

IMMUNOPRECIPITAZIONE ASSOCIATA A WESTERN BLOT

Esperimento in cui viene dimostrato come gli EJC siano localizzati solo sugli mRNA legati a CBP80 (proteina che fa parte del cap-binding complex) ma non a eIF4E.

L'esperimento prevede una co-immunoprecipitazione che ha lo scopo di vedere quali proteine siano legate a CBC o a eIF4E. Estratti nucleari (N) e citoplasmatici (C) vengono in un primo momento messi in contatti con anticorpi diretti contro CBC e eIF4E per avere l'immunoprecipitato di queste proteine.

Successivamente viene eseguito un western blot in cui si utilizzano anticorpi contro le altre proteine che si pensa possano interagire o comunque essere presenti insieme a CBC o eIF4E.

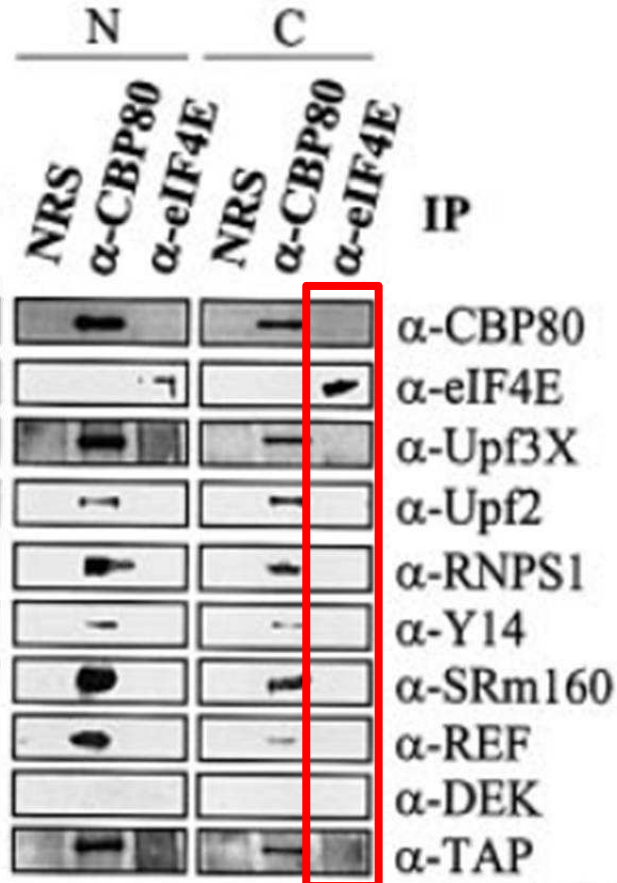
Quindi dall'utilizzo incrociato degli anticorpi si può vedere come le proteine costituenti gli EJC siano presenti negli immunoprecipitati di CBC sia nel nucleo che nel citoplasma (fila di mezzo nelle due serie), mentre nessuna proteina degli EJC co-immunoprecipita con eIF4E (fila a destra).

mRNA wild-type

~~EJC components~~

CBC → eIF4E exchange

mRNA translation by ribosomes



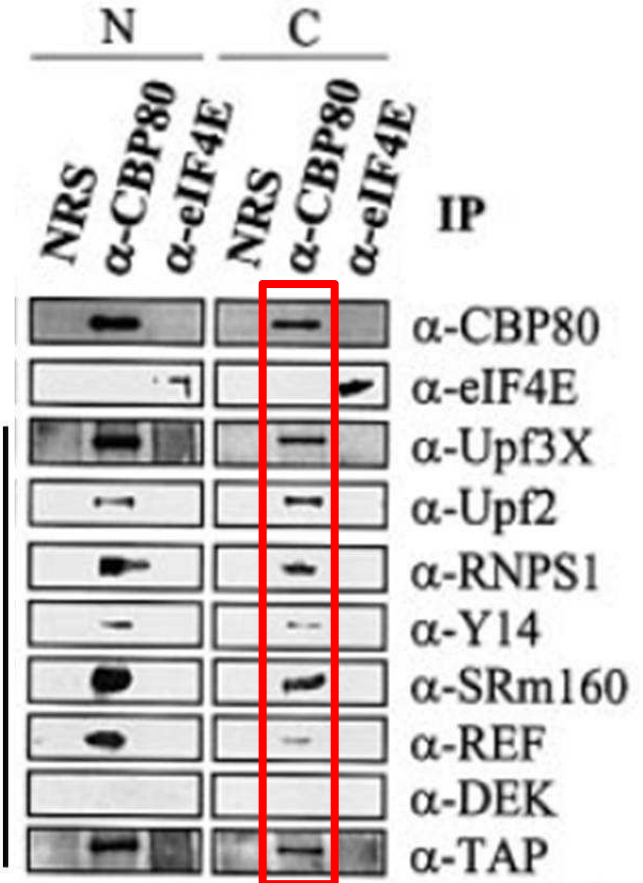
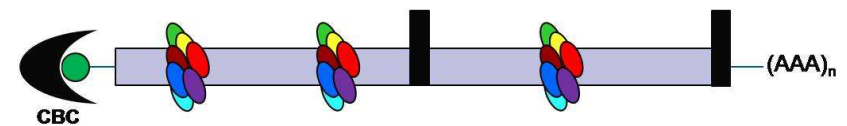
EJC

mRNA with PTC

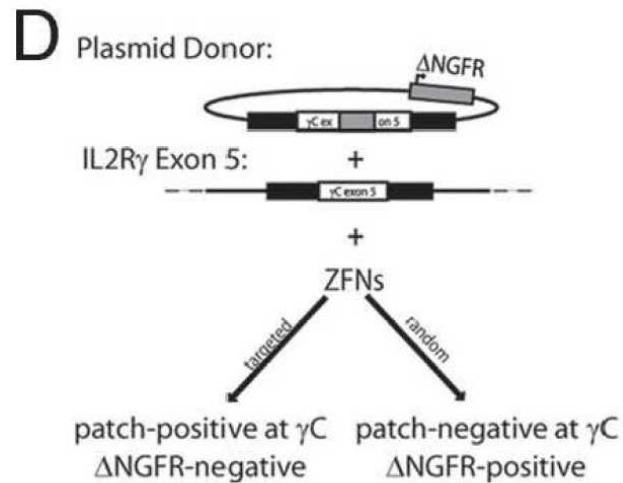
EJC components

no CBC → eIF4E exchange

NMD



EJC



D) measurement of the rate of plasmid DNA random integration.

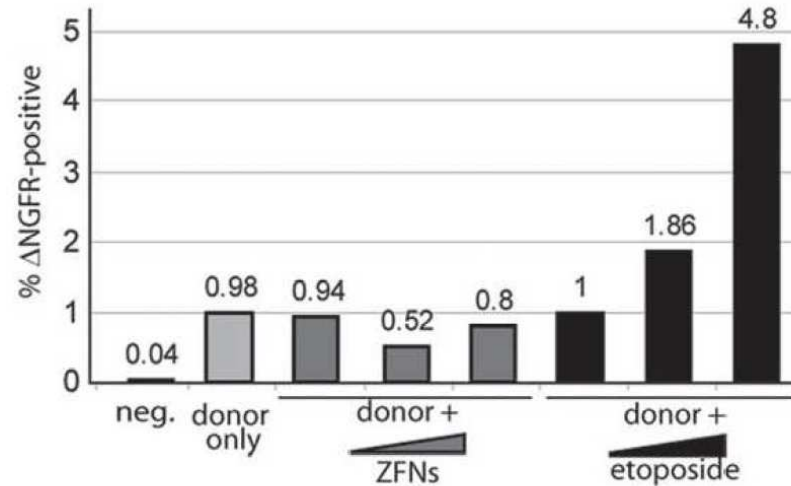
The plasmid donor construct (a tag-interrupted homology stretch flanked by an autonomous expression cassette for a cell surface marker, NGFR).

Cell phenotypes expected from a targeted (lower left) or random (lower right) integration event are shown.

Solo l'inserimento casuale causa la presenza e l'espressione del recettore di membrana

L'inserimento mirato invece causa l'interruzione dell'esone 5 ma non l'inserzione di NGFR

- Moehle *et al.* *PNAS February 27, 2007 vol. 104 no*



D) FACS-based measurement of the rate of plasmid DNA random integration.

FACS data from an experiment in which K562 cells were treated with only the donor molecule, the donor molecule together with the ZFN expression cassette, or the donor molecule and an increasing concentration of etoposide. The percentage of cells positive for the NGFR marker (as measured by FACS after sufficient cell passaging to allow for donor DNA decay) in each sample is indicated.

Lo ZNF non causa inserimenti casuali ulteriori al plasmide donor da solo (l'inserimento è "targeted" l'espressione di NGFR resta bassa).
 Invece l'etoposide producendo DSBreak causa un enorme aumento di inserimento di NGFR (l'evento è random).