ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ZNF519

Ταυτοποίηση και έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα ZNF519

Τσαγκαράκη Άννα

Επιβλέπουσα:

Βασιλακοπούλου Διδώ, Αναπλ. Καθηγήτρια

Επιστημονική καθοδήγηση:

Τσιτήλου Σόνια, τ. Αναπλ. Καθηγήτρια

Αθήνα 2015

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 6

1.1 Μεταγραφή 6

1.1.1 Ρύθμιση της μεταγραφής.....6

1.2 Μεταγραφικοί παράγοντες.....7

1.2.1 Ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων στην κυτταρική ζωή.....8

1.2.2 Δομές μεταγραφικών παραγόντων.....8

1.3 Μεταγραφικοί παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου.....9

1.4 Μεταγραφικοί παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 10

1.4.1 Δομή και πρόσδεση στο DNA.....10

1.4.2 Εξέλιξη των δαχτύλων ψευδαργύρου C_2H_2 12

1.4.3 Φυσιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 στον οργανισμό 14

1.5 Μεταγραφικοί παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου και περιοχή KRAB (Krüppel-associated box).....14

1.5.1 Μηχανισμός της καταστολής από τους μεταγραφικούς παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 και περιοχή KRAB.....16

1.5.2 Εξέλιξη της περιοχής KRAB.....17

1.6 Συρραφή του πρόδρομου mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.....17

1.6.1 Εναλλακτική συρραφή του πρόδρομου mRNA 18

1.6.2 Εναλλακτική συρραφή και μεταγραφικοί παράγοντες 19

1.7 Το πρόγραμμα ENCODE 21

1.8 Αναπρογραμματισμός σωματικών κυττάρων προς επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα με χρήση μεταγραφικών παραγόντων.....22

1.9 Σχεδιασμός πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου και οι εφαρμογές τους. 23

1.10 Το θέμα της διπλωματικής εργασίας.....25

1.10.1 Γενικά χαρακτηριστικά του γονιδίου ZNF519.....25

1.10.2 Στόχοι της διπλωματικής εργασίας.....27

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....28

2.1 Υλικά.....28

2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια.....28

2.1.2 Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.....29

2.1.2.1 Υλικά καλλιέργειας ανθρώπινων κυτταρικών σειρών.....29

2.1.2.2 Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων για την καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών.....30

2.1.3 Βακτηριακές καλλιέργειες.....31

2.1.3.1 Υλικά παρασκευής θρεπτικών μέσων για βακτηριακές καλλιέργειες..31

2.1.3.2 Παρασκευή θρεπτικών μέσων για βακτηριακές καλλιέργειες.....31

2.1.4 Πλασμιδιακοί φορείς.....32

2.1.5 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων.....32

2.1.5.1 Απομόνωση RNA.....32

2.1.5.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....33

2.1.5.3 Απομόνωση τμημάτων DNA μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης.....33

2.1.6 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.....34

2.1.7 Σύνθεση cDNA και PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης).....34

2.1.8 Εκκινητές.....35

2.1.9 Αντιδράσεις αλληλούχισης.....35

2.1.10 Λογισμικό.....35

2.2 Μέθοδοι.....37

2.2.1 Ανάπτυξη και διατήρηση ανθρώπινων κυτταροκαλλιεργειών.....37

2.2.1.1 Ξεπάγωμα κυττάρων.....37

2.2.1.2 Αραίωση της καλλιέργειας των κυττάρων που δεν σχηματίζουν επιθήλιο (εναιώρημα). 38

2.2.1.3 Αραίωση της καλλιέργειας των κυττάρων που σχηματίζουν επιθήλιο. 39

2.2.1.4 Πάγωμα κυττάρων σε υγρό άζωτο 40

2.2.1.5 Συλλογή των κυτταρικών ιζημάτων 40

2.2.2 Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές με RNAPure FL System 41

2.2.3 Ποιοτικός έλεγχος του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. 42

2.2.4 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA με φωτομέτρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία 42

2.2.5 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA με φωτόμετρο BioPhotometer Eppendorf 44

2.2.6 Σύνθεση cDNA από ολικό RNA κυττάρων 45

2.2.7 Ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction- RT-PCR) 47

2.2.8 Αντιδράσεις ελέγχου ποιότητας του cDNA με ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου της GAPDH με RT-PCR 49

2.2.8.1 Two-Step RT-PCR με ζεύγος εκκινητών GAPDH2F/GAPDH3R για ανίχνευση της έκφρασης της GAPDH σε cDNA από κυτταρικές σειρές ανθρώπου 49

2.2.9 Σχεδιασμός εκκινητών 51

2.2.10 Ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου ZNF519 με RT-PCR 52

2.2.10.1 Ανίχνευση νέων μεταγράφων του γονιδίου ZNF519 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με Two-Step RT-PCR και το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RNC 52

2.2.10.2 Ανίχνευση νέων μεταγράφων του γονιδίου ZNF519 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με Two-Step RT-PCR και το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RSHORT1 54

2.2.10.3 Ανίχνευση της έκφρασης του ZNF519 σε ανθρώπινους ιστούς μαστού και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με Two-Step RT-PCR με το ζεύγη εκκινητών 519F1/519RNC 55

2.2.10.4 Ανίχνευση της έκφρασης του ZNF519 σε ανθρώπινους ιστούς μαστού και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με Two-Step RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RSHORT1.....57

2.2.10.5 Ανίχνευση της έκφρασης του ZNF519 σε cDNA panels της Clontech από ενήλικους και εμβρυϊκούς ιστούς με RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RSHORT1 59

2.2.11 Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της RT-PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 62

2.2.12 Απομόνωση άγνωστου τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με το NucleoSpin® Extract II Kit της Macherey-Nagel.....63

2.2.13 Κλωνοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πλασμιδιακό φορέα για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του.....64

2.2.13.1 Κλωνοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR με την μέθοδο TA Cloning.....64

2.2.13.2 Ενίσχυση αγνώστου τμήματος DNA μέσω PCR με σκοπό την κλωνοποίηση του σε πλασμιδιακό φορέα 65

2.2.13.3 Αντίδραση σύνδεσης πλασμιδίου – ενθέματος 65

2.2.14 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με την αντίδραση σύνδεσης....67

2.2.14.1 Μετασχηματισμός παγωμένων δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α με την αντίδραση σύνδεσης 67

2.2.14.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* XL1blue με την αντίδραση σύνδεσης.....67

2.2.15 Επιλογή αποικιών και απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες με αλκαλική λύση 68

2.2.15.1 Ποιοτικός έλεγχος του πλασμιδιακού DNA με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....68

2.2.16 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με Nucleospin plasmid kit της Macherey-Nagel 70

2.2.16.1 Ποιοτικός έλεγχος του πλασμιδιακού DNA με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση σε 2% και 1.5% πήκτωμα αγαρόζης 70

2.2.17 Προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA και προετοιμασία του δείγματος για την αντίδραση αλληλούχισης 70

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 72

3.1 Ανίχνευση, κλωνοποίηση και ταυτοποίηση των εναλλακτικών μεταγράφων 8, 11, 12, 13, 14 και 15 του γονιδίου ZNF519 72

3.1.1 Ανίχνευση των μεταγράφων 11, 12, 13, 14 και 15 του ZNF519 72

3.1.1.1 Ανίχνευση του μεταγράφου 11.....72

3.1.1.2 Ανίχνευση των μεταγράφων 12, 13 και 14 77

3.1.2 Ανίχνευση του μεταγράφου 8 του ZNF519.....86

3.1.3 Ανάλυση των μεταγράφων 8, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου ZNF519 92

3.2 Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519 95

3.2.1 Μελέτη της έκφρασης του μεταγράφου 8 του ZNF519 σε φυσιολογικούς ιστούς ανθρώπου 95

3.2.2 Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519 σε ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικές σειρές μαστού.....101

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....107

4.1 Ανίχνευση και ταυτοποίηση των εναλλακτικών μεταγράφων 8, 11, 12, 13 και 14 του ZNF519.....107

4.2 Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519 110

4.2.1 Μελέτη της έκφρασης του μεταγράφου 8 του ZNF519 σε φυσιολογικούς ιστούς ανθρώπου 110

4.2.2 Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519 σε ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικές σειρές μαστού.....111

4.3 Μελλοντικοί στόχοι.....112

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....113

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....117

Α. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ.....117

Β. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ.....119

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταγραφή

Το DNA αποτελεί το βασικό μόριο της ζωής, καθώς στη δομή του είναι αποθηκευμένη η γενετική πληροφορία που αφορά τη μορφολογία και τις λειτουργίες του κυττάρου και κατ' επέκταση ολόκληρου του οργανισμού. Η γενετική πληροφορία μεταφέρεται στο RNA και τις πρωτεΐνες με ένα σύνολο διαδικασιών, γνωστό ως γονιδιακή έκφραση. Το πρώτο βήμα της γονιδιακής έκφρασης είναι η μεταγραφή, δηλαδή η σύνθεση μονόκλωνου RNA πάνω σε μονόκλωνη DNA-μήτρα. Κατά τη μεταγραφή αντιγράφονται επιλεκτικά περιοχές του γονιδιώματος παράγοντας από ένα πολύ μικρό έως ένα μεγάλο αριθμό αντιτύπων RNA από μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Οι περιοχές αυτές ποικίλουν στα διαφορετικά κύτταρα ή στο ίδιο κύτταρο. Διαφορετικές περιοχές μεταγράφονται σε διαφορετικό βαθμό, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ή στάδια ανάπτυξης, δηλαδή η διαδικασία αυτή υπόκειται σε ρύθμιση.

Η σύνθεση του RNA γίνεται σε τέσσερα διακριτά στάδια:

1. Πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στο DNA-μήτρα σε συγκεκριμένη αλληλουχία, τον υποκινητή, και σχηματισμός του συμπλόκου έναρξης
2. Έναρξη της μεταγραφής
3. Επιμήκυνση της αλυσίδας του RNA
4. Λήξη της μεταγραφής με απομάκρυνση του μορίου RNA από το DNA.

1.1.1 Ρύθμιση της μεταγραφής

Η ρύθμιση της μεταγραφής αποτελεί σημαντικό μέρος της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Τα γονίδια συνήθως ρυθμίζονται στο επίπεδο της μεταγραφής, αφού αυτή αποτελεί το πρώτο βήμα στη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας. Ρυθμιστικές πρωτεΐνες ασκούν θετικό ή αρνητικό έλεγχο στη μεταγραφή δρώντας ως ενεργοποιητές ή καταστολείς, δηλαδή σε απόκριση προς

κατάλληλα σήματα, βοηθούν ή παρεμποδίζουν την έναρξη της μεταγραφής αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες, με μεταγραφικούς παράγοντες, με τις RNA πολυμεράσες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και με ειδικές ρυθμιστικές αλληλουχίες στο DNA.

1.2 Μεταγραφικοί παράγοντες

Καμία ευκαρυωτική RNA πολυμεράση δεν μπορεί να προχωρήσει σε έναρξη της μεταγραφής χωρίς την παρουσία ενός συνόλου πρωτεϊνών - βοηθητικών παραγόντων - που ονομάζονται *(transcription factors)*.
Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίζουν τις ειδικές αλληλουχίες του υποκινητή ή και του ενισχυτή και προσδένονται κατευθείαν σε αυτόν προκειμένου να ξεκινήσει η μεταγραφή. Η απευθείας πρόσδεση στο DNA δεν είναι ο μοναδικός τρόπος δράσης τους. Κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίζουν άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ή την ίδια την RNA πολυμεράση ή ενσωματώνονται σε ένα σύμπλοκο έναρξης μόνο παρουσία κάποιων άλλων πρωτεϊνών. Με άλλα λόγια, μια πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται ως μεταγραφικός παράγοντας εάν η παρουσία της είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή από ένα συγκεκριμένο υποκινητή και δεν αποτελεί υπομονάδα της RNA πολυμεράσης .

Οι μεταγραφικοί παράγοντες ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

I. **Γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες**: αναγνωρίζουν αλληλουχίες κοινές για όλα τα γονίδια που μεταγράφονται από μία συγκεκριμένη RNA πολυμεράση, και συνεπώς είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφή όλων των γονιδίων σε όλα τα κύτταρα
II. **Ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες**: σε συνδυασμό με τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες αναγνωρίζουν αλληλουχίες που παίζουν ρόλο στη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης στους πολυκύτταρους οργανισμούς.

1.2.1 Ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων στην κυτταρική ζωή

Το κύτταρο αναγνωρίζει και ανταποκρίνεται κατάλληλα στα διάφορα εξωγενή και ενδογενή ερεθίσματα. Το μεταγραφικό ρυθμιστικό σύστημα, εξασφαλίζοντας την ορθή έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, παίζει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο πολλών βιολογικών διαδικασιών· από την πορεία του κυτταρικού κύκλου και τη συντήρηση της ενδοκυτταρικής μεταβολικής και φυσιολογικής ισορροπίας, ως την κυτταρική διαφοροποίηση και αναπτυξιακή πορεία του οργανισμού. Πολυάριθμες ασθένειες προκύπτουν από βλάβη στο ρυθμιστικό σύστημα της μεταγραφής: ογκογονίδια υπερεκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες, ανθρώπινες αναπτυξιακές διαταραχές έχουν αποδοθεί σε δυσλειτουργικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά, αλλαγές στη δράση και τη ρυθμιστική ειδικότητα τους είναι πιθανό να αποτελούν την κύρια πηγή φαινοτυπικής ποικιλομορφίας και εξελικτικής προσαρμογής (Vaquerizas, 2009).

1.2.2 Δομές μεταγραφικών παραγόντων

Μελέτες έχουν δείξει ότι ένας μεταγραφικός παράγοντας περιέχει στο μόριο του δύο λειτουργικές περιοχές:

I. (*DNA binding domain*), με την οποία αναγνωρίζει και προσδένεται στις ειδικές αλληλουχίες των ρυθμιστικών περιοχών του DNA (πχ. στον υποκινητή)

II. (*transcription activation domain*), μέσω της οποίας ρυθμίζει την έναρξη ή την καταστολή της μεταγραφής

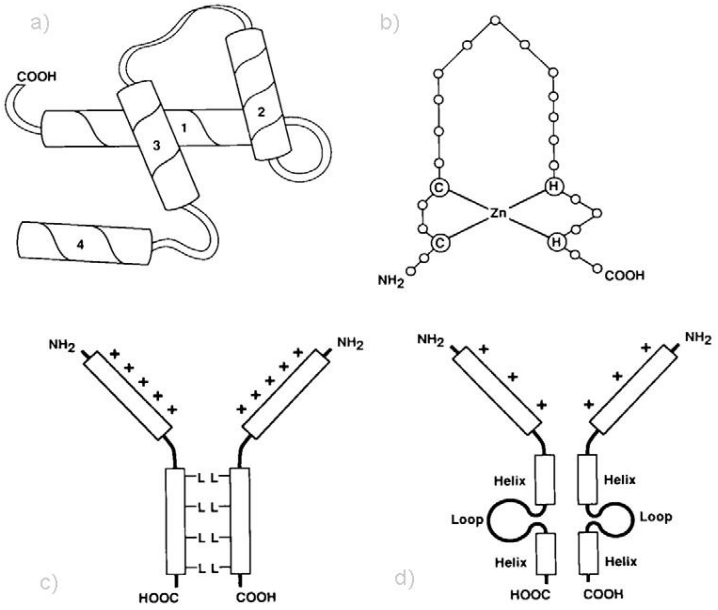
Η αμινοξική αλληλουχία της περιοχής πρόσδεσης στο DNA έχει δείξει ότι σε γενικές γραμμές παρατηρούνται οικογένειες δομών ή αλλιώς, δομικά μοτίβα. Τα κυριότερα μοντέλα των δομών που συναντώνται στους περισσότερους μεταγραφικούς παράγοντες είναι τα εξής:

έλικα-στροφή-έλικα (helix-turn-helix)

δάχτυλα ψευδαργύρου (Zinc Fingers)

φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper)

έλικα-θηλιά-έλικα (helix-loop-helix)



Εικόνα 1.1 Διαγραμματική απεικόνιση των τεσσάρων ομάδων μεταγραφικών παραγόντων, με βάση τη δομή των περιοχών πρόσδεσης στο DNA. a) Μεταγραφικοί παράγοντες με δομή έλικα-στροφή-έλικα. b) Μεταγραφικοί παράγοντες με δομή δακτύλων ψευδαργύρου. c) Μεταγραφικοί παράγοντες με φερμουάρ λευκίνης. d) Μεταγραφικοί παράγοντες με δομή έλικα-θηλιά-έλικα (Roberts and Gollob,, 2006).

1.3 Μεταγραφικοί παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στους μεταγραφικούς παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου.

Το συγκεκριμένο δομικό μοτίβο παίρνει το όνομά του από τη δομή που δημιουργείται όταν μία μικρή ομάδα από συντηρημένα αμινοξέα προσδένει ένα ιόν ψευδαργύρου και σχηματίζει μία ανεξάρτητη περιοχή στην πρωτεΐνη. (**Εικόνα 1.2**) Σε αυτή την οικογένεια υπάρχουν αρκετές ομάδες πρωτεϊνών. Σε δύο από αυτές θα γίνει αναφορά εδώ.

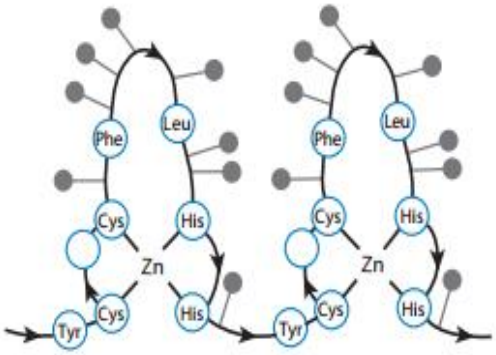
Αντιπρόσωπος της μιας ομάδας είναι ο μεταγραφικός παράγοντας των γονιδίων του 5S RNA, ο TFIIIA στον οποίο αρχικά αναγνωρίστηκε αυτό το μοτίβο (Miller et al. 1985) στον και μετά βρέθηκε σε πολλούς άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Το δάχτυλο δημιουργείται από τη θηλιά των αμινοξέων που προεξέχει από τη θέση πρόσδεσης του ψευδαργύρου και περιγράφεται ως δάχτυλο ψευδαργύρου, κυστεΐνης/ιστιδίνης (Cys_2/His_2). Σε διαφορετική ομάδα ανήκουν οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών και ορισμένες

άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν ένα διαφορετικό τύπο δαχτύλων, τα δάχτυλα κυστεΐνης/κυστεΐνης (Cys_2/ Cys_2).

1.4 Μεταγραφικοί παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2

1.4.1 Δομή και πρόσδεση στο DNA

Η παρούσα εργασία αφορά συγκεκριμένα τους μεταγραφικούς παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου τύπου κυστεΐνης/ιστιδίνης (C2H2).



Εικόνα 1.2 Δάχτυλα ψευδαργύρου τύπου C2H2 (Klug, 2010).

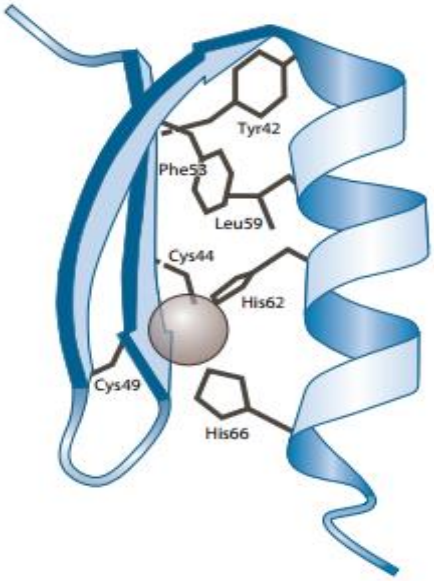
Ένας δάχτυλος ψευδαργύρου αποτελεί μία μικρή ανεξάρτητη δομική περιοχή στην πρωτεΐνη και περιλαμβάνει συνήθως 28-30 αμινοξικά κατάλοιπα. Το ιόν Zn συγκρατείται από δύο αμετάβλητα ζεύγη από κυστεΐνες και ιστιδίνες σχηματίζοντας μια τεραεδρική διάταξη, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.2**. Κάθε δάχτυλος περιλαμβάνει
και άλλα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα. (Klug et al., 2010) Έτσι προκύπτει η εξής συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία:

(Phe/Tyr)-X-Cys-X_{2-5}-Cys-X_3-(Phe/Tyr)-X_5-ψ-X_2-His-X_{3-5}-His

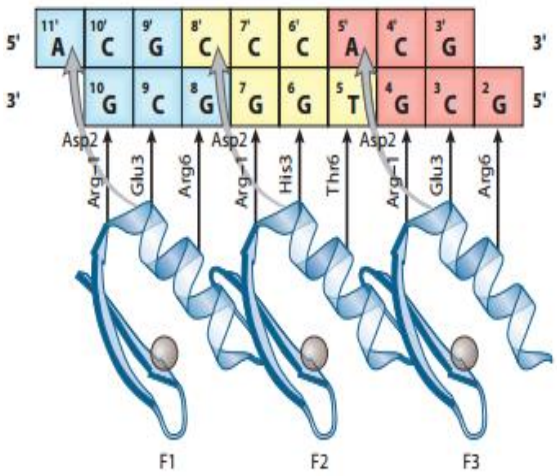
όπου το X αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε αμινοξικό κατάλοιπο και το ψ ένα υδρόφοβο κατάλοιπο (Cox, et al.,2000).

Τα δάκτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 συναντώνται συνήθως ως ομάδα με άλλα δάχτυλα που τοποθετούνται το ένα μετά το άλλο ως διαδοχικές επαναλήψεις.

Το C-τελικό άκρο κάθε δαχτύλου σχηματίζει α-έλικες, ενώ το N-τελικό άκρο σχηματίζει ένα β-φύλλο (**Εικόνα 1.3**). Τα τέσσερα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα βοηθούν το άκρο του αντιπαράλληλου β-φύλλου να συγκρατήσει το άκρο της α-έλικας. Η τελευταία είναι γνωστή ως «έλικα αναγνώρισης» γιατί προσδένεται στο DNA, μέσω μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τριών αμινοξέων του και τριών παρακείμενων βάσεων στη μεγάλη αύλακα του DNA (**Εικόνα 1.4**). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 μπορεί να περιέχουν από ένα έως και 30 δάχτυλα ψευδαργύρου (συνήθως τρία ή περισσότερα σε κάθε πρωτεΐνη), τα οποία συνδέονται με την έλικα του DNA ως μονομερή. Η ποικιλία στον αριθμό δαχτύλων ψευδαργύρου καθώς και η απόσταση που αυτά έχουν μεταξύ τους έχουν επίδραση στην αναγνώριση των βάσεων του DNA. Πρωτεΐνες με μεγάλο αριθμό δαχτύλων είναι επίσης σε θέση να δεσμεύουν RNA και πρωτεΐνες (Iuchi, 2001). Οι δεσμευτικές αυτές ιδιότητες εξαρτώνται από την αλληλουχία αμινοξέων των δαχτύλων, το συνδέτη (linker) μεταξύ τους και τον αριθμό των δακτύλων.



Εικόνα 1.3 Η δομή δαχτύλου ψευδαργύρου (Klug, 2010)

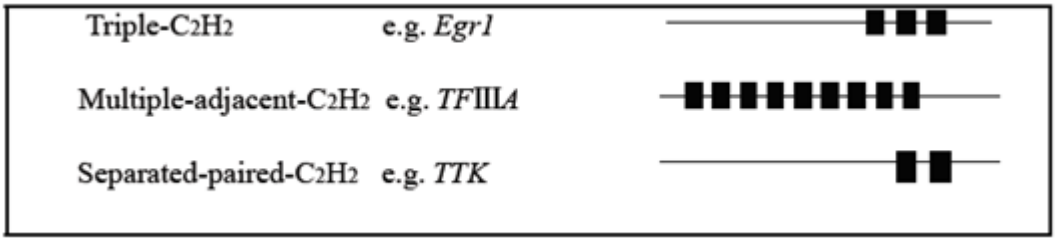


Εικόνα 1.4 Πρόσδεση των δαχτύλων ψευδαργύρου C_2H_2 στο DNA (Klug, 2010)

Ένα σύστημα ταξινόμησης που προτείνεται από τον S. Iuchi (2001) ομαδοποιεί όλα τα μέλη της ομάδας πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 σε τρεις περαιτέρω τάξεις ανάλογα με τον αριθμό και το πρότυπο των δαχτύλων που περιέχονται σε κάθε πρωτεΐνη.

Αυτές είναι:

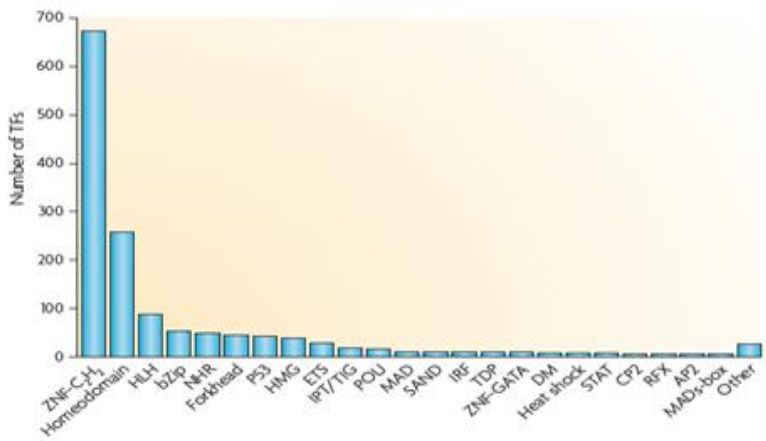
- τριπλά δάχτυλα (π.χ. Early Growth Response protein 1-EGR1)
- πολλαπλά γειτονικά δάχτυλα (π.χ. Transcription Factor for RNA polymerase III,TFIIIA) και
- διαχωριζόμενα ζεύγη δακτύλων (π.χ. Transcription Factor Tramtrack- TTK)



Εικόνα 1.5 Οι τρεις προτεινόμενες τάξεις πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 (Iuchi, 2001)

1.4.2 Εξέλιξη των δαχτύλων ψευδαργύρου C_2H_2

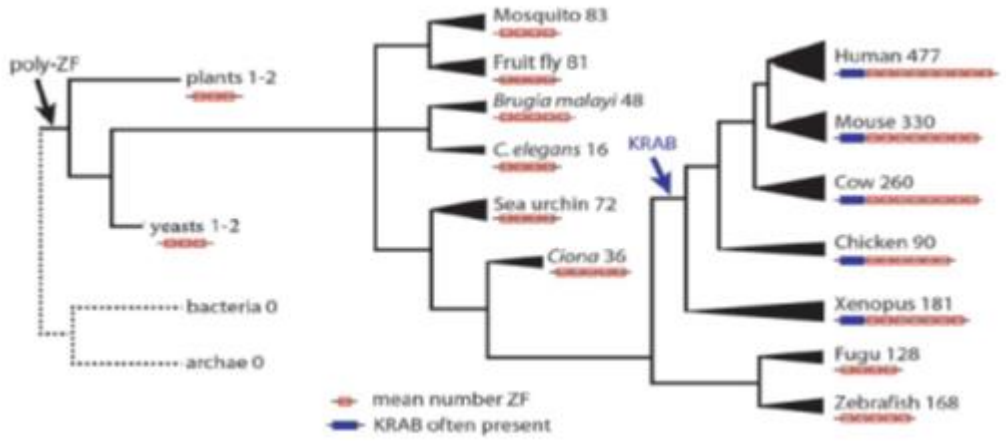
Οι μεταγραφικοί παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 είναι η μεγαλύτερη ομάδα μεταγραφικών παραγόντων στον άνθρωπο (Vaquerizas, et al. 2009) (**Εικόνα 1.6**). Ο σχετικά μεγαλύτερος αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτή την ομάδα μεταγραφικών παραγόντων στον άνθρωπο αλλά και η εξελικτικά πρόσφατη αύξηση τους σε αριθμό, υποδηλώνουν ότι πιθανόν να έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εξελικτική γραμμή που οδήγησε στην εμφάνιση του ανθρώπου.



Εικόνα 1.6 Ανθρώπινοι μεταγραφικοί παράγοντες ομαδοποιημένοι με βάση την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Vaquerizas, 2009)

Ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους εν λόγω μεταγραφικούς παράγοντες κατά μήκος του δέντρου της ζωής, δείχνει ότι η ομάδα προέκυψε από μία μικρότερη προγονική οικογένεια ευκαρυωτικών μεταγραφικών παραγόντων με δάχτυλα ψευδαργύρου μέσω πολλών επαναλαμβανόμενων γονιδιακών διπλασιασμών που συνοδεύτηκαν από λειτουργική απόκλιση (Emerson et al.2009). Η συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων δεν έχει ανιχνευθεί σε βακτήρια και αρχαία. Σε φυτά και μύκητες ο αριθμός των συγκεκριμένων γονιδίων αλλά και ο αριθμός των δαχτύλων σε κάθε γονίδιο είναι πολύ μικρός. Αυτή η εικόνα αντιπροσωπεύει την προγονική κατάσταση της συγκεκριμένης οικογένειας γονιδίων. Σημαντική αύξηση του αριθμού των γονιδίων και των πρωτεϊνών με δάχτυλα C_2H_2 που αυτά κωδικοποιούν παρατηρείται μόνο από την εμφάνιση των μεταζώων και έπειτα.

Η εξελικτική τάση που παρατηρείται για αύξηση του αριθμού των δαχτύλων (**Εικόνα 1.7**) έχει ως αποτέλεσμα πολλές πρωτεΐνες στα θηλαστικά να έχουν πολύ μεγαλύτερο αριθμό δαχτύλων από αυτό που χρειάζονται για να προσδεθούν σε μια μοναδική αλληλουχία DNA (Emerson, et. al. 2009). Η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι ο μεγάλος αριθμός δαχτύλων σε μια πρωτεΐνη επιτρέπει την πρόσδεση σε περισσότερες από μια αλληλουχίες, χρησιμοποιώντας κάθε φορά συγκεκριμένο μόνο αριθμό δαχτύλων από το συνολικό ή και όλα αναγνωρίζοντας μεγαλύτερο μήκος αλληλουχίας.



Εικόνα 1.7 Εξέλιξη της οικογένειας των γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2. Ο αριθμός δίπλα σε κάθε είδος αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες με τουλάχιστον τρία δάχτυλα ψευδαργύρου. Κάτω από το όνομα κάθε είδους τα κόκκινα κουτιά αντιστοιχούν στο μέσο αριθμό δαχτύλων και το μπλε κουτί στην παρουσία περιοχής KRAB

1.4.3 Φυσιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 στον οργανισμό

Ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με πολλαπλά δάχτυλα ψευδαργύρου (poly-zinc finger) στο ανθρώπινο γονιδίωμα και η πρόσφατη επέκταση και εξέλιξη ορισμένων μελών της οικογένειας δείχνουν ότι μερικά από αυτά τα γονίδια έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του γενεαλογικού δένδρου που οδηγεί στον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, υπάρχουν εξαιρετικά λίγες πληροφορίες σχετικά με την λειτουργία *in vivo* των πρωτεϊνών της οικογένειας αυτής και τα υπάρχοντα στοιχεία δεν δίνουν σαφή εικόνα.

Παρόλο που φαίνεται πιθανό ότι όλα ή τα περισσότερα τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με πολλαπλά δάχτυλα ψευδαργύρου λειτουργούν ως ρυθμιστές της μεταγραφής, υπάρχει το ενδεχόμενο να έχουν περισσότερους από έναν τύπο λειτουργίας στον οργανισμό.

Έχει προταθεί ότι το δομικό μοτίβο των πρωτεϊνών με πολλαπλά δάχτυλα ψευδαργύρου αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ταχεία εξέλιξη της μεταγραφικής ρύθμισης. Πιθανόν τα πολλαπλά δάχτυλα ψευδαργύρου να ενεργούν για να καταστείλουν τη μεταγραφή ιικών γονιδίων ή γονιδίων μεταθετών στοιχείων και η εξέλιξή τους οδηγείται από τον ανταγωνισμό με τα ίδια τα γονίδια. Εναλλακτικά, μπορούν να συμβάλλουν στην ταχεία μορφολογική εξέλιξη μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής αναπτυξιακών γονιδίων (Emerson, et al. 2009). Επειδή πολλές πρωτεΐνες με πολλαπλά δάχτυλα ψευδαργύρου προσδένονται στο DNA, θα ήταν ιδανικό να πραγματοποιηθούν δοκιμές για τη συνεξέλιξη των γονιδίων αυτών με τα γονίδια στόχους τους, γεγονός που θα διευκρίνιζε τις εξελικτικές δυνάμεις που διέπουν την ταχεία επέκταση και διαφοροποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες.

1.5 Μεταγραφικοί παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου και περιοχή KRAB (Krüppel-associated box)

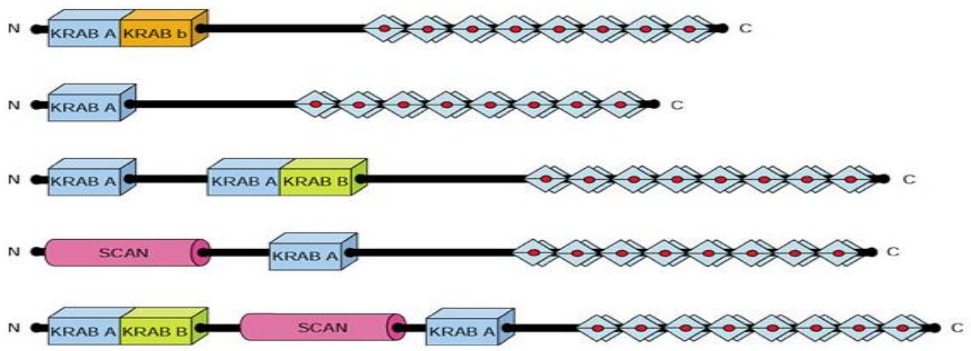
Οι περισσότεροι ανθρώπινοι μεταγραφικοί παράγοντες με δάχτυλα

ψευδαργύρου C_2H_2 έχουν την εξής αρχιτεκτονική: μία αμινοτελική περιοχή η οποία αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες και μια καρβοξυτελική περιοχή η οποία περιλαμβάνει τα δάχτυλα ψευδαργύρου με τα οποία προσδένεται στο DNA. Περίπου το 40% αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών εμφανίζει στο αμινοτελικό άκρο της μια περιοχή KRAB η οποία μπορεί να εξασκεί ισχυρή μεταγραφική καταστολή. Σε κάποιες πρωτεΐνες αντί ή παράλληλα με το KRAB εμφανίζονται δομικά μοτίβα όπως το SCAN και το BTB/POZ (Emerson et al. 2009).

Η περιοχή KRAB αποτελείται περίπου από 50-75 αμινοξέα και χωρίζεται σε δύο υποπεριοχές, το A και B box. (**Εικόνα 1.8**) Το A box παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή γιατί προσδένεται σε συγκαταστολείς, και το B box ενισχύει την καταστολή που προκαλείται από το A box, με άγνωστους προς το παρόν μηχανισμούς (Vissing, et al. 1995) Ανάλογα με τη δομή της περιοχής KRAB οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να χωριστούν σε 3 υποκατηγορίες:

1. KRAB A: περιέχουν μόνο το A box
2. KRAB A+B: περιέχουν τα A και B box
3. KRAB A+b: περιέχουν το A box και ένα διαφορετικό B box που ονομάζεται b box

Οι έως τώρα γνωστές λειτουργίες των πρωτεϊνών που περιέχουν την περιοχή KRAB περιλαμβάνουν την μεταγραφική καταστολή της RNA πολυμεράσης I, II και III και τον έλεγχο της λειτουργίας του πυρηνίσκου. Πρωτεΐνες με περιοχή KRAB εμπλέκονται επιπλέον στην κυτταρική διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (Urrutia, 2003).

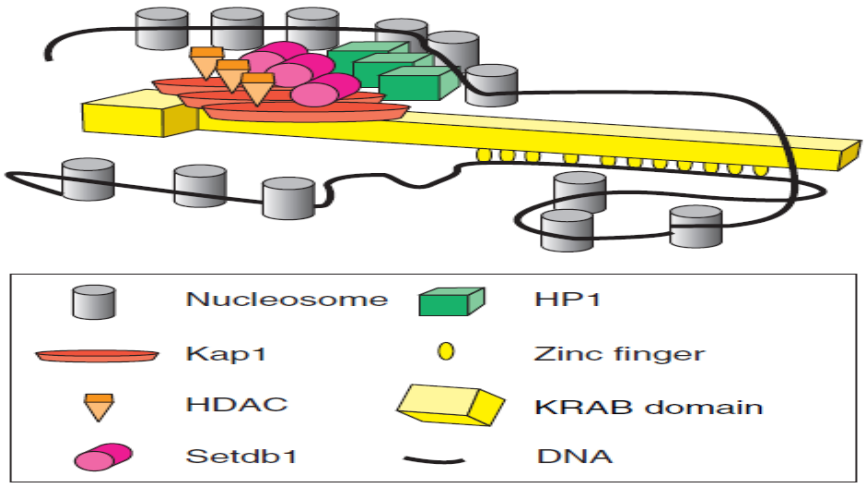


Εικόνα 1.8 Δομές τυπικών πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου που περιέχουν KRAB. Απεικονίζεται το εύρος των μοτίβων που περιέχουν. Ο αριθμός των δαχτύλων ψευδαργύρου περιορίζεται στους 8 για λόγους απλοποίησης, ενώ συνήθως κυμαίνονται από 4-34 (Urrutia, 2003).

1.5.1 Μηχανισμός της καταστολής από τους μεταγραφικούς παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 και περιοχή KRAB

Ένα μοντέλο (Urrutia, 2003) με το οποίο επιτυγχάνεται η καταστολή της μεταγραφής είναι το παρακάτω:

1. Ο μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται μέσω των δαχτύλων ψευδαργύρου σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία στον υποκινητή ενός γονιδίου.
2. Η πρωτεΐνη Kap1 προσδένεται ως τριμερές στην περιοχή KRAB του μεταγραφικού παράγοντα. Η πρόσδεση γίνεται μέσω της περιοχής RING-B-box coiled-coil (RBCC) της πρωτεΐνης Kap1.
3. Στη συνέχεια αποακετυλάσες (HDAC) προσδένονται στην Kap1 και αποακετυλιώνουν τη χρωματίνη, μετατρέποντας τη σε ανενεργή.
4. Η πρωτεΐνη Setdb1 (μια πρωτεΐνη με περιοχή SET) προσδένεται στην Kap1 και μεθυλιώνει το αμινοξικό κατάλοιπο της λυσίνης 9 της ιστόνης H3.
5. Η πρωτεΐνη HP1 (heterochromatin protein 1) προσδένεται στη μεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης H3 μετατρέποντας έτσι την ευχρωματίνη σε ετεροχρωματίνη και τα γονίδια σε αυτή την περιοχή μεταγραφικά ανενεργά. **(Εικόνα 1.9)**



Εικόνα 1.9: Μηχανισμός της καταστολής της μεταγραφής από τους μεταγραφικούς παράγοντες με δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2 και περιοχή KRAB (Urrutia, 2003).

1.5.2 Εξέλιξη της περιοχής KRAB

Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών με περιοχή KRAB είναι ότι εμφανίζονται μόνο στα τετράποδα σπονδυλωτά. Η περιοχή KRAB απουσιάζει από τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών των ψαριών, της Drosophila, των φυτών και διαφόρων μυκήτων, αλλά τα γονίδια που την κωδικοποιούν εντοπίζονται στα γονιδιώματα του ανθρώπου, του ποντικού, του κοτόπουλου και του βάτραχου. Ενώ τα δάχτυλα ψευδαργύρου υπάρχουν σε διάφορους οργανισμούς, από τους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς ως και τον άνθρωπο, η εμφάνιση της περιοχής KRAB φαίνεται να είναι ένα σχετικά πρόσφατο εξελικτικό γεγονός. Είναι πιθανό η εμφάνιση της περιοχής KRAB στα σπονδυλωτά να έγινε για να τους παρέχει κάποια σημαντική λειτουργία που αφορά την ανάπτυξή τους, το ανοσοποιητικό ή το νευρικό τους σύστημα (Urrutia, 2003).

1.6 Συρραφή του πρόδρομου mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

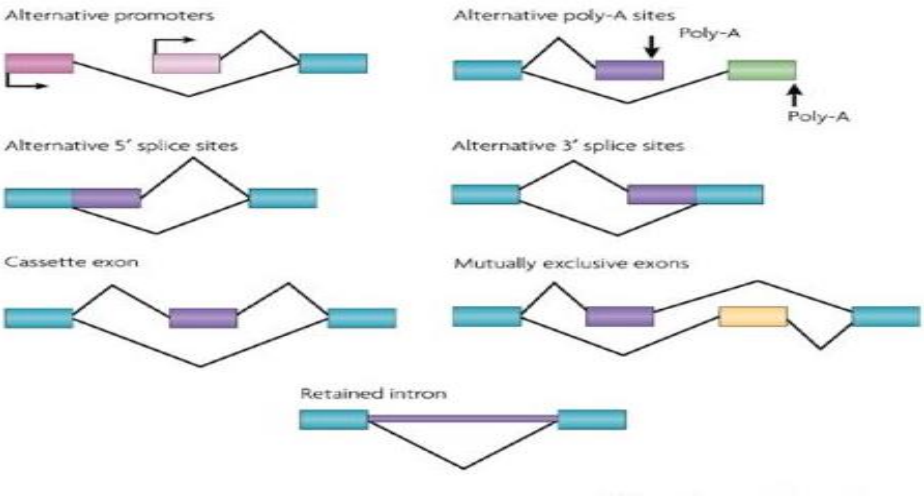
Η συρραφή του mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελεί βασικό στάδιο στη διαδικασία ωρίμανσης του προδρόμου μορίου. Πρόκειται για το μηχανισμό απομάκρυνσης των εσωνίων και σύνδεσης των εξωνίων μεταξύ τους για να σχηματίσουν το τελικό και λειτουργικό mRNA. Η αντίδραση της συρραφής είναι εξαιρετικά ακριβής, με τις τομές να γίνονται σε μοναδικές θέσεις οι οποίες αποτελούνται από ιδιαίτερα μικρές συντηρημένες αλληλουχίες. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η πιστότητα της διαδικασίας, καθώς λάθος σε μία βάση μπορεί να αλλάξει το πλαίσιο ανάγνωσης του mRNA με σοβαρότατες συνέπειες στη σύνθεση και τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών και επομένως του οργανισμού γενικότερα.

Οι απαραίτητες για τη συρραφή αλληλουχίες περιγράφονται από τον κανόνα GU-AG, ο οποίος αναφέρεται στα νουκλεοτίδια που συναντώνται στα άκρα του εσωνίου. Το υπόλοιπο εσώνιο φαίνεται να μην είναι σημαντικό. Τέλος, όλες οι 5΄ θέσεις συρραφής εμφανίζονται μεταξύ τους ισοδύναμες, καθώς και οι 3΄ θέσεις.

1.6.1 Εναλλακτική συρραφή του πρόδρομου mRNA

Το ευκαρυωτικό κύτταρο έχει την ικανότητα να κάνει διαφορετικές επιλογές μεταξύ των θέσεων συρραφής, δηλαδή των θέσεων εκτομής των εσωνίων και σύνδεσης των εξωνίων, στο ίδιο αρχικό μετάγραφο, με εναλλακτική συρραφή. Με άλλα λόγια, από το ίδιο πρόδρομο mRNA προκύπτουν περισσότερα του ενός ώριμα mRNA και επομένως περισσότερες της μιας πρωτεΐνες.

Το πρότυπο συρραφής μπορεί να αλλάξει με πολλούς τρόπους (**Εικόνα 1.10**). Ο πιο κοινός τρόπος είναι η ενσωμάτωση ή ο αποκλεισμός (exon skipping) στο ώριμο mRNA των λεγόμενων εξωνίων κασέτας. Τα εξώνια επίσης μπορούν να αυξηθούν ή να ελαττωθούν σε μήκος με αλλαγές στις θέσεις συρραφής, χρησιμοποιώντας δηλαδή εναλλακτικές θέσεις τόσο στο 5΄όσο και στο 3΄άκρο. Υπάρχουν, ακόμα, περιπτώσεις διατήρησης εσωνίων στο ώριμο mRNA. Ένας επιπλέον τύπος είναι ο αμοιβαίος αποκλεισμός 2 εξωνίων (mutual exclusion of exons), όπου είτε το ένα εξώνιο είτε το άλλο αλλά όχι και τα δύο ταυτόχρονα, εντοπίζονται στο ώριμο mRNA. Τέλος, ο αριθμός των εναλλακτικών μεταγράφων ενός γονιδίου αυξάνεται με την ύπαρξη εναλλακτικών υποκινητών για την έναρξη της μεταγραφής καθώς και με την επιλογή εναλλακτικών θέσεων προσθήκης ουράς poly(A) ουράς.



Εικόνα 1.10 Διαφορετικοί τρόποι εναλλακτικής συρραφής του πρόδρομου mRNA (Qin Li et al., 2007)

Αποτέλεσμα της εναλλακτικής συρραφής είναι η σύνθεση μορφών της ίδιας πρωτεΐνης είτε σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης ενός οργανισμού είτε σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Η εναλλακτική συρραφή φαίνεται να αποτελεί το βασικό συντελεστή ποικιλομορφίας των πρωτεϊνών, δεδομένου ότι ο αριθμός των γονιδίων των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, είναι μικρός σε σχέση με τον αριθμό των πρωτεϊνών. Στον άνθρωπο υπολογίζεται ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 60% των γονιδίων υπόκεινται σε εναλλακτική ωρίμανση. Πολλά μετάγραφα γονιδίων έχουν πολλαπλά πρότυπα συρραφής και σε ορισμένα παρατηρούνται ακόμα και χιλιάδες.

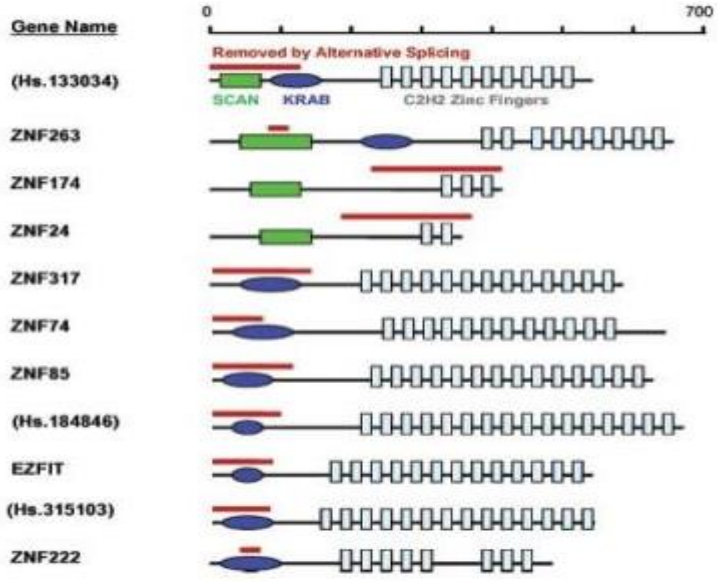
1.6.2 Εναλλακτική συρραφή και μεταγραφικοί παράγοντες

Η ρύθμιση της λειτουργίας των μεταγραφικών παραγόντων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Μεταξύ των μηχανισμών που ελέγχουν αυτή την λειτουργία είναι και η εναλλακτική συρραφή η οποία μελετάται αρκετά τα τελευταία χρόνια. Η εναλλακτική συρραφή των προδρόμων mRNA που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες οδηγεί στη σύνθεση ισομορφών που μπορεί να είναι ιστοειδικές ή ειδικές για συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Είναι γνωστό ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούνται από διαφορετικές περιοχές που η καθεμία έχει συγκεκριμένο ρόλο. Έλλειψη μιας τέτοιας περιοχής μέσω εναλλακτικής συρραφής φαίνεται να οδηγεί στην παραγωγή μεταγράφων που παρουσιάζουν διαφορετική δράση.

Έχει προταθεί ότι η εναλλακτική συρραφή θα μπορούσε να σχετίζεται με τις φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των οργανισμών. Ο Taneri et al. (2004), έχουν δείξει ότι ο βαθμός εναλλακτικής συρραφής των προδρόμων mRNA των μεταγραφικών παραγόντων στο ποντίκι είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τα πρόδρομα mRNA άλλων πρωτεϊνών του ίδιου οργανισμού. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι κάτι τέτοιο ισχύει και για τους μεταγραφικούς παράγοντες στον άνθρωπο (Talavera, et al., 2009). Μόνο ένα μικρό ποσοστό των ισομορφών των μεταγραφικών παραγόντων παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ομοιότητας. Συγκεκριμένα το 1⁄3 ή 1⁄4 των ισομορφών που μελετήθηκαν στην παραπάνω

έρευνα είναι 40% πανομοιότυπες, υποδηλώνοντας ότι η πλειονότητα των ισομορφών δεν έχουν την ίδια λειτουργία.

Συγκεκριμένες περιοχές των μεταγραφικών παραγόντων φαίνεται να επηρεάζονται πολύ περισσότερο από την εναλλακτική συρραφή η οποία έχει ως αποτέλεσμα είτε την ολική απομάκρυνσή τους από το τελικό μόριο της πρωτεΐνης, είτε τη μερική απομάκρυνσή τους. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τόσο περιοχές που χρησιμοποιούνται στην πρόσδεση στο DNA, όπως οι περιοχές HOX (homeobox domain), έλικα-θηλιά-έλικα (helix-loop-helix/HLH) και δάχτυλα ψευδαργύρου C_2H_2, όσο και περιοχές με ρυθμιστικό ρόλο, όπως οι KRAB και SCAN. Όσον αφορά τις περιοχές δαχτύλων ψευδαργύρου C_2H_2 και KRAB, τις οποίες κωδικοποιεί και το γονίδιο ZNF519 που μελετάμε στην παρούσα εργασία, βρέθηκε ότι από τα 11 πρόδρομα mRNA μεταγραφικών παραγόντων που περιέχουν τις παραπάνω περιοχές, στα 9 απομακρύνεται η περιοχή που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB με εναλλακτική συρραφή, ενώ στα άλλα 2 απομακρύνεται η περιοχή των δαχτύλων ψευδαργύρου C_2H_2. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα για τις ισομορφές στις οποίες παρατηρείται απομάκρυνση της περιοχής KRAB, εφόσον αναμένεται αυτές οι ισομορφές να προσδένονται στις ίδιες αλληλουχίες DNA και να ασκούν ενεργοποίηση της μεταγραφής αντί να την καταστέλλουν (Resch, et al., 2003) (**Εικ. 1.11**)



Εικόνα 1.11 Απομάκρυνση λειτουργικών περιοχών μεταγραφικών παραγόντων με εναλλακτική συρραφή του προδρόμου mRNA. Με κόκκινη γραμμή σημειώνεται η περιοχή που απομακρύνεται κάθε φορά (Resch et al. 2003)

1.7 Το πρόγραμμα ENCODE

Η πρόσφατη ολοκλήρωση του προγράμματος ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) αποτελεί ένα επίτευγμα εφάμιλλο με την αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Σκοπός του προγράμματος είναι η χαρτογράφηση όλων των λειτουργικών περιοχών του ανθρώπινου γονιδιώματος, δηλαδή των γονιδίων (protein-coding και non-coding genes), των μεταγράφων τους και των ρυθμιστικών περιοχών της μεταγραφής. Η μελέτη εστιάζει ιδιαίτερα στα μη-κωδικά RNA, στα εναλλακτικά μετάγραφα και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες. Συστηματικές αναλύσεις των παραπάνω είναι απαραίτητες για την ταυτοποίηση των γονιδίων, την κατανόηση των ανθρώπινων ασθενειών, καθώς επίσης μπορούν να παρέχουν μια πλήρη εικόνα της οργάνωσης και της ρύθμισης των γονιδίων.

Δεδομένα που έχουν προκύψει από το πρόγραμμα ENCODE αποκαλύπτουν σημαντικά χαρακτηριστικά σχετικά με την οργάνωση και τη λειτουργία του ανθρώπινου γονιδιώματος:

1. Το 80% του ανθρώπινου γονιδιώματος συμμετέχει σε ένα τουλάχιστον βιοχημικό γεγονός που σχετίζεται με τη μεταγραφή, τους μεταγραφικούς παράγοντες, τη δομή της χρωματίνης και τις τροποποιήσεις των ιστονών
2. Ανάλυση του γονιδιώματος έδειξε σε πρώτη φάση, ότι υπάρχουν 399.124 περιοχές με χαρακτηριστικά ενισχυτή, 70.292 περιοχές με χαρακτηριστικά υποκινητή καθώς επίσης εκατοντάδες χιλιάδες «ήσυχες» περιοχές.
3. Τα δεδομένα αναφέρουν 20,687 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, με μέσο όρο 6.3 εναλλακτικά μετάγραφα ανά γενετικό τόπο. Από αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα, κατά μέσο όρο, μόνο τα 3.9 κωδικοποιούν πρωτεΐνες, δηλαδή περίπου το 50%.
4. Ακόμη, εντοπίστηκαν 9.640 γονίδια που κωδικοποιούν μεγάλα μη-κωδικά RNA (long non-coding RNA, lncRNA), τα οποία συντίθενται με τον ίδιο μηχανισμό που ισχύει και για τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (The ENCODE project Consortium, 2011).

1.8 Αναπρογραμματισμός σωματικών κυττάρων προς επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα με χρήση μεταγραφικών παραγόντων

Μία σημαντική δυσκολία στη θεραπεία με αντικατάσταση ιστών σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως η νόσος Parkinson, ο τραυματισμός του νωτιαίου μυελού και ο διαβήτης, είναι η απόρριψη του μοσχεύματος από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Ένας τρόπος να αρθεί το πρόβλημα της απόρριψης θα ήταν η χρήση των σωματικών κυττάρων του ίδιου του ασθενούς προκειμένου να παραχθούν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Induced pluripotent stem cells-iPSCs). Αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε σωματικά κύτταρα και κατ' αυτό τον τρόπο θα μπορούσαν να παρέχουν μία πηγή κατά παραγγελία κυττάρων ενηλίκου ατόμου για τη θεραπεία μέσω μεταμόσχευσης.

Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί μία συναρπαστική νέα προσέγγιση στον αναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων που χρησιμοποιεί τη σύνθεση τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων-κλειδιών σε γενετικά τροποποιημένα κύτταρα προκειμένου να αντιστρέψει τη διαφοροποίηση και να μετατρέψει τα σωματικά κύτταρα σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά (iPSCs) όμοια με εμβρυϊκά (Takahashi & Yamanaka, 2006)

Προηγούμενη έρευνα στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα προσδιόρισε περίπου 24 μεταγραφικούς παράγοντες που απαιτούνται για την πολυδύναμη κατάσταση ή συνδέονται με αυτή, αλλά είναι απόντες από τα σωματικά κύτταρα. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι προκαλώντας τεχνητά τη σύνθεση ενός υποσυνόλου αυτών των παραγόντων σε ένα κύτταρο ενηλίκου ατόμου αυτό θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την πυροδότηση του αναπρογραμματισμού του διαφοροποιημένου κυττάρου σε πολυδύναμη κατάσταση.

Κύτταρα ινοβλαστών από το δέρμα ενός ποντικού τροποποιήθηκαν γενετικά για να εκφράσουν διάφορους συνδυασμούς των γονιδίων που κωδικοποιούν τους προαναφερθέντες παράγοντες. Χρησιμοποιήθηκε ένας ρετροϊός για να εισαχθούν τα cDNA των γονιδίων των 24 υποψήφιων μεταγραφικών παραγόντων στα

κύτταρα. Το γεγονός που προκάλεσε έκπληξη, είναι ότι 4 από τα 24 γονίδια αρκούσαν για να πετύχουν αυτό το αποτέλεσμα. Αυτά τα τέσσερα ήταν τα γονίδια που κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct4, Sox2, c-Myc και Klf4. Τα κύτταρα των ινοβλαστών που τροποποιήθηκαν γενετικά για να εκφράσουν τα τέσσερα γονίδια φάνηκαν να έχουν εισέλθει σε μία κατάσταση βλαστικών κυττάρων όμοιων με εμβρυϊκά, όπως κρίθηκε από τη μορφολογία, την ικανότητα για πολλαπλασιασμό και την έκφραση ορισμένων γονιδίων, τα οποία είναι γνωστό ότι είναι ενεργά σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, αλλά ανενεργά στα διαφοροποιημένα κύτταρα.

Τα αποτελέσματα είναι εντυπωσιακά, όμως η αληθινή πολυδυναμία απαιτεί μία απόδειξη ότι τα αναπρογραμματιζόμενα κύτταρα είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε ένα ενήλικο ζώο. Αυτή η αποφασιστική δοκιμασία δεν έχει επιτευχθεί ακόμα. Μέχρι στιγμής είναι δυνατό να παραχθούν χιμαιρικά ποντίκια, στους ιστούς των οποίων υπάρχουν αναπρογραμματισμένα και φυσιολογικά κύτταρα.

Εν κατακλείδι, η ανακάλυψη ότι η έκφραση των τεσσάρων συγκεκριμένων γονιδίων αρκεί για να αναπρογραμματίσει ένα κύτταρο ενηλίκου ατόμου σε ένα επαγόμενο πολυδύναμο κύτταρο είναι αναμφισβήτητα μία σημαντική ανακάλυψη στην έρευνα των βλαστοκυττάρων. Ωστόσο, η χρήση ενός ρετροϊού και η γενετικά τροποποιημένη έκφραση ενός γνωστού ογκογονιδίου (Myc) αποκλείει την εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας στο άμεσο μέλλον στον άνθρωπο. Στο μέλλον όμως πρέπει να διευκρινιστεί η αλυσίδα των γεγονότων που οδηγούν από τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct4, Sox2, c-Myc και Klf4 στην πολυδυναμία.

1.9 Σχεδιασμός πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου και οι εφαρμογές τους.

Η ανακάλυψη της δομής των δαχτύλων ψευδαργύρου έθεσε μία νέα βάση ως προς την αναγνώριση του DNA από πρωτεΐνες. Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA, οι πρωτεΐνες με δάχτυλα ψευδαργύρου μπορούν να

συνδεθούν διαδοχικά με γραμμικό τρόπο για να αναγνωρίσουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες διαφορετικού μήκους. Αυτός ο τρόπος πρόσδεσης προσφέρει ένα μεγάλο αριθμό συνδυαστικών δυνατοτήτων για ειδική αναγνώριση του DNA και γι αυτό είναι κατάλληλος για τη de novo σύνθεση πρωτεϊνών που στοχεύουν σε συγκεκριμένα γονίδια. Αυτές οι πρωτεΐνες (Zinc Finger Proteins, ZFPs) μπορούν να αναγνωρίσουν σχεδόν οποιαδήποτε επιθυμητή αλληλουχία DNA με μεγάλη συγγένεια και ειδικότητα. Πρωτεΐνες με πολλαπλά δάχτυλα ψευδαργύρου μπορούν να σχεδιαστούν και να ενωθούν με πεπτίδια που περιέχουν περιοχές ενεργοποίησης ή καταστολής ώστε επιλεκτικά να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν την έκφραση γονιδίων.

Κάποιες από τις εφαρμογές αυτής της τεχνολογίας θα αναφερθούν παρακάτω:

1. Αναστολή της έκφρασης του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) με στοχευμένη πρόσδεση των πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου σε υποκινητές των γονιδίων του ιού.
2. Καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου του ιού του απλού έρπητα από έναν μεταγραφικό παράγοντα με δάχτυλα ψευδαργύρου ο οποίος προσδέθηκε στοχευμένα στον υποκινητή του γονιδίου.
3. Ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα Α – (VEGF)-Α (σε κυτταρικές σειρές ανθρώπου και ποντικού) μέσω «κατασκευασμένων» πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου που αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή του γονιδίου.

Επιπλέον, η ένωση πρωτεϊνών που έχουν ενεργότητα νουκλεάσης με πρωτεΐνες με δάχτυλα ψευδαργύρου που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες οδηγεί στο σχηματισμό χιμαιρικών πρωτεϊνών (νουκλεάσες με δάχτυλα ψευδαργύρου - Zinc Finger Nucleases, ZFNs) με τη δράση των οποίων θα μπορούσαμε να χειριστούμε και να τροποποιήσουμε το γονιδίωμα για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Με άλλα λόγια, ο σχεδιασμός χιμαιρικών πρωτεϊνών με δάχτυλα ψευδαργύρου και ενζυμική περιοχή με ενεργότητα νουκλεάσης (ZFNs) με ικανότητα τομής μιας μεταλλαγμένης

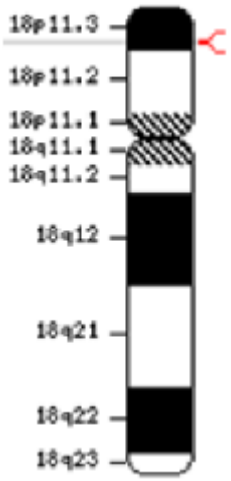
αλληλουχίας και ομόλογο ανασυνδυασμό με την επιθυμητή αλληλουχία μπορεί να οδηγήσει στη θεραπεία σοβαρών ασθενειών που οφείλονται σε ελαττωματικά και επιβλαβή γονίδια. Τέτοιες ασθένειες είναι η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η αιμοφιλία, η ασθένεια του Gaucher, η Χ-συνδεδεμένη βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID) (Klug, 2010) και άλλες.

1.10 Το θέμα της διπλωματικής εργασίας

Θέμα της διπλωματικής εργασίας είναι η ταυτοποίηση και η μελέτη της έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων του ανθρώπινου γονιδίου ZNF519. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων NCBI, το γονίδιο ZNF519 κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα με δάχτυλα ψευδαργύρου τύπου C_2H_2 και περιοχή KRAB.

1.10.1 Γενικά χαρακτηριστικά του γονιδίου ZNF519

Το γονίδιο ZNF519 εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 18 (18p11) (**Εικόνα 1.12**). Το γονίδιο έχει μήκος 56501bp, μεταγράφεται σε mRNA 6810 bp, που είναι το αποτέλεσμα συρραφής 3 εξωνίων και μεταφράζεται σε πρωτεΐνη 540aa. Τα παραπάνω στοιχεία προέρχονται από την τράπεζα δεδομένων του ανθρώπινου γονιδιώματος.



Εικόνα 1.12 Θέση του γονιδίου ZNF519 στο χρωμόσωμα 18 (κόκκινο)

Με το λογισμικό Scanprosite για την πρόβλεψη λειτουργικών περιοχών των πρωτεϊνών εντοπίσαμε στο αμινοτελικό άκρο του πρωτεϊνικού μορίου του ZNF519 μια περιοχή KRAB A και στο καρβοξυτελικό άκρο 9 ομαδοποιημένα δάχτυλα ψευδαργύρου τύπου C_2H_2 καθώς και ένα μεμονωμένο εκφυλισμένο δάχτυλο ψευδαργύρου τύπου C_2H_2 (**Εικόνα 1.13**) Εκφυλισμένα δάχτυλα ψευδαργύρου είναι αυτά των οποίων η αλληλουχία παρεκκλίνει από την κοινή τυπική αλληλουχία ενός δαχτύλου ψευδαργύρου τύπου C_2H_2 και έχουν χάσει τη δυνατότητα να προσδένουν ιόντα

ψευδαργύρου. Στο εκφυλισμένο δάχτυλο ψευδαργύρου του μεταγραφικού παράγοντα ZNF519, η μία από τις δύο ιστιδίνες αντικαθίσταται από προλίνη.



Εικόνα 1.13 Λειτουργικές περιοχές του μεταγραφικού παράγοντα που κωδικοποιείται από το γονίδιο ZNF519

Μέχρι και τη στιγμή συγγραφής της διπλωματικής εργασίας δεν υπήρχε κάποια δημοσίευση σχετικά με το ρόλο του γονιδίου ZNF519. Μία μόνο δημοσιευμένη εργασία προσπάθησε να αποδώσει κάποιο ρόλο στο γονίδιο, αλλά ακόμα τα δεδομένα είναι αρκετά ελλιπή. Η πρώτη δημοσιευμένη εργασία (Hassan, et al.,2008) συγκαταλέγει το ZNF519 ως ένα από τα 6 υποψήφια γονίδια υπεύθυνο για το σύνδρομο Jawad. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα βασίζεται σε διάφορες μεταλλαγές που παρατηρούνται στους ασθενείς στην περιοχή του γονιδιώματος όπου εδράζεται και το γονίδιο ZNF519. Τα άτομα που πάσχουν από το συγκεκριμένο σύνδρομο παρουσιάζουν εκ γενετής μικροκεφαλία, δηλαδή τουλάχιστον 3 φορές μικρότερη περιφέρεια εγκεφάλου σε σύγκριση με ένα φυσιολογικό άτομο. Αυτό οφείλεται κυρίως στο μειωμένο αριθμό κυττάρων λόγω μειωμένης διαίρεσης των αρχέγονων νευρικών κυττάρων ή λόγω εκτεταμένης απόπτωσης κατά τη νευρογένεση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα άτομα να εμφανίζουν διανοητική καθυστέρηση. Επιπλέον παρατηρούνται πολυδακτυλίες, συνδακτυλίες και λευκές κηλίδες στο δέρμα (**Εικόνα 1.14**). Συνοπτικά



Εικόνα 1.14 Άτομο με σύνδρομο Jaward. a. Μικροκεφαλία b. Λευκές κηλίδες στο δέρμα c. Πολυδακτυλία d. Συνδακτυλία (Hassan, et al. 2008)

εμφανίζουν ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου και των άκρων τους στις οποίες είναι πιθανό να εμπλέκεται και το γονίδιο ZNF519.

1.10.2 Στόχοι της διπλωματικής εργασίας

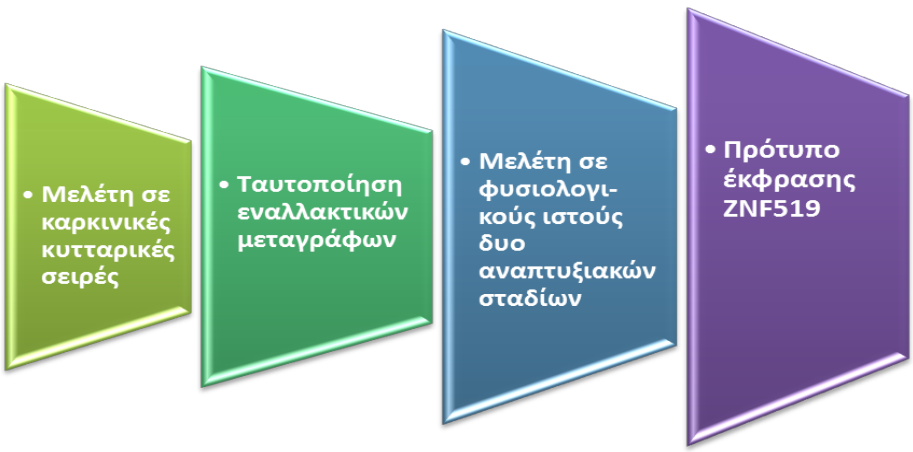
Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως βασικό στόχο τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου ZNF519. Δεδομένου ότι ο ρόλος του γονιδίου είναι ακόμα άγνωστος και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από προηγούμενες διπλωματικές εργασίες των Αντύπα Χ., Μπαλάσκα Π., Μάστορα Ι. που διεξήχθησαν στο εργαστήριό μας και αφορούν τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου ZNF519, θέσαμε τους παρακάτω στόχους:

1. Ανίχνευση και κλωνοποίηση και άλλων εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου

2. Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου ZNF519 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές & καρκινικούς ιστούς

3. Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου ZNF519 σε φυσιολογικούς εμβρυϊκούς & ενήλικους ιστούς

Με τη μελέτη της έκφρασης σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών ιστών και κυτταρικών σειρών, τόσο φυσιολογικών όσο και καρκινικών, από έμβρυα και ενήλικες, θα κατασκευάσουμε ένα λεπτομερές προφίλ έκφρασης του γονιδίου ZNF519.



2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Ο παρακάτω πίνακας περιλαμβάνει τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες.

Χημικά Αντιδραστήρια	Εταιρεία
Αιθανόλη	Merck
Βορικό οξύ	
Ισοαμυλική αλκοόλη	
Ισοπροπυλική αλκοόλη	
Φαινόλη	
Χλωροφόρμιο	
Tris-base	Applichem
X-gal	
Χλωριούχο Νάτριο	
D-γλυκόζη	Serva
Χλωριούχο Κάλιο	Ferak
Φορμαλδεΰδη (methanol free) 10% Ultrapure EM GRADE	Polysciences
β-μερκαπτοαιθανόλη	Sigma-Aldrich

2.1.2 Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Κυτταρική Σειρά	Περιγραφή	Τύπος Καλλιέργειας	Προέλευση
HeLa	Καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας	Επιθήλιο	Ερευνητική ομάδα Δ.Βασιλακοπούλου
HEK-293	Φυσιολογικά κύτταρα από νεφρό εμβρύου	Επιθήλιο	Ερευνητική ομάδα Δ.Βασιλακοπούλου
SH-SY5Y	Νευροβλάστωμα	Επιθήλιο	Ερευνητική ομάδα Δ.Βασιλακοπούλου
BL41	Κύτταρα από λέμφωμα Burkitt	Εναιώρημα	Ερευνητική ομάδα Δ.Σίδερη
SKOV3	Καρκινικά κύτταρα ωοθηκών	Επιθήλιο	Ερευνητική ομάδα Ι. Κιάρη

2.1.2.1 Υλικά καλλιέργειας ανθρώπινων κυτταρικών σειρών

Υλικά Θρεπτικών Διαλυμάτων	Εταιρεία Προμήθειας
DMEM High Glucose w/L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate	**Biosera**
RPMI 1640 w/L-Glutamine	
Fetal Bovine Serum (FBS)	
Πενικιλίνη / Στρεπτομυκίνη (100×)	
Αντιμυκητιακό (100×)	
Trypsin-EDTA (10×)	**PAA**
L-Glutamine (100×) 200mM	

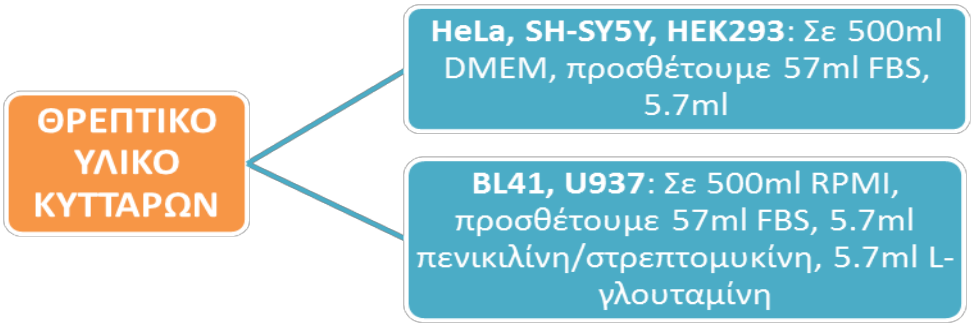
2.1.2.2 Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων για την καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών

Απενεργοποίηση FBS: Είναι πολύ σημαντικό πριν τη χρησιμοποίηση του FBS να γίνεται απενεργοποίησή του μέσω θέρμανσης στους 56 °C, προκειμένου να αποφύγουμε πιθανά προβλήματα στην σωστή ανάπτυξη των καλλιεργειών, όπως η ύπαρξη μόλυνσης ή η παρουσία χημικών ενώσεων που δεν επιτρέπουν τη δράση αυξητικών παραγόντων. Ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

- Μεταφέρουμε τη φιάλη των 500 ml του FBS από τους -20°C, όπου φυλάσσεται, στους 4°C και το αφήνουμε o/n να ξεπαγώσει.
- Την επόμενη μέρα το ξεπαγώνουμε σε υδατόλουτρο στους 37°C. Φροντίζουμε ώστε η στάθμη του νερού να είναι πάνω από τη στάθμη του FBS. Αναδεύουμε το FBS ανά διαστήματα.
- Όταν το FBS έχει ξεπαγώσει πλήρως το αφήνουμε για άλλα 15 min στους 37°C, προκειμένου να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία του με αυτή του υδατόλουτρου.
- Ανεβάζουμε τη θερμοκρασία στους 56°C. Όσο περιμένουμε να ανέβει η θερμοκρασία αναδεύουμε το FBS ανά 10 min.
- Όταν η θερμοκρασία φθάσει στους 56°C, επωάζουμε το FBS για άλλα 30 min, αναδεύοντας και πάλι κάθε 10 min.
- Στη συνέχεια αφήνουμε τη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
- Σε θάλαμο νηματικής ροής μοιράζουμε το FBS σε aliquots των 50 ml αποστειρώνοντάς το παράλληλα με φίλτρο. Φυλάσσουμε τα aliquots στους -20°C.

1 × PBS: Για 500ml, προσθέτουμε 4g NaCl, 0.12g KCl, 0.1g KH_2PO_4, 0.9g NA_2HPO_4. $2H_2O$, pH 7.2

Freezing medium: Για 1ml, προσθέτουμε 900μl FBS, 100μl DMSO



2.1.3 Βακτηριακές καλλιέργειες

2.1.3.1 Υλικά παρασκευής θρεπτικών μέσων για βακτηριακές καλλιέργειες

Υλικά	Εταιρεία
Αμπικιλίνη	Applichem
Trypton	Applichem
Yeast-extract	Duchefa
Agar for bacteriology	Genaxis

2.1.3.2 Παρασκευή θρεπτικών μέσων για βακτηριακές καλλιέργειες

LB Medium: Για 1L LB προσθέτουμε 10g trypton, 5g yeast extract, 10g NaCl. Ρυθμίζουμε σε pH 7.0 με προσθήκη 1.4ml 2N NaOH και αποστειρώνουμε.

LB Medium για τρυβλία: Ίδια σύσταση με το LB Medium με επιπλέον προσθήκη 15g bacto agar/L. Αφού αποστειρώσουμε αναδεύουμε ελαφρά την κωνική με το LB για να κατανεμηθεί ομοιόμορφα το άγαρ. Αφήνουμε να κρυώσει ως τους 50°C, πριν προσθέσουμε το κατάλληλο αντιβιοτικό. Αναδεύουμε και επιστρώνουμε 30-35ml σε κάθε τρυβλίο.

SOB Medium: Για 1L SOB προσθέτουμε 20g trypton, 5g yeast extract, 0.5g NaCl, 10ml 250mM KCl. Ρυθμίζουμε σε pH 7.0 με προσθήκη 1.4ml 2N NaOH και αποστειρώνουμε. Ακριβώς πριν το χρησιμοποιήσουμε προσθέτουμε 5ml αποστειρωμένου 2M διαλύματος $MgCl_2$.

SOC Medium: Ίδια σύσταση με το SOB Medium με επιπλέον προσθήκη γλυκόζης σε τελική συγκέντρωση 20mM. Αποστειρώνουμε το SOB και το αφήνουμε να

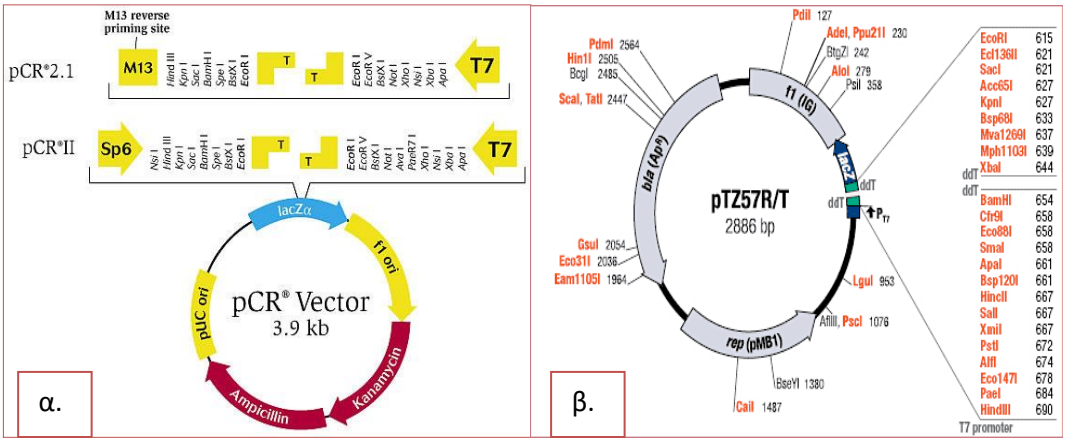
κρυώσει ως τους 60°C. Προσθέτουμε 20ml αποστειρωμένου διαλύματος γλυκόζης συγκέντρωσης 1M (αποστείρωση με φίλτρο 0.22-μm).

2.1.4 Πλασμιδιακοί φορείς

Ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πλασμίδια:

1. Το πλασμίδιο pCR2.1 (**Εικόνα 2.1α**), με μέγεθος 3.9kb και ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη. Ανήκει στο TACloning® Kit της Invitrogen.

2. Το πλασμίδιο pTZ57R/T (**Εικόνα 2.1β**), με μέγεθος 2.9kb και ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Το πλασμίδιο αυτό ανήκει στο InsTAclone™PCR Cloning Kit της Fermentas



Εικόνα 2.1 α. Το πλασμίδιο pCR2.1 και ο περιοριστικός του χάρτης β. Το πλασμίδιο pTZ57R/T και ο περιοριστικός του χάρτης

Οι πέψεις των πλασμιδίων έγιναν με περιοριστικά ένζυμα της Takara και της New England Biolabs.

2.1.5 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

2.1.5.1 Απομόνωση RNA

Οι απομονώσεις RNA πραγματοποιήθηκαν με το RNAPure FL System από *PEQLAB.*

0.1% DEPC dH_2O: Σε 1L dH_2O προσθέτουμε 1ml DEPC (από SIGMA – ALDRICH). Αναδεύουμε o/n σε θερμοκρασία δωματίου και αποστειρώνουμε για 20 min. Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιείται για να αναδιαλύσουμε το RNA κατά την απομόνωσή του, καθώς και για να πλύνουμε τα γυαλικά που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν κατά την απομόνωση. Έτσι πραγματοποιείται απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών.

Οι φωτομετρήσεις του RNA έγιναν σε κυψελίδες χαλαζία 50μl.

2.1.5.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Οι απομονώσεις του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκαν με το NucleoSpin® Plasmid kit από Macherey-Nagel και με αλκαλική λύση.

Για τις αλκαλικές λύσεις χρησιμοποιήσαμε τα παρακάτω διαλύματα:

Solution I: 50mM γλυκόζης, 25mM Tris-Cl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0). Αποστειρώνουμε και αποθηκεύουμε στους 4°C.

Solution !!: 0.2N NaOH, 1% (w/v) SDS, dH_2O.

Το παρασκευάζουμε λίγο πριν το χρησιμοποιήσουμε γιατί είναι σημαντικό να είναι ¨φρέσκο¨.

Solution !!!: 3M potassium acetate, 5M glacial acetic acid, dH_2O.

TE pH 8.0: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0

Ένζυμα: RNάση (20mg/mL)

2.1.5.3 Απομόνωση τμημάτων DNA μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με **το NucleoSpin® Extract II Kit** από Macherey-Nagel.

2.1.6 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Μάρτυρες (Markers): 1kb ladder από New England Biolabs, 100bp ladder από New England Biolabs, GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder 100 – 3000bp από Fermentas.

Μπογιές: 6 x loading dye από Fermentas και από New England Biolabs, 6 x loading Buffer για RNA (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% γλυκερόλη).

5 × TBE: Για 1L, 54g Tris Base, 27.5g βορικό οξύ, 20ml 0.5M EDTA (pH 8.0).

0.5 × TBE running buffer: Για 500ml, 450ml dH_2O, 50ml 5 × TBE, 25μl βρωμιούχο αιθίδιο 100mg/ml.
Πήκτωμα αγαρόζης 8 × 8cm: Για 30ml, 27ml dH_2O, 3ml 5 × TBE και την κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (πχ. 0.3g για 1% gel αγαρόζης). Αφού διαλύσουμε την αγαρόζη με θέρμανση προσθέτουμε 1.5μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml) ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση βρωμιούχου αιθίδιου 0.5μg/ml.
Για το πήκτωμα χρησιμοποιήσαμε **Agarose low EEO** από Applichem.

2.1.7 Σύνθεση cDNA και PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)

Ένζυμα: DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase από Finnzymes, AMV Reverse Transcriptase από Invitrogen, SuperScript® II Reverse Transcriptase (RT) από Invitrogen, RNase inhibitor από New England Biolabs.

cDNA φυσιολογικών ιστών: MTC-Multiple Tissue cDNA Human Panel I, MTC Multiple Tissue cDNA Human Fetal Panel από Clontech.

Λοιπά υλικά: dNTPs από Clontech και Invitrogen, oligodTs, mineral oil από SIGMA–ALDRICH.

2.1.8 Εκκινητές

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση του λογισμικού:

Primer Blast

Fast PCR

Η σύνθεση των εκκινητών πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία VBC-GENOMICS (Wien, Austria).

Ο υπολογισμός της Tm έγινε με βάση το Tm calculator της Finnzymes (http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html)

Ο πίνακας που ακολουθεί περιλαμβάνει το σύνολο των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες.

Όνομα	Περιγραφή	Αλληλουχία (5'→3')	Tm (°C)
519F1	Forward	GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAG	71.65
519RNC	Reverse	AGGCGGTTCTGAGATATGGGTTCG	71.81
519RSHORT 1	Reverse	CCTCTCCATCAATGTCGTCCCTCT	62.1
GAPDH Ex2F	Forward	CCACATCGCTCAGACACCAT	60.1
GAPDH Ex4R	Reverse	CCATGGGTGGAATCATATTGGAAC	59.7

2.1.9 Αντιδράσεις αλληλούχισης

Οι αντιδράσεις αλληλούχισης έγιναν από την εταιρεία MACROGEN

2.1.10 Λογισμικό

PrimerBLAST: Σχεδιασμός εκκινητών

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)

FastPCR: Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος για το σχηματισμό διμερών

(http://www.primerdigital.com/fastpcr.html)

ImageJ: Προσδιορισμός της έντασης της φωτεινότητας των ζωνών που ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και ημιποσοτικοποίηση

(http://rsbweb.nih.gov/ij/)

CLC Main Workbench 5.7: Επεξεργασία και σήμανση των αλληλουχιών στο παράρτημα

(http://www.clcbio.com)

PS Remote: Λογισμικό της ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής που χρησιμοποιήθηκε για τη φωτογράφηση των κυτταροκαλλιεργειών κατά την παρατήρηση με ανάστροφο φωτονικό μικροσκόπιο

(http://www.breezesys.com/PSRemote/)

Restriction Mapper: Ανίχνευση θέσεων που κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε μια νουκλεοτιδική αλληλουχία

(http://www.restrictionmapper.org/)

Webcutter 2.0: Ανίχνευση θέσεων που κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε μια νουκλεοτιδική αλληλουχία

(http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/)

ASPicDB: Πρόβλεψη των εναλλακτικών μεταγράφων ενός γονιδίου

(http://t.caspur.it/ASPicDB/)

Scanprosite: Ανίχνευση των λειτουργικών περιοχών των πρωτεϊνών

(http://au.expasy.org/tools/scanprosite/)

SMART : Ανίχνευση των λειτουργικών περιοχών των πρωτεϊνών.

(http://smart.embl-heidelberg.de/)

Expasy: Πρόβλεψη της πρωτεϊνικής αλληλουχίας από μια νουκλεοτιδική αλληλουχία.

(http://web.expasy.org/translate/)

BLAST: Ανίχνευση της ομοιότητας αλληλουχιών

(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Πρόγραμμα για την μετατροπή μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην αντίστροφη και τη συμπληρωματική της

(http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html)

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Ανάπτυξη και διατήρηση ανθρώπινων κυτταροκαλλιεργειών

Οι κυτταροκαλλιέργειες αποτελούν μια μέθοδο μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων in vitro. Σκοπός τους είναι η διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μακριά από τον οργανισμό από τον οποίο προήλθαν. Ένα από τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν οι κυτταροκαλλιέργειες είναι η απομόνωση του ολικού RNA από ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρων με τη μορφή κυτταρικών ιζημάτων και η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων. Αυτή είναι και η πορεία που ακολουθήσαμε στην παρούσα διπλωματική. Οι διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής και υπό στείρες συνθήκες.

2.2.1.1 Ξεπάγωμα κυττάρων

Τα κύτταρα που θέλουμε να καλλιεργήσουμε βρίσκονται αρχικά σε σωλήνες που περιέχουν 1ml freezing medium και τα οποία φυλάσσουμε σε υγρό άζωτο. Το ξεπάγωμα των κυττάρων πρέπει να γίνει ταχύτατα διότι, όπως αναφέρεται παραπάνω, το freezing medium περιέχει DMSO που αποτελεί αποδιατακτικό παράγοντα και είναι τοξικό για τα κύτταρα. Όσο πιο γρήγορα γίνει το ξεπάγωμα και στη συνέχεια το ξέπλυμα των κυττάρων, τόσο λιγότερο χρόνο θα έρθουν σε επαφή τα κύτταρα με το DMSO και θα αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος. Αφού ξεπαγώσουμε τα κύτταρα αδειάζουμε το περιεχόμενο του σωλήνα σε 6ml θρεπτικού διαλύματος και φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 2 min, στους 4° C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε θρεπτικό υλικό, στο οποίο έχουμε προσθέσει 1ml FBS, προκειμένου να ενεργοποιηθεί πιο γρήγορα

η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων. Μεταφέρουμε σε φλάσκα και επωάζουμε σε επωαστήρα στους 37° C, 5% CO_2.

2.2.1.2 Αραίωση της καλλιέργειας των κυττάρων που δεν σχηματίζουν επιθήλιο (εναιώρημα).

Η αραίωση μιας αρχικής καλλιέργειας κυττάρων γίνεται με σκοπό την ανανέωση του θρεπτικού υλικού και την απομάκρυνση των τοξικών ουσιών που παράγονται λόγω του μεταβολισμού των κυττάρων. Για να γίνει η αραίωση μιας κυτταροκαλλιέργειας πρέπει να ελέγξουμε την βιωσιμότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Για το λόγο αυτό αναδεύουμε ήπια το περιεχόμενο της φλάσκας και μεταφέρουμε γρήγορα 100μl κυττάρων σε ένα σωλήνα τύπου eppendorf. Προσθέτουμε 75μl 1× PBS και 25μl χρωστική Trypan Blue (αραίωση 3:1). Αναδεύουμε και μεταφέρουμε μια ποσότητα σε πλάκα Neubauer. Στα 4 μεγάλα τετράγωνα της πλάκας Neubauer μετράμε τα ζωντανά κύτταρα, είναι αυτά που δεν έχουν απορροφήσει τη χρωστική και δε βάφονται. Είναι σημαντικό να έχουμε ολοκληρώσει τη μέτρηση μέσα στα πρώτα 5min από την προσθήκη της χρωστικής, διότι με την πάροδο του χρόνου αρχίζουν να βάφονται και τα ζωντανά κύτταρα. Πρέπει να μετρήσουμε τουλάχιστον 200 ζωντανά κύτταρα για να έχουμε ακρίβεια στους υπολογισμούς που ακολουθούν. Διαφορετικά προετοιμάζουμε καινούργιο δείγμα με μικρότερη αραίωση. Από τα κύτταρα που βρίσκονται στις διαχωριστικές γραμμές της πλάκας, θα μετράμε εκείνα που βρίσκονται στην αριστερή και πάνω διαχωριστική γραμμή κάθε κουτιού. Υπολογίζουμε το μέσο όρο των ζωντανών κυττάρων στα 4 μεγάλα τετράγωνα και πολλαπλασιάζουμε με το συντελεστή αραίωσης. Πολλαπλασιάζουμε με 10^4 και βρίσκουμε πόσα κύτταρα/ml υπάρχουν στην αρχική καλλιέργεια.

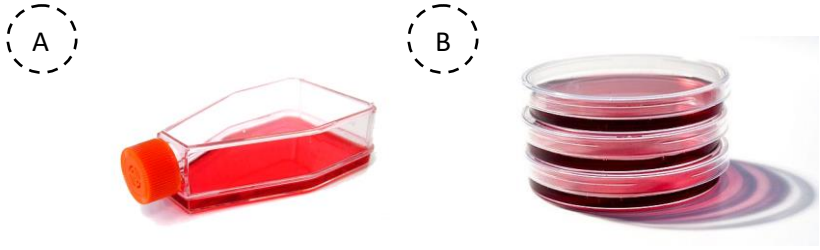
Γενικά ο αριθμός των κυττάρων/ml σε μια καλλιέργεια εναιωρήματος θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ $1 \times 10^5 – 2 \times 10^6$. Για να βρούμε τον όγκο της αρχικής καλλιέργειας με τον οποίο θα εμβολιάσουμε την ανακαλλιέργεια (V_1) θα εφαρμόσουμε το νόμο της αραίωσης,

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

όπου C_1 η συγκέντρωση κυττάρων που υπολογίσαμε με την πλάκα Neubauer, V_2 ο τελικός όγκος της ανακαλλιέργειας (συνήθως 20ml) και $C_2 = 1 \times 10^5$ κύτταρα/ml η επιθυμητή συγκέντρωση της ανακαλλιέργειας.

2.2.1.3 Αραίωση της καλλιέργειας των κυττάρων που σχηματίζουν επιθήλιο

Σε αυτόν τον τύπο κυτταροκαλλιέργειας τα κύτταρα παραμένουν προσκολλημένα στην κάτω επιφάνεια της φλάσκας ή του τρυβλίου, σχηματίζοντας επιθήλιο (**Εικόνα 2.2**). Εδώ η αραίωση πραγματοποιείται σε κυτταροκαλλιέργεια που καλύπτει το 80% της κάτω επιφάνειας της φλάσκας ή του τρυβλίου.



Εικόνα 2.2: Α. Φλάσκα για την ανάπτυξη των κυτταροκαλλιεργειών που σχηματίζουν επιθήλιο. Τα κύτταρα προσκολλώνται στην κάτω επιφάνεια της φλάσκας. Β. Τρυβλία για την ανάπτυξη κυτταροκαλλιεργειών που σχηματίζουν επιθήλιο.

Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Αφαιρούμε το θρεπτικό διάλυμα και ξεπλένουμε με 1× PBS.
- Αποκολλάμε τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας ή του τρυβλίου προσθέτοντας θρυψίνη και επωάζοντας για 3min στους 37° C.
- Προσθέτουμε ποσότητα θρεπτικού διαλύματος ίση με τη θρυψίνη προκειμένου να την απενεργοποιήσουμε, δεδομένου ότι η θρυψίνη μπορεί να είναι τοξική για κάποια κύτταρα αν επωάσουμε για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από το κανονικό.
- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 1500rpm για 2min, στους 4° C.

- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού διαλύματος (ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος προσθέτουμε εμπειρικά 2-6×800μl θρεπτικού διαλύματος έτσι ώστε να έχουμε περίπου 106 κύτταρα/ml).
- Μοιράζουμε το αναδιαλυμένο ίζημα σε δύο ή περισσότερες φλάσκες (800μl/φλάσκα) ή τρυβλία και συμπληρώνουμε με θρεπτικό διάλυμα ως τελικό όγκο 15ml για κάθε φλάσκα και 8ml για κάθε τρυβλίο.

2.2.1.4 Πάγωμα κυττάρων σε υγρό άζωτο

Για τα κύτταρα που σχηματίζουν επιθήλιο, αναδιαλύουμε το ίζημα που συλλέξαμε με την παραπάνω διαδικασία σε 1ml freezing medium ανά σωλήνα.

Για τα κύτταρα που δεν σχηματίζουν επιθήλιο ο αριθμός των κυττάρων σε ένα σωλήνα θα πρέπει να είναι 1×10^7 κύτταρα/ml. Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση με το νόμο της αραίωσης όπως παραπάνω. Φυγοκεντρούμε τον κατάλληλο όγκο στις 1000rpm, 5min, 4°C. Αναδιαλύουμε το ίζημα που συλλέξαμε σε κατάλληλο όγκο freezing medium (1ml για κάθε σωλήνα).

Τοποθετούμε τους σωλήνες στους -60° C για τουλάχιστον 24h και στη συνέχεια τους μεταφέρουμε στο υγρό άζωτο. Το πάγωμα των κυττάρων, σε αντίθεση με το ξεπάγωμα, πρέπει να γίνει αργά διότι με αυτόν τον τρόπο οι κρύσταλλοι πάγου που σχηματίζονται δεν καταστρέφουν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης.

2.2.1.5 Συλλογή των κυτταρικών ιζημάτων

Η συλλογή κυτταρικών ιζημάτων είναι σημαντικό να γίνει από μια καλά αναπτυγμένη καλλιέργεια κυττάρων με σταθερό ρυθμό διπλασιασμού και πραγματοποιείται τη χρονική στιγμή της αραίωσης της καλλιέργειας.

Για κύτταρα που σχηματίζουν επιθήλιο, μετά τη φυγοκέντρηση αναδιαλύουμε το ίζημα σε κατάλληλο όγκο 1×PBS (ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος που υπάρχει προσθέτουμε από 3 έως 6×760μl 1×PBS ώστε να έχουμε 10^6

κύτταρα/ml). Μοιράζουμε 1ml από το αναδιαλυμένο ίζημα σε σωλήνες τύπου eppendorf και τους φυλάσσουμε στους -60°C.

Στην περίπτωση των κυττάρων που δεν σχηματίζουν επιθήλιο, αφού μοιράσουμε την κατάλληλη ποσότητα στις φλάσκες, την υπόλοιπη ποσότητα τη φυγοκεντρούμε στις 1000rpm, για 5min, στους 4°C και ακολουθούμε την ίδια διαδικασία όπως και στα κύτταρα που σχηματίζουν επιθήλιο.

2.2.2 Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές με RNAPure FL System

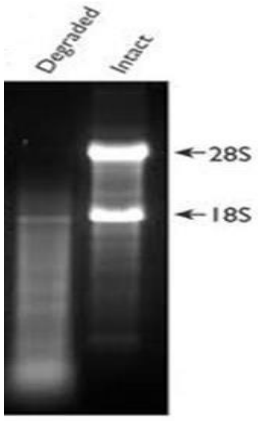
1. Ξεπαγώνουμε το ίζημα των κυττάρων που φυλάσσεται σε 760μl PBS στους -60°C (1/3 του περιεχομένου μιας φλάσκας 250ml) και φυγοκεντρούμε στις 1000rpm, για 2min, στους 4°C.

   *Η φυγοκέντρηση μπορεί να γίνει και σε RT για 3min σε 2000rpm.
2. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε 1ml αντιδραστηρίου RNAPure. Πιπετάρουμε αρκετές φορές για να ομογενοποιήσουμε τα κύτταρα και επωάζουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 0.2ml χλωροφόρμιο και αναδεύουμε έντονα με το χέρι για 15sec. Φυγοκεντρούμε στις 12.000 × g, για 15min, στους 4°C.
3. Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε ένα νέο σωλήνα τύπου eppendorf και προσθέτουμε 0.5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης. Αναδεύουμε με πιπέτα και επωάζουμε για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρούμε στα 12.000 × g, για 15min, στους 4°C.
4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο προσεχτικά και αναδιαλύουμε το ίζημα σε 1ml 70-75% αιθανόλης αραιωμένης με DEPC 0.1% dH_2O. Αναδεύουμε με vortex και φυγοκεντρούμε στα 7.500 × g, για 5min, στους 4°C.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το σωλήνα τύπου eppendorf με ανοιχτό καπάκι για 10min για να στεγνώσει το ίζημα. Υπολείμματα αιθανόλης στα τοιχώματα του σωλήνα αφαιρούνται με πιπέτα Pasteur (έχουμε μικρύνει τη διάμετρο του ανοίγματος της σε φλόγα).

6. Αφού στεγνώσει το ίζημα, προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα dH_2O (50-100μl) με DEPC 0.1% και αναδεύουμε με το χέρι ή με vortex. Φυλάσσεται στους -60°C.

2.2.3 Ποιοτικός έλεγχος του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ποιότητα του ολικού RNA που έχουμε απομονώσει μπορεί να ελεγχθεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, με με προσθήκη βρωμιούχου αιθίδιου. Οι ζώνες του ριβοσωμικού RNA πρέπει να είναι ευδιάκριτες και ο λόγος της φωτεινότητας της ζώνης του 28S rRNA προς του 18S rRNA να είναι 2:1. Εάν οι ζώνες του ριβοσωμικού RNA εμφανίζουν διάχυση προς μικρότερα μεγέθη τότε το RNA έχει αποικοδομηθεί (**Εικόνα 2.3**).



Εικόνα 2.3: Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στην αριστερή διαδρομή το RNA έχει αποικοδομηθεί, ενώ στη δεξιά το RNA είναι καλής ποιότητας και διακρίνονται οι ζώνες του 28S και 18S rRNA

Είναι σημαντικό τόσο το TBE όσο και το πήκτωμα αγαρόζης που θα χρησιμοποιήσουμε να μην έχουν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως, ώστε να αποφύγουμε την πιθανότητα αποικοδόμησης του RNA.

Στο δείγμα ολικού RNA που θα ηλεκτροφορήσουμε προσθέτουμε 2μl 6× Loading Buffer για RNA και ηλεκτροφορούμε στα 32mA.

2.2.4 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA με φωτομέτρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία

Μια από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους για τον προσδιορισμό τόσο της συγκέντρωσης όσο και της καθαρότητας του RNA είναι η φωτομέτρησή του σε

υπεριώδες φως. Η απορρόφηση του αραιωμένου δείγματος RNA μετριέται στα 260nm. Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον νόμο του Beer-Lambert, ο οποίος προβλέπει γραμμική συσχέτιση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης:

$$A = \epsilon CI$$

όπου A η απορρόφηση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, C η συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων, I το μήκος που διανύει το φως περνώντας μέσα από την κυψελίδα (συνήθως 1cm) και ϵ ο συντελεστής απόσβεσης [0.025 (mg/ml)-1cm-1].

Με την παραπάνω εξίσωση, τιμή απορρόφησης στα 260nm ίση με 1 αντιστοιχεί σε ~40μg/ml RNA.

Πρέπει να σημειώσουμε ότι η μέθοδος της φωτομέτρησης δεν διακρίνει το DNA από το RNA.

Η απορρόφηση του RNA συνήθως πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.1 και 1.0. Δείγματα εκτός του παραπάνω εύρους δεν μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια. Γενικά τα μεγαλύτερα σφάλματα προκύπτουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Επειδή A_{260}=0.1 αντιστοιχεί σε ~4μg/ml RNA, δεν δεχόμαστε τιμές απορρόφησης μικρότερες από 0.1 για να αποφύγουμε σφάλματα στον προσδιορισμό.

Ποιοτικός προσδιορισμός του RNA με φωτομέτρηση μπορεί να γίνει εφόσον γνωρίζουμε τις τιμές απορρόφησης του δείγματος RNA στα 260, 280, 230 και 320nm. Η καθαρότητα του RNA από τις πρωτεΐνες υπολογίζεται από το λόγο A_{260}/A_{280} (Τα 280nm είναι το μήκος κύματος απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων). Τιμές 1.8-2.1 αντιστοιχούν σε πολύ καθαρό RNA. Να τονίσουμε ότι ο λόγος A_{260}/A_{280} εξαρτάται από το pH και την ιονική ισχύ. Καθώς αυξάνεται το pH, η A_{280} μειώνεται ενώ η A_{260} δεν επηρεάζεται. Ως αποτέλεσμα ο λόγος A_{260}/A_{280} αυξάνεται. Επειδή το νερό έχει συχνά όξινο pH και μπορεί να μειώσει το λόγο A_{260}/A_{280} προτείνεται η χρήση ελαφρά βασικού διαλύματος, όπως το TE pH 8.0.

Άλλες προσμίξεις, όπως φαινόλη, trizol και άλλες αρωματικές ενώσεις ανιχνεύονται σε A_{230}. Σε αυτή την περίπτωση ο λόγος A_{260}/A_{230} πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1.8.

Η παρουσία σκόνης ή φθορά στην κυψελίδα μετράται με απορρόφηση στα 320nm.

2.2.5 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA με φωτόμετρο BioPhotometer Eppendorf

Στο συγκεκριμένο φωτόμετρο χρησιμοποιείται κυψελίδα 50μl την οποία ξεπλένουμε με DEPC dH_2O. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται αυτόματα στα 260nm, 280nm, 230nm και 320nm. Το συγκεκριμένο μοντέλο υπολογίζει αυτόματα τη συγκέντρωση του RNA, το λόγο A_{260}/A_{280} και A_{260}/A_{230}. Ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία για φωτομέτρηση:

- Προετοιμάζουμε ένα δείγμα με TE pH 8.0 που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό (50μl).
- Προετοιμάζουμε ένα δείγμα με προσθήκη RNA σε TE pH 8.0 με αραίωση 1:50.
- Μηδενίζουμε με το τυφλό πιέζοντας το πλήκτρο «Blank».
- Φωτομετρούμε τα δείγματα μας πιέζοντας το πλήκτρο «sample» ξεκινώντας από το αραιότερο δείγμα.

Ο αυτόματος υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA γίνεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$[RNA] = 40\ \mu g/ml \times A_{260}$$

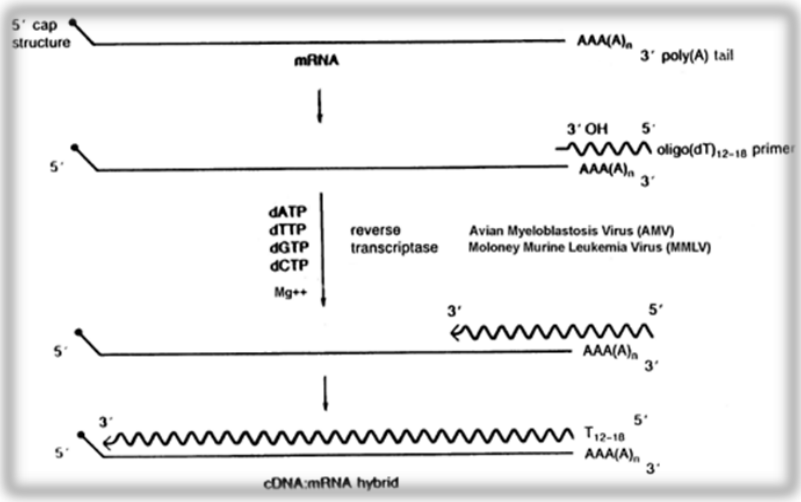
όπου η απορρόφηση 1unit στα 260nm αντιστοιχεί σε 40 μg RNA/ml.

Το αποτέλεσμα της αυτόματης μέτρησης το πολλαπλασιάζουμε έπειτα με το συντελεστή αραίωσης για να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση στο δείγμα μας.

2.2.6 Σύνθεση cDNA από ολικό RNA κυττάρων

Η απομόνωση ολικού RNA από μια κυτταρική σειρά αποτελεί το πρώτο βήμα για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων. Επόμενο βήμα είναι η σύνθεση cDNA από το ολικό RNA των κυττάρων μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής. Όπως είναι γνωστό μόνο τα mRNA των ευκαρυωτικών οργανισμών διαθέτουν ουρά polyA, η οποία εντοπίζεται στο 3’ άκρο τους. Επομένως, χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης (oligodTs), ως εκκινητές, τα οποία υβριδοποιούνται με την ουρά polyA των mRNA, είναι δυνατή η σύνθεση cDNA

Για να αρχίσει η σύνθεση του cDNA είναι αρχικά απαραίτητη η αποδιάταξη του RNA, διότι το RNA δημιουργεί δευτεροταγείς δομές οι οποίες εμποδίζουν την αντίστροφη μεταγραφή. Στη συνέχεια, ακολουθεί η υβριδοποίηση του εκκινητή oligodT με την αλυσίδα των mRNA, που χρησιμεύει ως μήτρα για τη σύνθεση των cDNA. Το τελικό βήμα της πορείας είναι αυτό της αντίστροφης μεταγραφής. Με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση έχουμε επιμήκυνση του 3’ άκρου του εκκινητή, με τελικό αποτέλεσμα τη σύνθεση της αλυσίδας του cDNA. (**Εικόνα 2.4**)



Εικόνα 2.4: Σύνθεση cDNA από mRNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής

Mix A. Αποδιάταξη RNA	
Αντιδραστήρια	**Όγκος (μl)**
RNA	x
oligodT (40ng/μl)	2
0.1% DEPC dH_2O	27-(x+2)
Συνολικά (Mix A)	**27**

-Επώαση της αντίδρασης στους **65 ºC** για **5 min**

Mix B.	
Αντιδραστήρια	**Όγκος (μl)**
Mix A	27
5 x First-strand Buffer	8
0.1 DDT	4
Συνολικά (Mix B)	**39**

-Επώαση της αντίδρασης για πρόσδεση του oligodT στους **42 ºC** για **2 min**

Mix C. Αντίστροφη Μεταγραφή	
Αντιδραστήρια	**Όγκος (μl)**
Mix B	39
Superscript II RT	1
Συνολικά (Mix C)	**40**

- Επώαση της αντίδρασης για πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής στους **42 ºC** για **50 min**

-Επώαση της αντίδρασης για απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης (Riverse Transcriptase) και υδρόλυση του RNA στους **70 ºC** για **15 min.**

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε για τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν παραπάνω. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για τη συγκέντρωση του cDNA διότι το RNA που χρησιμοποιούμε δεν είναι απόλυτα καθαρό, αλλά περιέχει και κάποια ποσότητα DNA.

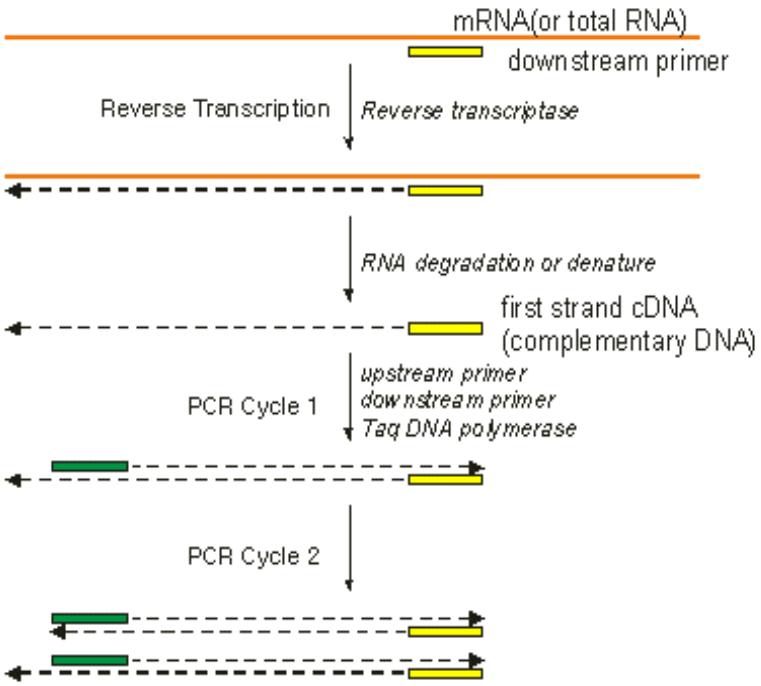
2.2.7 Ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction- RT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA. Στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή μια αλυσίδα RNA μεταγράφεται πρώτα στην συμπληρωματική της αλληλουχία DNA (cDNA) και στη συνέχεια, με τη χρήση εκκινητών και τη βοήθεια της θερμοανεκτικής DNA πολυμεράσης, το τμήμα της αλληλουχίας DNA που ορίζεται από τους εκκινητές πολλαπλασιάζεται εκθετικά δίνοντας πολύ μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Η ανίχνευση του προϊόντος της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθίδιου.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2.5**,, αποτελείται από 2 διακριτές αντιδράσεις:

1) την αντίστροφη μεταγραφή μιας αλυσίδας RNA και

2) τον εκθετικό πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας cDNA που προέκυψε από την αντίδραση 1.



Εικόνα 2.5 Πολλαπλασιαμσός μιας αλληλουχίας cDNA με τη διαδικασία της RT-PCR.

Όταν και οι δύο αντιδράσεις συμβαίνουν στον ίδιο σωλήνα χρησιμοποιώντας RNA ως αρχικό δείγμα τότε αυτή ονομάζεται One-Step RT-PCR. Αν οι 2 αντιδράσεις διαχωρίζονται χρονικά ως δύο διαδοχικές αντιδράσεις τότε αυτή ονομάζεται Two-Step RT-PCR.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εφαρμόστηκε η Two-Step RT-PCR, διότι, σε σχέση με την One-Step RT-PCR, μας δίνει τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε πολλαπλά μετάγραφα ενός γονιδίου από ένα δείγμα RNA, γιατί προσφέρει παράλληλα μεγαλύτερη ευελιξία στην επιλογή των εκκινητών και της DNA πολυμεράσης που θα χρησιμοποιήσουμε.

2.2.8 Αντιδράσεις ελέγχου ποιότητας του cDNA με ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου της GAPDH με RT-PCR

Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – GAPDH ή G3PDH) είναι ένα ένζυμο που έχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και συγκεκριμένα κατά τη γλυκόλυση. Καταλύει την οξειδωτική φωσφορυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης, παρουσία ανόργανου φωσφορικού και νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD). Το γονίδιο της GAPDH εκφράζεται σταθερά, συνεχώς και σε υψηλά επίπεδα σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Επομένως, η ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου της GAPDH αποτελεί ένα καλό θετικό μάρτυρα της ποιότητας του cDNA που παρασκευάζουμε, την αξιολόγηση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούμε κατά την αντίδραση της RT-PCR, ενώ μας δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης των σχετικών επιπέδων έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου. Απουσία ζώνης για το γονίδιο της GAPDH ή παρουσία διάχυσης κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί ένδειξη κακής ποιότητας cDNA ή/και κακής ποιότητας των αντιδραστηρίων της PCR.

2.2.8.1 Two-Step RT-PCR με ζεύγος εκκινητών GAPDH2F/GAPDH3R για ανίχνευση της έκφρασης της GAPDH σε cDNA από κυτταρικές σειρές ανθρώπου

Ο έλεγχος της ποιότητας των cDNA που παρασκευάσαμε είναι ένα απαραίτητο βήμα προκειμένου να προχωρήσουμε σε περαιτέρω πειράματα. Είναι σημαντικό οι δύο εκκινητές να υβριδοποιούνται με διαφορετικά εξώνια του γονιδίου, έτσι ώστε να είναι δυνατή η διάκριση του cDNA από το γενωμικό DNA, δεδομένου ότι κατά την απομόνωση του RNA δεν μπορούμε να απαλλαγούμε πλήρως από το χρωμοσωμικό DNA.

Το ζεύγος των εκκινητών GAPDH2F/GAPDH3R προέρχεται από το εργαστήριο του Α. Σκορίλα.

Το προϊόν που αναμένουμε έχει μέγεθος 107bp.

Αντίδραση PCR για GAPDH	
Αντιδραστήρια	**Όγκος (μl)**
cDNA	1.0[1]
10 × Buffer για DyNAzyme™	5.0
$MgCl_2$ (50mM)	2.0 (2mM)
dNTPs (10mM)	1.0 (0.2mM)
GAPDH2F	1.0
GAPDH3R	1.0
DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase (1U/μl)	1.0
ddH_2O	39.0
Σύνολο	50.0

Συνθήκες			
Κύκλοι	**Στάδιο**	**Θερμοκρασία (°C)**	**Χρόνος (min.sec)**
1	Αρχική αποδιάταξη	95	1
25	Αποδιάταξη	95	0.30
	Υβριδοποίηση εκκινητών	60	1
	Επιμήκυμση	72	0.30
1	Τελική επιμήκυνση	72	3

[1] Εμπειρικά, δεν γνωρίζουμε τη συγκέντρωσή του.

2.2.9 Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος primer BLAST. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών λάβαμε υπόψη μας τις παρακάτω προδιαγραφές που προτείνει ο κατασκευαστής των cDNA των φυσιολογικών ιστών:

Οι εκκινητές πρέπει να υβριδοποιούνται με μοναδικές περιοχές του γονιδίου, δεδομένου ότι το υπό μελέτη γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των δακτύλων ψευδαργύρου, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα και με άλλα γονίδια της ίδιας οικογένειας και περιλαμβάνει και εσώνια.

Το μήκος πρέπει να είναι τουλάχιστον 24 νουκλεοτίδια.

Το περιεχόμενο σε GC πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 45-60%.

Η Tm πρέπει να είναι τουλάχιστον 70°C έτσι ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί 2-step cycling, δηλ. υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση στο ίδιο βήμα, εξασφαλίζοντας μεγάλη ειδικότητα κατά την αντίδραση.

Αποφεύγουμε την παρουσία πάνω από 3 συνεχόμενων G ή C στα 5 τελευταία νουκλεοτίδια του 3΄ άκρου του εκκινητή.

Οι εκκινητές είναι προτιμότερο να δίνουν προϊόν μεταξύ 300-800bp. Αποφεύγουμε ανταγωνισμό από μη ειδικά προϊόντα μικρότερου μεγέθους και χρειαζόμαστε μικρότερο χρόνο για το βήμα της επιμήκυνσης.

Να σημειώσουμε ότι ο κατασκευαστής εγγυάται καθαρό cDNA χωρίς την ύπαρξη χρωμοσωμικού DNA. Οι εκκινητές όμως προορίζονται και για πειράματα με RT-PCR σε κυτταρικές σειρές όπου είναι δύσκολη η απομόνωση ολικού RNA χωρίς την παρουσία DNA. Επομένως

. Εάν οι εκκινητές υβριδοποιούνται σε διαφορετικά εξώνια ο καθένας, μπορεί να γίνει διάκριση του προϊόντος που οφείλεται σε χρωμοσωμικό DNA διότι θα αντιστοιχεί σε μεγαλύτερο μέγεθος από το αναμενόμενο αφού θα παρεμβαίνει και η αλληλουχία του εσωνίου. Εάν οι εκκινητές υβριδοποιούνται σε περιοχή συρραφής των εξωνίων δεν παίρνουμε καθόλου προϊόν που οφείλεται σε χρωμοσωμικό DNA. Παρόλο που η δεύτερη κατηγορία εκκινητών φαίνεται εκ πρώτης όψεως να πλεονεκτεί, εκκινητές που

υβριδοποιούνται σε διαφορετικά εξώνια αφήνουν περιθώρια ανίχνευσης εναλλακτικών μεταγράφων λόγω εναλλακτικού προτύπου συρραφής.

Στην περίπτωση σχεδιασμού εκκινητών για διαφορετικά εναλλακτικά μετάγραφα, στοιχίζουμε τα εναλλακτικά μετάγραφα μεταξύ τους με χρήση του λογισμικού BLAST ώστε να εντοπίσουμε τις ομοιότητες και τις διαφορές. Εφόσον μας ενδιαφέρει η ξεχωριστή ανίχνευση της έκφρασης ενός εναλλακτικού μεταγράφου πρέπει τουλάχιστον ο ένας από τους δυο εκκινητές που θα σχεδιαστούν να υβριδοποιείται με μοναδική για το εναλλακτικό μετάγραφο περιοχή.

Σημαντικό για την απόδοση των εκκινητών είναι να σχηματίζουν όσο το δυνατόν λιγότερα διμερή τα οποία επηρεάζουν την αντίδραση της PCR. Πρόβλεψη για το σχηματισμό διμερών γίνεται με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος FASTPCR.

2.2.10 Ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου ZNF519 με RT-PCR

2.2.10.1 Ανίχνευση νέων μεταγράφων του γονιδίου ZNF519 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με Two-Step RT-PCR και το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RNC

Το πρώτο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε προκειμένου να ανιχνεύσουμε νέα μετάγραφα του γονιδίου ZNF519 στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές είναι οι **519F1/519RNC**. Με το συγκεκριμένο ζεύγος έχουν ανιχνευθεί το μετάγραφοο **3** στα 611bp, το μετάγραφο **4** στα 533bp, το μετάγραφο **5** στα 406bp, το μετάγραφο **9** στα 484bp και το μετάγραφο **10** στα 557bp. Τα νέα μετάγραφα που ανιχνεύσαμε είναι το μετάγραφο **11** στα 761bp, το μετάγραφο **12** στα 847bp, το μετάγραφο **13** στα 769bp, το μετάγραφο **14** στα 312bp.

Αντίδραση PCR με εκκινητές 519F1/519RNC		
Αντιδραστήρια	SH-SY5Y (μl)	BL41 (μl)
10×Buffer για DyNAzyme™	5.0	5.0
$MgCl_2$ (50mM)	2.0	2.0
dNTPs (10mM)	1.0	1.0
519F1 (20pmol/μl)	1.0	1.0
519RNC (20pmol/μl)	1.0	1.0
cDNA κυτταρικής σειράς	3.0	4.0
DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase (1U/μl)	1.0	1.0
ddH_2O	36.0	35.0
Σύνολο	50.0	50.0

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων	
Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
$MgCl_2$(50mM)	2.0 (2mM)
dNTPs(10mM)	1.0 (0.2mM)
519F1(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)
519RNC(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)

Συνθήκες			
Κύκλοι	Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min.sec)
1	Αρχικήαποδιάταξη	94	1.0
35	Αποδιάταξη	94	0.30
	Υβριδοποίηση εκκινητών	68	1.0
	Επιμήκυνση	72	1.0
1	Τελική επιμήκυνση	72	45

2.2.10.2 Ανίχνευση νέων μεταγράφων του γονιδίου ZNF519 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με Two-Step RT-PCR και το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RSHORT1

Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε προκειμένου να ανιχνεύσουμε νέα μετάγραφα του γονιδίου ZNF519 στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές είναι οι εκκινητές **519F1/519RSHORT1**. Στόχος μας ήταν η ανίχνευση του μεταγράφου 1 στα 1938bp καθώς και να ελέγξουμε εάν τα μεταγράφα 2 και 8 ανιχνεύονται με τον 519RSHORT1. Τα υποθετικά μεγέθη είναι: για το μετάγραφο 2, 2072bp και για το μετάγραφο 8, 1812bp. Τελικά ανιχνεύσαμε το μετάγραφο **8** στα 1812bp.

Αντίδραση PCR με εκκινητές 519F1/519RSHORT1		
Αντιδραστήρια	SH-SY5Y	Hela
10×BufferγιαDyNAzyme™	5.0	5.0
$MgCl_2$ (50mM)	2.0	2.0
dNTPs (10mM)	1.0	1.0
519F1 (20pmol/μl)	1.0	1.0
519RSHORT1 (20pmol/μl)	1.0	1.0
cDNA κυτταρικής σειράς	3.0	3.0
DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase (1U/μl)	1.0!	1.0!
ddH_2O	36.0!	36.0!
Σύνολο	50.0	50.0

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων	
Αντιδραστήρια	**Τελική συγκέντρωση**
$MgCl_2$(50mM)	2.0 (2mM)
dNTPs(10mM)	1.0 (0.2mM)
519F1(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)
519RHORT1(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)

Συνθήκες			
Κύκλοι	**Στάδιο**	**Θερμοκρασία (°C)**	**Χρόνος (min.sec)**
1	Αρχική αποδιάταξη	94	2.0
35	Αποδιάταξη	94	1.0
	Υβριδοποίηση εκκινητών	65	1.0
	Επιμήκυνση	72	1.30
1	Τελική επιμήκυνση	72	45.0

2.2.10.3 Ανίχνευση της έκφρασης του ZNF519 σε ανθρώπινους ιστούς μαστού και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με Two-Step RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RNC

cDNA	Περιγραφή-Προέλευση
E101C	Ανθρώπινος καρκινικός ιστός μαστού
E101H	Ανθρώπινος υγιής ιστός μαστού
E91C	Ανθρώπινος καρκινικός ιστός μαστού
E91H	Ανθρώπινος υγιής ιστός μαστού
BT20	Κυτταρική σειρά μαστού
MCF7	Κυτταρική σειρά μαστού

Τα cDNA που περιγράφονται στον παραπάνω πίνακα και χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, προσφέρθηκαν από την ερευνητική μονάδα του Α. Σκορίλα. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι οι ανθρώπινοι υγιείς ιστοί μαστού είναι παρακείμενοι των αντίστοιχων καρκινικών.

Συνολικά θα πραγματοποιηθούν 6 αντιδράσεις PCR. Καθώς όμως η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γίνεται συγκριτικά μεταξύ τους, προχωράμε σε

παρασκευή συνολικού μείγματος (Master Mix), έτσι ώστε να εξασφαλιστούν ακριβώς ίδιες συνθήκες για κάθε αντίδραση και να αποφευχθούν σφάλματα κατά το πιπετάρισμα. Επομένως υπολογίζουμε αντιδραστήρια για 7 αντιδράσεις, δηλ. αύξηση 10% του όγκου του master Mix που θα αναλογούσε στις 6 αντιδράσεις. Είναι σημαντικό να γίνει καλή ανάδευση του master Mix.

Master Mix		
Αντιδραστήρια	**Όγκος για μία**	**Όγκος για 7 αντιδράσεις**
10 × Buffer για DyNAzyme™	5.0	35.0
$MgCl_2$ (50mM)	2.0	14.0
dNTPs (10mM)	1.0	7.0
519F1 (20pmol/μl)	1.0	7.0
519RNC (20pmol/μl)	1.0	7.0
ddH_2O	38.0	266.0
Συνολικά	**48.0**	**336.0**

Αντίδραση PCR με εκκινητές 519F1/519RNC	
Αντιδραστήρια	**Όγκος μL**
Master Mix	48.0
cDNA	1
DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase (1U/μl)	1
Συνολικά	**50.0**

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων	
Αντιδραστήρια	**Τελική συγκέντρωση**
$MgCl_2$(50mM)	2.0 (2mM)
dNTPs(10mM)	1.0 (0.2mM)
519F1(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)
519RNC(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)

Συνθήκες			
Κύκλοι	**Στάδιο**	**Θερμοκρασία (°C)**	**Χρόνος (min.sec)**
1	Αρχική αποδιάταξη	94	1.0
35	Αποδιάταξη	94	0.30
	Υβριδοποίηση εκκινητών	68	1.0
	Επιμήκυνση	72	1.0
1	Τελική επιμήκυνση	72	10.0

2.2.10.4 Ανίχνευση της έκφρασης του ZNF519 σε ανθρώπινους ιστούς μαστού και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με Two-Step RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RSHORT1

N° 1. Για τα cDNA, τον αριθμό των αντιδράσεων και τα αντιδραστήρια της PCR ισχύει ακριβώς ότι περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο (2.2.10.3). Διαφέρουν όμως οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις λόγω του διαφορετικού ζεύγους των εκκινητών.

Συνθήκες			
Κύκλοι	**Στάδιο**	**Θερμοκρασία (°C)**	**Χρόνος (min.sec)**
1	Αρχικήαποδιάταξη	94	2.0
35	Αποδιάταξη	94	1.0
	Υβριδοποίηση εκκινητών	65	1.0
	Επιμήκυνση	72	1.30
1	Τελική επιμήκυνση	72	10.0

Nº2.

cDNA !	Περιγραφή-Προέλευση!
K296C	Ανθρώπινος καρκινικός ιστός μαστού
K296H	Ανθρώπινος υγιής ιστός μαστού

Για τα cDNA ισχύει ό,τι αναφέρθηκε παραπάνω.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 αντιδράσεις, ως εξής:

Αντίδραση PCR με εκκινητές 519F1/519RSHORT1!				
!!!!!!!!Αντιδραστήρια!	K296C	K296H	!SH-SY5Y!	Hela!
10×BufferγιαDyNAzyme™	2.5	2.5	2.5	2.5
$MgCl_2$ (50mM) !	1.0	1.0	1.0!	1.0!
dNTPs (10mM) !	0.5	0.5	!!!!!!!!!!!!!0.5!	0.5!
519F1 (20pmol/μl) !	0.5	0.5	!!!!!!!!!!!!!0.5!	0.5!
519RSHORT1 (20pmol/μl) !	0.5	0.5	0.5 !	0.5!
cDNA κυτταρικής σειράς !	1.0	1.0	1.5 !	1.5!
DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase (1U/μl) !	0.5	0.5	0.5	0.5
ddH_2O !	18.5	18.5	18.0!	18.0!
Σύνολο!	25.0	25.0	25.0 !	25.0 !

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων!	
Αντιδραστήρια!	Τελική συγκέντρωση!
$MgCl_2$(50mM)	2.0 (2mM)!
dNTPs(10mM)	1.0 (0.2mM)!
519F1(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)!
519RHORT1(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)!

Συνθήκες			
Κύκλοι	**Στάδιο**	**Θερμοκρασία (°C)**	**Χρόνος (min.sec)**
1	Αρχική αποδιάταξη	94	2.0
35	Αποδιάταξη	94	1.0
	Υβριδοποίηση εκκινητών	65	1.0
	Επιμήκυνση	72	1.30
1	Τελική επιμήκυνση	72	10.0

2.2.10.5 Ανίχνευση της έκφρασης του ZNF519 σε cDNA panels της Clontech από ενήλικους και εμβρυϊκούς ιστούς με RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RSHORT1

Στα cDNA panels είναι απαραίτητο να γίνουν τα παρακάτω πειράματα ελέγχου πριν την εκτέλεση της PCR:

- Εντοπίζουμε τις κατάλληλες συνθήκες της αντίδρασης PCR που μας δίνουν τα αναμενόμενα προϊόντα πραγματοποιώντας αντιδράσεις PCR σε cDNA κυτταρικής σειράς όπου γνωρίζουμε ότι εκφράζεται το γονίδιο μας.

- Έλεγχος των εκκινητών ως προς το σχηματισμό διμερών, τα οποία επιμηκύνονται, πολλαπλασιάζονται και δρουν ανταγωνιστικά στον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού προϊόντος. Σχεδιάζουμε μία αντίδραση PCR με τις συνθήκες όπου εντοπίζουμε το επιθυμητό προϊόν αλλά προσθέτουμε cDNA και αυτός είναι ο αρνητικός μάρτυρας. Αν παρατηρηθεί σχηματισμός προϊόντος, τότε οι εκκινητές σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους.

- Πραγματοποίηση αντίδρασης PCR σε ανθρώπινο cDNA ελέγχου (human control cDNA) με συνθήκες στις οποίες εντοπίζεται το επιθυμητό προϊόν και παίρνουμε δείγμα στους 29 και 32 κύκλους για να εντοπίσουμε την εκθετική φάση της αντίδρασης (η ένταση της ζώνης διπλασιάζεται από κύκλο σε κύκλο κατά την εκθετική φάση). Είναι σημαντικό η αντίδραση να τερματίζεται σε εκθετική φάση έτσι ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ των ιστών.

- Πραγματοποίηση αντίδρασης PCR στα cDNA panels για ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου της GAPDH. (Το συγκεκριμένο πείραμα ελέγχου δεν έγινε λόγω περιορισμένης ποσότητας των cDNA panels).

Αξίζει να σημειωθεί ότι:

- ✓ Από τα πειράματα ελέγχου προέκυψε ότι η αντίδραση βρίσκεται σε εκθετική φάση στους 32 κύκλους.
- ✓ Πραγματοποιήσαμε 10 αντιδράσεις PCR για τα cDNA εμβρυϊκών και ενήλικων ιστών (8 ιστοί, 1 αντίδραση αρνητικού ελέγχου, 1 αντίδραση θετικού ελέγχου) με παρασκευή Master Mix.
- ✓ Στην αντίδραση θετικού ελέγχου των εμβρυϊκών ιστών χρησιμοποιήθηκε cDNA κυτταρικής σειράς Hela και στην αντίστοιχη των ενηλίκων ιστών χρησιμοποιήθηκε cDNA κυτταρικής σειράς SY5Y.

Master Mix		
Αντιδραστήρια	**Όγκος για 1 αντίδραση (μl)**	**Όγκος για 12 αντιδράσεις (μl)**
10 × Buffer για DyNAzyme™	5.0	60.0
$MgCl_2$ (50mM)	2.0	24.0
dNTPs (10mM)	1.0	12.0
519F1 (20pmol/μl)	1.0	12.0
519RSHORT1 (20pmol/μl)	1.0	12.0
ddH_2O	34.0	408.0
Σύνολο	**44.0**	**528.0**

Αντίδραση PCR με εκκινητές 519F1/519RSHORT1			
Αντιδραστήρια	ZNF519	Negative ctrl	Positive ctrl
Master Mix	44.0	44.0	44.0/44.0
Hela/SY5Y cDNA	-	-	5.0/2.0
panels cDNA (1ng/μl)	5.0	-	-/-
DyNAzyme™ EXT DNA Pol. (1U/μl)	1.0	1.0	1.0/1.0
ddH_2O	-	5.0	1.0/3.0
Συνολικά	**50.0**	**50.0**	**50.0/50.0**

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων	
Αντιδραστήρια	**Τελική συγκέντρωση**
$MgCl_2$(50mM)	2.0 (2mM)
dNTPs(10mM)	1.0 (0.2mM)
519F1(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)
519RHORT1(20pmol/μl)	1.0 (0.4pmol/μl)

Συνθήκες			
Κύκλοι	Στάδιο	**Θερμοκρασία (°C)**	**Χρόνος (min.sec)**
1	Αρχική αποδιάταξη	94	1.0
35	Αποδιάταξη	94	0.30
	Υβριδοποίηση εκκινητών	65	1.30
	Επιμήκυνση	72	1.30
1	Τελική επιμήκυνση	72	3.0

- Πήραμε δείγμα στους 32 και στους 35 κύκλους.
- Παρόλο που το πείραμα ελέγχου μας έδειξε ότι η αντίδραση βρίσκεται στην εκθετική της φάση στους 32 κύκλους, πήραμε δείγμα και στους 35 για να επιβεβαιώσουμε ότι η εκθετική φάση δεν συνεχίζεται μετά τους 32 κύκλους. Στο πείραμα ελέγχου λόγω περιορισμένης ποσότητας του cDNA

ελέγχου είχαμε τη δυνατότητα να πάρουμε δείγμα μόνο σε δύο σημεία και όχι σε τρία όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή.

2.2.11 Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της RT-PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα, λόγω των φωσφορικών τους ομάδων, με αποτέλεσμα όταν εφαρμόζεται σε πήκτωμα αγαρόζης ηλεκτρικό πεδίο, αυτά να κινούνται προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου, με ταχύτητα η οποία καθορίζεται από την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η τελευταία, τόσο γρηγορότερα μεταναστεύουν τα τμήματα του DNA. Η διαφορά δυναμικού που χρησιμοποιείται είναι της τάξης 4 -10 Vcm^{-1}. Για να γίνουν ορατά τα τμήματα του DNA, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο κατά την παρασκευή του πηκτώματος το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων και φθορίζει κάτω από ακτινοβολία UV. Επιπλέον για να προσδιορίσουμε το μέγεθος και την ποσότητα των προϊόντων της RT-PCR ηλεκτροφορούμε παράλληλα με το δείγμα μας ένα μάρτυρα μοριακών μεγεθών (marker) που περιέχει τμήματα νουκλεϊκών οξέων γνωστού μεγέθους και ποσότητας.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR περιγράφεται παρακάτω.

Παρασκευάσαμε πήκτωμα αγαρόζης 2% το οποίο επιτρέπει ικανοποιητική διάκριση των προϊόντων της RT-PCR. Αναλυτικότερα, το μέγεθος των προϊόντων που αναμέναμε από PCR με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC κυμαίνονται μεταξύ 100-1000bp. Στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RSHORT1 όπου τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων βρίσκονται περίπου στα 2000bp, παρασκευάστηκε πήκτωμα συγκέντρωσης 1.7%.

Στο κάθε δείγμα προσθέσαμε 6 × Loading Dye το οποίο μέσω των χρωστικών μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανού του ξυλενίου επιτρέπει

τον έλεγχο της πορείας της ηλεκτροφόρησης στο ορατό φως, διότι οι 2 ζώνες της χρωστικής αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα μεγέθη.

Από κάθε δείγμα «φορτώσαμε» 45μl.

Παράλληλα με το υπό προσδιορισμό δείγμα ηλεκτροφορήσαμε και 1μl κατάλληλου μάρτυρα μοριακών μεγεθών.

Ηλεκτροφορήσαμε αρχικά στα 32mA και στη συνέχεια στα 55 mA.

2.2.12 Απομόνωση άγνωστου τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με το NucleoSpin® Extract II Kit της Macherey-Nagel

Μετά την ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR όπως περιγράφηκε παραπάνω, φωτογραφίσαμε το πήκτωμα για να ημιποσοτικοποίησουμε τις ζώνες που αντιστοιχούν στο άγνωστο τμήμα DNA με τη βοήθεια του μάρτυρα μοριακών μεγεθών και να προσδιορίσουμε τον όγκο της έκλουσης στην παρακάτω διαδικασία.

Για την απομόνωση των ζωνών από το πήκτωμα ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή με τις παρακάτω διαφοροποιήσεις:

- Στο βήμα 1 προσθέσαμε μεγαλύτερη ποσότητα NT Buffer για να διαλυθεί το πήκτωμα από αυτή που προτείνει το πρωτόκολλο (πχ. 100μl αντί για 60μl).
- Στο βήμα 2 φυγοκεντρήσαμε για 2min.
- Στο βήμα 3 φυγοκεντρήσαμε για 3min.
- Στο βήμα 4 φυγοκεντρήσαμε για 4min.
- Στο βήμα 5 χρησιμοποιήσαμε TE pH 8.0, αντί για NE, το οποίο είχε θερμανθεί στους 65°C. Αφήσαμε για επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου την έκλουση από την κολώνα και μετά προχωρήσαμε σε φυγοκέντρηση για 10min.

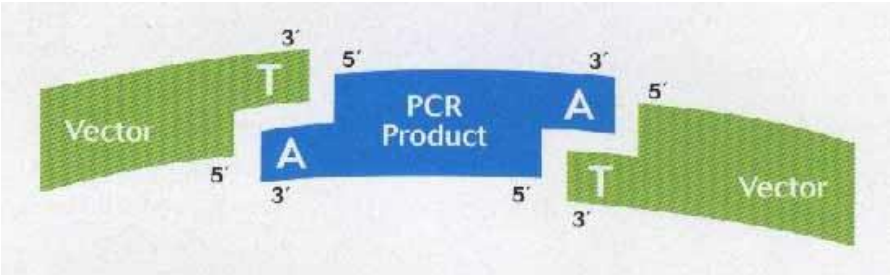
Μετά από κάθε έκλουση ηλεκτροφορήσαμε μια μικρή ποσότητα της για ποιοτικό και ημιποσοτικό προσδιορισμό του άγνωστου DNA που απομονώσαμε, δεδομένου ότι υπάρχουν απώλειες από τη συνολική ποσότητα DNA που απομονώνουμε λόγω κατακράτησης στην κολώνα. Σε κάποιες όμως περιπτώσεις

αυτό δεν ήταν εφικτό γιατί η άγνωστη ζώνη που θέλαμε να ταυτοποιήσουμε ήταν εξαρχής σε χαμηλή συγκέντρωση. Επομένως, σε αυτές τις περιπτώσεις προχωρήσαμε κατευθείαν σε αντίδραση σύνδεσης πλασμιδίου-τμήματος DNA προσθέτοντας όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα από το άγνωστο τμήμα DNA ώστε να αυξήσουμε τις πιθανότητες σωστής σύνδεσης.

2.2.13 Κλωνοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πλασμιδιακό φορέα για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του

2.2.13.1 Κλωνοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης PCR με την μέθοδο TA Cloning

Η κλωνοποίηση ΤΑ είναι μια από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους κλωνοποίησης προϊόντος της PCR. Το προϊόν ενισχύεται από μια Taq πολυμεράση που μπορεί να προσθέτει κατάλοιπα αδενίνης με κατεύθυνση 5΄→ 3΄ στα άκρα του προϊόντος της PCR και δεν διαθέτει την ιδιότητα της επιδιόρθωσης 5΄→ 3΄. Έτσι, καθίσταται εφικτή η συνένωση του προϊόντος με γραμμικό πλασμιδιακό φορέα που φέρει επιπλέον κατάλοιπα θυμίνης σε κατεύθυνση 5΄→ 3΄, με τη δράση της DNA λιγάσης.



Εικόνα 2.6. Αρχή της μεθόδου TA Cloning

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε το TA Cloning® Kit της Invitrogen και το InsTAclone™PCR Cloning Kit της Fermentas. Τα kit αυτά παρέχουν πλασμιδιακούς φορείς που διαθέτουν πολυσύνδεσμο με αλληλουχίες που αναγνωρίζουνται από διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και αλληλουχίες εκκινητών, όπως ο M13F και M13R.

Η μέθοδος της κλωνοποίησης του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε με απώτερο σκοπό την αλληλούχιση του προϊόντος της PCR.

2.2.13.2 Ενίσχυση αγνώστου τμήματος DNA μέσω PCR με σκοπό την κλωνοποίηση του σε πλασμιδιακό φορέα

Μία παράμετρος που πρέπει να ικανοποιείται για να έχουμε επιτυχή αντίδραση σύνδεσης τμήματος DNA-πλασμιδίου είναι να έχουμε αρκετή ποσότητα προϊόντος PCR για την κλωνοποίηση. Η αναλογία πλασμιδίου- τμήματος DNA πρέπει να είναι 1:1, δηλαδή χρειαζόμαστε τουλάχιστον 50ng προϊόντος PCR. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε περισσότερες από μία (συνήθως 3 ή 4) ίδιες αντιδράσεις PCR.

Επιπλέον, στον τελευταίο κύκλο της PCR, η τελική επιμήκυνση πραγματοποιείται για 45min ώστε να εξασφαλίσουμε την προσθήκη καταλοίπων αδενίνης στο 3' άκρο της κάθε αλυσίδας του προϊόντος. Προκειμένου να αποφύγουμε την αποικοδόμηση των μονόκλωνων άκρων αδενίνης, είναι πολύ σημαντικό να προχωρήσουμε όσο το δυνατόν πιο γρήγορα στην απομόνωση της άγνωστης ζώνης από το πήκτωμα αγαρόζης, ύστερα από τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, καθώς και στην αντίδραση σύνδεσης με τον πλασμιδιακό φορέα εντός του 24ώρου από τη λήξη της RT-PCR.

2.2.13.3 Αντίδραση σύνδεσης πλασμιδίου – ενθέματος

Οι αντιδράσεις σύνδεσης πλασμιδίου-ενθέματος κάθε φορά διαφέρουν ανάλογα με την ποσότητα του αγνώστου DNA που αρκετές φορές εμπειρικά υπολογίσαμε ότι έχουμε στην Α΄ έκλουση, μετά την απομόνωσή του από το πήκτωμα αγαρόζης.

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήσαμε το InsTAclone™PCR Cloning Kit της Fermentas η αντίδραση σύνδεσης έγινε με βάση τον κατασκευαστή ως εξής:

Αντίδραση ligation	
Αντιδραστήρια	**Όγκος (μl)**
5 × buffer για T4 ligase	6.0
Άγνωστη ζώνη DNA	X (175ng)*
φορέας pTZ57R/T (55 ng/μl**)**	3.0
T4 ligase (5 Weiss units/μl**)**	1.0
ddH_2O	20-X
Σύνολο	**30.0**

*X : όγκος σε μl της έκλουσης του αγνώστου τμήματος DNA που αντιστοιχεί σε 175 ng DNA.

☑ Επωάσαμε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 14h (over night, o/n).

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήσαμε το TA Cloning® Kit της Invitrogen η αντίδραση σύνδεσης έγινε ως εξής:

Αντίδραση ligation	
Αντιδραστήρια	**Όγκος (μl)**
10 × buffer για T4 ligase	2.0
Άγνωστη ζώνη DNA	X (50ng)*
φορέας pCR®2.1 (25ng/μl)	2.0
T4 ligase (4.0 Weiss units)	1.0
ddH_2O	15 - X
Σύνολο	**20.0**

*X : όγκος σε μl της έκλουσης του αγνώστου τμήματος DNA που αντιστοιχεί σε 50 ng DNA.

☑ Επωάσαμε στους 14°C για τουλάχιστον 14h (o/n).

2.2.14 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με την αντίδραση σύνδεσης

2.2.14.1 Μετασχηματισμός παγωμένων δεκτικών κυττάρων *! "#$%&* DH5α με την αντίδραση σύνδεσης

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο από το «Molecular Cloning» (Maniatis et al. 1989) με κάποιες διαφοροποιήσεις:

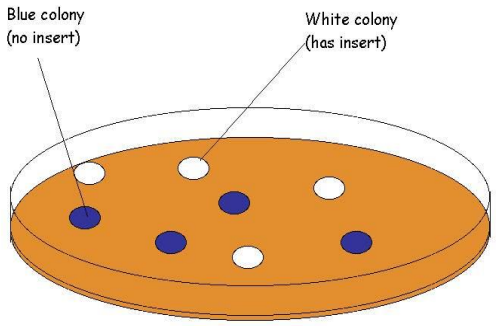
Ξεπαγώσαμε aliquot 200μl δεκτικών κυττάρων DH5α και επωάσαμε 10min στον πάγο. Προσθέσαμε τον μισό όγκο της αντίδρασης σύνδεσης (5-10 % περίπου σε σχέση με τον όγκο των βακτηριακών κυττάρων) και αναδεύσαμε ήπια. Επωάσαμε για 30min στον πάγο. Πραγματοποιήσαμε θερμικό σοκ (heat shock) για 2min σε υδατόλουτρο στους 42°C. Μεταφέραμε γρήγορα στον πάγο και επωάσαμε για 1-2min. Προσθέσαμε 800μl θρεπτικό διάλυμα SOC και μεταφέραμε σε ανακινούμενο επωαστήρα στους 37°C για 60min. Φυγοκεντρήσαμε το εναιώρημα των κυττάρων στις 4000rpm, για 7min στους 22°C. Αφαιρέσαμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύσαμε το ίζημα σε 200μl SOC. Επιστρώσαμε ένα τρυβλίο με LB medium και αμπικιλίνη, 100μg/ml, με 200μl κυττάρων, στο οποίο προηγουμένως έχουμε επιστρώσει 40μl X-gal (20mg/mL σε DMF) + 7μl 0.5M IPTG και επωάσει για 2h στους 37°C. Επωάσαμε για 16-18h σε κλίβανο στους 37°C.

2.2.14.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *! "$%&* XL1blue με την αντίδραση σύνδεσης

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή του InsTAclone™PCR Cloning Kit της Fermentas, κάνοντας τις απαραίτητες προσαρμογές στους όγκους ώστε να επιστρώσουμε σε κάθε τρυβλίο 200μl μετασχηματισμένων κυττάρων με 10μl από την αντίδραση σύνδεσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα για μετασχηματισμό δεν είναι παγωμένα και ότι μέσω της διαδικασίας που περιγράφει το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μετατρέπονται σε δεκτικά λίγο πριν το μετασχηματισμό τους.

2.2.15 Επιλογή αποικιών και απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες με αλκαλική λύση

Κατά την κλωνοποίηση στο πλασμίδιο, το ένθεμα παρεμβαίνει στην αλληλουχία του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης και συνεπώς το απενεργοποιεί. Επομένως όσες αποικίες έχουν το ένθεμα, δεν έχουν λειτουργικό γονίδιο β-γαλακτοσιδάσης και παραμένουν λευκές.



Εικόνα 2.7: Τρυβλίο που περιέχει λευκές και μπλε αποικίες.

Επιλέξαμε από το τρυβλίο μεγάλες και λευκές αποικίες και τις μεταφέραμε σε 3ml θρεπτικού υλικού LB με αμπικιλίνη (100μg/ml). Επωάσαμε σε ανακινούμενο κλίβανο (shaking incubator) για 16-18h στους 37°C.

Στο επόμενο βήμα πραγματοποιήσαμε **αλκαλικές λύσεις** στις υγρές καλλιέργειες για απομόνωση πλασμιδιακού DNA ακολουθώντας το πρωτόκολλο από το «Molecular Cloning» (Maniatis et al. 1989) με τις παρακάτω διαφοροποιήσεις:

Στο βήμα 3 αναδεύσαμε με το χέρι.

Στο βήμα 4 φυγοκεντρήσαμε για 15min, 4°C.

Στο βήμα 5, χρησιμοποιήσαμε χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη, 24:1, και όχι μόνο χλωροφόρμιο για την παρασκευή του διαλύματος φαινόλη: χλωροφόρμιο.

Στο βήμα 6 χρησιμοποιήσαμε 2.5 όγκους αιθανόλης.

Στο βήμα 7 φυγοκεντρήσαμε για 10-15min, 13000 × g στους 4°C.

2.2.15.1 Ποιοτικός έλεγχος του πλασμιδιακού DNA με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Με βάση την αλληλουχία του κάθε πλασμιδιακού φορέα στη θέση κλωνοποίησης, επιλέξαμε τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες που κόβουν όσο το

δυνατόν πιο κοντά στα άκρα του προϊόντος PCR που έχει κλωνοποιηθεί. Από την πέψη, εφόσον η κλωνοποίηση είναι επιτυχής, αναμένουμε ένα τμήμα που αντιστοιχεί στο φορέα και ένα τμήμα που αντιστοιχεί στην άγνωστη ζώνη που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε.

Αντίδραση Πέψης (φορέας pCR2.1)	
Αντιδραστήρια	**Όγκος (μl)**
10 × buffer για EcoRI	2.0
Πλασμιδιακό DNA	2.0[2]
RNase A[3] (20mg/ml)	1.0
EcoRI (15u/μl)	1.0
ddH_2O	14.0
Σύνολο	**20.0**

Αντίδραση Πέψης (φορέας pTZ57R/T)	
Αντιδραστήρια	**Όγκος (μl)**
10 × buffer για BamHI	2.0
Πλασμιδιακό DNA	X
RNase A (20mg/ml)	1.0
EcoRI (15u/μl)	1.0
BamHI (15u/μl)	1.0
ddH_2O	15.0-X
Σύνολο	**20.0**

- ✓ Αφήσαμε τις πέψεις για επώαση για 2 ώρες στους 37°C.
- ✓ Τερματίσαμε την αντίδραση με τη προσθήκη 2μl 6 × loading dye της Fermentas, που περιέχει 60mM EDTA και ηλεκτροφορήσαμε το δείγμα σε 2% ή 1.5% (ανάλογα με το μέγεθος της ζώνης που έχει κλωνοποιηθεί) πήκτωμα αγαρόζης. Παράλληλα ηλεκτροφορήσαμε 1μl μάρτυρα μοριακών μεγεθών

2 Επειδή δεν γνωρίζουμε την συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA που απομονώσαμε από τις υγρές καλλιέργειες με αλκαλική λύση προσθέσαμε εμπειρικά την ποσότητα .

3 Προσθέτουμε RNase, διότι με τις αλκαλικές λύσεις απομονώνουμε και βακτηριακό RNA, γεγονός που δημιουργεί πρόβλημα στην ηλεκτροφόρηση των πέψεων.

- ✓ Φωτογραφίσαμε το πήκτωμα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης σε σκοτεινό θάλαμο υπό ακτινοβολία UV.
- ✓ Επιλέξαμε τις καλλιέργειες με τον επιθυμητό κλώνο και προχωρήσαμε σε υγρές ανακαλλιέργειες, προσθέτοντας 200μl από την αρχική υγρή καλλιέργεια σε 3ml LB και αμπικιλίνης (100μg/ml). Επωάσαμε σε επωαστήρα με ανάδευση για 16-18h στους 37°C.

2.2.16 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με Nucleospin plasmid kit της Macherey-Nagel

Το πλασμιδιακό DNA που απομονώσαμε με τη μέθοδο των αλκαλικών λύσεων δεν είναι αρκετά καθαρό για να χρησιμοποιηθεί σε αντίδραση αλληλούχισης. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση kit.

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Επαναλαβάμε το βήμα 3 για μεγαλύτερη καθαρότητα. Η Α' έκλουση στο τελευταίο βήμα έγινε με 45μl ΤΕ pH 8.0 αντί με ΑΕ και η Β' έκλουση με 30μl. Το ΤΕ pH 8.0 είναι κατάλληλο για αντίδραση αλληλούχισης επειδή περιέχει EDTA που είναι αναστολέας των νουκλεασών.

2.2.16.1 Ποιοτικός έλεγχος του πλασμιδιακού DNA με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση σε 2% και 1.5% πήκτωμα αγαρόζης

Επαναλάβαμε τη διαδικασία πέψης που περιγράψαμε παραπάνω, με τη διαφορά ότι δεν προσθέσαμε RNase. Το συγκεκριμένο ένζυμο περιέχεται στο buffer A1 του kit.

2.2.17 Προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA και προετοιμασία του δείγματος για την αντίδραση αλληλούχισης

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους:

i) Με ηλεκτροφόρηση (ημιποσοτικός προσδιορισμός)

Έπειτα από τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων της πέψης και τη φωτογράφηση του πηκτώματος, συγκρίνουμε την ένταση της φωτεινότητας μεταξύ των τμημάτων DNA του μάρτυρα μοριακών μεγεθών (δεδομένου ότι γνωρίζουμε τη μάζα κάθε τμήματος νουκλεϊκών οξέων που τον απαρτίζουν) και του δείγματος.

ii) Με φωτομέτρηση (ποσοτικός προσδιορισμός)

Μετρήσαμε την απορρόφηση στα 260nm του αραιωμένου (1:50) δείγματος της Α΄έκλουσης. Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήσαμε είναι το φωτόμετρο BioPhotometer eppendorf. Η συγκέντρωση υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

[DNA]= 50μg/ml x A260 x Αραίωση

Ετοιμάσαμε δείγμα από την Α’ έκλουση με κατάλληλη συγκέντρωση και ποσότητα με βάση τις απαιτήσεις της εταιρείας αλληλούχισης. Για τη Macrogen, το δείγμα συνιστάται να έχει συγκέντρωση 100ng/μl και τελικό όγκο 20μl.

Ως εκκινητές για την αντίδραση αλληλούχισης επιλέξαμε τους **M13F** και **M13R-puc**.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανίχνευση, κλωνοποίηση και ταυτοποίηση των εναλλακτικών μεταγράφων 8, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου ZNF519

Ένας από τους στόχους της διπλωματικής εργασίας, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, ήταν η ανίχνευση των εναλλακτικών μεταγράφων του ZNF519 και η δημιουργία ενός προτύπου έκφρασης για αυτά τα μετάγραφα σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με εφαρμογή της μεθόδου Two-Step RT-PCR. Τελικά κλωνοποιήσαμε και ταυτοποιήσαμε 4 νέα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου καθώς και το μετάγραφο 8.

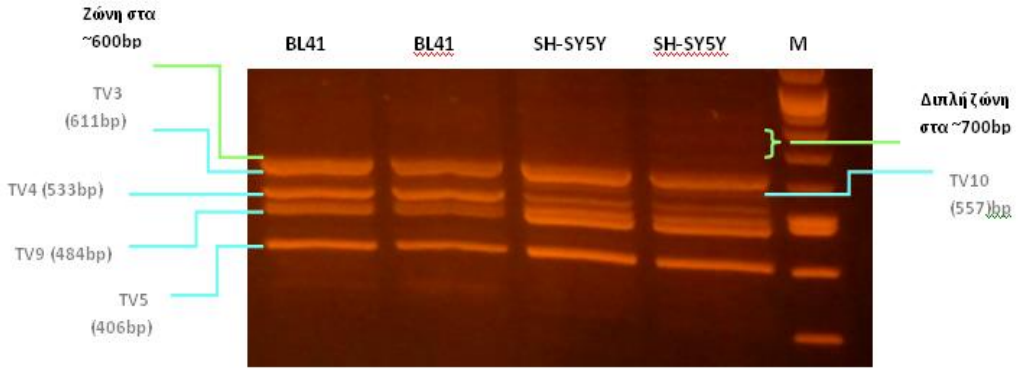
Για τον προσδιορισμό των νέων μεταγράφων επιλέξαμε τη μέθοδο της κλωνοποίησης σε πλασμιδιακό φορέα, διότι σε κάθε αντίδραση PCR είχαμε παραπάνω από ένα προϊόν. Αντίδραση αλληλούχισης απευθείας σε προϊόν PCR θα έδινε κακής ποιότητας αντίδραση, λόγω πρόσμιξης από τα άλλα προϊόντα. Ακόμη, με τη μέθοδο της κλωνοποίησης σε κάθε πλασμίδιο ενσωματώνεται ένα μόνο προϊόν, το οποίο μπορούμε να ελέγξουμε μέσω πέψης με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση των πέψεων σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.1.1 Ανίχνευση των μεταγράφων 11, 12, 13 και 14 του ZNF519

3.1.1.1 Ανίχνευση του μεταγράφου 11

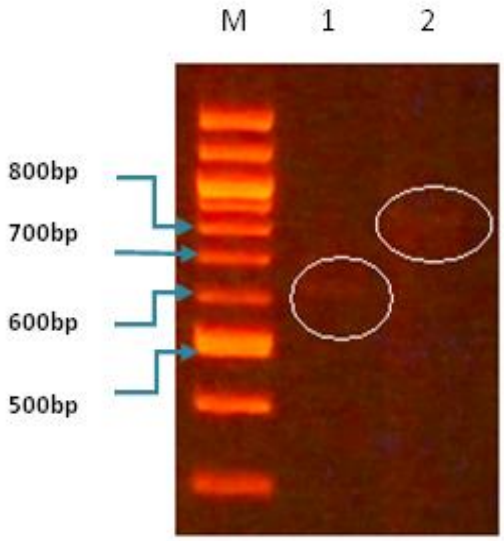
Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε είναι οι 519F1/519RNC. Με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών έχουν ήδη ανιχνευτεί στο εργαστήριό μας τα μετάγραφα 3, 4, 5, 9 και 10. Υπάρχουν όμως κάποιες ακόμα άγνωστες ζώνες στις αντιδράσεις PCR τις οποίες προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε. Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε σε PCR με το συγκεκριμένο ζεύγος των εκκινητών σε cDNA από κύτταρα BL41 και SH-SY5Y. Επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές διότι σε αυτές εμφανίζονται οι περισσότερες από τις άγνωστες ζώνες σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Έγιναν τέσσερις PCR, δύο για κάθε cDNA. Από κάθε PCR ηλεκτροφορήσαμε 50μl, ώστε να εξασφαλίσουμε αρκετή ποσότητα προϊόντων για

την αντίδραση σύνδεσης. (Ε**ικόνα 3.1**) Αρχικός μας στόχος ήταν η επανάληψη της προσπάθειας για απομόνωση και κλωνοποίηση άγνωστης ζώνης στα ~600bp που είχε αρχίσει σε προηγούμενη διπλωματική εργασία.



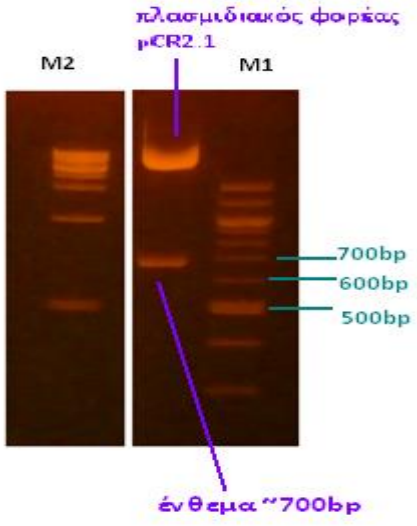
Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR από καρκινικές σειρές SH-SY5Y και BL41 με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ηλεκτροφορήθηκαν 50μl από κάθε PCR. Με γαλάζια βέλη επισημαίνονται τα μετάγραφα 3,4, 5,9 και 10 του ZNF519. Με πράσινα βέλη επισημαίνονται οι άγνωστες ζώνες. M: 100bp μάρτυρας μοριακών μεγεθών

Στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο των αντιδράσεων PCR, παρατηρήσαμε μια άγνωστη ζώνη στα ~600bp πολύ κοντά στο μετάγραφο 3 (611bp), η οποία είναι πιο έντονη στα BL41 σε σχέση με τα SH-SY5Y. Επίσης, στα ~700bp φαίνονται αχνά δύο άγνωστες ζώνες των οποίων η ένταση είναι λίγο μεγαλύτερη στα SH-SY5Y. Επομένως, προχωρήσαμε σε απομόνωση της ζώνης στα ~600bp και της διπλής ζώνης στα ~700bp. Οι δύο ζώνες στα ~700 απομονώθηκαν σαν μία ζώνη λόγω της κοντινής τους απόστασης και της πολύ χαμηλής τους έντασης. Η έκλουση των ζωνών έγινε σε 25μl ΤΕ pH 8.0. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας των εκλούσεων για ποιοτικό και ημιποσοτικό προσδιορισμό των απομονώσεων που πραγματοποιήσαμε. (**εικόνα 3.2**) και προχωρήσαμε σε αντίδραση σύνδεσης για τις 2 ζώνες με τον πλασμιδιακό φορέα pCR 2.1 (§2.2.13.3).



Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας από τις εκλούσεις. 1: έκλουση για τη ζώνη στα ~600bp, 2: έκλουση για τη ζώνη στα ~700+bp, M: μάρτυρας μοριακών μεγεθών (μαύρα βέλη).

Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός παγωμένων δεκτικών κυττάρων *E. Coli* DH5a με την αντίδραση σύνδεσης, επιλογή αποικιών και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες με αλκαλική λύση, πέψη του πλασμιδιακού DNA με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Οι παραπάνω διαδικασίες περιγράφονται στις Μεθόδους, §2.2.14-15)



Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% μετά από πέψη του πλασμιδιακού DNA με EcoR1. M1: 100bp μάρτυρας μοριακών μεγεθών, M2: 1kb μάρτυρας μοριακών μεγεθών

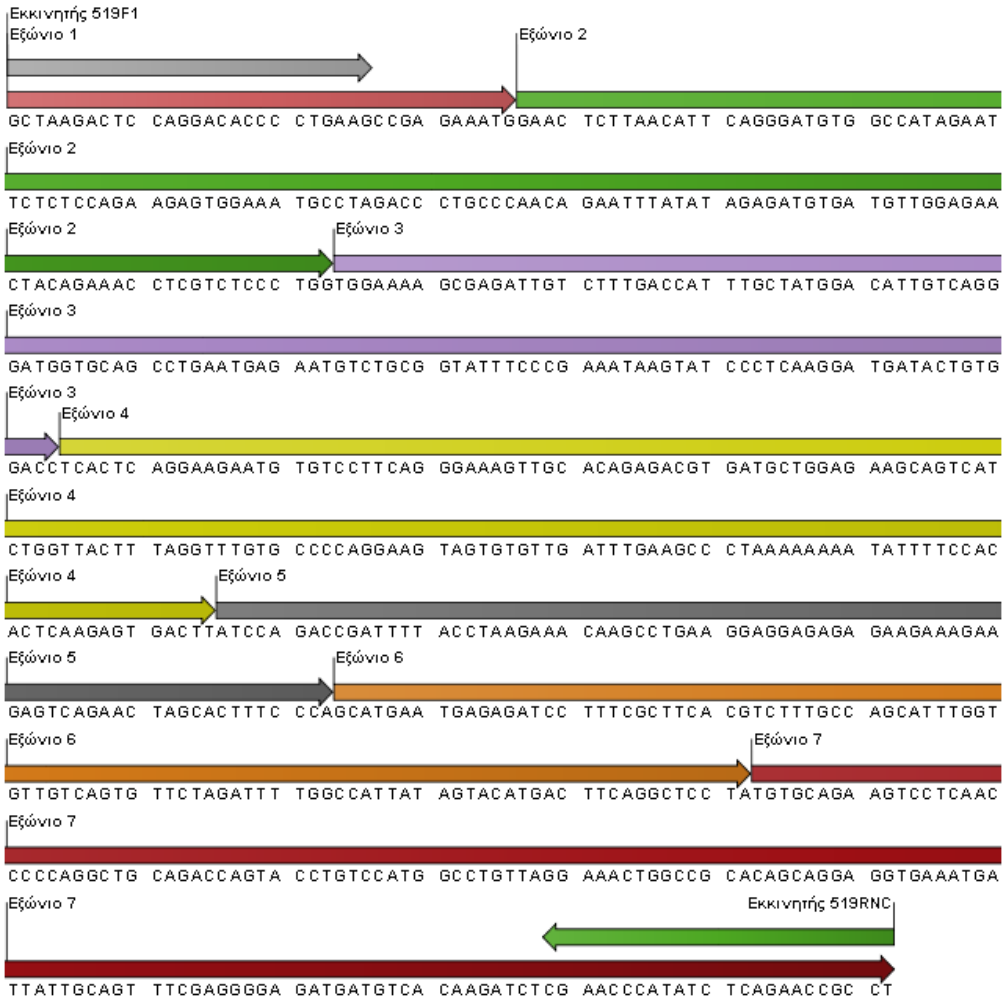
Στην **εικόνα 3.3** φαίνεται ότι κλωνοποιήσαμε τη ζώνη στα ~700bp . Δεν καταφέραμε όμως να κλωνοποιήσουμε την άγνωστη ζώνη στα ~600bp.

Προχωρήσαμε σε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε πιο καθαρή μορφή με τη χρήση του kit Nucleospin plasmid MN και προετοιμάσαμε το δείγμα για την αντίδραση αλληλούχισης (§2.2.16-17).

Τελικά, το δείγμα με την άγνωστη ζώνη που κλωνοποιήσαμε εστάλη στην εταιρία Macrogen σε συγκέντρωση 100ng/μl και όγκο 20μl, για να γίνει αντίδραση αλληλούχισης. Η αντίδραση αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε με εκκινητή τον **M13F.**

Ανάλυση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης αλληλούχισης

Το μέγεθος του προϊόντος προσδιορίστηκε στα **762bp** και η αλληλουχία του είναι η εξής:



Με το λογισμικό Blast κάναμε στοίχιση της αλληλουχίας του προϊόντος με το γονίδιο ZNF519. Η αλληλουχία όντως προκύπτει από το γονίδιο και σε μήκος 762bp, εκτός από 1 βάση, ταυτίζονται πλήρως μεταξύ τους. Επομένως έχουμε ομολογία σχεδόν 100%. Καταλήξαμε ότι είχαμε ένα ακόμη μετάγραφο του γονιδίου, το οποίο ονομάστηκε **μετάγραφο 11**.

Η βάση του μεταγράφου 11 που δεν ταυτίζεται με την αλληλουχία του γονιδίου βρίσκεται στη θέση 317, στο εξώνιο 3 του μεταγράφου. Η βάση αυτή είναι θυμίνη στην αλληλουχία του μεταγράφου, ενώ η αντίστοιχή της στο γονίδιο είναι κυτοσίνη. (**Βλέπε Παράρτημα)** Η παρατηρούμενη διαφορά μπορεί να οφείλεται είτε σε σφάλμα κατά την αντίδραση αλληλούχισης του άγνωστου προϊόντος στα 762bp, ή σε σφάλμα στην αλληλουχία του ίδιου του γονιδίου που είναι καταχωρημένη στο NCBI.

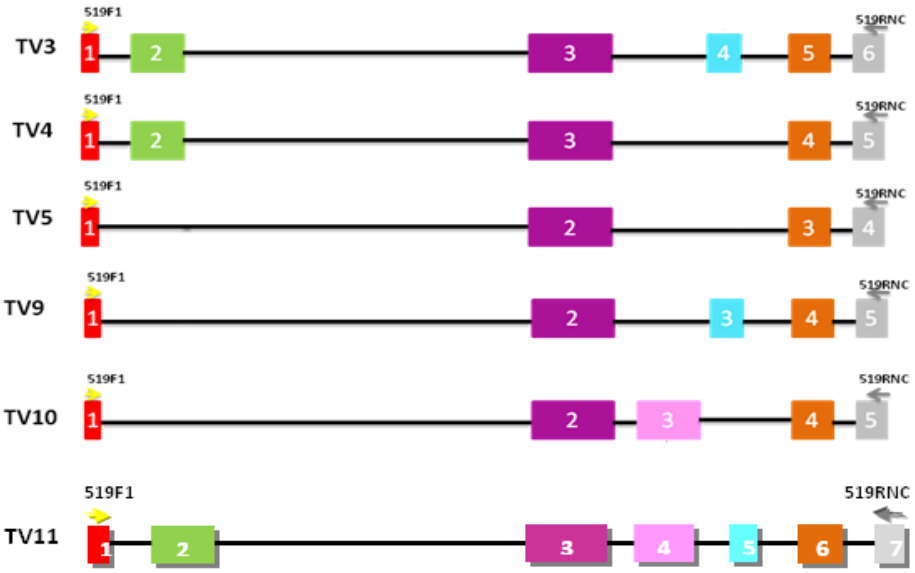
Σύγκριση του μεταγράφου 11 με τα μετάγραφα 3, 4, 5, 9 και 10, τα οποία έχουν επίσης ανιχνευτεί με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC, έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα για το μετάγραφο 11 (**Εικόνα 3.4**):

Έχει 7 εξώνια, κανένα όμως από αυτά δεν συναντάται για πρώτη φορά.

Περιέχει το μεγαλύτερο αριθμό εξωνίων σε σχέση με τα άλλα μετάγραφα, τα οποία περιέχουν από 4 έως 6 εξώνια.

Παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με το μετάγραφο 3. Συγκεκριμένα το τέταρτο εξώνιο του μεταγράφου 11 μεγέθους 151bp δεν υπάρχει στο μετάγραφο 3, ενώ σε όλη την υπόλοιπη αλληλουχία τους ταυτίζονται.

Περιέχει το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB, όπως τα μετάγραφα 3 και 4 και την περιοχή που κωδικοποιεί τα δάχτυλα ψευδαργύρου, όπως όλα τα μετάγραφα που έχουν κλωνοποιηθεί με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC.



Εικόνα 3.4: Σύγκριση των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10 και 11 του γονιδίου ZNF519. Το μετάγραφο 11 περιέχει το μεγαλύτερο αριθμό εξωνίων αλλά κανένα «νέο» εξώνιο.

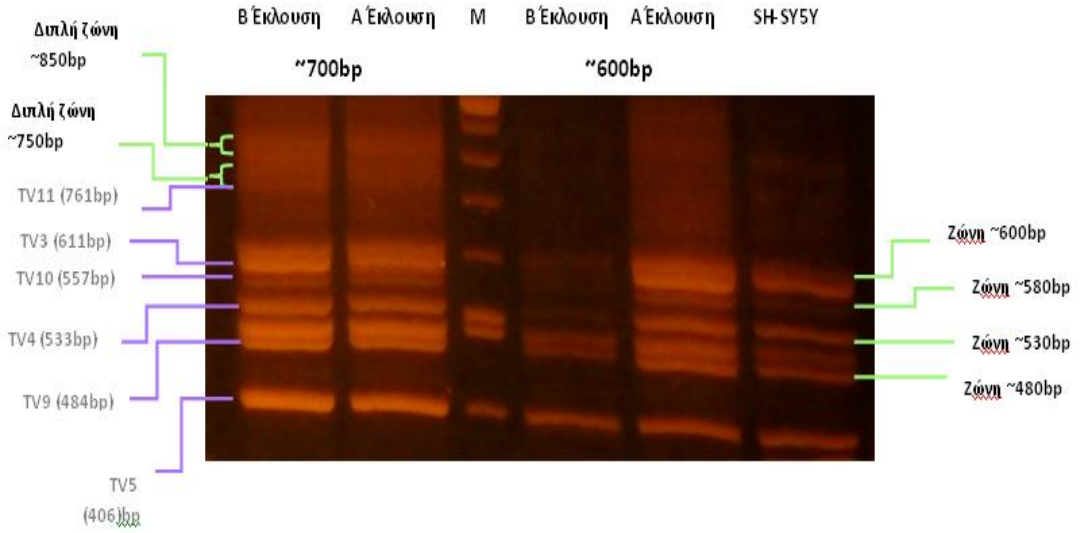
Για να διαπιστώσουμε το πρότυπο συρραφής των 4 τελευταίων εξωνίων του μεταγράφου 11 ελέγξαμε τα άκρα των εσωνίων στις θέσεις συρραφής. Επιβεβαιώσαμε ότι οι θέσεις συρραφής υπακούουν στον κανόνα GT-AG.

3.1.1.2 Ανίχνευση των μεταγράφων 12, 13 και 14

Με το ίδιο ζεύγος των εκκινητών (519F1/519RNC) πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR στις Α' και Β' εκλούσεις των ζωνών στα ~600 και στα ~700bp που απομονώσαμε παραπάνω. Σκοπός μας ήταν η ενίσχυση των άγνωστων ζωνών στα ~600bp και στα ~700bp που δεν καταφέραμε να κλωνοποιήσουμε στην προηγούμενη προσπάθεια μας ώστε να τις απομονώσουμε και να τις κλωνοποιήσουμε. Πρέπει να σημειωθεί ότι από τις δύο άγνωστες ζώνες στα ~700bp κλωνοποιήσαμε και ταυτοποιήσαμε μόνο τη μία. Έγιναν συνολικά πέντε αντιδράσεις: δύο για τις Α' εκλούσεις, δύο για τις Β' εκλούσεις και μία σε cDNA από κύτταρα SH-SY5Y και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Κατά την ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων παρατηρήσαμε περισσότερες ζώνες από τις αναμενόμενες. Η εικόνα από την ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR στις εκλούσεις μοιάζει με την εικόνα που προκύπτει από την PCR σε cDNA SH-SY5Y (**Εικόνα 3.5**). Οι ζώνες που απομονώσαμε, κατά σειρά ελαττούμενου μεγέθους, είναι οι εξής:

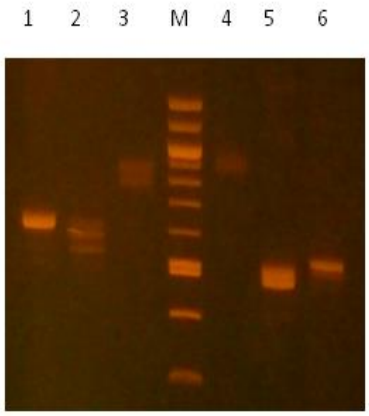
αχνή διπλή ζώνη στα ~850 bp
αχνή διπλή ζώνη στα ~750bp
ζώνη στα ~600+ **bp**
αχνή ζώνη στα ~580 **bp**
ζώνη στα ~530**bp**
ζώνη στα ~480**bp**



Εικόνα 3.5: Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR σε Α' και Β' εκλούσεις άγνωστων ζωνών στα ~600bp και ~700bp με εκκινητές 519F1/519RNC, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ηλεκτροφορήθηκαν 45μl από κάθε PCR. Με πράσινα βέλη επισημαίνονται οι άγνωστες ζώνες Με μωβ βέλη επισημαίνονται τα μετάγραφα 3, 4, 5, 9, 10 και 11 του ZNF519. M: 100bp μάρτυρας μοριακών μεγεθών.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για την απομόνωση της κάθε ζώνης είναι ίδια με εκείνη που απομονώσαμε το μετάγραφο 11 (βλ. §3.1.1.1 και §2.2.12-17) Συνοπτικά:

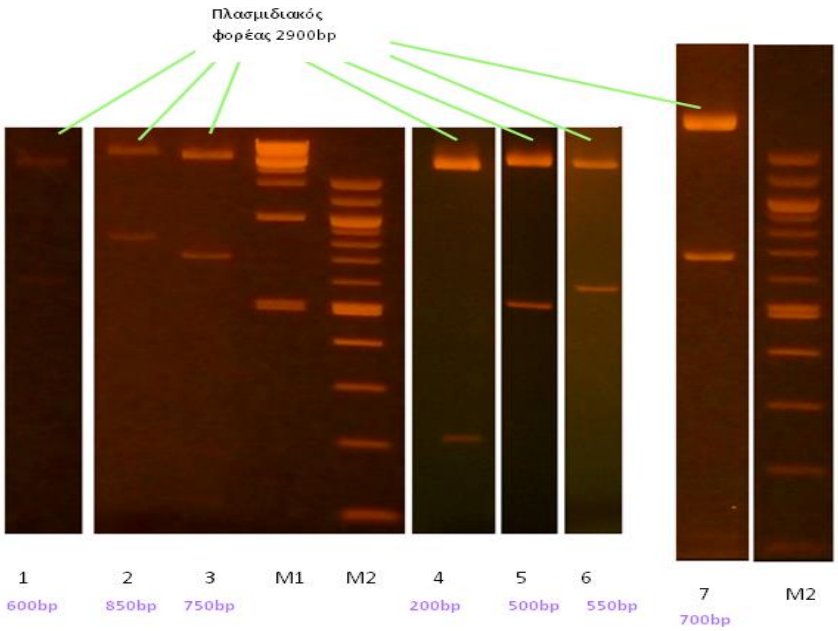
✓ Απομονώσαμε τις άγνωστες ζώνες από το πήκτωμα αγαρόζης και ηλεκτροφορήσαμε μικρή ποσότητα των εκλούσεων για ποιοτικό και ημιποσοτικό προσδιορισμό των απομονώσεων που πραγματοποιήσαμε (**Εικόνα 3.6**).



Εικόνα 3.6: Ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας από τις εκλούσεις. 1: έκλουση ζώνης στα 600bp 2: έκλουση ζώνης στα 580bp 3: ζώνη στα 750bp 4: ζώνη στα 850 5: ζώνη στα 480 6: ζώνη στα 530 M: 100bp μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Κάποιες ζώνες είναι διπλές λόγω δυσκολίας απομόνωσης τους από τις γειτονικές τους.

- ✓ Κλωνοποιήσαμε τις παραπάνω ζώνες σε πλασμιδιακό φορέα pTZ57R/T, μετασχηματίσαμε δεκτικά κύτταρα *E.coli* XL1blue και προχωρήσαμε σε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με αλκαλικές λύσεις.
- ✓ Πραγματοποιήσαμε πέψη των πλασμιδιακών DNA με EcoRI και BamHI και ηλεκτροφορήσαμε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης έδειξε ότι κλωνοποιήσαμε μία εκ των δύο άγνωστων ζωνών στα 850bp, μία από τις δύο άγνωστες ζώνες στα 750bp, άγνωστη ζώνη στα 700bp, στα 600bp, στα ~550bp στα 500bp και στα 200bp (**εικόνα 3.7**).



Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση των πέψεων του πλασμιδιακού DNA από αλκαλικές λύσεις, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ένθεμα 1. στα 600bp (πολύ αχνό) 2. στα 850bp 3. στα 750bp 4.στα 200bp 5. στα 500bp 6. στα 550bp 7. στα 700bp. M1: μάρτυρας μοριακών μεγεθών 1kb, M2: μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100bp.

!

!

τα εξής άγνωστα προϊόντα:

Τη μία από τις δύο άγνωστες ζώνες στα *850* bp, τη μία από τις δύο ζώνες στα *750 b*p, τις άγνωστες ζώνες στα *580* bp και στα *530* bp.

Προχωρήσαμε σε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε πιο καθαρή μορφή με τη χρήση του kit Nucleospin plasmid MN και προετοιμάσαμε τα δείγματα για την αντίδραση αλληλούχισης (§2.2.16-17).

Τα δείγματα που εστάλησαν για αντίδραση αλληλούχισης στην εταιρεία Macrogen είχαν συγκέντρωση 100ng/μl και όγκο 20μl.

Η αντίδραση αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε με τον εκκινητή **M13F**.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης αλληλούχισης

Το μέγεθος των προϊόντων προσδιορίστηκε στα 769bp, 606bp, 312bp, 484bp, 847bp, 611bp και 733bp.

- Για το προϊόν στα **484**bp: Στοίχιση της αλληλουχίας του προϊόντος με το γονίδιο ZNF519 έδειξε ότι η αλληλουχία αυτή όντως προκύπτει από το γονίδιο με ομολογία σχεδόν 100%. Στη συνέχεια, σύγκριση του προϊόντος με τα μετάγραφα του ZNF519 έδειξε ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία

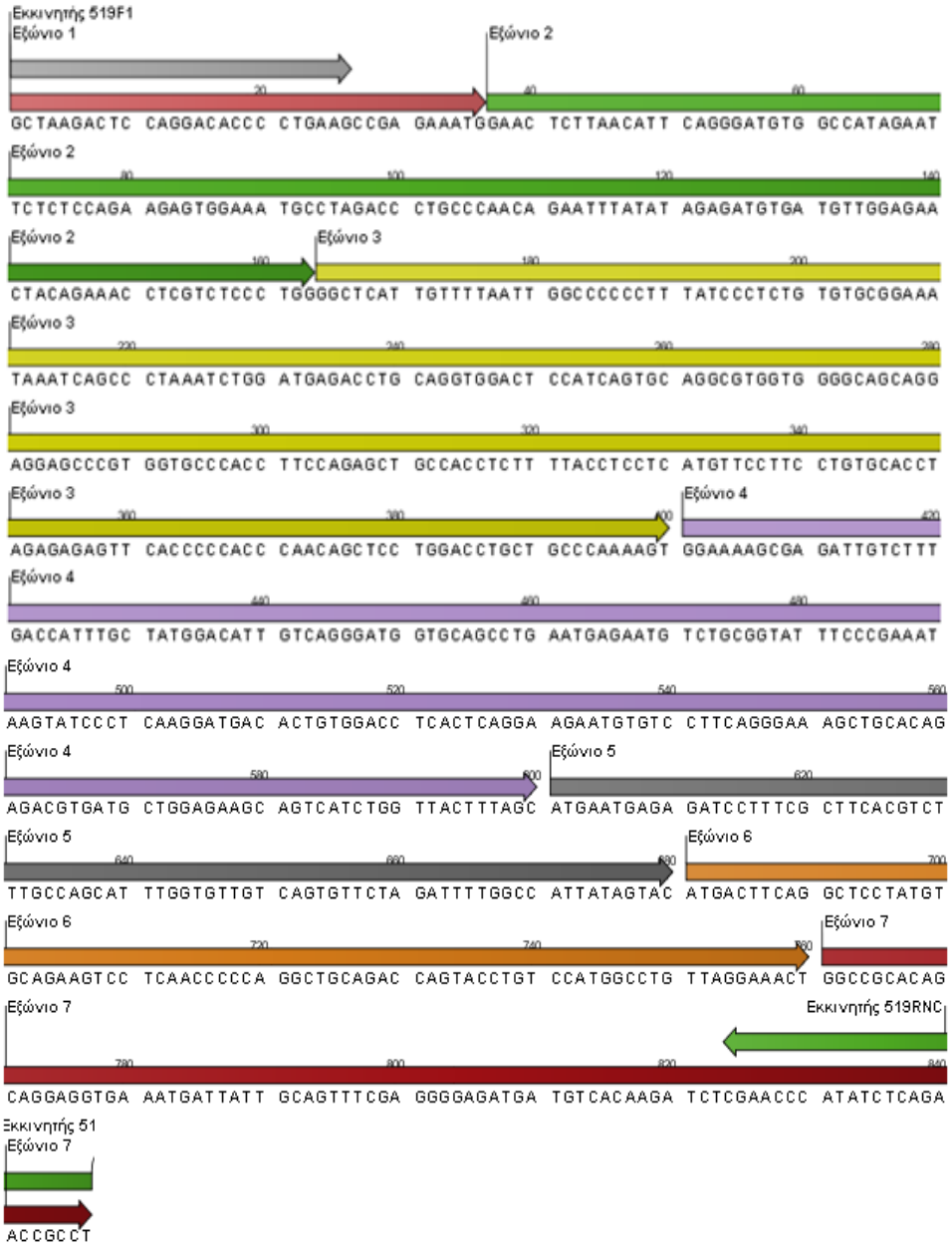
!

- Για το προϊόν στα **611**bp: Με την ίδια διαδικασία καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η αλληλουχία αυτή .

- Για το προϊόν στα **606**bp: Ακολουθώντας την ίδια πορεία καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η αλληλουχία αυτή είναι ίδια με εκείνη του μεταγράφου 5 με την εξής ιδιαιτερότητα: το δεύτερο εξώνιο του μεταγράφου 5 (μεγέθους 200bp) παρουσιάζεται διπλασιασμένο στην αλληλουχία των 606bp. Αποδώσαμε το φαινόμενο αυτό σε λάθος της πολυμεράσης ή σε γλίστρημα των αλυσίδων του cDNA κατά την αντίδραση PCR (**βλ. παράρτημα**).

➔ Για το προϊόν στα **733**bp: Η αλληλουχία αυτή ταυτίζεται με την αλληλουχία του μεταγράφου 4, αλλά το τρίτο εξώνιο του μεταγράφου 4, μεγέθους 200bp, είναι ίδιο με εκείνο της προηγούμενης περίπτωσης, δηλαδή βρίσκεται διπλασιασμένο στην αλληλουχία των 733bp. Έτσι εξηγείται και το γεγονός ότι έχουν διαφορά μεγέθους ακριβώς 200bp. (**βλ. παράρτημα)**

➔ Για το προϊόν στα **847**bp η αλληλουχία είναι:



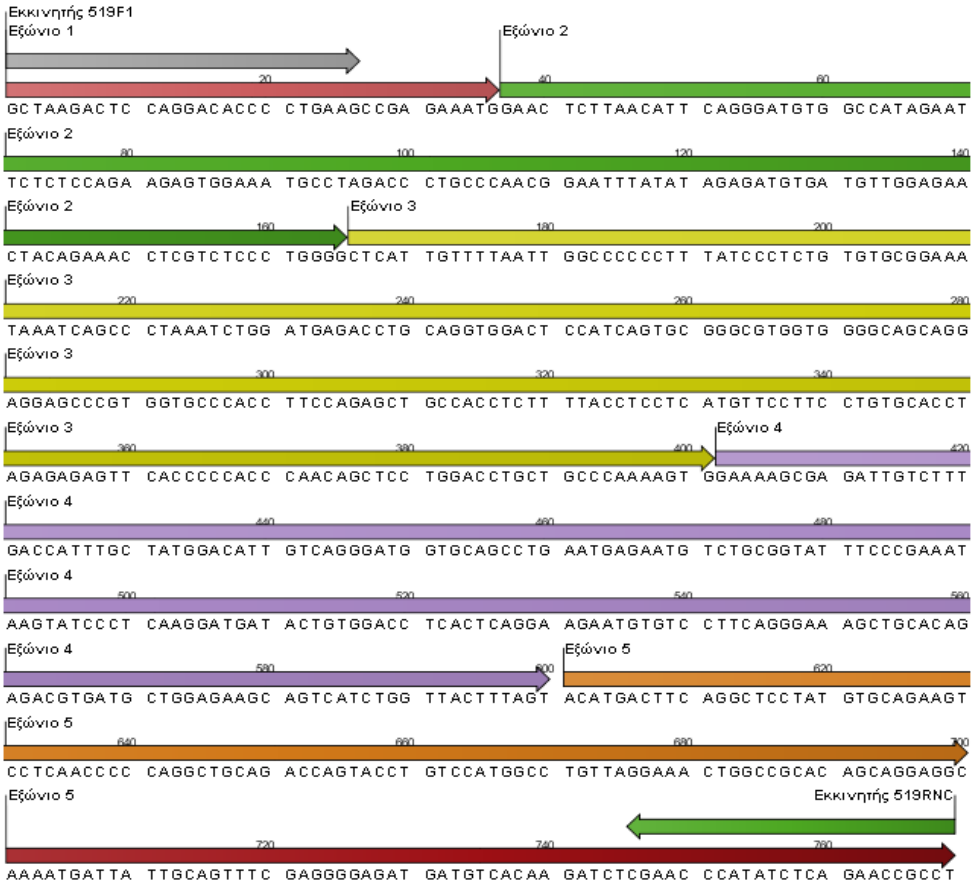
Στοίχιση της αλληλουχίας του προϊόντος με το γονίδιο ZNF519 έδειξε ότι αυτή η αλληλουχία όντως προκύπτει από αυτό το γονίδιο και σε μήκος 847bp, εκτός από 2 βάσεις, ταυτίζονται πλήρως μεταξύ τους. Οπότε υπάρχει ομολογία σχεδόν 100%. Επομένως απομονώθηκε ένα ακόμη μετάγραφο του γονιδίου, το οποίο ονομάστηκε **μετάγραφο 12**. (**βλ. παράρτημα**)

Οι βάσεις του μεταγράφου 12 που δεν ταυτίζονται με την αλληλουχία του γονιδίου είναι οι εξής:

Στη θέση 201 που ανήκει στο εξώνιο 3 του μεταγράφου. Η βάση αυτή είναι θυμίνη στην αλληλουχία του μεταγράφου και η αντίστοιχη της στο γονίδιο είναι αδενίνη.

Στη θέση 510 που ανήκει στο εξώνιο 4 του μεταγράφου. Η βάση αυτή είναι κυτοσίνη στην αλληλουχία του μεταγράφου και η αντίστοιχη της στο γονίδιο είναι θυμίνη.

➔ Για το προϊόν στα **769**bp η αλληλουχία είναι:



Το προϊόν αυτό, ύστερα από στοίχιση με το ανθρώπινο γονιδίωμα παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο ZNF519 σχεδόν 100%, αφού μόνο 3 βάσεις του προϊόντος δεν ταυτίζονται με το γονίδιο. Το εναλλακτικό αυτό μετάγραφο ονομάστηκε **μετάγραφο 13**.

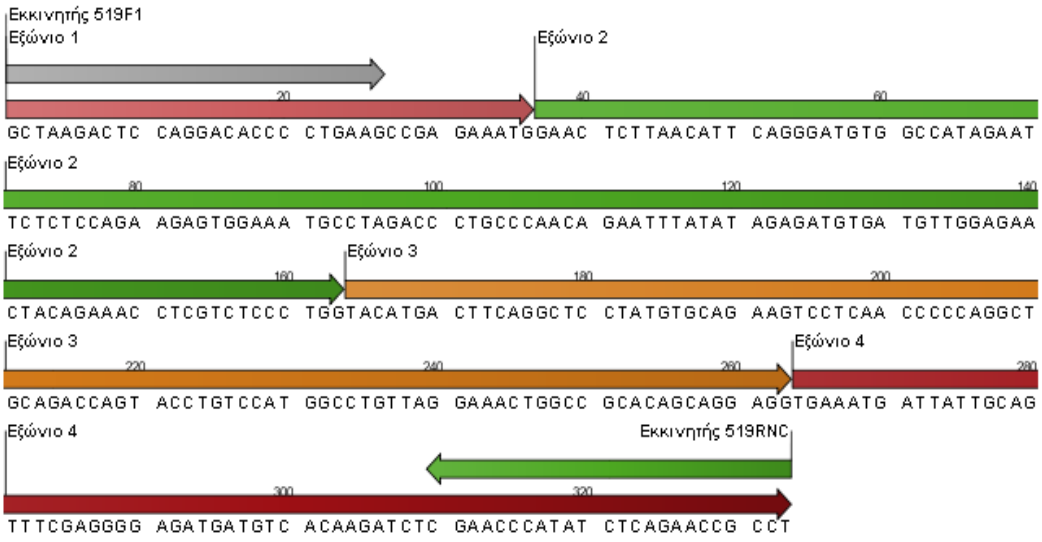
Οι βάσεις του μεταγράφου 13 που δεν ταυτίζονται με την αλληλουχία του γονιδίου είναι οι εξής (**Βλέπε Παράρτημα)**:.

Στη θέση 201 που ανήκει στο εξώνιο 3 του μεταγράφου. Η βάση αυτή είναι θυμίνη στην αλληλουχία του μεταγράφου και η αντίστοιχη της στο γονίδιο είναι αδενίνη.

Στη θέση 281 που ανήκει στο εξώνιο 3 του μεταγράφου. Η βάση αυτή είναι γουανίνη στην αλληλουχία του μεταγράφου και η αντίστοιχη της στο γονίδιο είναι αδενίνη.

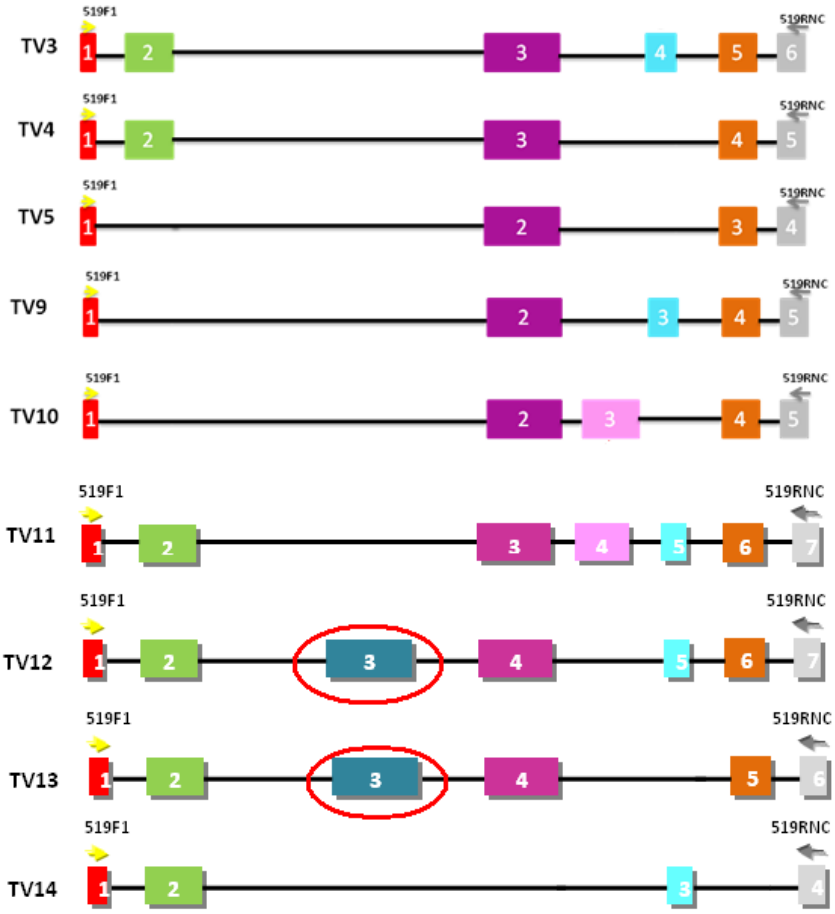
Στη θέση 110 που ανήκει στο εξώνιο 2 του μεταγράφου. Η βάση αυτή είναι γουανίνη στην αλληλουχία του μεταγράφου και η αντίστοιχη της στο γονίδιο είναι αδενίνη.

➔ Για το προϊόν στα **312**bp η αλληλουχία είναι:



Το προϊόν αυτό, μετά από στοίχιση με το ανθρώπινο γονιδίωμα παρουσιάζει 100% ομολογία με το γονίδιο ZNF519. Το εναλλακτικό αυτό μετάγραφο ονομάστηκε **μετάγραφο 14**.

Σύγκριση των νέων μεταγράφων 12, 13 και 14 μεταξύ τους αλλά και με τα μετάγραφα 3, 4, 5, 9, 10, 11 που έχουν επίσης απομονωθεί με εκκινητές 519F1/519RNC, έδωσε τα εξής αποτελέσματα (**Εικόνα 3.8**):



Εικόνα 3.8: Σύγκριση των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου ZNF519. Σε κόκκινο κύκλο περικλείεται το εξώνιο που συναντάται ! και πρόκειται για το εξώνιο 3 των μεταγράφων 12 και 13.

Για το μετάγραφο 12:

Έχει επτά εξώνια, .
Πρόκειται για το εξώνιο 3 το μέγεθος του οποίου είναι 236bp.

Παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με το μετάγραφο 3. Συγκεκριμένα, η μόνη διαφορά τους είναι πως από το μετάγραφο 3 απουσιάζει εντελώς το τρίτο εξώνιο του μεταγράφου 12, ενώ ταυτίζονται σε όλη την υπόλοιπη αλληλουχία τους**.**

Τέλος, περιέχει το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB, όπως τα μετάγραφα 3, 4, 11, 13 και 14. επίσης την περιοχή που κωδικοποιεί τα δάχτυλα ψευδαργύρου, όπως όλα τα μετάγραφα που έχουμε κλωνοποιήσει με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC.

Για το μετάγραφο 13:

Περιέχει έξι εξώνια. Ένα από αυτά είναι το «νέο» εξώνιο, το οποίο αποτελεί το εξώνιο 3 του μεταγράφου και έχει μέγεθος 236bp, όπως και στο μετάγραφο 12.

Παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με το μετάγραφο 12 και το μετάγραφο 4. Με το μετάγραφο 12 η διαφορά εντοπίζεται στο εξώνιο 5 του μεταγράφου που δεν υπάρχει στο μετάγραφο 13. Σε σύγκριση με το μετάγραφο 4 η μόνη διαφορά είναι ότι το εξώνιο 3 του μεταγράφου 13 δεν εμφανίζεται στο μετάγραφο 4.

Τέλος, περιέχει το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB, όπως τα μετάγραφα 3, 4, 11, 12 και 14. την περιοχή που κωδικοποιεί τα δάχτυλα ψευδαργύρου, όπως όλα τα μετάγραφα που έχουν κλωνοποιηθεί με το ζεύγος εκκινητών 519F1/519RNC.

Για το μετάγραφο 14:

Είναι το μικρότερο σε μέγεθος μετάγραφο (312bp) που απομονώσαμε ως τώρα με τους εκκινητές 519F1/519RNC.

Έχει τέσσερα εξώνια τα οποία υπάρχουν στα μετάγραφα που έχουν ήδη απομονωθεί.

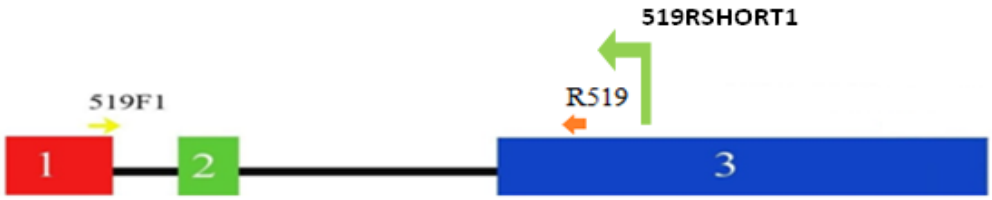
Μεγαλύτερη ομοιότητα παρουσιάζει με το μετάγραφο 3. Η διαφορά τους εντοπίζεται στο γεγονός ότι τα εξώνια 3 και 5 του μεταγράφου 3 δεν υπάρχουν στο μετάγραφο 14. Στην υπόλοιπη αλληλουχία τους ταυτίζονται.

Περιέχει το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB, όπως τα μετάγραφα 3, 4, 11, 12 και 13. την περιοχή που κωδικοποιεί τα δάχτυλα ψευδαργύρου, όπως όλα τα μετάγραφα που έχουμε κλωνοποιήσει με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC.

Έλεγχος των θέσεων συρραφής των εξωνίων των μεταγράφων 12, 13 και 14 έδειξε ότι αυτά συρράπτονται σύμφωνα με τον κανόνα GT-AG.

3.1.2 Ανίχνευση του μεταγράφου 8 του ZNF519

Σε προηγούμενες εργασίες που έχουν εκπονηθεί στο εργαστήριο μας, τα μετάγραφα 1, 2 και 8 έχουν κλωνοποιηθεί και απομονωθεί με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/R519 (**Εικόνα 3.9**). Ο εκκινητής 519F1 υβριδοποιείται στη θέση 181-206 του μεταγράφου 1 του γονιδίου ZNF519 και ο εκκινητής R519 στη θέση 978-1003.



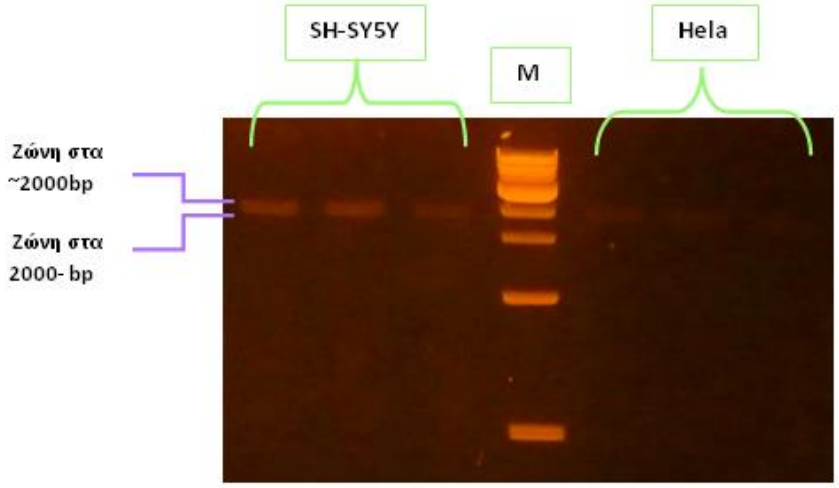
Εικόνα 3.9: Απεικόνιση του μεταγράφου 1 του γονιδίου ZNF519 με τις περιοχές υβριδοποίησης των εκκινητών 519F1/R519 και 519F1/519RSHORT1

Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε αυτή τη φορά είναι οι 519F1/519RSHORT1, με σκοπό να ανιχνεύσουμε το μετάγραφο 1 και να ελέγξουμε το μέγεθος των μεταγράφων 2 και 8, καθώς ο εκκινητής 519RSHORT1 υβριδοποιείται στη θέση 2096-2119 του μεταγράφου 1 του γονιδίου δηλαδή απέχει περίπου 1116bp από τον R519 (**Εικόνα 3.10**).



Εικόνα 3.10: Απεικόνιση των μεταγράφων 1, 2 και 8 που έχουν απομονωθεί με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/R519.

Πραγματοποιήσαμε συνολικά 2 PCR, 1 σε cDNA HeLa και 1 σε cDNA SH-SY5Y με εκκινητές 519F1/519RSHORT1 (**Εικόνα 3.11)**



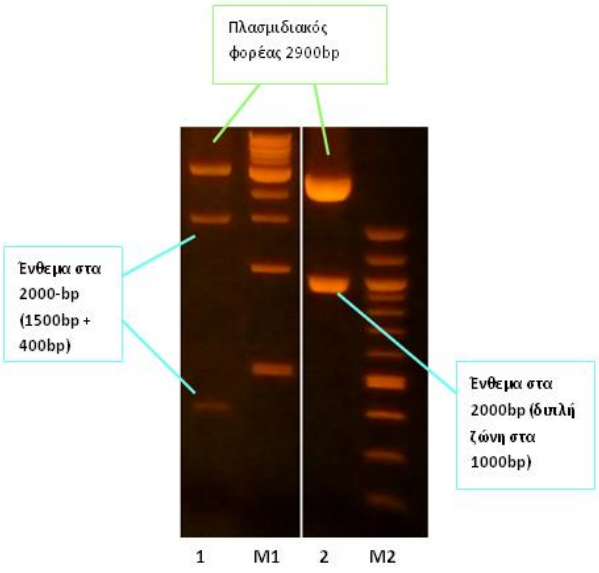
Εικόνα 3.11: Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR στις κυτταρικές σειρές SH-SY5Y και HeLa με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RSHORT1, σε πήκτωμα αγαρόζης 1.7%. Ηλεκτροφορήθηκαν συνολικά 48μl από κάθε αντίδραση. M: μάρτυρας μοριακών μεγεθών

Τα αναμενόμενα προϊόντα της αντίδρασης PCR με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RSHORT1 είναι το μετάγραφο 1 στα 1938bp και -αν υπάρχουν- το μετάγραφο 2 στα 2072bp και το μετάγραφο 8 στα 1812bp. Στην εικόνα της

ηλεκτροφόρησης παρατηρήσαμε δύο ζώνες στα ~2000bp οι οποίες ήταν πιο έντονες στα SH-SY5Y. Απομονώσαμε τις δύο ζώνες από το πήκτωμα. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε περιγράφεται στην ενότητα Υλικά & Μέθοδοι (βλ. §2.2.12-17). Συνοπτικά:

- ✓ Κλωνοποιήσαμε τις άγνωστες ζώνες σε πλασμιδιακό φορέα pTZ57R/T.
- ✓ Μετασχηματίσαμε δεκτικά κύτταρα E.coli XL1blue με την αντίδραση σύνδεσης.
- ✓ Απομονώσαμε τα πλασμιδιακά DNA με αλκαλικές λύσεις.
- ✓ Πραγματοποιήσαμε πέψη των πλασμιδιακών DNA με EcoRI και BamHI και ηλεκτροφορήσαμε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%.

Η πέψη των πλασμιδιακών DNA έδωσε το παρακάτω ηλεκτροφορητικό πρότυπο (**Εικόνα 3.12**):



Εικόνα 3.12: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% των πέψεων πλασμιδιακού DNA από αλκαλικές λύσεις. M1: μάρτυρας μοριακών μεγεθών 1kb, M2: μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100kb.

Στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης βλέπουμε ότι τα προϊόντα που κλωνοποιήσαμε δεν εμφανίζονται σαν μία ζώνη στα 2000bp. Στο 1 φαίνονται δύο ζώνες, μία στα ~1500bp και μια στα ~400bp και στο 2 μια διπλή ζώνη στα ~1000bp. Υποθέσαμε ότι αυτό οφείλεται στα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε για να απομονώσουμε το κλωνοποιημένο προϊόν από τον πλασμιδιακό φορέα.

Προχωρήσαμε σε απομόνωση των πλασμιδιακών DNA σε πιο καθαρή μορφή με τη χρήση του kit Nucleospin plasmid MN και προετοιμάσαμε τα δείγματα για την αντίδραση αλληλούχισης (βλ. §2.2.16-17).

Τα δείγματα που εστάλησαν για αντίδραση αλληλούχισης στην εταιρεία Macrogen είχαν συγκέντρωση 100ng/μl και όγκο 20μl.

Η αντίδραση αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε με εκκινητές **M13F** και **M13R-puc**.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων αλληλούχισης

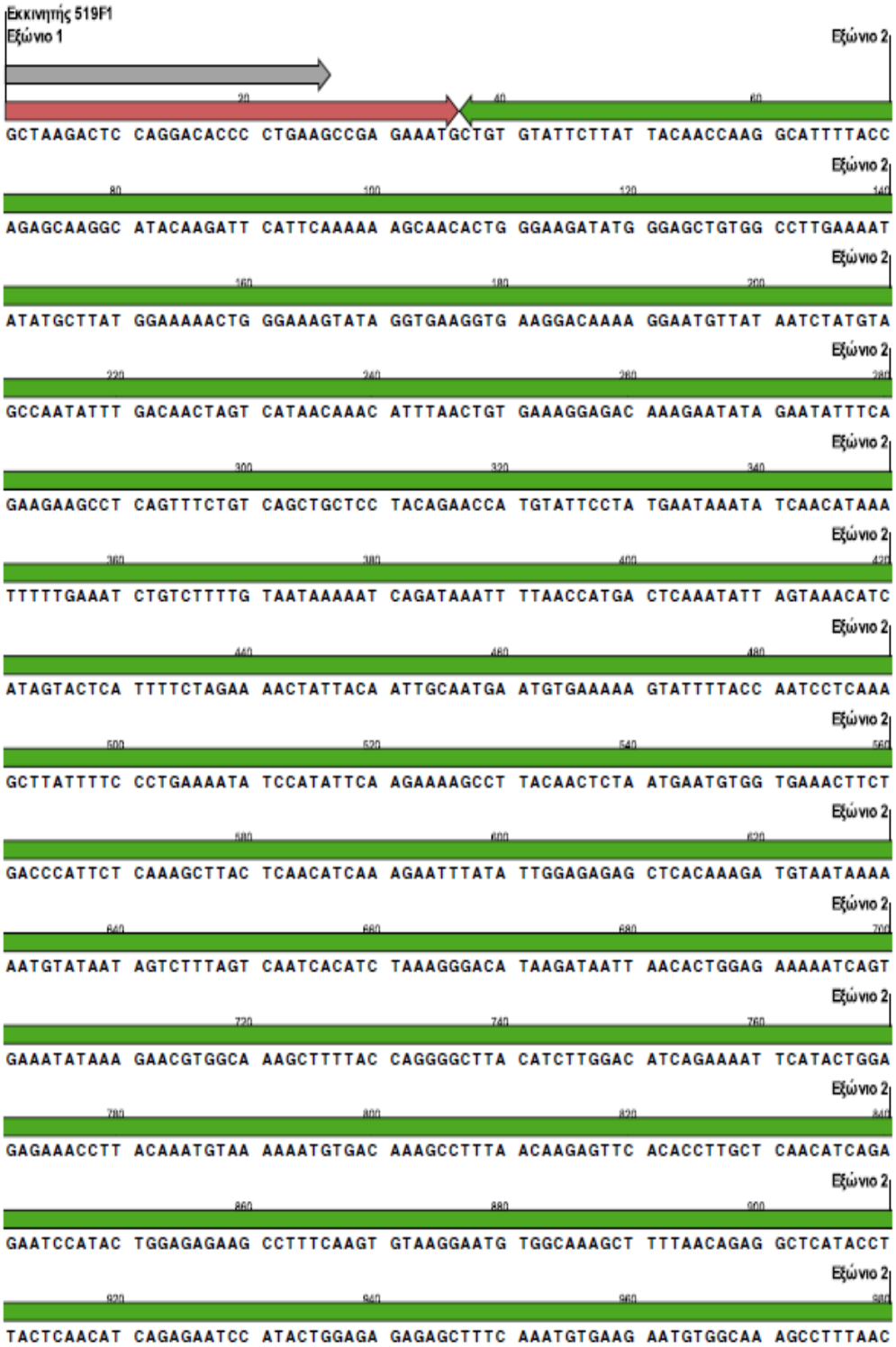
Το μέγεθος των δύο προϊόντων προσδιορίστηκε στα 1918bp και 1812bp.

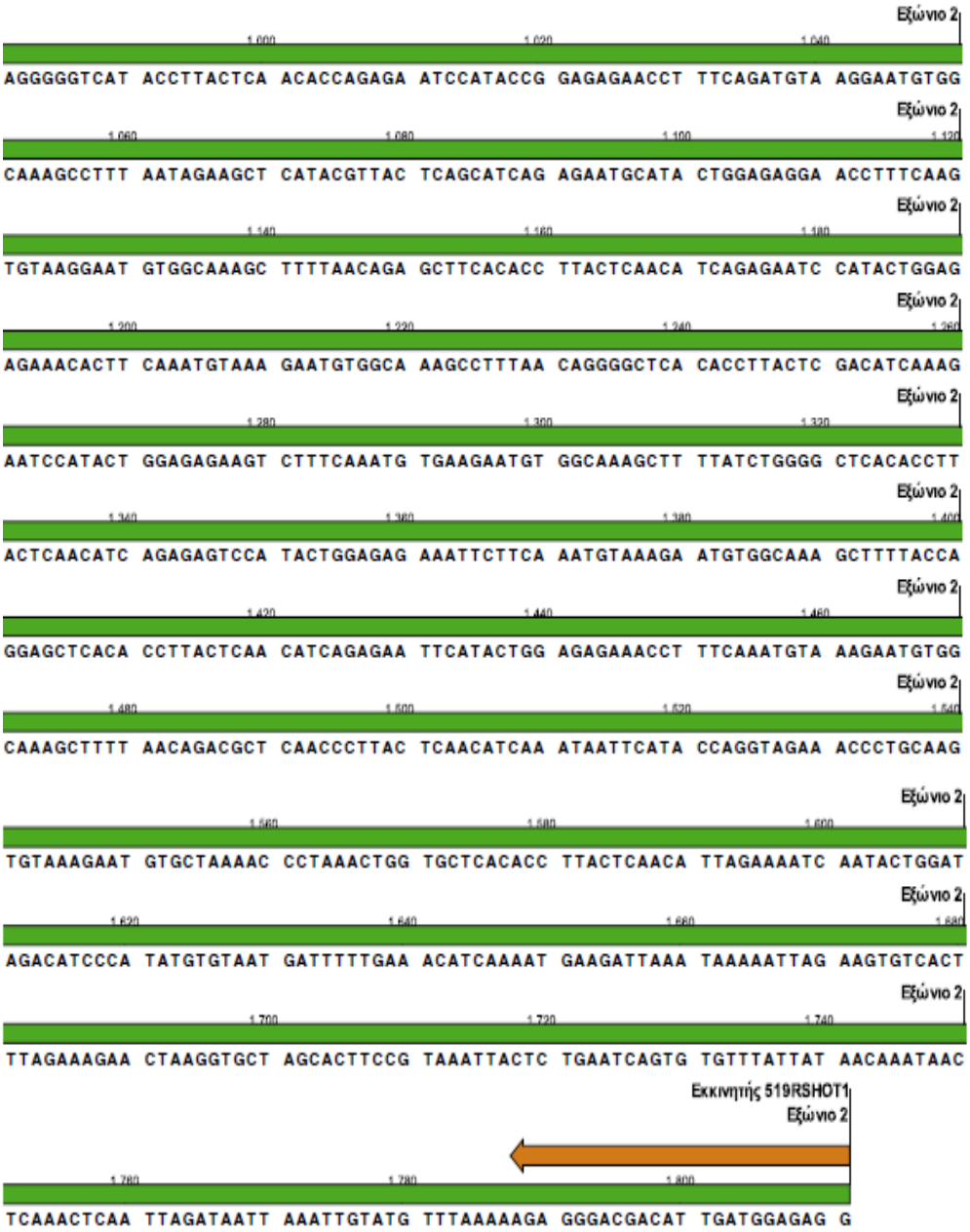
➔ Για το προϊόν στα **1918**bp διαπιστώσαμε, μέσω του λογισμικού BLAST, ότι 93% της αλληλουχίας του παρουσιάζει ομολογία κατά 99% με τον φάγο RB59. Συνεπώς δεν έχει καμία σχέση με το γονίδιο ZNF519 (**Εικόνα 3.13**)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Enterobacteria phage RB59, complete genome	1722	1722	93%	0.0	99%	KM607003.1
Enterobacteria phage RB55, complete genome	1722	1722	93%	0.0	99%	KM607002.1
Enterobacteria phage T4 strain GT7, complete genome	1722	1722	93%	0.0	99%	KJ477686.1
Enterobacteria phage T4 strain 147, complete genome	1722	1722	93%	0.0	99%	KJ477685.1
Enterobacteria phage T4 strain wild, complete genome	1722	1722	93%	0.0	99%	KJ477684.1
Enterobacteria phage T4T, complete genome	1722	1722	93%	0.0	99%	HM137666.1

Εικόνα 3.13: Αποτέλεσμα της στοίχισης του προϊόντος στα 1918bp με το ανθρώπινο γονιδίωμα.

➔ Για το προϊόν στα **1812**bp η αλληλουχία είναι:





Στοίχιση της αλληλουχίας του προϊόντος με το γονίδιο ZNF519 έδειξε ότι αυτή η αλληλουχία όντως προκύπτει από αυτό το γονίδιο και σε μήκος 1812bp, εκτός από 2 βάσεις, ταυτίζονται σχεδόν πλήρως μεταξύ τους με ομολογία πάνω από 99%. Επομένως, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για εναλλακτικό μετάγραφο του ZNF519. Οι βάσεις του μεταγράφου που δεν ταυτίζονται με την αλληλουχία του γονιδίου είναι οι εξής (**Βλέπε Παράρτημα)**:.

Στη θέση 522 που ανήκει στο εξώνιο 2 του μεταγράφου. Η βάση αυτή είναι γουανίνη στην αλληλουχία του μεταγράφου και η αντίστοιχη της στο γονίδιο είναι αδενίνη.

Στη θέση 1614 που ανήκει στο εξώνιο 2 του μεταγράφου. Η βάση αυτή είναι κυτοσίνη στην αλληλουχία του μεταγράφου και η αντίστοιχη της στο γονίδιο είναι αδενίνη.

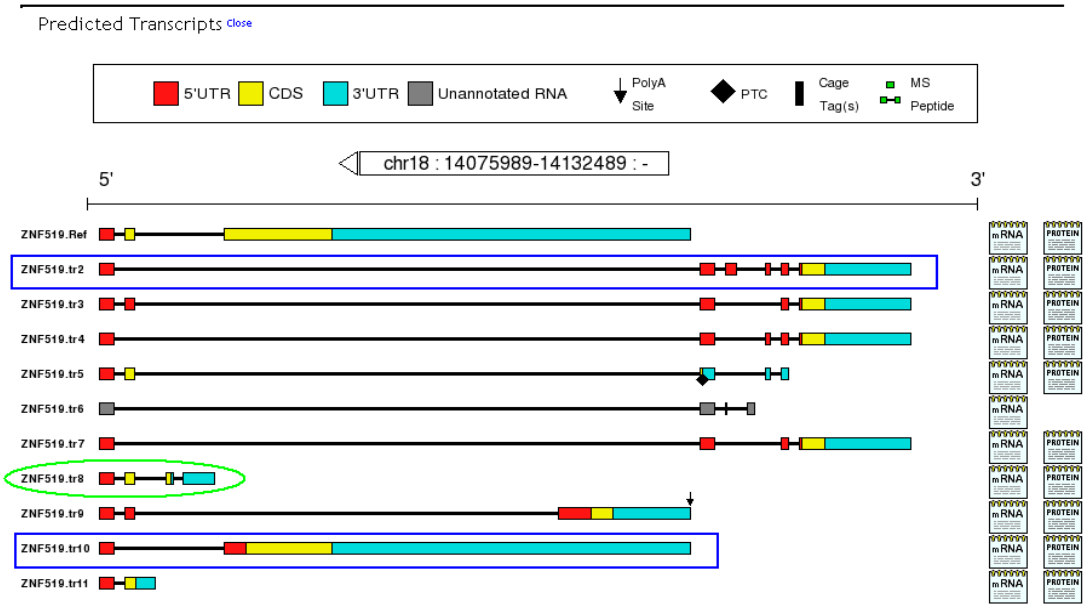
Σύγκριση του προϊόντος στα 1812bp με τα μετάγραφα 1, 2 και 8 επιβεβαίωσε ότι το συγκεκριμένο προϊόν είναι το μετάγραφο 8 και ονομάστηκε **μετάγραφο 8FULL** (**Εικόνα 3.14**)



Εικόνα 3.14: Σύγκριση του μεταγράφου 8FULL με τα μετάγραφα 1, 2 και 8. Φαίνεται ότι το εξώνιο 2 του μεταγράφου 8 εκτείνεται ως την αλληλουχία όπου υβριδοποιείται ο εκκινητής 519RSHORT1

3.1.3 Ανάλυση των μεταγράφων 8, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου ZNF519

Ανάλυση του γονιδίου ZNF519 με το λογισμικό πρόβλεψης εναλλακτικών μεταγράφων του **AspicDB** δίνει πρόβλεψη για 11 εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου (**Εικόνα 3.15**). Να σημειώσουμε ότι στο εργαστήριο έχουμε συνολικά απομονώσει και ταυτοποιήσει του γονιδίου.



Εικόνα 3.15: Πρόβλεψη των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου ZNF519 από τη βάση δεδομένων Aspic.

Με το λογισμικό **Expasy** προβλέφθηκε η πιθανή αλληλουχία των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα μετάγραφα που ταυτοποιήσαμε:

➔ Για το μετάγραφο **8** (1812bp):

SREMAVYSYYNQGILPEQGIQDSFKKATLGRYGSCGLENICLWKNWESIGEGG
QKECYNLCSQYLTTSHNKHLTVKGDKEYRIFQKKPQFLSAAPTEPCIPMNKYQ
HKFLKSVFCNKNQINFNHDSNISKHHSTHFLENYYNCNECEKVFYQSSKLIFPE
NIHIQKKPYNSNECGETSDPFSKLTQHQRIYIGESSQRCNKKCIIVFSQSHLKGH
KIINTGEKSVKYKERGKAFTRGLHLGHQKIHTGEKPYKCKKCDKAFNKSSHLAQ
HQRIHTGEKPFKCKECGKAFNRGSYLTQHQRIHTGERAFKCEECGKAFNRGSY
LTQHQRIHTGEKPFRCKECGKAFNRSSYVTQHQRMHTGEKPFKCKECGKAFN
RASHLTQHQRIHTGEKHFKCKECGKAFNRGSHLTRHQRIHTGEKSFKCEECGK
AFIWGSHLTQHQRVHTGEKFFKCKECGKAFTRSSHLTQHQRIHTGEKPFKCK
ECGKAFNRRSTLTQHQIIHTR (**502aa**)

➔ Για το μετάγραφο **11** (761bp):

SREMELLTFRDVAIEFSPEEWKCLDPAQQNLYRDVMLENYRNLVSLVEKRDC
L (**53aa**)

➔ Για το μετάγραφο **12** (847bp):

SREMELLTFRDVAIEFSPEEWKCLDPAQQNLYRDVMLENYRNLVSLGLIVLIG

PPLSLCVRK(**62aa**)

➔ Για το μετάγραφο **13** (769bp):

SREMELLTFRDVAIEFSPEEWKCLDPAQRNLYRDVMLENYRNLVSLGLIVLIG
PPLSLCVRK(**62aa**)

➔ Για το μετάγραφο **14** (312bp):

SREMELLTFRDVAIEFSPEEWKCLDPAQQNLYRDVMLENYRNLVSLVHDFRL
LCAEVLNPQAADQYLSMAC(**71aa**)

Με το λογισμικό **Smart** έγινε πρόβλεψη των λειτουργικών περιοχών των παραπάνω πιθανών πρωτεϊνών και προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

Για το **μετάγραφο 8 (1812bp)** προβλέπεται περιοχή που κωδικοποιεί 9+1 δάχτυλα ψευδαργύρου στην πρωτεϊνική του αλληλουχία (**Εικόνα 3.16**). Στοίχιση της πιθανής αλληλουχίας της πρωτεΐνης του μεταγράφου 8 με την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το μετάγραφο 1 έδειξε ότι η περιοχή των δαχτύλων ψευδαργύρου που κωδικοποιεί το μετάγραφο 8 ταυτίζεται πλήρως με την αντίστοιχη περιοχή των δαχτύλων ψευδαργύρου στο μετάγραφο 1 (**βλ**. **παράρτημα**). Επομένως, θεωρούμε ότι ανιχνεύσαμε και ταυτοποιήσαμε την πλήρη αλληλουχία του μεταγράφου 8.



Εικόνα 3.16: Πρόβλεψη λειτουργικών περιοχών της πιθανής πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το μετάγραφο 8. Πρόκειται για 9+1 δάχτυλα ψευδαργύρου.

Η πρωτεϊνική αλληλουχία που προβλέφθηκε για το μετάγραφο 8 δεν διαθέτει τη λειτουργική περιοχή KRAB. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς το μετάγραφο 8 δε φέρει στην αλληλουχία του το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB.

Στο μετάγραφο 8 δεν υπάρχει η αλληλουχία Kozak, η οποία είναι απαραίτητη για να αρχίσει η μετάφραση από το ριβόσωμα. Συνεπώς, είτε η αλληλουχία που κλωνοποιήσαμε δεν περιλαμβάνει την 5' αμετάφραστη περιοχή, είτε το μετάγραφο αυτό είναι μη-κωδικό RNA.

Για τα **μετάγραφα 12 και 13** προβλέπονται πρωτεΐνες με την ίδια αλληλουχία αμινοξέων. Τόσο για αυτά τα μετάγραφα όσο και για τα **μετάγραφα 11 και 14** προβλέπεται η περιοχή KRAB. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι και τα τέσσερα μετάγραφα φέρουν στην αλληλουχία τους το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB. Κανένα, όμως, από τα παραπάνω 4 μετάγραφα δεν έχει την περιοχή που κωδικοποιεί τα δάχτυλα ψευδαργύρου, καθώς τα μετάγραφα αυτά δεν έχουν το εξώνιο που την κωδικοποιεί.

" !

Συνεπώς, θεωρούμε ότι τα μετάγραφα αυτά μεταφράζονται σε πρωτεΐνες χωρίς δάχτυλα ψευδαργύρου, δηλαδή χωρίς την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Επομένως, η παραπέρα διερεύνηση του ρόλου τους στη ρύθμιση της μεταγραφής ή ενδεχομένως και άλλων διαδικασιών καθίσταται αναγκαία.

: Στις αλληλουχίες των μεταγράφων που βρίσκονται στο **παράρτημα** σημειώνονται τα και .

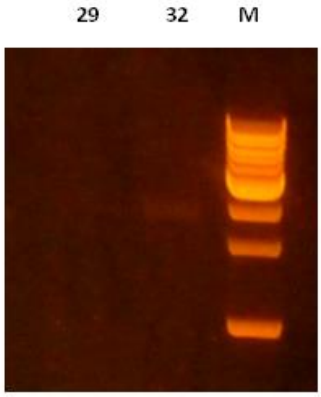
3.2 Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519

3.2.1 Μελέτη της έκφρασης του μεταγράφου 8 του ZNF519 σε φυσιολογικούς ιστούς ανθρώπου

Η μελέτη της έκφρασης του μεταγράφου 8 έγινε σε φυσιολογικούς ιστούς ανθρώπου δύο αναπτυξιακών σταδίων. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήσαμε τα cDNA της εταιρίας Clontech.

Αρχικά, πραγματοποιήσαμε αντίδραση PCR με εκκινητές 519F1/519RSHORT1 σε ανθρώπινο cDNA ελέγχου (human control cDNA) με

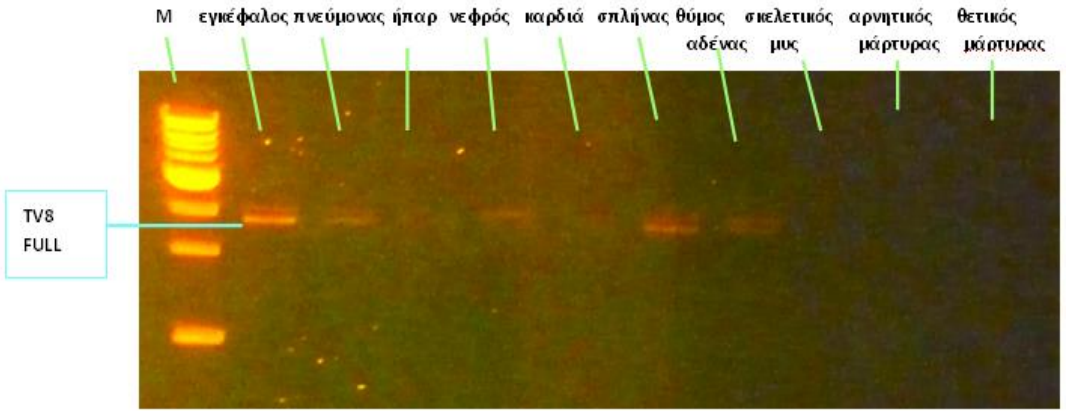
συνθήκες κατάλληλες ώστε να εντοπίσουμε το επιθυμητό προϊόν και να έχουμε την εκθετική φάση της αντίδρασης. Η ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης PCR για 29 και 32 κύκλους έδωσε την παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 3.17)**:



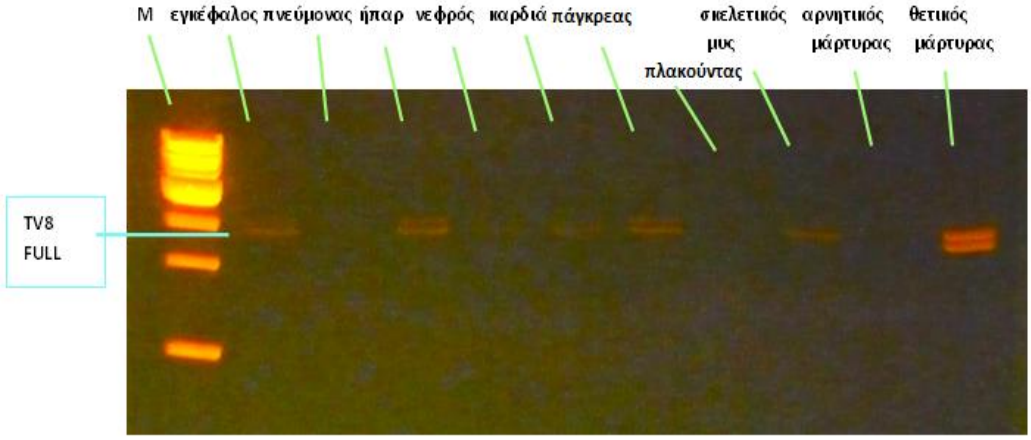
Εικόνα 3.17: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.6% της PCR σε ανθρώπινο cDNA ελέγχου με τους εκκινητές 519F1/519RSHORT1 για 29 και 32 κύκλους (time-points). Ηλεκτροφορήθηκαν 18μl από την αντίδραση για κάθε χρονικό σημείο (time-point). M: μάρτυρας μοριακών μεγεθών 1kb.

Οι αναμενόμενες ζώνες από την συγκεκριμένη αντίδραση PCR στα ~2000 bp ήταν πιο έντονες όταν η αντίδραση έγινε στους 32 κύκλους. Επομένως, επιλέξαμε τους 32 κύκλους για τις αντιδράσεις PCR στα cDNA των ιστών.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε PCR με τους εκκινητές 519F1/519RSHORT1 σε cDNA από ιστούς προκειμένου να ελέγξουμε την έκφραση του μεταγράφου 8 του ZNF519 **(Εικόνα 3.18, Εικόνα 3.19)**.



Εικόνα 3.18: Ανίχνευση του πλήρους μεταγράφου 8 του ZNF519 σε cDNA από ιστούς. Ηλεκτροφορήσαμε 18μl από κάθε αντίδραση PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1.6%. M: 1kb μάρτυρας μοριακών μεγεθών



Εικόνα 3.19: Ανίχνευση του μεταγράφου 8 του ZNF519 σε cDNA από ενήλικους ιστούς. Ηλεκτροφορήσαμε 18μl από κάθε αντίδραση PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1.6%. M: 1kb μάρτυρας μοριακών μεγεθών

#$%&

FULL).

Ποιοτική σύγκριση των παραπάνω εικόνων έδειξε ότι το μετάγραφο 8 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς των δύο αναπτυξιακών σταδίων. Συγκεκριμένα, στους φυσιολογικούς εμβρυικούς ιστούς παρατηρούμε ότι δεν εκφράζεται στο συκώτι, το νεφρό, την καρδιά και το σκελετικό μυ. Στους φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς το μετάγραφο 8 δεν εκφράζεται στον πνεύμονα, το νεφρό και τον πλακούντα. Επομένως υπάρχει διαφορική έκφραση του μεταγράφου 8 στους διαφορετικούς ιστούς και στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια.

Η συγκέντρωση των cDNA των ιστών είναι γνωστή επομένως μπορεί να γίνει ημιποσοτική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 8 μεταξύ των ιστών. Η σύγκριση αυτή επιτεύχθηκε με εφαρμογή του προγράμματος ImageJ στις φωτογραφίες των παραπάνω πηκτωμάτων. Με το συγκεκριμένο πρόγραμμα μετρήθηκε η ένταση των ζωνών των δειγμάτων και του μάρτυρα μοριακών

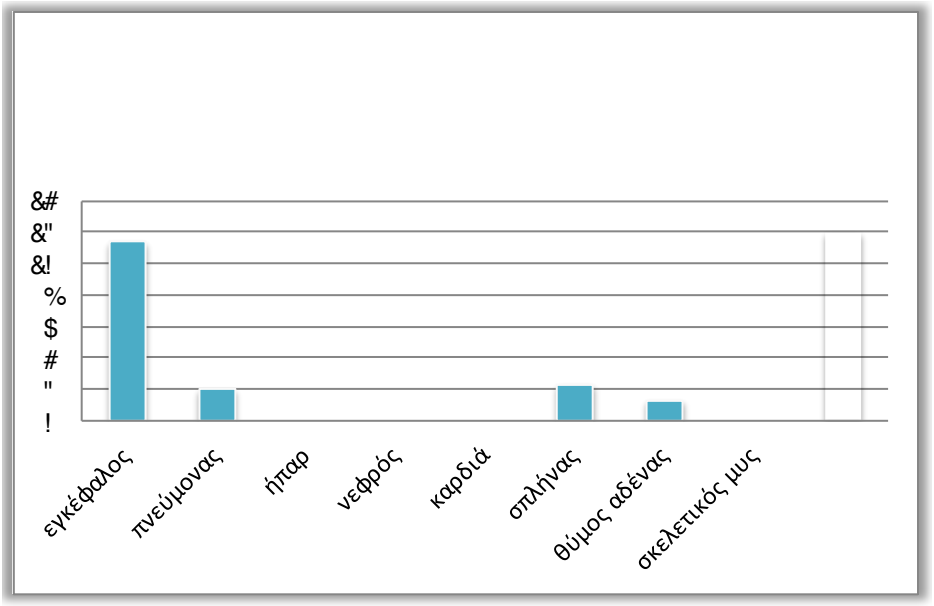
μεγεθών. Έπειτα αντιστοιχίσαμε την ένταση των ζωνών με ποσότητα DNA (ng) με τη βοήθεια του μάρτυρα μοριακών μεγεθών. Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν κατασκευάσαμε τα παρακάτω διαγράμματα που αφορούν στην διαφορική έκφραση του μεταγράφου 8 μεταξύ των διαφορετικών ιστών των δύο αναπτυξιακών σταδίων.

Αναλυτικότερα, συγκρίναμε τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 8

στους ιστούς των ενηλίκων

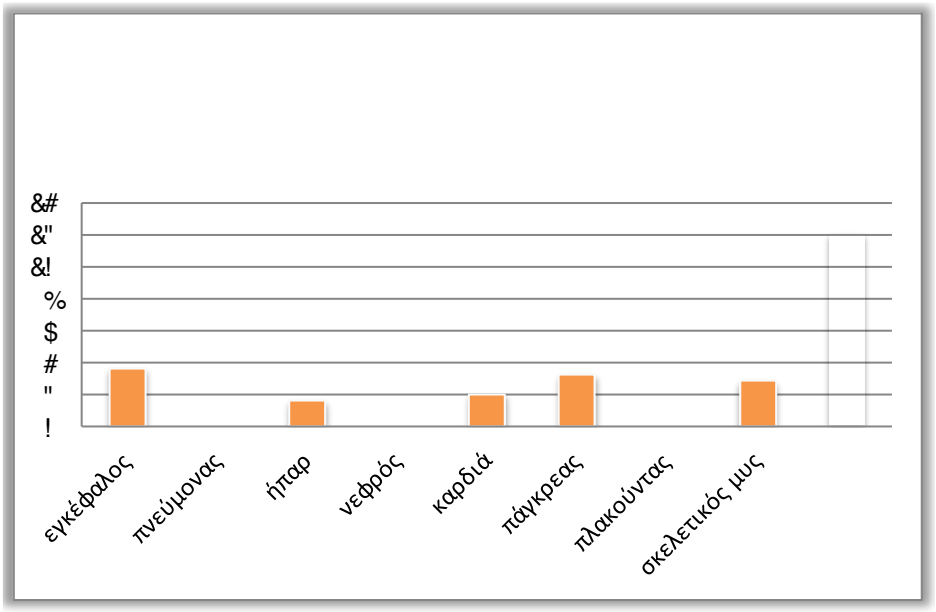
στους εμβρυικούς ιστούς

σε κάθε ιστό χωριστά εμβρυικό και ενηλίκου



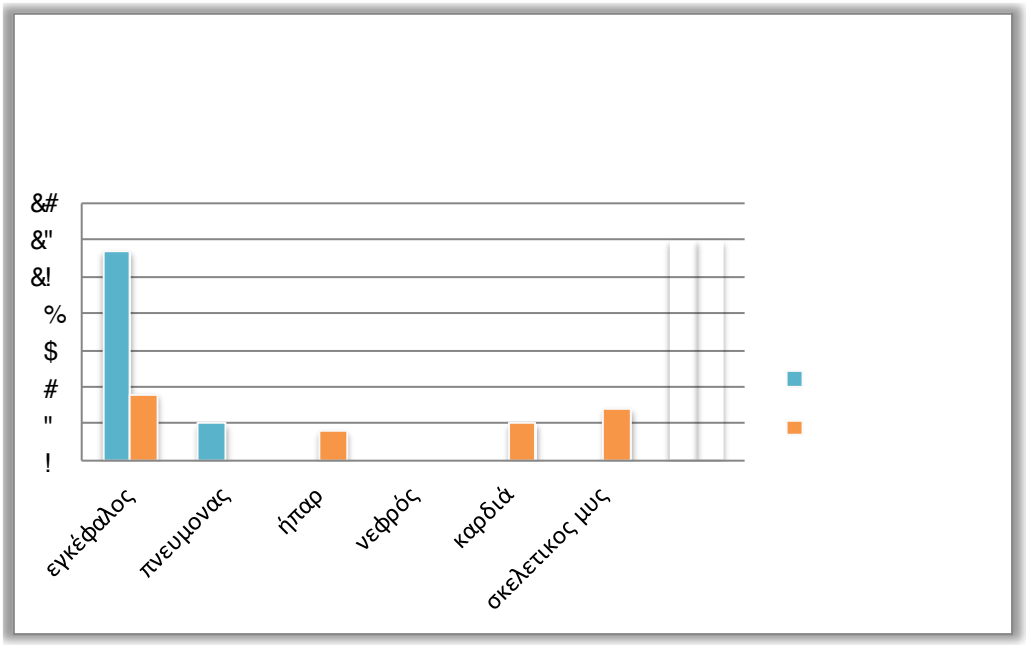
Διάγραμμα 3.1: Ημιποσοτική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 8 σε φυσιολογικούς εμβρυϊκούς ιστούς. Οι μονάδες του άξονα των y αντιστοιχούν σε ng DNA.

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 8 στους φυσιολογικούς εμβρυικούς ιστούς έδειξε ότι το μετάγραφο παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στον εγκέφαλο. Στους υπόλοιπους ιστούς τα επίπεδα έκφρασης είναι πολύ πιο χαμηλά, ενώ στο ήπαρ, το νεφρό, την καρδιά και τον σκελετικό μυ το μετάγραφο εκφράζεται σε επίπεδα μηδενικά ή μη ανιχνεύσιμα. Συνολικά παρατηρείται έκφραση του μεταγράφου στους 4 από τους 8 ιστούς.



Διάγραμμα 3.2: Ημιποσοτική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 8 σε φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς. Οι μονάδες του άξονα των y αντιστοιχούν σε ng DNA.

Έκφραση του μεταγράφου 8 παρατηρείται στους 5 από τους 8 ιστούς ενήλικα. Τα επίπεδα της έκφρασης είναι αρκετά χαμηλά και αφορούν τον εγκέφαλο, το ήπαρ, την καρδιά, το πάγκρεας και το σκελετικό μυ. Στον πνεύμονα, το νεφρό και τον πλακούντα δεν παρατηρείται έκφραση.



Διάγραμμα 3.3: Ημιποσοτική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 8 μεταξύ φυσιολογικών εμβρυικών και ενήλικων ιστών. Οι μονάδες του άξονα των y αντιστοιχούν σε ng DNA.

Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 8 μεταξύ των φυσιολογικών ιστών ενηλίκου και εμβρύου έδειξε ότι το μετάγραφο εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στον εμβρυικό εγκέφαλο. Γενικά έστω και σε χαμηλά επίπεδα το μετάγραφο 8 εκφράζεται σε 5 ενήλικους ιστούς και σε 4 εμβρυικούς. Κοινός ιστός στον οποίο παρατηρείται έκφραση ο εγκέφαλος. Τα συμπεράσματα αυτά παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα:

ΙΣΤΟΙ	Εμβρύου	Ενήλικα
Εγκέφαλος	++*	+
Πνεύμονας	+	-
Ήπαρ	-	+
Νεφρός	-	-
Καρδιά	-	+
Σκελετικός μυς	-	+
Σπλήνας	+	Δεν εξετάστηκε
Θύμος αδένας	+	Δεν εξετάστηκε
Πάγκρεας	Δεν εξετάστηκε	+
Πλακούντας	Δεν εξετάστηκε	-

Πίνακας 3.1: Συνοπτική παρουσίαση της έκφρασης του μεταγράφου 8 σε φυσιολογικούς ιστούς εμβρύου και ενήλικα

*

Ποσότητα DNA(ng)	Συμβολισμός	Έκφραση
0	**-**	**Καθόλου**
1-10	**+**	**Πολύ χαμηλή**
10-20	**++**	**Χαμηλή**

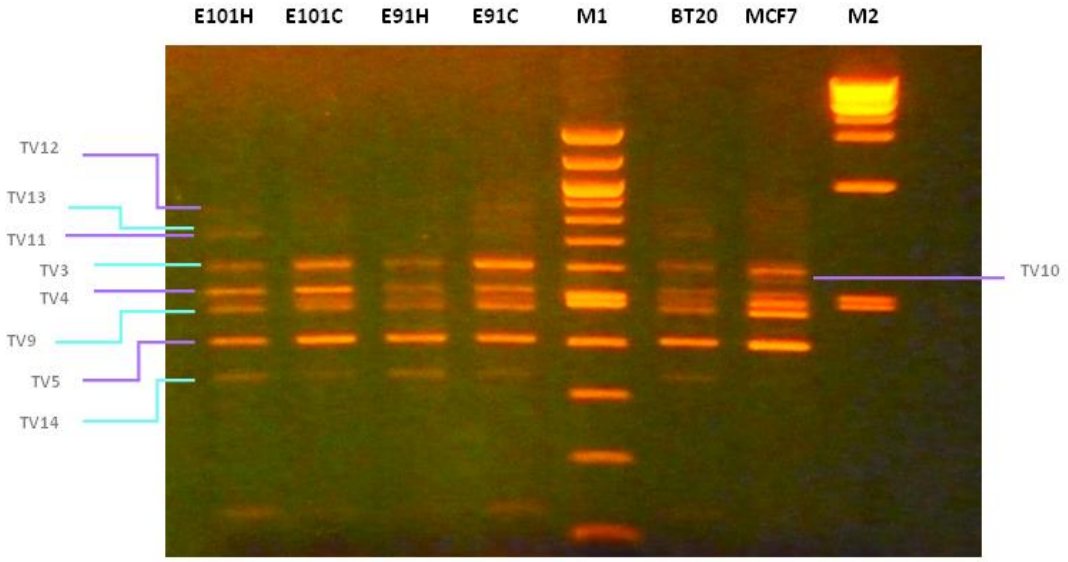
3.2.2 Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519 σε ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικές σειρές μαστού

Στη μελέτη της έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων χρησιμοποιήσαμε cDNA από ανθρώπινους ιστούς μαστού, υγιείς και καρκινικούς και cDNA από κυτταρικές σειρές μαστού (από το εργαστήριο του Α. Σκορίλα) (**Πίνακας 3.2**).

cDNA	Περιγραφή
E101C	Ανθρώπινος ιστός μαστού, καρκινικός
E101H	Ανθρώπινος ιστός μαστού, υγιής και παρακείμενος του αντίστοιχου καρκινικού
E91C	Ανθρώπινος ιστός μαστού, καρκινικός
E91H	Ανθρώπινος ιστός μαστού, υγιής και παρακείμενος του αντίστοιχου καρκινικού
BT20	Κυτταρική σειρά μαστού
MCF7	Κυτταρική σειρά μαστού

Πίνακας 3.2: cDNA από ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519

Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των αντιδράσεων PCR με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.20**

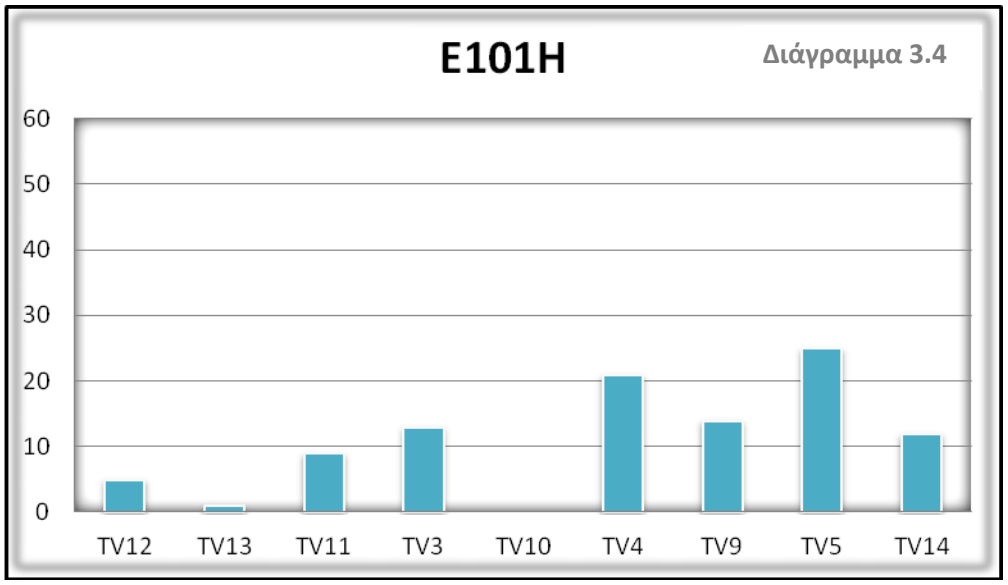


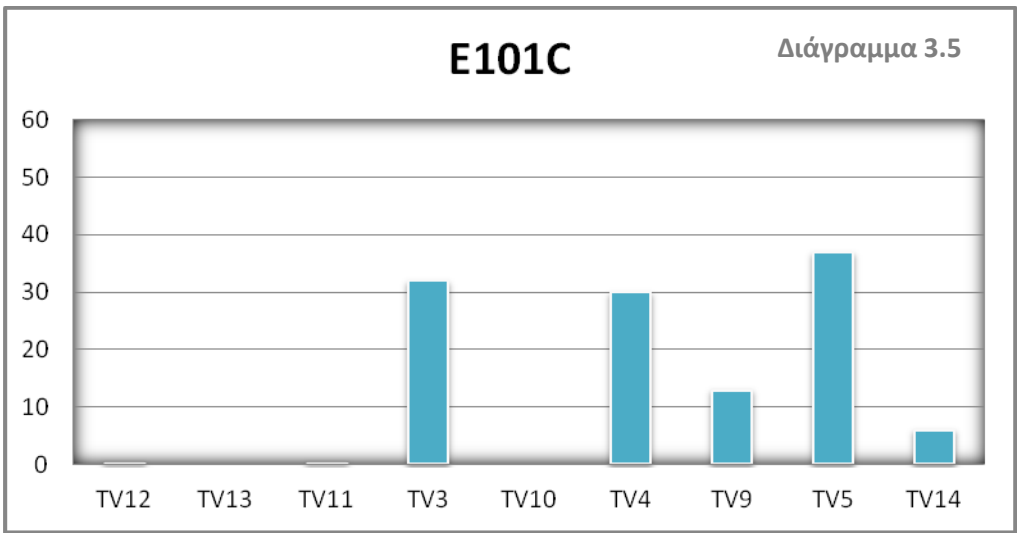
Εικόνα 3.23: Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων PCR σε cDNA από 4 ανθρώπινους ιστούς και 2 κυτταρικές σειρές μαστού με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC, σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Διακρίνονται τα μετάγραφα 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 καθώς και τουλάχιστον 3 άγνωστες ζώνες που δεν έχουν κλωνοποιηθεί. M1: μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100bp, M2: μάρτυρας μοριακών μεγεθών 1kb.

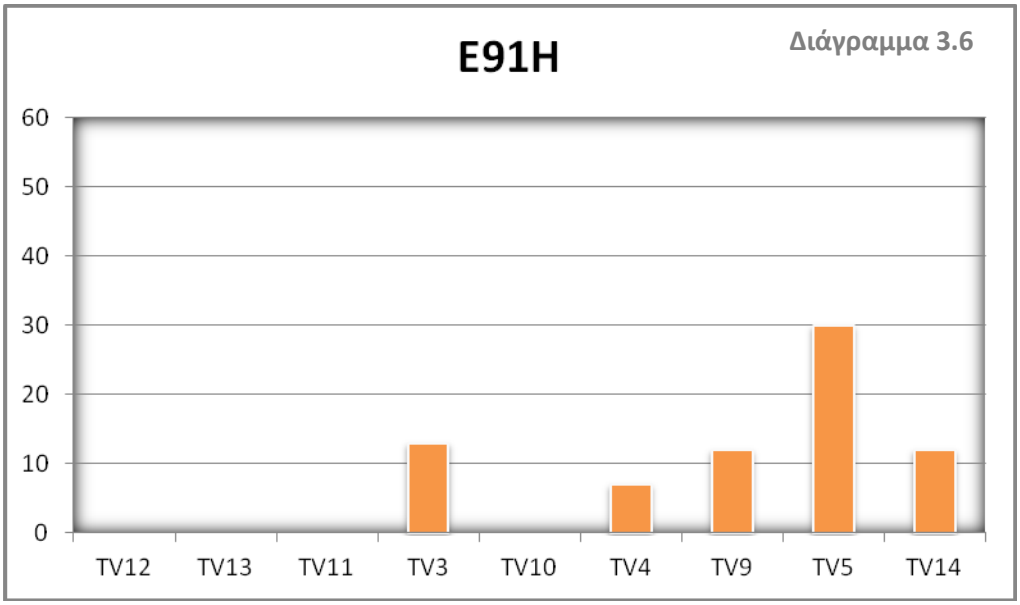
Στην εικόνα παρατηρούμε ότι τα περισσότερα από τα μετάγραφα που έχουμε κλωνοποιήσει και ταυτοποιήσει εκφράζονται σε όλους σχεδόν τους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές. Επισημαίνεται ότι τα μετάγραφα 11, 12 και 13 φαίνονται ιδιαίτερα αχνά και αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη μικρή ποσότητα cDNA που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση PCR. Επίσης το μετάγραφο 10 εμφανίζεται μόνο στην κυτταρική σειρά MCF7. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων μεταξύ των ιστών - σειρών δεν μπορεί να γίνει, διότι στο καθένα υπήρχε διαφορετική ποσότητα cDNA. Σύγκριση μπορεί να γίνει μόνο μεταξύ των διαφορετικών μεταγράφων της ίδιας κυτταρικής σειράς.

Έγινε ημιποσοτική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου ZNF519 μεταξύ τους σε κάθε κυτταρική σειρά και ιστό ξεχωριστά. Η σύγκριση αυτή επιτεύχθηκε με εφαρμογή του προγράμματος ImageJ στη

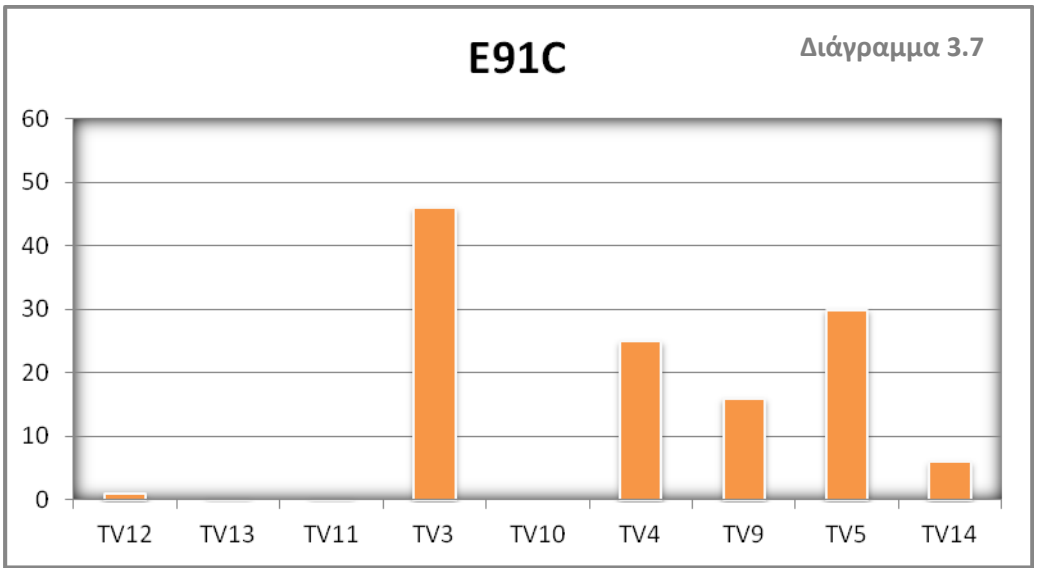
φωτογραφία του πηκτώματος. Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν κατασκευάσαμε τα παρακάτω διαγράμματα για κάθε ιστό και κυτταρική σειρά.



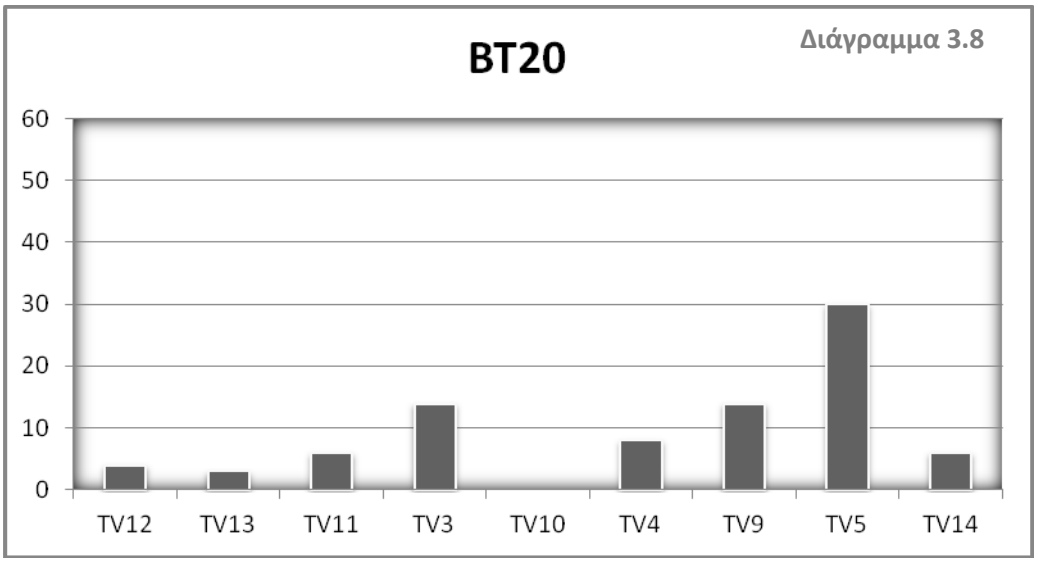




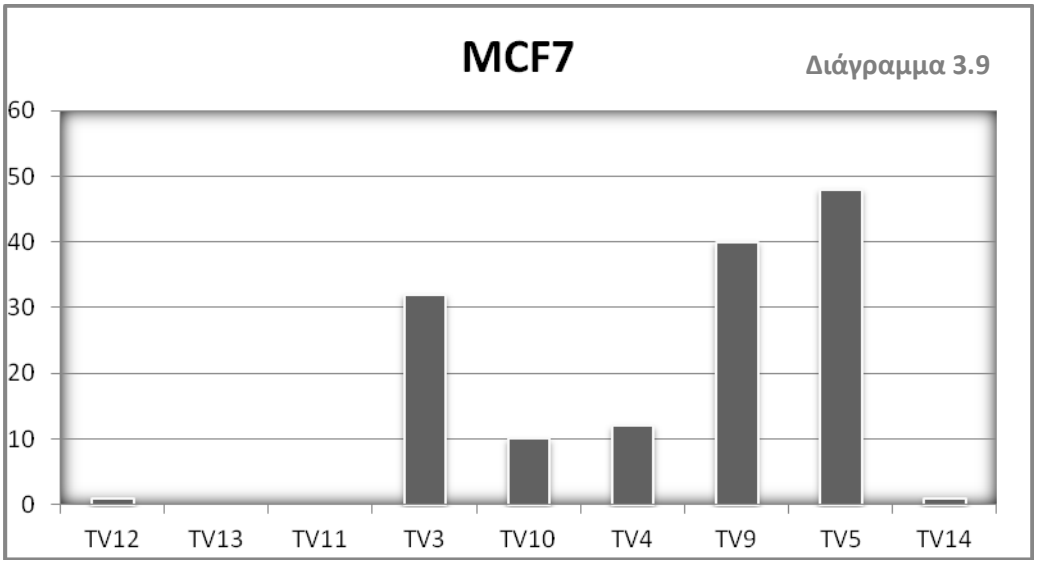
Διάγραμμα 3.6



Διάγραμμα 3.7



Διάγραμμα 3.8



Διαγράμματα 3.4-3,9: Ημιποσοτική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων 3,4,5,9,10,11,12,13,14 σε κάθε ιστό και κυτταρική σειρά. Οι μονάδες στον άξονα των y αντιστοιχούν σε ng DNA.

Η ημιποσοτική σύγκριση της έκφρασης όλων των μεταγράφων που έχουν έως τώρα απομονωθεί με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC προκύπτουν τα εξής:

Τα μετάγραφα **3, 4, 5, 9** και **14** εμφανίζονται σε όλους τους ιστούς του μαστού, υγιείς και καρκινικούς, και σε όλες τις κυτταρικές σειρές μαστού που εξετάστηκαν.

Τα μετάγραφα **11, 12** και **13** παρουσιάζουν πολύ χαμηλά έως και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης σε όλους τους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές.

Το μετάγραφο **10** δεν εμφανίζεται σε κανέναν ιστό παρά μόνο στη μία από τις δύο κυτταρικές σειρές, την MCF7, και σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης.

Να επισημάνουμε ότι σε προηγούμενη μελέτη έκφρασης του μεταγράφου **10,** από την Ιουλία Μάστορα, είχαν επίσης παρατηρηθεί πολύ χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου μεταγράφου σε διάφορες κυτταρικές σειρές καθώς και απουσία έκφρασης του μεταγράφου 8 σε φυσιολογικούς ιστούς εμβρύου. Πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης είχαν παρατηρηθεί και σε 2 από τους 8 φυσιολογικούς ιστούς ενήλικα (εγκέφαλος και ήπαρ).

Στον **Πίνακα 3.3** φαίνεται συνοπτικά σε ποιούς ιστούς και κυτταρικές σειρές από αυτές που μελετήθηκαν παραπάνω, παρατηρείται έκφραση των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14.

	E101H	E101C	E91H	E91C	BT20	MCF7
TV3	+	+	+	+	+	+
TV4	+	+	+	+	+	+
TV5	+	+	+	+	+	+
TV9	+	+	+	+	+	+
TV10	-	-	-	-	-	+
TV11	+	-	-	-	+	-
TV12	+	-	-	+	+	+
TV13	+	-	-	-	+	-
TV14	+	+	+	+	+	+

Πίνακας 3.3:Συνοπτική παρουσίαση της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 σε ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικές σειρές μαστού. +: παρατηρείται έκφραση, -: δεν παρατηρείται έκφραση.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γονίδιο ZNF519 που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι ένα ανθρώπινο γονίδιο με άγνωστο ακόμα ρόλο. Από τη βάση δεδομένων του NCBI γνωρίζουμε ότι το μετάγραφο 1 του γονιδίου κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα με 9 ομαδοποιημένα δάχτυλα ψευδαργύρου και 1 απομονωμένο, τύπου C_2H_2. Στην ίδια βάση δεδομένων πρόσφατα καταχωρήθηκε το εναλλακτικό μετάγραφο 2 (NCBI) του γονιδίου το οποίο δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη και χαρακτηρίζεται ως μη-κωδικό RNA. Δεν αντιστοιχεί σε κάποιο από τα μετάγραφα που έχουμε ταυτοποιήσει παρόλο που τα εξώνια που έχει δεν είναι νέα και τα έχουμε συναντήσει στα μετάγραφα που έχουν ανιχνευτεί με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC (**Εικόνα 4.1**).

Τα μη-κωδικά RNA αποτελούν ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον κεφάλαιο της σύγχρονης Μοριακής Βιολογίας καθώς ο ρόλος τους στο κύτταρο είναι ακόμα άγνωστος. Στο εργαστήριο μας είχαν ήδη κλωνοποιηθεί 10 εναλλακτικά μετάγραφα του ZNF519 πριν από την έναρξη της παρούσας εργασίας. Με αυτά τα δεδομένα αρχίσαμε τη μελέτη του γονιδίου με στόχο την ανίχνευση και ταυτοποίηση και άλλων εναλλακτικών μεταγράφων και τη δημιουργία ενός προτύπου έκφρασης σε εμβρυϊκούς, ενήλικους και καρκινικούς ιστούς. Μέσα από τα αποτελέσματα της μελέτης καταλήξαμε σε κάποια συμπεράσματα σχετικά με τον πιθανό ρόλο του γονιδίου.

4.1 Ανίχνευση και ταυτοποίηση των εναλλακτικών μεταγράφων 8, 11, 12, 13 και 14 του ZNF519

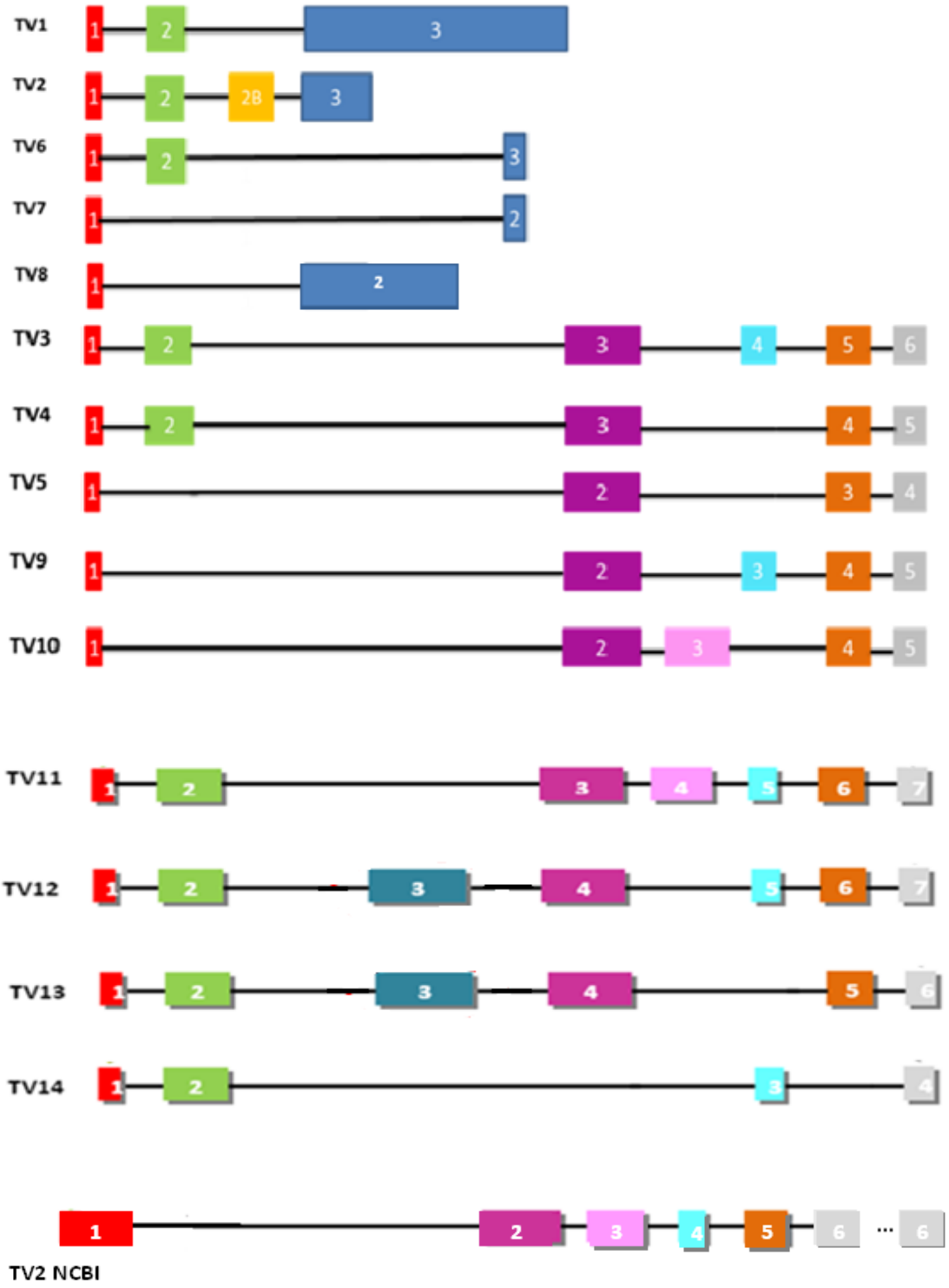
Τα νέα μετάγραφα που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι 4, τα **11, 12, 13** και **14** με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC. Το μετάγραφο **8** που είχε ήδη ταυτοποιηθεί με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/R519, το ανιχνεύσαμε και με τους εκκινητές 519F1/519RSHORT1 και διαπιστώσαμε ότι η αλληλουχία του είναι μεγαλύτερη από αυτήν που γνωρίζαμε (βλ. §3.1.2, §3.1.3).

Στα μετάγραφα 12 και 13 υπάρχει ένα νέο εξώνιο, το εξώνιο 3, και είναι αυτό που διαφοροποιεί το μετάγραφο 12 από το μετάγραφο 3 και το 13 από το 4. Αξιοσημείωτο, επίσης, είναι πως κανένα από τα τέσσερα μετάγραφα που ταυτοποιήσαμε δεν διαθέτει το εξώνιο 2Β του μεταγράφου 2. Πρόκειται για ένα εξώνιο που συναντάται μόνο σε αυτό το μετάγραφο του γονιδίου (**Εικόνα 4.1**).

Τα έως τώρα αποτελέσματα δείχνουν ότι από το γονίδιο ZNF519 προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός εναλλακτικών μεταγράφων ως αποτέλεσμα της εναλλακτικής συρραφής (**Εικόνα 4.1**). Τα μετάγραφα αυτά διαφοροποιούνται ως προς τις λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Συγκεκριμένα τα μετάγραφα 11, 12, 13 και 14 περιλαμβάνουν το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB ενώ δε φέρουν το εξώνιο που κωδικοποιεί τα δάχτυλα ψευδαργύρου. Το μετάγραφο 8 δεν περιλαμβάνει το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB αλλά έχει το εξώνιο που κωδικοποιεί τα δάχτυλα ψευδαργύρου.

Συμπεραίνουμε από τα παραπάνω ότι το γονίδιο ZNF519 έχει τη δυνατότητα κωδικοποίησης πρωτεϊνών με διαφορετικές ιδιότητες μέσω της εναλλακτικής συρραφής του πρόδρομου mRNA του. Ξέρουμε ότι η περιοχή των δαχτύλων ψευδαργύρου εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με το DNA. Τα πειραματικά αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το γονίδιο μπορεί να συνθέσει πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν την περιοχή αυτή. Αυτό υποδηλώνει ότι το γονίδιο μπορεί να εμπλέκεται σε διαδικασίες ενεργοποίησης ή και καταστολής της μεταγραφής, ή και σε άλλες διαδικασίες.

Ένα άλλο πολύ πιθανό ενδεχόμενο είναι να μην μεταφράζονται όλα τα μετάγραφα του γονιδίου σε πρωτεΐνη, δηλαδή να είναι μη-κωδικά RNA. Αυτά υποθέτουμε πως είναι τα μετάγραφα 9 και 10 καθώς στις αλληλουχίες τους απουσιάζουν τα εξώνια που κωδικοποιούν τις δύο βασικές λειτουργικές περιοχές των μεταγραφικών παραγόντων αυτού του τύπου, δηλαδή το εξώνιο που κωδικοποιεί την περιοχή KRAB και αυτό που κωδικοποιεί τα δάχτυλα ψευδαργύρου.



Εικόνα 4.1: Διαγραμματική απεικόνιση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου ZNF519 που έχουν κλωνοποιηθεί στο εργαστήριο μας .

4.2 Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519

4.2.1 Μελέτη της έκφρασης του μεταγράφου 8 του ZNF519 σε φυσιολογικούς ιστούς ανθρώπου

Η μελέτη της έκφρασης του μεταγράφου 8 σε φυσιολογικούς ιστούς ανθρώπου έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 8 τόσο στους εμβρυικούς όσο και στους ενήλικους ιστούς είναι αρκετά χαμηλά. Παρατηρούμε ότι οι ιστοί στους οποίους εκφράζεται διαφέρουν μεταξύ των εμβρυικών και των ενηλίκων. Η διαφορική αυτή έκφραση του μεταγράφου εξηγείται από τις διαφορετικές απαιτήσεις και ανάγκες των κυττάρων στα δύο αναπτυξιακά στάδια. Πιο αναλυτικά:

Ο εμβρυικός εγκέφαλος είναι ο ιστός στον οποίο το μετάγραφο 8 παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς των δύο αναπτυξιακών σταδίων. Από αυτό φαίνεται ότι μπορεί να παίζει ρόλο στη μορφογένεση και την έντονη ανάπτυξη του οργάνου που συμβαίνει στο στάδιο αυτό.

Στον πνεύμονα των εμβρύων παρατηρείται χαμηλή έκφραση του μεταγράφου, ενώ στον πνεύμονα των ενηλίκων δεν παρατηρείται έκφραση. Αυτό πιθανόν να εξηγείται εάν λάβουμε υπόψη ότι ο πνεύμονας αναπτύσσεται ως και το 8ο έτος της παιδικής ηλικίας γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτό το μετάγραφο ενδεχομένως να εμπλέκεται στο μηχανισμό ανάπτυξης του πνεύμονα.

Αντίθετα με τον πνεύμονα, το μετάγραφο 8 εκφράζεται στο ήπαρ και το σκελετικό μυ των ενηλίκων και όχι των εμβρύων. Η εξήγηση που δίνεται σε αυτή την περίπτωση είναι ότι το ήπαρ στα έμβρυα δεν έχει πλήρη λειτουργικότητα δεδομένου ότι ο πλακούντας παρέχει τις θρεπτικές ουσίες στα έμβρυα, ενώ το ήπαρ έχει μικρή συμμετοχή στο μεταβολισμό. Αύξηση των επιπέδων έκφρασης του μεταγράφου 8 του ZNF519 από το έμβρυο στον ενήλικα θα μπορούσε να σχετίζεται με την αυξημένη απαίτηση σε μεταγραφή και πρωτεϊνοσύνθεση του ήπατος λόγω της υψηλής δραστηριότητας του οργάνου στην ενήλικη ζωή. Ομοίως

για τον σκελετικό μυ που είναι πολύ πιο ενεργός σε έναν ενήλικο άνθρωπο από ότι σε ένα έμβρυο.

Στην ενήλικη καρδιά παρατηρείται χαμηλή έκφραση του μεταγράφου, ενώ στην εμβρυική δεν φαίνεται να εκφράζεται. Επίσης το μετάγραφο 8 φαίνεται να μην εκφράζεται στο νεφρό και των δύο αναπτυξιακών σταδίων.

Τέλος, παρατηρούμε ότι το μετάγραφο εκφράζεται στο σπλήνα των εμβρύων. Ο σπλήνας είναι ένα όργανο υπεύθυνο για την αιμοποίηση κατά την εμβρυική ζωή. Επομένως υποθέτουμε ότι το μετάγραφο 8 μπορεί να εμπλέκεται στην έντονη μεταγραφική δραστηριότητα του οργάνου.

Αξίζει να επισημάνουμε ότι από αντίστοιχη μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 9 και 10 του ZNF519 σε φυσιολογικούς ιστούς ανθρώπου, που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο από την Ιουλία Μάστορα, φάνηκε ότι το πρότυπο έκφρασης των μεταγράφων αυτών είναι ανάλογο με αυτό του μεταγράφου 8 που περιγράφηκε παραπάνω (βλ. διπλωματική εργασία Ι.Μ., §4.2.3)

4.2.2 Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 του γονιδίου του ZNF519 σε ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικές σειρές μαστού

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 και 14 στους ανθρώπινους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές μαστού δεν ήταν εφικτή, διότι τα cDNA που χρησιμοποιήσαμε από κάθε κυτταρική σειρά και ιστό δεν είχαν την ίδια συγκέντρωση. Επομένως, από τα αποτελέσματα της μελέτης της έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων καταλήξαμε σε κάποιες παρατηρήσεις, οι οποίες περιγράφονται στην ενότητα **3.2.2** και αποτελούν βάση για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων του γονιδίου.

4.3 Μελλοντικοί στόχοι

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου ZNF519 έδειξε ότι πρέπει να κατέχει σημαντικό ρόλο στη σωστή ανάπτυξη διαφόρων οργάνων κατά το εμβρυϊκό στάδιο αλλά και στη σωστή λειτουργία τους στο ενήλικο στάδιο του ανθρώπου.

Η ταυτοποίηση εναλλακτικών μεταγράφων επιβεβαίωσε ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα δεν περιορίζεται στον αριθμό των γονιδίων που φαινομενικά διαθέτει, αλλά δημιουργεί εναλλακτικούς συνδυασμούς των εξωνίων ενός γονιδίου για να μπορέσει να καθοδηγήσει την ανάπτυξη ενός τόσο πολύπλοκου οργανισμού.

Παρακάτω προτείνονται μερικές ερευνητικές προσεγγίσεις που θα συμβάλλουν στη μελέτη του ρόλου του γονιδίου ZNF519:

1. Ταυτοποίηση των άγνωστων προϊόντων που δεν καταφέραμε να κλωνοποιήσουμε στις αντιδράσεις PCR με το ζεύγος των εκκινητών 519F1/519RNC και 519F1/519RSHORT1.
2. Α) Υπερέκφραση του γονιδίου σε κυτταρικές σειρές με πλασμιδιακούς φορείς που εκφράζουν διαφορετικά μετάγραφα του γονιδίου και επομένως ισομορφές της πρωτεΐνης.

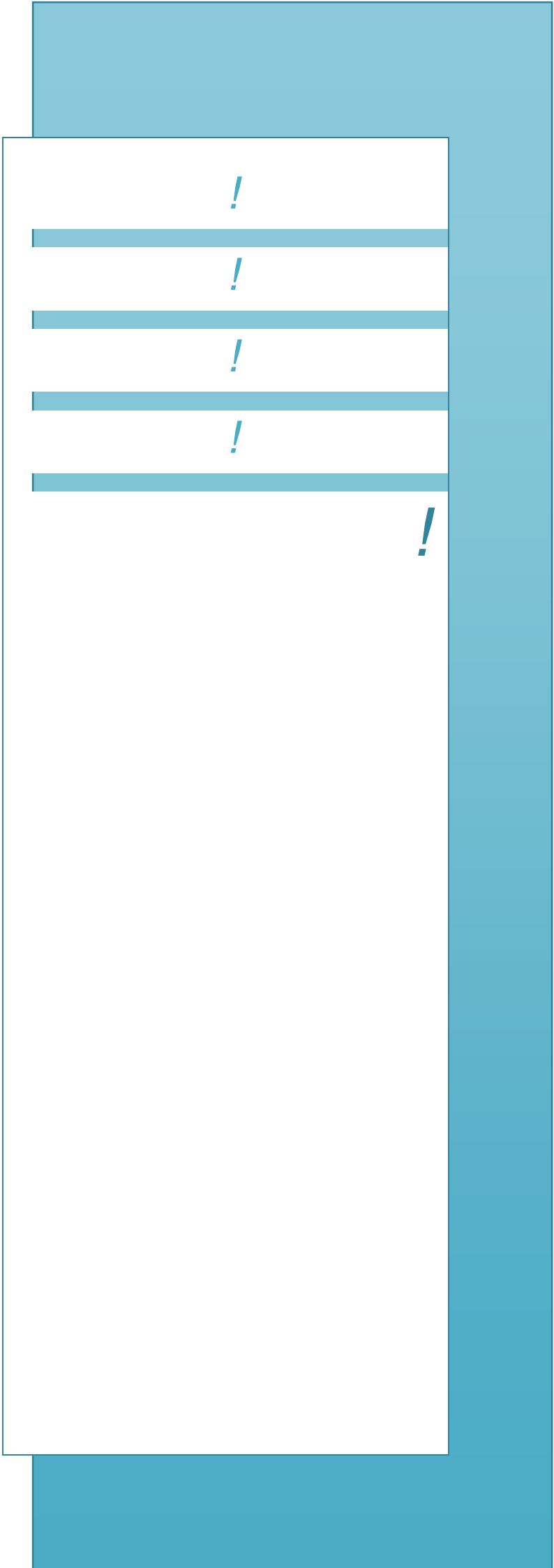
   Β) Καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων μεταγράφων του γονιδίου σε κυτταρικές σειρές με siRNA ή με τη νέα τεχνική CRSPR . Αυτή η ερευνητική προσέγγιση, σε συνδυασμό με την υπερέκφραση του γονιδίου ενδεχομένως να προσφέρει περισσότερα δεδομένα σχετικά με το ρόλο του γονιδίου ZNF519.
3. Προσδιορισμός της περιοχής πρόσδεσης των δαχτύλων ψευδαργύρου C_2H_2 των πρωτεϊνών του ZNF519 στο DNA.
4. Real – time PCR για ποσοτική μελέτη των επιπέδων των mRNA του ZNF519 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και αντίστοιχους καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς.
5. Πραγματοποίηση RACE ή Inverse PCR με σκοπό να ταυτοποιηθούν τα άκρα των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

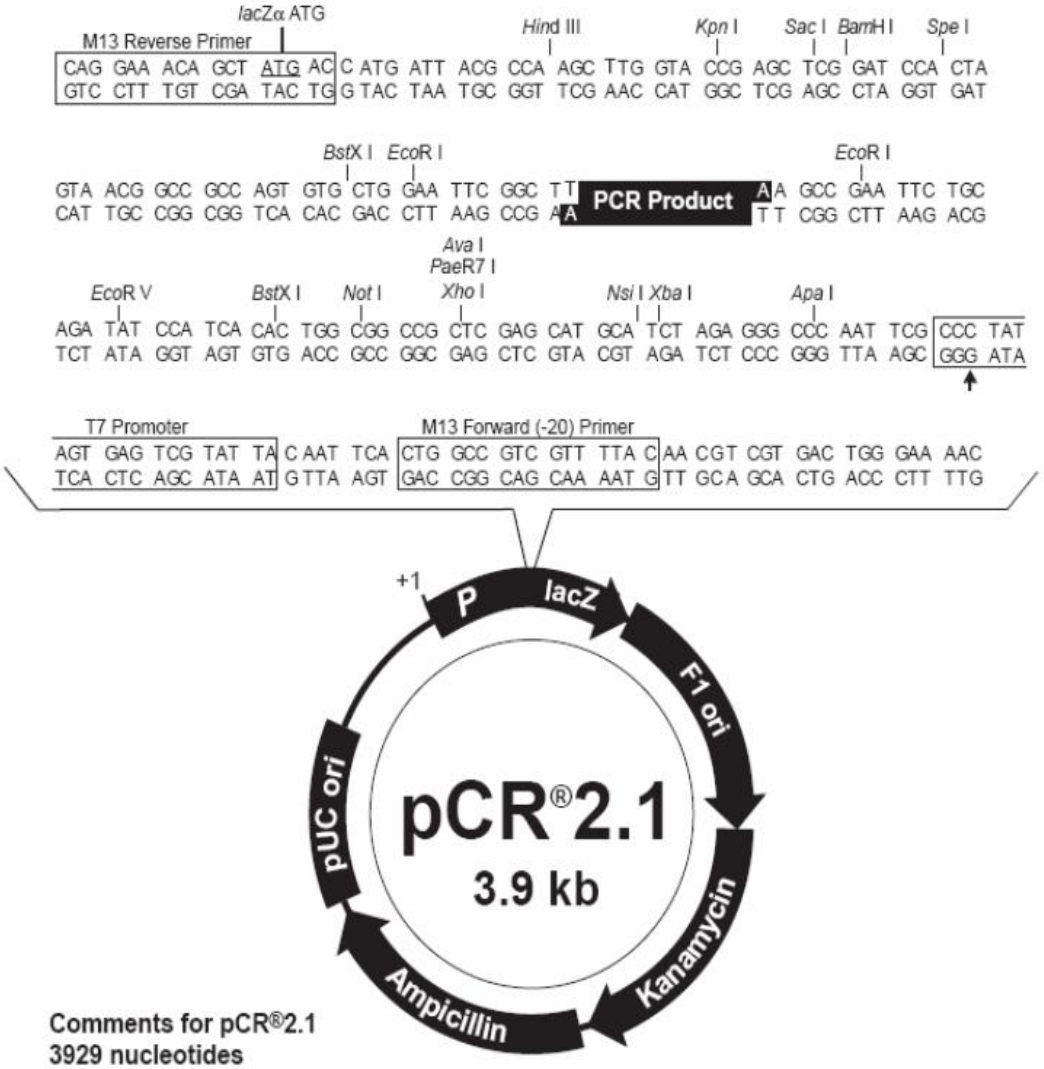
- Λεκανίδου, Τσιτήλου, & Ροδάκης, 2007, **Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία**, Αθήνα.
- Ροδάκης, Λεκανίδου, & Τσιτήλου, 2006, **Ειδικά Κεφάλαια Μοριακής Βιολογίας**, Αθήνα.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, 1994, **Molecular Biology of the Cell**, 3rd edition.
- Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, Losick, 2011, **Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου**, 1η Ελληνική έκδοση, Utopia.
- Lewin, **Genes VIII**, 6th ed., Pearson Prentice Hall, New York, 2004.
- Roberts, R. and Gollob, M., 2006, **Molecular cardiology and genetics in the 21st century--a primer**. Curr Probl Cardiol., 31, 637-701.
- Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J., 2005, **GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.** Physiol Genomics 21, 389–395.
- Bartlett, J. M., & Stirling, D., 2003, **Methods in Molecular Biology: PCR protocols 2nd edition**. Humana Press.
- Camilla Looman, 2004, **The ABC of KRAB Zinc Finger Proteins**. Comprehensive summaries, Uppsala University, Sweden.
- Cox, E. H. and MvLendon, G. L., 2000, **Zinc-dependent protein folding**. Curr. Opin. Chem. Biol. 4, 162-165
- Dale, J. W., & Schantz, M., 2002, **From Gene to Genomes**. JOHN WILEY & SONS, LTD.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J.B., Lipovich, L., Gonzalez, J.M., Thomas, M., Davis, C.A., Shiekhattar, R., Gingeras, T.R., Hubbard, T.J., Notredame, C., Harrow, J. and Guigó, R., 2012, **The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression.** Genome Res., 22, 1775-89.
- Emerson RO, Thomas JH, 2009, **Adaptive evolution in zinc finger transcription factors**. PLoS genetics, 5 (1):e1000325doi:10.1371/ journal.pgen.1000325
- ENCODE Project Consortium, 2012, **An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.** Nature, 6, 57-74.

- Eppendorf (2003, September). **Optimizing electroporation parameters**. www.eppendorf.com
- Fairall, L., Schwabe, J.W., Chapman, L., Finch, J.T. and Rhodes, D., 1993, **The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition**. Nature 366, 483–87.
- Filipova GN, Qi C-F, Ulmer JE, Moore JM, Ward MD, et al., 2002, **Tumor-associated Zinc Finger Mutation in the CTCF Transcription Factor Selectively Alter Its DNA-binding Specificity.** Cancer Res 62: 48–52.
- Hassan MJ, Chishti MS, Jamal SM, Tariq M, Ahmad W, 2008, **A syndromic form of autosomal recessive congenital microcephaly (Jawad syndrome) maps to chromosome 18p11.22-q11.2**. Hum Genet. 123(1):77-82.
- Huntley, S., Baggott, D.M., Hamilton, A.T., Tran-Gyamfi, M., Yang, S., Kim, J., Gordon, L., Branscomb, E. and Stubbs, L., 2006, **A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger genes: insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors**. Genome Res., 16, 669-77.
- Iuchi S., 2001, **Three classes of C2H2 zinc finger proteins**. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences.
- Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Banning MJ, Kalscheuer VM, et al., 2004, **Zinc finger 81(ZNF81) mutations associated with X-linked mental retardation.** J Med Genet 41: 394–399.
- Klug A., 1999, **Zinc finger peptides for the regulation of gene expression**. J. Mol. Biol. 293, 215-218.
- Krebs CJ, Larkins LK, Price R, Tullis KM, Miller RD, et al., 2003, **Regulator of sex-limitation (Rsl) encodes a pair of KRAB zinc-finger genes that control sexually dimorphic liver gene expression.** Genes Dev 17: 2664–2674.
- Krishna, S. S., Majumdar, I. and Grishin, N. V., 2003, **Structural classification of zinc fingers.**
- Lugtenberg D, Yntema HG, Banning MJG, Oudakker AR, Firth HV, et al., 2005, **ZNF674: A New Krüppel-Associated Box–Containing Zinc-Finger Gene Involved in Nonsyndromic X-Linked Mental Retardation**. Am J Hum Genet 78(2): 265–278.
- Luv Kashyap, Parul Tripathi, 2008, **Alternative Splicing: How one gene can make many proteins**, <www. bioscience-explained.org>

- Margolin JF, Friedman JR, Meyer WK, Vissing H, Thiesen HJ, Rauscher FJ 3rd., 1994, **Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains.** Proc Natl Acad Sci U S A., 91(10):4509-13.
- Qin Li, Ji-Ann Lee & Douglas L. Black, 2007, **Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing.** Nature Reviews Neuroscience 8, 819-831.
- Resch A., Xing, Y., Modrek B., Gorlick M., Riley R., Christopher Lee., 2004, **Assessing the Impact of Alternative Splicing on Domain Interactions in the Human Proteome**. Journal of Proteome Research, 3, 76-83
- Shoichet SA, Hoffmann K, Menzel C, Trautmann U, Moser B, Hoeltzenbein M, Echenne B, Partington M, Van Bokhoven H, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, Rott HD, Ropers HH, Kalscheuer VM., 2003, **Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits: identification of a new candidate for X-linked mental retardation.** Am J Hum Genet., 73(6):1341-54.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2006, **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors**. Cell, 126(4), 663–676.
- Talavera D., Orozco M., Cruz X., 2009, **Alternative Splicing of Transcription Factors' Genes: Beyond the Increase of Proteome Diversity.** Comparative and Functional Genomics Volume, Article ID 905894, 6 pages doi:10.1155/2009/905894
- Taneri B, Snyder B, Novoradovsky A, Gaasterland T, 2004, **Alternative splicing of mouse transcription factors affects their DNA-binding domain architecture and is tissue specific**. Genome Biol. 5(10):R75.
- Urrutia, R., 2003, **KRAB-containing zinc-finger repressor proteins.** Genome biology, 4 (10), 231.
- Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A. and Luscombe, N.M., 2009, **A census of human transcription factors: function, expression and evolution**. Nat Rev Genet, 10, 252-63.
- Witzgall R, O'Leary E, Leaf A, Onaldi D, Bonventre JV, 1994, **The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression.** Proc Natl Acad Sci U S A, 91(10):4514-8.



Α. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ



Comments for pCR®2.1
3929 nucleotides

LacZα gene: bases 1-545
M13 Reverse priming site: bases 205-221
T7 promoter: bases 362-381
M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
f1 origin: bases 546-983
Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
pUC origin: bases 3134-3807

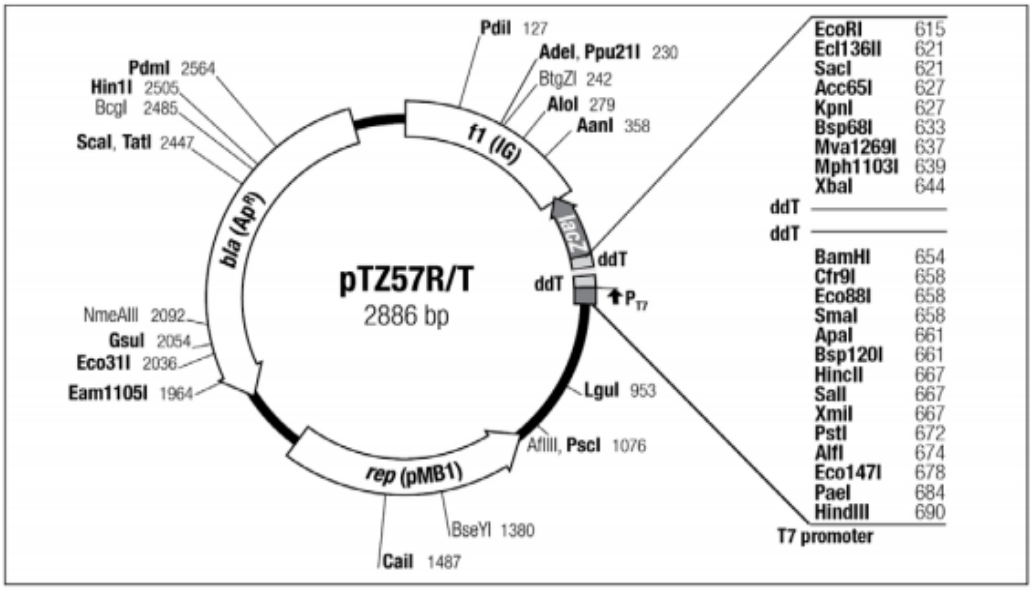


Fig.1. Map of the pTZ57R/T cloning vector. Unique restriction sites are indicated.

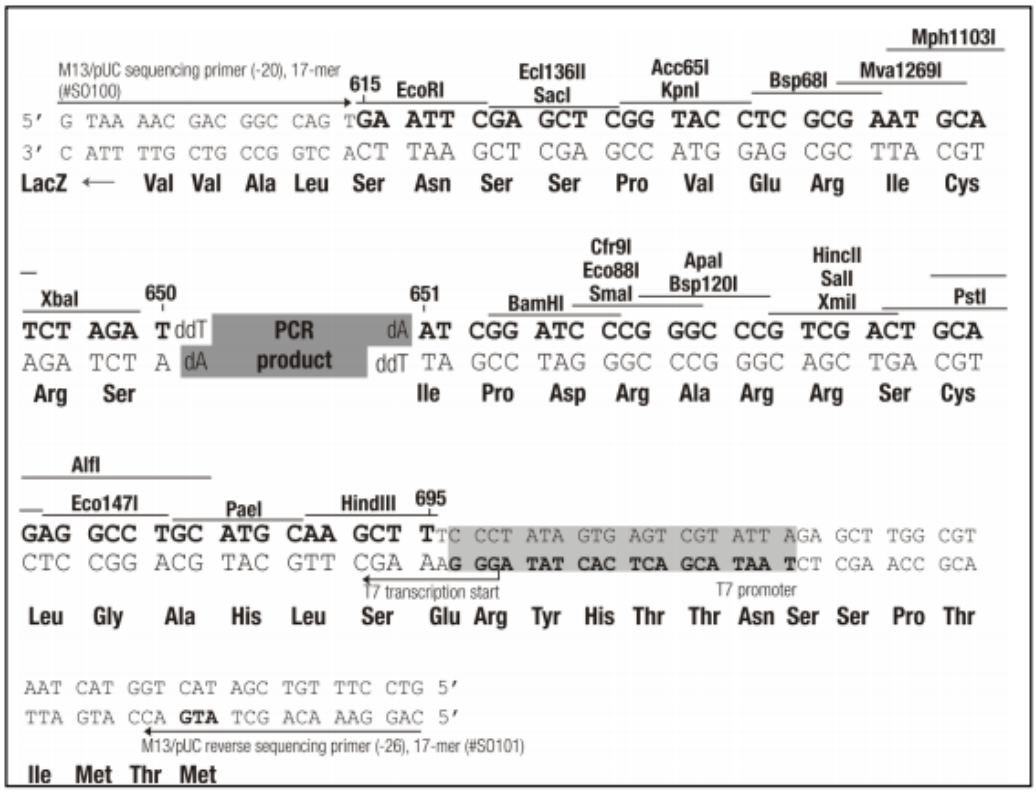


Fig. 2. DNA sequence of MCS region.

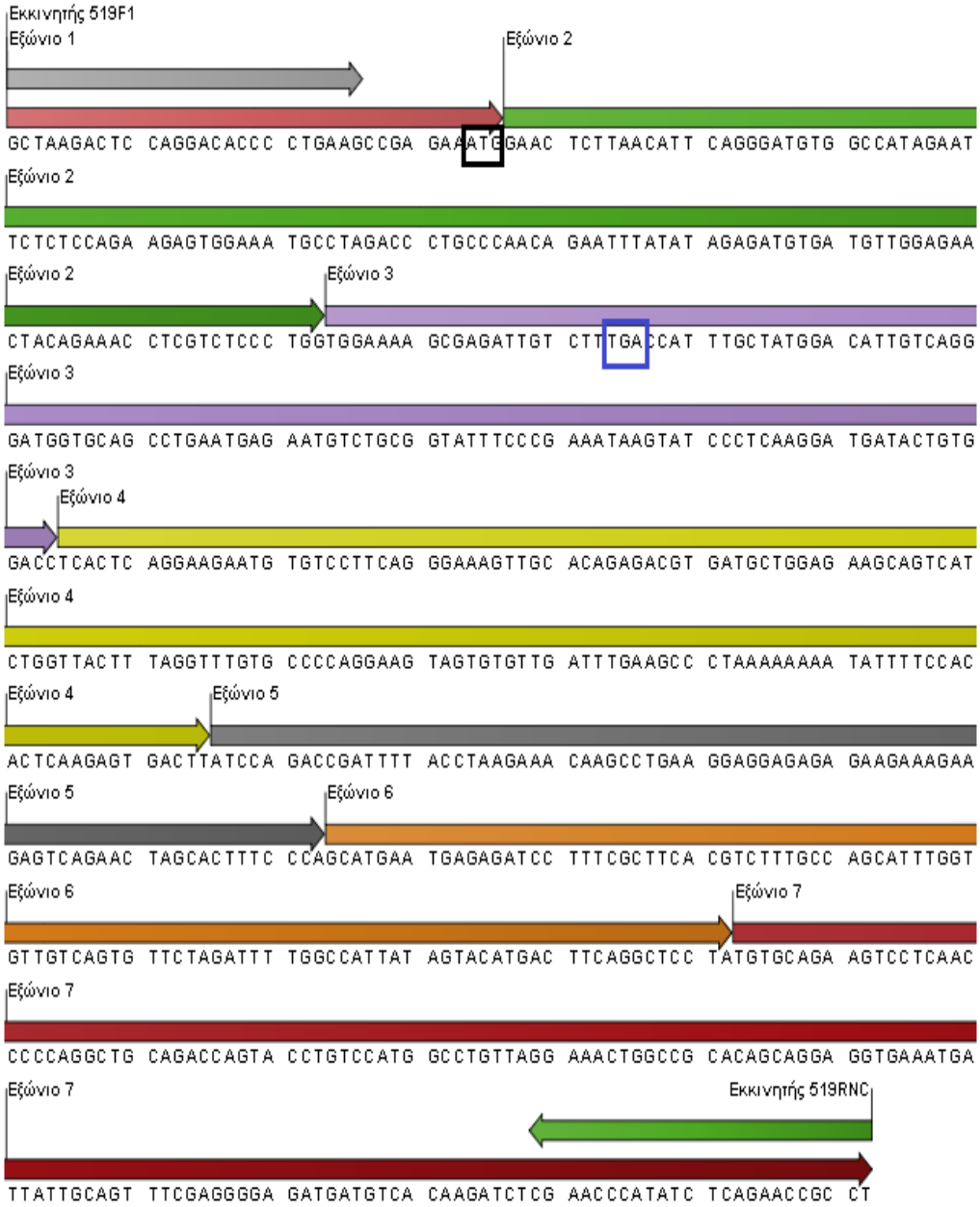
Β. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

Αλληλουχία του **μεταγράφου 11 (762bp)** του γονιδίου ZNF519

Εκκινητές: 519F1/519RNC

Σημείο έναρξης της μετάφρασης (σε **μαύρο** κουτί): εξώνιο 1, νουκλεοτίδιο 34

Σημείο λήξης της μετάφρασης (σε **μπλε** κουτί): εξώνιο 3, νουκλεοτίδιο 183



Αλληλουχία του **μεταγράφου 12 (847bp)** του γονιδίου ZNF519

Εκκινητές: 519F1/519RNC

Σημείο έναρξης της μετάφρασης (σε **μαύρο** κουτί): εξώνιο 1, νουκλεοτίδιο 34

Σημείο λήξης της μετάφρασης (σε **μπλε** κουτί): εξώνιο 3, νουκλεοτίδιο 210

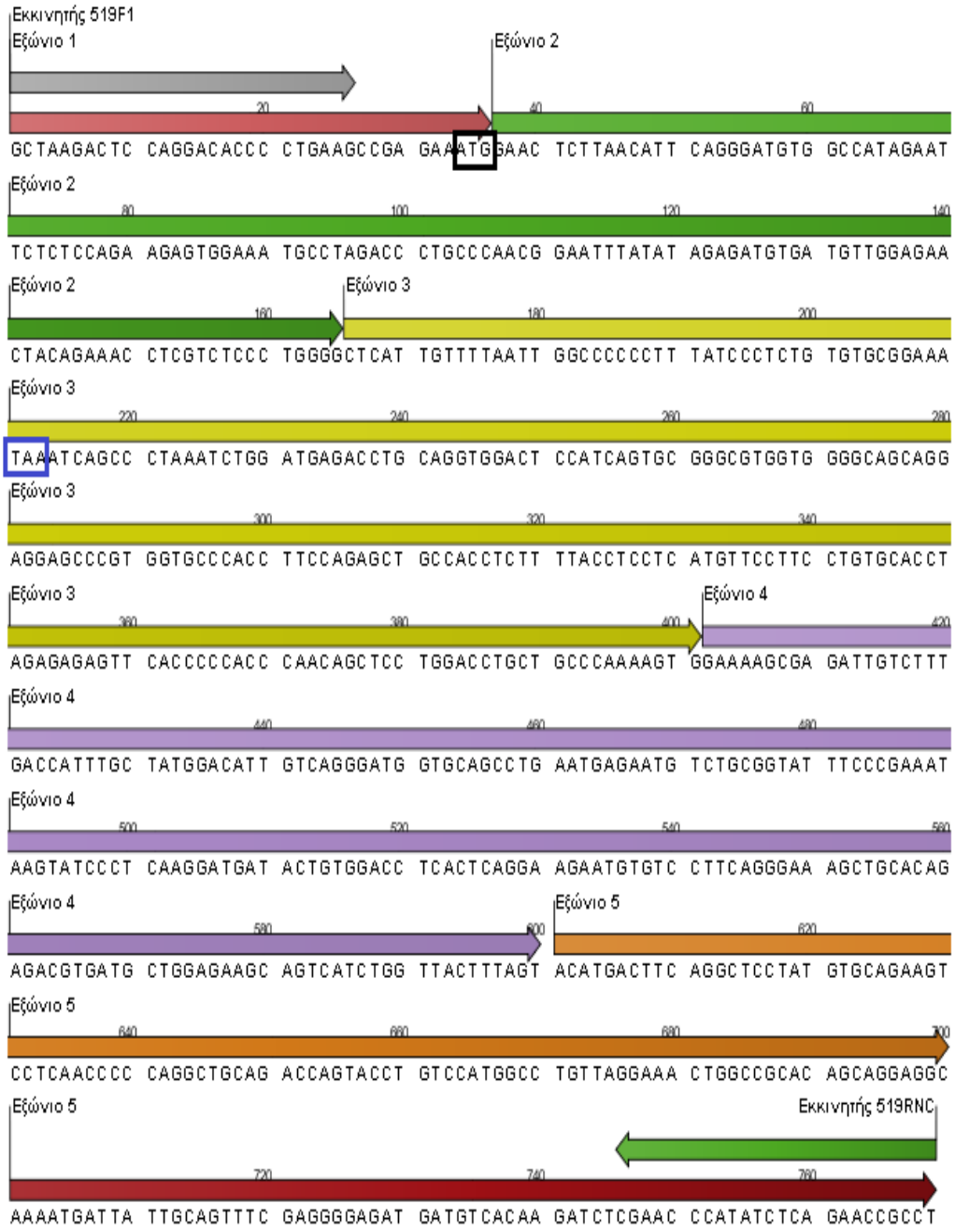


Αλληλουχία του **μεταγράφου 13 (769bp)** του γονιδίου ZNF519

Εκκινητές: 519F1/519RNC

Σημείο έναρξης της μετάφρασης (σε **μαύρο** κουτί): εξώνιο 1, νουκλεοτίδιο 34

Σημείο λήξης της μετάφρασης (σε **μπλε** κουτί): εξώνιο 3, νουκλεοτίδιο 210

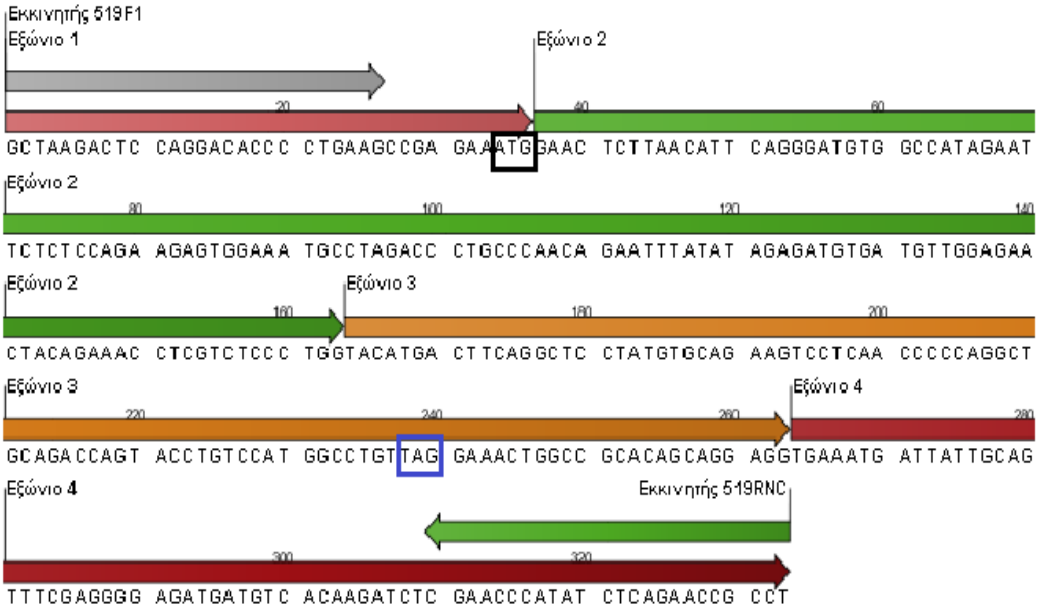


Αλληλουχία του **μεταγράφου 14 (312bp)** του γονιδίου ZNF519

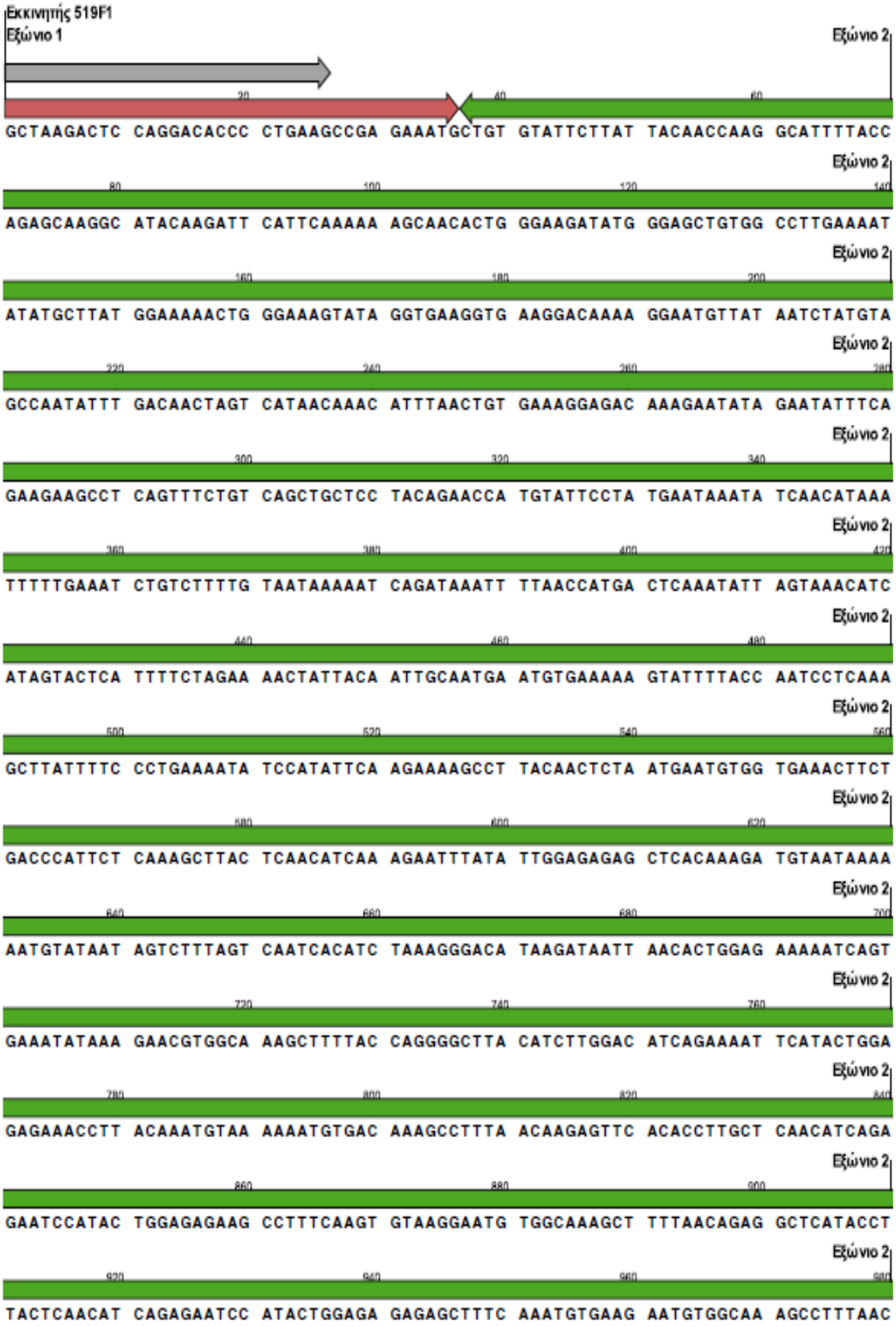
Εκκινητές: 519F1/519RNC

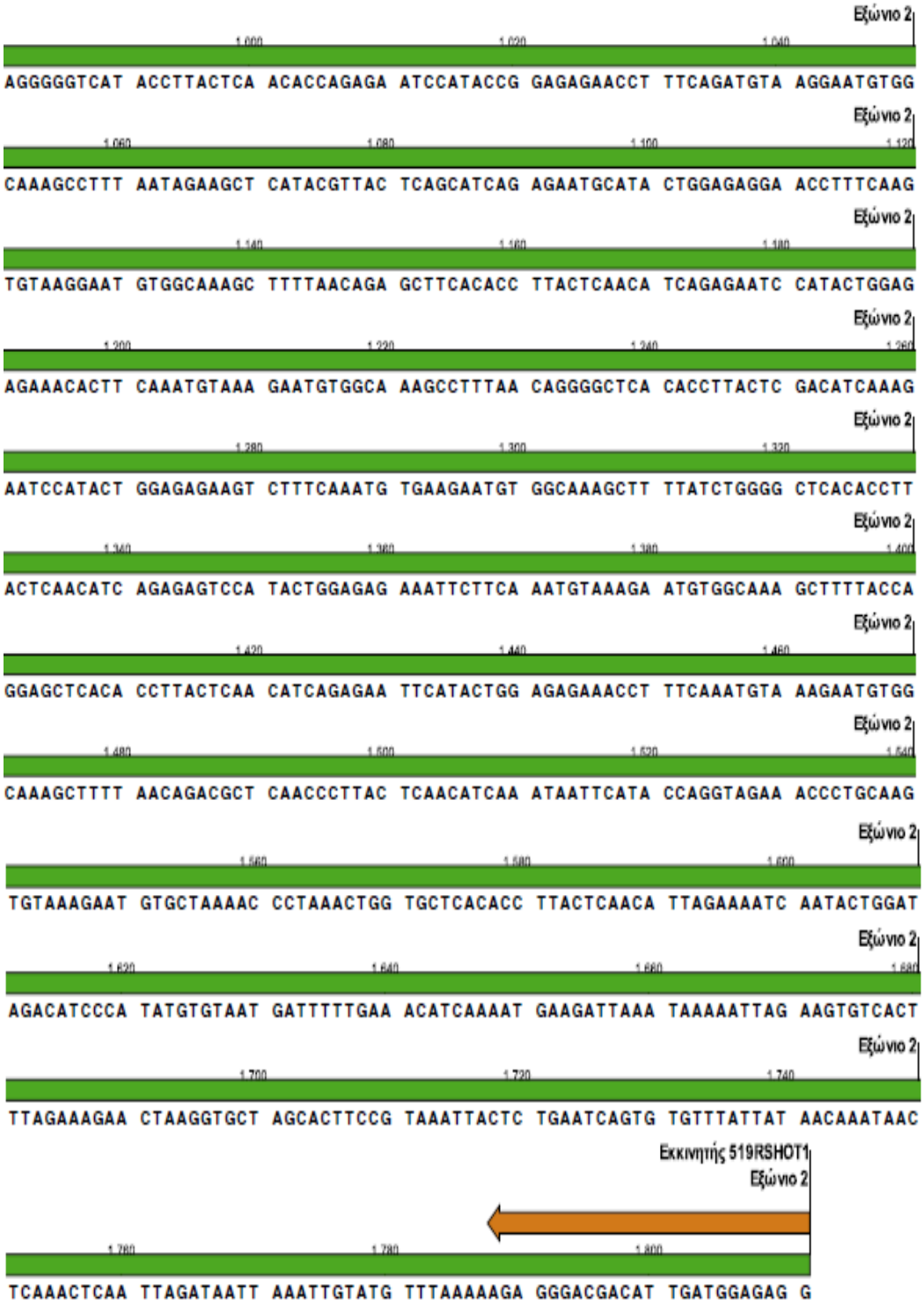
Σημείο έναρξης της μετάφρασης (σε **μαύρο** κουτί): εξώνιο 1, νουκλεοτίδιο 34

Σημείο λήξης της μετάφρασης (σε **μπλε** κουτί): εξώνιο 3, νουκλεοτίδιο 237



Αλληλουχία του **μεταγράφου 8 (1812bp)** του γονιδίου ZNF519
Εκκινητές: 519F1/519RSHORT1




Εξώνιο 2
1.000
1.020
1.040
AGGGGGTCAT ACCTTACTCA ACACCAGAGA ATCCATACCG GAGAGAACCT TTCAGATGTA AGGAATGTGG
Εξώνιο 2
1.060
1.080
1.100
1.120
CAAAGCCTTT AATAGAAGCT CATACGTTAC TCAGCATCAG AGAATGCATA CTGGAGAGGA ACCTTTCAAG
Εξώνιο 2
1.140
1.160
1.180
TGTAAGGAAT GTGGCAAAGC TTTTAACAGA GCTTCACACC TTACTCAACA TCAGAGAATC CATACTGGAG
Εξώνιο 2
1.200
1.220
1.240
1.260
AGAAACACTT CAAATGTAAA GAATGTGGCA AAGCCTTTAA CAGGGGCTCA CACCTTACTC GACATCAAAG
Εξώνιο 2
1.280
1.300
1.320
AATCCATACT GGAGAGAAGT CTTTCAAATG TGAAGAATGT GGCAAAGCTT TTATCTGGGG CTCACACCTT
Εξώνιο 2
1.340
1.360
1.380
1.400
ACTCAACATC AGAGAGTCCA TACTGGAGAG AAATTCTTCA AATGTAAAGA ATGTGGCAAA GCTTTTACCA
Εξώνιο 2
1.420
1.440
1.460
GGAGCTCACA CCTTACTCAA CATCAGAGAA TTCATACTGG AGAGAAACCT TTCAAATGTA AAGAATGTGG
Εξώνιο 2
1.480
1.500
1.520
1.540
CAAAGCTTTT AACAGACGCT CAACCCTTAC TCAACATCAA ATAATTCATA CCAGGTAGAA ACCCTGCAAG
Εξώνιο 2
1.560
1.580
1.600
TGTAAAGAAT GTGCTAAAAC CCTAAACTGG TGCTCACACC TTACTCAACA TTAGAAAATC AATACTGGAT
Εξώνιο 2
1.620
1.640
1.660
1.680
AGACATCCCA TATGTGTAAT GATTTTTGAA ACATCAAAAT GAAGATTAAA TAAAAATTAG AAGTGTCACT
Εξώνιο 2
1.700
1.720
1.740
TTAGAAAGAA CTAAGGTGCT AGCACTTCCG TAAATTACTC TGAATCAGTG TGTTTATTAT AACAAATAAC
Εκκινητής 519RSHOT1
Εξώνιο 2
1.760
1.780
1.800
TCAAACTCAA TTAGATAATT AAATTGTATG TTTAAAAAGA GGGACGACAT TGATGGAGAG G

Στοίχιση του μεταγράφου 11 του γονιδίου ZNF519 με το γονίδιο

(σε κόκκινο κουτί σημειώνονται οι βάσεις του μεταγράφου που δεν ταυτίζονται με τις αντίστοιχες βάσεις στο γονίδιο)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
370 bits(200)	2e-104	202/203(99%)	0/203(0%)	Plus/Plus

```
Query  47414  GTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCC  47473
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  163    GTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCC  222

Query  47474  TGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGA  47533
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  223    TGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGA  282

Query  47534  CCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTTCAGGGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGAA  47593
              |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  283    CCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTTCAGGGAAAGTTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGAA  342

Query  47594  GCAGTCATCTGGTTACTTTAGGT  47616
              |||||||||||||||||||||||
Sbjct  343    GCAGTCATCTGGTTACTTTAGGT  365
```

Range 2: 362 to 514 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
283 bits(153)	2e-78	153/153(100%)	0/153(0%)	Plus/Plus

```
Query  48142  AGGTTTGTGCCCCAGGAAGTAGTGTGTTGATTTGAAGCCCTaaaaaaaaTATTTTCCACA  48201
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  362    AGGTTTGTGCCCCAGGAAGTAGTGTGTTGATTTGAAGCCCTAAAAAAAATATTTTCCACA  421

Query  48202  CTCAAGAGTGACTTATCCAGACCGATTTTACCTAAGAAACAAGCCTGAAGGAGGAGAGAG  48261
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  422    CTCAAGAGTGACTTATCCAGACCGATTTTACCTAAGAAACAAGCCTGAAGGAGGAGAGAG  481

Query  48262  AAGAAAGAAGAGTCAGAACTAGCACTTTCCCAG  48294
              |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  482    AAGAAAGAAGAGTCAGAACTAGCACTTTCCCAG  514
```

Range 3: 36 to 163 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
237 bits(128)	2e-64	128/128(100%)	0/128(0%)	Plus/Plus

```
Query  8014  GGAACTCTTAACATTCAGGGATGTGGCCATAGAATTCTCTCCAGAAGAGTGGAAATGCCT  8073
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36    GGAACTCTTAACATTCAGGGATGTGGCCATAGAATTCTCTCCAGAAGAGTGGAAATGCCT  95

Query  8074  AGACCCTGCCCAACAGAATTTATATAGAGATGTGATGTTGGAGAACTACAGAAACCTCGT  8133
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96    AGACCCTGCCCAACAGAATTTATATAGAGATGTGATGTTGGAGAACTACAGAAACCTCGT  155

Query  8134  CTCCCTGG  8141
             ||||||||
Sbjct  156   CTCCCTGG  163
```

Range 4: 588 to 695 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
195 bits(105)	1e-51	108/109(99%)	1/109(0%)	Plus/Plus

```
Query  54187  TATCAGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACCCCCAGGCTGCAGACC  54246
              ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  588    TAT-AGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACCCCCAGGCTGCAGACC  646

Query  54247  AGTACCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAGGTGA  54295
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  647    AGTACCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAGGTGA  695
```

Range 5: 511 to 592 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
152 bits(82)	7e-39	82/82(100%)	0/82(0%)	Plus/Plus

```
Query  52221  CCAGCATGAATGAGAGATCCTTTCGCTTCACGTCTTTGCCAGCATTTGGTGTTGTCAGTG  52280
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  511    CCAGCATGAATGAGAGATCCTTTCGCTTCACGTCTTTGCCAGCATTTGGTGTTGTCAGTG  570

Query  52281  TTCTAGATTTTGGCCATTATAG  52302
              |||||||||||||||||||||
Sbjct  571    TTCTAGATTTTGGCCATTATAG  592
```

Range 6: 690 to 762 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
135 bits(73)	7e-34	73/73(100%)	0/73(0%)	Plus/Plus

```
Query  54963  AGGTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATAT  55022
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  690    AGGTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATAT  749

Query  55023  CTCAGAACCGCCT  55035
              |||||||||||||
Sbjct  750    CTCAGAACCGCCT  762
```

Range 7: 1 to 37 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
69.4 bits(37)	7e-14	37/37(100%)	0/37(0%)	Plus/Plus

```
Query  181  GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGG  217
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGG  37
```

Στοίχιση του μεταγράφου 12 του γονιδίου ZNF519 με το γονίδιο

(σε κόκκινο κουτί σημειώνονται οι βάσεις του μεταγράφου που δεν ταυτίζονται με τις αντίστοιχες βάσεις στο γονίδιο)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
433 bits(234)	2e-123	236/237(99%)	0/237(0%)	Plus/Plus

```
Query  31115  GGGCTCATTGTTTTAATTGGCCCCCCTTTATCCCTCTGAGTGCGGAAATAAATCAGCCCT  31174
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  163    GGGCTCATTGTTTTAATTGGCCCCCCTTTATCCCTCTGTGTGCGGAAATAAATCAGCCCT  222

Query  31175  AAATCTGGATGAGACCTGCAGGTGGACTCCATCAGTGCAGGCGTGGTGGGGCAGCAGGAG  31234
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  223    AAATCTGGATGAGACCTGCAGGTGGACTCCATCAGTGCAGGCGTGGTGGGGCAGCAGGAG  282

Query  31235  GAGCCCGTGGTGCCCACCTTCCAGAGCTGCCACCTCTTTTACCTCCTCATGTTCCTTCCT  31294
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  283    GAGCCCGTGGTGCCCACCTTCCAGAGCTGCCACCTCTTTTACCTCCTCATGTTCCTTCCT  342

Query  31295  GTGCACCTAGAGAGAGTTCACCCCCACCCAACAGCTCCTGGACCTGCTGCCCAAAAG  31351
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  343    GTGCACCTAGAGAGAGTTCACCCCCACCCAACAGCTCCTGGACCTGCTGCCCAAAAG  399
```

Range 2: 398 to 599 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
368 bits(199)	7e-104	201/202(99%)	0/202(0%)	Plus/Plus

```
Query  47413  AGTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGC  47472
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  398    AGTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGC  457

Query  47473  CTGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGG  47532
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  458    CTGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGACACTGTGG  517

Query  47533  ACCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTTCAGGGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGA  47592
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  518    ACCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTTCAGGGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGA  577

Query  47593  AGCAGTCATCTGGTTACTTTAG  47614
              |||||||||||||||||||||
Sbjct  578    AGCAGTCATCTGGTTACTTTAG  599
```

Range 3: 36 to 164 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
239 bits(129)	6e-65	129/129(100%)	0/129(0%)	Plus/Plus

```
Query  8014  GGAACTCTTAACATTCAGGGATGTGGCCATAGAATTCTCTCCAGAAGAGTGGAAATGCCT  8073
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36    GGAACTCTTAACATTCAGGGATGTGGCCATAGAATTCTCTCCAGAAGAGTGGAAATGCCT  95

Query  8074  AGACCCTGCCCAACAGAATTTATATAGAGATGTGATGTTGGAGAACTACAGAAACCTCGT  8133
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96    AGACCCTGCCCAACAGAATTTATATAGAGATGTGATGTTGGAGAACTACAGAAACCTCGT  155

Query  8134  CTCCCTGGG  8142
             |||||||||
Sbjct  156   CTCCCTGGG  164
```

Range 4: 673 to 780 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
195 bits(105)	1e-51	108/109(99%)	1/109(0%)	Plus/Plus

```
Query  54187  TATCAGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACCCCCAGGCTGCAGACC  54246
              ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  673    TAT-AGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACCCCCAGGCTGCAGACC  731

Query  54247  AGTACCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAGGTGA  54295
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  732    AGTACCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAGGTGA  780
```

Range 5: 598 to 677 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
148 bits(80)	1e-37	80/80(100%)	0/80(0%)	Plus/Plus

```
Query  52223  AGCATGAATGAGAGATCCTTTCGCTTCACGTCTTTGCCAGCATTTGGTGTTGTCAGTGTT  52282
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  598    AGCATGAATGAGAGATCCTTTCGCTTCACGTCTTTGCCAGCATTTGGTGTTGTCAGTGTT  657

Query  52283  CTAGATTTTGGCCATTATAG  52302
              ||||||||||||||||||||
Sbjct  658    CTAGATTTTGGCCATTATAG  677
```

Range 6: 775 to 847 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
135 bits(73)	8e-34	73/73(100%)	0/73(0%)	Plus/Plus

```
Query  54963  AGGTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATAT  55022
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  775    AGGTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATAT  834

Query  55023  CTCAGAACCGCCT  55035
              |||||||||||||
Sbjct  835    CTCAGAACCGCCT  847
```

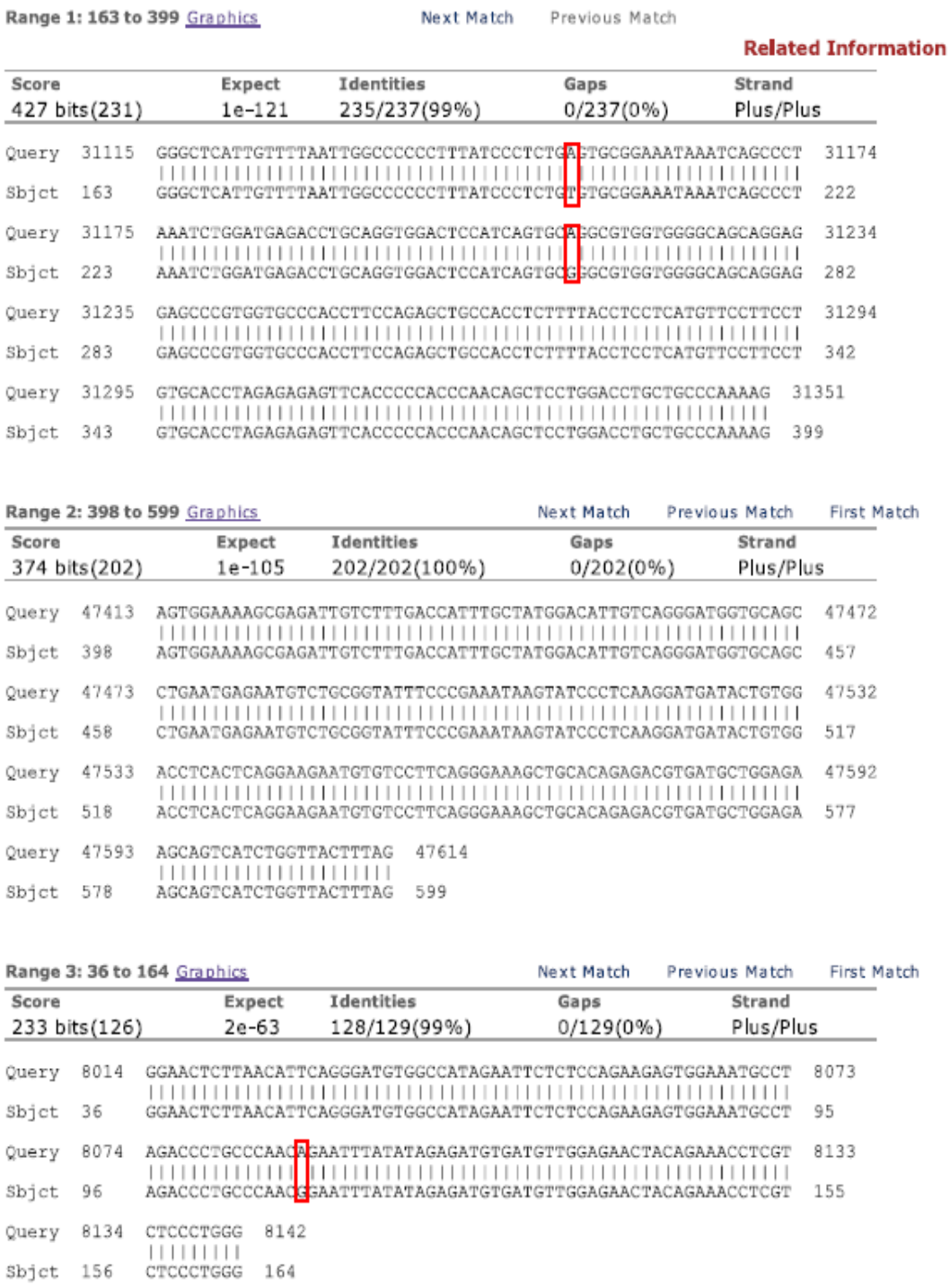
Range 7: 1 to 37 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
69.4 bits(37)	8e-14	37/37(100%)	0/37(0%)	Plus/Plus

```
Query  181  GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGG  217
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGG  37
```

Στοίχιση του μεταγράφου 13 του γονιδίου ZNF519 με το γονίδιο

(σε κόκκινο κουτί σημειώνονται οι βάσεις του μεταγράφου που δεν ταυτίζονται με τις αντίστοιχες βάσεις στο γονίδιο)



Range 4: 598 to 699 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
189 bits(102)	5e-50	102/102(100%)	0/102(0%)	Plus/Plus

```
Query  54191  AGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACCCCCAGGCTGCAGACCAGTA  54250
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  598    AGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACCCCCAGGCTGCAGACCAGTA  657

Query  54251  CCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAGG  54292
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  658    CCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAGG  699
```

Range 5: 702 to 769 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
126 bits(68)	4e-31	68/68(100%)	0/68(0%)	Plus/Plus

```
Query  54968  AAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATATCTCAG  55027
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  702    AAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATATCTCAG  761

Query  55028  AACCGCCT  55035
              ||||||||
Sbjct  762    AACCGCCT  769
```

Range 6: 1 to 37 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
69.4 bits(37)	7e-14	37/37(100%)	0/37(0%)	Plus/Plus

```
Query  181  GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGG  217
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGG  37
```

Στοίχιση του μεταγράφου 14 του γονιδίου ZNF519 με το γονίδιο

Range 1: 36 to 163 Graphics Next Match Previous Match

Related Information

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
237 bits(128)	7e-65	128/128(100%)	0/128(0%)	Plus/Plus

```
Query  8014  GGAACTCTTAACATTCAGGGATGTGGCCATAGAATTCTCTCCAGAAGAGTGGAAATGCCT  8073
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36    GGAACTCTTAACATTCAGGGATGTGGCCATAGAATTCTCTCCAGAAGAGTGGAAATGCCT  95

Query  8074  AGACCCTGCCCAACAGAATTTATATAGAGATGTGATGTTGGAGAACTACAGAAACCTCGT  8133
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96    AGACCCTGCCCAACAGAATTTATATAGAGATGTGATGTTGGAGAACTACAGAAACCTCGT  155

Query  8134  CTCCCTGG  8141
              ||||||||
Sbjct  156   CTCCCTGG  163
```

Range 2: 163 to 266 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
193 bits(104)	2e-51	104/104(100%)	0/104(0%)	Plus/Plus

```
Query  54192  GTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACCCCCAGGCTGCAGACCAGTAC  54251
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  163    GTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACCCCCAGGCTGCAGACCAGTAC  222

Query  54252  CTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAGGTGA  54295
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  223    CTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAGGTGA  266
```

Range 3: 261 to 312 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
97.1 bits(52)	1e-22	52/52(100%)	0/52(0%)	Plus/Plus

```
Query  54963  AGGTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGA  55014
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  261    AGGTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGA  312
```

Range 4: 1 to 37 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
69.4 bits(37)	3e-14	37/37(100%)	0/37(0%)	Plus/Plus

```
Query  181  GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGG  217
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGG  37
```

Στοίχιση της αλληλουχίας στα 606bp με το μετάγραφο 5 του γονιδίου ZNF519.

(*Query*: αλληλουχία 606bp, *Sbjct*: TV5)

Range 1: 36 to 406 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
669 bits(362)	0.0	368/371(99%)	0/371(0%)	Plus/Plus

```
Query  236  GTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCC  295
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36   GTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCC  95

Query  296  TGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGA  355
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96   TGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGA  155

Query  356  CCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTTCAGGGAAAGCTGCACAGAGTCGTGATGCTGGAGAA  415
            |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  156  CCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTTCAGAGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGAA  215

Query  416  GCAGTCATCTGGTTACTTTAGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACC  475
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216  GCAGTCATCTGGTTACTTTAGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACC  275

Query  476  CCCAGGCTGCAGACCAGTACCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAG  535
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  276  CCCAGGCTGCAGACCAGTACCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGTCGCACAGCAGGAG  335

Query  536  GTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATATCT  595
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336  GTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATATCT  395

Query  596  CAGAACCGCCT  606
            ||||||||||
Sbjct  396  CAGAACCGCCT  406
```

Range 2: 1 to 237 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
433 bits(234)	9e-126	236/237(99%)	0/237(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGAC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGAC  60

Query  61   CATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCCTGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   CATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCCTGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTC  120

Query  121  CCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGACCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  CCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGACCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTT  180

Query  181  CAGGGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGAAGCAGTCATCTGGTTACTTTAGT  237
            ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  CAGAGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGAAGCAGTCATCTGGTTACTTTAGT  237
```

Στοίχιση της αλληλουχίας στα 733bp με το μετάγραφο 4 του γονιδίου ZNF519

(*Query*: αλληλουχία 733bp, *Sbjct*: TV4)

Range 1: 1 to 364 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
673 bits(364)	0.0	364/364(100%)	0/364(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGGAACTCTTAACATTCAGGGATGTG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATGGAACTCTTAACATTCAGGGATGTG  60

Query  61   GCCATAGAATTCTCTCCAGAAGAGTGGAAATGCCTAGACCCTGCCCAACAGAATTTATAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   GCCATAGAATTCTCTCCAGAAGAGTGGAAATGCCTAGACCCTGCCCAACAGAATTTATAT  120

Query  121  AGAGATGTGATGTTGGAGAACTACAGAAACCTCGTCTCCCTGGTGGAAAAGCGAGATTGT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  AGAGATGTGATGTTGGAGAACTACAGAAACCTCGTCTCCCTGGTGGAAAAGCGAGATTGT  180

Query  181  CTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCCTGAATGAGAATGTCTGCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  CTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCCTGAATGAGAATGTCTGCG  240

Query  241  GTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGACCTCACTCAGGAAGAATG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  GTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGACCTCACTCAGGAAGAATG  300

Query  301  TGTCCTTCAGGGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGAAGCAGTCATCTGGTTACTT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  TGTCCTTCAGGGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGAAGCAGTCATCTGGTTACTT  360

Query  361  TAGT  364
            ||||
Sbjct  361  TAGT  364
```

Range 2: 163 to 533 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
664 bits(359)	0.0	367/371(99%)	0/371(0%)	Plus/Plus

```
Query  363  GTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGGCCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCC  422
            ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  163  GTGGAAAAGCGAGATTGTCTTTGACCATTTGCTATGGACATTGTCAGGGATGGTGCAGCC  222

Query  423  TGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGA  482
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  223  TGAATGAGAATGTCTGCGGTATTTCCCGAAATAAGTATCCCTCAAGGATGATACTGTGGA  282

Query  483  CCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTTCAGGGAAAGCTGCACAGGGACGTGATGCTGGAGAA  542
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  283  CCTCACTCAGGAAGAATGTGTCCTTCAGGGAAAGCTGCACAGAGACGTGATGCTGGAGAA  342

Query  543  GCAGTCATCTGGTTACTTTAGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACC  602
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  343  GCAGTCATCTGGTTACTTTAGTACATGACTTCAGGCTCCTATGTGCAGAAGTCCTCAACC  402

Query  603  CCCAGGCTGCAGACCAGTACCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCGCACAGCAGGAG  662
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  403  CCCAGGCTGCAGACCAGTACCTGTCCATGGCCTGTTAGGAAACTGGCCACACAGCAGGAG  462

Query  663  GTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGATCTCGAACCCATATCT  722
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  463  GTGAAATGATTATTGCAGTTTCGAGGGGAGATGATGTCACAAGGTCTCGAACCCATATCT  522

Query  723  CAGAACCGCCT  733
            ||||||||||||
Sbjct  523  CAGAACCGCCT  533
```

Στοίχιση του μεταγράφου 8 (full) του γονιδίου ZNF519 με το γονίδιο

(σε κόκκινο κουτί σημειώνονται οι βάσεις του μεταγράφου που δεν ταυτίζονται με τις αντίστοιχες βάσεις στο γονίδιο)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3247 bits(1758)	0.0	1771/1777(99%)	1/1777(0%)	Plus/Plus

```
Query  26081  GCTGTGTATTCTTATTACAACCAAGGCATTTTACCAGAGCAAGGCATACAAGATTCATTC  26140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36     GCTGTGTATTCTTATTACAACCAAGGCATTTTACCAGAGCAAGGCATACAAGATTCATTC  95

Query  26141  AAAAAAGCAACACTGGGAAGATATGGGAGCTGTGGCCTTGAAAATATATGCTTATGGAAA  26200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96     AAAAAAGCAACACTGGGAAGATATGGGAGCTGTGGCCTTGAAAATATATGCTTATGGAAA  155

Query  26201  AACTGGGAAAGTATAGGTGAAGGTGAAGGACAAAAGGAATGTTATAATCTATGTAGCCAA  26260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  156    AACTGGGAAAGTATAGGTGAAGGTGAAGGACAAAAGGAATGTTATAATCTATGTAGCCAA  215

Query  26261  TATTTGACAACTAGTCATAACAAACATTTAACTGTGAAAGGAGACAAAGAATATAGAATA  26320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216    TATTTGACAACTAGTCATAACAAACATTTAACTGTGAAAGGAGACAAAGAATATAGAATA  275

Query  26321  TTTCAGAAGAAGCCTCAGTTTCTGTCAGCTGCTCCTACAGAACCATGTATTCCTATGAAT  26380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276    TTTCAGAAGAAGCCTCAGTTTCTGTCAGCTGCTCCTACAGAACCATGTATTCCTATGAAT  335

Query  26381  AAATATCAACATAAATTTTTGAAATCTGTCTTTTGTAATAAAAATCAGATAAATTTTAAC  26440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336    AAATATCAACATAAATTTTTGAAATCTGTCTTTTGTAATAAAAATCAGATAAATTTTAAC  395

Query  26441  CATGACTCAAATATTAGTAAACATCATAGTACTCATTTTCTAGAAAACTATTACAATTGT  26500
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396    CATGACTCAAATATTAGTAAACATCATAGTACTCATTTTCTAGAAAACTATTACAATTGC  455

Query  26501  AATGAATGTGAAAAAGTATTTTACCAATCCTCAAAGCTTATTTTCCCTGAAAATATCCAT  26560
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  456    AATGAATGTGAAAAAGTATTTTACCAATCCTCAAAGCTTATTTTCCCTGAAAATATCCAT  515

Query  26561  ATTCaaaaaaaGCCTTACAACTCTAATGAATGTGGTGAAACTTCTGACCCATTCTCAAAG  26620
              |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  516    ATTCAAGAAAAGCCTTACAACTCTAATGAATGTGGTGAAACTTCTGACCCATTCTCAAAG  575

Query  26621  CTTACTCAACATCAAAGAATTTATATTGGAGAGAGCTCACAAAGATGTAATAAAAAATGT  26680
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  576    CTTACTCAACATCAAAGAATTTATATTGGAGAGAGCTCACAAAGATGTAATAAAAAATGT  635

Query  26681  ATAATAGTCTTTAGTCAATCACATCTAAAGGGACATAAGATAATTAACACTGGAGAAAAA  26740
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  636    ATAATAGTCTTTAGTCAATCACATCTAAAGGGACATAAGATAATTAACACTGGAGAAAAA  695

Query  26741  TCAGTGAAATATAAAGAACGTGGCAAAGCTTTTACCAGGGGCTTACATCTTGGACATCAG  26800
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  696    TCAGTGAAATATAAAGAACGTGGCAAAGCTTTTACCAGGGGCTTACATCTTGGACATCAG  755

Query  26801  AAAATTCATACTGGAGAGAAACCTTACAAATGTAAAAAATGTGACAAAGCCTTTAACAAG  26860
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  756    AAAATTCATACTGGAGAGAAACCTTACAAATGTAAAAAATGTGACAAAGCCTTTAACAAG  815

Query  26861  AGTTCACACCTTGCTCAACATCAGAGAATCCATACTGGAGAGAAGCCTTTCAAGTGTAAG  26920
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  816    AGTTCACACCTTGCTCAACATCAGAGAATCCATACTGGAGAGAAGCCTTTCAAGTGTAAG  875

Query  26921  GAATGTGGCAAAGCTTTTAACAGAGGCTCATACCTTACTCAACATCAGAGAATCCATACT  26980
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  876    GAATGTGGCAAAGCTTTTAACAGAGGCTCATACCTTACTCAACATCAGAGAATCCATACT  935

Query  26981  GGAGAGAGAGCTTTCAAATGTGAAGAATGTGGCAAAGCCTTTAACAGGGGGTCATACCTT  27040
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  936    GGAGAGAGAGCTTTCAAATGTGAAGAATGTGGCAAAGCCTTTAACAGGGGGTCATACCTT  995
```

```
Query  27041  ACTCAACACCAGAGAATCCATACCGGAGAGAAACCTTTCAGATGTAAGGAATGTGGCAAA  27100
              ||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  996    ACTCAACACCAGAGAATCCATACCGGAGAG-AACCTTTCAGATGTAAGGAATGTGGCAAA  1054

Query  27101  GCCTTTAATAGAAGCTCATACGTTACTCAGCATCAGAGAATGCATACTGGAGAGAAACCT  27160
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct  1055   GCCTTTAATAGAAGCTCATACGTTACTCAGCATCAGAGAATGCATACTGGAGAGGAACCT  1114

Query  27161  TTCAAGTGTAAGGAATGTGGCAAAGCTTTTAACAGAGCTTCACACCTTACTCAACATCAG  27220
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1115   TTCAAGTGTAAGGAATGTGGCAAAGCTTTTAACAGAGCTTCACACCTTACTCAACATCAG  1174

Query  27221  AGAATCCATACTGGAGAGAAACACTTCAAATGTAAAGAATGTGGCAAAGCCTTTAACAGG  27280
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1175   AGAATCCATACTGGAGAGAAACACTTCAAATGTAAAGAATGTGGCAAAGCCTTTAACAGG  1234

Query  27281  GGCTCACACCTTACTCGACATCAAAGAATCCATACTGGAGAGAAGTCTTTCAAATGTGAA  27340
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1235   GGCTCACACCTTACTCGACATCAAAGAATCCATACTGGAGAGAAGTCTTTCAAATGTGAA  1294

Query  27341  GAATGTGGCAAAGCTTTTATCTGGGGCTCACACCTTACTCAACATCAGAGAGTCCATACT  27400
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1295   GAATGTGGCAAAGCTTTTATCTGGGGCTCACACCTTACTCAACATCAGAGAGTCCATACT  1354

Query  27401  GGAGAGAAATTCTTCAAATGTAAAGAATGTGGCAAAGCTTTTACCAGGAGCTCACACCTT  27460
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1355   GGAGAGAAATTCTTCAAATGTAAAGAATGTGGCAAAGCTTTTACCAGGAGCTCACACCTT  1414

Query  27461  ACTCAACATCAGAGAATTCATACTGGAGAGAAACCTTTCAAATGTAAAGAATGTGGCAAA  27520
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1415   ACTCAACATCAGAGAATTCATACTGGAGAGAAACCTTTCAAATGTAAAGAATGTGGCAAA  1474

Query  27521  GCTTTTAACAGACGCTCAACCCTTACTCAACATCAAATAATTCATACCAGGTAGAAACCC  27580
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1475   GCTTTTAACAGACGCTCAACCCTTACTCAACATCAAATAATTCATACCAGGTAGAAACCC  1534

Query  27581  TGCAAGTGTAAAGAATGTGCTAAAACCCTAAACTGGTGCTCACACCTTACTCAACATTAG  27640
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1535   TGCAAGTGTAAAGAATGTGCTAAAACCCTAAACTGGTGCTCACACCTTACTCAACATTAG  1594

Query  27641  AAAATCAATACTGGATAGAATATCCCATATGTGTAATGATTTTTGAAACATCAAAATGAAG  27700
              |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1595   AAAATCAATACTGGATAGACATCCCATATGTGTAATGATTTTTGAAACATCAAAATGAAG  1654

Query  27701  ATTAAATAAAAATTAGAAGTGTCACTTTAGAAAGAACTAAGGTGCTAGCACTTCCGTAAA  27760
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1655   ATTAAATAAAAATTAGAAGTGTCACTTTAGAAAGAACTAAGGTGCTAGCACTTCCGTAAA  1714

Query  27761  TTACTCTGAATCAGTGTGTTTATTATAACAAATAATTCAAACTCAATTAGATAATTAAAT  27820
              |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1715   TTACTCTGAATCAGTGTGTTTATTATAACAAATAACTCAAACTCAATTAGATAATTAAAT  1774

Query  27821  TGTATGTTTAAAAAGAGGGACGACATTGATGGAGAGG  27857
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1775   TGTATGTTTAAAAAGAGGGACGACATTGATGGAGAGG  1811
```

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
67.6 bits(36)	6e-13	36/36(100%)	0/36(0%)	Plus/Plus

```
Query  181  GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATG  216
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GCTAAGACTCCAGGACACCCCTGAAGCCGAGAAATG  36
```

Στοίχιση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το μετάγραφο 1 με την πιθανή αλληλουχία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το μετάγραφο 8 (full) του γονιδίου ZNF519

Range 1: 4 to 501 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1019 bits(2636)	0.0	Compositional matrix adjust.	497/498(99%)	498/498(100%)	0/498(0%)

```
Query  46   LAVYSYYNQGILPEQGIQDSFKKATLGRYGSCGLENICLWKNWESIGEGEGQKECYNLCS  105
            +AVYSYYNQGILPEQGIQDSFKKATLGRYGSCGLENICLWKNWESIGEGEGQKECYNLCS
Sbjct  4    MAVYSYYNQGILPEQGIQDSFKKATLGRYGSCGLENICLWKNWESIGEGEGQKECYNLCS  63

Query  106  QYLTTSHNKHLTVKGDKEYRIFQKKPQFLSAAPTEPCIPMNKYQHKFLKSVFCNKNQINF  165
            QYLTTSHNKHLTVKGDKEYRIFQKKPQFLSAAPTEPCIPMNKYQHKFLKSVFCNKNQINF
Sbjct  64   QYLTTSHNKHLTVKGDKEYRIFQKKPQFLSAAPTEPCIPMNKYQHKFLKSVFCNKNQINF  123

Query  166  NHDSNISKHHSTHFLENYYNCNECEKVFYQSSKLIFPENIHIQKKPYNSNECGETSDPFS  225
            NHDSNISKHHSTHFLENYYNCNECEKVFYQSSKLIFPENIHIQKKPYNSNECGETSDPFS
Sbjct  124  NHDSNISKHHSTHFLENYYNCNECEKVFYQSSKLIFPENIHIQKKPYNSNECGETSDPFS  183

Query  226  KLTQHQRIYIGESSQRCNKKCIIVFSQSHLKGHKIINTGEKSVKYKERGKAFTRGLHLGH  285
            KLTQHQRIYIGESSQRCNKKCIIVFSQSHLKGHKIINTGEKSVKYKERGKAFTRGLHLGH
Sbjct  184  KLTQHQRIYIGESSQRCNKKCIIVFSQSHLKGHKIINTGEKSVKYKERGKAFTRGLHLGH  243

Query  286  QKIHTGEKPYKCKKCDKAFNKSSHLAQHQRIHTGEKPFKCKECGKAFNRGSYLTQHQRIH  345
            QKIHTGEKPYKCKKCDKAFNKSSHLAQHQRIHTGEKPFKCKECGKAFNRGSYLTQHQRIH
Sbjct  244  QKIHTGEKPYKCKKCDKAFNKSSHLAQHQRIHTGEKPFKCKECGKAFNRGSYLTQHQRIH  303

Query  346  TGERAFKCEECGKAFNRGSYLTQHQRIHTGEKPFRCKECGKAFNRSSYVTQHQRMHTGEK  405
            TGERAFKCEECGKAFNRGSYLTQHQRIHTGEKPFRCKECGKAFNRSSYVTQHQRMHTGEK
Sbjct  304  TGERAFKCEECGKAFNRGSYLTQHQRIHTGEKPFRCKECGKAFNRSSYVTQHQRMHTGEK  363

Query  406  PFKCKECGKAFNRASHLTQHQRIHTGEKHFKCKECGKAFNRGSHLTRHQRIHTGEKSFKC  465
            PFKCKECGKAFNRASHLTQHQRIHTGEKHFKCKECGKAFNRGSHLTRHQRIHTGEKSFKC
Sbjct  364  PFKCKECGKAFNRASHLTQHQRIHTGEKHFKCKECGKAFNRGSHLTRHQRIHTGEKSFKC  423

Query  466  EECGKAFIWGSHLTQHQRVHTGEKFFKCKECGKAFTRSSHLTQHQRIHTGEKPFKCKECG  525
            EECGKAFIWGSHLTQHQRVHTGEKFFKCKECGKAFTRSSHLTQHQRIHTGEKPFKCKECG
Sbjct  424  EECGKAFIWGSHLTQHQRVHTGEKFFKCKECGKAFTRSSHLTQHQRIHTGEKPFKCKECG  483

Query  526  KAFNRRSTLTQHQIIHTR  543
            KAFNRRSTLTQHQIIHTR
Sbjct  484  KAFNRRSTLTQHQIIHTR  501
```