ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΉΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Σύστημα υψηλής απόδοσης για την παρακολούθηση της ποιότητας αναδίπλωσης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται στο βακτήριο Escherichia coli»

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΔΡ. ΣΚΡΕΤΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
ΔΡ. ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΟΙΤΗΤΗ:
ΚΥΚΝΑΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΟ ΕΤΟΣ: 2017-2018

UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

«High throughput system for monitoring the folding quality of recombinant proteins expressed in bacteria of Escherichia coli»

SUPERVISOR PROFESSOR:
DR. SKRETAS GEORGIOS

CO-SUPERVISOR PROFESSOR:
DR. PSARRA ANNA-MARIA

DIPLOMA PROJECT OF THE STUDENT:
KYKNAS MICHAIL

ACADEMIC YEAR: 2017-2018

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Σκρέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε ένα φιλικό περιβάλλον και για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Καταλυτική ήταν η βοήθεια των υπόλοιπων συναδέλφων του εργαστηρίου. Η Δάφνη, ο Ηλίας, η Μυρτώ και κυρίως η Σταφανία, η Λίνα και η Δήμητρααποτέλεσαν στήριγμά μου στις δύσκολες στιγμές και τους ευχαριστώ. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ψαρρά για την στήριξη και το ενδιαφέρον που επέδειξε για την περαίωση της πτυχιακής μου εργασίας.

<u>Τριμελής εξεταστική επιτροπή:</u>

1. Σκρέτας Γεώργιος- Ερευνητής Β', Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
2. Ψαρρά Άννα-Μαρία- Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.
3. Λεωνίδας Δημήτριος- Καθηγητής Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	**Σφάλμα! Δεν έχ**
Abstract	**Σφάλμα! Δεν έχ**
Θεωρητικό μέρος	**Σφάλμα! Δεν έχ**
Παραγωγή ενζύμων	8
Συστήματα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	10
Στρατηγικές επίλυσης πιθανών προβλημάτων κατά την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	28
Υλικά-μέθοδοι	35
Superoxide dismutase	47
Αναλώσιμα	49
Πειραματικά πρωτόκολλα	50
Ενζυμικά assays	62
Σκοπός	65
Αποτελέσματα-συζήτηση	69
Βιβλιογραφία	83

Περίληψη

Ένα από τα συνηθέστερα και πιο δύσκολα στην αντιμετώπιση προβλήματα κατά την υπερέκφραση διαλυτών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από τον ξενιστή E. Coli είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων. Από τις ήδη υπάρχουσες προσεγγίσεις για την παρακολούθηση της ποιότητας αναδίπλωσης αρκετά υποσχόμενη είναι η χρήση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP ως δείκτη αναδίπλωσης μέσω της σύμπτηξής της με την πρωτεΐνη της επιλογής μας. Από το εργαστήριο ενζυμικής και συνθετικής βιοτεχνολογίας του ΕΙΕ προτάθηκε μια μέθοδος με χρήση της χιμαιρικής πρωτεΐνης και πηκτής πολυακρυλαμίδης για καθορισμό τόσο της σωστά αναδιπλωμένης όσο και της συσσωματωμένης πρωτεΐνης. Η ανάγκη για μια τέτοια τεχνική προέκυψε από το γεγονός πως ο δείκτης της διαλυτότητας δεν είναι επαρκής δείκτης για την ποιότητα αναδίπλωσης μιας διαλυτής πρωτεΐνης. Για την επιβεβαίωση των δεδομένων που προέκυψαν, πραγματοποιήσαμε συμπληρωματικό πείραμα με την unfused πρωτεΐνη A4V superoxide dismutase1, που αφορούσαν την σύγκριση στην ενζυμική ενεργότητα μετά από διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων

Abstract

One of the most common problems and also difficult to troubleshoot, while overexpressing recombinant soluble proteins from E. coli cells is the formation of aggregates. Ideally, one would like to optimize the expression conditions by monitoring simultaneously and rapidly both the amounts of properly folded and aggregated membrane protein, a requirement not met by any of the currently available methods. Using GFP protein as a folding marker when fusing GFP with a protein of interest seems promising. Here, the laboratory of synthetic and enzymatic biotechnology of NRS suggested a single approach using the fused protein and an SDS-PAGE for monitoring both amounts of well-folded and aggregated protein. The need for such a method derives from the fact, that solubility seems inadequate as a marker for the quality of folding for a soluble protein. To determine if the data of this project can be validated, we conducted an additional experiment using the unfused A4V SOD1 protein and calculating the specific enzymic activity from samples of cells that were cultivated in three different conditions.

Θεωρητικό μέρος

Οι πρωτεΐνες, ο δομικός λίθος της ζωής, αποτελούν απαραίτητο συστατικό όλων των μορφών των έμβιων οργανισμών και συντίθενται ως μέρος του φυσιολογικού τους

μεταβολισμού. Μερικές ειδικές περιπτώσεις, όπως τα ένζυμα, λειτουργούν ως βιοκαταλύτες και έχουν την ικανότητα να αυξάνουν το ρυθμό μεταβολικών αντιδράσεων, ενώ άλλες είναι μέρος της δημιουργίας του κυτταροσκελετού. Σε γενικές γραμμές, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, σε αντιδράσεις ανοσολογικής απόκρισης, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και σε πληθώρα άλλων διεργασιών της κυτταρικής ομοιόστασης. Σε βιομηχανική κλίμακα, παράγονται και διατίθενται στο εμπόριο με την πολύτιμη συμβολή της γενετικής και πρωτεϊνικής μηχανικής και γενικότερα των συνεχών ανακαλύψεων στο πεδίο αυτό. Οι ανασυνδυασμένες και φυσικές (native) πρωτεϊνες συνεισφέρουν σε πολυάριθμους τομείς της φαρμακοβιομηχανίας, της βιομηχανίας των ενζύμων και τον κλάδο της γεωπονίας. Κατά συνέπεια, κλάδοι όπως αυτός της ιατρικής, της διαγνωστικής, η βιομηχανία τροφίμων και διατροφής, βιομηχανία παραγωγής πλαστικών και πολυμερών, χαρτιού και δέρματος καθώς και αρκετών άλλων επωφελούνται στο έπακρο από τις συνεχείς ανακαλύψεις.

Κάνοντας μια σύντομη ιστορική αναδρομή, το πρώτο πρωτεϊνικό εμβόλιο που παράχθηκε ήταν το εμβόλιο με το όνομα «cow-pox» το έτος 1796 από τον επιστήμονα Jenner και τους συνεργάτες του. Η βιομηχανία της μικροβιακής ζύμωσης μπήκε στο παιχνίδι στις αρχές του 1900, όταν ξεκίνησε η πρώτη ευρείας κλίμακας παραγωγή προϊόντων όπως η ακετόνη και η βουτανόλη μέσω της διαδικασίας της αναερόβιας ζύμωσης. Την τεχνική αυτή ακολούθησε αυτή της αερόβιας ζύμωσης, με την επιτυχημένη παραγωγή του κιτρικού οξέος. Η πενικιλλίνη, η οποία ανακαλύφθηκε το 1927, άρχισε να παράγεται στις αρχές της δεκαετίας του 1940, δηλαδή μετά την ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης. Η πρώτη πρωτεϊνη, που παράχθηκε για φαρμακευτικούς σκοπούς, ήταν η ινσουλίνη το 1922. Η σύγχρονη εποχή της βιοτεχνολογίας ορίζεται αρκετά μεταγενέστερα χρονικά, με σημείο εκκίνησης το έτος 1971 και την εταιρεία «Cetus Corporation», η ίδρυση της οποίας χρονολογείται περίπου 2 χρόνια πριν την άκρως σημαντική ανακάλυψη του ανασυνδυασμένου DNA από τους Berg, Cohen και Boyer. Αυτή η χρονιά-ορόσημο είχε ως αποτέλεσμα την καθιέρωση αρκετών μεγάλων εταιρειών βιοτεχνολογίας, λίγα χρόνια αργότερα.

Θα παρουσιάσουμε συνοπτικά τη χρήση σκευασμάτων, που χρησιμοποιούνται ως φαρμακευτικά προϊόντα στο χώρο της ιατρικής. Μέχρι το 2002, περισσότερα από 155 φαρμακευτικά σκευάσματα και εμβόλια είχαν αναπτυχθεί από φαρμακευτικές εταιρείες, ενώ τη σήμερον ημέρα ο αριθμός αυτός ξεπερνά τα εγκεκριμένα 200 πεπτίδια και φαρμακευτικές πρωτεϊνες στην παγκόσμια λίστα του FDA. Μερικά παραδείγματα ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, που παράγονται για φαρμακευτικούς σκοπούς αποτελούν η ανθρώπινη ινσουλίνη, η αλβουμίνη, η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (HGH), ο παράγοντας FIII καθώς και πολλές άλλες. Απόρροια αυτής της παραγωγής σε μεγάλο έυρος είναι η βελτίωση της ζωής ασθενών ενός μεγάλου δικτύου ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, τα πιο σημαντικά επιτεύγματα αφορούν τις εξής κατηγορίες ασθενών:

i. Ασθενείς, που πάσχουν από διαβήτη έπαψαν ν' ανησυχούν ότι ο οργανισμός τους θα αντιμετωπίσει ως «ξένο» σώμα την ζωική ινσουλίνη και θα οδηγηθεί στην παραγωγή αντισωμάτων ενάντια της
ii. Παιδιά που έχουν έλλειμμα στην αυξητική ορμόνη δε χρειάζεται πλέον να υποφέρουν από νανισμό ή να αντιμετωπίζουν την πιθανότητα να αποκτήσουν το σύνδρομο Kreutzfeld- Jacob

iii. Παιδιά με χρόνια κοκκιωματώδη νόσο μπορούν επιτέλους να έχουν μια φυσιολογική ζωή, αφού υποβληθούν σε θεραπεία με γ-ιντερφερόνη
iv. Ασθενείς που υπόκεινται σε χημειοθεραπείες για την καταπολέμηση του καρκίνου αναρρώνουν πιο γρήγορα και με μειωμένο τον κίνδυνο των μολύνσεων με την συμβολή του παράγοντα G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor)

Αυτά είναι τα πιο τρανταχτά μα μονάχα μερικά από τα πολλά παραδείγματα, στα οποία φαίνεται στην πράξη η τεράστια συνεισφορά του κλάδου αυτού στη διευκόλυνση της ζωής ασθενών ανά τον κόσμο.

-Παραγωγή ενζύμων: Η μεγάλη άνθιση της βιομηχανίας ενζύμων συνέβη τη δεκαετία του 1990, όταν ήρθαν στο προσκήνιο τα μικροβιακά ένζυμα. Μέχρι τότε και τις αρχές της δεκαετίας του 1980, η πλειονότητα ενζύμων προερχόταν παραδοσιακά από φυτικές και ζωικές πηγές, γεγονός που συνεπαγόταν σε αρκετά χαμηλό επίπεδο διαθεσιμότητας τους, υψηλό κόστος και κατά συνέπεια αναστολή ανάπτυξης της βιομηχανίας ενζύμων. Ένα άμεσο πλεονέκτημα των μικροβιακών ενζύμων αφορούσε το οικονομικό σκέλος, αφού η καλλιέργεια τους είναι συγκριτικά πολύ πιο γρήγορη και απλή. Ακολούθως, και η «χειραγώγηση» τους σε επίπεδο γενετικό, με σκοπό την παραγωγή των επιθυμητών ποσοτήτων αλλά ταυτόχρονα και κατάλληλης ποιότητας ενζύμων, αποδείχθηκε αρκετά πιο εύκολη. Μερικά παραδείγματα των κυριότερων ενζύμων από μικροβιακά συστήματα και της χρήσης τους για βιομηχανική παραγωγή παραθέτονται παρακάτω:

I. E. Coli amidase προς παραγωγή → 6-APA (6-aminopenicillanic acid), 40.000 τόνοι/ χρόνο
II. Streptomyces xylose isomerase προς ισομερίωση της D-Glucose σε → D-Fructose, 100.000 τόνοι/ χρόνο
III. Pseudomonas chlorapis nitrile hydratase προς παραγωγή: Acrylonitrile → acrylamide, 30.000 τόνοι/ χρόνο

Αξίζει επίσης να αναφερθεί, πως η παραγωγή των ενζύμων της οικογένειας των αμυλασών ανέρχεται στο ποσό των 95.000 τόνων ανά χρόνο. Ο συνολικός τζίρος της βιομηχανίας των ενζύμων ανερχόταν στο ποσό των 2 δισεκατομμυρίων δολαρίων, με την αλλαγή της χιλιετίας το 2000, ενώ πριν λίγα χρόνια ξεπέρασε το ποσό των 2,5 δισεκατομμυρίων. «Αρχηγός» της βιομηχανίας θεωρείται το ένζυμο της πρωτεάσης, που αντιπροσωπεύει λίγο περισσότερο από το μισό επί του συνολικού τζίρου. Ακολουθούν τα ένζυμα της αμυλάσης, της γλυκοαμυλάσης, η λιπάση, η λακτάση, η κυτταρινάση και άλλα. Ο μεγαλύτερος «πελάτης» της βιομηχανίας ενζύμων είναι η βιομηχανία τροφίμων και σίτισης. Αναφορικά με τους οργανισμούς-ξενιστές, την πρώτη θέση καταλαμβάνουν οι ζύμες, που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή παραπάνω από των μισών βιομηχανικών ενζύμων. Ακολουθούν τα βακτηριακά συστήματα, με ποσοστό που ανέρχεται στο 30% περίπου, ενώ οι ζωικοί οργανισμοί με 8% και τα φυτά με 4% συμπληρώνουν το παζλ. Οι αριθμοί αυτοί αλλάζουν σταδιακά και είναι δύσκολο να προβλέψει κανείς, ποιό θα είναι το σκηνικό στο άμεσο μέλλον, αν αναλογιστεί κανείς ποιά ενδέχεται να είναι η επίδραση μιας σημαντικής ανακάλυψης στο χώρο αυτό. Να σημειώσουμε, πως σημαντικός είναι και ο ρόλος των ενζύμων στην κατάλυση αντιδράσεων, που οδηγούν στο μικροβιακό σχηματισμό αντιβιοτικών και άλλων δευτερεύοντων μεταβολιτών.

Οι προσπάθειες που καταβάλλονται για τη βελτίωση της παραγωγής είναι συνεχείς. Με την πάροδο των χρόνων επιτεύχθηκαν μεγαλύτερα ποσά στην παραγωγή μέσω κατευθυνόμενων μεταλλάξεων και τυχαίου screening μικροοργανισμών. Η μεγαλύτερη ωστόσο ώθηση δόθηκε με την ανακάλυψη του ανασυνδυασμένου DNA, ένα γεγονός που χαρακτηρίζεται από μεγάλη μερίδα ως «μάννα εξ ουρανού». Έκτοτε, η βελτίωση που επήλθε σε διαφορετικές εκφάνσεις του πεδίου ήταν ανυπολόγιστη, με τις παρακάτω περιπτώσεις να είναι οι πιο σημαντικες:

1) Τα φυτικά και ζωικά ένζυμα αντικαταστάθηκαν από ένζυμα, προερχόμενα από μικροβιακή ζύμωση, π.χ. η χυμοσίνη
2) Ένζυμα που προέρχονται από οργανισμούς, οι οποίοι παρουσιάζουν δυσκολία είτε στην ανάπτυξη είτε στη γενετική χειραγώγηση, παράγονται από μικροοργανισμούς. Παραδείγματα αποτελούν τα στελέχη Aspergillus, Trichoderma, Saccharomyces cerevisiae κ.ά.
3) Η ενζυμική παραγωγή βελτιστοποιήθηκε μέσω της χρήσης γονιδίων πολλαπλών αντιγράφων, ισχυρούς υποκινητές και αποδοτικές αλληλουχίες σηματοδότησης
4) Παραγωγή χρήσιμων ενζύμων, προερχόμενων από παθογόνους ή τοξικούς οργανισμούς, υλοποιήθηκε μέσω της αντικατάστασης των φυσιολογικών ξενιστών από ασφαλείς ξενιστές
5) Ενισχύθηκε η σταθερότητα, η ενεργότητα και εξειδίκευση ενζύμων μέσω της μηχανικής επεξεργασίας των πρωτεϊνών

Ήδη από τη δεκαετία του 1990, πολλά ένζυμα παράγονταν με τεχνικές που βασίζονταν στον ανασυνδυασμό. Το έτος 1993, περισσότερο από το 50% της αγοράς των βιομηχανικών ενζύμων παρεχόταν από διαδικασίες ανασυνδυασμού, αποφέροντας πολλά εκατομμύρια δολάρια. Ένα παράδειγμα που τονίζει τα παραπάνω είναι η παραγωγή του ενζύμου φυτάση, η οποία αυξήθηκε κατά χίλιες φορές από το μικροοργανισμό A. Niger μέσω χρήσης της ανασυνδυασμένης τεχνολογίας. Επιπλέον παράδειγμα αποτελούν οι λιπάσες, που χρησιμοποιούνταν στο πλύσιμο των ρούχων, σε προϊόντα περιποίησης του δέρματος, καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων και με άλλες εφαρμογές. Οι νέες τεχνολογίες είχαν και ως αποτέλεσμα και τη δραστική μείωση στην τιμή των ενζύμων. Στα μέσα της δεκαετίας του 1990, ποσοστό της τάξης του 60% των ενζύμων για χρήση στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων, απορρυπαντικών και επεξεργασίας άμυλου ήταν ανασυνδυασμένα προϊόντα.

Η κατάσταση που επικρατεί σήμερα παρουσιάζει συνεχώς μια αυξητική πορεία προς τη βελτιστοποίηση των συνθηκών στη βιομηχανία των ενζύμων. Με την πολύτιμη συμβολή της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA αλλά και της μηχανικής επεξεργασίας των πρωτεϊνών, τα ένζυμα μπορούν να παραχθούν για κάθε περίπτωση ξεχωριστά όπως ένα κοστούμι από ένα ράφτη, στα μέτρα δηλαδή που επιθυμούμε κάθε φορά. Πλέον έχει ξεπεραστεί το πρόβλημα του περελθόντος, κατά το οποίο οι ερευνητές αναγκαστικά «εγκλωβίζονταν» στις φυσικές ιδιότητες μιας πρωτεϊνης. Αλλαγές, ακόμα και σημειακές, στην αμινοξική αλληλουχία τροποποιούν φυσικές ιδιότητες, όπως η περιοχή του βέλτιστου pH της πρωτεϊνης ή η εξειδίκευση του υποστρώματός της. Μια νέα μέθοδος για βελτίωση των ιδιοτήτων των ενζύμων ονομάζεται κατευθυνόμενη εξέλιξη (directed evolution). Σε αντίθεση με τις σημειακές μεταλλάξεις, αυτή η μέθοδος συσκεντρώνει και ανασυνδυάζει

διαφορετικές περιοχές από παρεμφερή γονίδια διαφορετικών ειδών ή στελεχών. Αυτή η διαδικασία διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα και αποφέρει εντυπωσιακές βελτιώσεις. Ουσιαστικά μιμείται τη φύση στο γεγονός ότι οι μεταλλάξεις, η επιλογή και ο ανασυνδυασμός χρησιμοποιούνται για να εξελίξουν πρωτεϊνες που παρουσιάζουν μεγάλη προσαρμοστικότητα και σε χρόνο ασύγκριτα μικρότερο. Σκευάσματα που αναπτύχθηκαν βάσει αυτή της τεχνικής είναι διαθέσιμα από τη νέα χιλιετία.

-Συστήματα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών:

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα ποσά που διακυβεύονται στο χώρο της βιομηχανίας πρωτεϊνών και ενζύμων είναι υπέρογγα. Συνεπώς, γίνεται συνεχής προσπάθεια για βελτίωση των συνθηκών παραγωγής και για αυξημένη έκφραση. Επομένως, η πλειοψηφία των βιοφαρμακευτικών προϊόντων που παράγονται σήμερα είναι αποτέλεσμα ανασυνδυασμού. Σε θεωρητικό επίπεδο, τα βήματα που πρέπει να ακολουθήσει κάποιος ερευνητής για να ανακτήσει την επιθυμητή πρωτεϊνη, καθαρισμένη στην ανασυνδυασμένη της μορφή, είναι αρκετά απλά και ξεκάθαρα στην εφαρμογή τους. Ωστόσο, τα πρακτικά ζητήματα που είναι πιθανό να προκύψουν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας αποτελούν τροχοπέδη για την τελική έκβαση του πειράματος. Αν παραθέσουμε συνοπτικά τα στάδια της διαδικασίας, αυτά αποτελούνται από τα εξής διακριτά βήματα: Χρησιμοποιούμε το γονίδιο ενδιαφέροντός μας, το κλωνοποιούμε σε κάποιο φορέα έκφρασης που έχουμε στη διάθεσή μας, το μετασχηματίζουμε στον ξενιστή της επιλογής μας, επάγουμε την παραγωγή και κατ’ αυτόν τον τρόπο η πρωτεϊνη που μας ενδιαφέρει μπορεί να απομονωθεί και να καθαριστεί, για να γίνει ο βιοχημικός καθορισμός της. Στην πράξη, βέβαια, τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν και να καταστήσουν δύσκολη τη διαδικασία, είναι αρκετά. Κάποια από αυτά είναι η ανεπαρκής ανάπτυξη των κυττάρων του ξενιστή, η δημιουργία inclusion bodies, η πιθανότητα η πρωτεϊνη να παράγεται στην ανενεργή της μορφή, αλλά και η πιθανότητα να μην είναι δυνατή η συλλογή της.

Το πιο βασικό κομμάτι, που θα καθορίσει την στρατηγική του πειράματος, αφορά την επιλογή του οργανισμού-ξενιστή που θα επιλέξουμε ως εργοστάσιο παραγωγής της επιθυμητής πρωτεϊνης. Η απόφαση αυτή θα αποτελέσει τον πιο καθοριστικό παράγοντα για τον σχεδιασμό του πειράματος, κάτι που σημαίνει πως διαφορετικοί ξενιστές απαιτούν τη χρήση διαφορετικής τεχνολογίας, εξοπλισμού καθώς και μοριακών εργαλείων και αντιδραστηρίων. Ανάμεσα στις πιθανές επιλογές των μικροοργανισμών ως ξενιστή, συναντάμε βακτήρια, ζύμες, μύκητες και άλγη. Όπως αναμένει κανείς, κάθε μια επιλογή παρουσιάζει κάποια πλεονεκτήματα και αδύνατα σημεία και συχνά η επιλογή βασίζεται στις ιδιότητες της προς μελέτη πρωτεϊνης. Παραδείγματος χάριν, στην περίπτωση που απαιτούνται ευκαρυωτικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις για την εύρυθμη λειτουργία του ανασυνδυασμένου προϊόντος, όπως η γλυκοσυλίωση, τότε αποκλείονται τα συστήματα έκφρασης προκαρυωτικών οργανισμών.

Οι επιλογές σε αυτό το σημείο ποικίλλουν. Ανάλογα το κάθε πείραμα ξεχωριστά, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε καλλιέργειες βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων, διαγονιδιακών ζώων ή φυτών. Εναλλακτικές, αλλά σπανιότερες επιλογές αποτελούν κάποια είδη εντόμων και μούχλας. Η τελική επιλογή βασίζεται στην ποιότητα της παραγώμενης πρωτεϊνης, τη

λειτουργικότητά της, το χρονικό διάστημα παραγωγής, την απόδοση και το κόστος της διαδικασίας.

Πρωτεϊνες που δεν απαιτούν γλυκοσυλίωση παράγονται κατά κανόνα από τα βακτήρια E. Coli ή σπανιότερα από στελέχη ζύμης και αποτελούν περίπου το 40% θεραπευτικών πρωτεϊνικών σκευασμάτων. N-γλυκοσυλιωμένες πρωτεϊνες παράγονται από κύτταρα θηλαστικών, που μιμούνται την ανθρώπινη γλυκοσυλίωση. Κύτταρα CHO (Chinese hamster ovary) προσφέρουν το 50%, ωστόσο η διαδικασία παραγωγής είναι πολύ ακριβή και συχνά χρειάζεται τροποποίηση στις γλυκοπρωτεϊνες, που δεν είναι ταυτόσημες με τις ανρθρώπινες. Οι ζύμες, μούχλες και τα έντομα είναι σε γενικές γραμμές συστήματα ανίκανα να προσφέρουν τυπική θηλαστική γλυκοσυλίωση. Ωστόσο, στελέχη της οικογένειας της μεθυλοτρόπου ζύμης τροποποιήθηκαν γενετικά για παραγωγή ενός τύπου ανθρώπινης γλυκοσυλίωσης.

Κατά βάση, πρωτεϊνες με μεγάλο μοριακό βάρος εκφράζονται σε συστήματα ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ αυτές με μικρότερο μέγεθος σε προκαρυώτες. Επίσης, όταν είναι απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοσυλίωση, επιλέγονται οργανισμοί-ξενιστές ανάμεσα σε θηλαστικά, μύκητες ή βακιλοιούς. Ωστόσο, είναι ευρέως γνωστό, πως ο πιο εύκολος, φθηνός και συνάμα γρήγορος τρόπος για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι τα βακτηριακά στελέχη E. Coli, τα οποία όμως παρουσίαζουν ανικανότητα για παραγωγή μεγάλων σε μέγεθος πρωτεϊνών σε ικανοποιητικό ποσοστό επιτυχίας. Εκτός από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τα E. Coli δεν πρωτιμώνται και σε περιπτώσεις που η επιθυμητή πρωτεϊνη είναι πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς. Θα ακολουθήσει μια ανασκόπηση των πιθανών επιλογών, που μπορούν να λειτουργήσουν ως οργανισμοί-ξενιστές.

Οι πιο διαδεδομένες ζύμες, που χρησιμοποιούνται ως εργοστάσια παραγωγής ανασυνδυασμένων προϊόντων είναι τα στελέχη S. Cerevisiae και P. Pastoris και είναι ικανά να παράξουν μεγάλα ποσά της πρωτεϊνης- επιλογής αλλά και σε χαμηλό κόστος. Συμπληρωματικά, μπορούν να εκφράσουν χωρίς πρόβλημα πρωτεϊνες μεγέθους μεγαλύτερου των 50 kDa, καθώς και σηματοδοτικών αλληλουχιών ή να διεκπεραιώσουν τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της γλυκοσυλίωσης. Το πλεονέκτημα που παρουσιάζει το σύστημα του βακιλοιού, είναι πως μπορεί να φέρει εις πέρας πιο πολύπλοκες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στην περίπτωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που προέρχονται από θηλαστικούς οργανισμούς και έχουν υποστεί γλυκοσυλίωση, η πιο συνήθης επιλογή είναι αυτή των θηλαστικών. Γενετικά τροποποιημένα ζώα μπορούν να παράξουν ανασυνδυασμένες πρωτεϊνες και να τις εκκρίνουν στα σωματικά τους υγρά, όπως το γάλα, το αίμα ή τα ούρα, όπου γίνεται και η συλλογή τους. Αντίστοιχα, διαγονιδιακά φυτά, όπως αυτό της A. Thaliana, μπορούν να δώσουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο προϊόν.

Βακτήρια:

Αναμφίβολα, η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσω μικροβιακών συστημάτων έχει αποδειχθεί καινοτόμα και συνάμα έφερε επανάσταση στο χώρο της βιοχημείας.

Παρελθόν αποτελούν, πλέον, μέθοδοι όπου απαιτούνταν υπέρογκα ποσά από ζωικούς ή και φυτικούς ιστούς ή μεγάλες ποσότητες βιολογικών υγρών για τον καθαρισμό και την απομόνωση μόνο μικρής ποσότητας της επιθυμητής πρωτεϊνης. Τη σήμερον ημέρα είναι σχεδόν βέβαιο, πως κάθε ερευνητής που ενασχολείται με κάποιο πείραμα, στο οποίο απαιτείται η χρήση μια καθαρισμένης πρωτεϊνης, θα καταφύγει συνήθως στη λύση της ανασυνδυασμένης της μορφής. Η ικανότητα της έκφρασης και επακόλουθης απομόνωσης/ καθαρισμού της επιθυμητής ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης σε μεγάλη κλίμακα παραγωγής μας δίνει τη δυνατότητα για βιοχημικό καθορισμό. Επιπλέον, επιτρέπει και τη χρήση της για βιομηχανική παραγωγή και ανάπτυξη εμπορικών αγαθών.

E. Coli.

Ο οργανισμός, που είναι από τις πιο διαδεδομένες επιλογές ως οργανισμός-ξενιστής για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, αλλά αποτελεί και πολύ καλά μελετημένο σύστημα, είναι το βακτήριο E. Coli. Η χρήση τους ως κυτταρικό εργοστάσιο παραγωγής έχει καθιερώσει το βακτήριο αυτό ως την πιο διαδεδομένη πλατφόρμα παραγωγής. Ως αποτέλεσμα, υπάρχουν πλέον αρκετά μοριακά εργαλεία και πρωτόκολλα στη διάθεση των επιστημόνων για παραγωγή σε υψηλή κλίμακα ετερόλογων πρωτεϊνών, καθώς και κατάλογος με μεγάλο αριθμό πλασμιδίων έκφρασης για το εκάστοτε πείραμα, στελεχών που έχουν υποστεί μηχανική επεξεργασία και πληθώρα στρατηγικών για την επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας. Συνεπώς, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές προσεγγίσεις που βρίσκουν εφαρμογή σε διαφορετικές συνθήκες και σε κάθε πρόβλημα ξεχωριστά.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της επιλογής είναι αρκετά και έχουν εξακριβωθεί μετά από εκτενείς μελέτες. Αρχικά, οι ρυθμοί ανάπτυξης του μικροοργανισμού είναι ασυναγώνιστα ταχείς σε σύγκριση με άλλα συστήματα έκφρασης. Παρουσία αλάτων γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο και υπό τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες επώασης, ο χρόνος διπλασιασμού τους διαρκεί περίπου είκοσι λεπτά. Αυτό πρακτικά σημαίνει, πως μια καλλιέργεια μπορεί να φτάσει τη στατική φάση και να είναι έτοιμη για καθαρισμό μετά από μερικές ώρες, όταν έχει εμβολιαστεί με 1% αραιωμένη ποσότητα «κορεσμένης» καλλιέργειας. Ωστόσο, σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειώσουμε, πως η έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης είναι πιθανό να προκαλέσει ένα αβάσταχτο μεταβολικό βάρος στο μικροοργανισμό, το οποίο συνεπάγεται σε σημαντική μέιωση του χρόνου παραγωγής του. Συμπληρωματικά, καλλιέργειες υψηλής κυτταρικής πυκνότητας είναι εύκολο να επιτευχθούν. Βέβαια, τα θεωρητικά επίπεδα πυκνότητας είναι ασύγκριτα μεγαλύτερα από αυτά που επιτυγχάνονται στην πράξη. Η ολοένα και αυξανόμενη γνώση αναφορικά με τη φυσιολογία του μιρκοοργανισμού αυτού αναμένεται να αντιμετωπίσει τέτοιου είδους ζητήματα. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα των E. Coli ως ξενιστές είναι το χαμηλό κόστος των θρεπτικών μέσων και παράλληλα ο χαμηλός δείκτης πολυπλοκότητάς της σύνθεσής τους. Πειράματα μεγάλης κλίμακας, είναι λοιπόν, πιο προσιτά όταν σχεδιάζονται και συμπεριλαμβάνουν τα βακτήρια E. Coli ως μηχανές παραγωγής των εκάστοτε πρωτεϊνών. Ακόμη, το στάδιο του μετασχηματισμού τους είναι εύκολο και ταυτόχρονα γρήγορο διευκολύνοντας κατ΄αυτόν τον τρόπο το έργο των ερευνητών. Η διαδικασία αυτή δεν ξεπερνά τα 5 λεπτά.

Συγκεντρωτικά, τα βασικότερα πλεονεκτήματα καθώς και μειονεκτήματα του βακτηρίου αυτού:

Πλεονεκτήματα:

- Μικρός χρόνος έκφρασης
- Υψηλά ποσά παραγώμενων πρωτεϊνών
- Ευκολία σε καλλιέργεια και τροποποίηση γονιδιώματος
- Χαμηλό κόστος καλλιέργειας
- Γρήγορη μαζική παραγωγή και καλή αναλογία κόστους/ αποτελέσματος

Μειονεκτήματα:

- Δυσκολία έκφρασης πρωτεϊνών με δισουλφιδικούς δεσμούς
- Παραγωγή κυρίως μη γλυκοσυλιωμένων πρωτεϊνών
- Παραγωγή πρωτεϊνών με ενδοτοξίνες
- Δημιουργία οξικών ενώσεων λόγω ψηλής κυτταρικής πυκνότητας, που οδηγούν σε κυτταρική τοξικότητα
- Παραγωγή πρωτεϊνών ως inclusion bodies, ανενεργές

Μετά από την σύντομη περιγραφή στα προτερήματα και τα αδύνατα σημεία, που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός ως ξενιστής, θα ρίξουμε μια πιο προσεκτική ματιά στον οργανισμό αυτό, που ενδεχομένως αποτελεί το σημαντικότερο εργαλείο στα χέρια των ερευνητών. Αρχικά να σημειώσουμε, πως η γνώση πάνω στους γενετικούς μηχανισμούς των E. Coli είναι μακράν η μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Οι τελευταίες εξελίξεις στη γνώση των στοιχειωδών μηχανισμών στο επίπεδο της μεταγραφής και της μετάφρασης, καθώς και αναφορικά με την αναδίπλωση του βακτηρίου σε συνδυασμό με τα νέα διαθέσιμα γενετικά εργαλεία, το καθιστούν πιο χρήσιμο από ποτέ. Ακόμα και στην περίπτωση της έκφρασης ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, που παρουσιάζουν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα, θα έλεγε κανείς. Το γονιδιώμα του είναι εύκολα «χειραγωγήσιμο» και η τροποποίηση του μπορεί να γίνει με ακρίβεια, η ρύθμιση του υποκινητή και του αριθμού των αντιγράφων αλλάζουν εύκολα. Επιπλέον, είναι δυνατή η τροποποίηση της μεταβολικής ροής άνθρακα, ενδοκυτταρικών δισουλφιδικών δεσμών και αποφυγή αναλόγων των αμινοξέων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η συνεχής βελτιστοποίηση με αποτέλεσμα το βακτήριο να έχει την ικανότητα να συσσωρεύσει ανασυνδυασμένες πρωτεϊνες, που αγγίζουν το 80% του στεγνού του βάρους και να επιβιώσει σε πληθώρα περιβαλλοντικών συνθηκών.

Μερικά γενικευμένα μέτρα-προφυλάξεις, τα οποία είναι καλό να λαμβάνονται για να βελτιώσουν τη διαδικασία ή να αντιμετωπίσουν κάποιο ενδεχόμενο πρόβλημα στη βακτηριακή καλλιέργεια θα παρατεθούν παρακάτω:

1. Χρήση διαφορετικών υποκινητών για ρύθμιση έκφρασης με μεγαλύτερη ακρίβεια
2. Χρήση διαφορετικών στελεχών-ξενιστών
3. Ταυτόχρονη έκφραση με πρωτεϊνες- συνοδούς ή πρωτεϊνες ειδικές για σωστή αναδίπλωση (chaperones, foldases)
4. Μείωση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας

5. Έκκριση πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο ή εξωκυτταρικά στο θρεπτικό μέσο
6. Μείωση του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης
7. Τροποποίηση των συστατικών του θρεπτικού μέσου
8. Προσθήκη fusion partners
9. Έκφραση μόνο τμήματος της πρωτεϊνης
10. In vitro μετουσίωση της πρωτεϊνης και αναδίπλωσή της

Στην συνέχεια θα μελετήσουμε ειδικότερα κάποια από τα πιθανά προβλήματα, που τονίσαμε προηγουμένως και πιθανούς τρόπους επίλυσής τους. Το πρόβλημα της τοξικότητας λόγω ψηλής οξύτητας μπορεί να επιλυθεί με την εκθετική τροφοδότηση γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο και ταυτόχρονο έλεγχο, ώστε ο ρυθμός ανάπτυξης να παραμένει χαμηλότερος από το όριο, στο οποίο παρατηρείται η παραγωγή οξικών ενώσεων. Κατά την εμφάνιση του ζητήματος των inclusion bodies, η ανασυνδυασμένη πρωτεϊνη παραμένει ανενεργή, υπό μορφή συσσωμάτων και αδιάλυτη, ενώ συνήθως περιέχει και ενδο- και διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, καθώς και ασυνήθιστα ελεύθερα κατάλοιπα κυστεϊνης.

Συνηθέστερα, μεγαλύτερα ποσά παράγονται στο κυτταρόπλασμα παρά στον περιπλασματικό χώρο. Κυτταροπλασματικές πρωτεϊνες μπορούν να μεταφερθούν στο περίπλασμα για να διευκολυνθεί ο καθαρισμός και για να αποκτήσουν το σωστό πακετάρισμα. Αυτό πρέπει να πραγματοποιηθεί σε πρωτεϊνες, που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς, από την στιγμή που το κυτταρόπλασμα είναι πολύ αναγωγικό περιβάλλον. Για την έκκριση των πρωτεϊνών αυτών στο περίπλασμα, γίνεται συγχώνευση με ενα πεπτίδιο στο αμινοτελικό άκρο. Για να μεταφερθεί η πρωτεϊνη απ΄το περίπλασμα στο θρεπτικό μέσο, συχνά χρησιμοποιείταο οσμωτικό σοκ ή το κυτταρικό τοίχωμα καθίσταται παροδικά διαπερατό.

Για αύξηση παραγωγής γίνεται χρήση συστήματος υποκινητών (lac, tac, trc). Συστήματα υποκινητών πρέπει να είναι ισχυρά και ενδελεχώς ελεγχόμενα για να έχουν χαμηλό επίπεδο βασικής έκφρασης, να είναι εύκολα στη μεταφορά σε άλλα στελέχη E. Coli και να έχουν απλό σύστημα επαγωγής, το οποίο να κοστίζει λίγο και να είναι ανεξάρτητο από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου.

Bacillus:

Εκτός από τα E. Coli, ένα άλλο χρήσιμο βακτηριακό σύστημα αποτελούν τα Gram+ βακτήρια του στελέχους Bacillus. Ο οργανισμός αυτός προτιμάται κυρίως για ομόλογη έκφραση ενζύμων όπως πρωτεάσες και αμυλάσες. Τα πλεονεκτήματα που θα αναφέρουμε παρακάτω δεν συναντώνται σε όλα τα στελέχη του γένους αυτού, καθώς αρκετά από αυτά υπάρχουν μόνο σε βιομηχανικά στελέχη, που συνήθως δεν είναι διαθέσιμα για ερευνητικούς σκοπούς. Συμπληρωματικά, μετά από αλληλούχιση δύο στελεχών του γένους Bacillus δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ενδοτοξινών ούτε εξωτοξινών, που είναι βλαβερές για το κύτταρο. Πιο διαδεδομένη είναι η χρήση τεσσάρων στελεχών, τα οποία δεν έχουν εξωτερικές μεμβράνες με λιποσακχαρίτες όπως τα gram- βακτήρια. Σε συγκεκριμένα στελέχη όπως το B. subtilis παρατηρούνται προβλήματα σχετικά με την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, αφού περιέχουν υψηλό αριθμό πρωτεασών, οι οποίες ενδέχεται να καταστρέψουν το ανασυνδυασμένο προϊόν. Περιέχουν εφτά αναγνωρισμένες

πρωτεάσες, πέντε από τις οποίες είναι εξωκυτταρικές. Επιπροσθέτως, χρειάζεται προσοχή, καθώς οι υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσουν πρόβλημα, όπως και η αυξημένη παροχή οξυγλονου στο σύστημα. Κάτι τέτοιο μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικα στην παραγωγή ορισμένων πρωτεϊνών. Βιβλιογραφικά υπάρχουν και περιπτώσεις επιτυχημένης ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα την εστεράση, αλλά ο αριθμός τους είναι περιορισμένος.

Πλεονεκτήματα συστημάτων έκφρασης στελεχών Bacillus:

- Ικανοποιητική έκκριση πρωτεϊνών χωρίς τον σχηματισμό ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων
- Εύκολα χειραγωγίσιμος οργανισμός
- Σύστημα, που έχει χαρακτηριστεί σε μεγάλο βαθμό σε γενετικό επίπεδο
- Έξοχα ανεπτυγμένος μηχανισμός μετασχηματισμού και πολύ καλή τεχνολογια για γονιδιακή αντικατάσταση
- Χαρακτηρίζονται από αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης
- Ισχυρό μεταβολικό προφίλ
- Έχουν χαρακτηριστεί ως «ασφαλείς» από τον FDA
- Η ανάκτηση του επιθυμητού προϊόντος είναι αποτελεσματική και με χαμηλό κόστος

Πέρα από αυτά τα βακτηριακά στελέχη, οι περιπτώσεις που χρησιμοποιείται κάποιο άλλο βακτήριο είναι λίγες. Η ανάπτυξη ενός βακτηριακού gram- στελέχους, που υπερτερεί έναντι των στελέχων του E. Coli ως προς τον σχηματισμό inclusion bodies, φαίνεται να ξεχωρίζει.

Ζύμες: Το επόμενο εργοστάσιο παραγωγής, που θα μελετηθεί, είναι οι ζύμες. Αυτοί οι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούνται συχνά για παραγωγή πρωτεϊνών, που παρουσιάζουν δυσκολίες στην έκφραση σε βακτηριακά συστήματα. Ο λόγος σχετίζεται συνήθως με τη λανθασμένη αναδίπλωση που αποκτούν, όταν παράγονται στα βακτηριακά συστήματα, καθώς και η ανικανότητα αυτών των οργανισμών-ξενιστών να φέρουν εις πέρας μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η γύκοσυλίωση. Θα έλεγε λοιπόν κανείς, πως αναλαμβάνουν το έργο έκφρασης των περιπτώσεων αυτών, που αποτυγχάνουν να υλοποιήσουν τα βακτηριακά στελέχη. Οι γνώσεις γύρω από τα δυο κύρια στελέχη ζύμης που χρησιμοποιούνται, τα S. Cerevisiae και το μεθυλοτροπικό P. Pastoris, είναι σε βάθος και τα στελέχη αυτά θεωρούνται οργανισμοί αρκετά καλα χαρακτηρισμένοι σε γενετικό επίπεδο. Θεωρούνται αρκετά χρήσιμοι οργανισμοί για την παραγωγή και μελέτη διαφορετικών ανασυνδυασμένων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Τα πλεονεκτήματα των στελεχών της ζύμης αναγράφονται παρακάτω και είναι τα εξής:

- Υψηλά ποσά παραγώμενης πρωτεϊνης
- Τα στελέχη προσφέρουν σταθερή παραγωγή, ενώ χαρακτηρίζονται και από ανθεκτικότητα
- Χαμηλό κόστος παραγωγής σε σύγκριση με θηλαστικά και έντομα
- Καλλιέργειες υψηλής πυκνότητας, μεγάλη παραγωγικότητα
- Ταχεία ανάπτυξη σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο
- Παρόμοια επεξεργασία πρωτεϊνικού προϊόντος με κύτταρα θηλαστικών
- Φέρει εις πέρας μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η γλυκοσυλίωση,
- Παραγωγή λειτουργικών πρωτεϊνών, πλούσιες σε δισουλφιδικούς δεσμούς

- Εξυπηρετεί σωστό «πακετάρισμα» πρωτεϊνών

Εν συνεχεία, θα επικεντρωθούμε στους δυο κυριότερους «εκπροσώπους» από τις ζύμες, ξεκινώντας με το στέλεχος S. Cerevisiae. Παράδειγμα πρωτεϊνης, που παράγεται με χρήση του συγκεκριμένου ευκαρυωτικού οργανισμού, αποτελεί η ινσουλίνη. Το στέλεχος αυτό υπερτερεί έναντι των βακτηρίων ως ξενιστής και προσφέρει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα, τα οποία μπορεί να δει κανείς παρακάτω:

a. Χρησιμοποιείται αρκετό καιρό στη βιομηχανική ζύμωση, με αποτέλεσμα να υπάρχει καλή γνώση για τους γενετικούς μηχανισμούς του
b. Έκκριση ετερόλογων πρωτεϊνών στο εξωκυτταρικό μέσο με κατάλληλες σηματοδοτικές αλληλουχίες, ενσωματωμένες στα δομικά του γονίδια
c. Ικανότητα γλυκοσυλίωσης. Έχει παρατηρηθεί, ωστόσο, το φαινόμενο, κατά το οποίο η Ο-γλυκοσυλίωση που προσφέρει το στέλεχος αυτό σε πρωτεϊνες θηλαστικών να μην επαρκεί, καθώς οι Ο-ολιγοσακχαρίτες περιέχουν μόνο μανόζη ενώ πρωτεϊνες ανώτερων ευκαρυωτών περιέχουν σιαλυλιωμένες αλυσίδες Ο-ολιγοσακχαριτών. Επιπλέον, οι ζύμες υπεργλυκοσυλιώνουν σημεία που δέχονται Ν-γλυκοσυλίωση, με αποτέλεσμα να μειώνεται τόσο η ενεργότητα όσο και η ικανότητα πρόσδεσης με τον υποδοχέα. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να προκαλέσει ανεπιθύμητες ανοσολογικές αποκρίσεις.

Γλυκοσυλίωση: Σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά πεπτίδια, λαμβάνει χώρα αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίση. Η γλυκοσυλίωση είναι είδο-, ιστό- και κυτταροειδική. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μια φυσιολογικά γλυκοσυλιωμένη πρωτεϊνη είναι ενεργή χωρίς το υδατανθρακικό μισό και μπορεί να παραχθεί στα βακτήρια (π.χ. γ-ιντερφερόνη). Όταν η γλυκοσυλίωση είναι επιβεβλημένη για σταθερότητα ή κατάλληλη αναδίπλωση (π.χ. ερυθροποιητίνη) γίνεται χρήση οργανισμών της ζύμης, μούχλας, εντόμων ή θηλαστικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαφέρει από περίπτωση σε περίπτωση και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το θρεπτικό μέσο, παραδείγματος χάριν. Η τροποποίηση αυτή επηρεάζει την κινητική αντιδράσεων, τη διαλυτότητα της πρωτεϊνης, το χρόνο ημιζωής ορού, τη θερμοδυναμική σταθερότητα, την πρόσδεση σε υποδοχέα και μερικές άλλες ιδιότητες. Υπάρχουν δυο είδη γλυκοσυλίωσης, η Ο-, και η Ν-γλυκοσυλίωση. Η Ν- γίνεται μέσω δεσμού σε κατάλοιπο ασπαραγίνης σε αλληλουχία Asn-X-Ser/Thr, ενώ η Ο΄γλυκοσυλίωση μέσω δεσμού σε κατάλοιπο σερίνης, θρεονίνης, υδροξυπρολίνης ή υδροξυλυσίνης. Τα κατάλοιπα που δέχονται την τροποίηση της γλυκοσυλίωσης μπορεί να είναι εν μέρει γλυκοσυλιωμένα ή και καθόλου, με συνέπεια να παρουσιαστεί πρόβλημα ετερογένειας.

Οι μεθυλοτροπικές ζύμες αποτελούν τη δεύτερη κατήγορια, την οποία θα αναλύσουμε λίγο πιο ενδελεχώς. Οι ζύμες αυτές έχουν μετραπεί σε αρκετά ελκυστικούς ξενιστές, αφού οι υποκινητές τους συγκαταλέγονται μεταξύ των πιο ισχυρών και ταυτόχρονα αυτών που υπόκεινται στον πιο αυστηρό έλεγχο. Παρουσιάζουν ταχεία κυτταρική ανάπτυξη, σε υψηλή πυκνότητα, με δυνατότητα χειραγώγισης των επιπέδων παραγωγής κάνοντας μικρές τροποποιήσεις στα συστατικά του θρεπτικού μέσου. Έχουν κοινά μεταβολικά μονοπάτια και ικανότητα αξιοποίησης της μεθανόλης ως μοναδική πηγή άνθρακα. Σε περίπτωση λοιπόν, που υπάρχει μεθανόλη στο θρεπτικό υλικό ή στο περιβάλλον τους, αυτή είναι ικανή

να επάγει και να ενεργοποιήσει τους μηχανισμούς που θα οδηγήσουν το σύστημα της ζύμης στην πρωτεϊνοσύνθεση και την παραγωγή αρκετών ενζύμων σε υψηλά επίπεδα.

Ρίχνοντας μια πιο προσεκτική ματιά σε ένα παράδειγμα μεθυλοτροπικής ζύμης, την Pichia, θα κάνουμε μια σύγκριση με τα βακτήρια E. Coli και με άλλους οργανισμούς-ξενιστές ως προς τις δυνατότητές τους στην παραγωγή ανασυνδυασμένων προϊόντων. Το πιο σημαντικό ίσως προτέρημα της ζύμης αυτής έναντι του πιο διαδεδομένου βακτηριακού οργανισμού, αφορά τη γλυκοσυλίωση και τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Όπως είδαμε παραπάνω, τα βακτηριακά στελέχη είναι ανίκανα να φέρουν εις πέρας την συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, ενώ δυσκολία παρουσιάζουν και στις περιπτώσεις που η επιθυμητή πρωτεϊνη είναι πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς. Αντιθέτως, οι ζύμες Pichia έχει την ικανότητα να υλοποιήσει και τις δυο προαναφερθείσες λειτουργίες με επιτυχία. Έτσι, ενώ τα βακτήρια παράγουν πρωτεϊνες με λανθασμένη αναδίπλωση ή αδιάλυτη και με μειωμένη ενεργότητα, οι ζύμες αυτές δεν έχουν κανένα συνήθως πρόβλημα να εκφράσουν λειτουργικές και ενεργές πρωτεϊνες. Η σύγκριση της ζύμης έναντι κυττάρων της Drosophila melanogaster ή των θηλαστικών CHO κυττάρων βγάζει πάλι νικητρια την πρώτη σε επίπεδο ποσότητας παραγώμενης πρωτεϊνης. Οι κυτταρικές σειρές πολυκύτταρων οργανισμών απαιτούν κατά κανόντα πιο σύνθετα και ακριβότερα θρεπτικά μέσα, αυξάνοντας έτσι αρκετά το κόστος παραγωγής τους. Επιπλέον, η Pichia μπορεί να αναπτυχθεί σε μέσο που περιέχει μόνο μια πηγή άνθρακα και μία πηγή αζώτου, κάτι που την καθιστά κατάλληλη για εφαρμογές ισοτοπικού προσδιορισμού όπως το πρωτεϊνικό NMR. Σημαντικό πλεονέκτημα των μεθυλοτροπικών P. Pastoris έναντι άλλων ζυμών είναι η ικανότητα έκκρισης των παραγώμενων πρωτεϊνών στο εξωκυττάριο περιβάλλον.

Ακολούθως θα παραθέσουμε τα δυνατά και αδύναμα σημεία του προφίλ ανάμεσα στις ζύμες Pichia και S. Cerevisiae. Οι πρώτες παρουσιάζουν ανώτερη παραγωγικότητα, ενώ αποφεύγουν να υπεργλυκοσυλιώνουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεϊνες. Αυτό συμβαίνει επειδή η γλυκοσυλίωση στις ζύμες Pichia είναι λιγότερο εκτενής Επιπλέον, έχουν τη ξεχωριστή ιδιότητα ανάπτυξης παρουσία μεθανόλης, η οποία κρίνεται τοξική για θανατηφόρος για τους περισσοτερους μικροοργανισμούς. Το σύστημα που απαιτείται να συντηρηθεί είναι αρκετά απλό και με χαμηλό κόστος. Τέλος, μπορούν να εντάξουν πολλαπλά αντίγραφα «ξένου» DNA στο χρωμοσομικό τους γονιδίωμα και τα μετασχηματισμένα στελέχη να παραμένουν σταθερά. Οι ζύμες Pichia μειονεκτούν όταν επιλέγονται ως οργανισμοί-ξενιστές για παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών. Αυτό είναι απόρροια του γεγονόνοτος, πως οι Pichia δεν έχουν την ικανότητα παραγωγής πρωτεϊνών-μοριακών συνοδών, που είναι απαραίτητες για την σωστή διαμόρφωση στο χώρο ορισμένων ανασυνδυασμένων προϊόντων. Σε γενικές γραμμές, οι ζύμες αποτελούν μια καλή εναλλακτική επιλογή, σε περιπτώσεις που η επιθυμητή πρωτεϊνη απαιτεί κάποια τροποποίηση είτε για σωστή αναδίπλωση είτε για να αποκτήσει μέγιστη ενεργότητα.

Νηματοειδείς μύκητες (μούχλες): Η οικογένεια των νηματωειδών μυκήτων προσφέρει μια ακόμη ελκυστική επιλογή για την παραγωγή ανασυνδυασμένων προϊόντων. Αυτό έγκειται κυρίως στην ικανότητα τους για έκκριση μεγάλων ποσοτήτων βιοενεργών πρωτεϊνών με δυνατότητα για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Επίσης, μπορούν να ενσωματώσουν μεγάλο αριθμό γονιδίων μέσω πλασμιδίων, μεγάλο αριθμό αντιγράφων και να έχουν σταθερότητα γονιδιώματος. Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί ο οργανισμός

A. Niger. Ωστόσο, παρά τις όποιες επιτυχημένες πειραματικές προσπάθειες χρήσης των μυκήτων, συχνά η παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών είναι ελάχιστη. Μερικές φορές τεχνικές για ενίσχυση της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν και είχαν αποτέλεσμα, χωρίς όμως πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειώσουμε, πως υψηλός αριθμός αντιγράφων δεν συνεπάγεται και μεγαλύτερα ποσά παραγώμενης πρωτεϊνης. Παρατηρήθηκε, πως το πιο συχνό πρόβλημα εντοπιζόταν στο επίπεδο της μεταγραφής. Πιθανή εξήγηση είναι η αλληλεπίδραση των γονιδιακών αντιγράφων που εισάγονται στο σύστημ ή οι διαθέσιμες ποσότητες των trans-δραστικών ρυθμιστικών πρωτεϊνων που δεν επαρκούν. Όπως και σε άλλα συστήματα ξενιστών, υπηρχε αναφορά και για μεγάλο αριθμό πρωτεασών, που εμποδίζουν την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών με τη δράση τους.

Κύτταρα εντόμων: Τα κύτταρα των συγκεκριμένων οργανισμών επιλέγονται μερικές φορές λόγω της αποδεδειγμένης ικανότητάς τους να διενεργούν πιο πολύπλοκες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Εκτός από τη γλυκοσυλίωση μπορούν αν αντεπεξέρθουν και στην ακετυλίωση, φωσφορυλίωση καθώς και στα σηματοδοτικά πεπτίδια. Επιπλέον προσφέρουν ποιοτικότερη αναδίπλωση σε πρωτεϊνες θηλαστικών, αλλά και καλύτερο περιβάλλον για δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών όταν χρειάζεται. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων γίνεται συνηθέστερα με χρήση του φορέα των βακιλοϊών. Ο ιός περιέχει γονίδια που εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες και δεν είναι απαραίτητα για την αναπαραγωγή τους. Το γονίδο λοιπόν, που κωδικοποιεί για την επιθυμητή πρωτεϊνη, τοποθετείται υπό τον έλεγχο του υποκινητή αυτού. Το αποτέλεσμα είναι πολύ ψηλή έκφραση της ετερόλογης ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης. Οι καλλιέργεις μπορούν να έχουν αυξημένη πυκνότητα, εάν το επιθυμούμε. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να φέρουν εις πέρας την παραγωγή πρωτεϊνών ανεξαρτήτου μεγέθους, προσφέροντας έτσι ένα ισχυρό προτέρημα έναντι άλλων οργανισμών, ενώ έχουν χαρακτηριστεί ως «ασφαλή» για καλλιέργεια. Όπως υπογραμμίσαμε, έχουν και την ικανότητα να πέπτουν σηματοδοτικά πεπτίδια, καθώς και την ταυτόχρονη έκφραση πολλαπλών γονιδίων. Από τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν υπάρχουν κάποια τα οποία είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν επιτυχώς. Μερικές φορές, δεν υπάρχει αρκετή εμπειρία σχετικά με τη μέθοδο και το πρωτόκολλο που πρέπει να ακολουθηθεί για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αυτό πρέπει να καθπριστεί εμπειρικά. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές ανάμεσα σε πρωτεϊνες που εκφράζονται από θηλαστικά και από έντομα, μολυσμένα με το βακιλοϊό. Ένα από τα βασικά τους προτερήματα, αυτό της σωστής αναδίπλωσης, αποτελεί ορισμένες φορές και τρωτό σημείο. Ίσως λόγω καθυστερημένης έκφρασης στον μολυσματικό κύκλο, πρωτεϊνες παράγονται με λανθασμένη αναδίπλωση (misfoding) ή δημιουργόντας αδιάλυτα συσσωματώματα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί, πραγματοποιώντας την επώαση πιο σύντομα μετά τη μόλυνση. Έχουν καταγραφεί και περοπτώσεις, όπου τα επίπεδα έκφρασης ήταν μειωμένα, χωρίς βέβαια να καθοριστεί το ακριβές πρόβλημα. Τέλος, τα κύτταρα των εντόμων δεν περιέχουν αρκετά μεγάλο αριθμό γλυκοπρωτεϊνών. Αυτός ο περιορισμός οδηγεί στην μη επαρκή γλυκοσυλίωση μερικές φορές και τη μειωμένη ενεργότητα της πρωτεϊνης.

Τα κύτταρα των θηλαστικών χρησιμοποιούνται κατά βάση, σε περίπτωση που οι επιθυμητές πρωτεϊνες προέρχονται από θηλαστικούς οργανισμούς και απαιτούν κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Η ανάγκη ξεκίνησε στο περελθόν για την παραγωγή της

ερυθροποιητίνης, τη δεκαετία του 1980, επειδή με ξενιστή τα βακτήρια E. Coli δεν ήταν εφικτό να παραχθεί πλήρως λειτουργική πρωτεϊνη, εκείνη την εποχή τουλάχιστον. Τα κύτταρα CHO, προερχόμενα από τα κινέζικα χάμστερ, αποτελούν το προτιμώμενο μοντέλο για παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων. Εκτός αυτών συναντώνται και άλλοι κυτταρικοί τύποι. Στα πλεονεκτήματα των κυττάρων αυτών συγκαταλέγονται η σωστή στερεοδιαμόρφωση και η διενέργεια κατάλληλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων όπως για παράδειγμα η γλυκοσυλίωση, χωρίς να χρειάζεται κάποια περαιτέρω επεξεργασία. Ακόμη, χρησιμεύουν για προσθήκη αλυσίδων ίπαρών οξέων και φωσφορυλίωση καταλοίπων tyr, thr, ser. Παρουσιάζουν επίσης ψηλή παραγωγικότητα του ανασυνδυασμένου προϊόντος. Σε σύγκριση με τα E. Coli, τα ποσά παραγωγής φαίνεται να είναι χαμηλότερα, αλλά τα ποσά που μετρώνται μετά την ανάκτηση είναι πολύ μεγαλύτερα στην περίπτωση των θηλαστικών κυττάρων. Η έκκριση τους θεωρείται από τις χαμηλότερες ανάμεσα στους οργανισμούς-ξενιστές, με το πρόβλημα ωστόσο να βελτιώνεται με τεχνικές βελτιστοποίησης. Το πιο σημαντικό αρνητικό στοιχείο αποτελεί το ασύγκριτα υψηλό κόστος παραγωγής και συντήρησης τους, ενώ ταυτόχρονα απαιτείται και η έγκριση από τον παγκόσμιο οργανισμό FDA. Σε μερικά πειράματα, έχει παρατηρηθεί και το φαινόμενο να επιμολύνονται οι καλλιέργειες από ιούς.

Η περίπτωση των διαγονιδιακών ζώων χρησιμοποιείται για παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες συλλέγονται μετά από έκκρισή τους στα σωματικά υγρά του ζώου. Οι πιθανές επιλογές αφορούν το γάλα, τα ούρα, το αίμα, το σπερμικό πλάσμα αλλά και το ασπράδι αυγού σε μερικές των περιπτώσεων. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι αυτές των τριών πρώτων πιθανών επιλογών, όπου οι πρωτεϊνες ανακτώνται από τον αδένα, στον οποίο φυσιολογικά εκκρίνονται. Ζώα που χρησιμοποιούνται για παραγωγή είναι οι κατσίκες, οι αγελάδες, τα ποντίκια, τα πρόβατα και τα γουρούνια. Σε γενικές γραμμές η διαγονιδιακή έκφραση στο γάλα είναι πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με όποια άλλη σε διαφορετικό αδένα, ενώ η ενεργότητα παραμένει αμετάβλητη. Η παραγωγής χαρακτηρίζεται από μεγάλη ασφάλεια, αλλά το κόστος συντήρησης για το γάλα ξεπερνά αυτό της καλλιέργειας θηλαστικών κυττάρων. Η παραγωγή στα ούρα είναι προτιμότερη από αυτή στο αίμα, γιατί γίνεται πιο συχνά. Εκτός του υψηλού κόστους, η διαδικασία απαιτεί μεγάλα χρονικά διαστήματα για να αποκτήσουμε επιθυμητά επίπεδα παραγωγής, εάν τα συγκρίνουμε και με άλλους οργανισμούς. Στο περελθόν, παραγωγή αντιβιοτικών καθυστέρησε εξαιτίας του λουκέτου σε εργοστάσιο που ήταν υπεύθυνο και πήγε πίσω την όλη διαδικασία.

Αναφορικά με την επιλογή των διαγονιδιακών φυτών, η διαδικασία παραγωγής είναι πιο ασφαλής και με χαμηλότερο κόστος συγκριτικά με τα διαγονιδιακά ζώα. Ο χρόνος που απαιτείται για την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι μικρότερος. Επιπλέον υπερτερούν σε θέματα αποθήκευσης του προϊόντος και κατανομής του. Το κόστος ενδεχομένως να είναι χαμηλότερο και από τα μικροβιακά συστήματα, ενώ είναι και δυνατή η παραγωγή πιο σύνθετων πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση των παραγώμενων προϊόντων στους φυτικούς ιστούς είναι αρκετά υψηλη. Η πιθανότητα επιμόλυνσης μρ ζωικά παθογόνα είναι σπάνια, ενώ η απομόνωση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω μιας απλής και φθηνής διαδικασίας. Όσον αφορά την αναδίπλωση και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, δεν υστερούν, διευκολύνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το έργο της διαδικασίας. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο πιθανές οδούς. Στην πρώτη περίπτωση, το

επιθυμητό γονίδιο εισάγεται σε κάποιον φυτικό ιό. Αυτός λειτουργεί ως φορέας και μετασχηματίζει το φυτό μετά από την επιμόλυνση. Στη δεύτερη περίπτωση, το γονίδιο εισάγεται κατευθείαν στο φυτικό γονιδίωμα. Στα αρνητικά σημεία της επιλογής των διαγονιδιακών φυτών ως ξενιστές, είναι αρκετά πιθανή η πιθανότητα επιμόλυνσης με παρασιτοκτόνα ή τοξικούς φυτικούς μεταβολίτες. Η βιομηχανία παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσω φυτών έχει επιβραδύνει ρυθμούς λόγω απόσυρσης ενδιαφέροντος από σημαντικούς επενδυτές.

Εν κατακλείδι, οι επιλογές που υπάρχουν πλεόν όσον αφορά τον κατάλληλο οργανισμό για την παραγωγλη ανασνδυασμένων προϊόντων, είναι αμέτρητες. Η ανακάλυψη των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA και η συνεισφορά της γενετικής μηχανικής έχουν αλλάξει το σενάριο στο χώρο της φαρμακοβιομηχανίας. Σε σύγκριση με παλαιότερες εποχές και μέσω της χρήσης του ανασυνδυασμένου DNA, γονίδια ενδιαφέροντος, κυρίως θηλαστικών, μπορούν να κλωνοποιηθούν και να εισαχθούν σε ξένους οργανισμούς-ξενιστές. Αυτή η διαδικασία προσφέρει νέα οπτική στο ζήτημα επίλυσης πιθανών προβλημάτων. Πολλά προϊόνται, λοιπόν, προκύπτουν με χρήση συστημάτων μικροβίων-θηλαστικών για παράδειγμα. Αυτά είναι ασφαλή σκευάσματα και μπορούν να παραχθούν σε ποσότητες, που θα εξυπηρετήσουν υψηλή ζήτηση. Αυτό που είναι καλό να θυμόμαστε, είναι πως ένας γενικευμένος κανόνας υπαγορεύει, πως πρωτεϊνες με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 100 kDa ελφράζονται κυρίως σε ευκαρυωτικά συστήματα, ενώ μικρότερες από 30 kDa σε μικροβιακά. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως γλυκοσυλίωση, μπορούν να αντιμετωπίσουν επιτυχώς θηλαστικά, ζύμες και συστήματα που περιλαμβάνουν τους βακιλοϊούς. Τα βακτηριακά συστήματα των E. Coli προσφέρουν μια γρήγορη, απλή και φθηνή λύση αλλά με περιορισμό σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και δισουλφιδικούς δεσμούς.

2η ερώτηση αφορά το πλασμίδιο:

Το επόμενο ερώτημα, το οποίο καλούνται να απαντήσουν οι ερευνητές κατά τον σχεδιασμό του πειράματος, αφορά στο πλασμίδιο που θα χρησιμοποιηθεί. Η πιο συνήθης επιλογή αναφορικά με τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται για το μετασχηματισμό των ξενιστών, είναι αποτέλεσμα πολλών συνδυασμών από α) ρεπλικόνια, β) υποκινητές, γ) δείκτες επιλογής, δ) πολλαπλά σημεία κλωνοποίησης και ε) fusion proteins/ fusion protein removal strategies. Επομένως, ο κατάλογος από πιθανούς συνδυασμούς όλων των παραπάνω συστατικών για συναρμολόγηση του πλασμιδίου έκφρασης μοιάζει ατελείωτος και δυσχεραίνει αρκετά την απόφαση που πρέπει να λάβουν οι ερευνητές μεταξύ των αμέτρητων πιθανών επιλογών. Κάθε περίπτωση, λοιπόν, μοιάζει ξεχωριστή και δεν υπάρχει ένα πλασμίδιο που ν' αποτελεί πανάκεια. Θα εξετάσουμε ξεχωριστά τις πιο σημαντικές από αυτές τις παραμέτρους, που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την ορθή επιλογή του πλασμιδίου.

Α) Ρεπλικόνια: Το ρεπλικόνιο αποτελεί απαραίτητο στοιχείο μονάδων, που αντιγράφεται αυτόνομα, όπως και τα πλασμίδια. Περίεχει ένα ori (origin of replication)- Θέση Έναρξης Αντιγραφής (Θ.Ε.Α.), μαζί με στοιχεία cis- δραστικά για τη ρύθμισή του. Όταν γίνεται η επιλογή του κατάλληλου φορέα, είναι σημαντικό να έχουμε στο πίσω μέρος του μυαλού μας τον αριθμό των αντιγράφων, στοιχείο που ελέγχεται από το ρεπλικόνιο. Θα ήταν λογικό

να θεωρήσει κάποιος, πως όσο μεγαλύτερο αυτό το νούμερο, τόσο το καλύτερο για το πείραμα, δηλαδή αυτό το γεγονός να συνεπάγεται σε μεγαλύτερη τελική ποσότητα ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης, αφού υπάρχουν πολλά αντίγραφα των φορέων έκφρασής στο κύτταρο. 'Ομως, ψηλός αριθμός αντιγράφων ισούται με αρκετά πιθανό μεταβολικό βάρος για το κύτταρο, γεγονός που συμβάλλει σε μειωμένη βακτηριακή ανάπτυξη και ταυτόχρονα ισοδυναμεί με αυξημένη πλασμιδιακή αστάθεια. Όπως γίνεται αντιληπτό, κάτι τέτοιο είναι το ακριβώς αντίθετο από το επιθυμητό αποτέλεσμα, αφού ο αριθμός των υγιών βακτηρίων που συνθέτουν την πρωτεϊνη θα είναι περιορισμένος. Συμπερασματικά, αυξημένος αριθμός αντιγράφων δεν συνεπάγεται μεγαλύτερα ποσά παραγώμενης πρωτεϊνης σε καμία περίπτωση και κάθε πείραμα πρέπει να αντιμετωπίζεται διαφορετικά και ανάλογα με τις απαιτήσεις. Ρίχνοντας μια πιο προσεκτική ματιά, μια απ' τις πιο δημοφιλείς επιλογές φορέα αποτελούν τα πλασμίδια της σειράς PET. Περιέχουν το pMB1 origin με 15 έως 60 αντίγραφα ανά κύτταρο. Μια μεταλλαγμένη μορφή του pMB1 origin είναι παρούσα στα πλασμίδια της σειράς PUC, αποδίδοντας 500 μέχρι 700 αντίγραφα ανά κύτταρο. Το αγρίου τύπου ColE1 origin αποφέρει 15 με 20 αντίγραφα ανά κύτταρο και συναντάται στους φορείς της σειράς pQE. Όλες οι παραπάνω περιπτώσεις πλασμιδίων ανήκουν στην ίδια ομάδα συμβατότητας, με αποτέλεσμα να ανταγωνίζονται για τους μηχανισμούς αντιγραφής, κάτι που πρακτικά σημαίνει ότι δεν μπορούν να εισαχθούν ταυτόχρονα σε ένα κύτταρο. Υπάρχουν διαθέσιμα πλασμίδια για την επίτευξη διπλής και σπανιότερα τριπλής έκφρασης, κατά την οποία ο αριθμός των αντιγράφων είναι αυστηρά χαμηλός. Φορείς με χαμηλό αριθμό αντιγράφων ενδέχεται να αποτελούν πλεονέκτημα σε περιπτώσεις, που η υψηλή έκφραση πρωτεϊνών παράγει τοξικά αποτελέσματα για το κύτταρο. Εναλλακτικά, οι φορείς Duet απλοποιεί τη διπλή έκφραση, επιτρέποντας την κλωνοποίηση δυο γονιδίων στο ίδιο πλασμίδιο. Οι συγκεκριμένοι φορείς περιέχουν δυο διακριτά σημεία πολλαπλής κλωνοποίησης (multiple cloning sites), καθένα από τα οποία ελέγχεται από διαφορετικό υποκινητή, χειριστή και σημείο πρόσδεσης του ριβοσώματος.

B) Υποκινητής: Στο χώρο της έρευνας, υπάρχει ένας αδιαμφισβήτητος «βασιλιάς» όσον αφορά στην επιλογή του υποκινητή, έναν από τους πιο κρίσιμους ρόλους στο παζλ του όλου πειράματος. Αυτός δεν είναι άλλος από τον υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (lac promoter), κύριο συστατικό του οπερονίου της λακτόζης (lac operon). Η συσσωρευμένη γνώση γύρω από το μηχανισμό του οπερονίου επέτρεψε στην εκτεταμένη χρήση του στους φορείς έκφρασης. Η παρουσία της λακτόζης στο περιβάλλον προκαλεί επαγωγή του συστήματος και το συγκεκριμένο σάκχαρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρωτεϊνική παραγωγή. Ωστόσο, σε περίπτωση που υπάρχει και ποσότητα ανθρακικών πηγών, που είναι άμεσα μεβατολίσιμες, όπως στην περίπτωση της γλυκόζης, η επαγωγή του συστήματος καθίσταται αρκετά πιο δύσκολη. Πιο συγκεκριμένα, εάν είναι παρούσες στο σύστημα τόσο γλυκόζη όσο και λακτόζη, η επαγωγή της έκφρασης του οπερονίου της λακτόζης από τον υποκινητή αναστέλλεται μέχρι να καταναλωθεί όλη η ποσότητα της γλυκόζης. Σε αυτό το σημείο, ξεκινά η δράση της λακτόζης. Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο περιβάλλον είναι χαμηλή, παρατηρείται παραγωγή cAMP, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πλήρη ενεργοποίηση του οπερονίου. Ο θετικός έλεγχος της έκφρασης είναι γνωστός και ως «καταβολική καταστολή». Όπως γίνεται αντιληπτό, σε αυτή την περίπτωση, τα επίπεδα του cAMP είναι μειωμένα, όταν δηλαδή τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία σακχάρων, που προκαλούν την καταστολή του οπερονίου. Επιπροσθέτως, η παρουσία γλυκόζης στο

σύστημα έχει ως αποτέλεσμα και την ταυτόχρονη απενεργοποίηση της περμεάσης της λακτόζης (lactose permease), μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο και την πρόσληψη της λακτόζης.

Με ταυτόχρονη παρουσία και των δύο σακχάρων, μόνο ένα μεταλλαγμένο (mutant) στέλεχος με μειωμένη, αλλά μετρήσιμη, ευαισθησία στην καταστολή από τη γλυκόζη παρουσίασε αυθημένη έκφραση στο οπερόνιο λακτόζης. Πιο συγκεκριμένα, αυτός ήταν ο υποκινητής lacUV5 promoter. Η περίπτωση αυτή παρουσιάζει ωστόσο κάποιες δυσλειτουργίες, όταν εφαρμόζεται σε σύστημα πλασμιδίου πολλαπλών αντιγράφων. Ειδικότερα, παρατηρείται ένα γεγονός αδικαιολογήτως υψηλής έκφρασης ακόμα και απουσία κάποιου επαγωγέα. Η εξήγηση δίνεται μετά από υπολογισμό της ποσότητας της πρωτεϊνης του καταστολέα του υποκινητή στο οπερόνιο της λακτόζης, lacI. Αυτή αραιώνεται και η ήδη χαμηλή της συγκέντρωση ελαχιστοποιείται περαιτέρω. Στοιχειώδης έλεγος της έκφρασης του οπερονίου μπορεί να επιτευχθεί με εισαγωγή ενός άλλου μεταλλάγματος, αυτό του επαγωγέα του γονιδίου της πρωτεϊνης του καταστολέα. Ο επαγωγέας αυτός ονομάζεται $lacI^Q$. Οι υποκινητές της οικογένειας lac δεν είναι πολύ ισχυροί, γι' αυτό το λόγο δεν συνίσταται η χρήση τους όταν πρόκειται περί παραγωγής ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης. Συνθετικά υβρίδια κατασκευάζονται με την ισχύ άλλων υποκινητών και τα πλεονεκτήματα των υποκινητών του οπερονίου της λακτόζης. Ένα παράδειγμα τέτοιας κατασκευής αποτελεί ο υποκινητής tac, ο οποίος περιέχει την περιοχή -35 του υποκινητή της τρυπτοφάνης (trp) και την αντίστοιχη -10 του υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (lac promoter). Επιπρόσθετο παράδειγμα πλασμιδίων που περιέχουν υποκινητή tac ή lac και παρουσίαζουν εμπορική χρήση για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, είναι αυτά της σειράς pUC (lacUV5 promoter) pMAL (tac promoter).

Συνεχίζοντας την απαρίθμηση υποκινητών με αρκετά διαδεδομένη χρήση σε συστήματα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, δεν μπορούμε να παραλείψουμε τον T7 υποκινητή. Συναντάται κυρίως στους φορείς της οικογένειας pET (pMB1 ori, medium copy number) και δεν αποτελεί έκπληξη η φήμη που τον ακολουθεί, καθώς σε περιπτώσεις επιτυχημένων πειραμάτων, η συνολική ποσότητα της πρωτεϊνης-στόχου ανέρχεται στο αξισημείωτο 50% της συνολικής πρωτεϊνης που αντιστοιχεί στο κύτταρο. Στο υπό μελέτη σύστημα, το επιθυμητό γονίδιο κλωνοποιείται ανοδικά και δίπλα στον υποκινητή, ο οποίος αναγνωρίζεται από την RNA pol του φάγου T7 (T7 RNAP). Η εν λόγω πολυμεράση παρουσιάζει ιδιαίτερα αυξημένη ενεργότητα και παρέχεται στο σύστημα μέσω ενός άλλου πλασμιδίου ή συνηθέστερα τοποθετείται στο βακτηριακό γονιδίωμα μέσω του προφάγου λDE3. Αυτός, με την σειρά του, κωδικοποιεί την T7 RNAP υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή lacUV5, όπως προαναφέρθηκε. Επομένως, το σύστημα επάγεται από την παρουσία λακτόζης ή κάποιου αναλόγου της, με το πιο δημοφιλές να είναι το ευρέως χρησιμοποιούμενο μη υδρολύσιμο IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) . Το συγκεκριμένο ανάλογο της λακτόζης είναι μη μεταβολίσιμο προσφέροντας έτσι αυξημένη έκφραση του οπερονίου. Βασική έκφραση μπορεί να τεθεί υπό τον έλεγχο του $lacI^Q$ αλλά λαι με ταυτόχρονη έκφρασης της T7 λυσοζύμης. Η λυσοζύμη του T7 προσδένεται στην T7 RNAP και εμποδίζει την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης από τον υποκινητή του T7. Κατ' αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζουμε, πως σε περίπτωση παραγωγής μικρής ποσότητας T7 RNAP, η λυσοζύμη θα ελέγξει επιτυχώς ανεπιθύμητη έκφραση ετερόλογων γονιδίων που

τοποθετούνται υπό την έκφραση του T7 υποκινητή. Επιπρόσθετο στάδιο ελέγχου του συστήματος έκφρασης παρατηρείται, όταν εισάγεται ο χειριστής lacO καθοδικά του υποκινητή T7, γεγονός που αποσκοπεί στην αποφυγή ενεργοποίησης του συστήματος έκφρασης λόγω βασικής έκφρασης.

Το λεγόμενο πρόβλημα και ως «leaky expresion» αντικατοπτρίζει και ένα μειονέκτημα συστημάτων με υποκινητές, που υπόκεινται σε αρνητικό έλεγχο, όπως αυτό του lac υποκινητή. Αντιθέτως, υποκινητές που βασίζονται σε θετικό έλεγχο, πρέπει να έχουν μικρότερα ποσά έκφρασης που λαμβάνει χώρα στο παρασκήνιο. Τέτοια είναι και η περίπτωση του υποκινητή της αραβινόζης, $araP_{BAD}$, που είναι παρών στους φορείς pBAD. Η πρωτεϊνη AraC παρουσιάζει διττό ρόλο, καθώς έχει τόσο το ρόλο του καταστολέα όσο και του ενεργοποιητή, καθιστώντας την ιδανική περίπτωση όπως θα εξηγήσουμε παρακάτω. Απουσία του επαγωγέα της αραβινόζης, η πρωτεϊνη καταστέλλει τη μετάφραση με την σύνδεσή της σε δύο σημεία του βακτηριακού γονιδιώματος. Το σύμπλοκο «πρωτεϊνη-DNA» σχηματίζει μηα θηλιά, η οποία αναστέλλει επιτυχώς την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή. Αντίστοιχα, παρουσία του επαγωγέα, η πρωτεϊνη AraC μεταπίπτει στη μορφή «ενεργοποίησης» και συμβάλλει στη μεταγραφή από τον υποκινητή ara. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό πως η παρουσία της αραβινόζης κρίνεται απαραίτητη για την επιτυχή επαγωγή του συστήματος. Εναλλακτική επιλογή αποτελεί η τοποθέτηση των επιθυμητών γονιδίων υπό τον έλεγχο του φάγου λ- υποκινητή (pL), σε σύστημα φάγου λ. Ο ισχυρός αυτός υποκινητής, σχετίζεται με τα πρώιμα γονίδια του λυτικού κύκλου και χαρακτηρίζεται με υψηλά ποσοστά επιτυχίας σε πειράματα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ο υποκινητής καταστέλλεται ισχυρά από τον πρωτεϊνικό καταστολέα λcI, ο οποίος προσσδένεται στις αλληλουχίες του χειριστή κατά τη λυσιγονική ανάπτυξη. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του συστήματος περιλαμβάνει την αντίδραση SOS κατόπιν φθοράς του DNA. Η χρήση του μηχανισμού αυτού γίνεται σε φορείς έκφρασης, που περιέχουν τον υποκινητή pL. Ανεξάρτητα από την επιλογή που θα προτιμήσουμε, αναφορικά με τον υποκινητή του συστήματος έκφρασης, η μεταγραφή ξεκινά ως απόκριση σε κάποιο χημικό ερέθισμα. Αυτό συμβαίνει σε όλες τις περοπτώσεις που συζητήθηκαν παραπάνω. Υπάρχουν βέβαια και διαθέσιμα συστήματα, που ενεργοποιούνται έπειτα από φυσικά σήματα όπως είναι η αλλαγή στη θερμοκρασία και το pH. Στην περίπτωση της μεταβολής της θερμοκρασίας, η επώαση πριν και μετά την επαγωγή είναι διαφορετική. Έαν καλούμασταν να καταλήξουμε σε κάποιο βασικό συμπέρασμα ως προς την επιλογή του κατάλληλου υποκινητή στο σύστημα έκφρασης που επιλέγουμε, αυτό θα ήταν, πως δεν υπάρχει μόνο μια «σωστή» επιλογή και στις περισσότερες των περιπτώσεων, η τελική επιλογή καθορίζεται από τις υπόλοιπες παραμέτρους του πειράματός μας.

Γ) Δείκτες επιλογής (selection markers):

Οι δείκτες επιλογής αποτελούν ένα από τα πιο βασικά συστατικά στο παζλ, που καλείται να συμπληρώσει ένας ερευνητής. Παρότι ίσως να μην αποτελεί το κυριότερο συστατικό, η παρουσία τους κρίνεται απαραίτητη για την επιτυχή ολοκλήρωση του πειράματος. Ο ρόλος, που διαδραματίζουν οι δείκτες, αφορά στον εύκολο εντοπισμό των κυττάρων που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και διαφοροποιούνται από κύτταρα που δεν περιέχουν

πλασμίδιο. Έτσι, λοιπόν, προσθέτουμε έναν κατάλληλο δείκτη ως ένθεμα στη δομή του πλασμιδίου. Στα βακτηριακά συστήματα των E. Coli, στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, ο δείκτης αυτός είναι μια αλληλουχία που περιλαμβάνει γονίδια, τα οποία προσδίδουν ανθεκτικότητα ενάντια στη δράση κάποιου αντιβιοτικού. Πιο συγκεκριμένα, όταν γίνεται χρήση του αντιβιοτικού της αμπικιλλίνης (ampicillin), ο κατάλληλος δείκτης είναι αλληλουχία με τα γονίδια bla που κωδικοποιούν το ενζυμικό προϊόν, ικανό να απενεργοποιήσει τον δακτύλιο β-lactam των αντιβιοτικών της οικογένειας αντιβιοτικών «β–lactam», όπως και η αμπικιλλίνη. Ένα πιθανό πρόβλημα, που παρατηρείται ωστόσο με τη χρήση αντιβιοτικών αυτής της οικογενείας, έγκειται στο γεγονός της συνεχούς έκκρισης τον ενζύμου της β-λακταμάσης. Ως άμεσο αποτέλεσμα, προκαλείται αποδόμηση όλης της ποσότητας του αντιβιοτικού, που υπάρχει στη βακτηριακή καλλιέργεια. Έπειτα από ένα χρονικό διάστημα μερικών ωρών, τα επίπεδα του αντιβιοτικού είναι αμελητέα, επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη κυττάρων τα οποία δεν περίεχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλλίνη. Καταλαβαίνει λοιπόν κανείς, πως σε μια τέτοια περίπτωση, η επιβίωση κυττάρων που δεν περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο δυσχεραίνει το έργο της συλλογής της ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης. Το ίδιο φαινόμενο είναι πιθανό να λαμβάνει χώρα και σε άλλους δείκτες, στους οποίους η ανθεκτικότητα βασίζεται στην αποδόμηση κάποιου προϊόντος. Τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν τα αντιβιοτικά καναμυκίνη (kanamycin) και χλωραμφενικόλη (chloramphenicol), παρότι δεν υπάρχουν επαρκείς πειραματικές αποδείξεις ακόμη. Για την καταπολέμηση αυτού του φαινομένου, προτείνεται εναλλακτικά η χρήση του αντιβιοτικού της τετρακυκλίνης (tetracycline), η οποία παραμένει σταθερά σε υψηλά επίπεδα κατά την καλλιέργεια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, πως η ανθεκτικότητα ενάντια σε αυτήν προσδίδεται εξαιτίας της ενεργούς μεταφοράς της έξω από τα κύτταρα με τα κατάλληλα γονίδια (δείκτες επιλογής). Ανησυχίες που συνεχώς εντείνονται εκφράζονται, ωστόσο, από ειδικούς και σχετίζονται με το φαινόμενο αποδόμησης των αντιβιοτικών που περιγράφηκε, καθώς και με το υψηλός κόστος παραγωγής τους. Το πρόβλημα υψηλού κόστους παραγωγής εντοπίζεται κυρίως, σε πειράματα μεγάλης κλίμακας. Γίνονται συνεχείς προσπάθειες για ανάπτυξη συστημάτων, τα οποία θα βασίζονται στη χρήση πλασμιδίων χωρίς δείκτες ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. Η βασική ιδέα πίσω από αυτό το εγχείρημα σχετίζεται με το σκεπτικό του φαινομένου μιας καλλιέργειας, στην οποία κύτταρα που δεν περιέχουν κανένα πλασμίδιο, δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν. Παραδείγματος χάριν, κάποιο σημαντικό, για την επιβίωση των κυττάρων, γονίδιο διαγράφεται και εισάγεται στο πλασμίδιο. Έτσι, μετά από την κυτταρική διαίρεση, κύτταρα χωρίς το εν λόγω πλασμίδιο δεν επιβιώνουν. Ανάλογα συστήματα, που βασίζονται στην εξάρτηση σε κάποιο πλασμίδιο για την επιβίωση των κυττάρων, έχουν αναπτυχθεί. Επιγραμματικά, χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, οι οποίες είναι και οι εξής: α) τοξίνη/ αντιτοξίνη, β) συστήματα με βάση το μεταβολισμό ενός προϊόντος, γ) συστήματα operator/repressor titration . Οι τεχνολογίες αυτές έχουν ελεγχθεί και κριθεί επιτυχημένες σε πειράματα μεγάλη κλίμακας, ωστόσο συστήματα έκφρασης που βασίζονται στην παρουσία/ απουσία ενός πλασμιδίου για την επιβίωση των κυττάρων, δεν είναι μέχρι στιγμής ευρέως διαδεδομένα.

Affinity tags:

Στα πειράματα, που έχουν ως απώτερο σκοπό την απόκτηση καθαρισμένης ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης σε διαλυτή μορφή είναι αρκετά σημαντικό να έχει κανείς στη διάθεσή του μέσα, τα οποία βοηθούν

1. Στον εντοπισμό τους μετά την έκφραση/ απομόνωση τους
2. Στη μέγιστη διαλυτότητα
3. Στον εύκολο καθαρισμό τους

Αυτά συνήθως είναι βραχείες αλληλουχίες αμινοξέων (peptide tags) είτε μεγαλύτερα πολυπεπτίδια (fusion partners), που εκφράζονται μαζί με την πρωτεϊνη-στόχο προς σχηματισμό ενός χιμαιρικού προϊόντος, που θα επιτρέπει στην επίτευξη των προαναφερθέντων στόχων.

Πιο συγκεκριμνένα, αναφαρικά με τα peptide tags, το μικρό τους μέγεθος αποτελεί πλεονέκτημα, αφού είναι λιγότερο πιθανό να αλληλεπιδράσουν με αρνητικο τρόπο όταν είναι ενωμένα με την πρωτεϊνητου ενδιαφέροντος μας. Ένα ζήτημα, ωστόσο, που είναι πιθανό να προκύψει και να δημιουργήσει επιπλοκές σχετίζεται με την τριτοταγή δομή ή τη βιολογική εννεργότητα της χιμαιρικής πρωτεϊνης. Η θέση, στην οποία το peptide tag συνδέεται με την πρωτεϊνη είναι είτε το N- τελικό άκρο είτε το C- τελικό. Σύνδεση στο καρβοξυτελικό άκρο είναι προτιμότερη, σε περίπτωση που ένα πεπτίδιο σηματοδότησης έχει τοποθετηθεί στο αμινοτελικό άκρο. Εάν είναι γνωστή η τριτοταγής δομή της πρωτεϊνης που μας ενδιαφέρει είναι σώφρων να τη μελετήσουμε για να διαπιστώσουμε ποιό από τα δύο άκρα είναι βυθισμένο μέσα στη δομή και ποιό ελεύθερο, έτσι ώστε η σύμπτυξη να γίνει σε αυτό που είναι προσιτό. Μερικά παραδείγματα εμπορικών tags συγγένειας είναι τα εξής; Poly- Arg, FLAG, poly-His, c-Myc, S-, Strep-2-,. Δεδομένου, ότι στο εμπόριο κυκλοφορούν αντισώματα για όλα τα παραπάνω, μια τακτική μέθοδος που επιλέγεται κατά κόρον είναι αυτής της western blot για τον εντοπισμό της πρωτεϊνης- στόχου που έχει σημανθεί. Αυτή η μέθοδος πλεονεκτεί έναντι της ηλεκτροφόρησης με SDS- PAGE, επειδή έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και μπορεί να εντοπίσει σημαντικά μικρές ποσότητες, οι οποίες αντιθέτως δεν είναι μετρήσιμες στα πηκτώματα. Επιπλέον, παρέχουν τη δυνατότητα καθαρισμού της πρωτεϊνης με ένα βήμα, αφού είναι διαθέσιμες ρητίνες, που προσδένονται ισχυρά στα tags. Για παράδειγμα, πρωτεϊνες σημασμένες με ταγκ ιστιδίνης μπορούν να ανακτηθούν με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας μεταλλικών ιόντων (Ni, Ko2+), ενώ τζελ συγγένειας αντι-FLAG χρησιμοποιούνται για ανάκτηση πρωτεϊνών που περιέχουν FLAG-tag.

Εκτός από τα peptide tags , ωστόσο, υπάρχει και η επιλογή των fusion partners (non-peptide). Ένα όφελος της χρήσης τους εντοπίζεται στη διαλυτότητα της πρωτεϊνης, την οποία ενισχύει σημαντικά. Ο πιο διαδεδομένος fusion partner στον επιστημονικό χώρο είναι η πρωτεϊνη σύνδεσης της μαλτόζης (MBP), NusA (N-utilization substance protein A), η ουβικιτίνη, η s- τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η θειορεδοξίνη (Trx) και η SUMO. Παραμένει ακόμα ασαφές όμως, για ποιό λόγο αυτοί οι παράγοντες δρουν ως ενισχυτές διαλυτότητας και έχουν εκφραστεί αρκετές θεωρίες για να εξηγήσουν το φαινόμενο. Έχουν διεξαχθεί και κάποιες συγκριτικές μελέτες μεταξύ των παραγόντων αυτών. Πειραματικά δεδομένα καταδεικνύοθν το γεγονός αυτό, αφού όταν αυτοί οι fusion partners απομακρυνθούν, παρατηρείται ένα απρόβλεπτο αποτέλεσμα, ενισχύοντας έτσι την άποψη, ότι το μεγαλύτερο μέγεθος των tags αυτών μπορεί να επηρεάζει τις μετρήσεις, καθιστώντας

τις αναξιόπιστες. Συνεπώς, ιδανικά είναι tags με σχετικά μικρό μέγεθος και ικανότητες ενίσχυσης της διαλυτότητας της πρωτεϊνης.

Μια άλλη κατηγορία fusion tags είναι κάποια , που μπορούν να διαχωριστούν από το διάλυμα, όταν δεχτούν το κατάλληλο ερέθισμα (π.χ. χημική ουσία). Ως αποτέλεσμα παρατηρείται το φαινόμενο της κατακρήμνισης και κατ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός. Τα τελικά πρωτεϊνικά προϊόνται παρουσιάζουν ψηλή καθαρότητα. Η διαδικασία είναι σχετικά απλή και απαιτεί μικρό χρονικό διάστημα διεξαγωγής, ενώ είναι και ακριβής η διαλογή της επιθυμητής πρωτεϊνης. Ο διαχωρισμός μπορεί να βελτιωθεί και μέσω της μεθόδου της φυγοκέντρισης. Αυτή η τεχνική προσφέρει έναν εναλλακτικό τρόπο καθαρισμού από τον συμβατικό, αυτόν που βασίζεται στη χρωματογραφία.

Tag removals: Σε περίπτωση που απαιτούνται δομικές ή βιοχημικές μελέτες πάνω στην ανασυνδυασμένη πρωτεϊνη, είναι επιβεβλημένη η απομάκρυνση του fusion partner. Αυτό ισχύει και στην περίπτωση των peptide tags, τα οποία είναι πιθανό να παρεμβληθούν στη δομή ή και την ενεργότητα του προϊόντος, αν και είναι μικρότερα σε μέγεθος. Σε κρυσταλλογραφικές μελέτες, τα peptide tags δεν επηρεάζουν τις μετρήσεις, επομένως δεν κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνσή τους. Η απομάκρυνση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε ενζυμικά είτε με χημικά μέσα. Στην περίπτωση της ενζυμικής πέψης έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές πρωτεάσες στο παρελθόν με επιτυχία. Οι φορείς έκφρασης περιέχουν αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις πρωτεάσες για πέψη σε σημεία, που βρίσκονται καθοδικά του γονιδίου που κωδικοποιεί το tag. Η τελική επιλογή βασίζεται σε παράγοντες όπως η ειδικότητα, το κόστος της εκάστοτε επιλογής, ο αριθμός των αμινοξέων που παρεμένει στην πρωτεϊνη μετά την πέψη, καθώς και ο βαθμός της δυσκολίας με την οποία πραγματοποιείται η πέψη.

Το μονοπάτι της εναλλακτικής απομάκρυνσης περιλαμβάνει, όπως μαρτυρά εξαλλου και η ονομασία, τη χρήση ενός χημικού αντιδραστηρίου. Τα πλεονεκτήματς έναντι της συμβατικής μεθόδου και των πρωτεολυτικών ενζύμων είναι η εύκολη απομάκρυνση τους μετά τη χρήση, καθώς και το χαμηλό κόστος παραγωγής τους. Αυτό τα καθιστά, λοιπόν, πιο προσιτή επιλογή σε πειράματα ευρείας κλίμακας/ βιομηχανικής παραγωγής. Το βασικό μειονέκτημα, ωστόσο, είναι οι δύσκολες συνθήκες αντίδρασης, με αποτέλεσμα να γίνεται εφαρμογή τους μονάχα σε ανασυνδυασμένες πρωτεϊνες που έχουν ανακτηθεί από IBs. Επιπροσθέτως, είναι αρκετά πιθανό να προκαλεσουν ανεπιθύμητες τροποποιήσεις στην πρωτεϊνη. Μερικά παραδείγματα τέτοιων αντιδραστηρίων ειναι τα εξής: GnBr etc.

3η ερώτηση:

Ποιό είναι το «εγχειρίδιο» του κατάλληλου συνδυασμού όλων των εμπλεκόμωνων παραμέτρων;

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, οι επιλογές και συνεπώς οι πιθανοί συνδυασμοί είναι αμέτρητοι για τον σχεδιασμό του συστήματος έκφρασης. Δεν υπάρχει ο λεγόμενος ιδανικός για τις εκάστοτε συνθήκες, επομένως καθίσταται σαφές ότι η γνώση και η μελέτη όλων των παραγόντων μπορεί να κρίνει αρνητικά ή θετικά την έκβαση ενός πειράματος. Η ύπαρξη, άλλωστε, μιας «πανάκειας» για κάθε πείραμα , και λαμβάνοντας υπόψιν την πληθώρα των διαφορετικών συνθηκών , θα αποτελούσε ουτοπική σκέψη. Όσο πιο πολύπλοκο το

πείραμα, ο αριθμός των κλωνοποιημένων γονιδίων και ούτω καθεξής, τόσο πιο σύνθετη η κατασκευή και ο στρατηγικός σχεδιασμός του πειράματος. Κάθε ένας συνδυασμός κρίνεται στην πράξη και εκ του αποτελέσματος και οι πιθανότητες, να ξοδεφθεί μεγάλο χρονικό διάστημα και να διενεργηθούν αρκετά πειράματα, μόνο και μόνο για την έυρεση της ιδανικής φόρμουλας και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών, είναι υψηλές.

Αφού παρουσιάσαμε το γενικό πλαίσιο και τις αμέτρητες επιλογές και συνδυασμούς, ανάμεσα από τους οποίους μπορούμε να επιλέξουμε να χρησιμοποιήσουμε σε ένα πείραμα, θα επικεντρωθούμε στους οργανισμούς με τους οποίους δουλέψαμε για την εκπόνηση της εργασίας αυτής, τα βακτήρια E. Coli.

Εξειδικεύοντας τη μελέτη στα E. Coli ως ξενιστές, μπορούμε να διακρίνουμε μια πληθώρα πιθανών στελεχών, κάθε ένα από τα οποία όπως θα ανέμενε κανείς φέρει διακριτά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα έναντι των υπόλοιπων. Θα πρέπει να έχουμε στο πίσω μέρος του μυαλού μας, ότι πολλά από αυτά παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση και χρησιμοποιούνται σε ειδικές καταστάσεις.

-BL21: Μέλη του στελέχους αυτού, με έλλειμμα στην πρωτεάση loon, που έχει την ιδιότητα να πέπτει πολλές «ξένες» στο βακτήριο πρωτεϊνες. Τα στελέχη αυτά δεν έχουν και το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεάση της εξωτερικής μεμβράνης OmpT,η λειτουργία της οποίας είναι η αποσύνθεση εξωκυττάριων πρωτεϊνών. Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα, αφού δεν υπάρχει ο κίνδυνος πέψης εξωγενούς DNA μετά από ενδεχόμενη κυτταρική λύση κατά την έκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης. Επιπλέον, εξαιτίας μιας μετάλλαξης που υπάρχει στα κύτταρα αποτρέπεται η απώλεια πλασμιδίου. Ακόμη, μεθυλίωση DNA και αποσύνθεση του διαταρράσσεται. Όταν το επιθυμητό γονίδιο τοποθετείται υπό τον έλεγχο τιυ υποκινητή T7, πρέπει να τροφοδοτηθεί και με την RNAP. Στα DE3, ο προφάγος λDE3 εισάγεται στο χρωμόσωμα BL21 και περιέχει το γονίδιο RNAP υπό τον έλεγχο του υποκινητή Iac Uv5. Τα DE3 στελέχη είναι πιο διαδεδομένα για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

-Origami: Μεταλλάγματα του βακτηρίου trxB, ενισχύεται η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στο κυτταρόπλασμα. Έχουν έλλειμμα και στο γονίδιο της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούνται, όταν η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός μας είναι πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς και δε θέλουμε να καταφύγουμε στην επιλογή κάποιου άλλου ξενιστή αντί για τα E. Coli.

-HMS174: σταθεροποιούν την εισαγωγή πλασμιδίου.

-Στρατηγικές επίλυσης πιθανών προβλημάτων κατά την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών:

Η διαδικασία που περιγράφηκε και αποσκοπεί στην αυξημένη παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης της επιλογής μας μόνο εύκολη δεν είναι στην πράξη. Ακόμη και μετά από ενδελεχή έλεγχο όλων των παραμέτρων που σημειώσαμε, όπως ο οργανισμός- ξενιστής ή το πλασμίδιο, καθίσταται δύσκολο να προδικάσουμε ως επιτυχές το αποτέλεσμα. Τα πιθανά ζητήματα, που ενδεχομένως να προκύψουν κατά τη διάρκεια του

όλου πειράματος, είναι αρκετά και μπορεί να σχετίζονται με μη επαρκή ποσότητα της επιθυμητής πρωτεϊνης ή την συλλογή της σε μη ενεργή μορφή. Κάθε ανεπιθύμητη κατάσταση πρέπει να αντιμετωπίζεται ξεχωριστά, ενώ είναι αρκετά πιθανό ένα πρόβλημα να επιδέχεται διαφορετικών χειρισμών βάση και των υπόλοιπων παραμέτρων. Σε προηγούμενη ενότητα είχαμε αναφερθεί συνοπτικά στα πιο συνηθισμένα αρνητικά σενάρια που χρίζουν επίλυσης και πιθανούς τρόπους αντιμετώπισης όταν επιλέγουμε τα E. Coli ως ξενιστές, παρακάτω θα προσθέσουμε μια πιο λεπτομερή ματιά στο ζήτημα αυτό.

-----Μειωμένα επίπεδα παραγωγής: Το συγκεκριμένο πρόβλημα χαρακτηρίζεται ως το χειρότερο δυνατό σενάριο για αρκετούς λόγους. Σε περίπτωση που η πρωτεϊνη ενδιαφέροντός μας παράγεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδη, τότε το πρόβλημα συνήθως συνδέεται με κάποια τοξική επίδραση που έχει η ετερόλογη πρωτεϊνη στο κύτταρο- ξενιστή και συνεπώς θα πρέπει να υπάρξει τροποποίηση των παραμέτρων/ συνθηκών του πειράματος και εκ νέου διεξαγωγή. Η τεχνική που χρησιμοποιείται κατά κόρον για τον εντοπισμό της είναι η western blot. Υπαρκτή είναι και η περίπτωση να είναι εφικτή η ανίχνευση της αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα (μικρότερα από μg/ λίτρο καλλιέργειας), γεγονός το οποίο επίσης δεν εξυπηρετεί τον σκοπό του πειράματος. Το ζήτημα της τρωτεϊνικής τοξικότητας στο κύτταρο ενδέχεται να λαμβάνει χώρα, όταν η ανασυνδυασμένη πρωτεϊνη επιδρά με ανεπιθύμητο και ταυτοχρόνως επιλαβή τρόπο στο κύτταρο- ξενιστή. Αυτή αλληλεπιδρά με τη φυσιολογική ανάπτυξη και αναπαραγωγή, καθώς και ομοιόσταση του μικροοργανισμού, και το ορατό σε εμάς αποτέλεσμα είναι ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης, χαμηλή τελική κυτταρική πυκνότητα και ο κυτταρικός θάνατος. Σαν πρώτη δράση σε μια τέτοια περίπτωση, θα πρέπει να παρακολουθήσουμε το ρυθμό της κυτταρικής ανάπτυξης πριν το στάδιο της επαγωγής. Εάν ο ρυθμός ανάπτυξης του ανασυνδυασμένου στελέχους είναι μικρότερος σε σύγκριση με στέλεχος χωρίς φορέα έκφρασης, τότε τα δύο πιο πιθανά ενδεχόμενα, που δικαιολογούν το φαινόμενο αυτό, είναι τα εξής: γονιδιακή τοξικότητα ή βασική έκφραση τοξικού συμπλόκου mRNA/πρωτεϊνης. Η πρώτη περίπτωση θα πρέπει να εξεταστεί πιο προσεκτικά. Αναφορικά με τον έλεγχο της βασικής έκφρασης, προτείνονται αρκετοί διαφορετικοί τρόποι επίλυσης του ζητήματος. Η προσθήκη μικρής ποσότητας γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο μπορεί να έχει κατασταλτικά αποτελέσματα στον επαγωγέα της λακτόζης, στην περίπτωση που γίνεται χρήση φορέων με υποκινητές του οπερονίου της λακτόζης. Εναλλακτικά, η χρήση πλασμιδίων με μικρό αριθμό αντιγράφων που περιέχουν υποκινητές υπό αυστηρό έλεγχο (π.χ. υποκινητής $araP_{BAD}$) μπορεί να επιφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αφότου ξεπεράσουμε τον συγκεκριμένο « σκόπελο», η καλλιέργεια αναμένεται να αναπτύσσεται φυσιολογικά μέχρι το σημείο της επαγωγής. Στο ενδεχόμενο, που η ανασυνδυασμένη πρωτεϊνη είναι τοξική για το κύτταρο, τότε περιμένουμε να ανασταλεί η κυτταρική ανάπτυξη μετά την προσθήκη του επαγωγέα. Έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις, που ο βαθμός τοξικότητας της πρωτεϊνης γίνεται αντιληπτός μόνο όταν ξεπεραστεί ένα ανώτατο όριο, μέχρι το οποίο το κύτταρο- ξενιστής προσπαθεί να αντεπεξέλθει στις δυσχερείς αυτές συνθήκες. Σε αυτή την περίπτωση, είναι στην ευχέρεια του κάθε ερευνητή να συνεχίσει το πείραμα όπως εκείνος κρίνει ότι είναι προτιμότερο. Αυτό πρακτικά σημαίνει, αυστηρή «χειραγώγηση» των επιπέδων παραγωγής της πρωτεϊνης, έτσι ώστε να μην ξεπεραστεί αυτό το όριο, ή τροποποίηση του πειράματος και επανάληψή του (για παράδειγμα χρήση διαφορετικού βακτηριακού στελέχους). Η ελεγχόμενη έκφραση της πρωτεϊνης, εξαρτώμενη αποκλειστικά

από την ποσότητα της δόσης του μορίου- επαγωγέα, δεν είναι δυνατή όταν γίνεται χρήση του IPTG. Όπως προαναφέρθηκε, το μόριο αυτό που αποτελεί ανάλογο της λακτόζης, δεν υδρολύεται. Μέσω ενεργής μεταφοράς από την περμεάση της λακτόζης ή μέσω μονοπατιών που δεν περιλαμβάνουν την συμμετοχή της περμεάσης, εισέρχεται μέσα στο κύτταρο. Από την στιγμή, που ο αριθμός των ενεργών περμεασών ποικίλλει ανά κύτταρο, είναι πρακτικά να προβλέψουμε ποια θα είναι η παραγωγή της επιθυμητής πρωτεϊνης, αναλογικά με την συγκέντρωση της IPTG που προστίθεται στην καλλιέργεια. Αναφορές για χρήση μεταλλαγμένων στελεχών έχουν γίνει, χωρίς ωστόσο να ξεχωρίζει κάποια ιδιάζουσα περίπτωση για την αντιμετώπιση των προβλημάτων, που αναλύθηκαν άνωθεν. Μια επιπλέον εναλλακτική τακτική αντιμετώπισης του προβλήματος της τοξικότητας της πρωτεϊνης στο κύτταρο, αποτελεί η προσπάθεια «απομάκρυνσης» της εν λόγω πρωτεϊνης από το εσωτερικό του κυττάρου. Με άλλα λόγια, η έκφρασή της να γίνεται είτε στον περιπλασματικό χώρο του κυττάρου είτε εξωκυτταρικά προς το θρεπτικό μέσο. Σε κάποιες περιπτώσεις, αυτός είναι και ο μοναδικός τρόπος να παραχθεί αποτελεσματικά μια ανασυνδυασμένη πρωτεϊνη. Για να επιτευχθεί η έκφραση της πρωτεϊνης στο περίπλασμα, γίνεται σύμπτυξή της με κατάλληλο σηματοδοτικό πεπτίδιο, το οποίο και την οδηγεί εκεί μετά την παραγωγή της. Υπάρχουν αρκετά τέτοια πεπτίδια στη διάθεση των ερευνητών. Παρόμοια μέθοδος αποτελεί ο μηχανισμός της συμμετάφραστικής μετατόπισης (co-translational translocation), που βασίζεται σε μόρια ικανά να αναγνωρίσουν σήματα (Signal Recognition Particles). Η αναγνώριση αυτή επιτυγγχάνεται μέσω της παρουσίας υδρόφοβων ακολουθιών στο αμινοτελικό άκρο του υποστρώματος. Παραδείγματα ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, που παράγονται μέσω αυτής της διαδικασίας μετατόπισης, αποτελούν η θειορεδοξίνη (thioredoxin) και η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (human growth hormone).

Συμπληρωματικός παράγοντας εκτός της τοξικότητας της πρωτεϊνης, που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή της επιθυμητής ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης, είναι η μεγάλη διαφορά στην συχνότητα των συνώνυμων κωδικονίων ανάμεσα στο γονιδίωμα του κυττάρου- ξενιστή και το «ξένο» DNA. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει, καθώς παρατηρείται έλλειμμα στα υπάρχοντα tRNAs κατά τη διάρκεια της έντονης πρωτεινοσύνθεσης. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να οδηγήσει σε λανθασμένη ενσωμάτωση των αμινοξέων ή περικοπή του πολυπεπτιδίου, επηρεάζοντας κατ’ αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα έκφρασης του ανασυνδυασμένου προϊόντος. Στην καλύτερη, λοιπόν, των περιπτώσεων τα πρωτεϊνικά επίπεδα θα παρουσιάζουν μια σχετική μείωση απ’ το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Αρκετά πιθανή και η αρνητική επίδραση στην ενεργότητα της πρωτεϊνης. Το πρόβλημα της αναντιστοιχίας των κωδικονίων μπορεί να αντιμετωπιστεί με βελτιστοποίηση των κωδικονίων της ακολουθίας που δεν αντιστοιχεί στο κύτταρο- ξενιστή. Το σκεπτικό αυτής της μεθόδου είναι να τροποποιηθούν τα σπάνια κωδικόνια του γονιδίου- στόχου, ώστε να ταιριάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό με αυτά του γονιδιώματος του ξενιστή. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω κατευθυνόμενης σιωπηλής σημειακής μετάλλαξης, με προσοχή ωστόσο, ώστε να μην τροποποιηθεί η αλληλουχία που κωδικοποιεί την ανασυνδυασμένη πρωτεϊνη. Αυτή η μέθοδος, βέβαια, είναι αρκετά ακριβή και δεν συνίσταται όταν αυξάνεται ο αριθμός των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Σε γενικές γραμμές, η «διόρθωση» των κωδικονίων δεν είναι απλή υπόθεση και δεν εξασφαλίζει ότι θα αυξηθεί και η ποσότητα της παραγώμενης πρωτεϊνης. Μεταλλαγμένα στελέχη, που περιέχουν επιπλέον γονίδια για

κωδικοποίηση των σπανιότερων tRNAs, ενδέχεται να επιλύσουν πλήρως ή να βελτιώσουν έστω σε κάποιο βαθμό το συγκεκριμένο πρόβλημα. Τι συμβαίνει, ωστόσο, στην περίπτωση που καμία τεχνική από τις προαναφερθείσες προτάσεις δεν καταπολεμά επιτυχώς τη μειωμένη πρωτεϊνική παραγωγή; Ο παράγοντας, που αποτελεί τροχοπέδη για την επιθυμητή παραγωγή, μπορεί να σχετίζεται με τις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων και όχι με την γονιδιακή σύσταση. Όταν η χαμηλή έκφραση της επιθυμητής πρωτεϊνης δεν μπορεί να παρουσιάσει σημαντική αύξηση με την εφαρμογή κάποιου μηχανισμού, που αναφέρθηκαν παραπάνω, μια «έσχατη» λύση είναι η προσπάθεια να έχουμε καλλιέργεια υψηλότερης τελικής πυκνότητας. Κάτι τέτοιο είναι εφικτό, με μια τροποποίηση στις παραμέτρους όπως το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας ή προσφέροντας καλύτερο σύστημα αερισμού μέσω συνεχούς ανακίνησης. Το πιο σύνηθες θρεπτικό μέσο για καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών E. Coli είναι το LB. Είναι αρκετά εύκολο στην παραγωγή του, περιέχει πλούσια θρεπτικά συστατικά και η οσμομοριακότητά του κρίνεται ιδανική για ανάπτυξη στη φάση log. Όλα αυτά τα γνωρίσματα το καθιστούν ως την πιο προσιτή επιλογή για χρήση σε πειράματα πρωτεΐνικής παραγωγής και «επισκιάζουν» το γεγονός, πως δεν είναι το μέσο που επιτυγχάνει τη βέλτιστη κυτταρική πυκνότητα στην καλλιέργεια. Το γεγονός αυτό εξηγείται εν πολλοίς, αφού το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο περιέχει ανεπαρκείς ποσότητες υδατανθράκων καθώς και άλλων διαθέσιμων πηγών άνθρακα, αλλά και δισθενών ιόντων. Είναι αναμενόμενη λοιπόν η άυξηση στην κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας, άμα προσθέσουμε μεγαλύτερη ποσότητα tryptone ή yeast extract στην σύσταση του θρεπτικού μέσου. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και με την προσθήκη συμπληρώματος δισθενων ιόντων όπως για παράδειγμα MgSO4 in the millimolar range. Ενδεχόμενη προσθήκη γλυκόζης προσφέρει περιορισμένη βελτίωση, καθώς η παραγωγή οξέων από το μεταβολισμό της έχει αντίθετα αποτελέσματα κυρίως σε καλλιέργειες κωνικών φιαλών υπό ανάδευση, όπου ο έλεγχος του ph είναι πιο δύσκολη υπόθεση. Μια πρωτοποριακή μέθοδος σχετικά με την σύσταση του θρεπτικού μέσου έγινε στο πρόσφατο παρελθόν, στην οποία και αναπτύχθηκε η ιδέα της αυτοεπαγωγής. Στη διαδικασία αυτή. Ένα μείγμα από γλυκόζη, λακτόζη και γλυκερόλη σε ιδανική αναλογία προστίθεται στην καλλιέργεια. Η κύρια πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη και ιδανικά μεταβολίζεται κατά τη φάση ανάπτυξης, αποτρέποντας έτσι την πρόσληψη της λακτόζης μέχρι να αξιοποιηθεί ολόκληρη η ποσότητα της γλυκόζης. Αυτό συμβαίνει συνήθως στο μέσο της εκθετικής φάση, όπου η γλυκερόλη και λακτόζη διατίθενται προς κατανάλωση. Η τελευταία αποτελεί και τον επαγωγέα του συστήματος, δηλαδή η πρωτεϊνική έκφραση είναι ελεγχόμενη από τη λακτόζη (lac- controlled expression).

Είναι επιπλέον γεγονός, πως όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων ανά λίτρο καλλιέργειας, τα διαθέσιμα ποσά οξυγόνου παίζουν ακόμη πιο καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη. Ενδεχόμενος περιορισμός στην ποσότητα οξυγόνου ενεργοποιεί την έκφραση πληθώρας γονιδίων στο κύτταρο, σε μια προσπάθεια να προσαρμοστεί στη νέα σύσταση του αέρα. Κάτι τέτοιο, όπως γίνεται αντιληπτό, έχει σημαντική αρνητική επίδραση στη φυσιολογική ανάπτυξη, με αποτέλεσμα αυτή να αναστέλλεται σε βάθος χρόνου. Ένας απλός τρόπος αντιμετώπισης, προς αύξηση του διαθέσιμου οξυγόνου, είναι ο μεγαλύτερος ρυθμός ανάδευσης. Ο σχηματισμός αφρού, από την άλλη, λόγω αυξημένης ανάδευσης αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα για την αύξηση των επιπέδων οξυγόνου. Επιπλέον, είναι σημαντικό ο όγκος της καλλιέργειας να μην ξεπερνάει ένα συγκεκριμένο ανώτατο όριο της

συνολικής ποσότητας που χωράει σε μια φιάλη, έτσι ώστε ο αερισμός να είναι βέλτιστος. Το χρνικό σημείο, κατά το οποίο επιλέγεται να γίνει η επαγωγή, είναι ένα ακόμη θέμα προς συζήτηση, όπως και ο τρόπος προετοιμασίας της αρχικής καλλιέργειας. Σε περίπτωση λοιπόν ενδεχόμενου προβλήματος, αξίζει κανείς να αναρωτηθεί και για τους παράγοντες αυτούς και κατά πόσον επηρεάζουν τα επέπεδα έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης.

---Σχηματισμός σωματιδίων εγκλεισμού (inclusion bodies): Έχοντας ρίξει μια ενδελεχή ματιά στο κυριότερο πρόβλημα, που μπορεί να προκύψει σε πειράματα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, θ' ασχοληθούμε και με κάποια περαιτέρω, όπως αυτό της δημιουργίας των λεγόμενων inclusion bodies. Όταν ένα «ξένο» γονίδιο εισάγεται στα κύτταρα-ξενιστές και πιο συγκεκριμένα, τα βακτηριακά στελέχη E. Coli, χάνεται η δυνατότητα ελέγχου της έκφρασής του. Το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο που συντίθεται εκφράζεται στο μικροπεριβάλλον του βακτηρίου, το οποίο είναι αρκετά πιθανό να διαφέρει σε αρκετές συνιστώσες από το περιβάλλον στο οποίο γίνεται φυσιολογικά η έκφρασή του. Διαφορετικό pH,οσμομοριακότητα, τροποποιημένο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, ύπαρξη διαφορετικών συμπαραγόντων και μηχανισμών αναδίπλωσης συνιστούν μια νέα πραγματικότητα για τη νεοσυντιθέμενη πρωτεϊνη. Επιπροσθέτως, κατά την έκφραση πολύ υψηλών επιπέδων, υπάρχουν αυξημένες εκτάσεις υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με άλλες αντίστοιχες περιοχές. Η ταυτόχρονη δράση αυτών των παραγόντων οδηγεί στη δημιουργία δομών, γνωστών ως inclusion bodies, πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Ο σχηματισμός τέτοιων δομών προέρχεται από μια αναντιστοιχία ανάμεσα στη δημιουργία και συσσώρευση πρωτεϊνών και παραγόντων διαλυτοποίησής τους. Τα συσσώματα αυτά, που είναι προϊόν αυτής της ανισορροπίας που προκαλείται από μια στρεσογόνα για το κύτταρο κατάσταση, δυσχεραίνουν το έργο συλλογής και μετέπειτα επεξεργασίας της επιθυμητής πρωτεϊνης. Υπάρχουν ωστόσο κάποιες τεχνικές που διευκολύνουν το έργο μας και βοηθούν να αποκτήσουμε την πρωτεϊνη στη διαλυτή της μορφή. Μια επιλογή αποτελεί η συμπύκνωση της επιθυμητής πρωτεϊνης με κάποιο παράγοντα διαλυτότητας, που αποτρέπει τη δημιουργία των inclusion bodies. Σε κάποιες περιπτώσεις η συγκέντρωση της ποσότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης στα inclusion bodies αποτελεί πλεονέκτημα για το βήμα του καθαρισμού του πρωτεϊνικού προϊόντος, με την προυπόθεση ότι είναι εύκολη η αναδίπλωση της πρωτεϊνης μετέπειτα. Έχει παρατηρηθεί, πως κρίσιμο ρόλο στην σωστή αναδίπλωση στο χώρο καθώς και βιολογική ενεργότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, διαδραματίζει η σωστή δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών. Λανθασμένη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών είναι ικανό γεγονός για την απόκτηση λανθασμένης αναδίπλωσης της πρωτεϊνης και κατά συνέπεια σχηματισμό των inclusion bodies. Στα στελέχη των E. Coli, η οξείδωση των κυστεϊνών λαμβάνει χώρα στον περιπλασματικό χώρο, όπου οι δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζονται μετά από αντιδράσεις ανταλλαγής δισουλφιδίων. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων και κυριότερα από την οικογένεια των Dsb (disulfide bond enzymes). Αντιθέτως, η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στον κυτταροπλασματικό χώρο είναι πιο σπάνια, ενδεχομένως επειδή κατάλοιπα κυστεϊνης είναι μέρος καταλυτικών περιοχών πολλών ενζύμων. Ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών σε αυτόν το χώρο είναι πιθανό να οδηγήσει σε απανεργοποίηση πρωτεϊνών, λανθασμένη αναδίπλωσή τους και δημιουργία συσσωματωμάτων (inclusion bodies). Το κυτταρόπλασμα έχει ένα πιο αρνητικό

οξειδοαναγωγικό δυναμικό και διατηρείται ως αναγωγικό περιβάλλον από το σύστημα θειορεδοξίνης- αναγωγάση της θειορεδοξίνης (trxB) καθώς και αυτό της γλουταρεδοξίνης- αναγωγάση της γλουταρεδοξίνης (gor). Αυτή η κατάσταση, που επικρατεί έχει ισχυρή επίδραση στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με δισουλφιδικούς δεσμούς. Ένας πιθανός τρόπος αντιμετώπισης είναι να χρησιμοποιήσουμε εξειδικευμένα σηματοδοτικά μόρια για να κατευθύνουμε τα πρωτεϊνικά προϊόντα στο χώρο του περιπλάσματος, μια διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Παρόλ' αυτά, η έκφραση των πρωτεϊνών στον κυτταροπλασματικό χώρο είναι εφικτή χάρη σε κάποια στελέχη E. Coli, τα οποία έχουν ένα πιο οξειδωτικό κυτταροπλασματικό περιβάλλον, που ευνοεί τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Παράδειγμα τέτοιου στελέχους είναι τα Origami στελέχη καθώς και άλλα μεταλλάγματα. Η λύση, βέβαια στο πρόβλημα σχηματισμού συσσωματωμάτων, δε δίνεται πάντα με αυτόν τον τρόπο. Αρκετές φορές, το κύριο ζήτημα δεν αφορά στην ανεπαρκή δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, αλλά περισσότερο στη μη σωστή αναδίπλωση της πρωτεϊνης. Σημαντικό ρόλο στο κομμάτι αυτού του ποιοτικού ελέγχου κατέχουν οι μοριακοί συνοδοί- πρωτεϊνες (chaperones). Σκοπός τους είναι, να βοηθούν πολυπεπτίδια που δεν έχουν αυτή την ικανότητα, να αποκτήσουν την τελική τους λειτουργική διαμόρφωση στο χώρο. Παρεμφερής και ο ρόλος κάποιων πιο εξειδικευμένων μορίων(π.χ. ClpB) , που έχουν την ικανότητα να «ξεμπλέξουν» μη αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια που βρίσκονται στο θρεπτικό μέσο LB. Η υπερπαραγωγή μπορεί να οδηγήσει σε συνωστισμό μέσα στον κυτταρικό χώρο και ως επακόλουθο να κορεστούν οι μοριακοί συνοδοί. Έχει προταθεί η λύση του προβλήματος αυτού, μέσω διακοπής της πρωτεϊνικής έκφρασης με απομάκρυνση του μορίου- επαγωγέα μετά από ένα στάδιο φυγοκέντρησης και επανατροφοδοσία με νέο θρεπτικό μέσο, που θα περιέχει και ποσότητα αναστολέα της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο, οι μοριακοί συνοδοί θα έχουν το χρόνο να δράσουν ανεμπόδιστα. Αυτή η πρόταση δε γίνεται να εφαρμοστεί σε όλα τα πειράματα, ωστόσο. Με ταυτόχρονη έκφραση κάποιων μεμονωμένων μοριακών συνοδών ή συνόλου αυτών, θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα σχηματισμού των inclusion bodies. Διαθέσιμα είναι σετ από πρωτεϊνες-μοριακές συνοδούς για εμπορική χρήση, περιέχοντας πλασμίδια που επιτρέπουν την υπερέκφραση σαπερονίου ή συνδυασμού αυτών. Εναλλακτικά, το ήδη υπάρχον σύστημα μοριακών συνοδών στο κύτταρο μπορεί να επαχθεί είτε μέσω θερμικού σοκ είτε μετά από προσθήκη benzyl alcohol. Αυτές οι μέθοδοι έχουν μικρό ποσοστό επιτυχιας. Η προσθήκη κάποιων χημικών συνοδών και συμπαραγόντων στο θρεπτικό αποτελεί μια προοπτική, που θα μπορούσε να λάβει κανείς υπόψιν όταν αντιμετωπίζει πρόβλημα inclusion bodies, αφού αυξάνεται τόσο η ποσότητα όσο και η ποιότητα των παραγώμενων πρωτεϊνών. Όπως υπογραμμίσαμε και σε προηγούμενο σημείο, μερικές φορές η λύση βρίσκεται στην ελάττωση του ρυθμού παραγωγής του ανασυνδυασμένου προϊόντος. Με αυτό επιτυγχάνουμε να βελτιώσουμε την ποιότητα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, καθώς έχουν περισσότερο χρόνο στη διάθεσή τους για να αποκτήσουν την επιθυμητή διαμόρφωση στο χώρο. Αυτό ενισχύεται και από τη μείωση της συγκέντρωσης του συνολικού ποσού πρωτεϊνης. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος για «αναστολή» του ρυθμού παραγωγής είναι η μείωση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, γεγονός που επίσης αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα για δημιουργία συσσωματωμάτων. Το εύρος της θερμοκρασίας σε τέτοιες περιπτώσεις κυμαίνεται από 15 έως 25 ^{o}C. Ο σχηματισμός των inclusion bodies διευκολύνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, λόγω της εξάρτησης τους από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Επομένως, αποσκοπούμε σε μειωμένα επίπεδα

παραγωγής ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης, τα οποία ωστόσο θα συνεισφέρουν σε καλύτερη ποιότητα και ταυτόχρονο λιγότερα inclusion bodies. Δραστική μείωση της θερμοκρασίας στην καλλιέργεια, της τάξης 4-10 ^{o}C, δεν συνίσταται επειδή μειώνεται και σε μεγάλο βαθμό η ποσότητα του τελικού προϊόντος, ενώ είναι και πιθανή η «απανεργοποίηση» κάποιων πρωτεϊνών-συνοδών.

---Ανενεργότητα πρωτεϊνών/ μειωμένη ενεργότητα: Η διαδικασία του πειράματος δεν ολοκληρώνεται με την παραγωγή και συλλογή επιθυμητού ποσού διαλυτής πρωτεϊνης. Προς κακή τύχη των ερευνητών, αυτό δεν εξασφαλίζει, ότι η πρωτεϊνη θα είναι και καλής ποιότητας, δηλαδή δε θα έχει την ενεργότητα που θα αναμέναμε. Στο σενάριο αυτό, ο αποτρεπτικός παράγοντας ενδέχεται να σχετίζεται με την κακή αναδίπλωση της πρωτεϊνης. Δηλαδη, ενώ φαινομενικά η πρωτεϊνη φαίνεται να λαμβάνει την σωστή αναδίπλωση, κάποια λεπτομέρεια εμποδίζει την ενεργή περιοχή της από το να δράσει φυσιολογικά. Αντίστοιχα προβλήματα μπορεί να προκαλεί και ο λανθασμένος σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών, καθώς και η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η καλλιέργεια. Ενδείξεις υπάρχουν, πως μειωμένη θερμοκρασία επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα ενεργότητας. Επιπρόσθετος παράγοντας είναι και κάποια μεταμεταφραστική τροποποίηση που απαιτεί η πρωτεϊνη, ώστε να αποκτήσει πλήρη ενεργότητα. Ενδεχομένως, τότε να κρίνεται αναγκαία η αλλαγή του οργανισμού-ξενιστή ως εργοστάσιο παραγωγής του ανασυνδυασμένου προϊόντος μας. Τέλος, η ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης μπορεί να εξηγήσει το φαινόμενο μειωμένης η μηδενικής ενεργότητας της επιθυμητής μας πρωτεϊνης και σε μια τέτοια περίπτωση θα χρειαστεί να επαναλάβουμε το πείραμα με διαφορετικές συνθήκες.

Συμπερασματικά, τα βακτηριακά στελέχη των E. Coli θεωρούνταν ανέκαθεν ο καταξοχήν κατάλληλος μικροβιακός ξενιστής αναφορικά με την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Οι ιδιότητες αυτού του κυτταρικού «εργοστατίου» παραγωγής το καθιστούν ιδανικό για έκφραση σταθερά αναδιπλωμένων σφαιρικών πρωτεϊνών, τόσο προκαρυωτικών όσο και αυτών που προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Παρότι η έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 60 kDa είναι πιο πολυεπίπεδη, έχουν καταγραφεί αρκετές περιπτώσεις όπου κάτι τέτοιο έγινε εφικτό, προσαρμόζοντας κατάλληλα τις συνθήκες ανάλογα με την εκάστοτε πρωτεϊνη. Η παραγωγή ετερόλογης ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης από τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη μπορεί να συναντήσει αρκετούς «σκόπελους». Εάν σταθούμε τυχεροί, τότε κάποια από τις ήδη υπάρχουσες προτεινόμενες λύσεις, που παραθέσαμε προηγουμένως, θα συμβάλλει στην ορθή αντιμετώπιση του ζητήματος. Ειδάλλως, θα πρέπει να καταφύγουμε ενδεχομένως στη χρήση άλλου οργανισμού-ξενιστή. Όταν βρισκόμαστε αντιμέτωποι με την επίλυση κάποιας δυσκολίας, αναπόφευκτα θα υπάρξουν απόπειρες που θα αποτύχουν παταγωδώς. Κάτι τέτοιο μπορεί να σχετίζεται εν μέρει και με το γεγονός, ότι βιβλιογραφικά αρκετοί τρόποι αντιμετώπισης είναι πρωτεϊνο-εξαρτώμενοι, δηλαδή βρίσκουν εφαρμογή μόνο σε εξειδικευμένες πρωτεϊνες. Είναι σημαντικές λοιπόν και οι δημοσιέυσεις αναφορών με αρνητική έκβαση και όχι μόνο αυτών με θετικό πρόσημο. Το μόνο σίγουρο είναι, πως 40 χρόνια μετά την πρώτη επιτυχημένη ανάκτηση ανθρώπινης πρωτεϊνης από στέλεχος E. Coli υπάρχουν τεράστια περιθώρια βελτίωσης, παρά τα σημαντικά βήματα που έχουν ήδη γίνει προς την σωστή κατεύθυνση.

Υλικά-μέθοδοι

LB: Το θρεπτικό (LB) είναι ένα μέσο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών. Η φόρμουλα για την παραγωγή του συγκεκριμένου μέσου παρουσιάστηκε το έτος 1951 στο πρώτο paper του Bertani σχετικά με τη μελέτη του πάνω στους φάγους. Σκοπός του ήταν να βελτιστοποιήσει την ανάπτυξη των gram- βακτηρίων Shigelia. Το θρεπτικό αυτό μέσο άρχισε να χρησιμοποιείται κατά κόρον από τη δεκαετία του 1960 σε πειράματα μικροβιολογίας και αποτελεί μια «σταθερά» για καλλιέργεια των Escherichia coli. Τα συστατικά που περιέχει μπορεί να διαφέρουν σε μερικές περιπτώσεις, αλλά μοιράζονται κάποια κοινά στοιχεία που συμβάλλουν στην κυτταρική ανάπτυξη. Πεπτίδια παρέχονται μέσω της τρυπτόνης(tryptone), η αποία αποτελεί το αποτέλεσμα πέψης της πρωτεΐνης καζεΐνης από την πρωτεάση τρυψίνη. Αποτελεί την πηγή των απαραίτητων αμινοξέων για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Βιταμίνες (π.χ. βιταμίνη Β) καθώς και πληθώρα ιχνοστοιχείων αλλά και οργανικών στοιχείων προσφέρουν τα εκχυλίσματα ζύμης(yeast extract). Το μέσο περιέχει επίσης αλάτι(sodium chloride), υπέυθυνο για την οσμωτική ισορροπία. Η αρχική σύσταση του μέσου περιείχε και ποσότητα γλυκόζης, η οποία ωστόσο δε χρησιμοποιήθηκε μεταγενέστερα. Η σύσταση στην ποσότητα του χλωριούχου νατρίου διαφέρει, ανάλογα με τις οσμωτικές συνθήκες που επιθυμούμε να έχει το μέσο μας. Χαμηλή συγκέντρωση σε αλάτι επιλέγεται όταν η καλλιέργεια θα εμβολιαστεί με αντιβιοτικό ευαίσθητο σε αυτό (π.χ. LB-Luria). Για την παραγωγή ενός λίτρου θρεπτικού μέσου LB ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία:

Ζυγίζουμε και προσθέτουμε σε δοχείο ττις εξής ποσότητες:

- 10 g tryptone
- 5 g yeast extract
- 10 g NaCl

Διαλύουμε με ~800 ml απεσταγμένου νερού και συμπληρώνουμε μέχρι το 1 L συνολικού όγκου, Ετοιμάζουμε το αυτόκαστο για αποστείρωση του μέσου για 20’ στους 121 °C. Το μέσο είναι έτοιμο για χρήση όταν κρυώσει. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C. Εάν χρειαστεί, μπορούμε να συμπληρώσουμε με ποσότητα αντιβιοτικού για τη διενέργεια πειράματος.

Άγαρ: Για να παράξουμε άγαρ, που θα χρησιμοποιηθεί στα τρυβλία, ακολουθούμε την ίδια διαδικασία και προσθέτουμε 15 g agar πριν την αποστείρωση στο αυτόκαστο. Μόλις κρυώσει το μέσο και πριν στερεοποιηθεί το περιχύνουμε σε αποστειρωμένα τρυβλία παρουσία φλόγας, Εάν επιθυμούμε το τρυβλίο να περιέχει κάποιο αντιβιοτικό, το προσθέτουμε μετά την αποστείρωση και αφού αφήσουμε το άγαρ σε υδατόλουτρο και θερμοκρασία 50 ^{o} C να κρυώσει και να γίνει πιο ομαλή η αλλαγή της θερμοκρασίας. Η αναλογία αντιβιοτικού ως προς τον όγκο του άγαρ είναι 1/1000. Τα τρυβλία φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4 ^{o} C.

*PBS(*phosphate buffered saline), pH=7,4: Υδατικό διάλυμα με σταθερό pH που περιέχει φωσφορικά άλατα. Η οσμωμοριακότητα και το ιοντικό περιβάλλον είναι παρόμοια με αυτά του ανθρώπινου σώματος. Έχει αρκετές βιολογικές εφαρμογές, κυρίως χρησιμοποιείται για «ξέπλυμα» ή για αποκόλληση κυττάρων προσκολλημένα σε κάποια επιφάνεια, καθώς και για αραιώσεις. Είναι μη τοξικό για τα περισσότερα είδη κυττάρων, επειδή είναι ισοτονικό προς αυτά. Περιέχει τα παρακάτω συστατικά και η ρύθμιση του pH γίνεται με χρήση πυκνού διαλύματος HCl.

1. NaCl
2. Kcl
3. Na_2HPO_4
4. KH_2PO_4
5. dH_2O

TBS (Tris-buffered saline): Διάλυμα που κρατά σταθερό το pH του, είναι μη τοξικό και με αρκετές εφαρμογές στο χώρο της μοριακής βιολογίας. Χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα μεμβρανών με αντίσωμα καθώς και για αραίωση πυκνων διαλυμάτων που περιέχουν αντίσωμα. Οι ποσότητες των συστατικών μπορεί να διαφέρουν ελαφρώς, ενώ το pH έχει αλκαλικό χαρακτήρα και μπορεί να κυμαίνεται στο εύρος 7,4-8.

Συστατικά για 1 λίτρο:

Τρις(υδροξυμεθυλ)μεθυλαμίνη 6.07g

Χλωριούχο νάτριο, 8.7g

Συμπυκνωμένο υδροχλωρικό οξύ

Μέθοδος: Διαλύουμε τα άλατα σε 900 ml απεσταγμένου νερού. Προσθέστε συμπυκνωμένο HCl έως ότου το pH γίνει 7.6. Συμπληρώνουμε έως όγκο 1 L με απεσταγμένο νερό.

TBS-T: Μείγμα από διάλυμα TBS και το απορρυπαντικό Tween 20. Χρησιμοποιείται για ξέπλυμα μεμβρανών νιτροκυτταρίνης/νάιλον. Η σύστασή του περιέχει τα εξής στοιχεία:

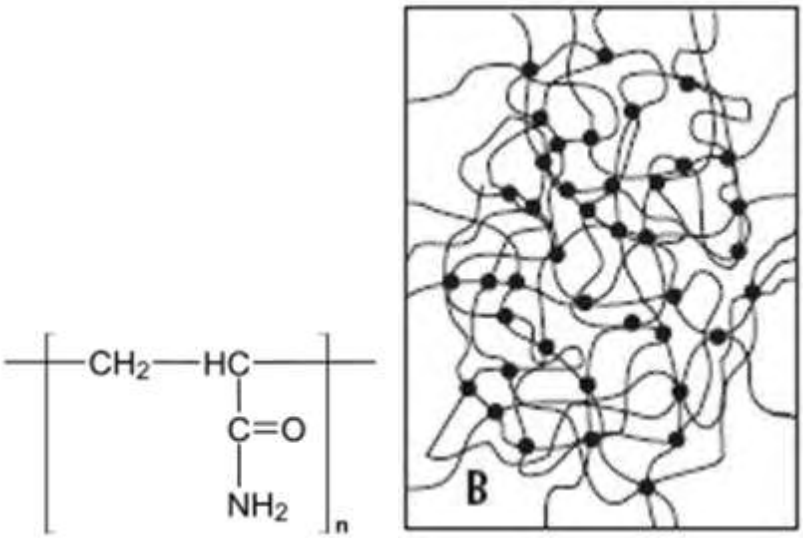
- 50 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 0.1% Tween 20

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.

ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

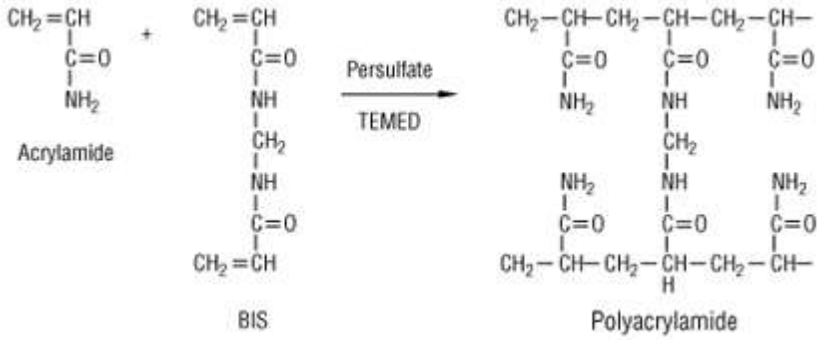
1. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγέθους 5 ως 2000kDa
2. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA 5-500bp



Εικόνα: Μόριο ακρυλαμίδης και απεικόνιση της πηκτής πολυακρυλαμίδης

Πολυμερισμός ακρυλαμίδης:

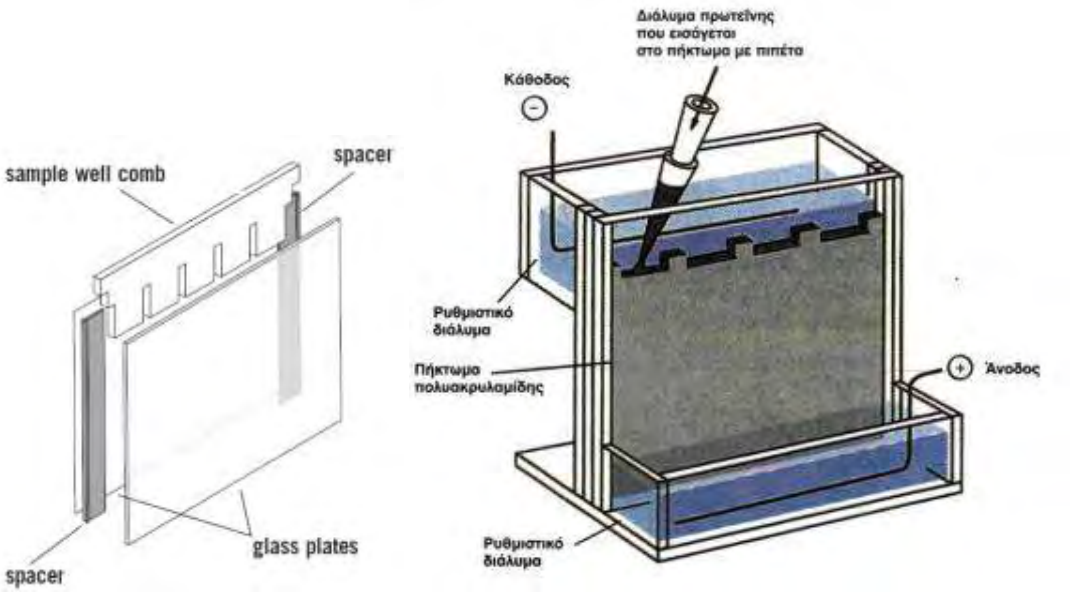
- Στην πηκτή πολυακρυλαμίδης η ακρυλαμίδη συνδέεται σταυρωτά (cross-linked) με N,N'-Methylenebisacrylamide
- Η δις-ακρυλαμίδη πολυμερίζεται με την ακρυλαμίδη σχηματίζοντας διασυνδέσεις μεταξύ των αλυσίδων ακρυλαμίδης σχηματίζοντας ένα δίκτυο πολυακρυλαμίδης
- APS (ammonium persulfate): παράγοντας πολυμερισμού: οξειδωτικός παράγοντας και πηγή ριζών
- TEMED (N,N,N,N'-tetramethylenediamine): καταλύει τον πολυμερισμό ενισχύοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών από το APS
- Ο πολυμερισμός επιταχύνεται από την παρουσία TEMED και απαιτεί την παρουσία υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) για την έναρξη του πολυμερισμού. Το TEMED καταλύει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών από το APS, οι οποίες κατευθύνουν τον πολυμερισμό



Εικόνα: Η αντίδραση πολυμερισμού της ακρυλαμίδης με την συμβολή των APS/TEMED

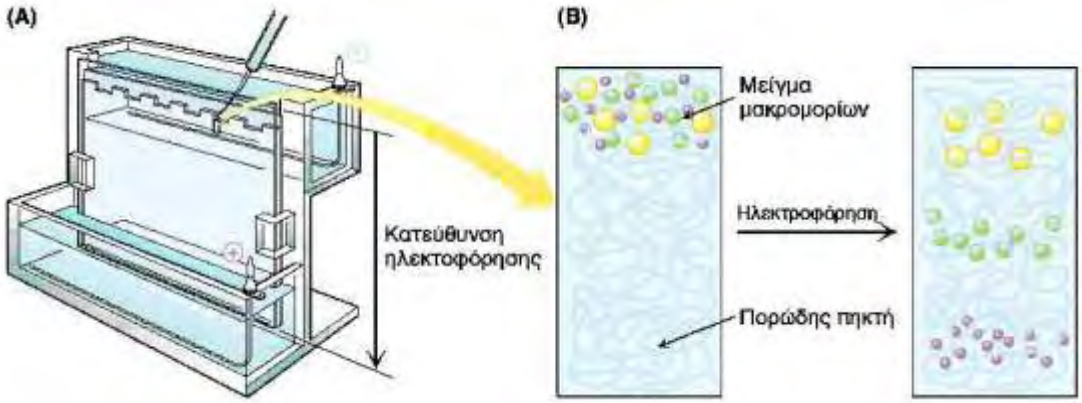
SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

- Οι πρωτεϊνες συνήθως αποδιατάσσονται με απορρυπαντικά, όπως το sodium dodecyl sulfate (SDS) που τους προσδίδει ένα αρνητικό φορτίο, οπότε κινούνται μέσω της πηκτής προς την άνοδο



Εικόνα: Η συσκευή που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση

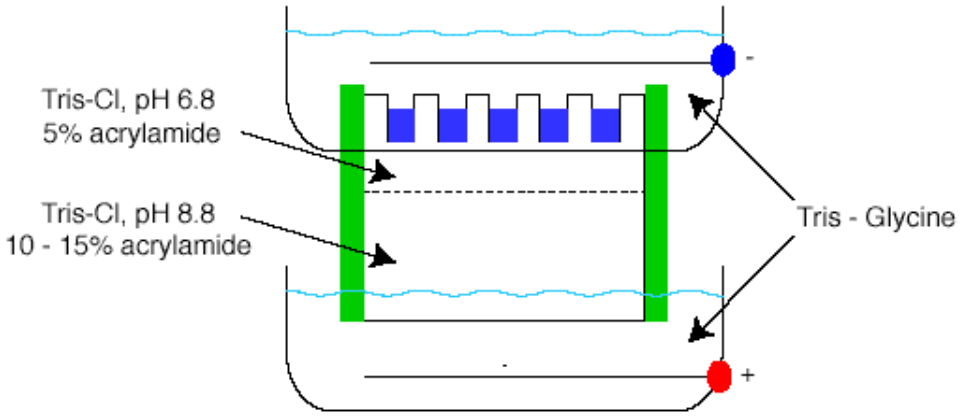
- Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, οι μικρότερες μετακινούνται ταχύτερα



Εικόνα: Αναπαράσταση της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης πρωτεΐνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

- **Πηκτή συμπύκνωσης** (stacking gel): Έχει μεγάλο μέγεθος πόρων, χαμηλή συγκέντρωση άλατος και pH και συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή
  - 30:0,8 ακρυλαμίδιο/δισακρυλαμίδιο (4-6%)
  - 0.125 M Tris-HCl, pH 6,8
  - SDS, APS, TEMED

- **Πηκτή διαχωρισμού** (separating gel): Μικρή διάμετρος πόρων, υψηλή συγκέντρωση άλατος και βασικό pH. Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μέγεθός τους.
  - 30:0,8 ακρυλαμίδιο/δισακρυλαμίδιο (5-15%)
  - 0.33 M Tris-HCl, pH 8,8
  - SDS, APS, TEMED



Εικόνα: Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη μέθοδο του SDS-PAGE

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης:
• 0.025 M Tris Base, pH 8.3
• 0.19 M Γλυκίνη
• 0.1% SDS
– Ιόντα γλυκίνης με μικρότερη ηλετροφορητική κινητικότητα από εκείνη των πρωτεϊνών

Κλίμακα Διαχωρισμού Πηκτής SDS-Ακρυλαμίδης

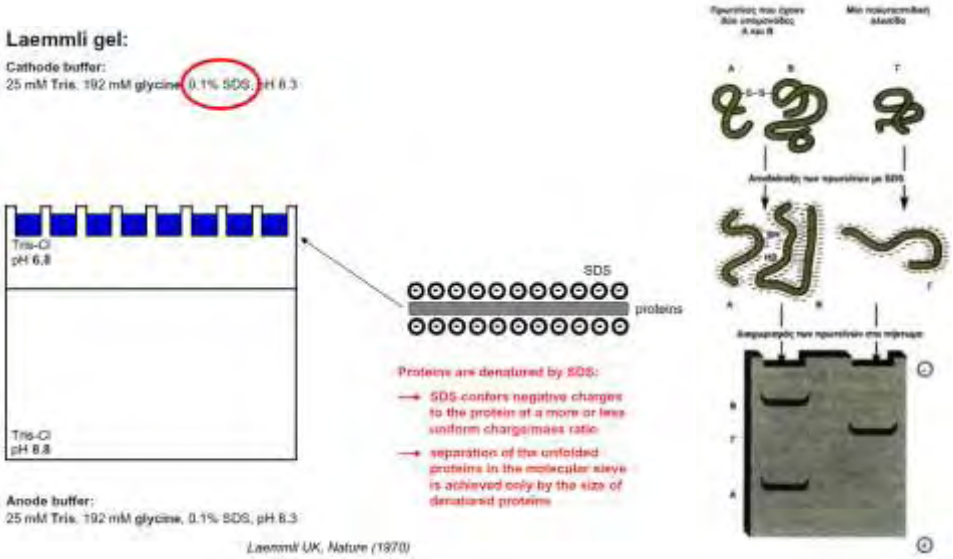
Συγκέντρωση* Ακρυλαμίδης (%)	Γραμμική Κλίμακα Διαχωρισμού (kD)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-12

Εικόνα: Σύσταση του πηκτώματος σε ακρυλαμίδη βάσει του μεγέθους των πρωτεϊνών

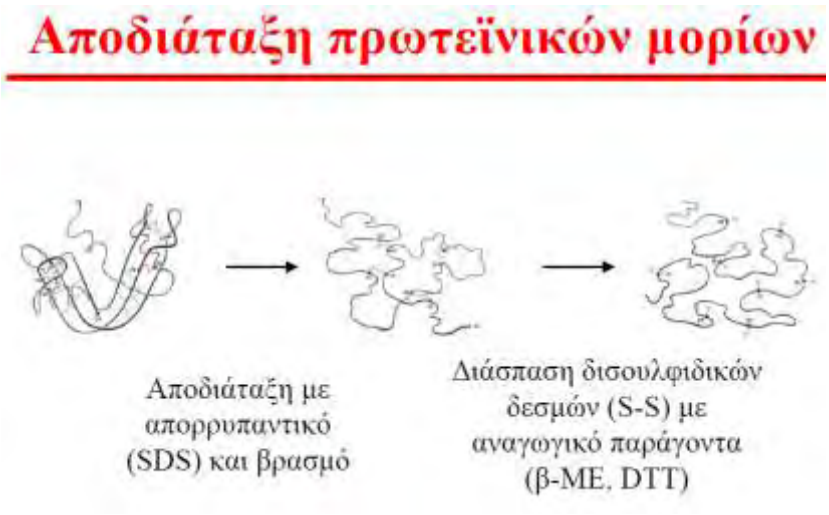
Αποδιατακτικές συνθήκες προετοιμασίας δειγμάτων

- **SDS:** καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και αποκτούν μεγάλο αρνητικό φορτίο
- **Μερκαπτοαιθανόλη:** ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς

- **Βράσιμο** των δειγμάτων στους 95 βαθμούς για 5 λεπτά



Εικόνα: Ρόλος του SDS στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών



Εικόνα: Αποδιάταξη πρωτεϊνικών μορίων

Απεικόνιση αποτελεσμάτων: Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μπορούν να εμφανιστούν με χρώση **Coomassie brilliant blue** (ανιχνεύει 10ng και πάνω)

- **Χρωματισμός**: Η χρωστική coomassie προσδένεται σε αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, αλλάζοντας χρώμα από κοκκινωπό-καφέ έως έντονο μπλε
- **Αποχρωματισμός**: πλύση της περίσσειας χρωστικής

Σχετικά με τη χρωστική αυτή:

- Τρι-φένυλο-μεθάνιο: χρωστική υφασμάτων.
- Το πήκτωμα μονιμοποιείται σε διάλυμα 45% μεθανόλης και 10% οξικού οξέως, για να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες και να αποφευχθεί η διάχυσή τους.
- Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνες
- Οι πρωτεϊνικές ζώνες που έχουν διαχωριστεί στην πηκτή μπορούν να μεταφερθούν σε μεμβράνες (νιτροκυτταρίνης, PVDF, Immobilon).

- Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη που βρίσκεται σε άμεση επαφή με την πηκτή, βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, με αποτέλεσμα οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες να μετακινούνται από την αρνητικά φορτισμένη πηκτή προς τη μεμβράνη που βρίσκεται στην άνοδο, όπου και ακινητοποιούνται.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε φυσική κατάσταση (Native PAGE)

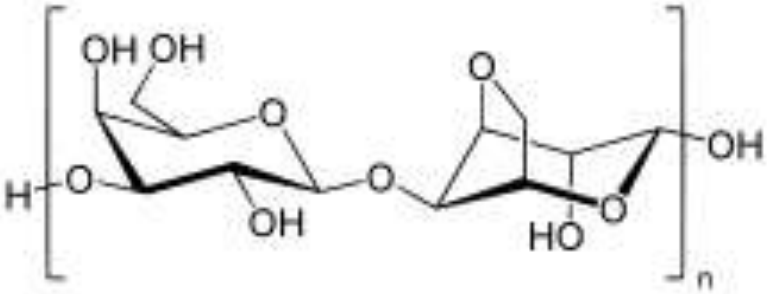
- **Μη-αποδιατακτικές συνθήκες**, οι πρωτεΐνες έχουν την τριτοταγή τους διαμόρφωση
- Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών οφείλεται στο εσωτερικό τους φορτίο, στο μέγεθος και το σχήμα τους
- Η μετακίνηση στην πηκτή συμβαίνει γιατί οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν αρνητικό φορτίο σε αλκαλικά διαλύματα (η κατεύθυνση της πρωτεΐνης μπορεί να αλλάξει χρησιμοποιώντας όξινο, ουδέτερο ή αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα)
- Χρήση διαφορετικού running buffer

Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια:
1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA.
3. Χρώση του πηκτώματος (αν αυτή δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο παρασκευής του) με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA και στη συνέχεια άμεση παρατήρηση και φωτογράφισή του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πηκτή αγαρόζης

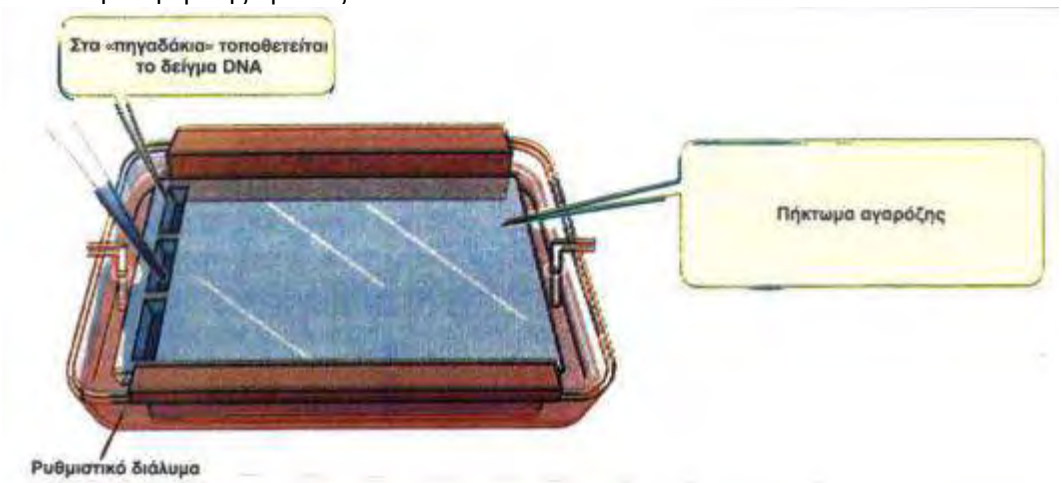
•Το άγαρ απομονώνεται από φύκη (red algae) και αποτελείται από αγαρόζη και αγαροπηκτίνη
•Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές (D-galactose και L-galactopyranose)



Εικόνα:Ο χημικός τύπος του πολυσακχαρίτη αγαρόζη

Πηκτή Αγαρόζης:
- Το ουδέτερο φορτίο καθώς και η χαμηλού βαθμού χημική πολυπλοκότητα της αγαρόζης την κάνουν ένα πολύ καλό υλικό που δεν αλληλεπιδρά με τα βιομόρια

- Η πηκτή από καθαρή αγαρόζη έχει σχετικά μεγάλους πόρους που επιτρέπει το διαχωρισμό μεγάλων μορίων
- Διαχωρισμός DNA (5-20000bp), RNA και πρωτεϊνών >200kD
- Η πηκτή αγαρόζης είναι συνήθως από 0.7% (καλός διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA 5–10kb) μέχρι 2% (καλός διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA 0.2–1kb) περιεκτικότητα σε αγαρόζη
- Τα νουκλεϊνικά οξέα διαχωρίζονται μέσα σε μια πηκτή αγαρόζης εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο
- Η πρώτη μοντέρνα συσκευή ηλεκτροφόρησης σχεδιάστηκε από τον Walter Schaffner, το 1975, που τότε ήταν απόφοιτος φοιτητής στη Ζυρίχη ! Ως τότε το κάθε δείγμα DNA αναλυόταν ξεχωριστά σε μικρά,κυλινδρικά και κατακόρυφα gels !
- τα νουκλεϊκά οξέα, μετακινούνται από αρνητικά προς θετικά ηλεκτρόδια, λόγω στο φυσικά-φερόμενο αρνητικό τους φορτίο που παρατηρείται στο σκελετό σακχάρου-φωσφορικής ομάδας



Εικόνα; Η συσκευή που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση αγαρόζης

Ρυθμιστικά Διαλύματα:
•Χρησιμοποιούνται για να παρέχουν τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται μεταφορά ρεύματος και να διατηρούν το pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή . Τα πιο κοινά διαλύματα είναι τα εξής:

- **TAE** (Tris/Acetate/EDTA) (μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, θέλει χαμηλότερη τάση και περισσότερο χρόνο αλλά καλύτερα αποτελέσματα, καλό διαχωρισμό σε DNA >4kb και σε υπερελικωμένο DNA)
- **TBE** (Tris/Borate/EDTA) (προβληματικό με το RNA λόγω αλληλεπίδρασης, καλό διαχωρισμό σε DNA 0.1-3 kb και όταν εφαρμόζουμε τάση >150 V)
- Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήσαμε ήταν το TBE (1x), που αποτελείται από 0.089 M Tris-Cl, 0.089 M βορικό οξύ, 0.002 M EDTA και pH 8.0. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που κυρίως χρησιμοποιήθηκε ήταν 1% για ανάλυση τμημάτων DNA 0.3 έως 10 Kb. Η χρώση του πηκτώματος πραγματοποιήθηκε με την φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 mg/ml). Η αναγνώριση των ζωνών DNA γίνεται με παρατήρηση στο υπεριώδες φως (260 nm).

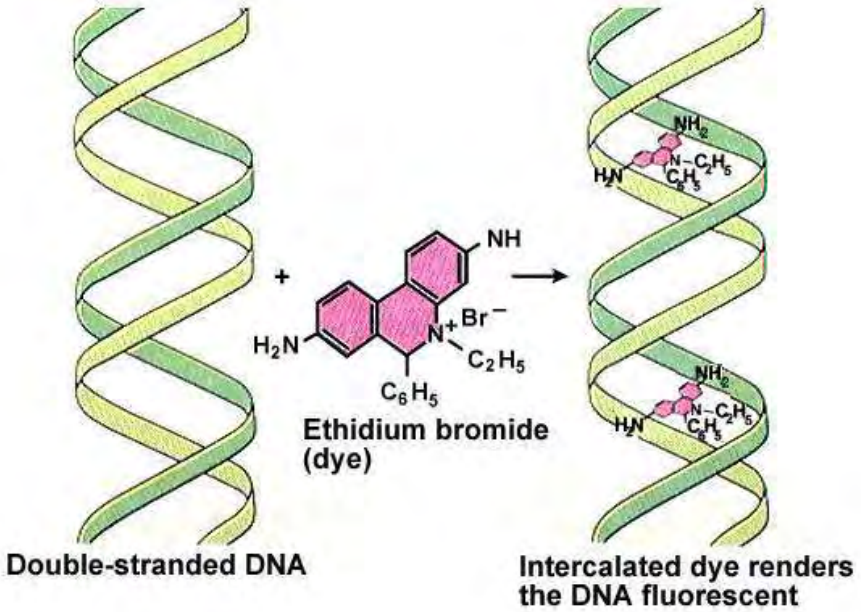
Απεικόνιση αποτελεσμάτων:
Το DNA μπορεί να γίνει ορατό με τη χρήση **Βρωμιούχου Αιθιδίου (EtBr)**

•Το βρωμιούχο αιθίδιο όταν παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή στο RNA) μπορεί να φθορίζει στο υπεριώδες φως

•Υπολογίζεται ότι ένα μόριο EtBr παρεμβάλλεται κάθε 2,5 νουκλεοτίδια

•Σχηματίζονται δεσμοί van der Waals

•Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου EtBr



Εικόνα: Βρωμιούχο αιθίδιο και DNA

- ✓ Άλλες επιλογές για εμφάνιση:Gelred, Syber Green, SYBR Gold

Pierce™ (**Thermo Scientific**)ECL Western Blotting Substrate

- Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιείται για την εμφάνιση μεμβρανών (νιτροκυτταρίνης). Είναι ένα ενισχυμένο χημειοφωταυγές υπόστρωμα για το μέγιστο εντοπισμό ενεργότητας αντισωμάτων κατά το στύπωμα κατά Western

Western Blot

Γενικα:

- Συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν και να ταυτοποιηθούν μετά το διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση, στην περίπτωση που υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα έναντι αυτών των πρωτεϊνών. Γι' αυτό το σκοπό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μεθοδολογίες με την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη αυτή του ανοσοαποτυπώματος (ή μεταφοράς) κατά Western.

- Το ανοσοαποτύπωμα (ή ανοσοστύπωμα) των πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης και την ανίχνευσή τους με αντισώματα. Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα ανοσο-αποτύπωσης, με γνωστότερο όλων το κλασσικό ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting).

Αποτύπωμα :

- Η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη καλείται **«αποτύπωμα»** ή **«στύπωμα»** και παρόλο που μπορεί να επιτευχθεί με απλή ροή του διαλύτη συνήθως γίνεται ηλεκτροφορητικά, γιατί έτσι είναι πιο γρήγορη και πιο ευαίσθητη. Η μεταφορά δηλαδή, ακολουθεί την ίδια βασική αρχή με την ηλεκτροφόρηση μόνο που αυτή τη φορά το ρεύμα εφαρμόζεται σε γωνία 90ο ως προς το πήκτωμα προκειμένου να μεταναστεύσουν οι πρωτεΐνες από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του αποτυπώματος είναι ότι οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα όταν βρίσκονται στην επιφάνεια του φίλτρου παρά στο πήκτωμα. Επίσης, οι χρόνοι χρώσης/αποχρωματισμού αλλά και οι χρόνοι επώασης με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια είναι πολύ πιο σύντομοι στις περιπτώσεις πρωτεϊνών προσδεμένων σε μεμβράνες, καθώς εδώ οι αντιδράσεις είναι **επιφανειακές**. Επιπρόσθετα, μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά από αποτύπωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περισσότερες της μιας ανοσοανιχνεύσεις, αφού ξηραθεί και αποθηκευτεί. Τέλος, οι μεμβράνες είναι πιο εύχρηστες και πιο ανθεκτικές σε σχέση με τα πηκτώματα.

Υλικά πρόσδεσης πρωτεϊνών

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα υλικά στήριξης είναι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, νάιλον ή PVDF, στην επιφάνεια των οποίων προσδένονται και ακινητοποιούνται οι πρωτεΐνες με τη σειρά που διαχωρίστηκαν στο πήκτωμα. Πιο συχνά επιλέγεται **μεμβράνη νιτροκυτταρίνης** καθώς δίνει αρκετά καλά αποτελέσματα στη μεταφορά και την ανοσοαποτύπωση. Εκτός από τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, χρησιμοποιούνται και διάφορες **νάιλον μεμβράνες** οι οποίες είναι πιο ανθεκτικές σε σχέση με τη νιτροκυτταρίνη, έχουν μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης πρωτεϊνών και προτιμώνται σε περιπτώσεις ανάλυσης πρωτεϊνών χαμηλού MB (που προσδένονται ασθενώς σε νιτροκυτταρίνη) ή σε περιπτώσεις πολλαπλών κύκλων ανοσοεντόπισης στην ίδια μεμβράνη. Παρόλα αυτά, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης παραμένουν η πρώτη επιλογή στα ανοσοαποτυπώματα, καθώς λόγω της χαμηλότερης συγγένειάς τους για τις πρωτεΐνες σε σχέση με τις νάιλον, χαρακτηρίζονται συνήθως και από χαμηλότερη μη-ειδική πρόσδεση αντισωμάτων, δηλαδή «θόρυβο».

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer)

Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος επιλογής καθορίζει το σωστό προσανατολισμό των ηλεκτροδίων για την επαφή πηκτώματος/νιτροκυτταρίνης. Έτσι, όταν αποτυπώνονται πηκτώματα SDS-PAGE, συνήθως σε ουδέτερα ή ελαφρώς αλκαλικά ρυθμιστικά διαλύματα μεταφοράς, τα πολυπεπτίδια συμπεριφέρνονται ως ανιόντα και η νιτροκυτταρίνη μεταφοράς πρέπει να βρίσκεται στην ανοδική πλευρά του πηκτώματος. Το διάλυμα μεταφοράς συνήθως περιέχει SDS και μεθανόλη. Το SDS αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς αλλά μειώνει την πρόσδεση πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη. Η μεθανόλη χρησιμοποιείται γιατί ελαχιστοποιεί το φούσκωμα του πηκτώματος κατά τη διάρκεια του αποτυπώματος και αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, αλλά δυσκολεύει την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα.

Χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography)

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό εφαρμοσμένης χημειάς, ως χρωματογραφία συγγένειας ορίζουμε την υγρή χρωματογραφική τεχνική, η οποία κάνει χρήση μιας βιολογικής αλληλεπίδρασης με σκοπό το διαχωρισμό και ταυτόχρονα την ανάλυση συγκεκριμένων «αναλυτών» μέσα σε ένα δείγμα. Για παράδειγμα, μια πρωτεϊνη που

συνδέεται με κάποια μέταλλα (π.χ. Ni) μπορεί να καθαριστεί από την παρουσία άλλων μη ειδικών πρωτεϊνών, όταν στο προς μελέτη δείγμα προστεθουν ρητίνες, που περιέχουν ακινητοποιημένη ποσότητα Ni. Μια πρωτεϊνη μπορεί να προσδέσει Ni εξαιτίας της παρουσίας αμινοξέων όπως η ιστιδίνη με συγκεκριμένο προσανατολισμό, με αποτέλεσμα να έχουν λειτουργία ημιδαζόλης και την ικανότητα να κατευθύνουν τα ιόντα Ni κατάλληλα προς την επίτευξη μέγιστης αλληλεπίδρασης. Το βιομόριο ενδιαφέροντος μας αλληλεπιδρά αντιστρεπτά με ένα συγκεκριμένο προσδέτη, ο οποίος αποτελεί κομμάτι μιας μήτρας. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η προαναφερθείσα ειδική σύνδεση στη μήτρα γίνεται ακόμα και υπό την παρουσία άλλων μορίων και επιτρέπει το ξέπλυμά του από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο είμαστε σε θέση να καθαρίσουμε το βιομόριο που μας ενδιαφέρει με αποτελεσματικό ποσοστό ανάκτησης σε ένα απλό βήμα, καθώς και υψηλή καθαρότητα. Υπάρχουν, ωστόσο, ορισμένες προϋποθέσεις που πρέπει να τηρούνται κατά τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας. Αυτές έχουν ως εξής:

- Ένας βιοειδικός προσδέτης, που μπορεί να προσδεθεί ομοιοπολικά σε μια μήτρα χρωματογραφίας
- Αυτός ο συνδεδεμένος προσδέτης θα πρέπει να έχει την ικανότητα για ειδική σύνδεση με το βιομόριο- στόχο
- Η σύνδεση ανάμεσα στον προσδέτη και το μόριο- στόχο θα πρέπει να έχει αντιστρεπτό χαρακτήρα, έτσι ώστε μετά το στάδιο της πλύσης να είναι σε ενεργή μορφή

Θα παραθέσουμε μερικά από τα πιο βασικά παραδείγματα αλληλεπίδρασης, στα οποία βρίσκουν εφαρμογή:

- Αντιγόνο- αντίσωμα
- Ένζυμο- ανάλογο υποστρώματος
- Πρωτεϊνη (binding)- προσδέτης
- Υποδοχέας- προσδέτης
- Νουκλεϊκό οξύ- αλληλουχία με συμπληρωματικές βάσεις
- Ορμόνη, βιταμίνη- υποδοχέας, carrier protein
- Γλουταθειόνη- glutathione-s- transferase, GST- proteins

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδέτη- μορίων στόχων μπορούν να είναι αποτέλεσμα ηλεκτροστατικών ή υδροφοβων αλληλεπιδράσεων, van der Waals ή/ και δεσμών υδρογόνου. Η έκλουση του μορίου- στόχου από την μήτρα/ στήλη μπορεί να επιτευχθεί είτε εξειδικευμένα με κάποιο προσδέτη/ ανταγωνιστή είτε μη ειδικά, με μετουσίωση του μορίου τροποποιώντας το ph, το ιονικό περιβάλλον ή την πολικότητα

Βήματα στη χρωματογραφία συγγένειας:

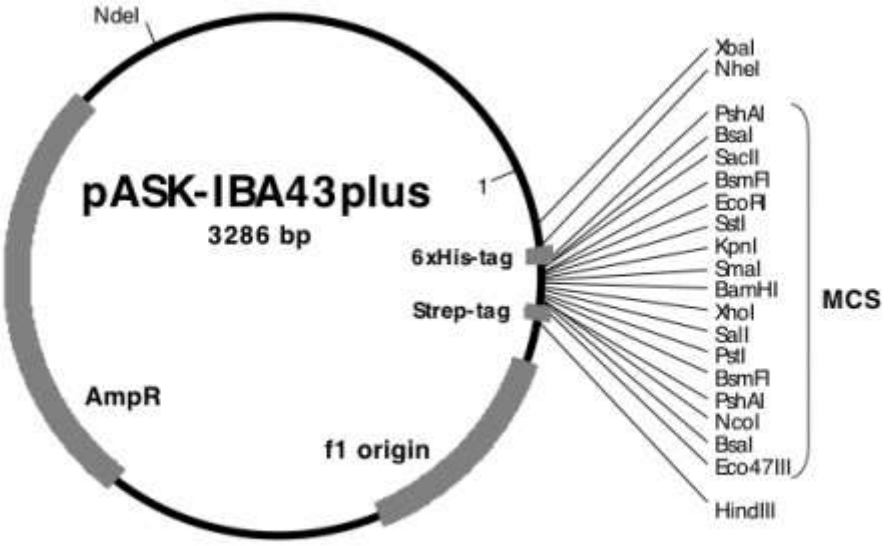
1. Ο προσδέτης ενώνεται ομοιοπολικά με τη μήτρα (π.χ. agarose beads)
2. Εισαγωγή της μήτρας σε στήλη χρωματογραφίας
3. Μη καθαρό δείγμα, που περιλαμβάνει το μόριο επιλογής εισάγεται στην στήλη συγγένειας

4. Ροή στην στήλη και αλληλεπίδραση των affinity beads με τον προσδλετη. Τα μόρια που δεν προσδένονται στον προσδέτη απομακρύνονται μέσω έκλουσης από την στήλη
5. Συνεχόμενες πλύσεις για αποτελεσματική απομάκρυνση μορίων, που έχουν προσδεθεί χαλαρά στον προσδέτη
6. Συλλογή των πρωτεϊνών που έχουν προσδεθεί ισχυρά με χρήση μεθόδων α) ειδικών, β) μη ειδικών
   Α) προσθήκη ανταγωνιστή για θέση σύνδεσης
   Β) προσθήκη αντιδραστηρίου, που μετουσιώνει τον στόχο μας και τον απελευθερώνει

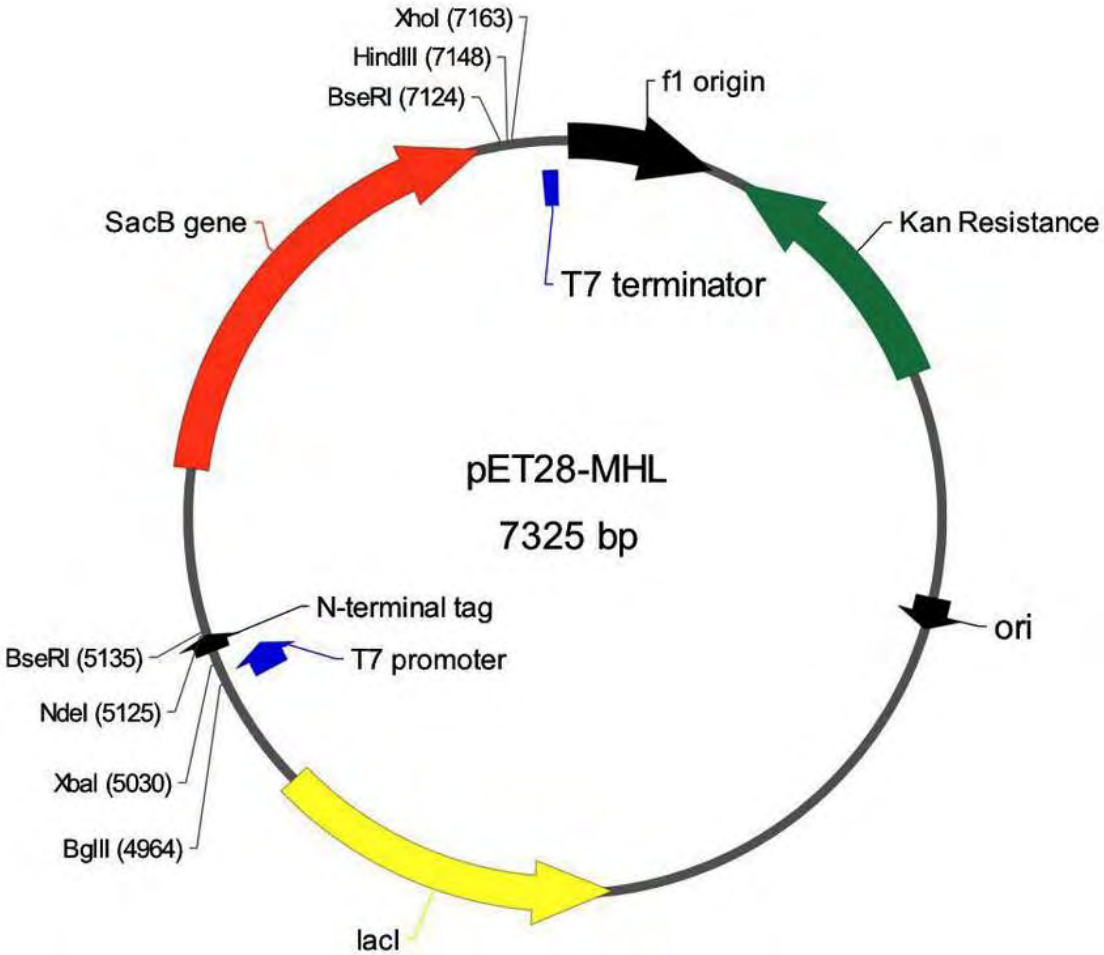
Agarose beads: Μήτρα βασισμένη στην αγαρόζη χρησιμοποιείται συχνά για καθαρισμό πρωτεϊνών με τη βοήθεια στήλης. Πιο συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις: α) gel filtration chromatography, b) affinity chromatography, c) ion exchange chromatography. Ωστόσο, δε χρησιμοποιείται ως ενιαίο τζελ, αλλά υπό τη μορφή σφαιριδίων, τα λεγόμενα beads. Τα agarose beads είναι αρτετά πορώδη, έτσι ώστε οι πρωτεϊνες να μπορούν να ρέουν ελεύθερα διαμέσου των beads. Οι κόκκοι βασισμένοι σε αγαρόζη είναι σε γενικές γραμμές απαλοί και διαλύονται ελυκολα, συνεπώς θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνθήκες χαμηλής φυγοκέντρισης/ χαμηλής πίεσης/ ροής βαρύτητας. Η αγαρόζη αποτελεί ιδανική επιλογή ως υλικό για χρήση στη χρωματογραφία επειδή δεν απορροφά βιομόρια, παρά μόνον σε μικρό βαθμό, έχει καλές ιδιότητες ροής και μπορεί να αντέξει σε αντίξοες συνθήκες ph/ ιοντικού περιβάλλοντος, καθώς και υψηλής συγκέντρωσης αποδιατακτικών συστατικών. Ειδικότερα, στην περίπτωση της χρωματογραφίας συγγένειας τα agarose beads αποτελούν την πιο διαδεδομένη επιλογή όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως βασικός κορμός για σύνδεση με κάποιο προσδέτη για το διαχωρισμό του. Οι προσδέτες συνδέονται ομοιοπολικά με ενεργοποιημένες ομάδες υδροξυλλίου του πολυμερούς της αγαρόζης. Κατόπιν, πρωτεϊνες του ενδιαφέροντός μας ενώνονται μέσω ειδικής σύνδεσης με τους προσδέτες και διαχωρίζονται μέσω αυτής της διαδικασίας από άλλες πρωτεϊνες. Στο τελικό στάδιο γίνεται έκλουση τους και συλλέγονται. Τυπικά agarose beads έχουν πυκνότητα 4-6% αγαρόζης και διαθέτουν πληθώρα διαθέσιμων θέσεων σύνδεσης για πρωτεϊνες.

Πλασμίδια

- Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό των DNA αλληλουχιών και των προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR ήταν το πλασμίδιο pET/pASK.



Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pASK



Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pASK

» Pet28: γονίδιο ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη, T7 υποκινητής, lac-o, επαγωγή με το ανάλογο της λακτόζης IPTG, περιέχει ταγκ ιστιδίνης για χρωματογραφία συγγένειας
» pAsk: γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμπικιλλίνη, tet υποκινητή επαγωγή από (άνυδρη) τετρακυκλίνη 200μg/ liter, ταγκ ιστιδίνης

Και τα δύο πλασμίδια είναι φορείς που προσφέρουν υψηλό αριθμό αντιγράφων. Οι ξενιστές που μετασχηματίζονται αναγκαστικά καλλιεργούνται σε τρυβλία με άγαρ που περιέχει διαφορετικό αντιβιοτικό (kan/amp), ενώ και η επαγωγή τους είναι διαφορετική. Η χρήση και των 2 είναι διαδεδομένη για παραγωγή ανασυνδυασμένων ετερόλογων πρωτεϊνών

✓ Τα στελέχη που χρησημοποιήσαμε για υπερέκφραση της υπεροξειδικής δισμουτάσης είναι τα Origami2DE3, τα οποία περιέχουν μεταλλάξεις σε αριθμό πρωτεασών και ευνοούν τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, βήμα απαραίτητο για την σωστή αναδίπλωση της SOD, μια απαραίτητη προϋπόθεση για να έχει πλήρη ενεργότητα

Superoxide dismutase

SOD1: Το ένζυμο «υπεροξειδική δισμουτάση» SOD1 ή αλλιώς SOD (Cu/Zn) κωδικοποιείται στον ανθρώπινο οργανισμό από το γονίδιο SOD1, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21(21q22.1). Το ένζυμο αυτό είναι μία από τις τρεις ανθρώπινες υπεροξειδικές δισμουτάσες. Πιστεύεται πως έχει ενεργό ρόλο στο μηχανισμό της απόπτωσης και την ασθένεια της πλάγιας αμυοτροφικής σκλήρυνσης (ALS). Η SOD1 είναι ένα διμερές, που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας της. Λειτουργία τους είναι η κατάλυση της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης του σουπεροξειδίου O_2^- (το ανιόν σουπεροξειδίου) σε μοριακό οξυγόνο O_2 και υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 . Αυτή η αντίδραση ονομάζεται Disproportionation/ Dismutation. Το υπεροξείδιο του O_2 είναι μία από τις πλέον δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στο κύτταρο, παράγαται ως παραπροϊόν του μεταβολισμού του οξυγόνου και αν δε ρυθμιστεί μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη. Και το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 είναι βλαβερό για το κύτταρο και διασπάται από τη δράση των ενζύμων «καταλάσες». Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως το ενζυμο SOD είναι ένας σημαντικός αντιοξειδωτικός αμυντικός μηχανισμός σε σχεδόν όλα τα κύτταρα που εκτίθενται στο οξυγόνο.

Ο μηχανισμός, στον οποίο το υπεροξείδιο του οξυγόνου καταλύεται από την SOD(Cu/Zn) μπορεί να παρουσιαστεί όπως στις παρακάτω αντιδράσεις:

- Cu^{2+}-SOD + O_2^- → Cu^+-SOD + O_2 (αναγωγή του χαλκού, οξείδωση του υπεροξειδίου)
- Cu^+-SOD + O_2^- + $2H^+$ → Cu^{2+}-SOD + H_2O_2 (οξείδωση του χαλκού, αναγωγή του υπεροξειδίου)
- Η αντίδραση dismutation/ disproportionation ειναι μια οξειδοαναγωγικη αντίδραση, στην οποία ένα στοιχείο ενδιάμεσης οξειδωτικής κατάστασης μετατρέπεται σε δυο διαφορετικά προϊόντα, ένα υψηλότερης και ένα μικρότερης οξειδωτικοής κατάστασης. Οι αριθμοί οξείδωσης παραμένουν σταθεροί σε αυτή την αντίδραση.

Υπάρχουν τρεις κύριες οικογένειες ενζύμων υπεροξειδικής δισμουτάσης, βάσει της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και τον συμπαράγοντα μετάλλου:

1. Η πρώτη προσδένει τόσο χαλκό (Cu) όσο και ψευδάργυρο (Zn)- κυτταρόπλασμα
2. Η δεύτερη προσδένει είτε σίδηρο (Fe) είτε μαγγάνιο (Mn)- μιτοχόνδρια
3. Η τρίτη προσδένει νικέλιο (Ni)- (εξωκυττάριο χώρο)

- Η πρώτη κατηγορία του ενζύμου συναντάται κυρίως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Πιστεύεται ότι το κυτοσόλιο όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων περιέχει το ένζυμο SOD1.

Κρυσταλλική δομή ανθρώπινου ενζύμου SOD1 συνδεδεμένου με χαλκό (πορτοκαλί σφαιρίδιο) και ψευδάργυρο(γκρι)

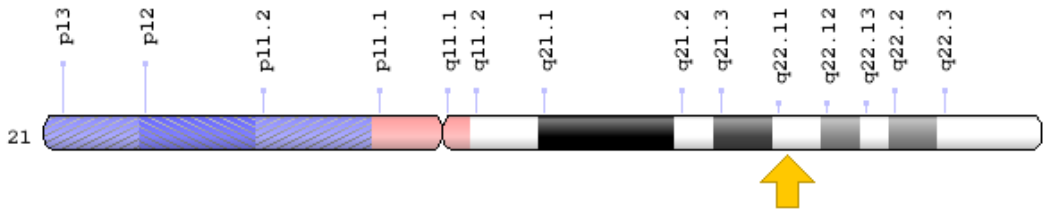
Η SOD προστατεύει το κύτταρο από την οξειδωτική τοξικότητα, που προκαλεί το υπεροξείδιο. Η αντίδραση του υπεροξειδίου με μη-δραστικά στοιχεία δεν είναι εφικτή λόγω του σπιν. Αυτό σημαίνει, πως στα βιολογικά συστήματα αντιδρά κυρίως με τον εαυτό του ή με κάποιο άλλο δραστικό στοιχείο όπως το NO, καθώς και με κάποιο μέταλλο που ανήκει στα στοιχεία μετάπτωσης. Η παρουσία της SOD είναι απαραίτητη, αφού το υπεροξείδιο αντιδρά με ευαίσθητους κυτταρικούς στόχους και παράγει τοξικά προϊόντα. Το ένζυμο αυτό έχει από τις υψηλότερες ικανότητες κατάλυσης, μεταξύ των γνωστών ενζύμων.

Η αναγκαιότητα των ενζύμων SOD στη φυσιολογία του κυττάρου φαίνεται από την πληθώρα παθολογικών φαινομένων με τα οποία συνδέονται οργανισμοί που πάσχουν από αυτά. Μεταλλάξεις στην SOD1 ενδέχεται να προκαλούν την εμφάνιση της οικογενούς ασθένειας ALS. Η μετάλλαξη A4V(η αλανίνη στο κωδικόνιο 4 αντικαθίσταται από βαλίνη) είναι η πιο σύνηθης, ενώ η πιο καλά μελετημένη είναι η G93A (η γλυκίνη στο κωδικόνιο 93 αντικαθίσταται από αλανίνη). Ο μηχανισμός που συνδέει μεταλλάξεις στα ένζυμα και την

εμφάνιση της ασθένειας δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Τα ένζυμα SOD έχουν επίσης φαρμακευτική χρήση και κάποιες εφαρμογές στο χώρο της κοσμητολογίας.

Δομή: SOD1 είναι ένα ομοδιμερές με μοριακό βάρος 32 kDa, που σχηματίζει δομή β-βαρελιού και περιέχει ένα ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό σε κάθε υπομονάδα. Σε κάθε υπομονάδα υπάρχει επίσης ένα κέντρο Cu/Zn, που αποτελεί τη θέση πρόσδεσης για τα δύο μέταλλα, καθώς και το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η ωρίμανση της πρωτεΐνης για να πάρει την τελική της μορφή είναι μια πολύπλοκη και ακόμα όχι πλήρως διευκρινισμένη διαδικασία. Περιλαμβάνει την εξειδίκευση προς τα δύο προαναφερθέντα μέταλλα, τη δημιουργία του δισουλφιδικού ανάμεσα κάθε υπομονάδας ανάμεσα στις Cys-57 και Cys-146, καθώς και το διμερισμό των δύο υπομονάδων. Η παραγωγή της γίνεται στο κυτοσόλιο. Η ώριμη πρωτεΐνη είναι πολύ σταθερή, αλλά αποσταθεροποιείται σε μεγάλο βαθμό όταν δεν έχει συνδεδεμένα τα μέταλλα ή δεν έχει σχηματιστεί ο δισουλφιδικός δεσμός κάθε υπομονάδας.

Λειτουργία: Τα ισοένζυμα της SOD1 είναι διαλυτές πρωτεϊνες του κυτταροπλασματικού και μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου. Η πρωτεΐνη δρα ως ομοδιμερές και μετατρέπει δραστικές μορφές οξυγόνου, που παράγονται φυσιολογικά, σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Ο εντοπισμός του ενδοκυτταρικά παρατηρείται εκεί, καθώς τα υπεροξειδικά ανιόντα παράγονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η αγρίου τύπου SOD1 έχει επιδείξει αντιαποπτωτικές ιδιότητες, ενώ κλινικά χρησιμοποιείται και για την αντιμετώπιση του εξειδωτικού στρες.



Εικόνα: Χρωμοσωμικός εντοπισμός του γοονιδίου της πρωτεΐνης: 21q22.11, που είναι στο χρωμόσωμα(q) 21 στη θέση 22.11

Αναλώσιμα/μηχανήματα:

- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5 mL, 2.0 mL)
- Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10, 25 mL)
- Πιπέττες τύπου Gilson (0.2-10 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL)
- Ρύγχη (0.2-10 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL)
- Πιπέτες Pasteur πλαστικές με poir βαθμονομημένες
- Αυτόματος πιπεταδόρος
- Τρυβλία petri (15 cm)
- Κωνικές φιάλες (250 mL- 2 L) [αποστειρωμένες]

- Ποτήρια ζέσεως (50-500 mL)
- Δοχεία για επώαση μεμβρανών
- Στήλη χρωματογραφίας συγγένειας
- Κυψελίδες για φασματομετρία
- 96-well plate
- Σωλήνες πλαστικοί για φυγοκέντρηση (500 mL)
- Γκαζάκι/ αναπτήρας
- Φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο +UV
- Μηχάνηματα τάσης ηλεκτροφόρησης, western blot
- Tecan για μέτρηση απορρόφησης
- Ζυγός ακριβείας
- Sonication machine
- pH-μετρο
- Βραστήρας
- Inqubators σταθερής θερμοκρασίας, ανάδευσης
- PCR machine
- Autoclave
- Vortex
- Υδατόλουτρο
- Roller/ shaker

Υλικά και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας:

- ✓ Απεσταγμένο νερό, διπλά απεσταγμένο νερό
- ✓ Στελέχη E. coli
- ✓ Πλασμιδιακοί φορείς
- ✓ Θρεπτικό μέσο LB, άγαρ
- ✓ Διάλυμα PBS
- ✓ Διάλυμα TBS-T
- ✓ Διάλυμα γλυκερόλης
- ✓ Επαγωγείς IPTG, τετρακυκλίνη
- ✓ Μεταλλικά διαλύματα $ZnCl_2$, CuCl
- ✓ Αντιβιωτικά: αμπικιλλίνη/ καναμυκίνη
- ✓ Αντισώματα
- ✓ Διαλύματα καθαρισμού πρωτεϊνών, agarose beads
- ✓ Υλικά για PCR, digestion
- ✓ Διαλύματα για απομόνωση πλασμιδιακού DNA
- ✓ Διαλύματα ενζυμικού assay SOD, in gel activity
- ✓ Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, DNA, western blot, ladders, loading dyes, running buffers, transfer buffer, διάλυμα γάλακτος, χρωστική coomassie blue, διάλυμα destain
- ✓ Διαλύματα για παραγωγή competent κυττάρων
- ✓ Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- ✓ Αιθανόλη 70%
- ✓ Διάλυμα διαπίδυσης, μεμβράνες

Πειραματικά πρωτόκολλα

Μετασχηματισμός και καλλιέργεια βακτηρίων:

- Για τον μετασχηματισμό του βακτηριακού ξενιστή χρησιμοποιήσαμε κύτταρα E. Coli Origami2-DE3/ BL21DE3, που βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80° C καθώς και δύο διαφορετικά πλασμίδια(αποθήκευση στους -20 ^{o} C), τα οποία περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο: pET28/pAsk
- Τα κύτταρα BL21DE3 χρησιμοποιήθηκαν για την πρωτεΐνη β-λακταμάση και τα κύτταρα Origami2DE3 για την πρωτεΐνη υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

- Σε διαφορετικά eppendorfs χωρητικότητας 1,5 ml μεταφέρουμε με πιπέτα 50μl από τα κύτταρα και 1 μl από το κάθε πλασμίδιο και αναδεύουμε. Η διαδικασία γίνεται πάντα στον πάγο, έτσι ώστε τα κύτταρα να παραμείνουν ανενεργά
- 15’ αναμονή
- Όσο περιμένουμε, «προετοιμάζουμε» τα τρυβλία που θα χρησιμοποιήσουμε και τα τοποθετούμε στους 37 ^{o} C, ενώ ρυθμίζουμε και το υδατόλουτρο στους 42 ^{o} C
- Εφαρμόζουμε heat-shock στο μείγμα κυττάρων-πλασμιδίου, δηλαδή τα μεταφέρουμε στο υδατόλουτρο και σε θερμοκρασία 42 ^{o} C, όπου και παραμένουν για 45’’
- Ακολούθως αναδεύουμε και τα ξανατοποθετούμε στον πάγο, όπου και τα αφήνουμε για 2’.
- Με χρήση κατάλληλης πιπέτας (200 μl- 1ml) συμπληρώνουμε σε κάθε eppendorf μέχρι τον όγκο τους 1 ml με το θρεπτικό μέσο LB (ανάλογα και με την πυκνότητα των κυττάρων). Το βήμα αυτό πραγματοποιείται παρουσία φλόγας, για να είναι στείρο το περιβάλλον
- Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση για μία ώρα στους 37 ^{o} C
- Μετά από χαλαρή ανάδευση με πιπέτα, μεταφέρουμε 400-500 μl σε τρυβλίο, που περιέχει άγαρ με κατάλληλο αντιβιοτικό.
- «Απλώνουμε» ομοιόμορφα τον όγκο με αποστειρωμένο γυάλινο «εργαλείο» και περιμένουμε ~15’ μέχρι να στεγνώσουν τα πιάτα (φλόγα)
- Επώαση overnight (~16h) στους 37 ^{o} C ή σε θερμοκρασία δωματίου (25 ^{o} C) για δύο ημέρες
- Την επόμενη ημέρα κάνουμε υγρή καλλιέργεια από μία αποικία του αναπτύχθηκε στο τρυβλίο. Δουλεύουμε παρουσία φλόγας
- Σε αποστειρωμένο κυλινδρικό σωλήνα μεταφέρουμε με αποστειρωμένο σιφώνιο 5 ml θρεπτικού μέσου LB και 5 μl από το αντιβιοτικό (αναλογία όγκων 1/1000)
- Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία ανάλογα με τον αριθμό των καλλιεργειών που θα χρειαστούμε. Σε κάθε μία προσθέτουμε το αντιβιοτικό, βάσει του δείκτη ανθεκτικότητας του πλασμιδιακού φορέα που χρησιμοποιήσαμε για τον μετασχηματισμό των κυττάρων (amp/kan)
- Αφού τους ονοματίσουμε, προσθέτουμε μία αποικία σε κάθε κύλινδρο και τους τοποθετούμε για overnight επώαση υπό ανάδευση στους 37 ^{o} C
- Την επόμενη μέρα κάνουμε επανακαλλιέργεια από την υγρή καλλιέργεια, που επωάστηκε overnight, παρουσία φλόγας
- Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, μεταφέρουμε θρεπτικό μέσο LB και κατάλληλο αντιβιοτικό σε νέους αποστειρωμένους κυλίνδρους/ κωνική φιάλη ανάλογα με τον όγκο του πειράματος

- Σημείωση: Στα πειράματα, που αποσκοπούσαν την εξοικείωση με τη διαδικασία και την βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν μικροί όγκοι καλλιέργειας σε γυάλινους κυλίνδρους, ενώ στα πειράματα καθαρισμού της πρωτεΐνης αποστειρωμένες κωνικές φιάλες για όγκο 1-2 L
  - Προσθέτουμε όγκο απο την overnight καλλιέργεια σε κάθε κύλινδρο/ κωνική με αναλογία όγκου 1/50, π.χ. 10 ml καλλιέργειας σε 500 ml θρεπτικού μέσου LB+ αντιβιοτικού, αντιστοίχως σε 1 L προσθέτουμε 20 ml καλλιέργειας
  - Επώαση για 2 ώρες στους 37 ^{o}C υπό ανάδευση
  - Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density) στα 600nm μετά το πέρας των 2 ωρών μέσω φωτομέτρησης- τουλάχιστον 0,2. Αλλιώς αφήνουμε λίγη ώρα ακόμα. Τυφλά: 1 ml LB , δείγματα: 800 μl LB 200 μl καλλιέργειας
  - Προσθήκη επαγωγέα άνυδρης τετρακυκλίνης/ IPTG= 0,1 M (1/1000) πχ 1ml σε 1 L και περαιτέρω επώαση υπό ανάδευση. Ο όγκος της προστιθέμενης τετρακυκλίνης είναι δεκαπλάσιος από αυτόν του IPTG. Η τετρακυκλίνη επάγει κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pASK και το IPTG με το πλασμίδιο pET28
  - Μαζί με τον επαγωγέα γίνεται προσθήκη ποσότητας των δύο μετάλλικών διαλμάτων $ZnCl_2$ CuCl 0,2 M) για την πρωτεΐνη sod. Αναλογία όγκων (1/1000)
  - Στους 37 ^{o} C, η καλλιέργεια επωάζεται μετά την επαγωγή για άλλες 2 ώρες ενώ στους 18 ^{o}C για άλλες 4
  - Μετά την επώαση, τα στάδια που θα ακολουθήσουμε διαφοροποιούνται ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος. Γίνεται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και υπολογισμός των μl (200/OD) που θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια του πειράματος. Αυτή η πράξη γίνεται επειδή δεν υπάρχει ίδιος αριθμός κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια. Το βήμα αυτό δεν πραγματοποιείται όταν έχουμε καλλιέργειες μεγάλου όγκου με σκοπό να γίνει καθαρισμός της πρωτεΐνης
  - Μεταφορά επιθυμητής ποσότητας από κάθε καλλιέργεια σε αποστειρωμένα eppendorfs
  - Φυγοκέντρηση στα 6.500 rpm, 2', ^{o}C
  - Τις καλλιέργειες μεγάλου όγκου τις χωρίζω σε πλαστικά αποστειρωμένα δοχεία και φυγοκέντρηση για 15', 4.500 g, 4ο C
  - Πετάμε το υπερκείμενο και αποθήκευση του pellet στην κατάψυξη, στους -20 ^{o}C
  - Επαναδιάλυση του pellet σε όγκο PBS 1x στον πάγο, ώστε τα κύτταρα να μη λειτουργούν φυσιολογικά με αναλογία όγκων 1/50 [πχ σε καλλιέργεια 5ml με pellet, επαναδιάλυση με 100μl PBS]
  - Sonication 5' high mode/ 5 φορές για 10'' και ενδιάμεση αναμονή περίπου 1' στον πάγο. Η τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γίνεται επειδή η μέθοδος αυτή παράγει μεγάλη ποσότητα θερμότητας και τα δείγματα υπερθερμαίνονται

- Φυγοκέντρηση για 20’, 15.000 g, 4ο C → καθαρισμός, στον οποίο θα αναφερθούμε στην συνέχεια
- Εάν δεν επιθυμούμε να καθαρίσουμε την πρωτεΐνη, θα την «τρέξουμε» σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για να ελέγξουμε την επιτυχία του πειράματος
- Από αυτό το σημείο και μέχρι την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα πρέπει να βρίσκονται στον πάγο
- Προσθήκη loading buffer/μερκαπτουρικό στον απαγωγό (αναλογία όγκων με το δείγμα μας ~1/4)
- Πριν την ηλεκτροφόρηση, βράζουμε τα δείγματα για 5’ στους 100 ^{o}C
- Ανάδευση και φορτώνουμε στο τζελ

Παραγωγή gel ακρυλαμίδης για πρωτεΐνική ανάλυση και στύπωμα κατά western:

- Ανάλογα με την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να αναλύσουμε, φτιαχνουμε gel διαφορετικής σύστασης σε ακρυλαμίδη
- Συνηθέστερα 10-12-15%, για την SOD επιλέγουμε 12%
- Αρχικά ετοιμάζουμε το separating gel σε σωλήνα falcon
- Χρησιμοποιούμε γυάλινο σετ ηλεκτροφόρησης
- Αφού προσθέσουμε το μείγμα στο σετ, συμπληρώνουμε με απεσταγμένο νερό/ ισοπροπανόλη μέχρι πάνω
- Αναμονή 20-30’ μέχρι να πήξει, αφαιρούμε το νερό/ισοπροπανόλη
- Προσθέτουμε το stacking gel και τα χτενάκια για να δημιουργηθούν τα «πηγαδάκια»
- Σημαντική σημείωση να προσθέτουμε τα APS, TEMED στο τέλος της προετοιμασίας και άμεσα να προσθέτουμε το μείγμα στο σετ ηλεκτροφόρησης για να μην πήξει πρόωρα (TEMED στον απαγωγό)
- Αναμονή 40’ για να πήξει
- Χρήση ξεχωριστών σιφωνίων για προσθήκη του απεσταγμένου νερού και των ρυθμιστικών διαλυμάτων, αποστειρωμένου για προσθήκη ακρυλαμίδης
- Όταν πήξει το gel, προσθέτω running buffer, αφαιρώ τα χτενάκια και φορτώνουμε τα δείγματα στον απαγωγό μαζί με κατάλληλο ladder (6 μl). Πρεσέχουμε να γίνει καλή ανάδευση των δειγμάτων
- Στην αρχή εφαρμόζουμε στο σύστημα ηλεκτρική τάση 85 V, μέχρι να απομακρυνθούν τα δείγματα από τα πηγαδάκια και στην συνέχεια 125
- Αποθήκευση ακρυλαμίδης στο ψυγείο, ρυθμιστικών διαλυμάτων σε θερμοκρασία δωματίου και APS στην κατάψυξη
- Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, μεταφέρουμε το τζελ σε δοχείο με transfer buffer για στύπωμα κατά western για 15’ ή σε δοχείο με τη χρωστική coomassie blue
- Coomassie: Πρώτα 30’ υπό ανάδευση, πλύση με διάλυμα destain μέχρι να αποχρωματιστεί το τζελ

- Προετοιμάζουμε τη μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης) σε διαστάσεις για να καλύπτει ολόκληρη την επιφάνεια του τζελ και 6 χαρτιά για κάθε μεμβράνη
- Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με μεθανόλη για 15’’
- Ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό για 2’
- Μεταφέρουμε τη μεμβράνη σε δοχείο με transfer buffer και την αφήνουμε για 15’
- Αφότου παραμείνουν τόσο το τζελ όσο και η μεμβράνη για 15’ σε διάλυμα transfer buffer, ξεκινάμε τη διαδικασία
- Τοποθετούμε 3 χαρτιά, αφότου τα βρέξουμε με transfer buffer, στο μηχάνημα και από πάνω το τζελ (μπάντες δεξιά)
- Τοποθετούμε τη μεμβράνη προσεκτικά από πάνω, με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτει όλη την επιφάνεια του τζελ
- Βάζουμε και τα υπόλοιπα 3 χαρτιά από πάνω και αφαιρούμε με ένα απορροφητικό χαρτί την επιπλέον ποσότητα transfer buffer (κίνδυνος να «τρέξει» κατά τη διάρκεια της διαδικασίας και να σταματήσει η western
- Κλείνουμε το καπάκι και εφαρμόζουμε στο σύστημα ηλεκτρική τάση 12 V για 55’
- Ετοιμάζουμε διάλυμα γάλακτος για να μπλοκάρουμε τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης της πηκτής
- Για κάθε μεμβράνη χρειαζόμαστε 30 ml
- Γάλα 1,5 g + 30 ml TBS-T 1x
- Μεταφέρουμε τη μεμβράνη με τις μπάντες στα αριστερά (τη γυρνάμε) στο δοχείο με το γάλα και την αφήνουμε overnight υπό ανάδευση στους 4°C
- Την επόμενη μέρα, χύνουμε το διάλυμα γάλακτος και κάνουμε 3 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS-T 1x υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου
- Ακολούθως, προσθέτουμε το αντίσωμα για μία ώρα υπό ανάδευση
- Αφού αφαιρέσουμε το αντίσωμα, ξανακάνουμε τρεις πεντάλεπτες πλύσεις με διάλυμα TBS-T 1x υπό ανάδευση
- Σε περίπτωση που χρειάζεται δευτερογενές αντίσωμα (π.χ. στο anti-GFP χρειάζεται και δεύτερο, το οποίο προσδένεται στο πρώτο), επαναλαμβάνω το στάδιο με τις πλύσεις και το προσθέτουμε για άλλη μια ώρα
- Κάθε αντίσωμα επαναχρησιμοποιείται μέχρι 5 φορές
- Ακολουθεί η εμφάνιση
- Αφαιρούμε το TBS-T 1x και προσθέτουμε 2 ml ECL για κάθε μεμβράνη, αφότου τα αναδεύσουμε
- Καλύπτουμε την επιφάνεια της μεμβράνης με τον όγκο αυτό και μετά από αναμονή 2’ τοποθετούμε τη μεμβράνη για εμφάνιση

➢ Σημείωση: Σε περίπτωση που επιθυμούμε να «τρέξουμε» τα δείγματα μας σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, ετοιμάζουμε Native gel πολυακρυλαμίδης, το οποίο αφήνουμε για 2-3h σε 100V, 4°C σε πάγο. Για την παραγωγή της πηκτής και το

τρέξιμο χρησιμοποιούμε διαφορετικά διαλύματα χωρίς απορρυπαντικό SDS, καθώς και διαφορετικά loading dyes

Καθαρισμός πρωτεϊνών (Quiagen)

1. Ξεπαγώνουμε τα κυτταρικά pellets για 15’ στον πάγο και τα επαναδιαλύουμε με 10 ml lysis buffer NPI-10 για κάθε 500 ml καλλιέργειας
2. Sonication 4*10’’, λόγω μεγάλου όγκου. Η διαδικασία γίνεται στον πάγο
3. Φυγοκέντρηση για 20’ στους 4 ^{o} C, σε 15.000 g, κρατάμε το υπερκείμενο
4. Προαιρετικά κρατάμε 5 μl από το υπερκείμενο για να «τρέξουμε» το δείγμα σε SDS-PAGE

Καθαρισμός πρωτεϊνών που περιέχουν 6xHis-tag

1. Φυγοκέντρηση ποσότητας 1,25 ml Ni-NTA Agarose beads στα 0,8 rpm για 45’’, απομάκρυνση αιθανόλης και προσθήκη 1,25 ml NPI-10 lysis buffer
2. Προσθήκη υπερκείμενου (~10 ml) και επώαση για 1h στους 4 ^{o} C, υπό συνεχή ανάδευση
3. Προσθήκη 10 ml σε στήλη χωρητικότητας 10 ml, τοποθέτηση φίλτρου στο κάτω μέρος της στήλης (αντίστοιχα 5 ml σε 5 ml- στήλη)
4. Πρόσδεση: Προσθήκη του δείγματος στην στήλη μετά την επώαση, αφήνουμε να τρέξει μέσα απο΄το φίλτρο
5. Πλύση: 2 πλύσεις με το washing buffer NPI-20
6. Έκλουση: Προσθήκη 4 ml elution buffer NPI-250 και συλλογή σε τέσσερα διαφορετικά eppendorfs
   Αποθήκευση στους -20 ^{o} C με 20% γλυκερόλη

Διαλύματα για τη μέθοδο του καθαρισμού

1) NPI-10: Lysis and equilibration buffer
- 50mM NaH_2PO_4
- 300mM NaCl
- 10mM Imidazole
  Ρυθμίζουμε το pH=8 χρησιμοποιώντας NaOH

2) NPI-20: Wash buffer
- 50mM NaH_2PO_4
- 300mM NaCl
- 20mM Imidazole
  Ρυθμίζουμε το pH=8 χρησιμοποιώντας NaOH

3) NPI-250: Elution buffer
- 50mM NaH_2PO_4
- 300mM NaCl
- 250mM Imidazole

Ρυθμίζουμε το pH=8 χρησιμοποιώντας NaOH

- Η ημιδαζόλη προσδένεται με μεγάλη συγγένεια στο νικέλιο και αντικαθιστά την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός μας. Για να σιγουρευτούμε ότι έγινε καλά ο καθαρισμός μας τρέχουμε πήκτη και χρωματίζουμε με coomassie blue

PCR

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιείται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Η αρχή της μεθόδου είχε περιγραφεί λεπτομερειακά ήδη από την δεκαετία του ’70 (Kleppe et al. 1971, Panet & Khorana 1974), όμως η ανακάλυψη των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών (Chien et al. 1976) και η αυτοματοποίηση της μεθόδου από τον Kary Mullis (βραβείο Nobel 1994) και τους συνεργάτες του στην εταιρία Cetus οδήγησαν στην εδραίωση της χρήσης της. Η μέθοδος περιλαμβάνει μήτρα DNA και δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά ως προς τα 3΄άκρα κάθε μονόκλωνης αλυσίδας της μήτρας. Τα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται ως εναρκτήρια μόρια στην αντίδραση πολυμερισμού συγκεκριμένου τμήματος της μήτρας DNA μαζί με μια θερμοσταθερή πολυμεράση. Η αντίδραση συνίσταται από επαναλαμβανόμενους κύκλους θερμικής αποδιάταξης του DNA , αναδιάταξης των εναρκτηρίων μορίων, και επιμήκυνσης των αλληλουχιών. Η πολυμεράση που συνήθως χρησιμοποιείται είναι η Taq (πολυμεράση που έχει απομονωθεί από θερμοανθεκτικό βακτήριο). Ο αριθμός των αντιγραφών της αλληλουχίας που βρίσκεται ανάμεσα στα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Η τελική συσσώρευση του προϊόντος εξαρτάται από :

- ✓ τη συγκέντρωση της πολυμεράσης
- ✓ τη συγκέντρωση των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων
- ✓ τη συγκέντρωση του μαγνησίου και ρυθμιστικών αλάτων
- ✓ τη θερμοκρασία και τον χρόνο αποδιάταξης,
- ✓ τη θερμοκρασία σύνδεσης των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ,
- ✓ τον χρόνο επιμήκυνσης της αλυσίδας και
- ✓ τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων κύκλων της αντίδρασης.

Θα παραθέσουμε ένα παραδείγμα με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και τους χρόνους για κάθε κύκλο αντίδρασης:

Copper chaperon for SOD1

Q_5 Buffer	10 μl
dNTPs	1 μl
SPO38ccs for	2,5 μl
SPO33ccs rev	2,5 μl
Template(mini prep)	1 μl
Q_5 pol	0,5 μl
dH_2O	22,5 μl
+Enhancer (Q_5)	10 μl
Τελικός όγκος	V=50 μl

Χρόνοι:

98 ^{o}C, 30’’

98 ^{o}C, 10’’

70 ^{o}C, 30’’ (annealing)

72 ^{o}C, 30’’

72 ^{o}C, 5’

Με τη μέθοδο της PCR αυξάνουμε την ποσότητα του πλασμιδίου, που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο για να ακολουθήσει η διαδικασία της κλωνοποίησης. Μετά την PCR προσθέτουμε σε κάθε δείγμα loading buffer και τα «τρέχουμε» σε DNA gel αγαρόζης. Εάν δούμε την μπάντα που αναμέναμε (στις σωστές βάσεις), η διαδικασία πέτυχε.

- Ακολουθεί ο καθαρισμός του προϊόντος που έχει απομείνει από το δείγμα της PCR με ειδικό κιτ (PCR clean up NucleoTraP)
- Μεταφέρουμε σε ειδική στήλη πυριτίου, που βρίσκεται σε eppendorf και προσδένει το DNA, το δείγμα με διπλάσιο όγκο NT1 και φυγοκέντρηση για 30'' στα 13.000 rpm. Το διάλυμα αυτό έχει επίσης την ικανότητα να συνδέεται με το DNA, ενώ περιέχει και συστατικά για να αποσυντεθει το gel
- Κάνουμε 2 πλύσεις (NT2, NT3) με την ίδια διαδικασία και φυγοκέντρηση για 30'' στα 13.000 rpm
- Μεταφέρουμε την στήλη σε νέο eppendorf και προσθέτουμε παρουσία φλόγας 35 μl απεσταγμένο νερό
- Αναμονή 1'
- Φυγοκέντρηση για 1' στα 13.000 rpm και έκλουση του προϊόντος μας
- Συλλογή στους -20 ^{o}C

➢ Σημείωση: Όταν φτάχνουμε μείγμα για παραπάνω δείγματα, προσθέτουμε τον όγκο του πλασμιδίου στο τέλος

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA παρέχει την δυνατότητα απομόνωσης συγκεκριμένων γονιδίων από το γονιδίωμα οποιουδήποτε οργανισμού, τη μεταφορά τους από έναν οργανισμό σε κάποιον άλλο (ξενιστή) και την έκφραση αυτών των γονιδίων στα νέα κύτταρα.

Τα βασικά βήματα είναι τα εξής :

1. Τεχνητή σύνδεση (ligation) είναι η εισαγωγή του τμήματος DNA (ένθεμα insert) σε κάποιο άλλο μόριο (στη συγκεκριμένη εργασία πλασμίδιο)
2. Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων ξενιστών κατά την πρόσληψη του ανασυνδιασμένου μορίου.
3. Η μοριακή κλωνοποίηση, δηλαδή η δημιουργία μεγάλου αριθμού πανομοιότυπων αντιγράφων του ανασυνδιασμένου μορίου καθώς το ένθεμα πολλαπλασιάζεται μαζί με τον φορέα κατά την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων.

Τεχνητή σύνδεση μορίων DNA (ligation)

➢ Το ένζυμο T4 DNA λιγάση επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση τμημάτων DNA με μονόκλωνα συμπληρωματικά άκρα, που έχουν παραχθεί από την δράση ίδιων περιοριστικών ενδονουκλεασών ή παρουσιάζουν τυφλά άκρα.

- Η αντίδραση πραγματοποιείται με ανάμιξη πλασμιδιακού φορέα και ευθύγραμμου τμήματος με συμπληρωματικά άκρα που πρόκειται να υποκλωνοποιηθεί σε αναλογία 1 : 3 .
- Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα δράσης της λιγάσης. Ακολουθεί επώαση στους 16° C για 12 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης η αντίδραση φυλάσσεται στους -20° C.

Digestion

NCOI	1 μl
XbaI	1 μl
2.1	4 μl
dH_2O	24 μl
Ccs m.p DNA	10 μl
Τελικός όγκος	V= 40 μl

- Η μέθοδος της πέψης χρησιμοποιείται για να κόψουμε το πλασμίδιο της επιλογής μας ή το γονίδιο της επιλογής μας σε συγκεκριμένα σημεία με χρήση περιοριστικών ενζύμων. Η διαδικασία αυτή προηγείται αυτής του ligation, όπου προσπαθούμε να εισάγουμε γονίδιο της επιλογής μας σε συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα, πριν το μετασχηματίσουμε στους βακτηριακούς ξενιστές
- Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες βρίσκονται σε πάγο, το διπλά απεσταγμένο υπό φλόγα. Σε μείγμα με πολλά δείγματα, προσθήκη του DNA στο τέλος
- Το buffer είναι πάντα το 10% του τελικού όγκου
- 2 ώρες επώαση στους 37 ^{o} C, μετά «τρέχουμε» τζελ για να διαπιστώσουμε εάν κόπηκε το πλασμίδιο

Παραγωγή Dna gel αγαρόζης

- 1-2 g αγαρόζης +100 ml ρυθμιστικού buffer (1-2% gel) → ανάδευση και τοποθέτηση σε φούρνο μικροκυμάτων για 2’
- Αφού κρυώσει το μείγμα, προσθέτουμε 4,5 μl βρωμιούχο αιθίδιο/100 ml και αναδεύουμε
- Τοποθετούμε τα χτενάκια για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια
- Αφότου πήξει το τζελ, φορτώνουμε τα δείγματα και «τρέχουμε» για 45’ στα 100 V
- Προσθήκη και loading dye 6x agarose gel DNA στα δείγματα (π.χ. 3 μl στα 10 δείγματος)
- Τρέχουμε και ladder ~10 μl
- Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή όταν δουλεύουμε για την παραγωγή της πηκτής λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου- διπλά γάντια, δεν ακουμπάμε τίποτα άλλο
- Μόλις τελειώσει η διαδικασία, εμφανίζουμε το τζελ σε UV κάμερα

Παραγωγή chemically competent κυττάρων

- Overnight υγρή καλλιέργεια από το στέλεχος κυττάρων που θέλουμε να φτιάξουμε (π.χ. origami2DE3)
- Δημιουργία υποκαλλιέργειας 50 ml με αναλογία 1/50 της overnight καλλιέργειας
- Επώαση για 2h στους 37 ^{o} C
- Μέτρηση οπτικής πυκνότητας OD_{600}, τουλάχιστον 0,4-0,5
- Τοποθέτηση της καλλιέργειας σε υδατικό λουτρό πάγου
- Συνεχής ανάδευση για 5'
- Φυγοκέντρηση για 10' στα 3,500 g στους 4° C, σε παγωμένα φιαλίδια falcon
- Πετάμε το υπερκείμενο προσεκτικά
- Επαναδιάλυση του pellet σε 2 ml TSS και ανάδευση
- Διαχωρίζουμε τον όγκο σε αποστειρωμένα eppendorfs και αποθηκεύουμε στους -80° C

Η διαδικασία για δημιουργία competent κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί και με διάλυμα ασβεστίου [$CaCl_2$, 10% glycerol]

Παραγωγή TSS [τελικός όγκος 40 ml] :

- 4g PEG σε 25 ml LB, το falcon δε χρειάζεται να είναι αποστειρωμένο αφού το PEG δεν είναι
- Ανάδευση με vortex και αποστείρωση μέσω φίλτρου (παρουσία φλόγας)
- Προσθήκη 2 ml DMSO + 1 ml 2M $MgCl_2$ και ελαφρή ανάδευση
- Συμπληρώνουμε με θρεπτικό μέσο LB μέχρι τα 40 ml
- Αποθήκευση στους 4° C

Προετοιμασία electrocompetent κυττάρων

- Υγρή καλλιέργεια E. Coli 5 ml
- Εμβολιασμός 50 ml LB με 1 ml της καλλιέργειας (1/50 αναλογία όγκων) σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη χωρητικότητας 250 ml
- Επώαση για ~2 ώρες στους 37 ^{o} C, υπό ανάδευση 220 rpm, μέχρι να έχουμε OD_{600} = 0,4
- Στα επόμενα βήματα, είναι απαραίτητο να διατηρουμε τα κύτταρα σε πάγο
- 15' σε υδατόλουτρο πάγου υπό ανάδευση
- Φυγοκέντρηση για 10', σε 4.000 g, 4 ^{o} C
- Προσεκτική απομάκρυνση υπερκείμενου. Είναι προτιμότερο να «θυσιάσουμε» μέρος των κυττάρων παρά να μείνει ποσότητα του υπερκείμενου
- Επαναδιάλυση του pellet σε 50 ml παγωμένου νερού
- Επανάληψη του σταδίου της φυγοκέντρησης, πετάμε το υπερκείμενο
- Επαναδιάλυση στον μισό όγκο παγωμένου νερού και επανάληψη της φυγοκέντρησης, πετάμε το υπερκείμενο
- Επαναδιάλυση σε παγωμένο διάλυμα 15% γλυκερόλης (αποστειρωμένο διάλυμα)
- Μεταφορά σε αποστειρωμένο σωλήνα Oakridge 30ml
- Φυγοκέντρηση υπό τις ίδιες συνθήκες, πετάμε το υπερκείμενο

- Επαναδιάλυση του pellet σε παγωμένο διάλυμα 15% γλυκερόλης σε τελικό όγκο 1 ml
- Αποθήκευση σε υγρό άζωτο ή σε θερμοκρασία -80 ^{o}C
- Τα κύτταρα, λόγω της παρουσίας της γλυκερόλης παραμένουν σταθερά για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών, υπό αυτές τις συνθήκες
-

Πρωτόκολλο για προετοιμασία πλασιμδίου DNA (high copy)

1. Υγρή καλλιέργεια:

1) Μετά από καλλιέργεια E. Coli σε θρεπτικό μέσο LB, φυγοκεντρώ συνεχόμενα όγκο 1-5 ml σε eppendorf tube 2 ml σε 13.000 rpm, 2', 25 ^{o}C

- Απομακρύνω όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα από το υπερκείμενο

2. Κυτταρική λύση:

- Προσθήκη 250 μl διαλύματος A1 και επαναδιάλυση του pellet
- Προσθήκη 250μl διαλύματος A2 και προσεκτική ανάδευση του eppendorf με το χέρι 8-10 φορές
- Αναμονή για 5' σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 300 μl διαλύματος A3 και προσεκτική ανάδευση 8-10 φορές με το χέρι

3. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 10' σε 13.000 rpm (σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν είναι καθαρό, επανάληψη της φυγοκέντρησης)
4. Πρόσδεση του DNA:

- Τοποθετούμε στήλη Nucleospin σε eppendorf και προσθέτουμε όγκο μέχρι 750 μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης στην στήλη
- Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1', 13.000 rpm
- Πετάμε τον όγκο που πέρασε από την στήλη και επανατοποθετουμε την στήλη στο eppendorff

5. Πλύση στήλης

- Προσθήκη διαλύματος AW, φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1' στα 13.000 rpm
- Συνίσταται επιπλέον πλύση με προθερμασμένο διάλυμα AW σε περίπτωση που τα βακτηριακά στελέχη, που χρησιμοποιούμε, περιέχουν υψηλό αριθμό νουκλεασών
- Τοποθέτηση της ειδικής στήλης σε νέο σωλήνα eppendorf

6. «Στέγνωμα» της μεμβράνης της στήλης

- Φυγοκέντρηση για 2' σε θερμοκρασία δωματίου στα 13.000 rpm και πετάμε τον σωλήνα συλλογής

7. Έκλουση DNA:

- Τοποθέτηση στήλης σε νέο eppendorf και προσθήκη 30-40 μl απεσταγμένου νερού
- Αναμονή 1' σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 1' σε θερμοκρασία δωματίου στα 13.000 rpm
- Κρατάμε την ποσότητα που πέρασε από την στήλη και αποθηκεύουμε στην κατάψυξη

- Με αυτή τη μέθοδο, τα βακτηριακά κύτταρα που είναι συσσωματωμένα μετά την αρχική φυγοκέντρηση της υγρής καλλιέργειας, επαναδιαλύονται με το διάλυμα A1 (resuspension buffer) και το πλασιμδιακό DNA «απελευθερώνεται» από το κύτταρο με τη χρήση του διαλύματος A2 (lysis buffer)- (αλκαλική λύση μέσω απορρυπαντικού). Το διάλυμα A3(neutralization buffer) βοηθά στην εξουδετέρωση του κυτταρικού προϊόντος που έχει λυθεί και δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για να προσδεθεί το πλασμιδιακό DNA στην στήλη. Το γενωμικό DNA, κυτταρικά υπολείμματα και πρωτεΐνες κατακρημνίζονται και απομακρύνονται μέσω της φυγοκέντρησης και τη χρήση του διαλύματος έκπλυσης AW(wash buffer). Πιθανά επιμολυντικά στοιχεία απομακρύνονται μέσω του βήματος της έκπλυσης.

-Παραγωγή καναμυκίνης: Διαλύω 0,5 g kanamycin sulfate σε 10 ml H2O, ανάδευση με μαγνητάκι για να διαλυθεί. Έπειτα φιλτράρισμα για αποστείρωση

-**Παραγωγή** Anti-mouse antibody 1:4000 σε διάλυμα 0,5% γάλακτος-TBS-T. Διαλύω 0,25 g γάλακτος σε 50 ml TBS-T και ακολούθως προσθέτω 12,5 μl αντιβιοτικού από το πυκνό stock

Dialysis (διαπίδυση)

- Διαπίδυση (dialysis): Κλασική τεχνική διαχωρισμού, που επιτυγχάνει την απομάκρυνση μικρών ανεπιθύμητων συστατικών απο πρωτεϊνες σε διάλυμα με εξειδικευμένη διάχυση μέσω μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης. Οι πρωτεϊνες, που είναι μεγαλύτερες από τους πόρους της μεμβράνης, παραμένουν στο δείγμα καθώς δεν διαπερνούν τη μεμβράνη, ενώ «επιμολυντές» μικρού μοριακού βάρους διαχέονται ελεύθερα διαμέσω της μεμβράνης και κατ' αυτόν τον τρόπο μπορούν να απομακρυνθούν με διαδοχικές αλλαγές των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η διαδικασία μπορεί να χρησιμεύσει και για απομάκρυνση μετάλλων.
- Προετοιμασία μεμβράνης
- Κόψουμε μεμβράνες μήκους 30 εκατοστών
- Ετοιμάζουμε διάλυμα βρασμού:
- 6,5 g Na_2CO_3
- 1,9 g EDTA, in 650 ml dH_2O
- Βρασμός μεμβράνης στο διάλυμα για 30', παρουσία φλόγας
- Ξεπλένουμε μεμβράνη με dH_2O
- Βρασμός μεμβράνης με dH_2O για 30', παρουσία φλόγας
- Ξεπλένουμε με dH_2O
- Προσθέτουμε την ποσότητα της πρωτεΐνης στην μεμβράνη και την «κλείνουμε»
- Διαδικασία για απομάκρυνση ημιδαζόλης (και φόρτωση μετάλλων)

Dialysis buffer: 1 L, pH=6,8

- Tris-Cl 100mM
- NaCl 300mM
- $CuSO_4$ 200μM
- $ZnSO_4$ 200μM
- Dialysis: 1 ml καθαρισμένης πρωτεΐνης (sod1 wt elute2) σε 1 L Dialysis buffer overnight, 4 ^{o} C, storage: -20 C in 20% glycerol

Η διαδικασία της διαπίδυσης γίνεται για να αφαιρεθεί από την πρωτεΐνη η ημιδαζόλη που υπάρχει στο διάλυμα μετά τον καθαρισμό και μπορεί να επηρεάσει το ενζυμικό assay. Η μεμβράνη που χρησιμοποιείται είναι διαπερατή στην ημιδαζόλη και όχι στην πρωτεΐνη μας, επομένως μέσω του φαινομένου της όσμωσης θα κινηθεί βάσει της διαβάθμισης της συγκέντρωσής της, δηλαδή από το διάλυμα του δείγματος μας προς το διάλυμα της διαπίδυσης.

Ενζυμικά πρωτόκολλα

Η διαδικασία αφού γίνει ο καθαρισμός της πρωτείνης και μετά από overnight dialysis: Για το equal loading στο tecan κάνουμε μέτρηση της πρωτεΐνης στο μηχάνημα UV (280 nm) φασματοφωτόμετρο (είτε densitometry για διπλοτσεκάρισμα) και βάσει αυτού τα πιο πυκνά δείγματα πρωτεΐνης αραιώνονται με PBS αναλόγως. Οι 3 μέθοδοι που χρησιμοποιήσαμε ήταν οι εξής; XO/XTT, XO/NBT, XO/ NBT+BSA (15%). Η μέτρηση στο tecan γίνεται για μισή ώρα. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούμε 3 blanks, τα οποία συγκριτικά με τον παρακάτω πίνακα διαφέρουν ως προς τα εξής:
Blank1: -XO
Blank2: - sample
Blank3: -XO/ sample

Buffers ενζυμικού assay SOD XO/XTT

50mM Sodium phosphate buffer (ph=8)	240 μl
30mM Xanthine	10 μl
3mM EDTA	10 μl
0,75mM XTT	20 μl
Sample	20 μl
XO solution (56 mu/ml)	3 μl
Τελικός όγκος	V= 300 μl

SOD1 wt activity assay: XO/XTT

Προετοιμασία:

1) 50mM Sodium Phosphate (pH=8)- 40 ml 0,1 M sodium phosphate + 40 ml dH2O
2) 4 ml Xanthine 3mM
3) 3 mM EDTA (400 μl 30mM EDTA in 3,6 ml dH2O)

4) 4 ml XTT 0,75 mM at 50 ^{o}C
5) 4 ml XO 56 munits/ ml (11,2 μl XO in 4 ml cold dH2O)
6) Sample dilutions (1, 1/5 , 1/25) +BSA negative control

Buffers ενζυμικού assay SOD XO/NBT

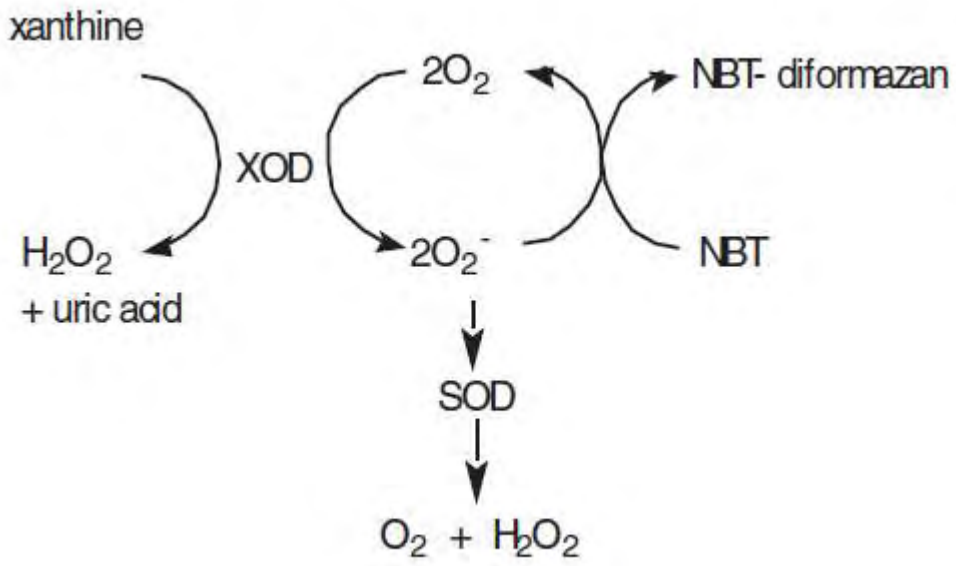
50mM Sodium phosphate buffer (ph=8)	240 μl
30mM Xanthine	10 μl
3mM EDTA	10 μl
2mM NBT	10 μl
15% BSA	10 μl
Sample	20 μl
XO solution (56 mu/ml)	3 μl
Τελικός όγκος	V= 300 μl

- στο τρίτο πείραμα χωρίς την προσθήκη του ορού αυξάνουμε ανάλογα τις ποσότητες των άλλων αντιδραστηρίων, με τον τελικό όγκο να μη μεταβάλλεται αισθητά

  - Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής ενεργότητας της SOD γίνεται χρήση μεθόδων που αποσκοπούν στον έμμεσο υπολογισμό της. Το πρόβλημα έγκειται στη μεγάλη αστάθεια που παρουσιάζει το υπόστρωμά της, δηλαδή το υπεροξειδικό ανιόν. Έτσι, η μέτρηση γίνεται σε αντιδράσεις που λαμβάνει μέρος το O_2- και κατά πόσον παρατηρείται αναστολή της αντίδρασης.
  - Η μέτρηση των πρωτεϊνών στο UV 280 nm για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής τους γίνεται χρησιμοποιώντας ως βάση «τυφλό» διάλυμα που περιέχει τα ίδια συστατικά με το δείγμα μας εκτός της πρωτεΐνης. Αυτό σημαίνει πως περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο της διαπίδυσης ή το διάλυμα έκλουσης, σε περίπτωση που δεν πραγματοποιήθηκε διαπίδυση. Μηδενίζουμε με το τυφλό όπως και στα φασματοφωτόμετρο και εν συνεχεία κάνουμε τη μέτρηση στο δείγμα μας. Η τιμή που θα δείξει το μηχάνημα αντιστοιχεί στην απορρόφηση της εκάστοτε πρωτεΐνης και για να υπολογιστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης διαιρούμε το νούμερο της απορρόφησης με τον αριθμό Ε. C., ο οποίος είναι μοναδικός για κάθε πρωτεΐνη. Ο αριθμός αυτός για την υπεροξειδάση είναι 5750.

Η XTT (3 *-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate) ανάγεται σε ένα υδατοδιαλυτό προϊόν, με μέγιστη απορρόφηση στα 470 nm, από τη δράση του υπεροξειδικού ανιόντος O_2- , το οποίο παράγεται μετά την αερόβια αλληλεπίδραση ξανθίνης(xanthine)/ οξειδάση της ξανθίνης (XO). Ο ρυθμός αναγωγής του XTT είναι γραμμικά ανάλογος της ενεργότητας της xanthine oxidase και αναστέλλεται από τη δράση της SOD. Η 100% αναστολή συνεπάγεται πως η XTT δεν αλληλεπιδρά με την XO.

Εναλλακτική μέθοδος για μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της πρωτεΐνης μας είναι η χρήση του συνδυασμού XO/ Nitroblue tetrazolium salt (NBT). Το μειονέκτημα αυτής της επιλογής είναι πως τα προϊόντα από το NBT είναι συχνά αδιάλυτα στο νερό και δε διευκολύνει τον καθορισμό του ενζυμικού προφίλ της SOD. Το άλας XTT υπερτερεί έναντι του NBT στο γεγονός πως το δικό του προϊόν (formazan) είναι υδατοδιαλυτό. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 560 nm και αφορά τη δημιουργία του NBT-diformazan από το NBT με τη βοήθεια του υπεροξειδικού ανιόντος O_2-. Το υπεροξειδικό ανιόν είναι παράγωγο της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης προς παραγωγή ουρικού οξέος και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η δράση της SOD στο πείραμα αυτό αναστέλλει τη δημιουργία του NBT-diformazan, καθώς μετατρέπει το υπεροξειδικό ανιόν σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου, εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδρασή του O_2- με το NBT. Συνοπτικά, η πορεία των αντιδράσεων παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα: Συνοπτική απεικόνιση ενζυμικού assay NBT

Η μέτρηση και στις δύο περιπτώσεις (XTT, NBT) μας δίνει μια εικόνα σχετικά με τη δράση της πρωτεΐνης. Αναμένουμε μείωση της απορρόφησης στα δείγματα που περιλαμβάνουν την SOD σε σύγκριση με τα «τυφλά» που δεν την περιλαμβάνουν, καθώς η συγκέντρωση του υπεροξειδικού ανιόντος δε θα μειώνεται λόγω της δράσης της δισμουτάσης και θα παράγεται προϊόν που θα αυξάνει την απορρόφηση.

Οι μετρήσεις έγιναν στο βέλτιστο μήκος κύματος, δηλαδη στα 470 και 560 nm αντίστοιχα για το XTT, NBT. Το μηχάνημα ρυθμίστηκε ώστε να λαμβάνει μετρήσεις για διάστημα μισής ώρας κάθε 20’’ τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα.

» **In gel activity (ζυμογράφημα)** με χρήση native gel πολυακρυλαμίδης 10%: Προσθέτω την πηκτή στο διάλυμα που θα χρησιμοποιήσουμε και το καλύπτω με

αλουμινόχαρτο, καθώς η ριβοφλαβίνη είναι φωτοευαίσθητη. Υπό ανάδευση το αφήνουμε σε θερμοκρασία 4 ^{o} C για μία ώρα. Αφού το ξεπλύνουμε 3 φορές με απεσταγμένο νερό, το αφήνουμε σε dH_2O σε θερμοκρασία δωματίου και περιμένουμε να γίνει η αντίδραση. Η δράση της δισμουτάσης μετράται όταν εμφανίζονται άχρωμες μπάντες στο τζελ, δηλαδή δεν παράγεται το έγχρωμο προϊόν NBT. Σε περιοχές της πηκτής που δεν υπάρχει η δισμουτάση, παρατηρείται χρωματισμός από την αναγωγή του NBT και την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος.

» Το διάλυμα που θα χρησιμοποιήσουμε περιλαμβάνει 30 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου(NaH_2PO_4-Na_2HPO_4) 50 mM (pH=8), 30 mg ριβοφλαβίνης, 9 mg NBT (2M) και 1,2 ml TEMED. Προσθέτω μέχρι 5 μl από τα δείγματα χωρίς την παρουσία κάποιου δείκτη και στην περίπτωση που είναι πολύ πυκνά αραιώνω με διάλυμα PBS.

✓ Πραγματοποιούμε και densitometry στην πηκτή πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με coomassie για να βεβαιωθούμε ότι θα φορτώσουμε την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης στη μέτρηση από το tecan. Δεν αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο, αλλά μας βοηθάει ως μια επιπλέον ένδειξη και σε συμφωνία με τη μέτρηση συγκέντρωσης από το μηχάνημα φωτομέτρησης UV στα 280 nm.

Σκοπός

✓ Στόχος μας υπήρξε η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών με την ικανότητα να παράγουν σωστά αναδιπλωμένες ανασυνδυασμένες ανθρώπινες πρωτεΐνες και η καθιέρωση ενός αποτελεσματικού και αξιόπιστου συστήματος για ποιοτικό έλεγχο διαλυτών πρωτεϊνών μετά από υπερέκφρασή τους . Γενικότερα, η υπερέκφραση πρωτεϊνών στον οργανισμό ξενιστή E. coli και ειδικότερα των διαλυτών, οδηγεί συχνά στη δημιουργία συσσωματωμάτων(aggregates) ή inclusion bodies, καθώς αυτή είναι μια ιδιαιτέρως στρεσογόνος διαδικασία για τα βακτήρια, στην οποία δεν μπορούν να αντεπεξέλθουν αποτελεσματικά. Το γεγονός αυτό αποτελεί αδιέξοδο πρόβλημα αρκετές φορές και η αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος κρίνεται επιβεβλημένη για τη διεκπεραίωση του πειράματος. Ιδανικά, θα θέλαμε να είναι τέτοιες οι συνθήκες, που να επιτρέπουν την άμεση μέτρηση των επιπέδων πρωτεΐνης, που είναι σωστά αναδιπλωμένη, αλλά και της συσσωματωμένης της μορφής. Κάτι τέτοιο παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες μέχρι στιγμής. Προγενέστερα ενθαρρυντικά πειράματα με τη χρήση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP αποτέλεσαν το έναυσμα για τη διενέργεια παρόμοιων συμπληρωματικών πειραμάτων προς επιβεβαίωση αυτών.

✓ Η υπερέκφραση πρωτεϊνών σε λειτουργική μορφή είναι ένα αγκάθι που συνεχίζει να υφίσταται και χρίζει επίλυσης στην πληθώρα των πειραμάτων με ξενιστή τα E. Coli. Ένα συχνό φαινόμενο, που αποτελεί και σύνηθες πρόβλημα είναι πως πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στους μικροοργανισμούς δημιουργούν συσσωματώματα και αποκτούν λανθασμένη αναδίπλωση (φαινόμενο misfolding). Παρά τις συνεχείς προσπάθειες και την ολοένα αυξανόμενη γνώση σχετικά με την πρωτεϊνική διαμόρφωση στο χώρο δεν υπάρχει ακόμα κάποια αρκετά αξιόπιστη μέθοδος που να προβλέπει με επιτυχία πότε οι πρωτεΐνες θα αποκτούν

λανθασμένη αναδίπλωση (misfold). Οι προσεγγίσεις που εφαρμόζονται συνηθέστερα για την επιτυχημένη έκφραση διαλυτών πρωτεΐνών στα E. Coli αφορούν συνένωση της πρωτεΐνης με κάποιο παράγοντα διαλυτότητας ή chaperone, επώαση σε χαμηλή θερμοκρασία, καθώς και τροποποίηση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας. Όπως αναμένεται το αποτέλεσμα δεν είναι πάντα επιθυμητό, αφού δε γίνεται τροποποίηση των χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την αναδίπλωση και εξαρτώνται από την αμινοξική αλληλουχία. Στόχος η ανάπτυξη ενός συστήματος που περιλαμβάνει ένα δείκτη της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, που να καταγράφει με υψηλή ακρίβεια την ποιότητα αναδίπλωσης, να είναι θερμοδυναμικά σταθερός και να μη χρειάζεται την παρουσία κάποιου εξωγενούς συμπαράγοντα. Η GFP πληροί αρκετά από αυτά τα κριτήρια.

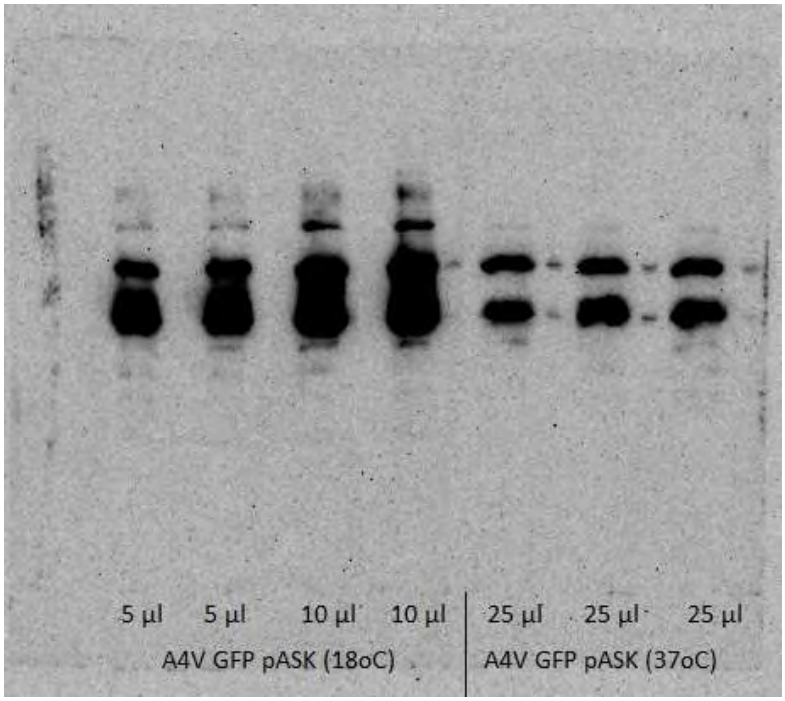
- ✓
- ✓ Η δημιουργία του χρωμοφόρου της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP εξαρτάται από την σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Βιβλιογραφικά, η GFP έχει χρησιμοποιηθεί ως «δείκτης» για την σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση. Η μέθοδος υλοποιείται με την συνένωση της επιθυμητής πρωτεΐνης στο αμινοτελικό άκρο της GFP και έχει ελεγχθεί με πληθώρα διαφορετικών πρωτεϊνών. Η επικρατούσα υπόθεση υποστηρίζει πως ο φθορισμός των κυττάρων E. coli που υπερεκφράζουν το χιμαιρικό προϊόν σχετίζεται άμεσα με την σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης που έχει συμπτυχθεί με την GFP. Αυτό πρακτικά σημαίνει, πως χιμαιρικές πρωτεΐνες που αποκτούν την σωστή διαμόρφωση στο χώρο αναμένεται να παράγουν φθορισμό, ενώ αντίθετα πρωτεΐνες υπό τη μορφή συσσωματωμάτων όχι. Συνεπώς, προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα αποτελούν ισχυρή ένδειξη πως η σωστή αναδίπλωση της περιοχής της GFP στη χιμαιρική πρωτεΐνη και η παραγωγή του πράσινου χρώματος είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ισχύ της σωστής πρωτεϊνικής αναδίπλωσης της πρωτεΐνης της επιλογής μας και την απουσία aggregates, inclusion bodies. Αυτό το γεγονός μεταφράζεται, πως το σήμα του φθορισμού είναι απολύτως ανάλογο της ποσότητας της πρωτεΐνης που έχει αναδιπλωθεί σωστά.
- ✓ Για να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια και πιο γρήγορα το ποσό της σωστά αναδιπλωμένης πρωτεΐνης, έχει προταθεί η συγχώνευση της πρωτεΐνης της επιλογής μας με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνης GFP και χρήση της χιμαιρικής πρωτεΐνης. Η ιδέα βασίστηκε στο γεγονός, πως σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης που επιλέξαμε ισοδυναμεί με σωστή αναδίπλωση και της GFP, ενώ αντίστοιχα λανθασμένη προκαλεί misfolding και της GFP, αποδίδοντας έτσι φθορισμό μόνο στην πρώτη περίπτωση.
- ✓ Βιβλιογραφικά, έχουν δημοσιευτεί μελέτες που βασίζονται σε μια απλή μέθοδο και χρήση πηκτής πολυακρυλαμίδης προς μέτρηση του φθορισμού της επιθυμητής πρωτεΐνης fused με την GFP. Η μέτρηση αυτή αποτελεί δείκτη της συνολικής ποσότητας της χιμαιρικής πρωτεΐνης που έχει παραχθεί και είναι λειτουργική μέσα στο κύτταρο, έχοντας δηλαδή την σωστή αναδίπλωση. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω της μέτρησης του φθορισμού, αλλά όχι και της συσσωματωμένης μορφής της πρωτεΐνης. Απο μόνη της, ωστόσο, η τιμή αυτή μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτική της κατάστασης και πρέπει να χρησιμοποιείται ως ένδειξη σε συνδυασμό και με άλλες

μεθόδους. Για παράδειγμα, όταν παρατηρείται χαμηλός φθορισμός τα τινά μπορεί να είναι δύο. Είτε έχει παραχθεί μικρή ποσότητα πρωτεΐνης και επομένως ο φθορισμός είναι μικρός, είτε μεγάλη ποσότητα αλλά με αυξημένα ποσά από aggregates. Η διαφορά αυτή είναι ζωτικής σημασίας και οι τρόποι αντιμετώπισης διαφορετικοί.

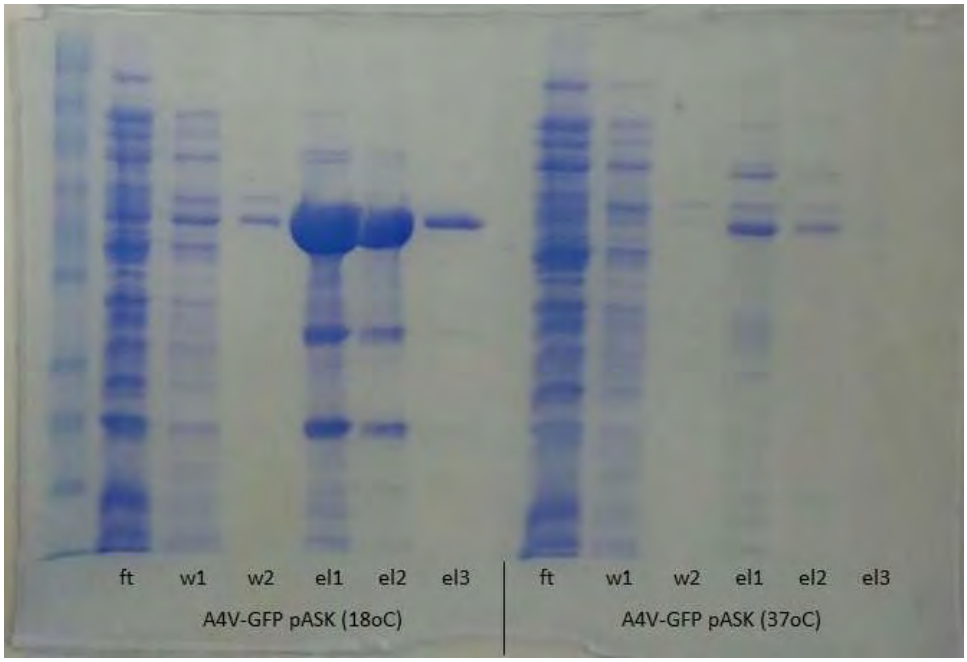
- ✓ Στο πλαίσιο αυτό αναπτύχθηκε μια θεωρία στο εργαστήριο για βελτίωση του τρόπου παρακολούθησης της ποιότητας διαλυτών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η διαδικασία περιλαμβάνει καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών E. coli προς παραγωγή του χιμαιρικού προϊόντος. Ο έλεγχος του παραγώμενου προϊόντος γίνεται και πάλι με χρήση πηκτής πολυακρυλαμίδης και παρατήρηση δύο μπαντών κάθε δείγματος. Όπως αναφέραμε, το σωστά αναδιπλωμένα προϊόν θα προσφέρει φθορισμό. Ωστόσο είναι αρκετά πιθανό να υπάρχει και ένα ποσοστό σε κάθε δείγμα που είναι σε συσσωματωμένη μορφή και συνεπώς λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης δεν φθορίζει. Αυτή η μπάντα αντιπροσωπεύει τη δεύτερη και είναι μη φθορίζουσα. Αναμένουμε λόγω μικρότερου μεγέθους και σωστής αναδίπλωσης, η χιμαιρική πρωτεΐνη στη λειτουργική της μορφή να «τρέξει» περισσότερο σε μια πηκτή σε σύγκριση με το συσσωμάτωμα, επομένως η φθορίζουσα μπάντα να είναι η κάτω και η μη φθορίζουσα η πάνω. Η μη φθορίζουσα μπάντα περιέχει το συσσωματωμένο προϊόν, το οποίο λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης δεν έχει την ίδια ικανότητα και ευκολία να κινείται μέσα στην πηκτή, επομένως βρίσκεται πάντα πιο πάνω από τη φθορίζουσα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται dual band migration και αποτελεί αντικείμενο διαλόγου ως προς την σωστή ερμηνεία του. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, λοιπόν, έχει ως στόχο να συνυπολογίσει και τις δύο μπάντες καθώς και το λόγο αυτών των δύο σε κάθε δείγμα.Μετά από ανάλυση του SDS-PAGE, λοιπόν θα συμπεράνουμε εάν έχουν δημιουργηθεί συσσωματώματα ή όχι βασιζόμενοι στην εμφάνιση της μη φθορίζουσας μπάντας, πόσο ισχυρός είναι ο φθορισμός ανάλογα με την ποσότητα της λειτουργικής χιμαιρικής πρωτεΐνης (στο μέγεθος του αθροίσματος της GFP και της πρωτεΐνη μας) και την αναλογία των σωστά και λανθασμένα αναδιπλωμένων προϊόντων. Κατ' αυτόν τον τρόπο πιστεύουμε πως η ταυτοποίηση πρωτεϊνών με καλή αναδίπλωση ή δημιουργία συσσωματωμάτων θα γίνεται ευκολότερα και με μεγαλύτερη ακρίβεια συγκριτικά με προηγούμενες μεθόδους, που βασίζονταν μονάχα στη φθορίζουσα μπάντα.
- ✓ Πιο συγκεκριμένα, παλαιότερα πειράματα στο εργαστήριο ενζυμικής βιοτεχνολογίας με χρήση πρωτεϊνών συμπτυγμένων με την GFP αποκάλυψαν διαφορές ανάμεσα στη φθορίζουσα και τη μη-φθορίζουσα μπάντα ανάλογα τις συνθήκες επώασης μετά την επαγωγή της καλλιέργειας. Οι διαφορετικές συνθήκες αφορούσαν διαφορετικές θερμοκρασίες και ειδικότερα 18 και 37 ^{o}C για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης SOD1 fused με την GFP, ενώ έγινε έλεγχος της υπόθεσης με χρήση semi-denaturating SDS-PAGE και δειγμάτων με ποσότητα ολικής/διαλυτής πρωτεΐνης. Η φθορίζουσα μπάντα στους 18 ^{o}C είναι αρκετά εντονότερη σε σύγκριση με τους 37 ^{o}C, γεγονός που υποδεικνύει καλύτερη ποιότητα αναδίπλωσης. Για να εξακριβωθεί το εύρημα αυτό και να βεβαιωθούμε, ότι η θεωρία που υποστηρίζουμε σχετικά με το νεο σύστημα ανίχνευσης της αναδίπλωσης των διαλυτών πρωτεϊνών έχει βάση, σχεδιάσαμε ένα νέο πείραμα με την πρωτεΐνη SOD στην unfused μορφή της. Συγκρίνοντας λοιπόν την ενεργότητα

της δισμουτάσης που έχει υπερεκφραστεί στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες 18 ^{o}/37 ^{o}C αναμέναμε να υπερτερεί αυτή από τη χαμηλότερη θερμοκρασία, γεγονός που θα μεταφράζεται σε καλύτερη αναδίπλωση της πρωτεΐνης.

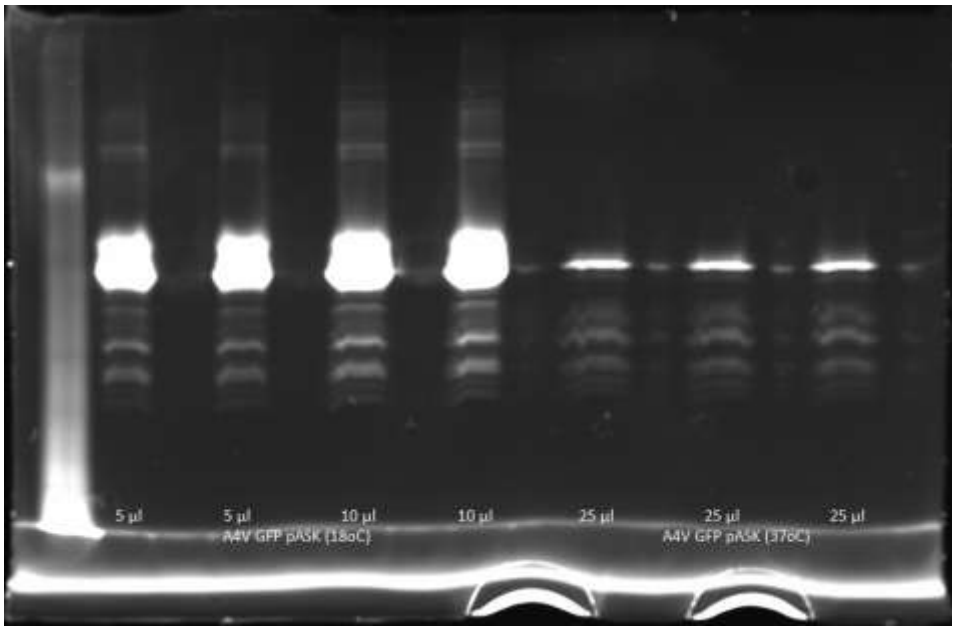
- ✓ Ευρήματα από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο με χρήση της πρωτεΐνης GFP ως δείκτη των επιπέδων συσσωμάτωσης και αναδίπλωσης διαλυτών πρωτεϊνών παρουσιάζονται παρακάτω. Παρατηρούμε, πως η κάτω φθορίζουσα μπάντα της πρωτεΐνης που επωάστηκε στους 18 ^{o}C μετά την επαγωγή είναι πιο ισχυρή (*εικόνα Α*). Από την εικόνα με τον καθαρισμό (*εικόνα Β*), παρατηρούμε πως στους 18 ^{o}C παράγεται πολύ περισσότερη ποσότητα συγκριτικά με τους 37 ^{o}C. Και ενώ αυτό το γεγονός μπορεί να σημαίνει πως η ποιότητα της παραγώμενης πρωτεΐνης μπορεί να μην είναι καλή, το αποτέλεσμα είναι διαφορετικό. Η *εικόνα Γ* δείχνει ξεκάθαρα πως η φθορίζουσα μπάντα είναι αρκετά πιο ισχυρή στη χαμηλότερη θερμοκρασία.



- ✓ *Εικόνα Α: A4V GFP pASK SDS/antiHis (non-boiled) σε διαφορετικές θερμοκρασίες*



✓ *Εικόνα Β: A4V GFP pASK, induction at 18 and 37 °C, Protein purification, SDS/coom*



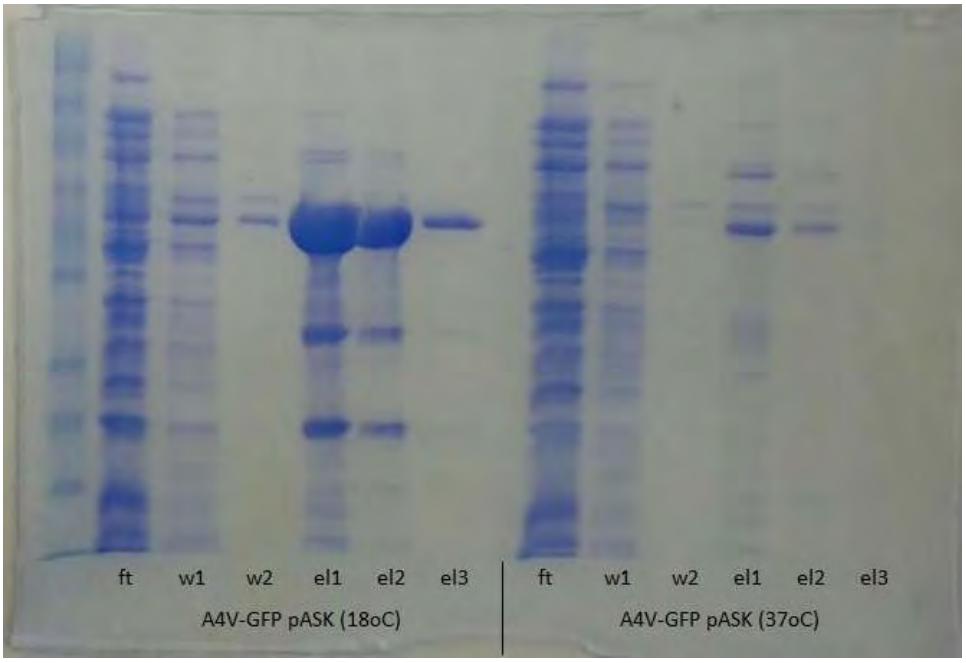
✓ *Εικόνα Γ: A4V GFP pASK, induction at 18 and 37 °C SDS/in gel fluorescence (non-boiled)*

Αποτελέσματα-συζήτηση

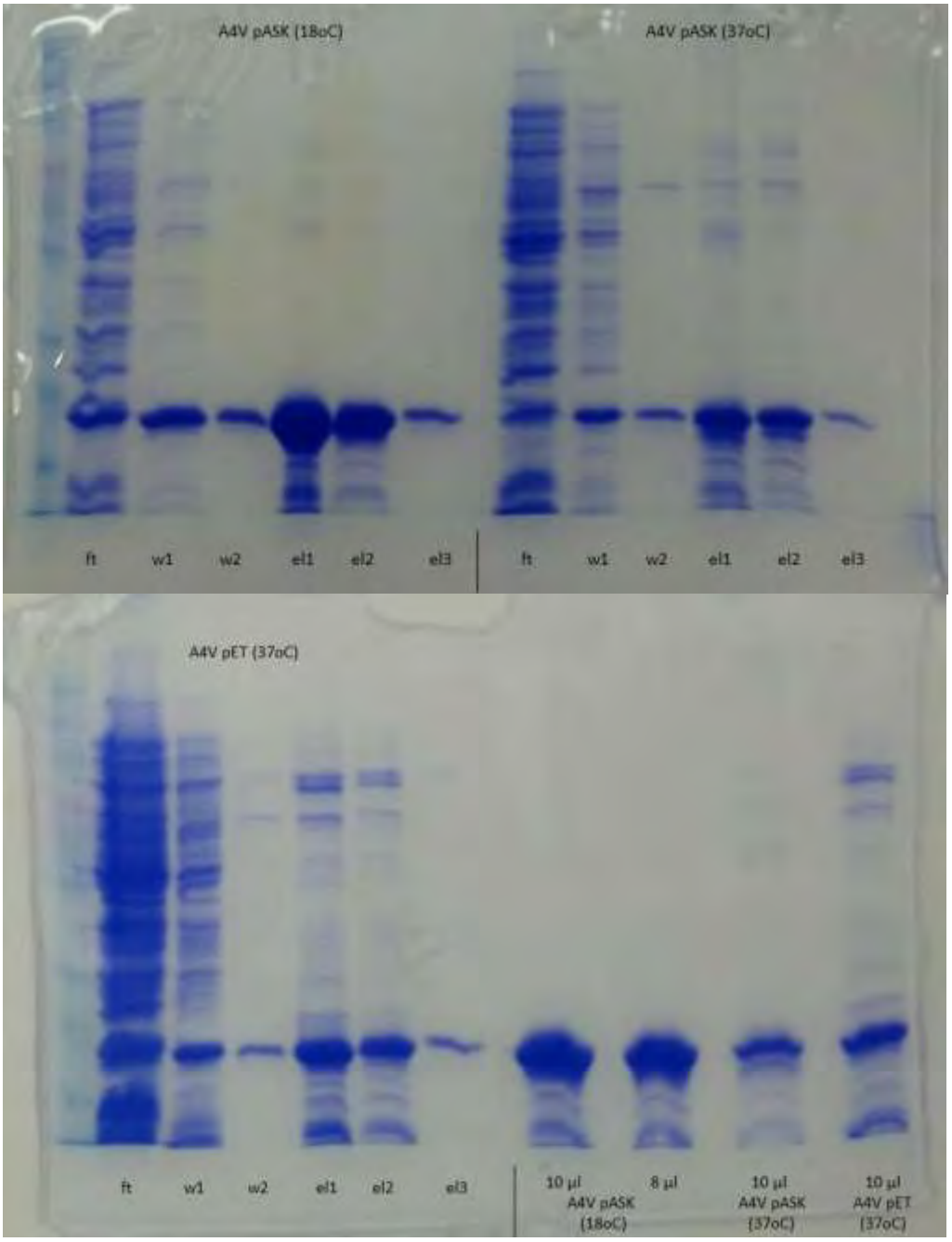
Τα δεδομένα από την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας θα παρουσιαστούν παρακάτω (in gel activity, purification, enzyme assays) και λειτουργούν θα λέγαμε ως επιστέγασμα της προαναφερθείσας θεωρίας που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη SOD(superoxide dismutase) στην unfused μορφή της και πιο συγκεκριμένα το μετάλλαγμα A4V και προσπαθήσαμε μετά από καθαρισμό της πρωτεΐνης να συγκρίνουμε την ενζυμική ενεργότητά της ανάμεσα σε καλλιέργειες διαφορετικών παραμέτρων, γεγονός που συνδέεται άμεσα με την σωστή αναδίπλωσή της. Επειδή η παραγώμενη πρωτεΐνη

διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας κάναμε χρήση μετρήσεων συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε UV φασματοφωτόμετρο , καθώς και densitometry, για να καταλήξουμε σε equal loading πρωτεΐνης στις ενζυμικές διαδικασίες.

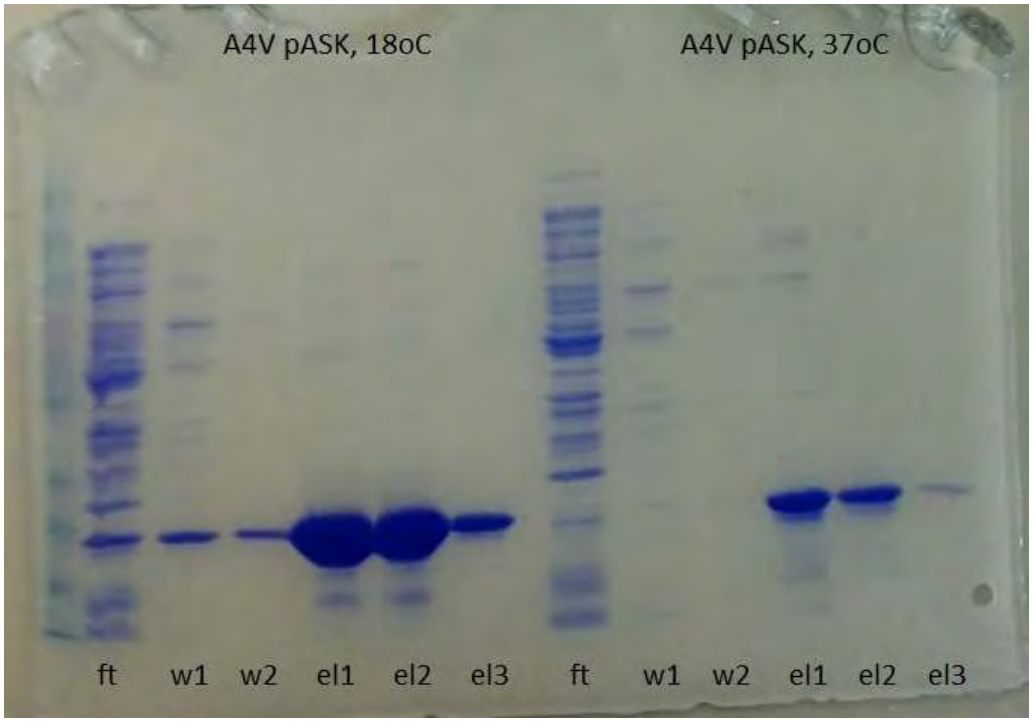
Μετά την καλλιέργεια και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης μας εφαρμόσαμε χρωματογραφία συγγένειας για την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος. Μετά τον καθαρισμό που πραγματοποιήσαμε με ένα βήμα, είχαμε στη διάθεσή μας καθαρή πρωτεΐνη(elution), αποτέλεσμα επώασης σε τρεις διαφορετικές συνθήκες και όπως αναμέναμε η ποσότητα σε κάθε περίπτωση διαφέρει αισθητά. Όπως μπορούμε να δούμε από τις «*εικόνες 11-16*» που αφορούν πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρωματισμό με τη χρωστική coomassie blue, μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης sod παράγεται στους 18^0 C με πλασμίδιο pASK, ενώ και στους 37^0 C το πλασμίδιο pASK έχει μεγαλύτερη παραγωγή από το pET28. Παρεθέτουμε εικόνες που περιέχουν την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης(equal loading) για άμεση σύγκριση της ποσότητας*(εικόνα 16*), καθώς και πηκτώματα στα οποία τα δείγματα έχουν ίδια ποσότητα από το elution αλλά διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης(*εικόνες 12-13*). Η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας δεν απέφερε τη μέγιστη επιθυμητή καθαρότητα, ωστόσο το ποσό της επιθυμητής πρωτεΐνης είναι ασύγκριτα μεγαλύτερο σε σχέση με τα υπόλοιπα προϊόντα. Από όλες τις φωτογραφίες καθαρισμού που παραθέτουμε, γίνεται αντιληπτό πως το αποτέλεσμα είναι επαναλήψιμο αναφορικά με τα παραγώμενα ποσά πρωτεΐνης και τις διαφορετικές θερμοκρασίες.



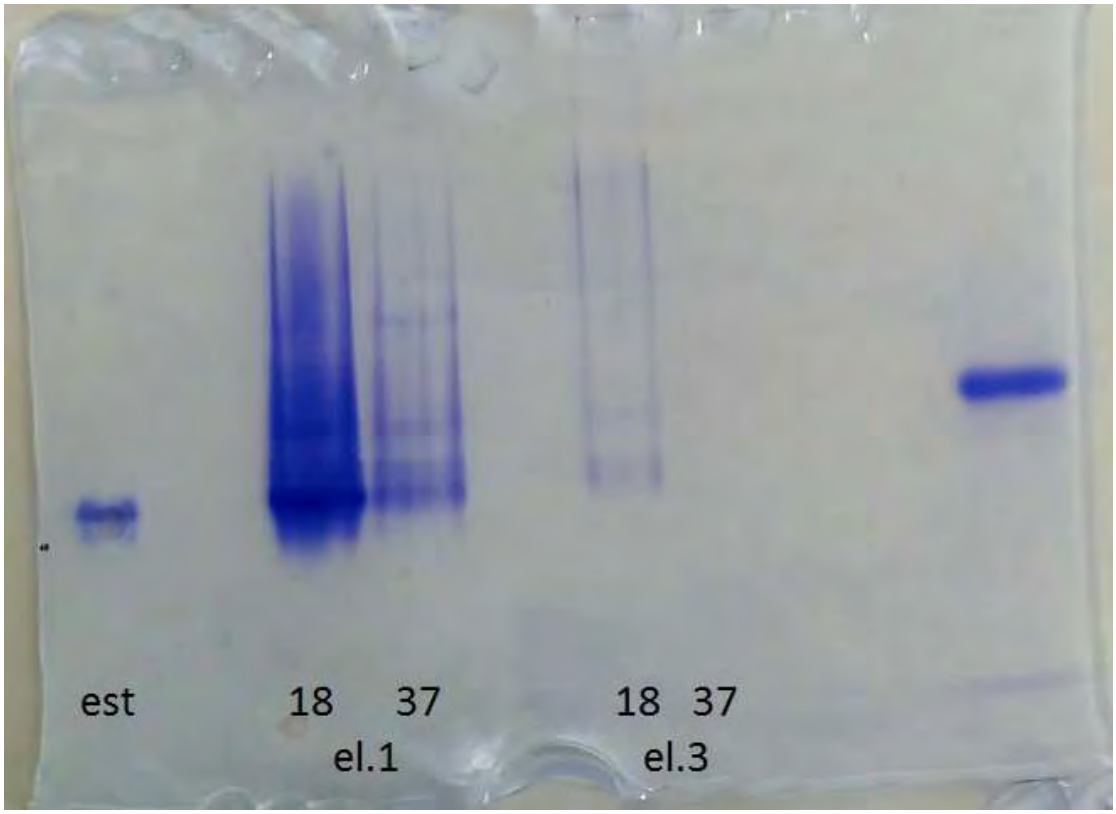
Εικόνα 1 A4V GFP pASK, induction at 18 and 37 °C, Protein purification, SDS/coomassie



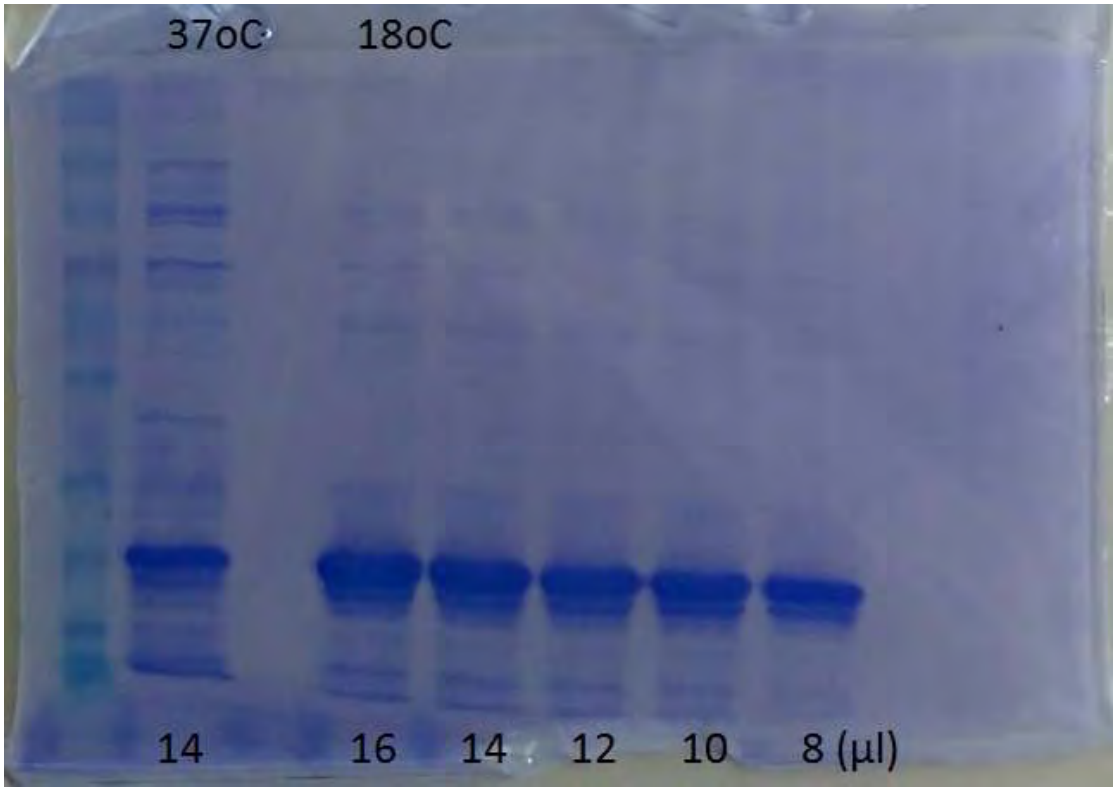
Εικόνα 2 A4V pASK, induction at 18 and 37 °C/ A4V pET28, induction at 37 °C, Protein purification, SDS/coomassie



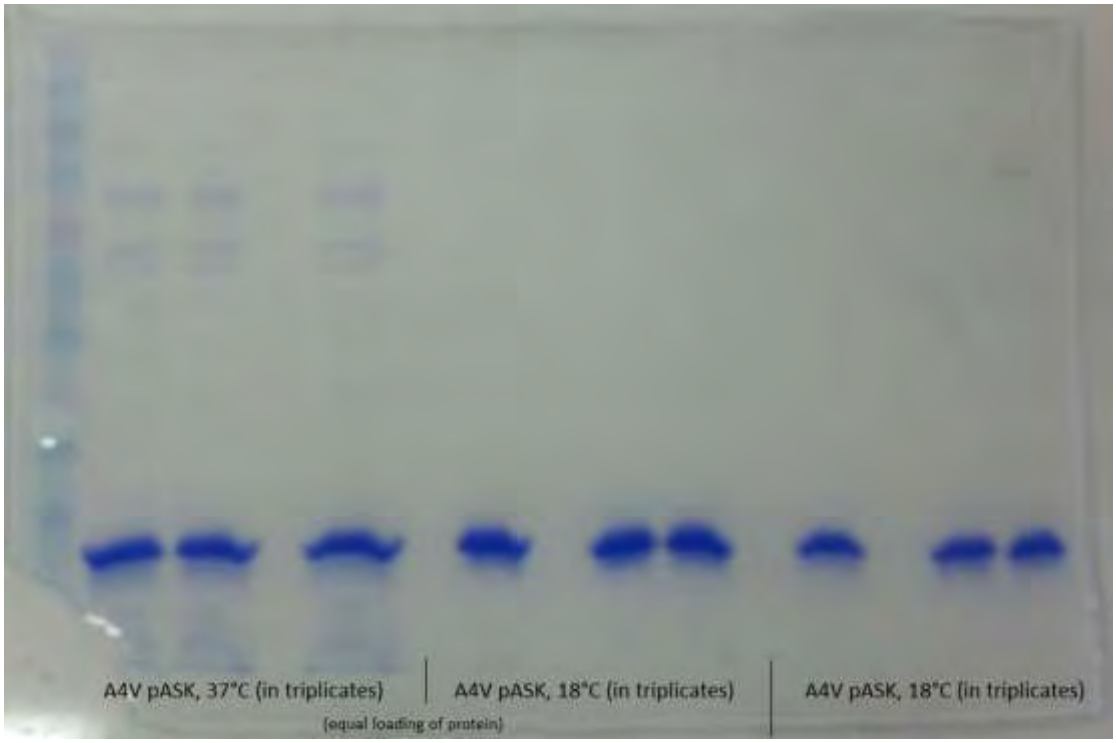
Εικόνα 3 A4V pASK induced at 18 and 37°C, Protein purification, SDS/coomassie



Εικόνα 4 NATIVE/coomassie, elutions 1 and 3 of SODA4V pASK induced at 18 and 37°C, Protein purification



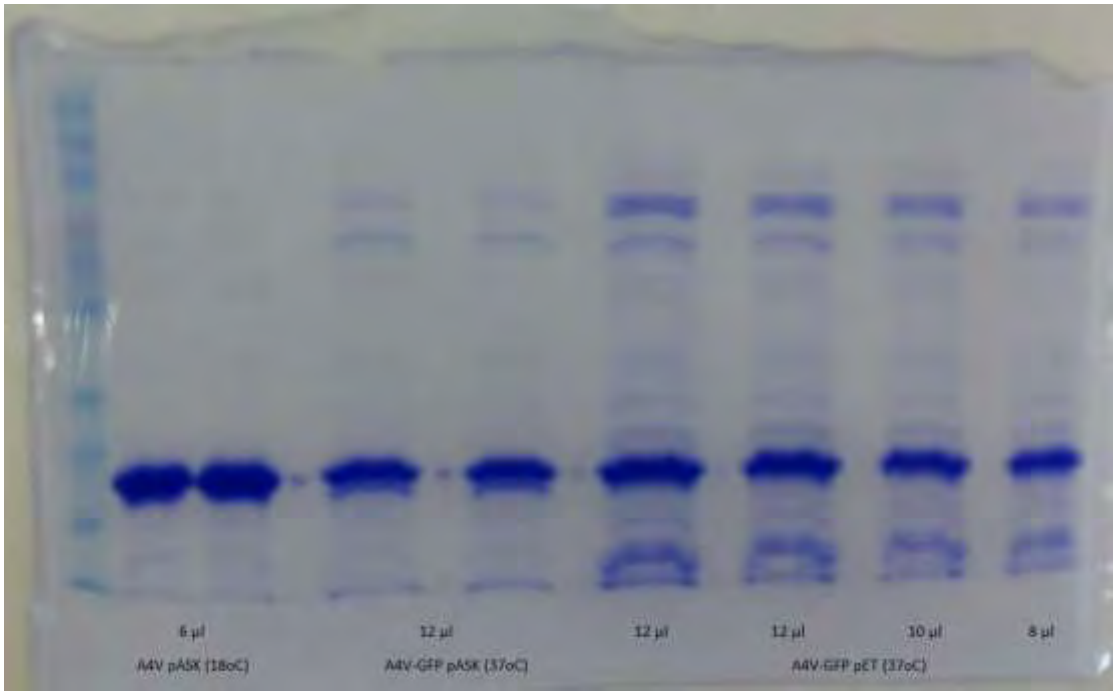
Εικόνα 5 Different concentration of protein produced at pASK, induction at 18, 37°C



Εικόνα 6 A4V pASK, induction at different temperatures (i.e. 18 and 37°C), SDS/coomassie

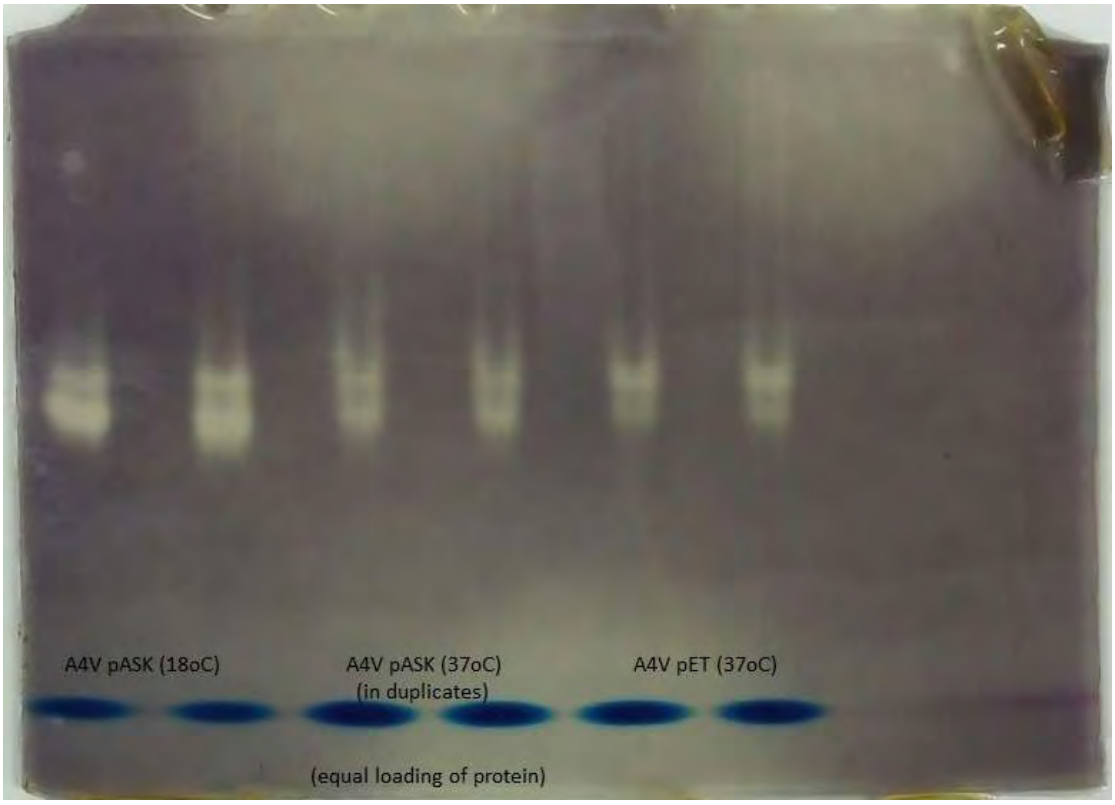
Επόμενο βήμα ήταν να ελεγξουμε την ενεργότητα της πρωτεΐνης που είχαμε συλλέξει μετά τον καθαρισμό. Αρχικά, για να είναι αξιόπιστη η μέτρηση χρειάζεται να έχουμε την ίδια

ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα από τις διαφορετικές συνθήκες. Για να το επιτύχουμε αυτό «τρέξαμε» διαφορετικές ποσότητες από τα δείγματά μας και αφότου τα χρωματίσαμε καταλήξαμε στην σωστή αναλογία που πρέπει να χρησιμοποιηθούν. Παράδειγμα αποτελεί η «*εικόνα 15*», όπου είναι εμφανές πως ποσότητα 8μL από το δείγμα από τους 18 ^{o} C ισούται με ποσότητα 14μL από τους 37^{0} C. Επιπρόσθετος τρόπος για να είμαστε σίγουροι πως έχουμε ίδια ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα είναι η χρήση της μεθόδου «densitometry», όπου γίνεται μέτρηση της έντασης/πυκνότητας της κάθε μπάντας από τον υπολογιστή και παίρνουμε το αποτέλεσμα του λόγου ανάμεσα σε κάθε δείγμα(*Εικόνα 17*). Αφού επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα και από τις δύο αυτές μεθόδους είμαστε έτοιμοι για τη διενέργεια των ενζυμικών τεχνικών.

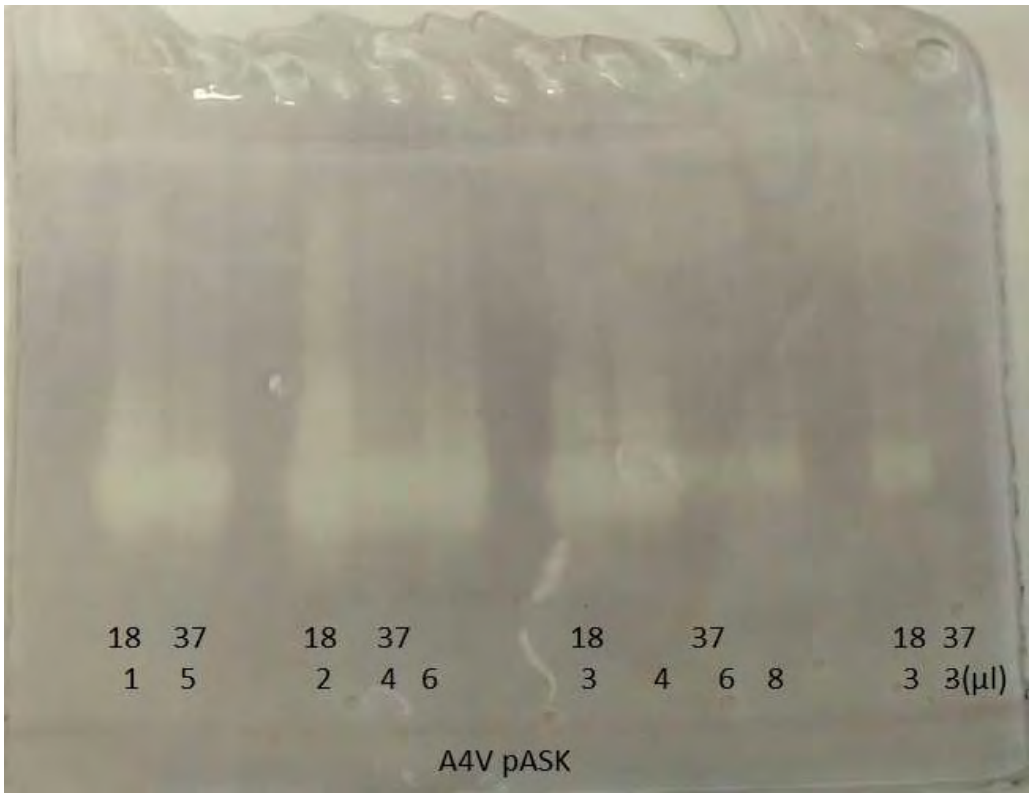


Εικόνα 17 SDS/coomassie for densitometry, A4V pASK, induction at different temperatures (i.e. 18 and 37°C)

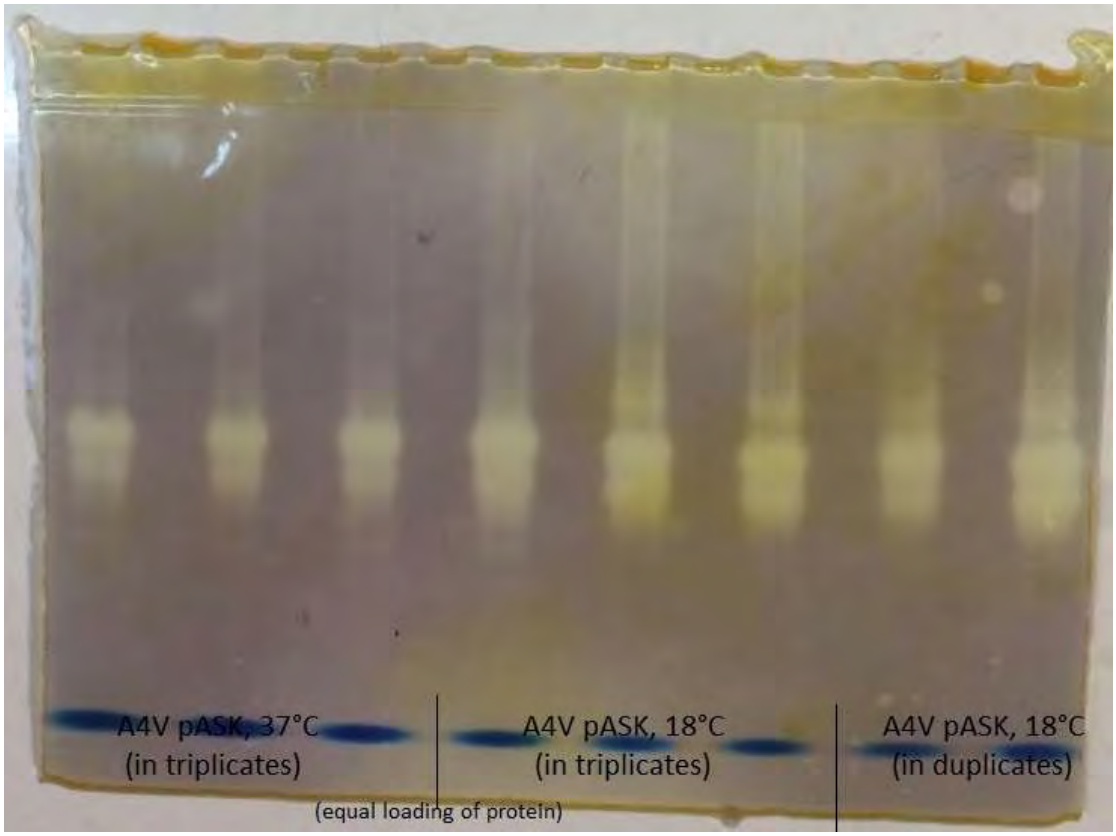
Όπως προαναφέραμε επιλέξαμε διαφορετικές τεχνικές για να διαπιστώσουμε εάν διαφέρει η ενεργότητα της πρωτεΐνης μας στα διαφορετικά δείγματα που συλλέξαμε. Στο ζυμογράφημα ελέγξαμε την ενεργότητα της πρωτεΐνης μέσα στην πηκτή μετά από equal loading πρωτεΐνης, που βασίστηκε στα δεδομένα που πήραμε από τις προαναφερθείσες τεχνικές(SDS/coomassie, densitometry). Στις «*εικόνες 8-10*» φαίνονται τα αποτελέσματα που λάβαμε και δεν υπάρχει αμφιβολία για την τελική έκβαση. Τόσο στις φωτογραφίες που έχει γίνει equal loading πρωτεΐνης (*εικόνες 8, 9β,10*), όσο και σε αυτές που υπάρχει ίδια ποσότητα δείγματος αλλα όχι πρωτεΐνης(*εικόνα 9α*), είναι εμφανής η διαφορά ενεργότητας. Η διαφορά αυτή αποτυπώνεται σε μεγαλύτερο αποχρωματισμό της πηκτής ενώ το υπόλοιπο τζελ γίνεται σκουρόχρωμο.



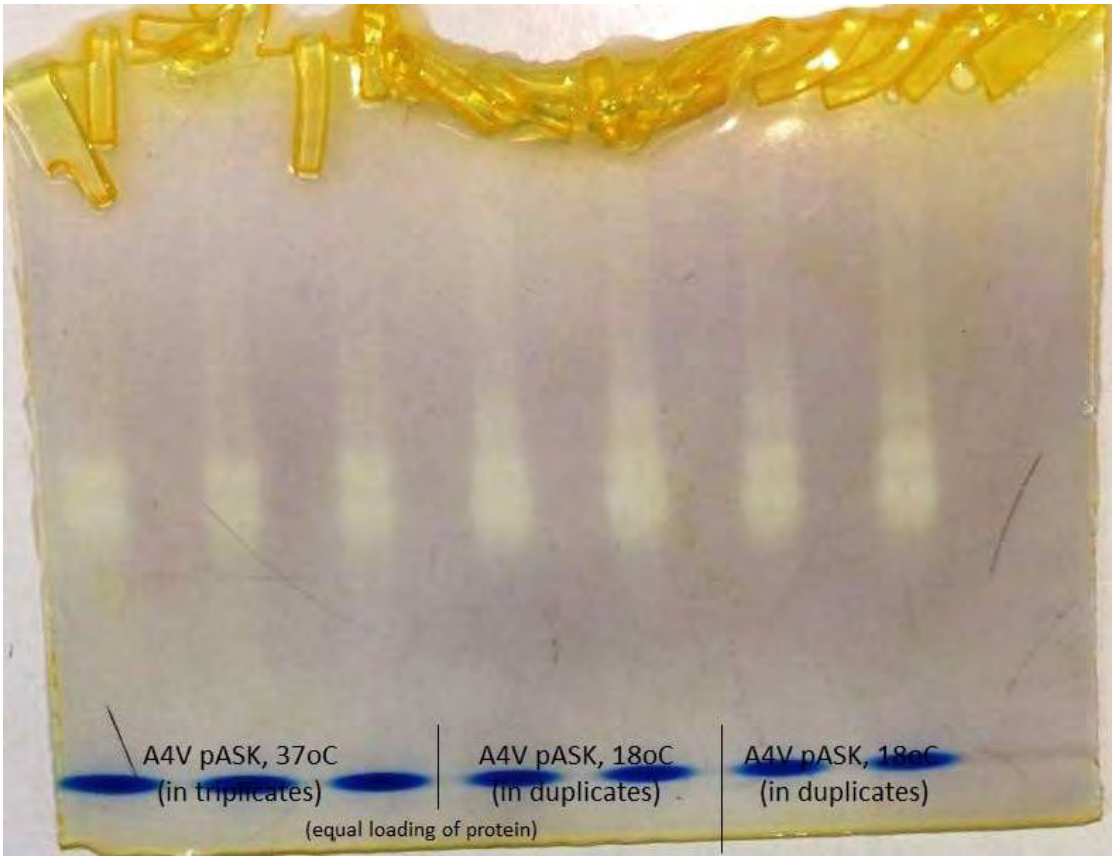
Εικόνα 7 NATIVE/ in gel activity (equal loading of protein),A4V pASK induction at 18 and 37 °C/ A4V pET, induction at 37 °C



Εικόνα 9α Native in gel activity, A4V pASK induction at 18 and 37 °C



Εικόνα 8β In gel activity (diluted protein 1:10) A4V pASK induction at 18 and 37 °C

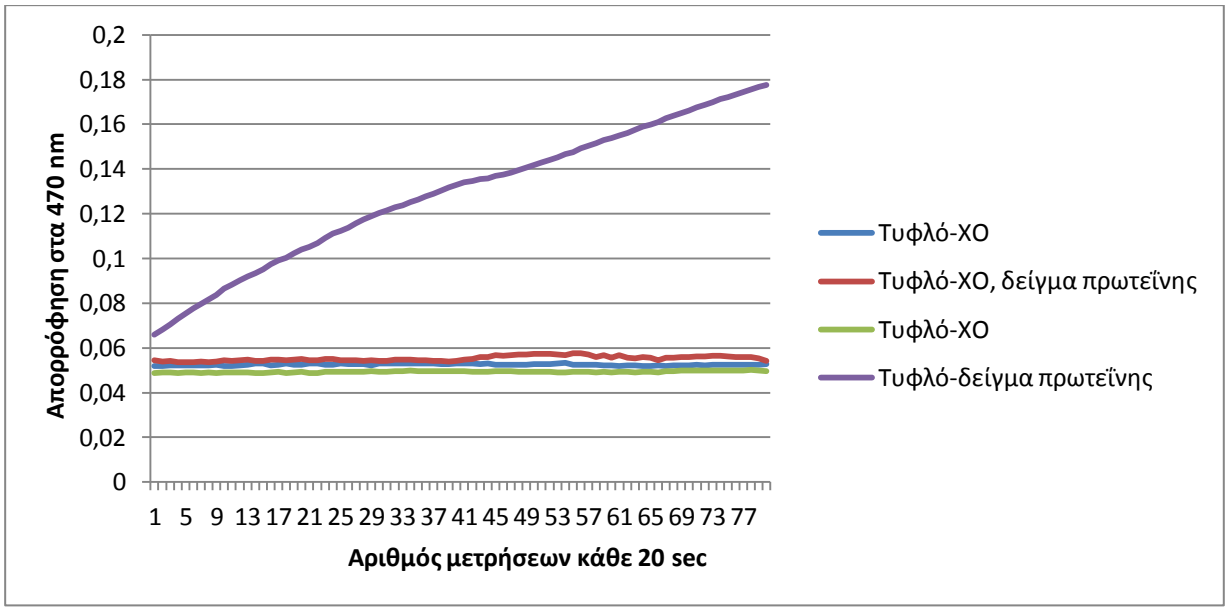


Εικόνα 9 Native in gel activity, A4V pASK induction at 18 and 37 °C

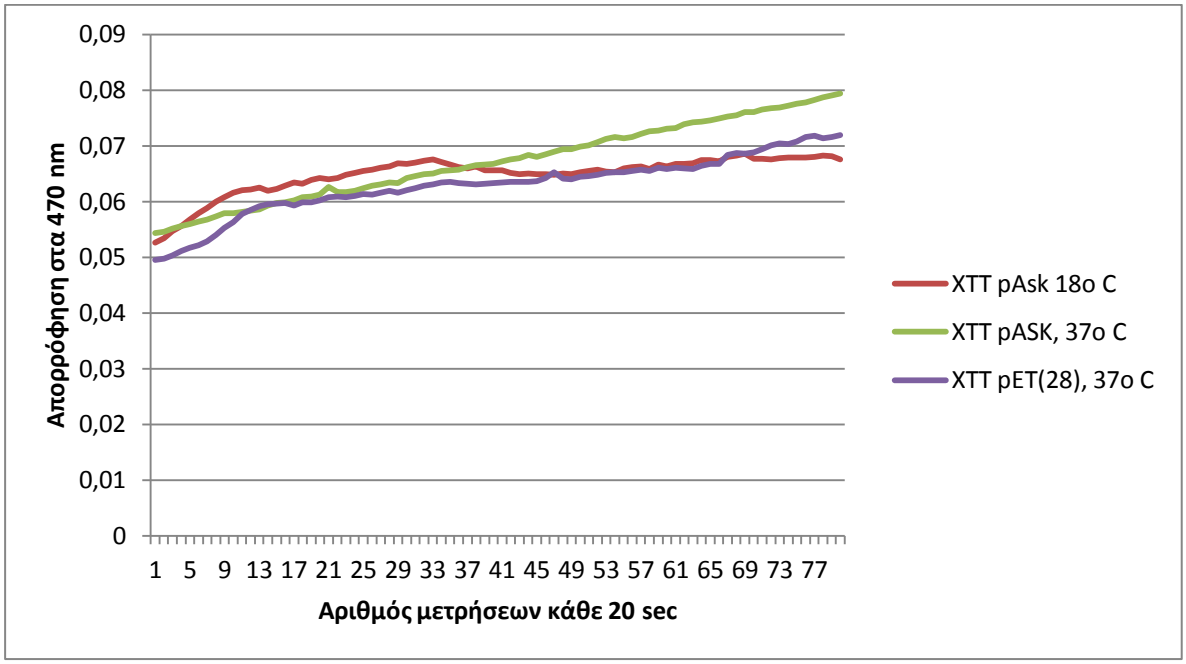
Όσο πιο έντονος ο αποχρωματισμός λοιπόν, τόσο πιο ενεργή είναι η πρωτεΐνη μας. Γίνεται αντιληπτό πως η πρωτεΐνη που παράγεται στη χαμηλότερη θερμοκρασία στα κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο pASK είναι καλύτερης ποιότητας σύμφωνα με το ζυμογράφημα. Επιπλέον όπως αναμενόταν, οι ποσότητες παραγωγής είναι μεγαλύτερες στους 18 συγκριτικά με τους 37°C. Υψηλή ενεργότητα προϋποθέτει σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, το οποίο είναι και το αντικείμενο των πειραμάτων μας. Συνεπώς, η ποιότητα της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης υπό κάποιες συνθήκες καλλιέργειας φαίνεται να ευνοείται έναντι κάποιων άλλων, όπως αναμέναμε και σύμφωνα με την υπόθεσή μας.

Τόσο στο πείραμε με την in gel activity που περιγράψαμε όσο και σε αυτά με υπόστρωμα το XO/XTT, XO/NBT και τη μέτρηση απορρόφησης ο υπολογισμός ενεργότητας της δισμουτάσης γίνεται με έμμεσο τρόπο, υπολογίζοντας πόσο αποτελεσματικά αποτρέπει τη δημιουργία ενός άλλου προϊόντος. Στην συμπληρωματική μέθοδο που εξετάσαμε, έγινε μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων μας μετά από την χορήγηση του κατάλληλου υποστρώματος. Χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά υποστρώματα και η μέθοδος βασίζεται στην ίδια λογική, η οποία έχει ως εξής: Η δράση της δισμουτάσης αποτρέπει τη δημιουργία ενός προϊόντος, το οποίο αυξάνει την απορρόφηση του δείγματος. Επομένως, αναμένουμε μείωση της απορρόφησης των δειγμάτων σε σύγκριση με τα τυφλά, τα οποία δεν περιέχουν ποσότητα πρωτεΐνης. Η μέτρηση έγινε ανά 20'' σε μήκος κύματος 470 560 nm αντίστοιχα για τις δυο διαφορετικές μεθόδους και για συνολικό χρόνο μισής ώρας. Τα αποτελέσματα για τις μεθόδους αυτές αποτυπώνονται σε διαγράμματα στις «*εικόνες 1-7*». Η μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων XTT πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 470 nm και των δειγμάτων NBT (+BSA) στα 560 nm. Για να φορτώσουμε ίδια ποσότητα πρωτεΐνης μετρήσαμε την απορρόφηση των δειγμάτων σε UV φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 280 nm και χρησιμοποιήσαμε και δεδομένα από τη μέθοδο «densitometry».

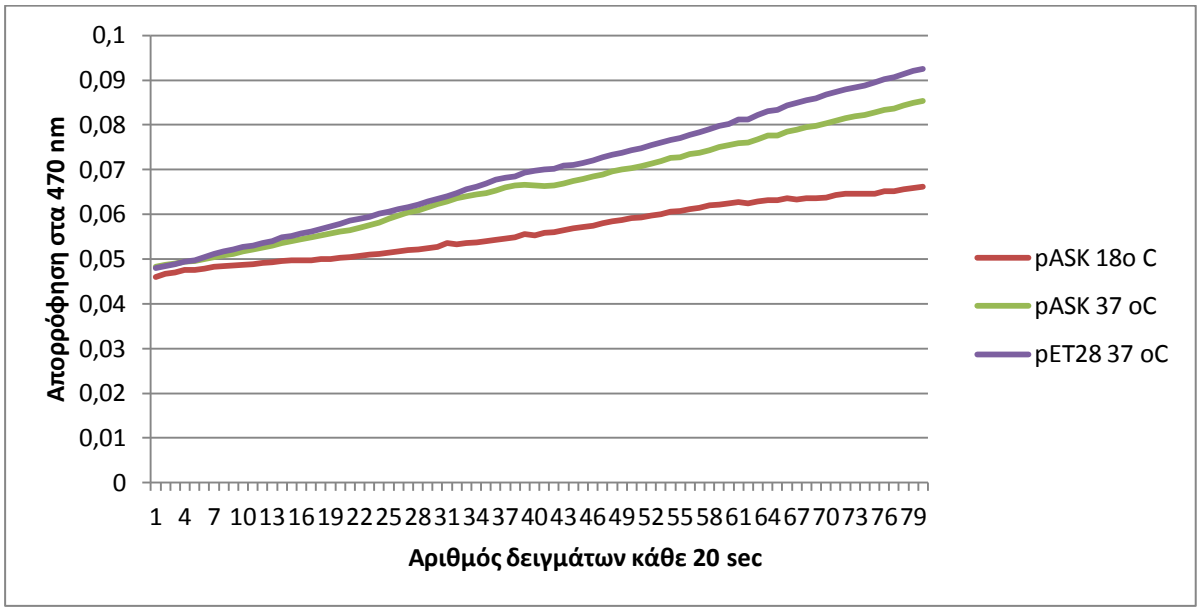
Τα αποτελέσματα από το ενζυμικό assay με το XTT φαίνονται στα διαγράμματα των εικόνων «*1-3*».



Εικόνα 10 XTT τυφλά δείγματα



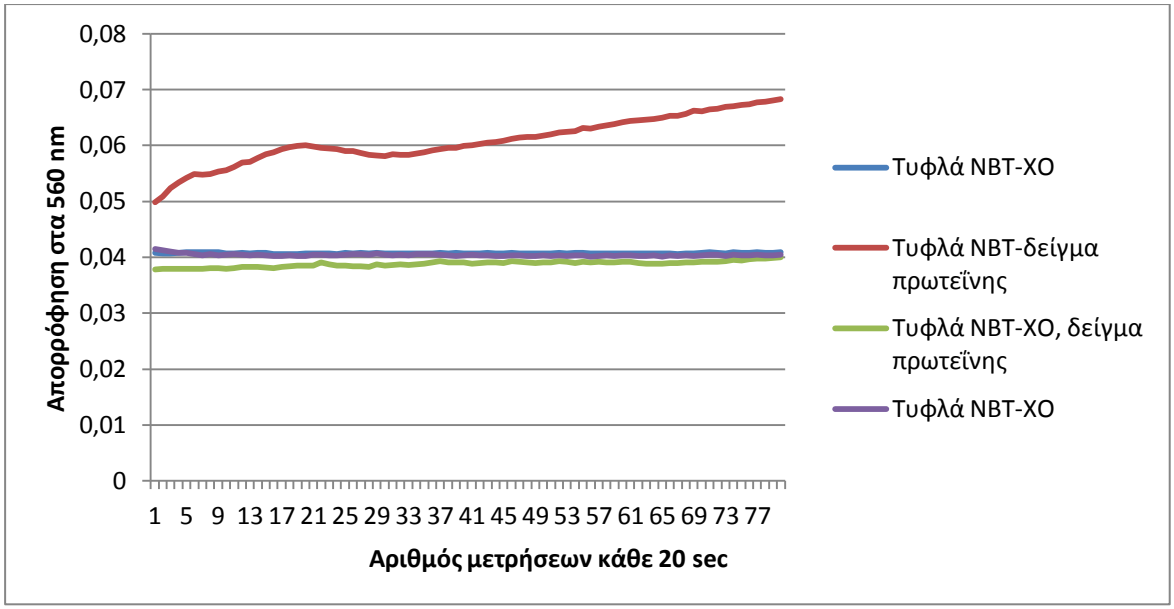
Εικόνα 11 XTT δείγματα από τρεις διαφορετικές συνθήκες



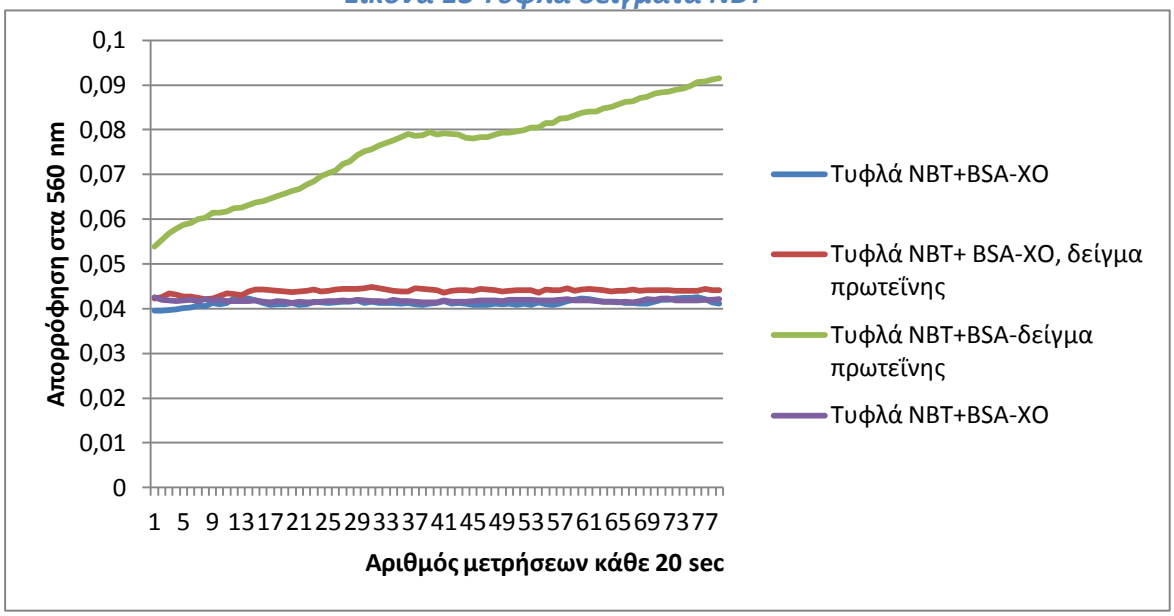
Εικόνα 12 XTT δείγματα από τρεις διαφορετικές συνθήκες

Στην πρώτη εικόνα απεικονίζεται η απορρόφηση των τυφλών δειγμάτων στον ενζυμικό προσδιορισμό με τη μέθοδο XO/XTT. Στα τυφλα δείγματα που δεν περιέχεται ποσότητα οξειδάσης της ξανθίνης (XO), δεν ευνοείται η παραγωγή προϊόντος που θα αυξήσει την απορρόφηση. Τα τυφλά δείγματα που περιέχουν XO αλλά όχι ποσότητα πρωτεΐνης παρουσιάζουν μια εμφανή διαφορά στη μεταβολή της απορρόφησης, η οποία και αυξάνεται, γεγονός αναμενόμενο. Στις «εικόνες 2-3» έχουμε τα γραφήματα για τα διαφορετικά δείγματά μας, δηλαδή πρωτεΐνη από κύτταρα με το πλασμίδιο pASK και επώαση στους 18 και 37 ^{o}C μετά την επαγωγή, καθώς και κύτταρα με το πλασμίδιο pET28 και επώαση στους 37° C μετά την επαγωγή. Και στα δύο γραφήματα η αποτελεσματικότητα της πρωτεΐνης από το δείγμα με το πλασμίδιο pASK-18 ^{o} C είναι μεγαλύτερη, ενώ τα άλλα δύο δείγματα από τους 37 ^{o} C παρουσιάζουν παρόμοια αποτέλεσμα. Παρότι η διαφορά της «παρεμπόδισης» της δισμουτάσης προς παραγωγή του προϊόντος, που αυξάνει την απορρόφηση, δεν είναι μεγάλη, βάσει αυτών των μετρήσεων με την ενζυμική μέθοδο της αλληλεπίδρασης ξανθίνης- οξειδάσης της ξανθίνης, μπορούμε να βγάλουμε ένα επιφυλακτικό συμπέρασμα, πως η καλύτερης ποιότητας πρωτεΐνη SODA4V παράγεται στο πλασμίδιο pAsk στους 18ο C, ενδεχομένως επειδή υπό χαμηλή θερμοκρασία να μην στρεσάρονται τόσο έντονα τα κύτταρα και η αναδίπλωση να γίνεται με μεγαλύτερη ποιότητα.

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα από το ενζυμικό assay με το NBT φαίνονται στα διαγράμματα των εικόνων «*4-7*», με ή χωρίς την προσθήκη BSA. Στις «*εικόνες 4-5*» απεικονίζονται οι απορροφήσεις των τυφλών δειγμάτων στον ενζυμικό προσδιορισμό με τη μέθοδο XO/NBT και XO/NBT+BSA αντίστοιχα. Η εικόνα είναι παρόμοια με το γράφημα των τυφλών δειγμάτων της μεθόδου XO/XTT, δηλαδή παρουσιάζεται αύξηση μόνο στο τυφλά δείγματα όπου δεν περιέχεται ποσότητα πρωτεΐνης.

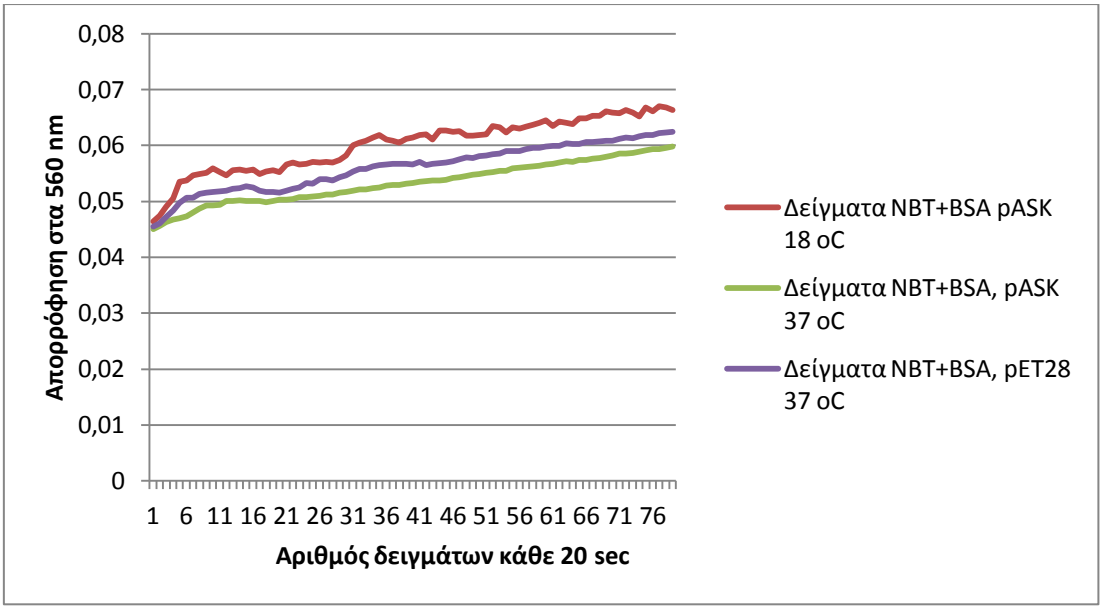


Εικόνα 13 Τυφλά δείγματα NBT

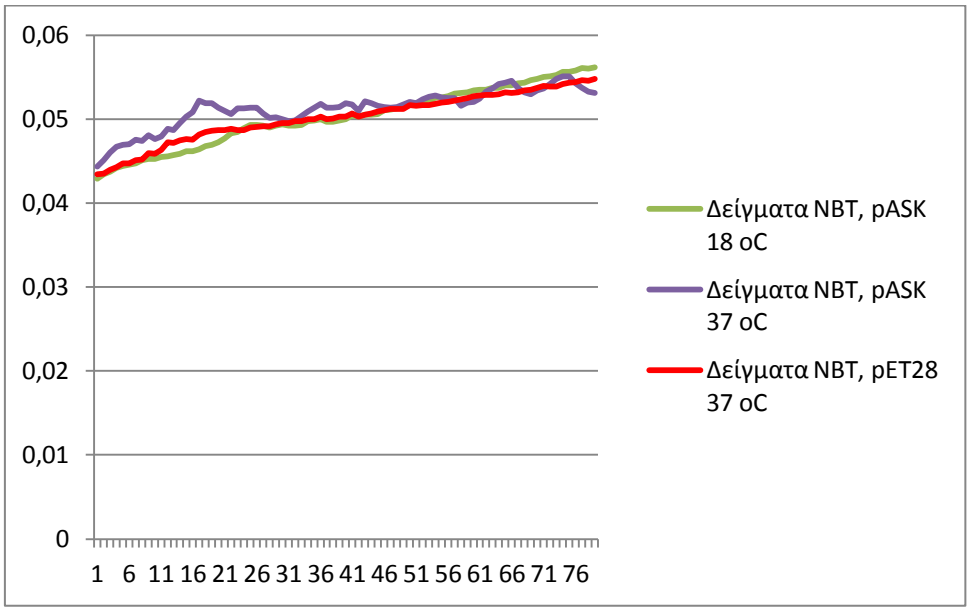


Εικόνα 14 Τυφλά δείγματα NBT+BSA

Στις «*εικόνες 6-7*» παρουσιάζεται η απορρόφηση των NBT δειγμάτων με και χωρίς την προσθήκη ορού. Μια παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε είναι, πως η απορρόφηση τόσο των τυφλών όσο και των δειγμάτων μας αυξάνεται με την προσθήκη BSA.



Εικόνα 15 Δείγματα NBT+ BSA από τρεις διαφορετικές συνθήκες



Εικόνα 16 Δείγματα NBT από τρεις διαφορετικές συνθήκες

Τα αποτελέσματα σε αυτήν την ενζυμική μέθοδο με το NBT δεν είναι τόσο ξεκάθαρα, δηλαδή δεν ξεχωρίζει κάποιο δείγμα από τα 3 που έχουμε [pAsk 18-37 ^{o}C, pet 37 ^{o}C], στο οποίο η δράση της δισμουτάσης να είναι καλύτερη συγκριτικά με τις άλλες περιπτώσεις.

Παρόμοια τα αποτελέσματα και στα δείγματα πρωτεΐνης με προσθήκη +BSA. Υπάρχει μείωση στην απορρόφηση σε σχέση με τα τυφλά, ωστόσο μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών η διαφορά είναι μικρή, με την καλύτερη εικόνα «παρεμπόδισης» να παρουσιάζει η πρωτεΐνη από το πλασμίδιο pAsk στους 37°C.

Εν κατακλείδι, τα πειραματικά δεδομένα από τις ενζυμικές διαδικασίες που εφαρμόσαμε επιβεβαιώνουν τις ενδείξεις, ότι στα κύτταρα E. Coli η διαλυτή πρωτεΐνη SOD που υπερεκφράζεται έχει διαφορετική ενεργότητα ανάλογα με τις συνθήκες επώασης της. Η ενζυμική ενεργότητα θα είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση, που η αναδίπλωση της πρωτεΐνης είναι βέλτιστη. Η ερμηνεία των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων συμβάλλει στο να ενισχυθεί η θεωρία μας σχετικά με την αναδίπλωση των ετερόλογων διαλυτών πρωτεΐνών και να καθιερωθεί μια διαδικασία παραγωγής λειτουργικών πρωτεΐνών, όπου η παρακολούθηση της ποιότητας αναδίπλωσής τους θα μπορεί να γίνει γρήγορα, αξιόπιστα και με αποτελεσματικό τρόπο. Τα αποτελέσματα που παραθέτουμε «συμφωνούν», πως η πρωτεΐνη που παράγεται στους 18° C με το πλασμίδιο pASK είναι καλύτερης ποιότητας συγκριτικά με τις άλλες δύο περιπτώσεις. Ο αποχρωματισμός που παρατηρείται στο native gel μετά από το ζυμογράφημα είναι εντονότερος σε όλα τα πειράματα που διενεργήσαμε. Προς αυτή την κατεύθυνση δείχνουν και οι μετρήσεις από τα assays με υποστρώματα NBT/XTT, παρόλο που δεν είναι τόσο κραυγαλέες οι διαφορές που παρατηρήθηκαν.

- ✓ Τα παραπάνω γραφήματα αφορούν μετρήσεις για απορρόφηση στο βέλτιστο μήκος κύματος κάθε μεθόδου, δηλαδη στα 470 και 560 nm αντίστοιχα για την ενζυμική μέθοδο που περιλαμβάνει το XTT/NBT, για τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *SODA4V* μετά από καλλιέργεια σε τρεις διαφορετικές συνθήκες (pET28 37°C, pASK 37°C, pASK 18°C) και καθαρισμό της μέσω της μεθόδου της χρωματογραφίας συγγένειας. Τα πλασμίδια μετασχηματίστηκαν σε στελέχη OrigamiB DE3 των βακτηρίων E. Coli. Σε κάθε γράφημα, έχει υπολογιστεί ο μέσος όρος των triplicates κάθε δείγματος.

Βιβλιογραφία

1. King, J., Haasepettingell, C., Robinson, A.S., Speed, M. & Mitraki, A. Thermolabile folding intermediates: inclusion-body precursors and chaperonin substrates. *FASEB J.* **10**, 57–66 (1996).
2. Makrides, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia-coli*. *Microbiol. Rev.* **60**, 512–538 (1996).
3. Plaxco, K.W., Simons, K.T. & Baker, D. Contact order, transition-state placement and the refolding rates of single-domain proteins. *J. Mol. Biol*. **277**, 985–994 (1998).
4. Wilkinson D.L. & Harrison R.G. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia-coli*. *Bio/Technology* **9,** 443–448 (
5. Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230 (1973).
6. Stemmer, W.P.C. Rapid evolution of a protein in-vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389–391 (1994).
7. Macbeath, G., Kast, P. & Hilvert, D. Redesigning enzyme topology by directed evolution. *Science* **279**, 1958–1961 (1998).
8. Martineau, P., Jones, P. & Winter, G. Expression of an antibody fragment at highlevels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol*. **280**, 117–127 (1998).
9. Proba, K., Worn, A., Honegger, A. & Pluckthun, A. Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J. Mol. Biol*. **275**, 245–253 (1998).
10. Ward, W.W. in *Bioluminescence and chemiluminescence* (eds DeLuca, M.A. & McElroy, W.D.) 235–242 (Academic, New York; 1981).
11. Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. & Ward, W.W. Chemical-structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212–1218 (1993).
12. Fitz-Gibbon, S. *et al.* A fosmid-based genomic map and identification of 474 genes of the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Extremophiles* **13**, 36–51 (1997) 13. Ma J, *et al.* (2004) Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *J Mol Biol* 338:103–114.
14. Kawate T, Gouaux E (2006) Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure* 14:673–681.
15. Wertman KF, Wyman AR, Botstein D (1986) Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene* 49:253–262.
16. Geertsma ER, Duurkens RH, Poolman B (2005) The activity of the lactose transporter from *Streptococcus thermophilus* is increased by phosphorylated IIA and the action of _-galactosidase. *Biochemistry* 44:15889–15897.
17. Geertsma ER, Poolman B (2007) High-throughput cloning and expression in recalcitrant bacteria. *Nat Methods* 4:705–707.
18. Drew D, *et al*. (2005) A scalable, GFP-based pipeline for membrane protein overexpression screening and purification. *Protein Sci* 14:2011–2017.
19. Geertsma ER, Duurkens RH, Poolman B (2003) Identification of the dimer interface of the lactose transport protein from *Streptococcus thermophilus*. *J Mol Biol* 332:1165–1174.
20. Groeneveld M, Slotboom DJ (2007) Rigidity of the subunit interfaces of the trimeric glutamate transporter GltT during translocation. *J Mol Biol* 372:565–570.
21. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouseDNAsinto *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4645–4649.
22. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177:4121–4130.
23. **Kadokura H, Katzen F, Beckwith J.** 2003. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem. **72**:111–135.
24. **Kang JG, et al.** 1999. RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. EMBO J. **18**:4292– 4298.
25. **Kim J, Robinson AS.** 2006. Dissociation of intermolecular disulfide bonds in P22 tailspike protein intermediates in the presence of SDS. Protein Sci. **15**:1791–1793.
26. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680–685.
27. **Le HV, Trotta PP.** 1991. Purification of secreted recombinant proteins from *Escherichia coli*. Bioprocess Technol. **12**:163–181.
28. **Locker JK, Griffiths G.** 1999. An unconventional role for cytoplasmic disulfide bonds in vaccinia virus proteins. J. Cell Biol. **144**:267–279.
29. **Makino T, Skretas G, Georgiou G.** 2011. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. Microb. Cell Fact.
30. **Martínez-Alonso M, Garcia-Fruitos E, Villaverde A.** 2008. Yield, solubility and conformational quality of soluble proteins are not simultaneously favored in recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. **101**:1353–1358.
31. **Martínez-Alonso M, Garcia-Fruitos E, Ferrer N, Rinas U, Villaverde A.** 2010. Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. Microb. Cell Fact. **9**:64.