



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτες έκφρασης
της Πολυ(Α)-εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης, PARN**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαλτεζάκη Μαρία

**Επιβλέπων: Νικόλαος Μπαλατσός
Λέκτορας Π.Θ.**

Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας
Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
Αθήνα 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ



Δρ. ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Λέκτορας Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δρ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κύριος Ερευνητής του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Δρ. ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ

Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περίληψη

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) είναι μια αποαδενυλάση που αποδομεί την πολυ(A) ουρά ευκαρυωτικών mRNAs, καθορίζοντας το χρόνο ζωής τους και εμπλέκεται ενεργά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Αποτελείται από 639 αμινοξέα, PARN[1-639] και ανήκει στην κατηγορία των DEDD ριβονουκλεασών. Φέρει δύο περιοχές πρόσδεσης RNA, τις R3H και RRM όπου η τελευταία εκτός από την πρόσδεση του υποστρώματος [της πολυ(A) ουράς] εμπλέκεται και στην αναγνώριση του καλύματος. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίσαμε κατάλληλες συνθήκες για την έκφραση ενός κολοβωμένου τμήματος της PARN, της διαλυτής ανασυνδυασμένης ανθρώπινης PARN[1-523] ή PARNt, η οποία διατηρεί τις δύο περιοχές πρόσδεσης RNA. Πειραματιστήκαμε με διαφορετικά στελέχη *Escherichia coli*, υλικά καλλιέργειας και συνθήκες ανάπτυξης. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι PARNt μπορεί να εκφραστεί από pET15b σε B834pLysS (DE3) που αναπτύσσονται σε TB κι επάγονται σε $OD_{600} \sim 0,5$ με 0,5mM IPTG και να αποδώσει ποσότητες πρωτεΐνης της τάξης των mg/Lt. Επιπλέον έγιναν απόπειρες καθαρισμού της PARNt με χρωματογραφία συγγένειας και ιοντοανταλλαγής. Η χρησιμοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών μπορεί να παρέχει ποσότητες πρωτεΐνης ικανές να χρησιμοποιηθούν σε δομικές μελέτες.

Abstract

Poly(A)-ribonuclease (PARN) is a cap-interacting 3' exoribonuclease that efficiently degrades eukaryotic mRNA poly(A) tails, determining their stability and thus is actively involved in the regulation of gene expression. PARN is composed of 639 aminoacids, PARN[1-639] and is a member of the DEDD ribonucleases family. PARN has two RNA binding domains, the R3H and the RRM, the latter also being involved in cap recognition. We have established conditions for expressing a truncated part of PARN, the soluble recombinant human PARN[1-523] or PARnt. We investigated different *Escherichia coli* strains, media and growth conditions. We found that truncated human PARN expressed from pET15b in B834pLysS (DE3) grown in TB and induced at $OD_{600} \sim 0,5$ with 0,5mM IPTG yielded mg amounts of soluble PARnt per litre culture. Further, we attempted to purify the protein via liquid affinity and anion-exchange chromatography. The results can be used to acquire sufficient amounts of purified recombinant PARnt and use it for further structural studies

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2009-Ιούλιος 2010, στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με το Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, όπου και πραγματοποιήθηκε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη, μέλος της ομάδας Δομικής Βιολογίας και Χημείας και Λέκτορα Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη καθοδήγησή της καθ'όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε. Οφείλω ακόμη ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό, για την εμπιστοσύνη που μου παρείχε σε όλες τις φάσεις της δημιουργίας της καθώς και για τις συμβουλές και διορθώσεις του. Επίσης ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή του Πανεπιστημίου Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα του οποίου η συνεισφορά ήταν ιδιαίτερα σημαντική για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αγάπη και την υποστήριξή τους και το Γιώργο για τη συνολική του συμπαράσταση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
ΠΟΛΥ(Α) ΟΥΡΑ – ΜΙΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΔΟΜΗ	11
ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ ΥΠΕΡ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ DEDD	12
ΥΠΟ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ RNase D.....	14
ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ PARN	15
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	16
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	18
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ PARN.....	18
PARN:ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΟΤΑΓΗ ΣΤΗΝ ΤΕΤΑΡΤΟΤΑΓΗ ΔΟΜΗ	19
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ HUMAN PARN.	20
Η ΠΕΡΙΟΧΗ R3H.....	22
Η ΠΕΡΙΟΧΗ RRM	23
ΕΝΕΡΓΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	24
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ PARN	25
ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	26
ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	28
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ και ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	29
ΣΤΑΔΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	30
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	33
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	35
ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ PARNtruncated (PARNt)	35
ΥΛΙΚΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ.....	36
1. Καλλιέργειες, Συλλογή και Λύση Κυττάρων BL21 για καθαρισμό της PARNt.	40
2. Καλλιέργειες BL21 για έλεγχο στους 37°C και τους 18°C.	46
3. Μετασχηματισμός και Καλλιέργειες B834 σειράς,	50
4. Απομόνωση και έλεγχος του πλασμιδίου	53
5. Μετασχηματισμός, καλλιέργειες & συλλογή Κυττάρων της σειράς B834 σε μικρότερο όγκο.	56
6. Μετασχηματισμός και καλλιέργειες BL21 STAR.....	58
7. Έλεγχος πρόσδεσης σε στήλη Νικελίου	60
8. Έλεγχος επίδρασης στο αποτέλεσμα ανανέωσης του υλικού καλλιέργειας.	62
9. Έλεγχος βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των κυττάρων B834rLysS.....	63
10. Έλεγχος αποτελέσματος σε καλλιέργεια μεγάλου όγκου στους 18°C.	63
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα σημαντικό βήμα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι ο έλεγχος της ποσότητας του mRNA που υπάρχει στο κύτταρο. Η συγκέντρωση του mRNA καθορίζεται από το ρυθμό μεταγραφής και αποδόμησής του. Οι ημιζωές των mRNA ποικίλλουν από μερικά λεπτά μέχρι πάνω από 24 ώρες ανάλογα με τη φύση του γονιδιακού προϊόντος. Το κάλυμμα στο άκρο 5' καθώς και η ουρά από αδενίνες στο 3' άκρο καθορίζουν ένα mRNA και μαζί ενέχονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, συμπεριλαμβανομένης της ωρίμανσης, της μεταφοράς, της μετάφρασης και της αποδόμησης του mRNA¹ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Δομή τυπικού ανθρώπινου mRNA που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, συμπεριλαμβανομένων των UTRs. Συμπεριλαμβανομένων των μη μεταφραζόμενων περιοχών (UTRs).

ΠΟΛΥ(A) ΟΥΡΑ – ΜΙΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΔΟΜΗ

Στην πορεία του mRNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η πολυαδενυλίωση είναι κομμάτι της διαδικασίας ωρίμανσής του για μετάφραση (χρονικά το δεύτερο βήμα μετά την προσθήκη του καλύμματος). Η τροποποίηση της πολυ(A) ουράς είναι ένας σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης της μετάφρασης του mRNA. Η πολυαδενυλίωση ξεκινά μετά το τέλος της μεταγραφής και είναι σημαντική για την σταθερότητα του mRNA. Η τροποποίηση της σταθερότητας του mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, του ποιοτικού ελέγχου στη βιοσύνθεση του mRNA και την προστασία ενάντια σε ιούς².

Η νεοσύστατη πολυ(A) ουρά εμφανίζει ομοιογένεια στα διάφορα μεταγράφα, με μήκος από 200 έως 250 αδενυλικά κατάλοιπα σε θηλαστικά και 60 με 80 A στη Ζύμη. Στη διάρκεια της ζωής ενός mRNA η πολυ(A) ουρά αποδομείται. Η αφαίρεση της πολύ-A ουράς αποτελεί συχνά το αρχικό

και ρυθμιστικό βήμα στην αποδόμηση του mRNA ενώ ευθύνεται και για τη μεταφραστική αποσιώπηση μητρικών mRNAs κατά την ωρίμανση του ωοκυττάρου και την πρόιμη ανάπτυξη³.

Αρκετές πολύ-A-εξωριβονουκλεάσες (αποαδενυλάσες) έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη: οι Pan2/Pan3 σε yeast και θηλαστικά, η Ccr4-Pop2-Not complex σε yeast και τα ομόλογά τους σε άλλους οργανισμούς και η πολύ-A-ριβονουκλεάση (PARN) στα σπονδυλωτά και το *Arabidopsis*.

ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΕΣ ΥΠΕΡ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ DEDD

Βάσει μελετών αλληλουχίας και καταλυτικών ιδιοτήτων, όλες οι αποαδενυλάσες και τα ομόλογά τους μόρια έχουν ομαδοποιηθεί σε 6 υπεροικογένειες και αρκετές υποοικογένειες. Η PARN ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών RNase D, μέλος της υπεροικογένειας DEDD, αποτελούμενη από RNases καθώς επίσης και από DNases. Οι πρωτεΐνες αυτής της υπεροικογένειας έχουν ένα χαρακτηριστικό πυρήνα αποτελούμενο από 4 όξινα αμινοξέα καθώς και αρκετά άλλα συντηρημένα κατάλοιπα μοιρασμένα σε 3 ξεχωριστά μοτίβα. Η οικογένεια DEDD πήρε το όνομά της από τα 4 αυτά συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα στο ενεργό κέντρο που ελέγχουν 2 ιόντα Mg απαραίτητα για τη σταθερότητα του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και την ενζυματική δράση. Πρόκειται για τρία ασπαρτικά οξέα (D) και ένα γλουταμινικό οξύ (E)¹ κατανεμημένα μεταξύ τριών ξεχωριστών διαδοχικών μοτίβων (ExoI-III)⁴ (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της δομής της PARN (Πηγή: Yan-Guo Ren, Poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN), βλ βιβλιογραφία)

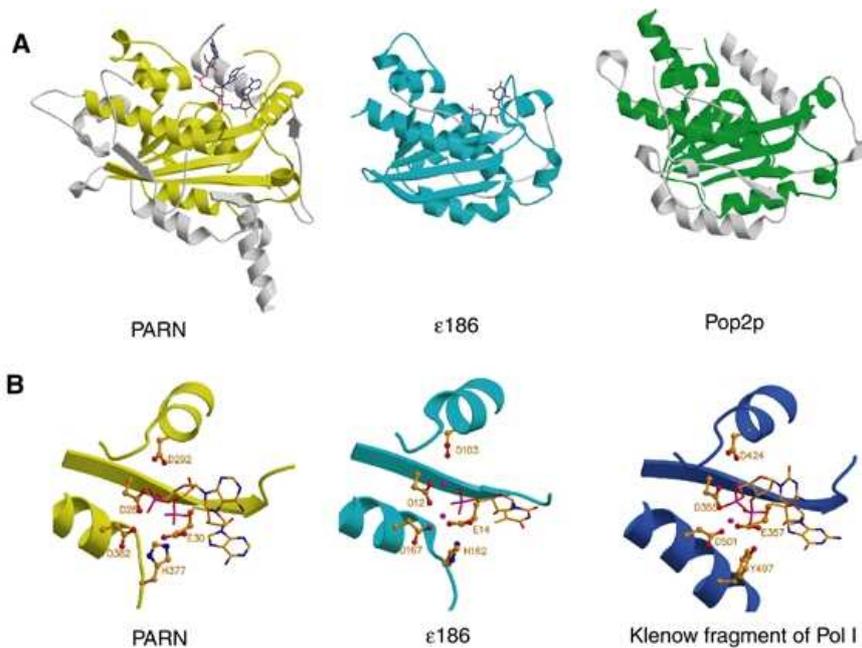
Όλες οι νουκλεάσες αυτής της οικογένειας διαθέτουν κοινό καταλυτικό μηχανισμό που χαρακτηρίζεται από την εμπλοκή 2 μεταλλικών ιόντων⁵. Η υπεροικογένεια DEDD διαιρείται περαιτέρω σε δύο υποομάδες,

¹ Ειδικά για την PARN πρόκειται για τα Asp²⁸, Asp²⁹², Asp³⁸² και , το Glu³⁰.

τις DEDDy και DEDDh, βάσει ενός πέμπτου συντηρημένου αμινοξέος- ανάλογα με το αν πρόκειται για τυροσίνη (Y) ή ιστιδίνη (H). Με βάση τις κρυσταλλικές δομές της εξωνουκλεάσης DNA πολυμεράσης I (Pol I) και της ε-υποομάδας της DNA πολυμεράσης III (ε186), η τυροσίνη (Y) και η ιστιδίνη (H) καλούνται να παίξουν έναν ισοδύναμο ρόλο στην ενεργοποίηση ενός μορίου ύδατος ή ενός υδροξειδίου κατά τη λύση του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Δεδομένου ότι η οικογένεια DEDD έχει μήκος ~150-200 αμινοξέα, ο ρόλος ενός μεγάλου τμήματος των πρωτεϊνών αυτών διερευνάται. Η ανθρώπινη PARN είναι μέλος της υποοικογένειας DEDDh². Διαφέρει όμως από αυτή γιατί περιέχει ένα μεγάλο ένθεμα μεταξύ των μοτίβων I και II. Χρησιμοποιώντας το πακέτο προγραμμάτων DALI προσδιορίστηκε μία έντονη δομική ομοιότητα μεταξύ του τμήματος νουκλεάσης της PARN και άλλων 3'-5' εξωνουκλεασών. Τα δομικά αυτά ομόλογα της PARN περιέχουν τα τμήματα νουκλεάσης της Pop2p, της ε186, της εξωνουκλεάσης I της E.coli (ExoI) και της ISG20. Όλες αυτές οι εξωνουκλεάσες, εκτός της Pop2p, ανήκουν στην DEDDh οικογένεια, όπως και η PARN.

Παρά τις ομοιότητες αυτές, μερικές αξιοσημείωτες δομικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ των τμημάτων νουκλεάσης των εξωνουκλεασών PARN, ε186 και Pop2p (Εικόνα 3). Το C- τελικό άκρο της PARNh [όπου PARNh η κολοβωμένη στο C-τελικό άκρο PARN[1-430], βλ. βιβλιογραφία Wu et al. (2005)] είναι πολύ μακρύτερο από αυτό της ε186 και παρουσιάζει διαφορετική διαμόρφωση από το αντίστοιχο της Pop2p. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της PARN είναι ότι τμήμα νουκλεάσης περιέχει την περιοχή R3H σε αντίθεση με ότι παρατηρείται στις ε186 και Pop2p. Πιθανώς η πιο σημαντική διαφορά είναι ότι το τμήμα νουκλεάσης της PARN είναι ένα ομοδιμερές, ενώ τα αντίστοιχα τμήματα των ε186 και Pop2p είναι μονομερή.

² Η ιστιδίνη της PARN είναι η His377 (Wu M. et al. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN και Zuo Y., Deutscher M.P. (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution (βλ. Βιβλιογραφία)



Εικόνα 3. Σύγκριση της PARNn με άλλα μέλη της οικογένειας DEDD (A). Δομική σύγκριση της περιοχής νουκλεάσης της PARNn με αυτές των ε186 και Pop2p. Οι περιοχές DEDD χρωματίζονται με κίτρινο, γαλάζιο και πράσινο χρώμα ενώ τα υπόλοιπα μόρια με γκρι. Τα συνδεδεμένα νουκλεοτίδια απεικονίζονται με μορφή ράβδου. (B). Δομές των ενεργών κέντρων της PARNn, της ε186 της Pol III και του θραύσματος klenow της Pol I. Τα καταλυτικά κατάλοιπα φαίνονται με μορφή ράβδου/σφαίρας ενώ τα μεταλλικά ιόντα χρωματίζονται έντονα (πηγή: Wu M et al. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN, βλ. Βιβλιογραφία)

ΥΠΟ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ RNase D

Η RNase D είναι μια οικογένεια 3'-5' αποαδενυλασών που χρειάζονται ένα δισθενές κατιόν για να δράσουν. Όλα τα μέλη της υποοικογένειας RNase D διαθέτουν το χαρακτηριστικό μοτίβο III (ExoIII βλ. Εικόνα 2) με την αλληλουχία [DN]-W-x(2)-R-P-[LI]-x(6)-Y-A-x(2)-D. Οι βακτηριακές πρωτεΐνες περιέχουν ~400 αμινοξέα και οι ευκαρυωτικές ~800. Η φυλογενετική κατανομή των RNase D (πολύ λίγες σε βακτήρια και κατά κανόνα παρούσες σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς) καθώς και η παρουσία τους σε βακτήρια-ξενιστές σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, υποδεικνύουν την πιθανότητα οριζόντιας μεταφοράς τους από ευκαρυωτικούς οργανισμούς στα βακτήρια. Αν και απαντάται σε

ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως πχ *Schizosaccharomyces pombe* και *Caenorhabditis elegans*, δεν είναι παρούσες στο *S.cerevisiae*.

ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ PARN

Δύο είναι τα κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA και αμφότερα ξεκινούν με αποαδενυλίωση της πολυ(A) ουράς. Στο μονοπάτι 5'-3', το 5' κάλυμμα του mRNA αφαιρείται από κατάλληλα ένζυμα³ όταν ένα βασικό τμήμα της πολυ(A) ουράς έχει αποδομηθεί. Ακολουθεί αποδόμηση του υπολοίπου μορίου ξεκινώντας από το 5' άκρο⁴. Στο μονοπάτι 3'-5' το κυτταροπλασματικό εξωσωμικό σύμπλεγμα θα συνεχίσει να αποδομεί το mRNA στην κατεύθυνση 3'-5' μετά την απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς⁶. Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν βρεθεί αρκετές αποαδενυλάσες. Πρώτοι οι Lazarus και Sporn αναφέρουν το 1967 ότι μια πυρηνική εξωριβονουκλεάση εξαρτώμενη από ένα δισθενές κατιόν ήταν παρούσα σε κύτταρα όγκου Ehrlich⁷. Οι σημαντικές ιδιότητες αυτής της ενζυμικής δραστηριότητας ήταν

- η υψηλή ειδικότητα του ενζύμου για 3'-5' αποικοδόμηση πολυ(A) ουρών
- η απαίτηση μιας 3'υδροξυλομάδας για την δραστηριότητα του.

Η PARN είναι ένα ένζυμο κλειδί στην αποδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA που εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς, τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Είναι ένα πολυπεπίδιο 74kDa, ενώ απαντάται και το πολυπεπίδιο 54kDa που είναι κλάσμα του προηγούμενου. Το γονίδιο της ανθρώπινης PARN βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 (16p13) ενώ ένα ανενεργό αντίγραφο που στερείται του 5' άκρου του ενζύμου υπάρχει στο χρωμόσωμα 15 (θέση 15q11-q13)⁸.

Ανήκει στην οικογένεια των RNase D 3'-5'-εξωριβονουκλεασών και είναι υψηλά ειδική για μονόκλωνες πολυ(A). Η PARN είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ απουσιάζει από τον *Saccharomyces cerevisiae* και την *Drosophila melanogaster*. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν αλληλεπιδρά μόνο με το 3' αλλά και με το 5' άκρο, κάτι που διεγείρει τη δράση της αποαδενυλίωσης και ενισχύει την πρόοδο αυτής της αντίδρασης⁹

³ DCP1-DCP2 complex

⁴ XRN1 5'-3' exonuclease

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο καταλυτικός μηχανισμός της PARN και ο μηχανισμός διέγερσης της δράσης της από τη δέσμευση της cap-περιοχής δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Για τη διαλεύκανση των παραπάνω και της σχέσης δομής-λειτουργίας της, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την κρυσταλλική δομή της PARN τόσο στην ελεύθερη μορφή της όσο και όταν βρίσκεται συνδεδεμένη με τον προσδέτη. Στην παρούσα εργασία γίνεται αναφορά στις μεθόδους έκφρασης και καθαρισμού της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης PARN. Η έκφραση και ο καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών διευκολύνει το λεπτομερή έλεγχο κάθε πρωτεΐνης αφού σ' αυτές υπάρχουν περιοχές συγγένειας που διευκολύνουν τον καθαρισμό με χρωματογραφικές μεθόδους. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δομικές και μηχανιστικές μελέτες.

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται, μέρος της οποίας είναι και η παρούσα εργασία, είναι η κατανόηση της σχέσης λειτουργίας - μοριακής δομής της PARN, και η αξιοποίηση της γνώσης αυτής στο σχεδιασμό νέων εν δυνάμει φαρμάκων. Η ανάλυση της δομής βιολογικών μακρομορίων παίζει σημαντικό ρόλο στην κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας των μακρομορίων. Οι σχέσεις αυτές αποτελούν την βάση της ερμηνείας των μοριακών μηχανισμών των ασθενειών. Παράλληλα προϋπόθεση για την εν δυνάμει είσοδο μιας φαρμακευτικής ένωσης σε κλινικές δοκιμές είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εξειδίκευση έναντι του πρωτεϊνικού της στόχου. Ο σχεδιασμός εξειδικευμένων αναστολέων αποτελεί σήμερα έναν από τους πλέον δύσκολους στόχους στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, αφού απαιτεί την γνώση της δομής και λειτουργίας του, αλλά και των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση του αναστολέα στο μακρομοριακό στόχο.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ PARN

Εξάρτηση από μεταλλικά ιόντα

Δισθενή μεταλλικά ιόντα είναι προαπαιτούμενα της κατάλυσης. Αν και οι αρχικές μελέτες ανέφεραν ιόντα Mg^{2+} δεν έχουν βρεθεί ιόντα Mg στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Εντούτοις αποδεικνύεται ότι και το κλάσμα 74kDa και αυτό των 54Da της ανθρώπινης PARN μπορούν να ολοκληρώσουν την αποαδενυλίωση παρουσία Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} και Cd^{2+} χρησιμοποιώντας L3(A₃₀), A₂, A₃ A₅ ως υποστρώματα^{7,10}.

Πολυ(A) ειδικότητα⁵

Σε συγκριτική μελέτη φάνηκε ότι η PARN διαθέτει περίπου 10, 100 και 200 φορές μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα αν το υπόστρωμά της είναι πολύ-ουρακίλη, πολύ-κυτοσίνη και πολύ-γουανίνη αντίστοιχα.

Ολιγομερική δομή

Αν και υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που αναφέρουν ομοτριμερή της PARN⁶ τα νεότερα δομικά δεδομένα καταλήγουν στην ύπαρξη ομοδιμερών της PARN⁷.

Σταδιακός τρόπος δράσης

i. Ακέραια μόρια υποστρώματος και πλήρως αποαδενυλιωμένο προϊόν είναι παρόντα κατά διαστήματα ii. Όταν το υπόστρωμα υπερβαίνει κατά πολύ την ποσότητα του ενζύμου δεν εντοπίζεται κάποιος ομογενής πληθυσμός

⁵ Βλ. βιβλιογραφία: Wu et al. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN και Henriksson et al. Recognition of adenosine residues by the active site of poly(A)-specific ribonuclease.

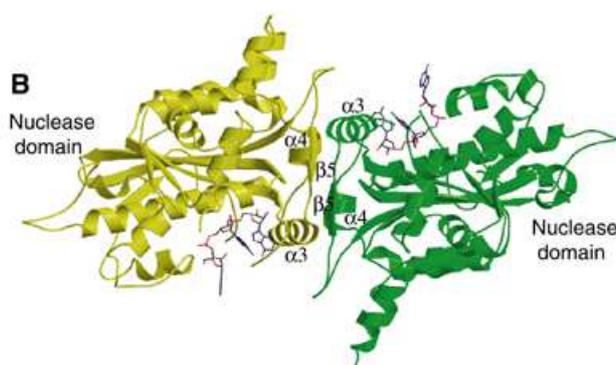
⁶ Βλ. Βιβλιογραφία: Nilsson P., Virtanen A. (2006). Expression and purification of recombinant poly(A)-specific ribonuclease (PARN).

⁷ Βλ. Βιβλιογραφία: Liu WF et al. (2009) Allosteric regulation of human poly(A)-specific ribonuclease by cap and potassium ions.

μερικώς αποαδενυλιωμένων υποστρωμάτων iii. Το χρονικό σημείο που εμφανίζεται το πρώτο πλήρως αποαδενυλιωμένο προϊόν είναι ανεξάρτητο από την συγκέντρωση του υποστρώματος και iv. Αφού ο τρόπος κατάλυσης είναι σταδιακός το ένζυμο παραμένει στο υπόστρωμα για πολλούς γύρους κατάλυσης και είναι δυνατό να ανιχνευτεί το σύμπλοκο.

PARN: ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΟΤΑΓΗ ΣΤΗΝ ΤΕΤΑΡΤΟΤΑΓΗ ΔΟΜΗ

Η ανθρώπινη PARN αποτελείται από 639 αμινοξέα. Η κρυσταλλική δομή του C-τελικού άκρου της (αμινοξέα 1-430), που ονομάζεται PARNn εκφράζεται στην *E.coli*⁸. Η PARNn σχηματίζει ένα ομοδιμερές μόριο στο σύμπλοκο PARNn-RNA, όπου η κάθε υποομάδα συνδέεται σε τρία νουκλεοτίδια αδενοσίνης.



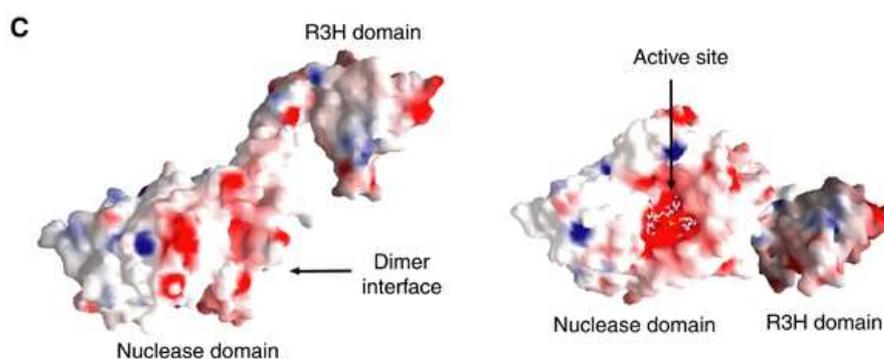
Εικόνα 4. Διάγραμμα του συμπλόκου PARNn-RNA. Τα 2 μόρια εμφανίζονται πράσινο & κίτρινο για λόγους διάκρισης. Τα νουκλεοτίδια εμφανίζονται σε μοντέλο ράβδου. Σημειώνονται οι α3, α4 & β5 (πηγή: Wu M et al. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN)

Η κάθε υποομάδα της PARNn έχει δομή τύπου α/β, με μία μεγάλη β-πτυχωτή επιφάνεια, που αποτελείται από οκτώ β-ελάσματα, στο κέντρο δίπλα σε δώδεκα α-έλικες. Το πέμπτο β-έλασμα (β5) και το αντίστοιχο β-

⁸ Η PARNn έχει προσδιοριστεί σε δύο καταστάσεις –ελεύθερη και δεσμευμένη στο RNA. Η μορφή αυτή της πρωτεΐνης είναι καταλυτικά ενεργή για τη λύση ενός πολυνουκλεοτιδίου 15 βάσεων, αν και εμφανίζει χαμηλότερη δραστηριότητα από τη φυσική πρωτεΐνη.

έλασμα από την άλλη υπομονάδα δημιουργούν μία μικρή αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια. Αυτή η επιφάνεια σε συνδυασμό με τις έλικες α3 και α4 και από τις δύο υπομονάδες αποτελούν την μεσεπιφάνεια των δύο μονομερών. Οι δομές των δύο υπομονάδων είναι αρκετά όμοιες. Το τρινουκλεοτίδιο είναι προσδεμένο σε μια μεγάλη κοιλότητα η οποία βρίσκεται σε αντίθετες πλευρές του διμερούς.

Στην δομή της PARNη, απουσία του ολιγονουκλεοτιδίου, η πολυπεπτιδική αλυσίδα διατάσσεται σε δύο μόνο τμήματα: το τμήμα της νουκλεάσης και το τμήμα της R3H που βοηθά την δέσμευση της PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Οι δυο περιοχές της λειτουργούν συνεργειακά ενισχύοντας έτσι τη δραστικότητα του ενζύμου. Η γενική μορφή της δομής θυμίζει έναν ιππόκαμπο (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Για λόγους απλότητας απεικονίζεται μόνο μία υπομονάδα. Με μπλε οι βασικές και με κόκκινο οι όξινες περιοχές. (αριστερά η πλάγια όψη και δεξιά το μόριο όπως φαίνεται από πάνω). (πηγή: Wu M et al. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN)

Η μακριά έλικα α8, η οποία είναι μερικώς αποδιατεταγμένη στο σύμπλοκο PARNη-RNA, συνδέει την R3H με το τμήμα νουκλεάσης. Η περιοχή R3H, η οποία υποτίθεται ότι βρίσκεται μεταξύ των α5 και α8 ελίκων, είναι αποδιατεταγμένη.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ HUMAN PARN.

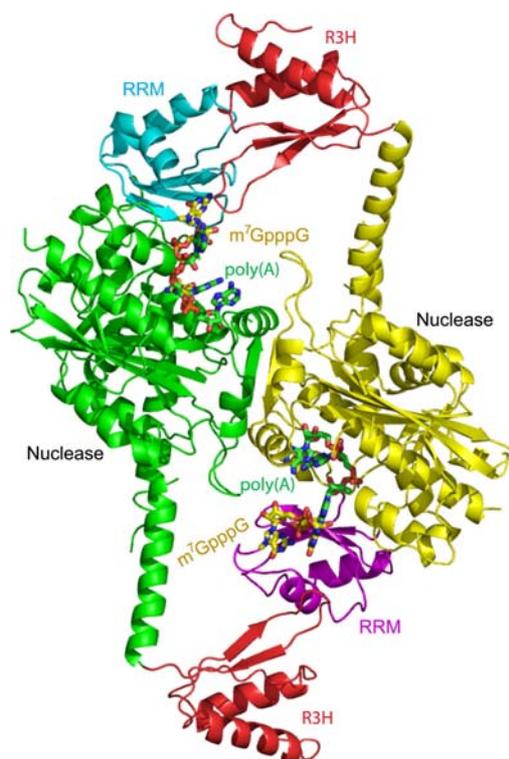
Η ανθρώπινη PARN αποτελείται από:

Την περιοχή νουκλεάσης που περιέχει το καταλυτικό κέντρο και είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση της πολυ(A) ουράς και το διμερισμό του

ενζύμου. Η ίδια αποτελεί ένα ομοδιμερές μόριο και η κάθε υπομονάδα του συνδέει ένα RNA νουκλεοτίδιο.

Την R3H περιοχή, συντηρημένη, υψηλά ειδική για σύνδεση στην πολυ(A) ουρά. Εισέρχεται στην περιοχή της νουκλεάσης και προεξέχει από αυτήν, ώστε βρίσκεται πάνω από το σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος της άλλης υπομονάδας στο ομοδιμερές.

Το τμήμα αναγνώρισης του RNA, RNA recognition motif ή RRM στο C-τελικό άκρο.



Εικόνα 6. Μοντέλο του ομοδιμερούς της PARN. Απεικονίζονται και οι τρεις δομικές περιοχές. (πηγή: Wu M. et al. (2009) Structural Basis of m7GpppG binding to Poly(A) Specific Ribonuclease)

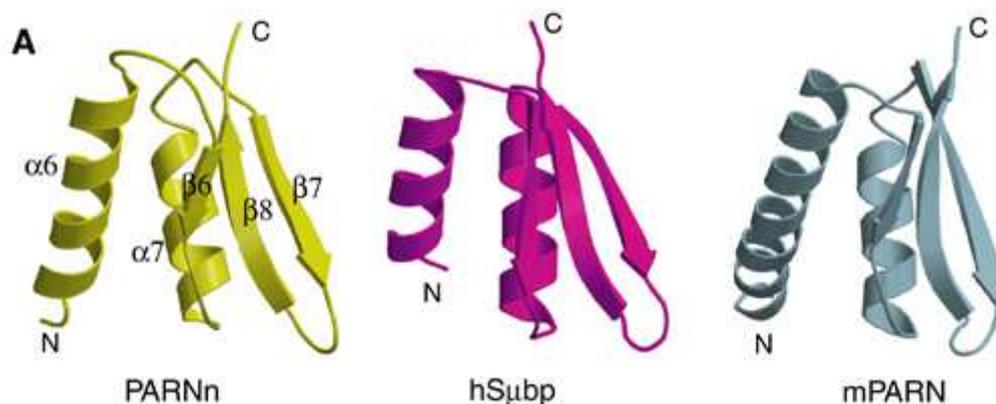
Η PARN σχηματίζει ένα συμπαγές διμερές αποτελούμενο από 2 όμοιες υπομονάδες (Εικόνα 6), με την R3H περιοχή της μιας υπομονάδας να περιβάλλει μερικώς το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην άλλη υπομονάδα και την πολυ-A ουρά να συνδέεται σε μια βαθιά κοιλότητα της περιοχής νουκλεάσης με τρόπο ανεξάρτητο από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό καταστέλλουν τόσο την ενζυμική δραστηριότητα όσο και αυτή της δέσμευσης στο RNA,

προσδιορίζοντας έτσι το διμερές ως τη δομική αλλά και λειτουργική μονάδα της PARN.

Η περιοχή R3H και πιθανώς και η περιοχή δέσμευσης του καλύμματος αν και ενέχονται στην πολύ-A δέσμευση δε συνεισφέρουν από μόνες τους στην πολύ-A εξειδίκευση του ενζύμου. Πειραματικά συγκρίθηκε η δραστηριότητα και σταθερότητα μεταλλαγμάτων της PARN από όπου έλλειπαν είτε η R3H είτε η RRM περιοχή. Αποδεικνύεται ότι επαρκεί η παρουσία μιας από τις δύο για την πρόσδεση του υποστρώματος αλλά απαιτούνται και οι δύο για αποτελεσματική κατάλυση.

Η ΠΕΡΙΟΧΗ R3H

Η περιοχή R3H είναι ένα συντηρημένο επαναλαμβανόμενο μοτίβο, το οποίο έχει προσδιοριστεί σε περισσότερες από 100 πρωτεΐνες από διαφορετικά είδη οργανισμών. Πρόκειται για ένα μοτίβο που συνδέεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα. Το κύριο χαρακτηριστικό του είναι η σταθερή παρουσία ενός καταλοίπου αργινίνης κι ενός υψηλά συντηρημένου καταλοίπου ιστιδίνης που τα χωρίζουν 3 άλλα αμινοξέα. Το μοτίβο έχει ακόμη υδροφοβικά κατάλοιπα, προλίνες και γλυκίνες. Είναι παρόν σε πρωτεΐνες διαφόρων οργανισμών – ευβακτηρίων, πράσινων φυτών, μυκήτων και μεταζώων αλλά όχι στην *E.coli*.



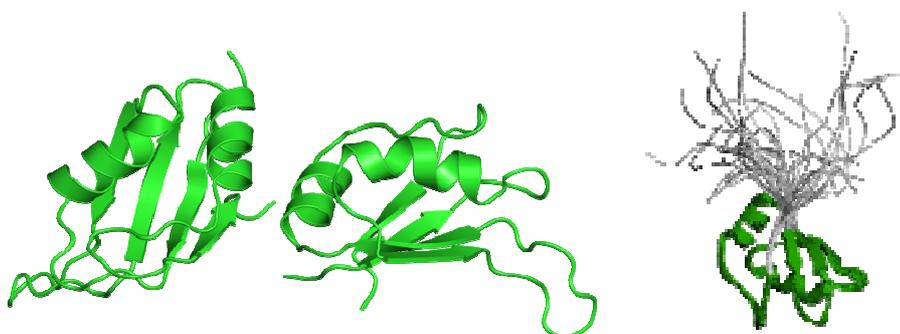
Εικόνα 7. Σύγκριση της δομής της R3h περιοχής της PARNn με την ανθρώπινη Sμbp-2 και την mouse PARNn. (πηγή: Wu M et al. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN)

Οι τρισδιάστατες δομές της περιοχής R3H από την PARN του ανθρώπου και του ποντικού, προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία NMR και έδειξαν ότι η περιοχή R3H που αποτελείται από ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο και δύο α-έλικες, είναι δομικά ομόλογο με την C-τελική περιοχή του παράγοντα έναρξης μετάφρασης (IF3) (Εικόνα 7).

Στην δομή της PARNη, η περιοχή R3H από το ένα μόριο του ομοδιμερούς, βρίσκεται στην κορυφή της θέσης σύνδεσης poly(A) από το άλλο μόριο, χρησιμεύοντας σαν 'κάλυμμα' εγκολπώνοντας την κοιλότητα της σύνδεσης του poly(A). Αφαίρεση της R3H περιοχής μειώνει δραματικά τη σταθερότητα της PARN και διαφοροποιεί το κινητικό της πρότυπο. Ίσως η περιοχή αυτή λειτουργεί σταθεροποιητικά ως προστάτης ή διαμοριακή σαπερονίνη της περιοχής RRM¹¹.

Η ΠΕΡΙΟΧΗ RRM

Πολλές ευκαρυωτικές πρωτεΐνες που συνδέουν μονόκλωνο RNA περιέχουν 1 ή 2 αντίγραφα μιας περιοχής περίπου 90 αμινοξέων γνωστής ως περιοχή αναγνώρισης RNA (RNA recognition motif). RRMs υπάρχουν σε μια ποικιλία RNA δεσμευτικών πρωτεϊνών όπως ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (hnRNPs), πρωτεΐνες που ενέχονται στη ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος και συστατικά των μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (snRNPs). Το μοτίβο επίσης εμφανίζεται σε ορισμένες πρωτεΐνες που συνδέουν DNA. Η δομή RRM αποτελείται από 2 α-έλικες και 4 αντιπαράλληλα β-ελάσματα τοποθετημένα σ' ένα μοτίβο α/β (τύπου β-α-β-β-α-β) με πλευρικές αλυσίδες που σωρεύουν βάσεις RNA (Εικόνα 8). Μια 3^η έλικα είναι παρούσα κατά την πρόσδεση του RNA σε κάποιες περιπτώσεις.



Εικόνα 8. Αριστερά RRM μοτίβο (κάτοψη). Δεξιά RRM συνδέει RNA (Πηγή: Protein Data Bank Europe).

ΕΝΕΡΓΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Βασιζόμενοι σε μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες θέσεις και συγκρίνοντας την αλληλουχία της PARN με την αλληλουχία 3'-5' εξωνουκλεασών της DEDD υπεροικογένειας, προσδιορίστηκαν τέσσερα αμινοξέα (Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382), τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική δραστηριότητα της PARN και τα οποία είναι απαραίτητα για την δέσμευση δισθενών μεταλλικών ιόντων σε αυτή. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, προτάθηκε ότι η PARN χρησιμοποιεί το μηχανισμό δύο μεταλλικών ιόντων για την κατάλυση, αν και ο αναλυτικός καταλυτικός μηχανισμός παραμένει ακόμα ασαφής.

Και στις δύο μορφές της PARN (ελεύθερη και σε σύμπλοκο με ολιγονουκλεοτίδιο) τα αμινοξέα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 δημιουργούν μία αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα. Το τρινουκλεοτίδιο συνδέεται σε αυτήν την κοιλότητα. Κατά τη σύνδεση του ολιγονουκλεοτιδίου δεν παρατηρούνται σημαντικές δομικές μεταβολές στα αμινοξέα Asp28, Asp292 και Asp382, ενώ παρατηρείται μία μικρή μετατόπιση της θέσης του Glu30. Οι παρατηρήσεις αυτές συνάδουν με τη διαπίστωση ότι τα τέσσερα αυτά κατάλοιπα δεν απαιτούνται για την σταθεροποίηση του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος.

Συγκριτική δομική ανάλυση έδειξε ότι τα αμινοξέα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 του συμπλόκου PARN-RNA μπορούν να ευθυγραμμιστούν χωροταξικά με τα αμινοξέα της ενεργής θέσης Asp12, Glu14, Asp103 και Asp167 στο σύμπλοκο ε186-TMP, με μικρές διαφορές στις θέσεις των μόνο των ατόμων της πλευρικής αλυσίδας. Τα μεταλλικά ιόντα που λείπουν μπορούν ενδεχομένως να καταλαμβάνουν θέσεις παρόμοιες με αυτές των δύο ιόντων Mg^{2+} στο σύμπλοκο ε186-TMP. Το αμινοξύ His162 της ε186, το οποίο προτάθηκε πως έχει ένα παρόμοιο ρόλο με αυτό της Tyr497 στην περιοχή εξωνουκλεάσης της Pol I, αντιστοιχεί χωροταξικά στο αμινοξύ His377 της PARN, επιβεβαιώνοντας ότι η PARN ανήκει στην DEDDh υπεροικογένεια. Σύμφωνα με το ρόλο της His377 στην κατάλυση, η αντικατάσταση της His377 με Ala στην PARN(1-537), αναστέλλει την

δραστικότητα της PARN, δείχνοντας ότι η His377 είναι ουσιαστικής σημασίας για την καταλυτική δράση της PARN⁹.

Αν και δεν υπάρχουν μεταλλικά ιόντα στις ενεργές θέσεις των δομών της PARN, βιοχημικά πειράματα και μελέτες μεταλλαξιγένεσης δείχνουν ότι τα αμινοξέα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 συμμετέχουν στον συντονισμό των μεταλλικών ιόντων. Η υψηλή ομοιότητα των δομών των ενεργών θέσεων μεταξύ της PARN και της ε186, υποδηλώνει ότι τα πέντε συντηρημένα αμινοξέα στα δύο αυτά ένζυμα έχουν τους ίδιους καταλυτικούς ρόλους, καθώς και ότι οι καταλυτικοί μηχανισμοί των δύο αυτών ενζύμων είναι πανομοιότυποι.

ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ PARN

Στα θηλαστικά κύτταρα η δραστικότητα της PARN αναστέλλεται από την πρωτεΐνη Pab1p, η οποία δεσμεύεται στην poly(A) περιοχή. Οι αμινογλυκοσίδες και τα φυσικά νουκλεοτίδια είναι από τα λίγα μόρια που έχουν ως τώρα αναφερθεί ως ρυθμιστές της PARN. Κινητικές αναλύσεις έδειξαν ότι η αναστολή της PARN είναι συναγωνιστική και δεν επηρεάζεται από μεταβολές στη συγκέντρωση των ιόντων Mg²⁺. Επιπλέον η αντικατάσταση λειτουργικών ομάδων των σακχάρων μπορεί να ενισχύσει σημαντικά το αποτέλεσμα αναστολής, αφού διαφαίνεται ότι αυτές είναι που σταθεροποιούν τα νουκλεοτίδια στο ενεργό κέντρο αλληλεπιδρώντας με καταλυτικά αμινοξικά κατάλοιπα. Αξιοσημείωτα ήταν τα αποτελέσματα αναστολής σε διάφορες καρκινικές σειρές, υποδεικνύοντας έτσι ότι η PARN μπορεί να δράσει θεραπευτικά μειώνοντας το διαθέσιμο mRNA¹².

Σε μια προσπάθεια αναζήτησης τελεστών της PARN ανάμεσα στα φυσικά της υποστρώματα αποδείχθηκε ότι πολλά νουκλεοτίδια πουρινών μπορούν να ελαττώσουν την ενζυμική αποικοδόμηση της πολυ(A) ουράς. Κινητικές αναλύσεις αποδεικνύουν ότι τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια (RTP) συμπεριφέρονται ως μη συναγωνιστικοί αναστολείς ενώ RDP και RMP δείχνουν συναγωνιστική αναστολή. Ιόντα Mg²⁺ μπορούν να άρουν την αναστολή από RTP και RDP αλλά όχι από RMP. Προτείνεται έτσι μια νέα

⁹ Βλ. βιβλιογραφία: Wu M et al. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN.

στρατηγική για τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας της PARN από μικρά μόρια τελεστές όπως τα νουκλεοτίδια¹³.

Η PARN ρυθμίζεται αλλοστερικά από ιόντα K^+ και ανάλογα του καλύμματος που έχουν θέσεις πρόσδεσης στην RRM περιοχή. Η πρόσδεση ιόντων K^+ αυξάνει την συνάφεια σύνδεσης του υποστρώματος αλλά μειώνει την αποτελεσματικότητα της κατάλυσης ενώ η σύνδεση αναλόγων καλύμματος προκαλεί ελάττωση και των δύο. Ο αλλοστερισμός είναι σημαντικός για την επίτευξη πολυεπίπεδης ρύθμισης του ενζύμου και ακρίβειας στον έλεγχο του μήκους της πολυ(A) ουράς¹⁴.

Έχει αποδειχθεί ότι η PARN εκτός από poly(A) μπορεί το ίδιο αποτελεσματικά να αποδομήσει poly(U), περίπου 10 φορές λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με τις poly(A). Η ικανότητα αποδόμησης poly(U) της PARN μπορεί να έχει βιολογική σημασία αφού ουρές oligo(U) έχουν πρόσφατα βρεθεί να παίζουν ρόλο σταθεροποίησης και αποσταθεροποίησης του RNA¹⁵.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΠΟΥ ΚΑΤΕΥΘΥΝΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ

Ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός αναστολέων και άλλων φαρμάκων με χρήση υπολογιστικών μεθόδων και σε συνεργασία με εργαστήρια φαρμακευτικής χημείας αποτελεί σήμερα ένα σημαντικότερο τομέα της φαρμακευτικής έρευνας. Η σύγχρονη προσέγγιση του μοριακού σχεδιασμού φαρμάκων βασίζεται στην τρισδιάστατη δομή των βιολογικών μακρομορίων (πρωτεϊνικών στόχων) με φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Οι μικρομοριακές χημικές ενώσεις (εν δυνάμει φάρμακα) συνδέονται σε ειδικά κέντρα βιολογικών μακρομορίων που εμπλέκονται σε ασθένειες και ρυθμίζουν τη βιολογική τους δράση προς την επιθυμητή κατεύθυνση. Εφόσον η 3D δομή, δηλαδή ο τρόπος σύνδεσης και αλληλεπίδρασης των μικρομοριακών ενώσεων, είναι γνωστή, μπορούν να σχεδιαστούν νέα φάρμακα με μεγάλη ακρίβεια, ταχύτερα, οικονομικότερα και με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Σήμερα, χάρις στην τεχνολογική πρόοδο στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, στον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό NMR και γενικότερα στη δομική πρωτεομική, οι 3D δομές νέων πρωτεϊνών

προσδιορίζονται με μεγάλη ταχύτητα. Η μέθοδος σχεδιασμού φαρμάκων με βάση τη μοριακή δομή προβλέπεται να έχει ευρύτερη εφαρμογή στο μέλλον.

Ο σχεδιασμός φαρμάκων που κατευθύνεται από τη δομή αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι των περισσότερων ερευνητικών προγραμμάτων παραγωγής φαρμάκων. Ο ιδανικότερος στόχος για κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκου είναι ένα μακρομόριο που σχετίζεται στενά με την ανθρώπινη ασθένεια και η δράση του είναι αναγκαία για την εμφάνιση της ασθένειας. Έτσι, διάφορα κατάλληλα σχεδιασμένα μικρά μόρια θα πρέπει να συνδέονται στο μακρομόριο και να αναστέλλουν αποτελεσματικά τη λειτουργία του. Ο βιολογικός στόχος για τα περισσότερα φάρμακα είναι μια πρωτεΐνη. Έχουν όμως αναφερθεί και άλλοι φαρμακευτικοί στόχοι όπως λιπίδια ή πρωτεολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και νουκλεϊνικά οξέα.

Οι τεχνικές της μοριακής βιολογίας έδωσαν την δυνατότητα έτσι ώστε να παράγονται μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης-στόχου ιδιαίτερα ανθρώπινων μέσω της ετερόλογης έκφρασης σε βακτήρια. Οι μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού των πρωτεϊνών βελτιώνονται και αυτές συνεχώς χάρη στις σύγχρονες αυτοματοποιημένες μεθόδους υγρής χρωματογραφίας. Έτσι, βελτιωμένα συστήματα υπερέκφρασης και απομόνωσης πρωτεϊνών διευκολύνουν σήμερα, την παραγωγή διαφόρων μορφών μίας πρωτεΐνης όπως π.χ. μεταλλαγμένων μορφών ή επισημασμένων με C13 ή N15 οι οποίες χρειάζονται για τον προσδιορισμό της μακρομοριακής δομής με φασματοσκοπία NMR. Επίσης, η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, η πλέον διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής μακρομορίων, εμφανίζει τα τελευταία χρόνια αλματώδη ανάπτυξη λόγω της χρήσης ειδικών ρομπότ για την ανάπτυξη κρυστάλλων, της διαθεσιμότητας πηγών ακτίνων-Χ μεγάλης ισχύος, καθώς και της ανακάλυψης τεχνικών ψύξης των κρυστάλλων σε θερμοκρασία 100 K.

Όλες αυτές οι ανακαλύψεις έχουν σαν αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του αριθμού των πρωτεϊνών για τις οποίες γνωρίζουμε σήμερα την τρισδιάστατη δομή τους. Έτσι σήμερα βρίσκονται κατατεθειμένες περισσότερες από 59000 δομές πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων στη διεθνή βάση πρωτεϊνικών δομών (RSCB PDB).

Κάτι το οποίο δεν πρέπει να ξεχνάμε είναι ότι ο προσδιορισμός της δομής αποτελεί ένα πολύ μικρό κομμάτι της συνολικής διαδικασίας που ακολουθείται για την δημιουργία ενός φαρμάκου. Υπάρχει αρκετός δρόμος από την ανακάλυψη ή τον σχεδιασμό ενός στενά συνδεδεμένου μορίου μιας πρωτεΐνης-στόχου και της εμπορικής διαθεσιμότητας ενός φαρμάκου. Σημαντικά και χρονοβόρα προβλήματα, όπως ο μεταβολισμός, η τοξικότητα, η διαθεσιμότητα, η σταθερότητα και οι τυχόν παρενέργειες πρέπει να αντιμετωπισθούν προκειμένου να κριθεί κατάλληλο προς χρήση ένα φάρμακο Ένας αναστολέας, που με επιτυχία ανακαλύφθηκε και σχεδιάστηκε μπορεί να είναι αρκετά τοξικός, να μεταβολίζεται και να απεκκρίνεται γρήγορα, να προκαλεί τερατογένεση, να έχει υψηλό κόστος παραγωγής κ.ά.

Τα κριτήρια για να επιτραπεί μια καινούργια ένωση να χορηγηθεί σε πληθυσμούς ατόμων είναι αρκετά αυστηρά και αυτός είναι ο λόγος που τα περισσότερα εν δυνάμει φάρμακα δεν φτάνουν στις προθήκες των φαρμακείων. Επομένως, απαιτούνται χρόνια έρευνας ώστε ένα εν δυνάμει φαρμακευτικό μόριο να μετατραπεί σε φαρμακευτικό σκεύασμα¹⁶.

ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μερικές από τις πρώτες εφαρμογές της γενετικής μηχανικής στα βακτήρια ήταν η βιοσύνθεση πρωτεϊνών που έχουν βιοτεχνολογικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Το DNA του ανθρώπου αλλά και άλλων οργανισμών είναι δυνατό να εκφράζεται σε βακτηριακά κύτταρα. Έτσι άνοιξε ο δρόμος της βιομηχανικής παραγωγής πρωτεϊνών, ορμονών και άλλων ουσιών.

Οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα για την παραγωγή πρωτεϊνών. Καλλιεργούνται εύκολα, τροποποιούνται γενετικά σχετικά εύκολα και οι καλλιέργειες τους καταλαμβάνουν μικρό χώρο. Από τους μικροοργανισμούς, το βακτήριο *E.coli* χρησιμοποιείται κυρίως για τη βιοσύνθεση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, γιατί παρουσιάζει αρκετά πρόσθετα πλεονεκτήματα: Η γενετική σύσταση του βακτηρίου είναι πού καλά γνωστή, έχει αποκρυπτογραφηθεί πλήρως το γονιδίωμά του, μπορεί να επιδιωχθεί η βιοσύνθεση μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών και είναι γνωστά τα βιοχημικά μονοπάτια της δράσης πολλών ενζύμων.

Πολλές πρωτεΐνες φαρμακευτικού ή βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος εκφράζονται φυσιολογικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, μπορεί να παραχθεί μια πολύ μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών. Αυτό περιλαμβάνει την εισαγωγή του γονιδίου που εκφράζει την επιθυμητή πρωτεΐνη σε ένα πλασμίδιο, που περιέχει έναν υποκινητή έτσι ώστε η πρωτεΐνη να εκφραστεί και στη συνέχεια την είσοδο του πλασμιδίου στο βακτήριο.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ και ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η απομόνωση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών είναι ουσιαστικά το πρώτο βήμα για την κατανόηση της λειτουργίας τους. Ξεκινώντας με καθαρές πρωτεΐνες μπορούμε να προσδιορίσουμε την αλληλουχία των αμινοξέων της και να ερευνήσουμε τη βιοχημική της λειτουργία. Ακόμη, μπορούμε να την κρυσταλλώσουμε και έτσι να αποκτήσουμε στοιχεία από μελέτες με ακτίνες X που μας δίνουν την εικόνα της τριτοταγούς δομής, η οποία αποτελεί και το πραγματικό λειτουργικό πρόσωπο μιας πρωτεΐνης.

Η απομόνωση θα δώσει ένα δείγμα πρωτεΐνης που θα περιέχει μόνο την πρωτεΐνη για την οποία ενδιαφέρεται ο βιοχημικός σε καθαρότητα μεγαλύτερη από 95%. Το δείγμα μπορεί να είναι μόνο το 1% του αρχικού υλικού, είτε το υλικό είναι κύτταρα σε καλλιέργεια είτε ένα συγκεκριμένο όργανο φυτού ή ζώου. Ο βιοχημικός χρειάζεται έναν τρόπο να αναγνωρίζει την πρωτεΐνη και ο τρόπος αυτός ονομάζεται δοκιμασία (assay). Ο προσδιορισμός της κατάλληλης δοκιμασίας είναι συχνά δύσκολος, όσο πιο εξειδικευμένη όμως είναι η δοκιμασία τόσο πιο αποτελεσματικός γίνεται ο καθαρισμός.

Για να καθαρίσουμε μια πρωτεΐνη πρέπει αρχικά να την απομονώσουμε από το κύτταρο. Τα πρωτόκολλα καθαρισμού αποφασίζονται με δοκιμές και, με βάση προηγούμενες εμπειρίες. Στο πρώτο στάδιο ομογενοποιείται το δείγμα, καταστρέφοντας την κυτταρική μεμβράνη. Στη συνέχεια το μείγμα κλασμάτωναται με φυγοκέντρηση, δίνοντας ένα ίζημα στον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα και ένα διαλυτό υπερκείμενο επάνω από το ίζημα. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται και πάλι σε μεγαλύτερη ταχύτητα και διαχωρίζεται σε νέο ίζημα και νέο υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή, που ονομάζεται διαφορική φυγοκέντρηση, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία

κλασμάτων ελαττούμενης πυκνότητας τα οποία περιέχουν χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες και τα οποία δοκιμάζονται για την δραστικότητα που προσπαθούμε να απομονώσουμε. Συνήθως ένα κλάσμα θα έχει αυξημένη δραστικότητα και αυτό θα χρησιμοποιηθεί για τον περαιτέρω καθαρισμό με άλλες πιο ευαίσθητες τεχνικές.

Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν βάσει της διαλυτότητας, του μεγέθους, του φορτίου και της δεσμευτικής συγγένειας για άλλα μόρια. Σε κάθε στάδιο καθαρισμού το παρασκεύασμα δοκιμάζεται και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Για να προσδιορίσουμε την τριτοταγή δομή και τον μηχανισμό δράσης απαιτείται αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης σε επίπεδο χιλιοστών του γραμμαρίου (mg). Επομένως, η συνολική απόδοση στην απομόνωση μίας πρωτεΐνης είναι σημαντικός παράγοντας σε ένα πρωτόκολλο καθαρισμού.

Αφού η πρωτεΐνη έχει υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία ακολουθεί ο καθαρισμός του πρωτεϊνικού διαλύματος με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας στήλης. Η προεπεξεργασία είναι συνήθως τέτοια, ώστε το ενζυμικό διάλυμα να μην περιέχει αδιάλυτα συστατικά, να έχει χαμηλό ιξώδες και να έχει κατάλληλα ρυθμισμένους τους παράγοντες pH, ιοντική ισχύ, θερμοκρασία και σταθεροποιητές της ενζυμικής δραστικότητας

ΣΤΑΔΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής ενός βιολογικού μακρομορίου είναι ένα πολύ δύσκολο πρόβλημα. Ενδεικτικά αναφέρουμε τα διάφορα στάδια για τη 'λύση' της δομής μιας πρωτεΐνης:

Απομόνωση –καθαρισμός: Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η απομόνωση του μακρομορίου και η λήψη μιας καθαρής ποσότητας της τάξης των mg.

Κρυστάλλωση: Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η κρυστάλλωση του μακρομορίου, π.χ. της πρωτεΐνης, για να ληφθούν διαγράμματα περίθλασης πολύ καλής ποιότητας. Αυτό είναι ένα πολύ δύσκολο στάδιο, γιατί κάθε πρωτεΐνη παρουσιάζει ιδιαιτερότητες και απαιτούνται πολλές προσπάθειες μέχρι να επιτευχθεί η βέλτιστη κρυστάλλωση (μικρή διάσταση κρυστάλλου, απουσία 'προσμίξεων' ή άλλων ελαττωμάτων στο πλέγμα).

Στο στάδιο αυτό παρασκευάζονται και παράγωγα του μακρομορίου με 'βαριά' άτομα, ισόμορφα της φυσικής δομής του κρυστάλλου.

Περίθλαση ακτίνων-Χ (συλλογή-καταγραφή διαγραμμάτων περίθλασης): Στο στάδιο αυτό καταγράφονται τα διαγράμματα περίθλασης των κρυστάλλων και τουλάχιστον δύο ισόμορφων παραγώγων τους, αρχίζοντας από χαμηλή διακριτική ικανότητα ($\sim 5 \text{ \AA}$) και φθάνοντας σε καλύτερες τιμές διακριτικής ικανότητας της τάξης του μεγέθους των χημικών δεσμών ($\sim 2 \text{ \AA}$).

Παραγωγή χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας: Στο στάδιο αυτό γίνεται πρώτα ο προσδιορισμός των ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων με τη βοήθεια της ανάλυσης Fourier και υπολογιστή. Έπειτα γίνεται η αναπαράσταση σε χώρους δύο και τριών διαστάσεων των ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων που έχουν υπολογισθεί (χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας) που δίνει μια στερεοσκοπική άποψη του μακρομορίου.

Ερμηνεία των χαρτών-βελτιστοποίηση της δομής: Στο στάδιο αυτό συνδυάζονται οι πληροφορίες που δίνει ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας με αυτές της δευτεροταγούς και πρωτοταγούς δομής του μακρομορίου για να κατασκευαστεί ένα ατομικό ή μοριακό μοντέλο. Στη συνέχεια ακολουθούν διορθώσεις της δομής, με διαδοχικές συσχετίσεις με διάφορους συντελεστές ακριβείας, που καταλήγουν στη βελτίωση της προτεινόμενης δομής. Η αύξηση της υπολογιστικής ικανότητας των σύγχρονων ηλεκτρονικών υπολογιστών έχει συμβάλει θεαματικά στην επιτάχυνση των διαδικασιών ερμηνείας - βελτίωση της δομής των μακρομορίων και στην ανάπτυξη ευκολότερου στη χρήση λογισμικού για την τεχνική της περίθλασης των ακτίνων-Χ σε βιοδομές.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το σύνολο των πειραματικών εργασιών που περιγράφονται παρακάτω είχε σκοπό τη σχεδίασμό ενός πρωτοκόλλου έκφρασης για την κολοβωμένη (truncated) μορφή της ανθρώπινης PARN (PARNt ή PARN[1-523]) που θα παράγει αρκετή πρωτεΐνη για περαιτέρω καθαρισμό και αργότερα δομικές μελέτες. Η PARNt, κολοβωμένη στο C-τελικό άκρο της, περιέχει την περιοχή νουκλεάσης, την R3H περιοχή και την περιοχή δέσμευσης του καλύμματος έχει πλήρη ενζυμική δραστικότητα και ικανότητα δέσμευσης m^7GTP Sepharose¹⁰. Από την PARNt λείπουν μόνο μη συντηρημένες περιοχές και είναι δυνατή η αυξημένη παραγωγή της με χαμηλά επίπεδα επιμολύνσεων σε βακτήρια. Επιπλέον η PARNt διαθέτει ακολουθία 6 καταλοίπων ιστιδίνης για την πρόσδεσή της σε στήλη Νικελίου και συνεπώς για αποτελεσματικότερο καθαρισμό της.

¹⁰ Βλ. βιβλιογραφία: Wu M et al. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ *PARNtruncated* (*PARNt*)

Έγιναν μελέτες με μεταβολή των παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την παραγωγή της *PARNt* από ανασυνδυασμένους μικροοργανισμούς όπως:

Κυτταρικές σειρές *E.coli*: Δοκιμάστηκαν οι BL21 (DE3), BL21 STAR (DE3), B834 (DE3) και B834pLysS (DE3).

Υλικά καλλιέργειας: Terrific Broth (TB) και Lysogeny Broth (LB).

Θερμοκρασίες καλλιέργειας: 18°C και 37°C.

Συγκεντρώσεις IPTG: από 0,1mM έως 1mM.

Όγκοι καλλιέργειας: από 50ml μέχρι 2lt.

Ανανέωση υλικών (media refreshment)

Το πλασμίδιο με το φορέα έκφρασης pET15b που περιείχε το *PARNt* γονίδιο μετασχηματίστηκε σε κύτταρα DH5a για να γίνει η απομόνωση του πλασμιδίου ενώ η λειτουργικότητά του ελέγχθηκε μετά από μετασχηματισμό στα B834pLysS κύτταρα. Τα τελευταία μάλιστα φαίνεται να δίνουν ικανοποιητική υπερέκφραση της *PARNt* σε συνθήκες που περιγράφονται στο 10^ο πείραμα.

Έγιναν απόπειρες καθαρισμού με στήλες Νικελίου, ιοντοανταλλαγής και συγγένειας. Παραδόξως η *PARNt* δεν στάθηκε δυνατό να δεθεί σε στήλη Ni. Υποθέτουμε ότι υφίσταται κάποιου είδους πρωτεόλυση που διαχωρίζει το μεγαλύτερο πρωτεϊνικό τμήμα από ένα μικρότερο που φέρει τις ιστιδίνες. Το μικρό αυτό τμήμα εμφανίζεται συχνά μαζί με την *PARNt* στις ηλεκτροφορήσεις, ενώ είναι το μόνο που καταφέραμε να πάρουμε ως έκλουσμα από τις στήλες Ni (βλ. πείραμα 10.4). Περνώντας τα κυτταρικά λύματα από την ιοντοανταλλακτική στήλη HiTrap Q πήραμε σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης.

ΥΛΙΚΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

1•Terrific broth (TB) – 1lt

	12gr tryptone		
A)	24gr yeast extract	B)	12,54gr K ₂ HPO ₄
	4ml glycerol		2,31gr KH ₂ PO ₄
	+900ml ddH ₂ O		+100ml ddH ₂ O

Τα Α) και Β) αποστειρώνονται σε μπουκάλια και αναμιγνύονται μετά την αποστείρωση για να αποφευχθεί ο σχηματισμός ιζήματος των αλάτων.

2•Lysogeny Broth (LB) Agar*

10gr Tryptone
10gr NaCl
5gr Yeast Extract
15gr Agar

3•Extraction buffer pH 7.9

20mM HEPES
0.5M KCl
0.5% TRITON-X 100[†]
10% glycerol[‡]
2 mM β-mercaptoethanol[§]
2.5 mM imidazole^{**}

* Παραλείποντας τη σκόνη του άγαρ παρασκευάζουμε τον αντίστοιχο ζωμό.

[†]T-atylphenoxypropylglyoxyethanol. Βοηθά στη διαλυτοποίηση των μεμβρανών. Προστίθεται μετά την ρHμέτρηση. Εναλλακτικά μπορεί να προστεθεί NP40.

[‡] Προστίθεται μετά την ρHμέτρηση διότι λόγω αυξημένου ιξώδους τη δυσχεραίνει.

[§] Αντιοξειδωτικός παράγοντας. Προστίθεται λίγο πριν τη χρήση.

^{**} Ανεβάζει το ρH. Για το λόγο αυτό καταφεύγουμε σε νέα ρHμέτρηση μετά την προσθήκη του.

4•Wash buffer

20mM HEPES pH 7.9

0.5M KCl

10% glycerol

5 mM imidazole

5•Elution buffer

20mM HEPES pH 7.9

0.5M KCl

10% glycerol

150mM imidazole^{††}

6•Equilibration buffer D^{††}

20mM HEPES pH 7.0

0.2mM EDTA

10% glycerol

7•Equilibration buffer D2^{§§}

20mM HEPES pH 7.0

0.2mM EDTA

10% glycerol

300mM KCl

8•Lysis Buffer

Filtered Extraction Buffer με lysozyme 1mg/ml και benzonase 1μl/10ml.

^{††} Το ρυθμιστικό διάλυμα D – όπως και κάθε ρυθμιστικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί στην Äkta- φιλτράρεται προηγουμένως και απερώνεται.

^{§§} Ουσιαστικά πρόκειται για ρυθμιστικό διάλυμα D στο οποίο προστέθηκε KCl.

▪Separating Gel (πήκτωμα) 8%

4,6ml HPLC water
2,5ml Tris 1,5M, pH5,8
0,1ml SDS 10%
0,1ml ammonium persulfate 10%
0,006ml TEMED
2,7ml acrylamid mix 30%

▪ Separating Gel 10%

4ml HPLC water
2,5ml Tris 1,5M, pH5,8
0,1ml SDS 10%
0,1ml aps 10%
0,004ml TEMED
3,3ml acrylamid mix 30%

▪Stacking Gel 5%

3,4ml HPLC water
0,63ml Tris 1M pH6,8
0,05ml sds 10%
0,05ml aps 10%
0,005ml TEMED
0,83ml acrylamid mix 30%

▪Πήκτωμα αγαρόζης 1%

100ml TBE (Tris Boric EDTA)
1gr Agarose

Τα υλικά ζεσταίνονται σε κωνική φιάλη μέχρι διάλυσης της αγαρόζης. Λίγο πριν τη χρήση προστίθεται 1μl Ethidium Bromide/30ml υλικού.

▪Δ/μα HEPES 0,5M, pH7,9

[N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N-2-ethane sulfonic acid / $C_8H_{18}N_2O_4S$ Mr=238,3]. Για την παρασκευή χρησιμοποιήθηκε HPLC water.

- Δ/μα IPTG 0,1M [Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside]
- Δ/μα KCl 2M παρασκευασμένο με HPLC water
- Ampicillin stock 50mg/ml
- PhenylMethylSulphonyl Fluoride/PMSF(stock=100mM)
- Lysozyme 0,125% w/v
- Kanamycin (stock=10mg/ml)
- Benzonase

ΟΡΓΑΝΑ-ΥΛΙΚΑ:

Ζυγός	Orma(Italy)
Κυψελίδες	Hellma QS(Hellma, Germany) Οπτική διαδρομή 1cm
Πεχάμετρο	Metrohm 691 (Metrohm, Switzerland)
Πιπέτες	Gilson P1000-P10 (Gilson,France)
Φασματοφωτόμετρο	Carry1E(Varian,USA).Ορατού-υπεριώδους
Υπερφυγόκεντρος	Beckman (Beckman, Germany)
Φυγόκεντρος	Centurion Scientific Ltd
Σύστημα υγρής χρωματογραφίας	ÄKTA purifier



Εικόνα 9. Σύστημα χρωματογραφικού καθαρισμού για πρωτεΐνες και πεπτιδία ÄKTApurifier™ (πηγή: <http://www.gelifesciences.com>).

1. Καλλιέργειες, Συλλογή και Λύση Κυττάρων BL21 για καθαρισμό της PARNt.

Για την ετερόλογη έκφραση της PARNtrunc, χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη κυτταρική σειρά της *Escherichia coli* BL21(DE3) με πλασμιδίο pET33 που περιέχει το γονίδιο για την PARN. Οι καλλιέργειες εμβολιάστηκαν και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο TB υπό επιλογή αντιβιοτικού (ampicillin) ώστε να εξασφαλιστεί η επιβίωση των πλασμιδιακών φορέων. Γενικά, η παρουσία του αντιβιοτικού οδηγεί σε επιλεκτική πίεση. Κάτι τέτοιο είναι σημαντικό διότι τα κύτταρα τείνουν να χάνουν το πλασμιδίό τους κατά την κυτταροδιαίρεση.

1.1. Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιεργειών

Σε 50ml TB που περιέχουν αμπικιλίνη 50μgr/ml για την αποφυγή επιμολύνσεων της καλλιέργειας και την επιλογή των φορέων του πλασμιδίου ενοφθαλμίστηκαν 500μlτ καλλιέργειας φορέων του πλασμιδίου για έκφραση RNase PARN^{***}. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για μια νύχτα^{†††} στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση 220rpm.

1.2. Προετοιμασία μεγάλων καλλιεργειών E. Coli

Παρασκευάστηκαν 4 μεγάλες καλλιέργειες ~500ml TB που περιείχαν 50μgr/ml αμπικιλίνη και 10ml από την μικρή εναρκτήρια καλλιέργεια. Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν στους 37°C, υπό ανάδευση 220rpm μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα $OD_{600nm}=0,6$ έναντι τυφλού-δ/τος TB (πρώτη μέτρηση μετά από 1 ώρα). Μετά από συνολικά 2,5h επώασης βρίσκουμε $OD_{600nm}=0,6$. Σε κάθε καλλιέργεια προσθέσαμε IPTG με τελική συγκέντρωση 1mM το οποίο επάγει την ενεργοποίηση του οπερόνιου της λακτόζης στα βακτήρια. Ακολούθησε 3ωρη επώαση στους 37°C, 220rpm.

1.3. Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων

Μετά την 3ωρη επώαση οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε 5 δοχεία φυγοκέντρου και ισοζυγίζονται με τη βοήθεια ζυγού. Ακολουθεί

^{***} glycerol stock -80°C

^{†††} Περίπου 16-18 ώρες.

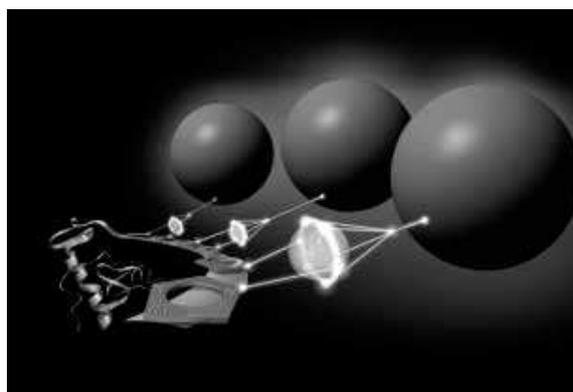
φυγοκέντρηση στις 4500rpm (~3000G) για 20λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα φυλάχθηκε στους -20°C¹⁷.

1.4. Λύση των κυττάρων

Για την λύση των κυττάρων (pellets από τους -20°C) χρησιμοποιήθηκαν <40ml ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (βλ. Υλικά: extraction buffer). Μετά το τέλος της διαλυτοποίησης προσθέσαμε 2μL benzonase κι ακολούθησε ήπια ανακίνηση (rotation) 15λεπτά, 4°C. Αναμένουμε αρχικά να έχει γίνει λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων. Για την αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων, ακολούθησε υπερήχηση σε χαμηλή συχνότητα (6 x10s με διάλλειμα 15s σε πάγο). Επαναλήφθηκε υπερήχηση (λόγω αυξημένου ιξώδους) 2x30sec με διάλλειμα 15s σε πάγο. Ακολούθησε υπερφυγοκέντρηση του δείγματος στις 17500rpm (~27000G) για 1 ώρα, στους 4°C.

1.5. Χρησιμοποιώντας στήλη συγγένειας Νικελίου

Η PARN διαθέτει μια ουρά με 6 His στο N-τελικό άκρο της. Χάρη σ' αυτή συγκρατείται από στήλη με ακινητοποιημένο Ni, (nickel-nitrilotriacetic acid /Ni-NTA), αντίθετα με άλλες πρωτεΐνες. Χρησιμοποιήθηκε στήλη από τη σειρά QIAexpressionist (QIAGEN) το πρωτόκολλο της οποίας διατίθεται στο διαδίκτυο: <http://www.mnstate.edu/provost/QiaExpressionist.pdf>



Εικόνα 10. Αλληλεπίδραση μεταξύ Ni-NTA και μιας 6xHis-tagged πρωτεΐνης (πηγή: QIAGEN Ni-NTA Magnetic Agarose Beads Handbook)

Μετά την υπερφυγοκέντρωση το υπερκείμενο υγρό αναμίχθηκε με αναγεννημένη Ni-NTA agarose^{***} και ανακινήθηκαν για 1 ώρα στους 4°C. Στη συνέχεια, διεξήχθη υγρός χρωματογραφικός διαχωρισμός συγγένειας (His-tag Affinity). Συλλέχθηκε flow through (άδετο στη στήλη) με ροή <0,5ml/min. Το υλικό πλύθηκε με ~15ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης που επίσης συλλέχθηκε. Η έκλουση της πρωτεΐνης έγινε με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σε αυξημένη συγκέντρωση ιμιδαζολίου αφού το ιμιδαζόλιο συναγωνίζεται με την His για τις θέσεις πρόσδεσης στη στήλη Ni και βοηθά στη διάσπαση των δεσμών μεταξύ ιστιδίνης και νικελίου.

Πίνακας 1. Απορροφήσεις των κλασμάτων έκλουσης της στήλης Νικελίου.

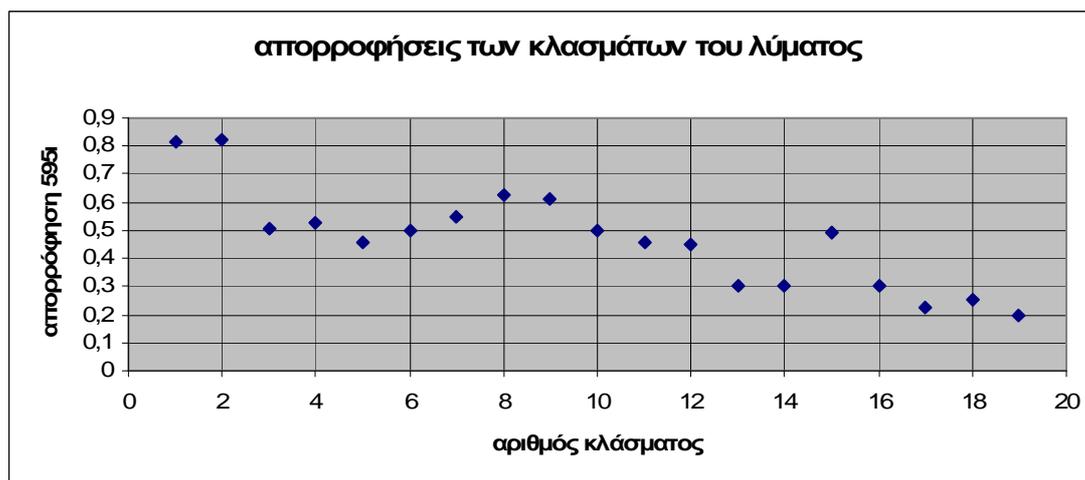
OD ₅₉₅ -κλάσμα 1	0.816
OD ₅₉₅ - κλάσμα 2	0.820
OD ₅₉₅ - κλάσμα 3	0.507
OD ₅₉₅ - κλάσμα 4	0.528
OD ₅₉₅ - κλάσμα 5	0.458
OD ₅₉₅ - κλάσμα 6	0.497
OD ₅₉₅ - κλάσμα 7	0.549
OD ₅₉₅ - κλάσμα 8	0.626
OD ₅₉₅ - κλάσμα 9	0.610
OD ₅₉₅ - κλάσμα 10	0.500
OD ₅₉₅ - κλάσμα 11	0.454
OD ₅₉₅ - κλάσμα 12	0.453
OD ₅₉₅ - κλάσμα 13	0.300
OD ₅₉₅ - κλάσμα 14	0.300
OD ₅₉₅ - κλάσμα 15	0.490
OD ₅₉₅ - κλάσμα 16	0.300
OD ₅₉₅ - κλάσμα 17	0.227
OD ₅₉₅ - κλάσμα 18	0.250
OD ₅₉₅ - κλάσμα 19	0.200

Αυξάνοντας τη συγκέντρωσή του ξεπερνάμε το πρόβλημα της μη ειδικής

***** Χρησιμοποιήσαμε συνολικά ~3ml στήλης για την αναγέννηση της οποίας την ξεπλύναμε με νερό και εν συνεχεία ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής στο οποίο δεν προστέθηκε Triton ούτε mercaptoethanol.

σύνδεσης στη στήλη. Συλλέχθηκαν 19 κλάσματα του 1ml. Με τη μέθοδο Bradford ελέγχθηκε η περιεχόμενη πρωτεΐνη σε κάθε κλάσμα του λύματος φωτομετρώντας στα 595nm^{§§§}. Μηδενική απορρόφηση ορίστηκε αυτή του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης.

Γράφημα 1. Απορρόφηση ανά κλάσμα στα 595nm.



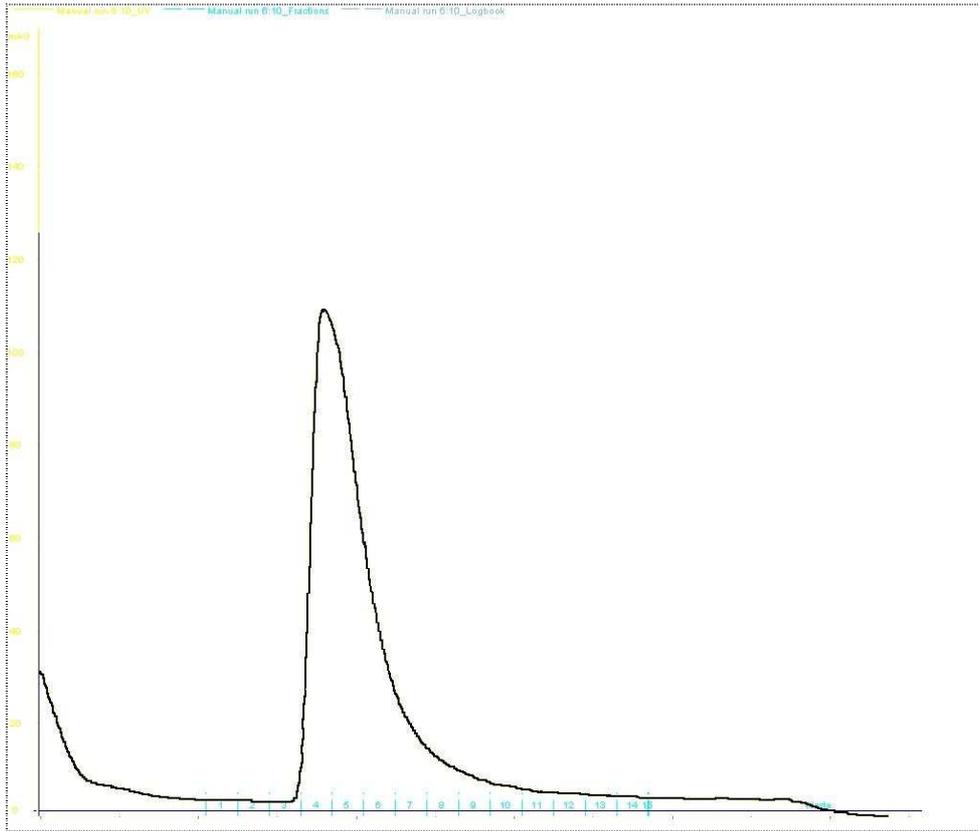
Τα 15 πρώτα aliquots τα οποία όπως φαίνεται και από το γράφημα 1 περιείχαν την μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης τοποθετήθηκαν σε μεμβράνη διαπίδυσης για μία νύχτα έναντι 1000ml Ρυθμιστικού διαλύματος D για την απομάκρυνση της περίσσειας του ιμιδαζολίου.

1.6.Χρησιμοποιώντας στήλη ιοντοανταλλαγής HiTrap QFF(1ml)

Η στήλη HiTrap QFF είναι ισχυρή ιοντοανταλλακτική στήλη με ικανότητα αντιστρεπτής πρόσδεσης φορτισμένων βιομορίων. Η στήλη συνδέθηκε σε σύστημα χρωματογραφίας Äkta και προετοιμάστηκε με χρήση των κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων. Οι περισσότερες από τις διεργασίες έγιναν με ροή ~0,5ml/min. Μετά τη φόρτωση του δείγματος συλλέχτηκε 5ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, 5όγκοι (~5ml) ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης κι έπειτα κλάσματα 1-14/1 ml.

Το χρωματογράφημα που πήραμε είναι το ακόλουθο:

^{§§§} Φωτομετρούμε 50µl από κάθε δείγμα προσθέτοντας 750µl HPLC water και 200λ αντιδραστήριο Bradford.



Εικόνα 11. Χρωματογράφημα της PARN μετά τη στήλη ιοντοανταλλαγής Hi- Trap QFF(1ml)

Με βάση το χρωματογράφημα, η πρωτεΐνη μας βρίσκεται στα κλάσματα 3-10. Τα κλάσματα αυτά τοποθετήθηκαν για διαπίδυση για μία νύχτα έναντι 500ml ρυθμιστικού διαλύματος D για την απομάκρυνση της περίσσειας του ιμιδαζολίου.

Έγινε ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) δειγμάτων από την 1^η και 2^η στήλη στο οποίο οι πρωτεϊνικές ζώνες ήταν πολύ αχνές για να δώσουν πληροφορίες και για το λόγο αυτό το πήκτωμα δεν παρατίθεται.

1.7.Καθαρισμός της PARN χρησιμοποιώντας στήλη συγγενείας 7-methyl-gtp-sepharose^{****}

Πρόκειται για στήλη χρωματογραφίας συγγένειας για καθαρισμό πρωτεϊνών που προσδένουν το κάλυμμα του mRNA ευκαρυωτικών οργανισμών. Στη στήλη χρησιμοποιήσαμε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης D2 (βλ Υλικά), το δείγμα από τη 2^η διαπίδυση (~8ml,

**** GE Healthcare 7-Methyl-GTP-Sepharose™ 4B Ø1cm.

συλλέχθηκε άδετο/flow through) και ~20ml διαλύματος έκπλυσης (συλλέχθηκε ανά ml). Ακολούθησε ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (elution buffer, βλ. υλικά) και συλλέχθηκαν κλάσματα E1-E25/ml.

Έγινε ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE⁺⁺⁺⁺) των ακόλουθων δειγμάτων: έκλουσμα 1^{ης} στήλης, 2^{ης} στήλης και φόρτωμα 3^{ης} στήλης στο οποίο οι πρωτεϊνικές ζώνες ήταν πολύ αχνές για να δώσουν πληροφορίες και για το λόγο αυτό το πήκτωμα δεν παρατίθεται.

1.8. Υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κατά τον καθαρισμό.

Με Bradford υπολογίζονται οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

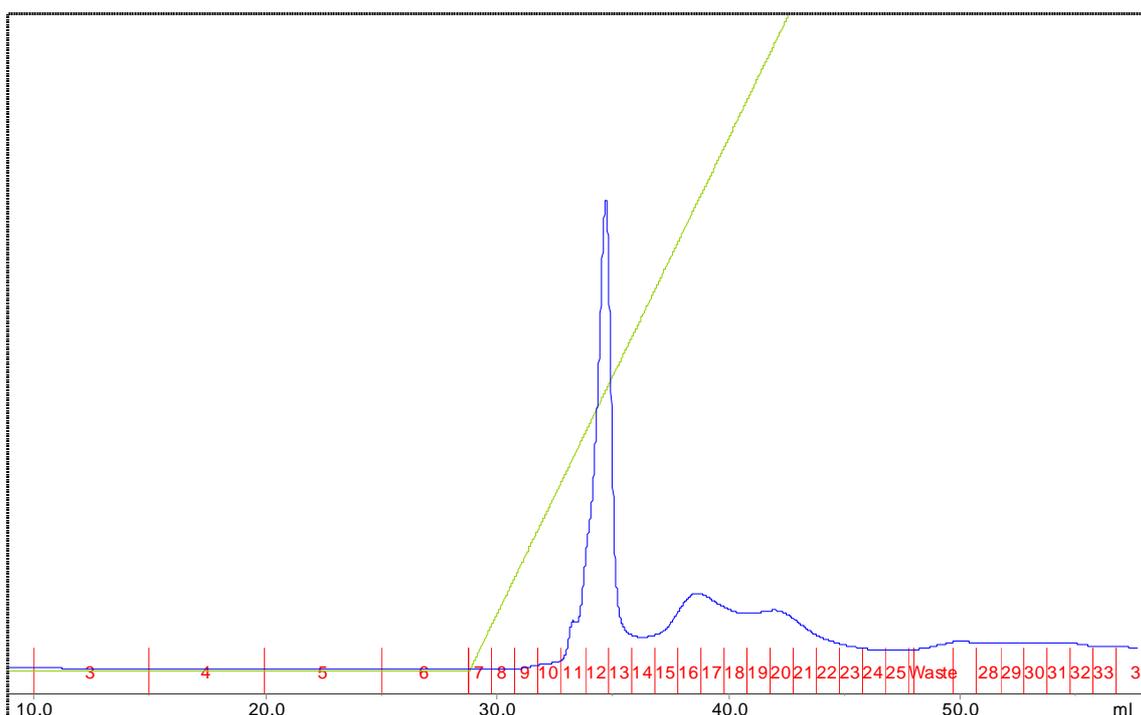
Πίνακας 2. Πρόοδος του καθαρισμού με τη χρήση χρωματογραφικών συστημάτων.		
Υλικό	όγκος	ολική πρωτεΐνη
Δείγματα 1-15 από 1 ^η διαπίδυση μετά την 1 ^η στήλη	15ml	3,27mg
Έκλουσμα 2 ^{ης} στήλης κλάσματα 3-10	~8ml	1,33mg
Δείγματα 3-10 από 2 ^η διαπίδυση μετά τη 2 ^η στήλη	~8ml	1,4mg
Εκ νέου δείγμα μετά τη 2 ^η διαπίδυση	~8ml	1,1mg
Έκλουσμα 3 ^{ης} στήλης, κλάσματα 1-5	~5ml	0,1mg
Δείγματα του wash 3 ^{ης} στήλης, κλάσματα 1-5	~5ml	0,2mg
Flow through 3 ^{ης} στήλης	~8ml	0,85mg

Συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνης δεν προσδέθηκε στην 3^η στήλη αλλά πέρασε στο flow through. Συμπυκνώνουμε το τελευταίο με 5 λεπτά φυγοκέντρηση 7000rpm, 4°C σε σωλήνα φυγοκέντρησης με φίλτρο nivaspin4. Όταν ο όγκος του συμπυκνώματος γίνει 0,5ml με Bradford υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε: 1,6mg/ml ή 0,83mg.

⁺⁺⁺⁺ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

1.9.Χρησιμοποιώντας στήλη ιοντοανταλλαγής HiTrap QFF(1ml) για σταδιακή έκλουση

Χρησιμοποιήθηκε εκ νέου η στήλη HiTrap QFF με νέες ρυθμίσεις για σταδιακή και ίσως πιο αποτελεσματική έκλουση της πρωτεΐνης. Ως φόρτωμα χρησιμοποιήθηκε το συμπύκνωμα που αραιώθηκε με Ρυθμιστικό διάλυμα D στα 10ml. Η ροή έκλουσης ρυθμίστηκε στα 0,35ml/min. Πήραμε το ακόλουθο χρωματογράφημα:



Εικόνα 12. Χρωματογράφημα της PARN μετά τη σταδιακή έκλουση από τη στήλη ιοντοανταλλαγής Hi- Trap QFF(1ml)

Στο γράφημα παρατηρείται μια έντονη κορυφή μεταξύ των κλασμάτων 11 και 14 κι ακολούθως μέχρι το 23 λιγότερο έντονες κορυφές. Φυλάχθηκαν τα ακόλουθα aliquots: 11, 12, 13, 16, 17, 18, 20, 21, 23.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) για κάθε ένα από αυτά στην οποία δεν ανιχνεύτηκαν πρωτεϊνικές ζώνες στο επιθυμητό ύψος.

2. Καλλιέργειες BL21 για έλεγχο στους 37°C και τους 18°C.

Έγινε έλεγχος σε δύο θερμοκρασίες για να ελεγχθεί ενδεχόμενη μεταβολή στην επαγωγή της πρωτεϊνικής παραγωγής σε κάποια από τις δύο

συνθήκες. Από διάλυμα αποθήκευσης γλυκερόλης *E.coli BL21(DE3)* με το πλασμιδίο της PARNt εμβολιάζεται τρυβλίο LB Agar με αμπικιλίνη 50mg/ml που επώαστηκε για μια νύχτα στους 37°C.

2.1. Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιέργειών

Σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες μοιράστηκαν 50ml TB που περιείχαν αμπικιλίνη 50μg/ml για την αποφυγή επιμολύνσεων της καλλιέργειας και την επιλογή των φορέων του πλασμιδίου. Σε κάθε σωλήνα ενοφθαλμίστηκε από 1 καλλιέργεια από το τρυβλίο LB. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για μια νύχτα στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση 220rpm.

2.2. Προετοιμασία μεγάλων καλλιέργειών E. Coli

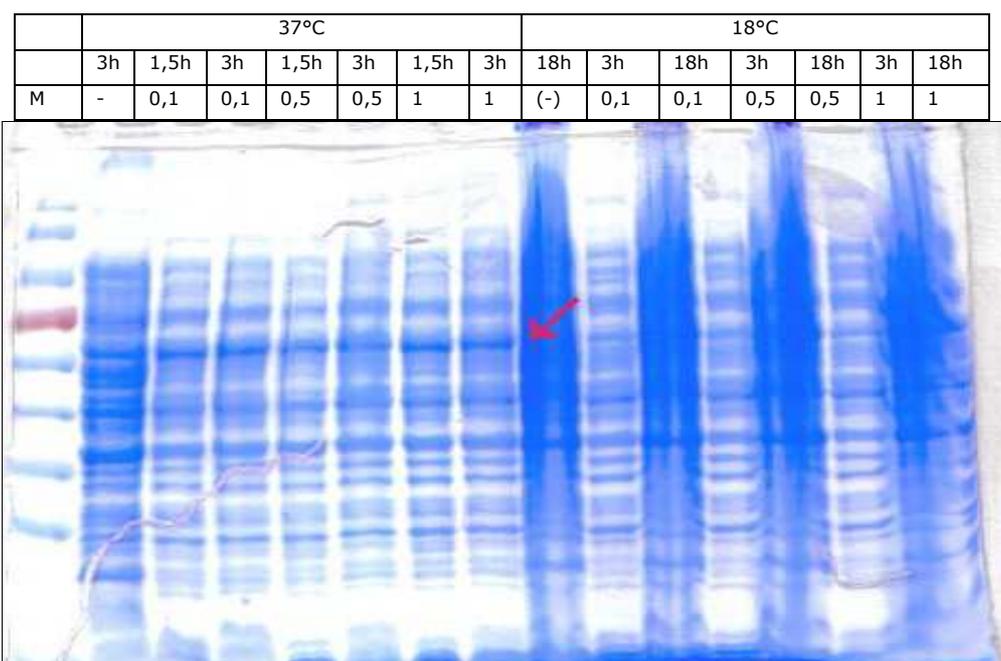
Την επομένη παρασκευάστηκαν 4 μεγάλες καλλιέργειες ~12ml TB που περιείχαν 100μg/ml αμπικιλίνη και 120μl από τις μικρές εναρκτήριες καλλιέργειες (αραίωση 100x). Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν στους 37°C, υπό ανάδευση 220rpm μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα $OD_{600nm}=0,5-0,6$ έναντι τυφλού-δ/τος TB. Μετά από συνολικά 4h επώασης μετρήθηκε $OD_{600nm}=0,6$. Οι καλλιέργειες μοιράστηκαν και προστέθηκε IPTG ώστε τελικά να υπάρχουν φυγοκεντρικοί σωλήνες καλλιέργειας με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις IPTG: 0,1mM 0,5mM 1mM (-)μάρτυρας [αυτά x2]. Τα μισά συνέχισαν να επωάζονται στους 18°C.

2.3. Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων

Μετά από επώαση 1 ώρας λήφθηκαν δείγματα από κάθε καλλιέργεια των 37°C. Φυγοκεντρήθηκαν αμέσως 8000rpm, 8min, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα στους -20°C. Μετά από 3ώρες επώασης λήφθηκαν εκ νέου δείγματα από κάθε καλλιέργεια (και από αυτές των 18°C) που επίσης φυγοκεντρήθηκαν 8000rpm, 8min, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα -20°C. Την επόμενη μέρα –μετά από ~16ώρες επώασης- λήφθηκαν από κάθε καλλιέργεια των 18°C 2 δείγματα του 1ml που φυγοκεντρήθηκαν 8000rpm, 8min, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα -20°C.

2.4. Αρχικός έλεγχος των δειγμάτων.

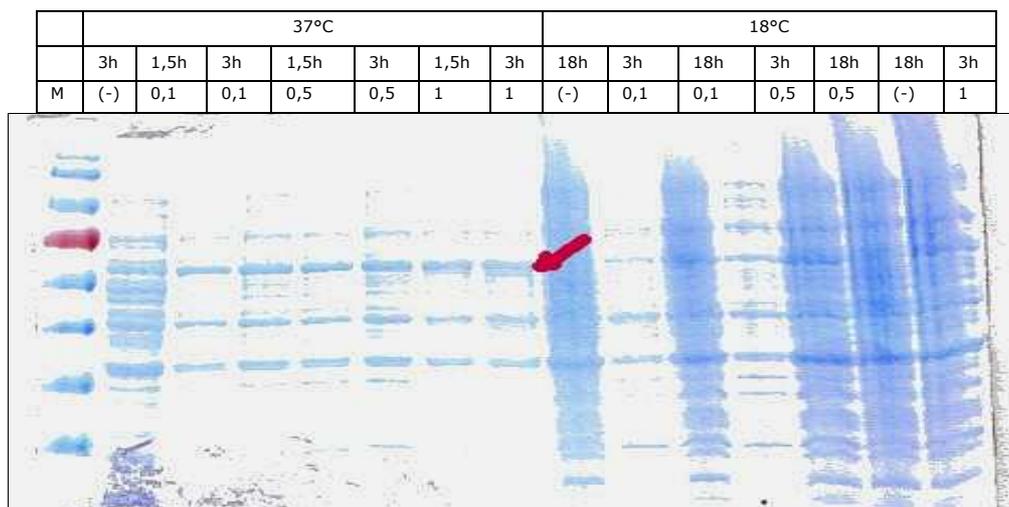
Κάθε δείγμα (ιζήμα) διαλυτοποιείται με 120μl Sample Buffer (SB) κι ακολουθεί υπερήχηση για ~10sec για λύση των κυττάρων. Τα δείγματα μένουν σε ξηρό επωαστήρα 100°C για 3λεπτά κι έπειτα φορτώνονται σε πήκτωμα 10% w/v για ηλεκτροφόρηση σε ρεύμα συνεχούς τάσης 160V (εικόνα 13).



Εικόνα 13. Εικόνα του πηκτώματος 10%w/v της SDS-PAGE^{****} στο οποίο σημειώνεται με βέλος το ύψος όπου αναμένεται η εμφάνιση της PARNt. Στην 1^η στήλη ο μάρτυρας (M) και δεξιά από αυτόν οι συγκεντρώσεις του IPTG σε mM. Όπως φαίνεται παράχθηκε πρωτεΐνη, αλλά δεν παρατηρείται σημαντική επαγωγή από το IPTG σε καμία από τις δύο συνθήκες (θερμοκρασίες), ούτε παράχθηκε σε μεγάλη ποσότητα.

Τα δείγματα υπέστησαν εκ νέου υπερήχηση για ~5sec προκειμένου να μειωθεί το ιξώδες που δυσχεραίνει την ηλεκτροφόρηση. Το αποτέλεσμα της SDS-PAGE παρατίθεται στη συνέχεια (εικ. 14).

**** (ακολουθεί χρώση coomassie σε όλα τα πηκτώματα).



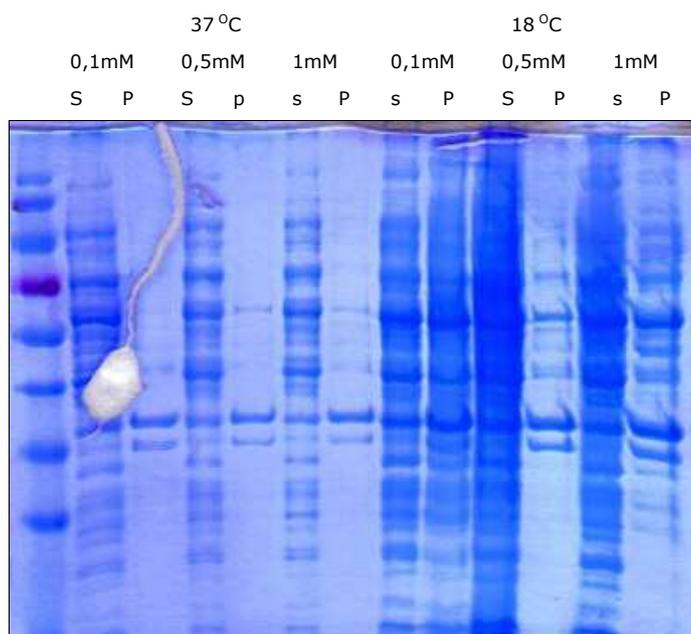
Εικόνα 14. Το πήκτωμα αυτό επιβεβαίωσε την απουσία επαγωγής και υπερέκφρασης της PARN υπό τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν. Το δείγμα $_{18h}$ φορτώθηκε εκ νέου στην προτελευταία θέση εις βάρος του $_{18h}$ (18°C) διότι παρατηρήθηκε ότι η ποσότητά του στο πηγαδάκι διέφερε. Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε διαφορά ρευστότητας και όχι σε λανθασμένη φόρτωση, αφού παρατηρήθηκε το ίδιο και στη νέα θέση.

2.5. Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης

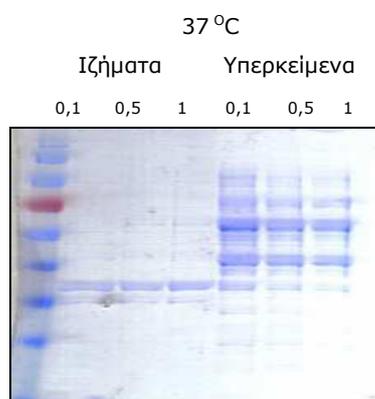
Βάσει της εικόνας της ηλεκτροφόρησης επιλέχθηκαν τα ακόλουθα δείγματα: $_{0,1_{3h}/0,5_{3h}/1_{3h}}$ από τις καλλιέργειες των 37°C και $_{0,1_{18h}/0,5_{18h}/1_{18h}}$ από τις καλλιέργειες των 18°C. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και έλεγχος για το αν η πρωτεΐνης κατανέμεται στο υπερκείμενο ή το ίζημα του κυτταρικού λύματος.

Κάθε ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 100μlτ ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer). Ακολούθησε 10λεπτη παραμονή σε πάγο με 1-2 αναταράξεις. Τα δείγματα υπέστησαν υπερήχηση για 5sec.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση 15000rpm (27000G), 4°C, 30min. Το υπερκείμενο φυλλάχθηκε σε φυγοκεντρικούς σωλήνες 1,7ml (eppendorfs) 1-6. Κάθε ίζημα εκπλύθηκε με 100μlτ φιλτραρισμένου ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (filtered extraction buffer) κι επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση. Τα υπερκείμενα προστέθηκαν στα προηγούμενα υπερκείμενα. Κάθε ίζημα διαλυτοποιήθηκε με 200μlτ 8M ουρίας. Ακολούθησε SDS-PAGE σε 2 πηκτώματα που παρατίθενται (εικ. 15, 16).



Εικόνα 15. Πήκτωμα 10%w/v SDS-PAGE στα 160V. Στην 1^η στήλη ο μάρτυρας και ακολούθως όπου σημειώνεται S για το υπερκείμενο και όπου P το ίζημα. Παρατηρείται ότι στις θέσεις των ιζημάτων, κυρίως στους 37°C δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου πρωτεΐνες



Εικόνα 16. Επαναλαμβάνεται η ηλεκτροφόρηση για τα δείγματα των 37°C, βάζοντας στη σειρά πρώτα τα ιζήματα κι έπειτα τα υπερκείμενα, και πάλι με αυξανόμενη σειρά συγκέντρωσης IPTG (σε mM). Αν και είναι φανερή η εντόπιση της πρωτεΐνης στα υπερκείμενα, δεν φαίνεται να υπάρχει επαγωγή ούτε υπερέκφραση της PARN.

3. Μετασχηματισμός και Καλλιέργειες B834 σειρές.

Εργαστήκαμε με νέα κυτταρική σειρά, την *E.coli* B834 (DE3) και την *E.coli* B834(DE3) ρ LysS. Τα κύτταρα της σειράς αυτής επιλέχθηκαν διότι παράγουν αυξημένες ποσότητες πρωτεΐνης με πλασμίδια που φέρουν T7

υποκινητή. Αντίστοιχα τα rLysS κύτταρα δίνουν μειωμένα επίπεδα βασικής έκφρασης^{§§§§}, ενώ επιλέγονται παρουσία τόσο αμπικιλίνης όσο και χλωραμφενικόλης.

3.1.Μετασχηματισμός των κυττάρων με το πλασμίδιο της PARNt.

Ακολουθήσαμε πρωτόκολλο βασικού μετασχηματισμού και στις 2 κυτταρικές σειρές. Σε περίπου 20μlτ κυττάρων (-80°C) προσθέσαμε 1μlτ από το πλασμίδιο. Ακολούθησε:

Παραμονή σε πάγο για 30 λεπτά

Heat shock στους 42°C για 30-45δεπτερόλεπτα.

Παραμονή σε πάγο για 1-2 λεπτά.

Προσθήκη 250μlτ TB.

Ανακίνηση 220rpm για 1 ώρα 37°C και στρώσιμο τρυβλίων που επώαστηκαν για μια νύχτα.

3.2.Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιεργειών

Μοιράστηκαν 40ml TB με αμπικιλίνη 100mg/ml σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες, σε 3 από τους οποίους εμβολιάστηκε από 1 αποικία από το τρυβλίο B834 (ένας αρνητικός μάρτυρας). Επώαστηκαν όλα για μια νύχτα 37°C, 220rpm.

3.3.Προετοιμασία μεγάλων καλλιεργειών E. Coli

Την επομένη παρασκευάστηκε 1 μεγάλη καλλιέργεια 500~ml TB που περιείχαν 50μgr/ml αμπικιλίνη και 5ml από τις μικρές εναρκτήριες καλλιέργειες (αραίωση 100x). Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν στους 37°C, υπό ανάδευση 220rpm μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα $OD_{600nm}=0,6$ έναντι τυφλού-δ/τος TB. Μετά από συνολικά 3h επώασσης μετρήθηκε $OD_{600nm}=0,7$. Οι καλλιέργειες μοιράστηκαν σε 2 φιάλες και στη μια προστέθηκε IPTG με τελική συγκέντρωση 0,5mM. Η άλλη φιάλη

^{§§§§}http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/Transformation/Trans-Misc/Learn_More_About_Choosing_Compentent_Cells/Genotypes_of_Compentent_Cells.html

μεταφέρθηκε για επώαση στους 18°C, 220grm και 45 λεπτά αργότερα προστέθηκε και σε αυτήν IPTG Cτελ=0,5mM.

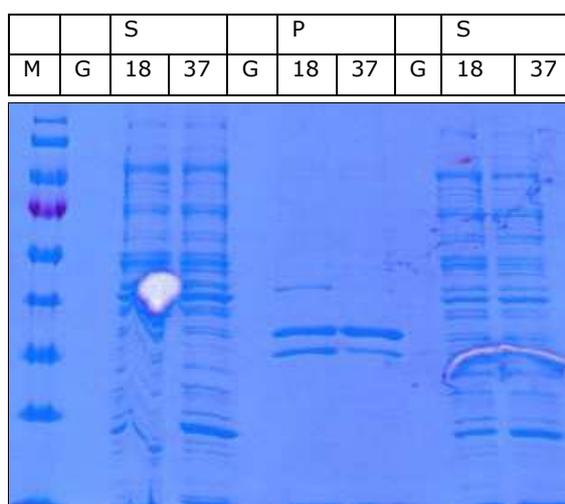
3.4. Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων

Δείγματα 2x1ml λαμβάνονται από τη φιάλη των 37°C μετά από 2,5 ώρες επώαση (μετά την προσθήκη του IPTG). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν αμέσως 8000grm, 8min, 4°C και τα ιζήματα φυλάχθηκαν στους -20°C. Το υπόλοιπο υλικό ισοζυγίστηκε με ακρίβεια σε δοχεία φυγοκέντρου και φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά 4500grm, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα -20°C.

Την επόμενη μέρα -μετά από ~18ώρες επώασης- λήφθηκαν δείγματα 2x1ml από την καλλιέργεια των 18°C και φυγοκεντρήθηκαν 8000grm, 8min, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα -20°C. Το υπόλοιπο υλικό ομοίως φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά 4500grm, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα -20°C.

3.5. Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης

Για ένα δείγμα από κάθε θερμοκρασία έγινε έλεγχος έκφρασης (ιζήμα ή υπερκείμενο, το πρωτόκολλο όπως στην §2.2.1). Τελικά έχουμε 4 δείγματα, από 1s και 1p για κάθε θερμοκρασία. Έγινε SDS-PAGE (εικ. 17).

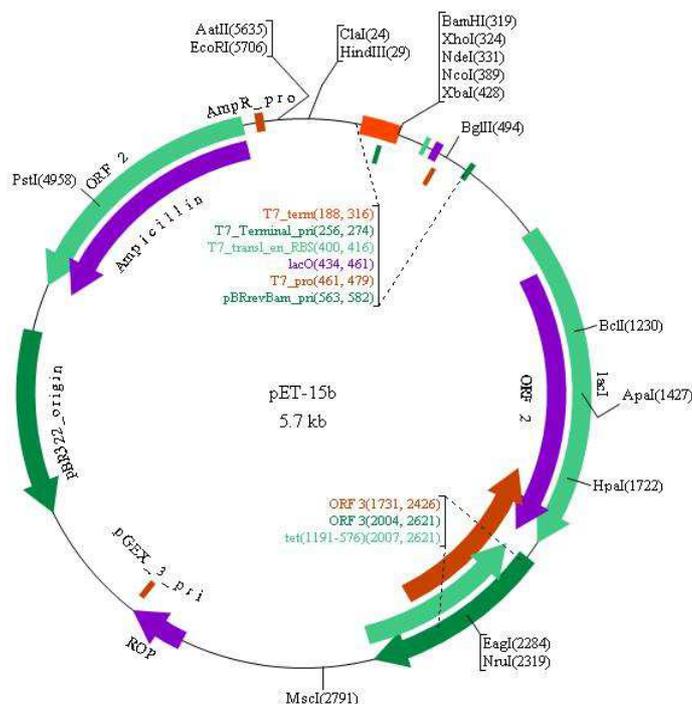


Εικόνα 17. SDS-PAGE σε πήκτωμα 10%. Όπου M=μάρτυρας, G=κενό, S αντιστοιχεί σε υπερκείμενα και P σε ιζήματα. Τα υπερκείμενα φορτώθηκαν εκ νέου στο τέλος για εξασφάλιση του αποτελέσματος. Παρατηρούμε 2 παρόμοιες ζώνες περιορισμένης έκφρασης στα πηγαδάκια των υπερκείμενων τόσο στους 18°C όσο και στους 37°C στο ύψος του κόκκινου μάρτυρα, κάπως ψηλότερα από το σημείο που αναμένεται η PARNt.

4. Απομόνωση και έλεγχος του πλασμιδίου

4.1. Μετασχηματισμός κυττάρων με το πλασμίδιο της PARN.

Με το βασικό πρωτόκολλο και τον pET15b φορέα έκφρασης (εικ. 18) μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E. coli* DH5a.



Εικόνα 18. Φορέας έκφρασης pET-15b.

4.2. Παρασκευή μικρής εναρκτήριας καλλιέργειας.

Την επομένη 30ml LB με αμπικιλίνη 100μgr/ml μοιράστηκαν σε 3 φυγοκεντρικούς σωλήνες και σε 2 από αυτά εμβολιάστηκε από μία αποικία από το τρυβλίο του μετασχηματισμού. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν για μια νύχτα στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση 220rpm.

4.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο του kit NucleoSpin® Plasmid της Macherey-Nigel**** για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές

**** Το πρωτόκολλο είναι διαθέσιμο στο διαδίκτυο στη διεύθυνση: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf

καλλιέργειες. Πρόκειται για μια στήλη με βάση ενεργοποιημένα σφαιρίδια πυριτίου που παρέχουν μια συνολικά θετική πυκνότητα φόρτισης για υψηλά ειδική πρόσδεση του αρνητικά φορτισμένου σκελετού του πλασμιδιακού DNA. Τα βήματα ήταν τα εξής:

α. Συλλογή των κυττάρων της καλλιέργειας

Σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες βάλαμε από 1,5ml από τη μικρή εναρκτήρια καλλιέργεια. Φυγοκεντρήθηκαν για 1,5 λεπτό στις 11000rpm, 26°C. Τα υπερκείμενα απορρίφθηκαν και σε κάθε σωλήνα προστέθηκε ακόμα 1,5ml από τη μικρή καλλιέργεια κι επαναλήφθηκε η φυγοκέντρωση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ώστε τελικά σε κάθε σωλήνα να έχει συλλεχθεί το ίζημα από 4,25ml μικρής καλλιέργειας.

β. Λύση των κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν τα Ρυθμιστικά διαλύματα A1, A2 και A3 που παρέχει το κιτ. Το λύμα φυγοκεντρήθηκε προς απομάκρυνση κατακρημνισμένων πρωτεϊνών, γενωμικού DNA και κυτταρικών υπολειμμάτων και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα.

γ. πρόσδεση του DNA στη στήλη

Με το κιτ NucleoSpin® Plasmid, οι επιμολύνσεις όπως άλατα, μεταβολίτες και διαλυτά μακρομοριακά κυτταρικά κατάλοιπα απομακρύνθηκαν με πλύσιμο της στήλης με το Ρυθμιστικό διάλυμα A4.

δ. Έκλυση του DNA

Η έκλυση έγινε υπό συνθήκες χαμηλού ιονισμού με ελαφρώς αλκαλικό Ρυθμιστικό διάλυμα (5mM Tris/HCl, pH8,5). Υπό αυτές τις αλκαλικές συνθήκες το θετικό φορτίο της στήλης ουδετεροποιήθηκε και το πλασμιδιακό DNA απελευθερώθηκε.

4.4. Κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με αιθανόλη.

Το υλικό της πλασμιδιακής απομόνωσης φυλάχθηκε αρχικά σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες με 50μl του πλασμιδίου σε αιθανόλη. Οι φυγοκεντρικοί σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν για 45λεπτά στις 20000rpm στους 4°C κι αφού απορρίφθηκαν τα υπερκείμενα τα ιζήματα διαλυτοποιήθηκαν σε 70% αιθανόλη και μεταφέρθηκαν σε 1 σωλήνα. Ο όγκος συμπληρώθηκε σε 1ml κι ακολούθησε φυγοκέντρωση 30λεπτών στις 20000rpm, 4°C. Τα ιζήματα αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία

δωματίου και προστέθηκαν 50μl HPLC H₂O για διαλυτοποίηση. Από αυτό 5μl διαλύθηκαν σε συνολικά 200μl νερού και φωτομετρώντας υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση του DNA είναι ~1,6mgr/ml.

4.5. Πέψη πλασμιδιακού DNA και Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

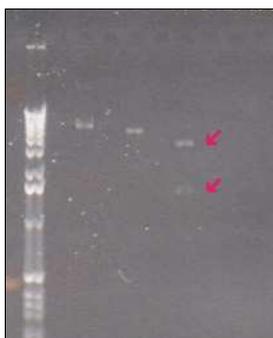
Πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και XhoI για να επαληθευτεί η ύπαρξη του ενθέματος στο πλασμίδιο (εικόνα 19). Ετοιμάστηκαν οι ακόλουθες αντιδράσεις (με σειρά προσθήκης) σε φυγοκεντρικούς σωλήνες του 1,7ml:

Διπλή πέψη	
ddH ₂ O	12μl
10xK Buffer	2 μl
BSA	2 μl
pET15b	2 μl
NdeI	1 μl
XhoI	1 μl
	20μl

Πέψη 1	
ddH ₂ O	13μl
10xK Buffer	2 μl
BSA	2 μl
pET15b	2 μl
NdeI	-
XhoI	1 μl
	20μl

Οι αντιδράσεις επώαστηκαν για 2ώρες στους 37°C.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι ένας εύκολος τρόπος να διαχωριστούν τα θραύσματα του DNA βάσει μεγέθους και να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα σε υπεριώδες φως χρησιμοποιώντας βρωμιούχο αιθίδιο. Η μέθοδος βασίζεται στην μετακίνηση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο ενός ηλεκτρικού πεδίου. Ο ρυθμός της μετακίνησης των θραυσμάτων του DNA μέσω του πηκτώματος αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογος με το λογάριθμο του συνόλου των ζευγών βάσεων (δηλαδή τα μεγαλύτερου μεγέθους τμήματα κινούνται πιο αργά μέσα στο πήκτωμα).



Εικόνα 19. Στο πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v φορτώθηκαν από αριστερά προς τα δεξιά: Μάρτυρας, ακέραιο δείγμα (uncut, για το οποίο χρησιμοποιήθηκαν 2μl δείγμα, 0,5λ SB10x και 3λ νερό), πέψη 1 (2μl δείγμα, 2μl SB, 1μl H₂O) και διπλή πέψη (αντιστοιχώς). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε TBE 1%w/v στα 100mV. Στο πήκτωμα σημειώνονται με βέλη τα κλάσματα της διπλής πέψης που μαρτυρούν επιτυχημένο αποτέλεσμα.

5.Μετασχηματισμός, καλλιέργειες & συλλογή Κυττάρων της σειράς B834 σε μικρότερο όγκο.

Έχοντας επιβεβαιώσει την ακεραιότητα του πλασμιδίου εργαστήκαμε και πάλι με *E.coli* B834 (DE3) και *E.coli* B834(DE3)pLysS τα οποία μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο με το βασικό πρωτόκολλο μετασχηματισμού.

5.1.Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιεργειών

Μοιράστηκαν 30ml TB με αμπικιλίνη 100μg/ml σε 3 φυγοκεντρικούς σωλήνες, σε 2 από τα οποία εμβολιάστηκε από 1 αποικία από το τρυβλίο B834 και αντίστοιχα για τα B834pLysS σε υλικό με αμπικιλίνη 100μg/ml και χλωραμφενικόλη 50μg/ml (1 αρνητικός μάρτυρας για κάθε σειρά). Επώαστηκαν όλα για μια νύχτα 37°C, 220rpm.

5.2.Προετοιμασία μεγάλων καλλιεργειών E. Coli

Την επομένη παρασκευάστηκαν 4 μεγάλες καλλιέργειες των 50ml TB (προσθέτοντας σε κάθε μία 2,5ml από τη μικρή εναρκτήρια καλλιέργεια): 2 που περιείχαν 10μg/ml αμπικιλίνη και 2 με επιπλέον 50μg/ml χλωραμφενικόλη. Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν για 3 ώρες στους 37°C, υπό ανάδευση 200rpm μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα OD_{600nm}>0,6 έναντι τυφλού-δ/τος TB. Προστέθηκε IPTG με τελική συγκέντρωση 0,5mM στη 1 φιάλη κάθε κυτταρικής σειράς (η άλλη φιάλη

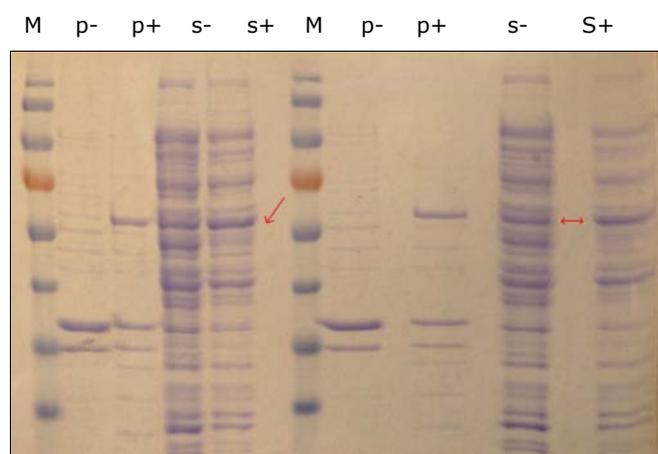
διατηρείται ως αρνητικός μάρτυρας). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 2,5 ώρες ακόμη 37°C, 200rpm.

5.3. Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων

Δείγματα 2x1ml λήφθηκαν από κάθε φιάλη μετά από 2,5 ώρες επώαση (μετά την προσθήκη του IPTG). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν αμέσως 8000rpm, 8min, 4°C και τα ιζήματα φυλάχθηκαν στους -20°C. Η υπόλοιπη καλλιέργεια ισοζυγίστηκε σε δοχεία φυγοκέντρου και φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά 4500rpm, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα -20°C.

5.4. Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης

Με το πρωτόκολλο §2.5 λύθηκαν τα κύτταρα των δειγμάτων και προετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Παρατίθεται το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης των B834pLysS κυττάρων αφού σε διαδοχικές ηλεκτροφορήσεις σ' αυτά τα κύτταρα παρατηρήθηκε τόσο σχετική υπερέκφραση της PARN -σε σχέση με τις υπόλοιπες ζώνες στο πήκτωμα- όσο και επαγωγή της έκφρασης μετά την προσθήκη του IPTG (σημειώνονται στην εικόνα 20).

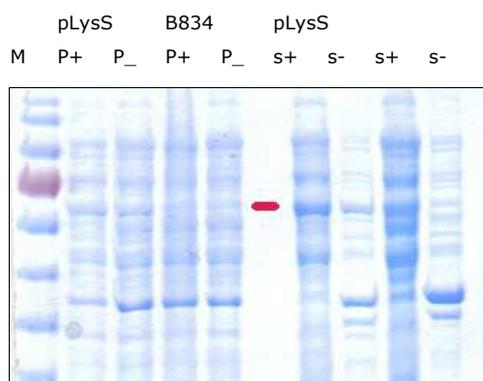


Εικόνα 20. Όπου M=μάρτυρας, P=ιζήμα και S=υπερκείμενο. Είναι εμφανής η υπερέκφραση της PARNt στο υπερκείμενο σε σχέση με το ιζήμα, καθώς και η επαγωγή της σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Για περαιτέρω διερεύνηση της δυνατότητας των κυττάρων αυτών έγινε λύση του συνόλου των κυττάρων της καλλιέργειας με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και παραμονή σε πάγο για 20λεπτά. Ακολούθησε υπερήχηση 3x5" με

5" διαλλείματα σε πάγο και κρατήθηκαν δείγματα για ανίχνευση ολικής (total) πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 45λεπτά στις 17000rpm, 4°C. Τα υπερκείμενα (S) μεταφέρθηκαν σε νέους φυγοκεντρικούς σωλήνες και κάθε ίζημα (P) διαλυτοποιήθηκε σε όγκο 8M ουρίας ίσο με αυτόν του αντίστοιχου υπερκείμενου. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 10%, 160V (εικόνα 21).



Εικόνα 21. Είναι φανερή η υπερέκφραση στο υπερκείμενο των B834pLysS κυττάρων (δεξιά της κόκκινης γραμμής). Αρκεί να συγκριθεί με τον αρνητικό μάρτυρα αλλά και με τα B834 κύτταρα όπου στο ίδιο ύψος ηλεκτροφόρησης δεν υπάρχει ευδιάκριτη μπάντα.

6. Μετασχηματισμός και καλλιέργειες BL21 STAR

Εργαστήκαμε με *E.coli* BL21 STAR DE3 τα οποία μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο της PARN για να προχωρήσουμε σε έλεγχο για τυχόν υπερέκφραση.

6.1. Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιεργειών

Μοιράστηκαν 40ml TB με αμπικιλίνη 100mg/ml σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες, σε 3 από τα οποία εμβολιάστηκε από 1 αποικία από το τρυβλίο BL21 STAR (1 αρνητικός μάρτυρας). Επώαστηκαν όλα για μια νύχτα 37°C, 220rpm.

6.2. Προετοιμασία μεγάλων καλλιεργειών E. Coli

Την επομένη παρασκευάστηκαν 6 μεγάλες καλλιέργειες των 50ml TB 100μgr/ml αμπικιλίνη (προσθέτοντας σε κάθε μία 2,5ml από τη μικρή

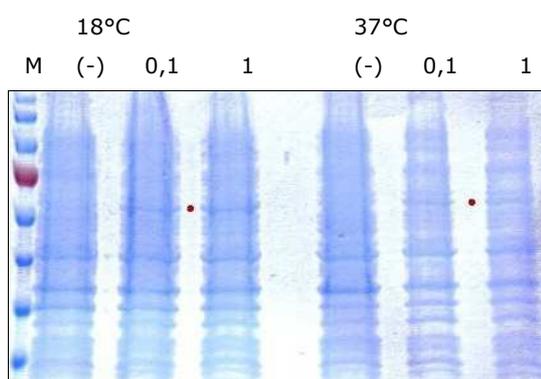
εναρκτήρια καλλιέργεια). Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν για 3 ώρες στους 37°C, υπό ανάδευση 220rpm μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα $OD_{600nm}=0,4$ έναντι τυφλού-δ/τος TB. Έπειτα σε 3 από τις φιάλες προστέθηκε IPTG ως εξής: 1^η φιάλη αρνητικός μάρτυρας (χωρίς IPTG), 2^η 0,1mM IPTG και 3^η 1mM IPTG και συνεχίστηκε η επώασή τους για 3 ώρες 37°C, 220rpm. Οι άλλες 3 φιάλες μεταφέρθηκαν για επώαση στους 18°C, 220rpm και 45 λεπτά αργότερα προστέθηκε και σε αυτές IPTG όπως και πριν (-, 0,1mM, 1mM) και η επώαση συνεχίστηκε για όλη τη νύχτα 18°C, 220rpm.

6.3. Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων

Δείγματα 2x1ml λήφθηκαν από κάθε φιάλη μετά από 3 ώρες επώαση (μετά την προσθήκη του IPTG). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν αμέσως 8000rpm, 8min, 4°C και τα ιζήματα φυλάχθηκαν στους -20°C. Το υπόλοιπο υλικό ισοζυγίστηκε με ακρίβεια σε δοχεία φυγοκέντρου και φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά 4500rpm, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα στους -20°C.

6.4. Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης

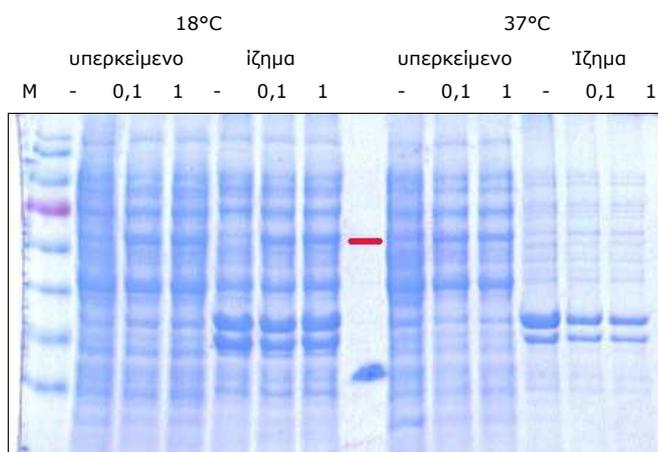
Σε 1 δείγμα/καλλιέργεια (ιζήμα) προστέθηκαν 200μl SB κι ακολούθησε υπερήχηση για λύση των κυττάρων. Έγινε SDS-PAGE (εικ. 22).



Εικόνα 22. SDS-PAGE σε πήκτωμα 10%w/v, 160V. Όπου M=μάρτυρας και στα δεξιά του οι συγκεντρώσεις του IPTG σε mM. Δεν παρατηρείται υπερέκφραση ούτε επαγωγή από το IPTG.

Επάνω ακριβώς από το σημείο όπου αναμένεται η PARN παρατηρείται σχεδόν πάντα μια δευτερεύουσα μικρή μπάντα. Πιθανότατα πρόκειται για θραύσμα της πρωτεΐνης, μια που επαναλαμβάνεται κι ακολουθεί την

έκφρασή της όπως φαίνεται και παρακάτω. Με το πρωτόκολλο §2.5 λύθηκαν τα κύτταρα και προετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Παρατίθεται το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 23).



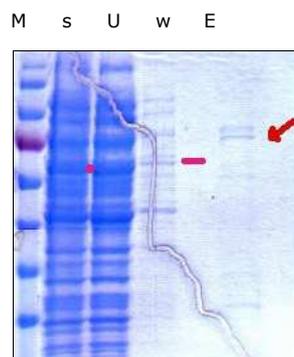
Εικόνα 23. SDS-PAGE σε πήκτωμα 10%, 160V. Όπου M=μάρτυρας και στα δεξιά του οι συγκεντρώσεις του IPTG σε mM. Δεν παρατηρείται σχετική υπερέκφραση της PARNt.-υπάρχουν μάλιστα άγνωστες ζώνες στο πήκτωμα που υπερεκφράζονται σχετικά -ούτε και επαγωγή της έκφρασης από το IPTG.

7. Έλεγχος πρόσδεσης σε στήλη Νικελίου

Θα ελεγχθεί η δυνατότητα πρόσδεσης της -έστω περιορισμένης- παραχθείσας πρωτεΐνης στη στήλη Ni-NTA (QIAGEN).

7.1. Έλεγχος πρόσδεσης του υπερκείμενου 37°C, 0,1mM IPTG

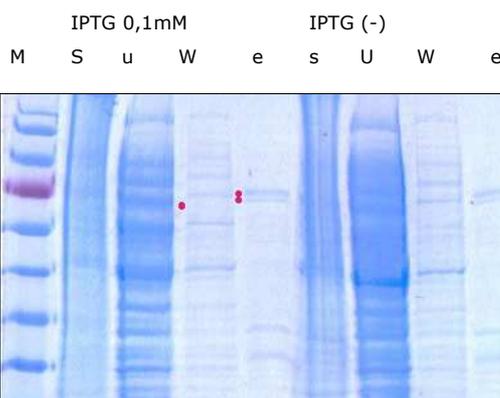
Από την παρασκευή καλλιιεργειών με τα κύτταρα BL21 STAR επιλέχτηκε το υπερκείμενο της καλλιέργειας των 37°C με συγκέντρωση IPTG 0,1mM. Η στήλη αναγεννήθηκε και εξισορροπήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Εκτός από το δείγμα s(0,1) 37°C συλλέχθηκαν τα flow through (άδετο/unbound), wash και elution, δείγματα από τα οποία ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση (εικ. 24).



Εικόνα 24. M=Μάρτυρας, s=δείγμα, U=άδετο, W=έκπλυμα, E=έκλουσμα. Οι πρωτεϊνική μπάντα της PARN σημειώνεται στην εικόνα με μια τελεία. Είναι προφανές ότι δεν δέθηκε στη στήλη αλλά πέρασε στο άδετο. Σε περιορισμένη ποσότητα η PARN πέρασε στο έκπλυμα της στήλης. Και σε αυτό το πείραμα παρατηρείται το θραύσμα της τόσο στο έκπλυμα (σημειώνεται με οριζόντια γραμμή) όσο και στο έκλουσμα, αν και σε υψηλότερη θέση σε σχέση με την αναμενόμενη (σημ. με βέλος).

7.2. Έλεγχος πρόσδεσης του υπερκείμενου 37°C, 0,1mM IPTG

Επαναλήφθηκε η προσπάθεια πρόσδεσης στη στήλη Ni, αυτή τη φορά για το υπερκείμενο των 18°C με συγκέντρωση IPTG 0,1mM. Αντιπαραβλήθηκε η ίδια διαδικασία για τον αρνητικό μάρτυρα (εικόνα 25).



Εικόνα 25. M=Μάρτυρας, s=δείγμα, U=άδετο, W=έκπλυμα, E=έκλουσμα. Με μονή τελεία σημειώνεται το ύψος όπου αναμένεται η PARN. Όπως είναι φανερό δεν δέθηκε στη στήλη. Με διπλή τελεία σημειώνεται η παρουσία των πιθανών θραυσμάτων της PARN.

8. Έλεγχος επίδρασης στο αποτέλεσμα ανανέωσης του υλικού καλλιέργειας.

Για να αποκλειστεί η περίπτωση παρεμπόδισης της επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης λόγω μεταβολών του pH (πχ λόγω παραγωγής παραπροϊόντος με τοξική επίδραση) ή έλλειψη απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων¹⁸ κατά την καλλιέργεια προχωρήσαμε στον ακόλουθο έλεγχο.

8.1.Μετασχηματισμός των κυττάρων με το πλασμίδιο.

Ακολουθήσαμε πρωτόκολλο βασικού μετασχηματισμού όπως στη §3.1.1. για τα BL21 STAR.

8.2.Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιεργειών

Μοιράστηκαν 40ml LB με αμπικιλίνη 100mg/ml σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες, σε 3 από τα οποία εμβολιάστηκε από 1 αποικία από το τρυβλίο BL21 STAR (1 αρνητικός μάρτυρας). Επώαστηκαν όλα για μια νύχτα 37°C, 220rpm.

8.3.Προετοιμασία μεγάλων καλλιεργειών E. Coli

Την επομένη παρασκευάστηκαν 2 μεγάλες καλλιέργειες των 200ml LB 100μg/ml αμπικιλίνη. Στην πρώτη προστέθηκαν 10ml από τη μικρή εναρκτήρια καλλιέργεια. Στη δεύτερη προστέθηκε ανανεωμένο υλικό καλλιέργειας (refreshed, R) που παρασκευάστηκε ως εξής:

Φυγοκεντρήθηκαν 10ml εναρκτήριας καλλιέργειας για 4 λεπτά στα 500G. Το υπερκείμενο απορρίφτηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10ml φρέσκου LB.

Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν για 3,5hrs στους 37°C, υπό ανάδευση 220rpm μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα $OD_{600nm}=0,4$. Έπειτα το υλικό κάθε φλάσκας μοιράστηκε σε 2 για να διατηρηθούν και αρνητικοί μάρτυρες. Σε μία φλάσκα από κάθε καλλιέργεια προστέθηκε IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM και η επώαση συνεχίστηκε για 3ώρες ακόμη, 37°C, 220rpm.

8.4. Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων

Μετά το τέλος της επώασης οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν (μέσα σε φυγοκεντρικούς σωλήνες ανά 25ml) 4500rpm, 20min, 4°C και φυλάχθηκαν τα ιζήματα στους -20°C.

8.5. Έλεγχος έκφρασης της πρωτεΐνης

Τα δείγματα ετοιμάστηκαν για SDS-PAGE όπως στην §2.4.

Στον έλεγχο που ακολούθησε δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση της ανανέωσης του υλικού στην έκφραση της PARN (για το λόγο αυτό το πήκτωμα δεν παρατίθεται).

9. Έλεγχος βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των κυττάρων B834pLysS.

Παρασκευάστηκαν 2 τρυβλία LB άγαρ α) ένα με χλωραμφενικόλη 30γ/ml και β) ένα με αμπικιλίνη 100γ/ml και χλωραμφενικόλη 30γ/ml. Σε αυτά ενοφθαλμίστηκαν κύτταρα B834pLysS από διάλυμα αποθήκευσης γλυκερόλης και επώαστηκαν στους 37°C για μια νύχτα.

Η ανάπτυξη καλλιεργειών στα τρυβλία αυτά επιβεβαιώνει α) τη δυνατότητα επιβίωσης και ανάπτυξης των κυττάρων pLysS (αφού αναπτύσσονται παρουσία χλωραμφενικόλης) και β) ότι τα κύτταρα διαθέτουν το πλασμίδιο και αυτό είναι λειτουργικό (αφού αναπτύσσονται παρουσία και των δύο αντιβιοτικών).

10. Έλεγχος αποτελέσματος σε καλλιέργεια μεγάλου όγκου στους 18°C.

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα B834pLysS που είχαν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pET15b κι ελέγχθηκε η δυνατότητα πρόσδεσης σε στήλη Ni.

10.1. Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιιεργειών

Σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες μοιράστηκαν 50ml TB που περιείχαν αμπικιλίνη 100μgr/ml και χλωραμφενικόλη 50μgr/ml. Σε 3/4 σωλήνες ενοφθαλμίστηκε από 1 καλλιέργεια από το τρυβλίο LB (1αρνητικός μάρτυρας). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για μια νύχτα στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση 220rpm.

10.2. Προετοιμασία μεγάλων καλλιιεργειών E. Coli

Την επομένη παρασκευάστηκαν 2 μεγάλες καλλιέργειες 1000ml TB που περιείχαν 100μgr/ml αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη 50μgr/ml και σε κάθε μία προστέθηκαν 10ml από τις μικρές εναρκτήριες καλλιέργειες (αραίωση 100x). Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν στους 37°C, υπό ανάδευση 220rpm μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα $OD_{600nm}=0,5-0,6$. Μετά από συνολικά 4h επώασης μετρήθηκε $OD_{600nm}=0,6$ και οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν για επώαση στους 18°C, 200rpm. Μετά από 1ώρα επώασης στους 18°C προστέθηκε IPTG σε συγκέντρωση 0,5mM σε κάθε φιάλη. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 18°C για μια νύχτα.

10.3. Συλλογή και λύση των βακτηριακών κυττάρων

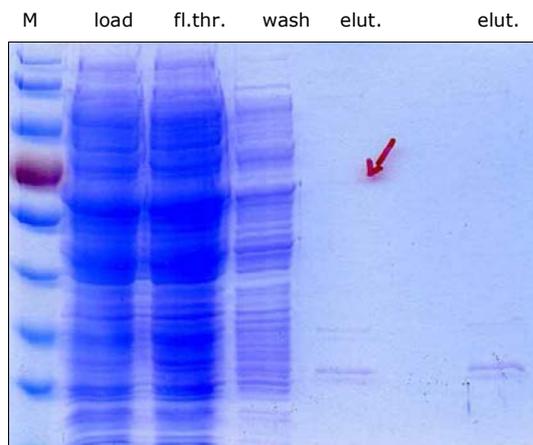
Την επομένη οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν 4000rpm, 20min, 4°C. Τα ιζήματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 30ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και παρέμειναν σε πάγο 20λεπτά. Σε αυτά προστέθηκε λυσοζύμη 1mg/ml (~45mg) και 2μlt βενζονάση. Μετά από ανάδευση παρέμειναν άλλα 10 λεπτά σε πάγο κι έπειτα υπέστησαν υπερήχηση 3x15" με διαλείμματα 20".

10.4. Έλεγχος πρόσδεσης σε στήλη Ni-NTA.

Η αναγεννημένη στήλη Ni-NTA εξισορροπήθηκε με 2x50ml ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (το πρώτο πέρασμα για απομάκρυνση της αιθανόλης στην οποία φυλάσσεται η στήλη). Το κυτταρικό λύμα προστέθηκε σταδιακά ώστε να μην αναταράσσεται η στήλη. Συλλέχθηκαν ~35ml flow through με ροή <2ml/min. Ακολούθησε το πλύσιμο και συλλέχθηκαν ~25ml wash με ροή 1ml/min. Προστέθηκαν 20ml ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης από τα οποία συλλέχθηκαν τα 10ml και η στήλη αφέθηκε για μια νύχτα με το

υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης. Το έκλουσμα που συλλέχτηκε αφήθηκε για μια νύχτα σε μεμβράνη διαπίδυσης μέσα σε 1,5lt Ρυθμιστικό διάλυμα D.

Δείγματα από το λύμα, το άδετο δ/μα(flow through), το έκπλυμα (wash) και το έκλουσμα (elution) προετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα που παρατίθεται (εικόνα 26).



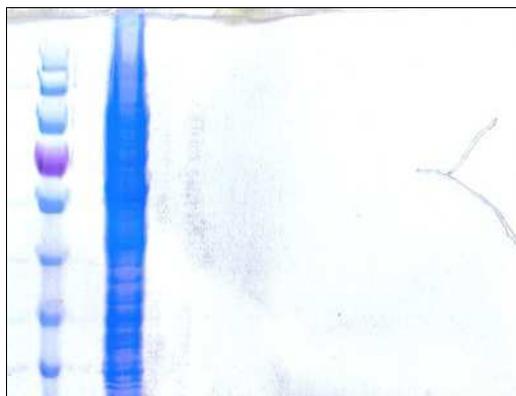
Εικόνα 26. . SDS-PAGE σε πήκτωμα 10%, 160V όπου M=Μάρτυρας, load=δείγμα που φορτώθηκε, fl.thr.=άδετο στη στήλη, wash=έκπλυμα, elut.=έκλουσμα. Είναι φανερή η επαγωγή και η υπερέκφραση της PARN που όμως δε δένεται στη στήλη. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία στο έκλουσμα της μικρής μπάντας πάνω από το ύψος όπου αναμένεται η PARN στην ηλεκτροφόρηση.

10.5.Έλεγχος παραμονής πρωτεϊνών στη στήλη Ni.

Δεδομένου ότι κατά την ηλεκτροφόρηση στο έκλουσμα δεν εντοπίζονται παρά ελάχιστες πρωτεΐνες και η PARN δεν είναι ανάμεσά τους, εξετάστηκε η πιθανότητα να έχει παραμείνει προσδεσμένη στη στήλη σε κάποια ποσότητα. Για να γίνει ο έλεγχος παρασκευάστηκε διάλυμα έκλουσης με αυξημένη περιεκτικότητα σε ιμιδαζόλιο (0,5M).

Αρχικά συλλέχθηκε το διάλυμα έκλουσης που είχε παραμείνει για μια νύχτα στη στήλη. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν 10ml από το νέο διάλυμα έκλουσης. Ετοιμάστηκαν δείγματα και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (εικόνα 27) μαζί με το άδετο/flow through της αμέσως προηγούμενης έκλουσης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα το τελευταίο είναι και το μόνο

που εμφανίστηκε στην ηλεκτροφόρηση, καταρρίπτοντας την αρχική υπόθεση.

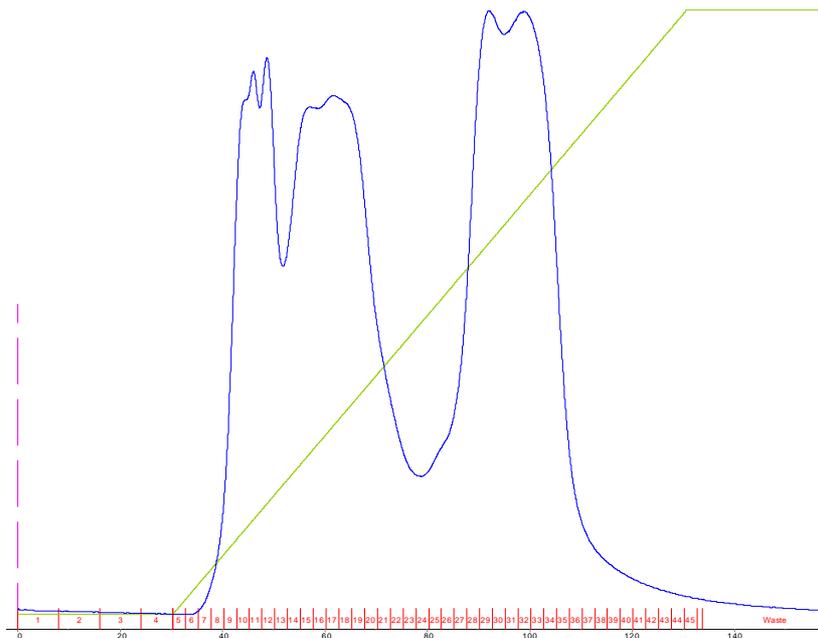


Εικόνα 27. SDS-PAGE σε πήκτωμα 10%, 160V για το έκλουσμα (δε φαίνεται μπάντα πρωτεΐνης) με αυξημένο ιμιδαζόλιο. Αριστερά φαίνεται η στήλη του μάρτυρα και η στήλη που φαίνεται δεξιά της είναι το άδετο της προηγούμενης έκλουσης.

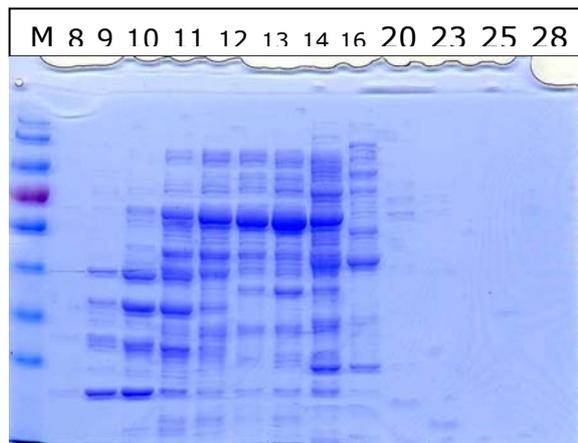
10.6.Καθαρισμός με ιοντοανταλλακτική στήλη.

Τα διαλύματα της στήλης νικελίου flow through και wash μπήκαν για διαπίδυση -σε χωριστές μεμβράνες- και σε 1 lt ρυθμιστικό διάλυμα D για μια νύχτα. Την επομένη χρησιμοποιήθηκαν ως φόρτωμα της ιοντοανταλλακτικής στήλης HiTrap QFF.

Τα δείγματα που διαπυήθηκαν για μια νύχτα ενώθηκαν (~35ml) και φορτώθηκαν στη στήλη μετά από πλύσιμο κι εξισορρόπησή της. Μετά τη συλλογή των flow through και wash η Äkta ρυθμίστηκε για συλλογή 40 κλασμάτων έκλουσης των 2,5ml με πολύ σταδιακή έκλουση από 0mM σε 500mM. Βάσει της γραμμής απορρόφησης του χρωματογραφήματος που πήραμε (εικόνα 28) επιλέχθηκαν τα ακόλουθα κλάσματα για να ελεγχθούν με ηλεκτροφόρηση: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 20, 23, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36 και 46. Προετοιμάστηκαν και φορτώθηκαν με τη σειρά μετά το μάρτυρα σε 2 πήκτωμα. Στο 2^ο πήκτωμα δεν υπάρχουν αντίστοιχα αποτελέσματα και για το λόγο αυτό παρατίθεται μόνο το πρώτο (εικόνα 29).



Εικόνα 28. Χρωματογράφημα της Άκτα για τη HiTrap Q FF.



Εικόνα 29. SDS-PAGE σε πήκτωμα 10%w/v για τα κλάσματα 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 20, 23, 25, 28, 29, 30 από την ιοντοανταλλακτική στήλη. Παρατηρείται ότι στα δείγματα 10 έως 16 εκλούστηκε η PARN.

Με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε η συνολική (μη καθαρή) πρωτεΐνη για τα κλάσματα 13, 14, 15 και 16 (που επιλέχθηκαν σύμφωνα με το χρωματογράφημα) σε 52mg/lit.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έγινε πειραματική διερεύνηση για να προσδιοριστούν κατάλληλες συνθήκες για την έκφραση σε ικανοποιητική ποσότητα και τον αποτελεσματικό καθαρισμό της PARnt. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν προκύπτουν από τις SDS-PAGE που παρατέθηκαν καθώς και από τις εκτιμήσεις σχετικά με την περιεχόμενη πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli* της σειράς B834pLysS σε καλλιέργεια ~18h στους 18°C έπειτα από επαγωγή με 0,5mM IPTG. Το πρωτόκολλο αυτό αποδίδει περίπου 40mg πρωτεΐνης ανά λίτρο καλλιέργειας.

Στις προσπάθειες καθαρισμού που έγιναν η PARnt δε δέθηκε στη στήλη νικελίου ενώ στη συνέχεια εκλούστηκε αποτελεσματικά από την ιοντοανταλλακτική στήλη. Υποθέτουμε ότι η PARnt πρωτεολύεται σε κάποιο βαθμό κατά τη διάρκεια της διαδικασίας λύσης των κυττάρων της καλλιέργειας και καθαρισμού της και για το λόγο αυτό δεν δένεται στη στήλη συγγένειας. Την υπόθεση αυτή ενισχύει η εμφάνιση στα πηκτώματα μικρών ζωνών πολύ κοντά στο ύψος όπου αναμένεται η PARnt. Ένας έλεγχος στυπώματος western έπεται για να επιβεβαιώσει την ταυτότητα της πρωτεΐνης που απομονώθηκε, ίσως και την υπόθεση αυτή. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πρωτεΐνης σε ποσότητα και καθαρότητα τέτοια που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προσπάθειες κρυστάλλωσής της για δομικές μελέτες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Nilsson, P., Virtanen A. (2006) Expression and purification of recombinant poly(A)-specific ribonuclease (PARN) *International Journal of Biological Macromolecules*, **39**, 95-99.
- ² Wu M, Reuter M, Lilie H, Liu Y, Wahle E, Song H. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.*, **24**: 4082-93.
- ³ Dehlin E, Wormington M, Körner CG, Wahle E. (2000) Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* **19(5)**:1079-86.
- ⁴ Ren, Y-G, Martínez, J. and Virtanen, A. (2001) Identification of the Active Site of Poly(A)-specific Ribonuclease by Site-directed Mutagenesis and Fe²⁺-mediated Cleavage. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 5982-5987.
- ⁵ Zuo, Y. and Deutscher, M. P. (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* **29(5)**: 1017–1026.
- ⁶ Garneau, N.L., Wilusz, J. and Wilusz, C. J. (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 113-126.
- ⁷ Lazarus, H.M., Sporn, M.B (1971) Studies on the allosteric properties of nuclear exoribonuclease from Ehrlich ascites tumor. *Biochemistry* **10**: 505-10.
- ⁸ Ren, Y-G. (2001) Poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN) Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.
- ⁹ Monecke T, Schell S, Dickmanns A, Ficner R.(2008) Crystal structure of the RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease reveals a novel m(7)G-cap-binding mode. *J Mol Biol.* **382(4)**:827-34.
- ¹⁰ Ren YG, Kirsebom LA, Virtanen A. (2004) Coordination of divalent metal ions in the active site of poly(A)-specific ribonuclease. *J Biol Chem.* **279**: 48702-6
- ¹¹ Liu WF, Zhang A, He GJ, Yan YB. (2007) The R3H domain stabilizes poly(A)-specific ribonuclease by stabilizing the RRM domain. *Biochem Biophys Res Commun.* **360(4)**:846-51.

¹²Balatsos NA, Vlachakis D, Maragozidis P, Manta S, Anastasakis D, Kyritsis A, Vlassi M, Komiotis D, Stathopoulos C. (2009) Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. *Biochemistry*. **48(26)**:6044-51.

¹³ Balatsos NA, Anastasakis D, Stathopoulos C. (2009) Inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by purine nucleotides: kinetic analysis. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **24(2)**:516-23.

¹⁴ Liu WF, Zhang A, Cheng Y, Zhou HM, Yan YB. (2009) Allosteric regulation of human poly(A)-specific ribonuclease by cap and potassium ions. *Biochem Biophys Res Commun*. **379(2)**:341-5

¹⁵ Henriksson, N., Nilsson, P., Wu, M., Song, H and Virtanen, A. (2010) Recognition of Adenosine Residues by the Active Site of Poly(A)-specific Ribonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**: 163-170.

¹⁶ Καραγιώργου, Α. (2009) ΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ poly(A) -specific ribonuclease (PARN). *Διπλωματική Εργασία Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*.

¹⁷ Nilsson P., Virtanen A. (2006). Expression and purification of recombinant poly(A)-specific ribonuclease (PARN). *Cell and Molecular Biology*. **2**: 1-2

¹⁸ Drago, L., Gismondo, M. R., Lombardi, A., Haën, C., Gozzini, L. (1997) Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters*. **153(2)**: 455-463.

pET System Manual, p.6. Διαθέσιμο στο διαδίκτυο στη διεύθυνση: http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/biochem_meth/pet.pdf