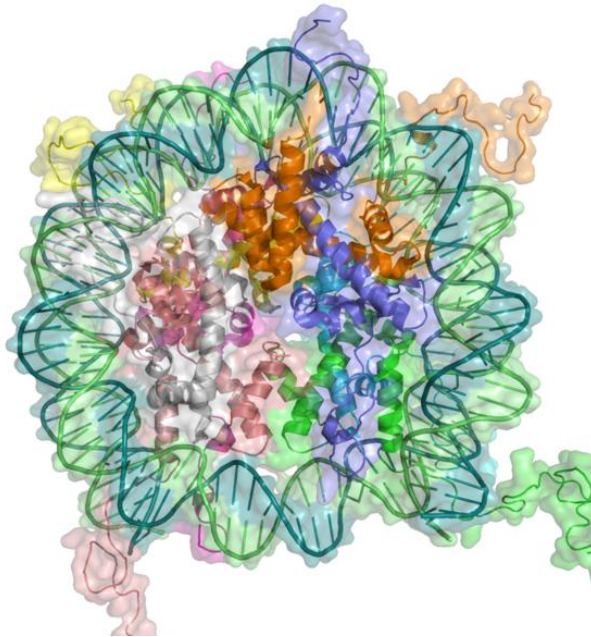


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗ

Μεταπτυχιακή Εργασία της Αυγουλέα Μαρίας

Επιβλέπων Καθηγητής: Μαυροθαλασσίτης Γεώργιος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2012

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου της Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2009- Δεκέμβριος 2011. Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Σπιλιανάκη Χαράλαμπο, Πετράτο Κυριάκο και Μαυροθαλασσίτη Γιώργο για την ηθική υποστήριξη και τις συμβουλές τους. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη του εργαστηρίου, την Έλενα Βοργιά, που δεν κουράστηκε ποτέ να απαντά ακόμη και στις πιο αφελείς ερωτήσεις μου, τον Ανδρέα Ζαραγκούλια που έδινε άλλον αέρα με την ευχάριστη παρουσία του, την Ιωάννα Περάκη που βοήθησε τόσο πολύ στην εργασία αυτή, με τις μεταλλάξεις που πραγματοποίησε και με τη σειρά των διαμολύνσεων που ακολούθησαν. Ευχαριστώ τον Κώστα Θεοδωράκη για τις συμβουλές του και τις καλές του κουβέντες. Ευχαριστώ τον καθηγητή μου, Γιώργο Μαυροθαλασσίτη για την υπομονή και την ανοχή του στην άγνοια και τον ενθουσιασμό μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ, στη Θοδώρα Σαρημανώλη τον άνθρωπο που έδωσε νόημα στη λέξη φίλη, με κάθε της λέξη και πράξη και συνεχίζει να φέρνει το χαμόγελο στη ζωή μας με την παρουσίας της. Ευχαριστώ τα παιδιά μου που υπέφεραν πολλά με την απουσία μου αλλά πάντα με παρότρυναν να συνεχίσω. Τέλος το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην αγάπη μου, τον σύντροφο μου, τον Κώστα Τζεβανίδη που χάρη σε αυτόν εκπλήρωσα αυτό το μεταπτυχιακό και χωρίς αυτόν δεν θα υπήρχε κανένα όνειρο να ακολουθήσω.

Αυγουλέα Μαρία

6/7/2012

Περιεχόμενα

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ | I |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ..... | III |
| 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 7 |
| 2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ | 11 |
| 2.1 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ | 11 |
| 2.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ETS ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ | 13 |
| 2.3 Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ ERF | 15 |
| 3 ERF ΚΑΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ..... | 21 |
| 3.1 ΕΙΔΗ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗΣ | 21 |
| 3.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ. | 23 |
| 3.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF | 26 |
| 4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 29 |
| 4.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΡΟΥΤΙΝΑΣ | 29 |
| 4.1.1 Καθαρισμός του DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο..... | 29 |
| 4.1.2 Κατακρήμνιση με αιθανόλη | 29 |
| 4.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης..... | 30 |
| 4.1.4 Έκλουση τμημάτων DNA απο πήκτωμα αγαρόζης..... | 31 |
| 4.1.5 Παρασκευή τρυβλίων με LB agar..... | 32 |
| 4.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας | 32 |
| 4.1.7 Απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA | 34 |
| 4.1.8 Απομόνωση δίκλωνου DNA σε μεγάλη κλίμακα..... | 35 |
| 4.1.9 Απομόνωση μεγάλης κλίμακας πλασμιδιακού DNA..... | 36 |
| 4.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ | 38 |
| 4.2.1 Προετοιμασία <i>E.coli</i> ηλεκτροδεκτικών κυττάρων | 38 |
| 4.2.2 Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση..... | 39 |
| 4.2.3 Κλωνοποίηση σε πλασμίδια..... | 40 |

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.4 | Πέψη περιορισμού..... | 41 |
| 4.2.5 | Αντίδραση συνδετάσης του DNA (DNA ligation)..... | 42 |
| 4.2.6 | Παρασκευή τρυβλίων επιλογής..... | 43 |
| 4.2.7 | Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 44 |
| 4.2.8 | Μεταλλαξιγένεση θέσης με το Kit της Stratagene..... | 45 |
| 4.2.9 | Διαμόλυνση κυττάρων με χλωριούχο ασβέστιο..... | 48 |
| 4.2.10 | Μέθοδος λουσιφεράσης..... | 50 |
| 4.2.11 | Δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης με RLB (Reporter Lysis Buffer)..... | 50 |
| 4.3 | ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ..... | 51 |
| 4.3.1 | Διάλυμα LB..... | 51 |
| 4.3.2 | Διάλυμα LB agar..... | 51 |
| 4.3.3 | Διάλυμα TE..... | 52 |
| 4.3.4 | TAE..... | 52 |
| 4.3.5 | EDTA..... | 52 |
| 4.3.6 | TBE..... | 52 |
| 4.3.7 | Διάλυμα λυσοζύμης (10mg/ml)..... | 53 |
| 4.3.8 | Διάλυμα P1..... | 53 |
| 4.3.9 | Διάλυμα P2..... | 53 |
| 4.3.10 | Διάλυμα P3 (διάλυμα εξουδετέρωσης)..... | 53 |
| 4.3.11 | Διάλυμα QTB (διάλυμα εξισορρόπησης)..... | 54 |
| 4.3.12 | Διάλυμα QC (διάλυμα πλύσης)..... | 54 |
| 4.3.13 | Διάλυμα QF (διάλυμα έκλουσης)..... | 54 |
| 4.3.14 | NZY+ broth (ζυμός)..... | 54 |
| 4.3.15 | Διάλυμα IPTG..... | 55 |
| 4.3.16 | Διάλυμα HBS (10X)..... | 55 |
| 4.3.17 | Διάλυμα H..... | 55 |
| 4.3.18 | Διάλυμα γλυκερόλης 15%..... | 55 |
| 4.3.19 | Διάλυμα PBS..... | 55 |
| 5 | ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 57 |
| 5.1 | ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ R83A..... | 57 |
| 5.1.1 | Καθαρισμός του πλασμιδιακού pSG5-ERF..... | 59 |
| 5.1.2 | Πέψεις των pSG5-ERF και pEGFP-ERF..... | 59 |
| 5.1.3 | Απομόνωση και καθαρισμός του DNA..... | 61 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.1.4 | Αντίδραση συνδετάσης του DNA | 61 |
| 5.1.5 | Παρασκευή τρυβλίων με LB agar..... | 62 |
| 5.1.6 | Εισαγωγή του ανακατασκευασμένου DNA σε DH10b κύτταρα .. | 62 |
| 5.1.7 | Minipreps για την μετάλλαξη R83A στον pSG5-ERF..... | 63 |
| 5.1.8 | Δημιουργία Stub για την μετάλλαξη R83A στο pSG5-ERF..... | 65 |
| 5.2 | ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΕ ΤΟ STRATAGENE ΚΙΤ..... | 65 |
| 5.2.1 | Αντίδραση ελέγχου..... | 65 |
| 5.2.2 | Νέες μεταλλάξεις στον ERF | 67 |
| 5.2.3 | Οι μεταλλάξεις 194G>A και 256C>T..... | 69 |
| 5.2.4 | Minipreps pSG5-ERF 194G>A και pSG5-ERF 256C>T..... | 70 |
| 5.2.5 | Αποτελέσματα αλληλούχισης..... | 71 |
| 5.2.6 | Μετάλλαξη 1512delT..... | 74 |
| 5.2.7 | Παρασκευή νέων ηλεκτροδεκτικών κυττάρων..... | 77 |
| 5.2.8 | Αντίδραση συνδετάσης..... | 77 |
| 5.2.9 | Ανασκόπηση και αναθεώρηση | 77 |
| 5.2.10 | Διαμόλυνση Hella κυττάρων | 84 |
| 5.3 | ΣΕΙΡΑ ΠΕΨΕΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΩΝ ΤΟΥ ERF ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ | 86 |
| 6 | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 89 |
| | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 93 |

1 Εισαγωγή

Ο ERF είναι ισχυρός μεταγραφικός καταστολέας, μέλος της οικογένειας ETS. Η κατασταλτική του δράση εξαρτάται τόσο από την περιοχή καταστολής όσο και από το σημείο πρόσδεσης του στο DNA (*Sgouras et al., 1995, Mavrothalassitis & Chysdael, 2000*). Όσον αφορά τον άνθρωπο, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19, έχει μήκος 7593 βάσεις και εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του ενήλικου ατόμου (*Liu et al., 1997*). Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/Erk από μιτογόνα ερεθίσματα οδηγεί σε φωσφορυλίωση του ERF από την Erk κινάση (*Le Gallic et al., 1999*). Συμμετέχει στην διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (*Le Gallic et al., 1999*), στην αγγειογένεση (*Papadaki, et al., 2005*) ενώ τέλος, έχει αποδειχτεί και ο ογκοκατασταλτικός του ρόλος (*Athanasidou et al., 2000*).

Είναι γνωστό ότι ο ETS1 και ETS2, δύο μεταγραφικοί παράγοντες της ίδιας ETS οικογένειας του ERF παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών (*A Raouf, A Seth 2000., YJ Kim, BG Kim, SJ Lee, HK Lee, 2007*). Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον ETS2 εμφανίζουν πολλαπλές σκελετικές ανωμαλίες στο εγκεφαλικό κρανίο, στο προσωπικό κρανίο και στον αυχένα (*SH Sumarsono, et al., 1996*).

Η κρανιοσυνοστέωση ή κρανιοσυνόστωση, είναι μια ασυνήθιστη αλλά όχι σπάνια διαταραχή στην διάπλαση του εγκεφαλικού κρανίου. Εμφανίζεται σε ποσοστό 1 στις 2000 γεννήσεις και είναι μια κατάσταση κατά την οποία μία ή περισσότερες ραφές στο βρεφικό κρανίο έχουν υποστεί πρόωμη σύγκλειση, με οστεοποίηση (*Hunter, A.G.W. and Rudd, N.L. 1976., Hunter, A.G.W. and Rudd, N.L. 1977., Lajeunie, et al., 1995., Lajeunie, et al., 1996*). Αυτό προκαλεί παραμόρφωση του κρανίου, χωρίς να εμποδίζει απαραίτητα και την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Σε περιπτώσεις όμως που περιορίζεται σημαντικά ο χώρος του εγκεφάλου, παρατηρείται αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση που οδηγεί σε προβλήματα όρασης, διαταραχή του ύπνου, διατροφικές δυσκολίες, και επιβάρυνση στην νοητική ανάπτυξη που πολλές φορές συνοδεύεται με σημαντική μείωση του IQ (*Renier, D et al., 1982., David, L.R et al., 1996., Gosain, A.Ket et al., 1996., Gonsalez, S*

et al., 1997). Οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί και οδηγούν σε διαφόρων τύπου κρανιοσυνόστωση, είναι κυρίως αυτές των FGFR, των EFNA4, EFNB1 και των υποδοχέων κινάσης τυροσύνης TWIST και MSX2 (*Elanko N et al.*, 2001, *Nathaniel H et al.*, 2011., *Wilkie AO* 1996). Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις με κάποιο τρόπο επηρεάζουν και διαταράσσουν την ισορροπία της οστεοποίησης στο σημείο των ραφών (*AOM Wilkie* 1997). Είναι ήδη γνωστή η συμμετοχή του ERF στα μονοπάτια των FGFR (*Elizabeth P et al.*, 1997) και των εφρινών (*Rui Guo, Zuoren Yu, Jikui et al.*, 2004) η εμπλοκή του όμως και ο τρόπος σύνδεσης του ERF με την οστεοποίηση μένει να μελετηθεί.

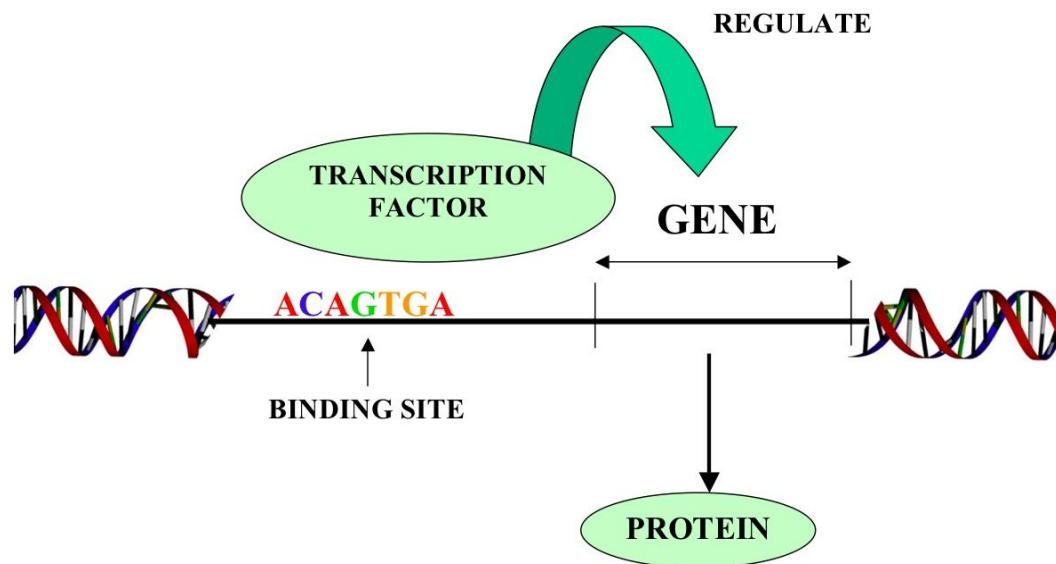
Προτείνεται λοιπόν, η διερεύνηση του ρόλου του ERF στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Η πειραματική μελέτη αποτελείται από δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, που εκπονείται και η παρούσα εργασία, γίνεται η διερεύνηση νέων μεταλλάξεων με στόχο τον καθορισμό της μετάλλαξης που παρουσιάζει μεγαλύτερο gain of function. Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάζονται constructs που στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για την διαμόλυνση Hella κυττάρων. Τα αποτελέσματα της διαμόλυνσης με τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν είναι αρκετά, ούτε ικανοποιητικά για να προκύψει ένα πόρισμα. Επιβάλλεται η επανάληψη της διαμόλυνσης των Hella κυττάρων με τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις περισσότερο από μία φορές έτσι ώστε στα αποτελέσματα που θα προκύψουν να υπάρχει επαναληψιμότητα και εγκυρότητα. Η διαμόλυνση θα πρέπει στη συνέχεια να εφαρμοστεί και για τις υπόλοιπες μεταλλάξεις που αναφέρονται στην εργασία. Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν θα αναλυθούν ως προς την μεταβολή της λειτουργικότητας του ERF. Στο δεύτερο στάδιο προτείνεται η χρήση καλλιεργειών μεσεγχυματικών κυττάρων που περιέχουν διαφορετικό ποσοστό του ERF και ο καθορισμός του βαθμού διαφοροποίησης των οστεοβλαστών σε αυτές. Τα αποτελέσματα του τελευταίου σταδίου αναμένεται να δείξουν το αν και κατά πόσο ο ERF επηρεάζει την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών.

Συνοπτικά η εργασία παρουσιάζεται σε έξι κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο, στην εισαγωγή παρουσιάζεται ο σκοπός της εργασίας και ο τρόπος που θα επιτευχθεί ο σκοπός αυτός. Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται μια αναφορά στους μεταγραφικούς παράγοντες και ιδιαίτερα σε αυτούς της οικογένειας των ETS μεταγραφικών παραγόντων για να καταλήξει στον αγαπημένο του εργαστηρίου τον μεταγραφικό καταστολέα ERF. Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζεται το θέμα που επιχειρείται να διερευνηθεί στην παρούσα εργασία με αφορμή την σχέση του ERF με την οστεογένεση και την Κρανιοσυνόστω-

ση. Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφονται τα υλικά καθώς και οι μέθοδοι του εργαστηρίου που ακολουθήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Στο πέμπτο κεφάλαιο παρουσιάζονται βήμα βήμα οι τεχνικές και τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την περάτωση της εργασίας καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα αυτά. Τέλος στο έκτο κεφάλαιο συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την εργασία αυτή όπως επίσης και προτάσεις για μελλοντική δουλειά.

2 Μεταγραφικοί Παράγοντες

Η μεταγραφή του DNA σε RNA, η ρύθμιση δηλαδή της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί κομβικό σημείο για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και συνεπώς της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες με συγκεκριμένη τρισδιάστατη δομή οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούν με το DNA, αναγνωρίζοντας ειδικές αλληλουχίες πάνω σε αυτό (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Αλληλεπίδραση μεταγραφικών παραγόντων και DNA.

2.1 Ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων

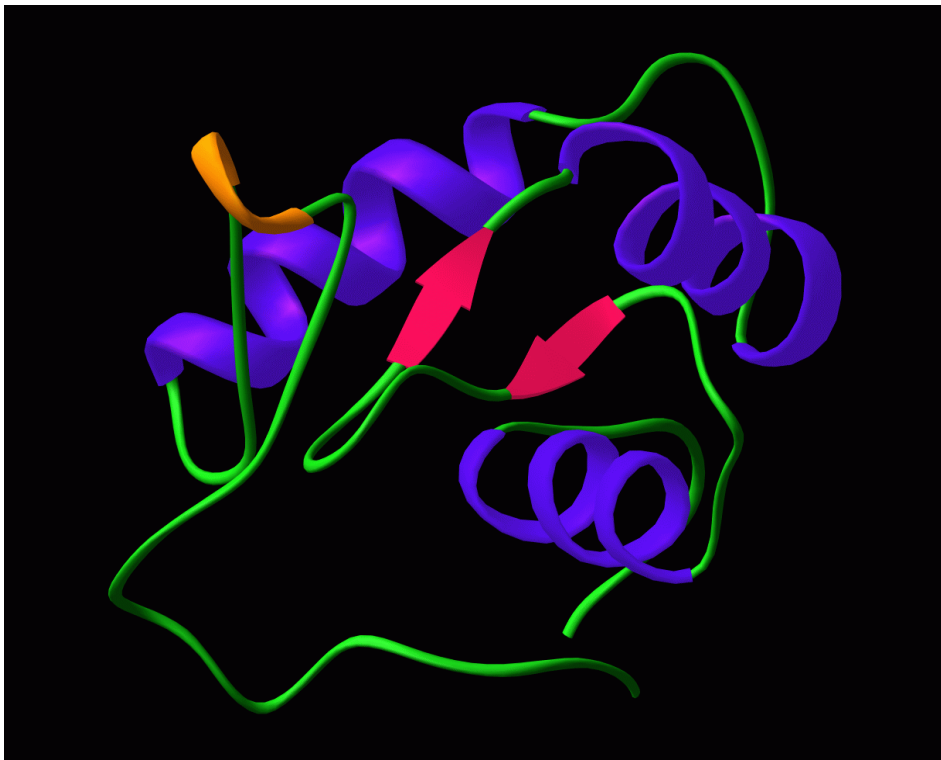
Τυπικά, το τμήμα πρόσδεσης στο DNA έχει τη διαμόρφωση α έλικας, ενώ η περιοχή πρόσδεσης περιέχει ή γειτνιάζει με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων τα οποία αλληλεπιδρούν με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφοσκελετό του DNA. Τα κύρια δομικά μοτίβα στο μόριο των μεταγραφικών παραγόντων, μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με το DNA, είναι τέσσερα: (α) έλικα-στροφή-έλικα (helix-turn-helix), (β) «δάκτυλα» ψευδαργύρου (zinc fingers), (γ) «φερμουάρ» λευκίνης (leucine zipper) και (δ) έλικα-βρόχος-έλικα (helix-loop-helix). Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται σε ειδικές θέσεις του DNA των γονιδίων, που ονομάζονται υποκινητές και ενισχυτές. Συνήθως ασκούν τη δράση τους μέσω σχηματισμού συμπλόκων με άλλες πρωτεΐνες της μεταγ-

ραφικής μηχανής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούν διακριτές επιφάνειες του μορίου τους, γνωστές ως περιοχές ενεργοποίησης ή καταστολής. Οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες λειτουργούν ως ομο- ή ετεροδιμερή. Η εξαιρετικά ποικιλόμορφη υπεροικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων περιλαμβάνει πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα ενεργών και ανενεργών μορφών και των οποίων η αλληλομετατροπή μπορεί να επάγεται τόσο από εξωκυττάρια (μεταβίβαση από ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς) όσο και από ενδοκυττάρια μηνύματα. Υπάρχουν, για παράδειγμα, μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι αμέσως μετά τη σύνθεση τους οδηγούνται στον πυρήνα του κυττάρου, ενώ βρίσκονται ήδη στην ενεργό μορφή τους. Αντίθετα, άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες μεταφέρονται και παραμένουν στον πυρήνα σε αδρανή μορφή και ενεργοποιούνται μόνο με τη σύνδεσή τους με τα κατάλληλα προσδέματα (π.χ. οι θυρεοειδικές ορμόνες για τον αντίστοιχο υποδοχέα), που μεταφέρονται στον πυρήνα επίσης από το κυτταρόπλασμα. Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες οδηγούνται στον πυρήνα σε ενεργό ή ανενεργό μορφή και αδρανοποιούνται ή ενεργοποιούνται, αντίστοιχα, εκεί από ειδικά ένζυμα (κινάσες ή φωσφατάσες, οι οποίες οδηγούν σε ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια μηνύματα αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων). Τέλος, υπάρχουν μεταγραφικοί παράγοντες, των οποίων οι ενεργείς μορφές (που προκύπτουν ή όχι από προηγούμενη ενεργοποιητική ομοιοπολική τροποποίηση) μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μόνο ως απόκριση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν κεντρικό ρόλο κατά την ανάπτυξη ενός νέου οργανισμού, που αφορά στη δράση τους κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης. Οι ορμόνες, οι αυξητικοί παράγοντες και άλλα χημικά μηνύματα επιδρούν στην αύξηση, τη διαφοροποίηση και τις κυτταρικές λειτουργίες, ενεργοποιώντας τη γονιδιακή έκφραση μέσω της δραστηριοποίησης συγκεκριμένων βιολογικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων. Κατά την εμβρυογένεση, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, ενεργοποιούνται ομάδες μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. οικογένεια Pax), που επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για τη διαφοροποίηση και τη δημιουργία των διαφόρων ιστών του σώματος. Η παραγωγή, επομένως, των μεταγραφικών παραγόντων (των ειδικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ή στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης) πρέπει να είναι ποιοτικά και ποσοτικά σωστή. Οι παράγοντες, δηλαδή, αυτοί πρέπει να μη φέρουν λειτουργικές ανωμαλίες λόγω μεταλλάξεων και να συντίθενται σε κανονικές ποσότητες μέσα στο κύτταρο, ενώ ταυτόχρονα πρέπει να είναι χωροχρονικά ακριβής, δηλαδή να εκφράζονται στον κατάλληλο τύπο κυττάρου και στο σωστό χρόνο. Εκτροπές από τις παρα-

πάνω συνθήκες μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικά προβλήματα, που σχετίζονται με μορφολογικές και λειτουργικές ανωμαλίες των διαφόρων ιστών και οργάνων. Σημαντική οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων είναι η οικογένεια των ETS, που συμμετέχει σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές διαδικασίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

2.2 Η οικογένεια των ETS μεταγραφικών παραγόντων

Χαρακτηριστική για την ETS οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων είναι η περιοχή πρόσδεσης στο DNA, το ETS domain, μια εξελικτικά συντηρημένη περιοχή που εντοπίζεται στο άμινο ή καρβόξυλο-τελικό άκρο των πρωτεϊνών. Η περιοχή αποτελείται από 85 αμινοξέα, που σχηματίζουν 3 α-έλικες και 4β-πτυχωτές επιφάνειες, σχηματίζοντας μια δομή έλικας-στροφής-έλικας (Εικόνα 2). Η συγκεκριμένη δομή συμβάλλει στην αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών με την συναινετική αλληλουχία GGAA/T (ETS binding site, EBS) στο γένωμα, ενώ παράλληλα η πρόσδεση υποβοηθάται από πρόσθετα γειτονικά νουκλεοτίδια.



Εικόνα 2: Δομή του ETS domain.

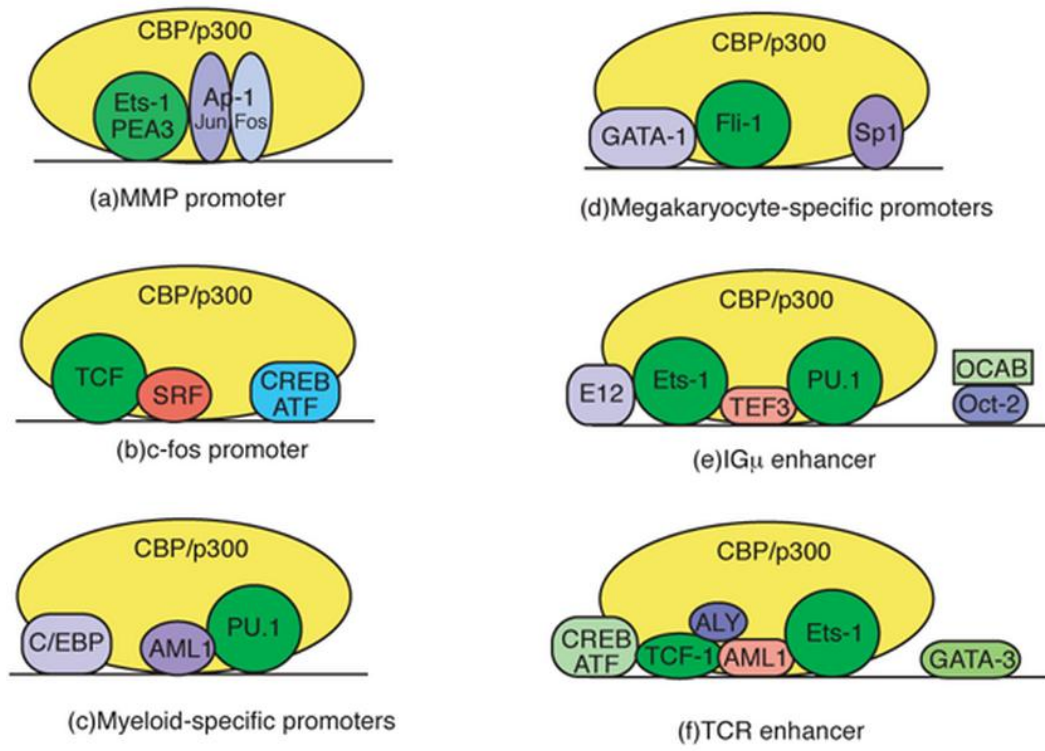
Το ETS domain είναι κοινό σε όλα τα μέλη της οικογένειας από το πρώτο, το v-ets, που ταυτοποιήθηκε αρχικά ως ένα συντηγμένο gag-myb-ets ογκογονίδιο του ρετροϊού E26 στα κοτόπουλα και προκαλούσε ερυθροβλαστική και μυελοβλαστική λευχαιμία, το

πρώτο κυτταρικό ομολόγου του, το Ets1 {Leprince, 1983 #96; Nunn, 1983 #116} και τουλάχιστον άλλων εικοσιεννέα μελών αυτής της οικογένειας που έχουν εντοπιστεί στα θηλαστικά (Εικόνα 3). Ets γονίδια έχουν χαρακτηριστεί σε διάφορα είδη του ζωικού βασιλείου από τον σπόγγο μέχρι τον άνθρωπο. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας των ETS ενεργοποιούνται από το RAS/MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι.

| Subfamily | Mammalian family members | Invertebrate orthologs |
|-----------|-------------------------------------------|------------------------|
| ELF | ELF1, ELF2 (NERF), ELF4 (MEF) | |
| ELG | GABPα | ELG |
| ERG | ERG, FLI1, FEV | |
| ERF | ERF (PE2), ETV3 (PE1) | |
| ESE | ELF3 (ESE1/ESX), ELF5 (ESE2), ESE3 (EHF) | |
| ETS | ETS1, ETS2 | POINTED |
| PDEF | SPDEF (PDEF/PSE) | |
| PEA3 | ETV4 (PEA3/E1AF), ETV5 (ERM), ETV1 (ER81) | |
| ER71 | ETV2 (ER71) | |
| SPI | SPI1 (PU.1), SPIB, SPIC | |
| TCF | ELK1, ELK4 (SAP1), ELK3 (NET/SAP2) | LIN |
| TEL | ETV6 (TEL), ETV7 (TEL2) | YAN |

Εικόνα 3: Μέλη της οικογένειας των ETS μεταγραφικών παραγόντων.

Οι ETS μεταγραφικοί παράγοντες (Εικόνα) τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά. Οι τροποποιήσεις αυτές ρυθμίζουν με διάφορους τρόπους τη δράση τους, αλλάζουν τη ενδοκυτταρική τους θέση, επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή τους με άλλες πρωτεΐνες, ή ακόμα και με το DNA και μεταβάλλουν τη μεταγραφική τους δράση ή την πρωτεϊνική τους σταθερότητα. Ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 4) και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση.



Εικόνα 4: Αλληλεπιδράσεις των ETS μεταγραφικών παραγόντων με διάφορους εκκινητές και ενισχυτές.

Ιικές ενθέσεις ή χρωμοσωμικές μετατοπίσεις οδηγούν σε απορύθμιση της έκφρασης των ETS ή ακόμη και στη δημιουργία χιμερικών πρωτεϊνών τους και συνδέονται με καρκίνο των κυττάρων του αίματος και διαφόρων τύπων συμπαγών όγκων. Ιδιαίτερο μέλος της οικογένειας των ETS μεταγραφικών παραγόντων είναι ο μεταγραφικός καταστολέας ERF.

2.3 Ο μεταγραφικός καταστολέας ERF

Ο μεταγραφικός παράγοντας ERF ανήκει στην οικογένεια των ETS γονιδίων. Εκτός από το ETS domain ο ERF δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, εκτός από την PE1/Mets και μαζί συνιστούν την ERF υποοικογένεια (Εικόνα 3). Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA εντοπίζεται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, στο κέντρο της εντοπίζεται το τμήμα που είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με την Erk κινάση και στο καρβοξυ-τελικό άκρο της βρίσκεται η περιοχή της μεταγραφικής καταστολής. Η συγκεκριμένη περιοχή δρα με αυτόνομο τρόπο από τη στιγμή που η σύντηξη της με περιοχές πρόσδεσης στο DNA μεταγραφικών ενεργοποιητών, όπως ο Ets1, ο NFκB και ο GAL4 διατηρεί την κατασταλτική της δράση. Επιπ-

ρόσθετα αποδεικνύεται πως η μεταγραφική του δράση εξαρτάται από την πρόσδεση του στο DNA, αφού κολοβές πρωτεΐνες στο αμινο-τελικό άκρο δεν μπορούν να καταστείλουν τη μεταγραφή, ενώ μεταλλαγμένες θέσεις πρόσδεσης στο DNA επίσης καταργούν τη δράση του ERF.

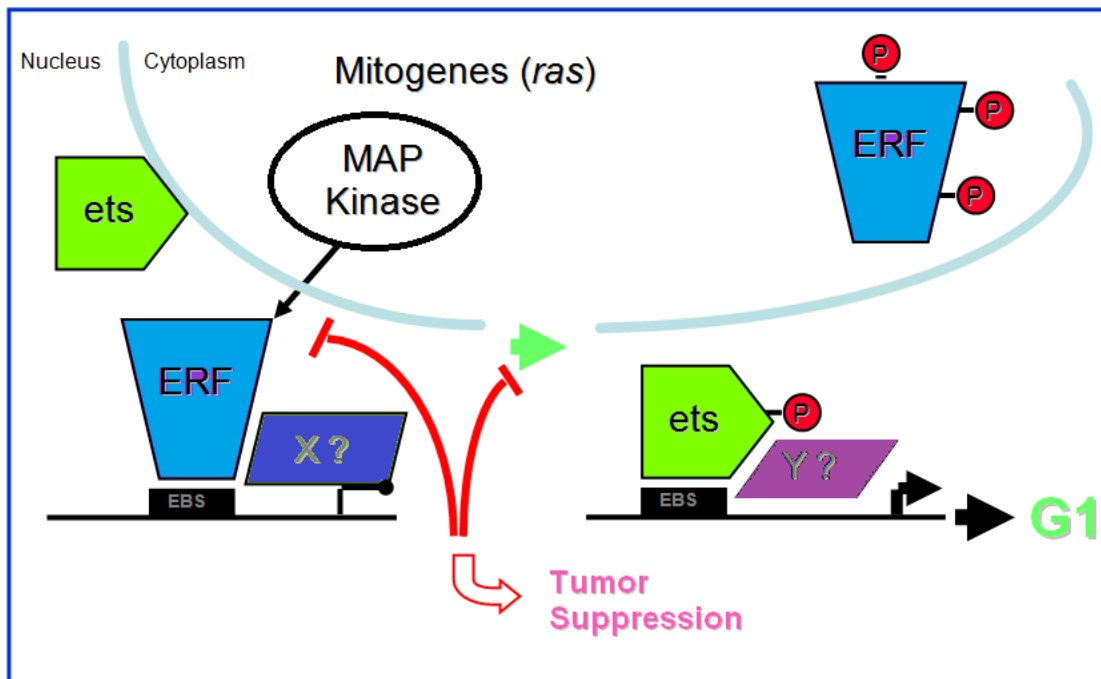
Το μέγεθος του ERF είναι 2.8 kb (mRNA) και κωδικοποιεί μία φωσφοπρωτεΐνη 80 kDa (Sgouras et al., 1995). Ο ERF εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα σε ένα μεγάλο εύρος ιστών, όπως νεφρά, εγκέφαλος, καρδιά, πνεύμονες, λεμφαδένες, ωοθήκη και όρχεις καθώς και σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Liu et al., 1997). Ακόμη ο ERF εκφράζεται παντού στο έμβryo καθόλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Έχουν απομονωθεί το ανθρώπινο και το ποντικίσιο γονίδιο του ERF τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία τόσο στην κωδική τους αλληλουχία (90%), όσο και σε πρωτεϊνικό (98%) επίπεδο. Μεγάλη ομολογία (91%) παρουσιάζουν επίσης και οι υποκινητές των δύο γονιδίων, που περιέχουν δυνητικές θέσεις πρόσδεσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι Sp1 και CREB/ATF. Το γονίδιο οργανώνεται όμοια και στα δύο είδη, αποτελείται από τέσσερα εξόνια από τα οποία το 2 και το 3 εξόνιο κωδικοποιούν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (ETS domain), ενώ το εξόνιο 4 περιέχει την περιοχή καταστολής της μεταγραφής (Liu et al., 1997). Ο ERF του ανθρώπου και του ποντικού παρουσιάζουν συντήρηση και στην χρωμοσωμική τους θέση εκτός της συντήρησης της δομής και της αλληλουχίας τους. Το γονίδιο του ERF στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q13.1, ενώ στον ποντικό στη συνταινιακή θέση κοντά στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 7. Τα δύο χρωμοσώματα έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό το γεγονός ότι συνδέονται με χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και τρισωμίες, που οδηγούν σε κακοήθειες του αιμοποιητικού ιστού καθώς και σε διάφορους συμπαγείς όγκους, όπως του μαστού και των πνευμόνων. Ο ERF πιθανόν να συνδέεται με αυτές τις κακοήθειες (Liu et al., 1997).

Ο ERF, ο YAN της Δροσόφιλας και οι NET και TEL, είναι οι μεταγραφικοί καταστολείς της οικογένειας των ETS η οποία μεσολαβεί μέσω ενός διακριτού domain καταστολής (Mavrothalassitis & Chysdael, 2000). Με πειράματα παροδικής επιμόλυνσης (transient transfection assays), έχει αποδειχθεί ότι ο ERF είναι ένας ισχυρός καταστολέας της μεταγραφής και η ικανότητα του αυτή εξαρτάται από την πρόσδεση του, μέσω του ETS domain στο DNA. Όταν η περιοχή καταστολής μεταφέρεται σε ετερόλογες θέσεις πρόσδεσης στο DNA, διατηρεί την κατασταλτική του ικανότητα. Όταν όμως το ETS domain απομακρύνεται, χάνεται η κατασταλτική του ενεργότητα (Sgouras et al.,

1995). Ο μοριακός μηχανισμός καταστολής του ERF όσο και τα γονίδια στόχοι δεν έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Ο ERF καταστέλλει την ETS εξαρτώμενη ογκογενετικότητα του πολυπεπτιδίου p135gag-myb-ets που κωδικοποιείται από τον ιό E26. Ο ιός E26 περιέχει το πρωτότυπο v-ets ογκογονίδιο και όταν συντήκεται με το v-myb επάγει ερυθρολευχαιμίες στα κοτόπουλα και προκαλεί το μετασχηματισμό των κυττάρων του ποντικού NIH3T3. Με τον τρόπο αυτό ο ERF παρουσιάζεται σαν ογκοκαταστολέας. Ο ERF καταστέλλει επίσης το μετασχηματισμό των NIH3T3 ινοβλαστών που επάγεται από τον ιό, κάτω από συνθήκες ανάπτυξης με χαμηλή συγκέντρωση ορού. Για την καταστολή του παραπάνω φαινοτύπου απαραίτητο είναι το ETS domain του ERF (Sgouras et al., 1995). Όπως αναφέρθηκε, χιμαιρικές πρωτεΐνες που σχηματίζονται ανάμεσα στο N- τελικό άκρο του γονιδίου EWS και το ETS domain διαφόρων ETS πρωτεϊνών έχουν ανιχνευτεί σε διάφορους όγκους στον άνθρωπο. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι και η χρωμοσωμική μετατόπιση που οδηγεί στη σύντηξη του EWS με το ETS domain του FLI1. Η χιμαιρική πρωτεΐνη που αποτελείται από το ETS domain του FLI1 και το domain καταστολής του ERF καταστέλλει την μεταγραφική ενεργοποίηση δυνητικών γονιδίων στόχων της ογκοπρωτεΐνης EWS-FLI1, όπως επίσης καταστέλλει και τον μετασχηματισμό των κυττάρων που προκαλούνται από το EWS- FLI1 (Athanasίου et al., 2000). Ο ERF όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των ETS πρωτεϊνών ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση από το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK σε απόκριση μιτογόνων ερεθισμάτων και ερεθισμάτων παύσης.

Επικεντρώνοντας στον ERF, αυτός αλληλεπιδρά με την ERK και φωσφορυλιώνεται από αυτή σε πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης και θρεονίνης. Η περιοχή αλληλεπίδρασης του ERF με την ERK εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 316 και 416 του μορίου της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα κατεγράφησαν τόσο in vivo όσο και in vitro. Σε αντίθεση, μετά από ερεθίσματα stress ο ERF δεν φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες που ενεργοποιούνται από αυτά, όπως είναι οι JNKs και p38. Σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης βρέθηκε ότι ο ERF αλληλεπιδρά με την φωσφορυλιωμένη (ενεργή) καθώς και με τη μη φωσφορυλιωμένη (ανενεργή) ERK, γεγονός που επαληθεύτηκε και in vitro μετά από GST pull down πειράματα. Η φωσφορυλίωση του ERF δεν επηρεάζει την αλληλεπίδρασή του με την ERK. Αυτό αποδεικνύεται μέσα από μεταλλαγμένες μορφές του ERF (ERFm1-7) όπου οι θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης αντικαταστάθηκαν με αλανίνη, αλλά δεν έχασαν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ERK (Le Gallie et al., 1999). Η φωσφορυλίωση του ERF από την ERK ρυθμίζει την υποκυτταρική του

εντόπιση και επομένως την κατασταλτική του ικανότητα (Εικόνα 5). Με την ενεργοποίηση του, μέσω μιτογόνων ερεθισμάτων, ο ERF φωσφορυλιώνεται από την ERK και εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, ενώ απουσία μιτογόνων ερεθισμάτων ο ERF εντοπίζεται στον πυρήνα μη φωσφορυλιωμένος.



Εικόνα 5: Φωσφορυλίωση και ERF.

Οι μεταλλαγμένες μορφές του ERF (ERFm1-7) στις οποίες και οι 7 θέσεις φωσφορυλίωσης έχουν αντικατασταθεί με αλανίνη, είναι κατεξοχήν πυρηνικές ακόμα και μετά από ενεργοποίηση με μιτογόνα ερεθίσματα. Αυτό υποδηλώνει ότι η φωσφορυλίωση του ERF από την ERK είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της υποκυτταρικής του εντόπισης. Σε αντίθεση με το YAN το οποίο μετά την φωσφορυλίωση του από τη MAPK εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου αποικοδομείται μετά από ουβικιτινιλίωση, ο ERF παραμένει στο κυτταρόπλασμα και επανασυσσωρεύεται στον πυρήνα μετά από την απενεργοποίηση της ERK (Le Gallie et al., 1999). Σε προηγούμενα πειράματα στα οποία μελετήθηκε το στάδιο φωσφορυλίωσης του ERF κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, βρέθηκε ότι ο ERF είναι φωσφορυλιωμένος κατά τη μετάβαση στη G0/G1 φάση μετά από προσθήκη αυξητικών παραγόντων (Sgouras et al., 1995). Σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις ότι ο ERF παραμένει στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται, ενώ μετατοπίζεται στον πυρήνα μετά από την απομάκρυνση των μιτογόνων ερεθισμάτων. Αυτό υποδηλώνει ότι ο ERF μπορεί να έχει ένα διακριτό ρόλο στη ρύθμιση της μετάβασης στη G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου.

Οι μεταλλαγμένες μορφές του ERF (ERFm1-7, πυρηνικό ERF) έχουν ως αποτέλεσμα να σταματάνε τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1, σε αντίθεση με το αγρίου τύπου ERF. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο ERF μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που ενεργοποιούνται κατά την είσοδο στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (Le Gallic et al., 1999).

Αν και τα γονίδια στόχοι που ρυθμίζονται από το ERF είναι άγνωστα, στα υπομήφια θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν οι D κυκλίνες οι οποίες αποκρίνονται στην ενεργοποίηση από το RAS και έχουν EBS στους υποκινητές τους. Επίσης άλλα γονίδια τα οποία έχουν EBS και έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζονται από τους ETS μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τα c-myc, JunB, c-Fos, p21, p53 κ.α. θα μπορούσαν να είναι επίσης στους υπομήφιους στόχους του ERF. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η επαγόμενη από τον ERF παύση (arrest) του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 καταστέλλεται από την υπερέκφραση κυκλινών (Le Gallic et al., 2004). Επίσης βρέθηκε ότι ο ERF μπορεί να επηρεάσει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου κατά ένα Rb εξαρτώμενο τρόπο. Όταν αγρίου τύπου και μεταλλαγμένοι ινοβλάστες ποντικού (MEFs) για το Rb, διαμολύνονται με το αγρίου τύπου ή τις μεταλλαγμένες μορφές του ERF, τότε τα φυσιολογικά MEFs σταματάνε τον κυτταρικό κύκλο κατά την υπερέκφραση του πυρηνικού ERF, ενώ στα μεταλλαγμένα MEFs ο τελευταίος δεν έχει καμία επίδραση (Le Gallic et al., 2004). Ο αγρίου τύπου ERF όπως αναφέρθηκε, έχει την ικανότητα να αναστέλλει το μετασχηματισμό των κυττάρων που προκαλείται από το v-ets. Στις Ha-ras μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές όμως, ο ERF είναι υπερφωσφορυλιωμένος και συνεπώς εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτές τις σειρές ο ERF δεν επηρεάζει το μετασχηματισμό αυτών των κυττάρων. Αντίθετα όταν οι μεταλλαγμένες μορφές ERFm1-7 εισάγονται στα Ha-ras μετασχηματισμένα NIH3T3 κύτταρα μπορούν και καταστέλλουν το κυτταρικό μετασχηματισμό που προκαλείται από τον ενεργοποιημένο Ras. Η φωσφορυλίωση, δηλαδή, του ERF από το RAS/MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι, η απενεργοποίηση που έπεται και η έξοδος του από τον πυρήνα, μπορεί να αποτελούν λειτουργίες οι οποίες απαιτούνται για τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ογκογόνο ικανότητα του Ras (Le Gallic et al., 1999).

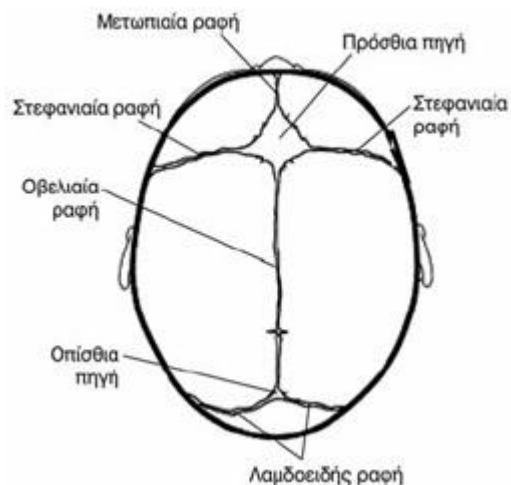
Ο ERF, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των ETS, έχει σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (nuclear localization signal, NLS) μέσα στο ETS domain. Αντίθετα δεν έχει σήμα εξόδου από τον πυρήνα (nuclear export signal). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η έξοδος του ERF από τον πυρήνα πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού CRM1.

Όταν κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους ή κύτταρα που επάγονται με αυξητικούς παράγοντες, επωάζονται με Leptomycin B, έναν αναστολέα ειδικό για το μηχανισμό CRM1, αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του φωσφορυλιωμένου ERF στον πυρήνα (Le Gallie et al., 2004).

Μέσα από loss of function μεταλλάξεις έχουν προκύψει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο των ETS μεταγραφικών παραγόντων σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, όπως αγγειογένεση, νευρογένεση, πλακουντογένεση, κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, απόπτωση και ογκογένεση. Η δημιουργία στο εργαστήριο ποντικών με έλλειψη του Etf παρείχε περαιτέρω στοιχεία για την *in vivo* δραστηριότητά του. Τα *etf*^{-/-} ποντίκια δεν είναι βιώσιμα πέρα από το στάδιο 10-10.5dpc της εμβρυικής ζωής, εξαιτίας σοβαρών προβλημάτων στην ανάπτυξη του πλακούντα. Συγκεκριμένα, στους πλακούντες των *Etf*^{-/-} εμβρύων παρατηρείται μία συμπαγής χοριακή στοιβάδα, αγενεσία του λαβυρίνθου, μία εκτεταμένη στοιβάδα γιγαντιαίων κυττάρων και μία μικρότερη σπογγώδης στοιβάδα (Papadaki, C., Verykokakis, Mavrothalassitis, G., et al., 2005). Παρατηρείται επίσης απουσία των μεταμιτωτικών κυττάρων του χορίου και των συγκυτιοκυττάρων, που αποτελούν τα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα του λαβυρίνθου. Αντίθετα, υπάρχει αυξημένη έκφραση γονιδίων-δεικτών των αρχέγονων τροφοβλαστικών κυττάρων που παραμένουν αδιαφοροποίητα. Επομένως, ο Etf φαίνεται ότι συμμετέχει στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων και την ανάπτυξη συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων που οδηγούν στην πλακουντογένεση. Μέσα από την έρευνα και τα στοιχεία που προέκυψαν για την δράση του ERF, προκύπτουν μια σειρά ερωτημάτων για τον βιολογικό του ρόλο σε έναν οργανισμό, στο σύνολο του. Σε συνδυασμό με τις πληροφορίες που προέκυψαν για τον ρόλο των ETS μεταγραφικών παραγόντων σε ένα πλήθος βιολογικών διεργασιών όπως η αγγειογένεση, η νευρογένεση, η πλακουντογένεση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η ογκογένεση, απομένει να ερευνηθεί η συμμετοχή του ERF σε κάθε μία από τις προαναφερόμενες διεργασίες.

3 ERF και κρανιοσυνοστέωση

Το εγκεφαλικό κρανίο χωρίζεται στην βάση, που αποτελείται από χονδρογενή οστά και τον θόλο που αποτελείται από υμενογενή πλατιά οστά: δύο μετωπιαία, δύο βρεγματικά και το ινιακό οστό. Κατά τη γέννηση τα οστά του κρανιακού θόλου χωρίζονται μεταξύ τους με σχισμές από συνδετικό ιστό πλάτους αρκετών χιλιοστών. Οι σχισμές αυτές ονομάζονται κρανιακές ραφές και είναι η μετωπιαία, η οβελιαία, η στεφανιαία και η λαμδοειδής (Εικόνα 6). Η σύγκλειση των κρανιακών ραφών συντελείται σε όλη σχεδόν την διάρκεια της ζωής με εξαίρεση την μετωπιαία ραφή η οποία κλείνει τους πρώτους τρεις με εννέα μήνες μετά την γέννηση. Η πρώιμη σύγκλειση μιας ή περισσοτέρων ραφών του κρανίου ονομάζεται *κρανιοσυνόστωση* ή *κρανιοσυνοστέωση* και προκαλεί κρανιακή δυσμορφία και πιθανά άλλες δυσλειτουργίες (Hunter, A.G.W. and Rudd, N.L. 1976., Hunter, A.G.W. and Rudd, N.L.1977., Lajeunie, et al.,1995., Lajeunie, et al.,1996).



Εικόνα 6: Ραφές του κρανίου.

3.1 Είδη κρανιοσυνόστωσης

Πρώτος ο R.Virchow το 1851 περιέγραψε λεπτομερώς την διαταραχή. Από τότε οι διάφορες μορφές της κρανιοσυνόστωσης έχουν μελετηθεί και ταξινομηθεί ωστόσο πολλά ερωτήματα που αφορούν την αιτιολογία και τις κλινικές επιπτώσεις της παθολογικής

αυτής κατάστασης παραμένουν αναπάντητα. Για το λόγο αυτό η κρανιοσυνόστωση συνεχίζει να αποτελεί μια διαγνωστική και θεραπευτική πρόκληση. Η πρώιμη συνοστέωση μπορεί να αφορά μία κρανιακή ραφή, οπότε ονομάζεται απλή κρανιοσυνόστωση, ή περισσότερες, οπότε ονομάζεται σύνθετη ή πολλαπλή. Μπορεί να εμφανίζεται σποραδικά σαν μεμονωμένο γεγονός (μη συνδρομική) ή να συνοδεύεται από πολλαπλές διαμαρτίες (συνδρομική). Στην περίπτωση όπου η πρώιμη σύγκλειση οφείλεται σε κάποιο πρωτοπαθές νόσημα όπως μικροκεφαλία ή υπερθυρεοειδισμό, χαρακτηρίζεται ως δευτεροπαθής.

Η συχνότητα της πρωτοπαθούς κρανιοσυνόστωσης είναι 1 στις 2000 γεννήσεις. Το 70-80% των περιπτώσεων της κρανιοσυνόστωσης ανήκουν στον τύπο της μη συνδρομικής, που περιλαμβάνει την μετωπιαία, την οβελιαία, την στεφανιαία και την λαμδοειδή κρανιοσυνόστωση (. Το 14% των περιπτώσεων ανήκει στην μετωπιαία κρανιοσυνόστωση με εμφάνιση τριγωνοκεφαλίας όπου στο μεγαλύτερο ποσοστό της (70%) εμφανίζεται μεμονωμένη. Αίτια της μετωπιαίας κρανιοσυνόστωσης είναι: η έκθεση σε βαλπροϊκό οξύ (αντιεπιληπτικό), η μετάλλαξη I300W στον FGFR1, η διαγραφή του χρωμοσώματος 11q24, τρισωμία ή διαγραφή του 9p και η διαγραφή του 7p. Η οβελιαία κρανιοσυνόστωση εμφανίζεται σαν σκαφοκεφαλία. Σε αυτήν ανήκει το μεγαλύτερο ποσοστό, της τάξης του 40-50%, των περιπτώσεων της μη συνδρομικής κρανιοσυνόστωσης. Αίτια της μπορεί να είναι: η πολύδυμη κύηση, το κάπνισμα της μητέρας καθώς και η αυξημένη ενδομήτρια πίεση. Επιπλέον, με γενετική ανάλυση έχει εντοπιστεί η μετάλλαξη A315T στον αναπτυξιακό παράγοντα των ινοβλαστών FGFR2. Η στεφανιαία κρανιοσυνόστωση αποτελεί το 20-30% των περιπτώσεων της μη συνδρομική κρανιοσυνόστωσης. Αίτια της είναι μεταλλαγές του A315S στον FGFR2 και στην EFNA4 ενώ παρουσιάζει κοινά μη γενετικά αίτια με αυτά της οβελιαίας κρανιοσυνόστωσης. Τέλος με το μικρότερο ποσοστό η λαμδοειδής κρανιοσυνόστωση εμφανίζει πλαγιοκεφαλία, ενώ δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία σχετικά με τα αίτια που την προκαλούν (*AOM Wilkie 1997*).

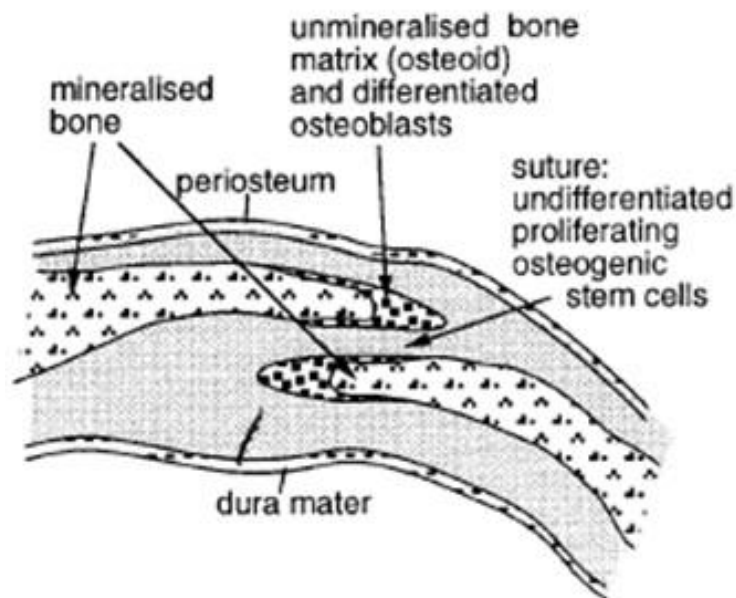
Στην συνδρομική κρανιοσυνόστωση ανήκει το 20-30% των περιπτώσεων της κρανιοσυνόστωσης. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί 150 περίπου σύνδρομα. Οι συνδρομικές μορφές σχετίζονται με μεντελικές χρωμοσωμικές αλλαγές, με χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως ο διπλασιασμός στο 13q21-q34, η διαγραφή στα 7p15-p21, 9p21-p24, 11q23-q25, 22q11 καθώς και η διαγραφή ή διπλασιασμός του 1p36. Μεταξύ των σπουδαιότερων συνδρόμων της κρανιοσυνόστωσης συγκαταλέγονται τα εξής: το σύνδρομο Muenke, το σύνδρομο Saethre-Chotzen, το σύνδρομο Crouzon το σύνδρομο Apert και

τέλος το σύνδρομο Pfeiffer (*Elanko N et al., 2001, Nathaniel H et al., 2011., Wilkie AO 1996*). Το σύνδρομο Muenke σχετίζεται με την σύγκλιση της στεφανιαίας ραφής. Η μετάλλαξη που χαρακτηρίζει το σύνδρομο είναι η P250R στον FGFR3 και δίνει την διαφορική διάγνωση της μη συνδρομικής κρανιοσυνόστωσης. Το Saethre-Chotzen σύνδρομο, εμφανίζεται με σύντηξη της μιας στεφανιαίας ραφής ή και των δύο, της οβελιαίας και πολλές φορές της μετωπιαίας ραφής όπου η πλειοψηφία των περιπτώσεων οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο TWIST1 (*Howard, T.D., Paznekas, W.A et al., 1997*). Το σύνδρομο Crouzon εμφανίζεται με δυστεφανιαία κρανιοσυνόστωση και συνδέεται με μεταλλάξεις στο FGFR2 (*Nathaniel H Robin et al 2011*). Το Apert σύνδρομο εμφανίζεται με χαρακτηριστικές μεταλλάξεις στο FGFR2 γονίδιο. Η μετάλλαξη S252W εντοπίζεται στο 71% των περιπτώσεων και η P253R στο 26% των περιπτώσεων. Τέλος το σύνδρομο Pfeiffer εμφανίζει χαρακτηριστικές μεταλλάξεις στο FGFR2 γονίδιο. Ωστόσο υπάρχει ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 5% που εμφανίζει μετάλλαξη στο FGFR1 γονίδιο. Συγκεντρωτικά τα γονίδια που σχετίζονται με την κρανιοσυνόστωση είναι: ρυθμιστικά μόρια σε επίπεδο DNA όπως ο TWIST και ο MSX2 (*EW Jabs et al, 1993*) υποδοχείς κίνησης τυροσίνης όπως οι FGFR1-3, υποδοχείς προσδετών όπως οι EFNB1 και EFNA4 (*AE Merrill, EG Bochukova, SM Brugger et al., 2006*) και τέλος ενδοκυτταρικοί μεταφορείς μεμβρανό-εξαρτώμενων πρωτεϊνών όπως ο RAB23 (*D Jenkins et al., 2007*).

3.2 Μορφολογία και ρόλος των ραφών.

Η ραφή είναι μια ινώδης σύνδεση στο κρανίο των σπονδυλωτών. Αποτελείται από τα δύο άκρα των πλατιών οστών που παρεμβάλλονται από ινώδη ιστό ο οποίος διαφοροποιείται από εμβρυικό μεσέγγυμα. Οι ραφές δεν είναι απλά αρθρώσεις, είναι τα βασικά σημεία της οστεογένεσης (*KL Rafferty et al., 1999*). Εκεί διαφοροποιούνται και πολλαπλασιάζονται τα πρόδρομα οστεοκύτταρα, τα οποία λειτουργούν ως οστεογεννητικά μέτωπα (Εικόνα 7). Στη εξωτερική πλευρά των οστών βρίσκεται το περίοστεο, μια ινοελαστική μεμβράνη που περιέχει πολλά αιμοφόρα αγγεία που τρέφουν το οστό. Στην εσωτερική πλευρά βρίσκεται η σκληρά μήνιγγα που διαχωρίζει τα οστά από τον εγκέφαλο. Η ραφή έχει πολλούς ρόλους, καταρχήν δρα ως μέτωπο ανάπτυξης των οστών, λειτουργεί ως άρθρωση που κρατά ενωμένα τα στοιχεία του κρανίου ενώ παράλληλα παρουσιάζει ανοχή σε παραμορφώσεις κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και τέλος αποτλεί μέσο απόσβεσης μηχανικών πιέσεων. Αυτό που καθορίζει την σωστή λειτουργία

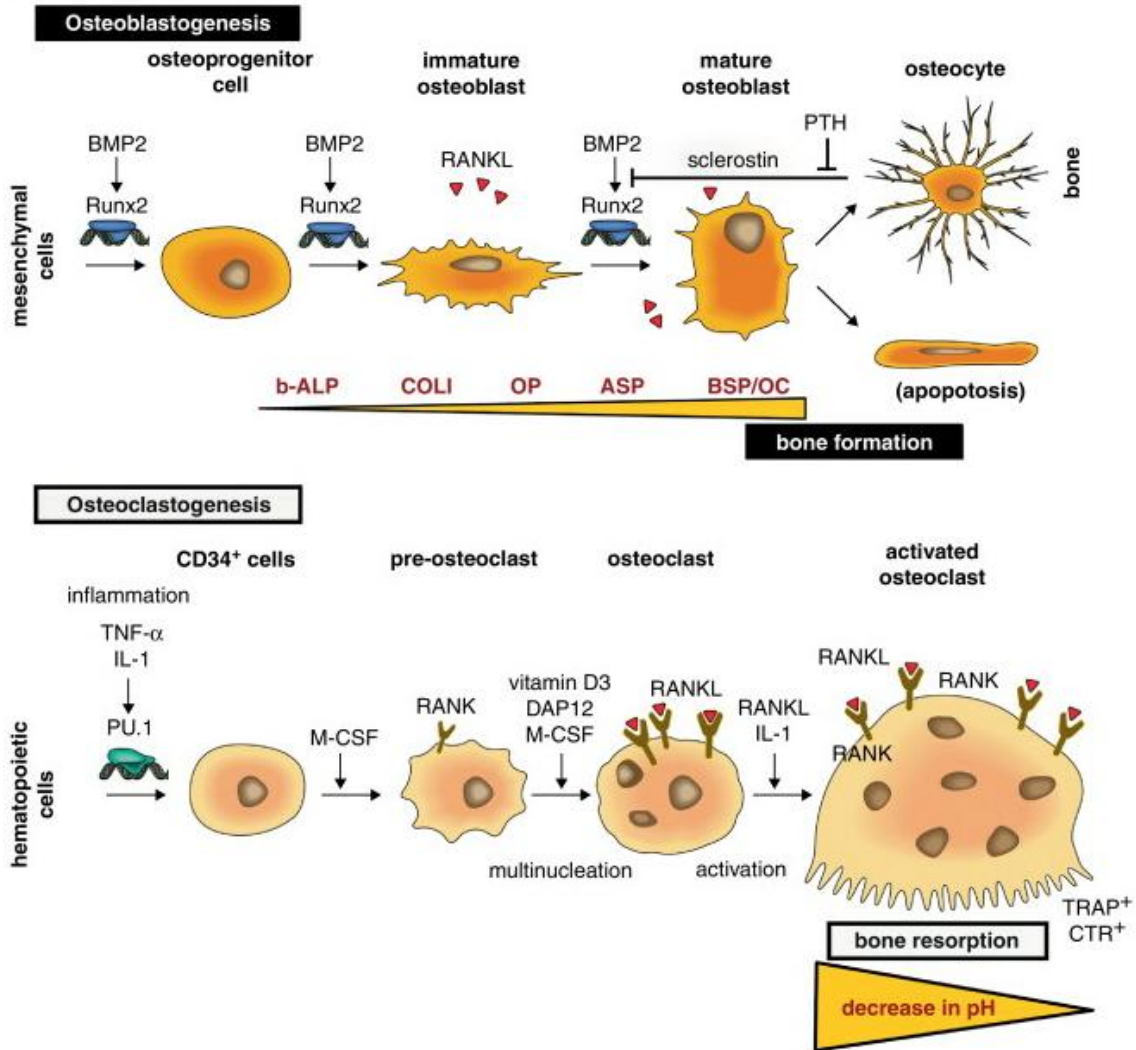
της ραφής είναι η ισορροπία μεταξύ της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των οστεογενετικών κυττάρων (LA Opperman et al., 2000). Σχετική έρευνα έχει δείξει ότι η μεταβολή της σηματοδότησης που επέρχεται μετά από αφαίρεση της σκληράς μήνιγγας, οδηγεί την ραφή σε πρόιμη σύντηξη (Levine JP, Bradley JP, Roth DA, McCarthy JG, Longaker MT 1998).



Εικόνα 7: Οστεογενετικά μέτωπα στη ραφή.

Η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Εικόνα 8) παίζει πρωταρχικό ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας της ραφής (C de Pollack, D Renieret al., 1996). Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία αυτή είναι οι: Runx2, Osterix και β-catenine (Toshihisa Komori 2006). Ο Runx2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που δρα σε πολλά στάδια της διαφοροποίησης. Αρχικά κατευθύνει πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα προς σκελετογενή χονδροκύτταρα ή οστεοβλάστες. Έπειτα ο Osterix και η β-catenine κατευθύνουν τα κύτταρα ‘χαμηλότερα’ στην οστεοβλαστική σειρά και ταυτόχρονα τα αποτρέπουν από το να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα. Ο Runx2 επίσης συμβάλλει στον περιορισμό της τελικής διαφοροποίησης των οστεοβλαστών σε οστεοκύτταρα, διατηρώντας έτσι τον πληθυσμό των ενεργών οστεοβλαστών σταθερό. Οι Wnts δεν είναι οι μόνοι αυξητικοί παράγοντες που έχουν ένα ρόλο κλειδί στην ανάπτυξη των οστεοβλαστών. Παράγοντες όπως οι: BMP, FGF, HH, TGFβ καθώς και αυξητικοί παράγοντες της ινσουλίνης, παρουσιάζονται ενεργοποιημένοι κατά την διαφοροποίηση. Η ανάπτυξη και η λειτουργία της ραφής περιλαμβάνει

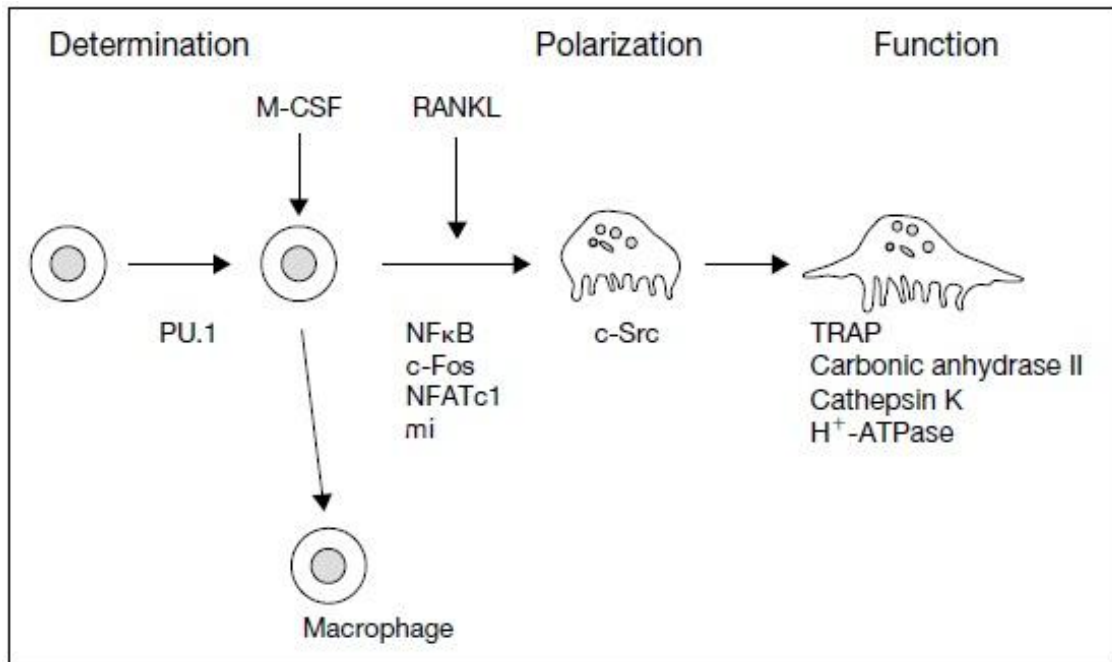
επίσης την αναδιαμόρφωση των οστών. Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την επαναρρόφιση των οστών είναι οι οστεοκλάστες.



Εικόνα 8: Διαφοροποίηση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών.

Υπάρχουν οστεοκλάστες μέσα στην ραφή όπου διατηρούν την ραφή ανοιχτή, αλλά η επαναρρόφιση λαμβάνει μέρος κυρίως στα αναπτυσσόμενα κρανιακά οστά. Οι οστεοκλάστες προέρχονται από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα (Tatsuo Suda et al., 1992). Ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1 είναι ο πρώτος που κατευθύνει τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα σε μακροφάγα της σειράς των οστεοκλαστών. Από εκεί οι εκκρινόμενοι, από τους οστεοβλάστες παράγοντες, M-CSF και RANKL καθώς και παράγοντες των κυττάρων του στρώματος μαζί με τους μεταγραφικούς παράγοντες NF κ B, c-Fos, NFATc1 και mi ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Εικόνα 9). Η λειτουργία των οστεοκλαστών περιλαμβάνομένης της διάλυσης των αλάτων και του

κολαγόνου ρυθμίζεται από τα ενζυμα TRAP, carbonic anhydrase II, H⁺-ATPase και cathepsin K.



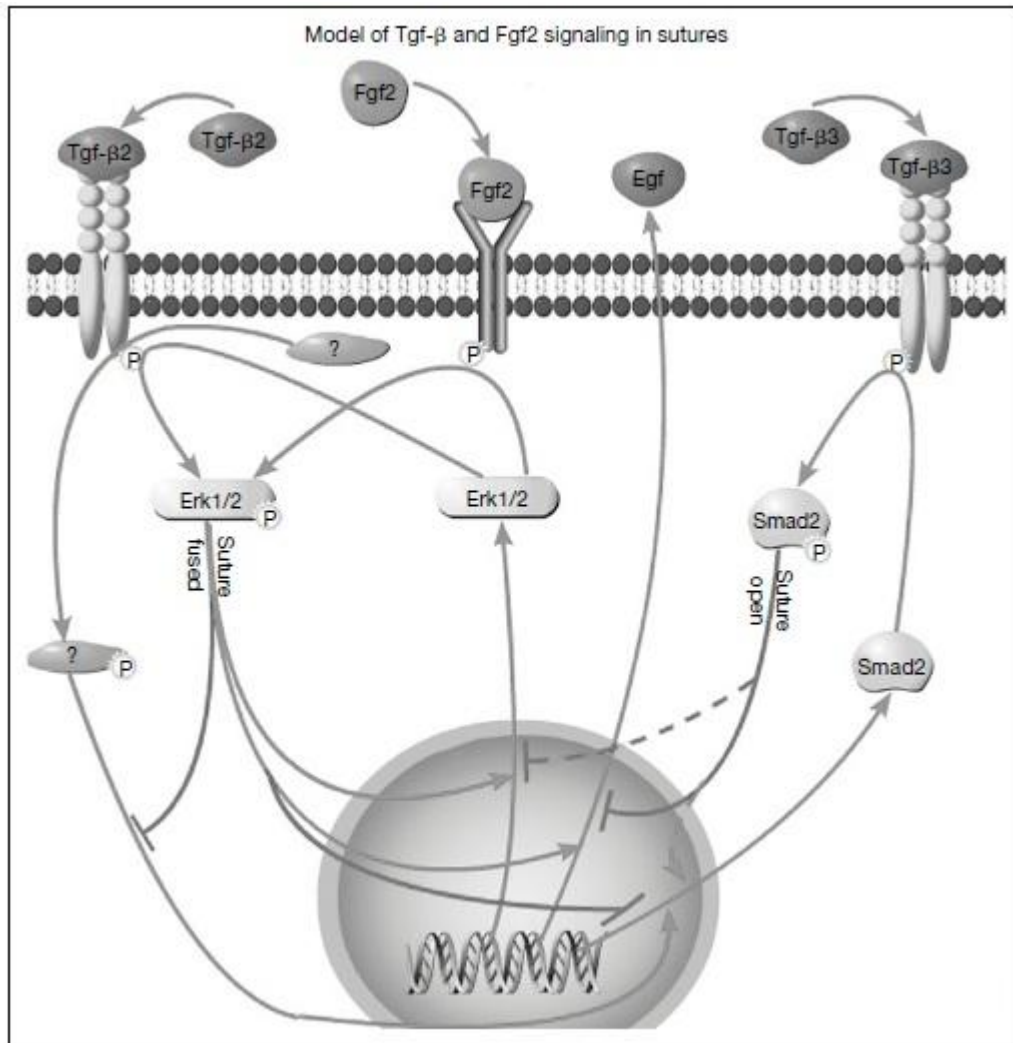
Εικόνα 9: Διαφοροποίηση των οστεοκλαστών.

Η σωστή επικοινωνία μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών είναι βασική για τον συντονισμό της ανάπτυξης και της αύξησης των οστών όπως και άλλες διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της διατήρησης της βατότητας της ραφής και της ομοιόστασης του ασβεστίου (*JM Pensler et al.,1997, E Filvaroff, et al.,1999, G Holmes et al.,2009*). Διαταραχές αυτής της ισορροπίας οδηγούν στην κρανιοσυνόστωση. Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε την σχέση μεταξύ των διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων, των αναπτυξιακών παραγόντων και των υποδοχέων τους έτσι ώστε να μας δοθεί η ικανότητα μοριακής παρέμβασης για τον περιορισμό της ανάγκης της χειρουργικής αποκατάστασης. Σε αυτό μας διευκολύνει το μοντέλο που περιγράφει δύο σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την διατήρηση των ραφών. Το μονοπάτι των FGFR (*HJ Kim et al.,1998*) και το μονοπάτι των Tgf-β (*LA Opperman et al.,1997*) είναι δύο καλά μελετημένα μονοπάτια που συνεργάζονται στην διατήρηση και λειτουργικότητα της ραφής (Εικόνα 10).

3.3 Ο ρόλος του ERF

Ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1 που επάγει την διαφοροποίηση της οστεοκλαστικής σειράς είναι ένας ETS μεταγραφικός παράγοντας. Οι ETS1 και ETS2 παίζουν σημαντι-

κό ρόλο στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών. Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον ETS2 εμφανίζουν πολλαπλές σκελετικές ανωμαλίες στο εγκεφαλικό κρανίο, στο προσωπικό κρανίο και στον αυχένα (Raouf, A. and Seth, A. *et al.*, 2000). Με τις διαδικασίες που εκτελέστηκαν και προτείνονται στη συνέχεια, έγινε μια απόπειρα διερεύνησης της σχέσης του καταστολέα ERF με την οστεογένεση. Ειδικότερα ενδιαφέρει ο έλεγχος του ρόλου του μεταγραφικού καταστολέα ERF στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών.



Εικόνα 10: Σηματοδοτικά μονοπάτια στις οστεογενετικές ραφές.

Η υλοποίηση της διαδικασίας διεξάγεται σε δύο διαφορετικά στάδια εκ των οποίων, το πρώτο υλοποιείται στην εργασία αυτή. Μια σειρά μεταλλάξεων του ERF, παλιών και νέων χρησιμοποιούνται για την δημιουργία ενός φάσματος έκφρασης και λειτουργικότητας της πρωτεΐνης. Από αυτές, οι νέες μεταλλάξεις είναι οι 194G>A R65Q και 256C>T R86C στα σημεία πρόσδεσης στο DNA, καθώς και η μετάλλαξη 1512delT

F504LfsX27 στη περιοχή καταστολής του γονιδίου. Για την πρόκληση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκε PCR site-directed mutagenesis με το QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit. Επίσης έλαβε χώρα μια σειρά διαδικασιών όπως η μεταφορά των μεταλλάξεων στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, πέψεις με συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η δημιουργία νέων ηλεκτροδεκτικών κυττάρων, η διαδικασία της αντίδρασης συνδετάσης για τα επιθυμητά τμήματα και διάφορες άλλες διαδικασίες απαραίτητες για την κατασκευή μιας σειράς από constructs για κάθε μετάλλαξη ξεχωριστά, με στόχο την διερεύνηση της λειτουργικότητας του ERF στις μεταλλάξεις. Η λειτουργικότητα του ERF έχει ελεγχθεί με την βοήθεια του Transfection των μεταλλάξεων σε HeLa κύτταρα ενώ, πραγματοποιήθηκε επίσης διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου, σύμφωνα με πρωτόκολλο του εργαστηρίου. Για τον έλεγχο της ενεργότητας του ERF χρησιμοποιήθηκε: ο PGL3 reporter vector basic, ο PGL3 reporter vector enhancer, ο GATA1 promoter του εργαστηρίου και ο RSV-Gal4 για τον έλεγχο της διαμόλυνσης. Επιπλέον ως τελικός πλασμιδιακός φορέας που φέρει τις μεταλλάξεις επιλέχθηκε ο psG424ERF, στον οποίο, το γονίδιο του ERF είναι συντηγμένο με τον Gal4, σε συνδυασμό με τον pGL3 basic UAS που εξασφαλίζει την πρόσδεση του προηγούμενου στη λουσιφεράση. Τέλος, μετά τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενεργότητας λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης ακολούθησε ταξινόμηση των μεταλλάξεων, ως προς το lose of function ή gain of function.

4 Υλικά και μεθόδοι

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται οι μέθοδοι ρουτίνας του εργαστηρίου που χρησιμοποιήθηκαν κατά την υλοποίηση της παρούσας εργασίας, καθώς και οι διαδικασίες που κρίνονται απαραίτητες για την επίτευξη των επιθυμητών μεταλλάξεων (διαδικασίες κλωνοποίησης).

4.1 Μέθοδοι ρουτίνας

4.1.1 Καθαρισμός του DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο.

Τεχνική καθαρισμού του DNA όπου προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου στο υδατικό διάλυμα που περιέχει το δείγμα. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση και φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό των φάσεων. Στη συνέχεια το DNA συγκεντρώνεται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Υλικά

Διάλυμα TE κορεσμένου σε φαινόλη

Μέθοδος

Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και χλωροφορμίου (1:1) σε δείγμα νουκλεονικών οξέων, μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρησης του 1.5ml. Ακολουθεί, ζωηρή ανάμιξη των συστατικών μέχρι να σχηματιστεί γαλάκτωμα. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 12.000XG για 15'' σε RT και απομακρύνεται η άνω φάση σε νέο σωλήνα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι η πρωτεΐνη να μην είναι ορατή σε καμία από τις φάσεις (οργανική και υδατική). Τέλος το DNA ανακτάται με κατακρήμνιση σε αιθανόλη.

4.1.2 Κατακρήμνιση με αιθανόλη

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο διαδεδομένη για την συμπύκνωση νουκλεϊκών οξέων καθώς είναι ταχεία και αποδοτική ακόμα και για μικρές ποσότητες DNA ή RNA (πικογραμμάρια).

Υλικά

Αιθανόλη 95%/0.12M οξικό Νάτριο, TE buffer (10mM Tris, pH 8.0 – 1mM EDTA).

Μέθοδος

Προστίθεται διάλυμα αιθανόλης/οξικού νατρίου 2.5-3 όγκων σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου 1.5 ml, όπου βρίσκεται το DNA, το δείγμα ανακινείται και τοποθετείται σε πάγο τουλάχιστο για 10 λεπτά. Για την ανάκτηση του DNA, ο σωλήνας φυγοκεντρείται στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4⁰C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πελέτα στεγνώνει αναποδογυρίζοντας το σωλήνα πάνω σε χαρτί. Στη συνέχεια η πελέτα του DNA ξεπλένεται με πιο αραιό διάλυμα αιθανόλης, 80% (περίπου δύο όγκοι αιθανόλης στο αρχικό δείγμα), επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά και φυγοκεντρείται ξανά για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πελέτα αφήνεται μέχρι να στεγνώσει. Το DNA επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό TE.

4.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Υλικά

1X TAE, ανάλογα με την πυκνότητα του πυκνώματος (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης σε διαφορετικές πυκνότητες.

| | 0.7% | 1.0% | 2.0% |
|---------------------|--------|--------|--------|
| Αγαρόζη | 0.2g | 0.3g | 0.6g |
| 20 X TAE | 1.5ml | 1.5ml | 1.5ml |
| dd H ₂ O | 28.5ml | 28.5ml | 28.5ml |
| EtBr(5 mg/ml) | 5μl | 5μl | 5μl |
| Final volume | 30ml | 30ml | 30ml |

Μέθοδος

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται για τον έλεγχο της προόδου της πέψης με ένζυμα περιορισμού, την μέτρηση της ποσότητας του DNA, της καθαρότητας του καθώς και για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι το DNA έχει ηλεκτρικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινείται προς τον θετικό πόλο όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την μετακίνηση του DNA είναι: α) το μέγεθος του DNA, τα γραμμικά μόρια μετακινούνται στο πήγμα αγαρόζης αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογαρίθμου του μεγέθους τους, β) η συγκέντρωση της αγαρόζης, η κινητικότητα του DNA σε σχέση με την συγκέντρωση της αγαρόζης δίνεται από τον τύπο:

$$\log_{\mu} = \log_{\mu 0} - K_{rt},$$

όπου μ είναι η κινητικότητα του DNA, μ_0 η ελεύθερη κινητικότητα του DNA, K_r ο συντελεστής καθυστέρησης και t η συγκέντρωση της αгарόζης, γ) η τάση του πεδίου, όπου ο καλύτερος διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται σε τάση $\leq 5\text{Volt/cm}$ και τέλος δ) η διαμόρφωση του DNA, μόρια ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης έχουν διαφορετική κινητικότητα, η κινητικότητα των μορίων κλειστού υπερελικωμένου κύκλου είναι μεγαλύτερη αυτής των μορίων ανοιχτού κύκλου που με την σειρά τους παρουσιάζουν υψηλότερη κινητικότητα από τα γραμμικά μόρια.

Το πήκτωμα αγαρόζης ετοιμάζεται σύμφωνα με την συνταγή (Πίνακας 1), θερμαίνοντας αρχικά την αγαρόζη με το νερό σε φούρνο μικροκυμάτων για 1-2 λεπτά μέχρι να διαλυθεί καλά, κρυώνοντας κάτω από τρεχούμενο νερό και στη συνέχεια προσθέτοντας 1.5 ml 20X TAE και το βρωμιούχο αιθίδιο. Έπειτα, τοποθετείται σε ειδική συσκευή για ηλεκτροφόρηση, με την χρήση του κατάλληλου διανομέα του δείγματος και αφήνεται να στερεοποιηθεί 10-20 λεπτά. Αφαιρούνται ο διανομέας του δείγματος και τα προστατευτικά που χρησιμοποιήθηκαν για το καλούπι του πηκτώματος και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα αγαρόζης. Προστίθεται το δείγμα του DNA αναμιγμένο με τουλάχιστον ένα δέκατο του όγκου 10X της ειδικής χρωστικής για το πήκτωμα της αγαρόζης. Ακολουθεί φόρτωση του πηκτώματος και η ηλεκτροφόρηση του για 20-40 λεπτά στα 50mA. Η οπτικοποίηση της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με την βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας και για την φωτογράφιση του πηκτώματος χρησιμοποιείται ειδική κάμερα.

4.1.4 Έκλυση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά

Φαινόλη, αιθανόλη 100%, αιθανόλη 70%, TE

Μέθοδος

Απομονώνεται το επιθυμητό τμήμα του DNA με την βοήθεια νυστεριού και στην συνέχεια κόβεται σε πολύ μικρά τμήματα. Το δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα φυγοκέντρου 1,5 ml και φυγοκεντρείται για 1' στις 13.000 στροφές (rpm). Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και αναδύεται σε Vortex για 30''. Έπειτα, τοποθετείται μέχρι να παγώσει στους -80°C ή σε ξηρό πάγο (για 30' ή 5' αντίστοιχα). Το δείγμα φυγοκεντρείται παγωμένο στις 13.000 στροφές για 20' σε θερμοκρασία δωματίου. Στο υπερκείμενο του δείγματος (όπου το DNA βρίσκεται σε υδατική φάση) προστίθεται ίσος όγκος φαινό-

λης/χλωροφόρμιου (PhOH/CHCl₃) με ένα δέκατο του όγκου οξικό νάτριο (CH₃COONa) 3M, pH 5.2. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 10' σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Στο υπερκείμενο προστίθενται δύο όγκοι (2V) αιθανόλης 100% και τοποθετείται στους -80⁰C ή σε ξηρό πάγο μέχρι να παγώσει. Στην συνέχεια ακολουθεί μια ακόμη φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10' στους 4⁰C. Τέλος μετά από το πλύσιμο της πελέτας με αιθανόλη 70% και την φυγοκέντρηση του δείγματος στις 13.000rpm για 5', γίνεται επαναδιάλυση του DNA σε 10-15ul TE.

4.1.5 Παρασκευή τρυβλίων με LB agar

Υλικά

Επαρκή ποσότητα dH₂O, 5.0 g τρυπτόνη, 2.5 g εκχύλισμα ζύμης, 5.0 g χλωριούχο νάτριο, 7.5 g άγαρ, αμπικιλίνη¹ (50mg διαλυμένα σε μικρή ποσότητα dH₂O).

Μέθοδος

Προσθέτονται 250 mL dH₂O σε ογκομετρικό κύλινδρο, ζυγίζονται 5.0 g τρυπτόνης, 2.5 g εκχύλισμα ζύμης, 5.0 g χλωριούχο νάτριο και 7.5 g άγαρ και ανακατεύονται μέχρι να διαλυθούν καλά. Το διάλυμα πληρώνεται με ποσότητα dH₂O μέχρι τον τελικό όγκο των 500 mL και μεταφέρεται σε φλάσκα του 1 L. Η φλάσκα, τοποθετείται σε θερμαινόμενη βάση με ανάδευση και αφήνεται να βράσει για ένα λεπτό. Έπειτα μεταφέρεται στο αυτόκαυστο και αποστειρώνεται για 20 λεπτά. Αφήνεται να κρυώσει στους 55⁰C (ο πάγκος εργασίας έχει καθαριστεί με χλωρίνη/EtOH). Τοποθετούνται τα τρυβλία Petri στον πάγκο και ρίχνεται μια λεπτή στοιβάδα (5 mm) LB άγαρ, περίπου 10 mL, σε κάθε πιάτο, προσέχοντας να μην ανοίξει υπερβολικά το καπάκι. Ανακινούνται τα τρυβλία με απαλές κυκλικές κινήσεις για την σωστή διανομή του άγαρ και αφήνονται να κρυώσουν, περίπου 20'. Στη συνέχεια αναποδογυρίζονται για να αποφευχθεί η υγρασία στο άγαρ και τέλος εισάγονται προς φύλαξη σε πλαστικές σακούλες στο ψυγείο αφού πρώτα έχει σημειωθεί το όνομα η ημερομηνία και το περιεχόμενο.

4.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, ώστε να επιλεχθούν οι κλώνοι των βακτηριακών κυττάρων που φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο

¹ Στην περίπτωση που χρειάζεται η προσθήκη αντιβιοτικού, αυτό προστίθεται στο LB άγαρ ακριβώς πριν εισαχθεί στα τρυβλία. Η συγκέντρωση της αμπικιλίνης είναι 100 ug/mL.

(θετικοί κλώνοι) ύστερα από δοκιμαστικές κατατμήσεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

Υλικά

Διάλυμα P1, διάλυμα P2, διάλυμα P3, RNase, διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου, οξικό Νάτριο, αιθανόλη 100%, αιθανόλη 70%, TE ή H₂O, εναλλακτικά ισοπροπανόλη.

Μέθοδος

Επιλέγεται αρχικά μοναδική αποικία από τρυβλίο petri και εμβολιάζεται σε σωλήνα που περιέχει 3-4ml διαλύματος LB με την σωστή ποσότητα αντιβιοτικού. Η καλλιέργεια επωάζεται ολονυκτίως στους 37⁰C με ανακίνηση. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε σωληνάρια φυγοκέντρησης (erpendorf) των 1,5ml και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 30''sec (το υπόλοιπο της καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4⁰C). Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η πελλέτα αφήνεται να στεγνώσει. Μόλις η πελλέτα στεγνώσει επαναδιαλύεται σε 200 ml P1² + RNase (0,1mg/ml). Στη συνέχεια προστίθενται 200ml διαλύματος P2³, και πραγματοποιείται γρήγορη και κοφτή ανάμιξη του δείγματος που παραμένει σε RT για 4' min. Ακολουθεί προσθήκη 200ml παγωμένου διαλύματος P3⁴ και παραμονή του δείγματος σε πάγο για 5' min. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε RT για 10' min στις 13.000rpm και μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέο erpendorf. Στο διάλυμα προστίθεται ίσος όγκος (~400μl) διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου και μετά από ισχυρή ανάδευση του δείγματος, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5-10' στις 13.000rpm. Την μεταφορά της υπερκείμενης φάσης σε νέο erpendorf, ακολουθεί η πρόσθεση οξικού Νατρίου 1/10 και 2 όγκων 100% αιθανόλης⁵. Το νέο δείγμα τοποθετείται στους -80⁰C Αφού παγώσει (περίπου 20'), φυγοκεντρείται στους 4⁰C για 20' και

² Περιέχει Tris που είναι ρυθμιστικό διάλυμα και ρυθμίζει το pH του DNA και EDTA που απενεργοποιεί μεταλόνζυμα καθώς ενώνεται μαζί τους και καταστέλλεται η καταστροφή του DNA και των πρωτεϊνών. Η γλυκόζη διατηρεί ισοτονικό το περιβάλλον προστατεύοντας τα σφαιροπλαστίδια από το να λυθούν. Η λυσοζύμη σπάει τους γλυκοσιδικούς δεσμούς στον πολυσακχαριτιδικό σκελετό των πεπτογλυκανών, άρα των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων.

³ Περιέχει καυστικό Νάτριο και SDS, απορρυπαντικό, που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία οπών στις κυτταρικές μεμβράνες.

⁴ Διάλυμα εξουδετέρωσης, που περιέχει ενώσεις όπως το οξικό οξύ, οξικό κάλιο, κ.α που σταματούν, εξουδετερώνουν, την δράση του P2 διαλύματος.

⁵ Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ισοπροπανόλη αντί για το οξικό Νάτριο και την αιθανόλη 100% (0,8V και αφήνεται σε RT για 10' ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000rpm σε RT).

στις 13.000rpm. Ακολουθεί το πλύσιμο της πελλέτας με αιθανόλη 70% και μία ακόμη φυγοκέντρηση στους 4⁰C για 5΄στις 13.000rpm τέλος η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 30-50μl TE ή H₂O.

4.1.7 Απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA

Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση του kit της Qiagen και αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης DNA σε μεγάλη κλίμακα προσαρμοσμένη σε μικρούς όγκους καλλιέργειας.

Υλικά

Διαλύματα P1, P2 και P3. Διάλυμα εξισορρόπησης QBT ,διάλυμα QC για τις πλύσεις, διάλυμα QF για την έκλυση.

Μέθοδος

Επιλέγεται αρχικά μοναδική αποικία από τρυβλίο petri και εμβολιάζεται σε 2-5ml διαλύματος LB που περιέχει την σωστή ποσότητα αντιβιοτικού. Επώαζεται για 8h στους 37⁰C με ανακίνηση στις 300rpm. Αραιώνεται η καλλιέργεια από 1/500 έως 1/1000 σε διάλυμα 3ml LB με αντιβιοτικό επιλογής, επώαζεται στους 37⁰C για 12-16h με ανακίνηση στις 300rpm. Η φλάσκα που χρησιμοποιείται για την επώαση πρέπει να είναι 4 φορές μεγαλύτερη από την ποσότητα της καλλιέργειας. Συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 6000xg για 15΄στους 4⁰C. Επαναδιάλυση της βακτηριακής πελλέτας σε 0.3ml διαλύματος P1 (στο διάλυμα έχει προστεθεί RNase κατάλληλης ποσότητας).Πρόσθεση 0.3ml διαλύματος P2 καλή ανάμιξη με έντονη αναστροφή και επώαση σε RT για 5΄. Ένα μπλέ χρώμα θα εμφανιστεί (μετά την πρόσθεση στο P1 διάλυμα του αντιδραστηρίου Lyseblue ,που εξασφαλίζει τον οπτικό έλεγχο της αποδοτικής λύσης των κυττάρων, της ατελούς καθίζησης του SDS, του γονιδιωματικού DNA και κυτταρικών υπολειμμάτων). Πρόσθεση 0.3ml παγωμένου διαλύματος P3, άμεση ανάμιξη με έντονη ανακίνηση 4 -6 φορές και επώαση στον πάγο για 5΄, το μίγμα που προκύπτει είναι νεφελώδες και το μπλέ χρώμα εξαφανίζεται. Το δείγμα φυγοκεντρείται στη μέγιστη ταχύτητα (13000rpm) για 10΄.Αφαίρεση του υπερκείμενου που περιέχει το πλασμιδιακό DNA. Εξισορρόπηση των ειδικών QIAGEN-tip 20 (ειδικές κολώνες) που περιέχονται στη συσκευασία, με 1ml διαλύματος QBT που αφήνεται να τρέξει από την κολώνα με την βοήθεια της βαρύτητας και μόνο. Άμεσα μετά τη φυγοκέντρηση προστίθεται στην κολώνα της QIAGEN το DNA και αφήνεται να τρέξει αβίαστα. Πλένεται το QIAGEN-tip 20, με 2X2ml διαλύματος QC. Εκλύεται το DNA από την κολώνα με

0.8ml διαλύματος QF, κατακρημνίζεται το DNA με την βοήθεια ισοπροπανόλης 0.7V σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρείται για 30' στις 10000rpm και αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο. Πλένεται η πελλέτα του DNA με 1ml αιθανόλης 70% σε RT και φυγοκεντρείται στη συνέχεια στις 10000rpm για 10', αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο, στέγνωμα της πελλέτας για 5-10' και επαναδιάλυση της σε κατάλληλης ποσότητας διάλυμα TE.

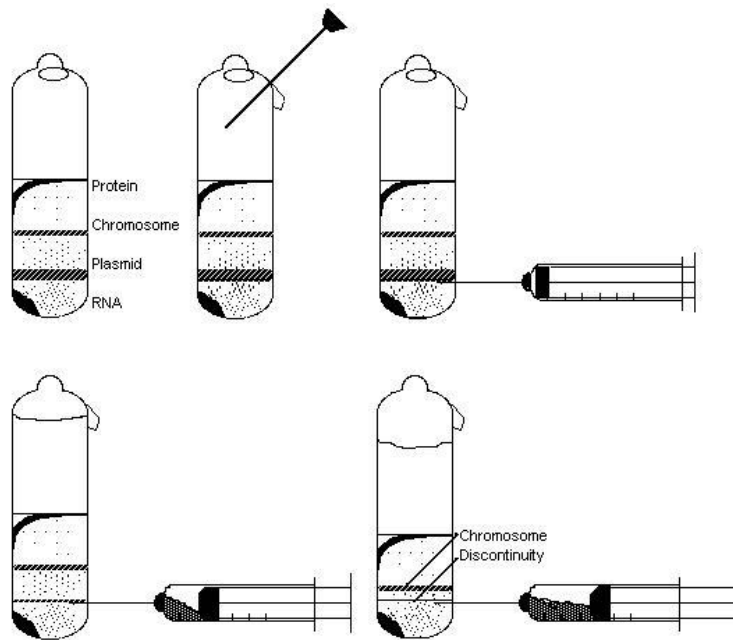
4.1.8 Απομόνωση δίκλωνου DNA σε μεγάλη κλίμακα.

Υλικά

Διάλυμα P1 (25% sucrose, 50 mM Tris*HCL pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0), διάλυμα P2 (0.1% Triton X-100, 50 mM Tris*HCL pH 8.0, 60 mM EDTA pH 8.0), διάλυμα P3 (30% polyethelyne glycol (PEG f.wt.8000), 1.5 M NaCl), διάλυμα λυσοζύμης (10mg/ml σε 10mM Tris pH 8.0), διάλυμα TE.

Μέθοδος

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομόνωση 0.5- 1.5mg DNA. Φυγοκεντρείται ολονύκτια καλλιέργεια 200ml στις 5000rpm για 10'. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται η πελλέτα σε 5ml διαλύματος P1. Προστίθενται 0.5 ml φρέσκου διαλύματος λυσοζύμης. Πρόσθεση 10 ml διαλύματος P2 απαλή ανάδευση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5' το μέγιστο. Πρόσθεση 7.5ml παγωμένου διαλύματος P3, απαλή ανάδευση και επώαση στον πάγο για 10'. Φυγοκέντρηση στους 4⁰C για 15' στις 10.000rpm. Φιλτράρισμα του υπερκειμένου (με την βοήθεια υαλοβάμβακα και ενός μικρού χωνιού μέσα σε falcon των 50ml) και προσθήκη 0.6V ισοπροπανόλης, καλή ανάδευση και διατήρηση σε RT για 10'. Ανάκτηση των νουκλεονικών οξέων με φυγοκέντρηση στις 2.000rpm για 10' σε RT. Προσεκτικά απορρίπτεται το υπερκείμενο και αναστρέφεται το σωληνάριο για να στεγνώσουν και οι τελευταίες σταγόνες. Επαναδιάλυση της πελλέτας σε 10ml TE, για κάθε ml TE προστίθεται ακριβώς και 1 gr στερεού χλωριούχου καισίου (CsCl) . Προσθήκη 300ul διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr, 10mg/ml) σε σωληνάρια φυγοκέντρου των 12ml, με την βοήθεια σύριγγας των 5-10ml και βελόνας των 20G. Πρόσθεση του διαλύματος DNA/CsCl, σφράγισμα των σωληναρίων με το ειδικό μηχάνημα και τοποθέτηση των σωληναρίων στην υπερφυγόκεντρο με κεφαλή Ti80 στις 45.000rpm για 40h στους 20⁰C. Ανάκτηση της ζώνης του υπερελικωμένου DNA με την βοήθεια σύριγγας του 1ml με βελόνα 19-20G (Εικόνα Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ανάκτηση του υπερελικωμένου DNA στη μέθοδο του χλωριούχου καίσου.

Στο διάλυμα του DNA προστίθεται ισοπροπανόλη κορεσμένη σε χλωριούχο καίσιο, σε τελικό όγκο 1.5ml. Ανάμιξη με ανακίνηση, αρκετές φορές και παραμονή έως τον διαχωρισμό των φάσεων, απόρριψη της άνω φάσης. Επανάληψη της διαδικασίας 4-6 φορές έως ότου το ρόζ χρώμα εξαφανιστεί τόσο από την υδατική όσο και από την οργανική φάση. Προσθήκη 70% αιθανόλης σε ολικό όγκο 1.5 ml. Φύλαξη στους -80°C έως ότου το διάλυμα του DNA να παγώσει εντελώς. Αφήνεται να ξεπαγώσει σε RT και αναδεύεται μερικές φορές, φυγοκέντρηση για 10', απόρριψη του υπερκείμενου και πλύσιμο της πελλέτας άλλες δύο φορές με 70% αιθανόλη. Στέγνωμα της πελλέτας και επαναδιάλυση σε διάλυμα TE κατάλληλου όγκου (~150ml).

4.1.9 Απομόνωση μεγάλης κλίμακας πλασμιδιακού DNA

Με την χρήση του kit της Qiagen, η μέθοδος στηρίζεται στην ειδική δέσμευση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας στήλη εφοδιασμένη με το κατάλληλο υλικό και στη συνέχεια έκλυση του DNA από τη στήλη.

Υλικά

Καλλιέργεια 500ml, όταν το πλασμίδιο είναι υψηλής αντιγραφής και καλλιέργεια 2.5 L όταν το πλασμίδιο είναι χαμηλής αντιγραφής. Διαλύματα P1, P2 και P3. Διάλυμα εξισορρόπησης QBT, διάλυμα QC για τις πλύσεις, διάλυμα QF για την έκλυση.

Μέθοδος

Επιλέγεται αρχικά μοναδική αποικία από τρυβλίο petri και εμβολιάζεται σε 5-10ml διαλύματος LB που περιέχει την σωστή ποσότητα αντιβιοτικού. Επώαζεται για 8h στους 37⁰C με ανακίνηση στις 300rpm. Αραιώνεται η καλλιέργεια από 1/500 έως 1/1000 σε διάλυμα LB με αντιβιοτικό επιλογής (στα 500ml LB, 500-1000ul της αρχικής καλλιέργειας όταν το πλασμίδιο είναι υψηλής αντιγραφής και στα 2.5L LB, 2.5-5ml της αρχικής καλλιέργειας όταν το πλασμίδιο είναι χαμηλής αντιγραφής), επώαζεται στους 37⁰C για 12-16h με ανακίνηση στις 300rpm. Η φιάσκα που χρησιμοποιείται για την επώαση πρέπει να είναι 4 φορές μεγαλύτερη από την ποσότητα της καλλιέργειας. Συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 6000xg για 15' στους 4⁰C. Επαναδιάλυση της βακτηριακής πελλέτας σε 50ml ή στα 125ml διαλύματος P1 (στο διάλυμα έχει προστεθεί RNase κατάλληλης ποσότητας). Πρόσθεση 50ml ή 125ml διαλύματος P2 καλή ανάμιξη με έντονη αναστροφή και επώαση σε RT για 5'. Ένα μπλέ χρώμα θα εμφανιστεί (μετά την πρόσθεση στο P1 διάλυμα του αντιδραστηρίου Lyseblue ,που εξασφαλίζει τον οπτικό έλεγχο της αποδοτικής λύσης των κυττάρων, της ατελούς καθίζησης του SDS, του γονιδιωματικού DNA και κυτταρικών υπολειμμάτων). Πρόσθεση 50ml ή 125ml παγωμένου διαλύματος P3, άμεση ανάμιξη με έντονη ανακίνηση 4 -6 φορές και επώαση στον πάγο για 30', το μίγμα που προκύπτει είναι νεφελώδες και το μπλέ χρώμα εξαφανίζεται. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 20.000xg για 30' στους 4⁰C. Αφαίρεση του υπερκείμενου που περιέχει το πλασμιδιακό DNA. Φυγοκέντρηση του υπερκείμενου στις 20.000xg για 15' στους 4⁰C, αφαίρεση του υπερκείμενου που περιέχει το πλασμιδιακό DNA. Εξισορρόπηση των ειδικών QIAGEN-tip 2500 ή QIAGEN-tip 10000 (ειδικές κολώνες) που περιέχονται στη συσκευασία, με 35ml ή 75ml διαλύματος QBT που αφήνεται να τρέξει από την κολώνα με την βοήθεια της βαρύτητας και μόνο. Αμεσα μετά τη φυγοκέντρηση προστίθεται στην κολώνα της QIAGEN το DNA και αφήνεται να τρέξει αβίαστα. Πλένεται το QIAGEN-tip 2500 ή QIAGEN-tip 10000, με 200ml ή 600ml διαλύματος QC. Εκλούεται το DNA από την κολώνα με 35ml ή 100ml διαλύματος QF, κατακρημνίζεται το DNA με την βοήθεια ισοπροπανόλης 24.5ml ή 70 ml σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρείται για 30' στους 4⁰C στις 15000xg και αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο. Πλένεται η πελλέτα του DNA με 7ml ή 10ml αιθανόλης 70% σε RT και φυγοκεντρείται στη συνέχεια στις 15000xg για 10', αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο, στέγνωμα της πελλέτας για 10-20' και επαναδιάλυση της σε κατάλληλης ποσότητας διάλυμα TE.

4.2 Διαδικασίες κλωνοποίησης

4.2.1 Προετοιμασία E.coli ηλεκτροδεκτικών κυττάρων

Η προετοιμασία των κυττάρων της E.coli είναι απαραίτητη διαδικασία προκειμένου να γίνουν δεκτικά στην πρόσληψη εξωγενούς DNA. Η προετοιμασία περιλαμβάνει είτε την κατεργασία των κυττάρων με δισθενή ιόντα (ασβέστιο ή ρουβίδιο), που ονομάζεται χημικός μετασχηματισμός, είτε στην έκθεση τους σε ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο που οδηγεί στον παροδικό σχηματισμό καναλιών στην κυτταρική μεμβράνη, που ονομάζεται ηλεκτροδιάτρηση.

Υλικά

Στελέχη της E.coli, DH5a, Dh10b, κ.α, τρυβλία με LB* (LB με λιγότερο αλάτι), αποιονισμένο αποστειρωμένο H₂O, γλυκερόλη 10%.

Μέθοδος

Η διαδικασία καλό είναι να πραγματοποιείται στους 4⁰C, με όλα τα υλικά σε πάγο. Καλλιέργεια DH5a κυττάρων σε τρυβλία LB⁶ με αμπικιλίνη. Απομόνωση μιας μόνο αποικίας σε 2ml LB για 3-4 ώρες, μεταφορά της καλλιέργειας σε φλάσκα των 200 με 50ml LB, για μία νύχτα O/N στους 37⁰C με ανακίνηση στις 250rpm. (Στην περίπτωση που τα στελέχη βρίσκονται σε stub στους -80⁰C η καλλιέργεια πραγματοποιείται απευθείας στα 50ml LB). Μεταφορά σε φλάσκα των 2L με 500ml LB*, 2-3ml της καλλιέργειας, στους 37⁰C με ανακίνηση στις 250rpm. Αφήνεται εωσότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm (OD₆₀₀) της καλλιέργειας να φτάσει στο 0.65. Τοποθετείται η καλλιέργεια σε πάγο για 15-30 λεπτά με ανακίνηση. Φυγοκέντρηση του δείγματος στους 4⁰C στις 4000rpm για 15' στη Sorval (σε φιάλες φυγοκέντρησης των 500ml), αφαίρεση του υπερκείμενου, επαναδιάλυση της πελλέτας (απαλά με την βοήθεια της πιπέτας)σε 500ml παγωμένο αποιονισμένο διασπασταγμένο νερό (npddH₂O), φυγοκέντρηση στους 4⁰C στις 4000rpm για 15' στη Sorval. Επαναδιάλυση σε 250ml παγωμένο npddH₂O και φυγοκέντρηση στους 4⁰C στις 4000rpm για 15'. Επαναδιάλυση σε 50ml παγωμένο npddH₂O και μεταφορά του δείγματος σε φιάλη των 50ml. Φυγοκέντρηση στους 4⁰C στις 3500 rpm για 10', επαναδιάλυση σε 10ml παγωμένου npddH₂O και φυγοκέντρηση

⁶ Η συγκεκριμένη μέθοδος μετασχηματισμού των κυττάρων έχει δεκαπλάσια απόδοση από την αντίστοιχη χημική (με χλωριούχο ασβέστιο CaCl). Η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται από την καθαρότητα του φορέα κλωνοποίησης, κυρίως την περιεκτικότητά του σε αλάτι. Υψηλή συγκέντρωση αλατιού προκαλεί βραχυκύκλωμα που μειώνει σημαντικά την βιωσιμότητα των κυττάρων.

στις ίδιες συνθήκες για 5'. Επαναδιάλυση της πελλέτας σε 1-1.5ml 10% γλυκερόλη (επίσης παγωμένη). Διαίρεση του δείγματος σε ποσότητα των 50ul, μέσα σε μικρά φιαλίδια φυγοκέντρησης των 1.5ml (η διαδικασία εκτελείται με τα φιαλίδια σε ξηρό πάγο) και άμεση κατάψυξη τους στους -80°C.

4.2.2 Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Η μέθοδος προϋποθέτει την ύπαρξη δεκτικών κυττάρων. Η αρχή στην οποία στηρίζεται είναι ότι αν υποβληθούν τα παγωμένα δεκτικά κύτταρα σε θερμοκρασιακό στρες, τότε εκφράζονται κάποιες θερμοεπαγώμενες (heat shock proteins), οι οποίες διευκολύνουν την είσοδο του εξωγενούς DNA.

Υλικά

Ηλεκτρομετασχηματιστής, 50ul ηλεκτροδεκτικών κυττάρων, 1ul από το ligation mix, LB ζωμός.

Μέθοδος

Η διαδικασία χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων, κυττάρων ζύμης, κ.α. Τα βακτήρια διαθέτουν κυτταρικά τοιχώματα που διαφέρουν από τις λιπιδικές μεμβράνες και αποτελούνται από πεπτιδογλυκάνες και παράγωγα τους. Τα τοιχώματα τους είναι από τη φύση τους πορώδη και λειτουργούν σαν προστατευτικό κέλυφος σε αντίξοες περιβαλλοντολογικές συνθήκες. Στην περίπτωση που αναμιχθούν πλασμίδια με βακτήρια, τα βακτήρια μπορούν να εισέλθουν μέσα στα κύτταρα μετά από την εφαρμογή ηλεκτροπαλμού. Αρκετές εκατοντάδες βόλτ διέρχονται από μια επιφάνεια αρκετών χιλιοστών σε αυτή τη διαδικασία. Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται σε πάγο. Αρχικά αποστειρώνονται οι κυβέτες στο UV, ξεπάγωμα των ηλεκτροδεκτικών κυττάρων 50ul (DH5a, DH10b) σε πάγο για ένα περίπου λεπτό, προσθήκη 1ul από το ligation mix και τοποθέτηση του δείγματος στην αποστειρωμένη κυβέτα. Τοποθέτηση της κυβέτας στην ειδική υποδοχή της συσκευής και εφαρμογή τάσης ύψους 1800V στο δείγμα, για 5msec (μέχρι ότου ακουστεί ο χαρακτηριστικός ήχος). Άμεση επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1ml LB και μεταφορά τους στους 37°C για 1-2h στις 250rpm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 13.000 rpm για 30''. Απόρριψη περίπου 850ul του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της πελλέτας στα υπόλοιπα 150ul. Στρώσιμο των κυττάρων σε προθερμασμένα τρυβλία με αμπικιλίνη. Για τον έλεγχο της μεθόδου χρησιμοποιούνται άλλα τέσσερα τρυβλία. Το ένα περιέχει άκοπο τον φορέα κλωνοποίησης, όπου εμφανίζονται πολλές αποικίες όταν ο μετασχηματισμός των κυτ-

τάρων έχει πετύχει, το δεύτερο περιέχει κομμένο τον φορέα κλωνοποίησης, όπου στην περίπτωση που δεν περιέχει ligation mix δεν πρέπει να εμφανιστούν αποικίες, αν εμφανιστούν αποικίες ο φορέας κλωνοποίησης δεν έχει κοπεί εντελώς. Το τρίτο τρυβλίο περιέχει τον φορέα κλωνοποίησης με λιγάση, μετά από ligation του κομμένου φορέα κλωνοποίησης (χωρίς το ένθεμα (insert)) πρέπει να εμφανιστούν αποικίες, είναι δείκτης ότι η ligation λειτουργεί. Τέλος το τέταρτο τρυβλίο περιέχει μόνο δεκτικά κύτταρα, χωρίς DNA, όπου δεν αναπτύσσονται αποικίες. Αυτό συμβαίνει γιατί τα κύτταρα δεν διαθέτουν το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για να αναπτυχθούν σε LB με αμικιλίνη.

4.2.3 Κλωνοποίηση σε πλασμίδια

Στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA τα πλασμίδια που θα χρησιμοποιηθούν καλύπτουν ορισμένες προϋποθέσεις: φέρουν τουλάχιστον ένα γονίδιο που διευκολύνει την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων (συνήθως γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα σε ορισμένο αντιβιοτικό σαν δείκτη επιλογής, π.χ τετρακυκλίνη). Μπορούν να μεταφέρονται εύκολα στα κύτταρα ξενιστές τους. Είναι ικανά να αντιγράφονται αυτόνομα μέσα στα κύτταρα δέκτες. Περιέχουν ένα μεγάλο εύρος μονών περιοριστικών θέσεων, οι οποίες αναγνωρίζονται από διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες (ένζυμα). Αυτές οι θέσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κλωνοποίηση διαφόρων μορίων DNA. Μερικές από τις θέσεις αυτές πρέπει να βρίσκονται εντός των αλληλουχιών γονιδίων που κωδικοποιούν ενζυμικά συστήματα ελεγχόμενης έκφρασης (γονίδια αναφοράς). Ένα κοινό τέτοιο σύστημα αποτελεί τμήμα του οπερονίου της λακτόζης. Ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τον προαγωγό του οπερονίου και τμήμα του γονιδίου lacZ, το οποίο κωδικοποιεί ένα πεπτιδίο του αμινοτελικού άκρου του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης. Ως κύτταρα δέκτες χρησιμοποιούνται στελέχη E.coli που περιέχουν το υπόλοιπο τμήμα του ενζύμου από το καρβοξυτελικό άκρο. Τα δύο ατελή πολυπεπτιδικά μόρια της β-γαλακτοσιδάσης που παράγονται από την έκφραση των αντίστοιχων αλληλουχιών του πλασμιδιακού φορέα και του χρωμοσώματος του ξενιστή, μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται και να προκύπτει η λειτουργική πρωτεΐνη. Εντός της αλληλουχίας του τμήματος lacZ του πλασμιδίου έχει ανασυνδυαστεί κατάλληλα μια περιοχή που φέρει πολλές θέσεις κλωνοποίησης. Εισαγωγή ενός ξένου τμήματος DNA σε αυτή την περιοχή έχει σαν αποτέλεσμα την διακοπή του μηνύματος για την παραγωγή του συμπληρωματικού πεπτιδίου του αμινοτελικού άκρου της β-γαλακτοσιδάσης και επομένως την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Η ανίχνευση της μη λειτουργικής β-

γαλακτοσιδάσης, η διάκριση δηλαδή, ανασυνδυασμένων και μη πλασμιδίων γίνεται με την χρησιμοποίηση δύο ουσιών, του 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδιο (X-gal) και του ισοπροπυλοθειο-β-D-γαλακτοζίτη (IPTG). Το X-gal αποτελεί ένα χρωμογόνο υπόστρωμα της αντίδρασης της β-γαλακτοσιδάσης, η διάσπαση του οποίου δίνει μπλέ χρώμα στις αποικίες. Το IPTG δρα ως επαγωγός της μεταγραφής του γονιδίου lacZ. Έτσι οι βακτηριακές αποικίες που περιέχουν ανασυνδυασμένα ή μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια διακρίνονται εύκολα σε τρυβλία επιλογής σαν μπλέ ή λευκές αποικίες. Τέλος τα πλασμίδια πρέπει να διατηρούνται σταθερά μέσα στα κύτταρα ξενιστές. Τα πλασμίδια πρέπει να φέρουν κατάλληλη περιοχή έναρξης της αντιγραφής, την οποία να αναγνωρίζει το σύστημα αντιγραφής του DNA των κυττάρων ξενιστών που χρησιμοποιούνται. Τα στάδια της κλωνοποίησης είναι: Στάδιο πρώτο. Γίνεται πέψη του πλασμιδιακού φορέα και του DNA, το οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί με την κατάλληλη ή τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Στάδιο δεύτερο όπου γίνεται η σύνδεση των δύο γραμμικών μορίων με τη επίδραση της λιγάσης και το τρίτο στάδιο όπου γίνεται η επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

4.2.4 Πέψη περιορισμού

Υλικά

Αποστειρωμένο απιονισμένο H₂O, περιοριστικό ένζυμο (1-10 unit για κάθε μικρογραμμάριο DNA), το ανάλογο για το ένζυμο ρυθμιστικό, το DNA που θα χρησιμοποιηθεί.

Μέθοδος

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση και στην κλωνοποίηση του DNA είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων του DNA και διασπούν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις και στις δύο αλυσίδες συμμετρικά εντός της περιοχής αναγνώρισης. Όταν ο πλασμιδιακός φορέας και το DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί υπόκειται σε μονή πέψη (με μία περιοριστική ενδονουκλεάση) πρέπει να γίνεται κατεργασία του φορέα με αλκαλική φωσφατάση ώστε να αποφεύγεται η επανακυκλοποίηση του. Η αλκαλική φωσφατάση δεν επιτρέπει την επανακυκλοποίηση του κυκλικού φορέα γιατί αποφωσφορυλιώνει τα 5' άκρα του ευθύγραμμου μορίου. Όταν γίνεται η πέψη του πλασμιδίου με δύο διαφορετικά ένζυμα ταυτόχρονα, τότε η χρήση της αλκαλικής φωσφατάσης δεν είναι υποχρεωτική γιατί τα άκρα δεν είναι συμβατά και η επανένωση του ίδιου του πλασμιδίου είναι περιορισμένη. Τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων που προκύπτουν μετά την δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών υπολογίζονται συγκρί-

νοντας τις αποστάσεις που διανύουν σε ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης με τις αποστάσεις πρότυπων ζωνών DNA γνωστού μοριακού βάρους. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασία, pH και σύστασης ρυθμιστικού διαλύματος στις οποίες δρα και οι οποίες δίνονται από τις κατασκευαστικές εταιρίες. Η συγκέντρωση των περισσοτέρων ενδοκουκλεασών εκφράζεται σε Unit/μl, όπου 1 Unit ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1 μg DNA του φάγου λ σε 1h, υπό τις κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου. Προετοιμασία της αντίδρασης πέψης με την προσθήκη των συστατικών σύμφωνα με την σειρά που παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Αντίδραση πέψης.

| Σειρά | | |
|-------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1 | απεσταγμένο dd H ₂ O | επαρκή ποσότητα |
| 2 | 10x ρυθμιστικό | ένα δέκατο του όγκου αντίδρασης |
| 3 | DNA | x μL (συνήθως 1μg) |
| 4 | περιοριστικό ένζυμο ⁷ | y μL (10-12 U/μl) |
| 5 | Final volume | z μL (συνήθως 10-20μl) |

Απαλή ανάδευση με την βοήθεια της πιπέτας, και επώαση της αντίδρασης στην κατάλληλη θερμοκρασία, συνήθως 37⁰C, για 1-3 ώρες. Το ένζυμο αδρανοποιείται με θέρμανση στους 70-100⁰C για 10 λεπτά ή με καθαρισμό με φαινόλη. Πριν την χρήση, σε άλλες διαδικασίες, όπως αποφωσφορυλίωση ή αντίδραση σύνδεσης, πρέπει μια μικρή ποσότητα να προσδιοριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης, για τον έλεγχο τυχόν άπεπτου DNA και την ποσοτικοποίηση του.

4.2.5 Αντίδραση συνδετάσης του DNA (DNA ligation)

Υλικά

Τμήματα DNA (ένθετο DNA) ανάλογα με την ποσότητα του φορέα κλωνοποίησης, φορέας κλωνοποίησης 5ng/ul, 10X ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης 1ul, T4 DNA λιγάση 1ul (400 U/ul), αποστειρωμένο ddH₂O, ATPs.

⁷ Αν χρησιμοποιηθούν δύο ένζυμα ταυτόχρονα πρέπει να δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό και στην ίδια θερμοκρασία. Ο όγκος της αντίδρασης εξαρτάται από την ποσότητα και το μέγεθος του DNA που πέπτεται. Μεγαλύτερες ποσότητες DNA χρειάζονται περισσότερο συνολικό όγκο (50-100 μL). Η διαφορά των ρυθμιστικών οφείλεται στην διαφορετική ποσότητα αλάτων που περιέχονται στο καθένα.

Μέθοδος

Η σύνδεση των τμημάτων του DNA πραγματοποιείται με την επώαση των τμημάτων μαζί με τον γραμμικό φορέα κλωνοποίησης, παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, ATPs και T4 DNA λιγάσης. Η ποσότητα του DNA εξαρτάται από την ποσότητα του φορέα κλωνοποίησης. Ποσότητα πάνω από 5ng/ul του φορέα κλωνοποίησης αυξάνει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις ενώ ποσότητα κάτω των 5ng/ul αυξάνει τις διαμοριακές δυνάμεις. Η ποσότητα του ένθετου DNA που θα προστεθεί στην αντίδραση προκύπτει από την σχέση:

$$ng\ insert = \frac{Kb\ insert \times 5(sticky\ ends)\ or \times 10(blunt\ ends) \times ng\ vector\ (50\ or\ 100\ depends\ on\ final\ volume)}{Kb\ vector}$$

Για τη βέλτιστη απόδοση της σύνδεσης των τμημάτων με κολλώδη άκρα, η βέλτιστη θερμοκρασία του ενζύμου πρέπει να εξισορροπείται με την θερμοκρασία τήξης (T_m), όσο και με την θερμοκρασία υβριδισμού. Εάν η θερμοκρασία περιβάλλοντος υπερβεί την T_m , η ομόλογη αντιστοίχιση στα κολλώδη άκρα δεν θα είναι σταθερή, γιατί η υψηλή θερμοκρασία διασπά τους δεσμούς υδρογόνου. Όσο μικρότερη η περιοχή που προεξέχει (στα κολλώδη άκρα) τόσο χαμηλότερη και η T_m , συνήθως ένα κολλώδες άκρο των 4^{ων} βάσεων έχει T_m 12-16⁰C. Η βέλτιστη θερμοκρασία στην περίπτωση των “τυφλών” άκρων είναι 14-20⁰ για μια ολόκληρη νύχτα, η απουσία συμπληρωματικών άκρων μειώνει την απόδοση της σύνδεσης και απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα λιγάσης στην αντίδραση.

4.2.6 Παρασκευή τρυβλίων επιλογής

Υλικά

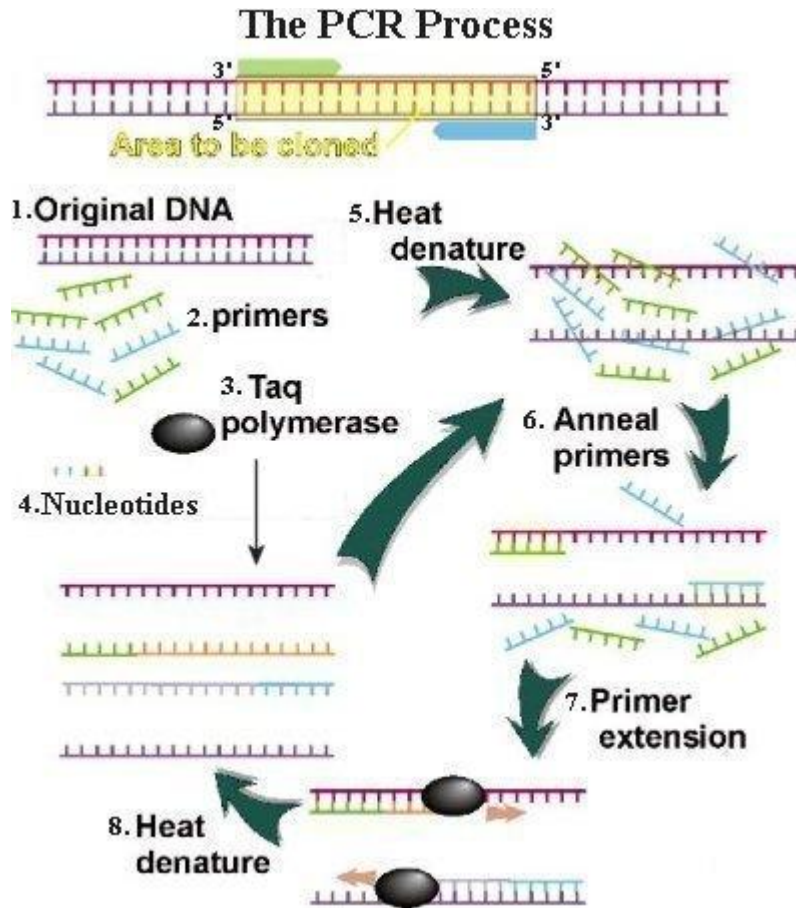
Έτοιμα τρυβλία με αντιβιοτικό (αμπικιλίνη), X-gal, IPTG.

Μέθοδος

Στα τρυβλία με το αντιβιοτικό επιλογής επιστρώνεται όλη η επιφάνεια με 20μl διαλύματος X-gal και 8 μl διαλύματος IPTG. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37⁰C για μια ώρα, ώστε να απορροφηθούν τελείως τα υγρά από την επιφάνεια του άγαρ. Ακολουθεί εμβολιασμός με την κατάλληλη αραίωση ώστε να προκύψουν περίπου 150-200 μετασχηματισμένες αποικίες ανά τρυβλίο και επωάζονται στους 37⁰C όλη τη νύχτα. Την επομένη, τα τρυβλία μεταφέρονται στο ψυγείο για 3-4h, για να γίνει πιο έντονο το μπλέ χρώμα των μη ανασυνδυασμένων αποικιών. Στη συνέχεια επιλέγονται οι λευκές αποικίες, οι οποίες περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, που στη συνέχεια ελέγχονται με απομόνωση και ανάλυση του πλασμιδιακού τους DNA.

4.2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την ενίσχυση τμημάτων DNA γνωστής αλληλουχίας.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου PCR.

Υλικά

DNA που περιέχει το τμήμα στόχο που θα πολλαπλασιαστεί, εκκινητές⁸, Τας πολυμεράση ή άλλη πολυμεράση (ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, νουκλεοτίδια που περιέχουν τριφωσφορικές ομάδες (dATP, dTTP, dCTP και dGTP), ισοτονικό διάλυμα που παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για την αντίδραση (δράση και σταθερότητα της πολυμεράσης), δισθενή κατιόντα μαγνησίου ή μαγκανίου(αποτελούν συνένζυμο της πολυμεράσης), μονοσθενή κατιόντα καλίου.

⁸ αλληλουχίες DNA μήκους 18-30 bp (ζεύγη βάσεων), που αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητες προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας.

Μέθοδος

Η PCR αποτελείται από μία σειρά 20-40 επαναλαμβανόμενων αλλαγών θερμοκρασίας (κύκλων), όπου ο κάθε κύκλος αποτελείται από 3 διακριτά βήματα (Εικόνα 12). Οι θερμοότητες που χρησιμοποιούνται και ο χρόνος κάθε κύκλου εξαρτώνται από μία σειρά παραμέτρων, όπως το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την σύνθεση του DNA, η συγκέντρωση των ιόντων και των ολιγονουκλεοτιδίων στην αντίδραση και η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών. Στην αποδιάταξη (denaturation) ,πρώτο βήμα , θερμαίνεται η αντίδραση στους $94-98^{\circ}\text{C}$ για 20-30", αυτό προκαλεί τήξη στο DNA, σπάζοντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων και αφήνοντας μονόκλιωνα μόρια DNA. Στην αναδιάταξη (annealing), δεύτερο βήμα, η θερμοκρασία μειώνεται στους $50-65^{\circ}\text{C}$ για 20-40" επιτρέποντας την προσαρμογή των εκκινητών στην μονόκλιωνα αλυσίδα του DNA. Συνήθως η θερμοκρασία της ανόπτησης είναι τρεις βαθμούς Κελσίου κάτω από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών. Σταθεροί δεσμοί υδρογόνου DNA-DNA σχηματίζονται όταν η αλληλουχία των εκκινητών είναι σχεδόν ίδια με αυτή της αλληλουχίας πρότυπου του DNA .Η πολυμεράση συνδέεται με το υβρίδιο εκκινητή-πρότυπη αλληλουχία και ξεκινά η σύνθεση του DNA. Η επιμήκυνση είναι το τρίτο στη σειρά βήμα, όπου η θερμοκρασία που εφαρμόζεται εξαρτάται από το είδος της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται. Για την Taq πολυμεράση η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 72°C , στην φάση αυτή η πολυμεράση συνθέτει έναν νέο κλώνο συμπληρωματικό του DNA προτύπου, προσθέτοντας ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά στην πρότυπη αλληλουχίας με κατεύθυνση 5' προς 3'. Ο χρόνος επέκτασης εξαρτάται τόσο από την πολυμεράση όσο και από το μέγεθος του τμήματος του DNA προς πολλαπλασιασμό. (σε βέλτιστες συνθήκες η πολυμεράση πολυμερίζει χίλιες βάσεις το λεπτό). Ακολουθεί ένα μοναδιαίο βήμα ,τελική επιμήκυνση, που εφαρμόζεται κατά περίπτωση σε θερμοκρασία $70-74^{\circ}\text{C}$ για 5-15 λεπτά, μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR, για την επέκταση, μέχρι και του τελευταίου, μονόκλιωνου μορίου DNA. Τέλος η αντίδραση διατηρείται στους 4°C .

4.2.8 Μεταλλαξιγένεση θέσης με το Kit της Stratagene

Υλικά

LB άγαρ, LB άγαρ με αμπικιλίνη, NZY⁺ διάλυμα, 10X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, TE ,PfuTurbo DNA πολυμεράση (2.5 U/ μl), DPN I ένζυμο περιορισμού (10 U/ μl), εκκινητές ελέγχου #1 [34-mer (100 ng/ μl)] 5' CCA TGA TTA CGC CAA GCG CGC AAT TAA CCC TCA C 3' και #2 [34-mer (100 ng/ μl)] 5' GTG AGG GTT AAT TGC

GCG CTT GGC GTA ATC ATG G 3, pWhitescript™ 4.5-kb πλασμίδιο ελέγχου (5 ng/μl), dNTP mix, XL1-Blue υπερδεκτικά κύτταρα (supercompetent cells), pUC18 πλασμίδιο ελέγχου (0.1 ng/μl σε TE).

Μέθοδος

Η μέθοδος είναι γρήγορη και πραγματοποιείται σε 4 βήματα, η απόδοση της μεθόδου σε μεταλλάγματα είναι μεγαλύτερη του 80%. Το πρωτόκολλο είναι απλό και χρησιμοποιεί πλασμιδιακό DNA που προέρχεται από miniprep ή από καθαρισμό με χλωριούχο καίσιο. Η βασική διαδικασία χρησιμοποιεί υπερελικωμένο δίκλωνο DNA (dsDNA) φορέα, με το ένθεμα που ενδιαφέρει και δύο συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, που περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι εκκινητές είναι ο καθένας συμπληρωματικός στο αντίθετο κλώνο του φορέα και επεκτείνονται κατά την διάρκεια θερμικών κύκλων, με την ειδική πολυμεράση PfuTurbo polymerase. Η ενσωμάτωση των εκκινητών δημιουργεί ένα μεταλλαγμένο πλασμίδιο που περιέχει κολλώδη τμήματα. Μετά την διαδικασία των θερμικών κύκλων το προϊόν επωάζεται με το ένζυμο Dpn I. Η ενδονουκλεάση DpnI (αλληλουχία στόχος : 5'-Gm ATC-3') είναι ειδική για μεθυλιωμένα και ημιμεθυλιωμένα DNA και χρησιμοποιείται για την πέψη του γονικού DNA πρότυπου και για να επιλογή συνθετικού DNA που περιέχει την μετάλλαξη. Το DNA που απομονώνεται από όλα σχεδόν τα στελέχη της E.coli είναι Dam methylated (έχει προστεθεί μια μεθυλομάδα στην αδενίνη της αλληλουχίας 5'-GATC-3') και για αυτό είναι επιδεκτικό στην πέψη με την DpnI. Στη συνέχεια ο φορέας του DNA που περιέχει την μετάλλαξη μετασχηματίζεται μέσα στα δεκτικά κύτταρα XL1-Blue supercompetent cells.

Αναλυτικά

Αρχικά κατασκευάζονται οι εκκινητές που περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη, ετοιμάζεται η αντίδραση ελέγχου:

- 10 μl of 10× reaction buffer 2 μl
- (10 ng) of pWhitescript 4.5-kb control plasmid (5 ng/μl)
- 1.25 μl (125 ng) of oligonucleotide control primer #1 [34-mer (100 ng/μl)]
- 1.25 μl (125 ng) of oligonucleotide control primer #2[34-mer (100 ng/μl)]
- 1 μl of dNTP mix
- 39.5 μl of double-distilled water (ddH₂O) to a final volume of 50 μl

Στη συνέχεια προστείνεται 1 μl of PfuTurbo DNA polymerase (2.5 U/μl).

Ετοιμασία της αντίδρασης του υπό μετάλλαξη δείγματος

- μl of 10 \times reaction buffer
- X μl (5–50 ng) of dsDNA template
- X μl (125 ng) of oligonucleotide primer #1
- X μl (125 ng) of oligonucleotide primer #2
- 1 μl of dNTP mix - ddH₂O to a final volume of 50 μl

στη συνέχεια προστίθεται 1 μl of PfuTurbo DNA polymerase (2.5 U/ μl). Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την PCR παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Παράμετροι της PCR.

| Cycles | Temperature | Time |
|-----------|-------------------|---------------------|
| Hot start | 95 ⁰ C | 5 sec |
| 1 | 95 ⁰ C | 30 sec |
| 12-18 | 55 ⁰ C | 1 min |
| | 68 ⁰ C | 1 min/kb του μήκους |

Ακολουθεί τοποθέτηση της αντίδρασης σε πάγο για 2' μέχρι να φτάσει την θερμοκρασία των 37⁰C. Προστίθεται 1 μl του ενζύμου DpnI , ανακινείται καλά με την βοήθεια πιπέτας και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 1', ακολουθεί άμεση επώαση της αντίδρασης στους 37⁰C για 1 ώρα όπου πραγματοποιείται η πέψη του γονικού υπερελικωμένου DNA. Ξεπαγώνονται τα δεκτικά XL1-Blue κύτταρα σε πάγο, για κάθε αντίδραση μετασχηματισμού απαιτούνται 50 μl δεκτικών κυττάρων, που τοποθετούνται στα ειδικά σωληνάρια 14-ml BD Falcon, τα οποία έχουν κρυώσει. Μεταφέρεται 1 μl από το δείγμα της πέψης του DNA (με την DpnI) και της αντίδρασης ελέγχου στα σωληνάρια με τα XL1-Blue κύτταρα. Για τον έλεγχο του μετασχηματισμού χρησιμοποιείται 1 μl του πλασμιδίου ελέγχου (control plasmid) σε 50 μl XL1-Blue κυττάρων. Ακολουθεί απαλή ανάδευση των δειγμάτων και επώαση τους στον πάγο για 30'. Τοποθέτηση των δειγμάτων για μόλις 45'' στους 42⁰C (σε υδατόλουτρο) και τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο για 2'. Πρόσθεση 0.5 ml από το διάλυμα NZY⁺, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 42⁰C και επώαση των αντιδράσεων μετασχηματισμού στους 37⁰C για 1h με ανακίνηση στις 225-250 rpm. Στρώνεται ο κατάλληλος όγκος από κάθε αντίδραση μετασχηματισμού, σε τρυβλία Petri που περιέχουν άγαρ και το αντιβιοτικό που αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα (Πίνακας 4). Για τον έλεγχο της μεταλλαξιγένεσης καθώς και του μετασχηματισμού απλώνονται κύτταρα σε LB άγαρ με αμικικίνη που περιέχουν g 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-gal και 20 mM IPTG*. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰C για >16h. Όγκοι για το στρώσιμο των τρυβλίων στην αντίδραση μετασχηματισμού:

Πίνακας 4: Τύπος αντίδρασης και αναλογία όγκου στα τρυβλία Petri.

| Τύπος αντίδρασης | Όγκος στο στρώσιμο του τρυβλίου |
|----------------------------------------|------------------------------------------|
| pWhitescript, κοντρόλ μεταλλαξιγένεσης | 250 μl |
| pUC18, κοντρόλ μετασχηματισμού | 5 μl (in 200 μl NZY+ broth) ⁹ |
| Δείγμα μεταλλαξιγένεσης | 250 μl σε κάθε τρυβλίο από τα δύο |

Οι αναμενόμενες αποικίες στο τρυβλίο που περιέχεται το κοντρόλ μεταλλαξιγένεσης pWhitescript κυμαίνονται από 50-800. Μεγαλύτερο από το 80% πρέπει να περιέχει την μετάλλαξη και εμφανίζεται σαν μπλέ αποικία. Στο τρυβλίο που περιέχει το κοντρόλ μετασχηματισμού, pUC18, παρατηρούνται περισσότερες από 250 αποικίες με ποσοστό >98% των αποικιών να εμφανίζει τον μπλέ φαινότυπο. Οι αποικίες που αναμένονται από τα δείγματα μεταλλαξιγένεσης κυμαίνονται μεταξύ 10-1000 ανάλογα με την σύνθεση και το μήκος του πρότυπου DNA. Τέλος ακολουθεί αλληλούχιση του τμήματος για να διαπιστωθεί η μετάλλαξη. Το pWhitescript 4.5-kb πλασμίδιο ελέγχου χρησιμοποιείται για να ελέγξει την αποτελεσματικότητα της δημιουργίας μεταλλαγμένων πλασμιδίων με το συγκεκριμένο Kit. Το συγκεκριμένο πλασμίδιο περιέχει ένα κωδικόνιο τερματισμού (TAA) σε θέση όπου εμφανίζεται κανονικά ένα κωδικόνιο γλουταμίνης (CAA) στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης του pBluescript II SK(-) phagemid (ειδικό πλασμίδιο). Τα XL1-Blue δεκτικά κύτταρα που μετασχηματίζονται με το συγκεκριμένο πλασμίδιο ελέγχου εμφανίζονται λευκά σε τρυβλία με LB άγαρ και αμπικιλίνη, που περιέχουν επίσης IPTG και X-gal, γιατί η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης έχει ανασταλεί. Οι εκκινητές ελέγχου που χρησιμοποιούνται στο Kit δημιουργούν μια σημειακή μετάλλαξη στο πλασμίδιο pWhitescript που αναιρεί τη θυμίνη του κωδικόνιου τερματισμού (TAA) στο ένατο αμινοξύ της β-γαλακτοσιδάσης και το μετατρέπει σε κυτοσίνη, έτσι παράγεται το κωδικόνιο (CAA) γλουταμίνης που βρίσκεται στην αλληλουχία αγρίου τύπου. Μετά τον μετασχηματισμό οι αποικίες μπορούν να ελεγχτούν για τον φαινότυπο της β-γαλακτοσιδάσης (μπλέ).

4.2.9 Διαμόλυνση κυττάρων με χλωριούχο ασβέστιο

Η διαδικασία πραγματοποιείται για την μεταφορά του DNA σε ευκαριωτικά κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία πόρων ή οπών στην μεμβράνη των κυττάρων που θα επιτρέψει την είσοδο των νουκλεονικών οξέων. Η μέθοδος εφαρμόζεται με την χρή-

⁹ Το X-Gal και το IPTG χρησιμοποιούνται για την χρωματική επιλογή των αποικιών μπλέ-λευκό.

στη χημικών μεθόδων (χλωριούχου ασβεστίου) και μη χημικών μεθόδων (ηλεκτροδιάτρηση, κ.α).

Υλικά

Κύτταρα Hella, DMEM + 10 bovine serum + penicillin + streptomycin, τρυψίνη, 10mM HEPES, CaCl₂, 150μl διαλύματος H, διάλυμα γλυκερόλης 15%.

Μέθοδος

Το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES περιέχει ιόντα φωσφορικού άλατος και συνδυάζεται με το διάλυμα του χλωριούχου ασβεστίου που περιέχει το DNA (προς μεταφορά στα ευκαριωτικά κύτταρα), αυτό προκαλεί την δημιουργία ιζήματος, από το θετικά φορτισμένο ασβέστιο και το αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό άλας, που έχει δεσμεύσει το DNA στην επιφάνεια του. Μετά από μεταφορά του ιζήματος σε καλλιέργεια ευκαριωτικών κυττάρων, ποσότητα του ιζήματος εισέρχεται στα κύτταρα και μαζί με αυτό και το DNA.

Προετοιμασία- χειρισμός κυττάρων

Αρχικά στρώνονται 200.000 κύτταρα Hella με στόχο τον διπλασιασμό τους την επομένη μέρα (400.000) Τα θρεπτικά που χρησιμοποιούνται είναι DMEM + 10 bovine serum + penicillin + streptomycin. Σε πρώτη φάση γίνεται η αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα των 75cm², ακολουθεί πλύσιμο της φλάσκας με 2ml PBS για να φύγουν τα υπολείμματα του θρεπτικού. Προστίθεται 2 ml τρυψίνη, για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φλάσκας και τοποθέτηση της στους 37⁰C για 1-2' . Απενεργοποίηση της τρυψίνης με την προσθήκη 8ml θρεπτικού. Μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer . Ανάπτυξη των κυττάρων σε πιάτο έξι θέσεων 1.5-2X10⁵ ανά πηγαδάκι με 3ml θρεπτικό, στους 37⁰C παρουσία διοξειδίου 5%.

Διαμόλυνση κυττάρων

Αφαίρεση του θρεπτικού την επόμενη μέρα και επώαση με νέο θρεπτικό που περιέχει και 10mM HEPES. Ετοιμασία των DNA δειγμάτων (3μg DNA σε 75μl ddH₂O και 75 μl 0.5M χλωριούχου ασβεστίου, CaCl₂) και απαλή ανάδευση του δείγματος. Σε πιάτο 24^{ov} θέσεων (το οποίο έχει προ-ψυχθεί) πρόσθεση 150μl διαλύματος H, ανά πηγαδάκι, ακριβώς στο κέντρο και από ένα ύψος 15-20cm στάγδιν. Πρόσθεση με τον ίδιο τρόπο του DNA/CaCl₂ πιπετάρισμα 2-3 φορές και παραμονή για 15-20' σε RT (δημιουργία ιζήματος). Πρόσθεση του προηγούμενου μίγματος στα Hella κύτταρα, από σχετικό ύψος, καλύπτοντας όλη την επιφάνεια στο πηγαδάκι. Επώαση στους 37⁰C με 5% CO₂ για 16-24h , χωρίς να ανακινήσουμε τα δείγματα. Προαιρετικά, μετά 4h επώασης, αφαίρεση

του θρεπτικού μέσου και πρόσθεση 1ml διαλύματος γλυκερόλης σε κάθε πηγαδάκι, επώαση 100'. Αφαίρεση της γλυκερόλης και άμεση συμπλήρωση 1ml θρεπτικού διαλύματος, αφαίρεση και πρόσθεση εκ νέου 3ml θρεπτικού διαλύματος.

4.2.10 Μέθοδος λουσιφεράσης

Τα πλασμίδια Luc έχουν τις κωδικοποιημένες περιοχές των υπό μελέτη υποκινητών, συνδεδεμένες με το γονίδιο αναφοράς Luc. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη λουσιφεράση (firefly luciferase από την πυγολαμπίδα *Photinus pyralis*). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν εκφράζεται από τα ευκαριωτικά κύτταρα, αλλά η έκφραση της είναι ανάλογη του πλασμιδιακού DNA που ενσωματώνεται και εκφράζεται στο κύτταρο. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της λουσιφεράσης να καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της λουσιφεράσης παρουσία ATP. Αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι η εκπομπή φωτός σε μήκος κύματος 562nm το οποίο ανιχνεύεται με την χρήση κατάλληλου λουμινόμετρου. Χρησιμοποιείται αυτό το γονίδιο αναφοράς για την ανίχνευση του ποσοστού έκφρασης των πλασμιδίων από τα κύτταρα.

Υλικά

PBS 1X, EDTA, RLB, luciferin.

Μέθοδος

Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα, στη συνέχεια ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων, δύο φορές, με 1X PBS. Προστίθεται 1ml PBS με 1mM EDTA και τα κύτταρα μεταφέρονται σε eppendorfs (σωληνάρια φυγοκέντρου). Φυγοκεντρούνται στις 2000rpm για 5' σε RT. Επαναδιαλύεται η πελλέτα σε 100μl 1X RLB ανά πηγαδάκι και καταψύχεται στους -80°C για 10', μεταφέρεται στους 37°C για 2'. Φυγοκεντρείται στις 11000rpm για 2' στους 4°C. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε καινούρια eppendorfs μέσα σε πάγο. Προστίθενται 10μl λουσιφερίνης με διάλυμα σε 10μl δείγματος. Αναδεύεται το μίγμα και ακολουθεί η μέτρηση της ποσότητας των πρωτονίων στην ειδική συσκευή μέτρησης της λουσιφεράσης (10').

4.2.11 Δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης με RLB (Reporter Lysis Buffer)

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης μέσα σε κύτταρα που έχουν υποστεί λύση και έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδια αναφοράς της β-γαλακτοσιδάσης, όπως ο pGL3. Στο δείγμα προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside), που είναι το υπόσ-

τρωμα της αντίδρασης, κατά την επώαση η β-γαλακτοσιδάση υδρολύει το άχρωμο υ-πόστρωμα σε O-nitrophenyl, το οποίο είναι κίτρινο. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανθρακικού νατρίου και μετράται η απορρόφηση στα 420nm.

Υλικά

Reaction buffer, ONPG, Na₂CO₃, β-μερκαπταιθανόλη(14.3M).

Μέθοδος

Αναμιγνύονται 550μl ρυθμιστικό διάλυμα, 1.25μl β-μερκαπταιθανόλης (14.3M), και 100μl ONPG (4mg/ml) με 50μl εκχύλισμα κυττάρων σε τελικό όγκο 700μl. Επωάζονται στους 37⁰C μέχρι να εμφανιστεί κίτρινο χρώμα (ανάλογα με την απόδοση της διαμόλυνσης ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση του κίτρινου χρώματος ποικίλει). Προστίθεται 200μl ανθρακικό νάτριο να σταματήσει η αντίδραση, τέλος η απορρόφηση μετράται στα 420nm σε φασματοφωτόμετρο.

4.3 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

4.3.1 Διάλυμα LB

- a. Προσθέτονται σε 800ml H₂O
 - 10g Bacto-tryptone
 - 5g yeast extract
 - 10g NaCl
- b. Ρύθμιση του pH με NaCl στο 7.5
- c. Ρύθμιση του όγκου στο 1L με προσθήκη dH₂O
- d. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

4.3.2 Διάλυμα LB agar

- a. Προσθέτονται σε 800ml H₂O
 - 10g Bacto-tryptone
 - 5g yeast extract
 - 10g NaCl
- b. Ρύθμιση του pH με NaCl στο 7.5
- c. Προσθήκη 15gr agar

- d. Θέρμανση του διαλύματος στα μικροκύματα μέχρι να λιώσει καλά το άγαρ
- e. Ρύθμιση του όγκου στο 1L με προσθήκη dH₂O
- f. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο

4.3.3 Διάλυμα TE

Για την ετοιμασία διαλύματος 1X:

- a. 10 mM Tris, bring to pH 8.0 with HCl
- b. 1 mM EDTA
- c. Συμπλήρωση με H₂O στα 100mL

4.3.4 TAE

Ετοιμασία διαλύματος 50X σε 1L H₂O:

- a. Προσθέτονται 242g Tris
- b. 57.1ml κρυσταλλικό οξικό οξύ
- c. 100 ml 0.5M EDTA (pH 8.0)

Το διάλυμα εργασίας 1X είναι 40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA.

4.3.5 EDTA

Για την ετοιμασία EDTA 0.5M (pH 8.0):

- a. Προσθέτονται 186.1g disodium EDTA·2H₂O σε 800ml H₂O. Έντονη ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα
- b. Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 8.0 με την προσθήκη NaOH (~20g). Διανεύμετε σε aliquots και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο. Το μετά νατρίου άλας του EDTA, δεν προστείνεται μέχρι το pH του διαλύματος να ρυθμιστεί στο 8,0 με την προσθήκη του NaOH.

4.3.6 TBE

Για την ετοιμασία 1L διαλύματος 5X:

- a. 54 g από Tris base
- b. 27.5 g από boric acid
- c. 20 ml από 0.5 M EDTA
- d. Το διάλυμα αποστειρώνεται με την βοήθεια φίλτρου

4.3.7 Διάλυμα λυσοζύμης (10mg/ml)

Διάλυση στερεής λυσοζύμης σε συγκέντρωση 10mg/ml σε 10mM tris-HCl (pH 8.0) αμέσως πριν τη χρήση. Βεβαιωθείτε ότι το pH του διαλύματος Tris είναι 8.0 ,πριν την διάλυση της πρωτεΐνης. Η λυσοζύμη δεν δρα ικανοποιητικά σε pH μικρότερο του 8.0.

4.3.8 Διάλυμα P1

50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA (χρησιμοποιείτε 2. 5 ml of 100X Tris-EDTA διαλύματος σε 50 ml νερό),100 ug.ml RNase A

Σε 800ml d H₂O διαλύονται:

- a. 6.06g Tris base
- b. 3,72g EDTA
- c. Ρυθμίζεται το pH στο 8.0 με την προσθήκη HCL
- d. Ρυθμίζεται ο όγκος με την προσθήκη H₂O στο 1L
- e. Προστίθεται 100mg RNase για κάθε λίτρο P1
- f. Μετά την προσθήκη της RNase φυλάσσεται στους -4⁰C

RNase A

- a. Διαλύεται η σκόνη της RNASE A σε νερό μέχρι τα 100 mg/ml
- b. Βράζεται το διάλυμα για να εξολοθρευτούν οι DNase
- c. Χωρίζεται σε aliquot και φυλάσσεται στους -20 ⁰C

4.3.9 Διάλυμα P2

200mM NaOH, 1% SDS

- a. Διαλύονται 8.09g NaOH σε κόκκους σε 950ml dH₂O
- b. Προστίθεται διάλυμα SDS 50mL 20%
- c. Τελική συγκέντρωση 1L
- d. Φυλάγεται σε θερμοκρασία δωματίου

4.3.10 Διάλυμα P3 (διάλυμα εξουδετέρωσης)

3.0 M potassium acetate, pH 5.5

- a. Διαλύονται 294.5g οξικού καλίου σε 500mL dH₂O

- b. Ρυθμίζεται το pH στο 5.5 με την προσθήκη κρυσταλλικού οξικού οξέως(περίπου 110mL)
- c. Ρυθμίζεται ο όγκος στο 1L με την προσθήκη dH₂O
- d. Φυλάσσεται στους -40C ή σε RT

4.3.11 Διάλυμα QTB (διάλυμα εξισορρόπησης)

750mM NaCl, 50mM MOPS, pH7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton X-100

- a. Διαλύονται 43.83g NaCl και 10.46g MOPS σε 800mL dH₂O
- b. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0
- c. Προστίθεται 150mL καθαρή ισοπροπανόλη και 15mL διαλύματος 10% Triton X-100
- d. Ρυθμίζεται ο όγκος στο 1L με προσθήκη dH₂O
- e. Φυλάσσεται σε RT

4.3.12 Διάλυμα QC (διάλυμα πλήσης)

1.0M NaCl, 50mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol

- a. Διαλύονται 58.44g NaCl και 10.46g MOPS σε 800 mL dH₂O
- b. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0
- c. Προστίθεται 150mL καθαρή ισοπροπανόλη
- d. Ρυθμίζεται ο όγκος στο 1L με προσθήκη dH₂O
- e. Φυλάσσεται σε RT

4.3.13 Διάλυμα QF (διάλυμα έκλουσης)

1.25M NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 8.5, 15% isopropanol

- a. Διαλύονται 73.05g NaCl και 6,06g Tris σε 800 mL dH₂O
- b. Ρυθμίζεται το pH στο 8.5 με την προσθήκη HCl
- c. Προστίθεται 150mL καθαρή ισοπροπανόλη
- d. Ρυθμίζεται ο όγκος στο 1L με προσθήκη dH₂O
- e. Φυλάσσεται σε RT

4.3.14 NZY+ broth (ζωμός)

Σε 950mL dH₂O

- a. Προστίθενται 5g NaCl, 2g MgSO₄ * 7H₂O, εκχύλισμα ζύμης 5g και NZ amine (υδρόλυμα καζεΐνης) 10g
- b. Ρυθμίζεται το pH στο 7.5 με την προσθήκη NaOH (~0,2ml)
- c. Ρυθμίζεται ο τελικός όγκος στο 1L με την προσθήκη dH₂O
- d. Αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο για 20 λεπτά στις 15 psi

4.3.15 Διάλυμα IPTG

- a. Διαλύονται 2g IPTG σε 8ml dH₂O
- b. Ρυθμίζεται ο όγκος του διαλύματος στα 10ml με dH₂O
- c. Αποστειρώνεται περνώντας από φίλτρο των 0.22μm
- d. Χωρίζεται σε aliquots των 1ml και
- e. Φυλάσσεται στους -200C

4.3.16 Διάλυμα HBS (10X)

- a. 1.37M NaCl
- b. 0.05 M KCl
- c. 0.007M Na₂HPO₄*7H₂O
- d. 0.06M glyucose (C₆H₁₂O₆)
- e. Το διάλυμα αποστειρώνεται με την χρήση φίλτρου 0.22nm

4.3.17 Διάλυμα H

- a. 10ml HBS
- b. 2ml 1M Hepes
- c. 38ml H₂O

4.3.18 Διάλυμα γλυκερόλης 15%

- a. 5ml διαλύματος H
- b. 1.5ml αποστειρωμένη γλυκερόλη
- c. 3.5ml αποστειρωμένο ddH₂O

4.3.19 Διάλυμα PBS

Διαλύονται σε 800ml τα παρακάτω συστατικά (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Συστατικά PBS.

| Ingredients | | |
|----------------------------------------------------|----------|--------------|
| NaCl | 74g/L | 1.27 M (10x) |
| Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O | 18.78g/L | 70 mM (10x) |
| Na ₂ HPO ₄ H ₂ O | 4.15g/L | 30 mM (10x) |

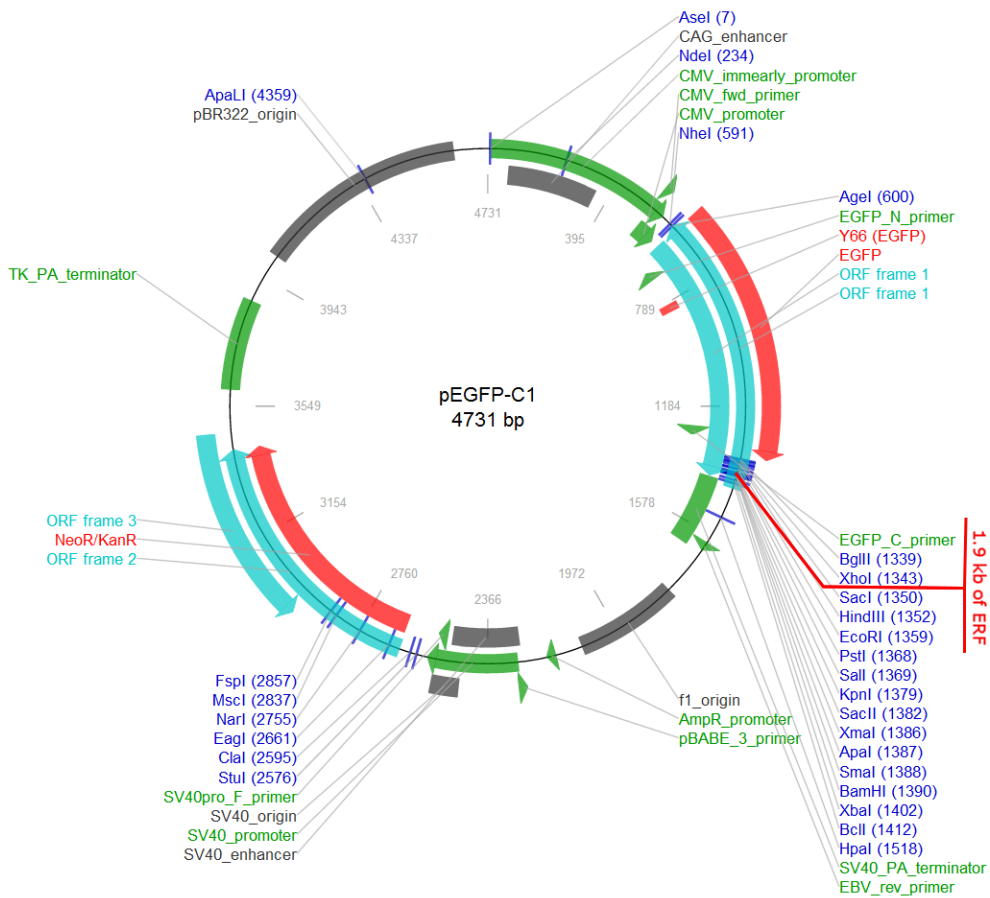
- a. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 με NaOH
- b. Ρυθμίζεται ο όγκος, μέχρι να συμπληρωθεί 1L, με προσθήκη H₂O

5 Πειράματα και αποτελέσματα

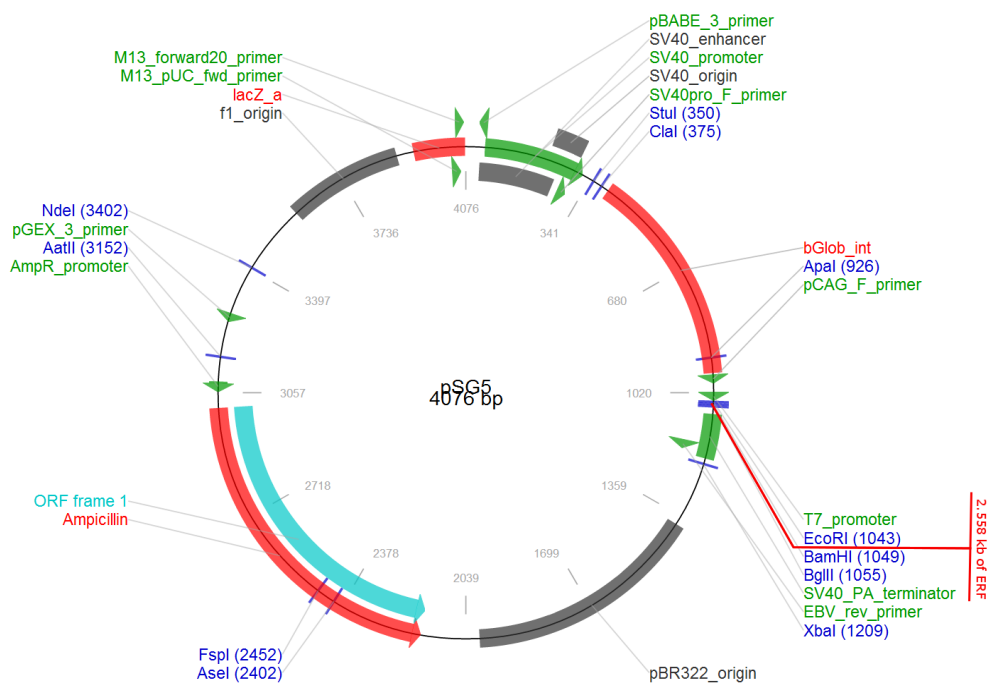
Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ακολουθία των πειραμάτων, που εκτελέστηκαν για την επίτευξη των επιθυμητών μεταλλάξεων στον ανασταλτικό παράγοντα ERF. Στις διαδικασίες που αναλύονται, περιλαμβάνονται: ο καθαρισμός των πλασμιδιακών DNAs, η πέψη τους με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η σύνδεση των τμημάτων τους και η μεταφορά τους στον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, η καλλιέργεια του πλασμιδιακού DNA, που περιέχει την μετάλλαξη σε μικρή και στη συνέχεια σε μεγάλη κλίμακα, η απομόνωση και φύλαξη της μετάλλαξης στα αρχεία του εργαστηρίου και τέλος μια σειρά πειραμάτων διαμόλυνσης Hella κυττάρων με τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Επίσης, στην τελευταία παράγραφο του κεφαλαίου, παρατίθεται ο πίνακας των αποτελεσμάτων.

5.1 Μεταφορά της μετάλλαξης R83A

Παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία της μεταφοράς της μετάλλαξης R83A από τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-ERF (Εικόνα 13) στον πλασμιδιακό φορέα pSG5-ERF (Εικόνα 14). Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα ώστε να απομονωθεί ο ERF από τον GFP που συνυπάρχουν στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-ERF. Η απομάκρυνση του GFP επιβάλλεται γιατί επηρεάζει την ανασταλτική ικανότητα του ERF. Η επίδραση της μετάλλαξης στην έκφραση του ERF θα φανεί όπως και για τις επόμενες μεταλλάξεις, μετά από την διαμόλυνση των Hella κυττάρων και την μέτρηση των επιπέδων της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης σε αυτά.



Εικόνα 13: Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-ERF.



Εικόνα 14: Ο πλασμιδιακός φορέας pSG5-ERF.

5.1.1 Καθαρισμός του πλασμιδιακού pSG5-ERF

Ο καθαρισμός του πλασμιδίου έγινε με την μέθοδο του χλωριούχου καισίου, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου. Η ποσότητα του καθαρού DNA που προέκυψε μετά από μέτρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ήταν 4γ/λ. Η επαναδιάλυση του DNA έγινε σε 150μl TE.

5.1.2 Πέψεις των pSG5-ERF και pEGFP-ERF

Αρχικά εντοπίζεται το τμήμα της μετάλλαξης που ενδιαφέρει (στην συγκεκριμένη περίπτωση για την σημειακή μετάλλαξη αρκεί ένα μικρό τμήμα) και απομονώνεται με την βοήθεια περιοριστικών ενδονουκλεασών που ενδείκνυνται και για τα δύο πλασμίδια. Καταλληλότερα είναι τα ένζυμα που κόβουν μόνο μία φορά στο πλασμίδιο δεξιά και αριστερά της μετάλλαξης.

Πίνακας 6: Πέψεις των pSG5-ERF και pEGFP-ERF (EcoR1 & Kpn).

| Double digests | | | |
|------------------|------|------------------|------|
| EcoR1 | 1μl | EcoR1 | 1μl |
| Kpn | 1μl | Kpn | 1μl |
| Buffer Neb1 | 3μl | Buffer Neb1 | 3μl |
| DNA pSG5-Erf | 2μl | DNA pEGFP-Erf | 2μl |
| BSA | 3μl | BSA | 3μl |
| H ₂ O | 20μl | H ₂ O | 20μl |
| Final volume | 30μl | Final volume | 30μl |

Με βάση τα παραπάνω επιλέγονται τα EcoR1 και Kpn σε συνδιασμό με το κατάλληλο buffer, το Neb1 της biolabs. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 διπλές πέψεις τόσο για τον pEGFP-ERF, όσο και για τον pSG5-ERF (Πίνακας 6). Οι πέψεις πραγματοποιούνται στους 37⁰C για 3h. Μετά από έλεγχο της πέψης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με 0,9% TAE διαπιστώθηκε ότι η πέψη ήταν ατελής. Το γεγονός προσδίδεται στην ανάγκη της EcoR1 για υψηλότερο βαθμό αλάτων από αυτόν της Kpn. Η λύση δίνεται με τη χρήση των ειδικών buffers για κάθε ένζυμο ξεχωριστά, και με την πραγματοποίηση διαδοχικών πέψεων για τον καλύτερο έλεγχο της ενεργότητας των ενζύμων. Έτσι λοιπόν αρχικά πραγματοποιείται η πρώτη πέψη με την Kpn (Πίνακας 7) που απαιτεί χαμηλότερο ποσοστό αλάτων και στην συνέχεια ακολουθεί η πέψη με την EcoR1. Η πρώτη πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37⁰C για 2h. Μετά από έλεγχο της πέψης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με 0,9% TAE διαπιστώθηκε μερική πέψη (δεν κόπηκε όλο το DNA) και για τον λόγο αυτό προστέθηκε άλλο 1μl ενζύμου που παράμε-

ινε στους 37⁰C για 1h και 30'. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν και πέψεις με διαφορετικά ένζυμα (που πληρούν τις προϋποθέσεις) όπως η διπλή πέψη με EcoR1 και Pst1 (Πίνακας 8).

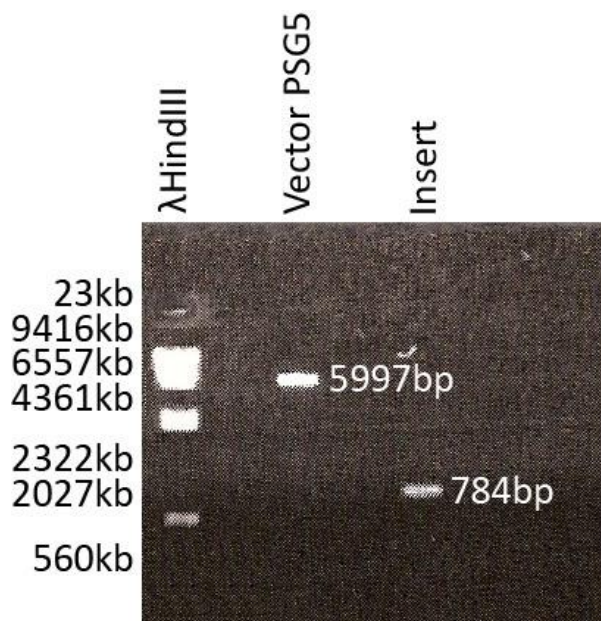
Πίνακας 7: Πέψεις των pSG5-ERF και pEGFP-ERF (μόνο Kpn).

| Single digests | | | |
|-----------------------|------|------------------|-------------|
| Kpn | 1μl | Kpn | 1μl |
| Buffer Neb1 | 2μl | Buffer Neb1 | 2μl |
| DNA pSG5-Erf | 2μl | DNA pEGFP-Erf | 2μl (4γ/μl) |
| BSA | 2μl | BSA | 2μl |
| H ₂ O | 13μl | H ₂ O | 13μl |
| Final volume | 20μl | Final volume | 20μl |

Πίνακας 8: Διπλές πέψεις των pSG5-ERF και pEGFP-ERF (EcoR1 & Pst1).

| Double digests | | | |
|-----------------------|------|------------------|------|
| EcoR1 | 1μl | EcoR1 | 1μl |
| Pst1 | 1μl | Pst1 | 1μl |
| Buffer EcoR1 | 2μl | Buffer EcoR1 | 2μl |
| DNA pSG5-Erf | 2μl | DNA pEGFP-Erf | 2μl |
| BSA | 2μl | BSA | 2μl |
| H ₂ O | 12μl | H ₂ O | 12μl |
| Final volume | 20μl | Final volume | 20μl |

Μετά από 1h και 30' στους 37⁰C ελέγχθηκαν οι πέψεις με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με 0,9% TAE. Η πέψη με την Kpn δεν ήταν ικανοποιητική, σε αντίθεση με την διπλή πέψη (EcoR1 και Pst1). Τα 20μl της πέψης ηλεκροφορήθηκαν σε 4 slots (δεν πρέπει να υπάρχουν περισσότερο από 12-13γ στο μl DNA σε κάθε slot). Για την ηλεκτροφόρηση του pSG5-ERF χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης με TAE 0,9% ενώ για το pEGFP-ERF πήκτωμα αγαρόζης με TBE 1,5%. Τα τμήματα που αναμενόταν να απομονωθούν έχουν μήκη αντίστοιχα 784bp για το ένθεμα και 5997bp για τον πλασμιδικό φορέα (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Τα τμήματα του DNA για την αντίδραση συνδετάσης.

5.1.3 Απομόνωση και καθαρισμός του DNA

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του DNA (pSG5-ERF, 784bp και pEGFP-ERF 5997bp) από το πήκτωμα αγαρόζης έγινε βάση του πρωτοκόλλου του εργαστηρίου με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Η ποσοτικοποίηση του DNA πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια των πηκτωμάτων αγαρόζης και επιβεβαιώθηκε σε ειδικό μετρητή. Προέκυψαν 7ng DNA από το τμήμα των 784bp του EGFP-ERF και 50ng DNA από το τμήμα των 5997bp του pSG5-ERF. Ακολούθησε η αντίδραση συνδετάσης για τα δύο τμήματα.

5.1.4 Αντίδραση συνδετάσης του DNA

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για τα τμήματα pSG5-ERF 784bp και pEGFP-ERF 5997bp και ετοιμάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Ligation τμημάτων των pSG5-ERF και pEGFP-ERF.

| Ligation | | Ligation control | |
|------------------|------|------------------|------|
| T4 ligase | 1μl | T4 ligase | 1μl |
| Insert | 4μl | | |
| Vector | 2μl | Vector | 2μl |
| Buffer ligase | 2μl | Buffer ligase | 2μl |
| H ₂ O | 1μl | H ₂ O | 5μl |
| Final volume | 10μl | Final volume | 10μl |

Για την αντίδραση της συνδετάσης, χρησιμοποιήθηκε ειδικό πρόγραμμα στη PCR που εκτελείται για 2h στους 12⁰C και στη συνέχεια και μέχρι την χρήση της ligation, στους 4⁰C. Από το δείγμα που προέκυψε 1μl, χρησιμοποιήθηκε, για τον μετασχηματισμό των DH10b κυττάρων.

5.1.5 Παρασκευή τρυβλίων με LB agar

Ετοιμάστηκαν τα τρυβλία σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου (με αντιβιοτικό αμπικιλίνη).

5.1.6 Εισαγωγή του ανακατασκευασμένου DNA σε DH10b κύτταρα

Τα δεκτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό είναι DH10b και ανήκουν στο stock του εργαστηρίου (φυλάσσονται στους -80⁰C). Πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός των κυττάρων με 1μl (ul) από το ligation mix και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου. Στρώθηκαν καλλιέργειες στα τρυβλία petri που είχαν προηγουμένα ετοιμαστεί. Στο ένα τρυβλίο περιέχεται το construct που ενδιαφέρει (pSG5-ERF και EGFP-ERF) και τα υπόλοιπα λειτουργούν σαν έλεγχος (control) του μετασχηματισμού. Αναλυτικά τα control είναι: ένα το υπερελικωμένο DNA (pSK+) για τον έλεγχο του μετασχηματισμού, ένα δεύτερο με τον φορέα σκέτο, χωρίς ligation mix, όπου ελέγχεται ή σωστή πέψη του φορέα από τις ενδονουκλεάσες και ένα τρίτο, με ηλεκτροδεκτικά κύτταρα μόνο, χωρίς DNA, για τον έλεγχο της ποιότητας και καταλληλότητας αυτών των κυττάρων.

Πίνακας 10: Καλλιέργειες.

| Construct | Sc DNA (pSK+) | Vector (no DNA) | DH10b cells |
|------------|---------------|-----------------|-------------|
| No columns | Many columns | No columns | No columns |

Τα αποτελέσματα των controls ήταν τα αναμενόμενα (Πίνακας 10), παρόλα αυτά δεν εμφανίστηκαν αποικίες στο τρυβλίο με το ανασυνδυασμένο DNA. Για τον λόγο αυτό ακολούθησε εκ νέου μετασχηματισμός (Πίνακας 11) με μικρότερες ποσότητες από το ligation mix (συγκεκριμένα: αραιώση 1/3 και 1/10) και μόνο 10pg από το υπερελικωμένο DNA για να είναι ευκολότερα μετρήσιμες οι αποικίες (μικρότερος αριθμός).

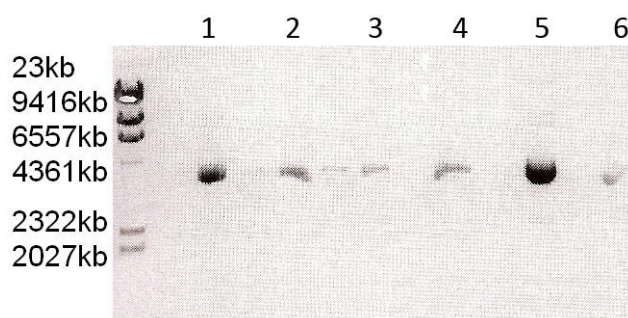
Πίνακας 11: Αποτελέσματα μετασχηματισμού.

| Construct (dil. 1/3) | Construct (dil. 1/10) | DH10b cells | Sc DNA (pSK+) | Vector |
|----------------------|-----------------------|-------------|---------------|------------|
| 9 columns | 15 columns | No columns | Some | No columns |

Από τις αποικίες των βακτηριών που προέκυψαν απομονώθηκε προσεκτικά μια μονή αποικία και στη συνέχεια εμβολιάστηκε υπό στείρες συνθήκες σε 3ml θρεπτικού μέσου που περιέχει το αντιβιοτικό επιλογής και η υγρή καλλιέργεια επώαστηκε ολονύκτια στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 6 αποικιών. Στη συνέχεια αυτές οι αποικίες επώαστηκαν και από τις καλλιέργειες τους απομονώθηκε το DNA τους.

5.1.7 Minipreps για την μετάλλαξη R83A στον pSG5-ERF

Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (minipreps) από τα δείγματα και την επαναδιάλυση της κάθε πελλέτας σε 30ml TE, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση του μεγέθους και η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση και τη χρήση του nanodrop (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: ταυτοποίηση του pSG5-ERF(mut R83A).

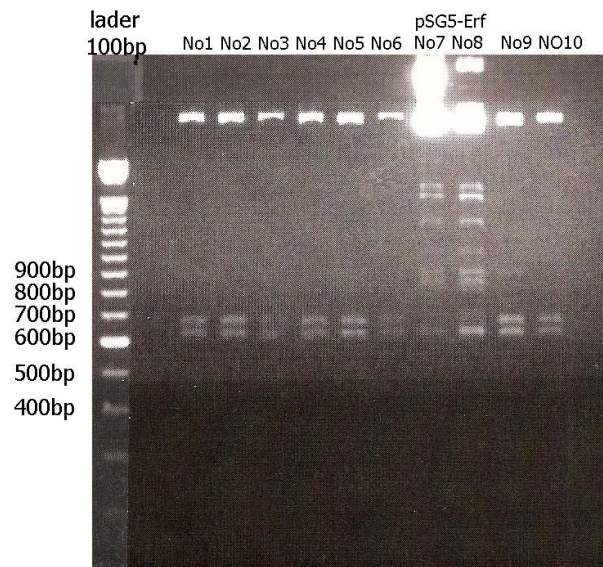
Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε κατάλληλο πήκτωμα αγαρόζης 1% με TAE και χρησιμοποιώντας ως δείκτη 500ng DNA από τον βακτηριοφάγο λ, ο οποίος έχει υποστεί ενζυμική πέψη με την ενδονουκλεάση HindIII.

Πίνακας:12 Πέψη ελέγχου με ApaI.

| Digests 1-6 | | Contol digest (pSG5-ERF 3,36 γ/λ) | |
|------------------|------|-----------------------------------|------|
| ApaI | 1μl | ApaI | 1μl |
| DNA 1-6 | 2μl | DNA | 2μl |
| Buffer Neb4 | 2μl | Buffer Neb4 | 2μl |
| BSA | 2μl | BSA | 2μl |
| H ₂ O | 13μl | H ₂ O | 13μl |
| Final volume | 20μl | Final volume | 20μl |

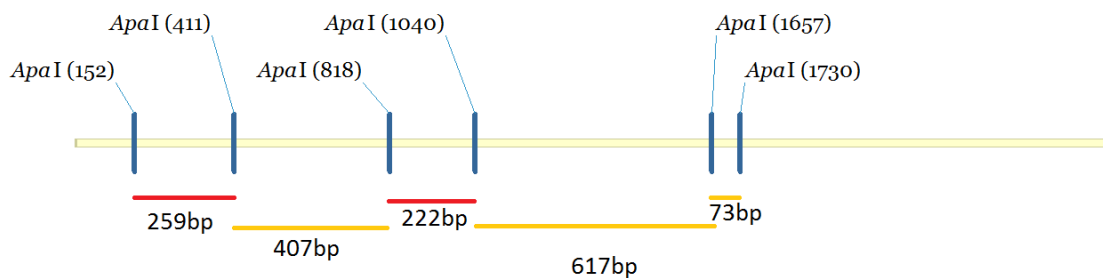
Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ακολούθησε πέψη των δειγμάτων με την ενδονουκλεάση ApaI (Πίνακας:12). Η συγκεκριμένη πέψη είναι μια πέψη ελέγχου, λόγω

του ότι η ενδονουκλεάση *ApaI* κόβει ακριβώς πάνω στη μετάλλαξη στο σημείο 411bp, αν έχει επιτευχθεί ο στόχος, δεν θα κόψει στο συγκεκριμένο σημείο και τα τμήματα που θα προκύψουν θα είναι διαφορετικά (Εικόνα 18). Έτσι στα μεταλλαγμένα στελέχη θα υπάρχουν τμήματα των 73bp, των 222bp, των 617bp και το τμήμα των 666bp, τα δύο τελευταία είναι ορατά στην ηλεκτροφόρηση αгарόζης. Στα έξι δείγματα που ελέγχθησαν ήταν πετυχημένος ο ανασυνδυασμός (Εικόνα 17).

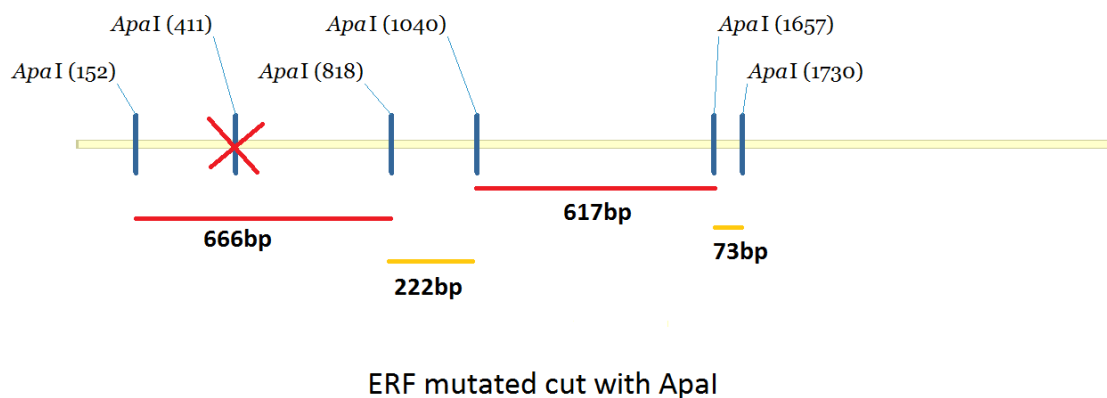


Εικόνα 17: Αντίδραση ελέγχου για την μετάλλαξη R83A. Τα έξι minipreps, ο pSG5-ERF του εργαστηρίου, ο pSG5-ERF που καθαρίστηκε προηγούμενα και πέψεις των Νο5 και Νο4 με μεγαλύτερη ποσότητα DNA(3μl)

Επιλέχθηκε σαν καλύτερο, το δείγμα Νο 5 και ακολούθησε η απομόνωση του νέου πλασμιδιακού DNA, pSG5-ERF (R83A) σε μεγάλη κλίμακα (maxi preps), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου.



ERF cut with *ApaI*



Εικόνα 18: Πέψη ελέγχου με την ApaI.

5.1.8 Δημιουργία Stub για την μετάλλαξη R83A στο pSG5-ERF

Για την αποθήκευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης δημιουργήθηκε ένα stub: τοποθετήθηκε δηλαδή, σε βιδωτό tube 1ml της καλλιέργειας σε 0.5ml γλυκερόλης 100%. Αναγράφονται στο εξωτερικό του tube λεπτομερείς πληροφορίες για την ταυτότητα του περιεχομένου (πλασμίδιο, μετάλλαξη, ημερομηνία, κ.α.) και στη συνέχεια τοποθετείται σε αρχειοθετημένη θέση στους -80°C . Το συγκεκριμένο δείγμα μπορεί να εξεταστεί ως προς την επίδραση της μετάλλαξης R83A στην ενεργότητα του ERF και μόνο μετά από την μεταφορά του στον πλασμιδιακό φορέα pSG424-ERF.

5.2 Δημιουργία νέων μεταλλάξεων με το Stratagene Kit

Οι νέες μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν στον ERF επετεύχθησαν με την βοήθεια του site directed mutagenesis Kit της Stratagene. Οι μεταλλάξεις είναι οι εξής: η σημειακή μετάλλαξη της βάσης 194 από γουανίνη σε αδενίνη και αλλαγή του αμινοξέως από αργινίνη σε γλουταμίνη, η σημειακή επίσης μεταλλαγή στη θέση 256 από κυτοσίνη σε θυμίνη και αλλαγή του αμινοξέως από αργινίνη σε κυστεΐνη και τέλος η διαγραφή στη θέση 1512 της βάσης θυμίνης που προκαλεί μια αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης που οδηγεί σε αλλαγή της φαινυλαναλίνης σε λευκίνη. Η εφαρμογή των μεταλλαγών απαιτεί αρχικά μια σειρά πειραμάτων ελέγχου της αποτελεσματικότητας του Kit.

5.2.1 Αντίδραση ελέγχου

Τα στοιχεία της αντίδρασης ελέγχου αποτελεσματικότητας του Kit παρατίθενται παρακάτω (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Αντίδραση ελέγχου του Stratagene Kit.

| Control reaction of Site directed mutagenesis | | |
|------------------------------------------------------|------------|-------------------------|
| Reaction buffer | 5μl | |
| pWhitescript 4.5Kb | 2μl (10ng) | |
| Control primer 1 | 1.25μl | |
| Control primer 2 | 1.25μl | |
| Dntps mix (1/3d) | 3μl | |
| dd H ₂ O | 36.5μl | |
| Final volume | 50μl | |
| PfuUltra HF DNA πολυμεράση | 1μl | (προστίθεται στο τέλος) |

Η PCR με τα στοιχεία που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 14) χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση ελέγχου του Kit.

Πίνακας 14: PCR μεταλλαξιγένεσης.

| Cycles | Temperature | Time |
|---------------------|--------------------|-------------|
| 1 | 95 ⁰ C | 30' sec |
| 12 | 95 ⁰ C | 30' sec |
| dd H ₂ O | 55 ⁰ C | 1' min |
| Final volume | 68 ⁰ C | 5' min |

Ακολούθησε η πέψη με την ενδονουκλεάση DpnI (1μl), ένα απαλό πιπετάρισμα του δείγματος και η φυγοκέντρωση του για 1 min. Η τοποθέτηση της αντίδρασης στους 37⁰C για 1h, πραγματοποιήθηκε για την πέψη του υπερελικωμένου dsDNA. Στο σημείο αυτό εκτελέστηκε η πρόψυξη των faclon No2059 καθώς και των tips και της πιπέτας, που θα χρησιμοποιηθούν αργότερα στην διαδικασία. Ακολουθεί σταδιακή απόψυξη των XL-1Blue supercompetent κυττάρων μέσα σε πάγο. Για κάθε δείγμα προς μετασχηματισμό καθώς και για το control, χρησιμοποιήθηκαν κλάσματα (aliquots) των 22,5μl των XL-1Blue supercompetent κυττάρων. Εκτελέστηκε μεταφορά 1μl από την πέψη με DpnI κάθε αντίδρασης (control και δείγμα), σε ξεχωριστό aliquot. Χρησιμοποιείται ακόμη ένα aliquot για την πιστοποίηση της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού με προσθήκη 1μl PUC18 στα 22,5μl του aliquot. Μετά από ελαφρά ανάδευση επωάζονται οι αντιδράσεις στον πάγο για 30' min, έπειτα ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων στους 42⁰C για ακριβώς 45'' sec. Στην συνέχεια μεταφέρονται ξανά στον πάγο για 2' min. Ακολουθεί η προσθήκη του προθερμασμένου στους 42⁰C (0.5ml) NZY+ θρεπτικού και η επώαση στους 37⁰C για 1h με ανάδευση στις 225-300 rpm. Το σημείο αυτό είναι το κατάλληλο για την παρασκευή των τρυβλίων με το αντιβιοτικό (όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4) με το Xgal και IPTG, όπου η προσθήκη των τελευταίων πραγματοποιείται μισή ώρα πριν την τοποθέτηση των βακτηρίων (Πίνακας 15). Η τελε-

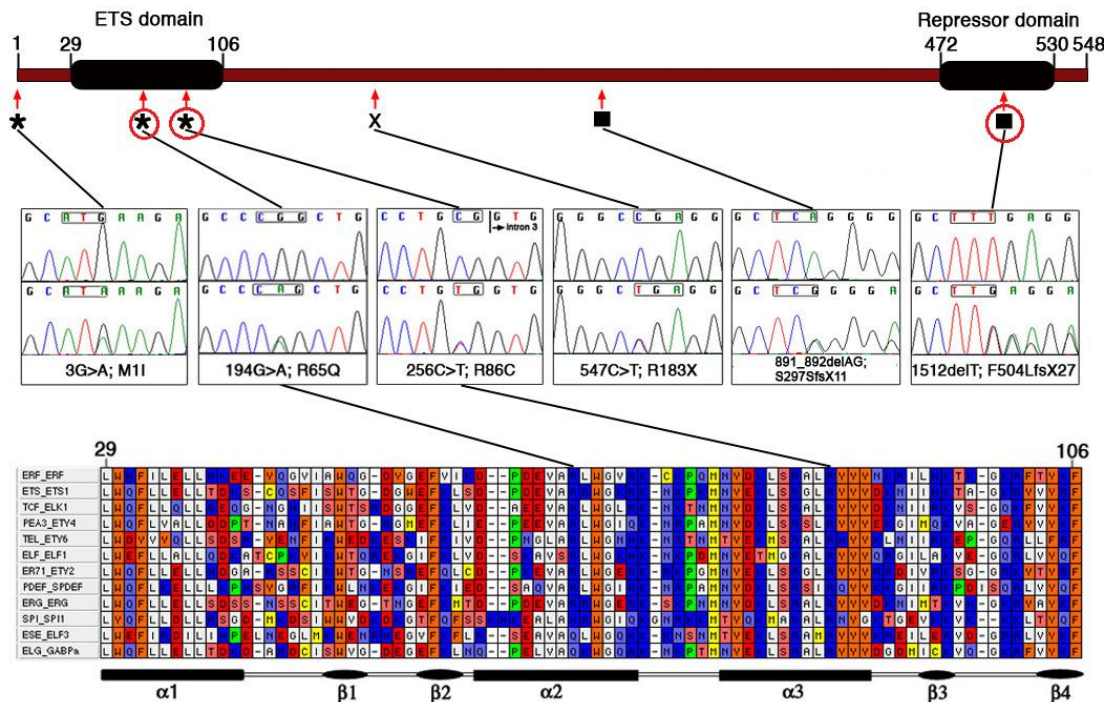
υαία εκτελείται διαδοχικά, πρώτα "στρώνεται" το IPTG (100μl των 10mM) και στη συνέχεια το Xgal (100μl 2% Xgal). Στο τέλος προστίθεται ο σωστός όγκος για την κάθε αντίδραση μετασχηματισμού ξεχωριστά, στα έτοιμα από πριν τρυβλία.

Πίνακας 15: Προετοιμασία τρυβλίων (21h στους 37⁰C).

| Reaction type | Volume to plate |
|----------------------------------------|-----------------------------------|
| pWhitescript, control μεταλλαξιγένεσης | 250 μl |
| pUC18, control μετασχηματισμού | 5 μl (σε 200 μl από NZY+broth) |
| Δείγμα μεταλλαξιγένεσης | 250 μl σε κάθε τρυβλίο από τα δύο |

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης ελέγχου ήταν φτωχά. Στο τρυβλίο με το control, υπήρχαν 24 αποικίες όπου σε 20 από αυτές η μετάλλαξη είχε πραγματοποιηθεί. Το efficiency όμως του μετασχηματισμού ήταν πολύ χαμηλό (65 αποικίες με 0,1ng DNA του PUC18, στα 5μl μόλις 0,0009ng). Για το λόγο αυτό επιπρόσθετα έγιναν τα εξής: κόπηκαν οι άκρες των ρυγχών της πιπέτας για να αποφευχθεί το στρεσάρισμα των κυττάρων και το σημαντικότερο, το θερμικό σοκ που εφαρμόστηκε ήταν πλέον για 35''sec και όχι για 45''sec. Μετά το σταντάρισμα της μεθόδου ακολούθησε η δημιουργία των επιθυμητών μεταλλάξεων.

5.2.2 Νέες μεταλλάξεις στον ERF



Εικόνα 19: Επιθυμητές μεταλλάξεις στον ERF.

Από τη στιγμή που εντοπίστηκαν και καθορίστηκαν οι μεταλλάξεις (Εικόνα 19), αυτό που ακολούθησε ήταν πρωτίστως η δημιουργία των κατάλληλων εκκινητών (primers¹⁰). Η επιλογή των εκκινητών ακολουθεί τους συγκεκριμένους κανόνες που αναφέρθησαν και η κατασκευή τους πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μικροχημείας του ΙΤΕ. Κατασκευάστηκαν πέντε ζευγάρια εκκινητών για το σύνολο των μεταλλάξεων, με τις αντίστοιχες θερμοκρασίες τήξεως. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών για τη μετάλλαξη 194G>A είναι το 339bp-364bp και το 339bp-364bp_{rev} με T_m=80.02. Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών για την μετάλλαξη 256C>T, είναι το 401-429 και 401-429_{rev}, με T_m=83,36. Το τρίτο ζεύγος εκκινητών για την μετάλλαξη 547C>T είναι το 694-719 και 694-719_{rev}, με T_m=80.02. Το τέταρτο ζεύγος εκκινητών για την μετάλλαξη 891_892delAG είναι το 1034-1062 και 1034-1062_{rev} με T_m=90.062 και τέλος το πέμπτο ζευγάρι εκκινητών για την μετάλλαξη 1512delT, το 1656-1687 και 1656-1687_{rev} με T_m=87.7.

¹⁰ Οι εκκινητές αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της αντίδρασης, γιατί αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητοι προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτιδία της αλληλουχίας. Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτιδία, το μήκος των οποίων κυμαίνεται ανάλογα με την χρήση τους (για να απομονώσουμε και να πολλαπλασιάσουμε μία μοναδική αλληλουχία στόχο DNA, οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν μέγεθος από 18 έως 30 βάσεις). Η συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση πρέπει να είναι 0,1-0,5 μΜ. Όταν η συγκέντρωση είναι πολύ υψηλή αυξάνεται η πιθανότητα να δημιουργηθούν μη ομόλογοι (τυχαίοι) υβριδισμοί μεταξύ εκκινητή και DNA, με αποτέλεσμα την δημιουργία DNA τμημάτων που δεν αντιστοιχούν στα αναμενόμενα προϊόντα. Για την κατασκευή των δύο εκκινητών μιας αντίδρασης πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη τα παρακάτω:

- a. οι αλληλουχίες τους δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ειδικά στο 3' άκρο
- b. οι αλληλουχίες τους πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G και C νουκλεοτιδία, ώστε οι T_m θερμοκρασίες τους (melting temperature) να μην διαφέρουν σημαντικά
- c. η αλληλουχία του κάθε εκκινητή δεν πρέπει να περιλαμβάνει περιοχές συμπληρωματικές, γιατί κατά την διάρκεια της αναδιάταξης δημιουργούνται φουρκέτες (hair-pins)
- d. κατά τον σχεδιασμό τους θα πρέπει η κατανομή των νουκλεοτιδίων να είναι τυχαία και να αποφεύγονται περιοχές με πολυπυρίνες ή πολυπυριμιδίνες. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγονται επαναλήψεις νουκλεοτιδίων (πχ. 5'AGCATCTCTCTCAGG 3')

Προκειμένου να πολλαπλασιαστεί επιλεκτικά μόνο ο επιθυμητός στόχος DNA οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα, συνεπώς ο επιτυχής σχεδιασμός τους είναι πολύ σημαντικός. Για την κατασκευή και ευκολότερη επιλογή εκκινητών υπάρχουν ειδικά προγράμματα τα οποία είναι διαθέσιμα από το διαδίκτυο (HINTPCR software, και PRIMER 0.5).

5.2.3 Οι μεταλλάξεις 194G>A και 256C>T

Οι μεταλλάξεις που επιλέχθηκαν για το ξεκίνημα της διαδικασίας αρχικά ήταν: οι δύο μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης του ERF (ETS domain of ERF) και η μετάλλαξη στη περιοχή καταστολής του ERF (Repressor domain of ERF). Πιο συγκεκριμένα η σημειακή μετάλλαξη της βάσης 194 από γουανίνη σε αδερίνη και αλλαγή του αμινοξέως από αργινίνη σε γλουταμίνη, η σημειακή επίσης μεταλλαγή στη θέση 256 από κυτοσίνη σε θυμίνη και αλλαγή του αμινοξέως από αργινίνη σε κυστεΐνη στην περιοχή πρόσδεσης του ERF και τέλος η διαγραφή στη θέση 1512 της βάσης θυμίνης που προκαλεί με αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης σε αλλαγή της φαινυλαναλίνης σε λευκίνη στο repressor domain του ERF. Για την πρώτη μεταλλαγή χρησιμοποιήθηκαν οι primers 339-364bp με αλληλουχία 5'-GATGAGGTGGCCCAGCTGTGGGGCC-3' και 339-365bp rev 5'-CGCCCCACAGCTGGGCACCTCATC-3'. Για την δεύτερη, οι primers 401-429bp με αλληλουχία 5'-GAGCCGGGCCCTGTGCTATTACTATAAC-3 και 401-429bp rev με 5'-GTTATAGTAATAGCACAGGGCCCGGCTC-3' και για την τρίτη οι primers 1656-1687bp 5'-CCCGCTGGGGGCTTGAGGATGAGGGTGAGG-3' και 1656-1687bp rev 5'-CCTCACCTCATCCTCAAGCCCCAGCGGG-3'. Οι αντιδράσεις για τις δύο πρώτες μεταλλάξεις παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 16). Η περάτωση του πρωτόκολλου πραγματοποιήθηκε με την επώαση των δειγμάτων στους 37⁰C για 21h. Τα αποτελέσματα ήταν φτωχά. Η απουσία αποικιών παρ'ότι το efficiency ήταν ικανοποιητικό, ($X10^3$) οδήγησε σε επανάληψη της διαδικασίας με διάφορες τροποποιήσεις (Πίνακας 17) και μόνο για την μία μετάλλαξη (194G>A). Οι αλλαγές που εφαρμόστηκαν ήταν: η προσθήκη στην αρχή της PCR της πολυμεράσης μετά από 5min hot start, η αύξηση του αριθμού των κύκλων της PCR σε 18 και η αύξηση επίσης του χρόνου επιμήκυνσης της PCR (extension) στα 7' min.

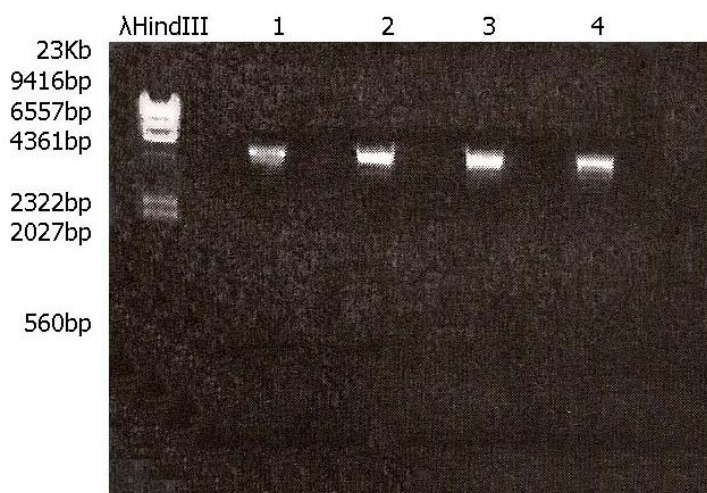
Πίνακας 16: Αντιδράσεις μετάλλαξης.

| Mutation reaction 194G>A | | Mutation reaction 256C>T | |
|----------------------------|--------|----------------------------|---------|
| Reaction buffer | 5μl | Reaction buffer | 5μl |
| DNA pSG5-ERF (4γ/λ) | 1.25μl | DNA pSG5-ERF (4γ/λ) | 1.25μl |
| primer 339-364 (125ng) | 16μl | primer 401-429 (125ng) | 14.5μl |
| primer 339-364 rev (125ng) | 16.6μl | primer 401-429 rev (125ng) | 14.5μl |
| Dntps mix (1/3d) | 3μl | Dntps mix (1/3d) | 3μl |
| dd H ₂ O | 7.15μl | dd H ₂ O | 10.75μl |
| Final volume | 50μl | Final volume | 50μl |
| PfuUltra HF DNA πολυμεράση | 1μl | PfuUltra HF DNA πολυμεράση | 1μl |

Πίνακας 17: Τροποποιήσεις στην αντίδραση PCR.

| Cycles | Temperature | Time |
|-----------|-------------------|---------|
| Hot start | | 5' min |
| 1 | 95 ^o C | 30' sec |
| 18 | 95 ^o C | 30' min |
| | 55 ^o C | 1' min |
| | 68 ^o C | 7' min |

Η επιτυχής έκβαση της διαδικασίας οδήγησε σε συλλογή 4 αποικιών. Ακολούθησε επανάληψη της διαδικασίας για την δεύτερη μετάλλαξη (256C>T) με τις ίδιες συνθήκες. Προέκυψε δυστυχώς μία και μοναδική αποικία. Στη συνέχεια όλες οι αποικίες επωάστηκαν σε 2ml αποστειρωμένου LB με αμικικίνη και ακολούθησε η απομόνωση του DNA τους.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση του DNA της μετάλλαξης 194G>A.

5.2.4 Minipreps pSG5-ERF 194G>A και pSG5-ERF 256C>T

Για την απομόνωση του DNA, προτιμήθηκε το kit της Qiagen για την λήψη καλύτερης ποιότητας DNA. Η διαδικασία εφαρμόστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας. Οι ποσότητες του DNA που προέκυψαν (Πίνακας 18) μετρήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 20) και σε ειδική συσκευή (nanodrop). Τα δείγματα επεξεργαστήκαν κατάλληλα για το sequencing (απαιτούνται 1,5γ DNA σε 8-10μl).

Πίνακας 18: Μετρήσεις DNA των pSG5-ERF 194>A και pSG5-ERF 256C>T.

| Samples | ng/uL | γ/λ | γ/50λ |
|------------------------|-------|--------|-------|
| No 1 primers (339-364) | 72.7 | 0.0727 | 3.63 |
| No 2 primers (339-364) | 113.0 | 0.113 | 5.65 |

| | | | | |
|------|-------------------|------|--------|------|
| No 3 | primers (339-364) | 95.3 | 0.0953 | 4.76 |
| No 4 | primers (339-364) | 77.8 | 0.0778 | 3.89 |
| No 5 | primers (401-429) | 98.6 | 0.0986 | 4.93 |

Η επεξεργασία περιλαμβάνει, αναλόγως συμπήκνωση ή αραίωση των δειγμάτων ώστε η συγκέντρωση να είναι η ζητούμενη. Η συμπήκνωση εκτελέστηκε ως εξής: πρόσθεση στο δείγμα 1/10 του όγκου, οξικό νάτριο 3M (CH₃COONa) και 2,5 όγκοι αιθανόλης 100%, τοποθέτηση του δείγματος στους -80°C για 10-15 min και φυγοκέντρηση του σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για 5' min. Τέλος ακολούθησε πλύσιμο με αιθανόλη 70% (100μl) και στέγνωμα. Η επαναδιάλυση του δείγματος έγινε σε 10μl TE.

5.2.5 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μικροχημείας του ΙΤΕ, έδειξαν επιτυχημένες μεταλλάξεις στα δείγματα Νο 1 και Νο 4 όπου επιτεύχθηκε η πρώτη μετάλλαξη, 194G>A και μια διπλή μετάλλαξη στο δείγμα Νο 5 που περιελάμβανε την δεύτερη επιθυμητή μετάλλαξη, 256C>T μαζί όμως με την μετάλλαξη R83A.

```

Name: 1-T7700
Report run date: Wed Mar 02 12:15:48 GMT+02:00 2011
Sample remarks:

1 CCCAGCATGA AGAaCCCGGC GGACACAGGG TTTGCCTTCC CGGATTGGGC
51 CTACAAGCCA GAGTCGTCCC CTGGcTCAAG GCAGATCCAG CTGTGGCACT
101 TTATCCTGGA GCTGCTGCGg AAGGAGGAGT ACCAGGGCGT CATTGCCTGG
151 CAGGGGGACT ACGGGGAATT CGTCATCAA GACCCTGATG AGGTGGCCCA
201 GCTGTGGGGC GTTCGCAAGT GCAAGCCCCA GATGAATTAC GACAAGCTGA
251 GCCGGGCCCT GCGCTATTAC TATAACAAGC GCATTCTGCA CAAGACCAAG
301 GGGAAACGGT TCACCTACAA GTTCAATTTT AACAAACTGG tGCTGGTCAA
351 TTACCCATT CATTGATGTGG GGTGGCTGG GGTGTCAGTG CCCCAGAGTG
401 CCCCAGCAGT GCCGTGCGGT GGTAGCCACT TCCGCTTCCC TCCCTCAACG
451 SCCTCCGAGG CGCTGTCCCC CACCGAGGAC CCCCCTCAC CACCAGCCTG
501 CTCTTcATCT TCATCTTCCC TCTTCTCGGC TGTGGTGGCC CGCCGCCTGG
551 GCCgAGGCTC AGTCAGTGAC TgTAGTGATG GCACGTCAGA GCTGGAGGAA
601 CCGCTGGGAG AGGATCCCCG CGSCCGACCA CCCGGCCCTY CGGATCTGGG
651 TGCCTTcCGA GGGSCCCCGC TGGgCCGcCT GCCCCATGAC CCTGGTGTCT
701 TYCGAGTCTA TYCCCgGCCT CGGGGTGGcc CTGAACCCCT CAGCCCCTTC
751 CCTGTGTcGc CTCTKGSCSG GTCCTGGaTC CCTGCTGcCC CcTYAgSTtT
801 TCCCgGGTtT gSCCATGacG GCCACCCACC TGGGCTACAM TccCTCGSCc
851 ACGgTGAGcc CgATGTAC

```

Name: 2-T7700
Report run date: Wed Mar 02 12:15:48 GMT+02:00 2011
Sample remarks:

```
1 aGCATGaaGA CCCCCGGCGGA CACAGGGTTT GCCTTcCCCGG ATTGGGCCTA
51 CAAGCCAGAG TCGTCCCCTG GCTCAAGGCA GATCCAGCTG TGGCACTTTA
101 TCCTGGAGCT GCTGCGgAAG GAGGAGTACC AGGGCGTCAT TGCCTGGCAG
151 GGGGACTACG GGGAAATTCGT CATCAAAGAC CCTGATGAGG TGGCCCCGGCT
201 GTGGGGCGTT CGCAAGTGCA AGCCCCAGAT GAATTACGAC AAGCTGAGCC
251 GGGCCCTGCG CTATTACTAT AACAAGCGCA TTCTGCACAA GACCAAGGGG
301 AAACGGTTCA CCTACAAGTT CAATTTCAAC AAActGGTGC TGGTCAATTA
351 CCCATTCATT GATGTGGGGT TGGCTGGGGG TGCAGTGCCC CAGAGTGCCC
401 CGCCAGTGCC GTCGGGTGGT AGCCACTTcC GCTTcCCTCC CTCAACGSCC
451 TCCGAGGCGC TGTCCCCCAC CGAGGACCCC CGCTcACCAC CAGCCTGCTC
501 TtCATCTTCA TCTTCCCTCT TCTCGGCTGT GGTGGCCCCG CGCCTGGGCC
551 gAGGCTCAGT CAGTGACTgT AGTGATGGCA CGTCAGAGCT GGAGGAACCG
601 CTGGGAGAGG ATCCCCGCGS CCGACCACC GGCCTYCGG ATCTGAGTGC
651 CTTcCGAGGG SCCCCGCTGG gCCGSCTGCC CCATGACCCT GGTGTSTTYC
701 GAGTSTATYC CCGGCCTcGG GGTGGcCCTG AACCCCTCAG cCCCTTYCCT
751 GTGTcGcCTC TgGCCgGTCC TGGRTCCctG STgCCCCCTY AGCTtTTCCC
801 GGGTYTGCC ATGaCGGcCA CCCACCTGGG CTACAMTtCC TYGSCcACGS
851 TGAGSCCGAT GTACCCAGTG GTGGgGGGGG GCCaSCGGT aSGGGGAGGT
901 tCACTTtTYt T
```

Name: 3-T7700
Report run date: Wed Mar 02 12:15:48 GMT+02:00 2011
Sample remarks:

```
1 cccAGCATGA aGACCCCGGC GGACACAGGG TTTGCCTTCC CGGATTGGGC
51 CTACAAGCCA GAGTCGTCCC CTGGCTCAAG GCAGATCCAG CTGTGGCACT
101 TTATCCTGga GCTGCTGCGG AAGGAGGAGT ACCAGGGCGT CATTGCCTGG
151 CAGGGGGACT ACGGGGAATT CGTCATCAAA GACCCTGATG AGGTGGCCCCG
201 GCTGTGGGGC GTTCGCAAGT GCAAGCCCCA GATGAATTAC GACAAGCTGA
251 GCCGGGCCCT GCGCTATTAC TATAACAAGC GCATTCTGCA CAAGACCAAG
301 GGGAAACGGT TCACCTACAA GTTCAATTTT AACAAActGG TGCTGGTCAA
351 TTACCCATTC ATTGATGTGG GGTTGGCTGG GGGTGCAGTG CCCCAGAGTG
401 CCCCGCCAGT GCCGTGCGGT GGTAGCCACT TcCGCTTCCC TCCCTCAACG
451 SCCTCCGAGG CGCTGTCCCC CACCGAGGAC CCCCCTCAC CACCAGCCTG
501 CTCTTcATCT TCATCTTCCC TCTTCTCGGC TGTGGTGGCC CGCCGCTGG
551 GCCGAGGCTc AGTCAGTGAC TgTAGTGATG GCACGTCAGA GCTGGAGGaA
601 CCGCTGGTAG AGGATCCCCG CgCCCACCA CCGGCCCTY CGGATCTGGG
651 TGCCTTcCGA GGGcCCCCG TGGSCCGCCT GCCCCATGAC CTTGGTGTCT
701 TcCGAGTcTA TcCCCCgCCT CGGGGTGGCC CTGAACCCCT CAGCCCCTTc
751 CCTGTGTYGC CTCTKGCCgG TCCTGGATCC CTGCTGCCCC CTtAGCTYTT
801 CCCGGSTYTG CCCATGACGG CCACCCACCT GGGCTACAMT YCCTCGCCcA
851 CgCTGAGGCC GATGTACCCC AgTGGTGGSG GGGGGSCCAG CGgcTYAgGG
901 GGGRGGTtCC ActTYTTCTT YAGCCCTGAG GACaAgAAAa GGTACCTSCA
951 GGCCACAAC CAAAGgKCT aCAAAa
```


Name: 4-T7700
Report run date: Wed Mar 02 12:15:48 GMT+02:00 2011
Sample remarks:

```
1 AGCATGAaGA CCCCgGCGGA CACAGGGTTT GCCTTCCCgG ATTGGGCCTA
51 CAAGCCAGAG TCGTCCCCTG GCTCAAGGCA GATCCAGCTG TGGCACTTTA
101 TCCTGGAGCT GCTGCGGAAG GAGGAGTACC AGGGCGTCAT TGCCTGGCAG
151 GGGGACTACG GGAATTCGT CATCAAAGAC CCTGATGAGG TGGCCAGCT
201 GTGGGGCGTT CGCAAGTGCA AGCCCCAGAT GAATTACGAC AAGCTGAGCC
251 GGGCCCTGCG CTATTACTAT AACAAGCGCA TTCTGCACAA GACCAAGGGG
301 AAACGGTTCA CCTACAAGTT CAATTTCAAC AAActGGTGC TGGTCAATTA
351 CCCATTCATT GATGTGGGGT TGGCTGGGGG TGCAGTGCCC CAGAGTGCCC
401 CGCCAGTGCC GTCGGGTGGT AGCCACTTCC GCTTcCCTCC CTCAACGCC
451 TCCGAGGCGC TGTCccccAC CGAGGACCCC CGCTCACCAC CAGCCTGCTC
501 TTCATCTTCA TCTTCCCTCT TCTCGGCTGT GGTGGCCcGc CGCCTGGGCC
551 gAGGCTCAGT CAGTACTGT AGTGATGGCA CGTCAGAGCT GGAGGAACCG
601 CTGGGAGAGG ATCCCCgCGC CCGACCACCC GGCCCTYCGG ATCTGGGTGC
651 CTTcCGAGGG CCCCgCTGG SCCGCCTGCC CCATGACCCT GGTGTCTTYC
701 GAGTCTATMC CCGCCTMGG GGTGGCCCTG AACCCCTCAG CCCCTTcCCT
751 GTGTYGCCTc TKGCCgGTcC TGGaTCCCTG CTGSCCCcTH AgMTWTtCCC
801 GGcTYTGCCC ATGAcGGCCA CCCACCTGGG CTACAMTHCC TCGCCcACGC
851 TGAGSCCgAT GTACCCCAgT GGTGSGGGG GGGCCAGCGG STTARGGGGA
901 GGgTYCMACT TTTTcTTTAg CcctGAGGRC ATgAAAAGGT ACcTgcAGgC
951 CACACCAAAG GgtTaaAAT TAccACTta
```

Name: 5-T7700
Report run date: Wed Mar 02 12:15:48 GMT+02:00 2011
Sample remarks:

```
1 aGCATGaaGa CCCCgGCGGA CACAGGGTTT GCTTCCCgGA TTGGGCCTAC
51 AAGCCAGAGT CGTCCCCTGG CTCAAGGCAG ATCCAGCTGT GGCACCTTAT
101 CTTGGAGCTG CTGCGgAAGG AGGAGTACCA GGCCTCATT GCCTGGCAGG
151 GGGACTACGG GGAATTCGTC ATCAAAGACC CTGATGAGGT GGCCCGGCTG
201 TGGGGCGTTC GCAAGTGCAA GCCCCAGATG AATTACGACA AGCTGAGCGC
251 GGCCCTGTGC TATTACTATA ACAAGCGCAT TCTGCACAAG ACCAAGGGGA
301 AACGGTTCAC CTACAAGTTC AATTTCAACA AACTGGTGCT GGTCAATTAC
351 CCATTCATTG ATGTGGGGT GGCTGGGGGT GCAGTGCCCC AGAGTGCCCC
401 GCCAGTGCCG TCGGGTGGTA GCCACTTCCG CTTCCCTCCT TCAACGCCCT
451 CCGAGGcGCT GTCCCCACC GAGGACCCC GCTCACCACC AGCCTGCTCT
501 TCATCTTCAT CTTCCCTCTT CTCGGCTGTG GTGGCCcGc GCCTGGGCCG
551 AGGCTCAGTC AGTGACTGTA GTGATGGCAC GTcAGAGCTG GAGGAACcGc
601 TGGGAGAGGA TCCCCGCGcC CGACCACCCG GCCCTYCGGA TCTGGGTGcC
651 TTcCGAGGGs CCCCgCTGGS CCGcCTGCC CATGACCCTG GTCTCTTcCG
701 AGTCTATcCC CGGCCTCGGG GTGGCCCTGA ACCCTCAGC CCCTCCCTG
751 TGTcGcCTCT KGCCGGTcCT GGATCCCTGC TGCCCCCTcA GcTYTtCCCG
801 GCTYTgCCCA TGACGGCCAC CCACCTGGGC TACAMTcCCT cGCCCACGgT
851 GAGCCCGATG TACCCcAGTg GTGSGGGGG GGCAGCGGC TcAGGGGGGA
901 GGcTYCCTACT TtTYcTTYAg ccCTGAGGAc ATGAAAaGGT ACCTGCAGGc
951 CCACAaCCAA AGgG
```

Εικόνα 21: Αλληλούχιση των δειγμάτων. Υπογραμμισμένο το σημείο της μετάλλαξης.

Το λάθος αυτό προέκυψε μετά από την χρήση του μεταλλαγμένου DNA του pSG5-ERF (R83A) και όχι αυτού που δεν περιείχε την μετάλλαξη. Από την διπλή μετάλλαξη έγινε καλλιέργεια και στη συνέχεια κρατήθηκε stub που φυλάχθηκε με τα στοιχεία του περιεχομένου στο αρχείο του εργαστηρίου στους -80°C . Για την επιτυχή μετάλλαξη 194G>A πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα. Ακολούθησε η

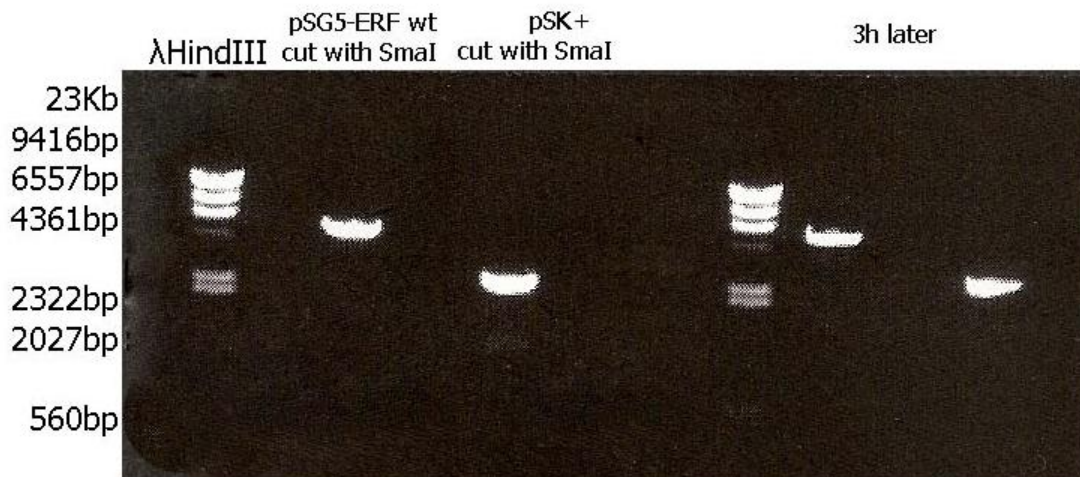
απομόνωση του DNA σύμφωνα με τη μέθοδο του εργαστηρίου (χλωριούχο καΐσιο). Από το δείγμα δημιουργήθηκε επίσης, stub και αρχειοθετήθηκε στους -80°C .

5.2.6 Μετάλλαξη 1512delT

Μετά την επίτευξη της πρώτης μετάλλαξης ακολούθησε η επανάληψη του πρωτοκόλλου της Stratagene για την μετάλλαξη, στο τμήμα καταστολής του ERF (διαγραφή της θυμίνης στη θέση 1512). Η διαδικασία εκτελέστηκε κανονικά αλλά δεν απέδωσε, δεν υπήρξε καμία αποικία. Μετά από επαναλήψεις αποφασίστηκε τελικά η μεταφορά του τμήματος ενδιαφέροντος, από τον pSG5(4.1Kb) φορέα σε μικρότερο πλασμίδιο. Η επιλογή μικρότερου πλασμιδιακού φορέα διευκολύνει την διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης στο επίπεδο της PCR (αριθμός των κύκλων) και προφανώς αυτή να είναι η λύση στο πρόβλημα. Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pSK+ (2.9Kb). Στο εργαστήριο υπήρχε ήδη έτοιμο το πλασμίδιο pSK+ERF. Στον καινούριο φορέα πραγματοποιήθηκαν συγκεκριμένες πέψεις για την απομόνωση και την μεταφορά των 180bp που ενδιαφέρουν. Με τη σειρά, εκτελέστηκαν οι πέψεις με την ενδονουκλεάση SmaI και στα δύο πλασμίδια (Πίνακας 19). Αυτές πραγματοποιήθηκαν στους 25°C , για 3h με ενδιάμεσους ελέγχους, που έγιναν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (). Έπειτα ακολούθησαν οι πέψεις με την ενδονουκλεάση SacI στους 37°C (Πίνακας 20).

Πίνακας 19: Πέψη του pSG5-ERF με SmaI.

| Digest 1 (pSG5-ERF) | | Digest 2 (pSK+) | |
|----------------------|------|------------------|------|
| SmaI | 2μl | SmaI | 1μl |
| DNA (pSG5-ERF, 6γ/λ) | 2μl | DNA (pSK+, 3γ/λ) | 1μl |
| Buffer Neb4 | 4μl | Buffer Neb4 | 2μl |
| H ₂ O | 32μl | H ₂ O | 16μl |
| Final volume | 40μl | Final volume | 20μl |

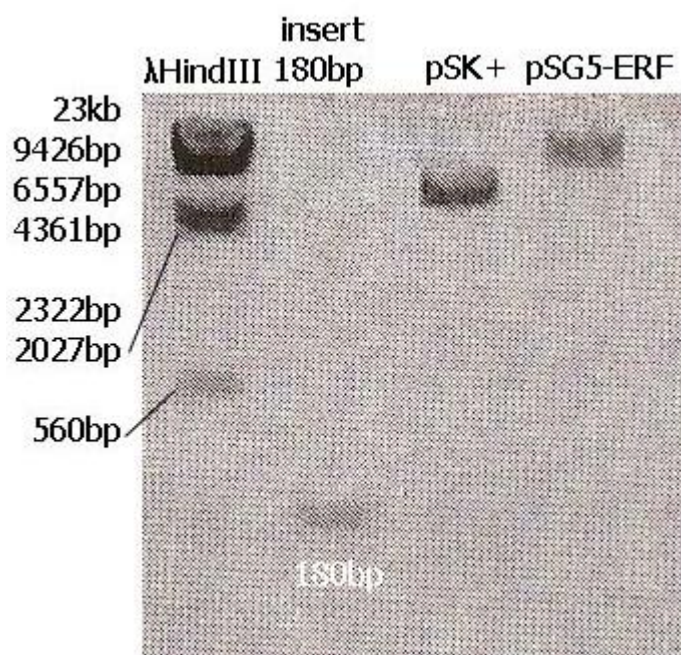


Εικόνα 22 Πέψεις των pSG5-ERF και pSK+ με SmaI.

Πίνακας 20: Πέψη του pSG5-ERF με SacI.

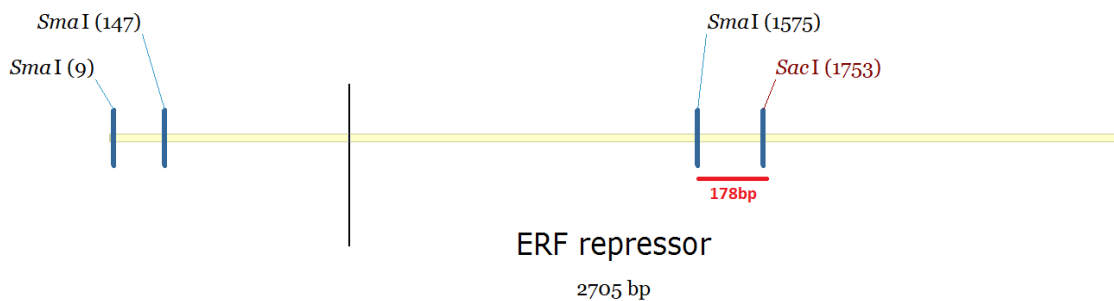
| Digest 1' (pSG5-ERF) pre-digested with SmaI | | Digest 2' (pSK+) pre-digested with SmaI | |
|---------------------------------------------|------|-----------------------------------------|------|
| SacI | 2μl | SacI | 1μl |
| DNA (pSG5-ERF, 6γ/λ) | 40μl | DNA (pSK+, 3γ/λ) | 20μl |
| Buffer Neb1 | 4μl | Buffer Neb1 | 2μl |
| BSA | 4μl | BSA | 2μl |
| Final volume | 50μl | Final volume | 25μl |

Ο έλεγχος των πέψεων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με 1% TAE για το πλασμίδιο και σε πήκτωμα με 1.5% TBE για το ένθετο τμήμα των 180 βάσεων.

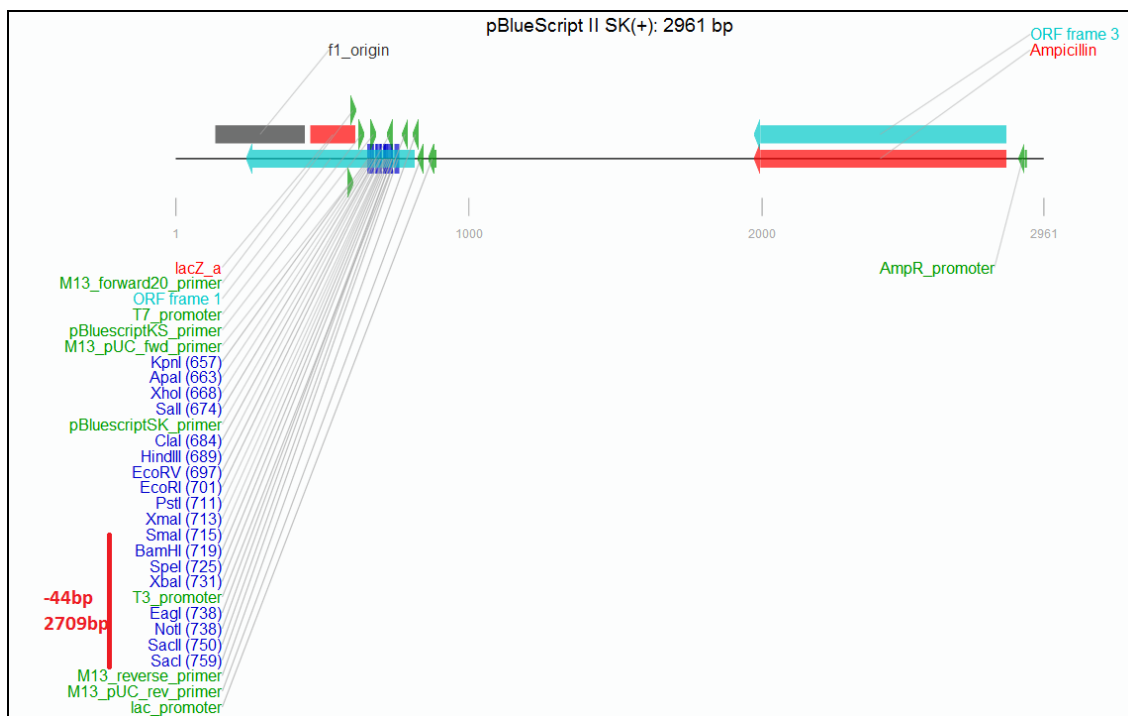


Εικόνα 23: Αναγνωριστικό πήκτωμα αγαρόζης για τις πέψεις των pSG5-ERF και pSK+ με τα ένζυμα SmaI και |SstI.

Τα τμήματα που ηλεκτροφορήθηκαν είχαν το αναμενόμενο μέγεθος (Εικόνα 23). Μετά από την ηλεκτροφόρηση του παρασκευαστικού πηκτώματος όπου χρησιμοποιήθηκε όλη η ποσότητα των δειγμάτων των πέψεων, ακολούθησε η έκλουση των τμημάτων, 180bp από το πλασμίδιο pSG5-ERF (Εικόνα 24) και 2709bp από το πλασμίδιο pSK+DNA (Εικόνα 25). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του DNA (178bp από το πλασμίδιο pSG5-ERF και 2709bp από το πλασμίδιο pSK+) από το πήκτωμα αγαρόζης σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου. Κρίθηκε ακόμη, σκόπιμη η φύλαξη του DNA στους -20°C έως την ολοκλήρωση της παρασκευής νέων ηλεκτροδεκτικών κυττάρων.



Εικόνα 24: Το τμήμα των 178 βάσεων του ERF που περιέχει την μετάλλαξη.



Εικόνα 25: Το πλασμίδιο pSK+ μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες SmaI και SacI..

5.2.7 Παρασκευή νέων ηλεκτροδεκτικών κυττάρων

Η παρασκευή των electrocompetent κυττάρων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου. Η διαδικασία ξεκίνησε από stub DH10b κυττάρων που βρίσκονται αρχειοθετημένα στους -80°C και έλαβε χώρα στους 4°C .

5.2.8 Αντίδραση συνδετάσης

Με φρέσκα ηλεκτροδεκτικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε η αντίδραση συνδετάσης (DNA ligation) για τα τμήματα DNA, του ενθέματος (12,2ng) των 178bp από το πλασμίδιο pSG5-ERF και του φορέα (50ng) των 2709bp από το πλασμίδιο pSK+ (Πίνακας 21), τα οποία προήλθαν, όπως αναφέρθηκε, μετά από διαδοχική πέψη με τις ενδονουκλεάσες SmaI και SstI.

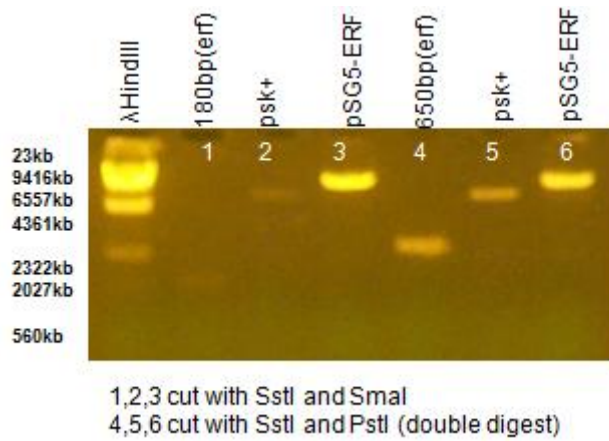
Πίνακας 21: Αντίδραση συνδετάσης για τις 178bp του pSG5-ERF και τις 2709bp του pSK+.

| Ligation | | Self ligation | |
|------------------|-------------|------------------|------|
| T4 ligase | 1μl | Reaction buffer | 1μl |
| Insert | 3μl(12.2ng) | | |
| Vector | 1μl(50ng) | Vector | 1μl |
| Buffer ligase | 2μl | Buffer ligase | 2μl |
| H ₂ O | 3μl | H ₂ O | 6μl |
| Final volume | 10μl | Final volume | 10μl |

Ταυτόχρονα ετοιμάστηκαν τα τρυβλία επιλογής σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου (με αντιβιοτικό αμικιλίνη) και επιστρώθηκαν με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37°C . Χαρακτηριστική ήταν και σε αυτή τη φάση της διαδικασίας η αντιμετώπιση όλων των πιθανών και απίθανων προβλημάτων, όπως δείγματα χωρίς αποικίες, δείγματα με αποικίες αγνώστου προέλευσης καθώς και άλλα μικρότερα προβλήματα που προέκυψαν από επιπόλαιο χειρισμό ή κακή τύχη.

5.2.9 Ανασκόπηση και αναθεώρηση

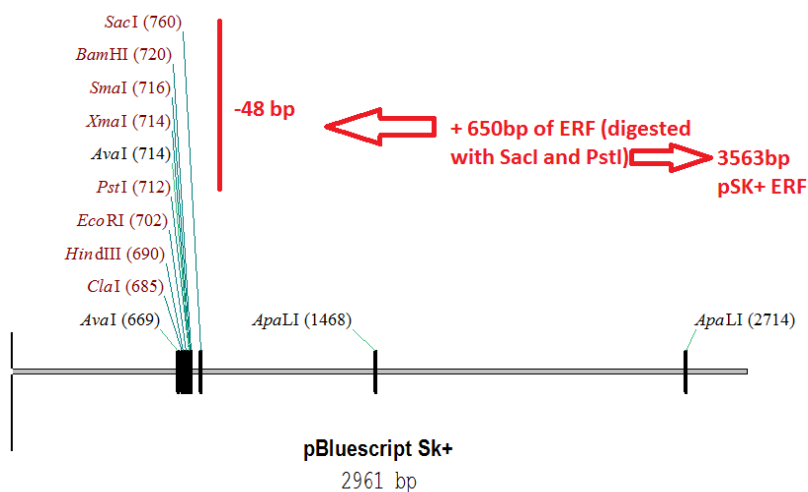
Έτσι τα αποτελέσματα οδήγησαν σε ανασκόπηση της διαδικασίας και αναθεώρηση των πεπραγμένων. Για την επίτευξη της μεταλλαγής επιλέχθηκε μεγαλύτερο τμήμα DNA (Εικόνα 26), που προέκυψε μετά από πέψη του pSG5-ERF με PstI και SstI (ισοσχίζομερές της ενδονουκλεάσης SacI).



Εικόνα 26: Η ηλεκτροφόρηση καταδεικνύει το κατάλληλο ένζυμο για την απομόνωση του τμήματος, όπου θα πραγματοποιηθεί η μετάλλαξη 1512delT.

Με τα ίδια ένζυμα κόπηκε και το πλασμίδιο pSK+. Προέκυψε έτσι ένα τμήμα από τον pSG5-ERF 650bp, το οποίο στη συνέχεια εισήχθη στο πλασμίδιο pSK+ αφού αφαιρέθηκαν πρώτα από αυτό 48 βάσεις. Προέκυψε έτσι, το πλασμίδιο pSK+ ERF μήκους 3563 βάσεων (Εικόνα 27).

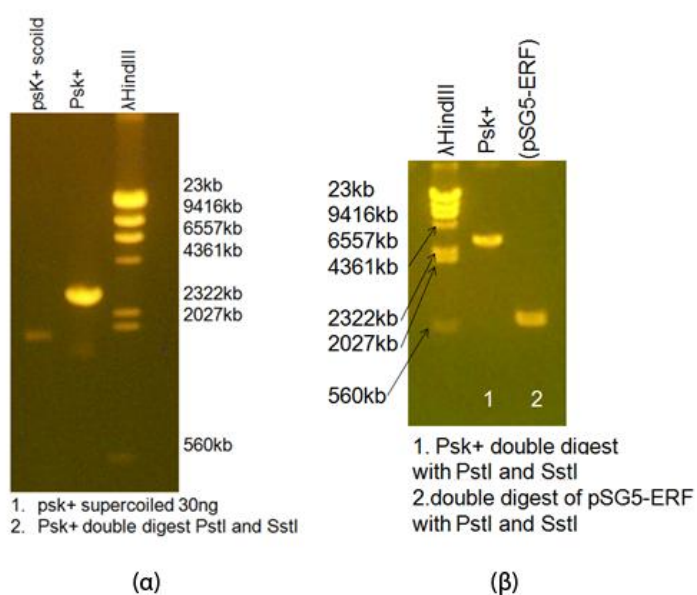
Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν στους 37⁰C (Πίνακας 22). Ο έλεγχος των πέψεων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 28). Η απομόνωση του DNA που ακολούθησε από το πήκτωμα αγαρόζης έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου. Τα τμήματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση συνδετάσης (Πίνακας 23). Τα ποσά του DNA που απομονώθηκαν ήταν 60ng για το πλασμίδιο και 30ng για το ένθεμα.



Εικόνα 27: pBluescript Sk+ και ERF(650bp).

Πίνακας 22: Πέψεις με SstI και PstI.

| Digest 1 (pSG5-ERF) 760ng/μl | | Digest 2 (pSK+) | |
|------------------------------|------|------------------|------|
| PstI | 1μl | PstI | 1μl |
| SstI | 1μl | SstI | 1μl |
| DNA (pSG5-ERF) | 15μl | DNA (pSK+, 3γ/λ) | 1μl |
| Buffer Neb1 | 2μl | Buffer Neb1 | 1μl |
| BSA | 2μl | BSA | 1μl |
| | | H ₂ O | 5μl |
| Final volume | 21μl | Final volume | 10μl |



Εικόνα 28: (α) Ηλεκτροφόρηση του pSK+, (β) Διπλή πέψη των pSK+ και pSG5-ERF.

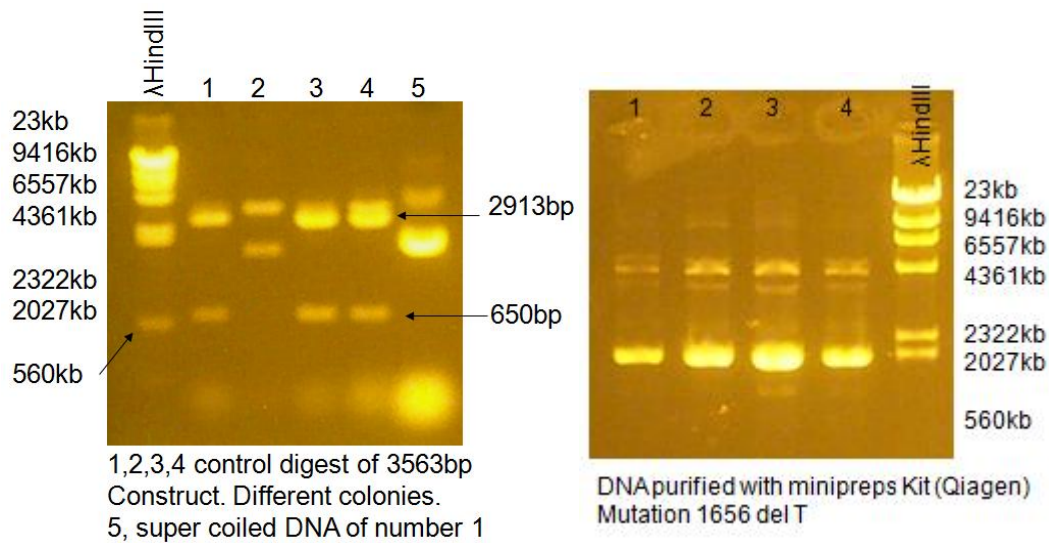
Η αντίδραση συνδετάσης πραγματοποιήθηκε στους 10⁰C ολονύκτια.

Πίνακας 23: Αντίδραση συνδετάσης.

| Ligation | | Ligation control | |
|--------------------|------|------------------|-----|
| T4 ligase | 1μl | T4 ligase | 1μl |
| Buffer ligase | 1μl | Buffer ligase | 1μl |
| Insert 650bp ERF | 2μl | | |
| Vector pSK+(-48bp) | 1μl | Vector | 1μl |
| ATP | 1μl | ATP | 1μl |
| H ₂ O | 4μl | H ₂ O | 6μl |
| Final volume | 10μl | Final volume | 6μl |

Ακολούθησε ο μετασχηματισμός των κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση, minipreps για τις τέσσερις αποικίες που επιλέχθηκαν και έλεγχος του DNA τους με ηλεκτροφόρηση σε

πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 29). Το DNA καθαρίστηκε με την μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου του εργαστηρίου.



Εικόνα 29: Έλεγχος των minipreps σε πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός του DNA τους..

Στη συνέχεια δημιουργήθηκε stub (από το πρώτο δείγμα) για το construct και αρχειοθετήθηκε κατάλληλα. Η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε ήταν 100μl με 30ng/μl. Για την μεταλλαξιγένεση με το Kit της Stratagene, χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα, ένα με 50ng DNA (No1) και ένα (No2) με 30ng DNA (Πίνακας 24). Η PCR εκτελέστηκε με τα στοιχεία που αναφέρονται στον αντίστοιχο πίνακα (

Πίνακας 25). Ακολούθησε η πέψη με το ένζυμο Dpn και συνεχίστηκε η ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου. Μετά την περάτωση της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του επιθυμητού DNA με την βοήθεια του Kit της Qiagen (Εικόνα 29). Οι ποσότητες που απομονώθηκαν μετρήθηκαν στο φωτόμετρο, στη συνέχεια τροποποιήθηκαν κατάλληλα (αραίωση ή συμπύκνωση) και στάλθηκαν για αλληλούχιση με τους κατάλληλους primers: 1656-1687bp 5'-CCCGCTGGGGGCTTGAGGATGAGGGTGAGG-3' και 1656-1687bp rev 5'-CCTCACCTCATCCTCAAGCCCCAGCGGG-3'.

Πίνακας 24: Αντιδράσεις μεταλλαξιγένεσης για την μετάλλαξη 1512delT;F504LfsX27.

| 1 Mutation reaction 1512delT;F504LfsX27 | | 2 Mutation reaction 1512delT;F504LfsX27 | |
|-----------------------------------------|--------|-----------------------------------------|--------|
| Reaction buffer | 5μl | Reaction buffer | 5μl |
| DNA pSK+ERF | 1.5μl | DNA pSK+ERF | 1μl |
| primer 1656-1687 (125ng) | 1.4μl | primer 1656-1687 (125ng) | 1.4μl |
| primer 1656-1687 rev (125ng) | 1.4μl | primer 1656-1687 rev (125ng) | 1.4μl |
| Dntps mix (1/3d) | 1μl | Dntps mix (1/3d) | 1μl |
| dd H ₂ O | 38.7μl | dd H ₂ O | 38.2μl |

| | | | |
|----------------------------|------|----------------------------|------|
| Final volume | 50μl | Final volume | 50μl |
| PfuUltra HF DNA πολυμεράση | 1μl | PfuUltra HF DNA πολυμεράση | 1μl |

Πίνακας 25: PCR για την μετάλλαξη 1512delT;F504LfsX27.

| Cycles | Temperature | Time |
|--------|-------------------|--------|
| 1 | 95 ⁰ C | 30 sec |
| 12 | 95 ⁰ C | 30 sec |
| | 55 ⁰ C | 1' min |
| | 68 ⁰ C | 4' min |

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μετάλλαξη τελικά, πραγματοποιήθηκε στα δύο δείγματα από τα τέσσερα, τα No2 και No4 .Στο δείγμα No2 στη θέση 70 λείπει μια αδενίνη, όπως επίσης και στο No4 στη θέση 68.

Name: 1GM-T7
 Report run date: Tue Jun 21 14:20:30 GMT+03:00 2011
 Sample remarks:

```

1 GGGTGAGGGg CCCCCAGCCT CCCCAGGcCC CTCCCCcACGC ACCTTCTTGT
51 CCTCACCCCTC ATcCTcAAAG CCCCCAGCGG GGCCCCCACC CCCTTCGAGG
101 CGACAGTCTT CACTcCAGCG CCGcTTAAAG CGTASTTgAG GGGCATGCAC
151 TGGGATGCC CCGGTGCCTC GCCGGGCTCA GGCTTAGGGG GTGCAGGTGG
201 GGCACGGGGC GTCTTGAACA CCTCCCCGTC TTCCTCATCC TCATCACTGA
251 TGTCAGTCAC CTCTACCTCC TCCGACTCGC CTTCCGAGAT GGGCTCCACC
301 TTGATCTGTG GTGGCGGGGG CGGTGGGGCT AGCGCCCCTG CCCCCTCAGC
351 CAGCCCGCCT GCACTGCCAC CGCTCTTGTG AGCACCGGCT ACGGCCTTCT
401 CCCCAGCTGC CCGCTGCCGG CGTCCGAGTG GGGGCGGCTG GAGCTTAAAC
451 TTGAATGGGG AGGAAGAAGA AGAAGAGGAT GACGAGGCCG AGGAGGGGAC
501 CggTGGGGTC TcGGGTGCCA TGGGCGGCAG CGGGCACTTG TcAGGGCGCT
551 GGGGCTGGGG CACCACCAGC CCAGGGTAGT GCAGGAAGGC GCGGGGGCTg
601 AGGTGGTAGT TgTAGACGCT TTGGGTGTGG GCCTGCAGGA ATTCGATATC
651 AAGCTTATCG ATACCGTCGA CCTCGAGGGG GGGCCCgGTA CCCAGCTTTT
701 GTTCCCTTTA GTGAGGGTTA ATWAcGCGCT TgGCGTAATC ATGGTCATAG
751 CTGTTTCCTG TGTGAAATTG TTATcCGCTC ACAATTcCAC ACAACATACG
801 AGCCGGGAGC ATAAAGTGTA AAGcCTGGGG GtGCCTAATG AGTGAGCTAA
851 CTCACATTAA TTKCGTTGCG CTRACTGCC GCTTTYCAGT CGGGAAACCT
901 GTcGTGCCAG CTGCATTAAT gaATYGGSCA ACGcGSGGGG AGAGGSGGTT
951 TGCGTATTgG GCGcTCTTcC GCTTcCTCGC TCACTgACTc GCTGCGSTCG
1001 GTCGTTcGGC TGCGGCGAgc

```

Name: 2GM-T7
Report run date: Tue Jun 21 14:20:30 GMT+03:00 2011
Sample remarks:

```
1 TTGGGGTGAG GGGCCCCCA GCCTCCCCAG GCCCCTCCCC ACGCACCTTC
51 TTGTCCTCAC CCTCATCCTC AAGCCCCCAG CGGGGCCCCC ACCCCCTTCG
101 AGGCGACAGT CTTCACTCCA GCGCCGCTTA AAGCGTAgTT GAGGGGCATG
151 CACTGGGATG CCCCggGTGC CTCGCCGGGC TCAGGCTTAG GGGGTGCAGG
201 TGGGGCACGG GGCgTCTTGA ACACCTCCCC GTCTTCCTCA TCCTCATCAC
251 TGATGTCAGT CACCTCTACC TCCTCCGACT CGCCTTCCGA GATGGGCTCC
301 ACCTTGATCT GTGGTGGCGG GGGCGGTGGG GCTAGCGCCC CTGCCCCCTC
351 AGCCAGCCCC CCTGCACTGC CACCGCTCTT GTCAGCACCG GCTACGGCCT
401 TCTCCCCAGC TGCCCCGCTGC CGGCgTCCGA GTGGGGGCGG CTGGAGCTTA
451 AACTTGAATG GGGAGGAAGA AGAAGAAGAG GATGACGAGG CCGAGGAGGG
501 GACCSgTGGG GTCTCGGGTG CCATGGGCGG CAGCGGGCAC TTGTcAGGGC
551 GCTGGGGCTG GGGCACCACC AGCCAGGGT AGTGCAGGAA GGCgCGGGGG
601 CTGAGGTGGT AGTTGTAGAC GCTTTGGGTG TGGCCTGCA GGAATTCGAT
651 ATCAAGCTTA TCGATACCgT CGACCTCGAG GGGGGGCCcG GTACCCAGCT
701 TTTGTTCCCT TTAGTGAGGG TTAATTcGC GCTTGCGTA ATCATGGTCA
751 TAGCTGTTTC CTgTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTY CACACAACAT
801 ACGRGCCGGG AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC
851 TAACTACAT TAATTaCGTT GCGCTCACTg CCCgCTTTCC AGTC
```

Name: 3GM-T7
Report run date: Tue Jun 21 14:20:30 GMT+03:00 2011
Sample remarks:

```
1 TTGGGGTGAG GgGCCCCCCA GCCTCCCCAG GYCCCTCCCC ACGCACCTTC
51 TTGTCCTCAC CCTCATCCTC AAAGCCCCCA GcGGGGCCCC CACCCCCTTC
101 GAGGCGACAG TCTTcACTCC AGCGCCGCTT AAAGCGTAST TGAGGGGCAT
151 GCACTGGGAT GCCCCGGGTG CCTCGCCGGG CTCAGGCTTA GGGGGTGCAG
201 GTGGGGCACG GGGCGTCTTG AACACCTCCC CGTCTTCCTC ATCCTCATCA
251 CTGATGTCAG TCACCTCTAC CTCCTCCGAC TCGCCTTCCG AGATGGGCTC
301 CACCTTGATC TGTGGTGGCG GGGGCGGTGG GGCTAGCGCC CCTGCCCCCT
351 CAGCCAGCCC GCCTGCACTG CCACCGCTCT TGTCAGCACG GGCTACGGCC
401 TTCTCCCCAG CTGCCCCTG CCGGCgTCCG AGTGGGGCG GCTGGAGCTT
451 AAAC TTGAAT GGGGAGGAAG AAGAAGAAGA GGATGACGAG GCCgAGGAGG
501 GGACCGGTGG GGTCTcGGGT GCCAtGGGCG GCAGCGGGCA CTTGTcAGGG
551 CGCTGGGGCT GGGGCACCAC CAGCCCAGGG TAGTGCAGGA AGGCgCGGGG
601 GCTGAGGTGG TAGTTGTAGA CGCTTTGGGT GTGGGCCTGC AGGAATTCGA
651 TATCAAGCTT ATCGATACCS TCGACCTCGA GGGGGGGCCC SGTACCCAGC
701 TTTTGTTCCT TTTAGTGAGG GTTAATTWCG CGCTTGCGT AATCATGGTC
751 ATAGCTGTTT CctGTGTGAA ATTgTTATCC GCTcACAATT tCACACAACA
801 TACGAGCCGG GaGCATAAAG TGTAAGSCT GGGGTGCCTA ATgAGTgAGC
851 TAACTYAcAT TAATTKCGTT GCGCTCACTG CCCSCTTT
```

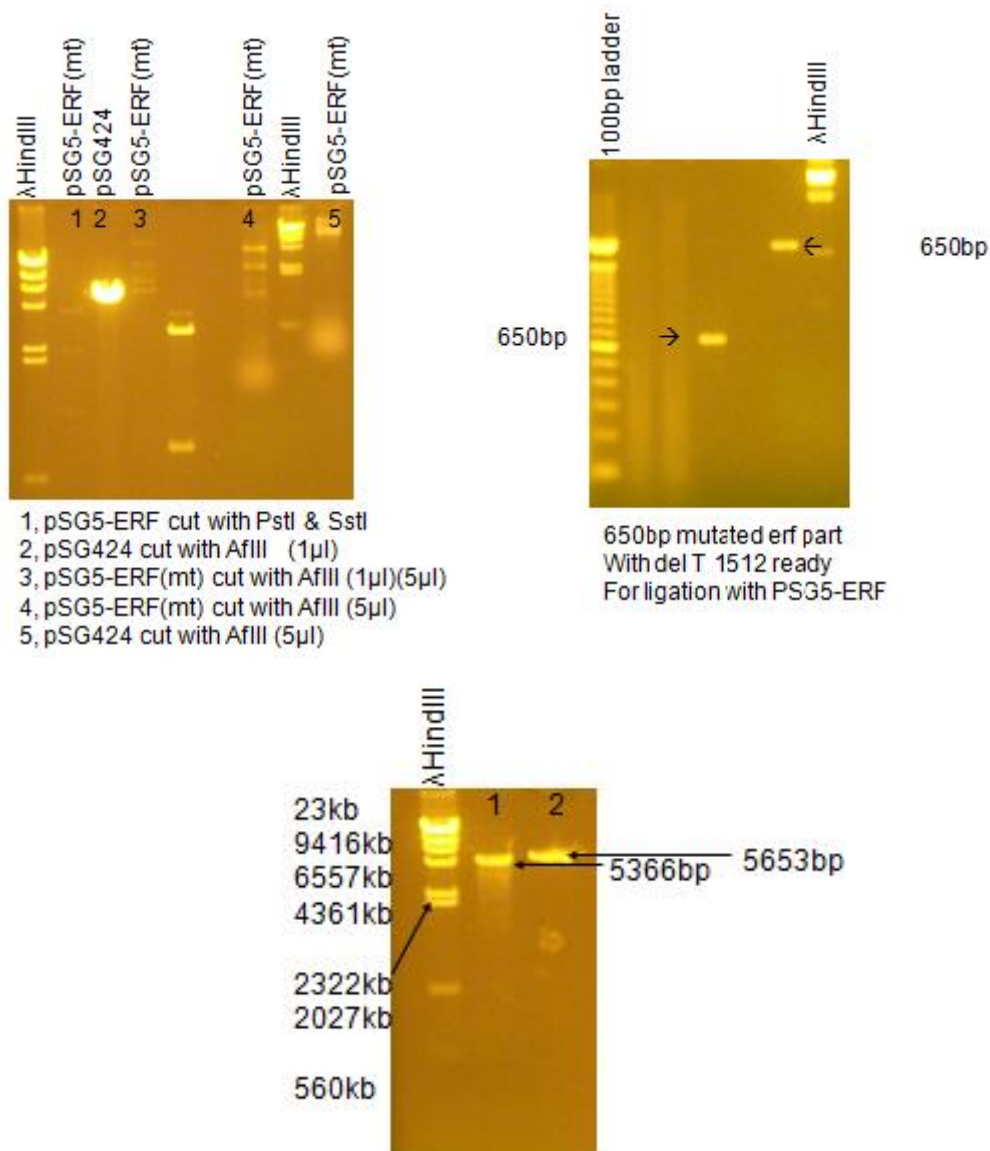

Name: 4GM-T7
Report run date: Tue Jun 21 14:20:30 GMT+03:00 2011
Sample remarks:

```
1 GGGTGAGGGg CCCCCAGCC TCCCCAGGcC CCTCCCCACG CACCTTCTTG
51 TCCTCACCCCT CATCCTcAAG CCCCCAGCGG GGCCCCCACC CCCTTCGAGG
101 CGACAGTCTT CACTCCAGCG CCGCTTAAAG CGTAgtTTGAG GGGCATGCAC
151 TGGGATGCC CGGGTGCCTC GCCGGGCTCA GGCTTAGGGG GTGCAGGTGG
201 GGCACGGGGC GTCTTGAACA CCTCCCCGTC TTCCTCATCC TCATCACTGA
251 TGTCAGTCAC CTCTACCTCC TCCGACTCGC CTTCCGAGAT GGGCTCCACC
301 TTGATCTGTG GTGGCGGGGG CGGTGGGGCT AGCGCCCCTG CCCCCTCAGC
351 CAGCCCGCCT GCACTGCCAC CGCTCTTGTG AGCACCGGCT ACGGCCTTCT
401 CCCCAGCTGC CCGCTGCCGG CGTCCGAGTG GGGGCGGCTG GAGCTTAAAC
451 TTGAATGGGG AGGAAGAAGA AGAAGAGGAT GACGAGGCCG AGGAGGGGAC
501 CGGTGGGGTC TCGGGTGCCA TGGGCGGCAG CGGGCACTTG TCAGGGCGCT
551 GGGGCTGGGG CACCACCAGC CCAGGGTAGT GCAGGAAGGC GCGGGGGCTG
601 AGGTGGTAGT TGTAAGACGCT TTGGGTGTGG GCTGCAGGAA TTCGATATCA
651 AGCTTATCGA TACCGTCGAC CTCGAGGGGG GGCCCgGTAC CCAGCTTTTG
701 TTCCTTTAG TGAGGGTTAA TTaCGCGCTT GCGTAATCA TGGTCAATAG
751 TGTTTCctGT GTGAaATTgT TATCCGCTCA CAATPYCACA CAACATACGA
801 GCCGGGAGCA TAAAGTGTA AGcCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT
851 CACATTAATT GCGTTGcGCT CACTGCCcGc TTTCCAGTCG GGAAMCtGTC
901 GTGCCaGCTG CATTAATGAA TCGGCCACGc GCGGGGaGAG GS
```

Εικόνα 30: Αλληλούχιση του DNA για την μετάλλαξη 1512delT;F504LfsX27.

Κρατήθηκε stub από την καλλιέργεια που περιείχε την μετάλλαξη (No 2) και αρχειοθετήθηκε στο αρχείο του εργαστηρίου με τα ακριβή του στοιχεία. Το βήμα που ακολούθησε ήταν η επανεισαγωγή του τμήματος με την μετάλλαξη 1512delT;F504LfsX27 στον πλασμιδιακό φορέα pSG5-ERF. Εκτελέστηκε η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή αρχικά πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PstI και SstI των πλασμιδίων pSG5-ERF και pSK+ERF(mutated) και έπειτα μεταφορά του μεταλλαγμένου τμήματος των 650bp, από τον pSK+ERF(mutated) στον πλασμιδιακό φορέα pSG5-ERF. Αντιμετώπιστηκε μια σειρά προβλημάτων με τις πέψεις και την αντίδραση συνδεάσης. Συγχρόνως έγιναν προσπάθειες για την απομόνωση του τμήματος που περιέχει την μετάλλαξη 256C>T (από τη στιγμή που η προηγούμενη εκτέλεση είχε σαν αποτέλεσμα μια διπλή μεταλλαγή). Μετά την εισαγωγή του μεταλλαγμένου τμήματος (650bp με 1512delT) στον pSG5-ERF ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού φορέα με τα ένζυμα NheI και AflIII. Οι ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του πλασμιδίου pSG424-ERF. Στόχος ήταν η μεταφορά της μετάλλαξης 1512delT από τον pSG5-ERF(mutated) στον κατάλληλο φορέα που χρησιμοποιήθηκε στην διαμόλυνση των κυττάρων, τον pSG424-ERF (). Η καταλληλότητα του φορέα κρίθηκε βάση της περιεκτικότητας του στο γονίδιο GAL4 και του γονιδίου της λουσιφεράσης. Ακολούθησε επίσης μεταφορά της μετάλλαξης 256C>T από το πλασμίδιο pSG5-ERF στο

πλασμίδιο pSG424-ERF. Μετά την εισαγωγή των μεταλλάξεων στον κατάλληλο φορέα διαμολύνθηκαν τα Hella κύτταρα με τις μεταλλάξεις 256C>T και 194G>A.



Εικόνα 31: Επάνω: Πέψεις για την απομόνωση των 650bp και την μεταφορά τους στον pSG424-ERF. Κάτω: DNA των pSG5-ERF μετά από πέψη με PstI και SstI (1) και του pSG424-ERF μετά από πέψη με AflIII και NheI (2)

5.2.10 Διαμόλυνση Hella κυττάρων

Η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, με την μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του εργαστηρίου. Εφαρμόστηκε πρώτιστα για τις μεταλλάξεις 256C>T και 194G>A. Αρχικά στρώθηκαν 200.000 κύτταρα Hella, την επόμενη και αφού αριθμός των κυττάρων διπλασιάστηκε (400.000) πραγματοποιήθηκε η διαμόλυνση τους. Για τον έλεγχο της ενεργότητας του ERF, χρησιμοποιήθηκαν ο PGL3 reporter vector basic, ο PGL3 reporter vector

enhancer, ο GATA1 promoter του εργαστηρίου και ο RSV-Gal4 για τον έλεγχο της διαμόλυνσης. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ο pSG424ERF (το γονίδιο του ERF είναι συντηγμένο με τον Gal4) σε συνδυασμό με τον pGL3 basic UAS, για την εξασφάλιση της πρόσδεσης του ERF στη λουσιφεράση. Τελικά μετά τις μετρήσεις ενεργότητας της λουσιφεράσης στο ειδικό όργανο (illuminometer) και της β-γαλακτοσιδάσης σε φωτόμετρο στα 420 nm ταξινομήθηκαν οι μεταλλάξεις με βάση το lose ή gain of function της ενεργότητας του ERF.

| 25/10/11 HeLa transfection with CaCl2 in 50% confluent 6-well plate (x2) efficiency ctrl (μg) →RSV-GAL (0.5) | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| Reporter (μg) | Effector (μg) | luciferase | LacZ (OD, h) | luc/Lac |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5 (2.25) | 155 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF (2.25) | 106 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF 256c>t (2.25) | 120 | 0,06 | 2000 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF 194g>a (2.25) | 116 | 0.058 | #VALUE! |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5 (2.25) | 136 | 1.045 | 0,130143541 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF (2.25) | 1145 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF 256c>t (2.25) | 131 | 0,06 | 2183,333333 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF 194g>a (2.25) | 1253 | 0,06 | 20883,33333 |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424 (2.25) | 93 | 0.026 | #VALUE! |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF (2.25) | 748 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF 256c>t (2.25) | 155 | 1,5 | 103,3333333 |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424 (2.25) | 72 | 0,044 | 1636,363636 |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF (2.25) | 239 | 0,115 | 2078,26087 |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF 256c>t (2.25) | 131 | 0 | #DIV/0! |

| 25/10/11 HeLa transfection with CaCl2 in 50% confluent 6-well plate (x2) efficiency ctrl (μg) →RSV-GAL (0.5) | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| Reporter (μg) | Effector (μg) | luciferase | LacZ (OD, h) | luc/Lac |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5 (2.25) | 58 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF (2.25) | 94 | 1,3 | 72,30769231 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF 256c>t (2.25) | 211 | 1,03 | 204,8543689 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF 194g>a (2.25) | 74 | 0,018 | 4111,111111 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5 (2.25) | 1045 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF (2.25) | 166 | 0,67 | 247,761194 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF 256c>t (2.25) | 68 | 0,068 | 1000 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF 194g>a (2.25) | 110 | 0,028 | 3928,571429 |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424 (2.25) | 0 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF (2.25) | 78 | 0,218 | 357,7981651 |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF 256c>t (2.25) | 134 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424 (2.25) | 0 | 0 | #DIV/0! |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF (2.25) | 98 | 0,03 | 3266,666667 |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF 256c>t (2.25) | 76 | 0 | #DIV/0! |

| 04/11/11 HeLa transfection with CaCl2 in 50% confluent 6-well plate (x2) efficiency ctrl (μg) →RSV-GAL (0.5) | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| Reporter (μg) | Effector (μg) | luciferase | LacZ (OD, h) | luc/Lac |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5 (2.25) | 1491 | 0,021 | 71000 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF (2.25) | 1532 | 0,070 | 21886 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF 256c>t (2.25) | 2542 | 0,173 | 14694 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF 194g>a (2.25) | 616 | 0,000 | #DIV/0! |

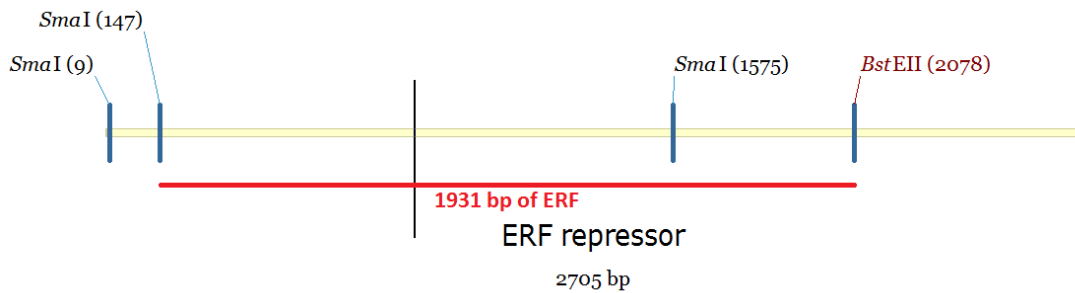
| | | | | |
|------------------------------|-------------------------|------|-------|---------------|
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5 (2.25) | 6211 | 0,065 | 95554 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF (2.25) | 3098 | 0,000 | #DIV/0! |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF 256c>t (2.25) | 3386 | 0,109 | 31064 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF 194g>a (2.25) | 2729 | 0,009 | 303222 |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424 (2.25) | 1306 | 0,000 | #DIV/0! |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF (2.25) | 982 | 0,000 | #DIV/0! |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF 256c>t (2.25) | 1080 | 0,050 | 21600 |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424 (2.25) | 309 | 0,000 | #DIV/0! |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF (2.25) | 1188 | 0,000 | #DIV/0! |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF 256c>t (2.25) | 464 | 0,000 | #DIV/0! |

| 16/11/11 HeLa transfection with CaCl₂ in 50% confluent 6-well plate (x2) (vrentzos) efficiency ctrl (μg) →RSV-GAL (0.5) | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| Reporter (μg) | Effector (μg) | luciferase | LacZ (OD, h) | luc/Lac |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5 (2.25) | 1838 | 0,090 | 20422 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF (2.25) | 1128 | 0,076 | 14842 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF 256c>t (2.25) | 1647 | 0,096 | 17156 |
| pGL3 basic GATA1 (0.25) | pSG5ERF 194g>a (2.25) | 2830 | 0,150 | 18867 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5 (2.25) | 18668 | 0,100 | 186680 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF (2.25) | 1737 | 0,014 | 124071 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF 256c>t (2.25) | 9800 | 0,048 | 204167 |
| pGL3 enhancer GATA1 (0.25) | pSG5ERF 194g>a (2.25) | 13989 | 0,120 | 116575 |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424 (2.25) | 969 | 0,060 | 16150 |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF (2.25) | 1233 | 0,078 | 15808 |
| pGL3 control Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF 256c>t (2.25) | 2188 | 0,092 | 23783 |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424 (2.25) | 370 | 0,026 | 14231 |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF (2.25) | 21788 | 0,140 | 155629 |
| pGL3 enhancer Gal4 BD (0.25) | pSG424ERF 256c>t (2.25) | 2855 | 0,044 | 64886 |

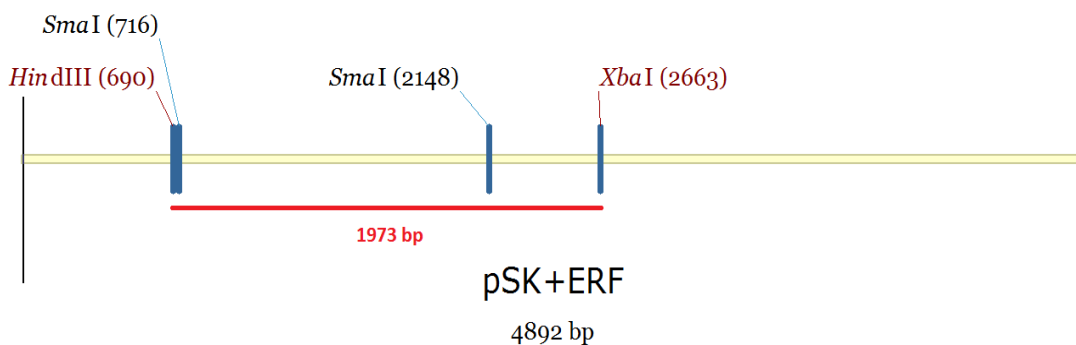
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δεν είναι διαφωτιστικά. Οποσδήποτε πρέπει να επαναληφθεί η όλη διαδικασία της διαμόλυνσης, αρκετές φορές, για να υπάρχει και επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα ώστε να είναι δυνατόν να προκύψει κάποιο βάσιμο συμπέρασμα.

5.3 Σειρά πέψεων και μεταφορών του ERF σε διάφορους φορείς

Στη παράγραφο αυτή υπάρχουν σχηματικές παραστάσεις που απεικονίζουν τις διάφορες μεταφορές του ERF από πλασμιδιακό φορέα σε πλασμιδιακό φορέα, που πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια συγκεκριμένων περιοριστικών ενδονουκλεασών. Στην Εικόνα 32 παρουσιάζεται η πέψη του ERF με SmaI και BstEII και το τμήμα των 1931 βάσεων που προέκυψε, ενώ στην Εικόνα 33 παρουσιάζεται το πλασμιδίο των 4829 βάσεων του pSk+ERF που προήλθε μετά από την εισαγωγή των 1931 βάσεων του ERF(SmaI, BstEII) στον φορέα pSK+.

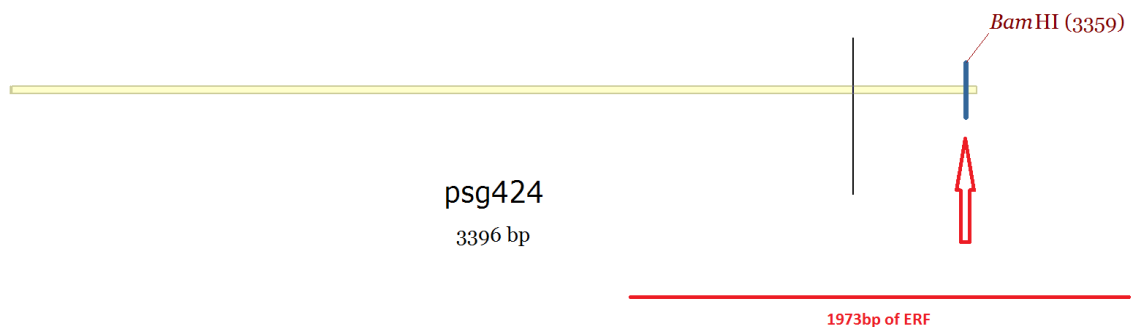


Εικόνα 32: Πέψη του ERF με SmaI και BstEII.



Εικόνα 33: Πέψεις για την δημιουργία του pSK+ERF.

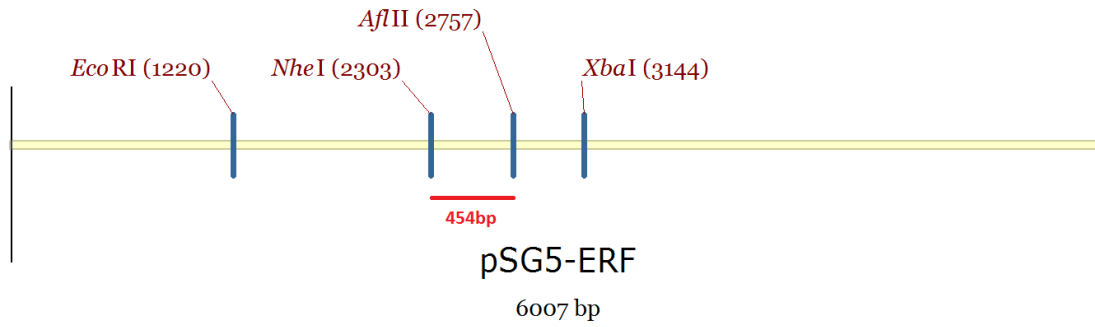
Ακολούθησαν οι πέψεις του πλασμιδιακού φορέα pSk+ERF με τα ένζυμα HindIII και XbaI. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την απομόνωση ενός νέου τμήματος 1973 bp. Το τμήμα αυτό εισήχθη τέλος στον κατάλληλο αποδέκτη, τον φορέα pSG424 (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Δημιουργία του pSG424-ERF.

Η δημιουργία του pSG424-ERF ήταν και το τελικό βήμα πριν την διαμόλυνση των κυττάρων Hella. Η ίδια ακριβώς διαδικασία (Εικόνα 35) επαναλήφθηκε για την μετάλλαξη 1512(delT) του ERF η οποία βρισκόταν στον πλασμιδιακό φορέα pSG5-ERF. Η πέψη του pSG5-ERF(m) πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα NheI και AflII, που ήταν τα βέλτιστα και για την εισαγωγή του τμήματος στον φορέα pSG424-ERF. Το τμήμα που α-

πομονώθηκε και αντικαταστάθηκε στη συνέχεια στο πλασμίδιο pSG424-ERF αποτελούσαν 457 bp.



Εικόνα 35: Απομόνωση της μετάλλαξης 1512(delT) του pSG5-ERF(m).



Εικόνα 36: Μεταφορά του μεταλλαγμένου τμήματος στον pSG424-ERF.

6 Συμπεράσματα

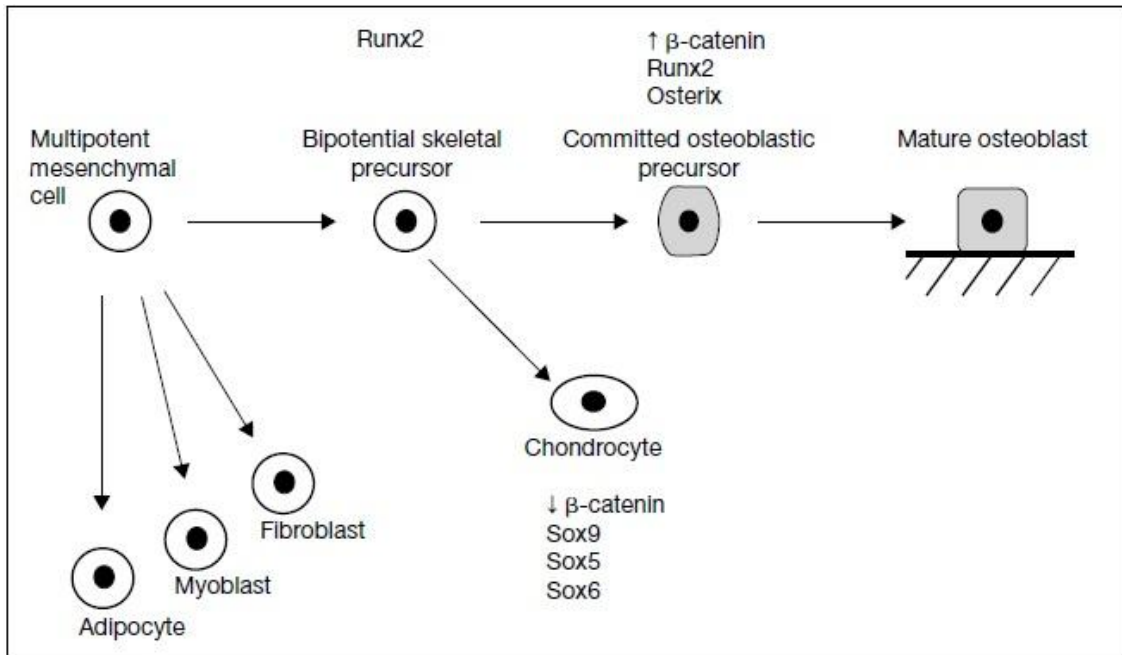
Ο έλεγχος των μεταλλάξεων για την έκφραση του ERF δεν έχει ολοκληρωθεί. Απομένει η διερεύνηση της μετάλλαξης 1512delT, της οποίας δεν ολοκληρώθηκε η μεταφορά στον pSG424-ERF, καθώς και αυτή των μεταλλάξεων που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο και είναι γνωστές από παλαιότερες εργασίες. Αυτές είναι, η μεταλλαγμένη μορφή του ERF στην οποία και οι επτά θέσεις φωσφορυλίωσης έχουν μεταλλαχθεί σε αλανίνη (ERF M1-7) (*Le Gallic L, Beal GJR and Mavrothalassitis G 1999*), η μετάλλαξη R83A και μια μεταλλαγμένη μορφή του ERF, ελαττωματική ως προς την πρόσδεση της στην ERK κινάση (*Sgouras DN, Athanasiou MA, Beal GJR, Fisher RJ, Blair DG and Mavrothalassitis G 1995.*) Ως μελλοντική εργασία, επίσης, προτείνεται η καλλιέργεια και απομόνωση πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων για να ελεγχθεί η διαφοροποίησή τους προς οστεοβλάστες. Τα κύτταρα αυτά θα μπορούσαν να απομονωθούν από τα οστά ποντικών άγριου τύπου και από ετερόζυγα ζώα ERF+/- . Το προηγούμενο μπορεί να υλοποιηθεί ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Heng Zhu et al. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί η κυτταρική σειρά C3H-10T1/2. Η προαναφερθείσα κυτταρική σειρά, είναι μία σειρά πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων, εμβρυικής προέλευσης η οποία κάτω από ειδικές συνθήκες μπορεί να εξελιχθεί επιλεκτικά σε οστεογενετική σειρά. Στόχος της προτεινόμενης προσέγγισης, είναι μελέτη της διαφοροποίησης προς οστεοβλάστες των ακόλουθων τριών κατηγοριών κυττάρων: ένας κυτταρικός πληθυσμός στον οποίο ο ERF θα βρίσκεται στη μισή ποσότητα από ότι φυσιολογικά, ένας δεύτερος όπου ο ERF θα απουσιάζει και τέλος ένας τρίτος, στον οποίο ο ERF θα υπερεκφράζεται.

Για την πρώτη κατηγορία κυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα μεσεγχυματικά κύτταρα που θα απομονωθούν από τα ετερόζυγα ERF+/- ζώα, ως έχουν. Για την δεύτερη κατηγορία κυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεσεγχυματικά κύτταρα ζώων αγρίου τύπου στα οποία όμως προηγούμενα έχει εφαρμοστεί RNA σίγηση στο γονίδιο του ERF. Η επιλογή των ΚΟ ζώων απορρίπτεται γιατί δεν υπάρχει μια αξιόπιστη μέθοδος επιλογής των οστεοβλαστών από διδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα κατά την διάρκεια της 10.5 εμβρυικής μέρας, μέρας αποβίωσης των ΚΟ ποντικών. Τέλος όσον αφορά την τρίτη κατηγορία κυττάρων (υπερεκφρασμένος ο ERF), θα μπορούσαν να χρησιμο-

ποιηθούν οι gain of function μεταλλάξεις που προκύπτουν, μετά από επιλογή, από το πρώτο μέρος των πειραμάτων της παρούσας εργασίας.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων, η διαδικασία της μετάβασης προς οστεοβλάστες διαρκεί 21 ημέρες. Όπως ορίζει το πρωτόκολλο, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά με τους κατάλληλους παράγοντες που θα κατευθύνουν την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών στην μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο. Τα στάδια διαφοροποίησης των οστεοβλαστών είναι τα εξής: η μετάβαση από πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα σε πρώιμους προ-οστεοβλάστες, η μετάβαση από πρώιμους προ-οστεοβλάστες σε προ-οστεοβλάστες, η μετάβαση των προ-οστεοβλάστες σε οστεοβλάστες και τέλος η μετάβαση των τελευταίων σε ώριμους οστεοβλάστες. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και σε τακτά χρονικά διαστήματα απαιτείται ο έλεγχος της μετάβασης της καλλιέργειας στο επόμενο στάδιο. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση ειδικών δεικτών (Εικόνα 37). Με την βοήθεια αντισωμάτων για τους συγκεκριμένους δείκτες μπορούν να αποκτηθούν στιγμιότυπα για όλες τις καλλιέργειες. Σε περίπτωση που η διαφοροποίηση σταματήσει σε κάποιο στάδιο, ένας νέος κύκλος πειραμάτων απαιτείται για να εμβαθύνει και να προσδιορίσει τις αλληλεπιδράσεις και τα πιθανά αίτια. Στην περίπτωση που η διαφοροποίηση ολοκληρωθεί, δηλαδή σε αυτήν που η κυτταρική σειρά μεταβεί στο στάδιο του ώριμου οστεοβλάστη, μπορεί επιπλέον να πραγματοποιηθεί και έλεγχος της ικανότητας σηματοδότησης για την στρατολόγηση των οστεοκλαστών. Αυτό επιτυγχάνεται με τον έλεγχο του δείκτη επιφανείας RANKL (Εικόνα 8). Επίσης θα ήταν σκόπιμο, κατά την διάρκεια των πειραμάτων και ανά πάσα στιγμή να πραγματοποιείται έλεγχος για τυχόν λανθάνουσα διαφοροποίηση προς τη σειρά των χονδροκυττάρων με τον δείκτη Sox9.

Τα αποτελέσματα των προτεινόμενων πειραμάτων αναμένεται ότι θα δείξουν καταρχήν αν και πόσο επηρεάζεται η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών από την παρουσία ή έλλειψη του ERF και επίσης, αν οι οστεοβλάστες που προκύπτουν, μπορούν να επάγουν την στρατολόγηση των οστεοκλαστών.



Εικόνα 37: Μετάβαση προς οστεοβλάστες και δείκτες ελέγχου.

Βιβλιογραφία

Leprince D, Gonne A, ColL J, de Taisne C, Schneeberger C, Lagrou C and Sthlin D 1983. Putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306: 395-397

Athanasiou M, Le Gallic L, Watson DK, Blair DG and Mavrothalassitis G 2000. Suppression of the Ewing's sarcoma phenotype by FLI1/ERF repressor hybrids. *Cancer Gene Therapy* 7: 1188-1195.

Sgouras DN, Athanasiou MA, Beal GJR, Fisher RJ, Blair DG and Mavrothalassitis G 1995. ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation. *The EMBO Journal* 14: 4781-4793.

Liu D, Pavlopoulos E, Modi W, Moschonas N and Mavrothalassitis G 1997. ERF: genomic organization, chromosomal localization and promoter analysis of the human and mouse genes. *Oncogene* 14: 1445-1451.

Mavrothalassitis G and Ghysdael J 2000. Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene* 19: 6524-6532.

Le Gallic L, Beal GJR and Mavrothalassitis G 1999. Transcriptional repressor ERF is a RAS/Mitogen-Activated Protein Kinase target that regulates cellular proliferation. *Molecular and cellular Biology* June 4121-4133.

Le Gallic L, Virgilio L, Cohen P, Biteau B and Mavrothalassitis G 2004. ERF nuclear shuttling a continuous monitor of ERK activity that links it to cell cycle progression. *Molecular and cellular Biology* Feb 1206-1218.

Bartel FO, Higuchi T, Spyropoulos DD. Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors. *Oncogene*. 2000 Dec 18;19(55):6443-54. Review.

Raouf A, Seth A. Ets transcription factors and targets in osteogenesis. *Oncogene*. 2000 Dec 18;19(55):6455-63.

Heng Zhu, Zi-Kuan Guo, Xiao-Xia Jiang, Hong Li, Xiao-Yan Wang, Hui-Yu Yao, Yi Zhang and Ning Mao. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone

Papadaki, C., Alexiou, M., Cecena, G., Verykokakis, M., Bilitou, A., Cross, J. C., Oshima, R. G., and Mavrothalassitis, G. (2005). Transcriptional repressor erf determines extraembryonic ectoderm differentiation. *Mol Cell Biol* 27: 5201-5213

Elizabeth P. Newberry, David Willis, Tammy Latifi, Jeanne M. Boudreaux and Dwight A. Towler (1997) Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Activates the Human Interstitial Collagenase Promoter via the Bipartite Ets-AP1 Element

Rui Guo, Zuoren Yu, Jikui Guan, Yehua Ge, Jing Ma, Sai Li, Shali Wang, Shepu Xue, Daishu Han (2004). Stage-specific and tissue-specific expression characteristics of differentially expressed genes during mouse spermatogenesis

YJ Kim, BG Kim, SJ Lee, HK Lee..., 2007 -The suppressive effect of myeloid elf-1-like factor (MEF) in osteogenic differentiation

SH Sumarsono, TJ Wilson, MJ Tymms, DJ Venter... - 1996 Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice

Hunter, A.G.W. and Rudd, N.L. (1976) Craniosynostosis. I. Sagittal synostosis; its genetics and associated clinical findings in 214 patients who lacked involvement of the coronal suture(s). *Teratology*, 14, 185–194.

Hunter, A.G.W. and Rudd, N.L. (1977) Craniosynostosis. II. Coronal synostosis: its familial characteristics and associated clinical findings in 109 patients lacking bilateral polysyndactyly or syndactyly. *Teratology*, 15, 301–310.

Lajeunie, E., Le Merrer, M., Bonaiti-Pellie, C., Marchac, D. and Renier, D. (1995) Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am. J. Med. Genet.*, 55, 500–504.

Lajeunie, E., Le Merrer, M., Bonaiti-Pellie, C., Marchac, D. and Renier, D. (1996) Genetic study of scaphocephaly. *Am. J. Med. Genet.*, 62, 282–285.

Renier, D., Sainte-Rose, C., Marchac, D. and Hirsch, J.-F. (1982) Intracranial pressure in craniostenosis. *J. Neurosurg.*, 57, 370–377.

David, L.R., Wilson, J.A., Watson, N.E. and Argenta, L.C. (1996) Cerebral

perfusion defects secondary to simple craniosynostosis. *J. Craniofac. Surg.*, 7,177–185.

Gosain, A.K., McCarthy, J.G. and Wisoff, J.H. (1996) Morbidity associated with increased intracranial pressure in Apert and Pfeiffer syndromes: the need for long-term evaluation. *Plastic Reconstr. Surg.*, 97, 292–301.

Gonzalez, S., Hayward, R., Jones, B. and Lane, R. (1997) Upper airway obstruction and raised intracranial pressure in children with craniosynostosis. *Eur. Respir. J.*, 10, 367–375.

Elanko N, Sibbring JS, Metcalfe KA, Clayton-Smith J, Donnai D, Temple IK, Wall SA, Wilkie AO.2001 A survey of TWIST for mutations in craniosynostosis reveals a variable length polyglycine tract in asymptomatic individuals.

Nathaniel H Robin, MD, Marni J Falk, MD, and Chad R Haldeman-Englert, MD 2011. FGFR-Related Craniosynostosis Syndromes

Wilkie AO.,1996. Fibroblast growth factor receptor mutations and craniosynostosis: three receptors, five syndromes.

AOM Wilkie - Human molecular genetics, 1997. Craniosynostosis: genes and mechanisms

Howard, T.D., Paznekas, W.A., Green, E.D., Chiang, L.C., Ma, N., De Luna,R.I.O., Delgado, C.G., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A.D. and Jabs, E.W.(1997) Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre–Chotzen syndrome.

EW Jabs, U Muller, X Li, L Ma, W Luo, IS Haworth... - Cell, 1993. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis

AE Merrill, EG Bochukova, SM Brugger... - Human molecular ..., 2006. Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin-Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis

D Jenkins, D Seelow, FS Jehee, CA Perlyn... - The American Journal of ..., 2007 RAB23 Mutations in Carpenter Syndrome Imply an Unexpected Role for Hedgehog Signaling in Cranial-Suture Development and Obesity

HJ Kim, DP Rice, PJ Kettunen... - Development, 1998. FGF-, BMP-and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development

KL Rafferty... - Journal of morphology, 1999. Craniofacial sutures: morphology, growth, and in vivo masticatory strains

LA Opperman - Developmental dynamics, 2000 Cranial sutures as intramembranous bone growth sites

Levine JP, Bradley JP, Roth DA, McCarthy JG, Longaker MT 1998. Studies in cranial suture biology: regional dura mater determines overlying suture biology.

P Bialek, B Kern, X Yang, M Schrock, D Sasic... - Developmental cell, 2004. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation

C de Pollack, D Renier, M Hott... - Journal of Bone and ..., 1996. Increased bone formation and osteoblastic cell phenotype in premature cranial suture ossification (craniosynostosis)

Toshihisa Komori 2006. Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors

Tatsuo Suda, Naoyuki Takahashi, Nobuyuki Udagawa, Eijiro Jimi, Matthew T. Gillespie, and T. John Martin 1992. Modulation of Osteoclast Differentiation

JM Pensler, PK Patel... - Plastic and reconstructive ..., 1997. Osteoblast-directed osteoclast metabolism from patients with premature coronal synostosis

E Filvaroff, A Erlebacher, J Ye, SE Gitelman... - ..., 1999 Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass

G Holmes, G Rothschild, UB Roy, CX Deng... - Developmental ..., 2009. Early onset of craniosynostosis in an Apert mouse model reveals critical features of this pathology

LA Opperman, AA Nolen... - Journal of Bone and ..., 1997. TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3 Exhibit Distinct Patterns of Expression During Cranial Suture Formation and Obliteration In Vivo and In Vitro