

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

Τμήμα Βιολογίας

Τμήμα Ιατρικής

**Ανάπτυξη και αξιολόγηση
υπολογιστικών μεθόδων ανίχνευσης
πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων**

Μεταπτυχιακή Εργασία

Επιβλέποντες καθηγητές :

Τζαμαρίας Δημήτριος

Ηλιόπουλος Ιωάννης

ΜΑΞΟΥΡΗ ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΑΜ:305
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

Πίνακας Περιεχομένων

Abstract	3
Περίληψη.....	4
Εισαγωγή	5
Πρωτεϊνικές Αλληλεπιδράσεις	5
Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.....	6
Πειραματικές προσεγγίσεις	6
Υπολογιστικές προσεγγίσεις	10
Σκοπός	14
Υλικά και Μέθοδοι	15
Πρόβλεψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βάσει των περιστατικών σύντηξης (fusion events)	15
UniReD: Πρόβλεψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βάσει της βιβλιογραφίας.....	16
Διάρρηξη γονιδίων και σήμανση πρωτεϊνών στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Ενίσχυση κασέτας μεταλλαξιγένεσης με PCR	17
Ενίσχυση επιτόπων PCR για σήμανση πρωτεϊνών	18
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	19
Μετασηματισμός κυττάρων <i>S. cerevisiae</i>	19
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε μεμονωμένες αποικίες (colony PCR)	20
Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.....	21
Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης	21
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	22
Ανοσοαποτύπωση κατά Western	23
Αποτελέσματα	25
Ανίχνευση αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Gcn5p και Zwf1p	26
Κατασκευή μονών μεταλλαγμάτων	26
Κατασκευή διπλών μεταλλαγμάτων	29
Παρατήρηση φαινοτύπων των στελεχών FT5, <i>gcn5Δ</i> , <i>zwf1Δ</i> , <i>gcn5Δ/zwf1Δ</i>	31
Μέτρηση επιπέδων έκφρασης <i>zwf1</i>	32
Ανίχνευση αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Gcn5p και Kin28p	33

Κατασκευή στελέχους <i>gcn5-HA/ kin28-Myc</i>	33
Συζήτηση	36
Ανάπτυξη και αξιολόγηση αλγορίθμου	36
Πειραματική αξιολόγηση UniReD	36
Αλληλεπίδραση μεταξύ Gcn5p και Zwf1p	36
Αλληλεπίδραση μεταξύ Gcn5p και Kin28p	37
Επίλογος	38
Παράρτημα.....	39
Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια.....	42
Θρεπτικά Υλικά.....	44
Βιβλιογραφία	45

Abstract

The recent advantages of high throughput technologies, in combination with the availability of fully sequenced genomes, have led to large-scale studies of maps toward the deeper understanding of the interactome of an organism. Interactome mapping scan stands as a powerful tool since information about the function of uncharacterized proteins or interacting domains aids experimentalists to design more targeted experiments. Since large-scale studies for protein-protein interaction (PPI) detection are not always applicable, there has been an effort to develop computational methods for predicting PPIs. These methods exploit either the available genomic or molecular data, or the available literature to extract information about PPIs. The aim of this project is the experimental evaluation of an existing computational approach for extracting PPIs from biomedical literature and the development of an additional approach for extracting PPIs from genomic data, in this case fusion events. The development of such tools will assist end-users in tackling the complexity of understanding molecular relationships in living systems.

Περίληψη

Οι πρόσφατες πρόοδοι των τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, σε συνδυασμό με τις διαθέσιμες πλήρεις αλληλουχίσεις γονιδιωμάτων, οδήγησαν σε μεγάλης κλίμακας μελέτες χαρτών με στόχο την βαθύτερη κατανόηση του ιντερακτόματος των οργανισμών. Η χαρτογράφηση του ιντερακτόματος αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, καθώς η πληροφορία για την λειτουργία μη χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών ή περιοχών αλληλεπίδρασης βοηθά τους ερευνητές στο σχεδιασμό πιο στοχευμένων πειραμάτων. Εφόσον οι υψηλής απόδοσης πειραματικές διαδικασίες για την μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων δεν είναι πάντοτε εφαρμόσιμες, γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης υπολογιστικών μεθόδων για την πρόβλεψή τους. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν είτε τα διαθέσιμα γενωμικά ή μοριακά δεδομένα, είτε την υπάρχουσα επιστημονική βιβλιογραφία ώστε να εξαγουν πληροφορίες για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι πειραματική αξιολόγηση μιας υπάρχουσας υπολογιστικής μεθόδου πρόβλεψης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από την βιοϊατρική βιβλιογραφία, καθώς και την ανάπτυξη μια επιπρόσθετης υπολογιστικής προσέγγισης πρόβλεψης αλληλεπιδράσεων διαμέσου των γενωμικών δεδομένων και συγκεκριμένα μέσω γεγονότων σύντηξης γονιδίων. Η ανάπτυξη τέτοιων εργαλείων θα βοηθήσει τους ερευνητές-χρήστες στο να ανταπεξέλθουν στην πολυπλοκότητα της κατανόησης των μοριακών σχέσεων στους ζωντανούς οργανισμούς.

Εισαγωγή

Πρωτεϊνικές Αλληλεπιδράσεις

Οι πρωτεΐνες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της ξηρής μάζας ενός κυττάρου και επιτελούν μια τεράστια ποικιλία λειτουργιών όπως για παράδειγμα μεταβολικές αντιδράσεις, μεταγωγή σημάτων και απόκριση σε αυτά, αντιγραφή και μεταγραφή του DNA. Ωστόσο οι πρωτεΐνες δεν λειτουργούν μόνες τους. Αντιθέτως, αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες δημιουργώντας πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που ονομάζονται μοριακές μηχανές [1]. Τα σύμπλοκα αυτά είναι δυναμικές οντότητες των οποίων η συγκρότηση ελέγχεται από διάφορους παράγοντες όπως για παράδειγμα εξωκυττάρια σήματα.

Οι ιδιότητες των πρωτεϊνικών συμπλόκων καθορίζονται περισσότερο από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, παρά από τα μεμονωμένα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σύμπλοκο [2]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η RNA πολυμεράση II που πραγματοποιεί τη σύνθεση όλων των mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η πρόσδεση επιπλέον μεταγραφικών παραγόντων στην RNA πολυμεράση II είναι αυτή που ελέγχει την έναρξη, την επιμήκυνση ή τον τερματισμό της μεταγραφής [3].

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών μπορεί να είναι άμεσες, δηλαδή οι πρωτεΐνες να έρχονται σε άμεση επαφή μεταξύ τους ή έμμεσες κατά τις οποίες οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τη συμμετοχή κάποιου ενδιάμεσου μορίου [4].

Ο πλήρης χάρτης των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν σε ένα ζωντανό κύτταρο ονομάζεται ιντεράκτομα (interactome). Η χαρτογράφηση του ιντερακτόματος αποτελεί πλέον κύριο στόχο της βιολογικής έρευνας, καθώς ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων είναι απαραίτητος για την κατανόηση των λειτουργιών μη χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών, των χαρακτηριστικών και του ρόλου των μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων, καθώς και τον ρόλο μεμονωμένων μορίων στα μονοπάτια που συμμετέχουν.

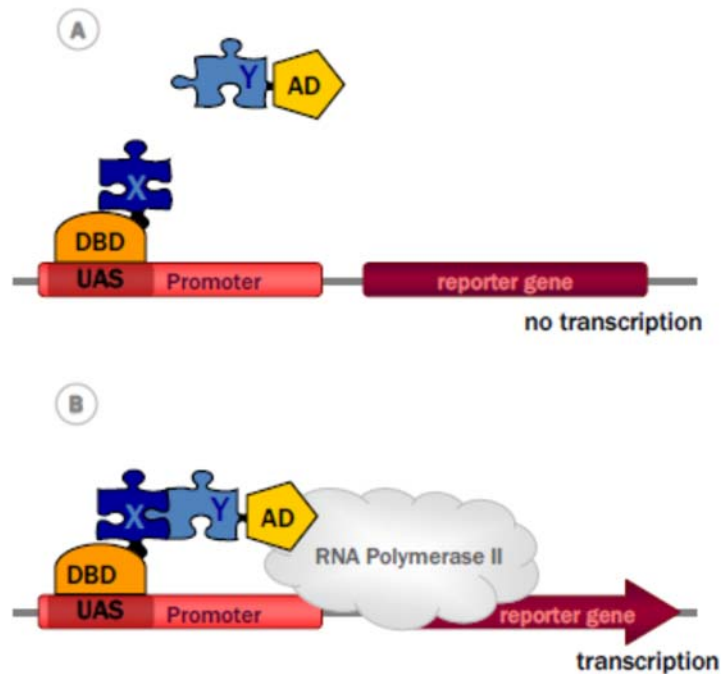
Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

Πειραματικές προσεγγίσεις

Για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από υψηλής απόδοσης τεχνικές (high throughput), όπως για παράδειγμα το σύστημα δυο υβριδίων στο ζυμομύκητα (yeast two hybrid-Y2H) [5], οι πρωτεϊνικές συστοιχίες (protein arrays) [6], η ανοσοκατακρήμνιση ή ο καθαρισμός με διαδοχική χρωματογραφία συγγένειας (Tandem Affinity Purification) και η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry) [7, 8]. Ωστόσο οι τεχνικές αυτές εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα όπως υψηλό κόστος, χαμηλή ακρίβεια και υψηλό ποσοστό ψευδώς αληθών αποτελεσμάτων[9]. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί διαφοροποιήσεις σε αποτελέσματα που προέκυψαν από διαφορετικά πειράματα υψηλής απόδοσης [10]. Τέλος, οι τεχνικές αδυνατούν να κατανοήσουν και να απεικονίσουν τη δυναμικότητα των πολύπλοκων συστημάτων στο χρόνο, διότι τα πειράματα γίνονται σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία του κυτταρικού κύκλου.

Σύστημα δυο υβριδίων στο ζυμομύκητα

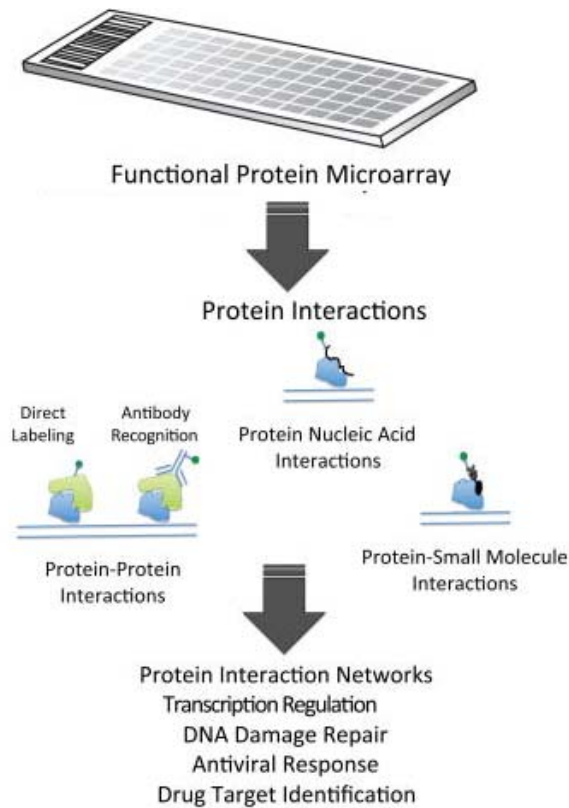
Το σύστημα δυο υβριδίων αποτελεί μια γενετική μέθοδο που χρησιμοποιεί την μεταγραφική ενεργότητα ως μέτρο πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης. Βασίζεται στην ύπαρξη μεταγραφικών παραγόντων που αποτελούνται από δύο διακριτές επικράτειες: μια επικράτεια πρόσδεσης στο DNA και μια επικράτεια ενεργοποίησης την μεταγραφής. Οι επικράτειες αυτές θα πρέπει να έρθουν σε επαφή έτσι ώστε να ξεκινήσει η μεταγραφή του εκάστοτε γονιδίου. Για την ανίχνευση αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών X και Y απαιτείται η δημιουργία δύο υβριδικών πρωτεϊνών και συγκεκριμένα μια επικράτεια πρόσδεσης στο DNA θα πρέπει να συντηχθεί με την X και μια επικράτεια ενεργοποίησης με την Y πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες αυτές θα πρέπει στη συνέχεια να εκφραστούν σε κύτταρα που περιέχουν τουλάχιστον ένα γονίδιο αναφοράς. Αν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, τότε οι δύο επικράτειες του μεταγραφικού παράγοντα θα έρθουν σε επαφή πυροδοτώντας έτσι τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς [11] (Εικόνα 1).



Εικόνα 1 Σύστημα δύο υβριδίων. Η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain – DBD) αναγνωρίζει το στοιχείο UAS ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου αναφοράς (reporter gene). A) Στην περίπτωση που οι πρωτεΐνες X και Y δεν αλληλεπιδρούν η επικράτεια ενεργοποίησης (Activation Domain - AD) δεν έρχεται σε επαφή με την επικράτεια πρόσδεσης. B) Αν οι πρωτεΐνες X και Y αλληλεπιδρούν, οι επικράτειες πρόσδεσης και ενεργοποίησης έρχονται έμμεσα σε επαφή ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς [11].

Πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες

Η τεχνολογία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων σε ένα μόνο πείραμα. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες θέσης ενός πλακιδίου (chip) και στη συνέχεια την έκθεση του πλακιδίου αυτού σε δείγματα που περιέχουν άλλα μόρια όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες. Η ανίχνευση αλληλεπιδράσεων γίνεται μέσω ανίχνευση φθορισμού, χημειοφωταύγειας κλπ. [12, 13] (Εικόνα 2). Ένα από τα πρώτα συστήματα πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών που κατασκευάστηκε περιείχε πάνω από 5.800 πρωτεΐνες του *Saccharomyces cerevisiae*, περίπου δηλαδή το 85% του συνολικού του πρωτεώματος και χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στον οργανισμό αυτό [6].



Εικόνα 2 Πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες για τη μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η ανίχνευση αλληλεπιδράσεων γίνεται με χρήση φθορίζουσών πρωτεϊνών ή σημασμένων φθοριζόντων αντισωμάτων[14].

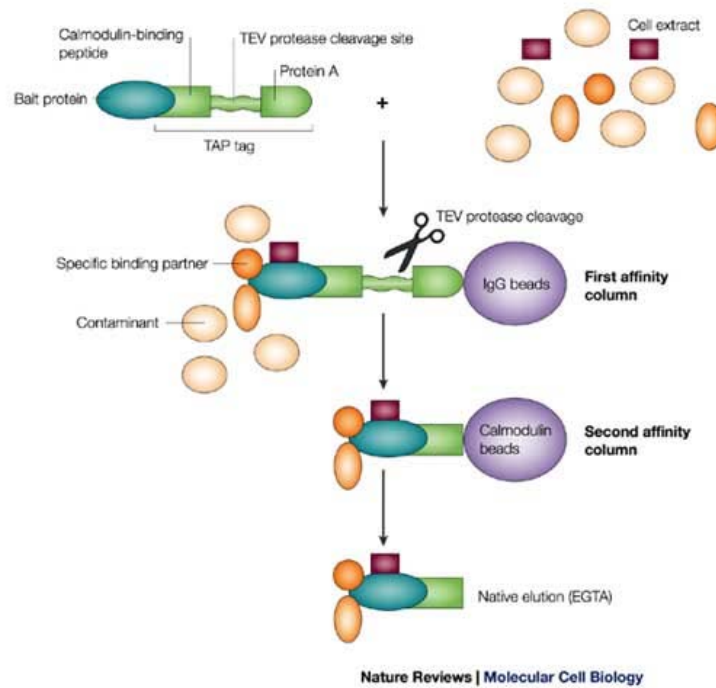
Καθαρισμός με διαδοχική χρωματογραφία συγγένειας και Φασματομετρία μάζας

Μια ακόμα τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων είναι ο καθαρισμός με διαδοχική χρωματογραφία συγγένειας (Tandem Affinity Purification - TAP) και στη συνέχεια η ταυτοποίηση των απομονωμένων συμπλόκων με φασματομετρία μάζας [8, 15].

Για την απομόνωση του πρωτεϊνικού συμπλόκου στο οποίο συμμετέχει μια υπό μελέτη πρωτεΐνη, απαιτείται η σύντηξη της πρωτεΐνης αυτής με ένα σήμα αποτελούμενο από τρία κύρια στοιχεία: ένα πεπτίδιο που προσδένει καλμοδουλίνη, μια αλληλουχία αναγνώρισης της πρωτεάσης TEV (Tobacco Etch Virus) και ένα τμήμα της πρωτεΐνης A του *Staphylococcus aureus* το οποίο αναγνωρίζει IgG αντισώματα.

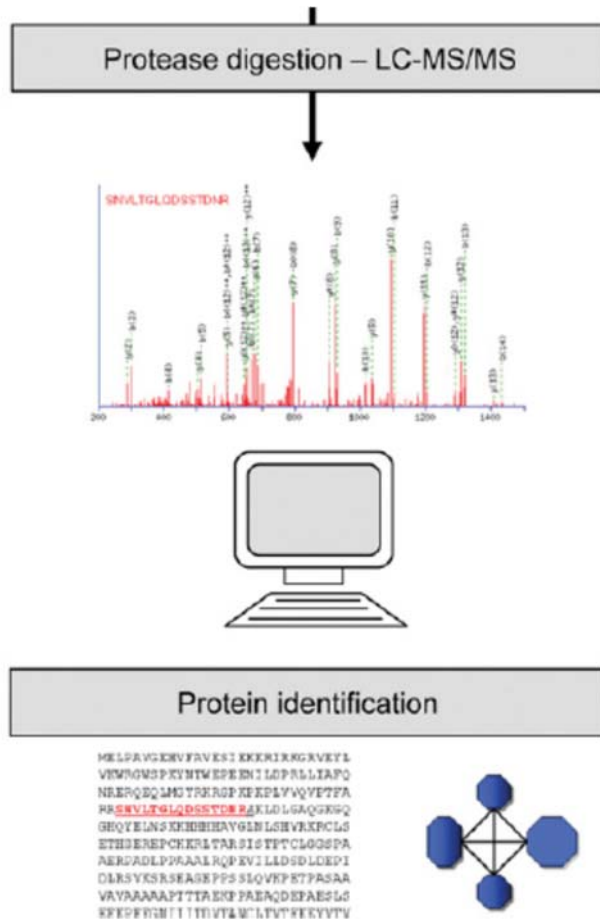
Οι σημασμένες πρωτεΐνες καθώς και οι πρωτεΐνες που δημιουργούν σύμπλοκα με αυτές, αρχικά απομονώνονται με τη χρήση μιας στήλης που αποτελείται από σφαιρίδια με αντισώμα IgG. Στη συνέχεια η TEV πρωτεάση κόβει την πρώτη περιοχή του σήματος

απελευθερώνοντας τα σύμπλοκα από τη σήλη. Η δεύτερη απομόνωση γίνεται με σήλη αποτελούμενη από σφαιρίδια καλμοδουλίνης [15] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 Καθαρισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων με διαδοχική χρωματογραφία συγγένειας. Οι σημασμένες πρωτεΐνες αρχικά απομονώνονται με τη χρήση σφαιριδίων που περιέχουν IgG. Στη συνέχεια, η απελευθέρωση των συμπλόκων γίνεται με την πρωτεάση TEV και ακολουθεί ο δεύτερος καθαρισμός με σφαιρίδια καλμοδουλίνης. Η τελική έκλυση των συμπλόκων γίνεται με την απομάκρυνση ιόντων ασβεστίου με τη χρήση EGTA[16].

Μετά την απομόνωση, τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα πέπτονται σε μικρότερα πεπτίδια και ταυτοποιούνται με φασματομετρία μάζας (Εικόνα 4). Ο φασματογράφος μετράει την αναλογία μάζα/φορτίο ενώ οι πληροφορίες για την πεπτιδική αλληλουχία και το μέγεθος των πεπτιδίων προκύπτει έπειτα από σύγκριση με φάσματα άλλων πρωτεϊνών [15].



Εικόνα 4 Ταυτοποίηση πρωτεϊνικών συμπλόκων με φασματομετρία μάζας. Τα απομονωμένα σύμπλοκα πέπτονται σε μικρότερα πεπτίδια και ο φασματογράφος υπολογίζει την αναλογία μάζα/φορτίο. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται μέσω σύγκρισης των φασμάτων που προκύπτουν με θεωρητικά φάσματα πρωτεϊνών[15].

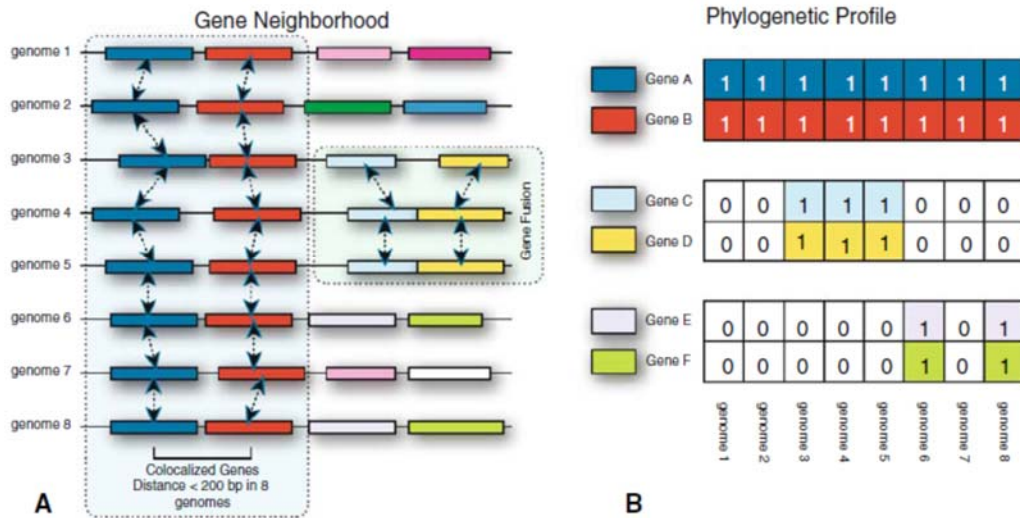
Υπολογιστικές προσεγγίσεις

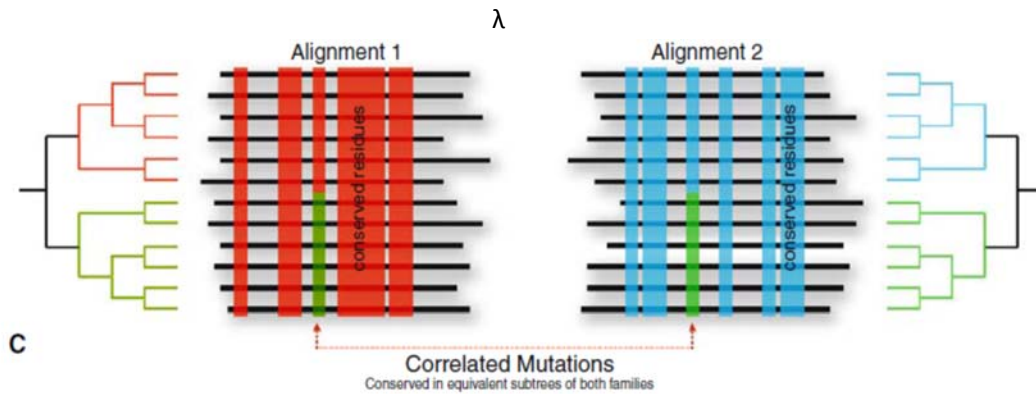
Παράλληλα με τις πειραματικές προσεγγίσεις έχει αναπτυχθεί μια σειρά υπολογιστικών μεθόδων που αξιοποιούν είτε μοριακά και γενωμικά δεδομένα είτε την διαθέσιμη βιβλιογραφία για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε μεγάλη κλίμακα. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε μοριακά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιούν είτε δομικές είτε γενωμικές πληροφορίες. Τα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται για να καθοριστούν οι επιφάνειες που αλληλεπιδρούν. Η μέθοδος αυτή ωστόσο, είναι

εφαρμόσιμη σε ένα μικρό μόνο αριθμό πρωτεϊνών των οποίων η τρισδιάστατη δομή υπάρχει διαθέσιμη στην Protein Databank (PDB)[17].

Αξιοποίηση γενωμικών δεδομένων

Οι γενωμικές πληροφορίες που χρησιμοποιούνται από αλγόριθμους για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνουν την ανίχνευση συνεντοπισμού (co-localization ή gene neighborhood), φυλογενετικών προφίλ, περιστατικών σύντηξης γονιδίων (fusion events) και συμπληρωματικών μεταλλάξεων (in-silico σύστημα δύο υβριδίων – in silico two hybrid). Οι αλγόριθμοι αυτοί βασίζονται στην παρατήρηση ότι ζεύγη πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν άμεσα ή σχετίζονται λειτουργικά, συχνά τείνουν να βρίσκονται σε γειτονικές περιοχές του γονιδιώματος διαφόρων οργανισμών, να συμμετέχουν σε γεγονότα σύντηξης, καθώς επίσης και να συνεμφανίζονται σε διαφορετικούς οργανισμούς. Επιπλέον, η μέθοδος in silico two hybrid βασίζεται στο γεγονός ότι μια μετάλλαξη που συμβαίνει σε μια πρωτεΐνη και επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με μια άλλη, θα ακολουθηθεί από μια δεύτερη συμπληρωματική μετάλλαξη στην δεύτερη πρωτεΐνη έτσι ώστε να διατηρηθεί η αλληλεπίδραση.





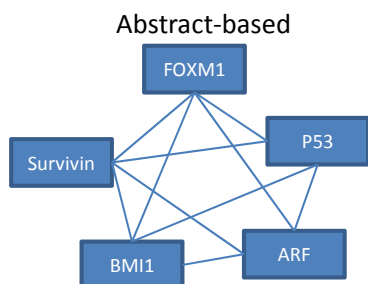
Εικόνα 5 Μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βασιζόμενες σε γενωμικά δεδομένα. (Α) Δυο πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν (κόκκινο και μπλε) βρίσκονται σε γειτονικές περιοχές σε οκτώ διαφορετικά γονιδιώματα. Υποπερίπτωση συνεντοπισμού αποτελεί και η σύντηξη γονιδίων (κίτρινο και ανοιχτό μπλε) (Β) Μελέτη των φυλογενετικών προφίλ για τα ίδια γονίδια. Τα γονίδια αυτά έχουν ίδια πρότυπα συνεντοπισμού και στα οκτώ γονιδιώματα. (C) Στοίχιση δύο πρωτεϊνικών οικογενειών. Με μπλε και κόκκινο φαίνονται οι συντηρημένες περιοχές των πρωτεϊνών αυτών. Η ύπαρξη μεταλλάξεων (πράσινο) στις ίδιες περιοχές ενός υποσυνόλου των οικογενειών υποδηλώνει ότι οι περιοχές αυτές συνιστούν την επιφάνεια αλληλεπίδρασης[18].

Αξιοποίηση βιβλιογραφίας

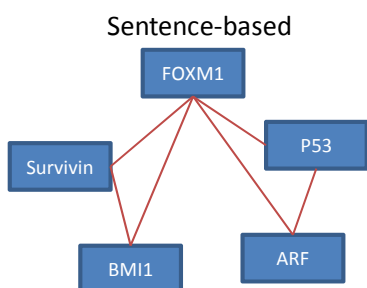
Η αύξηση της διαθέσιμης μέσω διαδικτύου βιβλιογραφίας κατέστησε δυνατή την ανάπτυξη επιπλέον υπολογιστικών εργαλείων για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η ανίχνευση αυτή μπορεί να γίνει με σημασιολογική ανάλυση (semantic analysis) των κειμένων ή με ανάλυση συνεμφάνισης (co-occurrence analysis). Κατά την ανάλυση συνεμφάνισης δημιουργούνται συσχετίσεις μεταξύ βιολογικών όρων που εμφανίζονται μαζί είτε σε προτάσεις είτε σε ολόκληρα κείμενα (συνήθως περιλήψεις των άρθρων) ή χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο κοινών όρων. Αντιθέτως, η σημασιολογική ανάλυση περιλαμβάνει βαθύτερη ανάλυση των κειμένων, τόσο εννοιολογική όσο και συντακτική και το αποτέλεσμα είναι η συσχέτιση των βιολογικών όρων αλλά και ο χαρακτηρισμός της συσχέτισης αυτής (Εικόνα 6) [19].

Abstract

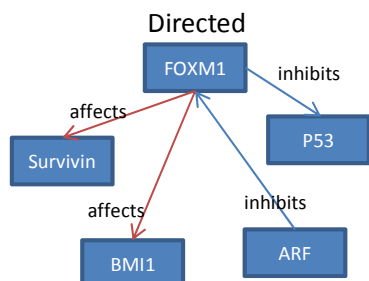
The forkhead box transcription factor **FOXM1** is considered to be a promising target for cancer therapy. However, the significance of **FOXM1** in tumors harboring mutation in **p53**, which is very common, is unclear. In this study, we investigated the efficacy of **FoxM1**-targeting in spontaneous **p53**-null tumors using genetic ablation as well as using a peptide-inhibitor of **FOXM1**. We show that conditional deletion of **FoxM1** inhibits growth of the **p53** null thymic lymphoma and sarcoma cells. In addition, deletion of **FoxM1** induces apoptotic cell death of the **p53** null tumors, accompanied by reduced expression of the **FOXM1** target genes **Survivin** and **Bmi1**. An **ARF**-derived peptide that inhibits the activity of **FOXM1**, by targeting it to the nucleolus, also induces apoptosis in the **p53** null sarcoma and lymphoma, leading to a strong inhibition of their metastatic colonization. Together, our observations suggest that **FOXM1** is critical for survival and growth of the **p53**-null lymphoma and sarcoma, and provide proof-of-principle that **FOXM1** is an effective therapeutic target for sarcoma and lymphoma carrying loss of function mutation in **p53**. PMID:23427295



	FOXM1	P53	ARF	BMI1	Survivin
FOXM1	1	1	1	1	1
P53	1	1	1	1	1
ARF	1	1	1	1	1
BMI1	1	1	1	1	1
Survivin	1	1	1	1	1



	FOXM1	P53	ARF	BMI1	Survivin
FOXM1	1	1	1	1	1
P53	1	1	1	0	0
ARF	1	1	1	0	0
BMI1	1	0	0	1	1
Survivin	1	0	0	1	1



	FOXM1	P53	ARF	BMI1	Survivin
FOXM1	1	1	0	1	1
P53	0	1	0	0	0
ARF	1	0	1	0	0
BMI1	0	0	0	1	0
Survivin	0	0	0	0	1

Εικόνα 6 Ανίχνευση συσχετίσεων με ανάλυση κειμένων. Α) Περίληψη άρθρου από την PubMed στο οποίο έχουν ανιχνευτεί (μπλε) τα ονόματα των πρωτεϊνών. Β) Ανίχνευση συσχετίσεων με ανάλυση συνεμφάνισης σε ολόκληρη την περίληψη. Στην περίπτωση αυτή όλες οι πρωτεΐνες που αναφέρονται στο κείμενο σχετίζονται μεταξύ τους. Γ) Ανίχνευση συσχετίσεων με ανάλυση συνεμφάνισης σε ξεχωριστές προτάσεις. Μόνο τα ζεύγη πρωτεϊνών που εμφανίζονται στην ίδια πρόταση ανιχνεύονται. Δ) Ανίχνευση συσχετίσεων με σημασιολογική ανάλυση. Η ανάλυση ανιχνεύει επιπλέον το είδος και την κατεύθυνση της αλληλεπίδρασης[19].

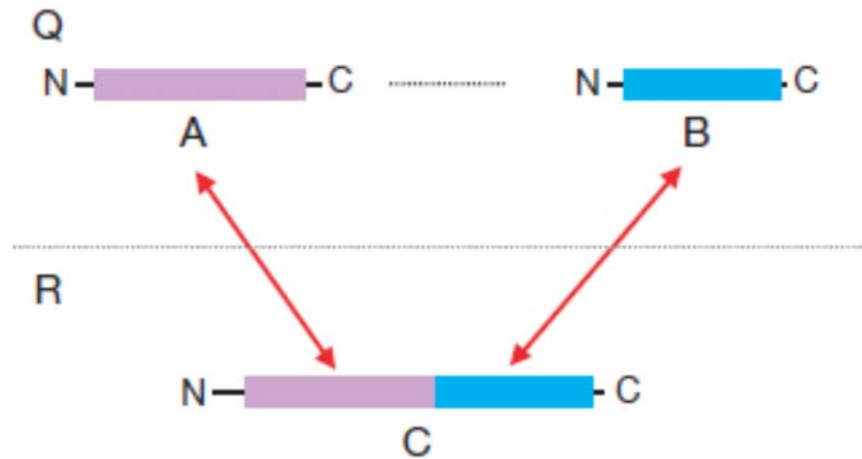
Σκοπός

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι η πειραματική αξιολόγηση μιας υπάρχουσας υπολογιστικής μεθόδου πρόβλεψης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία (UniReD), καθώς και η ανάπτυξη ενός νέου αλγορίθμου βασισμένου σε γενωμικά δεδομένα και συγκεκριμένα στην ανίχνευση συντηγμένων γονιδίων (*fused genes*). Αρχικά οι υπολογιστικές μέθοδοι θα χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη νέων αλληλεπιδράσεων για την πρωτεΐνη Gcn5p του *Saccharomyces cerevisiae*. Στη συνέχεια, οι προβλεπόμενες αλληλεπιδράσεις θα επιβεβαιωθούν πειραματικά.

Υλικά και Μέθοδοι

Πρόβλεψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βάσει των περιστατικών σύντηξης (fusion events)

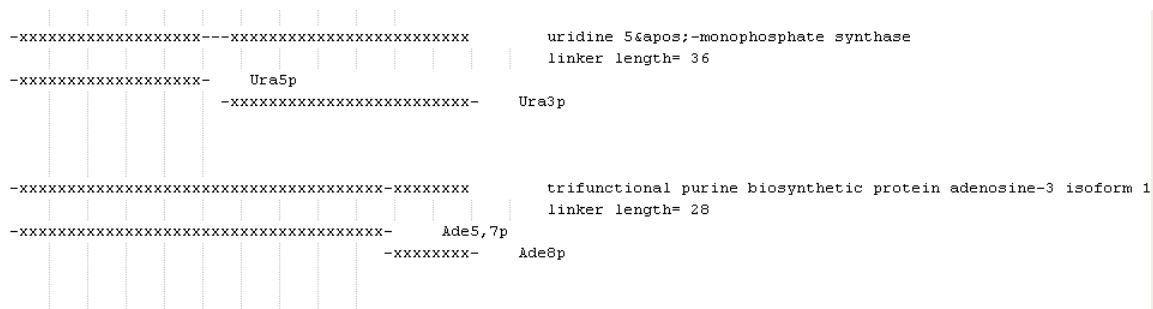
Η κινητήρια δύναμη για τη δημιουργία συντηγμένων γονιδίων είναι η ρύθμιση του ρυθμιστικού φορτίου για πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν. Έτσι λοιπόν η ανίχνευση περιστατικών σύντηξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί από υπολογιστικές μεθόδους για την πρόβλεψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 7 Συντηγμένες πρωτεΐνες σε ένα γονιδίωμα αναφορά (reference genome (R)) ανιχνεύονται αναζητώντας μη συντηγμένες πρωτεΐνες σε έναν υπό μελέτη οργανισμό που να είναι ομόλογες με την πρωτεΐνη αναφοράς αλλά όχι μεταξύ τους [20].

Ο αλγόριθμος που δημιουργήθηκε ανιχνεύει συντηγμένες πρωτεΐνες μέσα από την σύγκριση ζευγών γονιδιωμάτων. Η σύγκριση αυτή γίνεται με τη χρήση BLASTp για τη στοίχιση πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Για τη χρήση του αλγορίθμου απαιτείται το κατέβασμα των πρωτεϊνικών αλληλουχιών δύο οργανισμών σε μορφή fasta. Στη συνέχεια ο αλγόριθμος κάνει masking στις αλληλουχίες αυτές ώστε να αποκλείσει περιοχές χαμηλής πολυπλοκότητας που θα έδιναν ψευδώς θετικές στοίχισεις. Ακολουθεί η στοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών μεταξύ των δύο οργανισμών και φιλτράρισμα των αποτελεσμάτων προκειμένου να αποκλειστούν περιοχές όπως το WD40 που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της στοίχισης. Ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί το BLAST με προεπιλεγμένο $evalue=10^{-6}$, ωστόσο υπάρχει δυνατότητα αλλαγής. Η ανίχνευση των συντηγμένων πρωτεϊνών στη συνέχεια πραγματοποιείται αναζητώντας τουλάχιστον δύο μη συντηγμένες πρωτεΐνες σε έναν οργανισμό (query) που να είναι ομόλογες με μια πρωτεΐνη ενός άλλου οργανισμού αναφοράς (reference), αλλά στοιχίζονται σε διαφορετικές μη επικαλυπτόμενες περιοχές της πρωτεΐνης αυτής. Στο στάδιο αυτό υπάρχει η δυνατότητα αποκλεισμού αποτελεσμάτων όπου οι περιοχές στοίχισης καλύπτουν μικρό ποσοστό του συνολικού μήκους των πρωτεϊνών. Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας το ποσοστό αυτό ορίστηκε στο 70%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ένα αρχείο κειμένου με τη μορφή στοίχισεων. Επιπλέον αναφέρονται τα ονόματα των πρωτεϊνών που αναπαριστώνται, οι

περιοχές που στοιχίζονται και το μέγεθος των συνδετικών περιοχών (linkers) την συντηγμένης πρωτεΐνης.



Εικόνα 8 Παραδείγματα στοιχίσις όπως προκύπτει από τον αλγόριθμο. Στην πάνω σειρά κάθε παραδείγματος βρίσκεται η συντηγμένη πρωτεΐνη του οργανισμού αναφορά (*Homo sapiens* συγκεκριμένα). Από κάτω βρίσκονται οι πρωτεΐνες του οργανισμού που μας ενδιαφέρει (*Saccharomyces cerevisiae*).

UniReD: Πρόβλεψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βάσει της βιβλιογραφίας

Το UniReD (UniProt Related Documents) εκμεταλλεύεται τη διαθέσιμη επιστημονική βιβλιογραφία για την πρόβλεψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Τα βήματα που πραγματοποιεί είναι τα εξής:

1. Κατεβάζει αυτόματα από τη UniProt όλες τις καταγραφές που αναφέρονται στον οργανισμό που μας ενδιαφέρει.
2. Συλλέγει τα άρθρα της PubMed που αντιστοιχούν στις συγκεκριμένες καταγραφές της UniProt.
3. Για κάθε ένα από τα άρθρα, προσθέτει επιπλέον τα «related articles» από την PubMed.
4. Τα άρθρα κατηγοριοποιούνται σε ομάδες.
5. Τα ομαδοποιημένα άρθρα αντιστοιχίζονται πάλι στις καταγραφές της UniProt.
6. Οι ομάδες των άρθρων κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το GS2 score το οποίο αποτελεί μέτρο ομοιότητας των στοιχείων μιας ομάδας με βάση τα Gene Ontologies [21].

Σε γενικές γραμμές λοιπόν, τα UniProtIDs θα κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τον αριθμό των κοινών related articles που έχουν, δημιουργώντας ομάδες πρωτεϊνών που σχετίζονται λειτουργικά.

Διάρρηξη γονιδίων και σήμανση πρωτεϊνών στον *Saccharomyces cerevisiae*

Η απενεργοποίηση γονιδίων γενικά, επιτυγχάνεται παρεμβάλλοντας στο εσωτερικό ενός γονιδίου ένα τμήμα DNA με έναν επιλέξιμο δείκτη (πχ. γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά). Στον *Saccharomyces cerevisiae* η διαδικασία αυτή γίνεται σε δυο στάδια. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την ενίσχυση της κασέτας μεταλλαξιγένεσης από ειδικό πλασμιδιακό φορέα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Παράλληλα με την ενίσχυση της κασέτας προστίθενται σε αυτήν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ομόλογες με τις περιοχές εκατέρωθεν του γονιδίου που θέλουμε να διαρρήξουμε. Στο δεύτερο βήμα γίνεται μετασχηματισμός κυττάρων *S.cerevisiae* με το προϊόν της PCR, το οποίο με ομόλογο ανασυνδυασμό ενσωματώνεται στο γονιδίωμα και αντικαθιστά το γονίδιο που θέλουμε.

Παρόμοια διαδικασία ακολουθείται και κατά τη σήμανση μιας πρωτεΐνης. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται ένας πλασμιδιακός φορέας που περιέχει το σήμα που θέλουμε να προσθέσουμε στην πρωτεΐνη και έναν δείκτη επιλογής. Το κομμάτι αυτό ενισχύεται με PCR ενώ παράλληλα προστίθενται σε αυτό τμήματα ομόλογα με την περιοχή στην οποία επιθυμούμε να ενσωματωθεί. Έπειτα ακολουθεί μετασχηματισμός του προϊόντος της PCR, το οποίο ενσωματώνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό.

Ενίσχυση κασέτας μεταλλαξιγένεσης με PCR

Υλικά:

Συγκέντρωση ανά αντίδραση	
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (5X Takara Primestar Buffer)	1x
dNTPs (10mM)	2mM
Εκκινητής 1 (10μM)	3mM
Εκκινητής 2 (10μM)	3mM
Υπόστρωμα DNA	20-50ng
Πολυμεράση (Takara Primestar Polymerase)	1U
ddH ₂ O	

Για τη διάρρηξη του γονιδίου *zwf1* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ZWF1-S1 και ZWF1-R3 (Πίνακας 1, Παράρτημα) και το πλασμίδιο pYM6 ως υπόστρωμα (Παράρτημα, Εικόνα Π1), ενώ για τη διάρρηξη του *gcn5* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GCN5 (HATΔ) fw, GCN5 (HATΔ) rev και το πλασμίδιο YEr24 (Παράρτημα, Εικόνα Π2).

Η αντίδραση διάρρηξη του *zwf1* διεξήχθη σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

1. T= 94°C για 2'
2. T= 98 °C για 10''
3. T= 57 °C C για 10''
4. T=72 °C για 1' και 30''
5. επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων(2-4) 35 φορές
6. T=72 °C για 5'
7. παραμονή στους 4 °C.

Για τη διάρρηξη του *gcn5* το πρόγραμμα τροποποιήθηκε ως εξής:

1. T= 94°C για 2'
2. T= 98 °C για 10''
3. T= 53 °C C για 10''
4. T=72 °C για 2'
5. επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων(2-4) 35 φορές
6. T=72 °C για 5'
7. παραμονή στους 4 °C.

Ενίσχυση επιτόπων PCR για σήμανση πρωτεϊνών

Η ίδια ακριβώς διαδικασία με τη διάρρηξη γονιδίων ακολουθείται και για τη σήμανση πρωτεϊνών με επιτόπους ή με φθορίζουσες πρωτεΐνες.

Για τη σήμανση της *Zwf1p* πρωτεΐνης με GFP χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ZWF1-F5 και ZWF1-R3 (Πίνακας 1, Παράρτημα) και το πλασμίδιο ρKT128 (Παράρτημα, Εικόνα Π3)ως υπόστρωμα. Για τη σήμανση της *Gcn5p* με τον επίτοπο HA (hemagglutinin) οι εκκινητές GCN5-S2 , GCN5-S3 και το πλασμίδιο ρYM1 (Παράρτημα, Εικόνα Π4)και για τη σήμανση της *Kin28p* με τον επίτοπο Myc οι εκκινητές KIN28-S2 και KIN28-S3 και το πλασμίδιο ρYM6 (Παράρτημα, Εικόνα Π1).

Τα προγράμματα της PCR για κάθε μια αντίδραση ήταν τα εξής:

ZWF1-GFP	GCN5-HA	KIN28-Myc
T= 94°C για 2'	T= 94°C για 2'	T= 94°C για 2'
T= 98 °C για 10''	T= 98 °C για 10''	T= 98 °C για 10''
T= 57 °C για 10''	T= 63 °C για 10''	T= 61 °C για 10''
T=72 °C για 2' και 30''	T=72 °C για 2'	T=72 °C για 1' και 30''
επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 35 φορές	επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 35 φορές	επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 35 φορές
T=72 °C για 5'	T=72 °C για 5'	T=72 °C για 5'
παραμονή στους 4 °C.	παραμονή στους 4 °C.	παραμονή στους 4 °C.

Με την ολοκλήρωση του προγράμματος της PCR μια μικρή ποσότητα προϊόντος ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Υλικά για την παρασκευή gel αγαρόζης 1%w/v :

- 0.25gr agarose
- 1 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr).
- 0.5ml T.A.E(50X) ρυθμιστικό διάλυμα
- 24.5ml ddH₂O
- 5μl μάρτυρα (λDNA PstI ή λDNA HindIII)

Διαδικασία:

1. Διαλύουμε 0.25gr αγαρόζης σε 0.5ml T.A.E και 24.5ml ddH₂O.
2. Θερμαίνουμε το διάλυμα για 3 περίπου λεπτά μέχρις ότου γίνει διαφανές.
3. Προσθέτουμε 1μl EtBr.
4. Μεταφέρουμε σε ειδικά εκμαγεία που φέρουν προσαρμοσμένα χτένια(combs) και αφήνουμε να πολυμεριστεί.
5. Μεταφέρουμε την πηκτή σε συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμάτη με ρυθμιστικό διάλυμα T.A.E (1X).
6. Προσθέτουμε στα δείγματα (προϊόντα PCR) loading buffer (6X) και τα τοποθετούμε στις εσοχές που σχηματίστηκαν από τα ειδικά χτένια. Σε ένα από τα χτένια τοποθετούμε το μάρτυρα (DNA ladder)
7. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων γίνεται στα 100mV.

Μετασηματισμός κυττάρων *S. cerevisiae*

Υλικά:

- YPD υγρό θρεπτικό
- Τρυβλία επιλογής
- 40% γλυκόζη
- DNA (πλασμίδιο ή προϊόν PCR)
- LiAc 1M
- 50% PEG 3350
- SS-RNA carrier 10mg/mL

Η διαδικασία που ακολουθείται για τον μετασηματισμό κυττάρων *S. cerevisiae* είναι η εξής:

1. Εμβολιάζουμε -από φρέσκια στερεή καλλιέργεια κυττάρων YPD- με μοναδική αποικία 5ml YPD τα κύτταρα ολονύκτια στους 30°C.
2. Αραιώνουμε την καλλιέργεια μέχρι η οπτική της πυκνότητα να είναι OD=0,1 και προσθέτουμε γλυκόζη σε τελική συγκέντρωση 4%. Για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού χρειαζόμαστε 10ml καλλιέργειας.
3. Επωάζουμε στους 30°C μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει OD=0,5.
4. Μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε αποστειρωμένο falcon και φυγοκεντρούμε στις 3.000rpm για 5' και πετάμε το υπερκείμενο.
5. Ξεπλένουμε την πελέτα με 25ml ddH₂O.
6. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 900μl ddH₂O για κάθε 10ml αρχικής καλλιέργειας.
7. Μεταφέρουμε σε erpendorfs απο 900μl, προσθέτουμε 100μl LiAc 1M και αναδεύουμε.
8. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 15'' και πετάμε το υπερκείμενο.
9. Προσθέτουμε το μίγμα μετασχηματισμού με την εξής σειρά:

Όγκος/συγκέντρωση ανά αντίδραση		
1	50% PEG 3350	240μl
2	1.0M LiAc	36μl
3	ss-RNA (10mg/mL)	35μl
4	Προϊόν PCR	20μl
5	ddH ₂ O	29μl

10. Αναδεύουμε καλά και επωάζουμε για 30' στους 30°C.
11. Επωάζουμε για 20-25' στους 42°C και φυγοκεντρούμε στις 8.000 rpm για 15'' και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
12. Προσθέτουμε 1ml YPD και επωάζουμε 1,5 ώρα στους 30°C. Το βήμα αυτό απαιτείται μόνο όταν η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων γίνεται με αντιβιοτικά.
13. Φυγοκεντρούμε στις 8.000 rpm για 15'' και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
14. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 200μl ddH₂O και στρώνουμε σε κατάλληλο τρυβλίο επιλογής.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε μεμονωμένες αποικίες (colony PCR)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της διάρρηξης των γονιδίων *gcn5* *zwf1*. Πρόκειται για μία αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης όπως περιγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα μια ολόκληρη αποικία κυττάρων και όχι DNA. Η προετοιμασία των αποικιών γίνεται ως εξής:

1. Βυθίζουμε την αποικία σε 50μl NaOH 20mM και αναδεύουμε.
2. Επωάζουμε για 10' στους 100oC.
3. Φυγοκεντρούμε στις 13.000rpm για 15''.

4. Χρησιμοποιούμε 1μl ως υπόστρωμα ανά 25μl αντίδρασης PCR.

Για την επιβεβαίωση του στελέχους *gcn5Δ* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GCN5 (internal) Fw και GCN5 (internal) Rev ενώ για την επιβεβαίωση του *zwf1Δ* οι εκκινητές ZWF1 conf και ZWF1-R3. Οι αντιδράσεις έγιναν σύμφωνα με τα παρακάτω προγράμματα:

ZWF1Δ	GCN5Δ
T= 94°C για 2'	T= 94°C για 2'
T= 98 °C για 10''	T= 98 °C για 10''
T= 64 °C για 10''	T= 55 °C για 10''
T=72 °C για 1' και 40''	T=72 °C για 1' και 30''
επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 35 φορές	επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 35 φορές
T=72 °C για 5'	T=72 °C για 5'
παραμονή στους 4 °C.	παραμονή στους 4 °C.

Ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Υλικά:

- YPD
- NaOH 100mM

Διαδικασία:

1. Εμβολιάζουμε -από φρέσκια στερεή καλλιέργεια κυττάρων YPD- με μοναδική αποικία 5ml YPD τα κύτταρα ολονύκτια στους 30°C.
2. Αραιώνουμε την καλλιέργεια μέχρι η οπτική της πυκνότητα να είναι $OD_{600}=0,1$ σε τελικό όγκο 10ml
3. Επιάζουμε στους 30°C μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει $OD_{600}=0,5$.
4. Φυγοκεντρούμε τις καλλιέργειες στις 8.000rpm και πετάμε το υπερκείμενο.
5. Επαναδιαλύουμε σε 300μl NaOH 100mM και επιάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Φυγοκεντρούμε στις 8.000rpm και πετάμε το υπερκείμενο.

7. Ξεπλένουμε τα κύτταρα με ddH₂O.
8. Επαναδιαλύουμε σε 1x-SDS-Sample Buffer και προσθέτουμε 5μl αναστολείς πρωτεασών.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Υλικά:

- 30% Acrylamide mix
- 1.5M Tris-HCl pH8.8
- 1M Tris-HCl pH6.8
- 10% SDS
- 10% APS
- TEMED
- Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης δειγμάτων (4x-SDS-Sample Buffer)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης
- 5μl Μάρτυρα Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa) (NEB)

Πηκτή διαχωρισμού/separating gel 12% (5ml)

H₂O	1.7ml
30% Acrylamide mix (acrylamide:bis-acrylamide, 37.5:1)	2ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	1.3ml
10% SDS	50μl
10% APS	50μl
TEMED	2μl

Πηκτή στιβάγματος/stacking gel (3ml)

H₂O	2.1ml
30% Acrylamide mix (acrylamide:bis-acrylamide, 37.5:1)	500μl
1M Tris-HCl pH6.8	380μl
10% SDS	30μl
10% APS	30μl
TEMED	3μl

Διαδικασία:

Η προετοιμασία δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) περιλαμβάνει αρχικά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης των δειγμάτων (SDS-Sample buffer) σε τελική συγκέντρωση 1x. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονται (με vortex), ενώ ακολουθεί βρασμός (για 5min) και ολιγόλεπτη φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (13.000rpm).

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο φάσεις: 12% περιεκτικότητας ακρυλαμίδης για τον διαχωρισμό (separating) και 4% ακρυλαμίδης για το «στίβγμα» (stacking) των πρωτεϊνικών ζωνών.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Αρχικά γίνεται η ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολουθεί η επώαση με κατάλληλο αντίσωμα.

A) Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Υλικά

- Διάλυμα μεταφοράς
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0.45μ, Schleicher & Schuel)
- Χαρτί whatman

Διαδικασία:

1. Τρέχουμε τα πρωτεϊνικά δείγματα σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS PAGE gel)
2. Τοποθετούμε την πηκτή στη δεξαμενή μεταφοράς πάνω σε ένα εμποτισμένο σε διάλυμα μεταφοράς χαρτί Whatman.
3. Μεταφέρουμε πάνω του τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και προσθέτουμε ένα ακόμα χαρτί Whatman.
4. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στα 300 mA ή O/N στους 4°C και στα 40mA.

B) Western Blot

Υλικά:

- Διάλυμα TBS
- Διάλυμα πλύσης (TTBS)
- Διάλυμα για την απομάκρυνση θορύβου (blocking solution)
- Διάλυμα αντισώματος
- Πρωτογενές αντίσωμα (ειδικό για την πρωτεΐνη μας)
- Δευτερογενές αντίσωμα

- Διάλυμα χημειοφωταύγειας

Διαδικασία

1. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη 3 φορές για 10' με διάλυμα πλύσης και ήπια ανάδευση.
2. Προσθέτουμε το διάλυμα για την απομάκρυνση θορύβου και επωάζουμε για 1 ώρα με ήπια ανάδευση
3. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη φορές για 10' με διάλυμα πλύσης και ήπια ανάδευση.
4. Προσθέτουμε το 1^ο αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα αντισώματος (συγκέντρωση 1/1000, τελικός όγκος 10 ml) και επωάζουμε για 2 ώρες σε RT με ήπια ανάδευση.
5. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη 3 φορές για 10' με διάλυμα πλύσης και ήπια ανάδευση.
6. Προσθέτουμε το 2^ο αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα αντισώματος (συγκέντρωση 1/5000, τελικός όγκος 10 ml) και επωάζουμε για 2 ώρες σε RT με ήπια ανάδευση.

Αποτελέσματα

Για την αξιολόγηση των δύο αλγορίθμων επιλέξαμε την πρωτεΐνη Gcn5p του *Saccharomyces cerevisiae*. Η πρωτεΐνη Gcn5p είναι μια ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών (histone acetyltransferase - HAT) που λειτουργεί ως ρυθμιστής της μεταγραφής [22]. Αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα τριών συμπλόκων αναδιάταξης της δομής της χρωματίνης ADA, SAGA, και SLIK/SALSA, που εμπλέκονται στην ανάδρομη απόκριση καθώς και στην αρνητική και θετική μεταγραφική ρύθμιση πολλών γονιδίων [23-26]. Η Gcn5p περιλαμβάνει τρεις λειτουργικές επικράτειες, μια καρβοξυτελική επικράτεια bromodomain, μια επικράτεια με ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (HAT), και μια επικράτεια αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη ADA2. Μηδενικά μεταλλάγματα του *gcn5* στον *Saccharomyces cerevisiae* έχουν εμφανή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης [27] και της αναπνευστικής ικανότητας [28].

Για την πρόβλεψη αλληλεπιδράσεων μέσω των γεγονότων σύντηξης χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των οργανισμών: *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, *E.coli*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*. Τα αποτελέσματα που πήραμε δεν περιελάμβαναν το *gcn5*, ωστόσο όμως πήραμε ένα μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων, κυρίως μεταξύ μεταβολικών ενζύμων, που έχουν ήδη καταγραφεί στη *Saccharomyces* Genome Database (SGD).

Από τα αποτελέσματα που πήραμε από τη χρήση του UniReD αφαιρέσαμε τις αλληλεπιδράσεις που είναι ήδη καταγεγραμμένες στην *Saccharomyces* Genome Database. Μετά από αυτή τη διαδικασία οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν να είναι υποψήφιες για αλληλεπίδραση με την Gcn5p είναι οι εξής:

- Rps15p (40S ribosomal protein S15)
- Zwf1p (Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase MET19)
- Sod1p (Superoxide dismutase [Cu-Zn])
- Rps16ap (40S ribosomal protein S16-A)
- Tef1p (Elongation factor 1-alpha)
- Act1p (Actin)
- Kin28p (Serine/threonine-protein kinase KIN28)

Από αυτές επιλέχθηκαν οι Zwf1p και Kin28p.

Η πρωτεΐνη Zwf1p (Glucose-6-phosphate dehydrogenase - G6PD) είναι μια κυτταροπλασματική αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης, η οποία καταλύει το πρώτο βήμα της πορείας των φωσφορικών πεντοζών που παράγει NADPH από NADP⁺ μέσω μιας αντίδρασης οξειδοαναγωγής. Η Zwf1p παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων του NADPH καθώς επίσης και στην προστασία από οξειδωτικό στρες. Τα κύτταρα που υπόκεινται σε οξειδωτικό στρες προκειμένου να διατηρήσουν τη φυσιολογική τους κατάσταση χρειάζονται ανηγμένο γλουταθειό (GSH). Το

οξειδωμένο γλουταθείο ανάγεται από το NADPH που παράγεται από την πορεία των φωσφορικών πεντοζών. Στον *Saccharomyces cerevisiae* τα μηδενικά μεταλλάγματα του *zwf1* είναι βιώσιμα και δεν εμφανίζουν κάποια διαφοροποίηση στο ρυθμό ανάπτυξης τους [29], είναι αυξότροφα στη μεθειονίνη [30] και παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε οξειδωτικό στρες [30, 31].

Η Kin28p είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης και αποτελεί υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα TFIID. Η πρωτεΐνη αυτή φωσφορυλιώνει την CTD ουρά της RNA-πολυμεράσης II μετά τον σχηματισμό του προεναρκτήριου συμπλόκου ρυθμίζοντας έτσι θετικά τη μεταγραφή [32, 33]. Μηδενικά μεταλλάγματα της Kin28p δεν είναι βιώσιμα [34]. Λόγω συνεντοπισμού της Kin28p και Gcn5p στον πυρήνα, το ζεύγος ελέγχθηκε για την ύπαρξη άμεσης αλληλεπίδρασης.

Ανίχνευση αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Gcn5p και Zwf1p

Όπως προαναφέρθηκε η Zwf1p είναι κυτταροπλασματική σε αντίθεση με την Gcn5p που είναι πυρηνική. Για το λόγο αυτό το ζεύγος ελέγχθηκε μόνο για την ύπαρξη γενετικής αλληλεπίδρασης.

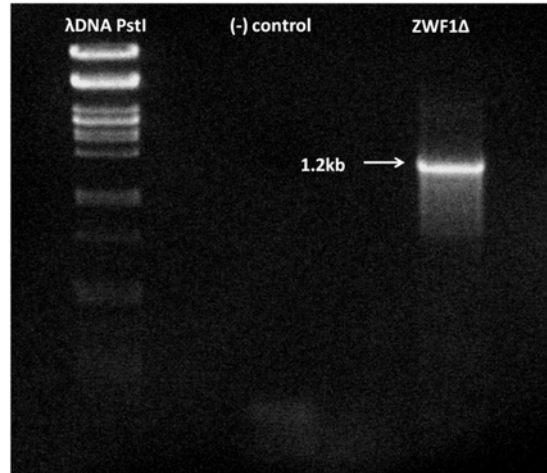
Γενικά για την ανίχνευση γενετικών αλληλεπιδράσεων παρατηρούνται οι φαινότυποι των μεταλλαγμένων οργανισμών. Η ύπαρξη αλληλεπίδρασης καθορίζεται από την απόκλιση που εμφανίζει ο φαινότυπος του διπλού μεταλλάγματος σε σχέση με τα μονά μεταλλάγματα. Για παράδειγμα, ένα διπλό μετάλλαγμα με εντονότερο φαινότυπο από το αναμενόμενο υποδηλώνει ύπαρξη συνεργιστικής/συνθετικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών, ενώ ένα διπλό μετάλλαγμα που εμφανίζει ηπιότερο φαινότυπο υποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες αυτές δρουν στο ίδιο μονοπάτι.

Στον *Saccharomyces cerevisiae* ένας από τους φαινότυπους που παρατηρείται για την ανίχνευση γενετικών αλληλεπιδράσεων είναι ο ρυθμούς ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών σε διάφορα θρεπτικά υλικά. Αρχικά λοιπόν, κατασκευάστηκαν τα μονά μεταλλάγματα *gcn5Δ* και *zwf1Δ*, καθώς και το διπλό μετάλλαγμα *gcn5Δ/zwf1Δ*. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ο φαινότυπος των μεταλλαγμάτων αυτών σε σχέση με το αγρίο τύπου στέλεχος FT5.

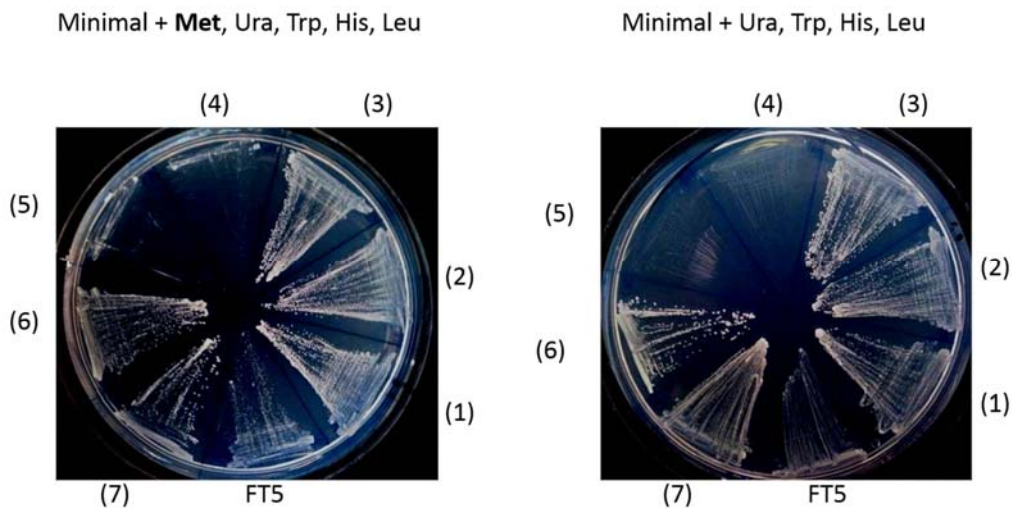
Κατασκευή μονών μεταλλαγμάτων

Αρχικά κατασκευάστηκαν με μεταλλαξιγένεση κασέτας τα μονά μεταλλάγματα *zwf1Δ* και *gcn5Δ*. Για την κατασκευή του *zwf1Δ* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ZWF1-S1 και ZWF1-R3 (Πίνακας 1, Παράρτημα) και το πλασμίδιο pYM6 ως υπόστρωμα (Παράρτημα, Εικόνα Π1). Το προϊόν της PCR (Εικόνα 9) χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους FT5 του *S.cerevisiae*. Με το μετασχηματισμό των κυττάρων η κασέτα μεταλλαξιγένεσης αντικατέστησε ολόκληρο το γονίδιο *zwf1*. Η κασέτα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε το

γονίδιο *trp1* και έτσι για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό χωρίς τρυπτοφάνη. Εφόσον τα *zwf1Δ* είναι αυξότροφα για τη μεθειονίνη, η επιλογή των θετικών κλώνων έγινε σε minimal θρεπτικό με και χωρίς μεθειονίνη (Εικόνα 10). Περαιτέρω επιβεβαίωση των στελεχών *zwf1Δ* έγινε με colony PCR με τους εκκινητές ZWF1 conf και ZWF1-R3.



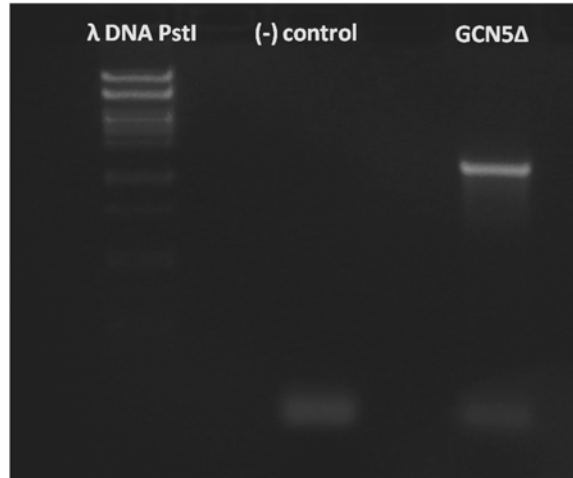
Εικόνα 9 Ενίσχυση κασέτας μεταλαξιγένεσης για το *zwf1*. Το προϊόν της PCR μεγέθους 1.2kb χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων *S.cerevisiae*.



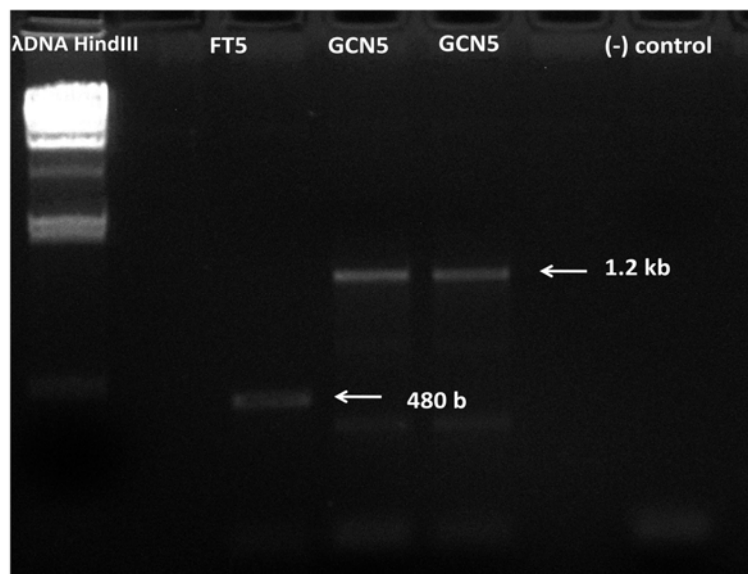
Εικόνα 10 Επιλογή των *zwf1Δ* στελεχών με μεθειονίνη. Το στέλεχος FT5 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control. Οι αποικίες παρατηρήθηκαν ως προς την ανάπτυξή τους σε πιάτα που περιείχαν ή όχι μεθειονίνη. Οι αποικίες 4 και 5 είναι θετικές.

Για την κατασκευή του *gcn5Δ* μεταλλάγματος χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GCN5 (HATΔ) fw, GCN5 (HATΔ) rev (Παράρτημα, Πίνακας 1) και το πλασμίδιο YEp24 (Παράρτημα, Εικόνα Π2). Το προϊόν της PCR ελέγχθηκε και πάλι σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 11) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων. Με τη διαδικασία αυτή η καταλυτική

υπομονάδα HAT του *gcn5* αντικαθίσταται από την κασέτα μεταλλαξιγένεσης. Η κασέτα περιείχε το γονίδιο *ura3* επομένως η αρχική επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων έγινε σε πιάτο που δεν περιείχε ουρακίλη. Κατόπιν οι θετικές αποικίες ελέγχθηκαν και με colony PCR χρησιμοποιώντας εσωτερικούς εκκινητές για το γονίδιο *gcn5* (Εικόνα 12). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι GCN5 (internal) Fw και GCN5 (internal) Rev.

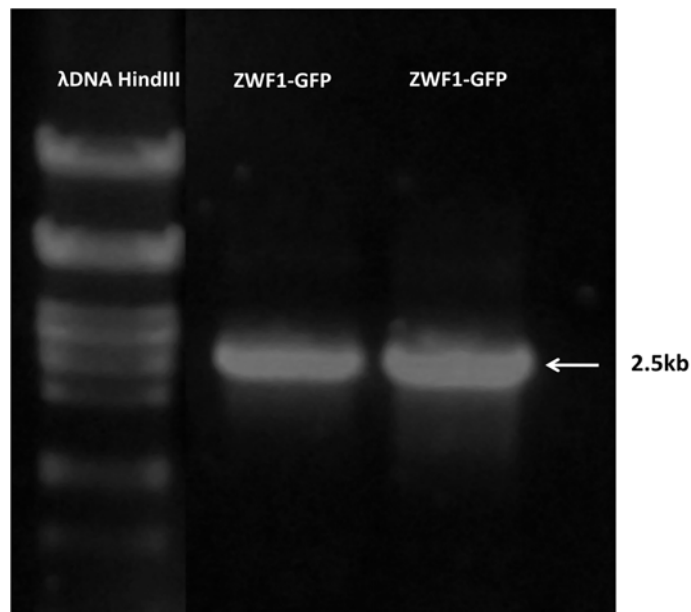


Εικόνα 11 Ενίσχυση κασέτας μεταλλαξιγένεσης για το *gcn5*. Το προϊόν της PCR μεγέθους 1.2kb χρησιμοποιήθηκε για τον μετασηματισμό κυττάρων *S.cerevisiae*.



Εικόνα 12 Επιβεβαίωση των στελεχών *gcn5Δ* με colony PCR. Οι αποικίες που ενσωμάτωσαν την κασέτα στην περιοχή του *gcn5* δίνουν προϊόν μεγέθους 1.2kb. Το θετικό control (FT5) δίνει προϊόν μεγέθους περίπου 480bp.

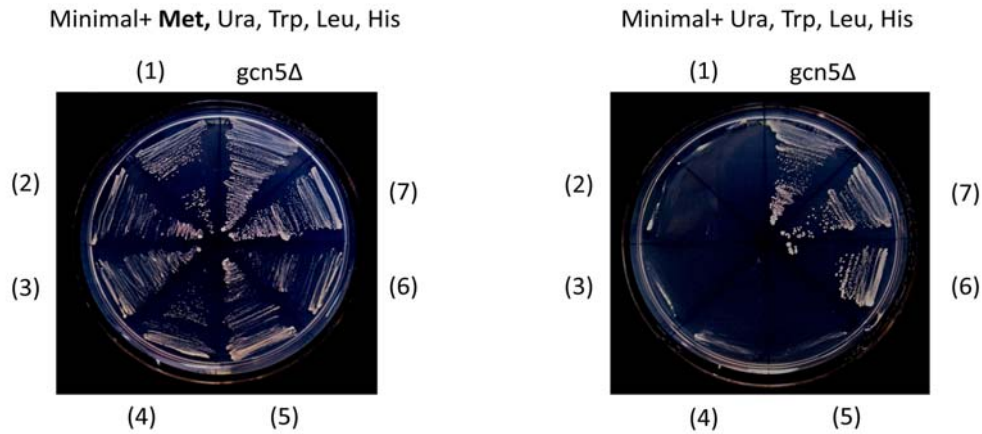
Για τη σήμανση της *Zwf1p* με GFP με PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ZWF1-F5 και ZWF1-R3 (Πίνακας 1, Παράρτημα) και το πλασμίδιο pKT128 (Παράρτημα, Εικόνα Π3) ως υπόστρωμα. Το προϊόν που προέκυψε αφού ελέγχθηκε σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 13) χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων. Εκτός από το γονίδιο της GFP, η κασέτα που ενισχύθηκε περιλαμβάνει το γονίδιο *his3* έτσι οι θετικές αποικίες επιλέχθηκαν με βάση την ικανότητά τους να μεγαλώνουν απουσία ιστιδίνης. Στη συνέχεια, τα επίπεδα φθορισμού της GFP προσδιορίστηκαν με χρήση φωτομέτρου, όπου έγινε διέγερση της GFP σε κύτταρα με ακτινοβολία μήκους κύματος 490nm και στη συνέχεια μετρήθηκε η εκπομπή ακτινοβολίας στα 530nm. Με τη μέτρηση αυτή είδαμε ότι όλες οι αποικίες που επιλέξαμε μετά το σχηματισμό εκφράζουν GFP η οποία είναι ενσωματωμένη στην *Zwf1p*.



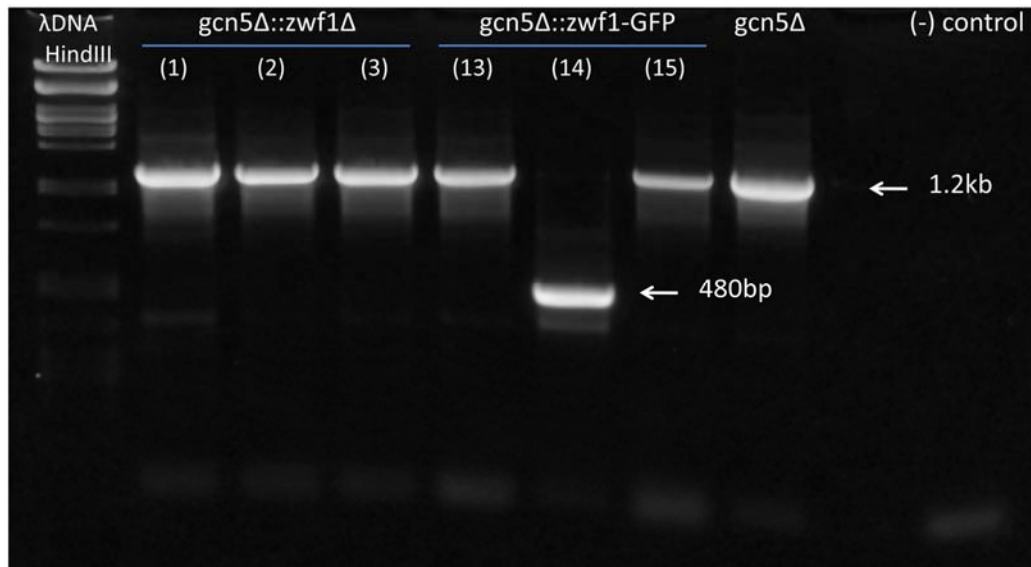
Εικόνα 13 Ενίσχυση κασέτας για σήμανση της *Zwf1p* με GFP. Το προϊόν της PCR μεγέθους 2.5kb χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων *S.cerevisiae*.

Κατασκευή διπλών μεταλλαγμάτων

Για την ανίχνευση γενετικών αλληλεπιδράσεων στη συνέχεια κατασκευάστηκαν δύο επιπλέον στελέχη. Το πρώτο ήταν το διπλό μετάλλαγμα *gcn5Δ/zwf1Δ*, το οποίο κατασκευάστηκε μετασχηματίζοντας *gcn5Δ* κύτταρα με την κασέτα μεταλλαξιγένεσης για το *zwf1*. Μετά το μετασχηματισμό τα κύτταρα ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μεγαλώνουν απουσία μεθειονίνης (Εικόνα 14). Το δεύτερο στέλεχος που κατασκευάστηκε ήταν το *gcn5Δ/zwf1Δ-GFP* το οποίο προέκυψε μετά από μετασχηματισμό του στελέχους *zwf1-GFP* με την κασέτα μεταλλαξιγένεσης για το *gcn5*. Και τα δύο στελέχη ελέγχθηκαν ως προς το *gcn5* γονίδιο με colony PCR (Εικόνα 15).



Εικόνα 14 Επιλογή των *gcn5Δ/zwf1Δ* στελεχών με μεθειονίνη. Το στέλεχος *gcn5Δ* χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control. Οι αποικίες παρατηρήθηκαν ως προς την ανάπτυξή τους σε πιάτα που περιείχαν ή όχι μεθειονίνη. Θετικές ήταν οι αποικίες 1-5.

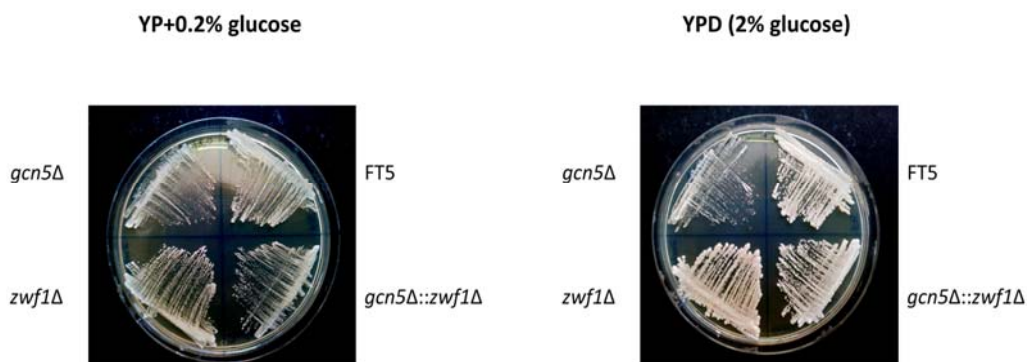


Εικόνα 15 Επιβεβαίωση των στελεχών *gcn5/zwf1Δ* και *gcn5/zwf1-GFP* με colony PCR. Οι αποικίες που ενσωμάτωσαν την κασέτα στην περιοχή του *gcn5* δίνουν προϊόν μεγέθους 1.2kb. Όλες οι αποικίες που επιλέχθηκαν εκτός από την *gcn5/zwf1-GFP* (14) ήταν θετικές.

Παρατήρηση φαινοτύπων των στελεχών FT5, *gcn5Δ*, *zwf1Δ*, *gcn5Δ/zwf1Δ*

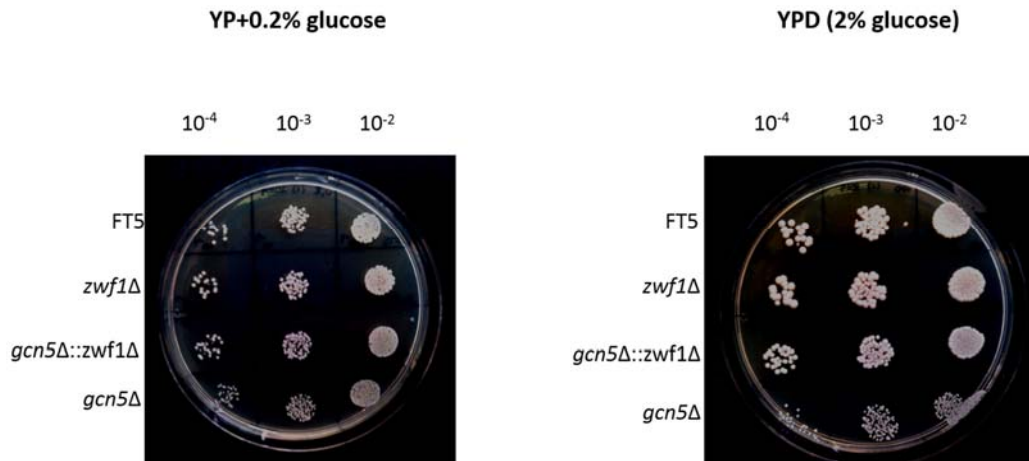
Όπως προαναφέρθηκε, για να διαπιστώσουμε την ύπαρξη γενετικών μεταλλάξεων μεταξύ δύο πρωτεϊνών θα πρέπει να παρατηρηθούν οι φαινότυποι των αντίστοιχων μονών και διπλών μεταλλαγμάτων. Στην περίπτωση του *S.cerevisiae* ο φαινότυπος που παρατηρείται συνήθως είναι ο ρυθμός ανάπτυξης σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά.

Αρχικά κύτταρα των στελεχών FT5, *gcn5Δ*, *zwf1Δ*, *gcn5Δ/zwf1Δ* στρώθηκαν σε πιάτα YPD και YP+0.2%glucose. Σε χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (0.2%) δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές μεταξύ των διαφορετικών στελεχών (Εικόνα 16). Σε 2% γλυκόζη το στέλεχος *zwf1Δ*, όπως αναμενόταν, έχει παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης με το FT5, ενώ το *gcn5Δ* έχει μικρότερο ρυθμό. Το διπλό μετάλλαγμα *gcn5Δ/zwf1Δ* ωστόσο, εμφανίζει παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης με το αγρίου τύπου και το *zwf1Δ* στέλεχος γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη γενετικής αλληλεπίδρασης.



Εικόνα 16 Ανάπτυξη των στελεχών FT5, *gcn5Δ*, *zwf1Δ*, *gcn5Δ/zwf1Δ* σε χαμηλή (αριστερά) και υψηλή (δεξιά) συγκέντρωση γλυκόζης. Στη δεύτερη περίπτωση παρατηρείται μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης του *gcn5Δ* στελέχους ο οποίος όμως αντιστρέφεται στο στέλεχος *gcn5Δ/zwf1Δ*.

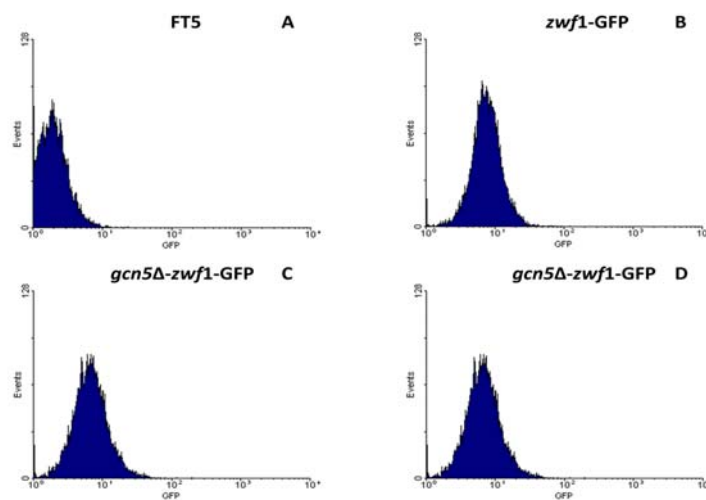
Για την καλύτερη παρατήρηση του ρυθμού ανάπτυξης των παραπάνω μεταλλαγμάτων χρησιμοποιήθηκε και η δοκιμή κηλίδας (spot assay) σε πιάτα χαμηλής (0.2%) και υψηλής (2%) συγκέντρωσης γλυκόζης (Εικόνα 17). Και πάλι φάνηκε ότι ο ρυθμός του *gcn5Δ* είναι μειωμένος σε σχέση με τα στελέχη *zwf1Δ* και *gcn5Δ/zwf1Δ*, καθώς βλέπουμε ότι μειώνεται το μέγεθος και όχι ο αριθμός των αποικιών.



Εικόνα 17 Παρατήρηση ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών FT5, *zwf1Δ*, *gcn5Δ*, *gcn5Δ/zwf1Δ* με δοκιμή κηλίδας σε χαμηλή (αριστερά) και υψηλή (δεξιά) συγκέντρωση γλυκόζης. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται μείωση του μεγέθους των αποικιών του στελέχους *gcn5Δ* καθώς και αποκατάσταση του μεγέθους στο στέλεχος *gcn5Δ/zwf1Δ*.

Μέτρηση επιπέδων έκφρασης *zwf1*

Η Gcn5p λειτουργεί ως ρυθμιστής της μεταγραφής για πολλά γονίδια, χωρίς να μας είναι όλα γνωστά. Έτσι λοιπόν, στη συνέχεια ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου *zwf1* παρουσία και απουσία του *gcn5* με κυτταρομετρία ροής. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *zwf1*-GFP, δύο διαφορετικές αποικίες του στελέχους *gcn5Δ/zwf1*-GFP καθώς και το στέλεχος FT5 ως αρνητικό control. Τα διαγράμματα που προέκυψαν (Εικόνα 18) έδειξαν ότι η έκφραση του *zwf1* στα στελέχη *gcn5Δ* και αγρίου τύπου βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα, γεγονός που δείχνει ότι το *gcn5* δεν επηρεάζει τη μεταγραφή του *zwf1*.



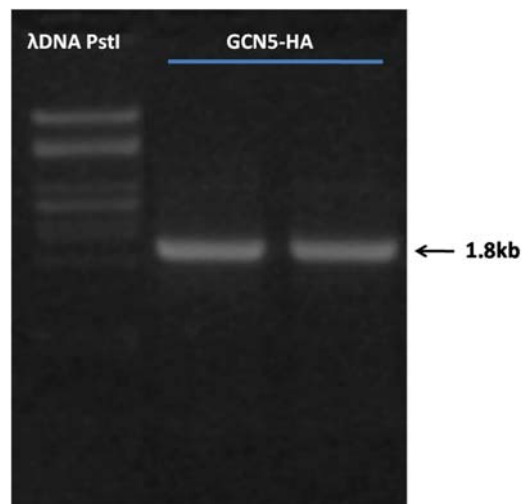
Εικόνα 18 Μέτρηση έκφρασης GFP σε αγρίου τύπου και *gcn5Δ* κύτταρα με κυτταρομετρία ροής. A) Αρνητικό control (FT5), τα κύτταρα δεν εκφράζουν GFP. Τα στελέχη *zwf1*-GFP (B) *gcn5Δ/zwf1*-GFP (C και D) έχουν ίδια επίπεδα έκφρασης GFP.

Ανίχνευση αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Gcn5p και Kin28p

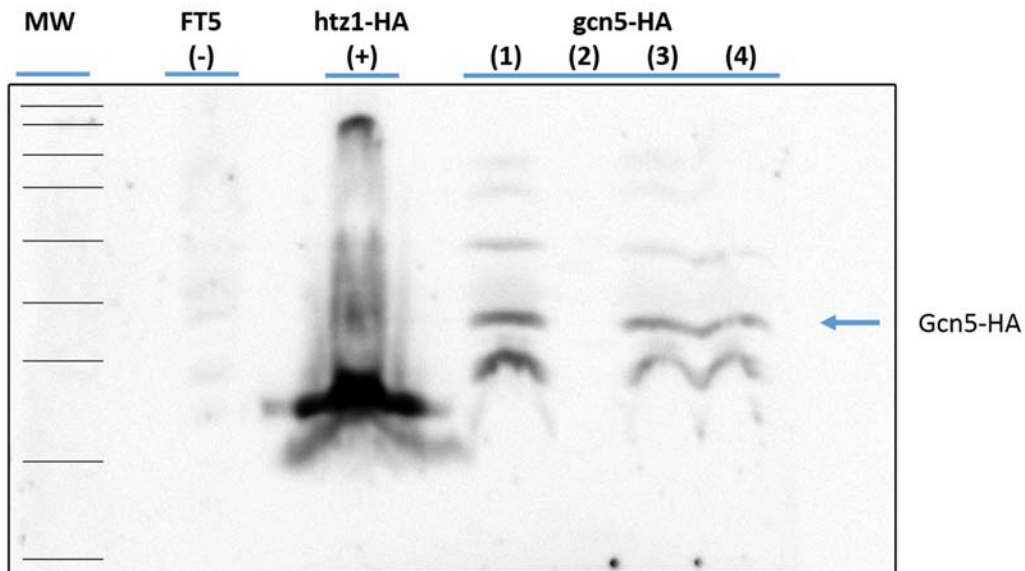
Τόσο η Gcn5p όσο και η Kin28p είναι πυρηνικές πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, το ζεύγος Gcn5p-Kin28p ελέγχθηκε για την ύπαρξη άμεσης αλληλεπίδρασης με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε ένα στέλεχος το οποίο περιέχει σημασμένη Gcn5p με τον επίτοπο HA και την Kin28p σημασμένη με τον επίτοπο Myc.

Κατασκευή στελέχους *gcn5-HA/ kin28-Myc*

Για τη σήμανση της Gcn5p με τον επίτοπο HA με PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GCN5-S2 , GCN5-S3 και το πλασμίδιο pYM1 (Παράρτημα, Εικόνα Π4) ως υπόστρωμα. Το προϊόν που προέκυψε αφού ελέγχθηκε σε πηκτική αγαρόζης (Εικόνα 19) χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων. Εκτός από τον επίτοπο HA, η κασέτα που ενισχύθηκε περιλαμβάνει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην Geneticin (G418) έτσι οι θετικές αποικίες επιλέχθηκαν με βάση την ικανότητά τους να μεγαλώνουν παρουσία G418. Στη συνέχεια οι αποικίες που επιλέχθηκαν επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω ως προς την ύπαρξη του HA επιτόπου με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για την αναγνώριση του επιτόπου χρησιμοποιήθηκε ως πρωτογενές αντίσωμα ένα anti-HA rabbit polyclonal, ενώ ως δευτερογενές χρησιμοποιήθηκε το anti-rabbit IgG HRP. Από τις 3 αποικίες που ελέγχθηκαν η μία ήταν θετική ως προς τον HA επίτοπο (Εικόνα 20).

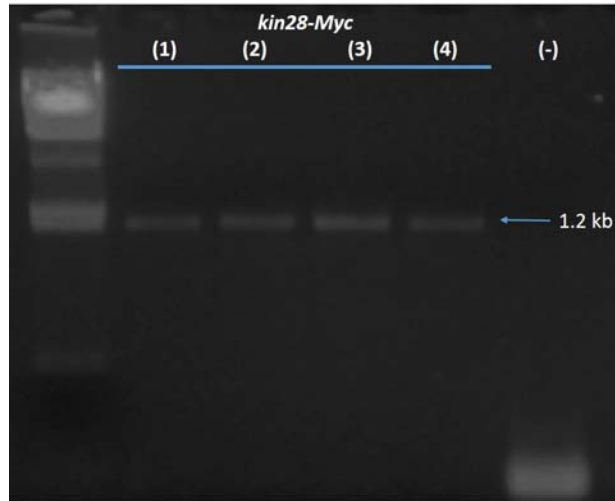


Εικόνα 19 Ενίσχυση κασέτας για σήμανση της Gcn5p με τον επίτοπο HA. Το προϊόν της PCR μεγέθους 1.8kb χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων *S.cerevisiae*.

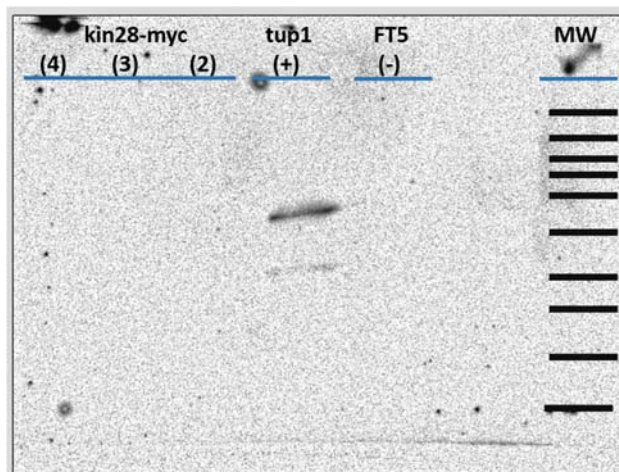


Εικόνα 20 Επιβεβαίωση θετικών *gcn5-HA* κλώνων με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος FT5 και ως θετικό το *Htz1-HA*. Η αποικίες *gcn5-HA* (1), (3) και (4) ήταν θετικές.

Μετά τη δημιουργία του στελέχους *gcn5-HA* ακολούθησε η σήμανση της Kln28p με τον επίτοπο Myc. Η σήμανση έγινε με PCR με τους εκκινητές KIN28-S2 και KIN28-S3 και το πλασμίδιο pYM6 (Παράρτημα, Εικόνα Π1) ως υπόστρωμα. Το προϊόν της PCR (μεγέθους 1.2 kb) ελέγχθηκε σε πηκτική αгарόζης (Εικόνα 21) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό του στελέχους *gcn5-HA*. Εκτός από τον επίτοπο Myc, η κασέτα που ενισχύθηκε περιλαμβάνει το γονίδιο *Trp1*, έτσι οι θετικές αποικίες επιλέχθηκαν με βάση την ικανότητά τους να μεγαλώνουν απουσία τρυπτοφάνης. Τέλος, οι αποικίες που επιλέχθηκαν επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω ως προς την ύπαρξη του Myc επιτόπου με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για την αναγνώριση του επιτόπου χρησιμοποιήθηκε ως πρωτογενές αντίσωμα ένα anti-HA mouse monoclonal, ενώ ως δευτερογενές χρησιμοποιήθηκε το anti-mouse IgG HRP. Από τις αποικίες που ελέγχθηκαν η μία ήταν θετική ως προς τον Myc επίτοπο (Εικόνα 22).



Εικόνα 21 Ενίσχυση κασέτας για σήμανση της *Kin28p* με τον επίτοπο *Myc*. Το προϊόν της PCR μεγέθους 1.2kb χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό του στελέχους *gcn5-HA*.



Εικόνα 22 Ανίχνευση θετικών *kin28-Myc* κλώνων με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *FT5* και ως θετικό το *Tup1-Myc*. Καμία από τις αποικίες δεν ήταν θετικές ως προς το *kin28-Myc*

Συζήτηση

Ανάπτυξη και αξιολόγηση αλγορίθμου

Όπως είδαμε, τα περιστατικά σύντηξης γονιδίων συχνά αποτελούν ένδειξη αλληλεπίδρασης των αντίστοιχων γονιδιακών τους προϊόντων (πρωτεΐνες). Έτσι λοιπόν ο αλγόριθμος που κατασκευάστηκε ανιχνεύει συντηγμένες πρωτεΐνες μέσα από την σύγκριση γονιδιωμάτων κατά ζεύγη.

Για την αξιολόγηση του χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη Gcn5p του *Saccharomyces cerevisiae* και για την πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των οργανισμών : *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus*, *E.coli*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*. Αν και τα αποτελέσματα δεν περιελάμβαναν κάποιο γεγονός σύντηξης με το gcn5, παρατηρήθηκε ένας μεγάλος αριθμός αλληλεπιδράσεων που έχουν ήδη καταγραφεί στη *Saccharomyces* Genome Database (SGD). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ήταν τόσο άμεσες όσο και έμμεσες και αφορούσαν κυρίως σε μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου.

Πειραματική αξιολόγηση UniReD

Στη συνέχεια, ακολούθησε η πειραματική αξιολόγηση του αλγορίθμου UniReD, για την οποία χρησιμοποιήθηκε και πάλι η πρωτεΐνη Gcn5p. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιλέχθηκαν δύο ζεύγη αλληλεπιδράσεων: 1) Gcn5p - Zwf1p και 2) Gcn5p - Kin28p.

Αλληλεπίδραση μεταξύ Gcn5p και Zwf1p

Οι πρωτεΐνες Gcn5p και Zwf1p αναμένεται να έχουν διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό καθώς η Gcn5p είναι πυρηνική και η Zwf1p είναι κυτταροπλασματική. Επομένως η αλληλεπίδρασή τους δε θα μπορούσε να είναι άμεση.

Για την ανίχνευση γενετικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών, κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα μονά μεταλλάγματα *gcn5Δ*, *zwf1Δ*, καθώς και το διπλό μετάλλαγμα *gcn5Δ/zwf1Δ* και στη συνέχεια έγινε σύγκριση των φαινοτύπων τους τόσο μεταξύ τους όσο και το με το αγρίου τύπου στέλεχος FT5. Η φαινοτυπική παρατήρηση των στελεχών έδειξε ότι ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης του στελέχους *gcn5Δ* μπορεί να διασωθεί μετά από διάρρηξη του γονιδίου *zwf1*, δείχνοντας ότι υπάρχει έμμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών.

Γνωρίζουμε ήδη ότι η Gcn5p λειτουργεί ως ρυθμιστής της μεταγραφής για πολλά γονίδια, χωρίς να μας είναι όλα γνωστά. Γι' αυτόν το λόγο ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου *zwf1* παρουσία και απουσία του *gcn5* με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του *zwf1* στα στελέχη *gcn5Δ* και αγρίου τύπου βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα, γεγονός που δείχνει ότι το *gcn5* δεν επηρεάζει τη μεταγραφή του *zwf1*. Χρειάζεται λοιπόν, περαιτέρω διερεύνηση για την περιγραφή του μηχανισμού αλληλεπίδρασης.

Αλληλεπίδραση μεταξύ Gcn5p και Kin28p

Η πρωτεΐνη Kin28p είναι πυρηνική και έτσι το ζεύγος Gcn5p - Kin28p θα μπορούσε να αλληλεπιδρά άμεσα. Για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης σημάνθηκε η Gcn5p με τον επίτοπο HA, ενώ στη συνέχεια έγινε προσπάθεια σήμανσης της Kin28p με τον επίτοπο Myc. Παρά τις επαναλαμβανόμενες προσπάθειες σήμανσης, δεν ανιχνεύθηκε η Kin28p-myc με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Παράλληλα επιχειρήθηκε η σήμανση της Kin28p σε αγρίου τύπου στέλεχος FT4, έτσι ώστε να δημιουργηθεί το διπλά σημασμένο στέλεχος μετά από σύζευξη των μονά σημασμένων στελεχών, χωρίς όμως αποτέλεσμα.

Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα κατά τη σχεδίαση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση της Kin28p με συνέπεια την αλλοίωση των αλληλουχιών που απαιτούνται για τον ομόλογο ανασυνδυασμό.

Στη συνέχεια λοιπόν, θα πρέπει είτε να επανασχεδιαστούν οι εκκινητές για την σήμανση της Kin28 με τον επίτοπο Myc, είτε να γίνει σήμανση με διαφορετικό επίτοπο (πχ. σήμανση με GFP). Εφόσον κατασκευαστεί το διπλά σημασμένο στέλεχος θα πρέπει να ακολουθήσει η ανοσοκατακρήμνιση προκειμένου να εξακριβωθεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των Gcn5p και Kin28p.

Επίλογος

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η πειραματική αξιολόγηση μιας υπάρχουσας υπολογιστικής μεθόδου πρόβλεψης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω της διαθέσιμης βιβλιογραφίας (UniReD), καθώς και η ανάπτυξη και αξιολόγηση ενός αλγορίθμου βασισμένου σε γενωμικά δεδομένα (fused genes).

Ο αλγόριθμος που δημιουργήθηκε έδωσε μια λίστα αλληλεπιδράσεων για τις πρωτεΐνες του *S.cerevisiae*, από τις οποίες ένα πολύ μεγάλο ποσοστό έχει επιβεβαιωθεί ήδη πειραματικά. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε άλλους οργανισμούς για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων, κυρίως μεταξύ πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος σε μεταβολικές διεργασίες.

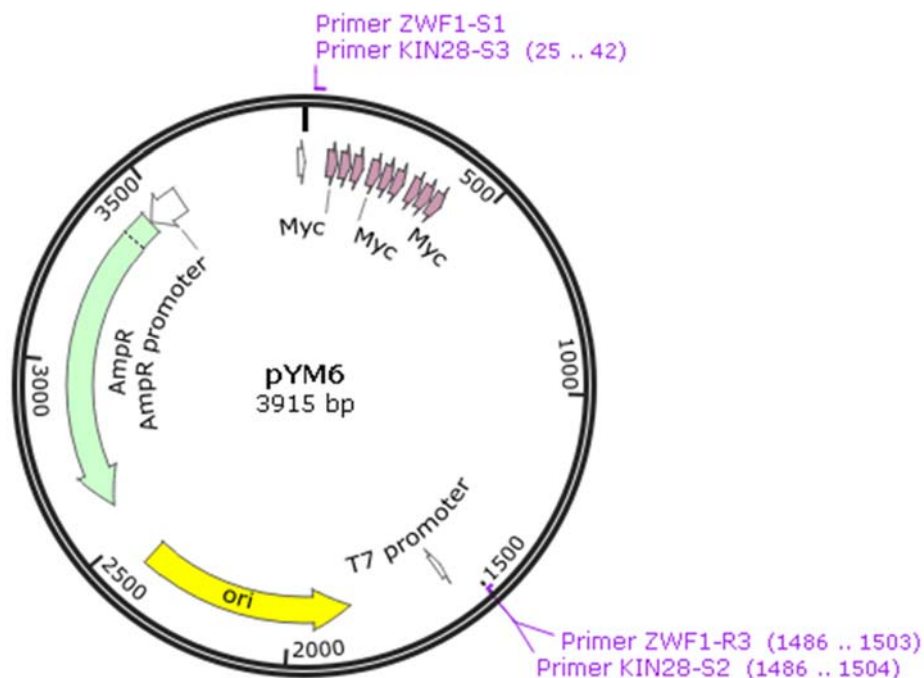
Η χρήση του UniReD υπέδειξε 7 νέες αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης Gcn5p. Από αυτές ελέγχθηκαν οι δύο (Zwf1p και Kin28p). Η αλληλεπίδραση μεταξύ Kin28p και Gcn5p δεν επιβεβαιώθηκε λόγω σφάλματων στο σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας. Ωστόσο όμως η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης Gcn5p-Zwf1p, δύο πρωτεϊνών που φαινομενικά δεν σχετίζονται, αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι ο αλγόριθμος μπορεί να ανιχνεύσει πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με βάση τη βιβλιογραφική αναζήτηση.

Παράρτημα

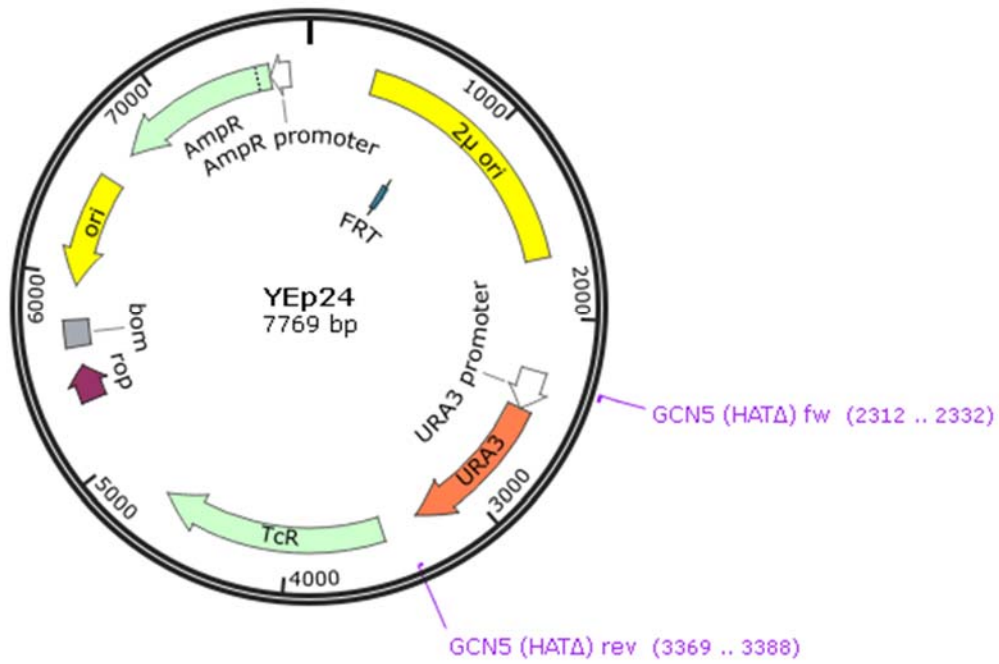
Πίνακας 1 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για διάρρηξη γονιδίων και σήμανση πρωτεϊνών.

ZWF1-S1	GAAAGAGTAAATCCAATAGAATAGAAAACACATAAGGCAAGcgtacgctgcaggtcgac
ZWF1-R3	ATTCAGTGACTTAGCCGATAAATGAATGTGCTTGCATTTTTctgatgaattcgagctcg
ZWF1-F5	TTACGCTTGGCCCGTGACTAAGCCAGAAGATACGAAGGATAATggtgacggtgctggttta
ZWF1 conf	GGCTTCCTCCTGCCCTC
GCN5 (HATΔ) fw	CATCTTTCATGGCTGTCATTAGGAAGCCATTGACTGTCGTAGGtttttgattccggtttcttg
GCN5 (HATΔ) rev	TTAATATATCCCATCCATATACTTTTATCCAACGTGATTTCTTTagattcccgggtaataactg
GCN5 (internal) Fw	CATGATGGTCCTAACTGGAT
GCN5 (internal) Rev	GGCCGCTTCTTGTAAATAAT
GCN5-S2	TTTCTTCTCGAAAGGAATAGTAGCGGAAAAGCTTCTTCTACGCAAtcgatgaattcgagctcg
GCN5-S3	AATAATAAAGTAAAGAAATACCTGAATATTCTCACCTTATTGATcgtacgctgcaggtcgac
KIN28-S2	CTAATGTCAATAACACAGATTCTACAAATTTATAAAATCATAatcgatgaattcgagctcg
KIN28-S3	TTACCACCACCAAGTGACCCGTCTTCAATAAAAATACGTAACcgtacgctgcaggtcgac

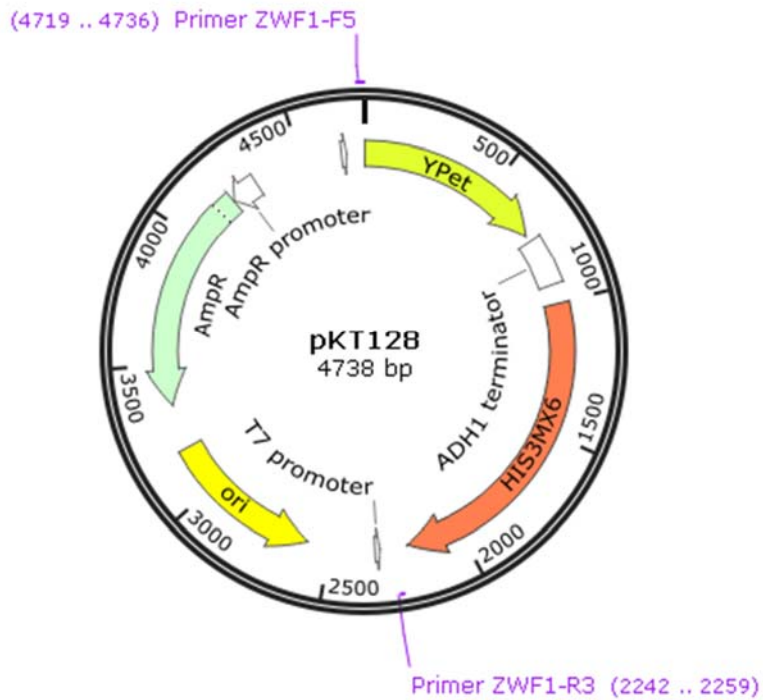
Created with SnapGene®



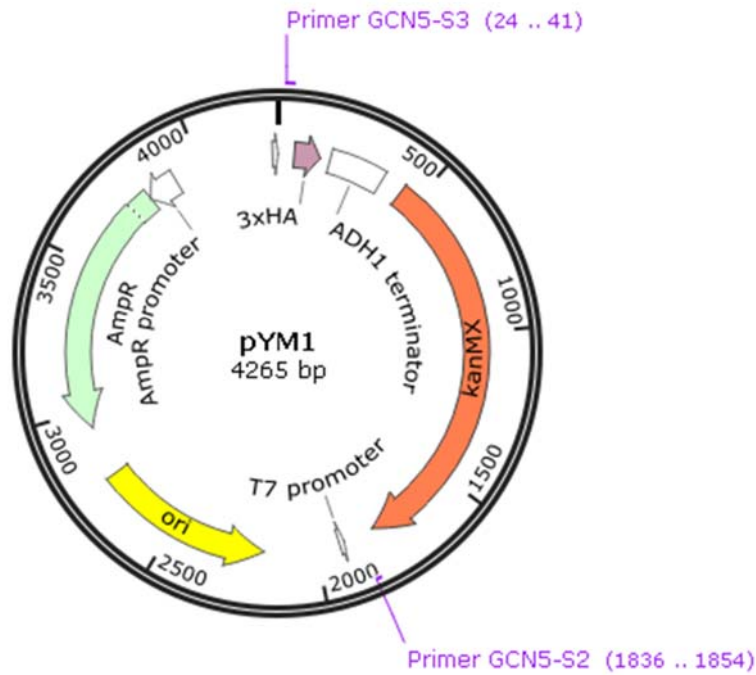
Εικόνα Π 1 Πλασμιδιακός χάρτης του pYM6. Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για την διάρρηξη του γονιδίου *zwf1* και τη σήμανση της Kin28p με τον επίτοπο Myc.



Εικόνα Π 2 Πλασμιδιακός χάρτης του YEpl246. Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για την διάρρηξη του γονιδίου *gcn5*.

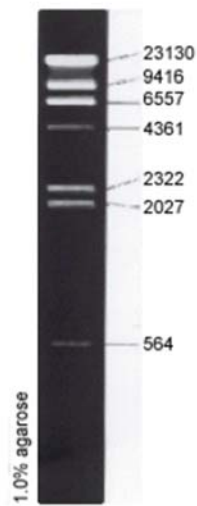


Εικόνα Π 3 Πλασμιδιακός χάρτης του pKT128. Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση της *Zwf1p* με GFP.

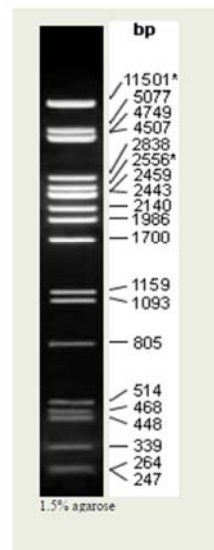


Εικόνα Π 4 Πλασμιδιακός χάρτης του pYM1. Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση της πρωτεΐνης Gcn5p με τον επίτοπο HA.

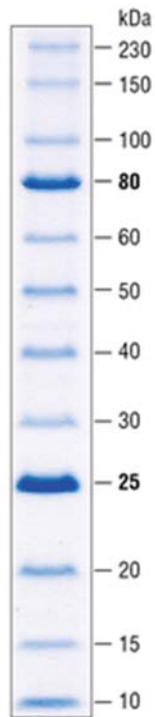
λ HindIII DNA ladder



λ PstI DNA ladder



Εικόνα Π 5 Μάρτυρες DNA που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης



Εικόνα Π 6 Μάρτυρας Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa) (NEB) που χρησιμοποιήθηκε για την SDS-PAGE

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια

T.A.E(50X) ρυθμιστικό διάλυμα

Tris acetate	2.0M
EDTA	0.05M

Ρυθμιστικό διάλυμα επαναιώρησης δειγμάτων (4x-SDS-Sample Buffer)

Tris-HCl (pH 6.8)	100mM
SDS	4% w/v
Bromophenol blue	0.2% w/v
Γλυκερόλη	20% w/v
DTT	200mM

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE

Tris-HCl	25mM
Γλυκίνη	250mM
SDS	0.1%

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer)

Tris- HCl	50 mM
Γλυκίνη	380 mM
SDS	0.1%
Μεθανόλη	20%

Διάλυμα TBS

Tris/HCl PH=7.5	20mM
NaCl	150mM

Διάλυμα πλύσης (TTBS)

Tris/HCl PH=7.5	20mM
NaCl	150mM
Tween-20	0.3%

Διάλυμα για την απομάκρυνση θορύβου (blocking solution)

TTBS	1x
σκόνη γάλακτος	5%

Διάλυμα αντισώματος

TTBS	1x
σκόνη γάλακτος	1%

Θρεπτικά Υλικά

Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)

Yeast extract	10g/L
Peptone	20g/L
Glucose/dextrose	20g/L
(Agar)	18g/L

YP 0.2% glucose

Yeast extract	10g/L
Peptone	20g/L
Glucose/dextrose	2g/L
(Agar)	18g/L

Standard Minimal Medium

Yeast nitrogen base without amino acids	6.7g/L
Glucose	20g/L
(Agar)	18g/L

Βιβλιογραφία

1. Alberts, B., *The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists*. Cell, 1998. **92**(3): p. 291-4.
2. Gavin, A.C. and G. Superti-Furga, *Protein complexes and proteome organization from yeast to man*. Curr Opin Chem Biol, 2003. **7**(1): p. 21-7.
3. Cramer, P., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg, *Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1863-76.
4. De Las Rivas, J. and C. Fontanillo, *Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks*. PLoS Comput Biol, 2010. **6**(6): p. e1000807.
5. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
6. Zhu, H., et al., *Global analysis of protein activities using proteome chips*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2101-5.
7. Gavin, A.C., et al., *Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 141-7.
8. Ho, Y., et al., *Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 180-3.
9. Pitre, S., et al., *Computational methods for predicting protein-protein interactions*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2008. **110**: p. 247-67.
10. Aloy, P. and R.B. Russell, *The third dimension for protein interactions and complexes*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(12): p. 633-8.
11. Bruckner, A., et al., *Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(6): p. 2763-88.
12. Templin, M.F., et al., *Protein microarray technology*. Trends Biotechnol, 2002. **20**(4): p. 160-6.
13. Wolf-Yadlin, A., M. Sevecka, and G. MacBeath, *Dissecting protein function and signaling using protein microarrays*. Curr Opin Chem Biol, 2009. **13**(4): p. 398-405.
14. Chen, R. and M. Snyder, *Yeast proteomics and protein microarrays*. J Proteomics, 2010. **73**(11): p. 2147-57.
15. Volkel, P., P. Le Faou, and P.O. Angrand, *Interaction proteomics: characterization of protein complexes using tandem affinity purification-mass spectrometry*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 883-7.
16. Huber, L.A., *Is proteomics heading in the wrong direction?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 74-80.
17. Chothia, C. and J. Janin, *Principles of protein-protein recognition*. Nature, 1975. **256**(5520): p. 705-8.
18. Skrabanek, L., et al., *Computational prediction of protein-protein interactions*. Mol Biotechnol, 2008. **38**(1): p. 1-17.
19. Pavlopoulos GA. , et al., *Biological information extraction and co-occurrence analysis.*, in "Biomedical Literature Mining", *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, USA (In Press).
20. Enright, A.J., et al., *Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events*. Nature, 1999. **402**(6757): p. 86-90.
21. Ruths, T., D. Ruths, and L. Nakhleh, *GS2: an efficiently computable measure of GO-based similarity of gene sets*. Bioinformatics, 2009. **25**(9): p. 1178-84.
22. Brownell, J.E., et al., *Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation*. Cell, 1996. **84**(6): p. 843-51.

23. Sterner, D.E., et al., *Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 86-98.
24. Grant, P.A., et al., *Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex*. Genes Dev, 1997. **11**(13): p. 1640-50.
25. Pray-Grant, M.G., et al., *The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(24): p. 8774-86.
26. Sterner, D.E., R. Belotserkovskaya, and S.L. Berger, *SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11622-7.
27. Lanza, A.M., et al., *Linking yeast Gcn5p catalytic function and gene regulation using a quantitative, graded dominant mutant approach*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e36193.
28. Perrone, G.G., C.M. Grant, and I.W. Dawes, *Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 218-30.
29. Nogae, I. and M. Johnston, *Isolation and characterization of the ZWF1 gene of Saccharomyces cerevisiae, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase*. Gene, 1990. **96**(2): p. 161-9.
30. Slekar, K.H., D.J. Kosman, and V.C. Culotta, *The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28831-6.
31. Kreams, B., C. Charizanis, and K.D. Entian, *Mutants of Saccharomyces cerevisiae sensitive to oxidative and osmotic stress*. Curr Genet, 1995. **27**(5): p. 427-34.
32. Feaver, W.J., et al., *Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIK*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1103-9.
33. Hengartner, C.J., et al., *Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases*. Mol Cell, 1998. **2**(1): p. 43-53.
34. Simon, M., B. Seraphin, and G. Faye, *KIN28, a yeast split gene coding for a putative protein kinase homologous to CDC28*. EMBO J, 1986. **5**(10): p. 2697-701.