ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:

«ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ Fras1/Frem»

ΧΙΩΤΑΚΗ ΡΕΝΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2005

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... 1

ABSTRACT..... 2

ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... 12

Α) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ DNA..... 12

Ι) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)..... 12

ΙΙ) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR..... 12

ΙΙΙ) ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ..... 13

IV) ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ DNA..... 14

V) ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ DNA ΜΕ ΦΟΡΕΑ..... 14

VI) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ QIAGEN ΚΙΤ..... 15

VII) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINIPREPS)..... 16

VIII) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MAXIPREPS)..... 16

IX) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΦΑΓΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ..... 17

Χ) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΑΓΙΚΟΥ DNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ CTAB..... 19

Β)ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ..... 20

Ι) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (COMPETENT CELLS)... 20

ΙΙ) ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ (TRANSFORMATION) ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ..... 20

ΙΙΙ)ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΙΑΤΩΝ LB/CHLORAMPHENICOL/AMPICILLIN.... 20

IV) ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ BL21 ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)..... 21

Γ) ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ..... 22

Ι) ΜΕΤΑΦΟΡΑ (TRANSFER) ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF..... 22

ΙΙ) WESTERN BLOTTING..... 22

ΙΙΙ) ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ..... 23

IV) ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ..... 23

V) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΑΠΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 12% 24

VI) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ BEADS ΝΙΚΕΛΙΟΥ..... 25

Δ) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ 27

Ι) ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ..... 27

ΙΙ) ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ..... 27

ΙΙΙ) ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ..... 30

Ε) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΡΡΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ..... 30

Ι) ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΡΡΟΥ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΜΕ WESTERN BLOTTING..... 30

ΙΙ) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΡΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΑΙΜΑ..... 31

ΙΙΙ) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΟΡΡΟ..... 31

ΣΤ) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ..... 32

Ι) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΜΕ 0.5%ΖΕΛΑΤΙΝΗ, 0.05% KBr(SO4)2-12H2O..... 32

ΙΙ) ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ ΓΙΑ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ..... 32

ΙΙΙ) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ..... 32

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... 34

Α) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ..... 34

Β) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ..... 38

Ι) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Fras1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ..... 39

ΙΙ) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Frem2 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ..... 42

ΙΙΙ) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Frem1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ..... 45

Γ) ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΦΑΓΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΤΟΥ Frem3... 47

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

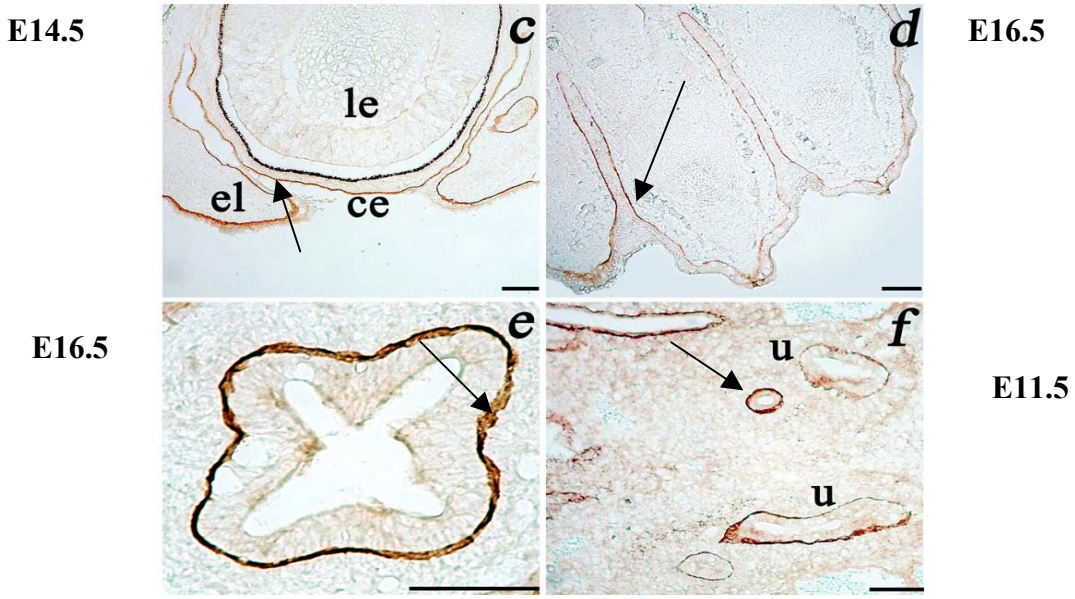
Το γονίδιο *Fras1* αποτελεί το πρώτο μέλος της οικογένειας των *Fras1/Frem*-γονιδίων που απομονώθηκε και συσχετίστηκε με το φαινότυπο bleb στον ποντικό και το σύνδρομο Fraser, μια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική ασθένεια του ανθρώπου. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί εντοπίζεται στην εξωκυττάρια ύλη της βασικής μεμβράνης όλων των επιθηλιακών δομών του ποντικού κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ δεν εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη άλλων κυτταρικών τύπων. Η πλειονότητα των *Fras1-/-* εμβρύων πεθαίνει νωρίς κατά την εμβρυογένεση, ενώ ένα μικρό ποσοστό επιβιώνει και ενηλικιώνεται. Τα έμβρυα που πεθαίνουν εμφανίζουν υπο-επιδερμικές αιμορραγικές φουσκαλίδες στην κεφαλή και τα άκρα καθώς και δυσπλασία ή αγενεσία των νεφρών. Τα ενήλικα ομόζυγα παρουσιάζουν συνδακτυλία και συγχώνευση των οφθαλμικών βλεφάρων. Τα παθολογικά αυτά συμπτώματα εμφανίζονται και σε μια κατηγορία μεταλλαγμένων ποντικών, τα 'bleb' καθώς επίσης και σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser στον άνθρωπο. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί δύο επιπλέον γονίδια ομόλογα του *Fras1* (*Frem1 και Frem2*) των οποίων μεταλλάξεις σχετίζονται με τον bleb φαινότυπο, ενώ ένα τρίτο γονίδιο το *Frem3*, το οποίο δεν έχει χαρτογραφηθεί ακόμα, παρουσιάζει ομολογία με το *Fras1*, αλλά δεν έχει συσχετιστεί με τον bleb φαινότυπο. Στην παρούσα εργασία παρασκευάσθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα για τις πρωτεΐνες Frem1, Frem2 και Frem3, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες για τον εντοπισμό τους στις δομές του ποντικού σε διάφορα εμβρυϊκά στάδια. Η έκφραση των πρωτεϊνών ανιχνεύεται σε επιθηλιακές δομές, όπως και αυτή της Fras1, καθώς πρόκειται για πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας. Η Frem2 και Frem1 εμφανίζουν σχεδόν ίδιο πρότυπο έκφρασης, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την πιθανή αλληλεπίδρασή τους, ενώ η Frem3 ανιχνεύεται ενδοκυτταρικά, στις ίδιες περίπου επιθηλιακές δομές. Ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των πρωτεϊνών αυτών μπορεί να διαλευκάνει τους μηχανισμούς δράσης τους. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση cDNA του *Frem3* με διερεύνηση φαγικών βιβλιοθηκών για την περαιτέρω χρήση του σε μελλοντικά πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

ABSTRACT

Fras1 gene, which is the first member of the recently discovered *Fras1/Frem* gene family, is related to blebbed phenotype in mice and human Fraser syndrome, a rare recessive autosomal disorder. The encoding protein is located in the extracellular matrix of the basement membrane of the mouse epithelial embryonic structures, but not the basement membrane of other cell types. The majority of *Fras1* knock out mice die early at embryogenesis, but a small proportion can survive to adulthood. Mutant mice that die exhibit sub-epidermal hemorrhagic blisters and renal agenesis or dysplasia. Adult mutants display syndactyly and cryptophthalmos. These developmental anomalies characterize blebbed mice and Fraser syndrome human patients. Two more homologous to *Fras1* genes have been discovered (*Frem1* and *Frem2*), mutations of which are related to bleb phenotype. *Frem3*, an unmapped gene, homologous to Fras1, has not been ascribed to any bleb phenotype. In this project polyclonal antibodies for Frem1, Frem 2, Frem 3 proteins were prepared and used in immunohistochemical experiments for the immunolocalization of the above in mouse embryonic structures at various embryonic stages. They were located in epithelial structures like Fras1, as they comprise members of the same gene family. Frem1 and Frem2 display similar expression patterns, which indicate their possible interaction, while Frem3 is located intracellularly at similar epithelial structures. Immunolocalization of the above proteins can shed light to their action mechanism. Screening of cDNA phage libraries was also performed for the isolation of *Frem3* cDNA, in order to provide us with the molecular tools for future transfection and protein interaction experiments.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

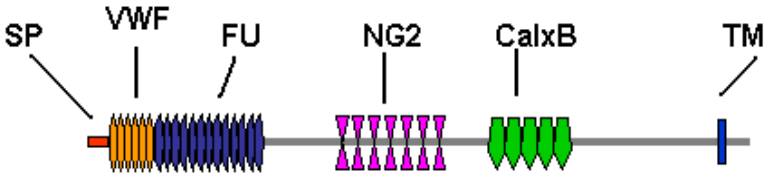
Το γονίδιο *Fras1*, το οποίο αποτελεί το πρώτο από τα τέσσερα μέλη της οικογένειας των Fras1/Frem πρωτεϊνών, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 4010 αμινοξέων, η οποία εντοπίζεται στην εξωκυττάρια ύλη των επιθηλιακών κυττάρων και συγκεκριμένα στη βασική μεμβράνη των περισσότερων επιθηλιακών δομών του ποντικού. Ανιχνεύεται σε όλα τα εμβρυϊκά στάδια, στη βασική μεμβράνη επιθηλίων όπως του επιδερμικού, του εντερικού, του ουρητηρικού, βλεφαρικού καθώς και του επιθηλίου του κερατοειδούς. (Vrontou *et al,* 2003*).* Στην παρακάτω φωτογραφία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης της πρωτεΐνης Fras1 σε διάφορα εμβρυϊκά στάδια.



Εικόνα 1: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της Fras1 πρωτεΐνης σε εγκάρσιες τομές σε διάφορα εμβρυϊκά στάδια. Εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη: c) του επιθηλίου του κερατοειδούς (ce) και του βλεφαρικού επιθηλίου (el), d) της επιδερμίδας στα δάχτυλα των άκρων πριν το διαχωρισμό τους, e)του εντερικού επιθηλίου (lu=lumen) f) του επιθηλίου του αναπτυσσόμενου ουρητήρα (u).

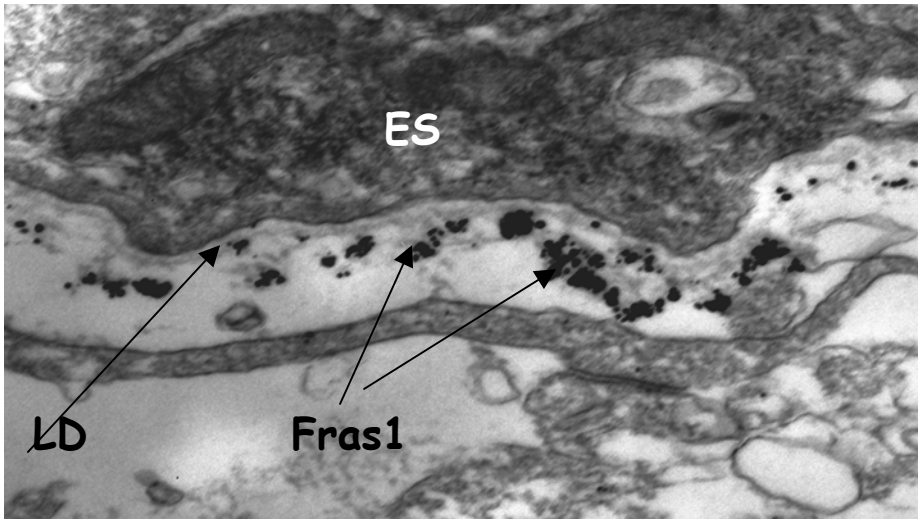
Η πρωτεΐνη Fras1 αποτελείται από δομικά διακριτές περιοχές που εμφανίζουν ομολογία με ξεχωριστά τμήματα διαφορετικών γνωστών πρωτεϊνών (Εικ. 2). Από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο εμφανίζει μια αλληλουχία σινιάλο για τη στόχευσή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (SP), 6 μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνες με ομολογία με αυτά της περιοχής C του Von Willembrandt Factor, 13 μοτίβα κυστεΐνης ομόλογα με αυτά των πρωτεασών φουρινών (FU), μια περιοχή ομολογίας με την NG2

πρωτεογλυκάνη θειϊκής χονδροϊτίνης, μια περιοχή με 5 μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου παρόμοια με τις πρωτεΐνες ανταλλαγής Ca^{++}-Na^{+} και μία διαμεμβρανική (TM) περιοχή (Vrontou *et al.*, 2003; McGregor *et al.,* 2003).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των διακριτών δομικών περιοχών της πρωτεΐνης Fras1. Από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο διακρίνονται: α) αλληλουχία σινιάλο (SP), β) μοτίβα 6 κυστεΐνών ομόλογα με αυτά του Von Willembrandt Factor (VWF), γ) 13 μοτίβα κυστεΐνης ομόλογα με αυτά των πρωτεασών φουρινών (FU), δ) περιοχή ομολογίας με την NG2 πρωτεογλυκάνη θειϊκής χονδροϊτίνης (NG2), ε) περιοχή με 5 μοτίβα πρόσδεσης ασβεστίου παρόμοια με τις πρωτεΐνες ανταλλαγής Ca^{++}-Na^{+} (Calxb) στ) διαμεμβρανική (TM) περιοχή

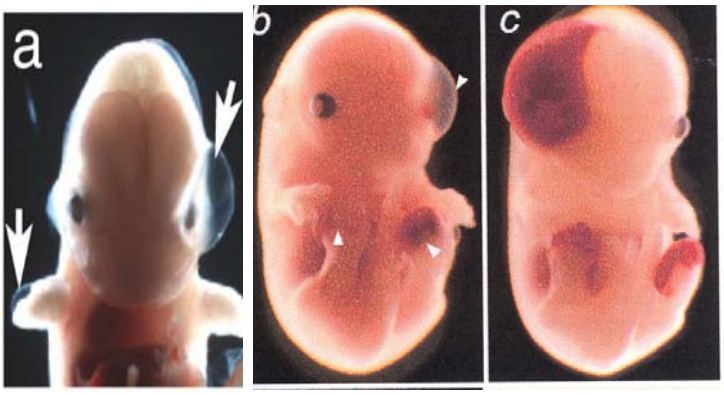
Με μελέτες ανοσοεντοπισμού της Fras1 στην επιδερμίδα αγρίου τύπου εμβρύων, με τη χρήση με ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης, διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη Fras1 εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας κάτω από τη lamina densa, κοντά στις πλάκες αγκυροβόλησης (Εικ. 3) (υπό δημοσίευση).



Εικόνα 3: Ανοσοεντοπισμός με χρυσό της Fras1 σε επιδερμίδα αγρίου τύπου εμβρύου E 14.5 ES=επιθηλιακός ιστός, LD=lamina densa.

Η σημασία του γονιδίου αυτού για την επιβίωση του ποντικού είναι καθοριστική, καθώς η απενεργοποίηση του γονιδίου *Fras1* οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο σε πρώιμα στάδια στο στέλεχος C57BL10 και σε μισά περίπου από τα ποντίκια στελέχους NMRI. Πιο συγκεκριμένα, τα έμβρυα κατά την ημέρα E12.5 εμφανίζουν διαφανείς υπο-επιδερμικές φουσκαλίδες (sub-epidermal blisters) που σχηματίζονται κυρίως στην περιοχή της κεφαλής και των άκρων. Αυτές κατά την ημέρα E13.0-E.14.0 γίνονται αιμορραγικές (Εικ. 4) με αποτέλεσμα το θάνατο κατά την ημέρα E14.5-E16.5. Πιθανόν ο θάνατος να οφείλεται στις αιμορραγικές φουσκάλες της κεφαλής δεδομένου ότι στο στέλεχος NMRI ποτέ δεν έχουν διαπιστωθεί αιματώματα στην περιοχή της κεφαλής σε νεογέννητα, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν ο θάνατός τους επέρχεται πριν τη γέννηση

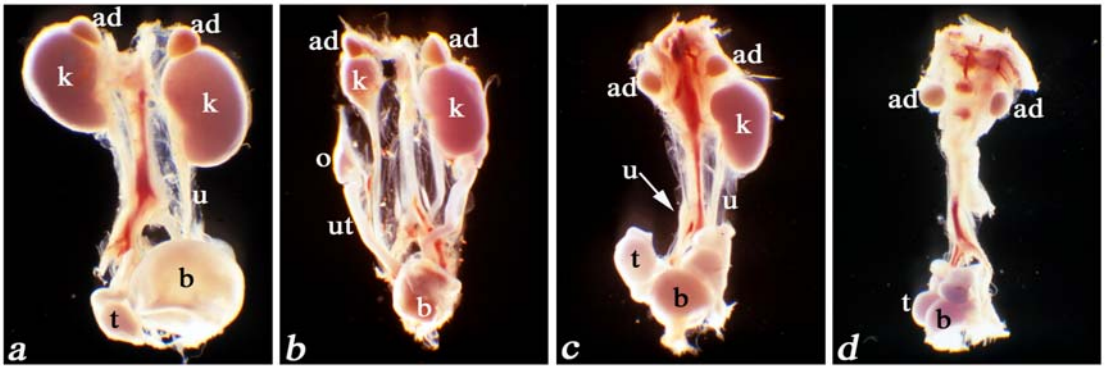
Να σημειωθεί ότι το φαινόμενο της αποκόλλησης της επιδερμίδας από τη δερμίδα χαρακτηρίζει ένα σύνολο από ανθρώπινα πομφολυγώδη νοσήματα, όπως πομφολυγώδης επιδερμόλυση (epidermolysis bullosa) κατά την οποία ο ασθενής αναπτύσσει επιδερμικές φουσκαλίδες έπειτα από κάποιο ελάχιστο τραύμα και δυσιδρωτικό έκζεμα (dyshidrotic eczema) όπου μικρές φουσκαλίδες σχηματίζονται στα άνω και κάτω άκρα του ασθενούς χωρίς προφανή αιτία.



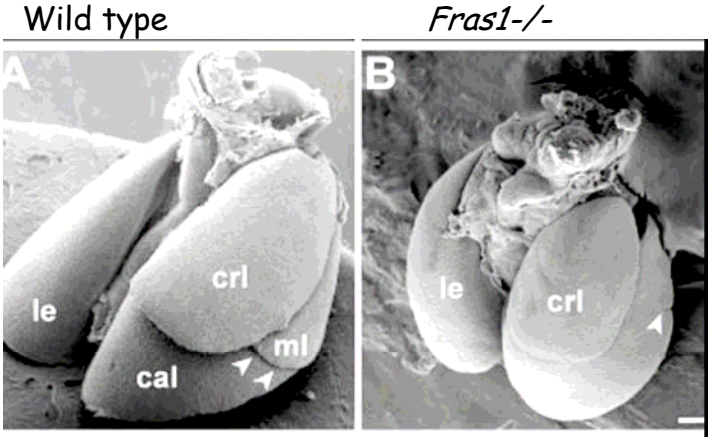
Εικόνα 4: *Fras1-/-* έμβρυα E 12.5 (a): Τα βέλη υποδεικνύουν τις διαφανείς υπο-επιδερμικές φουσκάλες στην περιοχή της κεφαλής και των άκρων, E 13.5 (b): Είσοδος ερυθρών αιμοσφαιρίων στην περιοχή των φουσκαλίδων , E 14.5 (c): Πλήρωση των φουσκαλίδων με αίμα και θάνατος του εμβρύου

Και στα δύο στελέχη η νεκροψία των μεταλλαγμένων ζώων κατέδειξε βλάβες στα νεφρά, όπως δυσπλασία ή υποπλασία του ενός ή και των δύο νεφρών καθώς και σε αγενεσία των νεφρών (Εικ. 5). Ένα ποσοστό των ομόζυγων ζώων στο NMRI στέλεχος επιβιώνουν και ενηλικιώνονται, εμφανίζοντας ωστόσο πολλά αναπτυξιακά προβλήματα, όπως συνδακτυλία

στα πρόσθια ή/και οπίσθια άκρα, συγχώνευση των οφθαλμικών βλεφάρων τους, κινητικά προβλήματα, αλλοιώσεις στο τρίχωμά τους, (Vrontou *et al,* 2003*),* συγχώνευση των λοβών στους πνεύμονες (Petrou *et al*) (Εικ. 6).



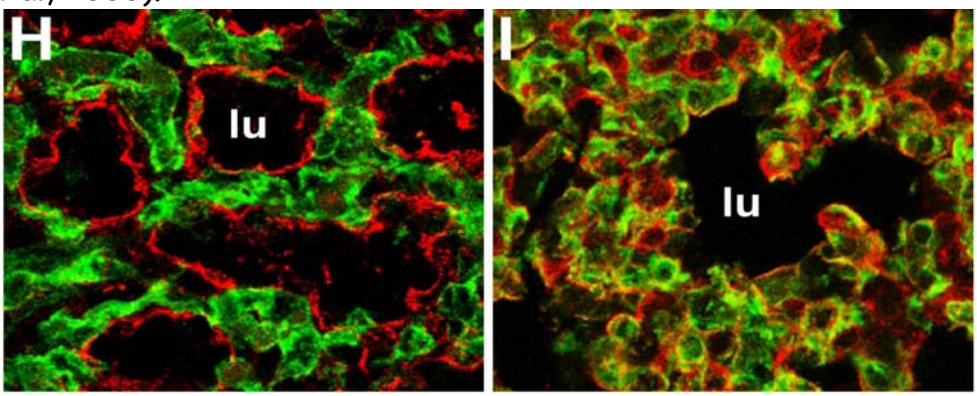
Εικόνα 5: (a) ουροποιητικό σύστημα αγρίου τύπου νεογέννητου ποντικού k=kidney, ad=επινεφρίδια, u=ουρητήρας, b=χοληδόχος κύστη, t=όρχεις, (b) υποπλασία ενός νεφρού, ut=μήτρα. (c) έλλειψη ενός νεφρού και στην (d) αγενεσία των νεφρών



Εικόνα 6: Συγχώνευση του κεντρικού και οπίσθιου λοβού του δεξιού πνεύμονα στα *Fras1 -/-* έμβρυα E18.5 (*al*: accessory lobe, *cal*: caudal lobe, *crl*:cranial lobe, *e*: airway epithelia, *le*: leftlung, *ml*: medial lobe)

Περαιτέρω μελέτες (Petrou *et al,* 2005) στον πνεύμονα μεταλλαγμένων *Fras1-/-* ποντικών έδειξαν ότι στα μεταλλαγμένα ποντίκια παρατηρείται αποδιοργάνωση των τριχοειδών αγγείων των κυψελίδων (Εικ. 7) και έξοδος ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αναπνευστική κοιλότητα. Σε αγρίου τύπου ζώα ουδέποτε τα τριχοειδή αγγεία περνούν πέρα από το όριο της βασικής μεμβράνης, η οποία, υπό φυσιολογικές συνθήκες, λειτουργεί σα φυσικός φραγμός για αυτά. Τα παραπάνω, μαζί με άλλα πειραματικά δεδομένα της ίδιας ερευνητικής ομάδας (Petrou *et al,* 2005) φανερώνουν τον πιθανό ρόλο του γονιδίου *Fras1* στις αγγειογενετικές διαδικασίες στον οργανισμό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Fras1 δεν εκφράζεται στη βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως επίσης

και άλλων κυττάρων όπως μυϊκά και κύτταρα του λιπώδους ιστού (Vrontou *et al*, 2003).



Εικόνα 7: Η) Σε αγρίου τύπου έμβρυα Ε18.5, τα τριχοειδή αγγεία (σημαίνονται πράσινα με τον ενδοθηλιακό marker Pecam-1) είναι καλά οργανωμένα γύρω από τις κυψελίδες κάτω από τη βασική μεμβράνη των αναπνευστικών επιθηλιακών κυττάρων (κόκκινη, Agrin marker) Ι) Σε *Fras-/-* έμβρυα Ε18.5 αποδιοργανώνεται τόσο η βασική μεμβράνη όσο και τα αγγεία, με αποτέλεσμα να εισχωρούν ερυθρά αιμοσφαίρια στην αναπνευστική κοιλότητα.

Βρέθηκε ότι τα *Fras1-/-* ποντίκια αποτελούν το ζωικό μοντέλο για το ανθρώπινο σύνδρομο Fraser, μια υπολειπόμενη αυτοσωμική ασθένεια, στην οποία οι ασθενείς εμφανίζουν παρόμοιο φαινότυπο με τα μεταλλαγμένα ζώα, όπως κρυπτοφθαλμία, συνδακτυλία και νεφρικές ανωμαλίες (Εικ. 8). Σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser έχουν ανιχνευθεί μεταλλαγές στο γονίδιο *FRAS1,* που οδηγούν στην απενεργοποίησή του (McGregor *et al,* 2003). Να σημειωθεί ότι παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τα *Fras1* ποντίκια εμφανίζουν και τα λεγόμενα blebbed (bl-/-) ποντίκια, στα οποία επίσης έχουν ανιχνευθεί μεταλλαγές στο γονίδιο *Fras1*, οι οποίες οδηγούν στο φαινότυπο αυτόν (Green M.C, 1989).

Εικόνα 8: Φαινοτυπικές ομοιότητες μεταξύ *Fras1-/-* ποντικών και ανθρώπων με σύνδρομο Fraser. Στην εικόνα παρατηρείται συγχώνευση των οφθαλμικών βλεφάρων και στα δύο είδη μετά τη γέννηση. Παρατηρούνται επίσης επιδερμικές φουσκαλίδες στο άνω άκρο του ανθρώπου (βέλος)

Εκτός από τα ποντίκια με blebbed φαινότυπο, ο οποίος οφείλεται σε μεταλλαγές στο γονίδιο *Fras1* (Vrontou *et al,* 2003*),* έχουν χαρακτηρισθεί ποντίκια με παρόμοιο φαινότυπο, ο οποίος οφείλεται στη μεταλλαγή γονιδίων που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Τα ποντίκια αυτά είναι γνωστά ως 1) eye-bleb (eb), 2) head-bleb (heb), 3) myelencephalic-bleb (my) and 4) fetal-haematoma (fh).

Οι παραπάνω φαινότυποι οφείλονται στη μεταλλαγή τεσσάρων διαφορετικών γονιδίων, του *Grip1, Frem1, Frem2* και *Frem3* αντίστοιχα, από τα οποία απομένει να χαρτογραφηθεί το τελευταίο (Smyth *et al.*,2004; Takamiya *et al.,* 2004; Jadeja *et al*, 2005).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) συνοψίζονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μεταλλαγών των παραπάνω γονιδίων, καθώς και η θέση τους στο γένωμα του ανθρώπου και του ποντικού:

Μεταλλαγή	**Φαινότυπος μεταλλαγής**						**Εντοπισμός**		**Γονίδιο**
	Μάτια	**Άκρα**	**Νεφροί**	**Δέρμα-Τρίχωμα**	**Κρανίο**	**ΚΝΣ**	**Χρωμόσωμα**	**Ομολογία στον άνθρωπο**	
Blebbed (bl)	+	+	+	+	-	-	**5**	**4q21.1**	**Fras1**
Eye-blebs (eb)	+	+	+	-	-	-	**10**	**-**	**Grip1**
Fetal Haematoma (fh)	+	+	-	-	-	-	**Άγνωστο (8)**	**- (4q31.1)**	**Not published Frem3**
Head bleb(heb)	+	+	-	-	+	-	**4**	**1p9**	**Frem1**
Myelengefalic bleb (my)	+	+	+	+	+	+	**3**	**4q**	**Frem2**

Πίνακας 1: Παράθεση των κύριων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών της απενεργοποίησης των γονιδίων *Fras1, Grip1, Frem1, Frem2* και *Frem3* καθώς επίσης και του εντοπισμού τους στο γένωμα του ανθρώπου και του ποντικού. Σε παρένθεση παρατίθεται ο πιθανός εντοπισμός του γονιδίου Frem1.

Από τα παραπάνω γονίδια έχει βρεθεί ότι το *Grip1* κωδικοποιεί μια κυτταροπλασματική PDZ-domain πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά με τη Fras1, καθώς η τελευταία περιέχει στην καρβοξυτελική περιοχή της ένα μοτίβο πρόσδεσης με τη Grip1. Η αλληλεπίδραση της Grip1 με τη Fras1 είναι απαραίτητη για την έξοδο της δεύτερης από το κύτταρο και το σωστό εντοπισμό της στη βασική περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων. Στα ποντίκια όπου η Grip1 έχει απενεργοποιηθεί, η Fras1 δεν οδηγείται εκτός του κυττάρου, με αποτέλεσμα ο φαινότυπος των *Grip1-/-* ποντικών να είναι

παρόμοιος με το φαινότυπο των *Fras1-/-.* Η Grip1 είναι ουσιαστική για την σωστή αλληλεπίδραση των κυττάρων και της εξωκυττάριας ύλης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη , με αποτέλεσμα όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, η απενεργοποίηση της να οδηγεί σε αναπτυξιακά προβλήματα στα ποντίκια, όπως αγενεσία των νεφρών, συνδακτυλίες, αποκόλληση της επιδερμίδας από τη δερμίδα, οι οποίες χαρακτηρίζουν και τους ασθενείς με σύνδρομο Fraser.

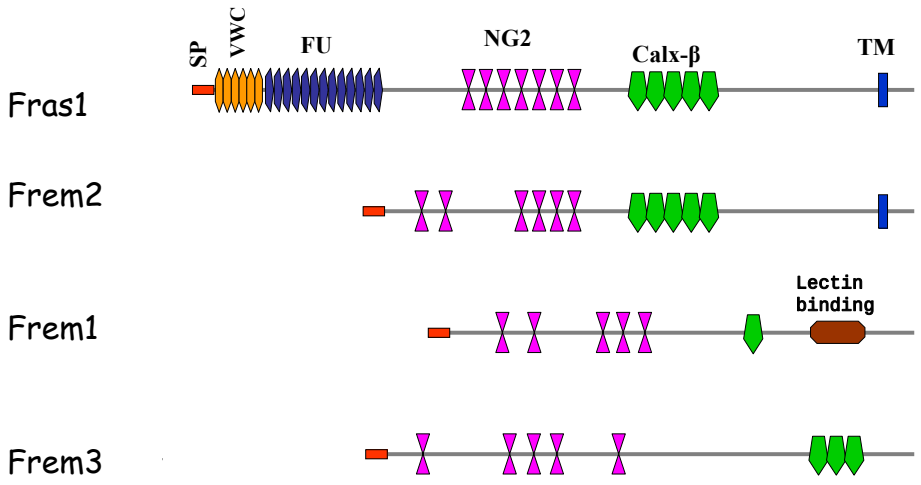
Τα γονίδια *Frem1, Frem2* και *Frem3 (Fras1 related extracellular matrix* genes), όπως φανερώνει το όνομα τους εμφανίζουν δομική και πιθανώς λειτουργική ομολογία με το γονίδιο *Fras1*. Μάλιστα, μεταλλαγές του *FREM2* έχουν εντοπισθεί σε ασθενείς με σύνδρομο Fraser. **(**Jadeja *et al*, 2005)

Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη την οποία κωδικοποιεί το γονίδιο *Frem1*, η οποία αποτελείται από 2191 αμινοξέα, περιέχει ένα πεπτίδιο σιγνάλο, μια περιοχή πρόσδεσης ασβεστίου παρόμοια με αυτήν στις Calxb πρωτεΐνες, μία περιοχή ομολογίας με την NG2 πρωτεογλυκάνη της θειϊκής χονδροϊτίνης (CSPG) και επιπλέον μια καρβοξυτελική περιοχή ομολογίας με τις λεκτίνες τύπου C. Το γονίδιο *Frem1* παρουσιάζει δυναμική έκφραση κατά την εμβρυογένεση σε περιοχές επιθηλιακών-μεσεγχυματικών αλληλεπιδράσεων. Η έκφρασή του ανιχνεύεται από την E10.5 σε ποικίλες δομές όπως αναπτυσσόμενες βλεφαρίδες, γαλακτοφόροι αδένες, νεφρικό μεσέγχυμα (Smyth *et al*, 2004). Η πρωτεΐνη Frem1 δρα ανεξάρτητα από τις Fras1 και Grip1 και παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση της επιδερμίδας στη δερμίδα και στη διαφοροποίηση της επιδερμίδας κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η απενεργοποίησή της οδηγεί επίσης σε ποικίλα αναπτυξιακά προβλήματα, που συνιστούν τον head bleb (heb) φαινότυπο (Smyth *et al*, 2004).

Η πρωτεΐνη Frem2 αποτελείται από 3160 αμινοξέα και περιέχει ένα αμινοτελικό πεπτίδιο σιγνάλο, 13 CSPGs, 5 περιοχές πρόσδεσης ασβεστίου παρόμοιες με τις Calxb πρωτεΐνες, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια μικρή κυτταροπλασματική περιοχή. Η έκφραση της Frem2 ανιχνεύεται από την E10.5 σε πολλές δομές όπως το εκτόδερμα και το μεσόδερμα των βραγχιακών τόξων, την αναπτυσσόμενη ωτική και οφθαλμική περιοχή καθώς και στους σωμίτες στην περιοχή της ουράς. Απενεργοποίηση του γονιδίου οδηγεί όπως προαναφέρθηκε σε παρόμοιο αιμορραγικό φαινότυπο με τα *Fras1-/-* ποντίκια **(**Jadeja *et al*, 2005). Η πρωτεΐνη Frem2 έχει ουσιαστική σημασία για τη μορφογένεση των εμβρυϊκών ιστών και τη σταθερότητα των αγγείων, δεδομένου ότι μπορεί να επηρεάσει δυναμικά την εξωκυττάρια ύλη και παρέχει το υπόστρωμα για την κυτταρική μετακίνηση. Γενικά συμβάλλει στην κυτταρική αναδιοργάνωση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Timmer *et al*, 2005).

Η πρωτεΐνη Frem3, το γονίδιο της οποίας παραμένει να χαρτογραφηθεί, σχετίζεται δομικά με τις Frem1 και Frem2, αλλά δεν περιέχει διαμεμβρανική περιοχή και μοτίβο πρόσδεσης PDZ πρωτεϊνών όπως η Frem2,ούτε περιοχή πρόσδεσης λεκτίνης, όπως η Frem1 (Smyth *et al*, 2004).

Η δομή των Fras1 και Frem-πρωτεϊνών φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικ. 9):



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των Fras/Frem πρωτεϊνών. Το πεπτίδιο-σινιάλο (κόκκινο χρώμα) διατηρείται σε όλες τις πρωτεΐνες της Fras1/Frem οικογένειας. Επιπλέον, σε όλες υπάρχουν περιοχές πρόσδεσης ασβεστίου (πράσινο χρώμα) και περιοχές ομολογίας με την NG2 περιοχή της θειϊκής χονδροϊτίνης. (μοβ χρώμα). Διαμεμβρανική περιοχή συναντάμε στις πρωτεΐνες Fras1 και Frem2 ,ενώ στη Frem1 ανιχνεύεται μια περιοχή ομολογίας με τις λεκτίνες τύπου C.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, οι πρωτεΐνες της Fras1/Frem οικογένειας εμφανίζουν τόσο δομικές, όσο και λειτουργικές ομοιότητες. Το γεγονός ότι η απενεργοποίησή τους οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο, σε συνδυασμό με την ομολογία που εμφανίζουν σε πρωτεϊνικό επίπεδο, αποτελεί ένδειξη για την πιθανή συμμετοχή τους σε ίδιους μηχανισμούς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ή σε παρόμοιους ανεξάρτητους μηχανισμούς, των οποίων η διαταραχή οδηγεί σε παραπλήσιους φαινότυπους. Η χρήση αντισωμάτων για τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό των πρωτεϊνών αυτών αποτελεί ένα σημαντικό και απαραίτητο εργαλείο για την εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης τους και τις αναπτυξιακές διαδικασίες τις οποίες επηρεάζουν. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η παρασκευή πολυκλωνικών αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες Frem1, Frem2, Frem3 από τον ανοσοποιημένο ορρό κουνελιού και η χρήση τους σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες διαφόρων αναπτυξιακών εμβρυϊκών σταδίων στον ποντικό. Με τον

τρόπο αυτόν κατέστη δυνατή η ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών και η σύγκριση της έκφρασης και του εντοπισμού τους σε ποικίλες δομές του ποντικού.

Στην εργασία αυτή επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα διερεύνησης φαγικών βιβλιοθηκών για να απομονωθεί το cDNA της πρωτεΐνης Frem3. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Frem3 απομένει να χαρτογραφηθεί. Η εύρεση του cDNA του γονιδίου αυτού είναι σημαντική για μελέτες αλληλεπιδράσεων σε σύστημα 2 υβριδίων (two hybrid system) με άλλες γνωστές πρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες της οικογένειας Fras1/Frem καθώς και σε πειράματα διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών. Η γνώση αυτή μπορεί να διαλευκάνει τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης των Fras1/Frem πρωτεϊνών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Α) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ DNA:

Ι) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για την παραγωγή του πεπτιδίου για τη Frem2 πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε η παρακάτω αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για 30 κύκλους στους 59°C:

5μl Taq buffer 10x
2,5μl dNTPs 20mM (Cτελ=1mM)
1,25μl mouse genomic DNA (1,2μg/μl)
1,25μl GC244 (200ng/μl)
1,25μl GC245 (200ng/μl)
0,75μl Taq polymerase
38μl H2O
_____
Vτελ=50μl

Για το Frem3 πραγματοποιήθηκε η παρακάτω αντίδραση PCR για 30 κύκλους στους 59°C:

5μl Taq buffer 10x
2,5μl dNTPs 20mM (Cτελ=1mM)
1,25μl mouse genomic DNA (1,2μg/μl)
1,25μl GC248 (200ng/μl)
1,25μl GC249 (200ng/μl)
0,75μl Taq polymerase
38μl H2O
_____
Vτελ=50μl

ΙΙ) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR:

- Αύξηση του όγκου της PCR στα 100μl με νερό και προσθήκη 1μl 0,5M EDTA, pH 8.0
- Προσθήκη 100μl phenol/CHCl3 και έντονη ανάδευση (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 5' στις 13000 rpm και τοποθέτηση του υπερκειμένου σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα 1,5 ml

- Προσθήκη 15μl NH4OAc και 500μl 100% αιθανόλη και έντονη ανάδευση (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 10' στις 13000 rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Προσθήκη 800μl 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση για 2' στις 13000 rpm
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και στέγνωμα της πελέτας, την οποία επαναδιαλύουμε σε 20μl H2O

ΙΙΙ) ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Για την κλωνοποίηση του Frem2 πεπτιδίου στον φορέα pRSETA πραγματοποιήθηκε πέψη της με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI/Klenow και XhoI και εισαγωγή του ενθέματος στο φορέα pRSETA, στις θέσεις BamHI/Klenow και XhoI. Οι αντιδράσεις φαίνονται παρακάτω:

Frem2 NdeI-XhoI	pRSETA BamHI-XhoI
10μl PCR product	3μl vector(1μg/μl)
2μl buffer NEB4 10x	2μl buffer B 10x
1,5μl NdeI	1,5μl BamHI
1,5μl RNaseA	14μl H2O
5μl H2O	
Vτελ=20μl	Vτελ=20μl

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση Klenow, καθαρισμός και κατακρήμνιση των πέψεων και επαναδιάλυση του DNA σε 25μl H2O

Ακολουθεί β πέψη με XhoI
25μl προϊόν πέψης
3μl buffer H
2μl XhoI

Για το Frem 3 πραγματοποιήθηκε πέψη του προϊόντος της PCR με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI/Klenow και XhoI και εισαγωγή του ενθέματος στο φορέα pRSETA στις θέσεις BamHI/Klenow και XhoI. Οι αντιδράσεις φαίνονται παρακάτω:

Frem3 BamHI-XhOI	pRSETA BamHI-XhOI
10μl PCR product	3μl vector(1μg/μl)
3μl buffer NEB2 10x	3μl buffer NEB2 10x
1,5μl BamHI	1,5μl BamHI
1,5μl XhoI	1,5μl XhoI
14μl H2O	21μl H2O
Vτελ=30μl	Vτελ=30μl

Για το Frem1 το προϊόν της PCR επωάστηκε με BamHI/HindII και εντέθηκε με τα ίδια ένζυμα σε φορέα pJC20

IV) ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ DNA

- Αύξηση του όγκου της αντίδρασης στα 100μl με H2O
- Προσθήκη 100μl phenol/CHCl3 και έντονη ανάδευση (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 5′ στις 13000 rpm και τοποθέτηση του υπερκειμένου σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα τυ 1,5ml
- Προσθήκη 10μl 3M CH3COONa και 500μl 100% αιθανόλης και έντονη ανάδευση (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 10′ στις 13000 rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Προσθήκη 800μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 2′ στις 13000 rpm
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και στέγνωμα της πελέτας, την οποία επαναδιαλύουμε σε 15μl H2O

V) ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ DNA ΜΕ ΦΟΡΕΑ

Ανάλογα με τα θραύσματα που προκύπτουν(τυφλά-blunt ή κολλώδη-sticky) καθορίζουμε τη μοριακή αναλογία ενθέματος και φορέα που θα χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση ligation:

Blunt: *10 insert/1 vector*
Sticky: *3 insert/1 vector*

Ο μοριακός τύπος που χρησιμοποιούμε είναι:
$Ni/Nv=m_i/m_v \times bp_v/bp_i$

Όπου Ni/Nv=μοριακή αναλογία ενθέματος προς φορέα
m_i/m_v=αναλογία μαζών ενθέματος προς φορέα
bp_v/bp_i = αναλογία βάσεων φορέα προς ένθεμα

Κι εδώ χρησιμοποιούνται:

- Νερό
- Το κατάλληλο buffer στο οποίο δρα το ένζυμο (10x ligase buffer)
- DNA (insert και vector)
- Ένζυμο (T4 DNA ligase)
- Κατάλληλη ποσότητα 10mM ATP αρχικής συγκέντρωσης 20mM

VI) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ QIAGEN KIT

- Απομονώνουμε τη ζώνη του gel στο UV
- Για κάθε 100mg αγαρόζης προσθέτουμε 300μl QX1 buffer
- Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα του 1,5ml βάζουμε 10μl glassmilk, το οποίο πρέπει να έχουμε ανακινήσει καλά πριν τη χρήση του
- Τοποθετούμε την αγαρόζη με το QX1 και το glassmilk στους 50°C για 10' και στο ενδιάμεσο ανακινούμε
- Φυγοκεντρούμε για 20" στις 13000 rpm και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- Στην πελέτα προσθέτουμε 500μl QX1 buffer και επαναδιαλύουμε με το χέρι
- Φυγοκεντρούμε για 20" στις 13000 rpm και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- Αφαιρούμε το QX1 buffer και προσθέτουμε 500μl PE buffer. Φυγοκεντρούμε για 20" στις 13000 rpm και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- Επαναλαμβάνουμε για 2 φορές και την τρίτη επαναδιαλύουμε σε 20μl H2O, το οποίο αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5'
- Φυγοκεντρούμε για 20" στις 13000 rpm και τοποθετούμε το υπερκείμενο σε ένα καινούριο δοκιμαστικό σωλήνα του 1,5ml
- Φυγοκεντρούμε ξανά για 20" στις 13000 rpm και φυλάσσουμε το υπερκείμενο

VII) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINIPREPS)

- Έπειτα από το μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων, από κάθε αποικία πραγματοποιούμε καλλιέργειες του 1ml σε LB-ampicillin. Οι καλλιέργειες αναδεύονται Ο/Ν στους 37°C
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 1΄ στις 1300rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση υπερκειμένου, προσθήκη 200μl P1 και ανάδευση
- Προσθήκη 200μl P2 και ελαφρά ανακίνηση. Αφήνουμε για 3' σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθέτουμε 200μl P3 και ανακινούμε με το χέρι. Φυγοκεντρούμε για 10' σε θερμοκρασία δωματίου
- Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 500μl Ph/CHCl3. Αναδεύουμε με vortex και φυγοκεντρούμε για 5'
- Στην πάνω φάση προσθέτουμε 600μl ισοπροπανόλη και αναδεύουμε με έντονα (vortex)
- Φυγοκεντρούμε για 10' σε θερμοκρασία δωματίου και προσθέτουμε στην πελέτα του DNA 800μl 75% αιθανόλη
- Αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε για 2'. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύουμε σε 20 μl H2O

VIII) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MAXIPREPS)

- Παρασκευή βακτηριακής καλλιέργειας σε 50ml LB-ampicillin από το βακτήριο με το ένθεμα που μας ενδιαφέρει
- Φυγοκέντρηση για 20'στις 3000 rpm στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 5ml διαλύματος P1-Έντονη ανάδευση (vortex)
- Προσθήκη 5ml διαλύματος P2 και ήπια ανάδευση. Αφήνουμε 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 5 ml από το διάλυμα P3, ήπια ανακίνηση και πάγωμα σε πάγο για 20' ανακινώντας στο ενδιάμεσο διάστημα
- Φυγοκέντρηση για 30'στις 10000 rpm σε 4°C.Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 12ml ισοπροπανόλη και αναδεύουμε
- Φυγοκέντρηση για 30' στις 10000 rpm σε 4°C και προσθήκη 5ml 75% αιθανόλης στην πελέτα. Έντονη ανάδευση (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 5' στις 10000rpm σε 4°C και στέγνωμα πελέτας
- Επαναδιαλύουμε σε 200μl TE και προσθέτουμε 10μl RNAseA

- Επώαση για 1 ώρα στους 37°C
- Προσθήκη 200μl Ph/CHCl3 και έντονη ανάδευση
- Φυγοκέντρηση για 5' σε 10000 rpm στους4°C και στο υπερκείμενο προσθέτουμε 850μl 100% παγωμένη αιθανόλη και ανακατεύουμε
- Φυγοκεντρούμε για 10' στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 800μl 75% αιθανόλη στην πελέτα
- Φυγοκέντρηση για 2' σε 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και επεναδιαλύουμε την πελέτα σε 160μl H2O και 40μl 5X ρυθμιστικό buffer πρωτεϊνάσης K, το οποίο έχουμε προηγουμένως βράσει στους 50°C
- Προσθήκη 5ml πρωτεϊνάσης K και επώαση στους 56°C για 1 ώρα
- Προσθήκη 200μl Ph/CHCl3 και έντονη ανάδευση
- Φυγοκέντρηση για 5' σε 10000 rpm στους4°C και στο υπερκείμενο προσθέτουμε 850μl παγωμένη 100% αιθανόλη και ανακατεύουμε
- Φυγοκεντρούμε για 10' στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 800μl 75% αιθανόλη στην πελέτα
- Φυγοκέντρηση για 2' σε 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- Επαναδιάλυση της πελέτας σε 80μl H2O

IX) ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΦΑΓΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ

- Πραγματοποιείται επώαση κυττάρων NM522 (για cDNA) σε LB/0,2% μαλτόζη/10mM MgSO4 στους 37°C
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των βακτηρίων στους 4°C για 10 λεπτά σε 2000rpm
- Επαναδιάλυση κυττάρων σε μισό του αρχικού όγκο 10 mM MgSO4
- Επώαση 300μl κυττάρων με κατάλληλη ποσότητα φάγου για 20' στους 37°C
- Ανάμιξη με υγροποιημένη top agarose (5gr NaCl, 2gr MgSO4/7H2O,2gr yeastextract, 10gr NZ amine casein hydrolysate, 4.5 ml 1N NaOH pH 7.5), η οποία έχει προθερμανθεί στους 55°C
- Άπλωμα του μίγματος σε προθερμασμένο τριβλίο (37°C) και O/N επώαση στους 37°C
- Μεταφορά των πλακών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με δίλεπτη τοποθέτησή τους στα τριβλία (οι μεμβράνες σημαδεύονται με χρήση βελόνας)
- Εμβάπτιση για 2 λεπτά σε διάλυμα αποδιάταξης (0,5N NaOH-1,5M NaCl)

- Εμβάπτιση για 5 λεπτά σε διάλυμα ουδετεροποίησης (0,5M Tris/HCl pH 7,0-1,5M NaCl)
- Εμβάπτιση σε διάλυμα ξεπλύματος για λίγα δευτερόλεπτα (0,5M Tris/HCl pH 7,5-2X SSC)
- Τοποθέτηση των μεμβρανών για 1 ώρα στους 80°C
- Μονιμοποίηση με υπεριώδη ακτινοβολία (UV crosslinking)
- Προθέρμανση των μεμβρανών στους 65°C με διάλυμα προθέρμανσης (3X SSC, 0,1% SDS) για 30 λεπτά
- Προϋβριδοποίηση για μία ώρα το λιγότερο στους 65°C με διάλυμα προυβριδοποίησης (για 25ml : 3,75ml 20X SSC,250μl 10%SDS, 5ml Denhardts, 250μl salmon sperm (προθερμασμένο στους 95°C για 5 λεπτά)
- Υβριδοποίηση με διάλυμα υβριδοποίησης (για 25ml : 3,75ml 20X SSC,250μl 10%SDS,5ml Denhardts,250μl salmon sperm προθερμασμένο στους 95°C για 5 λεπτά μαζί με τον ανιχνευτή) O/N στους 65°C

- *Για την κατασκευή του ανιχνευτή αναμιγνύουμε 23,5 μl H2O με 1 μl από το PCR προϊόν και θερμαίνουμε το μίγμα στους 95°C για 5 λεπτά*
- *Προστίθενται 2μl primers mix, 5μl 10x Klenow buffer, 3μl dGTP, 3μl dTTP, 5μl BSA 10x, 3μl dATP(P32), 3μl dCTP(P32), 1μl Klenow*
- *Επώαση στους 37°C για 1 ώρα και καθαρισμός του ανιχνευτή από μη προσδεδεμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια με χρήση κολόνας (η οποία φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 3000 rpm και στη συνέχεια μαζί με τον ανιχνευτή για 2 λεπτά στις 3000 rpm).*
- *Έλεγχος του ανιχνευτή*

- Έπειτα από την ολονύκτια υβριδοποίηση ακολουθεί ξέπλυμα των μεμβρανών με τα εξής διαλύματα:
- Διάλυμα 1 (2xSSC,0,5%SDS) 2x30'
- Διάλυμα 2 (0,5xSSC,0,5%SDS) 2x15'
- Διάλυμα 3 (0,1xSSC,0,1%SDS) 2x15'

- Έκθεση των μεμβρανών σε φιλμ στους -80°C για 1 με 2 ημέρες και ταύτιση του φιλμ πάνω στα τριβλία.
- Συλλογή κατάλληλων πλακών και τοποθέτησή τους σε διάλυμα SM (5,8g NaCl, 2gr MgSO4-7H2O, 50ml 1M Tris-HCl pH 7.5, 100mg gelatin) /0,6% CHCl3 O/N στους 4°C
- Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι την απομόνωση μιας μοναδικής φαγικής πλάκας

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ήταν:

VP7
agt gga aga tga gga cac tcc agc tg

VP8
cca agg cca gca ttg acg atg tag cc

Χ) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΑΓΙΚΟΥ DNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ CTAB

- Χρησιμοποιούμε ανάλογη συγκέντρωση φάγων, ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης λύση NM522 βακτηρίων σε δύο τριβλία
- Προσθέτουμε 9 ml SM και αφήνουμε τα τριβλία να ανακινούνται O/N στους 4°C.
- Την επομένη μέρα μεταφέρουμε το διάλυμα (~15ml) από το τριβλίο σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml και προσθέτουμε 600μl CHCl3
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 30 λεπτά στους 4°C.
- Στο υπερκείμενο προσθέτουμε διάλυμα 20% PEG8000/2,5M NaCl σε αναλογία 5 ml δ/τος:1 ml υπερκειμένου
- Αφήνουμε στον πάγο για 2 ώρες
- Φυγοκεντρούμε στις 10000 rpm για 40 λεπτά στους 4°C
- Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε διάλυμα απομόνωσης (50mM Tris pH 8.0, 50mM EDTA, 0.4M LiCl, 1% CTAB,0.5% Tween-20, 1.1M NaCl, 10μl mercaptoethanol/ml διαλύματος). Για κάθε 30ml αρχικού όγκου προσθέτουμε 1ml διαλύματος απομόνωσης
- Επώαση για 15 λεπτά στους 65°C
- Καθαρισμός με CHCl3 τρεις φορές (φυγοκέντρηση στις 13000 rpm 5 λεπτά)
- Προσθήκη 0.8 όγκων ισοπροπανόλης
- Αφήνουμε στον πάγο για 30 λεπτά
- Φυγοκεντρούμε στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε RT
- Ξέπλυμα με 75% EtOH (φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 λεπτά)
- Στέγνωμα πελέττας και επαναδιάλυση σε 40μl TE
- Έλεγχος σε 1% πήκτωμα αγαρόζης

Β) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ:

Ι) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (COMPETENT CELLS)

(η διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για παρασκευή χημειοδεκτικών BL21 και DH5α κυττάρων)

- Εμβολιασμός 100ml LB με 100μl stab γλυκερόλης
- Καλλιέργεια βακτηρίων στους 37°C για 3-4 ώρες
- Πάγωμα της καλλιέργειας σε πάγο για 10' και φυγοκέντρηση σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες των 50 ml για 15' στις 3000 rpm στους 4°C
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και στέγνωμα πελέτας
- Επαναδιάλυση με πεπετάρισμα των πελετών σε 10 ml παγωμένου 100mM CaCl2 (5ml σε κάθε πελέτα)
- Φύλαξη σε πάγο για 45'
- Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15' στους 4°C
- Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση σε 2ml 100mM CaCl2/10% glycerol για κάθε 50 ml καλλιέργειας
- Μοίρασμα σε 50 aliquots και αποθήκευση στους -80°C

ΙΙ) ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ (TRANSFORMATION) ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

- Προσθέτουμε 7 μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης (ligation) στα competent κύτταρα
- Αφήνουμε 30' στον πάγο
- Πραγματοποιούμε θερμικό σοκ στους 42°C για 1'30''
- Αφήνουμε στον πάγο για 1'
- Προσθέτουμε 800μl LB στο δοκιμαστικό σωλήνα του 1,5ml και αφήνουμε την καλλιέργεια να αναπτυχθεί στους 37°C για 45'
- Απλώνουμε σε τριβλία LB/αμπικιλλίνη 150μl από την καλλιέργεια και αφήνουμε τα πιάτα να επωαστούν στους 37°C O/N

ΙΙΙ) ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΙΑΤΩΝ LB/CHLORAMPHENICOL/AMPICILLIN

- Σε 200ml LB αντιστοιχούν 200μl chloramphenicol 35mg/ml και 100μl ampicillin 100mg/ml ώστε να έχουν τελικές συγκεντρώσεις 0,035 mg/ml και 0,05mg/ml αντίστοιχα
- Σε 150ml LB τοποθετούμε 1,6 gr NaCl,1 gr Yeast extract και 2gr Tryptone και αναδεύουμε

- Προσαρμόζουμε το pH 7 με λίγες σταγόνες NaOH 5M και συμπληρώνουμε ως τα 200 ml
- Σε ένα μπουκάλι τοποθετούμε 3gr agar και αναδευτήρα και προσθέτουμε το LB. Αποστειρώνουμε στον κλίβανο και αφού πέσει η θερμοκρασία του LB-agar προσθέτουμε τα αντιβιοτικά
- Μοιράζουμε σε 10-12 τριβλία και αφήνουμε να στερεοποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου

IV) ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ BL21 ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)

Έπειτα από την πραγματοποίηση μετασχηματισμού της κατάλληλης γενωμικής κατασκευής στα BL21 βακτήρια, ακολουθεί προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Η επαγωγή πραγματοποιείται με την πρόσδεση του αναστολέα του υποκινητή της T7 πολυμεράσης από το συνθετικό μόριο αυτό και την επακόλουθη έκφραση του γονιδίου της. Η T7 πολυμεράση με τη σειρά της επάγει την ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει και με τον τρόπο αυτόν πραγματοποιείται η έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου σε μεγάλες ποσότητες. Τα BL21 βακτήρια περιέχουν και το πλασμίδιο PlysS το οποίο τους προσδίδει ανθεκτικότητα στη χλωραμφαινικόλη και ρυθμίζει αρνητικά τη διαδικασία αυτή.

Η διαδικασία της επαγωγής είναι η εξής:

- Μετασχηματίζουμε τα BL21 βακτήρια με την κατάλληλη γενωμική κατασκευή
- Από μία μοναδική αποικία δημιουργούμε υγρή καλλιέργεια με LB-chloramfenicol-ampicillin, την οποία επωάζουμε στους 37°C O/N
- Την επόμενη ημέρα αραιώνουμε την καλλιέργεια 1:100 και περιμένουμε μέχρι να φτάσει στην κατάλληλη οπτική πυκνότητα, συνήθως OD=0,6-0,7
- Προσθέτουμε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Πριν την προσθήκη IPTG φυγοκεντρούμε 1 ml από την καλλιέργεια για 20" σε 13000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσουμε την πελέτα την οποία χρησιμοποιούμε σαν αρνητικό control. Περιμένουμε 3 ώρες για την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης μας
- Έπειτα από 3 ώρες φυγοκεντρούμε 1 ml από την καλλιέργεια για 20" σε 13000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσουμε την πελέτα.

- Φυγοκεντρύμε την καλλιέργεια σε 3000 rpm για 20' σε 4°C και φυλάσσουμε την πελέτα στους -80°C
- Επαναδιαλύουμε τις πελέτες σε 100μl PBS και loading buffer και ελέγχουμε την έκφραση της πρωτεΐνης μας με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Γ) ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ:

I) ΜΕΤΑΦΟΡΑ (TRANSFER) ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ PVDF

- Έπειτα από ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, το πήκτωμα τοποθετείται στην ειδική συσκευή για μεταφορά (transfer), αφού μετρηθούν οι διαστάσεις του.
- Τοποθετούμε στη συσκευή ένα σφουγγαράκι εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)
- Στη συνέχεια τοποθετούμε ένα χαρτί wattmann κομμένο στις διαστάσεις του πηκτώματος εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς
- Πάνω στο wattmann εφάπτουμε το πήκτωμα, το οποίο φροντίζουμε να διατηρούμε υγρό
- Εφάπτουμε με προσοχή τη μεμβράνη PVDF την οποία έχουμε εμποτίσει με μεθανόλη αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων
- Τοποθετούμε με τον ίδιο τρόπο ένα δεύτερο watmann και σφουγγαράκι πάνω από τη μεμβράνη και εφαρμόζουμε τη συσκευή στο ειδικό δοχείο, το οποίο γεμίζουμε με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς
- Η μεταφορά πραγματοποιείται O/N στα 60V, 110 mA στους 4°C
- Η σύσταση του transfer buffer είναι 20 mM Tris, 150mM glycin, 10% Methanol για 1lt H2O

II) WESTERN BLOTTING

- 'Επειτα από το transfer πραγματοποιείται blocking με 5% dry milk in TBS για 2 ώρες σε RT
- O/N Επώαση με 1° αντίσωμα (rabbit-anti mouse) σε κατάλληλη αραίωση σε 5% dry milk-TBS στους 4°C
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα A (10mM Tris pH 7,5 ,0,9% NaCl, 0,05% Tween) για 10'

- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα B (0,2% SDS ,0,9% NaCl, 0,5% Triton) για 10'
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα A (10mM Tris pH 7,5 ,0,9% NaCl, 0,05% Tween) για 10'
- Επώαση με το 2° αντίσωμα anti HRP, αραίωση 1:10000 σε 5% Dry milk/TBS για 1 ώρα σε RT
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα A (10mM Tris pH 7,5 ,0,9% NaCl, 0,05% Tween) για 10'
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα B (0,2% SDS ,0,9% NaCl, 0,5% Triton) για 10'
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα A (10mM Tris pH 7,5 ,0,9% NaCl, 0,05% Tween) για 10'
- Βάζουμε πάνω στη μεμβράνη 700μl Oxidizing reagent και 700μl Enchanced Luminal Reagent και αφήνουμε για 5΄στο σκοτάδι
- Έκθεση του φιλμ για 10",30", 1'

ΙΙΙ) ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 12%	
Running buffer	*stacking buffer*
4,8ml 30% ακρυλαμίδη	1,7 ml 30% ακρυλαμίδη
3,55 ml H2O	4,7 ml H2O
3,35 ml 1M Tris pH 8,9	3,4 ml 0,5M Tris pH 6.8
133,5 μl 10% SDS	99 μl 10% SDS
187 μl 10% APS	149 μl 10% APS
13,5μl TEMED	10 μl TEMED

IV) ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ*

*Για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν 2 ειδικοί συμπυκνωτές, τους οποίους μας παρείχε το εργαστήριο του Α.Οικονόμου. Αυτοί διατηρούνται στους 4°C σε 70% αιθανόλη

- Γεμίζουμε κάθε συμπυκνωτή με 10 ml H2O
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20' στις 2000rpm, 20°C-Απομακρύνουμε το flowthrough
- Εισάγουμε το πρωτεϊνικό μας διάλυμα και φυγοκεντρούμε για 40' στις 2000rpm,20°C. Απομακρύνουμε το flowthrough

- Βάζουμε 5 ml 10mM Tris pH 7,5, 100mM NaCl και ανακατεύουμε με πιπετάρισμα
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30' στις 2000rpm, 20°C
- Προσθέτουμε πάλι 5 ml 10mM Tris pH 7,5, 100mM NaCl και ανακατεύουμε με πιπετάρισμα
- Φυγοκεντρούμε για 40' στις 2000rpm, 20°C
- Έπειτα από την τρίτη προσθήκη 5 ml 10mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, φυγοκεντρούμε για 45 λεπτά περίπου αφήνοντας 1500μl στην εγκοπή του συμπυκνωτή.
- Ανακατεύουμε τα 1500μl και τα τοποθετούμε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα του 1.5ml
- Προσθέτουμε δύο φορές 1ml 10mM Tris pH 7,5, 100mM NaCl, ανακατεύουμε και το φυλάσσουμε, ώστε να ελεγχθεί αν έχει περισσέψει πρωτεΐνη στα τοιχώματα του συμπυκνωτή
- Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μας σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ώστε να ποσοτικοποιήσουμε τα αποτελέσματά μας

V) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΑΠΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 12%

- Για την απομόνωση της πρωτεΐνης Frem1 κατασκευάστηκε ένα παρασκευαστικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, στο οποίο φορτώθηκαν 2,5 πελέτες από βακτηριακή καλλιέργεια BL21 κυττάρων όγκου 20ml έκαστη, στην οποία έχει επαχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης Frem1 με IPTG (C τελ= 1mM).Το πήκτωμα τρέχει στα 100V, 300mA O/N
- Η σύσταση του gel φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΟ GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 12%	
100 ml Running buffer	*40 ml stacking buffer*
40ml 30% ακρυλαμίδη	6,18 ml 30% ακρυλαμίδη
29,57 ml H2O	16,92 ml H2O
27,9 ml 1M Tris pH 8,9	12,24 ml 0,5M Tris pH 6.8
1108,05 μl 10% SDS	356,4 μl 10% SDS
1557,71 μl 10% APS	536,4 μl 10% APS
112,455μl TEMED	36 μl TEMED

- Η ζώνη απομονώνεται, αφού το πήκτωμα βαφεί πρώτα με υδατοδιαλυτή 0,75% Coomasie για 20'-1hr

- Με τη βοήθεια μιας σύριγγας τεμαχίζεται η πολυακρυλαμίδη και τοποθετείται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα 15ml, στο οποίο προστίθενται 5ml 10mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl. Ακολουθεί O/N ανάδευση στους 4°C
- Την επόμενη μέρα η πολυακρυλαμίδη φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 20' στους 4°C
- Το υπερκείμενο συλλέγεται και φυγοκεντρείται ξανά στις 2000 rpm για 20' στους 4°C. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και το περνάμε από φίλτρο για αποστείρωση μαζί με την υπολειπόμενη πολυακρυλαμίδη
- Ακολουθεί έλεγχος και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης

VI) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ BEADS ΝΙΚΕΛΙΟΥ

- Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία αυτή, έχει προηγηθεί η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών Frem2 και Frem3 με IPTG (C τελ= 1mM) σε βακτηριακή καλλιέργεια BL21 κυττάρων όγκου 50ml έκαστη. Οι πελέτες αποθηκεύτηκαν στους -80°C.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση των πελετών σε 5ml 50mM Tris pH=7,5 και διάρρηξη με υπερήχους (sonication) των κυττάρων 10 φορές (80 pulse, 30" sonication-30"ηρεμία). Τα δείγματα πάντα διατηρούνται σε πάγο.
- Στη συνέχεια, χωρίζουμε τα 5 ml σε 5 eppendorfs (1ml το καθένα)
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30' στις 13000 rpm, 4°C
- Τοποθετούμε το υπερκείμενο σε ένα falcon (**δείγμα Α**) και επαναδιαλύουμε τις πελέτες σε 1ml 50mM Tris pH7,5, 8M Urea και ανακατεύουμε έντονα (vortex)
- Φυγοκεντρούμε για 30' στις 13000 rpm στους 4°C και αποθηκεύουμε το υπερκείμενο (**δείγμα Β**)
- Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 1ml 50mM Tris pH 7,5, 8M Urea κάνοντας καλό vortex (**δείγμα Γ**)
- Για να εντοπίσουμε την πρωτεΐνη μας φορτώνουμε περίπου 40μl από κάθε δείγμα (**Α,Β,Γ**) και πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. (Οι πρωτεΐνες εντιπίστηκαν στο δείγμα Β)
- Πριν ξεκινήσει η διαδικασία καθαρισμού είναι απαραίτητη η **εξισορρόπηση των beads** με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, στην περίπτωσή μας 50mM Tris pH7,5, 8M Urea.

ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ ΤΩΝ BEADS ΝΙΚΕΛΙΟΥ

- Σε ένα 15άρι δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 300μl από τα beads, αφού προηγηθεί καλή ανακίνηση τους
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5΄στις 3000rpm
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 2ml 50mM Tris pH 7.5, 8M Urea
- Φυγοκεντρούμε για 5΄στις 3000rpm και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- Προσθέτουμε 2ml 50mM Tris pH 7.5, 8M Urea, φυγοκεντρούμε και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- Τα beads είναι έτοιμα για χρήση

Συνεχίζουμε την διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης :

- Στα εξισορροπημένα beads προσθέτουμε το πρωτεϊνικό μας διάλυμα (**δείγμα Β**)
- Περιστρέφουμε για 30'-60' στους 4°C
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 5'
- Φύλαξη του υπερκειμένου, το οποίο χρησιμοποιείται σαν αρνητικό control (**control**)
- Προσθέτουμε 2ml 50mM Tris pH7,5, 8M Urea και φυγοκεντρούμε 3 φορές στις 3000 rpm για 5' –απομακρύνουμε το υπερκείμενο
- Κάνουμε elution της πρωτεΐνης μας: Στο falcon με τα beads εισάγουμε 1 ml 50mM ημιδαζόλη σε 50mM Tris pH 7.5, 8M Urea και ανακινούμε καλά. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 5' και φυλάσσουμε το υπερκείμενο (**δείγμα Δ**)
- Στη συνέχεια εισάγουμε 1 ml 100mM ημιδαζόλη σε 50mM Tris pH7,5, 8M Urea και ανακινούμε καλά. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 5' και πάλι φυλάσσουμε το υπερκείμενο (**δείγμα Ε**)
- Ακολούθως εισάγουμε 1 ml 200mM ημιδαζόλη σε 50mM Tris pH 7.5, 8M Urea και ανακινούμε καλά. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 5' και φυλάσσουμε το υπερκείμενο (**δείγμα Ζ**)
- Τρέχουμε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης το **control** και τα **δείγματα Δ,Ε,Ζ** ώστε να ταυτοποιήσουμε τις βέλτιστες συνθήκες έκλουσης της πρωτεΐνης μας

Δ) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ:

Ι) ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ:

RC1
ggaaggatcccatatggccggagatagagggacctc με Tm=63°C

RC2
ggaactcgagttatccttcagggtccactatctcc με Tm=59°C

RC3
ggaaggatcccatatggaagacgaacacctggaagg με Tm=61, 2°C

RC4
Ctgacagcaaccatcaagtccagtaactcgagttcc με Tm=60, 6°C

RC5
gacgccaagcttgggacacaagagcccatgctg με Tm=61°C

RC6
gacgccggatccttgcctggattgtgaagcgaac με Tm=57, 2°C

ΙΙ) ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του αντισώματος για την πρωτεΐνη Frem2 αντιστοιχεί στις θέσεις 231-400 της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Frem2, όπως αυτή υπάρχει σε τράπεζες δεδομένων:

```
  1  MASRARRTAK FSSFQPILAQ SPRLLLLLLL LSLVSYVSTQ AAGPGAALQS
 51  LGLSGTSGVP TEEAIVVANR GLRVPFGREV WLDPLRDLVL QVQPGDRCTV
101  TVLDNDALAQ RPGHLSPKRF ACDYGPGEVR YSHLGARSPS RDRVRLQLRY
151  DAPGGAIVLP LALEVEVVFT QLEIVTRNLP LVVEELLGTS NALDDRSLEF
201  AYQPETEECR VGILSGLSAL PRYGELLHYP QVQGGAGDRG TSKTLLMDCK
251  AFQELGVRYR HTAPSRSPNR DWLPMVVELH SRGAPEGSPA LKREHFQVLV
301  RIRGGAENTA PKPSFVAMMM MEVDQFVLTA LTPDMLAAED AESDPDLLIF Frem2 ab
351  NLTSAFQPGQ GYLVSTDDRS LPLSSFTQRD LRLLKIAYQP PSEDSDQERL
401  FELELEIVDP EGAASDPFAF MVVVKPMNTL APVVTRNTGL ILYEGQYRPL
451  TGPIGSGPQN LVISDEDDLE AVRLEVVAGL RHGHLVILGS PSSDSAPKTF
```

```
 501  TVAELAAGQV VYQHDDKDGS LSDNLVLRMS DGGGRHQVQF LFPITLVPVD
 551  DQPPVLNANT GLTVAEGETV PIPPLTLSAT DIDSDDSQLV FVLLPPFSSL
 601  GHLLLRQRHV PQEEQGLWQK QGSFYERTVT EWRQQDITEG KLFYRHSGPH
 651  SPGPVMDQFM FRVQDNHDPP NQSGIQRFVI RIHPVDRLPP ELGSGCPLRM
 701  VVQESQLTPL RKRWLHYTDL DTDDRELQYT VTQPPTDTDE NHSPAPLGTL
 751  VFTDNPSVVV SHFTQAQVNH HKIAYRPPGQ ELGVAARVAQ FQFQVEDRAG
 801  NVAPGTFTLY LQPVDNQPPE IVNTGFTVEE KGHHILRETE LHVSDVDTDV
 851  THISFTLTQA PKHGHMQISG RPLHVGGQFH LEDIKHGRIS YWNSGDESLT
 901  DSCSLEVSDR HHVVPITLRV NVRPGDREGP MSVLPAGTLE SYLDVLENGA
 951  TEVTANIIKG AYQGTDDLML TFLLEGPPSY GEILVNGAPA EQFTQRDILE
1001  GSVVYAHTSG EIGLLPKADS FNLSLSAMSQ EWRIGSSIVQ GVTVWVTILP
1051  VDSQAPEISL GEQFVVLEGD KSVISLTHLS AEDMDSLKDD LLCTIVIQPT
1101  SGYVENISPA PGSEKSRAGV AISAFTLKDL RQGHINYVQS VHRGVEPVED
1151  RFIFRCSDGI NFSERQIFPI VIIPTNDEQP EMFMREFMVM EGMSLVVNRL
1201  ILNAADADIP RDDLTFTITR FPTHGHVMNQ LINGTVLVES FTLDQIIESS
1251  SIIYEHDDSE TQEDSFVIKL TDGKHSVEKM VLIVVIPVDD ETPRMTINNG
1301  LEIEIGETKV INNKVLMATD LDSDDKSLVY IIRYGPGHGL LQRQKPLGAF
1351  ENITLGMNFT QDEVDRNLIQ YVHFGQEGIR DLIKFDVTDG TNALIDRYFY
1401  VTIGSVDIVF PDVVSKGVSL KEGGKVTLTT DLLSTSDLNS PDENLVFTIT
1451  RAPMRGHLEC TDRRGLSITS FTQLQLAGNK IYYIHTAEDE VKMDSFEFQV
1501  TDGRNPVFRT FRISISDVDN KKPVVTIHNL VVSESESKLI TPFELTVEDR
1551  DTPDRLLKFI VTQVPVHGHL LFNNTRSVMV FTKQDLNENL ISYKHDGTES
1601  TEDSFSFTVT DGTHSDFYVF PDTVFETRRP QVMKIQVLPV DNSVPQIVVN
1651  KGASTLRTLA TGHLGFMITS KILKVEDRDS LHFSLRFIVT EAPQHGYLLN
1701  LGQGNHSVTQ FTQADIDDMK ICYVLRERAN ATSDMFHFIV EDDGGNRLTN
1751  QHFRLNWAWI SFEKEYYLIN EDSKFLDIVL TRRGYLGETS FISIGTRDGT
1801  AEKDRDFKGK AQKQVQFNPG QTRASWRVRI LSDGEHEHSE TFQVVLSEPV
1851  LAILEFPTVT TVEIIDPGDE STVFIPQSEY SVEEDVGELF IPIRRSGDIS
1901  RELMVICYTQ QGTATSTVRT SVLSYSDYIS RPEDHSSVIR FDKDEREKMC
1951  RILVIDDSLY EEEETFQVLL SMPMGGRIGD KFPGANVTIL TDRDDEPAFY
2001  FGDTQYSVDE SAGYVELQVW RTGTDLSKPS SVTVRSRKTE SLSADAGTDY
2051  VGISRNLDFA PGVNMQTVRV VILDDLGRPI LEGIEKFELV LRMPMNAALG
2101  EPSKATVSIN DSASDVPKMQ FKERVYTCNE NDGRVVAMIY RSGDIQHRSS
2151  VRCYTRQGSA QVMMDFEERP NTDVSTVTFL PGEMEKPCVL ELMDDAVYED
2201  VEELRLVLGT PQGSSAFGAA VGEQNETLIK IQDEADEAVI KFGETKFSVT
2251  EPSRPGESVV VKIPVIRQGD TSKVSIVRVH TKDGSATSGE DYHPVSEEIE
2301  FKEGETQHTV EIEVIFDGVR EMREAFTVHL KPDENMVAET QATKAIVYIE
2351  EIHSMADVTF PSVPHIVSLL IYDDPSKGRE DTGPVSGYPV VCITACNPKY
2401  PDYEKTGSIC ASENINDTLT RYRWLISAPA GPDGVTSPMR EVDFDTFFTS
2451  SKMITLDSIY FQPGSRVQCA ARAVNTNGNE GLELMSPIVT IGREEGLCQP
2501  RVPGVVGAEP FSAKLRYTGP EDPDFANLIK LTVTMPHIDG MLPAISTREL
2551  SNFELTLSPD GTRVGNHKCS NLLDYNEVKT HHGFLTNATK NPEVIGETYP
2601  YQYSVPVRGS STLRFYRNLN LEACLWEFVS YYDMTELLAD CGGTIGTDGQ
2651  VLNLVQSYVT LRVPLYVSYV FHSPVGVGGW QHFDLKSELR LTFVYDTAIL
2701  WNHGIGSPPE AELQGSLYPT SMRIGEEGRL AVNFKTEAQF HGLFVLSHPA
2751  SFTSSLIVSA DHPGLTFSLR LIRSEPTYNQ PVQQWSFVSD FAVRDYSGTY
2801  TVKLVPCTTP SNQEYRLPVT CNPREPVTFD LDIRFQQVSD PVATEFSLNT
2851  HMYLLSKKNL WLSDGSMGFG QESDVAFAEG DVIYGRVMVD PVQNLGDSFY
2901  CSIEKVFLCT GDDGYVPKYS PANAEYGCLA DSPSLLHRFK IVDKAQPETQ
2951  ATSFGDVLFN AKLAVDDPEA VLLVNQPGSD GFKVDSTPLF QVALGREWYI
3001  HTIYTVKSKD NTHRGIGKRS LEYQYHSVVH PGPPQATTKS WKKRAVRSTP
3051  SLAGEIGAEN NRGTNIQHIS LNRRGKRQVP HGRIPPDGIL PWELNSPSSE
3101  VSLVTVLGGL TVGLLTVCLA VAAAVMCRNR STKGKDTPKG SGSTEPMMSP
3151  QSHYNDSSEV
```

Για την παραγωγή του αντισώματος για την πρωτεΐνη Frem3 παρήχθη ένα πεπτίδιο μεταξύ των αμινοξέων 576-750 της πρωτεΐνης Frem3, όπως φαίνεται σχηματικά παρακάτω:

```
   1  MAGDSLSLPG MSLQLLVTLT CLLLTCALRE RVPLSENVSH CELYLPPWGA
  51  LNGGSHQNPG ILIANSGFQV PQGRSVWLNP LRDLVIRVQR GDQCKVTVLD
 101  FPRLQGALSP HQFPCDFGAQ QVKYTHFGSP SSTRTRIQLQ VRYDAGNSTL
 151  VLPFTLQVNV VFPKLQLVAR NRPLKVFKVL GCSHAIDRRV LNFASRSRCR
 201  LTVLPHPGGP LPKYGLLVDT AGNPLSRGHL ADCEAFIQAG VRYQHTTTPS
 251  SPSRDYVPML VELLGPESQG TRSVEVLAQE YFQIQVRIQK RARSTAPIPS
 301  LAALMIVEVE QSLLTALTPD VLAAEDSESD PDDLVFNILN VPEAPPGHHG
 351  GQGYVVNTDD PLGLPVSFFT QKELRELKIA YRPPTGSSEG DHVFQLKLQV
 401  VDEDGDTSEP FAFMVVVKSM NVLAPIASYR GGLVVFEGQA RPLSDALSFQ
 451  VSDKDNSKEI KIVAVRGLQH GQLVVHGAPA GCKNFTLADL SAGRVVYQHD
 501  GSDSYSDNII LKMEGEHHRV DFLFPITIVP VDDAAPVLTA NMGLSVTEGQ
 551  VVQISPFVLC ATDIDSEDSA ILFVLEDEHL EGKEEETHED LAPGSYSSSQ
 601  HPGNMLLRQA EPPSSLLYSD WHYVEKEGLY ETVVTEWLQR DIMEGRLFFS Frem3 ab
 651  HPGPHSPSPV AHLAFHVQDD QDPPNLSNQH FFTISIQPAD TSQPQLSPET
 701  TLEMTVQGYQ LTPFQQKYLQ YTDQNSDEQN LWYTLLTRPT DADSNHQVQA
 751  GEIVLTDSPG RPIVHFTQTQ VNHQKIAYRP PQRNLGIVPR VVQFTYKVED
 801  TAGNSVSGTF TVFLQPLNNQ PPKVINRGFA VLEGDSFILG RGELNVSDPD
 851  TNDDQIFFIL VWGPQHGHLQ YFKKYMVPGE SFMLADVING SISYQNSRDQ
 901  TDSDVIYLEV SDGVHHIPIT VQVSVQPTVA DRSPGISITG TPVLATSLTV
 951  LENAASEITM DVTHGRKNTN DLMLSFIVED KPKLGMILVN GWPAEQVTQE
1001  DLLGGAVSYV HTSGEIGFQR VHDTFSFILS KDAYHRAMRD NILERVLVEV
1051  TVLPVDNMAP KVLVRKPFIV YEGGKNLLTP QHVNIEDVDT SKDEILCTLT
1101  VQPSSGYLEN LAPAPGSEVS RAGNPISAFF VKDVRVGCIN YVQSIHKGIE
1151  PGADQFTFYC SDGINFSPKV LLPLTILPTN DEQPQLFTRE FVVLEGMSRV
1201  IDTSLVNGVD ADFPSDKLHF RLTVFPQHGQ ITQQLATGSK PIHSFTLQEI
1251  QEPSSIAYEH DDSESTEDSF EVWLSDGRHT THTTVPIAVI LVDDEVPQLT
1301  INDGLEIETG HSEIITNHIL KAIDLDSDNK SLSFVLHSEP QQGLLQRLRK
1351  PGGDAKHNLT VGMNFTQDEI DRGLIHYIHT GQGEAVDLKF DVTDGVNTLR
1401  DRYFYITIDN SNSAVPEIVS KRVTLTEGNR MTLTTELLNT SDIHSPGEQL
1451  LYSITRAPST GHLESSDQPG EPMASFTQLQ LARNKISYVH ISNDKIKLDH
1501  FELRVTGGHH SESRIFRIFV TEQDNKKPTL TIQALALQRG DNIVVTPSQL
1551  TVEDEDTPAD FILFTITQIP IHGRILYNGS RPVTTFTKKD LTKSLILYCH
1601  DGSETSKDSF SFTVTDGIHT GFYVFPDTSL ETHVPQTVWI QISPFDDRLP
1651  QMGINRGATA LKLLHTGHLG FLITNEYLQA THQGVPHRLL TYKVTRGPEH
1701  GYIVNAGLGN ENTHMFTQAD IDEMRVYYIL NKGRGRATRD TFYFSVETRG
1751  KSSKALEGTT KWAQEREEVP ACCIDFSIES IARPVLGFTI SCDVSTAHKV
1801  VKTGQKILIE QQESMSEEEK GLKRKRKKKG DTVLSGGQKG QNKRAEAEEE
1851  GELASMPPPY ASSAATYRWT FCPEIWRIDS PDGHKDQTEP LWVLERLVRR
1901  CKNEAPDPVA PVDVVDDPTS TKDGAEMGDP FGIPEADTSS T
```

Για την παραγωγή του αντισώματος για την πρωτεΐνη Frem1 χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση του κουνελιού το πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1396-1549 της πρωτεΐνης:

```
   1  MHSPGCTGPK AQWFLLLQLL LLHLDRVSAT FISINRGLRV MKGSSAFLSG
  51  DHLRVAVPKE KDACRLEVVM NEPVTQRVGK LSPQVFDCHF LPNEVKYVHN
 101  GCPILDEDSV KLRLYRFTET DTFMETFLLR VYLVEPDCNI IRMSSNVLEV
 151  TEFYGLSQAI DKNLLQFDYD RTASLDCTIR LDPLRTQLPA HGKLVVVNRK
 201  SEGPRGDQPH SFFSETELGA GLKCPDGSCA LELKQVASLK VSCEEFLLTG
 251  FHYQHMQPPS PNIDYIPIQL DLTDRRSKTV YKSESAWLPV YIRVGIPNQV
 301  PRAAFMAMFV LEVDQFILTP LTTSVLDCEE DETPKPLLVF NITKAPLQGY
 351  VTHLLDHTRP ISSFTWKDLS DMQVAYQPPN SSHPERRHYT MELEVYDFFF
```

```
 401  ERSAPITVHI SIRTADTNAP RVSWNTGLNL LEGQSRAITW EQFQIVDNDD
 451  IGAVQLVTIG GLQHGRLTVR EGKGFLFTVT DLQAGVVRYH HDDSDTTKDF
 501  VAFRIFDGHH SSHHKFPINI LPKDDSPPFL ITNVVIELEE GKTILIQGSM
 551  LRASDMDSSD DYIFFNITKF PQAGEIMKKP GPRLIGYPVP GFLQRDLFSG
 601  IIYYRHFGGE IFEDSFEFVL WDSHEPPNLS VPQVVTIHIT PVDDQLPKEA
 651  PGISRHLVVK ETEVAYITKK HLHFLDMESR DGELIYTHAV NHMKVAYMPP
 701  MQDIGPSPRH VQFTVSVSNQ HGGALHGICF NITVLPVDNQ VPEVFTNTLR
 751  VVEGGQCTIS TEHILVSDVD TPLDSISLSL KERPLHGGVF PVNDEPPILK
 801  ADLIPMMHCS EGGEVTITPE YISATDADSD DLELLFLIAR EPQHGVVRKA
 851  GLHVDRFSQG DVISGAVTYK HTGGEIGLEP CSDTVVLVVS DGEADPLMNG
 901  CCYDGPDSSV PLHKSFPTYQ LNITVHPVDN QPPSIIIGRM LTVDEGFSAA
 951  LTTHHLTVVD WDTAPDDLKF MLASQPQFGY LENALPSAGF EKSNIGIRIA
1001  SFQWTDMKAS HINYVQSRHL RVEPTADQFT VYATDGKHRS LETTFHVIIN
1051  PTNDEAPDLA VQNITVYEGH MVELDSSIIS ATDRDIPKDP LLFSIALKPQ
1101  HGLLVDAAIS KDSHQIKQLQ HEIHSFSVDL LKNGMKLVYA HDDSESSADN
1151  FVIQLSDGKH KILKTISVNI TPVNDETPTL SKKAEISMAV GDTRVLSSAV
1201  LSATDKDSPR EKIHYVFERL PQNGQLQLKC TQEDVDLNLL RYTHAGKTDS
1251  QDGDSFTFYL WDEDNRSPAF DCHIIIEDMG KGDIVIHAKP LVVVKGDRGL
1301  LTTATLLAVD GADKPEELLY LITSPPRHGQ VEYVHSPGVP IASFSQMDIA
1351  GQTVCYIHKS RTAVPTDSFS FILMGIQAEP FALSLTLVEA SLPSMGTQEP
1401  MLKAALPLFA RFTISNGLQT QRGVFEITLQ TVDSALPVLT KNKRLRLAEG Frem1 ab
1451  AMGLLSADHL QLTDPDTPPE NLTFFLAQLP RHGYLFLRGK ALQHNFTQRD
1501  VDSGGVAYQH SGGGAREDYF TFLATDRKNQ GFVVDGKVQK EPVRFTIQAM
1551  GLLKNGCYGI YITSRVLKAS DPDTEDDQII FKILRGPLYG RLENTTTGEF
1601  IHERFSQKDL SHKTILYIIN PSLQVTSDIL EFQAMDPTGN TATPQSSTVQ
1651  TIYGAQARHT GPIELTESIP VDQRMEPMYT NGSSEKSGHS FVGRYWGKVQ
1701  IYVHRGGAAG PFRVQAISLQ QRMLDSDIHS VSLDLRWSYI EWAQTAYEVC
1751  ENVGLLPLEV TRRGYPMDSA FVGVEVNQVS ATVGKDFTVT PSKLLQFDPG
1801  MSTKMWNIAI TYDGLEEDDE VFEVILNSPV NAVLGTQTKA AVKILDSKGG
1851  SPLLERPPPS FTSGDALQGF GLTDLTQRKT MTQGNGKSYH GIVSLKLEGD
1901  RFSAHKRKAK ISIVSQPQRT IKVAELPLAD KVESTTDLHF LRQGLRPLFP
1951  KNCSVDLKGL FHFEESTHRL YQCDGISWKA WSPQTKGLED RSCPGGWLLH
2001  SGYCHILVTR QKGTWTTATR ACREQMLKST VNQSSRVIYN ARASMRTVNC
2051  LKNQPRTGHW EWIGGEPVAF TNWRRGAPLH PKPGKNCALV QKRGQWQTKN
2101  CSKGKAHNFV CSRKL
```

III) ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η πρωτεΐνη, έπειτα από συμπύκνωση ενίεται σε κουνέλι σε τέσσερις δόσεις των 500, 500, 250 και 250μl με χρονική διαφορά ενός μήνα η πρώτη από τη δεύτερη και οι υπόλοιπες μιας εβδομάδας μεταξύ τους. Σε κάθε περίπτωση συλλέγεται ο ανοσοποιημένος ορρός του ζώου.

Ε) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΡΡΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ:

I) ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΡΡΟΥ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΕΝΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΜΕ WESTERN BLOTTING

Για να ελεγχθεί κατά πόσο ο ορρός του κουνελιού μπορεί να ανιχνεύσει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη και να προσδιοριστεί ο τίτλος του αντισώματος,

πραγματοποιήθηκε western blotting κατά το οποίο φορτώθηκε μια συγκεκριμένη ποσότητα καλλιέργειας (η ελάχιστη δυνατή που μπορούμε να ανιχνεύσουμε) στην οποία έχει επαχθεί η έκφραση της πρωτεΐνη μας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF και επώαση με ορρό σε κατάλληλη αραίωση.

Έπειτα από τον καθαρισμό των αντισωμάτων (βλ σχετικό πρωτόκολλο) τα αντισώματα ελέγχονται με παρόμοιο τρόπο με western blotting σε κατάλληλη αραίωση.

ΙΙ) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΡΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΑΙΜΑ

- Τα δείγματα αφήνονται 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
- Στη συνέχεια τοποθετούνται Ο/Ν στους 4°C
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 30', 5°C
- Ο ορρός διαμοιράζεται σε eppendorfs του 1,5 ml
- Φυγοκέντρηση για 3' στις 10000 rpm –σχηματισμός κόκκινης πελέτας
- Δημιουργία aliquots του 1 ml το οποία φυλάσσονται στους -20°C

ΙΙΙ) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΟΡΡΟ

- Σε ένα παρασκευαστικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης φορτώνεται η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα από μια πελέτα που προέκυψε από βακτηριακή καλλιέργεια BL21 κυττάρων όγκου 20ml, στην οποία έχει επαχθεί η έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης με IPTG (C τελ= 1mM). Το πήκτωμα τρέχει στα 100V, 300mA.
- Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε PVDF μεμβράνη με Ο/Ν μεταφορά (transfer) στα 60V, 110mA στους 4°C (βλέπε σχετικό πρωτόκολλο)
- Την επόμενη μέρα η μεμβράνη τοποθετείται για 5' στη χρωστική Ponceau
- Η χρωστική απομακρύνεται με νερό ώστε να αποκαλυφθεί η ζώνη που εμπεριέχει την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει
- Αφού σημαδευτεί η πάνω μεριά της μεμβράνης, η ζώνη αποκόπτεται από τη μεμβράνη και τοποθετείται σε blocking διάλυμα (5% Dry milk σε TBS) για 45' με 2 ενδιάμεσες αλλαγές
- Η μεμβράνη επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με τον απομονωμένο ορρό του ανοσοποιημένου κουνελιού
- Ακολουθούν 3 πεντάλεπτα ξεπλύματα της μεμβράνης με TBS

- Η μεμβράνη έπειτα τοποθετείται πάνω σε parafilm και τα αντισώματα που έχουν προσδεθεί σε αυτήν εκλούονται με 400μl πρόσφατα παρασκευασμένης παγωμένης 0,2M γλυκίνης/HCl pH 2.5, η οποία τοποθετείται για 5΄πάνω στη μεμβράνη. Να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια του 5λεπτου χτυπάμε ελαφρά το τριβλίο στο οποίο είναι τοποθετημένη η μεμβράνη
- Τα 400μl γλυκίνης τοποθετούνται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα του 1,5ml με 400μl παγωμένου 1M Tris pH 8.0 -2% BSA
- Τα 800μl μοιράζονται σε 10 aliquots των 80 μl και φυλάσσονται στους -20°C

ΣΤ) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Ι) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΜΕ 0.5%ΖΕΛΑΤΙΝΗ, 0.05% KBr(SO4)2-12H2O

- Προσθέτουμε 1,5 gr ζελατίνης σε 300ml H2O και αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα στους 50°C
- Όταν διαλυθεί η ζελατίνη προσθέτουμε 150mg KBr(SO4)2-12H2O και συνεχίζουμε την ανάδευση
- Περιμένουμε να κρυώσει το διάλυμα και εμβαπτίζουμε για 10' τα πλακάκια σε αυτό

ΙΙ) ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ ΓΙΑ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ

- PFA 4% O/N στους 4°C
- 30% σουκρόζη σε PBS O/N στους 4°C
- Πάγωμα σε ισοπεντάνιο και αποθήκευση στους -80°C

ΙΙΙ) ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ

- 3 ξεπλύματα με 0,05%Tween in PBS
- 1 10λεπτο ξέπλυμα με 0,1% Triton in PBS
- 3 ξεπλύματα με 0,05%Tween in PBS
- Επώαση με blocking serum (0,1M Tris HCl pH=7.5, 0.15M NaCl, 0,5% blocking reagent) για 1 ώρα το λιγότερο
- Επώαση με κατάλληλη αραίωση του πρώτου αντισώματος O/N σε blocking serum στους 4°C
- 3 ξεπλύματα με 0,05%Tween in PBS

- Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (goat- anti rabbit) σε 1:500 αραίωση σε blocking serum για 30' στο σκοτάδι
- 2 ξεπλύματα με 0,05%Tween in PBS
- Επώαση με RNAse A σε 1:500 αραίωση σε PBS-Tween για 30'στους 37°C
- 3 ξεπλύματα με 0,05%Tween in PBS
- Χρώση με propidium iodide σε αραίωση 1:1000 σε PBS-Tween για 5' σε θερμοκρασία δωματίου
- 3 ξεπλύματα με 0,05%Tween in PBS
- Κάλυψη με moviol

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Α) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

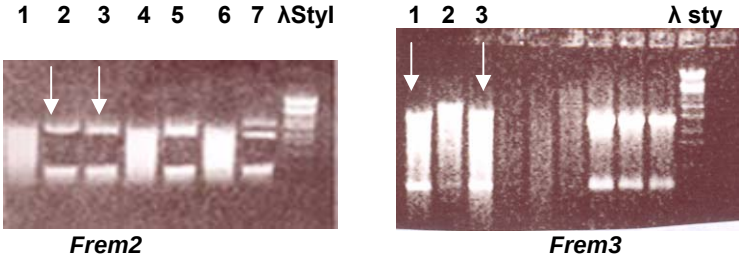
Για την παραγωγή του αντιγονικού πεπτιδίου για την παρασκευή των αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες Frem1, Frem2 και Frem3 του ποντικού επιλέχθηκαν πεπτίδια μεγέθους >100 αμινοξέα με μεγάλη αντιγονικότητα. Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε γενωμικό DNA ποντικού (καθώς δεν υπήρχε διαθέσιμο cDNA) με εκκινητές RC5-RC6, RC1-RC2, RC3-RC4 (βλ υλικά και μέθοδοι) για τις Frem1, Frem2 και Frem3 αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες περιοχές των πρωτεϊνών είναι 1396-1549 (Frem1), 231-400 (Frem2), 576-750 (Frem3).

Έπειτα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του προϊόντος της PCR και έλεγχος σε 1% gel αγαρόζης (Εικ. 1). Η γενωμική κατασκευή για τη Frem1 είχε ήδη πραγματοποιηθεί με κλωνοποίηση με τα ένζυμα BamHI/HindII στο φορέα pJC20 (από το μεταδιδακτορικό ερευνητή Πέτρο Πέτρου).

Εικόνα 1: Στα παραπάνω πήκτωματα φαίνονται με βέλη τα τμήματα του DNA των *Frem2* (507 bp) και *Frem3* (522bp) γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των αντίστοιχων πεπτιδίων.

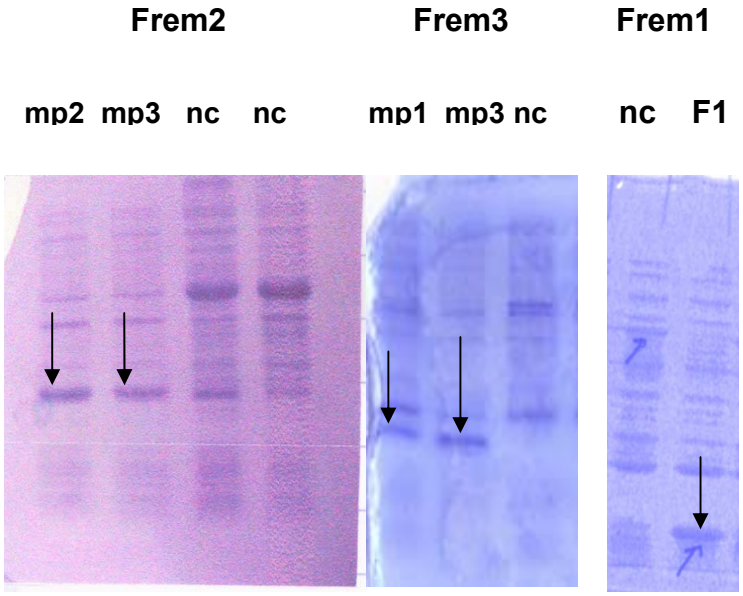
Το τμήμα DNA του *Frem2* επωάστηκε με NdeI/Klenow και XhoI και εντέθηκε στο φορέα pRSETA, έπειτα από επώασή του με BamHI/Klenow και XhoI. Το τμήμα του γονιδίου *Frem3* επωάστηκε με BamHI-XhoI και εντέθηκε στο φορέα pRSETA, έπειτα από επεξεργασία του επίσης με BamHI και XhoI.

Έπειτα από την απομόνωση DNA από βακτηριακές καλλιέργειες σε μικρή κλίμακα (minipreps) επιλέχθηκαν οι θετικοί κλώνοι (Εικ. 2).



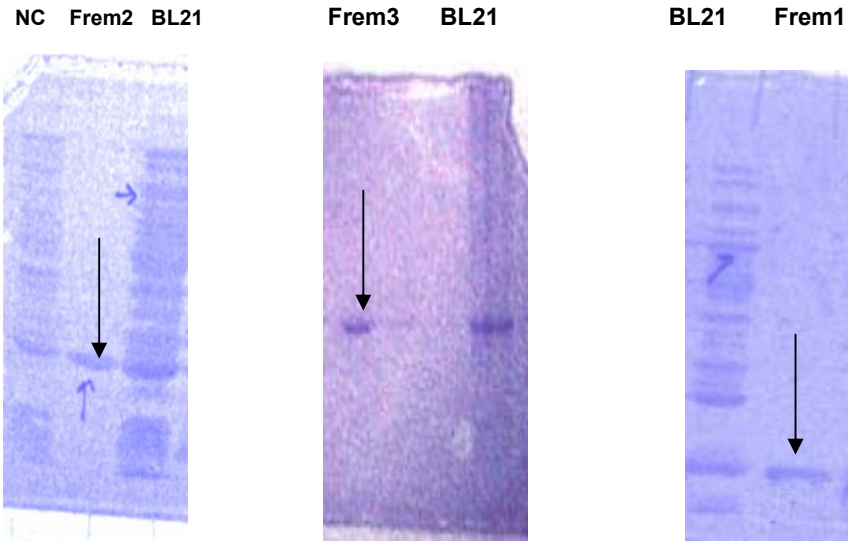
Εικόνα 2: Minipreps από βακτηριακές καλλιέργειες DH5α κυττάρων, στις οποίες έχουν εισαχθεί οι γενωμικές κατασκευές *Frem2*/pRSETA (αριστερή φωτογραφία) και *Frem3*/pRSETA (δεξιά φωτογραφία). Με βέλη σημειώνονται οι θετικοί κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των αντίστοιχων πεπτιδίων σε BL21 κύτταρα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επαγωγή της έκφρασης των πεπτιδίων με IPTG έπειτα από μετασχηματισμό σε BL21 κύτταρα (Εικ. 3). Τα μεγέθη των ζωνών στα πηκτώματα είναι τα αναμενόμενα, δηλαδή 169 αμινοξέα, 174 αμινοξέα και 153 αμινοξέα για τις Frem2, Frem3, και Frem1 αντίστοιχα, όπως ελέγχθηκαν με χρήση πρωτεϊνικού marker (τα στοιχεία δεν παρατίθενται). Με τα παραπάνω πειράματα ταυτοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής, οι οποίες εφαρμόστηκαν σε μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργεια για την ανοσοποίηση των κουνελιών.



Εικόνα 3: Έκφραση των πεπτιδίων Frem1, Frem2, Frem3 σε BL21 κύτταρα (βέλη), mp: miniprep, nc: negative control.

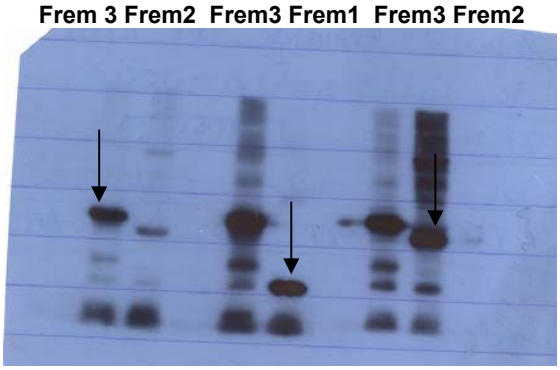
Για την παραγωγή των πρωτεϊνών σε μεγάλη ποσότητα (περίπου 2 mg) για την ανοσοποίηση των κουνελιών σε διαφορετικές δόσεις, πραγματοποιήθηκε επαγωγή με τον ίδιο τρόπο σε 10 καλλιέργειες των 50 ml και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες Frem2 και Frem3 καθαρίστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο «ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ BEADS ΝΙΚΕΛΙΟΥ», ενώ η Frem1 απομονώθηκε από παρασκευαστικό πήκτωμα 12% πολυακρυλαμίδης. Ακολούθησε έλεγχός τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Εικ. 4) και στη συνέχεια συμπύκνωση και επαναδιάλυσή τους σε τελικό όγκο 1500μl 10mM Tris pH 7.5,100mM NaCl.



Εικόνα 4: Καθαρισμένες πρωτεΐνες Frem1, Frem2, Frem3 (βέλη), nc: negative control, BL21: καλλιέργεια BL21 κυττάρων στην οποία έχει παραχθεί το αντίστοιχο πεπτίδιο.

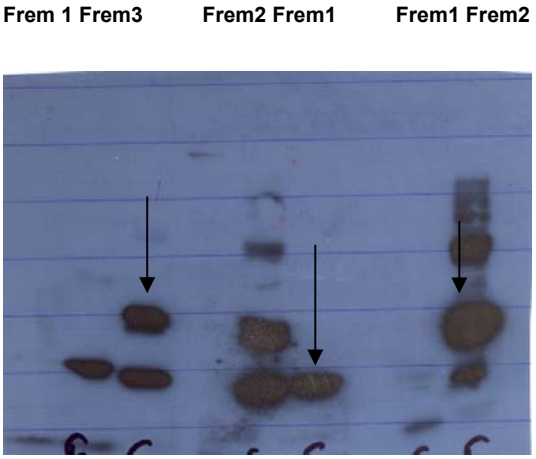
Η κάθε πρωτεΐνη ενέθηκε σε κουνέλι σε τέσσερις δόσεις των 500, 500, 250 και 250μl με χρονική διαφορά ενός μήνα η πρώτη από τη δεύτερη και οι υπόλοιπες μιας εβδομάδας μεταξύ τους και συλλέχθηκε σε κάθε περίπτωση ο ανοσοποιημένος ορρός του ζώου.

Για να ελεγχθεί κατά πόσο ο ορρός του κουνελιού μπορεί να ανιχνεύσει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη και να προσδιοριστεί ο τίτλος του αντισώματος, πραγματοποιήθηκε western blotting, κατά το οποίο φορτώθηκε μια συγκεκριμένη ποσότητα καλλιέργειας (η ελάχιστη δυνατή που μπορούμε να ανιχνεύσουμε με χρώση με Coomassie) στην οποία έχει παραχθεί η πρωτεΐνη μας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF και επώαση με ορρό σε αραίωση 1:200. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω φιλμ (Εικ. 5) το οποίο εκτέθηκε για 5".



Εικόνα 5: Επώαση της μεμβράνης με αραιωμένο ανοσοποιημένο ορρό 1:200 και έκθεση σε φιλμ.

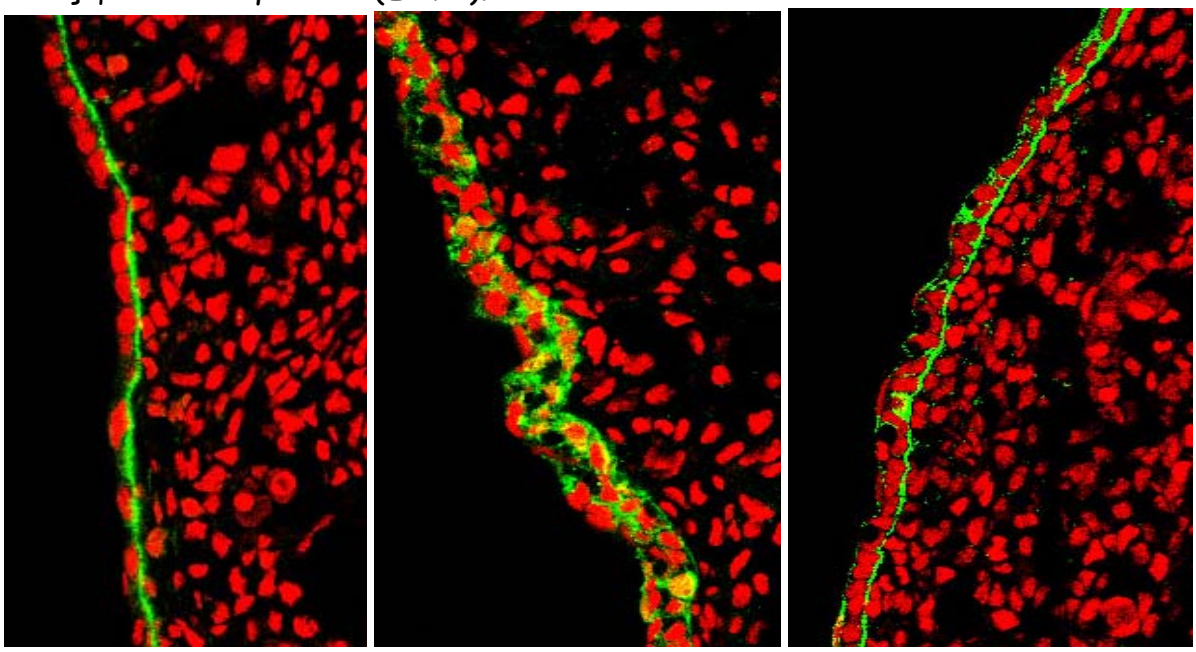
Στη συνέχεια, ο ορρός αραιώθηκε 1:25000 και πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω φιλμ που εκτέθηκε για 15" (Εικ. 6). Παρατηρείται ότι στις συγκεκριμένες αραιώσεις ο ανοσοποιημένος ορρός μπορεί να αναγνωρίσει τα αντίστοιχα πεπτίδια (βέλη), αλλά προσδένει μη ειδικά και κάποιες άλλες πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτόν είναι απαραίτητα πειράματα με ακόμα μεγαλύτερη αραίωση του ορρού. Η μεγάλη αντιγονικότητα των πεπτιδίων που παρασκευάσθηκαν, σε συνδυασμό με τις ελεγχόμενες συνθήκες έκφρασης και καθαρισμού τους οδήγησαν στη βέλτιστη ανοσοποίηση των κουνελιών. Έκθεση μερικών μόνο δευτερολέπτων αρκεί για να έχουμε πολύ δυνατό σήμα στο φιλμ. Ακολούθησε καθαρισμός των αντισωμάτων από τον ανοσοποιημένο ορρό και χρήση τους σε τομές εμβρύων ποντικού.



Εικόνα 6: Επώαση της μεμβράνης με τις πρωτεΐνες με αραιωμένο ορρό αντίσωμα 1:25000 και έκθεση σε φιλμ.

Β)ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ

Με τη χρήση των αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες Frem1, Frem2 και Frem3 πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοεντοπισμού τους κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και η σύγκριση του προτύπου έκφρασής τους σε διάφορα εμβρυϊκά στάδια. Με τον τρόπο αυτόν έγιναν υποθέσεις για το ρόλο και τις πιθανές λειτουργικές αλληλεπιδράσεις τους. Διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες εντοπίζονται σε ένα μεγάλο βαθμό σε παρόμοιες περιοχές του εμβρύου. Μάλιστα, η Frem2 εμφανίζει σχεδόν ίδιο πρότυπο έκφρασης με τη Fras1. Τα αντισώματα δοκιμάστηκαν σε saggital τομές εμβρύων, όπου χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση Frem2 1:50, Frem1 1:10 και Frem3 1:10. Η πιο έντονη έκφραση έκφραση των πρωτεϊνών ανιχνεύθηκε την ημέρα Ε14.5, όπως φαίνεται παρακάτω (Εικ. 7).



Frem2 Frem1 F rem3

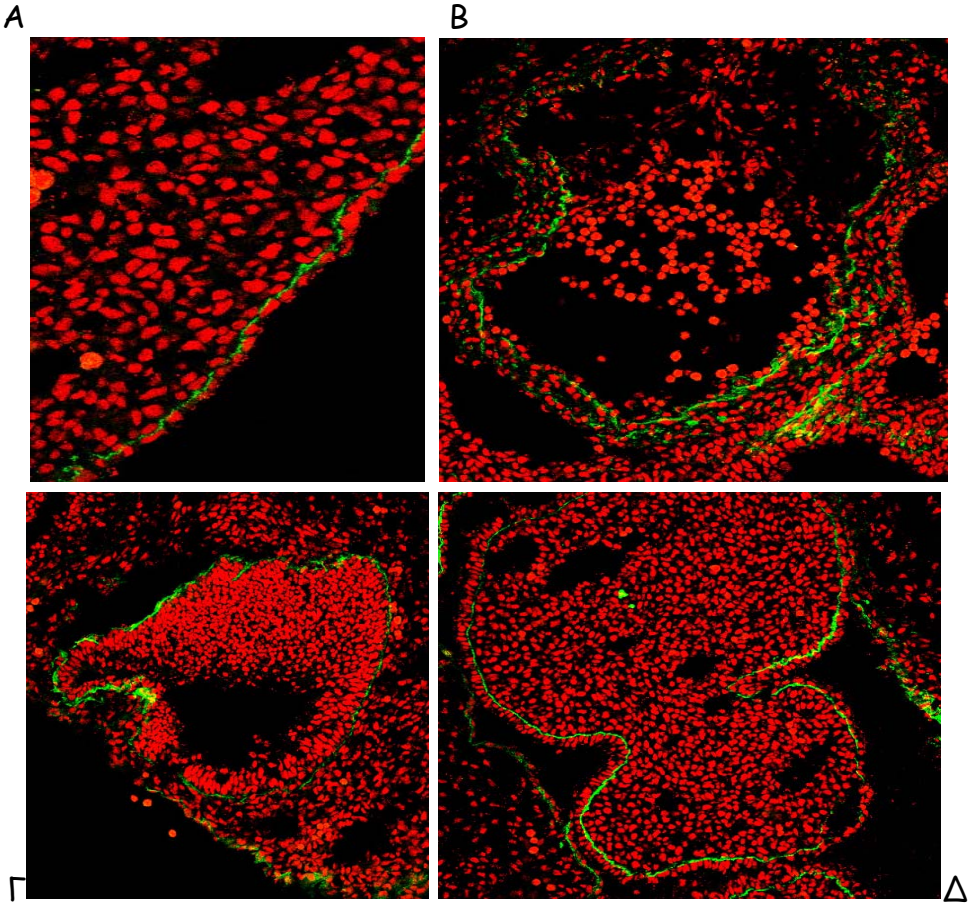
Εικόνα 7: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Frem1, Frem2, και Frem3 στην επιδερμίδα εμβρύου Ε14.5.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών Fras1, Frem1, Frem2, οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (το αντίσωμα για τη Fras1 πρωτεΐνη αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1212-1525 της πρωτεΐνης Fras1, Vrontou et al, 2003). Όπως φαίνεται και παρακάτω, οι πρωτεΐνες αυτές ανιχνεύονται εκτός από τη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας, σε αντίστοιχες επιθηλιακές δομές στους

πνεύμονες, τα νεφρά, το έντερο, το χοριοειδές πλέγμα στον εγκέφαλο και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια στο πάγκρεας και το νευρικό σωλήνα.

Ι) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Fras1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

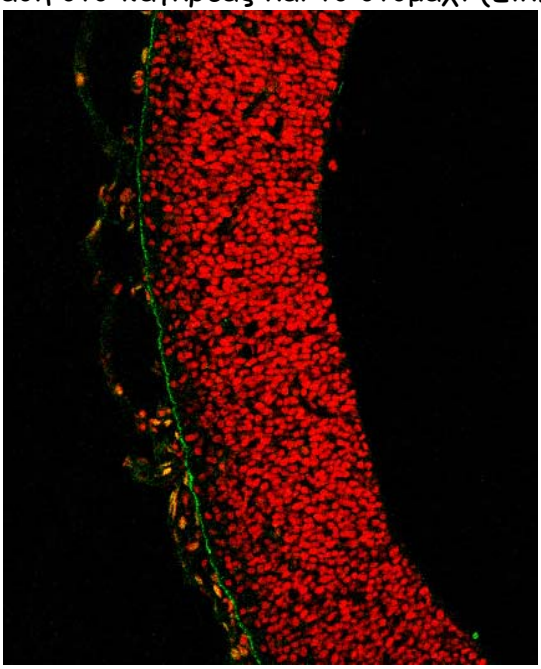
Στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, πρωτεΐνη Fras1 ανιχνεύθηκε από την Ε10.5 σε δομές όπως η βασική μεμβράνη της επιδερμίδας, του καρδιακού επιθηλίου, στο ρομβοειδή εγκέφαλο, το βραγχιακό τόξο (Εικ. 8). Ο εντοπισμός της Fras1 από τα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια φανερώνει τη σημασία της για την ομαλή εμβρυϊκή ανάπτυξη και δικαιολογεί το γεγονός ότι η απενεργοποίησή της οδηγεί σε πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο, εφόσον εντοπίζεται σε ζωτικά για την επιβίωση του οργανισμού όργανα.



Εικόνα 8: Έκφραση της Fras1 στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας (Α) , στην καρδιά (Β), στο ρομβρειδή εγκέφαλο (Γ) και στο βραγχιακό τόξο κατά το εμβρυϊκό στάδιο Ε10.5

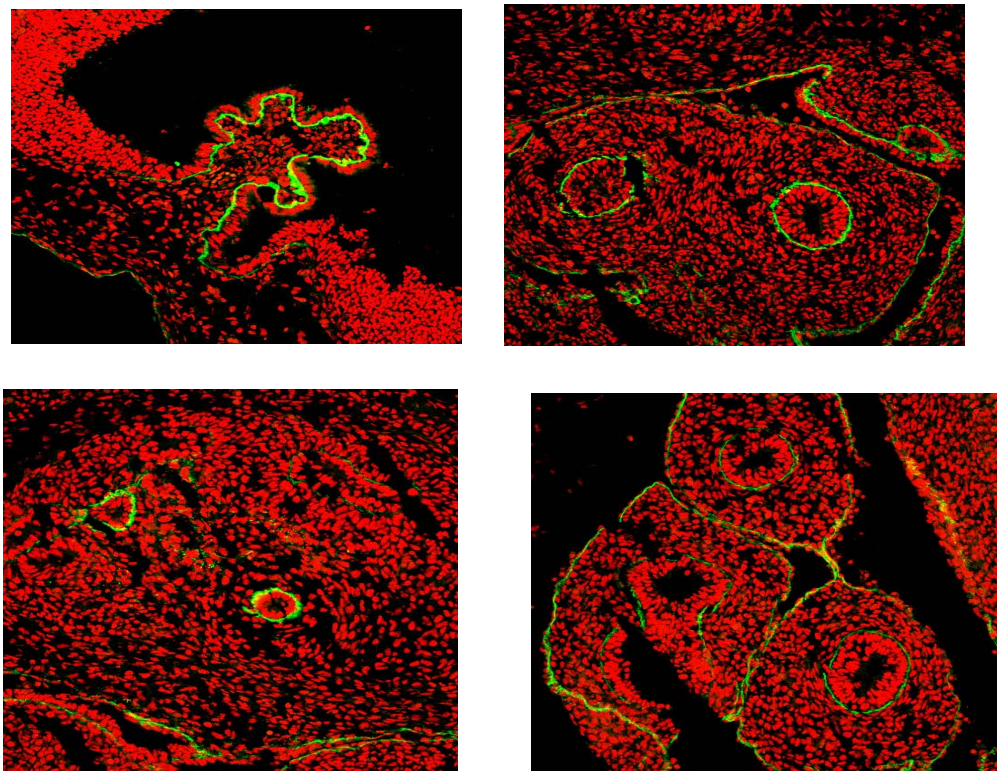
Η Fras1 ανιχνεύεται και κατά το εμβρυϊκό στάδιο Ε11.5 στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας, στο νευρικό σωλήνα, καθώς και την Ε12.5 στην επιδερμίδα, τα νεφρά, τους πνεύμονες, τη βασική μεμβράνη της χοριοειδούς

μήνιγγας του εγκεφάλου (Εικ. 9). Ο Ρόλος της στην επιδερμίδα είναι καθοριστικός, καθώς η απενεργοποίησή της οδηγεί στη διαταραχή της συνοχής της επιδερμίδας με τη δερμίδα και το σχηματισμό υπο-επιδερμικών φουσκαλίδων. Να σημειωθεί ότι τα *Fras1-/-* ποντίκια, όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζουν ανωμαλίες στους νεφρούς, τους πνεύμονες (Vrontou *et al*, 2003) καθώς επίσης και αιματώματα στην περιοχή του χοριοειδούς πλέγματος του εγκεφαλου. Πειραματικές μελέτες (Petrou *et al*, 2005) φανέρωσαν τη σημασία του γονιδίου αυτού για την ομαλή αγγείωσή του πνεύμονα.Ο εντοπισμός της στη βασική μεμβράνη των αεροφόρων κοιλοτήτων στον πνεύμονα επιβεβαιώνει τη σημασία του στο όργανο αυτό Ο ρόλος του στη βασική μεμβράνη στο χοριοειδές πλέγμα πιθανόν παίζει ρόλο στην ομαλή αγγείωσή του εγκεφάλου. Το *Fras1* δεν εκφράζεται στη βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, πιθανότατα όμως επηρεάζει την οργάνωση και την τοπολογία των αγγείων μέσω αλληλεπιδράσεων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. (Petrou *et al*, 2005). Η παρουσία του στη βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας μπορεί να επηρεάζει την οργάνωση και είσοδο των αγγείων στον εγκέφαλο κατά την αγγειογένεση του. Η έκφραση συνεχίζεται κατά την ημέρα Ε13.5 στην επιδερμίδα, το εντερικό επιθήλιο, στο μεσονεφρό, τους μετανεφρούς, τους πνεύμονες (Εικ. 10). Κατά την Ε14.5, η έκφραση συνεχίζεται να υφίσταται στην επιδερμίδα, τους πνεύμονες, τα νεφρά, το εντερικό επιθήλιο όπως και την ημέρα Ε15.5 όπου παρατηρείται επιπλέον έκφραση στο πάγκρεας και το στομάχι (Εικ. 11)



Εικόνα 9: Έκφραση της Fras1 κατά το εμβρυϊκό στάδιο Ε12.5 στη βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας του εγκεφάλου

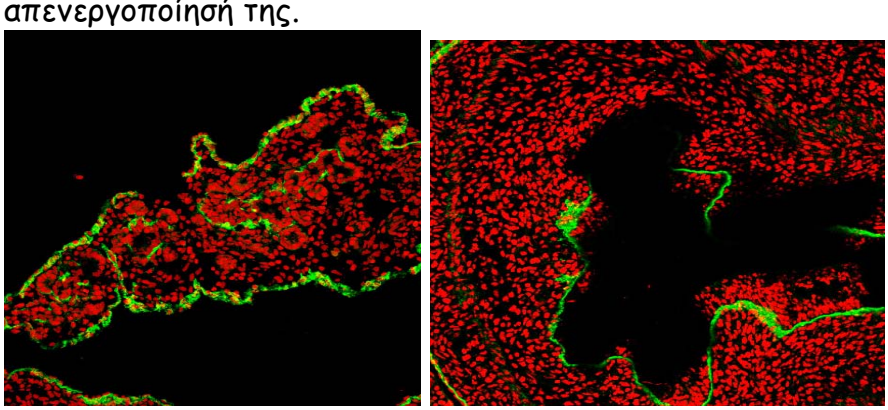
A **B**



Γ Δ

Εικόνα 10: Έκφραση της Fras1 στο χοριοειδές πλέγμα (Α), τη βασική μεμβράνη του εντερικού επιθηλίου (Β), τα νεφρά (Γ) και τους πνεύμονες (Δ) κατά το εμβρυϊκό στάδιο Ε12.5

Ο ρόλος της πρωτεΐνης Fras1 στη μορφογένεση των νεφρών πιθανόν διαδραματίζεται στις επιθηλιακές-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις κατά το σχηματισμό του μετανεφρού. Για το λόγο αυτόν η έλλειψή της οδηγεί σε νεφρική αγενεσία ή υποπλασία. Παράλληλα, η έκφραση του στο πάγκρεας και το στομάχι φανερώνει τον πιθανό ρόλο της και στα όργανα αυτά, παρόλο που δεν έχει μελετηθεί κάποιος προβληματικός φαινότυπος σε αυτά κατά την απενεργοποίησή της.



Εικόνα 11: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της Fras1 στο επιθήλιο του παγκρέατος (Α) και του στομάχου (Β) την ημέρα Ε15.5

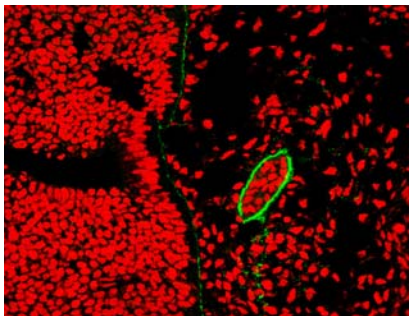
Την Ε17.5 η έκφραση ανιχνεύεται στο χοριοειδές πλέγμα, τα νεφρά και το εντερικό επιθήλιο, την επιδερμίδα και τους πνεύμονες. Η

ανοσοϊστοχημική επεξεργασία E18.5 αναμένεται να δώσει παρόμοια έκφραση με τα προηγούμενα στάδια.

ΙΙ) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Frem2 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

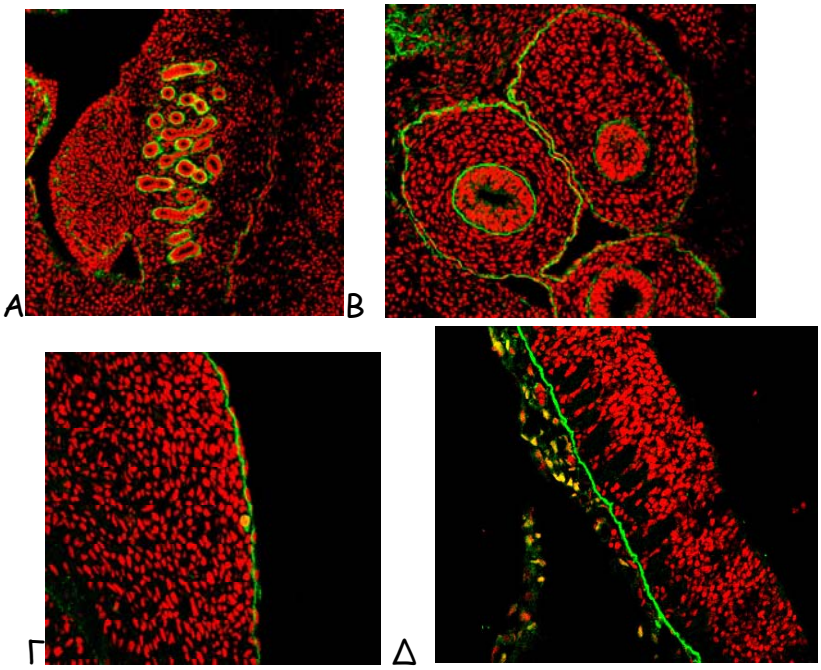
Η Frem2 ανιχνεύεται στα ίδια στάδια και σε σχεδόν τα ίδια όργανα με τη Fras1. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την πιθανή λειτουργική αλληλεπικάλυψη ή και αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών.. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε *Fras1-/-* έμβρυα χάνεται ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Frem2 και το αντίστροφο (αδημοσίευτα αποτελέσματα) γεγονός που αποτελεί επίσης ένδειξη για τη λειτουργική τους αλληλεπίδραση. Επιπρόσθετα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας για τον υπερδομικό εντοπισμό της Frem2 θα βοηθήσουν στην εξαγωγή πιο συγκεκριμένων συμπερασμάτων.

Η έκφρασή της Frem2 ανιχνεύθηκε από το εμβρυϊκό στάδιο E10.5 στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας. Κατά το στάδιο E11.5 αυξάνεται η έκφρασή της στην επιδερμίδα και εντοπίζεται και στη νωτοχορδή (Εικ. 12)

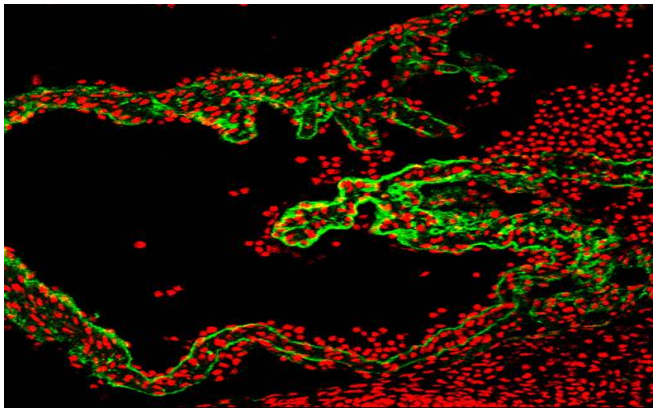


Εικόνα 12:Έκφραση της Frem2 στη νωτοχορδή στο στάδιο E11.5

Την ημέρα E12.5 η Frem 2 ανιχνεύεται στα νεφρά, τους πνεύμονες , την επιδερμίδα, το νευρικό σωλήνα, τη βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας, με παρόμοιο μοτίβο έκφρασης με τη Fras1 (Εικ. 13). Η απενεργοποίηση της Frem2 (Jajeda *et al.*, 2005; Timmer *et al.,* 2005) οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο με τα *Fras1-/-* ζώα. Ο ρόλος της στη σταθερότητα των αγγείων και τη μορφογένεση των ιστών είναι καθοριστικός (Timmer *et al.,* 2005), εντούτοις και αυτή δεν ανιχνεύεται στη βασική μεμβράνη των αγγείων. Ο εντοπισμός της σε επιθηλιακές δομές των νεφρών και τους πνεύμονες μπορεί να συσχετισθεί με τον προβληματικό φαινότυπο των *Frem2-/-* ποντικών στα όργανα αυτά.

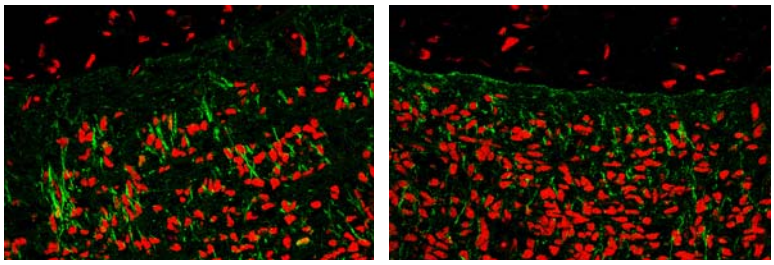


Εικόνα 13 :Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της Frem2 στα νεφρά (Α), το εντερικό επιθήλιο (Β), Την επιδερμίδα (Γ) και τη βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας του εγκεφάλου (Δ) την ημέρα Ε12.5



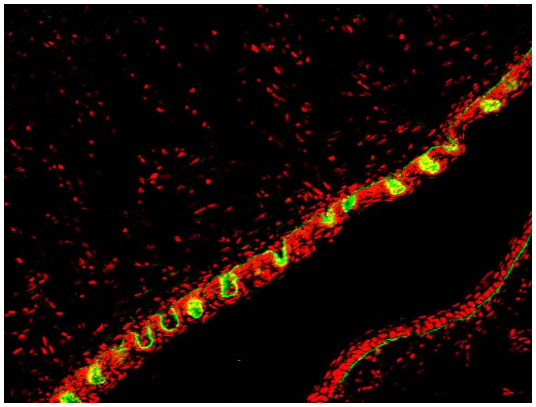
Εικόνα 14:Έκφραση της Frem2 στην καρδιά εμβρύου Ε12.5

Επιπλέον, ανιχνεύεται στις επιθηλιακές δομές της καρδιάς (Εικ. 14). Την ημέρα Ε13.5 ακολουθεί επίσης παρόμοιο μοτίβο έκφρασης με τη Fras1 (στην επιδερμίδα, το εντερικό επιθήλιο, το μεσονεφρό, τους μετανεφρούς, τους πνεύμονες), αλλά έκφράζεται παράλληλα ακόμα στη βασική μεμβράνη της χοριοειδούς μήνιγγας. Το ίδιο ισχύει και για την Ε 14.5 (έκφραση στην επιδερμίδα, τους πνεύμονες, τα νεφρά, το εντερικό επιθήλιο) κατά την οποία το ανιχνεύουμε και στα νευρικά κύτταρα του φλοιού του εγκεφάλου και τα ραχιαία γάγγλια (Εικ. 15). Να σημειωθεί ότι τα myelencephalic bleb ποντίκια είναι τα μόνα με ανωμαλίες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, γεγονός που μπορεί να συσχετισθεί με την ανίχνευση της πρωτεΐνης Frem2 σε νευρικά κύτταρα.



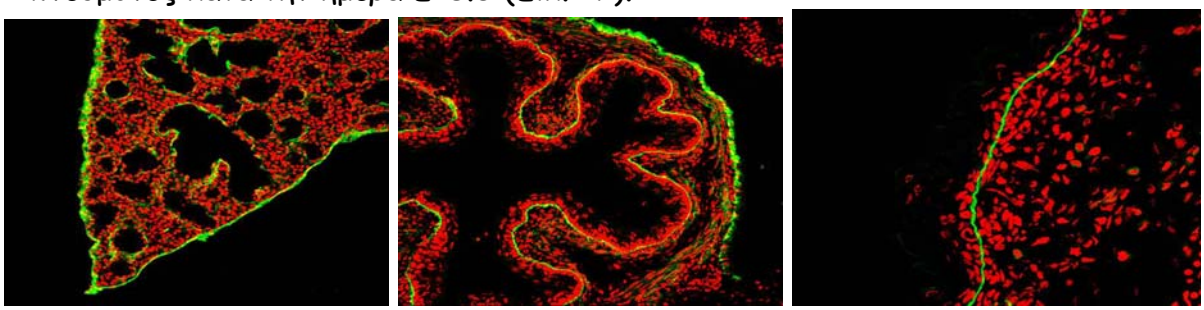
Εικόνα 15:Έκφραση της Frem2 στα νευρικά κύτταρα κατά το στάδιο E14.5

Κατά το E15.5, εκφράζεται στο χοριοειδές πλέγμα, το εντερικό επιθήλιο, τα νεφρά, λιγότερο στους πνεύμονες, πάγκρεας, στομάχι, οσφρητικό επιθήλιο ενώ την E17.5 το χοριοειδές πλέγμα, τα νεφρά, τον πνεύμονα, την επιδερμίδα και τους γευστικούς κάλυκες (Εικ. 16).Πιθανόν να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αίσθηση της γεύσης, υπόθεση που παραμένει να ερευνηθεί με περαιτέρω πειράματα.



Εικόνα 16:Έκφραση της Frem2 στους γευστικούς κάλυκες της γλώσσας εμβρύου E17.5

Τέλος έντονη είναι η έκφραση της Frem2 στο δέρμα, νεφρά ,έντερο και πνεύμονες κατά την ημέρα E18.5 (Εικ. 17).

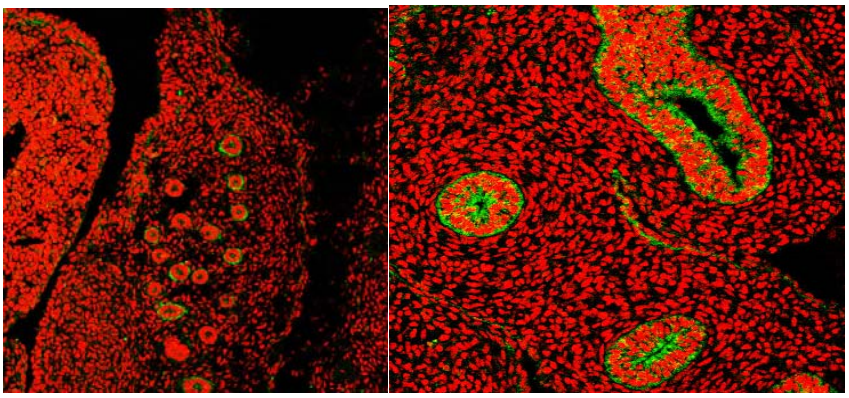


Εικόνα 17: Έκφραση της Frem2 στους πνεύμονες (αριστερή φωτογραφίας), το εντερικό επιθήλιο (μεσαία φωτογραφία) και την επιδερμίδα (δεξιά φωτογραφία) την ημέρα E18.5

III) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ Frem1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

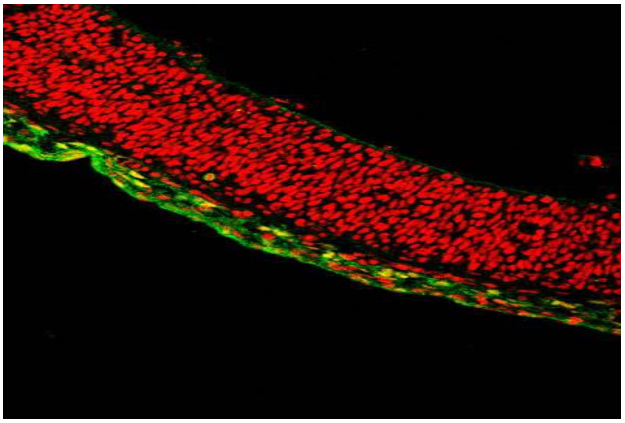
Η Frem1 στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν ανιχνεύθηκε κατά τη μέρα E10.5 στην επιδερμίδα ενώ στην επιδερμίδα σταδίου E11.5 η έκφρασή της ήταν ελάχιστη, σε αντίθεση με τις Fras1 και Frem2. Εντοπίστηκε κατά την ημέρα E11.5 στη νωτοχορδή και το νευρικό σωλήνα όχι σε υψηλά επίπεδα, ενώ ανιχνεύθηκε επίσης σε χαμηλά επίπεδα στα νεφρά, πνεύμονες, νευρικό σωλήνα, εμβρύων E12.5 (Εικ. 18). Η απενεργοποίησή της οδηγεί στον head bleb φαινότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με την απενεργοποίηση των Fras1 και Frem2 πρωτεϊνών.

Η έκφρασή της, όπως κατέδειξαν πειράματα ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της με χρυσό σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, με τη χρήση του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε στις παρούσες μελέτες, (υπό δημοσίευση) ανιχνεύθηκε ενδοκυτταρικά, στην περιοχή του συστήματος Golgi, γεγονός που φανερώνει ότι διαδραματίζει ένα διαφοροποιημένο, αλλά πιθανόν συνεργατικό ρόλο με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Και στα πειράματα ανοσοφθορισμού μπορεί να διακριθεί ότι το πρότυπο έκφρασής της διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες, αλλά εντοπίζεται σε παρόμοιες δομές.



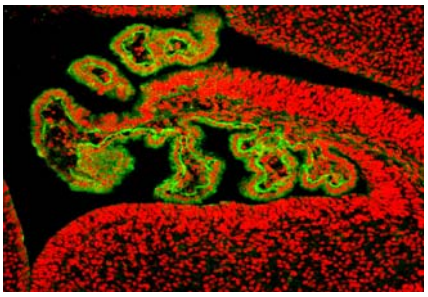
Εικόνα 18: Έκφραση της Frem1 στους νεφρούς (αριστερή φωτογραφία) και στους πνεύμονες E12.5

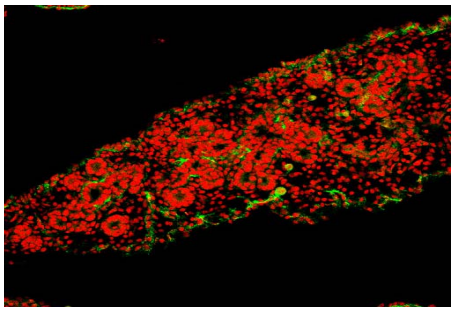
Εντοπίστηκε στο φλοιό του εγκεφάλου κατά την ημέρα E12.5 (**Εικ. 19**)



Εικόνα 19:Εντοπισμός της Frem1 στο φλοιό του εγκεφάλου εμβρύου E12.5

Κατά την E13.5 εντοπίζεται στο χοριοειδές πλέγμα ,πνεύμονες, επιθήλιο του στομάχου. Η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται την E14.5 στην επιδερμίδα, τους πνεύμονες και τα νεφρά καθώς επίσης και το στομάχι, τα νευρικά κύτταρα στον εγκέφαλο. Αυτή συνεχίζεται και κατά την E 15.5 και εμφανίζεται και στο χοριοειδές πλέγμα και το πάγκρεας (Εικ. 20). Παρατηρούμε ότι η έκφραση εντοπίζεται στα ίδια σχεδόν όργανα με τη Fras1 και Frem2 πρωτεΐνη.





Εικόνα 20:Έκφραση της Frem1 στο χοριοειδές πλέγμα (αριστερή φωτογραφία) και στο πάγκρεας (δεξιά φωτογραφία) κατά την ημέρα E15.5

Κατά την ημέρα E16.5 η Frem1 εμφανίζει ιδιαίτερο μοτίβο έκφρασης, με διαδοχικές περιοχές αυξημένης και ελαττωμένης έκφρασης στην περιοχή της επιδερμίδας (αδημοσίευτα αποτελέσματα) Η ιδιαιτερότητα αυτή υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο της σε διαδικασίες διαφοροποίησης της επιδερμίδας . Την ημέρα E17.5 φαίνεται να διατηρείται η έκφρασή της στην επιδερμίδα ενώ είναι ελαττωμένη στα εσωτερικά όργανα.

Οι παραπάνω μελέτες σε συνδυασμό με περαιτέρω μελέτες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι σημαντικές για τη διαλεύκανση του ρόλου και της πιθανής αλληλεπικάλυψη των ρόλων των γονιδίων της Fras1/Frem οικογένειας

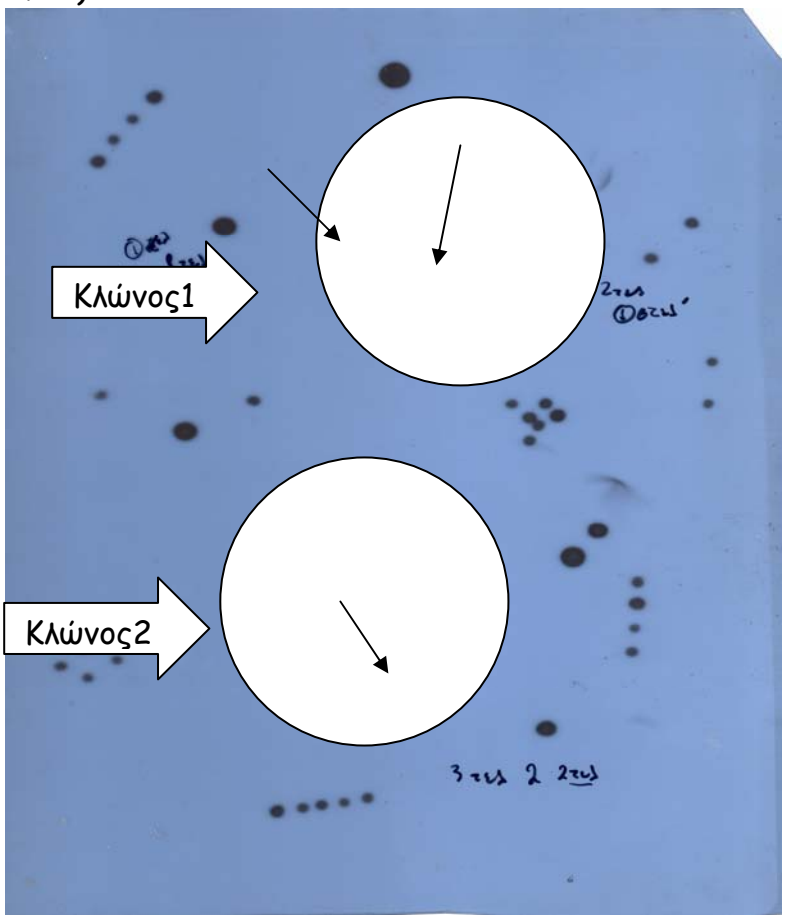
Από τα παραπάνω πειράματα προέκυψαν τρία αντισώματα με τα οποία έγινε εφικτή η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών Frem1, Frem2, Frem3,οι οποίες εντοπίζονται και χαρακτηρίζουν τον εξωκυττάριο χώρο. Να σημειωθεί

ότι η μελέτη της διακίνησης πρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου αποτελεί ένα σύστημα της Κυτταρικής Βιολογίας που δεν έχει μελετηθεί πλήρως. Φαίνεται πως η διαλεύκανση των μηχανισμών κυκλοφορίας και αλληλεπίδρασης των Fras1/Frem πρωτεϊνών είναι ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα για την εξιχνίαση τους ,στην οποία εκτός από τις ανοσοϊστοχημικές, σημαντικό ρόλο θα διαδραματίσουν και ηλεκτρονικές και in vitro μελέτες πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

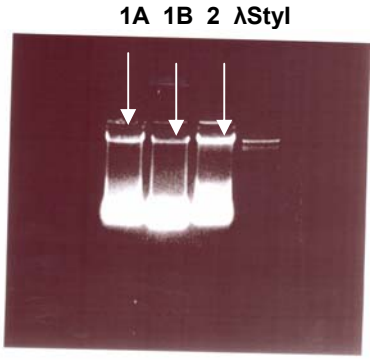
Γ) ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΦΑΓΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΤΟΥ Frem3

Για την απομόνωση του cDNA του *Frem3* πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικά διερευνήσεις (screenings).

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε παρήχθη με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη χρήση των εκκινητών VP7 και VP 8 .Από την πρώτη διερεύνηση προέκυψαν τρεις κλώνοι, ενώ από τη δεύτερη δύο.Στη συνέχεια, μετά την τρίτη διερεύνηση απομονώθηκαν δύο κλώνοι, ο 1 από τον οποίον συνελέγησαν δύο φαγικές πλάκες (1α και 1β) και ο 2. Το φιλμ που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μοναδιαίων πλακών φαίνεται παρακάτω (Εικ. 21):



Εικόνα 21: Συλλογή φαγικών πλακών για την απομόνωση του *Frem3* cDNA



Εικόνα 22: Φαγικό DNA από τους κλώνους 1A,1B, 2 (βέλη). Οι έντονες ζώνες RNA φαίνονται έντονα κάτω από το απομονωμένο DNA.

Με περαιτέρω πειράματα επώασης με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, θα ταυτοποιηθεί και θα απομονωθεί το cDNA του *Frem3* γονιδίου για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων και πραγματοποίηση πειραμάτων σε συστήματα 2 υβριδίων (two hybrid), ώστε να ελεγχθεί η αλληλεπίδρασή της πρωτεΐνης με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας Fras1/Frem καθώς επίσης και με άλλες γνωστές πρωτεΐνες. Η γνώση αυτή αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους δρα η Frem3.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Arin MJ and Roop**, Disease model: Heritable skin blistering, 2001, Trends Mol Med, 7(9):422-4.

- **Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M and McDonald D**, Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors, 2003, American Journal of Pathology, 163:1801-1815.

- **Bladt F, Tafuri A, Gelkop S, Langille L and Pawson T,** Epidermolysis bullosa and embryonic lethality in mice lacking the multi-PDZ domain protein GRIP1, 2002, PNAS, vol. 99, 6816–6821.

- **Bruckner-Tuderman L, Bruckner P**, Genetic diseases of the extracellular matrix: more than just connective tissue disorders, 1998, Mol Med, 76(3-4):226-37.

- **Bruckner-Tuderman L,** Hereditary skin diseases of anchoring fibrils, 1999, Journal of Dermatological Science, 20, 122-133.

- **Chan LS**, Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases, 1997, Front Bioscience, 2, 342-352.

- **Darling S, Gossler A,** A mouse model for Fraser syndrome? 1994, Clin Dysmorphol. Vol 3, p 91-5.

- **Ekblom P, Vestweber D and Kemler R,** Cell-Matrix Interactions and Cell Adhesion During Development, 1986,Annual Review of Cell Biology,Vol. 2: 27-47.

- **Fässler R, Attila Aszódi, Alexander Pfeifer, Mikael Wendel, László Hiripi,** Mouse models for extracellular matrix diseases, 1998, J Mol Med, 76:238–252.

- **Gattuso J, Patton MA, Baraitser M.,** The clinical spectrum of the Fraser syndrome: report of three new cases and review, 1987, J Med Genet, (9):549-55.

- **Green M.C.** Catalog of mutant genes and polymorphic loci in MF Lyon, AG Searle (eds): "Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse" 2nd Edition. 1989, Oxford University Press.

- **Gustavson E,Fassler R,** Insighthts into extracellular matrix functions from mutant mouse models, 2000, Exp Cell Res, (1):52-68

- **Hogan B, Costantini F, Lacy E**, Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual,1986, Cold Spring Harbor Laboratory,

- **Jadeja S, Smyth I, Pitera J, Taylor M, Van Haelst M, Bentley E, McGregor L, Hopkins J, Chalepakis G, Philip N, Perez Aytes, Watt F, Darling S, Jackson I, Woolf A, Scambler P** Identification of a new gene mutated in Fraser syndrome and mouse myelencephalic blebs , 2005, Nature Genetics ,Vol 37, p 520 – 525.

- **Kalinichenko VV, Lim L, Stolz DB, Shin B, Rausa FM, Clark J, Whitsett JA, Watkins SC, Costa RH.** Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the Forkhead Box f1 transcription factor, 2001, Dev Biol Vol 235,p 489-506.

- **Kaner RJ, Ladetto JV, Singh R, Fukuda N, Matthay MA, Crystal RG.** Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema, 2000, Am J Respir Cell Mol Biol. Vol 22, p 657-64.

- **Kaufmann M.H.,** The atlas of mouse development, 1994, Academic Press.

- **Kiyozumi D, Osada A, Sugimoto N, Weber CN, Ono Y, Imai T, Okada A, Sekiguchi K.**, Identification of a novel cell-adhesive protein spatiotemporally expressed in the basement membrane of mouse developing hair follicle, 2005, Exp Cell Res ,306(1):9-23.

- **Kogo T, Kostourou V, Adams S, Jadeja S, Chalepakis G, Scambler P, Huganir R, Adams R,** A direct functional link between the multi-PDZ domain protein GRIP1 and the Fraser syndrome protein Fras1 , 2004, Nature Genetics, Vol36, p 172 - 177 .

- **Kuure S,Vuolteenaho R,VainioS**, Kidney morphogenesis :cellular and molecular regulation, 2000,Mech Dev,(1):31-45.

- **Mariani T, Reed J, and Shapiro S,** Expression Profiling of the Developing Mouse Lung/Insights into the Establishment of the Extracellular Matrix, 2002, Respir. Cell Mol. Biol, Vol. 26, pp. 541–548.

- **Li Y and Thompson R**, Basement membrane components, 2003, Journal of Clinical Pathology, 56:885-887

- **Liddington R**, Mapping out the basement membrane,2001, Nature structural biology, Vol8, 573-574

- Lyon M, Rastan S, Brown S, 1996, Genetic variants and strains of the laboratory mouse, Oxford University Press.

- **Lim L, Kalinichenko VV, Whitsett JA, Costa RH,** Fusion of lung lobes and vessels in mouse embryos heterozygous for the forkhead box f1 targeted allele. 2002, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, Vol 282,p 1012-22.

- **Maronpot R, Boorman G, Gaul B**, Pathology of the mouse : reference and atlas, 1999, Cache River Press.

- **McGregor L, Makela V, Darling S, Vrontou S, Chalepakis G, Roberts C, Smart N, Rutland P, Prescott N, Hopkins J, Bentley E, Shaw A, Roberts E, Mueller R, Jadeja S, Philip N, Nelson J, Francannet C, Perez-Aytes A, Megarbane A, Kerr B, Wainwright B, Woolf A, Winter R, Scambler P,** Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in FRAS1/Fras1 encoding a putative extracellular matrix protein, Nature Genetics, 2003,Vol 34, p 203 - 208 .

- **Mena W, Krassikoff N, Philips J,** Fused eyelids, airway anomalies, ovarian cysts, and digital abnormalities in siblings: a new autosomal recessive syndrome or a variant of Fraser syndrome? 1991, Am J Med Genet, (3):377-82.

- **Nelson W, Yeaman C**, Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells, 2001, Trends Cell Biol, 12:483-486.

- **Paulsson M,** Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions,1999, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, Vol 27, 93-127.

- **Petrou P, Pavlakis E, Dalezios Y, Galanopoulos V, Chalepakis G,** Basement membrane distortions impair lung lobation and capillary organization in the mouse model for Fraser syndrome, 2005, The Journal of Biological Chemistry Vol. 280, p 10350–10356.

- **Relan NK, Schuger L**, Basement membranes in development, 1999, Pediatr Dev Pathol,(2):103-18.

- **Roberts Rugh,** The mouse-Its reproduction and development, 1990, Oxford Science publications.

- **Rossant J, Pedersen R**, Transgenic techniques in mice, 1988, Cold Spring Harbor, N.Y.

- **Schambra U, Lauder J, Silver J,** Atlas of the prenatal mouse brain 1992,San Diego Academic Press.

- **Slavotinek A and Tifft C,** Fraser syndrome and cryptophthalmos: review of the diagnostic criteria and evidence for phenotypic modules in complex malformation syndromes, 2002, J. Med. Genet., 39(9): 623 – 633.

- **Smyth I, Du X, Taylor M, Justice M, Beutler B, Jackson I,** The extracellular matrix gene Frem1 is essential for the normal adhesion of the embryonic epidermis, 2004, PNAS, Vol. 101, p 13560-13565.

- Tilghman S, Lodish H, The mouse as a model organism knocking outgenes to study gene function, 1996, Cogito Learning Media, Inc.

- **Timmer J, Mak T, Manova K, Anderson K, Niswander L,** Tissue morphogenesis and vascular stability require the Frem2 protein,

product of the mouse myelencephalic blebs gene, 2005, PNAS, Vol 102, p 11746-11750.

- **Theiler Karl,** The house mouse : atlas of embryonic development, 1989, New York : Springer-Verlag.
- **Vrontou S, Petrou P, Meyer B, Galanopoulos V, Imai K, Yanagi M, Chowdhury K, Scambler P, Chalepakis G,** Fras1 deficiency results in cryptophthalmos, renal agenesis and blebbed phenotype in mice, 2003,Nature Genetics, Vol 34,p 209 - 214 .
- **Winter, R. M**, Fraser syndrome and mouse 'bleb' mutants , 1990, Clin. Genet. 37, 494–495.
- **Winter R,M,** Malformation syndromes; a review of mouse/human homology,1988, J Med Genet,25:40-487
- **Wong L, Lin Y, Suwannarat P, Hsu C, Kwon H, Mackowiak S,** Mitochondrial DNA mutations in a patient with sex reversal and clinical features consistent with Fraser syndrome, 2004, Clin Genet, 67: 252–257.