

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΜΕΓΡΕΜΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ**

Τίτλος

**Υπερέκφραση και απομόνωση της ανθρώπινης poly(A)-δεσμεύουσας πρωτεΐνης -
PABP1- από κύτταρα βακτηρίων**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2010

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΜΕΓΡΕΜΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ

Τίτλος

Υπερέκφραση και απομόνωση της ανθρώπινης poly(A)-δεσμεύουσας πρωτεΐνης -
PABP1- από κύτταρα βακτηρίων

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8177/1

Ημερ. Εισ.: 16-04-2010

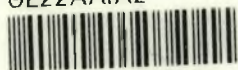
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ΜΕΓ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087104

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

⇒ Δρ . Δημήτριος Μαστέλλος , Ερευνητής Β΄ , ΕΚΕΦΕ <<Δημόκριτος>> (Επιβλέπων)



⇒ Δρ . Μαρία Κοντού , Λέκτορας κλινικής βιοχημείας



⇒ Δρ . Νικόλαος Μπαλατσός , Λέκτορας Βιοχημείας



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά το επιβλέποντά μου Δρ. Δημήτρη Μαστέλλο στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για το ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθειά του καθώς και για την υλικοτεχνική υποστήριξη που μου προσέφερε στα πλαίσια αποπεράτωσης των πειραμάτων μου .

Ευχαριστώ θερμά το Καθηγητή Νίκο Μπαλατσό , Λέκτορα Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη καθοδήγησή του .

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Μαρία Κοντού , Λέκτορα κλινικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη καθοδήγησή της .

Ευχαριστώ θερμότατα τον Δρ. Μιχάλη Νομικό μεταδιδακτορικό συνεργάτη στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την αμέριστη βοήθεια , καθοδήγηση και στήριξή του σε όλα τα επίπεδα .

Ευχαριστώ θερμά τον Άγγελο Θανάσουλα για την βοήθειά του στα θέματα Βιομοριακής φυσικής .

Ευχαριστώ θερμότατα την Μαρία Θεοδωρίδου για την καθοδήγηση και στήριξή της σε όλα τα επίπεδα .

Ευχαριστώ στον Καθηγητή Anthony Lai, από το συνεργαζόμενο εργαστήριο του Wales Heart Institute, University of Wales Medical School για την υλική υποστήριξη την οποία μου παρείχε (πλασμιδικός κλώνος πρωτεάσης 3C και PABP).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ	6
1.2 ΡΑΒΡ ΠΡΩΤΕΙΝΗ	10
1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΡΑΒΡ ΠΡΩΤΕΙΝΗ	10
1.2.2 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ	12
1.2.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΣΤΗΝ ΠΟΛΥΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ mRNA	15
1.2.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΣΤΗΝ ΕΞΟΔΟ ΤΟΥ mRNA ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ	18
1.2.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΣΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ	18
1.2.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΣΤΟΝ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΤΟΥ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΟΣ	20
1.2.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΣΤΗΝ ΑΠΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ mRNA	21
1.2.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ mRNA	21
1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	23
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	24
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	25
2.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E.coli	25
2.2.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E.coli	26
2.2.3 ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ	26
2.2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ-SDS	28
2.2.5 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E. coli ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ	30
2.2.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ GST ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ – ΧΙΜΑΙΡΑΣ	31
2.2.7 ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD	32
2.2.8 ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ	32
2.2.9 ΦΑΣΜΑΤΟΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ (CD)	33
2.3 ΥΛΙΚΑ	36

3 . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
3.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ	41
3.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ	
3.2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ IPTG ΣΤΟΥΣ 37°C ΣΕ BL21 ΚΥΤΤΑΡΑΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	45
3.2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ IPTG ΣΤΟΥΣ 25 °C ΣΕ BL21 ΚΥΤΤΑΡΑΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	46
3.2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ IPTG ΣΤΟΥΣ 16 °C ΣΕ BL21 ΚΥΤΤΑΡΑΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	48
3.2.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	49
3.2.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ	50
3.2.6 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ	52
3.2.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ GST ΣΗΜΑΣΜΕΝΗΣ ΡΑΒΡ	54
3.2.8 ΠΕΨΗ ΡΑΒΡ-GST ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΜΕ 3C ΠΡΩΤΕΑΣΗ	55
3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑΣ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ	56
4 . ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	57
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

Ο μηχανισμός σύνθεσης των πρωτεϊνών είναι μια διεργασία που ονομάζεται μετάφραση διότι τα νουκλεοτίδια των νουκλεϊκών οξέων μεταφράζονται σε ένα εντελώς διαφορετικό αλφάβητο, αυτό των πρωτεϊνών. Η μετάφραση είναι μια πολύ πιο δύσκολη διεργασία από την αντιγραφή και την μεταγραφή και αυτό γιατί απαιτεί τη συντονισμένη συμμετοχή περισσότερων από εκατό μακρομορίων.

Μια πρωτεΐνη συντίθεται στην κατεύθυνση από το άμινο- προς το καρβοξυ-τελικό άκρο με τη διαδοχική προσθήκη αμινοξέων στο καρβόξυλο-άκρο της αναπτυσσόμενης πεπτιδικής αλυσίδας. Τα ενεργοποιημένα πρόδρομα μόρια είναι αμινοάκυλο-tRNA, στα όποια η καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέος είναι ενωμένη με την 3'OH ενός μεταφορικού RNA (tRNA). Η σύνδεση ενός αμινοξέος με το αντίστοιχο του tRNA καταλύεται από μια συνθετάση του αμινοάκυλο-tRNA. Αυτή η αντίδραση ενεργοποίησης απαιτεί ATP. Για κάθε αμινοξύ υπάρχει τουλάχιστον ένα tRNA και ένα ενεργοποιητικό ενζυμο [1].

Τα ριβοσώματα είναι οι μοριακές μηχανές που συντονίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των tRNA, του mRNA και των πρωτεϊνών κατά την διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Εντός του ριβοσώματος υπάρχουν τρεις θέσεις οι οποίες είναι: η θέση E, η θέση P και η θέση A (εικόνα 1). Τα ριβοσώματα αποτελούνται από μια μεγάλη υπομονάδα 60s και μια μικρή υπομονάδα 40s, οι οποίες συνδυάζονται σχηματίζοντας ένα σωματίο των 80s 4200kd. Η υπομονάδα 40s περιέχει ένα 18s μόριο RNA ενώ η υπομονάδα 60s περιέχει τρία μόρια RNA: τα 5s, 5.8s και 28s. [1,2,3]

Η σύνθεση των πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια όπου, στο πρώτο πραγματοποιείται η έναρξη της μετάφρασης, στο δεύτερο η επιμήκυνση και στο τρίτο ο τερματισμός της.



Εικόνα 1. Η θέση E , η θέση P και η θέση A του ριβοσώματος

Η έναρξη έχει ως αποτέλεσμα την δέσμευση του αρχικού tRNA στο σημείο έναρξης του mRNA. Το αρχικό tRNA καταλαμβάνει τη θέση P (πεπτιδυλο-) εντός του ριβοσώματος.

Η επιμήκυνση αρχίζει με την δέσμευση ενός αμινοάκυλο-tRNA στην άλλη θέση δέσμευσης tRNA στο ριβόσωμα που καλείται θέση A (αμινοακυλο-). Τότε σχηματίζεται ένας πεπτιδικός δεσμός μεταξύ της αμινομάδας του εισερχόμενου αμινοάκυλο-tRNA και της καρβοξυλομάδας της φορμυλο-μεθειονίνης που μεταφέρεται από το πρώτο tRNA . Στη συνέχεια το διπεπτιδυλο-tRNA που προκύπτει μετακινείται από τη θέση A στη θέση P , ενώ το αρχικό tRNA απορρίπτεται από το ριβόσωμα . Η δέσμευση των αμινοάκυλο-tRNA , η μετακίνηση του πεπτιδυλο-tRNA από τη θέση A στη θέση P και η σχετική μετακίνηση του mRNA στο επόμενο κωδικόνιο χρησιμοποιούν ενέργεια από την υδρόλυση του GTP . Στο επόμενο βήμα ένα αμινοάκυλο-tRNA δεσμεύεται στην κενή θέση A αρχίζοντας ένα νέο κύκλο επιμήκυνσης.[1,4,6]

Ο τερματισμός συμβαίνει όταν ένα σήμα τερματισμού στο mRNA αναγνωρίζεται από έναν παράγοντα αποδέσμευσης της πρωτεΐνης που οδηγεί στην αποδέσμευση της πλήρους πολυπεπτιδικής αλυσίδας από το ριβόσωμα .

Το βασικό σχήμα σύνθεσης των πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι παρόμοιο με αυτό των προκαρυωτικών κυττάρων .Τα κυριότερα δομικά και μηχανιστικά χαρακτηριστικά επαναλαμβάνονται με τον ίδιο τρόπο στα ανώτερα κύτταρα.

Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι το AUG που βρίσκεται στο 5' άκρο. Το ριβόσωμα 40s συνδέεται στο κάλυμμα του 5' άκρου του mRNA και ψάχνει για το κωδικόνιο έναρξης AUG μετακινούμενο προς την κατεύθυνση 3'

Η διεργασία σάρωσης καταλύεται από την υδρόλυση του ATP

Το αντικωδικόνιο ενός Met-tRNA δεσμεύεται με το ριβόσωμα 40s και δεσμεύεται στο κωδικόνιο AUG.

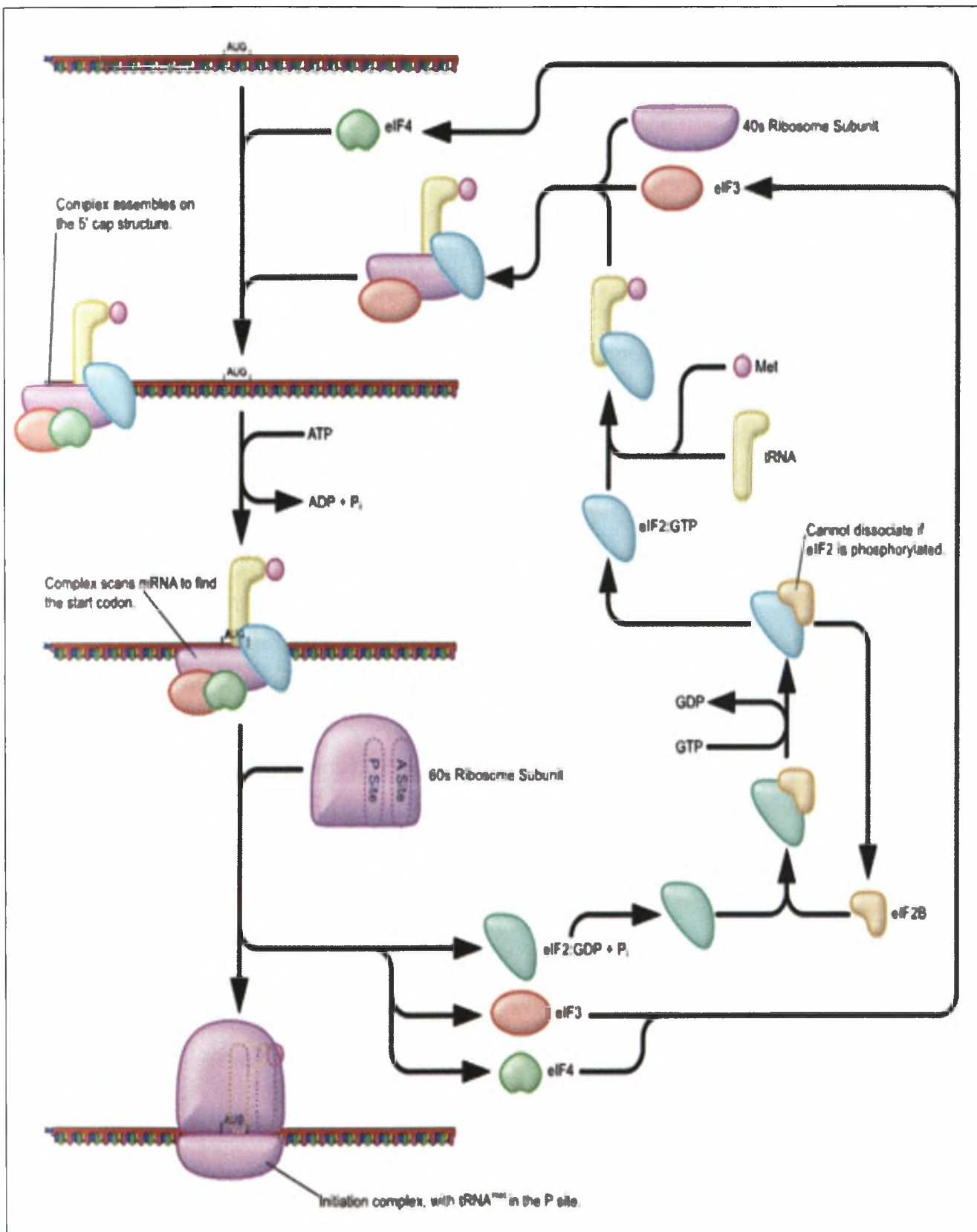
Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν πολλούς παράγοντες έναρξης και ο ρόλος τους είναι περίπλοκος. Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί εννέα ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης και μερικοί από αυτούς αποτελούνται από πολλές υπομονάδες. [7]

Οι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης συμβολίζονται ως eIF. Η μορφή GTP του eIF2 φέρνει το εναρκτήριο tRNA στην 40s υπομονάδα (εικόνα 2). Πρωτεΐνες CBP προσδέονται στα καλύμματα του mRNA. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με τον eIF3 ο οποίος βρίσκει το πλησιέστερο κωδικόνιο AUG προς το 5' άκρο. Σε αυτήν την αναζήτηση τον ρόλο της <<μηχανής>> που κινείται με υδρόλυση του ATP παίζει ο παράγοντας eIF4. Ο eIF5 επάγει την απελευθέρωση του eIF2 και eIF3 μετά το ζευγάρισμα του Met-tRNA με το κωδικόνιο έναρξης AUG. Ο eIF5 πραγματοποιεί αυτές τις δραστηριότητες προκαλώντας την υδρόλυση του GTP που βρίσκεται προσδεμένο στον eIF2. Τέλος η υπομονάδα 60s ενώνεται με το σύμπλοκο του εναρκτήριου tRNA, mRNA και της υπομονάδας 40s για να σχηματιστεί το σύμπλοκο έναρξης 80s. [1,5,7]

Οι ευκαρυωτικοί παράγοντες επιμήκυνσης είναι οι EF1α και EF1βγ. Η μορφή GTP του EF1α παραδίδει αμινοάκυλο-tRNA στη θέση A του ριβοσώματος ενώ ο EF1βγ καταλύει την ανταλλαγή του GTP με το δεσμευμένο GDP. Ο ευκαρυωτικός παράγοντας επιμήκυνσης EF2 συμμετέχει στην ωθούμενη από GTP μετατόπιση.

Ο τερματισμός στα ευκαρυωτικά γίνεται με τη δράση ενός μόνο παράγοντα αποδέσμευσης τον eRF ο οποίος είναι μια κατευθυνόμενη από το GTP πρωτεΐνη.

Τέλος ο eIF3 παρεμποδίζει την επανασύνδεση των ριβοσωμικών υπομονάδων απουσία του συμπλόκου έναρξης.



Εικόνα 2 . Μηχανισμός πρωτεϊνοσύνθεσης

1.2 PABP ΠΡΩΤΕΙΝΗ

1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ PABP ΠΡΩΤΕΙΝΗ

Οι PABP πρωτεΐνες είναι το κέντρο ρύθμισης της μετάφρασης και της σταθερότητας του mRNA. Είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να συνδέονται στις poly(A) ουρές του mRNA. Συγκεκριμένα συνδέονται σε 12 περίπου αδενοσίνες του mRNA. Αυτές οι πρωτεΐνες υπάρχουν σε κύτταρα ζύμης, σε φυτικά κύτταρα, σε ζωικά κύτταρα όχι όμως σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Ανάλογα με την ενδοκυτταρική τους τοποθεσία ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Αυτές που βρίσκονται στον πυρήνα και ονομάζονται PABPN1 πρωτεΐνες και αυτές που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και ονομάζονται PABPC1 πρωτεΐνες.

Ο ρόλος των πυρηνικών PABPN1 περιορίζεται κυρίως στην ωρίμανση του mRNA, στην σύνθεση της poly(A)-ουράς του και στην έξοδο του mRNA από τον πυρήνα.

Ο ρόλος του κυτταροπλασματικού PABPC1 είναι η ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA, η ρύθμιση της σταθερότητάς του καθώς και η αποικοδόμηση και ανακύκλωση των ριβοσωμάτων.[8,9,10]

Στους ευκαρυωτικούς μονοκύτταρους μικροοργανισμούς μόνο ένα γονίδιο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση του κυτταροπλασματικού PABP.

Αντίθετα σε μετάζωα και σε φυτικούς οργανισμούς οικογένειες γονιδίων είναι υπεύθυνα για την έκφρασή του. Παραδείγματος χάριν στον φυτικό οργανισμό *Arabidopsis thaliana* υπάρχουν 8 γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση του PABPC1 (εικόνα 3).[9]

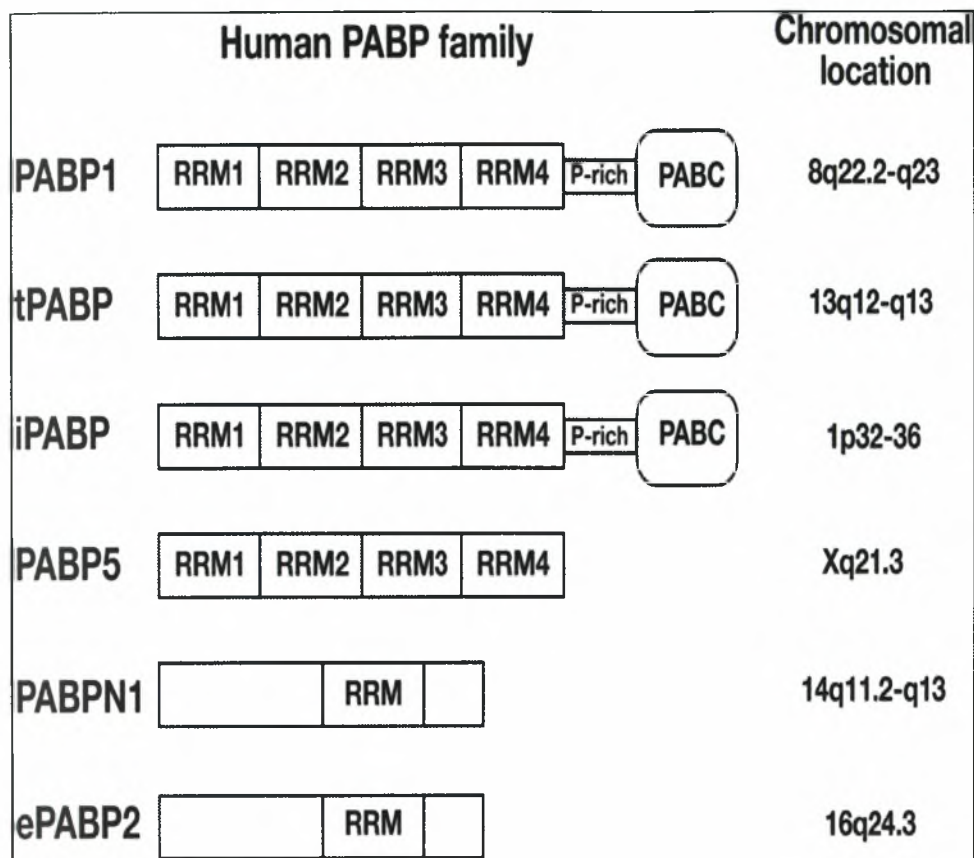
Organism	Number of PABPC genes
<i>Arabidopsis thaliana</i>	8
<i>Caenorhabditis elegans</i>	2
<i>Candida albicans</i>	1
<i>Drosophila melanogaster</i>	1
<i>Homo sapiens</i>	4
<i>Mus musculus</i>	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
<i>Xenopus laevis</i>	3

Εικόνα 3 Genes encoding cytoplasmic PABPs in various organisms

Όσον αφορά το πυρηνικό PABP βρέθηκε ότι μόνο ένα γονίδιο είναι υπεύθυνο για την έκφρασή του σε οργανισμούς όπως ο άνθρωπος, το ποντίκι, η αγελάδα, η ζύμη κ.α

Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις οικογένειες-μέλη :

1. Το tPABP
2. Το iPABP
3. Το PABP5



Εικόνα 4 . Η δομή της PABP πρωτεΐνης

Η πρωτεΐνη που παράχθηκε και μελετήθηκε στο εργαστήριο είναι η ανθρώπινη κυτταροπλασματική PABP1 η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο κυτταρόπλασμα .

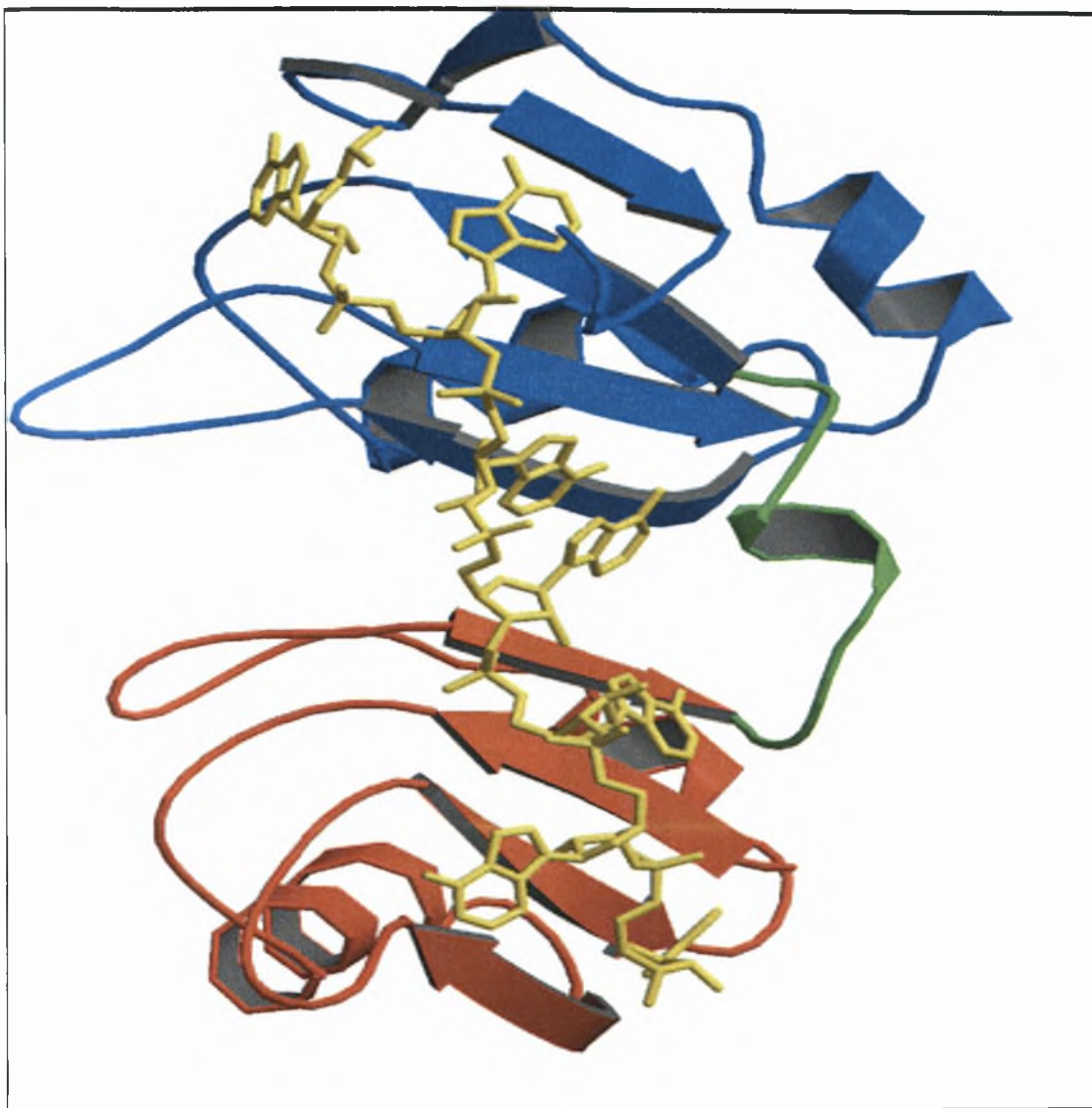
1.2.2 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ PABP ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

Αποτελείται απο τέσσερα μοτίβα RRMs και μια καρβοξυ-τελική περιοχή (εικόνα 4). Η καρβοξυ-τελική περιοχή συνδέεται με τα RRMs με μια περιοχή πλούσια σε προλίνες.

Το κάθε RRMs μοτίβο αποτελείται απο τέσσερις αντιπαράλληλες β-πτυχωτές αλυσίδες και δυο α-έλικες (εικόνα 5) .Τα RRM1 και RRM2 μοτίβα είναι κυρίως υπεύθυνα για την σύνδεση σε αυτά της poly(A) ουράς .[8-11,13-15]

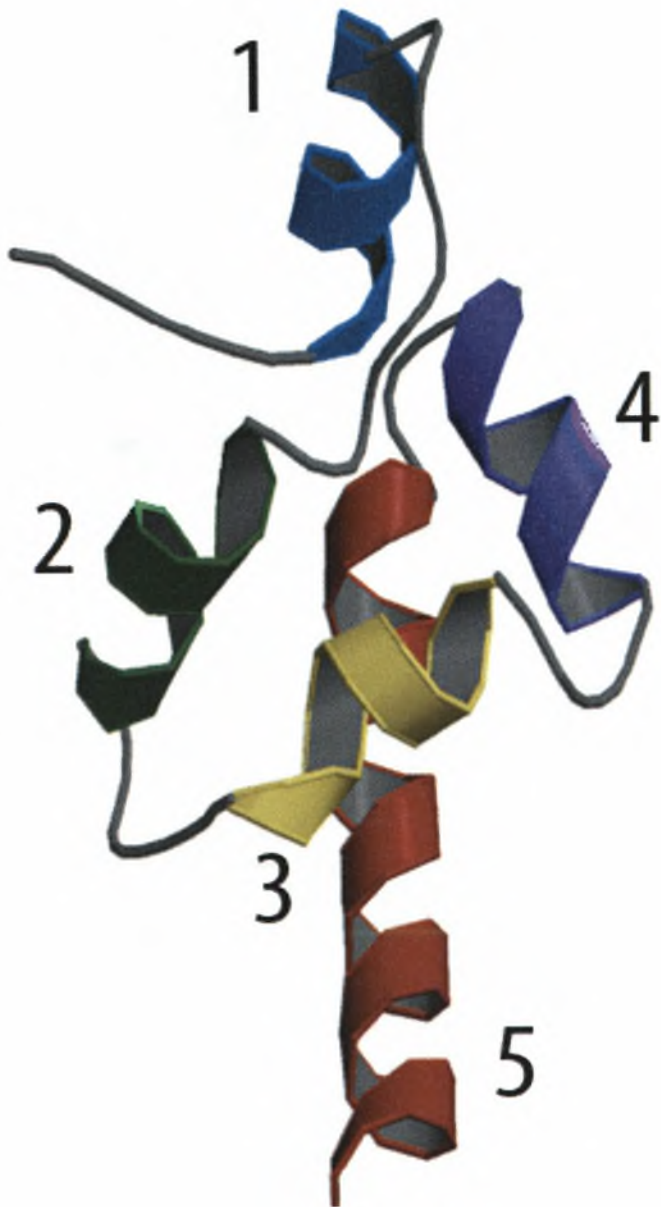
Κάθε RRMs μοτίβο περιλαμβάνει περίπου 90-100 αμινοξέα .

Οι δύο κεντρικές β-πτυχωτές αλυσίδες των RRMs μοτίβων περιέχουν δυο υψηλά συντηρημένες περιοχές => το οκταμερές RNP1 και το εξαμερές RNP2[8,9,15]



Εικόνα 5 . Η δομή του RRMs μοτίβου

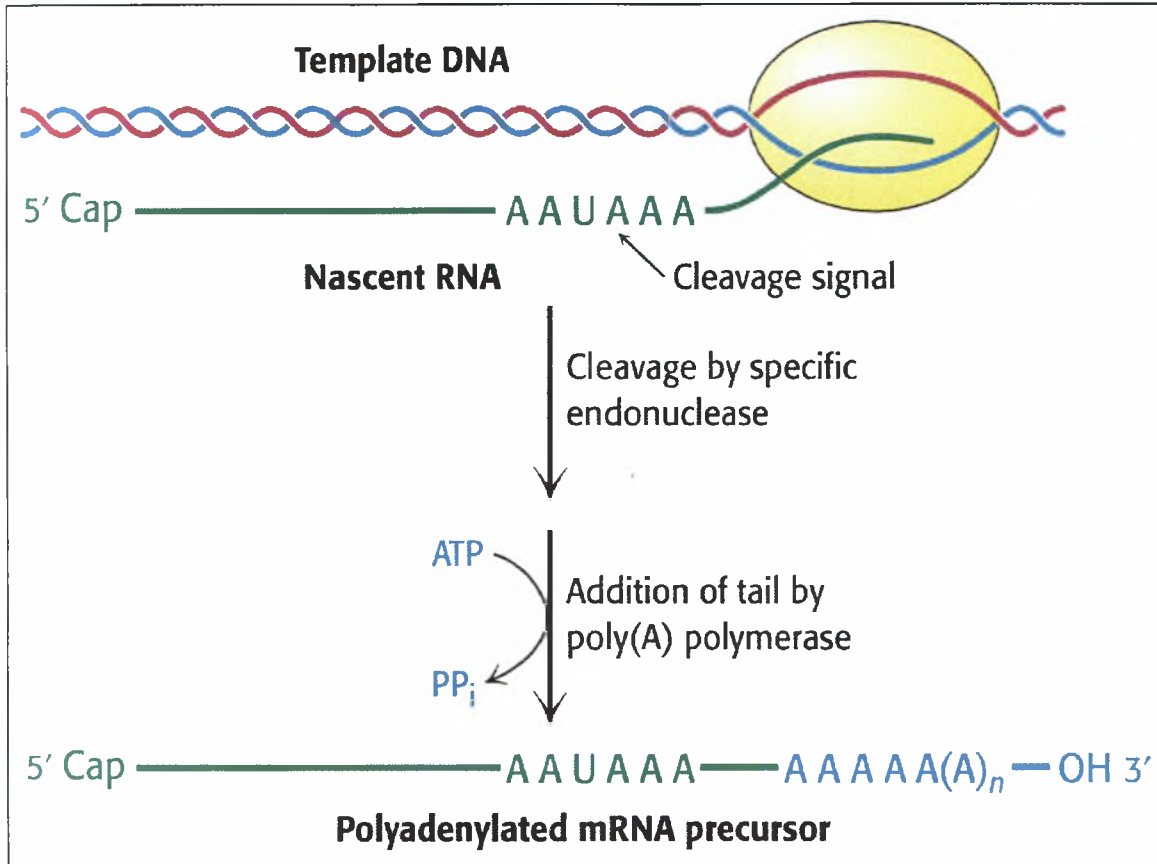
Το καρβοξυ-τελικό άκρο αποτελείται απο 5 α-έλικες που προωθούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (εικόνα 6) [8,9,15].



Εικόνα 6. Δομή της καρβοξυτελικής περιοχής της RABP πρωτεΐνης

1.2.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΣΤΗΝ ΠΟΛΥΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ mRNA

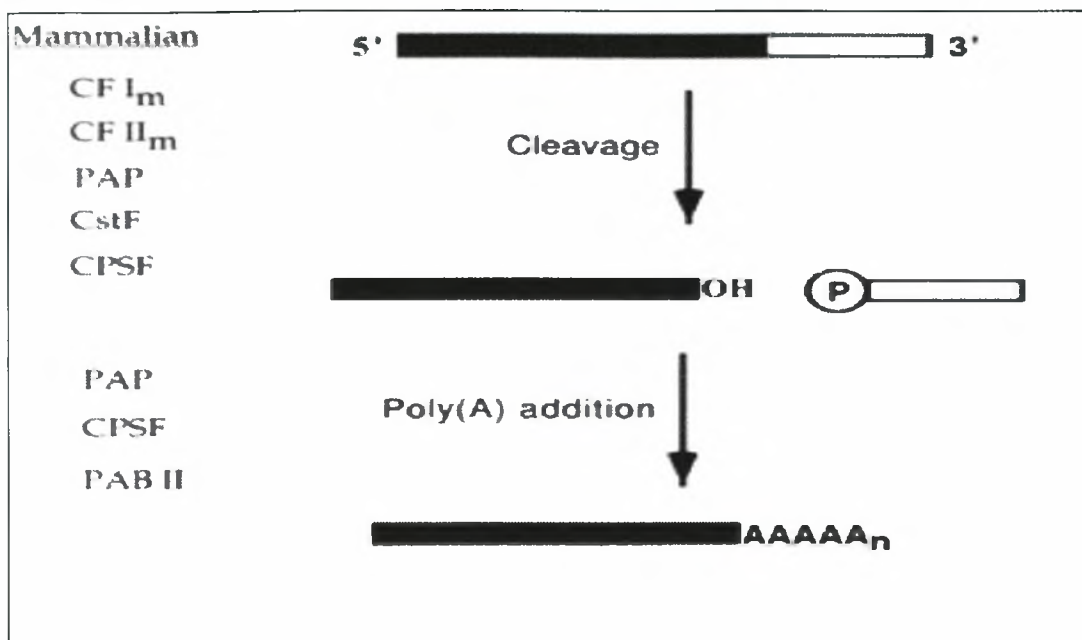
Τα messenger RNAs συντίθενται στον πυρήνα και γενικά περιέχουν μια 3' poly(A) ουρά



Εικόνα 7. Μηχανισμός πολυαδενυλίωσης mRNA

Αυτή η 3' poly(A) ουρά δεν κωδικοποιείται δηλαδή δεν προυπάρχει στο γονίδιο αλλά προστίθεται στο πρόδρομο mRNA σε δύο βήματα (εικόνα 7).

Στο πρώτο βήμα έχουμε πέψη από συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες σε συγκεκριμένη περιοχή του mRNA (σχήμα) συνήθως σε μια περιοχή με αλληλουχία AAUAAA. Στο δεύτερο βήμα έχουμε πολυαδενυλίωση στην περιοχή πέψης από την poly(A)-πολυμεράση και διάφορους άλλους παράγοντες (factors). Οι factors διεγείρουν την πολυμεράση που δεν ρυθμίζει μόνο την πολυαδενυλίωση κάθε αυτή αλλά τον τερματισμό της πολυαδενυλίωσης καθώς και το ιδανικό μέγεθος που πρέπει να έχει η poly(A) ουρά. [16]



Εικόνα 8 . Παράγοντες που συμμετέχουν στον μηχανισμό πολυαδενυλίωσης

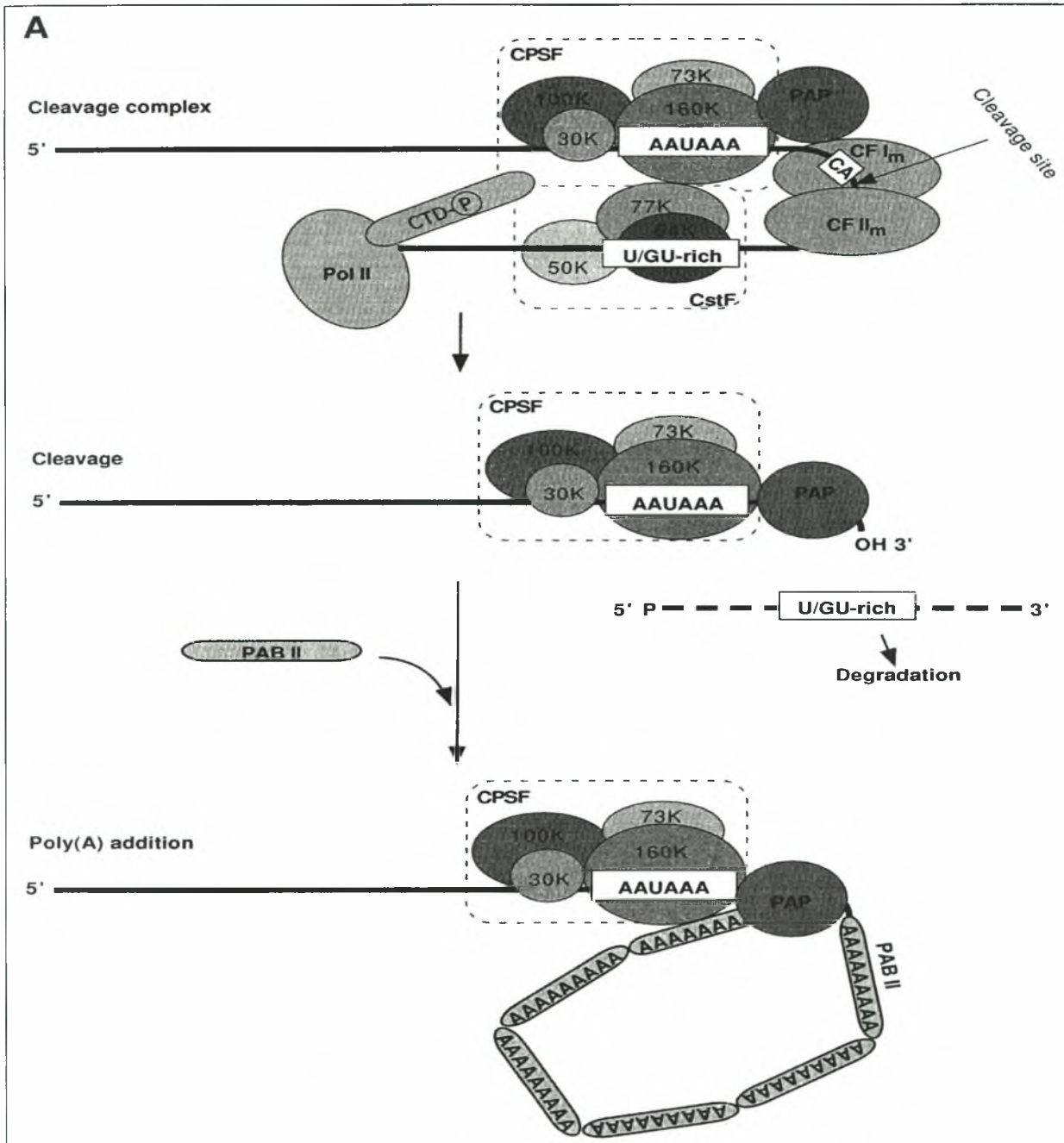
Συγκεκριμένοι παράγοντες (cleavage/polyadenylationspecificityfactors) **CPSF**, (cleavage-stimulatoryfactor) **CstF**, (cleavagefactorsI_m και II_m) **CFI_m** και **CFII_m**, (RNApolymerasell) **polIII** και (poly(A) polymerase) **PAP** εμπλέκονται στο βήμα της πέψης (cleavagestep) ενώ **CPSF**, **PAP**, και **poly(A)-bindingprotein** εμπλέκονται στο βήμα της πολυαδενυλίωσης (εικόνα 5).

Ο παράγοντας **CPSF** απαιτείται και για την πέψη και για την πολυαδενυλίωση, αναγνωρίζει και προσδέεται στην αλληλουχία AAUAAA με μικρή συγγένεια η οποία μπορεί να μεγαλώσει σε συνεργασία με τον παράγοντα **CstF** ο οποίος είναι απαραίτητος μόνο στο βήμα της πέψης. Οι παράγοντες **CFI_m** και **CFII_m** απαιτούνται μόνο για το βήμα της πέψης όπως και η **RNA polymerasell** προκαλώντας την με ταυτόχρονη υδρόλυση **ATP**. Η **Poly(A) polymerase** εκτός ότι συμμετέχει με την συνεργασία και των άλλων παραγόντων στο βήμα της πέψης, παίζει και σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του 3' τελικού άκρου προσθέτοντας αδενοσίνες στο mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Σύμφωνα με το σχήμα κατά το στάδιο της πέψης ο **CPSF** και ο **CstF** παράγοντας αναγνωρίζουν την περιοχή με αλληλουχία AAUAAA και την περιοχή με αλληλουχία πλούσια σε U και GU αντίστοιχα. Συνεργασία των δυο παραγόντων έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός συμπλόκου το οποίο προσδέεται στο mRNA και του δημιουργούν μια θηλιά. Πιο συγκεκριμένα ο **CPSF-160** αλληλεπιδρά με τον **CstF-77** και την **PAP**. Οι παράγοντες **CFI_m** και **CFII_m** μετά την πρόσδεση των **CPSF** και **CstF** προκαλούν πεψη του mRNA σε συγκεκριμένο cleavage site. Το μικρό κομμάτι του mRNA που κόπηκε

και περιέχει περιοχές πλούσιες σε U/GU-rich αποικοδομείται. Το υπόλοιπο mRNA πολυαδενυλιώνεται (εικόνα 9).

Στην πολυαδενυλίωση CPSF και PAP προσδένονται στο 3^ο άκρο στο κομμένο RNA και συνθέτουν poly(A) ουρά με την βοήθεια της PABII.[16,20]



Εικόνα 9 Μηχανισμός πολυαδενυλίωσης

1.2.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PABP ΣΤΗΝ ΕΞΟΔΟ ΤΟΥ mRNA ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ

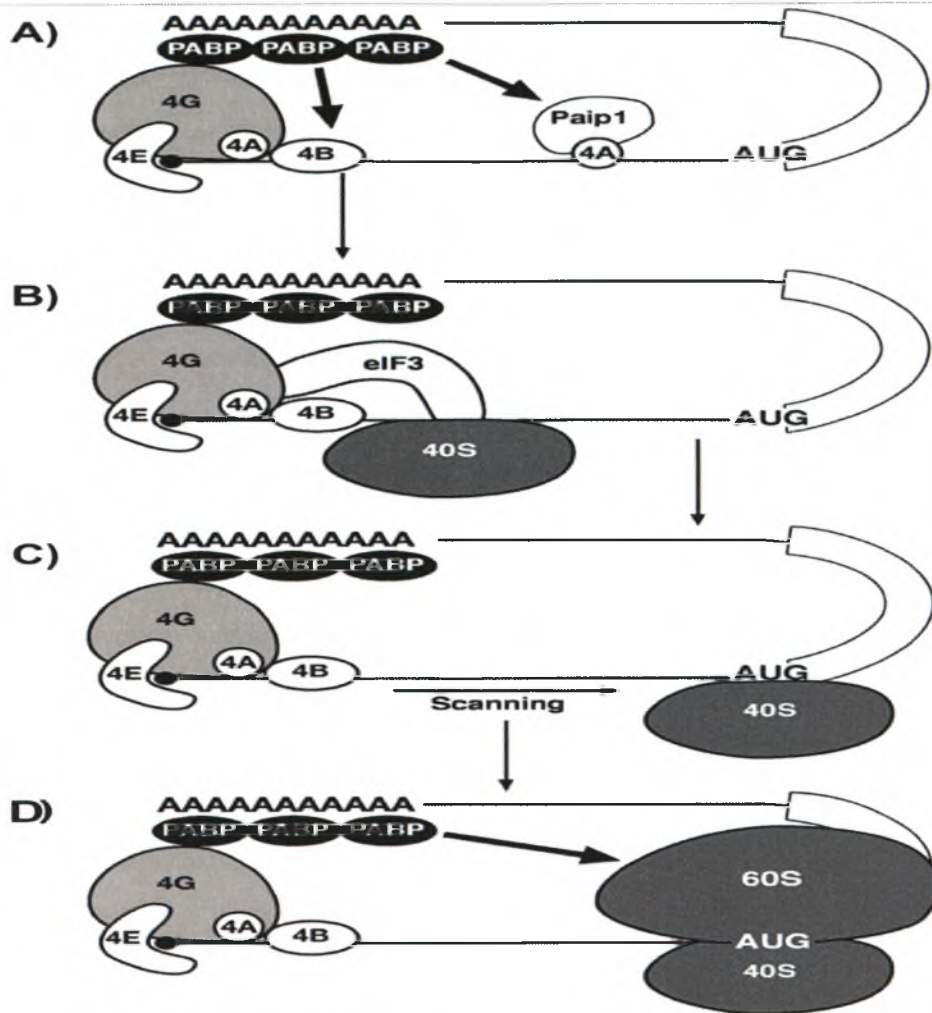
Ένας δεύτερος ρόλος του PABP στην ωρίμανση του mRNA είναι η έξοδος του στο κυτταρόπλασμα. Συνήθως μετά το σήμα αποδενυλίωσης το mRNA κατευθύνεται στο κυτταρόπλασμα. Στην έξοδο του mRNA σημαντικό ρόλο παίζει το PABP το οποίο συνδέεται με συγκεκριμένες κυκλοσπορίνες καθώς και με πυρινικούς υποδοχείς εξόδου Xpo1p. Έξοδος του mRNA από το κυτταρόπλασμα φαίνεται να είναι πιο περίπλοκη διαδικασία από την έξοδο πρωτεϊνών. Τα mRNAs βγαίνουν από τον πυρήνα ως ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα (mRNPs) που η συγκρότησή τους αρχίζει κατά την διάρκεια μεταγραφής του. Για την έξοδο του mRNA πρέπει να έχουν τελειώσει όλα τα βήματα ωρίμανσης του pre-mRNA που απαιτούνται και όλοι οι παράγοντες που βοηθούν στην ωρίμανση θα πρέπει να έχουν απομακρυνθεί. Ο μηχανισμός πολυαδενυλίωσης διαδραματίζει άμεσο ρόλο στην διευκόλυνση της μεταφοράς του mRNA στον πυρήνα. Η PABP πρωτεΐνη συμμετέχει στην διευκόλυνση της μεταφοράς και θα μπορούσε να κατέχει τα πυρηνικά σήματα εξαγωγής και να συμβάλλει στην έξοδο του mRNPs. Μελέτες με μικροσκόπηση ηλεκτρονίων έχει δείξει ότι 3' άκρο και 5' άκρο του mRNA έρχονται σε επαφή με τον πυρηνικό πόρο με το 5' άκρο να διασχίζει την πυρινική μεμβράνη πρώτη. Οι αλληλεπιδράσεις του πόρου με την πολυA-ουρά και τις συνδεδεμένες σε αυτό πρωτεΐνες βοηθούν στον προσανατολισμό του μορίου. Ένας άλλος μηχανισμός για το πως η PABP συμμετέχει στην έξοδο του mRNA είναι ότι αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που περιέχουν σήματα εξαγωγής Gle/Rss και τις στρατολογούν στο mRNA. [17,18,20]

1.2.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PABP ΣΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ

Όπως προαναφέραμε και παραπάνω το mRNA με την βοήθεια του PABP και άλλων παραγόντων εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα για να αρχίσει η μετάφρασή του από τα ριβοσώματα. Το PABP με την συνεργασία και άλλων μεταφραστικών παραγόντων είναι υπεύθυνο για την έναρξη της μετάφρασης. Αρχικά στο CAP στο 5' άκρο του mRNA προσδένεται ο παράγοντας eIF4E και στην πολυ(A)-ουρά στο 3' άκρο του προσδένεται το PABP. Στη συνέχεια ο μεταφραστικός παράγοντας eIF4G αλληλεπιδρά με το PABP και πιο συγκεκριμένα με τις RRM1 και RRM2 περιοχές του PABP, μια αλληλεπίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της συγγένειας του eIF4E για το CAP και του PABP για την πολυ(A)-ουρά. Η αλληλεπίδραση του eIF4G με το PABP και με το eIF4E προκαλεί αναδίπλωση του mRNA σχηματίζοντας μια θηλιά (closed loop) και δίνοντας το σήμα για την έναρξη της μετάφρασης. Έρευνες όμως

έχουν δείξει ότι μετάλλαξη του elf4G στις θέσεις αναγνώρισης με το PABP δεν επηρεάζουν την μετάφραση και αυτό γιατί υπάρχουν και άλλοι μεταφραστικοί παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρολό στην έναρξη της μετάφρασης . Ένας τέτοιος εναρκτήριο μεταφραστικός παράγοντας είναι ο elf4B ο οποίος αλληλεπιδρά με το PABP ενεργοποιώντας έτσι την δράση της elf4A RNA ελικάσης . Επίσης το PABP μπορεί και αλληλεπιδρά και με έναν άλλο εναρκτήριο μεταφραστικό παράγοντα , τον Paip1 ο οποίος όπως και ο elf4G αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τη δράση της elf4A RNA-ελικάσης . Επίσης ο Paip1 είναι υπεύθυνος για την σταθερότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του elf4G και της PABP.

Το μικρό τμήμα του ριβοσώματος 40s προσδένεται στο 5' κάλυμα . Η στρατολόγηση αυτή του μικρού τμήματος ριβοσώματος οφείλεται στον παράγοντα elf3 . Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται συνδεδεμένος με την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος 40s και τον elf4G μεταφραστικό παράγοντα . Η μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος 40s κατευθυνόμενη από αυτούς τους μεταφραστικούς παράγοντες σκανάρει το mRNA από το 5' άκρο προς το 3' άκρο μέχρι να βρει το εναρκτήριο κωδικό AUG . Τότε η μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος 60s προσδένεται στην μικρή υπομονάδα σχηματίζοντας το ριβόσωμα 80s όπου και θα ξεκινήσει την μετάφραση όπως προαναφέραμε και παραπάνω (εικόνα 10)[8,9,19-24].



Εικόνα 10 . Μηχανισμός έναρξης της μετάφρασης από τους μεταφραστικούς παράγοντες eIF

1.2.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PABP ΣΤΟΝ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΤΟΥ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΟΣ

Ο μεταφραστικός παράγοντας λήξης eRF1 είναι υπεύθυνος για την υδρόλυση του πολυπεπτιδίου μετά από αναγνώριση ενός εκ των τριών κωδικονίων λήξης της μετάφρασης UGA , UAG , UAA . Η ενεργοποίηση του παράγοντα αυτού ενεργοποιείται από μια GTPase , την eRF3 . Η GTPase eRF3 αλληλεπιδρά με τη καρβοξυ-τελική περιοχή της PABP μέσω της αμινοτελικής της περιοχής καθώς και με την eRF1 ενεργοποιώντας και ενισχύοντας την δράση της . Η eRF3 –PABP αλληλεπίδραση ενισχύει την αποτελεσματικότητα της λήξης της μετάφρασης στα κύτταρα και προωθεί την ανακύκλωση του ριβοσώματος .[8,9,24,25]

1.2.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PABP ΣΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ mRNA

Η PABP πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA μετά το πέρας της μετάφρασης .

Η διεργασία αποικοδόμησης του mRNA περιλαμβάνει τρία στάδια:

α) ενδονουκλεοτική πέψη β) απομάκρυνση του 5' καλλύματος γ) κόντευμα της poly(A) ουράς . Αποτέλεσμα των τριών γεγονότων αυτών είναι η καταστροφή της (closedloop) αναδίπλωσης του mRNA.

Αρχικά η αποικοδόμηση του mRNA αρχίζει με έναν καταλυτικό μηχανισμό κόντευματος της poly(A) ουράς σε oligo(A) ουρά μήκους 10-15 νουκλεοτιδίων . Αυτό επιτυγχάνεται με το Ccr4p-Pop2p-Notp σύμπλεγμα πρωτεϊνών αποαδενυλώσεως , με αποτέλεσμα το PABP και η poly(A) ουρά να απομακρύνονται εντελώς από το 3' άκρο .

Στη συνέχεια το 5' κάλυμα αποικοδομείται από το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα Dcp1p και Dcp2p.

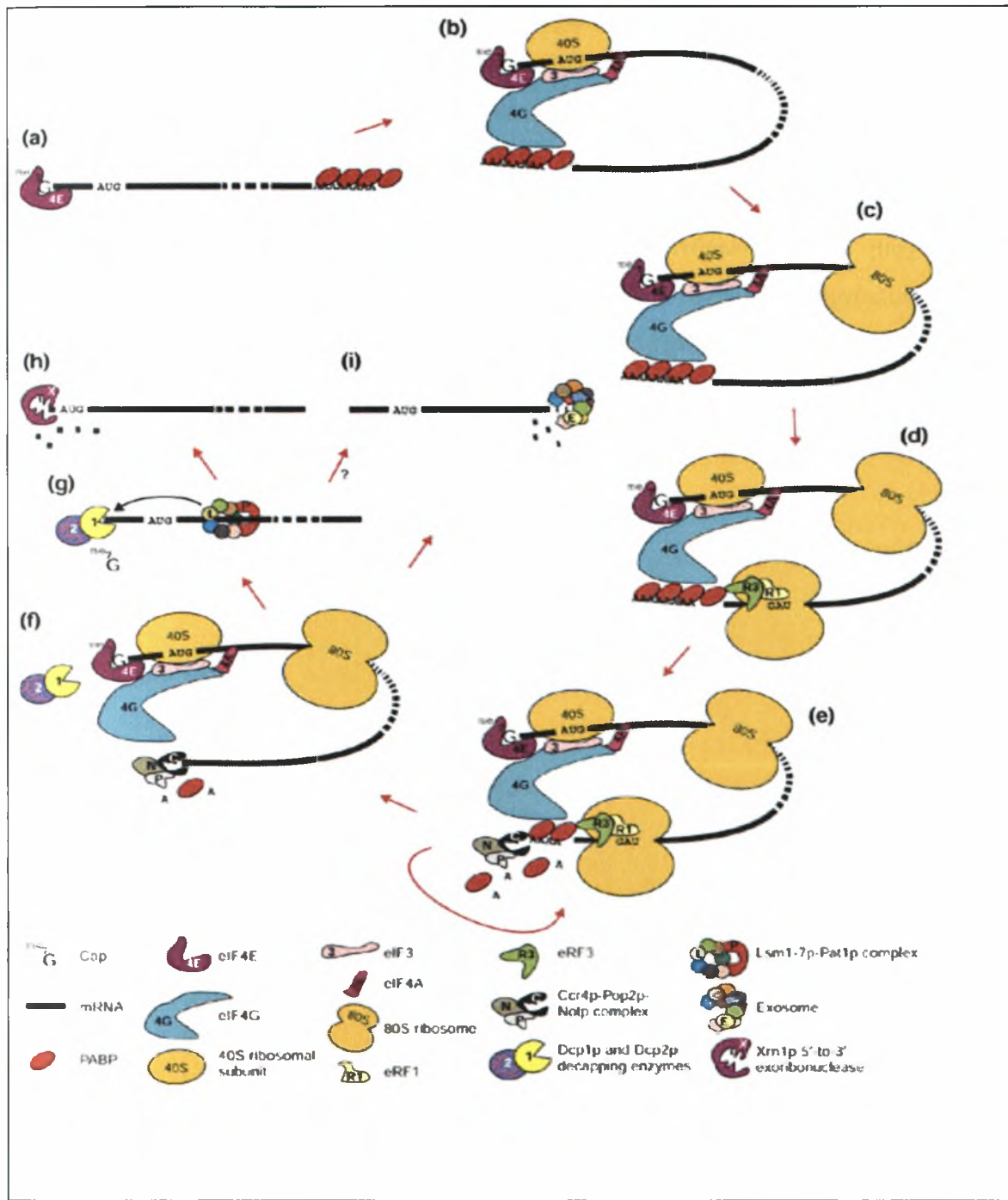
Κατα το τελικό στάδιο αποικοδόμησης το mRNA αποσυντίθεται από το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα Lsm1-7p-Pat1p και από την εξωριβονουκλεάση Xrn1p με κατεύθυνση 5' - 3' ή από το εξώσωμα με κατεύθυνση 3' - 5'. [8,9,25,26]

1.2.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ PABP ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ mRNA

Η PABP παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA με το να ανταγωνίζεται την αποικοδόμηση της poly(A) ουράς . Η πρόσδεση της στην poly(A) ουρά εμποδίζει την δράση παραγόντων και πρωτεϊνών που προκαλούν αποικοδόμηση του mRNA . Η δράση του πρωτεϊνικού συμπλέγματος Ccr4p-Pop2p-Notp και του ενζύμου αποδενυλίωσης PARN αναστέλλεται από την παρουσία της PABP .

Άρα η PABP προστατεύει το mRNA από την αποαδενυλίωση αναστέλλοντας την δράση αποαδενυλασών όπως η PARN . Επίσης προστατεύει το mRNA από τον eIF4E με το να προσδέεται στο 5' κάλυμα , ρυθμίζει συγκεκριμένες περιοχές του mRNA πλούσιες σε νουκλεοτίδια AU (AREs στοιχεία και mCRD στοιχεία) που είναι υπεύθυνες για την σταθερότητα του και αλληλεπιδρά με ρυθμιστικές πρωτεΐνες που αυξάνουν την σταθερότητα του mRNA . Για παράδειγμα δυο πρωτεΐνες που προσδέονται στο 3' άκρο του mRNA και ενισχύουν την

σταθερότητα του, η aCP1 και aCP2 αλληλεπιδρούν με την PABP. Με τον τρόπο αυτό η PABP ρυθμίζει και αυξάνει την ικανότητα των aCP πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν με την 3' UTR. [8,9,20,27,28]



Εικόνα 11 . Ο μηχανισμός έναρξης και λήξης της μετάφρασης, ο μηχανισμός αποικοδόμησης και όλοι οι παράγοντες που συμμετέχουν στη μετάφραση

1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση των κατάλληλων συνθηκών για την πλέον αποδοτική έκφραση της χιμαιρικής PABP- πρωτεΐνης σε βακτηριακά κύτταρα *E. Coli*. Επιπλέον, θα πραγματοποιηθεί καθαρισμός της PABP μέσω χρωματογραφίας συγγένειας, αποκοπή της ετικέτας των 6 ιστιδινών μετά από πέψη με την 3C πρωτεάση και ο έλεγχος της δευτεροταγούς δομής της ανασυνδυασμένης PABP πρωτεΐνης με την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού.

Στα πλαίσια των δραστηριοτήτων επιδιώχθηκε η μέγιστη δυνατή εξοικείωση με τεχνικές μοριακής βιολογίας (παρασκευή και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli*), βιοχημείας (επαγωγή έκφρασης και καθαρισμός πρωτεϊνών σύντηξης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας, ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου-SDS, διαπίδυση, ενζυμική πέψη υποστρώματος από την πρωτεάση 3C) και βιοφυσικής (φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού - CD).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κατά την πειραματική διαδικασία αρχικά πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή κατάλληλου DNA σε ένα φορέα κλωνοποίησης για την δημιουργία πλασμιδίου με τα κατάλληλα και επιθυμητά χαρακτηριστικά. Ο πλασμιδικός φορέας κλωνοποίησης που επιλέχτηκε τόσο για την PABP1 πρωτεΐνη όσο και την πρωτεάση 3C είναι ο pGEX-6p1. Η διαδικασία κλωνοποίησης του cDNA της πρωτεάσης 3C στο πλασμιδικό φορέα pGEX πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του καθηγητή Anthony Lai (Wales Heart Institute, University of Wales Medical School, UK). Η κλωνοποίηση του cDNA της PABP1 σε πλασμιδικό φορέα pGEX έγινε στο Εργαστήριο Πρωτεϊνικών Αλληλεπιδράσεων (ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»). Ο κλώνος cDNA της ανθρώπινης PABP1 παραχωρήθηκε από την Dr. Nicolle Dalla Venezia, University of LYON, CNRS, France.

Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε παράλληλα και για το PABP1 και την 3c πρωτεάση για την έκφραση, απομόνωση και καθαρισμό τους από κατάλληλους πλασμιδιακούς κλώνους μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης τους σε βακτηριακά κύτταρα E.coli έγινε όπως παρουσιάζεται παρακάτω

- 1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων E.coli BL21 (DE3) και origami (D3)
- 2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E.coli BL21 (DE3) και origami με το πλασμιδιο pGeX6p1
- 3 Επιλογή κυτταρικής σειράς και συγκέντρωσης IPTG για βέλτιστη παραγωγή πρωτεΐνης
- 4 Επιλογή βέλτιστης θερμοκρασίας επαγωγής έκφρασης σε συνάρτηση με την ποσότητα παραγωγής και διαλυτότητας της πρωτεΐνης
- 5 Επιλογή βέλτιστης χρονικής διάρκειας επαγωγής έκφρασης
- 6 Καθαρισμός με σφαιρίδια GST και γλουταθειονη
- 7 Διαπίδυση της πρωτεΐνης για δημιουργία κατάλληλου ρυθμιστικού περιβάλλοντος
- 8 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της PABP και της 3c πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου sds 7.5%

Η πρωτεΐνη PABP καθαρίστηκε και μελετήθηκε σε επίπεδο βιοφυσικής με την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού .

2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E.coli

Παράγονται κύτταρα E.coli BL21 (DE3) με την μέθοδο CaCl₂. Μια αποικία δεκτικών κυττάρων αναπτύσσεται σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB με κατάλληλο αντιβιοτικό στους 37°C υπό ανάδευση 220 rpm όλη τη νύχτα. Το επόμενο πρωί εμβολιάζονται 200 ml LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό με 1ml από την overnight καλλιέργεια και αφήνονται για ανάδευση στους 220 rpm στους 37°C μέχρι η πυκνότητα των κυττάρων φτάσει στο O.D₆₀₀=0.6 ύστερα από συχνή φωτομέτρηση.

Μεταφέρεται η καλλιέργεια σε 4 αποστειρωμένους σωλήνες (4x50 ml) .

Τα κύτταρα κατακρημνίζονται με φυγοκέντριση στις 6000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C.

Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα τοποθετείται στον πάγο. Επαναδιαλύονται τα κύτταρα με 10 ml διαλύματος CaCl₂ 0.1 M ανα 50 ml αρχικής καλλιέργειας.

Τοποθετούνται όλα τα διαλύματα σε ένα σωλήνα των 50 ml .Φυγοκεντρούνται στις 6000 στροφές για 10 λεπτά στους 3 °C. Αποχύνεται το υπερκείμενο και επαναδιαλύονται τα κύτταρα σε 10 ml διαλύματος CaCl₂0.1 M.

Τοποθετούνται στον πάγο για 30 λεπτά και μετά κατακρημνίζονται με φυγοκέντριση για 10 λεπτά στους 3°C στις 6000 rpm στροφές .

Αποχύνεται το υπερκείμενο και επαναδιαλύονται τα κύτταρα σε 1 ml διαλύματος CaCl₂ με γλυκερόλη (100 mM CaCl₂, 20 % γλυκερόλη w/v). Τα κύτταρα μοιράζονται σε 20 παγωμένους αποστειρωμένους σωλήνες erpendorfs και αποθηκεύονται στους -80 °C όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε στιγμή για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.2.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E.coli

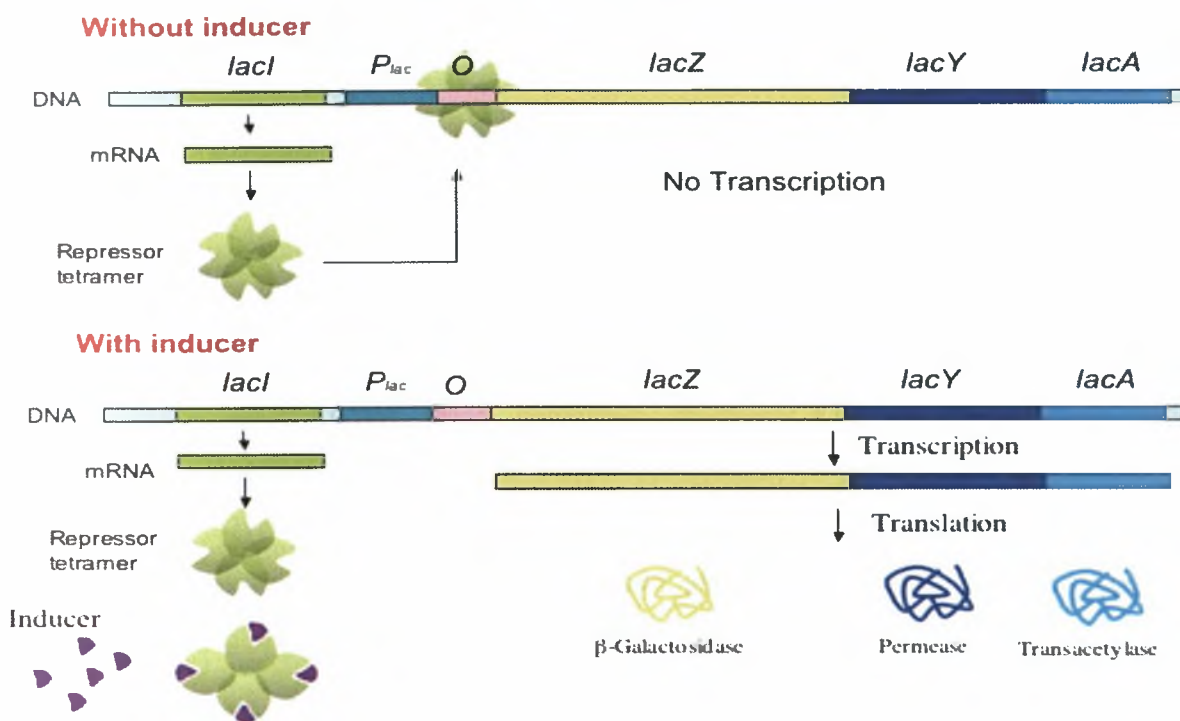
Τα δεκτικά βακτηριακά κυτταρα E.coli BL21 (DE3) από τους -80°C τοποθετούνται αμέσως στον πάγο για 5 λεπτά . Παράλληλα παρασκευάστηκαν 100 ml LB και 400 ml Άγαρ. Γεμίζεται το τριβλίο με άγαρ στο οποίο έχει εισαχθεί 400 ml αμπικιλίνη μέχρι τη μέση και αφήνεται να πήξει. Όταν ξεπαγώσουν τα κύτταρα προσθέτονται 2 ml ανασυνδυασμένου DNA (PABP-pGeX6p1). Τοποθετούνται στον πάγο για μισή ώρα και στη συνέχεια για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C μέσα στο υδατόλουτρο (heat-shock).

Επανατοποθετούνται τα κύτταρα στον πάγο για 5 λεπτά. Προσθέτονται 900 ml LB στα κύτταρα DNA με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Τοποθετείται το errendorf στον αναδευόμενο επωαστήρα για μία ώρα στους 37°C στις 220 στροφές. Μετά την μία ώρα κατακρημνίζονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για ένα λεπτό. Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα που μένει επαναδιαλύεται με 100 ml LB κάτω από τη χρήση της φλόγας. Επιστρώνονται στα τριβλία LB άγαρ με αντιβιοτικό ανάλογα με την θολερότητα 150 ml ιζήματος/LB και επωάζονται τα τριβλία στους 37°C για όλο το βράδυ.

2.2.3 ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

Οι κυτταρικές σειρές E. Coli που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση της πρωτεΐνης είναι τα BL21 (DE3) και Origami (D3) στα οποία εισήχθησαν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με το επιθυμητό γονίδιο. Η επαγωγή γίνεται με προσθήκη του επαγωγέα έκφρασης ισοπροπυλο-1-θείο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτη (IPTG). Το IPTG είναι ένα ανάλογο της λακτόζης που δεν διασπάται από το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση . Δεσμεύεται στον καταστολέα Iac και τον αδρανοποιεί λειτουργώντας έτσι ως επαγωγέας έκφρασης του οπερονίου της λακτόζης. Πιο συγκεκριμένα το IPTG δεσμεύεται στον καταστολέα και δεν του επιτρέπει να προσδεθεί στον υποκινητή. Έτσι ο υποκινητής είναι ελεύθερος για να προσδεθεί η RNA πολυμεραση και να αρχίσει η μεταγραφή και η μετάφραση (εικόνα 12).

The Lac Operon



Εικόνα 12 . Το οπερόνιο της λακτόζης με και χωρίς επαγωγέα

Η επώαση γίνεται σε διαφορετικές θερμοκρασίες, συγκεντρώσεις IPTG, χρόνους επαγωγής και κυτταρικές σειρές με σκοπό να βρεθούν οι πιο κατάλληλες συνθήκες για την έκφραση της πρωτεΐνης. Ο καθαρισμός της χημεικής πρωτεΐνης PABP-gst γίνεται με χρήση σφαιριδίων GST και L γλουταθειονης.

Κατά την επίτευξη αυτής της διαδικασίας μολύνονται αρχικά 35 ml LB / 35 ml amb με μια αποικία από κατάλληλα μετασχηματισμένη κυτταρική σειρά με στόχο την έκφραση της PABP από 3 L βακτηριακής καλλιέργειας. Αφήνεται να αναπτυχτεί όλη την νύχτα και την επομένη μέρα σε 3L LB/3ml amb προστείνεται 30 ml ποσότητας από το overnight. Οι φλάσκες μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο και όταν η πυκνότητα των βακτηριακών κυττάρων φτάσει το 0,6 προστείνεται το IPTG και αφήνεται για επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία και ανάλογη χρονική διάρκεια. Όταν τελειώσει η επώαση συλλέγονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 8 λεπτά. Η έκφραση της πρωτεΐνης ελέγχεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδιου-SDS.

2.2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ-SDS

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται α) για την επαλήθευση και επιβεβαίωση έκφρασης της σωστής πρωτεΐνης κατά την διάρκεια των πειραματικών διεργασιών βάση της σύγκρισης της με μοριακά βάρη δεικτών ανάλυσης β) για την διαπίστωση της ποσότητας της πρωτεΐνης με μια πρώτη εμπειρική ματιά γ) καθώς και την παρατήρηση της καθαρότητας της

Ανάλογα με το μέγεθος της προς ανάλυσης πρωτεΐνης παρασκευάζεται πηκτή κατάλληλης συγκέντρωσης σύμφωνα με τον πίνακα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η πρωτεΐνη μας είναι το PABP το οποίο έχει μοριακό βάρος γύρω στα 100 kDalton άρα παρασκευάζεται πηκτή πολυακρυλαμιδίου 7,5 %. Το προς πολυμερισμένο μείγμα τοποθετείται σε κατάλληλο σύστημα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (BioRad) (εικόνα 13) και επικαλύπτεται με νερό. Όταν η πηκτή είναι έτοιμη και έχει πήξει αποχύνεται το νερό και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.

Η πηκτή επιστοίβασης τοποθετείται ακολούθως μαζί με χτενάκι για τον σχηματισμό των πηγαδιών φόρτωσης. Όταν η πηκτή πήξει, τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή με διάλυμα ηλεκτροφόρησης Reducing Sample Buffer 1x και αφαιρείται το χτενάκι.

Πριν την φόρτωση των πρωτεϊνών, θερμαίνονται τα δείγματα μας στους 95 °C για 5 λεπτά με ρυθμιστικό διάλυμα Reducing Sample Buffer ώστε να αποδιαταχτούν και να είναι έτοιμες για την ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες μας διαχωρίζονται με εφαρμογή τάσης αρχικά 85 volt και μετά από κάποιο χρονικό διάστημα όπου τα ηλεκτροφορούντα δείγματα ξεπεράσουν την πηκτή επιστοίβασης το ανεβάζουμε στα 120 volt.

Upper buffer	1 ml
30% acrylamide	600 ul
H2O	2.4 ml
APS	30 ul
TEMED	5 ul

Πίνακας 1 . Συγκεντρώσεις συστατικών για πηκτή πολυακρυλαμιδίου - SDS

Άρα κατά την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου αρχικά παρασκευάζεται :

- a) 7,5 % lower gel : 1.25 ml Lower Buffer , 1.25 ml 30% Acrylamide , 2.45 ml H₂O , 50 μl 10 % APS και 5 μl TEMED
- b) upper gel : 1 ml Upper Buffer , 600 μl 30% Acrylamide , 2.4 ml H₂O , 30 μl 10 % APS και 5 μl TEMED

2.2.5 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E . coli ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΙΖΗΜΑΤΟΣ-ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ

Αμέσως μετά την συγκέντρωση των κυττάρων επιτελείται λύση αυτών για να ελεγχθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης (ίζημα-υπερκείμενο). Αυτό πραγματοποιείται με την εξής μεθοδολογία:

α) πήξη - τήξη (freeze-thaw) → Σε ένα ποτήρι ζέσεως με νερό και πάγο τοποθετούνται τα κύτταρα μας και αφήνονται να ξεπαγώσουν για περίπου 10 λεπτά .Στην συνέχεια τοποθετούνται για 10 λεπτά στους -80 °C και ξανά ξεπαγώνονται στο νερό με τον πάγο για 20 λεπτά . Αυτή η απότομη και εναλλασσόμενη μεταβολή της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα να οδηγούνται οι μεμβράνες των κυττάρων στην καταστροφή τους .

β) χρήση PBS-λυσοζυμης (Lysis buffer) → παρασκευάζεται διάλυμα PBS στο οποίο προσθέτουμε λυσοζυμη (0,04 gr στα 20 mlPBS)

Προστίθεται διάλυμα λύσης κυττάρων Lysis buffer στα κύτταρα μας και επαναιωρούνται . Αφήνονται σε αναδευτήρα για 1 ώρα στους 4 °C μέχρι να διαλυτοποιηθει εντελώς το ίζημα . Εν συνέχεια επαναιωρούται και πάλι . Τέλος αναδεύονται ισχυρά με vortex και τοποθετούνται στον πάγο .

γ) Λύση κυττάρων με χρήση υπερήχων → Τα σχεδόν ήδη λυμένα απο το προηγούμενο στάδιο κύτταρα τοποθετούνται σε συσκευή υπερήχων σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του οργάνου (8 χτυπήματα με υπέρηχο (burns) από 3 φορές)

Στην συνέχεια μεταφέρονται σε erpendorfs και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C επιτυγχάνοντας έτσι διαχωρισμό του ιζήματος από το υπερκείμενο .

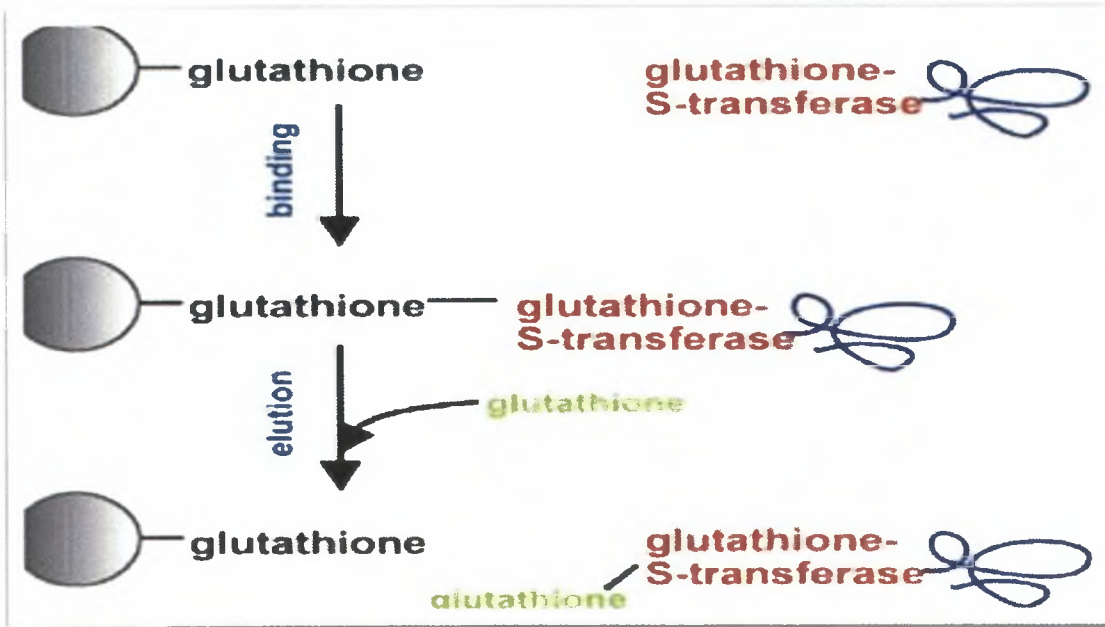
2.2.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ GST-PABP ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

Για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης αρχικά φυγοκεντρούνται τα σφαιρίδια GST για 3 λεπτά για να διαχωριστεί η αιθανόλη . Απορρίπτεται η αιθανόλη και προστίθεται τετραπλάσιος όγκος διαλύματος PBS .

Φυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες με πριν και απορρίπτεται το υπερκείμενο . Αναμειγνύονται τα σφαιρίδια με το υπερκείμενο των κυττάρων και αφήνονται για επώαση σε αναδευτήρα στους 4 °C για 45 λεπτά . Φυγοκεντρούνται και πάλι και απορρίπτεται το υπερκείμενο . Εν συνέχεια , ξεπλένονται τα σφαιρίδια με διάλυμα PBS τρεις φορές.

Αφήνεται μια μικρή ποσότητα PBS μαζί με τα σφαιρίδια και μεταφέρονται σε κατάλληλη στήλη όπου και τα επαναιωρούνται . Αφού περάσει το PBS , παύεται την ροη και τοποθετείται το διάλυμα έκλουσης (50mMTris, 10mM ανηγμένη L-γλουταθειόνη, pH=8,0) κρατώντας το έκλουμα .

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα κρατούνται κλάσματα των 20 μl για εφαρμογή της μεθόδου Bradford .



Εικόνα 14 . Καθαρισμός χημειρικής πρωτεΐνης GST-PABP πρωτεΐνης με σφαιρίδια γλουταθειόνης

2.2.7 ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD

Το αντιδραστήριο Bradford σχηματίζει έγχρωμο σύμπλοκο με την προς μέτρηση πρωτεΐνη και μετράται η απορρόφηση του στην περιοχή 465 – 596 nm .Το ποσό της απορρόφησης είναι ανάλογο της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης . Απλοποιημένα, φαίνεται οπτικά η χρωματική μετατροπή από καφέ σε διάφορες αποχρώσεις , που ανάλογα με το πόσο αυξημένη είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης τόσο τείνουν όλο και πιο πολύ προς το κυανό .[29]

2.2.8 ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ

Η διαπίδυση της πρωτεΐνης γίνεται με στόχο την δημιουργία κατάλληλου ρυθμιστικού περιβάλλοντος που να μας διευκολύνει για περαιτέρω χρήση της . Η μεμβράνη διαπίδυσης που χρησιμοποιήθηκε έχει μέγεθος πόρων που συγκρατεί εντός της μεμβράνης μόρια με βάρος 12 – 14

Kdalton και το διάλυμα διαπίδυσης που χρησιμοποιήθηκε είναι (150 mM NaCl , 50 mM Tris base , pH = 7,5)

Πρακτικά σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος διαπίδυσης τοποθετείται η μεμβράνη μας γεμάτη κατά τα 3 / 4 με πρωτεΐνη από τον καθαρισμό της με σφαιρίδια GST (η αναλογία διαλύματος - πρωτεΐνης επιδιώκεται να είναι περίπου 200 / 1) . Αφήνεται να διαπιδύεται για 12 ώρες.

2.2.9 ΦΑΣΜΑΤΟΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ (CD)

Η φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism - CD) είναι μια τεχνική η οποία καταγράφει , σαν συνάρτηση του μήκους κύματος , την ασυμμετρία απορρόφησης του δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός από ένα μόριο . Η διάφορα αυτή στην απορρόφηση προκύπτει από την ασυμμετρία στην διάταξη των χρωμοφόρων στο μόριο ή με άλλα λόγια , από την οπτική ενεργότητα του μορίου . Η απουσία οπτικής ενεργότητας στην δομή του μορίου οδηγεί σε μηδενικό σήμα , ενώ η ύπαρξη οργανωμένων δόμων παρέχει ένα φάσμα στο οποίο μπορεί να εμφανιστούν τόσο θετικές όσο και αρνητικές διαφορές απορρόφησης .

Η CD είναι μια τεχνική που μπορεί να αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμη ακόλουθα πεδία μελέτης :

α) στο να διαπιστώσει κανείς αν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην αναδιπλωμένη της μορφή, να προσδιορίσει την δευτεροταγή δομή της, να παρατηρήσει μεταβολές στην τριτοταγή δομή της και να την κατατάξει στην κατάλληλη δομική οικογένεια,

β) στην σύγκριση δομών πρωτεϊνών που προέκυψαν από διαφορετικές πηγές ή δομών της ίδιας πρωτεΐνης κάτω από διαφορετικές συνθήκες διαλύτη ή θερμοκρασίας ή και στην σύγκριση δομών προκληθέντων από μεταλλάξεις και

γ) στην μελέτη του εάν αλληλεπιδράσεις τύπου πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταβάλλουν την δομή των αλληλεπιδρώντων μορίων.

Η δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών προσδιορίζεται με CD στην περιοχή του άπω υπεριώδους (190-250nm). Στην περιοχή αυτή η χρωμοφόρος ομάδα είναι ο πεπτιδικός δεσμός και εμφανίζει μη μηδενικό σήμα όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην αναδιπλωμένη δομή (ύπαρξη κανονικότητας) .

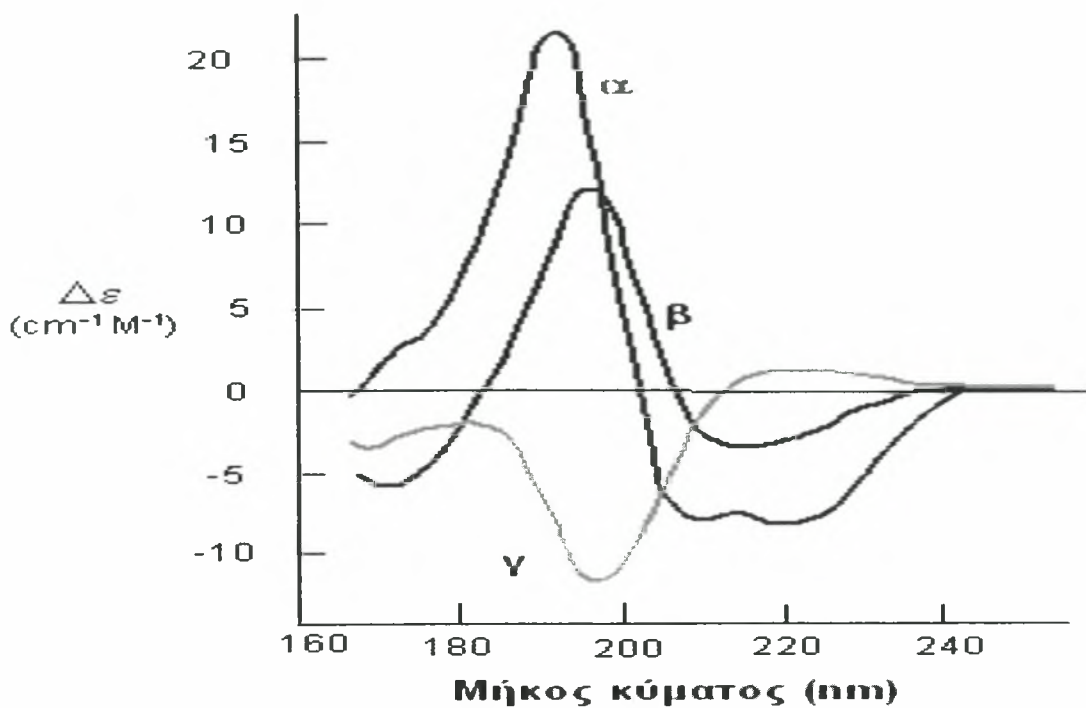
Οι δομές α-έλικας, β-πτυχωτού φύλλου και τυχαίου σπειράματος αποδίδουν ένα χαρακτηριστικό σε σχήμα και ένταση φάσμα και όπως ισχύει και για τις λοιπές φασματοσκοπικές τεχνικές, τα σήματα του CD απεικονίζουν τον μέσο όρο ολόκληρου του πρωτεϊνικού πληθυσμού. Στα πειράματα CD που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία διαφανής στο εύρος 190 – 350 nm με οπτική διαδρομή 1 cm για μετρήσεις στη περιοχή του εγγύς υπεριώδους και 1 mm για μετρήσεις στη περιοχή του μακρινού υπεριώδους. Η χρήση θερμοστάτη Peltier με υδάτινο λουτρό επιτρέπει τη λήψη φάσματος CD σε επιλέξιμη σταθερή θερμοκρασία καθώς και την καταγραφή της μεταβολής της ελλειπτικότητας, σε επιλεγμένο, σταθερό μήκος κύματος, συναρτήσει της θερμοκρασίας για σταθερό ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας του δείγματος (1 K/h έως 180 K/h). Ένα πείραμα κυκλικού διχρωϊσμού απαιτεί περίπου 200 μL πρωτεϊνικού διαλύματος σε συγκεντρώσεις από 50 μg/ml έως και 1 mg/ml, ανάλογα με την πρωτεΐνη, με διαλύτη οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα που δεν εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στη περιοχή αυτή (υψηλές συγκεντρώσεις DTT, ιστιδίνης ή ιμιδαζόλης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη περιοχή του μακρινού υπεριώδους).

Οποιοδήποτε φάσμα CD μπορεί να αναλυθεί ως ένας γραμμικός συνδυασμός των χαρακτηριστικών αυτών φασμάτων με την προσθήκη ενός όρου θορύβου που αντικατοπτρίζει την συνεισφορά των αρωματικών χρωμοφόρων (Εικόνα 12).

Για τον υπολογισμό της δευτεροταγούς δομής έχουμε:

$$\theta_{\lambda} = \sum F_{\lambda,i} S_{\lambda,i} + \theta_{\text{όρυβος}}$$

όπου θ_{λ} ο κυκλικός διχρωϊσμός της πρωτεΐνης ως συνάρτηση του μήκους κύματος λ , $F_{\lambda,i}$ το κλάσμα συμμετοχής του κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής i στην όλη πρωτεϊνική διαμόρφωση σε μήκος κύματος λ και $S_{\lambda,i}$ η ελλειπτικότητα σε μήκος κύματος λ του χαρακτηριστικού φάσματος κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής i .



Εικόνα 15 . Κανονικοποιημένο φάσμα κυκλικού διχροϊσμού για την πολυ-λυσίνη, όταν αυτή βρίσκεται σε διαφορετικές δομικές διαμορφώσεις ανάλογα με της ιδιότητες του διαλύματος. Με την καμπύλη α μπορεί κανείς να διακρίνει το χαρακτηριστικό φάσμα κυκλικού διχροϊσμού της α-έλικας, με την καμπύλη β αυτό του β-φύλλου και με την καμπύλη γ αυτό του τυχαίου σπειράματος.

Για την τριτοταγή δομή, οι μετρήσεις γίνονται στο εγγύς υπεριώδες (255-320nm). Σε αυτά τα μήκη κύματος τα χρωμοφόρα είναι τα αρωματικά αμινοξέα (τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη) και οι δισουλφιδικοί δεσμοί της πρωτεΐνης (απορροφούν στα όρια του εγγύς και άπω υπεριώδους – 250nm), τα σήματα των οποίων είναι ευαίσθητα στην διεύθυνση του μορίου στον χώρο και συγκεκριμένα στην ασυμμετρία του μικροπεριβάλλοντος των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων. Στην περιοχή 250-270 nm απορροφά κυρίως η φαινυλαλανίνη, στην περιοχή 275-290 nm απορροφά κυρίως η τυροσίνη και τέλος στην περιοχή 290-305 nm απορροφά η τρυπτοφάνη. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί δίνουν ασθενή σήματα σε όλο το εγγύς υπεριώδες. Μεταβολές στην τριτοταγή δομή του μορίου είναι δυνατόν να παρατηρηθούν μέσω της μεταβολής της απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους. Η μεταβολή αυτή στην απορρόφηση οφείλεται στην έκθεση των κατάλοιπων αυτών στον διαλύτη εξ' αιτίας της θερμικής αποδίπλωσης της πρωτεΐνης.[30-32]

2.3 ΥΛΙΚΑ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E. coli

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων E. coli είναι :

- α) 1 λίτρο LB → 5 g NaCl , 5 g εκχύλισμα ζύμης , 10 g τρυπτοφάνη και ρύθμιση σε pH = 7 με 5M NaOH
- β) 0,1 M CaCl₂
- γ) γλυκερόλη
- δ) χλωραμφενικόλη 34 mg/ml σε μεθανόλη

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E. coli

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων E. coli είναι:

- α) LB → για το 1 λίτρο : 5 g NaCl , 5 g εκχύλισμα ζύμης , 10 g τρυπτοφάνη και ρύθμιση σε pH = 7 με 5M NaOH
- β) χλωραμφενικόλη 34 mg / ml
- γ) αμπικιλίνη 50 mg / ml
- δ) Άγαρ → για το 1 λίτρο : 5 g NaCl , 5 g εκχύλισμα ζύμης , 10 g τρυπτοφάνη και 15 g Άγαρ

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ – SDS

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου – SDS είναι :

- α) Separating Lower Buffer : 1.5 M Tris 0.4 % SDS pH = 8.8

Για 100 ml :

3.69 gr Tris – HCl

15.39 gr Tris – Base

4 ml 10 % SDS

β) 30% Acrylamide / Bis (30 gr acrylamide , 0.8 bis (n,n-methylenbisacrylamide) , H₂O σε 100 ml , αποθήκευση σε dark bottle 4 °C)

γ) H₂O

δ) 10% APS (10 gr NH₄S₂O₈σε 100 ml H₂O)

ε) TEMED

ζ) Stacking Upper Buffer : 0.5 M Tris 0.4 % SDS pH = 6.8

Για 100 ml :

7.7 gr Tris – HCl

0.2 gr Tris – Base

4 ml 10 % SDS

η) 10 % SDS

θ) 5x ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης(5x Reducing Sample Buffer)

900 μl 1M Tris – HCl pH = 6.8

3.75 ml glycerol

3 ml 10% SDS

1.5 ml 1% bromophenol blue

5.1 ml H₂O

750 μl B-mercaptoethanol

ι) Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x Running Buffer)

Για 1 λίτρο:

30.3 gr Tris – Base

144.1 gr glycine

100 ml 10% SDS

κ) Διάλυμα χρώσης(Coomasie Blue)

Για 1 λίτρο:

1 gr coomasie blue

480 ml methanol

100 ml acetic acid

420 mlH₂O

λ) Διάλυμα αποχρωματισμού (DestaineBuffer)

Για 1 λίτρο:

450 ml methanol

100 ml acetic acid

450 ml H₂O

μ) δείκτης μοριακών βαρών (BioRad)

ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών είναι :

α) LB → για το 1 λίτρο : 5 g NaCl , 5 g εκχύλισμα ζύμης , 10 g τρυπτοφανε και ρύθμιση σε pH = 7
με 5M NaOH

β) αμπικιλίνη 50 mg / ml σε νερό

γ) IPTG 0.5 M (φιλτράκι αποστείρωσης)

ΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την λύση των κυττάρων και την εκτίμηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης είναι :

α) Διάλυμα λύσης PBS με λυσοζύμη και ρύθμιση του σε pH = 7.4

PBS :

Για 1 λίτρο → 8.0 gr NaCl

1.44gr Na₂HPO₄

0.24 gr KCl

0.2 gr KH₂PO₄

Στα 20 ml PBS προσθέτω 40 mg λυσοζύμη

β) β – μερκαπτοαιθανόλη

γ) αναστολείς πρωτεασών

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ GST-PABP ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης είναι :

α) Διάλυμα λύσης PBS με λυσοζύμη και ρύθμιση του σε pH = 7.4

PBS :

Για 1 λίτρο → 8.0 gr NaCl

1.44gr Na₂HPO₄

0.24 gr KCl

0.2 gr KH_2PO_4

Στα 20 ml PBS προσθέτω 40 mg λυσοζύμη

β) σφαιρίδια GST σε διάλυμα 50% αιθανόλης

γ) διάλυμα έκλουσης

50 mM Tris

10 mM ανηγμένη L - γλουταθειόνη

pH = 8.0

δ) 30% αιθανόλη

ε) αντιδραστήριο Bradford

ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διαπίδυση είναι :

α) μεμβράνη διαπίδυσης

β) Διάλυμα διαπίδυσης (150 mM NaCl , 50 mM Tris Base , pH = 7.5)

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ

Τα αριθμητικά δεδομένα της βιοφυσικής μελέτης επεξεργάστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος Origin 8. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου-SDS και οι λοιπές φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με το AdobePhotoshop 8. Οι όποιες αναλύσεις DNA και πρωτεϊνών έγιναν με τα λογισμικά που είναι διαθέσιμα στα ExPASy (<http://www.expasy.ch>) και NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ποικίλες άλλες εργασίες βασίστηκαν στις πηγές των δικτυακών τόπων του ProteinDataBase (<http://www.pdb.org>) και του ViperDataBase (<http://viperdb.scripps.edu/index.php>).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

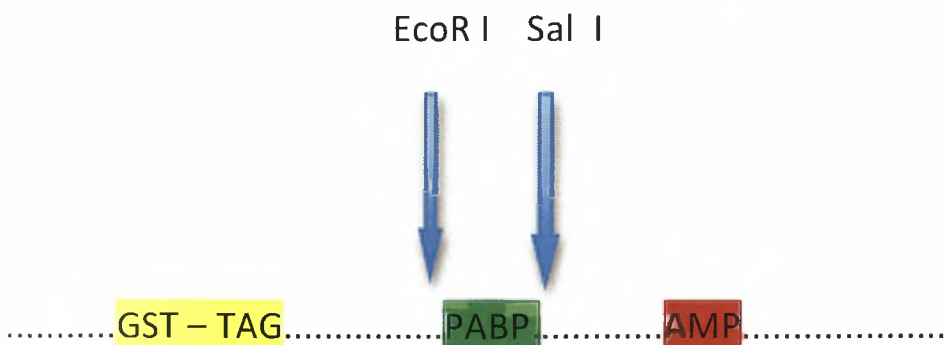
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

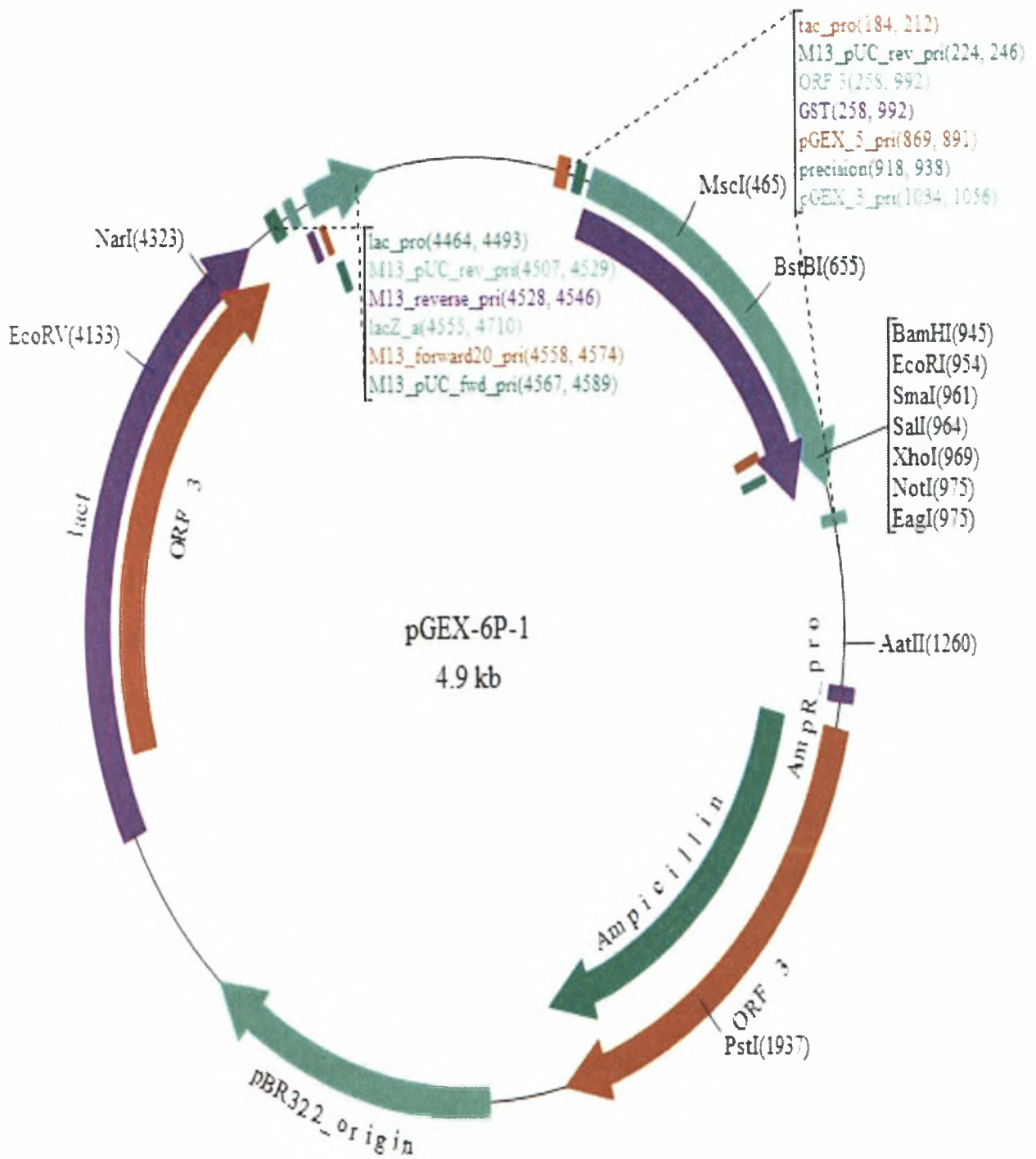
3.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η παραγωγή επαρκούς ποσότητας PABP πρωτεΐνης από κατάλληλο πλασμωδιακό κλώνο, η βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης της, ο καθαρισμός της καθώς και η χρήση αυτής για βιοφυσικές μελέτες. Για την παραγωγή της πρωτεΐνης μας χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος κλώνος DNA ο οποίος επιτρέπει την έκφραση σε προκαρυωτικό σύστημα κάτω από τον έλεγχο της T7 πολυμερασης.

Το αναμενόμενο μοριακό βάρος της GST-PABP χημικικής πρωτεΐνης είναι 99 kDalton. Η gst πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος περίπου 26 kDalton και η PABP πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος περίπου 73 kDalton

Ο κλώνος αυτός έχει την δομή που δίνεται παρακάτω (εικόνα 16)





Εικόνα 16 . Ο φορέας κλωνοποίησης pGEX-6P-1

Όσον αφορά την αλληλουχία DNA η όποια κωδικοποιεί την PABP1 πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζεται παρακάτω (εικόνα 17) . Ακολουθως παρουσιάζεται και η αμινοξική αλληλουχία της (εικόνα 18)

atgaaccccagtgccccagctaccccatggcctcgctctacgtgggggacctccaccccacgtgaccgagg
cgatgctctacgagaagttcagcccggccgggcccattcctctccatccgggtctgcagggacatgatcaccg
ccgctccttgggctacgcgtatgtgaactccagcagccggcggacgcggagcgtgcttggacacccatgaat
ttgatgttataaagggaagccagctacgcatcatgtggtctcagcgtgatccatcact
tcgcaaaagtgtagtaggcaacatattcattaanaaatctggacaaatccattgataataaagcactgtatga
tacattttctgcttttgtaacatcctttcatgtaaggtggttgtgatgaaaatggttccaagggtacggatt
tgtacactttgagacgcaggaagcagctgaaagagctattgaaaaaatgaatggaatgctcctaaatgatc
gcaaagtatttggtgacgatttaagtctcgtaaagaacgagaagctgaacttgagctagggcaaaagaa
ttaccaatgtttacatcaagaattttggagaagacatggatgatgagcgccttaaggatctcttgggcctgc
cttaagtgtgaaagtaatgactgatgaaagtggaaaatccaaaggatttggtttgtaagctttgaaaggca
tgaagatgcacagaaagctgtggatgagatgaacggaaaggagctcaatggaaaacaaatttatgttggtc
gagctcagaaaaaggtggaacggcagacggaacttaagcgaatttgaacagatgaaacaagatagga
tcaccagataccagggtgtaatctttatgtgaaaaatcttgatgatggtattgatgatgaacgtctccggaa
agagttttctccatttggtacaatcactagtgcacaaaggttatgatggagggtggtcgcagcaaaagggttgg
ttgtatgtttctcctccccagaagaagccactaaagcagttacagaaatgaacggtagaattgtggccaca
aagccattgtatgtagcttttagctcagcgaagaagagcgcagggtcacctcactaaccagtatatgcag
agaatggcaagtgtagcagctgttccaaccctgtaatcaaccctaccagccagcacctccttcaggttact
tcatggcagctatcccacagactcagaaccgtgctgcatactatcctcctagccaagttgctcaactaagacc
aagtcctcgtggactgctcagggtgccagacctcatccattccaaaatagcccgggtgctatccgcccagctg
ctcctagaccaccatttagtactatgagaccagcttcttcacaggtccacgagtcatgtcaacacagcgtgtt

**gctaacacatcaacacagacaatgggtccacgtcctgcagctgcagccgctgcagctactcctgctgtccgca
ccgttccacagtataaatatgctgcaggagttcgcaatcctcagcaacatcttaatgcacagccacaagttac
aatgcaacagcctgc
tgttcatgtacaaggtcaggaacctttgactgcttccatggtggcatctgccctcctcaagagcaaaag
caaatggtgggtgaacggctgtttcctcttattcaagccatgcaccctactcttgctggtaaaatcactg
gcatggtggtggagattgataattcagaacttctcatatgctcgagtctccagagtcactccgttctaaggtg
atgaagctgtagctgtactacaagcccaccaagctaaagaggctgccagaaagcagttaacagtgccacc
ggtgtccaactgtttaa**

Εικόνα 17 . Η αλληλουχία DNA η οποία κωδικοποιεί την PABP1 πρωτεΐνη , με κόκκινα γράμματα είναι το εναρκτήριο αμινοξύ μεθειονίνη

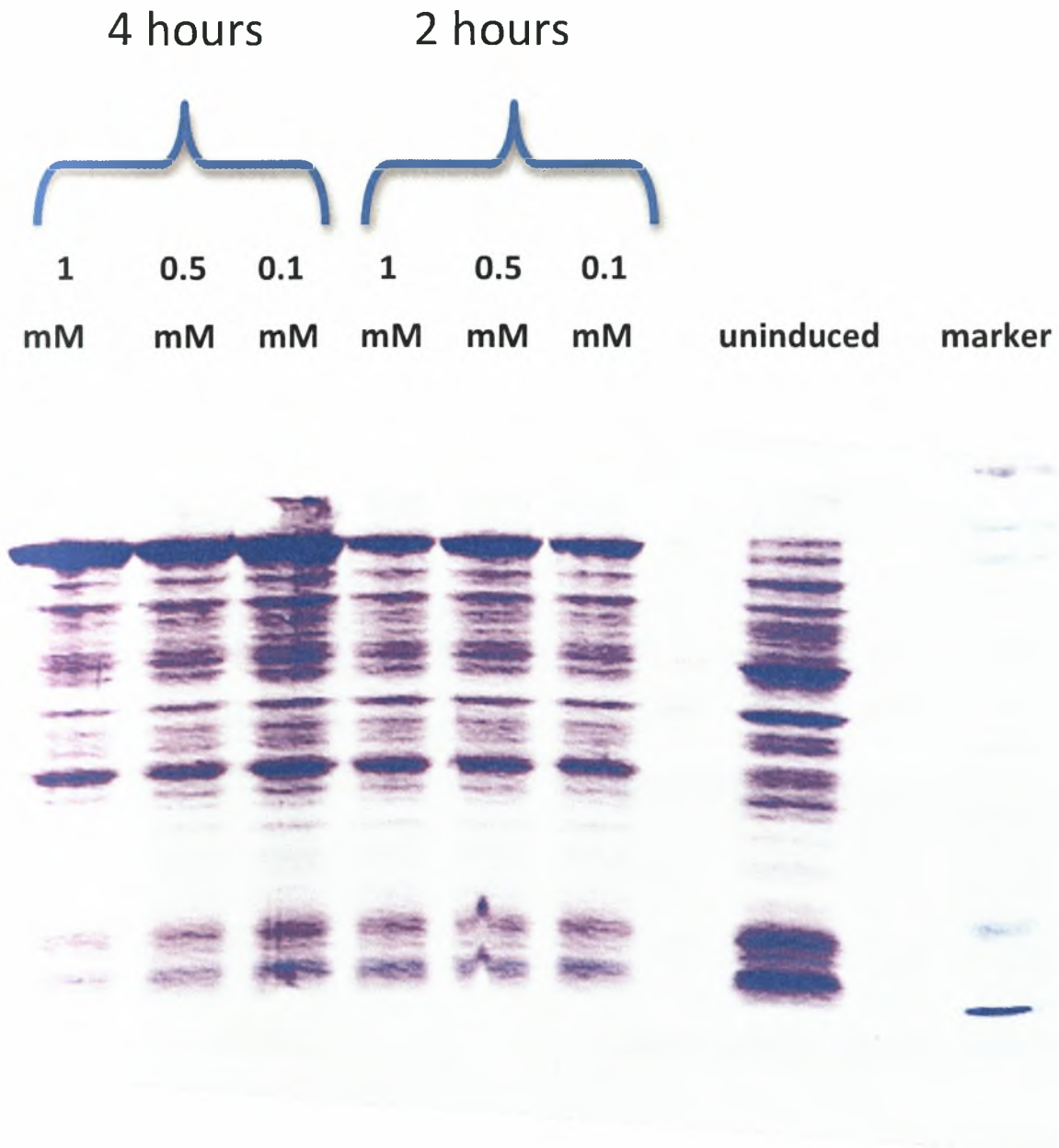
**MNPSAPSYPMASLYVGD LHPDVTEAMLYEKFSPAGPILSIRVCR
DMI TRRSLGYAYVNFQQPADAERALDTMNF DVIKGPVRIMWSQRDP SLRKSGVGNIF
IKNLDKSIDNKALYDTFSAFGNILSCKVVCDENGSKGYGFVHFETQEAERAIEKMNG
MLLNRKVFVGRFKSRKEREAE LGARAKEFTNVYIKNFGEDMDDERLKD LFGPALSVK
VMTDESGKSKGFGFVS FERHEDAQKAVDEMNGKELNGKQIYVGRAQKKVERQ TELKRK
FEQMKQDRITRYQGVNLYVKNLDDGIDDERLRKEFSPFGTITS AKVMMEGGRSKGFGF
VCFSSPEEATKAVTEMNGRIVATKPLYVALAQRKEERQAHLTNQYMQRMASVRV PNP
VINPYQPAPPSGYFMAAIPQTQNR AAYPPSQVAQLRPSRWTAQGARPHPFQNM PGA
IRPAAPRPPFSTMRPASSQVPRVMSTQRVANTSTQTMGPRPAAAAAATPAVRTVPQY
KYAAGVRNPQQHLNAQPQV TMQQPAVHVQGOEPLTASMLASAPPQE QKQMLGERL FPL
IQAMHPTLAGKITGMLLEIDNSELLHMLESPESLR SKVDEAVAVLQAHQAKEAAQKAV
NSATGVPTV**

Εικόνα 18 Η αμινοξική αλληλουχία της PABP πρωτεΐνης

3.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ1

3.2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ IPTG ΣΤΟΥΣ 37°C ΣΕ BL21 ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης σε BL21 κύτταρα στους 37 °C σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG: 0.1mM , 0.5 mM και 1mM. Όταν η πυκνότητα των βακτηριακών κυττάρων μετρήθηκε σε τιμή 0.6 τότε προστέθηκαν σε κάθε καλλιέργεια οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG: 0.1mM , 0.5 mM και 1mM. Η επαγωγή έκφρασης με το IPTG πραγματοποιήθηκε και δοκιμάστηκε για δυο διαφορετικές χρονικές διάρκειες . Συγκεκριμένα προστέθηκαν οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG και η επαγωγή έκφρασης της καλλιέργειας διεκόπει μετά από δυο ώρες και μετά από τέσσερις ώρες . Με βάση τα πειραματικά μας αποτελέσματα αρχικά επιλέχθηκε ο καταλληλότερος από τους δυο χρόνους επαγωγής έκφρασης ανάλογα με το ποτέ είχαμε την μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης . Παρατηρήθηκε στην (εικόνα 16) ότι στις 2 ώρες η επαγωγή έκφρασης είναι μικρότερη από ότι στις 4 ώρες . Όποτε επιλέχθηκαν οι 4 ώρες επαγωγής έκφρασης ως η καλύτερη χρονική διάρκεια για την επαγωγή. Από τις 4 ώρες παρατηρήθηκε με βάση την εικόνα ότι η βέλτιστη συγκέντρωση IPTG που προκαλεί την μεγαλύτερη έκφραση είναι η 1mM (εικόνα 19).

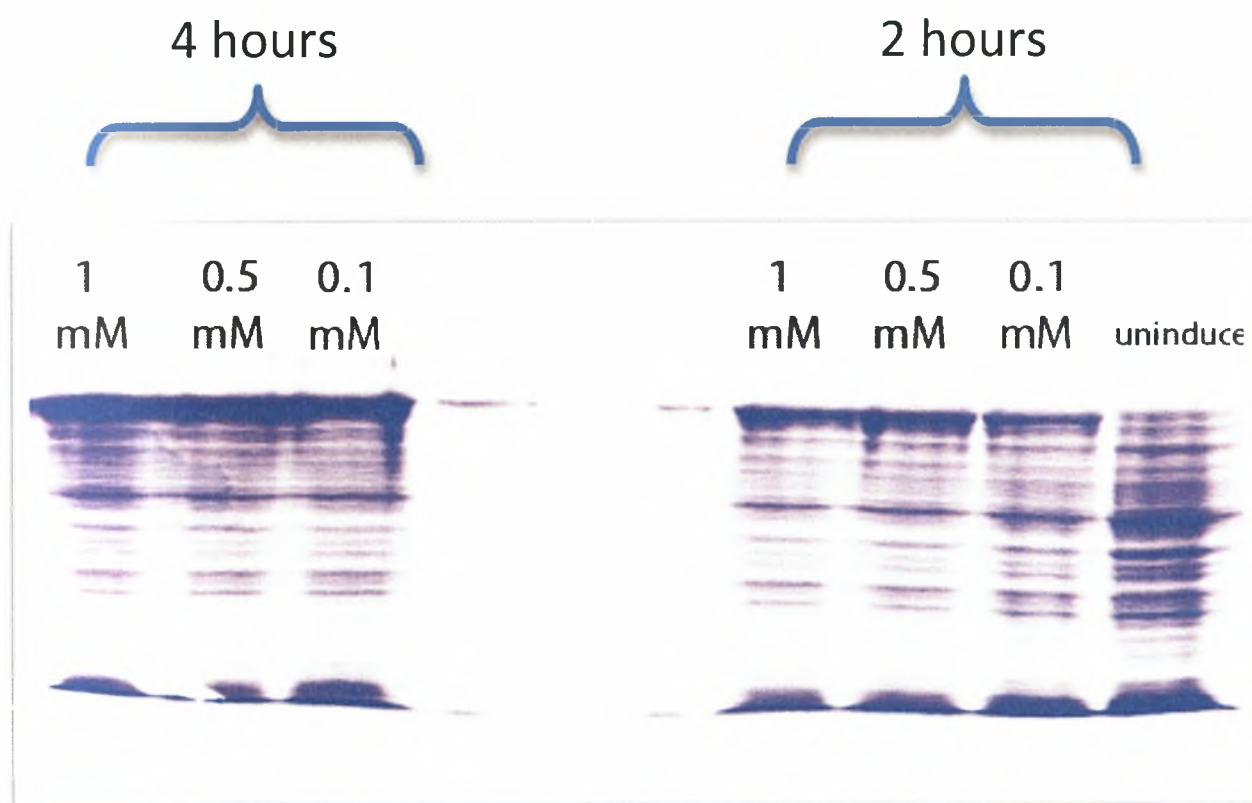


Εικόνα 19. Πηκτή 10% πολυακρυλαμιδίου – SDS για επιλογή βέλτιστης ώρας έκφρασης και βέλτιστης συγκέντρωσης στους 37 °C σε κύτταρα BL21

3.2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ IPTG ΣΤΟΥΣ 25 °C ΣΕ BL21 ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαγωγή έκφρασης της πρωτεΐνης σε BL21 κύτταρα στους 25°C πάλι στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG: 0.1mM , 0.5 mM και 1mM . Η επαγωγή έκφρασης με το IPTG πραγματοποιήθηκε πάλι για δυο διαφορετικές χρονικές διάρκειες .

Προστέθηκαν οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG και η επαγωγή έκφρασης της καλλιέργειας διεκόπει μετά από δυο και μετά από τέσσερις ώρες. Στην συνέχεια επιλέχθηκε ο καταλληλότερος από τους δυο χρόνους επαγωγής έκφρασης. Με βάση την εικόνα παρατηρήθηκε ότι στις 4 ώρες η έκφραση της πρωτεΐνης είναι μεγαλύτερη από τις 2 ώρες οπότε επιλέχθηκαν οι 4 ώρες ως η βέλτιστη χρονική διάρκεια επαγωγής της έκφρασης. Σύμφωνα με την εικόνα η βέλτιστη συγκέντρωση στην οποία έχουμε την αποδοτικότερη και μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης στις 4 ώρες είναι η 1 mM και 0.5 mM



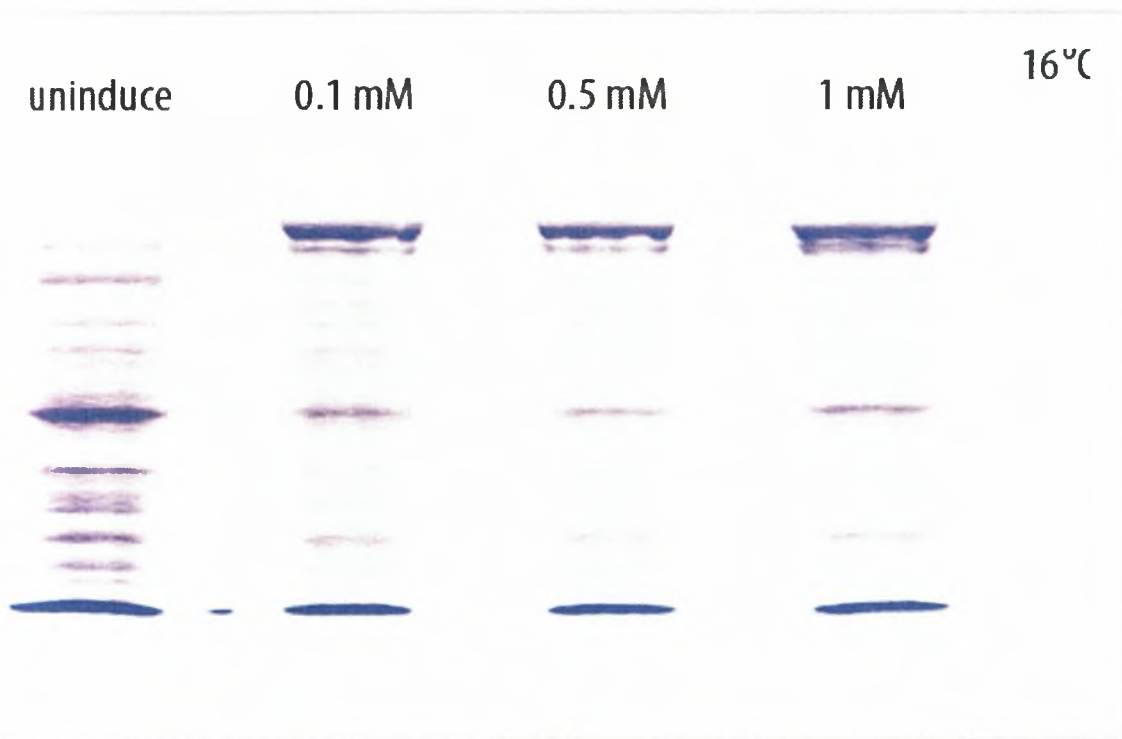
Εικόνα 20 . Πηκτή 10% πολυακρυλαμιδίου – SDS για επιλογή βέλτιστης ώρας έκφρασης και βέλτιστης συγκέντρωσης στους 25°C

Έχουμε καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η καταλληλότερη χρονική διάρκεια για επαγωγή έκφρασης στους 25 °C και στους 37 °C είναι οι 4 ώρες καθώς και η βέλτιστη συγκέντρωση IPTG είναι η 1mM στους 37°C και η 1mM και 0.5 mM στους 25°C.

Έχοντας εξετάσει την επαγωγή έκφρασης στους 25 °C και στους 37 °C θα μελετηθήκε η επαγωγή έκφρασης στους 16 °C .

3.2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ IPTG ΣΤΟΥΣ 16 °C ΣΕ BL21 ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η επαγωγή έκφρασης των BL21 βακτηριακών κυττάρων στους 16 °C αφέθηκε για όλο το βράδυ . Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG 0.1mM , 0.5 mM και 1mM για την επαγωγή της έκφρασης .



Εικόνα 21 . Πηκτή 10% πολυακρυλαμιδίου – SDS για επιλογή βέλτιστης συγκέντρωσης στους 25°C

Από την εικόνα παρατηρήσαμε ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης όταν κάναμε επαγωγή της έκφρασης με 0.1 mM IPTG είναι μεγαλύτερη από τις άλλες δυο συγκεντρώσεις IPTG. Άρα απορρίφθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.5 mM και 1mM και επιλέχθηκε η 0.1 mM συγκέντρωση IPTG ως η βέλτιστη συγκέντρωση για την επαγωγή της έκφρασης στους 16°C

3.2.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών συγκεντρώσεων και θερμοκρασίας αυτής της πειραματικής διαδικασίας συγκεντρωτικά είναι :

Από το πείραμα ελέγχου έκφρασης της PABP στους 37 °C επιλέχθηκαν οι συνθήκες

1 mM IPTG , 4 ώρες ,

Από το πείραμα ελέγχου έκφρασης της PABP στους 25 °C επιλέχθηκαν οι συνθήκες

0.5mM IPTG , 4 ώρες

1 mM IPTG , 4 ώρες

Από το πείραμα ελέγχου έκφρασης της PABP στους 16 °C επιλέχθηκαν οι συνθήκες

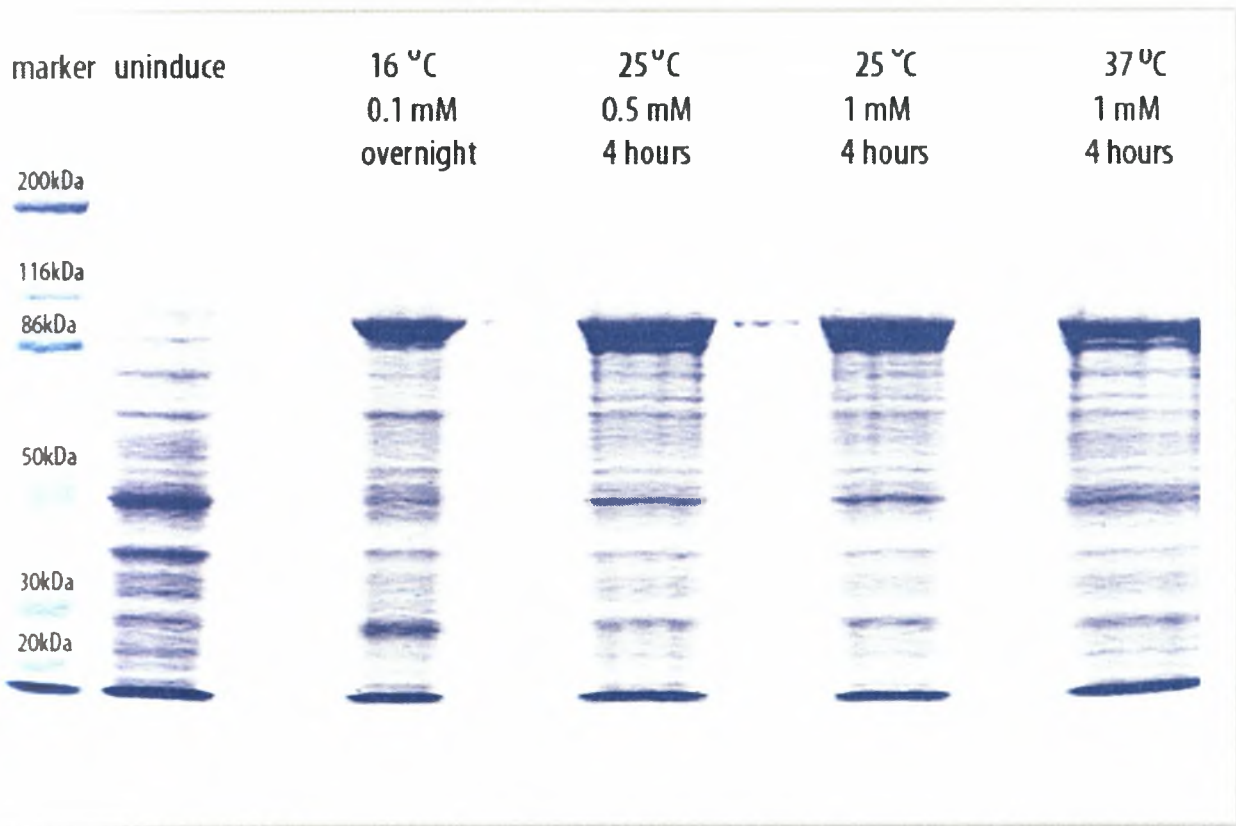
0.1mM IPTG για ολονύκτια επώαση (overnight)

Αφού έχω καταλήξει στις βέλτιστες συνθήκες στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των επιλεγμένων συνθηκών σε ένα gel SDS-page για να παρατηρήσουμε και να συγκρίνουμε την έκφραση των πρωτεϊνών σε αυτές τις συνθήκες .

Από την εικόνα παρατηρήθηκε ότι η μικρότερη ποσότητα της πρωτεΐνης εμφανίζεται στους 37 °C ,1 mM IPTG . Επίσης η συγκέντρωση 1 mM IPTG δεν ενδείκνυται για πειράματα επαγωγής έκφρασης καθώς η συγκέντρωση είναι μεγάλη και δεν συμφέρει για λόγους κόστους .

Η έκφραση της πρωτεΐνης στους 25 °C και στους 16 °C φάνηκε να είναι αποδοτικότερη . Πάλι η συγκέντρωση 1 mM στους 25°C δεν ενδείκνυται ως η καταλληλότερη λόγω κόστους οπότε απορρίφθηκε . Έχουμε λοιπόν ως καταλληλότερες συνθήκες έκφρασης α) τους 25°C 0.5 mM IPTG , 4 ώρες και β) τους 16°C 0.1 mM IPTG για όλο το βράδυ(overnight)

Από τις δυο αυτές συνθήκες δεν μπορούμε να διαλέξουμε κάποια καθώς θα πρέπει να ελέγξουμε με περαιτέρω πείραμα και την διαλυτότητα της πρωτεΐνης . Μπορεί δηλαδή η έκφραση σε κάποιες συνθήκες όπως στους 25 °C να είναι μεγαλύτερη από ότι στους 16 °C αυτό όμως δεν υποδεικνύει ότι είναι η βέλτιστη συνθήκη καθώς μπορεί η πρωτεΐνη μας να είναι όλη αδιάλυτη άρα και μη χρησιμοποιήσιμη . Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα ελέγχου της διαλυτότητας στις 4 συνθήκες που επιλέχθηκαν για να δούμε σε ποια έχουμε την περισσότερη διαλυτή πρωτεΐνη . Άρα για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης λήφθηκε υπ'οψιν μας τόσο η ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης όσο και η διαλυτότητα της στο υπερκείμενο των λυμένων κυττάρων .



Εικόνα 22 . Πηκτή 7.5 % πολυακρυλαμίδιου – SDS για σύγκριση των επιλεγμένων βέλτιστων συνθηκών στην επαγωγή έκφρασης

3.2.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ RABP ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ

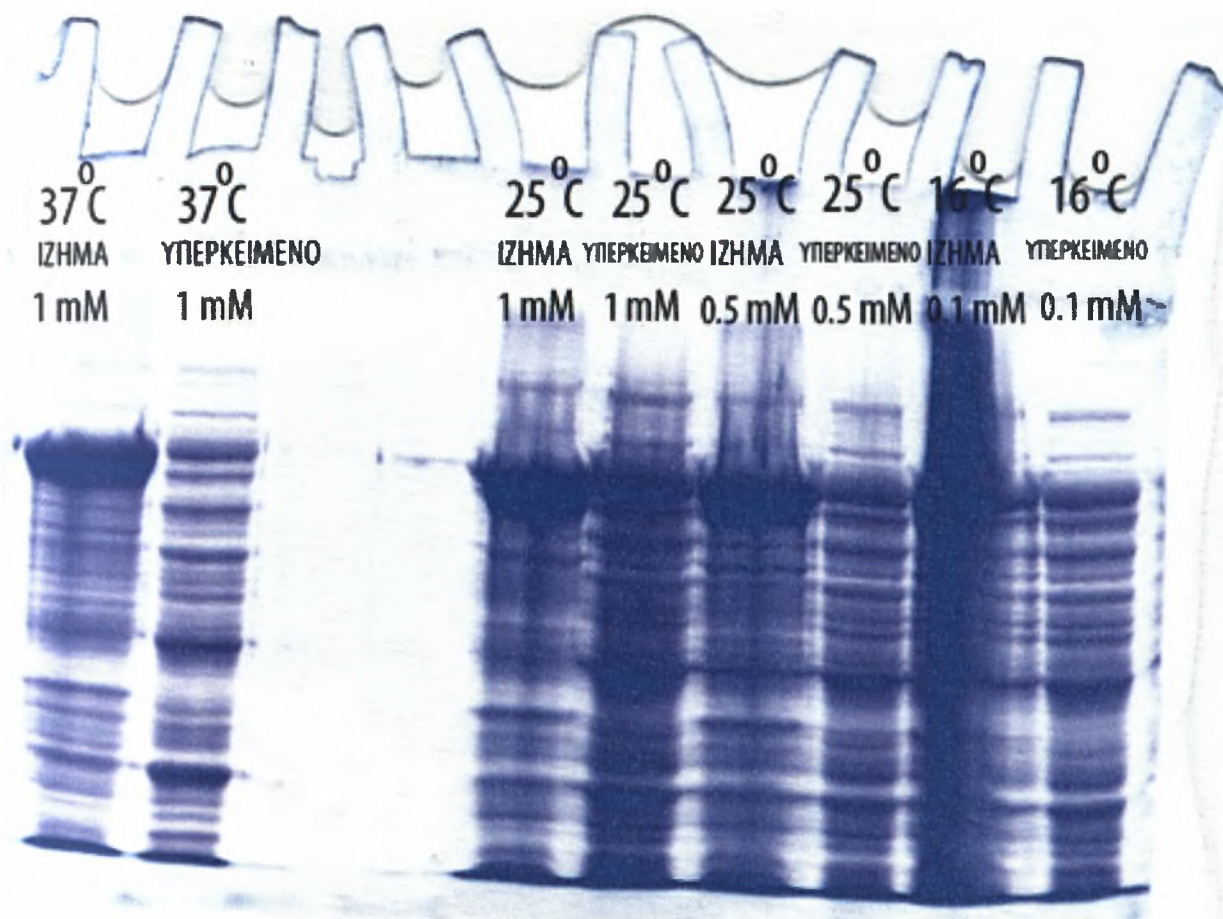
Για τον έλεγχο της διαλυτότητας πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και μετά φυγοκέντρηση αυτών .Αποτέλεσμα της φυγοκέντρησης είναι ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης σε διαλυτή και αδιάλυτη .Στο υπερκείμενο βρίσκεται η διαλυτή πρωτεΐνη την οποία θέλουμε και στο ίζημα η αδιάλυτη πρωτεΐνη που δεν μας είναι χρήσιμη.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για να δούμε πόση πρωτεΐνη υπάρχει στο ίζημα και πόση στο υπερκείμενο .Ανάλογα σε ποια από τις 4 συνθήκες έχουμε την μεγαλύτερη ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης στο υπερκείμενο επιλέχθηκε εν τέλη η βέλτιστη συνθήκη .

Από την παρακάτω (εικόνα 23) παρατηρήθηκε ότι και στις 4 συνθήκες η περισσότερη πρωτεΐνη βρίσκεται στο ίζημα δηλαδή σε αδιάλυτη μορφή. Παρόλα αυτά παρατηρούμε ότι η λιγότερη ποσότητα αδιάλυτης πρωτεΐνης εμφανίζεται στους 16°C 0.1mM IPTG. Αφού η ποσότητα της αδιάλυτης πρωτεΐνης στους 16 °C είναι μικρότερη κατά πολύ από τις άλλες 3 συνθήκες τότε η ποσότητα της διαλυτής πρωτεΐνης θα είναι ανάλογα μεγαλύτερη στους 16°C 0.1 mM IPTG κάτι που φαίνεται και στην (εικόνα 23).

Τελικά το συμπέρασμα είναι ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την επαγωγή έκφρασης της PABP σε BL21 βακτηριακά κύτταρα συναρτήσει του επιπέδου έκφρασης και της διαλυτότητας της πρωτεΐνης είναι η θερμοκρασία των 16°C, συγκέντρωσης 0.1 M IPTG για όλο το βράδυ (overnight) Κάτι όμως που μας γέννησε ερωτήματα είναι, αν αντί για BL21 βακτηριακά κύτταρα χρησιμοποιηθεί άλλη σειρά βακτηριακών κυττάρων όπως τα *origami*, τότε η επαγωγή έκφρασης θα είναι καλύτερη και αποδοτικότερη;

Έτσι αυτό που κάναμε στη συνέχεια ήταν να μετασχηματίσουμε τα βακτηριακά κύτταρα *origami*, να κάνουμε επαγωγή έκφρασης στην θερμοκρασία που επιλέχθηκε πιο πάνω δηλαδή σε θερμοκρασία 16 °C για όλο το βράδυ και σε συγκεντρώσεις 0.1 mM και 0.5 mM IPTG και να συγκρίνουμε τελικά σε ποια από τις δυο διαφορετικές κυτταρικές σειρές η ποσότητα της πρωτεΐνης που βρίσκεται σε διαλυτή μορφή είναι μεγαλύτερη.



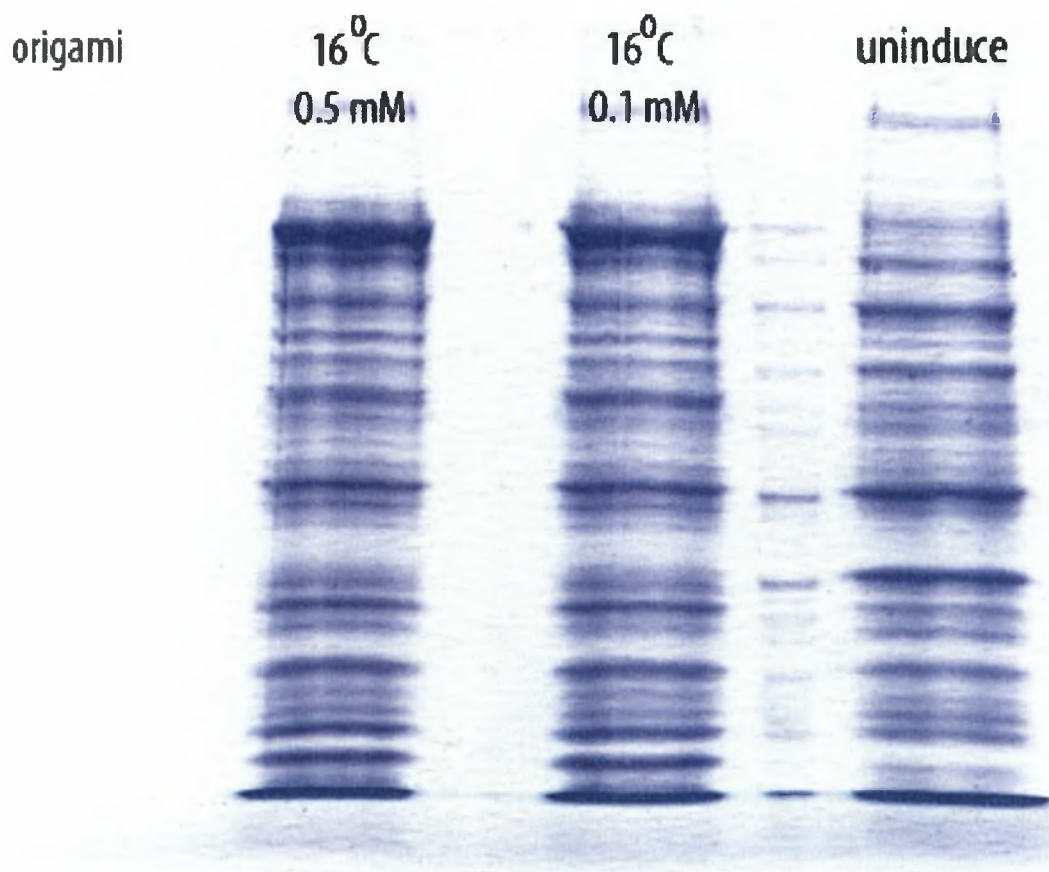
Εικόνα 23 . Πηκτή 7.5 % πολυακρυλαμίδιου – SDS για σύγκριση και επιλογή μιας εκ των επιλεγμένων βέλτιστων συνθηκών ανάλογα με την ποσότητα της διαλυτής πρωτεΐνης στο υπερκείμενο

3.2.6 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Για την επιλογή της καταλληλότερης κυτταρικής σειράς για επαγωγή έκφρασης της ΡΑΒΡ πρωτεΐνης πειραματιστήκαμε μεταξύ των στελεχών *E.coli* BL21 και *E.coli* origami .

Για την κυτταρική σειρά *E.coli* origami δοκιμάστηκαν δυο συγκεντρώσεις 0.1 mM και 0.5 mM IPTG . Το πείραμα επιτελέστηκε στους 16 °C για όλο το βράδυ (overnight) .Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση αυτών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου-SDS (εικόνα24) για να μελετηθεί η επαγωγή έκφρασης της ΡΑΒΡ πρωτεΐνης στις δυο συγκεντρώσεις 0.1 mM και 0.5 mM IPTG στην κυτταρική σειρά origami . Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης παρατηρήθηκε ότι στην

επαγωγή έκφρασης με συγκέντρωση 0.5 mM IPTG, η ποσότητα της πρωτεΐνης είναι μεγαλύτερη από την επαγωγή με συγκέντρωση 0.1mM IPTG (εικονα24) .



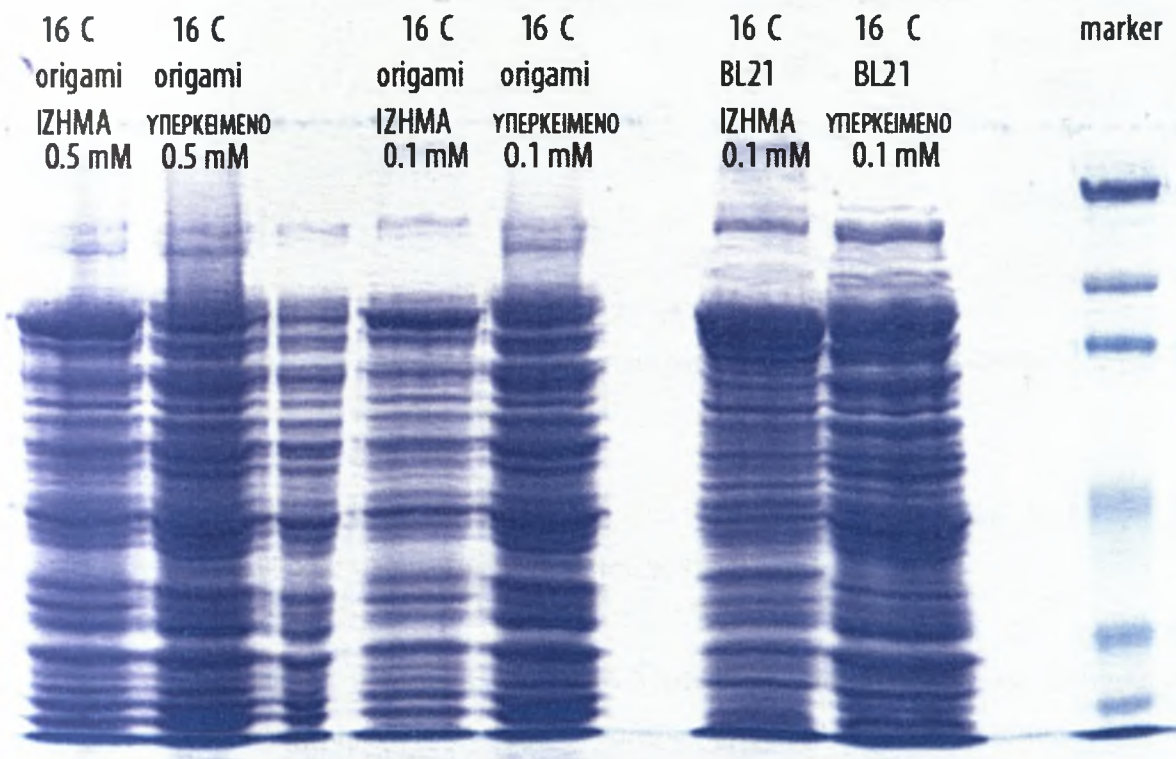
Εικόνα 24 . Πηκτή 7.5 % πολυακρυλαμιδίου – SDS για εύρεση της καταλληλότερης συγκέντρωσης IPTG μετά από επαγωγή έκφρασης στους 16 Cσε βακτηριακά κύτταρα origami

Έχοντας μελετήσει το επίπεδο έκφρασης της PABP πρωτεΐνης σε βακτηριακά κύτταρα origami προχωρήσαμε σε πειράματα ελέγχου της διαλυτότητας της . Στη συνέχεια συγκρίθηκε η διαλυτότητα της πρωτεΐνης αυτής με την διαλυτότητα της πρωτεΐνης που εκφράστηκε σε βακτηριακά κύτταρα BL21 και με τις συνθήκες επαγωγής έκφρασης που τελικά επιλέχθηκε [16°C, 0.1mM IPTG για όλο το βραδύ (overnight)]

Έχοντας συλλέξει τα υπερκείμενα και τα ιζήματα από τα πειράματα επαγωγής στους 16°C στις δυο αυτές κυτταρικές σειρές προχωρήσαμε σε ηλεκτροφόρηση αυτών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS (εικονα22)

Από την εικόνα παρατηρήθηκε ότι στα κύτταρα origami η διαλυτή πρωτεΐνη είναι μεγαλύτερη σε ποσότητα όταν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με 0.1 mM από ότι με 0.5 mM.

Το εντυπωσιακό όμως συμπέρασμα του πειράματος που φαίνεται και στην εικόνα είναι ότι η ποσότητα της διαλυτής πρωτεΐνης PABP στην κυτταρική σειρά E.coli BL21 είναι πολύ μεγάλη σε σχέση με την ποσότητα της διαλυτής πρωτεΐνης PABP στην κυτταρική σειρά E.coli origami. Άρα επιλέχθηκε ως καταλληλότερη κυτταρική σειρά η E.coli BL21 στους 16 °C με συγκέντρωση 0.1 mM για όλο το βράδυ.



Εικόνα 25 . Πηκτή 7.5 % πολυακρυλαμιδίου – SDS για σύγκριση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης σε βακτηριακά κύτταρα BL21 και origami στους 16 °C

3.2.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ GST ΣΗΜΑΣΜΕΝΗΣ PABP ΚΑΙ 3C ΠΡΩΤΕΑΣΗΣ

Έχοντας συλλέξει τα κλάσματα από τον καθαρισμό με σφαιρίδια GST από πάστα κυττάρων που αναπτύχθηκαν στις ευρεθείσες ως βέλτιστες συνθήκες, προχωρήσαμε σε ηλεκτροφόρηση αυτών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS (εικόνα 26). Τελικά αποφασίστηκε να κρατήσουμε τα τρία του διαλύματος έκλουσης από την 3C πρωτεάση και τα τέσσερα του διαλύματος έκλουσης από την PABP για να πάμε σε διαπίδυση. Όλα έγιναν στους 4 C ώστε κατά την όλη διαδικασία να αποφευχθεί η απώλεια ενεργότητας των πρωτεϊνών



Εικόνα 26. Πηκτή 10% πολυακρυλαμιδίου-SDS με τα κλάσματα από τον καθαρισμό με σφαιρίδια GST από πάστα κυττάρων που αναπτύχθηκαν στις ευρεθείσες ως βέλτιστες συνθήκες

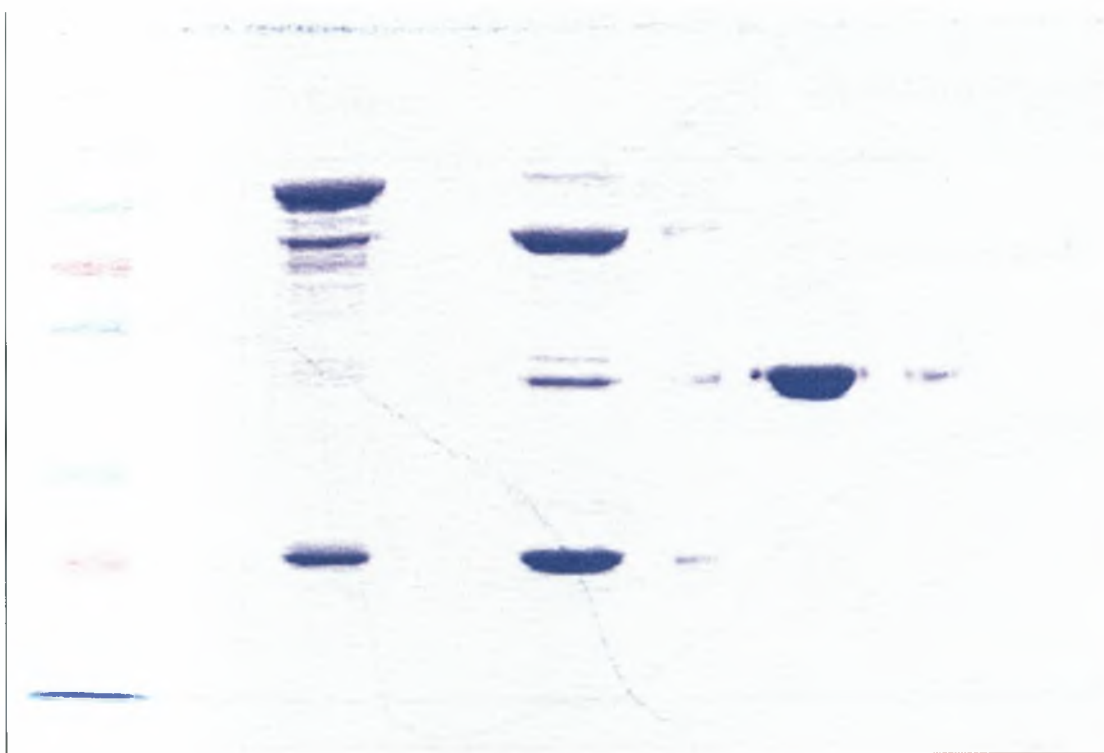
3.2.8 ΠΕΨΗ GST-PABP ΧΙΜΑΙΡΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΜΕ 3C ΠΡΩΤΕΑΣΗ

Το τελικό στάδιο είναι η υδρόλυση του 6xHIS-3Csite-PABP που παρήχθει και καθαρίστηκε όπως περιγράφεται στα προηγούμενα κεφάλαια .Η υδρόλυση έγινε στο διάλυμα διαπίδυσης (150mM NaCl , 50mM Tris base , pH = 7.5) στους 4 °C για 12 ώρες . Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα

ΑΚΟΠΗ ΡΑΒΡ

ΚΟΜΜΕΝΗ ΡΑΒΡ

3C ΠΡΩΤΕΑΣΗ



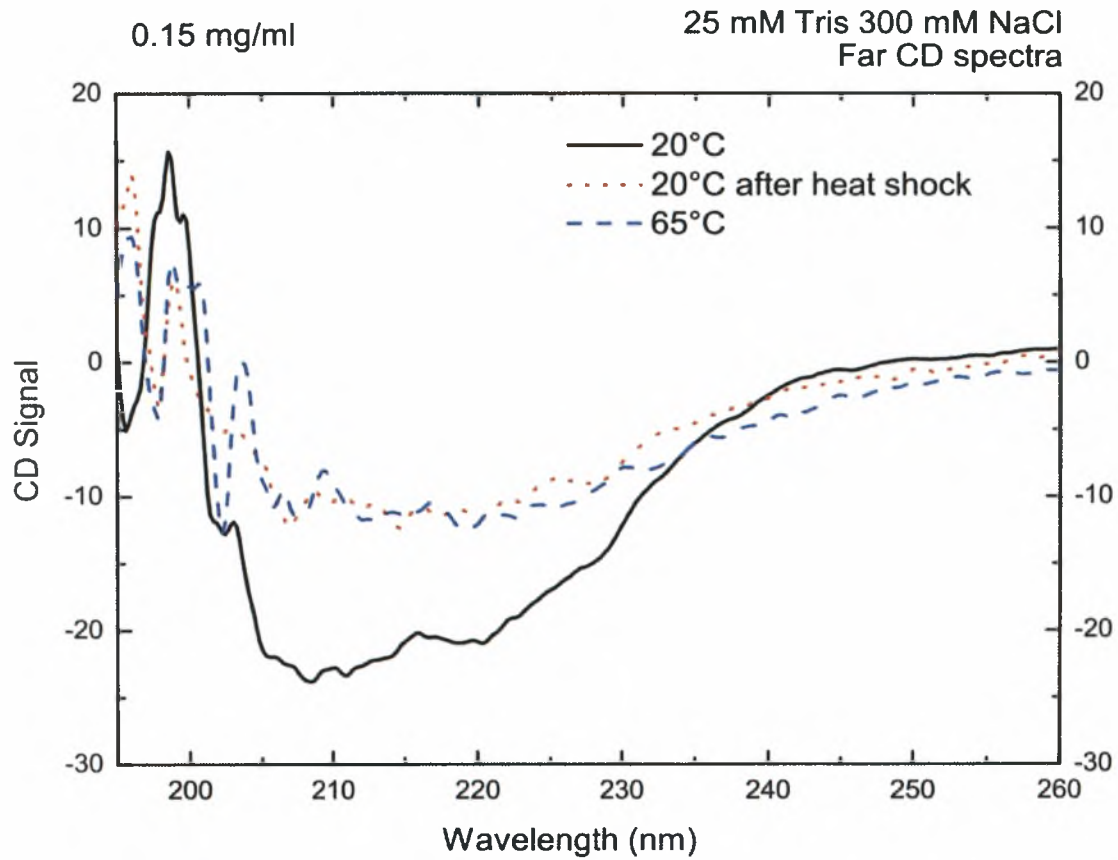
εικόνα 27 . Πέψη ΡΑΒΡ-GST χιμαϊρικής πρωτεΐνης με 3C πρωτεάση

3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΑΒΡ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Η πρωτεΐνη που παρήχθη είναι μια πρωτεΐνη-χιμαίρα της δομής GST-PABP . Έγινε λοιπόν η πέψη της με την 3C πρωτεάση και ύστερα η μελέτη της με φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωσισμού (CD)

Ο κυκλικός διχρωσμός μας προσφέρει πληροφορίες για τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής μιας πρωτεΐνης (παρουσία στο μόριο α-ελικων και β-φύλλων).

Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν στο άπω υπεριώδες έδειξαν πως η πρωτεΐνη μας έχει καθορισμένη δευτεροταγή δομή και όχι δομή τυχαίων σπειραμάτων . Αυτό το συμπεράναμε από το παρακάτω φάσμα καθώς εάν δεν είχε καθορισμένη δομή , το φάσμα που παίρνουμε στους 20°C θα έπρεπε να είχε την μορφή του φάσματος των 65°C με πολλά τυχαία σπειράματα (αρνητική κορυφή στα 195-200 nm) και θα απουσίαζαν οι αρνητικές και θετικές κορυφές στα υπόλοιπα μήκη κύματος του άπω υπεριώδους (εικόνα 28)



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η έκφραση της πρωτεΐνης PABP1 σε κύτταρα *E.coli* , ο καθαρισμός της από ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα βακτηρίων και η περαιτέρω μελέτη της δευτεροταγούς δομής της με φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού .

Ως φορείς για την έκφραση της PABP1 πρωτεΐνης , επιλέχθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *E.coli* BL21(DE3) και *origami* (D3) , ενώ για την επαγωγή της έκφρασης οι συγκεντρώσεις IPTG οι οποίες δοκιμάστηκαν ήταν οι: 0.1mM , 0.5 mM και 1mM .Οι θερμοκρασίες επαγωγής 16°C , 25 °C και 37°C επιλέχθηκαν για την υπό δοκιμή ανάπτυξη των βακτηρίων μας καθώς και οι 2 και 4 ώρες επαγωγής έκφρασης για τη συλλογή δειγμάτων προς μέτρηση του ποσοστού (απόδοσης) επαγωγής .

Οι βέλτιστες συνθήκες στις οποίες η PABP1 πρωτεΐνη βρέθηκε πως εκφράζεται σε μεγαλύτερα ποσά είναι σε βακτηριακά κύτταρα ξενιστή *E. coli* BL21 (DE3) , με 0,1 mM IPTG , και ολονύκτια επαγωγή στους 16°C.

Επόμενος στόχος της εργασίας ήταν ο δομικός χαρακτηρισμός της PABP1 πρωτεΐνης με βιοφυσικές μεθόδους.

Ο πειραματικός προσδιορισμός της δευτεροταγούς δομής έγινε με την τεχνική της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού με την οποία διαπιστώσαμε τη διατήρηση καθορισμένης δευτεροταγούς δομής στους 20°C . Με βάση τις μετρήσεις φάσματος κυκλικού διχρωισμού συμπεραίνεται ότι η ανασυνδυασμένη PABP1 πρωτεΐνη που εκφραστήκε σε κύτταρα βακτηρίων διατηρεί τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της (α -έλικες και β -φύλλα).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πραγματοποιήθηκε ερευνητική μελέτη για τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών υπερέκφρασης της πρωτεΐνης PABP (polyA-binding protein 1) του ανθρώπου σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* ως ανασυνδυασμένη χιμαιρική πρωτεΐνη με GST ετικέτα στο N-τελικό άκρο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός της από ολικό εκχύλισμα βακτηριακών πρωτεϊνών, η πέψη της με πρωτεάση 3C για την απομάκρυνση της GST ετικέτας καθώς επίσης και έλεγχος της δευτεροταγούς δομής της ανασυνδυασμένης PABP με βιοφυσικές μεθόδους.

Μελέτες για την βέλτιστη παραγωγή της PABP πρωτεΐνης έγιναν χρησιμοποιώντας διάφορες κυτταρικές σειρές *E. coli*, καθώς και ένα φάσμα συγκεντρώσεων IPTG, θερμοκρασιών ανάπτυξης και χρόνων επαγωγής έκφρασης.

Ο καθαρισμός της χιμαιρικής GST-PABP πρωτεΐνης από κύτταρα βακτηρίων έγινε με την τεχνική της χρωματογραφίας χημικής συγγένειας και τη χρήση σφαιριδίων συζευγμένων με GH (γλουταθειόνη).

Ο βιοφυσικός προσδιορισμός της δευτεροταγούς δομής της PABP πρωτεΐνης ,έγινε με φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού (CD) .

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Biochemistry 3th edition, 1975,1981,1988, by Lubert Stryer – W.H Freeman and Company
2. Spirin,A.S., 1986 Ribosome Structure and Protein Synthesis.Benjamin/Cummings
3. Noller,H.F.,1984.Structure of ribosomal RNA. *Ann. Rev.Biochem.*53:119-162
4. Moldave, K., 1985. Eukaryotic protein synthesis.*Ann. Rev. Biochem.* 54:1109-1149
5. Shatkin, A.J., 1985. mRNA cap binding proteins: essential factors for initiating translation. *Cell* 40:223-224.
6. Gupta, S.L., Waterson, J. Soropi, M., Weissman, S.M., and Leygyel, P., 1971. Movement of the ribosome along the messenger ribonucleic acid during protein synthesis.*Biochemistry* 10:4410-4421.
7. Maitra, U., Stringer, E.A., and Chaudhuri, A., 1982. Initiation factors in protein synthesis.*Ann. Rev. Biochem.* 51:869-900.
8. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the posttranscriptional control of gene expression David A Magngus,Matthew C Evans and Allan Jacobson 2003 BioMed Central Ltd
9. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression:A developmental perspective.Barbara Gorgoni and Nicola K. Gray
10. Sachs, A. B., Davis, R. W. and Kornberg, R. B. (1987), 'A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability', *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 7, pp. 3268–3276.
11. Gorlach, M., Burd, C. G. and Dreyfuss, G. (1994), 'The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity', *Exp. Cell Res.*, Vol. 211, pp. 400–407.
12. Kuhn, U. and Wahle, E. (2004), 'Structure and function of poly(A) binding proteins', *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1678, pp. 67–84.
13. Sachs AB, Bond MW, Kornberg RD: A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins:domain structure and expression.*Cell* 1986, 45:827-835 .The cloning and characterization of the yeast *PAB1* gene.
14. Deo RC, Bonanno JB, Sonenberg N, Burley SK: Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein.*Cell* 1999, 98:835-845. A report of the structure of the two amino-terminal RRM of human PABP bound to poly(A).
15. Kozlov G, Trempe JF, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I, Gehring K:Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein.*Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:4409-

4413.

A description of the structure of the carboxy-terminal domain of human PABP and demonstration of its role as a peptide-binding site.

16. Wahle E, Ruesegger U: 3'-end processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 1999, 23:277-295 A review of mRNA polyadenylation mechanisms.
17. Hammell CM, Gross S, Zenklusen D, Heath CV, Stutz F, Moore C, Cole CN: Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. *Mol Cell Biol* 2002, 22:6441-6457.
18. Allen NP, Huang L, Burlingame A, Rexach M: Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *J Biol Chem* 2001, 276:29268-29274.
19. Jacobson A: Poly(A) metabolism and translation: the closed loop model. In *Translational Control* (Edited by: Hershey JW, Mathews MB, Sonenberg N). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press 1996, 451-480. A review of poly(A) and PABP function in mRNA translation and decay.
20. Zhao J, Hyman L, Moore C: Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999, 63:405-445 .Kalo
21. Jacobson A, Favreau M: Possible involvement of poly(A) in protein synthesis. *Nucleic Acids Res* 1983, 11:6353-6368 This is the first formulation of the closed-loop model postulating interactions between the 5' and 3' ends of the mRN
22. Sachs AB, Varani G: Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* 2000, 7:356-361 A review of PABP structures required for interaction with eIF4G and poly(A).
23. Wilkie, G. S., Dickson, K. S. and Gray, N. K. (2003), 'Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors', *Trends Biochem.Sci.*, Vol. 28, pp. 182 – 188.
24. A.B. Sachs, P. Sarnow and M.W. Hentze, Starting at the beginning, middle, and end—translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89 (1997), pp. 831–838
25. Cosson B, Couturier A, Chabelskaya S, Kiktev D, Inge-Vechtomov S, Philippe M, Zhouravleva G: Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI(+)] propagation. *Mol Cell Biol* 2002, 22:3301-3315. This article reports the interactions of yeast PABP and termination factor eRF3.
26. Jacobson A, Peltz SW: Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 1996, 65:693-739. A review of the role of mRNP 5' / 3' interactions in the regulation of eukaryotic mRNA stability and translation
27. Wang Z, Day N, Trifillis P, Kiledjian M: An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding

protein to stabilize mRNA *in vitro*. *Mol Cell Biol* 1999, 19:4552-4560. This article reports that cell-free deadenylation of mammalian mRNAs occurs incrementally.

28. Korner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E, Wahle E: The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1998, 17:5427-5437. Mammalian deadenylase is shown to be inhibited by PABP.
29. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*,72, 248-254 (1976)
30. S.M.Kelly N.C. Price The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding, *Biochim Biophys Acta* 1338 (1997) 161-185
31. N.J Greenfield, Circular dichroism analysis for protein-protein interaction *Methods Mol Biol* 261 (2004) 55-78
32. S.M.Kelly N.C. Price circular dichroism to study protein interactions, *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 20 (2006) Unit 2010