



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*« Έκφραση του εξωκυτταρικού τμήματος της α₁
υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της
ακετυλοχολίνης σε βακτηριακά στελέχη E.coli »*

Παπαδάκη Ειρήνη

Λάρισα 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5197/1
Ημερ. Εισ.: 07-10-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087185



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*« Έκφραση του εξωκυτταρικού τμήματος της α_1
υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της
ακετυλοχολίνης σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* »*

Παπαδάκη Ειρήνη

Λάρισα 2007

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία τον διευθυντή του εργαστηρίου αυτού τον Καθ. Σωκράτη Τζάρτο καθώς και όλα τα μέλη που απαρτίζουν το συγκεκριμένο εργαστήριο, για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστώ τη Δρ. Ζησιμοπούλου Παρασκευή (μεταδιδακτορικό συνεργάτη του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ), που είχε την επίβλεψη των πειραμάτων και της συγγραφής της παρούσας εργασίας αλλά και τη Δρ Κωστελίδου Καλλιόπη .

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο και τη κα Ζίφα Αιμιλία, καθηγητές του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας που μαζί με τον κο Τζάρτο Σωκράτη αποτελούν τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1-2
1.Εισαγωγή.....	3-15
2.Μέθοδοι.....	16-26
3.Υλικά-Εξοπλισμός.....	27-30
4.Παρουσίαση και ανάλυση αποτελεσμάτων..	31-40
5.Συζήτηση.....	41-43
Βιβλιογραφία.....	44-47

Περίληψη

Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης ανήκουν στην υπερικογένεια των προσδετοελεγχόμενων ιοντικών διαύλων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας συντηρημένης κυστεϊνικής θηλιάς (cl-LGICs) και διακρίνονται σε νευρομυϊκού και νευρικού τύπου. Ο νευρομυϊκός υποδοχέας σχηματίζει ένα πενταμερές με σταθερή στοιχειομετρία $(\alpha 1)_2(\beta 1)_2$ στα ενήλικα άτομα και $(\alpha 1)_2(\beta 1)_2\gamma\delta$ στον εμβρυϊκό οργανισμό και διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη μεταγωγή σήματος στη νευρομυϊκή σύναψη, όπου και εντοπίζεται.

Η Βαριά Μυασθένεια αποτελεί ένα αυτοάνοσο νόσημα όπου τα αντισώματα που παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, κατευθύνονται κατά των νευρομυϊκών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στη νευρομυϊκή σύναψη. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται μείωση του αριθμού των υποδοχέων στις νευρομυϊκές συνάψεις με αποτέλεσμα τη διακοπή της μεταγωγής σήματος και την εμφάνιση παθολογικών χαρακτηριστικών. Λόγω της μη ύπαρξης ολοκληρωμένης θεραπευτικής προσέγγισης, η ανάγκη για εξειδικευμένη απομάκρυνση των αντισωμάτων που στρέφονται κατά των υποδοχέων, οδήγησε στην ιδέα ανοσοπροσρόφησης των αντισωμάτων με χρήση ανασυνδυασμένων τμημάτων του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (**Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας Tzartos et.al., 2002**). Αυτό προϋποθέτει την παραγωγή των εξωκυτταρικών τμημάτων σε μεγάλες ποσότητες, διατηρώντας την ικανότητα τους να αναγνωρίζονται από τα παθολογικά αντισώματα.

Υπάρχει μία πληθώρα συστημάτων έκφρασης με το εντεροβακτήριο *E.coli* να αποτελεί ένα από τα ευρέως διαδεδομένα συστήματα έκφρασης ετερόλογων γονιδίων. Η παρούσα εργασία, στόχο είχε την έκφραση του εξωκυτταρικού τμήματος της α_1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, σε στελέχη *E.coli*. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Rosetta, Origami, BL21 και C41 ενώ το υπό εξέταση γονίδιο ήταν κλωνοποιημένο σε έναν pET φορέα.

Η έκφραση όμως της πρωτεΐνης στους συγκεκριμένους ξενιστές δεν είχε ως αποτέλεσμα την απόκτηση διαλυτής πρωτεΐνης, καθώς δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα στάδιο της εργασίας σε κάποιο αντίστοιχο κλάσμα, όταν οι χειρισμοί γίνονταν υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η πρωτεΐνη ήταν εγκλωβισμένη μέσα σε συσσωματώματα, αν και οι ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν διέθεταν γενετικά τροποποιημένα χαρακτηριστικά, ώστε να εμπλουτίσουν την υπό παραγωγή πρωτεΐνη με κάποια από τα σημαντικότερα στοιχεία που εμφανίζονται όταν η πρωτεΐνη εκφράζεται *in vivo* (προσθήκη σπάνιων κωδικονίων, σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών).

Στη συνέχεια, ακολούθησε απομόνωση της πρωτεΐνης υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η έκφραση με αυτόν τον τρόπο είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή της πρωτεΐνης σε συγκεντρώσεις των 0.896 mg/L για το βακτηριακό στέλεχος Rosetta, 2.48 mg/L για το βακτηριακό στέλεχος Origami, 0.632 mg/L για το βακτηριακό στέλεχος BL21 και 1.36 mg/L για το βακτηριακό στέλεχος C41.

Παρά την αποδιατεταγμένη μορφή της πρωτεΐνης, σε πειράματα ανοσοπροσρόφησης και RIA που ακολούθησαν μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό της από στήλη νικελίου, η πρωτεΐνη ήταν ικανή να προσδέσει παθολογικά αντισώματα και να τα απομακρύνει από ορούς ασθενών που πάσχουν από μυασθένεια.

Η παρατήρηση αυτή, καθιστά το εντεροβακτήριο *E.coli* ένα εξαιρετικό σύστημα έκφρασης του εξωκυτταρικού τμήματος της α_1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, όταν η παραγόμενη πρωτεΐνη προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για κατασκευή στήλης με σκοπό την ειδική απομάκρυνση των αυτοαντισωμάτων που παράγονται κατά την ανάπτυξη του νοσήματος της μυασθένειας.

1. Εισαγωγή

Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης ανήκουν στην υπεροικογένεια των προσδετοελεγχόμενων ιοντικών διαύλων οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας συντηρημένης κυστεϊνικής θηλιάς (cl-LGICs). Η υπεροικογένεια περιλαμβάνει κατιονικούς και ανιονικούς υποδοχείς. Στους κατιονικούς υποδοχείς κατατάσσονται οι νικοτινικοί, οι σεροτονινεργικοί τύπου 3 (5-HT₃Rs) και οι ενεργοποιούμενοι από ιόντα ψευδαργύρου (Karlin *et.al* 1995). Στους ανιονικούς υποδοχείς ανήκουν οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος τύπου A (GABA) και αυτοί της γλυκίνης. Τα μέλη της υπεροικογένειας συναντώνται στα ασπώνδυλα και στα σπονδυλωτά ως ετερομερείς ή ομομερείς διάυλοι-υποδοχείς (Lindstrom, 2000).

Ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης είναι ένας εκ των δύο τύπων μετασυναπτικών υποδοχέων, νικοτινικών και μουσκαρινικών, οι οποίοι δεσμεύουν ακετυλοχολίνη. Οφείλει την ονομασία του στο γεγονός ότι η νικοτίνη προσδένεται αποκλειστικά σ' αυτόν τον υποδοχέα και ακολούθως μιμείται τις δράσεις της ακετυλοχολίνης.

Οι νικοτινικοί υποδοχείς διακρίνονται σε νευρομυϊκούς και νευρικούς. Οι νευρικοί υποδοχείς διακρίνονται περαιτέρω σε δύο τάξεις με βάση τις πρώιμες μελέτες χαρακτηρισμού τους, οι οποίες βασίζονταν σε δοκιμές πρόσδεσης ραδιοσημασμένων νικοτινικών αγωνιστών και ανταγωνιστών. Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει τους υποδοχείς οι οποίοι προσδένουν τους τριτιωμένους αγωνιστές με συγγένεια τάξης μεγέθους nM, όχι όμως και την α-μπουγκαροτοξίνη. Η δεύτερη τάξη περιλαμβάνει τους υποδοχείς οι οποίοι προσδένουν τους τριτιωμένους αγωνιστές με συγγένεια τάξης μεγέθους μM, ενώ την α-μπουγκαροτοξίνη (α-BTX) με συγγένεια τάξης μεγέθους nM.

Ο νευρομυϊκός υποδοχέας

Οι νευρομυϊκοί υποδοχείς εντοπίζονται σε μία εξειδικευμένη περιοχή της μυϊκής μεμβράνης η οποία καλείται τελική πλάκα. Σ' αυτή τη θέση δέχονται από τις εισερχόμενες νευρικές ίνες το χημικό σήμα της ακετυλοχολίνης το οποίο μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα επιτρέποντας την εισροή Na⁺. Αυτή η εισροή κατιόντων επιφέρει τη διάνοιξη των τασοελεγχόμενων διαύλων Na⁺ με αποτέλεσμα τη διέγερση της μυϊκής μεμβράνης. Η δυσλειτουργία των νευρομυϊκών υποδοχέων δεν επιτρέπει τη συναπτική διαβίβαση με αποτέλεσμα την πρόκληση ασθενειών. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η βαριά μυασθένεια για την οποία γίνεται εκτενέστερη αναφορά στη συνέχεια.

Ο νευρομυϊκός υποδοχέας σχηματίζει ένα πενταμερές από τέσσερις διαφορετικές υπομονάδες, τις $\alpha 1$, $\beta 1$, γ ή ϵ και δ , ονομασία κατά σειρά αυξανόμενου μοριακού βάρους, με σταθερή στοιχειομετρία $(\alpha 1)_2(\beta 1)\epsilon\delta$ στον ενήλικο και $(\alpha 1)_2(\beta 1)\gamma\delta$ στον εμβρυϊκό οργανισμό (Beeson *et.al.*, 1996, Vincent *et.al.*, 1998) και στους νικοτινικούς υποδοχείς των ηλεκτρικών οργάνων των ψαριών (Changeux *et.al.*, 1988-1989) Εικόνα 1.

Εξαίρεση στον ενήλικο οργανισμό φαίνεται ότι αποτελούν τα κύτταρα των εξωτερικών οφθαλμικών μυών, τα οποία εκφράζουν τόσο την ϵ , όσο και την γ υπομονάδα.

Ο νευρικός υποδοχέας

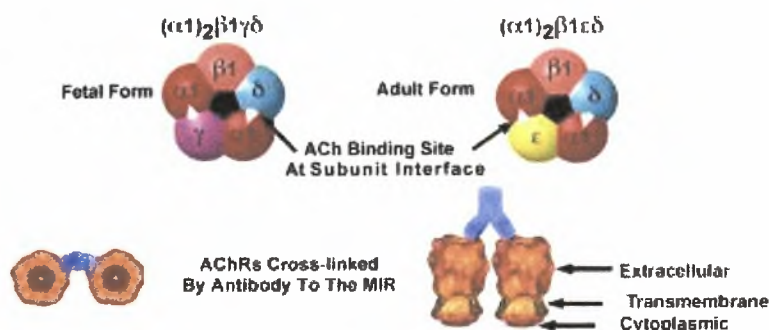
Οι νευρικοί υποδοχείς αποτελούν μία ετερογενή ομάδα ιοντικών διαύλων οι οποίοι εκφράζονται διαφορετικά στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Τα τελευταία χρόνια έχειδειχθεί ότι εντοπίζονται και σε μη νευρικούς ιστούς (Lindstrom, 1999). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η χολινεργική εννεύρωση ρυθμίζει μία σειρά διεργασιών όπως η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, η διέγερση διαφόρων κυττάρων και η συναπτική ολοκλήρωση, οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία των νευρωνικών δικτύων (Corriveau *et.al.*, 1995). Τα νευρωνικά δίκτυα με τη σειρά τους ελέγχουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες όπως η έγερση, ο ύπνος, η κόπωση, το άγχος, η κεντρική επεξεργασία της αισθήσεως του πόνου, η πρόσληψη τροφής καθώς και μία σειρά γνωστικών λειτουργιών (Hogg *et.al.*, 2003). Η προβληματική σηματοδότηση μέσω των νευρικών νικοτινικών υποδοχέων και ειδικότερα του υποτύπου $\alpha 7$ φαίνεται ότι προκαλεί την αδυναμία συγκέντρωσης και τις γνωστικές δυσλειτουργίες οι οποίες παρατηρούνται σε πάσχοντες από σχιζοφρένεια ή Alzheimer (Gotti *et.al.*, 2006).

Σε αντίθεση με τον μυϊκού τύπου υποδοχέα, ο νευρικού τύπου αποτελείται από τις υπομονάδες α και β σχηματίζοντας ομο- ή ετεροπενταμερή. Απαντώνται ευρέως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών και των εντόμων (Cooper *et.al.*, 1991). Η ταξινόμηση των νευρικών υπομονάδων του υποδοχέα γίνεται με βάση την ομολογία αυτών με τις υπομονάδες του μυϊκού τύπου υποδοχέα ακετυλοχολίνης. Βάσει αυτού, νευρικές υπομονάδες τύπου α χαρακτηρίζονται αυτές που διαθέτουν δύο γειτονικά κατάλοιπα κυστεΐνης, ομόλογα με αυτά του μυϊκού τύπου υποδοχέα (θέσεις 192, 193 της αμινοξικής αλληλουχίας). Ομοίως, και για την β υπομονάδα, χρησιμοποιήθηκε η $\beta 1$ του μυϊκού υποδοχέα ως πρότυπο, η οποία δεν διαθέτει το ζεύγος κυστεΐνων, όπως η α υπομονάδα.

Prominent AChR Subtypes

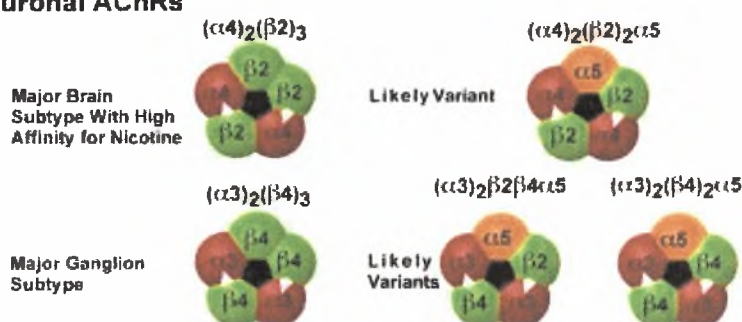
Muscle AChRs

Subunits: $\alpha 1, \beta 1, \gamma, \delta, \epsilon$



Heteromeric Neuronal AChRs

Subunits: $\alpha 2-\alpha 6, \beta 2-\beta 4$



$\alpha 6$ and $\beta 3$ may occupy only positions comparable to $\beta 1$ in which they do not participate in forming ACh binding sites. $\alpha 8$ can participate in forming ACh binding sites, but can also assemble in AChRs with, for example, $\alpha 3$ or $\alpha 4$ subunits.

Homomeric Neuronal AChRs

Subunits: $\alpha 7-\alpha 9$



Εικόνα 1 : Ο μυϊκού τύπου AChR είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από πέντε ομόλογες υπομονάδες με την στοιχειομετρία $\alpha 2\beta\gamma\delta$ (εμβρυϊκού τύπου). Ο νευρικού τύπου υποδοχέας της ακετυλοχολίνης είναι επίσης πενταμερής που αποτελείται από α ή β υπομονάδες (ετεροδιμερής) ή μόνο από α υπομονάδες (ετεροδιμερής). (Lindstrom, 2000).

Οι νικοτινικοί δίαυλοι φαίνεται ότι μπορούν να λάβουν τις ακόλουθες τέσσερις διακριτές διαμορφώσεις: α) ηρεμία, β) ανοιχτή, γ) απευαισθητοποίηση Ι και δ) απευαισθητοποίηση D. Στις δύο διαμορφώσεις απευαισθητοποίησης ο δίαυλος είναι κλειστός, μπορεί όμως να επανέλθει στην πρότερη κατάσταση ενεργοποίησης είτε σε ms (Ι) είτε σε μερικά min (D). Όταν

ο νικοτινικός δίαυλος λαμβάνει μία από τις παραπάνω διαμορφώσεις παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τους αγωνιστές, της τάξης των μM - nM . Η πρόσδεση των αγωνιστών στη θέση του νευροδιαβιβαστή ή σε κάποια αλλοστερική θέση μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ των μεταβατικών διαμορφώσεων του υποδοχέα. Επίσης, η μετάβαση από τη μία διαμόρφωση στην άλλη μπορεί να ρυθμιστεί μέσω φωσφορυλίωσης όπως έχει δειχθεί για την περίπτωση των νευρομυϊκών υποδοχέων (Changeux, 1993).

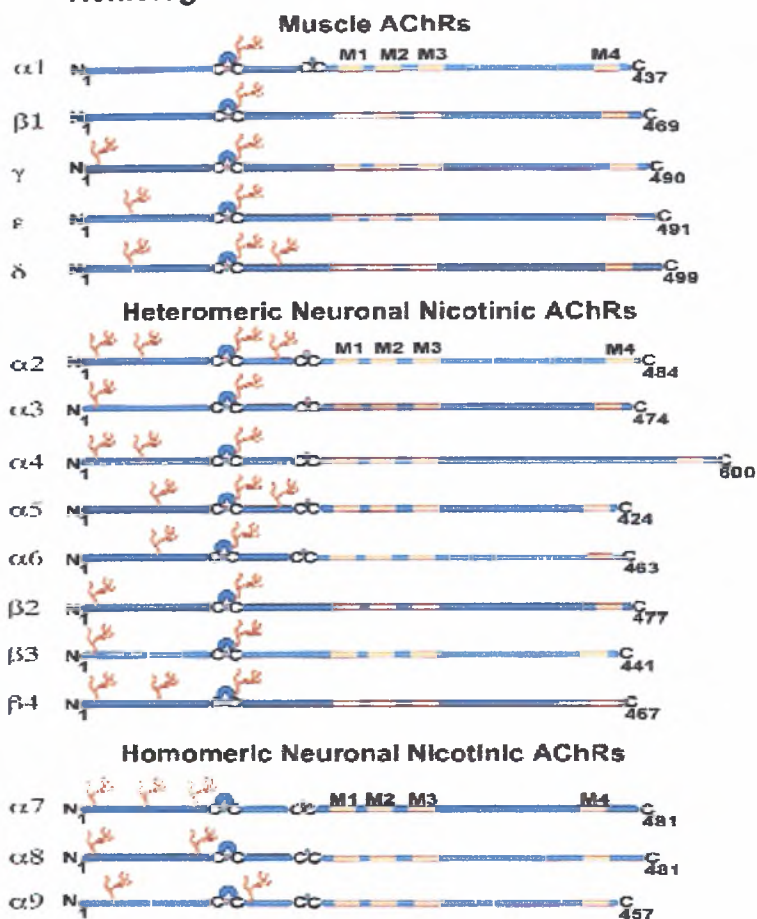
In vivo, μέσω νικοτινικών υποδοχέων άγονται κυρίως Na^+ και K^+ . Ωστόσο αρκετοί νευρικοί υποδοχείς άγουν και Ca^{2+} . Το μέγεθος του στενότερου τμήματος του πόρου αγωγής έχει εκτιμηθεί μελετώντας τη διαπερατότητα των νικοτινικών υποδοχέων από οργανικά κατιόντα διαφόρων μεγεθών (Karlin *et al.*, 1995). Για παράδειγμα, η διάμετρος του στενότερου τμήματος του πόρου του νευρομυϊκού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του *Torpedo californica* αντιστοιχεί σε 7,4 Å ενώ του *Mus musculus* σε 8,4 Å. Η σχετικά μεγάλη διάμετρος του πόρου των νικοτινικών υποδοχέων, ο οποίος φαίνεται ότι παρέχει ένα περιβάλλον πλήρες ύδατος, ερμηνεύει την αδυναμία των νικοτινικών διαύλων να διακρίνουν μεταξύ Na^+ και K^+ .

Όλες οι υπομονάδες του υποδοχέα μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά

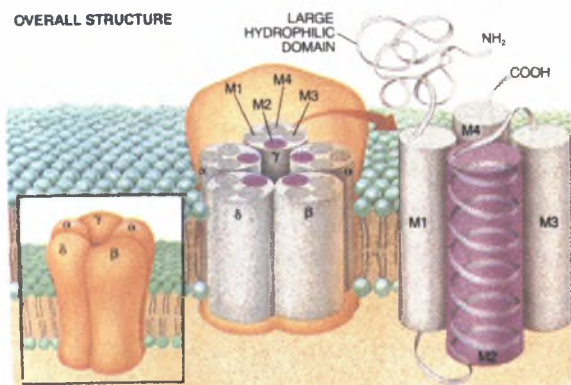
Έχουν κλωνοποιηθεί cDNAs για δεκαέξι υπομονάδες του υποδοχέα από διαφορετικά είδη με αποτέλεσμα να έχουμε συνδυασμούς των εξής υπομονάδων: $\alpha 1$ -9, $\beta 1$ -4, δ , γ και ϵ , όπως χαρακτηριστικά απεικονίζεται και στην εικόνα No 2A,2B (LeNovere *et al.*, 1995, Karlin. *et al.*, 1995)

- Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης πραγματοποιείται απομάκρυνση μιας αλληλουχίας-οδηγού, η οποία εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο.
- Εξωκυτταρική έκταση 220 αμινοξέων του N-τελικού άκρου, ύπαρξη θηλιάς λόγω ανάπτυξης δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα σε δύο περιεχόμενες κυστεΐνες.
- Στις περισσότερες υπομονάδες η θέση 141 αποτελεί θέση γλυκοσυλίωσης ενώ, επιπρόσθετες τέτοιες θέσεις εντοπίζονται στην εξωκυτταρική περιοχή.
- Τρείς διαμεμβρανικές περιοχές (M1-M3), πολύ κοντά η μία στην άλλη, με μορφή α -έλικας και πολύ συντηρημένες, εκτείνονται μεταξύ της μεγάλης εξωκυτταρικής και ενδοκυτταρικής περιοχής.
- Μία τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή (M4), η οποία αποτελείται από 20 περίπου αμινοξέα, τοποθετημένη στο πίσω μέρος της λιπιδιακής διπλοστιβάδας, οδηγώντας σε μία μικρή εξωκυτταρική αλληλουχία των 10-20 αμινοξέων (Anand *et al.*, 1993).

Homologous Structures Of AChR Subunits



Εικόνα 2Α: Ομόλογες δομές των υπομονάδων του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Παρουσιάζονται τα κυρίαρχα κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των υπομονάδων. Αυτά περιλαμβάνουν την παρουσία μίας συντηρημένης κυστεϊνικής θηλιάς (cl-LGICs) στη μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή, ύπαρξη θέσεων γλυκοσυλίσσης, τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (M1-M4) και σηματοδοτικό πεπτιδίο στο αμινοτελικό άκρο της κάθε υπομονάδας το οποίο αποκόπτεται κατά τη διαδικασία της μετάφρασης και δε θεωρείται ως μέρος των ώριμων υπομονάδων (Lindstrom, 2000).



Εικόνα 2Β : Σχηματική αναπαράσταση της τεταρτοταγούς δομής του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Ο υποδοχέας έχει σχήμα περίπου κυλινδρικό. Οι πέντε υπομονάδες του, οι οποίες παρουσιάζονται με τη μορφή κυλίνδρων, είναι διευθετημένες κανονικά γύρω από ένα κεντρικό άξονα, σχηματίζοντας μια δομή με σχετική πενταγωνική συμμετρία. Κάθε υπομονάδα διαθέτει μια μεγάλη υδρόφιλη αμινοτελική εξωκυτταρική περιοχή και τέσσερις υδρόφοβες διαμεμβρανικές περιοχές (M1-M4), οι οποίες παρουσιάζονται επίσης με τη μορφή κυλίνδρων (δεξιά εικόνα) (Changeux, 1993).

Λειτουργία του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης

Στο νευρικό σύστημα η μεταγωγή σήματος διεκπεραιώνεται, δια μέσου των συνάψεων. Οι συνάψεις είναι εξειδικευμένες περιοχές των νευρικών κυττάρων μέσω των οποίων επικοινωνούν με άλλα νευρικά κύτταρα ή με άλλους τύπους κυττάρων π.χ. μυϊκά ή αισθητήρια. Η νευρωνική επικοινωνία συμβαίνει κυρίως μέσω δυο ειδών συνάψεων, ηλεκτρικής ή χημικής φύσεως.

Στις **ηλεκτρικές συνάψεις**, το μήνυμα μεταφέρεται μέσω αλλαγών του δυναμικού της μεμβράνης των νευρώνων. Κύριο ρόλο διαδραματίζουν τα τασεοεξαρτώμενα κανάλια ιόντων των οποίων το άνοιγμα ρυθμίζεται από τις αλλαγές του δυναμικού της μεμβράνης του μετασυναπτικού κυττάρου.

Στη περίπτωση των **χημικών συνάψεων**, κυρίαρχη δράση κατέχουν οι νευροδιαβιβαστές μέσω των οποίων πραγματοποιείται η μεταφορά του μηνύματος από το προσυναπτικό νευρώνα στο μετασυναπτικό κύτταρο. Οι νευροδιαβιβαστές προσδένονται σε ειδικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες-υποδοχείς, υπεύθυνες για τη περαιτέρω μεταγωγή του σήματος. Παραδείγματα νευροδιαβιβαστών αποτελούν η ακετυλοχολίνη που χαρακτηρίζεται και ως ένας από τους πιο σημαντικούς, η γλυκίνη, η επινεφρίνη, η νορεπινεφρίνη, η σεροτονίνη, η γλυκίνη και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ.

Η μετάδοση σήματος στη **νευρομυϊκή σύναψη** έχει αποτελέσει αντικείμενο εντατικής και επισταμένης έρευνας. Στη περίπτωση αυτή παρατηρείται μεταφορά του σήματος από την απόληξη ενός προσυναπτικού νευρικού κυττάρου προς τη **κινητική τελική πλάκα** (είναι μια μορφολογικά διακριτή περιοχή της μυϊκής ίνας στην οποία απολήγει ένας από τους κλάδους της κινητικής νευρικής ίνας που φτάνει στο σκελετικό μυ). Μετά από διέγερση μιας νευρικής κινητικής ίνας, το δυναμικό ενέργειας προκαλεί ελευθέρωση ακετυλοχολίνης από τις νευρικές απολήξεις στην κινητική τελική πλάκα. Η απόληξη του προσυναπτικού νευρώνα πληρούται με συναπτικά κυστίδια κάθε ένα από τα οποία περιέχει περίπου 10^4 μόρια ακετυλοχολίνης. Η άφιξη της νευρικής ώσης ενεργοποιεί τα κανάλια ασβεστίου της απόληξης με αποτέλεσμα την είσοδο ιόντων Ca^{++} στην νευρική ίνα. Η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{++} έχει ως αποτέλεσμα την εξωκυττάρωση των κυστιδίων της ακετυλοχολίνης, φαινόμενο το οποίο αυξάνει τη συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στη συναπτική σχισμή από 10nM σε 500μM σε χρόνο λιγότερο από ένα χιλιοστό του δευτερολέπτου. Η ακετυλοχολίνη διαχέεται προς τη μεμβράνη της μυϊκής ίνας όπου και συνδέεται στους υποδοχείς της. Η δέσμευση της ακετυλοχολίνης αλλάζει σημαντικά την ιοντική διαπερατότητα της μεμβράνης της μυϊκής ίνας. Η αγωγιμότητα των Na^+ και των K^+ αυξάνεται σημαντικά μέσα σε 0.1ms, οδηγώντας σε ένα μεγάλο ρεύμα εισροής Na^+ και ένα μικρότερο ρεύμα εκροής K^+ . Το ρεύμα εισροής Na^+ οδηγεί σε εκπόλωση της μεμβράνης και πυροδότηση ενός δυναμικού ενεργείας. Το δυναμικό ενεργείας μεταφέρεται μέσω των T σωληνίσκων κατά μήκος της μυϊκής ίνας με αποτέλεσμα

τη σύσπαση του μυός. Η επαναπόλωση της μεμβράνης της μυϊκής ίνας, οφείλεται στην απομάκρυνση του νευροδιαβιβαστή (ακετυλοχολίνη) από τη συναπτική σχισμή λόγω της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης η οποία υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ. Η χολίνη προσλαμβάνεται πίσω, από τη προσυναπτική μεμβράνη για να σχηματίσει ξανά ακετυλοχολίνη.

Βαριά Μυασθένεια

Η **Βαριά Μυασθένεια** ανήκει στη κατηγορία των αυτοάνοσων νοσημάτων. Κύρια κλινικά χαρακτηριστικά αποτελούν η αδυναμία και η κόπωση των σκελετικών μυών. Η νόσος αυτή έχει διαδραματίσει κυρίαρχο ρόλο στη μέχρι σήμερα αποκτημένη γνώση γύρω από τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης καθώς μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε τη δεκαετία του 1970 και η οποία παρουσίασε την εμπλοκή του υποδοχέα με την ανθρώπινη νόσο Βαριά Μυασθένεια, (Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. Science 1973;180:871–872) αποτέλεσε το εφαλτήριο βήμα της προσπάθειας κατανόησης της δομής και λειτουργίας του μορίου του υποδοχέα. Σε μυασθενικούς ασθενείς, οι νευρομυϊκές συνάψεις παρουσιάζουν μορφολογικές αλλαγές όπως μείωση των μετασυναπτικών πτυχών και αύξηση της σχισμής μεταξύ προ και μετασυναπτικής μεμβράνης. Το ανοσοποιητικό σύστημα των ατόμων αυτών αναγνωρίζει και χαρακτηρίζει τους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης ως αντιγόνα και επάγει ανοσιακή απάντηση εναντίων τους. Παρατηρείται αναστολή της πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης και μείωση των υποδοχέων της.

Έχουν παρατηρηθεί *τρεις μηχανισμοί δράσης των αυτοαντισωμάτων* σε ασθενείς με βαριά μυασθένεια :

α)Αύξηση του ρυθμού ενδοκυττάρωσης και αποικοδόμησης των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (Kao *et.al.*, 1977). Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται από τον όρο *αντιγονική τροποποίηση* και στηρίζεται στην ικανότητα των αυτοαντισωμάτων να διασυνδέουν παρακείμενους υποδοχείς ακετυλοχολίνης. Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα αντισώματος–υποδοχέα εμφανίζουν ταχύτερο ρυθμό ενδοκυττάρωσης και αποικοδόμησης απ ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες.

β)Λύση της μετασυναπτικής μεμβράνης με ενεργοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος. Οι μορφολογικές αλλαγές στη νευρομυϊκή σύναψη των μυασθενικών αποδίδονται στη δράση στοιχείων του συμπληρώματος (Engel *et al.*, 1976).

γ)Αναστολή πρόσδεσης του μορίου της ακετυλοχολίνης λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Το αυξημένο μέγεθος των αυτοαντισωμάτων, όταν αυτά συνδέονται στον υποδοχέα προκαλεί παρεμπόδιση στη πρόσδεση του μορίου της ακετυλοχολίνης παρά το γεγονός πως φαίνεται να διαφέρουν οι θέσεις σύνδεσης τους.

Μελέτες με στόχο την εύρεση της περιοχής του υποδοχέα που εμφανίζει ανοσογόνο δράση συγκλίνουν σε μία περιοχή που ονομάζεται MIR. Αν και δεν αποτελεί τη μοναδική περιοχή με τη συγκεκριμένη ιδιότητα, αποτελεί τη κύρια ανοσογόνο περιοχή (MIR) καθώς την

αναγνωρίζουν πάνω από τα μισά των αντισωμάτων των ασθενών με βαριά μυασθένεια (MG) ή τα πειραματόζωα (αρουραίοι) με πειραματική βαριά μυασθένεια EAMG (Papanastasiou *et.al.*, 1999, Tzartos *et.al.*, 1998, Tzartos *et.al.*, 1980). Η κύρια ανοσογόνος περιοχή (MIR) αποτελεί μια περιοχή γειτονικών αμοιβαία αλληλοεπικαλυπτόμενων επιτόπων παρά ένα ενιαίο επίτοπο που αναγνωρίζεται από αντισώματα ενός ιδιοτύπου. Είναι μια περιοχή εξαρτώμενη από τη διαμόρφωση και των γειτονικών προσκείμενων σ' αυτή περιοχών (conformation-dependent region) και η οποία εντοπίζεται στο εξωκυτταρικό τμήμα της α₁ υπομονάδας (α67-76) (Beroukhim *et.al.*, 1995). Εκτείνεται εξωτερικά από τον κεντρικό άξονα του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Λόγω αυτού του προσανατολισμού, ένα ενιαίο αντίσωμα δεν μπορεί να προσδεθεί σε δύο α₁ υπομονάδες του ίδιου υποδοχέα αλλά έχει την κατάλληλη διαμόρφωση για να διασυνδέσει παρακείμενους AchRs (Conti-Tronconi *et.al.*, 1981). Τα αντισώματα που δεσμεύονται στο MIR δεν εμποδίζουν τη δέσμευση της ACh ή αBgt αλλά ούτε επηρεάζουν αλλοστερικά τη λειτουργία του AChR (Lindstrom *et.al.*, 1981, Wan *et.al.*, 1985). Η υψηλή ανοσογονικότητα που εμφανίζει η περιοχή MIR, πιθανώς οφείλεται στην ασυνήθιστη διαμόρφωση της και στο γεγονός ότι υπάρχουν δύο σε κάθε μόριο υποδοχέα με αποτέλεσμα την αυξημένη ανοσιακή απάντηση που οδηγεί σε εσωτερίκευση (internalization) και καταστροφή των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης. Αυτές οι θεμελιώδεις ιδιότητες της κύριας ανοσογόνου περιοχής πυροδοτούν τους βασικούς παθολογικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος κατά των AChRs.

Άξιο αναφοράς αποτελεί και το γεγονός ότι η αμινοξική αλληλουχία της κύριας ανοσογόνου περιοχής του υποδοχέα εμφανίζει ομολογία ανάμεσα στα διάφορα είδη.

Τι αποτελεί το έναυσμα της ανοσιακής απάντησης κατά των μυϊκών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στην βαριά μυασθένεια δεν είναι ακόμη γνωστό. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα στις διαφορετικές μορφές της ασθένειας.


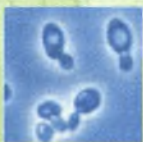
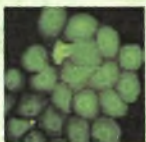

Δεν υπάρχει ολοκληρωμένη εξειδικευμένη θεραπεία για τη βαριά μυασθένεια. Η συνήθης αγωγή περιλαμβάνει τη λήψη φαρμακευτικών σκευασμάτων ή τη χειρουργική αφαίρεση του θύμου σε συνδυασμό με τη κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή ή ακόμα και τη πραγματοποίηση πλασμαφαίρεσης. Η πλασμαφαίρεση αν και αποτελεί μια σημαντική θεραπευτική αγωγή για τη μυασθένεια, απομακρύνει και άλλα πολύτιμα συστατικά του πλάσματος. Οι παραπάνω προσεγγίσεις αν και δε συνιστούν μία ολοκληρωμένη θεραπεία ελέγχουν τη πορεία της ασθένειας και έχουν δραματικά συνεισφέρει στη μείωση του ποσοστού θανάτου των ασθενών με Βαριά μυασθένεια.

Η ανάγκη για εύρεση στοχευμένης θεραπείας οδήγησε στη γένεση της ιδέας ανοσοπροσρόφησης των αντισωμάτων με χρήση ανασυνδυασμένων τμημάτων του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (**Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας** Tzartos *et.al.*, 2002). Η εξωσωματική απομάκρυνση των αυτοαντισωμάτων με ανοσοπροσρόφηση σε υποδοχέα ακινητοποιημένο σε αδιάλυτο υπόστρωμα προσφέρει μια λύση, μολονότι η εφαρμογή αυτής της διαδικασίας για θεραπεία δυσχεραίνεται από την έλλειψη φυσικού υποδοχέα σε μεγάλες ποσότητες.

Ετερόλογο σύστημα έκφρασης των υπομονάδων του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης

Η καθιέρωση της απομάκρυνσης των αυτοαντισωμάτων με ανοσοπροσρόφηση έχει ως πρώτη βασική προϋπόθεση την εύρεση όχι μόνο του κατάλληλου συστήματος έκφρασης αλλά και διερεύνηση των συνθηκών λειτουργίας του, με απώτερο σκοπό τόσο τη μεγάλη σε κλίμακα παραγωγή των ανασυνδυασμένων τμημάτων του υποδοχέα, αλλά και την μέγιστη δυνατή εμφάνιση ανοσοπροσρόφησης των παθογόνων αντισωμάτων από τα παραγόμενα αυτά ανασυνδυασμένα τμήματα του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

Έχει εδραιωθεί μια πληθώρα συστημάτων για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *in vitro*. Η επιλογή του εκάστοτε συστήματος εξαρτάται από το γονίδιο στόχο, αλλά και από τον απώτερο στόχο του πειράματος. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το σύστημα έκφρασης ρET σε βακτήρια *E.coli*. Για το σκοπό αυτό έχει επιλεγεί το εξωκυτταρικό τμήμα της υπομονάδας α₁.

Bacteria	Yeast	Insect & Mammalian Cells	Transgenic Plants & Animals
			
<ul style="list-style-type: none">• Insufficient folding of complex proteins of higher organisms• Lack of post-translational modifications• Endotoxins	<ul style="list-style-type: none">• Posttranslational modifications differs largely from mammalian cells• Problematic cell disruption	<ul style="list-style-type: none">• Laborious construction of over-expressing strains• Expensive media• Low growth rates• Difficult scale-up• Low expression levels	<ul style="list-style-type: none">• Long developmental cycles• Complex downstream processing• Contamination problems

Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση διαφορετικών συστημάτων έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς και τα χαρακτηριστικά τους

Το **pETsystem** ανήκει στα ισχυρότερα συστήματα για κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε *E.coli*. Τα γονίδια στόχοι κλωνοποιούνται σε πλασμίδια ρET υπό τον έλεγχο ενός T7 προαγωγέα. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταφέρεται σε *E.coli* στέλεχος που περιέχει χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης (T7 gene 1). Οι ξενιστές αυτοί είναι λυσογόνα παράγωγα του βακτηριοφάγου DE3, ενός λ παραγωγού που περιέχει την ανοσιακή περιοχή (immunity region) του φάγου 21 καθώς και μια DNA αλληλουχία που περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί τον καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης lac I, τον προαγωγέα lacUV5 και το γονίδιο της T7

RNA πολυμεράσης (Novy *et al.*, 2001, Studier *et al.*, 1986). Από τη στιγμή που θα σχηματιστεί το λυσογόνο DE3, ο μοναδικός προαγωγέας υπεύθυνος για τη μεταγραφή του γονιδίου της RNA πολυμεράσης είναι ο lacUV5. Ο προαγωγέας αυτός επάγεται με τη προσθήκη IPTG ή κάνοντας χρήση αυτοεπαγόμενου θρεπτικού μέσου. Η T7 RNA πολυμεράση αποτελεί ένα τόσο εκλεκτικό και ενεργό ένζυμο, ώστε όταν ενεργοποιείται πλήρως (μετά από προσθήκη IPTG) σχεδόν ολόκληρος ο μηχανισμός πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου στρατολογείται για την έκφραση του γονιδίου στόχου. Το επιθυμητό προϊόν μπορεί να αποτελεί και πάνω από το 50% της συνολικά παραγόμενης πρωτεΐνης μόνο με μερικές ώρες επαγωγής Εικόνα 4.

Τα στελέχη που έχουν επιλεγεί ως ξενιστές στη παρούσα μελέτη είναι τα ακόλουθα :

BL21(DE3) , Origami(DE3)pLysS , Rosetta(DE3)pLysS,C41(DE)pLys

STRAIN	GENOTYPE	DESCRIPTION
BL21(DE3)9	F – ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm (DE3)	general purpose expression3 host
Origami(DE3)pLysS5	Aara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F '[lac+ lacIq pro] (DE3) gor522 ::Tn10 trxB pLysS (CamR, KanR, StrR, TetR)	high-stringency3, 4 expression host; two mutations in cytoplasmic disulfide reduction pathway enhance disulfide bond formation in E. coli cytoplasm
Rosetta(DE3)pLysS9	F – ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm (DE3) pLysSRARE6 (CamR)	high-stringency3, 4 expression host; provides six rare codon tRNAs
C41	F' ompT hsdSB _g (rB ⁺ mB ⁺) gal dcm (DE3)}	at least one uncharacterized mutation which prevents the cell death associated with the expression of toxic recombinant proteins

Όλα τα B στελέχη (B834, **BL21**, BLR) εμφανίζουν ανεπάρκεια της Ion πρωτεάσης και στερούνται της ompT πρωτεάσης της εξωτερικής μεμβράνης (ompT outer membrane protease) η οποία μπορεί να οδηγούσε σε αποικοδόμηση των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού και απομόνωσης αυτών (Grodberg *et al.*, 1988). Επίσης, μερικές πρωτεΐνες στόχοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε αυτά τα στελέχη. Το στέλεχος BL21(DE3) είναι εκείνο που χρησιμοποιείται περισσότερο ως ξενιστής για τη παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Πολλές πρωτεΐνες απαιτούν το σχηματισμό των σταθερών δισουλφιδικών δεσμών ώστε να αποκτήσουν την κατάλληλη διαμόρφωση στο χώρο και να εμφανίσουν πλήρη δραστηριότητα. Χωρίς το σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών είναι πιθανό να ακολουθήσει αποικοδόμηση της παραγόμενης πρωτεΐνης ή συσσώρευση της σε συσσωματώματα

(inclusion bodies). Ένας από τους περιοριστικούς παράγοντες που οδηγεί σε μη αναμενόμενη αναδίπλωση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα ενός *E.coli* στελέχους, αποτελεί το υψηλό αναγωγικό δυναμικό που επικρατεί σ αυτό. Συνήθως οι δισουλφιδικοί δεσμοί διαμορφώνονται μόνο όταν η πρωτεΐνη μεταφέρεται στο περιπλασμικό χώρο. Μεταλλάξεις σε αναγωγάση γλουταθειόνης (glutathione reductase, gor) και αναγωγάση θυρεοδοξίνης (thioredoxin reductase, trxB) σε βακτηριακά στελεχη, αυξάνουν εκθετικά την ικανότητα τους να σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς στο κυτταρόπλασμα της *E.coli* (Prinz *et al.*, 1997). Η οικογένεια των στελεχών **Origami** φέρουν τις trxB και gor μεταλλάξεις για αυξημένη ικανότητα σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών. Μελέτες έχουν δείξει ότι έκφραση σε στελέχη Origami(DE3) είχε ως αποτέλεσμα 10 φορές πιο δραστική πρωτεΐνη σε σύγκριση με παράγωγη σε άλλο φορέα ακόμη και όταν τα επίπεδα έκφρασης ήταν παρόμοια (Prinz *et al.*, 1997).

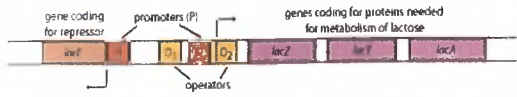
Πολλά αμινοξέα κωδικοποιούνται από περισσότερα από ένα κωδικόνια και κάθε οργανισμός διαθέτει συγκεκριμένο ποσοστό t-RNAs ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Όταν παράγεται mRNA από ετερόλογο γονίδιο στόχο σε *E. coli*, διαφορές στη χρήση των κωδικονίων μπορεί να εμποδίσει τη διαδικασία της μετάφρασης επειδή κάποια από τα απαιτούμενα tRNAs είναι πιθανό είτε να μην υπάρχουν είτε να σπανίζουν. Ανεπαρκείς tRNA δεξαμενές (pools) οδηγούν σε καθυστέρηση της διαδικασίας της μετάφρασης, πρόωρο τερματισμό ή λανθασμένη ενσωμάτωση στη πεπτιδική αλυσίδα.

Τα στελέχη **Rosetta** είναι έτσι σχεδιασμένα ώστε να αυξάνουν την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών που περιέχουν κωδικόνια που χρησιμοποιούνται σπάνια σε *E. coli* (Brinkmann *et al.*, 1989, Kane 1995, Kurland *et al.*, 1996, Seidel *et al.*, 1992). Με το να προμηθεύουν τα σπάνια αυτά tRNAs, τα στελέχη αυτά, εμφανίζουν πλεονέκτημα σε περιπτώσεις που η μετάφραση του προϊόντος θα περιοριζόταν από τη χρήση των συνηθισμένων κωδικονίων των *E.coli* (Brinkmann *et al.*, 1989, Del Tito *et al.*, 1995, Rosenberg *et al.*, 1993, Seidel *et al.*, 1992). Τα Rosetta περιέχουν tRNAs για τα κωδικόνια AUA, AGG, AGA, CUA, CCC και GGA σε ένα συμβατό πλασμίδιο που προσδίδει και ανθεκτικότητα σε χλωραμφενικόλη.

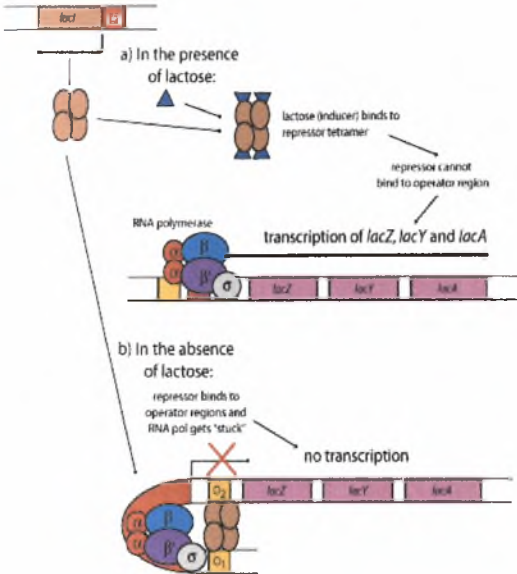
Το πλασμίδιο pLysS

Επιπρόσθετη σταθερότητα επιτυγχάνεται μέσω έκφρασης σε ξενιστές που περιέχουν ένα συμβατό πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε χλωραμφενικόλη και προσφέρει και μικρή ποσότητα T7 λυσοζύμης, ένα φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης (Moffatt *et al.*, 1987, Studier, 1991). Η T7 λυσοζύμη είναι ένα διλειειτουργικό ένζυμο· διασπά ένα ειδικό δεσμό σε στρώμα πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος της *E. coli* (Inouye *et al.*, 1973) αλλά

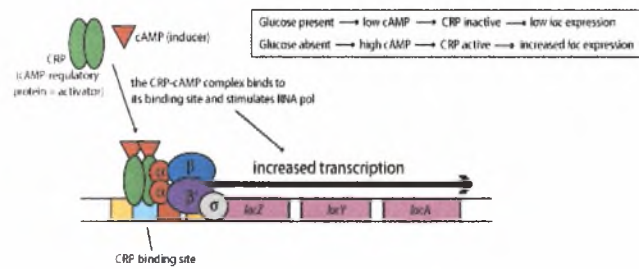
The lactose (*lac*) operon



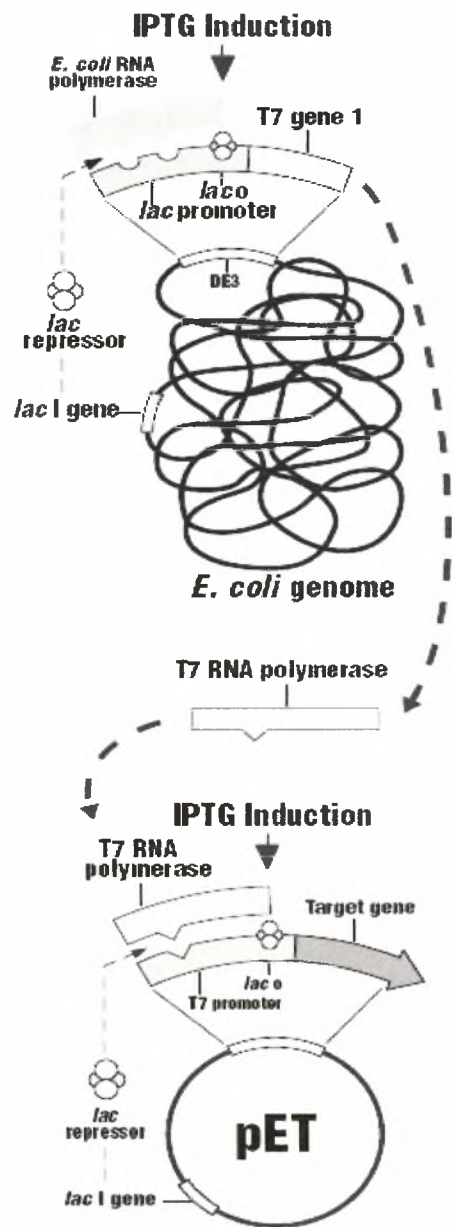
I. Negative regulation of the *lac* operon



II. Positive regulation of the *lac* operon (catabolite repression)



Εικόνα 4Α : Σχηματική απεικόνιση του οπερονίου της λακτόζης αλλά και βασικά στοιχεία της ρύθμισης του



Εικόνα 4Β : Το pET σύστημα . Αρχές λειτουργίας παρουσία και απουσία επαγωγέα

και προσδένεται σε T7 RNA πολυμεράση, εμποδίζοντας τη μεταγραφή (Huang *et al.*, 1999, X. Zhang *et al.*, 1997). Το ένζυμο παράγεται από ένα κλώνο του γονιδίου της T7 λυσοζύμης που εντοπίζεται σε μία *BamH I* θέση του pACYC184 (Chang *et al.*, 1978). Το κλωνοποιημένο τμήμα (bp 10.665–11.296 of T7 DNA) περιέχει επίσης το φ3.8 προαγωγέα για τη T7 RNA πολυμεράση αμέσως μετά το γονίδιο της λυσοζύμης (Dunn *et al.*, 1983). Το πλασμίδιο που περιέχει το συγκεκριμένο τμήμα DNA διευθετημένο ώστε το γονίδιο της λυσοζύμης να εκφράζεται από ένα *tet* προαγωγέα του pACYC184 αναφέρεται ως pLysE. Τα κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο αυτό συσσωρεύουν σημαντικά ποσά λυσοζύμης. Ένα πλασμίδιο που περιέχει το υπό ανάλυση τμήμα DNA διευθετημένο σε αντίθετη κατεύθυνση αναφέρεται ως **pLysS** και τα κύτταρα που το περιέχουν συσσωρεύουν πολύ μικρότερα ποσοστά λυσοζύμης. Η έκφραση της λυσοζύμης από ξενιστές που περιέχουν το **pLysS** πλασμίδιο εξαρτάται και από τις συνθήκες καλλιέργειας.

Η παρουσία είτε του ενός τύπου πλασμιδίου είτε του άλλου, αυξάνει την ανοχή του λυσογόνου λΔΕ3 για πλασμίδια που περιέχουν ενθέματα με τοξική δράση. Με αυτό το τρόπο, επιτυγχάνεται η υψηλή έκφραση πρωτεϊνών με τοξική δράση.

Pet-15b ως φορέας κλωνοποίησης

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (pET-a₁) είχε κατασκευαστεί στο παρελθόν και διατέθηκε για τις μελέτες της παρούσας εργασίας. Οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες διαθέτουν 6xHIS ουρά στο αμινοτελικό άκρο για καλύτερο καθαρισμό και εντοπισμό της πρωτεΐνης.

2. Μέθοδοι

2.1 Βακτηριακές καλλιέργειες

2.1.1 Προετοιμασία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

- Εμβολιάζονται 50 ml L-broth με βακτήρια από μια μοναδική αποικία από τρυβλίο που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος και καλλιεργούνται για 12-16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση μέσα σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας.
- Εμβολιάζονται 500 ml LB με 5ml της παραπάνω καλλιέργειας και η καλλιέργεια αφήνεται μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm να είναι μεταξύ 0.5-0.7 (αυξητική φάση).
- Η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο ώστε να κρυώσει όσο πιο γρήγορα γίνεται. Από αυτό το στάδιο και μετά είναι απαραίτητο τα κύτταρα να διατηρούνται στους 4⁰ C.
- Φυγοκέντρηση σε 4000rpm επί 15 min στους 4⁰ C.
- Επαναδιάλυση των βακτηρίων σε 250 ml κρύου στείρου διαλύματος 0.1M CaCl₂ (τα ιόντα ασβεστίου προσκολλώνται στη μεμβράνη των κυττάρων και βοηθάνε κατά αυτό τον τρόπο τον προσανατολισμό των μορίων DNA).
- Επώαση στον πάγο για 30 min.
- Φυγοκέντρηση σε 4000rpm επί 15 min στους 4⁰ C.
- Επαναδιάλυση των βακτηρίων σε 50 ml κρύου στείρου διαλύματος 0.1M CaCl₂ και επώαση σε πάγο για 30 min. Η επώαση σε πάγο σε αυτό το στάδιο είναι προαιρετική και ο χρόνος ποικίλλει ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος.
- Προστίθενται 5 ml στείρας γλυκερόλης 100% και ανακατεύονται με ήπιο τρόπο.
- Τα βακτήρια μοιράζονται ανά 100 μl σε στείρους πλαστικούς σωλήνες του 1.5 ml (eppendorf), οι οποίοι βρίσκονται τοποθετημένοι μέσα σε ξηρό πάγο και αιθανόλη, ώστε να εξασφαλιστεί το άμεσο πάγωμα των κυττάρων.
- Τα βακτήρια φυλάσσονται στους -80⁰ C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Με τη μέθοδο αυτή η ικανότητα των βακτηρίων για μετασχηματισμό κυμαίνεται από 5×10^6 - 2×10^7 / μg DNA. Ο υπολογισμός της ικανότητας μετασχηματισμού μπορεί να βρεθεί εάν ανταποκρίνεται στο παραπάνω εύρος με πειραματικό μετασχηματισμό των βακτηρίων με 1 ng άκοππου πλασμιδίου.

2.1.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Λαμβάνεται από τους -80°C το επιθυμητό βακτηριακό στέλεχος το οποίο έχει καταστεί ικανό προς μετασχηματισμό, και τοποθετείται σε πάγο. Σ' αυτό προστίθενται ανάλογη ποσότητα DNA και παραμένει στον πάγο για 45 min. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβάλλονται σε "heat shock", δηλαδή τοποθετούνται στους 42°C για 90 sec. Επανατοποθετούνται στον πάγο για 2-3 min. Ακολουθεί προσθήκη 1 ml LB-θρεπτικό μέσου (χωρίς αντιβιοτικό). Έπεται επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 45 min – 1h.

2.1.3 Καλλιέργεια βακτηρίων σε τριβλία Petri

Τοποθετούνται 80 μl από το tube των μετασχηματισμένων κυττάρων, κατόπιν ανάδευσης αυτών ώστε να επαναδιαλυθούν όσα έχουν καθιζάνει, σε τριβλίο Petri που περιέχει το κατάλληλο θρεπτικό μέσο και αντιβιοτικό επιλογής. Στη συνέχεια η λούπα η οποία θα χρησιμοποιηθεί για το «άπλωμα» των κυττάρων στο τριβλίο Petri εμβαπτίζεται σε αιθανόλη και πυρακτώνεται. Αρχικά η λούπα τοποθετείται στο «άκρο» του τριβλίου Petri ώστε να «παγώσει» και στη συνέχεια χρησιμοποιείται για το «άπλωμα» των κυττάρων. Για να επιτευχθεί το πυκνό «άπλωμα» τα κύτταρα υποβάλλονται σε "short spin" ώστε να καθιζάνουν πλήρως. Ακολούθως αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 80 μl LB, τα οποία τοποθετούνται στο τριβλίο Petri. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία που μόλις περιγράφηκε. Έπειτα η καλλιέργεια των βακτηρίων παραμένει σε RT για 10 min. Τελικά τα τριβλία Petri τοποθετούνται ανάποδα στους 37°C O/N. Το θρεπτικό μέσο LB με αμπικιλίνη (100 $\mu\text{g/ml}$) χρησιμοποιείται στην περίπτωση του pET-15b.

2.1.4 Μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Τοποθετούνται 5 ml LB ή low salt LB-θρεπτικό μέσο στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη σε tubes των 15 ml. Έπειτα λαβάνονται κλώνοι από το τριβλίο Petri με τη βοήθεια πιπέτας. Αρχικά αφήνεται με το "tip" μέρος της αποικίας σε άλλο τριβλίο με LB-amp, ώστε να παρασκευαστούν "masterplates" και τελικά το "tip" τοποθετείται στο υγρό θρεπτικό μέσο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C O/N.

2.1.5 Επαγωγή- έκφραση

Την επόμενη ημέρα 1 ml αυτής της καλλιέργειας χρησιμοποιείται στον ενοφθαλμισμό καλλιέργειας μεγαλύτερης κλίμακας, όπου και ελέγχεται η OD. Η επαγωγή με IPTG (1μM) ξεκινάει όταν η OD₆₀₀ βρίσκεται μεταξύ 0,6-0,9. Τα κύτταρα συλλέγονται 4h μετά την επαγωγή με φυγοκέντρηση (10 min, 4000rpm).

2.2 Επεξεργασία πλασμιδιακού DNA

2.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Βήματα:

- i) Μεταφέρεται 1,5 ml από τα tubes των 15 ml σε μικρά tubes, αφού τα κύτταρα τα οποία έχουν αναπτυχθεί στο υγρό θρεπτικό μέσο επαναιωρηθούν σ' αυτό με "vortex",.
- ii) Φυγοκέντρηση για ~1-2 min σε μέγιστη ταχύτητα και απότομη απόχυση υπερκειμένου ώστε να μην αποκολληθεί το ίζημα των κυττάρων. Στη συνέχεια ό,τι έχει απομείνει από το υπερκείμενο απομακρύνεται με πιπέτα παστέρ.
- iii) Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl του διαλύματος I με "vortex".
- iv) Προσθήκη 200 μl του διαλύματος II, το οποίο προκαλεί αλκαλική λύση των κυττάρων, και «απαλή» ανακίνηση 3-4 φορές. Μετά την προσθήκη του διαλύματος II τα tubes δεν πρέπει να παραμείνουν πάνω από 10 min σε RT.
- v) Προσθήκη 150 μl του διαλύματος III, το οποίο επαναφέρει το pH σε φυσιολογικά επίπεδα, και ανακίνηση έως ότου αρχίσει να σχηματίζεται ίζημα.
- vi) Φυγοκέντρηση για 10-15 min σε μέγιστη ταχύτητα. Μεταφορά υπερκειμένου (400 μl) σε αποστειρωμένα tubes προσεχτικά ώστε να μη ληφθεί και το ίζημα.
- vii) Προσθήκη 2X του όγκου του υπερκειμένου (800 μl) ισοπροπανόλης και "vortex" προς καλή ανάμιξη.
- viii) Φυγοκέντρηση για 10-15 min σε μέγιστη ταχύτητα. Άμεση απομάκρυνση της ισοπροπανόλης με απόχυση. Ότι απομένει απομακρύνεται με πιπέτα παστέρ.
- ix) Πλύση με προσθήκη 200 μl 70% αιθανόλης.
- x) Φυγοκέντρηση για 3-5 min σε μέγιστη ταχύτητα. Απόχυση υπερκειμένου και ό,τι έχει απομείνει από την αιθανόλη απομακρύνεται με πιπέτα παστέρ. Για να επιτευχθεί πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης, το ίζημα παραμένει στους 37°C για 30 min.
- xi) Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl TE/RNase, το οποίο ακολούθως παραμένει για 10 min σε RT.
- xii) Αποθήκευση στους 4°C.

2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Τοποθετούνται σε δίλιπρες φλάσκες 500 ml LB ή low salt LB-θρεπτικού μέσου στο οποίο έχει προστεθεί το αντίστοιχο αντιβιοτικό. Λαμβάνονται με τη βοήθεια πιπέτας από το "masterplate" οι κλώνοι οι οποίοι έχει δείχθει ότι φέρουν το επιθυμητό τμήμα DNA και τοποθετούνται στο υγρό θρεπτικό μέσο. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C O/N.

Βήματα:

- i) Μεταφέρονται τα 500 ml της υγρής καλλιέργειας σε «μπουκάλια» των 500 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min, στα 5000 rpm, στους 4°C (sorvall, GS3 κεφαλή). Απόχυση υπερκείμενου και τοποθέτηση του ιζήματος των κυττάρων σε πάγο.
- ii) Επαναδιάλυση ιζήματος σε 20 ml του διαλύματος I και μεταφορά σε «μπουκάλια» των 250 ml τα οποία παραμένουν στον πάγο για 10 min. Εν τω μεταξύ διεξάγεται η απόψυξη της λυσοζύμης.
- iii) Προσθήκη 1 ml λυσοζύμης από απόθεμα με συγκέντρωση 100mg/ml, «απαλό» ανακάτεμα. Παραμονή 5-10 min σε RT.
- iv) Προσθήκη 40 ml του διαλύματος II, το οποίο διασπά τις μεμβράνες, «απαλό» ανακάτεμα οπότε οι μεμβράνες εμφανίζονται να «επιπλέουν». Το διαλυμένο ίζημα παραμένει στον πάγο για 10 min.
- v) Προσθήκη 30 ml του διαλύματος III, το οποίο κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA. Παραμονή στον πάγο για 10 min.
- vi) Φυγοκέντρηση για 10 min, στα 10000 rpm, στους 4°C (sorvall, GS10 κεφαλή). Το υπερκείμενο (80 ml, ώστε να μη ληφθεί και το ίζημα) μεταφέρεται κατόπιν φιλτραρίσματος με τη βοήθεια συρίγγων των 50 ml οι οποίες φέρουν γάζα (η οποία λειτουργεί ως φίλτρο) σε καθαρά «μπουκάλια» των 250 ml. Εναλλακτικά το υπερκείμενο μεταφέρεται άμεσα σε καθαρά «μπουκάλια» των 250 ml και ξαναφυγοκεντρείται για 15 min, στα 10000 rpm, στους 4°C. Ακολούθως μεταφέρεται και πάλι σε καθαρά «μπουκάλια» των 250 ml.
- vii) Προσθήκη 0,6X όγκου του υπερκείμενου ισοπροπανόλη (δηλαδή 48 ml). Παραμονή σε RT για 15 min.
- viii) Φυγοκέντρηση για 15 min, στα 10000 rpm, σε RT. Απόχυση υπερκείμενου.
- ix) Πλύση του ιζήματος με προσθήκη 3 ml 70% αιθανόλη. Φυγοκέντρηση για 5 min, στα 10000 rpm, σε RT. Απόχυση υπερκείμενου. Το ίζημα παραμένει σε RT για 20-30 min, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.
- x) Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 8 ml TE 10:1 με "vortex" και μεταφορά σε corex.
- xi) Προσθήκη 3 ml LiCl 5M (precooled!), ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας. Τα corex σφραγίζονται με parafilm και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min, στα 10000 rpm, στους 4°C (sorvall, SS34 κεφαλή).
- xii) Μεταφορά υπερκείμενου σε καθαρά corex (11 ml) και προσθήκη ίδιου όγκου ισοπροπανόλης.

Φυγοκέντρωση για 10min, στα 10000 rpm, σε RT και απόχυση υπερκλειμένου.

xiii) Πλύση με προσθήκη 4 ml 70% αιθανόλη. Φυγοκέντρωση για 5 min, στα 10000 rpm, σε RT. Απόχυση υπερκλειμένου και «στέγνωμα» ιζήματος σε RT για 20-30 min.

xiv) Αναδιάλυση του ιζήματος σε 500 μl TE/RNase και μεταφορά σε eppendorf. Το προκύπτον διάλυμα παραμένει για 30 min σε RT ή αποθηκεύεται στους 4°C O/N.

xv) Προσθήκη 500 μl 1,6M NaCl/13% PEG 8000 και ανάδευση. Φυγοκέντρωση για 5 min, στα 13000 rpm, σε RT. Ακολουθεί πλήρης απομάκρυνση του υπερκλειμένου.

xvi) Αναδιάλυση ιζήματος σε 400 μl TE. Προσθήκη 1/12X όγκο διαλύματος CH₃COONa, το οποίο κρυσταλλοποιεί το DNA. Προσθήκη 1 ml 100% αιθανόλη (precooled!) και ανακίνηση. Φυγοκέντρωση για 5 min, στα 13000 rpm, σε RT και απόχυση υπερκλειμένου.

xvii) Πλύση με προσθήκη 500 μl 70% αιθανόλη. Φυγοκέντρωση για 2-3 min, στα 13000 rpm, σε RT, απόχυση υπερκλειμένου και «στέγνωμα» του ιζήματος για 5-10 min στους 37°C.

xviii) Αναδιάλυση σε 300 μl TE (αν το ίζημα δεν επαναδιαλύεται εύκολα, προστίθενται 100 μl TE επιπλέον). Αποθήκευση στους 4°C.

2.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης του DNA με φωτομέτρηση

Λαμβάνεται μία αραίωση του διαλύματος του DNA σε TE από την οποία τοποθετούνται 70 μl σε κυβέτα από χαλαζία. Το δείγμα φωτομετράται στα 260 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα TE. Η συγκέντρωση δίνεται από τον παρακάτω τύπο: $OD_{260} \times \text{αραίωση} \times 50 / 1000$ μg/μl.

2.2.4 Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης για την ανάλυση του DNA

Για το διαχωρισμό τμημάτων DNA μεγέθους 2-6 kb παρασκευάζεται πήκτωμα αгарόζης 1% όπως περιγράφεται παρακάτω. Για παράδειγμα για την παρασκευή 100 ml πηκτώματος αгарόζης 1% χρειάζεται 1 gr αгарόζης το οποίο διαλύεται σε 100 ml 1X TBE. Ακολούθως θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου πάρει βράση. Στη συνέχεια υφίσταται ανακίνηση και υποβάλλεται και πάλι σε βρασμό ώστε να παραχθεί ένα πλήρως ομοιογενές μίγμα. Το διάλυμα παραμένει για μερικά δευτερόλεπτα σε RT και προστίθενται σ' αυτό 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου. Ακολουθεί ανακίνηση αυτού ώστε να αναμιχθούν πλήρως τα συστατικά του και απόχυση στο εκμαγείο. Έπειτα τοποθετούνται τα χτενάκια ώστε να σχηματισθούν τα πηγαδάκια. Το διάλυμα της αгарόζης παραμένει σε RT έως ότου στερεοποιηθεί (για ~30-45 min). Στη συνέχεια το εκμαγείο τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία προστίθεται ο απαραίτητος όγκος από το 1X TBE ώστε να επικαλυφθεί πλήρως το πήκτωμα αгарόζης. Ακολούθως τα χτενάκια απομακρύνονται και φορτώνονται τα επιθυμητά δείγματα στα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί. Εάν τα καλώδια τοποθετηθούν σωστά στη συσκευή ηλεκτροφόρησης θα σχηματιστούν φουσαλίδες στην άνοδο και στην κάθοδο λόγω ηλεκτρόλυσης. Το DNA ως αρνητικά φορτισμένο λόγω των φωσφορικών ομάδων που φέρει

κατευθύνεται προς την άνοδο ενώ το βρωμιούχο αιθίδιο προς την κάθοδο. Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα DNA μέσω ενός πηκτώματος αгарόζης εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος (ή μήκος) και το σχήμα τους. Τα μικρότερα τμήματα DNA μετακινούνται πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Τα τμήματα DNA τα οποία έχουν το ίδιο μέγεθος μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα λόγω διαφορών ως προς τη διαμορφωσή τους. Για παράδειγμα το κυκλικό πλασμιδιακό DNA το οποίο έχει μεταβληθεί σε γραμμικό μόριο μέσω πέψης από ένα περιοριστικό ένζυμο παρουσιάζει ενδιάμεση κινητικότητα σε σχέση με τις δύο δομές που μπορεί να λάβει το κυκλικό πλασμιδιακό DNA, τη "χαλαρή" και την υπερελικωμένη. Η εικόνα του πηκτώματος της αгарόζης γίνεται ορατή με την εκπομπή φωτός του οποίου το μήκος κύματος κυμαίνεται στο φάσμα του υπεριώδους (260-300 nm). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το φθορισμό του βρωμιούχου αιθιδίου και την εμφάνιση του τμήματος του DNA στο πηκτώμα ως μία φθορίζουσα μπάντα.

2.3 Ανάλυση των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών

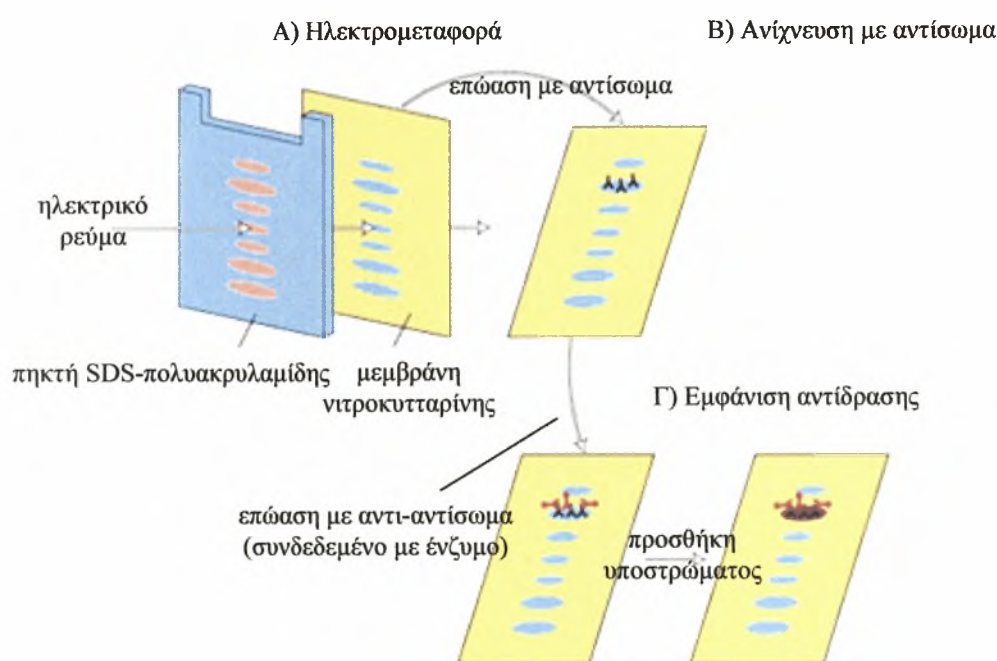
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα SDS-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα SDS-πολυακρυλαμίδης διεξάγεται για τον έλεγχο μείγματος πρωτεϊνών ως προς την περιεκτικότητα σε ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη, αλλά και για να διαπιστωθεί αν στα εκλούσματα από τις στήλες Ni περιέχεται μόνο η επιθυμητή πρωτεΐνη καθώς και σε τι κατάσταση βρίσκεται. Το SDS δρα ως αποδιατακτικό απορρυπαντικό, το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται. Επομένως με την εφαρμογή μίας διαφοράς δυναμικού κατά μήκος του πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel) οι πρωτεΐνες μετακινούνται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο μέσω των πόρων διαφορετικής διαμέτρου που σχηματίζονται σε όλο το μήκος του πηκτώματος κατά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Προκειμένου να ξεκινήσει η μετακίνηση όλων των πρωτεϊνών από το ίδιο «ύψος», τοποθετείται το πηκτώμα πακεταρίσματος (stacking gel) πάνω από το πηκτώμα διαχωρισμού. Στο πηκτώμα πακεταρίσματος δημιουργούνται τα πηγαδάκια στα οποία φορτώνονται τα δείγματα. Εφόσον οι πρωτεΐνες ξεκινούν να «τρέχουν» ταυτόχρονα, οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους μετακινούνται ταχύτερα από αυτές μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Κι αυτό γιατί οι πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους διανύουν με μεγαλύτερη ευκολία τους σχηματιζόμενους πόρους του πηκτώματος ανεξάρτητα από το μέγεθος των διαμέτρων τους. Αφού «στηθεί» το εκμαγείο για την παρασκευή του πηκτώματος της SDS-πολυακρυλαμίδης προστίθεται σ' αυτό νερό ώστε να ελεγχθεί αν υπάρχουν διαρροές. Ακολουθεί απόχυση του νερού και όσο απομένει συλλέγεται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Έπειτα παρασκευάζονται τα πηκτώματα πακεταρίσματος και διαχωρισμού σε δύο falcons. Για την παρασκευή των δύο πηκτωμάτων απαιτούνται τα παρακάτω: α') για την παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού 12% λαμβάνονται σε στείρες συνθήκες 3,35 ml dH₂O, 2,5 ml Tris HCl 1,5M pH 8,8, 100 μl 10% SDS, 4 ml 30% acrylamide/Bis, 50 μl ammonium

persulfate, 5 μ l TEMED, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10 ml, β') για την παρασκευή πηκτώματος πακεταρίσματος 4% λαμβάνονται σε στείρες συνθήκες 6,1 ml dH₂O, 2,5 ml Tris HCl 0,5M pH 6,8, 100 μ l 10% SDS, 1,33 ml 30% acrylamide/Bis, 50 μ l ammonium persulfate, 10 μ l TEMED, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται σε 10 ml. Τα δύο τελευταία συστατικά του δεύτερου πηκτώματος προστίθενται μετά την πήξη του πρώτου, το οποίο αμέσως μόλις παρασκευαστεί αποχύνεται με τη βοήθεια πιπέτας στο εκμαγείο μέχρι ένα ορισμένο ύψος αυτού (~4,5 ml). Η πήξη του πηκτώματος διαχωρισμού διαπιστώνεται από την πήξη της ποσότητας αυτού που παραμένει στο falcon. Κατά τη διάρκεια της πήξης του πηκτώματος διαχωρισμού προστίθεται ισοπροπανόλη μέσω σύριγγας, η οποία δεν αλληλεπιδρά με κανένα από τα συστατικά του πηκτώματος αλλά «εξομαλύνει» το μέτωπο λόγω βαρύτητας. Μετά από την πήξη του πηκτώματος διαχωρισμού απομακρύνεται η ισοπροπανόλη και προστίθεται με τη βοήθεια πιπέτας το πήκτωμα πακεταρίσματος. Στο πήκτωμα πακεταρίσματος τοποθετούνται τα χτενάκια (10 θέσεις) μέχρι ένα ορισμένο βάθος. Αναμονή έως ότου πήξει και το πήκτωμα πακεταρίσματος. Εν τω μεταξύ ετοιμάζονται τα δείγματα τα οποία πρόκειται να φορτωθούν. Το heat block ρυθμίζεται στους 100°C αφού τοποθετηθεί dH₂O στις υποδοχές του, ώστε η θερμοκρασία να κατανέμεται ομοιόμορφα. Λαμβάνονται τα δείγματα από τους 4°C και υφίστανται "vortex" πριν από τη λήψη του επιθυμητού όγκου (20 μ l). Έπειτα προστίθενται 5 μ l sample buffer 5X σε όλα τα δείγματα. Ακολουθεί "short spin" των δειγμάτων και τοποθέτηση αυτών στο heat shock για 5 min. Έπειτα τα δείγματα υφίστανται και πάλι "short spin". Τελικά τοποθετούνται σε πάγο. Μετά από την πήξη του πηκτώματος πακεταρίσματος το εκμαγείο τοποθετείται σε δεξαμενή στην οποία προστίθεται το "running buffer" 1X, του οποίου το απόθεμα είναι 10X. Κάθε δεξαμενή έχει χωρητικότητα 2 lt. Ο απαραίτητος όγκος του "running buffer" 1X παρασκευάζεται ως εξής: 200 ml "running buffer" 10X, 20 ml SDS 10% σε 2 lt dH₂O. Ακολούθως αφαιρούνται τα χτενάκια και φορτώνονται 25 μ l από το κάθε δείγμα σε κάθε πηγαδάκι και 5 μ l marker SM0441. Αρχικά εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού ίση με 100V, έως ότου τα δείγματα διέλθουν από το μέτωπο του πηκτώματος πακεταρίσματος και στη συνέχεια διαφορά δυναμικού ίση με 120V. Μπορεί να εφαρμοστεί και μεγαλύτερη διαφορά δυναμικού (έως και 200V) αλλά τα δείγματα «τρέχουν» καλύτερα όταν εφαρμόζεται μικρή διαφορά δυναμικού. Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν η χρωστική φθάσει στο άκρο του τζαμιού. Έπειτα το πήκτωμα μεταφέρεται σε μεγάλο τριβλίο Petri, στο οποίο προστίθεται το διάλυμα χρώσης του πηκτώματος (stain buffer). Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για ~1h. Έπονται πλύσεις του πηκτώματος με dH₂O και θέρμανση αυτού σε microwave (ένδειξη I) για ~4 min επί 3-4 φορές. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα αποχρωματισμού του πηκτώματος (destain buffer). Επώαση υπό ανάδευση σε RT O/N. Τελικά απομακρύνεται πλήρως το διάλυμα αποχρωματισμού του πηκτώματος με απόχυση και πλύσεις. Το πήκτωμα πακετάρεται σε ειδική μεμβράνη και τοποθετείται σε μέσα σε μικρό μεταλλικό θάλαμο όπου «στεγνώνει» μέσω θερμού ρεύματος αέρα.

2.3.2 Ανοσοαποτυπώματα πρωτεϊνών (Western blot)

Με την τεχνική αυτή, μπορούν να ανιχνευθούν πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης σε ένα μίγμα πρωτεϊνών. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος σε νιτροκυτταρίνη, απ' όπου ανιχνεύονται με την χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, ειδικού για το πρώτο. Ένα ένζυμο που βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το δεύτερο αντίσωμα δημιουργεί ένα έγχρωμο προϊόν παρουσία του κατάλληλου υποστρώματος.



Western Blotting. A) Ηλεκτρομεταφορά, B) Ανίχνευση με αντίσωμα, Γ) Εμφάνιση

2.3.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών

Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

- Ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης (Hybond-C, Amersham) και δύο κομμάτια χαρτιού Whatmann 3MM κόβονται σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από το πήκτωμα.
- Στην συνέχεια εμβαπτίζονται στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.
- Στην πλάκα της συσκευής που θα εφαρμοσθεί ο θετικός πόλος τοποθετούνται τα εξής: ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM, η νιτροκυτταρίνη, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (χωρίς να εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα), ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann 3MM και τέλος, η πλάκα της συσκευής που θα εφαρμοσθεί ο αρνητικός πόλος.

- Η ηλεκτρική μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στους 4°C με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA. Η διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς καθορίζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών. Για πρωτεΐνες με M.B. 10-100 kD μία ώρα ηλεκτρομεταφοράς είναι αρκετή.

2.3.4 Αντίδραση και ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος

- Επώαση της νιτροκυτταρίνης υπό συνεχή ανάδευση, με 3% κ.β. λυοφιλιωμένο γάλα σε PBS, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη διαδικασία αυτή, παρεμποδίζεται η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος.
- Ακολουθεί επώαση της νιτροκυτταρίνης με το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο σε 2.5% γάλα-PBS σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 ώρα (εναλλακτικά στους 4°C, για περίπου 16 h) υπό συνεχή, σιγανή, ανάδευση.
- Πραγματοποιούνται πλύσεις με PBS για την απομάκρυνση του πρώτου αντισώματος.
- Ακολουθεί επώαση της νιτροκυτταρίνης με το δεύτερο αντίσωμα, σε 2.5 %-PBS, για 1-2 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Πραγματοποιούνται πλυσίματα όπως παραπάνω.
- Η εμφάνιση για τα αντισώματα της υπεροξειδάσης με 0.003 % διαμινοβενζιδίνη (DAB), 0.003 % NiCl_2 , 0.003 % H_2O_2 σε διάλυμα PBS.
- Η αντίδραση σταματά με H_2O .

2.4 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA-αγαρόζης

Το υπερκείμενο των καλλιιεργειών που περιέχει την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη επωάζεται με μπίλιες NiNTA–αγαρόζης στους 4°C υπό σταθερή αργή ανάδευση O/N σε αναλογία 1ml μίγματος μπίλιες / 1 l καλλιέργειας.

Η πρωτεΐνη προσδένεται στις μπίλιες νικελίου, καθώς φέρει στο ένα άκρο της 6 ιστοδίνες. Με αυτό τον τρόπο, επιτυγχάνεται η ειδική πρόσδεσης της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης και ο διαχωρισμός της από άλλες που προέρχονται από το σύστημα έκφρασης των βακτηρίων.

Οι μπίλιες πακετάρονται σε κολώνα και η πρωτεΐνη εκλούεται με διαλύματα με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Ο κύριος όγκος της πρωτεΐνης εκλούεται στο διάλυμα συγκέντρωσης 150mM ιμιδαζόλιο.

2.5 Εφαρμογές ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών

2.5.1 Πρόσδεση της πρωτεΐνης σε σφαιρίδια CNBr-ενεργοποιημένης σεφαρόζης 4B.

- Ζυγίζεται η απαιτούμενη ποσότητα σεφαρόζης και διαλύεται σε 1 mM HCl. Η γέλη πλένεται για 15 min με 1 mM HCl σε γυάλινο φίλτρο (1g σεφαρόζης δίνει 3,5 ml γέλης).
- Ακολουθεί πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα NaHCO_3 0,1M pH8,3 στο οποίο εμπεριέχονται 0,5M NaCl .
- Ανάμιξη του ως προς την πρόσδεση μορίου με την γέλη σε μια στήλη χρωματογραφίας και ανάδυσή του με ήπιες μεθόδους για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου ή 16-18 h στους 4°C.
- Απομακρύνεται περίσσεια μη προσδεδεμένου προσδέτη με το διάλυμα πρόσδεσης (τουλάχιστον 5 όγκους στήλης).
- Μπλοκάρισμα των εναπομεινάντων ενεργών ομάδων με διάλυμα 0,1M Tris- HCl pH 8.0 ή αιθανολαμίνη 1M pH 8.0 και επώαση για 2 h.
- Πλύση του προϊόντος με τουλάχιστον τρεις κύκλους εναλλακτικού pH (5 όγκους στήλης έκαστος).
- Κάθε κύκλος θα αποτελείται από μια πρώτη πλύση με 0,1M διαλύματος οξικού pH 4,0 /0,5M NaCl ακολουθούμενος από μια δεύτερη με 0,1M Tris- HCl pH 8.0 /0,5M NaCl.

2.5.2 Μέθοδος ραδιοανοσολογικού προσδιορισμού (RIA με ορούς)

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται για τη μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων σε αντισώματα, τα οποία περιέχονται σε ορούς μυσσθενικών.

- Υπολογίζεται η ποσότητα του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, που απαιτείται για τον αριθμό δειγμάτων χρησιμοποιώντας πάντα 14 fmoles/RIA. Σημαίνεται ο υποδοχέας με 15πλάσια ποσότητα ραδιενεργού ^{125}I -α-Btx και το μίγμα επωάζεται για 5 h στους 4°C. Με την πάροδο των 4 h αραιώνεται ο υποδοχέας ώστε να αντιστοιχούν 10μl υποδοχέα ανά αντίδραση.
- Αραιώνονται οι οροί με διάλυμα PBS/0,2% BSA και επωάζονται για δυο ώρες με την πρωτεΐνη που είναι προσδεδεμένη στα σφαιρίδια σεφαρόζης, επαναδιαλυμένη σε διάλυμα PBS, υπό ανάδευση στο rotor shaker στους 4°C.
- Φυγοκεντρούνται τα δείγματα και στο υπερκείμενο προστίθεται σημασμένος υποδοχέας. Τα δείγματα επωάζονται για 16-18 h στους 4°C.

- Προστίθεται το αντι -αντίσωμα αντι-IgG (human) και επωάζονται τα δείγματα για 1.5 h στους 4°C ώστε να δημιουργηθεί σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ικανού να καθιζάνει κατά την φυγοκέντρωση.
- Προστίθεται 1 ml PBS-Triton 100 και φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 10 min.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο υπό κενό και επαναλαμβάνεται το προηγούμενο στάδιο άλλες δύο φορές.
- Μετράται η ακτινοβολία του ιζήματος στον μετρητή γ-ακτινοβολίας.

Για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση των αντισωμάτων στους ορούς των μυσθενικών, είναι απαραίτητη:

A) Η παράλληλη χρήση φυσιολογικού ανθρώπινου ορού (NHS) ως αρνητικός δείκτης, για τον προσδιορισμό της πρόσδεσης των αντισωμάτων του ορού και

B) Η επώαση του μυσθενικού ορού τόσο με στήλη που φέρει ακινητοποιημένη την προς μελέτη πρωτεΐνη, όσο και με στήλη με ακινητοποιημένη BSA για τον ποσοτικό υπολογισμό των αντισωμάτων του μυσθενικού ορού.

3. Υλικά Εξοπλισμός

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Για όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο H_2O . Όπου χρειαζόταν ακολουθούσε υγρή αποστείρωση σε κλίβανο για 40 min υπό πίεση 15 lb/in^2 ή φιλτράρισμα μέσα από φίλτρα με διάμετρο πόρου $0,2 \mu\text{m}$ (Sterile Acrodisc, Gelman).
- Κοινά χημικά αναλυτικού βαθμού (BDH., Sigma, Chemicals Ltd, Fluka), καθώς και χημικά υψηλού βαθμού καθαρότητας 99% τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνικές Μοριακής Βιολογίας.
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες από τις εταιρείες: Roche, New England Biolabs, Promega, MBI Fermentas.
- Ένζυμα: RNase A (Sigma), Λυσοζύμη (Sigma).
- α-μπουγκαροτοξίνη
- TEMED, APS, DAB, DTT, BSA και ιμιδαζόλιο (Sigma).
- Μάρτυρες μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών (Pharmacia, BIORAD, Fermentas).
- NiNTA-αγαρόζη από QIAGEN.
- Στις DNA ηλεκτροφορήσεις σε πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών (Promega).
- Ως θρεπτικά μέσα για τις βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά: Bacto-tryptone, Bacto-yeast-extract και Bacto-agar της Difco.
- Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αμπικιλίνη.

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Η φωτογράφιση πηκτωμάτων αγαρόζης πραγματοποιήθηκε σε ειδική μηχανή Polaroid.
- Φασματοφωτόμετρο PERKIN ELMER Lambda Bio10.
- Για τις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης Mini-Protean II της BIORAD και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη η συσκευή Mini Trans-Blot της BIORAD.
- Για τις ηλεκτροφορήσεις νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές οριζόντιας ηλεκτροφόρησης της B.R.L.
- Χρησιμοποιήθηκαν οι φυγόκεντροι Eppendorf 5410, Sorvall RC5C (κεφαλές: GS3, GSA, SS34) και Beckman GPR.
- Μετρητής γ-ακτινοβολίας LKB Wallac 1209 Rackbeta.
- Συσκευή ξήρανσης πηκτωμάτων Gel Air Dryer BIORAD.
- Μετρητής γ-ακτινοβολίας LKB Wallac ClineGamma I172, Analytical MDA 212.

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- ο Πλαστικά ακρορύγχια (tips) από Costar.
- ο Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου ή πολυστυρενίου των 15 και 50 ml από Falcon.
- ο Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml από Greiner.
- ο Τρυβλία για στερεές καλλιέργειες από Vive.
- ο Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2 και 0,45 μm από Gelman.
- ο Μembrάνες νιτροκυτταρίνη Hybond C.
- ο Χαρτί διήθησης 1mM και 3mM από Whatmann.
- ο Κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής για μέτρηση απορρόφησης διαλύματος.
- ο Όλα τα γυαλικά και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα ή αποστειρώνονταν με υγρή αποστείρωση όπου ήταν απαραίτητο.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

- ο **Rabbit–anti-Rat (Dako):** συζευγμένο με υπεροξειδάση αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του αρουραίου που έχει παραχθεί σε κουνέλι.
- ο **Goat anti-Human IgG (Lampire USA):** αντίσωμα έναντι των IgG ανοσοσφαιρινών του ανθρώπου που έχει παραχθεί σε κατσίκια και αναγνωρίζει τον ανθρώπινο υποδοχέα.
- ο **mAb198, mAb192:** μονοκλωνικό αντίσωμα του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης που προσδένει στην θέση 198 και 192 αντίστοιχα.
- ο **mAb73:** μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει περιοχή στο εξωκυτταρικό τμήμα της β υπομονάδας του υποδοχέα.
- ο **Goat-anti-mouse:** συζευγμένο με υπεροξειδάση αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του ποντικού που έχει παραχθεί σε κατσίκια.
- ο **Rabbit anti-His:** πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι των 6xHis.
- ο **Mouse anti-Rabbit:** συζευγμένο με υπεροξειδάση αντίσωμα έναντι των IgG ανοσοσφαιρινών του κουνελιού που έχει παραχθεί σε ποντίκι και αναγνωρίζει το anti-his.
- ο **Rart:** Rabbit anti-rat IgG, που παραγεται στο εργαστήριο.

Νικοτινικός AChR ενήλικου (μίγμα Τγ και Τε):

Παράγεται από το μεμβρανικό κλάσμα της κυτταρικής σειράς CN21/TE 671 και απομονώνεται έπειτα από εκχύλιση και διαλυτοποίησή. Η κυτταρική σειρά CN21 εκφράζει κυρίως ενήλικου τύπου υποδοχέα (α₂βγδ) και λίγο εμβρυϊκού τύπου(α₂ βεδ). Η κυτταρική σειρά TE671 εκφράζει εμβρυϊκού τύπου υποδοχέα (α₂ βεδ).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ρυθμιστικά διαλύματα

5x TBE

Tris - βορικό οξύ	0.9 M
EDTA (pH 8)	20 mM

TE (10:1)

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
-------------------	-------

EDTA (pH 8.0) 1 mM

6x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης δείγματος DNA (loading buffer)

μπλε χρωστική της βρωμοφαινόλης 0.025% κ.β.
γλυκερόλη 40% κ.β.

10x PBS pH 7.4

NaCl 140 mM
Na₂HPO₄·x(12H₂O) 8 mM
KCl 3 mM
KH₂PO₄ 1.5 mM

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30%

ακρυλαμίδιο 29.2% κ.β.
N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο 0.8% κ.β.

Πήκτωμα διαχωρισμού 12% (10 ml)

Διάλυμα ακρυλαμίδιου (30%) 4 ml
SDS 0.1% κ.β.
Tris-HCl (pH 8.8) 0.375 M
TEMED 0.05% κ.ο.
υπερθειικό αμμώνιο (APS) 0.005% κ.β.

Πήκτωμα συμπύκνωσης 4% (10 ml)

Διάλυμα ακρυλαμίδιου (30%) 1.3 ml
SDS 0.1% κ.β.
Tris-HCl (pH 6.8) 0.125 M
TEMED 0.1% κ.ο.
υπερθειικό αμμώνιο (APS) 0.005% κ.β.

Διάλυμα ηλεκτροδίων

Tris- HCl pH 8.4 0.025 M
Γλυκίνη 0.192 M
SDS 0.1 % κ.β.

Διάλυμα δείγματος 3X

SDS 10% κ.β.
Tris- HCl pH 6.8 0.12 M
β- μερκαπτοαιθανόλη 10% κ.ο.
ή DTT 1.234 % κ.β.
γλυκερόλη 20% κ.ο.
μπλε της βρωμοφαινόλης 0.05% κ.β.

Διάλυμα χρώσης (Stain gel)

Μεθανόλη 40% κ.ο.

Οξικό οξύ	10% κ.ο.
Coomassie brilliant blue R-250	0.1% κ.β.

Διάλυμα αποχρωματισμού (Destain gel)

Μεθανόλη	40% κ.ο.
Οξικό οξύ	10% κ.ο.

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Western blot)

Γλυκίνη	192 mM
Tris	25mM
Μεθανόλη	20% κ.ο.

Το pH του παραπάνω διαλύματος ρυθμίζεται με τη χρήση HCl σε 8,3.

Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα.

Διάλυμα I

Γλυκόζη	50 mM
Tris-HCl (pH 8)	25 mM
EDTA (pH 8)	10 mM

Διάλυμα II

NaOH	0,2 N
SDS	1% κ.β

Διάλυμα III (100 ml)

CH ₃ COOK 5M	60 ml
CH ₃ COOH	11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml

Θρεπτικά Υλικά

LB (Luria-Bertani) pH 7.5 (1 lt)

NaCl	10 g
Bacto-tryptone	10 g
Yeast-extract	5 g

Για τις στερεές καλλιέργειες προστίθενται 15 g Agar/ lt υλικού.

PMSF

PMSF	1.74gr
Isopropanol	100ml

4. Παρουσίαση και Ανάλυση αποτελεσμάτων

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η απομόνωση της εξωκυτταρικής περιοχής της α_1 υπομονάδας του ανθρώπινου υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, χρησιμοποιώντας ετερόλογο βακτηριακό σύστημα έκφρασης. Ο χαρακτηρισμός της ανασυνδιασμένης αυτής πρωτεΐνης θα αποδείξει τη χρησιμότητά της σε εφαρμογές ανοσοπροσρόφησης αυτοαντισωμάτων από ορούς μυασθενικών.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός DH5a κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς pET15b και pET-a1ECD με σκοπό την παραγωγή και απομόνωση πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα. Μετά το μετασχηματισμό ακολούθησε παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA αρχικά σε μικρή κλίμακα και έλεγχός του μέσω πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Εφόσον επαληθεύτηκε η ορθότητα των πλασμιδίων, πραγματοποιήθηκε μεγαλύτερης κλίμακας παρασκευή και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Ακολούθησε κατεργασία των βακτηριακών στελεχών που θα χρησιμοποιούνταν στη συνέχεια ώστε να γίνουν επιδεκτικά.

Αφού είχαν πραγματοποιηθεί και οι δύο παραπάνω διαδικασίες ακολούθησε ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών πια βακτηριακών στελεχών με τους πλασμιδιακούς φορείς.

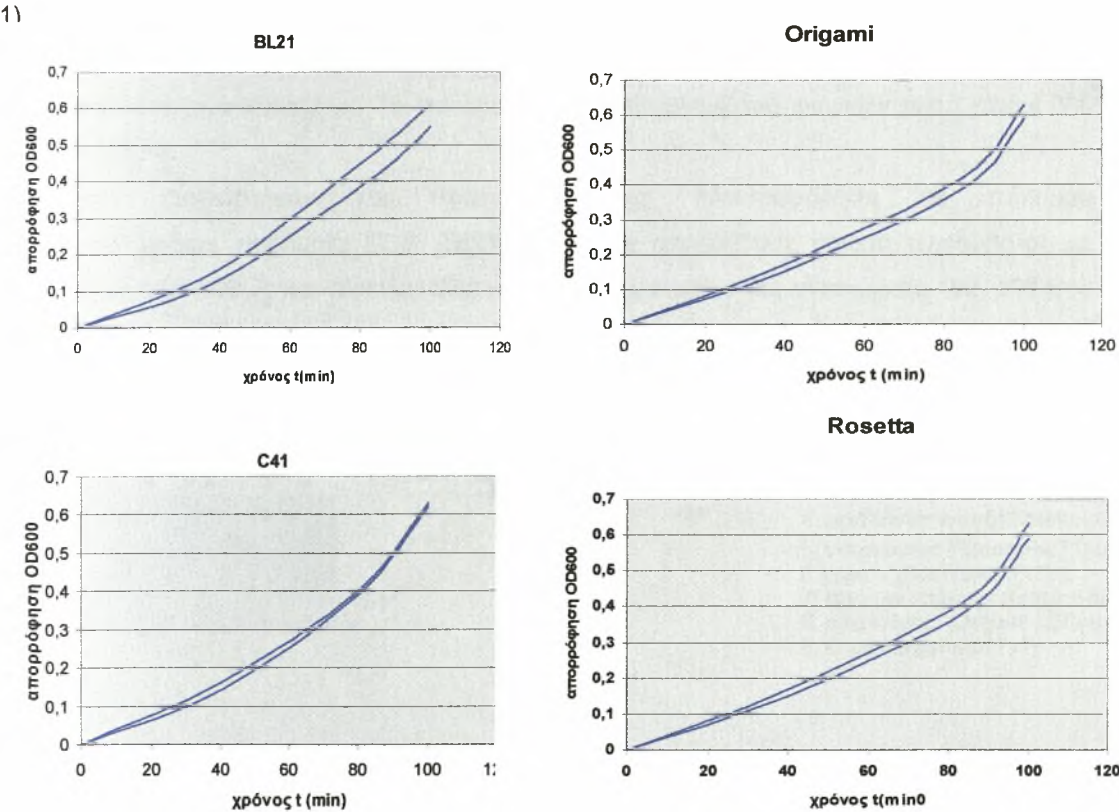
Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης του εξωκυτταρικού τμήματος της α_1 υπομονάδας του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

- Μελέτη πιθανής εμφάνισης τοξικής δράσης ανασυνδυασμένου πλασμιδίου καθώς και τυχόν αλλαγές σε πρότυπο ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών που φέρουν το συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα.
- Ταυτοποίηση παραγόμενου προϊόντος ως το επιθυμητό.
- Σύγκριση διαφορετικών μεθοδολογιών απομόνωσης ολικού πρωτεϊνικού κλάσματος.
- Εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών κατά την απομόνωση του ολικού πρωτεϊνικού κλάσματος.
- Χρήση στήλης νικελίου για απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης.
- Ποσοτικοποίηση παραγόμενης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.
- Έλεγχος δραστικότητας της απομονωμένης πρωτεΐνης.

Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια απαιτεί πρωταρχικά τόσο τη διατήρηση του πλασμιδίου που την κωδικοποιεί καθώς και τη μη εμφάνιση τοξικότητας της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η ύπαρξη του πλασμιδίου υπάρχει πιθανότητα να προκαλέσει μεταβολές στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου.

Έτσι αρχικά πραγματοποιήθηκε μία μικρής κλίμακας καλλιέργεια με βακτήρια μετασχηματισμένα τόσο με πλασμιδιακούς φορείς που περιέχουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την α₁ αλλά και με μη ανασυνδυασμένους φορείς, για να διαπιστωθεί αν πράγματι υπάρχει έκφραση του γονιδίου και αν η παρουσία του επηρεάζει με κάποιο τρόπο την ανάπτυξη των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών.

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη, BL21, Rosetta, Origami και C41, λόγω των χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν, όπως αναλυτικά περιγράφονται στην Εισαγωγή. Σε καλλιέργεια 5 mL πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δειγματοληψίες μέχρι τα κύτταρα να φτάσουν την επιθυμητή OD₆₀₀ (OD₆₀₀= 0.6) με σκοπό την κατασκευή διαγραμμάτων που να απεικονίζουν τη πορεία ανάπτυξης κάθε βακτηριακού στελέχους (Εικ.



Εικόνα 1 Πορεία ανάπτυξης των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα ανάπτυξης κάθε βακτηριακής σειράς που περιέχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με τα αντίστοιχα διαγράμματα που αναφέρονται στην ίδια

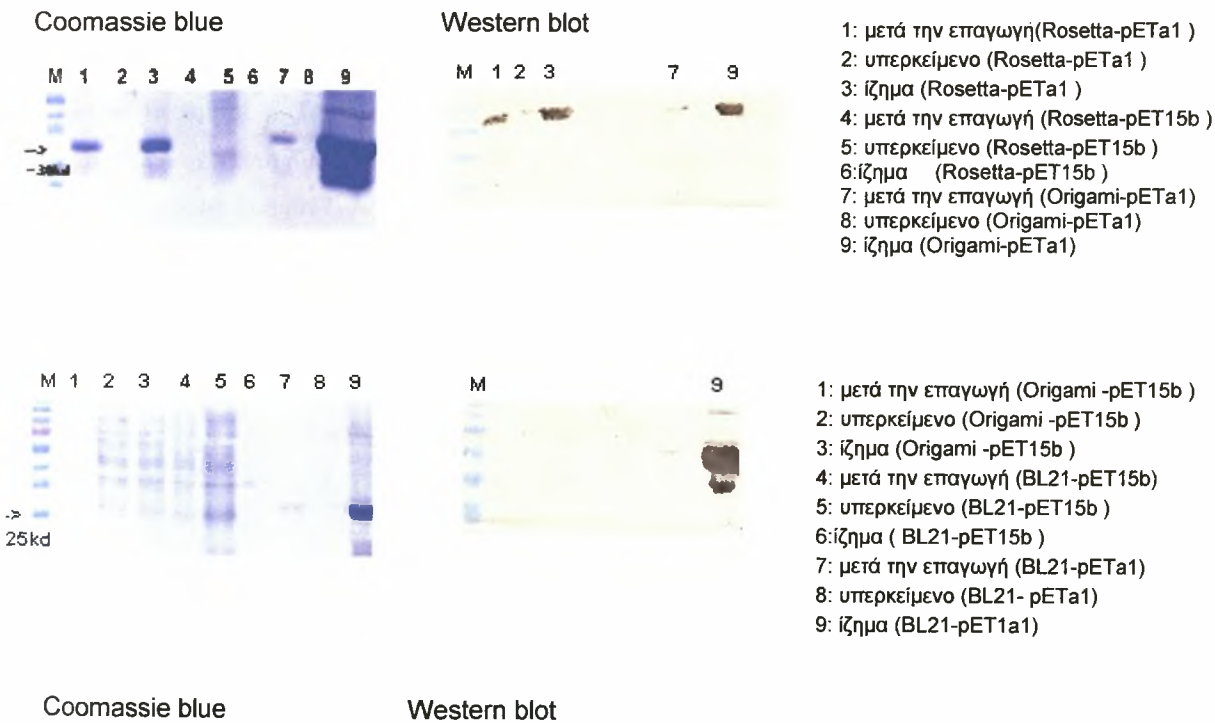
βακτηριακή σειρά που φέρει όμως αυτή τη φορά μόνο το φορέα, δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη διαφορά. Άρα η ύπαρξη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου δεν φαίνεται να καθυστερεί ή να επηρεάζει άμεσα στο στάδιο αυτό τη φυσιολογική λειτουργία – ανάπτυξη του βακτηριακού κυττάρου.

Στην περίπτωση του στελέχους Origami απαιτείται περισσότερος χρόνος για να φτάσει στην ίδια OD με τα υπόλοιπα τρία, που εμφανίζουν πανομοιότυπο πρότυπο ανάπτυξης. Αυτό φαίνεται να είναι ιδιότητα του συγκεκριμένου στελέχους, καθώς μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης του φορέα και αυτού με το ένθεμα της α1 δεν παρουσιάζεται καμία διαφορά.

Όταν τα κύτταρα έφτασαν την επιθυμητή τιμή OD₆₀₀ έγινε προσθήκη του επαγωγέα (IPTG 1mM) και η επώαση συνεχίστηκε για 3 h. Οι καλλιέργειες συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση.

Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων φυλλάχθηκε και ψύχθηκε στους -20⁰ C. Σε κάθε βακτηριακό ίζημα προερχόμενο από 1,5 mL καλλιέργειας προστέθηκε η ποσότητα των 150 μL διαλύματος (50mM NaH₂PO₄ , 300 mM NaCl) και έγινε η επαναδιάλυση του ιζήματος. Έπειτα πραγματοποιήθηκε χρήση του υπερηχητή (2x30 sec), έτσι ώστε να υπάρξει και μηχανική λύση των κυττάρων. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min.

Δείγματα ετοιμάστηκαν και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE) και ακολούθησε χρώση πηκτώματος με Coomassie blue καθώς και Western Blot ανάλυση με μονοκλωνικά αντισώματα 192, 198 που αναγνωρίζουν το εξωκυτταρικό τμήμα της α1 (Εικ. 2).





Εικόνα 2: Έλεγχος των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών μετά από SDS-PAGE.

Από τις εικόνες των SDS gels πράγματι διαπιστώνουμε την ύπαρξη μιας πρωτεΐνης στο ίδιο μοριακό βάρος με το α₁ECD, το οποίο στη συνέχεια αναγνωρίζεται και από τα μονοκλωνικά αντισώματα όπως δείχνει το αντίστοιχο western blot.

Επίσης διαπιστώνεται και η αποτελεσματικότητα του συστήματος έκφρασης, καθώς παρατηρούμε μία σαφή διαφορά στην ένταση της μπάντας που αντιστοιχεί στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες που αντιπροσωπεύουν το υπόλοιπο πρωτεϊνικό κλάσμα.

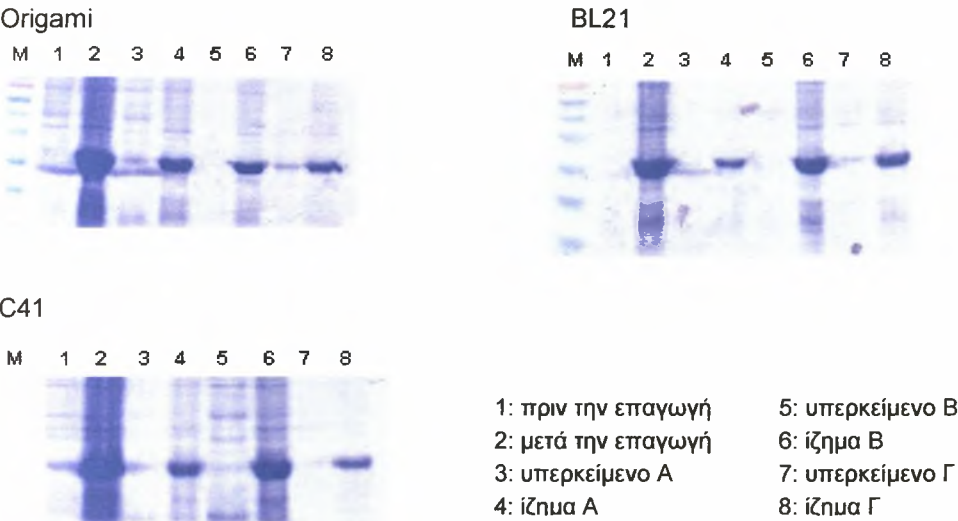
Σημαντική ένδειξη για τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης αποτελεί και το γεγονός ότι δεν παρατηρείται ύπαρξη πρωτεΐνης στο κλάσμα που αντιστοιχεί στο υπερκείμενο της τελικής φυγοκέντρησης.

Όπως έχει αναλυθεί εκτενώς και στην Εισαγωγή, εκτός από τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, έχει εξέχουσα σημασία και η παραγωγή της σε υψηλές ποσότητες. Έτσι, μετά τη διαπίστωση ότι η πρωτεΐνη δεν έχει τοξική ή επιζήμια επίδραση στους ξενιστές που τη φέρουν, καθώς και η ταυτοποίηση του παραγόμενου προϊόντος ως το επιθυμητό, ο επόμενος στόχος ήταν η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη παραγωγή της πρωτεΐνης αυτής.

Αυτός είναι και ο λόγος που πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα η χρήση διαφορετικών πρωτοκόλλων για τη λύση των κυττάρων και την περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων, έτσι ώστε να παρατηρηθούν τυχόν αλλαγές στη ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η ουσιαστική διαφορά των δύο αυτών προσεγγίσεων έγκειται στη χρήση ή όχι, μηχανικού μέσου (υπερηχητή – sonication) για τη λύση των κυττάρων.

Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων από 100 mL καλλιέργειας, μετά από επαγωγή με IPTG, φυλλάχθηκε και ψύχθηκε στους – 80°C κάνοντας αρχικά χρήση υγρού αζώτου. Σε κάθε βακτηριακό ίζημα προερχόμενο από 100 mL καλλιέργειας προστέθηκαν 5mL διαλύματος (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,1mM PMSF, 100μg/mL λυσοζύμη). Πραγματοποιήθηκε η επαναδιάλυση του ιζήματος και ακολούθησε επώαση σε πάγο για 30min. Έπειτα, δείγματα από την ίδια βακτηριακή καλλιέργεια υπέστησαν διαφορετική κατεργασία. Δηλαδή, στο ένα πραγματοποιήθηκε χρήση του υπερηχητή (2x30 sec), έτσι ώστε να υπάρξει και μηχανική λύση των κυττάρων, ενώ το τελευταίο στάδιο περιελάμβανε

φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm για 10 min (ίζημα Α και υπερκείμενο Α). Το δεύτερο δείγμα, προερχόμενο από την ίδια βακτηριακή καλλιέργεια), αρχικά παρέμεινε για 1h στους 4°C υπό σταθερή αργή ανάδευση. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση σε 10.000 rpm για 30 min (ίζημα Β και υπερκείμενο Β). Στο κλάσμα που αντιστοιχεί σε ίζημα Β προστέθηκαν 5 mL του αρχικού διαλύματος, χωρίς λυσοζύμη (50mM NaH₂PO₄ , 300 mM NaCL. , 0,1mM PMSF) και ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος, ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και τελικώς φυγοκέντρωση σε 10,000 rpm για 30min (ίζημα Γ και υπερκείμενο Γ). Μετά την κατεργασία των δειγμάτων σύμφωνα με τα παραπάνω, ακολούθησε SDS-PAGE (Εικ. 3).

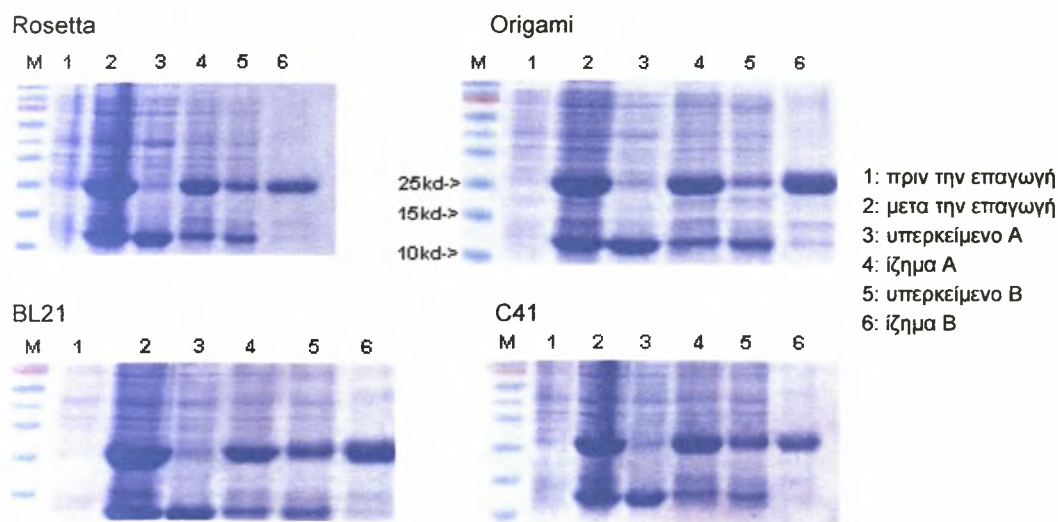


Εικόνα 3 Χρώση πηκτώματος με Coomassie blue για τον έλεγχο της επιρροής της μηχανικής λύσης κυττάρων.

Από τις παραπάνω απεικονίσεις διαφαίνονται τα εξής:
Συγκρίνοντας την ένταση της εμφανιζόμενης μπάντας πριν και μετά την προσθήκη του επαγωγέα (No1 ver No2), γίνεται εμφανής η ικανότητα του συστήματος για υπερέκφραση. Επίσης κι αυτήν τη φορά, το δείγμα που αντιστοιχεί σε κλάσμα υπερκειμένου (No3 και No 5) δεν περιέχει την επιθυμητή πρωτεΐνη, γεγονός που επισημαίνει την μη διαλυτή μορφή της παραγόμενης πρωτεΐνης.
Ακόμη, παρατηρείται διαφορά στις εντάσεις των μπαντών που αντιστοιχούν σε δείγματα από συλλογή πρωτεϊνικού κλάσματος μετά από εφαρμογή μεθόδου που μεσολάβησε στάδιο χρήσης υπερηχητή (No4) και από συλλογή πρωτεϊνικού κλάσματος μετά από εφαρμογή μεθόδου που δεν περιελάμβανε μηχανική λύση των κυττάρων (No6 και No8). Εφαρμόζοντας το δεύτερο πρωτόκολλο για συλλογή του ολικού πρωτεϊνικού κλάσματος, λαμβάνεται μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης ή διαφορετικά, πως κατά τη διαδικασία ανάκτησης του ολικού πρωτεϊνικού κλάσματος (σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο), το στάδιο χρήσης του υπερηχητή έχει επιζήμια επίδραση στην ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Όσες φορές και αν επαναλήφθηκαν οι παραπάνω διαδικασίες δεν εμφανίστηκε διαφορά στην εμφάνιση της πρωτεΐνης στο κλάσμα του υπερκειμένου. Η παραγωγή δηλαδή της πρωτεΐνης στους συγκεκριμένους ξενιστές και υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες δεν οδηγεί σε διαλυτή έκφραση του γονιδίου στόχου. Στο σημείο αυτό αποφασίστηκε η περαιτέρω διεξαγωγή των πειραμάτων υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Το επόμενο βήμα μετά τη μελέτη της διαλυτότητας της υπο έκφραση πρωτεΐνης είναι η ποσοτικοποίηση της. Ο προσδιορισμός δηλαδή της ποσότητας της πρωτεΐνης που παράγεται και η διαπίστωση αν ανάμεσα στα τέσσερα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές παρουσιάζεται κάποια διαφορά ως προς τον παράγοντα αυτόν.

Έτσι, πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες και των τεσσάρων βακτηριακών στελεχών με τις προαναφερόμενες συνθήκες. Σε κάθε βακτηριακό ιζημα προερχόμενο από 50 mL καλλιέργειας προστέθηκαν 5mL διαλύματος (50mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 0,1mM PMSF, 100μg/mL λυσοζύμη) και πραγματοποιήθηκε η επαναδιάλυση του ιζήματος. Ακολούθησε επώαση σε πάγο για 30min και παραμονή για 1h στους 4°C υπό σταθερή αργή ανάδευση. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm για 30 min (ιζημα Α και υπερκείμενο Α). Στο κλάσμα που αντιστοιχεί σε ιζημα Α προστέθηκαν 5 mL διαλύματος με ουρία (10mM ιμιδαζόλιο, 150 mM NaCl , 8M ουρίας, 100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris, pH 8). Ακολούθησε ανάδευση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 15 min (ιζημα Β και υπερκείμενο Β). Η διαλυτοποίηση του ιζήματος Β πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 5 mL από το τελευταίο διάλυμα με ουρία. Ακολούθησε δειγματοληψία κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας και προετοιμασία των δειγμάτων για SDS-PAGE (Εικ. 4).

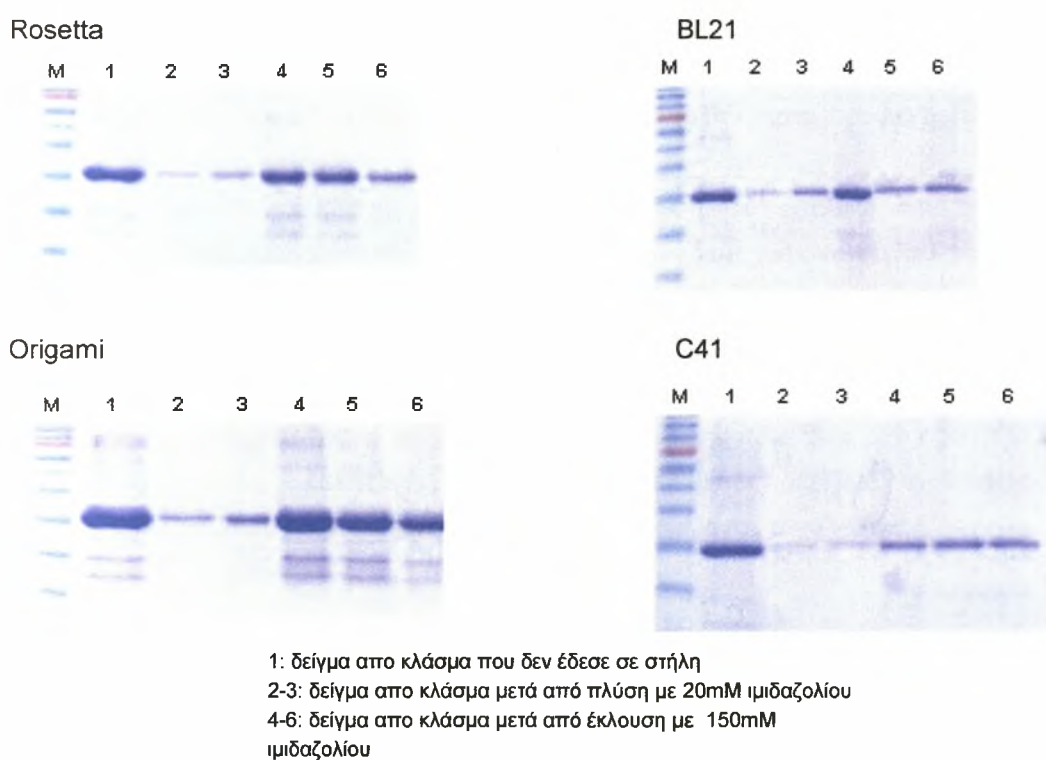


Εικόνα 4 Έλεγχος παραγωγής α_1 με αποδιατακτικές συνθήκες.

Από τα παραπάνω γίνεται ξεκάθαρη η μη διαλυτή έκφραση της πρωτεΐνης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Μετά από χρήση αποδιατακτικών συνθηκών, η πρωτεΐνη εμφανίζεται κατά ένα μικρό ποσοστό και στο υπερκείμενο.

Δεν εμφανίζεται κάποια ένδειξη που να υποδεικνύει επιζήμια επίδραση των καινούργιων συνθηκών σε απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού κλάσματος, όσον αφορά την ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης που λαμβάνεται.

Ο ακριβής προσδιορισμός της παραγόμενης πρωτεΐνης προϋποθέτει την εξειδικευμένη απομόνωση της από το ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η διαδικασία αυτή απλοποιείται λόγω της ύπαρξης της 6xHIS ουράς στο αμινοτελικό άκρο της α1. Έτσι, περνώντας το ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα από στήλη νικελίου, η πρωτεΐνη στόχος παραμένει προσδεσμένη στη στήλη και εκλύεται σταδιακά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία καθ'όλη τη διαδικασία καθαρισμού και ακολούθησε SDS-PAGE (Εικ. 5).



Εικόνα 5: Καθαρισμός της α1 μετά από δέσιμο σε Ni-NTA αγαρόζη

Από τις εικόνες που παρουσιάζονται παραπάνω εμφανίζεται ξεκάθαρα η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας του καθαρισμού καθώς είναι κυρίαρχη η εμφάνιση μιας πρωτεΐνης στο ίδιο μοριακό βάρος με την α1. Επίσης, παρατηρείται ίδια περίπου ένταση στις εμφανιζόμενες μπάντες, ανάμεσα στα δείγματα που προέρχονται από τα τρία βακτηριακά στελέχη, ενώ σε ένα εμφανίζεται μια σαφώς μεγαλύτερη ένταση που πιθανώς να αντιστοιχεί και σε μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης.

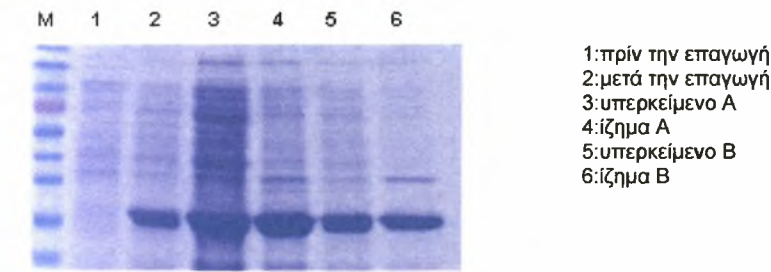
Μετά από την απομόνωση της παραγόμενης πρωτεΐνης, ενώθηκαν τα κλάσματα έκλουσης με 150mM ιμιδαζολίου και ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα :

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/L)
Rosetta	0.896
BL21	0.632
Origami	2.48
C41	1.36

Μετά την εφαρμογή της Bradford ανάλυσης, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της α1 υπομονάδας στο βακτηριακό στέλεχος Origami, οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη.

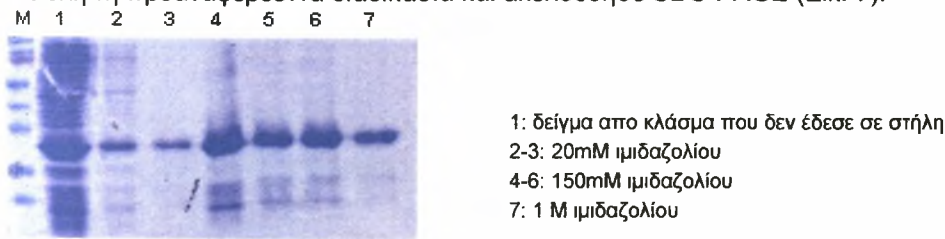
Έχοντας καταλήξει σε κάποιο από τα τέσσερα βακτηριακά στελέχη που παράγει την πρωτεΐνη σε μεγαλύτερη ποσότητα από τα άλλα, επόμενος στόχος αποτελεί να διαπιστωθεί η δραστικότητα ή όχι της πρωτεΐνης και αν έχει την ικανότητα απομάκρυνσης αντισωμάτων από ασθενείς με Βαριά Μυασθένεια.

Για τη διεξαγωγή όμως των απαιτούμενων πειραμάτων για τον έλεγχο της δραστικότητας του παραγόμενου προϊόντος, απαιτείται ή ύπαρξη διαθέσιμης πρωτεΐνης έτσι προηγήθηκε μία μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργεια (500 ml) ακολουθώντας ακριβώς το προηγούμενο πρωτόκολλο. Τα αποτελέσματα αυτής της παραγωγής φαίνονται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6: Έλεγχος παραγωγής α1 σε βακτηριακό στέλεχος Origami.

Επειδή το κλάσμα που αντιστοιχεί σε υπερκείμενο A εμφανίζει τη μεγαλύτερη ένταση στο SDS-gel επιλέχθηκε για να περάσει από στήλη νικελίου . Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία καθ'όλη τη προαναφερθέντα διαδικασία και ακολούθησε SDS-PAGE (Εικ. 7).



Εικόνα 7: Έλεγχος καθαρισμού της α1 μετά από δέσιμο σε Ni-NTA αгарόζη.

Τα δείγματα που αντιστοιχούν σε κλάσματα έκλουσης με 150 mM ιμιδαζολίου ενώθηκαν και μέσω της μεθόδου Bradford που πραγματοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η ποσότητα της περιεχόμενης πρωτεΐνης σε 1,076 mg/mL. Έπειτα, η εν λόγω πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία στηλών ανοσοπροσρόφησης όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο „Μέθοδοι“.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοπροσρόφησης και RIA με ορούς από μυασθενικούς, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

BSA στήλη						α ₁ στήλη				
	ΚΩΔ	cpm (τιμή Α)	cpm (τιμή Β)	(Α+Β) /2	Δcpm	cpm (τιμή Α)	cpm (τιμή Β)	(Α+Β) /2	Δcpm	% ποσοστό ανοσοπρο- ρόφησης
1	11580	2258	2106	2182	2087	888	982	935	814.5	61
2	11582	819	812	815.5	720.5	746	776	761	640.5	11
3	11583	526	469	497.5	402.5	549	570	559.5	439	0
4	11584	2462	2622	2542	2447	2582	2684	2633	2513	0
5	11586	2731	3052	2891.5	2796	1630	1237	1434	1313	53
6	11587	3308	3259	3283.5	3188	1159	1475	1317	1197	62
7	11588	934	915	924.5	829.5	1296	1027	1162	1041	0
8	11590	895	883	889	794	591	886	738.5	618	22
9	11592	2381	2625	2503	2408	2035	1993	2014	1894	21
10	11613	3005	3085	3045	2950	2551	2713	2632	2512	15
11	kef	1817	1804	1810.5	1715.5	2044	1999	2022	2022	0
12	neg	90	100	95	0	94	147	120.5	120.5	0

Οι υπολογισμοί των ποσοστών ανοσοπροσρόφησης έγιναν σύμφωνα με τα παρακάτω:

- 1. Υπολογισμός μέσης τιμής αποτελεσμάτων για κάθε ορό
- 2. Αφαίρεση από υπολογισμένη τιμή αποτελέσματος αρνητικού control, Δcpm
- 3. Εφαρμογή παρακάτω τύπου (Δcpm BSA - Δcpm ορού) x 100 / Δcpm BSA

Με τον τρόπο αυτόν αποδεικνύεται, ό,τι το εξωκυτταρικό τμήμα της α1 υπομονάδας του ανθρώπινου νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, εκφραζόμενο σε βακτηριακό στέλεχος

και απομονωμένο κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, είναι ικανό για την αποτελεσματική ανοσοπροσρόφηση αυτοαντισωμάτων από ορούς μυσθενικών.

5. Συζήτηση

Ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης εμπλέκεται στην εμφάνιση του αυτοάνοσου νοσήματος της Βαριάς Μυασθένειας. Στο νόσημα αυτό, τα αντισώματα που παράγονται, στρέφονται κατά των νικοτινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης, οι οποίοι εντοπίζονται στη νευρομυϊκή σύναψη. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται μείωση του αριθμού των υποδοχέων στις νευρομυϊκές συνάψεις με συνέπεια τη διακοπή της μεταγωγής σήματος και την εμφάνιση παθολογικών χαρακτηριστικών. Το μεγαλύτερο ποσοστό, δε, των αντισωμάτων προσδένεται σε μία περιοχή κοντά στο αμινοτελικό άκρο του εξωκυτταρικού τμήματος της α_1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, γνωστή ως MIR (κύρια ανοσογόνος περιοχή).

Δεν υπάρχει ολοκληρωμένη εξειδικευμένη θεραπεία για τη βαριά μυασθένεια. Η συνήθης αγωγή περιλαμβάνει τη λήψη φαρμακευτικών σκευασμάτων ή τη χειρουργική αφαίρεση του θύμου σε συνδυασμό με τη κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή ή ακόμα και την πραγματοποίηση πλασμαφαίρεσης. Η πλασμαφαίρεση αν και αποτελεί μια σημαντική θεραπευτική αγωγή για τη μυασθένεια, απομακρύνει και άλλα πολύτιμα συστατικά του πλάσματος. Λόγω της μη ύπαρξης ολοκληρωμένης θεραπευτικής προσέγγισης, η ανάγκη για εξειδικευμένη απομάκρυνση των αντισωμάτων που στρέφονται κατά των υποδοχέων, οδήγησε στην ιδέα ανοσοπροσρόφησης των αντισωμάτων με χρήση ανασυνδυασμένων τμημάτων του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (**Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας** Tzartos *et.al.*, 2002). Αυτό προϋποθέτει την παραγωγή των εξωκυτταρικών τμημάτων σε μεγάλες ποσότητες, διατηρώντας την ικανότητα τους να αναγνωρίζονται από τα παθολογικά αντισώματα.

Μελέτες που περιελάμβαναν την έκφραση του εξωκυτταρικού τμήματος της α_1 υπομονάδας στο ζυμομύκητα *Pichia Pastoris*, δηλαδή σε ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης, πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν από μέλη του ίδιου εργαστηρίου. Το αποτέλεσμα των παραπάνω μελετών ήταν παραγωγή της πρωτεΐνης σε μικρές ποσότητες σε σύγκριση με τα επιθυμητά αναμενόμενα αποτελέσματα, με δομή που απέχει πολύ από τη φυσιολογική, αν και εκφράζεται σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Η πρωτεΐνη που παράγεται από αυτό το ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης χρησιμοποιήθηκε για κατασκευή στηλών ανοσοπροσρόφησης των παθογόνων αντισωμάτων από ορούς μυασθενικών ατόμων. Διεξάγοντας πειράματα RIA διαπιστώθηκε ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη διατηρούσε την ικανότητα να αναγνωρίζεται και να προσδένει παθογόνα αντισώματα που περιέχονταν σε ορούς ασθενών που έπασχαν από μυασθένεια.

Η έκφραση όμως ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε ζυμομύκητα, είναι μία χρονοβόρα διαδικασία με υψηλό κόστος και με περίπλοκους χειρισμούς. Σε αντιπαράθεση, έκφραση ετερόλογων γονιδίων, σε εντεροβακτήριο *E.coli* δεν απαιτεί ακριβά θρεπτικά υλικά,

επιτυγχάνεται υψηλής πυκνότητας καλλιέργεια σε μικρό χρόνο, δεν απαιτεί περίπλοκους χειρισμούς και προτιμάται συνήθως για πρωτεΐνες που δεν απαιτούν περίπλοκες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αν ήταν δυνατή η χρήση του συστήματος έκφρασης του εντεροβακτηρίου *E.coli* στη θέση του ζυμομύκητα για παραγωγή εξωκυτταρικού τμήματος της α₁ υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης που ήταν σε θέση να προσδέσει παθολογικά αντισώματα μυασθενικών, το κόστος παραγωγής θα μειωνόταν δραματικά και η όλη διαδικασία θα πραγματοποιείτο υπό ιδιαίτερα απλουστευμένους χειρισμούς.

Αυτό έρχεται να εξετάσει και η υπό παρουσίαση εργασία, στην οποία πραγματοποιήθηκε έκφραση του εξωκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης σε τέσσερα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εκφραζόταν από έναν pET φορέα. Στο σύστημα αυτό η έκφραση του ετερόλογου γονιδίου λάβαινε χώρα μόνο μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας επαγωγέα IPTG. Τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Rosetta, Origami, BL21 και C41. Οι φορείς αυτοί αποτελούν λυσογόνα παράγωγα του βακτηριοφάγου DE3, ενός λ παραγώγου που περιέχει την ανοσιακή περιοχή (immunity region) του φάγου 21 καθώς και μια DNA αλληλουχία που περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί τον καταστολέα του σπερονίου της λακτόζης *lac I*, τον προαγωγέα *lacUV5* και το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης.

Η επιλογή των παραπάνω βακτηριακών στελεχών έγινε λόγω της ικανότητας τους να εκφράζουν ετερόλογα γονίδια σε μεγάλες ποσότητες αλλά και για να διαπιστωθεί αν εξαιτίας των ειδικών γενετικών χαρακτηριστικών τους, η προς παραγωγή πρωτεΐνη θα εμφανιζόταν σε διαλυτή μορφή και όχι ως συσσωματώματα.

Αρχικά, όλες οι διαδικασίες απομόνωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιούνταν υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες για να διαπιστωθεί αν η έκφραση της πρωτεΐνης στους παραπάνω φορείς οδηγούσε σε παραγωγή της σε διαλυτή μορφή. Όσες φορές και αν επαναλήφθηκε η πειραματική διαδικασία, καμία φορά δεν διαπιστώθηκε διαλυτή έκφραση της πρωτεΐνης από τη στιγμή που δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα που να αντιπροσωπεύει το αντίστοιχο κλάσμα. Διαπιστώθηκε δηλαδή, ότι η χρήση αυτών των γενετικά τροποποιημένων φορέων δεν οδήγησε σε διαλυτή έκφραση της πρωτεΐνης παρόλο που έχουν την ικανότητα να προσδίδουν στα υπό έκφραση γονίδια, χαρακτηριστικά που εμπλέκονται στην αύξηση της διαλυτότητάς τους. Μετά την παρατήρηση αυτή, αποφασίστηκε η περαιτέρω διεξαγωγή των πειραμάτων υπό αποδιατακτικές συνθήκες, έτσι ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας του συστήματος. Πράγματι, μετά την απομόνωση και καθαρισμό της πρωτεΐνης από στήλη νικελίου και εφαρμογή της μεθόδου Bradford για ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών, διαπιστώθηκε η υπερέκφραση της πρωτεΐνης και μάλιστα σε τιμές μεγαλύτερες σε σύγκριση με αυτή που λαμβάνεται όταν πραγματοποιείται έκφραση του ίδιου γονιδίου σε ζυμομύκητα (0,1 mg/L), σε αντιπαράθεση με τις τιμές των 0.896 mg/L για το βακτηριακό στέλεχος Rosetta, 2.48 mg/L για το βακτηριακό στέλεχος

Origami, 0.632 mg/L για το βακτηριακό στέλεχος BL21 και 1.36 mg/L για το βακτηριακό στέλεχος C41. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι το βακτηριακό στέλεχος Origami εξέφραζε τη πρωτεΐνη σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι καλλιέργειες που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν όλες σε βακτηριακά στελέχη Origami, τα οποία διαπιστώθηκε ότι παράγουν την πρωτεΐνη σε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τρία στελέχη. Το επόμενο βήμα αφού καλύφθηκε η ανάγκη για υψηλά ποσοστά παραγωγής ήταν να διαπιστωθεί αν η πρωτεΐνη που παράγεται από το βακτηριακό στέλεχος είναι ικανή να αναγνωρισθεί από τα παθολογικά αντισώματα και αν είναι σε θέση να προσδέσει τα αντισώματα αυτά. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοπροσρόφησης και RIA με ορούς από ασθενείς με μυασθένεια. Πράγματι, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανοσοπροσρόφησης σε μερικούς από τους υπό εξέταση ορούς, γεγονός που υποδεικνύει ότι αν και η πρωτεΐνη απομονώνεται κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, εντούτοις διατηρεί την ικανότητά της να αναγνωρίζεται από αντισώματα που στρέφονται κατά του υποδοχέα. Άρα η εκφραση του εξωκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης σε στελέχη *E.coli* μπορεί να εφαρμοσθεί, όταν η προς παραγωγή πρωτεΐνη προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για κατασκευή στήλης με σκοπό την ειδική απομάκρυνση των αυτοαντισωμάτων που παράγονται κατά την ανάπτυξη του νοσήματος της μυασθένειας.

Τέλος, τα παραπάνω στοιχεία συνηγορούν στη δυνατότητα αντικατάστασης του συστήματος έκφρασης του εξωκυτταρικού τμήματος της α_1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης σε ζυμομύκητα με εκείνο σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*, βέβαια μόνο για την περίπτωση που η πρωτεΐνη προορίζεται για κατασκευή στήλης ανοσοπροσρόφησης.

Βιβλιογραφία

- Arneric S, Brioni J, editors. Neuronal nicotinic receptors: pharmacology and therapeutic opportunities. New York: Wiley-Liss; 1999
- Appel S, Anwyl R, McAdams M, Elias S. Accelerated degradation of acetylcholine receptor from cultured rat myotubes with myasthenia gravis sera and globulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2130–2134.
- Beeson D, Jacobson L, Newsom-Davis J, Vincent A. A transfected human muscle cell line expressing the adult subtype of the human muscle acetylcholine receptor for diagnostic assays in myasthenia gravis. *Neurology* 1996;47:1552–1555
- Beroukhim R, Unwin N. Three-dimensional location of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *Neuron* 1995;15:323–331.
- Bevan S, Heinemann S, Lennon V, Lindstrom J. Reduced muscle acetylcholine sensitivity in rats immunized with acetylcholine receptor. *Nature* 1976;260:438–439.
- Changeux JP. Functional architecture and dynamics of the nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric ligand-gated ion channel. 1988–1989 Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures. Vol. 4. New York, Raven Press; 1990. p 21–168.
- Changeux JP, Bertrand D, Corringer PJ, Dehaene S, Edelstein S, Lena C, LeNovere N, Marubio L, Picciotto M, Zoli M. Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Rev* 1998;26:198–216.
- Corriveau and Berg Coexpression of multiple acetylcholine receptor genes in neurons: quantification of transcripts during development. *J. Neurosci* 1993 Jun;13(6):2662–71.
- Conti-Tronconi B, Tzartos S, Lindstrom J. Monoclonal antibodies as probes of acetylcholine receptor structure. II. Binding to native receptor. *Biochemistry* 1981;20:2181–2191.
- Cooper E, Couturier S, Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 1991;350:235–238.
- Engel A, Tsujihata M, Lambert E, Lindstrom J, Lennon V. Experimental autoimmune myasthenia gravis: a sequential and quantitative study of the neuromuscular junction ultrastructure and electrophysiologic correlation. *J Neuropathol Exp Neurol* 1976;35:569–587.
- Engel A, Tsujihata M, Lindstrom J, Lennon V. End-plate fine structure in myasthenia gravis and in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1976;274:60–79.
- Hogg RC, Raggenbass M., Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;147:1–46
- Changeux JP. Chemical signaling in the brain. *Sci Am*. 1993 Nov;269(5):58–62
- Kao I., Drachman DB Myasthenic immunoglobulin accelerates acetylcholine receptor degradation. *Science*. 1977 Apr 29;196(4289):527–9.
- Gotti C., Zoli M., Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance
- Karlin A, Akabas M. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 1995;15:1231–1244.

- LeNovere N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of a multi-gene family in excitable cells. *J Mol Evol* 1995;40:155–172.
- Lindstrom J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In: Narahashi T, editor. *Ion channels*. New York: Plenum Press; 1996. p 377–450.
- Lindstrom J. Purification and cloning of nicotinic acetylcholine receptors. In: Arneric S, Brioni D, editors. *Neuronal nicotinic receptors: pharmacology and therapeutic opportunities*. New York: John Wiley & Sons; 1999.
- Lindstrom J. Structures of neuronal nicotinic receptors. In: Clementi F, Gotti C, Fornasari D, editors. *Neuronal nicotinic receptors*. Berlin: Springer; 2000. p 101–162.
- Lindstrom J. Experimental induction and treatment of myasthenia gravis. In: Engel A, editor. *Myasthenia gravis and myasthenic disorders*. Oxford: Oxford University Press; 1999. p 111–130.
- Lindstrom J, Einarson B. Antigenic modulation and receptor loss in EAMG. *Muscle Nerve* 1979;2:173–179.
- Lindstrom J, Einarson B, Merlie J. Immunization of rats with polypeptide chains from *Torpedo* acetylcholine receptor causes an autoimmune response to receptors in rat muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:769–773.
- Lindstrom J, Peng X, Kuryatov A, Lee E, Anand R, Gerzanich V, Wang F, Wells G, Nelson M. Molecular and antigenic structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Ann NY Acad Sci* 1998;841:71–86.
- Lindstrom J, Seybold M, Lennon V. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: prevalence, clinical correlates and diagnostic value. *Neurology* 1976;26:1054–1059.
- Lindstrom J, Shelton GD, Fujii Y. Myasthenia gravis. *Adv. Immunol* 1988;42:233–284.
- Lindstrom J, Tzartos S, Gullick B. Structure and function of acetylcholine receptors studied using monoclonal antibodies. *Ann NY Acad Sci* 1981;377:1–19.
- Loutrari H, Kokla A, Tzartos S. Passive transfer of experimental myasthenia acetylcholine via antigenic modulation of acetylcholine receptor. *Eur J Immunol* 1994;22:2449–2452.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 1999;288:765–786.
- Moulian N, Wakkach A, Guyon T, Poeta S, Aissaoui A, Levasseur P, Cohen-Kaminsky S, Berrih-Aknin S. Respective role of thymus and muscle in autoimmune myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1998;841:397–406.
- Papanastasiou D, Mamalaki A, Eliopoulos E, Poulas K, Liolitsas C, Tzartos S. Construction and characterization of a humanized single chain Fv antibody fragment against the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol* 1999;94:182–195.
- Tzartos S, Barkas T, Cung M, Mamalaki A, Marraud M, Papanastasiou D, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Tsantili P, Tsikaris V. Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholinereceptor. *Immunol Rev* 1998;163:89–120.

Tzartos S, Hochschwender S, Vasquez P, Lindstrom J. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol* 1987;15:185–194.

Tzartos S, Langeberg L, Hochschwender S, Swanson L, Lindstrom J. Characteristics of monoclonal antibodies to denatured *Torpedo* and to native calf acetylcholine receptors: species, subunit and region specificity. *J Neuroimmunol* 1986;10:235–253.

Tzartos S, Lindstrom J. Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:755–759.

Tzartos S, Seybold M, Lindstrom J. Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:188–192.

Wan K, Lindstrom J. Effects of monoclonal antibodies on the function of acetylcholine receptors purified from *Torpedocalifornica* and reconstituted into vesicles. *Biochemistry* 1985;24:1212–1221.

Vincent A, Lang B, Newsom-Davis J. Autoimmunity to the voltage-gated calcium channel underlies the Lambert–Eaton myasthenic syndrome, a paraneoplastic disorder. *Trends Neurosci* 1989;12:496–502.

Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., and Mierendorf, R. in *Innovations* 2001;12,1–3.

Novy, R. and Morris, B. in *Innovations* 2001;13 8–10.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. *J. Mol. Biol.* 1986;189,113–130.

Grodberg, J. and Dunn, J.J. *J. Bacteriol* 1988;170, 1245–53.

Aslund, F., Bessette, P.H., Georgiou G. and Beckwith, J. *innovations* 1999;10,11–12.

Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., and Beckwith, J. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 15661–15667

Brinkmann, U., Mattes, R.E., and Buckel, P. *Gene* 1989;85, 109–114

Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N.J. *Bacteriol.* 1978;134, 1141.

Dunn, J.J. and Studier, F.W. *J. Mol. Biol.* 1983;166, 477–535.

Del Tito, B.J., Jr., Ward, J.M., Hodgson, J., Gershater, C.J., Edwards, H., Wysocki, L.A., Watson, F.A., Sathe, G., and Kane, J.F. *J. Bacteriol.* 1995;177, 7086–91.

Huang, J., Villemain, J., Padilla, R., and Sousa, R.. *Mol. Biol. J* 1999;293, 457–75.

Moffatt, B.A. and Studier, F.W. *Cell* 1987;49, 221.

Zhang, X. and Studier, F.W. *J. Mol. Biol.* 1997 ; 269, 10–27.

Kane, J.F. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995; 6, 494–500.

Kurland, C. and Gallant, J. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1996;7, 489–93.

Seidel, H.M., Pompliano, D.L., and Knowles, J.R. *Biochemistry* 1992; 31, 2598–608

Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W. *Gene* 1993 ; 56, 125–35.

Inouye, M., Arnheim, N., and Sternglanz, R. J. Biol. Chem. 1973 ; 248, 7247.