

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ
ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:
‘ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ
ΜΟΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ TAG1 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ
ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ
ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ’**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΜΑΡΙΑ ΣΑΒΒΑΚΗ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2007**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη TAG1(Transient Axonal Glycoprotein 1) είναι ένα μόριο κυτταρικής συνάφειας που εντοπίζεται ειδικά στο νευρικό σύστημα και ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Αποτελείται από 6 ανοσοσφαιρινικές περιοχές και 4 περιοχές που ομοιάζουν στη φιμπρονεκτίνη και είναι προσδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας ομάδας γλυκοφοσφατιδυλινοσιτόλης. Η έκφραση της πρωτεΐνης TAG1 ρυθμίζεται αναπτυξιακά, εντοπίζεται σε νευρικά κύτταρα και κύτταρα γλοίας του κεντρικού και περιφερειακού νευρικού συστήματος στα τρωκτικά και εμπλέκεται σε σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι η συνάφεια μεταξύ των νευρικών κυττάρων, η μετανάστευση των νευρικών κυττάρων, η αύξηση του μήκους των νευριτών και η μυελίνωση. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με τον εαυτό της και με άλλα μόρια και αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι κρίσιμες για το ρόλο της. Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με την ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με την TAG1 σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και σε περιοχές του εγκεφάλου που η έκφραση της είναι έντονη στα τρωκτικά. Μια τέτοια μελέτη αποσκοπεί στην περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης TAG1 στο νευρικό σύστημα μέσω της μελέτης των αλληλεπιδράσεων της με μόρια γνωστής λειτουργίας, καθώς και στην αναγνώριση υποδοχέων της στα διάφορα συστήματα μέσω των οποίων μεταδίδει σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου για να διεκπεραιώσει τις λειτουργίες της.

SUMMARY

TAG1 (Transient Axonal Glycoprotein 1) is a neural specific cell adhesion molecule of the F3/contactin family of the immunoglobulin superfamily. It consists of 6 Ig-like domains and 4 FNIII-like repeats and is anchored to the plasma membrane via a GPI (glycosylphosphatidylinositol) tail. TAG1 expression is highly regulated during development. This protein is specifically expressed by neural and glial cells of the central and peripheral nervous system in rodents and is implicated in fasciculation, neurite outgrowth, axon migration and myelination events. TAG1 protein interacts with itself as well as with other cell surface molecules, and these interactions are crucial for TAG1 function. In the present study, we intent to discover interactors of TAG1 in areas where its expression is high, in the developing and the adult nervous system of rodents. The aim of this study is to reveal new roles for TAG1 in nervous system development and maintenance, as well as to find possible downstream signaling events initiated by TAG1 binding to its specific receptor.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με το μόριο κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος TAG1 (Transient Axonal Glycoprotein 1) και ειδικότερα με την εύρεση μορίων που αυτή η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου τρωκτικών και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Η πρωτεΐνη TAG1 ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών των νευρωνικών μορίων κυτταρικής συνάφειας. Επίσης, η έκφραση της ρυθμίζεται αναπτυξιακά σε διάφορες περιοχές του κεντρικού και του περιφερειακού νευρικού συστήματος. Γνωστοί ρόλοι της πρωτεΐνης TAG1 μέχρι στιγμής αφορούν στην κυτταρική συνάφεια, την αύξηση του μήκους των νευρικών αξόνων, τη μετανάστευση και την καθοδήγηση νευρικών κυττάρων και τέλος τη μυελίνωση νευρικών ινών. Η εύρεση μορίων που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη TAG1 θα βοηθούσε στην κατανόηση ενός πιθανού μηχανισμού μέσω του οποίου διαδραματίζει τον ρόλο της στα διάφορα συστήματα.

A.1. ΜΟΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ (Cell Adhesion Molecules, CAMs)

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι η κυτταρική αύξηση, η κυτταρική διαφοροποίηση, η ανοσολογική απόκριση καθώς και η μετάδοση σημάτων από το εξωτερικό του κυττάρου στο εσωτερικό του. Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας διαχωρίζονται σε 4 βασικές οικογένειες πρωτεϊνών: τις ιντεγκρίνες (integrins), τις καντερίνες (cadherins), τις σελεκτίνες (selectins) και την υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin superfamily, IgSF) (Silverstein, 1998, Hynes, 2000).

Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, που αποτελούνται από δύο μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένες υπομονάδες και διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις με μόρια που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999). Δυο παραδείγματα ιντεγκρινών είναι η λαμινίνη και η φιμπρονεκτίνη. Οι καντερίνες είναι επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες εξαρτώνται από την πρόσδεση ιόντων ασβεστίου στο εξωκυττάριο τμήμα τους. Οι πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας είναι η N-καντερίνη που εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα, η P-καντερίνη που εντοπίζεται στον πλακούντα και η E-

καντερίνη που εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα. Οι καντερίνες διεκπεραιώνουν ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις μέσω της εξωκυττάριας περιοχής τους, καθώς και αλληλεπιδράσεις με κατενίνες μέσω της κυτταροπλασματικής περιοχής τους (Gumbiner, 2000). Οι σελεκτίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα, οι οποίες εξαρτώνται από την πρόσδεση δισθενών ιόντων. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας αλληλεπιδρούν με υδατάνθρακες μέσω του εξωκυττάριας τμήματος τους ενώ η οικογένεια αποτελείται από τρία μόλις μέλη: την E-σελεκτίνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, την L-σελεκτίνη που εντοπίζεται στα λευκοκύτταρα και την P-σελεκτίνη που εντοπίζεται στα αιμοπετάλια (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999).

Η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινικών μορίων κυτταρικής συνάφειας (IgSF CAMs) αποτελείται από μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες μη εξαρτώμενες από ιόντα ασβεστίου. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από ένα εξωκυττάρια τμήμα που περιέχει επαναλήψεις ανοσοσφαιρινικών περιοχών (Ig-like domains) συνδεδεμένων μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική περιοχή που αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό. Τυπικά τα μέλη αυτής της οικογένειας αλληλεπιδρούν με ιντεγκρίνες και άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας. Η υπεροικογένεια αυτή διαιρείται σε τέσσερις επιμέρους οικογένειες πρωτεϊνών, ανάμεσα στις οποίες και οι οικογένεια των μορίων κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος (Neural CAMs ή NCAMs) στην οποία ανήκει η υπό μελέτη πρωτεΐνη TAG1.

A.2. ΜΟΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ (IgSF NCAMs)

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος χαρακτηρίζονται από την παρουσία τμημάτων που ομοιάζουν με τις περιοχές των ανοσοσφαιρινών (Ig-like) και είναι συνήθως ομόλογες με την σταθερή τους περιοχή, C2 (Williams και Barclay, 1988). Κάποια μέλη αυτής της οικογένειας περιέχουν επίσης ποικίλο αριθμό τμημάτων που ομοιάζουν με τις φμπρονεκτίνες (FNIII-like). Αυτή η κατηγορία πρωτεϊνών μάλιστα διαρείται σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και σε πρωτεΐνες που είναι προσδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός τμήματος γλυκοφωσφατιδυλοϊνσιτόλης (GPI- anchor). Στην τελευταία υποομάδα ανήκει και η

υπό μελέτη πρωτεΐνη TAG1 (Karagogeos, 2003). Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος είναι γνωστό πως διαμεσολαβούν την κυτταρική συνάφεια, την ανάπτυξη και αύξηση των νευριτών καθώς και τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων και είναι απαραίτητα τόσο κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος όσο και στο ενήλικο (Walsh και Doherty, 1997).

Τα πρώτα μέλη της οικογένειας των IgSF NCAMs αποτελούν οι γλυκοπρωτεΐνες NCAM και L1, οι οποίες είναι τα ιδρυτικά μέλη των αντίστοιχων υποοικογενειών. Η υποοικογένεια L1 αποτελείται πλέον από 4 μέλη: την L1, την CHL1, την neurofascin και την NgCAM. Αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση των νευρικών αξόνων, στη μετανάστευση και επιβίωση των νευρικών κυττάρων, στην πλαστικότητα των συνάψεων καθώς και στην αναγέννηση των νευρικών κυττάρων μετά από τραύμα. Ο ρόλος αυτών των πρωτεϊνών είναι καλά μελετημένος και κάποιοι μηχανισμοί δράσης τους έχουν διευκρινιστεί. Η σημασία αυτών των μορίων επισημαίνεται επίσης από το γεγονός πως μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση τους έχουν βρεθεί να συμβαδίζουν με διάφορες νευρολογικές ασθένειες στον άνθρωπο. Κάποια παραδείγματα είναι η σχιζοφρένεια (μεταλλάξεις στο γονίδιο της CHL1), το σύνδρομο του αυτισμού (μεταλλάξεις στο γονίδιο του NgCAM) καθώς και το σύνδρομο L1 το οποίο χαρακτηρίζεται από διανοητική καθυστέρηση, υδροκεφαλία κ.α. και για το οποίο ευθύνονται μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης L1 (Maness και Schachner, 2007).

Η υποοικογένεια NCAM αποτελείται από 3 ισομορφές της πρωτεΐνης NCAM, οι οποίες διαφέρουν στο μοριακό τους βάρος καθώς και στην έκφραση τους. Το χαρακτηριστικό αυτό των πρωτεϊνών που τις κάνει μοναδικές ανάμεσα στα μόρια κυτταρικής συνάφειας είναι η παρουσία του υδατάνθρακα α-2,8-συνδεδεμένου πολυσιαλικού οξέως. Τις 3 ισομορφές του NCAM αποτελούν οι πρωτεΐνες NCAM180, NCAM140 και NCAM120 με τους αριθμούς να συμβολίζουν τα μοριακά τους βάρη. Οι δύο πρώτες ισομορφές είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ενώ η τρίτη είναι προσδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός τμήματος γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Οι πρωτεΐνες της υποοικογένειας NCAM διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων και τον προσανατολισμό των αξόνων καθώς και στην πλαστικότητα της σύναψης. Η πρωτεΐνη NCAM έχει συνδεθεί, όπως και η L1, με εγκεφαλικές διαταραχές στον άνθρωπο όπως είναι η σχιζοφρένεια, η διπολική διαταραχή καθώς και η νόσος του Alzheimer (Maness και Schachner, 2007).

Η πρωτεΐνη TAG1, που είναι το αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας ανήκει στην υποοικογένεια των μορίων κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος F3/contactin. Η υποοικογένεια αυτή είναι πιο πρόσφατη σε σχέση με τις δύο προηγούμενες και κάποιες πληροφορίες για τα μέλη της αναφέρονται παρακάτω.

A.3. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ TAG1 ΑΝΗΚΕΙ ΣΤΗΝ ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ F3/CONTACTIN ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Η υποοικογένεια της contactin, στην οποία ανήκει και η TAG1, αποτελείται από συνολικά 6 μέλη. Τα μέλη αυτά είναι η πρωτεΐνη contactin (ή όπως αλλιώς αναφέρεται F3 ή F11), η πρωτεΐνη TAG1 (ή όπως αλλιώς αναφέρεται contactin 2 ή TAX1 ή axonin-1), οι πρωτεΐνες BIG1 και BIG2 καθώς και τα νεότερα μέλη NB2 και NB3. Όλα τα μέλη αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό μεταξύ τους ομολογίας και αποτελούνται από 6 Ig-like περιοχές και 4 FNIII-like περιοχές ενώ είναι προσδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας περιοχής γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσινόλης (GPI anchor). Οι χρωμοσωμικές θέσεις στις οποίες εντοπίζονται τα γονίδια των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας έχουν συνδεθεί με νευρολογικά σύνδρομα και δυσλειτουργίες. Για παράδειγμα, το γονίδιο της πρωτεΐνης TAG1 εντοπίζεται στην περιοχή 1q32.1 στον άνθρωπο, όπου επίσης εντοπίζεται ένα γονίδιο υπεύθυνο για μικροκεφαλία με πνευματική καθυστέρηση (Kozlov et al., 1995). Επίσης το γονίδιο για την πρωτεΐνη NB2 εντοπίζεται στον άνθρωπο στη χρωμοσωμική θέση 11q21-q22.2 (Kamei et al., 2000), στην οποία επίσης εντοπίζονται γονίδια που εμπλέκονται με τη σχιζοφρένεια (Maziade et al., 1995).

Έχει μελετηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας contactin στο νευρικό σύστημα με *in situ* υβριδοποίηση και βρέθηκε πως παρουσιάζουν αλληλεπικαλυπτόμενη έκφραση σε κάποιες περιοχές και μοναδική έκφραση σε άλλες (Yoshihara et al., 1995). Όλα τα μέλη της οικογένειας contactin εκφράζονται αποκλειστικά στο νευρικό σύστημα και όχι σε άλλους ιστούς με περισσότερο διαδεδομένη της έκφραση της πρωτεΐνης contactin. Οι πρωτεΐνες F3, TAG1, BIG1 και BIG2 βρέθηκαν να επάγουν την ανάπτυξη νευριτών *in vitro* (Durbec et al., 1992, Furley et al., 1990, Yoshihara et al., 1994, Yoshihara et al., 1995).

A.4. Ο ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ TAG1 ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Η έκφραση της πρωτεΐνης TAG1 είναι σημαντικά ρυθμιζόμενη κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Πειράματα *in situ* υβριδοποίησης αποκάλυψαν την έκφραση της TAG1 σε πολλές περιοχές του αναπτυσσόμενου και ενήλικου νευρικού συστήματος του ποντικού και του αρουραίου, σε νευρικά κύτταρα όπως επίσης και σε κύτταρα γλοίας. Υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης βρέθηκε στον εγκέφαλο ενήλικων ποντικών και αρουραίων, ειδικότερα στην κοκκώδη στοιβάδα της παρεγκεφαλίδας, στα πυραμιδικά κύτταρα των περιοχών CA1 και CA3 του υποκάμπου καθώς και στους βασικούς νευρώνες του οσφρητικού λοβού. Στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, η πρωτεΐνη TAG1 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον αναπτυσσόμενο οσφρητικό λοβό, στο νεοφλοιό, στον υπόκαμπο κ.α. (Wolfer et al., 1997, Yoshihara et al., 1995, Denaxa et al., 2001).

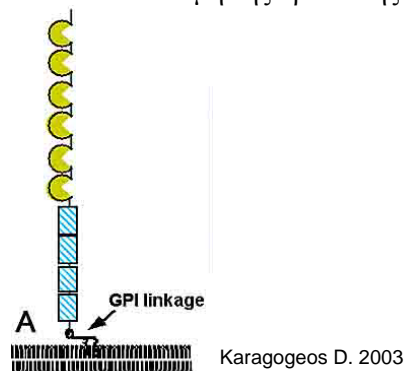
Η πρωτεΐνη TAG1 εντοπίζεται σε ειδικές περιοχές στην πλασματική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων. Οι περιοχές αυτές είναι πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη (lipid rafts). Ένα είδος σφιγγολιπιδίων είναι οι γαγγλιοζίτες, οι οποίοι είναι γλυκοσφιγγολιπίδια που περιέχουν σιαλικό οξύ, βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και η έκφραση τους είναι ιδιαίτερα ενισχυμένη στα νευρικά κύτταρα. Σε μία μελέτη ανοσοκατακρήμνισης από παρεγκεφαλίδα αρουραίου, χρησιμοποιώντας αντίσωμα ενάντια στον γαγγλιοζίτη GD3, ανιχνεύτηκε η πρωτεΐνη κινάση τυροσίνης Lyn (Kasahara et al., 1997). Αργότερα, από την ίδια ερευνητική ομάδα και από άλλες βρέθηκε πως και η πρωτεΐνη TAG1 αλληλεπιδρά με τον γαγγλιοζίτη GD3 στην περιοχή των lipid rafts (Kasahara et al., 2000, Prinetti et al., 2001, Loberto et al., 2003, Prioni et al., 2004). Επίσης, προτείνεται πως η πρωτεΐνη TAG1 που εντοπίζεται στην περιοχή των lipid rafts των κυττάρων της παρεγκεφαλίδας μεταδίδει σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω της κινάσης Lyn και της ακόλουθης φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 80 kDa. Αποικοδόμηση των γλυκοσφιγγολιπιδίων της μεμβράνης είχε σαν αποτέλεσμα μείωση της ενεργοποίησης της κινάσης Lyn από την TAG1 (Kasahara et al., 2000). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό πως η ακεραιότητα της μεμβράνης έχει

μεγάλη σημασία για τον εντοπισμό και τη δράση πιθανότατα της πρωτεΐνης TAG1.

A.5. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ TAG1

Η πρωτεΐνη TAG1 είναι μία υψηλά συντηρημένη γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 135 kDa, η οποία αποτελείται από μία υδρόφοβη αλληλουχία στο N-τελικό άκρο της ενώ ακολουθούν 6 Ig-like περιοχές, 4 FNIII-like επαναλήψεις και μία ουρά γλυκοσυλφωσατιδυλινοσιτόλης στο C-τελικό άκρο της με την οποία προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη (Furley et al., 1990). Η δομή της πρωτεΐνης δίνεται στην Εικόνα 1. Εκτός από αυτήν τη μορφή η πρωτεΐνη TAG1 βρίσκεται επίσης και σε διαλυτή μορφή (Karagogeos et al., 1991).

Εικόνα 1. Η δομή της πρωτεΐνης TAG1

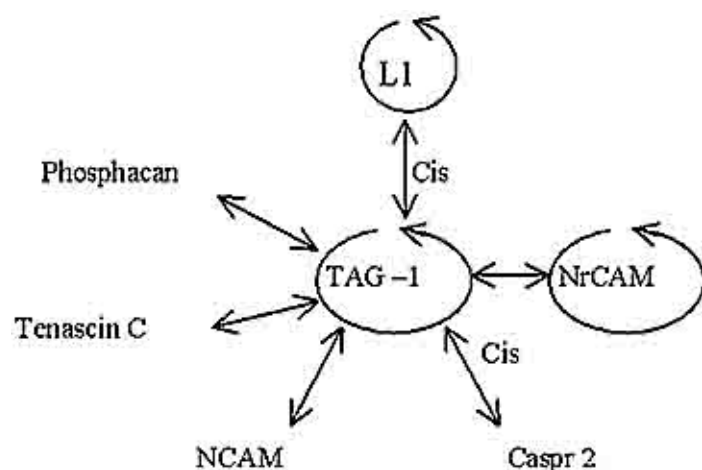


Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TAG1 στον άνθρωπο, βρίσκεται σε μία χρωμοσωμική περιοχή στην οποία έχει εντοπιστεί ένα γονίδιο υπεύθυνο για μικροκεφαλία και διανοητική καθυστέρηση (Kozlov et al., 1995). Επίσης, σε κακοήθη γλοιώματα στον άνθρωπο έχει βρεθεί πως η έκφραση του γονιδίου για την TAG1 είναι αυξημένη (Rickman et al., 2001). Όσον αφορά στα τρωκτικά απώλεια του γονιδίου της TAG1 είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση των A1 υποδοχέων της αδενosίνης στον υπόκαμπο και αυξημένη ευαισθησία σε διεγερτικά μόρια (Fukamauchi et al., 2001). Αυτή ήταν η πρώτη φαινοτυπική διαφορά που ανακαλύφθηκε σε αυτά τα ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, ενώ επόμενες μελέτες αποκάλυψαν περαιτέρω δυσλειτουργίες του νευρικού συστήματος που βοήθησαν στη μελέτη του ρόλου της TAG1 και θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Α.6. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ TAG1

Η πρωτεΐνη TAG1 συμμετέχει σε ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων και ρυθμίζει την συνάφεια ανάμεσα στα νευρικά κύτταρα, τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων καθώς και την αύξηση των νευρικών αξόνων.

In vitro μελέτες σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από μεμβράνες εγκεφάλου όρνιθας έχουν δείξει πως η TAG1 αποτελεί υψηλής συγγένειας προσδέτη για τις πρωτεΐνες: neurocan, φωσφατάση τυροσίνης β/ζ (phosphacan), NCAM και tenascin-C. Οι δύο πρώτες είναι πρωτεογλυκάνες που εκφράζονται από νευρώνες και αστρογλοιακά κύτταρα αντίστοιχα, ενώ η tenascin-C είναι πρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας. Πειράματα συνεντοπισμού έδειξαν διάφορες θέσεις αλληλεπικαλυπτόμενης έκφρασης της TAG1 με κάθεμια από τις 4 παραπάνω πρωτεΐνες σε εμβρυϊκό και εγκέφαλο μετά τη γέννηση αρουραίου (Milev et al., 1996). Η φυσιολογική σημασία αυτών των αλληλεπιδράσεων δεν έχει διευκρινιστεί έως και σήμερα. Στη συνέχεια θα αναλυθούν κάποια συστήματα στα οποία έχει βρεθεί ανάμιξη της πρωτεΐνης TAG1, οι αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχει και ο ρόλος της όπου έχει διευκρινιστεί. Στην Εικόνα 2 φαίνεται ένα συνολικό διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων που είναι γνωστές για την πρωτεΐνη TAG1 (Karagogeos 2003).



Εικόνα 2. Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης TAG1. Ο κύκλος με το βέλος υποδεικνύει πως οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες συμμετέχουν και σε ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις (Karagogeos 2003)

A.6.1. Αλληλεπιδράσεις και ρόλος της TAG1 στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα

Η πρωτεΐνη TAG1 βρέθηκε να εκφράζεται κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων εβδομάδων μετά τη γέννηση στα ποντίκια στην επιφάνεια της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας (external granule layer, EGL) της παρεγκεφαλίδας (Bailly et al., 1996). Σε αυτήν την περιοχή της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας, εντοπίζονται μεταμιτωτικά ανώριμα κοκκώδη κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν πάνω στον άξονα αναπτυσσόμενων παράλληλων ιών για να καταλήξουν στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (internal granule layer, IGL). Η πρωτεΐνη F3, στην οποία αναφερθήκαμε στην παράγραφο A.3, παρεμποδίζει την ανάπτυξη νευριτών από τα κοκκώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας όταν εκφράζεται από κύτταρα CHO που χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα για την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων. Εν αντιθέσει, όταν η πρωτεΐνη TAG1 συνεκφράζεται από τα CHO κύτταρα, η παρεμποδιστική δράση της F3 αντιστρέφεται. Επίσης, από την ίδια έρευνα προέκυψε πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν σε CHO κύτταρα διπλά διαμολυσμένα καθώς και σε εγκέφαλο νεογέννητου ποντικού (Buttgliione et al., 1998). Η παραπάνω έρευνα προτείνει έναν ρόλο για την TAG1 όσον αφορά στην ανάπτυξη νευριτών από τα κοκκώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας.

Ένα άλλο σημείο στο οποίο εμπλέκεται η πρωτεΐνη TAG1 αφορά τη μετανάστευση προπαρεγκεφαλιδικών πυρήνων. Τα κύτταρα που αργότερα θα σχηματίσουν τους προπαρεγκεφαλιδικούς πυρήνες LRN (lateral reticular nuclei) και ECN (external cuneate nuclei), εκφράζουν TAG1 και μεταναστεύουν από τον προμήκη μυελό μέσω της επιφανειακής μεταναστευτικής οδού (superficial migratory stream, SMS). Βρέθηκε πως τα ποντίκια στα οποία το γονίδιο για την TAG1 έχει καταστραφεί (TAG knock-out mice), και συνεπώς δεν εκφράζεται λειτουργική πρωτεΐνη, παρουσιάζουν μειωμένο αριθμό κυττάρων στους προπαρεγκεφαλιδικούς πυρήνες LRN και ECN, προτείνοντας έτσι ένα ρόλο της TAG1 στη μετανάστευση και επιβίωση τους (Denaxa et al., 2005, Kyriakopoulou et al., 2002).

A.6.2. Αλληλεπιδράσεις και ρόλος της TAG1 στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό

Η πρωτεΐνη TAG1 βρέθηκε να επάγει *in vitro* την αύξηση νευριτών από νευρικά κύτταρα που βρίσκονται στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών (DRGs) αρουραίου (Furley et al., 1990). Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG1 στους άξονες τους. Βρέθηκε αργότερα πως η πρωτεΐνη L1 των DRG νευρώνων είναι ο υποδοχέας της TAG1 όταν αυτή χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα αφού είναι απαραίτητη για τη συγκεκριμένη δράση της TAG1 και βρέθηκε να αλληλεπιδρά *in vitro* μαζί της (Felsenfeld et al., 1994, Kuhn et al., 1991). Βέβαια, σε DRG νευρώνες από L1 ετερόζυγα και knock-out ποντίκια, η επαγόμενη από την TAG1 αύξηση των νευριτών συνέβη φυσιολογικά, ενώ στην ίδια μελέτη διευκρινίστηκε πως οι Ig-like και οι FNIII-like περιοχές της TAG1 είναι ικανές από μόνες τους να διεκπεραιώσουν αυτή τη λειτουργία (Pavlou et al., 2002). Αργότερα προτάθηκε πως η πρωτεΐνη L1 αλληλεπιδρά με την TAG1 μόνο όταν βρίσκονται στην ίδια μεμβράνη (*in cis*), και με τον εαυτό της *in trans*, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο τετραμερή στις θέσεις επαφής ανάμεσα στους νευρίτες των DRG νευρικών κυττάρων, τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα την ομαδοποίηση και αύξηση των νευριτών σε καλλιέργεια (Buchstaller et al., 1996, Kunz et al., 1998). Σε καλλιέργεια DRG κυττάρων από έμβρυα όρνιθας βρέθηκε πως υπάρχει ένας υποδοχέας της TAG1 των DRGs στα κύτταρα γλοίας που τα περιβάλλουν. Αυτός ο υποδοχέας είναι η πρωτεΐνη NrCAM η οποία βρέθηκε να συνδέεται άμεσα με την TAG1 σε *in vitro* πειράματα (Suter et al., 1995).

Μένοντας στο σύστημα του νωτιαίου μυελού, η πρωτεΐνη TAG1 βρέθηκε να εκφράζεται και από μία άλλη ομάδα νευρικών κυττάρων, των λεγόμενων συνδεσμιακών κυττάρων (commissural neurons). Οι νευρώνες αυτοί εντοπίζονται στην ραχιαιοπλευρική περιοχή της σπονδυλικής στήλης και στέλνουν τους άξονες τους προς το εδαφιαίο πέταλο λόγω έλξης από τη νετρίνη-1. Στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό εμβρύων όρνιθας η πρωτεΐνη TAG1 εκφράζεται από τους συνδεσμιακούς άξονες, ενώ η πρωτεΐνη NrCAM από τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου. Βρέθηκε πως εμπλοκή της μίας ή της άλλης πρωτεΐνης με τα αντίστοιχα αντισώματα είχε σαν αποτέλεσμα αποπροσανατολισμό των αξόνων των συνδεσμιακών νευρώνων σε καλλιέργεια. Επίσης, στην ίδια μελέτη με την πραγματοποίηση *in vitro* πειραμάτων βρέθηκε πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα και μάλιστα η θέση σύνδεσης της TAG1 στην NrCAM εντοπίζεται στις 4 N-τελικές Ig-like περιοχές της (Fitzli et al., 2000).

A.6.3. Εντοπισμός και πιθανός ρόλος της πρωτεΐνης TAG1 στο αναπτυσσόμενο οσφρητικό σύστημα

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο A.4, η έκφραση της TAG1 είναι υψηλή κατά την ανάπτυξη του οσφρητικού συστήματος καθώς επίσης και στο ενήλικο. Μία πιο λεπτομερής μελέτη της έκφρασης της TAG1 στο αναπτυσσόμενο οσφρητικό σύστημα αποκάλυψε τον εντοπισμό της σε μία ειδική ομάδα κυττάρων στον οσφρητικό λοβό καθώς και στον οσφρητικό φλοιό. Ο οσφρητικός λοβός αποτελείται κυρίως από νευρικά κύτταρα τα οποία ονομάζονται mitral cells και στέλνουν τους άξονες τους σε συγκεκριμένες περιοχές του οσφρητικού φλοιού. Η πρωτεΐνη TAG1 εντοπίζεται μόνο στην περιοχή όπου βρίσκονται τα ανώριμα mitral cells στον οσφρητικό λοβό καθώς και στην επιφανειακή στοιβάδα του οσφρητικού φλοιού, ενώ δεν είναι παρούσα στον ώριμο οσφρητικό λοβό (Inaki et al., 2004). Αυτή η μελέτη προτείνει έναν πιθανό ρόλο για την TAG1 στην καθοδήγηση των mitral cells στο οσφρητικό σύστημα.

A.6.4. Αλληλεπιδράσεις και ρόλος της TAG1 στη μυελίνωση

Νωρίς μετά τη γέννηση όπου η διαδικασία της μυελίνωσης των νευρικών αξόνων ξεκινάει, καθώς και στο ενήλικο που η μυελίνωση έχει ολοκληρωθεί, η πρωτεΐνη TAG1 εκφράζεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα του Κ.Ν.Σ., τα κύτταρα Schwann του Π.Ν.Σ. καθώς και τις αντίστοιχες εμύελες ίνες και εντοπίζεται ειδικά στην εγγύς παρακομβική περιοχή (Traka et al., 2002). Βρέθηκε πως η αξονική TAG1 αλληλεπιδρά in trans με τον εαυτό της στα κύτταρα γλοίας καθώς και στα πλαίσια της ίδιας μεμβράνης (in cis) με την αξονική πρωτεΐνη Caspr2 (Traka et al., 2003). Η πρωτεΐνη Caspr2 (contactin-associated protein 2) είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη της οικογένειας neurexin με ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια μοτίβα σύνδεσης για πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική για την σωστή κατανομή και ομαδοποίηση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην εγγύς παρακομβική περιοχή, ενώ η λειτουργία του άξονα δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε TAG1 knock-out ποντίκια (Traka et al., 2003, Poliak et al., 2003).

ΣΤΟΧΟΙ, ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης κυτταρικής συνάφειας TAG1 με άλλα μόρια, σε διάφορες περιοχές υψηλής έκφρασης της, στο κεντρικό νευρικό σύστημα τρωκτικών και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Για τον σκοπό αυτό θα ακολουθήσουμε δύο βασικές πειραματικές προσεγγίσεις.

Ο πρώτος στόχος είναι η ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης TAG1 από διάφορα τμήματα εγκεφάλου τρωκτικών, ο επακόλουθος μοριακός διαχωρισμός των συμπλόκων σε gel ακρυλαμίδης, η χρώση του gel με νιτρικό άργυρο και στη συνέχεια η ανίχνευση των ειδικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης και της φασματομετρίας μάζας. Θα χρησιμοποιηθούν οι εξής ιστοί του εγκεφάλου από ποντίκια και αρουραίους: φλοιός και προμήκης μυελός από έμβρυα ποντικού και αρουραίου 14,5 και 16 ημερών αντίστοιχα, παρεγκεφαλίδα από ζώα ηλικίας 6-9 ημερών και φλοιός, παρεγκεφαλίδα και ιππόκαμπος από ενήλικα ζώα. Η επιλογή των ιστών έγινε με βάση το γεγονός πως η έκφραση της TAG1 είναι έντονη σε αυτές τις περιοχές κατά τα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Από αυτήν την προσέγγιση αναμένουμε τον εντοπισμό μορίων που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη TAG1 και βοηθούν στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης αυτής της πρωτεΐνης στα διάφορα συστήματα στα οποία εμπλέκεται.

Ο δεύτερος στόχος είναι η δημιουργία μιας πλασμιδιακής κατασκευής που οδηγεί στην έκφραση βιοτυνλιωμένης TAG1 πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα με τη βοήθεια της λιγάσης *birA*. Η κατασκευή αυτή θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα συνδιαμόλυνσης σε HEK293T κύτταρα, σε συνδυασμό με το γονίδιο της λιγάσης *birA* και το γονίδιο ενός μορίου του οποίου την αλληλεπίδραση με την TAG1 θέλουμε να ελέγξουμε. Στη συνέχεια, επώαση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με beads στρεπταβιδίνης και επακόλουθα πειράματα ανοσοαποτύπωσης θα επιβεβαιώσουν ή θα απορρίψουν την αλληλεπίδραση. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε εύκολα να ανιχνεύσουμε *cis* αλληλεπιδράσεις της TAG1. Επίσης, αυτό το σύστημα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν *in trans*. Σε αυτήν την περίπτωση, είναι απαραίτητη η παραγωγή βιοτυνλιωμένης TAG1 πρωτεΐνης σε μεγάλα ποσά από κύτταρα HEK293T, πρόσδεση της σε beads στρεπταβιδίνης και επώαση των beads με πρωτεϊνικό

εκχύλισμα από ιστό η διαμολυσμένα κύτταρα για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν in trans με αυτήν.

B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

B.1. ΤΕΣΤ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΣΕ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΙΣΤΡΟΥ ΚΑΙ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ

1. Παίρνουμε δείγμα από τον κόλπο του αρουραίου με στυλαίο δειγματοληψίας
2. Απλώνουμε το υλικό σε πλακάκι και το φιζάρουμε με σπρέυ μαλλιών
3. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 80%
4. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 70%
5. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 50%
6. Εμποτίζουμε το πλακάκι 1-2 φορές σε απεσταγμένο νερό
7. Εμποτίζουμε το πλακάκι σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Harris Hematoxylin solution, για χρώση του πυρήνα σε τόνους του μπλε) για 5΄
8. Ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό
9. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε απεσταγμένο νερό
10. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 50%
11. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 70%
12. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος
13. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 80%
14. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 96%
15. Εμποτίζουμε το πλακάκι σε διάλυμα Orange G (για χρώση των ώριμων κερατινοκυττάρων) για 5΄
16. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 96%
17. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 96%
18. Εμποτίζουμε το πλακάκι σε πολυχρωματικό διάλυμα (polychromatic staining solution, για χρώση του κυτταροπλάσματος σε τόνους του κόκκινου) για 5΄
19. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 96%
20. Επανάληψη του βήματος 21
21. Επανάληψη του βήματος 21
22. Εμποτίζουμε το πλακάκι 10 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 100%
23. Εμποτίζουμε το πλακάκι σε διάλυμα ξυλόλης για 30 δευτερόλεπτα
24. Επανάληψη του βήματος 25
25. Τοποθέτηση καλυπτρίδας με τη συνθετική ακρυλακρυλική ρητίνη Entellan (MERCK) και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο

Με την παραπάνω διαδικασία χρώσης μπορούμε να καταλάβουμε σε ποια ημέρα του κύκλου βρίσκεται το ζώο (Πίνακας 1), γνωρίζοντας πως ο κύκλος στους αρουραίους διαρκεί 5 ημέρες, καθώς και να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη σπερματοζωαρίων που σημαίνει εγκυμοσύνη.

Πίνακας 1

Κύτταρα του κόλπου	Ημέρα του κύκλου
Μικρά εμπύρρινα μπλε με μικρό κυτταρόπλασμα	Ημέρα 0
Μεγαλύτερα μπλε με μεγαλύτερο λόγο κυτταροπλάσματος/πυρήνα	Ημέρα 1
Αρχίζουν να εμφανίζονται και κάποια κόκκινα κύτταρα	Ημέρα 2
Μόνο κόκκινα κύτταρα	Ημέρα 3
Κόκκινα απύρινα κύτταρα	Ημέρα 4
Πορτοκαλί-κίτρινα απύρινα κερατινοκύτταρα	Ημέρα 5 (οίστρος)

B.2. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Η λύση των κυττάρων γίνεται με τη χρήση υπερήχων, ενώ για τη λύση του ιστού χρησιμοποιούμε ομογενοποιητή και στη συνέχεια υπερήχους. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη λύση και ομογενοποίηση παραθέτονται στη συνέχεια:

Lysis buffer (για τη λύση κυττάρων):

5mM Tris-HCl pH 8.0

2% NP-40 (octylphenol ethylene oxide, LKB Promma)

50mM NaCl

2.5mM CaCl₂

2.5mM MgCl₂

1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) προστίθεται στο διάλυμα τελευταίο, είναι παρεμποδιστής πρωτεασών και έχει δράση έως 30΄)

Pyranoside lysis buffer για την απελευθέρωση πρωτεϊνών που συνδέονται με τη μεμβράνη (για τη λύση ιστού από εγκέφαλο αρουραίου)

85mM Tris-HCl pH 7.5

30mM NaCl

1mM EDTA

120mM glucose

1% Triton X-100

60mM octyl β -D glucopyranoside (SIGMA)

1mM PMSF (προστίθεται τελευταίο)

B.3. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (immunoprecipitation, IP)

1. Λύνουμε τα κύτταρα ή ομογενοποιούμε τον ιστό στον κατάλληλο όγκο lysis buffer
2. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 30΄
3. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα καθαρό eppendorf 1.5 ml (επανάληψη του προηγούμενου βήματος αν το εκχύλισμα δεν είναι διαυγές)
4. Πλένουμε 20μl protein G (Santa Cruze) ή protein A (Biorad) agarose beads 3 φορές με wash buffer
5. Επωάζουμε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα με τα beads για 1-2 hrs στους 4°C υπό ανάδευση (preclearance step), ώστε να απομακρύνουμε οτιδήποτε μη ειδικό αλληλεπιδρά με τα beads
6. Φυγοκεντρούμε για 1΄ στις 4000 rpm και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα καθαρό eppendorf (φυλάσσουμε τα beads εάν θέλουμε να δούμε εάν πιάνουν μη ειδικά την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει)
7. Προσθέτουμε στο καθαρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα 1 μ g αντισώματος (εξαρτάται από το αντίσωμα) για κάθε 100 μ g πρωτεΐνης και τα επωάζουμε στους 4°C υπό ανάδευση όλη τη νύχτα (overnight, O/N)
8. Το επόμενο πρωί πλένουμε 20 μ l beads 3 φορές με wash buffer και σε αυτά προσθέτουμε το εκχύλισμα με το αντίσωμα που είχαμε στους 4°C όλο το βράδυ
9. Επωάζουμε τα beads με το αντίσωμα και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα στους 4°C για 1-2 hrs

10. Φυγοκεντρούμε για 1' στις 4000 rpm, αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε τα beads 3 φορές με wash buffer

11. Μετά το τελευταίο ξέπλυμα αφήνουμε τα beads όσο πιο στεγνά γίνεται, προσθέτουμε sample buffer και 0,1 M DTT, βράζουμε το δείγμα για 5 min και είναι έτοιμο να το τρέξουμε σε gel πολυακρυλαμίδης

WASH BUFFER (για τα πλυσίματα):

5mM Tris-HCl pH 8.0

1% Triton X-100

50mM NaCl

2.5mM CaCl₂

2.5mM MgCl

B.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ (WESTERN BLOT ANALYSIS)

Προετοιμασία δειγμάτων από τα κύτταρα:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από την κυτταρική καλλιέργεια
2. Ξέπλυμα των κυττάρων με 1xPBS δύο φορές
3. Μάζεμα των κυττάρων με 300-500 μl κρύου lysis buffer (βλ. πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης) πάνω στην κυτταρική καλλιέργεια (για καλλιέργεια σε τριβλίο διαμέτρου 10 cm)
4. Μεταφορά των κυττάρων σε eppendorf 1,5 ml
5. Επώαση στον πάγο για 30 min (vortex κάθε 10 min)
6. Λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων
7. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm , στους 4⁰ C για 30'
8. Μεταφορά υπερκείμενου (lysate) σε ένα καθαρό eppendorf
9. Προσθήκη ίσου όγκου 2X sample loading buffer και 0.1 M DTT σε 10 μl του δείγματος
10. Βράσιμο δειγμάτων για 5min
11. Μεταφορά στον πάγο ώσπου να ξεκινήσουμε το φόρτωμα του gel

Μοριακός διαχωρισμός των δειγμάτων σε gel πολυακρυλαμίδης

1. Προετοιμασία των gel πολυακρυλαμίδης και τοποθετησή τους στη συσκευή (Biorad)
2. Προσθήκη 1Lt από το 1X running buffer (γεμίζουμε όλο τον ενδιάμεσο των gel χώρο και των μισό από τον χώρο που βρίσκεται γύρω από τα gel)
3. Φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια (wells)
4. Ρύθμιση της συσκευής ηλεκτροφόρησης στα 80V για όσο χρόνο τα δείγματα βρίσκονται στο stacking gel (περίπου 30min) και στη συνέχεια στα 100V μέχρι να φύγει η χρωστική από το gel (σχεδόν 2hours)

Μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

1. Φτιάχνουμε 1X transfer buffer περίπου 1 ώρα πριν τη χρήση και το τοποθετούμε στους 4⁰ C
2. Κόβουμε στις διαστάσεις του gel 1 κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και 6 κομμάτια whattman
3. Αδειάζουμε το running buffer από την συσκευή και απομακρύνουμε το gel
4. Κόβουμε το τμήμα που αντιστοιχεί στο stacking gel και κρατάμε το τμήμα που αντιστοιχεί στο separating gel
5. Εμποτίζουμε σε 1X transfer buffer τα χαρτιά whattman, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης καθώς και τα ειδικά σφουγγαράκια
6. Τοποθετούμε πρώτα το σφουγγάρι (στη μαύρη πλευρά της θήκης του sandwich), ενώ ακολουθούν με τη σειρά 3 whattman χαρτιά, το gel, η μεμβράνη, 3 whattman χαρτιά, και το σφουγγαράκι δημιουργώντας έτσι ένα sandwich
7. Χρησιμοποιούμε μια γυάλινη πιπέτα pasteur για να απομακρύνουμε τον αέρα που έχει εγκλωβιστεί
8. Κλείνουμε το sandwich και το τοποθετούμε στην συσκευή, έχοντας την μαύρη πλευρά της θήκης του sandwich στην μαύρη πλευρά της συσκευής
9. Γεμίζουμε τη συσκευή του με κρύο transfer buffer και τοποθετούμε πάγο γύρω από αυτή
10. Ρυθμίζουμε την συσκευή της ηλεκτροφόρησης στα 310 mA για 1 hr ώστε να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το gel στη μεμβράνη

Ανοσοαποτύπωση

1. Απομακρύνουμε την μεμβράνη από το sandwich και την επωάζουμε σε PBSMT (0.1% PBST με 5% γάλα) για 1hr υπό ανακίνηση

0.1% PBST (500ml):

500ml 1xPBS

500μl tween 100% (τελική συγκέντρωση 0.1%)

2. Επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε PBSMT O/N στους 4°C
3. Την επομένη, απομακρύνουμε το αντίσωμα το οποίο μπορούμε να φυλάξουμε στους -20°C και να το ξαναχρησιμοποιήσουμε για 2-3 φορές
4. Πλύσιμο 3x με 0.1% PBST για 15min
5. Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα (συνδεδεμένο με υπεροξειδάση) στην κατάλληλη συγκέντρωση σε PBSMT, για 1hr υπό ανακίνηση
6. Πλύσιμο 3x με 0.1% PBST για 15min
7. Στεγνώνουμε την μεμβράνη ακουμπώντας την σε ένα κομμάτι whattman χαρτί
8. Τοποθετούμε πάνω στην μεμβράνη υπόστρωμα της υπεροξειδάσης για την αντίδραση χημειοφωταύγειας (Chemicon) για 1', στεγνώνουμε τη μεμβράνη ξανά και στη συνέχεια εκθέτουμε την μεμβράνη σε φωτογραφικό φιλμ και εμφανίζουμε

10x RUNNING-TRANSFER BUFFER (1 Lt):

900 ml 10x Tris-Glycine

100 ml SDS 10%

(για το 1x TRANSFER BUFFER χρησιμοποιούμε 100ml 10x RUNNING-TRANSFER BUFFER, 20% μεθανόλη και νερό μέχρι το 1lt)

10x Tris-Glycine (1 Lt, pH 8.3):

30.2 gr Tris-base

188 gr glycine

2x Sample Buffer:

100mM Tris-Cl pH 6.8

4% SDS

0.2% bromophenol blue

20% glycerol

7.5% gel preparation

separating gel

2.5 ml dH₂O

1.25 ml 30% acrylamide

1.25 separating gel buffer (1.5 M Tris-Cl pH 8.8 + 0.4% SDS)

50 µl 10% APS (ammonium persulfate)

2.5 µl TEMED (N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine, MERCK)

stacking gel

1.8 ml dH₂O

450 µl 30% acrylamide

750 µl stacking gel buffer (1 M Tris-Cl pH 6.8 + 0.4%SDS)

30 µl 10% APS

3 µl TEMED

B.5. ΧΡΩΣΗ ΑΡΓΥΡΟΥ (μέθοδος συμβατή με φασματομετρία μάζας)

Όλες οι χρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε gel ακρυλαμίδης 7.5%. Η διαδικασία της χρώσης είναι η παρακάτω:

1. Μοριακός διαχωρισμός των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε gel πολυακρυλαμίδης
2. Επώαση του gel σε 50% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ για 20' (φιξάρισμα του gel)
3. Επώαση του gel σε 50% μεθανόλη για 10' (φιξάρισμα του gel)
4. Πλύσιμο με milli Q H₂O για 2-3 h ή O/N
5. Επώαση σε 0.02% ένυδρο θειοθειϊκό νάτριο (sodium thiosulfonyl pentahydrate, SIGMA) για 1' (μείωση της μη ειδικής χρώσης)
6. 2 φορές πλύσιμο με milli Q H₂O για 1'
7. Επώαση σε 0.1% νιτρικό άργυρο (SIGMA) για 20'
8. 2 φορές πλύσιμο με milli Q H₂O για 1'

9. Επώαση σε 2% ανθρακικό νάτριο και 0.04% φορμαλδεϋδη για 30 δευτερόλεπτα (εμφάνιση)
10. Επώαση σε 2% ανθρακικό νάτριο και 0.04% φορμαλδεϋδη ώσπου να εμφανιστούν οι πρώτες ζώνες (εμφάνιση)
11. Διακοπή της αντίδρασης σε 5% οξικό οξύ
12. Το gel μπορεί να διατηρηθεί σε 1% οξικό οξύ ή απλά τυλιγμένο σε μεμβράνη στους 4°C

B.6. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (high performance liquid chromatography, HPLC) ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (mass spectrometry)

Οι μπάντες που εμφανίζονται στο gel έπειτα από τη χρώση με νιτρικό άργυρο κόβονται και στέλνονται στο εργαστήριο του Δρ. Παναγιώτου που εδράζει στο ινστιτούτο Φλέμινγκ στην Αθήνα. Εκεί κόβονται σε μικρά κομμάτια και υποβάλλονται σε μία διαδικασία η οποία καταλήγει στην αναγνώριση πεπτιδίων και την ακόλουθη αντιστοίχιση τους σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η όλη διαδικασία περιγράφεται λεπτομερώς από τους A. Saridaki και G.Panayotou (2005).

B.6. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΤΥΝΙΛΙΩΜΕΝΗΣ TAG1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

B.6.1. Παραγωγή σε μεσαία κλίμακα του πλασμιακού φορέα που περιέχει το bio πεπτίδιο και του πλασμιακού φορέα που περιέχει το cDNA της πρωτεΐνης TAG1 του αρουραίου (rTAG1)

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που οδηγεί την έκφραση του bio πεπτιδίου εντοπίζεται ανάμεσα στις θέσεις EcoRI, BamHI του polylinker του πλασμιακού φορέα pcDNA3 (ευγενική χορηγία από το εργαστήριο του Δρ. Δ. Καρδάση). Το bio πεπτίδιο αποτελείται από 20 περίπου αμινοξέα ανάμεσα στα οποία και ένα κατάλοιπο λυσίνης το οποίο αποτελεί τη θέση βιοτυνιλίωσης. Το cDNA ολόκληρης της κωδικής περιοχής της rTAG1 εντοπίζεται στον polylinker του πλασμιακού φορέα pBSkSII. Εκτός από τις δυο προηγούμενες κατασκευές προχωρήσαμε επίσης στην παραγωγή

σε μεσαία κλίμακα μιας πλασμιδιακής κατασκευής (ευγενική χορηγία από το εργαστήριο του Δρ. Δ. Καρδάση) που οδηγεί στην παραγωγή της λιγάσης *birA* στον πλασμιδιακό φορέα *pcDNA3*, η οποία είναι υπεύθυνη για τη βιοτυνιλίωση.

Η παραγωγή σε μεσαία κλίμακα των τριών παραπάνω κατασκευών έγινε χρησιμοποιώντας το kit της εταιρείας Macherey-Nagel (nucleobond) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

B.6.2. PCR αντίδραση για την παραγωγή ολόκληρης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της rTAG1 με άκρα EcoRV, NotI

Διαπιστώσαμε πως δεν υπάρχει τρόπος να εισάγουμε το cDNA ολόκληρης της κωδικής περιοχής της rTAG1 από τον πλασμιδιακό φορέα στον οποίο βρίσκεται (*pBSkSII*), κόβοντας το με περιοριστικά ένζυμα, στον πλασμιδιακό φορέα *pcDNA3* που περιέχει το *bio* πεπτίδιο διατηρώντας το πλαίσιο ανάγνωσης. Γι' αυτόν το λόγο προχωρήσαμε στην πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (PCR, polymerase chain reaction), χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα την πλασμιδιακή κατασκευή που περιέχει την αλληλουχία της rTAG1 και ειδικούς εκκινητές που εισάγουν τις επιθυμητές θέσεις περιορισμού στα άκρα του cDNA της rTAG1. Οι θέσεις περιορισμού που επιλέξαμε να εισάγουμε είναι οι θέσεις δράσης των ενζύμων EcoRV (πριν τη θέση έναρξης της μεταγραφής) και NotI (μετά τη θέση λήξης της μεταγραφής) οι οποίες δεν υπάρχουν ξανά στην αλληλουχία της rTAG1 και εντοπίζονται στην περιοχή του polylinker της *pcDNA3-bio* πλασμιδιακής κατασκευής μετά την περιοχή ένθεσης του *bio* πεπτιδίου. Οι εκκινητές σχεδιαστηκαν έτσι ώστε η αλληλουχία της rTAG1 να είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το *bio* πεπτίδιο το οποίο βρίσκεται ανοδικά αυτής. Ο πλασμιδιακός φορέας *pcDNA3* οδηγεί την έκφραση πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα και στη συγκεκριμένη περίπτωση θα οδηγήσει την έκφραση μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης που θα αποτελείται από το *bio* πεπτίδιο και την rTAG1 πρωτεΐνη.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού δίνει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού τμημάτων DNA *in vitro* μέσω διαδοχικών βημάτων επώασης σε διάφορες θερμοκρασίες και με τη χρήση του ανασυνδυασμένου θερμοανθεκτικού ενζύμου της DNA πολυμεράσης απομονωμένου από τον οργανισμό *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymerase). Η Taq DNA polymerase που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα φάση είναι η Expand High Fidelity Taq DNA polymerase (Roche), η

οποία είναι κατάλληλη για την παραγωγή μεγάλων προϊόντων μειώνοντας τα λάθη κατά τη μεταγραφή αφού αποτελεί μίγμα θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης και DNA πολυμεράσης με δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε καθώς και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήσαμε φαίνονται στους πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα. Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο μηχάνημα (PERKIN ELMER CETUS) και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 4. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προχωράμε στην ανάλυση μικρής ποσότητας του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης για μία πρώτη εκτίμηση της συγκέντρωσης και της ποιότητας του και ακολουθεί ακριβής μέτρηση της συγκέντρωσης του στα 260 nm. Το προϊόν της PCR αντίδρασης καθαρίζεται με τη χρήση ειδικής κολώνας της εταιρείας Macherey-Nagel (nucleospin), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Πίνακας 2. Στην αλληλουχία των εκκινητών φαίνονται με μαύρα έντονα γράμματα οι αλληλουχίες έναρξης και λήξης της μεταγραφής της rTAG1 και με έντονα κόκκινα γράμματα οι θέσεις περιορισμού που θέλουμε να εισάγουμε στα αντίστοιχα άκρα του προϊόντος

<u>Όνομα εκκινητή</u>	<u>Νουκλεοτιδική αλληλουχία (5'-3')</u>
rTAG1 Forward EcoRV	GGATATCCCATG GGGACACACGCCAGGAAA
rTAG1 Reverse NotI	GAAT GCGGCCGCTC AGAGCTTCTGGTAGCCAGCG

Πίνακας 3

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Ποσότητα στην τελική αντίδραση (συνολικού όγκου 20μl)</u>
rTAG1 στον πλασμιδιακό φορέα pBSkSII	500 pg
rTAG1 Forward EcoRV εκκινητής	100 ng
rTAG1 Reverse NotI εκκινητής	100 ng
Expand High Fidelity Taq DNA polymerase	2,5 units
10x buffer (with 15 mM MgCl ₂)	2 μl
dNTPs 2mM	2μl
Nanopure H ₂ O	Έως τα 20 μl

Πίνακας 4. Συνθήκες της PCR αντίδρασης

<u>Βήμα</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Χρόνος</u>
1 (αποδιάταξη)	94°C	5΄
2 (αποδιάταξη)	94°C	30"
3 (αναδιάταξη των εκκινητών)	58°C	40"
4 (πολλαπλασιασμός μητρικής αλυσίδας)	72°C	3΄
Επανάληψη 10 φορές των βημάτων 2, 3 και 4		
5 (αποδιάταξη)	94°C	30"
6 (αναδιάταξη των εκκινητών)	60°C	40"
7 (πολλαπλασιασμός μητρικής αλυσίδας)	72°C	3΄ 30"
Επανάληψη 21 φορές των βημάτων 5, 6 και 7		
8 (τελικό στάδιο πολλαπλασιασμού της μητρικής αλυσίδας)	72°C	10΄
9 (συντήρηση)	4°C	

B.6.3. Πέψεις με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και καθαρισμός των προϊόντων

Χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού EcoRV και NotI της εταιρείας NEB (New England Biolabs) για την πέψη του προϊόντος της PCR αντίδρασης που αναφέρθηκε προηγουμένως και της πλασμιδιακής κατασκευής που περιέχει το bio πεπτίδιο στον pcDNA3 φορέα, σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας. Η ενδονουκλεάση EcoRV αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία GATATC στο κέντρο και δημιουργεί τυφλά άκρα, ενώ η ενδονουκλεάση NotI αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία GCGGCCGC ανάμεσα στο δεύτερο και τρίτο νουκλεοτίδιο και δημιουργεί 5΄-προεξέχοντα άκρα. Χρησιμοποιήσαμε 5 μg αρχική ποσότητα DNA για τις πέψεις.

Η απομόνωση των προϊόντων των πέψεων έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλυσης σε μεμβράνες διαπίδυσης. Μετά την ηλεκτροφόρηση του DNA σε

παρασκευαστικό gel αγαρόζης 0,8% - 1% απομονώνεται η επιθυμητή ζώνη και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδωσης με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια αλλαγή της πολικότητας του ηλεκτρικού πεδίου για 30 sec ώστε να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη το DNA που πιθανόν έχει κολλήσει. Στη συνέχεια, το υγρό που περιέχει το DNA καθαρίζεται με τη χρήση ειδικής κολώνας της εταιρείας Macherey-Nagel (nucleosprin), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται έπειτα από μέτρηση στα 260 nm.

B.6.4. Συνένωση (ligation) του γραμμοποιημένου pcDNA3 bio πλασμιδιακού φορέα και του cDNA της rTAG1 με άκρα EcoRV-NotI

Για το σκοπό της συνένωσης των δύο προαναφερθέντων μορίων, χρησιμοποιήσαμε το ένζυμο T4 DNA λιγάση (Promega), που προέρχεται από στελέχη *E.coli* που περιέχουν πλασμίδια με το γονίδιο της λιγάσης σε υψηλές συνθήκες έκφρασης. Η T4 DNA λιγάση δημιουργεί δεσμούς ανάμεσα στα 3'-OH και 5'-P άκρα και χρειάζεται ATP και Mg^{+2} σαν συμπαραγόντες. Η αναλογία τμήματος DNA: φορέα εναπόκειται στην κρίση μας. Στην περίπτωση μας δοκιμάστηκαν αναλογίες τμήματος DNA: φορέα 5:1- 1,5:1. Η αναλογία αυτή δεν είναι αναλογία μάζας αλλά αναλογία μορίων. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις είναι αυτές που προτείνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία.

B.6.5. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων του είδους *Escherichia coli*, του στελέχους DH10b, με την εφαρμογή ηλεκτροσόκ (electroporation)

Καλλιέργεια 3ml εμβολιάζεται με αποικία κυττάρων *E.coli* στελέχους DH₁₀B και αφήνεται να αναπτυχθεί για ~16h στους 37⁰ C σε θρεπτικό μέσο LB (για 1lt, 5gr yeast extract, 10gr bactotryptone, 10gr NaCl, ρύθμιση του pH στο 7.0).

Την επόμενη ημέρα εμβολιάζονται 200ml θρεπτικού LB* (για 1lt: 5gr yeast extract, 10gr bactotryptone, 2gr NaCl, ρύθμιση του pH στο 7.0) με 2ml καλλιέργειας DH₁₀B κυττάρων και επωάζονται στους 37⁰C εωσότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων να είναι 0,6. Ακολουθεί:

1. Επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15'
2. Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4°C για 15'

3. Επαναδιάλυση πελέτας σε ίσο όγκο κρύο nanopure νερό
4. Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4°C για 15΄
5. Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/2 όγκο κρύο nanopure νερό
6. Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4°C για 15΄
7. Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/4 όγκου κρύο nanopure νερό
8. Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4°C για 15΄
9. Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/10 όγκο κρύο nanopure νερό
10. Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm στους 4°C για 15΄
11. Επαναδιάλυση σε ~1ml κρύο 10% v/v διάλυμα γλυκερόλης
12. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως ή φυλάσσονται σε aliquots των 80μl στους -80°C

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται όσο το δυνατό στον πάγο χρησιμοποιώντας πάντα κρύες πιπέττες, falcons, tips. Για το μετασχηματισμό των κυττάρων, προστίθενται 1-2μl της αντίδρασης ligation στα κύτταρα τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδική κρύα κυψελίδα για να γίνει το electroporation (2000 V για 5msec).

Στα κύτταρα προστίθενται ~800μl θρεπτικό μέσο 2XYT (για 1lt: 16gr tryptone, 10gr yeast extract, 10gr NaCl, ρύθμιση του pH στο 7.2-7.4) και αφήνονται να επωαστούν για 1h στους 37°C. Τα κύτταρα στη συνέχεια απλώνονται σε τριβλίο με θρεπτικό LB ή 2XYT που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό.

B.6.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης. Η μέθοδος αυτή αποδίδει υψηλής καθαρότητας και σχετικά μεγάλες ποσότητες πλασμιδίου (10-15 μg) κατάλληλου για ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα αλλά και για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

1. Εμβολιασμός περίπου 3ml υγρού θρεπτικού υλικού LB (Luria-Bertani) με αμικιλίνη (100μg/ml), που βρίσκεται σε βακτηριολογικό σωληνάριο, με μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων που έχουν αναπτυχθεί σε τριβλίο LB με αμικιλίνη. Τοποθετούμε το βακτηριολογικό σωληνάριο στους 37°C υπό ανάδευση O/N

2. Την επομένη μεταφέρουμε 1.5 ml από την καλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί στο βακτηριολογικό σωληνάριο σε erpendorf του 1.5 ml (το υπόλοιπο της καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4°C). Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 30 sec
3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο υγρό και αφήνουμε το ίζημα των βακτηρίων όσο πιο στεγνό γίνεται
4. Επαναδιαλύουμε το βακτηριακό ίζημα σε 100 μl κρύο Διάλυμα #1 ή GTE (Glucose Tris EDTA)

Διάλυμα #1

- 50 mM γλυκόζη
- 25 mM Tris·Cl (pH 8.0)
- 10 mM EDTA (pH 8.0)

5. Προσθέτουμε 200 μl φρεσκοφτιαγμένου Διαλύματος #2

Διάλυμα #2

- 0.2N NaOH
- 1% SDS

6. Κλείνουμε τα erpendorfs και τα ανακατεύουμε γρήγορα και καλά (με το χέρι). Στον πάγο για 5'
7. Προσθέτουμε γρήγορα 150 μl κρύο Διάλυμα #3. Κλείνουμε τα erpendorfs. Vortex για 10 sec και τα τοποθετούμε στον πάγο για 5'

Διάλυμα #3 (Το διάλυμα είναι 3M σε κατιόντα νατρίου και 5M σε οξικά ανιόντα)

Για 100 ml:

- | | |
|------------------|---------|
| 5M οξικό κάλιο | 60 ml |
| οξικό οξύ | 11,5 ml |
| H ₂ O | 28,5 ml |

8. Φυγοκέντρωση στους 4°C στις 12000 rpm για 5'
9. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf. Προσθήκη ίσου όγκου μίγματος φαινόλης:χλωροφόρμιου. Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε στους 4°C στις 12000 rpm για 3'

10. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη φάση σε νέο erppendorf και προσθέτουμε 2 όγκους αιθανόλη 100%. Ανακινούμε καλά και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5'
11. Φυγοκεντρούμε στους 4°C στις 12000 rpm για 5' για να πέσει το ίζημα με το πλασμιδιακό DNA. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει καλά
12. Προσθέτουμε 50-100 μl από ένα διάλυμα RNase A σε H₂O (10mg/ml) και φυλάσσουμε το δείγμα μας στους -20°C.

B.6.7. Διαγνωστικές πέψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα

Μετά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα ελέγξαμε την ύπαρξη της επιθυμητής κατασκευής πραγματοποιώντας πέψεις με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Οι ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τη NEB και οι συνθήκες των πέψεων ήταν αυτές που προτείνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία. Μετά την επιβεβαίωση πως έχουμε τη σωστή κατασκευή προχωρήσαμε στην παραγωγή πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο B.6.1. Για την επαλήθευση του αποτελέσματος στείλαμε δείγμα DNA για προσδιορισμό της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing analysis) στο εργαστήριο μικροχημείας του IMBB. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του τερματισμού της επιμήκυνσης της ραδιοσημασμένης αλυσίδας του DNA σε διάφορα μήκη, με την ενσωμάτωση τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (dideoxy nucleotide chain termination method) των Sanger et al., 1977.

B.7. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ (TRANSFECTION) ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την εισαγωγή κλωνοποιημένων ευκαρυωτικών τμημάτων DNA σε καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων. Εμείς χρησιμοποιούμε τη μέθοδο της κατακρήμνισης συμπλοκών DNA με φωσφορικό ασβέστιο. Η πρόσληψη του DNA από κύτταρα σε καλλιέργεια ενισχύεται σημαντικά όταν το νουκλεϊνικό οξύ παρουσιάζεται συμπλοκοποιημένο με φωσφορικό ασβέστιο.

Το φωσφορικό ασβέστιο ανοίγει τους πόρους της κυτταρικής μεμβράνης και δημιουργεί σύμπλοκο με το DNA το οποίο στη συνέχεια καθιζάνει. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήσαμε είναι HEK293T (Human Embryonic Kidney). Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το εξής:

A. Προετοιμασία ευκαρυωτικών κυττάρων για παροδική διαμόλυνση

1. 24 ώρες πριν τη διαμόλυνση αφαιρούμε όλο το θρεπτικό (DMEM*) από τη καλλιέργεια των κυττάρων που βρίσκονται προσκολλημένα στο πάτο της φλάσκας την οποία παίρνουμε από έναν κλίβανο όπου οι συνθήκες είναι 37°C/ 5% CO₂ όπου αναπτύσσονται τα κύτταρα
2. Προσθέτουμε τρυψίνη που βοηθάει τα κύτταρα να ξεκολλήσουν από το πάτο αλλά και μεταξύ τους, καθώς τα συσσωματώματα παρεμποδίζουν τη διαμόλυνση και τοποθετούμε τη φλάσκα στους 37°C/ 5% CO₂ για 5'-10'
3. Στη συνέχεια προσθέτουμε θρεπτικό υλικό (DMEM*) στη φλάσκα μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια της και ανακατεύουμε ώσπου να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και να διαλυθούν τα συσσωματώματα
4. Μετράμε τα κύτταρα με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή και βρίσκουμε τα κύτταρα/ml
5. Σε τριβλία διαμέτρου 10 cm, βάζουμε $1,5 \cdot 10^6$ κύτταρα/ τριβλίο καθώς και περίπου 8 ml θρεπτικό. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα κύτταρα στους 37°C/ 5% CO₂ μέχρι την επομένη που θα γίνει η διαμόλυνση

B. Διαμόλυνση

1. Ετοιμάζουμε το δείγμα του DNA που θα χρησιμοποιηθεί για τη διαμόλυνση (10 μg από την pcDNA3-bio-TAG1 κατασκευή και 10 μg από την pcDNA3-birA κατασκευή)
2. Στο eppendorf που περιέχει το δείγμα του DNA προσθέτουμε 62 μl CaCl₂ 2M και συμπληρώνουμε ως τα 500 μl με αποστειρωμένο H₂O (οι τιμές αυτές είναι ειδικές για τα τριβλία διαμέτρου 10 cm)
3. Ρίχνουμε το περιεχόμενο του προηγούμενου eppendorf σταγόνα-σταγόνα σε νέο eppendorf που περιέχει 500 μl 2xHBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES) και το αφήνουμε για 15'-20' σε θερμοκρασία δωματίου

4. Ανακατεύουμε με τη πιπέτα και προσθέτουμε το μίγμα στο τριβλίο με τα κύτταρα που βγάζουμε από τους 37°C/ 5% CO₂
5. Τοποθετούμε και πάλι το τριβλίο στους 37°C/ 5% CO₂ έως την επομένη
6. Την επομένη ξεπλύνουμε τα κύτταρα 2 φορές με θρεπτικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, SIGMA). Αφού τα ξεπλύνουμε προσθέτουμε θρεπτικό υλικό (DMEM*) και τα τοποθετούμε στους 37°C/ 5% CO₂ έως την επόμενη μέρα οπότε και θα μαζέψουμε τα κύτταρα για να πάρουμε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα (βλ. Παράγραφο B.2.)

DMEM*: αποτελείται από θρεπτικό υλικό DMEM καθώς και από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 2mM όπως επίσης και από 10% FBS (foetal bovine serum) και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HEK293T

B.8. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης και την ανοσοκατακρήμιση φαίνονται στον Πίνακα 5. Οι αραιώσεις που αναφέρονται για τα πειράματα ανοσοκατακρήμισης προέκυψαν από τις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούν.

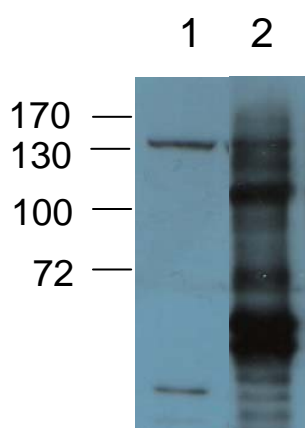
Πίνακας 5

Όνομα αντισώματος	Τύπος αντισώματος	Εξειδίκευση	Αραίωση σε Western blot	Αραίωση σε IP
TG1 (a-TAG1)	Πολυκλωνικό (rabbit)		1: 4000	Μη κατάλληλο
TG2 (a-TAG1)	Πολυκλωνικό (rabbit)		1: 4000	Μη κατάλληλο
TG3 (a-TAG1)	Πολυκλωνικό (rabbit)		1: 6000	Μη κατάλληλο
1C12 (a-TAG1)	Μονοκλωνικό (IgG)	Rat, human	Μη κατάλληλο	1 µg Ab/ 300 µg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιστο (μόνο αρουραίου και ανθρώπινου) και 1 µg Ab/ 100 µg εκχυλίσματος από κυτταρική καλλιέργεια
a- actin (Santa Cruze)	Μονοκλωνικό (mouse IgG)	Mouse, rat, human	1: 10000	Δεν δοκιμάστηκε
a- actin (Amersham, Life Science)	Μονοκλωνικό (mouse IgM)	Chick, rat, mouse	1: 2000	Δεν δοκιμάστηκε
Streptavidin-HRP (SIGMA)			1: 20000	

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΗΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΗΝ TAG1 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

Ξεκινήσαμε την προσπάθεια μας με ιστό παρεγκεφαλίδας από ποντίκια 7 ημερών, όπου η έκφραση της πρωτεΐνης TAG1 είναι υψηλή, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3. Χρησιμοποιήσαμε αρχικά το πολυκλωνικό αντίσωμα TG3 σε διάφορες αραιώσεις για να ανοσοκατακρημνίσουμε την TAG1 από πρωτεϊνικό εκχύλισμα συνολικής ποσότητας 200 μg. Επειδή η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανοσοκατακρημνίσαμε δεν ήταν αρκετή, συνεχίσαμε τις δοκιμές αλλάζοντας την ποσότητα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, αλλάζοντας αντισώματα (δοκιμάσαμε τα TG1, TG2, 2M, 4M), και χρησιμοποιώντας beads αгарόζης με protein A ή protein G ή μίγμα των δύο. Δυστυχώς το πρόβλημα ήταν πως τα αντισώματα που διαθέταμε δεν ήταν αρκετά αποτελεσματικά σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και έτσι η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης TAG1 παρέμενε στο υπερκείμενο. Την καλύτερη δυνατή εικόνα από αυτά τα πειράματα την αποκτήσαμε χρησιμοποιώντας 1 μg TG3 αντισώματος για κάθε 100 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από παρεγκεφαλίδα και beads αгарόζης με protein A (Εικόνα 3).



Εικόνα 3

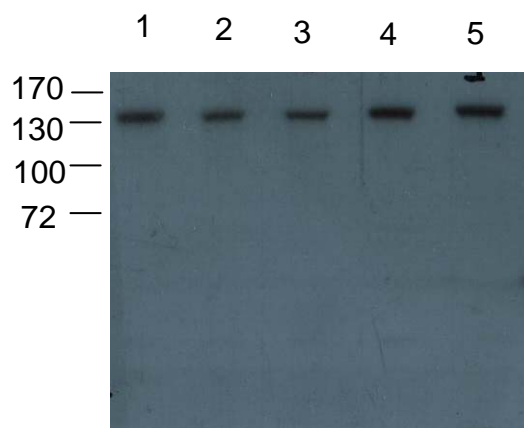
1: 50 μg κυτταρικού εκχυλίσματος από παρεγκεφαλίδα ποντικού 7 ημερών
2: IP σε 200 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με το αντίσωμα TG3 σε συγκέντρωση 1 μg/ 100 μg εκχυλίσματος
Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα TG3 σε αραιώση 1: 6000

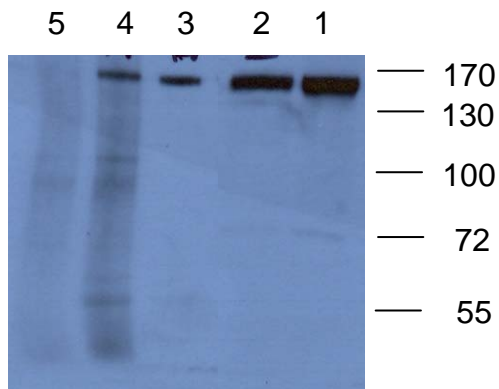
Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στην απομόνωση πρωτεΐνης από ιστό εγκεφάλου αρουραίου. Αυτή η επιλογή μας βασίστηκε στο γεγονός ότι διαθέτουμε ένα

μονοκλωνικό αντίσωμα για την TAG1 (το 1c12) το οποίο δουλεύει πολύ καλά σε ανοσοιστοχημεία και ειδικεύεται έναντι της πρωτεΐνης TAG1 του αρουραίου και του ανθρώπινου ομόλογου της. Επίσης, αυτό το αντίσωμα έχει προηγουμένα χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (Traka et al., 2003). Η έκφραση της TAG1 σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φλοιό, παρεγκεφαλίδα και ιππόκαμπο ενήλικου αρουραίου καθώς και σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φλοιό και προμήκη μυελό εμβρύων αρουραίου 16 ημερών φαίνεται στην Εικόνα 4. Το πρώτο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης (IP) με το αντίσωμα 1c12 πραγματοποιήθηκε σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φλοιό εγκεφάλου ενήλικου αρουραίου (200 μg). Χρησιμοποιήθηκαν protein G beads αγαρόζης (Santa Cruze) και protein G beads σεφαρόζης (ευγενική προσφορά από Δρ. Ηλιόπουλο) καθώς και 5 μg αντισώματος για κάθε 100 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα protein G beads είναι περισσότερο αποτελεσματικά για την κατακρήμνιση μονοκλωνικού αντισώματος, απ'ότι τα protein A beads. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην Εικόνα 5 και η διαφορά του από τα προηγούμενα πειράματα στο ποντίκι είναι εμφανής. Παρόλα αυτά χρώση με νιτρικό άργυρο των αντίστοιχων IPs δεν έδειξε το παραμικρό ίχνος πρωτεΐνης στο ύψος των 135 kDa, όπου εντοπίζεται η TAG1.

Εικόνα 4

1: 50 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό εγκεφάλου ενήλικου αρουραίου
2: 50 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από παρεγκεφαλίδα ενήλικου αρουραίου
3: 50 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιππόκαμπο ενήλικου αρουραίου
4: 50 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από εγκεφαλικό φλοιό εμβρύου αρουραίου
5: 50 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από προμήκη μυελό εμβρύου αρουραίου
Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα TG3 σε αραιώση 1: 6000





Εικόνα 5:

1: 100 μg εκχύλισμα παρεγκεφαλίδας αρουραίου 6 ημερών

2: 100 μg εκχύλισμα ιπποκάμπου αρουραίου 6 ημερών

3: IP με G sepharose beads σε 200 μg εκχυλίσματος από φλοιό ενήλικου αρουραίου

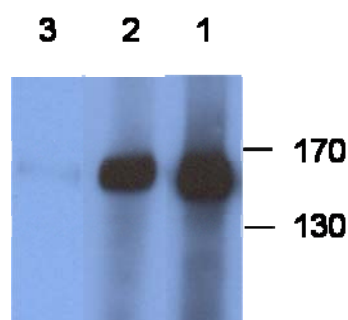
4: IP όπως το προηγούμενο με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήσαμε G agarose beads

5: G agarose beads που χρησιμοποιήθηκαν για το preclearance step (βλ. Παράγραφο B.3.)

Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα TG3 σε αραίωση 1: 6000

Συνεχίσαμε λοιπόν την προσπάθεια μας, τροποποιώντας την αναλογία πρωτεΐνης-αντισώματος, δοκιμάζοντας και τα αντισώματα που είχαμε νωρίτερα χρησιμοποιήσει στα πειράματα με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από εγκέφαλο ποντικού, με σκοπό να αυξήσουμε σε πρώτη φάση την ποσότητα της πρωτεΐνης που κατακρημνίζουμε. Δοκιμάσαμε επίσης αντίσωμα 1c12 που ήταν απομονωμένο από ασκιτικό υγρό. Επιπλέον, ενώ έως τώρα χρησιμοποιούσαμε για τη λύση του ιστού το διάλυμα λύσης που περιέχει NP-40 σαν απορρυπαντικό, αυτή τη φορά δοκιμάσαμε το διάλυμα λύσης που περιέχει octyl β-D glucopyranoside (καλύτερη διάσπαση κυτταρικών μεμβρανών) και Triton σαν απορρυπαντικά. Μετά από όλες τις παραπάνω δοκιμές καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα: 1) το αντίσωμα 1c12 από ασκιτικό υγρό δούλεψε καλύτερα σε IP για την TAG1 από όλα τα υπόλοιπα, 2) 10 μl καθαρών protein G beads αγαρόζης ήταν υπεραρκετά για 1 IP και 3) το διάλυμα λύσης που περιέχει octyl β-D glucopyranoside και Triton είναι πιο αποτελεσματικό. Έτσι καταφέραμε να δούμε μία ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης TAG1 έπειτα από χρώση του gel με νιτρικό άργυρο. Στις Εικόνες 6 και 7 φαίνονται το W.B. με TG3 αντίσωμα και η χρώση του gel με νιτρικό άργυρο αντίστοιχα, σε IPs με το μονοκλωνικό αντίσωμα 1c12 από ασκιτικό υγρό και με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φλοιό ενήλικου και αναπτυσσόμενου (κατά την εμβρυϊκή ημέρα 16) εγκεφάλου αρουραίου. Πραγματοποιήθηκαν 2 IPs με τις ίδιες συνθήκες, και μετά την προετοιμασία των δειγμάτων αυτά ενώθηκαν και ένα μέρος από το ενιαίο δείγμα χρησιμοποιήθηκε για WB (το 1/3 του συνολικού όγκου), ενώ το μεγαλύτερο μέρος

του χρησιμοποιήθηκε σε άλλο gel για χρώση με νιτρικό άργυρο (τα 2/3 του συνολικού όγκου).

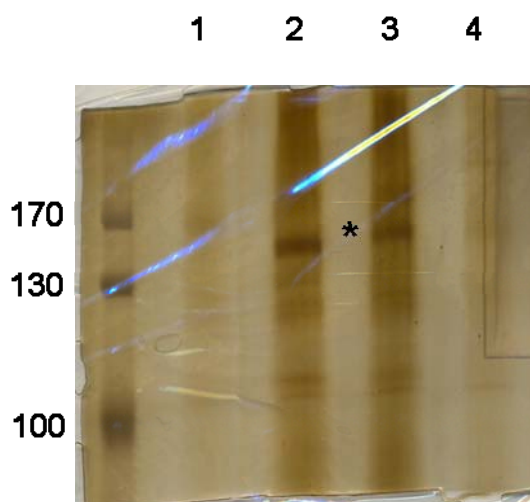


Εικόνα 6.

1: 1/3 από μίγμα δύο IPs όπου χρησιμοποιήσαμε 3 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό ενηλίκου αρουραίου και 1 μg 1c12 Ab/ 300 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

2: 1/3 από μίγμα δύο IPs όπου χρησιμοποιήσαμε 1 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό εμβρύου αρουραίου και 1 μg 1c12 Ab/ 100 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος/ IP

3: 50 μg πρωτεϊνικό εκχύλισμα από φλοιό εμβρύου αρουραίου 16 ημερών



Εικόνα 7.

1: G agarose beads που χρησιμοποιήθηκαν για το preclearance step του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό ενηλίκου ζώου

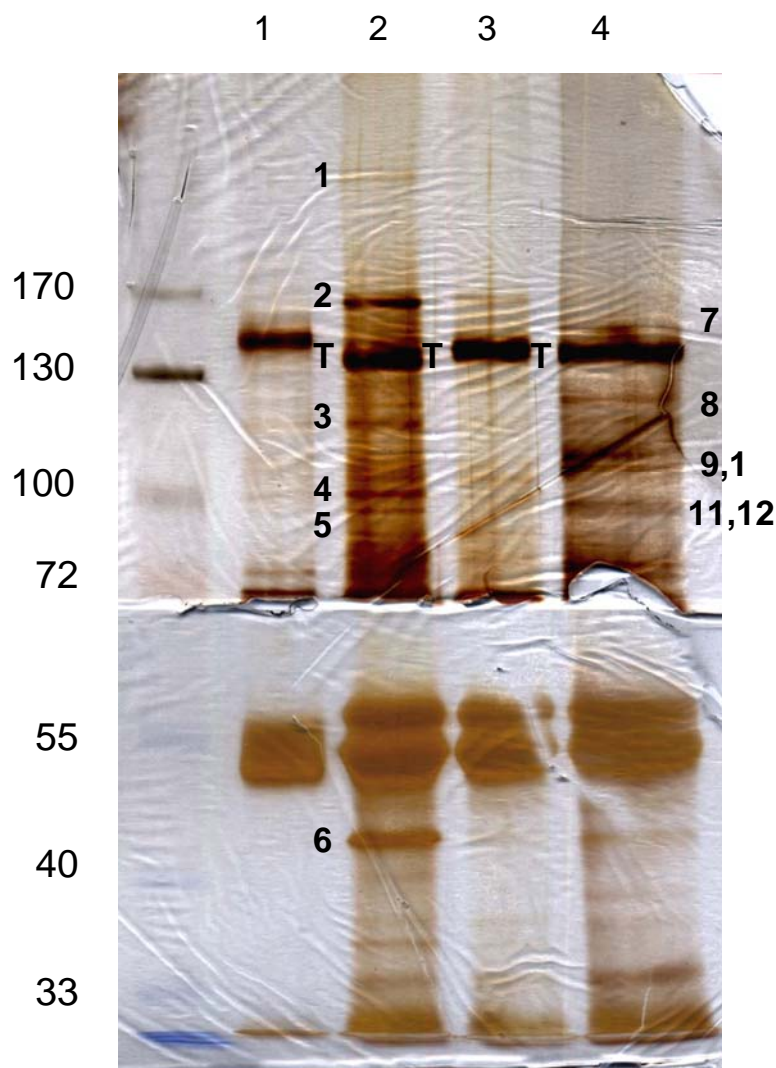
2: 2/3 από μίγμα δύο IPs όπου χρησιμοποιήσαμε 3 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό ενηλίκου αρουραίου και 1 μg 1c12 Ab/ 100 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος/ IP

3: 2/3 από μίγμα δύο IPs όπου χρησιμοποιήσαμε 1mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό εμβρύου αρουραίου και 1 μg 1c12 Ab/ 100 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος/ IP

4: G agarose beads που χρησιμοποιήθηκαν για το preclearance step του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό εμβρύου 16 ημερών

Στο gel της Εικόνας 7 μπορούσαμε να διαχωρίσουμε κάποιες ειδικές ζώνες που εντοπίζονται στο 1 από τα 2 IPs ή και στα 2. Η πιο έντονη ζώνη που διακρίνεται είναι κατά πάσα πιθανότητα της πρωτεΐνης TAG1 (σημειώνεται με αστερίσκο), ενώ οι υπόλοιπες ζώνες είναι πολύ αγνές. Έτσι, έπειτα και από συμβουλή του Δρ. Παναγιώτου, επιχειρήσαμε να πάρουμε ακόμα μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεϊνών στο gel για να μπορέσουμε να προχωρήσουμε στην αναγνώριση τους με

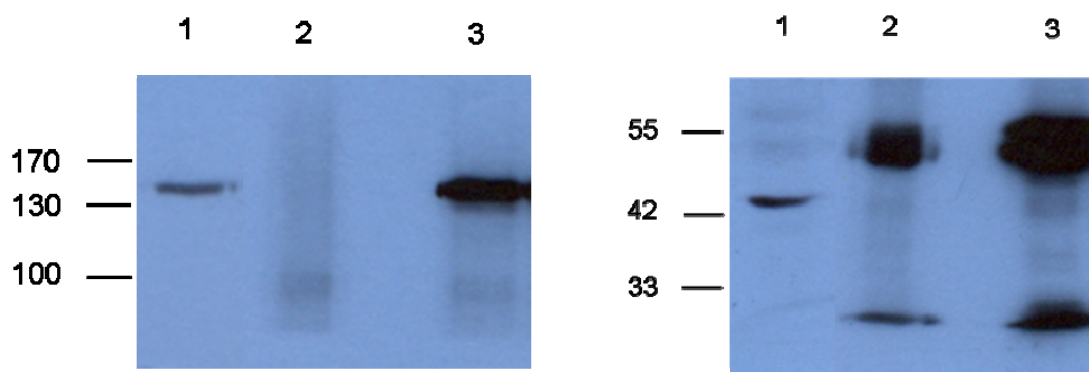
φασματομετρία μάζας. Μετά από πολλές προσπάθειες, η καλύτερη εικόνα που μπορέσαμε να αποκτήσουμε είναι αυτή που φαίνεται στην Εικόνα 8. Σε αυτό το πείραμα πραγματοποιήθηκαν 2 IPs για κάθε δείγμα ιστού από αρουραίο, τα οποία στη συνέχεια αναμίχθηκαν και διαχωρίστηκαν σε gel μεγάλων διαστάσεων περιεκτικότητας 7,5 %. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από 3 διαφορετικούς ιστούς αρουραίου: φλοιός από εγκέφαλο εμβρύων 16 ημερών, παρεγκεφαλίδα από αρουραίους 6 ημερών και φλοιός από εγκέφαλο ενήλικων ζώων. Οι συνθήκες του κάθε IP για τον εμβρυϊκό και τον ενήλικο ιστό είναι ίδιες με αυτές που περιγράφονται για το πείραμα των Εικόνων 6 και 7. Οι συνθήκες του IP για το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από παρεγκεφαλίδα είναι ίδιες με αυτές για το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το φλοιό του εγκεφάλου εμβρύου αρουραίου. Συνολικά οι ποσότητες πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε IP και για κάθε ιστό είναι οι εξής: 4,5 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό εγκεφάλου ενήλικου αρουραίου, 1,5 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό εγκεφάλου εμβρύων αρουραίου και 1,5 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από παρεγκεφαλίδα αρουραίου 6 ημερών. Οι αριθμοί που σημειώνονται στην Εικόνα 8 αντιστοιχούν στις ζώνες του gel που κόπηκαν και εστάλησαν στο εργαστήριο του Δρ. Παναγιώτου στο ινστιτούτο Φλέμινγκ για περαιτέρω κατεργασία που καταλήγει στην αναγνώριση πεπτιδίων. Επίσης κόπηκαν οι ζώνες από τα τρία δείγματα που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη TAG1 (T) προς θετική επιβεβαίωση των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης. Στο δείγμα της παρεγκεφαλίδας δεν εμφανίστηκαν ειδικές μάντες στο gel εκτός από αυτήν της πρωτεΐνης TAG1, πιθανότατα λόγω του ότι οι ποσότητες σε αυτό το δείγμα ήταν μικρότερες από τα υπόλοιπα δύο και οι ζώνες δεν πρόλαβαν να αποκαλυφθούν έως την παύση της αντίδρασης χρώσης.



Εικόνα 8. Χρώση με νιτρικό άργυρο σε IPs με ιστό από φλοιό εγκεφάλου ενήλικου αρουραίου (2), από παρεγκεφαλίδα αρουραίου 6 ημερών (3) και από φλοιό εγκεφάλου εμβρύου αρουραίου 16 ημερών (4). Το δείγμα που φαίνεται στη σειρά 1 είναι από τα G beads αгарόζης που χρησιμοποιήθηκαν για το preclearance step του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό ενήλικου αρουραίου και υποδεικνύει τις μη ειδικές μπάντες.

Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας επιβεβαίωσαν τη ζώνη της πρωτεΐνης TAG1 και αναγνώρισαν τη ζώνη με το νούμερο 6 ως ακτίνη. Δυστυχώς οι πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στις υπόλοιπες ζώνες δεν μπόρεσαν να αναγνωριστούν. Όπως είναι γνωστό, η ακτίνη είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού ενώ η TAG1 είναι μία πρωτεΐνη που συνδέεται με μία ομάδα γλυκοφωσφατιδυλινοσιτόλης στην εξωκυτταρική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Επομένως, ο μόνος τρόπος να αλληλεπιδρούν οι δύο πρωτεΐνες είναι εμμέσως μέσω άλλων πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης. Ελέγξαμε την ύπαρξη αυτής της αλληλεπίδρασης με περαιτέρω πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και επακόλουθης ανοσοαποτύπωσης. Το

αποτέλεσμα του ελέγχου ήταν αρνητικό και φαίνεται στην Εικόνα 9. Το αντιφατικό αποτέλεσμα που πήραμε από τις δύο διαδικασίες πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός πως πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού συχνά παρασύρονται στα πρωτεϊνικά δείγματα και δίνουν ψευδώς αληθές αποτέλεσμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση αυτό που μάλλον συμβαίνει είναι πως η ακτίνη (42 kDa) τρέχει στο ίδιο ύψος με μία πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο IP από εκχύλισμα από φλοιό ενήλικου αρουραίου και πεπτίδια της αναγνωρίζονται από τη φασματομετρία μάζας. Το γεγονός ότι από όλες τις ζώνες του gel που εστάλησαν προς αναγνώριση, μόνο η TAG1 επιβεβαιώθηκε, μπορεί να οφείλεται στην ποσότητα τους στο δείγμα, τη διαμόρφωση τους ή και τη μεταμεταφραστική τους τροποποίηση. Για παράδειγμα, η γλυκοσυλίωση πολλές φορές εμποδίζει την αναγνώριση πεπτιδίων από το φασματογράφο μάζας.



Εικόνα 9. Ανοσοαποτύπωση με το TG3 αντίσωμα σε αραιώση 1:6000 (αριστερά) και με αντίσωμα για την ακτίνη (S. Cruze) 1:10000 (δεξιά) στα εξής δείγματα: 1: 50 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος παρεγκεφαλίδας ενήλικου αρουραίου, 2: G beads αгарόζης που χρησιμοποιήθηκαν για το preclearance του εκχυλίσματος από φλοιό ενήλικου αρουραίου, 3: IP σε 3 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από φλοιό ενήλικου αρουραίου (precleared) χρησιμοποιώντας 1 μg 1c12 αντισώματος από ασκτικό υγρό/ 100 μg εκχυλίσματος

Γ.2. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΤΥΝΙΛΙΩΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ TAG1 ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

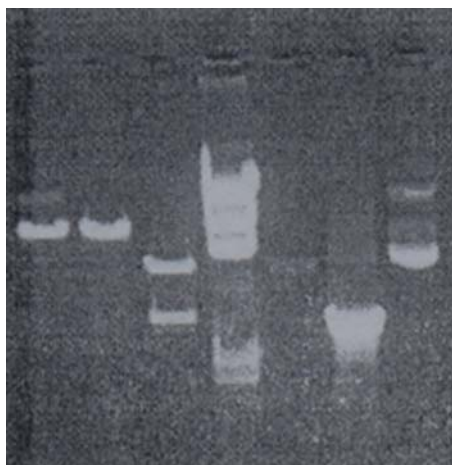
Ένας άλλος τρόπος για να ελέγξουμε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών είναι η τεχνική που χρησιμοποιεί την ισχυρή σύνδεση ανάμεσα σε beads στρεπταβιδίνης και βιοτυνυλιωμένες πρωτεΐνες. Σκοπός μας είναι να κατασκευάσουμε μία πλασμιδιακή

κατασκευή η οποία θα εκφράζει σε μεγάλες ποσότητες βιοτυνιλωμένη TAG1 πρωτεΐνη σε ευκαρυωτικά κύτταρα, εφόσον συνεκφράσουμε το γονίδιο της λιγάσης *bigA*. Αυτή η χμιαϊκή πρωτεΐνη στη συνέχεια θα επωαστεί με ειδικά beads στρεπταβιδίνης τα οποία θα δέσουν ισχυρά την πρωτεΐνη στο βιοτυνιλωμένο κατάλοιπο (στη συγκεκριμένη περίπτωση πρόκειται για ένα κατάλοιπο λυσίνης). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για τον εντοπισμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων που υπερεκφράζουμε σε ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές. Θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί με τρόπο παρόμοιο με την τεχνική GST-pull down, για την ανίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν *in trans* με την καθηλωμένη στα beads πρωτεΐνη. Σε αυτήν την περίπτωση πρωτεϊνικό εκχύλισμα από ιστό ή από κύτταρα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί.

Κινούμενοι προς αυτήν την κατεύθυνση, το πρώτο βήμα ήταν η κατασκευή της πλασμιδιακής κατασκευής για την παραγωγή βιοτυνιλωμένης TAG1. Έχουμε στην κατοχή μας έναν πλασμιδιακό φορέα (τον pBSkSII) που περιέχει ολόκληρο το cDNA της rTAG1 από τη θέση έναρξης της μεταγραφής έως τη θέση λήξης της μεταγραφής. Ελέγχοντας τις θέσεις περιορισμού που είναι διαθέσιμες στην ήδη υπάρχουσα κατασκευή της TAG1 και στην ήδη υπάρχουσα κατασκευή που οδηγεί στην έκφραση του πεπτιδίου βιοτυνιλώσης (ελέγχοντας και τη διατήρηση του σωστού πλαισίου ανάγνωσης), καταλήξαμε στην απόφαση να αποκτήσουμε με PCR αντίδραση το cDNA ολόκληρης της κωδικοποιούσας περιοχής της TAG1 προσθέτοντας στα άκρα του τις επιθυμητές θέσεις περιορισμού (βλ. Μέθοδοι και Υλικά). Οι θέσεις που επιλέξαμε είναι οι εξής: η θέση δράσης του ενζύμου EcoRV στο 5'-άκρο της κωδικής αλληλουχίας της TAG1 και η θέση δράσης του ενζύμου NotI στο 3'-άκρο της. Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR αντίδρασης θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνδεση του στις αντίστοιχες θέσεις του polylinker του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3 που περιέχει την αλληλουχία του πεπτιδίου βιοτυνιλώσης, αφού και τα δύο κοπουν με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRV και NotI για το σχηματισμό τυφλών και κολλωδών άκρων αντίστοιχα.

Έπειτα από αρκετές προσπάθειες και χρησιμοποιώντας την αναλογία μορίων πλασμιδιακού φορέα: προϊόν της PCR αντίδρασης 1:5, αποκτήσαμε 1 αποικία μετασχηματισμένων DH10b βακτηρίων που περιείχε την σωστή κατασκευή. Η κατασκευή ελέγχθηκε με διαγνωστικές πέψεις και στην Εικόνα 10 φαίνεται η επιβεβαίωση.

1 2 3 4 5 6 7



Εικόνα 10.

1: πλασμιδιακό DNA από την αποικία των μετασηματισμένων βακτηρίων κομμένο με το ένζυμο NotI

2: πλασμιδιακό DNA από την αποικία των μετασηματισμένων βακτηρίων κομμένο με το ένζυμο EcoRV

3: πλασμιδιακό DNA από την αποικία των μετασηματισμένων βακτηρίων κομμένο με τα ένζυμα EcoRV και NotI

4: μάρτυρας DNA (λ/ HindIII)

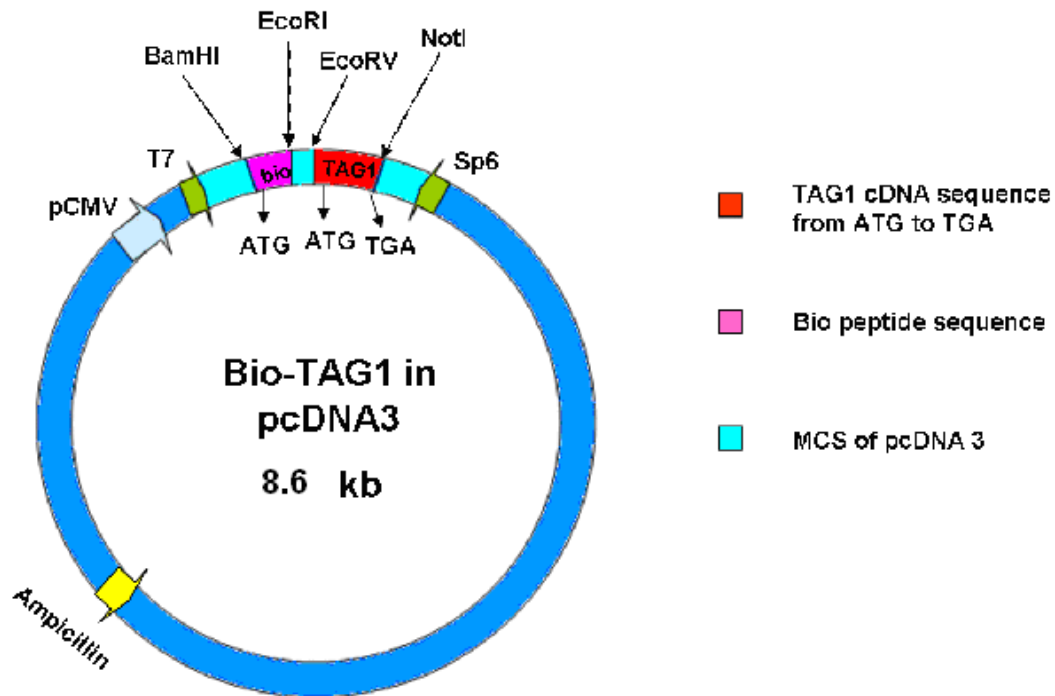
5: πλασμιδιακός φορέας που περιέχει την αλληλουχία του πεπτιδίου βιοτυνιλίωσης κομμένος με EcoRV και NotI (μικρή ποσότητα)

6: προϊόν της PCR αντίδρασης κομμένο με EcoRV και NotI (μεγάλη ποσότητα)

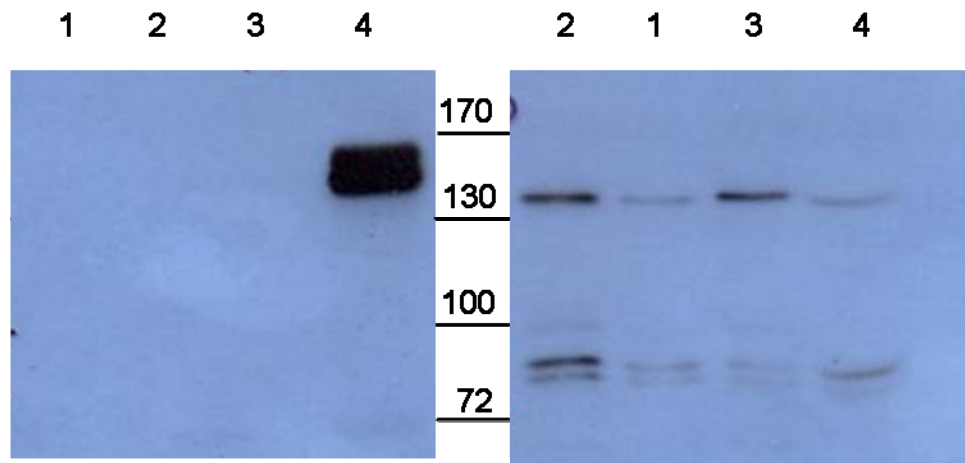
7: άκοπο πλασμιδιακό DNA από την αποικία των μετασηματισμένων βακτηρίων

Η παραπάνω κατασκευή ελέγχθηκε περαιτέρω με τη μέθοδο του τερματισμού της επιμήκυνσης της ραδιοσημασμένης αλυσίδας του DNA σε διάφορα μήκη, με την ενσωμάτωση τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων των Sanger et al., 1977. Έτσι, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11 η νέα μας κατασκευή περιέχει την κωδική αλληλουχία της rTAG1 καθοδικά της αλληλουχίας βιοτυνιλίωσης σε έναν πλασμιδιακό φορέα έκφρασης στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Το επόμενο βήμα ήταν να χρησιμοποιήσουμε την προαναφερθείσα πλασμιδιακή κατασκευή σε συνδυασμό με την πλασμιδιακή κατασκευή που οδηγεί στην έκφραση σε ευκαρυωτικά κύτταρα της λιγάσης birA, σε πειράματα συνδιαμόλυνσης σε HEK293T κύτταρα. Το θεωρητικό αποτέλεσμα αυτών των πειραμάτων συνδιαμόλυνσης, είναι η παραγωγή σε μεγάλη ποσότητα βιοτυνιλωμένης TAG1 πρωτεΐνης. Δυστυχώς, ενώ η πρωτεΐνη TAG1 παράγονταν σε μεγάλη κλίμακα από τα κύτταρα, δεν ήταν βιοτυνιλωμένη. Ένα συνολικό πείραμα το οποίο περιγράφει τη μη-βιοτυνιλίωση της TAG1 από τα κύτταρα είναι αυτό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 12. Ελέγχθηκε περαιτέρω η πιθανότητα παραγωγής από τα κύτταρα μη λειτουργικής λιγάσης birA σε πειράματα συνδιαμόλυνσης με μία πρωτεΐνη που γνωρίζουμε ότι βιοτυνιλιώνεται. Το αποτέλεσμα έδειξε πως η λιγάση ήταν πλήρως λειτουργική.



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση πλασμιδιακής κατασκευής που οδηγεί στην παραγωγή βιοτυνλιωμένης TAG1 πρωτεΐνης από ευκαρυωτικά κύτταρα (τα μεγέθη των ενθέσεων είναι εικονικά). TAG1 coding region: 3.2 kb, bio-peptide sequence: 60-70 bp, pcDNA 3 sequence: 5.4 kb



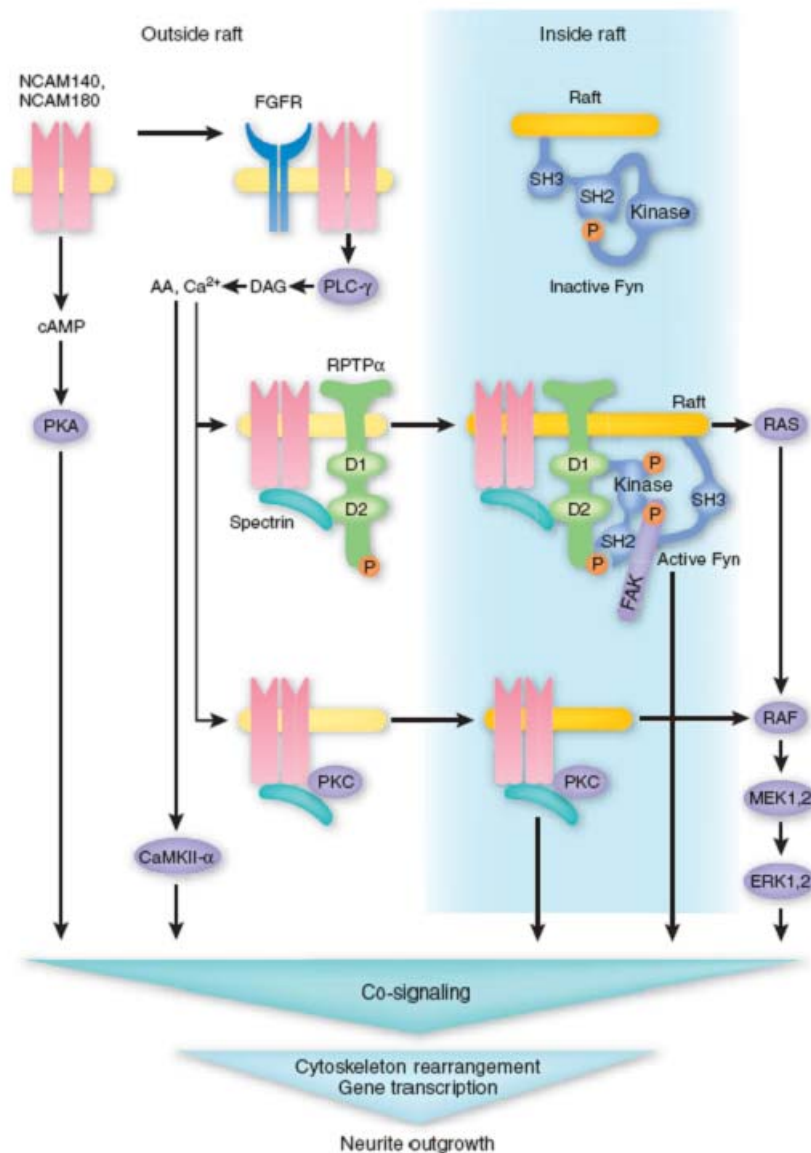
Εικόνα 12. Ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα TG3 (αριστερά) και το αντίσωμα streptavidin-HRP (δεξιά) των εξής δειγμάτων: 1: εκχύλισμα από mock transfected HEK 293T κύτταρα, 2: κατακρήμνιση με beads στρεπταβιδίνης εκχυλίσματος από mock transfected (διαμολυσμένα) HEK 293T κύτταρα, 3: κατακρήμνιση με beads στρεπταβιδίνης εκχυλίσματος από κύτταρα HEK 293T έπειτα από συνδιαμόλυνση της κατασκευής bio-TAG1 και της bigA λιγάσης και 4: 1/20 από το συνολικό όγκο του υπερκείμενου από το δείγμα 3

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρωτεΐνη TAG1 (Transient Axonal Glycoprotein 1) είναι ένα μόριο κυτταρικής συνάφειας που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και εκφράζεται ειδικά στο νευρικό σύστημα. Οι πρωτεΐνες αυτής της υπεροικογένειας διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αλλά και στο ενήλικο. Οι καλύτερα μελετημένες πρωτεΐνες αυτής της υπεροικογένειας είναι οι NCAM και L1. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι σημαντικές στη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων και τον προσανατολισμό των αξόνων καθώς και στην πλαστικότητα της σύναψης. Η πρωτεΐνη TAG1 ανήκει στην οικογένεια F3/contactin, το πιο μελετημένο μέλος της οποίας είναι η πρωτεΐνη F3 και ακολουθεί η TAG1. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, κυρίως στο αναπτυσσόμενο οσφρητικό σύστημα, το νεοφλοιό, την αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα, τον ιππόκαμπο και τον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό. Όσον αφορά στο ενήλικο νευρικό σύστημα, το μόριο TAG1 εντοπίζεται κυρίως στην παρεγκεφαλίδα, τον ιππόκαμπο, και τις εμμύελες ίνες του κεντρικού και του περιφερειακού νευρικού συστήματος (Wolfer et al., 1997, Yoshihara et al., 1995, Denaxa et al., 2001, Traka et al., 2002).

Για τις πρωτεΐνες των οικογενειών NCAM και L1, είναι γνωστή η αλληλεπίδραση τους με μόρια της κυτταρικής μεμβράνης και η επακόλουθη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση του μήκους των νευριτών και τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων (Reviewed by Maness and Schachner, 2007). Ειδικότερα, όσον αφορά στις πρωτεΐνες NCAM140 και NCAM180, αυτές σχηματίζουν ομοδιμερή στην κυτταρική μεμβράνη και ενεργοποιούν με άγνωστο τρόπο την πρωτεϊνική κινάση PKA. Επίσης, αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) και αυτή η αλληλεπίδραση έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης PKC και της ασβεστιο-εξαρτώμενης κινάσης CaMKII- α , καθώς και την δημιουργία συμπλόκου της NCAM με την πρωτεΐνη φωσφατάση τυροσίνης RPTP α σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης που είναι πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη (lipid rafts). Η δημιουργία του συμπλόκου μεταξύ των NCAM και RPTP α στα lipid rafts έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών. Η

ενεργοποίηση όλων των παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγούν στη μεταγραφή γονιδίων και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού που έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση του μήκους των νευριτών (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τις πρωτεΐνες NCAM140 και NCAM180 εντός και εκτός των περιοχών lipid rafts της κυτταρικής μεμβράνης (Maness and Schachner 2007)

Έχει διευκρινιστεί ο ρόλος της TAG1 στη συνάφεια ανάμεσα στα νευρικά κύτταρα, τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων, την αύξηση του μήκους των νευριτών, την καθοδήγηση των νευρικών αξόνων και τη μυελίνωση. Η πρωτεΐνη TAG1 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες L1 και NrCAM της οικογένειας L1, την πρωτεΐνη Caspr2 της οικογένειας neurexin καθώς και με τις πρωτεΐνες NCAM,

tenascin C και phosphacan. Επίσης, η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται σε ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις. Η φυσιολογική σημασία κάποιων από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις της TAG1 έχει διευκρινιστεί, σε καμία όμως περίπτωση δεν έχει συνδεθεί η δράση της πρωτεΐνης με την ενεργοποίηση κάποιου σηματοδοτικού μηχανισμού. Η παρούσα εργασία είναι μία προσπάθεια σύνδεσης της δράσης της TAG1 με υποδοχείς και μόρια της κυτταρικής μεμβράνης που η λειτουργία τους και τα μονοπάτια που ενεργοποιούν είναι γνωστά. Για τον σκοπό αυτό ακολουθήσαμε δύο πειραματικές προσεγγίσεις με σκοπό την αναγνώριση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την TAG1, σε περιοχές υψηλής έκφρασης της κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στα τρωκτικά.

Η πρώτη πειραματική προσέγγιση αφορά στην ανοσοκατακρήμνιση των συμπλόκων που σχηματίζει η πρωτεΐνη TAG1 σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου ποντικών και αρουραίων και τον μοριακό διαχωρισμό τους σε gel ακρυλαμίδης. Χρειάστηκε κατακρήμνιση της TAG1 και των μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτή στις διάφορες περιοχές, σε μεγάλη ποσότητα για να μπορέσουμε να προχωρίσουμε στην αναγνώριση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα σύμπλοκα. Πράγματι, μπορέσαμε να αυξήσουμε σε σημαντικό βαθμό την ποσότητα της πρωτεΐνης TAG1 που ανοσοκατακρημνίζουμε καθώς και των μορίων που αυτή αλληλεπιδρά στα διάφορα συστήματα. Έτσι, προχωρήσαμε στην απομόνωση των ειδικών ζωνών που εμφανίστηκαν στα IPs έπειτα από χρώση του gel με νιτρικό άργυρο και την περαιτέρω κατεργασία τους στο εργαστήριο του Δρ. Παναγιώτου που οδηγεί στην αναγνώριση πεπτιδίων και αντιστοίχιση τους σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η κατεργασία αυτή περιλαμβάνει πέψη με τρυψίνη των ζωνών του gel, υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης και τέλος φασματομετρία μάζας για την αναγνώριση των πεπτιδίων που προέκυψαν.

Θεωρητικά, 1-10 pmoles αρχική σύσταση σε πρωτεΐνη είναι αρκετή για να δώσει ένα καλό σήμα στον φασματογράφο μάζας, όμως το καλό σήμα δεν συνδέεται μονάχα με την ποσότητα αλλά και με την ποιότητα του δείγματος. Η μέθοδος της φασματομετρίας μάζας που εφαρμόσαμε έχει χρησιμοποιηθεί γενικά με επιτυχία στην αναγνώριση πρωτεϊνών που η έκφραση τους ποικίλλει ανάμεσα σε διάφορα δείγματα (Saridaki and Panayotou 2005, Trougakos et al., 2006). Εμείς χρησιμοποιήσαμε αυτήν τη μέθοδο για την αναγνώριση πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίζονται με την γλυκοπρωτεΐνη TAG1 και μάλιστα από ιστό εγκεφάλου ζώων. Το πρόβλημα σε αυτήν την περίπτωση έγκειται στην ποσότητα και την καθαρότητα του δείγματος. Η

ποσότητα βέβαια των πρωτεϊνών που εμφανίστηκαν στο gel ήταν μάλλον ικανοποιητική. Παρόλα ταύτα, οι μόνες πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν ήταν η TAG1 και η ακτίνη, η ύπαρξη της οποίας όμως δεν επιβεβαιώθηκε με επόμενα πειράματα. Οι πρωτεΐνες που περιμένουμε να αλληλεπιδρούν άμεσα με την TAG1 (και σημειώνονται στο gel της Εικόνας 8) είναι υποδοχείς τις κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους και που περιέχουν μέτα- μεταφραστικές τροποποιήσεις κάτι που δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο την αναγνώριση τους.

Η δεύτερη πειραματική προσέγγιση που ακολουθήσαμε αφορά στην βιοτυνιλίωση της πρωτεΐνης TAG1 σε ευκαρυωτικά κύτταρα και την επακόλουθη σύνδεση της σε ειδικά beads στρεπταβιδίνης. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε δύο πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα, η μία από τις οποίες είναι βιοτυνιλιωμένη. Επίσης, βιοτυνιλίωση και καθήλωση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει σε beads στρεπταβιδίνης και στη συνέχεια επώαση αυτών με πρωτεϊνικό εκχύλισμα από ιστό είτε από διαμολυσμένα κύτταρα θα μπορούσε να αποκαλύψει αλληλεπιδράσεις in trans. Προχωρήσαμε λοιπόν, στη δημιουργία μιας κατασκευής που οδηγεί στην έκφραση μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης που αποτελείται από την TAG1 πρωτεΐνη και μία σειρά αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της, που αποτελούν το πεπτιδιο-δέκτη της βιοτυνιλίωσης. Η βιοτυνιλίωση επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη διαμόλυνση του γονιδίου της λιγάσης birA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το γονίδιο αυτής της λιγάσης προέρχεται από το βακτηριακό είδος *E. coli* και η αντίστοιχη πρωτεΐνη ενεργοποιεί τη βιοτίνη και τη μεταφέρει σε πρωτεΐνες που μπορούν να τη δεχτούν. Η μέθοδος αυτή, της απομόνωσης πρωτεϊνών έπειτα από τη στοχευμένη βιοτυνιλίωση τους έχει χρησιμοποιηθεί τον τελευταίο καιρό με επιτυχία σε κάποιες πειραματικές μελέτες (Krepkiy et al., 2006, Kulman e al., 2007). Στη δική μας περίπτωση, η δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής bio-TAG1 ολοκληρώθηκε επιτυχώς, όμως έπειτα από συνδιαμόλυνση κυττάρων HEK293T με αυτήν την κατασκευή και το γονίδιο της λιγάσης birA, διαπιστώσαμε ότι δυστυχώς η πρωτεΐνη TAG1 δεν βιοτυνιλιώνεται. Μια λογική εξήγηση γι' αυτήν την εξέλιξη είναι πως η διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο κύτταρο δεν επιτρέπει την πρόσβαση της λιγάσης στη θέση βιοτυνιλίωσης και την επακόλουθη δράση της. Επιπλέον, ένα πείραμα το οποίο θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί στο μέλλον είναι η δημιουργία παρόμοιας κατασκευής με μόνη διαφορά την έκφραση του πεπτιδίου βιοτυνιλίωσης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης TAG1. Στην περίπτωση του υποδοχέα των καναβιδοειδών CB2, η θέση

του πεπτιδίου βιοτυνιλίωσης στο C-τελικό άκρο του είχε σαν αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα βιοτυνιλίωσης, ενώ η θέση του πεπτιδίου βιοτυνιλίωσης στο N-τελικό άκρο του οδήγησε σε πολύ χαμηλά επίπεδα βιοτυνιλίωσης (Kerkiy et al., 2006).

Τέλος, από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, έγινε φανερό πως η αντίχνευση μορίων που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη TAG1 από εκχύλισμα ιστού εγκεφάλου με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας είναι πολύ δύσκολη. Ίσως θα έπρεπε να εστιάσουμε τις έρευνες μας από δω και στο εξής στην αντίχνευση αλληλεπιδράσεων της TAG1 με πρωτεΐνες που εντοπίζονται στις περιοχές υψηλής έκφρασης της και θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποδοχείς της ή συνεργάτες της στα πλαίσια της ίδιας κυτταρικής μεμβράνης. Μόρια κυτταρικής συνάφειας που εντοπίζονται στο νευρικό σύστημα ή και υποδοχείς με δράση κινάσης ή φωσφατάσης, αποτελούν υποψήφιες πρωτεΐνες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bailly Y, Kyriakopoulou K, Dehaye-Bouchaud N, Mariani J, and Karagogeos D. 1996. Cerebellar granule cell differentiation in the mutant and X- irradiated rodents revealed by the neural cell adhesion molecule TAG-1. *J. Comp. Neurol.* 369:150-161

Buchstaller A, Kunz S, Berger P, Kunz B, Ziegler U, Rader C, and Sonderegger P. 1996. Cell adhesion molecules NgCAM and axonin 1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion. *J. of Cell Biol.* 135 (6):1593-1607

Buttiglione M, Revest JM, Pavlou O, Karagogeos D, Furley A, Rougon G, Faivre-Sarraihl C. 1998. A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1 and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. *J. of Neuroscience* 18 (17):6853-6870

Denaxa M, Kyriakopoulou K, Theodorakis K, Trichas G, Vidaki M, Takeda Y, Watanabe K, and Karagogeos D. 2005. The adhesion molecule TAG1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla, but not of cortical interneurons. *Dev Biol.* 288(1):87-99

Denaxa M., Chan C.H., Schachner M., Parnavelas J.G., Karagogeos D. 2001. The adhesion molecule TAG1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128:4635-4644

Durbec P., Gennarini G., Goridis C., Rougon G. 1992. A soluble form of the F3 neuronal cell adhesion molecule promotes neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 117(4):877-887

Felsenfeld DP, Hynes MA, Skoler KM, Furley AJ, and Jessel TM. 1994. TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and $\beta 1$ integrins. *Neuron* 12 (3):675-690

Fitzli D, Stoeckli ET, Kunz S, Siribour K, Rader C, Kunz B, Kozlov SV, Buchstaller A, Lane RP, Suter DM, Dreyer WJ, and Sonderegger P. 2000. A direct interaction of axonin1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM), results in guidance, but not growth of commissural axons. *J of Cell Biol.* 149 (4):951-968

Fucamauchi F, Aihara O, Wang YJ, Akasaka K, Takeda Y, Horie M, Kawano H, Sudo K, Asano M, Watanabe K, and Iwakura Y. 2001. TAG1 deficient mice have marked elevation of adenoside A1 receptors in the hippocampus. *Biochemical and Biophysical Rec. Com.* 281:220-226

Furley AJ, Morton SB, Manalo D, Karagogeos D, Dodd J, and Jessel TM. 1990. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite-outgrowth promoting activity. *Cell* 61:157-170

Gonzalez-Amaro R. and Sanchez-Madrid F., 1999. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.* 19(5-6):389-429

Gumbiner B.M. 2000. Regulation of Cadherin adhesive activity. *J of Cell Biol* 148(3):399-403

Hynes R.O. and Zhao Q. 2000. The evolution of cell adhesion. *J of Cell Biol.* 150(2):F89-96

Inaki K, Nishimura S, Toshiaki N, Itohara S, and Yoshihara Y. 2004. Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules. *J of Comp Neurol.* 479:243-256

Kamei Y, Takeda Y, Teramoto K, Tsutsumi O, Taketani Y and Watanabe K. 2000. Human NB-2 of the contactin subgroup molecules: chromosomal localization of the gene (CNTN5) and distinct expression pattern from other subgroup members. *Genomics* 69:113-119

Karagogeos D, Morton SB, Casano F, Dodd J, and Jessel TM. 1991. Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: Differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development* 112:51-67

Karagogeos D. 2003. Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Frontiers in Bioscience* 8:1304-1320

Kasahara K., Watanabe K, Takeuchi K., Kaneko H., Oohira A., Yamamoto T., Sanai Y. 2000. Involvement of gangliosides in glycosphosphatidylinositol-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG1 signaling in lipid rafts. *The journal of biological chemistry* 275(44):34701-34709

Kasahara K., Watanabe Y., Yamamoto T., Sanai Y. 1997. Association of Src family tyrosine kinase Lyn with ganglioside GD3 in rat brain. *The journal of biological chemistry* 272(47):29947-29953

Kozlov SV, Giger Rj, Hasler T, Karwatska A, Schorderet DM, and Sonderegger P. 1995. The human TAX1 gene encoding the axon- associated cell adhesion molecule TAG1/ axonin1: genomic structure and basic promoter. *Genomics* 30:141-148

Krepkiy D., Wong K., Gawrisch K., Yeliseev A. 2006. Bacterial expression of functional biotinylated peripheral cannabinoid receptor CB2. *Protein expression and purification* 49:60-70

Kuhn T.B., Stoeckli E.T., Condrau M.A., Rathjen F.G., Sonderegger P. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1 (G4). *J of Cell Biol.* 115(4):1113-1126

Kulman J.D., Satake M., Harris J.E. 2007. A versatile system for site-specific enzymatic biotinylation and regulated expression of proteins in cultured mammalian cells. *Protein expression and purification* 52:320-328

- Kunz S, Spirig M, Ginsburg C, Buchstaller A, Berger P, Lanz A, Pader C, Vogt L, Kunz B, and Sonderegger P. 1998. Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin1 and Ng cell adhesion molecule. *J of Cell Biol.* 143 (6):1673-1690
- Kyriakopoulou K, Diego I, Wassef M, and Karagogeos D. 2002. A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG1 in the caudal medulla. *Development* 129:287-296
- Loberto N., Prioni S., Prinetti A., Ottico E., Chigorno V., Karagogeos D., Sonnino S. 2003. The adhesion protein TAG1 has a ganglioside environment in the sphingolipid-enriched membrane domains of neuronal cells in culture. *Journal of neurochemistry* 85:224-233
- Maness P.F. and Schachner M. 2007. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signalling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature Neuroscience* 10(1):19-26
- Maziade M., Raymond V., Cliché D., Fournier J.P., Caron C., Garneau Y., Nicole L., Marcotte P., Couture C., Simard C., Boivin R., Rodrigue C., Boutin P., De Braekeleer M., Martinez M., and Menette C. 1995. Linkage results on 11q21-22 in Eastern Quebec pedigrees densely affected by schizophrenia. *Am J Med Genet.* 60:522-528
- Milev P, Maurel P, Haring M, Margolis RK, and Margolis RU. 1996. TAG1/axonin1 is a high affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphates ζ/β and NCAM. *The J of Biol Chemistry.* 271(26):15716-15723
- Pavlou O, Theodorakis K, Falk J, Kutsche M, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, and Karagogeos D. 2002. Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol Cel Neuroscience* 20:367-381
- Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, Stewards CL, Xu X, Chiu SY, Shrager P, Furley AJW, and Peles E. 2003. Juxtaparanodal clustering of

shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG1. *J of Cell Biol.* 162 (6):1149-1160

Prinetti A., Prioni S., Chigorno V., Karagogeos D., Tettamanti G., Sonnino S. 2001. Immunoseparation of sphingolipid-enriched membrane domains enriched in Src family protein tyrosine kinases and in the neuronal cell adhesion molecule TAG-1 by anti-GD3 ganglioside monoclonal antibody. *Journal of neurochemistry* 78:1162-1167

Prioni S., Mauri L., Loberto N., Casellato R., Chigorno V., Karagogeos D., Prinetti A., Sonnino S. 2004. Interactions between gangliosides and proteins of the exoplasmic leaflet of neuronal plasma membranes: a study performed with a tritium-labeled GM1 derivative containing a photoactivable group linked to the oligosaccharide chain. *Glycoconjugate journal* 21:461-470

Rickman DS, Tyagi R, Zhu XX, Bobek MP, Song S, Blaivas M, Misek DE, Israel MA, Kurnit DM, Ross DA, Kish PE, Hanash SM. 2001. The gene of the axonal cell adhesion molecule TAX1 is amplified and aberrantly expressed in malignant gliomas. *Cancer Res.* 61:2162-2168

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 74(12):5463-5467

Saridaki A and Panayotou G. 2005. Identification of growth factor regulated proteins using 2D electrophoresis and mass spectrometry. *Growth factors* 23(3):223-232

Silverstein J.J. and Silverstein RL. 1998. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest.* 16(3):176-182

Suter DM, Pollerberg GE, Buchstaller A, Giger RJ, Dreyer WJ, and Sonderegger P. 1995. Binding between the neural cell adhesion molecules axonin1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J of Cell Biol.* 131 (4):1067-1081

Traka M, Dupree JL, Pupko B, and Karagogeos D. 2002. The neuronal adhesion protein TAG1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to

the juxtaparanodal region of the myelinated fibers. *J of Neuroscience* 22 (8):3018-3024

Traka M, Gouterbroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fucamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, and Karagogeos D. 2003. Association of TAG1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J of Cell Biol.* 162 (6):1161-1172

Trougakos P.I., Saridaki A., Panayotou G., Gonos E.S. 2006. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mechanisms of ageing and development* 127:88-92

Walsh F.S. and Doherty P. 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:425-456

Williams A.F. and Barclay A.N. 1988. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol.* 6:381-405

Wolfer DP, Giger RJ, Stagliar M, Sonderegger P, and Lipp HP. 1997. Expression of the axon growth-related neural adhesion molecule TAG1/ axonin1 in the adult mouse brain. *Anat Embryol.* 197:177-185

Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Nagata S, Kagamiyama H, and Mori K. 1995. Overlapping and differential expression of BIG2, BIG1, TAG1 and F3: four members of an axon associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J. of Neurobiol.* 28 (1):51-69

Yoshihara Y., Kawasaki M, Tani A., Tamada A., Nagata S., Kagamiyama H., and Mori K. 1994. BIG-1: a new TAG1/F3- related member of the immunoglobulin superfamily with neurite outgrowth- promoting activity. *Neuron* 13:415-426