

**ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ
ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Β ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ Α. ΚΡΙΤΗΣ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ**

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 1992

**ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ
ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Β ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ Α. ΚΡΙΤΗΣ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ**

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 1992

Την εξεταστική επιτροπή της Διδασκαρικής αυτής Διατριβής απετέλεσαν :

Βασίλης Ι. Ζαννής : Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικού Τμήματος
Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωσήφ Παπαματθαίου : Καθηγητής Βιολογίας Βιολογικού Τμήματος
Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Π. Ανάγνου : Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης

Χαράλαμπος Σαββάνης : Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικού
Τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριακή Θερμού : Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ιατρικού
Τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης

στους γονείς μου

Μαρία και Άση

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε κατά ένα μεγάλο μέρος στο εργαστήριο Βιοχημείας του κ. Ζαννή στον τομέα Βασικών Επιστημών του Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης και κατά ένα μικρότερο, στο εργαστήριο του κ. Ζαννή στον τομέα Μοριακής Γενετικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου της Βοστώνης. Θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ζαννή για την καθοδήγηση της διατριβής καθώς επίσης και για την δυνατότητα που μου προσέφερε να εργασθώ σε επιστημονικό περιβάλλον τόσο στην Κρήτη όσο και στη Βοστώνη.

Ευχαριστώ θερμά την ομάδα θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Κρήτης για τη συμπαράσταση στις δύσκολες στιγμές του ξεκινήματός μου και για τη συνεχή επιστημονική επικοινωνία.

Ευχαριστώ το φίλο και συνάδελφό μου Θ. Μιχαηλίδη που αφιέρωσε πολλές ώρες μαζί μου καθοδηγώντας, επιβλέποντας και ενθαρρύνοντας τα πρώτα μου βήματα στον "πάγκο". Οφείλω να ευχαριστήσω τον Γ. Ταλιανίδη για την συμπαράστασή του και την έξοχη συνεργασία μας, τους Χ. Κλαδάρα και Μ. Χατζοπούλου-Κλαδάρα για την καθοδήγησή τους, καθώς επίσης και την φίλη μου Κ. Μπάρδα που έκανε τη ζωή μου απλούστερη στο εργαστήριο.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Αριστείδης Α. Κριτής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1

Συντηρήσεις

6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Λιποπρωτεΐνες - Απολιποπρωτεΐνες - Μεταβολισμός των Λιποπρωτεϊνών	8
2. Απολιποπρωτεΐνη ΑΙ-σχηματισμός της HDL	11
2.1. Το cDNA της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ	12
2.2. Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ	13
3. Απολιποπρωτεΐνη Β- σχηματισμός Χυλομικρών-VLD-LDL	13
3.1. Το cDNA της Απολιποπρωτεΐνης Β	16
3.2. Το γονίδιο της Απολιποπρωτεΐνης Β	19
4. Σκοπός της εργασίας και πειραματικές προσεγγίσεις	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ	23
ΜΕΘΟΔΟΙ	23
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με την αλκαλική μέθοδο.	23
Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με την αλκαλική μέθοδο.	24
Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο του Βρασμού (boiling mini prep.).	25
Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πύρτωμα αγαρόζης.	
1. Ηλεκτροέκλυση	25
2. Απομόνωση DNA από χαμηλής τήξης πύρτωμα αγαρόζης (low melting point agarose)	26
Απομόνωση τμημάτων DNA από πύρτωμα ακρυλαμίδιου.	26
Ραδιοσήμανση του DNA.	
α. Nick Translation	27
β. Μέθοδος της "τυχαίας εκκίνησης σήμανσης" (Random oligo labelling).	28
γ. 3' ακραία σήμανση (end labelling).	29
δ. 5' ακραία σήμανση (end labelling) συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων.	29
ε. 5' ακραία σήμανση τμημάτων DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).	30
Τεχνικές Υποαλωανοποίησης.	
1. Συμπλήρωση των άκρων τμημάτων DNA με το τμήμα Klenow της πολυμεράσης I (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).	31

2. Αντίδραση λεγάζης (Ligation reaction).	31
Μετασχηματισμός Βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο $\text{CaCl}_2\text{-RbCl}_2$.	33
Ταυτοποίηση Βακτηριακών Κλώνων με τη μέθοδο Grunstein.	34
Προϊβριδοποίηση και Υβριδοποίηση κατά CHURCH.	35
Προσδιορισμός Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας με μήτρα δώλων DNA.	35
Μετασχηματισμός (Transfection) Κυττάρων σε Κυτταροκαλλιέργεια.	
Τεχνητή της συγκαταρρήμισης DNA με $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.	36
α. Παροδικός μετασχηματισμός επικαρωτικών κυττάρων και ραδιοσήμανση <i>in vivo</i> με ^{35}S Μεθειονίνη.	37
β. Μετασχηματισμός κυττάρων με σκοπό τη δημιουργία κυτταριών γραμμών που εκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες.	37
γ. Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών από κλώνους μόνιμα μετασχηματισμένους.	38
Ψύξη και Απόψυξη Κλώνων	38
Ανοσοκαταρρήμιση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών.	39
Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτική ακρυλαμίδιου-SDS.	41
Επίπλευση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών σε διαβάθμιση πυκνότητας διαλύματος άλατος KBr.	41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΕΩΝ	44
1. Κατασκευή πλασμιδίων φορέων (Vectors)	44
Σειρά φορέων ΒΑ	44
Φορέας ΒΑ I	44
Φορέας ΒΑ II	44
Φορέας ΒΑ III	45
2. Υποκλωνοποίηση των F τμημάτων της αποΒ στους ενδιάμεσους φορείς ΒΑI, ΒΑII και ΒΑIII	48
Σειρά κατασκευών ΒΑF	48
Κατασκευή ΒΑIF1	49
Κατασκευή ΒΑIF2	50
Κατασκευή ΒΑIF3	51
Κατασκευή ΒΑIF4	52
Κατασκευή ΒΑIF5	53
Κατασκευή ΒΑIF6	54
Κατασκευή ΒΑIF7	55
Κατασκευή ΒΑIF8	56
Κατασκευή ΒΑIF9	57

Κατασκευή ΒΑΙΠF10	58
Κατασκευή ΒΑΙΠF11	59
Κατασκευή ΒΑΙF12	60
Κατασκευή ΒΑΙF13	61
Πλασμίδιο ρUB19	62
Πλασμίδιο ρUB47	63
Πλασμίδιο ρUBSB4	64
Πλασμίδιο 26ΑΙΤ	65

3. Υποκλωνοποίηση των F τμημάτων του cDNA της αποB από τους ενδιάμεσους φορείς της σειράς ΒΑ στον τελικό φορέα έκφρασης ρBMTAIN.	66
Σειρά κατασκευών ρΑΙΝBF	66
Φορέας ρBMTAIN	67
Σύνωση των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή της σειράς ρΑΙΝBF	68
Στρατηγική για τη δημιουργία της σειράς κατασκευών ρBMB	69
Φορέας ρBMT3XΜ	69
Πλασμίδιο ρUΑΡΟΒ-100	70
Φορέας ρBMT3XΜ	71
Σειρά κατασκευών ρBMB	72
ρBMB29	72
ρBMB41	72
ρBMB47	73
Πλασμίδιο ρBMB29	74
Πλασμίδιο ρBMB41	75
Πλασμίδιο ρBMB47	76

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΙΒ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ Β29, Β41, Β47 ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.

Μεθοδολογία	78
α. Εκφραση υβριδικών πρωτεϊνών ΑΙΒ.	80
Εκφραση των υβριδικών πρωτεϊνών ΑΙΒ1, ΑΙΒ3, και ΑΙΒ4 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια ρΑΙΝBF1, ρΑΙΝBF3 και ρΑΙΝBF4.	80
Εκφραση υβριδικών πρωτεϊνών ΑΙΒ7, ΑΙΒ8 και ΑΙΒ9 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια ρΑΙΝBF7, ρΑΙΝBF8 και ρΑΙΝBF9.	84
Εκφραση υβριδικών πρωτεϊνών, ΑΙΒ2, ΑΙΒ5, ΑΙΒ6 και ΑΙΒ10 μετά από παροδική επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς HepG2 με τα πλασμίδια	

ρΑΙΝΒF2 ρΑΙΝΒF5 ρΑΙΝΒF6 και ρΑΙΝΒF10.	90
Εκφραση υβριδικών πρωτεϊνών ΑΙΒ11, ΑΙΒ12 και ΑΙΒ13 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια ρΑΙΝΒF11, ρΑΙΝΒF12 και ρΑΙΝΒF13.	92
β. Εκφραση των πρωτεϊνών Β29, Β41, και Β47 μετά από παροδική επιμόλυνση C127 με τα πλασμίδια ρΒΜΒ29, ρΒΜΒ41 και ρΒΜΒ47.	95
γ. Εκφραση πρωτεϊνών Β29, Β41 και Β47 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια ρΒΜΒ29, ρΒΜΒ41 και ρΒΜΒ47.	95
2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΙΒ1 ΕΩΣ ΑΙΒ7 ΝΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΟΥΝ ΑΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΣ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΕΠΙΠΛΕΥΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΛΑΤΟΣ ΒΡΩΜΙΟΥΧΟΥ ΚΑΛΙΟΥ (KBr).	98
Γενικά	98
Επίπλευση των υβριδικών πρωτεϊνών ΑΙΒ1 έως και ΑΙΒ7.	98
Επίπλευση της πρωτεΐνης Β29.	107
Επίπλευση της πρωτεΐνης Β41.	107
Επίπλευση της πρωτεΐνης Β47.	107
3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ mRNA ΠΟΥ ΟΔΗΓΕΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΥΟ ΜΟΡΦΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	111
Γενικά	111
Ανίχνευση της μεταγραφικής τροποποίησης του mRNA από τη σύνθεση δύο μορφών της υβριδικής πρωτεΐνης ΑΙΒ7.	111
Ανίχνευση της μεταγραφικής τροποποίησης του mRNA από τη σύνθεση δύο μορφών της υβριδικής πρωτεΐνης ΑΙΒ8.	112
Ανίχνευση της μεταγραφικής τροποποίησης του mRNA από την παραγωγή της υβριδικής πρωτεΐνης ΑΙΒ9-stop.	112
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
Προϋποθέσεις σύνδεσης της αποΒ με λιπίδια για το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης.	114
Χρήση κυτταρικών γραμμών που εκφράζουν τμήματα της αποΒ για τη μελέτη της θέσης και της σημασίας της Ο και Ν-γλυκοσυλλώσης της αποΒ.	117
Χρήση κυτταρικών γραμμών που εκφράζουν τμήματα της αποΒ για τη μελέτη της μεταμεταγραφικής τροποποίησης του mRNA.	118
Γενικά συμπεράσματα.	119
Μελλοντικές κατευθύνσεις	120

<i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i>	122
<i>SUMMARY</i>	124
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	126

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

A: αδενίνη
Ac: οξικό
ADP: διφωσφορική αδενοσίνη
ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη
bp: ζεύγη βάσεων (base pairs)
C: κυτοσίνη
°C: βαθμοί κελσίου
DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EDTA: αιθυλενοδιαίμινο-τετραοξικό οξύ
EtBr: βρωμοσύχο αιθίδιο
G: γουανίνη
GDP: διφωσφορική γουανοσίνη
GTP: τριφωσφορική γουανοσίνη
HDL: Λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
(High Density Lipoprotein)
kb: χιλιοβάσεις (kilobases)
kDa: χιλιοδαλτόνιο (kilodalton)
Km: σταθερά Michaelis
LDL: Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
(Low Density Lipoprotein)
M: μοριακότητα διαλύματος
MB: μοριακό βάρος
ml: κυβικό εκατοστό
μl: κυβικό χιλιοστό
μg: μικρογραμμάριο
mole: γραμμόριο
ng: νανογραμμάριο
nm: νανόμετρο
RNA: ριβονουκλεϊκό οξύ
T: θυμίνη
u: μονάδες (units)
Tris: τρι-υδροξυμεθυλο αμινομεθάνιο
VLDL: Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας
(Very Low Density Lipoprotein)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Λιποπρωτεΐνες-Απολιποπρωτεΐνες-Μεταβολισμός των Λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομοριακά συμπλέγματα λιπιδίων και πρωτεϊνών παράγονται κυρίως στο σπλάι και το λεπτό έντερο και είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά και το μεταβολισμό των λιπιδίων στον οργανισμό. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος είναι σφαιρικά σωμάτια με πυρήνες που αποτελούνται από απολιπικά και ουδέτερα λιπίδια, κυρίως εστέρες της χοληστερόλης και τριγλυκερίδια, που περιβάλλονται από σχετικά πολικά στοιχεία όπως φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και πρωτεΐνες (Herbert *et al.*, 1982, Ζαννής και συνεργάτες 1990). Χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών που ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες ή αποπρωτεΐνες. Οι απολιποπρωτεΐνες ακολουθούν αλφαβητική ονοματολογία (Alaunovic, P. 1971) και οι κυριότερες είναι οι αποAI, αποAII, αποAIV, αποB, αποCI, αποCII, αποCIII, αποD και αποE. Στον πίνακα 1 συνοψίζονται οι ιδιότητες και η σύσταση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος στον άνθρωπο.

Στο πλάσμα πέντε ομάδες λιποπρωτεϊνών παίζουν σπουδαίο ρόλο στη μεταφορά και το μεταβολισμό των λιπιδίων. (1) **Χυλομικρά**, τα οποία συντίθενται κυρίως από το λεπτό έντερο, (2) **Λιποπρωτεΐνες Πολύ Χαμηλής Πυκνότητας VLDL** (Very Low Density Lipoproteins) οι οποίες προέρχονται κατά ένα ποσοστό από λιπίδια που προσλαμβάνονται από την τροφή και κυρίως παράγονται από το σπλάι και χρησιμεύουν για την εξαγωγή και κυκλοφορία των τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης, (3) **Λιποπρωτεΐνες Χαμηλής Πυκνότητας LDL** (Low Density Lipoproteins) οι οποίες θεωρείται ότι είναι το τελευταίο στάδιο του καταβολισμού της VLDL και (4) **Λιποπρωτεΐνες Υψηλής Πυκνότητας HDL** (High Density Lipoproteins) οι οποίες εμπλέκονται στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης. (Atkinson *et al.*, 1974, Havel *et al.*, 1982, Herbert *et al.*, 1982, Laggner *et al.*, 1981, Scavu *et al.*, 1982, Smith *et al.*, 1978, Zannis *et al.*, 1985, Ζαννής και συνεργάτες 1990).

Στις σελίδες που ακολουθούν παρουσιάζονται στοιχεία σχετικά με τις τάξεις αυτές των λιποπρωτεϊνών. Αν και το θέμα της παρούσας διατριβής είναι στενά συνδεδεμένο με τις τάξεις των VLDL και LDL η τάξη της HDL περιγράφεται σε κάποια έκταση. Αυτό θεωρείται αναγκαίο μια και η αποπρωτεΐνη AI κύριο συστατικό του HDL σωματιδίου χρησιμοποιήθηκε σε μία από τις πειραματικές προσεγγίσεις. Εκτενέστερη ανάλυση ακολουθεί στην παράγραφο 4. : Σκοπός της εργασίας και πειραματικές προσεγγίσεις.

Πίνακας 1: Ιδιότητες και σύσταση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος στον άνθρωπο.

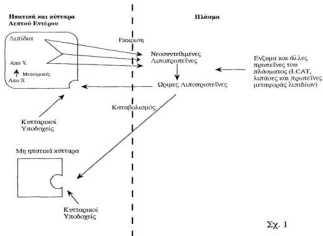
Τάξη	Χυλομικρά	VLDL	LDL	HDL
λιποπρωτεΐνης				
Μέγεθος				
(Å)	750-12000	300-700	180-300	50-120
Εύρος Πυκνότητας				
(g/ml)	0.940	0.940-1.006	1.019-1.063	1.063-1.210
Τριγλυκερίδια				
(% Βάρους)	80-95	45-65	4-8	2-7
Φωσφολιπίδια				
(% Βάρους)	3-6	15-20	18-24	26-32
Ελεύθερη χοληστερόλη	1-3	4-8	6-8	3-5
(% Βάρους)				
Εστεροποιημένη χοληστερόλη	2-4	16-22	45-50	15-20
(% Βάρους)				
S₀^a	400 ^a	20-400 ^a	0-12 ^a	0-9 ^b
Πρωτεΐνες				
(% Βάρους)	1-2	6-10	18-22	45-55
Κύριες	AI, AIV, B48	B, E, CI,	B	AI, AII, E
αποπρωτεΐνες	CI, CIII, E	CII, CIII		
Δευτερεύουσες	AII, CII	AI, AII,	CI, CII,	CI, CII,
αποπρωτεΐνες		AIV	CIII, E	CIII, D, F

Ο πίνακας είναι τροποποιημένος από τους Herbert *et al.*, 1982, Ζαννής και συνεργάτες 1990.

a S₀ είναι ο διορθωμένος δείκτης επίπλευσης σε πυκνότητα $d=1,063\text{g/ml}$ εκφρασμένος σε Svedbergs [$10^{-13} \text{cm}/(\text{sec} \cdot \text{dyne} \cdot \text{g})$].

b f 1,20 είναι διορθωμένος δείκτης επίπλευσης σε πυκνότητα $d=1,2 \text{g/ml}$

Ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά ενδιάμεσα βήματα, με στόχο τη ρύθμιση των λιπιδίων του πλάσματος και την ομοίωση της χοληστερόλης. Παρακάτω απεικονίζεται συνοπτικά το σύνθετο αυτό μεταβολικό μονοπάτι.



Σχ. 1

Σχήμα 1. Οι απολιποπρωτείνες συντίθενται κυρίως στο σπυκώτι και το λεπτό έντερο (Απο Χ) και υφίστανται ενδοκυττάρειες μετατροπές όπως γλυκοσυλλίωση και στη συνέχεια είτε εκκρίνονται ως έχουν είτε ως λιποπρωτεϊνικά σωματίια. Στο πλάσμα οι απολιποπρωτείνες και τα λιποπρωτεϊνικά σωματίια υφίστανται την επίδραση άλλων πρωτεϊνών όπως της λιπάσης των λιποπρωτεϊνών και της ηπατικής λιπάσης που υδρολύουν τριγλυκερίδια, της ακετυλοτρανσφεράσης της λεκιθίνης-χοληστερόλης (Lecithin-cholesterol acetyltransferase, LCAT), που είναι υπεύθυνη για την εστεροποίηση της χοληστερόλης των HDL και LDL και άλλων πρωτεϊνών που καταλύουν ανταλλαγή ή και μεταφορά εστέρων της χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων από λιποπρωτεΐνη σε λιποπρωτεΐνη. Στο πλάσμα επίσης συμβαίνει και ανταλλαγή των απολιποπρωτεϊνών μεταξύ λιποπρωτεϊνών με αποτέλεσμα την τροποποίησή τους σε ώριμες λιποπρωτείνες οι οποίες καταβολίζονται μέσω αναγνώρισης των απολιποπρωτεϊνών από κυτταρικούς υποδοχείς.

2. Απολιποπρωτεΐνη ΑΙ - σχηματισμός HDL

Η απολιποπρωτεΐνη ΑΙ είναι το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας, HDL. Τα σωματίδια αυτά περιέχουν περισσότερη πρωτεΐνη (45-55% κατά βάρος) από άλλες κλάσεις λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Η ποσοστιαία σύσταση των λιπιδίων κατά βάρος είναι: φωσφολιπίδια 26-32, χοληστερόλη 18-25, και τριγλυκερίδια 2-7 (Πίνακας Ι). Η αποΑΙ αποτελεί το 70% των πρωτεϊνών στο λιποπρωτεϊνικό σωματίο HDL και είναι σε αναλογία 3:1 με την αποΑII. Τα σωματίδια HDL περιέχουν και άλλες αποπρωτεΐνες όπως την ομάδα αποπρωτεϊνών C, καθώς και αποπρωτεΐνες E και D (Havel *et al.*, 1982, Herbert *et al.*, 1982, Scapu *et al.*, 1982, Smith *et al.*, 1978, Zannis *et al.*, 1985, Ζαννής και συνεργάτες 1990).

Μετρήσεις με χρήση ακτίνων X (low-angle x-ray scattering) δηλώνουν ότι οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας, HDL, περιβάλλονται από ένα εξωτερικό κάλυμμα υψηλής ηλεκτρονιακής πυκνότητας κάτω απ' το οποίο υπάρχει ένας σχετικά φτωχός σε ηλεκτρόνια πυρήνας (Shipley *et al.*, 1972, Laggner *et al.*, 1972 και 1973, Atkinson *et al.*, 1974, Muller *et al.*, 1974.). Ο πυρήνας αυτός μπορεί να θεωρηθεί ότι δηλώνει την παρουσία ουδέτερων λιπιδίων, ενώ το κάλυμμα υψηλής ηλεκτρονιακής πυκνότητας αντιστοιχεί σε ενυδατωμένη πρωτεΐνη και σε υδρόφιλες πολικές ομάδες φωσφολιπιδίων.

Αρκετά μοντέλα έχουν προταθεί προσπαθώντας να εξηγήσουν τη σχέση μεταξύ λιπιδίων και αποπρωτεϊνών στο λιποπρωτεϊνικό σωματίο υψηλής πυκνότητας, HDL (Stoffel *et al.*, 1974, Assmann *et al.*, 1974, Jackson *et al.*, 1974). Στα μοντέλα αυτά τα φωσφολιπίδια και οι πολικές περιοχές της αποΑΙ τοποθετούνται στο εξωτερικό περιβάλλον του σωματιδίου, ενώ οι υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης θεωρείται ότι αντιδρούν με τις ομάδες ακυλίων των λιπαρών οξέων και αποκλείονται από την υδατική φάση προσανατολιζόμενες προς τον υδρόφοβο πυρήνα του σωματιδίου HDL. Τα μοντέλα αυτά δίνουν μεγάλη έμφαση στις αμφιπαθείς έλικες της αποπρωτεΐνης ΑΙ οι οποίες προβάλλονται σαν στήριγμα για τα λιπίδια και επιτρέπουν την επικοινωνία με την υδατική φάση, ενώ ταυτόχρονα αποκλείουν από αυτήν μη πολικές μονάδες (Segrest *et al.*, 1974, Jackson *et al.*, 1975).

Η αποΑΙ δρά σαν συνεργατικός ενεργοποιητής του ενζύμου της αετιλοτρανσφεράσης της λεκιθίνης-χοληστερόλης (Lecithin-cholesterol acetyltransferase, LCAT), που είναι υπεύθυνο σχεδόν εξ ολοκλήρου για την εστεροποίηση της χοληστερόλης στο πλάσμα (Fielding *et al.*, 1972). Η παραπάνω αντίδραση θεωρείται ότι συμβάλλει στη διαδικασία ωρίμανσης των HDL σωματιδίων και έχει δείχθει πειραματικά ότι αναστολή ή απουσία της δράσης του ενζύμου LCAT οδηγεί στην παραγωγή σωματιδίων HDL φτωχών σε εστεροποιημένη χοληστερόλη και με μορφολογία διαφορετική από την HDL (Forte *et al.*, 1971, Hamilton, R.L. 1972). Τα σωματίδια αυτά θεωρούνται φυσικά

πρόδρομα μόρια της HDL μια και είναι δυνατόν να μεταβληθούν σε κανονική HDL μετά από επώαση με το ένζυμο LCAT (Norum *et al.*, 1975, Glomset *et al.*, 1980). Παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει και σε κύτταρα ηπατώματος HepG2 σε καλλιέργεια μετά από χαρακτηρισμό των ενδογενώς παραγομένων λιποπρωτεϊνών (McCall *et al.*, 1988 και 1989) .

Η αποΑΙ βρίσκεται σε αρκετά μεγάλα ποσοστά στο πλάσμα σε αναλογίες που φτάνουν το 1,0-1,2 mg/ml και φαίνεται ότι μετέχει στην αντίστροφη μεταφορά της μη εστεροποιημένης χοληστερόλης από περιφερικούς ιστούς στο συκώτι για απέκκριση (Glomset *et al.*, 1973). Το ένζυμο LCAT είναι υπεύθυνο για την εστεροποίηση της χοληστερόλης αυτής μόλις αφαιρεθεί από τους περιφερικούς ιστούς.

Τα επίπεδα HDL έχουν αντίστροφα συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης της στεφανιαίας νόσου και τό ίδιο έχει δείχθει και για την αποΑΙ (Heiss *et al.*, 1982).

2.1. Το cDNA της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ

cDNA κλώνοι της αποΑΙ απομονώθηκαν από διάφορα εργαστήρια και μελετήθηκαν όσον αφορά τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία (Breslow *et al.*, 1982, Cheung *et al.*, 1983). Το mRNA της αποΑΙ έχει μήκος 893 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί για 267 αμινοξέα. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με το μέγεθος του mRNA της αποΑΙ, που προκύπτει από ανάλυση κατά Northern mRNA από σκωτώ ανθρώπου (Zannis *et al.*, 1985).

Ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της αποΑΙ (Baker *et al.*, 1975, Brewer *et al.*, 1978) καθώς και της αλληλουχίας που συνάγεται από το cDNA (Breslow *et al.*, 1982, Cheung *et al.*, 1983), δείχνουν ότι η μετάφραση ξεκινά από μια μεθειονίνη, 24 αμινοξέα πριν από το αμινοτελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης. Τα 18 αμινοτελικά αμινοξέα από τα 24 μπορούν να πεφθούν κατά τη διάρκεια της μετάφρασης από τις μικροσωμικές μεμβράνες μέσα στο κύτταρο και αποτελούν το προ-προπεπτιδίο της αποΑΙ. Τα υπόλοιπα 6 είναι το προπεπτιδίο της αποΑΙ. Το προπεπτιδίο δεν απομακρύνεται ενδοκυττάρια, αλλά περιέχεται στην εκκρινόμενη αποΑΙ. Πρόσφατα δείχθηκε ότι υπάρχει μια πρωτεολυτική δράση που αναστέλλεται από EDTA στον ανθρώπινο ορό και στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών και ηπατικών κυττάρων η οποία είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση του προπεπτιδίου (Edelstein *et al.*, 1983). Η αλληλουχία του ωρίμου τμήματος της πρωτεΐνης όπως προβλέπεται από τις παραπάνω cDNA αλληλουχίες είναι σχεδόν όμοια με την αλληλουχία που καθορίστηκε με μεθόδους ανάλυσης πρωτεϊνικής αλληλουχίας (Brewer *et al.*, 1978, Baker *et al.*, 1975 και 1977).

Παρατηρήθηκε ότι η αμινοξική αλληλουχία της αποΑΙ μεταξύ των καταλοίπων 99 έως 230, αποτελείται από έξι επαναλήψεις 22 αμινοξέων, πέντε από τις οποίες αρχίζουν με προλίνη. Εξέταση της αλληλουχίας του cDNA δείχνει μια

επαναλαμβανόμενη αλληλουχία μήκους 66 νουκλεοτιδίων. Όπως διαπιστώθηκε από την πρωτεϊνική αλληλουχία η προλίνη που όπως είναι γνωστό τεματίζει δομές α-έλικας στις πρωτεΐνες, επαναλαμβάνεται κάθε 22 αμινοξέα. Τα αμινοξέα μεταξύ δύο προλινών αν τοποθετηθούν σε ένα διάγραμμα τροχού του Edmondson καθορίζουν μία α-έλικα με μια πολική και μια μη πολική πλευρά (Schiffer *et al.*, 1967). Αυτό είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό των αμφιπαθών ελίκων, και χαρακτηριστικό των λιποπρωτεϊνών (Li *et al.*, 1988). Γενικά θεωρείται ότι η μη πολική πλευρά της έλικας, αντιδρά με το υδρόφοβο λιπιδικό κέντρο του λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου ενώ το πολικό μέρος της α-έλικας αντιδρά με την υδρόφιλη φάση δηλαδή πλάσμα και υδρόφιλες κεφαλές φωσφολιπιδίων. Επιπρόσθετα, κατάλοιπα με θετικά φορτία τείνουν να συγκεντρώνονται μεταξύ των πολικών και μη πολικών περιοχών των α-ελίκων με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της δόμησης πρωτεΐνης-λιπιδίων (Segrest *et al.*, 1974, Fukushima *et al.*, 1979, Kaiser *et al.*, 1983).

2.2. Το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης AI

Το γονίδιο της αποAI έχει απομονωθεί και έχει καθοριστεί η νουκλεοτιδική του αλληλουχία (Karathanasis *et al.*, 1983, Li *et al.*, 1988). Έχει μέγεθος 1863 bp και αποτελείται από τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια. Το τέταρτο εξόνιο κωδικοποιεί για 200 αμινοξέα που αποτελούν το καρβοξυτερματικό άκρο της αποAI. Οι επαναλήψεις των 66 νουκλεοτιδίων βρίσκονται σε αυτό το εξόνιο (Makrides *et al.*, 1988).

Μετά από μελέτες χρωμοσωμικής χαρτογράφησης βρέθηκε ότι το γονίδιο της αποAI βρίσκεται 2,6 kb μακριά από το γονίδιο της αποCIII και 7,5 kb μακριά από το γονίδιο της αποAIV στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (Karathanasis *et al.*, 1983 και 1985, Cheung *et al.*, 1985).

3. Απολιποπρωτεΐνη Β- σχηματισμός Χυλομικρών-VLDL-LDL

Η αποB είναι το αποκλειστικό πρωτεϊνικό συστατικό των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), βρίσκεται όμως και στα χυλομικρά καθώς επίσης και στις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Με ηλεκτρονική μικροσκοπία οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, LDL, φαίνονται ομοιογενή σφαιρικά σωματίδια με διάμετρο από 180 έως 300 Å. Οι LDL ορίζονται έτσι με βάση την πυκνότητά τους (1,019 έως 1,063 g/ml). Ο μέσος όρος συγκέντρωσης της αποB σε πλάσμα φυσιολογικών ενηλίκων είναι 0,7-1,0 mg/ml. Η ποσοστιαία σύστασή της κατά βάρος σε λιπίδια είναι : φωσφολιπίδια 18-24%, τριγλυκερίδια 4-8% μη εστεροποιημένη χοληστερόλη 6-8% και εστέρες της χοληστερόλης 45-50%. Τα σωματίδια LDL αποτελούνται από 25% πρωτεΐνη και 75% λιπίδια (Πίνακας I). Η τρέχουσα αντίληψη είναι ότι τα σωματίδια LDL προέρχονται από τις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) μετά από

διάφορες τροποποιήσεις που υφίστανται οι τελευταίες (Havel *et al.*, 1982, Herbert *et al.*, 1982, Smith *et al.*, 1978, Zannis *et al.*, 1985, Ζαννής και συνεργάτες 1990).

Οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) κυμαίνονται από 300 έως 700 Å στη διάμετρό τους και έχουν πυκνότητα από 0,94 έως 1,006 g/ml (Πίνακας I). Οι VLDL βρίσκονται σε ενδιάμεση πυκνότητα με τις LDL και τα χυλομικρά. Η σύσταση των VLDL διαφέρει ανάλογα με το φυσικό τους μέγεθος. Με διάφορες μεθόδους έχει βρεθεί ότι η αποΒ αποτελεί το 20-25% των πρωτεϊνών της VLDL ενώ οι αποC πρωτεΐνες το 35-50% και η αποΕ το 7-12% (Havel *et al.*, 1982, Herbert *et al.*, 1982, Zannis *et al.*, 1985, Ζαννής, και συνεργάτες 1990).

Οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας μεταφέρουν κυρίως τριγλυκερίδια που συντίθενται από τον οργανισμό. Κύρια πηγή τριγλυκεριδίων είναι το συκώτι και το λεπτό έντερο (Havel *et al.*, 1982, Ζαννής και συνεργάτες 1990). Η αποΒ συντίθεται κυρίως από το συκώτι και το λεπτό έντερο (Cladaras *et al.*, 1986, Krishnaiah *et al.*, 1980) Η σύνθεση γίνεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και η γλυκοσυλίωση της στο σωματίο Golgi, όπως συμβαίνει με όλες τις γλυκοπρωτεΐνες. Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας απομονώθηκαν από το σωματίο Golgi (Mahley *et al.*, 1969, Hamilton *et al.*, 1991). Τα τριγλυκερίδια φαίνονται σαν σταγόνα λιπιδίων στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και προστίθενται στην αποΒ ενδοκυττάρια για να σχηματισθεί το σωματίο της λιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας. Από τα σωματίδια Golgi στη συνέχεια οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας μεταφέρονται σε κυστίδια (vacuoles) προς την κυτταρική μεμβράνη για απέκκριση. Η απέκκριση των σωματιδίων πολύ χαμηλής πυκνότητας από το συκώτι εμποδίζεται από διάφορους παράγοντες όπως η κολχικίνη (Le Marchand *et al.*, 1973), που αναστέλλουν το σύστημα των μικροσωληνίσκων, υποδηλώνοντας έτσι ότι η μεταφορά της VLDL και η απελευθέρωσή της από το κύτταρο είναι μια ενεργός διαδικασία. Επίσης αναστολή της σύνθεσης της αποΒ με κυκλοεξιμίδη αναστέλλει την έκκριση λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (Davis *et al.*, 1982, Suita-Morgano *et al.*, 1982) δείχνοντας έτσι ότι η σύνθεση της αποΒ είναι συγγραφομένη με την παραγωγή VLDL σωματιδίων.

Το πρώτο βήμα για τον καταβολισμό της VLDL είναι η δέσμευσή της από την ενδοθηλιακή λιποπρωτεϊνική λιπάση και συνεπώς η υδρόλυση του μεγαλύτερου μέρους των τριγλυκεριδίων που μεταφέρει (Fielding *et al.*, 1977, Nilsson-Ehle *et al.*, 1980). Ο ρυθμός της υδρόλυσης αυτής, είναι στενά συνδεδεμένος με το μέγεθος της VLDL. Μεγαλύτερα σωματίδια VLDL περιέχουν περισσότερα μόρια αποCII πρωτεϊνών, τα οποία είναι συνεργατικοί παράγοντες (cofactors) της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Miller *et al.*, 1973). Έτσι ο ρυθμός υδρόλυσης ενδέχεται να συνδέεται τουλάχιστον εν μέρει με τον αριθμό των αποτελεσματικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεϊνικής λιπάσης με τον συνεργατικό της παράγοντα στην επιφάνεια του VLDL σωματιδίου. Καθώς η υδρόλυση προχωρά, φωσφολιπίδια και αποC πρωτεΐνες μεταφέρονται στα σωματίδια HDL (Patsch *et al.*, 1978, Kushwaha *et al.*, 1978) και έτσι δημιουργούνται τα κατάλοιπα

VLDL, προϊόν δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης τα οποία περιέχουν μικρό ποσοστό τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων, με πρωτεϊνικά συστατικά τις αποΒ και αποΕ.

Στον άνθρωπο ένα μεγάλο ποσοστό, πιθανόν περίπου το μισό της συνολικής VLDL, τροποποιείται για να σχηματίσει τα σωματίδια LDL. Μικρά VLDL σωματίδια τροποποιούνται για να δώσουν μικρά υπολείμματα τα οποία είναι πιο πιθανό να μετατραπούν σε LDL, ενώ μεγάλα VLDL σωματίδια τροποποιούνται σε μεγάλα υπολείμματα, τα οποία απομακρύνονται από το σκώτι χωρίς να έχουν την δυνατότητα να σχηματίσουν LDL. Σε τελική ανάλυση βλέπουμε ότι η τροποποίηση της VLDL δίνει ένα ευρύ φάσμα υπολειμμάτων με διαφορετική σύσταση σε λιπίδια, μέγεθος και συνεπώς πυκνότητες. Υπολείμματα σωματιδίων VLDL με πυκνότητα μεγαλύτερη του 1,006 g/ml συχνά αναφέρονται ως λιποπρωτεϊνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL), αλλά δεν υπάρχουν στοιχεία ότι τα σωματίδια αυτά διαφέρουν ποιοτικά από σωματίδια VLDL χαμηλότερης πυκνότητας (Havel *et al.*, 1982).

Ο σχηματισμός της LDL από την VLDL γίνεται με πρόσθετη απομάκρυνση τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων από το λιποπρωτεϊνικό σωματίο, καθώς επίσης και με αφαίρεση της αποΕ, γεγονός που είναι σύμφωνο με την παρατήρηση ότι το μοναδικό πρωτεϊνικό συστατικό της LDL είναι η αποΒ. Η μείωση των λιπιδίων θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με τη δράση της ηπατικής λιπάσης, ενώ η αφαίρεση της αποΕ μπορεί να είναι ένα παθητικό γεγονός και να οφείλεται στη μείωση του συνολικού μεγέθους του σωματιδίου ή της αλλαγής της σύστασης των λιπιδίων του ή ακόμη στην αλλαγή της διαμόρφωσής του στο χέρο (Sigurdsson *et al.*, 1975, Berman *et al.*, 1978).

Το λεπτό έντερο είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση και συνεπώς τον καταβολισμό λιπιδίων που προέρχονται από την τροφή. Η απορρόφηση και ο καταβολισμός των λιπιδίων επιτυγχάνεται κύρια με την ικανότητα του λεπτού εντέρου να συνθέτει χυλομικρά (Havel *et al.*, 1982, Ζαννής και συνεργάτες 1990). Τα χυλομικρά είναι λιποπρωτεϊνικά σωματίδια με πολύ μεγάλο μέγεθος, διαμέτρου από 750 έως 12000 Å και μέση πυκνότητα 0,94 g/ml, αποτελούνται κατά κύριο λόγο από τριγλυκερίδια 80-95% κατά βάρος, 1-3% μη εστεροποιημένη χοληστερόλη, 3-6% φωσφολιπίδια, 1-2% πρωτεΐνες και 2-4% εστεροποιημένη χοληστερόλη (Πίνακας 1). Το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των χυλομικρών είναι η αποΒ48, καθώς επίσης οι αποC, αποΑΙ και αποΕ πρωτεΐνες. Η τρέχουσα αντίληψη για τη σύνθεση των χυλομικρών είναι ότι δημιουργούνται από το λεπτό έντερο ταυτόχρονα με τη σύνθεση της αποΒ48. Τα λιπίδια προστίθενται στην αποΒ48 παράλληλα με την μετάφρασή της και ακολουθεί απέκκριση. Οι παρατηρήσεις αυτές προέρχονται από ανάλυση παθολογικών καταστάσεων αφηταλιποπρωτεϊναιμίας και υποβηταλιποπρωτεϊναιμίας (Herbert *et al.*, 1982, Kane *et al.*, 1989, Mars *et al.*, 1969, Levy *et al.*, 1970) Τα χυλομικρά τροποποιούνται μετά την έκκρισή τους και προστίθενται σ' αυτά αποC, αποΑΙ και

αποΕ πρωτείνες. Κατόπιν υφίστανται και άλλες τροποποιήσεις από εξωηπατικούς ιστούς και το μεγαλύτερο μέρος των τριγλυκεριδίων υδρολύεται από την λιποπρωτεϊνική λιπάση αποδίδοντας τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στους ιστούς και στην αλβουμίνη του ορού. Τα υπολείμματα των χυλομικρών μεταβολίζονται τελικά από το συκώτι μέσω αναγνώρισης της αποΕ από τον υποδοχέα της LDL B/E (Havel *et al.*, 1982, Gotto, Jr. *et al.*, 1896, Ζαννής και συντεργάτες 1990).

3.1 Το cDNA της Απολιποπρωτεΐνης Β

Ο καθορισμός των σχέσεων δομής - λειτουργίας της αποΒ και η σχέση μεταξύ των δύο μορφών της αποΒ (B100 και B48) υπήρξε ένας πολύ δύσκολος στόχος στο παρελθόν, κυρίως λόγω του μεγέθους της πρωτεΐνης και των ασυνήθιστων φυσικοχημικών ιδιοτήτων του μορίου σε υδατικό διάλυμα απουσία λιπιδίων. Τα τελευταία χρόνια όμως χάρη στην πρόοδο της Μοριακής Βιολογίας, επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής της αποΒ, δηλαδή της αμινοξικής της αλληλουχίας (Cladaras *et al.*, 1986, Law *et al.*, 1986, Yang *et al.*, 1986, Knott *et al.*, 1986).

Στις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι το cDNA της αποΒ αποτελείται από 14112 νουκλεοτίδια, συμπεριλαμβανομένων και των 128 και 301 νουκλεοτιδίων στις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές αντίστοιχα. Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία δείχνει ότι το mRNA της αποΒ κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με 4560 αμινοξέα συμπεριλαμβανομένων και των 24 αμινοξέων του πεπτιδίου σήματος. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, υπολογισμένο με βάση την πρωτοταγή της δομή είναι 513 KDa. Αν θεωρήσουμε ότι το ποσοστό γλυκοσυλλίωσης της αποΒ είναι 8-10%, τότε το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης ανέρχεται σε περίπου 570 KDa. Υπολογίστηκε ότι περιέχεται ένα μόριο της αποΒ ανά σωματίδιο LDL (Cladaras *et al.*, 1986) θεωρώντας ότι η αποΒ είναι περίπου το 23,8% (Goldstein *et al.*, 1982) του σωματιδίου LDL και ότι το σωματίδιο LDL πυκνότητας 1,028-1,050 έχει μοριακό βάρος $2,5 \times 10^6$ KDa.

Πρόσφατα δείχθηκε ότι το mRNA της αποΒ48 δημιουργείται από μετα-μεταγραφική τροποποίηση του mRNA της αποΒ100. Η τροποποίηση αυτή συνίσταται σε μια αλλαγή του κωδικονίου CAA για την γλουταμίνη 2153 σε UAA (Powell *et al.*, 1987, Chen *et al.*, 1987, Driscoll *et al.*, 1989). Η τροποποίηση αυτή οφείλεται σε μια ειδική απαμινάση της κυτοσίνης με Km 0,2-2 nM (Greeve *et al.*, 1991) που απαιτεί για ενεργότητα την αλληλουχία GAUCAGUUAU στα κατάλοιπα 6672-6680 (Shah *et al.*, 1990). Η τροποποίηση του mRNA γίνεται στο λιπτό έντερο και σε άλλους ιστούς (Teng *et al.*, 1990), ρυθμίζεται κατά την ανάπτυξη (Teng *et al.*, 1990, Wu *et al.*, 1990) καθώς επίσης από την αυξητική ορμόνη και τη θυροξίνη (Davidson *et al.*, 1988 και 1990, Sjoberg *et al.*, 1991) και επηρεάζεται από την διατροφή (Baum *et al.*, 1990)

Ανάλυση με βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή της αμινοξικής αλληλουχίας της αποΒ δείχνει ότι περιέχει δομές α-ελίκων και β-πτυχωτών επιφανειών, μερικές των

οποιών μπορεί να έχουν αμφιπαθή χαρακτηριστικά (Cladaras *et al.*, 1986). Αμφιπαθείς δομές ελίκων θεωρούνται υπεύθυνες για τη δέσμευση λιπιδίων από άλλες λιποπρωτεΐνες όπως η αποΑΙ με φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως διαλυτότητα σε υδατικό διάλυμα και ανταλλαγή τους μεταξύ λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (Segrest *et al.*, 1974, Jackson *et al.*, 1975). Οι μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες της αποΒ δηλαδή η αδιαλυτότητά της σε υδατικό διάλυμα και η μη ανταλλαγή της μεταξύ λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων (Herbert *et al.*, 1982), παρά την ενδεχόμενη παρουσία αμφιπαθών περιοχών, πιθανόν να δηλώνουν ότι ένας διαφοροτικός μηχανισμός δρά με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί το λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο LDL. Ακριβής πρόβλεψη της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης με 4560 αμινοξέα είναι ένα σχεδόν ακατόρθωτο έργο και πρέπει να βρεθούν άλλοι τρόποι μελέτης του μορίου.

Η αμινοξική αλληλουχία της αποΒ περιέχει 25 κυστεΐνες και 16 N-γλυκοσυλιωμένα κατάλοιπα ασπαργίνης (Yang *et al.*, 1986 και 89). Στο πρώτο αμινοτετραμιακό τρίτο του μορίου δηλαδή μεταξύ των αμινοξέων 1 και 1635 βρίσκονται 18 από τις 25 κυστεΐνες. Οι περισσότερες κυστεΐνες σχηματίζουν γέφυρες θείου (Cardin *et al.*, 1982). Στο πρώτο αμινοτετραμιακό τρίτο της αποΒ, 14 από τις 16 κυστεΐνες σχηματίζουν γέφυρες μεταξύ διαδοχικών κυστεϊνών (Yang *et al.*, 1990). Έχει επίσης αναφερθεί ότι το μόριο της αποΒ δεσμεύει ομοιοπολικά στεατικό και παλμιτικό οξύ (Fisher *et al.*, 1964, Hoeg *et al.*, 1988). Αναφέρθηκε επίσης ότι οι κυστεΐνες στις θέσεις 51 και 3734 αντιδρούν με το γλουταμικό στις θέσεις 54 και 3737 αντίστοιχα (Huang *et al.*, 1988 και Lee *et al.* 1988). Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Yang *et al.*, 1990 που αναφέρουν ότι οι εν λόγω κυστεΐνες σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς με γειτονικές κυστεΐνες. Η πολιική αυτή τοποθέτηση των κυστεϊνών, καθώς επίσης και ο ρόλος τους στη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής του μορίου, παραμένει ασαφής και περισσότερα στοιχεία στο μέλλον πιθανόν να δώσουν μια καθαρότερη εικόνα, όσον αφορά τη συμμετοχή των κυστεϊνών στη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής της αποΒ και την πιθανή σημασία τους για το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης.

Μια καλά χαρακτηρισμένη λειτουργία της αποΒ είναι η δέσμευσή της από τον υποδοχέα της LDL που οδηγεί στον καταβολισμό της από το κύτταρο και τη ρύθμιση της ενδογενούς παραγόμενης χοληστερόλης (Goldstein 1977, 1982). Χημική τροποποίηση καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης (Mahley *et al.*, 1977, Weisgraber *et al.*, 1978), καθώς και πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με ^{13}C λυσίνη (Lund-Katz *et al.*, 1988) δηλώνουν, ότι αυτά τα φορτισμένα αμινοξέα είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση των αποΒ και αποΕ από τον υποδοχέα LDL. Μετά τον καθορισμό της δομής του υποδοχέα LDL προτάθηκε η άποψη, ότι οι δύο πρωτεΐνες συνδέονται με τον υποδοχέα τους, μέσω αντίδρασης των θετικά φορτισμένων αμινοξέων τους με τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα στην περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (Yamamoto 1984). Ανάλυση της αποΒ έδειξε αρκετές περιοχές που επιδεικνύουν ισχυρά μη πολικό

χαρακτήρα και μεγάλη υδροφοβικότητα (Cladaras *et al.*, 1986). Η αλληλουχία μεταξύ των καταλοίπων 3359 και 3367 περιέχει τα αμινοξέα Arg-Leu-Thr-Arg-Lys-Arg-Gly-Leu-Lys επιδεικνύει μεγάλη υδροφοβικότητα και έχει 63% ομολογία με την αλληλουχία της apoE μεταξύ των καταλοίπων 142-150 (Rall *et al.*, 1981) που έχουν προταθεί ως υπεύθυνα για τη δέσμευση της από τον LDL υποδοχέα (Innerness *et al.*, 1983, Weisgraber *et al.*, 1983). Τα στοιχεία αυτά είναι σύμφωνα με την άποψη που είχε προταθεί ωστόσο ότι υπεύθυνο για την δέσμευση της apoB από τον υποδοχέα της είναι το T2 θρομβολυτικό τμήμα της apoB που εκτείνεται από το κατάλοιπο 3249 μέχρι το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η άποψη αυτή προέκυψε από την παρατήρηση ότι αντισώματα για το εν λόγω τμήμα της apoB εμποδίζουν την δέσμευση της από τον υποδοχέα της. (Marcel *et al.*, 1987, Milne *et al.*, 1989, Pease *et al.*, 1990). Είναι ενδιαφέρον ότι η περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 3352-3369 γειτονεύει με τρεις περιοχές με υψηλό υδροφοβικό χαρακτήρα. Αυτές οι περιοχές βρίσκονται μεταξύ των αμινοξέων 3174-3190, 3595-3613 και 3666-3681 (Cladaras *et al.*, 1986). Ετσι, ενώ η περιοχή 3352-3369 μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο για τη δέσμευση της apoB από τον υποδοχέα LDL, είναι πιθανό ότι και μια ή περισσότερες από τις γειτονικές της περιοχές συμμετέχουν στο σχηματισμό της λειτουργικής περιοχής (domain) που δεσμεύεται από τον υποδοχέα B/E. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται από πειράματα θερμοκής αποδιάταξης (unfolding) της apoB (Walsh *et al.*, 1990) που δηλώνουν την παρουσία δομικών περιοχών (domains) που αντιδρούν μεταξύ τους. Επίσης έχουν περιγραφεί άτομα των οποίων η LDL έχει μικρή συγγένεια δέσμευσης με τον υποδοχέα της. Τα άτομα αυτά δεν παρουσιάζουν μεταλλάξεις στην περιοχή 3130-3630 (Dunning *et al.*, 1991).

3.2. Το γονίδιο της Απολιποπρωτεΐνης B

Το γονίδιο της apoB στον άνθρωπο έχει μήκος 43 kb αποτελείται από 29 εξώνια και 28 ιντρώνια (Blackhart *et al.*, 1986, Ludwig *et al.*, 1987) και εδράζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (Low *et al.*, 1985, Deeb *et al.*, 1986).

Η δομή αυτού του γονιδίου είναι αρκετά ασυνήθιστη. Οι θέσεις των ιντρωνίων μέσα στο γονίδιο διέπονται από μεγάλη ασυμμετρία, για παράδειγμα 24 από τα 28 ιντρώνια βρίσκονται στην 5' περιοχή του γονιδίου και μάλιστα στην περιοχή εκείνη που κωδικοποιεί μόνο το πρώτο 29% της ώριμης πρωτεΐνης. Σαν επιστέγασμα στην έλλειψη ιντρωνίων στην 3' περιοχή του γονιδίου παρατηρούνται δύο ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs, εξώνια) με ασυνήθιστα μεγάλο μέγεθος, το εξώνιο 26 μήκους 7572 bp και το εξώνιο 29 με μήκος 1906 bp. Δεν είναι ξεκάθαρο ποιο είναι το εξελικτικό πλεονέκτημα που μπορούν να προσφέρουν τόσο μεγάλα εξώνια στο γονίδιο της apoB.

Ο υποκινητής του γονιδίου περιέχει τα λεγόμενα “κουτιά” TATA και CAAT σε αναμενόμενες θέσεις για ένα γονίδιο που μεταγράφεται από την DNA πολυμεράση II. Το γονίδιο της αποΒ εκφράζεται κυρίως στο σπυκώτι και το λεπτό έντερο (Cladaras *et al.*, 1986, Krishanah *et al.*, 1989) και σε μικρότερη κλίμακα σε ιστούς όπως πλακούντας, κόλον, στομάχι και νεφρό (Demmer *et al.*, 1986, Lenich *et al.*, 1988, Teng *et al.*, 1990).

4. Σκοπός της εργασίας και πειραματικές προσεγγίσεις

Ο σκοπός της εργασίας αυτής είναι η διερεύνηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας στην αποπρωτεΐνη Β και ειδικότερα η συμβολή στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η αποπρωτεΐνη αυτή δεσμεύει λιπίδια και δημιουργεί λιποπρωτεΐνη.

Η απολιποπρωτεΐνη Β όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, είναι ένα πρωτεϊνικό μόριο που συνδέεται στενά με χοληστερόλη και εστέρες της τελευταίας, τριγλυκερίδια και φωσφολιπίδια και συμμετέχει με διάφορους τρόπους στο σχηματισμό των χυλομικρών, των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας LDL και των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας VLDL. Η αποΒ είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση της LDL από τον υποδοχέα LDL, που επίσης ονομάζεται B/E υποδοχέας, και τον καταβολισμό της με μια πολύ καλά περιγραφισμένη από τους Goldstein και Brown διαδικασία ενδοκύττωσης μέσω υποδοχέα (receptor mediated endocytosis) (Goldstein *et al.*, 1977, 1982).

Είναι γενικά άγνωστος ο μηχανισμός δέσμευσης λιπιδίων στο μόριο της αποΒ, και η δημιουργία λιποπρωτεϊνικών σωματιών. Οι Yang *et al.*, 1986, 1989 βασισμένοι σε απ' ευθείας πρωτεϊνική ανάλυση της αλληλουχίας της αποΒ προτείνουν ένα μοντέλο περιοχών δέσμευσης λιπιδίων (domains) από την αποΒ. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό τα κατόλπα από 1-1000 και από 3017-4100 είναι σχετικά ελεύθερα από λιπίδια ενώ τα κατόλπα από 1701-3070 και 4101-4536 είναι στενά συνδεδεμένα με λιπίδια και δεν έχουν εύκολη πρόσβαση σ' αυτά τα πρωτεολυτικά ένζυμα. Σύμφωνα πάντα με το μοντέλο που προτείνεται από τους Yang *et al.*, η περιοχή από 1001-1700 είναι “χαλαρά” συνδεδεμένη με λιπίδια.

Μελέτες βασισμένες στην αλληλουχία διαφόρων απολιποπρωτεϊνών, προτείνουν ότι η δέσμευση λιπιδίων επιτυγχάνεται μέσω αμιφιαθών α-ελίων και β-πτυχωτών επιφανειών. Ανάλυση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή της πρωτοταγούς δομής της αποΒ προβλέπει α-ελικές και β-πτυχωτές επιφάνειες, μερικές των οποίων μπορεί να έχουν αμιφιαθή χαρακτηριστικά (Cladaras *et al.*, 1986). Μελέτη σύνθεσης της αποΒ από HepG2 και σύνθεσης της αποΒ και αποΒ48 σε ηπατοκύτταρα αρουραίου (Hussain *et al.*, 1989) δηλώνουν ότι νεοσυνθετημένη αποΒ συνδέεται με λιπίδια ενδοκυττάρια και εκκρίνεται σαν VLDL ή LDL σωματίο. Οι μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες της αποΒ δηλαδή η αδιαλυτότητα της σε υδατικό διάλυμα και η μόνιμη σχέση που έχει με το

λιποπρωτεϊνικό σωματίο που σχηματίζει, πιθανόν να υποδηλώνουν ότι υπάρχει ένας διαφορετικός μηχανισμός όσον αφορά τη δέσμευση λιπιδίων από την πρωτεΐνη αυτή. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην υπόθεση ότι στην αμινοξική αλληλουχία της αποΒ υπάρχουν κατάλοιπα υπεύθυνα για τη δέσμευση λιπιδίων που πιθανά να σχηματίζουν μια ή περισσότερες λειτουργικές περιοχές (domains) προορισμένες για τη δέσμευση λιπιδίων από την πρωτεΐνη και τη δημιουργία του λιποπρωτεϊνικού σωματίου. Η υπόθεση αυτή υπαγόρευσε την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε:

Αποφασίστηκε η άμεση προσέγγιση του προβλήματος εξετάζοντας διαδοχικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα της αμινοξικής αλληλουχίας για δέσμευση λιπιδίων και δημιουργία λιποπρωτεϊνών. Ως μέσο έκφρασης των τμημάτων αυτών επιλέχθηκε η αποικιοπρωτεΐνη ΑΙ. Για το σκοπό αυτό αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του cDNA της αποΒ που συνολικά κάλυπταν όλο το μήκος της, χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία υβριδικών πρωτεϊνών με την αποΑΙ, οι οποίες στη συνέχεια εξετάστηκαν όσον αφορά την ικανότητά τους για δέσμευση λιπιδίων με επίτευξη σε διαβάθμιση πυκνότητας άλατος (KBr). Φορέας έκφρασης επιλέχθηκε ο pBMT3X, ένα παράγωγο του ιού βοείου θηλώματος, και ως σύστημα έκφρασης τα C127 κύτταρα ποικιλοειδούς (Lowy *et al.*, 1978, Krystal *et al.*, 1986) φυσικός ξενιστής του ιού. Οι παραπάνω επιλογές έγιναν διότι:

α. Είχε προηγηθεί η έκφραση της αποΑΙ από το παραπάνω σύστημα και δείχτηκε ότι η αποΑΙ εκκρίνεται από C127 κύτταρα σαν πρωτεΐνη ελεύθερη λιπιδίων και είναι λειτουργική, ικανή να μεταπηδήσει σε σωματίδια HDL (Roghani, *et al.*, 1988). Επιπλέον η αφαίρεση των καταλοίπων 212-233 στο καρβοξυτελικό τμήμα της αποΑΙ όπου γίνεται η προσθήκη των τμημάτων της αποΒ μειώνει ακόμα περισσότερο την ικανότητα της αποΑΙ να προσδεθεί με λιπίδια (Minnich *et al.*, 1992). Έχοντας υπόψη τις ιδιότητες της αποΒ και τα παραπάνω στοιχεία αποφασίστηκε τα διαδοχικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα της αποΒ να εκφραστούν ως υβριδικές πρωτεΐνες ΑΙΒ και να εξεταστούν οι ικανότητές τους να σχηματίσουν λιποπρωτεΐνες ικανές να επιπλεύσουν σε διαβάθμιση πυκνότητας διαλύματος άλατος KBr. Παίρνοντας υπόψη τα παραπάνω, υπεύθυνο για τη δημιουργία της λιποπρωτεΐνης θα είναι αποκλειστικά το τμήμα της αποΒ που εκφράζεται σε συνέχεια με την αποΑΙ. Την επιλογή της αποΑΙ σαν μέσο έκφρασης τμημάτων της αποΒ ισχυροποίησε το γεγονός ότι υπήρχαν για αυτήν πολύ καλά αντι σώματα, ανεκτίμητα εργαλεία στην προσπάθεια μελέτης έκφρασης πρωτεϊνών.

β. Με τον φορέα pBMT3X μπορεί κανείς να δημιουργήσει σχετικά εύκολα κυτταρικές σειρές-κλώνους. Ο φορέας αυτός επιμολύνοντας τα κύτταρα C127 δεν ενσωματώνεται στο γένωμά τους αλλά πολλαπλασιάζεται αυτόνομα σαν επίσωμα. Έτσι ένα κύτταρο μπορεί κάτω από καλές συνθήκες επιμόλυνσης να φιλοξενήσει πάνω από 100-150 μόρια του φορέα συμβάλλοντας έτσι στην πολλαπλάσια παραγωγή της εκφραζόμενης πρωτεΐνης (Sambrook *et al.*, 1989).

γ. Η επιλογή των κυττάρων C127 ήταν φυσικό επακόλουθο μια και είναι ο

φυσικός Ξενιστής του ιού. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν το επιπρόσθετο πλεονέκτημα ότι δεν παράγουν φυσιολογικά ενδογενείς ΑΙ και Β αποπρωτείνες (Roghani *et al.*, 1988). Αυτό διευκολύνει την πειραματική διαδικασία επιτρέποντας την ανίχνευση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών που προέρχονται από το DNA της κατασκευής που επιμολώνει τα κύτταρα.

Σαν συμπληρωματική προσέγγιση σχεδιάστηκε η έκφραση τριών τμημάτων της αποΒ στο ίδιο σύστημα έκφρασης. Τα τμήματα αυτά καλύπτουν το 29%, 41% και 47% της αποΒ και εκφράζονται σαν αμιγείς πρωτείνες και όχι σε υβριδική μορφή. Σκοπός αυτής της πειραματικής τακτικής ήταν να ελέγξει το σύστημα έκφρασης και να συμπληρώσει την πρώτη προσέγγιση της έκφρασης των υβριδικών πρωτεϊνών.

Στα κεφάλαια της διατριβής που ακολουθούν περιγράφεται η ανάλυση των διαφόρων πρωτεϊνών, προσερχομένων από ανασυνδυασμένο DNA όσον αφορά την ικανότητά τους να δεσμεύσουν λιπίδια και να σχηματίσουν λιποπρωτείνες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της μέγιστης δυνατής καθαρότητας και από όλες σχεδόν τις διαφορετικές εταιρείες που παρασκευάζουν χημικά αντιδραστήρια. Στην περίπτωση που είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί κάποιο αντιδραστήριο από ένα ειδικό προμηθευτή, αυτό δηλώνεται αναλυτικά στις μεθόδους.

Περιοριστικά ένζυμα και ένζυμα μετατροπής του DNA αγοράστηκαν από τη Minotech, New England Biolabs, Promega και Pharmacia.

Νουκλεοτίδια (dNTPs) ήταν αποκλειστικά από τη Pharmacia.

^{32}P dCTP, ^{32}P dATP και ^{35}S Μεθειονίνη ήταν από την Amersham.

Υλικά κυτταροκαλλιέργειών (D-MEM, MEM, PBS, Trypsin - EDTA, MEM χωρίς μεθειονίνη και ορός εμβρύου μύσχου) ήταν αποκλειστικά από την Gibco - BRL.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με την αλκαλική μέθοδο.

Ακολουθείται, σε γενικές γραμμές, το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Sambrook *et al.*, 1988, με μικρές τροποποιήσεις.

1. Βακτηριακές καλλιέργειες του 1 lt, αναπτύσσονται για 18 ώρες σε LB (5g NaCl, 5g yeast extract, 10g tryptone/ lt).
2. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνται για 5 min στις 5 Krpm, στους 4°C.
3. Τα βακτήρια επαναωραίνονται σε 10 ml διαλύματος I (50 mM glucose, 25 mM Tris.Cl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 10 mg/ml lysozyme).
4. Προστίθενται 20 ml διαλύματος II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Τα κύτταρα λιώνουν με ελαφρά ανάδευση και επώαση στον πάγο για 10 min.
5. Προστίθενται 15 ml διαλύματος III, (100 ml: 60 ml 5M KAc, 11,5 ml CH_3COOH , 28,5 ml H_2O), οπότε με γρήγορη ανάδευση και επώαση στον πάγο για 10 min, οι κυτταρικές πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA κατακρημνίζονται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 5 Krpm και στους 4°C.
6. Το υπερκείμενο διηθείται μέσω υαλοβάμβακα, και τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5 Krpm, για 10 min και σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, ξηραίνεται, και επαναδιαλυτοποιείται σε 9ml TE. Προστίθενται 9 g CsCl (1 gr για κάθε ml TE), και 300 μl διαλύματος EtBr (10 mg/ml). Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση στις 45 Krpm (κεφαλή Ti50 Beckman) για 36 ώρες, στους 20°C.

8. Σε ορισμένες περιπτώσεις, που απαιτείται αυξημένη καθαρότητα του πλασμιδιακού DNA, (όπως π.χ. για μετασχηματισμό κυττάρων θηλαστικών σε καλλιέργεια), ακολουθεί στάδιο δεύτερης υπερφυγοκέντρησης.

9. Η ζώνη του υπερελικομένου πλασμιδιακού DNA συλλέγεται, και το EtBr απομακρύνεται με εκχύλιση με ισοπροπανόλη κορεσμένη σε CsCl. Προστίθεται ίσος όγκος H₂O, και το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2 όγκων αιθανόλης, στις 4 Κγρμ, γιά 10-15 min σε θερμοκρασία δωματίου.

10. Το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε TE, εκχυλίζεται με φαινόλη, χλωροφόρμιο, και κατακρημνίζεται παρουσία 0,3 M NaAc pH 5,4 και 2 όγκων αιθανόλης.

11. Η ποσότητα και η ποιότητα του πλασμιδίου, ελέγχονται φασματοφωτομετρικά και ηλεκτροφορητικά σε πηκτωμα αгарόζης.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με την αλκαλική μέθοδο.

Ακολουθείται, σε γενικές γραμμές, το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω με μερικές τροποποιήσεις. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων σε συνδυασμό με τη μέθοδο παρασκευής πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο του βρασμού.

1. Βακτηριακές καλλιέργειες των 2 ml αναπτύσσονται σε γυάλινους σωλήνες, (κατάλληλου μεγέθους, ώστε να επιτυγχάνεται καλός αερισμός), για 12-18 ώρες.

2. 1,5 ml της καλλιέργειας μεταφέρεται σε σωλήνες erpendorf, και φυγοκεντρείται γιά 10-20 sec σε 14 Κγρμ.

3. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα βακτήρια επαναωροούνται σε 100 μl διαλύματος I (50 mM glucose, 25 mM Tris.Cl pH 8,0, 10 mM EDTA).

4. Προστίθενται 200 μl διαλύματος II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Τα κύτταρα λύνονται με ισχυρά ανάδευση και επώαση στον πάγο γιά 10 min.

5. Προστίθενται 150 μl διαλύματος III, (100 ml: 60 ml 5M KAc, 11,5 ml CH₃COOH, 28,5 ml H₂O), οπότε με γρήγορη ανάδευση και επώαση στον πάγο γιά 10 min, οι κυτταρικές πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA κατακρημνίζονται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση γιά 5 min στις 14 Κγρμ σε θερμοκρασία δωματίου .

6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο σε καθαρούς σωλήνες erpendorf, και τα νουκλεϊνικά οξέα κατακρημνίζονται με την προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης και παραμονή στους -80°C για 10-20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14 Κγρμ, γιά 15 min σε 4°C.

7. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, και ξηραίνεται.

8. Το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλυτοποιείται σε περίπου 50 μl TE. Στην κατάσταση αυτή, είναι κατάλληλο γιά ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα.

Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο του Βρασμού (boiling mini prep.).

Η μέθοδος αυτή σε συνδυασμό με την προηγούμενη χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων.

1. Βακτηριακές καλλιέργειες των 2 ml αναπτύσσονται σε γυάλινους σωλήνες, (κατάλληλου μεγέθους, ώστε να επιτυγχάνεται καλός αερισμός), για 12-18 ώρες.
2. 1,5 ml της καλλιέργειας μεταφέρεται σε σωλήνες errendorf, και φυγοκεντρείται για 10-20 sec.
3. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα βακτήρια επαναιωρούνται σε 700 μl διαλύματος STET (8% sucrose, 5% Triton X-100, 50mM EDTA pH 8,0, 10mM Tris.Cl pH 8,0).
4. Προστίθενται 50 μl λυσοζύμης (10 mg/ml), και ακολουθεί βρασμός για 1-2 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 min σε μικροφυγόκεντρο.
5. Ποσότητα 500μl από το υπερκείμενο μεταφέρεται (με προσοχή ώστε να μην αναμιχθεί η ιξώδης μεσόφαση-γενωμικό DNA), σε καθαρούς σωλήνες. Τα νουκλεϊνικά οξέα (πλασμιδιακό DNA) κατακρημνίζονται με την προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, αφού τοποθετηθούν στους -80°C για 15-20 min, και φυγοκεντρηθούν για 5 min.
6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, και ξηραίνεται.
7. Το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλυτοποιείται σε περίπου 50 μl TE. Στην κατάσταση αυτή, είναι κατάλληλο για ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα.

Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Διάφορες μέθοδοι έχουν περιγραφεί, για την απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Sambrook *et al.*, 1989). Δύο διαφορετικές που χρησιμοποιήθηκαν, είναι οι παρακάτω:

1. Ηλεκτροέκλυση:

Η μέθοδος αυτή κυρίως χρησιμοποιήθηκε όταν η διαθέσιμη ποσότητα του προς απομόνωση τμήματος, ήταν αρκετή.

α. Η ζώνη που μας ενδιαφέρει, εντοπίζεται με φωτισμό UV, και κόβεται από το πήκτωμα της αγαρόζης. Τοποθετείται σε μεμβράνη διαπύδωσης, έτσι ώστε να καλύπτεται πλήρως από διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

β. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, και εφαρμόζεται τάση έως ότου το DNA ελκωθεί πλήρως από το κομμάτι της αγαρόζης.

γ. Το διάλυμα, όπου περιέχεται πλέον το DNA, απομακρύνεται από τη μεμβράνη και μεταφέρεται σε στήλη DEAE Cellulose (100 μl πολτού για 10-50 μg DNA) η οποία έχει από πριν ξεπλυθεί με 1 ml TE pH 8,0.

δ. Η στήλη ξεπλένεται μετά τη μεταφορά του διαλύματος ακόμη μία φορά με 1 ml TE pH 8,0 και ακολουθεί έκλυση του DNA με 400 μl 2M NaCl

ε. Το DNA συλλέγεται σε σωλήνες erppendorf και τελικά κατακρημνίζεται παρουσία 2 όγκων αιθανόλης (800 μl).

2. Απομόνωση DNA από χαμηλής τήξης πήκτωμα αγαρόζης (low melting point agarose):

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε κυρίως, όταν οι διαθέσιμες ποσότητες DNA ήταν σχετικά περιορισμένες.

α. Το κομμάτι της αγαρόζης με το DNA, κόβεται και τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf. Προστίθεται ένας όγκος διαλύματος TNE (10mM Tris.Cl pH 8,0, 100mM NaCl, 1mM EDTA pH 8,0), και ακολουθεί επώαση στους 65°C, έως ότου τηχθεί η αγαρόζη.

β. Το DNA εκχυλίζεται δύο φορές με ζεστή φαινόλη (37°C), μία φορά με φαινόλη-χλωροφόρμιο, και τέλος με χλωροφόρμιο.

γ. Το υδατικό διάλυμα του DNA αφήνεται για 30 min στον πάγο (αυτό βοηθάει στην κατακρημνιση κομματιών αγαρόζης). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στους 4°C. Το υπερεκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωλήνες και το DNA κατακρημνίζεται παρουσία 0,3M NaAc pH 5,4 και δύο όγκων αιθανόλης.

Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα ακρυλαμίδιου.

α. Η ζώνη που μας ενδιαφέρει εντοπίζεται τοποθετώντας το πήκτωμα ακρυλαμίδιου πάνω σε φθορίζουσα επιφάνεια και φωτίζοντας το με φως UV (UV shadowing).

β. Η ζώνη που μας ενδιαφέρει απομακρύνεται και τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf. Το DNA εκλύεται με την προσθήκη 1ml διαλύματος έκλυσης (0,5M NH₄Ac, 10mM MgAc, 1mM EDTA pH 8,0, 0,1% SDS), για 8-12 ώρες, με δυνατή ανάδευση, στους 37°C.

γ. Ο σωλήνας φυγοκεντρείται για 5 min στις 14 Krpm για να απομακρυνθούν κομμάτια ακρυλαμίδιου.

δ. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη, χλωροφόρμιο και κατακρημνιση παρουσία 0,3 M NaAc pH 5,4, και 2 όγκων αιθανόλης.

Εναλλακτικά μετά το βήμα β ακολουθεί ηλεκτροέκλυση και καθαρισμός από DEAE - Cellulose όπως περιγράφεται προηγουμένως.

Ραδιοσήμανση του DNA.

α. Nick Translation (Sambrook *et al.*, 1989).

1. Σε σωλήνα erpendorf αναμειγνύονται:

- _ 100-500 ng DNA
- _ 3μl Nick Translation διάλυμα 10x
- _ 3μl TTP 0.1 mM
- _ 3μl dGTP 0.1 mM
- _ 2-5 μl α³²P-dATP
- _ 2-5 μl α³²P-dCTP
- _ 2 μονάδες (units) DNA πολυμεράση I
- _ H₂O μέχρι τα 30μl.

2. Επώαση στους 15°C για 90 min.

3. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 10mM, και ο όγκος αυξάνεται στα 100μl με TE.

4. Ο διαχωρισμός των ελεύθερων από τα ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, γίνεται με μοριακή διήθηση, χρησιμοποιώντας στήλες Sephadex G50. Σύριγγα του 1 ml, φράζεται στην άκρη με ναλοβάμβακα και γεμίζει με Sephadex G50 (Pharmacia). Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 2Krpm για 5 min. Ο όγκος της πακεταρισμένης στήλης G50, πρέπει να υπερβαίνει τα 0,7 ml, για να επιτευχθεί στην συνέχεια ικανοποιητικός διαχωρισμός. Τα 100 μl της αντίδρασης σήμανσης, τοποθετούνται στην κορυφή της κολώνας και ακολουθεί φυγοκέντρηση με τις ίδιες συνθήκες. Το ραδιοσημασμένο DNA συλλέγεται σε σωλήνα erpendorf.

5. Η ειδική ενεργότητα (specific activity) του ραδιοσημασμένου μορίου, υπολογίζεται μετά από κατακρήμνιση με 10% TCA, και μέτρηση σε μετρητή σπινθηρισμού (Liquid Scintillation Counter).

10x Nick Translation Buffer.

100mM MgCl₂

500mM Tris.Cl pH 7,4

10mM DTT

Ραδιενεργά νουκλεοτίδια: α³²P-dATP, α³²P-dCTP (800 Ci/mmol).

β. Μέθοδος της "τυχαίας εκκίνησης σήμανσης" (Random oligo labelling)
(Feinberg *et al.*, 1983).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ραδιοσημασμένων μορίων, με μεγάλη ειδική ενεργότητα ($>10^8$ - 9 cpm/μg).

1. Το DNA (60-100 ngr σε μέγιστο όγκο TE 5 μl), αποδιατάσσεται στους 95°C για 2 min.

2. Ακολουθεί άμεση μεταφορά του δείγματος στους 0°C.

3. Προσθέτουμε:

11.4 μl διαλύματος LS

1 μl BSA

dH₂O, μέχρι τα 20 μl

4. Στην συνέχεια, προσθέτουμε 2 μl από καθένα από τα α³²P-dATP και α³²P-dCTP, και 1μl Kleenow (τελικός όγκος αντίδρασης: 25 μl).

5. Επιδιώξουμε στους 25°C, για τουλάχιστον 3 ώρες (συνήθως 12-15 ώρες).

6. Η αντίδραση σταματάει, με την προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 10mM, αυξάνεται ο όγκος μέχρι τα 100μl με TE, και ο διαχωρισμός των ελεύθερων από τα ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, γίνεται όπως και προηγούμενα.

Διάλυμα TM.

250mM Tris.Cl pH 8,0

25mM MgCl₂

50mM β-μερκαπτοαιθανόλη

Διάλυμα DTM.

100μM από καθένα από τα dGTP και dTTP, σε TM.

Διάλυμα OL.

1mM Tris.Cl pH 7,5

1mM EDTA pH 7,8

90 OD μονάδες oligodeoxyribonucleotides, (Pharmacia, Cat. N. 27-2166-01), ανά ml του διαλύματος αυτού.

Διάλυμα LS.

1M Hepes pH 6,6 / DTM /OL (25/25/7).

Αποθήκευση στους -20°C.

BSA.

10 mg/ml

Klenow fragment:

2,5-5 units/μl και

Ραδιενεργά νουκλεοτίδια: $\alpha^{32}\text{P-dATP}$, $\alpha^{32}\text{P-dCTP}$ (800 Ci/nmol).**γ. 3' ακραία σήμανση (end labelling).**

1. Σε ένα σωλήνα erpendorf αναμειγνύονται:

- _ DNA με 3' υπολειπόμενο άκρο (recessive end), από 0,05-1μg
- _ 3μl 10x Nick Translation Buffer
- _ 3μl dGTP (1mM)
- _ 3μl TTP (1mM)
- _ 1 - 2 μl $\alpha^{32}\text{P-dATP}$
- _ 1 - 2 μl $\alpha^{32}\text{P-dCTP}$
- _ 1 - 2 units Klenow
- _ H_2O μέχρι τα 30μl.

2. Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, γιά 15 min.

3. Η αντίδραση σταματάει με EDTA, όπως περιγράφεται και στις προηγούμενες σημειώσεις, και ακολουθεί διαχωρισμός των ενσωματωμένων από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια, κατά τα γνωστά.

Παρατήρηση: τα χρησιμοποιούμενα στην αντίδραση, "κρύα" ή ραδιενεργά νουκλεοτίδια, ποικίλλουν, ανάλογα με την αλληλουχία του άκρου που "σημειώνεται". Έτσι, η αντίδραση που περιγράφεται παραπάνω, είναι απλώς μία από τις πολλές δυνατές του είδους αυτού.

δ. 5' ακραία σήμανση (end labelling) συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (Sambrook et al., 1989).

1. Σε ένα σωλήνα erpendorf, προστίθενται:

- 50-250 ng ολιγονουκλεοτιδίου
- 2 μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα κινάσης
- 1μl T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (T4 polynucleotide kinase)
- 250-400 μCi $\gamma^{32}\text{P-ATP}$
- H_2O , μέχρι τα 20 μl

2. Ακολουθεί επώαση στους 37°C γιά 30 min.

3. Το δείγμα μεταφέρεται στους 65°C γιά 10 min, ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο (ή σταματάμε την αντίδραση με EDTA, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα).

4. Ακολουθεί το βήμα της μοριακής διάθησης, σε στήλη χροματογραφίας Sephadex G50, ή G25, (ανάλογα με το μέγεθος του ολιγονουκλεοτιδίου).

10x ρυθμιστικό διάλυμα κινάσης (kinase buffer).

500 mM Tris.Cl pH 7,4

100 mM MgCl₂

50 mM DTT

10 mM σπερμιδίνη

T4 polynucleotide kinase: 10 units/μl.

Ραδιενεργό γ³²P-ATP: 3000-5000 Ci/mmol.**ε. 5' ακραία σήμανση τμημάτων DNA (Sambrook *et al.*, 1989).**

Στις περιπτώσεις αυτές προηγείται αποφωσφορυλίωση του άκρου, το οποίο στη συνέχεια θα σημειωθεί. Για τον σκοπό αυτό, προηγείται η επίδραση με φωσφατάση.

1. Σε ένα σωλήνα erpendorf, προστίθενται:

0,05 - 1 μg DNA, που έχει προσθήσει μετά από πέψη με περιοριστικό ένζυμο,

1 μονάδα αλκαλικής φωσφατάσης (το ποσό της χρησιμοποιούμενης φωσφατάσης ανά αντίδραση, διαφέρει, ανάλογα με την προέλευσή της),

1,5 μl 10x PME buffer και

H₂O μέχρι τα 15μl

2. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 min (σε περιπτώσεις που το 5' άκρο είναι είτε υπολειπόμενο, είτε τυφλό (blind), είναι αποτελεσματικότερο να γίνονται εναλλάξ επωάσεις των 15 min στους 37°C και στους 50°C, σε δύο κύκλους, με ενδιάμεση ανανέωση της φωσφατάσης).

3. Η φωσφατάση αδρανοποιείται, μεταφέροντας την αντίδραση στους 65°C, για 1 ώρα. Το αποφωσφορυλιωμένο DNA, σημαίνεται στην συνέχεια μέσω της κινάσης, ως εξής:

4. Στα 15 μl της αντίδρασης αποφωσφορυλίωσης, προστίθενται:

3 μl 10x PME Κιν. buffer,

1 μl T4 polynucleotide kinase (= 10 units),

1-2 μl γ³²P-ATP (3000-5000 Ci/mmol) και

H₂O μέχρι τα 30 μl.

5. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 min.

6. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη EDTA, σε συγκέντρωση 10 mM.

7. Ακολουθεί διαχωρισμός των ελεύθερων από τα ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, με στήλη χρωματογραφίας Sephadex G50, όπως περιγράφτηκε παραπάνω.

10x PME buffer.

100mM Tris.Cl pH 9,5

10mM spermidine

1mM EDTA pH 8,0

10x PME Κιν. buffer.

400mM Tris.Cl pH 9,5

100mM MgCl₂

50mM DTT

Τεχνικές Υποκλωνοποίησης.**1. Συμπλήρωση των άκρων τμημάτων DNA με το τμήμα Kleenow της πολυμεράσης I (Sambrook *et al.*, 1989).**

Το Kleenow κλάσμα της DNA πολυμεράσης I, διατηρεί τις ενεργότητες του πολυμερισμού και της 3' - 5' εξωνουκλεολυτικής δράσης του ενζύμου. Το ένζυμο Kleenow, χρησιμοποιήθηκε, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για την συμπλήρωση (fill in) 3' υπολειπόμενων άκρων, τμημάτων DNA που προέρχονται από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η αντίδραση γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, με την διαφορά ότι στην περίπτωση τμημάτων DNA, (φορέων-vectors, ή ενθέματων-inserts), τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σε υποκλωνοποιήσεις, δεν χρησιμοποιούνται ραδιενεργά νουκλεοτίδια. Η αντίδραση λιάσης (Ligation reaction) ενώνει δύο ή περισσότερα τμήματα DNA, συνθέσει ενθέματα σε φορείς. Εάν σε μια αντίδραση λιάσης μόνο ένα από τα δύο τμήματα DNA (φορέας ή ένθεμα) χρειάζεται filling, τότε το Kleenow αδρανοποιείται στους 65°C για 15' και στην συνέχεια οι κατάλληλες ποσότητες φορέα και ενθέματος συγκατακρημνίζονται με αβανόλη και ακολουθεί η αντίδραση λιάσης. Στην περίπτωση που τόσο ο φορέας όσο και το ένθεμα χρειάζονται συμπλήρωση με Kleenow, τότε η αντίδραση γίνεται από κοινού και για τα δύο.

2. Αντίδραση λιάσης (Ligation reaction).

Οι συνθήκες, σύμφωνα με τις οποίες πραγματοποιείται η διαδικασία της ligation, ποικίλουν, και εξαρτώνται τόσο από τα άκρα που πρόκειται να ενωθούν, (σφιχτά άκρα, sticky ends ή τυφλά άκρα, blunt ends), όσο και από το επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης (κυκλικό μονομερές, κυκλικό διμερές ή ολιγομερές, γραμμικό πολυμερές). Παρακάτω, περιγράφεται συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε, στις διάφορες περιπτώσεις:

α. Αντίδραση επανακυκλοποίησης πλασμιδίου με σφιχτά άκρα (sticky ends):

Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις που δεν ξεπερνούσαν τα 5 μg/ml, για πλασμίδια από 3 - 9 Kb. Η ποσότητα της T4 DNA λιάσης, δεν χρειάζεται να υπερβεί τις 0.2 Weiss units, στην περίπτωση αυτή.

β. Αντιδραση επαναεπικλοποίησης πλασμιδίου με τυφλά άκρα:

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, είναι οι ίδιες, όσον αφορά στην συγκέντρωση του DNA, αλλά απαιτείται 10-50 φορές παραπάνω T4 DNA λιγάση.

γ. Αντιδραση σχηματισμού ανασυνδισσόμενων πλασμιδίων με συμβατά άκρα (sticky ends):

Στις περιπτώσεις αυτές, η αναλογία φορέα/ενθέματος είναι 1/3 περίπου, και η συγκέντρωση του φορέα δεν υπερβαίνει τα 100ng/ml. Η ποσότητα της T4 DNA λιγάσης, είναι περίπου 0,2-0,5 Weiss units.

δ. Αντιδραση σχηματισμού ανασυνδισσόμενων πλασμιδίων με τυφλά άκρα (blind ends):

Γενικά διατηρούνται οι παραπάνω αναλογίες φορέα-ενθέματος (1:3), αλλά αυξάνεται κατά περίπου 10-50 φορές, η ποσότητα της T4 DNA λιγάσης.

ε. Αντιδραση σχηματισμού ανασυνδισσόμενων πλασμιδίων με προσανατολισμένη κλωνοποίηση του ενθέματος:

Στην περίπτωση αυτή, η αναλογία φορέα-ενθέματος είναι 1:1, και η ποσότητα της T4 DNA λιγάσης 1 Weiss unit.

στ. Ειδικές συνθήκες για αντιδράσεις σχηματισμού ανασυνδισσόμενων πλασμιδίων από πολύ μεγάλους φορείς και ενθέματα:

Στις περιπτώσεις αυτές οι κατάλληλες συγκεντρώσεις φορέα και ενθέματος υπολογίστηκαν σύμφωνα με την τιμή j και για τα δύο κομμάτια DNA. Η τιμή j περιγράφει την ελάχιστη συγκέντρωση σε g/l ενός κομματιού DNA σε διάλυμα, η οποία είναι αναγκαία για να διατηρήσει ανοιχτή μορφή, ώστε να ευνοηθούν αντιδράσεις μεταξύ διαφορετικών μορίων και περιγράφεται από τον τύπο $j (g/l) = 51,1 \times M_r^{-1/2}$ (Winnaker 1987).

10x ligation buffer

660mM Tris.Cl pH 7,6

100mM MgCl₂

10x mix buffer

200 mM DTT

10mM ATP

Το 10x mix buffer παρασκευάζεται πάντα φρέσκο από 1M διαλύματος DTT και 0.1 M διαλύματος ATP pH 7,0.

Η θερμοκρασία επίστασης είναι 12-15°C για κομμάτια με συμβατά άκρα, και 25°C (θερμοκρασία δωματίου), για κομμάτια με τυφλά άκρα.

**Μετασηματισμός Βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο $\text{CaCl}_2\text{RbCl}_2$
(Sambrook *et al.*, 1989).**

1. Την ημέρα που προηγείται του μετασηματισμού, εμβολιάζουμε μία αποικία κυττάρων HB101, (ή άλλου κλώνου, ανάλογα με τη περίπτωση), σε υγρό καλλιέργειας LB. Αναπτύσσουμε την καλλιέργεια στους 37°C, κατά τη διάρκεια της νύχτας.
2. Την επόμενη ημέρα, εμβολιάζουμε με ένα ποσό της καλλιέργειας, που αναπτύχθηκε την προηγούμενη νύχτα, υγρό καλλιέργειας LB σε αραίωση 1/100. Η καλλιέργεια αυτή αναπτύσσεται με έντονο αερισμό, στους 37°C, μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση στα 550 nm να μην υπερβαίνει το 0.5 (λογαριθμική φάση).
3. Η φιάλη με τα κύτταρα παραμένει για 5min στον πάγο.
4. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες των 50ml και φυγοκεντρούνται για 10min στις 2 Krpm και στους 4°C.
5. Τα κύτταρα επαναωροούνται σε διάλυμα I (στο 1/2 του αρχικού όγκου φυγοκέντρωσης).
6. Ακολουθεί φυγοκέντρωση, όπως και προηγούμενα.
7. Τα κύτταρα επαναωροούνται σε διάλυμα II (στο 1/2 του αρχικού όγκου φυγοκέντρωσης). Επιδύονται στον πάγο, για 15min.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρωση, όπως και προηγούμενα.
9. Τα κύτταρα επαναωροούνται σε διάλυμα II (στο 1/20 του αρχικού όγκου φυγοκέντρωσης). Προσθέτουμε DMSO, (25μl/ml κυτταρικού εναιωρήματος), και στη συνέχεια τα κύτταρα μοιράζονται ανά 300μl, σε γυάλινους σωλήνες.
10. Σε κάθε σωλήνα, προστίθεται DNA<300ng. Ακολουθεί επώαση στον πάγο, για 30 min.
11. Οι σωλήνες με τα κύτταρα επιδύονται στους 42°C, για 2min.
12. Σε κάθε σωλήνα, προστίθενται 5ml L-broth, και ακολουθεί επώαση στους 37°C, για περίπου 1 ώρα.
13. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2 Krpm, για 10min. Το κυτταρικό ίζημα, επαναωροείται σε 200μl LB.
14. Τα κύτταρα απλώνονται σε τριβλία LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής.

Διάλυμα I

- 10mM MOPS pH 7,0
- 10mM RbCl₂

Διάλυμα II

- 10mM MOPS pH 6,5
- 10mM RbCl₂
- 50mM CaCl₂

Τυποποίηση Βακτηριακών Κλώνων με τη μέθοδο Grunstein (Sambrook *et al.*, 1989).

1. Οι βακτηριακές αποικίες αναπτύσσονται στους 37°C, για 12-20 ώρες. Στη συνέχεια, τα τριβλία μεταφέρονται στους 4°C, για τουλάχιστον 1 ώρα.
2. Σε κάθε τριβλίο τοποθετείται ένα φίλτρο νιτροκυτταρίνης, έτσι ώστε να μη μεσολαβούν φυσολίδες αέρα μεταξύ του φίλτρου και της επιφάνειας ανάπτυξης των αποικιών.
3. Η θέση των φίλτρων στα τριβλία σημειώνεται με μελάνι.
4. Το φίλτρο απομακρύνεται και τοποθετείται (με τις αποικίες προς τα πάνω), σε χαρτί Wattman που έχει διαποτισθεί με 10% SDS. Παραμένει για 3 min.
5. Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε Wattman διαποτισμένο με 1x Αποδιατακτικό διαλύματος. Παραμένει για 2-3 min.
6. Ακολουθεί εξουδετέρωση, με 1x Διαλύματος Εξουδετέρωσης. Τα φίλτρα παραμένουν και σε αυτή τη φάση για 2-3 min.
7. Η περίσσεια αλατιού απομακρύνεται με τοποθέτηση των φίλτρων σε χαρτί Wattman διαποτισμένο με 40mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄.
8. Τα φίλτρα ξηραίνονται στον αέρα και στη συνέχεια το DNA μονιμοποιείται στη μεμβράνη, με επώαση στους 80°C για 2 ώρες.
9. Τα φίλτρα βρέχονται σε 40mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, και τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με ελαφρύ τρίψιμο των φίλτρων.
10. Ακολουθεί προύβριδοποίηση και υβριδοποίηση, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Church (Church *et al.*, 1984).

Διαλύματα

Αποδιατακτικό Διάλυμα

0,5 N NaOH

1,5 M NaCl

Διάλυμα Εξουδετέρωσης

1,5 M NaCl

0,5 M Tris.Cl pH 7,4

Διάλυμα Na₂HPO₄/NaH₂PO₄

1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄: 71 g Na₂HPO₄ ή 134 g Na₂HPO₄·7H₂O + 4 ml 85% H₃PO₄ / 1

Προϊβριδοποίηση και Υβριδοποίηση κατά CHURCH (Church *et al.*, 1984).

1. Τα φίλτρα προϊβριδοποιούνται για 30-60 min, σε διάλυμα Church (7% SDS, 0,5M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,2, 1% BSA, 1mM EDTA). Η θερμοκρασία προϊβριδοποίησης και υβριδοποίησης, εξαρτάται από τη σύνθεση και την ομολογία των υβριδοποιούντων αλληλουχιών.
2. Ακολουθεί υβριδοποίηση, με τις ίδιες συνθήκες (ο ανιχνευτής αποδιατάσσεται με θέρμανση για 3-5 min στους 100°C). Η υβριδοποίηση διεξάγεται για 12-18 ώρες (πάντα εξαρτάται από τη συγκεκριμένη περίπτωση).
3. Μετά το τέλος της υβριδοποίησης, τα φίλτρα εκπλύνονται με διάλυμα πλύσης (κατά Church) (5% SDS, 40mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,2, 1mM EDTA) (προθερμασμένο στην θερμοκρασία υβριδοποίησης), και ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

Προσδιορισμός Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας με μήτρα δίκλωνο DNA (Sequencing) (Sambrook *et al.*, 1989).

Δύο είναι οι τύποι DNA μήτρας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέθοδο προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης του Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Το γνήσιο μονόκλωνο DNA, όπως στην περίπτωση του M13 sequencing, αλλά και δίκλωνο DNA (που προέρχεται από κλωνοποίηση της αλληλουχίας που ενδιαφέρει), αφού όμως αποδιαταχθεί με θέρμανση ή αλκαλι. Οι ίδιοι γενικοί εκκινητές (primers) που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε φορείς M13mp18 και M13mp19, χρησιμοποιούνται και στην περίπτωση δίκλωνης DNA μήτρας. Για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας δίκλωνου DNA χρησιμοποιήθηκε το kit της USB (United States Biochemicals), που είναι βασισμένο πάνω σε μια τροποποιημένη μορφή της DNA πολυμεράσης του ιού T7, Sequanase® version 2.

Προετοιμασία του DNA

Σε 2-5 μg υπερελικοποιημένου DNA σε όγκο 40 μl προστίθενται 1,6 μl 5N NaOH. Το δείγμα επώαζεται για 30' στους 37°C. Ακολουθεί εξουδετέρωση με 16 μl 5M NH_4Ac (οξικό αμμώνιο) και κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 270 μl απολύτου αιθανόλης. Το DNA επαναδιαλυτοποιείται σε 7μl H_2O σε σωλήνα erpendorf και προστίθενται 1μl (0,5-1 pmole) εκκινητής (primer) και 2μl διαλύματος υβριδοποίησης (annealing buffer). Ο σωλήνας erpendorf θερμαίνεται στους 65°C για δύο λεπτά και αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία διαμπίου για 30'. Στη συνέχεια προστίθενται :

- 2 μl μίγματος σήμανσης (αραιωμένο 1:5 με νερό)
- 1 μl 0,1 M DTT
- 0,5 μl 35 S dATP
- 2 μl Sequenase® (αραιωμένη 1:8)

Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5'. Στη συνέχεια 3,5 μl από την αντίδραση σήμανσης μεταφέρονται σε σωλήνες erpendorf που περιέχουν από πριν ο κάθε ένας από 2,5 μl ανάλογου μίγματος επιμήκυνσης (ddATP, ddGTP, ddCTP και ddTTP). Οι σωλήνες επωάζονται στους 37°C για 10'. Οι αντιδράσεις σταματούν με την προσθήκη 4 μl διαλύματος τερματισμού. Τα δείγματα αναλύονται σε πιπette ακετυλαμίδιου-7M ουρίας. Ακολουθεί ξήρανση και αυτοραδιογραφία.

Μετασηματισμός (Transfection) Κυττάρων σε Κυτταροκαλλιέργεια. Τεχνική της συγκατακρήμνισης DNA με $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Οι Graham και Van der Eb, παρουσίασαν το 1973, την τεχνική της συγκατακρήμνισης του DNA με φωσφορικό ασβέστιο, και την εισαγωγή του ιζήματος στη συνέχεια, στα κύτταρα. Σύμφωνα με τη μέθοδο, αναμειγνύονται το DNA με διάλυμα CaCl_2 , και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων. Το αποτέλεσμα είναι, ο σχηματισμός ιζήματος DNA- CaPO_4 . Στην συνέχεια, το ίζημα αυτό προστίθεται προσεκτικά στην επιφάνεια κυττάρων θηλαστικών, που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Η μέθοδος διαφοροποιείται μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών αλλά για την C127 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Δύο τύποι τριβλίων χρησιμοποιήθηκαν, p60 (με διάμετρο 6 cm) και p100 (με διάμετρο 10 cm) καθώς και φιάλες T25 συνολικής επιφάνειας 25 περίπου cm^2 η μία. p60 χρησιμοποιήθηκαν μόνο όταν επρόκειτο για παροδικό μετασηματισμό κυττάρων και για *in vivo* σήμανση πρωτεϊνών με ^{35}S Μεθειονίνη, ενώ p100 για μόνιμο μετασηματισμό κυττάρων.

Διαλύματα	p60	p100
DNA(1μg/μl)	17 μl	35 μl
CaCl_2 2M	31 μl	62 μl
H_2O	202 μl	403 μl
2x HBS	250 μl	500 μl
Σύνολο	500 μl	1000 μl

Την προηγούμενη μέρα πριν τη διαδικασία του μετασηματισμού στρώνονται 5×10^5 κύτταρα σε p60, και επωάζονται κατά τη διάρκεια της νύκτας σε DMEM, που

περιέχει 10% ορό εμβρύου μόσχου. Την επόμενη μέρα και μία ώρα πριν το μετασηματισμό αλλάζεται το θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Το DNA που θα μετασηματιστεί τα κύτταρα αναμειγνύεται με νερό και CaCl_2 και προστίθεται σταγόνα-σταγόνα, σε αναλογίες που περιγράφονται στον παραπάνω πίνακα, σε διάλυμα 2x HBS. Το τελικό διάλυμα αφήνεται να ηρεμήσει για 20 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται κατόπιν σταγόνα-σταγόνα στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων και αναμειγνύεται με ελαφρά κίνηση του p60. Το ίζημα μένει στα κύτταρα για 31/2 - 4 ώρες και κατόπιν ακολουθεί έκλυση των κυττάρων με DMEM χωρίς ορό μιά φορά και έκθεση των κυττάρων σε 3ml 15% γλυκερόλης σε HBS για ένα λεπτό ακριβώς. Προστίθενται 7ml DMEM και το μείγμα αφαιρείται αμέσως, στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλύνονται δύο φορές με DMEM και προστίθενται 5 ml DMEM συμπληρωμένα με 10% ορό εμβρύου μόσχου, και τα κύτταρα επωάζονται στους 37° C και με συνεχή παροχή 5% CO_2 για 24 ή 36 ώρες ανάλογα με την περίπτωση.

α. Παροδικός μετασηματισμός ευκαρυωτικών κυττάρων και ραδιοσήμανση *in vivo* με ^{35}S Μεθειονίνη.

Ακολουθείται το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω. Μετά 24 ώρες επώασης ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο των κυττάρων και προστίθεται νέο που, εκτός των άλλων, περιέχει και τον παράγοντα επιλογής, στην περίπτωση μας 4 μM CdCl_2 . Την επόμενη μέρα αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και προστίθεται νέο χωρίς ορό με 10 μM CdCl_2 και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες, μετά ακολουθεί επώαση για μία ώρα σε MEM χωρίς μεθειονίνη με 10 μM CdCl_2 . Ακολούθως τα κύτταρα εκπλύνονται δύο φορές με MEM χωρίς μεθειονίνη και προστίθενται 2 ml MEM χωρίς μεθειονίνη με 10 μM CdCl_2 και 0,5 mCi ^{35}S μεθειονίνη. Ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. Μετά το πέρας της σήμανσης συλλέγονται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα για παρατέρα ανάλυση.

β. Μετασηματισμός κυττάρων με σκοπό τη δημιουργία κλώνων που εκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Για το μετασηματισμό των κυττάρων ακολουθείται το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί. Μετά την επώαση των κυττάρων με γλυκερόλη και την αλλαγή του θρεπτικού μέσου, τα κύτταρα επωάζονται για 36 ώρες. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με Τρυψίνη - EDTA μέχρις ότου αποκολληθούν από το τριβλίο. Ακολούθως αραιώνονται σε διαφορετικές αραιώσεις από 1:10 έως 1:100 ανά 10 μονάδες σε διπλά τριβλία p100 με DMEM που περιέχει ορό εμβρύου μόσχου και 10 μM CdCl_2 . Ακολουθεί επώαση μέχρις ότου εμφανιστούν διακριτές αποικίες κυττάρων μερικές των οποίων συλλέγονται και μεταφέρονται σε τριβλία p60. Όταν ο αριθμός των κυττάρων ξεπεράσει τα 5×10^5 τότε παγώνουμε τα κύτταρα σε πλήρες θρεπτικό μέσο με 10%

DMSO, αρχικά σε καταψύξη -80°C και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο. Παράλληλα επιμολύνουμε ένα p60 για ραδιοσήμανση με σκοπό τη μελέτη του κλώνου.

γ. Ραδιοσήμανση πρωτεϊνών που εκκρίνονται από κυτταρικούς κλώνους μόνιμα μετασχηματισμένους.

Η διαδικασία είναι η ίδια είτε πρόκειται για κλώνους που προέρχονται από την διαδικασία της παραγράφου β, είτε πρόκειται για κλώνους που προέρχονται από απόψυξη. Στις περιπτώσεις αυτές οι κλώνοι μεγαλώνουν σε ένα p60 μέχρις ότου φτάσουν σε αριθμό περίπου 5×10^5 . Την επόμενη μέρα αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και προστίθεται νέο χωρίς ορό με $10 \mu\text{M CdCl}_2$ και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. Μετά ακολουθεί επώαση για μία ώρα σε MEM χωρίς μεθειονίνη με $10 \mu\text{M CdCl}_2$. Ακολούθως τα κύτταρα εκπλύνονται δύο φορές με MEM χωρίς μεθειονίνη και προστίθενται 2 ml MEM χωρίς μεθειονίνη με $10 \mu\text{M CdCl}_2$ και $250 \mu\text{Ci } ^{35}\text{S}$ μεθειονίνη και ακολουθεί επώαση από 4 έως 12 ώρες. Μετά το πέρας της σήμανσης συλλέγονται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα για παρατέρα ανάλυση.

Ψύξη και Απόψυξη Κλώνων

Ψύξη

Οι κλώνοι ψύχονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο παρουσία 10% DMSO. Η ψύξη γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο οι κλώνοι μεταφέρονται σε καταψύξη -80°C και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο. Σε αυτές τις συνθήκες οι κλώνοι μπορούν θεωρητικά να διατηρηθούν απεριόριστα.

Απόψυξη

Οι κλώνοι αποψύχονται σε όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα γίνεται. Για το σκοπό αυτό αμπούλες που περιέχουν τα ψυγμένα κύτταρα από το υγρό άζωτο εμβαπτίζονται σε βραστό νερό και παρακαλουθείται η τήξη του περιεχομένου τους. Μόλις ρευστοποιηθεί το περιεχόμενο, αφαιρείται και προστίθεται σε σωλήνα Falcon 15 ml στον οποίο ήδη περιέχονται 5ml πλήρους θρεπτικού μέσου και ακολουθεί φηγοκέντρωση σε χαμηλές στροφές 1500 με 2000 σ.α.λ. για 5 λεπτά. Το βήμα αυτό έχει σαν σκοπό να ξεπλύνει τα κύτταρα από το DMSO που προστέθηκε σ' αυτά κατά τη διαδικασία της ψύξης. Μετά τη φηγοκέντρωση το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και προστίθεται νέο. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση του θρεπτικού μέσου και το μείγμα μεταφέρεται σε φιάλη T25. Την επόμενη μέρα

ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο και ακολουθεί επώαση κανονικά στους 37° C και με συνεχή παροχή 5% CO₂ .

Διαλύματα

2xHBS

	M.W.	mM	g/l
NaCl	58,44	274	16
KCl	74,56	10	0,74
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	268,07	1,5	0,4
Dextrose	180,14	12	2,0
Hepes	260,30	42	10,0

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται προσεκτικά στο 7,1 (± 0,1) μέγιστη τιμή. Το διάλυμα διηθείται μέσα από 0,2 μ Nalgene φίλτρο και κρατείται στους 4° C.

15% Γλυκερόλη

7,5 g γλυκερόλης διαλύονται σε 25 ml 2xHBS και ο όγκος συμπληρώνεται στα 50ml με διπλά απεσταγμένο νερό. Το τελικό διάλυμα διηθείται μέσα από 0,2 μ Nalgene φίλτρο και κρατείται στους 4° C.

2M CaCl₂

2M CaCl₂ σε διπλά απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα διηθείται μέσα από 0,2 μ Nalgene φίλτρο, μοιράζεται σε μικρούς όγκους και φυλάσσεται στους -70° C. Το CaCl₂ είναι από την BDH (British Drug House).

D-MEM (Dulbecco' s Modified Eagle Medium), MEM (Modified Eagle Medium), Ορός εμβρύου μόσχου (fetal calf serum) είναι από την Gibco - BRL.

Ανοσοκατακρήμνιση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών.

Το θρεπτικό μέσο μοιράζεται σε όγκους του 1 ml, τα κύτταρα λύνονται με προσθήκη 1ml ανά ρ60 διαλύματος 3 και μοιράζονται σε όγκους 0,5 ml. Φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρούς σωλήνες Eppendorf. Προστίθενται αναστολείς πρωτεασών (1μg/ml pepstatine, 1μg/ml Leupeptine, 1μg/ml Benzamidine και 10 μl 0,5 M EDTA) και απορρυπαντικά σε τελικές συγκεντρώσεις 0,5% Triton-X 100, 0,25% DOC, 0,5% SDS χρησιμοποιώντας τα διαλύματα 5 και 6. Ανάλογα με το αντίσωμα χρησιμοποιούνται είτε 100 μl πλυμένης starch A είτε ανάλογη ποσότητα πρωτεΐνης G. Ακολουθεί καλή ανάδευση μια και η starch A έχει την τάση να κατακρημνίζεται εύκολα. Τα δείγματα επωάζονται στους 4° C για μια ώρα με συνεχή ανάδευση. Αυτό έχει σαν σκοπό να αποκλειστεί μη ειδική δέσμευση

διαφόρων πρωτεϊνών με την Starb A ή την πρωτεΐνη G. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα και μεταφορά του υπερκευμένου σε καθαρούς σωλήνες Eppendorf, προστίθεται καθορισμένη ποσότητα αντισώματος και τα δείγματα εποκίζονται στους 4° C για 12 ώρες. Την επόμενη μέρα προστίθενται 100μl starb A ή ανάλογη ποσότητα πρωτεΐνης G και συνεχίζεται η επώαση για μία ώρα ακόμη. Στη συνέχεια ακολουθούν τρεις επλώσεις με το διάλυμα 4 και μία με το διάλυμα 2. Στο τέλος αφαιρείται όλο το υπερκείμενο διάλυμα και το ίζημα διαλύεται σε αποδιατακτικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

Διαλύματα

1. PBS (2 Liters)

NaCl	20,0 g
KCl	0,5 g
Na₂HPO₄	2,87 g
KH₂PO₄	0,5 g

2. Lysis Mix

1% SDS	
1% Triton X-100	
0,5% DOC	σε PBS (διάλυμα 1)

3. Lysis Mix - SDS

1% Triton X-100 (κατά βάρους)
0,5% DOC σε PBS

4. Lysis Mix +BSA

5 mg/ml BSA σε Lysis Mix (διάλυμα 2) BSA από τη SIGMA αριθμός καταλόγου 103700 98% καθαρή, ελεύθερη λιπαρών οξέων.

5. 5x Lysis Mix

5% SDS
5% Triton X-100
2,5% DOC σε PBS

6. PBS-1% SDS

1% SDS σε PBS

Staph A IgGSorb Ανοφιλοποιημένο 10% κυτταρικό διάλυμα. The Enzyme Center 36 Franklin St. Malden , MA 02148 USA. Πριν χορηγοποιηθεί το περιεχόμενο μιας φιάλης διαλύεται σε 10 ml νερό και υφίσταται κατεργασία υπερήχων σε παγόλυτρο για 10 λεπτά. Κατόπιν πλένεται τρεις φορές με διάλυμα 4 και κρατείται στους 4° C. **Πρωτεΐνη G** από τη Pharmacia. Πριν χορηγοποιηθεί πλένεται τρεις φορές με διάλυμα 4.

Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτική ακρυλαμίδου-SDS.

Ακολούθηθηκε κατά βάση το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί από τον Leammli 1970, όπως έχει τροποποιηθεί από τον Zannis V. I 1986.

Τα πρότυπα Μοριακά Βάρη πρωτεϊνών αγοράστηκαν από τη Pharmacia και Biorad.

Επίτευξη ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών σε διαβάθμιση πυκνότητας διαλύματος άλατος KBr.

Μετά το πέρας της περιόδου σήμανσης (τυπικά 4 ώρες) συλλέγεται το θρεπτικό μέσο σε όγκους του ενός ml. Προστίθενται αναστολείς πρωτεασών και η πυκνότητα του διαλύματος ρυθμίζεται σε 1,23 g/ml με προσθήκη KBr. Η ποσότητα KBr σε g που πρέπει να προστεθεί σε ένα συγκεκριμένο όγκο διαλύματος V, ώστε το τελικό διάλυμα που θα προκύψει να έχει πυκνότητα d, δίδεται από την παρακάτω σχέση:

$$g (KBr) = V \cdot (d-1) / (1-0,298 \cdot d).$$

2,25 ml θρεπτικό μέσο με πυκνότητα 1,23 g/ml τοποθετούνται στον πυθμένα σωλήνα υπερψυγοκέντρησης Beckman Ultra Clear (14 x 89 mm) και προστίθενται με προσοχή 1,75 ml διαλύματος KBr (1,19 g/ml), 3ml (1,063), 3ml (1,019) και 2 ml φυσιολογικού ορού (0,9% NaCl). Ακολουθεί υπερψυγοκέντρηση στις 40.000 στροφές ανά λεπτό για 12 ώρες συνήθως τη νύκτα στους 4° C. Την επόμενη μέρα συλλέγονται διαδοχικά τμήματα της διαβάθμισης, τέσσερα συνολικά 3 ml όγκου το κάθε ένα. Τα δείγματα μεταφέρονται σε σακούλες διαπίδυσης και εμβαπτίζονται σε διάλυμα 10 mM EDTA σε νερό από μία έως τρεις μέρες με συχνές αλλαγές του διαλύματος διαπίδυσης. Κατόπιν κάθε τμήμα της διαβάθμισης ρυθμίζεται ώστε να περιέχει τη σωστή αναλογία απορρυπαντικών και ακολουθεί ανοσοκατακρήμνιση και ανάλυση σε πηκτική ακρυλαμίδου όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Η επαλήθευση της ορθότητας της διαβάθμισης έγινε μετρώντας το δείκτη διάθλασης των διαφόρων τμημάτων της και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η πυκνότητα του διαλύματος βάση πινάκων μετατροπής. Ένα τυπικό δείγμα διαβάθμισης δίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Α/Α	Πρότυπες τιμές		ml διαβάθμισης από την κορυφή		Συγκεντρωμένα κλάσματα	
	n	ρ (g/ml)	n	ρ (g/ml)	n	ρ (g/ml)
1	1,3360	1,0164	1,3361	1,016	1+2+3	VLDL
2	1,3360	1,0164	1,3361	1,016	1,3362	1,017
3	1,3366	1,0200	1,3369	1,022		LDL
4	1,3385	1,0312	1,3384	1,030	4+5+6	LDL
5	1,3391	1,0350	1,3394	1,037	1,3394	1,037
6	1,3410	1,0465	1,3413	1,048		LDL
7	1,3441	1,0660	1,3442	1,054	7+8+9	LDL
8	1,3494	1,0986	1,3494	1,098	1,3488	1,095
9	1,3535	1,1242	1,3530	1,120		HDL
10	1,3591	1,1601	1,3592	1,160	10+11+12	HDL
11	1,3650	1,1980	1,3651	1,198	1,3649	1,198
12	1,3711	1,2383	1,3710	1,237		Ελεύθερο λιπίδιον

Οι πρότυπες τιμές δείκτη διάθλασης (n) και οι πυκνότητες διαλύματος στις οποίες αντιστοιχούν (ρ) είναι από το CRC Handbook of Chemistry and Physics, R.C. Weast, 59th edition 1978-79 D-288.

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που αποφασίστηκε να ακολουθηθεί, διαφορετικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του cDNA της αποΒ (εικόνα 1) υποκλωνοποιήθηκαν στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το γονίδιο της αποΑΙ. Για να επιτευχθεί αυτό ακολουθήθηκαν τα επόμενα βήματα.

1. Κατασκευή πλασμιδίων φορέων (Vectors)

Σειρά φορέων ΒΑ

Η σειρά αυτή αποτελείται από τρεις φορείς, που δημιουργήθηκαν αποκλειστικά για να δεχθούν τα διαφορετικά τμήματα του cDNA της αποΒ (εικόνα 1). Η βάση των φορέων αυτών είναι το πλασμίδιο φορέας pBluescript KS+ της Stratagene. Ο φορέας αυτός τροποποιήθηκε με την κλωνοποίηση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων στην περιοχή του πολυσυνδέτη (polylinker region). Η τροποποίηση αυτή έγινε για τους εξής σκοπούς : α) οι φορείς που θα προέκυπταν να δέχονται όσο το δυνατόν περισσότερα τμήματα του cDNA της αποΒ ο κάθε ένας και β) τα υποκλωνοποιούμενα τμήματα της αποΒ να είναι στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με τις δύο θέσεις περιορισμού *Xho I*, στα 5' και 3' άκρα του πολυσυνδέτη.

Φορέας ΒΑ I

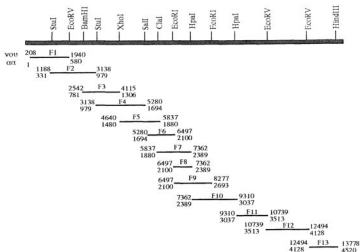
Για τη δημιουργία του συντέθηκαν δύο συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια κωδικοποιώντας τις θέσεις περιορισμού *Xho I*, *BamH I*, *Sal I*, *Cla I*, *EcoR I*, *Sma I*, *Xho I* και *Sac II*. Ο φορέας pBluescript KS+ υποβλήθηκε σε πέψη, με τα περιοριστικά ένζυμα *Xho I* και *Sac II*, για να αφαιρεθεί ένα μικρό τμήμα της αλληλουχίας του 79 νουκλεοτιδίων στην περιοχή του πολυσυνδέτη (polylinker region) και στη συνέχεια το παραπάνω ολιγονουκλεοτίδιο υποκλωνοποιήθηκε στις ίδιες θέσεις περιορισμού, αλλάζοντας έτσι τις θέσεις των περιοριστικών ενζύμων του πολυσυνδέτη. Εικόνα 2.

Φορέας ΒΑ II

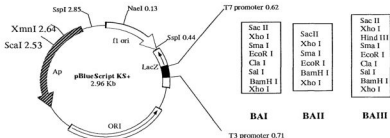
Ο φορέας ΒΑ II προέκυψε από τον ΒΑ I με μια μικρή τροποποίηση στην περιοχή του πολυσυνδέτη του. Ο φορέας ΒΑ I πέφθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *BamH I* και *EcoR I* και ένα μικρό ολιγονουκλεοτίδιο υποκλωνοποιήθηκε σε αυτές τις θέσεις, απαλείφοντας τις θέσεις περιορισμού *Sal I* και *Cla I*, δίνοντας έτσι το φορέα ΒΑ II. Εικόνα 2.

Φορέας BA III

Ο φορέας BA III προέκυψε από τον BA I με μια μικρή τροποποίηση στην περιοχή του πολυσυνδέτη του. Ο φορέας BA I πέφθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *Sma I* και *Sac II* και ένα μικρό ολιγονουκλεοτίδιο υποκλώνοποιήθηκε σε αυτές τις θέσεις δημιουργώντας μία νέα θέση περιορισμού την *Hind III* και δίνοντας έτσι το φορέα BA III. Εικόνα 2.



Εικόνα 1 : Σχηματική παράσταση που παρουσιάζει το συνολικό μήκος του cDNA της apoB. Φαίνονται οι θέσεις περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν. Από κάτω φαίνονται τα δεκατρία τμήματα του cDNA (F1-F13) που επιλέχθηκαν για να εκφραστούν σαν ιβρίδια με την apoAI. Οι αριθμοί πάνω και κάτω από κάθε τμήμα δηλώνουν αντίστοιχα αρίθμηση νουκλεοτιδίων και αμινοξέων της apoB .



Xho I BamHI Sal I Cla I EcoRI Sma I Xho I Sac II
 TCGAGagGGATCCTGTGCACATCGATtcGAATTCgCCCGGgaaacttCTCGAGCCGC
 CtcCCTAGGgCAGCTGTAGCTAagCTTAAGcGGGCCctttgaaGAGCTCGG BAI

Xho I BamHI EcoRI Sma I Xho I Sac II
 TCGAGagGGATCCaagqccaaGAATTCgCCCGGgaaacttCTCGAGCCGC
 CtcCCTAGGttccggttCTTAAGcGGGCCctttgaaGAGCTCGG BAI I

Xho I BamHI Sal I Cla I EcoRI Sma I Hind III Xho I Sac II
 TCGAGagGGATCCTGTGCACATCGATtcGAATTCgCCCGGgAAGCTTCTCGAGCCGC
 CtcCCTAGGgCAGCTGTAGCTAagCTTAAGcGGGCCcgtTCGAAGAGCTCGG BAI II

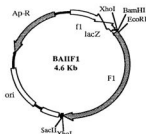
Εικόνα 2 : Σχηματική παράσταση του πλασμιδίου φορέα pBluescript KS+. Στα κουτιά φαίνονται οι διαφορετικές θέσεις περιορισμού του πολυσυνδέτη για τους φορείς BAI, BAI I και BAI II. Από κάτω φαίνεται η αλληλουχία του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου που χρησιμοποιήθηκε στη δημιουργία του φορέα BAI. Με έντονα γράμματα είναι οι αλληλουχίες των θέσεων περιορισμού. Υπογραμμισμένα είναι τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την μετατροπή του φορέα BAI κατά την κατασκευή των φορέων BAI I και BAI II.

2. Υποκλωνοποίηση των τμημάτων F1 έως F13 της αποB στους ενδιαμέσους φορείς ΒΑΙ, ΒΑΙΙ και ΒΑΙΙΙ

Σειρά κατασκευών ΒΑF(Ι-13)

Για τη δημιουργία της σειράς των κατασκευών αυτών χρησιμοποιήθηκαν τα τμήματα του cDNA της αποB που φαίνονται στην εικόνα 1 και η σειρά των φορέων ΒΑ που φαίνονται στην εικόνα 2. Το σύνολο του cDNA της αποB προήλθε από διαφορετικούς κλώνους, που περιγράφονται στις εικόνες 16 έως 19. Οι κατασκευές αυτές δημιουργήθηκαν α) από την αναγκαιότητα του κάθε τμήματος του cDNA της αποB να ορίζεται από δύο *Xho I* θέσεις περιορισμού στα 5' και 3' άκρα του, ώστε να μπορεί να κλωνοποιηθεί σαν *Xho I* τμήμα στον τελικό φορέα έαφρασης και β) το κάθε τμήμα της αποB να βρίσκεται στο ίδιο αναγωγικό πλαίσιο με την αλληλουχία της αποΑΙ στην οποία παρεμβάλλεται. Η παρεμβολή γίνεται μεταξύ δύο περιοριστικών θέσεων *Xho I* που οριοθετούν το τμήμα μεταξύ των καταλοίπων 212 έως 234 της αποΑΙ. Το σύνολο των κατασκευών αυτών περιγράφεται αναλυτικά στις εικόνες 3 έως 15.

Κατασκευή BAHF1



Xho I *BamH I* *EcoR I*

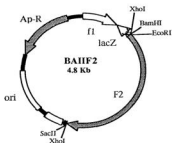
CTC GAG agG GAT CCa agg cca aGA ATT CCC CCA ATG CTG -----
 GAG CTC toC CTA GGe tcc ggt aCT TAA GGG GGT TAC GAC -----

F1 (1719 v.) *1/2 EcoR V-1/2 Sma I* *Xho I*

-----GCC AAT ATC GGG aaa ctt CTC GAG
 -----CGG TTA TAG CCC ttt gaa GAG CTC

Εικόνα 3: 1719 bp που καθορίζονται από τις περιοριστικές θέσεις *EcoR I* και *EcoR V* στο πλασμίδιο pUB19 (εικόνα 16) και κωδικοποιούν τα πρώτα 579 αμινοξέα της αποB, εικόνα 1, υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα BA II στις περιοριστικές θέσεις *EcoR I* και *Sma I*. Έτσι το αναγνωστικό πλαίσιο του τμήματος αυτού έρχεται στην ίδια φάση με αυτό των δύο περιοριστικών θέσεων *Xho I* του πολυσυνδέτη του φορέα. Από κάτω φαίνεται η περιοχή πολλαπλής υποκλωνοποίησης του φορέα BAH και το *EcoR I-EcoR V* τμήμα της αποB που έχει εντεθεί. Τα νουκλεοτίδια είναι διατεταγμένα σε τριπλέτες υποδηλώνοντας το σωστό αναγνωστικό πλαίσιο.

Κατασκευή ΒΑΗF2

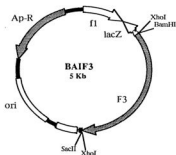


Εικόνα 4 : 1940 bp που καθορίζονται μεταξύ δύο περιοριστικών θέσεων *Stu I*, εικόνα 1, προερχόμενα από τον κλώνο *rUB47*, εικόνα 17, και κωδικοποιούν τα αμινοξέα από 331 έως 979, υποκλωνοποιήθηκαν στην περιοριστική θέση *Sma I* του φορέα ΒΑ ΙΙ. Έτσι το αναγνωστικό πλαίσιο του τμήματος αυτού είναι το ίδιο με αυτό των δύο *Xho I* περιοριστικών θέσεων του πολυσυνδέτη του φορέα. Σχηματικά παρακάτω φαίνεται η περιοχή πολλαπλής υποκλωνοποίησης του φορέα ΒΑ ΙΙ και το *Stu I*-*Stu I* τμήμα της αποΒ, που έχει παρεμβληθεί.

<i>Xho I</i>	<i>BamH I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>1/2 Sma I-1/2 Stu I</i>
CTC GAG aGg GAT CCa agg cCa aGA ATT CgC CCC CTC AGT GAT ---			
GAG CTC tCc CTA Ggt tcc ggt tCT TAA GcG GGG GAG TCA CTA ---			

F2 (1940)	<i>1/2 Stu I-1/2Sma I</i>	<i>Xho I</i>
-----GAA CTG AGG GGG aaa ctt CTC GAG		
-----CTT GAC TGG GGG ttt gaa GAG CTC		

Κατασκευή BAIF3



Εικόνα 5 : Το τμήμα F3, εικόνα 1, καθορίζεται από τις περιοριστικές θέσεις *BamH I* και *Xho I* αποτελείται από 2092 bp και κωδικοποιεί τα αμινοξέα 781 έως 1306 της αποΒ. Για την κλωνοποίηση του τμήματος αυτού χρειάστηκε πρώτα να απομονωθεί το *BamH I* τμήμα από το πλασμίδιο pUB47, εικόνα 17, και τα άκρα του να συμπληρωθούν με τη χρήση του ενζύμου Klenow. Στη συνέχεια ένας σύνδεσμος DNA (Linker) αποτελούμενος από δέκα bp και περιέχοντας μία *Xho I* περιοριστική θέση προστέθηκε στα άκρα του τεμαχίου F3. Η αλληλουχία του συνδέσμου έχει ως εξής:

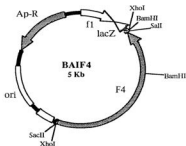
Xho I

```
ccCTCGAGgg
ggGAGCTCcc
```

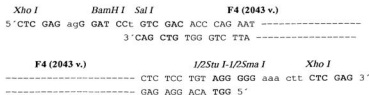
Μετά από πέψη με *Xho I* και απομόνωση του *Xho I* τεμαχίου από πριετή αгарόζης ακολούθησε υποκλωνοποίησή του στον φορέα BAI. Έτσι το αναγρωστικό πλαίσιο του τμήματος αυτού έρχεται στην ίδια φάση με την 5' *Xho I* περιοριστική θέση του πολυσυνδέτη του φορέα. Παρακάτω φαίνεται η περιοχή του πολυσυνδέτη μετά την παρεμβολή του τμήματος F3 της αποΒ.

<i>Xho I</i>	<i>BamH I</i>	F3 (2092v.)	<i>Xho I</i>
CTC GAG	gGG ATC	CCC CAG -----	CTG CCA TCT CGA G
GAG CTC	cCC TAG	GGG GTA -----	GAC GGT AGA GCT C

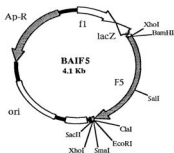
Κατασκευή BAIF4



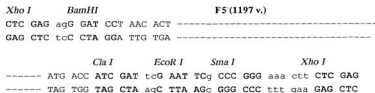
Εικόνα 6 : Το τμήμα F4, εικόνα 1, καθορίζεται από τις περιοριστικές θέσεις *Stu I-Sal I* αποτελείται από 2043 bp κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 979 έως 1694 και προέρχεται από το πλασμίδιο pUB47, εικόνα 17. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα BAI στις περιοριστικές θέσεις *Sal I-Sma I*. Αποτέλεσμα της υποκλωνοποίησης αυτής είναι το τμήμα F4 να βρίσκεται σε αντίθετο προσανατολισμό αλλά σε σωστό αναγνωστικό πλαίσιο με τις δύο περιοριστικές θέσεις *Xho I* του πολυσυνδέτη. Παρακάτω φαίνεται ο πολυσυνδέτης του BAI μετά την παρεμβολή του τμήματος F4 της αποB.



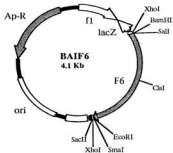
Κατασκευή BAIF5



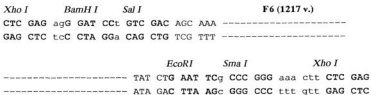
Εικόνα 7 : Το τμήμα F5, εικόνα 1, ορίζεται από τις περιοριστικές θέσεις *BamH I* και *Cla I*, αποτελείται από 1197 bp κωδικοποιεί τα αμινοξέα 1480 έως 1880 της αποB και προέρχεται από το πλασμίδιο pUB47, εικόνα 17. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες *BamH I* και *Cla I* περιοριστικές θέσεις του φορέα BAI. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.



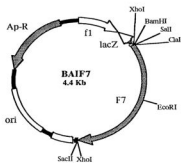
Κατασκευή BAIF6



Εικόνα 8 : Το τμήμα F6 ορίζεται μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *Sal I* και *EcoR I*, έχει μήκος 1217 bp, κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 1694 έως 2100, εικόνα 1, και προέρχεται από το πλασμίδιο pUB47, εικόνα 17. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες *Sal I* και *EcoR I* περιοριστικές θέσεις του φορέα BAI. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.



Κατασκευή BAIF7

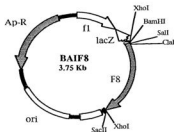


Εικόνα 9 : Το τμήμα F7, εικόνα 1, ορίζεται μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *Cla I* και *Hpa I*, το μήκος του είναι 1525 bp κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 1880 έως 2389 και προέρχεται από το πλασμίδιο pUBSB4, εικόνα 18. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στις περιοριστικές θέσεις *Cla I-Sma I* του φορέα BAI. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.

<i>Xho I</i>	<i>BamHI</i>	<i>Sal I</i>	<i>Cla I</i>	
CTC GAG agG GAT CCt	GTC GAC ATC GAT GCA	-----		
GAG CTC tcC CTA GGa	CAG CTG TAG CTA CGT	-----		

F7 (1525 v.)	<i>1/2HpaI-1/2SmaI</i>	<i>Xho I</i>
-----	GAA GAT GTT GGG aaa ctt CTC GAG	
-----	CTT CTA CAA CCC ttt gaa GAG CTC	

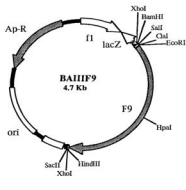
Κατασκευή BAIF8



Εικόνα 10 : Το τμήμα F8, εικόνα 1, μήκους 850 bp ορίζεται μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *EcoR I* και *Hpa I*, κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 2100 έως 2389 της αποB και προέρχεται από το πλασμίδιο pUBSB4, εικόνα 18. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στις *EcoR I*-*Sma I* περιοριστικές θέσεις του φορέα BAI. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.

<i>Xho I</i>	<i>BamH I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Cla I</i>	<i>EcoR I</i>
CTC GAG agG GAT CCT GTC GAC ATC GAT tgG AAT TCA TTC -----				
GAG CTC tcC CTA GGA CAG CTG TAG CTA acC TTA AGT AAG -----				

F8 (850 v.)	<i>1/2HpaI-1/2SmaI</i>	<i>Xho I</i>
-----	GAT GTT GGG aaa ctt CTC GAG	
-----	CTA CAA CCC ttt gaa GAG CTC	

Κατασκευή BAIII^{F9}

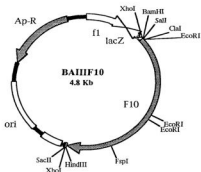
Εικόνα 11 : Το τμήμα F9, εικόνα 1, μήκους 1780 bp ορίζεται μεταξύ δύο *EcoR I* περιοριστικών θέσεων, κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 2100 έως 2693 της αποB και προέρχεται από το πλασμίδιο pUBSB4, εικόνα 18. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στην περιοριστική θέση *Sma I* του φορέα BAIII αφού πρώτα τα άκρα του συμπληρώθηκαν με τη χρήση του ενζύμου Klenow. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.

<i>Xho I</i>	<i>BamH I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Cla I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>Sma I/EcoR I</i>
CTC GAG agG GAT CCT GTC GAC ATC GAT t:cG AAT TCg CCC AAT TCA---					
GAG CTC t:cC CTA GGa CAG CTG TAG CTA agC TTA AGc GGG TTA AGT---					

F9 (1780 v.)*EcoR I/Sma I Hind III Xho I*

-----	GAA TTG GGc AAG CTT CTC GAG
-----	CTT AAC CCg TTC GAA GAG CTC

Κατασκευή ΒΑIII F10

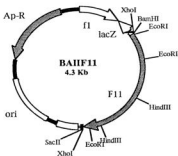


Εικόνα 12 : Το τμήμα F10, εικόνα 1, μήκους 1894 bp ορίζεται μεταξύ δύο περιοριστικών θέσεων *Hpa I*, κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 2389 έως 3037 της αποB και προέρχεται από το πλασμίδιο pUBSB4, εικόνα 18. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στην περιοριστική θέση *Sma I* του φορέα ΒΑIII. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.

<i>Xho I</i>	<i>BamH I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Cla I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>Sma I/Hpa I</i>
CTC GAG agG GAT Cct	GTC GAC ATC GAT tCG AAT TCg CCC AAC--				
GAG CTC tCG CTA GGa CAG CTG TAG CTA agC TTA AGg GGG TTC--					

F10 (1894 v.)	<i>Hpa I/Sma I</i>	<i>Hind III</i>	<i>Xho I</i>
-----	AGG TTG GGc AAG CTT CTC GAG		
-----	TCC AAC CCc AAC GTT GAG CTC		

Κατασκευή ΒΑΙΗF11

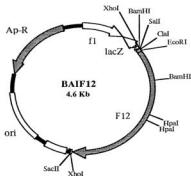


Εικόνα 13 : Το τμήμα F11, εικόνα 1, ορίζεται μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *Hpa I* και *EcoR V*, το μήκος του είναι 1430 bp, κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 3037 έως 3513 της αποβ και προέρχεται από το πλασμίδιο pUBSB4 εικόνα 18. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στην περιοριστική θέση *Sma I* του φορέα ΒΑΙΙ. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.

<i>Xho I</i>	<i>BamH I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>Sma I/Hpa I</i>
CTC GAG agG GAT CCA agg cca aGA ATT CgC CCA ACA GGG -----			
GAG CTC tcC CTA Ggt tcc ggt tCT TAA GcG GGT TGT CCC -----			

F11 (1430 v.)	<i>EcoR V/Sma I</i>	<i>Xho I</i>
-----	GAT GAT GGG aaa ctt CTC GAG	
-----	CTA CTA CCC ttt caa GAG CTC	

Κατασκευή BAIF12



Εικόνα 14 : Το τμήμα F12, εικόνα 1, ορίζεται μεταξύ δύο περιοριστικών θέσεων *EcoR V*, το μήκος του είναι 1755 bp, κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 3513 έως 4128 της αποB και προέρχεται από το πλασμίδιο 26A1T, εικόνα 19. Το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στην περιοριστική θέση *Sma I* του φορέα BAI. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.

<i>Xho I</i>	<i>BamH I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Cla I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>Sma I/Hpa I</i>
CTC GAG agG GAT CCT	GTC GAC ATC GAT	tCG AAT TCg CCC ATC-----			
GAG CTC tCG CTA GGa CAG CTG TAG CTA	agC TTA TGc GGG TAG-----				

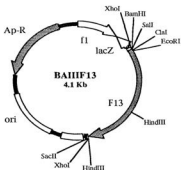
F12 (1755 v.)

EcoR V/Sma I

Xho I

-----	GAT GAT GGG aaa ctt CTC GAG
-----	CTA CTA CCC ttt gaa GAG CTC

Κατασκευή BAIF13



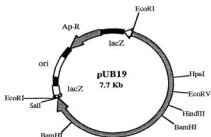
Εικόνα 15 : Το τμήμα F13, εικόνα 1, ορίζεται μεταξύ των περιοριστικών θέσεων *EcoR V* και *Hind III*, το μήκος του είναι 1284 bp, κωδικοποιεί τα αμινοξέα από 4128 έως 4520 της αποB και προέρχεται από το πλασμίδιο 26AIT, εικόνα 19. Για την κλωνοποίηση του τμήματος αυτού πρώτα απομακρύνθηκε το *EcoR V* τμήμα από το πλασμίδιο 26AIT και το υπόλοιπο του πλασμιδίου υποβλήθηκε σε μερική πέψη με *Hind III*. Το τμήμα *EcoR V - Hind III* απομονώθηκε και υποκλωνοποιήθηκε στις *Sma I Hind III* περιοριστικές θέσεις του φορέα BAIII. Παρακάτω φαίνεται το σχήμα υποκλωνοποίησης.

<i>Xho I</i>	<i>BamH I</i>	<i>Sal I</i>	<i>Cla I</i>	<i>EcoR I</i>	<i>Sma I/EcoR V</i>
CTC GAG agG GAT CCT	GTC GAC ATC GAT	tCG AAT TCg CCC ATC-----			
GAG CTC t:cC CTA GGt CAG CTG TAG CTA	agC TTA AGg GGG TAG-----				

F13 (1284 v.)

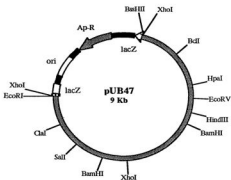
	<i>Hind III</i>	<i>Xho I</i>
-----	ATG AAG CTT CTC GAG	
-----	TAC TTC GAA GAG CTC	

Πλασμίδιο pUB19



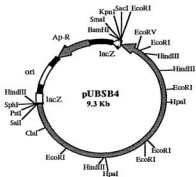
Εικόνα 16 : Ο κλώνος pUB19 προέρχεται από τον κλώνο λB19 που περιγράφεται από τους Cladaras *et al.*, 1986. Ένα μεγάλο τμήμα της αποB που εκτείνεται από το νουκλεοτίδιο 208 του cDNA της μέχρι λίγο μετά την *Sal I* θέση περιορισμού στο νουκλεοτίδιο 5280 έχει εξαχθεί μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *EcoR I* από τον λ φάγο (κλώνος λB19) και υποκλωνοποιήθηκε στην αντίστοιχη θέση περιορισμού του πλασμιδίου pUC19. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του πρώτου αμινοτερματικού τμήματος της αποB. Ο κλώνος pUB19 δεν περιλαμβάνει το πεπτιδιο-σήμα και αρχίζει ένα νουκλεοτίδιο πριν από το πρώτο ATG που κωδικοποιεί για την ώριμη πρωτεΐνη.

Πλασμίδιο pUB47



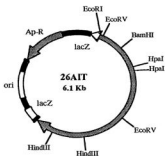
Εικόνα 17 : Το πλασμίδιο αυτό προέρχεται από διάφορους κλώνους του αποB cDNA Cladaras *et al.*, (αδημοσίευτη εργασία). Περιλαμβάνει όλη την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή και εκτείνεται μέχρι την *EcoR I* θέση περιορισμού στο νουκλεοτίδιο 6497 του cDNA της αποB. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν βάση για την κατασκευή των πλασμιδίων BAIF2 BAIF3 BAIF4 BAIF5 και BAIF6.

Πλασμίδιο pUBSB4



Εικόνα 18 : Το πλασμίδιο αυτό κατασκευάστηκε από τους Cladaras *et al.*, (αδημοσίευτη εργασία) και προέρχεται από ένωση διαφόρων τμημάτων του cDNA της αποB στον πλασμιδιακό φορέα pUC18. Το cDNA που είναι κλωνοποιημένο σ' αυτό το πλασμίδιο ξεκινά από μία *Sal I* θέση περιορισμού στο νουκλεοτίδιο 5279 και εκτείνεται έως μία *BamH I* θέση περιορισμού στο νουκλεοτίδιο 11105. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν βάση για την κατασκευή των πλασμιδίων BAIF7 BAIF8 BAIF9 BAIF10 και BAIF11.

Πλασμίδιο 26ΑΙΤ



Εικόνα 19 : Όπως και με τα πλασμίδια pUB47 και pUBSB4, το πλασμίδιο 26ΑΙΤ προέρχεται από αδημοσίευτη εργασία των Cladagas *et al*. Περιέχει το καρβοξυτετραματικό άκρο του cDNA της αποB από την *EcoR I* θέση περιορισμού στο νουκλεοτίδιο 10682 και εκτείνεται μέχρι την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν βάση για την κατασκευή των πλασμιδίων BAIF12 και BAIF13.

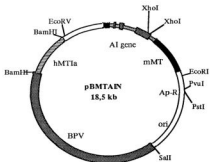
3. Υποκλωνοποίηση των F τμημάτων του cDNA της αποΒ από τους ενδιάμεσους φορείς της σειράς ΒΑ στον τελικό φορέα έκφρασης pBMTAIN.

Η ολοκλήρωση της σειράς κατασκευών ΒΑF επέτρεψε την πραγματοποίηση του τρίτου βήματος για την έκφραση των υβριδικών πρωτεϊνών. Τα τμήματα F1 έως F13 της αποΒ εξήχθησαν από τους ενδιάμεσους φορείς ΒΑ και υποκλωνοποιήθηκαν σαν *Xho I* τμήματα στον τελικό φορέα έκφρασης pBMTAIN. Ο φορέας αυτός είναι ένα παράγωγο του ιού βούου θηλώματος (Bovine Papilloma virus) και περιέχει ολόκληρο το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης του ποντικού και έχει χρησιμοποιηθεί για την έκφραση του γονιδίου της αποΑΙ σε ευκαρυωτικά κύτταρα C127 ποντικού (Rogani *et al.*, 1988). Ο φορέας αυτός χρησιμοποιήθηκε χωρίς καμιά τροποποίηση. Εικόνα 20.

Σειρά κατασκευών pAINBF(1-13)

Για τη δημιουργία της σειράς αυτής χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pBMTAIN και τα ήδη κλωνοποιημένα τμήματα F1 έως F13 στη σειρά φορέων ΒΑ. Ο φορέας pBMTAIN περιέχει το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ του ανθρώπου. Το γονίδιο αυτό έχει μήκος περίπου δύο χιλιάδων bp και στα νουκλεοτίδια 1709 και 1780 υπάρχουν δύο *Xho I* περιοριστικές θέσεις. Ο φορέας αυτός αφού πέφθηκε με *Xho I* και το μικρό τμήμα 71 bp απομακρύνθηκε, χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση όλων των F τμημάτων της αποΒ. Το σχήμα αυτό της κλωνοποίησης έφερε το κάθε ένα F τμήμα στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με αυτό της αποΑΙ δημιουργώντας έτσι ένα υβριδικό γονίδιο AINBF. Το συνολικό σχήμα υποκλωνοποιήσεων που έχει περιγραφεί μέχρι τώρα αποδίδεται σχηματικά στην εικόνα 21.

Φορέας ρBMTAIN



Εικόνα 20 : Σχηματική παράσταση που παρουσιάζει τον τελικό φορέα έκφρασης ρBMTAIN. Ο φορέας αυτός περιλαμβάνει $5,5 \times 10^3$ bp από το γένομα του BPV (Bovine Papilloma Virus) υπεύθυνο για τον μετασχηματισμό ευκαρυωτικών κυττάρων, το γονίδιο hMTIIa της ανθρώπινης μεταλλοθειονίνης, το γονίδιο mMT της μεταλλοθειονίνης του ποντικού, καθώς και το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης AI του ανθρώπου. Οι αλληλουχίες με την πληροφορία για πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου σε βακτήρια καθώς και αυτές για την αντίσταση στην αμιικιλίνη προέρχονται από το πλασμίδιο ρBR322. Φαίνονται επίσης και οι δύο *Xho I* θέσεις περιορισμού κοντά στο 3' του γονιδίου της αποAI.

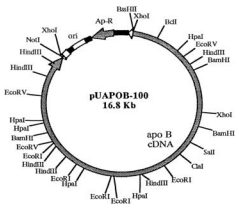
Στρατηγική για τη δημιουργία της σειράς κατασκευών pBMB

Η δημιουργία της σειράς αυτής έγινε με σκοπό την έκφραση συνεχών αμινοτερματικών τμημάτων του cDNA της αποB σε αντιδιαστολή με την προηγούμενα περιγραφόμενη προσέγγιση της δημιουργίας τριδικών μορίων πρωτεΐνης AIB. Για να γίνει αυτό εφικτό, τρία διαφορετικά τμήματα του cDNA της αποB που καλύπτουν το 29%, 41% και 47% κλωνοποιήθηκαν σε ένα παράγωγο του φορέα έκφρασης pBMT3X, τον pBMT3XM. Τα τμήματα αυτά προέρχονται από το πλασμίδιο pUAPOB-100 Cladagas *et al.*, (μη δημοσιευμένη εργασία) και περιγράφεται στην εικόνα 22. Ο φορέας έκφρασης περιγράφεται παρακάτω.

Φορέας pBMT3XM

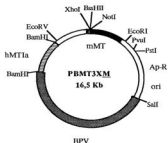
Ο φορέας αυτός είναι παράγωγο του φορέα pBMT3X, (Krystal *et al.*, 1986) και τα επιμέρους στοιχεία του έχουν περιγραφεί αναλυτικά προηγουμένως μια και πρόκειται για τον ίδιο φορέα έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των πλασμιδίων της σειράς pAINBF(1-13). Η διαφορά του με τον φορέα pBMTAIN είναι ότι δεν περιέχει το γονίδιο της αποAI του ανθρώπου και με τον φορέα pBMT3X είναι ότι περιέχει δύο νέες περιοριστικές θέσεις, *BssH II* και *Not I*. Για να γίνει αυτό ο φορέας pBMT3X πέφθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoR V* και *Xho I* και αφαιρέθηκε ένα τμήμα περίπου δύο χιλιάδων bp που περιείχαν τον υποκινητή της μεταλλοθειονίνης του ποντικού. Στο υπόλοιπο του φορέα υποκλωνοποιήθηκε ένα ολιγονουκλεοτίδιο που περιείχε τις δύο νέες θέσεις καθώς και κωδικόνια τερματισμού της μετάφρασης και στα τρία αναγνωστικά πλαίσια. Μετά από νέα πέψη *EcoR V* - *Xho I* στο φορέα που προέκυψε και επανεισαγωγή του υποκινητή της μεταλλοθειονίνης του ποντικού σαν *EcoR V* - *Xho I* τμήματος δημιουργήθηκε ο φορέας pBMT3XM. Ο φορέας περιγράφεται στην εικόνα 23.

Πλασμίδιο pUΑPOB-100



Εικόνα 22 : Σχηματική παράσταση που αναπαριστά το πλασμίδιο pUΑPOB-100. Το συνολικό μήκος του cDNA της apoB έχει υποκλωνοποιηθεί από διαφορετικά πλασμίδια σε ένα ενιαίο σύνολο στον φορέα pUC19.

Φορέας pBMT3XM



Εικόνα 23 : Σχηματική παράσταση που παρουσιάζει τον φορέα έκφρασης pBMT3XM. Σημειώνονται η αλληλουχία του ιού βοείου θηλώματος (Bovine Papilloma Virus, BPV), οι αλληλουχίες για τα γονίδια της μεταλλοθειονίνης του ποντικού και του ανθρώπου, καθώς επίσης και οι δύο νέες θέσεις περιορισμού *BssH II* και *Not I*. Η αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου που έχει εντεθεί περιγράφεται παρακάτω:

EcoR V *Xho I* *BssH II* *Not I* τροποποιημένη *Xho I*
ATCacg**t**cat**CTCGAG**ta**GCGCGC**ta**GCGGCCG**C**t**gat**t**gat**tga****G**
TAGtcagta**GAGCTC**at**CGCGCG**at**CGCCGGC**G**acta**acta**actCAGCT**

Σειρά κατασκευών pBMB

Για τη δημιουργία της σειράς αυτής χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pBMT3X \underline{M} για να δεχτεί τμήματα της αποB διαφόρου μεγέθους. Τρία συνολικά τμήματα υποκλωνοποιήθηκαν σ' αυτό το φορέα που κωδικοποιούν το 29%, 41% και 47% της αποB αντίστοιχα, εικόνες 24, 25 και 26.

pBMB29

Για τη δημιουργία της κατασκευής αυτής ένα *Xho I* τμήμα που περιείχε το 29% του cDNA της αποB απομονώθηκε μετά από πέψη του πλασμιδίου pUAPOB-100 με *Xho I*. Στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε στην περιοριστική θέση *Xho I* του φορέα pBMT3X \underline{M} δημιουργώντας έτσι την κατασκευή pBMB29, εικόνα 24.

pBMB41

Για την κατασκευή αυτή το πλασμίδιο pUAPOB-100 πέφθηκε με *Cla I* και *Not I* σπάζοντάς το έτσι σε δύο τμήματα. Στα τμήματα που προέκυψαν συγκολλήθηκε ένας μικρός συνθετικός προσαρμοστής DNA (DNA adaptor) με τις θέσεις περιορισμού *Cla I* και *Not I* στα άκρα του, η αλληλουχία του οποίου έχει ως εξής:

<i>Cla I</i>	<i>Not I</i>
CGATagcttcaagtcGC	
TAtcgaagttcagtcGCCGG	

Ακολούθησε πέψη με *Not I* και επανασύνδεση των τμημάτων με τη δράση της λιγάσης. Με αυτόν τον τρόπο αφαιρέθηκε από το πλασμίδιο pUAPOB-100 ένα τμήμα περίπου 8×10^3 bp και προέκυψε το πλασμίδιο pUB41 περιέχοντας μόνο το 41% του cDNA της αποB. Στη συνέχεια το pUB41 πέφθηκε με τα περιοριστικά ένζυμα *BssH II* και *Not I* για να απομονωθεί το cDNA που κωδικοποιεί το 41% της αποB. Το τμήμα αυτό στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pBMT3X \underline{M} αφού πρώτα είχε πεφθεί και αυτός με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Το πλασμίδιο που προέκυψε ονομάστηκε pBMB41, εικόνα 25.

pBMB47

Για την κατασκευή αυτή ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

α. Απομονώθηκε το ένθεμα από την κατασκευή BAIF6, εικόνα 8, με πέψη του περιοριστικού ενζύμιου *Xho I*.

β. Στο ένθεμα αυτό συγκολλήθηκε ένας προσαρμοστής DNA με άκρα *Xho I*, *Not I*, η αλληλουχία του οποίου φαίνεται παρακάτω:

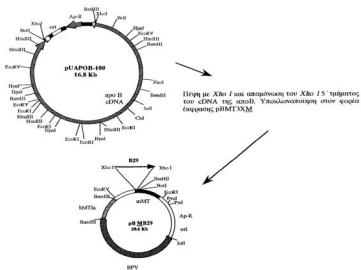
<i>Xho I</i>	<i>Not I</i>
TCGAG	GagcttcaagtcaGC
	CtcgaagttcagtcGCCGG

και ακολούθησε πέψη με περίσσεια ενζύμων *Cla I* και *Not I* και απομόνωση ενός *Cla I* - *Not I* τμαχίου 650 bp.

γ. Το πλασμίδιο pUB41 πέφθηκε με τα ένζυμα *Cla I* και *Not I* και το τμήμα που απομονώθηκε από το προηγούμενο βήμα υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις δημιουργώντας έτσι το pUB47.

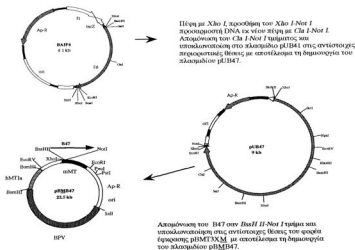
δ. Κατόπιν το 47% του cDNA της αποB απομονώθηκε μετά από πέψη του pUB47 με *BssH II* και *Not I* και υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του pBMT3XΜ δημιουργώντας έτσι την κατασκευή pBMB47, εικόνα 26.

Πλασμίδιο pBMB29



Εικόνα 24 : Σχηματική παράσταση που παρουσιάζει τη διαδικασία κατασκευής του πλασμιδίου pBMB29. Το 29% του cDNA της apoB προέρχεται από το πλασμίδιο pUAPOB-100 και υποκλωνοποιήθηκε στον τελικό φορέα έκφρασης pBMT3XM σαν *Xho I* περιοριστικό τμήμα.

Πλασμίδιο ρBMB47



Εικόνα 26 : Η σχηματική παράσταση παρουσιάζει τη διαδικασία κατασκευής του πλασμιδίου ρBMB47. Για την κατασκευή αυτή χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο ρUB41 εικόνα 25, το πλασμίδιο BAIF6, εικόνα 8, καθώς και ένας προσαρμοστές DNA με άκρα *Xho I-Not I*. Από το πλασμίδιο BAIF6 απομονώθηκε ένα μικρό τμήμα 650 bp που σηματοδοτώνει την απόσταση από το 41% μέχρι το 47% του μορίου της αποB. Το 3' άκρο του τμήματος αυτού τροποποιήθηκε με τον προσαρμοστέ DNA ώστε να καταλήγει σε *Not I* θέση περιορισμού. Το τμήμα αυτό που απομονώθηκε με εκ νέου πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Cla I* και *Not I* ενώθηκε με το B41 στο πλασμίδιο ρUB41 με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ενδιάμεσου πλασμιδίου ρUB47. Εν συνεχεία το 47% του cDNA της αποB εξήχθη από τον φορέα του με *BssH II - Not I* πέψη και υποκλωνοποιήθηκε στον τελικό φορέα έκφρασης ρBMT3XΜ στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού δημιουργώντας έτσι το πλασμίδιο ρBMB47.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΙΒ ΚΛΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ B29, B41, B47 ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.

Μεθοδολογία

Για την έκφραση των υβριδικών αυτών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pAINBF1 έως και pAINBF13, καθώς και τα πλασμίδια pBMB29, 41 και 47. Η κατασκευή των πλασμιδίων αυτών περιγράφεται αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα εξής βήματα :

1. Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων C127 ή HepG2 με την τεχνική της συγκατακρήμνισης του DNA με CaCl₂.

2. Δημιουργία κυτταρικών σειρών (κλώνων) που εκφράζουν τις ανάλογες πρωτεΐνες. Για την επιλογή κυτταρικών κλώνων που εκφράζουν τις υβριδικές πρωτεΐνες ΑΙΒ καθώς και τις B29, B41 και B47 τα επιμολυσμένα κύτταρα επωάστηκαν με μικρή συρέντρωση, 10 μM CdCl₂. Η επώαση αυτή είχε διπλό αποτέλεσμα. Πρώτον, κύτταρα που δεν είχαν επιμολυνθεί με το ανάλογο πλασμίδιο διατήρησαν την ευαισθησία τους απέναντι σε βαριά μέταλλα όπως το κάδμιο και μόνο τα επιμολυσμένα μπόρεσαν να αναπτυχθούν λόγω της έκφρασης του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης του ανθρώπου. Η επιλογή αυτή επέτρεψε την απομόνωση κυττάρων ανθεκτικών στο κάδμιο και τη δημιουργία κυτταρικών κλώνων που είχαν επιμολυνθεί με τα πλασμίδια pAINBF1 έως και pAINBF13, καθώς και τα πλασμίδια pBMB29, 41 και 47. Επιπρόσθετα το κάδμιο επάγει τον υποκινητή του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης του ποντικού με συνέπεια την έκφραση των γονιδίων που έχουν κλωνοποιηθεί κάτω από τον έλεγχό του.

3. Σήμανση των νεοσυνθεμένων πρωτεϊνών *in vivo* με ³⁵S Μεθειονίνη. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Τα προς σήμανση κύτταρα καλλιεργούνται σε συνθήκες έλλειψης μεθειονίνης. Όταν προστεθεί ιχνοθετιμμένη μεθειονίνη (³⁵S) στο θρεπτικό μέσο, ενσωματώνεται στις νεοσυνθεμένες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την ³⁵S σήμανσή τους.

4. Συλλογή του θρεπτικού μέσου και των κυττάρων και ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνών ΑΙΒ1 έως ΑΙΒ13 καθώς και των B29, 41 και 47. Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Περιλαμβάνει επώαση του θρεπτικού μέσου (εσκινομένη πρωτεΐνη) και του λύματος των κυττάρων (ενδοκυττάρια πρωτεΐνη) με το ανάλογο αντίσωμα παρουσία απορροπαντικών. Σε ένα δεύτερο βήμα το σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος επωάζεται με πρωτεΐνη Α ή G (ανάλογα με την προέλευση του αντισώματος) ώστε να είναι δυνατή η απομάκρυνσή του από το διάλυμα και η παρατέρα ανάλυσή του.

5. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου-SDS του συμπλέγματος αντισώματος-πρωτεΐνης και αυτοραδιογραφία. Η διαδικασία αυτή είναι η κλασική

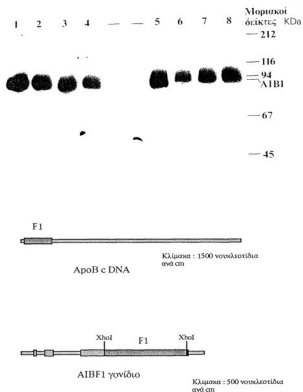
ηλεκτροφόρηση που περιγράφεται από τον Laemmli 1970 με ελάχιστες τροποποιήσεις (Zannis V. I. 1986).

α. Έκφραση υβριδικών πρωτεϊνών AIB.

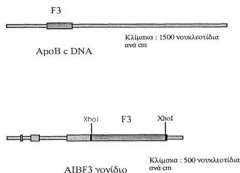
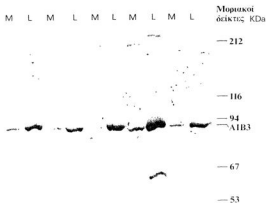
Ευρήματα

Έκφραση των υβριδικών πρωτεϊνών AIB1, AIB3, και AIB4 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια pAIBBF1, pAIBBF3 και pAIBBF4.

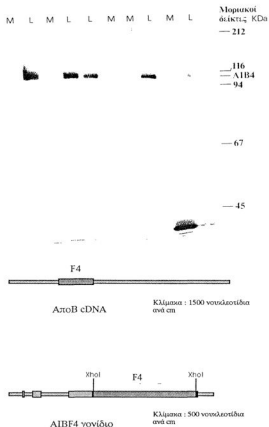
Για την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pAIBBF1, pAIBBF3 και pAIBBF4. Τα πλασμίδια αυτά προέρχονται από την σειρά πλασμιδίων pAIBBF. Το πλασμίδιο pAIBBF1, κωδικοποιεί για μια υβριδική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 90 περίπου KDa, τα πλασμίδια, pAIBBF3 και pAIBBF4, κωδικοποιούν υβριδικές πρωτεΐνες μοριακού βάρους 100 περίπου KDa. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να επιμολύνουν C127 κύτταρα σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται παραπάνω. Η εικόνα A1 δείχνει ενδοκυττάρια πρωτεΐνη, AIB1, 10 διαφορετικών κλώνων μόνιμα επιμολυσμένων με το πλασμίδιο pAIBBF1, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποA1 αντίσωμα, ανάλυση σε πριτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Σημειώνεται η παρουσία της υβριδικής πρωτεΐνης, AIB1, στο αναμενόμενο περίπου μέγεθος των 90 KDa. Οι εικόνες A3 και A4 δείχνουν παρόμοια ανάλυση προϊόντων ανοσοκατακρήμνισης, από 5 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια pAIBBF3 και pAIBBF4. Σημειώνονται οι υβριδικές πρωτεΐνες στο αναμενόμενο περίπου μέγεθος των 100 KDa.



Εικόνα Α1 : Φαίνεται η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη, AIB1, από 10 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAINBF1, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτιή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F1 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της αποB και το υβριδικό γονίδιο AIBF1 που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη AIB1.



Εικόνα A3 : Φαίνεται η ενδοκυττάρια και εσορινομένη πρωτεΐνη, AIB3, από 5 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAIBF3, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποAI αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F3 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της apoB και το υβριδικό γονίδιο AIBF3 που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη AIB3.



Εικόνα A4 : Φαίνεται η ενδοκυττάρια και εκκρινομένη πρωτεΐνη, AIB4, από 5 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAIBF4, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποA1 αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F4 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της αποB και το υβριδικό γονίδιο AIBF4 που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη AIB4.

Εκφραση υβριδικών πρωτεϊνών AIB7, AIB8 και AIB9 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια pAIBNF7, pAIBNF8 και pAIBNF9.

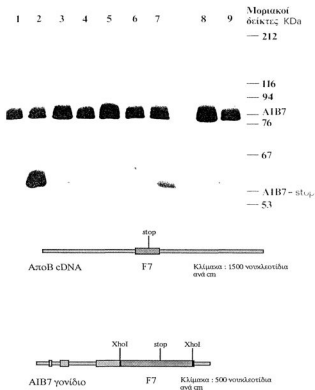
Τα πλασμίδια αυτά αποτελούν μια ενότητα, γιατί ενώ μεν καλύπτουν διαφορετικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του αποB cDNA, σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να περιλαμβάνουν την περιοχή στην οποία λειτουργεί ο μηχανισμός της τροποποίησης του mRNA (mRNA editing). Έτσι αν ο μηχανισμός της τροποποίησης του mRNA λειτουργεί στα C127, περιμένουμε να εκφράζονται δύο πρωτεϊνικά μόρια. Τα ευρήματα από την τροποποίηση του mRNA περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 3 του ίδιου κεφαλαίου.

Το πλασμίδιο pAIBNF7 κωδικοποιεί για μια υβριδική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 80 περίπου KDa. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για να επιμολύνει κύτταρα C127 ποντικού και μετά από επιλογή με 10 μ M Cd επιλέχθηκαν 10 διαφορετικοί κλώνοι που στη συνέχεια αναλύθηκαν όσον αφορά την έκφραση υβριδικής πρωτεΐνης AIB7. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην αρχή του κεφαλαίου. Η εικόνα A5 δείχνει ανάλυση των προϋόντων της ανοσοκατακρήμνιση σε πηκτιή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία της εκκρινόμενης μορφής της πρωτεΐνης από 10 διαφορετικούς κλώνους και η εικόνα A6 παρόμοια ανάλυση της ενδοκυττάριας μορφής της πρωτεΐνης από τους ίδιους 10 κλώνους που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω. Σημειώνεται η παρουσία της υβριδικής πρωτεΐνης στο αναμενόμενο περίπου μέγεθος των 80 KDa καθώς και μιας δεύτερης πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 60 KDa. Η δεύτερη μορφή αναμένεται αν λειτουργεί ο μηχανισμός τροποποίησης του mRNA και επέρχεται τεματισμός της μετάφρασης στο κωδικόνιο 2153 της αποB, AIB7-stop. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι η ετερογένεια μεγέθους της πρωτεΐνης που εμφανίζεται στις εικόνες A5 και A6 είναι χαρακτηριστικό Ο-γλυκοσυλίωσης. Δες εικόνες A5 και A6.

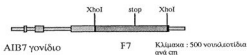
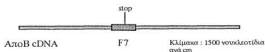
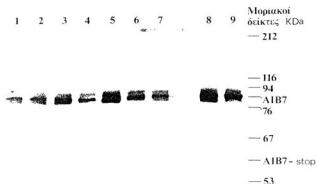
Τα πλασμίδια pAIBNF8 και pAIBNF9 κωδικοποιούν υβριδικές πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 60 και 90 KDa αντίστοιχα. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να επιμολύνουν C127 σύμφωνα με την μεθοδολογία που έχει περιγραφεί παραπάνω. Επιλέχθηκαν 5 διαφορετικοί κλώνοι από την κάθε μια που στη συνέχεια αναλύθηκαν όσον αφορά την έκφραση υβριδικών πρωτεϊνών AIB8 και AIB9. Οι εικόνες A7 και A8 δείχνουν ανάλυση προϋόντων ανοσοκατακρήμνιση ενδοκυττάριας και εκκρινόμενης πρωτεΐνης σε πηκτιή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία από επιλεγμένους κλώνους επιμολυσμένους με τις παραπάνω κατασκευές. Στην εικόνα A7 σημειώνεται παρουσία εκκρινόμενης και ενδοκυττάριας υβριδικής πρωτεΐνης στο αναμενόμενο περίπου μέγεθος των 60 KDa, για την AIB8, καθώς και μιας δεύτερης με μοριακό βάρος 35 KDa περίπου. Το μέγεθος της δεύτερης πρωτεΐνης αντιστοιχεί σε τεματισμό της μετάφρασης στο κωδικόνιο 2153 της αποB, AIB8-stop. Επίσης η ετερογένεια μεγέθους που εμφανίζεται στην εικόνα A7 για την

πρωτεΐνη AIB8 είναι παρόμοια με αυτή για την ιβριδική πρωτεΐνη AIB7 και AIB7-stop, εικόνες A5 και A6 και διαφορετικό για την AIB8-stop εικόνα A7.

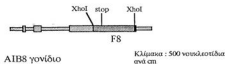
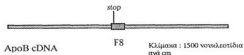
Στην εικόνα A8 σημειώνεται παρουσία εκκρινόμενης και ενδοκυτταρίου ιβριδικής πρωτεΐνης που όμως δεν έχει το αναμενόμενο μέγεθος των 90 περίπου KDa, για την AIB9, αλλά μόνο 35 περίπου KDa. Το μέγεθος της πρωτεΐνης αυτής είναι το αναμενόμενο για τερματισμό στο κωδικόνιο 2153 του mRNA της αλοB, AIB9-stop. Αξίζει να σημειωθεί ότι όμοια με την πρωτεΐνη AIB8-stop η πρωτεΐνη AIB9 δεν παρουσιάζει ετερογένεια μεγέθους.



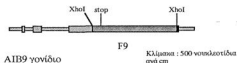
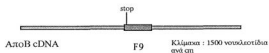
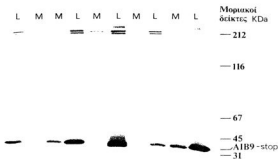
Εικόνα A5 : Φαίνεται η εκκρινόμενη πρωτεΐνη AIB7 και AIB7-stop, από 10 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAIBF7, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμιδίου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F7 σε σχέση με το συνολικό μέρος του cDNA της apoB και το υβριδικό γονίδιο AIBF7 που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες AIB7 και AIB7-stop.



Εικόνα A6 : Φαίνεται η ενδοκυττάρια πρωτεΐνη AIB7 και AIB7-stop, από 10 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAIBNF7, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποA1 αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτική ακρυλαμιδίου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F7 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της apoB και το υβριδικό γονίδιο AIBF7 που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες AIB7 και AIB7-stop.



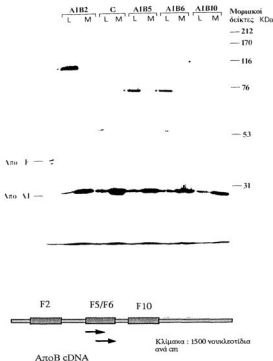
Εικόνα A7 : Φαίνεται η εκκρινόμενη και ενδοκυττάρια πρωτεΐνη AIB8 και AIB8-stop, από 5 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAIBF8, μετά από ανοσοκαταρμήμιση με αντι-αποΒ1 αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτική ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F8 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της apoB και το υβριδικό γονίδιο AIBF8 που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες AIB8 και AIB8-stop.



Εικόνα A8 : Φαίνεται η εκκρινομένη και ενδοκυττάρια πρωτεΐνη AIB9-stop, από 5 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAIBNF9, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποA1 αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτική ακρυλαμιδίου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F9 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της apoB και το υβριδικό γονίδιο AIBF9 που κωδικοποιεί για τη πρωτεΐνη AIB9-stop.

Έκφραση υβριδικών πρωτεϊνών, AIB2, AIB5, AIB6 και AIB10 μετά από παροδική επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς HepG2 με τα πλασμίδια pAINBF2 pAINBF5 pAINBF6 και pAINBF10.

Ο λόγος που αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά των HepG2, τα οποία προέρχονται από ηπατικό καρκίνωμα και όχι η κυτταρική σειρά C127 που προέρχεται από καρκίνωμα μαστού ποντικού, ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο είναι εφικτή η παραγωγή των υβριδικών πρωτεϊνών σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης, μετά από πρόσκαιρη επιμόλυνση με τον συγκεκριμένο φορέα έκφρασης. Τα αναμενόμενα μοριακά βάση της υβριδικής πρωτεΐνης AIB2 είναι 95 KDa, της AIB5 72 KDa, της AIB6 72 KDa και AIB10 95 KDa. Ακολούθησε η διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί με τη διαφορά ότι δεν δημιουργήθηκαν κλώνοι που εκφράζουν τις πρωτεΐνες αυτές αλλά τα κύτταρα σημάνθηκαν 24-36 ώρες μετά την επιμόλυνσή τους με ³⁵S Μεθειονίνη. Η εικόνα A2 δείχνει την εοκρινόμενη και ενδοκυττάριο παραγομένη πρωτεΐνη μετά από ανάλυση των προϊόντων της ανοσοκατακρήμνισης με αντι-αποΑΙ αντίσωμα σε πηκτική ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Σημειώνεται η παρουσία των εοκρινόμενων και ενδοκυτταρίων μορφών των υβριδικών πρωτεϊνών στα αναμενόμενα περίπου μέγεθη των 97, 95 και 72 KDa. Το γεγονός έκφρασης των υβριδικών πρωτεϊνών επιβεβαιώνει τη δυνατότητα των παραπάνω πλασμιδίων να παράγουν τις αντίστοιχες υβριδικές πρωτεΐνες, σε ηπατικά κύτταρα και μάλιστα στα αναμενόμενα μεγέθη.



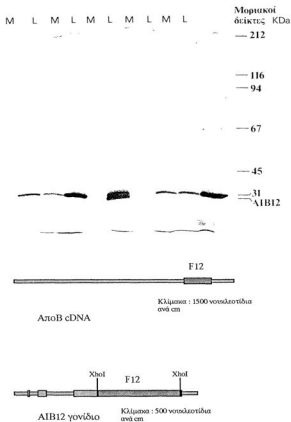
Εικόνα Α2 : Φαίνεται η εκκρινόμενη και ενδοκυττάρια πρωτεΐνη AIB2, AIB5, AIB6 και AIB10, μετά από παροδική επιμόλυνση κυττάρων HepG2 με τα πλασμίδια rAIBF2, rAIBF5, rAIBF6 και rAIBF10, ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζονται σχηματικά τα τμήματα F2, F5, F6 και F10 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της αποΒ.

Έκφραση υβριδικών πρωτεϊνών AIB11, AIB12 και AIB13 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια pAINBF11, pAINBF12 και pAINBF13.

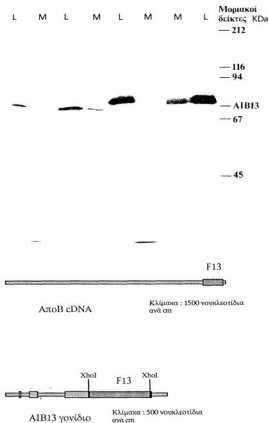
Τα πλασμίδια pAINBF11, pAINBF12 και pAINBF13 αναμένεται να κωδικοποιούν για υβριδικές πρωτεΐνες μοριακού βάρους 80, 95 και 75 KDa αντίστοιχα. Ακολούθησε η γνωστή μεθοδολογία και δημιουργήθηκαν μόνιμες κυτταρικές σειρές-κλώνοι. Ανάλυση κλώνων επιμολυσμένων με το πλασμίδιο pAINBF11 απέτυχε να δείξει οποιαδήποτε μορφή εκκρινόμενης ή ενδοκυτταρίου πρωτεΐνης. Η παρατήρηση αυτή, επαναλήφθηκε πολλές φορές με νέα σειρά πειραμάτων έκφρασης, της υβριδικής αυτής πρωτεΐνης. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από εισαγωγή μεταλλαγής στο πλασμίδιο pAINBF11, κατά την κλωνοποίηση, που πιθανόν να προκαλεί πρόωγο τεματισμό της πρωτεϊνικής αλυσού. Η ύπαρξη μεταλλαγής στο τμήμα F11 της αποB δεν μπορεί να εξηγήσει την έλλειψη πρωτεΐνης διότι έστω και εισαγωγή κωδικονίου τεματισμού θα μας έδινε τουλάχιστον το τμήμα της αποA1, κατάλοιπα (1-212), που μπορεί να εκφραστεί σταθερά σε κύτταρα C127 (Minich *et al.*, 1992). Εναλλακτικά ύπαρξη μεταλλαγής στον υποκινητή της μεταλλοθειονίνης του φορέα έκφρασης, θα δικαιολογούσε την αδυναμία παραγωγής mRNA και κατά συνέπεια πρωτεΐνης από το συγκεκριμένο πλασμίδιο.

Η εικόνα A9 δείχνει ανάλυση της ενδοκυττάριας και εκκρινόμενης μορφής της AIB12 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποA1 αντίσωμα σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Σημειώνεται η παρουσία της υβριδικής πρωτεΐνης που όμως δεν έχει το αναμενόμενο μέγεθος των 90 KDa αλλά μόνο 30 περίπου KDa. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τυχαία εισαγωγή μετάλλαξης στο αρχικό cDNA που χρησιμοποιήθηκε για τη κατασκευή pAINBF12.

Η εικόνα A10 δείχνει ενδοκυττάριο και εκκρινόμενη AIB13 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποA1 αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Σημειώνεται η παρουσία της υβριδικής πρωτεΐνης, AIB13, με το αναμενόμενο μέγεθος των 75 KDa.



Εικόνα Α9 : Φαίνεται η εκκρινόμενη και ενδοκυττάρια πρωτεΐνη AIB12, από 5 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAIBNF12, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F12 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της apoB και το υβριδικό γονίδιο AIBF12 που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη AIB12.



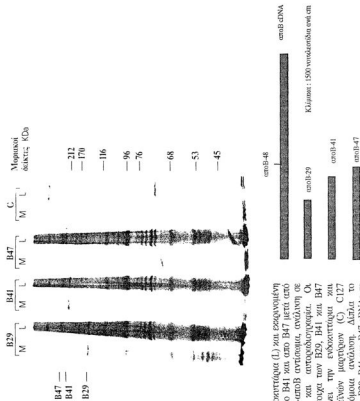
Εικόνα Α10 : Φαίνεται η εκκρινόμενη και ενδοκυττάρια πρωτεΐνη AIB13, από 5 διαφορετικούς κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με το πλασμίδιο pAIBNF13, μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα, ανάλυση σε περική αιθυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Κάτω από τη φωτογραφία απεικονίζεται σχηματικά το τμήμα F13 σε σχέση με το συνολικό μήκος του cDNA της αποΒ και το βιβριδικό γονίδιο AIBF13 που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη AIB13.

β. Έκφραση των πρωτεϊνών B29, B41, και B47 μετά από παροδική επιμόλυνση C127 με τα πλασμίδια pBMB29, pBMB41 και pBMB47.

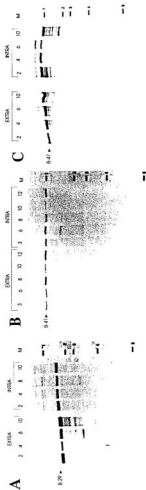
Για την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές της σειράς pBMB. Η βάση των κατασκευών αυτών είναι ο φορέας pBMT3XM. Ο φορέας αυτός ουσιαστικά είναι ίδιος με τον pBMT3X με τη μόνη διαφορά ότι στην περιοχή πολλαπλής υποκλωνοποίησης εκτός από την θέση περιορισμού Xho I έχουν προστεθεί επίσης οι περιοριστικές θέσεις *BssH* II και *Not* I, εικόνα 23. Κύτταρα C127 επιμολύνθηκαν με τα παραπάνω πλασμίδια παροδικά, όπως περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους και μετά από ραδιοσήμανση με ³⁵S Μεθειονίνη, συλλέχθηκαν το θρεπτικό μέσο και το κυτταρικό εκχύλισμα για παραπέρα ανάλυση. Τα αναμενόμενα μεγέθη των πρωτεϊνών αυτών είναι : 135 KDa, 200 KDa και 235 KDa περίπου, για την αποB29, αποB41 και την αποB47 αντίστοιχα. Στην εικόνα A11 φαίνεται η ενδοκυττάρια και εκκρινόμενη μορφή της αποB29, αποB41 και αποB47 μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποB αντίσωμα, ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμιδίου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι πρωτεΐνες με μεγέθη αντίστοιχα των B29, B41, και B47 σημειώνονται.

γ. Έκφραση πρωτεϊνών B29, B41 και B47 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια pBMB29, pBMB41 και pBMB47.

Τα παραπάνω πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για να επιμολύνουν κύτταρα C127 ποντικού και μετά από επιλογή με 10 μM Cd επιλέχθηκαν διαφορετικοί κλώνοι που στη συνέχεια αναλύθηκαν όσον αφορά την έκφραση των πρωτεϊνών B29, B41 και B47. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην αρχή του κεφαλαίου. Στην εικόνα A12 φαίνεται ανάλυση προϊόντων ανοσοκατακρήμνισης σε πηκτή ακρυλαμιδίου-SDS μετά από αυτοραδιογραφία ενδοκυττάριας και εκκρινόμενης μορφής των παραπάνω πρωτεϊνών από 5 κλώνους που έχουν μόνιμα επιμολυνθεί με τα πλασμίδια pBMB29, pBMB41 και pBMB47 αντίστοιχα.



Εικόνα Α11 : Φαίνεται η ενδοστράτια (L) και εξεργονμένη (M) μορφή της απο B29, απο B41 και απο B47 μετά από ανοσοκαταθροφήωση με αντι-αποB αντίσωμα, ανάκληση σε πρώτη εσφαλμάδιον-SIDS και αποκαθαρση. Οι προετινες με μεγάλη αντίσωμα των B29, B41 και B47 σημειώνονται. C φανερώσει την ενδοστράτια και εξεργονμένη μορφή προετινών μαρτύρων (C) C127 κατάρων μετά από παρέρωια ανάκληση. Διότι το σκεδέρωια απεικονίζα τα B29, B41 και B47 cDNAs σε σχέση με το συνολικό cDNA της αποB.



Εικόνα Α12 : φαινεται η ενδογενής (INTRA) και εξογενής (EXTRA) ποσότητα της ατοΒ29, ατοΒ41 στα πεπτάε Α, Β και C αντίστοιχα μετά από ανοσοπαραγωγή με αντι-ατοΒ αντίσωμα, αντίληψη σε παρτά εξογλυκόου-SDS και ανοσοπυροφωρίση. Τα πρότυπα Μοριακά Βάρη είναι : 1, Μυοσίνη (200 KDa), 2, β-γυλακτοσύνδεση (116 KDa), 3, φανοσυρόλαση β (97 KDa), 4, BSA (66 KDa), 5, Οβιδιοφωρίνη (43 KDa).

2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΙΒ1 ΕΩΣ ΑΙΒ7 ΝΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΟΥΝ ΔΙΟΠΡΩΤΕΪΝΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΕΠΙΠΛΕΥΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΛΑΤΟΣ ΒΡΩΜΙΟΥΧΟΥ ΚΑΛΙΟΥ (KBr).

Γενικά

Η έρευνα για τις λιποπρωτεΐνες άρχισε από το 1920 όταν ακόμα τίποτε δέν ήταν γνωστό σχετικά με τα ιδιόμορφα αυτά μόρια που έχουν την ικανότητα να συνδέονται με λιπίδια και να μεταφέρουν χοληστερόλη. Το 1955 οι Havel *et al.*, περιέγραψαν πρώτοι τη μέθοδο χαρακτηρισμού των λιποπρωτεϊνών σε διαβάθμιση πυκνότητας διαλύματος άλατος KBr. Η διαδικασία της επίπλευσης των υβριδικών πρωτεϊνών περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους. Συνοπτικά το θρεπτικό μέσο που περιέχει την εκκρινόμενη πρωτεΐνη μετά από σήμανση με ³⁵S Μεθειονίνη ρυθμίζεται ως προς την πυκνότητά του ($d=1,23$ g/ml) με προσθήκη άλατος KBr. Στη συνέχεια τοποθετείται σε σωλήνα υπερφυγοκέντρωσης και ο σωλήνας συμπληρώνεται με 1,75 ml διαλύματος KBr (1,15 g/ml), 3ml (1,063), 3ml (1,019) και 2 ml φυσιολογικού ορού (0,9% NaCl). Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στις 40.000 στροφές ανά λεπτό για 12 ώρες στους 4° C.

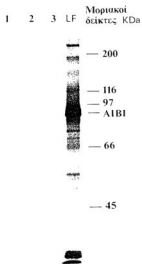
Κάθε μια από τις υβριδικές πρωτεΐνες ΑΙΒF1 έως ΑΙΒF7 καθώς και τα πρωτεϊνικά μόρια αποB29, αποB41, και αποB47 αναλύθηκαν σε διαβάθμιση διαλύματος πυκνότητας άλατος Βρωμιούχου Καλίου, με σκοπό τον προσδιορισμό της ικανότητάς των να σχηματίζουν λιποπρωτεΐνες.

Ευρήματα

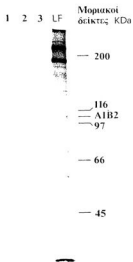
Επίπλευση των υβριδικών πρωτεϊνών ΑΙΒ1 έως και ΑΙΒ7.

Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνες που είχαν εκφραστεί από κύτταρα C127 μόνιμα επιμολυσμένα με τα πλασμίδια pAΙNBF1 έως και pAΙNBF7. Οι κλώνοι αποψύχθηκαν όπως περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους, σημάνθηκαν με ³⁵S Μεθειονίνη, το θρεπτικό μέσο συλλέχθηκε και ακολούθησε επίπλευση σε διαβάθμιση Βρωμιούχου Καλίου. Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης διαχωρίστηκαν 4 κλάσματα που αντιπροσωπεύουν τις VLDL($\rho=1,016-1,022$), LDL($\rho=1,030-1,048$), HDL($\rho=1,054-1,12$) και το κλάσμα με πυκνότητα ($\rho=1,16-1,237$). Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα αντι-αποAΙ και ανάλυση του υζήματος σε πηκτή ακρυλαμιδίου-SDS και αυτοραδιογραφία. Στις εικόνες Β1 έως Β7 φαίνονται τα

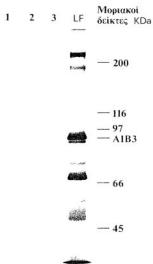
αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής. Ένα πολύ μικρό ποσοστό των υβριδικών πρωτεϊνών επιπλέει στο κλάσμα της HDL ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της παραχθείσας πρωτεΐνης βρίσκεται στα τρία τελευταία κλάσματα της βαθμίδωσης με πυκνότητες 1,16, 1,20 και 1,24 g/ml. Τα δύο τελευταία κλάσματα περιέχουν κυρίως πρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων. Ανάλυση της πρωτεΐνης AIB1 σε διαβάθμιση διαλύματος KBr κατά την οποία συλλέχθηκαν 12 κλάσματα και αναλύθηκαν με ανοσοκατακρήμνιση, ηλεκτροφόρηση-SDS και αυτοραδιογραφία έδειξε ότι η πρωτεΐνη κατανέμεται κυρίως στο 12^ο κλάσμα που περιέχει αποκλειστικά πρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων. Ένα ενδιαφέρον στοιχείο που προκύπτει, είναι ότι η πρωτεΐνη μεγέθους 60 KDa, AIB7-stop που είχε παρατηρηθεί κατά την έκφραση της AIB7 και που προέρχεται από τερματισμό της μετάφρασης στο αμινοξύ 2153, μετά από τροποποίηση του mRNA, κατανέμεται πλήρως στο κλάσμα της διαβάθμισης που περιέχει κυρίως πρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων. Αντίθετα η πρωτεΐνη που παράγεται από το μη τροποποιημένο mRNA επιπλέει κατά ένα μικρό ποσοστό στο κλάσμα της HDL, ενώ το μεγαλύτερο μέρος της κατανέμεται στο κλάσμα που περιέχει κυρίως πρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων. Τα στοιχεία αυτά μπορεί να έχουν ιδιαίτερη σημασία για τον σχηματισμό λιποπρωτεΐνης από την AIB7 και θα αναλυθούν στο κεφάλαιο της γενικής συζήτησης.



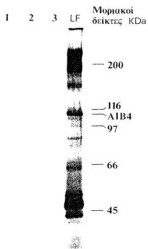
Εικόνα Β1 : Επίτευξη της υβριδικής πρωτεΐνης A1B1. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεϊνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων ($d=1,160 - d=1,237$).



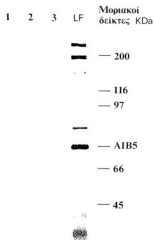
Εικόνα Β2 : Επίπλευση της υβριδικής πρωτεΐνης AIB2. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πυκνή ακρυλαμίδου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεϊνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων ($d=1,160 - d=1,237$).



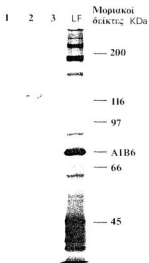
Εικόνα Β3 : Επίπλευση της υβριδικής πρωτεΐνης AIB3. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πικρή ακρυλαμίδου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεϊνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων ($d=1,160$ - $d=1,237$).



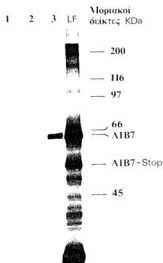
Εικόνα B4 : Επίπλευση της υβριδικής πρωτεΐνης A1B4. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποA1 αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεϊνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων ($d=1,160 - d=1,237$).



Εικόνα Β5 : Επίπλευση της υβριδικής πρωτεΐνης AIB5. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεϊνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων ($d=1,160 - d=1,237$).



Εικόνα Β6 : Επίπλευση της υβριδικής πρωτεΐνης AIB6. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεϊνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων ($d=1,160 - d=1,237$).



Εικόνα Β7 : Επίπλευση της ηβριδικής πρωτεΐνης AIB7. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι-αποΑΙ αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεΐνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων ($d=1,160 - d=1,237$).

Επίπλευση της πρωτεΐνης B29.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία που περιγράφεται, προηγουμένως ακολουθήθηκε και για τα πειράματα επίπλευσης των πρωτεϊνών αποB29, αποB41 και αποB47, με τη διαφορά ότι οι πρωτεΐνες αυτές προέρχονται από παροδικό μετασχηματισμό κυττάρων C 127. Στην εικόνα Γ1 φαίνονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση της αποB29 όσον αφορά την ικανότητα επίπλευσης της πρωτεΐνης στην διαβάθμιση πυκνότητας διαλύματος άλατος KBr. Παρατηρούμε τη γνώριμη εικόνα από τα πειράματα επίπλευσης των υβριδικών μορίων. Ένα μικρό ποσοστό της πρωτεΐνης βρίσκεται στο κλάσμα που αντιπροσωπεύει τις HDL ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης βρίσκεται στο κλάσμα της διαβάθμισης που περιέχει κυρίως πρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων.

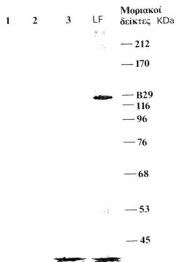
Επίπλευση της πρωτεΐνης B41.

Στην εικόνα Γ2 φαίνονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση της πρωτεΐνης αποB41 όσον αφορά την ικανότητα επίπλευσής της στη διαβάθμιση πυκνότητας διαλύματος KBr. Στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη που παράγεται μετά από παροδικό μετασχηματισμό των C127 επιπλέει εξ ολοκλήρου στο κλάσμα της διαβάθμισης που περιέχει τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας, HDL.

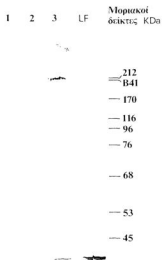
Επίπλευση της πρωτεΐνης B47.

Παρόμοια ανάλυση για την αποB47 δεν επέτρεψε την ανίχνευσή της πιθανόν λόγω εκτεταμένης αποικοδόμησης της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επίπλευσής της και τη μετέπειτα επεξεργασία του δείγματος για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS.

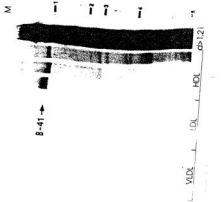
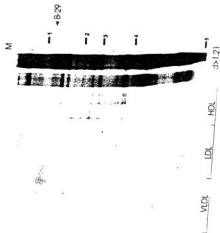
Στην εικόνα Γ3 φαίνεται επίπλευση των πρωτεϊνών B29 και B41 από κλώνους μόνιμα επιμολυσμένους με τα πλασμίδια pMB29 και pMB41. Στην περίπτωση αυτή αναλύθηκαν και τα δώδεκα κλάσματα της διαβάθμισης σε πηκτή ακρυλαμίδιου και με αυτοραδιογραφία χωρίς να προηγηθεί ανοσοκατακρήμνιση. Από την ανάλυση αυτή είναι σαφής ο διαφορετικός χαρακτήρας των πρωτεϊνών B29 και B41. Η B41 κατανέμεται στα κλάσματα που αντιπροσωπεύουν τις HDL όπως έχουμε δει και με την επίπλευσή της μετά από παροδικό μετασχηματισμό, ενώ η B29 κατανέμεται κυρίως στα δύο τελευταία κλάσματα της διαβάθμισης.



Εικόνα Γ1 : Επίπλευση της πρωτεΐνης apoB29. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι apoB αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεϊνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων (d=1,160 - d=1,237).



Εικόνα Γ2 : Επίτευξη της πρωτεΐνης apoB41. Η πρωτεΐνη φαίνεται μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντι apoB αντίσωμα και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδιου-SDS και αυτοραδιογραφία. Οι αριθμοί 1, 2 και 3 δηλώνουν τα κλάσματα VLDL, LDL και HDL αντίστοιχα. LF δηλώνει το κλάσμα πρωτεϊνών κυρίως ελευθέρων λιπιδίων ($d=1,160 - d=1,237$).

A**B**

Εικόνη Γ3 : Επίκλιση των πρωτεϊνών apoB29 (B) και apoB41 (A). Οι πρωτεΐνες φάνηκαν μετά από ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε απητή τετραελαμυδάου-SDS και αντιφωτογράφημα. Σημειώνονται πρώτιστα Μόρφωσις Βίση είναι : 1: Μίνοσίνη (200 KDa), 2: β -γαλακτοουδάση (116 KDa), 3: φωσφοφυλάση β (97 KDa), 4: BSA (66 KDa) και 5: Οφθαλμοπίνη (43 KDa).

3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ mRNA ΠΟΥ ΟΔΗΓΕΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΥΟ ΜΟΡΦΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Γενικά

Η αποΒ100 είναι προϊόν ενός γονιδίου που χαρτογραφείται στο μακρινό άκρο του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 2. Η παρουσία της αποΒ48 απασχόλησε ερευνητικές ομάδες για καιρό και διάφορες υποθέσεις είχαν προταθεί όσον αφορά τη προέλευσή της. Τελικά αποδείχτηκε ότι η αποΒ48 προέρχεται από την αποΒ100 μετά από μέτα-μεταγραφική τροποποίηση του mRNA της (mRNA editing). Η τροποποίηση του mRNA στην αποΒ100 συνίσταται σε αλλαγή της κυτοσίνης στη θέση 6666 σε ουρακίλη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή του κωδικονίου 2153 από CAA που κωδικοποιεί για γλουταμίνη σε UAA που κωδικοποιεί 'για τερματισμό της μετάφρασης της πρωτεΐνης. Έτσι παράγεται μία πρωτεΐνη με το μισό περίπου μοριακό βάρος της αποΒ100, που αποκαλείται αποΒ48. Η αποΒ είναι η μοναδική πρωτεΐνη στα θηλαστικά για την οποία έχει δειχθεί τέτοιας μορφής μετα μεταγραφική τροποποίηση του mRNA της (Powell *et al.*, 1987, Chen *et al.*, 1987, Driscoll *et al.*, 1989).

Ευρήματα

Ανίχνευση της μεταγραφικής τροποποίησης του mRNA από τη σύνθεση δύο μορφών της υβριδικής πρωτεΐνης AIB7.

Στην εικόνα Α5 και Α6 φαίνεται ανάλυση προϊόντων ανοσοκατακρήμνισης από εκκρινόμενη και ενδοκυττάρια πρωτεΐνη από C127 κύτταρα μετά από μετασηματισμό με τό πλασμίδιο pAIBF7. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει το τμήμα F7 της αποΒ. Το τμήμα αυτό περιλαμβάνει τα αμινοξέα από 1880 έως 2389. Αν η μετάφραση του mRNA που παράγεται προχωρήσει μέχρι το αμινοξύ 2389, η υβριδική πρωτεΐνη AIB7 έχει αναμενόμενο μοριακό βάρος 80 KDa, ενώ αν σταματήσει στο αμινοξύ 2153, τότε παράγεται η AIB7-stop και αναμένεται να έχει μοριακό βάρος 60 KDa. Στις εικόνες Α5 και Α6 παρατηρούμε και τις δύο μορφές των πρωτεϊνών με τα αναμενόμενα μοριακά βάρη των 80 και 60 KDa αντίστοιχα.

Ανίχνευση της μεταγραφικής τροποποίησης του mRNA από τη σύνθεση δύο μορφών της υβριδικής πρωτεΐνης AIB8.

Το πλασμίδιο pAINBF8 περιέχει το τμήμα F8 της αποB το οποίο κωδικοποιεί τα αμινοξέα της αποB από 2100 έως 2389. Η υβριδική πρωτεΐνη που παράγεται αν η μετάφραση του mRNA προχωρήσει μέχρι το αμινοξύ 2389 αναμένεται να έχει μοριακό βάρος 60 περίπου KDa ενώ αν σταματήσει στο αμινοξύ 2153 35 περίπου KDa. Η εικόνα A7 δείχνει ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου-SDS και αυτοραδιογραφία ενδοκυττάριας και εκκρινόμενης μορφής της πρωτεΐνης που παράγεται από C127 μετασηματισμένα με το πλασμίδιο pAINBF8. Παρατηρούμε δύο πρωτεΐνες, AIB8 και AIB8-stop, με μοριακά βάρη 60 και 35 KDa αντίστοιχα.

Ανίχνευση της μεταγραφικής τροποποίησης του mRNA από την παραγωγή της υβριδικής πρωτεΐνης AIB9-stop.

Το τμήμα F9 της αποB εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 2100 έως 2693. Η υβριδική πρωτεΐνη που θα παραχθεί αν η μετάφραση του mRNA προχωρήσει μέχρι το αμινοξύ 2693 αναμένεται να έχει μοριακό βάρος 90 περίπου KDa, ενώ εάν σταματήσει στο αμινοξύ 2153 αναμένεται να έχει μοριακό βάρος 35 περίπου KDa. Η εικόνα A8 δείχνει ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου-SDS και αυτοραδιογραφία ενδοκυττάριας και εκκρινόμενης μορφής της πρωτεΐνης που παράγεται από C127 μετασηματισμένα με το πλασμίδιο pAINBF9. Παρατηρούμε μία μόνο πρωτεΐνη, AIB9-stop, με μοριακό βάρος 35 περίπου KDa.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προϊποθέσεις σύνδεσης της αποΒ με λιπίδια για το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης

Το θέμα της εργασίας αυτής είναι η ανάλυση του μορίου της απολιποπρωτεΐνης Β47 όσον αφορά την ικανότητά του να δεσμεύει λιπίδια και να σχηματίζει λιποπρωτεΐνη. Στη προσπάθεια κατανόησης του προβλήματος ακολουθήθηκαν δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις.

Η πρώτη προσέγγιση συνίστατο στην έκφραση υβριδικών πρωτεϊνών αποτελούμενων από την απολιποπρωτεΐνη ΑΙ και διαδοχικά αλληλεπικαλυπτομένων τμημάτων της αποΒ και ανάλυση των υβριδικών ΑΙΒ πρωτεϊνών όσον αφορά την ικανότητά τους να δεσμεύουν λιπίδια και να σχηματίζουν λιποπρωτεΐνες. Η έκφραση των υβριδικών πρωτεϊνών υπήρξε επιτυχής με εξαίρεση το ενδέκατο τμήμα (αμινοξεία 3037-3513) της αποΒ που απέτυχε να εκφραστεί, και το δωδέκατο τμήμα της αποΒ (αμινοξεία 3513-4128) το οποίο εκφράστηκε μόνο κατά ένα μικρό μέρος του. Η επιτυχής έκφραση των άλλων τμημάτων της αποΒ σε υβριδική μορφή δημιούργησε ένα ισχυρό εργαλείο τόσο για τη μελέτη επιμέρους αλληλουχιών της αποΒ-48 όσο και για την πιθανή ταυτοποίηση μιας ή περισσότερων λειτουργικών περιοχών (domains) υπευθύνων για τη δέσμευση λιπιδίων. Τα αποτελέσματα από την επίτευξη των υβριδικών μορίων ΑΙΒ1 έως ΑΙΒ7, που καλύπτουν όλο το μήκος του cDNA της αποΒ-48, δείχνουν ότι οι υβριδικές πρωτεΐνες που εοικονομούνται από τις κυτταρικές γραμμές που δημιουργήθηκαν σε C127 κύτταρα, κατανέμονται ως επί το πλείστον στο κλάσμα της διαβάθμισης που περιέχει κυρίως πρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό της εκκρινόμενης πρωτεΐνης κατανέμεται στο κλάσμα της διαβάθμισης που αντιστοιχεί στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας, HDL. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υβριδική πρωτεΐνη ΑΙΒ7 η οποία περιέχει τα αμινοξεία από 1880 έως 2389 και εκκρίνεται σε δύο μορφές. Η μία μορφή περιέχει ολόκληρο το τμήμα μεταξύ των αμινοξέων 1880 έως 2389 ενώ η δεύτερη μορφή τελειώνει στο αμινοξύ 2153 λόγω τροποποίησης του mRNA. Η πρωτεΐνη αυτή στην πρώτη της μορφή κατανέμεται στο κλάσμα της διαβάθμισης που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνες κυρίως ελεύθερες λιπιδίων ($\rho=1,16-1,23$ g/ml) κατά ένα μεγάλο μέρος και κατά ένα μικρότερο στο κλάσμα της διαβάθμισης, που αντιστοιχεί στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας ($\rho=1,054-1,12$ g/ml, HDL). Η δεύτερη μορφή της υβριδικής πρωτεΐνης ΑΙΒ7-stop όμως κατανέμεται εξ ολοκλήρου στο κλάσμα της διαβάθμισης που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων ($\rho=1,16-1,23$). Το εύρημα αυτό, που επαναλήφθηκε σε τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα, δείχνει ότι η περιοχή αυτή, δηλαδή από το αμινοξύ 2153 έως το 2389, φαίνεται να είναι υπεύθυνη γι' αυτή τη διαφοροποίηση όσον αφορά την διαφορική επίπλευση των δύο υβριδικών μορίων. Οι παρατηρήσεις αυτές δηλώνουν ότι η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 2153 και 2389 ενδέχεται να συμβάλλει στην πρόσδεση λιπιδίων

από την πρωτεΐνη AIB7. Τα αποτελέσματα από την επίτευση των υβριδικών μορίων AIB1 έως και AIB7 από μόνα τους, δείχνουν ότι κανένα από τα υπό εξέταση τμήματα της αποΒ δεν είναι ικανό να προκαλέσει επίτευση των υβριδικών πρωτεϊνών. Ακόμη και το τμήμα από τα αμινοξέα 2153 έως 2389 (μέρος του υβριδίου AIB7) δεν επέτυχε να κάνει το μόριο να επιπλεύσει εξ' ολοκλήρου παρά μονάχα ένα ποσοστό του. Η δέμευση λοιπόν λιπιδίων και η δημιουργία λιποπρωτεΐνης μπορεί πιθανόν να μην οφείλεται μόνο σε ειδικές λειτουργικές περιοχές (domains). Ενδέχεται να είναι συνικρασμένη με το μέγεθος της πρωτεΐνης και συνεπώς με τον τρόπο που οι διάφορες περιοχές της πρωτεΐνης αναδιπλώνονται στον χώρο, δημιουργώντας την τριτοταγή δομή του μορίου.

Το κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση των διαφόρων πρωτεϊνών στη παρούσα μελέτη είναι τα C127 κύτταρα ποντικού. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καρκίνωμα του ποντικού στο μαστό, όργανο το οποίο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν παράγει καμιά λιποπρωτεΐνη. Μέχρι σήμερα επικρατούσε η άποψη ότι πιθανόν είναι αναγκαία η ύπαρξη ενός ιστοειδικού ενδοκυττάριου μηχανισμού που είναι υπεύθυνος για την ενδοκυττάρια σύνδεση των λιπιδίων με την αποΒ48 που οδηγεί στο σχηματισμό λιποπρωτεΐνης. Στην περίπτωση αυτή το κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιήσαμε δεν θα ήταν επαρκές για τη μελέτη του μηχανισμού σύνδεσης των μορφών της αποΒ με λιπίδια.

Για να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα και να πάρουμε μια πιο καθαρή εικόνα σχετικά με το σύστημα έκφρασης που χρησιμοποιούμε, σχεδιάστηκε η δεύτερη προσέγγιση στην οποία εκφράζονται αμινοτερματικά τμήματα της αποΒ που εκτείνονται από την αποΒ29 έως την αποΒ47. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (Herscovitz *et al.*, 1991) ότι το 17% της αποΒ, είναι ικανό να δεσμεύσει λιπίδια σε *in vitro* πειράματα αλλά βρίσκεται υπό τη μορφή ελεύθερης πρωτεΐνης όταν εκκρίνεται. Επίσης είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι υπάρχει σειρά φυσικών μεταλλαγών που παράγουν διάφορα τμήματα της αποΒ σε ένα εύρος από το 25% έως το 90% του μορίου (Huang *et al.*, 1989, Collins *et al.*, 1988, Yang *et al.*, 1990, Talmud *et al.*, 1989, Krul *et al.*, 1989, Young *et al.*, 1989, Wagner *et al.*, 1991, Pullinger *et al.*, 1990 και Welty *et al.*, 1991). Στη σειρά αυτή των φυσικών μεταλλαγών πρώτη περιγράφηκε μια μεταλλαγή που δημιουργεί το αμινοτερματικό 37% της αποΒ (Steinberg *et al.*, 1979). Η περίπτωση της μεταλλαγής αυτής μελετήθηκε και βρέθηκε ότι δημιουργεί λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, τα οποία κατανέμονται σε ένα εύρος πυκνότητας από 1,063 g/ml έως 1,21 g/ml (Young *et al.*, 1987). πυκνότητες που στην παρούσα μελέτη αντιστοιχούν στα κλάσματα HDL (1,054-1,120) και πρωτεϊνών ελευθέρων λιπιδίων (1,160-1,23).

Η επιτυχής έκφραση των τμημάτων αυτών της αποΒ που κωδικοποιούν για το 29, 41 και 47% είναι ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια κατανόησης της διαδικασίας με την οποία η αποΒ48 συνδέεται ενδοκυττάρια με λιπίδια και σχηματίζει

λιποπρωτεΐνη. Πειράματα επίπλευσης των παραπάνω πρωτεϊνών έδειξαν ότι η αποB29 κατανέμεται κατά ένα μεγάλο μέρος στο κλάσμα με πυκνότητα 1,160-1,23 και κατά ένα μικρότερο στο κλάσμα λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), κατάσταση που ήδη έχουμε συναντήσει με τις υβριδικές πρωτεΐνες (AIB1-AIB7) που παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο κατανομής. Η πρωτεΐνη όμως αποB-41 παρουσιάζει ένα τελείως διαφορετικό πρότυπο κατανομής. Κατανέμεται εξ ολοκλήρου στο κλάσμα της διαβάθμισης που αντιστοιχεί στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Αυτό από μόνο του είναι ένα σημαντικό στοιχείο που φανερώνει ότι η αποB41 έχει την ικανότητα να σχηματίζει λιποπρωτεΐνη.

Παίρνοντας υπόψη α) τα στοιχεία που προκύπτουν από την επίπλευση των υβριδικών μορφών AIB1-AIB7 (εικόνες B1-B7), που αποτυγχάνουν να δείξουν την ύπαρξη μιας συγκεκριμένης λειτουργικής περιοχής (domain) υπεύθυνης για τη δέσμευση των λιπιδίων, β) τα στοιχεία από τη βιβλιογραφία, που δείχνουν ότι η αποB17 είναι ικανή για δέσμευση λιπιδίων αλλά δεν σχηματίζει λιποπρωτεΐνη *in vivo*, γ) τα στοιχεία που προκύπτουν από τις φυσικές μεταλλαγές που εκφράζουν αμνοτερματικά ποσοστά της αποB και δηλώνουν γενικά ότι μικρότερα τμήματα έχουν μειωμένη ικανότητα να σχηματίζουν λιποπρωτεΐνη συγκρινόμενα με μεγαλύτερα τμήματα όπως αποB48 (Innegerity 1990) και δ) ότι η αποB41 επιπλέει εξ ολοκλήρου στο κλάσμα της διαβάθμισης που αντιστοιχεί στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ικανότητα σχηματισμού λιποπρωτεΐνης εξαρτάται από το μέγεθος της παραγόμενης πρωτεΐνης. Αυτό σημαίνει ότι η ικανότητα της αποB να προσδεθεί με φωσφολιπίδια (λιπίδια επιφανείας), χοληστερόλη και τριγλυκερίδια (λιπίδια πυρήνα) απαιτεί τη συμμετοχή διαφορετικών λειτουργικών περιοχών (domains) του αμνοτερματικού τμήματος της πρωτεΐνης που συμβάλλουν σε μια συγκεκριμένη τριτοταγή δομή. Αυτή η υπόθεση δεν αποκλείει την ιδιαίτερη σημασία που μπορεί να έχουν μερικές περιοχές της αποB48 για τη δέσμευση λιπιδίων. Στοιχεία ότι τμήματα της παραγόμενης πρωτεΐνης ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο για το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης προέρχονται από την παρατήρηση ότι η υβριδική πρωτεΐνη AIB7 παρουσιάζει ένα ποσοστό επίπλευσης στο κλάσμα της HDL ενώ η δεύτερη μορφή AIB7-stop μικρότερη κατά 30 KDa περίπου κατανέμεται εξ ολοκλήρου στο κλάσμα που αντιστοιχεί σε πρωτεΐνες ελεύθερες λιπιδίων.

Τα πειραματικά μας ευρήματα από την επίπλευση της αποB41 είναι σε συμφωνία με αυτά άλλων ερευνητικών ομάδων (Yao *et al.*, 1991, Graham *et al.*, 1991) οι οποίοι έχουν εκφράσει τις αποB48 και αποB53 σε κύτταρα ηπατώματος McA-RH7777 και παρατηρούν ότι οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες κατανέμονται στο κλάσμα της διαβάθμισης λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας, HDL. Η παρατήρηση ότι η αποB41 μπορεί και σχηματίζει λιποπρωτεΐνη σε μη ηπατικά κύτταρα είναι σημαντική και δηλώνει ότι ο σχηματισμός λιποπρωτεΐνης δεν χρειάζεται κάποιο ιστοειδικό

παράγοντα π.χ. πρωτεΐνες που μεταφέρουν λιπίδια στη νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη. Αντίθετα ο σχηματισμός λιποπρωτεΐνης ενδέχεται να είναι ένας γενικός μηχανισμός κατά τον οποίο η παραγομένη πρωτεΐνη προσλαμβάνει λιπίδια μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi του κυττάρου και εκκρίνεται σαν λιποπρωτεϊνικό σωματίο. Επίσης η κατανομή των λιποπρωτεϊνών αυτών στο κλάσμα της HDL και στις δύο περιπτώσεις μπορεί να θεωρηθεί ότι αντικατοπτρίζει τις σχεδόν “φυσιολογικές” συνθήκες έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών. Η αποΒ φυσιολογικά παράγεται στο συκώτι και το λεπτό έντερο, όργανα που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες συνθέτουν ένα πολύ μεγαλύτερο εύρος φωσφολιπιδίων, τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης και εστέρων της χοληστερόλης. Ο σχηματισμός λιποπρωτεΐνης από την αποΒ41 σε μη ηπατικά κύτταρα συνεπάγεται τουλάχιστον την πρόοδεση της πρωτεΐνης με φωσφολιπίδια που προέρχονται από το κύτταρο δηλαδή από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi και τις πλασματικές μεμβράνες. Πιο επισταμένη έρευνα, στην οποία τα κύτταρα θα βρίσκονται σε περιβάλλον πλούσιο σε λιπίδια, όπως μετά από παροχή ολεϊκού οξέος πιθανόν να δώσει λιποπρωτεΐνες που θα κατανέμονται σε πύ “φυσιολογικά” κλάσματα όπως αυτά της LDL και VLDL.

Χρήση κυτταρικών γραμμών που εκφράζουν τμήματα της αποΒ για τη μελέτη της θέσης και της σημασίας της O και N-γλυκοσυλίνωσης της αποΒ.

Μια άλλη πληροφορία που προέκυψε από την έκφραση των υβριδικών πρωτεϊνών, A1B6, A1B7, A1B8 και A1B9 στην παρούσα μελέτη, έχει να κάνει με τη γλυκοσυλίνωση της αποΒ. Όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο η αποΒ περιέχει 16 N-γλυκοσυλωμένα κατάλοιπα ασπαραγίνης (Yang *et al.*, 1986 και 89). Το καινούργιο στοιχείο που προσθέτει η παρούσα μελέτη είναι ότι η αποΒ-48 υφίσταται O-γλυκοσυλίνωση. Αυτό συμπεραίνεται από την ετερογένεια μεγέθους των πρωτεϊνών A1B7 και A1B8 που παρατηρείται μετά από ηλεκτοφόρηση σε απρήτη ακρυλαμίδιου παρουσία SDS. Η ετερογένεια αυτή είναι χαρακτηριστική για O-γλυκοσυλίνωση (Hatzoroulou-Cladaras, *et al.*, 1989). Συγκρίνοντας τις υβριδικές πρωτεΐνες A1B6, A1B7, A1B8 και A1B9 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 2153 και 2389 υφίσταται O-γλυκοσυλίνωση. Η ανάλυση αυτή δεν είναι ικανή να από μόνη της να διευκρινίσει τα συγκεκριμένα κατάλοιπα που γλυκοσυλώνονται αλλά επιδεικνύει τη χρησιμότητα των υβριδίων για μελλοντική χρήση σε πειράματα που θα έχουν στόχο τον εντοπισμό των θέσεων γλυκοσυλίνωσης της αποΒ. Η πειραματική διαδικασία ευκολύνεται πολύ λόγω του σχετικά μικρού μεγέθους της πρωτεΐνης, και της διαθεσιμότητας των διαφορετικών τμημάτων της αποΒ.

Χρήση κυτταρικών γραμμών που εκφράζουν τμήματα της αποΒ για τη μελέτη της μεταμεταγραφικής τροποποίησης του mRNA.

Η έκφραση των υβριδίων AIB7, AIB8 και AIB9 έδειξε ότι η διαδικασία τροποποίησης του mRNA είναι ενεργός και στα C127 κύτταρα ποντικού. Ήταν ήδη γνωστό από το 1987 (Powell *et al.*, 1987, Chen *et al.*, 1987) ότι το mRNA της αποΒ υπόκειται σε μια διαδικασία επεξεργασίας και ότι τροποποιείται, με αποτέλεσμα να μην παράγεται το 100% της πρωτεΐνης αλλά μια μικρότερη μορφή της, η αποΒ-48. Η τροποποίηση αυτή οφείλεται σε μια ειδική απαμινάση της κυτοσίνης με Km 0,2-2 nM (Greeve *et al.*, 1991) που απαιτεί για ενεργότητα την ακολουθία GAUCAGUAU στα κατάλοιπα 6672-6680 (Shah *et al.*, 1990). Η τροποποίηση του mRNA γίνεται στο λεπτό έντερο και σε άλλους ιστούς (Teng *et al.*, 1990), ρυθμίζεται κατά την ανάπτυξη (Teng *et al.*, 1990, Wu *et al.*, 1990) καθώς επίσης από την αυξητική ορμόνη και τη θυροξίνη (Davidson *et al.*, 1988 και 1990, Sjoberg *et al.*, 1991) και επηρεάζεται από την διατροφή (Baum *et al.*, 1990). Η έκφραση των υβριδίων πρωτεϊνών AIB7, AIB8 και AIB9 στα C127 κύτταρα δείχνει καθαρά ότι η ειδική απαμινάση της κυτοσίνης είναι ενεργός και σε αυτά τα κύτταρα συμβάλλοντας έτσι στην άποψη ότι ο μηχανισμός τροποποίησης του mRNA είναι ένας γενικός μηχανισμός που πιθανόν να διορθώνει και άλλα μηνύματα εκτός από αυτό της αποΒ, αρκεί να υπάρχουν οι κατάλληλες προϋποθέσεις. Τέτοιες προϋποθέσεις θα θεωρούσαμε εκτός από την αλληλουχία του mRNA δηλαδή την ακολουθία GAUCAGUAU και τη κατάλληλη δευτεροταγή δομή που θα καθιστούσε τη συγκεκριμένη αλληλουχία υπόστρωμα της απαμινάσης. Η άποψη αυτή ενισχύεται από τη διαφορετική τροποποίηση των mRNA των υβριδίων. Το mRNA της AIB7 παρουσιάζει σχετικά μικρό ποσοστό τροποποίησης. Το ποσοστό τροποποίησης στο mRNA της AIB8 είναι μεγαλύτερο από αυτό της AIB7 και αντιστοιχεί περίπου στα μισά μόρια του mRNA της AIB8, ενώ στην περίπτωση της AIB9 η τροποποίηση είναι σε ποσοστό 100% με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανίχνευση του προϊόντος του μη τροποποιημένου mRNA. Η εξήγηση που μπορούμε να δώσουμε για τις παραπάνω παρατηρήσεις είναι ότι πιθανόν το mRNA που παράγεται από το πλασμίδιο pA1NBf9 περιέχει τη βέλτιστη νοκλεοτιδική αλληλουχία για τη δημιουργία κατάλληλης δομής ώστε να καταστεί υπόστρωμα της απαμινάσης της κυτοσίνης. Με βάση τα πιο πάνω ευρήματα γίνεται τώρα δυνατός ένας πιο εστιασμένος σχεδιασμός πειραμάτων στο μέλλον που πιθανόν θα διαλευκάνουν περαιτέρω τον μηχανισμό τροποποίησης του mRNA της αποΒ.

Γενικά συμπεράσματα.

Τα τελευταία χρόνια η πρόοδος που σημειώθηκε στην Μοριακή Βιολογία διευκόλυνε τη διαδικασία για τον καθορισμό της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Η πρωτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης είναι η ταυτότητά της και παράλληλα η βάση για τη διερεύνηση της λειτουργίας της. Από την πρωτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης αν και υπάρχει δυνατότητα εν μέρει πρόβλεψης της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής, οι προβλέψεις αυτές δεν μπορούν να καθορίσουν με ακρίβεια τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο χώρο. Μπορούμε όμως να σχεδιάσουμε πειράματα με στόχο τη διερεύνηση και κατανόηση της σχέσης που υπάρχει μεταξύ της δομής της και της λειτουργίας της. Η εργασία που αναλύθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια ακολουθεί αυτή τη προσέγγιση και ο σχεδιασμός των πειραμάτων που περιγράφηκαν εντάσσεται στη διαδικασία διερεύνησης της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης σε σχέση με τη δομή της.

Η αποΒ αποτελεί μία μοναδική πρωτεΐνη που σχηματίζει λιποπρωτεΐνη ενδοκυττάρια και εκκρίνεται με την μορφή λιποπρωτεΐνης. Στη συγκεκριμένη διατριβή εξετάστηκαν δύο μοντέλα που θα επέτρεπαν την μελέτη των προϋποθέσεων που απαιτούνται για ενδοκυττάρια σύνδεση της αποΒ με λιπίδια και το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης. Το πρώτο μοντέλο υποθέτει την ύπαρξη συγκεκριμένων ακολουθιών κατά μήκος της αποΒ με την ιδιότητα να προσοδεύονται με λιπίτη. Η ανάλυση των υβριδικών AIB πρωτεϊνών δηλώνει ότι το μοντέλο αυτό δεν ευσταθεί. Το δεύτερο μοντέλο υποθέτει ότι η αποΒ γίνεται υπόστρωμα για την προσθήκη λιπών αφού αποκτήσει την τριτοταγή της δομή. Το μοντέλο αυτό υποστηρίζεται από την έκφραση των πρωτεϊνών αποΒ41 και αποΒ47. Το μοντέλο αυτό επίσης δηλώνει ότι το ελάχιστο μήκος που απαιτείται για να γίνει μια δομή της αποΒ υπόστρωμα για την πρόσδεση λιπιδίων είναι μεγαλύτερο από το 29% και μικρότερο ή ίσο με το 41% του μήκους της αποΒ. Το μοντέλο αυτό επίσης υποστηρίζεται από πρόσφατες παρατηρήσεις των Bogen *et al.*, 1992. Τα στοιχεία που παρουσιάζονται συμβάλλουν στο συμπέρασμα ότι καθοριστικός παράγοντας για τη δημιουργία λιποπρωτεΐνης από την αποΒ είναι το μέγεθος της πρωτεΐνης που παράγεται. Το παραπάνω συμπέρασμα δεν υποβιβάζει το ρόλο που μπορεί να έχουν συγκεκριμένες περιοχές της αλληλουχίας της αποΒ στη δέσμευση λιπιδίων. Η παρατήρηση που συνάγεται από το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης από την αποΒ-41, ότι δηλαδή η δέσμευση λιπιδίων δεν απαιτεί κάποιο ισοπεπτικό παράγοντα μεταφοράς λιπιδίων στο πρωτεϊνικό μόριο παρέχει ενδείξεις ότι η δέσμευση λιπιδίων από την αποΒ λαμβάνει χώρα παράλληλα με τη σύνθεση της πρωτεΐνης και εφ' όσον η αποΒ αποκτήσει ένα κρίσιμο μήκος. Επίσης μπορούμε να θεωρήσουμε ότι διαφορετικές περιοχές της αποΒ χρειάζεται να αναδυλωθούν στο χώρο και να αποκτήσουν τη δυνατότητα να προσδεθούν με λιπίδια. Δεν είναι προς το παρόν γνωστό αν η προσθήκη λιπιδίων γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων ή πρωτεϊνών

μεταφοράς λιπιδίων. Γενετικές μελέτες φανερώνουν ότι η αθηταλιποπρωτεΐναμία προέρχεται από μεταλλάξεις σε γονιδιακούς τόπους διαφορετικούς από αυτούς του γονιδίου της apoB (Zannis *et al.*, in press). Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την άποψη ότι η πρόσθεση λιπιδίων στην apoB και ο σχηματισμός λιποπρωτεΐνης εξαρτάται από άλλες πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου. Η παρατήρησή μας ότι η σύνδεση της apoB με λιπίδια πραγματοποιείται σε μη ηπατικά κύτταρα συνεπάγεται ότι κυτταρικές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στο σχηματισμό λιποπρωτεϊνών δεν είναι ισοειδικές. Το γεγονός ότι η apoB δεν μεταπηδά μεταξύ λιποπρωτεϊνικών σωματίων, δηλώνει μια στενή πρόσδεση της apoB με τα λιπίδια που μεταφέρει και ενισχύει τις παραπάνω παρατηρήσεις.

Μελλοντικές κατευθύνσεις.

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε για τη μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας στην apoB και η κατασκευή των υβριδικών πρωτεϊνών δημιούργησε ισχυρά εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για να διερευνηθούν λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά της apoB. Ήδη μια πρώτη πληροφορία που παρέχεται είναι το γεγονός της O-γλυκοσυλίωσης στην περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 2153 και 2389. Μπορούν να σχεδιαστούν πειράματα που θα έχουν στόχο τον εντοπισμό των συγκεκριμένων καταλοίπων που γλυκοσυλιώνονται και την εξακρίβωση της σημασίας της γλυκοσυλίωσης αυτής. Όπως αναφέρεται σε προηγούμενο κεφάλαιο έχει παρατηρηθεί ότι το μόριο της apoB δεσμεύει ομοιοπολικά στεατικό και παλμτικό οξύ (Fisher *et al.*, 1964, Hoeg *et al.*, 1988). Μπορεί λοιπόν κάποιος να εξακριβώσει χρησιμοποιώντας τις υβριδικές κατασκευές αν και κατά πόσο κάποια κατάλοιπα συνδέονται ομοιοπολικά με λιπίδια και να διευκρινίσει ποιά είναι αυτά. Εδώ επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι τα υβρίδια και συγκεκριμένα τα A1B1 και A1B2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διερευνηθεί ο ρόλος των κυστεϊνών στο μόριο της apoB γιατί αν και υπάρχουν στοιχεία για τον εντοπισμό των δισουλφιδικών δεσμών (Cardin *et al.*, 1982, Yang *et al.*, 1990) ο ρόλος τους στη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής της apoB παραμένει ασαφής. Αναφορικά με το μηχανισμό τροποποίησης του mRNA η πληροφορία που συνάγεται από τα υβρίδια, είναι ότι εκτός από την αναγκαιότητα της παρουσίας της συγκεκριμένης αλληλουχίας, σημαντικός παράγοντας είναι και η διαμόρφωση του mRNA στο χώρο. Μπορεί κανείς λοιπόν να σχεδιάσει πειράματα χρησιμοποιώντας τα υβρίδια, που θα ερευνούν τον τρόπο με τον οποίο η απαμίνωση της κυτοσίνης αλληλεπιδρά με το υπόστρωμά της και επιτυγχάνει την απαμίνωση της κυτοσίνης τροποποιώντας έτσι το mRNA. Θα ήταν επίσης ενδιαφέρον να απομονωθεί το ένζυμο και να συγκροταλλωθεί με το υπόστρωμά του. Αυτό θα έρχετο φως στο μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνεται η απαμίνωση της κυτοσίνης σε επίπεδο

αντίδρασης μεταξύ ατόμων. Για να απαντήσει κανείς στα παραπάνω ερωτήματα μπορεί να χρησιμοποιήσει σαν εργαλεία τις υβριδικές κατασκευές που δημιουργήθηκαν στην πορεία της εργασίας αυτής σε συνδυασμό με άλλες προσεγγίσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απολιποπρωτεΐνη Β του ανθρώπου είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 500 KDa περίπου. Το γονίδιο της apoB χαρτογραφείται στο μακρινό άκρο του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 2 με μέγεθος 43Kb. Το mRNA της apoB έχει μήκος 14112 bp και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 4560 αμινοξέων. Η apoB συμμετέχει στο σχηματισμό VLDL, LDL και χυλομικρών και βρίσκεται στο πλάσμα σε δύο μορφές: B100 και B48. Η δεύτερη μορφή προέρχεται από την πρώτη μετά από μετα-μεταγραφική τροποποίηση του mRNA της. Η apoB αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα LDL (B/E υποδοχέας) και καταβολίζεται με ενδοκύτωση, συμβάλλοντας έτσι στην ομοίωση της χοληστερόλης. Έχουν περιγραφεί παθολογικές καταστάσεις υποβηταλιποπρωτεϊναιμίας και αθηταλιποπρωτεϊναιμίας που σχετίζονται άμεσα με την δομή της apoB ή με την συναρμολόγηση της LDL αντίστοιχα. Η apoB είναι μοναδική ανάμεσα στις απολιποπρωτεΐνες για το μεγάλο μέγεθός της, για τη μόνιμη σχέση που έχει με τα λιπίδια που μεταφέρει και δεν ανταλλάσσεται μεταξύ λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, στο ότι συνδέεται με λιπίδια ενδοκυττάρια και στο γεγονός ότι υπάρχει σε δύο μορφές την apoB100 και την apoB48.

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στοιχεία που αφορούν στη διερεύνηση του ενδοκυττάριου μηχανισμού με τον οποίο η apoB συνδέεται με λιπίδια για το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης και την εξακρίβωση του ρόλου της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης και πιθανώς ενζυμικών ενεργοτήτων για την συναρμολόγηση της LDL. Παρουσιάζονται επίσης στοιχεία που αφορούν στη μετα-μεταγραφική τροποποίηση του mRNA της apoB καθώς επίσης και στις μετα-μεταφαστικές τροποποιήσεις της apoB.

Ακολούθησαν δύο αλληλοσυμπληρούμενες πειραματικές προσεγγίσεις. Η πρώτη συνίστατο στην έκφραση και ανάλυση υβριδικών πρωτεϊνών που αποτελούνται από το σύνολο σχεδόν της apoAI και διαδοχικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα της apoB παρεμβλημένα στο καρβοξυτεματικό άκρο της apoAI μεταξύ καταλοίπων 212-233, και ανάλυση αυτών ως προς την ικανότητά τους να σχηματίσουν λιποπρωτεΐνη. Η δεύτερη προσέγγιση συνίστατο στην έκφραση αμινοτεματικών τμημάτων της apoB (B29, B41 και B47) και ανάλυση αυτών ως προς την ικανότητά τους να σχηματίσουν λιποπρωτεϊνικά συμπλέγματα.

Τα πειραματικά δεδομένα οδηγούν στα συμπεράσματα ότι η ιδιότητα της apoB48 να συνδέεται ενδοκυττάρια με λιπίδια για το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης δεν προσδίδεται από ειδικές ακολουθίες που υπάρχουν σε επιμέρους τμήματα της apoB48 και ότι το ελάχιστο μήκος της apoB που απαιτείται για το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης σε κύτταρα C127 είναι μεγαλύτερο από το 29% και μικρότερο ή ίσο με το 41% του

μορίου της. Τα αποτελέσματά μας είναι συμβατά με ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο μετά τη σύνθεσή της η apoB αποκτά την κατάλληλη τριτοταγή δομή που της επιτρέπει (ενζυματική ή μη) ενδοκυττάρια σύνδεση με λιπίδια. Επιπρόσθετα ο σχηματισμός λιποπρωτεΐνης σε μη ηπατικά κύτταρα (C127) δηλώνει ότι τυχόν ενζυμικές ενεργότητες ή άλλες πρωτεΐνες που χρειάζονται για το σχηματισμό λιποπρωτεΐνης δεν είναι ιστοειδικές.

Αναφορικά με το μηχανισμό τροποποίησης του mRNA η πληροφορία που συνάγεται από την έκφραση των υβριδικών πρωτεϊνών AIB, είναι ότι εκτός από την αναγκαιότητα της παρουσίας της συγκεκριμένης αλληλουχίας σημαντικός παράγοντας είναι και η διαμόρφωση του mRNA στο χώρο. Αναφορικά με την γλυκοσυλίωση της apoB μια πρώτη πληροφορία που παρέχεται είναι το γεγονός της *O*-γλυκοσυλίωσης στην περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 2153 και 2389.

Οι μη ηπατικές C127 κυτταρικές σειρές που έχουν δημιουργηθεί κατά την πορεία της εργασίας αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιπλέον για την διερεύνηση των θέσεων γλυκοσυλίωσης της apoB καθώς και της φυσιολογικής τους σημασίας καθώς επίσης των φυσικοχημικών και λειτουργικών ιδιοτήτων της apoB.

SUMMARY

Human apolipoprotein B is a glycoprotein of about 500 KDa. ApoB gene is located at the distal end of the short arm of chromosome 2 about 43 Kb in length. ApoB mRNA size is 14112 bp and codes for a protein of 4560 amino acids. ApoB is a constituent part of VLDL, LDL and chylomicrons and in plasma can be found in two forms : B100 and B48. The latter form is produced by the former after a post-transcriptional modification of its mRNA. ApoB is recognized by the LDL (B/E) receptor and catabolised after endocytosis participating thus in cholesterol homeostasis. Pathological conditions of hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia have been described intimately related with the structure of apoB and the assembly of LDL respectively. ApoB is unique among apolipoproteins for its large size, its permanent relationship with the lipids it is associated with and its non exchangeability between lipoprotein particles, its intracellular assembly into lipoprotein and for the fact that it exists in two forms as B100 and B48.

In the present study evidence is presented concerning the investigation of the intracellular mechanism with which apoB assembles with lipids to form lipoprotein and the clarification of the role of secondary and tertiary structure of the protein and possibly of enzymatic activities in the formation of LDL. Evidence are also presented for the post-transcriptional modification of apoB mRNA as well as for the post-translational modifications of apoB.

Two complementary experimental approaches were followed. The first dealt with expressing and analyzing hybrid proteins consisting of almost all of apoAI protein and consecutive overlapping fragments of apoB inserted at the carboxyl terminal end of apoAI between the residues 212-233, and analysis of the resulting proteins for their ability to form lipoprotein. The second approach dealt with expressing aminoterminal fragments of apoB (B29, B41 and B47) and analyzing them for their ability to form lipoprotein.

The experimental data lead us to conclude that the ability of apoB48 for intracellular assembly into lipoprotein is not due to specific sequences present on distinct fragments of apoB48 and that the least length of apoB required for lipoprotein formation in C127 cells is more than 29% and equal or less than 41% of its molecule. Our conclusions are in agreement with a model in which apoB after its synthesis assumes the correct tertiary structure that allows (enzymatic or not) intracellular assembly with lipids. In addition lipoprotein formation in non hepatic C127 cells signifies that possible enzymatic activities or other proteins required for lipoprotein assembly are not tissue specific.

With respect to the mechanism of mRNA post-translational modification the information provided from the expression of the hybrid AIB proteins is that apart from the presence of the necessary recognition sequence for the mechanism to function it is

very important the tertiary structure of the mRNA. With respect to the glycosylation of apoB a first information is the fact of the *O*-glycosylation between the residues 2153-2389.

The non hepatic C127 cell lines generated during the course of this work can be further utilized for the investigation of the glycosylation positions and physiological significance of glycosylation of apoB as well as for the study of physicochemical and functional properties of apoB.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alaupovic, P. 1971.** : Conceptual development of the classification systems of plasma lipoproteins. In *proteides of Biological Fluids*. H. Peeters, editor. Pergamon, Oxford. 9-20.
- Assmann, G. and Brewer, H. B., jr. 1974.** : A molecular model of high density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1534.
- Atkinson, D., M. A. F. Davis, and Leslie, R.B. 1974.** :The structure of a high density lipoprotein (HDL₃) from porcine plasma. *Proc. R. Soc. Lond.* 186,Ser. B:165.
- Baker, H.N., Gotto, A.M., Jr., and Jackson, R.L. 1975.** : The primary structure of human plasma high density apolipoprotein glutamine I (apoA-I). II. The amino acid sequence and alignment of the cyanogen bromide fragments IV, III, and I. *J. Biol. Chem.* 250, 2725-2738.
- Baum, C.L., Teng, B.B., and Davidson, N.O. 1990.** : Apolipoprotein B messenger RNA editing in the rat liver. Modulation by fasting and refeeding a high carbohydrate diet. *J. Biol. Chem.* 265, 19263-19270.
- Berman, M., Hall, M. Levy, R.L., Eisenberg, S., Bilheimer, D.W., Phair, R.D., and Goebel, R.H. 1978.** : Metabolism of the apoB and apoC lipoproteins in man : Kinetic studies in normal and hyperlipoproteinemic subjects. *J. Lipid Res.* 19,38-56.
- Blackhart, B., Ludwig, E.M., Pierotti, V.R., Caiati, L., Onasch, M.A., Wallis S.C., Powell, L.M., Pease, R.J., Knott, T.J., Chu, M.L., Mahley, J. Scott, J, McCarthy, B.J., and Levy-Wilson, B. 1986.** : Structure of the human apolipoprotein B gene. *J. Biol.Chem.* 261,15364-15367.
- Boren, J., Graham, L., Wettsten, M., Scott, J., White, A., and Olofsson, S.O. 1992** : The assembly and secretion of ApoB100-Containing Lipoproteins in HepG2 Cells. *J. Biol. Chem.* 267, 9858-9867.
- Breslow, J.L., Ross, D., McPherson, J., Williams, H., Kurnit, D., Nussbaum, A.L., Karathanasis, S. K. and Zannis, V.L.1982** : Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6861-6865.
- Brewer, H.B., Jr., Fairwell, T., Larue, A., Ronan, R., Houser, A., and Bronzert, T. 1978.** : The amino acid sequence of human apoA-I, an apoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 6230630.
- Cardijn, A.D., Witt, K.R., Barhart, C.L., and Jackson, R.L. 1982.** : Sulfhydryl chemistry

- and solubility properties of human plasma apolipoprotein B. *Biochemistry* 21, 4503-4511.
- Chen, S.H., Habib, G., Yang, C.Y., Gu, Z.W., Lee, B.R., Weng, S.A., Silberman, S.R., Cai, S.J., Destypere, J.P., Rosseneu, M. Gotto, Jr., A.M., Li, W.H., and Chan, L. 1987.** : Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 238, 363-366.
- Cheung, P. and Chan, L. 1983.** Nucleotide sequence of cloned cDNA of human apolipoprotein A-I. *Nucl. Acids Rec.* 11, 3703-3715.
- Cheung, P., Kao, F.T., Law, M.L., Jones, C., Puck, T.T., and Chan, L. 1984.** : Localization of the structural gene for the human apolipoprotein A-I on the long arm of chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 508-511.
- Church G., and W.Gilbert. 1984.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991.
- Cladaras, C., Hadzopoulou-Cladaras, M., Nolte, R. T., Atkinson, D. & Zannis, V. I. 1986.** : The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100 : Relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *EMBO Journal*, 5,13, 3495-3507.
- Cohn, J.S., Wagner, D.A., Cohn, S.D., Millar, J.S., and Scafer, E.J. 1990.** : Measurement of very low density and low density lipoprotein apolipoprotein (apo) B-100 and high density lipoprotein Apo A-I production in human subjects using deuterated leucine. Effect of fasting and feeding. *J. Clin. Invest.* 85, 804-811.
- Collins, D.R., Knott, T.J., Pease, R.J., Powell, L.M., Wallis, S.C., Robertson, S., Pullinger, C.R., Milne, Marcel, Y.L., and Humphries, S.E. 1988.** : Truncated variants of apolipoprotein B cause Hypobetalipoproteinemia. *Nucl. Acids. Rec.* 16, 8361-8375.
- Davidson, N.O., Carlos, R.C., and Lukaszewicz, A.M. 1990.** : Apolipoprotein B mRNA editing is modulated by thyroid hormone analogs but not growth hormone administration in the rat. *Endocrinology* 4, 779-785.
- Davis, R.A., and Boogaerts, J.R. 1982.** : Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Effect of fatty acids on triacylglycerol and apolipoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 257, 10908-10913.
- Deeb, S.S., Disteche, C., Motulsky, A.G., Lebo, R.B., and Kan Y.W. 1986.** : Chromosome localization of the human apolipoprotein B gene and detection of homologous RNA in monkey tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 419-422.
- Demmer, L.A., Levin, M.S., Elovson, J., Reuben, M.A., Lusic, A.J., and Gordon J.I.**

1986. : Tissue-specific expression and developmental regulation of the rat apolipoprotein B gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8102-8106.

Driscoll, D.M., Wynne, J.K., Wallis, S.C., and Scott, J. 1989. : An in vitro system for the editing of apolipoprotein B mRNA. *Cell* 58, 519-525.

Dunning, A.M., Houlston, R., Fostergard, J., Revill, J., Nilsson, J., Hamsten, A., Talmud, P., and Humphries, S. 1991. : Genetic evidence that the putative receptor binding domain of apolipoprotein B (residues 3130 to 3630) is not the only region of the protein involved in the interaction with the low density lipoprotein receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1096, 231-237.

Edelstein, C., Gordon, J.L., Toscas, K., Sims, H.F., Strauss, A.W., and Scanu, A.M. 1983. : In vitro conversion of proapolipoprotein A-I to apoprotein A-I. Partial characterization of an extracellular enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 258, 11430-11433.

Feinberg A., and Vogestein B. 1983. : A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6.

Fielding, C.J., and Havel, R.J. 1977. : Lipoprotein Lipase. *Arch. Pathol.* 101, 225-229.

Fielding, C.J., Shore, V.G., and Fielding P.D. 1972. : A protein cofactor of Lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1943-1949.

Fisher, W.R., and Guri, S. 1964. : Structure of lipoproteins : Covalently bound fatty acids. *Science* 143,362-363.

Forte, T., Norum, K.R., Glomset, J.A., and Nichols, A.V. 1971 : Plasma lipoproteins in familial Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency : Structure of low and high density lipoproteins as revealed by electron microscopy. *J. Clin. Invest.* 50, 1141.

Fukushima, D., Kupferberg, J.P., Kokoyama, S., Kroon, D.J., Kaiser, E.T., and Kezdy, F.J. 1979. : A synthetic amphiphilic helical docosapeptide with the surface properties of plasma apolipoprotein A-I. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 3703-3704.

Glomset, J.A. and Norum, K.R. 1973. : The metabolic role of lecithin:cholesterol acyltransferase : Perspectives from pathology. *Adv. Lipid. Res.* 2, 1-16

Glomset, J.A., Mitchell, C.D., King, W.C., Applegate, K.A., Forte, T., Norum, K.R., and Gjone, E. 1980. : In vitro effects on Lecithin:cholesterol acyltransferase on apolipoprotein distribution in familial Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 348, 224-243.

- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1977.** : The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 897-930.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 1982.** : Familial hypercholesterolemia. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein, J.L., and M. S. Brown, editors. McGraw Hill, New York. 672-712.
- Gotto, Jr., A.M., Pownall, H.J., and Havel, R.J. 1986.** : Introduction to the plasma lipoproteins. In *Methods in Enzymology*. Segrest, J.P., and Albers, J.J. editors. Academic Press Inc. 128, 3-41.
- Graham, D.L., Knott, T.J., Jones, T.C., Pease, R.J., Pullinger, C.R., and Scott, J. 1991.** : Carboxyl-terminal truncation of apolipoprotein B results in gradual loss of the ability to form buoyant lipoproteins in cultured human and rat liver cell lines. *Biochemistry* 30, 5616-5621.
- Graham, F., and A. Van der Eb. 1973.** : A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 57, 456-467.
- Greeve, J., Navaratnam, N., and Scott, J. 1991.** : Characterization of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme : no similarity to the proposed mechanism of RNA editing in Kinetoplastid protozoa. *Nucleic. Acids. Research.* 19, 3569-3576.
- Hamilton, R.L. 1972.** : Synthesis and secretion of plasma lipoproteins. *Adv. Exptl. Med. Res.*, 15, 544
- Hamilton, R.L., Moorehouse, A. and Havel R.J. 1991.** : Isolation and properties of nascent lipoproteins from highly purified rat hepatocytic Golgi fractions. *J. Lipid. Res.* 32, 529-543.
- Hatzopoulou-Cladaras, M., Kritis, A., Zanni, E.E., Cladaras, C., and Zannis V.I. 1989.** : Expression of segments of the apoB-100 cDNA. *Cir.* 79,434.
- Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J.H. 1955.** : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, 34, 1345-1353.
- Havel, R.J. and J. P. Kane. 1982.** Introduction : Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. C.R. Scriver, A.I. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle, editors. McGraw-Hill, New York. 1129-1138

Heiss, G. and Tyroler, H. 1982. : In proceedings of the Workshop on Apolipoprotein Quantification, NIH Publ. No. 83-1266. U.S. Dept. Health and Human Services, NIH, Bethesda, Maryland. 7-24.

Herbert, P.N., G. Assmann, A.M. Gotto, Jr., and D.S. Fredrickson 1982. Familial lipoprotein deficiency : Abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia, and Tangier disease. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J.L. Goldstein, and M.D. Brown, editors. McGraw-Hill, New York, NY. 589-651.

Herscovitz, H., Hatzopoulou-Cladaras, M., Walsh, M.T., Cladaras, C. Zannis, V.I., and Small, D.M. 1991. : Expression, secretion, and lipid-binding characterization of the N-terminal 17% of apolipoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7313-7317.

Hoeg, J.M., Meng, M.S., Ronan, R., Demosky, Jr., J., Fairwell, T., and Brewer, Jr., H.B. 1988. : Apolipoprotein B synthesized by HepG2 cells undergoes fatty acid acylation. *J.Lipid. Res.* 29, 1215-1220.

Huang, G., Lee, D.M., and Singh, S. 1988. : Identification of the thiol ester linked lipids in apolipoprotein B. *Biochemistry* 27, 1395-1400.

Huang, L.S., Ripps, M.E., Korman, S.H., Deckelbaum, R.J., and Breslow, J.L. 1989. : Hypobetalipoproteinemia due to an apolipoprotein B gene exon 21 deletion derived by Alu-Alu recombination. *J. Biol. Chem.* 264, 11394-11400.

Hussain, M.M., Zanni, E.E., Kelly, M., and Zannis, V.I. 1989. : Synthesis, modification and flotation properties of rat hepatocyte apolipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1001, 90-101.

Innerarity, T.L. 1990. : Familial hypobetalipoproteinemia and familial defective apolipoprotein B100 : genetic disorders associated with apolipoprotein B. *Curr. Opin. Lipid.* 2, 104-109.

Innerarity, T.L., Friedlander, E.J., Rall, Jr., S.C., Weisgraber, K.H., and Mahley, R.W. 1983. : The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments. *J. Biol. Chem.* 258, 12341-12347.

Jackson, R.L., Morrisett, J.D., Gotto, A.M., and Segrest, J.P. 1975. : The mechanism of lipid-binding by plasma lipoproteins. *Mol. Cell. Biochem.*, 6, 43.

Jackson, R.L., Morrisett, J.D., Sparrow, J.T., Segrest, J.P., Pownall H.J., Smith, L.C., Hoff, H.F., and Gotto, A.M. 1974. : The interaction of apolipoprotein-serine with

phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.*, 249, 5314.

Kaiser, E.T., and Kezdy, F.J. 1983. : Secondary structures of proteins and peptides in amphiphilic environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1137-1143.

Kane, J.P., and Havel, R.J. 1989. : Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In the *Metabolic Basis of Inherited Disease*. C. R. Scriver, A.I. Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle, editors. McGraw-Hill, New York. 1139-1164.

Karathanasis, S.K. 1985. : Apolipoprotein multigene family : tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII and AIV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6374-6378.

Karathanasis, S.K., Zannis, V.I., and Breslow, J.L. 1983. : Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6147-6151.

Karathanasis, S.K., McPherson, J., Zannis, V.I., and Breslow, J.L. 1983. : Linkage of human apolipoprotein A-I and C-III genes. *Nature* 304, 371-373.

Knott, T.J., Pease, R.J., Powell, L.M., Wallis, S.C., Rall, Jr., S.C., Innerarity, T.L., Blackhart, B., Taylor, W.H., Marcell, Y., Milne, R., Johnson, D., Fuller, M., Lussis, A.J., McCarthy, B.J., Mahley, R.W., Levy-Wilson, B., and Scott, J. 1986. : Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B-100. *Nature* 323, 743-839.

Krishnaiah, K.V., Walker, L.F., Borensztajn, J., Schonfeld, G., and Getz, G.S., 1980. : Apolipoprotein B variant derived from rat intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3806-3810.

Krystal, M., Li, R., Lyles, D., Pavlakis, G., & Palese P. 1986. : Expression of the three influenza virus polymerase proteins in a single cell allows growth complementation of viral mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2709-2713

Krystal, M., Ruan, L., Lyles, D., Pavlakis, G., and Palese, R. 1986. : Expression of the three influenza virus polymerase proteins in a single cell allows growth complementation of viral mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 2709-2713.

Krul, E.S., Kinoshita, M., Talmud, P., Humphries S.E., Turner, S., Goldberg, A.C., Cook, K., Boerwinkle, E., and Schonfeld, G. 1989. : Two distinct truncated apolipoprotein B species in a Kindred with hypobetalipoproteinemia. *Arterio.* 9, 856-868.

Kushwaha, R.S., and Hazzard, W.R. 1978. : Catabolism of very low density lipoproteins in the rabbit. Effect of changing composition and pool size. *Biochem. Biophys. Acta* 528,176-189.

Laemmlı, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.

Laggner, P., G.M. Kostner, U. Rakusch, and D. Worcester. 1981. Neutron small angle scattering on selectively deuterated human plasma low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 255:11832-11838.

Laggner, P., Kratky, O., Kostner, G., and Holasek, A. 1972. : Small angle x-ray scattering of LpA, the major lipoprotein family of human plasma high density lipoprotein HDL₃. *F.E.B.S. Lett.*, 27, 53.

Laggner, P., Muller, K., Kratky, O., Kostner, G., and Holasek, A. 1973. : Studies on the structure of lipoprotein A of human high density lipoprotein HDL₃ : The spherically averaged electron density distribution. *F.E.B.S. Lett.*, 33, 77.

Law, S.W., Grant, S.M., Higuchi, K., Hospattankar, A., Lackner, K., Lee, N., and Brewer, H.B. 1986. : Human liver apolipoprotein B-100 cDNA : Complete nucleic acid and derived amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8142-8146.

Law, S.W., Lackner, K.J., Hospattankar, A.V., Anchors, J.M., Sakaguchi, A.Y., Naylor, S.L., and Brewer, Jr., H.B. 1985. : Human apolipoprotein B-100 : cloning, analysis of liver mRNA, and assignment of the gene to chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8340-8344.

Le Marchand, Y., Singh, A., Assimacopoulos-Jeannet, F., Orci, L., Rouilier, C., and Jeanrenaud, B. 1973. : A role for the microtubular system in the release of very low density lipoprotein by perfused mouse livers. *J. Biol. Chem.* 248,6862.

Lee, D.M., and Singh, S. 1988. : Presence and localization of two intramolecular thioester linkages in apolipoprotein B. *Cir.* 78, II-286.

Lenich, C., Brecher, P. Makrides, S., Chobanian, A. and Zannis V.I. 1988. : Apolipoprotein gene expression in the rabbit : abundance, size and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues. *J. Lipid. Rec.* 29,755-764.

Levy, R.L., Langer, T. Gotto, A.M., and Fredrickson, D.S. 1970. : Familial hypobetalipoproteinemia, a defect in lipoprotein synthesis. *Clin. Genet.* 9,149-155.

Li, W. H., Tanimura, M., Luo, C.C., Datta, S., and Chan, L. 1988. : The apolipoprotein

multigene family : biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J. Lipid Res.* 29, 245-271.

Lowy, D. R., Rand, E., & Scolnick, E. M. 1978. : Helper -Independent Transformation by Unintegrated Harvey Sarcoma Virus DNA. *J. Virol.* 26, 291-298.

Ludwig, E.M., Blackhart, B., Pierotti, V.R., Caiati, L., Fortie, C., Knott, Scott, J., Mahley, J., Levy-Wilson, B., and McCarthy, B.J. 1987. : DNA sequence of the human apolipoprotein B gene. *DNA* 6,363-372.

Lund-Katz, S., Ibdah, J. A., Letizia, J.Y., Thomas, M.T., and Phillips, M.C. 1988 : A ¹³C NMR Characterization of Lysine Residues in Apolipoprotein B and Their Role in Binding to the Low Density Lipoprotein Receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 13831-13838.

Mahley, R.W., Bersot, T.P., and Taylaur, C.E., 1970. : Identity of very low density lipoprotein apoproteins of plasma and liver Golgi apparatus. *Science* 168, 380.

Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Pitas, R.E. Weisgraber, K.H., Brown, J.H., and Gross, E. 1977. : Inhibition of lipoprotein binding to cell surface receptors of fibroblasts following selective modification of arginyl residues in arginine rich and B-apoproteins. *J. Biol. chem.* 252, 7279-7287.

Makrides, S.C., Ruiz-Opazo, N., Hayden, M., Nussbaum, A.L., Breslow, J.L., and Zannis, V.I. 1988. : Sequence and expression of Tangier apoA-I gene. *Eur. J. Biochem.* 173, 465-471.

Marcel, Y.L., Innerarity, T.L., Spilman, C., Mahley, R.w., Protter, A.A., and Milne, R.W. 1987. : Mapping of human apolipoprotein B antigenic determinants. *Arterio.* 7, 166-175.

Mars, H., Lewis, L.A., Robertson, Jr., A.L., Butkus, A., and Williams, Jr., C.H. 1969. : Familial hypo-B-lipoproteinemia: a genetic disorder of lipid metabolism with nervous system involvement. *Am. J. Med.* 46, 886-900.

McCall, M.R., Forte, T.M., and Shore, V.G. 1988. : Heterogeneity of nascent high density lipoproteins secreted by the hepatoma derived cell line, HepG2. *J. Lip. Res.*, 29, 1127-1137.

McCall, M.R., Nichols, A.V., Blanche, P.J., Shore, V.G., and Forte, T.M. 1989. : Lecithin:cholesterol acyltransferase-induced transformation of HepG2 lipoproteins. *J. Lip. Res.*, 30, 1579-1589.

Miller, A.L., and Smith, L.C., 1973. : Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 248,3359-3362.

Milne, R.W., Theolis, Jr., R., Maurice, R., Pease, R.J., Weech, P.K., Rassart, E., Fruchart, J.C., Scott, J., and Marcel, Y.L. 1989. : The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. *J. Biol. Chem.* 264, 19754-19760.

Minnich, A., Collet, X., Rogahani, A., Ciadaras, C., Hamilton, R.L., Fielding, C.J. and Zannis, V.I. 1992. : Site directed Mutagenesis and Structure-Function analysis of the Human Apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 267, 16553-16560.

Muller, K., Laggner, P., Kratky, O., Kostner, G., Holasek, A and Glatter, O. 1974. : X-ray small angle scattering of human plasma high density lipoprotein LpA from HDL₂ : Application of a new evaluation method. *F.E.B.S. Lett.*, 40, 213.

Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A.S., and Schotz, M.C. 1980. : Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 49,667-693.

Norum, K.R., Glomset, J.A., Nichols, A.V., Forte, T., Albers, J.J., King, W.C., Mitchell, C.D., Applegate, K.R., Gong, E.L., Cabana, V. and Gjone, E. 1975. : Plasma lipoproteins in familial Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency : effects of incubation with lecithin:cholesterol acyltransferase in vitro. *Scan. Clin. Lab. Invest.* 35 Suppl. 142, 31-55.

Patsch, J.R., Gotto, Jr. A.M., Olivecrona, T., and Eisenberg, S. 1978. : Formation of high density lipoprotein2-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75,4519-4523.

Pease, R.J., Milne, R.W., Jessup, W.K., Law, A., Provost, P., Fruchart, J.C., Dean, R.T., Marcel, Y.L., and Scott, J. 1990. : Use of bacterial expression cloning to localize the epitops for a series of monoclonal antibodies against apolipoprotein B100. *J. Biol. Chem.* 265, 553-568.

Powell, L.M., Wallis, S.C., Pease, R.J., Edwards, Y.H., Knott, T.J., and Scott, J. 1987. : A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein B-48 in intestine. *Cell* 50, 831-840.

Pullinger, C.R., Hillas, E., and Hardman, D.A. 1990. : A mutation in the apolipoprotein B gene results in a truncated variant, apoB-61, in VLDL and LDL in a kindred with hypobetalipoproteinemia. *Cir.* 82, III-424.

- Rall, S.C., Weisgraber, K.H., and Milne, R.W. 1981.** : Human apolipoprotein E : The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 257, 4171-4178.
- Roghani, A., & Zannis, V.I. 1988.** : Alterations of the Glutamine residues of Human Apolipoprotein AI Propeptide by in Vitro Mutagenesis. Characterization of the Normal and Mutant Protein Forms. *Biochemistry* 27,7428-7435.
- Sambrook J., Fritsch E., and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual (ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F., Micklen S., and A. Coulson. 1977.** : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463.
- Scanu, A.M. , R.E. Byrne, and M. Mihovilovic. 1982.** Functional roles of plasma high density lipoproteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 13:109
- Schiffer, M., and Edmundson, H.R. 1967.** : Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* 7, 121-135.
- Segrest, J.P., Jackson, R.L., Morrisett, J.D., and Gotto, A.M. 1974.** : A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *F.E.B.S. Lett.*, 38, 247-253.
- Shah, R., Knott, T., LeGross, J., Navaratnam, N., Greeve, J., and Scott, J. 1991.** : A 9-nucleotide motif is essential for the editing of apolipoprotein (apo) B mRNA. *Cir.* (Abstr.)
- Shipley, G.G., Atkinson, D., and Scanu, A. M. 1972.** : Small angle x-ray scattering of human serum high density lipoproteins. *J. Supramol. Struct.* 1, 98.
- Sigurdsson, G., Nicol, A., and Lewis, B. 1975.** : Conversion of very low density lipoprotein to low density lipoprotein. A metabolic study of apolipoprotein B Kinetics in human subjects. *J. Clin. Invest.* 56, 1481-1490.
- Sjoberg, A., Oscatsson, J., Bostrom, K., Innerarity, T.L., Eden, S., and Olofsson S.O. 1991.** : Growth hormone participates in the regulation of the editing of apolipoprotein B mRNA in the rat liver. *Cir.* 84 (II), 226.
- Smith, L.C., H.J. Pownall, and A.M. Gotto. 1978.** The plasma lipoproteins : Structure and metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 47:751-778.
- Steinberg, D., Grundy, S.M., Mok, H.Y.I., Turner, J.D., Weinstein, J.J., Brown, W.V., and Albers, J.J. 1979.** : Metabolic studies in an unusual case of asymptomatic

familial hypobetalipoproteinemia with hypoalphalipoproteinemia and fasting chylomicronemia. *J. Clin. Invest.* 64, 292-301.

Stoffel, W., Zierenberg, O., Tunggal, B., and Schreiber, E. 1974. : ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence for hydrophobic lipid-protein interactions in human high density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 3696.

Suita-Mangano, P., Janero, D.R., and Lane, M.D. 1982. : Association and assembly of triglyceride and phospholipid with glycosylated and unglycosylated apoproteins of very low density lipoprotein in the intact liver cell. *J. Biol. Chem.* 257, 11463-11467.

Talmud, P., King-Underwood, L., Krul, E., Schonfeld, G. and Humphries, S. 1989. : The molecular basis of truncated forms of apolipoprotein B in a Kindred with compound heterozygous hypobetalipoproteinemia. *J. Lipid. Res.* 30, 1773-1779.

Teng, B., Verp, M., Salomon, J., and Davidson, N.O. 1990. : Apolipoprotein B messenger RNA editing is developmentally regulated and widely expressed in human tissues. *J. Biol. Chem.* 265, 20616-20620.

Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Russel, D.W. and Schneider, W.J. 1984. : The human LDL receptor: A cystein-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39, 27-38.

Yang, C.Y., Chen, S.H., Gianturco, S.H., Bradley, W.A., Sparrow, T.J., Tanimura, M., Li, W.H., Sparrow, D.A., DeLoof, H., and Rosseneu, M. 1986. : Sequence structure receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* 323, 738-742.

Yang, C.Y., Gu, Z.W., Weng, S.A., Kim, T.W., Chen, S.H., Pownall, H.J., Sharp, P.M., Liu, S.W., Li, H.W., Gotto, Jr., A.M. and Chan, L. 1989. : Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins. *Arterio.* 9,96-108.

Yang, C.Y., Kim, T.W., Weng, S.A., Lee, B., Yang, M., and Gotto, Jr., A.M. 1990. : Isolation and characterization of sulfhydryl and disulfide peptides of human apolipoprotein B-100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5523-5527.

Yao, Z., Blackhart, B.D., Linton, M.F., Taylor, S.M., Young, S.G., and McCarthy, B.J. 1991. : Expression of carboxy-terminal truncated forms of human apolipoprotein B in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 266, 3300-3308.

Young, S.G., Hubl, S.T., Chappell, D.A., Smith, R.S., Claiborne, F., Snyder, S.M., and Terdiman, J.F. 1989. : Familial hypobetalipoproteinemia associated with a mutant

species of apolipoprotein B (B-46). *N. Engl. J. Med.* 320, 1604-1610.

Young, S.G., Hubl, S.T., Smith, R.S., Snyder, S.M., and Terdman, J.F. 1990. : Familial hypobetalipoproteinemia caused by a mutation in the apolipoprotein B gene that results in a truncated species of apolipoprotein B (B-31). A unique mutation that helps to define the portion of the apolipoprotein B molecule required for the formation of buoyant, triglyceride-rich lipoproteins. *J. Clin. Invest.* 85, 933-942.

Young, S.G., Peralta, F.P., Dubois, B.W., Cutiss, L.K., Boyles, J.K., and Witztum, J.L., 1987. : Lipoprotein B37, a naturally occurring lipoprotein containing the amino-terminal portion of apolipoprotein B100, does not bind to the apolipoprotein B,E (low density lipoprotein) receptor. *J. Biol. Chem.* 262, 16604-16611.

Wagner, R., Krul, E.S., Tang, J.J., Parhofer, K.G., Garlock, K., Talmud, P., and Schonfeld, G. 1991. : ApoB-45,8, a truncated apolipoprotein found primarily in VLDL, is associated with a nonsense mutation in the apoB gene and hypobetalipoproteinemia. *J. Lipid. Res.* 32, 1001-1011.

Walsh, M.T., and Atkinson, D. 1990. : Calorimetric and spectroscopic investigation of the unfolding of human apolipoprotein B. *J. Lipid. Res.* 31, 1051-1062.

Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. 1978. : Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in the high affinity binding to cell surface receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 575, 81-91.

Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L., Harder, K.J., Mahley, R.W., Milne, R.W., Marcel, Y.L., and Sparrow, J.T. 1983. : The receptor binding domain of human apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 258, 12348-12354.

Wetty, F.K., Hubl, S.T., Pierotti, V.R., and Young, S.G. 1991. : A truncated species of apolipoprotein B (B67) in a Kindred with familial hypobetalipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* 87, 1748-1754.

Winnaker E.L. 1987. : From genes to clones : Introduction to gene technology. Michael G. Weller editor. Weinheim. VCH Publishers. 108-110.

Ζαννής, Ι.Β., Μ. Ροβίθης, Α. Μαγκανάς και Α. Κρητός. 1990. Απολιποπρωτείνες Υποδοχείς Λιποπρωτεϊνών και Παθήσεις του Μεταβολισμού των Λιποπρωτεϊνών. Στο Τελευταίες Εξελίξεις στην Κλινική Διατροφή και Επιδημιολογία Νοσημάτων Διατροφής. Α.Γ. Καράτος και Δ.Ν. Λαμπαδάριος εκδότες. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Κοινωνικής Ιατρικής. Προγράμματα Πρωτοβάθμιας

Περίθαλψη και Διατροφής. Ηράκλειο, Κρήτη.

Zannis, V.I. 1986. : Genetic Polymorphism in Human Apolipoprotein E. In *Methods in Enzymology*, J. P. Segrest, J. J. Albers editors. Academic Press Inc. 128, 690-712.

Zannis, V.I. and J.L. Breslow. 1985. : Genetic mutation affecting human lipoprotein metabolism. *Adv. Hum. Genet.* 14:125-215 and 383-386.

Zannis, V.I., Cole, F.S., Jackson, C.L., Kurnit, D.M., and Karathanasis, S. K. 1985. : Distribution of apoA-I, apoCII, apoCIII, and apoE mRNA in human tissues, time dependent induction of apoE mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry* 24, 4450-4455.

Zannis, V.I., Karathanasis, S. K., Keutmann, H.T., Goldberg, G., and Breslow, J.L. 1983. Intracellular and extracellular processing of human apoA-I. Secreted apoA-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2574-2578.

Zannis, V.I., Kardasis, D., and Eleni, E.Z., Part II. In press : Genetic mutations affecting human lipoprotein metabolism. *Advances in human genetics.*