



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ - ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων  
πρωτεϊνών μέσω της ΡΤD τεχνολογίας –  
έλεγχος της ενδοκυττάριας μεταγωγής τους  
σε κυτταροκαλλιέργειες

ΜΗΛΙΩΤΟΥ Ν. ΑΝΤΡΟΥΛΛΑ  
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2016

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ - ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Κατεύθυνση: Μοριακή Διαγνωστική και Φαρμακευτική Βιοτεχνολογία

Κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών  
μέσω της ΡΤD τεχνολογίας –  
έλεγχος της ενδοκυττάριας μεταγωγής τους σε κυτταροκαλλιέργειες

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

**Παπαδοπούλου Χ. Λευκοθέα**

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας - Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ.*

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Λευκοθέα Χ. Παπαδοπούλου**

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας - Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ.*

**Αστέριος Σ. Τσιφτσόγλου**

*Ομότιμος Καθηγητής Φαρμακολογίας - Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ.*

**Χρήστος Α. Παναγιωτίδης**

*Καθηγητής Φαρμακολογίας - Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ.*

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2016

στη μαμά  
και  
στο μπαμπά..

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τομέα Φαρμακογνωσίας – Φαρμακολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την άμεση και συνεχή επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φαρμακολογίας, κ. Παπαδοπούλου Χ. Λευκοθέας.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της διπλωματικής αυτής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ.Λευκοθέα Παπαδοπούλου, για την υπόδειξη του θέματος, τη διαρκή, επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε, καθώς και την πολύπλευρη μέριμνα και την πολύτιμη καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής διατριβής. Δε θα μπορούσα να παραλείψω να την ευχαριστήσω θερμά για την υπομονή και το ενδιαφέρον της καθ'όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, καθώς και για τις υποδείξεις και τις εύστοχες διορθώσεις του συγγραφικού μέρους της διπλωματικής μου εργασίας. Θεωρώ τιμή μου που με συμπεριέλαβε στην ερευνητική της ομάδα και την ευχαριστώ από καρδιάς για την αρμονική και παραγωγική συνεργασία.

Περαιτέρω, θέλω να ευχαριστήσω τον κ.Τσιφτσόγλου Σ. Αστέριο, Καθηγητή Φαρμακολογίας και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής μου. Νιώθω περήφανη που υπήρξα φοιτήτριά του και μέλος του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις του, για τη μετάδοση γνώσεων καθώς και για την όμορφη συνεργασία μας.

Θέλω πολύ να ευχαριστήσω τον κ.Παναγιωτίδη Α. Χρήστο, Καθηγητή Κυτταρικής - Μοριακής Βιολογίας, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής μου, για το ενδιαφέρον του, τη μετάδοση επιστημονικών γνώσεων, τις πολύτιμες συμβουλές σε τεχνικά θέματα, τις εποικοδομητικές υποδείξεις του και για το χρόνο που θα αφιερώσει στη μελέτη της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Βιζιριανάκη Ιωάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, για το συνεχές ενδιαφέρον του και τα εποικοδομητικά σχόλιά του. Ήταν τιμή μου που υπήρξε καθηγητής μου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην υποψήφια διδάκτωρ κ.Γεωργίου Σοφία, για την αμέριστη και πολύτιμη συμπαράστασή της, τη μέριμνά της και την πολύ καλή φιλική της διάθεση καθ'όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Πάντα πρόθυμη να μας βοηθήσει.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το συνάδελφο, μεταπτυχιακό φοιτητή κ.Καϊάφα Γεώργιο για την αρμονική συνεργασία καθώς επίσης και την υποψήφια διδάκτορα κ.Παπανικολάου Αντιγόνη, για τη σημαντική συμβολή τους σε τεχνικά θέματα και το ενδιαφέρον τους



Ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους μου, με τους οποίους εργαστήκαμε στον ίδιο χώρο, για το πραγματικά ευχάριστο, φιλικό και άριστο κλίμα συνεργασίας. Ευχαριστώ τη συνάδελφο και αγαπημένη μου φίλη, μεταπτυχιακή φοιτήτρια Θεωδορούλα Νικολέτα, για όλη την ηθική συμπαράσταση και στήριξη κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής.

Ευχαριστώ τις αγαπημένες μου φίλες, τη Μυρσίνη, τη Στέλλα και τη Μαρίνα, που ήταν δίπλα μου και μου στάθηκαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την απεριόριστη αγάπη της, τη συνεχή ενθάρρυνση και κατανόηση που έδειξε καθ' όλη την πορεία των σπουδών μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα αδέρφια μου, Αθανασία, Χρήστο και Χριστίνα, για τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθώς και στους πολυαγαπημένους μου γονείς, Άννα και Νίκο, για όλα όσα έχουν κάνει, που ήταν για μένα οι πιο θερμοί υποστηρικτές και φύλακες άγγελοί μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b>	<b>9</b>
<b><u>A.1. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ</u></b>	<b>9</b>
<u>A.1.1. Πρωτεϊνική θεραπεία</u>	9
<u>A.1.2. Πεπτίδια μεταγωγής πρωτεϊνών με θεραπευτικό δυναμικό</u>	10
<u>A.1.3. TAT πεπτίδιο</u>	13
<u>A.1.4. Ενδοκυτταρική μεταφορά μορίων-φορτίων με τα PTDs</u>	14
<u>A.1.5. Μηχανισμός εισαγωγής των PTDs</u>	15
<u>A.1.6. Δυνατότητα μεταγωγής πρωτεϊνών σε υποκυτταρικά διαμερίσματα</u>	17
<u>A.1.7. Πλεονεκτήματα της ενδοκυττάριας μεταγωγής μέσω του TAT</u>	18
<u>A.1.8. Μειονεκτήματα της Τεχνολογίας Μεταγωγής μέσω των PTDs</u>	19
<b><u>A.2. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ</u></b>	<b>22</b>
<u>A.2.1. Αιμοσφαιρίνη</u>	22
<u>A.2.2. Μοντέλο έκφρασης των γονιδίων των σφαιρινών κατά την οντογένεση</u>	24
<u>A.2.3. Οργάνωση των γονιδίων αιμοσφαιρίνης</u>	25
<u>A.2.4. Αιμοσφαιρινοπάθειες – Μεσογειακή Αναιμία</u>	26
<u>A.2.5. β-θαλασσαιμία ή Μεσογειακή Αναιμία</u>	28
<u>A.2.6. α-Θαλασσαιμία–Μοριακή βάση</u>	29
<u>A.2.7. Κλινική ετερογένεια της α-θαλασσαιμίας</u>	34
<u>A.2.8. Πρόγνωση για τους κλινικούς φαινότυπους της α-θαλασσαιμίας</u>	38
<u>A.2.9. Επιδημιολογία α-θαλασσαιμίας</u>	39
<u>A.2.10. Κλινική αντιμετώπιση α-θαλασσαιμίας</u>	40
<u>A.2.11. Θεραπευτική αντιμετώπιση με ενδομήτρια μετάγγιση</u>	41
<u>A.2.12. Νέες προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση της α-θαλασσαιμίας - Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων</u>	42
<u>A.2.13. Γονιδιακή θεραπεία</u>	44
<u>A.2.14. Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις – Πρωτεϊνική θεραπεία</u>	45
<b><u>A.3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ</u></b>	<b>48</b>
<u>A.3.1. Μιτοχόνδρια, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά</u>	48
<u>A.3.2. Κατανομή και αριθμός μιτοχονδρίων</u>	52
<u>A.3.3. Μιτοχονδριακό γονιδίωμα</u>	53
<u>A.3.4. Μεταφορά των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο</u>	56
<u>A.3.5. Οξειδάση του κυτοχρώματος c</u>	59
<u>A.3.6. Βιοσύνθεση και συγκρότηση ολοενζύμου της COX στα θηλαστικά</u>	60
<u>A.3.7. Η μεταφορά του χαλκού στην υπομονάδα Cox2</u>	61
<u>A3.8. Προτεινόμενο μοντέλο του μονοπατιού συγκρότησης της COX</u>	62
<u>A.3.8. Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA</u>	63
<u>A.3.9. Μιτοχονδριακές ασθένειες</u>	64
<u>A.3.10. Δυσλειτουργία COX και μιτοχονδριακά νοσήματα</u>	66
<u>A.3.11. Το γονίδιο SCO2 και η πρωτεΐνη Sco2</u>	67
<u>A.3.12. Αντιμετώπιση μιτοχονδριακών ασθενειών</u>	68
<u>A.3.13. Μεταγωγή ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια ως θεραπευτική προσέγγιση για μιτοχονδριακές διαταραχές</u>	70
<u>A.3.14. Σύνδεση Sco2 με το φαινόμενο Warburg και τον καρκίνο</u>	73

A.3.15. Στόχευση καρκινικών κυττάρων με κατευθυνόμενα πεπτιδία	76
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>78</b>
<b>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>80</b>
<b>B.1. ΥΛΙΚΑ</b>	<b>80</b>
<u>B.1.1. Χημικά αντιδραστήρια – Χρωστικές -Απορρυπαντικά</u>	80
<u>B.1.2. Θρεπτικά Υλικά – Όροι – Αντιβιοτικά</u>	81
<u>B.1.3. Ένζυμα – Μάρτυρες</u>	82
<u>B.1.4. Βακτηριακοί φορείς</u>	83
<u>B.1.5. Βακτηριακά στελέχη</u>	83
<u>B.1.6. Αντισώματα</u>	83
<u>B.1.7. Κυτταροκαλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων</u>	84
<b>B.2. ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>86</b>
<u>B.2.1. Επεξεργασία RNA με DNAση</u>	86
<u>B.2.2. Υπολογισμός της απόδοσης απομόνωσης και της καθαρότητας του RNA</u>	87
<u>B.2.3. Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR)</u>	87
<u>B.2.4. PCR (Polymerase Chain Reaction)</u>	89
<u>B.2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων</u>	96
<u>B.2.6. Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA και RNA</u>	96
<u>B.2.7. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης</u>	98
<u>B.2.8. Εκχύλιση τμημάτων DNA-πλασμιδιακών φορέων με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοολής</u>	99
<u>B.2.9. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού</u>	100
<u>B.2.10. Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς</u>	109
<u>B.2.11. Αντίδραση συνένωσης</u>	116
<u>B.2.12. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης πλασμιδιακού φορέα</u>	116
<u>B.2.13. TA κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα pCR2.1</u>	117
<u>B.2.14. TOPO TA κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO</u>	120
<u>B.2.15. Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης (pET16b) με βάση το σχηματισμό συμπληρωματικών άκρων (“sticky ends”)</u>	122
<u>B.2.16. Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i></u>	124
<u>B.2.17. Παρασκευή επιδεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων</u>	125
<u>B.2.18. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων</u>	126
<u>B.2.19. Επιλογή βακτηριακής αποικίας <i>E. coli</i> που φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ενδιαφέροντος</u>	127
<u>B.2.20. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i></u>	128
<u>B.2.21. Έκφραση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε βακτήρια <i>E. coli</i></u>	130
<u>B.2.22. Σπάσιμο βακτηριακών κυττάρων με υπερήχους</u>	133
<u>B.2.23. Καθαρισμός βακτηριακών εγκλειστων</u>	134
<u>B.2.24. Διαλυτοποίηση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από τα βακτηριακά έγκλειστα με διάλυμα L-Αργινίνης</u>	135
<u>B.2.25. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Χρωματομερική μέθοδος κατά Bradford</u>	138
<u>B.2.26. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)</u>	140
<u>B.2.27. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue</u>	144

<u>B.2.28. Ανοσοαποτύπωση WESTERN (Western Blot)</u>	145
<u>B.2.29. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών</u>	147
<u>B.2.30. Προσδιορισμός του ρυθμού κυτταρικής ανάπτυξης των Ανθρώπινων Ερυθρολευχαιμικών Κυττάρων K-562</u>	149
<u>B.2.31. Έλεγχος ζωικότητας των Ανθρώπινων Ερυθρολευχαιμικών Κυττάρων K-562 με χρώση Trypan Blue</u>	149
<u>B.2.32. Διαδικασία ενδοκυτταρικής μεταφοράς της πρωτεΐνης</u>	150
<u>B.2.33. Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο RIPA</u>	152
<u>B.2.34. Υποκυτταρική κατανομή – Απομόνωση μιτοχονδρίων</u>	153
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>154</b>
<b><u>Γ.1. Κλωνοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου της α-σφαιρίνης στο πλασμίδιο pCR2.1</u></b>	<b>154</b>
<b><u>Γ.2. Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της TAT-αλληλουχία σύντηξης (x) στον πλασμιδιακό φορέα pCR@II-TOPO</u></b>	<b>162</b>
<u>Γ.2.1.Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της TAT-α-σφαιρίνη-HA στον πλασμιδιακό φορέα pCR@II-TOPO</u>	162
<u>Γ.2.2.Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της α-σφαιρίνης-HA στον πλασμιδιακό φορέα pCR@II-TOPO</u>	165
<u>Γ.2.3.Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της TAT-SCO2 στον πλασμιδιακό φορέα pCR@II-TOPO</u>	169
<u>Γ.2.4.Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της TAT-SCO2-NGR στον πλασμιδιακό φορέα pCR@II-TOPO</u>	173
<b><u>Γ.3. Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pET16b</u></b>	<b>176</b>
<b><u>Γ.5. Μελέτη της ενδοκυττάριας μεταγωγής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων</u></b>	<b>194</b>
<u>Γ.5.1.Πειράματα μελέτης της ενδοκυττάριας μεταγωγής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών α σφαιρίνη-HA και TAT-α σφαιρίνη-H</u>	196
<u>Γ.5.2.Πειράματα μελέτης της ενδοκυττάριας μεταγωγής, καθώς και του υποκυτταρικού εντοπισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR</u>	198
<b>Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>202</b>
<b>Ε. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>207</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>209</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>211</b>

## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### A.1. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ

#### A.1.1. Πρωτεϊνική θεραπεία:

Η αλλαγή του κυτταρικού φαινοτύπου και το θεραπευτικό όφελος μέσω της έκφρασης νέων πρωτεϊνών περιοριζόταν σε προσεγγίσεις που βασίζονταν στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, μέσω της γονιδιακής θεραπείας. Ωστόσο η τεχνολογία αυτή, ελλοχεύει πολλούς κινδύνους. Η είσοδος του διαγονιδίου, η διατήρηση και ο έλεγχος της έκφρασής του ,με τη χρησιμοποίηση είτε ιικών ή μη ιικών φορέων, είναι συχνά δύσκολο να επιτευχθούν και μπορεί να καταλήξουν σε δυσάρεστα φαινόμενα, όπως τοξικότητα, πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης και αδυναμία στόχευσης πολλών ειδών κυττάρων, με συνέπεια την περιορισμένη αποτελεσματικότητα των διαγονιδίων *in vivo*.

Η πρωτεϊνική θεραπεία αποτελεί μια υποσχόμενη προσέγγιση για την αντιμετώπιση ορισμένων ασθενειών. Πρόκειται για την παραγωγή και τη χορήγηση του άμεσα μεταφρασμένου προϊόντος ενός γονιδίου, ως θεραπευτική αντιμετώπιση μιας μονογονιδιακής ασθένειας ή μιας μεταβολικής πάθησης, κατά την οποία το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μια μη φυσιολογική πρωτεΐνη ή δεν παράγεται καθόλου η πρωτεΐνη αυτή. Πολλές πρωτεΐνες ή πεπτιδία εμφανίζουν βιολογική δράση, η οποία τις κατατάσσει στα εν δυνάμει θεραπευτικά μόρια. Η πρώτη ασθένεια για την οποία χρησιμοποιήθηκε εξωγενής πρωτεΐνη, η ινσουλίνη, ως θεραπευτική προσέγγιση ήταν ο νεανικός σακχαρώδης διαβήτης, το 1922.

Με βάση τη δράση τους οι θεραπευτικές πρωτεΐνες (*Papadopoulou L.C., and Tsiftoglou A.S., 2011*) (ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες θεραπευτικής ή/και διαγνωστικής, προστατευτικής αξίας) κατηγοριοποιούνται ως:

- Πρωτεϊνική / Ενζυμική θεραπεία αντικατάστασης: ινσουλίνη, αυξητική ορμόνη, ερυθροποιητίνη
- Μονοκλωνικά αντισώματα: trastuzumab, infliximab
- Εμβόλια: αντιγόνο επιφάνειας Ηπατίτιδας Β (HBsAg), HPV πρωτεΐνες καψιδίου
- Διαγνωστικές πρωτεΐνες: TSH, αντιγόνα HIV, HBV, HCV.

Οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να είναι πρωτεΐνες του πλάσματος, πρωτεΐνες με δράση επί της κυτταρικής μεμβράνης ή πρωτεΐνες, των οποίων η δράση εντοπίζεται ενδοκυττάρια.

Ωστόσο, οι θεραπευτικές πρωτεΐνες, των οποίων η δράση εντοπίζεται ενδοκυτταρικά, είχαν να αντιμετωπίσουν το μεγαλύτερο φραγμό για την είσοδό τους στο εσωτερικό του κυττάρου, την κυτταρική μεμβράνη.

Οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούν ένα φυσικό ημιδιαπερατό φραγμό με σκοπό τη ρύθμιση της σύστασης του ενδοκυττάρου περιβάλλοντος, ελέγχοντας τη ροή των θρεπτικών ουσιών, την είσοδο και έξοδο προϊόντων μεταβολισμού, ιόντων και άλλων μορίων, μέσα και έξω από το κύτταρο και στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα. Μόνο τα λιπόφιλα μόρια, μικρού μοριακού μεγέθους, χωρίς φορτίο, καθώς και το O<sub>2</sub> και το CO<sub>2</sub>, είναι σε θέση να διέλθουν διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με παθητική διάχυση (*Lipinski, et al., 2001*). Για τη μεταφορά των λοιπών μορίων, απαιτείται η συμμετοχή καναλιών και των διαφόρων συστημάτων που διευκολύνουν τη μεταφορά τους διαμέσου της μεμβράνης. Η εισαγωγή υδρόφιλων μακρομορίων επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης (*Rejman, et al., 2004*). Το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, συνήθως, οδηγεί εξωτερικά μόρια σε οργανίδια με υψηλή υδρολυτική δραστηριότητα (λυσσοσώματα), ασκώντας με αυτόν τον τρόπο επίσης σημαντικό προστατευτικό ρόλο.

Η ενδοκυττάρωση περιλαμβάνει δυο ευδιάκριτα μονοπάτια: τη φαγοκυττάρωση και τη πινοκυττάρωση. Η φαγοκυττάρωση αφορά τη πρόσληψη μεγάλων μορίων και περιορίζεται σε τύπους κυττάρων όπως τα μακροφάγα, μονοκύτταρα, και ουδετερόφιλα, τα οποία είναι εξειδικευμένα για την απομάκρυνση παθογόνων παραγόντων καθώς επίσης και μολυσμένων και αποπτωτικών κυττάρων. Η πινοκυττάρωση, από την άλλη, εμφανίζεται σε όλα τα κύτταρα και περιλαμβάνει ποικίλες διαδικασίες που οδηγούν στη λήψη υγρών, διαλυτών ουσιών και τμημάτων μεμβρανών. Η ρύθμιση αυτών των διαδικασιών είναι ιδιαίτερα σύνθετη και, παρά την τεράστια πρόοδο στην ανάλυση των μηχανισμών αυτών, πολλές λεπτομέρειες δεν είναι ακόμα επαρκώς κατανοητές. Τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά μονοπάτια πινοκυττάρωσης μπορούν να διακριθούν: η μακροπινοκυττάρωση, η μεσολαβούμενη από μόρια κλαθρίνης ενδοκυττάρωση (*clathrin mediated endocytosis, cme*), η μεσολαβούμενη από καβεόλη και λιπίδια ενδοκυττάρωση και η ανεξάρτητη από κλαθρίνη και καβεόλη ενδοκυττάρωση .

### **A.1.2. Πεπτίδια μεταγωγής πρωτεϊνών με θεραπευτικό δυναμικό:**

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, υπάρχουν πρωτεΐνες που η δράση τους εντοπίζεται εντός του κυττάρου. Πολλοί φαρμακευτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων διάφορων μεγάλων μορίων (πρωτεΐνες, ένζυμα, αντισώματα) αλλά και φαρμακευτικοί νανομεταφορείς, πρέπει να μεταφερθούν ενδοκυτταρικά για να ασκήσουν τη θεραπευτική δράση τους μέσα στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα ή σε άλλα συγκεκριμένα οργανίδια, όπως τα λυσοσώματα, τα μιτοχόνδρια ή το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Στις αρχές της δεκαετίας του '90, έγινε ταυτοποίηση ορισμένων πεπτιδίων μεταγωγής, που είχαν την ικανότητα να μεταφέρουν οποιοδήποτε «φορτίο», συνδεδεμένο με αυτά, διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης, επιτρέποντας στα «φορτία» αυτά να εισέρχονται

εντός του κυττάρου. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν μικρά κατιονικά (και μη) πεπτιδία που είχαν την ικανότητα να διαπερνούν όλες τις κυτταρικές μεμβράνες, τα PTDs (Protein Transduction Domains), δηλαδή δομικές αλληλουχίες μεταγωγής πρωτεϊνών ή CPPs (Cell Penetrating Peptides), δηλαδή πεπτιδία που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.

Η πρώτη παρατήρηση, που οδήγησε στην ανακάλυψη των πεπτιδίων αυτών, έγινε το 1988, από δύο διαφορετικά εργαστήρια, από τους Green και Frankel (*Frankel, et al., 1988*) (*Green, et al., 1988*). Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη TAT του ιού HIV-1, η οποία δρούσε ως μεταγραφικός παράγοντας (Trans-Activating factor of Transcription), είχε την ικανότητα να εκκρίνεται από μολυσμένα κύτταρα, στα οποία ο ιός ήταν ενεργός, να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να προσλαμβάνεται κατά κάποιο τρόπο από γειτονικά κύτταρα, και να μεταδιδεί τη μεταγραφή ιικών γονιδίων και την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών. Ορισμένα χρόνια αργότερα, το μεγέθους 60 αμινοξέων πεπτιδίο (penetratin) που αντιστοιχεί στη ομοιοπεριοχή του μεταγραφικού παράγοντα της Antennapedia αποδείχθηκε ότι εισέρχεται στο εσωτερικό νευρώνων και αυξάνει τη μορφολογική διαφοροποίησή τους. Η ικανότητα ενδοκυτταρικής μεταφοράς των συνθετικών ολιγοπεπτιδίων μοιάζει με την αντίστοιχη των φυσικών πρωτεϊνών, TAT και Antennapedia (*Joliot, et al., 1991*).

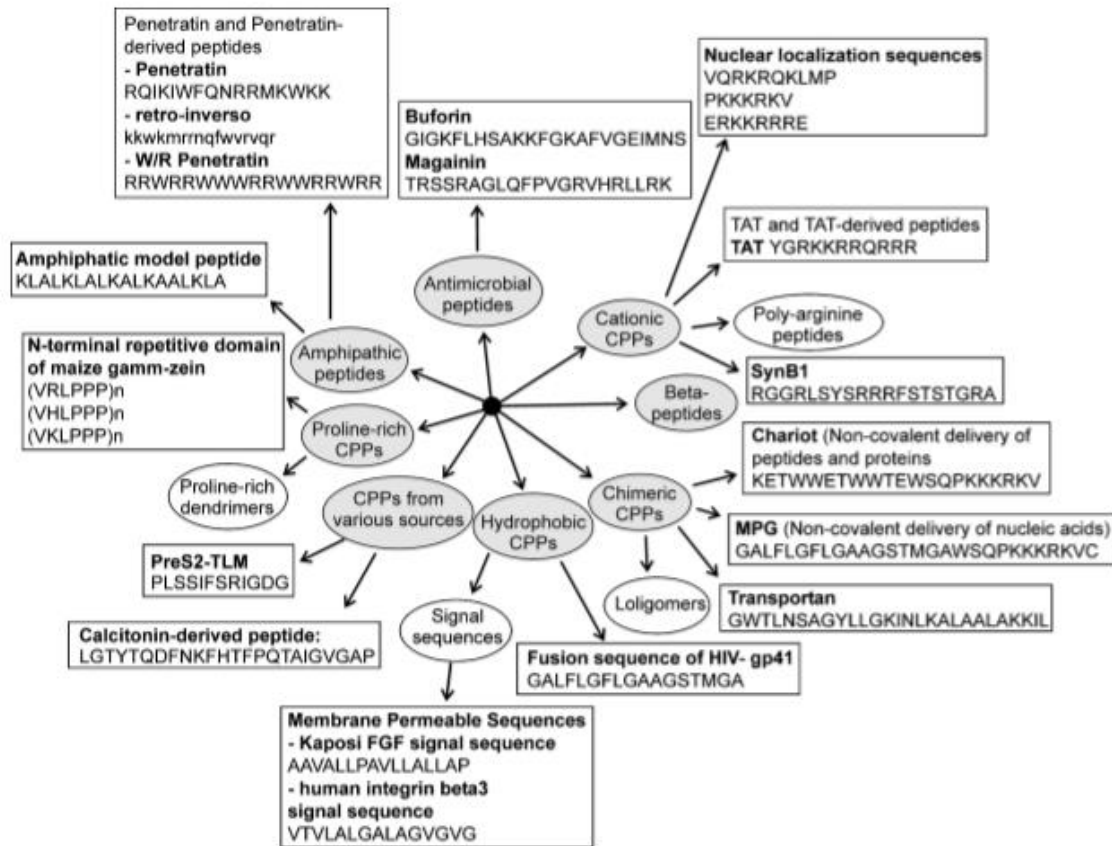
Με τη βοήθεια μεταλλάξεων στις αλληλουχίες των φυσικών πρωτεϊνών ή στις μεγάλες πρωτεϊνικές περιοχές, με περικοπές των αμινο- ή καρβόξυ τελικών περιοχών, ταυτοποιήθηκε ποιές αλληλουχίες των αμινοξέων των πρωτεϊνών ήταν υπεύθυνες για την πρόσληψή τους από τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, αποκαλύφθηκε ότι για να περάσουν οι πρωτεΐνες αυτές διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης ευθύνονται μικρές, μήκους 11- 34 αμινοξέων, κατιονικές περιοχές αυτών των πρωτεϊνών, που ονομάστηκαν PTDs (Protein Transduction Domains). Μάλιστα, τα πεπτιδία αυτά διατηρούν την ικανότητά τους να εισέρχονται μέσα στα κύτταρα χωρίς να είναι απαραίτητη η αλληλουχία της πλήρους μήκους πρωτεΐνης.

Πιο συγκεκριμένα, το 1994, οι Fawell και η ομάδα του (*Fawell, et al., 1994*) εντόπισαν την περιοχή της πρωτεΐνης TAT, στην οποία οφείλεται η εξαιρετική ικανότητα της ενδοκυτταρικής μεταγωγής, η οποία αντιστοιχεί σε ένα τμήμα 36 αμινοξέων. Οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα αυτό, όταν μετά από τη χημική σύνδεση του συγκεκριμένου τμήματος με ετερόλογες πρωτεΐνες, διατηρήθηκε η ικανότητα μεταφοράς τόσο της TAT όσο και των ετερόλογων πρωτεϊνών, που συμπεριφέρονταν ως «φορτίο», μέσα στα κύτταρα.

Το 1997, χαρακτηρίστηκε το μικρότερο τμήμα της πρωτεΐνης TAT, που διατηρούσε την ικανότητα να εισέλθει στα κύτταρα συντηγμένο με ένα φορτίο και αντιστοιχούσε σε ένα εντακαπεπτιδίο, τα αμινοξέα 49-57 (*Lebleu, et al., 1997*). Στην περίπτωση της ομοιοπρωτεΐνης antennapedia, αυτό αποδόθηκε στο πεπτιδίο (penetratin) 16 αμινοξέων της τρίτης έλικας (43-58) της ομοιοπρωτεΐνης (*Derossi, et al. 1994*).

Έκτοτε, έχουν χαρακτηρισθεί από τότε αρκετά πεπτιδία μεταγωγής, που ήταν το καθένα βασισμένο σε μικρές περιοχές από φυσικά υπάρχουσες πρωτεΐνες ή σχεδιασμένο *de novo*. Σήμερα, στη βάση δεδομένων **PTDsite 2.0 Database of Cell Penetrating**

**Peptides** [<http://crdd.osdd.net/raghava/PTDsite/>], παρατίθενται πάνω από 800 ταυτοποιημένα PTDs, με όλα τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους (προέλευση, αλληλουχία, υποκυτταρικός εντοπισμός). Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια μοριακών μεταφορέων που συνεχώς επεκτείνεται. Τα διάφορα PTDs απεικονίζονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Οικογενειακό δέντρο ορισμένων αντιπροσωπευτικών PTDs (Fischer, et al., 2015)

Για να χαρακτηριστεί ένα πεπτιδίο ως PTD πρέπει να πληρή τα ακόλουθα κριτήρια, σύμφωνα με τους Joliot και Prochiantz το 2004:

- Καλή διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα
- Μικρό μήκος αλληλουχίας
- Ευκολία προσέγγισης
- Χαμηλή κυτταροτοξικότητα

Τα πιο κοινά PTDs είναι θετικά φορτισμένα, αν και έχουν καταγραφεί και μερικά ανιονικά ή υδρόφοβα. Ανάλογα με την προέλευσή τους, μπορούμε να διακρίνουμε τρεις κύριες κατηγορίες :

α) Πεπτιδία που προέρχονται από ενδογενείς πρωτεΐνες (ιών, δροσόφιλας κτλ).



β) Χιμαιρικά πεπτίδια, που σχηματίζονται από τη σύντηξη δύο φυσικών ακολουθιών (transportan).

γ) Συνθετικά PTDs, τα οποία σχεδιάζονται βασισμένα σε μελέτες δομής- δραστηριότητας των φυσικών PTDs (R9-πολυαργινίνη).

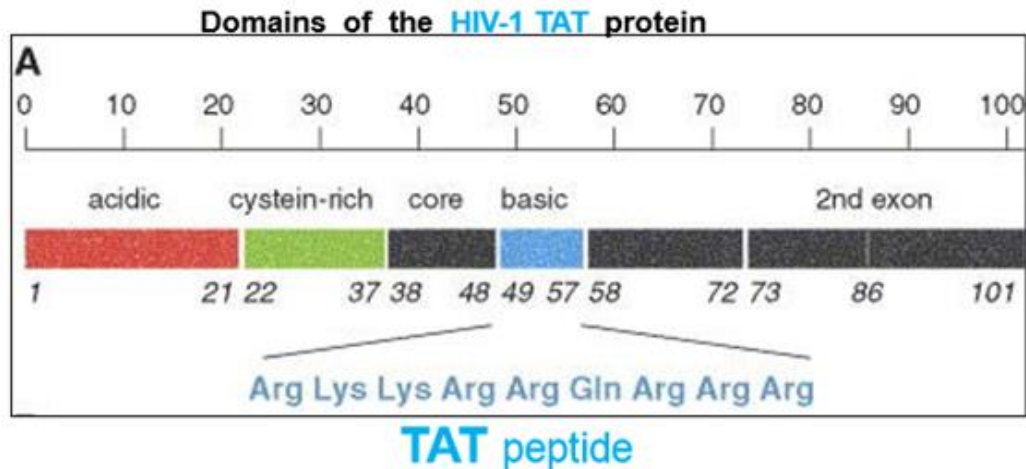
### **A.1.3. TAT πεπτίδιο:**

Η TAT πρωτεΐνη (Trans Activating Factor of Transcription) προέρχεται από τον ιό της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας 1 και 2 (HIV-1 και HIV-2) και είναι ένας δυναμικός trans-μεταγραφικός παράγοντας των γονιδίων του ιού του HIV. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μέγεθος 101 αμινοξέων, κωδικοποιείται από δύο εξώνια και είναι αρκετά εύκαμπτη, ενώ δεν παρουσιάζει προφανή δευτεροταγή δομικά στοιχεία, όπως έχουν καταδείξει δεδομένα από NMR φασματοσκοπία (*Bayer P., et al., 2005*).

Διακρίνονται 5 περιοχές στα δύο εξώνια της πρωτεΐνης. Στο πρώτο εξώνιο (1-72 αμινοξέα) υπάρχουν οι εξής θέσεις:

- 1) ένα αμινο-τελικό άκρο (1-21 αμινοξέα)
- 2) μια περιοχή που έχει 7 κυστεΐνες (22-37 αμινοξέα)
- 3) μια περιοχή σηματοδότησης για μεταφορά στον πυρήνα (38-48 αμινοξέα) και
- 4) μια βασική περιοχή, εμπλουτισμένη με λυσίνη και αργινίνη.

Το δεύτερο εξώνιο ξεκινά στη θέση 73 και έχει μια όχι τόσο συγκεκριμένη σειρά. Ύστερα από αρκετές απαλοιφές αμινοξέων από το πολυπεπτίδιο κατέληξαν στην αλληλουχία (YGRKKRRQRRR) η οποία αντιστοιχεί στα αμινοξέα 47-57 της πλήρους πρωτεΐνης TAT (*Fittipaldi and Giacca, 2005*) (Εικόνα 2). Πρόκειται για μια βασική δομική περιοχή της πρωτεΐνης, πλούσια στο αμινοξύ αργινίνη, και είναι η περιοχή στην οποία βασίζεται η ικανότητα της TAT να εισέρχεται στα κύτταρα.



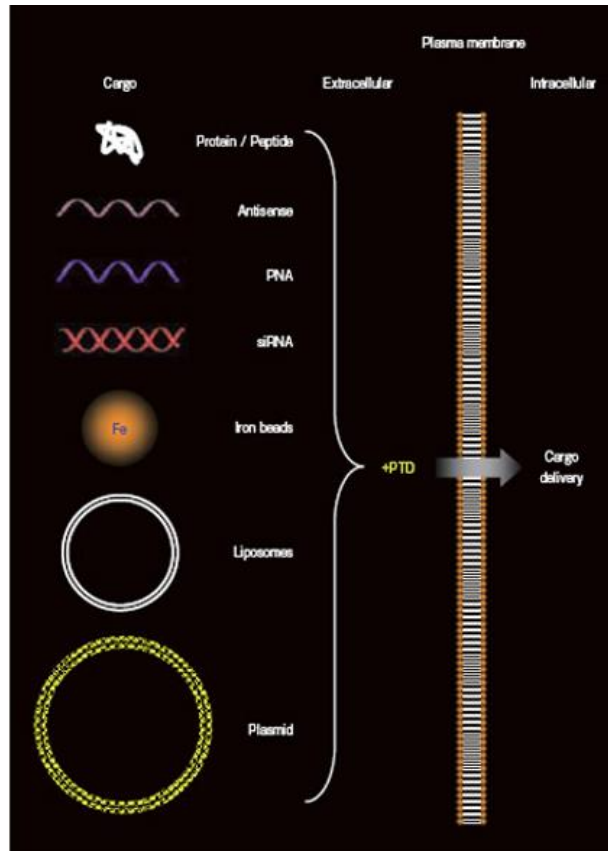
Adv Drug Deliv Rev. 2005 Feb 28;57(4):597-608

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης TAT του HIV-1 (*modified from Fittipaldi and Giacca, 2005*).

#### **A.1.4. Ενδοκυτταρική μεταφορά μορίων-φορτίων με τα PTDs:**

Τα PTDs μπορούν να μεταφέρουν μέσα στα κύτταρα ένα μεγάλο εύρος από ομοιοπολικά ή μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένα φορτία, όπως μικρά μόρια (κυκλοσπορίνη, δοξορουβικίνη) αλλά και siRNAs και μακρομόρια (πρωτεΐνες, πλασμίδια, λιποσώματα, δίκλωνο DNA) (Εικόνα 3). Η μεταφορά των φορτίων (μικρού μεγέθους έως μεγάλες πρωτεΐνες) έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε πειράματα *in vitro* και *in vivo* (Stewart, *et al.*, 2008).

Η πρώτη επίδειξη πρωτεϊνικής μεταγωγής με την τεχνολογία των PTDs σε πειραματόζωο καταγράφηκε από τον Dowdy και την ομάδα του (Schwarze *et al.*, 1999), όπου και έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση της β-γαλακτοσιδάσης, συντηγμένης με το TAT σε ποντίκι. Παρά το μεγάλο μέγεθος της πρωτεΐνης (120kDa), η πρωτεΐνη βρέθηκε σε αρκετούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου (Bechara and Sagan, 2013).

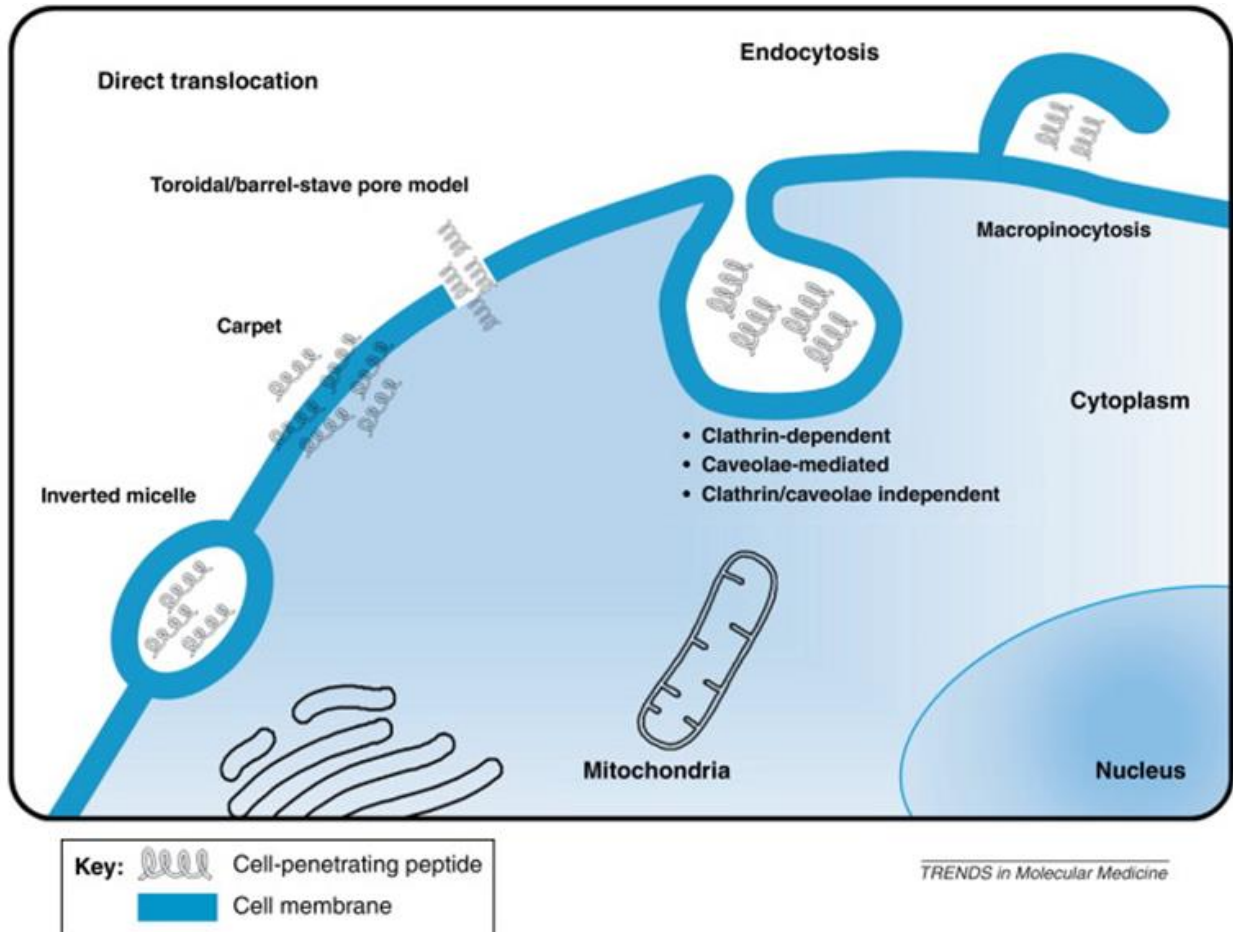


Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των μορίων-φορτίων που μπορούν να μεταφέρουν ενδοκυττάρια τα PTDs (Noguchi and Matsumoto, 2006).

### A.1.5. Μηχανισμός εισαγωγής των PTDs:

Η εισαγωγή των πεπτιδίων μεταγωγής εντός του κυττάρου εξαρτάται από το μέγεθος, τη δομή, τη φύση του φορτίου, την πολικότητα και την υδροφοβικότητά του.

Για το μηχανισμό που υιοθετούν τα PTDs για να επιτευχθεί η ενδοκυττάρια μεταγωγή τους έχουν προταθεί τρία γενικά μοντέλα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4. Πάντως, φαίνεται ότι διαφορετικά PTDs χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς και ότι δεν πρέπει να αποκλείεται η πιθανότητα το ίδιο PTD να χρησιμοποιεί εναλλακτικά μονοπάτια.



Εικόνα 4: Προτεινόμενα μοντέλα ενδοκυτταρικής μεταγωγής των PTDs (Stewart, et al., 2008)

- 1) Το πρώτο μοντέλο προτείνει ότι τα PTDs αρχικά δεσμεύονται στις πολικές κεφαλές των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, καταλήγοντας στον παροδικό σχηματισμό ανεστραμμένων μικκυλίων που "καταπίνουν" το πεπτίδιο και το μεταφερόμενο μόριο ακόμη και στους 4°C. Στη συνέχεια, το άνοιγμα του μικκυλίου μέσα στο κύτταρο οδηγεί στην απελευθέρωση του συντηγμένου με PTD μορίου στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, ο σχηματισμός ανεστραμμένου μικκυλίου περιορίζει το μέγεθος του φορτίου και απαιτεί την παρουσία υδρόφοβων αμινοξέων, που απουσιάζουν από το TAT και τα polyR PTDs, οπότε είναι απίθανο να αντιπροσωπεύει ένα κοινό μηχανισμό εσωτερίκευση των PTDs.
- 2) Το δεύτερο μοντέλο προτείνει την κάθετη εισαγωγή των αμφίφιλων πεπτιδίων στις μεμβράνες, με τα υδρόφοβα τμήματα να τοποθετούνται παραπλεύρως των λιπιδίων και τα υδρόφιλα τμήματα να σχηματίζουν ένα κανάλι μέσω ολιγομερισμού. Το κανάλι αυτό επιτρέπει την αποτελεσματική διέλευση υδρόφιλων μορίων, αποτελώντας ωστόσο μία απειλή για την επιβίωση του κυττάρου.

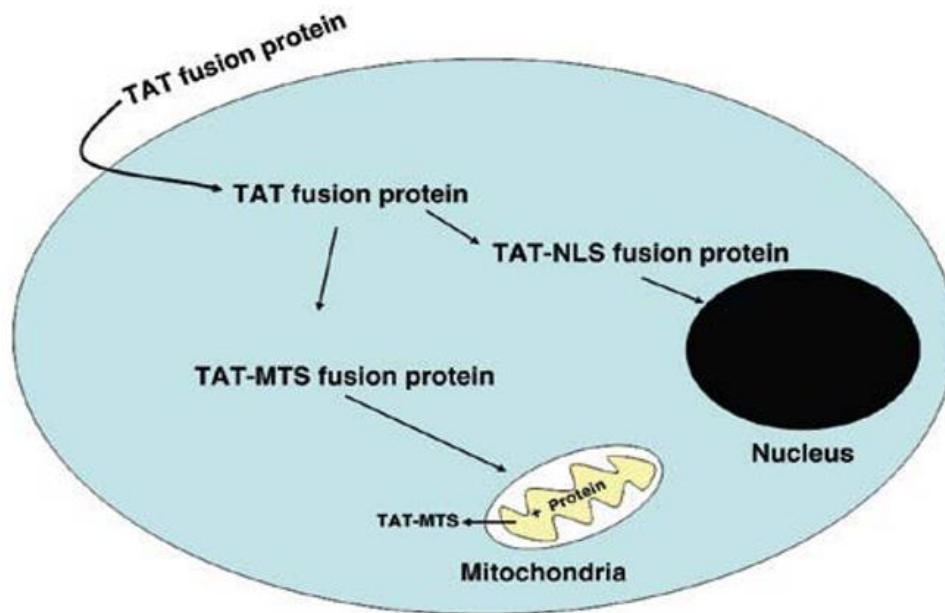
- 3) Το τρίτο μοντέλο είναι το μοντέλο της ενδοκυττάρωσης και είναι το επικρατέστερο. Για την ενδοκυττάρια μεταγωγή του μεγαλύτερου ποσοστού από τα θετικά φορτισμένα PTDs, απαιτείται η ηλεκτροστατική αλληλεπίδρασή τους με τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες της θειϊκής ηπαρίνης (HSPG, συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης), που λειτουργούν ως υποδοχείς. Με την αλληλεπίδραση των PTDs με τις HSPGs διεγείρεται η διατάραξη της μεμβράνης προς σχηματισμό ετερογενών κυστιδικών δομών που καλούνται "μακροπινωσώματα". Τα μακροπινωσώματα απελευθερώνουν με ομοιογένεια το περιεχόμενό τους στο κυτταρόπλασμα ή τον πυρήνα. Το περιεχόμενο των μακροπινωσωμάτων δεν προορίζεται για λυσοσωματιακή αποικοδόμηση και έτσι τα TAT πεπτίδια φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής συγκριτικά με το χρόνο ημιζωής μετά από ενδοκυττάρωση μέσω άλλων τύπων κυστιδίων. Η κυτταρική μεμβράνη και η βιωσιμότητα του κυττάρου δεν επηρεάζονται στο μοντέλο αυτό.

#### **A.1.6. Δυνατότητα μεταγωγής πρωτεϊνών σε υποκυτταρικά διαμερίσματα:**

Μετά την είσοδό τους στο κύτταρο, τα PTDs συντηγμένα με τα «φορτία» βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και είτε παραμένουν εκεί είτε μετακινούνται σε άλλο κυτταρικό διαμέρισμα (πχ. πυρήνας, μιτοχόνδρια). Η επιτυχής «στόχευση» των PTDs σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές εξαρτάται όχι μόνο από το φορέα αλλά και από το φορτίο με το οποίο είναι συντηγμένο, καθώς και από τη φύση του δεσμού μεταξύ του φορέα και του φορτίου. Εάν ο δεσμός αυτός είναι δισουλφιδικός, τότε το φορτίο απελευθερώνεται γρήγορα από το φορέα-PTD μέσα στα κύτταρα, εξαιτίας της δράσης της κυτταροπλασματικής γλουταθειόνης. Σε περίπτωση σύνδεσης της πρωτεΐνης με το PTD μέσω ενός σταθερού δεσμού, οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των δύο συστατικών θα καθορίσουν τον τελικό εντοπισμό της πρωτεΐνης.

Η στόχευση συγκεκριμένων οργανιδίων απαιτεί την προσθήκη ειδικών "κατευθυντήριων" μοτίβων – σηματοδοτικών αλληλουχιών.

Για παράδειγμα, πολλές από τις πρωτεΐνες των οποίων τα γονίδια κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, αλλά έχουν μιτοχονδριακό εντοπισμό, έχει παρατηρηθεί ότι φέρουν στο αμινο-τελικό τους άκρο μια αλληλουχία που τις κατευθύνει στα μιτοχόνδρια και απομακρύνεται όταν φτάσει τελικά μέσα στα μιτοχόνδρια μέσω της διαδικασίας της πρωτεόλυσης. Μια τέτοια σηματοδοτική αλληλουχία αντιστοιχεί στην ονομαζόμενη **MTS** (Mitochondria Targeting Sequence), αμινοτελική αλληλουχία της πρωτεΐνης.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου της μεταγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών συντηγμένων με το πεπτίδιο TAT ενδοκυτταρικά και στοχευμένα προς υποκυτταρικά διαμερίσματα (Piyush M Vyas and Ronald M Payne, 2008).

#### **A.1.7. Πλεονεκτήματα της ενδοκυττάριας μεταγωγής μέσω του TAT:**

Η τεχνολογία πρωτεϊνικής μεταγωγής είναι περισσότερο ασφαλής συγκριτικά με τη γονιδιακή θεραπεία, διότι δεν επηρεάζει την ακεραιότητα του γονιδιώματος του ξενιστή.

Έχει παρατηρηθεί ότι όλοι οι τύποι των ευκαρυωτικών κυττάρων, που εξετάστηκαν μέχρι σήμερα, είναι επιδεκτικοί στη μεταγωγή, μέσω των PTDs, με εξαίρεση τα κύτταρα της ζύμης λόγω της πολυπλοκότητας του κυτταρικού τοιχώματος.

Η μεταγωγή των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 15 λεπτά) απουσία ορού στο θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας, σε σχέση με το χρόνο που απαιτείται για την επιμόλυνση των κυττάρων με DNA (DNA transfection), διαδικασία που απαιτεί τουλάχιστον 4 ώρες απουσία ορού.

Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση είναι δυνατόν να ελεγχθεί, μέσω της ρύθμισης της ποσότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που επωάζεται στην κυτταροκαλλιέργεια. Η πρόσληψη της πρωτεΐνης γίνεται με παρόμοιο ποσοστό από κάθε κύτταρο.

Τα PTDs δεν επηρεάζουν τη λειτουργικότητα και τη διαδικασία καθαρισμού των πρωτεϊνών-φορτίων παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων, ενώ επανακτούν γρήγορα τη φυσιολογική τους διαμόρφωση και δραστηριότητα.

### **A.1.8. Μειονεκτήματα της Τεχνολογίας Μεταγωγής μέσω των PTDs:**

Η τεχνολογία των PTDs παρουσιάζει δυστυχώς και ορισμένα μειονεκτήματα (Πίνακας 1). Το χαρακτηριστικό των PTDs να μην παρουσιάζουν καμία κυτταρική προτίμηση μπορεί να θεωρηθεί θετικό σε ορισμένες περιπτώσεις, αλλά αποτελεί σοβαρό πρόβλημα όταν επιδιώκεται η στόχευση ενός μορίου σε μία συγκεκριμένη περιοχή του σώματος ή σε ένα συγκεκριμένο είδος κυττάρων. Για το λόγο αυτό, πρέπει να εξασφαλίζεται ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη-φορτίο δεν προκαλεί ανεπιθύμητες παρενέργειες στους υγιείς ιστούς.

Τα PTDs γενικά χαρακτηρίζονται από μεγάλη εξειδίκευση ως προς την ενδοκυτταρική μεταγωγή, αν και φυσική αστάθεια, πρωτεόλυση, συνάθροιση, αιμολυτική δραστηριότητα (ως ένδειξη κυτταρικής διαταραχής) και ανοσογονικότητα μπορούν να εμφανιστούν κατά τη χρήση τους (*Papadopoulou L.C., and Tsiftoglou AS., 2011*).

Μερικές έρευνες έδειξαν ότι η συστηματική χορήγηση ορισμένων PTDs σε ανεκτές δόσεις δεν προκάλεσε μεγάλη καταστροφή των ιστών. Ωστόσο υπήρξαν και κάποιες που αφορούσαν εκτεταμένη τοξικότητα σε ήπαρ και νεφρούς, μετά από έγχυση μεγάλων ποσοτήτων. Η βελτίωση της εξειδίκευσης των PTDs για ένα κύτταρο ή ιστό θα μπορούσε να μειώσει τη χορηγούμενη δόση και να ελαχιστοποιηθεί έτσι και η συστηματική τοξικότητα (*Lee SH, et al., 2013*).

Ένα ακόμη μειονέκτημα της τεχνολογίας των PTDs είναι ότι οι μεταφερόμενες πρωτεΐνες έχουν περιορισμένο ενεργό χρόνο ημιζωής με αποτέλεσμα η επίδρασή τους να είναι μόνο παροδική.

Τα PTDs ή τα μόρια τα συνδεδεμένα με PTDs μπορεί να παγιδευτούν μέσα στα μακροπινοσωμάτια, με αποτέλεσμα να χρειάζονται μεγαλύτερες δόσεις-συγκεντρώσεις για να λειτουργήσει η τεχνολογία των PTDs αποτελεσματικά. Είναι γνωστό ότι ορισμένοι ιοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για τη διαφυγή από τα ενδοσωμάτια, μέσω της πτώσης του pH. Προκειμένου να διευκολύνουν την απελευθέρωση των συνδεδεμένων με PTDs μορίων από τα μακροπινοσωμάτια, οι ερευνητές συνέδεσαν τις πρωτεΐνες με το άμινο-τελικό άκρο της υπομονάδας 2 της αιμαγλουτινίνης (HA<sub>2</sub>) του ιού της γρίπης, η οποία επάγει τη λύση των μεμβρανών σε χαμηλά επίπεδα pH. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η ταυτόχρονη χρήση ανασυνδυασμένων TAT-HA πεπτιδίων βελτιώνει αισθητά τη δράστικότητα των συνδεδεμένων με TAT φορτίων μέσα στο κύτταρο.

Obstacles of CPP-mediated PTs	Possible solution of the obstacles
lack of tissue specificity	<p data-bbox="737 296 1166 321">Development of “smart” delivery platforms</p> <p data-bbox="651 369 1252 428">Use of target-specific antibodies, attached via bonds sensitive to cell environmental or external stimulus conditions</p> <p data-bbox="829 476 1073 501">Use of Homing peptides</p> <p data-bbox="769 550 1133 575">Development of tissue specific CPPs</p>
protein instability	<p data-bbox="594 590 1308 615">Exchange L-amino acids of CPPs with the corresponding D-amino acids</p> <p data-bbox="704 663 1198 688">Polymerization technologies (protein PEGylation)</p> <p data-bbox="732 737 1170 762">Construction of liposomes and nanoparticles</p>
immunogenicity	<p data-bbox="581 774 1325 833">de-immunization by substitution of key aminoacids of T- or B-cell epitopes on CPP-mediated PT, using computer algorithms</p> <p data-bbox="716 882 1187 907">Dosage / Route of administration (topical / i.v.)</p>

Πίνακας 1: Μειονεκτήματα και λύσεις στη χρήση των PTDs στη θεραπευτική (Papadopoulou LC και Tsiftoglou AS., 2013).

Συμπερασματικά, η τεχνολογία μεταγωγής πρωτεϊνών μέσω των PTDs έχει προσφέρει αρκετές δυνατότητες για την ανακάλυψη νέων φαρμακολογικά δραστικών πρωτεϊνών, αποτελώντας ουσιαστικά μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση ανίατων ασθενειών.

**Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, με βάση τα επιστημονικά ενδιαφέροντα του εργαστηρίου, κλωνοποιήθηκαν και παρήχθησαν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, οι οποίες είτε είναι ελαττωματικές ή δεν εκφράζονται καθόλου, στις παρακάτω ασθένειες:**

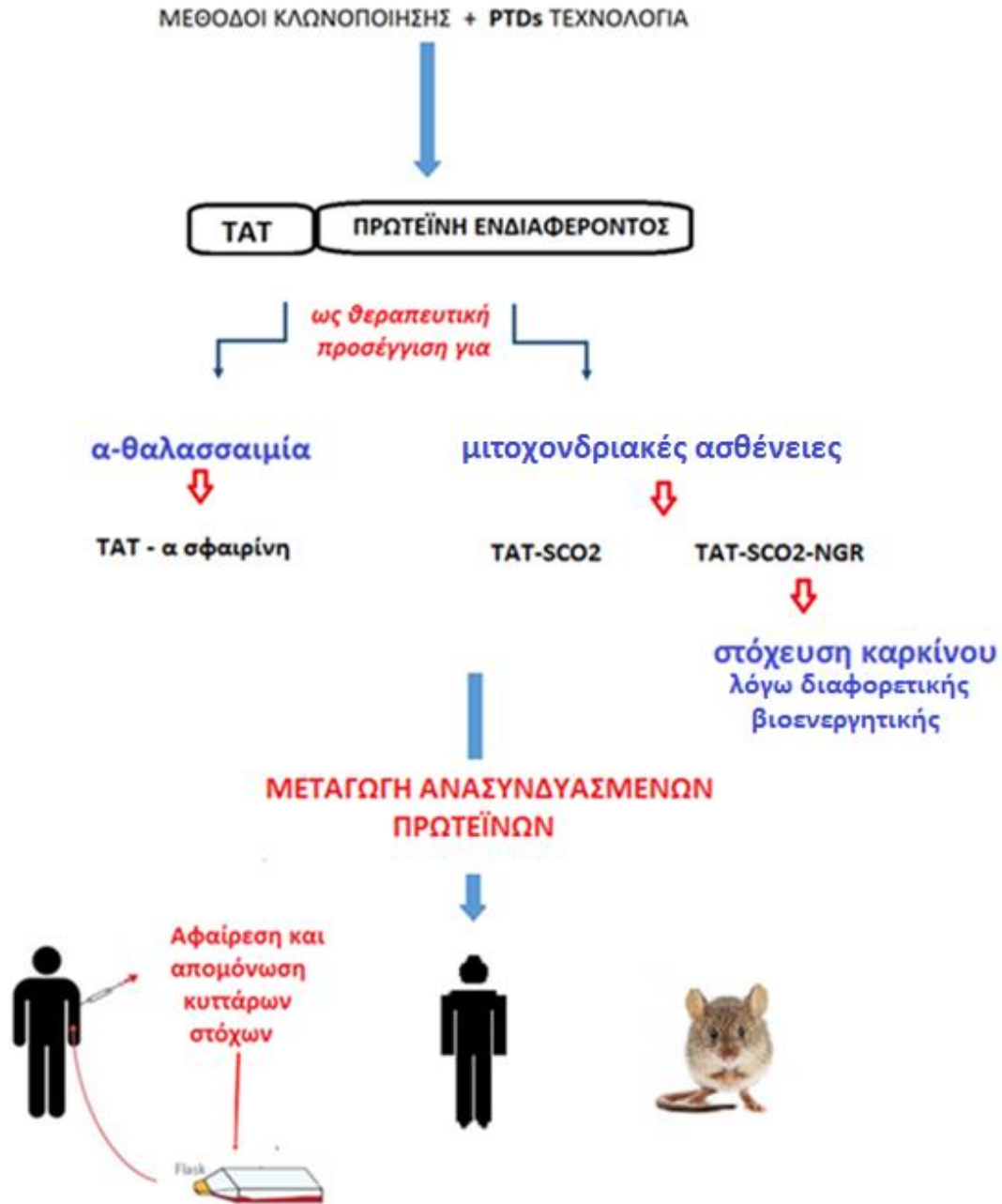
1. α-θαλασσαιμία

2. μιτοχονδριακά νοσήματα που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο SCO2 (συνέχεια της δουλειάς που έχει γίνει ήδη στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, όπου επιτεύχθηκε η ενδοκυττάρια μεταγωγή της TAT-L-SCO2-HA:

*Foltopoulou P.F., Tsiftoglou A.S, Bonovolias I.D., Ingendoh A.Σ. και Papadopoulou L.C., 2010, Intracellular Delivery of Full Length Recombinant Human Mitochondrial L-SCO2 Protein into the Mitochondria of Permanent Cell Lines and SCO2 Deficient Patient's Primary Cells. Bioch. Biophys. Acta.*



Ακολουθεί σχηματική απεικόνιση (Σχήμα 1) του σκοπού της διπλωματικής αυτής εργασίας, όπου εφαρμόζεται η τεχνολογία των PTDs, για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ως θεραπευτικά μόρια για τις ασθένειες αυτές.



Σχήμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση του απώτερου σκοπού της παρούσης μεταπτυχιακής εργασίας.

## A.2. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

### A.2.1. Αιμοσφαιρίνη

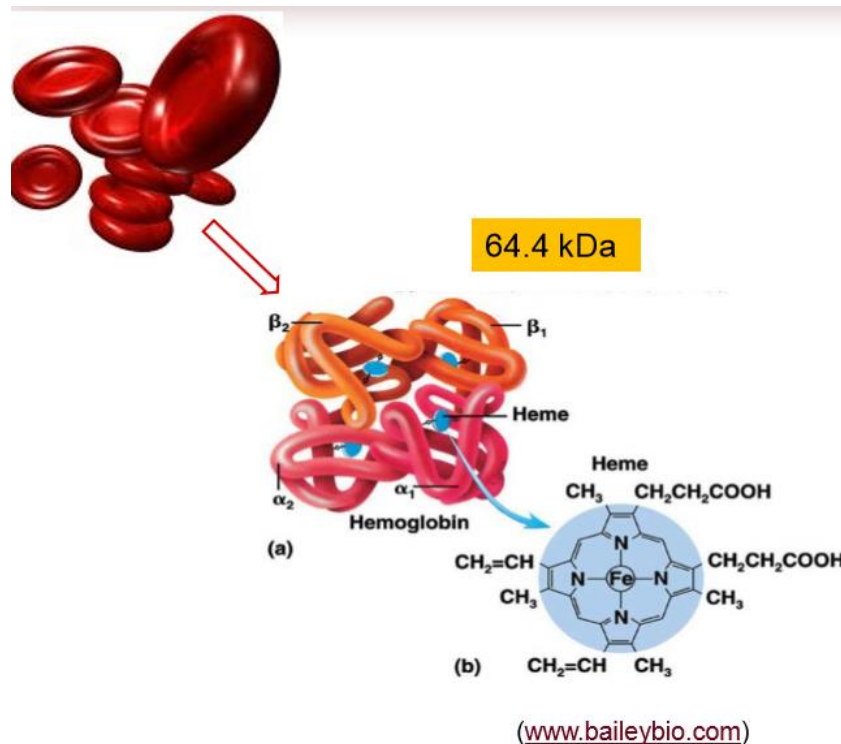
Τα θηλαστικά ανέπτυξαν δύο κύριους μηχανισμούς για να παρέχουν στα κύτταρα τους διαρκώς αρκετό οξυγόνο. Ο πρώτος είναι το κυκλοφοριακό σύστημα που παρέχει οξυγόνο στα κύτταρα. Ο δεύτερος είναι η χρήση μοριακών φορέων οξυγόνου για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της μικρής διαλυτότητας του οξυγόνου στο νερό. Οι φορείς οξυγόνου στα θηλαστικά είναι η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη λειτουργεί ως φορέας οξυγόνου στο αίμα και σε μικρότερο βαθμό, του διοξειδίου του άνθρακα, εναλλακτικά.

Τα ερυθροκύτταρα περιέχουν μεγάλες ποσότητες αιμοσφαιρίνης. Κύρια λειτουργία των ερυθροκυττάρων είναι η μεταφορά του οξυγόνου, που προσλαμβάνεται από τους πνεύμονες, και του διοξειδίου του άνθρακα, που παράγεται από τα κύτταρα του σώματος. Πρόκειται για ειδικές διαφοροποιήσεις κυττάρων από τα οποία απουσιάζει πλήρως η εσωτερική διαμερισματοποίηση και περιέχουν κυρίως τα μόρια της αιμοσφαιρίνης (περίπου  $3 \times 10^8$  μόρια αιμοσφαιρίνης).

Οι χρωμοπρωτεΐνες είναι συμπλοκοποιημένες πρωτεΐνες και εμφανίζονται έγχρωμες γιατί απορροφούν ορισμένα από μήκη κύματος της ζώνης του ορατού φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στην περίπτωση των αιμοπρωτεΐνων, η απορρόφηση του φωτός οφείλεται στην προσθετική τους ομάδα, την αίμη, ένα μη πολυπεπτιδικό στοιχείο. Σε όλους τους ανώτερους πολυκύτταρους ζωικούς οργανισμούς, το μόριο των χρωμοπρωτεΐνων μεταφοράς οξυγόνου, συνίσταται από την ίδια πορφυρινική προσθετική ομάδα που είναι η αίμη, στην οποία δεσμεύεται το οξυγόνο, και από το πρωτεϊνικό τμήμα που ονομάζεται σφαιρίνη. Η παρουσία της σφαιρίνης καθιστά την δέσμευση του οξυγόνου στην αίμη αντιστρεπτή.

Κάθε αλυσίδα α και β-σφαιρίνης "διπλώνει" σε 8 α ελικοειδή τμήματα (A-H) που, στη συνέχεια, αναδιπλώνονται για να διαμορφωθεί η τριτοταγής δομή. Οι αναδιπλωμένες έλικες διαμορφώνουν μια "θέση" που συγκρατεί το λειτουργικό κομμάτι κάθε αλυσίδας, την προσθετική ομάδα της αίμης. Η αίμη είναι ένα επίπεδο δακτυλιοειδές μόριο που περιέχει άτομα άνθρακα, αζώτου και υδρογόνου, με ένα ιόν  $Fe^{2+}$  στο κέντρο. Χωρίς το σίδηρο, ο δακτύλιος καλείται πορφυρίνη. Σε κάθε μόριο αίμης, ο σίδηρος συγκρατείται μέσα στο επίπεδο τμήμα από τέσσερα άτομα αζώτου του πορφυρινικού δακτυλίου. Επειδή ο Fe έχει έξι μονάδες συναρμογής κάνει έναν πέμπτο δεσμό με μια ιστιδίνη από μία από τις έλικες που δημιουργούν την "τσέπη" της αίμης. Αυτός ο πέμπτος δεσμός είναι με την ιστιδίνη 87 της α-αλυσίδας και την ιστιδίνη 92 της β-αλυσίδας. Και τα δύο υπόλοιπα ιστιδίνης είναι μέρος της F έλικας της κάθε σφαιρίνης. Η σύνδεση με το  $O_2$  γίνεται μέσω του έκτου δεσμού συναρμογής.

Η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη περιέχει τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες όμοιες ανά δύο. Οι τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες συγκρατούνται με μη ομοιοπολικές δυνάμεις. Η κάθε αλυσίδα περιέχει μια ομάδα αίμης και μία θέση δέσμευσης οξυγόνου. Προκειμένου να λειτουργήσει αποτελεσματικότερα, η αιμοσφαιρίνη πρέπει να δεσμεύσει στενά το οξυγόνο στην πλούσια σε οξυγόνο ατμόσφαιρα των πνευμόνων ( $PO_2=100\text{mg}$ ) και να είναι σε θέση να απελευθερώσει το οξυγόνο γρήγορα στο σχετικά φτωχό σε οξυγόνο περιβάλλον των ιστών ( $PO_2=50\text{mg}$ ). Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται με έναν κομψό και περίπλοκα συντονισμένο τρόπο.



**Εικόνα 6:** Απεικόνιση της τεταρτοταγούς δομής της αιμοσφαιρίνης (μέγεθος 64,4kDa). a) Απεικονίζεται ο δακτύλιος της αίμης (μπλε χρώμα σε μια αλυσίδα της δεοξυαιμοσφαιρίνης (α σφαιρίνες-κόκκινο, β σφαιρίνες-πορτοκαλί). b) Η χημική σύσταση του μορίου της αίμης. Η αίμη είναι ένα επίπεδο δακτυλιοειδές μόριο που περιέχει άτομα άνθρακα, αζώτου και υδρογόνου, με ένα ιόν  $Fe^{2+}$  στο κέντρο.

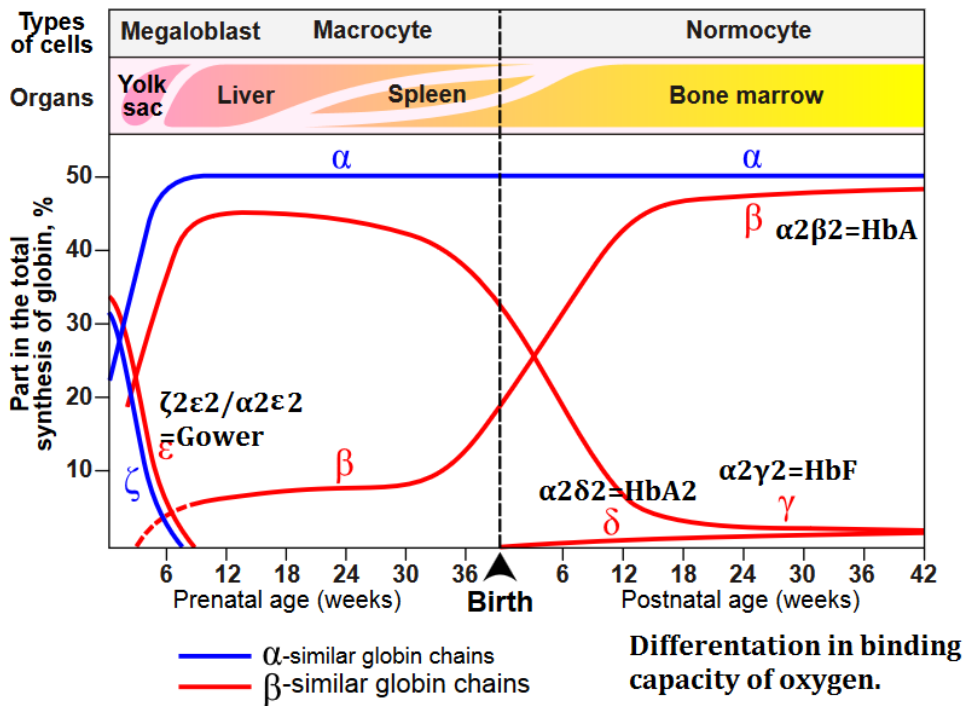
Η ιστορία της αιμοσφαιρίνης αποτελεί το πρωτότυπο παράδειγμα της σχέσης μεταξύ δομής και λειτουργίας ενός πρωτεϊνικού μορίου. Η δομή της αιμοσφαιρίνης χαρακτηρίζεται ως τεταρτοταγής, και το τετραμερές της αιμοσφαιρίνης αποτελείται από δύο πανομοιότυπα διμερή,  $(\alpha\beta)_1$  και  $(\alpha\beta)_2$ . Οι δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, σε κάθε διμερές, συγκρατούνται σφικτά μεταξύ τους κυρίως με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες φέρνουν σε στενή επαφή τις  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδες των δύο διμερών. Ανάμεσα στα μέλη του διμερούς αναπτύσσονται επίσης ιοντικοί δεσμοί και δεσμοί υδρογόνου. Ωστόσο τα δυο διμερή έχουν την ικανότητα να κινούνται το ένα σε σχέση με το άλλο, καθώς συγκρατούνται μεταξύ τους κυρίως με πολικούς δεσμούς.

Οι α-αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης έχουν 141 κατάλοιπα αμινοξέων, ενώ οι β- αλυσίδες έχουν 146.

### A.2.2. Μοντέλο έκφρασης των γονιδίων των σφαιρινών κατά την οντογένεση:

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και της ενήλικης ζωής παρατηρείται μια αλλαγή στους τύπους της αιμοσφαιρίνης που συντίθενται, εξαιτίας των αλλαγών στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων κατά την ανάπτυξη.

Στους φυσιολογικούς ενήλικες, η αιμοσφαιρίνη A [HbA: ( $\alpha_2\beta_2$ )] αναλογεί περίπου στο 97.5% της ολικής αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων, ενώ δυο άλλες αιμοσφαιρίνες η A2 [HbA2: ( $\alpha_2\delta_2$ )] και η F [HbF: ( $\alpha_2\gamma_2$ )] περιορίζονται περίπου σε ποσοστά λιγότερο από 2,5% και 1-1,5%, αντίστοιχα.



Εικόνα 7: Η έκφραση των γονιδίων των σφαιρινών σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, πριν και μετά τη γέννηση (Wood W.G., 1976).

Η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (αιμοσφαιρίνη Gower) εκφράζεται κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής περιόδου (μέχρι περίπου τη 12η εβδομάδα της σύλληψης), ενώ η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) από τη 12η εβδομάδα και μέχρι τη γέννηση. Η ενήλικη αιμοσφαιρίνη αρχίζει να εκφράζεται μετά τους πρώτους έξι μήνες μετά τη γέννηση και συνεχίζει να εκφράζεται καθ'όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Οι διαφορετικοί τύποι

αιμοσφαιρίνης διαφέρουν όσον αφορά την αγχιστεία τους προς το οξυγόνο. Έτσι η μεταφορά του οξυγόνου βελτιστοποιείται στις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης. Επιπλέον, διαφοροποιείται το μέρος σύνθεσης των αλυσίδων των σφαιρινών. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής φάσης, οι αλυσίδες της σφαιρίνης συντίθενται κυρίως στο εμβρυϊκό ήπαρ, ενώ μετά τη γέννηση η σύνθεση λαμβάνει χώρα στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα: CFU-Es, BFU-Es του μυελού των οστών.

### **A.2.3. Οργάνωση των γονιδίων αιμοσφαιρίνης**

Τα γονίδια των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης εντοπίζονται σε δυο γονιδιακά συγκροτήματα (συμπλέγματα).

Το γονίδιο της β αλυσίδας αιμοσφαιρίνης (HbB) βρίσκεται στο σύμπλεγμα των β γονιδίων, στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 (11p15.5, GenBank: NM\_000518), μαζί με το εμβρυϊκό γονίδιο της ε αλυσίδας (HbE), τα δύο εμβρυϊκά γονίδια των γ αλυσίδων (HbG2 και HbG1 ή Gγ και Aγ), το γονίδιο της δ αλυσίδας (HbD) που εκφράζεται περιορισμένα στην ενήλικη ζωή και ένα ψευδογονίδιο.

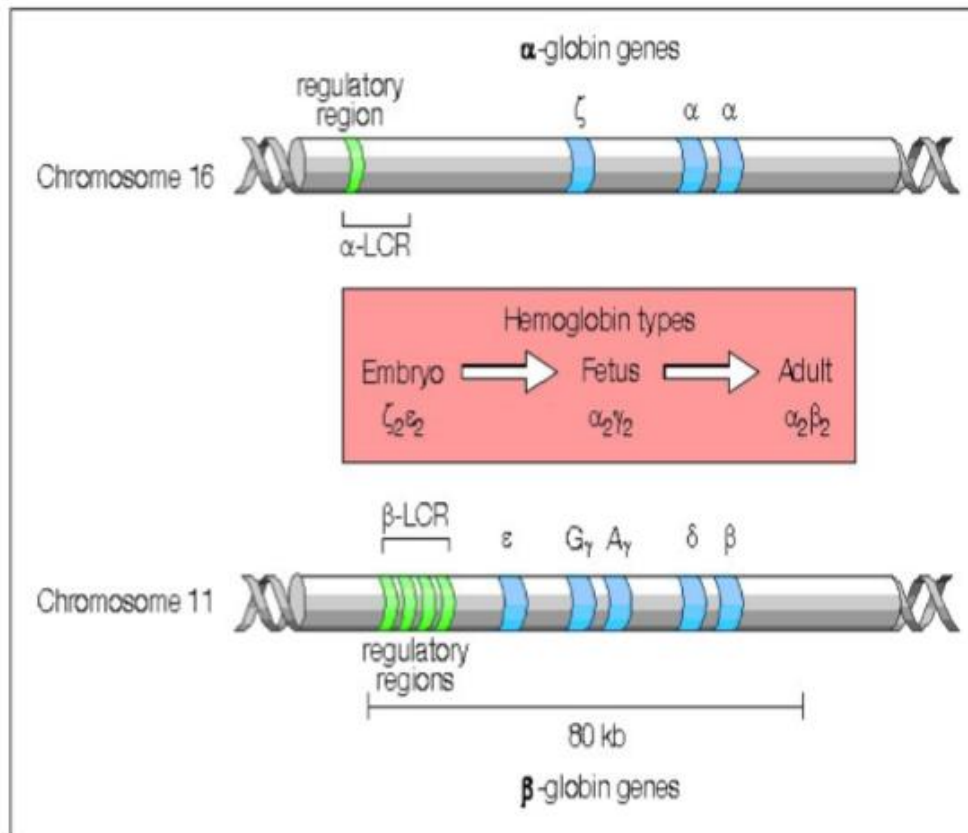
**Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία επικεντρώθηκε στο γονίδιο της α σφαιρίνης (HbA).** Το σύμπλεγμα των α γονιδίων αιμοσφαιρίνης βρίσκεται κοντά στο τελομερικό άκρο του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 16 (16p13.3, GenBank NG 000006) και περιέχει ένα εμβρυϊκό γονίδιο ζ αλυσίδας (HbZ ή ζ2), δύο γονίδια α αλυσίδας (HbA2, HbA1, ή α2, α1), τρία ψευδογονίδια (HbZps, HbD, HbA1PS ή ψζ1, ψα2, ψα1) και το γονίδιο θ αλυσίδας, του οποίου η λειτουργικότητα δεν είναι γνωστή.

Τα γονίδια α1 και α2 (HbA1 και HbA2) είναι σχεδόν όμοια και διαφέρουν στην προσθήκη επτά νουκλεοτιδίων κοντά στο τέλος του ιντρονίου 2 στο α2-γονίδιο, δύο αντικαταστάσεις στο ιντρόνιο 2 (+509 και +573 από τη θέση κάλυψης) και αρκετές νουκλεοτιδικές αλλαγές μετά το 3' άκρο του εξωνίου 3. Επί πλέον τα δύο α-γονίδια είναι τοποθετημένα μέσα σε 3 μεγαλύτερες ομόλογες αλληλουχίες, γνωστές ως περιοχές X, Y και Z, οι οποίες παίζουν μεγάλο ρόλο στο μηχανισμό για τη δημιουργία των πιο κοινών α+ ελλειμμάτων. Αν και τα δύο α-γονίδια παρουσιάζουν υψηλή ομολογία (98.5%), το γονίδιο-α2 παράγει από μόνο του 2-3 φορές περισσότερη α-αλυσίδα αιμοσφαιρίνης από το γονίδιο-α1.

Τα γονίδια των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης συναντώνται στα γονιδιακά συμπλέγματα με τη σειρά της οντολογικής τους έκφρασης. Στο σύμπλεγμα των α αλυσίδων η σειρά των γονιδίων είναι 5' ζ2-ψζ1-μ- ψα- α2- α1- θ 3' και στο σύμπλεγμα των β αλυσίδων είναι 5' ε - Gγ - Aγ - ψβ - δ - β 3'.

Η οικογένεια των γονιδίων των σφαιρινών παρέχει ένα ιδιαίτερα καλό παράδειγμα για το πώς ο διπλασιασμός DNA παράγει νέες πρωτεΐνες, επειδή η εξελικτική ιστορία της έχει επιλυθεί ιδιαίτερα καλά. Οι καταφανείς ομολογίες στην ακολουθία και την αλληλουχία αμινοξέων μεταξύ των σημερινών σφαιρινών δείχνουν ότι όλες πρέπει να προήλθαν από

ένα κοινό προγονικό γονίδιο, ακόμα κι αν μερικές κωδικοποιούνται τώρα από τα ευρέως διαχωρισμένα γονίδια στο γονιδίωμα των θηλαστικών.



(www.mmm.ca/.../BIOL3530/DB\_Ch09/fig9\_24.jpg)

Εικόνα 8: Η δομή των γονιδίων των σφαιρινών.

#### **A.2.4. Αιμοσφαιρινοπάθειες – Μεσογειακή Αναιμία:**

Οι πρώτες κλινικές περιγραφές για αυτή την κατηγορία νοσημάτων εμφανίζονται το 1928 από τον Cooley (*American Journal of Diseases of Children*, 1946). Οι σημαντικές αυτές διαπιστώσεις συνοδεύονταν από κλινικά καθώς και από εργαστηριακά στοιχεία για τη μικροκυττάρωση, υποχρωμία και κυρίως την αυξημένη αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων των ασθενών σε υπότονα διαλύματα NaCl.

Έκτοτε, τα Θαλασσαιμικά Σύνδρομα αποτελούν σταθερή αναφορά αλλά και μοντέλο για τη μελέτη των μονογονιδιακών νοσημάτων σε κλινικό, βιοχημικό και αργότερα μοριακό επίπεδο.

Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στην κατανόηση της φαινοτυπικής ετερογένειας τους και συνέβαλαν στη διερεύνηση της γνώσης όσον αφορά τη παθοφυσιολογία αυτών των

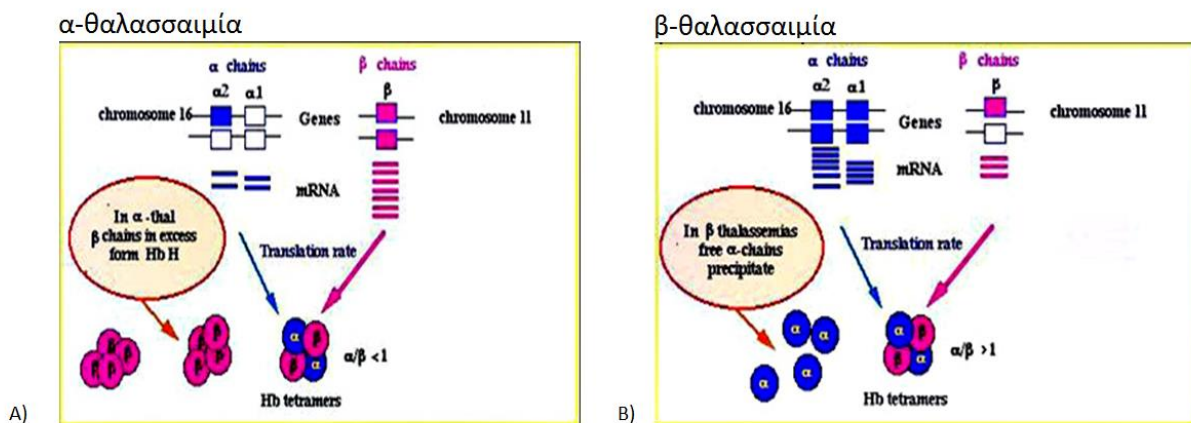
μονογονιδιακών νοσημάτων, προτείνοντας νέους τρόπους στο πεδίο της πρόληψης και της θεραπευτικής τους αντιμετώπισης.

Περισσότερες από 1000 μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στα α και β γονίδια, οι οποίες επηρεάζουν τόσο τη δομή όσο τη σύνθεση των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης.

Οι κληρονομικές διαταραχές της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης αποτελούν μία από τις πιο συχνές γενετικές διαταραχές του ανθρώπινου οργανισμού. Διαιρούνται σε δύο κατηγορίες Α) Την **ποσοτική** διαταραχή της αιμοσφαιρίνης, στην οποία συγκαταλέγονται οι θαλασαιμίες και Β) την **ποιοτική** διαταραχή της δομής της αιμοσφαιρίνης, στην οποία συγκαταλέγονται οι αιμοσφαιρινοπάθειες. Η πιο συχνά δομικά ανώμαλη αιμοσφαιρίνη είναι η HbS και σπανιότερα οι HbC, HbD, HbE και HbO.

Τα θαλασαιμικά σύνδρομα αποτελούν μία ετερογενή ομάδα κληρονομικών νοσημάτων που οφείλονται σε γονιδιακές βλάβες των πεπτιδικών αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη σύνθεση ή ακόμα και τη μη σύνθεση μιας εκ των σφαιρινών (α και β). Αυτό μπορεί να προκαλέσει τη σύνθεση μη φυσιολογικών μορίων αιμοσφαιρίνης και επομένως να προκληθεί αναιμία, το χαρακτηριστικότερο γνώρισμα της νόσου.

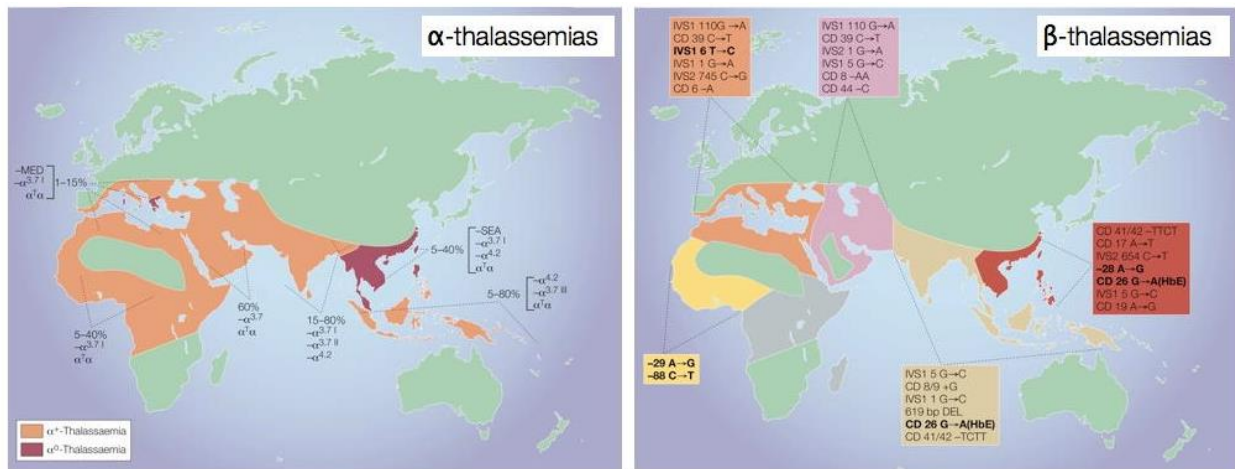
Η διαδικασία της παραγωγής των αλυσίδων των σφαιρινών ελέγχεται αυστηρά, γεγονός που διατηρεί το ισοζύγιο παραγωγής σε σταθερά επίπεδα. Στα θαλασαιμικά σύνδρομα αλλοιώνεται η διαδικασία αυτή, με αποτέλεσμα να χαλάει το ισοζύγιο παραγωγής α- προς β- σφαιρίνες. Μειωμένη παραγωγή των προϊόντων των γονιδίων της α<sub>2</sub>-σφαιρίνης ή α<sub>1</sub>-σφαιρίνης οδηγεί στη συγγενή συσσώρευση των β-αλυσίδων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον κλινικό φαινότυπο της α-θαλασαιμίας. Με παρόμοιο τρόπο, μειωμένη παραγωγή των προϊόντων των γονιδίων της β-σφαιρίνης οδηγεί σε μια πιο σοβαρή ασθένεια, τη β-θαλασαιμία.



**Εικόνα 9:** Ανάλογα με το γονίδιο της σφαιρίνης που παρουσιάζει μια γενετική ανωμαλία, προκύπτει: Α) η α-θαλασαιμία, όπου συσσωρεύονται τα προϊόντα έκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης ή Β) η β-θαλασαιμία, όπου συσσωρεύονται τα προϊόντα έκφρασης του γονιδίου της α-σφαιρίνης. (Διαλέξεις κ. Παπαδοπούλου Λ., Μάθημα Κλινική Φαρμακολογία – Θεραπευτική, «Αιμοσφαιρινοπάθειες», 2015).



Επιδημιολογικά, περίπου το 5% του παγκόσμιου πληθυσμού παρουσιάζει μεταλλάξεις σε ένα τουλάχιστον αλληλόμορφο από τα γονίδια των σφαιρινών, αλλά μόνο το 1,7% νοσεί από α- ή β-θαλασσαιμία. Η θαλασσαιμία επηρεάζει παρόμοια ποσοστά αντρών και γυναικών. Η α-θαλασσαιμία παρατηρείται πιο συχνά στις περιοχές της Αφρικής και της Νότιας Ασίας, ενώ η β-θαλασσαιμία είναι πιο κοινή ανάμεσα στα άτομα στη Μεσόγειο, στην Αφρική και στην Νότια Ασία. Η θαλασσαιμία επηρεάζει τα 5 στα 30 άτομα σε αυτές τις εθνικές ομάδες. Η εξάπλωση των παθολογικών αλληλομόρφων ευνοήθηκε στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, λόγω της ανθεκτικότητας των φορέων στην ελονοσία, αφού ο φαινότυπος των ερυθροκυττάρων παρείχε προστασία ενάντια στο πλασμώδιο της ελονοσίας (όπως, το *Plasmodium Falciparum*). Με την μετακίνηση των πληθυσμών, επήλθε και η αλλαγή στον επιδημιολογικό χάρτη.



**Εικόνα 10:** Ο επιδημιολογικός χάρτης για την α- και β- θαλασσαιμία. Στο χάρτη φαίνονται οι περιοχές έξαρσης της κάθε ασθένειας. Παράλληλα φαίνονται οι διάφοροι τύποι μεταλλάξεων που οδηγούν στον εκάστοτε φαινότυπο καθώς και τα ποσοστά ύπαρξης της κάθε μετάλλαξης στον πληθυσμό (DJ Weatherall, and JB Clegg, 2001)

### **A.2.5. β-θαλασσαιμία ή Μεσογειακή Αναιμία**

Η β-θαλασσαιμία εμφανίζεται κατά κύριο λόγο στους πληθυσμούς που κατοικούν γύρω από τη Μεσόγειο, γεγονός που είναι άλλωστε υπεύθυνο και για την ονομασία της νόσου: από τις ελληνικές λέξεις "θάλασσα" και "αίμα". Στην Ευρώπη, τα μεγαλύτερα ποσοστά ασθενών εντοπίζονται στην Ελλάδα, και ειδικότερα στις ακτές του Αιγαίου πελάγους αλλά και στις Μεσογειακές ακτές της, όπως και σε τμήματα της Ιταλίας. Ιδιαίτερα, στα Μεσογειακά νησιά όπως η Σαρδηνία, η Σικελία, η Κορσική, η Κύπρος και η Κρήτη (όχι οι Βαlearίδες νήσοι), η νόσος έχει ιδιαίτερα μεγάλη επιρροή. Άλλοι λαοί της Μεσογείου, που ανήκουν στην ευρύτερη περιοχή της, και εμφανίζουν κάποιο ποσοστό πασχόντων, είναι αυτοί της Δυτικής Ασίας και της Βόρειας Αφρικής. Μακριά από τη Μεσόγειο, η



θαλασσαιμία εμφανίζεται και στη νότια Ασία, με το μεγαλύτερο ποσοστό φορέων της ασθένειας να είναι στις Μαλδίβες (16% του πληθυσμού).

Περισσότερες από 200 μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα ότι επηρεάζουν την έκφραση των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης. Σε αντίθεση με την α-θαλασσαιμία, η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αυτών είναι σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές, για παράδειγμα αντικαταστάσεις μιας βάσης, ελλείμματα ή ενθέσεις λίγων νουκλεοτιδίων. Στους πληθυσμούς, στους οποίους η β-θαλασσαιμία είναι συχνή, την πλειοψηφία των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων καλύπτουν λίγες κοινές μεταλλάξεις και στα υπόλοιπα παθολογικά αλληλόμορφα συναντάται ένας μεγαλύτερος αριθμός σπάνιων μεταλλάξεων.

Οι μεταλλάξεις, οι οποίες περιορίζουν τη σύνθεση των β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης είναι γνωστές ως μεταλλάξεις β<sup>+</sup>-θαλασσαιμίας, ενώ αυτές, οι οποίες καταργούν ολοκληρωτικά τη σύνθεσή τους, ως μεταλλάξεις β<sup>0</sup>MA. Κάποιες μεταλλάξεις που επιτρέπουν σε ένα μεγάλο βαθμό τη σύνθεση των β αλυσίδων είναι γνωστές ως μεταλλάξεις β<sup>++</sup>. Οι περισσότερες μεταλλάξεις β<sup>0</sup> και β<sup>+</sup> έχουν επίπτωση στον αιματολογικό φαινότυπο των φορέων, όπως σχετική αύξηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων με μειωμένο μέσο όγκο (MCV 60-70fl) και αιμοσφαιρίνη ανά κύτταρο (MCH 19-23pg) καθώς και χαρακτηριστική αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης A2, (HbA2), συνήθως μεταξύ 4-6%. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν εξαιρέσεις του φαινοτύπου αυτού, όπως στις περιπτώσεις των «σιωπηρών φορέων» με φυσιολογικό ή σχεδόν φυσιολογικό φαινότυπο ή φορείς με μειωμένο MCV και MCH και είτε με φυσιολογικά επίπεδα HbA2 (<3.4%), είτε συχνά με αυξημένα επίπεδα HbA2 (>6%). Ορισμένοι φορείς συγκεκριμένων μεταλλάξεων βMA έχουν ελαφρώς αυξημένα επίπεδα HbF (>2% - <5%) και οι φορείς δβMA συνήθως έχουν ελαφρώς μειωμένους ερυθροκυτταρικούς δείκτες με αξιοσημείωτη αύξηση της HbF (>5% και <10%) και φυσιολογικά ή ελαφρώς μειωμένα επίπεδα HbA2.

Οι σημειακές μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη β-θαλασσαιμία ομαδοποιούνται με βάση το μηχανισμό που τροποποιούν τη σύνθεση των β-αλυσίδων, δηλαδή τη μεταγραφή, την επεξεργασία ή τη μετάφραση του RNA.

### **A.2.6 α-Θαλασσαιμία-Μοριακή βάση:**

Έχουν περιγραφεί παγκοσμίως, περισσότερες από 80 διαφορετικές μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν α-θαλασσαιμία (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>).

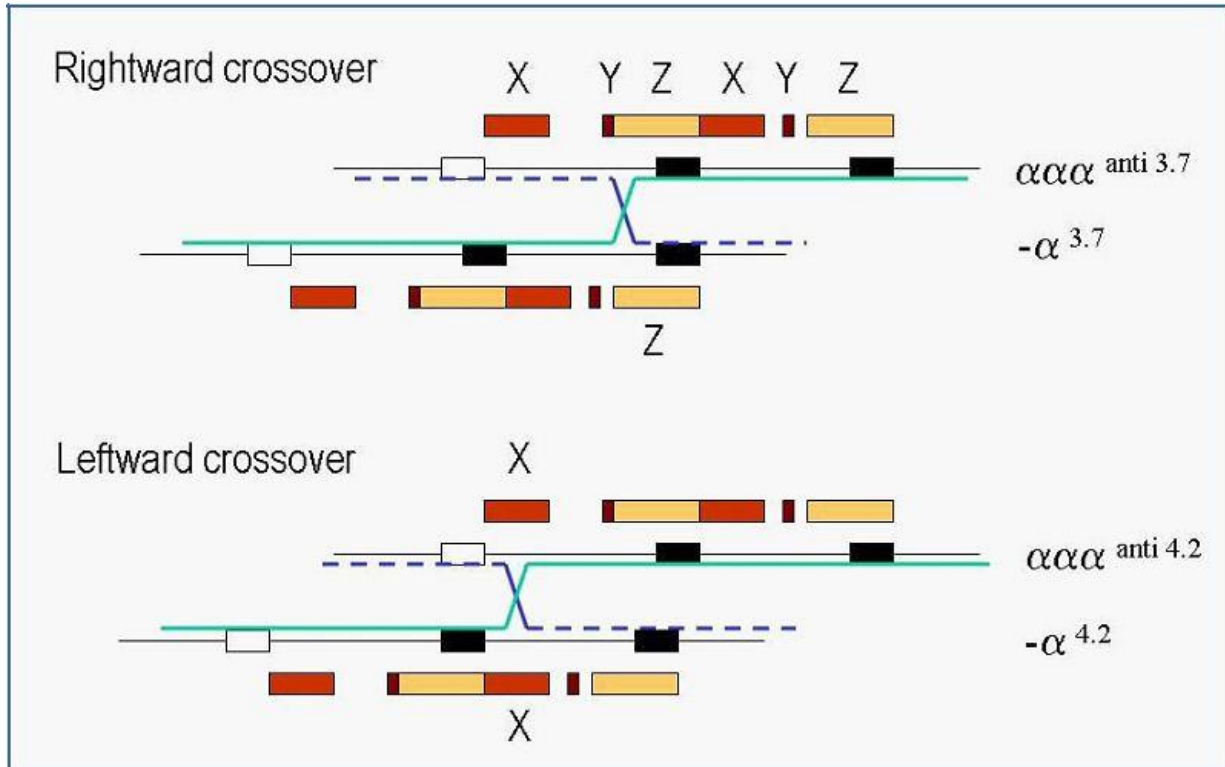
Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, τα δύο α-γονίδια είναι τοποθετημένα μέσα σε 3 μεγαλύτερες ομόλογες αλληλουχίες, γνωστές ως περιοχές X, Y και Z, οι οποίες παίζουν μεγάλο ρόλο στο μηχανισμό για τη δημιουργία των πιο κοινών α<sup>+</sup> ελλειμμάτων.

Η πλειοψηφία των διαταραχών αυτών είναι ελλείμματα, τα οποία απομακρύνουν ολόκληρο ή μέρος του συμπλέγματος των α-γονιδίων. Πιο σπάνιες είναι οι σημειακές μεταλλάξεις ή τα μικρά ελλείμματα μέσα στα δυο α-γονίδια σφαιρίνης. Οι μεταλλάξεις

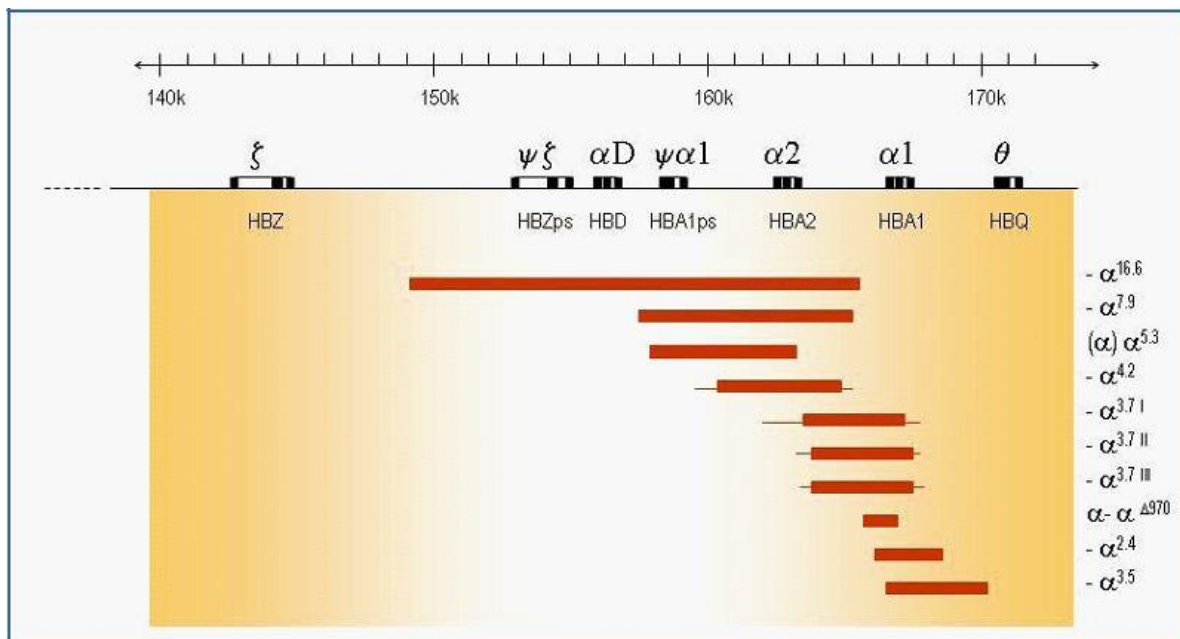
εκείνες, οι οποίες αποφέρουν μερική απώλεια στη σύνθεση των α-αλυσίδων από το παθολογικό χρωμόσωμα, είναι γνωστές ως μεταλλάξεις  $\alpha^+$ , ενώ εκείνες που προκαλούν ολοκληρωτική απώλεια της σύνθεσης των α-γονιδίων είναι γνωστές ως μεταλλάξεις  $\alpha^0$ . Χρησιμοποιείται συγκεκριμένος τρόπος για το συμβολισμό των διαφόρων τύπων μεταλλάξεων. Ο συμβολισμός «αα» αντιπροσωπεύει ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο με δυο α-γονίδια, ο συμβολισμός «-α» αντιπροσωπεύει έλλειμμα ενός α-γονιδίου, ο «--» έλλειμμα και των δύο α-γονιδίων από το ίδιο αλληλόμορφο.

Χρησιμοποιείται συχνά εκθέτης για να δηλώσει το μέγεθος του ελλείμματος ή τη φύση της σημειακής μετάλλαξης ή του πληθυσμού, στον οποίο πρωτοπεριγράφηκε η μετάλλαξη π.χ.  $-\alpha^{3.7}$  δηλώνει ένα έλλειμμα  $\alpha^+$ , στο οποίο λείπουν 3.7kb, ή **--SEA** δηλώνει ένα κοινό έλλειμμα  $\alpha^0$ , που πρωτοπεριγράφηκε σε πληθυσμό της ΝΑ Ασίας, ή **aPolyAa** δηλώνει μια σημειακή μετάλλαξη στο α2-γονίδιο, που επηρεάζει τη θέση πολυαδενυλίωσης.

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που ευθύνονται για α-θαλασσαιμία αφορούν ελλείμματα, τα οποία αφήνουν ένα μόνο λειτουργικό α-γονίδιο στο χρωμόσωμα. Η ύπαρξη διπλασιασμένων ομόλογων περιοχών εκατέρωθεν των α-γονιδίων ευνοεί φαινόμενα άνισων επιχιασμών κατά τη διάρκεια της μείωσης, όταν τα ομόλογα χρωμοσώματα δεν βρίσκονται σε σωστή «ευθυγράμμιση» (αντιστοίχιση) μεταξύ τους. Αποτέλεσμα του άνισου επιχιασμού είναι η δημιουργία ελλειμμάτων. Τρεις τύποι ελλειμμάτων, μεγέθους 3.7kb, δημιουργούνται μεταξύ των γονιδίων α1 και α2, εξ αιτίας άνισου επιχιασμού (ανασυνδυασμού) μεταξύ των περιοχών Z και είναι τα:  $-\alpha^{3.7I}$ ,  $-\alpha^{3.7II}$ ,  $-\alpha^{3.7III}$ , με αντίστοιχη φαινοτυπική ετερογένεια. Τα δυο πρώτα έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός γονιδίου που μοιάζει με το α1 και το τρίτο σε ένα υβριδικό γονίδιο που μοιάζει με το α2. Αντίστοιχα, άνισος επιχιασμός μεταξύ των περιοχών X οδηγεί στη δημιουργία ελλείμματος 4.2kb, το οποίο αφαιρεί ολόκληρο το γονίδιο α2. Και στις δύο περιπτώσεις άνισου επιχιασμού προκύπτουν δύο χρωμοσώματα, εκ των οποίων το ένα υπολείπεται ενός α-γονιδίου και το άλλο έχει ένα επιπλέον α-γονίδιο (**ααα<sup>anti3.7</sup>** και **ααα<sup>anti4.2</sup>**). (Εικόνα 11)

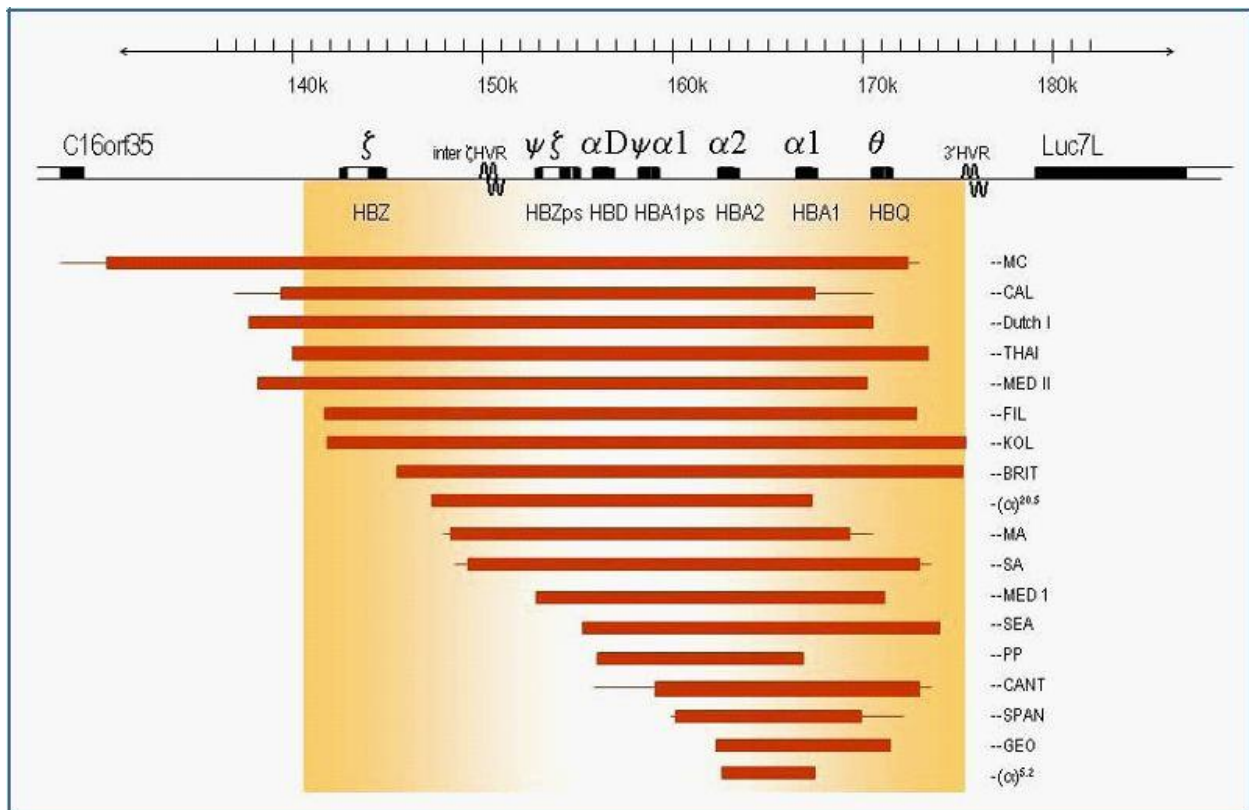


Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της α<sup>+</sup>-θαλασσαιμίας. Τα α<sup>3.7</sup> και ααα<sup>anti 3.7</sup> χρωμοσώματα (πάνω) προκύπτουν από τον επιχιασμό ανάμεσα στα άνισο επιχιασμό των Z περιοχών κατά τη μείωση. Τα -α<sup>4.2</sup> και ααα<sup>anti 4.2</sup> χρωμοσώματα, προκύπτουν από άνισο επιχιασμό των X περιοχών (Harteveld, C.L. and Higgs, D.R., 2010).



Εικόνα 12: Ελλείμματα που οδηγούν στην α<sup>+</sup>-θαλασσαιμία. Τα ελλείμματα σε κάθε περιοχή απεικονίζονται με τις κόκκινες μπάρες (Harteveld, C.L. and Higgs, D.R., 2010).

Η πλειοψηφία των ελλειμμάτων της α-θαλασσαιμίας, που προκύπτουν εξ αιτίας άνισου ανασυνδυασμού, συνήθως αφαιρούν και τα δύο α-γονίδια στο χρωμόσωμα που πλήττεται και σε κάποιες περιπτώσεις ολόκληρο το σύμπλεγμα των α-γονιδίων αιμοσφαιρίνης, δημιουργώντας το γενετικό αίτιο για α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 20 τέτοια ελλείμματα παγκοσμίως. Τα ελλείμματα αυτά δεν παρουσιάζουν περιοχές με εμφανή ομολογία στα σημεία κοπής τους και μπορούν να καταταγούν σε τρεις επί μέρους ομάδες που αφορούν αυτά που πρόέκυψαν από: α) επανασύνδεση μη ομόλογων θραυσμάτων, β) ανασυνδυασμό μεταξύ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών Alu, και γ) τελομερική σταθεροποίηση τμημάτων στα οποία αποκόπηκε το τελικό άκρο του χρωμοσώματος 16. Επί πλέον έχουν χαρακτηριστεί διάφορα ελλείμματα, τα οποία αφήνουν ανέπαφα τα α-γονίδια αλλά αφαιρούν ρυθμιστικές περιοχές, όπως την περιοχή HS-40, μαζί με διαφορετικού μεγέθους γειτονικές περιοχές. Στις περιπτώσεις αυτές, ενώ τα α-γονίδια υπάρχουν, δεν εκφράζονται προκαλώντας φαινότυπο α-θαλασσαιμίας.



Εικόνα 13: Ελλείμματα σε δύο α-γονίδια οδηγούν σε α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία (Harteveld, C.L. and Higgs, D.R., 2010).

Τα περισσότερα ελλείμματα που προκαλούν α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία είναι σποραδικά, αν και τέσσερα είναι τα πιο συχνά: τα ελλείμματα --Med και (-α)20.5 που συναντώνται στους μεσογειακούς πληθυσμούς και τα --SEA και --FIL στη ΝΑ Ασία.

Υπάρχουν περισσότερες από 40 σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές που προκαλούν α-θαλασσαιμία. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται πιο συχνά στο α2-γονίδιο και λιγότερο

στο α1. Περίπου οι μισές από τις διαταραχές αυτές επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA ή τη μετάφραση. Υπάρχει επίσης μια ενδιαφέρουσα ομάδα μεταλλάξεων, η οποία προκαλεί μετα-μεταφραστική αστάθεια του αιμοσφαιρινικού πολυπεπτιδικού παραγωγού με φαινότυπο α-θαλασσαιμίας, αφού η σύνθεση της α-σφαιρίνης είναι μειωμένη.

Πολλές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τις συντηρημένες αλληλουχίες στις περιοχές αποκοπής και επανασυγκόλλησης του mRNA έχουν περιγραφεί τόσο στο α1 όσο και στο α2 γονίδιο, και όλες έχουν ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική καταστολή της παραγωγής της α-σφαιρίνης από το παθολογικό γονίδιο. Ένα κοινό παράδειγμα περιλαμβάνει το έλλειμμα πέντε νουκλεοτιδίων που αφαιρεί το δινουκλεοτίδιο GT (θέση δότη κατά την επεξεργασία του mRNA) στο 5' άκρο του ιντρονίου 1 του α2-γονιδίου (α2 IVS1 GAGGGTGAGG>GAGG, γνωστό ως αHρha).

Οι διαταραχές κατά τη μετάφραση του RNA προκαλούνται από μεταλλάξεις: στο κωδικώνιο έναρξης, στο κωδικώνιο τερματισμού, σε μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου ή μη νοηματικές μεταλλάξεις. Μεταλλάξεις στο κωδικώνιο έναρξης έχουν βρεθεί και στα δύο α-γονίδια. Πέντε διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί στο κωδικώνιο τερματισμού, οι οποίες (όλες) πλήττουν το α2-γονίδιο. Όλες οι μεταλλάξεις στο κωδικώνιο τερματισμού έχουν ως αποτέλεσμα αντί για τον τερματισμό της μεταγραφής, την ενσωμάτωση ενός αμινοξέος και την παραγωγή μιας παθολογικής α-αλυσίδας από επιπλέον 31 αμινοξέα. Αυτές οι μεγαλύτερου μήκους α-αλυσίδες συντίθενται σε χαμηλότερα επίπεδα, αλλά έχουν την τάση να κατακρημνίζονται στα ερυθροκύτταρα, προκαλώντας διαταραχές στη λειτουργία των ερυθροκυττάρων και των κυτταρικών μεμβρανών.

Οι πιο κοινές παθολογικές αιμοσφαιρίνες που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο κωδικώνιο λήξης του α2 γονιδίου είναι: η Hb Constant Spring (α2 cd142 TAA>CAA) η οποία συναντάται συχνά στη ΝΑ Ασία και η Hb Icaria (α2cd142 TAA>AAA), η οποία δεν είναι σπάνια στην Ελλάδα. Άλλες μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην μετάφραση του RNA είναι μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου ή μη νοηματικές μεταλλάξεις που συναντώνται κυρίως στο α2-γονίδιο και κάποιες φορές στο α1.

Υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός μεταλλάξεων που αφορούν σημειακές αντικαταστάσεις ή μικρά ελλείμματα και προκαλούν τη σύνθεση ασταθών α-αλυσίδων αιμοσφαιρίνης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτές οι παθολογικές αλυσίδες είναι τόσο ασταθείς που δεν ανιχνεύονται καν σε πρωτεϊνικό επίπεδο και γίνονται αντιληπτές μόνο στην αλληλούχιση του DNA του γονιδίου. Οι παθολογικές αυτές αλυσίδες είναι αιματολογικά «σιωπηρές» στους φορείς, όταν όμως συνδυαστούν με άλλες μεταλλάξεις α-θαλασσαιμίας μπορεί να προκαλέσουν ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπων, όπως η αιμοσφαιρινοπάθεια H ή η ενδιάμεση α-θαλασσαιμία. Σε σπάνιες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις αυτές σε ομόζυγη κατάσταση ή σε συνδυασμό με ελλείμματα α<sup>0</sup> μπορεί να προκαλέσουν εμβρυϊκό ύδρωπα. Τυπικά παραδείγματα τέτοιων μεταλλάξεων είναι οι: Hb Quong Sze (α2 cd125 CTG>CCG, Leu>Pro), Hb Agrinio (α2 cd29 CTG>CCG, Leu>Pro) και η Hb Taybe (α1 cd38 ή cd39 delACC, Thr).

Στην περίπτωση του ελληνικού πληθυσμού η ανάλυση των γονοτύπων σε περιστατικά με HbH αποκάλυψε ότι το πιο συχνό έλλειμμα που συναντάται σε ποσοστό >50% των παθολογικών αλληλομόρφων είναι το  $-\alpha^{3.7}$ . Ακολουθούν τα  $-\text{MED}$  και  $-\alpha^{20.5}$ , ενώ σπανιότερα είναι τα  $-\alpha^{4.2}$  και  $-\alpha^{5.2}$ . Οι συχνότερες σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές που προκαλούν α-θαλασσαιμία στην Ελλάδα είναι η **αTSAUDI**, που εντοπίζεται στην ουρά πολυαδενυλίωσης του  $\alpha 2$  (AATAAA>AATAAG), και η **αHph**. Σε μικρότερη συχνότητα συναντώνται η **αTPA** στην ουρά πολυαδενυλίωσης του  $\alpha 2$  (AATAAA>AATAAA) καθώς και οι μεταλλάξεις που προκαλούν τις υπερασταθείς αιμοσφαιρίνες Hb Agripio και Hb Icaria. Σπανιότερα, συναντώνται μεταλλάξεις στο  $\alpha 1$  ή το  $\alpha 2$ -γονίδιο που προκαλούν τη σύνθεση των υπερασταθών αιμοσφαιρινών και συνοδεύονται με εικόνα α-θαλασσαιμίας όπως η Hb Taybe, η Hb Heraklion ( $\alpha 1$ , cd36/37 delCCC, Pro), η Hb Adana ( $\alpha 1$  ή  $\alpha 2$ , cd59 GGC>GAC, Gly>Asp).

### **A.2.7. Κλινική ετερογένεια της α-θαλασσαιμίας:**

Σύμφωνα με τον αριθμό των α-γονιδίων, των οποίων έχει επηρεαστεί η λειτουργικότητα, από τις διάφορες μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί πιο πάνω, έχουν χαρακτηριστεί τέσσερις βασικοί διαφορετικοί αιματολογικοί και κλινικοί φαινότυποι (Εικόνα 14) (Harteveld and Higgs, 2010). Το κλινικό φάσμα της α-θαλασσαιμίας είναι ιδιαίτερος ευρύ και κυμαίνεται από ασυμπτωματική έως βαρύτατη εκδοχή της νόσου που είναι ασύμβατη με τη ζωή και προκαλεί ενδομήτριο θάνατο.

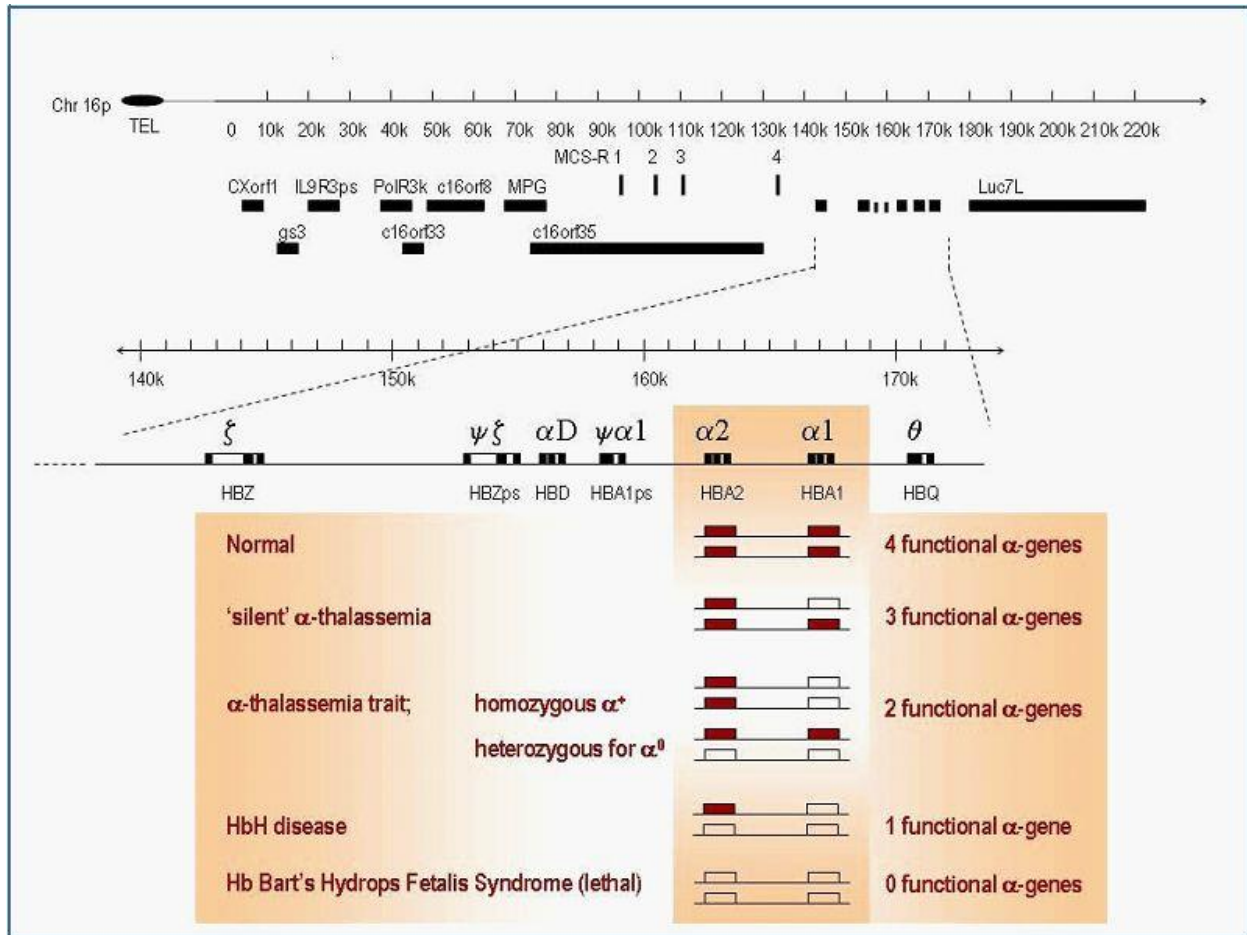
- Σιωπηλός φορέας (α-/α)

Πρόκειται για ασθενείς που φέρουν ένα α αλληλόμορφο με μειωμένη ή καθόλου λειτουργικότητα, λόγω ελλείμματος είτε λόγω μιας σημειακής μετάλλαξης που προκαλεί  $\alpha^+$ -θαλασσαιμία. Η υπερλειτουργικότητα των υπόλοιπων α-γονιδίων καλύπτει την έλλειψη του ενός, με αποτέλεσμα τα άτομα αυτά (φορείς) να μην παρουσιάζουν καθόλου έως ελάχιστες αιματολογικές διαταραχές στα ερυθροκύτταρά τους.

- Φορείς με αιματολογικά ευρήματα (αα/--) ή (α-/α-)

Τα άτομα αυτά έχουν κληρονομήσει δύο φυσιολογικά γονίδια α-σφαιρίνης και είναι είτε ετερόζυγα για την  $\alpha^0$ -θαλασσαιμία (αα/--) είτε ομόζυγα για την  $\alpha^+$ -θαλασσαιμία (α-/α-). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρουσιάζεται ο κλινικός φαινότυπος της α-θαλασσαιμίας. Εάν και τα δύο αλληλόμορφα: ένα  $\alpha 2$ -γονίδιο και ένα  $\alpha 1$ -γονίδιο, παρουσιάζουν ελλείμματα στο ίδιο χρωμόσωμα (--/αα), ο γονότυπος έχει cis μορφή, ενώ εάν παρουσιάζουν ελλείμματα και τα δύο αλληλόμορφα του ενός γονιδίου (έστω  $\alpha 2$ -γονιδίου) και στις δύο χρωματίδες του χρωμοσώματος 16, αλλά τα  $\alpha 1$ -γονίδια παραμένουν ενεργά (-α-/α), ο γονότυπος έχει trans μορφή. Τα άτομα που παρουσιάζουν

τους γονότυπους αυτούς είναι συνήθως κλινικά φυσιολογικοί αλλά συχνά παρουσιάζουν ήπια αναιμία. Παρατηρούνται μικροκυτταρικά και υποχρωματικά ερυθροκύτταρα, με αυξημένο αριθμό, υπερβαίνοντας τα  $5,5 \times 10^{12}/L$ , ενώ είναι δυνατόν να ανιχνευθούν και ελεύθερες β-αλυσίδες.



**Εικόνα 14:** Οι βασικοί κλινικοί φαινότυποι της  $\alpha$ -θαλασσαιμίας που έχουν χαρακτηριστεί βάση του αριθμού των αλληλομόρφων γονιδίων της  $\alpha$ -σφαιρίνης που εκφράζονται φυσιολογικά (Chui D.H., 2005).

- Αιμοσφαιρινοπάθεια H (HbH) ( $\alpha^-/-$ )

Πρόκειται για ασθενείς με μια ενδιάμεσης βαρύτητας κλινική συμπτωματολογία και αιματολογική εικόνα, γνωστή ως αιμοσφαιρινοπάθεια H (HbH). Τα άτομα αυτά έχουν κληρονομήσει μόνο ένα λειτουργικό γονίδιο  $\alpha$ -σφαιρίνης ( $\alpha^-/-$ ). Η απώλεια των υπόλοιπων τριών  $\alpha$ -γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άφθονων ποσοτήτων της αιμοσφαιρίνης H, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλό λόγο β-σφαιρινών προς  $\alpha$ -σφαιρίνες και αύξηση της παραγωγής β-σφαιρινών. Η συσσώρευση των β-αλυσίδων οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων β<sub>4</sub> τετραμερών, τα οποία αποτελούν μέχρι και το 30% της αιμοσφαιρίνης σε ασθενείς με HbH ασθένεια. Η αιμοσφαιρινοπάθεια H είναι



η σοβαρότερη, συμβατή με τη ζωή, μορφή α-θαλασσαιμίας, αν και είναι κλινικά είναι μικρότερης βαρύτητας από τους περισσότερους τύπους β-θαλασσαιμίας. Η αιμοσφαιρινοπάθεια Η προκαλείται, όταν μεταλλάξεις στα α-γονίδια συν-κληρονομηθούν, με αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεση των α-αλυσίδων σε επίπεδο σχεδόν ισοδύναμο με αυτό που αντιστοιχεί σε ένα λειτουργικό α-γονίδιο.

Η HbH παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια με το οξυγόνο, χωρίς να εμφανίζει φαινόμενο Bohr ή αλληλεπιδράσεις μέσω αίμης, γεγονός που τη μετατρέπει σε μη αποτελεσματικό μεταφορέα οξυγόνου, δηλαδή παρόλο που δεσμεύει το οξυγόνο, το αποδίδει ελάχιστα στους ιστούς.

Το ποσοστό της HbH είναι ένας παράγοντας-κλειδί για την βαρύτητα της νόσου και μάλιστα για περισσότερους από έναν λόγους. Η HbH δεν μπορεί να διανείμει οξυγόνο στους ιστούς, είναι δηλαδή λειτουργικά ανενεργή και επί πλέον είναι ασταθής και η κατακρήμνισή της προκαλεί το σχηματισμό των χαρακτηριστικών εγκλείστων, καθώς και βλάβη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και αιμόλυση. Τα ερυθροκύτταρα που περιέχουν HbH είναι πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα να είναι πιο επιρρεπή σε αιμόλυση, όταν χορηγούνται οξειδωτικά όπως οι σουλφοναμίδες. Εκτός της χρόνιας αιμόλυσης όμως, οι πάσχοντες από αιμοσφαιρινοπάθεια Η παρουσιάζουν και ένα βαθμό αναποτελεσματικής ερυθροποίησης

Οι κλινικές εκδηλώσεις συμπεριλαμβάνουν αναιμία, από ήπια έως αναιμία που να απαιτεί επείγουσα μετάγγιση, όπως κατά τη διάρκεια λοιμώξεων ή εγκυμοσύνης, και πολύ σπάνια τακτική μετάγγιση. Στα εργαστηριακά ευρήματα συμπεριλαμβάνονται υποχρωμία, μικροκυττάρωση, ανισοποικιλοκυττάρωση και αυξημένα δικτυοερυθροκύτταρα. Άλλα κλινικά ευρήματα είναι ίκτερος, ηπατοσπληνομεγαλία, χολολιθίαση, υπερφόρτωση με σίδηρο στους ενήλικες ως συνέπεια των μεταγγίσεων και καθυστέρηση ανάπτυξης στα παιδιά. Η ερυθροειδής υπερπλασία μπορεί να οδηγήσει σε δομικές ανωμαλίες των οστών με υπερπλασία του μυελού, λέπτυνση των οστών και παθολογικά κατάγματα.

Στους περισσότερους ασθενείς δεν είναι απαραίτητη καμία θεραπεία, ενώ σε ορισμένους απαιτείται μετάγγιση αίματος.

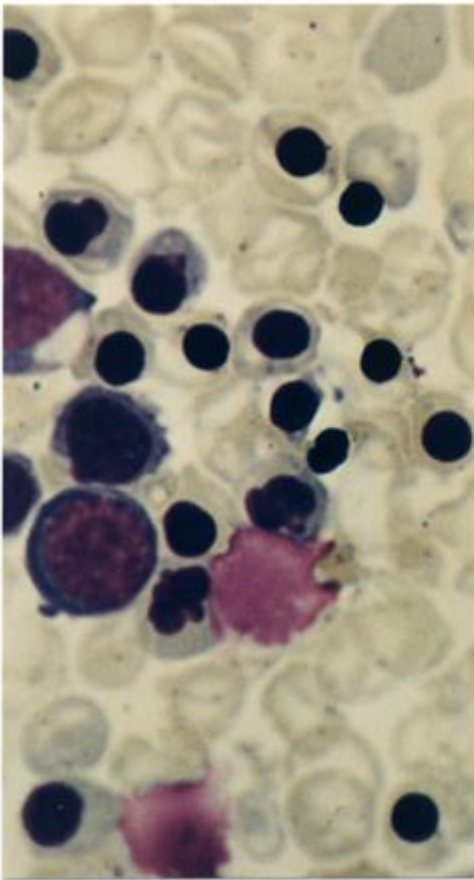
- Hb Bart's – Σύνδρομο εμβρυϊκού ύδρωπα (--/--)

Εμβρυϊκός ύδρωπας οφείλεται συνήθως στην συν-κληρονόμηση δύο μεταλλάξεων α<sup>0</sup>-θαλασσαιμίας και επομένως στην ολοκληρωτική απουσία της παραγωγής της α-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, άρα δεν μπορούν να παράγουν καθόλου λειτουργική αιμοσφαιρίνη HbA, HbF ή HbA2. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 20 διαφορετικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε λειτουργικές διαγραφές – ελλείμματα και στα δύο ζεύγη των γονιδίων της α-σφαιρίνης (--/--). Ο εμβρυϊκός ύδρωπας δεν είναι συμβατός με τη ζωή εκτός της μήτρας. Έχουν αναφερθεί κάποιες σπάνιες μορφές εμβρυϊκού ύδρωπα λόγω ομόζυγης κατάστασης μιας υπερασταθούς α-αλυσίδας ή συνύπαρξη υπερασταθούς αλυσίδας με έλλειμμα α<sup>0</sup>-θαλασσαιμίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το εμβρυϊκό αίμα αποτελείται



κυρίως από την Hb Bart's ( $\gamma_4$ ) αιμοσφαιρίνη, η οποία λειτουργικά είναι ανίκανη να μεταφέρει οξυγόνο, και μικρές ποσότητες από Hb Portland I και Portland II ( $\zeta_2\gamma_2$ ,  $\zeta_2\beta_2$ ), οι οποίες υποστηρίζουν την επιβίωση του εμβρύου στο τελευταίο στάδιο της εγκυμοσύνης. Βαριά αναιμία του εμβρύου οδηγεί σε ασφυξία, εμβρυϊκό ύδρωπα, και θάνατο αμέσως μετά τη γέννηση ή στο νεογνό. Η προγεννητική διάγνωση μπορεί να εντοπίσει και κατά συνέπεια να αποτρέψει τις σοβαρές επιπλοκές που δημιουργούνται συχνά στις εγκυμοσύνες ενός υδρωπικού εμβρύου (Εικόνα 15).

a.



b.



Εικόνα 15: a. Περιφερικό αίμα με ανώριμα ερυθροκύτταρα και υποχρωματικά, μικροκυτταρικά ερυθροκύτταρα b. έμβρυο με ύδρωπα (*Weatherall DJ, Clegg JB., 2001*)

### **A.2.8. Πρόγνωση για τους κλινικούς φαινότυπους της α-θαλασσαιμίας:**

Για τους σιωπηλούς φορείς και για τα άτομα με ελάχιστα αιματολογικά ευρήματα, η πρόγνωση είναι εξαιρετική.

Για τα άτομα με την ασθένεια HbH, το ποσοστό επιβίωσης διαφέρει, αλλά σε γενικές γραμμές είναι καλό, με τους περισσότερους ασθενείς να επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωση. Ωστόσο, ορισμένοι ασθενείς αντιμετωπίζουν πιο περίπλοκες καταστάσεις, όπως σοβαρής αναιμίας και απαιτούνται συχνές μεταγγίσεις κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Μια μελέτη υποστηρίζει ότι ένας υποτύπος της αιμοσφαιρίνης H – Constant Spring (HCS) σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο αναιμίας, απειλητικής για τη ζωή. Αν η αναιμία αντιμετωπιστεί κατάλληλα και αποφευχθεί η συσσώρευση σιδήρου με χημική θεραπεία, τα άτομα με νόσο HbH μπορούν να έχουν υγιή και φυσιολογική ζωή.

Ο εμβρυϊκός ύδρωπας, όπως έχει προαναφερθεί, είναι ασύμβατος με τη ζωή και απαιτείται ταυτοποίηση στη μήτρα και συνεχείς μεταγγίσεις στο έμβρυο, εάν πρόκειται να επιζήσει και να γεννηθεί. Για να διαπιστωθεί εάν τα έμβρυα φέρουν την αιμοσφαιρίνη Hb Bart's (γ4), πρέπει να διεξάγονται γενετικές μελέτες στην οικογένεια, να ταυτοποιούνται τα υψηλού ρίσκου ζευγάρια και τα έμβρυα να ελέγχονται ενδομητρίως εάν δεν παράγουν καθόλου α-σφαιρίνη.

Αν τα έμβρυα επιβιώσουν, λόγω μεταγγίσεων μέσα στη μήτρα, θα απαιτείται συνεχής ιατρική περίθαλψη και μεταγγίσεις καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Μια θεραπευτική αντιμετώπιση της α<sup>0</sup>-θαλασσαιμίας θα μπορούσε να είναι η μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων.

Μια μελέτη του Joly και της ομάδας του (*P. Joly, et al., 2012*) υποστηρίζει την ιδέα ότι η α-θαλασσαιμία μειώνει το ρίσκο για εγκεφαλική αγγειοπάθεια σε παιδιά με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Η αναφορά αφορούσε τρεις ομάδες παιδιών με δρεπανοκυτταρική αναιμία, η πρώτη ομάδα με εγκεφαλική αγγειοπάθεια (εγκεφαλικό επεισόδιο, σιωπηλό έμφραγμα ή μη φυσιολογικά αποτελέσματα σε διακρανιακό υπερηχογράφημα Doppler), η δεύτερη ομάδα χωρίς εγκεφαλική αγγειοπάθεια και η τρίτη ομάδα με αποτελέσματα υπό όρους σε διακρανιακό υπερηχογράφημα Doppler. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι η α-θαλασσαιμία έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια στην εγκεφαλική αγγειοπάθεια, ενώ η ανεπάρκεια σε G6PD (γλυκοζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση) αυξάνει το ρίσκο για εγκεφαλική αγγειοπάθεια σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία.

### **A.2.9. Επιδημιολογία α-θαλασσαιμίας:**

Τα παγκόσμια στατιστικά υποδεικνύουν την α-θαλασσαιμία, ίσως, ως την πιο κοινή μονογονιδιακή ασθένεια παγκοσμίως. Υπάρχουν περισσότεροι από 270 εκατομμύρια φορείς α<sup>+</sup>-θαλασσαιμίας στον κόσμο, με μεγαλύτερη συχνότητα στους πληθυσμούς της Ινδίας, της ΝΑ Ασίας και της Αφρικής. Η νόσος συναντάται λιγότερο συχνά στη Μεσόγειο και τη μέση Ανατολή. Επιπλέον, γεννιούνται 300.000-400.000 παιδιά με σοβαρή α-θαλασσαιμία κάθε χρόνο στις περιοχές αυτές.

Πριν την είσοδο των μεθόδων ανάλυσης DNA στο πεδίο της διάγνωσης, οι εξετάσεις των πληθυσμών για την α-θαλασσαιμία βασίζονταν εξ ολοκλήρου στη μέτρηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης Bart's στο αίμα του ομφάλιου λώρου. Ωστόσο, ετεροζυγώτες με έλλειμμα στο ένα γονίδιο της σφαιρίνης δεν μπορούσαν να ανιχνευθούν ως προς την αιμοσφαιρίνη Bart's κατά τη νεογνική περίοδο. Συνεπώς, βασίμα δεδομένα στις πληθυσμιακές συχνότητες για τους διάφορους τύπους α-θαλασσαιμίας δεν είναι πάντα διαθέσιμα.

Η συχνότητα των αλληλομόρφων με μεταλλάξεις που οδηγούν στην α-θαλασσαιμία είναι 5-10% στη Μεσόγειο, 20-30% σε περιοχές της Δυτικής Αφρικής και 60-80% σε περιοχές της Σαουδικής Αραβίας, της Ινδίας, της Ταϊλάνδης και της Παπούα Γουινέας. Στην Ταϊλάνδη, η οποία έχει πληθυσμό 62 εκατομμυρίων, γεννιούνται περίπου 7000 παιδιά με νόσο HbH. Η συχνότητα των ετεροζυγωτών φορέων, ανάμεσα στον κινέζικο πληθυσμό, έχει αναφερθεί να κυμαίνεται ανάμεσα στο 5% με 15%. Η συχνότητα της α-θαλασσαιμίας είναι μικρότερη του 0,01% στη Μεγάλη Βρετανία, στην Ισλανδία και την Ιαπωνία.

Οι ανωμαλίες στην παραγωγή των α-αλυσίδων είναι κληρονομικές. Η εξαίρεση στον κανόνα αυτό είναι οι ασθενείς με α-θαλασσαιμικό μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ATMDS), οι οποίοι εκδηλώνουν την ασθένεια σε μεγαλύτερη ηλικία, με μέσο όρο ηλικίας διάγνωσης τα 68 χρόνια.

Αναφορικά με την εμφάνιση των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων σε σχέση με το φύλο, επηρεάζονται σε παρόμοια ποσοστά και άντρες και γυναίκες. Ωστόσο, υπάρχει ένας τύπος α-θαλασσαιμίας, ο οποίος σχετίζεται με νοητική καθυστέρηση και επηρεάζει μόνο τα αρσενικά άτομα. Η ασθένεια αναφέρεται ως σύνδρομο α-θαλασσαιμίας νοητικής καθυστέρησης συνδεδεμένης με το X χρωμόσωμα (ATR-X) (*Steensma, D. P et al., 2004*).

Τέλος, ως προς την εμφάνιση της νόσου σε σχέση με τη φυλή, η α-θαλασσαιμία εμφανίζεται σε άτομα ανεξαρτήτως του εθνικού υπόβαθρου αλλά υπάρχουν περιοχές, που η συχνότητα των φορέων εμφανίζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με άλλα μέρη στον κόσμο. Η μελέτη TCRN στη Βόρεια Αμερική έδειξε ότι το 85% των ασθενών με α-θαλασσαιμία είναι Ασιάτες, το 4% ανήκουν στη λευκή φυλή και το 11% ανήκουν σε άλλες εθνικότητες, συμπεριλαμβανομένων των Αφρικανών και λοιπών εθνικοτήτων.

### **A.2.10. Κλινική αντιμετώπιση α-θαλασσαιμίας:**

Όταν ένας ασθενής με α-θαλασσαιμία θεωρηθεί ότι χρειάζεται κάποια θεραπευτική προσέγγιση, πρόκειται για άτομο με αιμοσφαιρινοπάθεια Η, αφού οι σιωπηλοί και συμπτωματικοί φορείς παρουσιάζουν εξαιρετική καλή πρόγνωση και δεν χρήζουν ιατρικής αντιμετώπισης.

Στην πλειοψηφία των ασθενών, τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης Α βρίσκονται γύρω στα 8-10 g/dl και παραμένουν σχετικά σταθερά. Πτώση της τιμής της αιμοσφαιρίνης παρατηρείται κατά τη διάρκεια εμπύρετων επεισοδίων, οπότε μπορεί να απαιτηθεί μετάγγιση. Σε σπάνιες περιπτώσεις απαιτούνται τακτικές μεταγγίσεις επειδή τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης Α παραμένουν σταθερά χαμηλά ακόμη και χωρίς κάποιο εμπύρετο επεισόδιο. Στις περιπτώσεις αυτές υπάρχει μεγαλύτερη σπληνομεγαλία και πιο έντονες οστικές αλλοιώσεις.

Συνήθως συστήνεται η λήψη φυλλικού οξέος (2-5 mg/ημέρα), ιδιαίτερα στα παιδιά, προκειμένου να ανταποκριθούν στις ανάγκες της αυξημένης ερυθροποίησης. Η οξεία αιμόλυση μπορεί να είναι τόσο απότομη όσο και στην περίπτωση της έλλειψης G-6-PD και να οδηγήσει τον ασθενή σε βαρύτερη κλινική εικόνα. Σπάνια αναφερόμενη είναι και η απλαστική κρίση μετά από λοίμωξη από τον ιό Parvo B19. Η πτώση της αιμοσφαιρίνης συνοδεύεται από δικτυοερυθροκυτταροπενία, σημείο διαφορικής διάγνωσης από την οξεία αιμόλυση.

Παρά το γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς έχουν σπληνομεγαλία, η σπληνεκτομή δεν συστήνεται όταν διατηρούν σταθερά επίπεδα αιμοσφαιρίνης Α και δεν απαιτούν συχνές μεταγγίσεις, δεν έχουν υπερσπληνισμό ή πιεστικά φαινόμενα λόγω του μεγέθους της σπλήνας. Η σπληνεκτομή συνοδεύεται συνήθως από σημαντική αύξηση της αιμοσφαιρίνης Η και είναι αυτονόητο ότι μετεγχειρητικά λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή βακτηριακών λοιμώξεων και φλεβικής θρόμβωσης.

Οι ασθενείς με βαρύτερη κλινική εικόνα που μεταγγίζονται συστηματικά πρέπει να έχουν τη φροντίδα των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών, με έμφαση στην αποσιδήρωση. Χολόλιθοι ανιχνεύονται στο >30% των ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθεια Η και αποτελούν αιτία χολοκυστίτιδας και ανιούσης χολαγγειίτιδας.

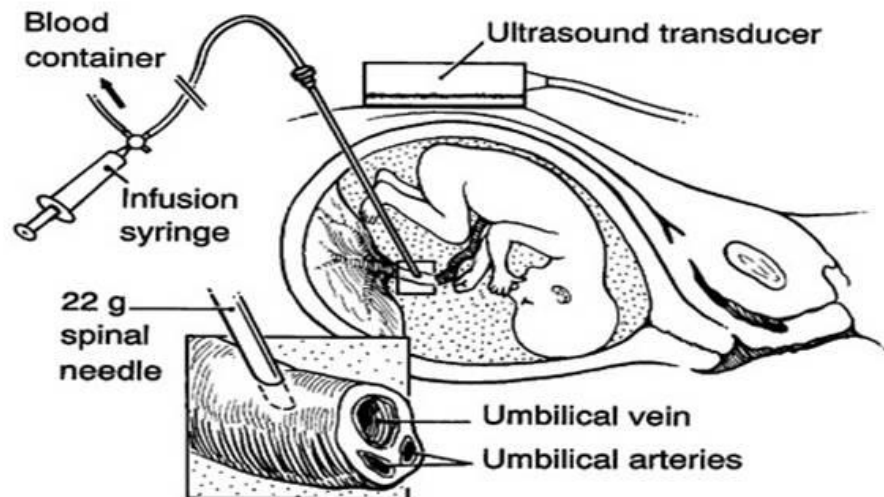
Ορισμένες φορές ενδείκνυται η χορήγηση δεφεροξαμίνης (deferoxamine), η οποία χρησιμοποιείται για την αφαίρεση πλεονάσματος σιδήρου και αργιλίου από τον οργανισμό.

Η χρήση αποτελεσματικών χηλικών ουσιών για το σίδηρο έχουν βελτιστοποιήσει τη θεραπεία αποσιδήρωσης στους μεταγγιζοεξαρτώμενους ασθενείς. Ένα νεότερο σκεύασμα είναι η δεφερασιρόξη, η οποία έχει εγκριθεί από τις Ευρωπαϊκές αρχές Υγείας ως θεραπεία πρώτης επιλογής για την αντιμετώπιση της χρόνιας υπερφόρτωσης σιδήρου λόγω μεταγγίσεων σε ασθενείς με θαλασσαιμία ηλικίας >6 ετών και ως δεύτερης επιλογής μετά από αποτυχία ή δυσανεξία στη δεφοραξαμίνη για παιδιά 2-6 ετών.

Οι περισσότεροι ασθενείς διατηρούν ισορροπία σιδήρου σε μια δόση 25-30 mg/κιλό σωματικού βάρους την ημέρα. Η δεφερασιρόξη διαθέτει το μεγαλύτερο πρόγραμμα κλινικών δοκιμών έχοντας μελετηθεί σε διάφορες κατηγορίες ασθενών που λαμβάνουν τακτικές μεταγγίσεις για την αντιμετώπιση της αναιμίας (θαλασσαιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, απλαστική αναιμία), τόσο σε παιδιατρικό (>2 χρόνων) όσο και σε ενήλικο πληθυσμό και οι ασθενείς που συμμετείχαν στις αρχικές μελέτες συμπληρώνουν κοντά στα 8-10 χρόνια θεραπείας με το φάρμακο ([www.galinos.gr](http://www.galinos.gr)).

### **A.2.11. Θεραπευτική αντιμετώπιση με ενδομήτρια μετάγγιση:**

Σε περιοχές όπως η Νότια Ασία, όπου ευδοκίμωσε η ελονοσία, παρατηρούνται αρκετά συχνά ελλείματα στα γονίδια του χρωμοσώματος 16, που αντιστοιχούν στη  $\alpha$ -σφαιρίνη, με τους φορείς των συγκεκριμένων μεταλλάξεων (με πιο συχνό το έλλειμα -SEA) να φτάνουν μέχρι και το 14% του πληθυσμού. Η ομοζυγωτία, ως προς το συγκεκριμένο έλλειμα, είναι η κύρια αιτία για την εμφάνιση της αιμοσφαιρίνης Bart's για το σύνδρομο του εμβρυϊκού ύδρωπα. Τα προσβεβλημένα έμβρυα υποκύπτουν σε φαινόμενα υποξίας κατά το τρίτο τρίμηνο. Για τα λίγα έμβρυα που επιβιώνουν, από τη γέννηση και μετά, είναι απαραίτητη η υποστηρικτική θεραπεία με μεταγγίσεις ερυθροκυττάρων και με θεραπεία αποσιδήρωσης.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της ενδομήτριας μετάγγισης σε έμβρυο με  $\alpha^0$ -θαλασσαιμία (Chik KW, Shing MM, Li CK, et al., 1998)

Σε μια εγκυμοσύνη υψηλού ρίσκου, γύρω στις 16 εβδομάδες, εφαρμόζεται διαγνωστική αμνιοκέντηση. Η πρόσβαση γίνεται συνήθως μέσω του ομφάλιου λώρου (Εικόνα 16). Μοριακά γενετικά τεστ στο αίμα και στα κύτταρα των γονίων, καθώς και στο αμνιακό

υγρό, μπορούν να οδηγήσουν σε συμπεράσματα αναφορικά με το γενετικό προφίλ του εμβρύου, ως προς την ύπαρξη ή όχι ομοζυγωτίας για μεταλλάξεις α-θαλασσαιμίας.

Μια μέτρηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης κάτω από 7 gr/dl είναι σοβαρή και συνεπής ένδειξη για την α-μείζονα-θαλασσαιμία.

Η πρώτη μετάγγιση αίματος μπορεί να πραγματοποιηθεί μετά τις 26 βδομάδες κύησης (Joshi et al., 2004).

Η ενδομήτρια μετάγγιση είναι μια ασφαλής διαδικασία, η οποία πρέπει να εφαρμόζεται από ειδικό γιατρό περιγεννητικής, εξοικειωμένο με την τεχνική. Χρησιμοποιείται φρέσκο αίμα, αρνητικό ως προς CMV (κυτταρομεγαλοϊό), και το οποίο πλένεται και ακτινοβολείται. Μπορεί να χρειαστούν αρκετές μεταγγίσεις (πάνω από 5) κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Η διόρθωση της αναιμίας οδηγεί σε μια δραματική βελτίωση στις λειτουργίες του εμβρύου καθώς και στη διόρθωση του ρυθμού εγκεφαλικής ροής του αίματος. Με την κατάλληλη ενδομήτρια μετάγγιση, σχεδόν το 90% αυτών των κυήσεων οδηγεί σε φυσιολογική γέννηση του εμβρύου. Ωστόσο, παρουσιάζονται ορισμένα ρίσκα, συμπεριλαμβανομένου του εμβρυϊκού θανάτου, σε ποσοστό 1% και 5% πιθανότητα ήπιας βραδυκαρδίας. Συνολικά, το σοβαρό ποσοστό επιπλοκών είναι περίπου 3%.

Περίπου 20 περιστατικά έχουν αναφερθεί, όπου έμβρυα με Hb Bart's έχουν θεραπευτεί με μεταγγίσεις αίματος ενδομητρίως. (Zhou et al., 2001). Ωστόσο, αυτά τα παιδιά είναι εξαρτώμενα από μετάγγιση και απαιτούν χηλικές ενώσεις σιδήρου για την αποφυγή επιπλοκών που προκύπτουν από υπερφόρτωση σιδήρου, όπως κίρρωση και ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη. Οι νεογνικές επιπλοκές περιλαμβάνουν επιπτώσεις στα άκρα (Dwinnell et al., 2011). Μεταξύ των εμβρύων που δεν υποβάλλονται σε μεταγγίσεις αίματος, αλλά επιβιώνουν μετά τη γέννηση, 25-50% επηρεάζονται από νευρολογικές ή αναπτυξιακές αδυναμίες (Derderian et al., 2014), πιθανώς από παρατεταμένη υποξία στη μήτρα. Ωστόσο, τα έμβρυα που υποβάλλονται σε μετάγγιση, νωρίς κατά την κύηση, έχουν μια πολύ χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης των επιπτώσεων του συνδρόμου. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί τη μόνη θεραπεία που μπορεί να εφαρμοστεί μέσα στη μήτρα, αν και αποδίδει μόνο ανακούφιση των συμπτωμάτων και όχι ριζική θεραπεία.

### **A.2.12. Νέες προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση της α-θαλασσαιμίας - Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων**

Μια νέα θεραπευτική προσέγγιση ως προς την αντιμετώπιση των αιμοσφαιρινοπαθειών, και κατ'επέκταση της σοβαρής μορφής της α-θαλασσαιμίας (α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία/Hb Bart's), είναι η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, ενδομήτρια ή λίγους μήνες μετά τη γέννηση των ασθενών. Πολλές μελέτες, καταδεικνύουν ότι η ενδομήτρια θεραπεία σε τέτοιες περιπτώσεις, προσφέρει προοπτικές για μακροχρόνια επιβίωση των εμβρύων με μεταλλάξεις στα γονίδια της α-σφαιρίνης που οδηγούν σε α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία.

Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιματοποιητικών κυττάρων που χρησιμοποιεί αλλογενή μυελό των οστών από έναν HLA-συμβατό δότη είναι μια ήδη εφαρμοσμένη θεραπευτική αντιμετώπιση της β-θαλασσαιμίας. Ο Lucarelli και οι συνεργάτες του (*Lucarelli et al., 2012*) έχουν θεραπεύσει περισσότερους από 1500 ασθενείς β-μείζονος θαλασσαιμίας με αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών. Το ποσοστό επιβίωσης είναι 80–90% για τους ασθενείς με την ελάχιστη εξελισσόμενη ασθένεια (κατηγορία 1 ή κατηγορία 2 από την ταξινόμηση Lucarelli, η οποία αξιολογεί τη σοβαρότητα της ασθένειας βάσει του βαθμού ηπατομεγαλίας, της παρουσίας πυλαίας ίνωσης στη βιοψία ήπατος και της αποτελεσματικότητας της χηλικής θεραπείας πριν από τη μεταμόσχευση). Οι μεταμοσχεύσεις είναι επιτυχεστέρες όταν δεν έχουν υπάρξει νωρίτερα πολλές περιπλοκές της ασθένειας, ενώ η μεγάλη ηλικία κατά τη διάρκεια της μεταμόσχευσης σχετίζεται με φτωχότερη έκβαση.

Αναφορικά με την α-θαλασσαιμία, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών με θετική έκβαση ως προς την επιβίωση του ασθενούς με α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία. Το 1998, ένα κορίτσι 21 μηνών με σύνδρομο εμβρυϊκού ύδρωπα δέχθηκε μόσχευμα μυελού των οστών από συμβατό δότη, τον μεγαλύτερο αδερφό της. Δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές σχετιζόμενες με τη μεταμόσχευση μυελού των οστών. Τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης A, παρέμειναν υψηλότερα των 10gm/dl για τους υπόλοιπους 20 μήνες της ζωής της, χωρίς την απαίτηση υποστηρικτικών μεταγγίσεων αίματος, παρόλο που εντοπίστηκαν υπολείμματα των αιμοποιητικών κυττάρων του ξενιστή, 2 μήνες μετά την μεταμόσχευση αλλογενούς μυελού των οστών (*Ki-wai Chik, 1998*).

Υπάρχουν άλλες δύο αναφορές μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε παιδιά ομόζυγα ως προς την α-θαλασσαιμία. Τα παιδιά αυτά δεν είχαν διαγνωστεί με την ασθένεια πριν τη γέννηση, και χρειάστηκε καρδιοπνευμονική ανάνηψη κατά τον τοκετό. Οι Chik et al. μεταμόσχευσαν μυελό των οστών από έναν HLA-συμβατό δότη (αδερφό) (*Ki-wai Chik, 1998*), ενώ οι Zhou et al. (*Zhou et al., 2001*) χρησιμοποίησαν αίμα από τον ομφάλιο λώρο από δότη (αδερφό) με μια μη συμβατή MHC (Major Histocompatibility Complex) περιοχή. Για να καταστραφούν τα κύτταρα του ξενιστή, χρησιμοποιήθηκαν βουσουλφάνη (busulfan), κυκλοφωσφαμίδη και αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη. Και τα δύο μοσχεύματα προσέδωσαν θεραπευτικά αποτελέσματα, παρόλο που στη μια περίπτωση παρουσιάστηκαν χιμαιρικά αιμοποιητικά κύτταρα. Ενδομήτριες μεταμοσχεύσεις αιμοποιητικών κυττάρων σε έμβρυα ομόζυγα ως προς την α-θαλασσαιμία οδήγησαν σε μερικώς θετικά αποτελέσματα (Πίνακας 2).

In utero transplantation for alpha-thalassemia.

Case	GA at diagnosis (weeks)	GA at transplant (weeks)	Cell source	Engraftment	Reference
1	10	13, 19, and 24	Paternal CD34 <sup>+</sup> BM cells	CB at Birth and BM at 3 months – detectable alpha globin but no donor cell engraftment detected	<a href="#">Hayward et al. (1998)</a>
2	N/A	18	Maternal T-cell depleted BM	CB at 20, 22, and 24 weeks – no engraftment Extramedullary engraftment on autopsy	<a href="#">Cowan and Golbus (1994)</a>
3	13	15, 31	Cryopreserved FL from abortions between 5 and 10 weeks' gestation	CB at 29 weeks GA – no donor DNA or alpha globin No postnatal donor cell engraftment detected	<a href="#">Westgren et al. (1996)</a>

**Πίνακας 2:** Τρεις περιπτώσεις (1994, 1996 και 1998) μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ενδομητρίως (*Derderian, et al., 2014*)

Η ενδομήτρια μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (IUHCTx) αποτελεί μια υποσχόμενη στρατηγική, η οποία παρακάμπτει τις προκλήσεις που έχει η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων μετά τη γέννηση (HSC). Ο σκοπός της ενδομήτριας μεταμόσχευσης είναι η εισαγωγή των κυττάρων του δότη σε ένα ανώριμο ανοσοποιητικό σύστημα δέκτη, επάγοντας την ανοχή του ξενιστή στα κύτταρα του δότη. Στις προηγούμενες δύο δεκαετίες έγιναν διάφορες προσπάθειες για ενδομήτρια μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων με σκοπό να θεραπευτούν διάφορες ασθένειες, με περιορισμένη όμως επιτυχία (*Derderian et al., 2014*).

### **A.2.13. Γονιδιακή θεραπεία:**

Οι διαταραχές της αιμοσφαιρίνης ήταν από τις πρώτες ασθένειες, για τις οποίες άρχισε να εφαρμόζεται η γονιδιακή θεραπεία. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα της έκφρασης των γονιδίων της σφαιρίνης και η ρύθμιση της έκφρασης αυτής κατέστησαν τη γονιδιακή θεραπεία ένα τρομερά δύσκολο εγχείρημα. Η στρατηγική της γονιδιακής θεραπείας για τις αιμοσφαιρινοπάθειες έχει τέσσερις αντικειμενικούς στόχους: 1) μεταφορά ενός μόνο γονιδίου σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εκλεκτικά για τα κύτταρα της ερυθρά σειράς; 2) ενδογενής έκφραση του διαγονιδίου σε υψηλά θεραπευτικά επίπεδα; 3) μόνιμη διατήρηση της έκφρασης του μεταφερόμενου γονιδίου; 4) χρησιμοποίηση ενός ασφαλούς μη-παθολόγου φορέα. Οι ήδη διαθέσιμες τεχνικές γονιδιακής μεταφοράς δε συμμορφώνονται και με τις τέσσερις αυτές απαιτήσεις. Μια πληθώρα συστημάτων φορέων ιικής και μη-ιικής προέλευσης έχουν χρησιμοποιηθεί για την επίτευξη αυτού του στόχου. Ιικά συστατικά σε κάποια συστήματα φορέων, όπως οι αδενοϊοί και οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί, δύναται να εγείρουν ανοσολογική απόκριση από τον ξενιστή στις ιικές πρωτεΐνες.

Μη-ϊικές μέθοδοι γονιδιακής μεταφοράς (για παράδειγμα μη-ϊικοί φορείς που μπορεί να είναι με τη μορφή γυμνού DNA, κατιονικά λιπίδια που δεσμεύουν ισχυρά το DNA με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, ή συντηρημένα DNA σωματίδια) προκαλούν σχετικά χαμηλή ανοσοαπόκριση, μπορούν να μεταφέρουν σχετικά μεγαλύτερα τμήματα DNA



(απ'ότι ένας ιικός φορέας), αλλά περιορίζονται από ένα χαμηλό ποσοστό μεταφοράς γονιδίων, ένα χαμηλό ποσοστό μόνιμης ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του ξενιστή και φτωχή έκφραση μακροπρόθεσμα. Αντίθετα, οι φυσικοί ιοί έχουν εξελιχθεί κατά τη διάρκεια εκατομμυρίων ετών για να εξοπλιστούν με τη δυνατότητα να εισάγονται και να εκφράζουν τις ιικές γενετικές πληροφορίες στα κύτταρα των ξενιστών. Οι ρετροϊοί μεταγράφουν ανάστροφα το RNA γονιδίωμά τους σε DNA και ενσωματώνονται μόνιμα στο γονιδίωμα του ξενιστή. Ως εκ τούτου, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως οχήματα για τη μεταφορά γονιδίων σε ασθένειες που απαιτούν "δια βίου" διόρθωση στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs).

Η α-θαλασσαιμία θα μπορούσε εν δυνάμει να στοχευθεί για εμβρυϊκή γονιδιακή θεραπεία, αφού τα έμβρυα, ομόζυγα ως προς τη νόσο αυτή, συνήθως πεθαίνουν ανάμεσα στο τρίτο τρίμηνο της κύησης ή αμέσως μετά τη γέννηση. Μέχρι τώρα, έχει διερευνηθεί η χρήση λεντι-ϊικών φορέων που περιέχουν τα HS2,3 και 4 του LCR του γονιδίου της β-σφαιρίνης με GFP και τον υποκινητή του γονιδίου της α-σφαιρίνης, στοχεύοντας στην έκφραση του γονιδίου της α-σφαιρίνης σε α-θαλασσαιμικά μοντέλα ποντικών. Χρησιμοποιώντας το φορέα αυτό, οι Han et al. (Han et al., 2007) κατεύθυναν τη γονιδιακή μεταφορά μέσα στη μήτρα, στον αμνιακό σάκκο σε έμβρυα σε μεσαίο στάδιο κύησης, από ποντίκια κατασκευασμένα ως μοντέλα για την α<sup>0</sup>-θαλασσαιμία. Ο Han et al. κατέδειξαν ότι σε νεογνά ποντίκια, το ανθρώπινο γονίδιο της α-σφαιρίνης εντοπίστηκε στο ήπαρ, στο σπλήνα και στο περιφερικό αίμα. Η έκφραση του γονιδίου της α-σφαιρίνης διατηρούνταν στα υψηλότερα επίπεδα για 3-4 μήνες. Ωστόσο, η έκφραση εξαφανίστηκε στους 7 μήνες. Δοκιμές στα ποντίκια αυτά έδειξαν χαμηλά επίπεδα του μεταγράφου του γονιδίου της α-σφαιρίνης (Han et al., 2007).

#### **A.2.14. Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις – Πρωτεϊνική θεραπεία:**

Λίγα χρόνια πριν, η αλλαγή του κυτταρικού φαινοτύπου και το θεραπευτικό όφελος μέσω της έκφρασης νέων πρωτεϊνών περιοριζόταν σε προσεγγίσεις που βασίζονταν στην τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε, η εισαγωγή του διαγονιδίου στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας, η διατήρηση και ο έλεγχος της έκφρασής του ,με τη χρησιμοποίηση είτε ιικών ή μη ιικών φορέων, είναι συχνά δύσκολο να επιτευχθούν και μπορεί να καταλήξουν σε δυσάρεστα φαινόμενα, όπως τοξικότητα, πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης και αδυναμία στόχευσης πολλών ειδών κυττάρων, με συνέπεια την περιορισμένη αποτελεσματικότητα των διαγονιδίων *in vivo*.

Η τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί κάτω από την ομπρέλα της πρωτεϊνικής θεραπείας. Η παραγωγή, με μεθόδους βιοτεχνολογίας, ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών, οι οποίες μεταφράζονται μη φυσιολογικά ή και καθόλου, όταν το αντίστοιχο γονίδιο είναι μεταλλαγμένο σε μια ασθένεια, αποτελεί μια ακόμα θεραπευτική προσέγγιση σε νόσους, όπως η α-θαλασσαιμία.

Από τις αρχές του 1980, έγιναν οι πρώτες προσπάθειες έκφρασης ανασυνδυσασμένης α-σφαιρίνης σε διαφορετικά βακτηριακά συστήματα *E.coli*. Κατά τις προσπάθειες έκφρασης των α-αλυσίδων παράγονταν οι πρωτεΐνες αυτές στα *E.coli*, αλλά λόγω της αστάθειάς τους «απαντώνταν» σε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε σύγκριση με την παραγωγή των β-αλυσίδων. Οι Jessen et al., το 1994, χρησιμοποίησαν ένα σύστημα έκφρασης ανασυνδυσασμένης α-σφαιρίνης μόνο, όπως είχε γίνει παλαιότερα για τη β-σφαιρίνη, χρησιμοποιώντας πεπτιδία συντηγμένα στο αμινοτελικό άκρο, τα οποία αποκόπτονται από τον παράγοντα  $\lambda$ a, σύμφωνα με τους Nagai και Thogersen το 1984. Αυτή η ανασυνδυσασμένη α-σφαιρίνη ήταν αδιάλυτη και συσσωρευόταν στα βακτηριακά έγκλειστα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Τα βήματα διαλυτοποίησης και καθαρισμού της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης θεωρήθηκαν χρονοβόρα και ακριβά. Η μονομερής α-σφαιρίνη δεν ήταν δυνατόν να βρεθεί διαλυτοποιημένη στο κυτταρόπλασμα, ακόμα και όταν χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκφρασης υπό τον έλεγχο του ισχυρού T7 υποκινητή από τους Weickert και Curry, το 1997. Η ασταθής α-σφαιρίνη οδηγούνταν σε ταχεία πρωτεόλυση.

Επιπλέον, είχε γίνει προσπάθεια έκφρασης της ανασυνδυσασμένης α-σφαιρίνης σε διαλυτή μορφή με τη βοήθεια της εξωγενούς χορήγησης αίμης. Η έκφραση και η απομόνωση της πρωτεΐνης από τα βακτήρια αποδείχτηκε εξαιρετικά δύσκολη σε σύγκριση με την απομόνωση της σταθερής β-σφαιρίνης, της οποίας επιτεύχθηκε ο εντοπισμός και η απομόνωσής της σε ποσοστό 10% από την πρωτεϊνική περιεκτικότητα του κυττάρου (Hernan, et al., 1992).

Το μόριο της αίμης έχει αποδειχθεί ότι παίζει κομβικό ρόλο στη σταθερότητα των α-αλυσίδων. Η αλληλεπίδραση των σφαιρινών με την αίμη, κατά τη συγκρότηση της αιμοσφαιρίνης, θεωρείται απαραίτητη για το σχηματισμό της τεταρτοταγούς δομής των αναπτυσσόμενων αλυσίδων, ακόμα και κατά το στάδιο όπου εξέρχονται νεοσυντιθέμενες αλυσίδες από τα πολυριβωσώματα (Komar, et al., 1993, 1997). Έχει αποδειχθεί ότι η νεοσυντιθέμενη α-αλυσίδα αποκτά μία τριτοταγή δομή, η οποία επιτρέπει τη σύνδεση με το μόριο της αίμης μόλις συντεθούν τα πρώτα 86 αμινοξέα από τα 141 από τα οποία αποτελείται η πρωτεΐνη. Επιπλέον, έχουν γίνει προσπάθειες συν-έκφρασης ανασυνδυσασμένων σφαιρινών με συστήματα μεταφοράς αίμης στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων, για την επίτευξη της σταθερότητας των ανασυνδυσασμένων σφαιρινών. Η συγκρότηση της αιμοσφαιρίνης A, με έκφραση σε *in vitro* χωρίς κύτταρα σύστημα, έδειξε επίσης ότι οι β-αλυσίδες αλληλεπιδρούν με τις α-αλυσίδες κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά τη μετάφραση, αποτρέποντας το σχηματισμό ασταθών μονομερών α-αλυσίδων (Adachi, et al., 2002).

Μια άλλη στρατηγική που υιοθετήθηκε από τους Adachi et al., το 2000, ήταν η συν-έκφραση της α-σφαιρίνης με μια αμινοπεπτιδάση της μεθειονίνης (MAP), υπό την παρουσία εξωγενούς αίμης, η οποία οδήγησε στην παραγωγή διαλυτής σφαιρίνης. Ωστόσο, το σύστημα αυτό απαιτούσε τη μεσολάβηση δύο βημάτων χρωματογραφίας για τον καθαρισμό της ανασυνδυσασμένης α-σφαιρίνης, με μέτρια απόδοση.

Το 2006, προτάθηκε από τους *Vasseur-Godbillon, et al.*, μια ενδιαφέρουσα στρατηγική στα πλαίσια της πρωτεϊνικής μηχανικής, χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες-συνοδούς (chaperones), για την υψηλής απόδοσης παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται αδιάλυτες σε αλλογενή συστήματα έκφρασης και απουσιάζουν οι παράγοντες που προσδένονται σε αυτές υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η ομάδα αυτή, κατάφερε να υπερπαραγάγει την ανθρώπινη α-σφαιρίνη σε *E.coli*, μέσω της συνέκφρασής της με την πρωτεΐνη-συνοδό AHSP.

Οι μοριακοί συνοδοί (chaperones) εμπλέκονται στο σχηματισμό και τη διατήρηση της φυσιολογικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών-στόχων τους, και επιπλέον συμβάλουν στην αποφυγή της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών. Αποτελούν μια υψηλά συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών, πολλές από τις οποίες είναι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins). Οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν επιλεκτικά και προσδέονται στις εκτεθειμένες υδρόφοβες επιφάνειες των πρωτεϊνών-στόχων, με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, για να αποφευχθεί η μη αναστρεψίμη συσσωμάτωση. Η σταθεροποιητική πρωτεΐνη της α-σφαιρίνης (α-hemoglobin-stabilizing protein - AHSP), αποτελεί μια μοριακή συνοδό – τσαπερόνη, η οποία επιλεκτικά προσδέεται στην α-σφαιρίνη, για το σχηματισμό ενός σταθερού, διαλυτού ετεροδιμερούς, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τις νεοσυντιθέμενες α αλυσίδες.

Οι δύο ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες παρήχθησαν ως ανεξάρτητες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με την τρανσφεράση S της γλουταθειόνης (GST) και έπειτα από βακτηριακή λύση, η α-σφαιρίνη βρισκόταν σε σύμπλοκο με την AHSP. Το καθαρό αυτό σύμπλοκο ανασυνδυασμένης AHSP/ανασυνδυασμένης α-σφαιρίνης (recAHSP/recα-Hb complex) παρουσιάζει όλα τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου της ανασυνδυασμένης AHSP με την αγρίου τύπου α-σφαιρίνη (recAHSP/native α-Hb complex).

**Η ομάδα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ**, με τη βοήθεια της Τεχνολογίας της Πρωτεϊνικής Μεταγωγής, ασχολείται με την παραγωγή της β-σφαιρίνης, σε σύντηξη με το πεπτιδίο TAT, σε βακτηριακό σύστημα έκφρασης, με σκοπό τη μελέτη της μεταγωγής της ανασυνδυασμένης αυτής πρωτεΐνης, ενδοκυττάρια σε καλλιέργειες θαλασσαιμικών κυττάρων.

**Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία**, βασισμένη στη μελέτη αυτή, είχε ως σκοπό την κλωνοποίηση και την έκφραση της ανασυνδυασμένης **α-σφαιρίνης**, συντηγμένης με το πεπτιδίο TAT και τη μελέτη της ενδοκυττάριας μεταγωγής της σε ευκαρυωτικά κύτταρα, με απώτερο στόχο την ανάπτυξη μιας πιθανής θεραπευτικής προσέγγισης σε ασθενείς με σοβαρή α-θαλασσαιμία.

## A.3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

### A.3.1. Μιτοχόνδρια, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά:

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ενδοκυτταρικά οργανίδια όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων (φωτοσυνθετικών και μη), με εξαίρεση τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια. Είναι συνήθως ωοειδή ή κυλινδρικά, με πλάτος ~0,2μm και μήκος μέχρι και 7μm.



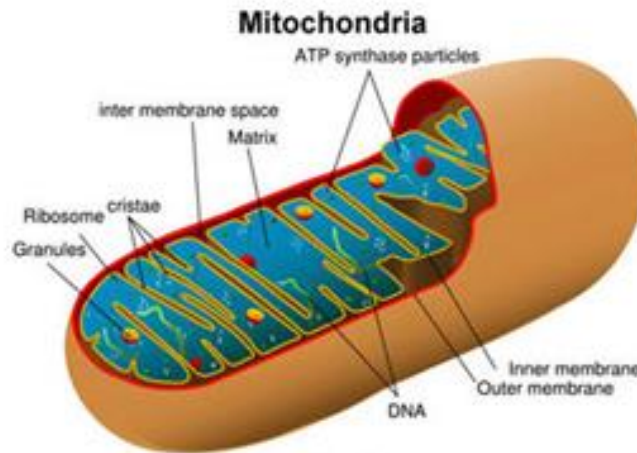
Εικόνα 17: Εγκάρσια τομή πνευμονικών κυττάρων θηλαστικών, όπως φαίνεται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [Louisa Howard - <http://remf.dartmouth.edu/imagesindex.htm>]

Η μορφολογία τους παραμένει η ίδια ανάμεσα στα κύτταρα του ίδιου τύπου, ενώ διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Το σχήμα τους μεταβάλλεται ανάλογα με την ορμονική κατάσταση του οργανισμού, κατά την ανάπτυξη και κατά τη νεοπλασματική μεταμόρφωση των κυττάρων.

Σύμφωνα με τη συμβιωτική θεωρία της εξέλιξης, τα οργανίδια αυτά, τα οποία είναι παραγωγοί ενέργειας στα ευκαρυωτικά κύτταρα, προέρχονται ευθέως από προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι ενσωματώθηκαν από πρωτόγονα ευκαρυωτικά κύτταρα νωρίς στην εξελικτική ιστορία και ανέπτυξαν συμβιωτική σχέση με αυτά. Με τη θεωρία αυτή δικαιολογείται η ύπαρξη του μιτοχονδριακού DNA. Βέβαια, με την πάροδο του χρόνου, αφότου εμφανίστηκαν τα πρώτα ευκαρυωτικά κύτταρα, χάθηκε ένα μεγάλο μέρος του γονιδιώματος των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα να εξαρτώνται από διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες, οι οποίες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια. Το «κύτταρο-ξενιστής» εξαρτάται και αυτό από τα μιτοχόνδρια, για την παροχή ATP, απαραίτητο για τη διεξαγωγή των διάφορων λειτουργιών του, όπως τη βιοσύνθεση, την άντληση ιόντων και την κίνηση.

Χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων είναι το ζεύγος μεμβρανών από τις οποίες οριοθετείται, η εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές στις δραστηριότητές του και περιέχουν μια μοναδική συλλογή πρωτεϊνών. Η ύπαρξη των δύο

μεμβρανών χωρίζει τα μιτοχόνδρια σε δύο ξεχωριστά διαμερίσματα: τη μήτρα και το διαμεμβρανικό χώρο.



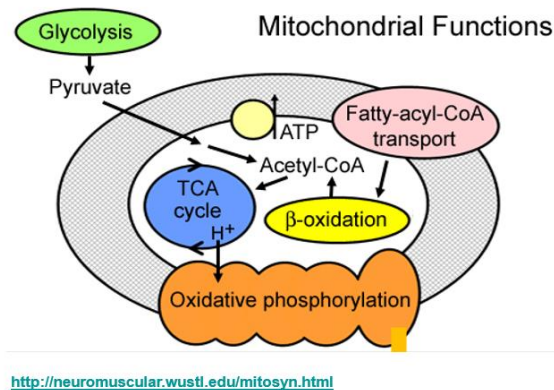
Εικόνα 18: Διαμήκης τομή του μιτοχονδρίου και απεικόνιση της γενικής οργάνωσης. Στο μοντέλο απεικονίζονται τα τέσσερα μιτοχονδριακά διαμερίσματα: εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη, διαμεμβρανικός χώρος και μήτρα (Logan, 2006).

Αναφορικά με τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών, η εξωτερική μεμβράνη, είναι πλούσια σε πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν πόρους κατά μήκος της, με αποτέλεσμα να είναι διαπερατή σε μόρια μικρότερα από 10kDa. Επίσης, η εξωτερική μεμβράνη περιέχει ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν λιπόφιλα υποστρώματα σε μορφές, οι οποίες ακολούθως μεταβολίζονται στη μήτρα. Η εσωτερική μεμβράνη έχει την εξής ιδιαιτερότητα: χαρακτηρίζεται από το μεγάλο αριθμό εγκολπώσεων που σχηματίζει λόγω των πολλών αναδιπλώσεων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιφάνειά της. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται αγκυροβολημένες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι πολύ σημαντικές, γιατί πρόκειται για τα ένζυμα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης – ΟΧΡΗΟΣ και πρωτεΐνες μεταφοράς των διάφορων μεταβολιτών εντός και εκτός της μήτρας. Η ηλεκτροχημική βαθμίδωση κατά μήκος της μεμβράνης αυτής παραμένει σταθερή, λόγω της αδιαπερατότητάς της σε μικρά ιόντα.

Στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων επιτελούνται κύριες μεταβολικές αντιδράσεις, όπως η β-οξείδωση λιπαρών οξέων, ο κύκλος του κιτρικού οξέος και οι αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ η γλυκόλυση, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και το μεγαλύτερο μέρος του μεταβολισμού των αμινοξέων επιτελούνται στο διαλυτό κυτταρόπλασμα. Οι μεταβολίτες (που χρησιμοποιούνται για τη β-οξείδωση, τον κύκλο του κιτρικού οξέος), αλλά και το υδρογόνο (για την αναγωγή του NAD κατά τη γλυκόλυση, την αναπνευστική αλυσίδα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων) εισάγονται στο μιτοχόνδριο από το εξωτερικό περιβάλλον, ενώ αντίστροφα οι μεταβολίτες που παράγονται στα μιτοχόνδρια εξέρχονται για περαιτέρω επεξεργασία στο κυτταρόπλασμα.

Η εσωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης φέρει τα οργανωμένα στοιχεία της αναπνευστικής αλυσίδας, την ηλεκτρική αφυδρογονάση και τους παράγοντες σύζευξης. Επιπλέον, η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τη διαπερατότητά της σε διάφορες ενώσεις. Για το λόγο αυτό διαθέτει ειδικούς πρωτεϊνικούς φορείς, οι οποίοι διακινούν διάφορους μεταβολίτες και νουκλεοτίδια στο εσωτερικό και στο εξωτερικό περιβάλλον του μιτοχονδρίου. Η διάβαση ουσιών από το ένα διαμέρισμα στο άλλο γίνεται μέσω συστημάτων, που μεταφέρουν ουσίες προς μια κατεύθυνση ή μέσω αμοιβαίας ανταλλαγής. Έτσι επιτυγχάνεται ο συντονισμός των μεταβολικών οδών ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και το μιτοχόνδριο.

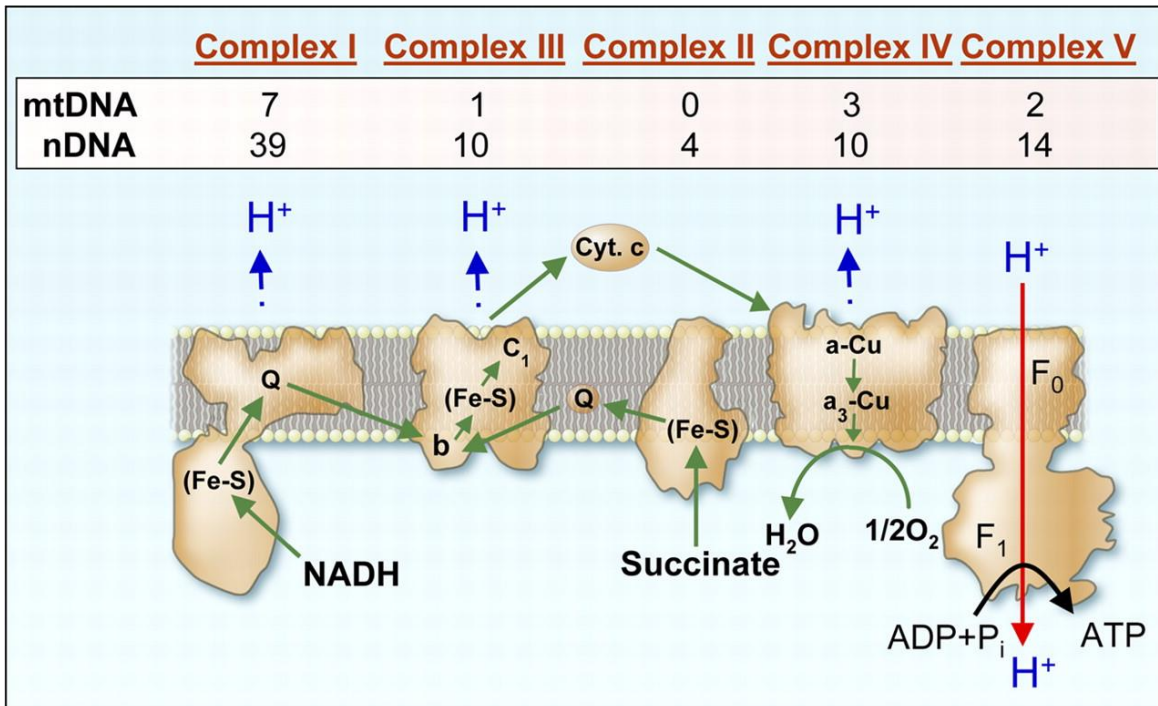
Στη μήτρα του μιτοχονδρίου λαμβάνουν χώρα διαδικασίες όπως η οξειδωση του πυροσταφυλικού οξέος, ο κύκλος του κιτρικού οξέος, η β-οξειδωση των λιπιδίων και η μεταφορά λιπαρών οξέων (Stryer et al, Βιοχημεία, Τόμος 1, 2006). Τα ένζυμα για την οξειδωση του πυροσταφυλικού οξέος, των λιπαρών οξέων αλλά και αυτά που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος (εκτός από την ηλεκτρική αφυδρογονάση) περιέχονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (Εικόνα 19). Η μιτοχονδριακή μήτρα περιέχει και άλλα εκατοντάδες ένζυμα αλλά και πολλά αντίγραφα του γονιδιώματος του μιτοχονδριακού DNA, μιτοχονδριακά ριβοσώματα και tRNAs.



Εικόνα 19: Οι τέσσερις κύριες λειτουργίες του μιτοχονδρίου.

Τα μιτοχονδριακά γονίδια εκφράζουν πρωτεΐνες, οι οποίες παίζουν κυρίως κεντρικό ρόλο στο συντονισμό των αντιδράσεων για παραγωγή ATP. Για παράδειγμα, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση συμμετέχουν πέντε ενζυμικά σύμπλοκα (Εικόνα 20), αποτελούμενα από πολυπεπτίδια, των οποίων οι υπομονάδες κωδικοποιούνται είτε από πυρηνικό DNA είτε και από πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA. Πρόκειται για τα εξής σύμπλοκα: το σύμπλοκο I (Οξειδοαναγωγή NADH-ουβικινόνη), το σύμπλοκο II (Ηλεκτρική αφυδρογονάση ουβικινόνη), το σύμπλοκο III (Οξειδοαναγωγή ουβι-υδροκινόνης –κυτοχρώματος c), το σύμπλοκο IV (Οξειδάση του κυτοχρώματος c) και το σύμπλοκο V (ATP συνθετάση). Τα πολυπεπτίδια αυτά κωδικοούνται από >70 πυρηνικά γονίδια και 13 μιτοχονδριακά γονίδια.





Εικόνα 20: Στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων εντοπίζονται τα ενζυμικά συστήματα της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι υπομονάδες των 5 συμπλόκων κωδικοποιούνται είτε από το πυρηνικό, είτε από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Kanabus M, et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία έχει ως εξής:

Το NADH και το FADH<sub>2</sub> που σχηματίζονται στη γλυκόλυση, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων και στον κύκλο του κιτρικού οξέος, είναι μόρια πλούσια σε ενέργεια, διότι το κάθε ένα περιέχει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Όταν αυτά τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο με μοριακό οξυγόνο, απελευθερώνεται μεγάλη ποσότητα ελεύθερης ενέργειας, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ATP.

Οξειδωτική Φωσφορυλίωση είναι η διεργασία στην οποία παράγεται ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub> δια μέσου μιας σειράς φορέων ηλεκτρονίων. Αυτή η διεργασία λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Το αποτέλεσμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι η παραγωγή μορίων ATP που σχηματίζονται όταν η γλυκόζη οξειδώνεται σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί το επιστέγασμα μιας σειράς ενεργειακών μετασχηματισμών, οι οποίοι αποτελούν την κυτταρική αναπνοή. Αρχικά, καύσιμα οργανικά μόρια οξειδώνονται στον κύκλο του Krebs για να προκύψουν ηλεκτρόνια με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Στη συνέχεια, αυτή η ηλεκτρονιοκίνητη δύναμη μετατρέπεται σε πρωτονιοκίνητη δύναμη και η τελευταία σε δυναμικό μεταφοράς φωσφορικής ομάδας. Η μετατροπή της ηλεκτρονιοκίνητης δύναμης σε πρωτονιοκίνητη επιτελείται από τρεις ηλεκτρονιοκίνητες αντλίες πρωτονίων – την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-

συνενζύμου Q, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c και την οξειδάση του κυτοχρώματος c.

Συγκεκριμένα, η οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX) των θηλαστικών αποτελείται από 13 πολυπεπτίδια, εκ των οποίων οι τρεις υπομονάδες (υπομονάδες I, II και III) κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA. Οι υπομονάδες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια αποτελούν κυρίως δομικά και όχι λειτουργικά στοιχεία του συμπλέγματος, ενώ μερικές από αυτές αλληλεπιδρούν ευθέως με τις υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, των οποίων ο συντονισμός γίνεται με σταδιακή αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, που δεν συμμετέχουν στο τελικό λειτουργικό ενζυμικό σύμπλοκο.

Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ηλεκτροχημική βαθμίδωση [ $\Delta P = \Delta \Psi + \Delta \mu H^+$ ]. Κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, εμφανίζεται βαθμίδωση της συγκέντρωσης των πρωτονίων, δηλαδή στη μήτρα απαντάται μικρότερη συγκέντρωση πρωτονίων σε σχέση με το εσωτερικό του μιτοχονδρίου, με αποτέλεσμα η εσωτερική μεμβράνη από την πλευρά της μήτρας να είναι αρνητικά φορτισμένη και από την πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου, θετικά φορτισμένη.

Η τελική φάση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιτελείται από τη συνθάση της ATP (σύμπλοκο V).

### **A.3.2. Κατανομή και αριθμός μιτοχονδρίων:**

Η κατανομή και ο αριθμός των μιτοχονδρίων διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων κυττάρων. Σε πολλά κύτταρα τα μιτοχόνδρια είναι τυχαία κατανεμημένα μέσα στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες περιοχές. Σε κάποια κύτταρα τα μιτοχόνδρια παραμένουν καθηλωμένα σε μια περιοχή του κυττάρου, έτσι ώστε να διοχετεύουν άμεσα το παραγόμενο ATP εκεί που απαιτείται ιδιαίτερα αυξημένη κατανάλωση ATP. Για παράδειγμα, σε ένα μυοκαρδιακό κύτταρο τα μιτοχόνδρια εντοπίζονται κοντά στην περιοχή της καρδιάς που γίνονται οι συστολικές κινήσεις, ενώ σε ένα σπερματοζώαριο συσσωρεύονται γύρω από το κινητό μαστίγιο. Είναι προφανές ότι η κατανομή των μιτοχονδρίων υποκυτταρικά σχετίζεται άμεσα με τη βασική λειτουργία τους ως κέντρων παραγωγής ενέργειας. Κατά τη μίτωση, τα μιτοχόνδρια συγκεντρώνονται κοντά στη μιτωτική άτρακτο και στο τέλος της κυτταρικής διαίρεσης κατανέμονται σχεδόν εξίσου στα θυγατρικά κύτταρα.

Ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε κύτταρα διαφορετικού είδους ποικίλλει σημαντικά και μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν μερικές εκατοντάδες μιτοχόνδρια, αν και ορισμένα ζωομαστιγοφόρα και φύκη έχουν μόνο ένα μιτοχόνδριο, το οποίο διαιρείται ταυτόχρονα με την κυτταρική διαίρεση. Στα κύτταρα των γραμμωτών μυών, ο αριθμός μπορεί να αυξηθεί κατά 5-10 φορές, λόγω της αύξησης και διαίρεσης των μιτοχονδρίων



που συμβαίνει, όταν ο μυς διεγερθεί επαναληπτικά. Σε ορισμένα κύτταρα, τα μιτοχόνδρια αφθονούν ιδιαίτερα (π.χ. κάθε ηπατοκύτταρο περιέχει 1.000-2.000 μιτοχόνδρια), οπότε μπορούν να συγκροτήσουν μακρόστενες συστοιχίες μαζί με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού.

Γενικώς, κύτταρα που έχουν υψηλές απαιτήσεις σε χημική ενέργεια (μυϊκά, νευρικά και καρδιακά) περιέχουν και πάρα πολλά μιτοχόνδρια, ενώ κύτταρα με μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις περιέχουν και μικρότερο αριθμό μιτοχονδρίων (Stryer, 1997).

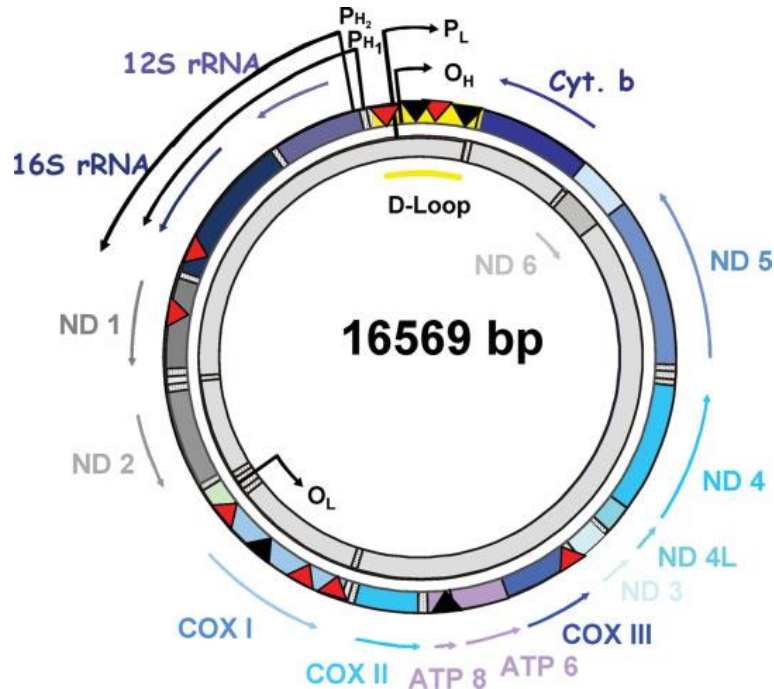
### **A.3.3. Μιτοχονδριακό γονιδίωμα:**

Εξελικτικά, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα διαφοροποιήθηκε από το πυρηνικό, λόγω του περιορισμού του μιτοχονδριακού γενετικού συστήματος σε ιδιαίτερο περιβάλλον. Η εξελικτική ιδιομορφία του μιτοχονδριακού γενετικού κώδικα στα θηλαστικά φαίνεται στα ασυνήθιστα χαρακτηριστικά του, όπως για παράδειγμα οι διαφοροποιήσεις στο γενετικό κώδικα: το κωδικόνιο UGA, δεν αποτελεί κωδικόνιο τερματισμού, αλλά διαβάζεται ως τρυπτοφάνη; το κωδικόνιο AUA δεν αντιστοιχεί σε μεθειονίνη αλλά σε ισολευκίνη; τα κωδικόνια τερματισμού στο mtDNA αντιστοιχούν στα AGA και AGG, ενώ στο γενικό κώδικα διαβάζονται ως αργινίνη.

Οι διαφορές των δύο γονιδιωμάτων δεν περιορίζονται μόνο στη διαφορετική αντιστοίχιση των κωδικονίων με τα αμινοξέα αλλά και στο μέγεθος. Το μιτοχονδριακό DNA έχει σχετικά χαμηλό αριθμό γονιδίων που εκφράζουν tRNAs (22 γονίδια).

Το μιτοχονδριακό DNA βρίσκεται πακεταρισμένο σε κυκλική μορφή στα εκατοντάδες μιτοχόνδρια ενός κοινού ευκαρυωτικού κυττάρου. Σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA, στο μιτοχονδριακό DNA δεν συνδέονται ιστόνες και η δομή του γονιδιώματος μοιάζει περισσότερο με αυτή των βακτηρίων, παρά με την ευκαρυωτική χρωματίνη. Το mtDNA έχει κανονικά την ικανότητα αντιγραφής και έκφρασης αλλά μόνο εντός των ορίων του μιτοχονδρίου και εκφράζει τα απαραίτητα tRNAs και rRNAs, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται το μιτοχονδριακό σύστημα μετάφρασης των γονιδίων σε πολυπεπτίδια.

Συγκεκριμένα, στα θηλαστικά, το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα κλειστό κυκλικό δίκλωνο μόριο, μεγέθους περίπου 16kb προσκολλημένο στο εσωτερικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και περιέχει δύο διαφορετικές αλυσίδες, τη βαριά (H) και την ελαφριά (L). Τα ιντρόνια απουσιάζουν από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μιας και αποτελείται εξ ολοκλήρου από αλληλουχίες που εκφράζονται. Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες, που αποτελούν όλες υπομονάδες ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, δύο γονίδια αντιστοιχούν σε rRNAs και 22 γονίδια εκφράζουν tRNAs. Τα δύο rRNA και τα 14 tRNA κωδικοποιούνται από τη βαριά αλυσίδα (H), καθώς και οι 12 από τις 13 πρωτεΐνες, ενώ 8 tRNA γονίδια και ένα για την πρωτεΐνη (υπομονάδα της NADH αφυδρογονάσης) εντοπίζονται στην ελαφριά (L).



**Εικόνα 21:** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και οι περιοχές με HREs. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών είναι κυκλικό, δίκλωνο μόριο, το οποίο αποτελείται από τη βαριά (H) και ελαφριά (L) αλυσίδα. Η L αλυσίδα μεταγράφεται από τον υποκινητή (PL) και η H αλυσίδα από τα παρακείμενα (PH1, PH2). Όλοι οι υποκινητές εντοπίζονται στη ρυθμιστική περιοχή, τον D-βρόγχο. Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων περιορίζεται στον D-βρόγχο, παρά την παρουσία εν δυνάμει μοριακών ρυθμιστικών αλληλουχιών (πχ HREs), που προσφέρουν την ικανότητα ρύθμισης και άλλων σταδίων της μεταγραφικής διαδικασίας. Η μεταγραφή από τους PH2 και PL παράγει μακριά, πολυκυστρονικά προϊόντα. Η μεταγραφή από το PH1 παράγει μικρά μηνύματα που περιέχουν δύο rRNAs. Ο ND6 και τα tRNAs για τα Gln, Ala, Asn, Cys, Tyr, Ser, Glu, και Pro παράγονται από τη μεταγραφή της ελαφριάς αλυσίδας, ενώ τα COX I, II, III, NAD1-5, κυτόχρωμα b, ATP-συνθετάση(ATP 6, 8), 12SRNA, 16SRNA, και τα υπόλοιπα tRNAs από το PH2. Η μεταγραφική μηχανή του μιτοχονδρίου μπορεί να φαίνεται απλή, σε σχέση με την πολυπλοκότητα της πυρηνικής μεταγραφής. Μια απλή πολυπεπτιδική, προκαρυωτικού τύπου DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (POLRMT), η οποία παρουσιάζει υψηλή αλληλουχική ομοιότητα με το C-τελικό άκρο των T3/T7 πολυμερασών της οικογένειας των βακτηριοφάγων, είναι το μοναδικό ένζυμο σύνθεσης RNA στα μιτοχόνδρια. Για να αλληλεπιδράσει με στοιχεία υποκινητών, η POLRMT απαιτεί τη διαμεσολάβηση του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (TFAM) και ενός από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες B, TFB1M και TFB2M. Η POLRMT, ο TFAM, και ο TFB1M ή ο TFB2M επαρκούν για να καλύψουν τη μεταγραφή από έναν υποκινητή που περιέχει συγκεκριμένο τμήμα DNA. Επιπλέον, εκτός από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της μεταγραφής, έχει απομονωθεί και άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο MTERF. Ο MTERF προσδένεται σε μια αλληλουχία με συγκεκριμένο τρόπο στην περιοχή τερματισμού της μεταγραφής στο 3' άκρο του Leu-tRNA και στην περιοχή κοντά στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής του PH1. Ο MTERF3 παίζει ρόλο στον τερματισμό του μεταγράφου H1 και στο μπλοκάρισμα της μεταγραφής της ελαφριάς αλυσίδας, αλλά διευκολύνει επίσης και την επανέναρξη της μεταγραφής του PH1. Ένας νέος μεταγραφικός παράγοντας, ο MTERF3, ο οποίος δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της μιτοχονδριακής μεταγραφής, έχει προστεθεί στη λίστα των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων.

Οι περιοχές στο γονιδίωμα που έχουν ταυτοποιηθεί πειραματικά για την πρόσδεση των υποδοχέων στεροειδών και θυροειδών ορμονών είναι:

Με κόκκινα τρίγωνα, HREs για υποδοχείς τάξης I (συναινετική αλληλουχία, AGAACAx<sub>xx</sub>TGTTCT)

Με μαύρα τρίγωνα, HREs για υποδοχείς τάξης I (συναινετική αλληλουχία, AGGTCAx<sub>xx</sub>TGACCT)

Μεταλλάξεις, όχι μόνο στα δομικά γονίδια αλλά και στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος (D-βρόγχος), μπορούν να συνδεθούν με διάφορες ασθένειες (Kanabus M et al., 2013).

Η αντιγραφή στα μιτοχόνδρια έχει ως σημείο έναρξης στη βαριά αλυσίδα (H), με τη βοήθεια ενός RNA πρόδρομου μορίου, το οποίο κωδικοποιείται από τον υποκινητή της ελαφριάς (L). Στην αντιγραφή, όπως και στη μεταγραφή, συμμετέχουν ένζυμα που εκφράζονται από το πυρηνικό DNA και συντίθενται στο κυτταρόπλασμα (όλα τα mRNAs του μιτοχονδρίου είναι ενδογενή).

*In silico* ανάλυση (ανάλυση με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή) αποκάλυψε την ύπαρξη στο μιτοχονδριακό DNA αλληλουχίες, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν εν δυνάμει ορμονοανταποκρινόμενες αλληλουχίες τόσο για τους υποδοχείς στεροειδών όσο και για τους υποδοχείς θυρεοειδών ορμονών.

Οι περισσότερες πληροφορίες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα εντοπίζονται στη βαριά αλυσίδα, αν και οι δύο κλώνοι μεταγράφονται. Το γονιδίωμα αποτελεί μια πολυκιστρονική ομάδα και η μόνη μη κωδικεύουσα περιοχή του mtDNA, είναι η περιοχή του D-βρόγχου (βρόγχος μετατόπισης) όπου εντοπίζονται οι υποκινητές. Η περιοχή αυτή περιέχει μια τριπλή DNA δομή και αποτελεί την περιοχή έναρξης της μεταγραφής.

Γενικά, η διαμόρφωση των μιτοχονδριακών γονιδιωματικών αλληλουχιών χαρακτηρίζεται από:

A) Έλλειψη μεσογονιδιακών νουκλεοτιδικών διαστημάτων, τα οποία να μην κωδικοποιούνται (ιντρόνια). Συνεπώς, δεν είναι δυνατόν να υπάρχουν ρυθμιστικές περιοχές έκφρασης συγκεκριμένων γενετικών στοιχείων (εκτός και αν είναι ενδογονιδιακές).

B) Ο D-βρόγχος αποτελεί τη μοναδική ρυθμιστική περιοχή με υποκινητές στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Γ) Δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στον αριθμό, στον τύπο και την εντόπιση του μιτοχονδριακού DNA και των μιτοχονδριακών mRNAs.

Δ) Υπάρχουν μόνο δύο περιοχές του mtDNA των θηλαστικών, οι οποίες δεν περιέχουν γονίδια. Η μια είναι η κοντή δυαδική αλληλουχία, η οποία λειτουργεί ως περιοχή έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας και η δεύτερη είναι ο D-βρόγχος.

Ε) Στα περισσότερα θηλαστικά, οι D-βρόγχοι μεταγράφονται σε RNAs με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής.

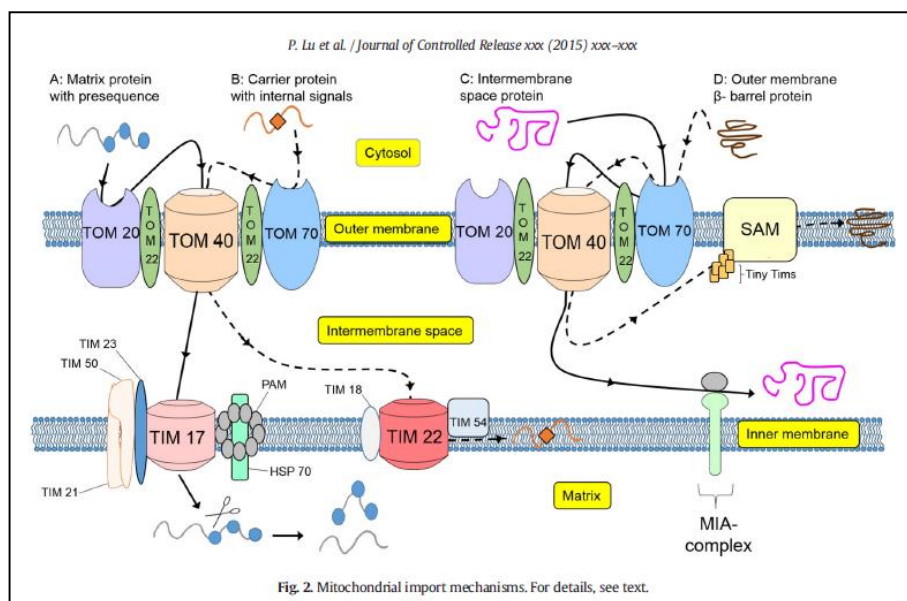
Η διαδικασία της μεταγραφής του mtDNA χαρακτηρίζεται από εξαιρετική συμμετρία για τους δύο κλώνους και ακολουθείται από εκτεταμένη μεταγραφική επεξεργασία. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται με ρυθμό 2-3 φορές μεγαλύτερο από τη βαριά, ενώ τα προϊόντα μεταγραφής της ελαφριάς έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής από αυτά της βαριάς, με αποτέλεσμα να μη συσσωρεύονται σε μεγάλο βαθμό στα μιτοχόνδρια.

Σχετικά με τη σύνθεση του RNA και τη μετα-μεταγραφική επεξεργασία, τα προϊόντα της ελαφριάς αλυσίδας συντίθενται πολύ πιο γρήγορα από αυτά στη βαριά αλυσίδα και η μεταγραφή της L-αλυσίδας γίνεται στο σύνολό της, χωρίς να υπάρχει λειτουργική αιτία

γι'αυτό, αφού η έκφρασή του είναι περιορισμένη σε πολλές μικρές περιοχές κατανεμημένες στο 75% της συνολικής έκτασης του γονιδιώματος. Οι υποκινητές και στους δύο κλώνους βρίσκονται κοντά ο ένας στον άλλο, χωρίς επικαλύψεις, ενώ η έναρξη της μεταγραφής γίνεται ανεξάρτητα για κάθε κλώνο. Υπάρχουν δύο αλληλουχίες απαραίτητες για να είναι λειτουργικός ο υποκινητής: το σημείο έναρξης της μεταγραφής και μια δεύτερη αλληλουχία, ανοδικά του σημείου αυτού. Οι ανοδικές αλληλουχίες στους δύο κλώνους είναι ανάστροφες η μια σε σχέση με την άλλη, με αποτέλεσμα οι ρυθμιστικοί παράγοντες της μιτοχονδριακής μεταγραφής να δρουν και προς τις δύο κατευθύνσεις (Patricio Fernández-Silva et al., 2003).

### **A.3.4. Μεταφορά των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο:**

Οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες έχουν το προνόμιο, χωρίς να είναι αποκλειστικό, να εισάγονται στα μιτοχόνδρια, αφού υποστούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Wienhues et al., 1992).

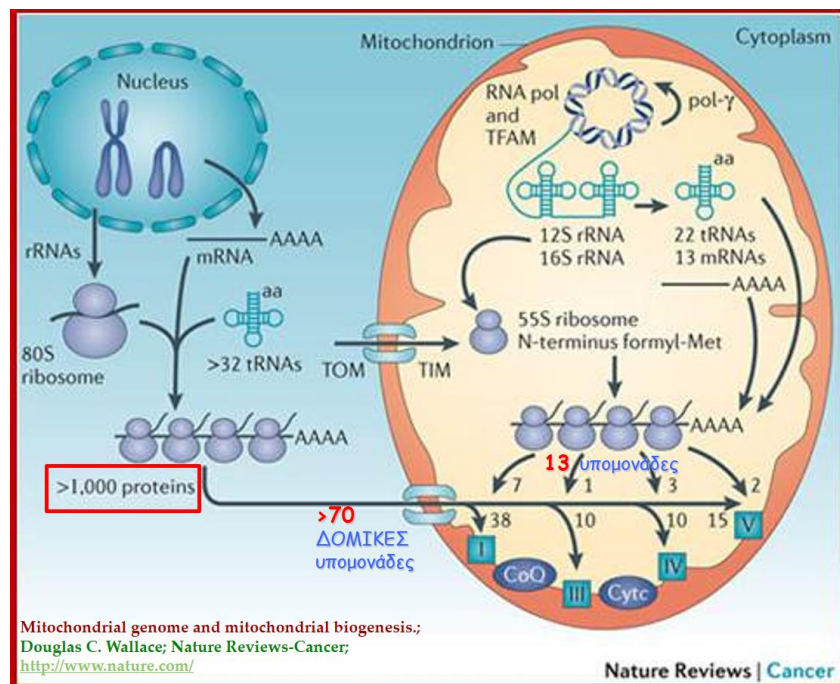


**Εικόνα 22:** Μηχανισμός εισόδου πρωτεϊνών εντός του μιτοχονδρίου.

Η βασική αρχή μεταφοράς μιας πρωτεΐνης στο αντίστοιχο οργανίδιο, όπου εντοπίζεται η δράση της, είναι η ύπαρξη σηματοδοτικών αλληλουχιών, είτε μίας αλληλουχίας είτε πολλών, οι οποίες «διαβάζονται» στο οργανίδιο-στόχο και είναι ικανές να κατευθύνουν τις πρωτεΐνες στον προορισμό τους. Σε αρκετές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, οι σηματοδοτικές αλληλουχίες (leader peptides), μήκους 10-80 αμινοξέα, βρίσκονται συνήθως στην αμινο-τελική αλληλουχία της πρόδρομης μορφής της πρωτεΐνης (πρωτεΐνες εσωτερικής μεμβράνης, μήτρας και διαμεμβρανικού χώρου) και μετέπειτα απομακρύνονται με πρωτεόλυση μέσα στο οργανίδιο με τη βοήθεια ειδικών πεπτιδασών.

Οι σηματοδοτικές αλληλουχίες είναι πιθανόν να εντοπίζονται και στην αλληλουχία της ώριμης πρωτεΐνης (πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης).

Οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αποτελούν περίπου το 1% όλου του πρωτεϊνικού περιεχομένου του κυττάρου και παρουσιάζουν μικτή προέλευση: ένα ποσοστό (13 υπομονάδες) κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, ενώ οι υπόλοιπες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. Έχουν εντοπιστεί γύρω στις 1.000 με 1.500 πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μιτοχονδριακή λειτουργία.



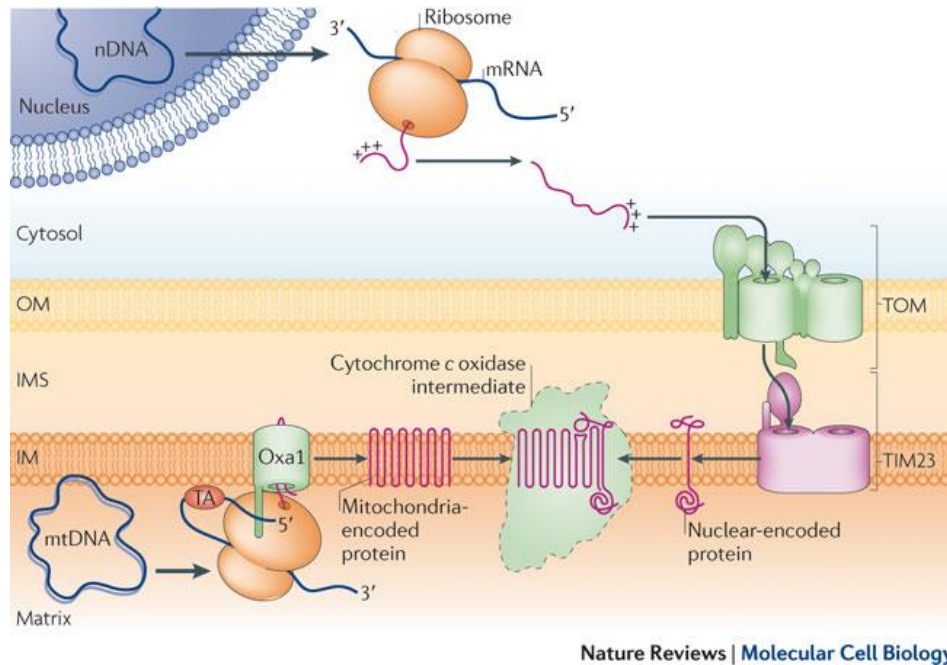
Εικόνα 23: Βιογένεση μιτοχονδρίου.

Ο παράγοντας διέγερσης της μιτοχονδριακής εισόδου (MSF, Mitochondrial Import Stimulation Factor) φαίνεται να κατευθύνει ενεργά τις πρωτεΐνες αυτές προς τα μιτοχόνδρια, αφού αναγνωρίζει τις σηματοδοτικές αλληλουχίες. Επιπλέον, ο παράγοντας αυτός προκαλεί το ξεδίπλωμα των πρόδρομων πρωτεϊνών πριν εισέλθουν στο μιτοχόνδριο, με ένα ATP-εξαρτώμενο τρόπο (*Pfanner και Geissler, 2001*). Οι αρχικές-πρόδρομες πρωτεΐνες δεν μπορούν να μεταφερθούν διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε αναδιπλωμένη μορφή, αλλά πρέπει να είναι τουλάχιστον μερικώς αποδιαταγμένες για να προσαρμοστούν ανάμεσα στο κανάλι εισαγωγής.

Μετά τη διέλευσή τους από την εξωτερική μεμβράνη, διαμέσου του GIP (General Import Pore, γενικού πόρου εισόδου) του συμπλόκου TOM (*Kunkele et al., 1998*), οι πρωτεΐνες κατευθύνονται προς τα πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς, τις τρανσλοκάσες (σύμπλοκο TIM23 ή TIM22), που βρίσκονται αγκυροβολημένες στις μιτοχονδριακές εσωτερικές



μεμβράνες (Εικόνα 24). Πρόκειται για πολύπλοκα και μεγάλου μεγέθους σύμπλοκα, με μεγάλη μεταβλητότητα και προσαρμοστικότητα, τα οποία αναγνωρίζουν τις πρόδρομες πρωτεΐνες, διαμορφώνουν κανάλια για να περάσουν διαμέσου οι πρωτεΐνες και παράγουν ενέργεια για τη μεταφορά αυτή. Οι υδρόφοβες και οι υδρόφιλες πρωτεΐνες, αφού αποδιατάσσονται, χρησιμοποιούν μια κοινή τρανσλοκάση στην εξωτερική μεμβράνη, αλλά χρησιμοποιούν διαφορετικά συστήματα μεταφοράς όταν βρεθούν στην εσωτερική μεμβράνη.



Εικόνα 24: Απεικόνιση των συστημάτων μεταφοράς πρωτεϊνών διαμέσου των μεμβρανών του μιτοχονδρίου, ανάλογα με την σηματοδοτική αλληλουχία που φέρει η κάθε πρωτεΐνη (David U. Mick, et al., 2012)

Οι πρωτεΐνες επανακτούν την τριτοταγή τους δομή, όταν φτάσουν στον τελικό προορισμό τους, σε ένα από τα τέσσερα διαμερίσματα: εξωτερική, εσωτερική μεμβράνη, μήτρα και διαμεμβρανικός χώρος.

Η μεταφορά διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης επιτυγχάνεται μέσω της διαβάθμισης του μεμβρανικού δυναμικού ( $\Delta\psi$ ). Στη συνέχεια, η αμινοπεπτιδάση **MPP** (Mitochondrial Processing Peptidase) απομακρύνει την αλληλουχία οδηγό. Η πρωτεΐνη που απομένει αναδιπλώνεται και σχηματίζει την ενεργή της μορφή με τη βοήθεια της υδρόλυσης του ATP, που ρυθμίζει τη σύνδεση της πρωτεΐνης-συνοδού mtHsp70 (Heat Shock Protein 70), υπεύθυνης για την επαναδίπλωση των πρόδρομων πρωτεϊνών που εισέρχονται στη μήτρα.

### **A.3.5. Οξειδάση του κυτοχρώματος c:**

Στα περισσότερα κύτταρα, η αντίδραση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c ευθύνεται για το 90% της πρόληψης οξυγόνου. Συνεπώς, αυτό το πρωτεϊνικό σύμπλοκο έχει καίρια σημασία για την αερόβια ζωή.

Η οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX) είναι μια διμερής πρωτεΐνη, της οποίας το μονομέρες αποτελείται από 13 διαφορετικές υπομονάδες και έχει μοριακό μέγεθος ~204kDa. Οι τρεις από αυτές τις υπομονάδες (Cox1, Cox2 και Cox3) απαρτίζουν το λειτουργικό κέντρο του ενζύμου, αναγκαίο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων και για την άντληση πρωτονίων. Αποτελούν το 60% της μοριακής μάζας του συμπλόκου και κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Ολόκληρη η πρωτεΐνη διατάσσεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου και εδράζεται όλη η αναπνευστική ενζυμική αλυσίδα. Είναι το τελευταίο σύμπλοκο της αναπνευστικής αλυσίδας (σύμπλοκο IV) και καθώς τα ηλεκτρόνια διέρχονται από την πρωτεΐνη, κατευθυνόμενα προς το μόριο του οξυγόνου που προσδένει, την αναγκάζουν να αντλεί πρωτόνια διαμέσου της μεμβράνης, από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο.

Η συγκρότηση του ενεργού ολοενζύμου της COX των θηλαστικών παρουσιάζει αρκετές πολυπλοκότητες, γιατί απαιτεί το συντονισμό της συγκρότησης των υπομονάδων που συντίθενται τόσο στο μιτοχόνδριο όσο και στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, η συγκρότηση της COX εξαρτάται από την εισαγωγή πέντε διαφορετικών ομάδων: δύο μόρια αίμης, τρία ιόντα χαλκού (Cu), ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn), ένα ιόν μαγνησίου (Mg) και ένα ιόν νατρίου (Na). Τέλος, είναι απαραίτητος μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών συγκρότησης του ενζύμου, για τη μεταφορά του χαλκού και τη σύνθεση της αίμης.

Οι προσθετικές ομάδες του ενζύμου, η αίμη και ο χαλκός, παίζουν κομβικό ρόλο στη λειτουργικότητα του ενζύμου και συντονίζονται από τις υπομονάδες Cox1 και Cox2.

Η υπομονάδα Cox1, περιέχει δύο συμπαραγοντες αίμης, εκ των οποίων η αίμη a, εμπλέκεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και η αίμη a<sub>3</sub> αλληλεπιδρά με τη μονοπυρηνική θέση του χαλκού και σχηματίζει μια έτερο-διμεταλλική ενεργή θέση (Cu<sub>B</sub>). Σε αντίθεση με τη διμεταλλική θέση Cu<sub>B</sub> του χαλκού στην υπομονάδα Cox1, ο χαλκός στην υπομονάδα Cox2 εντοπίζεται σε ένα διπυρηνικό (μεικτό σθένος χαλκού) κέντρο Cu<sub>A</sub>. Η COX εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων με το ένα τμήμα του μορίου να προεξέχει στο διαμεμβρανικό χώρο και το άλλο στη μήτρα των μιτοχονδρίων. Η αλληλεπίδραση του κυτοχρώματος c με την οξειδάση COX εντοπίζεται στην περιοχή της Cox2 που είναι εκτεθειμένη στο διαμεμβρανικό χώρο, κοντά στη θέση Cu<sub>A</sub>.

### **A.3.6. Βιοσύνθεση και συγκρότηση ολοενζύμου της COX στα θηλαστικά:**

Η συγκρότηση της COX είναι μια διαδικασία με διακριτά ενδιάμεσα στάδια. Απαιτούνται περισσότεροι από 30 βοηθητικοί συμπαραγόντες. Επιπρόσθετα της βιολογικής τους σημασίας, το αυξημένο ενδιαφέρον επί της διαδικασίας της συγκρότησης της COX προέρχεται από βιολογικές στατιστικές που αποδεικνύουν ότι η έλλειψη της COX είναι η πιο συχνή αιτία μιτοχονδριακών εγκεφαλομυοπαθειών, μια ετερογενή ομάδα ανθρώπινων διαταραχών που σχετίζονται με την αερόβια παραγωγή ενέργειας, δηλαδή βλάβες στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (*Shoubridge E.A., et al., 2001*).

Στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, η COX σχηματίζεται από 11 διαφορετικές υπομονάδες δυαδικής γενετικής προέλευσης. Οι τρεις μεγαλύτερες σε μέγεθος υπομονάδες είναι η Cox1p, Cox2p, και Cox3p, οι οποίες κωδικοποιούνται από το mtDNA, και σχηματίζουν τον καταλυτικό πυρήνα του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο του Nijtmans, η βιογένεση της Cox1p είναι το πρώτο βήμα. Το άλλο ενδιάμεσο σχηματίζεται από την Cox1p και την Cox4p και το τρίτο ενδιάμεσο περιέχει όλες τις υπομονάδες εκτός από τις 6a, 7a και 6b η προσθήκη των οποίων δίνει το ολοένζυμο. Η διαδικασία είναι συντηρημένη μεταξύ σακχαρομύκητα και ανθρώπου και ρυθμίζεται από το οξυγόνο (*Fontanesi F., et al., 2006*).

Μέταλλα, όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος και το μαγνήσιο, είναι απαραίτητα για τη λειτουργία της COX. Το άτομο  $Zn^{+2}$  το οποίο βρίσκεται σε μία μη καταλυτική υπομονάδα, πιθανώς παίζει ρόλο στη δομική σταθερότητα του συμπλόκου. Η θέση των  $Mg^{+2}/Mn^{+2}$  είναι κοντά στον δίαυλο  $H_2O$  και βοηθά την απελευθέρωση του  $H_2O$ , το οποίο παράγεται από την αναγωγή του οξυγόνου. Η είσοδος του χαλκού στη θέση  $Cu_B$  διευκολύνει το σταθερό σχηματισμό του κέντρου  $Mg^{+2}/Mn^{+2}$  (*Barrientos et al., 2009*).

Η Sco2 (από το: Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2), όπως έχει προαναφερθεί, αποτελεί πρωτεΐνη με πολύ σημαντικό ρόλο τόσο για τη σωστή συγκρότηση του ολοενζύμου της COX όσο και για την ακέραη λειτουργία της, καθώς συμμετέχει στη μεταφορά χαλκού προς την θέση  $Cu_A$  της Cox2 υπομονάδας (*Papadopoulou L.C., et al., 1999*). Συμμετέχει επίσης στον μεταβολισμό του  $Cu^{+2}$  σε συνεργασία με τη Sco1 πρωτεΐνη, ρυθμίζοντας από κοινού την εισροή και εκροή (και επομένως τα επίπεδα) Cu στα κύτταρα (*Brosel S. H., et al., 2010*). Η μεταφορά χαλκού στην Cox2 ξεκινά στα μιτοχόνδρια από την μικρή διαλυτή πρωτεΐνη Cox17, που λειτουργεί ως πρωτεΐνη – συνοδός του χαλκού τόσο στη θέση  $Cu_A$  της Cox2, όσο και στη θέση  $Cu_B$  της Cox1. Μέσω της Cox17 τα ιόντα χαλκού περνούν στην Sco2 και στην Sco1, που σχηματίζουν στη συνέχεια σύμπλοκο με την Cox2 (Σύμπλοκο Sco1- Cox2 – Sco2). Οι Sco1 και Sco2 του συμπλόκου μεταφέρουν το Cu στη θέση  $Cu_A$  στην υπομονάδα Cox2. Αυτή η οξείδωση, καθώς και η μεταφορά χαλκού στην  $Cu_A$  θέση, αποδεσμεύουν την Cox2 υπομονάδα από το σύμπλοκο. Μετά την αποδέσμευσή της, η Cox2 ενσωματώνεται στο σύμπλοκο της COX, ενώ οι Sco πρωτεΐνες ξεκινούν νέο κύκλο.



### A.3.7. Η μεταφορά του χαλκού στην υπομονάδα Cox2:

Η μεταφορά του χαλκού εντός του κυττάρου επιτυγχάνεται από μία ομάδα τυπικών μικρών διαλυτών πρωτεϊνών, οι οποίες αναφέρονται ως «συνοδοί» (chaperones). Ένας από αυτούς τους παράγοντες, η πρωτεΐνη Cox17, εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο διαμεμβρανικό τμήμα των μιτοχονδρίων. Στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων εντοπίζονται επίσης οι Cox19, και Cox23, οι οποίες φέρουν το χαρακτηριστικό μοτίβο CX9C και μεταφέρονται με παρόμοιο τρόπο από το σύστημα μεταφοράς των μιτοχονδρίων, τα σύμπλοκα TOM-TIM.



Εικόνα 25: Μεταφορά χαλκού μέσω της Sco2 πρωτεΐνης [BCM, *Sco2 Mutation analysis*, <http://www/bcm.edu/cms>].

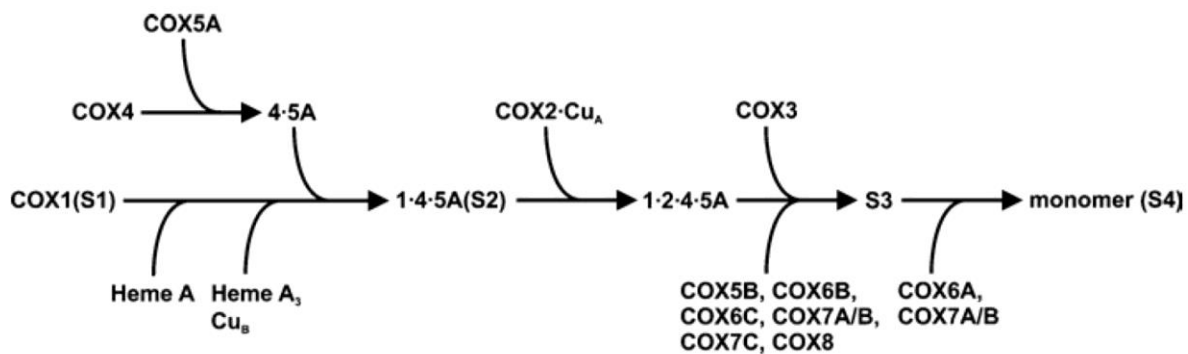
Στην πρόδρομη μορφή της, η Sco2 πρωτεΐνη αποτελείται από 266 αμινοξέα. Τα πρώτα 41 αμινοξέα που βρίσκονται στο αμινοτελικό της άκρο, αποτελούν το MTS (L) μέσω του οποίου η Sco2 αναγνωρίζεται από τα σύμπλοκα TOM και TIM και μεταφέρεται στη μήτρα. Μετά την αποκοπή του MTS πεπτιδίου από την MPP, η Sco2 αποκτά την ώριμη και λειτουργική μορφή της, η οποία αποτελείται από 225 αμινοξέα και ενσωματώνεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Στο μόριο της Sco2 πρωτεΐνης, στην πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου υπάρχει το συντηρημένο μοτίβο πρόσδεσης του χαλκού C133xxxC137 καθώς και ένα συντηρημένο κατάλοιπο ιστιδίνης (His224) (Papadopoulos L.C., et al., 1999) και (Foltopoulou, P.F., et al., 2010).

Η Cox2 περιέχει δύο ιόντα χαλκού σε ένα διπυρηνικό κέντρο, το Cu<sub>A</sub>. Το Cu<sub>B</sub> είναι 13Å κάτω από την επιφάνεια της μεμβράνης. Το ιόν Mg<sup>+2</sup> είναι προσδεμένο στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των υπομονάδων Cox1 και Cox2, κοντά στην αίμη a3 (Fiumera H.L. et al., 2007). Το Cu<sub>A</sub> κέντρο μέσα στην Cox2 σχηματίζεται μέσα σε ένα β-βαρέλι που αποτελείται από δέκα β-κλώνους. Τα δύο ιόντα χαλκού γεφυρώνονται από δύο κατάλοιπα κυστεΐνης, μέσα στο CxxxC μοτίβο.

### **A3.8. Προτεινόμενο μοντέλο του μονοπατιού συγκρότησης της COX:**

Η Cox4 και η Cox1 εντοπίζονται στα πρώτα ενδιάμεσα στάδια της βιοσύνθεσης της COX στα θηλαστικά. Οι υπομονάδες Cox6a και Cox7a προστίθενται στο τέλος. Η καρβοξυτελική επικράτεια της Cox2 διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων με τη βοήθεια της Cox18 και άλλων δύο πρωτεϊνών. Η Cox5 περιέχει μία επικράτεια 70 καταλοίπων που διεισδύει στην μήτρα, άρα πιθανώς είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση του συμπλόκου Cox10- Cox15 για την τροποποίηση της αίμης b (*Fontanesi F., et al., 2006*). Η Cox11 μοιάζει με την Sco1, με μία μονή διαμεμβρανική έλικα, κάτω από το MTS. Η καρβοξυτελική επικράτεια έχει 189 κατάλοιπα, και διεισδύει στον IMS, ενώ τρία κατάλοιπα κυστεΐνης δένουν το ιόν Cu(I). Η πρωτεΐνη συγκρότησης Cox11 είναι η μεταλλοπρωτεΐνη για τη θέση Cu<sub>B</sub>.

Η είσοδος του χαλκού στην υπομονάδα Cox1 και στην υπομονάδα Cox2 λαμβάνει χώρα στον ενδομεμβρανικό χώρο, καθώς όλα τα μόρια που μεταφέρουν χαλκό, όπως η Cox17, η Sco1, η Sco2 και η Cox11, εντοπίζονται σε αυτό το μιτοχονδριακό διαμέρισμα.



Εικόνα 26: Μονοπάτι βιοσύνθεσης και συγκρότησης της COX (*Stiburek, et al., 2005*).

Τα στάδια συγκρότησης του ολοενζύμου της COX κατά σειρά (*Stiburek, et al., 2005*) είναι τα εξής:

1. Περιέχει μόνο την υπομονάδα Cox1.
2. Δημιουργείται το πρώτο ενδιάμεσο σύμπλοκο συγκρότησης, το οποίο αποτελείται από τις υπομονάδες Cox1, Cox4 και Cox5 (~110kDa).
3. Δημιουργείται το ενδιάμεσο σύμπλοκο συγκρότησης (~180kDa), το οποίο περιέχει όλες τις υπομονάδες, εκτός από τις υπομονάδες COX6A, COX7A ή την COX7B.
4. Συγκρότηση του μονομερούς ολοενζύμου.

### **A.3.8. Μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA:**

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις, εξαιτίας της απουσίας αξιόπιστου μηχανισμού επιδιόρθωσης των μεταλλάξεων που προκαλούνται από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) στα μιτοχόνδρια αλλά και εξαιτίας της απουσίας της προστατευτικής συμβολής των ιστονών στο γονιδίωμα. Το μιτοχονδριακό DNA είναι 20 φορές πιο επιρρεπές να υποστεί μετάλλαξη από ότι το πυρηνικό DNA. Επιπλέον, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν δομείται από ιντρόνια, παρά μόνο εξώνια, με αποτέλεσμα η πληροφορία να συσσωρεύεται με μεγάλη πυκνότητα σε σχέση με το πυρηνικό και επομένως μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα αντικατοπτρίζονται πιο συχνά σε παθολογικές διαταραχές.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό του μιτοχονδριακού DNA είναι ο μεγάλος πολυμορφισμός που εμφανίζει, με αποτέλεσμα η συσχέτιση του mtDNA δύο ανθρώπων μετά από τυχαία επιλογή να εμφανίζει περίπου 50-70 διαφορετικά νουκλεοτίδια, διαφορά που υπολογίζεται γύρω στο 0,42% του ολικού μιτοχονδριακού γονιδιώματος.

Στοιχεία για μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία δεν μπορούν να ληφθούν από συνηθισμένες τεχνικές στο αίμα (αφού οι παθογόνες μεταλλάξεις του mtDNA δεν είναι ανιχνεύσιμες) καθώς και σε κλινικά τεστ, φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού ή υπέρυθη φασματοσκοπία. Σε περίπτωση υποψίας για μιτοχονδριακή ασθένεια, επιβάλλεται η άμεση νουκλεοτιδική αλληλούχιση ολόκληρου του mtDNA.

Επιπλέον, ένα ακόμα χαρακτηριστικό του μιτοχονδριακού DNA που αποτελεί τροχοπέδη στον εντοπισμό παθογόνων μεταλλάξεων, αποτελεί η πολυπλασμία του. Συγκεκριμένα, ενώ τα ανθρώπινα κύτταρα φέρουν μόνο δύο αντίγραφα του πυρηνικού DNA, τα μιτοχόνδρια των κυττάρων περιέχουν πάρα πολλά αντίγραφα του mtDNA, από 1.000-100.000. Τα αντίγραφα του mtDNA σε ένα κύτταρο, σε ένα υγιές άτομο, είναι πανομοιότυπα (ομοπλασμία). Αντιθέτως, σε περίπτωση που ένα άτομο φέρει παθολογικές μεταλλάξεις σε ορισμένα αντίγραφα από αυτά, δεν παύει να φέρει και φυσιολογικά αντίγραφα του mtDNA, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ετεροπλασμία.

Η αποκάλυψη μιας συγκεκριμένης γενετικής βλάβης στο μιτοχονδριακό DNA και ακολούθως η συσχέτισή της με μια παθολογική κατάσταση, είναι συχνά δύσκολη. Πολλά άτομα δεν εμπίπτουν σε μια συγκεκριμένη κατηγορία ασθενειών, ενώ η κατάσταση γίνεται ακόμη πιο περίπλοκη από την ασαφή συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Για παράδειγμα, ασθενείς με εξωτερική οφθαλμοπληγία μπορεί να έχουν ίδια κλινικά συμπτώματα, αλλά μερικοί μπορεί να φέρουν μια έλλειψη του mtDNA, άλλοι μπορεί να φέρουν μια σημειακή μετάλλαξη του mtDNA (π.χ. m.3243A>G), κι άλλοι μπορεί να φέρουν μια αυτοσωματική επικρατή μετάλλαξη σε πυρηνικό γονίδιο, που σχετίζεται με δευτερογενείς ανωμαλίες του mtDNA (π.χ. μεταλλάξεις στο γονίδιο ANT1).

Επιπλέον, η ίδια γενετική μετάλλαξη μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από πολύ διαφορετικά κλινικά σύνδρομα (π.χ. η σημειακή μετάλλαξη m.3243A>G, μπορεί να

προκαλέσει CPEO, σακχαρώδη διαβήτη και κώφωση, ή μια σοβαρή εγκεφαλοπάθεια με εγκεφαλικά επεισόδια και επιληψία).

Είναι γνωστό ότι το mtDNA κληρονομείται από τη μητέρα στα παιδιά της. Το σπέρμα περιέχει περίπου 100 αντίγραφα του mtDNA, τα οποία εισέρχονται στο ωάριο, αλλά σύντομα καταστρέφονται, με αποτέλεσμα το ζυγωτό που προκύπτει φέρει τα μιτοχόνδρια από το ωάριο της μητέρας.

Ο τύπος της κληρονομικότητας των μιτοχονδριακών νοσημάτων μπορεί να ποικίλει, αλλά ένα νόσημα που οφείλεται αποκλειστικά σε μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται πάντα από τη μητέρα (μητρική κληρονομικότητα) και έτσι τα άρρενα τέκνα δεν μεταδίδουν τη νόσο στους απογόνους τους.

Ο πατέρας του πάσχοντος δεν είναι σε κίνδυνο να φέρει την παθολογική μετάλλαξη στο mtDNA, αλλά η μητέρα (συνήθως) έχει τη μιτοχονδριακή μετάλλαξη και είναι δυνατό να εκδηλώνει συμπτώματα της νόσου ή όχι. Ελλείψεις του μιτοχονδριακού DNA είναι γενικά *de novo* κι έτσι δεν υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για άλλα μέλη της οικογένειας. Αντίστοιχα, σημειακές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA και διπλασιασμοί μπορεί να μεταδίδονται από τη μητρική γραμμή, ενώ μια γυναίκα που φέρει σε ετεροπλασμία μια μετάλλαξη μπορεί να μεταδώσει ένα μεταβλητό ποσό του μεταλλαγμένου mtDNA στους απογόνους της, με αποτέλεσμα τη σημαντική κλινική ετερογένεια μεταξύ πασχόντων μέσα στην ίδια οικογένεια.

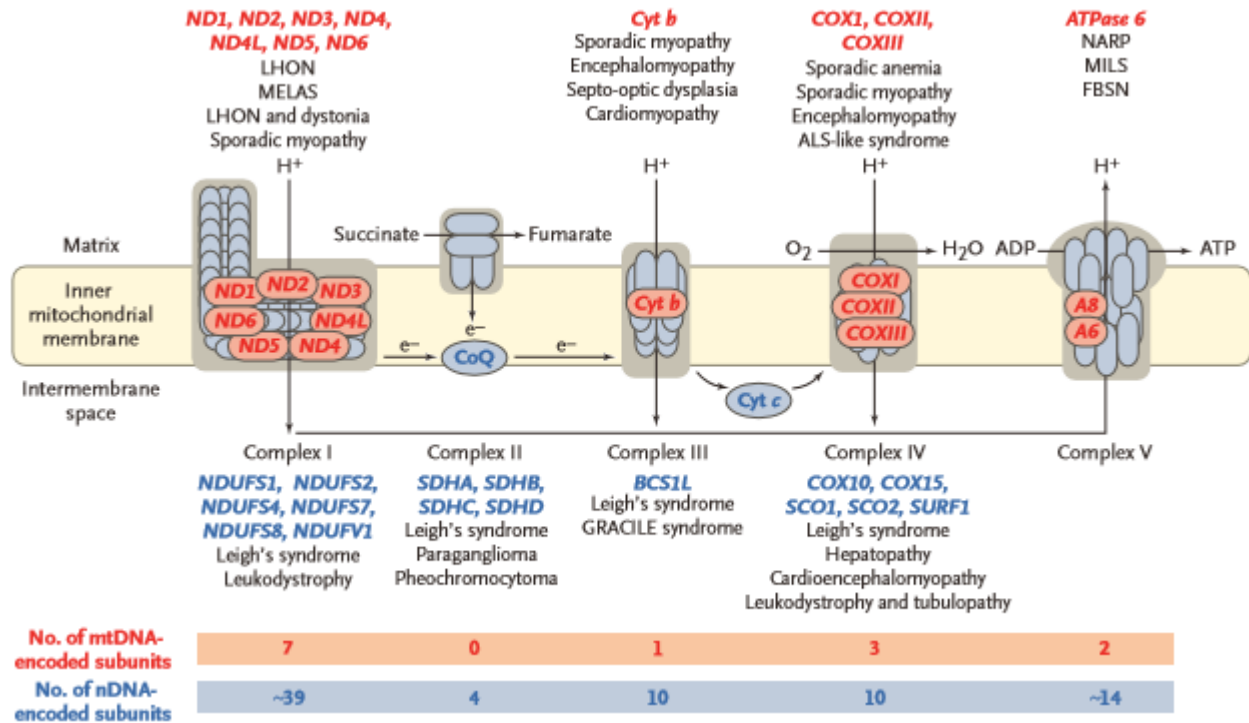
### **A.3.9. Μιτοχονδριακές ασθένειες:**

Ο όρος «πρωτογενή μιτοχονδριακά νοσήματα» αναφέρεται σε μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα γενετικών νοσημάτων, τα οποία όλα οδηγούν σε ανωμαλίες της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ένα μιτοχονδριακό νόσημα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων του πυρηνικού DNA ή μεταλλάξεων γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA.

Με τα νοσήματα αυτά έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 200 παθογόνες σημειακές μεταλλάξεις και μεγάλος αριθμός ανακατατάξεων (διαγραφές και διπλασιασμοί) του mtDNA. Επιπλέον, έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών γονιδίων παίζει ρόλο στην ομοιόσταση των μιτοχονδρίων και η αλλοίωση των γονιδίων αυτών οδηγεί σε μιτοχονδριακές ασθένειες αυτοσωμικού, υπολειπόμενου τύπου.

Η μεγάλη ετερογένεια τους οφείλεται εν μέρει στη βιοχημική πολυπλοκότητα του μηχανισμού της μιτοχονδριακής αναπνοής, αλλά και στο γεγονός ότι δύο γονιδιώματα, το μιτοχονδριακό και το πυρηνικό, φέρουν και τα δύο, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Γενικά, όργανα και ιστοί με την υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση, όπως ο εγκέφαλος και οι μύες, είναι πιο πιθανό να επηρεαστούν και γ'αυτό τα νοσήματα αυτά αναφέρονται κι ως "μιτοχονδριακές εγκεφαλομυοπάθειες".

Η ομάδα των παθήσεων, που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Oxidative phosphorylation - ΟΧΡΗΟΣ), είναι τα σχετικά συχνότερα, με χαρακτηριστικά κλινικά χαρακτηριστικά αλλά μεγάλη γενετική ετερογένεια.



**Εικόνα 27:** Στο σχήμα φαίνονται οι υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA με μπλε χρώμα και οι υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το μιτοχondριακό DNA με κόκκινο χρώμα. Καθώς τα ηλεκτρόνια μετακινούνται διαμέσου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αντλούνται πρώτιστα από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο, μέσω των συμπλόκων I, II και IV, και έπειτα ξανά πίσω στη μήτρα μέσω του συμπλόκου V για την παραγωγή ATP. Φαίνονται και τα γονίδια για τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας, των οποίων οι μεταλλάξεις ευθύνονται για μιτοχondριακά νοσήματα (S. DiMauro et al., 2003).

Οι μιτοχondριακές παθήσεις γενικά αποτελούν τη συνηθέστερη αιτία νευρομεταβολικών νοσημάτων κατά την παιδική ηλικία, με συχνότητα εμφάνισης 1/10.000 γεννήσεις, κι η κλινική τους πορεία είναι συνήθως προοδευτική. Η ετερογένεια στην κατανομή του μιτοχondριακού DNA (ετεροπλασμία) και η ιστο-ειδική έκφραση πολλών γονιδίων του πυρηνικού DNA αποτελούν τις κύριες αιτίες για τη μεγάλη ποικιλία των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, που εκδηλώνουν οι ασθενείς.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η διάγνωση είναι δύσκολη, αν και ορισμένες ασθένειες (π.χ. κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber) διαγιγνώσκονται πιο εύκολα. Επιπλέον, ο φαινότυπος των μιτοχondριακών νοσημάτων ποικίλει, αφού πολλά προσβάλλουν τις λειτουργίες πολλών οργάνων (π.χ. ακοή, καρδιά, κλπ) ή ένα μόνο

όργανο (π.χ. τα μάτια). Γενικά, η διάγνωση βασίζεται σε ένα λεπτομερές ιατρικό οικογενειακό ιστορικό και σε γενετικό έλεγχο για συγκεκριμένες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA, που θα επιβεβαιώσει την παρουσία του συγκεκριμένου νοσήματος.

### **A.3.10. Δυσλειτουργία COX και μιτοχονδριακά νοσήματα:**

Όπως έχει προαναφερθεί, η κύρια αιτία εμφάνισης μιτοχονδριακών ασθενειών στον άνθρωπο αποτελεί η αδυναμία συγκρότησης του ενζύμου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, γιατί οδηγεί σε ανεπάρκεια της αναπνευστικής αλυσίδας.

Οι ασθενείς, με παθογένεια αναφορικά με το ένζυμο αυτό, παρουσιάζουν ένα ευρύ και ετερογενές φάσμα κλινικών φαινοτύπων. Τα μιτοχονδριακά νοσήματα εμπλέκουν σοβαρές διαταραχές, αφού προσβάλουν πρωταρχικά τα όργανα με μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις, όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά και οι μύες.

Οι γενετικές αιτίες της μειωμένης δραστηριότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

1. Μεταλλάξεις σε δομικές υπομονάδες του ενζύμου που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια:

Οι υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, είναι η Cox1, Cox2 και Cox3, στις οποίες έχουν εντοπιστεί σποραδικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με ποικίλους κλινικούς φαινότυπους με ήπια συμπτώματα μέχρι και σοβαρές πολυσυστηματικές ασθένειες. Οι ασθενείς εκδηλώνουν την ασθένεια σε μεγάλη ηλικία (πάνω από 40 χρονών), λόγω του φαινομένου της ετεροπλασμίας.

2. Μεταλλάξεις στα πυρηνικά γονίδια συγκρότησης της οξειδάσης του κυτοχρώματος c:

Αφορούν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν συμπληρωματικούς παράγοντες, απαραίτητους για την αναδίπλωση και την ωρίμανση των υπομονάδων της COX, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες μεταφοράς και εισαγωγής των προσθετικών ομάδων στο ολοένζυμο.

Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια έχουν μελετηθεί εκτενώς στη ζύμη και έχουν αναγνωριστεί ανθρώπινα ομόλογα γονίδια για αρκετά από αυτά.

Οι μεταλλάξεις στα ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν συμπληρωματικούς παράγοντες, σχετίζονται με σοβαρούς φαινότυπους, με ασθενείς που επιβιώνουν μόνο μέχρι την αρχή της παιδικής ηλικίας, αλλά κατά κόρον θανάσιμες κατά τη βρεφική περίοδο. Η έλλειψη COX εμφανίζει πρότυπα κληρονομικότητας ανάλογα με το γονίδιο που την προκαλεί. Όταν το γονίδιο, στο οποίο λαμβάνει χώρα η μετάλλαξη, κωδικοποιείται από μιτοχονδριακό DNA, η έλλειψη COX κληρονομείται από τη μητέρα,

ενώ όταν κωδικοποιείται από πυρηνικό DNA είναι αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια (*Salviati L. et al., 2002*).

Πυρηνικά γονίδια, στα οποία μεταλλάξεις προκαλούν μειωμένη δραστικότητα της COX είναι: το γονίδιο *TACO1* (μεταγραφικός ενεργοποιητής του συμπλόκου IV), το γονίδιο *LRPPRC* (σταθεροποιεί την Cox10 και την Cox15, οι οποίες ενέχονται στην βιοσύνθεση της αίμης), τα γονίδια *COX10* και *COX15*, τα γονίδια *SCO1*, *SCO2* (εμπλέκονται στη μεταφορά του χαλκού στην οξειδάση) και ο *SURF1*, ο οποίος ενέχεται στην ωρίμανση της Cox1.

### **A.3.11. Το γονίδιο SCO2 και η πρωτεΐνη Sco2:**

Το ανθρώπινο *SCO2* γονίδιο (κωδικός GENEBank CR456569.1) χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 22), και όταν μεταλλάσσεται, σχετίζεται με βρεφική θανάσιμη καρδιοεγκεφαλομυοπάθεια και μειωμένη δραστικότητα της COX (*Papadopoulou L.C., et al., 1999*).

Το γονίδιο αυτό, περιέχει δύο εξώνια και ένα ιντρόνιο. Το εξώνιο 1 αντιστοιχεί στην 5'-UTR περιοχή, ενώ το εξώνιο 2 περιέχει τα τελευταία 13bp από την 5'-UTR περιοχή, την κωδικοποιούμενη περιοχή (801bp) και την 3'-UTR περιοχή (41bp), η οποία περιέχει και το πολυαδενυλικό σήμα (ATTAAA) (*Papadopoulou L.C., et al., 1999*).

Το γονίδιο κωδικοποιεί τη μιτοχονδριακή Sco2 πρωτεΐνη, η οποία περιέχει ένα σήμα στόχευσης για τα μιτοχόνδρια (MTS), μία μονή διαμεμβρανική επικράτεια και μία πολύ συντηρημένη αλληλουχία CxxxC.

Η πρωτεΐνη Sco2, όπως και η πρωτεΐνη Sco1, βοηθούν στη μεταφορά του χαλκού στο ολοένζυμο της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Το *SCO1* και το *SCO2* γονίδιο είναι παράλογα γονίδια, που κωδικοποιούν για μεταλλοπρωτεΐνες; με ουσιαστική δράση, σε ότι αφορά το ρόλο τους στη μεταφορά του χαλκού και στη συγκρότηση της COX. Και η Sco1 και η Sco2 πρωτεΐνες συνδέονται στην εσωτερική μεμβράνη με μία μονή διαμεμβρανική α-έλικα. Διαθέτουν μια σφαιρική επικράτεια, η οποία διεισδύει στον διαμεμβρανικό χώρο και είναι ικανή για να προσδένει ιόντα χαλκού *in vitro* και *in vivo* (*Buchwald, et al., 1991*) (*Foltopoulou, et al., 2004*). Και η Sco1 και η Sco2 ενέχονται στην ενσωμάτωση του χαλκού στη θέση Cu<sub>A</sub>. Σε αντίθεση με τη Sco2, η υπερέκφραση της Sco1 επαναφέρει την αναπνοή σε κύτταρα με έλλειψη της Cox17, ενώ υψηλά επίπεδα της Sco2 πρωτεΐνης στον ζυμομύκητα δεν επιδιορθώνουν τα ελλείμματα της αναπνοής που προκαλούνται από την έλλειψη της Sco1 (*Glerum, et al., 1996*).

Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια, σχετίζονται με διάφορους κλινικούς φαινοτύπους, αν και τα δύο γονίδια εκφράζονται ιδιοστατικά (*Banci, et al., 2007*).

Η ανηγμένη Sco2 προσδένει μονοσθενή ή δισθενή χαλκό, ομοίως με τη Sco1. Συνολικά, η δομή της Sco2 περιλαμβάνει 4 α-έλικες και 9 β-κλώνους, που σχηματίζουν ένα κεντρικό

β-φύλλο και δύο β-φουρκέτες που οργανώνονται σε διαμόρφωση θειορρεδοξίνης. Ο χαλκός περιβάλλεται από τα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης του συντηρημένου μοτίβου CxxxC, που εντοπίζεται στο βρόχο 3 και στην έλικα α1, και στην συντηρημένη ιστιδίνη His224, η οποία εντοπίζεται σε μία β-φουρκέτα.

Μεταλλάξεις στη Sco2 σχετίζονται με καρδιομυοεγκεφαλοπάθεια σε νεογνά, λόγω έλλειψης COX (COX deficiency). Η μετάπτωση C-T στο 1280 νουκλεοτίδιο δημιουργεί ένα κωδικόνιο λήξης στο Gln-53 (Q53X) στο ένα αλληλόμορφο και η μετάπτωση G-A στη θέση 1541 μετατρέπει το κατάλοιπο Glu-140 σε Lys (E140K) στο άλλο αλληλόμορφο. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από μειωμένη δράση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Papadopoulou, et al., 1999).

Αρχικά, το 1999 ταυτοποιήθηκαν οι εξής μεταλλάξεις: Q53X, E140K και S225F (Papadopoulou et al., 1999).

Στη συνέχεια, ταυτοποιήθηκαν οι: C133S (Tarnopolsky, et al., 2004), L151P, R171W (Jacksch, et al., 2001) [ <http://www.uniprot.org/uniprot/>]. Η μετάλλαξη C133S αφορά το κατάλοιπο κυστεΐνης στο μοτίβο CXXXC και έτσι η πρωτεΐνη καθίσταται ανίκανη να προσδέσει χαλκό. Επομένως η Sco2 δεν είναι πλέον λειτουργική. Το αμινοξύ γλουταμινικό στη θέση 140 (E140) βρίσκεται στην έλικα α1, όταν η Sco2 προσδένει μονοσθενή χαλκό, η οποία δεν είναι δυνατό να δημιουργηθεί στη μετάλλαξη E140K. Επειδή το κατάλοιπο E140 είναι σχετικά κοντά στο μοτίβο πρόσδεσης C137, τα δομικά στοιχεία που επάγονται από τη μετάλλαξη επηρεάζουν και τις δυνατότητες πρόσδεσης χαλκού και την σταθερότητα της πρωτεΐνης, όπως και η μετάλλαξη S225F (Foltopoulou et al., 2004)

### **A.3.12. Αντιμετώπιση μιτοχονδριακών ασθενειών:**

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη θεραπεία για τις μιτοχονδριακές ασθένειες. Υπάρχουν βέβαια στρατηγικές αντιμετώπισης των ασθενειών αυτών με συμπτωματική, φαρμακολογική, γονιδιακή και πρωτεϊνική θεραπεία.

Η συμπτωματική θεραπεία, η οποία χρησιμοποιείται συχνά στην κλινική πράξη, μπορεί να είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με μιτοχονδριακές διαταραχές. Στις ασθένειες αυτές, επηρεάζονται περισσότερο οι ιστοί με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Η αερόβια άσκηση και η φυσιοθεραπεία, φαίνεται ότι βελτιώνει το ισοζύγιο του φυσιολογικού με το μεταλλαγμένο μιτοχονδριακό DNA.

Η αερόβια άσκηση παρατηρήθηκε ότι επάγει την οξειδωτική φωσφορυλίωση και διευκολύνει τις μιτοχονδριακές λειτουργίες. Ανάμεσα στις ενδοκρινολογικές διαταραχές, με αιτιολογία τις μιτοχονδριακές νόσους, είναι πιθανόν να εμφανιστεί διαβήτης, που αντιμετωπίζεται με δίαιτα, χορήγηση ινσουλίνης και υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Συνίσταται, επίσης, εφαρμογή κετογονικής διαίτας (>90% λιπαρά οξέα, εμπλουτισμένα με πρωτεΐνες, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, αλλά χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες),



αντικαθιστώντας τη γλυκόζη με κετονικά πρόδρομα μόρια, μετατοπίζοντας το μεταβολισμό από τη γλυκόλυση στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια. Οι κετόνες, έχει παρατηρηθεί, ότι μειώνουν την παραγωγή των ενεργών δραστικών ειδών του οξυγόνου (ROS) και ότι αυξάνουν τη βιογένεση των μιτοχονδρίων.

Επιπλέον, σε ασθενείς με υπογοναδισμό χορηγούνται οιστρογόνα και τεστοστερόνη, σε ασθενείς με υποθυροειδισμό χορηγούνται θυροειδείς ορμόνες, ενώ σε περιπτώσεις παραθυροειδισμού χορηγείται βιταμίνη D. Ένα από τα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι η πτώση βλεφάρων και ο καταρράκτης, που αντιμετωπίζονται με χειρουργική επέμβαση. Λόγω του ότι τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της αίμης, ενδέχεται να εμφανιστεί σιδηροβλαστική αναιμία, η οποία σε μικρή ηλικία αντιμετωπίζεται με μεταγγίσεις αίματος, ενώ σε μεγαλύτερη ηλικία, με τη χορήγηση ερυθροποιητίνης.

Στη φαρμακολογική και μεταβολική θεραπεία, εντάσσεται η απομάκρυνση τοξικών μεταβολίτων, όπως το νευροτοξικό γαλακτικό οξύ, το οποίο προκαλεί γαλακτική οξέωση και ανισορροπία του κυτταρικού pH, και το οποίο απομακρύνεται με τη χορήγηση όξινου ανθρακικού άλατος ή με το πιο εξειδικευμένο αντιδραστήριο-ένωση, διχλωροξεϊκό οξύ (DCA). Η θεραπεία αυτή δεν ενδείκνυται για μακροχρόνια εφαρμογή.

Επιπλέον, ως θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθούν ουσίες που δρουν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων, όπως η διφωσφορική μεναδιόλη, η βιταμίνη C, το ηλεκτρικό οξύ, το συνένζυμο Q10 (CoQ10) καθώς και πολλές βιταμίνες και συμπαράγοντες, όπως το φολικό οξύ, η L-καρνιτίνη, κρεατινίνη και λιποϊκό οξύ. Αυτές οι ουσίες είναι φυσικές και ασφαλείς στις δόσεις που χορηγούνται στους ασθενείς.

Κατά τις διαταραχές της αναπνευστικής αλυσίδας υπερπαραγονται τοξικά προϊόντα, τα δραστικά είδη του οξυγόνου, ROS ( $H_2O_2$ , το  $O_2\cdot$  και  $\cdot OH$ ), τα οποία δεν μπορούν να απομακρυνθούν με τους φυσιολογικούς αμυντικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Η υπερπαραγωγή των ROS οδηγεί σε υπεροξειδωση των λιπιδίων, καταστροφή των μεμβρανών και αύξηση του ήδη υψηλού ρυθμού μεταλλάξεων του mtDNA. Οι «συλλέκτες» των ενεργών δραστικών ειδών του οξυγόνου, που χορηγούνται σε τέτοιες περιπτώσεις είναι: η βιταμίνη E, το συνένζυμο Q10, η γλουταθειόνη και το δίδρο-λιποϊκό οξύ. Θα μπορούσαν, επίσης, να χορηγηθούν αναστολείς των μιτοχονδριακών καναλιών ασβεστίου για να επαναφέρουν την ισορροπία της ομοιόστασης ασβεστίου.

Η γονιδιακή θεραπεία αφορά την αντικατάσταση ενός «ελαττωματικού» γονιδίου με το σωστό αλληλόμορφο του μέσα στα κύτταρα, είτε την εμφύτευση κυττάρων που φέρουν το φυσιολογικό DNA, με σκοπό την αναπλήρωση της ανεπάρκειας του οργανισμού στο αντίστοιχο γονιδιακό προϊόν. Η γονιδιακή θεραπεία για τις μιτοχονδριακές θεραπείες που προέρχονται από μεταλλάξεις του πυρηνικού DNA αντιμετωπίζει τα ίδια εμπόδια με τις προσπάθειες για γονιδιακή θεραπεία για τις μονογονιδιακές ασθένειες, όπως η έλλειψη ιδανικού φορέα, η ανοσογονικότητα των φορέων, το χαμηλό ποσοστό επιμόλυνσης των κυττάρων και η υπερέκφραση των γονιδίων ενδιαφέροντος. Για τις μιτοχονδριακές θεραπείες που προέρχονται από μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA, η γονιδιακή θεραπεία καθίσταται ακόμα πιο περίπλοκη, λόγω του φαινομένου της ετεροπλάσμιας, της

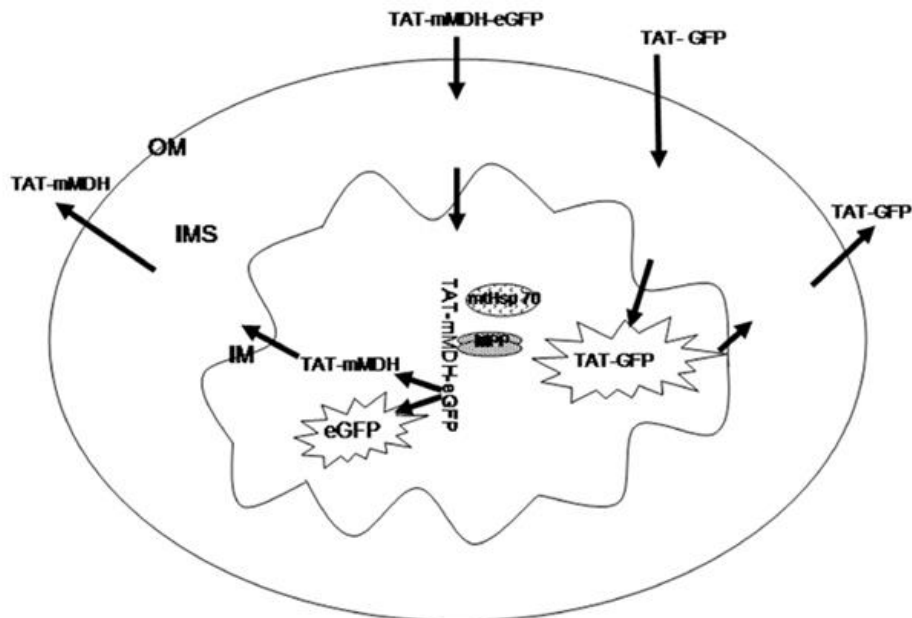
αναγκαιότητας για στόχευση αποκλειστικά των μιτοχονδρίων, τον εντοπισμό που δύναται να έχουν τα γονιδιακά προϊόντα στα διάφορα μιτοχονδριακά διαμερίσματα και λόγω του διαφορετικού μιτοχονδριακού γενετικού κώδικα. Καμία ερευνητική ομάδα μέχρι στιγμής δεν έχει καταφέρει να εισάγει DNA στα μιτοχόνδρια με κληρονομήσιμο τρόπο (*DiMauro, et al., 2006*).

### **A.3.13. Μεταγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια ως θεραπευτική προσέγγιση για μιτοχονδριακές διαταραχές:**

Η τεχνολογία πρωτεϊνικής μεταγωγής (Protein Transduction Domain Technology, PTDs), αφορά μακρομόρια-πρωτεΐνες που αδυνατούν να εισέλθουν στα κύτταρα και συνδέονται με δομές που έχουν τη δυνατότητα εισόδου στα κύτταρα, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η ενδοκυτταρική μεταφορά τους ως εξωτερικό φορτίο.

Οι πρωτεΐνες σύντηξης με το πεπτίδιο TAT έχει δειχτεί να διασχίζουν τις μεμβράνες των κυττάρων γρήγορα και αποτελεσματικά, να εισέρχονται μέσα στα κύτταρα σε κυτταροκαλλιέργειες, όπως και να εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς μετά από ενέσιμη χορήγησή τους στο ποντίκι (*Schwarze, et al., 1999*), να διατηρούν τη φυσιολογική τους δραστηριότητα και να μην είναι τοξικές. Έχει αναφερθεί επίσης, ότι σύντηξη του TAT με τη λυσοσωμική β-γλουκουρονιδάση, επιτυγχάνει την εισαγωγή της στα λυσοσωμάτια *in vitro* και *in vivo* (*Xia, et al., 2001*). Αυτή η διαπίστωση υποδεικνύει ότι η χρήση ειδικών αλληλουχιών-σημάτων για κάποιο οργανίδιο δίνει τη δυνατότητα εντόπισης της πρωτεΐνης σύντηξης με το TAT στο συγκεκριμένο οργανίδιο στόχο.

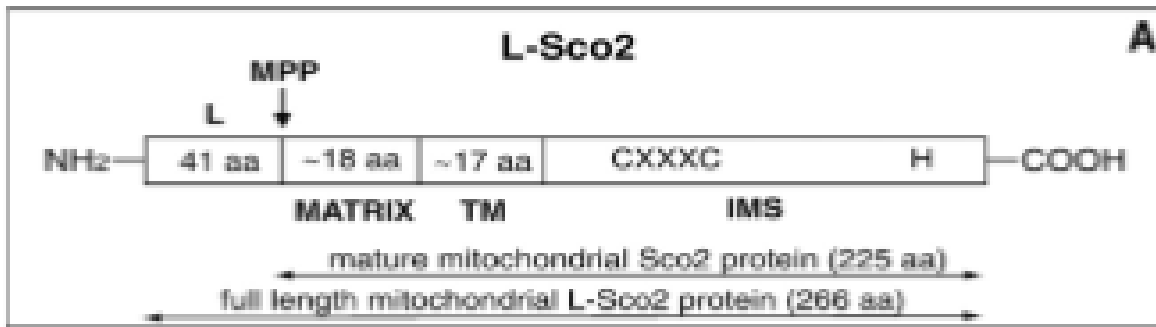
Στην περίπτωση της μεταγωγής πρωτεϊνών εντός των κυττάρων και τη μεταφορά τους στα μιτοχόνδρια, η σύντηξη με το πεπτίδιο μεταγωγής TAT, δίνει τη δυνατότητα η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη τόσο να εισέρχεται μέσα στα μιτοχόνδρια, όσο και να εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια, πάλι πίσω στο κυτταρόπλασμα. Εάν στην πρωτεΐνη σύντηξης με το TAT, ενσωματωθεί κατάλληλα μια σηματοδοτική αλληλουχία στόχευσης των μιτοχονδρίων, αφού εισέλθει εντός των κυττάρων των μιτοχονδρίων, θεωρητικά το TAT με τη σηματοδοτική αλληλουχία αποκόπτονται με πρωτεόλυση και η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος παραμένει εντός του μιτοχονδρίου.



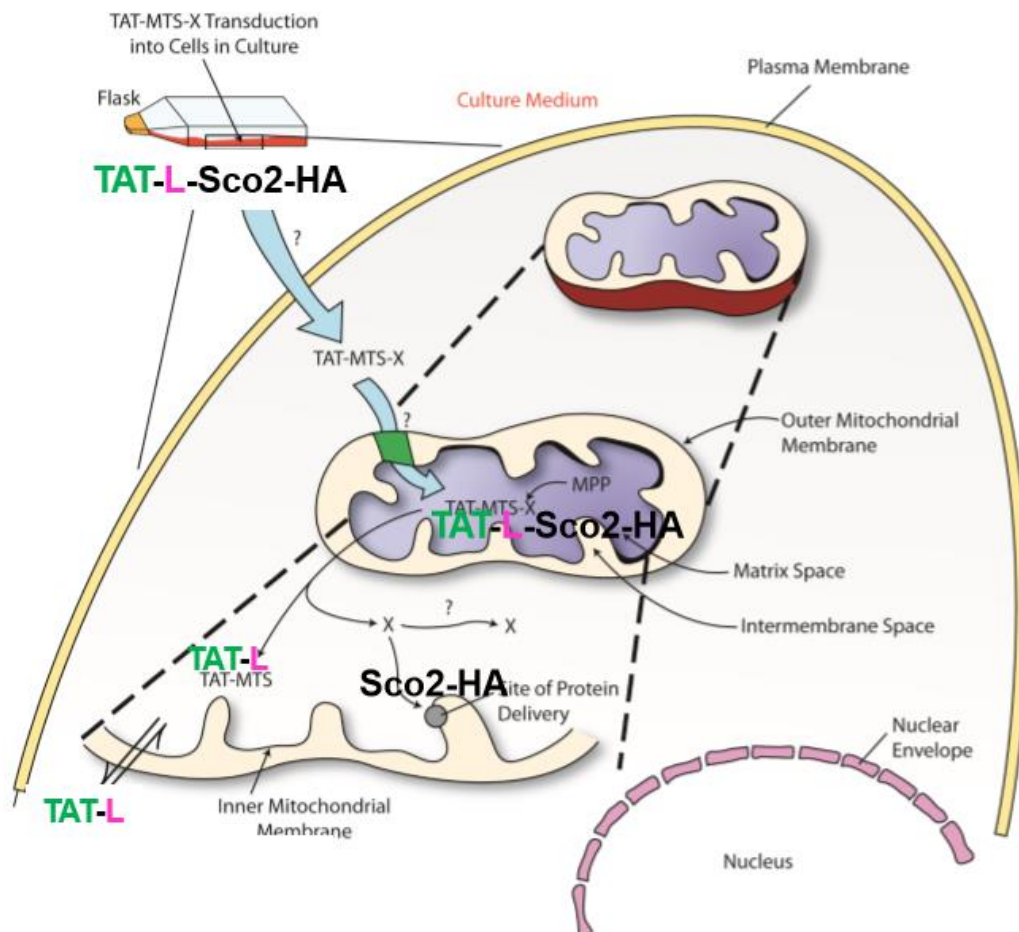
Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου της μεταγωγής πρωτεϊνών TAT-mMdh-GFP και TAT-mMdh στα μιτοχόνδρια (Del Gaizo και Payne, 2003).

Σε πειράματα μεταγωγής της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης TAT-Mmdh-GFP (Mmdh-μιτοχονδριακή σηματοδοτική αλληλουχία), η πρωτεΐνη εισέρχεται εντός του κυττάρου, ενώ πρωτεολύεται στα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα να αποκόπτεται η Mmdh και η GFP να παραμένει μέσα στα μιτοχόνδρια (Del Gaizo and Payne, 2003). Έπειτα από χορήγηση της ανασυνδρασμένης TAT-Mmdh-GFP σε ποντίκι, η GFP εντοπίστηκε μέχρι και 5 μέρες από τη χορήγηση, σε ιστούς όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, το ήπαρ και τα νεφρά. Επιπλέον, η GFP εντοπίστηκε στο κλάσμα απομονωμένων μιτοχονδρίων και όχι στο κλάσμα του κυτταροπλάσματος. Η ανασυνδρασμένη πρωτεΐνη φαίνεται ότι μπορεί να διαπεράσει και τον πλακούντα και να εντοπιστεί στα κύτταρα του εμβρύου, έπειτα από χορήγηση σε ποντίκι (Del Gaizo and Payne, 2003). Τα πειράματα αυτά προσφέρουν μια πολύ υποσχόμενη προοπτική για τη θεραπεία μιτοχονδριακών ασθενειών, ακόμα και από το στάδιο της κύησης.

Ένα από τα ενδιαφέροντα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας είναι η ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων για μιτοχονδριακές νόσους που σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της SCO2, μέσω της τεχνολογίας PTDs. Πιο συγκεκριμένα, το 2010, δημοσιεύθηκε η εργασία των Foltoroulou και συνεργάτες, στην οποία επιτεύχθηκε η ενδοκυτταρική μεταφορά της πλήρους μήκους ανασυνδρασμένης, ανθρώπινης, μιτοχονδριακής L-Sco2 (Σχήμα 2) πρωτεΐνης μέσα στα μιτοχόνδρια από κυτταρικές σειρές και σε κύτταρα από ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο της SCO2 (Foltoroulou et al., 2010).



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών της πλήρους μεγέθους ανθρώπινης μιτοχondριακής πρωτεΐνης L-Sco2. Το κάθετο βέλος υποδεικνύει τη θέση απομάκρυνσης της σηματοδοτικής αλληλουχίας (L) από τη μιτοχondριακή πεπτιδάση MPP.



Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση της μεταγωγής της ανασυνδυασμένης TAT-L-Sco2-HA σε κυτταροκαλλιέργειες. Η πρωτεΐνη εισέρχεται εντός των κυττάρων και λόγω της αλληλουχίας σηματοδότησης MTS, κατευθύνεται προς τα μιτοχόνδρια, όπου και πρωτεολύεται η MTS, με αποτέλεσμα η ανασυνδυασμένη Sco2-HA να παραμένει στα μιτοχόνδρια (modified from Papadopoulou L.C. and Tsiftoglou AS., 2011).

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Sco2, σε σύντηξη με το πεπτιδίο TAT, αλλά και με το επιτόπιο HA, για σκοπούς ανοσοανίχνευσης, αποδείχθηκε ότι εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων γλοιώματος U87-MG.

Επιπλέον, βρίσκεται σε εξέλιξη η μελέτη βιοκατανομής της βιοτεχνολογικά παραγόμενης ανθρώπινης ανασυνδυασμένης μιτοχονδριακής TAT-L-Sco2-HA πρωτεΐνης, με τη ραδιοεπισήμανσή της και με την *in vivo* μελέτη της ενδοκυττάριας μεταγωγής της, με χορήγηση σε ποντίκια, στα πλαίσια πρωτεϊνικής θεραπείας μεταβολικών γενετικών νόσων.

Ως συνέχεια της δουλειάς αυτής, η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είχε ως στόχο την κλωνοποίηση και την έκφραση της ανασυνδυασμένης L-Sco2 (χάριν συντομίας θα παραλείπεται το L), συντηγμένης με το πεπτιδίο μεταγωγής TAT, αλλά χωρίς το επιτόπιο HA, έτσι ώστε να είναι πιο κοντά στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη Sco2, με σκοπό την μεταγωγή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα, ως θεραπευτική προσέγγιση του φαινοτύπου της βρεφικής θανάσιμης καρδιομυοεγκεφαλοπάθειας, που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου SCO2.

#### **A.3.14. Σύνδεση Sco2 με το φαινόμενο Warburg και τον καρκίνο:**

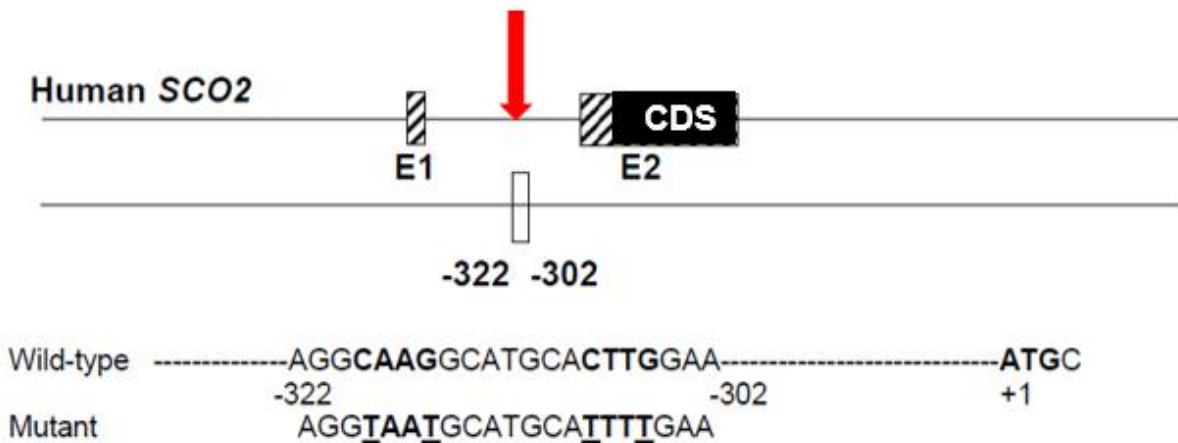
Μια θεμελιώδης ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων είναι η εκλεκτική εκμετάλλευση του μονοπατιού της γλυκόλυσης, σε σχέση με την αερόβια αναπνοή, για την παραγωγή του ATP. Επομένως, παρατηρείται μια εναλλακτική μεταβολική οδός, κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν διαφορετικά μεταβολικά χαρακτηριστικά: μετατόπιση του ισοζυγίου της παραγωγής ενέργειας προς τη γλυκολυτική οδό σε σχέση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Το 1931, ο γερμανός βιοχημικός Otto Warburg τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής, για τις εργασίες του σχετικά με τον οξειδωτικό μεταβολισμό. Σύμφωνα με τις μελέτες του, ο μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων διαφέρει σημαντικά από το μεταβολισμό των φυσιολογικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα αναγκάζονται να επιζήσουν σε συνθήκες υποξίας και χρησιμοποιούν λιγότερο οξυγόνο από τα φυσιολογικά, λόγω του αυξημένου ρυθμού γλυκόλυσης και μειωμένου αριθμού αερόβιας αναπνοής (Warburg, 1956). Οι παρατηρήσεις του Warburg, βέβαια, δεν ισχύουν πάντα και δεν είναι απόλυτες, μιας και η άποψη που επικρατεί σήμερα είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα μετατοπίζουν τα ισοζύγιο παραγωγής ενέργειας από τη γλυκολυτική οδό στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και αντίστροφα, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

Το γονίδιο SCO2 στο μονοπάτι του p53:

Η p53 έχει ή αντι-οξειδωτική ή προ-οξειδωτική δραστηριότητα, η οποία εξαρτάται από την έκταση των σημάτων στρες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η p53 επάγει την έκφραση πρωτεϊνών με αντιοξειδωτική δράση, όπως οι σεστρίνες 1 και 2, και οι πρωτεΐνες TIGAR, gpx1, ald4, gls2, και Parkin, ώστε τα επίπεδα των ROS στο κύτταρο να μειωθούν. Η αντιοξειδωτική δράση προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη του DNA. Επιπλέον, η p53 επάγει την p21, ώστε να σταθεροποιηθούν τα επίπεδα του Nrf2, ενός μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος επάγει την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων, για να μειώσει τα επίπεδα των ROS. Αντίθετα, υπό συνθήκες στρες, η p53 επάγει προ-οξειδωτικά γονίδια, όπως η Bax και η Puma, για να επάγει τα επίπεδα των ROS στα κύτταρα, γεγονός που υπερενεργοποιεί την p53, με αποτέλεσμα την άμεση απόπτωσή τους (Liang et al., 2013).

Παρατηρήθηκε ότι και μόνο η έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p53 αρκεί για να προκληθεί το φαινόμενο αυτό σε πολλές κυτταρικές σειρές. Ο μειωμένος ρυθμός αναπνοής ήταν εμφανής, ακόμη και σε επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού. Συγκεκριμένα, η αερόβια αναπνοή μελετήθηκε σε μιτοχόνδρια ήπατος, αγρίου τύπου (+/+), ετερόζυγα (-/-) και ομόζυγα για την έλλειψη της p53. (Matoba, et al., 2006).



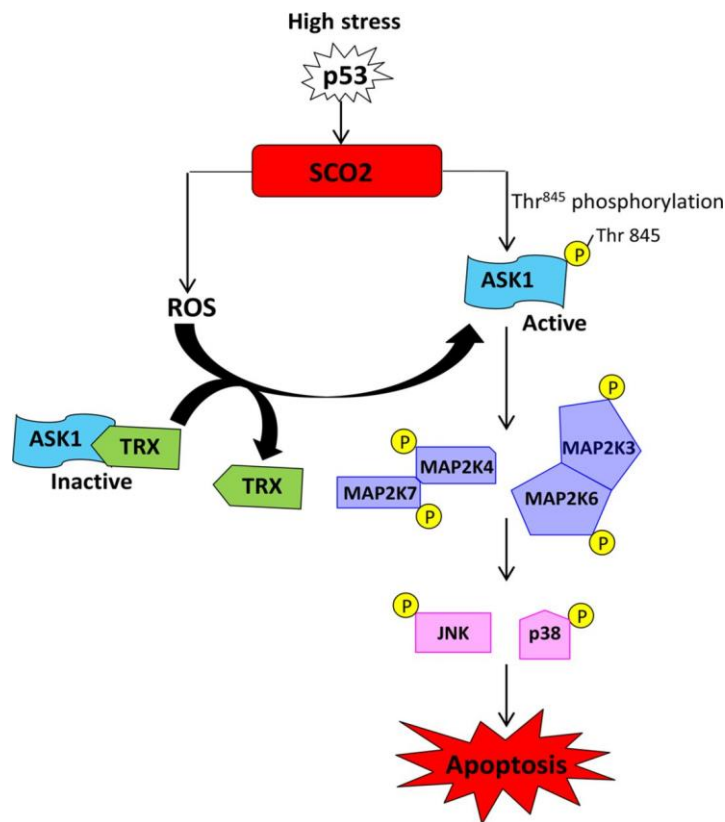
Εικόνα 30: Το p53 ρυθμίζει το μιτοχονδριακό μεταβολισμό, μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης της έκφρασης της Sco2 (Matoba, et al., 2006).

Για να εντοπιστούν οι στόχοι του p53 παράγοντα, οι οποίοι ενδεχομένως ευθύνονταν για αυτή τη μεταβολή στο μεταβολισμό, εξετάστηκαν πιθανά γονίδια, στόχοι του TP53 γονιδίου, που είχαν προβλεφθεί από μελέτες σειριακής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης. Ένα από αυτά είναι το γονίδιο SCO2. Το ανθρώπινο γονίδιο SCO2 αποτελείται από δύο εξώνια και ένα ιντρόνιο, αλλά η περιοχή CDS (coding sequence) βρίσκεται μόνο στο εξώνιο 2. Μέσα στο ιντρόνιο του γονιδίου SCO2 [-322 ως -302] περιλαμβάνεται θέση

πρόσδεσης της πρωτεΐνης p53 [p53 binding consensus site] (Matoba και συν, 2006). Επίσης, η έκφραση του SCO2 γονιδίου παρατηρήθηκε ότι ήταν μειωμένη σε κυτταρικές σειρές με μεταλλάξεις στο γονίδιο του TP53.

Η πρωτεΐνη Sco2 είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX). Θα ήταν αναμενόμενο τα επίπεδα μιας τέτοιας πρωτεΐνης να επηρεάζουν την αναπνευστική ικανότητα των κυττάρων. Πράγματι, η υπερέκφραση του SCO2 αυξάνει τον αναπνευστικό ρυθμό των κυττάρων. Επιπλέον, όπως συμβαίνει σε κύτταρα που φέρουν απαλοιφή στο γονίδιο TP53, με την απαλοιφή του γονιδίου SCO2 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με αγρίου τύπου μορφή της πρωτεΐνης p53, τα κύτταρα καθοδηγούνται προς το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης.

Επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων μέσω της Sco2:



Εικόνα 31: Μοντέλο που απεικονίζει το μηχανισμό της SCO2-επαγόμενης απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα και όγκους μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού ROS και του μονοπατιού της ASK-1 κινάσης (Esha Madan et al., Mol. Cell. Biol. 2013).

Αποδείχθηκε ότι η Sco2 λειτουργεί ως αποπτωτική πρωτεΐνη σε επίμυες με καρκίνο, παρέχοντας ένα εναλλακτικό μονοπάτι για την p53-διαμεσολαβούμενη απόπτωση. Η Sco2 επάγει φωσφορυλίωση της ASK-1 στη θρεονίνη 845, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κινάσων MAP 4 και 7 (MAP2K4/7) και MAP2K3/6. Η επιμόλυνση με

το  $SCO_2$  γονίδιο σε υποξικά καρκινικά κύτταρα και υποξικούς όγκους επάγει επίσης την απόπτωση (Εικόνα 31) (Madan et al., 2013) (Papadopoulou et al., 2013).

Η διατάραξη του ισοζυγίου του ενεργειακού μεταβολισμού στα καρκινικά κύτταρα, δηλαδή η μετατόπιση της ενεργειακής παραγωγής από την οξειδωτική φωσφορυλίωση προς τη γλυκόλυση, πιθανώς αποτελεί κλειδί για τη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, η  $SCO_2$  φαίνεται να εμπλέκεται στην εκδήλωση τη φαινομένου αυτού, αφού έλλειψη της έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης (που έχει κομβικό ρόλο στη λειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος c) έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να καθοδηγούνται προς το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης και επιπλέον, υπερέκφραση της  $SCO_2$  παρατηρήθηκε ότι οδηγεί σε ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών σε ποντίκια με καρκίνο.

Όλες αυτές οι παρατηρήσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι μια θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου θα ήταν η ενδοκυττάρια μεταγωγή της ανασυνδασμένης  $SCO_2$  πρωτεΐνης, στοχευμένα σε καρκινικά κύτταρα. Η αυξημένη ενδοκυττάρια μεταγωγή της  $SCO_2$  στα καρκινικά κύτταρα θα ενισχύσει τις δράσεις της πρωτεΐνης (ενεργοποίηση μονοπατιών απόπτωσης και μετατόπιση ενεργειακού ισοζυγίου προς την οξειδωτική φωσφορυλίωση) που ενδεχομένως έχει μειωμένη έκφραση στα κύτταρα αυτά.

**Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είχε σκοπό και την κλωνοποίηση και έκφραση της ανασυνδασμένης κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου της  $SCO_2$ , συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου TAT, για την ενδοκυττάρια μεταγωγή της, καθώς και με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του κατευθυνόμενου πεπτιδίου NGR.**

### **A.3.15. Στόχευση καρκινικών κυττάρων με κατευθυνόμενα πεπτιδία:**

Η αγγειογένεση, ο σχηματισμός δηλαδή νέων αιμοφόρων αγγείων, αποτελεί ένα κομβικό στάδιο στην ανάπτυξη στερεών όγκων. Τα αγγειογεννητικά αιμοφόρα αγγεία εκφράζουν ορισμένους δείκτες που είτε εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα είτε απουσιάζουν τελείως από τα φυσιολογικά αιμοφόρα αγγεία. Τέτοιοι δείκτες είναι οι ανβ3 και ανβ5 ιντεγκρίνες, ορισμένοι υποδοχείς για αυξητικούς παράγοντες αιμοφόρων αγγείων, μεταλλοπρωτεάσες της μήτρας και άλλου τύπου μόρια, όπως οι μεγάλοι μοριακού βάρους μεταλλοπρωτεάσες. Οι υποδοχείς για αυξητικούς παράγοντες αιμοφόρων αγγείων και οι ιντεγκρίνες δεν αποτελούν μόνο δείκτες για την αγγειογένεση αλλά παίζουν και σημαντικό, λειτουργικό ρόλο στη διαδικασία (Ferrara, et al., 1999).

Οι βιβλιοθήκες πεπτιδίων σε φάγο χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μελέτη πεπτιδικών αλληλουχιών, που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς. Οι δοκιμές ελέγχου (screening) *in vivo* σε βιβλιοθήκες φάγων, σε κύτταρα από όγκους σε ποντίκια, αποδείχθηκαν χρήσιμες για τη διαλογή πεπτιδίων ικανών να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που εκφράζονται σε



αιμοφόρα αγγεία που σχετίζονται με όγκους και που αυτοκατευθύνονται σε νεοπλασματικούς ιστούς (Arap, et al., 1998, Science).

**Τα κατευθυνόμενα (homing) πεπτιδία** συντηγμένα με αντικαρκινικά φάρμακα έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Προωθούν τη μεταφορά και την ενδοκυτταρική πρόσληψη ποικίλων φορτίων (φάρμακα, ολιγονουκλεοτίδια και νανοσωματίδια).
2. Εμφανίζουν ελάχιστες μη-στοχευμένες επιπτώσεις.
3. Οδηγούν στην επίτευξη βέλτιστης κατανομής των θεραπευτικών μορίων σε ασθενείς ιστούς.

Ανάμεσα σε ένα μεγάλο εύρος πεπτιδίων στόχευσης όγκων, το **NGR (ασπαραγίνη – γλυκίνη – αργινίνη) πεπτιδίο** αποδείχθηκε ότι είναι ικανό να μεταφέρει μια μεγάλη «γκάμα» από αντι-καρκινικούς προσδέτες, όπως χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αποπτωτικά πεπτιδία και κυτοκίνες σε αιμοφόρα αγγεία όγκων. Έχει αποδειχθεί ότι ένα αυτοκατευθυνόμενο πεπτιδίο με ένα αντικαρκινικό φάρμακο μπορεί να έχει αυξημένη αποτελεσματικότητα ενάντια σε καρκινικά κύτταρα, αλλά ελάχιστη τοξικότητα στους φυσιολογικούς ιστούς ποντικών (Ellerby et al., 1999).

Πεπτιδία που φέρουν στην αλληλουχία τους το μοτίβο NGR προσδένονται στην **αμινοπεπτιδάση N (APN)** ή CD13 (Shipp, M. A et al., 1993). Η APN είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, εξαρτώμενη από ψευδάργυρο ( $Zn^{2+}$ ), μοριακού βάρους 140kDa, η οποία εκφράζεται σε διάφορα επιθηλιακά κύτταρα στερεών όγκων και σε μακροφάγα. Το ένζυμο αυτό αποικοδομεί πρωτεΐνες και πεπτιδία με ουδέτερα κατάλοιπα στο άμινο-τελικό τους άκρο. Φαίνεται ότι παίζει ρόλο στη διαδικασία των χημειοκινών και στην ογκογένεση (Saiki, et al., 1993). Τα μόνα κύτταρα αιμοφόρων αγγείων με ανιχνεύσιμη έκφραση APN είναι τα αιμοφόρα αγγεία αγγειογεννητικών όγκων. Επιπλέον, ανταγωνιστές της APN παρουσιάζονται ως αντι-αγγειογεννητικοί *in vivo*.

Το NGR μοτίβο έχει συντηχθεί με δοξορουβικίνη και με τον TNF $\alpha$ , αυτοκατευθυνόμενο με επιτυχία σε αγγειογενετικούς όγκους (Gregorc et al., 2010). Σε πρόκλινικα μοντέλα, το σύμπλοκο NGR-TNF έχει βρεθεί ότι έχει 10 τάξεις περισσότερη δραστικότητα ως φάρμακο από τον TNF- $\alpha$  και ήταν ενδιαφέρον ότι επέδειξε μια διφασική (σε σχήμα U) δόσοεξαρτώμενη καμπύλη, με αντικαρκινική δραστικότητα να παρατηρείται ακόμα και σε χαμηλές δόσεις (0.005 $\mu$ g/kg). Αυτή η δόση αντιστοιχεί στα 0.2  $\mu$ g/m<sup>2</sup> στον άνθρωπο, η οποία έχει επιλεχθεί ως αρχική δόση στη φάση I για κλινικές δοκιμές.

**Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία**, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι κλωνοποίησης και παραγωγής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με το πεπτιδίο NGR, σε σύντηξη με την αλληλουχία της Sco2 και με το πεπτιδίο TAT, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ενδοκυττάρια μεταγωγή της ανασυνδυασμένης Sco2 πρωτεΐνης, στοχευμένα σε καρκινικά κύτταρα, ως πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για την αναστροφή του καρκινικού φαινοτύπου, μέσω μετατόπισης του μεταβολικού ισοζυγίου προς την οξειδωτική φωσφορυλίωση.

## ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή αυτή εργασία έγινε εφαρμογή των μεθόδων κλωνοποίησης με τη βοήθεια της Τεχνολογίας Πρωτεϊνικής Μεταγωγής (Protein Transduction Domain Technology), με στόχο την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, συντηγμένων με το TAT (το πιο κοινό PTD πεπτίδιο), για να έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να μεταβιβάζονται στο εσωτερικό ευκαρυωτικών κυττάρων σε καλλιέργειες, ως εναλλακτική θεραπεία για δύο διαφορετικά νοσήματα: για την α-θαλασσαιμία και για τη μιτοχονδριακή καρδιοεγκεφαλομυοπάθεια που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της *SCO2*.

**A.** Αναφορικά με την ανάπτυξη τεχνολογίας μεταφοράς, μέσω PTDs, της ανασυνδυασμένης α-σφαιρίνης, συντηγμένης με το πεπτίδιο TAT, στο εσωτερικό ευκαρυωτικών κυττάρων, στα πλαίσια της θεραπευτικής προσέγγισης σοβαρών μορφών α-θαλασσαιμίας, έγινε:

- Σχεδιασμός γενετικά ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα, που φέρει την νουκλεοτιδική αλληλουχία της κωδικής αλληλουχίας (CDS) της *α-σφαιρίνης<sub>WT</sub>* (*HBA1/2*).
- Σχεδιασμός γενετικά ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα, που φέρει την νουκλεοτιδική αλληλουχία της κωδικής αλληλουχίας (CDS) της *α-σφαιρίνης<sub>WT</sub>*, συντηγμένης με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των πεπτιδίων TAT (11αα) ως PTD και HA (9αα), για την παρακολούθηση της πορείας της πρωτεΐνης TAT-α σφαιρίνη-HA, μέσα στα κύτταρα με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HA.
- Σχεδιασμός γενετικά ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα, που φέρει την νουκλεοτιδική αλληλουχία της κωδικής αλληλουχίας (CDS) της *α-σφαιρίνης<sub>WT</sub>*, συντηγμένης με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία HA (9αα), για τη χρήση της πρωτεΐνης α-σφαιρίνη-HA ως control, στα πειράματα με την πρωτεΐνη TAT-α σφαιρίνη-HA.
- Παραγωγή και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAT-α σφαιρίνη-HA και α σφαιρίνη-HA.
- Επώαση K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες TAT-α-σφαιρίνη-HA και α-σφαιρίνη-HA και μελέτη της ενδοκυττάριας μεταγωγής τους.

**B.** Από τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας έχει ήδη επιτευχθεί η ενδοκυτταρική μεταφορά, μέσω PTDs, της φυσιολογικής πρωτεΐνης Sco2 (L-Sco2 πλήρους μήκους – χάριν συντομίας θα αναφέρεται Sco2), συντηγμένης με τις αλληλουχίες από το πεπτίδιο TAT και το πεπτίδιο HA, στα μιτοχόνδρια θηλαστικών κυττάρων στα πλαίσια της θεραπευτικής προσέγγισης της θανάσιμης βρεφικής καρδιοεγκεφαλομυοπάθειας λόγω μεταλλάξεων στο *SCO2* γονίδιο, (*Foltopoulou P.F., Tsiftoglou A.S, Bonovolias I.D., Ingendoh A.S. και Papadopoulou L.C.(2010) Intracellular Delivery of Full Length*

*Recombinant Human Mitochondrial L-Sco2 Protein into the Mitochondria of Permanent Cell Lines and SCO2 Deficient Patient's Primary Cells. Bioch. Biophys. Acta).*

**Ως συνέχεια της δουλειάς αυτής**, επιδιώχθηκε η κλωνοποίηση και η έκφραση της αλληλουχίας της *SCO2*, συντηγμένης με το πεπτιδίο TAT, αλλά **χωρίς την αλληλουχία HA**, η οποία χρησιμοποιούνταν για σκοπούς ανοσοανίχνευσης. Η TAT-SCO2 απαλλαγμένη από το HA, αποτελεί μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, πιο κοντά στη φυσιολογική, για τη περαιτέρω χρήση της ως θεραπευτική αντιμετώπιση της θανάσιμης βρεφικής καρδιοεγκεφαλομυοπάθειας λόγω μεταλλάξεων στο *SCO2* γονίδιο.

Επιπλέον, έγινε η κλωνοποίηση του πλήρους μεγέθους *SCO2* γονιδίου, συντηγμένου με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου TAT (11aa) ως PTD **και με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία (9 nt) του πεπτιδίου NGR (3 aa)**, με σκοπό τη στοχευμένη καθοδήγηση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης TAT-SCO2 στα μιτοχόνδρια καρκινικών κυττάρων.

Για το σκοπό αυτό έγινε:

- Σχεδιασμός γενετικά ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα, που φέρει το cDNA του πλήρους μεγέθους *SCO2* γονιδίου (L-SCO2, 266aa), συντηγμένου με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου TAT (11aa) ως PTD.
- Σχεδιασμός γενετικά ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα, που φέρει το cDNA του πλήρους μεγέθους *SCO2* γονιδίου (L-SCO2, 266aa), συντηγμένου με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου TAT (11aa) ως PTD και με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου NGR (3aa).
- Παραγωγή και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR.
- Επώαση K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR και μελέτη της ενδοκυττάριας μεταγωγής τους – μεταφοράς τους στα μιτοχόνδρια με πειράματα υποκυτταρικής κατανομής.

## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### B.1. ΥΛΙΚΑ

#### B.1.1. Χημικά αντιδραστήρια – Χρωστικές -Απορρυπαντικά:

Κατηγορία Υλικού	Υλικό	Εταιρία
Χημικά αντιδραστήρια	Ακρυλαμίδιο	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Αναστολείς πρωτεασών	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Bis-ακρυλαμίδιο (N,N,N,N μεθύλενο- δις ακρυλαμίδιο)	
	EDTA (μέτα νατρίου άλας του αιθυλενο-διάμινο- τετραοξικό οξέος)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	SDS (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	DEPC (πυροκαρβονικός διαιθυλεστέρας)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Tris- Base[ τρις- (υδρόξυμέθυλο)- άμινομεθάνιο]	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	X-gal (5- βρώμο-4- χλώρο3-ινδολυλ-β-D- γαλακτοσιδάση)	AppliChem.GmbH (Germany)
	IPTG (ισοπρόπυλ- θειο- β- D- γαλακτοσιδάση)	AppliChem.GmbH (Germany)
	Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4)	GIBCO-Invitrogen Life Technologies Inc. (Sco2tland)
	Αγαρόζη	Invitrogen Life Technologies Inc. (Sco2tland)
	MOPS (3-(N- μορφόλινο) προπτανοσουλφονικό οξύ	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	DMSO (διμεθυσουλφοξειδίο)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)

	TEMED (N,N,N,N-τετραμέθυλο-αιθυλένο-διαμίνη)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	L-Αργινίνη	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
<b>Κατηγορία Υλικού</b>	<b>Υλικό</b>	<b>Εταιρία</b>
<b>Χρωστικές</b>	Brilliant Blue R-250	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Trypan Blue 0,4%	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Αντιδραστήριο Bradford	BIO-RAD Laboratories Inc. (U.S.A.)
	BCIP (βρώμο-χλώρο-ινδόλυλο-φωσφορικό)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	NBT (κυανούν του νιτροτετραζολίου)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)

<b>Κατηγορία Υλικού</b>	<b>Υλικό</b>	<b>Εταιρία</b>
<b>Απορρυπαντικά</b>	Tween 20	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Nonidet P-40	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Triton X-100	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)

### **B.1.2. Θρεπτικά Υλικά – Όροι – Αντιβιοτικά:**

<b>Κατηγορία Υλικού</b>	<b>Υλικό</b>	<b>Εταιρία</b>
<b>Θρεπτικά Υλικά Βακτηριοκαλλιιεργειών</b>	Τρυπτόνη (Tryptone)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
<b>Θρεπτικά Υλικά Κυτταροκαλλιιεργειών</b>	RPMI-1640	GIBCO-Invitrogen Life Technologies Inc. (Sco2tland)
	OptiMEM®I	GIBCO-Invitrogen Life Technologies Inc. (Sco2tland)
<b>Όρος</b>	FBS (ορός εμβρύου μόσχου)	GIBCO-Invitrogen Life Technologies Inc. (Sco2tland)
<b>Αντιβιοτικά</b>	Αμπικικιλίνη	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.) GIBCO-Invitrogen Life Technologies Inc. (Sco2tland)
	Στρεπτομυκίνη	GIBCO-Invitrogen Life Technologies Inc. (Sco2tland)
	Πενικιλίνη	GIBCO-Invitrogen Life Technologies Inc. (Sco2tland)
	Τετρακυκλίνη	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)

**B.1.3. Ένζυμα – Μάρτυρες:**

Κατηγορία Υλικού	Υλικό	Εταιρία
DNA πολυμεράσες για PCR	DNA polymerase	Invitrogen Life Technologies Inc. (U.S.A.)
	DNA polymerase	New England Biolabs (NEB)
Ένζυμα	T4 Λιγάση του DNA	TAKARA Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan)
	Αλκαλική φωσφατάση CIAP	TAKARA Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan)
	DNase I	TAKARA Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan)
	RNase (απαλλαγμένης από DNase)	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Λυσοζύμη	SIGMA Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
	Prime Script™ Αντίστροφη Μεταγραφάση (Reverse Transcriptase)	TAKARA Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan)
	Ενδονουκλεάση περιορισμού NdeI	New England Biolabs Inc.
	Ενδονουκλεάση περιορισμού XhoI	New England Biolabs Inc.
	Ενδονουκλεάση περιορισμού NcoI	New England Biolabs Inc.
	Ενδονουκλεάση περιορισμού HindIII	New England Biolabs Inc.
	Ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI	TAKARA Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan)
Μάρτυρες για το προσδιορισμό του μοριακού βάρους τμημάτων DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	100bp DNA Ladder	NIPPON Genetics EUROPE GmbH
	1kb DNA Ladder	NIPPON Genetics EUROPE GmbH
Μάρτυρες για το προσδιορισμό της μοριακής μάζας πρωτεϊνικών μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE	Proscieve color protein markers	Cambrex Life Science Corp. (U.S.A.)

**B.1.4. Βακτηριακοί φορείς:**

Κατηγορία	Πλασμιδιακός φορέας	Εταιρία
TA cloning	pCR <sup>®</sup> 2.1	Original TA Cloning <sup>®</sup> Kit, Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.
TA TOPO cloning	pCR <sup>®</sup> II-TOPO	TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit, Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.
“Sticky ends” cloning	pet16b	Novagen Biosciences, Inc., Germany *

\*Ο πλασμιδιακός φορέας pET16b είχε παραχωρηθεί στην κ. Παπαδοπούλου Λευκοθέα από τον Dr. Παναγιωτίδη Χρήστο (Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Φαρμακευτικής, ΑΠΘ).

**B.1.5. Βακτηριακά στελέχη:**

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *E. coli*:

Βακτηριακό στέλεχος	Τύπος κλωνοποίησης	Εταιρία
INVaF'	TA cloning	Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.
TOP10F'	TA cloning, TOPO TA cloning	Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.
C43 (DE3)	“Sticky ends” cloning	Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.

**B.1.6. Αντισώματα:**

Αντίσωμα	Ζώο στο οποίο παράγεται	Κλωνικότητα	Εταιρία	Χρησιμοποιήθηκε έναντι της πρωτεΐνης
anti-HA.IgG	Ποντίκι	μονοκλωνικό	Molecular Probes - Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.	alpha globin-HA
				TAT-alpha globin-HA
anti-Hemoglobin α.IgG	Κουνέλι	πολυκλωνικό	Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.	alpha globin-HA
				TAT-alpha globin-HA
anti-Sco2.IgG	Κουνέλι	πολυκλωνικό	Dr. Papadopoulou / Dr. Pappas *	TAT-Sco2
				TAT-Sco2-NGR

<b>anti-mouse IgG-Ap</b>	Κατσίκια	-	Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.	alpha globin-HA
				TAT-alpha globin-HA
<b>anti-rabbit IgG-Ap</b>	Κατσίκια	-	Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.	alpha globin-HA
				TAT-alpha globin-HA
				TAT-Sco2
				TAT-Sco2-NGR

\*Το πολυκλωνικό αντίσωμα, που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών TAT-Sco2 και TAT-Sco2-NGR, αναπτύχθηκε από την Dr. Παπαδοπούλου Λευκοθέα (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ.) και τον Dr. Παππά Ιωάννη (Αναπληρωτή Καθηγητή στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) στο εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ.

### **B.1.7. Κυτταροκαλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων:**

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών K562 κυττάρων. Πρόκειται για ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν αρχικά από τους Lozzio και Lozzio (Lozzio and Lozzio, 1975). Προέρχονται από πλευρικό υγρό ασθενούς γυναίκας, η οποία βρισκόταν σε τελικό στάδιο Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (Chronic Myelogenous Leukaemia – CML). Είναι κύτταρα εν αιωρήσει και το θρεπτικό στο οποίο αναπτύσσονται είναι το RPMI 1640. Για τη διατήρηση των κυττάρων σε εκθετική φάση ανάπτυξης, οι καλλιέργειες αραιώνονται κάθε 48-72 ώρες με φρέσκο θρεπτικό υγρό. Διατηρούνται στην εκθετική φάση στους 37°C, σε 5% CO<sub>2</sub> και σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα.

Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας:

<b>RPMI 1640 supplemented with 2mM Glutamine</b>
<b>10% Fetal Bovine Serum (FBS)</b>
<b>1% Streptomycin (1μg/ml)</b>
<b>1% Penicillin (1U/ml)</b>





Εικόνα 32: Κύτταρα K562, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο σε συγκέντρωση  $10^5$  κύτταρα/ml.

## B.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### **B.2.1. Επεξεργασία RNA με DNAση:**

Για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA απαιτείται ως εκμαγείο ένα μόριο DNA. Το DNA που χρησιμοποιείται αποτελεί προϊόν της αντίδρασης της Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR), της μετατροπής δηλαδή του RNA σε cDNA. Για να θεωρηθεί το RNA κατάλληλο εκμαγείο για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής πρέπει να καθαριστεί από τυχόν DNA ίχνη που υπάρχουν στο δείγμα και θα μπορούσαν να δράσουν ανασταλτικά στην αντίδραση. Η επεξεργασία του mRNA γίνεται με τη βοήθεια του kit TURBO DNA-free-DNase treatment, της Ambion-life technologies.

Το kit αυτό περιέχει μια ισχυρή ανασυνδυασμένη δεοξυριβονουκλεάση (DNάση), το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα και τον κατάλληλο παράγοντα απενεργοποίησης του ενζύμου. Σε περίπτωση που το παρασκεύασμα του RNA περιέχει γονιδιακό DNA, μπορεί να γίνει κατεργασία με δεοξυριβονουκλεάση (DNase). Ο παράγοντας απενεργοποίησης της DNάσης απομακρύνει τόσο το ένζυμο, όσο και τα δισθενή κατιόντα που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα, αφήνοντας το RNA κατάλληλο για τις επόμενες αντιδράσεις. Επιπλέον, μειώνει την ανάγκη για θέρμανση των δειγμάτων για την απενεργοποίηση του ενζύμου ή για την προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης EDTA.

Για το σκοπό αυτό, γίνεται προσθήκη του ενζύμου σε αναλογία 0.2 units ανά 2 μg εκμαγείου.

<b>Placenta mRNA</b>	<b>Έως 10μg</b>
<b>Turbo Buffer 10X</b>	<b>1X</b>
<b>Turbo DNase</b>	<b>1μl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Έως 50μl</b>

Αρχικά, προστίθεται το 10X Turbo DNase Buffer και 1μl από την Turbo DNase στο RNA και αναδεύονται ήπια. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20-30 λεπτά. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 1X του παράγοντα απενεργοποίησης της DNάσης (Dnase Inactivation Reagent), πολύ καλή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, αναδεύοντας τρεις φορές κατά τη διάρκεια της επώασης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στις 11.000xg και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάκι erppendorf. Εάν η ποσότητα του αρχικού RNA αντιστοιχεί σε 10μg, αναμένεται να προκύψει RNA συγκέντρωσης ~7 μg.

### **B.2.2. Υπολογισμός της απόδοσης απομόνωσης και της καθαρότητας του RNA:**

Η απόδοση της απομόνωσης προσδιορίζεται φωτομετρικά με τη χρήση του οργάνου NanoDrop™ 2000/2000c-spectro-φωτόμετρο μικροποσοτήτων.

Υπολογίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm, όπου μια μονάδα απορρόφησης ( $A_{260}$ ) ισοδυναμεί με 40  $\mu\text{g/ml}$  μονόκλωνου RNA ( $1 A_{260}\text{unit} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$ ). Το RNA για να θεωρηθεί καθαρό δεν πρέπει να περιέχει προσμίξεις DNA ή πρωτεϊνών. Το καθαρό RNA έχει λόγο  $A_{260}/A_{280} = 2$ . Όταν ο λόγος αυτός είναι μεταξύ 1.7-2.0 τότε το RNA θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας. Αν ο παραπάνω λόγος είναι πολύ διαφορετικός συνίσταται επανεκχύλιση του RNA με συνέπεια χαμηλή απόδοση στην απομόνωση.

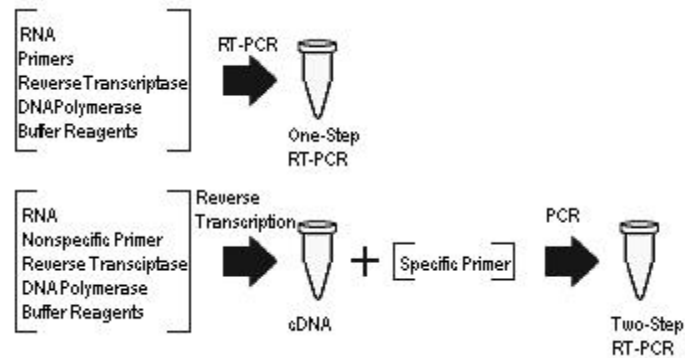
### **B.2.3. Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR):**

Η τεχνική PCR μπορεί να εφαρμοστεί και για τη γονιδιακή επέκταση RNA. Επειδή όμως, οι θερμοανθεκτικές πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της βασικής PCR απαιτούν ένα εκμαγείο DNA, πρέπει πρώτα το RNA μετατραπεί σε συμπληρωματικό του DNA (cDNA).

Κατά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription), το RNA εκμαγείο μετατρέπεται αρχικά σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA-cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Ακολούθως το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για εκθετική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του με PCR (Polymerase Chain Reaction).

Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση. Για να αρχίσει να δημιουργεί cDNA έχοντας ως ικρίωμα το ολικό ώριμο mRNA, η αντίστροφη μεταγραφάση απαιτεί ορισμένους εκκινητές με ελεύθερο το 3'-OH που θα υβριδιστούν πάνω στο mRNA. Υπάρχουν δυο ευρέως χρησιμοποιούμενα είδη ανάστροφης μεταγραφάσης, η μια προέρχεται από ιό μυελοβλάστωσης πτηνών (AMV) και η άλλη από ιό της λευχαιμίας Moloney ποντικών (M-MLV).

Η RT-PCR μπορεί να επιτευχθεί ως αντίδραση «ενός βήματος» (one-step) ή «δύο βημάτων» (two-step). Στην προσέγγιση σε ένα βήμα, όλη η αντίδραση από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την ενίσχυση με PCR γίνεται σε ένα μόνο σωληνάκι, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται το πειραματικό λάθος, αφού όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις διενεργούνται σε ένα ενιαίο περιβάλλον. Ωστόσο, τα αρχικά εκμαγεία RNA είναι επιρρεπή στην αποικοδόμηση στην «ενός βήματος» προσέγγιση, μέθοδος που δεν συνίσταται όταν απαιτούνται επαναλαμβανόμενες δοκιμασίες από ένα δείγμα. Επιπλέον, η «ενός βήματος» προσέγγιση έχει αναφερθεί ως λιγότερο ακριβής σε σύγκριση με την αντίδραση RT-PCR σε δύο βήματα. Το μειονέκτημα της αντίδρασης σε δύο βήματα είναι η επιδεκτικότητα σε επιμόλυνση, λόγω της συχνότερης χρήσης του δείγματος.



Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της Αντίστροφης Μεταγραφής σε ένα και σε δύο βήματα.

Όπως υποδηλώνει το όνομα, η «two-step» RT-PCR διεξάγεται σε δύο βήματα. Πρώτα η αντίστροφη μεταγραφή και στη συνέχεια η ενίσχυση με PCR. Η μέθοδος αυτή είναι πιο ευαίσθητη από την αντίστοιχη «one-step». Οι εκκινητές για την «two-step» RT-PCR δεν είναι απαραίτητο να είναι εξειδικευμένοι για μια αλληλουχία, αλλά τυχαίοι.

#### Βήμα 1:

1. Συνδυασμός του εκμαγείου RNA, των τυχαίων εκκινητών (primers), του μίγματος με dNTPs (δεοξυνουκλεοτίδια) και H<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από νουκλεάσες, σε ένα σωληνάκι για PCR.
2. Προσθήκη αναστολέα Rnaσών και του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.
3. Τοποθέτηση του σωληναρίου PCR στον θερμοκυκλοποιητή για ένα κύκλο, στον οποίο συμπεριλαμβάνονται: ο υβριδισμός, η επέκταση και η απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

#### Βήμα 2:

1. Προσθήκη «master mix» που περιέχει: ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Taq Πολυμεράση και H<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από νουκλεάσες, σε ένα σωληνάκι για PCR.
2. Προσθήκη των κατάλληλων εκκινητών.
3. Τοποθέτηση του σωληναρίου PCR στον θερμοκυκλοποιητή για ~30 κύκλους για το πρόγραμμα της ενίσχυσης, το οποίο περιλαμβάνει τρία βήματα: αποδιάταξη-υβριδισμός-επιμήκυνση.
4. Τα προϊόντα της αντίδρασης RT-PCR μπορούν να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Για την Παρασκευή του cDNA χρησιμοποιείται το kit Prime Script™ RT Reagent kit και περίπου 0,5μg RNA. Οι εναλλαγές στη θερμοκρασία γίνονται με το θερμοκυκλοποιητή PCR, της Thermo Fisher Scientific, στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας 304, με το πρόγραμμα που περιγράφεται πιο κάτω:

<b>Oligo dT Primer</b>	<b>50μM → 25pmol/rxn</b>
<b>Random 6mers</b>	<b>100μM → 50pmol/rxn</b>
<b>RNA</b>	500ng/μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Up to 7,5μl

Ακολουθεί θέρμανση στους 70°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια ακολουθεί ήπιο spin (~2.500g για ~1min) και αμέσως τοποθέτηση στον πάγο για να γίνει ο υβριδισμός του RNA. Ακολούθως γίνεται προσθήκη:

<b>PrimeScript Buffer</b>	<b>5X → 1X</b>
<b>PrimeScript Enzyme Mix</b>	0,5μl
<b>Total volume:</b>	10μl

Η αντίδραση συνεχίζεται 37°C για 15 λεπτά για να δράσει η αντίστροφη μεταγραφάση, στους 85°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου και στους 4°C για 10 λεπτά για το τέλος της αντίδρασης. Ακολουθεί spin και αποθήκευση του νεοσυντιθέμενου cDNA στους -20°C.

#### **B.2.4. PCR (Polymerase Chain Reaction):**

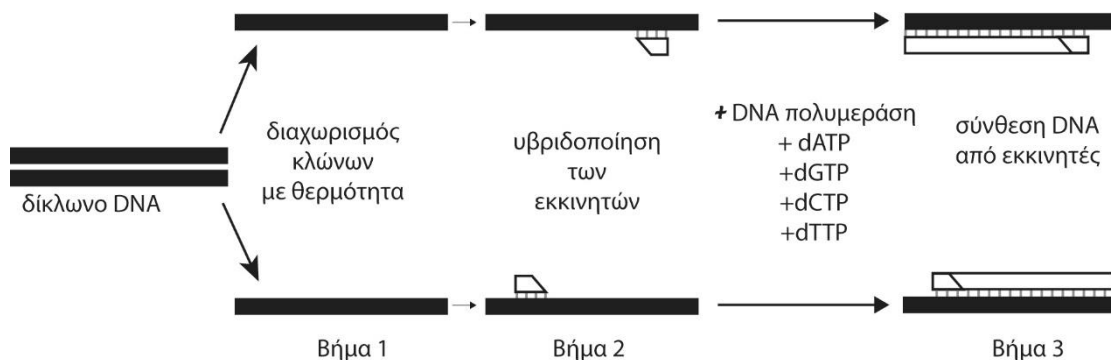
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια επαναστατική τεχνική *in vitro* σύνθεσης πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA (DNA στόχος) με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων. Η τεχνική αυτή μιμείται το φυσιολογικό μηχανισμό του κυττάρου για τον πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων DNA με τρόπο γρήγορο και αξιόπιστο. Η μεγάλη της αξία στηρίζεται στο ότι είναι μέθοδος γρήγορη, απλή, μικρού κόστους, αυτοματοποιημένη και απαιτεί μόνο ελάχιστες ποσότητες δείγματος. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι η ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία της. Η τεχνική αναπτύχθηκε το 1984 από τον Dr. Kary Banks Mullis, ερευνητή της εταιρείας Cetus Corporation, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1993 για τη συνεισφορά του αυτή.

Με την τεχνική PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση *in vitro* ενός τμήματος DNA. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, το DNA στόχος πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κλώνων της αντίδρασης.

Το DNA στόχος που πρόκειται να ενισχυθεί, προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με DNA πολυμεράση, τους εκκινητές (primers), δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), ρυθμιστικό

διάλυμα αντίδρασης και μαγνήσιο, και υπόκεινται σε μια εναλλαγή θερμοκρασιών. Το DNA στόχος είναι αυτό που θα αποτελέσει το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αφετηρία τους εκκινητές, δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον έναν κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αρχικά το DNA-στόχος μετουσιώνεται, με θέρμανση περίπου στους 95°C, για 15sec – 2min. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι του DNA αποχωρίζονται ο ένας από τον άλλον.
2. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται στους 40-60°C για 30-60 sec. Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές προσδένονται με τους κλώνους του DNA στόχου.
3. Ξεκινά η σύνθεση του νέου κλώνου του DNA, με την προσθήκη νουκλεοτιδίων, από το ένζυμο DNA πολυμεράση, στο 3'-άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Η διαδικασία της επιμήκυνσης διαρκεί 1-2 min και πραγματοποιείται στους 74°C.



**Εικόνα 34:** Στάδια που ακολουθούνται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου αντίδρασης PCR:

Bήμα 1: Μετουσίωση δίκλωνου DNA.

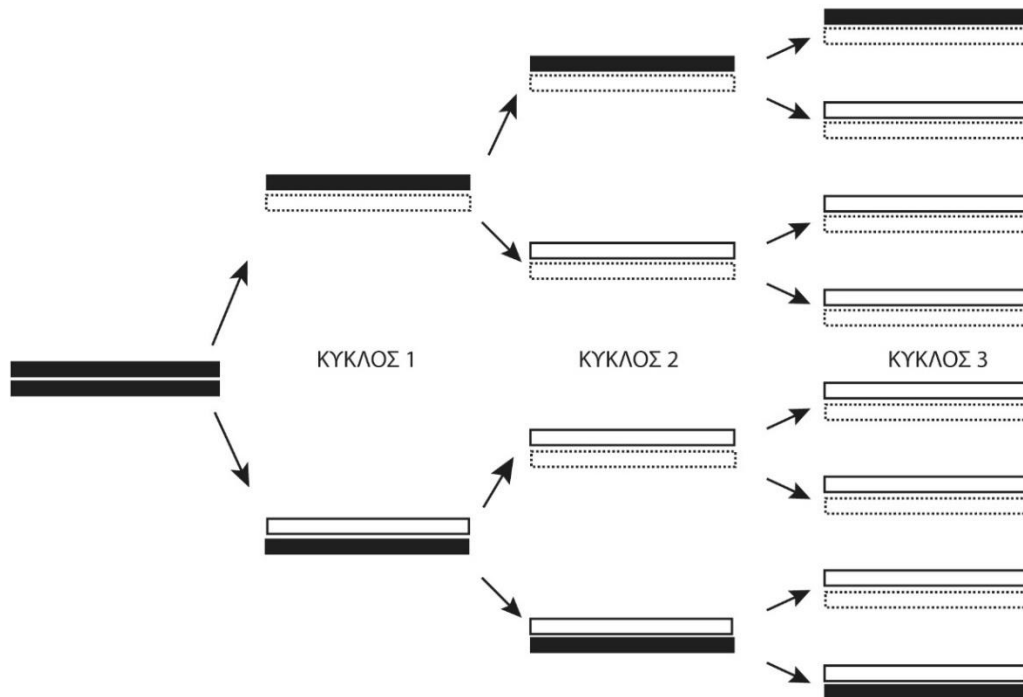
Bήμα 2: Δέσμευση των εκκινητών στους κλώνους του DNA.

Bήμα 3: Επιμήκυνση της αλυσίδας κατόπιν προσθήκης βάσεων με την επίδραση της DNA-πολυμεράσης.

Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA, συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του πρότυπου DNA, και το DNA στόχος έχει κατ' αυτόν τον τρόπο διπλασιαστεί. Η σειρά των τριών βημάτων, μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν έναν κύκλο της αντίδρασης PCR. Ο επόμενος κύκλος ξεκινά πάλι από το στάδιο 1, όπου γίνεται μετουσίωση των σχηματιζόμενων μορίων DNA.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον τέσσερις και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2<sup>ο</sup> κύκλο. Στο τέλος του 2<sup>ου</sup> κύκλου οι κλώνοι θα είναι οκτώ και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός ανατύπων του στόχου DNA, επειδή οι κλώνοι που

σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός του DNA στόχου,  $2^n$  όπου  $n$  ο αριθμός των κύκλων.



Εικόνα 35: Πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA σε PCR αντίδραση: Μετά το τέλος του 1<sup>ου</sup> κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2<sup>ου</sup> κύκλου έχει τετραπλασιαστεί, μετά το τέλος του 3<sup>ου</sup> κύκλου έχει οκταπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής  $2^n$ , όπου  $n$  ο αριθμός των κύκλων.

### Συστατικά της PCR αντίδρασης:

#### 1. Taq DNA πολυμεράση

Το ένζυμο DNA πολυμεράση είναι αυτό που καταλύει την επέκταση των εκκινητών. Χρησιμοποιώντας την θερμοάντοχη Taq DNA πολυμεράση είναι δυνατή η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επέκταση της αλληλουχίας, με μειωμένη τη μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και την απόδοση του προϊόντος. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει 5' → 3' δράση εξωνουκλεάσης.

#### 2. Ολιγονουκλεοτίδια – Εκκινητές

Το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές κυμαίνεται μεταξύ 20-30 νουκλεοτιδίων και πάντα πρέπει να αποτελούνται από τουλάχιστον 16 νουκλεοτίδια. Οι αλληλουχίες αυτές πρέπει να περιέχουν 40-60% γουανίνη και κυτοσίνη (G+C) και δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους. Οι εκκινητές αποτελούν ένα

από τους πιο σημαντικούς παράγοντες στην εξειδίκευση της PCR. Εάν για παράδειγμα οι εκκινητές δεν προσδένονται στη σωστή θέση ή σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους ή δομές που έχουν τη μορφή «φουρκέτας» (hairpin loops), η αντίδραση δεν θα αποδώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing) των εκκινητών εκτιμάται κάθε φορά βάση των σημείων τήξης των εκκινητών, τα οποία όμως σημεία πρέπει να είναι παρόμοια για τους δυο εκκινητές. Απαιτείται εξαιρετικά ακριβής ρύθμιση της θερμοκρασίας, καθώς ελλοχεύει ο κίνδυνος ενίσχυσης ανεπιθύμητων προϊόντων.

### 3. Ρυθμιστικά διαλύματα

Το πιο κοινό ρυθμιστικό διάλυμα της PCR περιέχει 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) και 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της Taq DNA πολυμεράσης. Απουσία των ελευθέρων ιόντων μαγνησίου, η DNA πολυμεράση είναι ανενεργή, ενώ σε περίσσεια αυτής η ακρίβεια του ενζύμου μειώνεται και είναι πιο πιθανή η πραγματοποίηση μη ειδικής ενίσχυσης. Η συγκέντρωση χηλικών παραγόντων (όπως είναι το EDTA) ή αρνητικά φορτισμένων παραγόντων (όπως είναι τα φωσφορικά ιόντα) πρέπει να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα και αυτό γιατί χηλικοί ή αρνητικά φορτισμένοι παράγοντες θα δημιουργούσαν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> με αρνητικά αποτελέσματα στη δράση της Taq DNA πολυμεράσης.

### 4. dNTPs

Τα dNTPs (δεοξυνουκλεοτίδια) χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις κορεσμού (0.2 mM το καθένα).

### 5. Αλληλουχίες-στόχοι

Το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο μπορεί να προστεθεί στο μείγμα αντίδρασης της PCR σε μονόκλωνη αλλά και δίκλωνη μορφή.

Τα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης PCR απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>DNA εκμαγείο</b>	<b>10-20ng</b>
<b>Εκκινητής Forward (νοηματικός)</b>	20pmol
<b>Εκκινητής Backward (anti-sense)</b>	20pmol
<b>Μίγμα dNTPs</b>	20mM
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (10X)</b>	5μl
<b>DMSO*</b>	~5μl
<b>Πολυμεράση (Taq)</b>	1μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 50μl

\*Η παρουσία του DMSO είναι αναγκαία όταν πρόκειται να γίνει η ενίσχυση περιοχών DNA με αυξημένο ποσοστό GC, δομών που παρεμποδίζουν την διαδικασία της αντιγραφής κατά την αντίδραση της PCR, όπως στην 5' περιοχή του γονιδίου SCO2.



Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της κωδικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της ανθρώπινης ασφαιρίνης (HBA1 CDS), το οποίο ενισχύθηκε από το εκμαγείο cDNA, προϊόν της RT (Reverse Transcription). Στη συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτική αγαρόζης και εκλούσθηκε.

Επιπλέον, η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθεί η αλληλουχία της ασφαιρίνης, συντηγμένη με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου TAT καθώς και με την αλληλουχία για το επιτόπιο HA, αλληλουχίες που περιέχονταν στους κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινητές.

Η PCR χρησιμοποιήθηκε παράλληλα και για την ενίσχυση της αλληλουχίας για το ανθρώπινο γονίδιο L-SCO2w/t, συντηγμένης με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου TAT, αλληλουχία που περιέχονταν στον κατάλληλα σχεδιασμένο πρόσθιο εκκινητή. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε ο κλωνοποιημένος φορέας pET16b-Xa-TAT-L-SCO2-HA, ο οποίος κατασκευάστηκε από την κ. Φολτοπούλου Παρθένα, Ph.D., στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, την οποία υποστήριξε δημόσια το 2007.

Επίσης, στους εκκινητές περιλαμβάνονταν και αλληλουχίες αναγνώρισης από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI και XhoI, για forward και backward εκκινητές αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη επιλογή εκκινητών αποσκοπούσε στην μετέπειτα κλωνοποίηση των ενισχυμένων συντηγμένων (fusion) γονιδίων, στον πλασμιδιακό φορέα pET16b, με βάση τη δημιουργία συμπληρωματικών μονόκλωνων («κολλώδων»-«sticky») άκρων.

Οι αντιδράσεις PCR έγιναν σε ειδική συσκευή MJ Mini™ Thermal Cycler της BioRad (Laboratories, Inc., U.S.A.).

Όνομα	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Ενισχυμένη αλληλουχία	Ένζυμο Περιορισμού	Πλασμιδίο
<b>F-HbA</b>	ATG GTG CTG TCT CCT GCC GAC	<i>α-σφαιρίνη</i>	-	pCR <sup>®</sup> 2.1
<b>B-HbA</b>	ACG GTA TTT GGA GGT CAG CAC GGT	<i>α-σφαιρίνη</i>	-	pCR <sup>®</sup> 2.1
<b>F-TAT-HBA</b>	GCA GGT TCA TAT <b>GCG</b> <b>CAA GAA ACG CCG CCA</b> <b>GCG CCG CCG</b> CAT GGT GCT GTC TCC T	<i>TAT-α</i> <i>σφαιρίνη-HA</i>	NdeI	PCRII <sup>®</sup> - TOPO <sup>®</sup>  pET16b
<b>B-HBA-HA</b>	CAA CTC GAG TCA AGC ATA GTC TAA GAC GTC ATA ATA ACG GTA TTT GGA GGT CAG	<i>TAT-α</i> <i>σφαιρίνη-HA</i>	XhoI	PCRII <sup>®</sup> - TOPO <sup>®</sup>  pET16b
<b>F-HBA2</b>	GCA GGT TCA TAT GGT GCT GTC TCC TGC CGA CAA	<i>α σφαιρίνη-HA</i>	NdeI	PCRII <sup>®</sup> - TOPO <sup>®</sup>  pET16b
<b>B-HBA-HA</b>	CAA CTC GAG TCA AGC ATA GTC TAA GAC GTC ATA ATA ACG GTA TTT GGA GGT CAG	<i>α σφαιρίνη-HA</i>	XhoI	PCRII <sup>®</sup> - TOPO <sup>®</sup>  pET16b
<b>F-TAT-SCO</b>	GCA GGT TCA TAT <b>GCG</b> <b>CAA G AA ACG CCG CCA</b> <b>GCG CCG CCG</b> CCT GCT GCT GAC TCG GAG	<i>TAT-SCO2</i>	NdeI	PCRII <sup>®</sup> - TOPO <sup>®</sup>  pET16b
<b>B-SCO2A</b>	CAA CTC GAG TCA AGA CAG GAC ACT GCG GAA AGC	<i>TAT-SCO2</i>	XhoI	PCRII <sup>®</sup> - TOPO <sup>®</sup>  pET16b
<b>F-TAT-SCO2</b>	GCA GGT TCA TAT <b>GCG</b> <b>CAA G AA ACG CCG CCA</b> <b>GCG CCG CCG</b> CCT GCT GCT GAC TCG GAG	<i>TAT-SCO2- NGR</i>	NdeI	PCRII <sup>®</sup> - TOPO <sup>®</sup>  pET16b
<b>B-SCO2-NGR</b>	CAA CTC GAG TCA ACG GCC GTT AGA CAG GAC ACT GCG GAA AGC	<i>TAT-SCO2- NGR</i>	XhoI	PCRII <sup>®</sup> - TOPO <sup>®</sup>  pET16b

Πίνακας 3: Ακολουθία εκκινητών, γονίδιο, ένζυμο περιορισμού και πλασμιδιακός φορέας.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να ενισχύονται τμήματα DNA μήκους:

$\alpha$ -σφαιρίνη<sub>wt</sub> → 428bp

TAT- $\alpha$ -σφαιρίνη-HA → 485bp

$\alpha$ -σφαιρίνη-HA → 455bp

TAT-SCO2 → 851bp

TAT-SCO2-NGR → 862bp

Στον ακόλουθο πίνακα, φαίνονται αναλυτικά οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντίδραση.

A/A	Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος	Κύκλοι
1	Αποδιάταξη	94°C	2min	1x
2	Αποδιάταξη	94°C	40sec	40x
3	Υβριδισμός	66°C *	30sec	
4	Επιμήκυνση	72°C	40sec	
5	Επιμήκυνση	72°C	5min	1x

Πίνακας 4: Συνθήκες PCR για τις αλληλουχίες της  $\alpha$ -σφαιρίνης.

\*Για την ενίσχυση της αλληλουχίας της κωδικής αλληλουχία της  $\alpha$ -σφαιρίνης<sub>wt</sub> η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing) αντιστοιχεί στους 66°C για 30sec.

\*Για την TAT- $\alpha$  σφαιρίνη-HA, το στάδιο του υβριδισμού (annealing) πραγματοποιείται στους 68°C για 30sec.

\*Για την αλληλουχία της  $\alpha$  σφαιρίνης-HA η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing) αντιστοιχεί στους 70°C για 30sec.

A/A	Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος	Κύκλοι
1	Αποδιάταξη	96°C	2min	1x
2	Αποδιάταξη	96°C	45sec	40x
3	Υβριδισμός	60°C	45sec	
4	Επιμήκυνση	72°C	90sec	
5	Επιμήκυνση	72°C	10min	1x

Πίνακας 5: Συνθήκες PCR για την ενίσχυση των αλληλουχιών TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR.

### **B.2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων:**

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) σε υδατικά διαλύματα και σε διαλύματα με Tris-HCl, υπολογίζονται στο NanoDrop™ 2000/2000c-spectro-φωτόμετρο μικροποσοτήτων (Thermo Fisher Scientific).

Η μέτρηση βασίζεται στην απορρόφηση των πουρινών και πυριμιδινών στο υπεριώδες φως. Οι παραπάνω χρωμοφόρες ομάδες απορροφούν στα 260nm. Με βάση το νόμο του Beer-Lambert, η απορρόφηση ενός αναλύτη είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του στο υπό μελέτη δείγμα. Από το συγκεκριμένο νόμο προκύπτει πως μια οπτική πυκνότητα στα 260nm (1 OD<sub>260nm</sub>) ισούται με 50 µg/ml για το DNA και με 40 µg/ml για το RNA.

Χρήζει ιδιαίτερης σημασίας ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm, ο οποίος αποτελεί ένδειξη καθαρότητας του υπό εξέταση δείγματος νουκλεϊκών οξέων ως προς την ύπαρξη πρωτεϊνών σε αυτό, οι οποίες απορροφούν στα 280nm. Ο λόγος αυτός, για να θεωρηθεί ένα διάλυμα νουκλεϊκών οξέων καθαρό, πρέπει να κυμαίνεται από 1,8-2,0.

### **B.2.6. Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA και RNA:**

α) Σε πηκτή αγαρόζης:

Η ηλεκτροφόρηση τμημάτων νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί μια από τις καλύτερες μεθόδους διαχωρισμού, καθαρισμού και απομόνωσής τους.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης με υψηλό μοριακό βάρος, η οποία αποτελείται από μόρια D-γαλακτόζυλο-3,6-άνυδρο-L-γαλακτόζη. Η τήξη του πολυσακχαρίτη αυτού, επιτυγχάνεται εύκολα και γρήγορα μετά από θέρμανσή του, παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος.

Η μέθοδος βασίζεται στη μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊκών οξέων, σε ουδέτερο pH προς την άνοδο.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική ικανότητα των τμημάτων DNA είναι οι εξής:

- Το μέγεθος των υπό ανάλυση τμημάτων DNA. Για τα γραμμικά δίκλινα μόρια DNA, η μετακίνησή τους διαμέσου του πηκτώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη από το δεκαδικό λογάριθμο του αριθμού των βάσεων τους.
- Η διαμόρφωση του DNA. Τα υπερελικωμένα μόρια DNA έχουν διαφορετική κινητικότητα από τα κυκλικά ή τα γραμμικά μόρια, ανεξάρτητα αν έχουν το ίδιο μοριακό βάρος.

- Η συγκέντρωση της αгарόζης. Η κίνηση ενός μορίου πυρηνικού οξέος σε μια πηκτή αгарόζης, εξαρτάται από την ποσότητα της αгарόζης που περιέχει η πηκτή.
- Το ηλεκτρικό πεδίο. Ο καλύτερος διαχωρισμός τμημάτων νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους, είναι αντιστρόφως ανάλογος με την τάση που εφαρμόζεται σε μια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.
- Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

Αρχικά, το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X, με την κατάλληλη συγκέντρωση αгарόζης, θερμαίνεται στους 100°C για ~2 λεπτά στο φούρνο μικροκυμάτων. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 50°C. Αφού το διάλυμα αποκτήσει την επιθυμητή θερμοκρασία, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml και το διάλυμα αποχύνεται άμεσα, πριν προλάβει να επέλθει η πήξη, σε ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και ακολούθως, οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων δημιουργούνται με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας, η οποία αφαιρείται μετά την πήξη της πηκτής.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης της εταιρείας Owl, Separation Systems (Portsmouth, NH), ενώ η συγκέντρωση των πηκτών αгарόζης που χρησιμοποιούνται είναι 0,8-1%.

Το ρυθμιστικό διάλυμα Ηλεκτροφόρησης TAE 1X, έχει την εξής σύσταση:

#### Ρυθμιστικό διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (TAE 1X):

Tris-Base	40mM
Οξικό Οξύ	11,4mM
EDTA, pH 8	1mM

Τα δείγματα πριν ηλεκτροφορηθούν, αναμιγνύονται με το διάλυμα διαλυτοποίησης δειγμάτων, του οποίου η σύσταση είναι η ακόλουθη:

#### Διάλυμα Διαλυτοποίησης Δειγμάτων (6X):

Γλυκερόλη	50% v/v
Κυανό του ξυλενίου	0,25% w/v
Κυανό της βρωμοφαινόλης	0,25 w/v
EDTA, pH 8	1mM

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο 85 V για 40min, ενώ τόσο η άνοδος όσο και η κάθοδος είναι βυθισμένες σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE [1x].

Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), για να είναι δυνατή η εμφάνιση των ζωνών, οι οποίες αντιστοιχούν στα τμήματα DNA που ηλεκτροφορούνται. Το EtBr είναι μια φθορίζουσα ένωση, η οποία έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, ενώ επίσης μπορεί να απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία (302-366nm) και να επανεκπέμπει στην περιοχή του κόκκινου

ορατού φάσματος. Η ένταση της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA. Η ένταση φθορισμού του ελεύθερου EtBr είναι πολύ μικρότερη από αυτή του συμπλόκου EtBr-DNA, επομένως είναι δυνατή η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων DNA (*Sambrook et al., 1989*).

Η ανίχνευση των τμημάτων DNA αντίδρασης γίνεται με τοποθέτηση των πηκτωμάτων πάνω σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η φωτογράφιση των πηκτωμάτων γίνεται με CCD κάμερα ενώ η ανάλυση, η επεξεργασία και η ποσοτικοποίηση των ζωνών στα πηκτώματα αγαρόζης μπορεί να γίνει βάση του προγράμματος ανάλυσης εικόνας MiniBis Pro / BioImaging systems, έπειτα από μέτρηση και ολοκλήρωση του εκπεμπόμενου φθορισμού των ζωνών.

Αναφορικά με την ηλεκτροφορήση του RNA μπορεί να γίνει και με παρόμοια διαδικασία με την ηλεκτροφόρηση του DNA, με τη διαφορά στην ειδική πλύση με SDS 10%, τόσο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, όσο και της πλαστικής οδοντωτής μήτρας, με σκοπό την αποφυγή της υδρόλυσης του RNA. Για τον ίδιο λόγο, ενδείκνυται η χρήση αποστειρωμένων «tips με φίλτρο» στους διάφορους χειρισμούς.

### **B.2.7. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης:**

Τα τμήματα DNA που ενισχύονται με τη μέθοδο της PCR ή τα τμήματα DNA-προϊόντα αντίδρασης πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού, είναι δυνατόν να εκλουσθούν και να απομονωθούν για την μετέπειτα χρήση τους.

Η έκλυση των τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II, της Macherey-Nagel. Το συγκεκριμένο kit περιλαμβάνει στηλίτσες οι οποίες έχουν σφαιρίδια από το πορώδες υλικό του πυριτικό οξέος (silica gel), τα οποία έχουν τη δυνατότητα, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, να προσροφούν εκλεκτικά μόρια DNA, ενώ οι προσμίξεις διέρχονται από τις στήλες χωρίς να συγκρατηθούν.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

Η ζώνη στην πηκτή αγαρόζης που αντιστοιχεί στο επιθυμητό τμήμα DNA και φθορίζει κάτω από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, αποκόπτεται προσεκτικά με τη χρήση ενός αποστειρωμένου νυστεριού και μεταφέρεται σε σωληνάκι Eppendorf. Στη συνέχεια προστίθεται 200μl διαλύματος NT για κάθε 100mg πηκτώματος. Το αποκομμένο πηκτώμα αγαρόζης με το buffer NT, επωάζεται στους 50°C για 5-15min, μέχρι να λιώσει πλήρως. Συνίσταται περιοδική ανάμειξη με vortex ανά 2-3min για την ταχύτερη τήξη της πηκτής.

Ακολουθεί η δέσμευση του DNA στην στηλίτσα (Nucleospin Plasmin Column), η οποία έχει ως στατική φάση σφαιρίδια με silica gel. Η στήλη τοποθετείται σε σωληνάκι συλλογής

των 2ml (collection tube), το διάλυμα με το λιωμένο gel και το buffer διαβιβάζεται στη στήλη και φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (erppendorf, Centrifuge 5417c) για 1min στις 11.000xg. Το διαφεύγον υγρό που περιέχεται στο σωληνάκι συλλογής απορρίπτεται και η στηλίτσα επανατοποθετείται.

Η στήλη με silica gel στην οποία συγκρατείται το DNA, πλένεται από τις προσμίξεις με την προσθήκη 600μl διαλύματος NT3 (washing buffer - το οποίο περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min στις 11.000xg. Το περιεχόμενο του collection tube απορρίπτεται με προσοχή.

Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση για 2 min στις 11.000xg, με σκοπό το στέγνωμα της silica, ώστε να απομακρυνθεί του διάλυμα NT3. Συνιστάται προαιρετική θέρμανση για 2-5min στους 70°C, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αιθανόλης.

Η έκλουση του DNA γίνεται με προσθήκη 15-50μl απεσταγμένου νερού ή διαλύματος TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 8,0) ή διαλύματος έκλουσης NE, προθερμασμένου στους 70°C. Η στήλη επωάζεται με το διάλυμα έκλουσης για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρείται για 1min στις 11.000xg.

Η καθαρότητα του διαλύματος και η περιεκτικότητα σου DNA προσδιορίζεται με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στο NanoDrop καθώς και με ηλεκτροφόρηση. Το παρασκεύασμα φυλάσσεται στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

### **B.2.8. Εκχύλιση τμημάτων DNA-πλασμιδιακών φορέων με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοολής:**

Εκτός από τη μέθοδο καθαρισμού του DNA από προσμίξεις με πρωτεΐνες και ενδονουκλεάσες με τη χρήση κατάλληλου kit, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί καθαρισμός των τμημάτων DNA ή του πλασμιδιακού DNA με διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοολής.

Το διάλυμα στο οποίο περιέχεται το δείγμα DNA, αραιώνεται με H<sub>2</sub>O, έτσι ώστε ο όγκος να φτάσει στο μέγιστο δυνατό σε σωληνάκι erppendorf χωρητικότητας 1,5ml (~650μl). Αυτό γίνεται για να υπάρξουν όσο το δυνατό λιγότερες απώλειες κατά την εκτέλεση της εκχύλισης. Ακολούθως προστίθεται ίσος όγκος (~650μl) διαλύματος βασικής φαινόλης, εξισορροπημένης με Tris-HCl, pH 8,0, και το διάλυμα ανακινείται έντονα (vortex) για 5min. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 12.000xg για 10min. Το υπερκείμενο (~600μl) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erppendorf πολύ προσεκτικά (αναρρόφηση υπερκειμένου μέχρι τη διεπιφάνεια). Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος (~600μl) χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοολής 24:1, για την απομάκρυνση της εναπομένουσας φαινόλης, ανακινούνται έντονα (vortex) για 5min φυγοκεντρώνονται στις 12.000xg για 10min. Κάθε φορά απομονώνεται η υδατική στοιβάδα, οπότε το υπερκείμενο (~600μl) μεταφέρεται σε δύο νέα σωληνάκια erppendorf (από 300μl) και προστίθενται 2,5 όγκοι

100% αιθανόλης στο καθένα, CH<sub>3</sub>COONa 3M (1:10 του τελικού όγκου) και 3μl γλυκογόνο.

Το διάλυμα αφήνεται στον πάγο για 30min και φυγοκεντρείται στις 12.000xg για 10min για να γίνει η κατακρήμνιση του DNA. Το κάθε ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα 70% αιθανόλης, διαλυτοποιείται τελικά σε απεσταγμένο νερό ή διάλυμα TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 8,0) και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του (Sambrook *et al.*, 1989).

### **B.2.9. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού:**

Στην πορεία της εξέλιξης εμφανίστηκε ένα ενζυμικό σύστημα, που στοχεύει στον περιορισμό της ανάπτυξης και επιβίωσης φάγων DNA, οι οποίοι μολύνουν τα βακτήρια. Η λειτουργία του συστήματος βασίζεται σε δύο ενζυμικές δράσεις. Από τη μια η ενδονουκλεάση περιορισμού, αναγνωρίζει και διασπά υδρολυτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες, ταυτόχρονα και στους δύο κλώνους του μορίου του DNA. Τα ένζυμα περιορισμού δεν αποικοδομούν το δικό τους DNA, καθώς μια μεθυλάση, τροποποιεί τις ίδιες ακολουθίες του βακτηρίου, προσθέτοντας ένα μεθύλιο σε μια αδενίνη ή κυτοσίνη της ακολουθίας. Αυτή τη θέση δεν την αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού ώστε να αποικοδομεί μόνο το ξένο DNA του φάγου, θωρακίζοντας βιοχημικά το βακτήριο.

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικά κατασκευασμένα για να σπάζουν δίκλωνα μόρια. Καθένα αναγνωρίζει ακολουθίες 4-8 νουκλεοτιδίων που έχουν ένα άξονα συμμετρίας και «κόβουν» το DNA μέσα σε αυτές τις ακολουθίες. Οι θέσεις αυτές καλούνται «θέσεις περιορισμού». Μια θέση αναγνώρισης για κάθε τετρανουκλεοτίδιο θα βρίσκεται κάθε 4<sup>4</sup> (256) νουκλεοτίδια. Αντίστοιχα, για ένα εξανουκλεοτίδιο θα βρίσκεται κάθε 4<sup>6</sup> (4096) νουκλεοτίδια. Τα διαφορετικά είδη των βακτηρίων έχουν διαφορετικά ένζυμα περιορισμού. Οι ακολουθίες που αναγνωρίζονται είναι συνήθως παλίνδρομες. Δηλαδή οι αλληλουχίες στους δυο κλώνους DNA είναι ίδιες στο σημείο αναγνώρισης όταν διαβάζονται στην κατεύθυνση 5'→3' στον κάθε κλώνο.

Ανάλογα με τον τρόπο πέψης, τα ένζυμα περιορισμού δημιουργούν τμήματα DNA με συμπληρωματικά (κολλώδη) ή τυφλά (λεία) άκρα. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 500 συστήματα περιορισμού και αποτελούν πολύτιμα εργαλεία στην κλωνοποίηση του DNA και στην υβριδοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων και αποτελούν τη βάση της ανάπτυξης του κλάδου της Γενετικής Μηχανικής και της Βιοτεχνολογίας.

Για να επιτευχθεί η πέψη ενός τμήματος DNA με ένζυμα περιορισμού, η αντίδραση πρέπει να περιλαμβάνει:

- Το τμήμα DNA που υποβάλλεται σε κοπή, το οποίο μπορεί να είναι γενωμικό DNA, πλασμιδιακός φορέας ή τμήμα DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί.
- Το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο παρέχεται από την εκάστοτε εταιρεία, στο οποίο το αντίστοιχο ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη δράση.



- Σε ορισμένες περιπτώσεις, για την καλύτερη δράση του ενζύμου απαιτείται αλβουμίνη (BSA). Η BSA εμποδίζει την ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενζύμου και της πλαστικής επιφάνειας του σωληναρίου μέσα στο οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση.
- Η ενδονουκλεάση περιορισμού που έχει επιλεγεί.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης συνήθως κυμαίνεται από 20-50μl, πραγματοποιείται στους 37°C, πλην ορισμένων περιπτώσεων και διαρκεί από 15min μέχρι 3 ώρες. Η ποσότητα των ενζύμων δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% v/v του συνολικού όγκου της αντίδρασης, γιατί ελλοχεύει ο κίνδυνος να γίνει μη εξειδικευμένη πέψη, εξαιτίας της περίσσειας των ενζύμων, καθώς και της υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο μίγμα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "star activity" και σχετίζεται με τη χαμηλή κατιονική ισχύ, το υψηλό pH και την περίσσεια γλυκερόλης. Για την αξιολόγηση των προϊόντων πέψης απαιτείται ηλεκτροφόρηση.

Υπάρχουν περιπτώσεις που στην αντίδραση πέψης απαιτείται η χρήση δύο ενδονουκλεασών περιορισμού, τα οποία ειθιστά να δρουν είτε σε ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, είτε σε διαφορετικό. Στην περίπτωση που απαιτούνται δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, πραγματοποιείται διαδοχική επώαση με τα δύο αντίστοιχα διαφορετικά ένζυμα. Όταν πρόκειται για πέψη πλασμιδίων με δύο διαφορετικές ενδονουκλεάσες περιορισμού, γίνεται επώαση πρώτα με το ένα ένζυμο περιορισμού, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός του τμήματος DNA από την πηκτική αγαρόζη και έπειτα πραγματοποιείται η επώαση με το δεύτερο ένζυμο. Με τον τρόπο αυτό είναι εφικτή η διαπίστωση της επιτυχούς κοπής του πλασμιδίου σε μία θέση με αποτέλεσμα το πλασμίδιο να εμφανίζει χαρακτηριστική ηλεκτροφορητική εικόνα γραμμικού μορίου και όχι κυκλικού.

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην προκειμένη εργασία είναι οι ακόλουθες και έχουν επιλεγεί με τη βοήθεια του εργαλείου βιοπληροφορικής NEBcutter V2.0 της New England Biolabs [ <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>]

- ✓ Η ενδονουκλεάση περιορισμού HindIII:

Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος - Buffer R (ThermoFisher Scientific): 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0,1mg/ml BSA.

Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος - Buffer M (Takara): 10mM Tris-HCl (pH 7,5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol, 500mM NaCl

- ❖ Επαλήθευση της ενίσχυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *α-σφαιρίνης*<sub>WT</sub> (428bp). Η επιτυχής έκβαση της PCR και ακολούθως της πέψης, θα συνοδεύονταν από δύο ζώνες μήκους 271bp και 157bp.

<b>Προϊόν PCR α-σφαιρίνης<sub>WT</sub> (έκλουση από gel)</b>	10μl
<b>HindIII (ThermoFisher Scientific) (10U/μl)</b>	1μl
<b>Buffer R (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

- ❖ Επαλήθευση της ενίσχυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *TAT-α-σφαιρίνης-HA* (485bp). Η επιτυχής έκβαση της PCR και ακολούθως της πέψης, θα συνοδεύονταν από δύο ζώνες μήκους 302bp και 183bp.

<b>Προϊόν PCR <i>TAT-α-σφαιρίνης-HA</i> (έκλουση από gel)</b>	10μl
<b>HindIII (ThermoFisher Scientific) (10U/μl)</b>	1μl
<b>Buffer R (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

- ❖ Επαλήθευση της ενίσχυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *α-σφαιρίνης-HA* (455bp). Η επιτυχής έκβαση της PCR και ακολούθως της πέψης, θα συνοδεύονταν από δύο ζώνες μήκους 274bp και 181bp.

<b>Προϊόν PCR α-σφαιρίνης-HA (έκλουση από gel)</b>	10μl
<b>HindIII (ThermoFisher Scientific) (10U/μl)</b>	1μl
<b>Buffer R (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *TAT-α-σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 4029bp (πλασμίδιο pCRII-TOPO σε γραμμική μορφή) και 331bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-<i>TAT-α-σφαιρίνης-HA</i></b>	3μl
<b>HindIII (Takara) (10U/μl)</b>	0,4μl
<b>Buffer M (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *α-σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 4096bp (πλασμίδιο pCRII-TOPO σε γραμμική μορφή) και 334bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-α σφαιρίνης-HA</b>	3μl
<b>HindIII (Takara) (10U/μl)</b>	0,4μl
<b>Buffer M (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *TAT-α-σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pET16b. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 5713bp (pET16b σε γραμμική μορφή) και 478bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pET16b-TAT-α σφαιρίνης-HA</b>	5μl
<b>HindIII (Takara) (10U/μl)</b>	0,5μl
<b>Buffer M (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *α-σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pET16b. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 5683bp (pET16b σε γραμμική μορφή) και 478bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pET16b-α σφαιρίνης-HA</b>	5μl
<b>HindIII (Takara) (10U/μl)</b>	0,5μl
<b>Buffer M (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C.

- ✓ Η ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI:

Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος - Buffer H (Takara): 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0,1mg/ml BSA.

- ❖ Χρησιμοποιήθηκε για την αποκοπή ολόκληρης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *α-σφαιρίνης<sub>WT</sub>* (428bp) το οποίο κλωνοποιείται στον φορέα pCR2.1. Η επιτυχής αντίδραση κλωνοποίησης και πέψης με τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση, αποδίδει δύο ζώνες: μια ζώνη με μήκος 4005bp (ζώνη που αντιστοιχεί στον γραμμικό φορέα pCR2.1) και μια ζώνη μήκους 330bp.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCR2.1-<math>\alpha</math> σφαιρίνη<sub>WT</sub></b>	3μl
<b>EcoRI (Takara) (10U/μl)</b>	0,7μl
<b>Buffer H(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 2 ώρες στους 37°C. Προσθήκη 2μl RNase 10mg/ml και επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της αλληλουχίας της *TAT- $\alpha$ -σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 3913bp (πλασμίδιο pCRII-TOPO σε γραμμική μορφή) και 447bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-<math>\alpha</math> σφαιρίνη-HA</b>	3μl
<b>EcoRI (Takara) (10U/μl)</b>	0,3μl
<b>Buffer H(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρες στους 37°C και προσθήκη 0,2μl RNase 100mg/ml για άλλα 30min.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της  *$\alpha$ -σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 3995bp (πλασμίδιο pCRII-TOPO σε γραμμική μορφή) και 475bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-<math>\alpha</math> σφαιρίνη-HA</b>	3μl
<b>EcoRI (Takara) (10U/μl)</b>	0,3μl
<b>Buffer H(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρες στους 37°C και προσθήκη 0,2μl RNase 100mg/ml για άλλα 30min.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της αλληλουχίας του γονιδίου της *TAT-SCO2* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 3913bp (πλασμίδιο pCRII-TOPO σε γραμμική μορφή) και 819bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2</b>	3μl
<b>EcoRI (Takara) (10U/μl)</b>	0,4μl
<b>Buffer H(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρες στους 37°C και προσθήκη 0,2μl RNase 100mg/ml για άλλα 30min.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *TAT-SCO2-NGR* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα,

αντιστοιχούν σε 3913bp (πλασμίδιο pCRII-TOPO σε γραμμική μορφή) και 877bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR</b>	3μl
<b>EcoRI (Takara) (10U/μl)</b>	0,3μl
<b>Buffer H(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρες στους 37°C και προσθήκη 0,2μl RNase 100mg/ml για άλλα 30min.

- ✓ Η ενδονουκλεάση περιορισμού NcoI:
- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της TAT-SCO2 στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 2873bp (πλασμίδιο pCRII-TOPO σε γραμμική μορφή) και 1859bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2</b>	3μl
<b>NcoI (Takara) (10U/μl)</b>	0,4μl
<b>Buffer K(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρες στους 37°C και προσθήκη 0,2μl RNase 100mg/ml για άλλα 30min.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της TAT-SCO2-NGR στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 2994bp (πλασμίδιο pCRII-TOPO σε γραμμική μορφή) και 1866bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR</b>	3μl
<b>NcoI (Takara) (10U/μl)</b>	0,4μl
<b>Buffer K(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρες στους 37°C και προσθήκη 0,2μl RNase 100mg/ml για άλλα 30min.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της TAT-SCO2 στον πλασμιδιακό φορέα pET16b. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 5918bp (pET16b σε γραμμική μορφή) και 618bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pET16b-TOPO-TAT-SCO2</b>	5μl
<b>NcoI (Takara) (10U/μl)</b>	0,5μl
<b>Buffer K(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρες στους 37°C και προσθήκη 0,2μl RNase 100mg/ml για άλλα 30min.

- ❖ Επαλήθευση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *TAT-SCO2-NGR* στον πλασμιδιακό φορέα *pET16b*. Οι ζώνες που αναμένονται ως αποτέλεσμα επιτυχούς κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στον φορέα, αντιστοιχούν σε 5927bp (*pET16b* σε γραμμική μορφή) και 642bp σε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο <i>pET16b-TOPO-TAT-SCO2-NGR</i></b>	5μl
<b><i>NcoI</i> (Takara) (10U/μl)</b>	0,5μl
<b>Buffer K(10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1<sup>1/2</sup> ώρες στους 37°C και προσθήκη 0,2μl RNase 100mg/ml για άλλα 30min.

- ✓ Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού *NdeI* και *XhoI*:

Η χρήση δύο ενδονουκλεασών περιορισμού γίνεται για τη δημιουργία μονόκλωνων άκρων στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του συντηγμένου γονιδίου που πρόκειται να συντηχθεί με τον παρομοίως κομμένο πλασμιδιακό φορέα *pET16b*. Η συγκεκριμένη διαδικασία αποτελεί μέρος της μεθόδου κλωνοποίησης "sticky ends" (κολλώδη άκρα).

Αντίδραση διπλής πέψης του πλασμιδιακού φορέα *pET16b*:

<b><i>pET16b</i> απομονωμένος φορέας από TOP10-<i>pET16b</i> (mock) κύτταρα</b>	3,5-5μg
<b><i>NdeI</i> (10U/μl)</b>	0,7μl
<b>Buffer H (10X)</b>	5μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 50μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:

<b><i>XhoI</i> (10U/μl)</b>	0,7μl
-----------------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

Θερμική απενεργοποίηση των δύο ενζύμων με επώαση στους 60°C για 15min.

Αντίδραση διπλής πέψης του υποψηφίου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pCRII-TOPO-TAT-α-σφαιρίνη-HA*:

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο <i>pCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA</i></b>	~0,5μg/μl
<b><i>NdeI</i> (10U/μl)</b>	0,7μl
<b>Buffer H (10X)</b>	5μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 50μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:

<b><i>XhoI</i> (10U/μl)</b>	0,7μl
-----------------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

Θερμική απενεργοποίηση των δύο ενζύμων με επώαση στους 60°C για 15min.

Αντίδραση διπλής πέψης του υποψηφίου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCRII-TOPO-α-σφαιρίνη-HA:

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA</b>	~0,5μg/μl
<b>NdeI (10U/μl)</b>	0,7μl
<b>Buffer H (10X)</b>	5μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 50μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:

<b>XhoI (10U/μl)</b>	0,7μl
----------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

Θερμική απενεργοποίηση των δύο ενζύμων με επώαση στους 60°C για 15min.

Αντίδραση διπλής πέψης του υποψηφίου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCRII-TOPO-TAT-SCO2:

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2</b>	~0,5μg/μl
<b>NdeI (10U/μl)</b>	0,7μl
<b>Buffer H (10X)</b>	5μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 50μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:

<b>XhoI (10U/μl)</b>	0,7μl
----------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

Θερμική απενεργοποίηση των δύο ενζύμων με επώαση στους 60°C για 15min.

Αντίδραση διπλής πέψης του υποψηφίου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR:

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR</b>	~0,5μg/μl
<b>NdeI (10U/μl)</b>	0,7μl
<b>Buffer H (10X)</b>	5μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 50μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:



<b>XhoI (10U/μl)</b>	0,7μl
----------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

Θερμική απενεργοποίηση των δύο ενζύμων με επώαση στους 60°C για 15min.

Πέρα από την δημιουργία των κολλώδων, συμπληρωματικών άκρων, η χρήση των δύο αυτών ενδονουκλεασών περιορισμού γίνεται και για την επαλήθευση της συνένωσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενδιαφέροντος με το πλασμίδιο pET16b, διαπιστώνοντας έτσι την επιτυχία της κλωνοποίησης.

- ❖ Επιτυχής έκβαση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *TAT-α-σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pET16b θα συνοδευόταν από μια ζώνη μήκους 5704bp (λόγω της γραμμικής μορφής του κομμένου pET16b) καθώς και μια ζώνη μήκους 478bp.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pET16b-TOPO-TAT-α-σφαιρίνη-HA</b>	5μl
<b>NdeI (10U/μl)</b>	0,5μl
<b>Buffer H (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:

<b>XhoI (10U/μl)</b>	0,5μl
----------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

- ❖ Επιτυχής έκβαση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *α-σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pET16b θα συνοδευόταν από μια ζώνη μήκους 5704bp (λόγω της γραμμικής μορφής του κομμένου pET16b) καθώς και μια ζώνη μήκους 457bp.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pET16b-TOPO-α-σφαιρίνη-HA</b>	5μl
<b>NdeI (10U/μl)</b>	0,5μl
<b>Buffer H (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:

<b>XhoI (10U/μl)</b>	0,5μl
----------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

- ❖ Επιτυχής έκβαση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *TAT-SCO2* στον πλασμιδιακό φορέα pET16b θα συνοδευόταν από μια ζώνη μήκους 5704bp



(λόγω της γραμμικής μορφής του κομμένου pET16b) καθώς και μια ζώνη μήκους 832bp.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pET16b-TOPO-TAT-SCO2</b>	5μl
<b>NdeI (10U/μl)</b>	0,5μl
<b>Buffer H (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:

<b>XhoI (10U/μl)</b>	0,5μl
----------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

- ❖ Επιτυχής έκβαση της κλωνοποίησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *TAT-SCO2-NGR* στον πλασμιδιακό φορέα pET16b θα συνοδευόταν από μια ζώνη μήκους 5704bp (λόγω της γραμμικής μορφής του κομμένου pET16b) καθώς και μια ζώνη μήκους 865bp.

<b>Απομονωμένο πλασμίδιο pET16b-TOPO-TAT-SCO2-NGR</b>	5μl
<b>NdeI (10U/μl)</b>	0,5μl
<b>Buffer H (10X)</b>	2μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 20μl

Επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Τα ένζυμα δρουν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Προσθήκη του δεύτερου ενζύμου:

<b>XhoI (10U/μl)</b>	0,5μl
----------------------	-------

Επώαση για άλλη 1 ώρα στους 37°C.

## **B.2.10. Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς**

Μοριακή κλωνοποίηση είναι ο βιολογικός πολλαπλασιασμός μίας συγκεκριμένης DNA αλληλουχίας μέσω μιτωτικών διαιρέσεων του κυττάρου ξενιστή, το οποίο έχει μετασχηματισθεί με την συγκεκριμένη αλληλουχία. Επειδή οι αλληλουχίες DNA χρειάζονται τουλάχιστον ένα σημείο έναρξης αντιγραφής (origin of replication-ori) για να αντιγράφονται αυτόνομα, χρησιμοποιούνται φορείς κλωνοποίησης.

Φορέας κλωνοποίησης είναι ένα γενετικό στοιχείο, συνήθως ένας βακτηριοφάγος ή ένα πλασμίδιο, το οποίο χρησιμοποιείται για να δέχεται και να μεταφέρει ένα κομμάτι DNA (ένθεση) σε ένα κύτταρο αποδέκτη (ξενιστής), με σκοπό την κλωνοποίησή του.

Η κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα στηρίζεται: 1) στη δημιουργία συμβατών άκρων μεταξύ του πλασμιδιακού φορέα και του προς ενσωμάτωση τμήματος του DNA, που προκύπτουν μετά από πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού. Κατευθυνόμενη κλωνοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα άκρα της παρεμβαλλόμενης DNA αλληλουχίας (ένθεση) είναι κολλώδη και διαφορετικά που έχουν

δημιουργηθεί με την δράση δύο διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων, συμπληρωματικά (sticky ends) των οποίων υπάρχουν στον φορέα κλωνοποίησης, ώστε να μην υπάρχει τυχαίοποιημένος προσανατολισμός αλλά κατευθυνόμενος. 2) στην ομοιοπολική επανακυκλοποίηση των συμβατών άκρων του φορέα και του τμήματος του DNA με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μέσω της δράσης της T4 DNA λιγάσης. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που προκύπτει μπορεί να μεταφερθεί σε κατάλληλα προετοιμασμένα κύτταρα και να αναπτυχθεί παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού, επιτρέποντας την επιλογή των κυττάρων αυτών σε σχέση με τα κύτταρα που δεν έχουν πλασμίδιο (*Sambrook et al., 1989*). Υποκλωνοποίηση είναι η διαδικασία μεταφοράς τμήματος μίας κλωνοποιημένης DNA αλληλουχίας από ένα φορέα σε έναν άλλο.

Υπάρχουν πέντε βασικοί τύποι φορέων κλωνοποίησης που δέχονται διαφορετικά μεγέθη DNA ενθέσεων:

Φορείς	Μέσο μέγεθος ένθεσης (bp)
Πλασμίδιο	4.000
βακτηριοφάγος	20.000
Κοσμίδιο	40.000
τεχνητό χρωματόσωμα ζύμης (YAC)	400.000
τεχνητό χρωματόσωμα βακτηρίου (BAC)	400.000

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά δίκλινα μόρια DNA που ποικίλουν σε μέγεθος (από 1kb έως 200kb). Τα πλασμίδια μπορούν να αντιγράφονται ανεξάρτητα από τα βακτηριακά χρωματοσώματα αν και χρησιμοποιούν ένζυμα και πρωτεΐνες από τον ξενιστή τους. Τα πλασμίδια δεν πρέπει να ενσωματώνονται στο χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή. Για να είναι ένα πλασμίδιο χρήσιμο στην γενετική μηχανική πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

α. Να μπορεί να πολλαπλασιάζεται αυτόνομα και ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό γονιδίωμα του βακτηρίου ξενιστή. Για τον λόγο αυτό τα πλασμίδια περιέχουν ένα σημείο έναρξης αντιγραφής (origin of replication - ori). Ο αριθμός των αντιγράφων του πλασμιδίου σε ένα βακτηριακό κύτταρο ελέγχεται γενετικώς από το ίδιο το πλασμίδιο. Ανάλογα με τον αριθμό πλασμιδιακών αντιγράφων υπάρχει αυστηρός (λίγα αντίγραφα) ή χαλαρός (πολλά αντίγραφα) έλεγχος αντιγραφής:

Πλασμίδιο	Αριθμός αντιγράφων
Puc	500-700
pBluescript®	300-500
GEM®	300-400
Ptz	>1000
pBR322	15-20
Pacyc	10-12
pSC101	~5

β. Να υπάρχει ένα μοναδικό σημείο δράσης ενός ή περισσότερων περιοριστικών ενζύμων στο πλασμίδιο, κατά προτίμηση μέσα στην αλληλουχία του δείκτη επιλογής. Με αυτό τον τρόπο όταν γίνεται ενσωμάτωση μίας αλληλουχίας DNA στο σημείο δράσης του περιοριστικού ενζύμου, το γονίδιο του δείκτη επιλογής απενεργοποιείται λόγω του ανασυνδυασμού. Υπάρχουν πλασμίδια που περιέχουν ένα πολυσυνδέτη (polylinker), δηλαδή μία DNA περιοχή που περιλαμβάνει θέσεις αναγνώρισης για περισσότερα από ένα ένζυμα περιορισμού.

γ. Να περιέχει δείκτες επιλογής. Συνήθως δείκτες επιλογής είναι γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (π.χ. αμπικιλίνη-ApR ή amp , τετρακυκλίνη-TcR ή tet, χλωραμφενικόλη-CmR, καναμυκίνη-KmR) ή γονίδια που ευθύνονται για την παραγωγή χρώσης όταν τα βακτήρια βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα (π.χ. β-γαλακτοσιδάση σε υπόστρωμα X-gal και IPTG).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pCR<sup>®</sup>2.1, pCRII-TOPO και pET16b.

**α) Πλασμιδιακός φορέας pCR<sup>®</sup>2.1 (Original TA Cloning<sup>®</sup> Kit, Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.)**

Ο φορέας pCR2.1 έχει μέγεθος 3.096bp.

Γονίδιο LacZα (1-587bp): Τμήμα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, κωδικοποιεί τον προαγωγέα του οπερονίου της λακτόζης.

T7 προαγωγέας / θέση εκκινήσεως (promoter/priming site) (362-381bp): Επιτρέπει την in vitro μεταγραφή με νοηματικό προσανατολισμό.

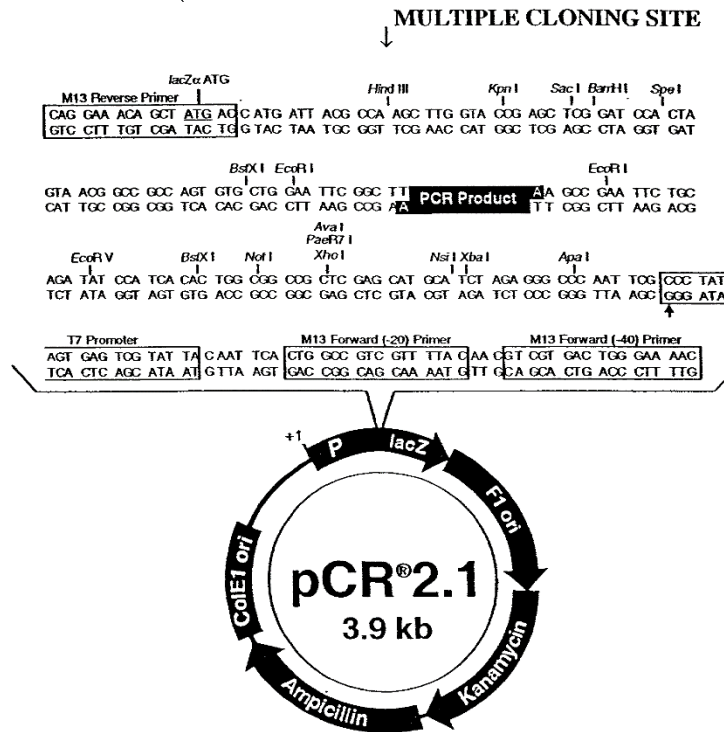
Περιοχή θέσεων κλωνοποίησης γονιδίων (Multiple cloning site) (234-355bp): Επιτρέπει την κλωνοποίηση / ενσωμάτωση του γονιδίου.

f1 περιοχή έναρξης αναπαραγωγής του πλασμιδιακού DNA (origin of replication) (546-960): Επιτρέπει τη «διάσωση» μονόκλωνων τμημάτων DNA.

ColE1 έναρξη (origin) (3111-3784bp): Επιτρέπει την αντιγραφή του πλασμιδίου σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων και την ανάπτυξη στα βακτήρια *E. coli*.

Γονίδιο αντίστασης στην καναμικίνη (Kanamycin resistance ORF, Kan<sup>R</sup>) (1294-2088): Εξασφαλίζει την επιλογή των μικροβίων (*E.coli*) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα με το γονίδιο αντίστασης Kan<sup>R</sup> στην καλλιέργεια (φαινοτυπική επιλογή).

Γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη (Ampicillin resistance ORF, Amp<sup>R</sup>) (2106-2966): Εξασφαλίζει την επιλογή των μικροβίων (*E.coli*) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα με το γονίδιο αντίστασης Amp<sup>R</sup> στην καλλιέργεια (φαινοτυπική επιλογή).



**β) Πλασμιδιακός φορέας pCR®II-TOPO (TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen Life Technologies Inc., U.S.A.)**

Ο πλασμιδιακός φορέας pCRII-TOPO έχει μέγεθος 3931bp.

Γονίδιο LacZα (1-547bp): Τμήμα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, κωδικοποιεί τον προαγωγέα του σπερονίου της λακτόζης.

T7 προαγωγέας / θέση εκκινήσεως (promoter/priming site) (364-383bp): Επιτρέπει την in vitro μεταγραφή με νοηματικό προσανατολισμό.

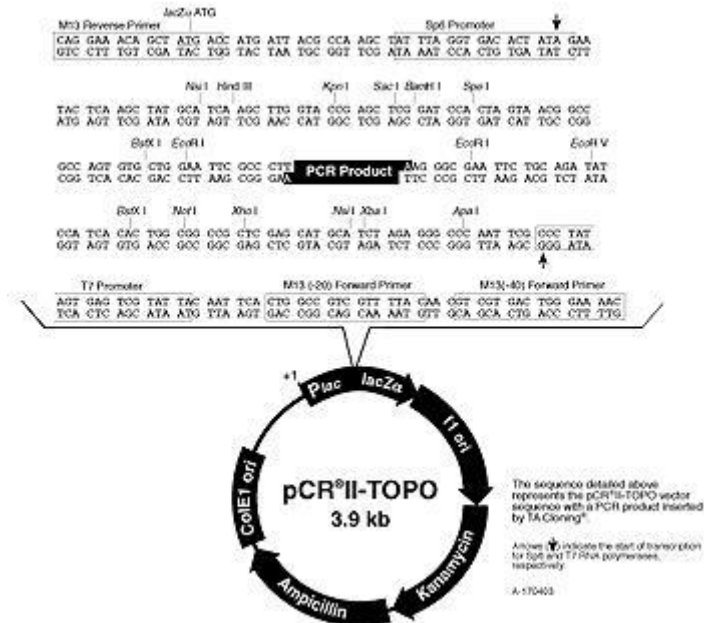
Περιοχή θέσεων κλωνοποίησης γονιδίων (Multiple cloning site) (234-357bp): Επιτρέπει την κλωνοποίηση / ενσωμάτωση του γονιδίου.

f1 περιοχή έναρξης αναπαραγωγής του πλασμιδιακού DNA (origin of replication) (548-985): Επιτρέπει τη «διάσωση» μονόκλωνων τμημάτων DNA.

ρUC έναρξη (origin) (3136-3809bp): Επιτρέπει την αντιγραφή του πλασμιδίου σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων και την ανάπτυξη στα βακτήρια *E. coli*.

Γονίδιο αντίστασης στην καναμυκίνη (Kanamycin resistance ORF, Kan<sup>R</sup>) (1319-2113): Εξασφαλίζει την επιλογή των μικροβίων (*E.coli*) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα με το γονίδιο αντίστασης Kan<sup>R</sup> στην καλλιέργεια (φαινοτυπική επιλογή).

Γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη (Ampicillin resistance ORF, Amp<sup>R</sup>) (2131-2991): Εξασφαλίζει την επιλογή των μικροβίων (*E.coli*) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα με το γονίδιο αντίστασης Amp<sup>R</sup> στην καλλιέργεια (φαινοτυπική επιλογή).



**γ) Πλασμιδιακός φορέας pET16b (Novagen Biosciences, Inc., Germany)**

Ο πλασμιδιακός φορέας pET16b έχει μέγεθος 5711bp και φέρει τα εξής επιμέρους χαρακτηριστικά:

T7 προαγωγέας (promoter) (466-482bp): Επιτρέπει την in vitro μεταγραφή με νοηματικό προσανατολισμό.

Περιοχή θέσεων κλωνοποίησης γονιδίων (Multiple cloning site) (213-259bp): Επιτρέπει την κλωνοποίηση / ενσωμάτωση του γονιδίου.

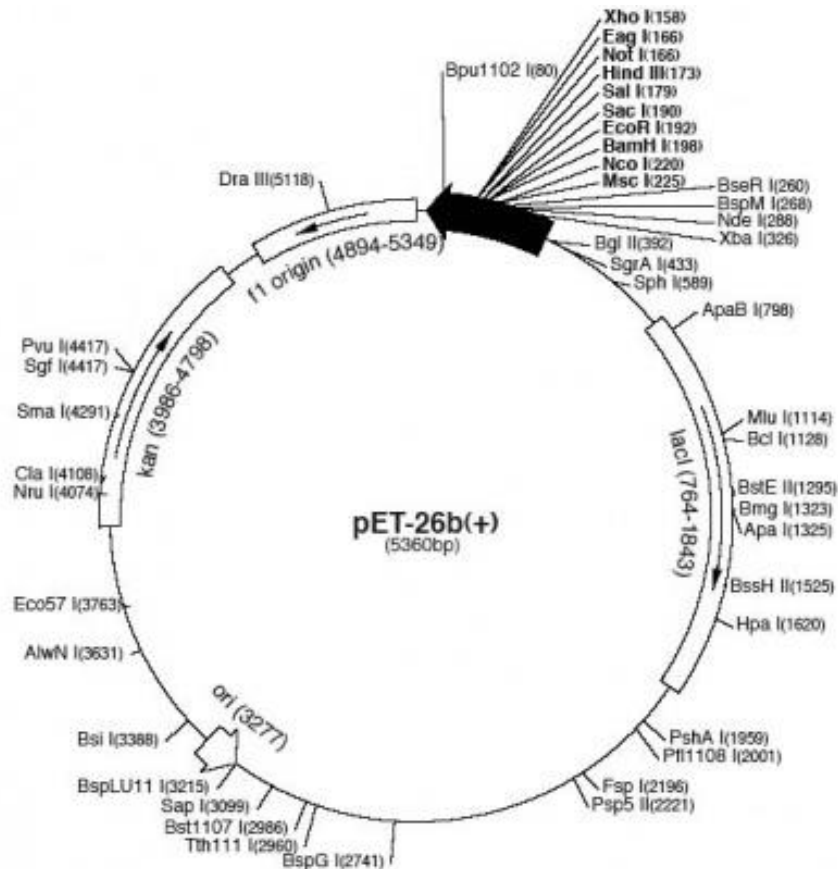
Αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί την ουρά των δέκα ιστιδίων (His-Tag coding sequence) (360-389bp): Το πεπτίδιο των 10 ιστιδίων δίνει τη δυνατότητα απομόνωσης και καθαρισμού της υβριδικής πρωτεΐνης με χρωματογραφία αχιστείας (σφαιρίδια Ni-NTA).

Αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί τη θέση αναγνώρισης από τον παράγοντα Χα: Στο καρβοξυτελικό άκρο της ουράς των δέκα ιστιδίων βρίσκεται η αμινοξική περιοχή που αναγνωρίζεται από τον παράγοντα Χα.

Γονίδιο *lacI* (869-1948bp): Επιτρέπει την παραγωγή του αναστολέα του οπερονίου της λακτόζης.

ρBR322 περιοχή έναρξης αναπαραγωγής του πλασμιδιακού DNA (3885bp)

Γονίδιο *bla* ( $Ap^R$ ) αντίστασης στην αμπικιλίνη (Ampicillin resistance ORF) (4646-5503bp): Εξασφαλίζει την επιλογή των μικροβίων (*E.coli*) που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα με το γονίδιο αντίστασης  $Ap^R$  στην καλλιέργεια (φαινοτυπική επιλογή).



### **B.2.11. Αντίδραση συνένωσης:**

Η ενσωμάτωση ενός τμήματος DNA ενδιαφέροντος στον αντίστοιχο πλασμιδιακό φορέα, επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Ο μοριακός λόγος των δύο αντιδρώντων δεν είναι συγκεκριμένος, αν και συνήθως συνίσταται λόγος 6:1 (τμήμα DNA:πλασμιδιακός φορέας).

Οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

DNA πλασμιδιακού φορέα	10ng
DNA τμήματος προς ενσωμάτωση	60ng
Ρυθμιστικό διάλυμα της T4 DNA λιγάσης (10X)	2μl
T4 DNA λιγάση (5units/μl)	1μl
H <sub>2</sub> O	Έως 20μl

Το πλασμίδιο και το τμήμα DNA προς ενσωμάτωση, επωάζονται αρχικά στους 70°C για 15min. Το μίγμα τοποθετείται γρήγορα στον πάγο για να ψυχθεί και ακολούθως γίνεται προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων. Η αντίδραση καταλύεται σε θερμοκρασία 16°C για διάστημα 12-16 ώρες. Η T4 λιγάση απενεργοποιείται μετά το πέρας της αντίδρασης με επώαση στους 70°C για 10min.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, θεωρητικά το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο είναι έτοιμο προς μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων.

Αν παρατηρηθεί υψηλό ποσοστό ανάπτυξης αποικιών παρουσία αντιβιοτικού, κρίνεται σκόπιμο να γίνει αποφωσφορυλίωση του χωρίς ένθεμα πλασμιδίου, πριν αυτό χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση συνένωσης.

### **B.2.12. Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης πλασμιδιακού φορέα:**

Ο πλασμιδιακός φορέας, ορισμένες φορές, κρίνεται απαραίτητο να υφίσταται αποφωσφορυλίωση, όπως και το προς ενσωμάτωση τμήμα DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται για να ελαχιστοποιηθεί η επανακυκλοποίηση του πλασμιδιακού φορέα χωρίς να έχει γίνει η εισαγωγή του τμήματος DNA. Συγκεκριμένα, απομακρύνονται οι φωσφορικές ομάδες από τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στα δύο άκρα του κομμένου πλασμιδίου, εμποδίζοντας οποιαδήποτε περίπτωση σχηματισμού φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ τους.

Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης γίνεται ως εξής:

DNA πλασμιδιακού φορέα	100ng
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφατάσης (10X)	5μl
CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (Takara)	2μl
H <sub>2</sub> O	Έως 50μl



Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 37°C για 30min. Μετά το τέλος της επώασης, γίνεται η απενεργοποίηση του ενζύμου, προσθέτοντας στο διάλυμα 5mM EDTA, 0,5% SDS, 50μg πρωτεΐνωση K και το μίγμα επωάζεται στους 56°C για 30min και επιπλέον στους 75°C για 10min.

Ακολουθεί προσθήκη H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 650μl και κατόπιν, γίνεται εκχύλιση του πλασμιδιακού φορέα με βασική φαινόλη. Προστίθεται ίσος όγκος (~650μl) διαλύματος βασικής φαινόλης και το διάλυμα ανακινείται έντονα (vortex) για 5min. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 12.000xg για 10min. Το υπερκείμενο (~600μl) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erpendorf πολύ προσεκτικά (αναρρόφηση υπερκειμένου μέχρι τη διεπιφάνεια). Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος (~600μl) χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1, για την απομάκρυνση της εναπομείνουσας φαινόλης, ανακινούνται έντονα (vortex) για 5min και φυγοκεντρούνται στις 12.000xg για 10min. Κάθε φορά απομονώνεται η υδατική στοιβάδα, οπότε το υπερκείμενο (~600μl) μεταφέρεται σε δύο νέα σωληνάκια erpendorf (από 300μl) και προστίθενται 2,5 όγκοι 100% αιθανόλης στο καθένα, CH<sub>3</sub>COONa 3M (1:10 του τελικού όγκου) και 3μl γλυκογόνο. Το διάλυμα αφήνεται στον πάγο για 30min και φυγοκεντρείται στις 12.000xg για 10min για να γίνει η κατακρήμνιση του DNA. Το κάθε ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα 70% αιθανόλης και διαλυτοποιείται τελικά σε απεσταγμένο νερό ή διάλυμα TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 8,0) και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του για την αντίδραση συνένωσης (Sambrook et al., 1989).

### **B.2.13. ΤΑ κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα pCR2.1:**

Ο φορέας pCR2.1 έχει μέγεθος 3.096bp, χρησιμοποιείται κυρίως για την κλωνοποίηση τύπου TA (Thymine-Adenine complementation) και για την κλωνοποίηση του έχει δύο δείκτες επιλογής: **α.** ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλίνη και **β.** ένας γόνος lacZ' που παράγει την β-γαλακτοσιδάση.

Ο πολυσυνδέτης βρίσκεται μέσα στο γονίδιο lacZ'. Μετά το μετασχηματισμό, τα βακτήρια που δεν έχουν μετασχηματισθεί με το πλασμίδιο, δεν έχουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, που έχει προστεθεί στο θρεπτικό υπόστρωμα με αποτέλεσμα να μην επιβιώνουν. Βακτήρια που έχουν μετασχηματισθεί αλλά το πλασμίδιο δεν είναι ανασυνδυασμένο (δεν περιέχει ένθεση DNA σε μία από τις θέσεις περιορισμού του πολυσυνδέτη), έχουν χρώμα μπλε γιατί παράγουν την β-γαλακτοσιδάση και υδρολύουν το υπόστρωμα X-gal.

Η α-συμπληρωματικότητα είναι η διαδικασία κατά την οποία το α-πεπτιδίο (146 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου) της β-γαλακτοσιδάσης, που παράγεται από το lacZ' γονίδιο του πλασμιδίου, αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο (ω-πεπτιδίο), που παράγεται από ορισμένα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* (πχ. DH5α, SURE κλπ) από τα οποία έχει

αφαιρεθεί το γονίδιο *lacZ'*, με αποτέλεσμα την εμφανή δράση της β-γαλακτοσιδάσης. Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την διάσπαση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Στο βακτηριακό θρεπτικό υπόστρωμα προστίθεται μία χρωμογενής ένωση, η X-gal (5-chloro-4-bromo-3-indolyl-β-D-galactoside), η οποία υδρολύεται παρουσία β-γαλακτοσιδάσης και οι βακτηριακές αποικίες αποκτούν μπλε χρώμα.

State of the plasmid...	Intact <i>lacZ</i> -alpha gene	Interrupted <i>lacZ</i> -alpha
The cause?	No insertion at ligation	Insertion
State of the X-gal...	Cleaved by <i>lacZ</i> protein	No cleavage
Color of colony on plate?	<b>BLUE</b>	<b>WHITE</b>

Πίνακας 6: Ιστοχημική μέθοδος ανίχνευσης δράσης της β-γαλακτοσιδάσης ("blue/white screening").

Εκτός του γονιδίου *lacZ'*, το πλασμίδιο φέρει και το *lacI*. Το γονίδιο *lacI* παράγει μία πρωτεΐνη-καταστολέα, η οποία εμποδίζει την έκφραση του *lacZ'* και την περαιτέρω παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης. Η πρωτεΐνη-καταστολέας αδρανοποιείται με την προσθήκη του IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) –ένα δομικό ανάλογο της λακτόζης- στο θρεπτικό υπόστρωμα των βακτηρίων. Ο πολυσυνδέτης (οι θέσεις δράσης των περιοριστικών ενζύμων) βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια *lacI* και *lacZ'*. Όταν λοιπόν γίνεται μία DNA ένθεση σε αυτή την περιοχή δεν παράγεται το α-πεπτιδίο της β-γαλακτοσιδάσης, με αποτέλεσμα οι βακτηριακές αποικίες να παραμένουν άσπρες.

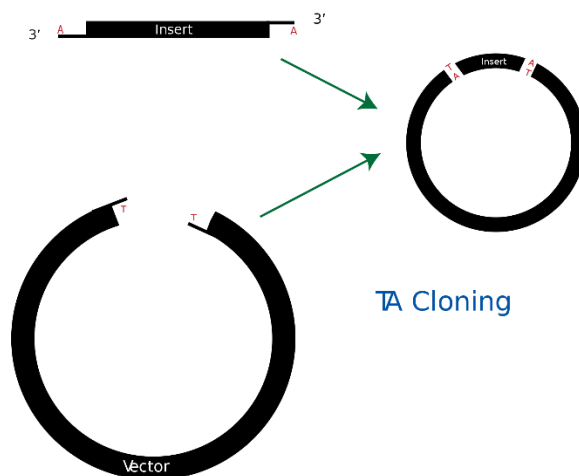
Με τους δύο δείκτες επιλογής που περιέχονται στα πλασμίδια pCR2.1 (ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης) είναι δυνατή η επιλογή μετασχηματισμένων βακτηριακών αποικιών (αποικίες που δεν περιέχουν το πλασμίδιο δεν επιβιώνουν στο θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει αμπικιλίνη) και η αναγνώριση αποικιών που δεν περιέχουν (μπλε αποικίες) ή περιέχουν (άσπρες αποικίες) DNA ένθεση.

Τέλος, βακτηριακές αποικίες που περιλαμβάνουν DNA ένθεση, η οποία βρίσκεται ενσωματωμένη σε κάποια θέση δράσης περιοριστικού ενζύμου μέσα στον πολυσυνδέτη, παραμένουν άσπρες γιατί έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο *lacZ'* και δεν είναι εφικτή η παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης.

- α. Το πλασμίδιο να μην μπορεί να μεταβιβάζεται ούτε να κινείται, για λόγους ασφάλειας.
- β. Το μοριακό βάρος του πλασμιδίου πρέπει να είναι μικρό, γιατί η αποδοτικότητα μετασχηματισμού και ο αριθμός αντιγράφων μειώνεται όσο μεγαλώνει το μοριακό βάρος του πλασμιδίου.
- γ. Να είναι δυνατή η εύκολη απομόνωση του πλασμιδίου από το βακτηριακό γονιδίωμα χωρίς να καταστρέφεται η δομή του πλασμιδίου.

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου της κωδικής αλληλουχίας της α-σφαιρίνης<sub>W/T</sub> που ενισχύθηκε, στο πλασμίδιο pCR2.1 χρησιμοποιήθηκε το kit Original Cloning® Kit with pCR2.1®. Πρόκειται για μια γρήγορη, σε ένα βήμα στρατηγική κλωνοποίησης για την άμεση ένθεση ενός PCR προϊόντος μέσα σε έναν πλασμιδιακό φορέα.

Η Taq Πολυμεράση έχει μια μη εξαρτώμενη από το εκμαγείο ενεργότητα, κατά την οποία προσθέτει μονές δεοξαδενοσίνες (A hangs) στα 3'-άκρα του ενισχυόμενου PCR προϊόντος. Συνίσταται το προϊόν της αντίδρασης PCR να χρησιμοποιείται άμεσα στην αντίδραση συνένωσης και να αποφεύγεται η αποθήκευσή του για μεγάλο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να μην αλλοιώνονται τα άκρα που προστίθενται από την DNA πολυμεράση. Ο γραμμικός φορέας που παρέχεται με το kit αυτό, έχει επίσης 2-3 μονά μόρια θυμίνης στο 3'-άκρο, καθιστώντας τον έτσι ιδανικό για κλωνοποιήσεις μορίων με άκρα αδενίνης. Με την προσθήκη της T4 DNA λιγάσης, επιτυγχάνεται η συνένωση του PCR ενθέματος με τον φορέα.



Εικόνα 36: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου TA cloning. [“TA Cloning Kit Manual”. Invitrogen]

#### Η αντίδραση TA cloning:

pCR2.1 (50ng)	1μl
Προϊόν PCR	3μl
Ρυθμιστικό διάλυμα της T4 DNA λιγάσης (10X)	1μl
T4 DNA λιγάση	1μl
H <sub>2</sub> O	Έως 10μl

Η αντίδραση καταλύεται σε θερμοκρασία 16°C για διάστημα 12-16 ώρες. Η T4 λιγάση απενεργοποιείται μετά το πέρας της αντίδρασης με επώαση στους 70°C για 10min.

Μετά την κλωνοποίηση ακολουθεί απομόνωση του ενθέματος, που επιτυγχάνεται με πέψη του αντίστοιχου πλασμιδιακού φορέα με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες (EcoRI).

### **B.2.14. ΤΟΡΟ ΤΑ κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακό φορέα pCRII-ΤΟΡΟ:**

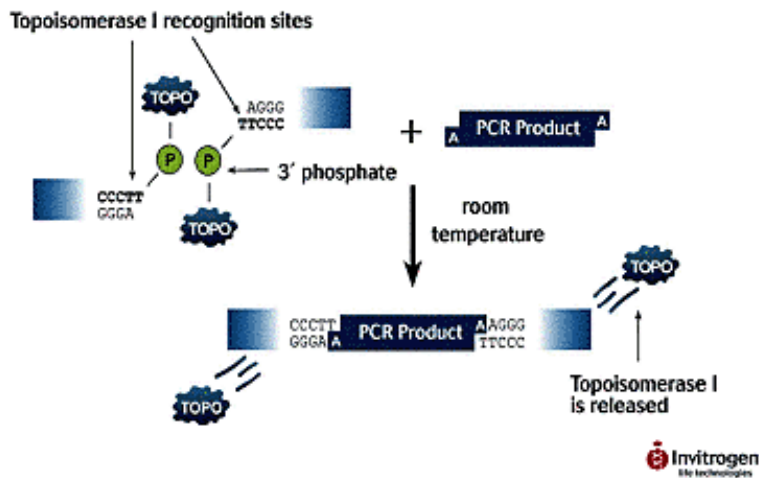
Η μέθοδος ΤΟΡΟ® ΤΑ Cloning® αποτελεί μια υψηλής αποτελεσματικότητας, διάρκειας μόνο 2 ωρών, στρατηγική κλωνοποίησης, για την άμεση ένθεση των PCR προϊόντων μέσα σε έναν πλασμιδιακό φορέα. Η μέθοδος αυτή διακρίνεται για την μη μεσολάβηση του ενζύμου της λιγάσης.

Ο φορέας pCRII-ΤΟΡΟ παρέχεται γραμμικός, με 3'-άκρα θυμίνης, καθώς επίσης και το ένζυμο τοποϊσομεράση I, ομοιοπολικά συνδεδεμένο στα άκρα του γραμμικού φορέα.

Η Ταq-πολυμεράση έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζει δράση τρανσφεράσης, άνευ εκμαγείου, η οποία προσθέτει κατάλοιπα δεοξυ-αδενίνης (A) στο 3'-άκρο των προϊόντων PCR. Ο φορέας που παρέχεται γραμμικός, όπως αναφέρθηκε, φέρει στο 3'-άκρο κατάλοιπα δεοξυ-θυμίνης (T). Η συμπληρωματικότητα ανάμεσα στα κατάλοιπα αδενίνης και θυμίνης, δίνει την δυνατότητα της συνένωσης του PCR προϊόντος με τον γραμμικό φορέα.

Οι τοποϊσομεράσες του DNA, αποτελούν μια ομάδα ενζύμων, τα οποία υπάρχουν τόσο στα ευκαρυωτικά όσο και στα προκαρυωτικά κύτταρα, όπου δρουν στην τοπολογία του DNA, προκαλώντας ή καταργώντας ρήγματα στις έλικες του DNA. Οι έρευνες, από την ανακάλυψή τους από τον Wang το 1971 μέχρι σήμερα, έδειξαν ότι είναι απαραίτητα ένζυμα στις διαδικασίες αναπαραγωγής, αντιγραφής, μίτωσης και ανασυνδυασμού του DNA. Έχουν εντοπισθεί πέντε τοποϊσομεράσες (I-V), από τις οποίες μόνο οι δύο (I και II) αποτελούν στόχο κυτταροστατικών παραγόντων. Οι δύο τοποϊσομεράσες I και II, ταξινομούνται έτσι, ανάλογα με την ιδιότητά τους να δρουν στη μία ή στις δύο έλικες του DNA αντίστοιχα. Αμφότερες είναι πυρηνικά ένζυμα, υπεύθυνα για την τροποποίηση ή την διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του DNA.

Η δράση της τοποϊσομεράσης I δεν εξαρτάται από την παρουσία ATP. Δεσμεύεται στην διπλή έλικα του DNA και τεμαχίζει μία από τις έλικες του διμερούς, σχηματίζοντας ταυτόχρονα έναν ομοιοπολικό δεσμό ανάμεσα στο τεμαχισμένο DNA και στο κατάλοιπο τυροσίνης του ενζύμου. Μέσα από ένα μηχανισμό περιστροφής, η αλυσίδα που δεν έχει τεμαχιστεί, μπορεί να απελευθερώσει τη «δύναμη» συστροφής της διπλής έλικας του DNA (αποελίκωση).



Εικόνα 37: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου TOPO TA Cloning. [TOPO TA cloning manual, [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)]

Στο γραμμικό φορέα pCRII-TOPO, βρίσκεται συνδεδεμένη η τοποϊσομεράση I του ιού *Vaccinia virus*, η οποία κόβει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς έπειτα από την αλληλουχία 5'-CCCTT (Shuman, 1991). Η ενέργεια από τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού συντηρείται από το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του 3'-φωσφορικού άκρου της κομμένης αλυσίδας και του τυροσινικού κατάλοιπου (tyr-274) της τοποϊσομεράσης. Ο φωσφορο-τυροσινικός δεσμός μεταξύ του DNA και του ενζύμου μπορεί ακολούθως να προσβληθεί από το 5'-υδροξύλιο από την πρώτη κομμένη αλυσίδα, αναστρέφοντας την αντίδραση και απελευθερώνοντας την τοποϊσομεράση (Shuman, 1992).

Με το πέρας της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του τμήματος DNA προς ένθεση, το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορεύεται και εκχυλίζεται από το πήκτωμα αγαρόζης. Συνίσταται το προϊόν της αντίδρασης PCR να χρησιμοποιείται άμεσα στην αντίδραση συνένωσης και να αποφεύγεται η αποθήκευσή του για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Για την αντίδραση χρησιμοποιείται το TOPO® TA Cloning® Kit, της Invitrogen στο οποίο περιέχεται ο φορέας pCRII-TOPO.

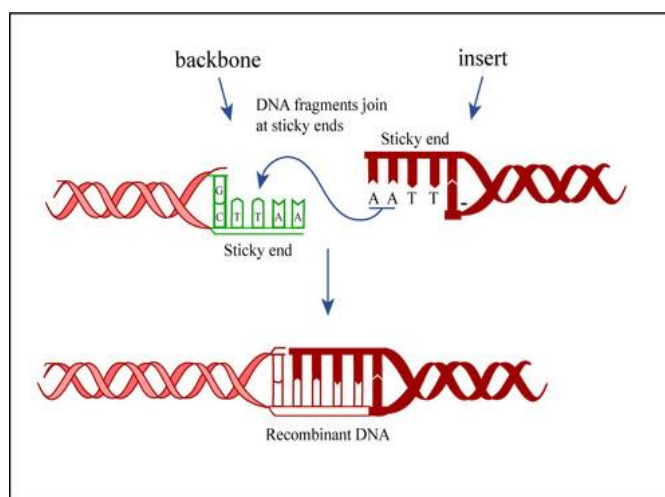
Η αντίδραση TOPO cloning έχει ως εξής:

Salt Solution	0,5μl
Προϊόν PCR	2μl
TOPO φορέας	0,5μl

Ακολουθεί επώαση του μίγματος στους 25°C για 2-2<sup>1/2</sup> ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης, θεωρητικά το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο TOPO με το ένθεμα DNA, είναι έτοιμο για μετασχηματισμό επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων.

### **B.2.15. Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης (pET16b) με βάση το σχηματισμό συμπληρωματικών άκρων (“sticky ends”):**

Όπως γνωρίζουμε, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA, μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων. Έχουν απομονωθεί πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες, όποτε συναντούν την ειδική αλληλουχία στο γονιδίωμα, κόβουν κάθε αλυσίδα σε συγκεκριμένη θέση αφήνοντας μονόκλωνες ουρές από αζευγάρωτα νουκλεοτίδια. Γενικά τα περιοριστικά ένζυμα διασπούν το DNA στο ακριβές σημείο της αλληλουχίας αναγνώρισής τους, ανεξάρτητα από την προέλευση του γενετικού υλικού. Τα κολλώδη (sticky) συμπληρωματικά άκρα, που δημιουργούν τα περισσότερα ένζυμα είναι πολύ χρήσιμα στη δημιουργία ανασυνδυασμένων μορίων DNA.



Εικόνα 38: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου κλωνοποίησης με συμπληρωματικά (“sticky”) άκρα (Stryer et al, Βιοχημεία, Τόμος I, 2006).

Ο πλασμιδιακός φορέας pET16b χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση των συντηγμένων (fusion) αλληλουχιών *TAT-α-σφαιρίνη-HA*, *α-σφαιρίνη-HA*, *TAT-SCO2* και *TAT-SCO2-NGR*.

Οι επιθυμητές αλληλουχίες που ενισχύονται με αντίδραση PCR, με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές (Ενότητα B.2.25), οι οποίοι περιελάμβαναν εξειδικευμένες αλληλουχίες αναγνώρισης για τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NdeI-forward primer, XhoI-backward primer) κλωνοποιούνται με τη μέθοδο TOPO TA cloning στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Το τμήμα DNA προς ένθεση στον pET16b, προέρχεται από πέψη του πλασμιδίου pCRII-TOPO και όχι από απλή πέψη του ενισχυμένου προϊόντος PCR. Η διαδικασία επιτυγχάνεται με τον τρόπο αυτό, γιατί οι ενδονουκλεάσες περιορισμού παρουσιάζουν βέλτιστη δραστηριότητα όταν υπάρχουν πάνω από 6 ζεύγη βάσεων και στις δύο πλευρές της αλληλουχίας αναγνώρισης του ενζύμου.

Η κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών, που βασίζεται στην ύπαρξη συμπληρωματικών μονόκλωνων άκρων («sticky ends»), ξεκινάει από την επώαση τόσο του πλασμιδιακού φορέα [pET16b] όσο και του πλασμιδίου [pCRII-TOPO-fusion γονίδιο X] με δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, την NdeI και την XhoI. Οι δύο διαφορετικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιούνται για να διασφαλιστεί σωστά προσανατολισμένη είσοδος του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα.

Αφού πραγματοποιηθεί η αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού φορέα και του πλασμιδίου με τη συντηγμένη αλληλουχία «κωδικοποίησης», ακολουθεί θερμική απενεργοποίηση των ενζύμων της αντίδρασης, στους 60°C για 15min.

Ακολούθως, τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης και εκλούνται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πριν. Εντούτοις, παρατηρήθηκε ότι ο πλασμιδιακός φορέας κατά την ηλεκτροφόρηση, λόγω του μεγάλου του μεγέθους, περνάει με μεγαλύτερη δυσκολία διαμέσου του πηκτώματος αγαρόζης, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται τα μονόκλινα συμπληρωματικά άκρα που έχουν δημιουργηθεί κατά την αντίδραση πέψης. Για το λόγο αυτό, ηλεκτροφορείται ένας μικρός όγκος του προϊόντος πέψης για διαγνωστικούς σκοπούς και ο υπόλοιπος όγκος εκλούζεται με το πρωτόκολλο PCR Clean UP από το kit Nucleospin Extract II, της Macherey-Nagel, χωρίς να μεσολαβεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, αλλά απευθείας μεταφορά του προϊόντος πέψης στη στηλίτσα έκλουσης. Αν κριθεί απαραίτητο, ο πλασμιδιακός φορέας, πρέπει να υποστεί αποφωσφορυλίωση, για να διασφαλιστεί η αποφυγή της επανακυκλοποίησής του. Το πλασμίδιο και το τμήμα DNA επωάζονται σε αντίδραση συνένωσης με λόγο 1:3 (vector:insert).

Αντίδραση συνένωσης pET16b με το τμήμα DNA του fusion γονιδίου:

pET16b μετά από πέψη με NdeI/XhoI	110ng
Τμήμα DNA μετά από πέψη με NdeI/XhoI	X ng *

\*όπου X ng τμήματος DNA →

$$\text{Insert mass in ng} = \left( \frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \right) \times \text{molar ratio of } \left( \frac{\text{insert}}{\text{vector}} \right)$$

$$(\text{molar ratio of insert/vector} = 3/1)$$

Ο υπολογισμός της ποσότητας του προϊόντος πέψης του τμήματος DNA με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, που χρειάζεται στην αντίδραση συνένωσης με τον πλασμιδιακό φορέα, μπορεί να γίνει και με τη βοήθεια του εργαλείου βιοπληροφορικής [http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html).

Ο πλασμιδιακός φορέας και το τμήμα DNA προς ένθεση, επωάζονται στους 70°C για 10min και απευθείας τοποθετούνται στον πάγο.

Ακολούθως, προστίθενται στην αντίδραση τα εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα T4 λιγάσης (10X)	2μl
T4 DNA λιγάση	1μl
H <sub>2</sub> O	Έως 20μl

Η αντίδραση καταλύεται σε θερμοκρασία 16°C για διάστημα 12-16 ώρες. Η T4 λιγάση απενεργοποιείται μετά το πέρας της αντίδρασης με επώαση στους 70°C για 10min.

### **B.2.16. Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E.coli***

Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας βακτηρίων:

α) Υγρά Θρεπτικά Μέσα Καλλιέργειας Βακτηρίων

Το θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύσσονται τα βακτηριακά στελέχη *E.coli* είναι το L.B. (Luria – Bertani medium) (*Sambrook J. et al., 1989*), του οποίου η σύσταση είναι η εξής:

0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης
1,0% w/v ενζυμική τρυπτόνη
1,0% w/v NaCl
1mM NaOH

Το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται σε αυτόκαυστρο στους 121°C, υπό πίεση 1 Atm, για 20min και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής προστίθενται στο μέσο, λίγο πριν τη χρήση του.

Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται στους 37°C, υπό έντονη ανάδευση στα 225rpm.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν για ανάπτυξη καλλιεργειών βακτηριακών κυττάρων τα στελέχη *E.coli* INVaF, TOP10 και C43 (DE3).

β) Στερεά Θρεπτικά Μέσα Καλλιέργειας Βακτηρίων (τριβλία καλλιέργειας)

Για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού μέσου, προστίθεται 1,5% άγαρ στο υγρό θρεπτικό μέσο LB, αποστειρώνεται και αποχύνεται σε τριβλία Petri βακτηριακής καλλιέργειας και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η θερμοκρασία να κατέβει στους 50°C και ακολούθως προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού (70μg/ml). Το θρεπτικό αποχύνεται στα τριβλία και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Αργότερα, τα τριβλία με το στερεό θρεπτικό τοποθετούνται ανάποδα σε επωαστήριο στους 37°C για 16 ώρες (overnight) για να διαπιστωθεί ότι είναι στείρα και δεν αναπτύσσονται οποιαδήποτε μικρόβια. Τα τριβλία φυλάσσονται στο ψυγείο (4°C).



### **B.2.17. Παρασκευή επιδεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων:**

Τα βακτηριακά κύτταρα των *E.coli* διαθέτουν το αδιαπέραστο κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο:

- Περικλείει το πρωτόπλασμα
- Εντοπίζεται εξωτερικά από την κυτταρική μεμβράνη
- Είναι δομή πάχους 10-25nm, ανθεκτική, άκαμπτη με μικρή ελαστικότητα, πορώδης
- Ελεύθερα διαπερατή σε μόρια μάζας < 10kDa και διαμέτρου < 1nm

Τα χαρακτηριστικά αυτά του βακτηριακού τοιχώματος καθιστούν αδύνατη την είσοδο του πλασμιδίου στο εσωτερικό τους.

Η τεχνική αυτή έχει ως σκοπό τη δημιουργία βακτηριακών κυττάρων ικανών (επιδεκτικών) να «προσλάβουν» οποιοδήποτε ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA που βρίσκεται στο περιβάλλον τους κατά το μετασχηματισμό.

Η μέθοδος παρασκευής επιδεκτικών κυττάρων είναι μια διαδικασία δύο ημερών κ εκμεταλλεύεται το  $\text{CaCl}_2$ , το οποίο σχηματίζει πόρους στο βακτηριακό τοίχωμα με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η πρόσληψη εξωγενούς γενετικού υλικού.

Μέρα 1:

Σε τριβλίο χωρίς αντιβιοτικό επιστρώνεται μικρός όγκος από κύτταρα TOP10'/INVa/C43 τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στους  $-80^\circ\text{C}$ . Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί στον επωαστήρα, στους  $37^\circ\text{C}$ , κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Μέρα 2:

Στο πιάτο που αναπτύχθηκε η καλλιέργεια, αναμένονται να αναπτυχθούν πολλές λευκές αποικίες, από τις οποίες επιλέγεται μια κεντρική αποικία και αποσπάται από το πιάτο με τη μύτη ενός tip. Ακολούθως, με την αποικία αυτή εμβολιάζονται 50ml υγρού θρεπτικού LB, χωρίς αντιβιοτικό και επωάζονται στους  $37^\circ\text{C}$ , υπό ανάδευση για περίπου 5 ώρες.

Μετά το πέρας των 4 από τις 5 ώρες, ξεκινάει η φωτομέτρηση, στα 600nm, σε 1ml από την καλλιέργεια κάθε φορά, με σκοπό τον υπολογισμό της συγκέντρωσης και την πορεία ανάπτυξης των βακτηρίων σε αυτή. Όταν η οπτική πυκνότητα φτάσει περίπου  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,375$ , θεωρείται ότι η εκθετική αύξηση των βακτηρίων έχει ξεκινήσει.

Τα κύτταρα γίνονται δεκτικότερα όταν βρίσκονται στην λογαριθμική ή εκθετική φάση ανάπτυξης. Η καμπύλη ανάπτυξης εκφράζει την βακτηριακή ανάπτυξη σε συνάρτηση με το χρόνο και διακρίνεται σε τέσσερα κύρια στάδια: τη φάση προσαρμογής, την εκθετική, τη στατική φάση και τη φάση ύφεσης (ή φάση θανάτου).

Ακολούθως, η καλλιέργεια τοποθετείται σε παγωμένο falcon των 50ml και τα επόμενα στάδια της παρασκευής επιδεκτικών κυττάρων διεξάγονται στον πάγο.

Η καλλιέργεια αφήνεται στον πάγο για 10min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στην ψυχώμενη φυγόκεντρο (4°C) για 10min στα 4.000rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει με αναποδογυρισμένο το falcon για 1min. Στη συνέχεια, το ίζημα διαλυτοποιείται σε 10ml παγωμένου διαλύματος  $\text{CaCl}_2$  0,1M και αφήνεται για 5min στον πάγο. Έπειτα, φυγοκεντρείται στην ψυχώμενη φυγόκεντρο (4°C) για 10min στα 4.000rpm, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει με αναποδογυρισμένο το falcon για 1min. Στη συνέχεια, το ίζημα διαλυτοποιείται με ήπιο πιπετάρισμα, σε 2ml παγωμένου διαλύματος  $\text{CaCl}_2$  0,1M και αποθηκεύεται στο ψυγείο (4°C). Ο μετασχηματισμός των φρέσκων επιδεκτικών κυττάρων, παρουσιάζει βέλτιστη αποτελεσματικότητα την επόμενη μέρα από την παρασκευή τους. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά του ελαττώνεται μετά το πέρασ 3 ημερών.

### **B.2.18. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων:**

Η μεταφορά του ανασυνδυσμένου μορίου DNA σε ένα βακτηριακό κύτταρο-ξενοστή ονομάζεται μετασχηματισμός. Τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα θεωρούνται ικανά να προσλάβουν με ευκολία, έπειτα από ειδικούς χειρισμούς εξωγενές γενετικό υλικό που βρίσκεται στο περιβάλλον τους.

Από τα φρέσκα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα TOP10/INVa/C43 που έχουν παρασκευαστεί την προηγούμενη μέρα, μεταφέρω, με ψυχώμενη πιπέτα, 200μl σε ψυχώμενο tube των 1,5ml. Ακολούθως, εμβολιάζονται τα κύτταρα με 4μl από το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης (ανασυνδυσμένο πλασμίδιο) και αναμειγνύω με τη μύτη της πιπέτας. Αφήνονται για επώαση 30min στον πάγο, χωρίς να μετακινηθούν καθόλου. Παράλληλα, σε τριβλίο με αμπικικιλίνη (50mg/ml), απλώνονται 20μl Xgal [80mg/ml] και 40μl IPTG [100mM] όταν πρόκειται για TOP10 κύτταρα (TA cloning) ή μόνο IPTG [100mM] όταν πρόκειται για INVa (TA cloning). Τα βακτηριακά κύτταρα μεταμορφωμένα με τον pET16b δεν απαιτούν επιπλέον επίστρωση με Xgal ή IPTG (“sticky ends” cloning). Τα τριβλία αφήνονται να απορροφήσουν τις επιστρώσεις καθώς προχωράει η διαδικασία του μετασχηματισμού.

Μετά την επώαση των 30min στον πάγο, τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ στους 42°C για ακριβώς 90sec. Αμέσως μετά, τα κύτταρα μεταφέρονται στον πάγο για 2min και ακολούθως γίνεται προσθήκη 800μl από υγρό θρεπτικό LB και αφήνονται για επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση.

Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση για 3min στα 3.000rpm, το υπερκείμενο απορρίπτεται, περίπου 800μl από αυτό, και το ίζημα διαλυτοποιείται στα υπόλοιπα 200μl περίπου LB. Απλώνονται τα 200μl στο τριβλίο με την αμπικικιλίνη (ή και το Xgal και το IPTG) και αφήνεται την καλλιέργεια να αναπτυχθεί στον επωαστήρα, στους 37°C, για 16 ώρες.

### **B.2.19. Επιλογή βακτηριακής αποικίας E.coli που φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ενδιαφέροντος:**

A. Επιλογή ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με τη χρήση αντιβιοτικών:

Την επόμενη μέρα του μετασχηματισμού, αφού το τριβλίο επωάστηκε στους 37°C για 16 ώρες, αναμένεται να εμφανιστούν πολλές λευκές αποικίες, που αντιστοιχούν μόνο στα βακτήρια που έχουν προσλάβει πλασμιδιακό DNA.

Ακολούθως, επιλέγονται ορισμένοι κλώνοι, 6-10 σε αριθμό με τη βοήθεια ενός tip πιπέτας, ξύνοντας απαλά την επιφάνεια του τριβλίου, στο σημείο της λευκής αποικίας πάνω στο άγαρ. Το tip με την επιλεγμένη αποικία εμβολιάζει 3ml υγρό θρεπτικό LB και αμπικικιλίνη (50mg/ml). Οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37°C, υπό ανάδευση, για 16 ώρες και την επόμενη μέρα ακολουθούνται πρωτόκολλα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.

B. Επιλογή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με την ιστοχημική μέθοδο ανίχνευσης δράσης της β-γαλακτοσιδάσης (blue/white screening method):

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω (TA κλωνοποίηση), η ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης βασίζεται στην ύπαρξη του γονιδίου lacZ (το αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου της β-γαλακτοσιδάσης), ενώ το βακτηριακό χρωμόσωμα περιλαμβάνει επίσης τμήμα του γονιδίου lacZ (το καρβοξυτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου αυτού). Όταν τα δύο αυτά τμήματα ενωθούν, σχηματίζεται η πλήρης λειτουργική πρωτεΐνη. Η εισαγωγή ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα έχει ως αποτέλεσμα την διακοπή της παραγωγής της β-γαλακτοσιδάσης, χωρίς βέβαια να επηρεάζεται το αναγνωστικό πλαίσιο.

Για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιούνται δύο ουσίες: το X-Gal και το IPTG. Η ουσία X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside) αποτελεί χρωμογόνο υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης και η διάσπαση του από αυτή προσδίδει μπλε χρώμα στις βακτηριακές αποικίες. Το IPTG (ισοπρότυλο-β-D-θειογαλακτοπυρανοσίδης) αποτελεί τον επαγωγέα της έκφρασης του γονιδίου lacZ.

Το τριβλίο με το άγαρ στο οποίο επιστρώνονται τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικικιλίνη), επιστρώνονται επίσης 20μl Xgal [80mg/ml] και 40μl IPTG [100mM] όταν πρόκειται για TOP10 κύτταρα (TA cloning) ή μόνο IPTG [100mM] όταν πρόκειται για INVa (TA cloning). Τα τριβλία αφήνονται στους 37°C και στο σκοτάδι για να απορροφηθούν οι ουσίες αυτές, πριν επιστρωθούν τα μετασχηματισμένα βακτήρια.

Μετά την επίστρωση των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων, επιλέγονται με προσοχή γύρω στις 15 λευκές, κεντρικές και όχι δορυφορικές αποικίες και 1-2 μπλε αποικίες που λειτουργούν ως control και που θεωρητικά έχουν προσλάβει το αρχικό πλασμίδιο το οποίο δεν περιλαμβάνει το ένθεμα ενδιαφέροντος.

Η κάθε αποικία αποσπάται από το τριβλίο με τη μύτη ενός «tip» και εμβολιάζει 3ml υγρό θρεπτικό LB και αμπικιλίνη (50mg/ml). Οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37°C, υπό ανάδευση, για 16 ώρες.

### **B.2.20. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli*:**

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Ανάπτυξη μετασχηματισμένης βακτηριακής καλλιέργειας
- Συλλογή και λύση των κυττάρων
- Καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA

#### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας το Plasmid DNA Purification kit:

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τον κάθε κλώνο που καλλιεργείται ξεχωριστά, σε 3ml υγρό LB, χρησιμοποιήθηκε το Plasmid DNA Purification kit, της Macherey-Nagel.

Σε ένα tube μεταφέρεται 1,5ml από την καλλιέργεια και φυγοκεντρείται στα 11.000g για 30sec. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλυτοποιείται πλήρως σε 250μl A1 Buffer, το οποίο φυλάγεται στους 4°C, με πιπετάρισμα και ήπιο vortex. Ακολουθώντας, γίνεται προσθήκη 250μl A2 Buffer, με απλή ανακίνηση 6-8 φορές. Συνίσταται η αποφυγή του vortex. Αφήνονται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 300μl A3 Buffer με απλή ανακίνηση 6-8 φορές. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5-7min στα 11,000g, μέχρι το υπερκείμενο να είναι διαυγές.

Μια ειδική στήλη τοποθετείται σε collection tube και εκεί μεταφέρεται το υπερκείμενο σε δύο δόσεις, περίπου 600μl κάθε φορά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000g. Το περιεχόμενο του collection tube απορρίπτεται και στη στήλη προστίθενται 500μl AW Buffer το οποίο είναι προ-θερμασμένο στους 50°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1min. Το περιεχόμενο του tube απορρίπτεται. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 600μl A4 Buffer, το οποίο περιέχει αιθανόλη και φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000g. Το περιεχόμενο του tube απορρίπτεται και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται για 2min στα 11.000g. Η στήλη τοποθετείται σε νέο tube και αφήνεται για 3min, με σκοπό να εξατμιστεί η αιθανόλη. Ακολουθώντας γίνεται η προσθήκη 50μl AE Buffer ή TE. Αφήνεται να απορροφηθεί στη στήλη για 3min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, γίνεται φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1min.

### Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης:

Από τριβλίο στο οποίο έχουν επιστρωθεί μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα και έχουν αναπτυχθεί αποικίες, επιλέγεται μια από αυτές και εμβολιάζει 5ml θρεπτικό υλικό LB, στο οποίο έχει προστεθεί αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί, για 12-16 ώρες, στους 37°C υπό ανακίνηση.

Από την καλλιέργεια, μεταφέρεται 1,5ml σε σωλήνα Eppendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.000xg για 30sec. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 100μl ψυχρό Διάλυμα I, για να διαλυτοποιηθεί. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και προστίθενται 200μl Διάλυμα II, για να επιτευχθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων. Το μίγμα ομογενοποιείται με απλή ανακίνηση, 5-6 φορές και αφήνεται για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη 150 μl ψυχρό Διάλυμα III, έντονη ανάδευση με vortex και το μίγμα αφήνεται στους 4°C για 10min. Το διάλυμα αυτό περιέχει άλατα τα οποία προκαλούν κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA έπειτα από την προσθήκη αιθανόλης. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15min, στις 14.000xg, στους 4°C, ώστε να απομακρυνθούν με κατακρήμνιση τα μεμβρανικά συστατικά, οι πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό DNA και το SDS. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνα Eppendorf και προστίθενται 2,5 όγκοι ψυχρής αιθανόλης (EtOH) 100% και αφήνεται στους -20°C για 30min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000xg και το ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα αιθανόλης 70%. Το ίζημα διαλυτοποιείται σε διάλυμα TE (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 8,0) και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του. Είναι πιθανόν να μεσολαβήσει καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA με χρήση βασικής φαινόλης/χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης, όπως περιγράφεται πιο πάνω. Αν το πλασμιδιακό DNA ενδέχεται να χρησιμοποιηθεί μόνο για διαγνωστικές κοπές με ενδονουκλεάσες περιορισμού, δεν είναι απαραίτητος ο καθαρισμός με βασική φαινόλη.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται απαιτείται να είναι πρόσφατα παρασκευασμένα και είναι τα εξής:

Διάλυμα I:

<b>50mM γλυκόζη</b>
<b>25mM Tris-HCl, pH 8,0</b>
<b>10mM EDTA, pH 8,0</b>

Διάλυμα II:

<b>0,2M NaOH</b>
<b>1% w/v SDS</b>

Διάλυμα III:

<b>3M οξικό κάλιο</b>
<b>5M παγόμορφο οξικό οξύ</b>

### **B.2.21. Έκφραση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε βακτήρια E.coli:**

Η έκφραση ανασυνδυασμένων ετερόλογων γονιδίων στα βακτήρια, και συγκεκριμένα στο βακτήριο *Escherichia (E.) coli*, αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές και θεμελιώδεις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τη δομική γονιδιωματική και το σχεδιασμό και την παραγωγή πρωτεϊνών, λόγω της ταχείας ανάπτυξης και του εύκολου χειρισμού των βακτηρίων.

Η *E.coli* μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε στελέχη της να παράγουν το κλωνοποιημένο γονίδιο σε ποσοστό μέχρι και 30% της συνολικής παραγωγής τους σε πρωτεΐνες. Έχει προταθεί πως κάθε πρωτεΐνη που δεν είναι πολύ υδρόφοβη και δεν περιέχει πολλές κυστεΐνες, μπορεί να εκφραστεί στην *E.coli*. Εντούτοις, η έκφραση στον προκαρυωτικό αυτό οργανισμό έχει και κάποια μειονεκτήματα.

Μερικές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται στην *E.coli* δεν έχουν τις απαιτούμενες τελικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Επιπλέον, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται *in vivo* απαντώνται συχνά στα μη διαλυτά σωματίδια, τα οποία ονομάζονται βακτηριακά έγκλειστα (inclusion bodies, **IBs**) (*DC Williams et al., Science 215, 1982*). Πρόκειται για σφικτά συσκευασμένα συσσωμάτωμα, αποτελούμενα κυρίως από ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (*G. Taylor et al., Biotechnology 4, 1986*). Η συσσωμάτωση αυτή αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για την αποτελεσματικότητα της παραγωγής και της χρήσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα βακτήρια.

Η δευτεροταγή δομή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα βακτηριακά έγκλειστα δεν είναι απαραίτητα κοντά στη φυσιολογική και ποικίλει ανάλογα με τον τύπο της πρωτεΐνης. Για παράδειγμα, η ιντερλευκίνη (IL)-2 και η β-λακταμάση έχουν πάνω από 50% α-έλικες στη φυσιολογική τους δευτεροταγή δομή, αλλά αποκτούν μη φυσιολογικές δευτεροταγείς δομές στα έγκλειστα, μαζί με μειωμένη περιεκτικότητα σε α-έλικες (*Fink et al., Fold. Des. 3, 1998*) (*T.M. Przybycien et al., Protein Eng. 7, 1994*). Αντιθέτως, η IL-1β (της οποίας η φυσιολογική μορφή έχει μόνο β-πτυχωτά φύλλα), στα βακτηριακά έγκλειστα παρουσιάζει την ίδια δευτεροταγή δομή με την φυσιολογική της μορφή (*K. Oberg et al., Biochemistry 33, 1994*), ενώ και η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), εξακολουθεί να φθορίζει ακόμα και στα βακτηριακά έγκλειστα (*K. Tsumoto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 312, 2003*).

Ο σχηματισμός των βακτηριακών εγκλείστων μπορεί να κατασταλεί ελέγχοντας τις συνθήκες καλλιέργειας και με τη συν-έκφραση με πρωτεΐνες συνοδούς (chaperones).

Οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται και καθιζάνουν σχηματίζοντας αδιάλυτα συσσωμάτωμα (inclusion bodies), μπορούν να απομονωθούν με διαλυτοποίηση σε παράγοντες μετουσίωσης (π.χ. ουρία).

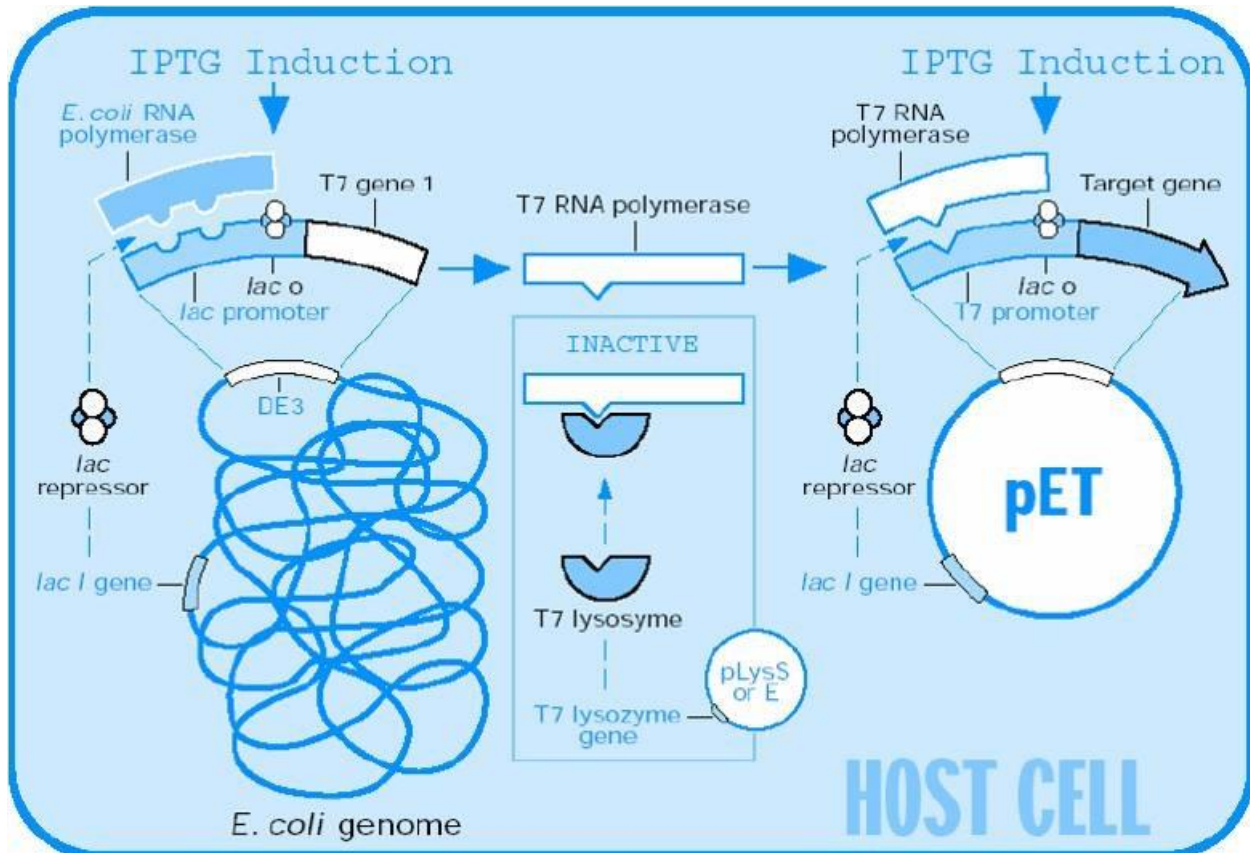
Τέλος, είναι δύσκολο να ρυθμιστεί επαρκώς η έκκριση μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται στην *E. coli*, παρόλο που για μικρές ποσότητες είναι εφικτή η έκκρισή τους με ωσμωτικό σοκ.

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν αρκετοί ισχυρά ρυθμιζόμενοι υποκινητές που χρησιμοποιούνται για έκφραση «ξένων» γονιδίων στην *E. coli*. Αυτή η ενότητα εστιάζεται στην έκφραση γονιδίων που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της RNA πολυμεράσης του βακτηριοφάγου T7. Η χρησιμοποίηση της T7 RNA πολυμεράσης, συγκριτικά με αυτή της RNA πολυμεράσης της *E. coli*, παρουσιάζει ένα ικανό αριθμό πλεονεκτημάτων:

- Είναι ένα πολύ ενεργό ένζυμο, που συνθέτει RNA σε πολύ υψηλότερα ποσοστά απ' ό τι η RNA πολυμεράση της *E. coli*.
- Είναι πολύ επιλεκτική για έναρξη μεταγραφής που κατευθύνεται από τους δικούς της υποκινητές και έτσι δεν ξεκινά τη μεταγραφή χρησιμοποιώντας εναλλακτικά κάποια αλληλουχία του DNA της *E. coli*.

Δύο σειρές φορέων έχουν αναπτυχθεί γι' αυτό το σκοπό, η σειρά φορέων έκφρασης τύπου pT7 και η σειρά pET. Εναλλακτικά, μια άλλη προσέγγιση αφορά την επαγωγή της T7 RNA πολυμεράσης με IPTG αντί για θερμική επαγωγή. Για το σκοπό αυτό, ο φορέας έκφρασης που περιέχει τον υποκινητή pT7 μετασχηματίζει το στέλεχος *E. coli* BL21 (DE3) που φέρει το γονίδιο για την T7 RNA πολυμεράση ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα της *E. coli*, κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή της λακτόζης (*lac promoter*). Το IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) επάγει τον υποκινητή *lacUV5*, που κατευθύνει τη μεταγραφή της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον υποκινητή pT7 και, συνεπώς, την έκφραση του γονιδίου.

Συγκεκριμένα, η παραγωγή εκκινεί με την προσθήκη IPTG 1M σε τελική συγκέντρωση 0,5mM (θεωρείται επαγωγέας της πρωτεϊνικής παραγωγής) σε βακτηριακές καλλιέργειες που έχουν συγκεκριμένη οπτική πυκνότητα  $OD_{600nm}=0,5-0,6$  και μπορεί να διαρκέσει από κάποιες ώρες (πχ.  $2^{1/2}$  ώρες) έως overnight, ανάλογα με τη θερμοκρασία, 37°C ή 16°C. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία παραγωγής, οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται στα 4.000rpm για 10min στους 4° και το ίζημα που προκύπτει υφίσταται διάσπαση είτε με τη χρήση λυσοζύμης είτε συνηθέστερα με την εφαρμογή μηχανικής πίεσης ώστε να ληφθεί το ολικό, διαλυτό και αδιάλυτο (που περιέχει τα έγκλειστα) βακτηριακό, πρωτεϊνικό εκχύλισμα.



Εικόνα 39: Επαγωγή της παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από το IPTG, σε σύστημα *E. coli* C43 (DE3).

Η ανάλυση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος γίνεται με μεθόδους SDS-PAGE και Western Blot.

Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθούνται για την παραγωγή των πρωτεϊνών TAT-α σφαιρίνη-HA, α σφαιρίνη-HA, TAT-*Sco2* και TAT-*Sco2*-HA στα C43 (DE3), είναι τα εξής και το πρωτόκολλο εφαρμόζεται ταυτόχρονα τόσο στους κλώνους C43 *E. coli* με τον pET16b-fusion protein και για mock C43 *E. coli* με τον pET16b:

1. Ανάπτυξη κλώνων ενδιαφέροντος σε 5ml καλλιέργεια με θρεπτικό υλικού LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό, στους 37°C για 12-16 ώρες.
2. Τα 5ml αποχύνονται σε μεγαλύτερη φλάσκα με νέα καλλιέργεια των 100ml θρεπτικού υλικού LB και προστίθεται επιπλέον ποσότητα αντιβιοτικού σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση.
3. Διακοπή της ανάπτυξης της καλλιέργειας, όταν η οπτική πυκνότητα φτάσει  $OD_{600nm}=0,5-0,6$  (~2 ώρες και 10min)
4. Τα 10ml από την καλλιέργεια αφαιρούνται και αποτελούν τη μη επαγόμενη καλλιέργεια – uninduced.



5. Στα υπόλοιπα 90ml προστίθεται IPTG 1M σε τελική συγκέντρωση 0,5mM και επωάζονται στους 37°C για 2 ώρες και 30min. Η καλλιέργεια αυτή αποτελεί την επαγόμενη καλλιέργεια – induced.
6. Η μη επαγόμενη καλλιέργεια φυγοκεντρείται στα 4.000rpm για 10min στους 4°C, το ίζημα ξεπλένεται με PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X και φυλάσσεται στους -80°C.
7. Η επαγόμενη καλλιέργεια, μετά την επώαση για 2<sup>1/2</sup> ώρες, φυγοκεντρείται στα 4.000rpm για 10min στους 4°C, το ίζημα ξεπλένεται με PBS 1X και φυλάσσεται στους -80°C για τουλάχιστον 2-3 ώρες ή 16 ώρες.
8. Το ίζημα διαλυτοποιείται και ξεπλένεται με PBS 1X και φυγοκεντρείται στις 3220xg για 14min στους 4°C.
9. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα δείγματα προετοιμάζονται για να επεξεργαστούν με υπέρηχους, με σκοπό το σπάσιμο των βακτηριακών κυττάρων και ακολούθως τον καθαρισμό των βακτηριακών εγκλείστων.

### **B.2.22. Σπάσιμο βακτηριακών κυττάρων με υπέρηχους:**

Τα δαλυτοποιημένα βακτηριακά κύτταρα υφίστανται λύση με τη χρήση υπέρηχων στο μηχάνημα TRANSSONIC 660/H Elma. Σε όλη τη διάρκεια της λύσης τα κύτταρα βρίσκονται στον πάγο. Τα υψηλής συχνότητας ηχητικά κύματα που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της λύσης με υπέρηχους, προκαλούν τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και των μεμβρανών των βακτηρίων.

Τα δείγματα, για να θεωρηθούν έτοιμα για επεξεργασία με υπέρηχους, προετοιμάζονται ως εξής:

Στο ίζημα που προκύπτει μετά την φυγοκέντρωση, προστίθεται PBS 1X, αναστολέας πρωτεασών, DDT 3M σε τελική συγκέντρωση 1mM και λυσοζύμη 10mg/ml σε τελική συγκέντρωση 0,2mg/ml. Τα δείγματα τοποθετούνται στον περιστροφέα (rotary) της Snijders Scientific, Tilburg-Holland, για 20min στον ψυκτικό θάλαμο (cold room). Μετά το πέρας των 20min στον περιστροφέα, προστίθεται TritonX 10% σε τελική συγκέντρωση 1%, και ακολουθεί περιστροφή για επιπλέον 5min στο «cold room».

Τα δείγματα είναι έτοιμα για επεξεργασία με υπέρηχους. Το έμβολο καθαρίζεται διαδοχικά με αιθανόλη – απιονισμένο νερό – αποστειρωμένο νερό, έπειτα από την επεξεργασία κάθε δείγματος. Συνολικά, τα δείγματα υφίστανται λύση με υπέρηχους για 2min με διακοπές ανά 30sec και αναμονή 1min. Το κάθε δείγμα μοιράζεται σε σωληνάκια erpendorf των 1,5ml και θεωρείται ότι έχει ανακτηθεί το ΟΛΙΚΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ. Ακολούθως, φυγοκεντρείται στις 17.000xg για 20min στους 4°C. Μετά το πέρας της λύσης με υπέρηχους, απομακρύνεται το υπερκείμενο (ΔΙΑΛΥΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ) και το ίζημα που απομένει φυλάσσεται στους -20°C και αποτελεί το ΑΔΙΑΛΥΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (ΑΚΑΘΑΡΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ).

### **B.2.23. Καθαρισμός βακτηριακών εγκλείστων:**

1. Τα ιζήματα επαναδιαλυτοποιούνται σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα – Buffer A. Συγκεκριμένα, για κάθε 1g ιζήματος από την αρχική υγρή καλλιέργεια, χρησιμοποιούνται 7,5ml από το Buffer A. Το διάλυμα αυτό περιέχει «sodium deoxycholate», το οποίο χρησιμοποιείται για να βοηθήσει στη λύση βακτηριακών υπολειμμάτων, ενώ διαλυτοποιεί κυτταρικά και μεμβρανικά υπολείμματα.

#### Buffer A:

<b>50mM Tris-HCl pH 8,0</b>
<b>100mM NaCl</b>
<b>1mM EDTA</b>
<b>0,1% sodium deoxycholate</b>
<b>0,2mg/ml λυσοζύμη</b>
<b>Αναστολείς πρωτεασών 1%</b>

2. Το ίζημα διαλυτοποιείται στο Buffer A, ενώ επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στον περιστροφέα (rotator), τοποθετημένο στο cold room (4°C) για 45min.
3. Μετά το πέρας των 45min, γίνεται προσθήκη MgCl<sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 100mM, καθώς και DNase I σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml. Η ανάδευση στον περιστροφέα, συνεχίζεται για άλλη 1 ώρα και 45min στο «cold room» (4°C).
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 17.000xg για 20min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που προκύπτει ζυγίζεται.
5. Για κάθε 1g ιζήματος χρησιμοποιούνται 7,5ml ρυθμιστικού διαλύματος – Buffer B για να το διαλυτοποιήσουν. Το Buffer B περιέχει το απορρυπαντικό Nonidet P-40, το οποίο διαλυτοποιεί μεμβρανικές πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια απομόνωσης συμπλόκων πρωτεϊνών-μεμβρανών.

#### Buffer B:

<b>50mM Tris-HCl pH 8,0</b>
<b>100mM NaCl</b>
<b>1mM EDTA</b>
<b>0,1% Nonidet P-40</b>
<b>Αναστολείς πρωτεασών 1%</b>

6. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναδεύονται για 15min στον περιστροφέα (rotator), τοποθετημένο στο cold room (4°C).

7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 17.000xg για 20min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που προκύπτει ζυγίζεται.
8. Για κάθε 1g ιζήματος χρησιμοποιούνται 7,5ml ρυθμιστικού διαλύματος – Buffer C.

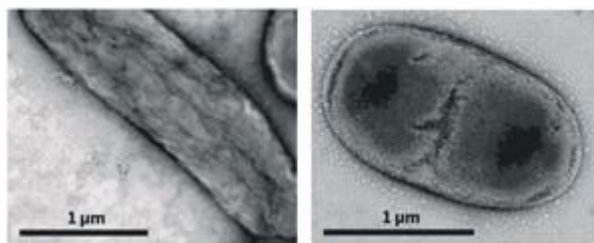
Buffer C:

50mM Tris-HCl pH 8,0
100mM NaCl
1mM EDTA
Αναστολείς πρωτεασών 1%

9. Τα δείγματα τοποθετούνται στους 4°C για αποθήκευση.

### **B.2.24. Διαλυτοποίηση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από τα βακτηριακά έγκλειστα με διάλυμα L-Αργινίνης:**

Όπως έχει αναφερθεί πιο πάνω, τα βακτήρια *E.coli* έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών οι οποίες δεν απαιτούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοσυλίωση, για τη βιολογική ενεργοποίησή τους. Παρόλ'αυτά, η αυξημένη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα *E.coli* συνήθως οδηγεί στη συσσώρευσή τους ως αδιάλυτα συσσωματώματα *in vivo*, τα βακτηριακά έγκλειστα. Οι πρωτεΐνες των βακτηριακών εγκλείστων στερούνται βιολογικής δραστηριότητας και χρειάζονται περίτεχνη διαλυτοποίηση, επαναδίπλωση και καθαρισμό για να ανακάμψει το λειτουργικό, ενεργό προϊόν.



Εικόνα 40: Αριστερά φαίνεται στο μικροσκόπιο, ένα φυσιολογικό βακτηριακό κύτταρο *E.coli* και δεξιά ένα βακτηριακό κύτταρο το οποίο εμφανίζει δομές βακτηριακών εγκλείστων έπειτα από επαγωγή (induced) για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. (*Jyllian Kemsley, 2008*)

Γενικά, η αποτελεσματική απομόνωση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος από τα βακτηριακά έγκλειστα επιτυγχάνεται από τη χρήση φαινομένων πρωτεϊνικής αποδιάταξης/μετουσίωσης και ακολούθως την αποτελεσματική επαναδίπλωση, με σκοπό την αποτελεσματική επαναδίπλωση των πρωτεϊνών, ώστε να υπάρξει επαναφορά της ορθής τριτοταγούς ή τεταρτοταγούς δομής, γεγονός που αποτελεί εχέγγυο για τη διασφάλιση της πρωτεϊνικής βιολογικής δραστηριότητας. Οι παράγοντες που επηρεάζουν

το ισοζύγιο ανάμεσα στην πρωτεϊνική επαναδίπλωση και στην πρωτεϊνική συσσωμάτωση είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών μιγμάτων, όπως η ιονική ισχύς, η πολικότητα, το pH κ.α.

Για τη διαλυτοποίηση των βακτηριακών εγκλείστων γίνεται χρήση υψηλής συγκέντρωσης χαοτροπικοί παράγοντες, όπως η ουρία και η υδροχλωρική γουανιδίνη, προκαλώντας πλήρη αποδιάταξη της τριτοταγούς πρωτεϊνικής δομής. Η αποτελεσματική διαλυτοποίηση που προκαλούν αντισταθμίζεται όμως από τον αυξημένο κίνδυνο πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης κατά την επαναδίπλωση, για αυτό και υπάρχει πλέον η τάση χρησιμοποίησης ηπιότερων εναλλακτικών μεθόδων. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα με τα αδιάλυτα βακτηριακά εγκλείστα, με την συν-έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με συνοδούς-πρωτεΐνες (chaperones), η οποίες μπορούν να διασφαλίσουν την ορθή επαναδίπλωση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία με πρόσθετα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων, όπως σάκχαρα, πολυόλες, άλατα, αμινοξέα και οξειδωτικά. Τα πρόσθετα αυτά παρεμβαίνουν στην διαλυτότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσω της παρεμπόδισης του σχηματισμού των συσσωματωμάτων, μέσω της επίτευξης της απαραίτητης ιονικής ισχύος για την ορθή επαναδίπλωση των πρωτεϊνών ή μέσω της αποκατάστασης των ενδομοριακών δυσουλφιδικών δεσμών.

Όσον αφορά τη κατηγορία των αμινοξέων, η **L-Αργινίνη** αποτελεί τον παράγοντα διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος που έχουν εκφραστεί στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί διάλυμα L-Αργινίνης 1M, με βάση τη στρατηγική που ακολουθείται στο εργαστήριο (*Papadopoulou et al., 2010*).

Η L-Αργινίνη αποτελεί το πιο βασικό αμινοξύ στον ανθρώπινο οργανισμό, με  $pK_a=12,46$ . Είναι θετικά φορτισμένη σε ουδέτερο pH. Θεωρείται ότι με την προσθήκη της L-αργινίνης μπορεί να επιτευχθεί την απαιτούμενη πρωτεϊνική διαλυτοποίηση όσο και την απαραίτητη πρωτεϊνική επαναδίπλωση. Επιπλέον, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ενδιαφέροντος που βρίσκεται στα βακτηριακά εγκλείστα, ανακτά ταυτόχρονα και τη λειτουργικότητά της. Μετά τη διαλυτοποίηση με L-Αργινίνη, οι πρωτεΐνες είναι έτοιμες για να μελετηθούν σε κυτταροκαλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων, αφού η L-Αργινίνη δεν είναι τοξική για τα κύτταρα. Αντιθέτως, οι χαοτροπικοί παράγοντες όπως η ουρία και η γουανιδίνη ως πρόσθετα διαλυτοποίησης, πρέπει να απομακρυνθούν πριν επωαστούν οι διαλυτοποιημένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με τα ευκαρυωτικά κύτταρα, λόγω της υψηλής τους τοξικότητας. Οι χαοτροπικοί παράγοντες απομακρύνονται με μεθόδους διαπίδυσης, οι οποίες είναι χρονοβόρες, πολύπλοκες και πολυδάπανες. Για το λόγο αυτό, σε πειράματα μικρής κλίμακας, στα πλαίσια της έρευνας, η L-Αργινίνη θεωρείται κατάλληλη να αντικαταστήσει τις πολυσύνθετες μεθόδους διαπίδυσης και χρωματογραφίας που εφαρμόζονται από τις φαρμακοβιομηχανίες, για τη μεγάλη κλίμακας παρασκευή ανθρώπινων, θεραπευτικών πρωτεϊνών σε συστήματα *E.coli*.

Η L-Αργινίνη αποτελεί έναν άριστο διαλυτοποιητή πρωτεϊνών από τα βακτηριακά έγκλειστα και καταστολέα της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης. Είναι, επιπλέον, συντηρητικό των πρωτεϊνικών διαλυμάτων και σταθεροποιητής της native μορφής τους, καθώς και των ολιγομερών πρωτεϊνικών δομών. Ο μηχανισμός με τον οποίο προσδίδονται οι ιδιότητες αυτές στην L-Αργινίνη βασίζεται στην εξής θεωρία: όταν τα πρωτεϊνικά μόρια βρίσκονται σε ένα υδατικό διάλυμα και σε αυτό προστίθενται μόρια (πρόσθετα) μεγαλύτερα σε μέγεθος από αυτά του νερού, θερμοδυναμικά απαιτείται περισσότερη ενέργεια για τα πρωτεϊνικά μόρια να συσσωματωθούν. Η L-Αργινίνη αλληλεπιδρά με τα π-ηλεκτρόνια των αρωματικών ομάδων των πρωτεϊνών και παρουσιάζει μεγάλη αγχιστεία με τις L-τρυπτοφάνες, όταν οι πρωτεΐνες είναι εμπλουτισμένες με το αμινοξύ αυτό (*Tsumoto K et al.,2004*)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που έχουν παραχθεί, περιέχουν στην αλληλουχία τους κατάλοιπα τρυπτοφάνης.

Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα L-Αργινίνης 1M με pH 11 για τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος από τα βακτηριακά έγκλειστα. Το διάλυμα περιέχει τα εξής:

#### Διάλυμα L-Αργινίνης:

L-Αργινίνη 1M
Tris-HCl 20mM
pH 11

Οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος βρίσκονται υπό μορφή ίζηματος, με το Buffer C και τον αναστολέα πρωτεασών από το πρωτόκολλο για τον καθαρισμό των βακτηριακών εγκλειστών και έχουν διατηρηθεί στους 4°C. Απορρίπτεται, λοιπόν, το υπερκείμενο και το ίζημα διαλυτοποιείται αρχικά σε μια δεδομένη ποσότητα διαλύματος L-Αργινίνης 1M, περίπου 500ml (για ίζημα που προέρχεται από ~100 ml βακτηριακής καλλιέργειας) και ακολούθως, φυγοκεντρείται για 5min στις 4.000xg. Το υπερκείμενο που προκύπτει αποτελεί το «1° spin» είναι εμπλουτισμένο στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Σε περίπτωση που το υπερκείμενο (1° spin) δεν είναι διαυγές και έπειτα από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις απομένει ίζημα, συλλέγεται και το επόμενο υπερκείμενο (2° spin) κ.ο.κ. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος που προκύπτει δεν πρέπει να ξεπερνά τα 4μg/ml και να μην περιέχει αιωρούμενα σωματίδια (πλήρως διαυγές).

### **B.2.25. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Χρωματομετρική μέθοδος κατά Bradford:**

Η χρωματομετρική μέθοδος Bradford βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250, σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 495nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595nm όταν είναι προσδεσμένη σε πρωτεΐνη.

Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595nm. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη διότι ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλέγματος πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερός σε μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων. Απλά για κάθε περιοχή (χαμηλή ή υψηλή συγκέντρωση) πρέπει να γίνει διαφορετική καμπύλη αναφοράς. (*Bradford, MM, 1976.*)

Η μέθοδος αυτή είναι απλή, γρήγορη και ευαίσθητη (1μg το κατώτατο κατώφλι εντοπισμού πρωτεΐνης). Παρόλ'αυτά μειονεκτεί στο γεγονός ότι μπορεί να επηρεαστεί από μια σειρά προσθέτων που μπορεί να εντοπίζονται στα υπό μελέτη πρωτεϊνικά μίγματα (L-Αργινίνη, SDS κ.α.), όταν αυτά ξεπεράσουν μια συγκεκριμένη συγκέντρωση.

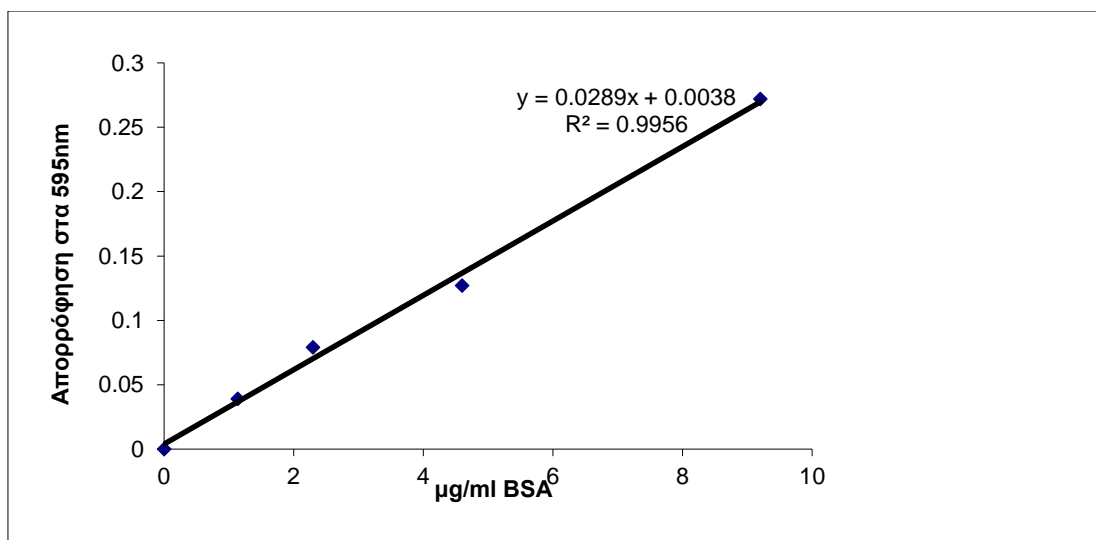
Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δείγματα γίνεται ανάμιξη του κάθε δείγματος με 500μl αντιδραστηρίου Bradford και μετά από παραμονή 5min, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm.

Μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης δειγμάτων γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, είναι απαραίτητη για την ποσοτική εκτίμηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε άγνωστα δείγματα. Επιπροσθέτως, τα δείγματα θα πρέπει να μετρούνται διπλά για την αύξηση της αξιοπιστίας του αποτελέσματος. Εξαιτίας της εξελισσόμενης πορείας ανάπτυξης του χρώματος του συμπλόκου πρωτεΐνης - χρωστικής, το διάλυμα Bradford θα πρέπει να προστίθεται στα πρότυπα και άγνωστα πρωτεϊνικά διαλύματα ταυτόχρονα.

Επίσης, όλα τα δείγματα θα πρέπει να μετρούνται διαδοχικά ακολουθώντας την ανάπτυξη της αντίδρασης του χρώματος. Για κάθε μέτρηση πρωτεϊνικών διαλυμάτων άγνωστων συγκεντρώσεων πρέπει πάντα να σχεδιάζεται μια νέα πρότυπη καμπύλη. Ο πίνακας πρότυπης καμπύλης που ακολουθεί (Πίνακας 7) δείχνει εμφανώς πώς πρέπει να προετοιμάζεται μια πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 1). Η πρότυπη καμπύλη για τη μέθοδο Bradford παραμένει ευθεία σε μια κλίμακα ποσοτήτων πρωτεΐνης από περίπου 0.625μg έως 5μg του BSA (0,250mg/ml) (ή αντίστοιχη κλίμακα συγκεντρώσεων). Εάν οι απορροφήσεις των άγνωστων πρωτεϊνικών δειγμάτων αντιστοιχούν σε ποσότητες (δηλαδή συγκεντρώσεις) που βρίσκονται έξω από αυτήν την κλίμακα, το περιθώριο λάθους γίνεται πάρα πολύ μεγάλο. Είναι επίσης πιθανό το ποσό του BSA που μετρήθηκε να εκφραστεί ως συγκέντρωση κατά μήκος του άξονα x.

BSA (0.250mg/ml)	NaCl 0,15M	Αντιδραστήριο Bradford
0μl	50μl	500μl
2,5μl	47,5μl	500μl
5μl	45μl	500μl
10μl	40μl	500μl
15μl	35μl	500μl
20μl	30μl	500μl

Πίνακας 7: Πίνακας πρότυπης καμπύλης Bradford



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Bradford.

Η τιμή του R square της καμπύλης αναφοράς πρέπει να προσεγγίζει το 0,999. Είναι δυνατόν να αφαιρεθούν μια ή το πολύ δύο τιμές έτσι ώστε να προκύψει η καλύτερη δυνατή καμπύλη. Αντίστοιχα, ο υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του κάθε δείγματος γίνεται με τον τρόπο που προετοιμάστηκαν τα προκαθορισμένα δείγματα της πρότυπης καμπύλης.

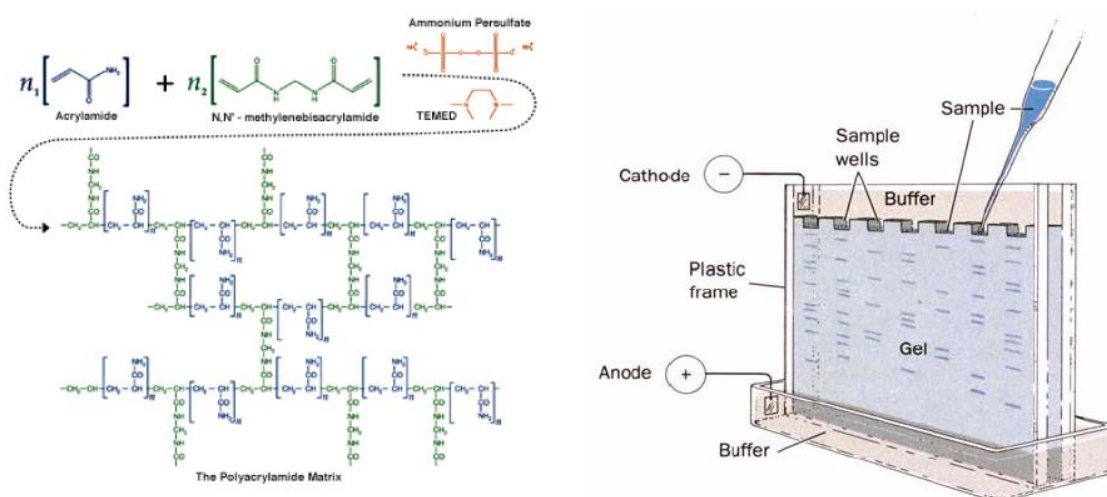
Όνομα δείγματος	Όγκος δείγματος	NaCl	Αντιδραστήριο Bradford
Τυφλό με πρόσθετο	5μl	45μl	500μl
Δείγμα A	5μl	45μl	500μl
Δείγμα B	5μl	45μl	500μl

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων γίνεται αφού διαιρεθεί η συγκέντρωση που προκύπτει, από την επίλυση της εξίσωσης με τον όγκο δείγματος που έχει προστεθεί την κάθε αντίστοιχη φορά.

## **B.2.26. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτῃ πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE):**

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS).

Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (διαφορετική κινητικότητα).



**Εικόνα 41:** Αριστερά: Σχηματισμός πήκτῃματος ακρυλαμίδης. Δεξιά: Πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης. Διακρίνεται ο τρόπος «φόρτωσης» των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής καθώς και η συνδεσμολογία της συσκευής.

Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πήκτῃματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης (Εικόνα 41, δεξιά).

Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης



ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο (Εικόνα 38, δεξιά). Η ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη, το οποίο είναι έγχρωμο λόγω της χρώσης με Coomassie blue.

Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίζεται το πήκτωμα είναι ένα «sandwich» επίπεδων τζαμιών (Εικ.41). Το φόρτωμα των δειγμάτων γίνεται σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται σε πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση ειδικής «χτένας» (Εικ.41), όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Η επίπεδη ηλεκτροφόρηση έχει το πλεονέκτημα ότι όλα τα δείγματα διαχωρίζονται στο ίδιο πήκτωμα, συνεπώς στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης ακρυλαμίδης, θερμοκρασίας, κλπ, κι έτσι είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των ζωνών μεταξύ τους.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής (discontinuous) επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πήκτωμα: ένα πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα επιστοίβασης. Το πήκτωμα επιστοίβασης έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο, ενώ το πήκτωμα διαχωρισμού είναι πιο πυκνό. Εκτός από τη διαφορά στη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, οι δύο τύποι πήκτης διαφέρουν και στην τιμή του pH: το πήκτωμα επιστοίβασης έχει pH περίπου 6, κοντά στο pH που έχουν και οι πρωτεΐνες.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli, το πήκτωμα επιστοίβασης δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Ακολουθως, διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης (γιατί χρειάζεται πολικότητα) με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.

1) Παρασκευή πηκτής ηλεκτροφόρησης.

- Πηκτική επιστοίβασης (stacking gel):

Το πρώτο τμήμα αποτελείται από τη πηκτική επιστοίβασης (stacking gel), όπου τα δείγματα πακετάρονται με σταθερή τάση 80V και έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης 5%.

Bis-Acrylamide 30%:

<b>Acrylamide</b>	29,2g
<b>Bis</b>	0,8g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Έως 100ml

\*Φύλαξη μακριά από το φως - 4°C.

## Σύσταση πηκτής επιστοίβασης (stacking):

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
<b>Ακρυλαμίδιο 30%</b>	5%	0,67ml
<b>Tris-HCl 1,5M (pH 6,8)</b>	0,125M	0,5ml
<b>SDS 10%</b>	0,1%	0,04ml
<b>TEMED</b>	0,1%	0,004ml
<b>APS 10%</b>	0,05%	0,04ml
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	-	Έως 4ml

- Πηκτική διαχωρισμού (separating gel):

Το ποσοστό ακρυλαμιδίου της πηκτικής διαχωρισμού (separating gel) εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν.

Για τα πειράματα της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήσαμε 13-14% ποσοστό ακρυλαμιδίου, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μεγαλομοριακών πρωτεϊνών, ενώ οι μικρομοριακές πρωτεΐνες απορρίπτονται γρήγορα.

## Σύσταση πηκτικής διαχωρισμού (separating):

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
<b>Ακρυλαμίδιο 40%</b>	13-14%
<b>Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)</b>	0,375M
<b>SDS 10%</b>	0,1%
<b>TEMED</b>	0,05%
<b>APS 10%</b>	0,05%
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως 8ml

Το APS (Ammonium Persulfate: υπερθειικό αμμώνιο-απαρχητής του πολυμερισμού) και το TEMED (N, N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη-επιταχυντής του πολυμερισμού) προστίθενται στο τέλος καθώς είναι υπεύθυνα για την επιτάχυνση του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου. Το APS δημιουργεί ελεύθερες ρίζες για πολυμερισμό ενώ ο επιταχυντής καταλύει τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

Καλό είναι να αποφεύγεται η επαφή του διαλύματος της ακρυλαμίδης με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο γιατί υπάρχει κίνδυνος οξειδωσης του TEMED κι έτσι παρεμπόδισης του πολυμερισμού. Για το λόγο αυτό, αφού παρασκευαστεί η πηκτή, καλύπτεται με ισοπροπανόλη 10%, στο σημείο που εφάπτεται με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Πρέπει, επίσης, να αποφευχθεί η έκθεση του ακρυλαμιδίου στο φως γιατί το αλλοιώνει.

## 2) Προετοιμασία δείγματος ηλεκτροφόρησης.

Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκα-άκυλο-θειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Η γλυκερόλη βοηθάει τα δείγματα να εισέλθουν με ευκολία στο εσωτερικό των κελιών που έχουν σχηματιστεί με το «χτενάκι» στο stacking gel. Το Tris-HCl pH 6,8, διασφαλίζει το απαιτούμενο pH που απαιτεί η ηλεκτροφόρηση. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρειτόλη, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση στους 95°C για 10min έτσι ώστε να γίνεται μετουσίωση των πρωτεϊνών. Το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (loading buffer 4x) περιλαμβάνει:

### Loading Buffer:

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση
Tris pH 6,8	0,0625M
glycerol	10%
10% SDS	2%
β-μερκαπτοαιθανόλη	1%v/v
1% bromophenol blue.	0,02%

Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος, λόγω δημιουργίας υδρατμών, για να μην χαθούν ποσότητες δείγματος.

## 3) Φόρτωμα και τρέξιμο δείγματος.

Αρχικά, συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 38. Ακολούθως φορτώνονται 6-10μg πρωτεΐνης στις ειδικές αύλακες της πηκτής καθώς και οι έγχρωμοι μάρτυρες μοριακού βάρους, ProSieve™ Color Protein Markers.

Έπειτα, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) είναι η εξής:

**5X Running Buffer:**

<b>25mM Tris</b>
<b>192mM Glycine</b>
<b>0,1% SDS</b>

Το pH του διαλύματος θεωρητικά αντιστοιχεί σε 8,3, ωστόσο δεν χρειάζεται ρύθμιση του pH γιατί το SDS που περιέχει το διάλυμα θα καθιζάνει στους πόρους του ηλεκτροδίου του pH-μέτρου.

Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 80V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτική επιστοίβαση, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτική διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 100V.

**B.2.27. Χρώση με Coomassie Brilliant Blue:**

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες βάφονται με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue P-250. Η χρωστική αυτή σχηματίζει σύμπλοκα με τα πρωτεϊνικά μόρια τα οποία φέρουν χαρακτηριστικό κυανό χρώμα. Η χρώση πραγματοποιείται όταν η πηκτική εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης (staining solution), υπό διαρκή ανάδευση από 3-24 ώρες, ανάλογα με την ημερομηνία παρασκευής του διαλύματος. Το διάλυμα αυτό έχει την ικανότητα να στερεώνει τις πρωτεϊνικές ζώνες στην πηκτική. Η σύσταση του διαλύματος χρώσης έχει ως εξής:

**Staining Solution:**

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
<b>Μεθανόλη</b>	45%	90ml
<b>Οξικό οξύ</b>	10%	20ml
<b>Coomassie BB-R</b>	0,1%	200mg
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	-	Έως 200ml

Μετά τη χρώση των πρωτεϊνών υπό μορφή κυανών ζωνών στην πηκτική, ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτικής. Αυτό συμβαίνει με την αφαίρεση του διαλύματος χρώσης (staining) και την προσθήκη του διαλύματος αποχρωματισμού (destaining) στην πηκτική και επώαση υπό ανάδευση για αρκετές ώρες. Η σύσταση του διαλύματος αποχρωματισμού είναι η ακόλουθη:

**Destaining Solution:**

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
<b>Μεθανόλη</b>	30%	150ml
<b>Οξικό οξύ</b>	10%	50ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	-	Έως 500ml

### **B.2.28. Ανοσοαποτύπωση WESTERN (Western Blot):**

Η ανοσοαποτύπωση Western είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ανάλυσης, η οποία πραγματοποιείται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα δείγμα ομογενοποιημένου ιστού ή εκχύλισμα. Αρχικά, οι πρωτεΐνες του δείγματος ηλεκτροφορούνται σε πηκτική SDS-πολυακρυλαμιδίου. Ακολούθως, μεταφέρονται σε μια μεμβράνη PVDF, όπου ανιχνεύονται με τη χρήση συγκεκριμένων αντισωμάτων και εμφανίζεται σήμα. Πέρα από τη μεμβράνη PVDF, η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται και με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης, σε συγκεκριμένο ποσοστό ακρυλαμιδίου, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Δηλαδή, οι πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους έχουν μειωμένη κινητικότητα ενώ η κίνηση μέσα στο πήκτωμα είναι ταχύτερη για τις πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους. Αφού διαχωριστούν, πραγματοποιείται η αποτύπωση του πηκτώματος στη μεμβράνη PVDF με τη μέθοδο της ηλεκτρομεταφοράς, εφαρμόζοντας διαφορά δυναμικού.

Τα τμήματα της μεμβράνης, επί της οποίας έγινε η ηλεκτρομεταφορά, που δεν έχουν καταληφθεί από πρωτεΐνες, υφίστανται μια διαδικασία «blocking» με διάλυμα BSA ή γάλακτος, που δεν θα επιτρέψει μη ειδικές προσδέσεις αντισωμάτων αργότερα. Για να εμφανιστεί το σήμα, γίνεται επώαση με το ειδικό αντίσωμα (μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό) έναντι της πρωτεΐνης υπό μελέτη, αφού οι πρωτεΐνες διατηρούν τις αντιγονικές τους ιδιότητες και μετά τη μεταφορά τους στη μεμβράνη. Το αντίσωμα δεσμεύεται στη μεμβράνη και μετά από μια διαδικασία πλύσεων της μεμβράνης με PBST, γίνεται επώαση και με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι αντίσωμα έναντι του πρώτου αντισώματος.

Στη συνέχεια, προστίθενται ενζυμικά υποστρώματα τα οποία μετατρέπονται σε αδιάλυτα προϊόντα που μπορούν να εντοπιστούν και επωάζονται στο στύπωμα. Τα προϊόντα αυτά αφήνουν ένα χρωματιστό ίχνος – ζώνη, πάνω στη μεμβράνη, που αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Εναλλακτικά, ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης μπορεί να γίνει μέσω χημειοφωταύγειας (σκοτεινός θάλαμος, φιλμ για ακτίνες X).

Χρησιμοποιούνται κυριότερα δύο είδη μεμβρανών: μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και PVDF (polyvinylidene fluoride). Και τα δύο είδη μεμβρανών έχουν την ικανότητα να προσροφούν περίπου  $\sim 100\mu\text{g}$  πρωτεΐνης/ $\text{cm}^2$ . Η μεμβράνη PVDF χρησιμοποιείται επίσης όταν πρόκειται οι πρωτεΐνες να απομονωθούν και να αλληλουχηθούν, λόγω της αντοχής που επιδεικνύει όταν τοποθετείται στα μηχανήματα αλληλούχιση

Πριν από τη πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης και της ανοσοαποτύπωσης Western, είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε mg του προς ανάλυση δείγματος με τη μέθοδο Bradford.

Αυτό πραγματοποιείται για να υπολογιστεί ο όγκος από το δείγμα αφού η επιθυμητή συγκέντρωση της πρωτεΐνης ανά πηγαδάκι καθορίζεται στα 10mg.

Στη συνέχεια, διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή 13% ή 14% SDS-πολυακρυλαμιδίου. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή επωάζεται στο Transfer Buffer για 15min, καθώς και τα δύο σφουγγαράκια και τα έξι χαρτιά Wattman 3mm που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.

Transfer Buffer 1X:

Tris Base	479mM
Γλυκίνη	39mM
SDS	0,1% w/v
Μεθανόλη	20% w/v
pH 8.3	

\*Κατά περιπτώσεις: 0.025–0.1% SDS.

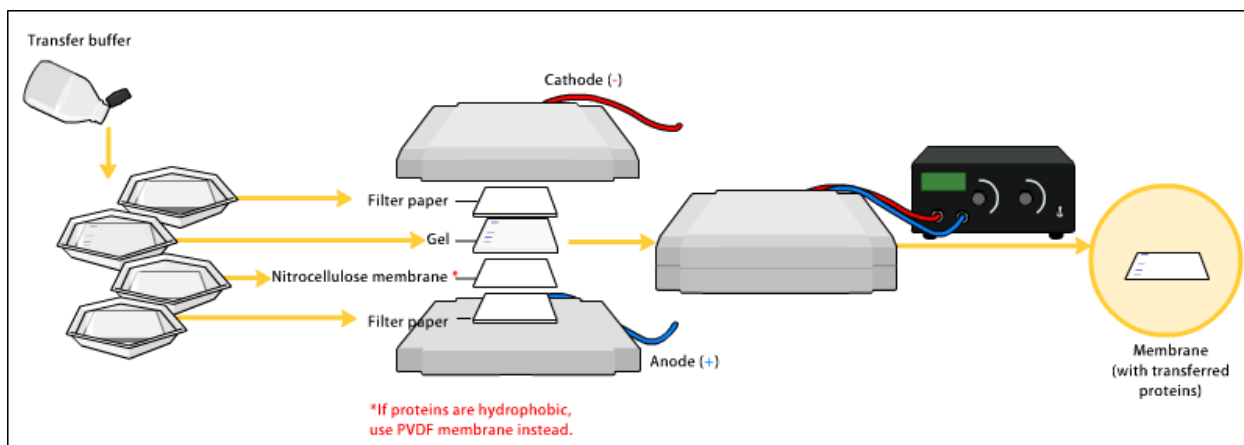
Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται το Transfer Buffer που περιγράφηκε από τον Towbin (1979).

Standard Towbin Buffer:

Tris	25mM
Γλυκίνη	129mM
Μεθανόλη	10-20% w/v
pH 8,3	

Με μεγάλη προσοχή και με τη χρήση λαβίδας αποκλειστικά, η μεμβράνη PVDF εμβαπτίζεται για 1min στη μεθανόλη για να ενεργοποιηθεί, ξεπλένεται για 15min σε απιονισμένο νερό και στη συνέχεια επωάζεται σε Transfer Buffer για 10min.

Ακολούθως, συναρμολογείται η συσκευή για τη μεταφορά. Η διάταξη μέσα στην κασέτα μεταφοράς είναι η ακόλουθη: μαύρη πλευρά – σφουγγάρι – 3 χαρτιά Whatman- πηκτή- μεμβράνη PVDF – 3 χαρτιά Whatman- σφουγγάρι – λευκή πλευρά κασέτας. Μετά την τοποθέτηση της κάθε επιφάνειας γίνεται «ρολάρισμα» για αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων.



Εικόνα 42: Διαμόρφωση κασέτας μεταφοράς.

Η κασέτα κλείνεται με προσοχή για να μην διαφύγουν από τη σωστή θέση που έχουν τοποθετηθεί. Στη συνέχεια συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, τοποθετώντας την κασέτα στη δεξαμενή και συμπληρώνοντας με Transfer Buffer. Είναι απαραίτητη η παρουσία μαγνητικού αναδευτήρα και παγοκύστης.

Η μεμβράνη πρέπει να είναι τοποθετημένη με προσανατολισμό στο θετικό πόλο, ενώ η πηκτική προς τον αρνητικό, έτσι ώστε η ροή του ρεύματος να μεταφέρει τις πρωτεΐνες προς τη μεμβράνη. Η διαδικασία της μεταφοράς έχει διάρκεια 1 ώρα και 45min στα 290mA (ή στα 36V για 3 ώρες) και λαμβάνει χώρα στο cold room (4°C). Με το πέρας των 105min, η μεμβράνη αφαιρείται προσεκτικά με λαβίδα κ τοποθετείται σε PBST στο ψυγείο (4°C).

PBST:

<b>PBS 1X</b>
<b>Tween 20 0,1%</b>
<b>pH 7,4</b>

### **B.2.29. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών:**

Η ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών αποτελεί μια τεχνική, η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, η οποία βρίσκεται καθηλωμένη σε μια μεμβράνη, με τη βοήθεια πολυκλωνικού ή μονοκλώνικού αντισώματος. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα των πρωτεϊνών, μετά την ηλεκτρομεταφορά τους, να διατηρούν τον αντιγονικό τους χαρακτήρα και να αλληλεπιδρά με το κατάλληλο πρώτο αντίσωμα. Η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο εκτός του ότι αναγνωρίζει και δεσμεύεται στις ανοσοσφαιρίνες (IgG) του πρώτου αντισώματος, περιέχει συζευγμένο στο μόριό του ένα ενζυμο-δείκτη, το οποίο αντιδρώντας με το εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα δίνει χαρακτηριστική χρωμοαντίδραση της ζώνης της πρωτεΐνης-αντιγόνου.

Στην παρούσα εργασία, η τεχνική της ανοσοανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών: alpha globin-HA, TAT-alpha globin-HA, TAT-Sco2, TAT-Sco2-HA.

Μετά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με 4ml Blocking Buffer 4% για 1 ώρα και 30min υπό ελαφριά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση με το Blocking Buffer γίνεται για να κορεστεί η μεμβράνη από τις πρωτεΐνες του γάλακτος στις μη-ειδικές θέσεις, έτσι ώστε το αντίσωμα που θα προστεθεί στη συνέχεια να δεσμεύεται μόνο στην εξειδικευμένη πρωτεΐνη, στις ειδικές θέσεις.

Blocking Solution:

<b>PBST</b>
<b>BSA ή σκόνη άπαχου γάλατος 2% ή 4%</b>

Ακολούθως προστίθεται το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα στις ενδεδειγμένες συγκεντρώσεις, με διάλυμα κορεσμού (Blocking Solution) συγκέντρωσης 4% και η επώαση διαρκεί 1 ώρα και 15min, υπό συνεχή ανακίνηση.

1<sup>ο</sup> αντίσωμα για κάθε πρωτεΐνη:

alpha globin-HA	Mouse anti-HA.IgG	1:300	μονοκλωνικό
TAT-alpha globin-HA	Mouse anti-HA.IgG	1:300	μονοκλωνικό
alpha globin-HA	Rabbit anti-Hemoglobin α.IgG	1:400	πολυκλωνικό
TAT-alpha globin-HA	Rabbit anti-Hemoglobin α.IgG	1:400	πολυκλωνικό
TAT-Sco2	Rabbit anti-Sco2.IgG	1:400	πολυκλωνικό
TAT-Sco2-NGR	Rabbit anti-Sco2.IgG	1:400	πολυκλωνικό

Πραγματοποιούνται διαδοχικές πλύσεις με PBST υπό ελαφριά ανάδευση, μια πλύση με 10ml για 15min και 3 πλύσεις με 5ml για 5min.

Στη συνέχεια προστίθεται το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα στις ενδεδειγμένες συγκεντρώσεις, με διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer) συγκέντρωσης 2% και η επώαση διαρκεί 1 ώρα και 15min, υπό συνεχή ανακίνηση. Τα δεύτερα αντισώματα έναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG, του κουνελιού (rabbit) ή του ποντικιού (mouse), παραγόμενα σε κατσίκια (goat), είναι συζευγμένα με το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης.

2<sup>ο</sup> αντίσωμα για κάθε πρωτεΐνη:

alpha globin-HA	Goat anti-mouse IgG-Ap	1:10000
TAT-alpha globin-HA	Goat anti-mouse IgG-Ap	1:10000
alpha globin-HA	Goat anti-rabbit IgG-Ap	1:2500
TAT-alpha globin-HA	Goat anti-rabbit IgG-Ap	1:2500
TAT-Sco2	Goat anti-rabbit IgG-Ap	1:2500
TAT-Sco2-NGR	Goat anti-rabbit IgG-Ap	1:2500

Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με PBST υπό ελαφριά ανάδευση, μια πλύση με 10ml για 15min και 3 πλύσεις με 5ml για 5min. Μόλις ολοκληρωθούν οι πλύσεις με PBST, πραγματοποιούνται οι πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα της αλκαλικής φωσφατάσης (AP buffer) υπό ελαφριά ανάδευση, μια πλύση με 10ml για 15min και 3 πλύσεις με 5ml για 5min.

AP buffer:

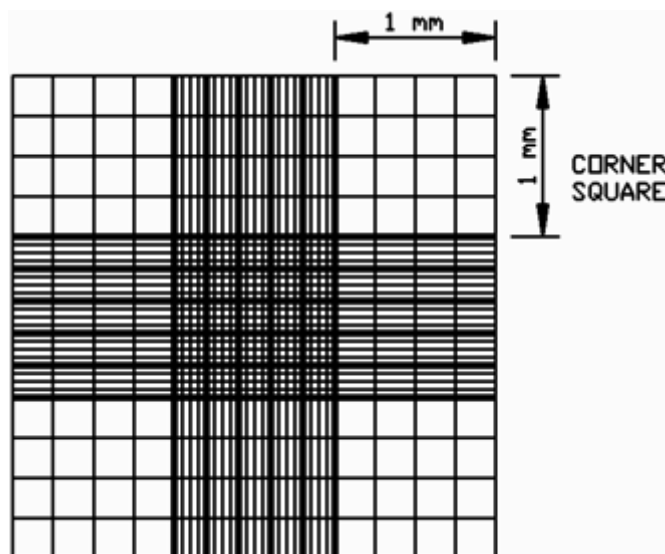
Tris-HCl, pH 9,5 100mM
NaCl 100Mm
MgCl <sub>2</sub> 5Mm



Τέλος, η μεμβράνη μεταφέρεται σε νέο διάλυμα AP (4ml), στο οποίο προστίθεται 30μl BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphatase) (50mg/ml) και 130μl NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) (10mg/ml), διαλυμένα σε νερό. Η χρωμοαντίδραση εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση, έως ότου γίνει η εμφάνιση διακριτών ζωνών, οι οποίες αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος. Με την εμφάνιση των επιθυμητών ζωνών η μεμβράνη ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και φυλάσσεται σε σκοτεινό χώρο.

### **B.2.30. Προσδιορισμός του ρυθμού κυτταρικής ανάπτυξης των Ανθρώπινων Ερυθρολευχαιμικών Κυττάρων K-562:**

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού αναπαραγωγής των κυττάρων K562 στην καλλιέργεια, γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα όγκου (ml) θρεπτικού υγρού, σε διάφορα χρονικά διαστήματα: 0h, 24h, 48h, 72h και 96h. Η κάθε μέτρηση γίνεται εις διπλούν. Χρησιμοποιείται η μέθοδος του αιματοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer, PolyOptic, 0,1mm βάθος και 0,0025mm<sup>2</sup> επιφάνεια) και η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται σε κοινό μικροσκόπιο (100x) (American Optical Corp., U.S.A.).



Εικόνα 43: Αιματοκυτταρόμετρο – Πλάκα Neubauer

### **B.2.31. Έλεγχος ζωτικότητας των Ανθρώπινων Ερυθρολευχαιμικών Κυττάρων K-562 με χρώση Trypan Blue:**

Ο έλεγχος της ζωτικότητας των ανθρώπινων ερυθρολευχαιμικών κυττάρων γίνεται με τη χρώση και την αντίδραση των κυττάρων αυτών, με το διάλυμα trypan blue (0,4%). Το διάλυμα αυτό περιέχει τη χημική ένωση C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>14</sub>S<sub>4</sub>. Η συγκεκριμένη ένωση έχει

την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, όταν η τελευταία είναι διερρηγμένη, με διανοιγμένους κυτταρικούς πόρους σε καταστάσεις κυτταρικής νέκρωσης.

Σε ένα 96-well πιάτο, προστίθενται 15μl κυτταρικού δείγματος σε κάθε πηγαδάκι και 15μl διαλύματος trypan blue (0,4%). Γίνεται ήπια ανακίνηση, 2-3 φορές με αναρρόφηση με την πιπέτα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου, πάνω από 4min (~10min). Με το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, μεταφέρονται 8μl της αντίδρασης, στο αιματοκυτταρόμετρο, το οποίο τοποθετείται στο μικροσκόπιο, έτσι ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός των νεκρών κυττάρων.

Το ποσοστό θανάτου επί τοις % υπολογίζεται με βάση την αναλογία νεκρών κυττάρων, τα οποία αποκτούν κυανό χρώμα, ως προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων στην πλάκα. Ο ελάχιστος αριθμός ζωντανών-νεκρών κυττάρων που μετράται είναι 300 κύτταρα.

### **B.2.32. Διαδικασία ενδοκυτταρικής μεταφοράς της πρωτεΐνης:**

Τα ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα K562 αναπτύσσονται σε θρεπτικό υγρό RPMI, παρουσία 10% FBS (ορός εμβρύου μόσχου), 1u/ml πενικιλίνης και 1 μg/ml στρεπτομυκίνης σε επωαστήρα καλλιέργειών. Μετά από ~40 ώρες, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 1.000xg για 5min και τα κύτταρα ( $3,4 \times 10^6$ ) επαναιωρούνται σε 25ml θρεπτικό υγρό Opti-MEM® I Reduced Serum Media.

Τα κύτταρα K562 τοποθετούνται σε πηγαδάκι μικροτριβλίου (6-well plate), στα οποία προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεΐνης, η οποία καθαρίστηκε και διαλυτοποιήθηκε από τα βακτηριακά έγκλειστα. Συνολικά, σε κάθε πηγαδάκι με 4ml από K562 κύτταρα ( $3,4 \times 10^6$ ), προστίθενται περίπου 80μg πρωτεΐνης.

### **Επώαση K562 με μιτοχονδριακές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες:**

Η αρχική συγκέντρωση που έχουν τα κύτταρα είναι  $3,4 \times 10^7$  κύτταρα/ml σε κάθε πηγαδάκι. Είναι απαραίτητη μια τόσο μεγάλη συγκέντρωση κυττάρων, γιατί τα κύτταρα αυτά, αφού επωαστούν με τις βακτηριακές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, πρόκειται να υποστούν λύση και να απομονωθεί το μιτοχονδριακό πρωτεϊνικό περιεχόμενο, το οποίο αντιστοιχεί σε πολύ μικρό ποσοστό από το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα στα κύτταρα. Η επώαση με τα διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα (IBs), εμπλουτισμένα στις πρωτεΐνες TAT-Sco2-HA, TAT-Sco2 και TAT-Sco2-NGR, καθώς και με την L-Αργινίνη, με το mock και τα untreated κύτταρα, διαρκεί 1 ώρα στους 37°C.

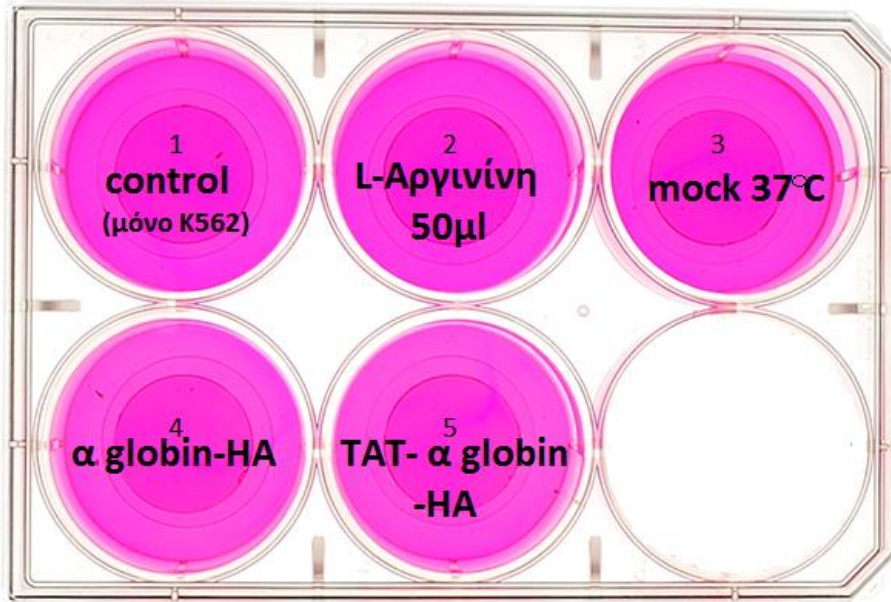


Εικόνα 44: 1: Control - 4ml κύτταρα K562-untreated, 2: 4ml κύτταρα K562 με 50μl L-Αργινίνη, 3: mock 37°C - διαλυτοποιημένο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από βακτηριακά έγκλειστα κλώνων που φέρουν το πλασμίδιο pET16b χωρίς ένθεμα, 4,5,6: 4ml κύτταρα K562 που επώαστηκαν με τα πρωτεϊνικά δείγματα από τα βακτηριακά έγκλειστα για 1 ώρα.

#### Επώαση K562 με ανασυνδυασμένες σφαιρίνες:

Η αρχική συγκέντρωση που απαιτείται να έχουν τα κύτταρα, είναι περίπου  $7-8 \times 10^5$  κύτταρα/ml. Δεν απαιτείται τόσο μεγάλη συγκέντρωση των προς επώαση κυττάρων γιατί οι σφαιρίνες είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και θεωρητικά μπορούν να εντοπιστούν εύκολα στο απομονωμένο ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την επεξεργασία με διάλυμα RIPA.

Η επώαση με τις πρωτεΐνες alpha globin-HA, TAT-alpha globin-HA από τα βακτηριακά έγκλειστα καθώς και με την L-Αργινίνη, με το mock και τα untreated κύτταρα, διαρκεί 1 ώρα στους 37°C.



**Εικόνα 45:** 1: Control - 4ml κύτταρα K562-untreated, 2: 4ml κύτταρα K562 με 50μl L-Αργινίνη, 3: mock 37°C - διαλυτοποιημένο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από βακτηριακά έγκλειστα κλώνων που φέρουν το πλασμίδιο pET16b χωρίς ένθεμα, 4,5: 4ml κύτταρα K562 που επώαστηκαν με τα πρωτεϊνικά δείγματα από τα βακτηριακά έγκλειστα για 1 ώρα.

### **B.2.33. Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο RIPA:**

Με το πέρας της 1 ώρας επώασης με τις διαλυτοποιημένες, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες από τα βακτηριακά έγκλειστα, τα κύτταρα από κάθε well συλλέγονται και φυγοκεντρούνται στις 1.000xg για 5min. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο. Το ίζημα ξεπλένεται PBS 1X δύο φορές. Στη συνέχεια, ακολουθεί η λύση των κυττάρων χρησιμοποιώντας 150μl διάλυμα λύσης RIPA κα 2μl αναστολέας πρωτεασών για 100μl RIPA. Ακολουθεί επώαση 30min και χρησιμοποιείται σύριγγα ινσουλίνης για να ενισχύσει τη λύση των κυττάρων. Μετά τη φυγοκέντρηση στις 10.000xg για 10min, στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων, ενώ το ίζημα αντιστοιχούσε σε μεμβράνες και κύτταρα που δεν είχαν σπάσει.

#### **Διάλυμα RIPA:**

<b>NaCl 150Mm</b>
<b>SDS 0,1% w/v</b>
<b>NP-40 1% v/v</b>
<b>Deoxycholic acid sodium salt 1% w/v</b>
<b>Sodium phosphate 10mM, pH 7,2</b>

### **B.2.34. Υποκυτταρική κατανομή – Απομόνωση μιτοχονδρίων:**

Με το πέρας της 1 ώρας επώασης με τις διαλυτοποιημένες, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες από τα βακτηριακά έγκλειστα, τα κύτταρα από κάθε well συλλέγονται και φυγοκεντρούνται στις 1.000xg για 5min. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο. Το ίζημα ξεπλένεται με PBS 1X δύο φορές και διαλυτοποιείται σε παγωμένο διάλυμα Mito Buffer, 6ml διαλύματος ανά  $3 \times 10^8$  κύτταρα (συνολικά στα 4 ml καλλιέργειας στο well), καθώς προστίθεται και 60μl αναστολέας πρωτεασών (Protease Inhibitor, P.I.) ανά 6ml Mito Buffer. Το συγκεκριμένο διάλυμα, διαρρηγνύει επιλεκτικά την κυτταρική μεμβράνη, χωρίς να τη διαλυτοποιεί, με αποτέλεσμα την καθίζηση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.

#### Mito Buffer:

0,2mM EDTA
0,25mM Sucrose
10mM Tris-HCl
pH 7,8

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με την ομογενοποίηση του ιζήματος με το Mito Buffer, με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης, με αργές κινήσεις, επαναλαμβάνοντας 20 φορές. Μετά το τέλος της διαδικασίας, το ομογενοποιημένο μίγμα φυγοκεντρείται στις 1.000xg για 10min στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο, στο οποίο περιέχονται τα μιτοχόνδρια, σε νέο σωληνάκι erpendorf και φυγοκεντρείται στις 12.000xg για 15min, στους 4°C. Με το τέλος της διαδικασίας, το ίζημα που προκύπτει, αντιπροσωπεύει το κλάσμα των μιτοχονδρίων και διαλυτοποιείται σε 500μl Mito Storage Buffer (Qproteome Mitochondria Isolation Kit, QIAGEN) για  $3 \times 10^8$  κύτταρα και γίνεται προσθήκη αναστολέα πρωτεασών. Το υπερκείμενο αντιπροσωπεύει το κλάσμα του κυτταροπλάσματος. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα πειράματα ολοκληρώθηκαν σε πέντε στάδια και σε αυτή την ενότητα παρατίθενται τα πειραματικά αποτελέσματα για την κλωνοποίηση, την παραγωγή και τη μελέτη της ενδοκυττάριας μεταγωγής των εξής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών:

1. 10xHis-Xa<sub>SITE</sub>-TAT-α σφαιρίνη-HA
2. 10xHis-Xa<sub>SITE</sub>-α σφαιρίνη-HA
3. 10xHis-Xa<sub>SITE</sub>-TAT-Sco2
4. 10xHis-Xa<sub>SITE</sub>-TAT-Sco2-NGR

\*Χάριν συντομίας, παραλείπεται η αλληλουχία «10xHis-Xa<sub>SITE</sub>» μέσα στο κείμενο.

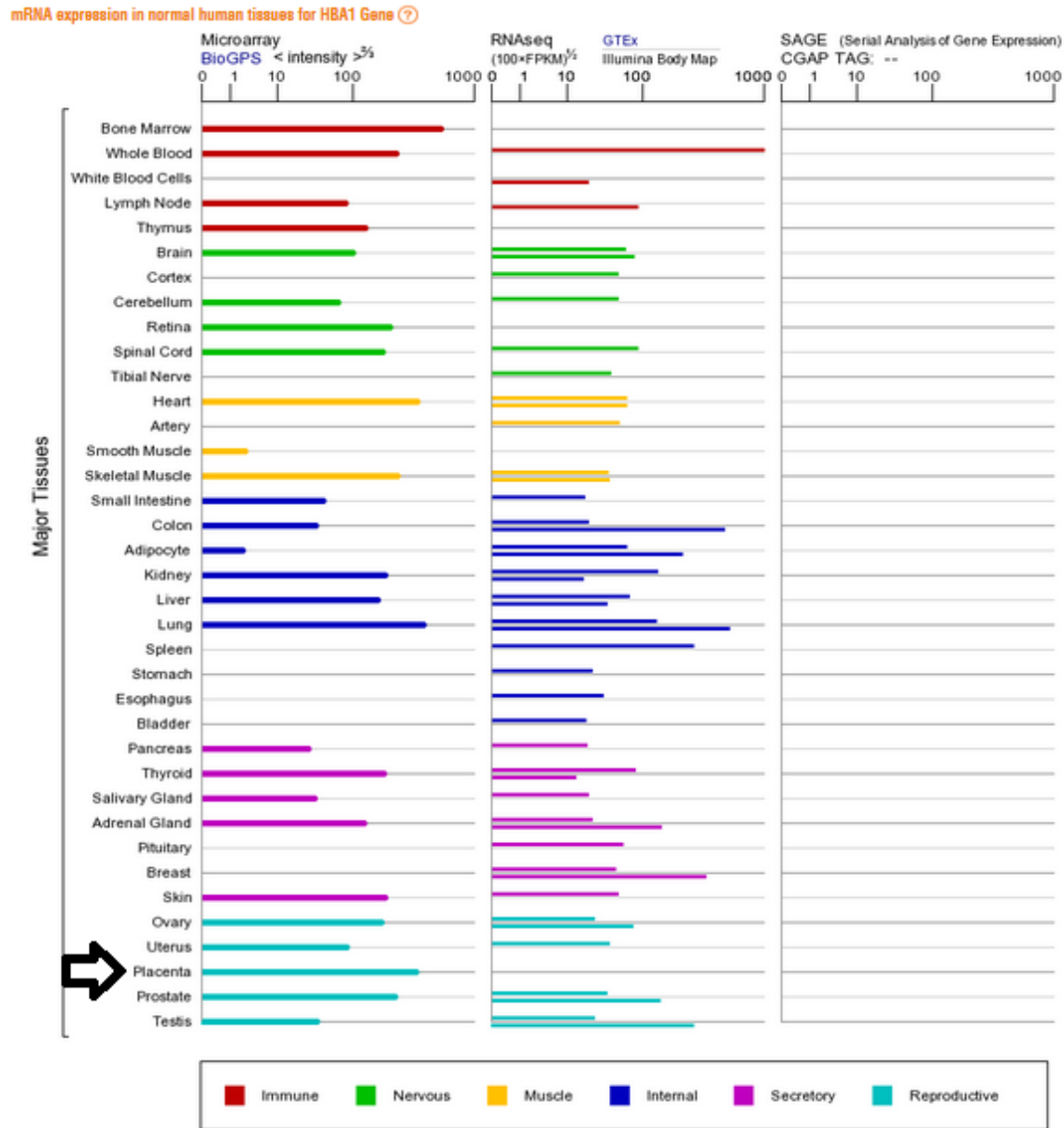
### Γ.1. Κλωνοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου της α-σφαιρίνης στο πλασμίδιο pCR2.1:

Τον Οκτώβριο του 2014 τέθηκε ως στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η κλωνοποίηση και η έκφραση της πρωτεΐνης της α-σφαιρίνης, συντηγμένης με το πεπτιδίο μεταγωγής TAT και χωρίς αυτό (ως control) και με το επιτόπιο HA. Το Εργαστήριο Φαρμακολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, έχει ως πειραματικό ενδιαφέρον τη μελέτη των θαλασσαιμικών συνδρόμων και πιο συγκεκριμένα έχει επιτευχθεί η κλωνοποίηση και η έκφραση ανασυνδυασμένης β-σφαιρίνης. Η α-σφαιρίνη είναι μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τα θαλασσαιμικά σύνδρομα αλλά παρόλ'αυτά δεν είχε μελετηθεί στο Εργαστήριο.

Όποτε, παρουσιάστηκε η ανάγκη της δημιουργίας ενός εκμαγείου: την κατασκευή και την αποθήκευση βακτηριακών κλώνων που φέρουν ένα πλασμίδιο με την αγρίου τύπου ανθρώπινη α-σφαιρίνη. Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε η κλωνοποίηση της CDS (κωδικής αλληλουχίας) του γονιδίου της α-σφαιρίνης στον φορέα pCR2.1 με τη μέθοδο TA cloning.

Αρχικά θα έπρεπε να απομονωθεί η περιοχή CDS της α-σφαιρίνης από ολικό ώριμο mRNA με τη τεχνική της RT-PCR. Λόγω των όσων αναφέρθηκαν στην εισαγωγή για το ρόλο της α-σφαιρίνης στην συγκρότηση της αιμοσφαιρίνης στο αίμα, η προφανής επιλογή ήταν να χρησιμοποιηθεί ανθρώπινο ολικό ώριμο mRNA απομονωμένο από περιφερικό αίμα. Οι προσπάθειες όμως που κατεβλήθησαν δεν στέφθηκαν από επιτυχία. Στη συνέχεια, αποφασίστηκε να ληφθεί το ολικό ώριμο mRNA από πλακουντιακό ιστό και να επιχειρηθεί εκ νέου η απομόνωση της CDS περιοχής του γονιδίου της ανθρώπινης α-σφαιρίνης.

Το RNA που επιλέχθηκε ως εκμαγείο για την απομόνωση και ενίσχυση του γονιδίου της *α-σφαιρίνης* (*α-globin*) ήταν ευγενική παραχώρηση του υποψήφιου διδάκτορα Γεώργιου Γαβριηλίδη και προερχόταν από εκχύλισμα ολικού RNA από πλακούντα.



Εικόνα 46: Έκφραση του mRNA της *α-σφαιρίνης* σε διάφορους ιστούς, έπειτα από μελέτες με Micro Arrays, RNA Sequencing και SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). Η έκφραση του mRNA της *α-σφαιρίνης* στον πλακούντα είναι αυξημένη σε σύγκριση με άλλους ιστούς [<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=hba1>]

Η απόφαση αυτή βασίστηκε στη βοήθεια εργαλείων πληροφορικής και συγκεκριμένα του GeneCards-The Human Gene Compendium, όπου η έκφραση του γονιδίου HbA1 σε υγιή άτομο παρατηρήθηκε ότι ήταν αυξημένη στον ιστό του πλακούντα.

Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώθηκε και μέσω του εργαλείου του NCBI>UniGene>EST profile Viewer, όπου η έκφραση του γονιδίου είναι επίσης αυξημένη στον πλακούντα.

### EST Profile

Hs.449630 - HBA1: Hemoglobin, alpha 1

#### Breakdown by Body Sites

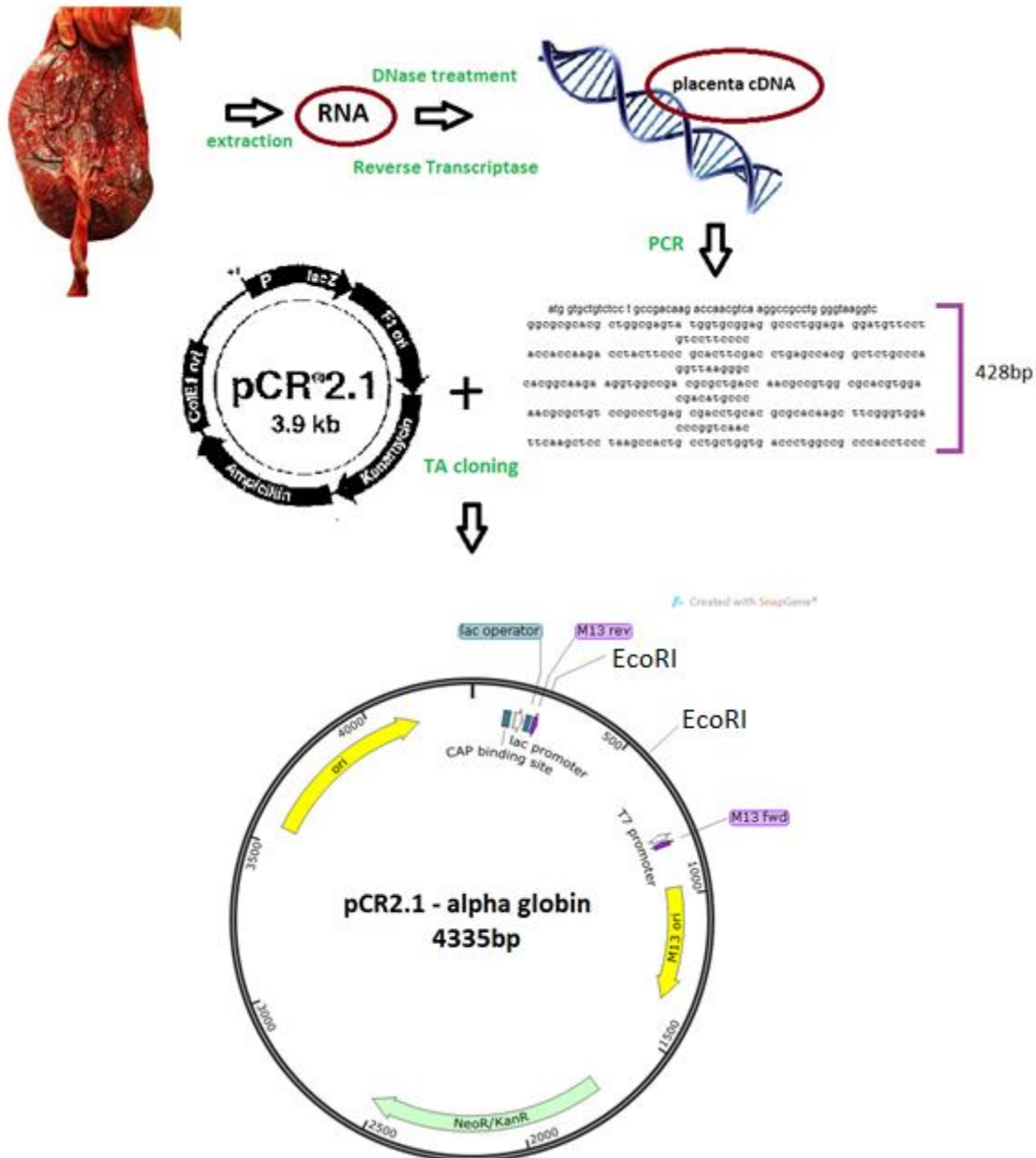
		Hs.449630	
adipose tissue	77		1 / 12866
adrenal gland	0		0 / 32940
ascites	0		0 / 39834
bladder	0		0 / 29860
blood	310		38 / 122252
bone	27		2 / 71618
bone marrow	471		23 / 48737
brain	45		50 / 1092688
cervix	0		0 / 48486
connective tissue	73		11 / 149072
ear	0		0 / 16100
embryonic tissue	9		2 / 212896
esophagus	0		0 / 20154
eye	47		10 / 208840
heart	323		29 / 89524
intestine	12		3 / 231981
kidney	9		2 / 210778
larynx	0		0 / 23466
liver	526		108 / 205291
lung	53		18 / 334815
lymph	0		0 / 44302
lymph node	22		2 / 89748
mammary gland	85		13 / 151230
mouth	0		0 / 66150
muscle	206		22 / 106371
nerve	64		1 / 15535
ovary	29		3 / 101488
pancreas	323		69 / 213440
parathyroid	97		2 / 20594
pharynx	834		34 / 40725
pituitary gland	60		1 / 16526
placenta	498		141 / 283019



Εικόνα 47: Η έκφραση του mRNA της α-σφαιρίνης στους διάφορους ιστούς με τη βοήθεια ανάλυσης EST profile (expressed sequence tag). Στον ιστό του πλακούντα είναι αυξημένη. [ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.449630> ]



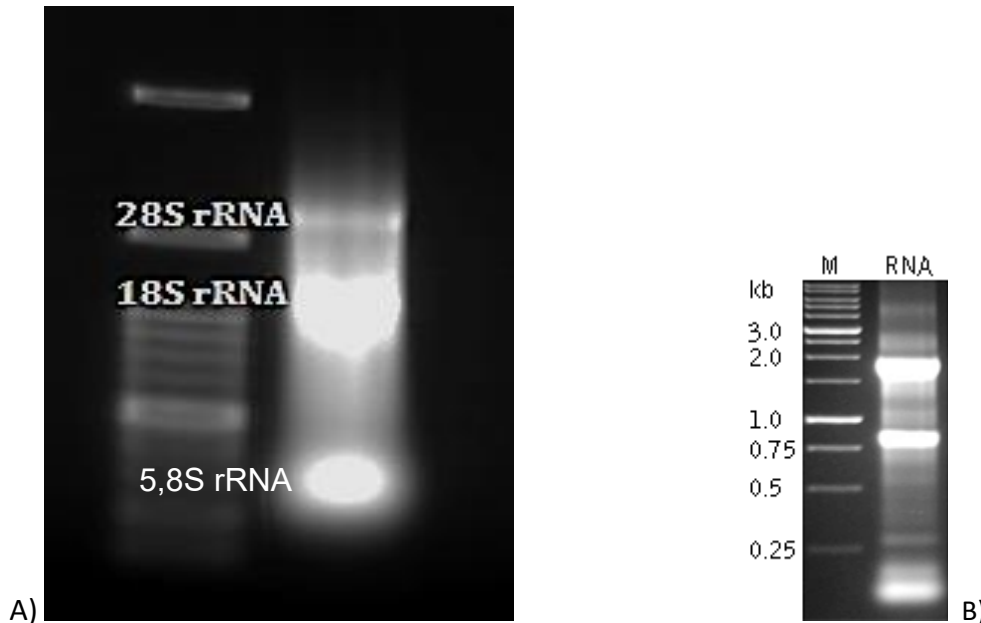
Η απομόνωση της CDS περιοχής της α-σφαιρίνης τελικώς επιτεύχθηκε και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό φορέα pCR2.1 και στάλθηκε για αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επιβεβαίωσαν την πλήρη ορθότητα της ενσωμάτωσης της περιοχής CDS ενδιαφέροντος στο πλασμιδιακό φορέα χωρίς καμία μετάλλαξη. Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Εικόνα 48) αποτυπώνεται η πειραματική στρατηγική της πρώτης φάσης της παρούσας διπλωματικής διατριβής:



Εικόνα 48: Το πρώτο στάδιο των πειραμάτων που περιλαμβάνει την κλωνοποίηση της ανθρώπινης α-σφαιρίνης στο πλασμιδίο pCR2.1 στη θέση EcoRI.

Πιο αναλυτικά η πειραματική διαδικασία της κλωνοποίησης της  $\alpha$ -σφαιρίνης<sub>WT</sub> στον pCR2.1 είχε ως εξής:

Η συγκέντρωση του δείγματος του πλακουντιακού ολικού RNA μετρήθηκε στο NanoDrop™ 2000/2000c-spectro-φωτόμετρο και υπολογίστηκε στα 668,2ng/μl και ο λόγος A260/A280 ήταν 1,95. Το ολικό RNA καθαρίστηκε με DNάση και εικόνα του κατά την ηλεκτροφόρηση αντιστοιχούσε στην αναμενόμενη μορφή που έχει το ακέραιο RNA.



Εικόνα 49: A) Ηλεκτροφόρηση DNAase treated placenta mRNA. B) Ηλεκτροφόρηση control ακέραιου RNA.

Στην Εικόνα 49 δεν διακρίνονται καθαρά η μπάντα που αντιστοιχεί στο 28S RNA ενώ υπάρχει διάχυτο “smear” γεγονός που υποδηλώνει πιθανή υδρόλυση του RNA λόγω μη επαρκούς πλύσης της συσκευής ηλεκτροφόρησης με SDS.

Η πορεία της RT-PCR, για την παραλαβή cDNA από RNA, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον προμηθευτή των αντιδραστηρίων (Takara) και το kit Prime Script™ RT Reagent kit.

Για την παρασκευή του cDNA χρησιμοποιήθηκαν περίπου 0,5μg placenta RNA [668,2ng/μl], ενώ οι συγκεντρώσεις των εκκινητών ήταν 1μM.

Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η σύνθεση cDNA από πλακουντιακό ολικό RNA, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -20°C και αποτελεί κατάλληλο εκμαγείο για αντιδράση PCR.

Ακολούθως, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το cDNA που παρήχθηκε, έγιναν προσπάθειες γονιδιακής ενίσχυσης της κωδικής αλληλουχίας CDS της αγρίου τύπου  $\alpha$ -σφαιρίνης. Σχεδιάστηκαν ο κατάλληλοι εκκινητές, ενώ η αλληλουχία προς ενίσχυση ήταν η εξής:

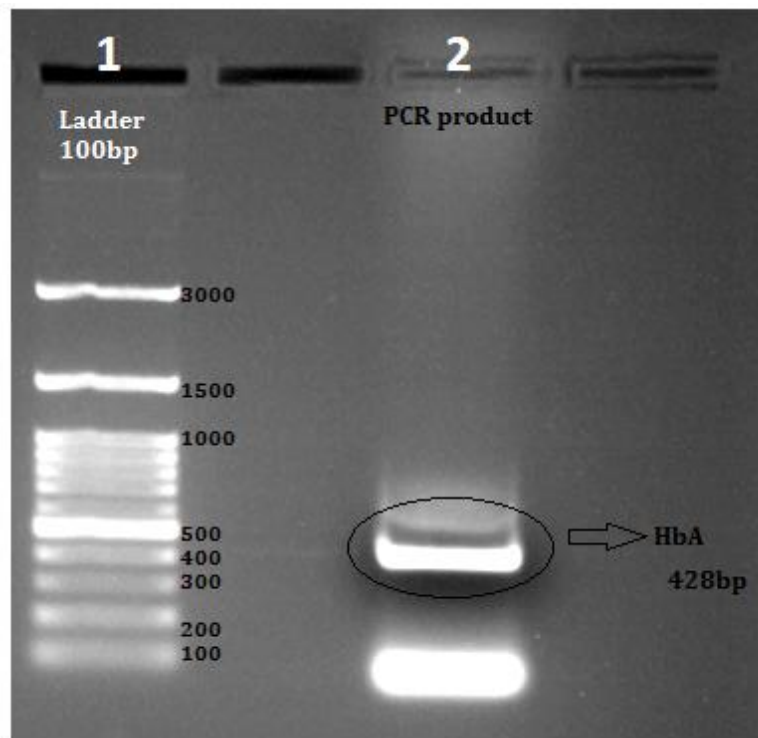
**CDS α-σφαιρίνης : 428bp**

```

ATGGTGCTGTCTCCTGCCGACAAGACCAACGTC AAGGCCGCTG      GGGTAAGGTCGGCGCGCACG      CTGGCGAGTA
TGGTGCGGAG GCCCTGGAGA GGATGTTCTT GTCCCTCCCC ACCACCAAGA CCTACTTCCC GCACTTCGAC CTGAGCCACG
GCTCTGCCCA GGTTAAGGGCCACGGCAAGA  AAGTGGCCGA  CGCGTGACC AACGCCGTGG  CGCACGTGGA
CGACATGCCCAACGCGCTGT CCGCCCTGAG CGACCTGCAC GCGCACAAGC TTCGGGTGGA CCCGGTCAACTTCAAGCTCC
TAAGCCACTG CTTGCTGGTG ACCCTGGCCG CCCACCTCCC CGCCGAGTTC ACCCCTGCGG TGCACGCCTC CCTGGACAAG
TTCTTGCTT CTGTGAGCAC CGTGTGACC TCC AAA TAC C GT TAA
    
```

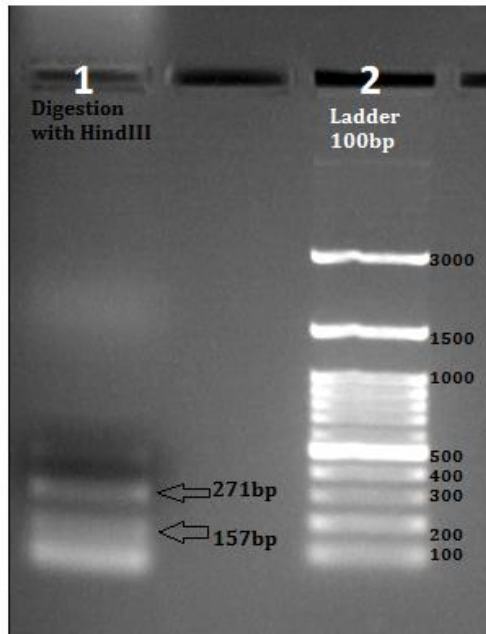
**Εικόνα 50:** Κωδική αλληλουχία CDS της αγρίου τύπου α-σφαιρίνης.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και παράλληλα, σε διπλανό πηγαδάκι φορτώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε μάρτυρας μοριακού μεγέθους 100bp, της Nippon, έτσι ώστε να γίνει εφικτή η αντιστοίχιση του μεγέθους του DNA που εμφανίζεται ως φωτεινή ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης. Εμφανίστηκε η επιθυμητή ζώνη στα 428bp, η οποία αντιστοιχεί στο μέγεθος της ενισχυμένης αλληλουχίας της CDS της α-σφαιρίνης.



**Εικόνα 51:** Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της ανθρώπινης α-σφαιρίνης από cDNA το οποίο παρήχθηκε ολικό ώριμο mRNA πλακουντιακού ιστού. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρες μοριακού βάρους 100bp ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Αντίδραση PCR με τη χρήση εκκινητών F-HBA και B-HBA. Διακρίνεται φωτεινή μπάντα στα 428bp.

Στη συνέχεια η ζώνη που αντιστοιχεί στο ενισχυμένο γονίδιο της *α-σφαιρίνης* εκλούσθηκε. Η έκλυση του τμήματος DNA από πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II, της Macherey-Nagel. Ακολούθησε διαγνωστική κοπή με την ενδονουκλεάση περιορισμού HindIII. Με τη βοήθεια του εργαλείου βιοπληροφορικής NEBcutter V2.0, είναι γνωστό πως η κωδική αλληλουχία του γονιδίου, φέρει μια θέση αναγνώρισης κοπής του ενζύμου HindIII, δίνοντας ως προϊόντα κοπής δύο τμήματα DNA μεγέθους 271bp και 157bp.

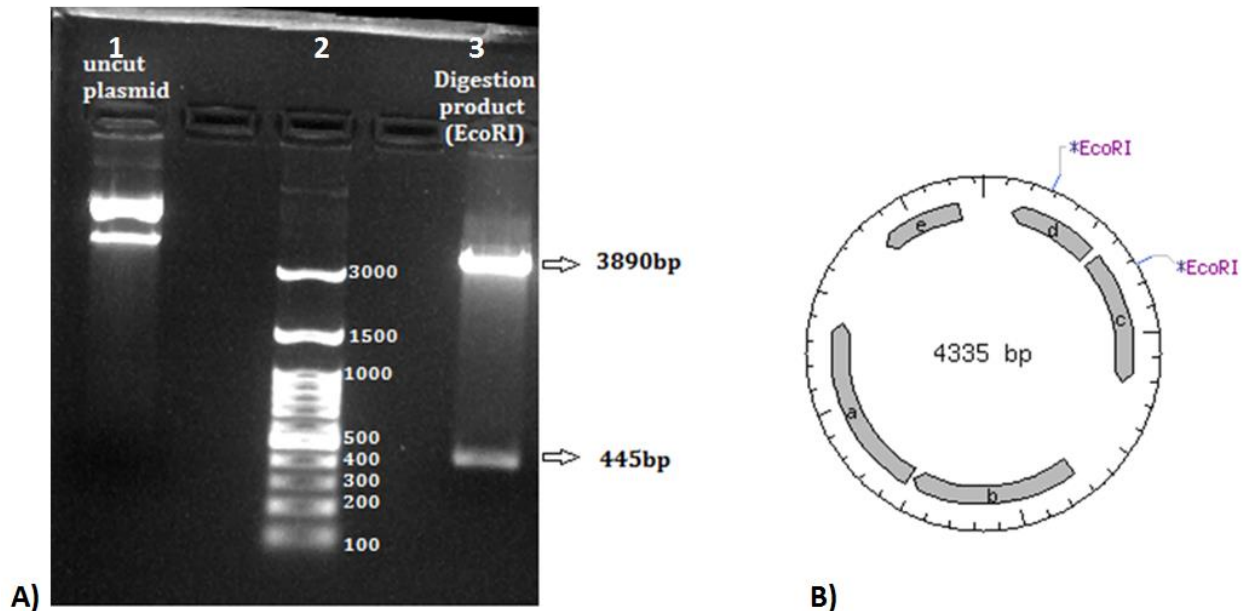


**Εικόνα 52:** Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης πέψης της ενισχυμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της CDS της *α* σφαιρίνης, με το ένζυμο HindIII.

Η συγκέντρωση της εκλουσμένης μπάντας στα 428bp, η οποία επιβεβαιώθηκε σε διάλυμα με Tris-HCl, υπολογίστηκε στο NanoDrop™ 2000/2000c-spectro-φωτόμετρο μικροποσοτήτων, στα 25ng/μl, με λόγο 260:280 να αντιστοιχεί σε 2,17.

Ακολούθησε η αντίδραση συνένωσης (ligation) με τον πλασμιδιακό φορέα pCR2.1 της Invitrogen, με τη βοήθεια του Original TA Cloning® Kit, με αναλογία [φορέα:ένθεμα] = [1:3]. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης συνένωσης χρησιμοποιήθηκε σε επακόλουθη αντίδραση μετασχηματισμού (transformation) φρέσκων (fresh) δεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων TOP10. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια αφέθηκαν να αναπτυχθούν όλη τη νύχτα (overnight) σε στερεό άγαρ. Την επόμενη μέρα εμφανίσθηκαν πολλές λευκές και λίγες κυανές αποικίες βακτηρίων, από τις οποίες επιλέχθηκαν ορισμένες, βάση της ιστοχημικής μεθόδου ανίχνευσης δράσης της β-γαλακτοσιδάσης (“blue/white screening”).

Στη συνέχεια, οι επιλεγμένες λευκές αποικίες αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό LB και αμπικιλίνη και την επόμενη μέρα ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Το πλασμιδιακό DNA υπέστη πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. Τα βιοπληροφορικά δεδομένα προέβλεπαν πως πέψη με EcoRI του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pCR2.1 ο οποίος φέρει την νουκλεοτιδική αλληλουχία ενδιαφέροντος θα οδηγούσε στην αποκοπή της αλληλουχίας από το υπόλοιπο πλασμιδιακό μόριο. Εν τέλει, η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης με EcoRI ήταν η ακόλουθη:



**Εικόνα 53:** A) Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης κοπής με ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Άκοπτο πλασμίδιο pCR2.1-*α σφαιρίνη*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Μάρτυρας 100bp. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: «Κομμένο» πλασμίδιο pCR2.1-*α σφαιρίνη* με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. B) Πρόβλεψη κοπής pCR2.1-*α σφαιρίνη* με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>)

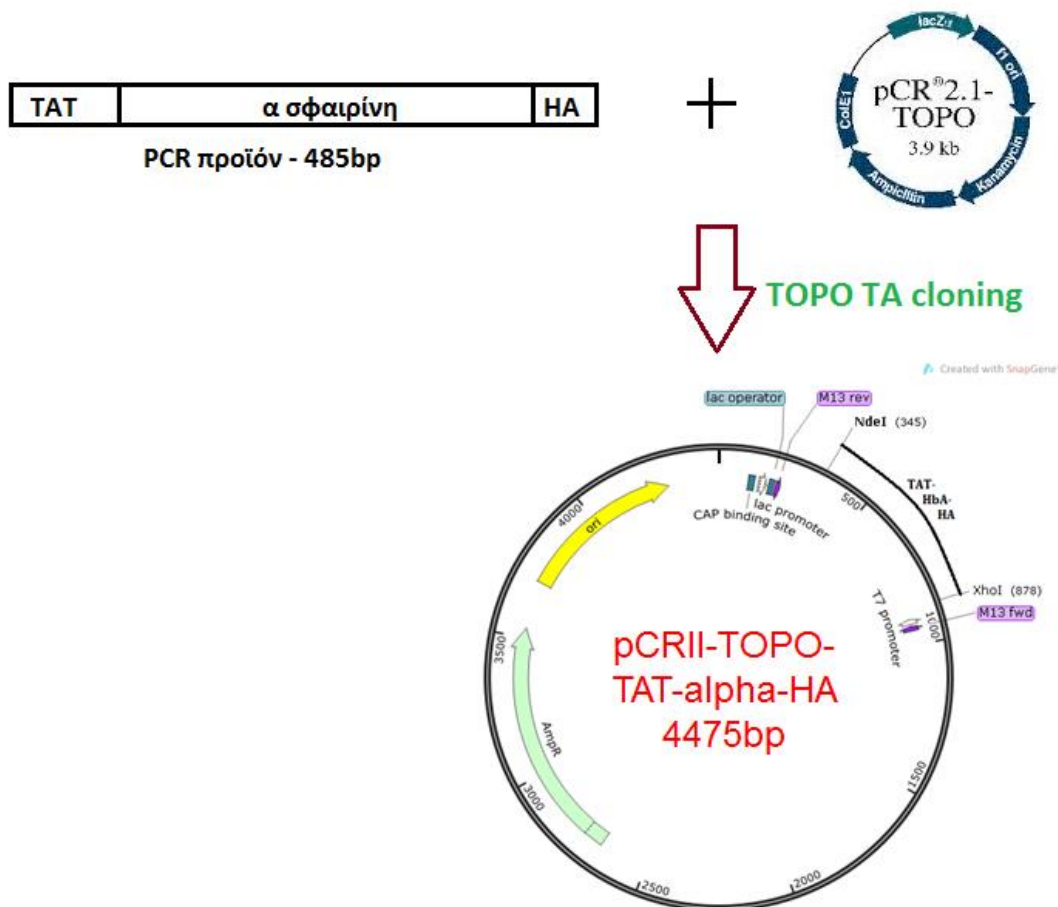
Η επιβεβαίωση για την επιτυχή κλωνοποίηση του γονιδίου της ανθρώπινης *α-σφαιρίνης*<sub>WT</sub> στον πλασμιδιακό φορέα pCR2.1 προήλθε από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης τα οποία απέδειξαν πως η κωδική αλληλουχία CDS της *α-σφαιρίνης* είχε ενσωματωθεί με 100% πιστότητα στον πλασμιδιακό φορέα. Έχουν αλληλουχηθεί με επιτυχία τρεις διαφορετικοί βακτηριακοί κλώνοι που φέρουν το πλασμίδιο pCR2.1-*α σφαιρίνη* (A4-27/2, A45/3 και A12).

## Γ.2. Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της TAT-αλληλουχία σύντηξης (x) στον πλασμιδιακό φορέα pCR®II-TOPO

Το δεύτερο στάδιο της μεταπτυχιακής εργασίας έλαβε χώρα τον Νοέμβριο του 2015 και περιελάμβανε την κλωνοποίηση των συντηγμένων (fusion) κωδικών αλληλουχιών των γονιδίων με τις αλληλουχίες των πεπτιδίων μεταγωγής (PTD) και με το επιτόπιο HA, σε πλασμιδιακό φορέα pCR®II-TOPO, τόσο για την αποθήκευση των βιοτεχνολογικά ανασυνδυασμένων γονιδίων, όσο και για τη χρήση τους ως πηγή για την νουκλεοτιδική αλληλουχία ενδιαφέροντος για την περαιτέρω κλωνοποίηση της σε φορέα που ενδείκνυται στο να εκφράσει με επαγόμενο τρόπο τη συγκεκριμένη αλληλουχία.

### Γ.2.1.Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της TAT-α-σφαιρίνη-HA στον πλασμιδιακό φορέα pCR®II-TOPO:

Η πειραματική στρατηγική είχε ως εξής:



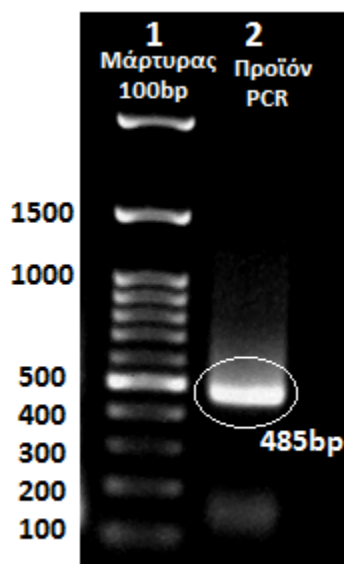
Εικόνα 54: Πορεία πειραμάτων για την κλωνοποίηση της ανασυνδυασμένης TAT-α σφαιρίνης-HA στον πλασμιδιακό φορέα pCR®II-TOPO.



Αρχικά, επιδιώκεται η σύντηξη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της  $\alpha$ -σφαιρίνης με:

- Την αλληλουχία του πεπτιδίου TAT: 5'-CGC AAG AAA CGC CGC CAG CGC CGC CGC-3' στο 5' άκρο.
- Την αλληλουχία του επιτόπιου HA: 5'-TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT 3' or 5' TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCT-3' στο 3' άκρο.

Η σύντηξη των αλληλουχιών αυτών με την κωδική αλληλουχία της  $\alpha$ -σφαιρίνης γίνεται βιοτεχνολογικά, με τη μέθοδο της PCR δηλαδή, όπου σχεδιάζονται εκκινητές που υβριδίζονται και ενισχύουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενδιαφέροντος, καθώς επίσης περιέχουν ενσωματωμένες στην αλληλουχία τους και τις προς σύντηξη αλληλουχίες TAT και HA. Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας TAT- $\alpha$  σφαιρίνη-HA με μήκος 485bp με τη μέθοδο της PCR και το προϊόν γονιδιακής ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Η ζώνη που εμφανίστηκε κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιστοιχούσε στο επιθυμητό μήκος των 485bp.



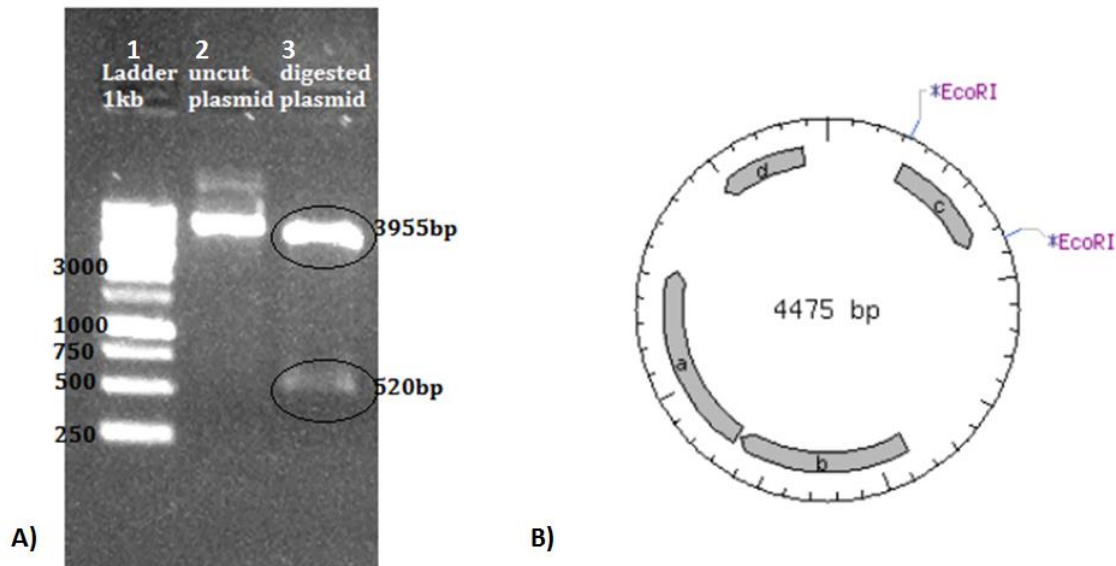
Εικόνα 55: Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτη αγαρόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου σύντηξης TAT- $\alpha$  σφαιρίνη-HA (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2, 485bp). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 100bp.

Η φωτεινή ζώνη στα 485bp που αντιστοιχεί στην ενισχυμένη TAT- $\alpha$  σφαιρίνη-HA εκλούσθηκε με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II, της Macherey-Nagel και η συγκέντρωση του προϊόντος έκλουσης μετρήθηκε στο NanoDrop™ 2000/2000c-spectrophotometer μικροποσοτήτων και αντιστοιχούσε σε 49,6ng/μl, με λόγο 260:280 = 1,88.

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pCRII-TOPO, του TOPO® TA Cloning® kit της Invitrogen. Αφού γίνει η αντίδραση της συνένωσης του πλασμιδιακού φορέα με το προϊόν έκλουσης της αντίδρασης PCR, φρέσκα επιδεκτικά βακτηριακά

κύτταρα TOP10 μετασχηματίστηκαν με το προϊόν της αντίδρασης αυτής και επιστρώθηκαν σε στερεό άγαρ. Αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 12-16 ώρες (overnight) και ακολούθως επιλέχθηκαν πολλές λευκές και λίγες κυανές (control) αποικίες με την ιστοχημική μέθοδο ανίχνευσης δράσης της β-γαλακτοσιδάσης (“blue/white screening”).

Οι επιλεγμένες αποικίες αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό LB και αμπικιλίνη και την επόμενη μέρα ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Το πλασμιδιακό DNA υπέστη πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. Τα βιοπληροφορικά δεδομένα προέβλεπαν πως πέψη με EcoRI του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα *pCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA*, ο οποίος φέρει την νουκλεοτιδική αλληλουχία ενδιαφέροντος θα οδηγούσε στην αποκοπή της αλληλουχίας από το υπόλοιπο πλασμιδιακό μόριο. Η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης με EcoRI ήταν η ακόλουθη:

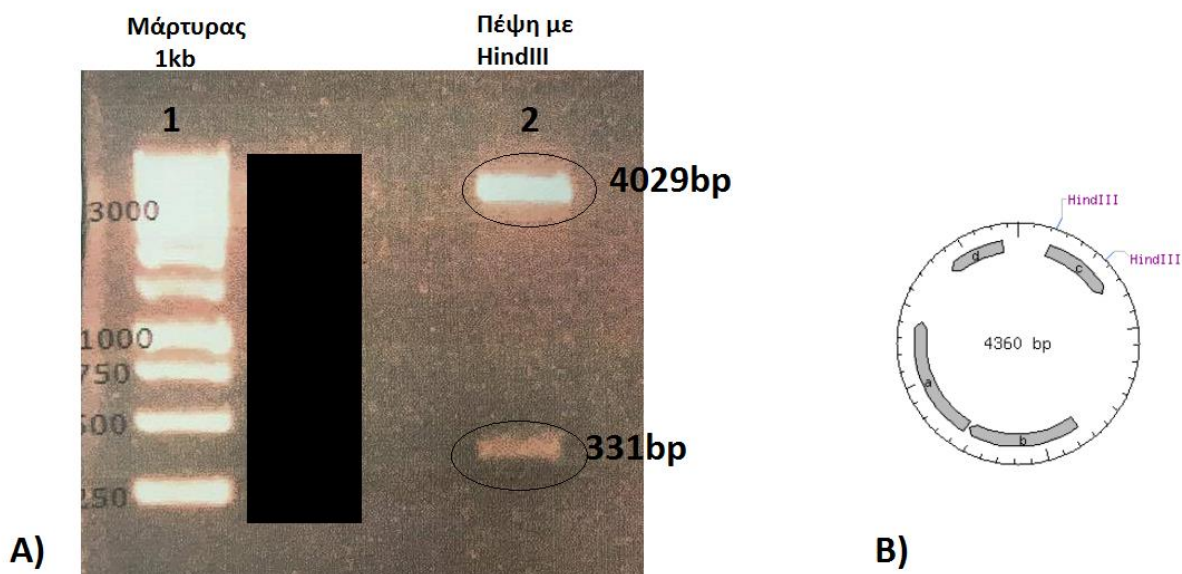


Εικόνα 56: A) Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης κοπής με ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 1kb. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Άκοπτο πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: «Κομμένο» πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA* με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. B) Πρόβλεψη κοπής *pCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA* με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Με το συγκεκριμένο εργαλείο βιοπληροφορικής παρατηρείται και η διχοτόμηση της αλληλουχίας με το ένζυμο HindIII. Η διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) είχε δείξει πως η αλληλουχία της κωδικής αλληλουχίας της α-σφαιρίνης εμφάνιζε θέση κοπής από την HindIII περίπου στο ενδιάμεσο της, ενώ μια άλλη θέση κοπής από το ίδιο ένζυμο εντοπίζεται στην αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο τμημάτων DNA, το ένα μεγάλου μήκους (4029bp) και ένα μικρού μήκους (331bp).



Η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης με HindIII ήταν η ακόλουθη:



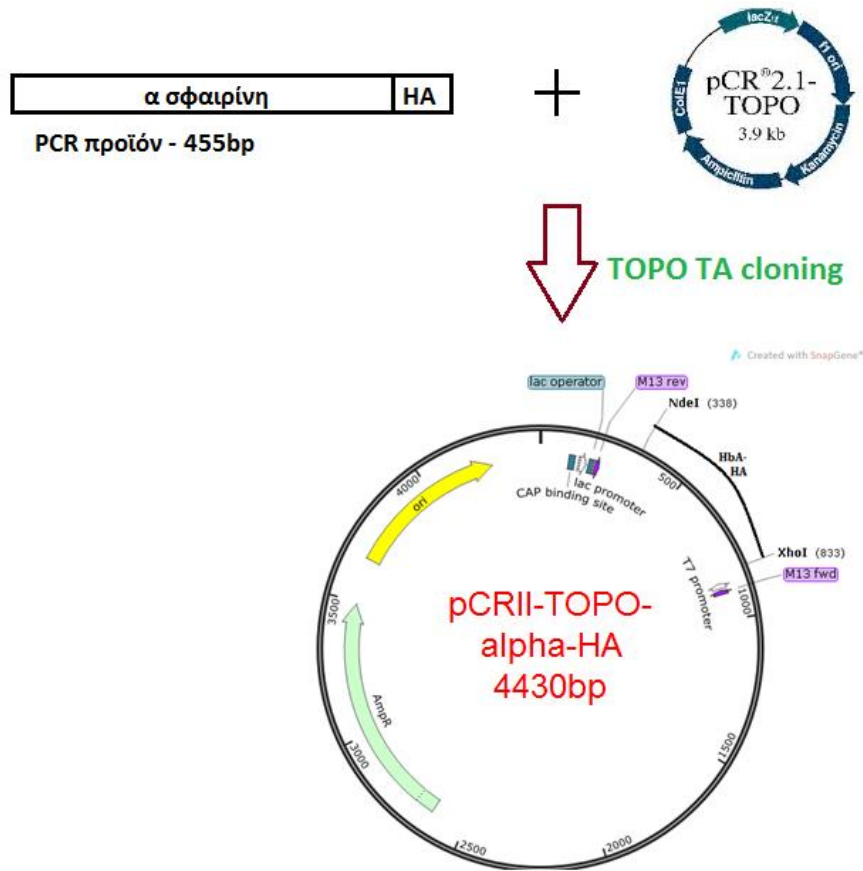
Εικόνα 57: Α) Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης κοπής με ενδονουκλεάση περιορισμού HindIII. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 1kb. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: «Κομμένο» πλασμίδιο rCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Β) Πρόβλεψη κοπής rCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Η επιβεβαίωση για την επιτυχή κλωνοποίηση του γονιδίου της *TAT-α σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα rCRII-TOPO προήλθε από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης τα οποία απέδειξαν πως η αλληλουχία της *TAT-α σφαιρίνης-HA* είχε ενσωματωθεί με 100% πιστότητα στον πλασμιδιακό φορέα. Έχουν αλληλουχηθεί με επιτυχία τρεις διαφορετικοί βακτηριακοί κλώνοι που φέρουν το πλασμίδιο rCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA (ΤΗΗ16, ΤΗΗΒ2 και ΤΗΗC2).

### Γ.2.2.Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της α-σφαιρίνης-HA στον πλασμιδιακό φορέα rCRII-TOPO:

Παράλληλα με την κλωνοποίηση του γονιδίου της *TAT-α σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα rCRII-TOPO, έγινε και η κλωνοποίηση της *α σφαιρίνης-HA* στον φορέα αυτό.

Η πειραματική στρατηγική είχε ως εξής:

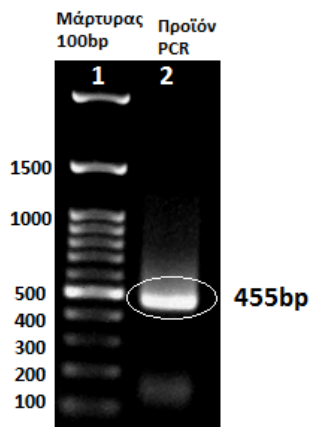


Εικόνα 58: Πορεία πειραμάτων για την κλωνοποίηση της ανασυνδυασμένης *α σφαιρίνης*-*HA* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO.

Επιδιώκεται η σύντηξη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *α-σφαιρίνης* με:

- Την αλληλουχία του επιτόπιου HA: 5'-TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT 3' or 5' TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCT-3' στο 3' άκρο.

Η σύντηξη της αλληλουχίας του HA με την κωδική αλληλουχία της *α-σφαιρίνης* γίνεται βιοτεχνολογικά, με τη μέθοδο της PCR δηλαδή, οπότε σχεδιάζονται εκκινητές που υβριδίζονται και ενισχύουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενδιαφέροντος και οι οποίοι φέρουν ενσωματωμένη την αλληλουχία του HA στον ανάστροφο (backward) εκκινητή. Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της *α σφαιρίνης*-*HA* με τη μέθοδο της PCR και το προϊόν γονιδιακής ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Η ζώνη που εμφανίστηκε κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιστοιχούσε στο επιθυμητό μήκος των 455bp.

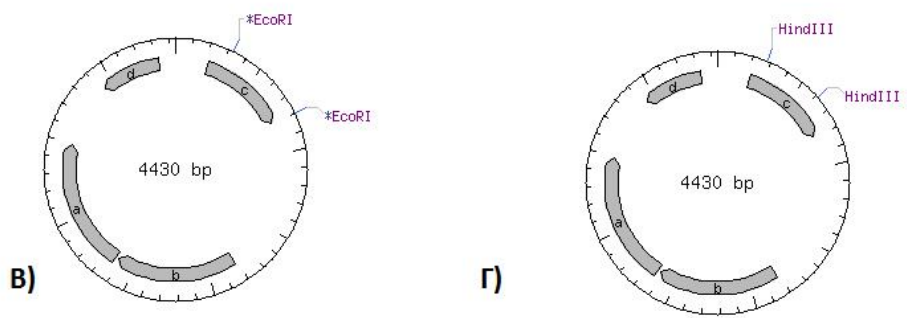
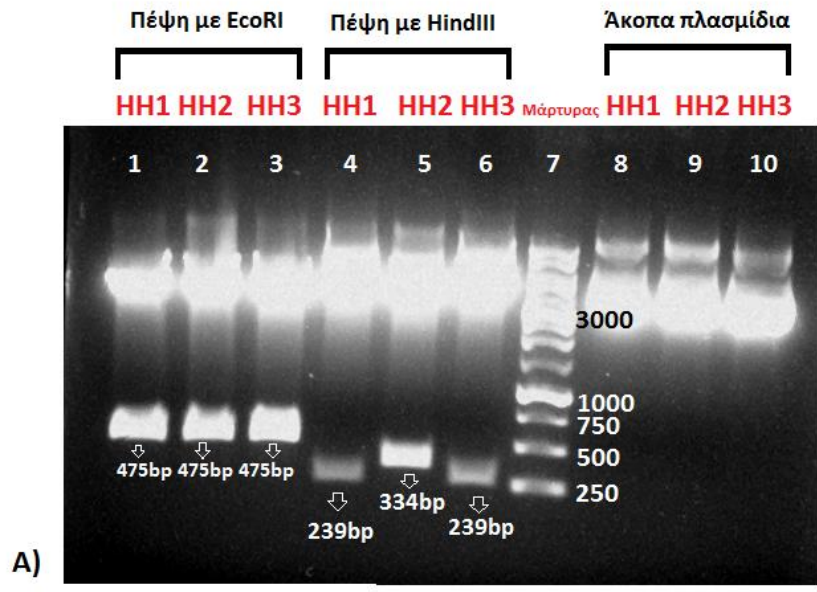


Εικόνα 59: Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου σύντηξης  $\alpha$  σφαιρίνης-HA (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2, 455bp). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 100bp.

Η φωτεινή ζώνη στα 455bp που αντιστοιχεί στην ενισχυμένη  $\alpha$  σφαιρίνη-HA εκλούσθηκε με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II, της Macherey-Nagel και η συγκέντρωση του προϊόντος έκλουσης μετρήθηκε στο NanoDrop™ 2000/2000c-spectro-φωτόμετρο μικροποσοτήτων και αντιστοιχούσε σε 23,3ng/μl, με λόγο 260:280 = 1,83.

Ακολούθησε η αντίδραση της συνένωσης του πλασμιδιακού φορέα με το προϊόν έκλουσης της αντίδρασης PCR. Στη συνέχεια, φρέσκα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα TOP10 μετασχηματίστηκαν με το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης και επιστρώθηκαν σε στερεό άγαρ. Αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 12-16 ώρες (overnight) και ακολούθως επιλέχθηκαν πολλές λευκές και λίγες κυανές (control) αποικίες.

Οι επιλεγμένες αποικίες αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό LB και αμπικιλίνη και την επόμενη μέρα ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Το πλασμιδιακό DNA υπέστη πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. Τα βιοπληροφορικά δεδομένα (NEBcutter) προέβλεπαν πως πέψη με EcoRI του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pCR11-TOPO- $\alpha$  σφαιρίνη-HA, ο οποίος φέρει την νουκλεοτιδική αλληλουχία ενδιαφέροντος, θα οδηγούσε στην αποκοπή της αλληλουχίας από το υπόλοιπο πλασμιδιακό μόριο. Επιπλέον, η διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) είχε δείξει πως η αλληλουχία της κωδικής αλληλουχίας της  $\alpha$ -σφαιρίνης εμφάνιζε θέση κοπής από την HindIII περίπου στο ενδιάμεσο της, ενώ μια άλλη θέση κοπής από το ίδιο ένζυμο εντοπίζεται στην αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο τμημάτων DNA, το ένα μεγάλου μήκους (4096bp) και ένα μικρού μήκους (334bp). Παρόλ'αυτά, σε περίπτωση που το ένθεμα εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα με ανάποδη κατεύθυνση, τα τμήματα που προκύπτουν μετά την πέψη με HindIII, αντιστοιχούν σε 4191bp και 239bp, γεγονός που παρατηρείται στην ηλεκτροφορητική



**Εικόνα 60:** Α) Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης κοπής με ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI και HindIII, τριών διαφορετικών βακτηριακών κλώνων: HH1, HH2 και HH3. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: «Κομμένο» πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH1, με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: «Κομμένο» πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH2, με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: «Κομμένο» πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH3, με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: «Κομμένο» πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH1, με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: «Κομμένο» πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH2, με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: «Κομμένο» πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH3, με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7: Μάρτυρας 1kb. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 8: Άκοπο πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH1. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 9: Άκοπο πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH2. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 10: Άκοπο πλασμίδιο rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA του κλώνου HH3.

Β) Πρόβλεψη κοπής rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

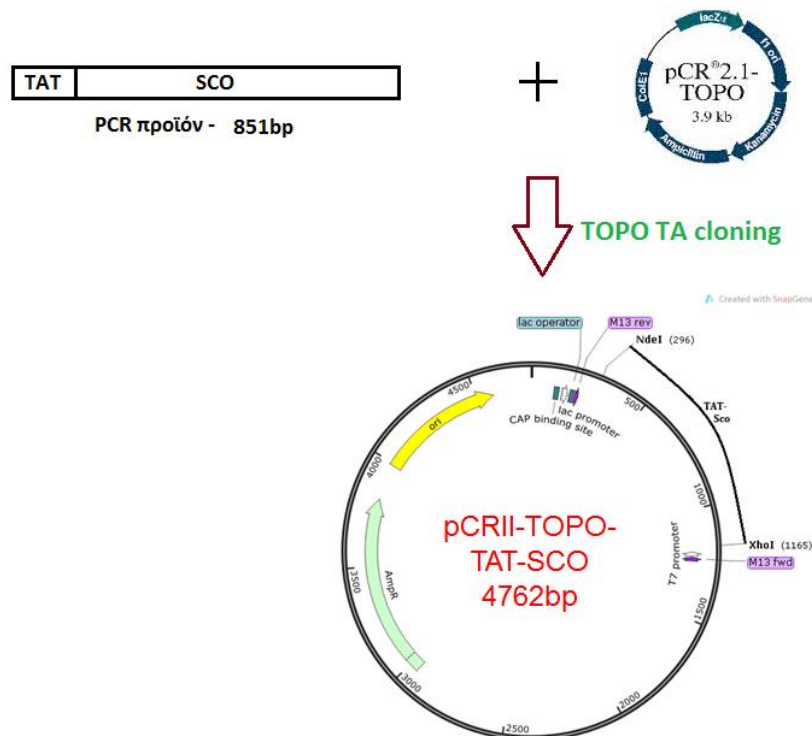
Γ) Πρόβλεψη κοπής rCRII-TOPO-α σφαιρίνη-HA με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

ανάλυση για τους κλώνους HH1 και HH3. Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών κοπών με τα ένζυμα περιορισμού σε τρεις διαφορετικούς κλώνους φαίνονται στην Εικόνα 60.

Η επιβεβαίωση για την επιτυχή κλωνοποίηση του γονιδίου της *α σφαιρίνης-HA* στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO προήλθε από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης τα οποία απέδειξαν πως η αλληλουχία της *α σφαιρίνης-HA* είχε ενσωματωθεί με 100% πιστότητα στον πλασμιδιακό φορέα. Έχουν αλληλουχηθεί με επιτυχία τρεις διαφορετικοί βακτηριακοί κλώνοι που φέρουν το πλασμίδιο pCRII-TOPO-*α σφαιρίνη-HA* (HH1, HH2 και HH3).

### Γ.2.3.Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της TAT-SCO2 στον πλασμιδιακό φορέα pCR®II-TOPO:

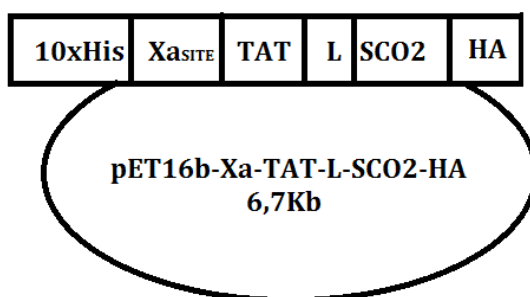
Πέραν από τις ανασυνδυασμένες σφαιρίνες, η μέθοδος TOPO TA cloning εφαρμόστηκε για την κλωνοποίηση και του CDS του SCO2 γονιδίου με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου TAT, στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:



Εικόνα 61: Πορεία πειραμάτων για την κλωνοποίηση της ανασυνδυασμένης TAT-SCO2 στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO.

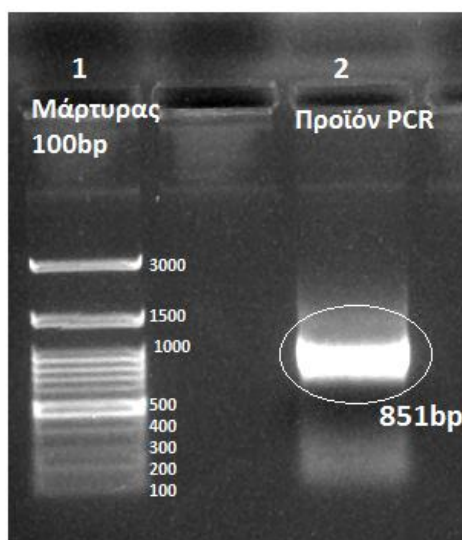
Αρχικά, χρειάστηκε να ενισχυθεί με τη μέθοδο της PCR η αλληλουχία ενδιαφέροντος. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του TAT: 5'-CGC AAG AAA CGC CGC CAG CGC CGC CGC-

3' ενσωματώθηκε στον πρόσθιο (forward) εκκινητή, ο οποίος υβριδίζεται στην κωδική αλληλουχία της SCO2 έτσι ώστε να προκύψει η συντηγμένη αλληλουχία TAT-SCO2. Ως εκμαγείο για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pET16b-Xa<sub>SITE</sub>-TAT-L-SCO2-HA, το οποίο κατασκευάστηκε από την Δρ. Φωλτοπούλου Παρθένα κατά την εκπόνηση της διδακτορικής της διατριβής, το 2007, στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής:



Εικόνα 62: Πλασμίδιο pET16b-XaSITE-TAT-L-SCO2-HA, Φωλτοπούλου 2007.

Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της TAT-SCO2 με μήκος 851bp με τη μέθοδο της PCR και το προϊόν γονιδιακής ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Η ζώνη που εμφανίστηκε κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιστοιχούσε στο επιθυμητό μήκος των 851bp.



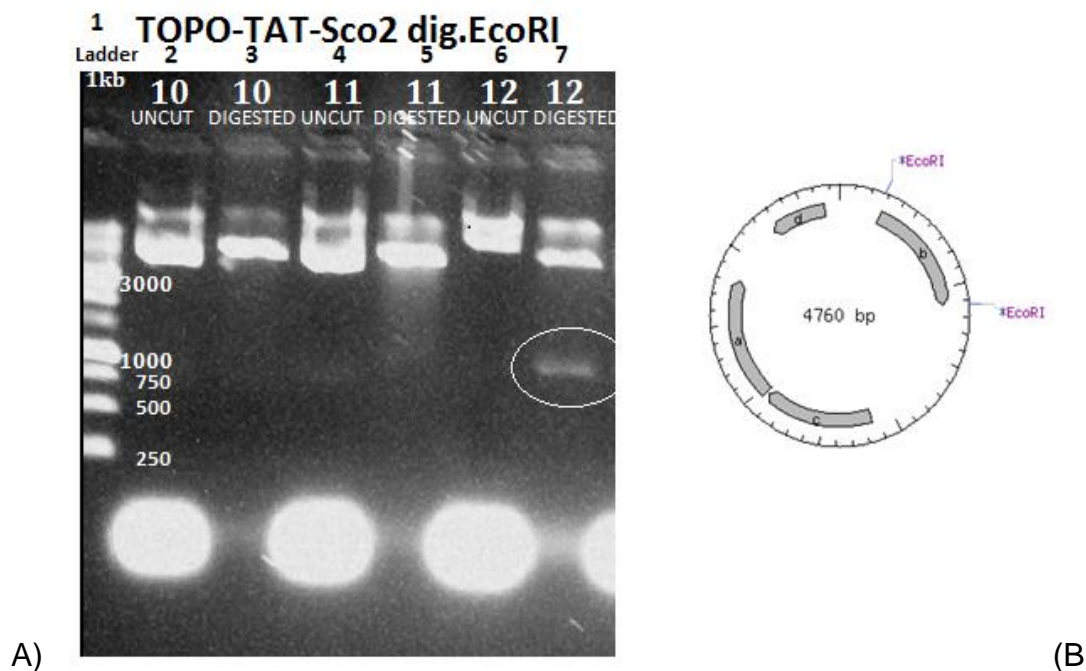
Εικόνα 63: Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτη αγαρόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου σύντηξης TAT-SCO2 (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2, 851bp). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 100bp.

Η μπάντα στο μέγεθος 851bp, που αντιστοιχεί στην ενισχυμένη TAT-SCO2, εκλούσθηκε με τη χρήση του kit Nucleospin Extract II, της Macherey-Nagel και η συγκέντρωση του



προϊόντος έκλουσης μετρήθηκε στο NanoDrop™ 2000/2000c-spectro-φωτόμετρο μικροποσοτήτων και αντιστοιχούσε σε 62,5ng/μl, με λόγο 260:280 = 1,98.

Στη συνέχεια έλαβε χώρα η αντίδραση της συνένωσης του πλασμιδιακού φορέα με το προϊόν έκλουσης της αντίδρασης PCR. Παρασκευάστηκαν φρέσκα επιδεικτικά βακτηριακά κύτταρα TOP10, τα οποία μετασχηματίστηκαν με το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης και επιστρώθηκαν σε στερεό άγαρ. Αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 12-16 ώρες (overnight) και ακολούθως επιλέχθηκαν πολλές λευκές και λίγες κυανές (control) αποικίες με την ιστοχημική μέθοδο ανίχνευσης δράσης της β-γαλακτοσιδάσης (“blue/white screening”).



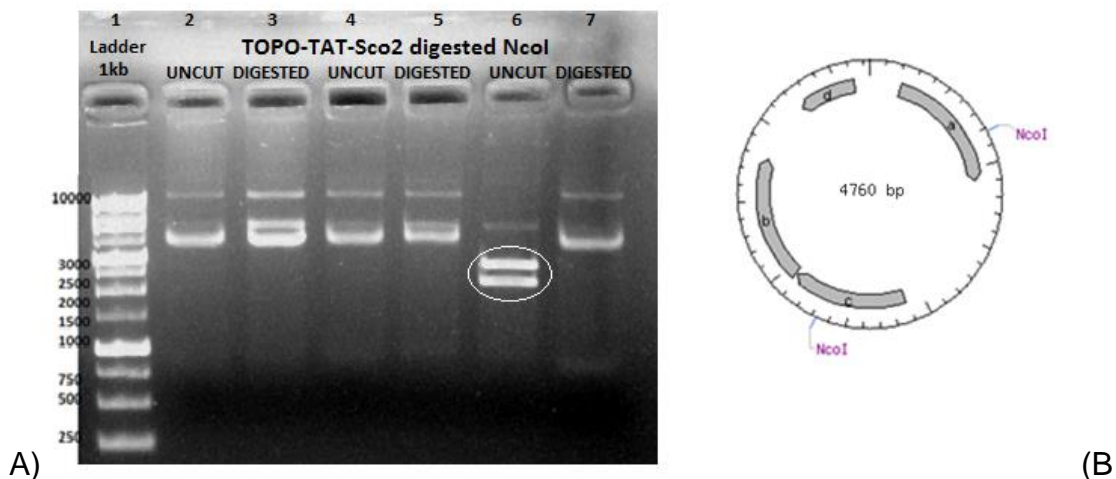
**Εικόνα 64:** Α) Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης κοπής με ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI του πλασμιδίου rCRII-TOPO-TAT-SCO2 των κλώνων TS10, TS11 και TS12 (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7, 3909bp και 851bp). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 1kb. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Άκοπο απομονωμένο πλασμίδιο του κλώνου TS10. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Προϊόν πέψης με EcoRI, απομονωμένου πλασμιδιακού DNA από τον κλώνο TS10. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Άκοπο απομονωμένο πλασμίδιο του κλώνου TS11. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: Προϊόν πέψης με EcoRI, απομονωμένου πλασμιδιακού DNA από τον κλώνο TS11. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: Άκοπο απομονωμένο πλασμίδιο του κλώνου TS12. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7: Προϊόν πέψης με EcoRI, απομονωμένου πλασμιδιακού DNA από τον κλώνο TS12. Β) Πρόβλεψη κοπής rCRII-TOPO-TAT-SCO2 με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Οι αποικίες αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, για 12-16 ώρες (overnight) στους 37°C και από τις καλλιέργειες αυτές απομονώθηκαν τα πλασμίδια που φέρουν. Ακολούθως, τα απομονωμένα πλασμίδια επωάστηκαν με την ενδονουκλεάση EcoRI και με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής, υπολογίστηκε πως το αναμενόμενο αποτέλεσμα της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο αυτό, αντιστοιχούσε στο ένθεμα το οποίο ενσωματώθηκε κατά την κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα (851bp). Το

προϊόν της πέψης με την *EcoRI* ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v και φαίνονται στην Εικόνα 64.

Η μπάντα στα 851bp, που παρατηρήθηκε κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος πέψης του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA του TS12, αποτελεί ένδειξη ότι στον βακτηριακό κλώνο TS12, υπάρχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2*.

Εκτός από την πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI*, έλαβε χώρα άλλη μια διαγνωστική πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *NcoI*. Με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής εντοπίστηκε ότι η αλληλουχία της *TAT-SCO2* έχει ενσωματωμένη μια αλληλουχία αναγνώρισης πέψης της ενδονουκλεάσης περιορισμού *NcoI*. Επιπλέον, το ένζυμο αυτό αποδείχτηκε ότι «κόβει» και σε ένα σημείο, τον πλασμιδιακό φορέα *pCRII-TOPO*. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, μετά την πέψη του απομονωμένου πλασμιδίου *pCRII-TOPO-TAT-SCO2* με την ενδονουκλεάση περιορισμού *NcoI*, να προκύπτουν δύο τμήματα DNA, το ένα μεγέθους 2873bp και το άλλο 1859bp. Το προϊόν της πέψης του πλασμιδίου με την *NcoI* ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v και τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:



Εικόνα 65: A) Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτη αγαρόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης κοπής με ενδονουκλεάση περιορισμού *NcoI* των απομονωμένων πλασμιδίων των κλώνων TS10, TS11 και TS12. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 1kb. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Άκοπτο απομονωμένο πλασμίδιο του κλώνου TS10. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Προϊόν πέψης με *NcoI*, απομονωμένου πλασμιδιακού DNA από τον κλώνο TS10. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Άκοπτο απομονωμένο πλασμίδιο του κλώνου TS11. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: Προϊόν πέψης με *NcoI*, απομονωμένου πλασμιδιακού DNA από τον κλώνο TS11. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: Άκοπτο απομονωμένο πλασμίδιο του κλώνου TS12. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7: Προϊόν πέψης με *NcoI*, απομονωμένου πλασμιδιακού DNA από τον κλώνο TS12. B) Πρόβλεψη κοπής *pCRII-TOPO-TAT-SCO2* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI* από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Με τα αποτελέσματα από τις δύο διαγνωστικές κοπές με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού, συμπεραίνεται πως η κλωνοποίηση του συντηγμένου γονιδίου *TAT-SCO2* στον πλασμιδιακό φορέα *pCRII-TOPO* ήταν επιτυχής, στον βακτηριακό κλώνο TS12. Η

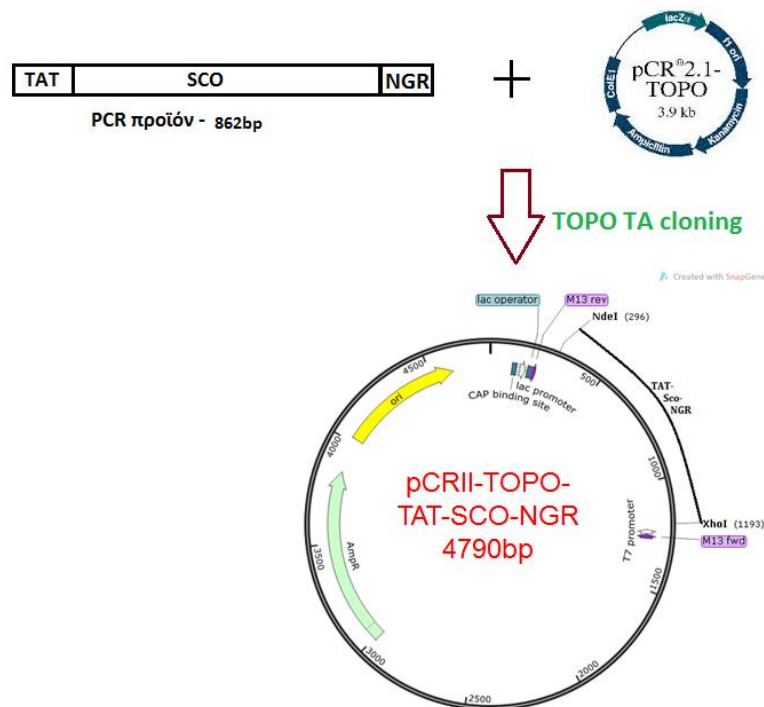


επιβεβαίωση της ένθεσης του γονιδίου με 100% πιστότητα και χωρίς κάποια μετάλλαξη, προήλθε από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του απομονωμένου πλασμιδίου από τον κλώνο TS12.

**Γ.2.4.Κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης της TAT-SCO2-NGR στον πλασμιδιακό φορέα pCR®II-TOPO:**

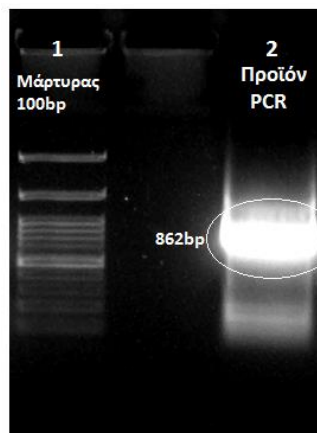
Αφού έγινε η κλωνοποίηση του CDS του γονιδίου SCO2 σε σύντηξη με την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο πεπτιδίο TAT, στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO, αποφασίστηκε να κλωνοποιηθεί επίσης στον φορέα αυτό το γονίδιο TAT-SCO2, συντηγμένο με μια επιπλέον αλληλουχία, την αλληλουχία του πεπτιδίου-οδηγού NGR (Ασπαραγίνη-Γλυκίνη-Αργινίνη).

Η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής:



Εικόνα 66: Πορεία πειραμάτων για την κλωνοποίηση της αλληλουχίας σύντηξης TAT-SCO2-NGR στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO.

Αρχικά, σχεδιάστηκε ένας επιπλέον ανάστροφος εκκινητής, ο οποίος φέρει ενσωματωμένη την αλληλουχία του πεπτιδίου NGR: aac ggc cgt και ενίσχυση της αλληλουχίας TAT-SCO2-NGR. Η αντίδραση PCR έγινε με επιτυχία, όπου και ενισχύθηκε ένα τμήμα DNA με μήκος 862bp. Το προϊόν γονιδιακής ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Η ζώνη που εμφανίστηκε κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση αντιστοιχούσε στο επιθυμητό μήκος των 862bp.

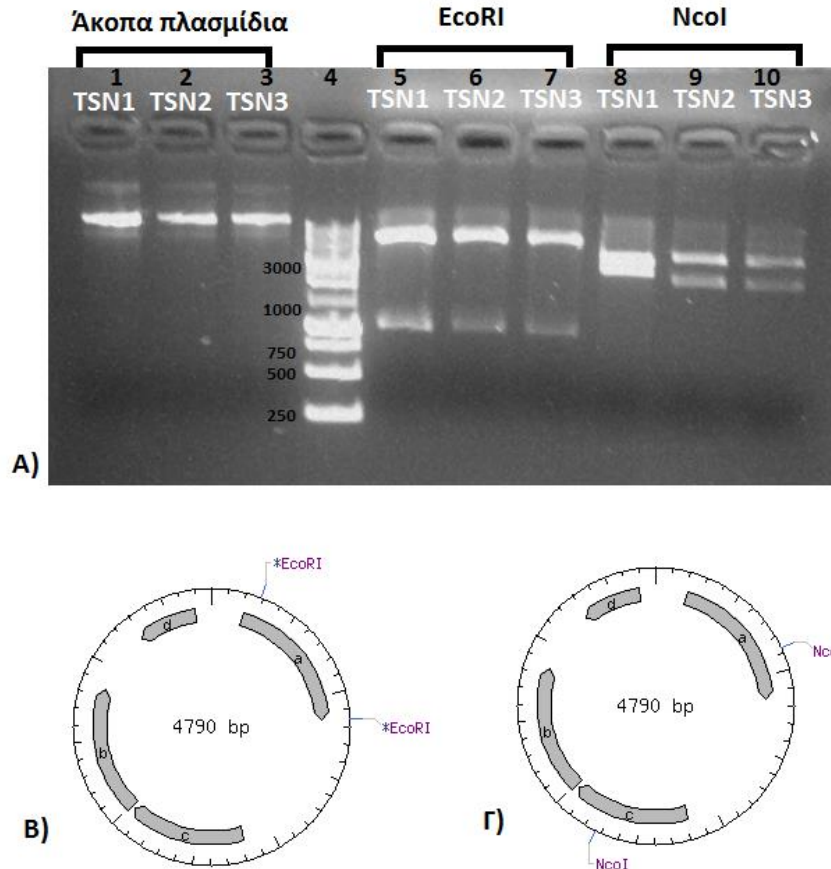


**Εικόνα 67:** Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v του προϊόντος της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου σύντηξης *TAT-SCO2-NGR* (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2, 862bp). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 100bp.

Η μπάντα στα 862bp που φάνηκε να αντιστοιχεί στην αλληλουχία *TAT-SCO2-NGR*, εκλούσθηκε με τη βοήθεια του kit της Macherey-Nagel, Nucleospin Extract kit και ακολούθως υπολογίσθηκε και η συγκέντρωση του προϊόντος έκλυσης μετρήθηκε στο NanoDrop™ 2000/2000c-spectro-φωτόμετρο μικροποσοτήτων και αντιστοιχούσε σε 53,8ng/μl, με λόγο 260:280 = 1,98.

Ακολούθησε η αντίδραση συνένωση του εκλουσθέντος τμήματος DNA με τον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO και το προϊόν που προέκυψε, χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό φρέσκων επιδεικτικών κυττάρων TOP10, επεξεργασμένων με CaCl<sub>2</sub>. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώνονται σε στερεό άγαρ, όπου και αφήνονται να αναπτυχθούν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Με την ιστοχημική μέθοδο ανίχνευσης της β-γαλακτοσιδάσης, επιλέγονται λευκές βακτηριακές αποικίες, οι οποίες αναπτύσσονται σε καλλιέργεια με υγρό θρεπτικό LB κατά τη διάρκεια της νύχτας. Από την καλλιέργεια αυτή προκύπτουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, με τη μέθοδο της απομόνωσης με αλκαλική λύση.

Για να διαγνωσθεί αν τα απομονωμένα πλασμίδια αντιστοιχούν στο pCRII-TOPO-*TAT-SCO2-NGR*, ακολούθησαν αντιδράσεις πέψης με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί το EcoRI, το οποίο αναγνωρίζει θέσεις κοπής στο 5' και στο 3' άκρο του ενθέματος, με αποτέλεσμα μετά την πέψη να προκύπτουν δύο τμήματα: ένα που αντιστοιχεί στο μέγεθος του ενθέματος (877bp) και ένα μεγαλύτερο που αντιστοιχεί στο μέγεθος του φορέα pCRII-TOPO (3913bp). Το προϊόν πέψης του απομονωμένου πλασμιδίου με την ενδονουκλεάση περιορισμού με την EcoRI, ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v και το αποτέλεσμα ήταν το εξής:



**Εικόνα 68:** Α) Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v των προϊόντων της αντίδρασης κοπής με ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI* και *NcoI*, τριών διαφορετικών βακτηριακών κλώνων: TSN1, TSN2 και TSN3. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Άκοπο πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN1. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Άκοπο πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN2. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Άκοπο πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN3. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Μάρτυρας 1kb. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: «Κομμένο» πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN1, με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: «Κομμένο» πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN2, με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7: «Κομμένο» πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN3, με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 8: «Κομμένο» πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN1, με την περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 9: «Κομμένο» πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN2, με την περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 10: «Κομμένο» πλασμίδιο *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* του κλώνου TSN3, με την περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI*.

Β) Πρόβλεψη κοπής *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Γ) Πρόβλεψη κοπής *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI* από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

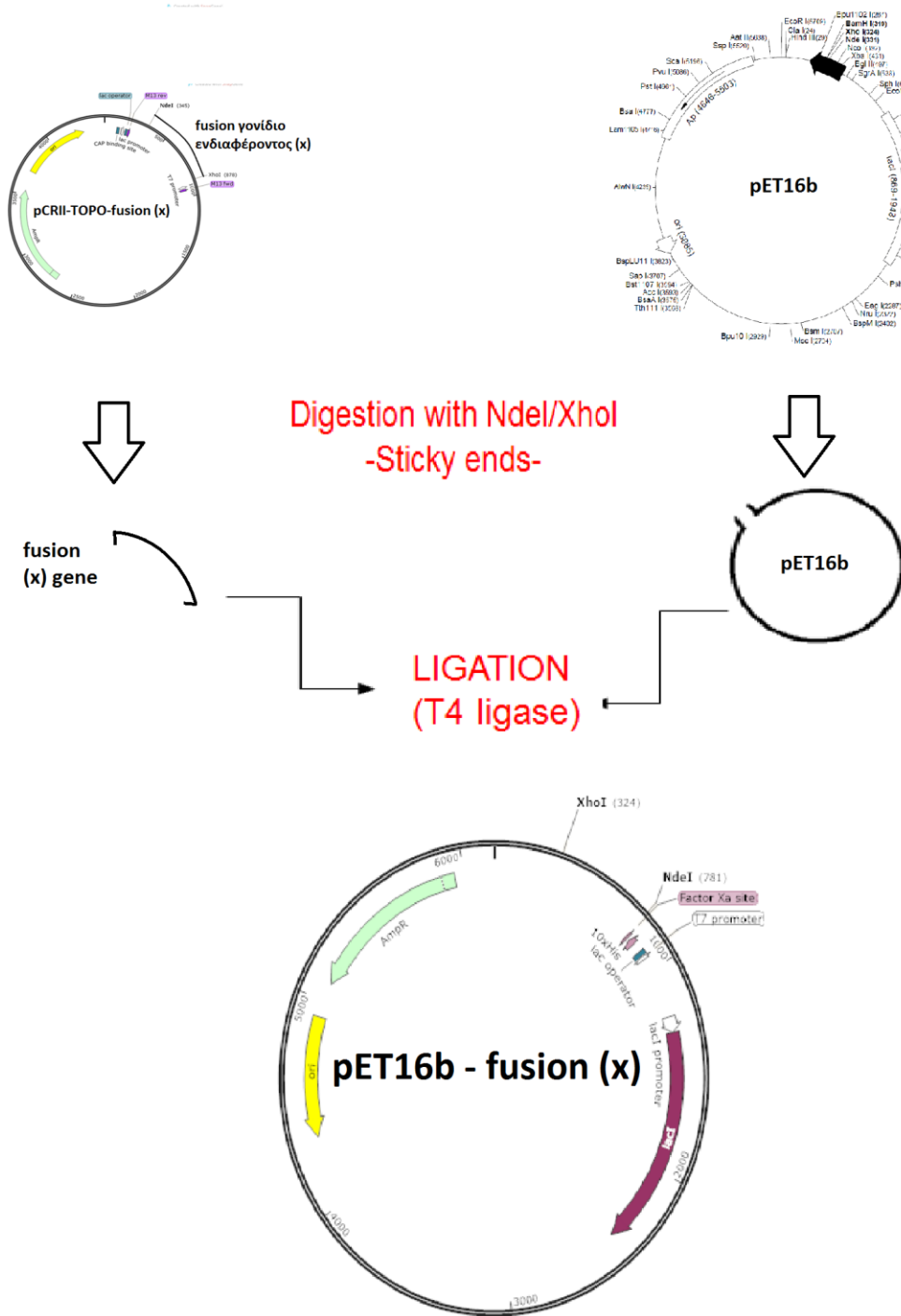
Το γεγονός ότι το συντηγμένο γονίδιο *TAT-SCO2-NGR* ενσωματώθηκε με 100% πιστότητα στον πλασμιδιακό φορέα *pCRII-TOPO*, επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης σε τρεις διαφορετικούς βακτηριακούς κλώνους, τον TSN1, TSN2 και TSN3.

### **Γ.3. Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pET16b:**

Το τρίτο στάδιο της παρούσας διπλωματικής έλαβε χώρα τον Ιανουάριο του 2016 και περιελάμβανε την περαιτέρω κλωνοποίηση των γονιδίων ενδιαφέροντος σε ένα άλλο πλασμιδιακό φορέα ο οποίος θα περιελάμβανε όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για να μεταφραστεί μια νουκλεοτιδική αλληλουχία ενδιαφέροντος με επαγόμενο τρόπο σε επιδεκτικά βακτηριακά στελέχη *E.coli*.

Οι αλληλουχίες ενδιαφέροντος: *TAT-α σφαιρίνη-HA*, *α σφαιρίνη-HA*, *TAT-SCO2* και *TAT-SCO2-NGR* λήφθηκαν με τη μέθοδο της PCR. Οι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές περιείχαν ειδικές αλληλουχίες για κοπή από δυο διαφορετικά ένζυμα περιορισμού, το NdeI στον πρόσθιο (forward) εκκινητή και το XhoI στον ανάστροφο (backward) εκκινητή. Ακολούθως, τα συντηγμένα γονίδια κλωνοποιήθηκαν το κάθε ένα, με επιτυχία στον πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO με τη μέθοδο TOPO TA cloning, γεγονός που επαληθεύτηκε με αλληλούχιση. Το επόμενο στάδιο πειραμάτων, αφορούσε την πέψη τόσο των νεοσυντιθέντων pCRII-TOPO πλασμιδίων, όσο και του πλασμιδιακού φορέα pET16b με τις δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού, NdeI και XhoI, ώστε να επέλθει συνένωση πλασμιδίου και αλληλουχίας ενδιαφέροντος, με βάση τη χρήση συνδετήρων με μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα (sticky ends). Η πέψη με τις ίδιες ενδονουκλεάσες περιορισμού διασφαλίζει την ενσωμάτωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων ενδιαφέροντος στον pET16b με τον επιθυμητό προσανατολισμό.

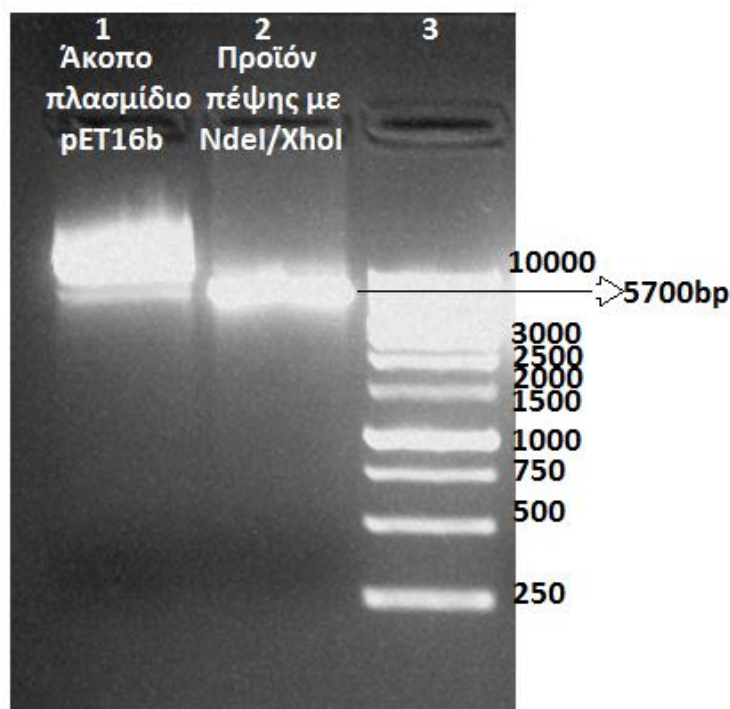
Πιο κάτω φαίνεται διαγραμματικά η αλληλουχία των πειραμάτων:



Εικόνα 69: Πορεία πειραμάτων για την κλωνοποίηση της συντηγμένης (fusion) αλληλουχίας (x) στον πλασμιδιακό φορέα pET16b.

Αρχικά, ο πλασμιδιακός φορέας pET16b επωάστηκε διαδοχικά με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI και XhoI και το αποτέλεσμα της πέψης ήταν ο φορέας να γίνει γραμμικός, αποκτώντας μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα (sticky ends). Μετά την πέψη του πλασμιδίου, ακολουθούσε θερμική απενεργοποίηση των ενζύμων, με την επώαση της αντίδρασης στους 60°C για 15min. Στη συνέχεια, το προϊόν της πέψης καθαριζόταν με τη μέθοδο PCR clean up, με τη βοήθεια ειδικών στηλών, που παρέχει το kit Nucleospin Extract II, της Macherey-Nagel. Ο λόγος που δεν μεσολαβεί έκλουση της ζώνης που αντιστοιχεί στον γραμμικό φορέα, από το πήκτωμα αγαρόζης, είναι ότι ενδέχεται να αλλοιωθούν τα μονόκλωνα άκρα που έχουν δημιουργηθεί κατά την πέψη, καθώς ο φορέας διαπερνάει το πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση του «κομμένου» γραμμικού φορέα μετρήθηκε στο spectro-φωτόμετρο μικροποσοτήτων NanoDrop™ και αντιστοιχεί σε 54,9ng/μl και ο λόγος 260:280 σε 1,87.

Μια μικρή ποσότητα του προϊόντος πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v, για διαγνωστικούς λόγους και το αποτέλεσμα ήταν η εμφάνιση μιας φωτεινής μπάντας, μεγέθους 5700bp, που αντιστοιχεί στο μήκος του γραμμικού φορέα pET16b.

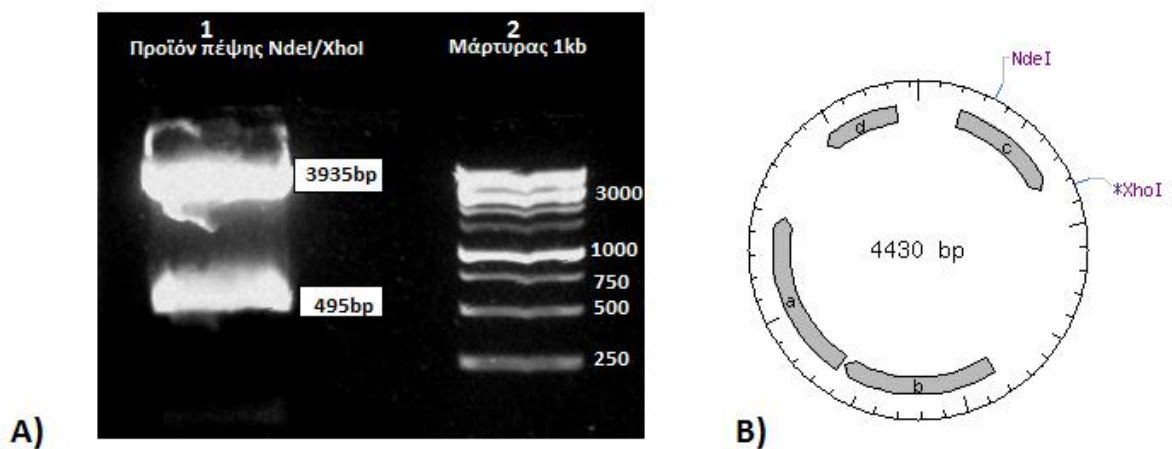


**Εικόνα 70:** Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v, του προϊόντος πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET16b με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI και XhoI. (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: «Άκοπο» πλασμίδιο pET16b. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Μάρτυρας 1kb.

Αναφορικά με τις συντηγμένες αλληλουχίες ενδιαφέροντος, ακολούθησαν πέψεις των πλασμιδίων pCRII-TOPO, με τις ίδιες ενδονουκλεάσες περιορισμού, NdeI και XhoI. Σκοπός ήταν να αποκοπούν οι αλληλουχίες ενδιαφέροντος από τα πλασμίδια αυτά και να δημιουργηθούν τα ανάλογα συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα.

Μετά από την αντίδραση πέψης για το κάθε πλασμίδιο: pCRII-TOPO-*TAT-α σφαιρίνη-HA*, pCRII-TOPO-*α σφαιρίνη-HA*, pCRII-TOPO-*TAT-SCO2* και pCRII-TOPO-*TAT-SCO2-NGR*, το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται κάθε φορά μια φωτεινή μπάντα στο μέγεθος που αντιστοιχεί στο μήκος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του εκάστοτε συντηγμένου γονιδίου, το οποίο αναμένεται να φέρει τα μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα και μια φωτεινή μπάντα που αντιστοιχεί στον γραμμικό φορέα pCRII-TOPO, γύρω στα 3900bp.

Διπλή πέψη με NdeI/XhoI του πλασμιδίου pCRII-TOPO-*α σφαιρίνη-HA*:

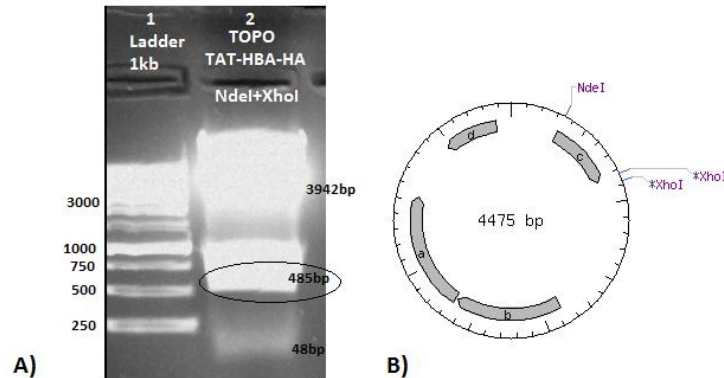


**Εικόνα 71:** A) Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: «Κομμένο» πλασμίδιο pCRII-TOPO-*α σφαιρίνη-HA*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Μάρτυρας 1kb. B) Πρόβλεψη κοπής pCRII-TOPO-*α σφαιρίνης-HA* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI/XhoI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Η φωτεινή μπάντα στα 495bp αντιστοιχεί στο συντηγμένο γονίδιο *α-σφαιρίνη-HA*, που φέρει τα «κολλώδη» μονόκλωνα άκρα. Ακολούθησε, έκλουση του συγκεκριμένου τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και η συγκέντρωσή του, σύμφωνα με το NanoDrop™ αντιστοιχεί σε 11,4ng/μl, ενώ ο λόγος 260:280 ισούται με 1,93.



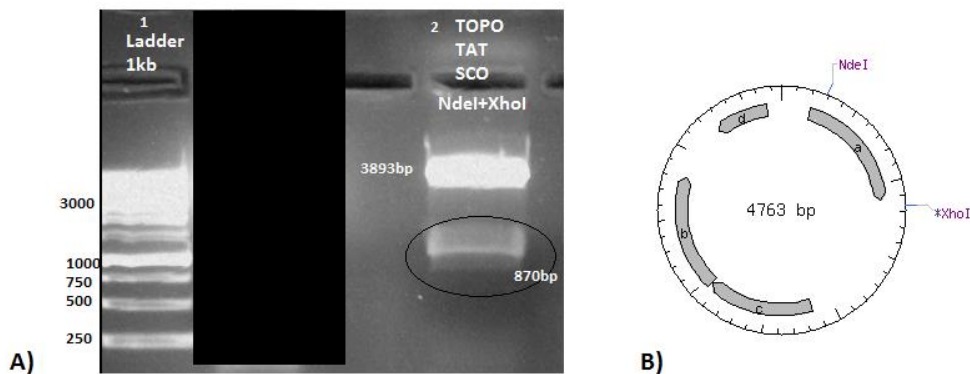
Διπλή πέψη με NdeI/XhoI του πλασμιδίου pCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA:



**Εικόνα 72:** Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: «Κομμένο» πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνη-HA. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Μάρτυρας 1kb. Β) Πρόβλεψη κοπής pCRII-TOPO-TAT-α σφαιρίνης-HA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI/XhoI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Η φωτεινή μπάντα στα 485bp αντιστοιχεί στη συντηγμένη αλληλουχία TAT-α σφαιρίνη-HA, που φέρει τα «κολλώδη» μονόκλωνα άκρα. Ακολούθησε, έκλουση του συγκεκριμένου τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και η συγκέντρωσή του, σύμφωνα με το NanoDrop™ αντιστοιχεί σε 25ng/μl, ενώ ο λόγος 260:280 ισούται με 1,98.

Διπλή πέψη με NdeI/XhoI του πλασμιδίου pCRII-TOPO-TAT-SCO2:



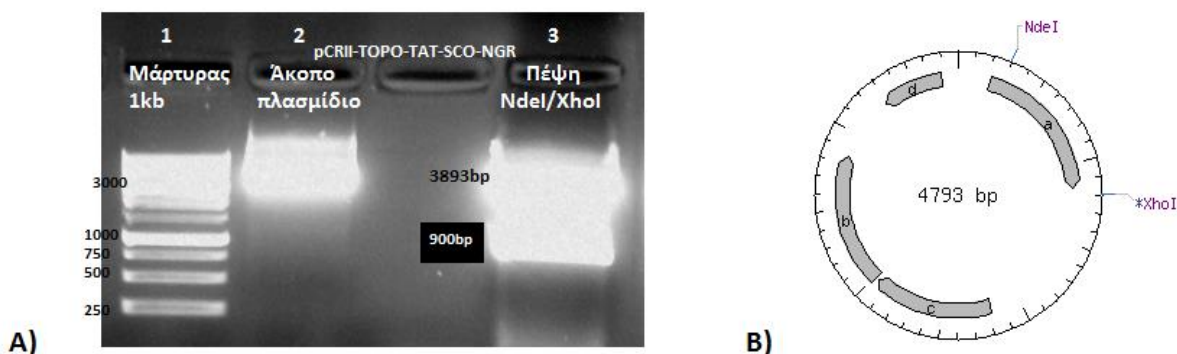
**Εικόνα 73:** Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: «Κομμένο» πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Μάρτυρας 1kb. Β) Πρόβλεψη κοπής pCRII-TOPO-TAT-SCO2 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI/XhoI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Η φωτεινή μπάντα στα 870bp αντιστοιχεί στο συντηγμένο γονίδιο TAT-SCO2, που φέρει τα «κολλώδη» μονόκλωνα άκρα. Ακολούθησε, έκλουση του συγκεκριμένου τμήματος



DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και η συγκέντρωσή του, σύμφωνα με το spectrophotόμετρο μικροποσοτήτων NanoDrop™ αντιστοιχεί σε 31ng/μl, ενώ ο λόγος 260:280 ισούται με 1,89.

#### Διπλή πέψη με NdeI/XhoI του πλασμιδίου pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR:



**Εικόνα 74:** Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Μάρτυρας 1kb. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Άκοπο πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: «Κομμένο» πλασμίδιο pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR. Β) Πρόβλεψη κοπής pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI/XhoI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Η φωτεινή μπάντα στα 900bp αντιστοιχεί στο TAT-SCO2-NGR, που φέρει τα «κολλώδη» μονόκλινα άκρα. Ακολούθησε, έκλυση του συγκεκριμένου τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και η συγκέντρωσή του, σύμφωνα με το NanoDrop™ αντιστοιχεί σε 18,7ng/μl, ενώ ο λόγος 260:280 ισούται με 1,79.

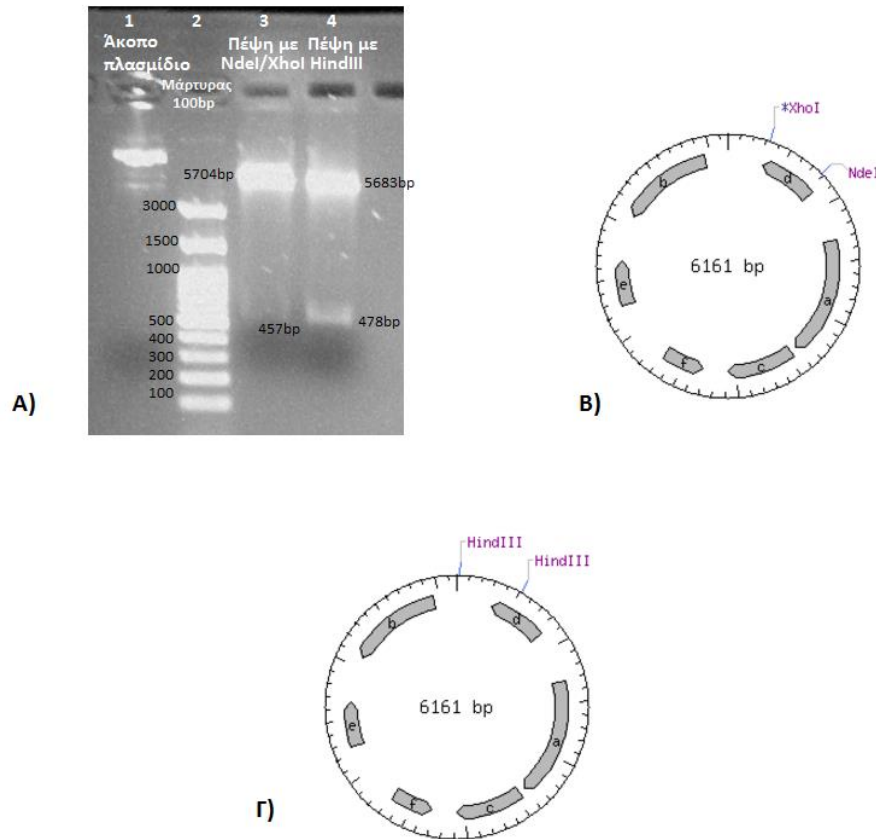
Το επόμενο και πιο σημαντικό στάδιο στην κλωνοποίηση των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pET16b, είναι η **αντίδραση συνένωσης μεταξύ του κομμένου γραμμικού πλέον πλασμιδιακού μορίου και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενδιαφέροντος η οποία πλέον έφερε μονόκλινα άκρα**. Η αναλογία του φορέα προς το ένθεμα αντιστοιχούσε σε 1:3.

Το αποτέλεσμα της αντίδρασης συνένωσης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων C43 (DE3) *E. coli* τα οποία κατόπιν αναπτύχθηκαν σε στερεό άγαρ όλη τη νύχτα παρουσία αμπικιλλίνης. Ακολούθως έγινε τυχαία επιλογή διαφόρων αποικιών από τις οποίες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA.

Ακολούθησαν διαγνωστικές κοπές για να διαπιστωθεί η επιτυχής ένθεση του εκάστοτε συντηγμένου γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα. Επιλέχθηκαν οι ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI/XhoI, όπου πραγματοποιείται αντίδραση διπλής πέψης, καθώς και άλλη μια αντίδραση πέψης με μια ενδονουκλεάση περιορισμού που «κόβει» τόσο μέσα

στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενθέματος, όσο και στον πλασμιδιακό φορέα. Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών πέψεων φαίνονται κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων *pET16b-αλληλουχία ενδιαφέροντος (x)*, όπου θα εμφανίζονταν μια μεγάλη μεγέθους φωτεινή μπάντα (γραμμικός φορέας) και μια μικρότερου μεγέθους (ένθεμα).

Διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδίου *pET16b-α σφαιρίνη-HA*:



**Εικόνα 75:** Α) Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων από αντιδράσεις διαγνωστικών πέψεων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pET16b-α σφαιρίνη-HA* με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *NdeI/XhoI* και *HindIII*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Άκοπτο πλασμίδιο *pET16b-α σφαιρίνη-HA*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Μάρτυρας 100bp. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης με τα ένζυμα *NdeI* και *XhoI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο *HindIII*. Β) Πρόβλεψη κοπής *pET16b-α σφαιρίνης-HA* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI/XhoI* από τη διαδικτυακή πλατφόρμα *NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Γ) Πρόβλεψη κοπής *pET16b-α σφαιρίνη-HA* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HindIII* από τη διαδικτυακή πλατφόρμα *NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

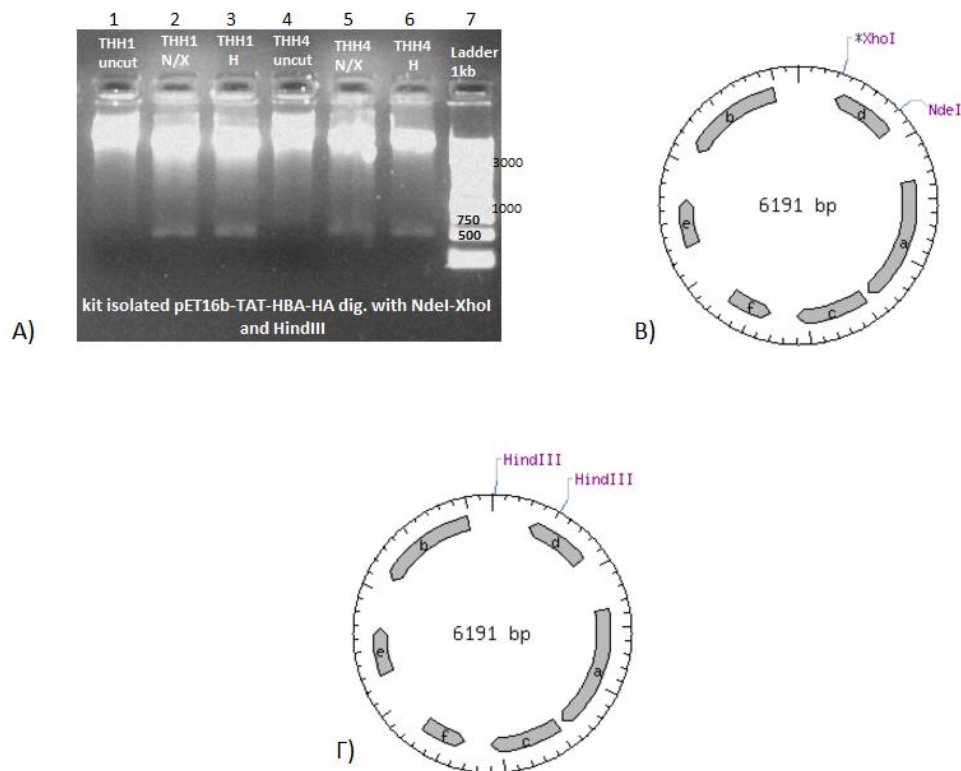
Σύμφωνα με την εικόνα που παρουσιάζουν τα προϊόντα των διαγνωστικών πέψεων, επιβεβαιώνεται η επιτυχής ένθεση της αλληλουχίας *α σφαιρίνη-HA* στον πλασμιδιακό

φορέα pET16b. Οι μπάντες που εμφανίζονται αντιστοιχούν στα μεγέθη DNA που προβλέπονται με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής:

Πέψη pET16b-α σφαιρίνη-HA με NdeI και XhoI: 5704bp και 457bp

Πέψη pET16b-α σφαιρίνη-HA με HindIII: 5683bp και 478bp

Διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδίου pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA:



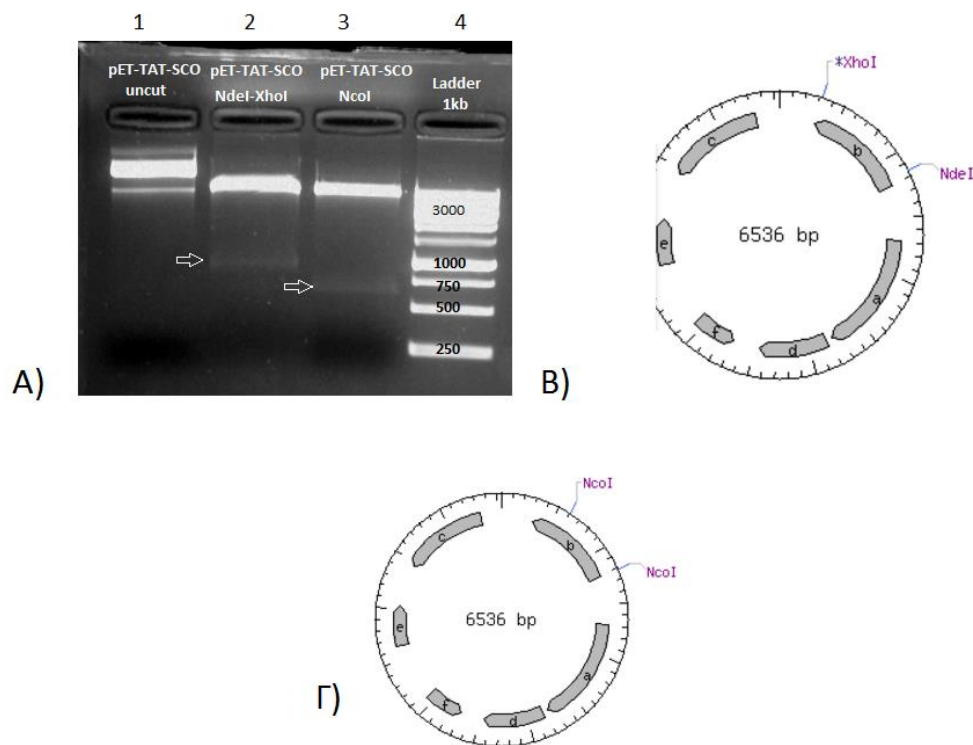
**Εικόνα 76:** Α) Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων από αντιδράσεις διαγνωστικών πέψεων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI/XhoI και HindIII. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Άκοπτο πλασμίδιο pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA του κλώνου THH1. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης του απομονωμένου πλασμιδίου του κλώνου THH1 με τα ένζυμα NdeI και XhoI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης του απομονωμένου πλασμιδίου του κλώνου THH1 με το ένζυμο HindIII. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Άκοπτο πλασμίδιο pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA του κλώνου THH4. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης του απομονωμένου πλασμιδίου του κλώνου THH4 με τα ένζυμα NdeI και XhoI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης του απομονωμένου πλασμιδίου του κλώνου THH4 με το ένζυμο HindIII. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7: Μάρτυρας 1kb. Β) Πρόβλεψη κοπής pET16b-TAT-α σφαιρίνης-HA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI/XhoI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Γ) Πρόβλεψη κοπής pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA με την περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Σύμφωνα με την εικόνα που παρουσιάζουν τα προϊόντα των διαγνωστικών πέψεων, επιβεβαιώνεται η επιτυχής ένθεση του συντηγμένου γονιδίου *TAT-α σφαιρίνη-HA* στον πλασμιδιακό φορέα *pET16b*. Οι μπάντες που εμφανίζονται αντιστοιχούν στα μεγέθη DNA που προβλέπονται με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής:

Πέψη *pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA* με *NdeI* και *XhoI*: 5704bp και 487bp

Πέψη *pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA* με *HindIII*: 5713bp και 478bp

Διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδίου *pET16b-TAT-SCO2*:



**Εικόνα 77:** Α) Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων από αντιδράσεις διαγνωστικών πέψεων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pET16b-TAT-SCO2* με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *NdeI/XhoI* και *NcoI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Άκοπτο πλασμίδιο *pET16b-TAT-SCO2*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης με τα ένζυμα *NdeI* και *XhoI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο *NcoI*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Μάρτυρας 1kb. Β) Πρόβλεψη κοπής *pET16b-TAT-SCO2* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI/XhoI* από τη διαδικτυακή πλατφόρμα *NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Γ) Πρόβλεψη κοπής *pET16b-TAT-SCO2* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *NcoI* από τη διαδικτυακή πλατφόρμα *NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

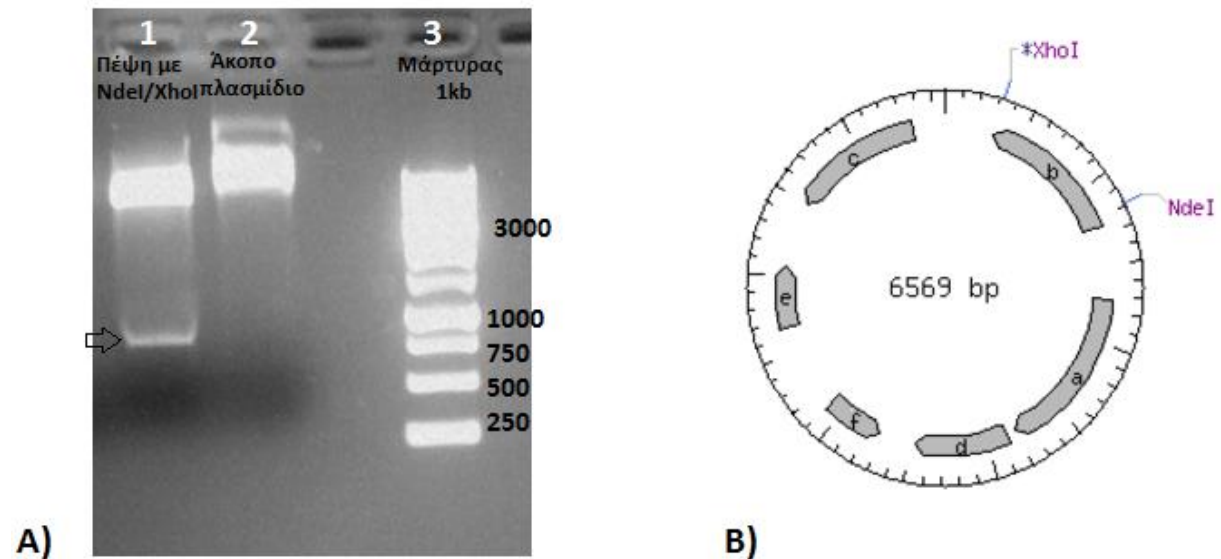
Σύμφωνα με την εικόνα που παρουσιάζουν τα προϊόντα των διαγνωστικών πέψεων, επιβεβαιώνεται η επιτυχής ένθεση του *TAT-SCO2* στον πλασμιδιακό φορέα *pET16b*. Οι

μπάντες που εμφανίζονται αντιστοιχούν στα μεγέθη DNA που προβλέπονται με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής:

Πέψη pET16b-TAT-SCO2 με NdeI και XhoI: 5704bp και 832bp

Πέψη pET16b-TAT-SCO2 με NcoI: 5918bp και 618bp

Διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδίου pET16b-TAT-SCO2-NGR:



Εικόνα 78: A) Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της αντίδρασης πέψης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pET16b-TAT-SCO2-NGR με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI/XhoI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Το προϊόν της αντίδρασης πέψης με τα ένζυμα NdeI και XhoI. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Άκοπο πλασμιδίο pET16b-TAT-SCO2-NGR. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Μάρτυρας 1kb. B) Πρόβλεψη κοπής pET16b-TAT-SCO2-NGR με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI/XhoI από τη διαδικτυακή πλατφόρμα NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Σύμφωνα με την εικόνα που παρουσιάζει η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της διαγνωστικής πέψης, επιβεβαιώνεται η επιτυχής ένθεση του συντηγμένου γονιδίου TAT-SCO2-NGR στον πλασμιδιακό φορέα pET16b. Οι μπάντες που εμφανίζονται αντιστοιχούν στα μεγέθη DNA που προβλέπονται με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής:

Πέψη pET16b-TAT-SCO2-NGR με NdeI και XhoI: 5704bp και 865bp

#### Γ.4. Επαγωγή έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια *E.coli* C43 (DE3):

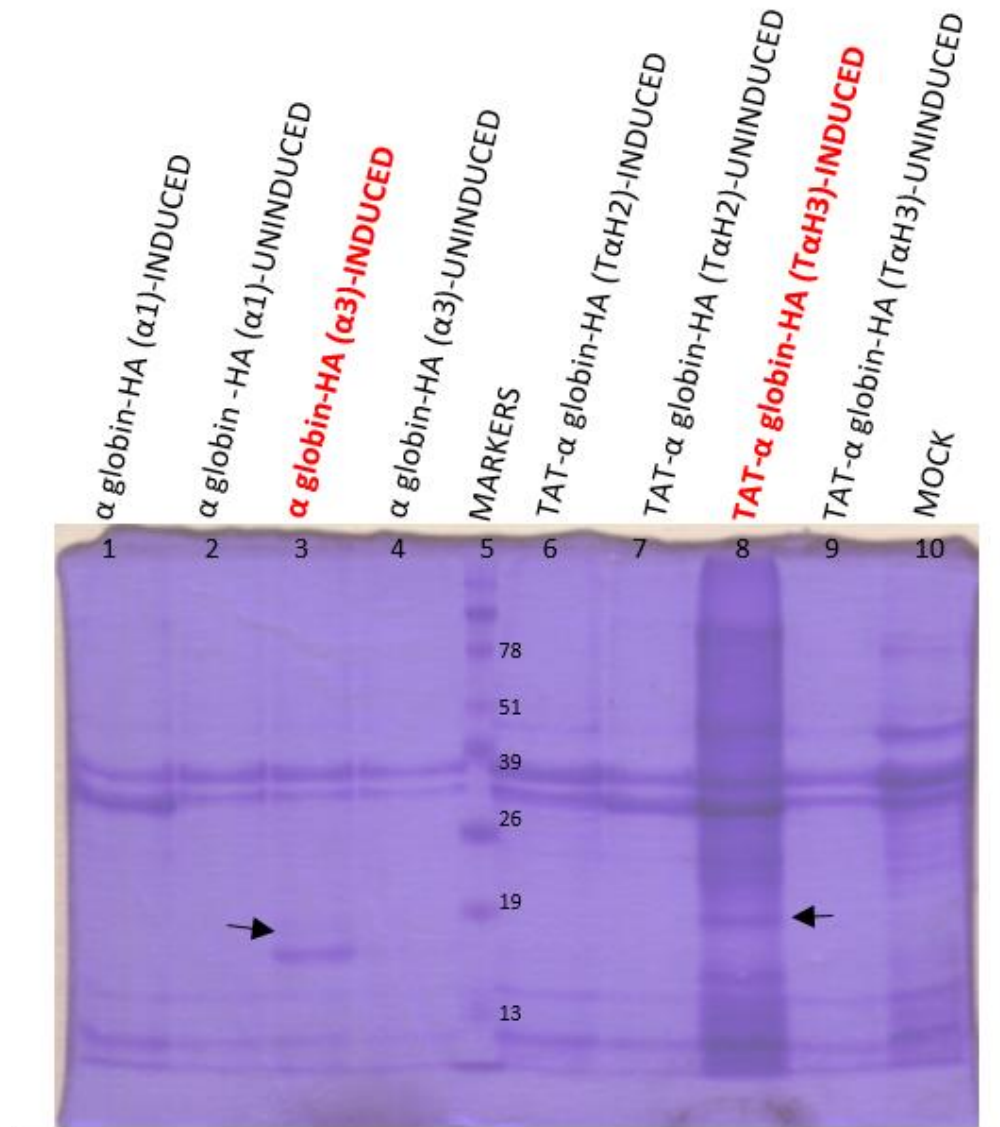
Το τέταρτο μέρος των πειραμάτων ξεκίνησε το Φεβρουάριο του 2016 και αφορούσε τη μετάφραση της εκάστοτε νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενδιαφέροντος η οποία είχε ενσωματωθεί στο πλασμιδιακό φορέα pET16b. Τα επιδεκτικά C43 βακτηριακά κύτταρα μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-αλληλουχία ενδιαφέροντος (x) και αποτέλεσαν τα «εργοστάσια» παραγωγής της αντίστοιχης πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (x).

Με τη βοήθεια του εργαλείου βιοπληροφορικής EXPASY- Compute Mw/pi TOOL, ήταν δυνατή η πρόβλεψη του μεγέθους της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος που θα προέκυπτε από τη μετάφραση του εκάστοτε αναγνωστικού πλαισίου:

Πρωτεΐνη	Υπολογισμός Μοριακής Μάζας (kDa)
<b>10xHis-X<sub>SITE</sub>-α σφαιρίνη-HA</b>	18.781,28
<b>10xHis-X<sub>SITE</sub>-TAT-α σφαιρίνη-HA</b>	20.234,08
<b>10xHis-X<sub>SITE</sub>-TAT-SCO2</b>	33.652,21
<b>10xHis-X<sub>SITE</sub>-TAT-SCO2-NGR</b>	34.891,71

Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν σε στερεό άγαρ (μετά από επώαση που διήρκεσε όλη τη νύχτα) επιλέχθηκε μια αποικία, η οποία μεταφέρθηκε σε υγρή καλλιέργεια LB 5ml. Μετά το πέρας των 16 ωρών, η καλλιέργεια αραιώθηκε σε μεγαλύτερη καλλιέργεια των 100ml και ακολουθήθηκαν ακριβώς τα πειραματικά πρωτόκολλα για την επαγόμενη με IPTG πρωτεϊνοσύνθεση καθώς και για τη λήψη των βακτηριακών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (ολικό, διαλυτό, καθαρά βακτηριακά έγκλειστα). Τα βακτηριακά έγκλειστα διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα L-Αργινίνης 1 M pH=11. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε και για “mock” *E.coli* C43 (DE3), δηλαδή *E coli* τα οποία περιείχαν το αυθεντικό πλασμιδιακό φορέα pET16-b χωρίς κάποιο ένθεμα. Στο σημείο αυτό είχαν συνολικά ανακτηθεί πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καλλιέργειες επαγόμενες με IPTG (induced), μη επαγόμενες (uninduced) και «πλαστές» (mock). Ακολούθησε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:



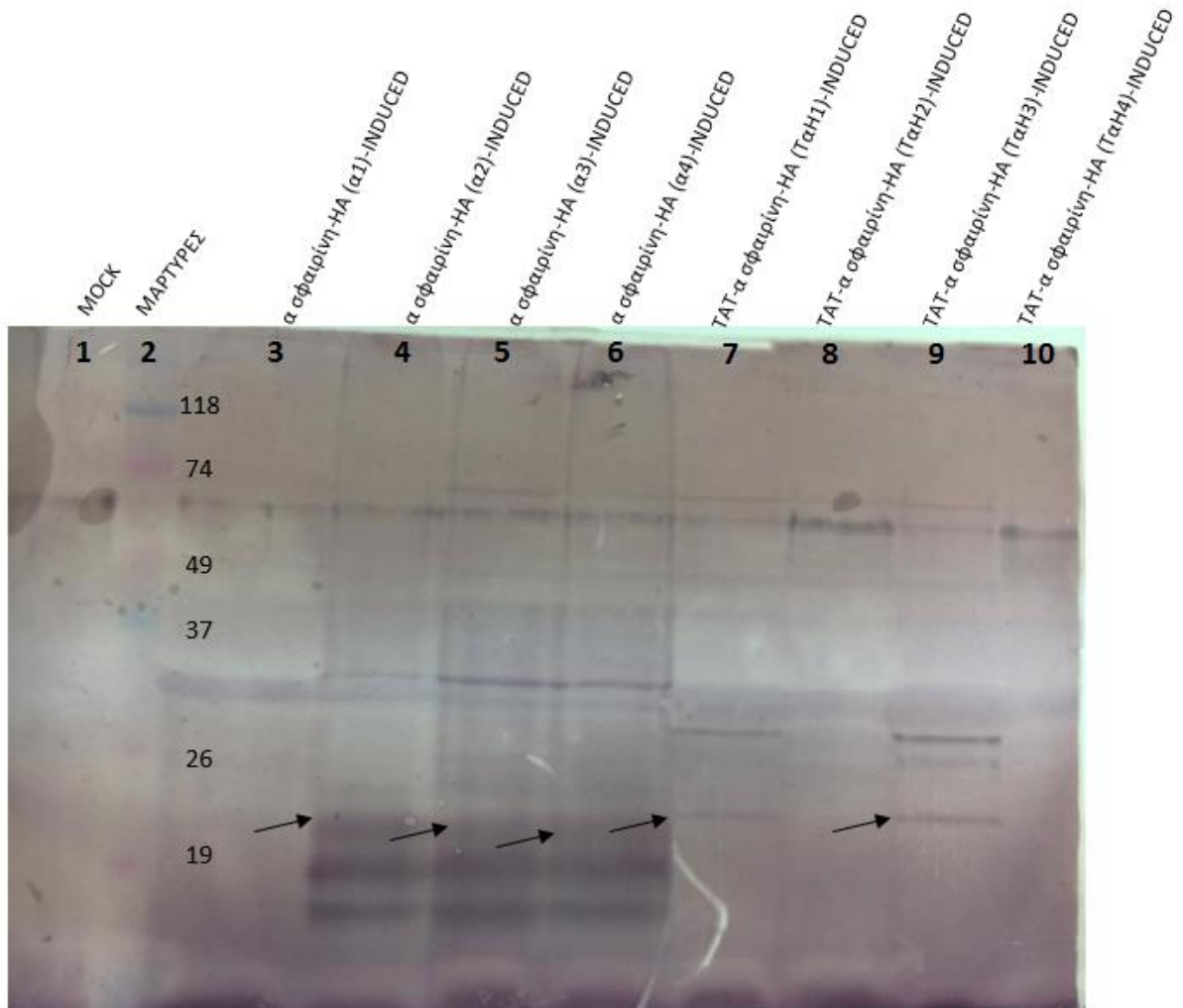


**Εικόνα 79:** SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση 14% w/v των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των «επιδεκτικών» βακτηριακών κυττάρων *E.coli* C43 (DE3) που μετασηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-*α σφαιρίνη-HA* (κλώνοι α1 και α3) και με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-*TAT-α σφαιρίνη-HA* (κλώνοι TαH2 και TαH3). Επώαστηκαν στους 37°C με IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM για 2 ώρες και 30min [επαγόμενα, (INDUCED)]. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου α1 – επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (INDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου α1 – ΜΗ επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου α3 – επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (INDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου α3 – ΜΗ επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TαH2 – επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TαH2 – ΜΗ επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 8: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TαH3 – επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (INDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 9: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TαH3 – ΜΗ επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). Στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 10 φαίνεται η ηλεκτροφορητική ανάλυση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των «επιδεκτικών» βακτηριακών κυττάρων *E.coli* C43 (DE3) που μετασηματίστηκαν με το πλασμίδιο pET16b (MOCK).

Σύμφωνα με την Εικόνα 79, εμφανίζεται μια κυανή ζώνη στα 18 και στα 20 kDa στη διαδρομή όπου έχουν ηλεκτροφορηθεί στα διαλυτοποιημένα στην L-Αργινίνη βακτηριακά έγκλειστα από τον κλώνο α-σφαιρίνη α3 (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3) και από τον κλώνο TAT-α σφαιρίνη-HA ΤαΗ3 (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 8), αντίστοιχα. Στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3, εμφανίζεται μια πολύ έντονη ζώνη, λίγο πιο κάτω από τα 18kDa, που αντιστοιχούν στην ανασυνδυασμένη α σφαιρίνη-HA πρωτεΐνη, η οποία ενδέχεται να αποτελεί προϊόν υδρόλυσης των ασταθών α-αλυσίδων που παράγονται. Παρολ'αυτά, οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος α σφαιρίνη-HA και TAT-α σφαιρίνη-HA φαίνεται πως εκφράστηκαν και ανιχνεύθηκαν στα έγκλειστα των επαγόμενων καλλιιεργειών, από όπου ανακτήθηκαν με τη βοήθεια της L-Αργινίνης.

Ακολούθησε στύπωμα κατά Western:



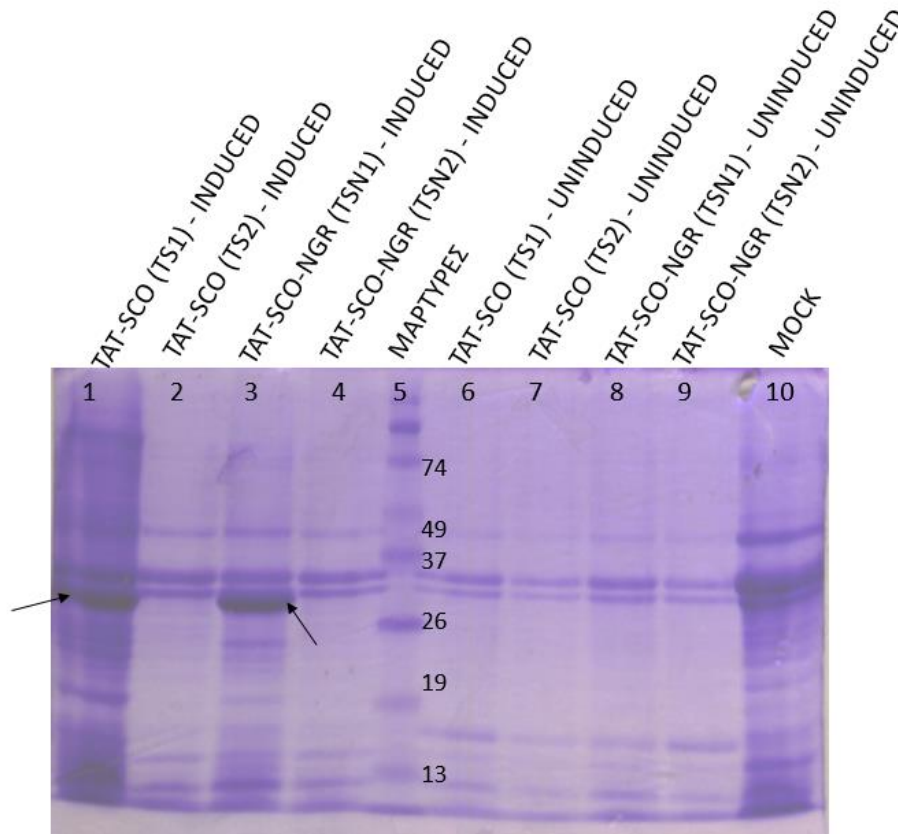


**Εικόνα 80:** Στύπωμα κατά Western σε μεμβράνη PVDF των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των «επιδεκτικών» βακτηριακών κυτάρων *E.coli* C43 (DE3) που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-α σφαιρίνη-HA (α1, α2, α3, α4) και το πλασμίδιο pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA (ΤαΗ1, ΤαΗ2, ΤαΗ3, ΤαΗ4). Επώαστηκαν στους 37°C με IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM για 2 ώρες και 30min [επαγόμενα, (INDUCED)]. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα σε L-Αργινίνη 1M (MOCK) κυτάρων. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων α1 με α σφαιρίνη-HA. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων α2 με α σφαιρίνη-HA. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων α3 με α σφαιρίνη-HA. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων α4 με α σφαιρίνη-HA. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων ΤαΗ1 με TAT-α σφαιρίνη-HA. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 8: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων ΤαΗ2 με TAT-α σφαιρίνη-HA. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 9: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων ΤαΗ3 με TAT-α σφαιρίνη-HA. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 10: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων ΤαΗ4 με TAT-α σφαιρίνη-HA. Ποσότητα πρωτεΐνης ανά διαδρομή περίπου 10μg. Χρησιμοποιήθηκε ως 1<sup>ο</sup> αντίσωμα το anti-Hemoglobin α.IgG και ως 2<sup>ο</sup> αντίσωμα το Goat anti-rabbit IgG-Ap.

Στις ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ 4, 5, 6 εμφανίζονται ζώνες λίγο πιο ψηλά από τα 19-20kDa, η οποίες ενδέχεται να αντιστοιχούν στα έγκλειστα της επαγόμενης καλλιέργειας από βακτηριακούς κλώνους που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-α σφαιρίνη-HA και που έχουν διαλυτοποιηθεί σε διάλυμα L-Αργινίνης. Παρομοίως, στις ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ 7 και 9, ενδέχεται να εμφανίζεται ζώνη περίπου στα 20-21kDa, η οποία αντιστοιχεί στα έγκλειστα της επαγόμενης καλλιέργειας από βακτηριακούς κλώνους που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-TAT-α σφαιρίνη-HA και που έχουν διαλυτοποιηθεί σε διάλυμα L-Αργινίνης.

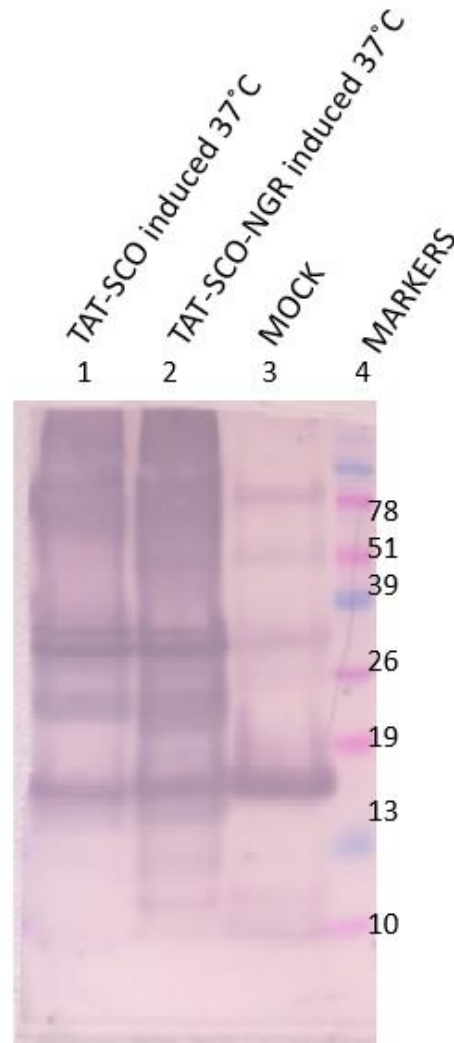
Επομένως, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα από την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ίσως από το στύπωμα κατά Western, καθώς και με την πρόβλεψη του εργαλείου βιοπληροφορικής ExPASy - Compute pI/Mw tool, φαίνεται πως οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος έχουν ανακτηθεί με επιτυχία από τα βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενης καλλιέργειας με τη διαλυτοποίηση στο διάλυμα 1M L-Αργινίνης και πρόκειται όντως για την α-σφαιρίνη-HA και την TAT-α -σφαιρίνη-HA.

Με παρόμοιο τρόπο, διεξήχθησαν πειράματα για την ανάλυση της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR. Αρχικά, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των «επιδεκτικών» βακτηριακών κυττάρων *E.coli* C43 (DE3) που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-TAT-SCO2 (κλώνοι TS1 και TS2) και με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-TAT-SCO2-NGR (κλώνοι TSN1 και TSN2). Επώαστηκαν στους 37°C με IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM για 2 ώρες και 30min [επαγόμενα, (INDUCED)] και τα βακτηριακά έγκλειστα διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα L-Αργινίνης. Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των ανασυνδυασμένων αυτών πρωτεϊνών ήταν η εξής:



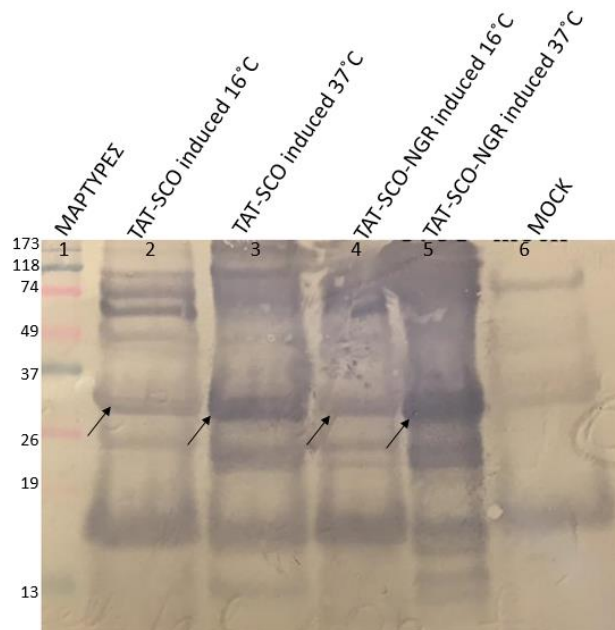
**Εικόνα 81:** SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση 14% w/v των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των «επιδεκτικών» βακτηριακών κυττάρων *E.coli* C43 (DE3) που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-*TAT-SCO2* (κλώνοι TS1 και TS2) και με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-*TAT-SCO2-NGR* (κλώνοι TSN1 και TSN2). Επώαστηκαν στους 37°C με IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM για 2 ώρες και 30min [επαγόμενα, (INDUCED)]. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TS1 – επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (INDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TS2 –επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (INDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TSN1 – επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (INDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TSN2 – επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (INDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TS1 – ΜΗ επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TS2 – ΜΗ επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 8: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TSN1 – ΜΗ επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 9: Διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα βακτηριακού κλώνου TSN2 – ΜΗ επαγόμενη με IPTG καλλιέργεια (UNINDUCED). Στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 10 φαίνεται η ηλεκτροφορητική ανάλυση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των «επιδεκτικών» βακτηριακών κυττάρων *E.coli* C43 (DE3) που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pET16b (MOCK).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 81, στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1 και στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3, εμφανίζονται διπλές ζώνες, γύρω στα 34-35kDa. Από αυτές τις δύο ζώνες, στους συγκεκριμένους κλώνους, η κάτω ζώνη παρουσιάζει πιο έντονη κυανή χρώση και πιστεύεται πως αντιστοιχεί στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *TAT-SCO2* (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1) και στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *TAT-SCO2-NGR* (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3). Για να επιβεβαιωθεί η παρατήρηση αυτή, ακολούθησε στύπωμα Western:



**Εικόνα 82:** Στύπωμα κατά Western σε μεμβράνη PVDF των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των «επιδεκτικών» βακτηριακών κυττάρων *E.coli* C43 (DE3) που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-*TAT-SCO2* και το πλασμίδιο pET16b-*TAT-SCO2-NGR*. Επωάστηκαν στους 37°C με IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM για 2 ώρες και 30min [επαγόμενα, (INDUCED)]. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυττάρων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-*TAT-SCO2*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυττάρων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-*TAT-SCO2-NGR*. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα σε L-Αργινίνη 1M (MOCK) κυττάρων. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες. Ποσότητα πρωτεΐνης ανά διαδρομή περίπου 10μg. Χρησιμοποιήθηκε ως 1<sup>ο</sup> αντίσωμα το anti-SCO2.IgG και ως 2<sup>ο</sup> αντίσωμα το Goat anti-rabbit IgG-Ap.

Επιπλέον, έγινε προσπάθεια επαγωγής της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR, σε διάφορες συνθήκες, με σκοπό να επιτευχθεί η βέλτιστη παραγωγή τους στα βακτηριακά κύτταρα *E.coli* C43 (DE3). Για το λόγο αυτό, τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα που έφεραν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, επωάζονται στους 16°C για 16 ώρες ή στους 37°C για 4 ώρες, μετά την προσθήκη IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM. Το στύπωμα Western για τα δείγματα που αφορούν τις διαφοροποιημένες συνθήκες επαγωγής της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι το εξής:



**Εικόνα 83:** Στύπωμα κατά Western σε μεμβράνη PVDF των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των «επιδεκτικών» βακτηριακών κυτάρων *E.coli* C43 (DE3) που μετασχηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET16b-TAT-SCO2 και το πλασμίδιο pET16b-TAT-SCO2-NGR. Επώαστηκαν στους 37°C με IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM για 4 ώρες και στους 16°C για 16 ώρες [επαγόμενα, (INDUCED)]. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-TAT-SCO2. Επαγωγή έκφρασης στους 16°C για 16 ώρες. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-TAT-SCO2. Επαγωγή έκφρασης στους 37°C για 4 ώρες. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-TAT-SCO2-NGR. Επαγωγή έκφρασης στους 16°C για 16 ώρες. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5: Διαλυτοποιημένα σε διάλυμα L-Αργινίνης 1M βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενων (INDUCED) κυτάρων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-TAT-SCO2-NGR. Επαγωγή έκφρασης στους 37°C για 4 ώρες. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6: Διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα σε L-Αργινίνη 1M (MOCK) κυτάρων. Ποσότητα πρωτεΐνης ανά διαδρομή περίπου 10μg. Χρησιμοποιήθηκε ως 1<sup>ο</sup> αντίσωμα το anti-SCO2.IgG και ως 2<sup>ο</sup> αντίσωμα το Goat anti-rabbit IgG-Ap.

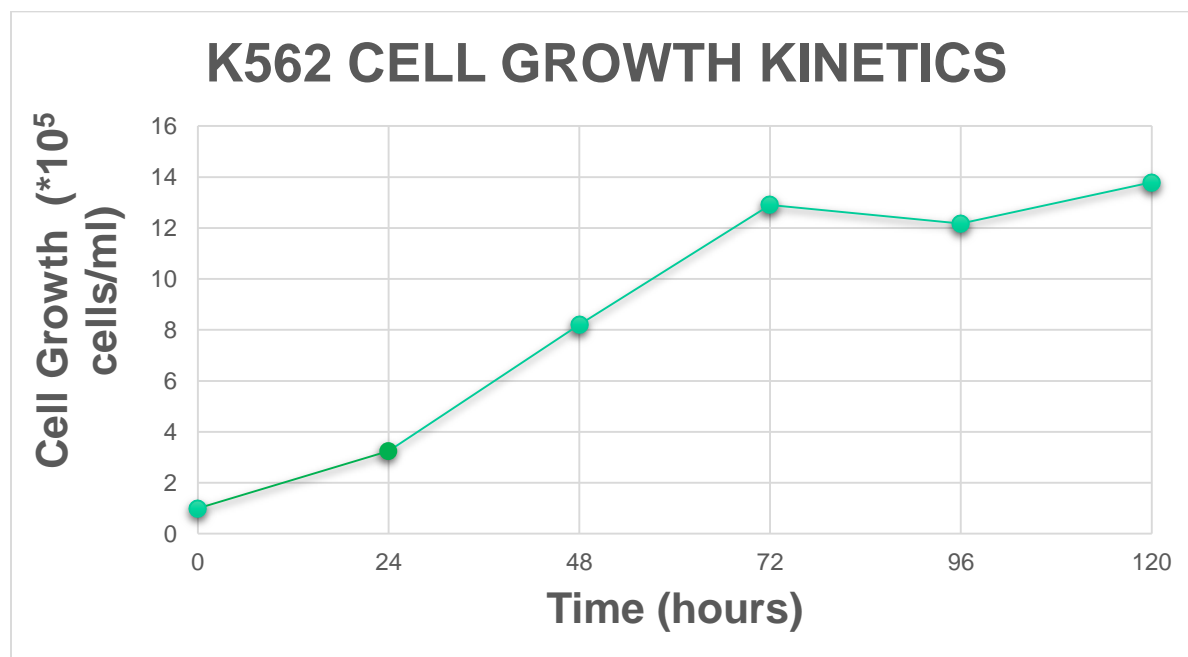
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η καλύτερη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης SCO2, πραγματοποιήθηκε έπειτα από επώαση με IPTG στους 37°C.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από το στύπωμα Western, από την ηλεκτροφορητική ανάλυση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR καθώς και από το εργαλείο πληροφορικής EXPASY-Compute MW/pI TOOL, φαίνεται πως οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος έχουν ανακτηθεί με επιτυχία από τα βακτηριακά έγκλειστα επαγόμενης καλλιέργειας, με τη διαλυτοποίηση στην L-Αργινίνη και πρόκειται όντως για την TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR. Η πρωτεϊνοσύνθεση στους μετασχηματισμένους βακτηριακούς κλώνους επάγεται επιτυχώς τόσο στους 37°C για 4 ώρες, όσο και στους 16°C για 16 ώρες, μετά την προσθήκη IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM.

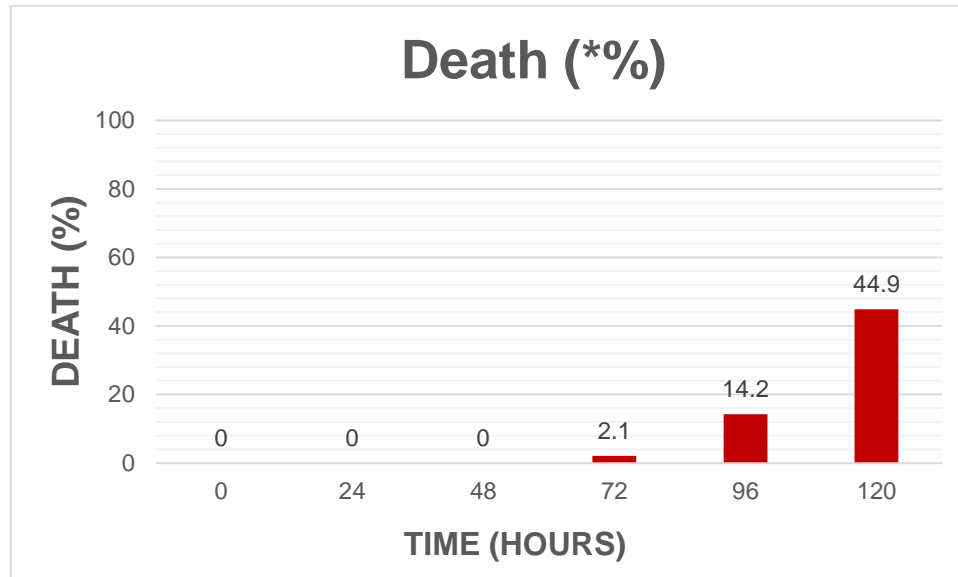
### **Γ.5. Μελέτη της ενδοκυττάριας μεταγωγής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε καλλιέργειες K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων:**

Το πέμπτο και τελευταίο στάδιο των πειραμάτων ξεκίνησε τον Απρίλιο του 2016 και είχε σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που ανακτήθηκαν από τη διαλυτοποίηση των βακτηριακών εγκλείστων, να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες ευκαρυωτικών κυττάρων, ικανότητα που τους προσδίδει η σύντηξη με το πεπτιδίο μεταγωγής TAT. Τα K562 ερυθρολευχαιμικά κύτταρα επιλέχθηκαν επειδή αποτελούν μια κυτταρική σειρά η οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, και κατ'επέκταση είναι γνωστά αρκετά δεδομένα για τα βιολογικά χαρακτηριστικά της, γεγονός που θα καθιστούσε εφικτή την ενδελεχή ανάλυση όλων των στοιχείων που θα προέκυπταν από τα πειράματα με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

Το πρώτο βήμα για τα πειράματα στις κυτταροκαλλιέργειες αποτελεί η μελέτη της κινητικής ανάπτυξης της συγκεκριμένης σειράς, μέσω της κατασκευής της πρότυπης καμπύλης ανάπτυξης των κυττάρων, καθώς και η μελέτη του % κυτταρικού θανάτου σε κανονικές συνθήκες (RPMI/ FBS 10%/ PS 1%).



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη κινητικής ανάπτυξης K562 σε φυσιολογικές συνθήκες.



Διάγραμμα 3: % θάνατος K562 σε φυσιολογικές συνθήκες.

Ακολούθως, έλαβαν χώρα πειράματα που περιελάμβαναν:

- Κύτταρα – control, που επώαστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες
- Κύτταρα, στα οποία προστέθηκε ποσότητα δείγματος με πρωτεϊνικό περιεχόμενο που προέρχονταν από επαγόμενα βακτήρια
- Κύτταρα στα οποία προστέθηκε ποσότητα δείγματος με πρωτεϊνικό περιεχόμενο που προέρχονταν από “mock” βακτήρια
- Κύτταρα στα οποία προστέθηκε ποσότητα διαλύματος L-Αργινίνη 1M, Tris-HCl 20mM

Με βάση αντίστοιχα προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο, αποφασίστηκε να προστεθεί η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος στις κυτταροκαλλιέργειες, σε τελική συγκέντρωση 20 µg/ml. Η ποσότητα του δείγματος που προέρχονταν από “mock” βακτήρια περιείχε το ίδιο ποσό συνολικής πρωτεΐνης με τη ποσότητα του δείγματος που προέρχονταν από βακτήρια μεταμορφωμένα με τον ανασυνδυασμένο φορέα.

Ο όγκος της ποσότητας του διαλύματος L-Αργινίνη 1M, Tris-HCl 20mM αντιστοιχούσε κάθε φορά με το μεγαλύτερο από τους όγκους των προαναφερθέντων δειγμάτων που θα αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση 20µg/ml.

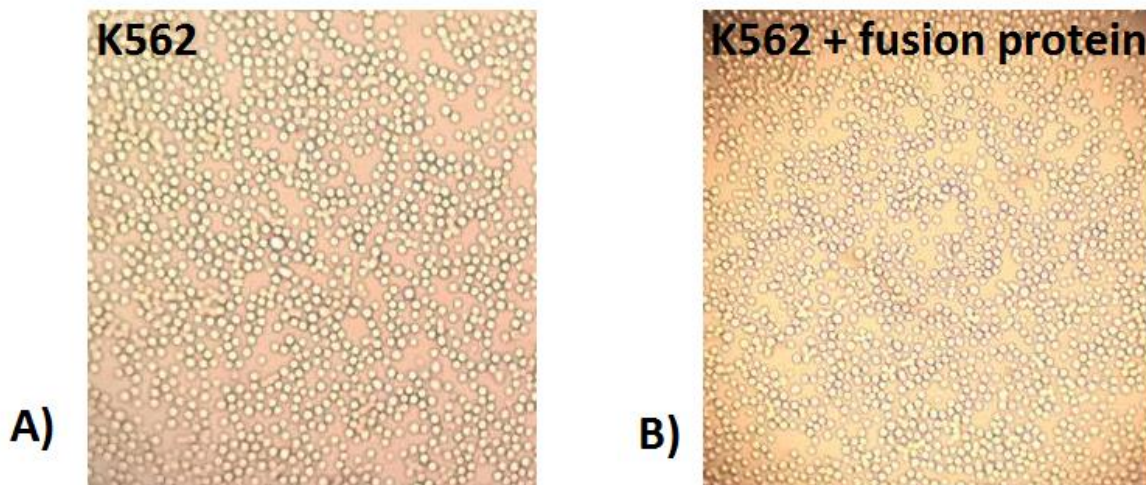
Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα έπρεπε να βρίσκονται σε εκθετική φάση (48 - 72 ώρες).



Όλες οι κυτταροκαλλιέργειες επωάστηκαν με τα αντίστοιχα δείγματα για 1 ώρα, κατά την οποία εμφάνισαν ένα πιο έντονο ερυθροειδές χρώμα γεγονός που σχετίζεται με τη στιγμιαία αύξηση του pH λόγω της L-Αργινίνης που ήταν παρούσα.

Όλες οι κυτταροκαλλιέργειες μελετήθηκαν παράλληλα με «διπλότυπες» τους (duplicates), δηλαδή κυτταροκαλλιέργειες ίδιου όγκου και συγκέντρωσης κυττάρων που επωάστηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες ταυτόχρονα, με σκοπό τη μείωση της πιθανότητας τυχαίου σφάλματος.

Η συγκέντρωση των κυττάρων στην καλλιέργεια υπολογίζεται τόσο πριν, όσο και μετά τη επώαση με το εκάστοτε δείγμα για 1 ώρα. Οι μετρήσεις αυτές ήταν πανομοιότυπες, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται καμία αλλαγή στην ανάπτυξη των κυττάρων και καθόλου κυτταρικός θάνατος. Κατά την παρατήρηση των καλλιεργειών στο μικροσκόπιο έπειτα από την προσθήκη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, δεν παρατηρείται καμία φαινοτυπική αλλαγή.



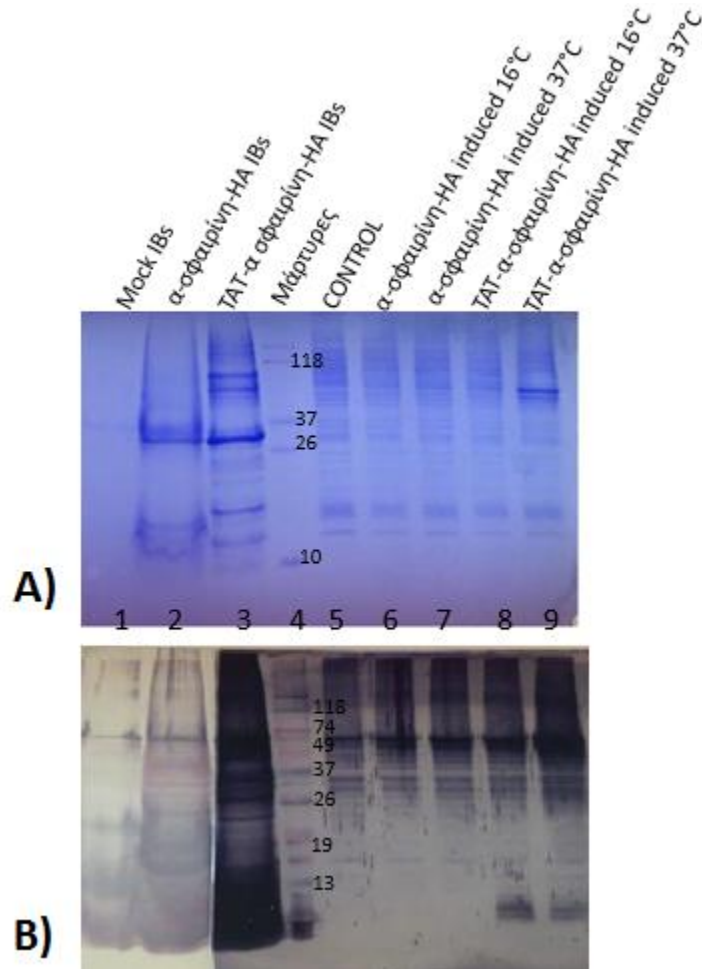
**Εικόνα 84:** Φωτογραφίες από κοινό μικροσκόπιο (100x) (American Optical Corp., U.S.A.) A) κυττάρων K562 72 ωρών με συγκέντρωση  $3,2 \times 10^7$  cells/ml και B) τα ίδια κύτταρα έπειτα από επώαση για 1 ώρα με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη από διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα.

### **Γ.5.1. Πειράματα μελέτης της ενδοκυττάριας μεταγωγής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών α σφαιρίνη-HA και TAT-α σφαιρίνη-H:**

Αρχικά, τα K562 κύτταρα επωάστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (control), παρουσία L-Αργινίνης 1M, παρουσία πρωτεϊνικού δείγματος mock και παρουσία της α σφαιρίνης-HA και της TAT-α σφαιρίνης-HA σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml στο κάθε πηγαδάκι (well). Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 6-well plates. Στη συνέχεια, έγινε παραλαβή του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από την εκάστοτε καλλιέργεια (μέθοδος RIPA). Ακολούθησε



στύπωμα κατά Western με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος anti-Hemoglobin α.IgG ως πρώτο αντίσωμα και ως δεύτερο αντίσωμα το Goat anti-rabbit IgG-Ap.



**Εικόνα 85:** A) Πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρώση Coomassie Brilliant Blue P-250, έπειτα από αποτυχημένη προσπάθεια ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0,45μm. Οι πρωτεΐνες που δεν έχουν μεταφερθεί προς τη μεμβράνη φαίνονται ως κυανές ζώνες στο πήκτωμα. B) Στύπωμα κατά Western σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος K562 κυτάρων που επωάστηκαν για 1 ώρα σε φυσιολογικές συνθήκες (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5), παρουσία α σφαιρίνης-HA επαγόμενης στους 16°C (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6), παρουσία α σφαιρίνης-HA επαγόμενης στους 37°C (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7), παρουσία TAT-α σφαιρίνης-HA επαγόμενης στους 16°C (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 8) και παρουσία TAT-α σφαιρίνης-HA επαγόμενης στους 37°C (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 9). Στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2 είναι η ανασυνδυασμένη α σφαιρίνη-HA επαγόμενη στους 37°C από διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα (10μg), στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3 είναι η ανασυνδυασμένη TAT-α σφαιρίνη-HA επαγόμενη στους 37°C από διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα (10μg) και στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1 διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα σε L-Αργινίνη 1M (MOCK) κυτάρων. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες.

### Γ.5.2.Πειράματα μελέτης της ενδοκυττάριας μεταγωγής, καθώς και του υποκυτταρικού εντοπισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAT-Sco2 και TAT-Sco2-NGR:

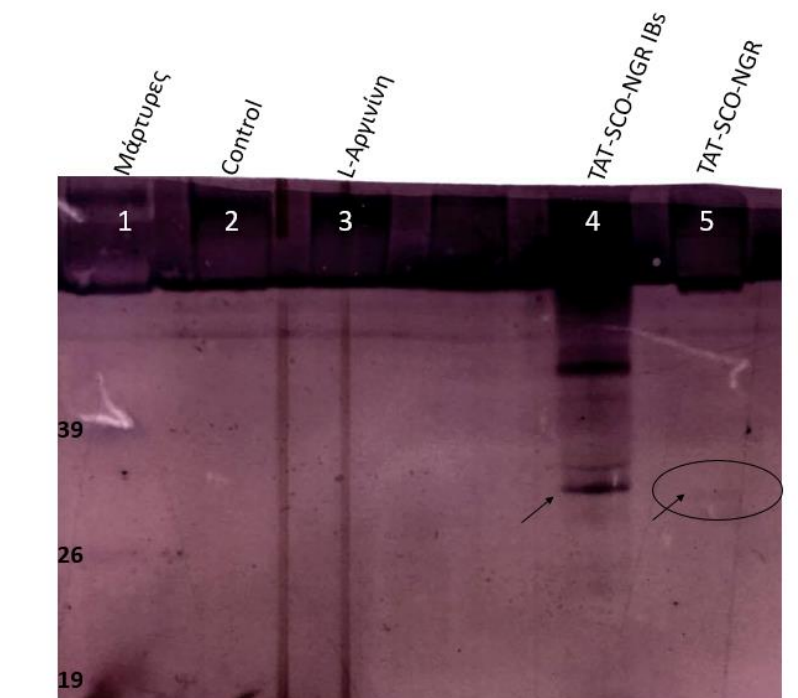
Τα K562 κύτταρα επωάστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (control), παρουσία L-Αργινίνης 1M, παρουσία πρωτεϊνικού δείγματος mock και παρουσία

α) της TAT-Sco2-HA (παραχωρήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Καϊάφα Γεώργιο, διαλυτοποιημένη από βακτηριακά έγκλειστα, με συγκέντρωση 0,13μg/μl), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον control,

β) της TAT-Sco2 και

γ) της TAT-Sco2-NGR.

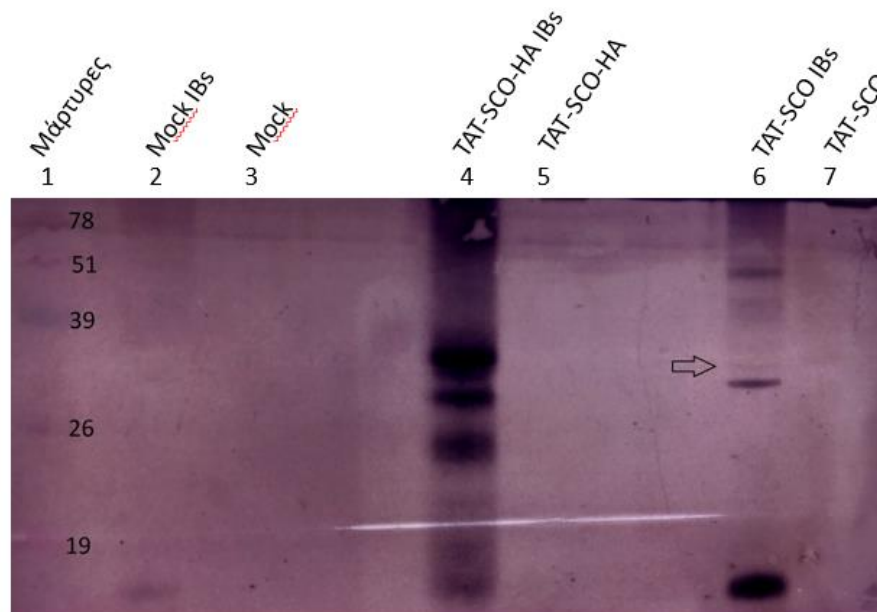
Τα πρωτεϊνικά δείγματα προστέθηκαν σε τελική συγκέντρωση 20 μg/ml στο κάθε πηγαδάκι (well). Για το πείραμα αυτό, επίσης χρησιμοποιήθηκαν 6-well plates. Στη συνέχεια, έγινε απομόνωση μιτοχονδρίων και παραλαβή του πρωτεϊνικού τους περιεχομένου. Ακολούθησε στύπωμα κατά Western με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος anti-SCO2.IgG ως πρώτο αντίσωμα και ως δεύτερο αντίσωμα το Goat anti-rabbit IgG-Ap.



Εικόνα 86: Στύπωμα κατά Western σε μεμβράνη PVDF μιτοχονδριακού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος K562 κυττάρων που επωάστηκαν για 1 ώρα σε φυσιολογικές συνθήκες (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2), παρουσία L-Αργινίνης (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3) και παρουσία TAT-Sco2-NGR (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5). Στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4 είναι η ανασυνδυασμένη TAT-Sco2-NGR από διαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα (10μg). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Πρωτεϊνικοί μάρτυρες.

Δεξιά, στην Εικόνα 86, με το βέλος υποδεικνύεται η περιοχή στην οποία είναι ορατή η ζώνη που αντιπροσωπεύει την TAT-Sco2-NGR, που όπως υποδεικνύει το στύπωμα Western, εντοπίστηκε στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τα απομονωμένα μιτοχόνδρια, από κύτταρα K562, τα οποία επωάστηκαν για 1 ώρα με τη βακτηριακή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TAT-Sco2-NGR. Με την εικόνα που παρουσιάζει το στύπωμα Western, μπορεί να επιβεβαιωθεί ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, έχει την ικανότητα, όχι μόνο να εισέρχεται στα κύτταρα, αλλά να οδηγείται και να εντοπίζεται σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό οργανίδιο, στα μιτοχόνδρια.

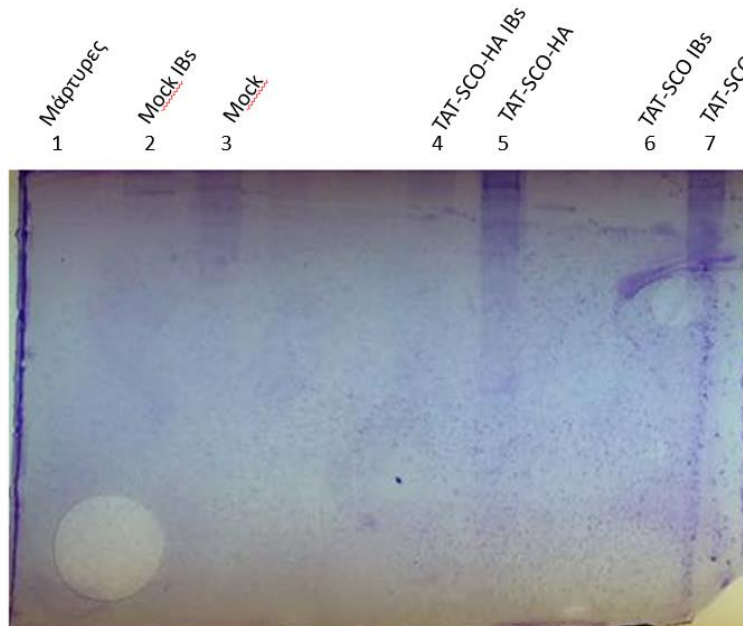
Αντίστοιχα πειράματα μεταγωγής σε κυτταροκαλλιέργειες έγιναν και με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TAT-Sco2. Το στύπωμα Western του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα απομονωμένα μιτοχόνδρια των κυττάρων που επωάστηκαν με την πρωτεΐνη αυτή είχε την εξής εικόνα:



**Εικόνα 87:** Στύπωμα κατά Western σε μεμβράνη PVDF μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων K562 κυττάρων που επωάστηκαν για 1 ώρα σε φυσιολογικές συνθήκες παρουσία πρωτεϊνικού δείγματος mock (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3), παρουσία TAT-Sco2-HA (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5) και παρουσία TAT-Sco2 (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7). Στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4 είναι η ανασυνδυασμένη TAT-Sco2-HA (10μg) και στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6 είναι η ανασυνδυασμένη TAT-Sco2 (10μg). ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Πρωτεϊνικοί Μάρτυρες.

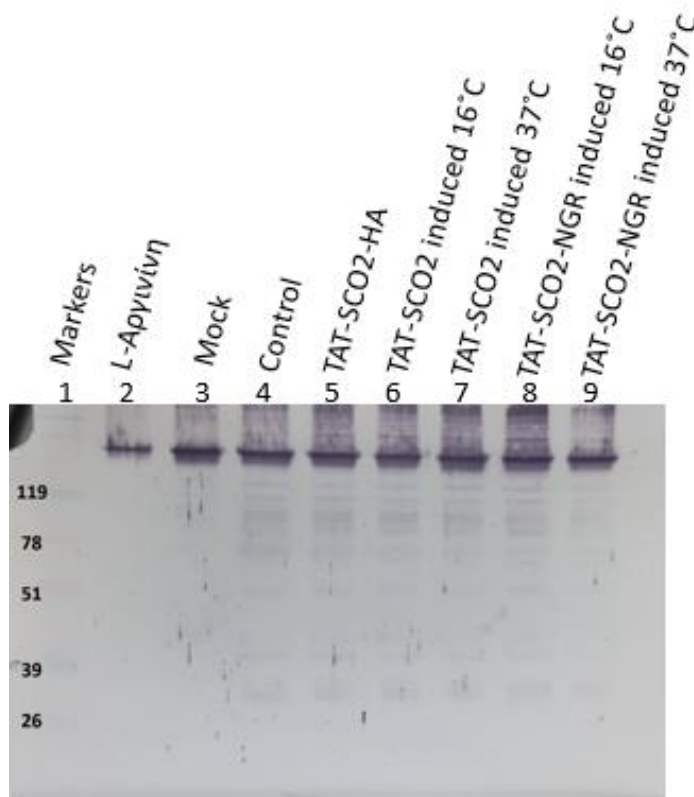
Στο συγκεκριμένο στύπωμα δεν ανιχνεύθηκε η επιθυμητή πρωτεΐνη, κάτι που μπορεί να οφείλεται σε τεχνικά προβλήματα κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προς τη μεμβράνη PVDF. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μετά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και αφού θεωρητικά έχει απαλλαγεί από τις πρωτεΐνες, οι οποίες μεταφέρονται στη μεμβράνη PVDF, εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης (staining solution), το οποίο περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue P-250. Ο λόγος που γίνεται αυτό είναι για να διαπιστωθεί ότι δεν έχουν παραμείνει καθόλου πρωτεΐνες στο πήκτωμα. Εάν εμφανίζονταν ζώνες, τότε πιθανόν η ηλεκτρομεταφορά να μην πραγματοποιήθηκε με επιτυχία.

Δυστυχώς, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 85, στην Εικόνα 86 και στην Εικόνα 87, δεν έγινε μεταφορά όλης της ποσότητας των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, γεγονός που παρατηρήθηκε κατ'επανάληψη, ειδικά στην περίπτωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων από κυτταροκαλλιέργειες, στην προσπάθεια να διαπιστωθεί η ενδοκυττάρια και υποκυτταρική μεταγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, κατά το τελευταίο στάδιο των πειραμάτων.



Εικόνα 88: Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue P-250, έπειτα από την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών προς τη μεμβράνη PVDF.

Έγινε επανάληψη του πειράματος μεταγωγής σε κυτταροκαλλιέργειες των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAT-SCO2 και TAT-SCO2-NGR και το σύστημα Western του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα απομονωμένα μιτοχόνδρια των κυττάρων που επωάστηκαν με την πρωτεΐνη αυτή είχε την εξής εικόνα:



**Εικόνα 89:** Στύπωμα κατά Western σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων K562 κυττάρων που επωάστηκαν για 1 ώρα σε φυσιολογικές συνθήκες παρουσία πρωτεϊνικού δείγματος mock (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 3), παρουσία TAT-SCO2-HA (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 5), παρουσία TAT-SCO2 από παραγωγή επαγόμενη στους 16°C (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 6), παρουσία TAT-SCO2 από παραγωγή επαγόμενη στους 37°C (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 7), παρουσία TAT-SCO2-NGR από παραγωγή επαγόμενη στους 16°C (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 8) και παρουσία TAT-SCO2-NGR από παραγωγή επαγόμενη στους 37°C (20μg/ml) (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 9). Στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 4 είναι το πρωτεϊνικό δείγμα από τα κύτταρα control και στη ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2 είναι το πρωτεϊνικό δείγμα από κύτταρα επωασμένα με διάλυμα L-Αργινίνης. ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1: Πρωτεϊνικοί Μάρτυρες.

Στην εικόνα 89, φαίνεται το στύπωμα Western, στο οποίο εμφανίζεται μια μπάντα στο μέγεθος 34-35kDa στις ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ 5,6,7,8 και 9. Ενδέχεται να πρόκειται για τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, που θεωρητικά εισέρχονται εντός των μιτοχονδρίων λόγω της ύπαρξης του πεπτιδίου TAT, αλλά η παρουσία της ζώνης αυτής και στο πρωτεϊνικό δείγμα από απομονωμένα μιτοχόνδρια κυττάρων, που δεν επωάστηκαν με κάποια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (control), δεν μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για την επίτευξη της ενδοκυττάριας μεταγωγής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και τον εντοπισμό τους στα μιτοχόνδρια. Η παρουσία της ζώνης αυτής πιθανός οφείλεται και σε κάποιο λάθος χειρισμό.

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρωταρχικός στόχος της διπλωματικής εργασίας υπήρξε η κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας της αγρίου τύπου *α-σφαιρίνης* σε πλασμιδιακό φορέα για αποθήκευση. Αρχικά, ολικό ώριμο mRNA πλακουντιακής προελεύσεως, αφού καθαρίστηκε με DNάση, αποτέλεσε το ικρίωμα για αντίδραση RT-PCR, η οποία περιελάμβανε κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινητές, έτσι ώστε να ενισχύονταν η περιοχή CDS του γονιδίου της ανθρώπινης *α-σφαιρίνης*. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης, αφού ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης, και φάνηκε πως αντιπροσωπεύεται από μία ζώνη στα 428bp, εκλούστηκε και ακολούθησε αντίδραση συνένωσης (ligation) με το γραμμικό πλασμιδιακό φορέα pCR2.1, η οποία βασίζονταν στη βιοτεχνολογική στρατηγική TA cloning.

Το προϊόν της αντίδρασης μετασχημάτισε επιλεκτικά βακτήρια *E.coli* TOP10, τα οποία και αναπτύχθηκαν παρουσία αντιβιοτικού σε καλλιέργειες στερεού άγαρ. Επιλέχθηκαν λευκές αποικίες με βάση την Ιστοχημική Μέθοδο Ανίχνευσης Δράσης της β-γαλακτοσιδάσης (“blue/white screening method”), απομονώθηκε το πλασμιδιακό τους DNA, το οποίο και απεστάλη για αλληλούχιση καθώς ήταν το υποψήφιο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR2.1-*α-σφαιρίνη*.

**Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης επιβεβαίωσε την ύπαρξη του πλασμιδίου ενδιαφέροντος, το οποίο είχε ενσωματώσει την CDS περιοχή του γονιδίου της *α-σφαιρίνης* w/t με 100% πιστότητα.**

Το επόμενο στάδιο των πειραμάτων αφορούσε την κλωνοποίηση της CDS αλληλουχίας της *α-σφαιρίνης* συντηγμένης με την αλληλουχία του πεπτιδίου TAT και του επιτόπιου HA τόσο σε φορέα pCRII-TOPO όσο και σε βακτηριακό φορέα έκφρασης pET16b. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης της κωδικής αλληλουχίας της ανθρώπινης *α-σφαιρίνης* συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του επιτόπιου HA, η οποία θα χρησιμοποιηθεί ως αρνητικό control στα πειράματα ενδοκυτταρικής μεταφοράς.

Αρχικά, σχεδιάστηκαν εκκινητές που θα ενίσχυαν σε αντίδραση PCR την αλληλουχία της CDS της *α-σφαιρίνης* συντηγμένης με την αλληλουχία του πεπτιδίου TAT και του επιτόπιου HA, με αποτέλεσμα κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση να ενισχύονται ζώνες στα 485bp για την αλληλουχία σύντηξης *TAT-α-σφαιρίνη-HA* και στα 455bp για την αλληλουχία σύντηξης *α-σφαιρίνη-HA*. Ακολούθησαν διαγνωστικές κοπές με το ένζυμο HindIII και έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με αυτή την ενδονουκλεάση περιορισμού, οι ζώνες που εμφανίστηκαν ταυτίζονταν με την πρόβλεψη του εργαλείου βιοπληροφορικής NEBcutter, οπότε συμπεραίνουμε ότι ενισχύθηκαν οι σωστές αλληλουχίες.

Η κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας της ανθρώπινης *α-σφαιρίνης* συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου TAT και του επιτόπιου HA, καθώς και της *α-σφαιρίνης* συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία HA, μέσα σε πλασμιδιακό φορέα pCRII-TOPO έγινε με τη μέθοδο TOPO TA cloning.

**Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, η κλωνοποίηση των συντηγμένων αλληλουχιών *TAT-α σφαιρίνη-ΗΑ* και *α-σφαιρίνη-ΗΑ* στον πλασμιδιακό φορέα *pCRII-TOPO*, έγινε με 100% επιτυχία.**

Ως επιπλέον στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας τέθηκε η κλωνοποίηση και η έκφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλήρους μεγέθους γονιδίου *SCO2*, συντηγμένης με την αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου *TAT* σε πλασμιδιακό φορέα *pCRII-TOPO* και ακολούθως βακτηριακό φορέα έκφρασης *pET16b*, καθώς και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλήρους μεγέθους γονιδίου *SCO2*, συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου μεταγωγής *TAT* και με την αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία του κατευθυνόμενου πεπτιδίου *NGR* σε πλασμιδιακό φορέα *pCRII-TOPO* και ακολούθως βακτηριακό φορέα έκφρασης *pET16b*.

Αρχικά, σχεδιάστηκαν εκκινητές που θα ενίσχυαν σε αντίδραση *PCR* την αλληλουχία του πλήρους μεγέθους γονιδίου *SCO2*, συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου *TAT*, αλλά και του πλήρους μεγέθους γονιδίου *SCO2*, συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου *TAT* και επιπλέον με το αυτοκατευθυνόμενο πεπτίδιο *NGR*. Το αποτέλεσμα, κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης *PCR*, ήταν να ενισχύονται ζώνες στα 851bp για την αλληλουχία σύντηξης *TAT-SCO2* και για την αλληλουχία σύντηξης *TAT-SCO2-NGR* στα 862bp. Ακολούθησαν διαγνωστικές κοπές με το ένζυμο *NcoI* και έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης με αυτή την ενδονουκλεάση περιορισμού, οι ζώνες που εμφανίστηκαν ταυτίζονταν με την πρόβλεψη του εργαλείου βιοπληροφορικής *NEBcutter*, οπότε συμπεραίνουμε ότι ενισχύθηκαν οι σωστές αλληλουχίες.

Η κλωνοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλήρους μεγέθους γονιδίου *SCO2* συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου *TAT*, καθώς και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλήρους μεγέθους γονιδίου *SCO2* συντηγμένης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία *TAT* και *NGR*, μέσα σε πλασμιδιακό φορέα *pCRII-TOPO* έγινε με τη μέθοδο *TOPO TA cloning*.

**Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των νεοσυντηθέντων πλασμιδίων, επιβεβαίωσαν την 100% επιτυχή κλωνοποίηση των αλληλουχιών σύντηξης και ότι πρόκειται για τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια *pCRII-TOPO-TAT-SCO2* και *pCRII-TOPO-TAT-SCO2-NGR*.**

Ακολούθησε η κλωνοποίηση των αλληλουχιών σύντηξης σε βακτηριακό φορέα έκφρασης *pET16b*. Οι αλληλουχίες σύντηξης, μέσω της αντίδρασης *PCR* και των ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών, φέρουν στις αλληλουχίες τους θέσεις κοπής των ενδονουκλεασών *NdeI* και *XhoI*. Η κλωνοποίηση στον φορέα *pET16b* γίνεται με τη μέθοδο των «κολλώδων άκρων» (συμπληρωματικών άκρων – «sticky ends»). Ο φορέας επωάζεται σε αντίδραση πέψης με τις δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού, έτσι ώστε να



δημιουργηθούν τα κολλώδη άκρα, κατά την ηλεκτροφόρηση να εμφανιστεί μια ζώνη στα 5.700bp, που αντιστοιχούν στο γραμμικό φορέα και τέλος η ζώνη αυτή εκλούεται από το πήκτωμα αγαρόζης.

Το κάθε πλασμίδιο pCRII-TOPO, με ενσωματωμένη τη συντηγμένη αλληλουχία ενδιαφέροντος, επωάζεται με τις δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού διαδοχικά. Τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα παρουσίαζαν δύο ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης, μια που αντιστοιχεί στον γραμμικό φορέα pCRII-TOPO και μια στην αλληλουχία σύντηξης. Για την TAT-α σφαιρίνη-HA, εμφανίστηκαν ζώνες στα 495bp και 3.935bp, για την α σφαιρίνη-HA, εμφανίστηκαν ζώνες στα 485bp και 3942bp, για την TAT-SCO2, εμφανίστηκαν ζώνες στα 870bp και 3.983bp και για την TAT-**SCO2**-NGR, εμφανίστηκαν ζώνες στα 900bp και 3.983bp.

Το επόμενο και πιο σημαντικό στάδιο στην κλωνοποίηση των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pET16b, ήταν η αντίδραση συνένωσης μεταξύ του κομμένου γραμμικού πλέον πλασμιδιακού μορίου και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενδιαφέροντος, η οποία πλέον έφερε μονόκλωνα άκρα. Η αναλογία του φορέα προς το ένθεμα αντιστοιχούσε σε 1:3. Με το τέλος της αντίδρασης συνένωσης, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού NdeI και XhoI, όπου επιβεβαίωσαν την επιτυχία της ένθεσης των αλληλουχιών μέσα στο φορέα έκφρασης, αφού το προφίλ της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης ταυτιζόταν με την πρόβλεψη του εργαλείου βιοπληροφορικής NEBcutter.

Το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης μετασχημάτισε επιλεκτικά βακτήρια *E.coli* C43 (DE3), τα οποία επιβίωσαν σε θρεπτικό υλικό στερεού άγαρ, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού.

Ακολούθησε έκφραση, παραγωγή και καθαρισμός των τεσσάρων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Μελετήθηκαν για την κάθε πρωτεΐνη 3 είδη βακτηριακών καλλιιεργειών: καλλιέργεια που είχε λάβει IPTG [επαγόμενη (induced)], καλλιέργεια που δεν είχε λάβει IPTG [μη επαγόμενη (uninduced)] και καλλιέργεια που περιελάμβανε τον αυθεντικό πλασμιδιακό φορέα pET16-b ("mock"). Διαπιστώθηκε ότι και οι τέσσερις πρωτεΐνες, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία και το χρόνο επαγωγής της έκφρασης τους, εντοπίζονται κυρίως στα έγκλειστα (αδιάλυτο ίζημα) των βακτηριακών κυττάρων. Η βέλτιστη παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έγινε στις συνθήκες επαγωγής με 0,5mM IPTG στους 37°C για 2 ώρες και 30min.

Αναφορικά με την απομόνωση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από τα βακτηριακά έγκλειστα, αποφεύχθηκε η χρήση χαστροπικών παραγόντων, όπως η γουανιδίνη και η ουρία, για να μπορέσουν να μελετηθούν οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος άμεσα σε ευκαρυωτικές κυτταροκαλλιέργειες. Αν η διαλυτοποίηση γινόταν με τη χρήση χαστροπικού παράγοντα, θα έπρεπε να ακολουθήσει απομάκρυνσή του και σωστή επαναδίπλωση της πρωτεΐνης, κάτι πολύ δύσκολο και εφαρμογή της τεχνικής της διαπίδωσης, για την απομάκρυνσή του θα μπορούσε να προκαλέσει μη αντιστρεπτή συσσωμάτωση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Επιπλέον, η εφαρμογή στις



κυτταροκαλλιέργειες θα ήταν καταστροφική, αφού οι παράγοντες αυτοί είναι ιδιαίτερα τοξικοί. Η διαλυτοποίηση και η επαναδίπλωση των βακτηριακών εγκλείστων προς τη λειτουργική τριτοταγή διαμόρφωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος L-Αργινίνης 1M, με pH 11, ένας διαλύτης σχετικά ανεχτός από τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η L-Αργινίνη διαλυτοποιεί την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, λόγω της αλληλεπίδρασης της γουανιδικής ομάδας του αμινοξέος με τις πλευρικές ομάδες των τρυπτοφανών που περιέχονται στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος.

Η βιοπληροφορική πρόβλεψη του προγράμματος EXPASY MW/PI TOOL έδειξε πως οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ενδιαφέροντος θα αναμένονταν να έχουν μέγεθος 19kDa η **10xHis-Xa<sub>SITE</sub>-α σφαιρίνη-HA**, 20kDa η **10xHis-Xa<sub>SITE</sub>-TAT-α σφαιρίνη-HA**, 34kDa η **10xHis-Xa<sub>SITE</sub>-TAT-Sco2** και 35kDa η **10xHis-Xa<sub>SITE</sub>-TAT-Sco2-NGR**. Με βάση τις εικόνες των SDS-PAGE gel και των στυπωμάτων κατά Western οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος εντοπίστηκαν (έντονη ζώνες στα προβλεπόμενα μεγέθη) στα δαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα των επαγόμενων καλλιιεργειών. Στα αντίστοιχα δείγματα των “mock” καλλιιεργειών δεν εντοπίστηκε η ζώνη ενδιαφέροντος.

Σε αρκετές περιπτώσεις, εκεί όπου αναμένονταν η ζώνη ενδιαφέροντος για τις ανασυνδυασμένες α-σφαιρίνες (19-21 kDa) προέκυπτε κατ'επανάληψη μια έντονη ζώνη στα 40 περίπου kDa, η οποία πιστεύεται ότι αντιστοιχεί στα διμερή που σχηματίζονται. Οι α-αλυσίδες είναι αρκετά ασταθή μόρια, πολύ πιο ασταθή από τις β-αλυσίδες. Κατά τη σύνθεση των αλυσίδων αυτών απαιτείται η ύπαρξη της συνοδού-πρωτεΐνης AHSP, σε φυσιολογικά κύτταρα, για να μην διασπαστούν οι μονομερείς μορφές. Στα βακτήρια, δεν είναι παρούσα η πρωτεΐνη αυτή. Στο γεγονός αυτό ίσως οφείλεται η παρουσία ζωνών μικρότερης μοριακής μάζας από το αναμενόμενο (εικόνα 79, ιδίως για την α σφαιρίνη-HA)

Στο τελευταίο στάδιο των πειραμάτων έγινε προσπάθεια της ενδοκυττάριας μεταγωγής των τεσσάρων πρωτεϊνών ενδιαφέροντος σε καλλιέργειες K562 ερυθρολευχαιμικών κυττάρων. Αρχικά, μελετήθηκε η κινητική τους καθώς και ο θάνατός τους σε φυσιολογικές συνθήκες. Ακολούθως, διεξήχθησαν τα πειράματα επώασης 1 ώρας, της κάθε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που περιεχόταν στα δαλυτοποιημένα βακτηριακά έγκλειστα, σε συγκέντρωση 20μg/ml, ενώ παράλληλα ως control λήφθηκε καλλιέργεια κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες, καλλιέργεια παρουσία πρωτεϊνών που προέρχονταν από “mock” καλλιέργειες και καλλιέργεια απουσία διαλύματος L-Αργινίνη 1M, Tris-HCl 20mM. Οι καλλιέργειες που επώαστηκαν με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, όσο και οι καλλιέργειες control δεν εμφάνισαν καμία διαφοροποίηση στον αριθμό των κυττάρων, ούτε και στο ποσοστό θανάτου, μετά το πέρασ 1 ώρας επώασης.

Έπειτα από πειράματα εκχύλισης του ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων και εκχύλισης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοανίχνευσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για να διαπιστωθεί ότι λόγω της ύπαρξης του πεπτιδίου TAT στην αλληλουχία τους, έχουν την ικανότητα να διαπερνούν το φραγμό της κυτταρικής μεμβράνης και να εισέρχονται εντός των κυττάρων.

Δυστυχώς, αντιμετωπίστηκαν ορισμένα τεχνικά προβλήματα κατά τη διαδικασία ηλεκτρομεταφοράς, που είχαν ως αποτέλεσμα την ελλιπή μεταφορά των πρωτεϊνών, από τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των ευκαρυωτικών, από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου προς τη μεμβράνη PVDF. Για το λόγο αυτό, κατά την ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών στο στύπωμα κατά Western, δεν πήραμε επαρκή σήμα για την ύπαρξη της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των ευκαρυωτικών κυττάρων, παρά μόνο στην περίπτωση της TAT-Scd2-NGR, όπου εμφανίστηκε μια αχνή ζώνη στα 35kDa.

Ως πιθανό αίτιο του προβλήματος αυτού, το οποίο ίσως να βρίσκεται στην ηλεκτρομεταφορά, θεωρήθηκε ότι μπορεί να είναι η αυξημένη περιεκτικότητα του Transfer Buffer σε μεθανόλη (20%). Η μεθανόλη επιτρέπει στις πρωτεΐνες να δεσμεύονται στη μεμβράνη, απομακρύνοντας το SDS. Η αυξημένη, όμως, συγκέντρωση της μεθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, μπορεί να προκαλέσει συρρίκνωση των πόρων στην πηκτή, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να μεταφέρονται στη μεμβράνη με περισσότερη δυσκολία. Στην τελευταία εικόνα 89, φαίνεται η προσπάθεια ανοσοανίχνευσης των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών, έπειτα από στύπωμα Western με το anti-Scd2.IgG αντίσωμα, μετά από επιτυχημένη ηλεκτρομεταφορά.

Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της μη επιτυχούς ηλεκτρομεταφοράς, αυξήθηκε ο χρόνος της διαδικασίας της ηλεκτρομεταφοράς στις 3 ώρες στα 36V και έγινε αλλαγή του είδους της μεμβράνης, αντί PVDF, έγινε χρήση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης 0,45μm, μια μεμβράνη που δεν απαιτεί περίπλοκους χειρισμούς, όπως η PVDF (ενεργοποίηση με μεθανόλη για 1min). Επιπλέον, η συγκέντρωση της μεθανόλης στο Transfer Buffer μειώθηκε στο 10%. Με τον τρόπο αυτό, έγινε προσπάθεια για τη βελτίωση της εικόνας του στυπώματος Western για τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα K562 επωασμένα με τις ανασυνδυσμένες πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος.

Ωστόσο, απαιτούνται επαναληπτικά δοσοεξαρτώμενα και χρονοεξαρτώμενα πειράματα για να επιτευχθεί επαρκής ενδοκυττάρια μεταγωγή των πρωτεϊνών που παρήχθησαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, έπειτα από επώαση με τα K562 ερυθρολευχαιμικά κύτταρα. Ενδέχεται να απαιτείται περισσότερος χρόνος επώασης και μεγαλύτερη συγκέντρωση ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης.

Επιπλέον, απαιτούνται πειράματα για τη βελτιστοποίηση της επαγωγής της έκφρασης των ανασυνδυσμένων πρωτεϊνών, σε διάφορες συνθήκες παραγωγής, ενώ σαφώς απαιτούνται πειράματα για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών αυτών.

## Ε. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τεχνολογία μεταγωγής πρωτεϊνών μέσω των PTDs (Protein Transduction Domains) προσφέρει αρκετές δυνατότητες, για την παραγωγή νέων φαρμακολογικά δραστικών πρωτεϊνών, αποτελώντας ουσιαστικά μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση ανιάτων ανθρώπινων ασθενειών.

Η τεχνολογία πρωτεϊνικής μεταγωγής αναφέρεται στη μεθοδολογία που χρησιμοποιεί μικρά πεππίδια, τα οποία αποτελούνται από λιγότερα από 30 αμινοξέα και είναι ικανά να διαπεράσουν σχεδόν όλες τις βιολογικές μεμβράνες. Αυτά τα μικρά πεππίδια αποκαλούνται PTDs ( Protein Transduction domains ) ή PTDs ( Cell Penetrating Peptides).

Τα Θαλασσαιμικά Σύνδρομα αποτελούν μια μεγάλη ομάδα κληρονομικών νοσημάτων, τα οποία απασχόλησαν τη διεθνή επιστημονική κοινότητα ήδη από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα, τόσο στο επίπεδο της κλινικής εικόνας, όσο και της διερεύνησης της παθοφυσιολογίας και της μοριακής γενετικής τους.

Η α-θαλασσαιμία οφείλεται στη μη επαρκή ή ολική έλλειψη παραγωγής των α-αλυσίδων, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του ισοζυγίου σε σχέση με την παραγωγή β-αλυσίδων και στη συσσώρευσή τους.

Το κλινικό φάσμα της α-θαλασσαιμίας εξαρτάται από τον αριθμό των α-γονιδίων, των οποίων έχει επηρεαστεί η λειτουργικότητα από τις διάφορες μεταλλάξεις και είναι ιδιαιτέρως ευρύ και κυμαίνεται από ασυμπτωματική έως βαρύτατη εκδοχή της νόσου, που είναι ασύμβατη με τη ζωή και προκαλεί ενδομήτριο θάνατο.

Οι συμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση γενικότερα των θαλασσαιμιών, περιλαμβάνουν τις εφόρου ζωής μεταγγίσεις συνδυασμένες με μεθόδους αποσιδήρωσης και τη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών.

Η ομάδα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ, με τη βοήθεια της Τεχνολογίας της Πρωτεϊνικής Μεταγωγής, παρήγαγε την ανασυνδυασμένη β-σφαιρίνη, συντηγμένη με το πεππίδιο TAT και το επιτόπιο HA, σε βακτηριακό σύστημα έκφρασης, με σκοπό τη μελέτη της μεταγωγής της ανασυνδυασμένης αυτής πρωτεΐνης, ενδοκυττάρια σε καλλιέργειες β-θαλασσαιμικών κυττάρων.

**Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία**, βασισμένη στη μελέτη αυτή, είχε ως σκοπό την κλωνοποίηση και την έκφραση της **ανασυνδυασμένης α σφαιρίνης**, συντηγμένης με το πεππίδιο TAT και το επιτόπιο HA και της μελέτη της ενδοκυττάριας μεταγωγής της σε ευκαρυωτικά κύτταρα, με απώτερο στόχο την ανάπτυξη μιας πιθανής θεραπευτικής προσέγγισης σε ασθενείς με σοβαρή α-θαλασσαιμία.

Παράλληλα με την προσπάθεια ανάπτυξης θεραπευτικής προσέγγισης των θαλασσαιμικών σύνδρομο, ανάμεσα στα επιστημονικά ενδιαφέροντα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, βρίσκεται και η προσπάθεια εφαρμογής της τεχνολογίας μεταγωγής

μέσω των PTDs για την αντιμετώπιση μιτοχονδριακών διαταραχών που σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο SCO2.

Η ευκαρυωτική οξειδάση του κυτοχρώματος c (COX) είναι το τελικό ένζυμο της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Το ολοένζυμο της οξειδάσης του κυτοχρώματος c σχηματίζεται από υπομονάδες που κωδικοποιούνται τόσο από το πυρηνικό όσο και από το μιτοχονδριακό DNA, και των οποίων η συγκρότηση ρυθμίζεται αυστηρά. Εκτός από τις δομικές υπομονάδες, απαιτούνται πολλοί βοηθητικοί παράγοντες για τη συγκρότηση του ολοενζύμου. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για αυτούς τους παράγοντες, σχετίζονται άμεσα με παθολογικές καταστάσεις (*Paradourou και συν, 1999*).

Η ανθρώπινη Sco2 πρωτεΐνη είναι μία τέτοια πρωτεΐνη συγκρότησης, η οποία προσδένεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και συμμετέχει στη μεταφορά του ιόντος χαλκού, γεγονός που είναι απαραίτητο ενδιάμεσο στάδιο, για τη συγκρότηση της COX, και η οποία πρωτεΐνη, όταν μεταλλάσσεται, οδηγεί σε βρεφική θανάσιμη καρδιομυοεγκεφαλοπάθεια και μειωμένη δραστηριότητα της COX (*Paradourou και συν, 1999*).

Από προηγούμενες μελέτες μελών του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, της Φαρμακευτικής του ΑΠΘ, αποδείχθηκε ότι η ανασυνδυσασμένη L-Sco2 πλήρους μεγέθους, συντηγμένη με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του πεπτιδίου μεταγωγής TAT, το οποίο είναι ένα έντεκα-πεπτίδιο από την πρωτεΐνη TAT του ιού HIV-1, και με την αλληλουχία του επιτόπιου HA, για σκοπούς ανοσοανίχνευσης, έχει την ικανότητα μεταγωγής σε ευκαρυωτικά κύτταρα και να αναστρέφει το φαινότυπο της μειωμένης δραστηριότητας της COX.

Ως συνέχεια της εργασίας αυτής, σκοπός και της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η κλωνοποίηση, η παραγωγή και η ενδοκυττάρια μεταγωγή της ανασυνδυσασμένης TAT-Sco2, χωρίς το επιτόπιο HA, αλλά και ο εντοπισμός της στα μιτοχόνδρια ευκαρυωτικών κυττάρων.

## SUMMARY

The aim of the study is the bacterial production of recombinant human fusion proteins, intended for intracellular delivery into human cells where the absence or reduce of production and expression of the specific protein, results in pathological situations.

Macromolecules such as peptides, catalytic protein domains, complete proteins, and oligonucleotide offer great potential as therapeutic molecules, but they have poor penetration in tissues and inability to cross the cellular membrane.

Combinational cloning technology complemented by the Protein Transduction Domain Technology (PTD) was applied in order to attempt targeted intracellular delivery of recombinant fusion proteins in eukaryotic cells.

Protein transduction technology uses small peptides, called PTDs (Protein transduction Domains) or CPPs (Cell Penetrating Peptides), to penetrate almost all biological membranes, delivering also the therapeutic cargos, attached to them, intracellularly. TAT, the most common among these peptides, derived from the HIV-1 transactivator TAT protein, facilitates the intracellular delivery of therapeutic cargos possibly due to the mechanism of micropinocytosis.

Congenital hemoglobinopathies are a diverse class of human genetic disorders that are prevalent in the Mediterranean and result in reduced levels of functional  $\alpha$ -globin in red blood cells. An emerging and highly promising therapeutic strategy against  $\alpha$ -thalassemia is the protein therapy, which is based on the use of protein transduction technologies to directly deliver healing levels of wild-type  $\alpha$ -globin fused to PTDs into the red blood cells of patients.

The research aims to evaluate the efficiency at which  $\alpha$ -globin chains fused to Tat peptide, enter K562 cells. The recombinant human fusion proteins TAT- $\alpha$  globin-HA and a globin-HA (as control) have been produced and tried to be transduced intracellularly into human K562 cells as shown by Western Blot analysis. The experimental procedure of Western Blot analysis is in progress.

The OXPHOS system comprises the 4 respiratory chain complexes (I to IV) and ATPase (complex V) and is responsible for the ATP production and is an important source of superoxide radicals. Defects of the OXPHOS system result in failure of energy metabolism and increased free radical mediated damage. Furthermore, one of the most frequent cause of mitochondrial disorders is Cytochrome c Oxidase (COX) deficiency. COX is the IV complex in mitochondrial electron chain reaction, embedded in the inner mitochondrial membrane and the holoenzyme consists of 13 subunits, being encoded by mtDNA. Primary mitochondrial disorders consist an heterogeneous group of rare genetic diseases (~1/5000), affecting mainly organs with high energy (ATP) demands, like brain, heart and muscles.

One of the proteins involved in COX assembly is Sco2, encoded by the nuclear gene *SCO2* and is involved in mitochondrial copper transfer, redox signaling and p53 regulatory pathway. Mutations in this gene lead to promoting or disturbing the copper binding capacity and result in impaired COX assembly. Impaired COX assembly leads to COX deficiency, lack of cell respiration and cell death. In late 1990's, Papadopoulou et al. at Columbia University N.Y., identified mutations in the human *SCO2* gene, in three unrelated infants with a newly recognized fatal cardioencephalomyopathy and COX deficiency.

Considering the successful transduction of TAT-Sco2-HA (Foltopoulou et al.) into eukaryotic cells, we produced the same recombinant protein without –HA (hemagglutinin), the present work was designed to apply the Protein Transduction Domain Technology (PTD) to transduce the recombinant full length Sco2, fused to TAT peptide in mitochondria of cultured eukaryotic K562 cells, in an approach to counteract mitochondrial disorders due to pathogenic mutations detected in Sco2 gene. Wild type Sco2 fused to TAT, was successfully produced in genetically modified *E.coli* cells, resolved and refolded. The TAT-Sco2 recombinant protein transduction experiments in eukaryotic cells are in progress.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adachi, K., Yamaguchi, T., Yang, Y., Konitzer, P.T., Pang, J., Reddy, K.S., Ivanova, M., Ferrone, F., and Surrey, S. "Expression of Functional Soluble Human Alpha-Globin Chains of Hemoglobin in Bacteria." *Prot. Expr. Purif.* 20 (2000): 37-44.
- Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. "Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature." *Science* 279 (1998): 377–80.
- Barrientos et. al. "Suppression Mechanisms of Cox Assembly Defects in Yeast and Human: Insights into the Cox Assembly Process." *Bioch. and Biofys. Acta* (2009).
- Banci L. I., et al. "A Structural Characterization of Human Sco2." *Structure* 15 (2007): 1132-40.
- Bayer, P., M. Kraft, A. Ejchart, M. Westendorp, R. Frank, and P. Rosch. "Structural Studies of Hiv-1 Tat Protein." *J. Mol. Biol.* 247 (2005): 529-35.
- Bechara, et al. "Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand?" *Febs Letters* (2013).
- Bradford MM. "A Rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (1976): 248-54.
- Brosel S. H., et al. "Unexpected Vascular Enrichment of Sco1 over Sco2 in Mammalian Tissues: Implications for Human Mitochondrial Disease." *Am J Pathol* 177 (2010): 2541-8.
- Buchwald P., et al. "Immunological Identification of Yeast Sco1 Protein as a Component of the Inner Mitochondrial Membrane." *Mol Gen Genet* 229 (1991): 413-20.
- Carter, Lau, Tosh, Ward and Mrsny. "Cell Penetrating Peptides Fail to Induce an Innate Immune Response in Epithelial Cells in Vitro: Implications for Continued Therapeutic Use." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2013).
- Chik KW, Shing MM, Li CK, et al. "Treatment of Hemoglobin Bart's Hydrops with Bone Marrow Transplantation." *The Journal of Pediatrics* (1998).
- Chui, DH. "Alpha-Thalassemia: Hb H Disease and Hb Barts Hydrops Fetalis." *Ann N Y Acad Sci.* (2005).
- Crystal, et al. "Transfer of Genes to Humans: Early Lessons and Obstacles to Success." *Science* (1995).
- Derossi D., A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz. "The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes." *J. Biol. Chem.* 28, no. 11 (1994): 2639-56.
- David U. Mick, et al. "Inventory Control: Cytochrome C Oxidase Assembly Regulates Mitochondrial Translation." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12 (2011): 14-20.
- David U. Mick, et al. "Mitrac Links Mitochondrial Protein Translocation to Respiratory-Chain Assembly and Translational Regulation." *cell* 151, no. 7 (2012): 1528–41.
- Del Gaizo V, and Payne RM. "A Novel Tat-Mitochondrial Signal Sequence Fusion Protein Is Processed, Stays in Mitochondria, and Crosses the Placenta." *Mol Ther.* (2003).
- Derderian, Cerine Jeanty, Mark C. Walters, Elliott Vichinsky, and Tippi C. MacKenzie. "In Utero Hematopoietic Cell Transplantation for Hemoglobinopathies." *Front Pharmacol* 5 (2014): 278.

- DiMauro, Schon. "Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases." *New England Journal of Medicine* (2003).
- Dwinnell, et al. "In Utero Diagnosis and Management in Fetus with Homozygous  $\alpha$ -Thalassemia in the Second Trimester: A Case Report and Literature Review." *J Pediatr Hematol Oncol* 33 (2011): 358-60.
- Ellerby, E., Arap, W., Kain, R., Andrusiak, R., Ellerby, L., Del Rio, G., Krajewski, S., Lombardo, C. R., Ruoslahti, E., Bredesen, D. E., Pasqualini, R. "Anti-Cancer Activity of Targeted Pro-Apoptotic Peptides." *Nat. Med.* 5 (1999): 1032–38.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B., Barsoum, J. . "Tat-Mediated Delivery of Heterologous Proteins into Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994): 664-68.
- Ferrara. "Vascular Endothelial Growth Factor: Molecular and Biological Aspects." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237 (1999): 1-30.
- Fink, et al. "Protein Aggregation: Folding Aggregates, Inclusion Bodies and Amyloid." *Fold. Des.* 3 (1998).
- Fischer, et al. "Defective T-Cell Receptor Signalling and Positive Selection of Vav-Deficient Cd4+ Cd8+ Thymocytes." *Nature* 374, no. 6521 (2015): 474-7.
- Fittipaldi and Giacca. "Transcellular Protein Transduction Using the Tat Protein of Hiv-1." *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005): 597–608.
- Fiumera. "Translocation of Mitochondrially Synthesized Cox2 Domains from the Matrix to the Intermembrane Space." *Mol Cell Biol* 13 (2007): 4664-73.
- Foltopoulou P.F., Tsiftoglou A.S, Bonovolias I.D., Ingendoh A.Σ. and Papadopoulou L.C. "Intracellular Delivery of Full Length Recombinant Human Mitochondrial L-Sco2 Protein into the Mitochondria of Permanent Cell Lines and Sco2 Deficient Patient's Primary Cells." *Bioch. Biophys. Acta* 1802 (2010): 497-508.
- Fontanesi F., Barrientos A. "Mitochondrial Cytochrome Oxidase Assembly in Health and Human Diseases." *Mol Cell Biol* (2006).
- Fontanesi F., Barrientos A. "Assembly of Mitochondrial Cytochrome C-Oxidase, a Complicated and Highly Regulated Cellular Process." *American J. of Physiology* 291 (2006): 1129-C47.
- Frankel, A.D., Pabo, C.O. "Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus." *cell* 55 (1988): 1189-93.
- Glerum D.M., et al. "Sco1 and Sco2 Act as High Copy Suppressors of a Mitochondrial Copper Recruitment Defect in *Saccharomyces Cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* 271 (1996): 20531-5.
- Green, et al. "Mutational Analysis of Hiv-1 Tat Minimal Domain Peptides: Identification of Trans-Dominant Mutants That Suppress Hiv-Ltr-Driven Gene Expression." *cell* (1988).
- Gregorc, et al. "Phase II Study of Asparagine-Glycine-Arginine–Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , a Selective Vascular Targeting Agent, in Previously Treated Patients with Malignant Pleural Mesothelioma." *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* 28, no. 15 (2010): 2604-11.
- Han, et al. "Fetal Gene Therapy of  $\alpha$ -Thalassemia in a Mouse Model." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007).
- Harteveld and Higgs. "A-Thalassemia." *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2010).



- Heitz. "Twenty Years of Cell-Penetrating Peptides: From Molecular Mechanisms to Therapeutics " *Br J Pharmacol* 157 ( 2009): 195–206.
- Hernan, R.A., Hui, H.L. Andracki,M.E., Noble,R.W., Sligar,S.G., Walder,J.A. and Walder,R.Y., . "Human Hemoglobin Expression in Escherichia Coli: Importance of Optimal Codon Usage." *Biochemistry* 31 (1992): 8619–28.
- Jaksch M., et al. "Cytochrome C Oxidase Deficiency Due to Mutations in Sco2, Encoding a Mitochondrial Copper-Binding Protein, Is Rescued by Copper in Human Myoblasts." *Hum. Mol. Genet.* 10, no. 26 (2001): 3025-35.
- Jessen, T.H., Komiyama,N.H., Tame,J., Pagnier,J., Shih,D., Luisi,B., Fermi,G. and Nagai,K. "A Mutation That Improves Soluble Recombinant Hemoglobin Accumulation in Escherichia Coli in Heme Excess." *Methods Enzymol.* 231 (1994): 347–64.
- Joliot A., Prochiantz A. "Transduction Peptides: From Technology to Physiology." *Nat Cell Biol.* (2004).
- Joliot A., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz. "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis." *J. Biol. Chem.* 269 (1991): 10444-50.
- Joliot A., C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz. "Transduction Peptides: From Technology to Physiology." *J. Biol. Chem.* (2004).
- Joly, et al. "The Alpha-Globin Genotype Does Not Influence Sickle Cell Disease Severity in a Retrospective Cross-Validation Study of the Pediatric Severity Score." *Eur J Haematol* (2012).
- Joshi, et al. "Hydrops Fetalis Caused by Homozygous A-Thalassemia and Rh Antigen Alloimmunization." *Clin Med Res* (2004).
- Kanabus, et al. "Development of Pharmacological Strategies for Mitochondrial Disorders." *Journal of Pharmacology* (2013).
- Kemsley. "Protein Aggregates Probed: Inclusion Bodies May Have More Diverse Structures Than Anticipated." *Chemical & Engineering News* 86, no. 41 (2008): 31.
- Komar A, Kommer, A., Krashennikov,I.A., and Spirin,A.S. "Cotranslational Folding of Globin." *Febs Letters* 326, no. 261-263 (1993).
- Künkele KP, Heins S, Dembowski M, Nargang FE, Benz R, Thieffry M, Walz J, Lill R, Nussberger S, Neupert W. "The Preprotein Translocation Channel of the Outer Membrane of Mitochondria." *cell* 12, no. 93 (1998): 1009-19.
- Lebleu B., et al. "A Truncated Hiv-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus." *J. Biol. Chem.* 272 (1997): 16010-17.
- Lee SH, Castagner B, and Leroux J-C. "Is There a Future for Cell-Penetrating Peptides in Oligonucleotide Delivery?" *Eur J Pharm Biopharm* (2013).
- Liang Y., et al. "The Regulation of Cellular Metabolism by Tumor Suppressor P53." *Cell & Bioscience* 6, no. 3 (1) (2013): 9.
- Lipinski, et al. "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings." *Adv Drug Deliv Rev* 46 (2001): 3-26.
- Logan. "The Mitochondrial Compartment." *J Exp Bot.* 57, no. 6 (2006): 1225-43.
- Lucarelli, et al. "Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Thalassemia and Sickle Cell Anemia." *Cold Spring Harb Perspect Med.* (2012).

- Madan E., et al. "Sco2 Induces P53-Mediated Apoptosis by Thr845 Phosphorylation of Ask-1 and Dissociation of the Ask-1-Trx Complex." *Mol Cell Biol* 33 (2013): 1285-302.
- Matoba S., et al. "P53 Regulates Mitochondrial Respiration." *Science* 312 (2006): 1650-3.
- Noguchi and Matsumoto. "Protein Transduction Technology: A Novel Therapeutic Perspective." *Acta Med Okayama* (2006).
- Oberg, et al. "Native-Like Secondary Structure in Interleukin-1 $\beta$  Inclusion Bodies by Attenuated Total Reflectance Ftir." *Biochemistry* 33 (1994).
- Papadopoulou L.C. "Αιμοσφαιρινοπάθειες." Διαλέξεις για το Μάθημα Κλινική Φαρμακολογία – Θεραπευτική (2015).
- Papadopoulou L.C. and Tsiftoglou AS. "Transduction of Human Recombinant Proteins into Mitochondria as a Protein Therapeutic Approach for Mitochondrial Disorders." *Pharmaceutical Research* 28 (2011): 2639-56.
- Papadopoulou L.C. and Tsiftoglou A.S. "The Potential Role of Cell Penetrating Peptides in the Intracellular Delivery of Proteins for Therapy of Erythroid Related Disorders." *Pharmaceuticals* (2013).
- Papadopoulou L.C., Sue C.M., Davidson M., Tanji K., Nishino I., Sadlock J., Krishna S., Walker W., Selby J., Glerum D. M., Van Coster R., Lyon G., Scalais E., Lebel R., Kaplan P., Shanske S., DeVivo D.C., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S. and Schon E.A. "Fatal Infantile Cardioencephalomyopathy with Cytochrome C Oxidase (Cox) Deficiency and Mutations in Sco2, a Human Cox Assembly Gene." *Nature Genetics* (1999).
- Pasqualini R., et al. "Aminopeptidase N Is a Receptor for Tumor-Homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis1." *CANCER RESEARCH* 60 (2000): 722–27.
- Patricio Fernández-Silva, José A. Enriquez, and Julio Montoya. "Replication and Transcription of Mammalian Mitochondrial DNA." *Exp Physiol* 88 (2003): 41-56.
- Pfanner N., Geissler A. "Versatility of the Mitochondrial Protein Import Machinery." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, no. 5 (2001): 339-49.
- Piyush M Vyas, and Ronald M Payne. "Tat Opens the Door " *Molecular Therapy* 16, no. 4 (2008).
- Przybycien, et al. "Secondary Structure Characterization of B-Lactamase Inclusion Bodies." *Protein Eng.* 7 (1994).
- Rejman, et al. "Size-Dependent Internalization of Particles Via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis." *Biochem J.* 377 (2004): 159-69.
- Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T., and Azuma, I. . "Role of Aminopeptidase N (Cd13) in Tumor-Cell Invasion and Extracellular Matrix Degradation." *Int. J. Cancer* 54 (1993): 137–43.
- Salviati L., et al. "Cytochrome C Oxidase Deficiency Due to a Novel Sco2 Mutation Mimics Werdnig-Hoffmann Disease." *Arch Neurol* 59 (2002).
- Sambrook, et al. "Molecular Cloning a Laboratory Manual." (1989).
- Schwarze, Ho, Vocero-akbani and Dowdy. "In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse." *Science* (1999).
- Shipp, et al. "Hematopoietic Differentiation Antigens That Are Membrane-Associated Enzymes: Cutting Is the Key. ." *Blood* 82 (1993): 1052–70.

- Shoubridge. "Nuclear Genetic Defects of Oxidative Phosphorylation." *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001): 2277-84.
- Shuman, et al. "Recombination Mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in E. Coli Is Sequence Specific." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991).
- Steensma, et al. "Acquired Somatic Atrx Mutations in Myelodysplastic Syndrome Associated with A Thalassemia (Atmds) Convey a More Severe Hematologic Phenotype Than Germline Atrx Mutations." *Blood* (2014).
- Stewart, et al. "Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vehicles for Biology and Medicine." *Org. Biomol. Chem.* (2008).
- Stiburek, et al. "Tissue-Specific Cytochrome C Oxidase Assembly Defects Due to Mutations in Sco2 and Surf1." *Biochemical Journal* (2005).
- Stryer, et al. "Βιοχημεία, Τομος 1." (2006).
- Tarnopolsky M. A., et al. "Novel Sco2 Mutation (G1521a) Presenting as a Spinal Muscular Atrophy Type I Phenotype." *Am J Med Genet A* 125A (2004): 310-4.
- "Thomas Benton Cooley, Md 1871-1945." *American Journal of Diseases of Children* (1946): 77-79.
- Tsumoto K., et al. "Solubilization of Active Green Fluorescent Protein from Insoluble Particles by Guanidine and Arginine." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003).
- Tsumoto K., et al. "Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification." *Biotechnol Prog.* (2004).
- Vasseur-Godbillon, Corinne. "High-Yield Expression in Escherichia Coli of Soluble Human  $\alpha$ -Hemoglobin Complexed with Its Molecular Chaperone." *Protein Engineering* (2006).
- Warburg Otto. "On the Origin of Cancer Cells." *Science* 23, no. 123 (3191) (1956): 309-14.
- Weatherall DJ and Clegg JB. "The Thalassemia Syndromes." Blackwell Science (2001).
- Weatherall DJ. "Phenotype-Genotype Relationships in Monogenic Disease: Lessons from the Thalassemias." *Nature Reviews Genetics* (2001).
- Weickert, M.J., and Curry, S.R. "High-Fidelity Translation of Recombinant Human Hemoglobin in Escherichia Coli." *Arch. Biochem. Biophys.* 348 (1997): 337-46.
- Wienhues. "Protein Translocation across Mitochondrial Membranes." *Bioessays* (1992).
- Williams, DC. "Cytoplasmic Inclusion Bodies in Escherichia Coli Producing Biosynthetic Human Insulin Proteins." *Science* 215 (1982).
- Wood, WG. "Haemoglobin Synthesis During Human Fetal Development." *Br. Med. Bull* 32, no. 3 (1976): 282-87.
- Xia, et al. "The Hiv Tat Protein Transduction Domain Improves the Biodistribution of  $\beta$ -Glucuronidase Expressed from Recombinant Viral Vectors " *Mol Ther.* 7 (2001): 720-30.
- Zhou, et al. "Successful Mismatched Sibling Cord Blood Transplant in Hb Bart's Disease." *Bone Marrow Transplant* (2001).
- Ziegler and Seelig "Interaction of the Protein Transduction Domain of Hiv-1 Tat with Heparan Sulfate: Binding Mechanism and Thermodynamic Parameters." *Biophys J.* (2004).