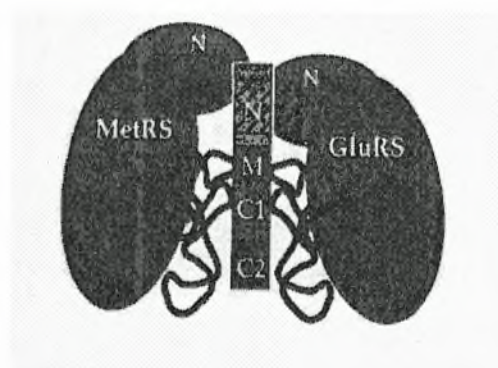


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Arc1p, MetRS ΚΑΙ GluRS ΤΟΥ *Saccharomyces cerevisiae*.**



ΙΤΣΙΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

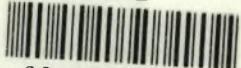
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4428/1
Ημερ. Εισ.: 20/09/2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΙΤΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087893

Υπεύθυνος καθηγητής:

Γιώργος Σίμος

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- Κωνσταντίνος Σταθόπουλος
- Γιώργος Σίμος
- Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος

Ευχαριστίες:

Με ιδιαίτερη χαρά θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις και η βοήθεια έπαιξαν καταλυτικό ρόλο στην διεκπεραίωση της συγκεκριμένης εργασίας. Κυρίως, ευχαριστώ τις Χαχάμη Γεωργία, Τριανταφύλλου Νατάσσα και Λυμπεροπούλου Αγγελική όπως επίσης και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής Λάρισας για την πολύτιμη βοήθειά τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας Γ.Σίμο για την επιστημονική υποστήριξή του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας Κ.Σταθόπουλο για την ηθική υποστήριξή του και την εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπό μου. Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Βασικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής Λάρισας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
• ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΩΝ	4
• ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΗ (ADAPTOR HYPOTHESIS)	5
• ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΩΝ	6
• ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΩΝ	8
• ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ MetRS – Arc1p – GluRS	9
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	11
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	12
• ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. COLI</i>	12
• ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. COLI</i>	13
• ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINI PREPARATION)	14
• ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	15
• ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	15
• ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕΣΩ IPTG ΣΕ <i>E. COLI</i>	16
• ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΗΣ	17
• ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ ΣΕ ΣΦΑΙΡΟΠΛΑΣΤΕΣ	19
• ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ SDS-PAGE	20
• ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (WESTERN BLOTTING)	21
• ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑ – ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
• ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ	23
• ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
• ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΕΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ARC1P	28
• ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ GLURS ΚΑΙ METRS	29
• ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ARC1P, METRS ΚΑΙ GLURS	31
• ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	36
• ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΤΗΣ Arc1p ΓΙΑ ΤΑ ΔΥΟ ΕΝΖΥΜΑ	37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μεταφορικό RNA (tRNA) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες στην αποκωδικοποίηση της γενετικής πληροφορίας. Από την ακρίβεια της αντίδρασης ομοιοπολικής δέσμευσης του συγκεκριμένου μορίου με το συγγενές αμινοξύ, η οποία καταλύεται από τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η πιστότητα της μετάφρασης του γενετικού κώδικα.

Στο ζυμομύκητα έχει ανακαλυφθεί η ύπαρξη ενός συμπλόκου που αποτελείται από δύο ένζυμα, τις αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες της μεθειονίνης (MetRS) και της γλουταμίνης (GluRS), καθώς και από την πρωτεΐνη Arc1p (Aminoacyl-tRNA synthetase cofactor 1). Η Arc1p συνδέεται με τις αμινο-τελικές «προσαρτήσεις» των δύο ενζύμων και υποβοηθά την καταλυτική τους δραστηριότητα αυξάνοντας την αγκιστεία τους για τα συγγενή μόρια tRNA (tRNA^{Met} και tRNA^{Glu}).

Στην παρούσα πειραματική εργασία, υπερεκφράσαμε την πρωτεΐνη Arc1p σε βακτήρια [στέλεχος BL21(DE3)] και τα ένζυμα GluRS και MetRS σε κύτταρα ζύμης (στέλεχος RS453). Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων και των κύτταρων ζύμης με τα κατάλληλα πλασμίδια και την καλλιέργειά τους, ακολούθησε η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών – της μεν Arc1p με ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτη (IPTG) και των δε ενζύμων με γαλακτόζη.

Ακολούθησε ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν έφεραν νικέλιο (Ni-NTA), το οποίο και σχηματίζει χηλική ένωση με το ημιδαζόλιο των ιστιδινών (His-tag). Η επιλογή έγινε επειδή και οι τρεις υπό μελέτη πρωτεΐνες περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια ουρά ιστιδινών (8His-tag για τις GluRS και MetRS και 6His-tag για την Arc1p). Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πηκτές πολυακρυλαμίδης και η ανίχνευση των ζωνών έγινε με τη χρώση Coomassie Blue καθώς και με επώαση με αντισώματα (Arc1p).

Παρατηρήθηκε ότι η επαγωγή της έκφρασης και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία. Δεν ισχύει όμως το ίδιο και για την προσπάθεια ποσοτικού προσδιορισμού της συμπλοκοποίησης των τριών αυτών πρωτεϊνών με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες (Non-denaturing Electrophoresis).

SUMMARY

The molecule of tRNA is one of the most important factors in the decoding of the genetic information. The fidelity of the translation of the genetic code depends to a large extent on the precision of the reaction between the molecule of tRNA and the cognate amino-acid, which is mediated by the aminoacyl-tRNA synthetases.

A complex has been discovered in yeast which is composed by two enzymes, the methionyl-tRNA (MetRS) and the glutamyl-tRNA (GluRS) synthetases as well as by the protein Arc1p (Aminoacyl-tRNA synthetase cofactor 1). Arc1p interacts with the N-terminal appended domains of the two enzymes and assists their catalytic activity by increasing their affinity for the cognate molecules of tRNA (tRNA^{Met} and tRNA^{Glu}).

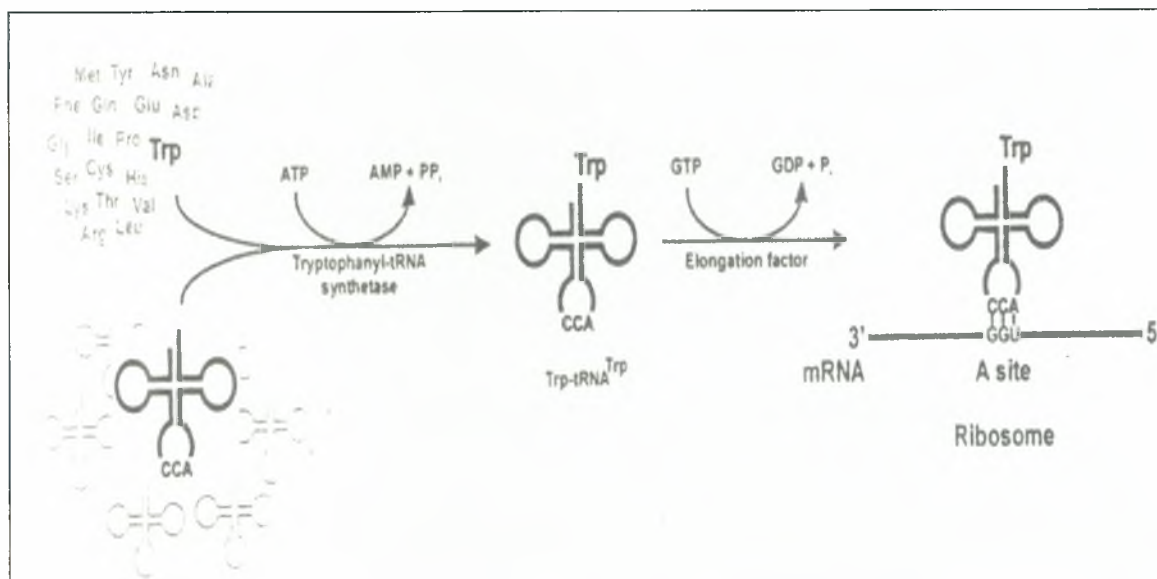
In the present experimental work, we overexpressed the protein Arc1p in bacteria [strain BL21(DE3)] and the enzymes GluRS and MetRS in yeast (strain RS453). After the transformation of the bacteria cells and the yeasts with the corresponding expression plasmids and their culture, the expression of the proteins was induced with IPTG for the Arc1p and galactose for the two enzymes.

Subsequently the purification of the proteins was performed with the use of affinity chromatography. The columns used contained nickel (Ni-NTA), which binds to the imidazole of the histidines (His-tag). We have chosen these columns because the three under study proteins contained a tail of histidines (8His-tag for GluRS, MetRS and 6His-tag for Arc1p) at their N-terminal domain. The proteins were analyzed in SDS-polyacrylamide gels and were stained with Coomassie Blue as well as with incubation with antibodies (for Arc1p).

The induction of expression and the purification of the proteins were carried out with success. However, it was not possible to monitor the formation of the complex by these three molecules using the technique of Non-denaturing Electrophoresis.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

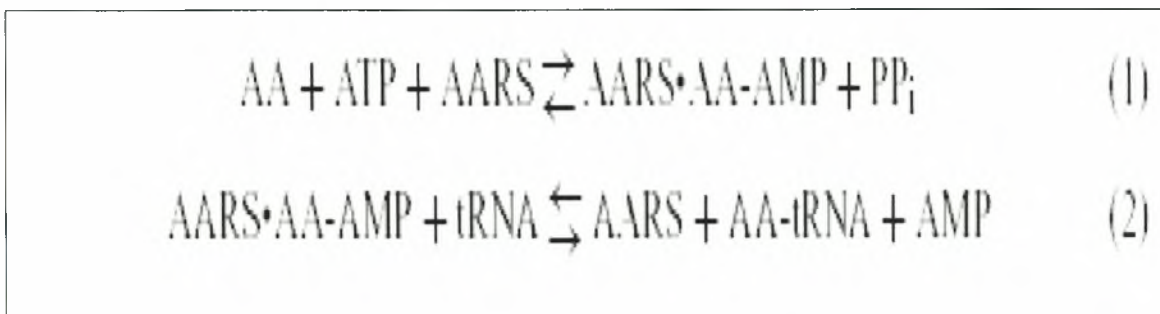
Μετάφραση είναι η διαδικασία κατά την οποία η γενετική πληροφορία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της αντίστοιχης αλληλουχίας των αμινοξέων και τη δημιουργία πρωτεϊνών (Ibba και Soll, 1999). Με τον όρο αμινοακυλίωση αναφερόμαστε σε μια από τις πιο κεντρικές κυτταρικές διαδικασίες κατά την οποία συνθέτονται αμινοάκυλο-tRNA (aa-tRNA) μόρια, που αποτελούν τα κατάλληλα υποστρώματα για την μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνες, το οποίο βρίσκεται προσδεμένο στο ριβόσωμα (Εικόνα 1). Γι' αυτό το λόγο και η πιστότητα αυτής της βιολογικής διαδικασίας είναι κρίσιμότητα για τη σωστή αποκωδικοποίηση των πληροφοριών που περιέχουν τα γονίδια (Ibba και Soll, 1999).



Εικόνα 1: Ο ρόλος του σχηματισμού του αμινοάκυλο-tRNA στη φάση επιμήκυνσης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αρχικά ένα αφορτιστο tRNA αμινοακυλιώνεται με το κατάλληλο αμινοξύ και έτσι παράγεται ένα αμινοάκυλο-tRNA το οποίο αλληλεπιδρά με έναν μεταφραστικό παράγοντα επιμήκυνσης. Αυτό επιτρέπει την παράδοση του αμινοάκυλο-tRNA στην A ριβοσωμική περιοχή, όπου το αντικωδικόνιο του αλληλεπιδρά με το αντίστοιχο κωδικόνιο του mRNA. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα παρουσιάζεται με ποιο τρόπο το κωδικόνιο GGU μεταφράζεται ως τρυπτοφάνη.

Η διεργασία της αμινοακυλίωσης βασίζεται στη δράση των ενζύμων αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες (aaRS) που καταλύουν την εστεροποίηση ενός μόνο συγκεκριμένου αμινοξέος με την βάση της αδενίνης στο 3' άκρο του αντίστοιχου tRNA (Frugier *et al.*, 2000). Ουσιαστικά πρόκειται για μια αντίδραση δυο σταδίων (Εικόνα 2), κατά την οποία στο πρώτο βήμα η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση ενεργοποιεί το αμινοξύ με την

κατανάλωση δυο δεσμών υψηλής ενέργειας ($ATP \rightarrow AMP + PP_i$) και κατά το δεύτερο βήμα το ίδιο ένζυμο μεταφέρει το ενεργοποιημένο αμινοξύ στο κατάλληλο tRNA. Το αμινοακυλιωμένο tRNA, στη συνέχεια, δεσμεύεται από τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu μαζί με ένα μόριο GTP (Sprinzl, 1994). Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου (aa-tRNA:EF-Tu:GTP) είναι απαραίτητη για τη περαιτέρω δέσμευση του aa-tRNA στο ριβόσωμα, όπου η τριπλέτα του αντικωδικονίου στο tRNA (Soll *et al.*, 1995) θα αναγνωρίσει και θα συνδεθεί με το κατάλληλο κωδικόνιο του mRNA, ούτως ώστε να προχωρήσει η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.



Εικόνα 2: Δύο είναι τα στάδια της αμινοακυλίωσης. Το πρώτο αφορά την ενεργοποίηση του αμινοξέος (aa) με την κατανάλωση ενός μορίου ATP και το δεύτερο τη μεταφορά αυτού του αμινοξέος στο tRNA. Και τα δύο στάδια καταλύει η αμινοάκυλο-tRNA συνθετάση (aaRS).

• ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΩΝ

Τα ένζυμα αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες έχει βρεθεί πως χωρίζονται (Πίνακας 1) σε δύο δομικά διακριτές και εξελικτικά συντηρημένες ομάδες (class I και class II) (Eriani *et al.*, 1990), που διαθέτουν αποκλειστικές αλληλουχίες και μοτίβα τα οποία αντικατοπτρίζουν ενεργά κέντρα που παρουσιάζουν διαφορετικές τοπολογίες (Ruff *et al.*, 1991). Αναλύσεις στη δομή που έχουν γίνει στις συνθετάσες κλάσης I (περιλαμβάνονται οι συνθετάσες των γλουταμινικού οξέος, γλουταμίνης, τρυπτοφάνης, τυροσίνης, βαλίνης, λευκίνης, ισολευκίνης, μεθειονίνης, κυστεΐνης και αργινίνης), έχουν αποδείξει πως η αλληλουχία τους αποκαλύπτει την ύπαρξη δυο δομικών μοτίβων, του “HIGH” (His-Ile-Gly-His) και του “KMSKS” (Lys-Met-Ser-Lys-Ser), τα οποία απουσιάζουν από τα ένζυμα κλάσης II (Burbaum *et al.*, 1991). Επίσης, στο καταλυτικό κέντρο της πρώτης κλάσης πρωτεϊνών περιέχεται μια δινουκλεοτιδική Rossmann περιοχή, ενώ στις κλάσης II αυτή η μορφή αντικαθίσταται από ένα β-πτυχωτό φύλλο.

Τάξη I	Τάξη II
<u>Υποκατηγορία Ia</u>	<u>Υποκατηγορία IIa</u>
CysRS	SerRS
ArgRS	ProRS
IleRS	ProCysRS
LeuRS	HisRS
ValRS	ThrRS
MetRS	AlaRS
	GlyRS-I
	GlyRS-II
<u>Υποκατηγορία Ib</u>	<u>Υποκατηγορία IIβ</u>
GlnRS	LysRS-II
GluRS	LysRS-III
LysRS-I	AsnRS
	AspRS
<u>Υποκατηγορία Iγ</u>	<u>Υποκατηγορία IIγ</u>
TrpRS	PheRS
TyrRS	

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών (Francklyn *et al.*, 2002)

Μια άλλη σημαντική διαφορά είναι ο τρόπος πρόσδεσης των tRNA από τις συνθετάσες, όπου τα I κλάσης ένζυμα προσεγγίζουν το βραχίονα υποδοχής του tRNA (acceptor stem) από την μικρή αύλακα και με το μεταβλητό βρόγχο (variable loop) να έχει κατεύθυνση προς τον διαλύτη. Σε αντίθεση τα ένζυμα της δεύτερης κλάσης πλησιάζουν το tRNA από τη μεγάλη αύλακα του βραχίονα υποδοχής, ενώ ο μεταβλητός βρόγχος κατευθύνεται προς τη συνθετάση. Βέβαια σε αυτές τις διαφορές εντάσσονται και εξαιρέσεις, όπως η αμινοακυλο-tRNA συνθετάση της αλανίνης (Ibba *et al.*, 2000). Παρόλα αυτά η «συμμετρία» αυτών των ομάδων φαίνεται ότι εξελικτικά διατηρήθηκε με προσαρμογή των ενζύμων αυτών ως προς τα υποστρώματά τους (μόρια tRNA).

- **ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΗ (ADAPTOR HYPOTHESIS)**

Προτού ακόμα απομονωθούν και χαρακτηριστούν οι παράγοντες που συμμετέχουν στο μηχανισμό της αμινοακυλίωσης, η ύπαρξή τους είχε προβλεφθεί από τον Crick, με την υπόθεση του προσαρμοστή (Adaptor hypothesis) (Crick, 1958). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση όλοι οι οργανισμοί διαθέτουν 20 αμινοξέα και 20 αντίστοιχες αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες, μια για κάθε αμινοξύ, που τα μεταφέρουν στα tRNA (Πίνακας 2). Η υπόθεση αυτή έγινε στη συνέχεια γενική παραδοχή με την ανακάλυψη των 20 αμινοακυλο-tRNA συνθετασών τις επόμενες δεκαετίες

Crick's prediction	Current terminology
'...the RNA of the microsomal particles, regularly arranged, is the template'	mRNA
'...whatever went onto the template in a specific way did so by forming hydrogen bonds'	Codon-anticodon interactions
'...the amino acid is carried to the template by an adaptor...'	Aminoacyl-tRNA
'such adaptors...might contain nucleotides'	tRNA
'...a separate enzyme would be required to join each adaptor to its own amino acid...'	Aminoacyl-tRNA synthetases ^a
'...the specificity required to distinguish between...isoleucine and valine would be provided by these enzymes'	Editing by aminoacyl-tRNA synthetases

Πίνακας 2: Η υπόθεση του προσαρμοστή που διατυπώθηκε από τον Crick αποδείχτηκε μια εντυπωσιακά προφητική περιγραφή πολλών πτυχών της πρωτεϊνοσύνθεσης. Στον πίνακα αναφέρονται μερικές από τις προβλέψεις-κλειδιά αυτής της υπόθεσης ερμηνευμένες στη σύγχρονη ορολογία της μοριακής βιολογίας. ^a Παρόλο που ο Crick προέβλεψε σωστά την ύπαρξη των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών, η αποκλειστική χρήση τους στη σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNAs με την αντίληψη "ένα αμινοάκυλο-tRNA ανά ένα ένζυμο" έχει αποδειχτεί εκ των υστέρων ότι παραβιάζεται με αρκετούς τρόπους.

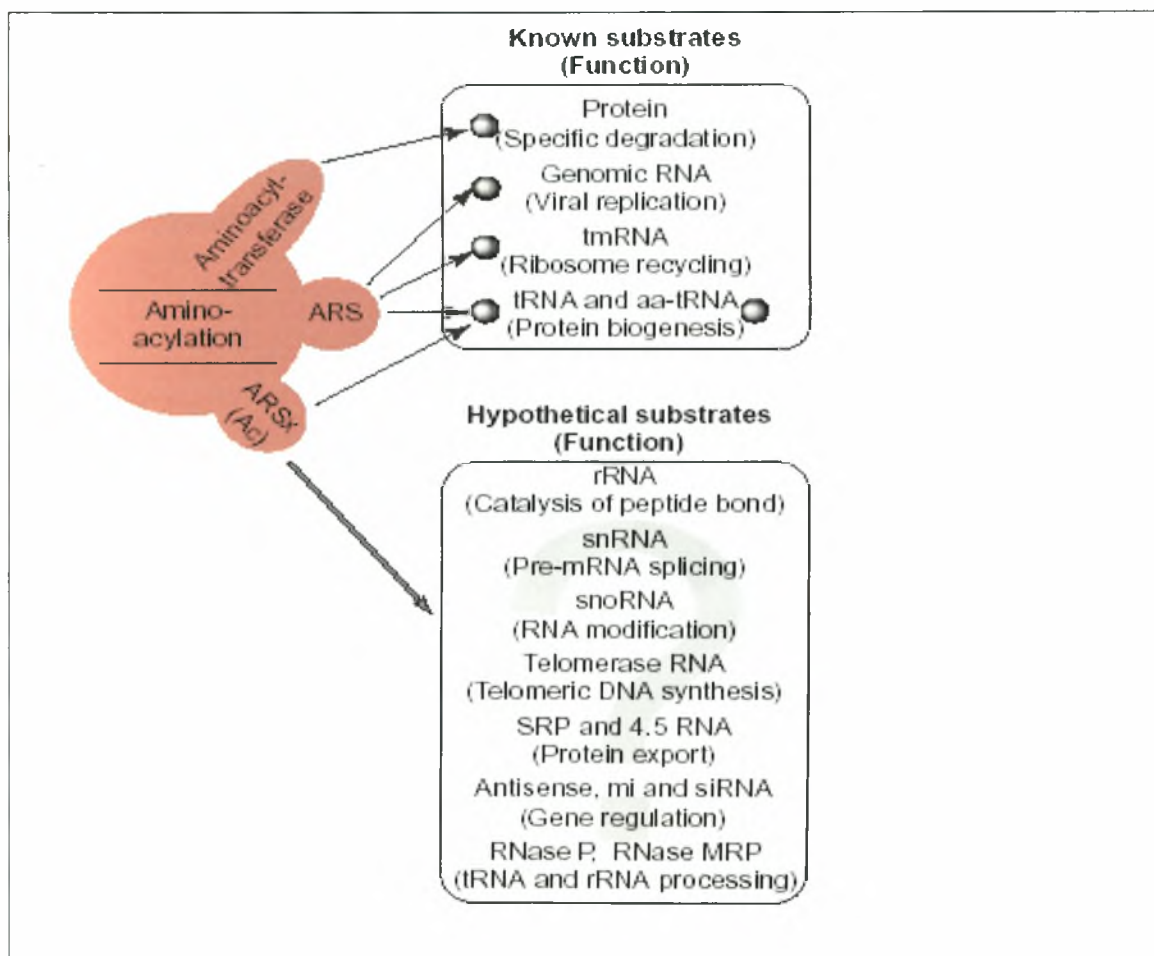
Όμως οι τεχνικές που αναπτύχθηκαν και η πλήρης ή μερική αποκωδικοποίηση ολοένα και περισσότερων γενωμάτων σε πολλούς οργανισμούς (από το *E. coli* έως τον άνθρωπο) αναδεικνύουν διαφορετική εικόνα. Στην πραγματικότητα παρατηρήθηκε ότι στο γενετικό υλικό των βακτηρίων ή των αρχαίων υπάρχουν λιγότερες από 20 συνθετάσες, ενώ μόνο στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων υπάρχουν 20 συνθετάσες. Ακόμα και στα οργανίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, ανιχνεύθηκαν λιγότερες από 20 αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών (Schon *et al.*, 1988). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις η αντίδραση της αμινοακυλίωσης γίνεται με τη χρήση έμμεσων βιοσυνθετικών οδών για τη σύνθεση ορισμένων αμινοάκυλο-tRNA μορίων (Ibba *et al.*, 2000). Έτσι στο γένωμα των αρχαίων και των βακτηρίων έχουν βρεθεί διπλασιασμοί, ελλείψεις των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτές τις συνθετάσες ή και τμήματα μόνο των γονιδίων αυτών τα οποία δεν φαίνονται να λαμβάνουν μέρος στη tRNA αμινοακυλίωση.

• ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΩΝ

Εκτός από την «συμβατική» τους λειτουργία στην αμινοακυλίωση του tRNA, οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες συμμετέχουν και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες (Εικόνα 3). Πιο συγκεκριμένα, τα εν λόγω ένζυμα εμπλέκονται στην μεταφορά του tRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Simos και Hurt, 1999). Και μάλιστα, πειράματα έχουν δείξει

ότι η αναστολή της αμινοακυλίωσης προκαλεί την μείωση της εξαγωγής του tRNA από τον πυρήνα (Lund και Dahlberg, 1998; Sarkar *et al.*, 1999). Αυτό είναι πιθανόν να συμβεί αν οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες είναι σε θέση να εισέρχονται στον πυρήνα και παρόλο που πειραματικά δεδομένα συνηγορούν στην παρουσία αυτών των ενζύμων τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο πυρηνόπλασμα (Nathanson και Deutscher, 2000), ο μηχανισμός εισόδου τους στον πυρήνα παραμένει άγνωστος.

Οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλους κλειδιά και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως στο μάτισμα των μιτοχονδριακών RNA, στη ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης (Francklyn *et al.*, 1997; Martinis *et al.*, 1999), στην αντιγραφή του DNA καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης των ίδιων τους των γονιδίων, λειτουργία που έχει μελετηθεί λεπτομερέστατα στα βακτήρια (Putzer *et al.*, 1995).

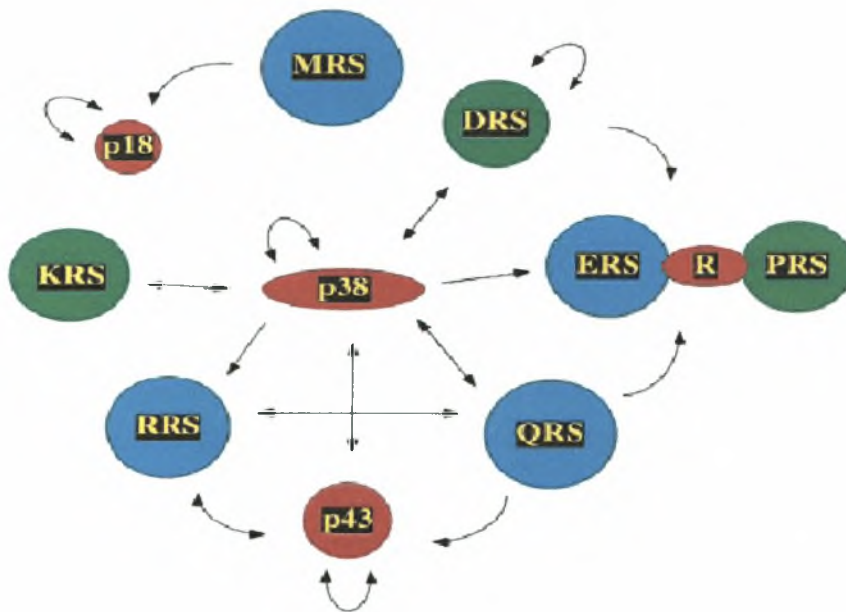


Εικόνα 3: Κυτταρικοί ρόλοι και λειτουργίες των αντιδράσεων αμινοακυλίωσης (Geslain και Rouplana, 2004)

• ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΑΚΥΛΟ-tRNA ΣΥΝΘΕΤΑΣΩΝ

Στους ανώτερους ευκαρυώτες ένας αριθμός αμινοακυλο-tRNA συνθετασών έχουν αναγνωρισθεί ως συστατικά πολυενζυμικών συμπλόκων, ένα χαρακτηριστικό που πιστεύεται ότι είναι μοναδικό στα μετάζωα (Kerjan *et al.*, 1994). Μέχρι σήμερα, δυο τέτοια σύμπλοκα έχουν χαρακτηριστεί. Το πρώτο είναι ένα σύμπλοκο μεταξύ της ValRS και τις α , β , γ και δ υπομονάδες (σε αναλογία 2:1:1:1) του μεταφραστικού παράγοντα επιμήκυνσης EF-1H (Mirande, 1991; Mirande *et al.*, 1993; Kisselev και Wolfson, 1994).

Το δεύτερο και μεγαλύτερο σύμπλοκο αποτελείται από τις ArgRS, AspRS, GlnRS, IleRS, LeuRS, LysRS, MetRS, GluRS-ProRS και από τρία μη ενζυμικά πολυπεπτίδια των 43, 38 και 18 kDa που ονομάζονται p43 (pro-EMAPII), p38 και p18 αντίστοιχα (Filonenko και Deutscher, 1994; Quevillon *et al.*, 1999). Ο πιθανός ρόλος των τριών αυτών βοηθητικών πρωτεϊνών στο σχηματισμό του συμπλόκου έχει πλέον διευκρινιστεί: η αλληλουχία της p18 υποδεικνύει ότι ευθύνεται για την παροδική αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τον EF-1H (Quevillon και Mirande, 1996), η p38 είναι σημαντική για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου (Εικόνα 4) και μάλιστα η συγκεκριμένη πρωτεΐνη απουσιάζει από οργανισμούς που δεν εμφανίζουν σύμπλοκα αμινοακυλο-tRNA συνθετασών (Quevillon *et al.*, 1999), και η p43 πιθανώς ενισχύει τη δέσμευση του tRNA από το σύμπλοκο (Quevillon *et al.*, 1997). Οι υπόλοιπες δέκα αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες γενικά χαρακτηρίζονται ως ελεύθερα ένζυμα.



Εικόνα 4: Το p38 ως πρωτεΐνη-πυρήνας στο σύμπλοκο των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών (Norcum και Warrington, 1998).

Έχουν προταθεί μερικά μοντέλα για τη δομική οργάνωση των συγκεκριμένων συμπλόκων τα οποία βασίζονται στην παρατήρηση ότι οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες που απαρτίζουν αυτά τα σύμπλοκα είναι υδρόφοβες πρωτεΐνες, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες στους προκαρυώτες (Cirakoglu και Waller, 1985). Επιπλέον, το σύμπλοκο μπορεί εν μέρει να διασπαστεί με τη χρήση χρωματογραφίας υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (Cirakoglu και Waller, 1985) ή με επώαση με χαοτροπικά άλατα ή απορρυπαντικά (Norcum, 1991). Ένα μοντέλο προτείνει ότι οι συνθετάσες συγκρατούνται μαζί εξαιτίας πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω των υδρόφοβων περιοχών (Cirakoglu *et al.*, 1985).

Ενώ παραμένει αδιευκρίνιστος ο ακριβής ρόλος αυτών των συμπλόκων μέσα στο κύτταρο, οι αλληλεπιδράσεις τους με παράγοντες επιμήκυνσης εδραϊώνει την άποψη ότι διευκολύνουν τη μεταφορά υποστρωμάτων κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης (Stapulionis και Deutscher, 1995; Negrutskii και El'skaya, 1998).

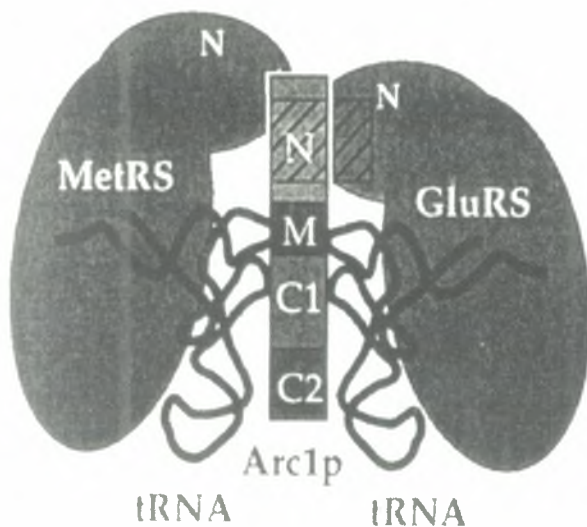
• ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ MetRS – Arc1p– GluRS

Οι ευκαρυωτικές αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες τους προκαρυωτικές, συχνά αποτελούν μέρη συμπλόκων υψηλού μοριακού βάρους. Στον ζυμομύκητα οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες της μεθειονίνης (MetRS) και της γλουταμίνης (GluRS) συνδέονται με την tRNA-δεσμευτική πρωτεΐνη Arc1p (Εικόνα 5) (Simos *et al.*, 1996a ; Simos *et al.*, 1998). Το συγκεκριμένο σύμπλοκο εντοπίζεται αυστηρά στο κυτόπλασμα και συμμετέχει στην αμινοακυλίωση των tRNAs. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε περίπτωση αδυναμίας σχηματισμού του συμπλόκου (λόγω π.χ. απουσίας της Arc1p), οι Arc1p, MetRS και GluRS είναι ικανές να διεισδύσουν στον πυρήνα. Εκεί οι συνθετάσες αμινοακυλιώνουν τα tRNAs και διευκολύνουν έτσι την πυρηνική εξαγωγή των τελευταίων στους ζυμομύκητες και στους ανώτερους ευκαρυώτες (Grosshans *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 1999; Lund και Dahlberg, 1998).

Η εύρεση της αλληλουχίας του *ARC1* έδειξε ότι το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μια βασική πρωτεΐνη (pI=8.99) 376 αμινοξέων με μια προβλεπόμενη μοριακή μάζα 42kDa. Εντός της Arc1p μπορούν να διακριθούν τρεις περιοχές: μια N-τελική περιοχή (κατάλοιπα 1-131) που παρουσιάζει μικρή ομολογία με άλλες γνωστές πρωτεΐνες, μια μεσαία περιοχή (κατάλοιπα 132-200) πλούσια σε κατάλοιπα λυσίνης και αλανίνης, της οποίας η αλληλουχία παρουσιάζει ομοιότητες (ως και 34%) με τις H1 ιστόνες και μια C-τελική περιοχή (κατάλοιπα 201-376) η οποία παρουσιάζει σημαντική ομολογία με μερικές άλλες πρωτεΐνες (π.χ. EMAP II) (Kao *et al.*, 1994).

Όπως προαναφέρθηκε, στον ζυμομύκητα σχηματίζεται ένα σταθερό σύμπλοκο μεταξύ των δύο αμινοακυλο-tRNA συνθετασών, GluRS και MetRS, και της Arc1p. Και τα δύο ένζυμα αλληλεπιδρούν άμεσα με την Arc1p. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης πραγματοποιούνται αφενός μέσω των N-τελικών επισυναπτόμενων περιοχών («προσαρτήσεις») των ενζύμων και αφετέρου μέσω της N-περιοχής της Arc1p, η οποία περιέχει ευδιάκριτες αλλά επικαλυπτόμενες περιοχές δέσμευσης για τα δύο ένζυμα. Έτσι,

οι καταλυτικές περιοχές των δύο ενζύμων είναι ελεύθερες να συνδεθούν και να αμινοακυλιώσουν τα συγγενή tRNAs. Η επιλογή και η δέσμευση αυτών των tRNAs διευκολύνεται από την TRBD (tRNA-Binding Domain), η οποία βρίσκεται στην C-τελική περιοχή της Arc1p (Simos *et al.*, 1998; Deinert *et al.*, 2001). Η TRBD είναι συντηρημένη στην πρωτεΐνη p43 (Quevillon *et al.*, 1997), ενώ η N-περιοχή που συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου είναι συντηρημένη στις πρωτεΐνες p18 και p38 (Galani *et al.*, 2001).



Εικόνα 5: Σχηματικό μοντέλο για την οργάνωση του συμπλόκου MetRS-Arc1p-GluRS που εντοπίζεται στον ζυμομύκητα.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η Arc1p σχηματίζει μια διαμοριακή γέφυρα (αψίδα) μεταξύ του tRNA και των συνθετασών, φέρνοντας σε στενή επαφή τα ζευγάρια αλληλεπίδρασης. Το αποτέλεσμα του σχηματισμού αυτού του συμπλόκου είναι όχι μόνο ο υψηλός βαθμός δέσμευσης των GluRS και MetRS με τα συγγενή τους tRNAs αλλά και η ρύθμιση της καταλυτικής αποτελεσματικότητας των συγκεκριμένων συνθετασών. Όταν η Arc1p δεσμεύεται στην MetRS, αυξάνεται σχεδόν 500 φορές η καταλυτική αποτελεσματικότητα της τελευταίας λόγω της δραματικής μείωσης της K_m μέσω της άμεσης μεταφοράς του tRNA στη συνθετάση (Simos *et al.*, 1998). Η Arc1p μπορεί επίσης να αυξάνει την αποτελεσματικότητα αμινοακυλίωσης της GluRS εξαιτίας της προφανούς υψηλότερης συγγένειας του συμπλόκου Arc1p-GluRS για το tRNA^{Glu} (Deinert *et al.*, 2001). Συνεπώς, και τα δύο ένζυμα που συνδέονται με την Arc1p στον ζυμομύκητα αποκτούν ένα καταλυτικό πλεονέκτημα.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός των πειραμάτων που εκτελέστηκαν κατά την παρούσα πτυχιακή εργασία είναι η υπερέκφραση των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών GluRS και MetRS καθώς και της πρωτεΐνης Arc1p σε ζυμομύκητες και βακτήρια αντίστοιχα. Μετά την υπερέκφραση τους ακολούθησε ο καθαρισμός τους με τη χρήση της τεχνικής της χρωματογραφίας, η οποία ελαχιστοποίησε τη διάσπαση των πρωτεϊνών και επέτρεψε έτσι την ανάκτηση μεγάλων ποσοτήτων καθαρών πλέον πρωτεϊνών.

Η χρησιμότητα της ανάκτησης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε καθαρή μορφή έγκειται στο ότι δύναται η ευκαιρία να μελετηθεί η κινητική σχηματισμού διμερών (Arc1p-MetRS ή Arc1p-GluRS) ή τριμερούς (MetRS-Arc1p-GluRS) συμπλόκου χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση κάτω από μη-αποδιατακτικές συνθήκες (Non-denaturing Electrophoresis) ή τη μέθοδο συντονισμού πλασμονίων επιφάνειας (surface plasmon resonance) στο σύστημα BIAcore. Προχωρώντας ένα βήμα πέρα από τον κύριο σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκε επιπλέον μια σειρά πειραμάτων με τη χρήση της ηλεκτροφόρησης κάτω από μη-αποδιατακτικές συνθήκες προκειμένου να μελετηθεί η προαναφερθείσα κινητική σχηματισμού του συγκεκριμένου συμπλόκου αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα!

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αναμένεται να δώσουν πληροφορίες σχετικά με: το αν η δημιουργία (ή διάσπαση) του συμπλόκου είναι μια δυναμική και αντιστρεπτή διαδικασία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το κατά πόσο είναι δυνατόν αυτή να ρυθμίζεται από άλλους παράγοντες (όπως π.χ. η συγκέντρωση του tRNA) και τον μηχανισμό δημιουργίας του συμπλόκου σε μοριακό επίπεδο. Οι πληροφορίες αυτές θα συμβάλουν στην κατανόηση βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως η βιογένεση και μεταφορά του tRNA ενώ μακροπρόθεσμα είναι πιθανόν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη μικροβιοκτόνων ουσιών (αντιβιοτικών) που θα στοχεύουν την διαδικασία αμινοακυλίωσης του tRNA των μικροοργανισμών. Επιπλέον, το μοντέλο αλληλεπίδρασης του συγκεκριμένου συμπλόκου μπορεί να λειτουργήσει ως ένα απλό πρότυπο για το πολυενζυμικό σύμπλοκο των θηλαστικών.

Από τα όσα αναφέρονται παραπάνω, καθίσταται σαφές ότι αυτή μελέτη των βασικών κυτταρικών και βιοχημικών μηχανισμών της αμινοακυλίωσης και μεταφοράς του tRNA είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα μιας και οι κλασικές μελέτες που έχουν γίνει κυρίως σε βακτήρια δεν επαρκούν για να εξηγήσουν τις αντίστοιχες διεργασίες στα ευκαρυωτικά κύτταρα όπου η πολυπλοκότητα των βιοχημικών συστημάτων είναι μεγαλύτερη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli*

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για να κατασκευάσουμε βακτηριακά κύτταρα [στη συγκεκριμένη περίπτωση τα στελέχη: TOP 10 και BL21(DE3)] ικανά να δεχτούν την εισαγωγή πλασμιδίων μέσω της τεχνικής του μετασχηματισμού που περιγράφεται παρακάτω. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απαιτούσε την παρασκευή των παρακάτω διαλυμάτων στην απαιτούμενη ποσότητα:

<u>TYM</u>	<u>TFB-I pH 7</u>	<u>TFB-II pH 7</u>
2% tryptone	30mM KOAc	10mM MOPS
0,5% yeast extract	50mM MnCl ₂	75mM CaCl ₂
0,1M NaCl	100mM KCl	10mM KCl
10mM MgSO ₄	10mM CaCl ₂	20% glycerol
	15% glycerol	

Στη συνέχεια εκτελέστηκαν τα ακόλουθα βήματα:

- Από τους -80°C παίρνουμε TOP 10 (ανθεκτικά στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη) και BL21(DE3) (μη ανθεκτικά στην στρεπτομυκίνη) κύτταρα και τα τοποθετούμε σε 5mL θρεπτικού μέσου TYM. Προσθέτουμε και 5μL στρεπτομυκίνης μόνο στο σωληνάκι που περιέχει τα TOP 10 κύτταρα. Αφήνουμε τα κύτταρά μας όλη τη νύχτα στους 37°C προκειμένου να πολλαπλασιαστούν.
- Την επόμενη μέρα αφαιρούμε από 30μL από τις δύο καλλιέργειες και τα μεταφέρουμε σε δύο σωληνάκια που περιέχουν 3mL (αραίωση 1:100) του ίδιου διαλύματος (TYM+στρεπτομυκίνη για τα TOP 10, μόνο TYM για τα BL21DE3). Έπειτα, αφήνουμε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν στους 37°C για 2-3 ώρες.
- Από τα δύο αυτά σωληνάκια μεταφέρουμε από 500μL (500μL TOP 10 και 500μL BL21DE3) σε δύο κωνικές φιάλες που περιέχουν από 100mL TYM χωρίς αντιβιοτικά και αφήνουμε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν έως ότου η οπτική τους πυκνότητα (OD) φτάσει την τιμή 0.35-0.4 (η απορρόφηση μετريέται στα 600nm).
- Μετά από 3:30 ώρες, η OD των BL21(DE3) κυττάρων φτάνει την τιμή 0.35. Έπειτα, μοιράζουμε τα 100mL των BL21DE3 κυττάρων σε δύο σωλήνες (falcon) των 50mL και φυγοκεντρούμε στα 1600g για 5 λεπτά στους 4°C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε σε κάθε falcon από 25mL TFB-I και επαναϊωρούμε το ίζημα. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για 10 λεπτά.
- Ξαναφυγοκεντρούμε τα δύο falcon με τα BL21DE3 κύτταρα στα 1600g για 7 λεπτά στους 4°C.

- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε σε κάθε falcon από 2mL TFB-II και επαναιωρούμε το ίζημα. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για μία ώρα.
- Μοιράζουμε τα 4 συνολικά mL του διαλύματος με τα B121DE3 κύτταρα σε 20 erpendorf (από 200μL) και τα αποθηκεύουμε στους -80°C.
- Όταν λίγο αργότερα η OD των TOP 10 κυττάρων φτάσει την τιμή 0.35, ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E.coli*

Τα TOP 10 κύτταρα, που έχουν καταστεί δεκτικά (competent) στην εισαγωγή πλασμιδίων με την τεχνική που αναφέρθηκε προηγουμένως, μπορούν να μετασχηματιστούν σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα:

1. Παίρνουμε ένα erpendorf που περιέχει TOP 10 κύτταρα (200 μL) και προσθέτουμε σε αυτό μια ποσότητα του επιθυμητού πλασμιδίου (1μL). Τα αφήνουμε στον πάγο για μισή ώρα περίπου.
2. Ακολουθεί θερμικό σοκ (heat shock) για 50 δευτερόλεπτα στους 42°C.
3. Προσθέτουμε 1mL θρεπτικό υλικό LB* στο erpendorf και αφήνουμε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν στους 37 °C με ταυτόχρονη ανάδευση στα 30g για μία ώρα.
4. Φυγοκεντρούμε το περιεχόμενο του erpendorf στα 1700g για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, αφαιρούμε το υπερκείμενο (≈1mL) και επαναιωρούμε το ίζημα με τα κύτταρα έτσι ώστε να τα απλώσουμε σε τριβλίο το οποίο περιέχει θρεπτικό υλικό (LB) και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη).
5. Το τριβλίο με τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C ως την επόμενη μέρα (overnight).

* Το θρεπτικό μέσο LB παρασκευάζεται διαλύοντας σε ένα λίτρο δις απεσταγμένου νερού:

- 10g bacto-tryptone: προκύπτει από την πέψη, με τα κατάλληλα ένζυμα, πρωτεϊνών βακτηριακών κυττάρων.
- 5g bacto-yeast extract: εκχύλισμα από κύτταρα ζύμης και βακτηρίων.
- 5g NaCl
- Σε περίπτωση που το θρεπτικό μέσο προορίζεται για επίστρωση σε τριβλία, προσθέτουμε και 10g άγαρ.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINI-PREPARATION)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Λαμβάνονται 1.5mL από υγρή καλλιέργεια των κυττάρων και φυγοκεντρώνται για 20sec. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και κρατούμε το ίζημα των κυττάρων όπου προσθέτουμε 300 μL από το διάλυμα TENS και αναμιγνύουμε για να ομογενοποιήσουμε το διάλυμα. Το διάλυμα TENS δημιουργεί πόρους στη κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, επιτρέποντας έτσι την έξοδο των νουκλεϊκών οξέων από το κύτταρο και παρασκευάζεται ως εξής:

- 0,5% SDS
- 0,1N NaOH
- Συμπληρώνουμε με TE (Tris και EDTA)

Στη συνέχεια προστίθενται 150μL 3M NaOAc και αναδεύουμε ελαφρώς. Το NaOAc προκαλεί τη κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, αλλά λόγω των αλάτων που περιέχει ρυθμίζει και το pH του διαλύματος. Κατόπιν το διάλυμα φυγοκεντρείται για 2min στα 210g και κρατάμε το υπερκείμενο (το ίζημα περιέχει πρωτεΐνες που έχουν καθιζάνει μετά τη προσθήκη του NaOAc). Έπειτα στο υπερκείμενο προστίθεται αιθανόλη 100% 1mL και το διάλυμα αφήνεται στο πάγο για 20min. Έπειτα, φυγοκεντρείται για 2min στα 210g. Σε αυτό το στάδιο καθιζάνουν τα πλασμίδια, το RNA διαλύεται και παραμένει στο υπερκείμενο. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου, προσθήκη 0.5mL αιθανόλης 70% στο ίζημα και φυγοκέντρηση για 2min στα 210g. Ομοίως απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα ξηραίνεται για 60min. Τελικά προστίθενται 20μL TE και το ίζημα του DNA επαναδιαλύεται με ανάδευση. Πάντοτε ύστερα από την προετοιμασία αυτή του DNA αναλύουμε το διάλυμα σε πήκτωμα αγαρόζης για να βεβαιωθούμε ότι υπάρχει DNA στο διάλυμα.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (καλλιέργειες κυττάρων των 100mL) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το Plasmid Midi Kit (QIAGEN). Ο σκόπος μιας τέτοιας απομόνωσης είναι η ανάκτηση καθαρότερου και σε μεγαλύτερη ποσότητα – σε σχέση με την απομόνωση σε μικρή κλίμακα – πλασμιδιακού DNA. Με το DNA αυτό μπορούμε, αφού επιβεβαιωθούμε με μια πολλαπλή πέψη για την ορθότητα των κατασκευών μας, να μετασχηματίσουμε κύτταρα στους κλώνους των οποίων θα επάγουμε την έκφραση των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν.

ΠΕΨΗ ΜΕ ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η διεργασία αυτή πρόκειται για την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA με ένζυμα περιορισμού. Πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο, παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που προτείνεται από τον κατασκευαστή, και αφήνεται για 1 ώρα στους 37°C. Ενζυμική μονάδα ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μg DNA από βακτηριοφάγο σε μια ώρα, σε βέλτιστες συνθήκες. Κατά την επεξεργασία του πλασμιδίου με ένζυμα περιορισμού, προστίθεται επίσης μια ριβονουκλεάση (RNase) για την διάσπαση τυχόν RNA προσμίξεων, καθώς και BSA. Η ουσία αυτή δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων, εμποδίζοντας έτσι την δέσμευση των ενδονουκλεασών σε αυτά και την επακόλουθη μείωση της δραστηριότητάς των.

Παρασκευή διαλύματος πέψης

Για την παρασκευή ενός διαλύματος πέψης 5μL πλασμιδιακού DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί το παρακάτω πειραματικό πρωτόκολλο:

- DNA 5μL
- Ένζυμο 0,5μL
- RNase I 0,2μL
- BSA 2μL
- Ρυθμιστικό διάλυμα 2μL
- Νερό(δix απεσταγμένο) 10,3μL

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ο διαχωρισμός διαλύματος DNA πραγματοποιείται σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης 1% συγκέντρωσης. Για τη δημιουργία του gel χρησιμοποιείται αγαρόζη και ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Το διάλυμα που περιέχει αυτά τα δυο συστατικά, θερμαίνεται μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 0.4 μg/mL και το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή όπου και αφήνεται να πήξει. Εν τω μεταξύ προετοιμάζεται το δείγμα που θα ηλεκτροφορηθεί με τη προσθήκη της χρωστικής κυανούν της βρωμοφαινόλης. Όταν το gel στερεοποιηθεί φορτώνουμε το δείγμα στις θέσεις υποδοχής που υπάρχουν στο gel και εφαρμόζουμε τάση 100 V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ανιχνεύουμε την ύπαρξη DNA στην υπεριώδη ακτινοβολία, που επιτυγχάνεται με την προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου που έχει προηγηθεί, το οποίο απορροφά στην υπεριώδη ακτινοβολία.

ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕΣΩ IPTG ΣΕ *E.Coli*

Το IPTG ή ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης είναι ένας επαγωγέας της μεταγραφής των γονιδίων του οπερονίου της λακτόζης (*lacZ*). Φυσιολογικά η μονάδα αυτή στο *E.coli* κωδικοποιεί για τρία ένζυμα, τη β-γαλακτοσιδάση που διασπά το δισακχαρίτη λακτόζη σε D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη, τη περμεάση που καταλύει τη μεταφορά της λακτόζης μέσα στο κύτταρο και τη τρανσακετυλάση που δεν είναι απαραίτητη για τον μεταβολισμό της λακτόζης και ο φυσιολογικός της ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι τώρα.

Στα κύτταρα του *E.coli*, όμως, αναστέλλεται η έκφραση των γονιδίων του οπερονίου της λακτόζης από τον καταστολέα LacI^Q. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η προσθήκη του προαγωγέα IPTG. Το IPTG συνδέεται με την κατασταλτική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από συγκεκριμένη περιοχή του οπερονίου, και η οποία εμποδίζει τη μεταγραφή των δομικών γονιδίων.

Το πλασμίδιο pET-8c περιέχει τον εκκινητή του οπερονίου της λακτόζης και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επαγωγή της έκφρασης της *Arc1p* με IPTG. Τα κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν ανήκουν στο στέλεχος BL21(DE3) και θεωρούνται κατάλληλα για την επαγωγή μέσω IPTG έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Επιπλέον, έχουν αντίσταση στο αντιβιοτικό αμικιλίνη ιδιότητα που θα χρησιμοποιήσουμε για την επιλογή των σωστών αποικιών.

Πειραματική διαδικασία

- Έχοντας πραγματοποιηθεί η διαδικασία (περιγράφεται παραπάνω) ώστε τα κύτταρα BL21(DE3) να καταστούν δεκτικά στην εισαγωγή πλασμιδίων, προχωρούμε στο μετασχηματισμό των κυττάρων αυτών (ακολουθείται η ίδια διαδικασία που έχει περιγραφεί πρωτότερα) με τα πλασμίδια που περιέχουν το γονίδιο της πρωτεΐνης (*Arc1p*) που θέλουμε να εκφράσουμε.
- Την επόμενη μέρα αφού τα κύτταρα πολλαπλασιαστούν, σηκώνουμε 4-5 αποικίες από κάθε τριβλίο με τα μετασχηματισμένα κύτταρα και τις μεταφέρουμε σε μία φλάσκα που περιέχει 25mL LB medium + αμικιλίνη (100 µg/mL). Αφήνουμε τα κύτταρα στους 37°C για μία μέρα προκειμένου να πολλαπλασιαστούν.
- Την επόμενη μέρα, 6.50mL από την καλλιέργεια μεταφέρονται σε 500mL LB medium + 500µl αμικιλίνη και αφήνονται να πολλαπλασιαστούν στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα (OD) φτάσει την τιμή 0.4.
- Όταν η OD της καλλιέργειας φτάσει την τιμή 0.4, βγάζουμε τη φλάσκα από τους 37°C και την αφήνουμε σε °C δωματίου μέχρι να φτάσει η OD την τιμή 0.6.
- Όταν η OD της καλλιέργειας φτάσει την επιθυμητή τιμή τότε προσθέτουμε σε αυτήν 1mM IPTG. Έπειτα, αφήνουμε την καλλιέργεια για 2 ώρες σε °C δωματίου και κατόπιν φωτομετρούμε. Πριν την προσθήκη του επαγωγέα στην καλλιέργεια, κρατάμε 1mL δείγματος από αυτήν προκειμένου να αναλυθεί αργότερα με SDS-PAGE.

- Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της επώασης απομονώνουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στα 2800g για 15min. Πριν την απομόνωση των κυττάρων, κρατάμε πάλι 1ml δείγματος για τον ίδιο ακριβώς λόγο.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Επαναιωρούμε σε δις απεσταγμένο νερό και φυγοκεντρούμε στα 2800g για 15min.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αποθηκεύουμε τα κύτταρα στους -20°C.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΗΣ

Έχουμε κύτταρα ζύμης (στέλεχος RS453) τα οποία και θέλουμε να μετασχηματίσουμε με τα πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια των επιθυμητών πρωτεϊνών (MetRS και GluRS) και στη συνέχεια να τα καλλιεργήσουμε προκειμένου να επάγουμε την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών. Για να το πετύχουμε, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα και θρεπτικά μέσα:

• <u>YPD (500mL)</u>	<u>SDC-Ura pH 5.6 (500mL)</u>	<u>SDC-Leu pH 5.6 (500mL)</u>
10g γλυκόζη	10g γλυκόζη	10g γλυκόζη
5g bacto-yeast extract	2.5g (NH ₄) ₂ SO ₄	2.5g (NH ₄) ₂ SO ₄
10g bacto-peptone	0.85g YNB	0.85g YNB
10g άγαρ	0.375g CSM-Ura	0.375g CSM-Leu
	10g άγαρ	10g άγαρ

Τα παραπάνω θρεπτικά μέσα επιστρώθηκαν σε τριβλία αφού προηγουμένως αποστειρώθηκαν.

• <u>SGC-Leu pH 5.5 (1.5 lit)</u>	<u>SDC-Leu pH 5.6 (1.5 lit)</u>
30g γαλακτόζη	30g γλυκόζη
7.5g (NH ₄) ₂ SO ₄	7.5g (NH ₄) ₂ SO ₄
2.55g YNB	2.55g YNB
1.125g CSM-Leu	1.125g CSM-Leu

- 1M LiAc, PEG 50% 4000 και ssDNA (salmon sperm DNA)

α) Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

- Από ένα τριβλίο στο οποίο υπάρχουν ήδη κύτταρα του στελέχους RS453, παίρνουμε με ένα αποστειρωμένο ξυλάκι μια μικρή ποσότητα αυτών και τα επιστρώνουμε σε ένα τριβλίο που περιέχει YPD. Έπειτα, αφήνουμε το τριβλίο για τρεις μέρες στους 30°C.
- Κατόπιν, από το συγκεκριμένο τριβλίο παίρνουμε 75μL του ανεπτυγμένου στελέχους RS453 και τα τοποθετούμε σε ένα erpendorf όπου και τα αιωρούμε με 1mL δις απεσταγμένου νερού.
- Φυγοκεντρούμε για 5sec στα 20000g (top speed).
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε με 1mL 100mM LiAc. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 5min.
- Στη συνέχεια, φυγοκεντρούμε για 5sec στα 20000g.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε τα παρακάτω αντιδραστήρια με τη συγκεκριμένη σειρά:
 - 240μL PEG 50%
 - 36μL 1M LiAc
 - 50μL ssDNA
 - 5 μL πλασμιδιακού DNA
 - 20μL δις απεσταγμένου νερού
- Ακολουθεί ανάδευση στο vortex για 1 λεπτό και επώαση στους 42°C για 20 λεπτά. Μετά, φυγοκεντρούμε για 10sec στα 20000g και αφαιρούμε το υπερκείμενο.
- Επαναιωρούμε απαλά το ίζημα με 200μL δις απεσταγμένου νερού.
- Επιστρώνουμε το περιεχόμενο του erpendorf σε δύο SC-Ura τριβλία και τα τοποθετούμε στους 30°C για δύο μέρες.
- Μετά από δύο μέρες προχωρούμε στη διαδικασία της μεταφοράς αποικιών σε νέο τριβλίο (replating). Παίρνουμε ένα νέο SDC-Ura τριβλίο και το χωρίζουμε σε 4 τομείς. Σε κάθε τομέα απλώνουμε και από μία αποικία. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για δύο μέρες.

β) Επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης.

- Μετά το πέρας των δύο ημερών (τελευταίο βήμα της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας), ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία (replating) με τη μόνη διαφορά ότι τώρα επιστρώνουμε σε ένα νέο SDC-Leu τριβλίο. Ξαναεπωάζουμε στους 30°C για 2-3 μέρες.
- Έπειτα, παίρνουμε από το SDC-Leu τριβλίο μία ποσότητα κυττάρων και την τοποθετούμε σε μία φλάσκα με 200mL SDC-Leu (start culture). Αφήνουμε τη φλάσκα στους 30°C ως την επόμενη μέρα (overnight) μέχρι η OD της καλλιέργειας να φτάσει την τιμή 1.

- Όταν αυτό πραγματοποιηθεί, κρατάμε από τη φλάσκα ένα δείγμα των 10 OD (\approx 0mL) για ανάλυση με SDS-PAGE
- Κατόπιν, φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια στα 1600g για 5min.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε σε 10mL SGC-Leu. Φυγοκεντρούμε ξανά στα 1600g για 5min.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε σε νέο SGC-Leu. Τοποθετούμε την καλλιέργεια σε νέα φλάσκα που περιέχει 500mL SGC-Leu (Η γαλακτόζη επάγει τον υποκινητή των πλασμιδίων). Αφήνουμε τη φλάσκα στους 30°C για 18 ώρες..
- Μετά την επαγωγή της καλλιέργειας, τη φωτομετρούμε και κρατάμε δείγμα των 10 OD (περίπου 8mL) για να αναλυθεί αργότερα με SDS-PAGE.

ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΖΥΜΗΣ ΣΕ ΣΦΑΙΡΟΠΛΑΣΤΕΣ

Τα κύτταρα ζύμης διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα. Με τη διαδικασία μετατροπής των κυττάρων αυτών σε σφαιροπλάστες διαλύουμε το εν λόγω κυτταρικό τοίχωμα. Με αυτόν τον τρόπο πετυχαίνουμε την ευκολότερη λύση των συγκεκριμένων κυττάρων κατά τη διαδικασία του καθαρισμού. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- I. 50mL KPi pH 7.4
 9.9mL KH_2PO_4 0.1M
 40.1mL K_2HPO_4 0.1M
- II. Ρυθμιστικό διάλυμα για σφαιροπλάστες (200mL):
 40mL KPi 0.1M pH 7.4
 43.725g sorbitol (1.2M)
- III. DTT- alkaline buffer
 10mM DTT
 100mM Tris-Cl pH 9.4

Πειραματική διαδικασία

- Μετά την επαγωγή της καλλιέργειας των κυττάρων, ακολουθεί η μετατροπή τους σε σφαιροπλάστες.
- Τοποθετούμε την καλλιέργεια των κυττάρων σε ένα δοχείο (falcon) και φυγοκεντρούμε στα 1600g για 5min.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 45mL απεσταγμένου νερού.
- Φυγοκεντρούμε στα 1600g για 5min.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 25mL DTT-alkaline buffer. Αναδεύουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, φυγοκεντρούμε ξανά στα 1600g για 5min
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ζυγίζουμε το ίζημα του κάθε falcon.

- Προσθέτουμε στο ίζημα 15mL ρυθμιστικό διάλυμα για σφαιροπλάστες + 10mg ζυμολύση/g κυττάρων. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 20min.
- Φυγοκεντρούμε στα 400g για 5min.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε απαλά με ρυθμιστικό διάλυμα για σφαιροπλάστες (25mL).
- Φυγοκεντρούμε ξανά στα 400g για 5min.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αποθηκεύουμε τους σφαιροπλάστες στους -20°C.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ SDS-PAGE

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη πηκτή διαχωρισμού και τη πηκτή συγκέντρωσης. Το πήκτωμα συγκέντρωσης, όπως φαίνεται και από την ονομασία του, συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται στη πηκτή διαχωρισμού. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν τα φορτώσουμε στην πηκτή περιλαμβάνει τη προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών υλοποιείται με την τοποθέτηση των δειγμάτων στους 95°C (παρουσία SDS), για 3min, ούτως ώστε να γίνει διαχωρισμός τους σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους. Στη συνέχεια, αφού φορτωθούν τα δείγματα στη πηκτή και προστεθεί στην ηλεκτροφορητική συσκευή το ρυθμιστικό διάλυμα, εφαρμόζεται τάση 150V.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

1.Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (4X):

- 0.375M Tris-HCl pH 8.8
- 2 mM EDTA
- 0.1% SDS

2.Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής συσσώρευσης (4X):

- 0.125 M Tris-HCl pH 6.8
- 2 mM EDTA
- 0.1% SDS

3.30% ακρυλαμίδιο / 0.8% δις ακρυλαμίδιο

4.Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10%

5.TEMED

6.Ρυθμιστικό διάλυμα δοχείου ηλεκτροφόρησης:

- 50 mM Tris
- 0.38 M γλυκίνη
- 0.1% SDS
- 2 mM EDTA

7. Ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο προστίθενται τα δείγματα των πρωτεϊνών (4X loading buffer):

- 250 mM Tris-HCl pH 6.8
- 9.2% SDS
- 40% γλυκερόλη
- 0.2% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης
- 100mM DTT (προστίθεται λίγο πριν την προετοιμασία των δειγμάτων)

8. Διάλυμα χρωματισμού της πηκτής:

- 0.5% Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB) σε καθαρή (100%) αιθανόλη
 - 20% οξικό οξύ
- αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1

9. Διάλυμα αποχρωματισμού της πηκτής:

- 30% αιθανόλη
- 10% οξικό οξύ

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (Western Blotting)

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή της BIORAD και η μέθοδος ηλεκτροφορητικής μεταφοράς semi-dry :SD (ημι-ξηρά). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην πηκτή πολυακρυλαμίδης μετακινούνται προς την άνοδο (+) κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (λόγω του αρνητικού τους φορτίου) και δεσμεύονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

❖ Ρυθμιστικό διάλυμα για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Bjerrum and Schafer-Nielsen transfer buffer):

- 48mM Tris
- 39mM γλυκίνη
- 20% μεθανόλη
- 1.3mM SDS

Το pH πρέπει να είναι περίπου 9.2

❖ Ponceau S 0.2% που περιείχε:

- 2% Ponceau
- 30% τριχλωρο-οξικό οξύ
- 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ

Αραιώσαμε το διάλυμα 1:10 ώστε να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση (0.2%)

- ❖ Phosphatae Buffer Saline (PBS) pH 7.5. Σε ένα λίτρο απεσταγμένου νερού διαλύουμε:
11.5g disodium hydrogen orthophosphate anhydrous (80mM)
2.96g sodium dihydrogen orthophosphate (20mM)
5.84g sodium chloride (100mm)

❖ PBS-T: 0.1% Tween 20 στο διάλυμα PBS

❖ Διάλυμα κορεσμού μεμβράνης (membrane blocking agent): 5g άπαχου αφυδατωμένου γάλακτος σε 100mL PBS-T.

Πειραματική διαδικασία

- Βγάζουμε την πηκτή από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τη μεταφέρουμε στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) για περίπου 15min.
- Μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αφού κοπεί στις διαστάσεις της πηκτής, μεταφέρεται επίσης σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς για 15min.
- Τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, με την ακόλουθη σειρά, τα εξής:
 1. Τρία διηθητικά χαρτιά (υγρά).
 2. Τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που είχαμε μεταφέρει στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
 3. Την πηκτή πολυακρυλαμιδίου, που είχαμε τοποθετήσει στο διάλυμα μεταφοράς.
 4. Τρία διηθητικά χαρτιά (υγρά).
- Κλείνουμε τη συσκευή – η κάθοδος (-) βρίσκεται στο άνω μέρος – και τη συνδέουμε με το τροφοδοτικό. Εφαρμόζουμε συνεχή τάση 400mA για 1:30 ώρα.
- Μετά το πέρας της μεταφοράς μεταφέρουμε τη μεμβράνη σε διάλυμα ronceau 0.2% για 1min.
- Αφαιρούμε το διάλυμα ronceau 0.2% και ξεπλένουμε τη μεμβράνη με νερό. Οι ζώνες των πρωτεϊνών εμφανίζονται τότε με κόκκινο χρώμα.
- Ξεπλένουμε με PBS μέχρι να αποχρωματιστεί εντελώς η μεμβράνη.
- Μπλοκάρουμε την μεμβράνη με το διάλυμα κορεσμού (για μία ώρα στον αναδευτήρα σε °C δωματίου) ώστε να μην υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση με άλλες ουσίες.
- Τέλος, ξεπλένουμε με PBS-T αλλάζοντας το διάλυμα τρεις φορές (την πρώτη φορά μετά από επώαση στον αναδευτήρα για 15min και τις άλλες δύο μετά από επώαση 5min).

ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑ – ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα για την ανοσοενζυμική ανίχνευση της πρωτεΐνης Arc1p:

1. Αντίσωμα αντί-Arc1p (ορός ανοσοποιημένου κουνελιού). Το αραιώσαμε 1:500 σε PBS-T.

2. Δεύτερο ενζυμοσύνδετο (με HRP) αντίσωμα (ορός κασίικας ενάντια των IgG του κουνελιού / goat anti-rabbit) για το αντί-Arc1p, το οποίο αραιώσαμε 1:3000 σε PBS-T.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

1. PBS

2. PBS-T

3. Διάλυμα HRP (horse radish peroxidase):

Προσθέτουμε 5 mg/mL chloronaphthol (-20°C) σε μεθανόλη.

Έπειτα, προσθέτουμε 9mL PBS και 10μL H₂O₂ 37%.

Πειραματική διαδικασία

➤ Μετά το ξέπλυμα της μεμβράνης με PBS-T (τελευταίο στάδιο του προηγούμενου πειράματος/Western Blotting), την επωάζουμε με το πρώτο αντίσωμα (5μl αντισώματος σε 2.5mL PBS/ αραιώση 1:500) στο εσωτερικό ενός ψυγείου ως την επόμενη μέρα (overnight).

➤ Την επόμενη μέρα αφαιρούμε το πρώτο αντίσωμα και τοποθετούμε τη μεμβράνη για 15min σε κουτί που περιέχει PBS-T. Αδειάζουμε το κουτί και προσθέτουμε ξανά PBS-T για 5min (2 φορές).

➤ Αδειάζουμε το κουτί και προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα (3μL αντισώματος σε 9mL PBS-T/ αραιώση 1:3000). Επωάζουμε τη μεμβράνη με το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα.

➤ Έπειτα, αφαιρούμε το αντίσωμα, ξεπλένουμε και προσθέτουμε στο κουτί το διάλυμα HRP. Περιμένουμε μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες που μας ενδιαφέρουν.

➤ Τέλος, ξεπλένουμε τη μεμβράνη με νερό.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Αργή της μεθόδου

Πρωτεΐνες μπορούν να καθαριστούν με τη χρήση της τεχνικής που ονομάζεται χρωματογραφία συγγένειας, η οποία εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια πολλών πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα ενός μορίου να σχηματίζει σύμπλοκο με κάποιο στοιχείο της στήλης και έτσι να παραμένει στη σταθερή φάση μιας χρωματογραφικής στήλης καθώς διέρχεται μέσω αυτής. Στη συνέχεια το μόριο που μας ενδιαφέρει ανακτάται από τη στήλη μέσω ενός διαλύματος το οποίο περιέχει (σε υψηλή συγκέντρωση) μια ένωση ή ένα μόριο με μεγαλύτερη ή ίδια συγγένεια προς το μόριο που θέλουμε να εκλούσουμε.

Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν φέρουν νικέλιο, το οποίο και σχηματίζει χηλική ένωση με το ιμιδαζόλιο των ιστιδινών (His-tag). Η επιλογή έγινε επειδή οι τρεις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια ουρά ιστιδινών (His-tag).

Πειραματική διαδικασία

ΟΡΓΑΝΑ:

1. Στήλες NTA-Agarose
2. Ψυχόμενη φυγόκεντρος
3. Συσκευή υπερήχων

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

1. Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer:LB) για την Arc1p:
50mM KPi pH 8
200mM NaCl
0.1% Triton X-100
10mM β-μερκαπτοαιθανόλη
2. Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer:LB) για GluRS, MetRS:
50mM Tris-Cl pH 7.5
150mM NaCl
5mM MgCl₂
1mM DTT
10% γλυκερόλη
20mM ιμιδαζόλιο
3. Αναστολέας πρωτεασών (protease inhibitor)
4. Διάλυμα ιμιδαζολίου 2.5M (stock)

ΕΚΤΕΛΕΣΗ:

- Προσθέτουμε στα κύτταρα 10mL από το αντίστοιχο διάλυμα λύσης στο οποίο έχει προστεθεί Triton και μείγμα αναστολέων πρωτεασών (EDTA-free protease inhibitor cocktail / Roche).
- Το διάλυμα των κυττάρων, πριν και μετά τη λύση τους, βρίσκονται στον πάγο.
- Στη συνέχεια λύνονται τα κύτταρα με τη χρήση υπερήχων οι οποίοι εφαρμόζονται ανά 10sec και έχουν διάρκεια επίσης 10sec (10 επαναλήψεις /κύκλοι)
- Απομάκρυνση και φύλαξη 100μL από το διάλυμα με τα λυμένα κύτταρα (total extract : TE).
- Φυγοκέντρηση στη συσκευή Sorval των λυμένων κυττάρων στα 20500g για 30min.
- Από το συνολικό υπερκείμενο (supernatant : S) όγκου 10mL, παίρνουμε δείγμα 100μL.
- Το ίζημα (pellet : P) επαναιωρείται σε 10mL LB +Triton +protease inhibitor / pmsf και από αυτό κρατάμε δείγμα 100μL.

- Ακολουθεί η προετοιμασία της στήλης με τη μεταφορά σε αυτήν 400μL Ni-NTA Agarose και ξέπλυμα με 10mL (2X5mL) LB +Triton.
- Στη συνέχεια, εισάγουμε από το πάνω μέρος της στήλης το συνολικό υπερκείμενο – εκτός από τα 100μL που έχουμε κρατήσει – και το αφήνουμε να επωαστεί μαζί με τη στήλη για 30min με συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία 4°C.
- Ακολουθεί έκλουση της στήλης – πάντα στους 4°C – και από το συνολικό εκλούόμενο διάλυμα (flow through : FT) κρατάμε δείγμα 100μL.
- Έπειτα, ξεπλένουμε τη στήλη με 5mL LB.
- Έκλουση της στήλης με 4mL LB+ 20mM ιμιδαζόλιο.
- Συλλογή εκλουόμενων κλασμάτων ανά 1mL (W₁-W₄). Από το W₁ και από το W₄ κρατάμε δείγμα 100μL.
- Η πρωτεΐνη ανακτάται μέσω έκλουσης της στήλης με 3mL LB+ 150mM ιμιδαζόλιο.
- Συλλογή εκλουόμενων κλασμάτων ανά 1mL (E₁, E₂ και E₃). Και από τα τρία κλάσματα κρατάμε από ένα δείγμα 50μL.
- Τέλος, τα κλάσματα καθαρισμού αποθηκεύονται στους -20°C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η παραπάνω εκτέλεση αναφέρεται στα κύτταρα με την Arc1p. Η εκτέλεση για τα κύτταρα με τις MetRS, GluRS διαφέρει σε κάποιες λεπτομέρειες. Πιο συγκεκριμένα:

- Τα κύτταρα (σφαιροπλάστες) επαναιωρούνται σε περίπου 30mL του αντίστοιχου διαλύματος λύσης στο οποίο έχουν προστεθεί και αναστολείς πρωτεασών.
- Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται σε μια συσκευή ομογενοποίησης (Dounce Homogenizer/είκοσι χτυπήματα).
- Η προετοιμασία των δύο στηλών πραγματοποιείται με τη μεταφορά σε αυτές από 1mL Ni-NTA-Agarose.
- Η έκλουση των πρωτεϊνών μας γίνεται με την προσθήκη στις στήλες από 2mL LB +250mM ημιδαζόλιο. Τα εκλουόμενα κλάσματα συλλέγονται σε 4 erpendorf (από 0.5mL/ δύο στήλες – 8 συνολικά erpendorf). Από το κάθε κλάσμα κρατάμε δείγμα 50μL.

ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν από μικρά μόρια με διαπίδυση μέσω μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης όπως π.χ. μίας μεμβράνης κυτταρίνης με πόρους. Μόρια με διαστάσεις πολύ μεγαλύτερες από τους πόρους μένουν μέσα από τη μεμβράνη, ενώ τα μικρά μόρια και τα ιόντα περνούν τους πόρους της μεμβράνης και εμφανίζονται στο διάλυμα έξω από αυτήν. Για τη διαπίδυση των τριών πρωτεϊνών χρησιμοποιήσαμε το παρακάτω ρυθμιστικό διάλυμα:

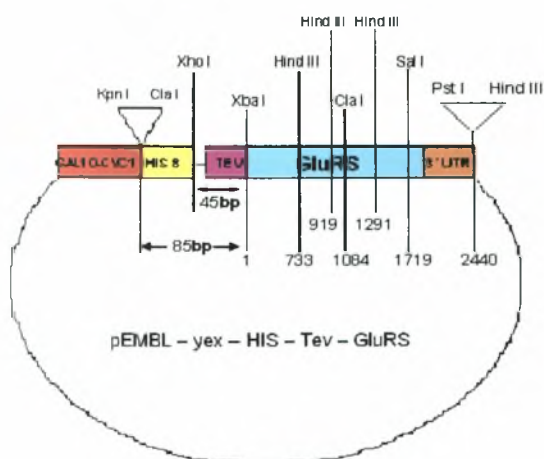
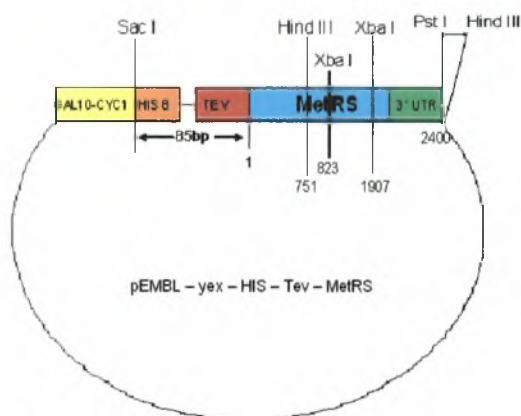
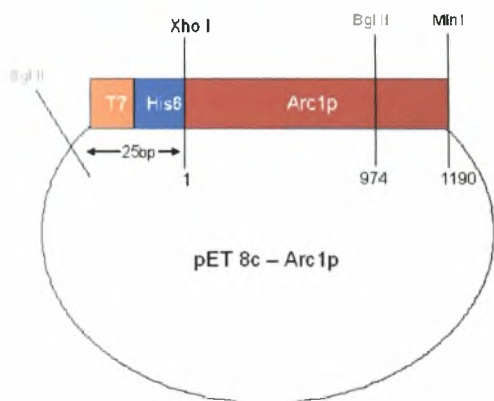
- Ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης
20mM HEPES pH 7.4
150mM NaCl
5mM MgCl₂
10% γλυκερόλη

Πειραματική διαδικασία

- Τοποθετούμε το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) διαπίδυσης σε ένα δοχείο μέσα στο ψυγείο (αναδεδυμένο). Βάζουμε την πρωτεΐνη σε μια ημιδιαπερατή μεμβράνη κυτταρίνης [Spectrum (SpectraPor) / 6000-8000 daltons] και κατόπιν μέσα στο buffer διαπίδυσης. Αφήνουμε τη μεμβράνη μέσα στο buffer έως την επόμενη μέρα (overnight).
- Την επόμενη μέρα, κόβουμε τη μεμβράνη και τοποθετούμε την πρωτεΐνη σε erpendorf.
- Φυγοκεντρούμε στα 10600g για 15min στους 4°C. Έπειτα, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο erpendorf.
- Στη συνέχεια, προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο **Bradford**. Για να το πετύχουμε αυτό ετοιμάσαμε 5 erpendorf που περιείχαν αντίστοιχα:
 - Στα δύο πρώτα erpendorf («τυφλά») τοποθετήσαμε 800μL δις απεσταγμένο νερό και 200μL Bradford.
 - Στο erpendorf #3 τοποθετήσαμε 800μL δις απεσταγμένο νερό, 200μL Bradford και 2μL από την πρωτεΐνη Arc1p.
 - Στο erpendorf #4 τοποθετήσαμε 800μL δις απεσταγμένο νερό, 200μL Bradford και 5μL από την πρωτεΐνη MetRS.
 - Στο erpendorf #5 τοποθετήσαμε 800μL δις απεσταγμένο νερό, 200μL Bradford και 5μL από την πρωτεΐνη GluRS.
- Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595nm.
- Τέλος, αποθηκεύουμε την πρωτεΐνη στους -80°C.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικός στόχος ήταν να καταστούν τα TOP 10 βακτηριακά κύτταρα επιδεκτικά (competent) στην εισαγωγή πλασμιδίων και κατόπιν να μετασχηματιστούν (σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφεται στη μεθοδολογία) με τα πλασμίδια τα οποία και φέρουν τα γονίδια των πρωτεϊνών Arc1p, MetRS και GluRS (Εικόνα 1).

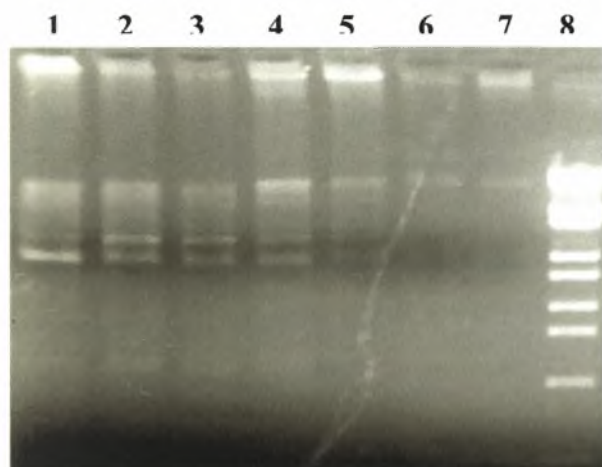


Εικόνα 1: Χάρτες των πλασμιδίων τα οποία φέρουν τα γονίδια των πρωτεϊνών Arc1p, MetRS και GluRS. Τα εν λόγω πλασμίδια πληρούν τις κατάλληλες προδιαγραφές για τα πειράματά. Πιο συγκεκριμένα, φέρουν μια περιοχή με θέσεις πέψης με διαφορετικά ένζυμα (MCS: Multiple Cloning Site), το His tag και το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη. Επίσης, τα πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια των MetRS και GluRS περιλαμβάνουν και δύο αυξοτροφικούς μάρτυρες (τα γονίδια *Leu2-d* και *URA3*). Τα συγκεκριμένα γονίδια (γονίδια επιλογής) παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των κυττάρων ζύμης (στέλεχος RS453) που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς με τα εν λόγω πλασμίδια. Αναλυτικότερα, μετά την απόπειρα μετασχηματισμού των κυττάρων ζύμης με τα συγκεκριμένα πλασμίδια, ακολουθεί η καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο απουσία ουρακίλης (σε πρώτη φάση) και λευκίνης (σε δεύτερη φάση). Μόνο τα (επιθυμητά) κύτταρα ζύμης που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς θα πολλαπλασιαστούν. Αξίζει να σημειωθεί ότι το *Leu2-d* γονίδιο είναι μεταλλαγμένο (→ ανάγκη για μεγαλύτερες ποσότητες λευκίνης → αυξημένη μεταγραφή του *Leu2-d* → αυξημένη μεταγραφή των γονιδίων των πρωτεϊνών MetRS και GluRS).

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΕΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ Arc1p

Τον μετασχηματισμό των TOP 10 κυττάρων με τα πλασμίδια τα οποία φέρουν το γονίδιο της πρωτεΐνης Arc1p, ακολούθησε η καλλιέργεια των συγκεκριμένων βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (LB) παρουσία και του κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής (αμπικιλίνη). Μετά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν όντως τα TOP 10 κύτταρα περιείχαν τα πλασμίδια με το γονίδιο της πρωτεΐνης Arc1p. Έτσι, προχωρήσαμε στην απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-preparation) και στην πολλαπλή πέψη του (σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο που αναφέρεται στη μεθοδολογία) με το περιοριστικό ένζυμο Bgl II. Μετά την πέψη ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA (5μL) σε πηκτή αγαρόζης 1% εφαρμόζοντας σταθερή τάση 100V.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης ήταν το αναμενόμενο σύμφωνα με τον παραπάνω χάρτη του αντίστοιχου πλασμιδίου (μία ζώνη περίπου 1000bp / βελάκι), αποδεικνύοντας ότι οι αποικίες περιέχουν πράγματι τα πλασμίδια με το γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη Arc1p. Να σημειωθεί ότι η εν λόγω ζώνη εμφανίζεται εξασθενημένη στην παρακάτω εικόνα κάτι που μπορεί να αποδοθεί στη μη αρκετή ποσότητα πλασμιδιακού DNA.



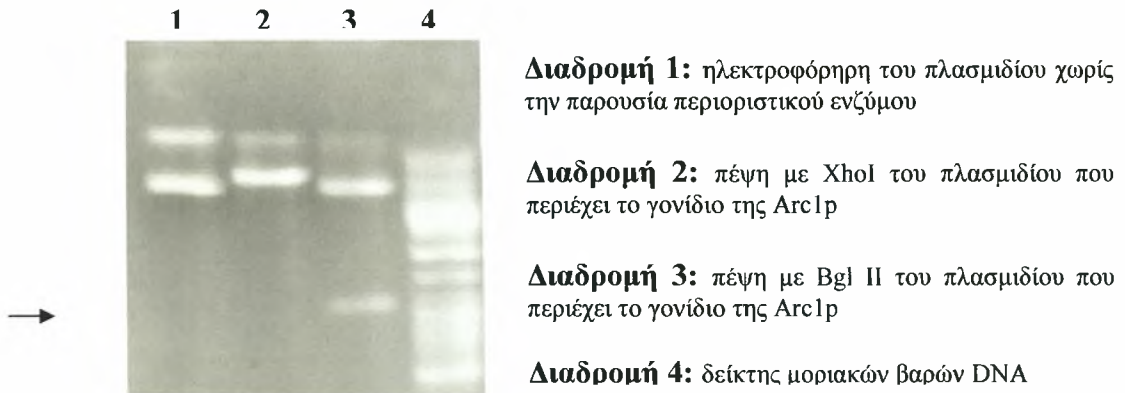
Διαδρομή 1-7: πέψη με Bgl II του πλασμιδίου που περιέχει το γονίδιο της Arc1p

Διαδρομή 8: δείκτης μοριακών βαρών DNA

Εικόνα 2: Πέψη με Bgl II DNA από mini-preparation για τον έλεγχο της παρουσίας του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της πρωτεΐνης Arc1p στις αποικίες των TOP 10 κυττάρων. Αναλύθηκαν 5μL DNA από την mini-preparation σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Αφού βεβαιωθήκαμε για την παρουσία του πλασμιδίου στις συγκεκριμένες αποικίες, πραγματοποιήσαμε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi-preparation). Ακολούθησε και πάλι η πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και Bgl

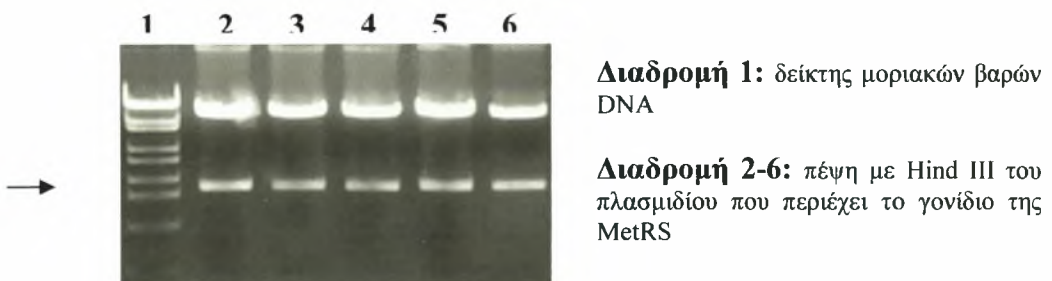
Η για επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης. Αυτή τη φορά αναλύθηκαν 2μL DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%. Τα αποτελέσματα ήταν και πάλι τα αναμενόμενα σύμφωνα πάντοτε με το χάρτη του πλασμιδίου (μια ζώνη περίπου 1000bp στην 3^η διαδρομή / βελάκι).



Εικόνα 3: Πέψη DNA από midi-preparation με περιοριστικά ένζυμα για τον έλεγχο της παρουσίας του πλασμιδίου στις αποικίες. Αναλύθηκαν 2 μL DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%.

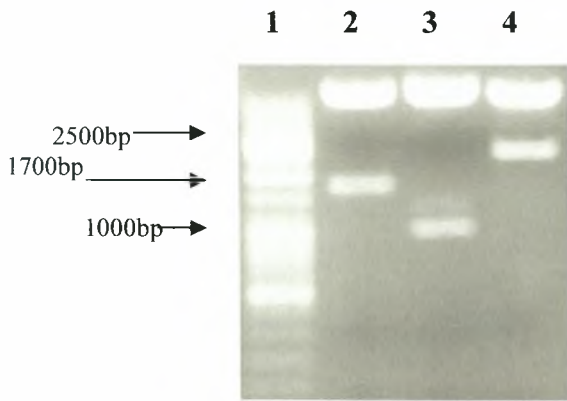
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ GluRS ΚΑΙ MetRS

Η ίδια ακριβώς διαδικασία για τον ίδιο λόγο ακολουθήθηκε και για το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της πρωτεΐνης MetRS. Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων TOP10 με το συγκεκριμένο πλασμίδιο και την απομόνωση του τελευταίου σε μικρή κλίμακα, ακολούθησε η πέψη του με ένζυμα περιορισμού. Αναλύθηκαν 5μL πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% και, παρατηρώντας τον αντίστοιχο χάρτη (Εικόνα 1), το αποτέλεσμα ήταν το προσδοκώμενο (μια ζώνη 1649bp / βελάκι)



Εικόνα 4: Πέψη με Hind III DNA από mini-preparation για τον έλεγχο της παρουσίας του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της πρωτεΐνης MetRS στις αποικίες των TOP 10 κυττάρων. Αναλύθηκαν 5μL DNA από την mini-preparation σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα και η πέψη του με ένζυμα περιορισμού. Αναλύθηκε 1μL DNA σε πηκτή αгарόζης 1% και τα αποτελέσματα (μια ζώνη 1649bp στη 2^η διαδρομή, μια των 1084bp στην 3^η διαδρομή και μια ζώνη 2485bp στην 4^η διαδρομή / βλ. Εικόνα 1) επιβεβαίωσαν την παρουσία του πλασμιδίου στις συγκεκριμένες αποικίες.



Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών DNA

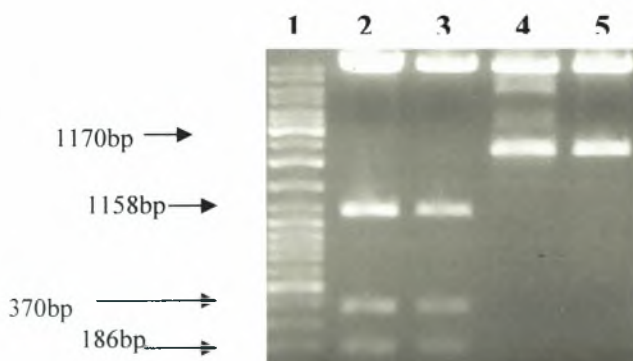
Διαδρομή 2: πέψη με Hind III του πλασμιδίου που περιέχει το γονίδιο της MetRS

Διαδρομή 3: πέψη με Xba I του πλασμιδίου που περιέχει το γονίδιο της MetRS

Διαδρομή 4: πέψη με Sac I και Pst I του πλασμιδίου που περιέχει το γονίδιο της MetRS

Εικόνα 5: Πέψη DNA από midi-preparation με περιοριστικά ένζυμα για τον έλεγχο της παρουσίας του πλασμιδίου στις αποικίες. Αναλύθηκε 1 μL DNA σε πηκτή αгарόζης 1%.

Ακολουθήσαμε τα ίδια βήματα και για το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της πρωτεΐνης GluRS (μετασχηματισμός σε TOP10 κύτταρα, απομόνωση σε μικρή κλίμακα, πέψη με ένζυμα περιορισμού). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η ανάλυση 3μL DNA σε πηκτή αгарόζης 1%. Στις διαδρομές 2 και 3 έχουμε την εμφάνιση τριών ζωνών (186bp, 372bp και 1149bp) ενώ στις διαδρομές 4 και 5 έχουμε μία ζώνη (1169bp). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις αναμενόμενες τιμές βάσει βιβλιογραφίας (βλ. Εικόνα 1).



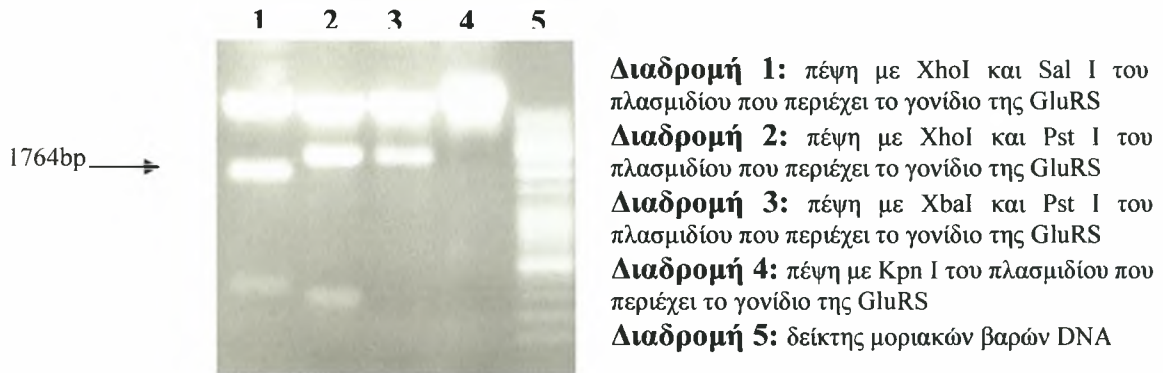
Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών DNA

Διαδρομή 2-3: πέψη με Hind III του πλασμιδίου που περιέχει το γονίδιο της GluRS

Διαδρομή 4-5: πέψη με Cla I του πλασμιδίου που περιέχει το γονίδιο της GluRS

Εικόνα 6: Πέψη με περιοριστικά ένζυμα DNA από mini-preparation για τον έλεγχο της παρουσίας του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της πρωτεΐνης GluRS στις αποικίες των TOP 10 κυττάρων. Αναλύθηκαν 3 μL DNA από την mini-preparation σε πηκτή αгарόζης 1%.

Τέλος, αφού πραγματοποιήσαμε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα, πέψαμε με ένζυμα περιορισμού όπως προηγουμένως. Αναλύθηκε 1μL DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% και τα αποτελέσματα, που συμβαδίζουν με τις τιμές που αναφέρονται στην Εικόνα 1 (μία ζώνη 1764bp στη 1^η διαδρομή, μία 2485bp στην 2^η, μία 2440bp στην 3^η και μια ζώνη πολύ ψηλά στην 4^η διαδρομή), επιβεβαίωσαν την παρουσία του πλασμιδίου στις συγκεκριμένες αποικίες.



Εικόνα 7: Πέψη με περιοριστικά ένζυμα DNA από midi-preparation για έλεγχο της παρουσίας του πλασμιδίου στις αποικίες. Αναλύθηκε 1 μL DNA από την midi-preparation σε πηκτή αγαρόζης 1%.

ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Arc1p, MetRS ΚΑΙ GluRS

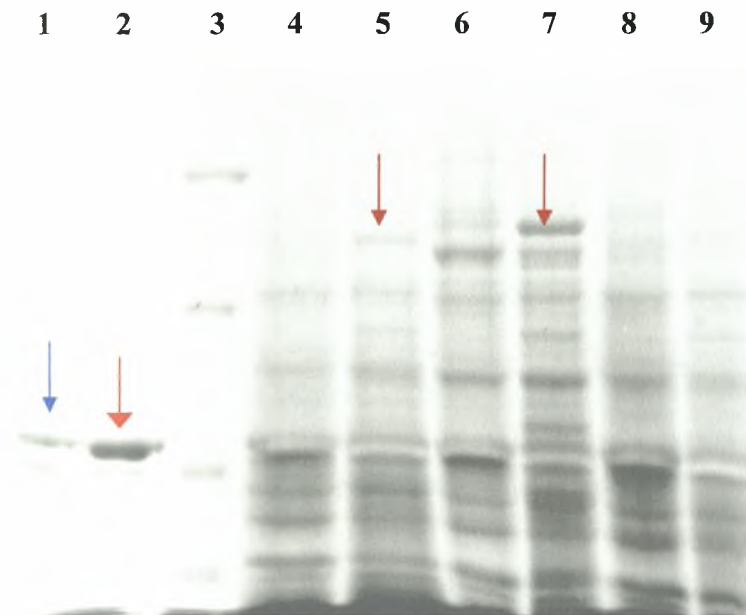
α) Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών Arc1p, MetRS και GluRS

Έχοντας πολλαπλασιάσει και απομονώσει τα πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια των τριών πρωτεϊνών (midi-preparation), προχωρήσαμε στο μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων [BL21(DE3)] με τα πλασμίδια που περιέχουν το γονίδιο της πρωτεΐνης Arc1p και κυττάρων ζύμης (στέλεχος RS453) με τα πλασμίδια που περιέχουν τα γονίδια των πρωτεϊνών GluRS και MetRS αντίστοιχα.

Κατόπιν, πραγματοποιήσαμε την επαγωγή της έκφρασης των τριών πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, για την πρωτεΐνη Arc1p χρησιμοποιήσαμε IPTG προκειμένου να επάγουμε την έκφρασή της. Ο T7 προαγωγέας του pET 8c (Εικόνα 1) επάγεται ήδη από την T7 RNA πολυμεράση στα βακτηριακά κύτταρα και με την προσθήκη IPTG ενισχύουμε την επαγωγή του συγκεκριμένου προαγωγέα και επομένως τη μεταγραφή του γονιδίου στόχου. Για το λόγο αυτό διακρίνουμε μια ορισμένη ποσότητα της πρωτεΐνης Arc1p πριν

την επαγωγή της έκφρασής της με IPTG (Εικόνα 8 / μπλε βελάκι). Για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών GluRS και MetRS χρησιμοποιήσαμε γαλακτόζη, η οποία επάγει τον GAL10 προαγωγέα (Εικόνα 1).

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της επαγωγής, ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (Εικόνα 8) δείγματα κυττάρων πριν και μετά την διαδικασία της επαγωγής. Αναλύθηκαν δείγματα κυττάρων 15μL αφού αναμείχθηκαν με περίπου 5μL 4X loading buffer. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης δείχνουν ότι η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών ήταν επιτυχημένη.



Διαδρομές 1-2: δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη Arc1p πριν και μετά (κόκκινο βελάκι) την επαγωγή

Διαδρομή 3: δείκτης μοριακών βαρών πρωτεϊνών

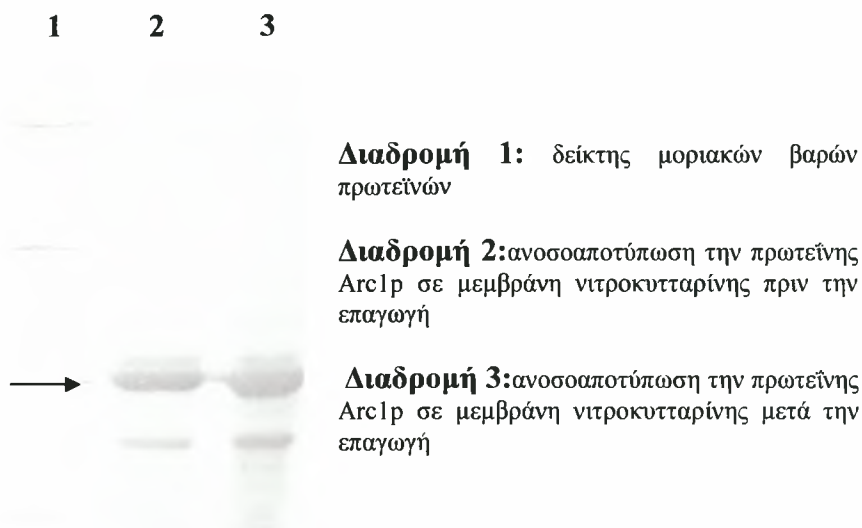
Διαδρομές 4-5: δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη MetRS πριν και μετά (βελάκι) την επαγωγή

Διαδρομές 6-7: δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη GluRS πριν και μετά (βελάκι) την επαγωγή

Διαδρομές 8-9: δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο που δεν εκφράζει καμιά πρωτεΐνη πριν και μετά την επαγωγή

Εικόνα 8: Τα δείγματα των εκχυλισμάτων κυττάρων αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%. Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 15μL δείγματος που αναμείχθηκαν με περίπου 5μL 4X loading buffer. Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πηκτές χρωματίστηκαν με Coomassie Blue.

Επίσης, δύο επιπλέον δείγματα εκχυλίσματος κυττάρων (πριν και μετά την επαγωγή) που περιέχουν το πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη Arc1p ηλεκτροφορήθηκαν και αυτά σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (όπως παραπάνω) αλλά στη συνέχεια, αντί να χρωματιστούν με Coomassie Blue, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (βλ. μεθοδολογία). Η παρακάτω εικόνα αποτελεί επιπλέον απόδειξη του ότι η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Arc1p ήταν επιτυχημένη.

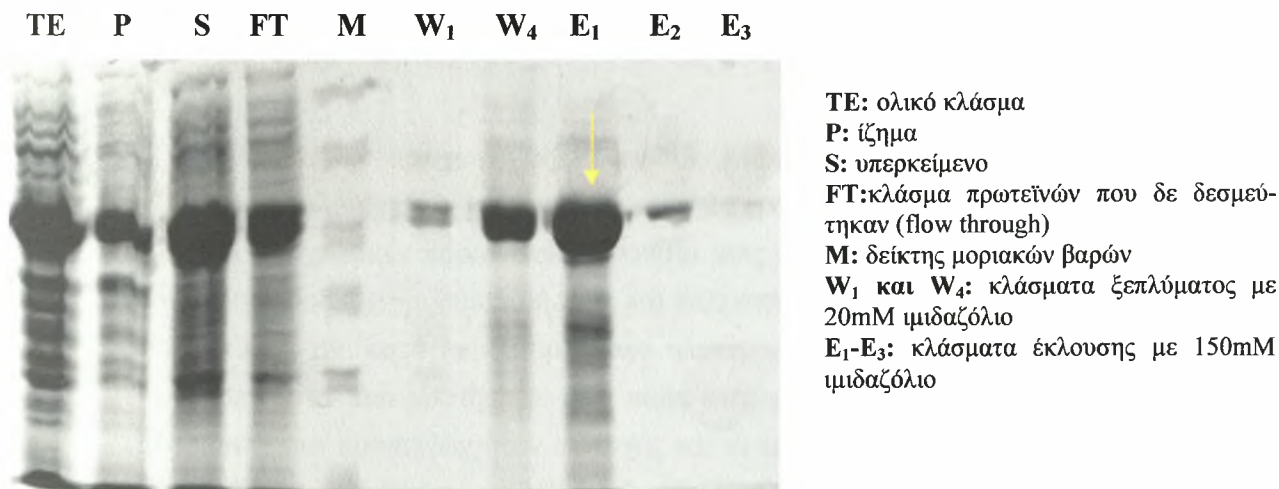


Εικόνα 9: Το δείγμα της πρωτεΐνης αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%. Για την ανοσοεξεισμική ανίχνευση της πρωτεΐνης Arc1p χρησιμοποιήθηκε αρχικά ένα αντί-Arc1p αντίσωμα (ορός ανοσοποιημένου κουνελιού) και ακολούθως ένα δεύτερο goat anti-rabbit αντίσωμα (ορός κατσίκας ενάντια των IgG του κουνελιού).

β) Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας και διαπίδυση της πρωτεΐνης Arc1p

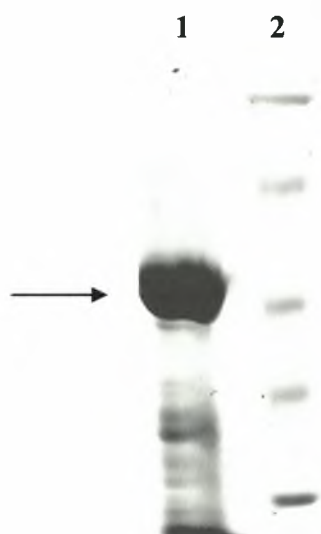
Μετά την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Arc1p με IPTG, ακολούθησε ο καθαρισμός της με χρωματογραφία συγγένειας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε στήλες που φέρουν νικέλιο, το οποίο και σχηματίζει χηλική ένωση με το ιμιδαζόλιο των έξι ιστιδινών (6His-tag). Η επιλογή έγινε επειδή η πρωτεΐνη μας περιέχει στο αμινοτελικό της άκρο μια ουρά έξι ιστιδινών (6His-tag).

Ακολουθώντας την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στη μεθοδολογία, καθαρίσαμε την πρωτεΐνη και ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% τα δείγματα που κρατήσαμε από κάθε στάδιο της διαδικασίας. Από το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης, που παρατίθεται στην εικόνα 9, φαίνεται ότι ο καθαρισμός ήταν επιτυχής και η πρωτεΐνη μας βρίσκεται όπως αναμενόταν στο κλάσμα E₁ (κλάσμα έκλουσης με 150mM ιμιδαζόλιο / κίτρινο βελάκι).



Εικόνα 10: Τα κλάσματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Από κάθε κλάσμα χρησιμοποιήθηκαν 15μL δείγματος που αναμείχθηκαν με 5μL 4X loading buffer. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή χρωματίστηκε με Coomassie Blue.

Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης Arc1p ακολούθησε η διαπίδυσή της (σε ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδωσης: 20mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂ και 10% γλυκερόλη) μέσω μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης κυτταρίνης με πόρους (βλ.μεθοδολογία). Ο σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από μικρά μόρια και ιόντα τα οποία περνούν τους πόρους της μεμβράνης και εμφανίζονται στο διάλυμα έξω από αυτήν. Ακολούθως, ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% δείγμα της πρωτεΐνης μετά τη διαπίδυση προκειμένου να ανιχνεύσουμε τυχόν απώλειες στην ποσότητα της μετά τη συγκεκριμένη διαδικασία. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε.



Διαδρομή 1: δείγμα της πρωτεΐνης Arc1p μετά τη διαπίδυση της καθαρισμένης μορφής της

Διαδρομή 2: δείκτης μοριακών βαρών πρωτεϊνών

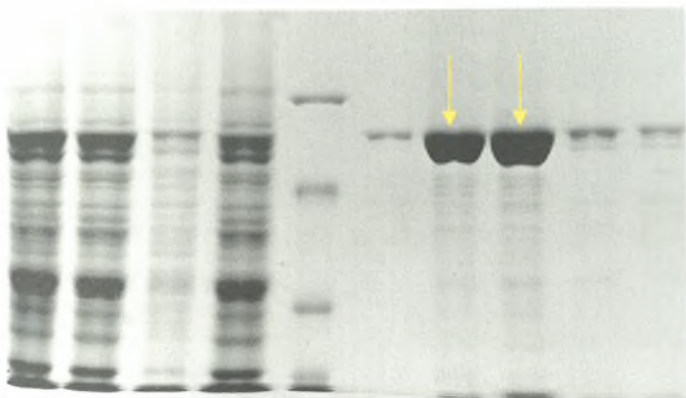
Εικόνα 11: Το δείγμα της πρωτεΐνης αναλύθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%. Χρησιμοποιήθηκαν 15μL δείγματος της πρωτεΐνης που αναμείχθηκαν με 5μL 4x loading buffer. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή χρωματίστηκε με Coomassie Blue.

γ) Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας και διαπίδυση των πρωτεϊνών MetRS / GluRS

Μετά την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών MetRS και GluRS με γαλακτόζη ακολούθησε ο καθαρισμός τους με χρωματογραφία συγγένειας. Για τον ίδιο λόγο που περιγράφηκε παραπάνω (παρουσία μιας ουράς οκτώ ιστιδινών στο αμινοτελικό τους άκρο/8His-tag), χρησιμοποιήσαμε και πάλι στήλες που φέρουν νικέλιο.

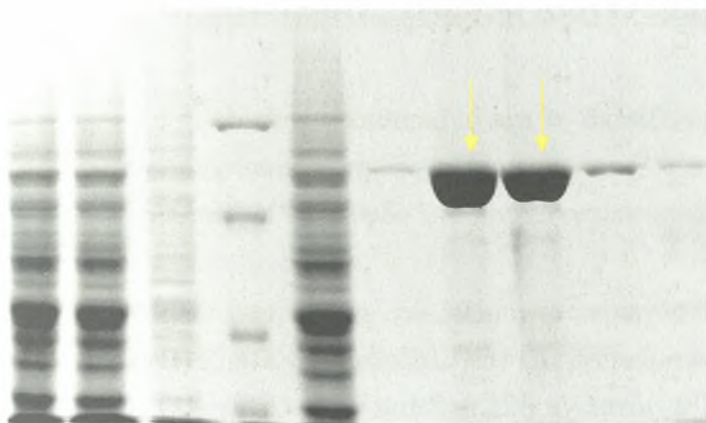
Κατόπιν, κατά παρόμοιο τρόπο ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% τα δείγματα που κρατήσαμε από κάθε στάδιο της διαδικασίας του καθαρισμού. Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών ήταν επιτυχής και οι τελευταίες βρίσκονται στα κλάσματα E₁ και E₂ (κλάσματα έκλουσης με 250 mM ιμιδαζόλιο).

TE S P FT M W₄ E₁ E₂ E₃ E₄



TE: ολικό κλάσμα
S: υπερκείμενο
P: ίζημα
FT: κλάσμα πρωτεϊνών που δε δεσμεύτηκαν (flow through)
M: δείκτης μοριακών βαρών
W₄: κλάσμα ξεπλύματος με 20mM ιμιδαζόλιο
E₁-E₄: κλάσματα έκλουσης με 250 mM ιμιδαζόλιο

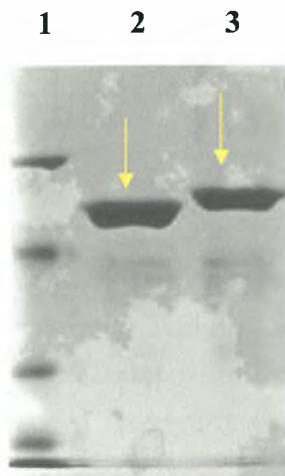
TE S P M FT W₄ E₁ E₂ E₃ E₄



TE: ολικό κλάσμα
S: υπερκείμενο
P: ίζημα
M: δείκτης μοριακών βαρών
FT: κλάσμα πρωτεϊνών που δε δεσμεύτηκαν (flow through)
W₄: κλάσμα ξεπλύματος με 20mM ιμιδαζόλιο
E₁-E₄: κλάσματα έκλουσης με 250 mM ιμιδαζόλιο

Εικόνα 12: Τα δείγματα των κλασμάτων αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (GluRS πάνω εικόνα / MetRS κάτω εικόνα) και ακολούθησε η χρώση των πηκτών με Coomassie Blue.

Μετά τον καθαρισμό των πρωτεϊνών MetRS και GluRS ακολούθησε η διαπίδυσή τους μέσω πάλι μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης κυτταρίνης με πόρους για τους ίδιους λόγους που ισχύουν και για την πρωτεΐνη Arg1p. Μετέπειτα, ηλεκτροφορήσαμε και πάλι σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% δείγματα των πρωτεϊνών μετά τη διαπίδυσή τους προκειμένου να διαπιστώσουμε ότι η ποσότητα τους παρέμεινε αναλλοίωτη. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης ήταν το προσδοκώμενο.



Διαδρομή 1: δείκτης μοριακών βαρών πρωτεϊνών

Διαδρομή 2: δείγμα της πρωτεΐνης MetRS μετά τη διαπίδυση

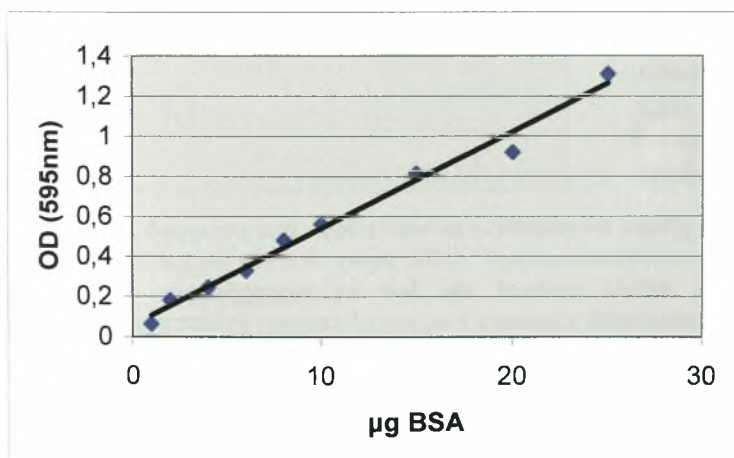
Διαδρομή 3: δείγμα της πρωτεΐνης GluRS μετά τη διαπίδυση

Εικόνα 13: Τα δείγματα των πρωτεϊνών αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%. Χρησιμοποιήθηκαν 15μL δείγματος από την κάθε πρωτεΐνη που αναμείχθηκαν με 5μL 4X loading buffer. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή χρωματίστηκε με Coomassie Blue.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μετά τον καθαρισμό και τη διαπίδυση των πρωτεϊνών, θελήσαμε στη συνέχεια να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωσή τους. Έτσι, προχωρήσαμε στον προσδιορισμό τους σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford. Αναλυτικότερα:

➤ Φωτομετρήσαμε στα 595nm το περιεχόμενο των 5 erpendorf (βλ. "ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ" / μεθοδολογία) και βρήκαμε ότι η OD των πρωτεϊνών είναι: Arc1p=0.406, MetRS=0.163 και GluRS=0.226 αντίστοιχα. Μέσω της πρότυπης καμπύλης (Εικόνα 14) προσδιορίσαμε τις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών. Και πιο συγκεκριμένα: της Arc1p είναι 4.35 mg/mL, της MetRS είναι 0.72 mg/mL και της GluRS είναι 1.02 mg/mL αντίστοιχα. Έτσι, η συνολική απόδοση για κάθε πρωτεΐνη είναι: Arc1p 4.35 mg ($mg = V \times C$), MetRS 0.72mg και GluRS 1.02mg αντίστοιχα.

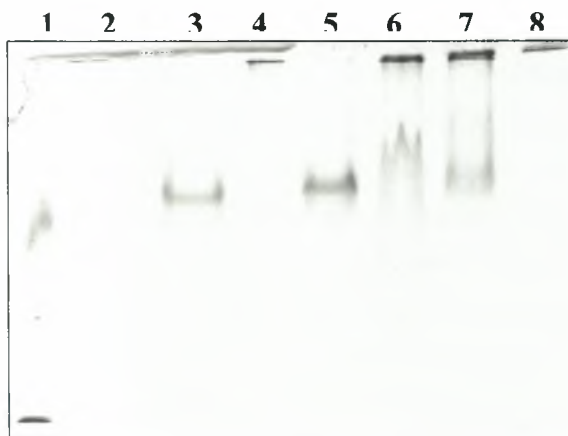


Εικόνα 14: η πρότυπη καμπύλη BSA. Η συγκεκριμένη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών Arc1p, MetRS και GluRS.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΤΗΣ Arc1p ΓΙΑ ΤΑ ΔΥΟ ENZYMA

Έχοντας τις τρεις πρωτεΐνες σε καθαρή πλέον μορφή, θελήσαμε να μελετήσουμε το βαθμό συμπλοκοποίησης τους. Για να το πετύχουμε αυτό, ηλεκτροφορήσαμε προεπωασμένα μείγματα των τριών αυτών πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (non-denaturing electrophoresis). Χρησιμοποιήσαμε δηλαδή την τεχνική της μη συνεχούς ηλεκτροφόρησης πηκτής (πολυακρυλαμίδης / pH 8.8) αλλά χωρίς την παρουσία SDS και DTT ώστε οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν βάσει του μεγέθους, του σχήματος και του φορτίου τους.

Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη Arc1p μένει εκτός από το stacking gel και επομένως δε φτάνει ποτέ στο αντίστοιχο separating. Μια εξήγηση μπορεί να είναι ότι επειδή το pI της Arc1p είναι υψηλό, η πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη και έτσι το pH του stacking gel (6.8) καθιστά αδύνατη την είσοδο της σε αυτό. Επίσης, η GluRS δεν εισέρχεται (για άγνωστο λόγο) στο separating gel αν και περιμέναμε το αντίθετο. Μόνο η ηλεκτροφόρηση της MetRS δεν παρουσίασε κανένα πρόβλημα. Στη διαδρομή 5 παρατηρούμε μια ζώνη ελαφρώς μετατοπισμένη προς τα πάνω (σε σχέση με τη ζώνη του δείγματος της πρωτεΐνης MetRS στη διαδρομή 3) γεγονός που υποδηλώνει ίσως την παρουσία του συμπλόκου Arc1p και MetRS στο σημείο αυτό. Το ίδιο ισχύει και για τη ζώνη στη διαδρομής 7 (δείγμα προεπωασμένου μείγματος των πρωτεϊνών Arc1p, MetRS και GluRS). Τέλος, στη διαδρομή 6 διαπιστώνουμε την ύπαρξη μιας διάχυτης ζώνης (για άγνωστο λόγο) που δε μας επιτρέπει την εξαγωγή κάποιου συμπεράσματος.



- Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών πρωτεϊνών
- Διαδρομή 2:** δείγμα της πρωτεΐνης Arc1p
- Διαδρομή 3:** δείγμα της πρωτεΐνης MetRS
- Διαδρομή 4:** δείγμα της πρωτεΐνης GluRS
- Διαδρομή 5:** δείγμα προεπωασμένου μείγματος των πρωτεϊνών Arc1p και MetRS
- Διαδρομή 6:** δείγμα προεπωασμένου μείγματος των πρωτεϊνών Arc1p και GluRS
- Διαδρομή 7:** δείγμα προεπωασμένου μείγματος των πρωτεϊνών Arc1p, MetRS και GluRS
- Διαδρομή 8:** δείγμα της πρωτεΐνης BSA

Εικόνα 15: Τα δείγματα των πρωτεϊνών αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (separating gel pH 8.8 και stacking gel pH 6.8 / χωρίς SDS). Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 2μL δείγματος από την κάθε πρωτεΐνη που αναμείχθηκαν με 5μL 4x loading buffer (χωρίς SDS και DTT). Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή χρωματίστηκε με Coomassie Blue προκειμένου να παρατηρηθεί η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ των πρωτεϊνών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύνθεση των αμινοάκυλο-tRNAs αποτελεί αφενός μια πολύ σπουδαία κυτταρική διαδικασία και αφετέρου στόχο διεξοδικής έρευνας για κατανόηση της λειτουργίας της σε πολλά επιστημονικά εργαστήρια παγκοσμίως. Τα αμινοακυλιωμένα tRNAs θεωρούνται σημαντικά μοριακά εργαλεία, εξαιτίας της ενεργής συμμετοχής τους στην σύνθεση των πρωτεϊνών των κυττάρων και η μελέτη τους αποσκοπεί στην λεπτομερέστερη κατανόηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, την εμβάθυνση στην εξελικτική πορεία των διαφόρων μορφών ζωής, και κατ' επέκταση στην μελέτη και την αντιμετώπιση γενετικών ασθενειών που οφείλονται στην ελαττωματική διεξαγωγή των βιοχημικών μονοπατιών της αμινοακυλίωσης και της επιτυχούς σύνθεσης των απαραίτητων πρωτεϊνών.

Η αρχική θεωρία υποστήριζε την ύπαρξη 20 ενζύμων ικανών να αμινοακυλιώνουν τα 20 κύρια αμινοξέα των κυττάρων, των αμινοάκυλο-tRNA συνθετασών. Η πραγματικότητα, παρ' όλα αυτά, ήταν πολύ πιο πολύπλοκη και ποικιλόμορφη από ότι φαντάζονταν οι ερευνητές σε σχέση με αυτά τα ένζυμα. Βρέθηκε, λοιπόν, σε γονιδιώματα αρχαιοβακτηρίων, πως η συνθετάση της προλίνης (ProRS) μπορεί να λάβει μέρος στη διαδικασία της μετάφρασης και ως συνθετάση της κυστεΐνης (CysRS), σχηματίζοντας εξίσου Pro-tRNA^{Pro} και Cys-tRNA^{Cys} (Stathopoulos *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1999). Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό παράδειγμα της πολυπλοκότητας της αμινοακυλίωσης είναι και η εισαγωγή της σεληνοκυστεΐνης στα νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια. Σε αυτή τη περίπτωση, το βακτήριο *E. coli*, που είναι και το καλύτερα μελετημένο σύστημα (Bock. *et al.*, 2004), αμινοακυλιώνει το tRNA^{Sec} με το αμινοξύ της σερίνης σχηματίζοντας Ser-tRNA^{Sec} μέσω της μη εξειδικευμένης συνθετάσης της σερίνης. Το Ser-tRNA^{Sec} μετατρέπεται σε Sec-tRNA^{Sec} με τη καταλυτική δράση της συνθετάσης της σεληνοκυστεΐνης SelA. Ανάλογο βιοχημικό μονοπάτι ακολουθεί το κύτταρο και για τη μεταφορά της πυρολυσίνης (Pyl-tRNA^{Pyl}) στο ριβόσωμα κατά τη πρωτεϊνοσύνθεση (Polycarpo *et al.*, 2003; Theobald-Dietrich *et al.*, 2004). Επιπλέον, γονδιακές αναλύσεις απέδειξαν την ύπαρξη στην πλειοψηφία των οργανισμών ενζύμων, που επονομάζονται tRNA αμιδοτρανσφεράσες και δρουν εξαρτώμενες από το tRNA και το ATP, και που εμπλέκονται στην αμινοακυλίωση των μεταφορικών RNAs των αμινοξέων της γλουταμίνης και ασπαραγίνης.

Όσον αφορά τις ευκαρυωτικές αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες, η «συμβατική» τους λειτουργία εστιάζεται στην αμινοακυλίωση του tRNA. Παρόλα αυτά, οι αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες συμμετέχουν και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, τα εν λόγω ένζυμα εμπλέκονται στην μεταφορά του tRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, στο μάτισμα των μιτοχονδριακών RNA, στη ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης, στην αντιγραφή του DNA καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης των ίδιων τους των γονιδίων.

Οι ευκαρυωτικές αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες τους προκαρυωτικές, συχνά αποτελούν μέρη συμπλόκων υψηλού μοριακού βάρους. Στον ζυμομύκητα οι αμινοάκυλο-tRNA συνθετάσες της μεθειονίνης (MetRS) και της γλουταμίνης (GluRS) συνδέονται με την tRNA-δεσμευτική πρωτεΐνη Arc1p. Το εν λόγω

σύμπλοκο εντοπίζεται αυστηρά στο κυτόπλασμα και συμμετέχει στην αμινοακυλίωση των tRNAs. Για την κατανόηση της λειτουργίας του συγκεκριμένου συμπλόκου είναι απαραίτητη η διαθεσιμότητα των πρωτεϊνών που το αποτελούν σε ικανοποιητικές ποσότητες.

Σκοπός των πειραμάτων που εκτελέστηκαν κατά την παρούσα πτυχιακή εργασία ήταν καταρχήν η υπερέκφραση των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών GluRS και MetRS καθώς και της πρωτεΐνης Arc1p σε ζυμομύκητες και βακτήρια αντίστοιχα. Μετά την υπερέκφραση τους ακολούθησε ο καθαρισμός τους με τη χρήση της τεχνικής χρωματογραφίας συγγένειας, η οποία ελαχιστοποίησε τη διάσπαση τους και επέτρεψε έτσι την ανάκτηση μεγάλων ποσοτήτων καθαρών πλέον πρωτεϊνών, και η διαπίδυση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Ακόμα, επιχειρήθηκε και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγγένειας της Arc1p για τα δύο ένζυμα.

Βασιζόμενοι σε παλαιότερη επιτυχημένη πειραματική προσπάθεια (Deinert *et al.*, 2001), ο αρχικός σκοπός υλοποιήθηκε με τον αποτελεσματικό μετασχηματισμό των κυττάρων με τα πλασμίδια που έφεραν τα γονίδια των τριών αυτών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια διεξήχθησαν τεχνικές για την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων.

Το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης των εν λόγω πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της παρούσας πειραματικής διαδικασίας θα μπορούσε να χαρακτηριστεί σε μεγάλο βαθμό ικανοποιητικό (σελ 32 / Εικόνα 8). Η παρουσία ήδη κάποιας ποσότητας πρωτεΐνης Arc1p οφείλεται στην επαγωγή του βακτηριακού προαγωγέα T7 από την T7 RNA πολυμεράση. Η περαιτέρω ενίσχυση της επαγωγής με τη χρήση του IPTG είχε ως αποτέλεσμα την αποδοτική έκφραση της πρωτεΐνης Arc1p. Επίσης, η επαγωγή της έκφρασης των αμινοακυλο-tRNA συνθετασών GluRS και MetRS με γαλακτόζη ήταν άκρως επιτυχημένη.

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας με στήλες που έφεραν νικέλιο, μας έδωσε τη δυνατότητα να ανακτήσουμε ικανοποιητικές ποσότητες αυτών. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 10 (σελ. 33), η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης Arc1p βρίσκεται σε διαλυτή μορφή (S) ενώ μόνο ένα μικρό μέρος της είναι αδιάλυτο (P). Και αν εξαιρέσουμε μια μικρή ποσότητα της πρωτεΐνης που δε συνδέθηκε στη στήλη (FT), η πρωτεΐνη Arc1p ανακτήθηκε κυρίως σε ένα κλάσμα (E_1) γεγονός που καθιστά τον καθαρισμό εξαιρετικά αποδοτικό! Στην περίπτωση του καθαρισμού των πρωτεϊνών GluRS και MetRS (σελ.35 / Εικόνα 12) το αποτέλεσμα είναι ακόμα πιο εντυπωσιακό καθώς οι πρωτεΐνες ανακτώνται σχεδόν εξολοκλήρου σε δύο κλάσματα (E_1 και E_2)!!

Γενικότερα όμως η έκφραση και ο καθαρισμός μιας πρωτεΐνης δεν είναι μια τυποποιημένη διαδικασία αλλά μια ερευνητική προσπάθεια που άλλοτε επιτυγχάνεται εύκολα και άλλοτε δύσκολα από τη στιγμή που πολλά σημεία σε ότι αφορά το μεταβολισμό και τη βιοχημεία ακόμα και των απλών μικροοργανισμών παραμένουν άγνωστα.

Η χρησιμότητα της ανάκτησης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε καθαρή μορφή έγκειται στο ότι δύναται η ευκαιρία να μελετηθεί η κινητική σχηματισμού διμερών (Arc1p-MetRS ή Arc1p-GluRS) ή τριμερούς (MetRS-Arc1p-GluRS) συμπλόκου χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση κάτω από μη-αποδιατακτικές συνθήκες (Non-denaturing

Electrophoresis) ή τη μέθοδο συντονισμού πλασμονίων επιφάνειας (surface plasmon resonance) στο σύστημα BIAcore. Προχωρώντας ένα βήμα πέρα από τον κύριο σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια ποσοτικού προσδιορισμού της συγγένειας της Arg1p για τα δύο ένζυμα. με τη χρήση της ηλεκτροφόρησης σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες (Non-denaturing Electrophoresis) αλλά δεν καρποφόρησε. Πιθανή αιτία θα μπορούσε να είναι το pH ή ακόμα και η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Έτσι, προσεκτικότερη επιλογή των δύο αυτών παραμέτρων θα μπορούσε ίσως να δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Επιτυχή αποτελέσματα μιας τέτοιας μελέτης αναμένεται να δώσουν πληροφορίες σχετικά με: το αν η δημιουργία (ή διάσπαση) του συμπλόκου είναι μια δυναμική και αντιστρεπτή διαδικασία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το κατά πόσο είναι δυνατόν αυτή να ρυθμίζεται από άλλους παράγοντες (όπως π.χ. η συγκέντρωση του tRNA) και τον μηχανισμό δημιουργίας του συμπλόκου σε μοριακό επίπεδο. Οι πληροφορίες αυτές θα συμβάλουν στην κατανόηση βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως η βιογένεση και μεταφορά του tRNA ενώ μακροπρόθεσμα είναι πιθανόν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη μικροβιοκτόνων ουσιών (αντιβιοτικών) που θα στοχεύουν την διαδικασία αμινοακυλίωσης του tRNA των μικροοργανισμών. Επιπλέον, το μοντέλο αλληλεπίδρασης του συγκεκριμένου συμπλόκου μπορεί να λειτουργήσει ως ένα απλό πρότυπο για το πολυενζυμικό σύμπλοκο των θηλαστικών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bock A., Thanbichler M., Rother M., and Resch A. (2004). Selenocysteine. In *aminoacyl-tRNA synthetases* (eds. Ibba M., Francklyn C.S., Cusack S.). Landes Bioscience (in press).
- Burbaum J.J., and Schimmel P. (1991). Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.*, 266, 16965-16968.
- Cirakoglu, B., and Waller, JP.(1985). Leucyl-tRNA and lysyl-tRNA synthetases, derived from the high-Mr complex of sheep liver, are hydrophobic proteins. *Eur.J.Biochem.* 151(1):101-110.
- Cirakoglu, B., Mirande, M., and Waller, JP.(1985). A model for the structural organization of aminoacyl-tRNA synthetases in mammalian cells. *FEBS Lett.* 183(2):185-190.
- Crick F.H.C. (1958). On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 12, 138-163.
- Deinert, K., Fasiolo, F., Hurt, E.C., and Simos, G.(2001). Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J Biol Chem.* 276:6000-8.
- Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., and Moras D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, 347, 203-206.
- Filonenko, V.V., and Deutscher, M.P.(1994). Evidence for similar structural organization of the multienzyme aminoacyl-tRNA complex in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 17375-17378.
- Francklyn, C., Musier-Forsyth, K., and Martinis, S.A.(1997). Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and disease: new evidence for structural and functional diversity in an ancient family of enzymes. *RNA*, 3, 954-960.
- Francklyn, C., Perona, J.J., Puetz, J., and Ya-Ming Hou (2002). Aminoacyl-tRNA: versatile players in the changing theatre of translation. *RNA*, 8, 1363-1372.
- Frugier M., Moulinier L., and Giege R. (2000). A domain in the N-terminal extension of the class IIb eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases is important for RNA binding. *The EMBO Journal*, 19, 2371-2380.
- Galani, K., Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E.C., and Simos, G.(2001). The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J.* 20:6889-98.
- Geslain, R., and Pouplana, L.R. (2004). Regulation of RNA function by aminoacylation and editing?. *TRENDS in Genetics.* 606.
- Grosshans, H., Hurt, E.C., and Simos, G.(2000). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev.*, 14, 830-840.
- Ibba M., and Soll D. (1999). Quality control mechanisms during translation. *Science*, 286, 1893-1897.
- Ibba M., Becker H.D., Stathopoulos C., Tumbula D.L., and Soll D. (2000). The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.*, 25, 311-316.

- Kao, J., Houck, K., Fan, Y., Haehnel, I., Libutti, S.K., Kayton, M.L., et al.(1994). Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. *J. Biol. Chem.* 269, 25106-25119.
- Kerjan, P., Cerini, C., Semeriva, M., and Mirande, M.(1994). The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals. *Biochim. Biophys. Acta*, 1199, 293-297.
- Kisselev, L., and Wolfson, A.D.(1994). Aminoacyl-tRNA synthetases from higher eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 48, 83-141.
- Li T., Graham D., Stathopoulos C., Haney P., Kim H.S., Vothknecht U., Kitabatake M., Hong K.W., Eggertsson G., Curnow A.W., Lin W., Celic I., Whitman W., and Soll D. (1999). Cysteinyl-tRNA formation : the last puzzle of aminoacyl-tRNA synthesis. *FEBS Lett.*, 462, 302-306.
- Lund, E., and Dahlberg, J.E.(1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science*. 282:2082-5.
- Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J., and Florentz, C.(1999). Aminoacyl-tRNA synthetases : a family of expanding functions. *EMBO J.* 18:4591-6.
- Mirande, M.(1991). Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40, 95-142.
- Mirande, M., Lazard, M., Kerjan, P., Bec, G., Agou, F., Quevillon, S., and Waller, J.-P. (1993) in *The Translational Apparatus*. pp. 657-668, Plenum Press, New York
- Nathanson, L., and Deutscher, M.P.(2000). Active aminoacyl-tRNA synthetases are present in nuclei as a high molecular weight multienzyme complex. *J Biol. Chem.* 275:31559-62.
- Negrutskii, B.S., and El'skaya, A.V.(1998). Eukaryotic translation elongation factor 1 α : structure, expression, functions and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 60, 47-48.
- Norcum, M.T.(1991). Structural analysis of the high molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complex: effects of neutral salts and detergents. *J. Biol. Chem.* 266(23):15398-15405.
- Norcum, M.T., and Warrington, J.A. (1998). Structural analysis of the multienzyme aminoacyl-tRNA synthetase complex: A three-domain model based on reversible chemical crosslinking. *Protein Sci.* 7(1): 79-87.
- Polycarpo C., Ambrogelly A., Ruan B., Tumbula-Hansen D., Ataide S.F., Ishitani R., Yokoyama S., Nureki O., Ibba M., and Soll D. (2003). Activation of the pyrrolysine suppressor tRNA requires formation of a ternary complex with class I and class II lysyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell*, 12, 287-294.
- Putzer, H., Grunberg-Manago, M., and Springer, M.(1995). In *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function*. 293-333.
- Quevillon, S., and Mirande, M.(1996). The p18 component of the multisynthetase complex shares a protein motif with the β and γ subunits of eukaryotic elongation factor 1. *FEBS Lett.*, 395, 63-67.

- Quevillon, S., Agou, F., Robinson, J.C., and Mirande, M.(1997). The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J Biol. Chem.* 272, 32573-32579.
- Quevillon, S., Robinson, J.C., Berthonneau, E., Siatecka, M., and Mirande, M.(1999). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases : identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J. Mol. Biol.*, 285, 183-195.
- Ruff M., Krishnaswamy S., Boeglin M., Poterszman A., Mitschler A., Podjarny A., Rees B., Thierry J.-C., and Moras D. (1991). Class II aminoacyl transfer RNA synthetases : crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Asp}. *Science*, 252, 1682-1689.
- Sarkar, S., Azad, A.K., and Hopper, A.K.(1999). Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 14366-71.
- Schon A., Kannagara C.G., Gough S., and Soll D. (1988). Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature*, 331, 187-190.
- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M., and Hurt, E.C.(1996). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* 15: 5437-48.
- Simos, G., Sauer, A., Fasiolo, F., and Hurt, E.C.(1998). A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell.* 1:235-42.
- Simos, G., and Hurt, E.(1999). Transfer RNA biogenesis: A visa to leave the nucleus. *Curr Biol.* 9:R238-41.
- Soll D., and RajBhandary U.L. (1995). tRNA : structure, biosynthesis and function. *ASM Press, Washington, D.C.*
- Sprinzi M. (1994). Elongation factor Tu : a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 245-250.
- Stapulionis, R., and Deutscher, M.P.(1995). A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 7158-7161.
- Stathopoulos C., Li T., Longman R., Vothknecht U.C., Becker H.D., Ibba M., and Soll D. (2000). One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science*, 287, 479-482.
- Theobald-Dietrich A., Frugier M., Giege R., and Rudinger-Thirion J. (2004). A typical archaeal tRNA pyrrolysine transcript behaves towards EF-Tu as atypical elongator tRNA. *Nucleic Acids Res.*, 32, 1091-1096.