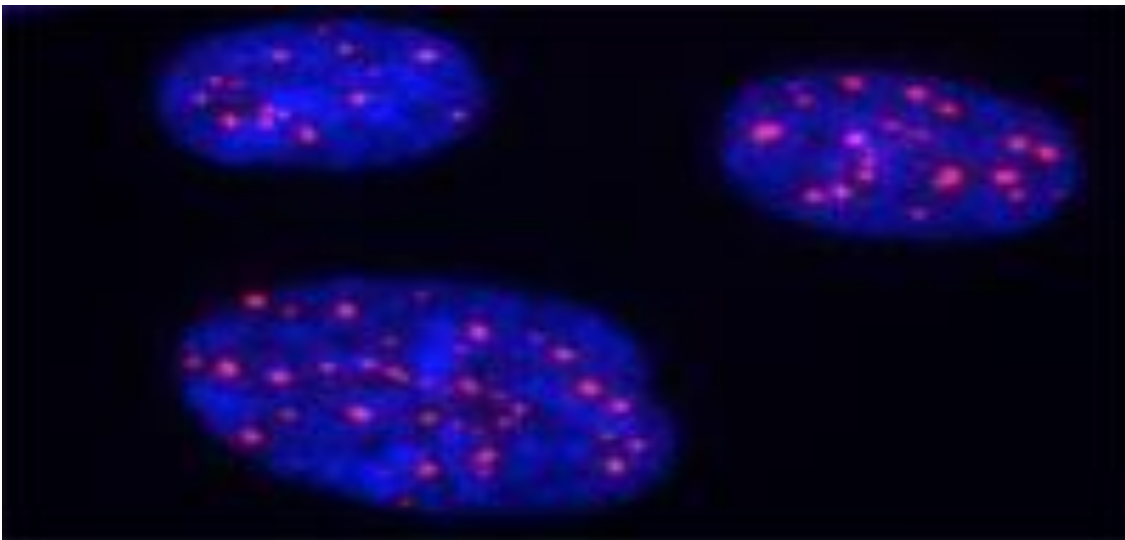




**Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών και
Τεχνολογικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας**

Πτυχιακή εργασία με τίτλο:

Άλληλεπίδραση της πρωτεΐνης TRF1 με το αμινοξικό και το καρβοξυτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης PML IV.



Ζώρζου Παναγιώτα

A.M: 1742

Υπεύθυνος καθηγητής:

Ιωσήφ Παπαματθαϊάκης, Καθ. Μορ. Βιολογίας

Supervisors:

Παναγιώτα Αραμπατζή, Τάκης Μακατουνάκης

Ηράκλειο, 2014

Ευχαριστίες..

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον κύριο Σήφη Παπαματθαιάκη ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέλος του εργαστηρίου του και να έλθω σε επαφή με την επιστήμη της μοριακής Βιολογίας. Οι γνώσεις και η βοήθεια του με βοήθησαν στην κατανόηση και πραγματοποίηση της εργασίας αυτής και αποτελούν εφόδια για το μέλλον. Καταλυτικοί παράγοντες στην επιμόρφωση μου καθ'ολη τη διάρκεια αυτής της εμπειρίας ήταν η Γιώτα Αραμπατζή και ο κύριος Τάκης Μακατουνάκης που ήταν εκεί για να λύνουν κάθε μια από τις εκατοντάδες απορίες μου με υπομονή και χαμόγελο. Τους ευχαριστώ πολύ για όλα όσα μου πρόσφεραν γιατί ήταν πραγματικά χρήσιμα. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την Χριστιάνα η οποία πρόσφερε πάντοτε απλόχερα θετική ενέργεια, την Κωνσταντίνα που με βοηθούσε κάθε φορά όσο σημαντικό και να ήταν το paper που διάβαζε καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Ναταλία, Νικολέτα, Αλεξάνδρα, Διονύση, Μπεν που πάντοτε φρόντιζαν να διατηρείται ένα πολύ ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αργυρώ για όλες τις στιγμές που μοιραστήκαμε και θα μείνουν πραγματικά αξέχαστες. Όλοι μαζί και καθένας ξεχωριστά με εμπλούτισαν με γνώσεις και στιγμές που θα θυμάμαι για πολύ καιρό ακόμη. Εύχομαι ολόψυχα σε όλους τα καλύτερα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και τα αδέρφια μου, Άγγελο και Ειρήνη γιατί χωρίς εκείνους και την στήριξη τους δεν θα μπορούσα να είχα φτάσει ως εδώ. Ένα ευχαριστώ είναι πραγματικά λίγο για όλα όσα μου έχουν προσφέρει.

Περιεχόμενα:

1. Εισαγωγή

- Η πρωτεΐνη PML.....σελ 4
- Τα PML πυρηνικά σωμάτια (nuclear bodies).....σελ 6
- Τα τελομερή.....σελ 8
- Η πρωτεΐνη TRF1.....σελ 9
- PML IV και TRF1.....σελ 10

2. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....σελ 12

3. Υλικά και μέθοδοι

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....σελ 13
- Εξαγωγή μπάντας από gel αγαρόζης (gel extraction).....σελ 14
- Αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation).....σελ 15
- Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation).....σελ 15
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Miniprep).....σελ 17
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (Maxiprep).....σελ 18
- Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με φωσφορικά άλατα και CaCl_2 (transfection).....σελ 19
- Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot).....σελ 20
- Συν-κατακρήμιση πρωτεϊνών (co-IP).....σελ 23

4. Αποτελέσματα.....σελ 25

5. Συζήτηση.....σελ 32

6. Βιβλιογραφία.....σελ 33

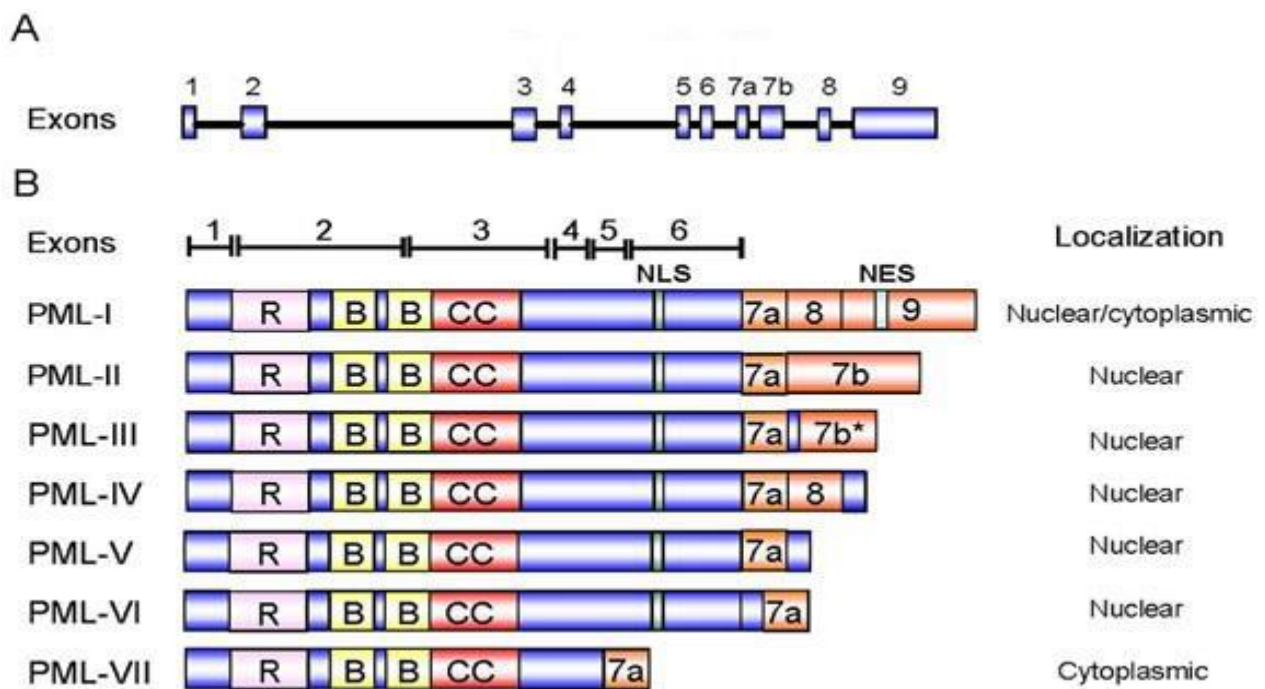
1.Εισαγωγή:

Η πρωτεΐνη PML:

Η πρωτεΐνη PML (promyelocytic leukemia protein) είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη η οποία κωδικοποιείται από το ομώνυμο γονίδιο και τις περισσότερες φορές εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων διασκορπισμένη ανάμεσα στη χρωματίνη. Διαφορετικά όργανα εκφράζουν διαφορετικές ποσότητες PML. Ακόμα και στο ίδιο κύτταρο μπορεί να εμφανιστούν διαφοροποιήσεις.(2) Η πρωτεΐνη αυτή έχει πολλαπλές λειτουργίες και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένων της καταστολής των όγκων, επαγωγή απόπτωσης, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου, RAS-επαγώμενης πρόωρης γήρανσης, μεταγραφική ρύθμιση, απόκριση σε DNA καταστροφή και επιδιόρθωση καθώς και στην σταθερότητα του γονιδιώματος. (7)

Το PML γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 9 στο ποντίκι. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν μια χαρακτηριστική αλληλουχία /μοτίβο γνωστό ως TRIM ή RBCC. Το μοτίβο αυτό εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και αποτελείται από 3 περιοχές πρόσδεσης ψευδαργύρου. Η πρώτη περιοχή ονομάζεται RING finger και ακολουθείται από άλλες δυο περιοχές πρόσδεσης ψευδαργύρου τις ονομαζόμενες ως B-boxes. Οι περιοχές B-boxes είναι πλούσιες σε κατάλοιπα Cys και His ενώ ακολουθούνται από μια περιοχή α-έλικας (α-helical coiled-coil), υπεύθυνη για τον διμερισμό των PML μορίων. (1) Το μοτίβο αυτό (εντοπίζεται σε πολλές πρωτεΐνες εκτός της PML) μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με αντι-ιικές και αντι-μικροβιακές δραστηριότητες της πρωτεΐνης που το φέρει. (6) Τέλος πρωτεΐνες που το φέρουν επάγονται από ιντερφερόνες. (2) Πιο συγκεκριμένα για την PML το μοτίβο αυτό είναι βασικό για τον in vivo σχηματισμό των PML-nuclear bodies (για τα οποία θα μιλήσουμε αργότερα) καθώς απαιτείται για τον πολυμερισμό της PML πρωτεΐνης. (4) Παράλληλα διαδραματίζει και κάποιο ρόλο σε διαδικασίες απόπτωσης και καταστολής της ανάπτυξης. Παρόλα αυτά δεν της προσδίδει ικανότητα δέσμησης με DNA μόρια. (6)

Ο γενετικός τόπος του PML γονιδίου είναι περίπου 35kb και υποδιαιρείται σε 9 εξώνια (Εικόνα 1). Ένας μεγάλος αριθμός από εναλλακτικά ματίσματα οδηγούν στη δημιουργία διαφορετικών ισομορφών (7 έχουν παρατηρηθεί στον άνθρωπο και 2 στο ποντίκι). Οι ισομορφές που προκύπτουν διαφέρουν στο μοριακό μέγεθος το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 48-97 kDa. (6) Όλες οι ισομορφές έχουν κοινά τα εξώνια 1, 2, 3 με αποτέλεσμα να περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο (N-terminal) το μοτίβο TRIM/BRCC ενώ διαφέρουν είτε στην κεντρική ή στην καρβοξυτελική (C-terminal) περιοχή τους. (5) Το γεγονός αυτό οφείλεται στο εναλλακτικό μάτισμα που πραγματοποιείται κατά τη μεταγραφή. Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα που ακολουθεί, στην κεντρική περιοχή των περισσότερων ισομορφών της PML υπάρχει μια NLS αλληλουχία που επιτρέπει στην πρωτεΐνη να εισέρχεται στον πυρήνα. Έχει βρεθεί ότι η PML IV μπορεί να υφίσταται απουσία του εξωνίου 5. (6)



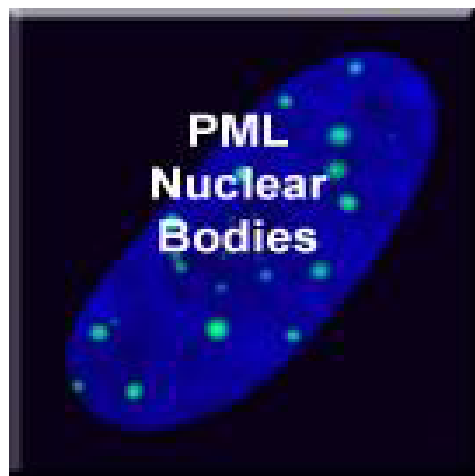
Εικόνα 1 Α) Εξώνια του ανθρώπινου PML γονιδίου Β) Απεικόνιση των διαφορετικών ισομορφών της Pml πρωτεΐνης στον άνθρωπο.

Πιο συγκεκριμένα τώρα για την πρωτεΐνη PML IV με την οποία και θα ασχοληθούμε έχουν γίνει εκτενής μελέτες. Ίσως είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη ισομορφή της PML πρωτεΐνης. Έχει βρεθεί ότι το καρβοξυτελικό κομμάτι της PML IV μεσολαβεί για την φυσική σχέση της με την p53 ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. (1) Η

p53 προσλαμβάνεται στα PML-NBs μέσω της PML IV ή από την συνέκφραση των SUMO-1 και E2 συζευγμένου ενζύμου hUBC9. Επίσης έχει βρεθεί ότι η PML IV καταστέλλει τη μεταγραφή αλληλεπιδρώντας με τις απακετυλάσες ιστονών. (6) Υπερέκφραση των ενεργών PML IV προάγουν τη γήρανση στους ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες. (5)

Τα PML πυρηνικά σωμάτια: (nuclear bodies)

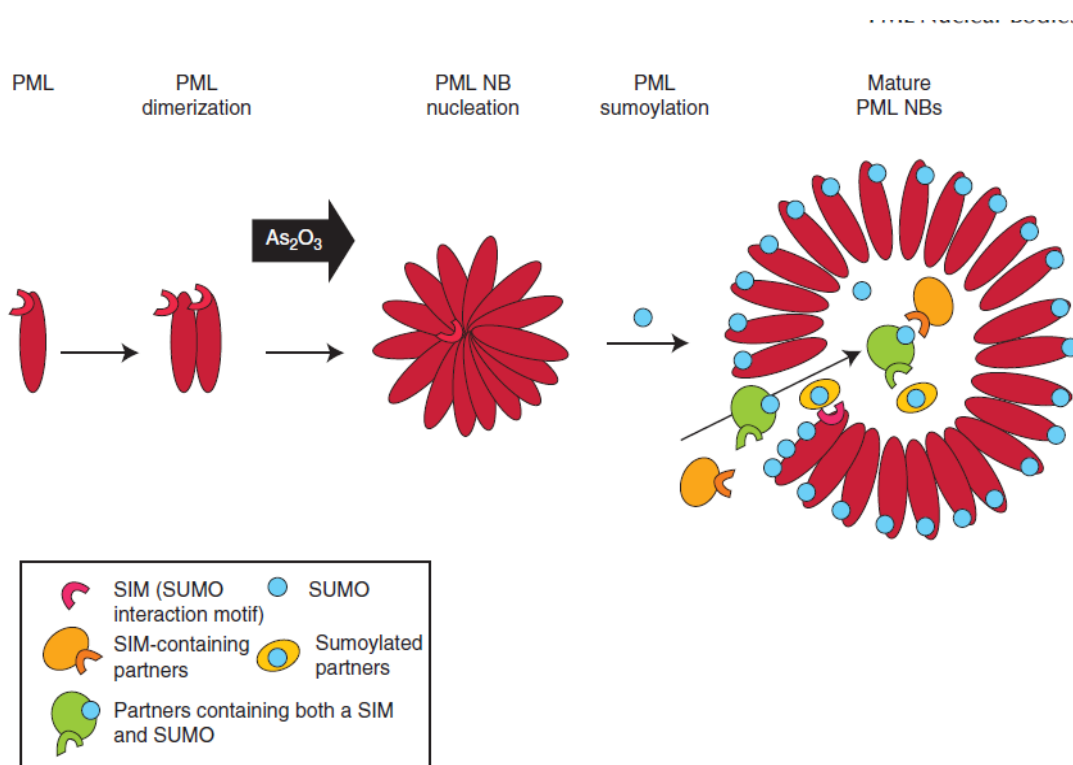
Η PML πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των PML πυρηνικών σωματίων (στο εξής θα αναφέρονται ως PML-NBs).(2) Τα κύρια συστατικά των PML-NBs είναι η PML και οι SP100 πρωτεΐνες. (4) Εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου με μορφή σφαίρας, διαμέτρου 0,2-1,0 μm και ο αριθμός τους ανά πυρήνα κυμαίνεται μεταξύ 1-30 σωματιδίων. Ο αριθμός αυτός εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, τη φάση του κυτταρικού κύκλου και το στάδιο



διαφοροποίησης του κυττάρου. Η τοπική συγκέντρωση της PML μπορεί να διαφέρει ακόμη και ανάμεσα στις περιοχές ενός PML-NB. (2) Τα PML-NBs βρίσκονται στα περισσότερα σωματικά κύτταρα και αυξάνονται σε μέγεθος και αριθμό όταν το κύτταρο υποβληθεί σε διαδικασία κυτταρικής γήρανσης. Αυτό τα καθιστά ως δείκτες γήρανσης.(8) Τέλος έχει φανεί πως σε συμπαγείς όγκους και σε λευχαιμίες όπως για παράδειγμα στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία τα PML-NBs καταστρέφονται χάνοντας έτσι τις λειτουργικές τους ικανότητες. (2)

Υπάρχουν ενδείξεις οι οποίες υποστηρίζουν ότι για το σχηματισμό των PML-NBs και τη συγκρότηση των τμημάτων τους απαραίτητη είναι η σουμοϋλίωση της PML πρωτεΐνης.(2) Κατά τη διαδικασία αυτή η οποία αναπαριστάται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 3) γίνεται προσθήκη μιας ομάδας SUMO σε πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης (συνήθως στα κατάλοιπα λυσίνης που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο της PML). Το SUMO είναι ένα πεπτίδιο που εμφανίζει 18 % ομοιότητα με την αλληλουχία της ουβικιτίνης και συχνά αλλάζει τις ιδιότητες της πρωτεΐνης στην οποία προστίθεται. Η PML σουμοϋλιώνεται από το

ένζυμο UBC9 σε 3 κατάλοιπα λυσίνης. Αυτά τα κατάλοιπα είναι: το K65 στην περιοχή RING finger, το K160 στην περιοχή B1 box και K490 στην περιοχή NLS. (9)



Εικόνα 3 Σχηματισμός ενός PML πυρηνικού σωματιδίου (PML-NB)

Όπως η PML έτσι και τα PML-NBs εμπλέκονται στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών. Τα PML-NBs είναι δυναμικές κατασκευές που ευνοούν την παγίδευση και την έκκριση πρωτεϊνών μεσολαβώντας στις μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και προωθώντας ειδικά πυρηνικά γεγονότα, σε απόκριση στο κυτταρικό στρες. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν πως τα PML-NBs μπορεί να είναι ετερογενή στη σύνθεση, την κινητικότητα και τη λειτουργία ενώ για να σταθεροποιηθούν δομικά, συνδέονται με τις ίνες της χρωματίνης. Τέλος έχει βρεθεί ότι σχετίζονται μη-τυχαία με περιοχές πλούσιες σε γονίδια και με μεταγραφική ενεργότητα. (9)

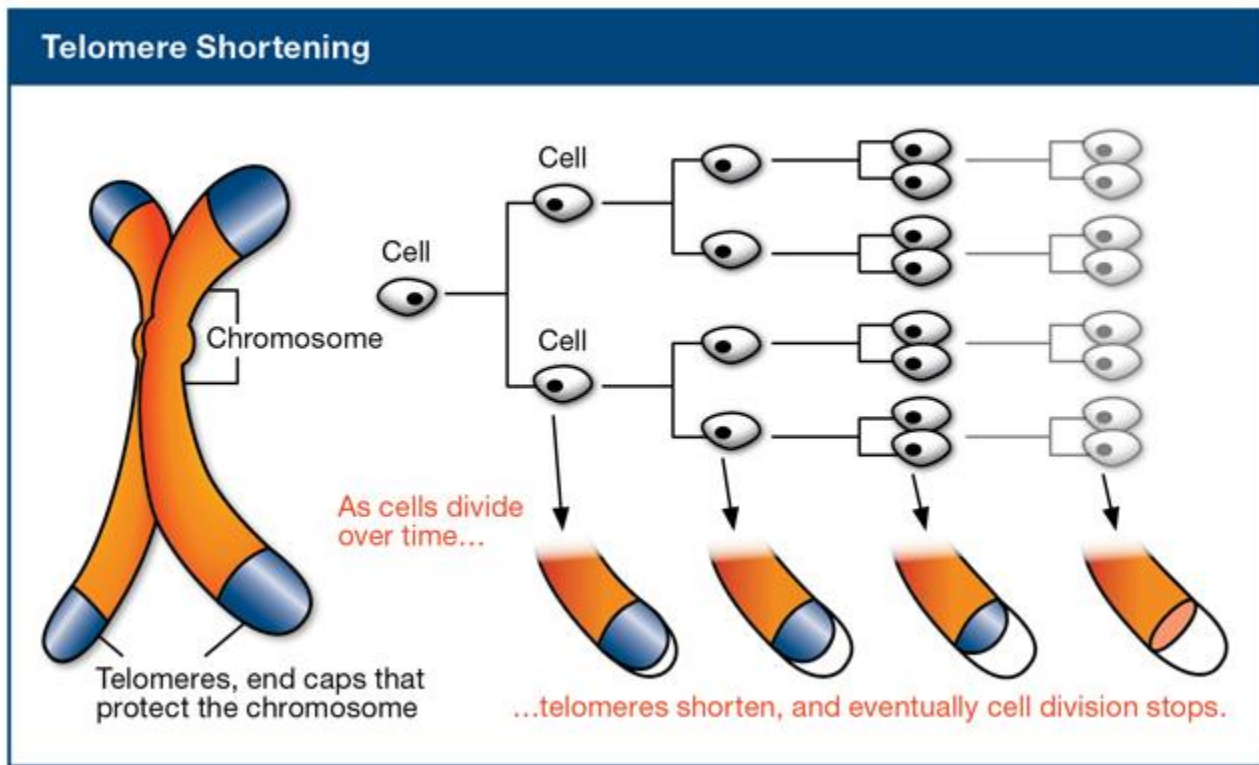
Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά τα PML-NBs και την εμπλοκή τους στην διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA πιθανά σενάρια δράσης μετά την καταστροφή του είναι τα εξής:

- Τα PML-NBs δρουν ως χώρος αποθήκευσης ο οποίος απελευθερώνει επιδιορθωτικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες ελέγχου.
- Η ενεργός ρύθμιση του DNA επιδιορθωτικού μηχανισμού. (9)

Τα τελομερή:

Το μήκος των χρωμοσωμάτων κάθε κυττάρου μειώνεται μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ελλάτωση ή την απώλεια της ανανεωτικής ικανότητας των κυττάρων. Όταν τα τελομερή φτάσουν σε ένα κρίσιμο μήκος το κύτταρο σταματάει να διπλασιάζεται και εισέρχεται στην διαδικασία γήρανσης. Στη φάση αυτή το κύτταρο είναι ανενεργό έως ότου γίνει αποπτωτικό και επέλθει ο κυτταρικός θάνατος. (4)

Το τέλος των γραμμικών χρωμοσωμάτων αποτελείται (στον άνθρωπο) από επαναλήψεις της αλληλουχίας 5'-TTAGGG-3'. Οι επαναλήψεις αυτές δημιουργούν μια συγκεκριμένη DNA δομή που αναγνωρίζεται από την ομάδα πρωτεϊνών "shelterin". Η ομάδα αυτή συμπεριλαμβάνει τις πρωτεΐνες TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 και TPP1. Οι πρωτεΐνες προσδέονται στο DNA σχηματίζοντας έτσι ένα νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο προστατεύει τα άκρα του χρωμοσώματος. Έτσι τα άκρα δεν αναγνωρίζονται ως σπάσιμο της διπλής αλυσίδας και προστατεύονται από την απόκριση στη DNA καταστροφή. (4) Χάρη στην τελομεράση η οποία είναι ένα ένζυμο με δράση ριβονουκλεοπρωτεϊνικής πολυμεράσης προστίθενται στο νεοσυντιθέμενο DNA των χρωμοσωμάτων επαναλήψεις της αλληλουχίας TTAGGG. Η τελομεράση έχει δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης και φέρει ένα RNA μόριο το οποίο χρησιμεύει ως μήτρα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Η έκφραση της τελομεράσης καταστέλλεται σε μεταγενετικά σωματικά κύτταρα με αποτέλεσμα την προοδευτική μείωση των τελομερών. Απορρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης σε σωματικά κύτταρα υποστηρίζεται ότι εμπλέκεται στη δημιουργία όγκων. Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η τελομεράση συμμετέχει επίσης στην επιδιόρθωση του DNA.

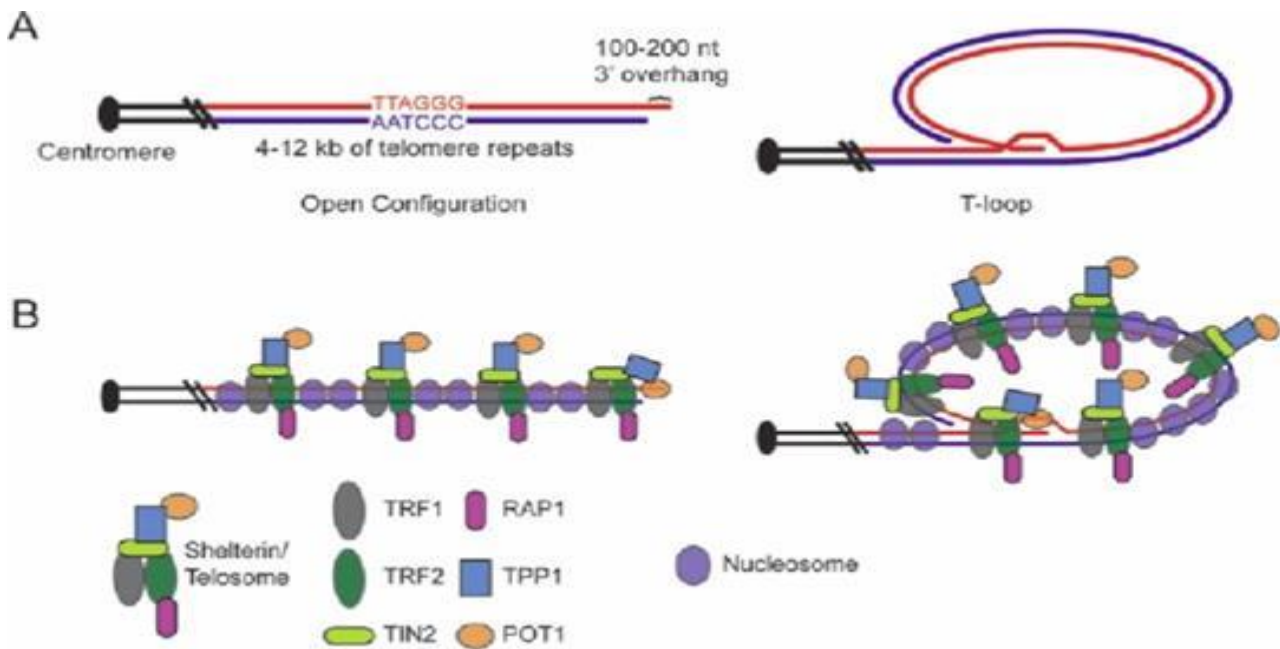


Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της μείωσης των τελομερών ανα κυτταρική διαίρεση

Η πρωτεΐνη TRF1:

Η πρωτεΐνη TRF1 (telomeric repeat binding factor 1) αλλιώς γνωστή ως TERC1 έχει αναφερθεί αρχικά ότι συμμετέχει κυρίως στον έλεγχο του μήκους των τελομερών. Σε πειράματα στα οποία έγινε στοχευμένη διαγραφή του γονιδίου TRF1 σε ποντίκια, παρατηρήθηκε πρόωρος εμβρυϊκός θάνατος. Η θνησιμότητα αυτή πιθανόν οφείλεται στην αποπροστασία των τελομερών λόγω έλειψης της πρωτεΐνης TRF1 ενώ ταυτόχρονη διαγραφή της πρωτεΐνης p53 για την DNA καταστροφή παρέτεινε τη ζωή των εμβρύων. (Η p53 πρωτεΐνη ενέχεται σε διαδικασίες κυτταρικής γήρανσης). (10)

Όπως αναφέρθηκε ήδη ο TRF1 παράγοντας εντοπίζεται στα τελομερή μαζί με άλλους παράγοντες που σχηματίζουν το προστατευτικό σύμπλοκο του κάθε τελομερούς. (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Α) απεικόνιση τελομερούς Β) Απεικόνιση παραγόντων που προσδέονται στο τελομερές.

PML IV και TRF1:

Υπό φυσιολογικές κυτταρικές συνθήκες οι πρωτεΐνες PML IV και TRF1 δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Ωστόσο όπως προαναφέραμε, και οι δύο βρίσκονται στον πυρήνα του κυττάρου. Σε καρκινικά κύτταρα (κυρίως σε όγκους μεσεγχυματικής και νευροεπιθηλιακής προέλευσης και σπανιότερα σε καρκινώματα) εντοπίζεται ένα εναλλακτικό, ανεξάρτητο τελομεράσης, μονοπάτι. Το μονοπάτι αυτό ονομάζεται ALT (Alternative Lengthening of Telomeres = εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών). (4) Είναι μια, ακόμη, ασαφής διαδικασία με την οποία κάποια αθανатоποιημένα ανθρώπινα και κάποια καρκινικά κύτταρα διατηρούν τα τελομερή τους. Στις ALT κυτταρικές σειρές ένα νέο είδος PML-NB (nuclear body) έχει περιγραφεί στο οποίο η PML πρωτεΐνη συνεντοπίζεται με το τελομερικό DNA, τις πρωτεΐνες που προσδέονται στα τελομερη TRF1, TRF2 καθώς και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση του DNA όπως οι RPA (παράγοντας αντιγραφής), RAD51 και RAD52. Αυτές οι δομές ονομάζονται APB (ALT-associated PML Nuclear Bodies= ALT-σχετιζόμενα PML πυρηνικά σωμάτια) και εμπλουτίζονται κατά την φάση G₂/M του κυτταρικού κύκλου. (1) Τα APBs είναι ένα υποσύνολο των PML-NBs που εμφανίζονται στα ALT κύτταρα και όχι σε φυσιολογικά ή σε κύτταρα που διαθέτουν τελομεράση. (8) Επιπλέον οι παράγοντες που ενέχονται στη συγκρότηση των APBs είναι σουμοϋλιωμένες. (9) Μέσα από πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί πως μεταλλαγμένες TRF1 και TRF2 πρωτεΐνες που είναι ανίκανες

να σουμοϋλιωθούν δεν μπορούν να σχηματίσουν APBs. (4) Τέλος στα ALT κύτταρα σε αντίθεση με τα εξαρτώμενα τελομεράσης τα PML-NBs συνεντοπίζονται με τους παράγοντες των τελομερών και αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη. (3)

Ο επικρατέστερος μηχανισμός δράσης του ALT μονοπατιού υποστηρίζεται ότι είναι η ρύθμιση των τελομερών του κυττάρου μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Γι' αυτό το λόγο παρατηρούνται στα ALT κύτταρα διακυμάνσεις στο μήκος των τελομερών και χρωμοσωμική αστάθεια. Στο επίπεδο σχηματισμού των APBs μελέτες με χρήση μικροσκοπίας υποστηρίζουν πως σχηματίζονται μέσω συσσώρευσης διαλυτής PML πρωτεΐνης στα τελομερή. Αυτή η συσσώρευση είναι πιθανό να μεσολαβείται από την απευθείας αλληλεπίδραση του TRF1 με την PML IV ισομορφή. (4)

2. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας:

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου της ισομορφής PML IV και η αλληλεπίδραση τους με τον τελομερικό παράγοντα πρόσδεσης TRF1.

Αρχικά με μέθοδο ανοσοκατακρήμνισης ελέγξαμε ποια από τις πρωτεΐνες PML III και PML IV αλληλεπιδρά καλύτερα με την TRF1. Επιλέξαμε την PML IV. Με μεθόδους cloning (περιγράφονται στο κεφάλαιο 3 «Υλικά και μέθοδοι») ενθέσαμε σε κατάλληλους φορείς το αμινοτελικό (περιλαμβάνει τα εξώνια 1->4 του γονιδίου) και το καρβοξυτελικό (περιλαμβάνει τα εξώνια 6->7) κομμάτι της PML IV καθώς και το TRF1. Στο E-GFP-N₁ πλασμίδιο ενθέσαμε το γονίδιο του TRF1 ενώ τα κομμάτια της PML IV ενθέθηκαν σε πλασμίδιο 3myc.

Έχοντας αυτά τα τμήματα DNA ενθεμένα σε πλασμίδια στην κατοχή μας, διαμολύναμε HEK 293T ανθρώπινα βλαστικά καρκινικά κύτταρα νεφρού. Με τεχνικές Western blot και co-IP (επίσης περιγράφονται στο κεφάλαιο 3 «Υλικά και μέθοδοι») ανιχνεύουμε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που μελετάμε. Το κομμάτι του PML IV που θα συνεντοπιστεί με το TRF1 θα είναι και αυτό με το οποίο αλληλεπιδρά.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η συγκεκριμένη *in vitro* μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς την χρήση ζωντανών οργανισμών (όπως για παράδειγμα *E.coli*). Η συγκεκριμένη αντίδραση μπορεί να πολλαπλασιάσει μια γενωμική περιοχή έως και δισεκατομμύρια φορές. Απαιτεί γνώση της αλληλουχίας που θα κλωνοποιηθεί ώστε να μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλη εκκινητές από τους οποίους θα ξεκινήσει να δρα η DNA πολυμεράση. Για κάθε δείγμα μας χρησιμοποιήσαμε τα ακόλουθα συστατικά: (σε όγκο διαλύματος $V=50\mu\text{L}$)

- 5 μL γενωμικό DNA αραιωμένο ώστε να έχει συγκέντρωση 50-100ng
- 1 μL 3' primer (αντίστροφος εκκινητής)
- 1 μL 5' primer
- 5 μL 10X buffer Taq
- 5 μL 25 mM MgCl_2 (το Mg είναι απαραίτητο για την κατάλυση από τη DNA πολυμεράση)
- 2 μL πυκνά Dntps
- 30 μL dH_2O
- 1 μL ένζυμο Taq πολυμεράσης

Εναλλακτικό μείγμα για PCR είναι να αντικατασταθούν τα: Taq buffer, MgCl_2 , DNTPs και ένζυμο Taq πολυμεράσης από το 25x Kappa mix το οποίο περιέχει όλα τα παραπάνω συστατικά. Η αναλογίες που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο όγκο ($V=50\mu\text{L}$) είναι οι εξής:

- 5 μL γενωμικό DNA
- 25x Kappa mix
- 1 μL 5' primer
- 1 μL 3' primer
- 18 μL H_2O

3.2 Εξαγωγή μπάντας από gel αγαρόζης (Gel extraction)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση της επιθυμητής ζώνης DNA από ένα σύνολο μπαντών σε gel αγαρόζης. Το υλικό που παραλαμβάνουμε μετά τη συγκεκριμένη διαδικασία μπορεί να εντεθεί ύστερα σε κάποιον επιθυμητό φορέα. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα.

- Αρχικά κόβουμε με νυστέρι την επιθυμητή μπάντα από το gel. Αυτό γίνεται με χρήση λάμπας UV έτσι ώστε να είναι ορατές οι μπάντες.
- Τοποθετούμε το κομμάτι αγαρόζης που έχουμε κόψει και περιλαμβάνει το επιθυμητό DNA σε ένα eppendorf.
- Ζυγίζουμε το κομμάτι αγαρόζης. (το βάρος του eppendorf είναι γνωστό και αφαιρείται από το μεικτό βάρος)
- Για κάθε 100 mg βάρους αγαρόζης προσθέτουμε 200 μ L NT1 buffer. [χρησιμοποιούμε το kit Nucleospin extract II (Macherey Nagel)].
- Επωάζουμε το eppendorf με το δείγμα μας στους 55 °C και χρησιμοποιούμε vortex ανα 5 λεπτά μέχρι να λιώσει πλήρως η αγαρόζη.
- Τοποθετούμε τη στήλη του kit σε ένα tube συλλογής των 2 mL και φορτώνουμε το δείγμα μας (μέχρι 700 μ L τη φορά)
- Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 11000g. Πετάμε το υλικό που διέρχεται από τη στήλη στο tube και επαναλαμβάνουμε μέχρι να διέλθει όλο το δείγμα μας από τη στήλη κατακράτησης του DNA.
- Προσθέτουμε 700 μ L NT3 buffer το οποίο περιέχει αιθανόλη στη στήλη και φυγοκεντρούμε στις 11000g για 1 λεπτό ώστε να πλύνουμε την κολώνα μας. Απομακρύνουμε εκ νέου το υλικό που συγκεντρώνεται στο tube.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στις 11000g για 2 λεπτά ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη και να απομακρυνθούν τυχόν υπολλείματα.
- Τέλος προσθέτουμε 15-30 μ L NE buffer για να εκλουστεί το DNA. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκεντρούμε στις 11000g για ένα λεπτό. (έχουμε τοποθετήσει καινούριο tube κάτω από τη στήλη ώστε το υλικό που παραλαμβάνεται να μην αναμειχθεί με τα προηγούμενα).

3.3 Αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation)

Μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας γίνεται συνένωση ενός επιθυμητού ενθέματος (insert) με ένα πλασμιδιακό φορέα (vector). Ο υπολογισμός των ποσοτήτων που θα προστεθούν στην αντίδραση συγκόλλησης δίνεται από την εξής εξίσωση:

$$\text{ng insert} \geq \text{ng vector} \times 10 \times \frac{\text{μοριακό βάρος insert}}{\text{μοριακό βάρος vector}}$$

(Η ποσότητα του φορέα και του ενθέματος υπολογίζονται αφού πρώτα τα έχουμε τρέξει σε gel αγαρόζης)

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 20 μL . Εκτός από το φορέα και το ένθεμα το διάλυμα περιέχει λιγάση (προέρχεται από T4 φάγο) και το buffer (+ATP) της. Ο όγκος του buffer δεν πρέπει να ξεπερνάει το 1/10 του συνολικού όγκου. Συνεπώς για όγκο διαλύματος 20 μL προσθέτουμε 2 μL buffer. Στην περίπτωση που ο φορέας και το ένθεμα έχουν λεία άκρα (blunt ends) η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Στην αντίθετη περίπτωση που τόσο ο φορέας όσο και το ένθεμα έχουν προεξέχοντα μονόκλινα κολλώδη άκρα (sticky ends) η αντίδραση πραγματοποιείται στους 16 $^{\circ}\text{C}$.

3.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων (Transformation)

Μετασχηματισμός είναι η γενετική τροποποίηση ενός κυττάρου (βακτηρίου στη συγκεκριμένη τεχνική) που προκύπτει από την άμεση πρόσληψη και ενσωμάτωση εξωγενούς γενετικού υλικού από το περιβάλλον του μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή όταν θέλουμε να εισάγουμε σε βακτηριακά κύτταρα ένα πλασμίδιο που φέρει ένα επιθυμητό ένθεμα. Η διαδικασία αυτή συνήθως ακολουθείται της αντίδρασης μοριακή συγκόλλησης (ligation). Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση κυττάρων E.coli του στελέχους DH5α τα οποία έχουν καταστεί επιδεκτικά στον μετασχηματισμό ύστερα από ειδική επεξεργασία με CaCl_2 .

- Παραλαμβάνουμε τα βακτήρια τα οποία φυλάσσονται στους -80°C σε errendorf (κάθε errendorf περιέχει 100 μL διαλύματος) και τα διατηρούμε σε πάγο.
- Προσθέτουμε τη ligation ή το πλασμίδιο που θέλουμε να εισάγουμε στα κύτταρα στο errendorf που περιέχει τα βακτήρια. Με αυτό τον τρόπο το DNA έρχεται σε επαφή με τα βακτηριακά κύτταρα.
- Επωάζουμε για 30 λεπτά σε πάγο.
- Πραγματοποιούμε θερμικό σοκ στους 42°C για 1:30 λεπτά ώστε να υποβοηθήσουμε την είσοδο του πλασμιδίου στα επιδεκτικά κύτταρα. Το θερμικό σοκ προκαλεί άνοιγμα των πόρων του κυττάρου με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολη η πρόσβαση του εξωγενούς γενετικού υλικού.
- Για 1 λεπτό στον πάγο.
- Προσθέτουμε 900 μL καθαρό θρεπτικό LB στο διάλυμα και επωάζουμε στους 37°C για 30 λεπτά ώστε τα βακτήρια να επανέλθουν μετά το θερμικό σοκ και να επέλθουν σε διαδικασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού. (το θρεπτικό υλικό δεν περιέχει αντιβιοτικό)
- Απλώνουμε 100 μL από τα συνολικά 1000 σε τρυβλίο που περιέχει στερεό θρεπτικό LB μέσο και κατάλληλο αντιβιοτικό.
- Την υπόλοιπη ποσότητα (900 μL) τη φυγοκεντρούμε στις 6000rpm για 1 λεπτό. Πετάμε τη μεγαλύτερη ποσότητα από το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε την πελέτα. Απλώνουμε τα κύτταρα όπως και στο προηγούμενο βήμα. Το πλασμίδιο προσδίδει ανθεκτικότητα στα βακτήρια που το φέρουν λόγω του γονιδίου ανθεκτικότητας που φέρει στο γονιδίωμα του. Αυτή η ιδιότητα χρησιμεύει στη διαλογή των μετασχηματισμένων από των μη-μετασχηματισμένων κυττάρων. Όσα κύτταρα έχουν ενσωματώσει το πλασμίδιο θα μπορέσουν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν παρουσία αντιβιοτικού στο τρυβλίο.
- Αφήνουμε τα τρυβλία στους 37°C για όλο το βράδυ ώστε να αναπτυχθούν τα βακτήρια με το πλασμίδιο μας και να σχηματιστούν αποικίες.
- Παίρνουμε μοναδιαίες αποικίες από το τρυβλίο και τις μεγαλώνουμε ξεχωριστά σε κωνική φιάλη που περιέχει υγρό θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικό.
- Επωάζουμε ξανά όλο το βράδυ στους 37°C

(Μετά ακολουθεί η διαδικασία της απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA η οποία αναλύεται παρακάτω.)

3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Miniprep)

Η τεχνική αυτή αφορά μετασχηματισμούς βακτηρίων, τα οποία έχουν επωαστεί σε φλάσκες ή κωνικές φιάλες ёγκου <50 mL. Η διαδικασία βασίζεται στην αλκαλική λύση των βακτηρίων και στην παραλαβή του πλασμιδιακού DNA. Τα βήματα για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι τα εξής:

- Μεταφορά σε σωληνάκια των κλώνων που προέκυψαν από επώαση στο τρυβλίο. Κάθε σωληνάκι περιέχει 1,5 mL θρεπτικό LB και αντιβιοτικό σε συγκέντρωση 1/1000.
- Επωάζουμε τα σωληνάκια για ~18 ώρες στους 37 °C σε αναδευτήρα. Έτσι εξασφαλίζονται οι ανάγκες τις καλλιέργειας για καλό αερισμό των βακτηρίων.
- Παίρνουμε 1 mL από κάθε καλλιέργεια σε errendorf και φυγοκέντρούμε για 1 λεπτό στις 6000rpm.
- Πετάμε το υπερκείμενο που περιέχει το θρεπτικό μέσο και κρατάμε τη βακτηριακή πελέτα.
- Επαναδιαλυτοποιούμε την πελέτα του κάθε errendorf χρησιμοποιώντας vortex σε 100 µL διαλύματος S1 (resuspension buffer) το οποίο περιέχει RNase.
- Προσθέτουμε 100 µL διαλύματος S2 το οποίο λύνει τα κύτταρα. Για καλύτερη δράση του διαλύματος ανακινούμε καλά.
- Προσθέτουμε 100 µL διαλύματος S3 ώστε να εξουδετερωθεί το S2 διάλυμα και να επανέλθει το PH σε ουδέτερες τιμές. Ανακινούμε καλά και πάλι με το χέρι και φυγοκεντρούμε στις 14000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- Παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο (~300 µL) και προσθέτουμε αιθανόλη 2,5 φορές τον όγκο του υπερκειμένου μας (~750 µL). Έτσι κατακρημνίζεται το DNA.
- Ανακινούμε και φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο που περιέχει την αιθανόλη και στεγνώνουμε καλά τη πελέτα.

- Επαναδιαλυτοποιούμε την πελέτα σε 100 μL dH_2O και αποθηκεύουμε στους -20°C .

3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (Maxiprep)

Η τεχνική αυτή έχει την ίδια λειτουργία με την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας. Η μόνη τους διαφορά είναι ότι οι φλάσκες ή κωνικές φιάλες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν όγκο $>200\text{ mL}$.

- Προσθέτουμε αντιβιοτικό σε θρεπτικό LB σε τελική συγκέντρωση 1/1000.
- Παίρνουμε μικρή ποσότητα (της τάξης του mL) από την υγρή καλλιέργεια που θέλουμε να μεγαλώσουμε και την προσθέτουμε στο θρεπτικό.
- Η καλλιέργεια επωάζεται για ~ 18 ώρες στους 37°C σε αναδευτήρα.
- Μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε πλαστικά baquets και φυγοκεντρούμε στις 5000rpm για 10 λεπτά.
- Παραλαμβάνουμε πελέτα, πετάμε υπερκείμενο.
- Χρήση ειδικών κολώνων για απομόνωση πλασμιδιακού DNA.
- Προσθέτουμε στην κολώνα 12mL equilibrium buffer για εξισορρόπηση της.
- Προσθήκη 8 mL παγωμένου διαλύματος (resuspension buffer) S1. Το S1 buffer περιέχει RNase.
- Επαναδιαλυτοποιούμε την πελέτα ανακινώντας με το χέρι.
- Προσθέτουμε 8 mL (lysis buffer) S2. Το buffer S2 προκαλεί λύση στα κύτταρα.
- Εξισορρόπηση του PH του διαλύματος με προσθήκη 8 mL (neutralization buffer) S3. Το buffer S3 προστατεύει το DNA το οποίο αν παραμείνει για χρονικό διάστημα πάνω από 5 λεπτά στο διάλυμα S2 καταστρέφεται.
- Φορτώνουμε το δείγμα στην κολώνα. Το πλασμιδιακό DNA θα συγκεντρωθεί στο κάτω φίλτρο της κολώνας.
- Μετά τη διέλευση του δείγματος από την κολώνα πραγματοποιούμε δύο πλύσεις. 1^η: προσθήκη 5 mL equilibrium buffer. Αφαίρεση πάνω φίλτρου

(σε αυτό είναι συγκεντρωμένα κυτταρικά υπολλείματα και γενωμικό DNA)
2^η : 8 mL washing buffer.

- Προσθέτουμε 5 mL elution buffer ενώ πρώτα έχουμε τοποθετήσει ένα falcon κάτω από την κολώνα για να συλλέξουμε εκεί το πλασμιδιακό DNA.
- Κατακρημνίζουμε το DNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (~5mL).
- Φυγοκέντρηση στις 3100rpm για 30 λεπτά.
- Πετάμε το υπερκείμενο, κρατάμε την πελέτα και την επαναδιαλυτοποιούμε σε TE buffer. Ο όγκος του TE εξαρτάται από το μέγεθος της πελέτας.
- Αποθηκεύουμε στους -20°C.
- Τρέχουμε το DNA που απομονώσαμε σε gel αγαρόζης 1% ώστε να ποσοτικοποιήσουμε το πλασμιδιακό DNA που παραλάβαμε ενώ παράλληλα μπορούμε να ελέγξουμε και την ποιότητα του. (αν είναι ακέραιο ή nicked).

3.7 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με φωσφορικά άλατα και CaCl₂ (Transfection)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται στη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με μια ή περισσότερες πλασμιδιακές κατασκευές. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο συσσωματώνεται με θετικά ιόντα του ασβεστίου και στην συνέχεια κατακάθεται πάνω στα κύτταρα. Αυτό συμβαίνει λόγω της προσκόλλησης σε αρνητικά φωσφορικά άλατα μεγάλου μοριακού βάρους. Η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιείται για τα εκάστοτε πειράματα (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν T293 κύτταρα). Ο συνολικός όγκος που προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι είναι το 1/10 του όγκου του θρεπτικού που αυτό περιέχει. Η ποσότητα του πλασμιδίου που πρέπει να προσθέσουμε διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος του πηγαδιού (για παράδειγμα σε μια 6-well plate προσθέτουμε ~5 μg πλασμιδίου ενώ σε μια 12-well plate ~2,5 μg. Η διαδικασία που ακολουθείτε είναι η εξής:

- Ελέγχουμε αν τα πλασμίδια μας είναι σε καλή κατάσταση (υπερελικωμένα και χωρίς εγκοπές) και τα ποσοτικοποιούμε τρέχοντας μια ποσότητα τους (της τάξης του >1μL) σε gel αγαρόζης.
- Σε αποστειρωμένα tubes προσθέτουμε CaCl₂ 2.5 M (20x) αραιωμένο 10 φορές, τα πλασμίδια που θέλουμε να εισαχθούν στα ευκαρυωτικά κύτταρα και dH₂O έως ότου συμπληρωθεί ο μισός όγκος διαλύματος που θα προστεθεί σε κάθε πηγαδάκι.
- Ο υπόλοιπος όγκος (άλλος μισός) του διαλύματος είναι φωσφορικά άλατα Hebs (2x). Συνολικά κάθε πηγαδάκι λοιπόν περιέχει 1x CaCl₂, 1x Hebs και το DNA προς εισαγωγή.
- Αφήνουμε να επωαστεί το διάλυμα για 20 λεπτά στον απαγωγό μέχρι να σχηματιστεί ίζημα.
- Προσθέτουμε με προσοχή το διάλυμα ενώ παράλληλα ανακινούμε ομαλά την plate ώστε να απλωθεί ομοιόμορφα στα κύτταρα.
- Τα κύτταρα επώάζονται στους 37 °C για 16-18 ώρες. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από το είδος του κυττάρου που χρησιμοποιείται.
- Ξεκολλάμε τα κύτταρα με προσθήκη 1 mL PBS-EDTA και τα μαζεύουμε σε αποστειρωμένα falcons.

3.8 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα και ακολουθείτε του transfection που αναφέραμε στην ενότητα 3.7. Γίνεται χρήση ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης έτσι ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολουθεί η σήμανση της προς μελέτης πρωτεΐνης με αντισώματα, ειδικά για την πρωτεΐνη στόχο. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε ήταν η εξής:

- Αφού έχουμε μαζέψει τα κύτταρα σε falcons φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 5 λεπτά.
- Πετάμε υπερκείμενο, κρατάμε πελέτα και κάνουμε πλύσεις προσθέτοντας 1 mL PBS. Επαναδιαλυτοποιούμε καλά την πελέτα.
- Μεταφέρουμε σε αποστειρωμένα erpendorfs και φυγοκεντρούμε στις 6000rpm για 1 λεπτό.

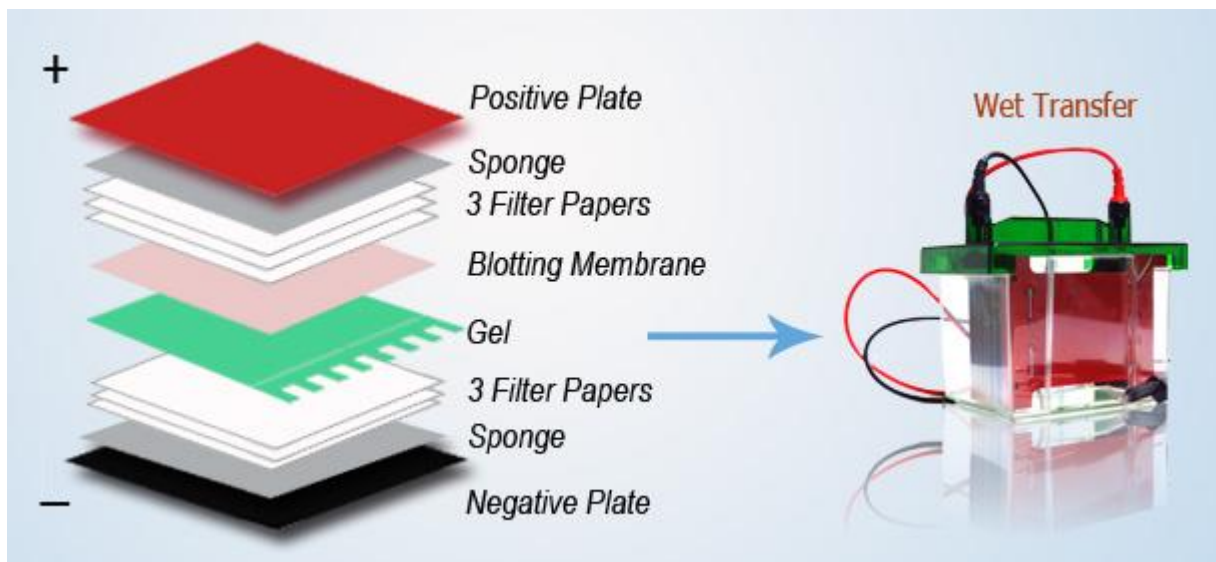
- Πετάμε υπερκείμενο, κρατάμε πελέτα και επαναδιαλυτοποιούμε με προσθήκη 1 mL PBS.
- Επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση. (6000rpm για 1 λεπτό)
- Προσθήκη 120 μ L RIPA (προκαλεί λύση κυττάρων).
- Φυγοκέντρηση 6000rpm για 1 λεπτό.
- Φτιάχνουμε μείγμα με 1 mL RIPA και 1/100 όγκου PMSF (10 μ L). Το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών και προστατεύει τις πρωτεΐνες από την καταστροφή. Σε κάθε δείγμα προσθέτουμε 150 μ L από το μείγμα.
- Στον πάγο για 20 λεπτά ώστε να δράσουν οι RIPA και PMSF.
- Φυγοκέντρηση στους 4 °C στις 14000 rpm για 10 λεπτά.
- Μεταφέρουμε υπερκείμενο στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες σε νέα tubes.

Προετοιμασία για ηλεκτροφόρηση:

- Στήνουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Ετοιμάζουμε το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. (running και stacking gel)

Προετοιμασία δειγμάτων:

- Τοποθετούμε 20 μ L από κάθε δείγμα σε νέο tube.
- Προσθέτουμε 5 μ L πρωτεινικό loading buffer.
- Βράζουμε για 5 λεπτά τα δείγματα μας και το Benedict marker (ώστε να αποδιαταχθούν καλά οι πρωτεΐνες και να τρέξουν ομοιόμορφα στο gel)
- Προσθέτουμε running buffer (περιέχει Tris/Glycine, SDS και H₂O) μέχρι το σημείο των ηλεκτροδίων.
- Τρέχουμε τις πρωτεΐνες στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.
- Ετοιμάζουμε τη συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
- Προσθέτουμε transfer buffer (περιέχει Glycine H₂O και μεθανόλη)
- Αφήνουμε να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη μέσω ηλεκτροφόρησης. Οι πρωτεΐνες κινούνται από τον αρνητικό στο θετικό πόλο των ηλεκτροδίων. (Εικόνα 6)



Εικόνα 6 Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη γίνεται προσθήκη αντισώματος το οποίο προσδένεται εκλεκτικά με την πρωτεΐνη στόχο. Ανάλογα την πρωτεΐνη που μελετάμε προσθέτουμε και διαφορετικό αντίσωμα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα:

- α-GFP (για την ανίχνευση TRF1) που είχε παραχθεί από κουνέλι.
- α-myc (για την ανίχνευση του PML) από ποντίκι.
- Monomeric red (για την ανίχνευση του PML) από κουνέλι.

Η διαδικασία πρόσδεσης των αντισωμάτων στις πρωτεΐνες στόχους είναι η εξής:

- Προσθέτουμε TBST στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ώστε να μην αφυδατωθεί.
- Αφαιρούμε TBST και προσθέτουμε χρωστική Ponceau για να ελέγξουμε αν έχει γίνει μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη.
- Ξεπλένουμε καλά μέχρι να φύγει η χρωστική με νερό ή TBST.
- Blocking με γάλα (5%) για 1 ώρα σε αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου (ώστε να μην έχουμε μη ειδική πρόσδεση αντισώματος)
- Προσθήκη πρώτου αντισώματος σε συγκέντρωση: 1/250 για το myc, 1/1.000 για τα GFP και monomeric red αντισώματα.
- Σε αναδευτήρα για 1 ώρα.
- 3 πλυσίματα των 5 λεπτών το κάθε ένα με TBST.
- Προσθήκη δεύτερου αντισώματος το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο HRP (υπεροξειδάση). Χάρη σε αυτό βλέπουμε την πρωτεΐνη μας κατά την έκθεση καθώς το ένζυμο της υπεροξειδάσης αντιδρά με το υπόστρωμα ECL. Η

συγκέντρωση του δεύτερου αντισώματος που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα εργασία ήταν: 1/10.0000 και για τα δύο αντισώματα anti-mouse και anti-rabbit.

- 3 πλυσίματα των 5 λεπτών το κάθε ένα με TBST.
- Έκθεση. Με αυτό τον τρόπο οπτικοποιούμε την ειδική πρόσδεση του πρώτου αντισώματος (πρωτογενούς) με τη μέθοδο της χημειοφωταύγιας. Γίνεται με χρήση υποστρώματος ECL.

Για να ξανα χρησιμοποιήσουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για άλλο αντίσωμα κάνουμε stripping με strip buffer εως ότου καλυφθεί η μεμβράνη. Επωάζουμε για 10 λεπτά στους 65 ° C. Το buffer βοηθάει στην απομάκρυνση προηγούμενων πρώτων και δεύτερων αντισωμάτων.

- Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία για το επόμενο πρώτο και δεύτερο αντίσωμα.

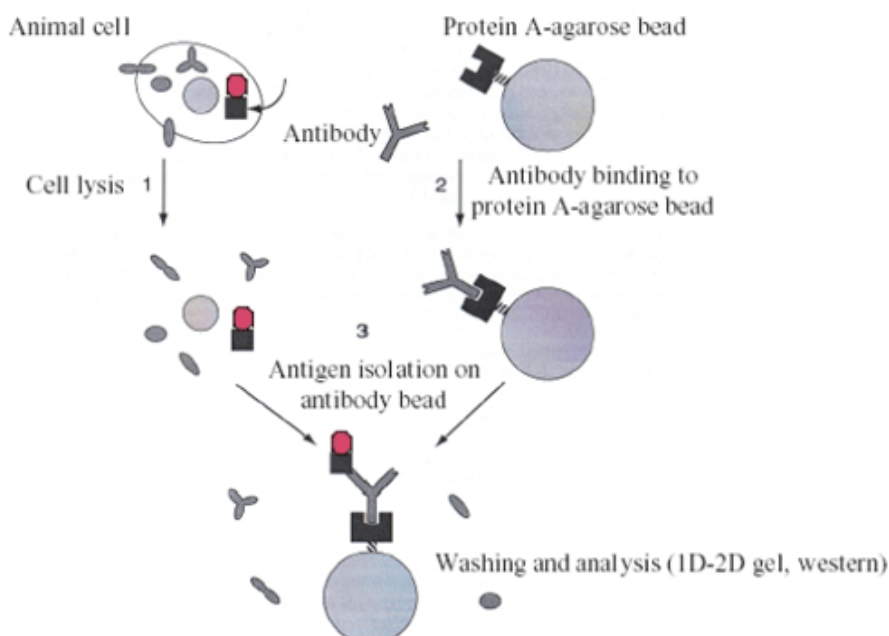
Για να υπολογίσουμε το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιούμε την εξίσωση:

$$MB = N \text{ αμινοξέων} \times 110 \text{ Dalton}$$

Όπου N ο αριθμός των αμινοξέων. Το 110 προκύπτει από το γεγονός ότι ένα αμινοξύ ισούται με 110 Da.

3.9 Συνκατακρήμνιση πρωτεϊνών (co-IP)

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιούμε beads (σφαιρίδια αγαρόζης) τα οποία συντηρούνται σε 60% αιθανόλη. Μαζί με τα extracts φεύγουν όσες πρωτεΐνες κάνουν μη ειδική πρόσδεση. (Εικόνα 7)



Εικόνα 7: απεικόνιση πρόσδεσης αντισώματος σε bead

Η διαδικασία που ακολουθείται για την συν-κατακρήμνιση πρωτεϊνών είναι η εξής:

- Προσθέτουμε σε tubes 10 μL beads. (όσα τα δείγματα μας τόσα και τα tubes)
- 3 πλυσίματα με 500 μL co-IP buffer στις 3500rpm για 1 λεπτό.
- Τα δείγματα μας θα τρέξουν με και χωρίς beads. Γι'αυτό το λόγο παίρνουμε 100 μL και 10 μL από το ίδιο δείγμα σε διαφορετικά tubes. Στα 100 μL θα προσθέσουμε τα 10 μL από τα beads. Για καλύτερη παραλαβή των beads τα προσθέτουμε 100 μL co-IP buffer και παίρνουμε με tip το οποίο το έχουμε κόψει στην άκρη του ώστε να έχει μεγαλύτερο άνοιγμα. (οι ποσότητες του co-IP buffer και των δειγμάτων υπολογίζονται κάθε φορά από την ποσότητα πρωτεΐνης που έχουμε)
- Για 1 ώρα στους 4 $^{\circ}\text{C}$.
- Φυγοκέντρηση στους 4 $^{\circ}\text{C}$ για 2 λεπτά.
- Κρατάμε υπερκείμενο. Προσθέτουμε πρωτογενές αντίσωμα.
- Για 1 ώρα στους 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight.
- 3 πλυσίματα με 500 μL co-IP buffer για 1 λεπτό στις 3500rpm στους 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 20 μL beads σε κάθε δείγμα
- Για 3 ώρες στους 4 $^{\circ}\text{C}$ σε αναδευτήρα.
- 100 μL από PMSF (αναστολέας πρωτεασών) σε 1mL NENT buffer.
- Φυγοκέντρηση στις 3500rpm στους 4 $^{\circ}\text{C}$ για 2 λεπτά.
- Πετάμε υπερκείμενο, κρατάμε πελέτα.
- Προσθήκη 1 mL NENT buffer σε κάθε δείγμα.
- 5 λεπτά στον πάγκο
- Επαναλαμβάνουμε 3 φορές.

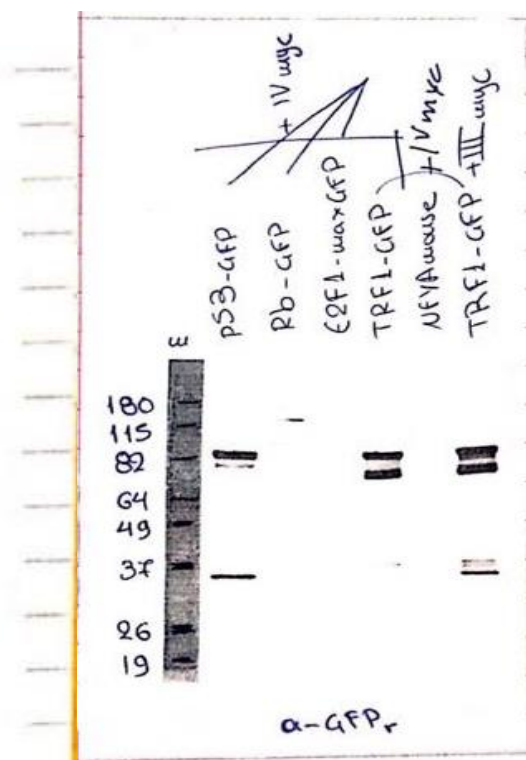
Μετά από αυτή την διαδικασία ακολουθεί ίδια με το Western blot που αναφέραμε παραπάνω (ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και έκθεση με υπόστρωμα ECL)

4. Αποτελέσματα:

Η βιβλιογραφία αναφέρει πως η PML IV αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την TRF1 σε σχέση με άλλες ισομορφές της PML πρωτεΐνης. Αυτό το εξακριβώσαμε με Western blot και co-IP. (1^ο πείραμα) Χρησιμοποιήσαμε και άλλες πρωτεΐνες εκτός από την TRF1 ως control. Στο πείραμα αυτό κάναμε υπερέκφραση των πρωτεϊνών με παροδική διαμόλυνση. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι χμαιρικές με φθορίζοντα μόρια όπως για παράδειγμα GFP. Τα PML έχουν myc επίτοπο. Με Western blot ελέγχουμε εάν έχουν εκφραστεί οι πρωτεΐνες μας και τις ποσοτικοποιούμε για το co-IP.



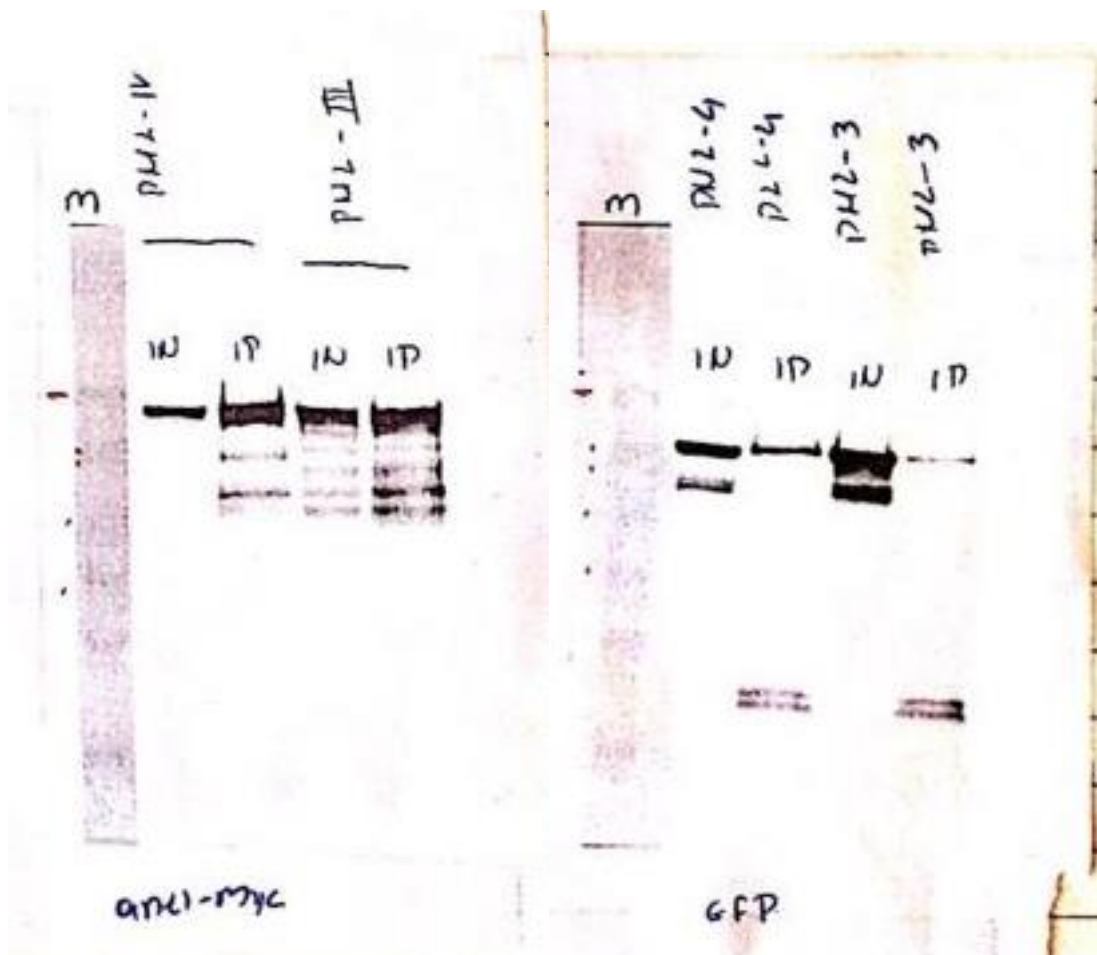
Εικόνα 8: myc αντίσωμα



Εικόνα 9: GFP αντίσωμα

Όπως φαίνεται και στις Εικόνες 8,9 η TRF1 υπάρχει τόσο στα κύτταρα που εκφράζουν και PML IV όσο και σε αυτά με PML III πρωτεΐνη. Για να ελέγξουμε αν η TRF1 αλληλεπιδρά με τις PML III και PML IV κάναμε χρήση της τεχνικής co-IP τα αποτελέσματα της οποίας αναπαριστώνται στις εικόνες 10,11. Για να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών PML και TRF1 χρησιμοποιήσαμε πρώτα myc αντίσωμα. Το συγκεκριμένο αντίσωμα προσδένεται στην πρωτεΐνη PML. Ανιχνεύουμε την ύπαρξη της αλληλεπίδρασης με το GFP αντίσωμα που προσδένει τη χμαιρική πρωτεΐνη GFP-TRF1. Τα input χρησιμοποιούνται ως σημεία αναφοράς για την έκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης και περιέχουν το 1/10 του όγκου των IP. Αν οι πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους θα εμφανιζόταν ζώνη στο input αλλά όχι

στο ip. Όπως φαίνεται στις εικόνες 10 και 11 οι πρωτεΐνες μας δίνουν την ίδια ζώνη σε input και ip. Έτσι συμπεραίνουμε ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών TRF1 και PML. Επιλέξαμε την PML IV γιατί όπως φαίνεται και στις εικόνες αλληλεπιδρά καλύτερα με την TRF1 καθώς στο ip για το αντίσωμα GFP η ζώνη έχει μεγαλύτερο πλάτος.

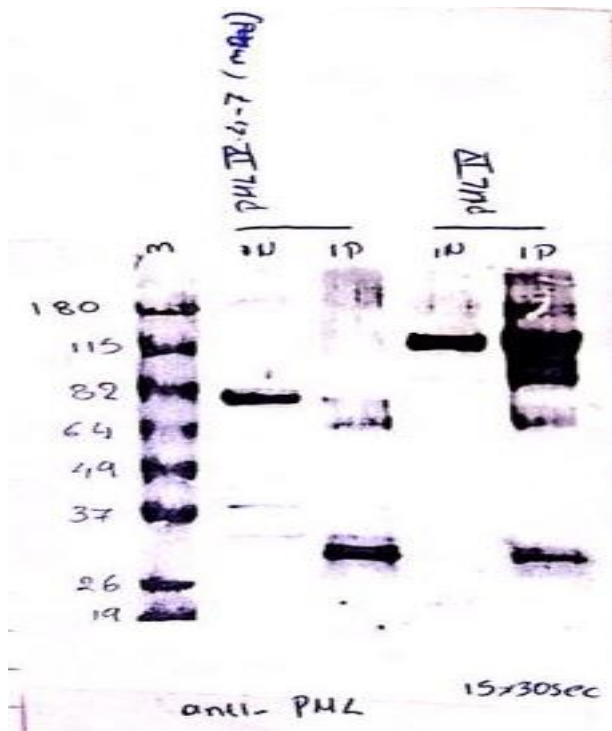


Εικόνα 10: myc αντίσωμα

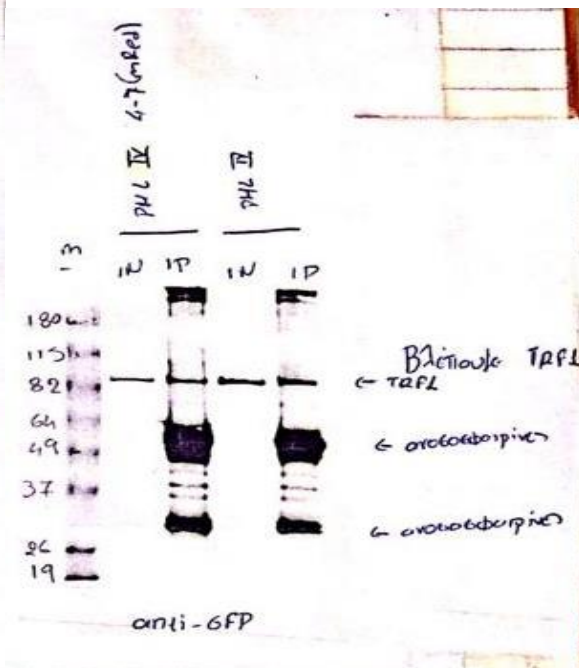
Εικόνα 11: GFP αντίσωμα

Πραγματοποιήσαμε ένα επιπλέον πείραμα (2^ο πείραμα) συν-κατακρήμνησης πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας τις πρωτεΐνες PML IV (4-7)/mRed και PML IV ώστε να δούμε αν χωρίς το αμινοτελικό άκρο της, αλληλεπιδρά εξίσου καλά η PML IV πρωτεΐνη με τον TRF1 παράγοντα. Όπως φαίνεται και στις εικόνες 12,13 το καρβοξυτελικό κομμάτι αλληλεπιδρά και εκείνο εξίσου με την TRF1. Όπως και στο προηγούμενο πείραμα συνκατακρήμνησης εμφανίζεται ίδια ζώνη σε input και ip. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήσαμε PML αντίσωμα για να κατεβάσουμε τις πρωτεΐνες μας και GFP για να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση. Στην εικόνα 13

παρατηρούμε ίδια ζώνη, αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών ενώ οι υπόλοιπες ζώνες που εμφανίζονται είναι πιθανόν ανοσοσφαιρίνες.



Εικόνα 12: co-IP με αντίσωμα PML

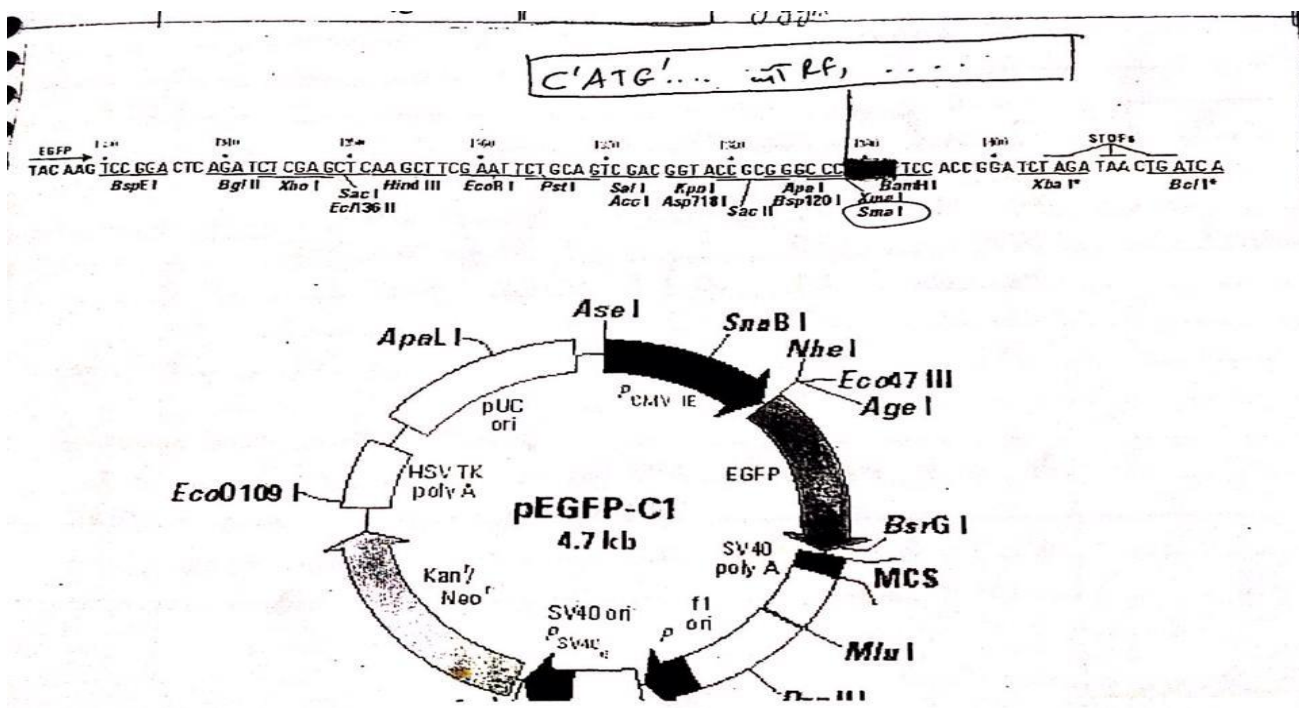


Εικόνα 13: co-IP με GFP αντίσωμα

Στο επόμενο πείραμα (3^ο πείραμα) ενθέσαμε σε 3mgc πλασμίδιο το αμινοτελικό κομμάτι που αποτελείται από τα εξώνια 1-4 του γονιδίου της PML και το καρβοξυτελικό κομμάτι που αποτελείται από τα εξώνια 6-7. Τα κομμάτια αυτά DNA τα πήραμε από πλασμίδιο mRED στο οποίο και ήταν κλωνοποιημένα. Επίσης ενθέσαμε τον TRF1 παράγοντα σε φορέα EGFP-C1.

Cloning TRF1 σε E-GFP-C1 φορέα (vector):

Για την παραλαβή πλασμιδίου που φέρει το TRF1 γονίδιο, κόβουμε φορέα και ένθεμα με BamH1 και EcoRI ένζυμα. Συνεχίζουμε με μοριακή συγκόλληση (ligation) των άκρων και μέσω της τεχνικής του transformation και mini preps παίρνουμε τους κατάλληλους κλώνους που φέρουν το πλασμίδιο με το TRF1 γονίδιο. (η ίδια ακολουθία τεχνικών γίνεται και στα επόμενα cloning).



Εικόνα 14: φορέας EGFP-C1 στον οποίο ενθέσαμε το TRF1 γονίδιο

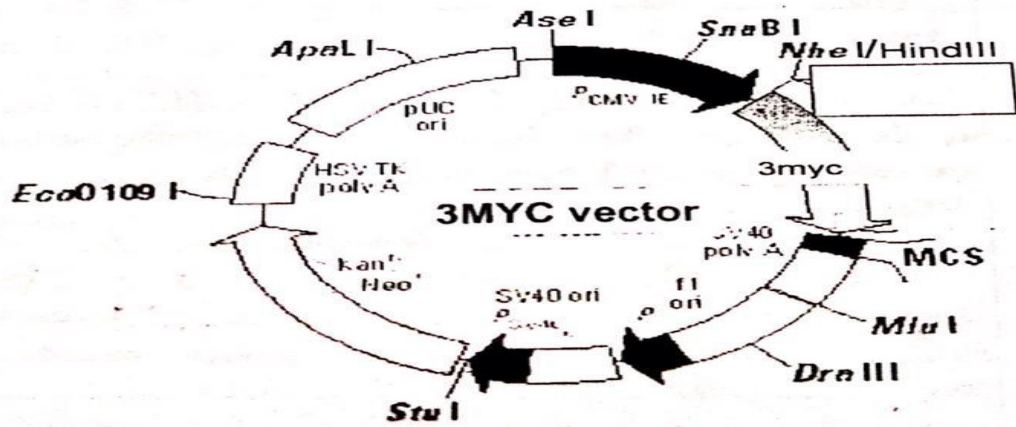
Cloning PML IV (1-4) σε 3myc φορέα (vector):

Αρχικά κόβουμε το κομμάτι της PML IV (1-4) με τα ένζυμα EcoRI και BamHI. Κάνουμε Klenow ώστε να δημιουργηθούν τυφλά άκρα ενώ παράλληλα κόβουμε και το φορέα με Sma ένζυμο ώστε να δημιουργηθούν άκρα τα οποία θα κολλήσουν με το DNA PML IV (1-4). Μετά από κάθε κόψιμο με περιοριστικό ένζυμο τρέχουμε 5 μl για να επιβεβαιώσουμε ότι έχει δράσει το ένζυμο αποτελεσματικά. Αφού κόψουμε λοιπόν και τα δύο DNA, δημιουργώντας άκρα, με μοριακή συγκόλληση (ligation) τα ενώνουμε. Έτσι ολοκληρώθηκε ένα από τα 3 πρώτα πειράματα για την παρούσα εργασία. Στην εικόνα 15 απεικονίζεται ο φορέας 3myc στον οποίο ενέθηκε τόσο το PML IV (1-4) όσο και το PML IV (6-7).

```

1      AGCTTGATCGAATTGACCATGGAGCAGAAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGAATTGACC
      NcoI      BclI      NcoI
      S L I E L T M E O K L I S E E D L E L T
61     ATGGAGCAGAAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGAATTGACCATGGAGCAGAAAGCTGATC
      BclI      AlwNI      NcoI      AlwNI      BclI
      M E O K L I S E E D L E L T M E O K L I
121    AGCGAGGAGGACCTGGAATTAATTCTGCAGTCGACCGTACCGCGGGGCCGGGATCCACCGGATCTAGATAactga
      AseI      PstI      SalI      KpnI      SacII      SmaI      BamHI      XbaI
      S E E D L E L L I L Q S T V P R A R D P P D L D N

```



Εικόνα 15: φορέας 3MYC στον οποίο ενθέσαμε το γονίδιο για την PML IV (1->4) πρωτεΐνη.

Cloning PML IV (6-7) σε 3myc φορέα (vector):

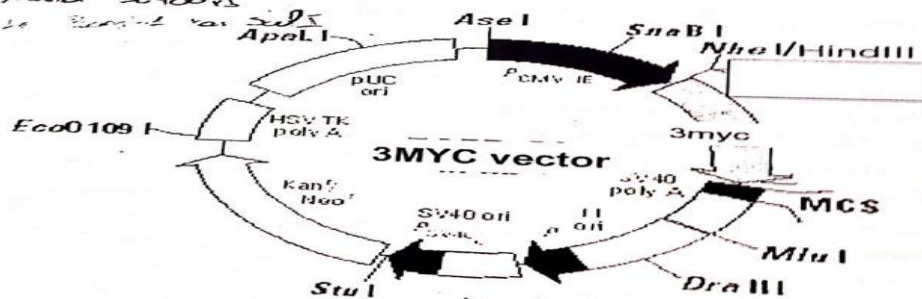
Στο τελευταίο μας cloning κόβουμε τα PML IV (6-7) με τα ένζυμα BglIII και BamH1. Κάνουμε κλωνοποίηση του DNA σε 1,5 % gel αγαρόζης και το απομονώνουμε με gel extraction. Ο φορέας 3myc κόβεται με BamHI ένζυμο. Με μοριακή συγκόλληση (ligation) ενώνονται τα άκρα πλασμιδίου- pml και έτσι έχουμε και το δεύτερο πλασμίδιο κλωνοποιημένο με το DNA που χρειαζόμαστε.

```

1      AGCTTGATCGAATTGACCATGGAGCAGAAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGAATTGACC
      NcoI      BclI      AlwNI      HaeIII
      S L I E L T M E O K L I S E E D L E L T
61     ATGGAGCAGAAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGAATTGACCATGGAGCAGAAAGCTGATC
      AlwNI      BclI      NcoI      AlwNI      BclI
      M E O K L I S E E D L E L T M E O K L I
121    AGCGAGGAGGACCTGGAATTAATTCTGCAGTCGACCGTACCGCGGGGCCGGGATCCACCGGATCTAGATAactga
      AseI      PstI      SalI      KpnI      SacII      SmaI      BamHI      XbaI
      S E E D L E L L I L Q S T V P R A R D P P D L D N

```

Περαιτέρω κλωνοποίηση
Οι κλώνοι σε gel αγαρόζης και επιλογή

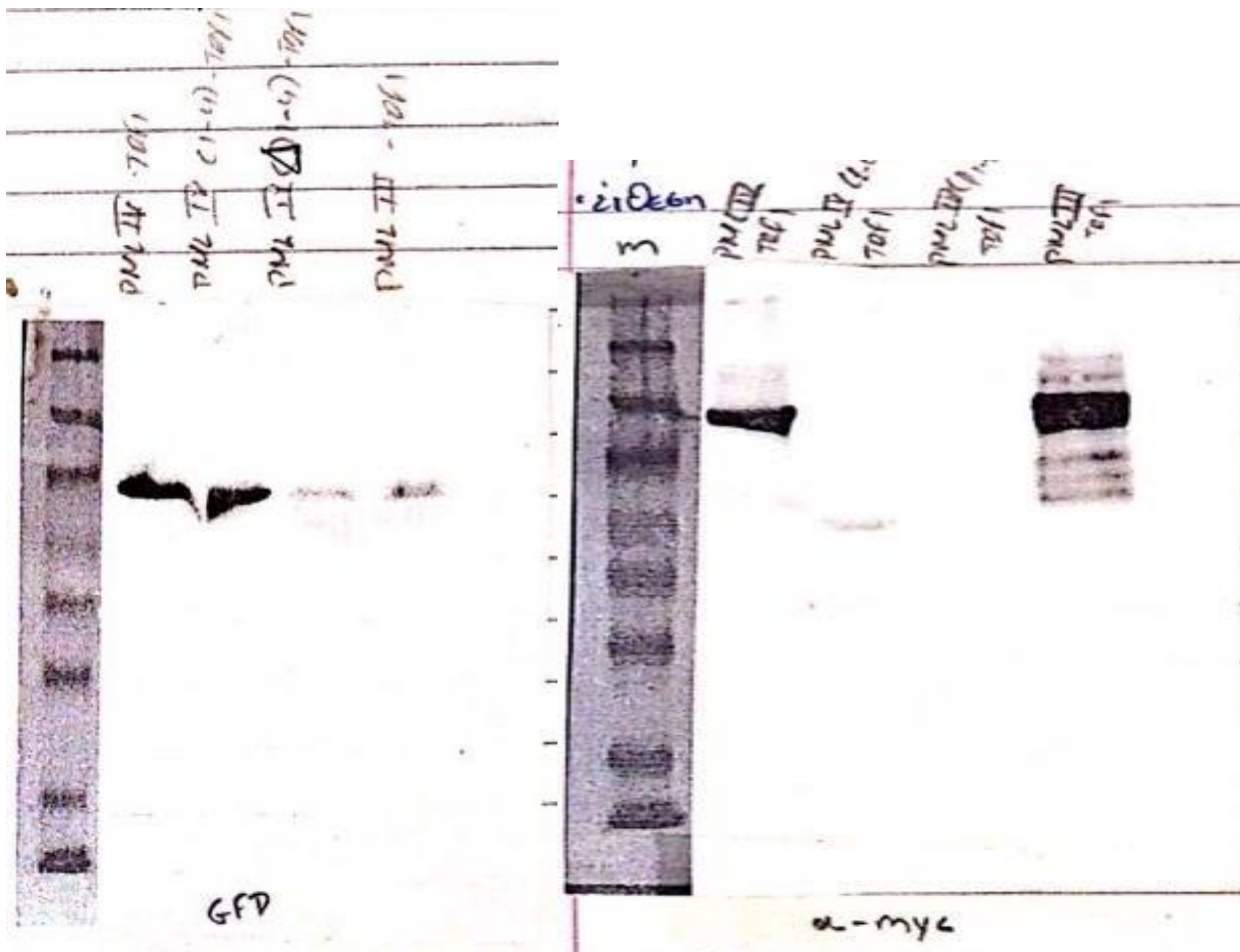


Εικόνα 16: φορέας 3myc στον οποίο ενθέσαμε το γονίδιο για την έκφραση του καρβοξυτελικού κομματιού της PML 4 πρωτεΐνης.

Το δεύτερο κομμάτι της εργασίας (4^ο πείραμα) ήταν η έκφραση των πλασμιδίων που δημιουργήσαμε σε ανθρώπινα νεφρικά καρκινικά κύτταρα HEK 293T και ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών μεταξύ τους. Για το Western blot έγινε παροδική διαμόλυνση σε 6-well plate και τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. PML IV/3myc (5 μ L) + TRF1 (3.75 μ L)
2. PML IV (1-4)/3myc (3.75 μ L) + TRF1 (3.75 μ L)
3. PML IV (6-7)/3myc (3.75 μ L) + TRF1 (3.75 μ L)
4. PML III/3myc (10 μ L) + TRF1 (3.75 μ L)

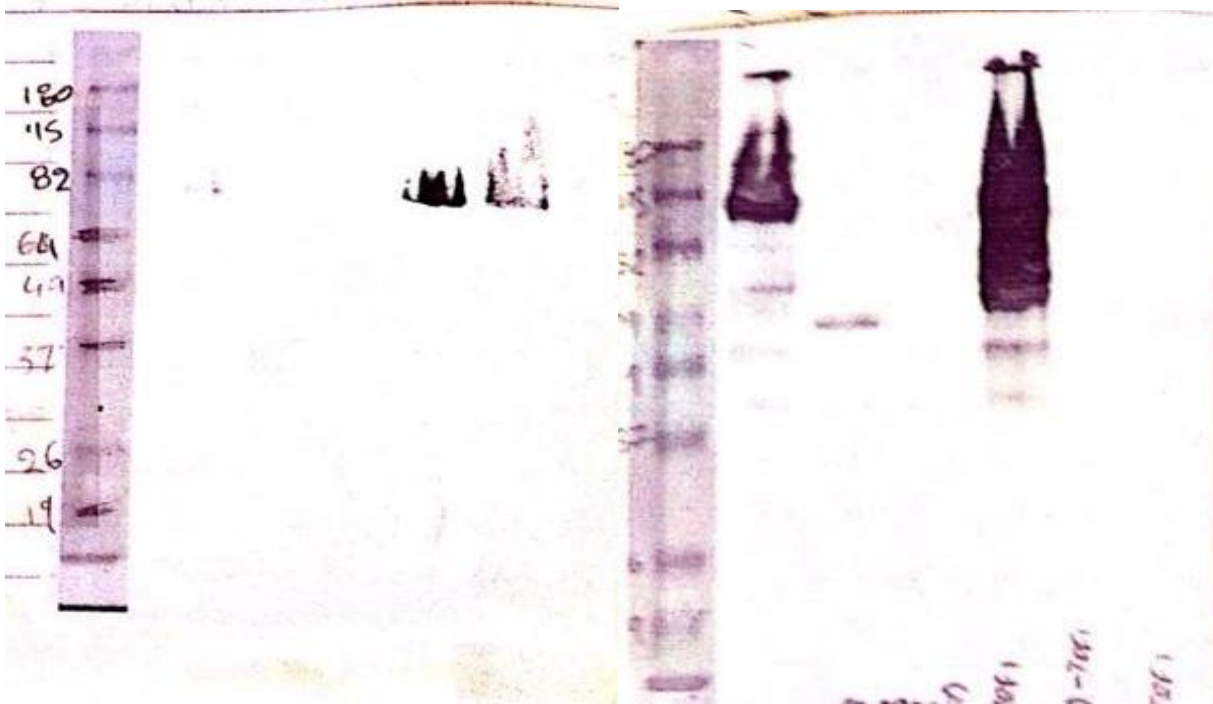
Μετά τη διαμόλυνση παρατηρήθηκε φθορισμός λόγω της GFP που διαθέτει το πλασμίδιο στο οποίο έχει κλωνοποιηθήκε το TRF1. Ωστόσο δεν ήταν τόσο έντονος όσο αναμέναμε γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε λάθος κατά την ένθεση των DNA στα πλασμίδια, κακή κατάσταση των κυττάρων ή του θρεπτικού μέσου που αναπτύχθηκαν. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε από το Western blot που ακολούθησε στο οποίο όπως φαίνεται και στις εικόνες δεν υπήρξε καλή έκφραση πρωτεϊνών.



Έγινε επανάληψη της διαδικασίας με νέα διαμόλυνση HEK 293T κυττάρων. Και αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε 6-well plate με τα εξής 6 δείγματα:

- 1) PML IV/3myc (5 μ L) + TRF1 (3.75 μ L)
- 2) PML IV (1->4)/3myc (3.75 μ L) + TRF1 (3.75 μ L)
- 3) PML IV (6-7) /3myc (10 μ L) + TRF1 (3.75 μ L)
- 4) PML III/3myc (10 μ L) + TRF1 (3.75 μ L)
- 5) PML IV (1->4)/mRed (7.5 μ L)+ TRF1 (3.75 μ L)
- 6) PML IV/mRed (7.5 μ L)+ TRF1 (3.75 μ L)

Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν ήταν ίδια με αυτά του προηγούμενου Western blot και απεικονίζονται στις εικόνες 19,20.



Εικόνα 19: GFP αντίσωμα

Εικόνα 20: myc αντίσωμα

Η σειρά των δειγμάτων που απεικονίζονται στο Western blot είναι αυτή που έχει αριθμηθεί παραπάνω. Στο παραπάνω πείραμα παρατηρούνται κάποιες μπάντες μονάχα στο πρώτο well που περιείχε PML IV και στο τέταρτο που είχε PML III. Όσο αφορά το TRF1 οι μπάντες που διακρίνουμε είναι στο τέταρτο well (PML III) και στο πέμπτο το οποίο περιείχε PML IV (1->4).

5.Συζήτηση:

Στο αρχικό μας πείραμα (Western blot και co-IP) κατά τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών TRF1 και PML IV διαπιστώσαμε όντως ότι υπάρχει αλληλεπίδραση καθώς στην αντίδραση συν-κατακρήμνισης εμφανίζονται διακριτές οι μπάντες των πρωτεϊνών (1^ο πείραμα). Εστιάζοντας την προσοχή μας στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό κομμάτι, (πείραμα 2) διαπιστώσαμε ότι απουσία αμινοτελικής περιοχής (εξωνίων 1-4) η πρωτεΐνη PML IV αλληλεπιδρά με τον τελομερικό παράγοντα TRF1.

Στο 4^ο πείραμα στο οποίο μετασχηματίσαμε T293 κύτταρα με τα πλασμίδια που είχαμε πάρει από τα cloning (3^ο πείραμα) δεν παρατηρήσαμε παρόμοια εικόνα με αυτή των αρχικών Western και co-IP πειραμάτων μας. Η αλληλούχιση των πλασμιδίων μας με τα ενεμένα DNA [PML IV (1->4) PML IV (6-7)] έδειξε πως υπήρξαν σημαντικές μεταλλαγές στα γονίδια μας που πιθανόν να δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας με αποτέλεσμα η αλληλουχίες μας να έχουν λανθασμένο πλαίσιο ανάγνωσης και έτσι να μην εκφράζεται σωστά το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό κομμάτι της PML.

Παρ'όλα αυτά στηριζόμενοι στην βιβλιογραφία και στα πρώτα δύο μας πειράματα μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι το γονίδιο PML απουσία των εξωνίων 1 έως 4 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα TRF1.

Καθώς όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή οι ισομορφές της PML πρωτεΐνης έχουν πολλές και ποικίλες λειτουργίες, απαιτούνται περαιτέρω ερευνητικές προσπάθειες για τις λειτουργίες αυτές και τα μονοπάτια που συμμετέχουν. Ωστόσο η επιστημονική κοινότητα συνεχώς κάνει βήματα προς την κατανόηση της πρωτεΐνης αυτής.

Βιβλιογραφία:

1. Bernardi R., Pandolfi P. P., (2003). Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene, Nature Publishing Group*
2. Bernardi R., Pandolfi P. P., (2007), Structure, dynamics and functions of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies. *Nature Publishing Group*
3. Borden K., (2002). Pondering the Promyelocytic Leukemia Protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *American Society for Microbiology*
4. Chung I. , Osterwald S., Deeg C I. K., Rippe K., (2012). PML body meets telomere. *Landes bioscience*
5. Condemine W. et al. ,(2006). Characterization of endogenous human Promyelocytic Leukemia isoforms. *Cancer Research*
6. Jensen k., Shiels C., Freemont S. P., (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene, Nature Publishing Group*
7. Jian Yu, (2010). PML3 interacts with TRF1 and is essential for ALT-associated PML bodies assembly in U2OS cells. *Cancer Letters, Journal Elsevier*
8. Jiang W. Q. et all (2006). Induction of alternative lengthening of telomeres associated PML bodies by p53/p21 requires HP1 proteins. *The journal of cell biology.*

9. Lallemand- Breitenbach V. and Hugues de The', (2010). PML nuclear bodies. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10. Verdum E. R., Karlseder J., (2007). Replication and protection of telomeres. *Nature Publishing Group*

Websites:

- <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3333/fulltext.php?bframe=figures.htm>
- <http://malone.bioquant.uni-heidelberg.de/people/chung/index-chung.html>
- <http://jcs.biologists.org/content/117/11/2417/F8.expansion.html>
- <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A4%CE%B5%CE%BB%CE%BF%CE%BC%CE%B5%CF%81%CE%AD%CF%82>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5371>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100689470>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7015>