgactcag ctatgactg ggaacagctt agactgaant gccaggata tcttggctlc
1561 agtatatamc ccttcatlnt taactatana aactaaact ctatattaa ctgcaatga
1621 gaaaaaaaaa aaatttttln qagaagtatt ggtctgtata gttcttga taagtggg
1681 tcaatgtana tgccttttca tttactctat tgcctcaact gttactgaa gatggcglaa
1741 tcaatnaatt atcctgttgt atcagtata aaatgatnc cttctgttag gggggattt
1801 tcaatnatg ctgcttcttg aaggctgca ctccagaa ctctcttctc tctgctgac
1861 cactcatata tatatatata tatccatata tatcttgacc agtccctggc atttggccc
1921 ctcttctctc gttgaccata gcccagaata gtaacttca agtgggtaa tctagaactt
1981 aaagttaaaa gacctttlca tgggaaagta atttgcatc ataatatag aaggtgtct
2041 ttatgtatgt tacaagatna ctlttaactt atgtccaaa ataatgttgg tagtatgca
2101 aaattatgat aatagatita ntgtatglt taaaagttc atatgttca atgcttaact
2161 ggaatcagaa atttaaagaa tcttgaant gtaattctc cttaataac taattacaa
2221 ggg
  
```

Εικ. 19 Η ηλεκτρονική καταχώρηση στην τράπεζα γονιδιωμάτων GenBank του NCBI, της αλληλουχίας του κλώνου 5aI με κωδικό AF395203



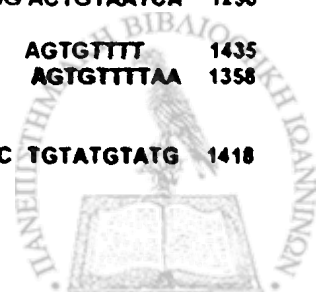
CTCACCCACCGGCGTCAGCGCACCGGCAGTAGAAG ATG GTG AAA GAA ACA ACT TAC TAC GAT GTT 65
M V K E T T Y Y D V 10
TTG GGG GTC AAA CCC AAT GCT ACT CAG GAA GAA TTG AAA AAG GCT TAT AGG AAA CTG GCC 125
L G V K P N A T Q E E L K K A Y R K L A 30
TTG AAG TAC CAT CCT GAT AAG AAT CCA AAT GAA GGA GAG AAG TTT AAA CAG ATT TCT CAA 185
L K Y H P D K N P N E G E K F K Q I S Q 50
GCT TAC GAA GTT CTC TCT GAT GCA AAG AAA AGG GAA TTG TAT GAC AAA GGA GGA GAA CAG 245
A Y E V L S D A K K R E L Y D K G G E Q 70
GCA ATT AAA GAG GGT GGA GCA GGT GGC GGT TTT GGC TCC CCC ATG GAC ATC TTT GAT ATG 305
A I K E G G A G G G F G S P M D I F D M 90
TTT TTT GGA GGA GGA GGA AGG ATG CAG AGA GAA AGG AGA GGC AAA AAT GTT GTA CAT CAG 365
F F G G G R M Q R E R R G K N V V H Q 110
CTC TCA GTA ACC CTA GAA GAC TTA TAT AAT GGT GCA ACA AGA AAA CTG GCT CTG CAA AAG 425
L S V T L E D L Y N G A T R K L A L Q K 130
AAT GTG ATT TGT GAC AAA TGT GAA GGT AGA GGA GGT AAG AAA GGA GCA GTA GAG TGC TGT 485
N V T C D K C E G R G G K K G A V E C C 150
CCC AAT TGC CGA GGT ACT GGA ATG CAA ATA AGA ATT CAT CAG ATA GGA CCT GGA ATG GTT 545
P N C R G T G M Q I R I H Q I G P G M V 170
CAG CAA ATT CAG TCT GTG TGC ATG GAG TGC CAG GGC CAT GGG GAG CGG ATC AGT CCT AAA 605
Q Q I Q S V C M E C Q G H G E R I S P K 190
GAT AGA TGT AAA AGC TGC AAT GGA AGG AAG ATA GTT CGA GAG AAG AAG ATT CTA GAA GTT 665
D R C K S C N G R K I V R E K K I L E V 210
CAT ATT GAC AAA GGC ATG AAG GAT GGC CAG AAG ATA ACA TTC CAT GGT GAA GGA GAC CAA 725
H I D K G M K D G Q K I T F H G E G D Q 230
GAA CCA GGA CTG GAG CCA GGC GAT ATT ATC ATT GTG TTA GAT CAG AAG GAC CAT GCT GTT 785
E P G L E P G D I I I V L D Q K D H A V 250
TTT ACT CGA CGA GGA GAA GAC CTT TTC ATG TGT ATG GAC ATA CAG CTG GTT GAA GCA TTG 845
F T R R G E D L F M C M D I Q L V E A L 270
TGT GGC TTC CAG AAG CCG ATA TCC ACT CTT GAC AAC CGA ACC ATA GTC ATC ACC TCT CAT 905
C G F Q K P I S T L D N R T I V I T S H 290
CCA GGT CAG ATT GTC AAG CAT GGA GAT ATT AAG TGT GTA CTA AAT GAA GGC ATG CCA ATT 965
P G Q I V K H G D I K C V L N E G M P I 310
TAT CGT AGA CCA TAT GAA AAG GGT CGC CTA ATC ATC GAA TTT AAG ATA AAC TTT CCT GAG 1025
Y R R P Y E K G R L I I E F K I N F P E 330
AAT GGC TTT CTC TCT CCT GAT AAA CTG TCT TTG CTG GAA AAA CTC CTA CCC GAG AGG AAG 1085
N G F L S P D K L S L L E K L L P E R K 350
GAA GTG GAA GAG ACT GAT GAG ATG GAT CAA GTA GAA CTG GTG GAC TTT GAT CCA AAT CAG 1145
E V E E T D E M D Q V E L V D F D P N Q 370
GAA AGA CGG CGC CAT TAC AAT GGA GAA GCA TAT GAG GAT GAT GAA CAT CAT CCC AGA GGT 1205
E R R R H Y N G E A Y E D D E H H P R G 390
GGT GTT CAG TGT CAG ACC TCT TAA TGGGCCAGTGAATAACACACTGCTGGCATTAAATGTGCAT 1271
G V Q C Q T S 397

TAGTGAATAAGTGAAGGACTGTAATCATAATATGCTCACTACTTGCTCTTGT TTTTGT TTTAATATTCAACTA
T AGTAGTGT TTTTAAAAAGTTAAATGAAGAATAAACGCAATATAAAAAGCTCTG ACTTTGCCCTGTATGTATG
ATGACTTCA GTGT GCAAGATGAAGTTTAATACCTGTA AAAACTACGAAGAAGTTCCCCTAGCATTCTAGG
CCAAACCTTGTAATTGACTTCAGCTATGTA CGTGGACAAGCTTAGACTGAAATGCCAGGTATATGTTGGCT
TCAGTGTATGACCCITCAT TGTTAAGCTATGAAAGTAAAA CTCTGTATTAACTGGCAAT GAGGAAAAAAA
AAAAATTT GTAGA GAAGTGTGGTCTGTATAGTTC TTTGTATTAAGTGGGATTCA TTGTAATGCCTTTGCAT
TTATT CTATT GCCTCAACTGTTACTT GAAGATGGCGTAATATAATTTATCCTGTGGTATCAGTGATAAAA
ATGATACCTTTCTGTAGGAGGGGTTTATCATAATATGCTGCTTCTTGAAGGCTTGC ACTTCCAGAATTGTGT
TTCCTTCTG CTGTGCCATT CATATATATATATATATATCCATATATATCTTGACCAGTCCTGGCCATTTGCC
CCCTCCTT GTCTGT GGA CCATAAGCCCCGAGTAGTACTTCAGAGCTGGGTAATGTAGAAATTAAGTGAA
AA GACCTTTA CGTG GAGAAGTAATTTGCATGCATAATATAGGAAGGTGTTCTTTAGGTATGTTACAGGATT
ACTTTAAA CTTAT GCTCCAAA GTAATGTTGGTAGTATA GCAAATATGATGAATAGCTTTAATTGTATGTT
AAAAGTCTCAT GTTCACATGCTTAAATC GGTATCAGAATTTAAGCAATTC TTGAAATGATTGTCTCCTT
AATATACTAATTACAAAGCG

Εικ.20 Νουκλεοτιδική αλληλουχία του κλώνου 5aI. Διακρίνονται, το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης MyDj2 καθώς και τα προκύπτοντα, ανά κωδικόνιο, αμινοξέα της πρωτεΐνης



hdj2	AACTTTCCAG AACGCTCGGT GAGAGGCGGA GGAGCGGTAA CTACCCCGGC TGCGCACAGC	60
5al		
hdj2	TCGGCGCTCC TTCCCGCTCC CTCACACACC GGCCTCAGCC CGCACCGGCA GTAGAAG	120
5al	CTCACCCACC GGCCTCAG -- CGCACCGGCA GTAGAAG	38
hdj2	GTGAAAGAAA CAACTTACTA CGATGTTTTG GGGGTCAAAC CCAATGCTAC TCAGGAAGAA	180
5al	GTGAAAGAAA CAACTTACTA CGATGTTTTG GGGGTCAAAC CCAATGCTAC TCAGGAAGAA	98
hdj2	TTGAAAAGG CTTATAGGAA ACTGGCCTTG AAGTACCATC CTGATAAGAA CCCAAATGAA	240
5al	TTGAAAAGG CTTATAGGAA ACTGGCCTTG AAGTACCATC CTGATAAGAA TCCAAATGAA	158
hdj2	GGAGAGAAGT TAAACAGAT TTCTCAAGCT TACGAAGTTC TCTCTGATGC AAAGAAAAGG	300
5al	GGAGAGAAGT TAAACAGAT TTCTCAAGCT TACGAAGTTC TCTCTGATGC AAAGAAAAGG	218
hdj2	GAATTATATG ACAAAGGAGG AGAACAGGCA ATTAAGAGG GTGGAGCAGG TGGCGGTTTT	360
5al	GAATTGTATG ACAAAGGAGG AGAACAGGCA ATTAAGAGG GTGGAGCAGG TGGCGGTTTT	278
hdj2	GGCTCCCCCA TGGACATCTT TGATATGTTT TTTGGAGGAG GAGGAAGGAT GCAGAGAGAA	420
5al	GGCTCCCCCA TGGACATCTT TGATATGTTT TTTGGAGGAG GAGGAAGGAT GCAGAGAGAA	338
hdj2	AGGAGAGGTA AAAATGTTGT ACATCAGCTC TCAGTAACCC TAGAAGACTT ATATAATGGT	480
5al	AGGAGAGGCA AAAATGTTGT ACATCAGCTC TCAGTAACCC TAGAAGACTT ATATAATGGT	398
hdj2	GCAACAAGAA AACTGGCTCT GCAAAAGAAT GTGATTTGTG ACAAATGTGA AGGTAGAGGA	540
5al	GCAACAAGAA AACTGGCTCT GCAAAAGAAT GTGATTTGTG ACAAATGTGA AGGTAGAGGA	458
hdj2	GGTAAGAAAG GAGCAGTAGA GTGCTGTCCC AATTGCCGAG GACTGGAAT GCAAATAAGA	600
5al	GGTAAGAAAG GAGCAGTAGA GTGCTGTCCC AATTGCCGAG GACTGGAAT GCAAATAAGA	518
hdj2	ATTCATCAGA TAGGACCTGG AATGGTTCAG CAAATTCAGT CTGTGTGCAT GGAGTGCCAG	660
5al	ATTCATCAGA TAGGACCTGG AATGGTTCAG CAAATTCAGT CTGTGTGCAT GGAGTGCCAG	578
hdj2	GGCCATGGGG AGCGGATCAG TCCTAAAGAT AGATGTAAAA GCTGCAACGG AAGGAAGATA	720
5al	GGCCATGGGGAGCGGATCAG TCCTAAAGAT AGATGTAAAA GCTGCAATGG AAGGAAGATA	638
hdj2	GTTCCGAGAGA AAAAAATTTT AGAAGTTCAT ATTGACAAAG GCATGAAAGA TGGCCAGAAG	780
5al	GTTCCGAGAGA AGAAGATTCT AGAAGTTCAT ATTGACAAAG GCATGAAAGA TGGCCAGAAG	698
hdj2	ATAACATTCC ATGGTGAAGG AGACCAAGAA CCAGGACTGG AGCCAGGCCA TATTATCATT	840
5al	ATAACATTCC ATGGTGAAGG AGACCAAGAA CCAGGACTGG AGCCAGGCCA TATTATCATT	758
hdj2	GTGTTAGATC AGAAGGACCA TGCTGTTTTT ACTCGACGAG GAGAAGACCT TTTTATGTGT	900
5al	GTGTTAGATC AGAAGGACCA TGCTGTTTTT ACTCGACGAG GAGAAGACCT TTTTATGTGT	818
hdj2	ATGGACATAC AGCTCGTTGA AGCACTGTGT GGCTTCCACA AGCCAATATC TACTCTTGAC	960
5al	ATGGACATAC AGCTCGTTGA AGCACTGTGT GGCTTCCACA AGCCAATATC TACTCTTGAC	878
hdj2	AACCGAACCA TCGTCATCAC CTCTCATCCA GGTCAGATTG TCAAGCATGG AGATATCAAG	1020
5al	AACCGAACCA TAGTCATCAC CTCTCATCCA GGTCAGATTG TCAAGCATGG AGATATTAAG	938
hdj2	TGTGTAATA ATGAAGGCAT GCCAATTTAT CGTAGACCAT ATGAAAAGGG TCGCCTAATC	1080
5al	TGTGTAATA ATGAAGGCAT GCCAATTTAT CGTAGACCAT ATGAAAAGGG TCGCCTAATC	998
hdj2	ATCGAATTTA AGGTAAACTT TCCTGAGAAT GGCTTTCTCT CTCCTGATAA ACTGTCTTTG	1140
5al	ATCGAATTTA AGATAAACTT TCCTGAGAAT GGCTTTCTCT CTCCTGATAA ACTGTCTTTG	1058
hdj2	CTGGAAAAAC TCCTACCCGA GAGGAAGGAA GTGGAAGAGA CTGATGAGAT GGACCAAGTA	1200
5al	CTGGAAAAAC TCCTACCCGA GAGGAAGGAA GTGGAAGAGA CTGATGAGAT GGATCAAGTA	1118
hdj2	GAAGTGGTGG ACTTTGATCC AAATCAGGAA AGACGGCGCC ACTACAATGG AGAAGCATAT	1260
5al	GAAGTGGTGG ACTTTGATCC AAATCAGGAA AGACGGCGCC ATTACAATGG AGAAGCATAT	1178
hdj2	GAGGATGATG AACATCATCC CAGAGGTGGT GTTCAGTGTG AGACCTCTT TGGGCCAGT	1320
5al	GAGGATGATG AACATCATCC CAGAGGTGGT GTTCAGTGTG AGACCTCTT TGGGCCAGT	1238
hdj2	GAATAACACT CACTGCTGGC ATTTAATGTG CAGTAGTAA TGAGTGAAGG ACTGTAATCA	1380
5al	GAATAACACA CACTGCTGGC ATTTAATGTG CATTAGTAA TAAGTGAAGG ACTGTAATCA	1298
hdj2	TAATATGCTC ACTACTTGCT CTGTTTTT TTTTAAATATT CAACTATAGT AGTGTTTT	1435
5al	TAATATGCTC ACTACTTGCT CTGTTTTT TTTTAAATATT CAACTATAGT AGTGTTTTAA	1358
hdj2	AAAAAGTTAA ATGAAGTTCGCAAATA TAAAAGCTCT GACTTTGCC TGTATGTATG	1418
5al		



hdj2
 5al ATGACTTCA GTGTGCAAGA TGAAGTTTAA TACCTGTAAA AACTACGAAG AAGTCCCCT 1478
 hdj2
 5al AGCATTCTA GGCCAAACCT TGTAATTGAC TTCAGCTATG TACGTGGACA AGCTTAGACT 1538
 hdj2
 5al GAAATGCCAG GTATATGTTG GCTTCAGTGT ATGACCCTTC ATTGTTAAGC TATGAAAGTA 1598
 hdj2
 5al AAACTCTGTA TTTAACTGGC AATGAGGAAA AAAAAAAAAAT TTGTAGAGAA GTGTTGGTCT 1658
 hdj2
 5al GTATAGTTCT TTGTATTAAG TGGGATTCAT TGTAATGCCT TTGCATTTAT TCTATTGCCT 1718
 hdj2
 5al CAACTGTTAC TTGAAGATGG CGTAATATAT AATTATCCT GTGGTATCAG TGATAAAAAAT 1778
 hdj2
 5al GATACCTTTC TGTAGGAGGG GTTATCATA ATATGCTGCT TCTGAAGGC TTGCACTTCC 1838
 hdj2
 5al AGAATTGTGT TTCCTTCTGC TGTGCCATTC ATATATATAT ATATATATCC ATATATATCT 1898
 hdj2
 5al TGACCAGTCC TGGCCATTTG CCCCCCTCCT TGCTGTGGA CCATAAGCCC GAGTAGTGAC 1958
 hdj2
 5al TTCAGAGCTG GGTAATGTAG AAATTAAGT GAAAAGACCT TTACGTGGAG AAGTAATTTG 2018
 hdj2
 5al CATGCATAAT ATAGGAAGGT GTTCTTTAGG TATGTTACAG GATTACTTTA AACTTATGCT 2078
 hdj2
 5al CCAAAGTAAT GTTGGTAGTA TAGCAAATTA TGATGAATAG CTTTAATTGT ATGTTAAAAA 2138
 hdj2
 5al GTCTCATATG TTCACATGCT TAAATCGGTA TCAGAATTTA AGCAATTCTT GAAATGTATT 2198
 hdj2
 5al GTCTCCTTAA TATACTAATT ACAAAGCG

Εικ.21 Νουκλεοτιδική αντιπαράθεση μεταξύ του cDNA hdj2 και του κλώνου 5al. Υπογραμμίζονται, το κοινό ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (με τα κωδικά έναρξης και λήξης της μετάφρασης), οι θέσεις πολυαδενυλίωσης του μηνύματος καθώς και οι διαφορές βάσεων όπου αυτές υφίστανται.



3.2) ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ hdj2

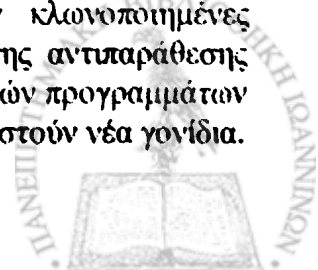
3.2.1) Αναζήτηση του γονιδίου hdj2 σε γενωμικές βάσεις δεδομένων

Η ανάγνωση της αλληλουχίας του κλώνου 5aI και η συγκριτική αντιπαράθεση του, σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, με το ανθρώπινο cDNA της πρωτεΐνης dj2, δημιουργεί εύλογα ερωτηματικά όσον αφορά την προέλευση των δύο μεταγραφημάτων καθώς και του τρόπου παραγωγής τους. Δεδομένου ότι ο κλώνος 5aI αποτελούσε το μοναδικό cDNA για την πρωτεΐνη dj2, που προέκυψε από τις επιλογές της cDNA βιβλιοθήκης των κυττάρων πιθήκου, ενώ αντίστοιχα στη βιβλιογραφία δεν είχε καταγραφεί ένα μεγαλύτερο μήνυμα για την ανθρώπινη πρωτεΐνη, θα μπορούσαν να ισχύουν δύο πιθανότητες εξίσου ισχυρές:

α) Το δύο cDNAs, κλώνος 5aI και ανθρώπινο cDNA, αντιπροσωπεύουν τα μοναδικά μεταγραφήματα που παράγονται από το γονίδιο dj2 σε κάθε είδος. Η διαφορά μεγέθους δε, αντανακλά διαφορά στην αλληλουχία που υπάρχει στο 3' άκρο μεταξύ των γονιδίων του ανθρώπου και του πιθήκου.

β) Τα μηνύματα που αντιστοιχούν στα δύο cDNAs παράγονται ταυτόχρονα τόσο στα κύτταρα του ανθρώπου όσο και του πιθήκου. Θεωρητικά, θα μπορούσαν αυτά να προέρχονται είτε από δύο διαφορετικά γονίδια (τα οποία παρήχθησαν π.χ. από διπλασιασμό), είτε από ένα γονίδιο. Η τελευταία πιθανότητα θα μπορούσε να ισχύει εφόσον τα δύο μηνύματα παράγονταν με εναλλακτική πολυαδενυλίωση, όπως έχει αναφερθεί για άλλα γονίδια (152).

Προκειμένου να δώσουμε απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα καταφύγαμε σε γενωμικές βάσεις δεδομένων. Λόγω του ότι υπάρχουν ανεπαρκή στοιχεία για το γονιδίωμα του πράσινου πιθήκου (*Cercopithecus aethiops*), χρησιμοποιήσαμε πληροφορίες σχετικές με το ανθρώπινο γονιδίωμα το οποίο πλέον είναι γνωστό στο σύνολο του. Αυτό γιατί μόλις πρόσφατα (153), η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) και η καταχώρηση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας σε βάσεις δεδομένων, όπως η ENTREZ nucleotide (του National Center for Biotechnology Information) ή η ENSEMBL (του European Bioinformatics Institute), έχουν δώσει τη δυνατότητα για γρήγορες και διεξοδικές έρευνες και άντληση στοιχείων που αφορούν την ανθρώπινη αλληλουχία. Οι παραπάνω βάσεις δεδομένων, είναι κατασκευασμένες έτσι, ώστε να ανιχνεύουν αυτόματα όλες τις ήδη γνωστές αλληλουχίες του γονιδιώματος, να τις συγκρίνουν μεταξύ τους και να συνθέτουν μεγάλες γραμμικές αλληλουχίες τοποθετώντας τις ταυτόχρονα στην σωστή τους θέση στο γένωμα (π.χ στο αντίστοιχο χρωμόσωμα). Επίσης, αντιπαραθέτουν τις αλληλουχίες αυτές με εκείνες που είναι αποθηκευμένες στη βάση δεδομένων των ESTs (Expressed Sequence Tag sequences) και οι οποίες αφορούν κλωνοποιημένες αλληλουχίες άγνωστων μεταγραφημάτων. Το αποτέλεσμα αυτής της αντιπαράθεσης συνδυάζεται με τα θεωρητικά αποτελέσματα της δράσης υπολογιστικών προγραμμάτων (π.χ. Genscan), έτσι ώστε τελικά να αναγνωριστούν και να χαρακτηριστούν νέα γονίδια.



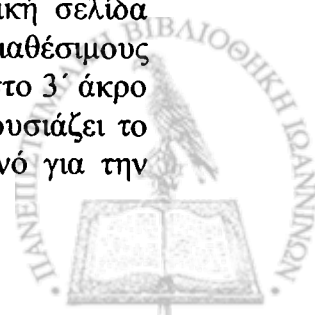
Η αναζήτηση του γονιδίου της *hdj2* γίνεται χρησιμοποιώντας ως λέξεις-κλειδιά, τις: *hdj2* ή *DNAJA1*-σύμφωνα με το καθιερωμένο σύστημα ονοματολογίας για τις πρωτεΐνες *DnaJs* (278)- στην μηχανή αναζήτησης της ηλεκτρονικής σελίδας του NCBI Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>) της βάσης δεδομένων του NCBI .

Η έναρξη της αναζήτησης παραπέμπει αυτομάτως στην ηλεκτρονική σελίδα Entrez Genome (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=hdj2) του NCBI και το αποτέλεσμα της αφορά στον εντοπισμό της θέσης του γονιδίου σε χρωμοσωμικό επίπεδο. Το γονίδιο *DNAJA1* (*hdj2/HSDJ*), λοιπόν, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και συγκεκριμένα στην κυτταρογενετική θέση 9p13-p12. Η ανάγνωση της αλληλουχίας του χρωμοσώματος 9, καθώς και η ανάλυση αυτής, ολοκληρώθηκε πρόσφατα (279). Από την ανάλυση αυτή, προέκυψε ότι οι ευχρωματινικές αλληλουχίες του χρωμοσώματος εκτείνονται σε απόσταση 109.044.351 bp, περιοχή που αποτελεί ποσοστό μεγαλύτερο του 99,6% της συνολικής αλληλουχίας του χρωμοσώματος. Επίσης, δείχθηκε ότι αυτή η περιοχή περιέχει 1149 γονίδια καθώς και 426 ψευδογονίδια (279). Ένα από αυτά είναι και αυτό της *hdj2* (*DNAJA1*). Ο εντοπισμός του γονιδίου μας οδήγησε επίσης στην εξής αξιοσημείωτη παρατήρηση: κοντά στην χρωμοσωμική θέση του γονιδίου της *hdj2* και σε απόσταση περίπου 216Kb κατά την οποία παρεμβάλλονται τέσσερα άλλα γονίδια βρίσκεται το γονίδιο της πρωτεΐνης *Bag-1* σε αντίθετη μεταγραφική φορά. Η πρωτεΐνη αυτή -όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 5 της εισαγωγής -συμμετέχει μαζί με την πρωτεΐνη *hdj2* στην ρύθμιση της πρωτεΐνης *hsp70*.

3.2.2) Δομή του γονιδίου της *hdj2* και παραγόμενα μεταγραφήματα

Μία σύνοψη των πληροφοριών που είναι διαθέσιμες για το γονίδιο της *hdj2* καθώς και των βάσεων δεδομένων στις οποίες αυτό εμφανίζεται μπορούμε να πάρουμε στην ιστοσελίδα του Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=retrieve&dopt=default&lisuids=3301>) του NCBI. Στην σελίδα αυτή παρατίθενται όλα τα γνωστά mRNAs που σχετίζονται με αυτό το γονίδιο. Αναλυτικά στοιχεία για αυτά, ανευρίσκονται στις ιστοσελίδες του Entrez Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=Nucleotide&dopt=GeBank&val=8249463>) του NCBI μετά από αναζήτηση τους με την βοήθεια των κωδικών πρόσβασης. Εξέταση αυτών των στοιχείων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, μέχρι σήμερα, οι κλώνοι των ανθρώπινων cDNAs, που έχουν συσχετιστεί με το γονίδιο της *hdj2*, δεν υπερβαίνουν σε μήκος τα 1474 bp (κλώνος BC008182). Συγκριτική αντιπαράθεση των κλώνων αυτών μεταξύ τους, αλλά και με το γένωμα, έχει ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό του γονιδίου, όπως ειπώθηκε, στο χρωμόσωμα 9 μεταξύ των βάσεων 33014909 και 33029464 της αλληλουχίας του χρωμοσώματος και με συνολικό μήκος 14556 bp. Το αποτέλεσμα αυτής της αντιπαράθεσης συνδυάζεται επίσης με πληροφορίες από τη βάση δεδομένων των ESTs και με την βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων (Model Maker :http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/modelmaker.cgi?org=human&contig=NT_00_84_13.16&from=33015309&to=33029064&cntg=cntg) προκύπτει η αναμενόμενη δομή του γονιδίου της *hdj2*, σύμφωνα με την οποία, το γονίδιο έχει 9 εξόνια

Το πλήρες μεταγράφημα του γονιδίου, το οποίο περιλαμβάνει όλα τα περιγραφόμενα εξόνια, αντιστοιχεί στον κλώνο NM_001539 και η αλληλουχία του μαζί με την παραγόμενη πρωτεϊνική αλληλουχία ανευρίσκεται στην ηλεκτρονική σελίδα Entrez Nucleotide του NCBI. Αξιοσημείωτο είναι ότι από τους έξι διαθέσιμους κλώνους cDNAs, δύο δεν διαθέτουν κάποια από τα εξόνια, είτε στο 5', είτε στο 3' άκρο τους. Πιο συγκεκριμένα, στον κλώνο με κωδικό πρόσβασης BT007292 απουσιάζει το εξόνιο 1, αλλά παραμένει ένα ακέραιο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο ικανό για την



παραγωγή ολόκληρης της πρωτεΐνης, όπως ακριβώς παράγεται από το πλήρες μεταγράφημα του γονιδίου. Τέλος, ο κλώνος με τον κωδικό πρόσβασης AY186741 παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον αφού είναι ένα πλήρες cDNA το οποίο αποτελεί προϊόν διαφορικής διασύνδεσης καθώς δημιουργείται από τα 8 πρώτα εξόνια του γονιδίου. Το αποτέλεσμα είναι να κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μήκους 331 αα, στην οποία απουσιάζουν τα 66 τελικά αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της πλήρους πρωτεΐνης hdj2, η οποία και αποτελείται από 397 αα. Ο κλώνος αυτός, προέρχεται από μια cDNA βιβλιοθήκη όρχεος, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι η διαφορική διασύνδεση του γονιδίου μπορεί να σχετίζεται με ιστοειδικότητα.

3.2.3) Ανάλυση υποκινητικών στοιχείων του γονιδίου της hdj2

Οι βάσεις δεδομένων του NCBI δεν προσφέρουν επιπλέον πληροφορίες για τις υποκινητικές περιοχές των γονιδίων που είναι καταχωρημένα, πέρα από τις γραμμικές αλληλουχίες αυτών. Η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο γονίδιο της hdj2 και είναι διαθέσιμη προς επεξεργασία εκτείνεται μεταξύ των θέσεων 33014909 και 33029464 του χρωμοσώματος και περιλαμβάνει μια αλληλουχία υποκινητικών στοιχείων μήκους 365 bp, αν θεωρήσουμε ως σημείο έναρξης της μεταγραφής, το πρώτο νουκλεοτίδιο του πρώτου εξονίου. Στα πλαίσια αυτής της αλληλουχίας, αναζητήθηκαν νουκλεοτιδικά μοτίβα τα οποία είναι χαρακτηριστικά για τους υποκινητές των γονιδίων των ευκαρυωτικών οργανισμών. Τέτοια είναι, το πλαίσιο TATA (βρίσκεται περίπου 25–35 bp ανωδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής), το πλαίσιο CAAT και το πλαίσιο GC (θέση δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1)(280). Επιπλέον, επειδή το γονίδιο της hdj2 ανήκει στην οικογένεια 40kD των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ, μέλη της οποίας, έχει βρεθεί να επάγουν την έκφραση τους κατά το θερμικό σοκ, μέσω των HSE (Heat Shock Elements) τα οποία εδράζουν στον υποκινητή του γονιδίου και στα οποία προσδένεται ο HSF1 (Heat Shock Factor 1) (151), αναζητήθηκαν τέτοια στοιχεία στην αλληλουχία των 365 bp, ανωδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά προγράμματα λογισμικού, το PROSCAN και το TRANSFAC, τα οποία διατίθενται προς χρήση στις ηλεκτρονικές σελίδες: <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/> και <http://wwwtest.bionet.nsc.ru/mgs/programs/yura/RecGropScan Start.html> αντίστοιχα. Τα προγράμματα αυτά είναι εξειδικευμένα στην ανίχνευση επαναλαμβανόμενων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών στο γένωμα. Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης διασταυρώνεται με τις καταχωρήσεις μιας τράπεζας νουκλεοτιδικών μοτίβων, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί στη βιβλιογραφία ως θέσεις δέσμησης, είτε του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής, είτε ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων.

Η ανάλυση αυτή παρείχε τις εξής πληροφορίες:

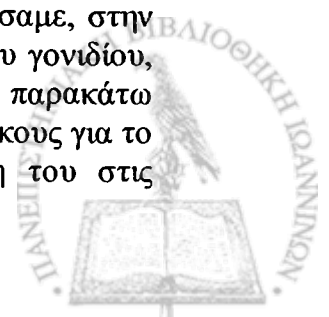
- 1) Δεν αναγνωρίστηκαν πλαίσια TATA και CAAT αλλά ούτε και στοιχεία HSE. Επομένως, το γονίδιο της hdj2 ανήκει σε εκείνη την κατηγορία των γονιδίων που δεν έχουν πλαίσιο TATA, στο οποίο προσδένεται άμεσα ο παράγοντας TBP για την έναρξη της μεταγραφής.
- 2) Αναγνωρίστηκαν πέντε θέσεις δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 (εικ. 22Α). Ο Sp1 είναι ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος απαντά τόσο σε γονίδια που φέρουν πλαίσιο TATA όσο και σε αυτά που δεν έχουν. Παρόλα αυτά θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο να διατηρεί τα επίπεδα μεταγραφής ιδιοσυστατικών γονιδίων (π.χ. γονίδια βασικών λειτουργιών) τα οποία δεν φέρουν πλαίσιο TATA (281). Στο τελευταίο, όταν υπάρχει, προσδένεται το σύμπλοκο Eπiσης, η μεταγραφή του γονιδίου φαίνεται να μην επηρεάζεται από το θερμικό σοκ, αφού απουσιάζουν οι θέσεις πρόσδεσης του HSF1, σε αντίθεση με ότι ισχύει για το γονίδιο

της πρωτεΐνης hdj1, η οποία είναι ένα άλλο μέλος, επαγόμενο όμως, της ίδιας οικογένειας του TFIID το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη TBP (είναι αυτή που συνδέεται με την αλληλουχία TATA) και οι συνδεόμενες, με αυτήν, πρωτεΐνες, που καλούνται TAFs. Απουσία ενός πλαισίου TATA, ο παραγόντας Sp1 αλληλεπιδρά με τους παράγοντες TAFs και έτσι διευκολύνει την πρόσδεση του συμπλόκου TFIID, το οποίο στη συνέχεια στρατολογεί την μεταγραφική μηχανή της RNA πολυμεράσης II (282). Ο Sp1 φαίνεται όμως να παίζει ρόλο στην διατήρηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων βασικών λειτουργιών (house keeping genes), με την αποτροπή της αποσιώπησης τους μέσω της μεθυλίωσης του DNA. Έχει δειχθεί ότι η απομάκρυνση των αλληλουχιών δέσμευσης του Sp1 (και άλλων μελών της οικογένειας SP/XKLF) από τις CpG-πλούσιες, ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων, τα οποία έχουν συστατική έκφραση, έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση τους σε μεθυλίωση και τελικώς την αποσιώπηση τους (283,284)

Στην εικ. 22B παρουσιάζεται γραφική αναπαράσταση της παρουσίας των βάσεων GC κατά μήκος του γονιδίου της hdj2 (14556) και ταυτόχρονα απεικονίζονται τα εξόνια αυτού. Παρατηρείται η ύπαρξη μιας περιοχής πολύ πλούσιας σε GC (πάνω από 70%) με μήκος περίπου 700 bp που περιλαμβάνει την περιοχή του υποκινητή, ανοδικά του 5' άκρου του πρώτου εξονίου και το 1/3 του πρώτου ιντρονίου. Η παρουσία μιας τέτοιας περιοχής υψηλού περιεχομένου σε GC στο 5' άκρο είναι χαρακτηριστική πολλών γονιδίων βασικών λειτουργιών στα θηλαστικά και θεωρείται ότι εμπεριέχει πολλά σημαντικά στοιχεία για τη βασική μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων (285,286).

3.2.4) Δυνατότητα παραγωγής ενός μεγαλύτερου μεταγραφήματος από το γονίδιο της hdj2

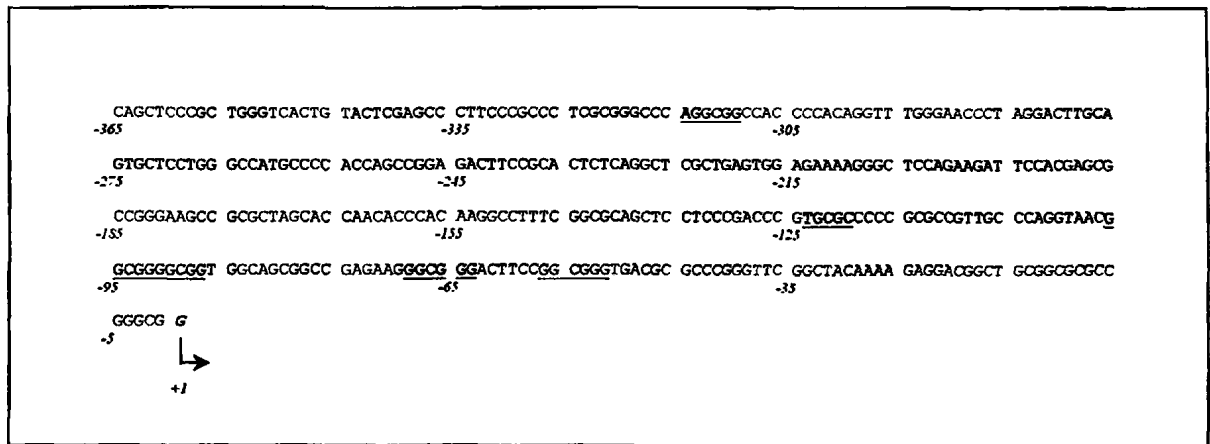
Εφόσον υπάρχει ένα αντίγραφο του γονιδίου της hdj2 στο ανθρώπινο γένωμα, τότε, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα το γονίδιο αυτό να παράγει και ένα μεγαλύτερο μεταγράφημα με εκτεταμένη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή ανάλογο προς τον κλώνο 5aI, που κλωνοποιήσαμε από τα κύτταρα του πιθήκου. Για να εξετάσουμε αυτή την πιθανότητα, ανατρέξαμε στις γενωμικές αλληλουχίες και επεκτείναμε το 3' άκρο του γονιδίου όπως αυτό παρέχεται στην ηλεκτρονική σελίδα του Entrez Nucleotide του NCBI, κατά περίπου 1000 bp από το κωδικό λήξης TAA (33028899-33028901). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε αυτή την αλληλουχία σε μία συγκριτική αντιπαράθεση με την αλληλουχία της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής του κλώνου του 5aI του πιθήκου. Η νουκλεοτιδική αυτή αντιπαράθεση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού Blast 2 Sequences, που διατίθεται στην ηλεκτρονική σελίδα του NCBI. Από τη σύγκριση, που παρουσιάζεται στην εικ.23, συμπεραίνεται ότι οι δύο αλληλουχίες εμφανίζουν πολύ μεγάλη ομολογία (> 92%). Το πιο σημαντικό στοιχείο, όμως, είναι ότι το εναλλακτικό σινιάλο πολυαδενυλίωσης, το οποίο εντοπίζεται 13 nt από το τέλος του 3' άκρου του κλώνου 5aI, το οποίο πολύ πιθανά είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία του, εντοπίζεται ακέραιο στην αλληλουχία του γονιδίου του ανθρώπου. Αυτό σημαίνει ότι το τελευταίο έχει τη δυνατότητα παραγωγής ενός μεγαλύτερου μεταγραφήματος μέσω του μηχανισμού της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Το εναλλακτικό αυτό σινιάλο πολυαδενυλίωσης, θα πρέπει να είναι, λογικά, υπεύθυνο για τη δημιουργία του μεγαλύτερου μηνύματος της hdj2, το οποίο και ανιχνεύσαμε, στην προσπάθεια μας να χαρακτηρίσουμε τα προϊόντα της μεταγραφής αυτού του γονιδίου, σε κυτταρικές σειρές ανθρώπου και πιθήκου, όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω (βλ.εν.3.3.1). Αν και αυτή τη στιγμή δεν είναι γνωστό ένα cDNA τέτοιου μήκους για το ανθρώπινο γονίδιο, προβλέπεται ότι η εύρεση του και η καταχώρηση του στις



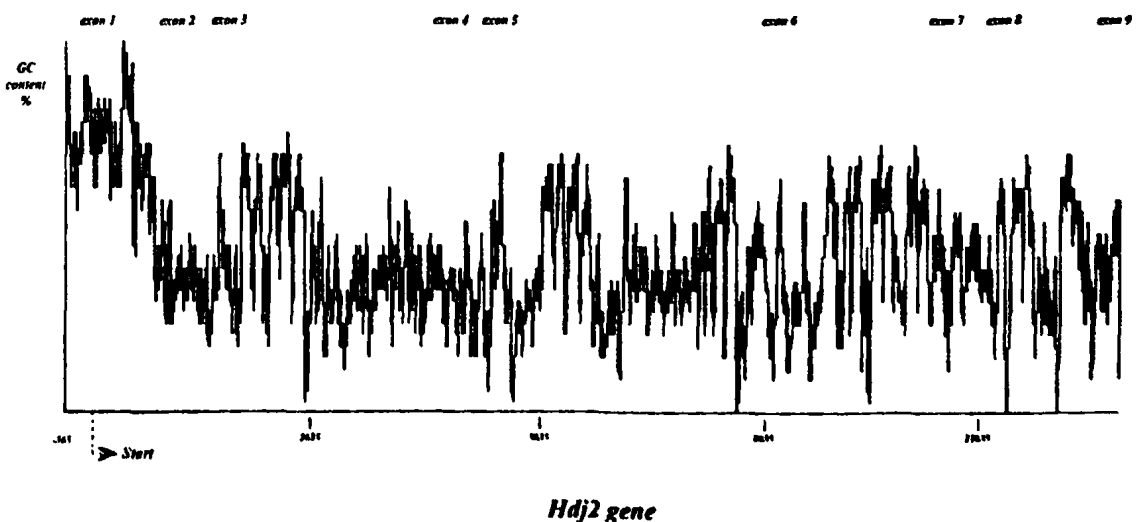
γενωμικές βάσεις δεδομένων είναι θέμα χρόνου μια και ο εμπλουτισμός των βάσεων αυτών γίνεται επί καθημερινής βάσης με τις εισαγωγές νέων στοιχείων.

Στο τέλος αυτού του κεφαλαίου παρατίθεται ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδίου της *hdj2* που παρέχεται από τις βάσεις δεδομένων του NCBI, με υπογραμμισμένες όλες τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η αλληλουχία όμως αυτή συμπληρώνεται με την προσθήκη της επιπλέον αλληλουχίας που της δίνει την ικανότητα παραγωγής του μεγαλύτερου μεταγραφήματος (εικ. 24).

A



B



Εικ. 22 (A) Υποκινητής γονιδίου *hdj2*. Έχουν υπογραμμιστεί οι θέσεις δέσμευσης του παράγοντα *Sp1*. (B) Γραφική παράσταση του περιεχομένου σε GC (%) της αλληλουχίας του γονιδίου. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τα εξόνια αυτού.



BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.6 [Apr-09-2003]

Match: 1 Mismatch: 2 gap open: 5 gap extension: 2
 x_dropoff: 50 expect: 10.000 wordsize: 11 Filter Align

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 994 (1..994)
 Sequence 2 lcl|seq_2 Length 34389 (1..34389)
 NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database
 NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence
 Score = 1062 bits (552), Expect = 0.0
 Identities = 611/638 (95%), Gaps = 7/638 (1%)
 Strand = Plus / Plus

```

5aI : 1      tgggccagtggaataacacacactgctggcatttaatgtgcattagtggaataagtgaagga 60
3'UTR      |||
Sb: 33028902 tgggccagtggaataacactcactgctggcatttaatgtgcagtagtggaatgagtggaagga 33028961
5aI : 61     ctgtaatacataaatatgctcactacttgctctgtttttgttttaataattcaactatagta 120
3'UTR      |||
Sb: 33028962 ctgtaatacataaatatgctcactacttgctctgtttttgttttaata---aactatagta 33029018
                    poly A signal
                    ↓
5aI : 121    gtgttttaaaaagttaaatgaagaataaaacgcaaatataaaagctctgactttgcctgt 180
3'UTR      |||
Sb: 33029019 gtgttttaaaaagttaaatgaagaataaaacgcaaatataaaagctctgactttgcctgt 33029078
5aI : 181    atgtatgatgacttcagtggtgcaagatgaagtttaatacctgtaaaaactcagaagaagt 240
3'UTR      |||
Sb: 33029079 atgtatgatgacttcagtggtgcaagatgaagtttaatacctgtaaaaactcagaagaagt 33029138
5aI : 241    tcccctagcatttctaggccaaaccttgaattgacttcagctatgtacgtggacaagct 300
3'UTR      |||
Sb: 33029139 tcccctagcatttctaggccaaaccttgaattgacttcagctatgtacgtggacaagct 33029198
5aI : 301    tagactgaaatgcccaggtatagt--tggttcagtgatgacccttcattgttaagcta 358
3'UTR      |||
Sb: 33029199 tagactgaaatgctaggtatagtattggcttcagtgatgacccttcattgttaagcta 33029258
5aI : 359    tgaagtaaaaactctgtatttaactggcaatgaggnnnnnnnnnnnnttggtagagaagt 418
3'UTR      |||
Sb: 33029259 tgaagtaaaaactctgtatttaactggcaatgagggaaaaaaaaaat--tttggtagagaagt 33029316
5aI : 419    gtggctctgtatagttcctttgtattaaagtgggattcattgtaatgcctttgcatttatc 478
3'UTR      |||
Sb: 33029317 gtggctctgtatagttcctttgtattaaagtgggattcattgtaatgcctttgcatttatc 33029376
5aI : 479    tattgcctcaactgttacttgaagatggcgtaatatataatttatcctgtggtatcagtg 538
3'UTR      |||
Sb: 33029377 tattgcctcaactgttacttgaagatggcgtaatatataatttatcctgtggtatcagtg 33029436
5aI : 539    ataaaaatgataaccttctgtaggaggggtttatcataatagctgcttcttgaaggctt 598
3'UTR      |||
Sb: 33029437 ataaaaatgataaccttctgtaggaggggtttatcataatagctgcttcttgaaggctt 33029496
5aI : 599    gcacttcagaattgtgtttcctctctgctgtgccattc 636
3'UTR      |||
Sb: 33029497 gcacttcagaattgtgtttcctctctgctgtgccattc 33029534
Score = 454 bits (236), Expect = e-124
Identities = 315/342 (92%), Gaps = 19/342 (5%)
Strand = Plus / Plus
    
```

```

5aI : 665    ctgaccagtcctggccatttgccccctccttctgtctgtggaccat aagcccgagta 721
3'UTR      |||
Sb: 33029562 ctgaccagtcctggccatttgctcccctccttctgtctgtggaccatgataagcccaagta 33029621
5aI : 722    gtgacttcagagctgggtaaatgtagaaatataaagtgaaaagacctttacgtggagaa 781
3'UTR      |||
Sb: 33029622 gtgacttcagagctgggtaaac--agaaatataaagtgaaaagacctttacgtggagaa--- 33029676
5aI : 782    atttgoatgcataatataggaaggtgttcttttaggtatgttacaggattactttaaac-- 839
3'UTR      |||
Sb: 33029677 -tttgcattgcgtaatataggaaggtgttcttttaggtatgttacaggattactttaaacca 33029735
5aI : 840    ttatgctccaaagtaattgttggtatagcaaatatgatgaatagctttaat 893
3'UTR      |||
Sb: 33029736 tttagcttctgctccaaagttatgttggtatagcaaatatgatgaatagctttaat 33029795
5aI : 894    tgtatgtttaaaagctctcatatgttcacatgctttaaact--ggatcagaatttaagcaa 951
3'UTR      |||
Sb: 33029796 tgtatgtttaaaagctctcatatgttcacatgctttaaactctgggtatcagaatttaagcaa 33029855
5aI : 952    ttcttgaatgtattgtctccttctaaactaattacaaagc 993
3'UTR      |||
Sb: 33029856 ttcttgaatgtattgtctccttctaaactaattacaaagc 33029897
    
```

Alternative poly A signal

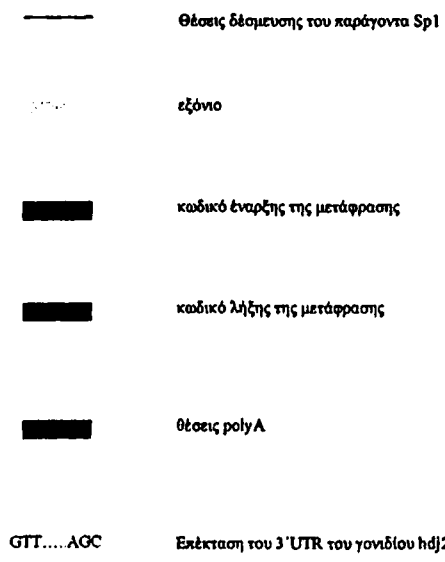
Εικ. 23 Νουκλεοτιδική αντιπαράθεση μεταξύ της 3'UTR περιοχής του κλώνου 5aI και του 3' άκρου του γονιδίου της hdj2. Υπογραμμίζονται τα σινιόλα πολυαδενυλίωσης των δύο αλληλουχιών



1 CAGCTCCCGC TGGGTCACTG TACTCGAGCC CTTCOCGCC TCOCGGGCC AGGOCGGCC CACAGAGGT TGGGAACCT AGGACTTGA GTGCTCTGG
101 GCGATCCGCC ACCAGCCGGA GACTCCGCA CTCTCAGCT CGGTGAGTGG AGAARAGGGC TCCAGAAGT TCCACGAGG CCGGGAAGCC GCGCTAGCAC
201 CAACACCCAC AAGGCCCTTC GCGCAGCTC CTCCCGACC GTGCGCCCC GCGCCGTTC CCAGTAACG GCGGGCCGT GCGAGCGCC GAGAGGGGC
301 GCGACTCCGG CCGGTGAGCC GCGCAGCTC GGCTACAAA GAGGACCGCT GCGCGGCGCC GCGGGAACT TCCAGAACG CTCGGTGAAG GCGGGAGG
401 GCGTAATCAC CCGGGCTCG CACAGCTCGG CCCTCTTCC GCGCCCTCA CACACCGCC TCAGCCCGCA CCGTGAAGT CCGTCCGCTG GCGTCCCTC
501 AGTCCCTGG TGGGGCCAT TGGCGCCGG AAACCGATGG AGCCCGGCT GCGGAGCAGT TGGCCCGGT GCGTAGGACG CTGTCACTG CTGGGCCAC
601 GATTTCCTTT CTGGAGGCGT CTGGAGGCGT GGTGTGGTGC CTTCCGCAAC ATCCCGGCC AGGACAGTG AATGGGCCG AGACTTTCC TAGACTTCC
701 GCGTGGGATG TCCAGGAGC TACTGTCTTC GCGTGCOCCT CCGTGCOCGC CCGCGGCCG CCGTCCCGG TCGGTGCTCG CTGCGGGTGG GCGGGGGGAG
801 TGGGGTGGC GACCCTGGC ACGGCCACAG GGAGGCAAGG GCGAGGGGCT GCGGGGGGAG CCGGGGGGAG ACTGCGGCT TGGTTTCCG TTTCTCTGT
901 TCCCTCCCT TTGTTGGTGG AGGGCTGGC TTTCCCCACC GCGCTTGGG TCCAGGGTGG GAGGGAGAAA GCGGACAGG CCGTCAAGC GAGTGCAGG
1001 GGGAAACCTG GCGAGTAAC TCTGCCAGC TGAGGGGGCA GAGGGATCG GCTGGAGAG CTGTAAAGCC TGGCGGGTGG AGGGCTTGT AGTGGAGCC
1101 AGTAACCTG TCTATAACC ACTCCCCCC ACCACTGTGT TCGCAGAGT CTTTTCTGG AGAGTATATG AGATTTATCA GATTTGCCAA AGACATGAT
1201 AGTGTATGA CCGGTAGACT GAACATATCA GTGCTCTTT TGGTACAA TGTACCCGC TCTAGGGCAA CCGGAGAAA TCCAGATAT AGTTGTGTA
1301 TATTAGTAG GAAGCTTGG TGTAGGAAA TTGGAACAG CTGTAGAA GCGGCTCTCA GATTATTTCC CGATAATGAT TATTTGTTT GTCGTCTGA
1401 GTTTATAGT GAATTAATGG AGGAATTTGT ACCTTTTGG TGAATTTAG GGAAGTGTG GGAAGTGTG GTTCTTATA TCGGATTTG CAAGAGATT CCGTCCGCT
1501 AGCTCTCTT TTTATAAAA GCTACCACT GAAGCCCGGT TAAATTTGCA TTTTCTTAT TCAGGCAGTA GAGGCTGTG AAAGAAACCA CTCTACAGG
1601 TGTGTTGGG GTCAACCCCA ATGCTACTCA GGAAGAAITG AAAAAAGCTT ATAGGAACT GCTTTGAA GACCTTCTG ATAGAAACCC AAATGAAGG
1701 GAGAAGTGA ATAGTATCTA CTCTAAAGC TATCTGAATA GTTCTTGGC AGAGTATAG TATTTCTATT ATGGCTGAA ATCGAGTAT TAATATAGA
1801 ACTATGATCA CTCTCCGGC TTTTATAGTA AGATCAAGT TAATGTAGT AGGTAACACT TGTTTTTTAA AAAATGAAAT TCACTTCTCT TTTCTCAAC
1901 AGTTTAAACA GCTTACGAA GCTTACGAA GCTTCTCTGA TTCTCTCTGA TCCAAAGAAA AGGAAATAT ATGCAAAAG ATGCAAAAG CCAATGGAAG
2001 AGGTGGCGGT TTTGGCTCC CCATGGACAT CTTTGTATG TTTTGTGGAG GAGGGGAGG ATGCAAGAA GAAAGGAGAG GAAAGAGAA TCTAGTCTT
2101 GTGCAGCTAA CTAAGATTAG CTGTGGTCA GAGCAGATG TGGCAAGCT TGGCAAGCT ACCCATTTA AATGTCTGT TACATTTGG TATAATGTT GCAACGTG
2201 ACAAAITGCC TCTGATTTG GGTGTGTGT TTTTGTGTG TGGTTTTT TTTTTTTT TGGAGOCGA GTTCCCTCT TATTCCCGAG GCTGGAGAGC
2301 CATGGCGGTG TCTCAGCTCA CAGCAACCT CACTCCCGG GTTCAAGCG TTTCTCCGC TCAGCCTCC AAGTAGCTG GATTACAGG ATGTGCCAG
2401 AAACCCGGCT AATTTGTAT TTTTGTATG GATGGGTTG TCCATTTGG TCCAGGCTG CAACCTCAG GTGGTGTG CAAAGCTCAG GTCGGTGTG
2501 GCTCCCGCA GTCGTGGAT TACAGTGTG ACCACCATG CCGACCGAT GTGTGCTGT TTTTAAAT GAGATTAAG GGGCTAAAA AATGACCAAC
2601 AGAGTGGTAG CAAATGACT CTCCAAAAC TTTAGATAT TATCAAAA AATAGAGAA ATTAGAGAA CAGGCCCGCT ATCTGTATG AATGACACT
2701 TGGGAGCGG AGGTGGTGG ATCAGTGGG TCGAGGTTG AGACAGCTG GCGCAAGATG GTGAAACCC ATCTCTACA ACTACAGAA TTAGCTGGC
2801 GTGTGGTGG GCATCTGCA TCCAGCTCC TCTGGAGGT GAGGCGAGG AATCGTGA ACCCTGGAG CAGAGGTTG AGCAACCGA GGTACGCCA
2901 CTGCATCCA CCGTGGCCAA CCGTGGCCAA TCTCTGTAC AAAAARCCA AAAAATCCA AAAATAGCC AGGATGTG TCTTGAATG CAACCTCAG GTCGGTGTG
3001 TACTCAGGA GGGCTGAGC AGGAGGTGG CTTGAACCC GAGGTGGAG GTTCAAGTA GCTGAGACT CCGCATTTA CCGTCCGCT AGCAACAG
3101 CGAGCTCTT GTCTCAAAA AAAAARAAA AAAAARAAA GACAAGTAT ATGCAAAAT AATTTTCAA CCGCTTTTA CAGATCTAT TTTGGTCTC
3201 CTCACCTCCC AAGGAATTT GATGTAGGT ACAGTGGCT TTTCAAATG GAGTAAATG AAAATTCAGA AACTAAAA TCTTCAAGC TCAATAGCA
3301 AGCAACAGA CCGAGGCTG AAACTGGTT CGTTGCCCT CATCTATCTA TCTTGTTC AGCTTTATG TGTCAAAT ATGTATTAA TATGTTATC
3401 AGGAAATGG CCTATGGCT CTAGAATAC TCGTTATAG AGTAAATGT TCAAGAGAA TCACTCTAC TTTATTTCA GTATAGTGA TACAATAAG
3501 GGCTGATGAG CAGAACCTG TTTAGAAATG ATGGCCAGC CATTAATTT CACTTTGAG TCTTAAAGT TCGAAAGAT TGGGAAAT GTTTATCAG
3601 TTTTCTTTA AAGTCTTCA TATGTTTTA TTAAGTACT TAACTCCCT TCAACTTCTG AATAGTAA TCCAAATCC AAAAGAGAG TCTGATATG
3701 TGTAGAAAT TGTCCAAA AAAAGTAGT TGGTTTTCA CTTACCTAC AAAGAACCT CAGGTTACA TGGCAAGCT CTTTATGTG GCTTATGATC
3801 ATATTGAGG GTTATTTCTG GGGAAATGCG CTTCAATCAG CTCTAGAAG TTTATTTTC TCTTCTATA CTAACACTG TCCAAAATA GGGCAGTAG
3901 ATTTTAGCGT GCCAAACTA AAGGTGGAAC TATAAGCAGA AGGACATAAT TAATGTATT TCAATGTATT TCAATGTTA AAAATGTTA TTAGGATAT
4001 GTACACAGG CAGGTTGAG AACTTTTTT AGTGGTGGG AAGGCCAAT TAITGTGTG AATAAGTCT TGTGGAAGA CCACTAGTA GGAACCTACT
4101 AACTAGTAG CAGGTGACT CATACTCTA ACCTCAGTG CCTTAGAGA CTTTAGCTG AATGAGTAT AGACTCTAG TATAGATG AAAATGAT TACTGACT
4201 AGTAGCGGT GCGCATGTG GGCTCCATA ATTTAGACA AAAAARAAA TACGGTTCT TAGTCTAAT GCGCACATT ACATGCTAA TTAGCAGT
4301 TGATTGGCTG CTGCTAGTT GGACAGACA GATATAAAC ATTTATCAT AGTAAAGT CCGTGGGCA ATGCTATT ATGAAAGTGA AGAAATTTG
4401 CTTTAAAC ACCAGTGTG GCGCCAGCAG TAAATGGCT TAAATGACT ATCTCTACT AAATCAGAA GAGTAGAAA TGTGATCTCT CCAATAAT
4501 ACATCAGCT CCGTGGCCAA TCTGTATTA TGAATTTA TGAATTTA CTTGTCTCA GATTTTGG GAATTTGG ATGAAATAT TGGCATTG TCTCAAGT
4601 AAAGCTCAA AAAATATAT AAAATATAT TGAATTTG TGAATTTG AATTTGGC CAAATATTA ATCTGACC TATTTTCC TCTCAAGT TCTCAAGT
4701 AATGCTTTG CTTACCAT TCCAAAGAT GCCAGCTG TGCCTTAA CAATATTA ATCTGACC TATTTTCC TATCTGTA TCAATGTA TCAATGTA
4801 GTTTGAGAT CATCTGTAT AACGTGAACA TCTGTGTAT ATAGTAGTT TCCAACAGT GTACCTGTG AGGCTCAT TTTATTTA TTTGCCAT
4901 TTTTATAGT CCGCTTAGCA CAAATAGAC CCAGCATTT AACAGATTA CCAAGATTT GCAATATTA ATATTTGTT TTAGTAAAA ATGCTCTCA
5001 GTAACCTAG AAGACTATA TAAATGGCA ACAAGAAAC TGCTCTGCA AAGAAATGT ATTTGTA CAAGTGAAG TACGGTGT TTTTGTG
5101 TTTTGTG TTTTAAAGCA CTTTAAAT GACACCTGAA AATGAGTAT TAAAGTATG AAAGTATG ATAGATGAT AAAATGAT TACTGACT
5201 TGGGGAGGA GAGGCAGAT ATGAAGAAA CCAACTGAA ACCTCCACC TAAAGAA TAAGACTT TCTGTTA AAGAAATGAA TGTCTCAT CCAATGTA
5301 TCAAGCTAGT TGGTATCT TTTTGAATA AGTAAATTT ATGGAAGT GTGTTCTA AAGAAATGAA CCAATGTA TGTCTCAT TGTCTCAT
5401 TCAAGAGGA ACCAGTCA AGGCTCGAAC AATATTAACA GTATAGCTT ATAGAAATG TAAAGTATG TAAAGTATG TAAAGTATG TAAAGTATG
5501 ACATATTTA ATTTCTTT TAAATTTAG TAAAGAAAG TAAAGAAAG CAGTAGATG CAGTAGATG CAGTAGATG CAGTAGATG CAGTAGATG
5601 CACAGATAG CCGTGGAA TGTTCAGCA ATTCAGCTG TGTTCAGT TGTTCAGT TGTTCAGT TGTTCAGT TGTTCAGT TGTTCAGT TGTTCAGT
5701 GCAACGAGG AAGATAGTT CGAGAGAGA AAAATTTAGA AGTTCAAT GACAAAGTG AGTTCTAGT TACTTATCT TACTTATCT TACTTATCT
5801 AGATTTATA TTAACATTT ATAATTTGTT AAAAATCAT CTTAATTAG TATATATGA TCTATCAAT TCTATCAAT TCTATCAAT TCTATCAAT
5901 ATGTTCTTT ATCCAGACT AATTTGTCAC ATTTGATAT TACTAATAGA TACTAATAGA TACTAATAGA TACTAATAGA TACTAATAGA TACTAATAGA
6001 TCTGTGTC TGAATATGAT TGAATAGT TCCAAACTA ATCTCTCT GTTAAACAT AGTCTTCA TCTTTAAA CATTAGAT TGTACATG
6101 TTAATAGGA GTTACTAGT CAAGGGATG GCATCTTT AAGGATTTG AAGGAGTTG AAGGAGTTG AAGGAGTTG AAGGAGTTG AAGGAGTTG AAGGAGTTG
6201 GAGACGGAG TTTGCTCTT CTGCGAGTGT CAATGGCAG CAATGGCAG ATTTGAGCT ATTTGAGCT ATTTGAGCT ATTTGAGCT ATTTGAGCT ATTTGAGCT
6301 CTAGCCCTC CAAGTACCTG GGATACAGG CACCCAGCAG CATGCCCCG TAATGTTTT TATTTTTT TATTTTTT TATTTTTT TATTTTTT TATTTTTT
6401 TGATCTGAA CACTGACTG CAGGTGATGA CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG
6501 TAAACCAAT GGCATGTTT TGTGTTTTG TTTTTTCTG ATTTGTTG TTTGTTG TTTGTTG TTTGTTG TTTGTTG TTTGTTG TTTGTTG TTTGTTG
6601 AACCTCTGC TCGTGGTTC AAGGATTT CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG CCGTCCCGG
6701 TTTTAGTAG GATGGGTTT CACCATGTTA CCGTGGTCT CAATGGCAG CAATGGCAG ATTTGAGCT ATTTGAGCT ATTTGAGCT ATTTGAGCT ATTTGAGCT
6801 GTGTGCCAC ATACCTGGC TGGGCTAGT TAAATAGCC CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT
6901 ATTTGATAGA TACTCTTCA TTTTTTAGA CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT CTTGACACT
7001 GGATTTGAT GATTTGTCAA TTTTAAAT TACTCTGT CACTTTGCA AACTTTTA AACTTTTA AACTTTTA AACTTTTA AACTTTTA AACTTTTA
7101 GTATATAAC CCAAGAGGA ACTTAAGTCA ACATATGTT AATCTCTTT CAGATTTG CAGATTTG CAGATTTG CAGATTTG CAGATTTG CAGATTTG
7201 GATACAAATCG GGAACGTTT AATATTTGAA CATATTTCA TATTAATATA CAAATCTCA CAAATCTCA CAAATCTCA CAAATCTCA CAAATCTCA
7301 ATGACTGCG CCTCTGAC CCGCAGGTT CACCCAAAGA ATGTAGTGA ATGTAGTGA ATGTAGTGA ATGTAGTGA ATGTAGTGA ATGTAGTGA ATGTAGTGA
7401 TGTGTTTTACC CCGTGTGGG CCGATGCTA AGGTTTATAC TTTGAGTCA TTTGATACC TTTGATACC TTTGATACC TTTGATACC TTTGATACC
7501 TGGAAACTG GGCATCTAG CAGATGACC TCAAAATAG TCAATGAGT CCAATGAGT CCAATGAGT CCAATGAGT CCAATGAGT CCAATGAGT CCAATGAGT
7601 TCTGTTATG TGTCTTTCA TTTAAAGCAA TTTCAAGAA CCTATCACA ATGACTGTA ATGACTGTA ATGACTGTA ATGACTGTA ATGACTGTA ATGACTGTA
7701 GAAGGCATT GTGCTGTGCC TACTCTTACT GGTATTCCG GAAACCTAG CAGAGTTAA TGTCTTCT AGGATTTAA TGTCTTCT AGGATTTAA TGTCTTCT
7801 GATTAAGAC AGATTTGTA ATTTGTGAG TGTATGATC TGATAGGCT TAAAGCTTT ATTAAGGCT ATTAAGGCT ATTAAGGCT ATTAAGGCT ATTAAGGCT
7901 TATAGTTGGA TTTGCTTGA AAGTATATG GGGGGCAGT CAGTAGGCT TAATAGTGA TAATAGTGA TAATAGTGA TAATAGTGA TAATAGTGA TAATAGTGA
8001 ATGGATATG AGGAATTCAT TGTACTGTTG CCGTCTTTA TACAGGATTA ATATTTTCA TACGTTAA TACGTTAA TACGTTAA TACGTTAA TACGTTAA
8101 AGTATCTGT GGAATAATC AGGAGATAAC TCGTTTGGT TAATACTTA CAAACAGG CAAACAGG CAAACAGG CAAACAGG CAAACAGG CAAACAGG
8201 CCGTACTGTA ACATAAATAT GTGGTCAAG GTGGGCGGC ACCAAGCTC ACCAAGCTC ACCAAGCTC ACCAAGCTC ACCAAGCTC ACCAAGCTC
8301 TCGTCCCTT GTATTTAGG GACCAACTGG CCAAGGGAG CCAAGGGAG CCAAGGGAG CCAAGGGAG CCAAGGGAG CCAAGGGAG CCAAGGGAG
8401 CCGTCTTCA CCGTGTATC CTCAGGATG CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT
8501 ATACGGATT TCAAGCACAG GGGCTCAGG CTGTAATCC AACACTAG TGGCTGTG TGGCTGTG TGGCTGTG TGGCTGTG TGGCTGTG TGGCTGTG
8601 GACATAGAA CCGCCATCT TATTAATAAT AAAAATTT CAAATTTAG TGGCTGTG TGGCTGTG TGGCTGTG TGGCTGTG TGGCTGTG TGGCTGTG
8701 GCGCAGAGA TGGGAGTGC AGTGAGCTG GTTGTGCCA CTGCACTCA CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT CCGCTGACT
8801 AATTTTTTA GTTTTATATA TAAATATAC AATAGAGG; TCTGATTA CATTGCTT CATTGCTT CATTGCTT CATTGCTT CATTGCTT CATTGCTT
8901 AACTCAAT ACTTAATTA AATTTTTGG TATAGCCAG TATAGCCAG TATAGCCAG TATAGCCAG TATAGCCAG TATAGCCAG TATAGCCAG TATAGCCAG
9001 CTAATGAGT GTAGGTGCT GTGGAAAGT TGAACCTGG AAGGATATG AAGGATATG AAGGATATG AAGGATATG AAGGATATG AAGGATATG
9101 TGAAGCTAG TCTCTTGGC TCTGGAGTT GTGTCTTCA CTATAGTGA TTTTCTAG; TTTTCTAG; TTTTCTAG; TTTTCTAG; TTTTCTAG; TTTTCTAG
9201 ATTTTGTGA TTTTATGCA TAAACAATA TCTATGATA TCTATGATA TCTATGATA TCTATGATA TCTATGATA TCTATGATA TCTATGATA TCTATGATA
9301 TTTAGCAGT AAAGTGGCC AGAAGATAA ATTCAGCTG GAAAGAGCT AAGAGAGCT AAGAGAGCT AAGAGAGCT AAGAGAGCT AAGAGAGCT
9401 GACCACTG TTTTACTG GTAAGACTA CTAATAAT TAAATATG TAAATATG TAAATATG TAAATATG TAAATATG TAAATATG TAAATATG
9501 AAATGTTTT CATTACTCT TAAACCTAT TTTCTAGAA GATTTTAA CATTGTTA CATTGTTA CATTGTTA CATTGTTA CATTGTTA CATTGTTA
9601 TTTTCTCTA AGTATGAA GGTGAAAAT GCTTTCAAT GCTTTCAAT GCTTTCAAT GCTTTCAAT GCTTTCAAT GCTTTCAAT GCTTTCAAT GCTTTCAAT
9701 TCGCTCAAT CATTGTAAG CAATTTAAG TCTTAAAG TCTTAAAG TCTTAAAG TCTTAAAG TCTTAAAG TCTTAAAG TCTTAAAG TCTTAAAG
9801 AAAGCATCT TGTAGAAAC TAAATTTGA ACTAATACT AAGTATAAT TCAAGTCTC CATTTTAGC TAAATATGA GTATAGAAA CACTGAAAC
9901 CAAGAAAGT GGATGATTA CAGCAATGT TTTGATCCA TGGTAAAT AACACTCT GTGATGCTA TATTTCCAG



10001 GAGGATCACT TGAGGCCAGG AGTCCAGCT ACTGGGGAGG CTGAGGCAGA AGAGTGGCTT GAACCTCAGGA GTTCAAGGTT ATGATCATGC CACTGCATTC
10101 TAGGCTGGGT GACAGTAAAG ACCCACCTTT TTTTTTTTT TTTTTTAAGT GAGTGGAGGT GAAATTGGGA ACATCTTAAA CTAGTTTAGG ATTAATTAAT
10201 ATTTACAGCTT GGTTTGGTGG CTTACGCCCTG TAATCCCAAC ACTTTAGGAGT GCCGAGGTGG ATGGTCAGGA GTTCAAGACC AGCCTAGCCA ACATGGTGAA
10301 ATGCCATCTC TGTAAAAAAT TAAAAAATTA GCCAGGCATC TTGGCAGGCC CTGAGGCAGG AGAATCACTT GAACACAGGA GGCAGAGGTC GCGGTGAGTT
10401 GAGATGGCCG CATTGCATCT CAGCCTGGCC AAAAAGAGCA AAACCTGGTC TCAAAAAAAA AGACTAATAT TTTACAATG TCTGAAGATA ATGGGAAATG
10501 TTGTCAAGCT CAGGCTTTTG ATGCTGTCTAT TTGAGAAGGG TATTAAGAT GTTTTTATTA TTTATTTATT TTTTTTGAGA TGCAGTTTCG CTCACAGCC
10601 CCAGCTGGG TTGCGATGGT GAGATCTTGG CTCACTGCAA CCTCCAACTC CAGGTTCAA GCAATCTCTT CACCTCAGCC TCCCAGTAG CTGGGATTAC
10701 AGGCCGCCAC CACCACGCCCC AGCTGATTTT TGTATTTTAA TGAGAGACGG GTTTCACCAT GTTGGCCAGG CTGGTATCGA ACTCCTGACC TTAGGCCAATC
10801 CACCTGCCCT GGCTCCCAA AGTGTCTGGG TTACAGGCAT GAGCACCCTG GCCCAGCCTA AAGATGTTTT ATTAATGTGG GTTGGAAAGG AAGAGCTAA
10901 GCATGAGNAG GAGGAAGTGG GCTGTAAACG TTAATATGA AAGCTGTGT TCACCTCAA TATGCCAGGA AATATATTT CAGTGTCCAT AATGAGGAAA
11001 TTGTTAGAT CCCTTTAAAT TGGACATAT CTCATTTGTT AATTTCAATT AGCCTAAAT ATCTAGGACC CTGCCCAGG CTAGAGTGCAG TAGGACGATC
11101 TCAACTCACT GCAATCTCTG CCTCCAGATT CAAGTGATTC TCCTGCCTCA GCCTCCCGAG TAGCTGGAAC TACAGGTGGC GCACCACATG CCTGGCTGAT
11201 TTTTGTATT TTTAGTAGAG ATGGGGTTTC ACCATGTTGG CCAGGCTGGT CTTGAACCTC AGACCTTAGG TGATCCACCC CTCTCAGCCT CCCAACTGC
11301 TGGAAATACA GATGCCAACC ACAGTGCCTG GCCTAACCTT CACTCTTGTG AGTTGTTTTT TTTTTTTCCC CTCTGAGAAA CCAGATTTAA AACTAGGTAA
11401 TGAAACAGCT CACTGATGTT AATGGTAAA GGCTGCCTAG AGTGTGTGGA ATGACTTTGA ATCCTTAACT AGGAAAACGG GCTGGCAGGT TGCACATGTT
11501 TTTCTTCCC AGATCTGCTG TCTGTGTAT TTTTCAATG GGGGAAGAAA AGGCTGTCTT TGTAAAAGAC CCTTTGCTTT TATTAACAA AAAAACAGCC
11601 TGCTTTGGTA CATCTACTGA TCGTGTATT GAAAAATATA AATATGTGTC ATATTTTATG CAGACGAGGA GAAGACCTTT TCAATGTATG GGACATAGAC
11701 CTGCTTAAAG CACTGTGTGG CTCCAGAAAG CCAATATCTA CTCTTGACAA CCGAACCATC GTCATCACTT CTCATCCAGG TATGGGAAT AGGCAAGCTT
11801 AAACCTCTCT TTTCTATTCT AGTATTTTCC TTGCTCTCTG TTAACAAAGT GTAGTATAGG CACTGAGGGA AACCCATTGT TTTTCTTCT CGTTCATATA
11901 TCCTTCTCTG GGCTAGATG AAGTATAAG GTCTTGGCTC TCTTGTCAAG CCTTGGAAAA CCCATAGTG AAAGGTAAAC GGATTTGCTT GCCACGTAA
12001 TTTTCTCTCT GCCAATGAGC TAGGACAGTG CTCTGTCTT TATATTTCCG TCATCTATAA AATGTGACCA TACTTAAAGG AGAATTTGGC TTCAATGTT
12101 TTAGGCTCAG TTGCTAAGCA TGGAGATATC AAGTGTGTAC TAAATGTAGG CATGCCAAT TATCGTAGAC CATATGAAA GGGTCCGCTA ATCATCGAAT
12201 TTAAGGCTAAG CTGTAATGTA CTTTAAAGAT ACTTGAAGAC AATTTGGCTA CTAAATCTG ATAAAAAAGT AAAATTTTCAG CCAGGTGCAA TTAGCTCATG
12301 CCTGTAAATC CCGCAITTTG AAGGGCTGAG GCAGGAGGAT CCCTTGAGCC CTGGAGTTTT GAGAACAGCC TGGGCAACAT AGTGAACCC TGTCTCTTTA
12401 AAAAAACAAA AAAAAAATAA AATTAATAAT TCTGAAATGCC TCAGAACCTG AAACCTTACAT TTTTCCACAG CAAGAAATAT ATGGATCTGG CCACGTGCCA
12501 CTGGCACACA CCTATAATCC CAGTGTCTTG GGAGGGCAAG ACAGGTGGAT TGCTTGAGCT CAGGAGTTAA AGGCCAGCCT GGGGAACATG GCAAAAACCC
12601 ATCTCTACAA AAGTACAAA AATTAGCCAG GCATGGTGGC ACACACCTGT AGTCCCAGCT ACTCGGGAGG CTGAGGTGGG AGGATGCTT GAGCCTAGGT
12701 GGTCAAGGCT GCAGTGAAT AAGATGTTGT CACTGTACTT CAACCTGGGT GACAGAATGA GACCCTGTCT CAAAAAAGA AAAAAAAGA TTTACCTAAT
12801 AACTACTTCT GTCATGTTGA GCATCTTTTG TTAACAAGTT GAGGATGGGG TTTTTGTCAT CATTAAATGG ATATTTAAG ATAGGTTGTG GGAAGGTTGT
12901 GTGGGCAAG TGGGATTTT ACTAATGAAA GGTGTAACT GGCATCTTAA AGTTGAGAGG TGCTTTATAA TAATTCGAGA TTTCTTGCCA AAATAGTGA
13001 ATGCTTGATT TGTAAATAGG TATAAAGCAA TCCAGTCATT TTCTGAGTC TTAATTTGGC CTGTCCACAT AAAAAATTA ATTAACACTT TTTTTTTTT
13101 TTTCTCTTT TGAGACGGGA GTCTGTCTT GTCAACCAGG GTGGAGTGCA GTGGTGGCAT CCTGGATCAC TGTAACTCC ACCTCTCTGG TTCAGCAGT
13201 TCTCTGCTC CAGCTCCTG AGTAGCTGGG AATACAGGTG CCCCACCA CACTGGGCTT TTTAGTAGAG ATGGGGTTT ACCATATTG CCAGGCTGGT
13301 CTCAACTCT TGACCTCAGG TGAATCTGCC ATCTCAGCTT CCCAAGTGT TGGGATTTGT AATCCCAAT GTATGAGCCA CCGCCCTCG CCTAAAAACA
13401 TCTTTGGTAA GGAAGAACTA CCTTTTGG AGTAAGAATA GCTTTGTTA AATATGTCT AAGAAGGTT AGGCTGTTC AGGATGGGTT TTGGTATTAA
13501 AAGTCAAGT TGCTGGATAG AACAATGGTT GTTAAAGTGC AGTTTTATT AATACAATCA TTTTAAATAA AGCCTGACTT CTGGTCATAA TCCTTGAAC
13601 CTAGTTTACA GTGTGCTATG CACTGTGCCCT TTTTAGAGCC TGTCTTAACT TGAGATTTGG AGATTCACT AATATTAAG TGTTTACATG TGTTTTTCTG
13701 GGGAAAAATG GTCCATGATA CTCTAAGGGA GCTAATGATG AAATCAGATT GAACAGTGA AGTTTCTTT GAAGGTAAAC TTTCTCTGAGA ATGGCTTTCT
13801 CTCTCTGAT AAACCTCTT TGTGGAAAA ACTCTTACC GAGAGGAAGG AAGTGAAGA GACTGTAGAG ATGGACCAAG TAGAACCTGT GGACTTTGAT
13901 CCAATCAGG AAGACGGCG CCACTCAAT GGAGAGCAT ATGAGGATGA TGAACATCAT CCCAGAGGTC GTGTCTAGT TCAGACCTCT TGGGGCCA
14001 GTGAATAACA CTCACTGCTG GCATTTAAATG TTGAGTATG GAGAGTGAAG GAGCTGTAAAT CAATAATGC TCACTACTTG CTCTTGTTTT TGTTTTATG
14101 CTATACTA GTTTTTTAAA AAGTTAAATG AAGTAAATC GCAATAATAA AAGCTGTGAT TTTGCCCTGT ATGATATGAT ACTTCTAGT GCAAGATGAA
14201 GTTAAATACC TGTAAAAACT ACAAAGAAT TCCCCTAGCA TTTCTAGGCC AAACCTTGT ATTGACTTCA GCTATGTACG TGGACAAGCT TAGACTGAAA
14301 TGCTAGGAT ATGATTTGGC TTCAGTGTAT GACCCTTCAAT TGTAAAGCTA TGAAGTAAA ACTCTGAT TAACTGGCAA TGAGGAAAAA AAAATTTTGT
14401 AGAGAAGTGT TGTCTCTAT AGTCTTTAT ATTAAGTGGG ATTCATGTA ATGCTCTGCT ATTTATCTG TTTGCCCTCAG TGTACTTGA AGATGGCGTA
14501 ATATATAATT TATCTGTGG TATCAGTAT AAAAAATGATA CCTTCTGTA GGAGGGGTTT ATCATAAAT GCTGCTTCTT GAAGGCTTGC ACTTCCAGAA
14601 TTGTGTTTTT TCTGCTGTG CCATTCATAT ATATATACAT ATATATATAT AATCTTGACC AGTCCCTGGT ATTTGCTCCC CTCTTGTCT GTGGACCATG
14701 ATAAGCCCAA GTAGTGACTT CAGAGCTGGG TAAACAGAAAT TAAAGTGAAG AGACCTTTAC GTGGAGAATT TGCATGCGTA ATATAGGAAG GTGTCTTTA
14801 GGTATGTTAC AGGATTAATT TAAACATTT GACTTTGCT CCAAGTTAT GTTGGTATGA TAGCAAAATA TGATGAATAG CTTTAAATGT ATGTTTAAA
14901 GTCTCATATG TTCACATGCT TAAATCTGGG TATCAGAATT TAAGCAATTC TTGAAATGTA TTGTCTCCTT CTAA TTACAAAGC



Εικ. 24 Πλήρης αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου της dj2 η οποία αποτελείται από την αλληλουχία του γονιδίου όπως αυτή παρέχεται από την ιστοσελίδα του NCBI καθώς και από τη συμπληρωματική αλληλουχία που δίνει στο γονίδιο τη δυνατότητα παραγωγής του μεγαλύτερου μεταγραφώματος. Επισημαίνονται επίσης, οι θέσεις δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1, τα εξόνια, τα κωδικά έναρξης και λήξης της μετάφρασης και τέλος, οι πιθανές θέσεις πολυαδενυλίωσης μηνύματος.



3.3) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ dj2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ

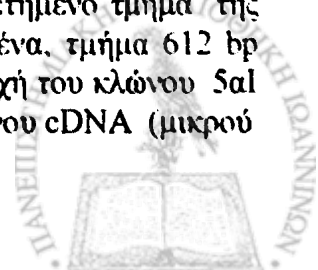
3.3.1) Ανίχνευση δύο πληθυσμών μεταγραφημάτων του γονιδίου dj2 σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών

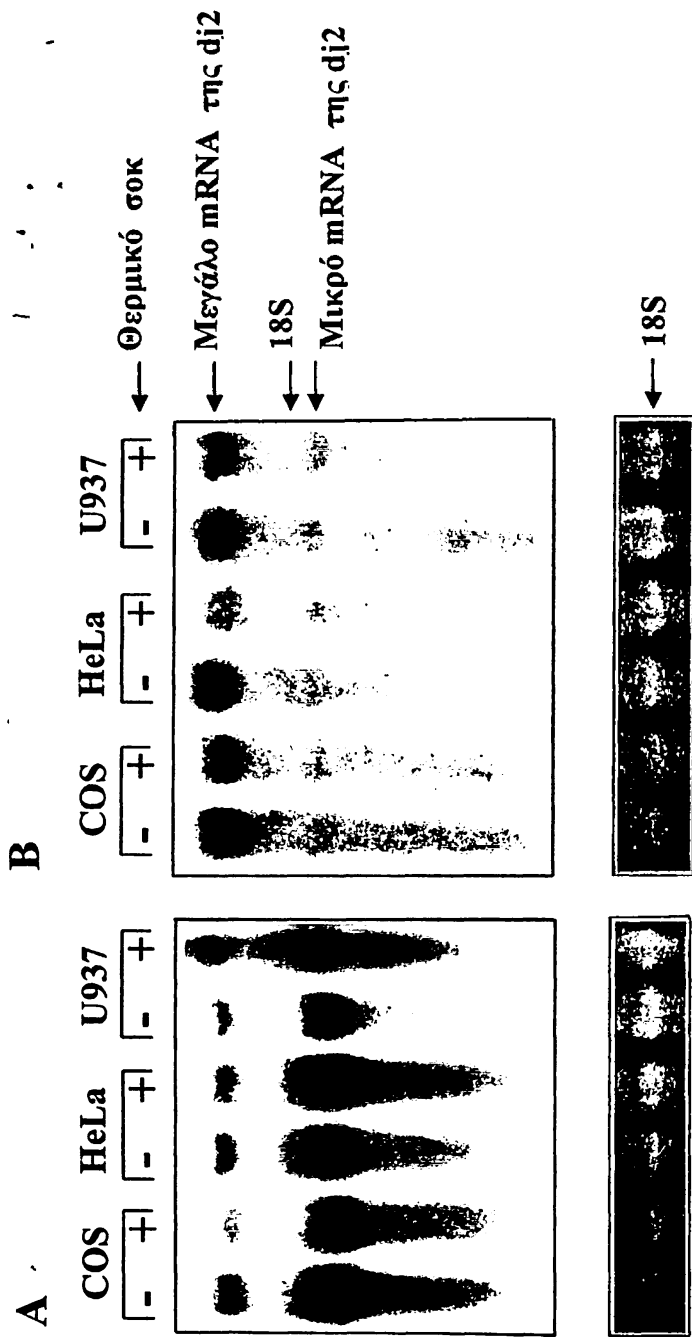
Η έκφραση του γονιδίου dj2 ελέγχθηκε με ανάλυση κατά Northern σε ολικό πληθυσμό RNAs, που απομονώθηκε από διάφορες κυτταρικές σειρές (COS, HeLa, U937), οι οποίες αναπτύχθηκαν τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και κάτω από συνθήκες θερμικού σοκ (43°C για 90min και επαναφορά 90min στους 37°C). Σε κάθε περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν 40μg RNA, τα οποία και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (βλ. εν. 2.2.2α). Με δεδομένο ότι το ανθρώπινο cDNA για την πρωτεΐνη dj2 ήταν κατά 788 bp μικρότερο από το ένθεμα του κλώνου 5aI, ελέγχθηκε η ταυτόχρονη ύπαρξη δύο μεταγραφημάτων, το μέγεθος των οποίων, θα αντιστοιχούσε στα δύο απομονωθέντα cDNAs (ανθρώπου-πιθήκου). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως ραδιενεργός ανιχνευτής, η αλληλουχία της κωδικοποιούσας περιοχής του ενθέματος του κλώνου 5aI, η οποία θα είχε τη δυνατότητα υβριδισμού και με τα δύο πιθανά μεταγραφήματα, ενώ οι συνθήκες του υβριδισμού ήταν εξαιρετικά αυστηρές.

Όπως φαίνεται στην εικ. 25A, ο ανιχνευτής πράγματι αναγνωρίζει δύο ξεχωριστούς πληθυσμούς μεταγραφημάτων, διαφορετικού MB, των οποίων το μέγεθος αντιστοιχεί στο μέγεθος των απομονωθέντων cDNAs. Μάλιστα, όσον αφορά την παρουσία των δύο πληθυσμών στις διάφορες κυτταρικές σειρές και στις διάφορες συνθήκες, μπορούν να γίνουν οι εξής παρατηρήσεις:

- Το μικρό mRNA της πρωτεΐνης dj2 βρίσκεται σε αφθονία σε όλους τους κυτταρικούς τύπους που εξετάστηκαν.
- Ο πληθυσμός του μεγάλου mRNA της πρωτεΐνης dj2 εμφανίζεται σε κάθε περίπτωση ποσοτικά μειωμένος, τουλάχιστον κατά 3-5 φορές, σε σχέση με το πληθυσμό του μικρού mRNA, ενώ η αναλογία αυτή παραμένει σταθερή ακόμη και όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε θερμικό σοκ.
- Η έκφραση του γονιδίου της dj2 κάτω από συνθήκες θερμικού σοκ δεν μεταβάλλεται αισθητά, όπως φαίνεται από την παρουσία των δύο μηνυμάτων, σημειώνοντας ταυτόχρονα μια ελαφριά μείωση του πληθυσμού του μεγάλου mRNA, κάτω από τις συνθήκες αυτές.

Προκειμένου να πιστοποιηθεί ότι το μεγάλο mRNA το οποίο ανιχνεύεται στην ανάλυση κατά Northern, αντιστοιχεί στον απομονωθέντα κλώνο 5aI, ακολούθησε απουβριδισμός της μεμβράνης και επαναυβριδισμός της με ιχνηθετημένο τμήμα της αλληλουχίας του 5aI κλώνου από το 3' άκρο του. Πιο συγκεκριμένα, τμήμα 612 bp (1517-2129 bp) το οποίο ανήκει στην 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή του κλώνου 5aI και βρίσκεται πέρα από το τέλος του 3' άκρου του ανθρώπινου cDNA (μικρού





Εικ. 25 Ανίχνευση των δύο μορφών mRNA της dj2 σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών με ανάλυση κατά Northern. Σε κάθε διαδρομή ηλεκτροφορήθηκαν 40 µg ολικού πληθυσμού RNA που προέρχονταν από κύτταρα που αναπτύχθηκαν είτε σε φυσιολογικές συνθήκες [(-): 37°C], είτε υπέστησαν θερμικό σοκ [(+): 43°C για 90 min και ανάκαμψη 90 min]. Στο αποτόπωμα A χρησιμοποιήθηκε ως ραδιενεργός ανιχνευτής το ανθρώπινο cDNA της dj2 ενώ στο αποτόπωμα B ο ραδιενεργός ανιχνευτής ήταν τμήμα της 3'-μη μεταφραζόμενης περιοχής του κλώνου 5aI μετά το τέλος του ανθρώπινου cDNA (βλ. εικ. 18)



mRNA της dj2) χρησιμοποιήθηκε ως ραδιενεργός ανιχνευτής. Ο επαναυβριδισμός πραγματοποιήθηκε σε εξίσου αυστηρές συνθήκες με αυτές του υβριδισμού. Όπως παρατηρείται στην εικ. 25B, ο δεύτερος ανιχνευτής αναγνωρίζει μόνο τον πληθυσμό μηνυμάτων του μεγαλύτερου μεγέθους, γεγονός που σημαίνει ότι αυτά αντιστοιχούν στον απομονωθέντα κλώνο 5aI.

3.3.2) Διαφορετική κατανομή των δύο πληθυσμών μεταγραφμάτων του γονιδίου dj2 σε ιστούς ποντικού

Μετά την επιβεβαίωση της ύπαρξης δύο ξεχωριστών πληθυσμών mRNA για το γονίδιο dj2 σε κυτταρικές σειρές, ακολούθησε ο έλεγχος, των επιπέδων αυτών, σε ιστούς ποντικού. Για το σκοπό αυτό, ολικός πληθυσμός RNA απομονώθηκε από πνεύμονα, εγκέφαλο, όρχεις, νεφρό, καρδιά, σπλήνα, μύες και συκώτι ποντικού. RNA από κύτταρα μάρτυρες, COS και HeLa, ελέγχθηκαν παράλληλα με RNAs ιστών, με τη βοήθεια ανάλυσης κατά Northern, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως ραδιενεργός ανιχνευτής ολόκληρη η αλληλουχία της κωδικοποιούσας περιοχής του cDNA της dj2 του πηθήκου (κλώνος 5aI).

Όπως διαπιστώνεται από την εικ. 26, παρόλο που η παρουσία και των δύο μηνυμάτων ανιχνεύεται σε όλους τους ιστούς, η κατανομή τους μεταξύ αυτών είναι πολύ διαφορετική. Έτσι, μπορούν να γίνουν οι εξής παρατηρήσεις:

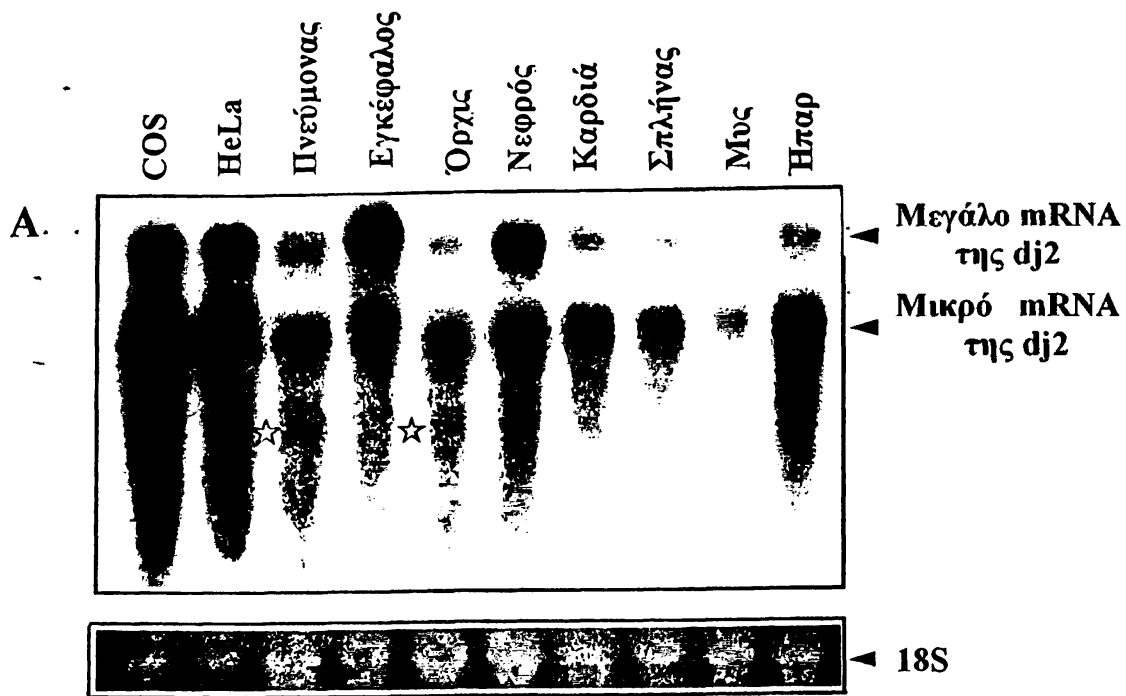
- Το μικρό mRNA της dj2 φαίνεται να αντιπροσωπεύει το κύριο μεταγράφημα του γονιδίου, μια και εμφανίζεται άφθονο σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν, με εξαίρεση το σκελετικό μυ, όπου ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα, τα οποία όμως είναι ταυτόχρονα αρκετά υψηλότερα, σε σχέση με τα επίπεδα του μεγάλου mRNA, στον ίδιο ιστό.
- Αντίθετα, το μεγάλο mRNA εμφανίζει χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς, ενώ σε τρεις από αυτούς, εγκέφαλο, νεφρό και πνεύμονα παρουσιάζεται εξίσου ή και περισσότερο άφθονο, συγκρινόμενο με το μικρό mRNA με σχετικές αναλογίες 2:1, 1:1 και 1:2.
- Αν και με δυσκολία διακρίνονται στην εικ. 26 (σημειώνονται με αστερίσκο), μικρότερα μηνύματα ανιχνεύονται στον πνεύμονα και στον όρχι. Τα μηνύματα αυτά, πιθανόν να αντιπροσωπεύουν προϊόντα διαφορικής διασύνδεσης μόνο στους ιστούς αυτούς, όπως ειπώθηκε στην ενότητα 3.2.2.

3.3.3) Έλεγχος της σταθερότητας των δύο μεταγραφμάτων του γονιδίου της dj2

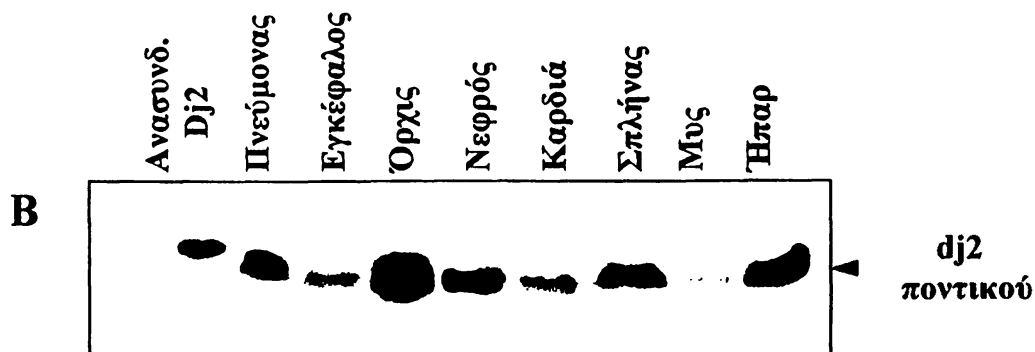
Όπως σημειώθηκε παραπάνω, η κύρια διαφορά μεταξύ του μεγάλου mRNA (κλώνος 5aI) και του μικρού mRNA (cDNA ανθρώπου) της dj2 εντοπίζεται σε μια επιπλέον αλληλουχία μήκους 788 bp, στη 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή του πρώτου. Επειδή σε αρκετές περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι στις 5' και 3'-μη μεταφραζόμενες περιοχές των μεταγραφμάτων εδράζουν τόσο στοιχεία ρύθμισης της μετάφρασης όσο και στοιχεία αστάθειας του μηνύματος (instability elements), προχωρήσαμε στον έλεγχο της σταθερότητας των δύο μεταγραφμάτων. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργήθηκαν κύτταρα COS και HeLa, παρουσία ακτινομυκίνης D (γνωστού αναστολέα της μεταγραφής), σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες θερμικού σοκ (43°C για 90 min).



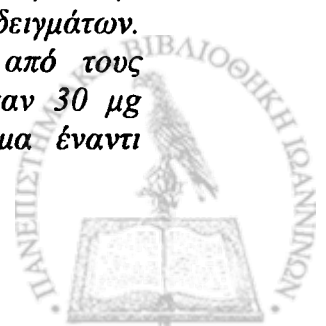
Northern Blot



Western Blot



Εικ. 26 Έκφραση του γονιδίου της *dj2* σε ιστούς ποντικού. **(A)** Αποτύπωση κατά Northern σε ολικό πληθυσμό RNA που απομονώθηκε από τους αναγραφόμενους ιστούς ποντικού. Σε κάθε διαδρομή ηλεκτροφορήθηκαν 40 μ g RNA και ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε τμήμα του κλώνου 5a1 ραδιενεργά σημασμένο. Με αστερίσκο σημειώνονται μικρότερα μηνύματα που ανιχνεύονται ασθενώς στους ιστούς του πνεύμονα και του όρχεος. Στο κάτω μέρος, φαίνεται το 18S κλάσμα των RNAs όπως αυτό εμφανίζεται, μετά από χρώση της πηκτής που χρησιμοποιήθηκε για την αποτύπωση. Το κλάσμα αυτό πιστοποιεί το ισόποσο του RNA μεταξύ των δειγμάτων. **(B)** Ανοσοαποτύπωση σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από τους αναγραφόμενους ιστούς ποντικού. Σε κάθε διαδρομή ηλεκτροφορήθηκαν 30 μ g πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Mydj2, το οποίο κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μας.



Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, και για διαφορετικούς χρόνους επώασης με την ακτινομυκίνη D, λαμβάνονταν ολικός πληθυσμός RNA από τα κύτταρα αυτά, στη βάση ενός χρονοδιαγράμματος που διαρκούσε 24 ώρες. Στο τέλος της επώασης, 40 µg RNA από κάθε επωαστικό χρόνο ηλεκτροφορήθηκαν υπό αποδιατακτικές συνθήκες και εξετάστηκαν με ανάλυση κατά Northern. Ως ραδιενεργός ανιχνευτής στον υβριδισμό που ακολούθησε, χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η κωδικοποιούσα περιοχή του cDNA του πιθήκου (5aI κλώνος). Τα αποτελέσματα (εικ. 27) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι κάτω από τις πειραματικές συνθήκες οι πληθυσμοί και των δύο μεταγραφημάτων αποδεικνύονται εξαιρετικά σταθεροί. Ακόμη και μετά από 24 ώρες παρουσίας ακτινομυκίνης D και τα δύο μηνύματα είναι παρόντα σε ανιχνεύσιμες ποσότητες. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η σταθερότητα των δύο mRNA δεν μεταβάλλεται καθόλου, ακόμη και μετά την έκθεση των κυττάρων στην θερμοκρασία των 43°C για 90 min, ακριβώς πριν τον χρόνο προσθήκης ακτινομυκίνης D. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω μπορούμε να εκτιμήσουμε ότι η παρατηρούμενη διαφορά στα 3'-άκρα των δύο μηνυμάτων δεν παίζει κάποιο ρόλο, όσον αφορά στη σταθερότητα αυτών.

3.3.4) *In vitro* μεταγραφή-μετάφραση του κλώνου 5aI

Η μετάφραση της αλληλουχίας του κλώνου 5aI, σε όλα τα δυνατά αναγνωστικά πλαίσια, με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (PLASMID PREMIERE) στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, μας παρέχει τις παρακάτω πληροφορίες για την παραγόμενη από αυτόν πρωτεΐνη:

Κλώνος cDNA 5aI:

Μέγιστο αναγνωστικό πλαίσιο: 398 κωδικόνια

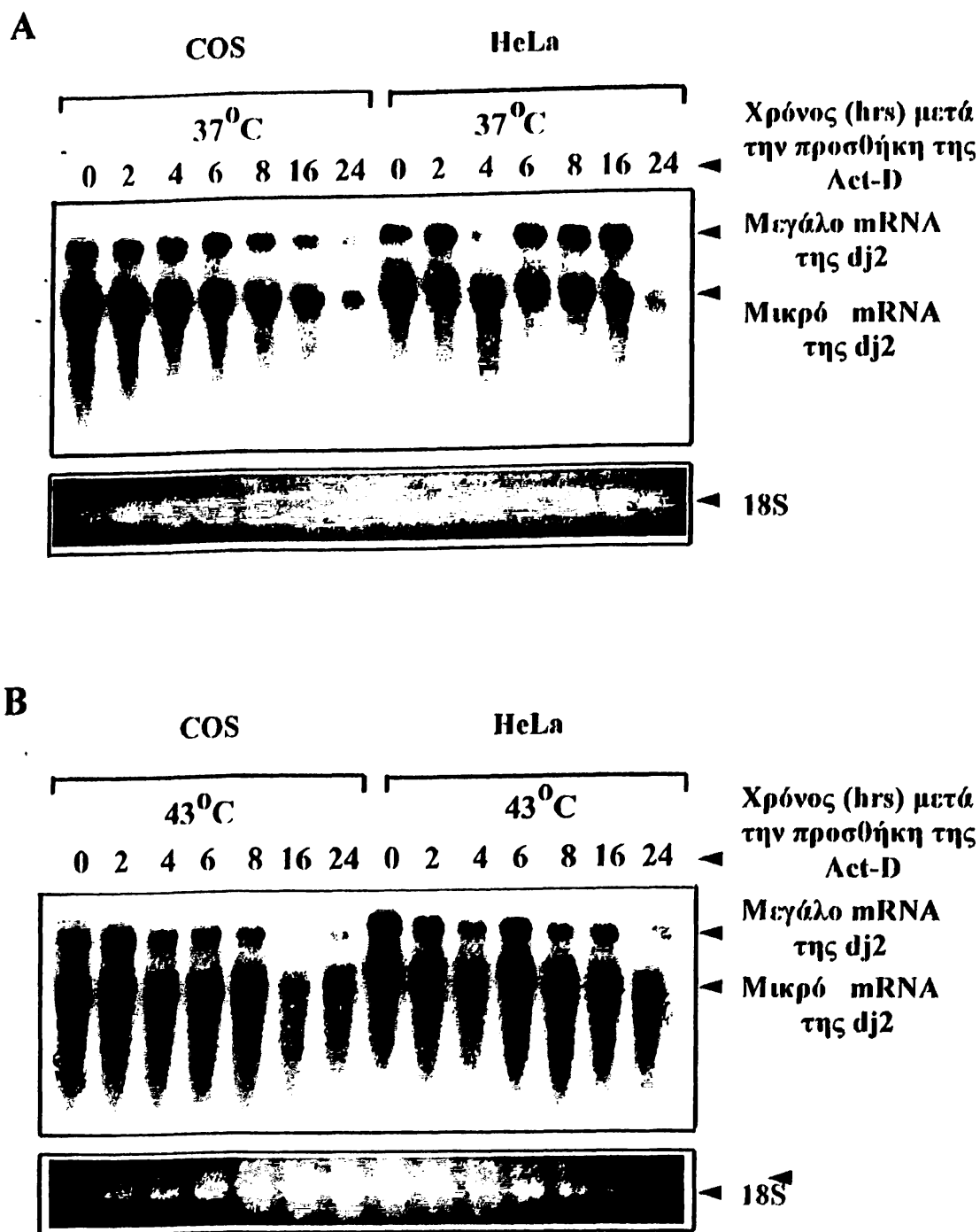
Θέση αναγνωστικού πλαισίου: 36-1229 bp

Παραγόμενη πρωτεΐνη Mydj2:

ΑΝΑΛΥΣΗ	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
Μήκος	397 aa
Μοριακό βάρος	44990.57 D
1 microgram =	22227 pMoles
Ισοηλεκτρικό σημείο	6.69

ΑΜΙΝΟΞΕΑ	ΣΥΝΟΛΟ	% ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
ΟΞΙΝΑ (D,E)	63 (26,37)	15,9
ΒΑΣΙΚΑ (R,H,K)	73 (25,12,36)	18,4
ΥΔΡΟΦΙΛΑ (D,C,E,G,S,T,Y)	129 (14,13,23,43,12,13,11)	32,5
ΥΔΡΟΦΟΒΑ (A,I,L,F,M,F,P,V)	132 (13,26,27,12,13,18,23)	33,2





Εικ. 27 (A) Κύτταρα COS και HeLa καλλιεργήθηκαν στους 37°C παρουσία 10 μg/ml ακτινομυκίνης D για 0, 2, 4, 16 και 24 h. (B) Παράλληλες καλλιέργειες επωάσθηκαν στις ίδιες συνθήκες όπως προηγούμενα και υπέστησαν θερμικό σοκ για 90 min στους 43°C. 40 μg ολικού RNA από κάθε περίπτωση εξετάστηκαν με ανάλυση κατά Northern. Στο κάτω μέρος κάθε αυτοραδιογραφίας επιδεικνύεται τμήμα της πηκτής που αντιστοιχεί στη ζώνη ηλεκτροφόρησης του 18S rRNA προς επιβεβαίωση του ίδιου ποσού RNA σε κάθε διαδρομή



Αντίστοιχα, από την ανάλυση της αλληλουχίας του ανθρώπινου cDNA της πρωτεΐνης dj2 εξάγονται τα εξής δεδομένα:

cDNA hdj2

Μέγιστο αναγνωστικό πλαίσιο: 398 κωδικόνια

Θέση αναγνωστικού πλαισίου: 124 -1317 bp

Παραγόμενη πρωτεΐνη hdj2:

ΑΝΑΛΥΣΗ	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
Μήκος	397 aa
Μοριακό βάρος	44985.55 D
1 microgram =	22229 pMoles
Ισοηλεκτρικό σημείο	6.72

ΑΜΙΝΟΞΕΑ	ΣΥΝΟΛΟ	% ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
ΟΞΙΝΑ (D,E)	63 (26,37)	15,9
ΒΑΣΙΚΑ (R,H,K)	74 (25,13,36)	18,6
ΥΔΡΟΦΙΛΑ (D,C,E,G,S,T,Y)	128 (14,13,22,43,12,13,11)	32,3
ΥΔΡΟΦΟΒΑ (A,I,L,F,M,F,P,V)	132 (13,25,27,12,13,18,24)	33,2

Τέλος, η συγκριτική αντιπαράθεση σε αμινοξικό επίπεδο μεταξύ των πρωτεϊνών που παράγονται από τα δύο cDNA δίνει τα παρακάτω αποτελέσματα:

	1	50
hdj2	MVKETTYDVLGVKPNATQEEELKKAYRKLALKYHPDKNPNEGEKFKQISQ	
Mydj2	MVKETTYDVLGVKPNATQEEELKKAYRKLALKYHPDKNPNEGEKFKQISQ	
	51	100
hdj2	AYEVLSDAKKRELYDKGGEQAIKEGGAGGGFGSPMDIFDMFFGGGGGRMQR	
Mydj2	AYEVLSDAKKRELYDKGGEQAIKEGGAGGGFGSPMDIFDMFFGGGGGRMQR	
	101	150
hdj2	ERRGKNVVHQLSVTLEDLYNGATRKLALQKNVICDKCEGRGGKKGAVECC	
Mydj2	ERRGKNVVHQLSVTLEDLYNGATRKLALQKNVICDKCEGRGGKKGAVECC	
	151	200
hdj2	PNCRGTGMQIRIHQIGPGMVQOIQSVCMECOGHGERISPKDRCKSCNGRK	
Mydj2	PNCRGTGMQIRIHQIGPGMVQOIQSVCMECOGHGERISPKDRCKSCNGRK	



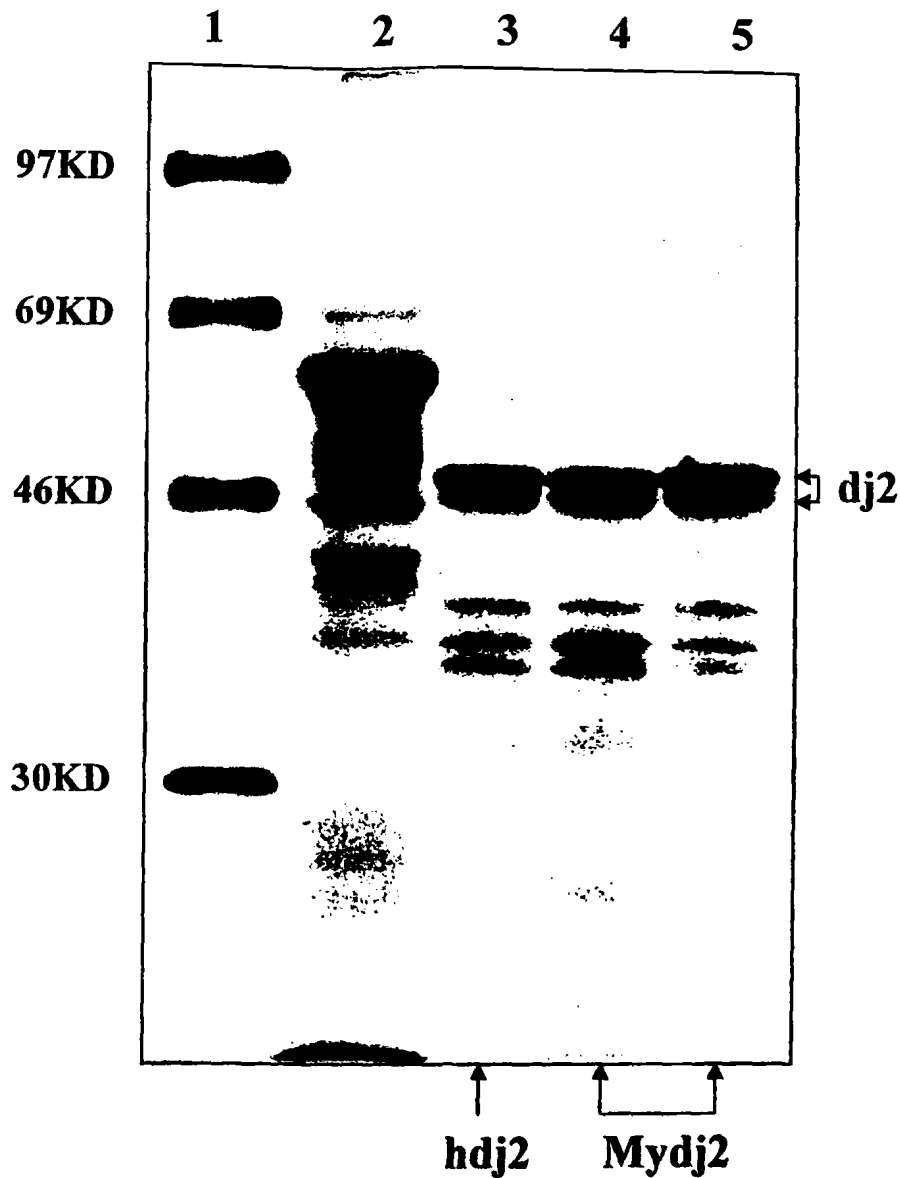
	201	250
hdj2	IVREKKILEVHIDKGMKDGQKITFHGEGDQEPGLEPGDI IIVLDQKDHAV	
Mydj2	IVREKKILEVHIDKGMKDGQKITFHGEGDQEPGLEPGDI IIVLDQKDHAV	
	251	300
hdj2	FTRRGEDLFMCMDIQLVEALCGFHKPISTLDNRTIVITSHPGQIVKHGDI	
Mydj2	FTRRGEDLFMCMDIQLVEALCGFQKPISTLDNRTIVITSHPGQIVKHGDI	
	301	350
hdj2	KCVLNEGMPYRRPYEKGRLLIEFKVNFPENGFLSPDKLSLLEKLLPERK	
Mydj2	KCVLNEGMPYRRPYEKGRLLIEFKINFPENGFLSPDKLSLLEKLLPERK	
	351	397
hdj2	EVEETDEMDQVELVDFDPNQERRRHYNGEAYEDDEHHPRGGVQCQTS-	
Mydj2	EVEETDEMDQVELVDFDPNQERRRHYNGEAYEDDEHHPRGGVQCQTS-	

Από τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει ότι ο κλώνος 5aI που απομονώθηκε από τη βιβλιοθήκη cDNA πιθήκου διαθέτει την πληροφορία για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης κατά 99,5% ομόλογη προς την ανθρώπινη πρωτεΐνη dj2 και η οποία διαφέρει από τη τελευταία μόνο σε δύο αμινοξέα (274: Q αντί H, 326: I αντί V). Προκειμένου να αποδειχθεί πειραματικά η ικανότητα του κλώνου 5aI στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης, όπως αυτή προβλέπεται από την ανάλυση του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου του, προχωρήσαμε στην *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση αυτού, σε σύστημα ελεύθερο δικτυοκυττάρων κουνελιού παρουσία ραδιενεργά σημασμένης μεθειονίνης (βλ. εν. 2.2.4). Στο ίδιο σύστημα εξετάστηκαν παράλληλα τα προϊόντα που παράγονται κατά τη αντίδραση συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης δύο ακόμη cDNAs: α) του γονιδίου της ανθρώπινης dj2 και β) του cDNA του κλώνου 5aI από το οποίο αφαιρέθηκαν οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές. Η χρήση του τελευταίου έγινε προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα οι περιοχές αυτές να παίζουν ρόλο στην μετάφραση του μηνύματος όπως έχει δείχθει για ανάλογες περιπτώσεις (245)

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική ακρυλαμιδίου και τα μεγέθη τους εκτιμήθηκαν μετά από σύγκριση με γνωστά πρωτεϊνικά μοριακά βάρη. Το αποτέλεσμα αυτής της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται στην εικ. 28, η εξέταση της οποίας οδηγεί στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Ο κλώνος 5aI έχει τη δυνατότητα παραγωγής μιας πρωτεΐνης που έχει το ίδιο M.B. με την ανθρώπινη dj2, όπως αυτό προβλέπεται από την ανάλυση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας
- Όπως προβλέπεται από την ανάλυση της αμινοξικής της αλληλουχίας, η dj2 του πιθήκου φέρει στα τέσσερα τελευταία αμινοξέα του (-CQTS), μοτίβο σύμφωνα με το οποίο, η πρωτεΐνη επιδέχεται μετα-μεταφραστικής τροποποίησης στο καρβοξυλικό της άκρο (προσθήκη μιας φαρνεσουλ-ομάδας, είτε μιας γερανυλ-γερανυλ-ομάδας) (166, 261). Στη τροποποίηση αυτή οφείλεται η παρουσία μιας δεύτερης ζώνης σε χαμηλότερο M.B., όπως θα αποδειχθεί στη συνέχεια.
- Τέλος, όπως φαίνεται στη διαδρομή 5, η απουσία των 5' και 3' μη μεταφραζόμενων περιοχών από την αντιδρούσα αλληλουχία του 5aI κλώνου δεν επιφέρει καμμία αισθητή αλλαγή στην παραγωγή της πρωτεΐνης του πιθήκου.





Εικ. 28 Αυτοραδιογραφία από αντίδραση *in vitro* συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης σε εκχύλισμα δικτυοκυττάρων. (1) Πρότυποι πρωτεϊνικοί δείκτες Μοριακών Βαρών. (2) Αντίδραση-μάρτυρας, με υπόστρωμα έτοιμη πλασμιδιακή κατασκευή που είχε ως ένθεμα το cDNA του γονιδίου της λουσιφεράσης. Στις υπόλοιπες αντιδράσεις χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα τα cDNA του γονιδίου hDj2 (3) και του κλώνου 5a1, με τις 5' και 3' UTR αλληλουχίες (4) και χωρίς αυτές (5).

3.4) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Mydj2 ΣΕ E.coli ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΑΥΤΗΣ

3.4.1) Δημιουργία ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Mydj2 σε κύτταρα E.coli

α) Υποκλωνοποίηση ενθέματος του 5aI κλώνου στο φορέα pQE-32

Ο κλώνος 5aI χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της πρωτεΐνης dj2 σε βακτηριακά κύτταρα E.coli. Για το σκοπό αυτό, ολόκληρη η κωδικοποιούσα περιοχή του ενθέματος του κλώνου 5aI αναπαράχθηκε με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας τους εξής εκκινητές:

α) 5' άκρο: 5' GCAGTAGAGGGA $\overline{\text{T}}\overline{\text{C}}\overline{\text{C}}\overline{\text{T}}$ GAAAGAAA 3' (δημιουργία BamHI)

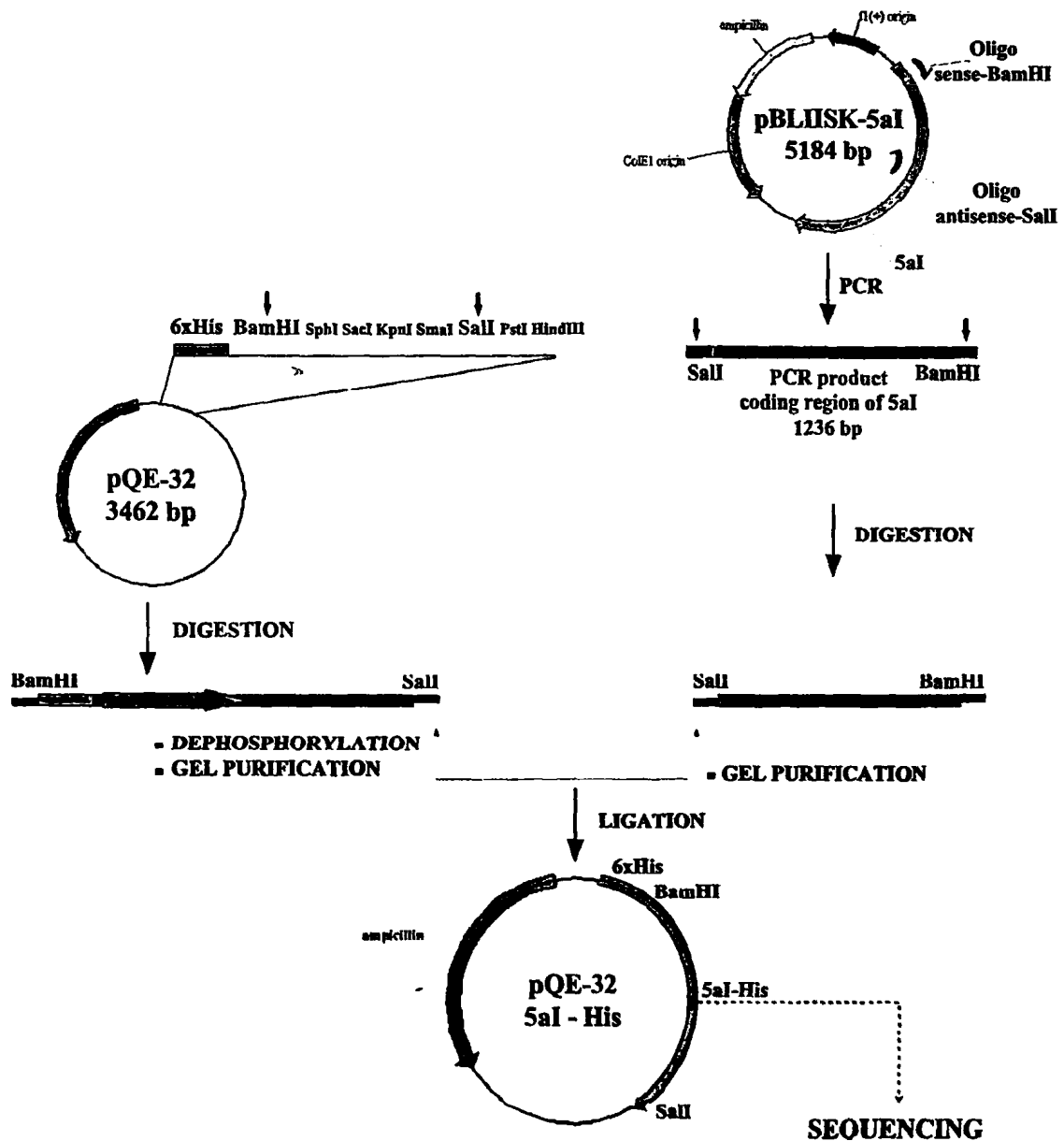
β) 3' άκρο: 5' GTTATTCAGTCGACCATTAAGAGG 3' (δημιουργία Sall)

Κατά τον τρόπο αυτό, δημιουργήθηκαν, στα 5' και 3' άκρα του παραγόμενου προϊόντος, θέσεις κοπής για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και Sall αντίστοιχα (εικ. 29). Η θέσεις αυτές, ήταν κατάλληλες για την υποκλωνοποίηση του τμήματος αυτού σε αντίστοιχες θέσεις της περιοχής κλωνοποίησης του φορέα έκφρασης pQE-32 και έτσι ώστε η κωδικοποιούσα περιοχή της πρωτεΐνης dj2 να είναι εντός του ίδιου αναγνωστικού πλαισίου με αλληλουχία του φορέα που περιελάμβανε έξι κωδικόνια για το αμινοξύ ιστιδίνη (εικ. 29). Το αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή μιας χίμαιρας πρωτεΐνης αποτελούμενης από την πρωτεΐνη Mydj2 και μιας επιπρόσθετης αλληλουχίας στο αμινοτελικό της άκρο, που συμπεριελάμβανε έξι ιστιδίνες (απαραίτητες για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης) καθώς και δέκα ακόμη αμινοξέα από την περιοχή κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα. Έτσι τελικώς, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Mydj2-His είναι ελαφρώς μεγαλύτερη (~1.8 kDa) σε σχέση με την φυσική πρωτεΐνη όπως φαίνεται και στις εικόνες

Η πλασμιδιακή κατασκευή που προήλθε από την υποκλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων του στελέχους M15[pREP4] του E.coli από τα οποία και πραγματοποιήθηκε μεγάλης κλίμακας παρασκευή πλασμιδιακού DNA. Τέλος, η ορθότητα της κατασκευής ελέγχθηκε με ανάγνωση αλληλουχίας βάσεων των περιοχών σύνδεσης μεταξύ του ενθέματος και του φορέα pQE.

β) Υπερέκφραση της MyDj2 σε κύτταρα M15[pREP4] και απομόνωση αυτής από στήλη Ni-NTA αгарόζης

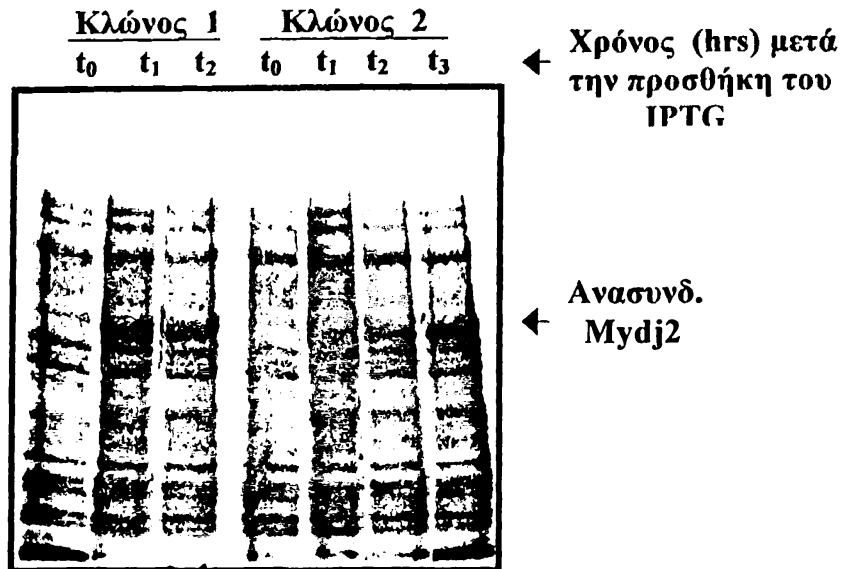




Εικ. 29 Υποκλωνοποίηση της κωδικοποιούσας περιοχής του κλώνου *5aI* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης *pQE-32*, με σκοπό την παραγωγή της χίμαιρας πρωτεΐνης *MydJ2*, η οποία φέρει στο αμινοτελικό της άκρο αλληλουχία έξι επιπλέον ιστιδινών

Όπως ειπώθηκε, η προκύπτουσα πλασμιδιακή κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό επιδεικτικών κυττάρων M15[pREP4]. Τα δε, μετασχηματισμένα κύτταρα επιλέχθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο, παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών. Στη συνέχεια, 10–20 βακτηριακοί κλώνοι εξετάστηκαν με τη διαδικασία επιλογής μικρής κλίμακας, μετά από επαγωγή με IPTG ορισμένης συγκέντρωσης (1mM). Στη συνέχεια, οι θετικοί κλώνοι που επιλέχθηκαν, επάχθηκαν παρουσία κλίσης συγκέντρωσης IPTG, προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση του επαγωγέα στην οποία προκαλείται η μέγιστη υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, στα πλαίσια ενός χρονοδιαγράμματος διάρκειας τεσσάρων ωρών. Στην εικ. 30 παρουσιάζονται δύο βακτηριακοί κλώνοι που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη *MydJ2*, μετά από επαγωγή με 1mM IPTG.

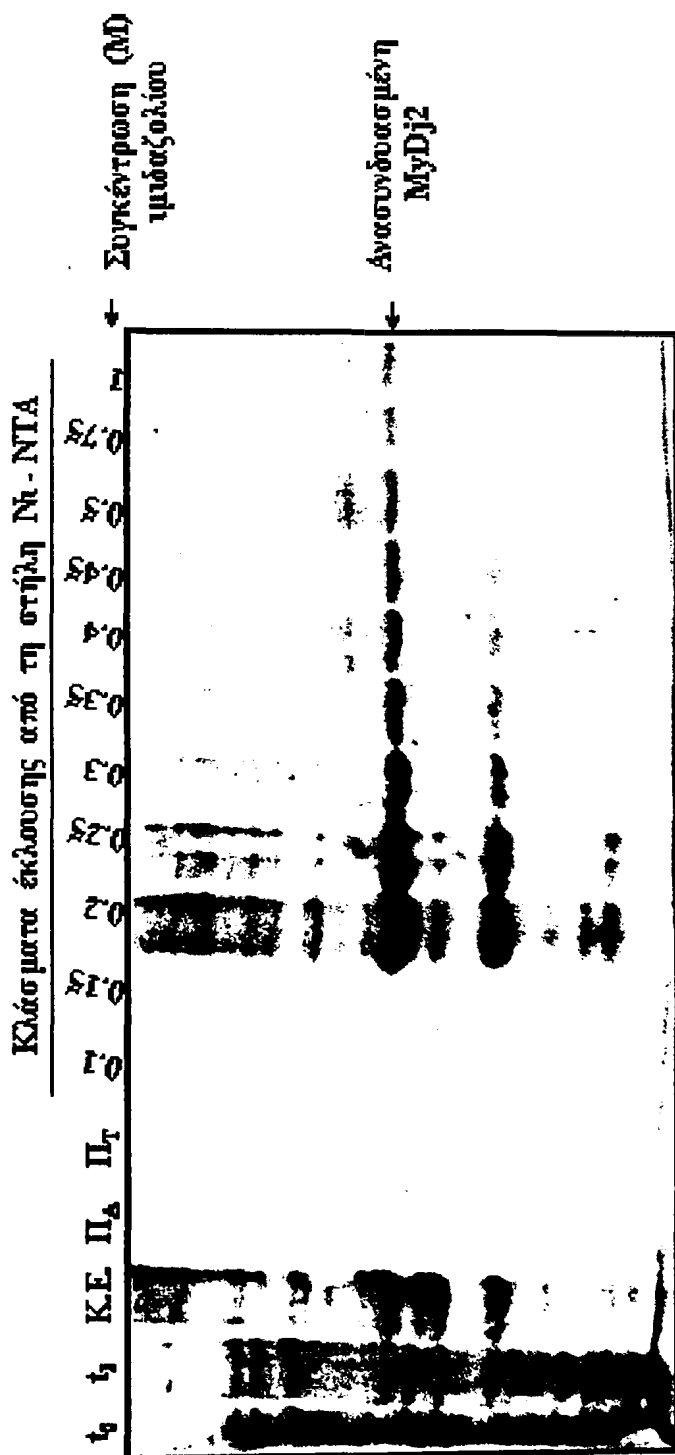




Εικ. 30 Επιλογή βακτηριακών κλώνων που υπερεκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Mydj2. Η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με χορήγηση IPTG (1mM), στον χρόνο t_0 , ενώ δείγματα των καλλιιεργειών απομακρύνθηκαν στους χρόνους που αναγράφονται και τα κύτταρα υπέστησαν λύση. Τα ληφθέντα πρωτεϊνικά κλάσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS και η υπερέκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης ελέγχθηκε με χρώση Coomassie.

Μετά την απομόνωση των βακτηριακών κλώνων που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Mydj2, προχωρήσαμε στον έλεγχο της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, στα κυτταρικά κλάσματα που λαμβάνονται κατά τη διαδικασία. Διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη Mydj2 ανευρίσκεται στο διαλυτό κλάσμα των κυττάρων, γεγονός που επέτρεψε την απομόνωση της σε φυσική διαμόρφωση, με διαδικασία επιλογής μεγάλης κλίμακας και καθαρισμό με τη βοήθεια στήλης Ni-NTA αραρόζης. Το αποτέλεσμα της τελευταίας παρουσιάζεται στην εικ. 31 από την οποία εξαγόνται οι εξής παρατηρήσεις:

- Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (Mydj2-His tag) εκλούεται από τη στήλη αραρόζης Ni-NTA ταυτόχρονα με άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες, οι οποίες, όμως, συμμετέχουν σε ένα μικρό ποσοστό στο συνολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, όπως αυτό διαμορφώνεται μετά την έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη, με την χρήση αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου
- Σε όλες τις απόπειρες απομόνωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και παρά τις αυστηρές συνθήκες καθαρισμού που σταδιακά χρησιμοποιήθηκαν, εμφανίζεται μια πρωτεϊνική ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους, η οποία θα πρέπει να αποτελεί ειδικό προϊόν της πλασμιδιακής κατασκευής. Αυτό γιατί: α) εμφανίζεται μόνο στα εκχυλίσματα των θετικών βακτηριακών κλώνων, β) υπερεκφράζεται στα ίδια επίπεδα με το κύριο πρωτεϊνικό προϊόν που παράγεται από την πλασμιδιακή κατασκευή και γ) έχει την ίδια συγγένεια για τη στήλη Ni-NTA που έχει και η πρωτεΐνη Mydj2 όπως αποδεικνύεται από την ανάλυση των ενδιάμεσων και τελικών κλασμάτων της στήλης καθαρισμού. Τα παραπάνω, δικαιολογούν την υπόθεση ότι η ζώνη αυτή αντιπροσωπεύει μία ελλιπή (truncated) μορφή της Mydj2, που φέρει τις έξι ιστιδίνες και η οποία πιθανώς να παράγεται από πρώιμο τερματισμό της μετάφρασης.



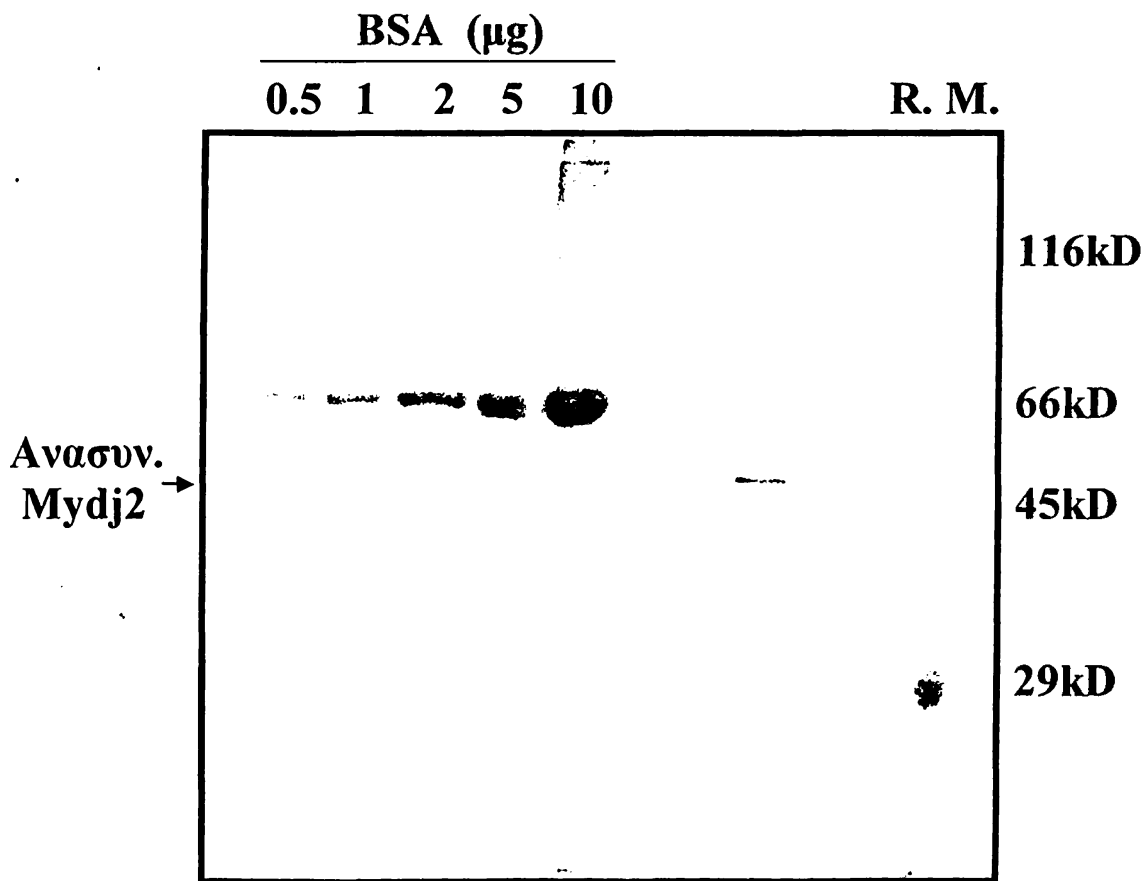
Εικ. 31 Απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης MydJ2 με τη βοήθεια σφαιριδίων αφαρόξης -Ni-NTA από βακτηριακά εκχυλίσματα. Η σταδιακή έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (0.1-1 M). Δείγματα από τα κλάσματα έκλυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδου-SDS και η καθαρότητα της παρασκευής ελέγχθηκε με χρώση Coomassie (t_0 , t_1 : χρόνοι επαγωγής (hours) της έκφρασης με IPTG, K.E.: κυτταρικό εκχύλισμα μετά το πέρασμα του από τη στήλη, ΠΔ και ΠΤ: πλάσμα σφαιριδίων αρχικό και τελικό αντίστοιχα)

Οι παραπάνω λόγοι επέβαλλαν την χρήση επιπλέον βημάτων καθαρισμού, με τη βοήθεια άλλων μεθόδων προκειμένου η απομονωμένη πρωτεΐνη να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως καθαρό αντιγόνο για παρασκευή ειδικών αντί-dj2 πολυκλωνικών αντισωμάτων. Για το σκοπό αυτό, η συνολική ποσότητα του τελικού εκλούσματος της πρωτεΐνης Mydj2 ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου και η πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχεί σε αυτήν απομονώθηκε με τη διαδικασία της ηλεκτροέκλουσης (βλ. εν. 2.4.2). Στη συνέχεια, ακολούθησαν διαδοχικές διαπιδύσεις, συμπύκνωση της πρωτεΐνης με λυοφιλισμό και επαναιώρηση της σε κατάλληλο όγκο. Τέλος, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος με τη βοήθεια φωτομέτρησης (Bio-Rad protein assay). Με βάση τις μετρήσεις αυτές, η ποσότητα της καθαρής πρωτεΐνης Mydj2, που απομονώθηκε τελικώς, ισοδυναμούσε με 2 mg/250 ml βακτηριακής καλλιέργειας. Η τελική απομόνωση της καθαρής πρωτεΐνης Mydj2 παρουσιάζεται στην εικ. 32.

3.4.2) Παρασκευή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Mydj2 σε κουνέλια

Καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Mydj2, ποσότητας 100μg, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να παρασκευαστεί πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης αυτής σε κουνέλια. Η διαδικασία που ακολούθηθηκε περιγράφεται στην ενότητα 2.4.3.

Μετά και τη δεύτερη ένεση του μίγματος αντιγόνου, έλαβε χώρα λήψη αίματος



Εικ. 32 Ηλεκτροφόρηση δείγματος καθαρής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Mydj2, μετά και την απομόνωση της από πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS, με ηλεκτροέκλουση. Σε παράλληλες διαδρομές ηλεκτροφορήθηκαν γνωστές ποσότητες αλβουμίνης (BSA) για ποσοτική σύγκριση καθώς και χρωμοφόροι πρωτεϊνικοί δείκτες μοριακών βαρών (Rainbow Markers, SIGMA)



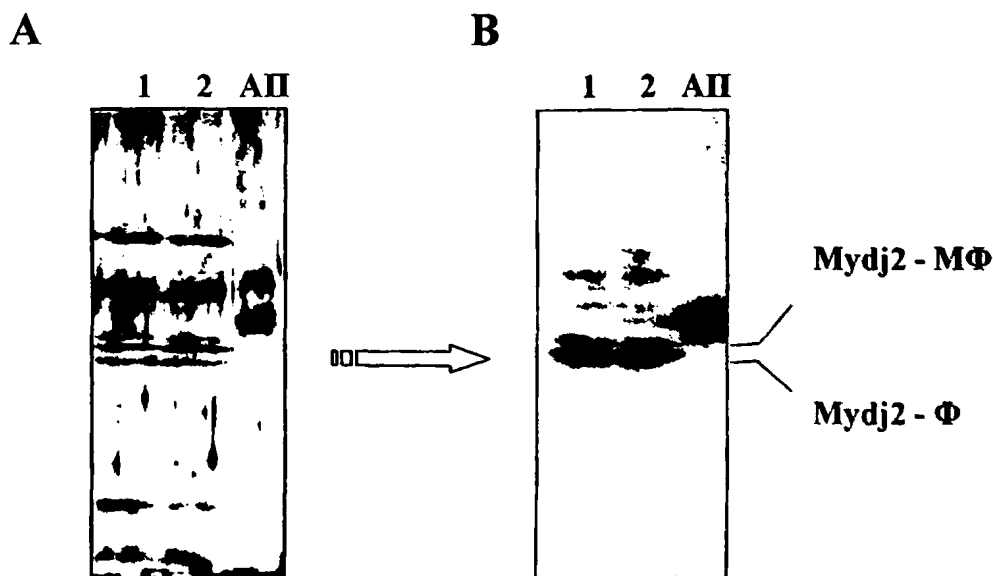
από τον οργανισμό και, εν συνεχεία, απομόνωση του αντιορού από το αίμα, με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Ο έλεγχος και η τιτλοδότηση του παραχθέντος αντισώματος έγινε με τη βοήθεια ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, προερχόμενα από κύτταρα CV1, τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμιδίου. Το αποτέλεσμα αυτής της ανάλυσης παρουσιάζεται στην εικ. 33Α.

Όπως γίνεται φανερό από την εικόνα, το αντίσωμα αναγνωρίζει τόσο την ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη Myd_j2 όσο και τις ενδογενείς μορφές αυτής. Ταυτόχρονα, όμως, ο αντιορός εμφανίζει ειδικότητα για μια σειρά άλλων ζωνών του πρωτεϊνικού προφίλ των κυττάρων CV1, παρά τις διαφορετικές συνθήκες που εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκαν κατά τις ανοσοαποτυπώσεις ελέγχου. Στις τελευταίες, παρατηρήθηκε, επίσης, ότι ο τίτλος του αντισώματος είναι χαμηλός, όπως αποδείχθηκε με την χρήση βαθμιαία αυξανόμενων συγκεντρώσεων αντιορού έναντι αυξανόμενων ποσοτήτων πρωτεΐνης Myd_j2.

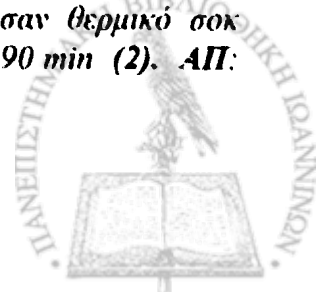
Για τους παραπάνω λόγους πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια οι εξής βελτιωτικές κινήσεις:

- Αύξηση του τίτλου του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Myd_j2 στον αντιορό του ανοσοποιημένου κουνελιού, με τη βοήθεια δύο συνεχόμενων υπενθυμιστικών ενέσεων μίγματος αντιγόνου-CFA, με χρονική απόσταση μεταξύ τους 30 ημερών και,
- Ενίσχυση της ειδικότητας του αντιορού, που λαμβάνεται μετά τη τελευταία υπενθυμιστική ένεση, με απομόνωση του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Myd_j2, με την βοήθεια χρωματογραφίας αγγιστείας. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.4.4.

Το ενισχυτικό αποτέλεσμα των παραπάνω γίνεται φανερό στην εικ. 33B όπου παρουσιάζεται ανοσοαποτύπωση στην οποία γίνεται χρήση του καθαρού αντισώματος έναντι της Myd_j2 και η οποία είναι απολύτως συγκρίσιμη με αυτήν της εικ. 33Α.



Εικ. 33 Καθαρισμός πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Myd_j2 και έλεγχος του αντιορού με ανοσοαποτύπωση, πριν (A) και μετά (B) τον καθαρισμό του. Κατά την ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων CV1, τα οποία είτε αναπτύχθηκαν στους 37°C (1), είτε υπέστησαν θερμικό σοκ στους 43°C για 90 min και επαναφορά στους 37°C για άλλα 90 min (2). ΑΠ: ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη Myd_j2.



3.5) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Mydj2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ

3.5.1) Μελέτη της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που επιδέχεται η πρωτεΐνη Mydj2

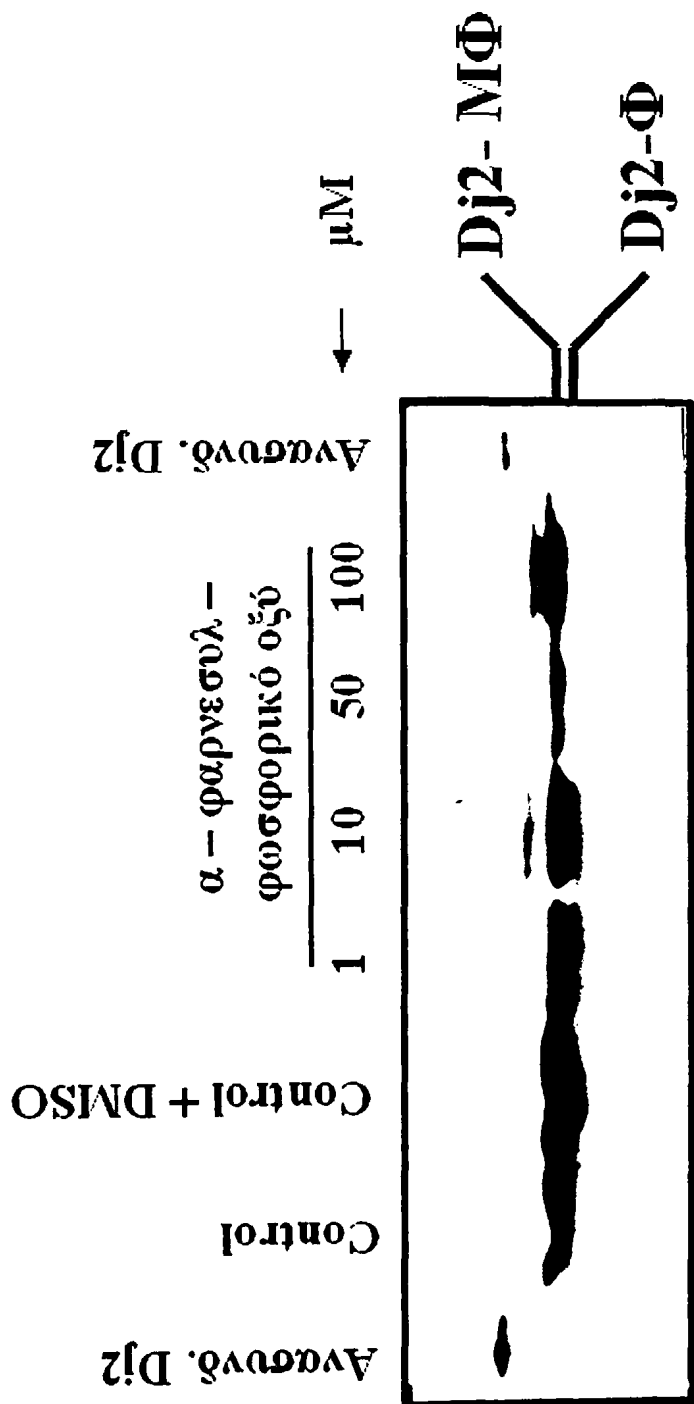
Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, τα τέσσερα τελικά αμινοξέα -CQTS όπου C= κυστεΐνη, Q= γλουταμίνη, T= θρεονίνη, S= σερίνη- της πρωτεΐνης Mydj2, όπως αυτά προβλέπονται από την μετάφραση του αναγνωστικού της πλαισίου, αντιστοιχούν στο γνωστό πρότυπο CAAX (όπου C = κυστεΐνη, A= αλειφατικό αμινοξύ και X= οποιοδήποτε αμινοξύ), το οποίο είναι υπεύθυνο για την μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης που το εμπεριέχει. Η τροποποίηση αυτή, πραγματοποιείται με την αποκοπή των τριών τελικών αμινοξέων από ειδικά ένζυμα που αναγνωρίζουν το πρότυπο αυτό και τη ταυτόχρονη προσθήκη στην εναπομείνουσα τελική κυστεΐνη μιας φαρνεσυλ-ομάδας ή μιας γερανυλ-γερανυλ-ομάδας (166,261).

Προκειμένου να ελεγχθεί, αν η δεύτερη πρωτεϊνική ζώνη που ανιχνεύεται, ειδικά, από το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Mydj2, αντιπροσωπεύει μια τροποποιημένη μορφή αυτής και ειδικότερα την φαρνεσυλιωμένη της μορφή χρησιμοποιήσαμε ένα γενικό αναστολέα της φαρνεσυλίωσης γνωστό ως ³H-α φαρνεσυλ-φωσφορικό οξύ (SIGMA). Κύτταρα CV1 επώαστηκαν στους 37°C και για 24 h, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του αναστολέα, εκπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα PBS (1X), συλλέχθηκαν και επώαστηκαν με διάλυμα λύσης προκειμένου να ληφθεί ολικό κυτταροπλασματικό εκχύλισμα. Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων για κάθε περίπτωση ηλεκτροφορήθηκαν σε παράλληλες διαδρομές και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με την χρήση του αντισώματος, αντί-Mydj2. Όπως φαίνεται στην εικ. 34, η πρωτεϊνική ζώνη που ανιχνεύεται ειδικά από το αντίσωμα μας, σε χαμηλότερο μοριακό βάρος από την κύρια ζώνη της πρωτεΐνης Mydj2, ελλατώνεται αντιστρόφως ανάλογα με την χρήση αυξανόμενης συγκέντρωσης αναστολέα της φαρνεσυλίωσης. Το γεγονός αυτό, μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι η ζώνη αυτή αντιπροσωπεύει την φαρνεσυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Mydj2.

3.5.2) Μελέτη των ολιγομερών μορφών της πρωτεΐνης Mydj2 με την χρήση ζωνώδους καθίζησης σε προκατασκευασμένη κλίση συγκέντρωσης

Οι δύο μορφές της πρωτεΐνης Mydj2 κατέστη δυνατό να μελετηθούν με την χρήση υπερφυγοκέντρωσης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε προκατασκευασμένη κλίση συγκέντρωσης σουκρόζης. Για τη διαδικασία αυτή, αρχικά, παρασκευάστηκαν





Φ : φαρνεσυλιωμένη
ΜΦ : μη φαρνεσυλιωμένη

Εικ. 34 Έλεγχος της αναστολής της φαρνεσυλίωσης της πρωτεΐνης Myd2 με αναστολή σε πρωτεϊνικά εκχάσματα κύτταρων C57, τα οποία επώστηκαν παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης α-φαρνεσυλ-φωσφορικού οξέος για 24 h στους 37°C. Χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Myd2, το οποίο αναγνωρίζει και τις δύο μορφές της.

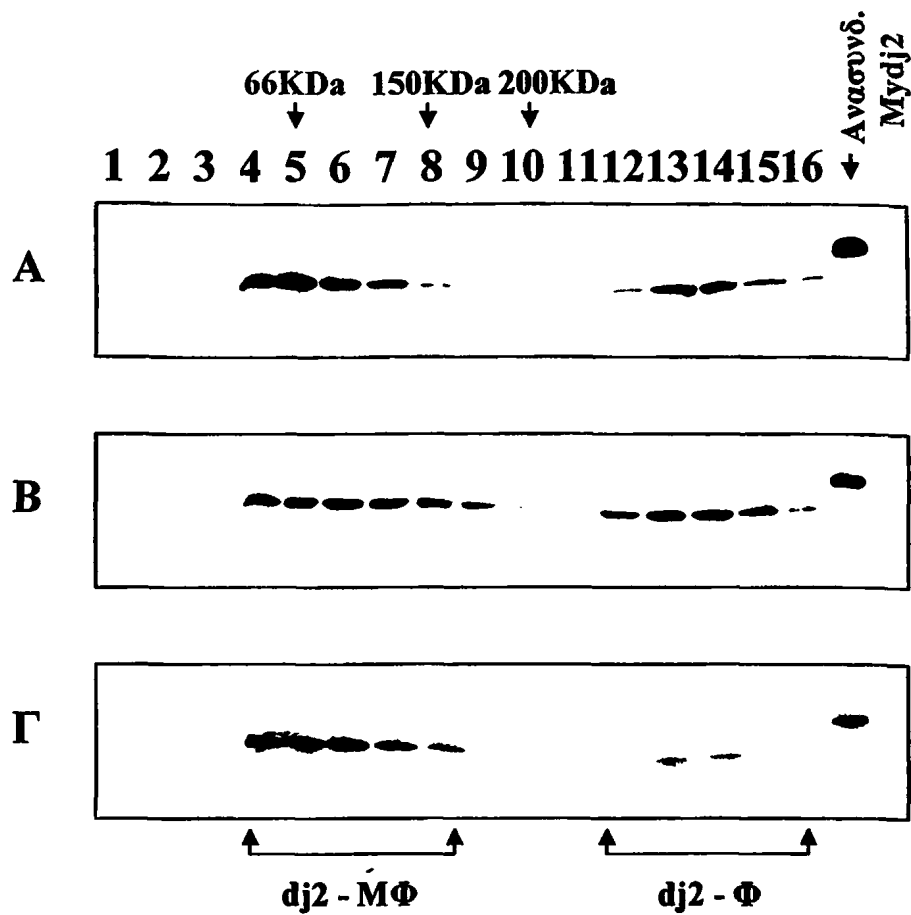
διαλύματα με συνεχή κλίση συγκέντρωσης σουκρόζης (10–30%) σε φυγοκεντρικά σωληνάρια όγκου 5ml, με τη βοήθεια μηχανικού διαβαθμιδωτή. Στη συνέχεια, λήφθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα CV1, τα οποία είτε αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (37°C), είτε υπέστησαν θερμικό σοκ στους 43°C και αφέθηκαν να ανακάμψουν στους 37°C για επιπλέον 160 min. Αμέσως μετά την παρασκευή τους, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επιστρώθηκαν με προσοχή στην επιφάνεια των διαβαθμισμένων διαλυμάτων σουκρόζης και ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση στις 45000 rpm για 17h. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης, διαχωρίστηκαν οι ζώνες των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων σε 16 ίσου όγκου κλάσματα, με την βοήθεια περισταλτικής αντλίας. Σε αυτά προστέθηκε ανάλογος όγκος μετουσιωτικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, προκειμένου να ηλεκτροφορηθούν υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (10%). Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση στην οποία χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της MydJ2 (εικ. 35A,B,Γ).

Όπως γίνεται φανερό, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των δύο μορφών της πρωτεΐνης MydJ2 σε δύο πληθυσμούς, οι οποίοι και επιδεικνύουν διαφορετική κινητικότητα κατά την υπερφυγοκέντρωση, δια μέσου του διαβαθμισμένου διαλύματος σουκρόζης. Η ταυτοποίηση των δύο πληθυσμών έγινε με αναστολή φαρνεσυλίωσης, με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγούμενα (βλ. εν. 3.5.1) και είχε ως αποτέλεσμα τη δραστική ελάττωση των φαρνεσυλιωμένων μορίων, όπως φαίνεται στην εικ. 35Γ. Ο πληθυσμός, ο οποίος απαρτίζεται από τα μη φαρνεσυλιωμένα μόρια, φαίνεται να περιορίζεται στα κλάσματα εκείνα που αντιστοιχούν σε ένα εύρος μοριακών βαρών που ξεκινά περίπου από το υπολογιζόμενο μοριακό βάρος της μονομερούς μορφής της πρωτεΐνης (45KDa) και φθάνει σε τιμές ίσες με το διπλάσιο ή και τριπλάσιο (≤ 150 KDa) μοριακό βάρος αυτής. Σε αντίθεση, ο δεύτερος πληθυσμός μορίων της MydJ2, ο οποίος αποτελείται από τα φαρνεσυλιωμένα μόρια αυτής, εκτείνεται μόνο στα κλάσματα υψηλών μοριακών βαρών (>200 KDa) γεγονός που δεν δικαιολογείται από την προσθήκη της φαρνεσυλ-ομάδας. Τα παραπάνω, παρατηρούνται με ελάχιστες διαφορές τόσο στην περίπτωση που τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προέρχονται από κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί στους 37°C, όσο και στην περίπτωση που αυτά προέρχονται από κύτταρα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ. Αυτό, υποδηλώνει ότι ο παράγοντας στρες δεν έχει καμμία σχεδόν επίδραση στο πρότυπο κλασμάτωσης των δύο μορφών της MydJ2 (εικ. 35A,B).

3.5.3) Ενδοκυτταρική κατανομή των ισομορφών της πρωτεΐνης MydJ2 σε φυσιολογικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ

Ο έλεγχος της ενδοκυτταρικής κατανομής της πρωτεΐνης MydJ2 έγινε σε κύτταρα CV1 τα οποία είτε αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (37°C) είτε υπέστησαν θερμικό σοκ για 120 min στους 43°C και στη συνέχεια επώαστηκαν για άλλα 160 min σε φυσιολογική θερμοκρασία. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, εκκλύθηκαν 2 φορές με διάλυμα PBS (1X) και λύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 2.25β κατά την οποία λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του κυττάρου στα δύο κλάσματα, το κυτταροπλασματικό και το πυρηνικό. Τα υποκυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με την χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της MydJ2. Το αποτέλεσμα της παραπάνω ανοσοαποτύπωσης φαίνεται στην εικ 36., η εξέταση της οποίας, μπορεί να μας οδηγήσει στα εξής συμπεράσματα:





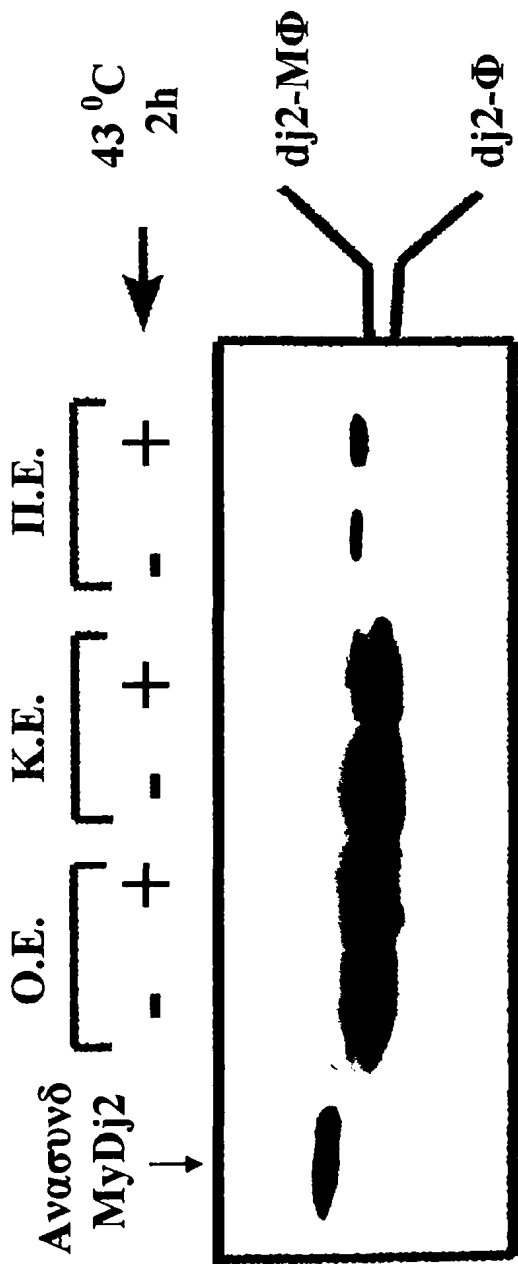
Εικ. 35 Ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που σχηματίζουν οι δύο μορφές της πρωτεΐνης Mydj2. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων CV1, τα οποία είτε αναπτύχθηκαν στους 37°C (A), είτε υπέστησαν θερμικό σοκ στους 43°C για 2 h και επαναφορά στους 37°C για άλλα 160min (B), κλασματώθηκαν με υπερφυγοκέντρωση σε κλίση σουκρόζης στις 45000 rpm, για 17 h. Η ταυτοποίηση των δύο πληθυσμών μορίων, που ανιχνεύονται μετά την κλασμάτωση τους, έγινε με αναστολή της φαρνεσυλίωσης στα κύτταρα CV1, όπως περιγράφηκε προηγούμενα. Φ=φαρνεσυλιωμένη μορφή, ΜΦ=μη φαρνεσυλιωμένη μορφή.

- Και οι δύο μορφές της πρωτεΐνης Mydj2 αντιπροσωπεύουν, κατά κύριο λόγο, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Εδώ, θα πρέπει να επισημανθεί ότι, σε φυσιολογικές συνθήκες, ένα μικρό ποσοστό μόνο της μη φαρνεσυλιωμένης μορφής ανιχνεύεται στο πυρήνα του κυττάρου
- Το θερμικό σοκ δεν ασκεί κάποια ανιχνεύσιμη επίδραση, σε οποιαδήποτε από τις μορφές της πρωτεΐνης Mydj2, όσον αφορά την επαγωγή της έκφρασης τους ή την μετατροπή της μιας μορφής στην άλλη. Αυτό επιβεβαιώθηκε επανειλημμένα χρησιμοποιώντας διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικούς χρόνους επώασης (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Παρόλα αυτά, στην περίπτωση αύξησης της θερμοκρασίας του κυττάρου, παρατηρείται αύξηση της ποσότητας της μη φαρνεσυλιωμένης μορφής, που ανιχνεύεται στο πυρηνικό κλάσμα. Η αύξηση αυτή, μάλιστα, όπως αποδεικνύει η ταυτόχρονη ελάττωση του σήματος αυτής στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, δεν προκύπτει μετά από συνολική επαγωγή της μορφής αυτής σε συνθήκες θερμικού σοκ, αλλά, μάλλον, από απλή μετακίνηση ενός σημαντικού ποσοστού αυτής, από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου.
- Τέλος, σε αντίθεση με την μη φαρνεσυλιωμένη μορφή, η φαρνεσυλιωμένη Mydj2 παραμένει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ανεξάρτητα από την θερμοκρασία καλλιέργειας των κυττάρων.

3.5.4) Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Mydj2 σε φυσιολογικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ

Ο έλεγχος της ενδοκυτταρικής κατανομής της πρωτεΐνης Mydj2, που έγινε όπως αναφέρθηκε με τη βοήθεια ανοσοαποτύπωσης, επιβεβαιώθηκε και με την χρήση της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού, που περιγράφηκε στην ενότητα 2.4.12. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα CV1, τα οποία επιστρώθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες και τα οποία, όπως και προηγουμένως, είτε αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (37°C), είτε υπέστησαν θερμικό σοκ για 120 min, στους 43°C, και στη συνέχεια επώαστηκαν για άλλα 160 min, σε φυσιολογική θερμοκρασία. Τα κύτταρα εκκλήθηκαν δύο φορές, με διάλυμα PBS (1X), μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός, κατά τον οποίον χρησιμοποιήθηκε ως πρωτοταγές αντίσωμα, το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Mydj2, και ως δευτεροταγές, αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών της κατηγορίας IgG του κουνελιού, το οποίο έφερε ομοιοπολικά συνδεδεμένο το χρωμοφόρο της φλουορεσκίνης (anti-rabbit IgG-FITC, SIGMA). Όπως παρατηρείται στην εικ. 40 η πρωτεΐνη Mydj2 σε φυσιολογική θερμοκρασία είναι κύρια μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που εμφανίζει μια διάχυτη κατανομή στο κυτταρόπλασμα με μια ελαφριά πιο έντονη συσσώρευση στο χώρο γύρω από την πυρηνική μεμβράνη. Στην ίδια θερμοκρασία, η Mydj2 ανιχνεύεται ασθενώς στον πυρήνα του κυττάρου. Όμως με την άνοδο, της θερμοκρασίας το προφίλ του εντοπισμού της αλλάζει, καθώς ένα σημαντικό ποσοστό της πρωτεΐνης μεταναστεύει στον πυρήνα με εστίες αυξημένης συγκέντρωσης τους πυρηνίσκους ενώ ταυτόχρονα η εναπομείνουσα πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα ανιχνεύεται συσσωρευμένη σε υποκυτταρικές περιοχές όπως ενδοπλασματικό δίκτυο ή σύστημα Golgi. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν απόλυτα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών κλασμάτων του του κυτταρικού εκχυλίσματος και την εξέτασή τους με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης όπως αυτά περιγράφηκαν στην ενότητα 2.4.10.





Φ : φαρνεσυλιωμένη
 ΜΦ : μη φαρνεσυλιωμένη

Εικ. 36 Έλεγχος με ανοσοαποτύπωση, του ενδοκυτταρικού εντοπισμού και της μετακίνησης των δύο μορφών της πρωτεΐνης MyDj2 υπό φυσιολογικές συνθήκες (37°C) και συνθήκες θερμικού σοκ (43°C, 2 h), σε κύτταρα CV1. Χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της MyDj2 το οποίο αναγνωρίζει και τις δύο μορφές της (O.E.: ολικό εκχύλισμα κυττάρων, K.E.: κυτταροπλασματικό εκχύλισμα και Π.Ε.: πυρηνικό εκχύλισμα)

3.5.5) Διαφορική έκφραση της πρωτεΐνης Mydj2 σε ιστούς αρουραίου και ποντικού

Σε συνέχεια της διαφορικής κατανομής των δύο μεταγραφημάτων του γονιδίου της πρωτεΐνης Mydj2 σε επιλεγμένους ιστούς ποντικού (βλ.εν.3.3.2) εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης για τους ίδιους ιστούς τόσο σε ποντικό όσο και σε αρουραίο. Η απομόνωση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τους ιστούς έγινε με την μεθοδολογία που περιγράφηκε στην ενότητα 2.4.6. Αφού υπολογίστηκε η συνολική ποσότητα των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος με τη βοήθεια φωτομέτρησης (βλ.εν.2.4.7), ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση ισόποσων δειγμάτων για κάθε περίπτωση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης Mydj2 έγινε με τη βοήθεια ανοσοαποτύπωσης κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δύο διαφορετικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης Mydj2:

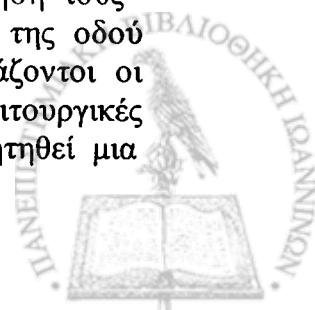
1. Το πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο ολόκληρο το μόριο της καθαρής πρωτεΐνης Mydj2 (βλ.εν.2.4.3). Το αντίσωμα αυτό έχει την ικανότητα, όπως έχει δείχθει προηγουμένως, να αναγνωρίζει και τις δύο μορφές της πρωτεΐνης Mydj2 σε εκχυλίματα κυττάρων θηλαστικών

2. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού το οποίο είναι κατασκευασμένο έναντι του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης hdj2 και για την περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 – 179 (NEOMARKERS, clone KA2A5.6). Το αντίσωμα αυτό μειονεκτεί στο γεγονός ότι αναγνωρίζει μόνο την μη φαρνεσυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης αλλά υπερέχει σε αντιδράσεις ανοσοκαθίζησης αυτής.

Τα αποτελέσματα αυτών των ανοσοαποτυπώσεων παρουσιάζονται στην εικ. 41 και καταδεικνύουν τη διαφορετική έκφραση της πρωτεΐνης Mydj2 στους διάφορους ιστούς που εξετάστηκαν. Συγκρίνοντας, τις εικόνες Α και Β στις οποίες χρησιμοποιούνται τα δύο διαφορετικά αντισώματα έναντι των ίδιων πρωτεϊνικών δειγμάτων, μπορούμε με ασφάλεια να συμπεράνουμε ότι η μορφή της Mydj2 που ανιχνεύεται στους διάφορους ιστούς είναι η μη φαρνεσυλιωμένη. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ζώνες που εμφανίζονται σε υψηλότερο και χαμηλότερο μοριακό βάρος σε σχέση με την κύρια παρατηρούμενη ζώνη και μόνο στην περίπτωση του ιστού του όρχεος. Είναι πιθανόν οι ζώνες αυτές να αντιπροσωπεύουν είτε διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της ίδιας πρωτεΐνης είτε πρωτεΐνες που έχουν προέλθει ως προϊόντα διαφορικής διασύνδεσης όπως αναλύθηκε στην ενότητα 3.2.2.

3.5.6) Αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης Mydj2 με τις πρωτεΐνες συνοδούς της hsp70 κυτταροπλασματικής μηχανής

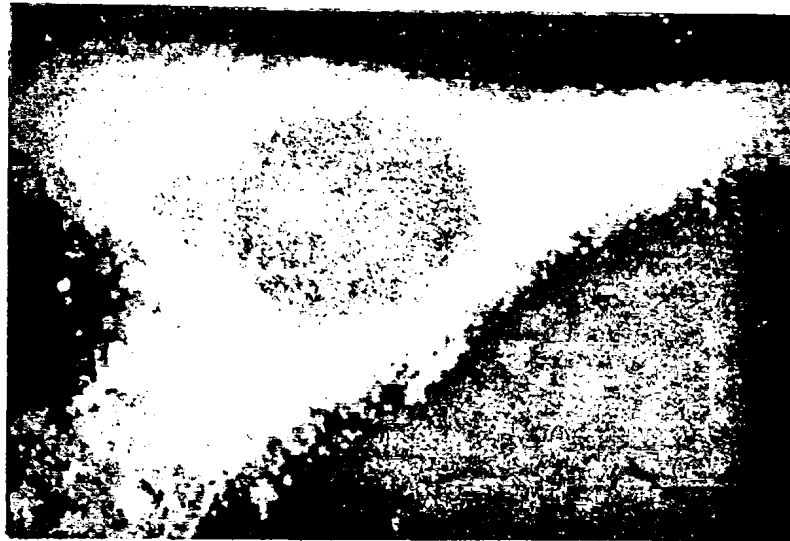
Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα η πρωτεΐνη Mydj2 φέρει όλα τα δομικά χαρακτηριστικά τα οποία επιτρέπουν την κατάταξη της στην οικογένεια των DnaJ πρωτεϊνών. Τα μέλη της οικογένειας αυτής, συνεργάζονται με μέλη της οικογένειας των hsp70 πρωτεϊνών και πιθανόν με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες συνιστώντας πρωτεϊνικές «νανομηχανές» υπεύθυνες για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως, η αναδίπλωση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, η μετακίνησή τους δια μέσου των μεμβρανών του κυττάρου και η απομάκρυνσή τους δια της οδού της αποικοδόμησής τους (8,48,117). Ο τρόπος με τον οποίο συνδυάζονται οι πρωτεΐνες των προαναφερόμενων οικογενειών για να δημιουργήσουν λειτουργικές νανομηχανές δεν είναι πλήρως γνωστός. Ήταν, λοιπόν, επόμενο να αναζητηθεί μια



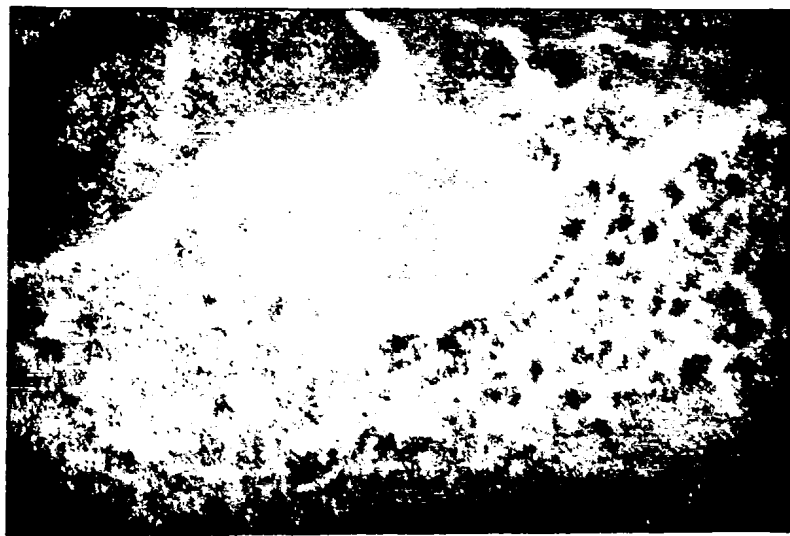
A



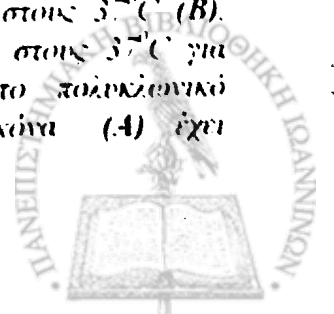
B

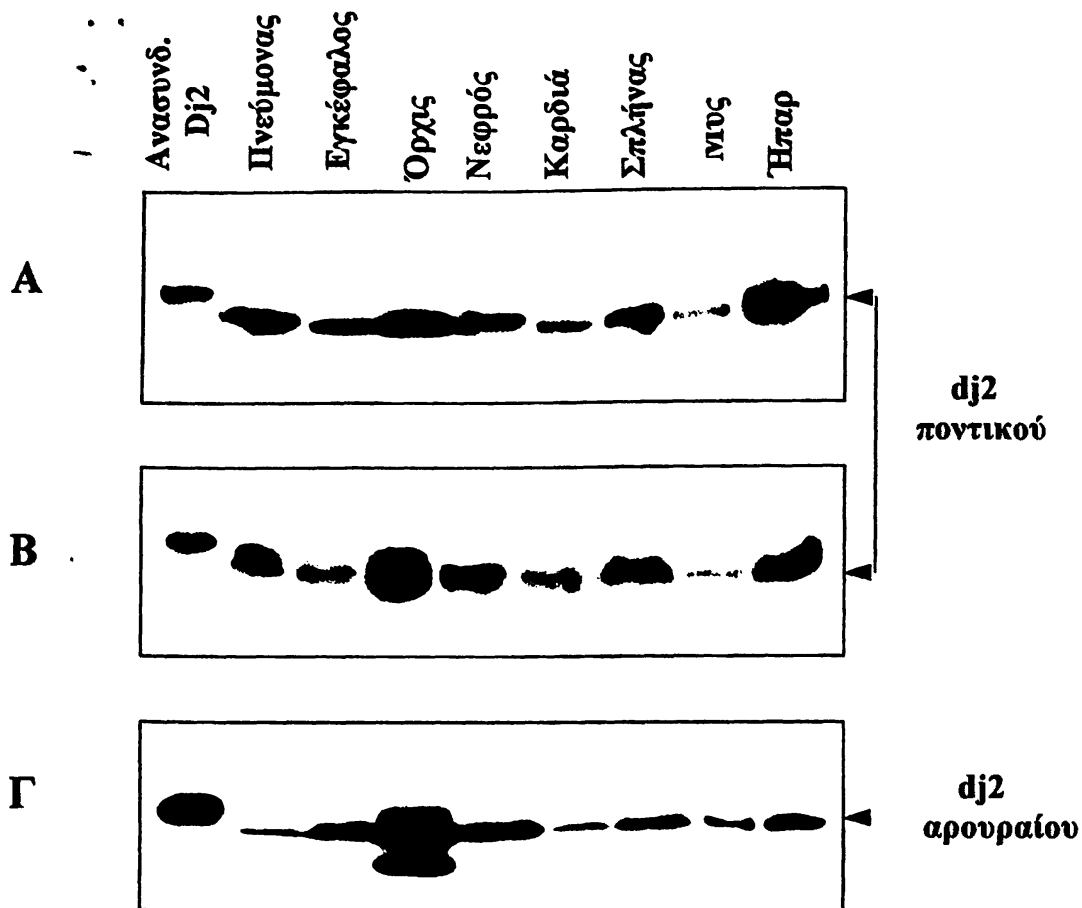


Γ



Εικ. 40 Έλεγχος μη ανοσοφθορισμού της ενδοκυτταρικής κατανομής της πρωτεΐνης MydJ2 σε κύτταρα CV1 τα οποία είτε αναπτύχθηκαν στους 37°C (B), είτε υπέστησαν θερμικό σοκ στους 43°C για 2h και επαναφορά στους 37°C για 160 min (Γ). Στις εικόνες (B) και (Γ) χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης MydJ2 ενώ στην εικόνα (A) έχει χρησιμοποιηθεί μη ανοσοποιημένος ορός κοινού.





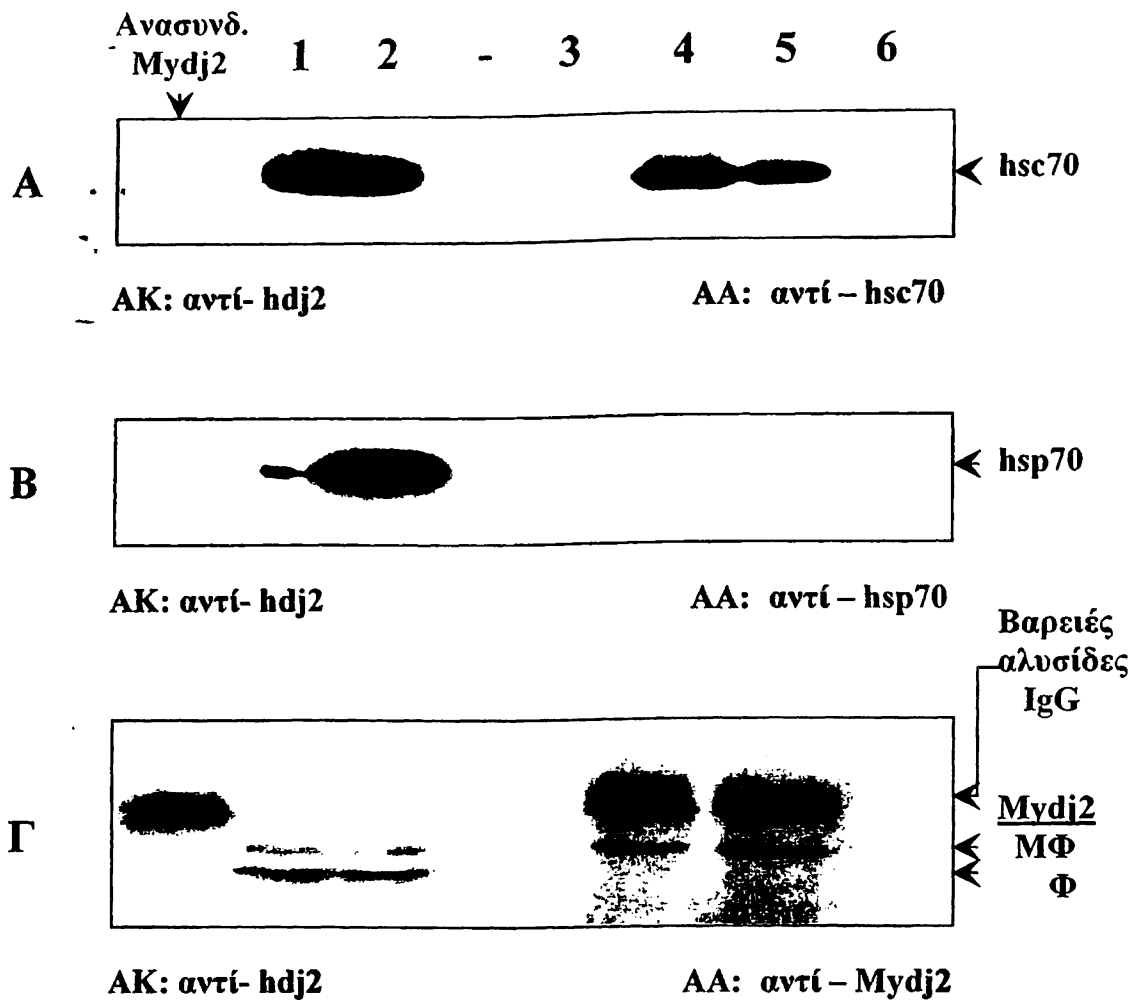
Εικ. 41 Ανοσοαποτύπωση σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από τους αναγραφόμενους ιστούς ποντικού και αρουραίου αντίστοιχα. Σε κάθε διαδρομή ηλεκτροφορήθηκαν 30 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και χρησιμοποιήθηκαν είτε το μονοκλωνικό αντίσωμα (A), είτε το πολυκλωνικό αντίσωμα (B,Γ) έναντι της πρωτεΐνης dj2.

μια πιθανή σύνδεση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Mydj2 με τις πρωτεΐνες hsc70 και hsp70 που θεωρείται ότι εμπλέκονται στην δημιουργία των λειτουργικών αυτών μονάδων. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων CV1 τα οποία είτε αναπτύχθηκαν στους 37°C είτε υπέστησαν θερμικό σοκ στους 43°C για 2 h και επαναφορά στους 37°C για ακόμη 160 min. Τα εκχυλίσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε ανοσοκαθιζήσεις στις οποίες έγινε διαδοχικά χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών Mydj2, hsc70 και hsp70. Ειδικά για την περίπτωση της πρωτεΐνης Mydj2 από τα δύο διαθέσιμα αντισώματα, χρησιμοποιήθηκε κυρίως το μονοκλωνικό αντίσωμα (Neomarkers) επειδή αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό στην απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων σε σύγκριση με το πολυκλωνικό αντίσωμα. Τα αποτελέσματα των ανοσοκαθιζήσεων αναλύθηκαν με την βοήθεια ανοσοαποτυπώσεων οι οποίες παρουσιάζονται στις εικ. 42 και 43.

Οι ανοσοαποτυπώσεις της εικ. 42 αφορούν τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Mydj2 και οι οποίες καθιζάνουν μαζί της παρουσία του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της Mydj2. Είναι φανερό ότι τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες θερμικού σοκ η πρωτεΐνη Mydj2 συνδέεται μόνο με την πρωτεΐνη συνοδό hsc70 και όχι με την hsp70 (εικ. 42, A, B). Μάλιστα η αλληλεπίδραση αυτή αφορά την μη φαρνεσυλιωμένη μορφή της Mydj2 όπως αποδεικνύεται από την ανοσοαποτύπωση που εφαρμόζεται στα παραπάνω ανοσοσυμπλέγματα και στην οποία γίνεται χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της Mydj2 το οποίο, όπως έχει αναφερθεί, αναγνωρίζει και τις δύο μορφές της (εικ. 42, Γ).

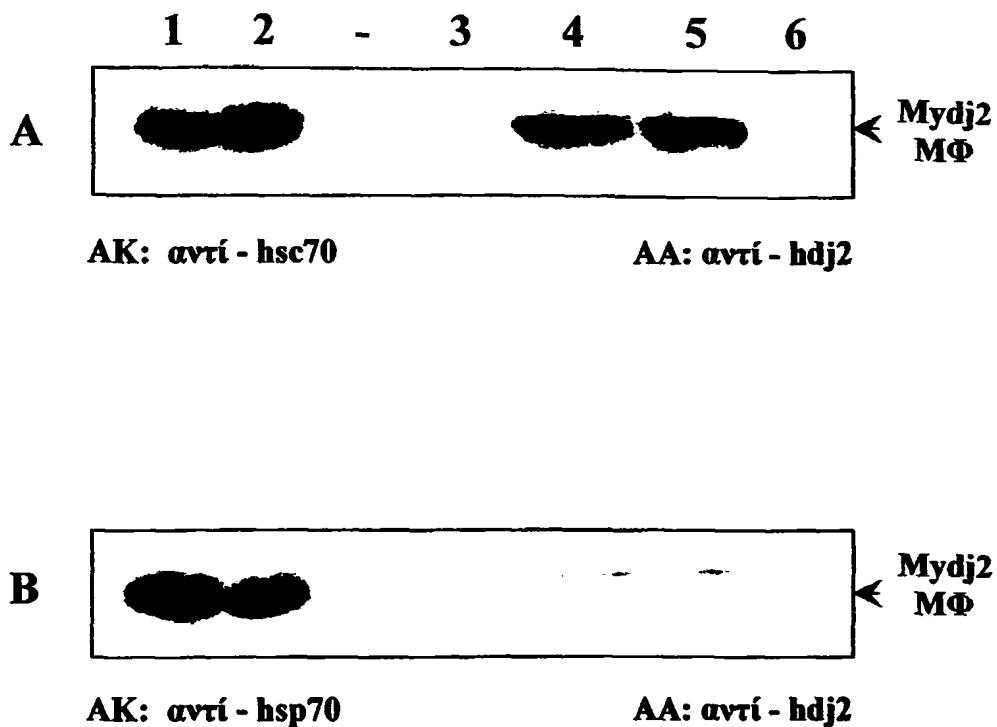
Προς επιβεβαίωση των παραπάνω, έλαβαν χώρα οι αντίστροφες ανοσοκαθιζήσεις, στα ίδια πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, με την χρησιμοποίηση των αντισωμάτων SPA815 και SPA810 ειδικών έναντι των πρωτεϊνών hsc70 και hsp70 αντίστοιχα. Στις εικ. 43 A, B, παρουσιάζονται οι ανοσοαποτυπώσεις αυτών των ανοσοκαθιζήσεων κατά τις οποίες, η ανίχνευση της πρωτεΐνης Mydj2 έγινε δυνατή με την χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι αυτής. Όπως γίνεται φανερό οι αντίστροφες αυτές ανοσοκαθιζήσεις επιβεβαιώνουν με τη σειρά τους το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Mydj2 συμμετέχει στα πρωτεϊνικά συμπλέγματα μόνο της hsc70 (εικ. 43A:4,5) και όχι αυτά της hsp70 (εικ. 43B:4,5). Άρα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η Mydj2 συνδέεται ειδικά με την hsc70 και πιθανόν με άλλους παράγοντες δημιουργώντας μία ειδική κυτταροπλασματική νανομηχανή.





Εικ. 42 Ανοσοκαθιζήσεις παρουσία ειδικού αντισώματος έναντι της *hdj2* (Neomarkers), σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων CV1 τα οποία είτε αναπτύχθηκαν στους 37°C είτε υπέστησαν θερμικό σοκ στους 43°C για 90 min και επαναφορά στους 37°C για άλλα 90 min. Τα ανοσοσυμπλέγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών *hsc70* (A), *hsp70* (B) και *Mydj2* (Γ). Διαδρομή 1: εκχυλίσματα φυσιολογικών κυττάρων, διαδρομή 2: εκχυλίσματα κυττάρων θερμικού σοκ, διαδρομή 4: ανοσοσυμπλέγματα από εκχυλίσματα φυσιολογικών κυττάρων, διαδρομή 5: ανοσοσυμπλέγματα από εκχυλίσματα κυττάρων θερμικού σοκ. Οι διαδρομές 3 και 6 αντιπροσωπεύουν ανοσοσυμπλέγματα ελέγχου καθώς προέρχονται από εκχυλίσματα φυσιολογικών κυττάρων και κυττάρων που υπέστησαν θερμικό σοκ αντίστοιχα, τα οποία επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα παραπάνω απουσία όμως του αντισώματος έναντι της *hdj2*. ΜΦ = μη φαρνεσυλιωμένη μορφή, Φ = φαρνεσυλιωμένη μορφή, AK = ανοσοκαθίξεση, AA = ανοσοαποτύπωση.

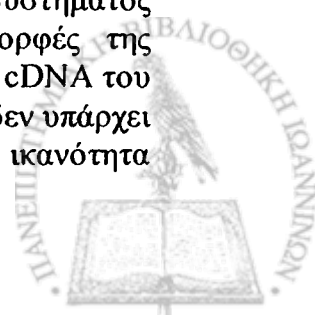




Εικ. 43 Ανοσοκαθιζήσεις παρουσία ειδικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών *hsc70* (A) και *hsp70* (B), σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων CV1 τα οποία είτε αναπτύχθηκαν στους 37°C είτε υπέστησαν θερμικό σοκ στους 43°C για 90 min και επαναφορά στους 37°C για άλλα 90 min. Τα ανοσοσυμπλέγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης *hdj2* (Neomarkers). Διαδρομή 1: εκχυλίσματα φυσιολογικών κυττάρων, διαδρομή 2: εκχυλίσματα κυττάρων θερμικού σοκ, διαδρομή 4: ανοσοσυμπλέγματα από εκχυλίσματα φυσιολογικών κυττάρων, διαδρομή 5: ανοσοσυμπλέγματα από εκχυλίσματα κυττάρων θερμικού σοκ. Οι διαδρομές 3 και 6 αντιπροσωπεύουν ανοσοσυμπλέγματα ελέγχου καθώς προέρχονται από εκχυλίσματα φυσιολογικών κυττάρων και κυττάρων που υπέστησαν θερμικό σοκ αντίστοιχα, τα οποία επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα παραπάνω απουσία όμως του αντισώματος έναντι της *hdj2*. MΦ = μη φαρνεσυλιωμένη μορφή, AK = ανοσοκαθίζηση, AA = ανοσοαποτύπωση.

Το ερευνητικό έργο που αναλύεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, εντάσσεται σε πολύχρονη ερευνητική διαδικασία του εργαστηρίου μας που αφορά την μελέτη του ρόλου που διαδραματίζουν κυρίως τα δύο κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών hsp70 (hsc70 και hsp70) στα κύτταρα των θηλαστικών, σε φαινόμενα όπως το θερμικό σοκ (240), η θερμοανθεκτικότητα (241), η μόλυνση από τον ιό SV40 (242,243,244) κ.α. Μάλιστα, προϊόν αυτής της δραστηριότητας υπήρξε η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών τα οποία και υπερεκφράζουν το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη hsp70. Οι ποντικοί αυτοί χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται ως μοντέλο ελέγχου της δράσης της πρωτεΐνης αυτής, σε επίπεδο οργανισμού, κάτω από στρεσογόνες καταστάσεις (287,288,289). Τη τελευταία δεκαετία, όμως, έχει αναδειχθεί στη βιβλιογραφία η σημασία που έχουν συν-συνοδά μόρια στη συγκρότηση των νανομηχανών, μέσω των οποίων – όπως συνεχώς διαπιστώνεται – ασκούνται κυρίως οι λειτουργίες των πρωτεϊνών hsp70 (3). Δεδομένου ότι ακόμη και σήμερα, δεν είναι τελείως γνωστό κάτω από ποιες συνθήκες, για ποια υποστρώματα και με ποιο τρόπο συνδυάζονται οι συνοδές με τις συν-συνοδές πρωτεΐνες, έτσι ώστε να ασκήσουν την λειτουργία τους κατά περίπτωση, η πλήρης αποσαφήνιση αυτού του πολύ σημαντικού ερευνητικού πεδίου αποτελεί πόλο έλξης για πολλές ερευνητικές ομάδες. Μεταξύ αυτών, και οι δικές μας ερευνητικές προσπάθειες οδηγήθηκαν προς την κατεύθυνση της ανεύρεσης και του χαρακτηρισμού συν-συνοδών μορίων και συγκεκριμένα, μελών της οικογένειας hsp40 καθώς και στην μελέτη της σχέσης τους με τις δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες hsp70 και hsc70 στα κύτταρα των θηλαστικών.

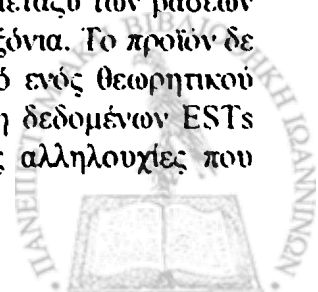
Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, αποφασίστηκε να γίνει η κλωνοποίηση του cDNA μιας πρωτεΐνης hsp40 από μια προπαρασκευασμένη cDNA βιβλιοθήκη, προερχόμενη από κύτταρα του πράσινου Αφρικανικού πιθήκου. Η επιλογή της βιβλιοθήκης αυτής δικαιολογείται από το γεγονός ότι, τα προηγούμενα χρόνια, είχε χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την κλωνοποίηση και των δύο κυτταροπλασματικών μελών της οικογένειας hsp70 (243), ενώ η επιλογή της συγκεκριμένης hsp40 εξηγείται αν ληφθεί υπόψη ότι, μέχρι εκείνη τη στιγμή, το μόνο που ήταν γνωστό για αυτήν ήταν η νουκλεοτιδική αλληλουχία του cDNA της ανθρώπινης ομόλογης της (245). Το τελευταίο μάλιστα, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του ραδιενεργού ανιχνευτή με τον οποίο έγινε η διαλογή της βιβλιοθήκης, μια και εξασφάλιζε θεωρητικά υψηλή προσδοκώμενη συγγένεια προς το υπό ανεύρεση cDNA του πιθήκου. Από τη διαδικασία της διαλογής, απομονώθηκαν 13 θετικοί κλώνοι, εκ των οποίων μόνο ένας πληρούσε τα κριτήρια για να χαρακτηριστεί ως πλήρες μεταγράφημα του γονιδίου dj2 στον πίθηκο. Ο κλώνος ονομάστηκε 5a1 και μετά την αλληλούχησή του αποδείχθηκε ότι διαθέτει υψηλό ποσοστό ομολογίας, σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, με το ανθρώπινο cDNA, το οποίο σε ορισμένες περιοχές έφθανε το 99%. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι ο κλώνος 5a1 ήταν κατά 0.77Kb μεγαλύτερος σε μήκος από το ανθρώπινο cDNA και ότι αυτές οι επιπρόσθετες αλληλουχίες βρισκόταν στην 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή του και όχι εντός της κωδικοποιούσας περιοχής. Το στοιχείο αυτό, σε συνδυασμό με το αποτέλεσμα της συγκριτικής ανάλυσης μεταξύ των παραγόμενων αμινοξικών αλληλουχιών των δύο cDNA, σύμφωνα με το οποίο, οι δύο πρωτεΐνες εμφάνιζαν ποσοστό ομολογίας 99.5%, μας οδηγούσε στο συμπέρασμα ότι ο κλώνος 5a1 ήταν υπεύθυνος για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης, με το ίδιο μοριακό βάρος, όπως και η ανθρώπινη hsp40. Απόδειξη αυτού, λάβαμε με την χρήση ενός *in vitro* συστήματος συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης, στο οποίο παρήχθησαν δύο μορφές της πρωτεΐνης dj2 (όπως προβλεπόταν από την αμινοξική σύσταση), τόσο για το cDNA του πιθήκου όσο και για το ανθρώπινο. Επιπλέον, το πείραμα αυτό απέδειξε ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ των δύο μεταγραφημάτων όσον αφορά την ικανότητα



μετάφρασης τους (translatability), σε αντίθεση με ότι έχει δειχθεί σε ανάλογες περιπτώσεις (246,247). Το γεγονός ότι τα δύο cDNA είχαν την ικανότητα να παράγουν την ίδια πρωτεΐνη, παρόλη την νουκλεοτιδική διαφορά τους στη 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή, ενίσχυε την πιθανότητα ο κλώνος 5aI να αντιπροσώπευε το μοναδικό μεταγράφημα για την πρωτεΐνη dj2, στα κύτταρα πιθήκου.

Η παραπάνω πιθανότητα ελέγχθηκε με ανάλυση κατά Northern, σε ολικό πληθυσμό RNA, που απομονώθηκε από διάφορες κυτταρικές σειρές, οι οποίες αναπτύχθηκαν τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και κάτω από συνθήκες θερμικού σοκ. Η ανάλυση αυτή, έδειξε ότι τόσο στα κύτταρα του πιθήκου όσο και σε αυτά του ανθρώπου παράγονται δύο διακριτοί πληθυσμοί μεταγραφημάτων για την πρωτεΐνη dj2. Ο μεγαλύτερος από τους δύο αντιστοιχεί στον απομονωθέντα από το εργαστήριο μας κλώνο 5aI, ενώ ο άλλος, με μικρότερο μήκος, στο ανθρώπινο cDNA. Αργότερα, η παρουσία αυτών των δύο πληθυσμών επιβεβαιώθηκε και από άλλες ερευνητικές ομάδες, σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (158,248). Στις αναφορές αυτές όμως, αφενός δεν υπάρχουν στοιχεία για την ταυτότητα του μεγαλύτερου μηνύματος που παρατηρείται και αφετέρου, σε μία από αυτές (248), διατυπώνεται η υπόθεση ότι ο πληθυσμός αυτός, πιθανά, να αντιστοιχεί σε πρόδρομα μόρια RNA τα οποία δεν έχουν υποστεί ωρίμανση μέσω διασύνδεσης. Αντίθετα προς αυτό, τα στοιχεία μας καταδεικνύουν, όπως περιγράφηκε και παραπάνω, ότι το μεγαλύτερο μεταγράφημα αποτελεί ένα πλήρως λειτουργικό μόριο, το οποίο διαθέτει την ικανότητα παραγωγής πρωτεΐνης, όπως ακριβώς και το μικρότερο του. Στην ανάλυση κατά Northern ελέγχθηκαν επίσης και τα επίπεδα των δύο μηνυμάτων σε συνθήκες θερμικού σοκ. Όπως διαπιστώθηκε, αυτά δεν αλλάζουν, τουλάχιστον αισθητά, σε κανένα από τους δύο πληθυσμούς, αν και παρατηρήθηκε μια σχετική μείωση στον πληθυσμό του μεγάλου mRNA κάτω από τις συνθήκες αυτές. Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη που δεν επάγεται από το θερμικό σοκ, όπως έχει παρατηρηθεί για άλλα μέλη της οικογένειας hsp40 (249). Η παρατήρηση αυτή, συμφωνεί με άλλες, όσον αφορά την μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου, κάτω από παρόμοιες συνθήκες (248), ενώ διαφωνεί εν μέρει, με τις παρατηρήσεις των Terada και συνεργατών του (158,159), οι οποίες αναφέρονται και πάλι στο ανθρώπινο γονίδιο. Σύμφωνα με αυτές, υπάρχει μια ελαφριά αύξηση της έκφρασης του, κάτω από συνθήκες θερμικού σοκ. Η επαλήθευση του συμπεράσματος ότι πρόκειται για μια μη επαγόμενη από το θερμικό σοκ πρωτεΐνη, έγινε με την βοήθεια πειραμάτων τα οποία και θα συζητηθούν παρακάτω.

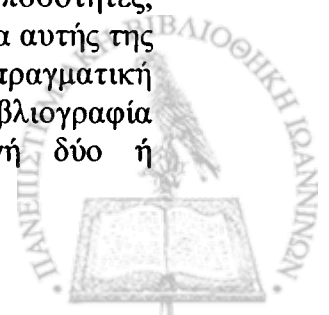
Η αναγνώριση των δύο αυτών πληθυσμών μεταγραφημάτων δημιουργούσε το εύλογο ερώτημα της προέλευσης τους. Τα δύο μηνύματα θα μπορούσαν να προέρχονται είτε από δύο αντίγραφα του ίδιου γονιδίου, με διαφορές στα 3' άκρα τους, είτε από ένα αντίγραφο, το οποίο είχε τη δυνατότητα παραγωγής διαφορετικών μεταγραφημάτων. Για να δοθεί απάντηση στο ερώτημα αυτό, ανατρέξαμε στις γενωμικές βάσεις δεδομένων. Ο ανιχνευτής, που χρησιμοποιήσαμε, ήταν ολόκληρη η αλληλουχία του cDNA της Mydj2, η οποία και αντιπαρατέθηκε προς την αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιού, όπως αυτή έχει καταχωρηθεί μετά τη ολοκλήρωση της χαρτογράφησης της στην τράπεζα δεδομένων ENTREZ nucleotide του NCBI (National Center of Bioinformatics). Το αποτέλεσμα αυτής της αναζήτησης ήταν ο εντοπισμός ενός μόνο γονιδίου της dj2, το οποίο εδράζει στο χρωμόσωμα 9 και συγκεκριμένα στην κυτταρογενετική ζώνη 9p13-p12. Ειδικότερα, το γονίδιο βρίσκεται μεταξύ των βάσεων 33014909 και 33029464 με μήκος 14556 bp και αποτελείται από 9 εξόνια. Το προϊόν δε της διασύνδεσης αυτών των εξονίων προκύπτει από το συνδυασμό ενός θεωρητικού υπολογισμού με πραγματικά στοιχεία που αντλούνται από τη βάση δεδομένων ESTs (Expression Sequence Tags), η οποία και περιλαμβάνει όλες τις αλληλουχίες που



έχουν την ικανότητα δημιουργίας πρωτεϊνικού προϊόντος, άσχετα αν αυτό είναι ήδη γνωστό ή όχι. Στην περίπτωση του γονιδίου της Myd_j2, το αναμενόμενο μεταγράφημα που προκύπτει από τη συγκριτική αντιπαράθεση των 7 καταχωρημένων ESTs (με ομολογία γι αυτό το γονίδιο), σε συνάρτηση πάντα με τα ήδη γνωστά cDNAs, δεν υπερβαίνει τις 1459 βάσεις, όσο δηλαδή περίπου και το ανθρώπινο cDNA. Εάν, όμως, προχωρήσουμε πέρα από το τέλος του γονιδίου χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το 3'UTR του κλώνου 5aI, με τη βοήθεια του λογισμικού νουκλεοτιδικής αντιπαράθεσης BLAST αποκαλύπτεται ότι η αλληλουχία σε προέκταση πάνω στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχει πάνω από 90% ομολογία με αυτή του 3'UTR του κλώνου 5aI. Μάλιστα, και στις δύο αυτές αλληλουχίες βρίσκουμε ακέραια δύο σινιάλα πολυαδενυλίωσης του μηνύματος. Το πρώτο, έχει αλληλουχία AATAA και βρίσκεται σε απόσταση 138 βάσεων καθοδικά από το κωδικό λήξης TAA καθώς και 17 βάσεις ανοδικά από τη θέση προσθήκης της πολύ-(A) ουράς (όπως αυτό αποδεικνύεται από το ανθρώπινο cDNA). Το δεύτερο, έχει αλληλουχία AATATA και βρίσκεται σε απόσταση 973 βάσεων καθοδικά από το κωδικό λήξης TAA και 13 βάσεις ανοδικά από την αναμενόμενη θέση προσθήκης της πολύ-(A) ουράς (όπως αυτό αποδεικνύεται από την αλληλουχία του κλώνου 5aI). Επομένως, από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η παραγωγή των δύο μεταγραφημάτων για την πρωτεΐνη Myd_j2, είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στην έκφραση του αυτού γονιδίου, το οποίο έχει την ικανότητα δημιουργίας δύο μηνυμάτων διαφορετικού μήκους, μέσω του μηχανισμού επιλογής διαφορετικού σινιάλου πολυαδενυλίωσης (alternative polyadenylation) (152,250).

Η θεωρητική ανάλυση του γονιδίου της hdj2 ολοκληρώθηκε με την διερεύνηση των υποκινητικών στοιχείων και την αναζήτηση νουκλεοτιδικών μοτίβων που πιθανά παίζουν ρόλο στην έκφραση του γονιδίου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, καθώς και κάτω από συνθήκες στρες. Με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων ελέγχθηκε μια περιοχή 365 bp, ανοδικά του πρώτου νουκλεοτιδίου του πρώτου εξονίου, θεωρώντας αυτό σαν το σημείο έναρξης της μεταγραφής (ο έλεγχος αυτός δε, επεκτάθηκε για άλλες 600 bp προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα). Κατά την ανάλυση αυτή, φάνηκε ότι το γονίδιο της hdj2 ανήκει σε εκείνη την κατηγορία γονιδίων τα οποία δεν φέρουν πλαίσιο TATA, ενώ, επίσης, δεν αναγνωρίστηκε πλαίσιο CAAT. Αντίθετα, αναγνωρίστηκαν πέντε θέσεις δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μεταγραφική ενεργότητα γονιδίων τα οποία δεν διαθέτουν πλαίσιο TATA (242,243). Το στοιχείο αυτό, σε συνδυασμό με το αυξημένο ποσοστό βάσεων GC, κατά μήκος αυτής της αλληλουχίας, συγκριτικά προς το υπόλοιπο γονίδιο, αποδίδουν στο γονίδιο της hdj2 τα χαρακτηριστικά ενός ιδιοσυστατικού γονιδίου, το οποίο θα πρέπει να διατηρεί σταθερά τα επίπεδα της μεταγραφής του (244, 245). Τέλος, ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα αυτής της ανάλυσης είναι ότι στα υποκινητικά στοιχεία του γονιδίου δεν συμπεριλαμβάνονται νουκλεοτιδικά μοτίβα που αναγνωρίζονται από τον παράγοντα μεταγραφής HSF1, ο οποίος και είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνος για την μεταγραφή των γονιδίων που επάγονται από το θερμικό σοκ (151, 263). Επομένως, αναμένεται η έκφραση του γονιδίου της hdj2 να μην αυξάνει με την άνοδο της θερμοκρασίας. Η μελέτη αυτή παρείχε θεωρητικά συμπεράσματα τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα, αν και χρονικά, τα τελευταία, προηγήθηκαν κατά πολύ αυτής της ανάλυσης.

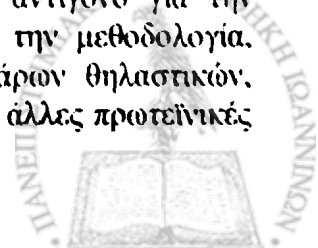
Η παρουσία δύο μηνυμάτων, τα οποία παράγονται από ένα γονίδιο, είναι υπεύθυνα για την δημιουργία της ίδιας πρωτεΐνης και διατηρούνται σε αμέταβλητες ποσότητες, κάτω από συνθήκες στρες, δημιουργεί ερωτηματικά τόσο για τη σκοπιμότητα αυτής της ταυτόχρονης παραγωγής όσο και για το αν η τελευταία αποτελεί μια πραγματική κατάσταση μεταξύ των διαφόρων ιστών του οργανισμού. Στη βιβλιογραφία ανευρίσκονται παρόμοιες περιπτώσεις που αφορούν στην παραγωγή δύο ή



περισσοτέρων μεταγραφημάτων από το ίδιο γονίδιο, τα οποία όμως είτε παράγονται σε διαφορετικό στάδιο διαφοροποίησης (251,252), είτε παράγονται σε διαφορετικούς ιστούς του οργανισμού (253,254,255). Για τους παραπάνω λόγους, προχωρήσαμε σε ανάλυση κατά Northern, χρησιμοποιώντας ολικό πληθυσμό RNA από ένα αριθμό ιστών ποντικού. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι και τα δύο μηνύματα παράγονται σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Παρόλα αυτά, το μικρότερο mRNA είναι το κύριο προϊόν της μεταγραφής του γονιδίου της dj2 -και γενικά σταθερό σε ποσότητα- ενώ το μεγαλύτερο mRNA εμφάνιζε σημαντικές ποσοτικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των εξετασθέντων ιστών. Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις, τα δύο μηνύματα παρουσιάζονταν ισόποσα, γεγονός που πιθανά υποδηλώνει την ιδιαίτερη σημασία της πρωτεΐνης dj2 στους ιστούς αυτούς.

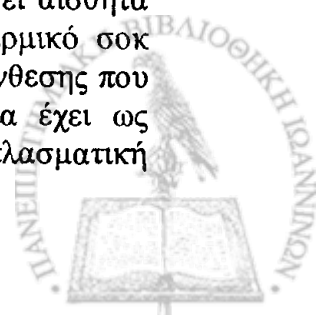
Η ανάλυση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δύο μεταγραφημάτων συνεχίστηκε με τον έλεγχο της σταθερότητας τους. Όπως ειπώθηκε παραπάνω, η κύρια διαφορά τους σε νουκλεοτιδικό επίπεδο είναι μια επιπρόσθετη αλληλουχία μήκους 867 bp, στη 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή του μεγαλύτερου mRNA. Υπάρχουν στη βιβλιογραφία περιπτώσεις γονιδίων τα οποία είναι σε θέση να δημιουργούν περισσότερα του ενός μεταγραφήματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από διαφορετικό βαθμό σταθερότητας (256,257). Αυτό θεωρείται ότι οφείλεται σε σύντομα πρότυπα αλληλουχιών τα οποία εδράζουν στις 5'- και συνήθως στις 3'-μη μεταφραζόμενες περιοχές. Αυτά καθορίζουν τον χρόνο ημιζωής των μεταγραφημάτων καθώς και την ικανότητα να οδηγούνται προς μετάφραση (258,259). Τα στοιχεία αυτά, είναι γνωστά σαν AREs (AU-rich elements) και έχουν ως πρωταρχική λειτουργία την επιλεκτική αποικοδόμηση των μεταγραφημάτων που τα φέρουν. Παρόλα αυτά, έχει δειχθεί ότι κάτω από ειδικές συνθήκες (π.χ. συνθήκες στρες, χημική διέγερση των κυττάρων, κ.α.) μπορεί να συνεισφέρουν αποφασιστικά στη σταθερότητα των μεταγραφημάτων-φορέων τους (260). Παραδείγματα τέτοιων προτύπων αποτελούν αλληλουχίες όπως οι AUUUA και UUAUUUAUU. Στην 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή του 5aI κλώνου ανευρίσκονται διάσπαρτες πέντε επαναλήψεις του προτύπου AUUUA, η ύπαρξη των οποίων άφηγε την πιθανότητα το μεγαλύτερο mRNA να στερείται σταθερότητας, σε σύγκριση πάντα με το μικρότερο αντίστοιχο του. Για τη διερεύνηση αυτής της πιθανότητας, έγινε αναστολή της μεταγραφής σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογική θερμοκρασία και σε κύτταρα που υπέστησαν θερμικό σοκ και στη συνέχεια απομονώθηκε ολικός πληθυσμός RNA στη βάση ενός χρονοδιαγράμματος που διαρκούσε 24 ώρες. Από την ανάλυση κατά Northern που ακολούθησε, αποδείχθηκε για ακόμη μια φορά ότι τα δύο μηνύματα έχουν την ίδια συμπεριφορά, μια και εμφανίζονται το ίδιο σταθερά, με ένα χρόνο ημιζωής περίπου στις 8 ώρες.

Μετά από την εξέταση της συμπεριφοράς του γονιδίου σε μεταγραφικό επίπεδο, προχωρήσαμε στην μελέτη της παραγόμενης από αυτό πρωτεΐνης. Λόγω του ότι μέχρι εκείνη τη στιγμή δεν υπήρχε διαθέσιμο ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης dj2, είτε από κάποια εταιρεία, είτε από κάποια άλλη ερευνητική ομάδα, αποφασίσαμε να παράγουμε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της dj2. Για το σκοπό αυτό το cDNA του κλώνου 5aI υποκλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Η κατασκευή αυτή εξασφάλιζε ότι η παραγόμενη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε βακτήρια θα έφερε στο αμινοτελικό της άκρο έξι επιπρόσθετα κατάλοιπα ιστιδινών, τα οποία θα επέτρεπαν την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε στήλη αгарόζης Ni-NTA και κατά αυτόν τον τρόπο την απομόνωση της καθαρής της μορφής. Η διαδικασία αυτή τελικά απέδωσε αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης, η οποία και χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για την ανοσοποίηση κουνελιών. Το αντίσωμα που προέκυψε με αυτή την μεθοδολογία, ελέγχθηκε με ανοσοαποτίπωση σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων θηλαστικών, όπου και διαπιστώθηκε ότι εκτός της πρωτεΐνης dj2 αναγνώριζε και άλλες πρωτεϊνικές



ζώνες. Για τον λόγο αυτό και προκειμένου να διασφαλιστεί το αξιόπιστο των αποτελεσμάτων μας, το πολυκλωνικό αυτό αντίσωμα υπέστη ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού με χρωματογραφία αγγιστείας. Σε αυτήν, καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη dj2 χρησιμοποιήθηκε για ακόμη μια φορά προκειμένου να επιλεγεί ο πληθυσμός εκείνος των ανοσοσφαιρινών που αναγνώριζαν ειδικά μόνο επιτόπους της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Διαθέτοντας πλέον το αντίσωμα στη τελική του μορφή, προχωρήσαμε στην μελέτη της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας, αρχικά, ολικά εκχυλίσματα κυττάρων πθήκου (CV1) τα οποία είχαν αναπτυχθεί είτε σε φυσιολογικές συνθήκες, είτε σε συνθήκες θερμικού σοκ. Σε όλες τις περιπτώσεις, στις ανοσοαποτυπώσεις που ακολούθησαν, το αντίσωμα μας αναγνώριζε δύο πρωτεϊνικές μορφές της dj2, οι οποίες είχαν παρατηρηθεί και κατά την *in vitro* μεταγραφή-μετάφραση του κλώνου 5a1, καθώς και του ανθρώπινου κλώνου. Η δεύτερη αυτή ζώνη ήταν θεωρητικά αναμενόμενη, λαμβάνοντας υπόψη την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης, αφού σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (166,261) πρωτεΐνες όπως η dj2, οι οποίες στο καρβοξυτελικό τους άκρο φέρουν το αμινοξικό πρότυπο CAAX (όπου C=κυστεΐνη, A=αλειφατικό αμινοξύ και X=οποιοδήποτε αμινοξύ), είναι πολύ πιθανό να επιδέχονται μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που συνίσταται στην προσθήκη είτε μιας φαρνεσυλ- ομάδας, είτε μιας γερανυλ-γερανυλ-ομάδας. Προκειμένου να καθορίσουμε την φύση της τροποποίησης που επιδέχεται η πρωτεΐνη dj2 χρησιμοποιήσαμε ειδικό αναστολέα της φαρνεσυλίωσης. Με τα πειράματα αυτά αποδείχθηκε ότι η dj2 φαρνεσυλιώνεται. Αυτό επιβεβαιώθηκε κατά την χρήση ζωνόδους καθίζησης σε προκατασκευασμένη κλίση συγκέντρωσης σουκρόζης, οπότε και διαπιστώθηκε ότι είναι δυνατός ο επιπλέον διαχωρισμός των δύο πληθυσμών μορίων της dj2 (των φαρνεσυλιωμένων και μη) σε διαφορετικές περιοχές μοριακών βαρών. Έτσι, με την χρήση του παραπάνω αναστολέα της φαρνεσυλίωσης, φάνηκε ότι ο πληθυσμός των μη φαρνεσυλιωμένων μορίων εκτείνεται σε περιοχή που ξεκινά από το υπολογιζόμενο μοριακό βάρος της μονομερούς μορφής (45KDa) και φθάνει σε τιμές που αντιστοιχούν στο διπλάσιο ή και στο τριπλάσιο μοριακό βάρος αυτής. Αντίθετα, ο πληθυσμός των φαρνεσυλιωμένων μορίων εκτείνεται μόνο στα κλάσματα υψηλών μοριακών βαρών (>200KDa), γεγονός που δε δικαιολογείται από την προσθήκη και μόνο της φαρνεσυλ-ομάδας. Σχετικά με την φαρνεσυλίωση των πρωτεϊνών, όπως έχει δειχθεί για ανάλογες περιπτώσεις (262), η τροποποίηση αυτή καθιστά τις πρωτεΐνες που την φέρουν ικανές να αγκυροβολούν στις μεμβράνες του κυττάρου. Επομένως είναι δυνατόν η πρωτεΐνη Mydj2 να εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά μεμβρανών όπως, του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων ή και της πυρηνικής μεμβράνης. Ο πιθανός ρόλος αυτού του εντοπισμού της Mydj2, έχει να κάνει στην διευκόλυνση της μεταφοράς πρόδρομων πολυπεπτιδικών μορίων εντός των οργανιδίων αυτών, είτε συμμετέχοντας μόνο η ίδια ως μοναδικός μοριακός συνοδός στη διαδικασία της μετακίνησης, είτε αποτελώντας πυρήνα προσέλκυσης κυτταροπλασματικών μορίων hsp70, τα οποία είναι και τα κυρίως υπεύθυνα για την ολοκλήρωση της μετακίνησης αυτής. Τέτοια δράση, όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα 6(β), έχει αποδοθεί σε πρωτεΐνες της οικογένειας hsp40, οι οποίες επίσης τροποποιούνται κατά τον ίδιο (156,159) ή παρόμοιο τρόπο (168) και εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Μάλιστα, για μια από αυτές τις περιπτώσεις, οι Carlson και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι η αναλογία των φαρνεσυλιωμένων/μη φαρνεσυλιωμένων μορφών της πρωτεΐνης ydj1 του σακχαρομύκητα, αυξάνει αισθητά εις βάρος των δεύτερων στην περίπτωση που τα κύτταρα υφίστανται θερμικό σοκ (167). Το γεγονός αυτό, ερμηνεύεται προς χάρη της αυξημένης πρωτεϊνοσύνθεσης που παρατηρείται στην περίοδο επαναφοράς μετά το θερμικό σοκ, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων στην κυτταροπλασματική



πλευρά των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων (167). Παρόλα αυτά, τα δικά μας αποτελέσματα δεν συνηγορούν υπέρ αυτής της άποψης αφού ακόμη και σε συνθήκες θερμικού σοκ καμμία διαφορά δεν παρατηρείται, ούτε στις ποσότητες των δύο πληθυσμών, ούτε στην μεταξύ τους αναλογία. Η μόνη παρατήρηση που θα μπορούσε να γίνει, προκύπτει από το διαχωρισμό των δύο πληθυσμών με την χρήση ζωνώδους καθίζησης σε προκατασκευασμένη κλίση συγκέντρωσης σουκρόζης και ηλεκτροφόρηση των κλάσμάτων σε πηκτή σταθερής συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδιου, υπό υποδιατακτικές συνθήκες. Με το σύστημα αυτό, παρατηρείται απλά μια ελαφριά μετακίνηση των δύο πληθυσμών σε συνθήκες θερμικού σοκ, του μεν μη φαρνεσυλιωμένου προς μεγαλύτερα μοριακά βάρη, του δε φαρνεσυλιωμένου σε μικρότερα, γεγονός που σημαίνει ότι, κάτω από συνθήκες στρες, οι δύο μορφές της πρωτεΐνης μεταβάλλουν τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου.

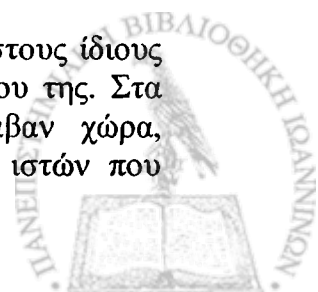
Στη συνέχεια, έχοντας ένα αντίσωμα το οποίο επιβεβαιωμένα πλέον επέτρεπε την αναγνώριση και των δύο μορφών της πρωτεΐνης, προχωρήσαμε στον έλεγχο της ενδοκυτταρικής κατανομής αυτών. Η πραγματοποίηση αυτής της εξέτασης έγινε με διαχωρισμό των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, που λήφθηκαν από κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογική και υψηλή θερμοκρασία, σε δύο κλάσματα: ένα κυτταροπλασματικό και ένα πυρηνικό. Η ανοσοαποτύπωση που ακολούθησε παρείχε σημαντικές πληροφορίες. Αποδείχθηκε ότι και οι δύο μορφές της πρωτεΐνης αποτελούν, κατά κύριο λόγο, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, με την φαρνεσυλιωμένη μορφή να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σχεδόν σε διπλάσια ποσότητα από την μη φαρνεσυλιωμένη. Επίσης, σε φυσιολογικές συνθήκες ανιχνεύεται μια μικρή ποσότητα της τελευταίας στον πυρήνα. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι σε συνθήκες θερμικού σοκ, δεν παρατηρείται καμμία μεταβολή, τόσο ως προς τις ποσότητες της κάθε μιας μορφής ξεχωριστά, όσο και ως προς την αναλογία μεταξύ τους, όπως ειπώθηκε και προηγούμενα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις των Kanazawa και των συνεργατών του, όσον αφορά την ανθρώπινη πρωτεΐνη dj2, οι οποίες αποτυπώνουν μια μικρή έστω επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης σε παρόμοιες συνθήκες θερμικού σοκ (158). Από την άλλη όμως, έρχεται σε συμφωνία με παρατηρήσεις των Davis και των συνεργατών των (248), οι οποίοι δεν διαπιστώνουν οποιαδήποτε ποσοτική μεταβολή της ανθρώπινης dj2 μετά από θερμικό σοκ (248). Τέλος, το πιο σημαντικό ίσως εύρημα που προέκυψε από την ανάλυση αυτής της κατανομής είναι ότι σε αυξημένες θερμοκρασίες ανιχνεύεται μεγαλύτερη ποσότητα, μόνο της μη φαρνεσυλιωμένης μορφής της Mydj2, στο πυρηνικό κλάσμα. Παρατηρώντας ότι, ταυτόχρονα, μειώνεται το κυτταροπλασματικό κλάσμα της μορφής αυτής κατά το θερμικό σοκ, συμπεραίνουμε ότι η αύξηση στο πυρηνικό κλάσμα αυτής οφείλεται σε απλή μετακίνηση κάποιας ποσότητας της μη φαρνεσυλιωμένης πρωτεΐνης, από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, γεγονός που όπως φαίνεται δεν ισχύει σε καμμία περίπτωση για τη τροποποιημένη της μορφή. Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι τα αποτελέσματα των ανοσοαποτυπώσεων, όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες, συμφωνούν με τα αποτελέσματα των αποτυπώσεων κατά Northern, στα οποία, όπως ειπώθηκε, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση του γονιδίου της Mydj2 κάτω από τις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες.

Ο έλεγχος της κατανομής της πρωτεΐνης ολοκληρώθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού, στα οποία έγινε προσπάθεια του κυτταρικού εντοπισμού της Mydj2, κάτω από τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων. Τα πειράματα αυτά, επιβεβαίωσαν την κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματική φύση της πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα, απέδωσαν ένα ασθενή εντοπισμό της στον πυρήνα, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Στην περίπτωση δε του θερμικού σοκ, ανιχνεύθηκε σημαντική ποσότητα της Mydj2 στον πυρήνα και ιδίως στους πυρηνίσκους. Παρόμοιες

μετακινήσεις έχουν παρατηρηθεί και για άλλους μοριακούς συνοδούς και συν-συνοδούς είτε θερμικά επαγόμενους (264,265), είτε εκφραζόμενους αδιάφορα (244,266,159). Παρόλα αυτά, δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη οι αιτίες που προκαλούν αυτού του είδους τις μετακινήσεις, κάτω από ειδικές συνθήκες όπως το θερμικό σοκ ή ιϊκή μόλυνση, αν και έχουν διατυπωθεί διάφορες απόψεις που προσπαθούν να τις δικαιολογήσουν. Έτσι, έχει υποστηριχθεί ότι οι μοριακοί συνοδοί μεταβαίνουν στους πυρηνίσκους προκειμένου να προστατεύσουν τις πρωτεΐνες αυτού του πυρηνικού οργανιδίου και να αποκατασταθούν έτσι, όσο το δυνατό πιο γρήγορα, διαδικασίες όπως η μεταγραφή των rRNA γονιδίων και η συγκρότηση των ριβοσωμάτων μετά το θερμικό σοκ (266,267). Σύμφωνα με μια πρόσφατη θεώρηση (268), κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ, οι πρωτεΐνες hsp70 μπορεί να εμπλέκονται στην μετακίνηση μετουσιωμένων πυρηνικών πρωτεϊνών στους πυρηνίσκους, όπου και αποθηκεύονται για να επαναδιπλωθούν όταν η θερμοκρασία κατέλθει σε επιτρεπτά επίπεδα. Τέλος, έχει βρεθεί ότι μετά από θερμικό σοκ, διάφοροι μοριακοί συνοδοί μετακινούνται στον πυρήνα όπου και συνδέονται με πρωτεΐνες του πυρηνικού πλέγματος (nuclear matrix), με σκοπό την προστασία τους και τη διασφάλιση λειτουργιών όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η επιδιόρθωση του DNA, με τις οποίες έχει συσχετιστεί αυτή η περιοχή του πυρήνα (269,270,271).

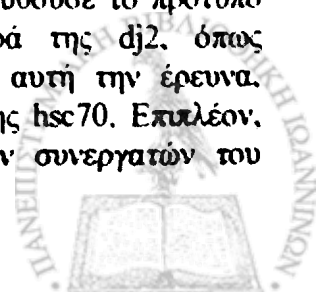
Το αξιοσημείωτο που προέκυψε από τα πειράματα του ανοσοφθορισμού είναι ότι ένα ποσοστό της πρωτεΐνης MydJ2 εντοπίζεται, κάτω από όλες τις συνθήκες, στον περιπυρηνικό χώρο δίνοντας την χαρακτηριστική εικόνα μιάς φωτεινής στεφάνης που περικλείει τον πυρήνα. Το υπόλοιπο δε της πρωτεΐνης, σε φυσιολογική θερμοκρασία παραμένει διάχυτο σε όλο το κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα, στο θερμικό σοκ, παρουσιάζει ένα πρότυπο συσσώρευσης σε υποκυτταρικές περιοχές, πιθανά, γύρω από οργανίδια όπως, το ενδοπλασματικό δίκτυο ή τα μιτοχόνδρια. Εικάζουμε ότι η περιπυρηνική στεφάνη όπως και το πρότυπο συσσώρευσης οφείλονται στην φαρνεσυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης, η οποία κατά το θερμικό σοκ παραμένει στο κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με τη μη τροποποιημένη η οποία εισέρχεται στον πυρήνα, αφήνοντας πίσω της τα συγκεκριμένα πρότυπα χρώσης να γίνουν πιο έντονα αντιληπτά σε κατάσταση σοκ. Αν αυτό είναι και η αλήθεια, τότε ο εντοπισμός αυτός της φαρνεσυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης πρέπει να έχει σχέση με ένα άμεσο ρόλο στη διαδικασία μεταφοράς υποστρωμάτων στα κυτταρικά αυτά οργανίδια. Αυτό μπορούμε να το υποθέσουμε χάρη σε ενδείξεις που έχουν αναφερθεί όσον αφορά την εμπλοκή ομόλογων DnaJ πρωτεϊνών, σε μεταφορά πρόδρομων πολυπεπτιδικών ενώσεων στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή (όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 6β). Πέρα από αυτά όμως, σε καμία περίπτωση δεν έχει αναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να συμμετέχουν στην μεταφορά πρωτεϊνών εντός του πυρήνα, για παράδειγμα, συμμετέχοντας στο σύμπλεγμα του πυρηνικού πόρου (Nuclear Pore Complex). Η πιθανότητα μάλιστα αυτή ενισχύεται από μελέτες που βρίσκουν απαραίτητη την παρουσία των κυτταροπλασματικών hsp70 για την μετακίνηση στον πυρήνα κάποιων πυρηνόφιλων πρωτεϊνών (272,273). Έχει ειπωθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να διευκολύνουν την μεταφορά, καθώς επηρεάζουν την διαμόρφωση των μεταφερόμενων υποστρωμάτων, καθιστώντας τα έτσι προσβάσιμα σε διαλυτούς παράγοντες του συστήματος πυρηνικής εισόδου (π.χ. καρυοφερίνη/ιμπορτίνη ή και σε δομικά στοιχεία του πυρηνικού πόρου (274).

Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης dj2 στους ίδιους ιστούς που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου της. Στα συμπεράσματα, που προέκυψαν από τις ανοσοαποτυπώσεις που έλαβαν χώρα, περιλαμβάνονται η διαφορετική παραγωγή της πρωτεΐνης μεταξύ των ιστών που



εξετάστηκαν και η αντιστοιχία σε γενικές γραμμές της παραγωγής αυτής με την παραγωγή των δύο μηνυμάτων του γονιδίου της *dj2* σε κάθε ιστό. Έτσι για παράδειγμα, στον μυ, όπου τα δύο μεταγραφήματα δεν έχουν ισχυρή παρουσία, αντίστοιχα χαμηλή είναι και η παραγωγή του πρωτεϊνικού προϊόντος. Το αντίθετο ισχύει για τον πνεύμονα, όπου η αυξημένη έκφραση του γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα μια αυξημένη συσσώρευση του πρωτεϊνικού προϊόντος. Επιπλέον, μια πιο προσεκτική εξέταση της εικ. 26, στην οποία παρουσιάζεται η κατανομή των δύο μεταγραφημάτων του γονιδίου της *dj2*, σε αντιπαράθεση με την κατανομή της πρωτεΐνης του στους ίδιους ιστούς, μπορεί να οδηγήσει στην εξής ενδιαφέρουσα παρατήρηση: παρόλο που κάθε ένα μεταγράφημα ξεχωριστά είναι ικανό –όπως ειπώθηκε παραπάνω– να παράγει την πρωτεΐνη *dj2*, η δράση και των δύο δεν φαίνεται να είναι αθροιστική για τη διαμόρφωση της τελικής ποσότητας του προϊόντος. Εάν λοιπόν, η πρωτεΐνη προέκυπτε από την ταυτόχρονη μετάφραση και των δύο μηνυμάτων, τότε στον εγκέφαλο όπου και οι δύο πληθυσμοί έχουν την πιο έντονη παρουσία σε σχέση με κάθε άλλο ιστό, η πρωτεΐνη θα έπρεπε να εμφανίζεται στην μεγαλύτερη ποσότητα της, γεγονός το οποίο δε συμβαίνει. Αντίθετα, στον όρχι και το ήπαρ, όπου η παρουσία των δύο πληθυσμών βρίσκεται σε μέτρια επίπεδα, η παραγόμενη πρωτεΐνη εμφανίζεται στην μεγαλύτερη ποσότητα της. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις, κατά την άποψη μας, αφήνουν να εννοηθεί ότι η δημιουργία της πρωτεΐνης *dj2* είναι αποτέλεσμα όχι ενός απλού μεταφραστικού γεγονότος, αλλά μιας διαδικασίας η οποία περιλαμβάνει κάποιο μηχανισμό ρύθμισης σε μεταγραφικό επίπεδο, πιθανά, μέσω του ελέγχου μετάφρασης του μεγαλύτερου μηνύματος, το οποίο και προσφέρει περισσότερες θέσεις για μια τέτοια ρύθμιση στην εκτεταμένη 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή του.

Μετά από τον χαρακτηρισμό των βασικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης *Mydj2*, που πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των πειραμάτων που αναφέρθηκαν προηγουμένα, αντικείμενο της ερευνητικής μας προσπάθειας αποτέλεσε η διερεύνηση αλληλεπιδράσεων της με άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου. Η προσπάθεια αυτή προσανατολίστηκε προς τα κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας των *hsp70*. Όπως έχει ειπωθεί, η πρωτεΐνη *Mydj2* ανήκει στην οικογένεια των *hsp40* της οποίας, τα μέχρι σήμερα γνωστά μέλη, επιτελούν το καλά χαρακτηρισμένο ρόλο των συν-συνοδών μορίων των μοριακών συνοδών της οικογένειας *hsp70*. Τα τελευταία χρόνια, όπως εκτενώς αναφέρθηκε και στην ενότητα 7, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με την ύπαρξη μιας εξειδικευμένης σχέσης μεταξύ συγκεκριμένων μελών της οικογένειας *hsp40* με συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας *hsp70*. Με δεδομένη την συνεχόμενη αύξηση των νέων μελών της οικογένειας *hsp40*, υπήρχε η ανάγκη αποκωδικοποίησης των περιορισμών που διέπουν τις αλληλεπιδράσεις τους με τις πρωτεΐνες της *hsp70* οικογένειας. Οι περισσότερες των δημοσιεύσεων, σχετικά με το θέμα αυτό, αφορούσαν περιπτώσεις συνεργασίας μελών των δύο οικογενειών, τα οποία μέλη, εντοπίζονται στο εσωτερικό ενδοκυτταρικών οργανιδίων όπου και επιτελούν ειδικές εργασίες (227,229,275). Υπήρχε λοιπόν το ερώτημα, αν η εξειδίκευση αυτής της σχέσης ίσχυε και μεταξύ των κυτταροπλασματικών μελών αυτών των οικογενειών στα κύτταρα των θηλαστικών και συγκεκριμένα των πρωτεϊνών *hsc70* και *hsp70* με τις μέχρι τότε γνωστές *DnaJ* πρωτεΐνες, *dj1* και *dj2*. Μελέτες που αφορούν τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της *dj1* διαπίστωναν την ικανότητα της να συνδέεται και με τις δύο πρωτεΐνες *hsp70* (240,276) παρόλο που η έκφραση της, η κατανομή της και η μετακίνηση της στο κύτταρο, κάτω από ακραίες συνθήκες, ακολουθούσε το πρότυπο της θερμοεπαγόμενης *hsp70*. Από την άλλη, η συμπεριφορά της *dj2*, όπως αποδεικνύεται και από τα πειράματα που παρουσιάστηκαν σε αυτή την έρευνα, ταιριάζει περισσότερο προς το προφίλ της αδιάφορα εκφραζόμενης *hsc70*. Επιπλέον, όπως έχει ειπωθεί, τα *in vitro* πειράματα των Terada και των συνεργατών του



υποστήριζαν ότι η hsc70 μπορεί να συνεργάζεται πιο αποδοτικά με την πρωτεΐνη dj2 παρά με τη dj1, για την μεταφορά πρόδρομων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (232). Με βάση τα παραπάνω, ελέγξαμε την υπόθεση η πρωτεΐνη Mydj2 να αποτελεί το φυσικό συν-συνοδό μόριο στο κύτταρο της πρωτεΐνης hsc70 και όχι της hsp70. Η εξέταση αυτής της υπόθεσης βασίστηκε καταρχήν στην πραγματοποίηση ανοσοκαθιζήσεων κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι όλων των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών. Ειδικά για την πρωτεΐνη Mydj2, από τα δύο διαθέσιμα αντισώματα χρησιμοποιήθηκε κυρίως το μονοκλωνικό αντίσωμα (Neomarkers), επειδή αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό στην απομόνωση των πρωτεϊνικών της συμπλεγμάτων. Επώαση αυτού του αντισώματος με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων CV1, είχε ως αποτέλεσμα την συγκαθίζηση, μαζί με την πρωτεΐνη Mydj2, της πρωτεΐνης hsc70, κάτω τόσο από φυσιολογικές συνθήκες όσο και συνθήκες θερμικού σοκ, ενώ σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε συγκαθίζηση με την πρωτεΐνη hsp70. Με τη βοήθεια των αντίστροφων ανοσοκαθιζήσεων, στις οποίες έγινε χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι κάθε μιας από τις πρωτεΐνες hsp70, επιβεβαιώθηκε η επιλεκτικότητα της πρωτεΐνης Mydj2 να αλληλεπιδρά ειδικά με την hsc70 και όχι με την hsp70. Η ενίσχυση της άποψης που υποστηρίζει αυτή την επιλεκτικότητα προήλθε και από ταυτόχρονα *in vitro* πειράματα (pull down) τα οποία διεξήχθησαν στο εργαστήριό μας και τα οποία αν και δεν παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία έχουν περιληφθεί στη σχετική δημοσίευση (277). Σε αυτά, καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Mydj2, η οποία ήταν ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια αгарόζης, επώαστηκε με εκχυλίσματα κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε παρόμοιες συνθήκες, όπως και παραπάνω. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της Mydj2, που απομονώθηκαν μ' αυτόν τον τρόπο, στη συνέχεια αποκαλύφθηκαν με μια σειρά ανοσοαποτυπώσεων. Στις τελευταίες, ανιχνεύτηκε κάτω από όλες τις συνθήκες ως αλληλεπιδρώσα με την Mydj2 πρωτεΐνη, μόνο η hsc70 και όχι η hsp70.

Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη Mydj2 συμμετέχει ειδικά, μόνο στη συγκρότηση της νανομηχανής της hsc70 και κρίνονται ως ιδιαίτερος σημαντικός, γιατί προσφέρουν ένα ακόμη κομμάτι στην εικόνα που απεικονίζει τις σχέσεις μεταξύ δύο μεγάλων οικογενειών πρωτεϊνών του θερμικού σοκ που αφορούν συνοδά και συν-συνοδά μόρια.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



- Απομονώσαμε και χαρακτηρίσαμε ένα νέο κλώνο cDNA από βιβλιοθήκη κυττάρων πιθήκου ο οποίος μετά την αλληλούχηση του, αναγνωρίστηκε σαν το πλήρες μεταγράφημα του γονιδίου dj2 στον πίθηκο και κατατέθηκε στη τράπεζα δεδομένων GENBANK (AF395203)
- Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου της dj2 έδειξε ότι δεν υπάρχουν ρυθμιστικά στοιχεία για την επαγωγή του από το θερμικό σοκ. Αντιθέτως, υπάρχει η δυνατότητα να παραχθούν περισσότερα του ενός μεταγραφήματα μέσω εναλλακτικής πολυαδενύλωσης
- Υπάρχουν δύο μεταγραφήματα για την dj2 ικανά να κωδικοποιούν για την ίδια πρωτεΐνη. Η έκφραση των μεταγραφημάτων αυτών δεν επάγεται από το θερμικό σοκ και η κατανομή τους είναι διαφορετική σε ιστούς ποντικού
- Η πρωτεΐνη dj2 επιδέχεται μετα-μεταφραστικής τροποποίησης με την προσθήκη μιας φαρνεσυλ-ομάδας. Οι δύο αυτές μορφές (φαρνεσυλιωμένη και μη) αποτελούν κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που δεν επαγόνται από το θερμικό σοκ. Αντίθετα, το θερμικό σοκ προκαλεί την μετακίνηση στον πυρήνα μόνο της μη φαρνεσυλιωμένης μορφής
- Τέλος, μελέτη των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης dj2 με τα κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας των 70 kDa έδειξε ότι η πρωτεΐνη dj2 συνεργάζεται επιλεκτικά μόνο με την hsc70 και όχι με την hsp70



ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια έγινε φανερό ότι τα κυτταροπλασματικά μέλη της 70 KD οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και συγκεκριμένα οι hsp70 και hsc70 συμμετέχουν στις διάφορες κυτταρικές διεργασίες μέσα από τη συγκρότηση νανομηχανών. Σε αυτές τις πρωτεϊνικές μηχανές σημαντική θέση καταλαμβάνουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας Hsp40. Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η εύρεση και ο χαρακτηρισμός της δράσης νέων μελών της οικογένειας Hsp40 στα κύτταρα των θηλαστικών καθώς και η ταυτοποίηση της νανομηχανής την οποία συγκροτεί με μέλη της οικογένειας Hsp70. Για το σκοπό αυτό ανατρέξαμε σε μια βιβλιοθήκη cDNA από κύτταρα COS και με ανιχνευτή το ανθρώπινο cDNA της πρωτεΐνης dj2, απομονώσαμε ένα κλώνο cDNA μήκους 2.2 Kb (5aI), ο οποίος μετά την αλληλούχηση του, αναγνωρίστηκε σαν το πλήρες μεταγράφημα του γονιδίου dj2 στον πύθκο και κατατέθηκε στη τράπεζα δεδομένων GENBANK. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι ο κλώνος 5aI ήταν κατά 0.77 Kb μεγαλύτερος σε μήκος από το ανθρώπινο cDNA. Μετά από αναζήτηση στις γενωμικές βάσεις δεδομένων, το γονίδιο της dj2 εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 9 και συγκεκριμένα στην κυτταρογενετική ζώνη 9p13-p12, με μήκος 14.5 Kb και αποτελούμενο από 9 εξόνια. Επιπλέον θεωρητική ανάλυση της αλληλουχίας του έδειξε ότι μπορεί να διατηρεί σταθερά επίπεδα βασικής έκφρασης τα οποία αναμένεται να μην επηρεάζονται από το θερμικό σοκ και ότι έχει τη δυνατότητα παραγωγής δύο μεταγραφημάτων διαφορετικού μεγέθους, μέσω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, ανιχνεύσαμε δύο διακριτούς πληθυσμούς μεταγραφημάτων του γονιδίου dj2 των οποίων η παραγωγή παραμένει σταθερή τόσο σε φυσιολογική θερμοκρασία όσο και μετά από θερμικό σοκ που υπέστησαν τα κύτταρα. Τα δύο μεταγραφήματα παρουσιάστηκαν το ίδιο σταθερά όσον αφορά το ρυθμό αποικοδόμησης τους μετά από αναστολή της μεταγραφής που εφαρμόσαμε στα κύτταρα για 24 ώρες. Τέλος, με ανάλυση κατά Northern σε RNAs που απομονώθηκαν από διάφορους ιστούς ποντικού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των δύο μηνυμάτων σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Με ένα *in vitro* σύστημα συζευγμένης μεταγραφής-μετάφρασης δείξαμε ότι ο κλώνος 5aI είναι ικανός να παράγει μια πρωτεΐνη με το ίδιο μοριακό βάρος όπως και η ανθρώπινη dj2. Με υποκλωνοποίηση της κωδικοποιούσας περιοχής του κλώνου 5aI σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα (pQE) επιτεύχθηκε η έκφραση μιας χίμαιρας πρωτεΐνης Mydj2 σε βακτήρια. Η καθαρή πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της Mydj2, το οποίο σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης ανίχνευσε, ειδικά, δύο πρωτεϊνικές ζώνες. Αναστολή της φαρνεσυλίωσης σε κύτταρα πιστοποίησε ότι η δεύτερη παρατηρούμενη ζώνη αποτελεί τροποποιημένη μορφή της πρωτεΐνης Mydj2. Διαχωρισμός των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε δύο κλάσματα, κυτταροπλασματικό και πυρηνικό έδειξε ότι και οι δύο μορφές (φαρνεσυλωμένες και μη) είναι κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και ότι η παραγωγή τους δεν επηρεάζεται από την άνοδο της θερμοκρασίας. Επιπλέον δείχθηκε ότι σε φυσιολογικές συνθήκες μόνο η μη φαρνεσυλωμένη μορφή της πρωτεΐνης ανιχνεύεται στον πυρήνα σε χαμηλά επίπεδα, τα οποία και αυξάνουν κατά το θερμικό σοκ από την μετακίνηση κάποιας ποσότητας της μορφής αυτής από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν επιπροσθέτως ότι η μετακίνηση αυτή γίνεται κυρίως προς τους πυρηνίσκους. Πιθανές αλληλεπιδράσεις της Mydj2 με τις hsc70 και hsp70 ελέγχθηκαν με ανοσοκαθιζήσεις στις οποίες φάνηκε ότι τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες θερμικού σοκ η πρωτεΐνη Mydj2 αλληλεπιδρά ειδικά μόνο με την hsc70 και σε καμμία περίπτωση με την hsp70.



SUMMARY

Over the past years it is well known that the mammalian cytoplasmic hsc70 and hsp70 of the 70kD heat shock family proteins participate in the assembly of nanomachines assisted by Hsp40 family proteins. The aim of the present study was the isolation of new Hsp40 family members and the identification of nanomachines assembled with members of the Hsp70 family. We screened a COS cDNA library using the human dj2 cDNA as a probe and isolated a 2.2 Kb clone (5aI) which, following sequencing, was identified as the full transcript of the monkey dj2 gene and submitted to the GENBANK data bank. Sequence analysis showed that the 5aI clone is 0.77 Kb longer than the respective human cDNA. A search through genomic human data bases for the dj2 gene revealed that it maps on chromosome 9 and consists of 9 exons within a molecular size of 14.5 Kb. Theoretical analysis of its sequence showed that it may retain a stable basal expression but is not expected to be influenced by heat shock. It was also shown that the gene is capable of producing two transcripts of different length by alternative polyadenylation. In mammalian cell lines we found two distinct populations of dj2 transcripts of stable production both under normal temperature and heat shock treatment. In addition, these two transcripts were equally stable following inhibition of transcription by actinomycin D for 24h. Moreover, Northern blot analysis confirmed the expression of the two transcripts in all mouse tissues examined. Using an *in vitro* system of coupled transcription-translation we showed that the 5aI clone is capable of producing a protein of the same molecular weight as the human dj2. By subcloning the coding region of the 5aI clone in the bacterial expression vector pQE we produced a chimeric Mydj2-His protein, which was further purified and used for the production of a polyclonal antibody, which detected two specific protein bands in Western blotting analysis. Inhibition of farnesylation showed that the second band observed constitutes the modified form of Mydj2. Experiments in cell extracts with cytoplasmic and nuclear fractions revealed that both forms of the protein (farnesylated and non-farnesylated) are mainly cytoplasmic and their production remains unaffected following heat treatment. Moreover it was shown that under normal conditions, low levels of the non-farnesylated form only were detected in the nucleus with an increase during heat shock due to translocation from cytoplasm to nucleus. By immunofluorescence experiments we showed that this translocation is mainly towards nucleoli and finally, interactions conducted by immunoprecipitation of Mydj2 with either hsc70 or hsp70 led to the conclusion that under both normal and heat shock conditions Mydj2 interacts only with hsc70 and in no case with hsp70.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...



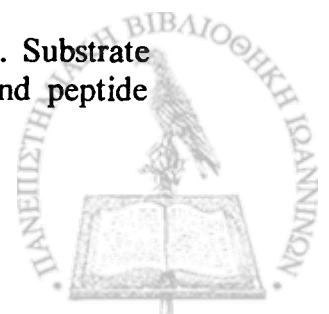
- 1) Georgopoulos C. & Welch W.J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 601-634.
- 2) Anfinsen C.B. (1973). Principles that govern the folding of proteins chains. *Science* 181, 223-230.
- 3) Wetlaufer D.B. (1973). Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70,697-701
- 4) Creighton T.E. (1975). The two-disulphide intermediates and the folding pathway of reduced pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* 25, 167-199
- 5) Creighton T.E. (1990). Protein folding. *Biochem. J.* 270, 1-16
- 6) Ptitsyn O.B. (1991). How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *J. Prot. Chem.* 6, 272-293
- 7) Dill K.A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry.*29,7133-7155
- 8) Hartl F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580
- 9) Agashe R.V. & Hartl F.U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11, 15-25
- 10) Netzer W.J. & Hartl F.U. (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* 388, 343-349
- 11) Dobson C.M. & Karpus M. (1999). The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 92-101
- 12) Zimmerman S. B. & Trach S.O. (1991). Estimation of macromolecular concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Eschericia coli*. *J. Molec. Biol.* 222, 599-620
- 13) Zimmerman S. B. & Minton A.P. (1993). Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 27-65
- 14) Ellis R. J. & Hartl F.U. (1996). Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function *FASEB J.* 10, 20-26
- 15) Kolb V.A., Makeyev E.V. and Spirin A.S (1994). Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *EMBO J.* 13, 3631-7
- 16) Kolb V.A., Makeyev E.V., Kommer A. and Spirin A.S. (1995). Cotranslational folding of proteins. *Biochem Cell Biol.* 73, 1217-20



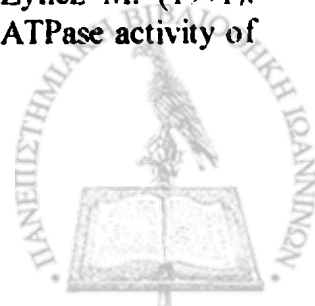
- 17) Gething M.J., McCammon K. & Sambrook J. (1986). Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *J.Cell* 46, 939-950
- 18) Mitraki A. & King J. (1989). Amino acid substitutions influencing intracellular protein folding pathways. *FEBS Lett.* 307, 20-5
- 19) Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D. & Finch JT (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420
- 20) Ellis J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378-379
- 21) Flynn G.C., Pohl J., Flocco M.T. & Rothman J.E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353, 726-730
- 22) Landry S.J., Jordan R., McMacken R. & Gierasch L.M. (1992) Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL *Nature* 355, 455-457
- 23) Hartl F.U., Martin J. and Neupert W (1992). Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 21, 293-322
- 24) Palleros D.R., Reid K.L., Shi L., Welch W.J., Fink A.L. (1993). ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K⁺ but not ATP hydrolysis. *Nature* 365, 664-666
- 25) Szabo A., Langer T., Schroder H., Flanagan J., Bukau B. & Hartl F.U. (1994). The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system-DnaK, DnaJ and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10345-10349
- 26) Buchberger A., Schroder H., Hestekamp T., Schonfeld H.J. & Bukau B. (1996). Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J.Mol. Biol.* 261, 328-333
- 27) Hubbard T.J. & Sander C. (1991). The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein Eng* 4, 711-717
- 28) Zahn R., Spitzfaden C., Ottiger M., Wuthrich K. & Pluckthun A. (1994) Destabilization of the complete protein secondary structure on binding to the chaperone GroEL. *Nature* 368, 261-265
- 29) Goloubinoff P., Mogk A., Zvi P.A., Tomoyasu T. & Bukau B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732-13737
- 30) Schmid F.X., Mayr L.M., Mucke M., Schonbrunner E.R. (1993). Prolyl isomerases : role in protein folding. *Adv. Protein Chem.* 44, 25-66



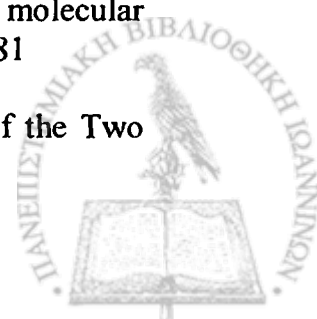
- 31) Freedman R.B., Hirst T.R. & Tuite M.F.(1994). Protein disulfide isomerase : building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* 19, 331-336
- 32) Lindquist S. & Craig E.A. (1988). The heat shock proteins. *Annu.Rev.Genet.* 22,631-677
- 33) Morimoto R.I. (1993). Cells in stress : transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259, 1409-1410
- 34) Khandjian E.W. & Turler H. (1983). Simian virus 40 and polyomavirus induce synthesis of heat shock proteins in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 3, 1-8
- 35) Fink L.A. (1999). Chaperone – mediated protein folding. *Physiological reviews* 79, 425-449
- 36) Flaherty K.M., DeLuca-Flaherty C. & McKay D.B. (1990). Three dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat shock cognate protein. *Nature* 346, 623-628
- 37) Wang T.F., Chang J. & Wang C. (1993). Identification of the peptide binding domain of hsc70. *J. Biol. Chem.* 268, 26049-26051.
- 38) Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F., Gragerov A., Ogata C.M., Gottesman M. & Hendrickson W.A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-1614.
- 39) Flaherty K.M., McKay D.B., Kabsch W. & Holmes K.C. (1991). Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5041-5045.
- 40) Flaherty K.M., Wilbanks S.M., Deluca-Flaherty C. & McKay D.B. (1994). Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. II. Structure of the active site with ADP or ATP bound to wild type or mutant ATPase fragment. *J. Biol. Chem.* 269, 12899-12907.
- 41) Morshauer R.C., Hu W., Wang H., Pang Y., Flynn G.C., Zuiderweg E.R. (1999). High-resolution solution structure of the 18kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70. *J. Mol. Biol.* 289, 1387-1403
- 42) Blond-Elguindi S., Cwirla S.E., Dower W.J., Lipshutz R.J., Sprang S.R., Sambrook J.F. & Gething M.J. (1993). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 75, 717-728
- 43) Gragerov A., Zeng L., Zhao X., Burkholder W.F. & Gottesman M.E. (1994). Specificity of DnaK-peptide binding. *J.Mol.Biol.* 235, 848-854
- 44) Rudiger S., Germeroth L., Schneider-Mergener J. & Bukau B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J* 16, 1501-1507



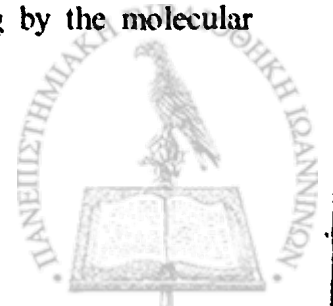
- 45) Beckmann R.P., Mizzen L.A. & Welch W.J. (1990). Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins : implications for protein folding and assembly. *Science*, 248, 850-854
- 46) Scherer P.E., Krieg U.C., Hwang S.T., Vestweber D. & Schatz G. (1990). A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70kd mitochondrial stress protein. *EMBO J.* 9, 4315-4322
- 47) Schatz G. & Dobberstein B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526
- 48) Clarke, A.R. (1996). Molecular chaperones in protein folding and translocation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 43-50
- 49) DeLuca-Flaherty C., McKay DB, Parham P, Hill BL (1990). Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* 62, 875-887
- 50) Lee Y.K., Brewer J.W., Hellman R. & Hendershot L.M. (1999). Bip and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol. Biol. Cell* 10, 2209-2219
- 51) Schlossman D.M., Schmid S.L, Braell W.A. & Rothman J.E. (1985). A role for clathrin light chains in the recognition of clathrin cages by uncoating ATPase. *Nature* 311, 228-231
- 52) Beggah A.I., Mathews P., Beguin P. & Geering K. (1996). Degradation and endoplasmic reticulum retention of unassembled alpha- and beta-subunits of Na,K-ATPase correlate with interaction of BiP. *J.Biol.Chem.* 271, 20895-20902
- 53) Bercovich B., Stancovski I., Mayer A., Blumenfeld N., Laszlo A., Schwartz A.L. & Ciechanover A. (1997). Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates *in vitro* requires the molecular chaperone Hsc70. *J.Biol. Chem.* 272,9002-9010
- 54) Mayer M.P., Laufen T., Paal K., McCarty J.S. and Bukau B. (1999). Investigation of the Interaction between DnaK and DnaJ by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *J.Mol.Biol.* 289,1131-1144
- 55) Caplan A.J., Cyr D.M, and Douglas M.G. (1993). Eukaryotic Homologues of Eschericia coli dnaJ: A Diverse Protein Family That Functions with HSP70 Stress Proteins. *Mol. Biol. Cell* 4, 555-563
- 56) Silver P.A. and Way J.C. (1993). Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell* 74, 5-6
- 57) Liberek K., Marszalek J., Ang D., Georgopoulos C., and Zylicz M. (1991). Eschericia coli dnaJ and grpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of dnaK. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 88, 2874-2878



- 58) Pellechia M., Szyperski T., Wall D., Georgopoulos C. and Wuthrich K. (1996). NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J.Mol.Biol.* 260, 236-250
- 59) Qian Y.Q., Patel D., Hartl F.U. and McColl D.J. (1996). Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J.Mol.Biol.* 260, 224-235
- 60) Tsai J. & Douglas M.G. (1996). A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J.Biol.Chem.* 271, 9347-9354
- 61) Schlenstedt G., Harris S., Risse B., Lill R. and Silver P.A. (1995). A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with Bip/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J.Cell Biol.* 129, 979-988
- 62) Hennessey F., Cheetham M.E., Dirr H.W. & Blatch G.L. (2000). Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress & Chaperones* 5, 347-358
- 63) Wall D., Zylicz M. and Georgopoulos C. (1995). The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone. *J.Biol.Chem.* 270, 2139-2144
- 64) Karzai A.W. and McMacken R. (1996). A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein. *J.Biol.Chem.* 271, 11236-11246
- 65) Yan W. and Graig E. (1999). The Glycine – Phenylalanine – Rich Determines the Specificity of the Yeast Hsp40 Sis 1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7751-7758
- 66) Huang K., Flanagan J.M. and Prestegard J.H. (1999). The influence of C-terminal extension on the structure of the “J-domain” in E.coli DnaJ. *Protein Sci.* 8, 203-214
- 67) Banecki B, Liberek K, Wall D et al (1996). Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. *J. Biol.Chem.* 271, 14840-14848
- 68) Szabo A, Korszun R., Hartl F.U. and Flanagan J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.* 15, 408-417
- 69) Martinez-Yamout M., Legge G.B., Zhang O., Wright P.E. and Dyson H.J. (2000). Solution Structure of the Cysteine - rich Domain of the Escherichia coli Chaperone Protein DnaJ. *J.Mol.Biol* 300, 805-818
- 70) Cyr, D.M., Langer, T. & Douglas, M.G. (1994). DnaJ like proteins : molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.* 19, 176-181
- 71) Linke K., Wolfram T., Bussemer J., and Jakob U. (2003). The Roles of the Two Zinc Binding Sites in DnaJ. *J. Biol.Chem.* 278, 44457–44466



- 72) Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K., and Hartl, F. U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone – mediated protein folding. *Nature* 356, 683–689
- 73) Schroder, H., Langer, T., Hartl, F. U., and Bukau, B. (1993). DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* 12, 4137–4144
- 74) Goffin L. and Georgopoulos C. (1998). Genetic and biochemical characterization of mutations affecting the carboxy-terminal domain of the *Escherichia coli* molecular chaperone DnaJ. *Molecular Microbiology* 30, 329-340
- 75) Johnson J.L. and Craig E.A. (2001). An Essential Role for the Substrate – binding Region of Hsp40 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 152,851-856
- 76) Lu, Z. & Cyr, D. M. (1998b). The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J. Biol.Chem.* 273, 5970-5978
- 77) Lu, Z. & Cyr, D. M. (1998a). Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the hsp40 cochaperones Sis1 and Ydj1. *J. Biol. Chem.* 273, 27824-27830
- 78) Rudiger S. Schneider-Mergener J. and Bukau B. (2001). Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* 20,1042-1050
- 79) Cheetham M. and Caplan A. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress & Chaperones* (1998) 3, 28-36
- 80) Buchberger A., Theyssen H., Schroder, H., McCarty, J.S., Virgallita, G., Milkereit, P., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995). Nucleotide- induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J. Biol. Chem.* 270, 16903–16910
- 81) Ha J.-H., and McKay D.B. (1995). Kinetics of nucleotide-induced changes in the tryptophane fluorescence of the molecular chaperone Hsc70 and its subfragments suggest the ATP-induced conformational change follows initial ATP binding. *Biochemistry* 34, 11635-11644
- 82) Wilbanks S.M., Chen L., Tsuruta H., Hodgson K.O., and McKay D.B. (1995). Solution small-angle X-ray scattering study of the molecular chaperone hsc70 and its subfragments. *Biochemistry* 34, 12095–12106
- 83) Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F., Gragerov A., Ogata C.M., Gottesman M., and Hendrickson W.A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606–1614



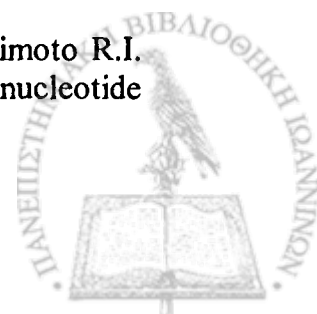
- 84) Schmid D., Baici A., Gehring H. and Christen P. (1994). Kinetics of molecular chaperone action. *Science* 263, 971-973
- 85) Walter S. and Buchner J. (2002). Molecular Chaperones—Cellular Machines for Protein Folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1098-1113
- 86) Gao, B., Yumiko, E., Greene, L. and Eisenberg, E. (1993). Nucleotide binding properties of bovine brain uncoating ATPase. *J. Biol. Chem.* 268, 8507–8513
- 87) McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J. and Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* 249, 126–137
- 88) Theyssen, H., Schuster, H.-P., Bukau, B. and Reinstein, J. (1996). The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* 263, 657–670
- 89) Gamer J., Multhaup G., Tomoyasu T., McCarty J.S., Rudiger S, Schonfeld HJ., Schirra C., Bujard H. and Bukau B. (1996). A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the Escherichia coli heat shock transcription factor sigma32. *EMBO J.* 15, 607-17
- 90) Gao B., Greene L., and Eisenberg E. (1994). Characterization of nucleotide-free uncoating ATPase and its binding to ATP, ADP and ATP analogues. *Biochemistry* 33, 2048–2054
- 91) Jordan R., and McMacken, R. (1995). Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 4563–4569
- 92) Misselwitz B., Staeck O., and Rapoport T. A. (1998). J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol. Cell* 2, 593–603
- 93) Rudiger S., Schneider-Mergener J. and Bukau B. (2001). Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* 20, 1042-1050
- 94) Liberek K., Marszalek J., Ang D., Georgopoulos C., and Zylicz, M. (1991). Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2874–2878
- 95) Dekker, P.J.T., and Pfanner, N. (1997). Role of the mitochondrial GrpE and phosphate in the ATPase cycle of matrix Hsp70. *J. Mol. Biol.* 270, 321–327
- 96) Harrison C.J., Hayer-Hartl M., DiLiberto M., Hartl F.U., Kuriyan J. (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK *Science* 276, 431–35
- 97) Hartl F.U. and Hayer – Hartl M. (2002). Molecular Chaperones in the Cytosol : from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* 295, 1852-1858



- 98) Hohfeld J. (1998). Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights Biol.Chem. 379,269-274
- 99) Hoehfeld J., Minami Y. & Hartl F.U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70 / Hsp40 reaction cycle. Cell 83, 589-598
- 100) Minami Y.,Hohfeld J., Ohtsuka K., Hartl F.U. (1996). Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. J. Biol. Chem. 271,19617-24
- 101) Ziegelhoffer T., Lopez-Buesa P., Craig E.A. (1995). The Dissociation of ATP from hsc70 of *Saccharomyces cerevisiae* Is Stimulated by Both Ydj1p and Peptide Substrate. J. Biol. Chem. 270,10412-19
- 102) Frydman J. (2001). FOLDING OF NEWLY TRANSLATED PROTEINS *IN VIVO*: The Role of Molecular Chaperones. Annu. Rev. Biochem. 70,603-47
- 103) Prapapanich V., Chen S., Toran E.J., Rimerman R.A. & Smith D.F. (1996). Mutational analysis of the hsp70-interacting protein Hip. Mol. Cell Biol. 16, 6200-6207
- 104) Bruce B.D. & Churchich J. (1997). Characterization of the molecular-chaperone function of the heat-shock-cognate-70-interacting protein. Eur. J. Biochem. 245, 738-744
- 105) Shiyong Chen & David F. Smith (1998). Hop as an Adaptor in the Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Hsp90 Chaperone Machinery. J.Biol. Chem. 273, 35194-35200
- 106) Johnson B.D., Schumacher R.J., Ross E.D. & Toft D.O. (1998). Hop modulates hsp70/hsp90 Interactions in Protein Folding. J.Biol. Chem. 273, 3679-3686
- 107) Lamb R.J., Tugendreich S. & Hieter P. (1995). Tetratricopeptide repeat interactions : to TPR or not to TPR? TIBS 20, 257-259
- 108) Scheufler C., Brinker A., Bourenkov G.,Pegoraro S., Moroder L., Bartunik H., Hartl f.u. & Moarefi I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes : critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. Cell 101,199-210
- 109) Gross M. & Hessefort S. (1996). Purification and characterization of a 66-kDa protein from rabbit reticulocyte lysate which promotes the recycling of hsp 70 J.Biol. Chem. 271,16833-16841
- 110) Ballinger C.A., Connell P., Wu Y., Hu Z., Thompson L.J., Yin L.-Y. & Patterson C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. Mol. Cell. Biol. 19,4535-4545



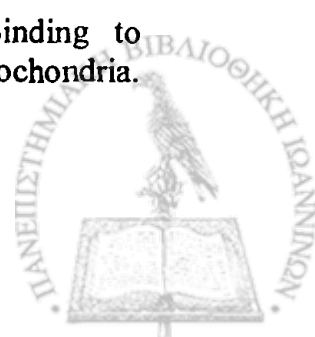
- 111) Kampinga H.H., Kanon B., Salomons A.F., Kabakov E.A. & Patterson C. (2003). Overexpression of the Cochaperone CHIP Enhances Hsp70-Dependent Folding Activity in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4948-4958
- 112) Jihong J., Ballinger A.C., Wu Y., Dai Q., Cyr M.D., Hohfeld J. & Patterson C. (2001). Chip is a U-box – dependent E3 Ubiquitin Ligase. *J.Biol. Chem.* 276,42938-42944
- 113) Hatakeyama S., Yada M., Matsumoto M., Ishida N. & Nakayama K-I (2001). U Box Proteins as a New Family of Ubiquitin-Protein Ligases. *J.Biol. Chem.* 276, 33111–33120
- 114) Hershko A., Ciechanover A. & Varshavsky A. (2000). The ubiquitin system. *Nature Medicine* 6, 1073-1081
- 115) Conell P., Ballinger C.A., Jiang J., Wu Y., Thompson L.J., Hohfeld J. & Patterson C. (2001). Regulation of heat shock protein-mediated protein triage decisions by the co-chaperone CHIP. *Nature Cell Biol.* 3, 93-96
- 116) Meacham G.C., Patterson C., Zang W., Younger J.M. & Cyr D. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nature Cell Biol.* 3, 100-105
- 117) Alberti S., Demand J., Esser C., Emmerich N., Schild H. & Hohfeld J. (2002). Ubiquitylation of Bag-1 Suggests a Novel Regulatory Mechanism during the Sorting of Chaperone Substrate to the Proteasome. *J.Biol. Chem.* 277, 45920-45927
- 118) Hohfeld J., Cyr M.D. & Patterson C. (2001). From the cradle to the grave : molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO reports* 2, 885-890
- 119) Takayama S., Bimston D.N., Matsuzawa S-I., Freeman B.C., Aime-Sempe C., Xie Z., Morimoto R.I. & Reed J.C. (1997). Bag-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J.* 16, 4887-4896
- 120) Zeiner M., Gebauer M. & Gehring U. (1997). Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. *EMBO J.* 18, 5483-5490
- 121) Doong H., Vrailas A. & Kohn C.E. (2002). What's in the 'BAG'?-a functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Letters* 188, 25-32
- 122) Suh W-C, Burkholder W.F., Lu C.Z., Gottesman M.E. and Gross C.A. (1998). Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 95, 15223-15228
- 123) Bimston N.D., Song J. Winchester D., Takayama S., Reed J.C.& Morimoto R.I. (1998). Bag-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *The EMBO J.* 17, 6871-6878



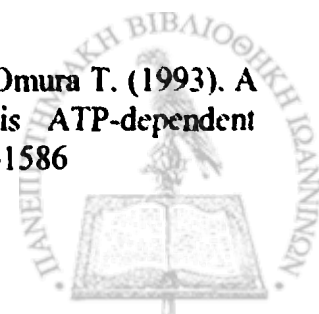
- 124) Nollen A.A.E., Kabakov E.A., Brunsting F.J., Kanon B., Hohfeld J. & Kampinga H.H. Modulation of *in Vivo* HSP70 Chaperone Activity by Hip and Bag-1. *J.Biol. Chem.* 276, 4677-4682
- 125) Hohfeld J. & Jentsch S. (1997). GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *The EMBO J.* 16, 6209-621
- 126) Gassler C.S., Wiederkehr T., Brehmer D., Bukau B. & Mayer M.P. (2001). Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J.Biol.Chem.* 276, 32538-32544
- 127) Sondermann H., Sceufler C., Schneider C., Hohfeld J., Hartl F-U & Moarefi I. (2001). Structure of a Bag /Hsc70 Complex: Convergent Functional Evolution of Hsp70 Nucleotide Exchange Factors. *Science* 291, 1553-1557
- 128) Brehmer D., Rudiger S., Gassler C.S., Klostermeier D. and Packschies L. and Bukau B. (2001). Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nature Struct.Biol.* 8, 427-432
- 129) Luders J., Demand J., Papp O. & Hohfeld J. (2000). Distinct Isoforms of the Cofactor BAG-1 Differentially Affect Hsc70 Chaperone Function. *J.Biol.Chem.* 275, 14817-14823
- 130) Luders J., Demand J. & Hohfeld J. (2000). The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J.Biol.Chem.* 275, 4613-4617
- 131) Demand J., Alberti S., Patterson C. & Hohfeld J. (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone / proteasome coupling. *Current Biology* 11, 1569-1577
- 132) Wiederkehr T., Bukau B. & Buchberger A. (2002). Protein Turnover: A CHIP Programmed for Proteolysis. *Current Biology* 12, R26-R28
- 133) Hohfeld J., Douglas M.C. & Patterson C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO reports* 2, 885-890
- 134) Prasad K., Barouch W., Greene L. & Eisenberg E. (1993). A protein cofactor is required for uncoating of clathrin baskets by uncoating ATPase. *J Biol Chem* 268 . 23758-23761
- 135) Ungewickell E., Ungewickell H., Holstein S.E., Lindner R., Prasad K., Barouch W., Martin B., Greene L.E. & Eisenberg E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378, 632-635
- 136) Umeda A., Meyerholz A. & Ungewickell E. (2000). Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol* 79, 336-342



- 137) Pichvaee B., Costaguta G., Yeung B.G., Ryazantsev S., Greener T., Greene L., Eisenberg E., McCaffery J.M. & Payne G.S. (2000). A yeast DNA J protein required for clathrin-coated vesicle uncoating *in vivo*. *Nat Cell Biol* 2, 958-963
- 138) Holstein S.E.H., Ungewickell H. & Ungewickell E. (1996). Mechanism of clathrin basket dissociation: Separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin. *J Cell Biol* 135, 925-937
- 139) Greener T., Grant B., Zhang Y., Wu X., Greene L.E., Hirsh D. & Eisenberg E. (2001). *Caenorhabditis elegans* auxilin: a J-domain protein essential for clathrin-mediated endocytosis *in vivo*. *Nat Cell Biol* 3, 215-9
- 140) Jiang R., Gao B., Prasad K., Greene L.E. & Eisenberg E. (2000). Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes. *J Biol Chem* 275, 8439-8447
- 141) Zinsmaier K.E., Hofbauer A., Heimbeck G., Pflugfelder G.O., Buchner S. & Buchner E. A. (1990). Cysteine-string protein is expressed in retina, and brain of *Drosophila*. *J Neurogenet.* 7, 15-29
- 142) Mastrogiacomo A., Parsons S.M., Zampighi G.A., Jenden D.J., Umbach J.A. & Gunderson C.B. (1994b). Cysteine string proteins : a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca²⁺ channels. *Science* 263, 981-982
- 143) Braun J.E.A., Wilbanks S.M. & Scheller R.H. (1995). Cysteine string protein, a DnaJ family member, is present on diverse secretory vesicles. *Neuropharmacology* 34, 1361-1369
- 144) Zinsmaier K.E. & Bronk P. (2001). Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis. *Biochemical Pharmacology* 62, 1-11
- 145) Young C.J., Barral J.M. & Hartl F.U. (2003). More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 541-547
- 146) Murakami K., Tanase S., Morino Y. and Mori M. (1992). Presequence binding factor – dependent and –independent import of proteins into mitochondria. *J.Biol.Chem.* 257, 13119 - 13122
- 147) Hachiya N., Komiya T., Alam R., Iwahashi J., Sakaguchi M., Omura T and Mihara K. (1994). MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J.* 13, 5146-5154
- 148) Mihara K. and Omura T. (1996). Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria : the role of MSF and hsp70. *Trends in Cell Biology* 6, 104-108
- 149) Artigues A., Iriarte A. and Martinez-Carrion Marino (2002). Binding to Chaperones Allows Import of a Purified Mitochondrial Precursor into Mitochondria. *J.Biol.Chem.* 277, 25047-25055



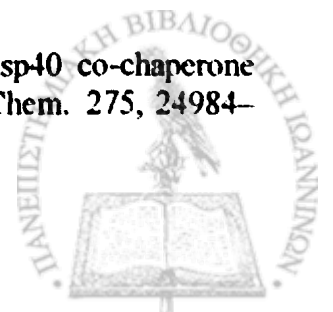
- 150) Suh W-C., Lu C.Z. and Gross C.A. (1999). Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperones DnaK with its cochaperone DnaJ. *J.Biol.Chem.* 274, 30534-30539
- 151) Sarge, K.D., Murphy, S.P., and Morimoto, R.I. (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Molecular & Cellular Biology* 13, 1392-1407.
- 152) Edwards-Gilbert G., Veraldi K.L. and Milcarek C. (1997). Alternative poly(A) site selection in complex transcription units : means to an end ? *Nucleic Acids Research* 25, 2547-2561
- 153) The human genome (2001). *Nature* 409,745-964
- 154) Neupert W. (1997). Protein import into mitochondria *Annu.Rev.Biochem.*66, 863-917
- 155) Atencio D.P. and Yaffe M.P. (1992). MAS5, a yeast homolog of DnaJ involved in mitochondrial protein import. *Mol. Cell. Biol.* 12, 283-291
- 156) Caplan A.J., Douglas M.C. & Douglas M. (1992). Ydj1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* 71, 1143-1155
- 157) Becker J., Walter W., Yan W. and Craig E. (1996). Functional Interaction of Cytosolic hsp70 and a DnaJ-Related Protein, Ydj1p in Protein Translocation *In Vivo*. *Mol.Cell.Biol.*, 4378-4386
- 158) Kanazawa M., Terada K., Kato S. & Masataka M. (1997). Hsdj, a human homolog of DnaJ, is farnesylated and is involved in protein import into mitochondria. *J. Biochem.* 121, 890-895
- 159) Terada K. and Mori M. (2000). Human DnaJ Homologs dj2 and dj3, and bag-1 Are Positive Cochaperones of hsc70. *J.Biol.Chem.* 275, 24728-24734
- 160) Caplan A.J., Douglas M.C. & Douglas M. (1993). Eukaryotic homologues of *Eschericia coli* dnaJ : A diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol. Cell Biol.* 1993, 555-563
- 161) Schatz G. & Dobberstein B.(1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526
- 162) Murakami K. and Mori M. (1990). Purified presequence binding factor (PBF) forms an import – competent complex with a purified mitochondrial precursor protein. *EMBO J.* 9, 3201-3208
- 163) Hachiya G.R., Sakasegawa A.Y., Sakaguchi M., Mihara K. & Omura T. (1993). A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *EMBO J.* 12, 1579-1586



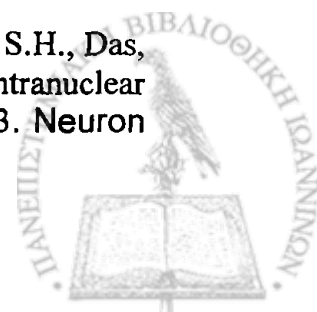
- 164) Cyr D.M. (1995). Cooperation of the molecular chaperones Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation. *FEBS Lett.* 359,129-132
- 165) Prip Buus C., Westerman B., Schmitt M., Langer T., Neupert W. & Schwartz E.(1996). Role of the mitochondrial DnaJ homologue, Mdj1p, in the prevention of heat-induced protein aggregation. *FEBS Lett.* 380,142-146
- 166) Sinensky M. (2000). Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1484,93-106
- 167) Caplan A.J., Tsai J, Casey P.J. and Douglas M.G. (1992). Farnesylation of YDJ1p is required for function at elevated growth temperatures in *S.cerevesiae*. *J. Biol. Chem.* 267, 18890-18895
- 168) Chapple J.P. and Cheetham M.E. (2003). The Chaperone Environment at the Cytoplasmic Face of the Endoplasmic Reticulum Can Modulate Rhodopsin Processing and Inclusion Formation. *J.Biol.Chem.* 278, 19087-19094
- 169) Matouscheck A., Pfanner N. and Voos W. (2000). Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep.* 1, 404-410
- 170) Sanders S.L., Whitfield K.M., Vogel J.P., Rose M.D., & Schekman R. W. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* 69, 353-365
- 171) Walter P., & Johnson A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 87-119
- 172) Beckmann R.D., Bubeck. R., Grassuci P., Penczek A., Verschoor G., Blobel G., & Frank J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-sec61 complex. *Science* 278, 2123-2130
- 173) Deshaies R.J., Sanders S.L., Feldheim D.A., & Schekman R. (1991). Assembly of yeast SEC proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349, 806-808
- 174) Panzner S., Dreier L., Hartmann E., Kostka S., & Rapoport T.A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81, 561-570
- 175) Sadler I., Chiang A., Kurihara T., Rothblatt J., Way J., & Silver P. (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. *J. Cell Biol.* 109, 2665-2675
- 176) Sanders S.L., Whitfield K.M., Vogel J.P., Rose M.D., & Schekman R.W. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* 69, 353-365



- 177) Lyman S.K. & Schekman R. (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131, 1163–1171
- 178) Corsi A.K. & Schekman R. (1997). The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 173, 1483–1493
- 179) Feldheim D., Rothblatt J. & Schekman R. (1992). Topology and functional domains of SEC63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3288–3296
- 180) Matlack K.E.S., Misselwitz B., Plath K. & Rapoport T.A. (1999). BiP Acts as a Molecular Ratchet during Posttranslational Transport of Prepro- α Factor across the ER Membrane. *Cell* 97, 553–564
- 181) Schlenstedt G., Harris S., Risse B., Lill R. & Silver P. A. (1995). A Yeast DnaJ Homologue, Scjlp, Can Function in the Endoplasmic Reticulum with BiP/Kar2p Via a Conserved Domain That Specifies Interactions with Hsp70s *J. Cell Biol.* 129, 979–988
- 182) Plemper R.K. and Wolf D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24, 266–270
- 183) Nishikawa S.I., Fewell S.W., Kato Y., Brodsky J.L. & Endo T. (2001). Molecular Chaperones in the Yeast Endoplasmic Reticulum Maintain the Solubility of Proteins for Retrotranslocation and Degradation. *J. Cell Biol.* 153, 1061–1070
- 184) Plemper R.K., Bohmler S., Bordallo J., Sommer T., & Wolf D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891–895
- 185) Brightman S.E., Blatch G.L., & Zetter B.R. (1995). Isolation of a mouse cDNA encoding MTJ1, a new murine member of the DnaJ family of proteins *Gene (Amst.)* 153, 249–254
- 186) Skowronek M.H., Rotter M., & Haas I.G. (1999). Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol. Chem.* 380, 1133–1138
- 187) Tyedmers J., Lerner M., Bies C., Dudek, J., Skowronek M H., Haas I.G., Heim N., Nastainczyk W., Volkmer J. & Zimmermann R. (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7214–7219
- 188) Bies C., Guth S., Janoschek K., Nastainczyk W., Volkmer J. & Zimmermann R. (1999) A Scjlp homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes *Biol. Chem.* 380, 1175–1182
- 189) Yu M., Haslam R.H. & Haslam D.B. (2000). HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. *J. Biol. Chem.* 275, 24984–24992



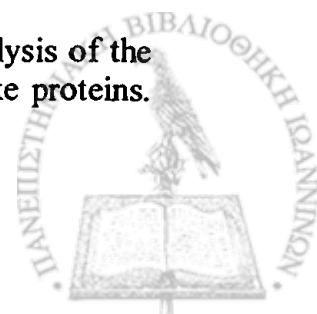
- 190) Shen Y., Meunier & Hendershot L.M. (2002). Identification and Characterization of a Novel Endoplasmic Reticulum (ER) DnaJ Homologue, Which Stimulates ATPase Activity of BiP *in Vitro* and Is Induced by ER Stress. *J.Biol.Chem.* 277, 15947-15956
- 191) Cunnea P.M., Miranda-Vizueté A., Bertoli G., Simmen T., Damdimopoulos A.E., Hermann S., Leinonen S., Huikko M.P., Gustafsson J-A, Sitia R. & Spyrou G. (2003). ERdj5, an Endoplasmic Reticulum (ER)-resident Protein Containing DnaJ and Thioredoxin Domains, Is Expressed in Secretory Cells or following ER Stress. *J.Biol.Chem.* 278, 1059-1066
- 192) Ben-Zvi A.P. & Goloubinoff P. (2001). Review: Mechanisms of Disaggregation and Refolding of Stable Protein Aggregates by Molecular Chaperones. *J. Struct. Biol.* 135, 84-93
- 193) Laskowska E., Kuczynska-Wisnik D., Skorko-Glonek J. & Taylor A. (1996) Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of Escherichia coli proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA action *in vivo* and *in vitro*. *Mol.Microbiol.* 22, 555-571
- 194) Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rudiger S., Roder D., Langen H. & Bukau B. (1999). Identification of thermolabile E. coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* 18, 6934-6949
- 195) Tomoyasu T., Mogk A., Langen H., Goloubinoff P. & Bukau B. (2001). Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the Escherichia coli cytosol. *Mol. Microbiol.* 40, 397-413
- 196) Goloubinoff P., Mogk A., Ben Zvi A.P., Tomoyasu T., & Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732-13737
- 197) Diamant S., Ben-Zvi A.P., Bukau B. & Goloubinoff P. (2000). Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 275, 21107-21113
- 198) McLaurin J., Yang D., Yip C.M. & Fraser P. E. (2000). Review: Modulating factors in amyloid-beta fibril formation. *J.Struct. Biol.* 130, 259-270
- 199) Prusiner S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13363-13383
- 200) Serio T.R. & Lindquist S.L. (2000). Protein-only inheritance in yeast: Something to get [PSI1]-ched about. *Trends Cell Biol.* 10, 98-105
- 201) Cummings C.J. and Zoghbi H.Y. (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum. Mol. Genet.* 9, 909-916
- 202) Paulson H. L., Perez M. K., Trottier Y., Trojanowski J. Q., Subramony S.H., Das, S. S., Vig P., Mandel J. L., Fischbeck K. H. & Pittman R. N. (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19, 333-344



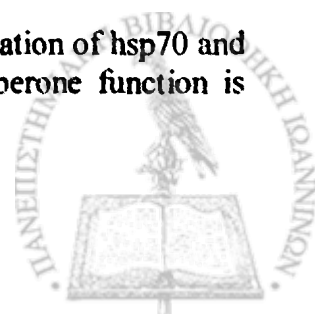
- 203) Waelter S., Boeddrich A., Lurz R., Scherzinger E., Lueder G., Lehrach H. & Wanker, E. E. (2001). Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol. Biol. Cell* 12, 1393–1407
- 204) Sugars K.L & Rubinsztein D.C.(2003). Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *TRENDS in Genetics* 19, 233-238
- 205) Opal P. & Zoghbi H.Y. (2002). The role of chaperones in polyglutamine disease. *TRENDS in Molecular Medicine* 8, 232-236
- 206) Krobitsch S. & Lindquist S. (2000) Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1589–1594
- 207) Kobayashi Y., Kume A., Li M., Doyu M., Hata M., Ohtsuka K., & Sobue G. (2000) Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 275, 8772–8778
- 208) Jana N.R., Tanaka M., Wang G.H. & Nukina N. (2000). Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2009–2018
- 209) Cummings C. J., Sun Y., Opal P., Antalffy B., Mestril R., Orr H. T., Dillmann, W. H. & Zoghbi, H. Y. (2001). Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1511–1518.
- 210) Sakahira H., Breuer P., Hayer-Hartl M.K., & Hartl F.U. (2002). Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16412–16418
- 211) Muchowski P. J., Schaffar G., Sittler A., Wanker E. E., Hayer-Hartl. M. K. & Hartl, F.U. (2000) Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7841–7846.
- 212) Sittler A., Lurz R., Lueder G., Priller J., Lehrach H., Hayer-Hartl M. K., Hartl F. U. & Wanker E. E. (2001). Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1307–1315
- 213) Chan H. Y., Warrick J. M., Gray-Board G. L., Paulson H. L. & Bonini N. M. (2000). Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2811–2820



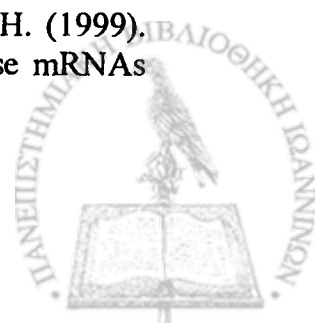
- 214) Nucifora F.C. Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM and Ross CA. (2001). Interference by Huntingtin and Atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291, 2423–2428
- 215) Kim S, Nollen E.A.A, Kitagawa K., Bindokas V.P. & Morimoto R.I. (2002) Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat. Cell Biol.* 4, 826–831
- 216) Waelter S., Boeddrich A., Lurz R., Scherzinger E., Lueder G., Lehrach H. & Wanker, E. E. (2001) Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol. Biol. Cell* 12, 1393–1407
- 217) Chai, Y., Koppenhafer S.L., Bonini N.M., Paulson H.L. (1999) Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J. Neurosci.* 19, 10338–10347
- 218) Kazemi-Esfarjani, P. and Benzer, S. (2000). Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science* 287, 1837–1840
- 219) Cummings, C.J., Mancini M. A., Antalffy B., DeFranco D. B., Orr H. T. & Zoghbi, H. Y. (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered Subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat. Genet.* 19, 148–154
- 220) Stenoien, D.L., Cummings CJ, Adams HP, Mancini MG, Patel K, DeMartino GN, Marcelli M, Weigel NL, Mancini MA. (1999) Polyglutamine expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum. Mol. Genet.* 8, 731–741
- 221) Silver P.A. & Way J.C. (1993). Eukaryotic DnaJ Homologs and the Specificity of Hsp70 Activity. *Cell* 74, 5-6
- 222) Kelley W.L. (1999). Molecular chaperones : How J domains turn on Hsp70s. *Current Biology* 9, 305-308
- 223) Greene M.K., Maskos K. & Landry S.J. (1998). Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl Acad Sci USA* 95, 6108-6113
- 224) Suh W.C., Burkholder WF, Lu C.Z., Zhao X., Gottesman M.E. & Gross C.A. (1998). Interaction of the Hsp70 molecular chaperones, DnaK, with its cochaperone DnaJ. . *Proc. Natl Acad Sci USA* 95, 15223-15228
- 225) Gassler C.S., Buchberger A., Laufen T., Mayer M.P., Schroder H., Valencia A. & Bukau B. (1998). Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15229-15234
- 226) Hennessey F., Cheetham M.E., Dirr H.W. & Blatch G.L. (2000). Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress & Chaperones* 5, 347-358



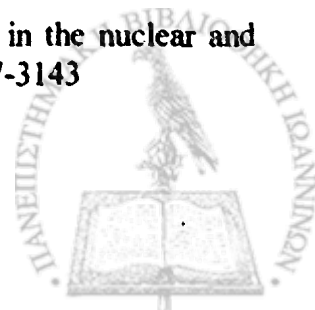
- 227) Schlendstedt G., Harris S., Risse B., Lill R. & Silver P.A. (1995). A yeast DnaJ homolog, scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J Cell Biol* 129,979-988
- 228) McClellan A.J., Endres J.B., Vogel J.P., Palazzi D., Rose M.D. & Brodsky J.L. (1998). Specific molecular chaperone interactions and an ATP-dependent conformational change are required during posttranslational protein translocation into the yeast ER. *Mol Biol Cell* 9, 3533-3545
- 229) Brodsky J.L., Baurele M., Horst M. & McClellan A.J. (1998). Mitochondrial Hsp70 cannot replace BiP in driving protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 435, 183-186
- 230) Cyr D.M. (1995). Cooperation of the molecular chaperone Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation. *FEBS Letters* 359, 129-132
- 231) King C., Eisenberg E. and Greene L. (1997). Effect of Yeast and Human DnaJ Homologs on Clathrin Uncoating by 70 Kilodalton Heat Shock Protein. *Biochemistry* 36, 4067-4073
- 232) Terada K., Kanazawa M., Bukau B. and Mori M. (1997). The Human DnaJ Homologue dj2 Facilitates Mitochondrial Protein Import and Luciferase Refolding. *J. Cell. Biol.* 139, 1089-1095
- 233) Karzai A. W. and McMacken R. (1996). A bipartite signalling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Eschericia coli DnaK protein. *J.Biol.Chem.* 271, 11236-11246
- 234) Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1990). High efficiency transformation of Eschericia coli with plasmids. *Gene* 96, 23-8
- 235) Ish-Horowicz D. and Burke J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic. Acids. Res.* 9, 2989-98
- 236) Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74,5463-5467
- 237) Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162,156-9
- 238) Harlow E. and Lane D. (1988). *Antibodies A LABORATORY MANUAL*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 541-551
- 239) Laemli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- 240) Angelidis C.E., Lazaridis I. and Pagoulatos G.N.(1999). Aggregation of hsp70 and hsc70 *in vivo* is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms. *Eur J Biochem.*259,505-12



- 241) 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.* 1, 35-9
- 242) Angelidis C.E., Lazaridis I. and Pagoulatos G.N.(1988). Specific inhibition of simian virus 40 protein synthesis by heat and arsenite treatment. *Eur J Biochem.* 172, 27-34
- 243) Sainis I., Angelidis C.E., Lazaridis I. and Pagoulatos G.N.(1994). The hsc70 gene which is slightly induced by heat is the main virus inducible member of the hsp70 gene family. *FEBS Lett.* 355, 282-6
- 244) Sainis I., Angelidis C., Pagoulatos G.N. and Lazaridis I. (2000). HSC70 interactions with SV40 viral proteins differ between permissive and nonpermissive mammalian cells. *Cell Stress Chaperones* 2,132-8
- 245) Oh S., Iwahori A. and Kato S. (1993). Human cDNA encoding DnaJ protein homologue. *Biochim Biophys Acta* 1174, 114-6
- 246) de Sauvage F., Krays V., Marinx O., Huez G. and Octave J.N. (1992). Alternative polyadenylation of the amyloid protein precursor mRNA regulates translation. *EMBO J.* 8, 3099-103
- 247) Miyamoto S., Chiorini J.A., Urcelay E. and Safer B.(1996). Regulation of gene expression for translation initiation factor eIF-2 alpha: importance of the 3' untranslated region. *Biochem J.* 315,791-8
- 248) Davis A.R., Alevy Y.G., Chellaiah A., Quinn M.T. and Mohanakumar T.(1998). Characterization of HDJ-2, a human 40 kD heat shock protein. *Int J Biochem Cell Biol.* 11, 1203-21
- 249) Hata M. and Ohtsuka K. (1998). Characterization of HSE sequences in human Hsp40 gene: structural and promoter analysis. *Biochim Biophys Acta.* 1397,43-55
- 250) Zhao J., Hyman L. and Moore C. (1999). Formation of mRNA 3' Ends in Eucaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 63, 405-445
- 251) Currie P.D. and Sullivan D.T. (1994). Structure and Expression of the Gene Encoding Phosphofructokinase (PFK) in *Drosophila melanogaster*. *J.Biol.Chem.* 269, 24679-24687
- 252) Grover J. and Roughley P.J. (1995). Expression of cell-surface proteoglycan mRNA by human articular chondrocytes. *Biochem J.* 309, 963-8
- 253) Thiele B. J., Berger M., Huth A., Reimann I.,SchwartzK.and Thiele H. (1999). Tissue-specific translational regulation of alternative rabbit 15-lipoxygenase mRNAs differing in their 3'-untranslated regions. *Nucleic Acids Res.* 27, 1828-1836



- 254) Krebber H. and Ponstingl H.(1996). Ubiquitous expression and testis-specific alternative polyadenylation of mRNA for the human Ran GTPase activator RanGAP1. *Gene* 180,7-11
- 255) Mishima K., Price S.R., Nightingale M.S., Kousvelari E., Moss J. and Vaughan M. (1992). Regulation of ADP-ribosylation factor (ARF) expression. Cross-species conservation of the developmental and tissue-specific alternative polyadenylation of ARF 4 mRNA. *J Biol Chem.* 267, 24109-16
- 256) Ristimaki A., Narko K. and Hla T.(1996). Down-regulation of cytokine-induced cyclo-oxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem J.* 318, 325-31
- 257) Yong T.J., Gan Y.Y., Toh B.H. and Sentry J.W.(2003). Human CKIalpha(L) and CKIalpha(S) are encoded by both 2.4- and 4. 2-kb transcripts, the longer containing multiple RNA-destablising elements. *Biochim Biophys Acta.* 1492, 425-33
- 258) Zhang T., Krays V., Huez G. and Gueydan C. (2002). AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of *trans*-activating factors. *Bioch.Soc. Trans.* 30, 952-8
- 259) Grzybowska E.A., Wilczynska A., and Siedlecki J.A. (2001). Regulatory Functions of 3' UTRs. *BBRC* 288, 291-295
- 260) Gallouzi I.E., Brennan C.M., Stenberg M.G., Swanson M.S., Eversole A., Maizels N. and Steitz J.A. (2000). HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97,3073-8
- 261) Roskoski R Jr.(2003). Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *BBRC* 303, (1-7)
- 262) Glomset J.A., Gelb M.H. and Farnsworth C.C.(1990). Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem Sci.* 15,139-42
- 263) Pirkkala L., Nykanen P. and Sistonen L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15, 1118-1131
- 264) Welch W.J. and Feramisco J.R. (1984). Nuclear and Nucleolar Localization of the 72,000-dalton Heat Shock Protein in Heat-shocked Mammalian Cells. *J.Biol.Chem.* 259, 4501-4513
- 265) Hattori H., Liu Y.-C., Tohnai I., Ueda M., Kaneda T., Kobayashi T., Tanabe K. and Ohtsuka K. (1992). Intracellular Localization and Partial Amino Acid Sequence of a Stress - Inducible 40 - kDa Protein in HeLa Cells. *Cell Struc. Func.* 17,77-86
- 266) 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



- 267) Pelham H.R.B. (1985). Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* 3, 3095-3100
- 268) Nollen E.A.A., Salomons F.A., Brunsting J.F., van der Want J.J.L., Sibon O.C.M. and Kampinga H.H. (2001). Dynamic changes in the localization of thermally unfolded nuclear proteins associated with chaperone-dependent protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12038-12043
- 269) Gerner C., Holzmann K., Meissner M., Gotzmann J., Grimm R., Sauer mann G. (1999). Reassembling proteins and chaperones in human nuclear matrix protein fractions. *J Cell Biochem* 74, 145-151
- 270) Lepock J.R., Frey H.E., Heynen M.L., Senisterra G.A., Warters R.L. (2001). The nuclear matrix is a thermolabile cellular structure. *Cell Stress Chap* 6,136-147
- 271) Willsie J.K. and Clegg J.S. (2002). Small Heat Shock Protein p26 Associates With Nuclear Lamins and HSP70 in Nuclei and Nuclear Matrix Fractions From Stressed Cells. *J.Cell. Biochem.* 84,601-614
- 272) Imamoto N., Matsuoka Y., Kurihara T., Kohno K., Miyagi M., Sakiyama F., Okada Y., Tsunasawa S. and Yoneda Y. (1992). Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J. Cell. Biol.* 119, 1047-1061
- 273) 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.* 2186-2192
- 274) Shulga N., Roberts R., Gu Z., Spitz L., Tabb M.M., Nomura M. and Goldfarb D.S. (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
- 275) Schneider H., Berthold J., Bauer M., Dietmeier K., Guiard B., Brunner M. and Neupert W. (1994). Mitochondrial hsp70 / MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 371, 768-774
- 276) Yamane M., Hattori H., Sugito K., Hayashi Y., Tohnai I., Ueda M., Nishizawa K. and Ohtsuka K. (1995). Cotranslocation and Colocalization of hsp40 (DnaJ) with hsp70 (DnaK) in Mammalian Cells. *Cell Struc. Func.* 20, 157-166
- 277) Bozidis P., Lazaridis I., Pagoulatos G. and Angelidis C.E. (2002). Mydj2 as a potent partner of hsc70 in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 269, 1553-1560
- 278) Ohtsuka K. and Hata M. (2000). Mammalian HSP40/DNAJ homologs : cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature. *Cell Stress and Chaperones* 5 (2)
- 279) Humphray S.J., et al. (2004). DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature* 429, 369-374



- 280) Latchman D.S. (1998). Eucaryotic transcription factors. Academic Press, third edition, London
- 281) Samson S. L-A and Wong N.C.W.(2002). Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. J.Molec.Endocrin. 29, 265-279
- 282) Bouwman P. and Philipsen S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. Molec. Cell. Endocrin. 195, 27-38
- 283) Brandeis M., Frank D., Keshet I., Siegfried Z., Mendelsohn M., Nemes A., Temper V., Razin A. and Cedar H. (1994). Sp1 elements protect a CpG island from *de novo* methylation. Nature 371, 435-438
- 284) Macleod D., Charlton J., Mullins J. and Bird A.P. (1994). Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. Genes and Development 8, 2282-2292
- 285) D'Onofrio G. (2002). Expression patterns and gene distribution in the human genome. Gene 300, 155-160
- 286) Vinogradov A.E. (2003). Isochores and tissue-specificity. Nucleic Acids Res. 31, 5214-5220
- 287) Plumier J.C., Ross B.M., Currie R.W., Angelidis C.E., Kazlaris H., Kollias G. and Pagoulatos G.N. (1995). Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. J Clin Invest. 95,1854-60
- 288) Angelidis C.E., Nova Chr., Lazaridis I., Kontoyannis D., Kollias G. and Pagoulatos G.N. (1996). Overexpression of Hsp70 in transgenic mice results in increased cell thermotolerance. Transgenics 2,111-117
- 289) Plumier J.C., Krueger A.M., Currie R.W., Kontoyiannis D., Kollias G., Pagoulatos G.N. (1997). Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. Cell Stress Chaperones. 2,162-7



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ



ADP:	Adenosine 5'- diphosphate
ATP:	Adenosine 5'- triphosphate
BSA:	Bovine serum albumin
cDNA:	complementary DNA
cpm:	counts per minute
dATP:	2'- Deoxyadenosine 5'- triphosphate
dCTP:	2'- Deoxycytidine 5'- triphosphate
dGTP:	2'- Deoxyguanosine 5'- triphosphate
dTTP:	2'- Deoxythymidine 5'- triphosphate
dNTPs:	deoxyribonucleotides triphosphates
ddNTP:	dideoxyribonucleotides triphosphates
Hsp70:	Heat shock protein 70KD
Hsp40:	Heat shock protein 40KD
DDT:	Dithiotreitol
DMSO:	Dimethyl sulphoxide
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
HEPES:	(N-[2-hydroxyethyl] piperazine – N – [2 – ethane – sulfonic acid])
Hsc70:	Heat shock cognate 70KD
KD:	KiloDalton
Mops:	3 – (N – morpholino) propanesulphonic acid
mRNA:	messenger RNA
NP-40:	Nonidet P – 40 (octylphenoxy ethanol)
PPO:	2,5 – diphenyloxazole
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
TCA:	Trichloroacetic acid
TEMED:	N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine
v/v:	volume per volume
w/v:	weight per volume
tet:	tetracycline
MCS:	Multiple cloning site
CsCl:	Cesium chloride
Amper:	Ammonium persulfate
CIAP:	Calf intestinal alkaline phosphatase
PMSF:	Phenylmethanesulfonyl fluoride
HRP:	Horseradish peroxidase
ECL:	Enhanced chemiluminescence
Kar2:	karyogamy gene 2
GroEL:	affects head morphogenesis of lamda groE+ phage (Large subunit)
GroES:	affects head morphogenesis of lamda groE+ phage (Small subunit)
GrpE:	affects DNA replication of phage grpE
Jem1:	DnaJ-like protein of the ER lumen
Sec61:	secretory mutant 61
DnaK:	affects DNA replication of lamda phage
DnaJ:	affects DNA replication of lamda phage
Ydj1:	yeast DnaJ-like protein 1
Scj1:	Saccharomyces cerevisiae DnaJ-like protein 1
Hdj2:	human DnaJ-like protein 2
ERdj1-5:	endoplasmic reticulum DnaJ-like proteins 1-5
Hsj1:	heat shock DnaJ-like protein 1



BIP: immunoglobulin heavy-chain binding protein

ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Αλανίνη	Ala	A		Λευκίνη	Leu	L
Αργινίνη	Arg	R		Λυσίνη	Lys	K
Ασπαράγινη	Asn	N		Μεθειονίνη	Met	M
Ασπαραγινικό οξύ	Asp	D		Φαινυλαλαίνη	Phe	F
Κυστεΐνη	Cys	C		Προλίνη	Pro	P
Γλουταμίνη	Gln	Q		Σερίνη	Ser	S
Γλουταμινικό οξύ	Glu	E		Θρεονίνη	Thr	T
Γλυκίνη	Gly	G		Τρυπτοφάνη	Trp	W
Ιστιδίνη	His	H		Τυροσίνη	Tyr	Y
Ισολευκίνη	Ile	I		Βαλίνη	Val	V

