



ΚΦΕ 53
ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΥΛΗΣ ΣΕ ΕΜΒΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
2015-2016
Ανδρέας Σκορίλας

3^η ΕΡΓΑΣΙΑ

Αναστάσιος Νέζης
ΑΜ: 81717

Θέμα 1

Αρχές, τυπικά εργαστηριακά πρωτόκολλα και εφαρμογές των τεχνικών:

α. Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT)

β. Real Time PCR

ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

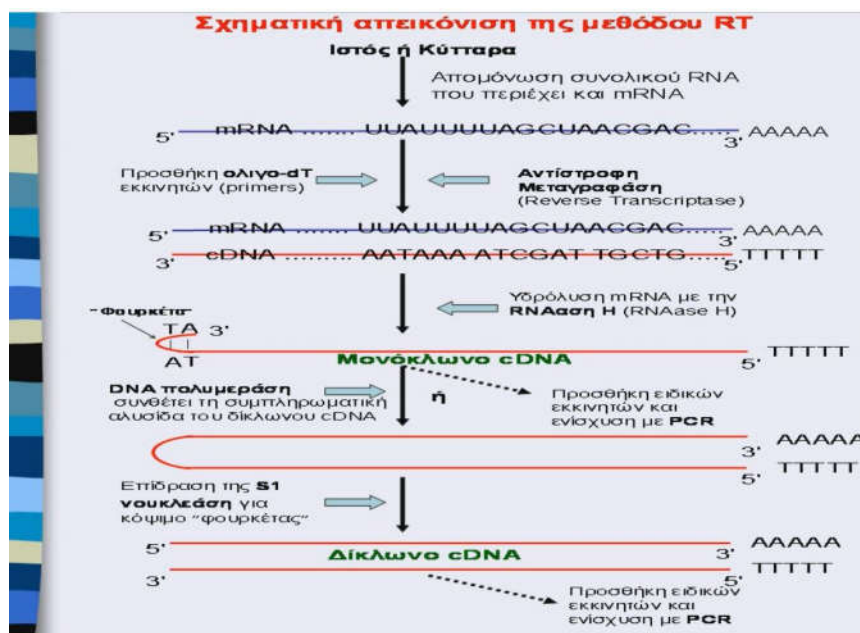
ΑΡΧΕΣ RT-PCR^{1,2}

Πρόκειται για μια παραλλαγή της συμβατικής τεχνικής PCR (regular PCR), κατά την οποία έχουμε μεταγραφή του RNA σε cDNA (συμπληρωματικό) in vitro. Γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου *αντίστροφη μεταγραφάση*. Ακολουθούν τα υπόλοιπα στάδια της regular PCR και πολλαπλασιάζεται το γενετικό υλικό.

Διαδικασία: ξεκινάμε με ένα αρχικό μόριο mRNA το οποίο απομονώνουμε από το ολικό RNA (το ολικό RNA το έχουμε απομονώσει χημικά –διαδοχικές εκχυλίσεις- από ιστό ή κύτταρα). Το mRNA είναι ώριμο και έχει το 5' άκρο και το 3' άκρο με την πολυ-A ουρά. Προσθέτουμε τους εκκινητές ολιγο-dT (αλληλουχία περίπου 20 μονοφωσφορικών θυμιδινών) και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.

Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα ένζυμα αντίστροφης μεταγραφής προέρχονται από ιούς όπως ο AMV και ο MMLV, με την AMV να είναι περισσότερο θερμοάντοχη (από την MMLV), άρα ευκολότερη σε εργαστηριακούς χειρισμούς. Άλλο ένζυμο που χρησιμοποιούνται είναι η Tth DNA πολυμεράση, η οποία έχει ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφής (διαδικασία που πραγματοποιείται σε ένα στάδιο). Είναι επίσης θερμοάντοχο ένζυμο. Τέλος αντίστροφες μεταγραφάσες είναι και οι Superscript και Thermoscript (με ενεργότητα ανάλογη της MMLV). Μπορούμε εναλλακτικά να χρησιμοποιήσουμε και τυχαίες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (random hexamers), στο 5' άκρο του RNA ή άλλες συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, ανάλογα με το είδος του mRNA.

Τα oligo-dT υβριδοποιούνται στην πολυ-A ουρά (περιέχει 50 έως 200 αδενοινουκλεοτίδια) και η αντίστροφη μεταγραφάση ξεκινάει την αντίστροφη μεταγραφή από την πολυ-A ουρά. Προκύπτει DNA και συγκεκριμένα cDNA (συμπληρωματικό του RNA): έναντι των U μπαίνουν A, ενώ έναντι των A μπαίνουν T και τα άλλα δύο κανονικά, δηλαδή έναντι των G μπαίνουν C και έναντι των C μπαίνουν G. Φυσικά τα νουκλεοτίδιά του είναι δεοξυριβο- και όχι ριβο-.



Στη συνέχεια, στο σύμπλοκο mRNA-cDNA γίνεται υδρόλυση (καταστροφή) του mRNA, από την RNAase-H. Το ένζυμο αυτό μπορεί να μπει ξεχωριστά, αλλά οι πιο σύγχρονες, τελευταίας γενιάς αντίστροφες μεταγραφάσες έχουν οι ίδιες αυτή την ιδιότητα – ενεργότητα. Από το μονόκλωνο cDNA που έχει απομείνει, δημιουργείται φουρκέτα στο 3' άκρο (λόγω συμπληρωματικότητας κάποιων “απέναντι” βάσεων) ενώ δεν είναι δυνατόν να συμβεί κάτι τέτοιο στο 5' άκρο αφού αποτελείται αποκλειστικά από θυμίνες (προερχόμενες από τη

συμπληρωματικότητα της πολυ-αδενυλικής ουράς του αρχικού mRNA). Προσθέτουμε στο διάλυμά μας DNA πολυμεράση και τώρα γίνεται κανονική σύνθεση DNA, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το μονόκλωνο cDNA. Προκύπτει κανονική δίκλωνη αλυσίδα DNA με φουρκέτα και με επίδραση της S1 νουκλεάσης, κόβεται η φουρκέτα. Τελικά παίρνουμε δίκλωνο DNA, συμπληρωματικό του mRNA που αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

Το δίκλωνο αυτό cDNA (αφού το πολλαπλασιάσουμε με συμβατική PCR) μπορούμε να το εισάγουμε σε φορείς κλωνοποίησης, πχ βακτήρια και να πολλαπλασιάσουμε τα βακτήρια ώστε να μας εκφράσουν το συγκεκριμένο γονίδιο (που μας ενδιαφέρει). Έτσι θα πάρουμε πρωτεΐνη που κωδικοποιείται απ' αυτό το γονίδιο.

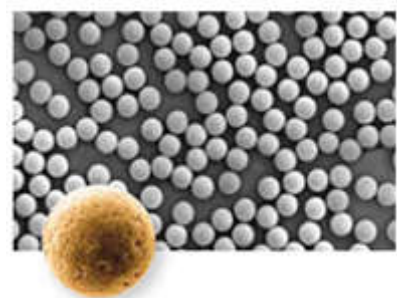
Για μελέτες έκφρασης γονιδίων σε ιστούς και κύτταρα, ακολουθούμε μια λίγο διαφορετική πορεία: από το σημείο που έχουμε το μονόκλωνο cDNA με τη φουρκέτα στο 3' άκρο, προχωρούμε με συμβατική PCR. Βάζουμε κατάλληλους εκκινητές (ανάστροφο μετά το 5' άκρο και πρόσθιο πριν το 3' άκρο) ώστε να πολλαπλασιάσουμε ένα συγκεκριμένο τμήμα αυτού του cDNA και έτσι να γίνει η μελέτη της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ RT-PCR³

Διαδικασία για τη σύνθεση cDNA από dynabeads

Πρωτόκολλο: Jim Hutchins, Μέθοδος: David Klein

1. Διαλύουμε RNA (30 ug) σε 10 ul H₂O και προσθέτουμε 20 ul TE/1M KCl.
2. **α)** τοποθετούμε 100 ul dynabeads (5 mg/ml) σε σωλήνα των 0,5 ml
 - β)** δεσμεύουμε τα σφαιρίδια
 - γ)** αφαιρούμε το υγρό
 - δ)** προσθέτουμε 100 ul TE/1M KCl
 - ε)** ξεπλένουμε
 - στ)** δεσμεύουμε τα σφαιρίδια
3. **α)** προσθέτουμε RNA στα σφαιρίδια
 - β)** θερμαίνουμε στους 70 °C για 2 min και ψύχουμε αργά μέχρι θερμοκρασία δωματίου για 10 min
 - γ)** δεσμεύουμε τα σφαιρίδια
 - δ)** αφαιρούμε το υγρό
4. Επαναιωρούμε (resuspend) τα σφαιρίδια σε 50 ul, όπου:
 - 2,5 ul ρυθμιστικό διάλυμα A* (200 mM Tris-HCl / pH 8,3 / 1,0M KCl)



(*) αυτά τα ρυθμιστικά παρέχονται με Retrotherm RT

- 2,5 ul ρυθμιστικό διάλυμα B* (30 mM MgCl₂ και 15 mM MnSO₄)
 - 20,0 ul dNTPs (2,5 mM το καθένα)
 - 1,0 ul 32P-dCPT (5 uCi)
 - 1,0 ul RNasin - Pharmacia
 - 2,0 ul SuperScript II RT (200 U/ul) (Gibco BRL #18064-014)
 - 5,0 ul Retrotherm RT (1 U/ul) (Epicentre Technologiew #R19250)
 - 16,0 ul H₂O
5. Αφαιρούμε 1 ul της αντίδρασης: αυτό αντιπροσωπεύει συνολικά 32P για τον υπολογισμό του ποσού του cDNA που συντίθεται
 6. Θερμαίνουμε στους 40 °C για 30 min
 7. Θερμαίνουμε στους 70 °C για 60 min
 8. Δεσμεύουμε τα σφαιρίδια και αφαιρούμε όλο το νερό
 9. Ξεπλένουμε τα σφαιρίδια με 100 ul TE, δεσμεύουμε τα σφαιρίδια και αφαιρούμε το υγρό
 10. Επαναϊωρούμε (resuspend) τα σφαιρίδια σε 100 ul TE. Μετράμε 1 ul από σφαιρίδια για να υπολογίσουμε το ποσό του cDNA που συντίθεται. Χρησιμοποιούμε 1 ul από σφαιρίδια, ανά PCR.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ RT-PCR^{1,2}

Οι ανώτεροι οργανισμοί έχουν περίπου 100.000 γονίδια, από τα οποία μόνο το 15% (περίπου) εκφράζεται πάντα σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο. Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των κυττάρων σχετίζονται κυρίως με το είδος των γονιδίων που εκφράζονται. Έτσι η PCR (γενικά) ως μέθοδος, βοηθά στην ανάλυση της διαφορετικής γονιδιακής έκφρασης.

Λόγω της ενίσχυσης των προϊόντων του γονιδιώματος, έχουμε ευρεία χρήση σε πολλές μελέτες του:

- Επαλήθευση της έκφρασης των γονιδίων προς εξέταση
- Ανίχνευση μεταλλάξεων
- Καθορισμός σημείων ματίσματος
- Κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών.

Η τεχνική RT-PCR χρησιμοποιείται επίσης και για την μελέτη των γονιδιωμάτων διαφόρων ιών (RNA γονιδιώματα).

REAL TIME PCR

APXEΣ RealTime-PCR^{4,5}

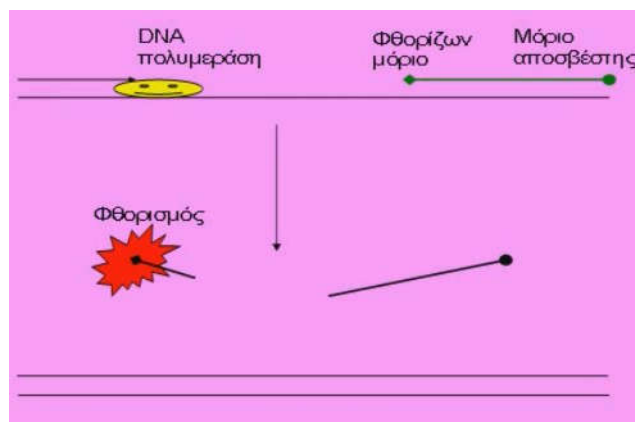
Είναι μια ευαίσθητη τεχνική με την οποία μετράμε τη συγκέντρωση προϊόντων PCR στη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης. Στηρίζεται σε κινητική αντίδραση φθορισμού. Κάθε όργανο που χρησιμοποιούμε στην real time PCR περιλαμβάνει τα εξής τρία τμήματα:

- **Πηγή φωτός** (καθορίζει και τις χρησιμοποιούμενες χρωστικές αναφορές)
- **Σύστημα ανίχνευσης** (καθορίζει την ευαισθησία του προσδιορισμού)
- **Θερμικός κυκλοποιητής** (ρυθμίζει την ταχύτητα της αντίδρασης, την ομοιομορφία της θερμοκρασίας μεταξύ των δειγμάτων και τον αριθμό των δειγμάτων που εξετάζονται κάθε φορά)

Τεχνικές Real Time PCR:

❖ **Τεχνική TaqMan:** στηρίζεται στην ενεργότητα 5'→3' εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης και στα διπλά σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια – ιχνηθέτες (probes). Αυτά εκπέμπουν φθορίζουσα ακτινοβολία όταν κοπούν. Η κατασκευή τους βασίζεται στην αρχή FRET (αρχή μεταφοράς ενέργειας συντονισμού με φθορισμό): ολιγονουκλεοτίδια που στο ένα άκρο τους έχει συνδεθεί μόριο που φθορίζει και στο άλλο άκρο τους μόριο που απορροφά αυτή την ακτινοβολία. Όταν και τα δύο μόρια είναι συνδεδεμένα στο ολιγονουκλεοτίδιο, δεν λαμβάνουμε ακτινοβολία (η εκπεμπόμενη ακτινοβολία από το ένα άκρο, απορροφάται από το άλλο). Αν όμως ο ιχνηθέτης κοπεί και απομακρυνθούν η φθορίζουσα χρωστική αναφοράς και η χρωστική – αποσβέστης, τότε ο εκπεμπόμενος φθορισμός λαμβάνεται (από εμάς).

Ας το δούμε λίγο πιο αναλυτικά, παρατηρώντας το διάγραμμα:

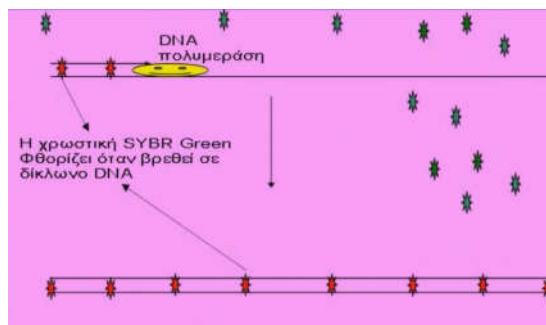


Στο αριστερό άκρο του μονόκλωνου DNA στόχου (ή του cDNA), έχουμε τον ένα εκκινητή και στο δεξιό άκρο τον ανάστροφο. Η DNA πολυμεράση (☺) προσδένεται στο αριστερό

δίκλωνο άκρο εκκινητή – DNA στόχου και ξεκινάει τον πολυμερισμό της (προς τα δεξιά). Στο δείγμα μας υπάρχει και ένας TaqMan ιχνηθέτης όπου έχει (χημικά προσδεμένο) ένα φθορίζων μόριο και ένα μόριο – αποσβέστη). Το μηχάνημα ανίχνευσης φθορισμού δεν δίνει σήμα, αφού όπως είπαμε η εκπεμπόμενη ακτινοβολία απορροφάται απ’ ευθείας. Όταν όμως η DNA πολυμεράση φτάσει τον ιχνηθέτη, και επειδή έχει δράση εξωνουκλεάσης, τον διασπά. Τότε μπορούμε να ανιχνεύσουμε ακτινοβολία από το φθορίζων μόριο (το μόριο αποσβέστης είναι πλέον μακριά). Επομένως η ανίχνευση της ακτινοβολίας συνοδεύει τον σχηματισμό (από την DNA πολυμεράση) ενός δίκλωνου μορίου DNA. Με κατάλληλες καμπύλες αναφοράς και κατάλληλους αλγόριθμους, κάνουμε ποσοτική ανίχνευση του DNA στόχου.

❖ **Τεχνική SYBR Green:** στηρίζεται στη χρήση χρωστικών (όπως η SYBR Green I ή το βρωμιούχο αιθίδιο) που προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA και μας επιτρέπουν να ανιχνεύσουμε τον σχηματισμό προϊόντων PCR. Με αυτή την τεχνική δεν είναι απαραίτητη η χρήση εξειδικευμένου ιχνηθέτη (όπως TaqMan) με αποτέλεσμα το χαμηλότερο κόστος. Απαιτείται όμως ιδιαίτερη προσοχή στα εργαστηριακά πρωτόκολλα της μεθόδου ώστε να ανιχνευθεί κάθε δίκλωνο DNA που υπάρχει ή τυχόν δημιουργείται ως παραπροϊόν.

Σύμφωνα με το σχήμα έχουμε: καθώς η DNA πολυμεράση (☺) προχωράει προς τα δεξιά δημιουργώντας δίκλωνο DNA, τα μόρια της χρωστικής SYBR Green, που βρίσκονται στο διάλυμα, εισέρχονται στα δίκλινα τμήματα του DNA και φθορίζουν. Εμείς ανιχνεύουμε τον φθορισμό αυτό.

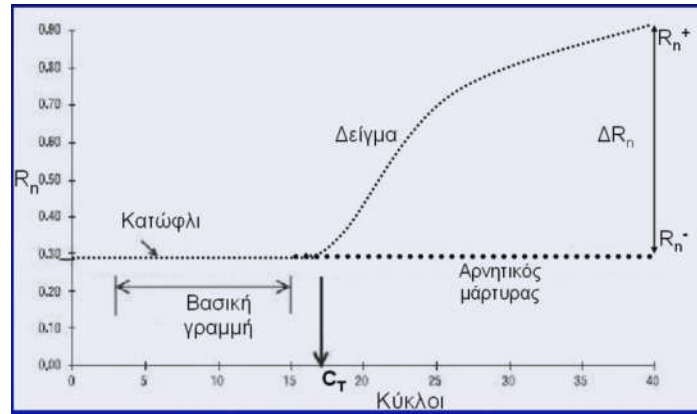


Αν όμως υπάρχουν στο διάλυμα και παραπροϊόντα DNA, τότε η χρωστική προσδένεται και σε αυτά και φθορίζει από αυτά επίσης (περισσότερο σήμα).

❖ **Άλλες Τεχνικές:** οι **μοριακοί φάροι** (molecular beacons) (η φθορίζουσα χρωστική και η χρωστική – αποσβέστης είναι αρκετά μακρύτερα σε σχέση με τον TaqMan ιχνηθέτη. Έτσι το υβρίδιο φθορίζει αφού δεν έχουμε απορρόφηση από τον αποσβέστη και εμείς ανιχνεύουμε τον φθορισμό), οι **σκορπιοί** (scorpions) και οι **ιχνηθέτες υβριδισμού** (hybridization probes). Όλες στηρίζονται στην αρχή FRET (χωρίς ανάγκη υδρόλυσης από την ενεργότητα νουκλεάσης της πολυμεράσης Taq).

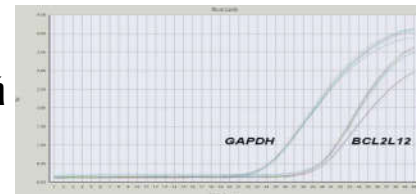
Διάγραμμα Κινητικής Φθορισμού της Real Time PCR:

Διάγραμμα όπου στον κάθετο άξονα έχει τα σήματα φθορισμού (ένταση) και στον οριζόντιο άξονα τον αριθμό των κύκλων. Παρατηρούμε τη βασική γραμμή και το κατώφλι που αποτελεί τον θόρυβο (χαρακτηριστικό για κάθε αντίδραση).



Ο αριθμός του κύκλου όπου η ένταση του φθορισμού ξεπερνάει το 10-πλάσιο της τυπικής απόκλισης του θορύβου, χαρακτηρίζεται ως **κατώφλι** C_T (cycle threshold) και αποτελεί καθοριστική παράμετρο για την real time PCR. Μετά το C_T έχουμε εκθετική αύξηση του φθορισμού, σύμφωνα με τον τύπο: $I = P \cdot X_0 \cdot (1 + E_X)^C$ (I: ένταση σήματος, P: συντελεστής αναλογικότητας, X_0 : αρχικός αριθμός του γενετικού υλικού-στόχου, E_X : απόδοση αντίδρασης και C: αριθμός κύκλων).

Χρησιμοποιείται σε διάφορες μεθόδους όπως η **σχετική ποσοτικοποίηση** με σύγκριση των C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$).



ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ Real Time PCR⁶

Μέθοδος: Xiaowei Wang, Brian Seed

1. Κανονικοποιούμε τις συγκεντρώσεις των εκκινητών και ανακατεύουμε τα ειδικά γονιδιακά ανάστροφα και πρόσθια ζεύγη εκκινητών. Η συγκέντρωση του εκκινητή (ανάστροφου ή πρόσθιου) στο μίγμα είναι 5 nM/μl
2. Ρυθμίζουμε το πείραμα και το ακολουθών PCR πρόγραμμα στο ABI Prism SDS 7000. Δεν κάνουμε κλικ στο πρωτόκολλο διαχωρισμού, αν θέλουμε να ελέγξουμε το αποτέλεσμα της PCR με gel αραγόζης. Αποθηκεύουμε ένα αντίγραφο του αρχείου εγκατάστασης (setup file) και διαγράφουμε όλους τους κύκλους PCR (θα χρησιμοποιηθεί για μετέπειτα ανάλυση της καμπύλης διαχωρισμού). Προσοχή: τα βήματα επέκτασης είναι ελάχιστα διαφορετικά απ' αυτά που περιγράφονται στη αντίστοιχη δημοσίευση.

α) 50 °C για 2 min / 1 κύκλος

β) 95 °C για 10 min / 1 κύκλος

γ) 95 °C για 15 sec και 60 °C για 30 sec και 72 °C για 30 sec / 40 κύκλοι

δ) 72 °C για 10 min / 1 κύκλος

3. Ένα real time PCR μίγμα αντίδρασης μπορεί να είναι είτε 50 μl, είτε 25 μl.

Προετοιμάζουμε το επόμενο μίγμα σε οπτικό σωλήνα:

Για 50 μl

25 μl SYBR Green Mix (2x)

0,5 μl ηπατικό cDNA

2 μl μίγμα ζευγών εκκινητών

(5 pmol/μl από το καθένα)

22,5 μl H₂O

Για 25 μl

12,5 μl SYBR Green Mix (2x)

0,2 μl ηπατικό cDNA

1 μl μίγμα ζευγών εκκινητών

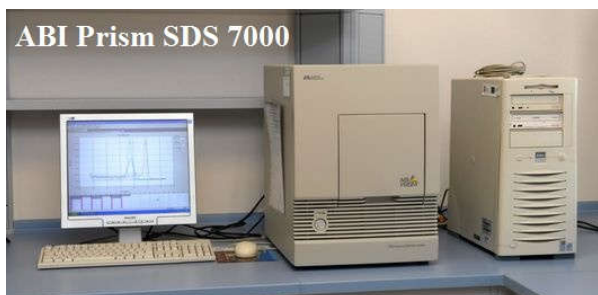
(5 pmol/μl από το καθένα)

11,3 μl H₂O

ή

4. Αφού ολοκληρωθεί η PCR, αφαιρούμε τους σωλήνες από το μηχάνημα. Η εξειδίκευση (specificity) της PCR εξετάζεται με 3% gel αραγόζης, χρησιμοποιώντας 5 μl από κάθε αντίδραση.

5. Τοποθετούμε τους σωλήνες πάλι μέσα στο μηχάνημα (SDS 7000) και εκτελούμε ανάλυση καμπύλης διαχωρισμού με το αποθηκευμένο αντίγραφο από το αρχείο εγκατάστασης.



6. Αναλύουμε το αποτέλεσμα της real time PCR με το λογισμικό SDS 7000. Ελέγχουμε να δούμε αν υπάρχει διπλή κορυφή διαχωρισμού στην καμπύλη ή ανώμαλη γραφική ενίσχυσης (abnormal amplification plot).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ Real Time PCR^{4,5}

➤ **Ανίχνευση, ταυτοποίηση και προσδιορισμός βακτηρίων:** η real time PCR είναι μέθοδος ευαίσθητη, γρήγορη και φθηνή, με την οποία ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Ταυτόχρονα αναγνωρίζει συγκεκριμένα γονίδια ή μεταλλάξεις στους μικροοργανισμούς. Βοηθά επίσης στη γρήγορη επιβεβαίωση αποτελεσμάτων από άλλες συμβατικές μεθόδους και ορολογικούς ελέγχους καθώς και στη διόρθωση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Αναγνωρίζει γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά ή γονίδια που κωδικοποιούν ιογενείς παράγοντες. Αναγνωρίζει μεταλλάξεις σε γονίδια σχετιζόμενα με την αντιβιοτική ανθεκτικότητα. Έτσι βοηθά στη γρήγορη έναρξη κατάλληλης θεραπείας ή στη

διόρθωση της εφαρμοζόμενης θεραπείας. Τέλος παρακολουθεί ποσοτικά το παθογόνο κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Ενδεικτικά βακτήρια που σχετίζονται με την real time PCR τεχνική είναι τα: *Helicobacter pylori*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis & faecium* και *Mycobacterium tuberculosis*.

➤ **Ανίχνευση, ταυτοποίηση και προσδιορισμός μυκήτων & παρασίτων:** για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας μιας χορηγούμενης θεραπείας, εκτός από την ανίχνευση μιας μυκητίασης, είναι σημαντική και η ποσοτικοποίηση του μυκητιασικού φορτίου. Η real time PCR είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τα παραπάνω. Ενδεικτικά αναφέρουμε την ανθεκτικότητα των ειδών *Candida* και *Aspergillus* σε διάφορους αντιμυκητιακούς παράγοντες. Το **πλασμίδιο της ελονοσίας** είναι ένα άλλο παράδειγμα που μπορεί να διαγνωστεί γρήγορα με TaqMan real time PCR. Το παράσιτο *Entamoeba histolytica* (που προσβάλλει το έντερο) και ο μη παθολογικός του τύπος *Entamoeba dispar*, διακρίνονται πλέον από μια μέθοδο real time PCR.

➤ **Ανίχνευση, ταυτοποίηση και προσδιορισμός ιών:** στην κλινική ιολογία η real time PCR παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία και ειδικά αν συγκριθεί με άλλες συμβατικές μεθόδους. Βασικό πρόβλημα είναι η πιθανότητα αποτυχίας στην ανίχνευση ικών στελεχών (ίδιας βαρύτητας με τις συμβατικές μεθόδους). Ένα επιπλέον πρόβλημα έγκειται στην ποικιλία μεταξύ των στελεχών των ιών, αλλά μπορεί να ξεπεραστεί με εφαρμογή δύο προσδιορισμών PCR, με διαφορετικά γονίδια – στόχους.

Βασικό της πλεονέκτημα είναι η ικανότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησης πολλών ικών τύπων ταυτόχρονα, σε μια μόνο αντίδραση (μείωση κόστους και χρόνου!).

Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για την τυποποίηση ιών:

α) χρήση ιχνηθετών υβριδισμού και ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης

β) χρήση ειδικών (για κάθε τύπο ιού) ιχνηθετών TaqMan, που είναι σημασμένοι με διαφορετικά φθορίζοντα μόρια.

Στην κλινική ιολογία, η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ιών του αίματος (**ηπατίτιδα B/C, HIV**) καθώς και διαφόρων ιών γρίπης (**H₁N₁**). Εφαρμογές βρίσκει και στον τομέα των μεταμοσχεύσεων, μιας και οι ιοί αποτελούν τους πιο σημαντικούς μικροβιακούς παράγοντες (που μπορεί να οδηγήσουν μέχρι και σε απόρριψη του νεομεταμοσχευθέντος οργάνου).

➤ **Προγεννητικός έλεγχος μονογονικών νόσων:** στόχος είναι η έγκαιρη διάγνωση προβλημάτων του εμβρύου και απαιτείται η γρήγορη και ασφαλής λήψη υλικού από αυτό.

Εμβρυικό δείγμα παίρνουμε με αμνιοπαρακέντηση ή από τον τροφοβλάστη. Επίσης από το αίμα της μητέρας (όπου υπάρχουν εμβρυακά κύτταρα και DNA του εμβρύου).

Πολλές τεχνικές PCR χρησιμοποιούνται στον προγεννητικό έλεγχο για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τις σφαιρίνες (οι αιμοσφαιρινοπάθειες ήταν οι πρώτες γενετικές νόσοι που χαρακτηρίστηκαν σε μοριακό επίπεδο και έχουν αποτελέσει πρότυπο).

Χαρακτηριστικό της real time PCR είναι ο συνδυασμός γρήγορων κύκλων PCR και φθορισμομετρίας. Έτσι ελέγχεται η εκπομπή φθορισμού της αντίδρασης ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο. Τελικά γίνεται χαρακτηρισμός και ποσοτικοποίηση των προϊόντων και επομένως καθορισμός του γονότυπου, χωρίς μετέπειτα επεξεργασία του δείγματος. Η μεγάλη ακρίβεια και ταχύτητα στη μέθοδο φτάνει στο σημείο, αν είναι γνωστή η μετάλλαξη που φέρουν οι γονείς, να έχουμε προγεννητικό έλεγχο σε 3(!) ώρες (μαζί με την απομόνωση του DNA από το εμβρυικό δείγμα).

➤ **Άλλες Εφαρμογές:** η real time PCR χρησιμεύει για την ανίχνευση **μικρομεταστάσεων στον καρκίνο** του προστάτη, του παχέος εντέρου και του νευροβλαστώματος, με χρήση ποσοτικοποίησης της έκφρασης των ογκογονιδίων και των ογκοανασταλτικών γονιδίων. Επίσης βρίσκει εφαρμογές στον προσδιορισμό της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων της νόσου **Alzheimer**, σε **καρδιαγγειακά νοσήματα**, σε **γενετικές νόσους** και στον **προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου**.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 1^ο Θέματος

1. Σκορίλας Α, Θεμελιώδεις Βιοχημικές και Μοριακές Μεθοδολογίες – Μοριακοί Δείκτες Ασθενειών, *Εκδόσεις ΕΑΠ.*; σ. 39-41, 2008
2. Σκορίλας Α, Webcast video KFE53_3.2.avi, *Εκδόσεις ΕΑΠ.*; 08:29-22:09, 2005
3. Hutchins J, Reverse Transcriptase-PCR Protocol, *University of Mississippi Medical Center*; ([link](#))
4. Σκορίλας Α, Θεμελιώδεις Βιοχημικές και Μοριακές Μεθοδολογίες – Μοριακοί Δείκτες Ασθενειών, *Εκδόσεις ΕΑΠ.*; σ. 42-55, 2008
5. Σκορίλας Α, Webcast video KFE53_3.3.avi, *Εκδόσεις ΕΑΠ.*; 05:58-18:51, 2005
6. Wang X, Seed B, Protocol for Real-Time RT-PCR, *Harvard University*; 2004 ([link](#))



Θέμα 2

Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών: Ιστορικά δεδομένα, αρχή μεθόδων, εργαστηριακά πρωτόκολλα, διδακτικά σχήματα

Οι πρωτεΐνες¹ αποτελούν το κύριο μέρος της ξηρής μάζας του κυττάρου και ουσιαστικά αυτό που παρατηρούμε βλέποντας στο μικροσκόπιο ένα κύτταρο ή αναλύοντας την ηλεκτρική ή βιοχημική του συμπεριφορά. Αποτελούνται από μια σειρά (αλληλουχία) αμινοξέων, δομημένα σε τρισδιάστατη μορφή. Σχετίζονται με το σχήμα και σχεδόν όλες τις λειτουργίες του κυττάρου.

Η κατανόηση της δομής τους είναι θεμελιώδους σημασίας για την κατανόηση του φαινομένου της ζωής και όλων των εκφάνσεών της. Η ποικιλία στη δομή αυτή (στερεοδομή) είναι που δίνει τις πολυάριθμες δυνατότητες στις πρωτεΐνες και καθορίζει τη μεγάλη προσοχή που τους δίνουμε.

Ορισμένες από τις λειτουργίες των πρωτεϊνών (ώστε να καταδειχθεί ο πολύ σημαντικός τους ρόλος) είναι:

- **ως ένζυμα:** καταλύουν σχηματισμό ή διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών
- **ως δομικές πρωτεΐνες:** δράση μηχανικής στήριξης κυττάρων και ιστών
- **ως κινητήριες πρωτεΐνες:** δημιουργούν κινήσεις σε κύτταρα και ιστούς
- **ως αποθηκευτικές πρωτεΐνες:** αποθηκεύουν μικρά μόρια και ιόντα
- **ως σηματοδοτικές πρωτεΐνες:** μεταφέρουν σήματα από κύτταρο σε κύτταρο
- **ως πρωτεΐνες υποδοχείς:** ανιχνεύουν και μεταβιβάζουν σήματα που φτάνουν στα κύτταρα
- **ως πρωτεΐνες ρύθμισης γονιδίων:** συνδέονται με το DNA και καταστέλλουν ή ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων
- **ως πρωτεΐνες ειδικής λειτουργίας:** εδώ ο κατάλογος μεγαλώνει πολύ, από αντιψυκτικές πρωτεΐνες (για να μην παγώνει το αίμα των αρκτικών ψαριών) έως φθορίζουσες πρωτεΐνες (στα πλάσματα της αβύσσου ή τις μέδουσες) και συγκολλητικές πρωτεΐνες (για την πρόσδεση των οστράκων στα βράχια).

Παρακάτω παραθέτουμε έναν πίνακα² για τα ιστορικά ορόσημα στις μελέτες για την κατανόηση των πρωτεϊνών:

1838	Ο Berzelius πρότεινε τον όρο « πρωτεΐνη » (από την Ελληνική λέξη πρώτος) για την πολύπλοκη, οργανική, αζωτούχο ουσία που υπάρχει στα κύτταρα όλων των ζώων και των φυτών.
1819-1904	Ανακαλύφθηκαν τα περισσότερα από τα 20 αμινοξέα που υπάρχουν στις πρωτεΐνες.
1864	Ο Hoppe-Seyler κρυστάλλωσε και ονόμασε την πρωτεΐνη αιμοσφαιρίνη .
1894	Ο Fischer πρότεινε ένα ανάλογο κλειδαριάς και κλειδιού για την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος.
1897	Οι Buchner και Buchner έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα ζύμης ελεύθερα κυττάρων έχουν τη δυνατότητα να επιτύχουν τη ζύμωση της σουκρόζης και να σχηματίσουν διοξειδίο του άνθρακα και αιθανόλη, θέτοντας έτσι τα θεμέλια της ενζυμολογίας .
1926	Ο Sumner κρυστάλλωσε την ουρεάση σε καθαρή μορφή και έδειξε ότι οι πρωτεΐνες μπορεί να διαθέτουν την καταλυτική δράση των ενζύμων. Ο Svedberg ανέπτυξε την πρώτη αναλυτική υπερφυγόκεντρο και τη χρησιμοποίησε για να υπολογίσει το μοριακό βάρος της αιμοσφαιρίνης.
1933	Ο Tiselius εισήγαγε την τεχνική της ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό πρωτεϊνών σε διάλυμα.
1934	Οι Bernai και Crowfoot παρουσίασαν τα πρώτα λεπτομερή διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X μιας πρωτεΐνης που πήραν από κρυστάλλους του ενζύμου πεψίνη.
1942	Οι Martin και Syngge ανέπτυξαν τη χρωματογραφία , μια τεχνική η οποία σήμερα χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών.
1951	Οι Pauling και Corey πρότειναν τη δομή της ελικοειδούς διαμόρφωσης μιας αλυσίδας L-αμινοξέων, την α-έλικα και τη δομή του β-πτυχωτού φύλλου . Αργότερα, τόσο η α-έλικα όσο και η β-πτυχωτή δομή βρέθηκαν σε πολλές πρωτεΐνες.
1955	Ο Sanger ολοκλήρωσε την ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων της ινσουλίνης . Η ινσουλίνη ήταν η πρώτη πρωτεΐνη της οποίας η αλληλουχία των αμινοξέων καθορίστηκε πλήρως.
1956	Ο Ingram παρήγαγε τα πρώτα πρωτεϊνικά «αποτυπώματα» (protein fingerprints) και έδειξε ότι η διαφορά ανάμεσα στη δρεπανοκυτταρική και τη φυσιολογική αιμοσφαιρίνη οφείλεται σε μεταβολή ενός μόνο αμινοξέος.
1960	Ο Kendrew περιέγραψε την πρώτη λεπτομερή δομή μιας πρωτεΐνης, της μιμοσφαιρίνης του σπέρματος της φάλαινας, με διακριτική ικανότητα 0.2 nm και ο Perutz περιέγραψε με μικρότερη διακριτική ικανότητα τη δομή της αιμοσφαιρίνης.
1963	Οι Monod, Jacob και Changeux αναγνώρισαν ότι πολλά ένζυμα ρυθμίζονται μέσω αλλοστερικών μεταβολών της διαμόρφωσής τους.

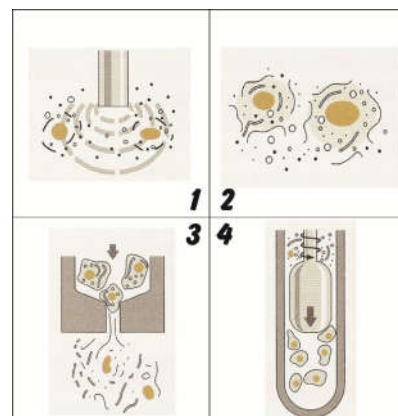
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ^{3,4}

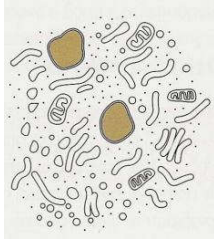
Η πολύπλοκη δομή μιας πρωτεΐνης (“εικόνα” χρήσιμη για την κατανόηση της λειτουργίας και των ιδιοτήτων της) προκύπτει με λεπτομερή παρατήρησή της με ακτίνες X. Επειδή αποτελείται από αμινοξέα και για να μπορέσουμε να “δούμε” σε αυτό το (ατομικό) επίπεδο, χρειαζόμαστε φως αντίστοιχου μήκους κύματος, το οποίο μας το δίνουν οι ακτίνες X. Όμως πριν από τις ακτίνες X πρέπει να γίνουν δύο ακόμη διεργασίες: **η απομόνωση της πρωτεΐνης σε καθαρή μορφή και ο καθορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων** που την αποτελούν. Στη συνέχεια η **ανάλυση ακτίνων X** (ή η **φασματοσκοπία NMR**) θα μας δώσει την (τελική) τριτοταγή μορφή της.

➤ Απομόνωση της Πρωτεΐνης σε Καθαρή Μορφή:

❖ **Λύση κυττάρων και ιστών:** έχουμε αρχικά σπάσιμο της κυτταρικής μεμβράνης και την απελευθέρωση του εσωτερικού του κυττάρου. Αυτό γίνεται με:

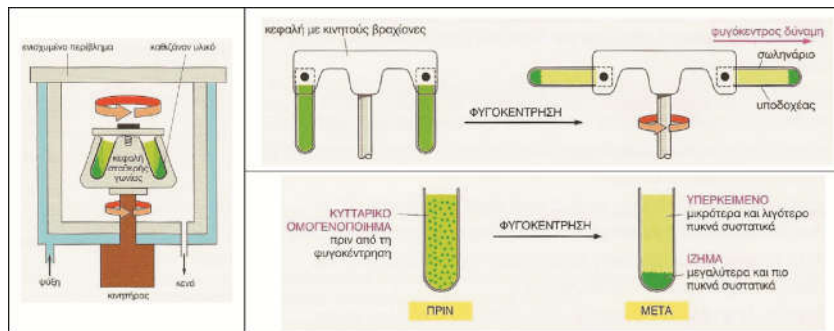
- (1) Υπερήχους
- (2) Διάνοιξη οπών στη μεμβράνη με ήπιο απορρυπαντικό
- (3) Συμπύεση κυττάρων ώστε να περάσουν από μικρή οπή
- (4) Σύνθλιψη κυττάρων ανάμεσα σε περιστρεφόμενο έμβολο και στα τοιχώματα γυάλινου σωλήνα.





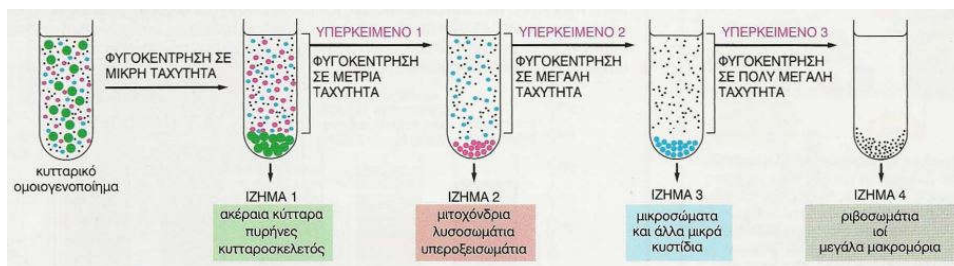
Το ομογενοποίηση ή εκχύλισμα (το υγρό που προκύπτει) περιέχει ένζυμα, ριβοσώματα, μεταβολίτες και όλα τα οργανίδια του κυττάρου, τα οποία παραμένουν ακέραια, εφόσον η “λύση” να γίνει προσεκτικά.

❖ **Φυγοκέντριση:** το ομογενοποίηση τοποθετείται στη φυγοκεντρική μηχανή και η περιστροφή το διαχωρίζει σε διάφορα μέρη ή κλάσματα. Οι σύγχρονες μηχανές φτάνουν έως και 100.000 rpm δημιουργώντας επιταχύνσεις έως και 600.000 g.



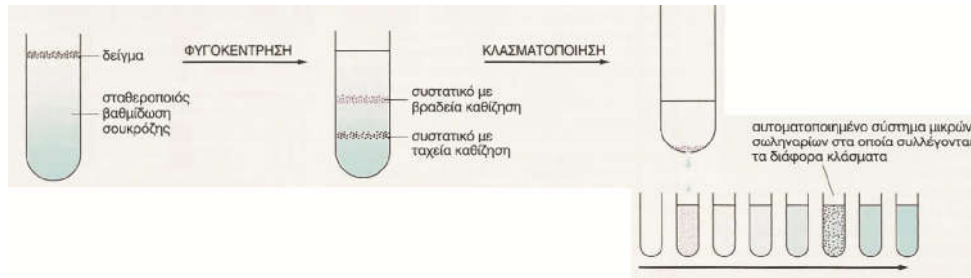
Υπάρχουν κεφαλές σταθερής γωνίας (μεγαλύτερου όγκου αλλά όχι ομοιόμορφου ιζήματος) και κεφαλές με κινητούς βραχίονες. Στις τελευταίες παρατηρούμε καθαρά το ίζημα (μεγαλύτερα και πιο πυκνά συστατικά) σε σχέση με το υπερκείμενο.

❖ **Διαφορική Φυγοκέντριση:** πρόκειται για την προηγούμενη διαδικασία αλλά σε στάδια συνεχώς αυξανόμενης συχνότητας περιστροφής. Όσο μεγαλύτερη η συχνότητα, τόσο αναγκάζονται να καθιζάνουν όλο και μικρότερα, και λιγότερο πυκνά μόρια. Σε κάθε στάδιο αφαιρούμε το υπερκείμενο, το οποίο και υποβάλλουμε σε νέα φυγοκέντριση με μεγαλύτερη συχνότητα.

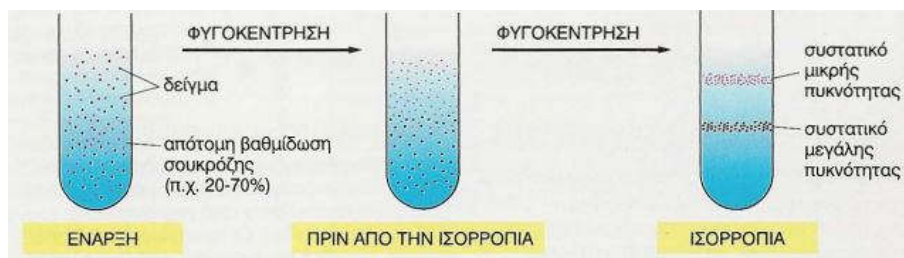


❖ **Διαχωρισμός με βάση την ταχύτητα καθίζησης:** ένας ακόμη τρόπος φυγοκέντρισης, αυτή τη φορά με τη βοήθεια ενός υποστρώματος διαλύματος αλάτων. Το ομογενοποίηση τοποθετείται πάνω σε μια συνεχή, ήπια βαθμίδωση σουκρόζης (5-20%) με αυξανόμενη συγκέντρωση προς τα κάτω. Όταν τα διάφορα συστατικά καθιζάνουν (ανάλογα με το

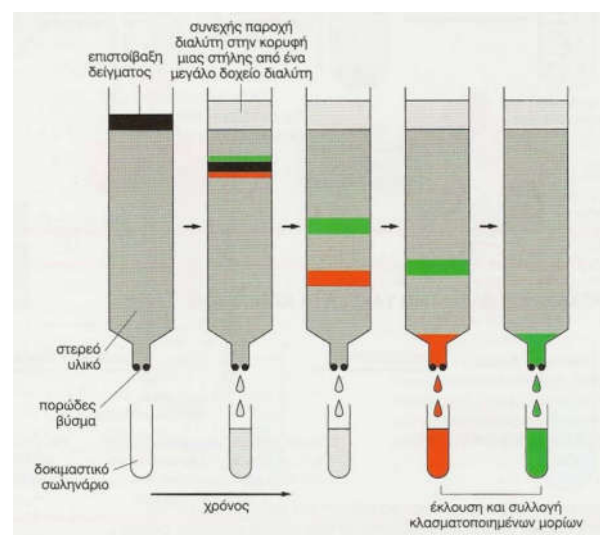
μέγεθός τους) δημιουργούν διακριτά στρώματα. Παίρνουμε τα συστατικά με κατάλληλο τρύπημα του πάτου του σωλήνα φυγοκέντρισης.



❖ **Καθίζηση Ισοροπίας:** το ομογενοποίημα διασπείρεται σε απότομη βαθμίδωση πυκνότητας, που περιέχει μεγάλη συγκέντρωση σουκρόζης (20-70%) ή χλωριούχου καισίου (ακόμη μεγαλύτερο ποσοστό). Κατά τη **φυγοκέντριση** (και πάλι) κάθε υποκυττάριο συστατικό θα μετακινηθεί πάνω ή κάτω, ώστε να πάει στην περιοχή με την οποία παρουσιάζει την ίδια πυκνότητα. Στο τέλος έχουμε διάφορες ζώνες συστατικών, τα οποία συλλέγουμε όπως και στην προηγούμενη διαδικασία. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον διαχωρισμό DNA και RNA.



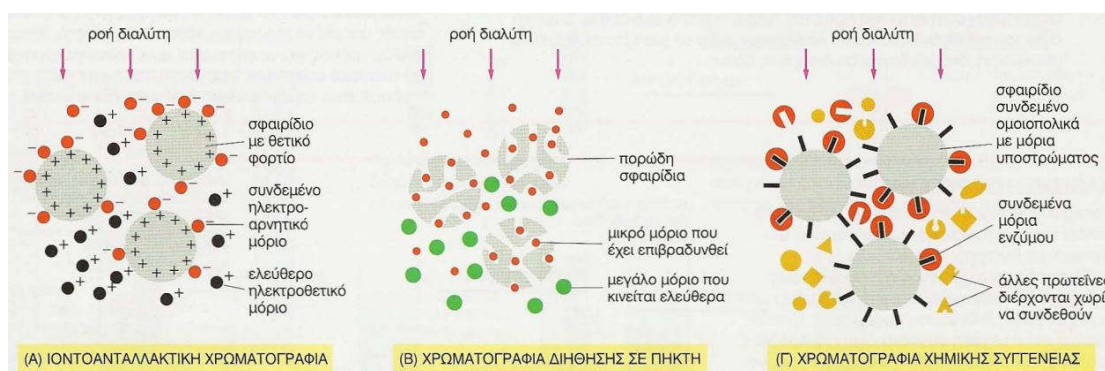
❖ **Χρωματογραφία Στήλης:** πρόκειται για ένα άλλο, διαφορετικό, είδος διαχωρισμού. Το μίγμα των πρωτεϊνών τοποθετείται πάνω σε **διαπερατό στερεό υλικό**, σε κατακόρυφη στήλη. Ποσότητα διαλύτη παρέχεται από πάνω συνεχώς και αντλείται από κάτω. Οι διάφορες πρωτεΐνες παρασύρονται από τον διαλύτη, αλλά επιβραδύνονται από το υλικό, αλληλεπιδρώντας μαζί του με **τρεις** τρόπους. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται σταδιακά και η συλλογή του κάθε είδους γίνεται από τη βάση της κατακόρυφης στήλης. Οι **τρεις** τρόποι αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με το διαπερατό στερεό υλικό (πακεταρισμένο σε μικρά σφαιρίδια) είναι:



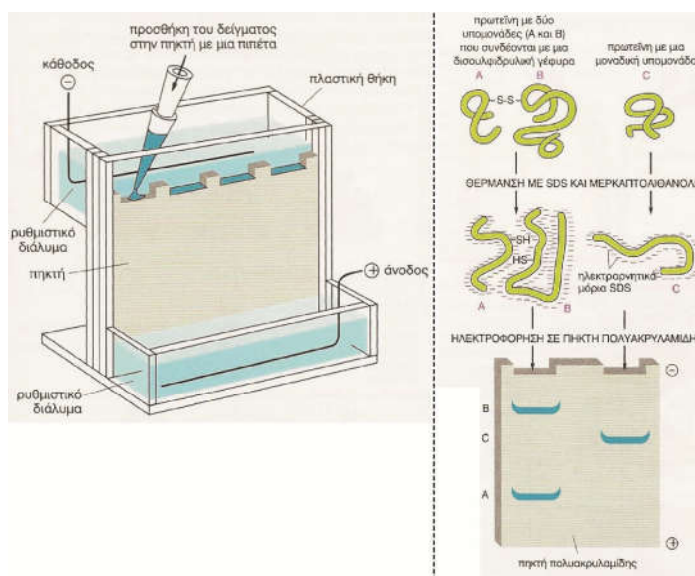
(Α) ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία: τα σφαιρίδια του υλικού είναι φορτισμένα. Επιβραδύνουν τις ετερόσημες πρωτεΐνες και αφήνουν να κινηθούν τις ομόσημες.

(Β) χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή: τα σφαιρίδια είναι πορώδη και επιβραδύνουν τις πρωτεΐνες που μπορούν να χωρέσουν στους πόρους τους. Οι μεγαλύτερες, που δεν χωράνε, διέρχονται.

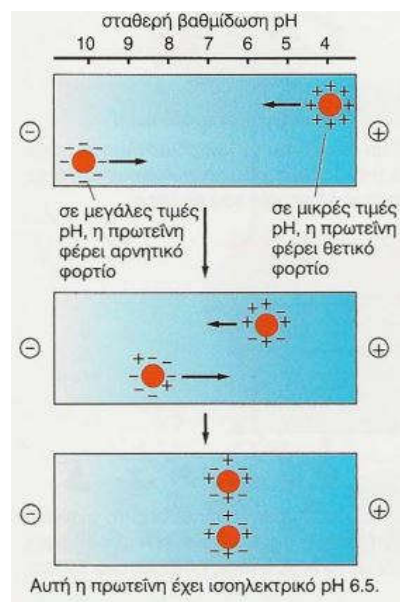
(Γ) χρωματογραφία χημικής συγγένειας: το υλικό έχει χημική συγγένεια με κάποια πρωτεΐνη, η οποία και δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς μαζί του. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες διέρχονται. Η προσδεσμεμένη πρωτεΐνη μπορεί να απελευθερωθεί με αλλαγή του pH του διαλύτη ή άλλους τρόπους.



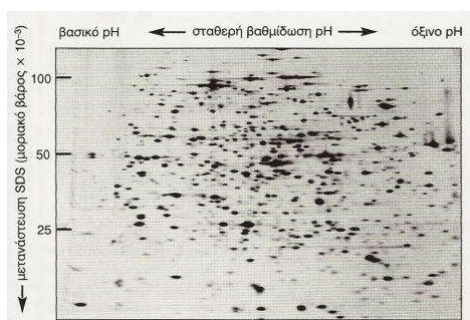
❖ **Ηλεκτροφόριση σε πηκτή:** απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) προστίθεται σε δείγμα πρωτεϊνων με τις οποίες δημιουργεί ηλεκτραρνητικά σύμπλοκα. Το συνολικό δείγμα τοποθετείται με πιπέτα σε πορώδη πηκτή πολυακρυλαμίδη. Μεταξύ δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και τα σύμπλοκα κινούνται προς τα κάτω (προς την “άνοδο”) με ταχύτητες ανάλογες του μεγέθους (μοριακού βάρους) και του καθαρού τους φορτίου. Έτσι διαχωρίζονται. Σημαντικό στοιχείο είναι η πρόσθεση ενός αναγωγικού παράγοντα (μερκαπτοαιθανόλη) προκειμένου να διασπαστούν οι δεσμοί -S-S- που υπάρχουν μεταξύ των πρωτεϊνών.



❖ **Ισοηλεκτρική Εστίαση:** είναι μια άλλη τεχνική ηλεκτροφόρισης όπου σε οριζόντιο σωλήνα έχουμε πηκτή πολυακρυλαμίδης, με διαβάθμιση pH (που φτιάχνεται από ρυθμιστικά διαλύματα). Με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, οι πρωτεΐνες κινούνται μέχρι το **ισοηλεκτρικό τους σημείο**, δηλαδή μέχρι το σημείο που το pH είναι τέτοιο που η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει ηλεκτρικό φορτίο. Και χωρίς ηλεκτρικό φορτίο, δεν δέχεται πλέον ηλεκτρική δύναμη από το πεδίο και σταματάει εκεί. Έτσι διαχωρίζεται το μίγμα.



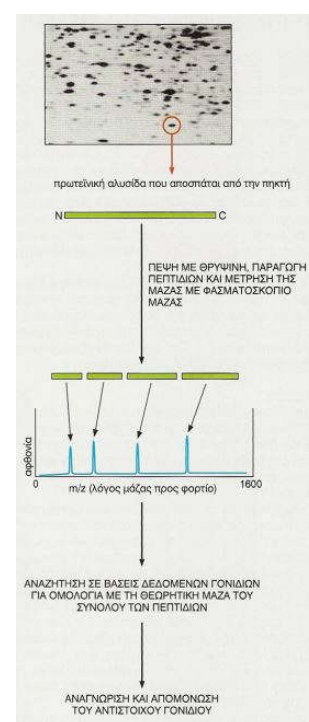
❖ **Ηλεκτροφόριση σε Δύο Διαστάσεις:** συνδυασμός των δύο ανωτέρω τεχνικών με κατευθύνσεις κάθετες μεταξύ τους. Αρχικά το δείγμα υφίσταται ισοηλεκτρική εστίαση σε μια στενή λωρίδα – πηκτή. Στη συνέχεια αυτή η λωρίδα τοποθετείται σε πλάκα



πηκτής SDS – πολυακρυλαμίδης και υφίσταται δεύτερη ηλεκτροφόριση, κάθετη προς την πρώτη. Κάθε πρωτεΐνη σχηματίζει μια διακριτή κηλίδα. Η μέθοδος μπορεί να διαχωρίσει περισσότερες από 1000 πρωτεΐνες, σε κάθε 2D χάρτη.

➤ **Ταυτοποίηση Πρωτεϊνών:**

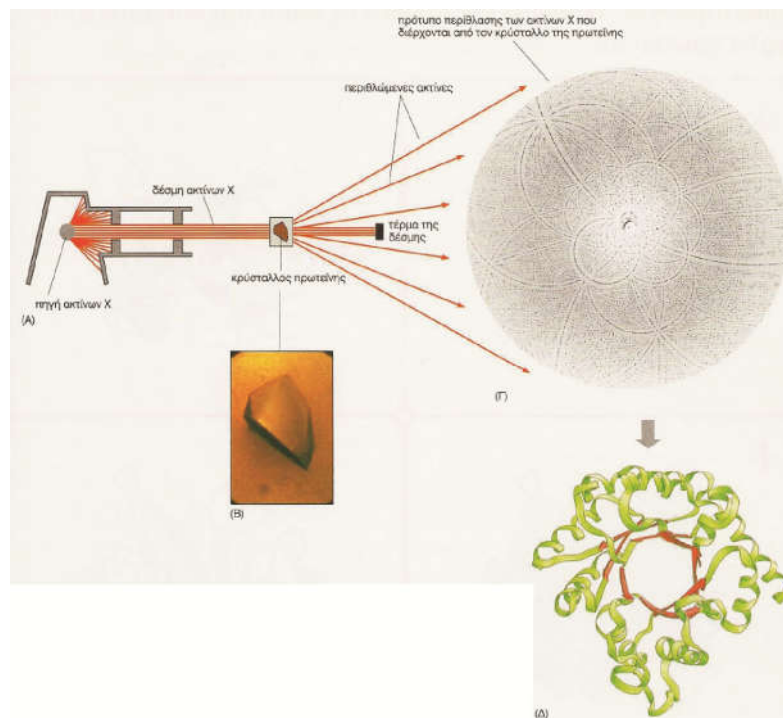
Αρχικά η πρωτεΐνη τεμαχίζεται σε μικρότερα κλάσματα. Αυτό γίνεται με τη χρήση μιας εκλεκτικής πρωτεάσης (πχ θρυψίνης). Μπορούμε στη συνέχεια να υπολογίσουμε την ακριβή μάζα κάθε πεπτιδικού κλάσματος με τη μέθοδο της **φασματοσκοπίας μάζας**. Η πρωτεΐνη ταυτοποιείται μέσα από καταλόγους πρωτεϊνών που προβλέπεται ότι παράγει ο οργανισμός (βάσει DNA). Η τεχνική της φασματοσκοπίας έχει ως εξής: πάνω σε μεταλλική πλάκα ξεραινουμε τα πεπτίδια που προέκυψαν από την πέψη της πρωτεΐνης με την θρυψίνη. Το δείγμα θερμαίνεται με laser και τα πεπτίδια ιονίζονται αποσπώμενα από την πλάκα. Υπό την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου κινούνται προς ανιχνευτή και ο χρόνος



πτήσης τους εξαρτάται από τη μάζα και το φορτίο τους (q/m). Έτσι μετράται με μεγάλη ακρίβεια η μάζα του κάθε πεπτιδίου και έχουμε το “αποτύπωμα” που επιτρέπει την απομόνωση του αντίστοιχου γονιδίου. Ουσιαστικά έτσι έχουμε τον καθορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρωτεΐνης.

➤ Δομική Ανάλυση Πρωτεϊνών:

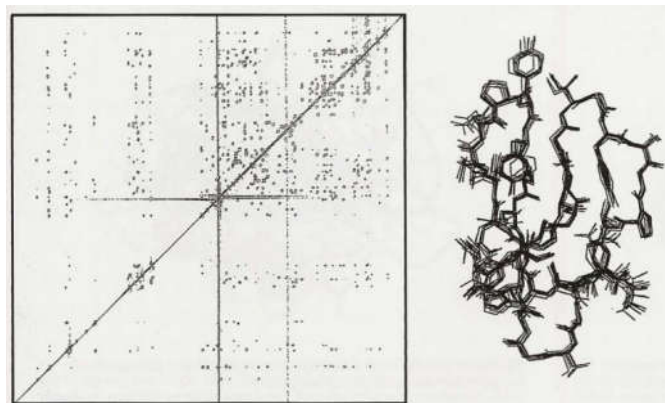
❖ **Κρυσταλλογραφία Ακτινών Χ:** για να γίνει ο καθορισμός της τριτοταγούς δομής πρέπει να γίνει ανάλυση κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ. Αυτή η διαδικασία προϋποθέτει την κατασκευή κρυστάλλων πρωτεΐνης, δηλαδή μεγάλων, τακτικών συστοιχιών όπου το κάθε πρωτεϊνικό μόριο έχει την ίδια διαμόρφωση και είναι παρατεταγμένο με τέλειο τρόπο σε σχέση με τα γειτονικά του.



Ακολουθεί ο “φωτισμός” του κρυστάλλου με παράλληλη δέσμη ακτινών Χ και η λήψη της εικόνας περίθλασης στον ανιχνευτή (παλαιότερα φωτογραφικό χαρτί, σήμερα δέκτης CCD). Η εικόνα οφείλεται στο φαινόμενο της περίθλασης των ακτινών Χ καθώς αυτές περνάνε μέσα από την πρωτεΐνη. Η θέση και η ένταση της κάθε κηλίδας στο σχέδιο, περιέχει πληροφορίες για τη θέση (στο χώρο) των ατόμων που αποτελούν την πρωτεΐνη. Φυσικά η ερμηνεία των εικόνων περίθλασης (που μπορεί να περιλαμβάνουν μέχρι και 25000 κηλίδες) γίνεται από ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Ο συνδυασμός όλων των

πληροφοριών, μαζί με την αλληλουχία των αμινοξέων, μας δίνει την 3D μορφή της πρωτεΐνης.

❖ **Φασματοσκοπία NMR:** μέθοδος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance), κατάλληλη για μικρά πρωτεϊνικά μόρια ($MB < 40000$ daltons). Διάλυμα καθαρής πρωτεΐνης τοποθετείται μέσα σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο και υφίσταται ηλεκτρομαγνητικές ώσεις στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων. Σήματα από τους πυρήνες υδρογόνου των διαφόρων αμινοξέων της πρωτεΐνης, επιτρέπουν τον καθορισμό των αποστάσεων ανάμεσα στα αμινοξέα. Σιγά – σιγά “χτίζεται” η 3D εικόνα της πρωτεΐνης. Για πρωτεΐνες με $MB > 40000$ daltons χρησιμοποιείται **τμηματική NMR**, δηλαδή διαχωρισμός της πρωτεΐνης σε τμήματα και NMR – φασματοσκόπηση σε καθένα από αυτά.



ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΒΙΟΥΡΕΤ⁵

➤ Εξοπλισμός:

- Φασματοφωτόμετρο ορατού με μέγιστο στα 450 nm
- Κυψελίδες πολυστυρενίου ή γυαλιού

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

➤ Αντιδραστήριο: η συνταγή για το αντιδραστήριο biuret (ανά λίτρο τελικού όγκου) είναι:

- 9 gm τρυγικού καλίου νατρίου (f.w. 282,22)
- 3 gm θεικού χαλκού $\times 5H_2O$ (f.w. 249,68)
- 5 gm ιωδιούχου καλίου (166,0)



- Όλα διαλύονται σε σειρά σε 400ml NaOH 0,2M (f.w. 40,0) πριν τα φέρουμε στον τελικό όγκο
- Φυσικά ο όγκος μπορεί να κλιμακωθεί προς τα πάνω ή προς τα κάτω
- Απορρίπτουμε, αν σχηματιστεί μαύρο ίζημα

➤ **Προσδιορισμός (Assay):**

1. Όγκοι δείγματος αντιδραστηρίου μπορούν να κλιμακωθούν πάνω ή κάτω ή/και οι αλλαγές όγκων ποικίλουν (όντας σε προσδιορισμό).
2. Ζεσταίνουμε το φασματοφωτόμετρο για 15 min πριν τη χρήση.
3. Προετοιμάζουμε πρότυπο από αλβουμίνη βόειου ορού, που κατά προτίμηση διαμορφώνεται χρησιμοποιώντας απορρόφηση στα 280 nm και συντελεστή απόσβεσης. Χρησιμοποιούμε 5 ml έγχρωμο αντιδραστήριο σε 1 ml δείγματος με συνιστώμενο εύρος 0,5-20 mg πρωτεΐνης.
4. Ετοιμάζουμε σωλήνα αναφοράς με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος.
5. Αν είναι δυνατόν, αραιώνουμε άγνωστο σε περίπου 1-10 mg/ml ρυθμιστικό. Θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια σειρά από αραιώσεις εάν η πραγματική συγκέντρωση δεν μπορεί να εκτιμηθεί.
6. Χρησιμοποιούμε 1 ml δείγματος ανά δοκιμαστικό σωλήνα.
7. Προσθέτουμε 9 ml αντιδραστηρίου biuret σε κάθε σωλήνα, ανακατεύουμε αμέσως και το αφήνουμε να ηρεμίσει για 20 min.
8. Διαβάζουμε στα 550 nm.

➤ **Ανάλυση:** ετοιμάζουμε πρότυπη καμπύλη απορρόφησης συναρτήσεως των μg πρωτεΐνης (ή το αντίθετο) και υπολογίζουμε τα ποσά από την καμπύλη. Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των αρχικών δειγμάτων από την ποσότητα πρωτεΐνης, όγκος/δείγμα και τον συντελεστή αραιώσεως, αν υπάρχει.

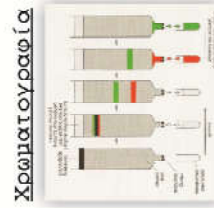
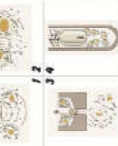
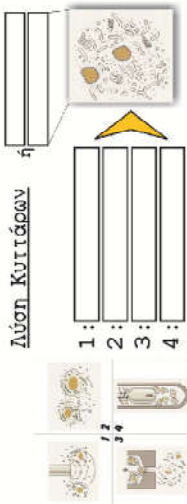
ΔΙΔΑΚΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

Ένα διδακτικό σχήμα που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε προκειμένου να διδάξουμε στη δευτεροβάθμια εκπαίδευση τις **μεθόδους προσδιορισμού των πρωτεϊνών** είναι η συμπλήρωση ενός *εννοιολογικού χάρτη*. Στον χάρτη που παραθέτουμε παρακάτω, ζητάμε από τους μαθητές (σε μια ή δύο διδακτικές ώρες) να συμπληρώνουν τις πληροφορίες που ακούνε κατά την παράδοση, συσχετίζοντάς τες με τις αντίστοιχες εικόνες. Είναι κοινώς αποδεκτό

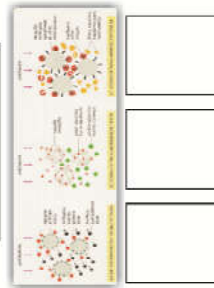
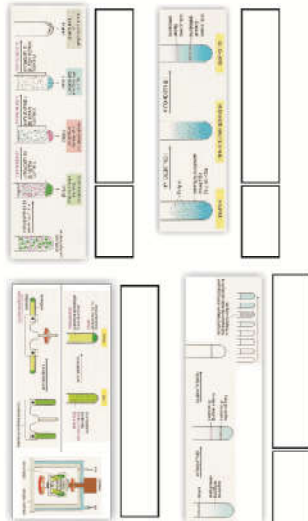
πως αυτού του είδους η παράδοση, κρατάει το ενδιαφέρον των μαθητών ζωνρό σε όλη τη διάρκεια του μαθήματος. Ιδανικό θα ήταν η παράδοση να συνδυάζεται από μια παρουσίαση (τύπου PowerPoint ή Prezi) και από βίντεο, από τα πολλά που υπάρχουν στο διαδίκτυο για το θέμα μας.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

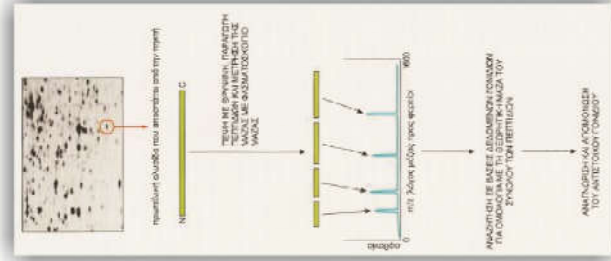
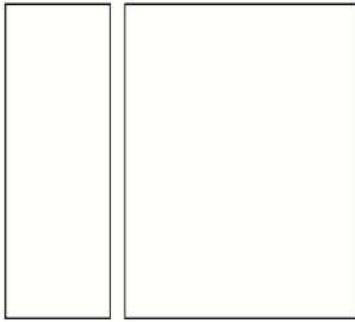
Απομόνωση πρωτεϊνών σε Καθαρή Μορφή



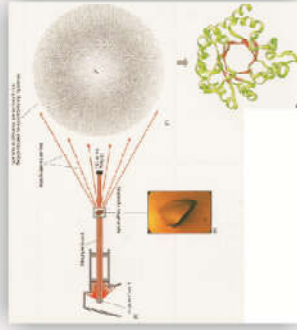
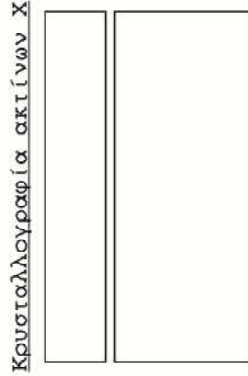
φυγοκέντριση



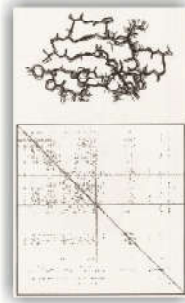
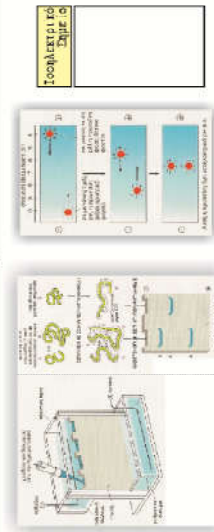
Ταυτοποίηση πρωτεϊνών



Δομική Ανάλυση πρωτεϊνών



Ηλεκτροφόρηση



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 2^ο Θέματος

1. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης.*; Τόμος Ι Κεφ.4, σελ. 143-144, 2006
2. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης.*; Τόμος Ι Κεφ.4, σελ. 190, 2006
3. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης.*; Τόμος Ι Κεφ.4, σελ. 155-157, 2006
4. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης.*; Τόμος Ι Κεφ.4, σελ. 192-195, 2006
5. Experimental Biosciences Resources, Biuret Protein Assay. *Rice University, Houston, USA*
([link](#))



Θέμα 3

Η τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA: Αρχές και σύγχρονες εφαρμογές

Αρχές¹

Η τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA (*Γενετική Μηχανική*) είναι η κατασκευή τεχνητών γονιδιωμάτων και η αξιοποίησή τους για την παρασκευή ποσοτήτων ζωικών προϊόντων (βασικά πρωτεϊνών), τη θεραπεία ασθενειών, τη βελτίωση προϊόντων φυτικών οργανισμών, κ.α. Ξεκινώντας από την ανακάλυψη της δομής του DNA το 1953 και φτάνοντας στο 1972, βλέπουμε τους P. Berg et al. να δημιουργούν in vitro ένα γονιδίωμα που περιείχε περιοχές από το γονιδίωμα του λ φάγου και του ζωικού ιού SV40. Ήταν η γέννηση της *τεχνολογίας του ανασυνδυσμένου DNA*.

Τα Εργαλεία της Τεχνολογίας του Ανασυνδυσμένου DNA

☛ Φορείς του γονιδίου ή τμήματος του DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε:

Για να μελετήσουμε ένα γονίδιο ή τμήμα του γονιδιώματος, πρέπει πρώτα να το εντοπίσουμε και στη συνέχεια να το αναπαράγουμε σε τέτοια έκταση ώστε να είναι εφικτός ο χειρισμός του. Η διαδικασία ονομάζεται μοριακή κλωνοποίηση. Για να γίνει θα πρέπει το κομμάτι να εισαχθεί σ' ένα κύτταρο και αυτό, αξιοποιώντας τον μηχανισμό αντιγραφής να το αναπαράγει σε πολλά αντίγραφα. Για να γίνει η εισαγωγή, ενσωματώνουμε το κομμάτι σε κάποιο φορέα (vector).

Ο φορέας θα πρέπει:

- να έχει πρόσβαση σε έναν ξενιστή χωρίς να ενσωματώνεται στο γονιδιώμα του,
- να διαθέτει εναρκτήρια περιοχή,
- να προσδίδει ιδιότητες στον ξενιστή ώστε εμείς να τον ξεχωρίζουμε,
- το γονιδιώμα του να περιέχει κάποια περιοχή, όχι τελείως απαραίτητη για τον ίδιο (τον φορέα), ώστε να κοπεί και να αντικατασταθεί από το τμήμα του DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε.

Εναλλακτικά ψάχνουμε για έναν φορέα που μπορεί να δεχτεί ένα επιπλέον κομμάτι DNA, χωρίς να απολέσει την ικανότητά του να αναπυχθεί μέσα στον ξενιστή. Τέτοιοι φορείς είναι τα πλασμίδια (μπορούν να δεχθούν τμήματα DNA έως και 15 kbp), τα κοσμίδια και οι ιοί.

☞ Ξενιστές Φορέων Κλωνοποίησης:

Είναι τα κύτταρα που δέχονται τους, ή προσβάλλονται από τους, φορείς. Οι ιογενείς φορείς (όπως οι φάγοι) αναγνωρίζουν ως ξενιστές κύτταρα με τους κατάλληλους υποδοχείς. Οι πλασμιδικοί φορείς αναγνωρίζουν ως ξενιστές μόνο κύτταρα οργανισμών από τους οποίους προέρχονται (ή έχουν μεγάλη συγγένεια). Εξαιρέση αποτελούν τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια (που αναγνωρίζουν κύτταρα από σχετικά πολλούς οργανισμούς).

☞ Εργαλεία που χρησιμοποιούμε στις διαδικασίες κλωνοποίησης:

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA στηρίζεται εν πολλής στην αξιοποίηση κάποιων ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση και διάσπαση του DNA (αλλά και του RNA). Χωρίς τη γνώση της δομής και της λειτουργίας αυτών των ενζύμων, δεν θα είχαμε αυτή την τεχνολογία. Αυτά τα ένζυμα είναι:

☞ DNA Πολυμεράσες: ένζυμα που συνθέτουν DNA με τη χρήση ενός DNA εκμαγείου και ενός εκκινητή DNA ή RNA στο 3' άκρο. Συνθέτουν DNA με κατεύθυνση 5'→3' και αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική αυτής του DNA εκμαγείου. Έχουν συνήθως και δράση εξωνουκλεάσης (υδρολύουν με κατεύθυνση 3'→5').

☞ Αντίστροφες Τρανσκριπτάσες: πρόκειται για πολυμεράσες που απαιτούν ως εκμαγείο μόριο RNA. Συνθέτουν δηλαδή DNA, συμπληρωματικό ενός RNA. Τις συναντάμε στους ρετροϊούς.

☞ DNA Λιγάσες: ένζυμα που ενώνουν γειτονικά τμήματα του DNA. Απαιτούν έναν συμπαράγοντα που μπορεί να είναι είτε το NAD⁺ (το οποίο διασπάται σε NMP⁺ και AMP), είτε το ATP (το οποίο διασπάται σε AMP και πυροφωσφορικό). Η πιο γνωστή (ευρέως χρησιμοποιούμενη) λιγάση είναι αυτή που κωδικεύεται από το γονίδιο του ιού T4.

☞ Ακραίες Τρανσφεράσες: είναι DNA πολυμεράσες που δεν χρειάζονται εκμαγείο. Επιμηκύνουν την DNA αλυσίδα προς το 3' άκρο προσθέτοντας δεοξυμονο-νουκλεοτίδια που παίρνουν από τριφωσφορικούς εστέρες που βρίσκουν στο περιβάλλον.

☞ S₁ Νουκλεάση: γενική νουκλεάση που υδρολύει και το RNA και το DNA. Εξειδικεύεται στις μονόκλωνες περιοχές (εσωτερικές ή άκρα) και δίνει μονο-νουκλεοτίδια. Σταματάει τη δράση της όταν φτάσει σε δίκλωνη περιοχή.

☞ Περιοριστικές Ενδονουκλεάσες: ένζυμα που μπορούν να κόψουν το DNA (και πλασμίδια, κοσμίδια, κλπ) σε σχετικά μεγάλα τμήματα, που θα είναι επαναλαμβανόμενα με συγκεκριμένα (όχι τυχαία) άκρα. Η συχνότητα με την οποία μια ενδονουκλεάση

υδρολύει το DNA, υφίσταται εκθετική μείωση σε σχέση με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία στην οποία είναι εξειδικευμένη.

Μοριακή Κλωνοποίηση

➤ Κατασκευή τμημάτων DNA ή γονιδίων που θα κλωνοποιηθούν:

Φυσικές πηγές γονιδίων είναι: **α)** το **γονιδίωμα** του ίδιου του οργανισμού, όπου όμως υπάρχει το πρόβλημα των “άχρηστων” ιντρονίων (περιοχών του DNA, χωρίς πληροφορία) και **β)** το **mRNA** που κωδικεύει το τελικό προϊόν του γονιδίου, όπου επειδή δεν ενσωματώνεται με το DNA, θα πρέπει πρώτα να αντιγραφεί σε **cDNA**, το οποίο θα πάει για κλωνοποίηση.

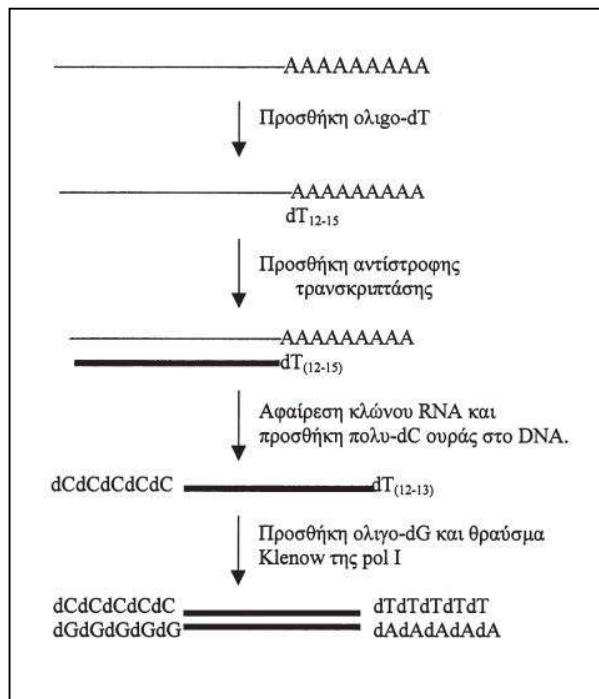
❖ Παρασκευή θραυσμάτων χρωμοσωμικού DNA που μπορούν να κλωνοποιηθούν:

γίνεται πέψη του χρωμοσωμικού DNA με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο (ή και συνδυασμούς ενζύμων). Όσο πιο μεγάλη η αλληλουχία νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζει το ένζυμο, τόσο μεγαλύτερα θραύσματα προκύπτουν. Αλλά αν τα θραύσματα είναι πολύ μεγάλα, τότε δεν θα υπάρχουν φορείς για να ανασυνδυαστούν.

❖ Παρασκευή cDNA: προκειμένου να κλωνοποιήσουμε ένα ενεργό γονίδιο (ή ένα μέρος του) μπορούμε να κατασκευάσουμε συμπληρωματικό DNA (δηλαδή cDNA), ως αντίγραφο μορίων mRNA. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- ♦ απομονώνουμε το συνολικό RNA από τον ιστό (τμήμα του είναι το mRNA που μας ενδιαφέρει),
- ♦ τοποθετούμε το RNA σε δοχείο με ολιγο-dT και τότε μόνο το mRNA θα υβριδοποιηθεί με το ολιγο-dT και θα διαχωριστεί,
- ♦ απελευθερώνουμε το mRNA από το αδιάλυτο υπόστρωμα,
- ♦ στο διάλυμα του mRNA προσθέτουμε ολιγο-dT που υβριδοποιείται με την πολύ-A ουρά,
- ♦ προσθέτουμε αντίστροφη τρανσκριπτάση, η οποία χρησιμοποιώντας ως εκκινήτη το ολιγο-dT, συνθέτει DNA, συμπληρωματικό του mRNA,
- ♦ καταστρέφουμε το RNA με αλκάλι ή με κατάλληλη ριβονουκλεάση,
- ♦ προσθέτουμε στο 5' άκρο του cDNA, ουρά από dC ή dG,
- ♦ συμπεριλαμβάνουμε την αντίδραση ολιγο-dG ή ολιγο-dC αντίστοιχα, ώστε να υβριδιστεί με την ουρά του 5' άκρου,

♦ αντιγράφουμε τον κλώνο του cDNA σε έναν νέο κλώνο DNA με το θραύσμα Klenow της polI, που έχει την ίδια αλληλουχία νουκλεοτιδίων με το αρχικό μόριο mRNA.



Διαγραμματική αναπαράσταση σύνθεσης δίκλωνου μορίου cDNA. Με λεπτές γραμμές το RNA και με πλατιές το DNA. Υποστρώματα ενζύμων δεν έχουν συμπεριληφθεί.

➤ Η διαδικασία της κλωνοποίησης:

❖ **Μετασηματισμός:** διαδικασία κατά την οποία ενσωματώνουμε το ξένο DNA στο γενετικό υλικό κάποιου φορέα, ο οποίος μπορεί να πολλαπλασιάζεται μέσα σε κάποιον ξενιστή. Έτσι υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες, ο ξενιστής να αναγνωρίσει το ξένο DNA. Θα πρέπει όμως τόσο το ξένο DNA (που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε) όσο και το DNA του φορέα να προετοιμαστούν κατάλληλα. Αυτό γίνεται με ταυτόχρονη υδρόλυση, με το ίδιο ένζυμο περιορισμού, του γονιδίου που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε, με τον φορέα του. Η ανάμιξη των δύο υδρολυμάτων θα μας δώσει μόρια (υβρίδια) που θα οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των άκρων του φορέα και των άκρων του DNA. Με πρόσθεση DNA λιάσης, θα αποκατασταθούν οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί και θα προκύψει ένα ανασυνδυασμένο μόριο. Αυτό θα πρέπει να εισαχθεί σε ένα επιδεικτικό κύτταρο, τον ξενιστή, όπου θα πολλαπλασιαστεί. Με κατάλληλους χειρισμούς παίρνουμε είτε ποσότητες του προϊόντος του γονιδίου, είτε ποσότητες του ίδιου του γονιδίου.

❖ **Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**: μέθοδος in vitro κλωνοποίησης του DNA με την προϋπόθεση της γνώσης της αλληλουχίας λίγων νουκλεοτιδίων σε καθένα από τα άκρα του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει. Με λίγα λόγια η μέθοδος έχει ως εξής:

- ♦ θερμαίνουμε το δίκλωνο γονιδίωμα για να γίνει μονόκλωνο,
- ♦ προσθέτουμε ολιγονουκλεοτίδια με συμπληρωματικές αλληλουχίες των άκρων του τμήματος που μας ενδιαφέρει,
- ♦ έχουμε υβριδισμό των νουκλεοτιδίων με τις συμπληρωματικές άκρες του τμήματος του DNA,
- ♦ προσθέτουμε DNA πολυμεράση,
- ♦ τα υβριδισμένα νουκλεοτίδια θα λειτουργήσουν σαν εκκινητές για τη σύνθεση νέων κλώνων,
- ♦ θερμαίνουμε πάλι το διάλυμα και το αρχικό και το νέο DNA γίνονται μονόκλινα,
- ♦ όταν το διάλυμα ψυχθεί, οι εκκινητές θα υβριδιστούν ξανά, και στα αρχικά, αλλά και στα νέα DNAs,
- ♦ προσθέτουμε νέα πολυμεράση,
- ♦ συνεχίζουμε και επαναλαμβάνουμε την προηγούμενη διαδικασία, σε νέο/ους κύκλο/ους.

Ο λόγος που συνεχώς προσθέτουμε πολυμεράσες είναι γιατί αυτές καταστρέφονται με τις εναλλαγές της θερμοκρασίας. Όμως τελευταία χρησιμοποιούνται θερμοάντοχες πολυμεράσες και δεν χρειάζεται να προσθέτουμε νέες σε κάθε κύκλο. Επίσης σύγχρονα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές) επαναλαμβάνουν αυτόματα τη διαδικασία, ανάλογα με το εκάστοτε πρωτόκολλο.

Αν αντί πολυμεράσης, βάλουμε αντίστροφη τρανσκριπτάση, πολλαπλασιάζουμε και μόρια RNA υπό τη μορφή cDNA.

Γενετικές Βιβλιοθήκες

Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και των τεχνικών που περιγράψαμε παραπάνω, φτιάχνουμε “βιβλιοθήκες” μορίων DNA στις οποίες αποθηκεύουμε γενετικές πληροφορίες. Η αρχή κατασκευής μιας βιβλιοθήκης είναι η εξής: ετοιμάζουμε με κατάλληλα άκρα, θραύσματα γονιδιώματος ή cDNA και τα μεταφέρουμε σε κατάλληλους φορείς. Με τους φορείς μετασχηματίζουμε κατάλληλους ξενιστές (συνήθως E.coli ή ζύμες). Διατηρούμε στη συνέχεια τις αποικίες που δημιουργούνται για όσο καιρό θέλουμε (έως και επ’ άπειρον!). Οι γενετικές βιβλιοθήκες είναι δύο ειδών:

❖ **Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες:** περιέχουν θραύσματα DNA από το σύνολο ενός γονιδιώματος. Συνήθως φορές είναι ο λ φάγος και ξενιστής το E.coli.

❖ **cDNA Βιβλιοθήκες:** περιέχουν τα cDNAs ενός οργανισμού, ιστού ή κυτταροκαλλιέργειας (δίκλινα DNA αντίγραφα των mRNAs). Κάνουμε χρήση των ίδιων φορέων με αντίστοιχα κατάλληλα συμπληρωματικά άκρα (και του cDNA και του DNA των φορέων). Περιέχουν μόνο εξόνια (λειτουργικές περιοχές) και όχι οπωσδήποτε το γονίδιο σε όλο του το μήκος.

Για την αναγνώριση των γονιδίων μέσα στις βιβλιοθήκες έχουμε διάφορες τεχνικές: εκμεταλλευόμαστε τις ιδιότητες που δίνει το γονίδιο στον ξενιστή, σημαίνουμε (ραδιενεργά ή φθορίζοντα) συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια και τα εισάγουμε στη βιβλιοθήκη ή αναπτύσσουμε αντισώματα απέναντι στο πρωτεϊνικό προϊόν και αλληλεπιδρούμε με το αποτύπωμα στο φίλτρο.

Εφαρμογές^{2,3}

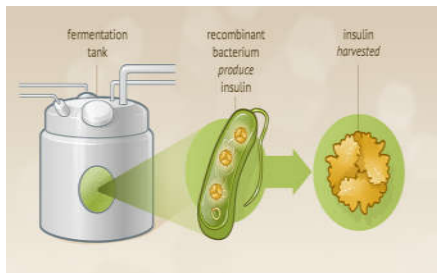
Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA βρίσκει εφαρμογές σε ιατρική, βιομηχανία, προστασία περιβάλλοντος, γεωργία και κτηνοτροφία. Μετά το '70 η πρόοδος της βιοτεχνολογίας υπήρξε αλματώδης. Ο ανασυνδυασμός του DNA δημιούργησε με ακρίβεια και αποδοτικότητα οργανισμούς με νέες ιδιότητες και ο νέος κλάδος της μοριακής βιολογίας βοήθησε σε όλες τις προαναφερθείσες περιπτώσεις. Ορισμένες από τις εφαρμογές είναι:

❶ **Θεσηκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (SDM):** αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου με ένα άλλο, σε συγκεκριμένη θέση του γονιδίου. Αν η αντικατάσταση γίνει σε κωδικεύουσα περιοχή, όταν εκφραστεί το γονίδιο, αντικαθίσταται και ένα αμινοξύ με ένα άλλο. Αυτό γίνεται σε συγκεκριμένη περιοχή του πρωτεϊνικού προϊόντος, του γονιδίου. Έτσι έχουμε τη δυνατότητα μελέτης της συμβολής του αμινοξέος στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Με κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου (και έκφρασή του) παίρνουμε μεταλλαγμένο ένζυμο, το οποίο και μελετάμε ως προς την αποδοτικότητά του, ή ως προς άλλες ιδιότητες (θερμική αντοχή, αντοχή pH, κ.α.) Αν μας ικανοποιεί μπορούμε να το εκμεταλλευτούμε, ακόμη και εμπορικά.

❷ **Τρανσγονιδίωση:** εισαγωγή ξένων γονιδίων σε φυτά ή ζώα με σκοπό τη δημιουργία νέων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Στα φυτά χρησιμοποιείται κυρίως ένα πλασμίδιο που

υπάρχει στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* ως φορέας για την παρεμβολή του επιθυμητού γονιδίου στο γονιδίωμα του φυτού – ξενιστή. Στα ζώα τον ρόλο αυτό τον παίζουν συνήθως ρετροϊοί (μεταλλαγμένοι, ώστε να μη πολλαπλασιάζονται).

Τα τροποποιημένα, με αυτή την τεχνική, φυτά και ζώα έχουν ως κύρια εφαρμογή τους την παραγωγή πρωτεϊνών για τον άνθρωπο, διαδικασία που διεθνώς ονομάζεται *bio pharming*. Η διαδικασία είναι “απλή”: ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με μεγάλη σημασία για την ανθρώπινη υγεία, κλωνοποιούνται και εισάγονται



σε μη ανθρώπινα κύτταρα – ξενιστές (με μεταφορά σωματικών κυττάρων ή με μικροέγχυση). Κλασικά παραδείγματα της παραπάνω διαδικασίας είναι η παραγωγή ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης από γενετικά τροποποιημένους ποντικούς και η παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης από βακτήρια.

❶ **Ανίχνευση ανωμαλιών γονιδίων:** γνωρίζοντας τη δομή ενός γονιδίου, συνθέτουμε ολιγονουκλεοτίδια που είναι συμπληρωματικά ορισμένων περιοχών του. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια, τα χρησιμοποιούμε ως ιχνηθέτες για την ανίχνευση του γονιδίου (ή μέρους αυτού), όταν το έχουμε καθηλώσει σε ένα φίλτρο.

Έστω λοιπόν ότι υπάρχει υποψία για κάποια γενετική ανωμαλία σε ένα έμβryo. Ακολουθούμε την εξής διαδικασία: αφαιρούμε κύτταρα από το έμβryo, απομονώνουμε το DNA και το υποβάλλουμε σε **ανάλυση κατά Southern**:

- πέπουμε το DNA με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα,
- ηλεκτροφορίζουμε το υδρόλυμα σε κατάλληλο μέσο,
- τα προϊόντα της υδρόλυσης κατανέμονται ανάλογα με το MB τους, μεταφέρονται με αποτύπωση και κολλάνε σε πλαστικό φίλτρο,
- εμβαπτίζουμε το φίλτρο διάλυμα με τον ραδιενεργό ιχνηθέτη,
- όπου (και αν) υπάρχει το τμήμα του γονιδίου που μας ενδιαφέρει, εμφανίζεται ραδιενεργός ζώνη.

Επειδή κάθε γονίδιο παρουσιάζει μια συγκεκριμένη κατανομή στα προϊόντα της υδρόλυσής του, με ένα συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο, οποιαδήποτε μεταβολή της κατανομής αυτής, είναι δείγμα ύπαρξης ανώμαλου γονιδίου.

④ **Αντίστροφη Γενετική**⁴: η παραδοσιακή Γενετική για την μελέτη ενός γονιδίου περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- ♦ ανακάλυψη ενός διαφορετικού (μεταλλαγμένου) φαινότυπου,
- ♦ τρόπος κληρονόμησης γνωρίσματος,
- ♦ προσδιορισμός μεταλλαγμένου αλληλόμορφου,
- ♦ χαρτογράφηση γονιδίου
- ♦ κλωνοποίηση γονιδίου
- ♦ αλληλούχιση των βάσεων του DNA του,
- ♦ προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων, της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το γονίδιο.

Το ανασυνδρασμένο DNA μας δίνει τη δυνατότητα της αντίστροφης διαδικασίας (αντίστροφη Γενετική), μεθοδολογίας που είναι απαραίτητη στη Γενετική Μηχανική.

Αρχίζουμε με το τελικό προϊόν (πρωτεΐνη ή κομμάτι DNA), χωρίς να ξέρουμε τι κάνει, χωρίς δηλαδή να έχουμε καμία γενετική πληροφορία. Το κλωνοποιημένο κομμάτι DNA μπορεί να είναι ORF (ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο) άγνωστης λειτουργίας ή να είναι cDNA, από αντίστροφη μεταγραφή. Αν έχουμε άγνωστης λειτουργίας πρωτεΐνη, η σειρά των αμινοξέων μεταφράζεται σε ακολουθία βάσεων DNA, η οποία στη συνέχεια συντίθεται in vitro. Η κλωνοποιημένη αλληλουχία DNA τελικά, χρησιμοποιείται ως ιχνηθέτης για την ανίχνευση του αντίστοιχου γονιδίου. Αυτό κλωνοποιείται και αφού μεταλλαχθεί in vitro, εισάγεται σε κανονικό δέκτη, ώστε να ελέγξουμε το φαινοτυπικό του αποτέλεσμα σε ετεροζυγωτική ή σε ομοζυγωτική κατάσταση.

Πολυάριθμα, άγνωστης λειτουργίας, ORFs έχουν ανακαλυφθεί με την ολοκλήρωση των προγραμμάτων ολικής αλληλούχισης του γονιδιώματος του ανθρώπου (και άλλων ανώτερων οργανισμών). Αυτό μας δείχνει ότι η μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος δεν τελειώνει με την αλληλούχισή του. Αντίθετα αποτελεί το πρώτο βήμα, που θα μας δώσει τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε όλα τα γονίδια και να εξακριβώσουμε ποιοι πολυμορφισμοί μέσα σ' αυτά είναι “βλαβεροί” και ποιοι “όχι”. Έτσι θα μπορέσουμε να τα χρησιμοποιήσουμε για (γενετική) θεραπεία ή/και πρόγνωση.

⑤ **Προστασία Περιβάλλοντος**⁵: στις σύγχρονες “πολιτισμένες” κοινωνίες είναι γνωστή η πρακτική διαχείρισης των αστικών και βιομηχανικών λημμάτων. Μονάδες βιολογικού καθαρισμού χρησιμοποιούν τεχνικές που σχετίζονται με την τεχνολογία του ανασυνδρασμένου DNA: χρησιμοποιούν κατάλληλα ένζυμα και γενετικά τροποποιημένους

μικροοργανισμούς ώστε να βιοδιασπάσουν τα οργανικά τμήματα των αποβλήτων, γρήγορα και με ακρίβεια. Φυσικά η κλασική Γενετική είναι επίσης παρούσα στις διαδικασίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 3^ο Θέματος

1. Γεωργάτσος Ι. Μοριακή Βιολογία. *Εκδόσεις ΕΑΠ.*; Κεφ.10, σελ. 209-226, 2001
2. Γεωργάτσος Ι. Μοριακή Βιολογία. *Εκδόσεις ΕΑΠ.*; Κεφ.10, σελ. 228-229, 2001
3. Primrose SB, Twyman RM. Principles of Gene Manipulation and Genomics, *Blackwell Publishing*; σελ. 509, 2006
4. Γιαννόπουλος Γ. Γενετική. *Εκδόσεις ΕΑΠ.*; Τόμος Α' Κεφ.12, σελ. 309, 2001
5. Αλέπορου-Μαρίνου Β, Αργυροκαστρίτης Α, Κομητοπούλου Αι, Πιαλόγλου Π, Σγουρίτσα Β. Βιολογία Γ' Λυκείου Θετικής κατεύθυνσης. *Εκδόσεις ΙΤΥΕ Διόφαντος.*; Κεφ. 4, σελ. 61, 2014-15



Θέμα 4

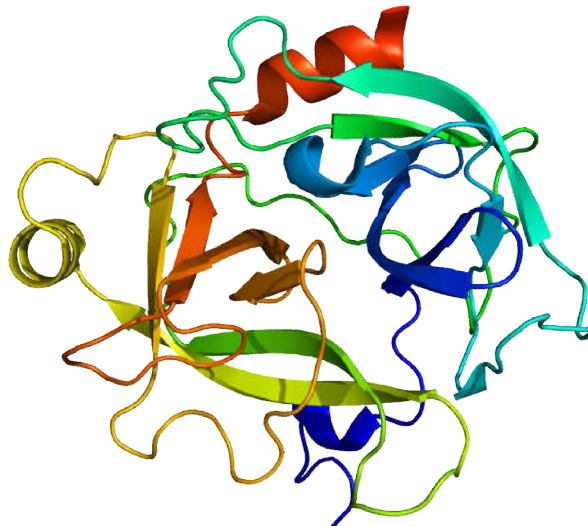
Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένα ανθρώπινο γονίδιο, στο οποίο ένας πολυμορφισμός του, πιθανόν εμπλέκεται στη νόσο Alzheimer. Να γραφεί μια ερευνητική εργασία στην οποία θα αναλυθούν οι τρόποι και οι μεθοδολογίες που θα επιτρέψουν τη μελέτη του συγκεκριμένου γονιδίου στον ελληνικό πληθυσμό

«Ερευνητική Πρόταση»

Τίτλος:

Ανάλυση της έκφρασης και μελέτη του γονιδίου KLK6 η νόσο Alzheimer στον ελληνικό πληθυσμό.

**Επιστημονικός Υπεύθυνος
Αναστάσιος Νέζης**



Σαλαμίνα 2016

1. Περίληψη-στόχοι

Σύμφωνα με την εργασία¹ των M. Zarghooni et al. η πρωτεάση σερίνης hK6 κωδικοποιείται από το γονίδιο Καλλικρεΐνη 6 (KLK6) και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Σημαντικός αριθμός ασθενών με Alzheimer επιβεβαιώνει ότι τα επίπεδα της hK6 στον εγκέφαλό τους, είναι περίπου στο 1/3 σε σύγκριση με υγιή άτομα – ελέγχου. Η μείωση παρατηρείται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (ινιακός, βρεγματικός, μετωπιαίος και κροταφικός λοβός).

Δεν γνωρίζουμε όμως αν η μείωση είναι αποτέλεσμα παθογένειας ή συνέπεια της νόσου Alzheimer. Ο ρόλος πολλών πρωτεασών στην παθογένεση και εξέλιξη της νόσου είναι κοινώς αποδεκτός.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η hK6 σχετίζεται με τη νόσο και στο παρελθόν έχουν εξεταστεί οι εκφράσεις όλων των KLKs στον εγκεφαλικό ιστό δείχνοντας ότι τουλάχιστον 11 από αυτές, τελικά, εκφράζονται εκεί. Είναι πολύ πιθανό ότι η hK6 και άλλες καλλικρεΐνες, έχουν βιολογική λειτουργία στον ιστό αυτό.

Θα είναι χρήσιμο να γίνει περαιτέρω μελέτη της βιολογικής σημασίας της hK6 στον εγκέφαλο των ασθενών με Alzheimer και να αναπτυχθεί ένα βελτιωμένο μοντέλο ανοσοδοκιμασίας για την ανθρώπινη καλλικρεΐνη 6 ώστε να καταδειχθούν οι μειώσεις στη συγκέντρωση του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα ερευνητική πρόταση προτιθέμεθα να μελετήσουμε έναν σημαντικό αριθμό ασθενών από νοσοκομεία των Αθηνών και της Θεσσαλονίκης και να εξάγουμε στατιστικά χρήσιμα συμπεράσματα για τη σχέση της hK6 (ως δείκτης) με τη νόσο, στον Ελληνικό πληθυσμό.

2. Υπάρχουσα γνώση - σκοπός και αντικείμενο της πρότασης - προσδοκώμενο τελικό αποτέλεσμα

Σύμφωνα με την εργασία¹ των M. Zarghooni et al. το ανθρώπινο γονίδιο Καλλικρεΐνη 6 (KLK6) κωδικοποιεί μια εκκρινόμενη πρωτεάση σερίνης, την hK6, η οποία εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στον εγκέφαλο. Παλαιότερες μελέτες συνδέουν την hK6 με την παθογένεση της νόσου Alzheimer.

Στα θηλαστικά, οι πρωτεάσες σερίνης εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες, όπως πήξη (coagulation), ινωδολύση (fibrinolysis), πέψη, ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση ορμονών, υποδοχείς, κυτοκίνες, κ.α. Η οικογένεια του ανθρώπινου γονιδίου της Καλλικρεΐνης αποτελείται από 15 γονίδια πρωτεάσης σερίνης (KLK1...KLK15) που μοιράζονται σημαντική ομοιότητα αλληλουχίας στο DNA και στο επίπεδο των αμινοξέων (40-80%). Πολλά από αυτά τα γονίδια ρυθμίζονται από στεροειδείς ορμόνες.

Το γονίδιο KLK6 κωδικοποιεί την πρωτεάση σερίνης hK6, η οποία έχει αναγνωριστεί από πολλά εργαστήρια ως ζύμη, πρωτεάση M ή neurosin. Η hK6 συντίθεται ως ανενεργό ζυμογόνο και μετατρέπεται σε δραστικό ένζυμο με διάσπαση μεταξύ Lys21 και Leu22. Το γονίδιο εκφράζεται εντόνως στον εγκεφαλικό ιστό, στην παρεγκεφαλίδα και στον νωτιαίο μυελό. Επίσης στα νεφρά, στον σπλήνα, στον ιστό του μαστού και στους σιελογόνους αδένες. Οι εγκεφαλικές πρωτεάσες σερίνης εμπλέκονται εκτός άλλων (συναπτική πλαστικότητα, αναπτυξιακές διαδικασίες, έκφυση νευριτών) και σε νευρολογικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης και της νόσου Alzheimer.

Οι διαταραχές αυτές μπορεί να προκαλούνται από τη πρωτεολυτική διάσπαση των ζυμογόνων προδρόμων και προπεπτιδίων, την ενεργοποίηση ειδικών υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων ή/και στην υποβάθμιση των εξωκυτταρικών μητρικών (matrix) πρωτεϊνών.

Η hK6 έχει προταθεί να έχει αμυλοειδογονική δυνατότητα στον εγκέφαλο και ίσως να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και πρόοδο της νόσου Alzheimer με διάσπαση APP (πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς) κατά μήκος της αμυλοειδογονικής οδού.

Τέσσερα γονίδια έχουν (έως σήμερα) ενοχοποιηθεί για τις οικογενείς μορφές της νόσου. Τρία από αυτά (όταν είναι μεταλλαγμένα) προκαλούν αυτοσωμικές κυρίαρχες μορφές της νόσου (β APP, πρεσενιλίνη 1 & 2) και ένα προκαλεί φυσικό πολυμορφισμό (ApoE4) και αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου. Το ApoE σχετίζεται με την όψιμη έναρξη της νόσου, ενώ τα άλλα τρία γονίδια σχετίζονται με εξαιρετικά πρόωμη έναρξη. Παρ' όλη τη γενετική ετερογένεια, και τα τέσσερα γονίδια έχει δειχθεί ότι αυξάνουν την παραγωγή ή/και απόθεση του β -αμυλοειδούς πεπτιδίου στον εγκέφαλο, προκαλώντας νευρωνικό εκφυλισμό που σχετίζεται με τη νόσο Alzheimer.

Το παθολογικό σήμα κατατεθέν της νόσου είναι η εναπόθεση (deposition) αμυλοειδούς στα εγκεφαλικά αγγεία, η διάχυση των νευριτικών πλακών (εντός του εξωκυτταρικού χώρου του εγκεφάλου) και τα νευροϊνιδιακά μπερδέματα (μέσα στους νευρώνες). Οι περιοχές που πλήττονται περισσότερο είναι ο ιπόκαμπος και ο εγκεφαλικός φλοιός. Στην παθογένεση της νόσου πιστεύεται ότι εμπλέκεται η απορυθμισμένη έκφραση ή η ανώμαλη επεξεργασία της APP.

Τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανιστεί δύο βιοχημικοί δείκτες από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Αυξημένα επίπεδα CSF-tau και μειωμένα επίπεδα CSF της $A\beta_{42}$, είναι καλοί δείκτες για τη νόσο. Απ' ευθείας μετρήσεις των ισόμορφων $A\beta$ σε εγκεφαλικό ιστό νεκρών ασθενών με presenilin 1, συνδέονται με την οικογενή μορφή της νόσου. Επίσης παρουσιάζουν

σημαντικές αυξήσεις του ποσού της Αβ₄₂ σε σχέση με εγκεφαλικό ιστό δειγμάτων ελέγχου, από ασθενείς με σποραδική νόσο Alzheimer.

Όμως οι δείκτες που έχουν μέχρι τώρα προταθεί δεν χαίρουν καθολικής αποδοχής, ή καλύτερα δεν πληρούν όλα τα κριτήρια για έναν ιδανικό βιοδείκτη. Στόχος της έρευνας είναι η ανάπτυξη μιας ανοσοδοκιμής και η εξέταση και σύγκριση των επιπέδων της πρωτεΐνης στον εγκεφαλικό ιστό ασθενών της νόσου και υγιών δειγμάτων ελέγχου. Η πρόβλεψη είναι ότι η hK6 και άλλες πρωτεΐνες σερίνης, της οικογένειας της Καλλικρεΐνης, παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου του Alzheimer.

3. Επιλεγμένη Βιβλιογραφία

1. Zarghooni M, Soosairpillai A, Grass L, Scorilas A, Mirazimi N, Diamandis EP. Decreased concentration of human kallikrein 6 in brain extracts of Alzheimer's disease patients. *Clin Biochem.*; 35(3): 225-31, 2002 ([link](#))

4. Μεθοδολογία

Σύμφωνα με την προαναφερθείσα δημοσίευση (στην οποία υπάρχουν όλες οι λεπτομέρειες), επιγραμματικά η μεθοδολογία έχει ως εξής:

1. Παραγωγή και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης hK6 πρωτεΐνης (από ανθρώπινα εγκεφαλικά κύτταρα)
2. Παραγωγή και χαρακτηρισμός μονόκλωνων αντισωμάτων (από θηλυκά ποντίκια Balb/c)
3. Καθαρισμός των μονόκλωνων αντισωμάτων anti-hK6
4. Ανάπτυξη πολύκλωνων αντισωμάτων έναντι της ανασυνδυασμένης hK6 (από κουνέλια)
5. Ανοσοφθορομετρικός προσδιορισμός hK6 (με τυπική διαδικασία προσδιορισμού)
6. Χαρακτηριστικά προσδιορισμού:
 - i. Προσδιορισμός ορίου αντίδρασης
 - ii. Γραμμικότητα
 - iii. Συγκριτική μελέτη
 - iv. Ανάκτηση, ακρίβεια, διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (cross reactivity)
7. Κλινικά δείγματα: θα χρησιμοποιηθούν περίπου 500 εγκεφαλικοί ιστοί ασθενών με Alzheimer και 250 επιπλέον από άτομα ίδιας ηλικίας χωρίς Alzheimer, ως δείγματα ελέγχου. Τα δείγματα θα παρθούν, σύμφωνα με την κείμενη νομοθεσία από

νοσοκομεία της Αθήνας και της Θεσσαλονίκης, απ' όπου και θα έχουμε και το ιστορικό των ασθενών. Η αποθήκευση (μέχρι τη μελέτη του καθενός) θα γίνει στους -80 °C.

8. Κυτοσολικά εκχυλίσματα ανθρώπινων ιστών
9. Συνολικός προσδιορισμός πρωτεΐνης
10. Στατιστική ανάλυση:
 - i. Λογισμικό SAS Institute, Cary, NC
 - ii. Κατανομές hK6: μη παραμετρικά τεστ Mann-Whitney και Kruskal Willis
 - iii. Σχέσεις hK6 – ηλικίας: συντελεστής συσχέτισης Spearman
 - iv. Στατιστικά σημαντική τιμή για p: μικρότερη του 0,05.

5. Προϋπολογισμός

Διάρκεια: **24 μήνες**

Για την εκτέλεση του προτεινόμενου ερευνητικού έργου θα εφαρμοστούν αρκετές μοριακές τεχνικές και θα χρειαστούν αρκετά αναλώσιμα εργαστηρίου καθώς και υποστηρικτικά επιστημονικά όργανα. Επιπλέον θα απαιτηθεί πρόσληψη επιστημονικού και βοηθητικού προσωπικού καθώς και έξοδα συνεδρίων.

Ποιο συγκεκριμένα θα απαιτηθούν :

A. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ (40000 €)

Θα απαιτηθούν:

Θερμικός κυκλοποιητής (συμβατικό PCR) (5000€), συσκευές ηλεκτροφορήσεως (2000€), καταψύκτης -80°C (8000€), συσκευή υγρού αζώτου (5000€), φασματοφωτόμετρο UV/VIS (8000€), ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης ηλεκτροφορημάτων (3000€), ζυγός ακριβείας (3000€), αναδευτήρες, H/Y και άλλα μικροόργανα (6000€). Εκτιμώμενο συνολικό κόστος: 40000€

B. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ (35000 €)

Θα χρειαστούν βιολογικά και χημικά αντιδραστήρια (Ένζυμα, primers, probes) RNA, DNA extraction and RT-PCR kits, χημικά αντιδραστήρια (διαλύτες, οργανικές ουσίες), πλαστικά υλικά μιας χρήσης (πιπέττες, tips, πλαστικά ELISA, tubes, γάντια κτλ), υλικά ηλεκτροφόρησης, software, χαρτική ύλη, υλικά HY. Το κόστος τους, για όλη τη διάρκεια του προγράμματος, θα ανέλθει στα 35.000 €.

ΕΙΔΟΣ	Ενδεικτικές Τιμές σε €
Αναλώσιμα/ Αντιδραστήρια	
βιολογικά και χημικά αντιδραστήρια (Ένζυμα, primers, probes, διαλύτες, οργανικές ουσίες, αντισώματα, αντιδραστήρια ELISA, αντιδραστήρια ηλεκτροφόρησης, κ.τλ)	12500
RNA, DNA extraction, RT, PCR, gene expression, purification κ.τ.λ kits	10500
πλαστικά υλικά μιας χρήσης (πιπέττες, tips, πλαστικά ELISA, tubes, γάντια κτλ)	6000
Software, χαρτική ύλη, υλικά ΗΥ	6000
ΣΥΝΟΛΟ	35000

Γ. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ – ΒΟΗΘΗΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (70500 €)

Ιδιότητα	Απασχ. (μήνες)	Μέσο ποσοστό απασχ.	Μηνιαία αμοιβή	Ολική Δαπάνη (€)
Επιστημονικός Συνεργάτης (Πτυχιούχος Θετικών Επιστημών ή Επιστημών Υγείας, με μεταπτυχιακές σπουδές και με εμπειρία σε μοριακές τεχνικές.	24	100%	2000	48000
Βοηθός έρευνας (Πτυχιούχος Θετικών Επιστημών ή Επιστημών Υγείας, ΑΕΙ ή ΤΕΙ με εμπειρία σε μοριακές τεχνικές.	18	100%	1250	22500
Σύνολο				70500

Δ. ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΕΙΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ / ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ (5500 €)

Τα αποτελέσματα του προγράμματος θα παρουσιαστούν σε διεθνή και ελληνικά συνέδρια το κόστος των οποίων υπολογίζεται στα 5500 €.

Ε. ΑΛΛΑ ΕΞΟΔΑ (4000€)

Προβλέπεται το ποσό των 4000 € για διάφορα μικροέξοδα που απαιτούνται για την εύρυθμη εκτέλεση του ερευνητικού έργου.

ΣΥΝΟΨΗ ΠΡΟΫΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

<i>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΑΠΑΝΗΣ</i>	<i>ΠΟΣΟ ΣΕ €</i>
ΥΠΟΣΤΗΡΙΚΤΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ	40000
ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	35000
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ – ΒΟΗΘΗΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ	70500
ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΕΙΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ / ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ	5500
ΑΛΛΑ ΕΞΟΔΑ	4000
ΣΥΝΟΛΟ	155.000

