



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Ενότητα 4^η: Φορείς κλωνοποίησης

Δροσοπούλου Ε.
Σκούρας Ζ.

Τμήμα Βιολογίας

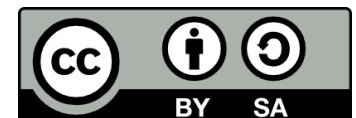


Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



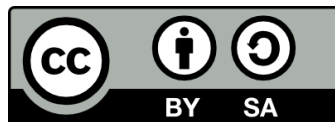
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Περιεχόμενα ενότητας

- ❑ Ορισμός
- ❑ Χαρακτηριστικά φορέων κλωνοποίησης
- ❑ Φορείς για προκαρυωτικά συστήματα
 - Πλασμίδια
 - Βακτηριοφάγοι λ
 - Κοσμίδια
 - Τεχνητά χρωμοσώματα βακτηρίων BACs
- ❑ Κριτήρια επιλογής φορέων κλωνοποίησης



Ορισμός

- Οι φορείς κλωνοποίησης είναι μόρια DNA με τα οποία ανασυνδυάζεται η ακολουθία που κλωνοποιείται, ώστε να γίνει δυνατός ο εύκολος πολλαπλασιασμός της, συνήθως σε κάποιο μικροοργανισμό.



Χαρακτηριστικά φορέων κλωνοποίησης (1/3)

Οι φορείς κλωνοποίησης είναι:

- Μικρά και καλά μελετημένα μόρια
- Μόρια ικανά για αυτόνομο πολλαπλασιασμό σε κατάλληλο ξενιστή

Οι φορείς κλωνοποίησης περιλαμβάνουν την **Αρχή της αντιγραφής - Origin of replication** (Ori), η οποία είναι μια αλληλουχία DNA που αναγνωρίζεται από τον κυτταρικό μηχανισμό αντιγραφής



Χαρακτηριστικά φορέων κλωνοποίησης (2/3)

Οι φορείς κλωνοποίησης θα πρέπει να περιλαμβάνουν ένα **σύστημα αναγνώρισης και ανάκτησης των ανασυνδυασμένων μορίων**

Για αυτό το λόγο περιέχουν ένα Υπερέχον Γονίδιο - Δείκτη Επιλογής

Ο δείκτης επιλογής είναι απαραίτητος για την αναγνώριση των κυττάρων που φέρουν το φορέα και για τη διατήρηση αυτού.

Συνήθως χρησιμοποιούνται **γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά**



Χαρακτηριστικά φορέων κλωνοποίησης (3/3)

Οι φορείς κλωνοποίησης θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνουν **ακολουθίες αναγνώρισης για ενδονουκλεάσες περιορισμού (θέσεις κλωνοποίησης)**

Οι περισσότεροι φορείς περιέχουν μία **θέση πολυσύνδεσης** (Multiple cloning site - MCS), μία αλληλουχία DNA με μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για αρκετές ενδονουκλεάσες κοντά η μία στην άλλη. Οι θέσεις αυτές δεν υπάρχουν πουθενά αλλού στο φορέα και τοποθετούνται σε περιοχές χωρίς λειτουργική σημασία



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (1/24)

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι φορέων για κλωνοποίηση:

- Πλασμίδια
- Βακτηριοφάγοι (λ , M13)
- Κοσμίδια
- Τεχνητά χρωμοσώματα βακτηρίων (PACs, BACs)



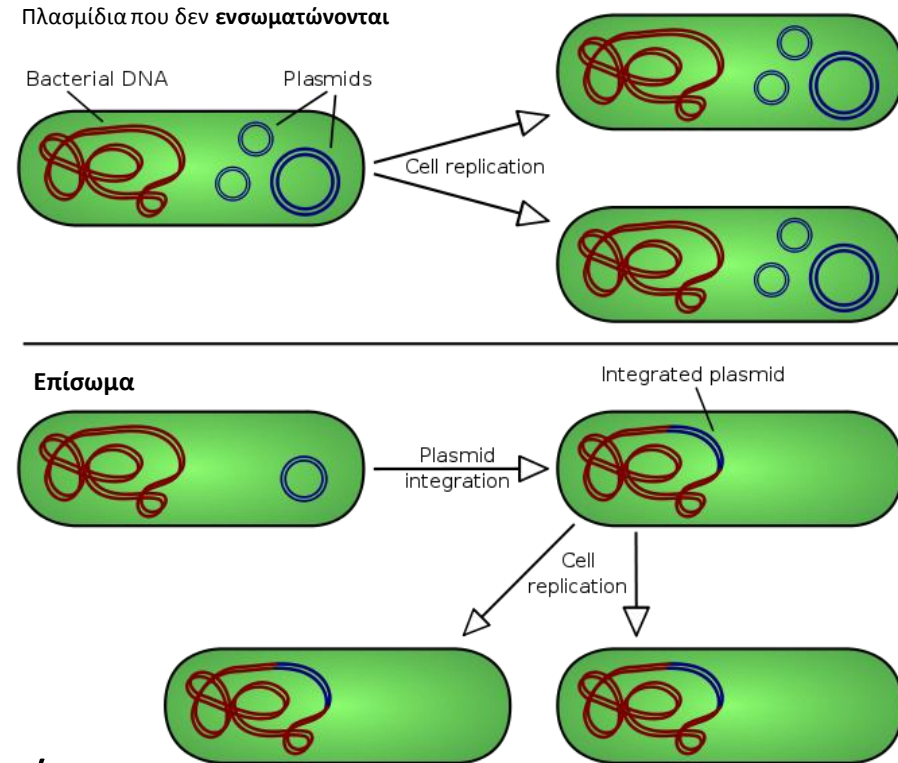
Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (2/24)

Πλασμίδια

Τα πλασμίδια φέρουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- ▶ Είναι κυκλικά
- ▶ Είναι πλεονεκτικά για το φορέα
- ▶ Παρουσιάζουν αυτόνομη αντιγραφή
- ▶ Μέγεθος: 1-250 kb
- ▶ Αντίγραφα/κύτταρο: 1-50

Επισώματα-ενσωμάτωση στο βακτηριακό χρωμόσωμα



Εικόνα 1: Αντιγραφή Πλασμιδίου.

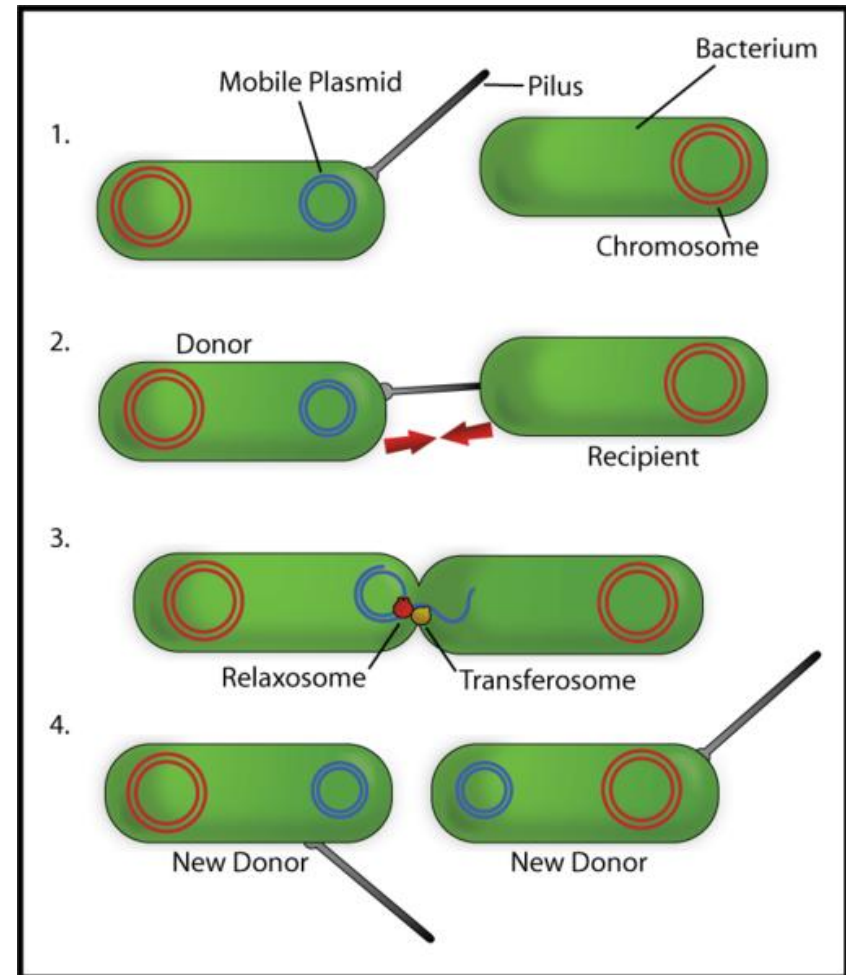


Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (3/24)

Πλασμίδια

Τα πλασμίδια διακρίνονται σε

- Συζευκτικά, τα οποία μεταβιβάζονται μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων (Βακτηριακή σύζευξη)
- Μη συζευκτικά, τα οποία δεν μεταβιβάζονται μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων



Εικόνα 2: Βακτηριακή σύζευξη.



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (4/24)

Πλασμίδια

Κατηγορίες πλασμιδίων:

F (fertility) πλασμίδια: συζευκτικά (*F-E. coli*)

R (resistance) πλασμίδια: ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (RP4-*Pseudomonas*)

Col πλασμίδια: τοξικότητα για άλλα βακτήρια (*ColE1-E. coli*)

Πλασμίδια αποικοδόμησης: δυνατότητα μεταβολισμού για ασυνήθη μόρια (τολουένιο,σαλικυλικό) (*TOL-Pseudomonas*)

Πλασμίδια παθογένεσης: δυνατότητα παθογένεσης στο φορέα (*Ti-Agrobacterium*)



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (5/24)

Πλασμίδια

Οι περισσότεροι φορείς κλωνοποίησης προέρχονται από μη συζευκτικά πλασμίδια με μικρό μέγεθος (2-4 kb) και 1-20 αντίγραφα ανά κύτταρο

- **Αυτόνομη αντιγραφή-Πολλαπλά αντίγραφα**
- **Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά-σύστημα αναγνώρισης**
- **Πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού-Πολυσύνδεσμος (multiple cloning site- MCS)**

<http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch19/polylinker.html>



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (6/24)

Πλασμίδια

Τα πλασμίδια μεταφέρονται εύκολα σε βακτηριακά κύτταρα και μπορούν να απομονωθούν από αυτά

- Τα πλασμίδια εισάγονται στα βακτήρια με μια διαδικασία που ονομάζεται μετασχηματισμός
- Απαραίτητη η χρήση ενώσεων ή ηλεκτρικού πεδίου για αποδιοργάνωση κυτταρικής μεμβράνης
- Συχνότητα μετασχηματισμού: 10^{-4}

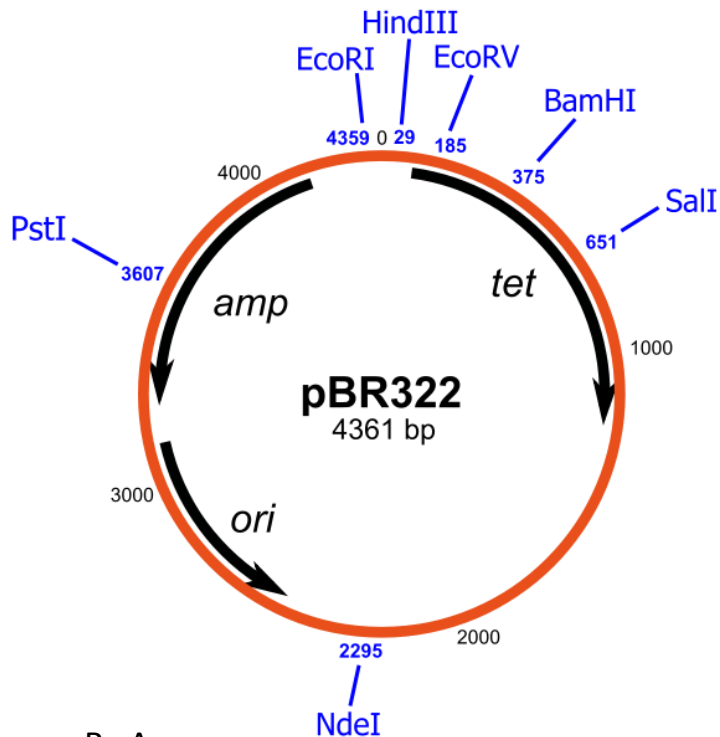
<http://www.odec.ca/projects/2006/sidh6h2/bg.html>



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (7/24)

Πλασμίδια

Εικόνα 3: Πλασμίδιο pBR322



- Ανθεκτικό στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (*amp*) και τετρακυκλίνη (*tet*)

- Η επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων και η ταυτοποίηση των μετασηματισμένων κυττάρων με ένθεμα βασίζεται στην ανθεκτικότητα στα 2 αντιβιοτικά

By Ayacop,

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PBR322.svg>



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (8/24)

Πλασμίδια

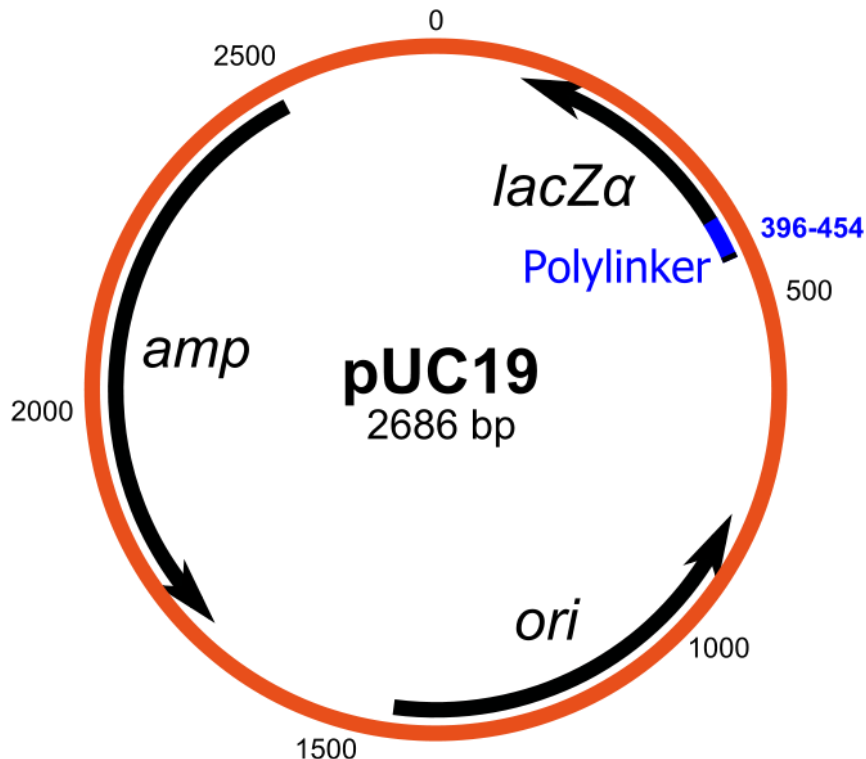
Για να γίνει αυτό ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Κλωνοποίηση τμήματος DNA σε κάποια από τις θέσεις περιορισμού εντός γονιδίου ανθεκτικότητας (π.χ. *Sal* I στο γονίδιο ανθεκτικότητας *tet*)
- Μετασχηματισμός βακτηρίων
- Καλλιέργεια των βακτηρίων **παρουσία αμπικιλίνης-ΟΛΑ τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύσσουν αποικίες (τριβλίο 1)**
- Μεταφορά των αποικιών και καλλιέργεια παρουσία **αμπικιλίνης και τετρακυκλίνης- μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα με ΜΗ ανασυνδυασμένα πλασμίδια αναπτύσσουν αποικίες (τριβλίο 2)**
- Επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων **με ανασυνδυασμένα πλασμίδια από το τριβλίο 1** (αποικίες που δεν αναπτύχθηκαν στο τριβλίο 2)



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (9/24)

Πλασμίδια



Εικόνα 4: Πλασμίδιο pUC19

- Ανθεκτικό στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (amp)
- Τμήμα γονιδίου lac Zα που παράγει τη β-γαλακτοσιδάση α συμπληρωματικότητα

By Yikrazuul,

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PUC19.svg>



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (10/24)

Πλασμίδια

- Διείσδυση ξένου DNA μέσα στη θέση κλωνοποίησης καταστρέφει το γονίδιο *lac Z'* και δεν παράγεται β-γαλακτοσιδάση
- Καλλιέργεια παρουσία αμπικιλίνης και X-gal (υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης που γίνεται μπλε παρουσία της) διαχωρίζει τα κύτταρα που έχουν μετασχηματισθεί με ανασυνδυασμένα ή μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια

μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια -μπλε αποικίες

ανασυνδυασμένα πλασμίδια - άσπρες αποικίες



Εικόνα 5: Blue-white test.



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (11/24)

Πλασμίδια

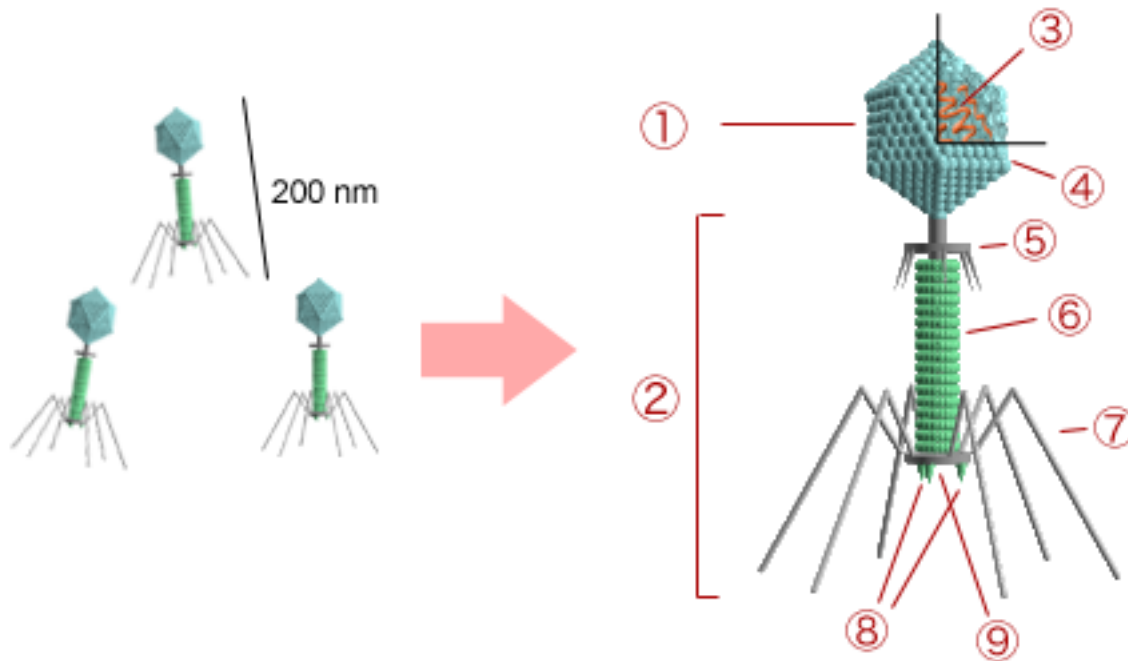
Μειονεκτήματα πλασμιδίων

- Μικρό μέγεθος ενθέματος (0- 10 kb)
- Μικρή απόδοση μεθόδων μετασχηματισμού



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (12/24)

Βακτηριοφάγοι λ



1. Κεφαλή
2. Ουρά
3. Νουκλεϊκό οξύ
4. Καψίδιο
5. Collar
6. Μανδύας
7. Ινίδια της ουράς
8. Spikes
9. Baseplate

Εικόνα 6: Δομή ενός βακτηριοφάγου.



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (13/24)

Βακτηριοφάγοι λ

Λυτικός κύκλος

- Ο φάγος προσκολλάται στο βακτηριακό κύτταρο και εγχύει το DNA του
- Το DNA του φάγου αντιγράφεται χρησιμοποιώντας συστατικά του ξενιστή
- Τα συστατικά του καψιδίου συνθέτονται και τα ιοσωμάτια σχηματίζονται και απελευθερώνονται

<http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch19/lytic.html>



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (14/24)

Βακτηριοφάγοι λ

Λυσιγονικός κύκλος

- Το ιοσωμάτιο προσκολλάται στο βακτήριο και εγχύει το DNA
- Το DNA του βακτηριοφάγου λ κυκλοποιείται
- Το DNA του βακτηριοφάγου λ ενσωματώνεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα (προφάγος)
- Κυτταρική διαίρεση - κατά την οποία πολλαπλασιάζεται και ο προφάγος με τον ξενιστή
- Στη συνέχεια μπορεί να επαχθεί ο λυτικός κύκλος → Το DNA του λ αποκόπτεται από το βακτηριακό χρωμόσωμα → Σχηματίζονται νέοι φάγοι

http://cronodon.com/images/Lambda_cycle.jpg



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (15/24)

Βακτηριοφάγοι λ

- Διπλόκλωνο DNA γονιδίωμα μεγέθους 49 Kb
- Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες της κεφαλής είναι συγκεντρωμένα στο αριστερό άκρο του DNA
- Ακολουθούν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες της ουράς
- Στο δεξί άκρο του DNA εδράζονται τα γονίδια για τη σύνθεση του DNA και αυτά που ελέγχουν το λυτικό κύκλο
- Στο κέντρο του γονιδιώματος υπάρχει μια περιοχή με τα γονίδια που ελέγχουν το λυσιγονικό κύκλο
- Τα γονίδια που σχετίζονται το λυσιγονικό κύκλο δεν ενδιαφέρουν όσον αφορά τον γρήγορο πολλαπλασιασμό του φάγου και μπορούν να απομακρυνθούν
- Στα άκρα του γονιδιώματός του υπάρχουν 12νουκλεοτιδικές μονόκλωνες συμπληρωματικές αλληλουχίες (θέσεις cos)

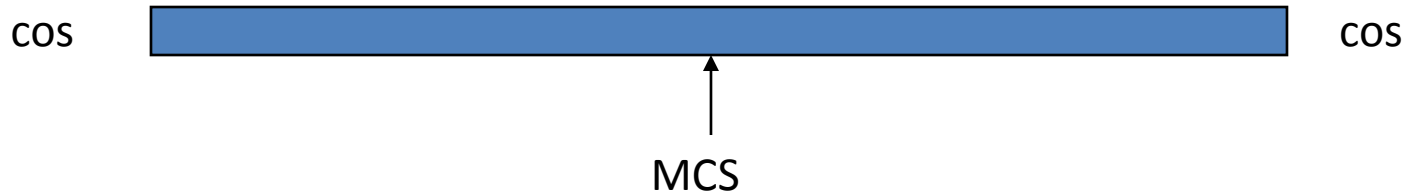


Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (16/24)

Βακτηριοφάγοι λ

Τροποποιημένοι λ βακτηριοφάγοι με 1 θέση πολυσύνδεσης που χωρίζουν το μόριο σε δύο τμήματα: **Φορείς εισχώρησης**

Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο βακτηριοφάγος λ ZAPII

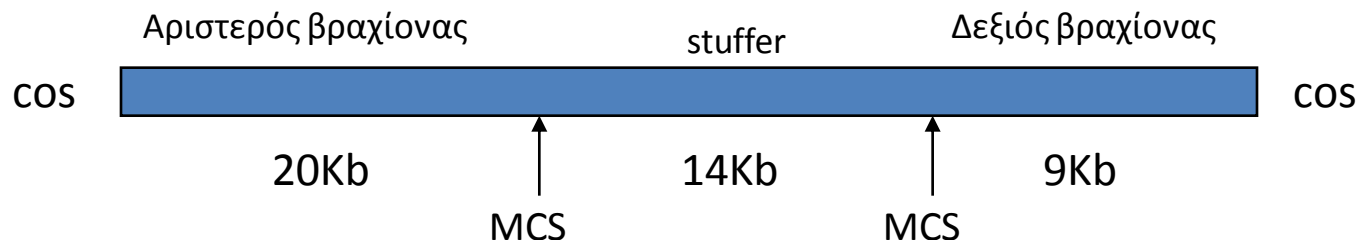


Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (17/24)

Βακτηριοφάγοι λ

Τροποποιημένοι λ βακτηριοφάγοι με 2 θέσεις πολυσύνδεσης που χωρίζουν το μόριο σε τρία τμήματα: **Φορείς αντικατάστασης**

Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο βακτηριοφάγος λ FIXII



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (18/24)

Βακτηριοφάγοι λ

- ✓ Κλωνοποίηση σε φορείς αντικατάστασης
 - ❖ Πέψη του DNA προς κλωνοποίηση (μέγεθος ~10-20 kb)
 - ❖ Πέψη του βακτηριοφάγου λ στις θέσεις κλωνοποίησης, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το κεντρικό τμήμα
 - ❖ Ανασυνδυασμός των μορίων-Αντικατάσταση του κεντρικού τμήματος από το DNA που κλωνοποιείται -Δημιουργία μορίων ~50kb με άκρα cos
 - ❖ Προσθήκη πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βακτηριοφάγων-Αυτόματη συναρμολόγηση καψιδίων
 - ❖ Μόλυνση των βακτηρίων
 - ❖ Πολλαπλασιασμός βακτηριοφάγων και λύση βακτηρίων



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (19/24)

Βακτηριοφάγοι λ

Επιλογή ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων

- Μέγεθος γονιδιώματος → Το ανασυνδυασμένο τμήμα πρέπει να έχει το κατάλληλο μέγεθος ώστε να είναι δυνατό το πακετάρισμα του σε καψίδιο
- Απενεργοποίηση *lacZ* γονιδίου → Στην καλλιέργεια παράγονται άχρωμες πλάκες, που αντιστοιχούν στους ανασυνδυασμένους βακτηριοφάγους και μπλε πλάκες που αντιστοιχούν στους μη ανασυνδυασμένους
- Φαινότυπος *Spi* → Μόνο ο ανασυνδυασμένος βακτηριοφάγος λ μπορεί να μολύνει το κατάλληλο στέλεχος κυττάρων



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (20/24)

Βακτηριοφάγοι λ

- ❖ Κατάλληλοι για κλωνοποίηση μικρών (0-5 kb) ή μεγάλων (10-20 kb) ενθεμάτων
- ❖ Ικανοποιητική ικανότητα κλωνοποίησης και εύκολη συντήρηση
- ❖ Μεγάλη μολυσματική ικανότητα. Η απόδοση κλώνων είναι συνήθως μεγαλύτερη από ότι στα πλασμίδια
- ❖ Εύκολος έλεγχος μεγάλου αριθμού ανασυνδυασμένων κλώνων



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (21/24)

Κοσμίδια

Τα κοσμίδια (Cosmids) είναι υβριδικά πλασμίδια

Το όνομα τους προέρχεται από

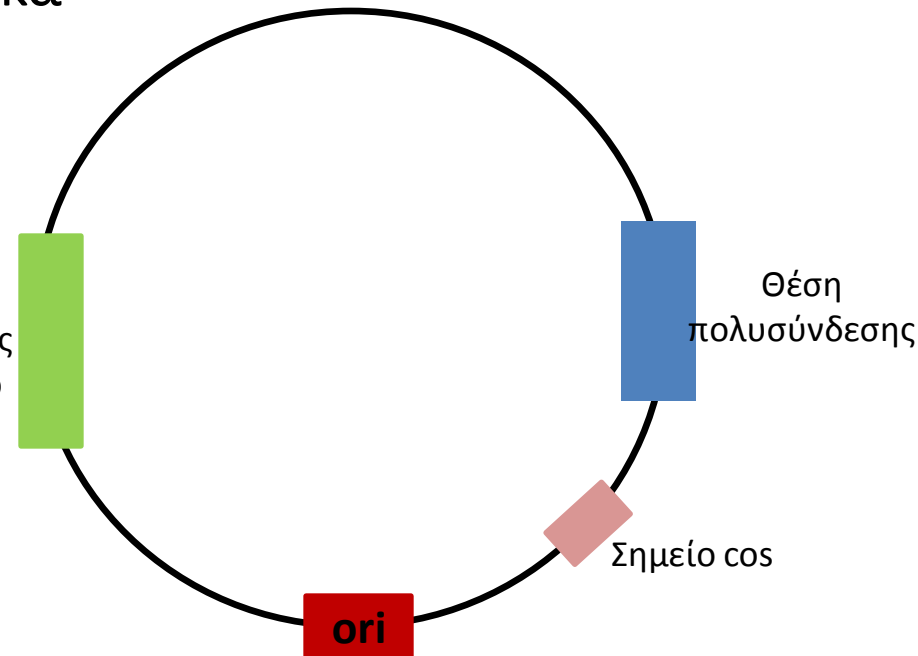
- Τα άκρα **cos** του φάγου
- Τις θέσεις αντιγραφής **ori** των πλασμιδίων (**plasmid**)

Ξενιστής: *E. coli*

Μέγεθος Φορέα: ~ 5-7 kb.

Μέγεθος ενθέματος: ως 45 kb

Γονίδιο
ανθεκτικότητας
σε αντιβιοτικό



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (22/24)

Κοσμίδια

Η διαδικασία που ακολουθείται για την κλωνοποίηση με τη χρήση κοσμιδίων, περιλαμβάνει:

- ⊙ Πέψη του γονιδιωματικού DNA (μέγεθος ~40 kb)
- ⊙ Πέψη του κοσμιδίου στη θέση κλωνοποίησης και στη θέση *cos*, έτσι ώστε αυτό να μετατραπεί σε 2 γραμμικά μόρια που φέρουν άκρα *cos*
- ⊙ Ανασυνδυασμός των μορίων-Δημιουργία μορίων ~50kb με άκρα *cos*
- ⊙ Πακετάρισμα των ανασυνδυασμένων κοσμιδίων σε καψίδια λ βακτηριοφάγου
- ⊙ Μόλυνση των βακτηρίων
- ⊙ Πολλαπλασιασμός και διατήρηση των ανασυνδυασμένων κοσμιδίων όπως τα πλασμίδια



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (23/24)

	Κοσμίδια	Βακτηριοφάγοι λ	Πλασμίδια
<u>Ξενιστής</u>	Βακτήρια	Βακτήρια	Βακτήρια
<u>Μέγεθος Ενθέματος</u>	Ως 50kb	<20kb	~ 1-8 kb
<u>Είσοδος στα Κύτταρα</u>	Μόλυνση	Μόλυνση	Μετασχηματισμός
<u>Αποτελεσματικότητα</u>	Πολύ υψηλή	Πολύ υψηλή	Μέτρια
<u>Αποτέλεσμα</u>	Πολ/σμός	Πολ/σμός-Θάνατος	Πολ/σμός
<u>Εμφάνιση μολυσμένων κυττάρων</u>	Αποικίες	Πλάκες	Αποικίες
<u>Εφαρμογές</u>	Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες	Γονιδιωματικές Βιβλιοθήκες	Κλωνοποίηση



Φορείς κλωνοποίησης για προκαρυωτικά συστήματα (24/24)

Τεχνητά Βακτηριακά Χρωμοσώματα -BACs

- Ένθεμα **150-300 Kb**
- Το πλασμίδιο F δίνει την ικανότητα αντιγραφής, η επιλογή γίνεται για χλωραμφαινικόλη
- Το DNA ανακτάται εύκολα
- 1 αντίγραφο /κύτταρο
- Χρησιμοποιούνται ευρέως σε προγράμματα ανάλυσης γονιδιωμάτων

<http://escience.ws/b572/L18/L18.htm>



Κριτήρια επιλογής φορέων κλωνοποίησης

Κατά την επιλογή του καταλληλότερου φορέα κλωνοποίησης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

- ❖ **Μέγεθος ενθέματος** (10^{-1} - 10^3 Kb)
- ❖ Ευκολία κλωνοποίησης
- ❖ Ευκολία χειρισμού
- ❖ Δυνατότητα επιλογής ενθέματος
- ❖ **Ακόλουθος πειραματικός σχεδιασμός** (ευκαρυωτικό-προκαρυωτικό σύστημα, απομόνωση ανάλυση γονιδίου-γονιδιώματος)



Σημείωμα χρήσης έργων τρίτων

Εικόνα 1: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plasmid_replication_\(english\).svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plasmid_replication_(english).svg), by Spaully, CC-BY-SA-2.5 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/deed.en>).

Εικόνα 2: http://da.wikipedia.org/wiki/Fil:Bacterial_Conjugation_en.png, by Mike Jones, CC-BY-SA-2.5 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/deed.en>).

Εικόνα 5: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Blue-white_test.jpg, by Navaho, CC-BY-SA-2.5 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/deed.en>).

Εικόνα 6: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacteriophage_structure.png, by Y_tambe, CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>).



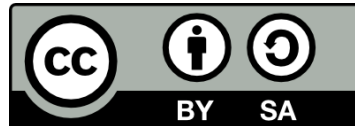
Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Δροσοπούλου Ελένη.
«Γενετική Μηχανική. Φορείς κλωνοποίησης». Έκδοση: 1.0. Θεσσαλονίκη
2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
http://opencourses.auth.gr/eclass_courses.



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά - Παρόμοια Διανομή [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>





Τέλος ενότητας

Επεξεργασία: Μηνούδη Στυλιανή
Θεσσαλονίκη, Χειμερινό εξάμηνο 2013-2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

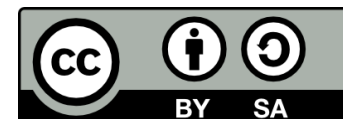


ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα χρήσης έργων τρίτων

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

