



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό

Πανεπιστήμιο Αθηνών

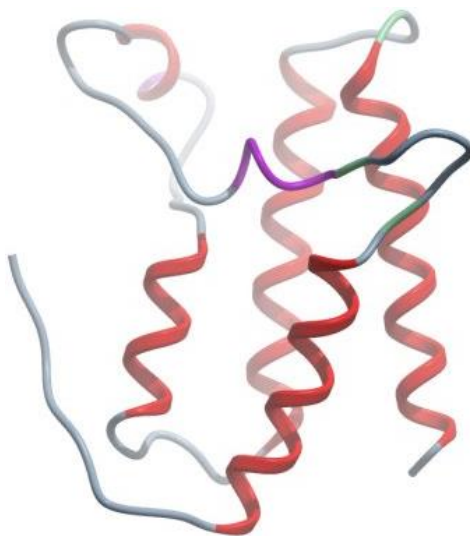
Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Βιολογίας

Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ετερόλογη παραγωγή και καθαρισμός της ανθρώπινης πρωτεΐνης PB1 για δομικές, βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες»



Κριστέλη Ελευθερίου

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δρ. Κωνσταντίνος Βοργιάς

ΑΘΗΝΑ 2017

**Εξώφυλλο:** Κρυσταλλική δομή του πέμπτου bromodomain της ανθρώπινης πρωτεΐνης Polybromo-1 (PB1)

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, στον τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, υπό την άμεση επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Κωνσταντίνου Ε. Βοργιά.

Καθοριστικό ρόλο για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας διαδραμάτισε ο κ. Βοργιάς και θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ιδιαίτερα για τη συνεργασία, τη συνεχή καθοδήγηση, την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε και κυρίως διότι μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστούμε και με δέχτηκε στην οικογένεια του εργαστηρίου του.

Ένα ευχαριστώ, οφείλω, επίσης, στον μεταδιδακτορικό φοιτητή Αναστάσιο Γεωργούλη και την μεταπτυχιακό Βαρβάρα Δράκου για τη βοήθεια τους και την στήριξη τους. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την τεχνολόγο του εργαστηρίου κα. Αγγελική Τσόκα που με έκανε να εξοικειωθώ γρήγορα με τον χώρο του εργαστηρίου. Την ευχαριστώ για τις συμβουλές της, την πολύτιμη βοήθεια της αλλά και την απεριόριστη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου, Γεωργιάνα, Δέσποινα, Ελένη, Σταυρούλα που είναι πάντα κοντά μου και με στηρίζουν τόσο στα εύκολα όσο και στα δύσκολα. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου, για την απεριόριστη αγάπη και πολύπλευρη υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

# Περιεχόμενα

Σελίδες

1. Εισαγωγή	
1.1 Η ανθρώπινη πρωτεΐνη PB1	1
1.2 Ανακάλυψη του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης PBAF	1
1.3 Polybromo-1: Μία μοναδική PBAF υπομονάδα	4
1.4 Τα bromodomains	6
1.5 Ρόλος των bromodomains	12
1.6 Η περιοχή BAH	13
1.7 Ο τομέας της ομάδας υψηλής κινητικότητας (HMGB)	15
1.8 Οι ισομορφές της PB1	17
1.9 Το Polybromo 1 (5 <sup>th</sup> bromodomain)	18
2. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	20
3. Υλικά και Μέθοδοι	21
3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός	21
3.2 Μοριακή κλωνοποίηση	22
3.2.1 Σχεδιασμός και σύνθεση του γονιδίου	22
3.2.2 Μέθοδος PCR	24
3.2.3 Ανασυνδυασμένος πλασμδιακός φορέας έκφρασης	26
3.2.4 Αντίδραση λιγάσης	28
3.2.5 Gel extraction	29
3.2.5.1 Αρχές μεθόδου	29
3.2.5.2 Πειραματική διαδικασία	29
3.2.6 TA cloning και το σύστημα φορέων pGEM®-T Easy	30
3.2.6.1 Χαρακτηριστικά του φορέα κλωνοποίησης pGEM®-T Easy	30
3.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	33
3.3.1 Πειραματική διαδικασία	33
3.3.1.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων	33
3.3.1.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E.coli	34
3.3.1.3 Αποθήκευση Μετασχηματισμένων Κυττάρων	35
3.4 Απομόνωση πλασμδιακού DNA	36
3.4.1 Αρχή της μεθόδου	36
3.4.2 Πειραματική διαδικασία	36
3.5 Επαγωγή του συστήματος έκφρασης pET	38
3.5.1 Το σύστημα pET: περιγραφή και ιδιότητες	38
3.5.2 Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της PB1 πρωτεΐνης	39
3.5.2.1 Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου στόχου	39

3.5.2.2 SDS-PAGE – Έλεγχος της επαγωγής του γονιδίου της PB1	40
3.6 Διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού της πρωτεΐνης PB1	43
3.6.1 Μεθολογική προσέγγιση	43
3.6.2 Διαφορική κλασμάτωση με τη χρήση θειικού αμμωνίου	44
3.6.3 Χρωματικός καθαρισμός της PB1	44
3.6.4 Πειραματική προσέγγιση	46
3.6.4.1 Διαφορική κλασμάτωση της πρωτεΐνης PB1 με χρήση θειικού αμμωνίου	46
3.6.4.2 Κατακρήμνιση της πρωτεΐνης PB1 με τριχλωρικό οξύ	47
3.6.4.3 Εξισορρόπηση διαλυμάτων μέσω διαπίδυσης	48
3.6.4.4 Καθαρισμός της πρωτεΐνης PB1 με χρωματογραφία συγγένειας	50
3.6.4.5 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης PB1	51
3.7 Βιοχημικός και βιοφυσικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης PB1 και δομική ανάλυση της	53
3.7.1 Μελέτη της πρωτεΐνης PB1 με Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού (Circular Dichroism, CD)	53
3.7.2 Μελέτη της πρωτεΐνης PB1 με διαμορφούμενη διαφορική φθοριομετρία σάρωσης (Differential scanning fluorimetry, DSF)	58
4. Αποτελέσματα	61
4.1 Κινητικές επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου	61
4.2 Καθαρισμός και απομόνωσης της πρωτεΐνης PB1	63
4.3 Μέτρηση της πρωτεΐνης PB1 με χρήση φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism, CD spectroscopy)	67
4.4 Μέτρηση της πρωτεΐνης PB1 με διαμορφούμενη διαφορική φθοριομετρία σάρωσης (Differential scanning fluorimetry, DSF)	68
5. Συζήτηση	70
6. Βιβλιογραφία	71

# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Η ανθρώπινη πρωτεΐνη PB1

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη Polybromo-1 (PB1), επίσης γνωστή ως BAF180, είναι μία μοναδική υπομονάδα από το σύμπλεγμα Polybromo Associated Factors (PBAF). Ο εντοπισμός του PBAF στον κινητοχώρο του μιτωτικού χρωμοσώματος είναι σύμφωνος με την απαίτησή του για πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω μίτωσης <sup>1</sup>.

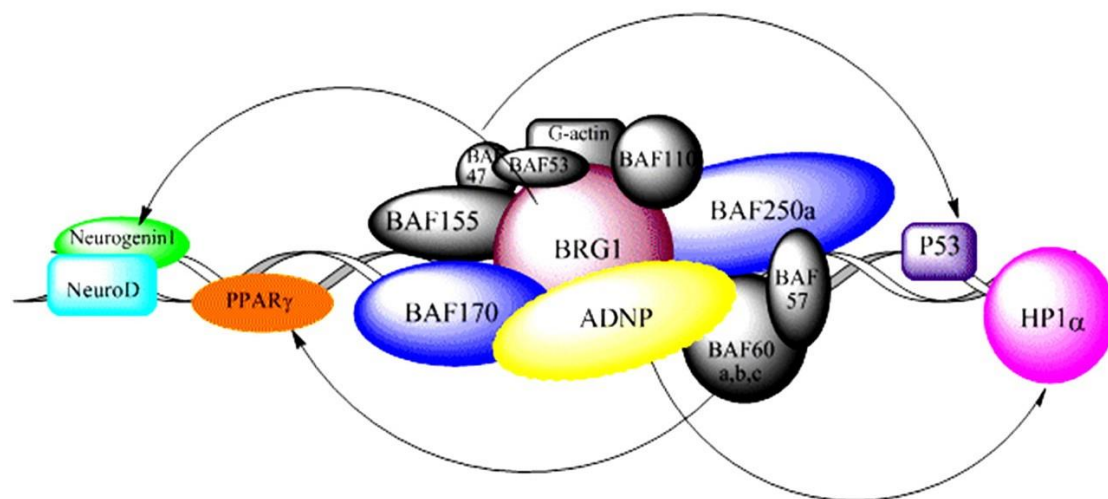
Η PB1 συντονίζει βασικά χαρακτηριστικά, κοινά σε όλα τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης, συμπεριλαμβανομένου του εντοπισμού της χρωματίνης, της στρατολόγησης πρωτεϊνικών υπομονάδων και της αλλαγής της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης. Μια περιεκτική ανάλυση των μεμονωμένων τομέων που συνθέτουν την PB1 χρησιμοποιείται για να προτείνει νέες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία της PB1 στο σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης PBAF. Ο πρόσφατα προσδιορισμένος ρυθμιστικός ρόλος αυτής της σημαντικής πρωτεΐνης εξετάζεται επίσης για να εξηγήσει τόσο τη φυσική λειτουργία όσο και τον αναδυόμενο ρόλο του PB1 ως καταστολέα όγκων που βρέθηκε να μεταλλάσσεται στον καρκίνο του μαστού.

Η PB1 μοιάζει στενά με ένα ανάλογο σύμπλεγμα που περιγράφεται σε ζυμομύκητες που περιέχουν τις υπομονάδες Rsc1, Rsc2 και Rsc3. Το Polybromo σύμπλεγμα αποτελείται από 6 bromodomains, τα οποία δεσμεύουν ακετυλιωμένες ιστόνες, ακολουθούμενες από 2 περιοχές BAH που είναι γνωστό ότι δρουν ως ενότητες πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης και ένα C-τελικό HMG box (τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια). Η PB1 εκφράζεται ευρέως και πιστεύεται ότι στοχεύει το PBAF σε θέσεις χρωματίνης, προσλαμβάνει ειδικές πρωτεΐνες τελεστές και μεταβάλλει αλληλεπιδράσεις ιστόνης – DNA.

## 1.2 Ανακάλυψη του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης PBAF

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη PB1 ανακαλύφθηκε αρχικά σε screenings που ταυτοποιούν υπομονάδες ομόλογες με το σύμπλεγμα της ζύμης SWI/SNF (Switching/Sucrose Non-Fermentable) (Εικόνα 1.1) από διάφορες κυτταρικές σειρές θηλαστικών με τη βοήθεια αντισώματος έναντι Brg1 <sup>2</sup>. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε αυτά τα screenings ονομάστηκαν Brg1-Associated Factors. Το σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης PBAF, αρχικά ονομαζόμενο SWI/SNF-

Β λόγω της ομοιότητας του με το SWI/SNF, περιέχει εννέα κοινές υπομονάδες και τέσσερις εναλλάξιμες υπομονάδες. Ο ελάχιστος καταλυτικός πυρήνας που απαιτείται για τη δραστηριότητα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης *in vitro* απαιτεί τέσσερις υπομονάδες: Brg1, BAF155, BAF170 και BAF47, αν και μόνο η Brg1 εμφανίζει κάποια δραστηριότητα αναδιαμόρφωσης<sup>3</sup>.



**Εικόνα 1.1** Το σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF.

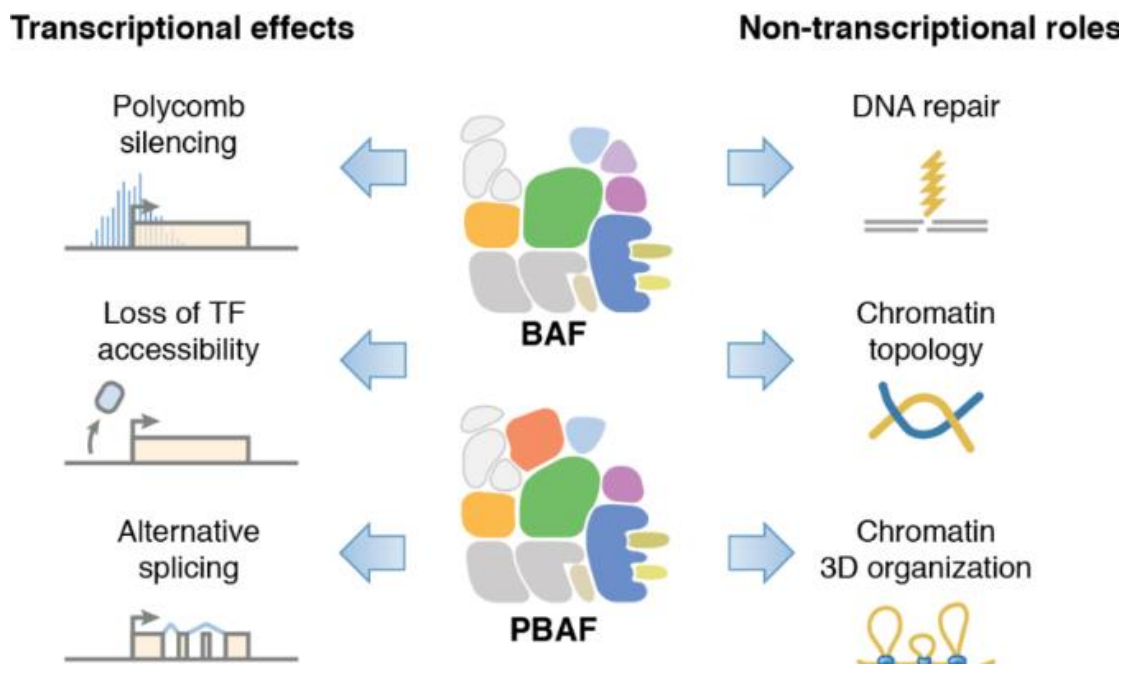
*In vivo*, ωστόσο, η σταθερή συσχέτιση του συμπλόκου BAF με τη χρωματίνη απαιτεί την παρουσία ακτίνης και BAF53, δύο υπομονάδων που συνδέονται έντονα με την BRG-1. Επειδή αυτές οι υπομονάδες BAF είναι επίσης συστατικά του PBAF και η δραστηριότητα της ATPase του BRG-1 είναι βέλτιστη όταν συνδέεται ακτίνη και BAF53, μπορεί να υποστηριχθεί ότι αυτές οι υπομονάδες είναι βασικά συστατικά του συμπλόκου του ενεργού πυρήνα<sup>4</sup>. Τα BAF155 και BAF170 παρουσιάζουν υψηλή ομολογία αλληλουχίας και, ανάλογα με τον τύπο ιστού, μπορούν να σχηματίσουν ομοή ή ετεροδιμερή στο σύμπλοκο.

Η αλληλεπίδραση της BAF57 με διάφορους πυρηνικούς υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχών γλυκοκορτικοειδών, οιστρογόνων και ανδρογόνων, με άμεση συσχέτιση με την πρόσληψη συμπλοκών που βασίζονται σε Brg1 σε υποκινητές που αποκρίνονται στον υποδοχέα, τροποποιούν έτσι τη μεταγραφική δραστηριότητα<sup>5</sup>. Είναι ενδιαφέρον ότι οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ των μοτίβων φερμουάρ λευκίνης των BAF155 και BAF170 φαίνεται να ρυθμίζουν τα επίπεδα της σταθερής κατάστασης της υπομονάδας BAF57 και, κατά συνέπεια, τη συνολική στοιχειομετρία του συμπλόκου. Το BAF47, ένα ανθρώπινο

ομόλογο της πρωτεΐνης SNF5 των ζυμομυκήτων, ενεργοποιεί τη δραστηριότητα αναδιαμόρφωσης του Brg1 *in vitro*, αλληλοεπιδρά με παράγοντες μεταγραφής όπως το c-Myc<sup>6</sup> και προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στο G0 / G1<sup>7</sup>.

Η πρόσφατα ανακαλυφθείσα υπομονάδα BAF200 χρησιμεύει για τη ρύθμιση ορισμένων γονιδίων που ανταποκρίνονται στην ιντερφερόνη και δρα για τη σταθεροποίηση της PB1 στο σύμπλεγμα PBAF υψηλότερης τάξης<sup>8</sup>. Τρία υψηλά ομόλογα γονίδια BAF60 (BAF60a, BAF60b και BAF60c) έχουν ταυτοποιηθεί σε διαφορετικούς τύπους ιστών, γεγονός που υποδηλώνει έναν ειδικό για τον ιστό ρόλο για αυτή την πρωτεΐνη δέσμευσης πυρηνικού υποδοχέα<sup>9</sup>. Αυτό ισχύει επίσης και για τις υπομονάδες BAF45, οι οποίες συσχετίζονται με το BAF53 για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των νευρωνικών βλαστικών κυττάρων<sup>10</sup>.

Η BAF53, το πλησιέστερο ομόλογο του Atp3, είναι μία από τις σχετιζόμενες με ακτίνη πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την ενεργότητα της ATPάσης του Brg1 *in vivo*. Λαμβάνοντας υπόψη την παρατήρηση ότι η ακτίνη συν-καθαρίζεται με PB1 και η υπομονάδα PB1 απαιτείται για να εντοπίσει το PBAF σε κινητοχώρους των μιτωτικών χρωμοσωμάτων<sup>11</sup>, είναι πιθανό ότι η PB1 διαμεσολαβεί τόσο στη στόχευση νουκλεοσωμάτων όσο και στην εξαρτώμενη από ακτίνη μετανάστευση χρωμοσωματικών περιοχών εντός πυρήνας.



**Εικόνα 1.2** Οι ρόλοι των συμπλεγμάτων BAF (mSWI / SNF) και PBAF



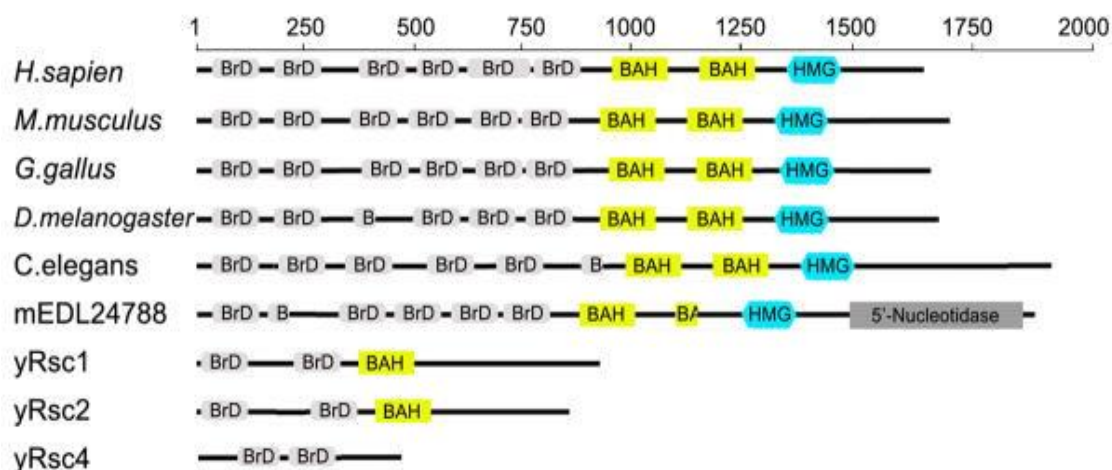
Οι διαφορές στις δύο εξαιρετικά διατηρημένες υποκατηγορίες του ανθρώπινου SWI / SNF καθορίζονται από την παρουσία είτε των υπομονάδων Polybromo-1 και BAF200 ή BAF250 είτε BRM στο σύμπλεγμα<sup>12</sup>. Όταν θεωρείται ότι η πλειοψηφία των υπομονάδων μοιράζονται μεταξύ των συμπλεγμάτων, ο εντοπισμός της χρωματίνης είναι πιθανώς μια συνάρτηση αυτών των χαρακτηριστικών υπομονάδων. Στην πραγματικότητα, πιστεύεται ότι οι υπομονάδες PB1 και BAF200 δρουν στοχεύοντας τα PBAF σε διαφορετικές περιοχές γονιδίων μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες ζυμομυκίτων ομόλογες προς BAF250 (Swi1) και Polybromo-1 (Rsc1, Rsc2 και Rsc4) είναι γνωστές ως υπομονάδες υπογραφής γSWI / SNF ή γRSC (αναδιαμορφώνει τη δομή της χρωματίνης), αντίστοιχα. Δεν υπάρχει ομόλογο με το Swi1 στο σύμπλεγμα γRSC και παρόμοια, οι πρωτεΐνες Rsc1, Rsc2 και Rsc4 δεν έχουν αντίστοιχη σχέση με το γSWI / SNF.

Ως αποτέλεσμα των παρατηρούμενων μεταβολών της σύνθεσης, τα σύμπλοκα διαιρέθηκαν σε δύο υποοικογένειες: μία που περιλαμβάνει τον ζυμομυκίτη SWI / SNF και το ομόλογο θηλαστικού BAF που περιέχει BAF250 και BRM και μια δεύτερη υποοικογένεια που περιλαμβάνει συμπλέγματα RSC ζυμομυκίτων και PBAF θηλαστικών. Μια βασική σχέση μεταξύ του ανθρώπινου PBAF και του συμπλόκου RSC ζυμομυκίτων βασίζεται στη σύνθεση υπομονάδας της PB1, η οποία είναι ομόλογη με τις RSC υπομονάδες Rsc1, Rsc2 και Rsc4<sup>13</sup>. Το RSC είναι πιο άφθονο σε σύγκριση με το γSWI / SNF που μπορεί να αντικατοπτρίζει τον ευρύτερο ρόλο του RSC στη συντήρηση της χρωματίνης και στη δομική ρύθμιση. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι η RSC παίζει ρόλο στην αθροιστική συνοχή των χρωματίδων και στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων<sup>14</sup>. Επειδή το PBAF αποδείχθηκε ότι εντοπίζεται στους κινητοχώρους κατά τη διάρκεια της μίτωσης<sup>11</sup>, έχει προταθεί ότι το PBAF, όπως το RSC, απαιτείται για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω της μίτωσης.

### 1.3 Polybromo-1: Μία μοναδική PBAF υπομονάδα

Η πρωτεΐνη PB1 πλήρους μήκους 1689 αμινοξέων περιέχει έξι bromodomains (BRDs), δύο bromo-γειτονικές περιοχές ομολογίας (BAH) και μία ομάδα υψηλής κινητικότητας (HMG) (Εικόνα 1.3). Το γεγονός ότι τα BRDs δεσμεύουν τις ακετυλιωμένες ιστόνες<sup>15</sup>, οι περιοχές BAH είναι υπομονάδες αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης<sup>16</sup> και οι HMGs έχουν αποδειχθεί ότι δεσμεύουν το νουκλεοσωμικό DNA<sup>17</sup>,

καθιστά την πρωτεΐνη PB1 χρήσιμη ως σημαντική υπομονάδα PBAF που συντονίζει διάφορους κεντρικούς ρόλους για τη λειτουργία των πιο γνωστών συμπλεγμάτων αναδιαμόρφωσης: τη στόχευση θέσεων χρωματίνης, τη πρόσληψη συγκεκριμένων πρωτεϊνών τελεστή και τη μεταβολή των αλληλεπιδράσεων ιστόνης-DNA για έλεγχο γενετικών λειτουργιών.



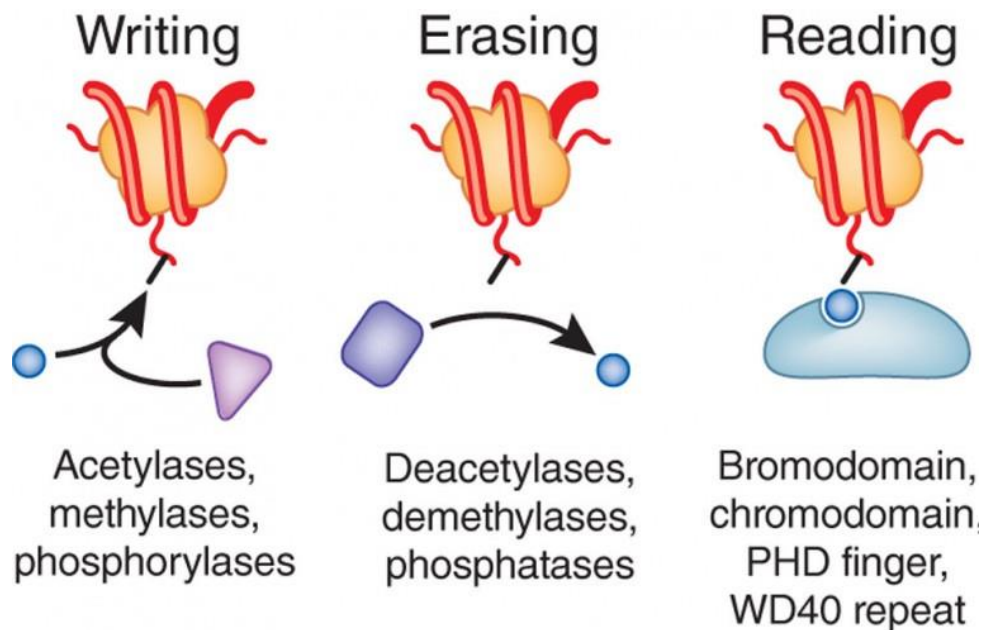
**Εικόνα 1.3** Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης της ανθρώπινης Polybromo-1. Γνωστές και προβλεπόμενες περιοχές για την PB1 συγκρίνονται με Polybromo πρωτεΐνες από τους υποδεικνυόμενους οργανισμούς και τις ομόλογες Rsc πρωτεΐνες ζύμης. Οι πρωτεΐνες που εμφανίζονται εδώ μοιράζονται παρόμοια οργάνωση<sup>18</sup>.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι Polybromo πρωτεΐνες από διαφορετικούς οργανισμούς δείχνουν υψηλή ομολογία αλληλουχίας για όλες τις γνωστές και υπολογιζόμενες Polybromo πρωτεΐνες. Όταν εξετάζονται μόνο πρωτεΐνες Polybromo θηλαστικών, οι ταυτότητες ακολουθίας πλησιάζουν το 90%. Οι ευθυγραμμίσεις αλληλουχιών μεταξύ Polybromo-πρωτεϊνών από *H. sapiens*, *D. melanogaster* και *C. elegans* και Rsc1, Rsc2 και Rsc4 από *S. cerevisiae* δείχνουν ότι οι τρεις εξαιρετικά ομόλογες πρωτεΐνες Rsc έχουν παρόμοια οργάνωση domain και μοιράζονται πολλαπλά διατηρημένα δομικά μοτίβα. Επειδή οι πρωτεΐνες Rsc έχουν συνολικά έξι BRDs και δύο περιοχές BAH, έχει προταθεί ότι η PB1 μπορεί να είναι προϊόν γονιδιακών συντήξεων, προσδίδοντας χαρακτηριστικά στο ανθρώπινο PBAF όπως και οι τρεις Rsc πρωτεΐνες προσδίδουν στο σύμπλοκο RSC ζύμης.

## 1.4 Τα bromodomains

Η υπόθεση του «κώδικα ιστόνης» υποδηλώνει ότι η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών ιστόνης μπορεί να μεταβάλει την τοπική και ολική πρωτεϊνική αρχιτεκτονική και να δημιουργήσει νέες αλληλεπιδράσεις ικανές να στρατολογήσουν πρωτεΐνες τελεστές<sup>19</sup> (Εικόνα 1.4). Σε συμφωνία με αυτή την ιδέα, η σχεδίαση ακετυλίωσεων για συγκεκριμένες θέσεις σε διατηρούμενες περιοχές ουράς ιστονών παίζει σημαντικό ρόλο σε μονοπάτια πολλαπλών σηματοδοτήσεων, οι οποίες συγκλίνουν σε ιστόνες για να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης και να ρυθμίσουν τη μεταγραφή<sup>20</sup>.

Η ικανότητα να αναγνωρίζεται και να συνδέεται επιλεκτικά με ακετυλιωμένες ιστόνες είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα μιας οικογένειας εξελικτικά συντηρημένων μονάδων πρωτεΐνης μήκους περίπου 100 αμινοξέων που ονομάζονται Bromodomains<sup>21</sup>. Τα Bromodomains είναι περιοχές δέσμησης ακετυλολυσίνης (AcK) που βρίσκονται σε υπομονάδες συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης και σε πολλές ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (HATs)<sup>22</sup>. Τα νέα ευρήματα αποκαλύπτουν ότι η αναγνώριση bromodomain-ακετυλολυσίνης χρησιμεύει ως κεντρικός μηχανισμός για τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η μεταγραφική ενεργοποίηση. Βασικά, ο μοναδικός ρόλος του BRD ως διερμηνέας του κώδικα ακετυλίωσης της ιστόνης επικεντρώνεται στην ικανότητα στόχευσης συγκεκριμένων θέσεων ακετυλίωσης ιστόνης<sup>23</sup>, κάνοντας αυτά τα πεδία βασικά στοιχεία στόχευσης συμπλεγμάτων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης όπως τα RSC, SWI / SNF και PBAF<sup>24</sup>.



**Εικόνα 1.4** Το νουκλεόσωμα που αποτελεί τη βασική μονάδα της χρωματίνης, αποτελείται από DNA τυλιγμένο γύρω από ιστόνες. Οι "ουρές" των ιστονών υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που διαμεσολαβούνται από τους readers, τους writers και τους erasers.

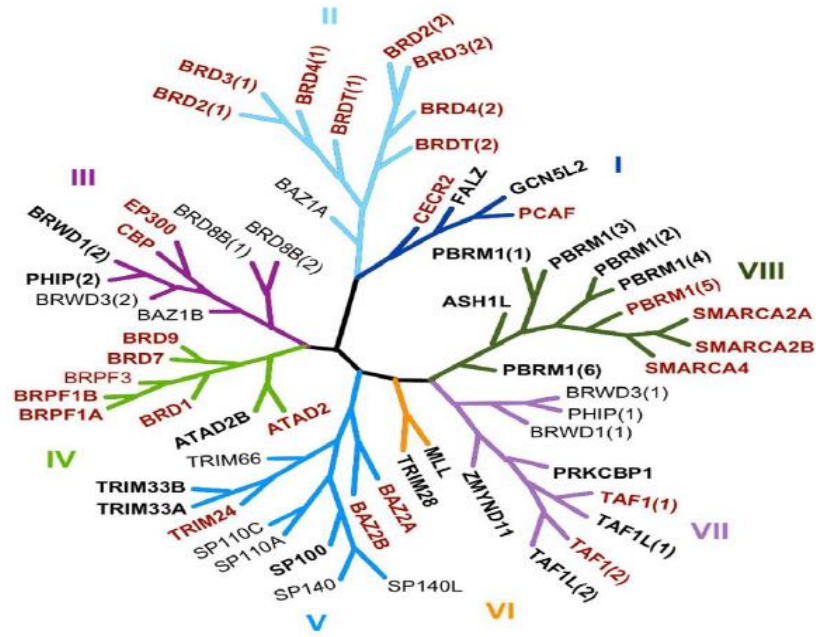
Η υπολογιστική ανάλυση των bromodomain μορίων από την πρωτεΐνη PBI ανθρώπου και ποντικού Rsc και πολλαπλών δομών από την Βάση Πρωτεϊνών (PDB) υποδηλώνει ότι οι αλληλουχίες αμινοξέων των bromodomains είναι εξαιρετικά διατηρημένες σε περιοχές που έρχονται σε άμεση επαφή με την ακετυλολυσίνη, αλλά λιγότερο διατηρημένες σε περιοχές που έρχονται σε επαφή με πλευρικές αλυσίδες ιστόνης που περιβάλλουν την τροποποιημένη λυσίνη<sup>25</sup>. Ο πλούσιος σε τυροσίνη θύλακας σύνδεσης περιέχει τα εξαιρετικά συντηρημένα -YY- και -YN- που συμβάλλουν στην επιλογή για πλευρικές αλυσίδες ακετυλιωμένης λυσίνης. Οι εξαιρετικά συντηρημένες πλευρικές αλυσίδες τυροσίνης σχηματίζουν έναν υδρόφοβο θύλακα που περιβάλλει την ακετυλολυσίνη. Η έλλειψη πλευρικών αλυσίδων στον θύλακα, που είναι σε θέση να σταθεροποιήσει ένα θετικό φορτίο, μπορεί να διακρίνει την κατάσταση ακετυλίωσης και να δράσει έναντι της μη τροποποιημένης λυσίνης. Είναι ενδιαφέρον ότι υπάρχουν σημαντικές παραλλαγές της ακολουθίας BRD σε περιοχές που σχηματίζουν τη διασύνδεση ακετυλολυσίνης, υποδηλώνοντας μία ερμηνεία μοριακού επιπέδου για την παρατηρούμενη εξειδίκευση θέσης πολλών πρωτεϊνών bromodomain<sup>26</sup>.

Η αναδυόμενη εικόνα των αλληλεπιδράσεων BRD-ακέτυλο-ιστόνης υποστηρίζει την ιδέα ότι η λειτουργική ποικιλομορφία μιας διατηρημένης δομής της

πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με εξελικτικές μεταβολές των αλληλουχιών αμινοξέων σε περιοχές που συνθέτουν τη θέση δέσμευσης. Θεωρώντας ότι οι αλληλουχίες “ουράς ιστόνης” είναι σχεδόν αμετάβλητες από τη ζύμη στον άνθρωπο, είναι πιθανό ότι τα Bromodomains έχουν εξελιχθεί για να διακρίνουν τις λεπτές μοριακές διαφορές στις “ουρές”. Οι πρωτεΐνες bromodomain είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένες για μια συγκεκριμένη ακετυλο-λυσίνη, όπως υποδεικνύεται από in vitro μελέτες δέσμευσης<sup>27</sup>. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι ξεχωριστά κλωνοποιημένα και εκφρασμένα bromodomain από PB1 ήταν σε θέση να διακρίνουν την κατάσταση ακετυλίωσης λυσίνης σε πεπτίδια ουράς της ιστόνης<sup>28</sup>.

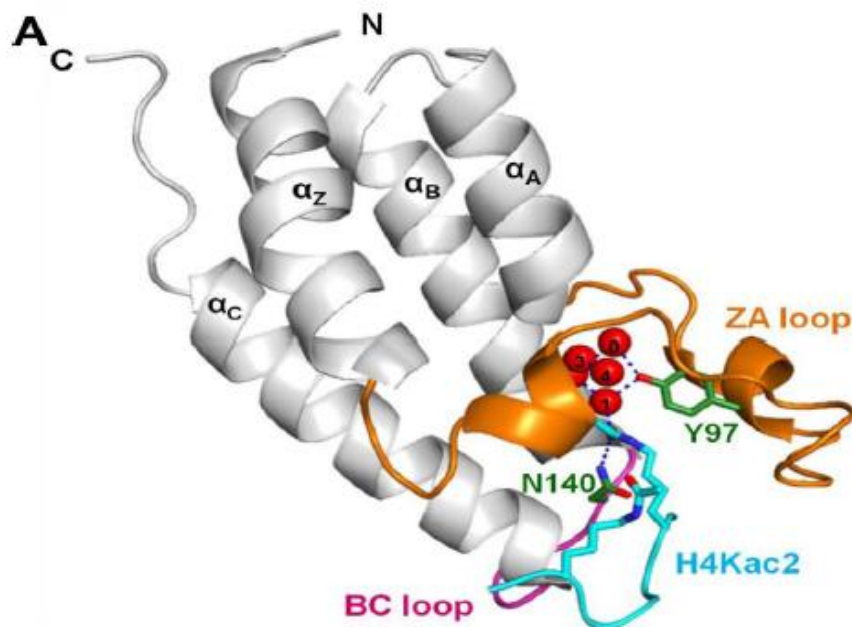
Μελέτες που χρησιμοποιούν μια βιβλιοθήκη πεπτιδίων αποτελούμενη από μικρά τμήματα “ουράς” ακετυλο-ιστόνης ήταν η πρώτη απόδειξη ότι μεμονωμένα bromodomain στόχευαν σε ειδικές ακετυλο-λυσίνες<sup>23</sup>. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις bromodomain-ακετυλο-ιστόνης απαιτούν την ακετυλίωση της λυσίνης και εμφανίζουν μεταβλητές συγγένειες και εξειδικεύσεις όπως παρατηρούνται για τις πρωτεΐνες δέσμευσης DNA. Οι κινητικές και θερμοδυναμικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι οι ακετυλο-λυσίνες που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις δεσμεύονται με ένα εύρος συγγενειών λόγω των διαφορικών αποτελεσμάτων της δίπλωσης που προκαλείται από προσδέματα - σύμφωνα με παρατηρήσεις από τις δομές NMR<sup>29</sup>. Οι in vivo μελέτες αποκαλύπτουν ισχυρές συνδέσεις μεταξύ της βιολογικής λειτουργίας και της απαίτησης από πρωτεΐνες bromodomain για ακετυλίωση σε ορισμένες πλευρικές αλυσίδες ιστόνης.

Τα bromodomains (BRDs) ονομάστηκαν σύμφωνα με την πρωτεΐνη brahma της *Drosophila*, στην οποία ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 46 διαφορετικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν συνολικά 61 BRDs.<sup>30</sup> Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν τις HAT (ακετυλοτρανσφεράσες της ιστόνης) και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις HAT (όπως π.χ. η KAT2A), τους CPB/P300 συσχετιζόμενους παράγοντες (PCAF ή αλλιώς KAT2B) ή την πρωτεΐνη BRD9, μεθυλοτρανσφεράσες της ιστόνης (π.χ. η ASH1L και η MLL (mixed leukemia protein)), ελικάσες (π.χ. SMARCA), συμπλέγματα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης εξαρτώμενα από το ATP (π.χ. BAZ1B, γνωστό και ως μεταγραφικός παράγοντας του συνδρόμου του Williams), μεταγραφικούς συνενεργοποιητές (π.χ. TRIMs και TAFs) και μεταγραφικούς διαμεσολαβητές (π.χ. TAF1), πρωτεΐνες του πυρηνικού σκελετού (π.χ. Polybromo 1 (PBRM1)), όπως και η υποοικογένεια των BET πρωτεϊνών.<sup>31</sup>



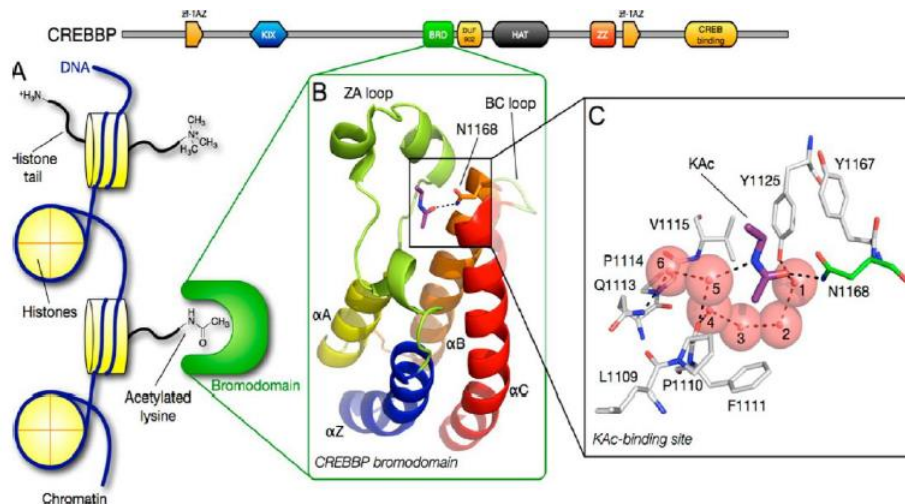
**Εικόνα 1.5** Το φυλογενετικό δέντρο των BRDs με βάση τη δομή. Οι διάφορες οικογένειες συμβολίζονται με λατινικούς αριθμούς.<sup>30</sup>

Ύστερα από κατηγοριοποίηση που βασίστηκε στη δομή, προέκυψαν 8 οικογένειες που περιλαμβάνουν τα 61 Bromodomains.<sup>30</sup> Το καλύτερα μελετημένο γκρουπ των BRDs είναι ένα κομμάτι της οικογένειας II, τα BET (Bromodomain and Extra-Terminal BRDs). Παρά το χαμηλό βαθμό γενικής ομολογίας της ακολουθίας, όλα τα BRDs μοιράζονται ένα συντηρημένο τρόπο αναδίπλωσης που συνίσταται από τέσσερις α-έλικες (aZ, aA, aB, aC) που συνδέονται με μεταβλητές περιοχές, τους βρόχους, (ZA και BC βρόχοι) που σχηματίζουν το σημείο πρόσδεσης για τα αναγνωριζόμενα μοτίβα αλληλεπίδρασης. Το C- και το N-τελικό άκρο διαφέρουν αρκετά στα BRDs και μπορεί να συνδέονται είτε με επιπλέον έλικες που επεκτείνουν τη συνηθισμένη αναδιπλωμένη μορφή του BRD (π.χ. το έκτο BRD της PB1 έχει μία επιπλέον έλικα στο C-τελικό του άκρο), είτε να έχουν εκτεταμένες μπερδεμένες έλικες ως επέκταση του N- ή του C-τελικού άκρου (π.χ. στο TAF1L ή στο ATAD2).



**Εικόνα 1.6** Η δομή του Bromodomain BRD4 μαζί με τον διακετυλιωμένο πεπτίδιο της ιστόνης ως προσδέτη. Η εικόνα δείχνει την αναδίπλωση του BRD και τις λεπτομέρειες που καθιστούν δυνατές τις αλληλεπιδράσεις για πρόσδεση<sup>32</sup>

Μια βαθιά κοιλότητα σχηματίζεται από τις τέσσερις έλικες που παρατείνεται κατά τις δύο περιοχές των βρόχων ZA και BC, δημιουργώντας μία πολύ υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης της Kac. Μία δομική διαφορά που αξίζει να σημειωθεί, μεταξύ του βασικού σκελετού διαφόρων BRDs, είναι η δομή φουρκέτας που βρίσκεται ανάμεσα στην έλικα  $\alpha_z$  και το βρόχο ZA, που βρίσκεται σε όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας VIII. Η εγγύτητα στο σημείο πρόσδεσης της Kac υποδηλώνει ότι αυτό το πρόσθετο κομμάτι μπορεί να παίζει ρόλο στην κινητοποίηση ακετυλιωμένων προσδεμάτων. Αλληλουχίες αμινοξέων που παρεμβάλλονται στο βρόχο ZA είναι συνήθεις, πράγμα που οδηγεί στην ύπαρξη σημαντικών διαφορών στο άκρο του σημείου πρόσδεσης της Kac. Σε αντίθεση με την συντηρημένη τριτοταγή δομή, παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στα BRDs στις ιδιότητες της επιφάνειάς τους. Το ηλεκτροστατικό δυναμικό της επιφάνειας κοντά στο σημείο πρόσδεσης της Kac μπορεί να είναι από πολύ θετικό έως και ισχυρά αρνητικό, πράγμα που υποδηλώνει πως τα BRDs αναγνωρίζουν αρκετά διαφορετικές αλληλουχίες<sup>30</sup>.

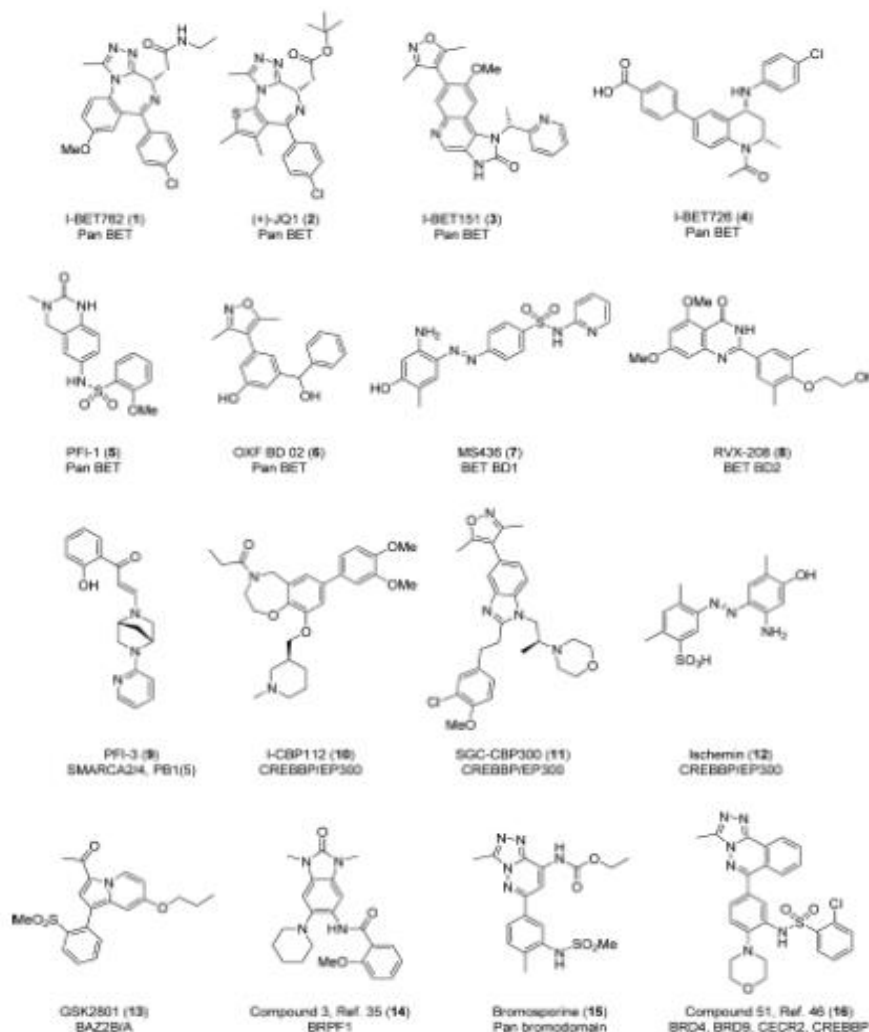


**Εικόνα 1.7** Η ακετυλίωση της Lys στο CREBBP και η "ανάγνωση" της αλλαγής από το BRD του πρωτεϊνικού συμπλέγματος. Η δομή του BRD με την Kac με έμφαση στο δίκτυο των νερών και στις αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων με την Kac<sup>32</sup>

Δύο αμινοξικά κατάλοιπα υπεύθυνα για την αναγνώριση της Kac , που είναι συντηρημένα στα περισσότερα BRDs είναι μια τυροσίνη στο βρόχο ZA και μια ασπαραγίνη στο βρόχο BC. Αυτά τα αμινοξέα σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου απευθείας ή μέσω μορίου νερού με την Kac και την ακετυλο-ομάδα αντίστοιχα. Ορισμένα BRDs έχουν διαφορετικά αμινοξέα στη θέση της ασπαραγίνης και παρουσιάζουν ασυνήθιστες διαμορφώσεις του βρόχου ZA π.χ. TRIM28 και PBRM1(1). Το γεγονός ότι κάποια από αυτά τα BRDs δένονται παρόλα αυτά σε ιστόνες με εξαρτώμενο της ακετυλίωσης τρόπο υποδηλώνει πως χρησιμοποιούν εναλλακτικούς τρόπους αναγνώρισης της Kac, οι οποίοι δεν έχουν ξεκαθαριστεί.

Ένα ακόμη πολύ καλά συντηρημένο χαρακτηριστικό στα BRDs είναι τα τέσσερα μόρια νερού (οι κόκκινες σφαίρες που απεικονίζονται στην εικόνα 1.7C) που βρίσκονται «θαμμένα» στην υδρόφοβη κοιλότητα. Σε αρκετές κρυσταλλογραφίες BRDs, έχουν συγκρυσταλλωθεί 1 ή 2 ακόμη μόρια νερού, τα οποία αλληλεπιδρούν με το κανάλι ZA. Τα μόρια αυτά παρατηρούνται συνεχώς στις κρυσταλλογραφίες των BRDs και έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρούν με προσδέτες και αναστολείς με παρόμοιο τρόπο, καθιστώντας τα σημαντικό χαρακτηριστικό για το σχεδιασμό φαρμάκων<sup>32</sup>.





**Εικόνα 1.8** Δομές γνωστών αναστολέων διαφόρων BRDs

Τέλος σε πολλά BRDs, συμπεριλαμβανομένης και της υποοικογένειας BET αλλά και άλλων, υπάρχει μια συντηρημένη αλληλουχία τριών αμινοξέων γνωστή ως «WPF shelf». Η παρουσία ή η απουσία της μπορεί να διερευνηθεί με σκοπό την εκλεκτική αναστολή των BET από τα υπόλοιπα BRDs .

### 1.5 Ρόλος των bromodomains

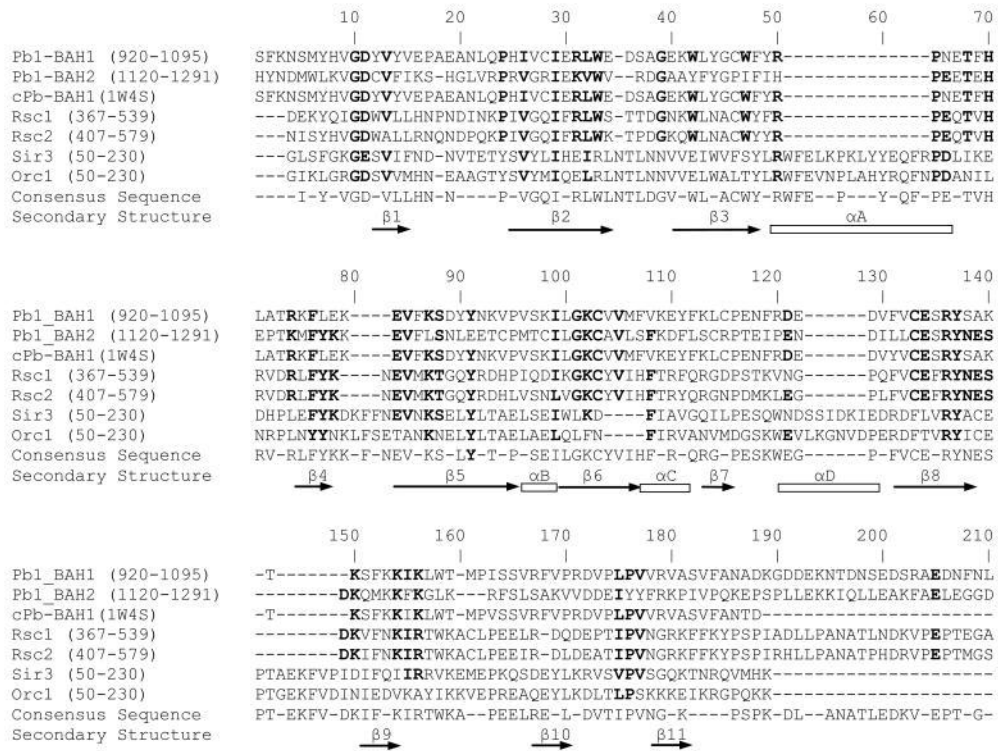
Οι πρωτεΐνες που περιέχουν BRDs συχνά απορρυθμίζονται σε παθολογικές καταστάσεις και τα bromodomains φαίνεται να έχουν ρόλους στο μηχανισμό πρόκλησης της ασθένειας. Μεταξύ των κατηγοριών των πρωτεϊνών αυτών που έχουν συσχετιστεί με κάποια ασθένεια, περιλαμβάνονται συν-ρυθμιστές της μεταγραφής (π.χ. η BRD4 που ανήκει στα BET και η ATAD2), μεταγραφικοί καταστολείς (π.χ. BAZ2A ή αλλιώς TIP5), παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (π.χ. BAZ1A, BPTF,

CECR2), ακετυλοτρανσφεράσες της ιστόνης (π.χ. CREBBP και EP300) και E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης (π.χ. TRIM24) μεταξύ άλλων. Η σύνδεση του ρόλου 15 πρωτεϊνών που διαθέτουν BRDs έχει πυροδοτήσει την ανάπτυξη αναστολέων των BRDs για σκοπούς ανακάλυψης νέων φαρμάκων<sup>32</sup>.

Τα τελευταία πέντε χρόνια έχουν προκύψει πολλοί αναστολείς που στοχεύουν την υποοικογένεια των BET. Μέχρι στιγμής, έχουν ανακαλυφθεί δέκα μόρια που μπλοκάρουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στα BET και έχουν περάσει στο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Ένα από αυτά το RVX-208 έφτασε στη φάση III το φθινόπωρο του 2015 για τη θεραπεία της αρτηριοσκλήρυνσης που σχετίζεται με καρδιαγγειακή νόσο. Τρεις ακόμη αναστολείς των BET έχουν φτάσει στη φάση II των κλινικών δοκιμών (OTX015, BMS-9861158 και GSK525762). Το OTX015 βρίσκεται μάλιστα σε 4 διαφορετικές κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της οξείας λευχαιμίας και αιματολογικών κακοηθειών, για προχωρημένους συμπαγείς όγκους, για επανεμφανιζόμενο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και σε συνδυασμό με την αζακυτιδίνη σε ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση οξείας μυελογενούς λευχαιμίας που δεν αποτελούν υποψήφιοι για τη συνηθισμένη θεραπεία.

## 1.6 Η περιοχή BAH

Η περιοχή bromo-γειτονικής ομολογίας (BAH) είναι μια περιοχή 130 αμινοξέων που προσδιορίστηκε πρώτα στην πρωτεΐνη Polybromo των σπονδυλωτών και αργότερα βρέθηκε ότι υπάρχει σε μια ποικιλία πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση<sup>16</sup>. Παρόλο που σχετικά λίγα είναι γνωστά για τις περιοχές BAH, η λειτουργία φαίνεται ότι επικεντρώνεται γύρω από την ικανότητά της να δρα ως αλληλεπιδραστική πρωτεϊνική ενότητα<sup>33</sup>. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχές BAH έχουν βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με τον σιωπηλό ρυθμιστή πληροφοριών Sir1p εντός του ζυμομύκητα *Orc1p*. Η αλληλεπίδραση που σχηματίζεται από την περιοχή BAH μπορεί να συντονίζει τη χωρική οργάνωση των πρωτεϊνών και, στην περίπτωση της PB1, οι παράπλευρες περιοχές BAH μπορούν να χρησιμεύσουν για την πρόσδεση της υπομονάδας μέσα στο σύμπλεγμα PBAF.



**Εικόνα 1.9.** Ευθυγράμμιση ακολουθίας που συγκρίνει τις περιοχές BAH από ανθρώπινες και πρωτεΐνες από ζύμη. Τα εξαιρετικά ομόλογα αμινοξέα που βασίζονται σε ταυτότητα ή χημικές ιδιότητες εμφανίζονται με έντονους χαρακτήρες.

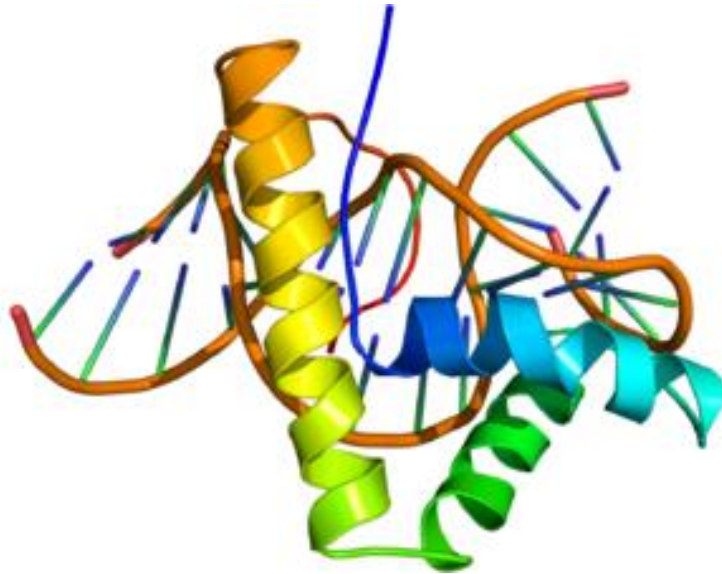
Αν και τα γονίδια για αρκετές πρωτεΐνες που περιέχουν BAH έχουν δείξει σοβαρά φαινοτυπικά ελαττώματα, δεν υπήρχαν δεδομένα που να αποδεικνύουν ότι η ίδια η περιοχή BAH εμπλέκεται άμεσα. Αυτό ήταν μέχρι ο Cairns και οι συνεργάτες του να δείξουν ότι οι περιοχές BAH για τα Rsc1 και 2 απαιτούνταν για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου RSC αλλά όχι για τα bromodomains<sup>34</sup>. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε σε εικασίες ότι ο τομέας BAH είχε λειτουργίες που επικεντρώνονται γύρω από τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που απαιτούνται για το συγκρότημα πολλαπλών υπομονάδων του RSC και ενδεχομένως την αλληλεπίδραση με τους παράγοντες μεταγραφής του DNA που δεσμεύουν. Αντιστρόφως, ο τομέας BAH της πρωτεΐνης yOrc1 έχει συνδεθεί με την αποσιώπηση των θέσεων τύπου HML και HMR από την αλληλεπίδραση του N-τελικού τομέα BAH<sup>35</sup>. Μεταγενέστερες μελέτες που δείχνουν ότι η Sir1 αλληλοεπιδρά με την N-τερματική περιοχή του Orc1 σε καταστολή που εξαρτάται από την αντιγραφή υποστηρίζουν περαιτέρω την απαίτηση της περιοχής BAH στο σχηματισμό κρίσιμων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης<sup>36</sup>.

Ο ρόλος των περιοχών BAH στην PB1 αναμένεται να είναι συγκρίσιμος με αυτόν των ομόλογων περιοχών BAH στις δύο πρωτεΐνες Rsc που βρίσκονται στο σύμπλεγμα RSC. Οι δύο περιοχές BAH της PB1 μπορούν να συνδέονται επιλεκτικά με έναν ή περισσότερους παράγοντες δέσμησης στην περιοχή σχηματισμού της PBAF πολυ-υπομονάδας. Είναι σημαντικό να προσδιοριστεί ο παράγοντας δέσμησης για να κατανοηθεί ο μηχανισμός συναρμολόγησης του συγκροτήματος. Για παράδειγμα, η παρατήρηση ότι το BAF200 απαιτείται για την πρόσδεση της PB1 στο σύμπλεγμα PBAF κάνει ένα ισχυρό επιχείρημα για μια αλληλεπίδραση εξαρτώμενη από BAH μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Αυτό εγείρει την περαιτέρω ερώτηση σχετικά με την απώλεια των περιοχών BAH που παρατηρούνται σε διαφορετικές ισόμορφες PB1 (που αναφέρονται παρακάτω) που θα μπορούσαν να απενεργοποιήσουν την περιοχή και να επηρεάσουν δυσμενώς την ικανότητα σχηματισμού αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή να συναρμολογηθούν σε PBAF. Αυτές οι θέσεις PB1 ως κεντρική πρωτεΐνη που συνδέει το πρότυπο ακετυλίωσης εμφανίζονται στα νουκλεοσώματα που δρουν ως ο δεσμευτικός στόχος της περιοχής Polybromo με τις πρωτεΐνες που προσλαμβάνονται από τις περιοχές BAH.

## 1.7 Ο τομέας της ομάδας υψηλής κινητικότητας (HMGB)

Ο τομέας της ομάδας υψηλής κινητικότητας, ή HMG-box (HMGB), ορίζεται από μια περιοχή μήκους περίπου 80 αμινοξέων και βρίσκεται σε μια ποικιλία ευκαρυωτικών χρωμοσωματικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών που δεσμεύουν νουκλεοσώματα<sup>6</sup>.

Τα κουτιά HMG συνδέονται στη μικρή εγκοπή του DNA και ομαδοποιούνται σε τρεις κύριες τάξεις με βάση τον τρόπο σύνδεσης τους. Η τάξη I αποτελείται από πρωτεΐνες που περιέχουν ένα απλό κουτί HMG που αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες αλληλουχίες και δομές DNA, συμπεριλαμβανομένων τεσσάρων διακλαδώσεων DNA και αμφίδρομων στόχων DNA. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες Sox είναι μεταγραφικοί ρυθμιστές που σχετίζονται με αναπτυξιακές διεργασίες που δρουν μεταβάλλοντας τη διαμόρφωση του DNA και την νουκλεοσωμική αρχιτεκτονική<sup>37</sup>.



**Εικόνα 1.10** Δομή NMR της περιοχής HMG-box συμπλεγμένο με DNA (καφέ)

Οι τάξεις II και III είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το DNA με μη συγκεκριμένο τρόπο και πολλές φορές περιέχουν δύο ή περισσότερα παράλληλα κουτιά HMG. Παραδείγματα πρωτεϊνών τάξεις II περιλαμβάνουν δεσμευτικούς παράγοντες (UBF) και μη-ιστονικές χρωμοσωμικές πρωτεΐνες που δεσμεύονται με στρεβλωμένο και παραμορφωμένο DNA. Επειδή οι πρωτεΐνες HMGB1 και 2 εμπλέκονται στη συναρμολόγηση συμπλεγμάτων νουκλεοπρωτεϊνών σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του ανασυνδυασμού V (D) J, της μεταγραφής και της επιδιόρθωσης του DNA, θεωρούνται αμφότερες ότι έχουν αρχιτεκτονικούς ρόλους. Οι πρωτεΐνες της τάξης III συνδέονται επίσης με συνδέσεις τεσσάρων κατευθύνσεων DNA και περιλαμβάνουν πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς παράγοντες μεταγραφής

Το κουτί HMG που βρίσκεται στην PB1 παρουσιάζει μερικές εντυπωσιακές ομοιότητες με την πρωτεΐνη 20B που περιέχει θηλαστικά HMG που είναι μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με την SMARCE1. Αυτή η πρωτεΐνη είναι ακτινο-εξαρτώμενος σχετιζόμενος με τη μήτρα του DNA ρυθμιστής της χρωματίνης και που σχετίζεται με το SWI / SNF και έχει μεταγραφικό παράγοντα τύπου Sox<sup>38</sup>. Αυτό είναι ένα μη εξειδικευμένο κουτί HMG που δεσμεύεται με DNA. Αυτή η πρωτεΐνη, επίσης ονομαζόμενη BRAF35, εκφράστηκε σε υψηλό βαθμό σε πολλαπλασιαστικούς ιστούς και η πυρηνική χρώση αποκάλυψε μια στενή συσχέτιση με τη φωσφορυλίωση της H3 της χρωματίνης. Παρόμοια με την PB1, η πρωτεΐνη BRAF35 μπορεί να διαδραματίσει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Είναι ενδιαφέρον να

σημειωθεί ότι οι πολύ ομόλογες πρωτεΐνες Polybromo ποντικού και ανθρώπου, οι οποίες εμφανίζουν > 90% ταυτότητα, έχουν ταυτόσημες αλληλουχίες HMG-box μέχρι το αμινοξύ 52 (αντιστοιχεί στο αμινοξύ 1399 στον άνθρωπο και στο 1444 στον ποντικό). Οι αλληλουχίες πέρα από αυτό το σημείο δείχνουν αμελητέα ομολογία που θέτει ερωτήματα σχετικά με την εξέλιξη αυτών των περιοχών και τις δυνατότητες εναλλακτικής λειτουργίας. Οι περιοχές HMG που αναμένεται να απαιτηθούν για σύνδεση DNA με βάση τη δομική μοντελοποίηση είναι άθικτες και δεν αναμένεται καμία δυσμενή επίδραση στη δέσμευση. Περαιτέρω σύγκριση υποδεικνύει ότι η PB1 είναι εξαιρετικά ομόλογη προς την NHP6A του ζυμομύκητα, μια μη ειδική για την αλληλουχία ειδική πρωτεΐνη δέσμευσης DNA που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών HMGB. Η Nhp6a απεδείχθη ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα της διάσπασης V (D) J συνδέοντας τις παραμορφωμένες δομές DNA και προωθώντας τις χημικές αντιδράσεις που προκαλούνται από το RAG 1/2 στο DNA<sup>39</sup>.

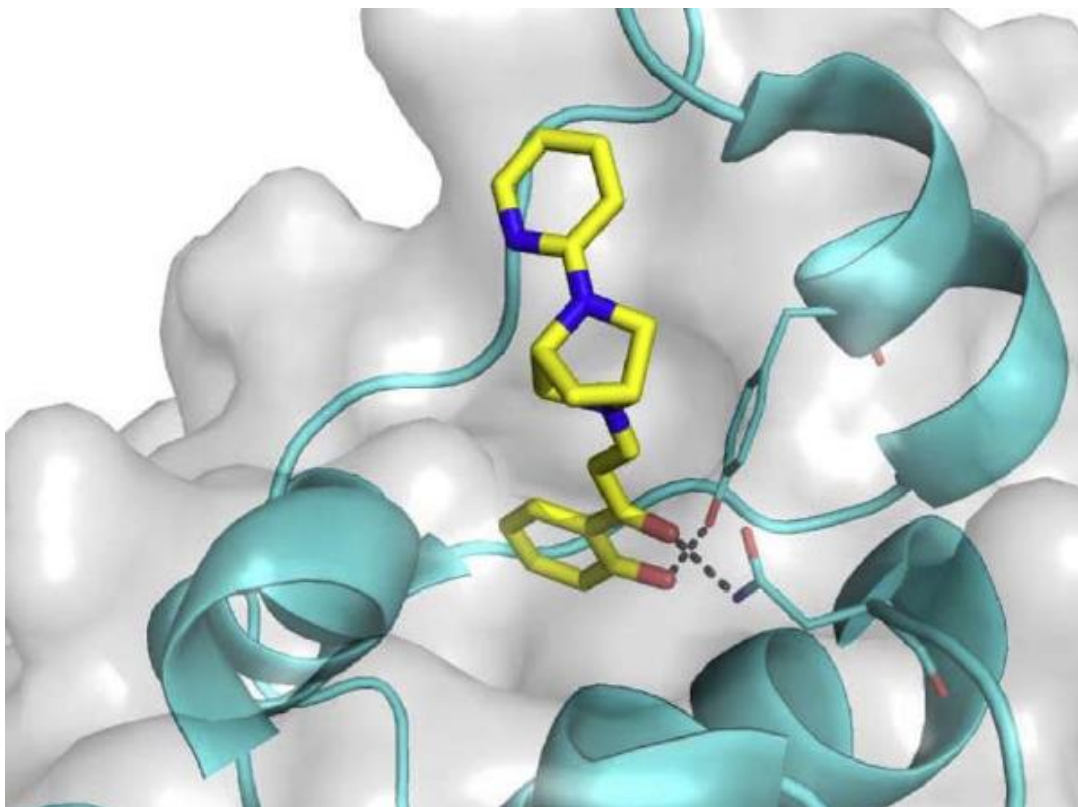
Οι περιοχές HMG-box βρίσκονται συχνά σε συσχετιζόμενες με χρωματίνη πρωτεΐνες και επάγουν δομικές μεταβολές DNA κατά τη δέσμευση για να ρυθμίσουν τη λειτουργία της χρωματίνης και την έκφραση γονιδίων. Η ανάλυση αλληλουχίας υποδηλώνει ότι το κουτί HMG στη PB1 είναι ομόλογο με την ανθρώπινη SMARCE1-σχετική πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη SMARCE1r ομάδας υψηλής κινητικότητας βρέθηκε να συσχετίζεται με την πυρηνική μήτρα και να έχει δραστηριότητα δέσμευσης DNA<sup>40</sup>. Επειδή η οικογένεια των κουτιών HMG είναι αρκετά διαφορετική, δεν είναι σαφές εάν ο τομέας στην PB1 δρα για να χαλαρώσει τη χρωματίνη με μετατόπιση της ιστόνης H1 ή να θέσει τοπολογικούς περιορισμούς στο DNA, ή και τα δύο να διευκολύνουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση.

## 1.8 Οι ισομορφές της PB1

Η ανθρώπινη Polybromo-1 πρωτεΐνη έχει έξι ισομορφές που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα εναλλακτικών προϊόντων ματίσματος, πέντε από τα οποία τροποποιούν τον αριθμό και τον τύπο των περιοχών που υπάρχουν στην πρωτεΐνη PB1. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρόλο αυτών των περιοχών, οι παραλλαγές της PB1 μπορεί να στοχεύουν διαφορετικά πρότυπα ακετυλίωσης ιστόνης και εναλλάξ, να στρατολογούν διάφορους συνεργάτες δέσμευσης σε διαφορετικές θέσεις χρωματίνης βασισμένες στη σύνθεση των παρούσων περιοχών BRD και BAH.

## 1.9 Το Polybromo 1 (5)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το πέμπτο BRD της Polybromo 1 (PB1(5)). Η πρωτεΐνη PB1 περιλαμβάνει έξι BRDs που έχουν κατηγοριοποιηθεί στην οικογένεια VIII των πρωτεϊνών που περιέχουν BRDs με βάση τη δομική και αλληλουχική τους ομολογία. Η PB1 βρίσκεται στο σύμπλεγμα PBAF (Polybromo Brg-1 associated factors) μαζί είτε με το SMARCA2 ή το SMARCA4. Τα BRDs της PB1 έχει δειχθεί ότι προσδένονται σε οποιαδήποτε ακετυλιωμένη λυσίνη στο N-τελικό άκρο της H3 ιστόνης. Η Pfizer και το SGC (Structural Genome Consortium) ανέπτυξαν το PFI-3 ως chemical probe για τα SMARCA2/4 και το PB1(5), που διαθέτει εκλεκτικότητα για αυτά σε σχέση με την υποοικογένεια BET.



**Εικόνα 1.11** Κρυσταλλογραφία του PFI-3 στο σημείο πρόσδεσης της PB1(5)

Αποτελώντας ανάλογο που αναπτύχθηκε από το σαλικυλικό οξύ, το PFI-3, παρουσιάζει έναν ιδιαίτερα ασυνήθιστο τρόπο πρόσδεσης στα BRDs καθώς απομακρύνει τέσσερα μόρια νερού από την κοιλότητα, τα οποία είναι καλά συντηρημένα σε πολλές κρυσταλλογραφικές δομές BRDs. Το παράγωγο του

σαλικυλικού που μιμείται την Kac αλληλοεπιδρά απευθείας με τόσο με την ασπαραγίνη της κοιλότητας (N1464) όσο και με την τυροσίνη (Y1421), σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση μέσω νερού που παρατηρείται συνήθως στην τυροσίνη. Η γέφυρα του πιπεραζινικού δακτυλίου όχι μόνο προσδίδει σχηματική συμπληρωματικότητα στο bromodomain, αλλά και η τοποθέτηση του πυριδινικού δακτυλίου μέσα στην υδρόφοβη κοιλότητα είναι επίσης σημαντική για την στερεοχημική παρεμπόδιση της υδρόλυσης της εναμίνης.



## 2. Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη Polybromo-1 (PB1) αποτελεί μοναδική υπομονάδα του συμπλέγματος PBAF και συντονίζει βασικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, της στρατολόγησης πρωτεϊνικών υπομονάδων και της αλλαγής της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης. Επιπρόσθετα, απαιτείται για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω μίτωσης. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί επιγενετικό στόχο και χρησιμοποιείται για την κατασκευή ενός φαρμακοφόρου μοντέλου.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ετερόλογη υπερέκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης-στόχου PB1(5) μέσω χρήσης ενός διαφορετικού πρωτοκόλλου καθαρισμού από εκείνο που προτείνει το SGC (Structural Genomics Consortium), ώστε να γίνει εφικτή η παραλαβή μεγάλης ποσότητας της πρωτεΐνης. Με επίτευξη καθαρισμού της πρωτεΐνης άνω του 90%, καθίσταται εφικτή η μελέτη της πρωτεΐνης με βιοφυσικές όπως κυκλικό διχρωισμό (CD, Circular Dichroism) και φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης (DSF, Differential Scanning Fluorimetry) και η πραγματοποίηση προκαταρκτικών πειραμάτων με προσδέτη έναν αναστολέα της πρωτεΐνης, με σκοπό την εύρεση νέων υποψήφιων φαρμάκων που στοχεύουν την πρωτεΐνη αυτή.

## 3. Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Αποστειρωμένοι σωλήνες Eppendorf 1,1.5,2 ml
- Αποστειρωμένοι σωλήνες Falcon 15,50 ml  
Αυτόκαυστο
- Γυάλινα δοχεία (κωνικές φιάλες, μπουκάλια, ογκομετρικοί κύλινδροι, ποτήρια ζέσεως)
- Επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας για σωλήνες Eppendorf με δυνατότητα ανάδευσης
- Επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας με δυνατότητα ανάδευσης για υγρές καλλιέργειες
- Επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας για τρυβλία
- Τρυβλία petri
- Ζυγός ακριβείας
- Ηλεκτρόδιο μέτρησης pH
- Μηχανικές πιπέτες και αποστειρωμένα tips
- Συσκευές ηλεκτροφόρησης ακρυλαμίδης
- Συσκευή παραγωγής υπέρηχων με έμβολο
- Συσκευή παραγωγής υπέρηχων σε υδατόλουτρο
- Σύστημα χρωματογραφίας με κολώνα ηπαρίνης, κολώνα TALON και περισταλτική αντλία
- Φυγόκεντροι για σωλήνες Eppendorf, falcons και ψυχόμενη υπερφυγόκεντρος (Sorvall)
- Φωτόμετρο UV-VIS, κυψελίδες φωτόμετρου
- Κρύος θάλαμος (Cold room) 4 °C
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής

## 3.2 Μοριακή κλωνοποίηση

### 3.2.1 Σχεδιασμός και σύνθεση του γονιδίου

Τα συνθετικά γονίδια είναι αλληλουχίες ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης, κοινώς γνωστών, των οποίων η σύνθεση πραγματοποιείται *in vitro*. Ένα συνθετικό γονίδιο είναι το προϊόν επιλογής, εφόσον ο φυσικός κλώνος δεν είναι διαθέσιμος ή οι διαθέσιμοι κλώνοι δεν πληρούν τις εξειδικευμένες απαιτήσεις, όπως είναι η 100% ταύτιση αλληλουχίας με μια αλληλουχία βάσης δεδομένων και η βελτιστοποίηση της αλληλουχίας DNA για μεγιστοποίηση της απόδοσης της πρωτεΐνης στο σύστημα έκφρασης που προτιμάται, όπως σε κύτταρα *E. coli*. Στηρίζονται στην ολιγονουκλεοτιδική σύνθεση DNA και δε χρειάζεται προϋπάρχουσα αλληλουχία για τη δημιουργία τους, αρκεί να είναι γνωστή η πρωτεϊνική αλληλουχία.

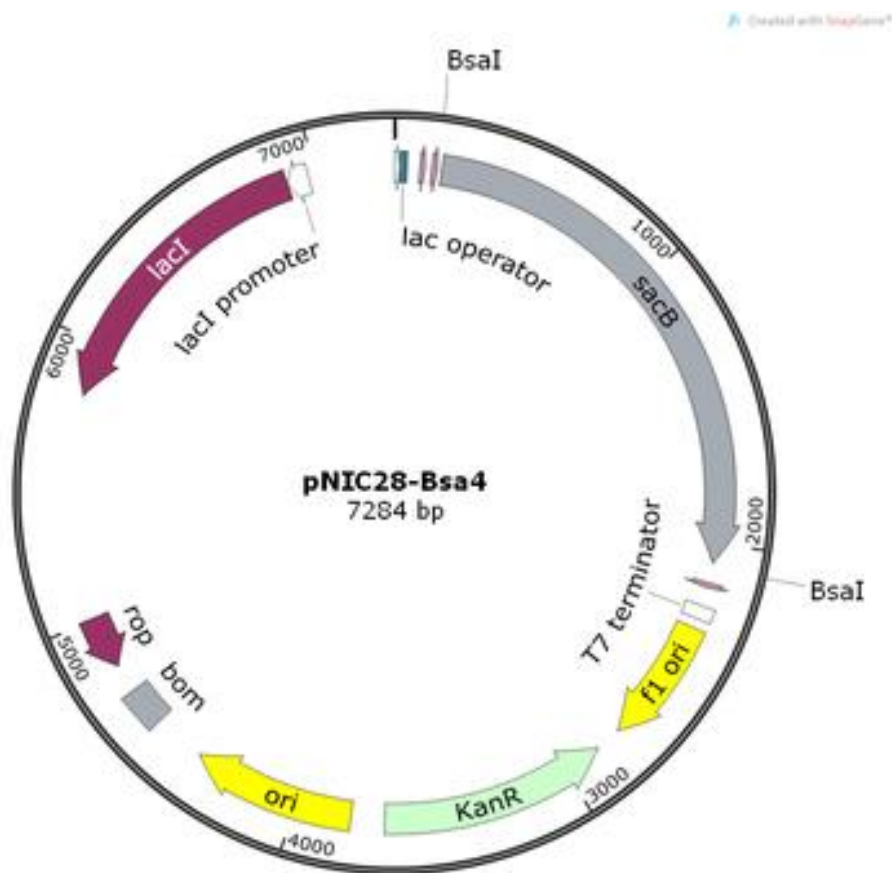
Το συνθετικό γονίδιο που σχεδιάστηκε για την πρωτεΐνη PB1 (5<sup>th</sup> Bromodomain) έχει την παρακάτω αλληλουχία:

```
TAC TTC CAA TCC ATG AGC GGC ATT AGC CCG AAA AAA AGC AAA TAT
Y F Q S M S G I S P K K S K Y
ATG ACC CCG ATG CAG CAG AAA CTG AAC GAA GTG TAT GAA GCG GTG
M T P M Q Q K L N E V Y E A V
AAA AAC TAT ACC GAT AAA CGC GGT CGC CGT CTG AGC GCC ATT TTT
K N Y T D K R G R R L S A I F
CTG CGC CTG CCG AGC CGC AGC GAA CTG CCG GAT TAT TAT CTG ACC
L R L P S R S E L P D Y Y L T
ATT AAA AAA CCG ATG GAT ATG GAA AAA ATT CGC AGC CAC ATG ATG
I K K P M D M E K I R S H M M
GCG AAT AAA TAT CAG GAT ATT GAT AGC ATG GTT GAA GAT TTT GTT
A N K Y Q D I D S M V E D F V
ATG ATG TTC AAT AAC GCG TGC ACC TAT AAC GAA CCG GAA AGC CTG
M M F N N A C T Y N E P E S L
ATC TAT AAA GAT GCG CTG GTG CTG CAT AAA GTG CTG CTG GAA ACC
I Y K D A L V L H K V L L E T
CGC CGC GAT CTG GAA GGC GAT TGA CAG TAA AGG TGG ATA
R R D L E G D *
```

Ο φορέας pNIC28-Bsa4 χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για την κατασκευή του συστήματος έκφρασης (Εικόνα 3.1). Σύμφωνα με τη μέθοδο της PCR που περιγράφεται παρακάτω, σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές (Πίνακας 3.1) για τη σύνθεση της πρωτεΐνης.

Primer	Αλληλουχία
Forward	5'-TACTTCCAATCCATGAGCGGCATTAGCCCCGAAAAAAG-3'
Reverse	5'-GATTGGAAGTAGAGGTTCTCTGCCGGGCTCGCCATATCATC-3'

Πίνακας 3.1 Εκκινητές (primers) για τη σύνθεση της πρωτεΐνης PB1.



Εικόνα 3.1 Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pNIC28-Bsa4 που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή του συνθετικού γονιδίου για την παραγωγή της πρωτεΐνης PB1.

### 3.2.2 Μέθοδος PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (αγγλ.: PCR, εκ του polymerase chain reaction) είναι μία μέθοδος Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες.

Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και πραγματοποιείται χωρίς περιορισμούς στη μορφή του DNA που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της, συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων.

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής ενός κλώνου DNA (DNA-στόχος). Οι περισσότερες μέθοδοι PCR ενισχύουν τυπικά θραύσματα DNA μεταξύ 0,1 και 10 kbp, αν και κάποιες τεχνικές επιτρέπουν την ενίσχυση των θραυσμάτων έως 40 kbp. Το ενισχυόμενο προϊόν προσδιορίζεται από τα διαθέσιμα υποστρώματα στην αντίδραση, όπου αυτά γίνονται περιοριστικά καθώς προχωρεί η αντίδραση. Μια βασική PCR, απαιτεί πολλά συστατικά και αντιδραστήρια, τα οποία περιλαμβάνουν:

- Το DNA υπόστρωμα που περιέχει την περιοχή του DNA πρόκειται να ενισχυθεί
- Δύο εκκινητές (primers) που είναι συμπληρωματικοί προς το 3' άκρο της κωδικής και της αντί-κωδικής αλυσίδας του DNA-στόχου, αντίστοιχα
- Την *Taq* πολυμεράση ή άλλη DNA πολυμεράση, που έχει βέλτιστη απόδοση σε θερμοκρασία περίπου 70°C
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που είναι δομικά στοιχεία από τα οποία η *Taq* πολυμεράση συνθέτει τη νέα αλυσίδα DNA
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για βέλτιστη σταθερότητα και δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης
- Δισθενή κατιόντα, όπως ιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ )

Τυπικά, η PCR αποτελείται από μια σειρά από 20-40 επαναλαμβανόμενες εναλλαγές θερμοκρασίας, που ονομάζονται κύκλοι, με κάθε κύκλο συνήθως να αποτελείται από 2-3 διακριτά στάδια θερμοκρασίας, συνήθως τρία. Οι θερμοκρασίες και το χρονικό διάστημα που εφαρμόζονται σε κάθε κύκλο εξαρτάται από μια ποικιλία

παραμέτρων. Αυτές περιλαμβάνουν το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, τη συγκέντρωση των δισθενών ιόντων και dNTPs στην αντίδραση, καθώς και τη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των εκκινητών.

### **Διαδικασία-Στάδια**

- *Εκκίνηση (initialization)*. (Απαιτείται μόνο για τις DNA πολυμεράσες που απαιτούν ενεργοποίηση θερμότητας από hot-start PCR). Το στάδιο αυτό συνίσταται από θέρμανση της αντίδρασης σε μία θερμοκρασία 94-96 °C (ή 98 °C εάν είναι εξαιρετικά θερμοσταθερές οι πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται), η οποία πραγματοποιείται για 1-9min.

- *Αποδιάταξη του DNA (denaturation)*. Αυτό το βήμα είναι το πρώτο κανονικά σε έναν κύκλο της PCR και αποτελείται από θέρμανση της αντίδρασης στους 94-98°C για 20-30sec. Προκαλεί την τήξη του DNA υποστρώματος με διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων, αποδίδοντας μονόκλινα μόρια DNA.

- *Προσαρμογή των εκκινητών (primers) στο DNA εκμαγείο (annealing)*. Η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται στους 50-65 °C για 20-40sec, προσαρμόζοντας τους εκκινητές στο εκμαγείο μονόκλωνου DNA. Αυτή η θερμοκρασία πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή ώστε να επιτρέπει την υβριδοποίηση του εκκινητή με την έλικα, αλλά αρκετά υψηλή ώστε η υβριδοποίηση να είναι ειδική, δηλαδή ο εκκινητής πρέπει να δεσμεύεται μόνο σε ένα τέλει συμπληρωματικό μέρος του υποστρώματος. Αν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή, ο εκκινητής είναι δυνατό να προσδεθεί ατελώς. Αν είναι πάρα πολύ υψηλή, ο εκκινητής μπορεί να μην δεσμευτεί. Τυπικώς, η θερμοκρασία προσαρμογής των εκκινητών είναι περίπου 3-5 °C κάτω από την  $T_m$  των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Σταθεροί DNA-DNA δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μόνο όταν η ακολουθία του εκκινητή ταιριάζει πολύ στενά με την αλληλουχία του DNA υποστρώματος. Η πολυμεράση προσδένεται στο υβρίδιο εκκινητή-υποστρώματος και ξεκινά ο σχηματισμός του DNA.

- *Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)*. Η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα εξαρτάται από την DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Η *Taq* πολυμεράση έχει βέλτιστη ενεργότητα στους 75-80°C και συνήθως μια θερμοκρασία 72°C χρησιμοποιείται για το ένζυμο αυτό. Σε αυτό το βήμα, η DNA πολυμεράση συνθέτει ένα νέο συμπληρωματικό κλώνο DNA προς τον κλώνο-εκμαγείο του DNA, προσθέτοντας dNTPs συμπληρωματικά με το πρότυπο με 5'-3' κατεύθυνση, ενώνοντας

την 5'-φωσφορική ομάδα των dNTPs με την 3'-υδροξυλομάδα των παραγόμενων κλώνων DNA. Ο χρόνος επέκτασης εξαρτάται τόσο από την DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται, όσο και από το μήκος του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Στη βέλτιστη θερμοκρασία, η DNA πολυμεράση θα πολυμερίσει χίλιες βάσεις ανά λεπτό. Υπό βέλτιστες συνθήκες, δηλαδή, εάν δεν υπάρχουν περιορισμοί λόγω περιοριστικών υποστρωμάτων ή αντιδραστηρίων σε κάθε στάδιο επέκτασης, η ποσότητα του DNA-στόχου διπλασιάζεται, οδηγώντας σε εκθετική (γεωμετρική) ενίσχυση του ειδικού θραύσματος DNA.

- *Τελική επιμήκυνση.* Αυτό το μοναδικό στάδιο εκτελείται κατά περίπτωση σε θερμοκρασία από 70-74 °C (η απαιτούμενη θερμοκρασία για βέλτιστη δραστηριότητα των περισσότερων πολυμερασών που χρησιμοποιούνται στην PCR) για 5-15min μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR για να εξασφαλιστεί ότι κάθε απομένον μονόκλωνο DNA έχει επεκταθεί πλήρως
- *Τελική αναμονή.* Αυτό το βήμα στους 4-15 °C για ένα απροσδιόριστο χρονικό διάστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βραχυπρόθεσμη συντήρηση της αντίδρασης.

### 3.2.3 Ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας έκφρασης

Χρησιμοποιώντας τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI* και *BamHI*, το συνθετικό γονίδιο για την πρωτεΐνη PB1 αποσπάστηκε από το φορέα κλωνοποίησης pNIC28-Bsa4 και έγινε ενσωμάτωσή του στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET-30(b). Ύστερα, πραγματοποιήθηκε πέψη τόσο του φορέα κλωνοποίησης όσο και της αλληλουχίας εισδοχής, με σκοπό τα προκύψαντα άκρα να είναι συμπληρωματικά (Πίνακας 3.2), καθώς και χρήση DNA λιγάσης ώστε να γίνει η σύνδεση των δύο μορίων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4.

Το σύστημα φορέων pET (plasmid for expression by T7 RNA polymerase) αναπτύχθηκε με σκοπό την κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα *E. coli* υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του φάγου T7. Καθώς ο T7 υποκινητής δεν αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση του *E. Coli*, δεν πραγματοποιείται μεταγραφή του γονιδίου-στόχου απουσία της T7 RNA πολυμεράσης, και έτσι η διαδικασία της κλωνοποίησης αποσυνδέεται από τη διαδικασία της έκφρασης και τα ανασυνδυασμένα γονίδια μπορούν να διατηρηθούν σε μεταγραφικώς ανενεργή κατάσταση.

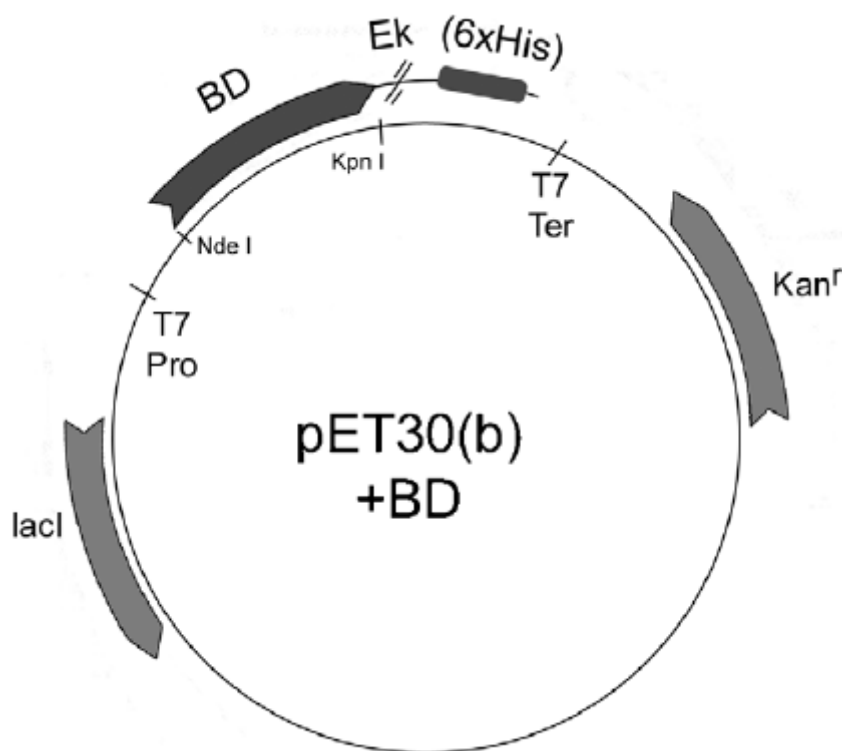
Τα χαρακτηριστικά του pET-30(b) που επιλέχθηκε για το πείραμα φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 3.3), καθώς και ο χάρτης του πλασμιδίου μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου που παράγει την πρωτεΐνη PB1 του 5<sup>ου</sup> bromodomain (Εικόνα 3.2).

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	Αλληλουχίες αναγνώρισης
<i>Bam</i> HI	5'...G/GATCC...3' 3'...CCTAG/G...5'
<i>Nde</i> I	5'...CA/TATG...3' 3'...GTAT/AC...5'

**Πίνακας 3.2** Αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών

Χαρακτηριστικά	Λειτουργία
<b>Kan<sup>R</sup></b>	Ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη- επιλογή μετασηματισμένων στελεχών
<b>T7 υποκινητής και σημείο έναρξης</b>	Μεταγραφή του εισαχθέντος γονιδίου από την T7 πολυμεράση
<b>Σημείο έναρξης pBR322 ori</b>	Έναρξη αντιγραφής σε κύτταρα <i>E.coli</i>

**Πίνακας 3.3** Χαρακτηριστικά του πλασμιδιακού φορέα pET-30(b)



**Εικόνα 3.2.** Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pET30 (b) έχει ένα bromodomain που έχει εισαχθεί ανοδικά από μια θέση πρωτεάσης εντεροκινάσης (Ek) και μια ετικέτα hexahistidine (6 x His). Οι θέσεις T7 Pro και Ter παρουσιάζονται μαζί με τα γονίδια Kan<sup>r</sup> και lacI.



### 3.2.4 Αντίδραση λιγάσης

Η χρήση της DNA λιγάσης στη μοριακή βιολογία βοηθά στην πρόσδεση δύο αλυσίδων DNA με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού. Η DNA λιγάση είναι ένας ειδικός τύπος ενζύμου ιδιαίτερα σημαντικός για την επιδιόρθωση σε σπασίματα των μονών αλυσίδων ενός δίκλωνου DNA σε ζωντανούς οργανισμούς, όμως μερικές μορφές της (όπως η DNA λιγάση IV) μπορεί να επιτευχθεί εξειδικευμένη επιδιόρθωση σπασιμάτων δίκλωνων τμημάτων DNA (ένα σπάσιμο και στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA). Οι μονόκλωνες θραύσεις επιδιορθώνονται από την DNA λιγάση χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλυσίδα ως καλούπι και σχηματίζοντας τον τελευταίο φωσφοδιεστερικό δεσμό, για να επιδιορθωθεί πλήρως το DNA.

Η DNA λιγάση χρησιμοποιείται συχνά σε εργαστήρια μοριακής βιολογίας για πειράματα ανασυνδυασμένου DNA. Καθαρισμένη λιγάση χρησιμοποιείται σε κλωνοποίηση γονιδίων και λειτουργεί ως η μοριακή «κόλλα» που ενώνει τμήματα DNA μαζί για να σχηματίσουν το ανασυνδυασμένο DNA.

Η DNA λιγάση από τον βακτηριοφάγο T4 (T4 DNA λιγάση) είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη λιγάση στην εργαστηριακή έρευνα. Μπορεί να συνδέσει συμπληρωματικά ή «κολλώδη» άκρα του DNA, ολιγονουκλεοτίδια, καθώς και RNA και RNA-DNA υβρίδια, όχι όμως μονόκλωνα νουκλεϊκά οξέα. Μπορεί επίσης να συνδέσει κομμένα άκρα του DNA με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από ότι η DNA λιγάση του *E. coli*. Αντίθετα με την τελευταία, η T4 DNA λιγάση δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει  $\text{NAD}^+$  και απαιτεί ATP ως συμπαραγοντα.

Για να εισαγάγουμε το γονίδιο της PB1 πρωτεΐνης σε πλασμίδια έκφρασης, όπως είναι ο pET-30(b), χρησιμοποιήσαμε την T4 DNA λιγάση και τους συμπαραγοντες που αναγράφονται στον Πίνακα 3.4. Πρέπει να σημειωθεί ότι το buffer της λιγάσης που χρησιμοποιούμε το μετατρέπουμε από 10x σε 1x, καθώς σε αυτή τη συγκέντρωση εξασφαλίζει τη βέλτιστη δραστηριότητα του ενζύμου. Τέλος, το γονίδιο αποσπάται από τον φορέα αποθήκευσης (π.χ., pNIC28-Bsa4) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενο υπό-κεφάλαιο, κι έπειτα, αφού το τρέξουμε σε gel αгарόζης 1%, το παίρνουμε σε καθαρή μορφή με τη χρήση του kit για gel extraction.

Αντίδραση λιγάσης	Αντίδραση λιγάσης-control	Συνθήκες
4 λ dH <sub>2</sub> O	6.5 λ dH <sub>2</sub> O	
1λ 10x T4 DNA ligase buffer	1λ 10x T4 DNA ligase buffer	
1 λ T4 DNA ligase	1 λ T4 DNA ligase	2 h, 25°C
1.5 λ πλασμίδιο έκφρασης	1,5 λ πλασμίδιο έκφρασης	
2.5 λ συνθετικό γονίδιο	-	

**Πίνακας 3.4.** Πρωτόκολλο αντίδρασης λιγάσης

### 3.2.5 Gel extraction

Για να αποσπαστούν οι αλληλουχίες DNA ενδιαφέροντος ώστε να προχωρήσουμε σε περαιτέρω διαδικασίες, όπως εισαγωγή ενός γονιδίου που έχουμε ενισχύσει με τη μέθοδο PCR σε κάποιον φορέα κλωνοποίησης, χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* kit της εταιρείας Macherey-Nagel.

#### 3.2.5.1 Αρχή της μεθόδου

Το *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* kit είναι ένα kit 2 σε 1 που επιτρέπει τον καθαρισμό τμημάτων DNA από ενζυματικές αντιδράσεις, όπως την PCR, καθώς και από gel αγαρόζης. Το δείγμα αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης NTI και, σε περίπτωση μπάνας DNA που κόβεται από gel, θερμαίνεται ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Η πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη της σιλικόνης της στήλης καθαρισμού του *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* kit, γίνεται παρουσία χαοτροπικού άλατος. Επιμολύνσεις απομακρύνονται με απλά βήματα πλύσεως με αιθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης NT3. Τέλος, το καθαρό DNA εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλού άλατος με ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5).

#### 3.2.5.2 Πειραματική διαδικασία

Περιγράφεται το πρωτόκολλο καθαρισμού DNA από gel αγαρόζης.

1. *Αποκοπή τμήματος DNA/διαλυτοποίηση λωρίδας του gel.* Με ένα καθαρό νυστέρι, αποκόπτουμε λωρίδα του gel αγαρόζης που περιέχει το κομμάτι του DNA που θέλουμε να καθαρίσουμε, προσπαθώντας η λωρίδα αυτή να έχει όσο λιγότερη αγαρόζη γίνεται. Τοποθετούμε τη λωρίδα αυτή σε ένα σωληνάριο

τύπου erpendorf, το οποίο έχουμε ζυγίσει από πριν. Η διαδικασία κοπής γίνεται με παράλληλη έκθεση του gel αγαρόζης σε UV ακτινοβολία.

Για κάθε 100mg από gel αγαρόζης < 2% προσθέτουμε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος NTI, ενώ για gel αγαρόζης > 2%, διπλασιάζουμε τον όγκο του NTI. Επωάζουμε το δείγμα για 5-10min στους 50°C. Κάνουμε vortex στο δείγμα κάθε 2-3min μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.

2. «Δέσιμο» του DNA. Τοποθετούμε τη στήλη *NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup* σε ένα σωλήνα συλλογής και φορτώνουμε έως 700μl δείγματος. Φυγοκεντρούμε για 30s σε 13.000rpm. Απορρίπτουμε το flow-through και επιστρέφουμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής. Φορτώνουμε και το υπόλοιπο δείγμα εάν χρειάζεται και επαναλαμβάνουμε το βήμα της φυγοκέντρωσης.
3. Ξέπλυμα μεμβράνης της στήλης. Προσθέτουμε 700μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη. Φυγοκεντρούμε για 30 s σε 13.000rpm. Απορρίπτουμε το flow-through και επιστρέφουμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής.
4. Στέγνωμα μεμβράνης της στήλης. Φυγοκέντρωση για 1min στις 13.000rpm για να φύγει το NT3 διάλυμα εντελώς. Πετάμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε erpendorf 1.5ml.
5. Έκλυση DNA. Προσθέτουμε 15-30μl ρυθμιστικού διαλύματος NE και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Φυγοκεντρούμε για 1min στις 13.000rpm.

### 3.2.6 TA cloning και το σύστημα φορέων pGEM®-T Easy

Το TA cloning είναι μια τεχνική υπό-κλωνοποίησης που αποφεύγει τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και είναι ευκολότερη και ταχύτερη από την παραδοσιακή υπό-κλωνοποίηση. Η τεχνική στηρίζεται στην ικανότητα της αδενίνης (A) και της θυμίνης (T) –συμπληρωματικών βάσεων- διαφορετικών τμημάτων DNA να υβριδοποιούνται και παρουσία λιγάσης, να ενώνονται μεταξύ τους. Τα προϊόντα του PCR συνήθως ενισχύονται με τη χρήση *Taq* DNA πολυμεράσης η οποία προσθέτει κατά προτίμηση μία αδενίνη στο 3' άκρο του προϊόντος. Τέτοια ενισχυμένα με PCR τμήματα κλωνοποιούνται σε γραμμικούς φορείς που έχουν 3' συμπληρωματικά άκρα θυμίνης.

Η διαδικασία συμπεριλαμβάνει την προσθήκη αδεονικών και στα δύο 3' άκρα του προϊόντος του PCR (Πίνακας 3.5) και την προσθήκη θυμίνης και στα δύο 3' άκρα του φορέα που μας ενδιαφέρει, ο οποίος πρέπει να είναι γραμμικός. Συνήθως, χρησιμοποιούνται kits από εταιρείες που συμπεριλαμβάνουν μεγάλο εύρος φορέων που είναι ήδη έτοιμοι για TA cloning, που έχουν δηλαδή ήδη γίνει γραμμικοί με μια θυμίνη στο 3' ελεύθερο άκρο τους. Έναν τέτοιο φορέα χρησιμοποιήσαμε κι εμείς, τον pGEM®-T Easy φορέα της εταιρείας Promega. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αντίδραση λιγάσης του φορέα με το εισαγόμενο τμήμα DNA (Πίνακας 3.6) και ακολουθεί μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* DH5a και επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία LB agar/Kan<sup>R</sup>, επιστρωμένα με 100mM IPTG και 2% X-gal.

### 3.2.6.1 Χαρακτηριστικά του φορέα κλωνοποίησης pGEM®-T Easy

- *T-προεξοχές για εύκολη κλωνοποίηση του προϊόντος του PCR.* Οι pGEM®-T Easy φορείς είναι γραμμικοί φορείς κλωνοποίησης με μια θυμίνη στα 3' τελικά άκρα, και στα δύο άκρα. Οι T-προεξοχές στη θέση εισαγωγής βελτιώνουν σημαντικά την αποδοτικότητα της σύνδεσης με λιγάση των προϊόντων PCR, αποτρέποντας την επανένωση των άκρων του φορέα κλωνοποίησης και παρέχοντας μια συμβατή προεξοχή για προϊόντα PCR που έχουν προέλθει από μια θερμοσταθερή πολυμεράση.
- *Μπλε/Λευκή επιλογή των ανασυνδυασμένων.* Οι φορείς κλωνοποίησης pGEM®-T Easy είναι φορείς πολλών αντιγράφων που περιλαμβάνουν τους υποκινητές των T7 και SP6 πολυμερασών που πλαισιώνουν μια πολλαπλή περιοχή κλωνοποίησης μέσα στην περιοχή που κωδικοποιείται το α-πεπτίδιο του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Η εισαγωγή ενός τμήματος εκεί, απενεργοποιεί το α-πεπτίδιο και επιτρέπει την αναγνώριση των επιτυχώς ανασυνδυασμένων φορέων με τη διαλογή μπλε/λευκών αποικιών που εμφανίζονται σε τρυβλίο που ενδείκνυται από το kit.
- *Επιλογή περιοριστικών θέσεων για απόσπαση του εισαγομένου τμήματος.* Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy περιλαμβάνει πολυάριθμες θέσεις περιορισμού μέσα στην πολλαπλή περιοχή κλωνοποίησης. Αυτή πλαισιώνεται από περιοριστικές θέσεις για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI*, *BstZI* και *NotI*, παρέχοντας τρεις μονές ενζυμικές πέψεις για απόσπαση του εν λόγω

εισαγμένου τμήματος. Εναλλακτικά, μια διπλή πέψη μπορεί να απελευθερώνει το τμήμα αυτό από το φορέα κλωνοποίησης.

- *Γρήγορη πρόσδεση.* Στο kit pGEM®-T Easy Vector Systems συμπεριλαμβάνεται ένα 2x Rapid Ligation Buffer. Οι αντιδράσεις λιγάσης που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα μπορούν να επωαστούν για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ο χρόνος επώασης μπορεί να αυξηθεί για να αυξηθούν και οι αποικίες μετά από μετασχηματισμό. Γενικά, μια επώαση στους 4°C για όλο το βράδυ, παράγει το μέγιστο αριθμό των μετασχηματισμών.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (σε μl)	Συνθήκες
Προϊόν PCR (από gel extraction)	12	5 min στους 72 °C
dATP (5mM)	1	
MgCl <sub>2</sub>	1.5	
5x buffer C	5	
KAPA Taq DNA polymerase	0.5	
dH <sub>2</sub> O sterile	5	

**Πίνακας 3.5** Προσθήκη αδερινών (dATPs) στο προϊόν της PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (σε μl)	Συνθήκες
pGEM®-T Easy (50 ng/μl- Promega-kan <sup>R</sup> )	1	2 h σε θερμοκρασία δωματίου
Προϊόν PCR με dA-άκρα	3	
10x buffer λιγάσης (Takara)	1	
Λιγάση	1	
dH <sub>2</sub> O sterile	4	

**Πίνακας 3.6** Ligation TA

## 3.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

### 3.3.1 Πειραματική Διαδικασία

#### 3.3.1.1 Παρασκευή Δεκτικών Κυττάρων

Ο μετασχηματισμός είναι ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και ένα από τα συστήματα μεταφοράς γενετικού υλικού σε ζωντανά κύτταρα. Κατά το μετασχηματισμό, γίνεται εισαγωγή σε κύτταρα ξενιστές ανασυνδυασμένων μορίων DNA, συνήθως βακτηριακά, και πολλαπλασιάζονται εντός των κυττάρων δημιουργώντας ένα σημαντικό αριθμό αντιγράφων που φέρουν το κλωνοποιημένο τμήμα DNA. Κατά τον διπλασιασμό των κυττάρων ξενιστών, διαβιβάζονται και στην επόμενη γενιά αντίγραφα του ανασυνδυασμένου μορίου DNA. Μετά από πολλές διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις, δημιουργούνται κλώνοι κυττάρων τα οποία περιέχουν τουλάχιστον ένα μόριο ανασυνδυασμένου DNA το καθένα.

Οι κατάλληλοι βακτηριακοί ξενιστές για κλωνοποίηση περιλαμβάνουν τα στελέχη *E. coli* DH5a, διότι έχουν υψηλή απόδοση μετασχηματισμού και δε φέρουν το γονίδιο της T7 πολυμεράσης, εξαλείφοντας την πιθανότητα αστάθειας του πλασμιδίου εξαιτίας της παραγωγής πιθανών τοξικών προϊόντων.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων ήταν αυτό των Inoue *et al.*<sup>41</sup>, που χρησιμοποιεί σαν θρεπτικό υλικό διάλυμα S.O.B. (Πίνακας 3.7) και διάλυμα αναδιάλυσης TB (10mM PIPES, 15mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM KCl, 55mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6.7).

Η διαδικασία παρασκευής δεκτικών κυττάρων περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Διαλέγουμε μία αποικία (διαμέτρου 2-3 mm) από τρυβλίο που έχει επωαστεί για 16-20 h στους 37°C.
2. Εμβολιάζουμε την αποικία σε 25 ml θρεπτικού υλικού SOB σε κωνική φιάλη των 250 ml.
3. Επωάζουμε την καλλιέργεια για 6-8 h στους 37°C υπό ανάδευση (250-300 rpm).
4. 10 ml από την καλλιέργεια αυτή εμβολιάζονται σε 250 ml SOB και επωάζουμε τους 25°C μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει 0.55 στα 600 nm.
5. Όταν OD<sub>600nm</sub>=0.55, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε παγόνερο για 10min.

6. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 3900 rpm για 10 min σε φυγόκεντρο Sorvall στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου.
7. Αναδιάλυση των κυττάρων σε 80ml παγωμένου διαλύματος Inoue για μετασχηματισμό.
8. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 3900rpm για 10min σε φυγόκεντρο Sorvall στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου. Το ίζημα των κυττάρων πρέπει να είναι απολύτως στεγνό.
9. Αναδιάλυση των κυττάρων σε 20ml παγωμένου διαλύματος Inoue για μετασχηματισμό.
10. Προσθήκη 1.5 ml DMSO. Ήπια ανάδευση του βακτηριακού εναιωρήματος σε παγωμένα και αποστειρωμένα eppendorfs τα οποία βυθίζονται σε υγρό άζωτο, ώστε να καταψυχθούν.
11. Αποθήκευση κυττάρων στους -80°C.

### 3.3.1.2 Μετασχηματισμός Δεκτικών Κυττάρων *E. coli* DH5a

Σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a, τα βήματα μετασχηματισμού είναι τα ακόλουθα:

1. Σε 50 μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκε 1 μl του ανασυνδυασμένου, με το επιθυμητό γονίδιο, πλασμιδίου (σωλήνας 1).
2. Επώαση του σωλήνα 1 στον πάγο για 30 min. Σε αυτό το στάδιο το αρνητικά φορτισμένο DNA θα αλληλεπιδράσει με τους πόρους της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίοι έχουν επενδυθεί με τα θετικά φορτισμένα ιόντα.
3. Πρόκληση θερμικού σοκ (heat shock). Μεταφορά του σωλήνα 1 σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 42 °C για 90 sec. Το θερμικό σοκ συμβάλλει στην είσοδο του DNA εντός των κυττάρων.
4. Τοποθέτηση του σωλήνα 1 για 5 min σε παγόνερο.
5. Υπό ασηπτικές συνθήκες, πρόσθεση 250 μl SOC medium (Πίνακας 3.7) στο σωλήνα 1.
6. Επώαση στους 37°C για 50 min. Αυτό το στάδιο επιτρέπει την ανάκαμψη των κυττάρων από το κρύο. Αρχίζουν να μεγαλώνουν και να συνθέτουν πρωτεΐνες πριν την προσθήκη αντιβιοτικών.
7. Επίστρωση, σε τρυβλίο με LB agar (Πίνακας 3.7), 150 μl αντιβιοτικού αμπικιλλίνη (amp) συγκέντρωσης 100μg/ml. Αφήνω τα τρυβλία να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα τοποθετώ τα τρυβλία στους 37°C ανάποδα,

ώστε αν συμβεί συμπύκνωση υδρατμών, το νερό να συσσωρευτεί στο καπάκι και όχι στο άγαρ, προκειμένου να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις. Η επώαση γίνεται για 12-16 ώρες.

### 3.3.1.3 Αποθήκευση Μετασηματισμένων Κυττάρων

Κλώνοι κυττάρων μπορούν να διατηρηθούν ζωντανοί στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, κλίμακας ετών. Η διαδικασία που ακολουθείται για την αποθήκευση είναι η εξής:

1. Εμβολιάζουμε μια μονή αποικία από φρέσκο τρυβλίο σε 10 ml LB (Πίνακας 7) που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό.
2. Επωάζουμε την καλλιέργεια στους  $37^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση μέχρι η  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  να πάρει τιμή 0.8, δηλαδή να φτάσει η καλλιέργεια στη μέση λογαριθμική φάση ανάπτυξης.
3. Μεταφέρουμε σε σωλήνα erpendorf 900 μl καλλιέργειας και προσθέτουμε 100 μl διαλύματος γλυκερόλης 60%. Αναδεύουμε καλά με πιπετάρισμα. Ο ρόλος της γλυκερόλης είναι να προστατεύει τα κύτταρα από τη θραύση κατά την ψύξη.
4. Αν επιθυμούμε, καταψύχουμε τα κύτταρα σε υγρό άζωτο, και μεταφέρουμε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Θρεπτικό Υλικό	Σύσταση
<b>Super Optimal Broth (SOB medium)</b>	2% w/v tryptone 0.5% w/v yeast extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM $\text{MgCl}_2$ 10 mM $\text{MgSO}_4$
<b>S.O.C. medium</b>	2% tryptone 0.5% yeast extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM $\text{MgCl}_2$ 10 mM $\text{MgSO}_4$ 20 mM glucose
<b>LB agar</b>	10g/L Bacto-tryptone 5g/L yeast extract 10 g/L NaCl 15 g/L agar
<b>LB SIGMA</b>	10g/L Tryptone 5 g/L Yeast Extract 5 g/L NaCl

**Πίνακας 3.7** Θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και η σύστασή τους



### 3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το kit *NucleoSpin® Plasmid* της εταιρείας Macherey-Nagel.

#### 3.4.1 Αρχή της Μεθόδου

Με τη μέθοδο *NucleoSpin® Plasmid* τα βακτήρια που έχουν μετατραπεί σε ίζημα επαναδιαλύονται (Ρυθμιστικό διάλυμα A1) και το πλασμιδιακό DNA απελευθερώνεται από τα κύτταρα-ξενιστές *E. coli* με SDS/αλκαλική λύση (Ρυθμιστικό διάλυμα A2). Το ρυθμιστικό διάλυμα A3 ουδετεροποιεί το προκύπτον λύμα των κυττάρων και δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για την πρόσθεση του πλασμιδιακού DNA στη μεμβράνη σιλικόνης της στήλης καθαρισμού του *NucleoSpin® Plasmid* kit. Κατακρημνισμένες πρωτεΐνες, γενωμικό DNA και συντρίμματα κυττάρου ιζηματοποιούνται μετά από ένα βήμα φυγοκέντρησης. Το υπερκείμενο περνά από τη στήλη καθαρισμού του kit.

Με το *NucleoSpin® Plasmid* kit επιμείξεις όπως άλατα, μεταβολίτες και διαλυτά συστατικά μακρομόρια του κυττάρου αφαιρούνται με απλή πλύση με το αιθανολικό ρυθμιστικό διάλυμα A4. Καθαρό πλασμιδιακό DNA εκλύεται κάτω από συνθήκες χαμηλού ιονικού δυναμικού με το ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Αν χρησιμοποιούνται κλώνοι ξενιστών με υψηλά επίπεδα νουκλεασών, ένα επιπλέον βήμα ξεπλύματος ακολουθείται με προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα AW. Επιπλέον πλύσιμο με ρυθμιστικό AW θα αυξήσει επίσης το μήκος ανάγνωσης των αυτοματοποιημένων αντιδράσεων προσδιορισμού αλληλουχίας του DNA με φθορισμό.

#### 3.4.2 Πειραματική Διαδικασία

Η διαδικασία απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1. *Καλλιέργεια και συλλογή βακτηριακών κυττάρων.* Φυγοκέντρηση 2ml καλλιέργειας βακτηρίων στις 13.000rpm/30 min και απόρριψη υπερκειμένου.
2. *Λύση των κυττάρων.* Αναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων με προσθήκη 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος A1 και χρήση vortex. Πρόσθεση 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος A2 με ήπια ανάδευση του σωλήνα. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι το λύμα να φανεί διαυγές. Πρόσθεση 300μl ρυθμιστικού διαλύματος A3 και ήπια ανάδευση.

3. *Διάγεια λύματος*. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm/5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. «*Δέσιμο*» *DNA*. Το υπερκείμενο του βήματος 3 τοποθετείται σε στήλη *NucleoSpin® Plasmid* η οποία έχει τοποθετηθεί μέσα σε ένα σωλήνα συλλογής. Φυγοκέντρηση 13.000 rpm/1 min. Απόρριψη του flow-through.
5. *Ξέπλυμα μεμβράνης της στήλης*. Προσθήκη 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος A4. Φυγοκέντρηση 13.000 rpm/1 min. Απόρριψη του flow-through.
6. *Στέγνωμα μεμβράνης της στήλης*. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm/2 min και απόρριψη σωλήνα συλλογής.
7. *Έκλυση DNA*. Μεταφέρουμε τη στήλη σε σωληνάκι erpendorf 1.5 ml και προσθέτουμε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος AE. Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρηση 13.000 rpm/1 min.

## 3.5 Επαγωγή του συστήματος έκφρασης pET

### 3.5.1 Το σύστημα pET: περιγραφή και ιδιότητες

Το pET σύστημα είναι από τα ισχυρότερα συστήματα που έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων στο *E. coli*. Τα γονίδια-στόχοι υπό-κλωνοποιούνται σε pET πλασμίδια κάτω από τον έλεγχο των ισχυρών μεταγραφικά σημάτων του βακτηριοφάγου T7<sup>42</sup>. Η έκφραση επάγεται παρέχοντας μια πηγή T7 RNA πολυμεράσης στο κύτταρο-ξενιστή. Η T7 RNA πολυμεράση είναι τόσο επιλεκτική και δραστική, που όταν έχει ενεργοποιηθεί πλήρως, σχεδόν όλα τα αποθέματα του κυττάρου χρησιμοποιούνται για την έκφραση του γονιδίου-στόχου. Το επιθυμητό προϊόν μπορεί να περιλαμβάνει περισσότερο από το 50% του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου, μόλις μερικές ώρες μετά την επαγωγή.

Παρότι το σύστημα είναι ιδιαίτερα ισχυρό, υπάρχει η δυνατότητα εξασθένησης των επιπέδων έκφρασης ελαττώνοντας τα επίπεδα του επαγωγέα. Ελάττωση του επιπέδου έκφρασης μπορεί να ενισχύει την απόδοση έκφρασης ορισμένων πρωτεϊνών-στόχων.

Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα αυτού του συστήματος είναι η ικανότητά του να διατηρεί τα γονίδια-στόχους μεταγραφικά σιωπηρά πριν την επαγωγή. Τα γονίδια-στόχοι αρχικά κλωνοποιούνται σε ξενιστές που δεν περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης κι έτσι εξαλείφεται η πιθανότητα αστάθειας του πλασμιδίου εξαιτίας της παραγωγής δυνητικά τοξικών πρωτεϊνών για το κύτταρο-ξενιστή. Από τη στιγμή που το πλασμίδιο έχει σταθεροποιηθεί σε έναν μη εκφράζοντα ξενιστή (π.χ. κύτταρα DH5a) η έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης μπορεί να ξεκινήσει είτε μολύνοντας τον ξενιστή με έναν CE6 φάγο ο οποίος περιέχει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης, κάτω από τον έλεγχο των pL και pI υποκινητών, ή μεταφέροντας το πλασμίδιο σε έναν εκφράζοντα ξενιστή ο οποίος περιέχει ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης κάτω από τον έλεγχο του *lacUV5*.

## 3.5.2 Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της PB1 πρωτεΐνης

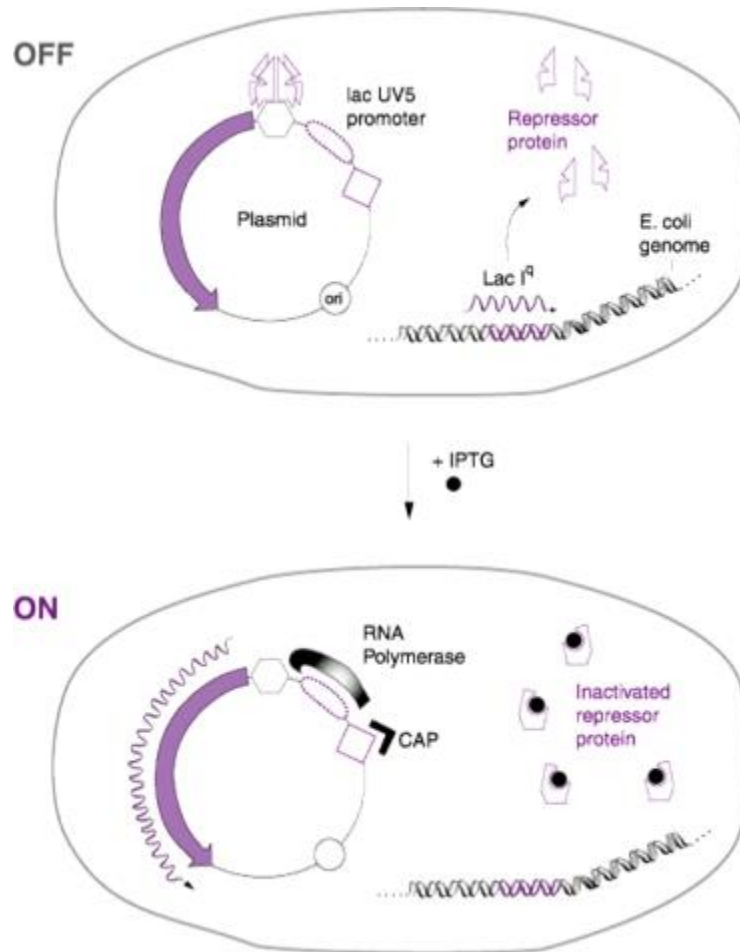
### 3.5.2.1 Επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου στόχου

Μετασηματισμός των κυττάρων BL21(DE3)-R3-RARE με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pET-30(b) θα οδηγήσει σε υπερ-έκφραση του γονιδίου-στόχου μόνο μετά από επαγωγή της T7 RNA πολυμεράσης. Η T7 RNA πολυμεράση είναι κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του *lacUV5* υποκινητή του *lac* οπερονίου. Όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό χωρίς λακτόζη, ο καταστολέας *lacI* είναι προσδεμένος στο χειριστή εμποδίζοντας τη μεταγραφή. Εάν στο θρεπτικό υλικό προσθέσω κάποιο ανάλογο της λακτόζης, όπως το IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), αυτό προσδένεται στον καταστολέα και έτσι επάγεται η μεταγραφή του *lac* οπερονίου και κατ' επέκταση της T7 RNA πολυμεράσης (Εικόνα 3.3).

Για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης PB1 μετασηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3)-R3-RARE με το πλασμιδιακό ανασυνδυασμένο DNA που απομονώθηκε από τους ξενιστές κλωνοποίησης. Το στέλεχος είναι ειδικό για την υπερ-έκφραση πρωτεϊνών. Διαθέτει γονίδιο για την παραγωγή της T7 RNA –πολυμεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5*, ενώ έχουν αδρανοποιηθεί τα γονίδια που εκφράζουν τις περιπλασμικές πρωτεάσες OmpT και Lon.<sup>43</sup> Τα μετασηματισμένα στελέχη επωάζονται overnight στους 37°C υπό ανάδευση, σε θρεπτικό LB με αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη και καναμυκίνη. Το επόμενο πρωί, μετράται η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600nm και η καλλιέργεια αραιώνεται έτσι ώστε η οπτική της πυκνότητα να είναι 0.1 ( $OD_{600nm}=0.1$ ). Η αραιώση γίνεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$OD_{600nm}(\text{pre-culture}) \times V_{(\text{pre-culture})} = OD_{600nm} (=0.1) \times V_{(\text{culture})}$$

Μετά την αραιώση της προ-καλλιέργειας, η καλλιέργεια επωάζεται μέχρις ότου η  $OD_{600nm}$  φτάσει την τιμή 0.4. Τότε, προστίθεται το IPTG 1mM και η καλλιέργεια επωάζεται overnight. Αρχικά, η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου που παράγει την πρωτεΐνη PB1 πραγματοποιήθηκε σε μικρούς όγκους καλλιέργειας (5 ml) και έπειτα σε 200 ml και 2L. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία της επαγωγής και να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή έκφραση της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής 18°C και 37°C.



**Εικόνα 3.3** Επαγωγή παραγωγής της πρωτεΐνης με IPTG- ο ρόλος του lacUV5 υποκινητή

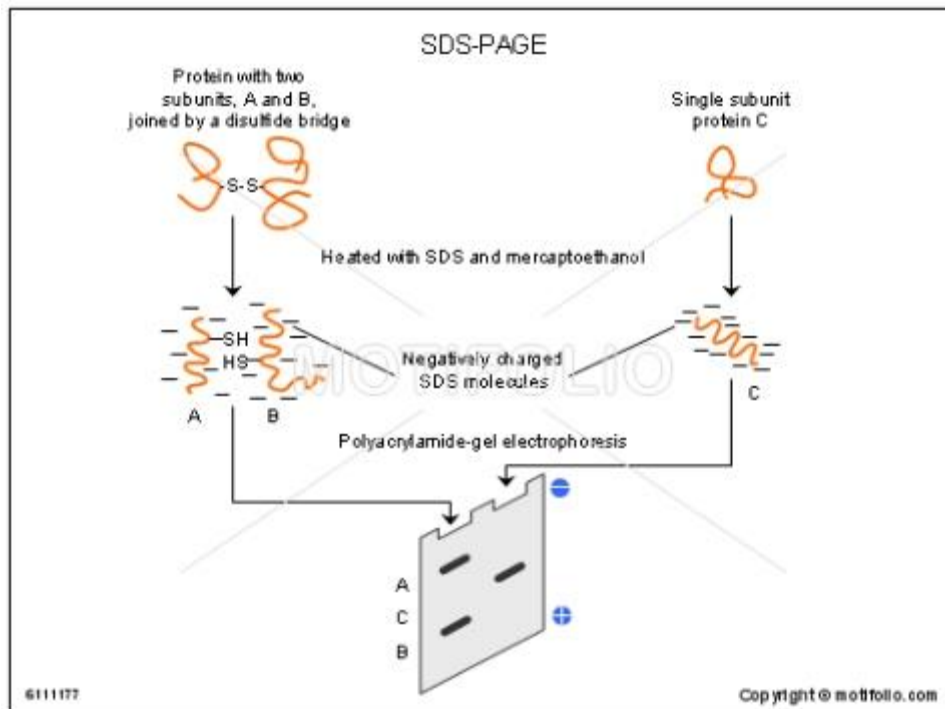
### 3.5.2.2 SDS-PAGE – Έλεγχος της επαγωγής του γονιδίου της PB1

Οι πρωτεΐνες έχουν συνήθως ένα καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο το οποίο, αντικατοπτρίζει το μίγμα των φορτισμένων αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται. Εάν εφαρμοσθεί ένα ηλεκτρικό πεδίο σε ένα διάλυμα που περιέχει ένα πρωτεϊνικό μόριο, αυτό θα κινηθεί με ρυθμό ο οποίος εξαρτάται από το φορτίο, το σχήμα και το μέγεθός του. Αυτή η τεχνική ονομάζεται ηλεκτροφόρηση και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μιγμάτων πρωτεϊνών που βρίσκονται είτε σε ένα υδατικό διάλυμα, είτε σε διαλύματα τα οποία συγκρατούνται σε ένα στερεό πορώδες υλικό.

Μια εκδοχή αυτής της μεθόδου ονομάζεται SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση που χρησιμοποιεί ένα πήκτωμα ακρυλαμίδης ως αδρανές υλικό μέσα στο οποίο διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες. Το πήκτωμα παρασκευάζεται, συνήθως ακριβώς πριν να

χρησιμοποιηθεί, από πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμίδης. Ο πολυμερισμός επάγεται από την παρουσία των ενώσεων TEMED (N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη) και APS (ammonium persulfate). Συγκεκριμένα, το TEMED καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS, οι οποίες στις συνέχεια προκαλούν τον πολυμερισμό. Σε χαμηλές τιμές pH καταστέλλεται η δράση του TEMED, οπότε χρησιμοποιείται η βιταμίνη ριβοφλαβίνη. Αύξηση της συγκέντρωσης του TEMED ή του APS οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας πολυμερισμού της ακρυλαμίδης. Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος μπορεί να προσαρμοσθεί έτσι ώστε να επιβραδύνεται η κίνηση των πρωτεϊνικών μορίων του ενδιαφέροντος. Οι πρωτεΐνες που πρόκειται να διαχωρισθούν βρίσκονται σε ένα διάλυμα το οποίο περιέχει ένα ισχυρά αρνητικά φορτισμένο αποδιατακτικό παράγοντα, το SDS (sodium dodecyl sulfate).

Λόγω του ότι το SDS προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνικών μορίων, προκαλεί την αποδιάταξη αυτών σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες και εξαλείφει τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες ή λιπίδια. Επιπρόσθετα, ένας αναγωγικός παράγοντας, όπως είναι η μερκαπτοαιθανόλη, χρησιμοποιείται για να σπάσει τους διαμοριακούς και ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, ξεπερνώντας έτσι κάποιες μορφές της τριτοταγούς αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και καταστρέφοντας την τεταρτοταγή δομή κάποιων. Κάθε πρωτεϊνικό μόριο προσδένει μεγάλο αριθμό αρνητικά φορτισμένων μορίων, με αποτέλεσμα να επικαλύπτεται το ενδογενές φορτίο της κάθε πρωτεΐνης και η κίνησή τους να γίνεται προς το θετικό ηλεκτρόδιο όταν εφαρμοσθεί τάση (Εικόνα 3.4). Πρωτεΐνες του ίδιου μεγέθους έχουν την τάση να συμπεριφέρονται πανομοιότυπα διότι, αφενός η δομή τους είναι εντελώς αποδιαταγμένη από το SDS με αποτέλεσμα το σχήμα τους να είναι ίδιο, αφετέρου προσδένουν την ίδια ποσότητα SDS οπότε φέρουν το ίδιο μέγεθος αρνητικού φορτίου.



**Εικόνα 3.4** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχής έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης PB1, γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE 15%, Πίνακας 3.8) των πρωτεϊνών που προκύπτουν από 1ml βακτηριακής καλλιέργειας που είχε υποβληθεί σε επαγωγή με IPTG, μετά από την εξής κατεργασία των κυττάρων:

1. Φυγοκέντρηση σε 13.000rpm/3min στους 4°C, ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα
2. Λύση των κυττάρων με:
  - Επαναδιάλυση των pellets σε 50ml Lysis Elution Wash Buffer (LEW: 50mM HEPES, 500mM NaCl, 5mM ιμιδαζόλιο, 5% γλυκερόλη, 0.1mM TCEP, 1mM PMSF [κατά τη χρήση του διαλύματος])
  - Σπάσιμο κυττάρων με χρήση υπερήχων για 30 λεπτά αφού προστέθηκε στο διάλυμα μισό χάπι αναστολέα πρωτεασών.
  - Φυγοκέντρηση σε 13.000rpm/40min στους 4°C.
  - Προσθήκη διαλύματος Laemmli 1x (10μl για 0.1 OD<sub>600nm</sub> της καλλιέργειας) από stock Laemmli Buffer 2x (4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125 M Tris-Cl, 10% beta-mercaptoethanol). Για την αραιώση του διαλύματος Laemmli 2x σε 1x, χρησιμοποιώ Laemmli Buffer 2x και dH<sub>2</sub>O σε αναλογία 1:1
  - Ισχυρή ανάδευση για 10min

- Επίδραση υπερήχων για 30min
- Θέρμανση στους 100°C για 3min

Running (15%)		Stacking (5%)	
Συστατικά	Ποσότητες για ένα πήκτωμα	Συστατικά	Ποσότητες για ένα πήκτωμα
dH <sub>2</sub> O	1.15 ml	dH <sub>2</sub> O	2.1 ml
Ακρυλαμίδη- bis ακρυλαμίδη (30:0,8%)	2.5 ml	Ακρυλαμίδη- bis ακρυλαμίδη (30:0,8%)	500 μl
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	1.25 ml	1 M Tris/HCl pH 6.8	380 μl
10% SDS	50 μl	10% SDS	30 μl
10% APS	50 μl	10% APS	30 μl
TEMED	3 μl	TEMED	3 μl

**Πίνακας 3.8** Συστατικά πηκτώματος SDS-PAGE 15%

## 3.6 Διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού της πρωτεΐνης PB1

### 3.6.1 Μεθολογική προσέγγιση

Η στρατηγική του καθαρισμού της υπέρ-εκφρασμένης πρωτεΐνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον εντοπισμό του υπέρ-εκφρασμένου πολυπεπτιδίου εντός του ξενιστή, καθώς αυτό μπορεί να μεταφερθεί στον περιπλασματικό χώρο ή να εκφραστεί σαν διαλυτό ή αδιάλυτο (έγκλειστα σωματίδια) πολυπεπίδιο μέσα στο κυτόπλασμα, και επιπρόσθετα από τα βιοχημικά και βιοφυσικά χαρακτηριστικά της. Σε κάθε περίπτωση η απομόνωση επιτυγχάνεται με διαφορετικό τρόπο. Όλες οι μέθοδοι απομόνωσης περιλαμβάνουν χρωματογραφικά στάδια προσαρμοσμένα στα διαφορετικά χαρακτηριστικά των καθοριζόμενων πρωτεϊνών.



### 3.6.2 Διαφορική κλασμάτωση με τη χρήση θειικού αμμωνίου

Για να επιτευχθεί η κατακρήμνιση μιας διαλυτής πρωτεΐνης, είναι απαραίτητο να μειωθούν οι υδρογονικοί δεσμοί που σχηματίζει με το νερό. Η προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης αλάτων απομακρύνει τα μόρια του νερού από τις πρωτεΐνες και με αυτόν τον τρόπο μειώνεται ο αριθμός των υδρογονικών δεσμών και αυξάνεται η τάση της πρωτεΐνης για κατακρήμνιση. Η διαδικασία salting out («εξαλάτωση») λαμβάνει χώρα σε υψηλή συγκέντρωση άλατος. Το άλας συναγωνίζεται με τις πολικές πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών για το ζευγάρι με τα μόρια του νερού, ενώ ταυτόχρονα μειώνει τον αποτελεσματικό όγκο του διαλύτη. Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών ποικίλλει ανάλογα με την ιονική ισχύ του διαλύματος, και επιπλέον εξαρτάται από την συγκέντρωση του άλατος. Δύο ξεχωριστά φαινόμενα λαμβάνουν χώρα: σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος, η διαλυτότητα των πρωτεϊνών αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του άλατος, ένα φαινόμενο που καλείται salting in. Όσο η συγκέντρωση του άλατος, δηλαδή η ιονική ισχύς, αυξάνεται περαιτέρω, η διαλυτότητα των πρωτεϊνών σταδιακά μειώνεται. Σε ικανή και υψηλή ιονική ισχύ, η πρωτεΐνη θα κατακρημνιστεί.

Η διαφορική κλασμάτωση με θειικό αμμώνιο είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για μερικό καθαρισμό πρωτεϊνών. Στο διάλυμα, ένας μεγάλος αριθμός μορίων νερού αλληλοεπιδρούν με το θειικό ανιόν μειώνοντας την διαθεσιμότητα του νερού για αλληλεπίδραση με πρωτεϊνικά μόρια. Σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση θειικού αμμωνίου, η ποσότητα των μορίων νερού που δεν έχουν προσδεθεί στο θειικό ανιόν, δεν είναι ικανή να διατηρήσει την πρωτεΐνη σε διαλυτή κατάσταση με αποτέλεσμα αυτή να κατακρημνίζεται<sup>44</sup>.

### 3.6.3 Χρωματικός καθαρισμός της PB1

Η χρωματογραφία βασίζεται στην κατανομή των προς διαχωρισμό ουσιών εντός δύο φάσεων, όπου η μία φάση διατηρείται ακίνητη (στατική φάση), ενώ η δεύτερη βρίσκεται υπό συνεχή ροή (κινητή φάση). Το προς διαχωρισμό μίγμα εισάγεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης στη στατική φάση. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της

κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά διαχωρίζονται. Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρή ή αέρια) ή της στατικής (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα), ως προς το μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός (προσρόφηση, ιοντοανταλλαγή, κατανομή, μέγεθος μορίων) και ως προς το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση (στήλη, λεπτή στοιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα, χαρτί).

Για τον καθαρισμό της PB1 χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται κολώνα TALON και ηπαρίνης, που έχουν αρνητικό φορτίο, εφόσον υποθέτουμε ότι η υπό μελέτη πρωτεΐνη προσδένεται στο DNA, που επίσης φέρει αρνητικό φορτίο.

Η χρωματογραφία συγγένειας βασίζεται στην ικανότητα βιολογικών μορίων να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αναστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένα μόρια συνδέτες. Αν κάποιος συνδέτης ακινητοποιηθεί σε κατάλληλο πολυμερές στερεό υλικό τότε προκύπτει ο προσροφητής συγγένειας. Όταν ένα δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη στήλη που φέρει τον προσροφητή, τότε μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον συνδέτη θα συγκρατηθεί στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν. Στη συνέχεια, το προσροφημένο μακρομόριο εκλύεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις αναγνώρισης με τον συνδέτη. Η μέθοδος μπορεί να διακριθεί σε πέντε στάδια:

- **Εξισορρόπηση:** καθορίζεται το pH και η ιονική δύναμη της στήλης, έτσι ώστε να επιτρέπεται η πρόσδεση των επιθυμητών μορίων.
- **Πρόσδεση των μορίων του δείγματος:** το δείγμα φορτώνεται στην στήλη υπό συνθήκες οι οποίες ευνοούν την ειδική πρόσδεση του μορίου στόχου σε ένα συμπληρωματικό υπόστρωμα (συνδέτης). Τα μόρια στόχοι προσδένονται ειδικά αλλά αντιστρεπτά στον συνδέτη και τα ανεπιθύμητα μόρια απομακρύνονται.
- **Έκλυση:** τα μόρια εκλύονται από τη στήλη αυξάνοντας την ιονική δύναμη ή μεταβάλλοντας το pH του διαλύματος έκλυσης. Η αλλαγή των συνθηκών έκλυσης μπορεί να γίνεται σταδιακά ή απότομα.
- **Τέλος της έκλυσης.**
- **Αναγέννηση:** γίνεται επανεξισορρόπηση της στήλης στις αρχικές συνθήκες.

### 3.6.4 Πειραματική προσέγγιση

Μετά την επαγωγή της υπερπαραγωγής της πρωτεΐνης σε καλλιέργεια 2L, έγινε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε ψυχόμενη φυγόκεντρο τύπου Sorvall στους 4°C σε 13.000rpm/15min. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου η λύση των κυττάρων γίνεται ως εξής:

1. Αναδιάλυση των κυττάρων στο διάλυμα λύσης LEW (50mM HEPES, 500mM NaCl, 5mM ιμιδαζόλιο, 5% γλυκερόλη, 0.1mM TCEP, 1mM PMSF [κατά τη χρήση του διαλύματος])
2. Σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους για 30min μετά από μερική ανάδευση (Τα κύτταρα πάντα σε θερμοκρασία 4°C, επωασμένα σε παγόνερο)

Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος σε 13.000rpm/40min στους 4°C. Το ίζημα που προκύπτει περιέχει θραύσματα μεμβρανών, υπολείμματα οργανιδίων, κυτταρικό σκελετό, το μεγαλύτερο τμήμα του χρωμοσωμικού DNA, ενώ το υπερκείμενο (διαλυτό κλάσμα) περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες, θραύσματα DNA, RNA, μικρά μόρια, ριβοσώματα, κ.ά.

#### 3.6.4.1 Διαφορική κλασμάτωση της πρωτεΐνης PB1 με χρήση θειικού αμμωνίου

Η προσθήκη του θειικού αμμωνίου γίνεται στο υπερκείμενο που συλλέχθηκε μετά τη λύση των κυττάρων, του οποίου χρειάζεται να μετρηθεί ο όγκος γιατί το θειικό αμμώνιο που προστίθεται εξαρτάται από τον όγκο του υπερκείμενου. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση θειικού στην οποία κατακρημνίζεται η κάθε πρωτεΐνη είναι διαφορετική, η διαδικασία κατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε δύο φορές, αυξάνοντας κάθε φορά το βαθμό κορεσμού του διαλύματος σε θειικό αμμώνιο, ως εξής: 0-60%, και 60-80% κορεσμός. Η προσθήκη του θειικού αμμωνίου που προστίθεται δίνεται από πίνακα (Εικόνα 3.5), διότι το θειικό αμμώνιο μεταβάλλει τον όγκο του διαλύματος στο οποίο προστίθεται. Τα διαλύματα φυγοκεντρώνται για 15min στις 14.000rpm, στους 4°C. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση κρατάμε 1ml από κάθε υπερκείμενο και ίζημα.

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C

		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																			
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697			0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662			5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627			10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592			15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557			20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522			25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488			30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453			35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418			40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383			45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348			50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313			55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279			60
									0	31	63	97	132	168	205	244			65
										0	32	65	99	134	171	209			70
											0	32	66	101	137	174			75
												0	33	67	103	139			80
													0	34	68	105			85
														0	34	70			90
															0	35			95
																0			100

**Εικόνα 3.5** Ποσότητα θειικού αμμωνίου που πρέπει να προστεθούν σε ένα λίτρο διαλύματος ανάλογα με το ποσοστό κορεσμού του θειικού αμμωνίου

### 3.6.4.2 Κατακρήμνιση της πρωτεΐνης PB1 με τριχλωρικό οξύ

Η καθίζηση των πρωτεϊνών με τη χρήση τριχλωροξικού οξέος στηρίζεται στη μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις τριχλωροξικού οξέος, τα αρνητικά φορτισμένα τριχλωροξικά ιόντα προκαλούν τη μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών διαταράσσοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν τη φυσική τους διαμόρφωση. Η μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση μη πολικών επιφανειών, το οποίο οδηγεί στην ενδομοριακή συνένωση των πρωτεϊνών και συνεπώς την κατακρήμνισή τους. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι η μερική αποδιάταξη που προκαλείται από το τριχλωροξικό οξύ είναι αντιστρεπτή διαδικασία.

Η κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA) πραγματοποιήθηκε στα υπερκείμενα και τα ιζήματα που είχαν φυλαχθεί από τη διαδικασία κατακρήμνισης με θειικό αμμώνιο. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιημένο σε LEW Buffer ίζημα προστίθεται τόση ποσότητα TCA

50%, ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 10%. Η ποσότητα δίνεται από τον τύπο:

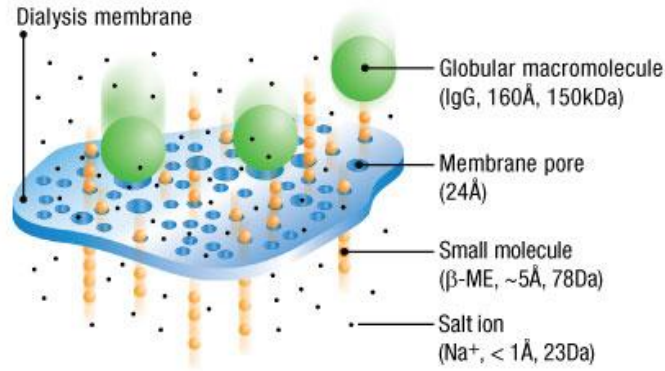
$$50\% \times V_{TCA} = (V_{\text{διαλύματος}} + V_{TCA}) \times 10\%$$

Η κατακρήμνιση γίνεται ως εξής:

1. Σε μια ποσότητα από το κάθε δείγμα προστίθεται το TCA που του αναλογεί με βάση τον παραπάνω τύπο και το διάλυμα αφήνεται για 15min στους 4°C.
2. Φυγοκέντρωση 14.000rpm/15min στους 4°C. Απόρριψη υπερκλειμένου.
3. Ξέπλυμα του ίζηματος με 1ml παγωμένης ακετόνης και φυγοκέντρωση 14.000rpm/15min στους 4°C. Απόρριψη υπερκλειμένου. (το βήμα αυτό γίνεται δύο φορές)
4. Αφού αφαιρεθεί η ακετόνη, αφήνω το ίζημα να στεγνώσει τελείως και προσθέτω Laemmli Buffer 1x.

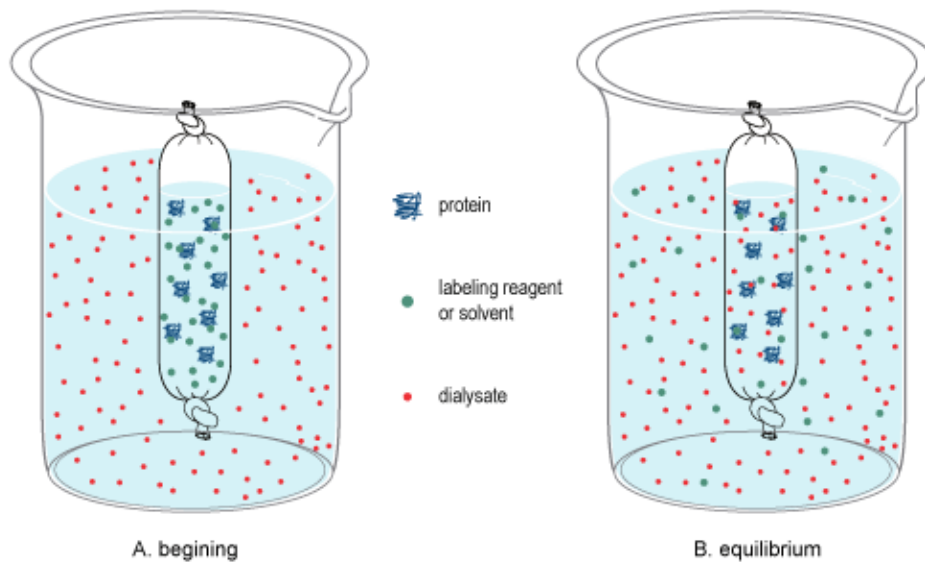
### 3.6.4.3 Εξισορρόπηση διαλυμάτων μέσω διαπίδυσης

Η μέθοδος διαπίδυσης είναι μια κλασική εργαστηριακή τεχνική που βασίζεται στην εκλεκτική διάχυση μορίων σε μια ημιπερατή μεμβράνη για τον διαχωρισμό των μορίων με βάση το μέγεθος. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για μια ευρεία ποικιλία εφαρμογών: αφαλάτωση, ανταλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος, απομάκρυνση των αντιδραστηρίων σήμανσης, μελέτες δέσμευσης φαρμάκων, ανάπτυξη και τροφοδότηση των κυττάρων, καθαρισμός των ιών και θεραπεία αίματος. Τυπικά, ένα δείγμα και ένα ρυθμιστικό διάλυμα (που ονομάζεται προϊόν διαπίδυσης) τοποθετούνται σε αντίθετες πλευρές μίας μεμβράνης διαπίδυσης που περιέχει πόρους μεγέθους φάσματος. Τα μόρια δείγματος που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους διατηρούνται στην πλευρά του δείγματος της μεμβράνης, αλλά μικρά μόρια περνούν μέσω της μεμβράνης μειώνοντας τη συγκέντρωση αυτών των μορίων στο δείγμα (Εικόνα 3.6). Εναλλακτικά, τα επιθυμητά συστατικά στο εξωτερικό ρυθμιστικό διάλυμα μπορούν αργά να εισάγονται στο δείγμα.



**Εικόνα 3.6** Μόρια δείγματος διαπερνούν την ημιπερατή μεμβράνη εάν το μέγεθος τους επιτρέπει.

Το χαρακτηριστικό διαχωρισμού που προσδιορίζεται από το εύρος μεγέθους πόρου μιας μεμβράνης διαπίδυσης αναφέρεται συχνότερα ως η αποκοπή μοριακού βάρους (MWCO) της μεμβράνης. Παραδοσιακά, το MWCO της μεμβράνης αναφέρεται στη μικρότερη μέση μοριακή μάζα ενός τυποποιημένου μορίου που δεν θα διαχέεται αποτελεσματικά στην μεμβράνη. Τυπικά, το σφαιρικό μακρομόριο μικρότερου μεγέθους (σε Daltons) που συγκρατείται κατά περισσότερο από 90% μετά από παρατεταμένη διαπίδυση (ολονύκτια) ορίζει το ονομαστικό MWCO. Έτσι, μια μεμβράνη διαπίδυσης με 10K MWCO θα διατηρήσει γενικά πρωτεΐνες που έχουν μοριακή μάζα τουλάχιστον 10 kDa.<sup>45</sup>



**Εικόνα 3.7** Αναπαράσταση εξισορρόπησης διαλυμάτων μέσω διαπίδυσης

### 3.6.4.4 Καθαρισμός της πρωτεΐνης PB1 με χρωματογραφία συγγένειας

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης PB1 χρησιμοποιώντας τη στήλη **TALON® Metal Affinity**, των 10 ml, που είναι ρητίνη με προσδεμένο κοβάλτιο που χρησιμοποιείται σε χρωματογραφία συγγένειας με ακινητοποιημένο μέταλλο και συγκρατεί ειδικά τις His-tagged πρωτεΐνες, σε κλάσματα των 5 ml με βαθμιδωτή συγκέντρωση ιμιδαζολίου σε συγκεντρώσεις 50, 150 και 250 mM. Οι His-tagged πρωτεΐνες φέρουν είτε στο άμινο- είτε στο καρβόξυ -τελικό άκρο μια σειρά από 6 τουλάχιστον μόρια ιστιδίνης τα οποία αλληλεπιδρούν με το «ακινητοποιημένο» στη ρητίνη κοβάλτιο και τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας, έγινε ως εξής:

- **Εξισορρόπηση (equilibration)** της στήλης στις κατάλληλες συνθήκες pH με το διάλυμα εξισορρόπησης ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ο όγκος του διαλύματος εξισορρόπησης ισούται με 5 φορές τον όγκο της στήλης.
- **Φόρτωση του δείγματος.** Το δείγμα πρέπει να βρίσκεται σε διάλυμα συνθηκών που να επιτρέπουν τη δέσμευση της επιθυμητής πρωτεΐνης στο υλικό της στήλης, δηλαδή σε συνθήκες όμοιες με του διαλύματος εξισορρόπησης. Στο στάδιο αυτό οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του δείγματος διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και τις συλλέγουμε στο κλάσμα flow-through.
- **Έκπλυση (washing)**
- **Έκλυση (elution)** της πρωτεΐνης PB1 από τη στήλη με χρήση διαλύματος με διαβαθμισμένη συγκέντρωση ιμιδαζολίου.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 15% SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και έλεγχος του κλάσματος στο οποίο πήραμε την πρωτεΐνη-στόχο.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα βήματα του καθαρισμού της πρωτεΐνης συμπεριλαμβάνονται στον Πίνακα 3.9.

Διάλυμα	
Εξισορρόπηση	50mM HEPES, 500mM NaCl, 5mM ιμιδαζόλιο, 5% γλυκερόλη
Έκλουση	50mM HEPES, 500mM NaCl, 50-250mM ιμιδαζόλιο, 5% γλυκερόλη

**Πίνακας 3.9** Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην χρωματογραφία συγγένειας με χρήση της κολώνας **TALON®** Metal Affinity Resins

Στη συνέχεια ακολούθησε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης PB1 χρησιμοποιώντας τη στήλη **HiTrap™ Heparin HP, 5 ml**. Έγινε επανάληψη των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την κολώνα **TALON®** Metal Affinity Resins με διαφορετικά διαλύματα (Πίνακας 3.10) και έκλουση στήλη με χρήση διαλύματος με γραμμικά διαβαθμισμένη αύξηση άλατος (gradient).

Διάλυμα	
Εξισορρόπηση	20mM Na-phosphate buffer pH 8.0, 1mM EDTA (P <sub>20</sub> E <sub>1</sub> pH 8.0)
Έκλουση	20mM Na-P buffer pH 8.0 0-300mM gradient NaCl, 1mM EDTA

**Πίνακας 3.9** Συνθήκες χρωματογραφίας συγγένειας με τη χρήση της στήλης **HiTrap™ Heparin HP, 5 ml**

### 3.6.4.5 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης PB1

Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης PB1 μέσω χρωματογραφίας συγγένειας, κάναμε ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με Brij 35 (Διάλυμα Brij35: 1μl Brij 35 σε 10 ml dH<sub>2</sub>O) σε συμπυκνωμένη πρωτεΐνη.

Η συμπύκνωση έγινε με χρήση του Aquicide II, που είναι άλας νατρίου της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης. Έχει εξαιρετικά υψηλό ιξώδες. Περιέχει κατά μέσο όρο 0,85 καρβοξυμεθυλομάδες ανά μονάδα ανυδρογλυκόζης. Τα Aquacides είναι χρήσιμα για τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία απομάκρυνση του νερού από το σωλήνα διαπίδυσης



χρησιμοποιώντας είτε ένα σιρόπι 2% ή το Aquacide στερεό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε στερεό Aquicide II. Τα Aquacides δεν προκαλούν ούτε μετουσίωση πρωτεϊνών, ούτε αλλάζουν το pH κατά τη διάρκεια της συγκέντρωσης. Σε θερμοκρασία δωματίου, 1 g του Aquacide απορροφά περίπου 5 ml νερού από το διάλυμα σε 1 ώρα. Έπειτα, η μεμβράνη διαπίδωσης επώαστηκε overnight σε dialysis buffer (P<sub>20</sub>E<sub>1</sub> pH 8.0) για περαιτέρω συμπύκνωση της πρωτεΐνης, στους 4 °C.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν κατά το πρωτόκολλο του Brij 35 ήταν τα εξής:

Φωτομέτρηση στα 205nm των παρακάτω:

- 1μl συμπυκνωμένης πρωτεΐνης PB1 + 999μl διαλύματος Brij35 (Αραίωση 1:1000)
- 5μl συμπυκνωμένης πρωτεΐνης PB1+ 995μl διαλύματος Brij35 (Αραίωση 1:200)
- 10μl συμπυκνωμένης πρωτεΐνης PB1 + 990μl διαλύματος Brij35 (Αραίωση 1:100)

Με βάση το νόμο των Lambert-Beer,

$$C \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{205}}{31 \times l},$$

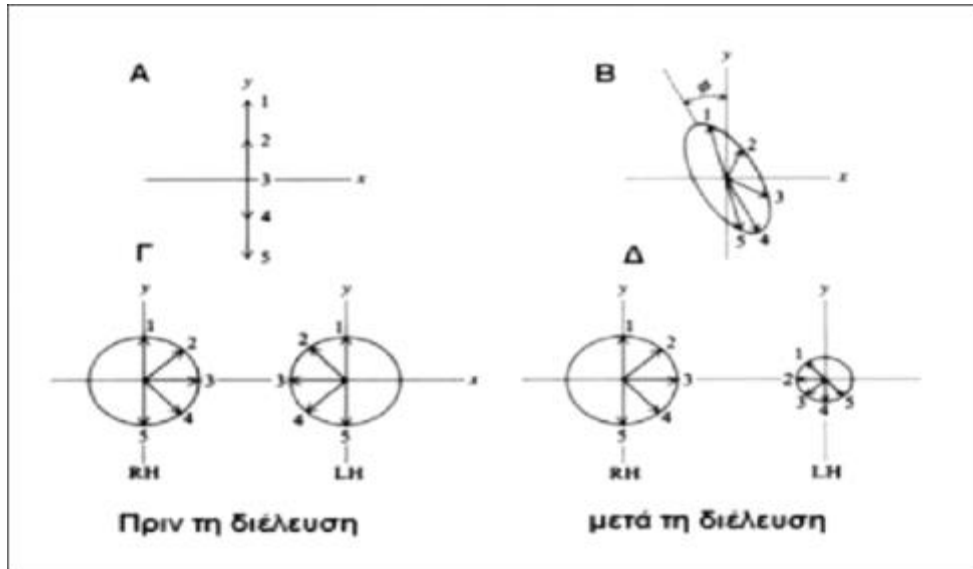
όπου l=αραίωση, οπότε μπορούμε να κάνουμε ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης, υπολογίζοντας τη συγκέντρωσή της.

## 3.7 Βιοχημικός και βιοφυσικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης PB1 και δομική ανάλυση της

### 3.7.1 Μελέτη της πρωτεΐνης PB1 με Φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού (Circular Dichroism, CD spectroscopy)

Με την τεχνική της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού μετράμε την επαγόμενη ελλειπτικότητα στην πόλωση γραμμικά πολωμένου φωτός όταν αυτό διέρχεται από μία οπτικά ενεργό ουσία. Ως οπτικά ενεργές ουσίες χαρακτηρίζονται οι ουσίες που παρουσιάζουν τις εξής τέσσερις χαρακτηριστικές ιδιότητες αλληλεπίδρασης με το φως: (1) ισχύ οπτικής στρέψης (optical rotator power), στρέφουν δηλαδή το επίπεδο πόλωσης γραμμικά πολωμένου φωτός που διέρχεται μέσω αυτών, (2) κυκλική διπλοθλαστικότητα (circular birefringence), παρουσιάζουν δηλαδή διαφορετικό δείκτη διάθλασης για αριστερόστροφα και δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένο φως, (3) κυκλικό διχρωισμό (circular dichroism), την αλλαγή δηλαδή της πόλωσης από γραμμική σε ελλειπτική όταν γραμμικά πολωμένο φως διέρχεται μέσω αυτών και (4) παρουσιάζουν διαφορετικό συντελεστή απορρόφησης για δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως.

Η στρέψη του επιπέδου πόλωσης γραμμικά πολωμένου φωτός είναι συνέπεια της κυκλικής διπλοθλαστικότητας και ο κυκλικός διχρωισμός είναι συνέπεια της διαφοράς των συντελεστών απορρόφησης για αντίθετης φοράς κυκλικά πολωμένο φως. Οι τέσσερις παραπάνω ιδιότητες ανάγονται σε δύο, με τις (1) και (2) να αφορούν στη διάθλαση και τις (3) και (4) να αφορούν στην απορρόφηση κυκλικά πολωμένου φωτός. Γνωρίζουμε από τη βασική θεωρία του ηλεκτρομαγνητισμού ότι η διάθλαση συνδέεται με την απορρόφηση, καθώς ισχυρότερη απορρόφηση συνεπάγεται ισχυρότερη διάθλαση. Με τον τρόπο αυτό, όποτε παρουσιάζεται ισχύς οπτικής στρέψης παρουσιάζεται και κυκλικός διχρωισμός. Αυστηρά λοιπόν μιλώντας, ακόμα και σε περιοχές όπου το υλικό είναι διαφανές, θα πρέπει να αναφερόμαστε σε στρέψη του μεγάλου ημιάξονα της έλλειψης παρά σε στέψη του επιπέδου πόλωσης. Με την τεχνική φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού μετράται η ελλειπτικότητα  $\theta$  στην πόλωση που προκαλεί μία οπτικά ενεργός ουσία σε γραμμικά πολωμένο φως, σαν συνάρτηση του μήκους κύματος  $\lambda$ .



**Εικόνα 3.8** Διανυσματική αναπαράσταση του ηλεκτρικού πεδίου στη διεύθυνση διάδοσης ακτινοβολίας για την περίπτωση ύπαρξης απορρόφησης οπτικά ενεργού ουσίας σε προσπίπτον γραμμικά πολωμένο φως. Οι θέσεις 1 έως 5 αντιστοιχούν σε ίσα χρονικά διαστήματα. (Α) Προσπίπτον γραμμικά πολωμένο φως. (Β) Εξερχόμενο ελλειπτικά πολωμένο φως με τον μεγάλο ημιάξονα της έλλειψης στραμμένο κατά γωνία  $\phi$  ως προς το αρχικό επίπεδο πόλωσης. (Γ) Ανάλυση γραμμικά πολωμένου φωτός σε δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες με αντίθετη φορά πόλωσης. (Δ) Η επίδραση της οπτικά ενεργού ουσίας στις κυκλικά πολωμένες συνιστώσες αντίθετης φοράς πόλωσης. Το άθροισμα των συνιστωσών του Δ δίνει το Β.

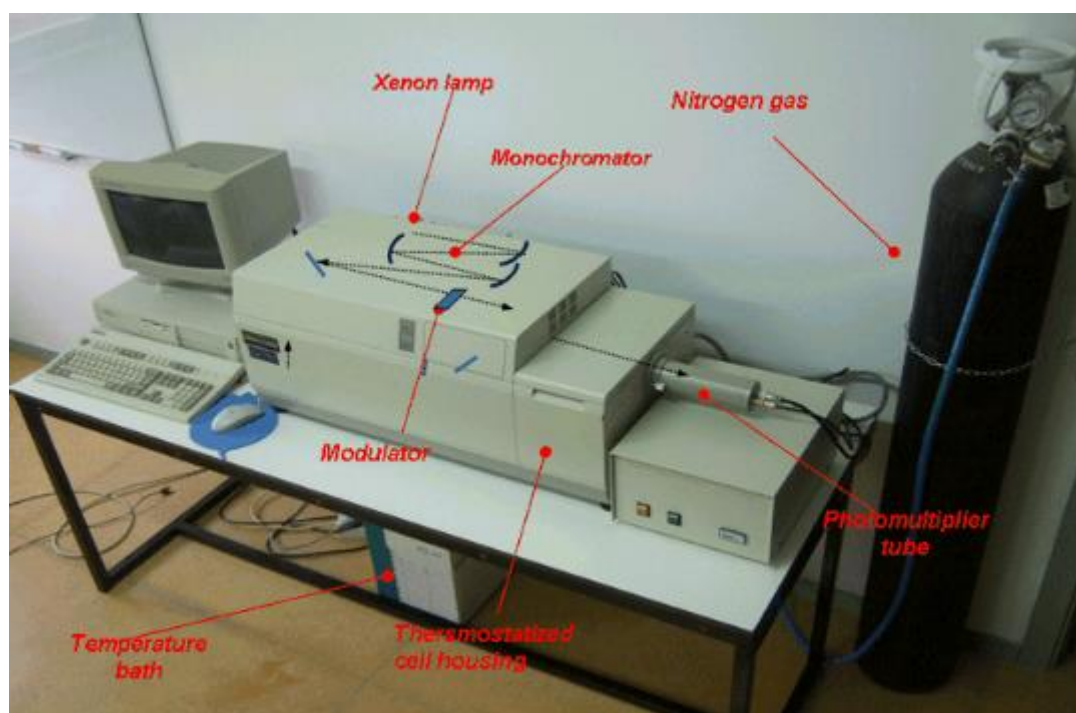
Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην ισοδυναμία που εκφράζουν τα διαγράμματα της εικόνας 3.8B και 3.8Δ. Γραμμικά πολωμένες δέσμες φωτός με δεξιόστροφες και αριστερόστροφες συνιστώσες της ίδιας αρχικής έντασης  $I_0$  διέρχονται από την κυψελίδα που περιέχει το υπό μελέτη δείγμα. Από τις τελικές τιμές έντασης  $I_L$  και  $I_R$  της εξερχόμενης ακτινοβολίας υπολογίζεται η διαφορά των απορροφήσεων  $A_r$  και  $A_i$  και βάσει αυτής της διαφοράς υπολογίζεται τελικά η ελλειπτικότητα  $\theta$  (σε μοίρες):  $\theta = 2.303(A_i - A_r)180/4\pi$ .

Σχεδόν όλα τα βιολογικά μόρια είναι οπτικά ενεργά μόρια. Επειδή τα επιμέρους δομικά συστατικά των βιομορίων απορροφούν ακτινοβολία σε διαφορετικές περιοχές μήκους κύματος, η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού δίνει τη δυνατότητα, ανάλογα με την περιοχή κύματος, να διακρίνουμε διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά ενός μορίου σε διάλυμα. Το σήμα κυκλικού διχρωισμού σε αυτές τις περιοχές μήκους κύματος είναι μη μηδενικό, μόνο όταν το άμεσο περιβάλλον των οπτικά ενεργών μορίων είναι μη συμμετρικό, γιατί μόνο τότε το ηλεκτρονιακό νέφος των

απεντοπισμένων ηλεκτρονίων των αρωματικών δακτυλίων συστρέφεται και σχηματίζει μία «ελικοειδή» διάταξη.

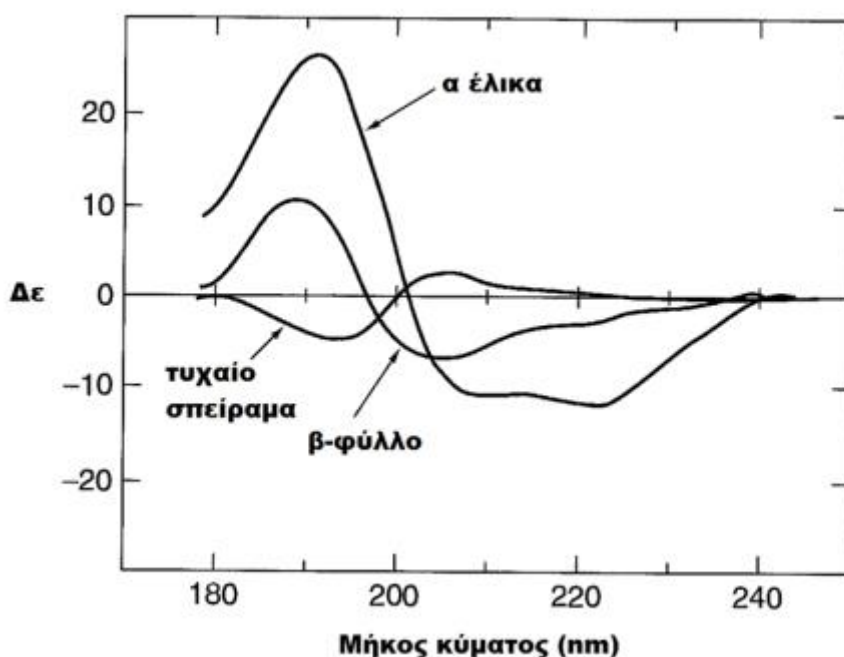
Η πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι το φασματοπολωσίμετρο JASCO- 715 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) (Εικόνα 3.9) με λειτουργικό εύρος μήκους κύματος στην περιοχή του ορατού (VIS) και του υπεριώδους (UV) ( $\lambda_{\min}=170\text{nm}$ ). Η φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού είναι μία τεχνική που μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στα ακόλουθα πεδία μελέτης:

- Στο να διαπιστώσει κανείς αν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην αναδιπλωμένη της μορφή, να προσδιορίσει την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της και να την κατατάξει στην κατάλληλη δομική οικογένεια.
- Στη σύγκριση των δομών πρωτεϊνών που προέκυψαν από διαφορετικές πηγές, ή δομών της ίδιας πρωτεΐνης κάτω από διαφορετικές συνθήκες διαλύτη ή θερμοκρασίας ή ακόμα και μεταβολές στη δομή που προκαλούνται από μεταλλαγές
- Στη μελέτη του κατά πόσο αλληλεπιδράσεις τύπου πρωτεΐνης–πρωτεΐνης μεταβάλλουν τη δομή των αλληλοεπιδρώντων μορίων.



Εικόνα 3.9 Φασματοπολωσίμετρο κυκλικού διχρωισμού JASCO-715

Είναι χαρακτηριστικό ότι η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοπολωσιμετρία κυκλικού διχρωισμού στη περιοχή του άπω υπεριώδους (190-250nm). Στη περιοχή αυτή η χρωμοφόρος ομάδα είναι ο πεπτιδικός δεσμός και εμφανίζει μη μηδενικό σήμα όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στην αναδιπλωμένη δομή. Οι δομές α-έλικας, β-φύλλου και τυχαίου σπειράματος αποδίδουν ένα χαρακτηριστικό σε σχήμα και ένταση φάσμα κυκλικού διχρωισμού (Εικόνα 3.10). Ακριβέστερα, η α-έλικα παρουσιάζει δυο αρνητικές κορυφές στα 208 και 222nm και μια θετική στα 193nm και η β-πτυχωτή επιφάνεια παρουσιάζει μια ευρεία αρνητική κορυφή στα 218nm και μια θετική στα 195nm. Όπως και οι υπόλοιπες φασματοσκοπικές τεχνικές, τα σήματα του κυκλικού διχρωισμού απεικονίζουν τον μέσο όρο ολόκληρου του πρωτεϊνικού πληθυσμού. Για το λόγο αυτό, ενώ μπορεί κανείς να υπολογίσει ότι, π.χ., το 50% των αμινοξικών καταλοίπων μίας πρωτεΐνης συμμετέχουν στον σχηματισμό κάποιας α-έλικας, δεν μπορεί να προσδιορίσει ποια ακριβώς είναι τα κατάλοιπα αυτά.



**Εικόνα 3.10** Ιδανικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού της α-έλικας, του β-πτυχωτού φύλλου και του τυχαίου σπειράματος.

Στα πειράματα CD που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία διαφανής στο εύρος 190- 350nm με οπτική διαδρομή 1cm για μετρήσεις στη περιοχή του εγγύς υπεριώδους και 1nm για μετρήσεις στη περιοχή του άπω υπεριώδους. Η χρήση ψυκτικού συστήματος 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.

Ένα πείραμα κυκλικού διχρωισμού απαιτεί περίπου 200μl πρωτεϊνικού διαλύματος σε συγκεντρώσεις από 50μg/ml έως και 1mg/ml, ανάλογα με την πρωτεΐνη, με διαλύτη οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα που δεν εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή αυτή (υψηλές συγκεντρώσεις DTT, ιμιδαζολίου ή ιστιδίνης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περιοχή του άπω υπεριώδους).

Οποιοδήποτε πρωτεϊνικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού μπορεί να αναλυθεί σαν γραμμικός συνδυασμός των χαρακτηριστικών αυτών φασμάτων με την προσθήκη ενός όρου θορύβου, που αντικατοπτρίζει την συνεισφορά των αρωματικών χρωμοφώρων.

Επομένως, για τον υπολογισμό των στοιχείων δομής χρησιμοποιεί κανείς την εξίσωση:  $\theta\lambda = \sum F_i \lambda S_{\lambda, i}$  θόρυβος. Όπου  $\theta\lambda$  ο κυκλικός διχρωισμός της πρωτεΐνης σαν συνάρτηση του μήκους κύματος  $\lambda$ ,  $F_i \lambda$  το κλάσμα συμμετοχής του κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής  $I$  στην όλη πρωτεϊνική διαμόρφωση και σε μήκος κύματος  $\lambda$  και όπου  $S_{\lambda, i}$  η ελλειπτικότητα σε μήκος κύματος  $\lambda$  του χαρακτηριστικού φάσματος κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής  $i$ .

Το πρωτεϊνικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους (250-350nm) εμφανίζει ευαισθησία σε συγκεκριμένα στοιχεία τριτοταγούς δομής. Σε αυτά τα μήκη κύματος τα χρωμοφόρα είναι τα αρωματικά αμινοξέα και οι δισουλφιδικοί δεσμοί της πρωτεΐνης τα σήματα των οποίων είναι ευαίσθητα στην όλη διεύθυνση του μορίου στο χώρο. Στην περιοχή 250-270nm απορροφά κυρίως η φαινυλαλανίνη, στη περιοχή 270-290nm απορροφά η τρυπτοφάνη. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί δίνουν ασθενή σήματα σε όλη την περιοχή του εγγύς υπεριώδους. Αν η πρωτεΐνη διατηρεί στοιχεία δευτεροταγούς δομής αλλά δεν υπάρχει σαφώς καθορισμένη τριτοταγής δομή (πχ. αναδιπλωμένη πρωτεΐνη σε μη λειτουργική διαμόρφωση), τότε τα σήματα στη περιοχή αυτή θα κινούνται σε μηδενικές τιμές. Αν όμως υπάρχουν σημαντικά σήματα στο εγγύς υπεριώδες τότε μπορούμε να υποθέσουμε με ασφάλεια ότι η πρωτεΐνη που μελετάμε αναδιπλώθηκε σε μία αυστηρά καθορισμένη δομή. Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδες είναι ευαίσθητο και σε μεταβολές στη δομή που οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων ή σε μεταβολή των συνθηκών του διαλύτη. Η ένταση των σημάτων στην περιοχή αυτή

είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή του μακρινού υπεριώδους και για τη λήψη των φασμάτων αυτών απαιτούνται περίπου 600μl διαλύματος πρωτεΐνης με συγκέντρωση 0,3-2mg/mL, ανάλογα πάντα με το πρωτεϊνικό μόριο<sup>45</sup>

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήσαμε 0.163 mg/mL καθαρής πρωτεΐνης PB1 η οποία βρισκόταν σε διάλυμα 20 mM Phosphate, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.0.

### **3.7.2 Μελέτη της πρωτεΐνης PB1 με διαμορφούμενη διαφορική φθορισμομετρία σάρωσης (Differential scanning fluorimetry, DSF)**

Η Φθορισμομετρία Διαφορικής Σάρωσης (DSF) είναι μια γρήγορη και ανέξοδη μέθοδος διαλογής για την αναγνώριση προσδεμάτων χαμηλού μοριακού βάρους που δεσμεύουν και σταθεροποιούν τις καθαρμένες πρωτεΐνες. Η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσεται μια πρωτεΐνη μετράται με αύξηση του φθορισμού μιας χρωστικής με συγγένεια για υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης, τα οποία εκτίθενται καθώς ξετυλίγεται η πρωτεΐνη. Μια απλή διαδικασία δοκιμής επιτρέπει τον γρήγορο υπολογισμό του μέσου όρου της μετάβασης. Η διαφορά στη θερμοκρασία αυτού του μέσου σημείου παρουσία και απουσία συνδέτη σχετίζεται με τη συγγένεια σύνδεσης του μικρού μορίου, η οποία μπορεί να είναι μια ένωση χαμηλού μοριακού βάρους, ένα πεπτίδιο ή ένα νουκλεϊκό οξύ. Το DSF εκτελείται καλύτερα χρησιμοποιώντας συμβατικό μέσο PCR σε πραγματικό χρόνο. Τα διαλύματα προσδεμάτων από μια πλάκα αποθήκευσης προστίθενται σε ένα διάλυμα πρωτεΐνης και χρωστικής, που κατανέμεται στα φρεάτια της πλάκας PCR και η ένταση φθορισμού μετράται καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά. Τα αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν σε μία μόνο ημέρα.

Οι περισσότερες εφαρμογές που καθορίζουν τις δραστηριότητες, τις αλληλεπιδράσεις ή τις δομές των πρωτεϊνών απαιτούν τα δείγματα πρωτεϊνών να είναι σταθερά για μεγάλες χρονικές περιόδους. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες η πρωτεΐνη είναι πιο σταθερή είναι επίσης οι καλύτερες για να αποτραπεί η μετουσίωση ενώ οι πρωτεΐνες αποθηκεύονται και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της κατάψυξης και της απόψυξης.

Μεταξύ των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την σταθερότητα της πρωτεΐνης είναι τα γενικά συστατικά όπως τα ρυθμιστικά, τα άλατα και τα

απορρυπαντικά των οποίων οι αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη είναι μη εξειδικευμένες, αλλά και οι προσδέτες που δεσμεύονται με την πρωτεΐνη σε μια συγκεκριμένη θέση. Εκτός από την επίδρασή τους ως σταθεροποιητές πρωτεϊνών, οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-προσδέματος μπορεί να είναι υψηλής αξίας για λειτουργικές μελέτες όπως μελέτες εξειδίκευσης υποστρώματος και για την ταυτοποίηση αλλοστερικών τελεστών που θα βοηθούσαν στην παροχή καλύτερων πρωτεϊνικών σχολιασμών. Επιπλέον, η αναγνώριση προσδεμάτων είναι ένα πολύτιμο σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη υποψηφίων φαρμάκων.

Η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης σχετίζεται με την ελεύθερη ενέργεια Gibbs της αναδίπλωσης,  $\Delta G_u$ , η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία <sup>46</sup>. Η σταθερότητα των περισσότερων πρωτεϊνών μειώνεται με τη θερμοκρασία. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, η  $\Delta G_u$  μειώνεται και γίνεται μηδενική σε ισορροπία όπου οι συγκεντρώσεις πτυχωμένης και μη πτυχωμένης πρωτεΐνης είναι ίσες. Σε αυτό το σημείο, η θερμοκρασία θεωρείται θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ). Εάν η πρωτεΐνη ξεδιπλώνεται με τρόπο αναστρέψιμο, ισχύουν τα μοντέλα θερμοδυναμικής ισορροπίας<sup>3</sup>. Εάν μια ένωση δεσμεύεται με μια πρωτεΐνη, η συνεισφορά της ελεύθερης ενέργειας της δέσμευσης συνδέτη στις περισσότερες περιπτώσεις οδηγεί σε αύξηση της  $\Delta G_u$ , η οποία μπορεί να προκαλέσει αύξηση της  $T_m$ . Έχει δειχθεί ότι η σταθεροποιητική επίδραση των ενώσεων κατά τη δέσμευση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης και συγγένειας των προσδεμάτων<sup>47</sup>.

Ωστόσο, οι ερμηνείες σχετικά με τη θερμοδυναμική πρέπει να γίνονται με προσοχή και να επιβεβαιώνονται με άλλες μεθόδους. Επίσης, θα πρέπει να δοθεί προσοχή στην ταξινόμηση ενώσεων που έχουν ταυτοποιηθεί ως προσδέματα για μια πρωτεΐνη με βάση τις τιμές τους  $\Delta T_m$ , καθώς αυτές οι τιμές δεν είναι πάντα μια αντανάκλαση των σχετικών συγγενειών τους. Το μέγεθος της μετατόπισης  $T_m$  που παρατηρήθηκε για διαφορετικές ενώσεις με την ίδια συγγένεια στη σχετική θερμοκρασία εξαρτάται από τις συνεισφορές της ενθαλπίας και της εντροπίας της δέσμευσης. Μεγαλύτερες μετατοπίσεις  $T_m$  παρατηρούνται για μεγαλύτερη πρόσδεση (π.χ. υδρόφοβη) από την εντροπία. Παρομοίως, μια δεδομένη μετατόπιση  $T_m$  δεν είναι μοναδική σε δεδομένη συγγένεια δέσμευσης, επειδή ένα εύρος διαφορετικών συγγενειών, με διαφορετικά εντροπικά και ενθαλπικά συστατικά, μπορεί να προκαλέσει την ίδια μεταβολή στην  $T_m$ . Τα ανταγωνιστικά αποτελέσματα θα μπορούσαν επίσης να καλύψουν τη δέσμευση του συνδέτη. Για παράδειγμα, μια ένωση



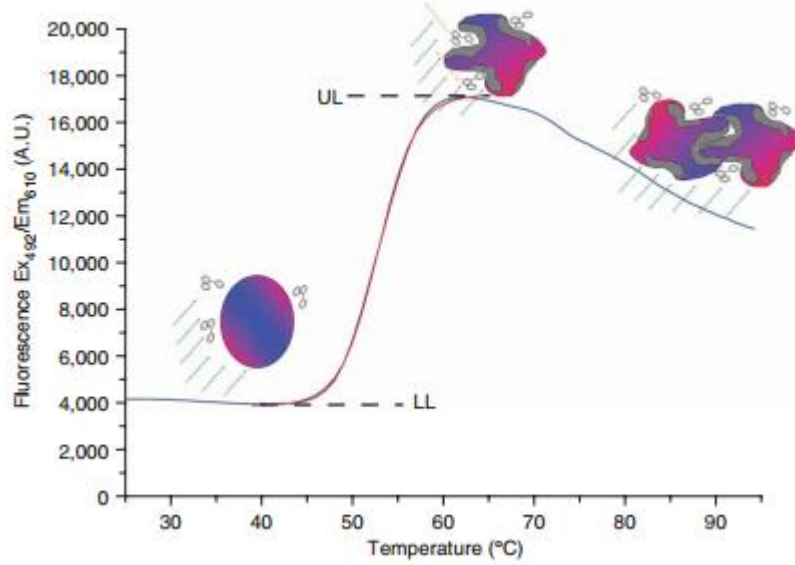
που δεσμεύεται σφικτά και ενθαλπικά στην φυσική κατάσταση θα μπορούσε να καλυφθεί με ασθενέστερη, εντροπικά οδηγούμενη σύνδεση με την μετουσιωμένη κατάσταση. Ωστόσο, μπορεί να ταξινομηθούν ενώσεις με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με βάση τη σχετική του  $\Delta T_m$ .

Το DSF παρακολουθεί το θερμικό ξεδίπλωμα πρωτεϊνών παρουσία φθορίζουσας χρωστικής ουσίας<sup>48</sup> και εκτελείται τυπικά με τη χρήση οργάνου PCR10 Real Time (π.χ., Stratagene Mx3005p, Bio-Rad iCycler5, DNA Engine Opticon 2). Το DSF μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών. Οι φθορίζουσες χρωστικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το DSF είναι εξαιρετικά φθορίζουσες σε μη πολικό περιβάλλον, όπως οι υδρόφοβες θέσεις στις ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, σε σύγκριση με το υδατικό διάλυμα όπου ο φθορισμός σβήνεται. Οι διάφορες χρωστικές που έχουν χρησιμοποιηθεί διαφέρουν σε σχέση με τις οπτικές τους ιδιότητες<sup>49</sup>, ιδιαίτερα στην κβαντική απόδοση φθορισμού που προκαλείται από τη δέσμευση σε μετουσιωμένη πρωτεΐνη.

Το DSF είναι μια εξαιρετική πλατφόρμα για την εξέταση των συνθηκών που σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες, λόγω των μικρών ποσοτήτων και των χαμηλών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών που απαιτούνται. Κατά συνέπεια, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα για τα οποία η συσσωμάτωση ή η χαμηλή σταθερότητα εμποδίζουν τις προσπάθειες καθαρισμού<sup>6</sup>. Στο DSF, η ένταση του φθορισμού είναι γραφική παράσταση όπως η αρχική τιμή του όγκου συνάρτηση της θερμοκρασίας. Αυτό δημιουργεί μια σιγμοειδής καμπύλη που μπορεί να περιγραφεί από μια μετάβαση δύο καταστάσεων (Εικόνα 3.11). Το σημείο καμπής της καμπύλης μετάβασης ( $T_m$ ) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας απλές εξισώσεις όπως η εξίσωση Boltzmann,

$$y = LL + \frac{(UL - LL)}{1 + \exp\left(\frac{T_m - x}{a}\right)}$$

Όπου LL και UL είναι οι τιμές των ελάχιστων και μέγιστων εντάσεων, αντίστοιχα, και a δηλώνει την κλίση της καμπύλης μέσα στο  $T_m$ . Ο απλούστερος τρόπος υπολογισμού των τιμών  $T_m$  είναι να καθοριστεί το μέγιστο του πρώτου παραγώγου. Αυτό το χαρακτηριστικό προσφέρεται από τα περισσότερα πακέτα λογισμικού PCR (π.χ. στο Mx3005p, οι σαρώσεις χρησιμοποιώντας τον τύπο 'SYBR green' επιτρέπουν την απεικόνιση παραγώγων μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης).



**Εικόνα 3.11.** Τυπική καταγραφή της έντασης φθορισμού έναντι της θερμοκρασίας κατά το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης (Συνθάση του κιτρικού οξέος) παρουσία χρωστικής SYPRO orange. Η χρωστική, η μοριακή δομή της οποίας δεν είναι γνωστή συμβολίζεται ως ένα αρωματικό μόριο με τρεις δακτυλίους. Κατά το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης με φως 492 nm αποκαλύπτονται υδρόφοβα τμήματα(γκρι).

Μέχρι σήμερα, η χρωστική με τις πιο ευνοϊκές ιδιότητες για το DSF είναι SYPRO orange, λόγω της υψηλής αναλογίας σήματος προς θόρυβο.

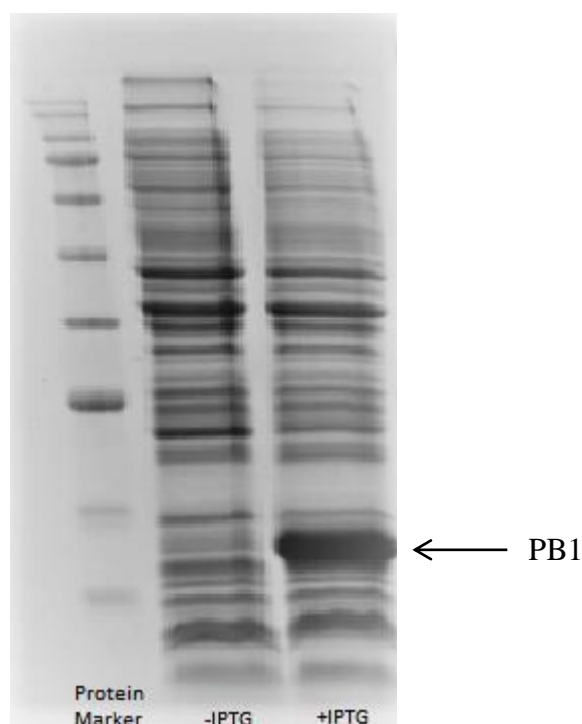
## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Κινητικές επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου *pb1*

Η επαγωγή του *pb1* γονιδίου πραγματοποιήθηκε με IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM, αρχικά σε μικρή κλίμακα (καλλιέργειες των 5mL) για μια πιλοτική μελέτη και έπειτα, σε μεγάλη κλίμακα σε καλλιέργειες 1- 2 L για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω καθαρισμό. Η επαγωγή ξεκινούσε κατά την εκθετική φάση αύξησης των βακτηρίων (χρόνος 0,  $OD_{600}= 0.4$ ). Αναλυτικά η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην § 3.5.2.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία της επαγωγής και να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή έκφραση της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής 18°C και 37°C. Παρατηρήθηκε όμως πως στους 37°C η πρωτεΐνη PB1 είναι αδιάλυτη, οπότε και εργαστήκαμε στους 18°C.

Η εικόνα που παρατηρήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμίδης SDS-PAGE πριν και μετά την επαγωγή ήταν η εξής:

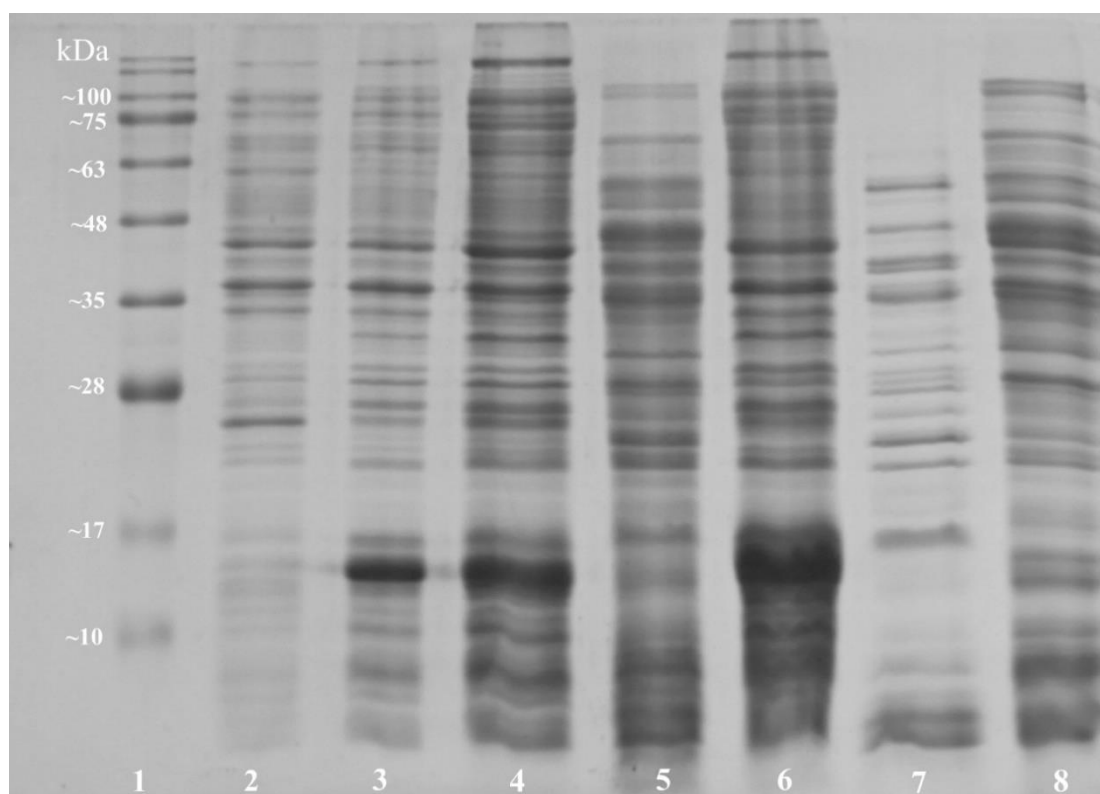


**Εικόνα 4.1** Ανάλυση διαφόρων κλασμάτων με SDS-PAGE. Ανάλυση συνολικών πρωτεϊνών των κυττάρων BL21(DE3) που περιέχουν το πλασμίδιο pET-30(b) πριν και μετά την επαγωγή της με τη χρήση του IPTG.

## 4.2 Καθαρισμός και απομόνωσης της πρωτεΐνης PB1

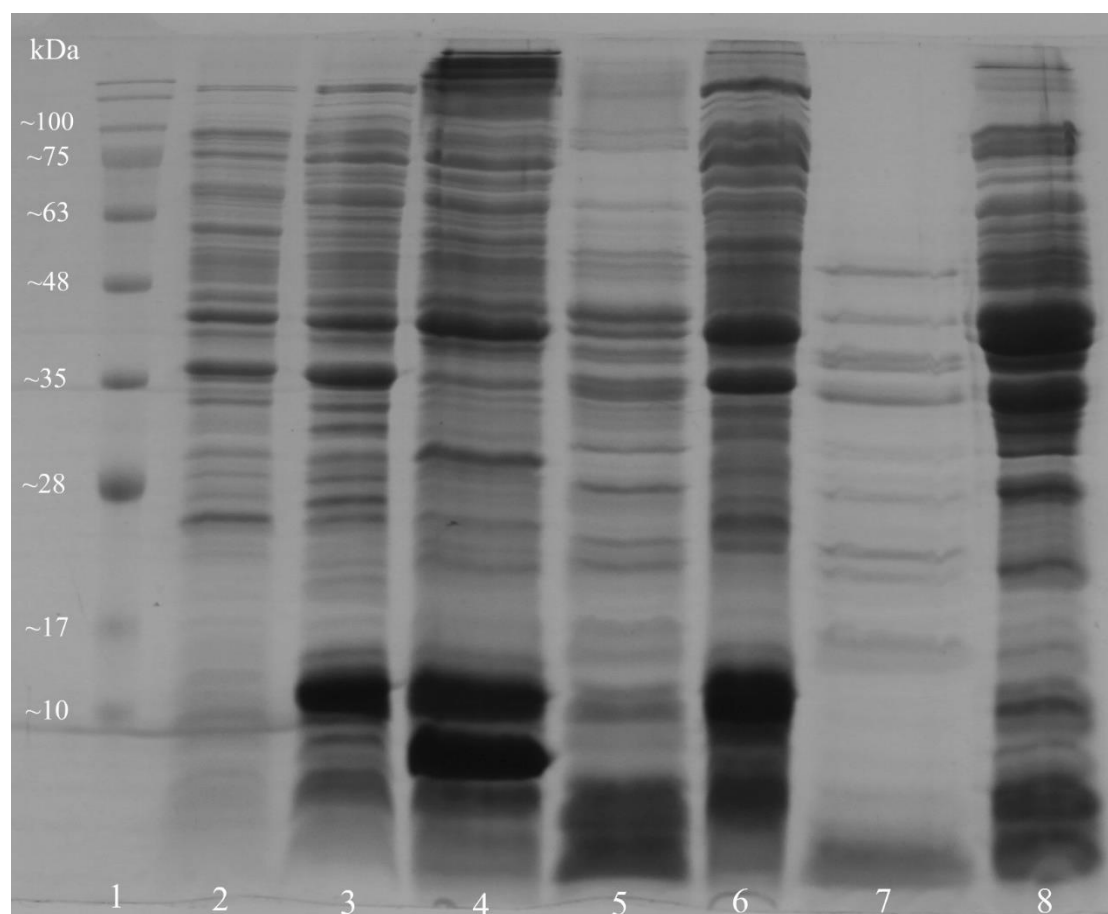
Η απομόνωση της υπερπαραγμένης PB1 πρωτεΐνης, ύστερα από τη διαδικασία της επαγωγής πραγματοποιήθηκε μέσα από τα εξής στάδια: α) λύση των κυττάρων, β) κλασμάτωση με θειικό αμμώνιο (AS), γ) κατακρήμνιση με τριχλωρικό οξύ (TCA) και δ) χρωματογραφία συγγένειας, όπως περιγράφονται αναλυτικά στην § 3.6.4 του κεφαλαίου 3.

Μετά την λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων και φυγοκέντρηση, έγινε προσθήκη του θειικού αμμωνίου με βάση τον όγκο του διαλύματος (Εικόνα 3.5) σταδιακά και αφού διαλύθηκε πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και κατεργασία με TCA στο ίζημα και το υπερκείμενο τόσο του 0-60% όσο και του 60-80%. Ύστερα από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel ακρυλαμίδης SDS-PAGE (15%) η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης βρέθηκε στο pellet του κλάσματος 0-60% (Εικόνα 4.2).



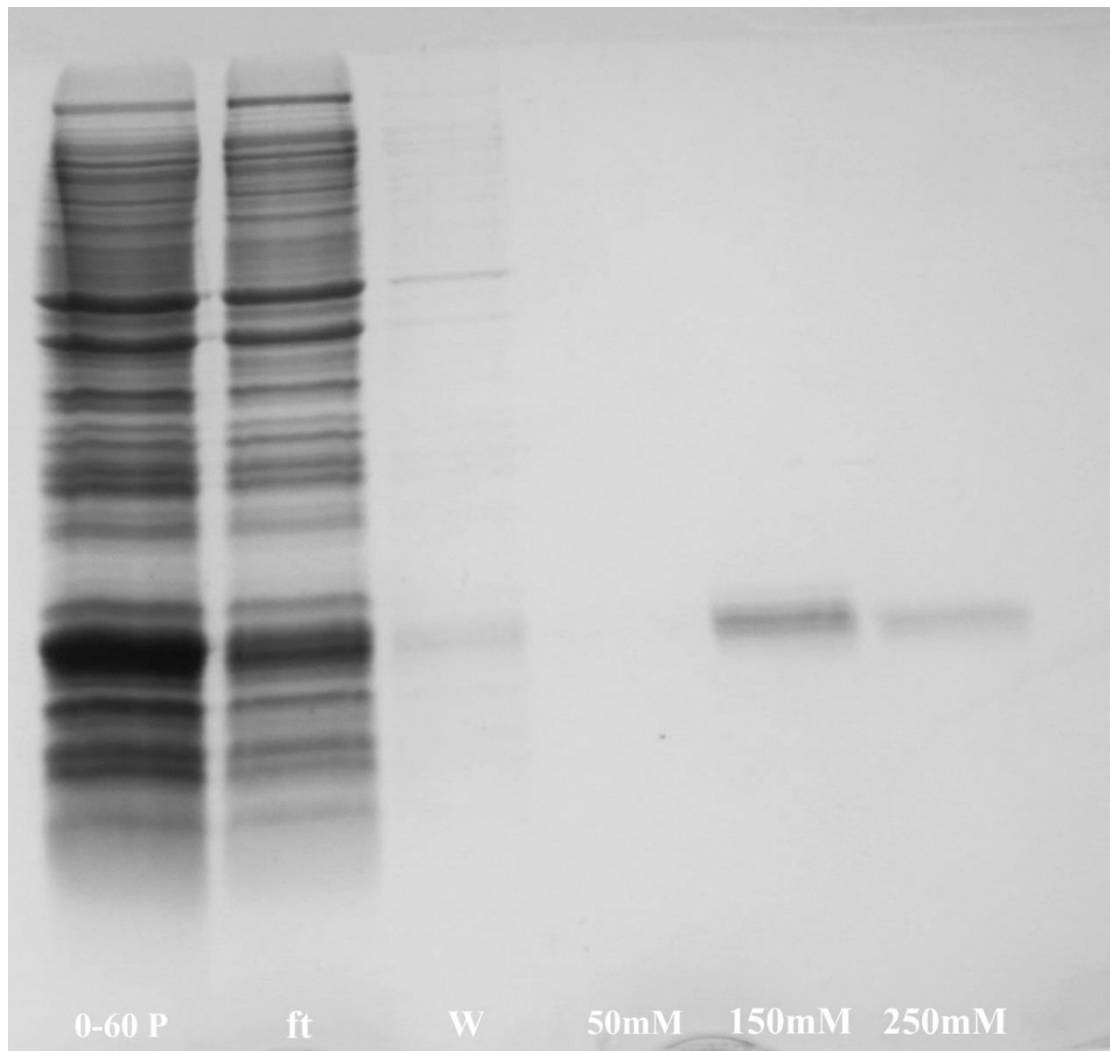
**Εικόνα 4.2** Ανάλυση διαφόρων κλασμάτων με SDS-PAGE κατά τη διαδικασία της απομόνωσης και καθαρισμού της PB1. Διαδρομή: 1: Marker, 2: O/N Επαγωγή, 3: Επαγωγή για 6 ώρες, 4: Συνολικό εκχύλισμα, 5: 0-60% κορεσμένο AS-υπερκείμενο, 6: 0-60% κορεσμένο AS-ίζημα, 7: 60-80% κορεσμένο AS-υπερκείμενο, 8: 60-80% κορεσμένο AS-ίζημα.

Όταν κατά την λύση των κυττάρων και την διαφορική κλασμάτωση με θειικό αμμώνιο δεν προστέθηκε αναστολέας πρωτεασών, παρατηρήθηκαν στο ολικό εκχύλισμα δύο ζώνες μικρότερου μοριακού βάρους όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.3.



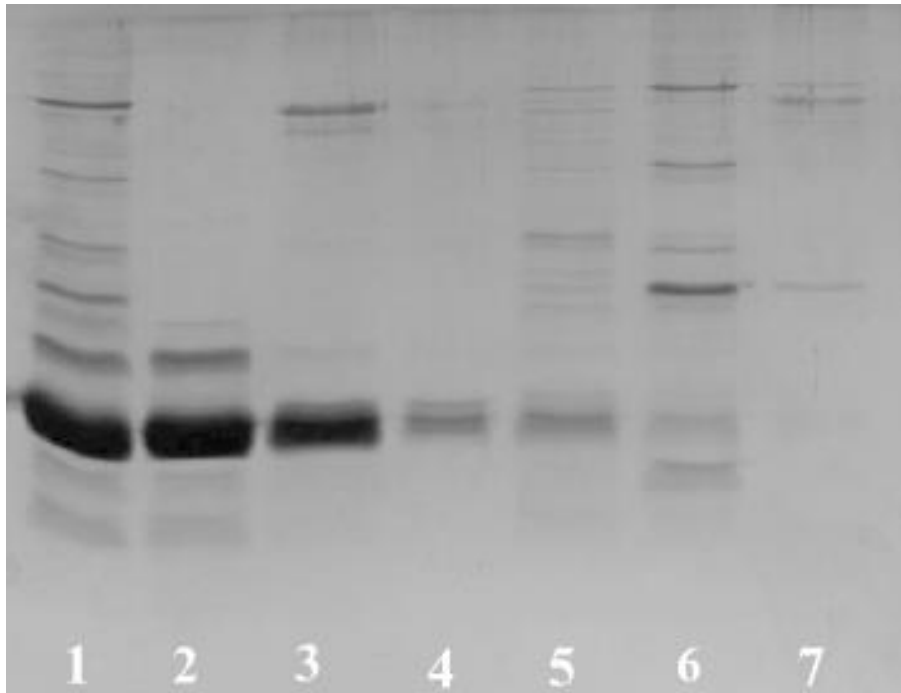
**Εικόνα 4.3** Ανάλυση διαφόρων κλασμάτων με SDS-PAGE κατά τη διαδικασία της απομόνωσης και καθαρισμού της PB1 χωρίς την προσθήκη αναστολέα πρωτεασών.  
Διαδρομή: 1: Marker, 2: O/N Επαγωγή, 3: Επαγωγή για 6 ώρες, 4: Συνολικό εκχύλισμα, 5: 0-60% κορεσμένο AS-υπερκείμενο, 6: 0-60% κορεσμένο AS-ίζημα, 7: 60-80% κορεσμένο AS-υπερκείμενο, 8: 60-80% κορεσμένο AS-ίζημα.

Στη συνέχεια, επαναδιαλύθηκε το ίζημα του κλάσματος 0-60% σε διάλυμα LEW και εφαρμόστηκε η μέθοδος της διαπίδυσης (όπου περιγράφηκε στην §3.6.4.3) για ένα βράδυ. Ακολούθησε έκλουση της προσδεμένης PB1 στην ρητίνη TALON (10ml), σε κλάσματα των 5 ml με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου, από 50, σε 150 και τέλος 250 mM. Η πρωτεΐνη PB1 εκλούστηκε στο κλάσμα των 150 mM ιμιδαζολίου όπως φαίνεται στην εικόνα 4.4.



**Εικόνα 4.4** Ανάλυση κλασμάτων έκλουσης της πρωτεΐνης PB1 από κολώνα TALON® Metal Affinity με SDS-PAGE. Διαδρομή: 0-60 P: Κυτταρικό εκχύλισμα από το ίζημα του κλάσματος 0-60%, ft: Flowthrough, W: Έκπλυση Στήλης, 50mM-150mM-250mM: Συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου που χρησιμοποιήθηκαν για την έκλυση.

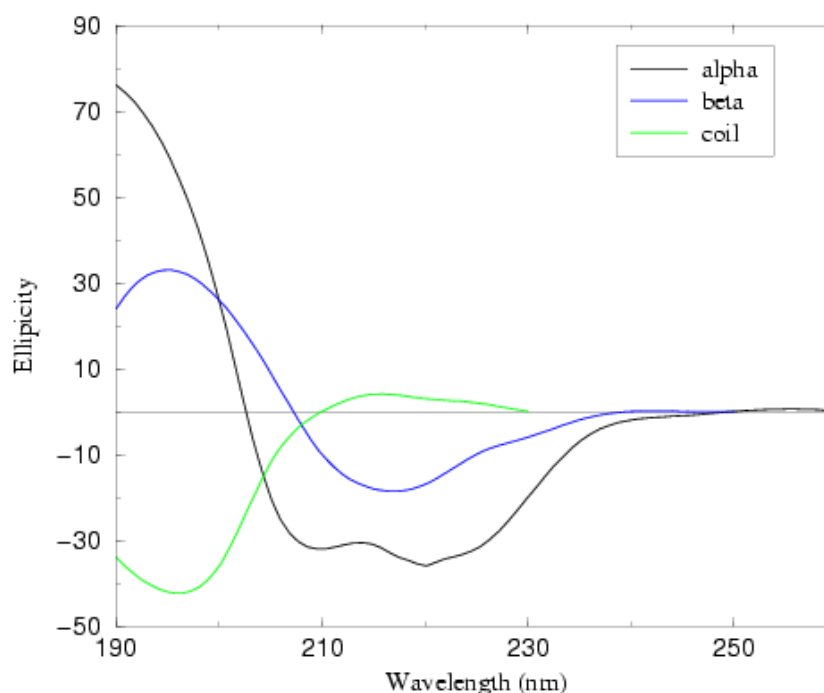
Τέλος, τα κλάσματα με 150mM και 250mM ιμιδαζολίου περάστηκαν από στήλη ηπαρίνης (Hightrap Heparin των 5ml), χρησιμοποιώντας για την έκλυση βαθμιδωτές συγκεντρώσεις NaCl μέχρι τη συγκέντρωση 300mM. Η πρωτεΐνη πέρασε το Flowthrough, δηλαδή δε συγκρατήθηκε καθόλου από τη ρητίνη. (Εικόνα 4.5)



**Εικόνα 4.5** Ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης της πρωτεΐνης PB1 από στήλη ηπαρίνης με SDS-PAGE. Διαδρομή: 1: 150 και 250 mM Ιμιδαζολίου, 2: Flowthrough, 3: Έκπλυση Στήλης, 4-7: Βαθμιδωτές συγκεντρώσεις NaCl από 0 έως 300 mM.

### 4.3 Μέτρηση της πρωτεΐνης PB1 με χρήση φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού

Προκειμένου να προσδιορίσουμε εάν η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είναι σε φυσική κατάσταση και ως και τούτου χρήσιμη για πειράματα αλληλεπίδρασης με φάρμακα, χρησιμοποιήσαμε την τεχνολογία της φασματοπολωσιμετρίας κυκλικού διχρωισμού. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με 0.163mg/mL καθαρής PB1 πρωτεΐνης η οποία βρισκόταν σε διάλυμα 20 mM Phosphate, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.0.



Εικόνα 4.6 Τυπικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού της πρωτεΐνης PB1

Στην εικόνα 4.6 απεικονίζεται το τυπικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού της PB1 στις συνθήκες που περιγράφονται στην § 3.7.1. Η μαύρη γραμμή είναι το συνολικό φάσμα της πρωτεΐνης PB1 και αντιστοιχεί σε α-έλικες ενώ η μπλε γραμμή παρουσιάζει το μικρό ποσοστό β-πτυχωτών επιφανειών. Τέλος, η πράσινη αντιστοιχεί σε τυχαίες δομές, κυρίως τυχαίες θηλιές. Συγκρίνοντας τη κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης με το φάσμα κυκλικού διχρωισμού αποδεικνύεται ότι η ανασυνδυασμένη και καθαρισμένη πρωτεΐνη PB1 είναι σε φυσική κατάσταση και μπορούμε να τη χρησιμοποιήσουμε σε πειράματα αλληλεπίδρασης με πιθανά φάρμακα.



#### 4.4 Μέτρηση της πρωτεΐνης PB1 με τη χρήση διαφορικής φθοριομετρίας σάρωσης (Differential scanning fluorimetry, DSF)

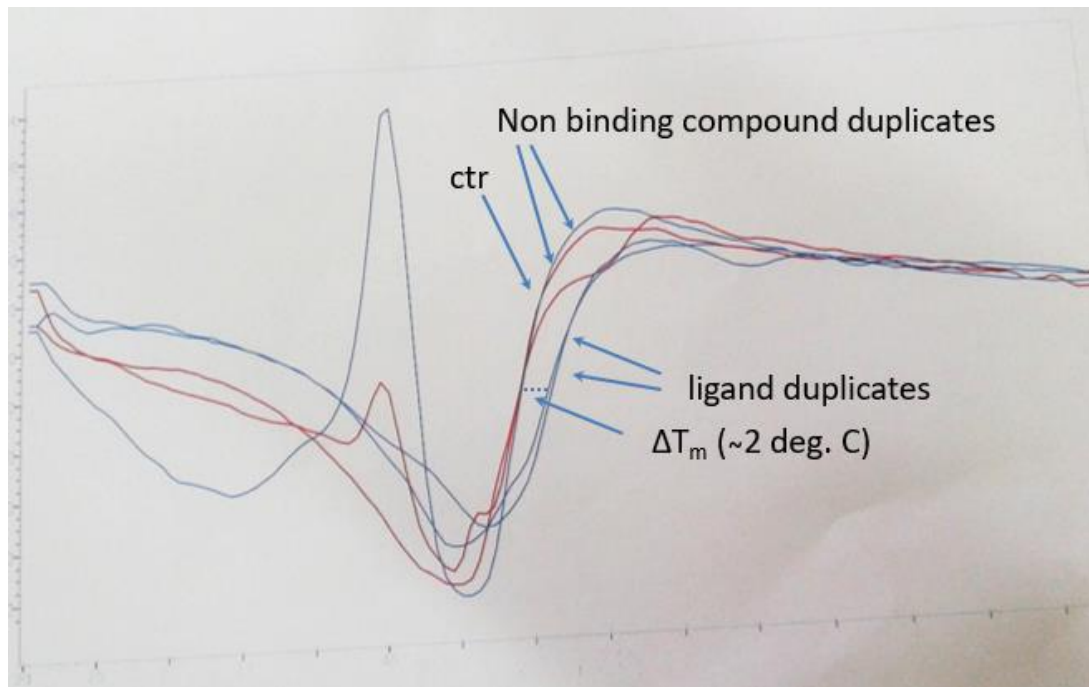
Όπως αναφέρεται στην § 3.7.2, η διαφορική φθοριομετρία σάρωσης μας δίνει τη δυνατότητα να παρακολουθήσουμε την θερμική αποδιάταξη πρωτεϊνών με τη χρήση μίας φθορίζουσας χρωστικής και με την παρουσία διαφορετικών παραγόντων, όπως παραδείγματος χάρι διαφόρων προσδετών, αναστολέων κλπ.

Η διαδικασία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και για να παραχθούν σωστά αποτελέσματα είναι απαραίτητο να δοκιμαστούν διάφορες ποσότητες και σχέσεις χρωστικής – πρωτεΐνης για την αποφυγή παραγωγής λάθος αποτελεσμάτων. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για κάθε πρωτεΐνη και οφείλεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση της φθορίζουσας χρωστικής με κάθε πρωτεΐνη που προκύπτει από την διαφορετική υδροφοβικότητα κάθε πρωτεΐνης.

Μετά από σειρά δοκιμών αποφασίσαμε ότι για την πρωτεΐνη μας 50  $\mu\text{M}$  της πρωτεΐνης PB1 απαιτούνται να μετρηθούν παρουσία 1000x αραιωμένης SYPRO. Η αρχική συγκέντρωση SYBRO δεν γίνεται γνωστή από την εταιρεία, ως εκ τούτου μέτρο σύγκρισης είναι ο βαθμός αραίωσης και η σχέση αραίωσης με συγκέντρωση πρωτεΐνης. Η βέλτιστη συγκέντρωση πρωτεΐνης σχετίζεται με την δομή της, το μέγεθός της και την υδροφοβικότητά της.

Το τυπικό φάσμα DSF απεικονίζεται στην εικόνα 4.7. Η ένταση του φθορισμού αναπαρίσταται γραφικά ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Έτσι, προκύπτει μία σιγμοειδής καμπύλη που περιγράφει το ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ ακέραιης και αποδιαταγμένης πρωτεΐνης (Στην εικόνα 4.7 εμφανίζεται ως Control).

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα για DSF χρησιμοποιώντας ως προσδέτη έναν αναστολέα της πρωτεΐνης, με σκοπό την εύρεση νέων υποψήφιων φαρμάκων που στοχεύουν την πρωτεΐνη αυτή. Παρατηρήθηκε πως ο αναστολέας αυτός προσδεδεμένος μεταβάλλει τη θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης  $T_m$  κατά  $2^\circ\text{C}$ . Η μεταβολή αυτή είναι αριθμητικά μικρή αλλά σημαντική διότι η αλληλεπίδραση του προσδέτη με την πρωτεΐνη βασίζεται σε μικρό αριθμό αλληλεπιδράσεων, οι οποίες όμως είναι ειδικές.



**Εικόνα 4.7** Τυπικό φάσμα DSF της πρωτεΐνης PB1 παρουσία και απουσία του φαρμάκου. Ctl (Control-μπλε γραμμή): Το φάσμα τήξης της πρωτεΐνης απουσία προσδέτη-φαρμάκου, Ligand duplicates: (μπλε γραμμές) Δύο φάσματα τήξης της πρωτεΐνης παρουσία προσδέτη-φαρμάκου. Κόκκινες γραμμές: Φάσματα τήξης πρωτεΐνης απουσία προσδέτη-φαρμάκου αλλά με διαφορετικές αραιώσεις.

Αναφορικά με την εικόνα 4.7, η μπλε γραμμή ονομαζόμενη ως Control αποτελεί το φάσμα τήξης της πρωτεΐνης απουσία προσδέτη-φαρμάκου. Οι γραμμές ονομαζόμενες ως Ligand duplicates είναι δύο φάσματα τήξης της πρωτεΐνης παρουσία προσδέτη-φαρμάκου. Παρατηρούμε ότι τα φάσματα συμπίπτουν απόλυτα γεγονός που αναδεικνύει την πιστότητα των αποτελεσμάτων. Τέλος, τα δύο φάσματα με τις ενδιάμεσες κόκκινες γραμμές αφορούν φάσματα τήξης της πρωτεΐνης απουσία προσδέτη-φαρμάκου αλλά με διαφορετικές αραιώσεις SYPRO (άνω κόκκινη γραμμή 1:1500 και κάτω κόκκινη γραμμή 1:500).

## 5.Συζήτηση

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη PB1 έχει έναν κομβικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης αλλά και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου λόγω της συνεισφοράς της στο σύμπλεγμα PBAF. Ο πρόσφατα προσδιορισμένος ρυθμιστικός ρόλος αυτής της σημαντικής πρωτεΐνης εξετάζεται επίσης για να εξηγήσει τόσο τη φυσική λειτουργία όσο και τον αναδυόμενο ρόλο της PB1 ως καταστολέα όγκων που βρέθηκε να μεταλλάσσεται σε καρκίνους μαστών.

Στην εργασία αυτή, μελετήθηκε το 5<sup>ο</sup> bromodomain της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη παρήχθη από το συνθετικό γονίδιο *pb1* και στη συνέχεια ακολούθησε η ετερόλογη υπερέκφραση της σε βακτηριακά κύτταρα και ο καθαρισμός της, με απώτερο σκοπό την μελέτη της αλληλεπίδρασης της με υποψήφιο φαρμακευτικό σκεύασμα.

Μέσα από την εργασία αυτή, καταφέραμε να έχουμε στη διάθεσή μας σημαντικές ποσότητες της πρωτεΐνης, που χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθεί εάν η πρωτεΐνη είναι στην φυσική της κατάσταση ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα αλληλεπίδρασης με πιθανά φάρμακα. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από τα προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας αυτής, φανερώνουν πως η πρωτεΐνη μπορεί να αποτελέσει στόχο νέων υποψήφιων φαρμάκων που την στοχεύουν.

Μελλοντικά, με περαιτέρω μελέτη των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με διάφορα υποψήφια φάρμακα, είναι δυνατή η ανάπτυξη ενός νέου σκευάσματος που έχει ως στόχο την αναστολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης αυτής.

## 6.Βιβλιογραφία

1. Kornberg RD. Structure of Chromatin. *Annu Rev Biochem.* 1977;46(1):931-954. doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.004435.
2. Studier FW. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol.* 1991;219(1):37-44. doi:10.1016/0022-2836(91)90855-Z.
3. Phelan ML, Narlikar GJ, Kingston RE. Reconstitution of a Core Chromatin Remodeling Complex from SWI / SNF Subunits. 1999;3:247-253.
4. Miyamoto K, Pasque V, Jullien J, Gurdon JB. Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes. *Genes Dev.* 2011;25(9):946-958. doi:10.1101/gad.615211.
5. Marshall TW, Link KA, Knudsen KE, et al. Genes : Structure and Regulation : Differential Requirement of SWI / SNF for Androgen Receptor Activity Differential Requirement of SWI / SNF for Androgen Receptor Activity \*. 2003. doi:10.1074/jbc.M304582200.
6. Zhang Z, Davies KP, Allen J, et al. Cell Cycle Arrest and Repression of Cyclin D1 Transcription by INI1 / hSNF5. 2002;22(16):5975-5988. doi:10.1128/MCB.22.16.5975.
7. Versteeg I, Medjkane S, Rouillard D, Delattre O. A key role of the hSNF5 / INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. 2002;6403-6412. doi:10.1038/sj.onc.1205841.
8. Yan Z, Cui K, Murray DM, et al. RESEARCH COMMUNICATION PBAF chromatin-remodeling complex requires a novel specificity subunit , BAF200 , to regulate expression of selective interferon-responsive genes. 2005;(410):1662-1667. doi:10.1101/gad.1323805.1662.
9. Lickert H, Takeuchi JK, Both I Von. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. 1995;182:177-182.
10. Lessard J, Wu JI, Ranish JA, et al. Article An Essential Switch in Subunit Composition of a Chromatin Remodeling Complex during Neural Development. 2007:201-215. doi:10.1016/j.neuron.2007.06.019.
11. Xue Y, Canman JC, Lee CS, et al. The human SWI SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast Rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. 2000;97(24).
12. Taatjes DJ, Marr MT, Tjian R. Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. 2004;5(May):3-10.
13. Chandrasekaran R, Thompson M. Expression , puri W cation and characterization of individual bromodomains from human Polybromo-1. 2006;50:111-117. doi:10.1016/j.pep.2006.07.004.
14. Baetz KK, Krogan NJ, Emili A, Greenblatt J, Hieter P. The ctf13-30 / CTF13 Genomic Haploinsufficiency Modifier Screen Identifies the Yeast Chromatin Remodeling Complex RSC , Which Is Required for the Establishment of Sister Chromatid Cohesion. 2004;24(3):1232-1244. doi:10.1128/MCB.24.3.1232.
15. Bs T. May 1 9 9 7. 1997;4(97):151-153.
16. Y IC, Courvalin J, Mornon J. The BAH ( bromo-adjacent homology ) domain : a link between DNA methylation , replication and transcriptional regulation. 1999;446:189-193.
17. Sciences ML. Review The HMG-box : a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. 2007;64:2590-2606. doi:10.1007/s00018-007-7162-3.

18. Thompson M. complex. 2010;91(3):309-319.  
doi:10.1016/j.biochi.2008.10.019.Polybromo-1.
19. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. 2001;293(August):1074-1080.
20. Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. 2000:836-845.
21. Wijnen AJVAN. Molecular Characterization of Celtix-1 , a Bromodomain Protein Interacting With the Transcription Factor Interferon Regulatory Factor 2. 2000;279(April):269-279.
22. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou M. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain bromodomain is similar to that of acetyl-CoA by histone acetyl-. 1999;399(June):491-496.
23. Chandrasekaran R, Thompson M. Polybromo-1-bromodomains bind histone H3 at specific acetyl-lysine positions. 2007;355:661-666.  
doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.193.
24. Hassan AH, Awad S, Prochasson P. The Swi2 / Snf2 Bromodomain Is Required for the Displacement of SAGA and the Octamer Transfer of SAGA-acetylated Nucleosomes \*. 2006;281(26):18126-18134.  
doi:10.1074/jbc.M602851200.
25. Identification P. Searching Protein Sequence Libraries : Comparison of the Sensitivity and Selectivity of the Smith-Waterman and FASTA Algorithms. 1991;650:635-650.
26. Owen DJ, Ornaghi P, Yang J, et al. The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase Gcn5p. 2000;19(22):6141-6149.
27. Kupitz C, Chandrasekaran R, Thompson M. Biophysical Chemistry Kinetic analysis of acetylation-dependent Pb1 bromodomain – histone interactions. *Biophys Chem.* 2008;136(1):7-12. doi:10.1016/j.bpc.2008.03.011.
28. Chandrasekaran R, Thompson M. Expression, purification and characterization of individual bromodomains from human Polybromo-1. *Protein Expr Purif.* 2006;50(1):111-117. doi:10.1016/j.pep.2006.07.004.
29. Hudson BP, Martinez-yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. Solution Structure and Acetyl-lysine Binding Activity of the GCN5 Bromodomain. 2000.  
doi:10.1006/jmbi.2000.4207.
30. Filippakopoulos P, Knapp S. The bromodomain interaction module. *FEBS Lett.* 2012;586(17):2692-2704. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.045.
31. Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, et al. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell.* 2012;149(1):214-231. doi:10.1016/j.cell.2012.02.013.
32. Ferri E, Petosa C, McKenna CE. Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2016;106:1-18.  
doi:10.1016/j.bcp.2015.12.005.
33. Oliver AW, Jones SA, Roe SM, Matthews S, Goodwin GH, Pearl LH. Crystal structure of the proximal BAH domain of the polybromo protein. 2005;664(1):657-664.
34. Cairns BR, Schlichter A, Erdjument-bromage H, Tempst P, Kornberg RD, Winston F. Two Functionally Distinct Forms of the RSC Nucleosome-Remodeling Complex , Containing Essential AT Hook , BAH , and Bromodomains. 1999;4:715-723.
35. Bell P, Mitchell J. The Multidomain Structure of Orclp Reveals Similarity to Regulators of DNA Replication and Transcriptional function. 1995;83:563-

- 568.
36. triolo1996.pdf.
  37. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX Family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators. 2000;255:239-255. doi:10.1006/dbio.2000.9883.
  38. Marmorstein LY, Kinev A V, Chan GKT, et al. A Human BRCA2 Complex Containing a Structural DNA Binding Component Influences Cell Cycle Progression. 2001;104:247-257.
  39. Dai Y, Wong B, Yen Y, Oettinger MA, Kwon J, Johnson RC. Determinants of HMGB Proteins Required To Promote RAG1 / 2-Recombination Signal Sequence Complex Assembly and Catalysis during V ( D ) J Recombination. 2005;25(11):4413-4425. doi:10.1128/MCB.25.11.4413.
  40. Mi Y, Shin H, Choi W, Ahn S, Kim W. Characterization of human SMARCE1r high-mobility-group protein. 2002;1574:269-276.
  41. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*. 1990;96(1):23-28. doi:10.1016/0378-1119(90)90336-P.
  42. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. 1986;189(1):113-130. doi:10.1016/0022-2836(86)90385-2.
  43. Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, et al. Protein production and purification. *Nat Methods*. 2008;5(2):135-146. doi:10.1038/nmeth.f.202.Protein.
  44. Burgess RR. *Chapter 20 Protein Precipitation Techniques*. Vol 463. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009. doi:10.1016/S0076-6879(09)63020-2.
  45. Klemm D, Heublein B, Fink H, Bohn A. Polymer Science Cellulose : Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material *Angewandte*. 2005;3358-3393. doi:10.1002/anie.200460587.
  46. Schellman JA. Temperature, stability, and the hydrophobic interaction. *Biophys J*. 1997;73(6):2960-2964. doi:10.1016/S0006-3495(97)78324-3.
  47. Vedadi M, Niesen FH, Allali-Hassani A, et al. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(43):15835-15840. doi:10.1073/pnas.0605224103.
  48. Robertson I, Iles PA, Gratton L, Sharpley D. from the SAGE Social Science Collections . All Rights Reserved . *West Journal Nurs Res* 1991, 13(2), 256-272. 1991;44(9):963-982. doi:0803973233.
  49. Epps DE, Sarver RW, Rogers JM, Herberg JT, Tomich PK. The Ligand Affinity of Proteins Measured by Isothermal Denaturation Kinetics. *Anal Biochem*. 2001;292(1):40-50. doi:10.1006/abio.2001.5047.
  50. Clark, D., Dunlap, P., Madigan, M., & Martinko, J. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco: Pearson.
  51. Debril M, Gelman L, Fayard E, Annicotte J, Rocchi S, Auwerx J. Transcription factors and nuclear receptors interact with the swi/snf complex through the baf60c subunit. *J Biol Chem*. 2004; 279:16677–16686.
  52. Baetz K, Krogan N, Emili A, Greenblatt J, Hieter P. The ctf13-30/ctf13 genomic haploinsufficiency modifier screen identifies the yeast chromatin remodeling complex rsc, which is required for the establishment of sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol*. 2004; 24:1232–1244.

53. Huang J, Hsu J, Laurent B. The rsc nucleosome-remodeling complex is required for cohesin's association with chromosome arms. *Mol Cell*. 2004; 13:739–750.
54. Filetici P, Ornaghi P, Ballario P. The bromodomain: A chromatin browser. *Front Biosci*. 2001; 6:866–876.
55. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signalling to chromatin through histone modifications. *Cell*. 2000; 103:263–271
56. Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol*. 2002; 14:286–298.
57. Garzón JFG, Kupitz CJ, Bailey JD, Thompson M. Acetylation-dependent binding analysis of the yeast *gcn5* bromodomain protein. *Am J Undergrad Res*. 2008; 7:19–25.
58. Horn P, Peterson C. The bromodomain: A regulator of atp-dependent chromatin remodeling? *Front Biosci*. 2001; 6:1019–1023.
59. Mohrmann L, Verrijzer CP. Composition and functional specificity of *swi2/snf2* class chromatin remodeling complexes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*. 2005;1681:59–73.
60. Carey M, Li B, Workman JL. Rsc exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to rna polymerase II elongation. *Molecular Cell*. 2006; 24:481–487.
61. VanDemark AP, Kasten MM, Ferris E, Heroux A, Hill CP, Cairns BR. Autoregulation of the *rsc4* tandem bromodomain by *gcn5* acetylation. *Molecular Cell*. 2007; 27:817–828.
62. Hou Z, Bernstein DA, Fox CA, Keck JL. Structural basis of the *sir1*-origin recognition complex interaction in transcriptional silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:8489–8494
63. A. S. Bayden, D. T. Moustakas, D. Joseph-McCarthy, and M. L. Lamb (2015). Evaluating Free Energies of Binding and Conservation of Crystallographic Waters Using SZMAP. *J. Chem. Inf. Model*. 55 (8): 1552–1565
64. Vidler L., Brown N., Knapp S., Hoelder S., (2012). Druggability analysis and structural classification of bromodomain acetyl-lysine binding sites. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55:7346-7359
65. Hewings D., T. P. C. Rooney, L.E. Jennings, D. A. Hay, C. J. Schofield, P. E. Brennan, S. Knapp, S. J. Conway (2012). Progress in the Development and Application of Small Molecule Inhibitors of Bromodomain–Acetyl-lysine Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55:9393-9413
66. Noguchi-Yachide T. (2016). BET Bromodomain as a Target of Epigenetic Therapy *Chem. Pharm. Bull*. 64, 540–547
67. Simó-Riudalbas L., Esteller M. (2015). Targeting the histone orthography of cancer: drugs for writers, erasers and readers. *British Journal of Pharmacology*. 172:2716-2732
68. Xiang-Jiao Y. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *BioAssays*. 26:1076–1087
69. Theodoulou N.H., Bamborough P., Bannister A.J., Becher I., Bit R.A., Che K, H., Chung C., Dittmann A., Drewes G., Drewry D.H., Gordon L., Grandi P., Leveridge M., Lindon M., Michon A., Molnar J., Robson S.C., Tomkinson N.C.O., Kouzarides T., Prinjha R.K. and Humphreys P.G. (2015). Discovery of I-BRD9, a Selective Cell Active Chemical Probe for Bromodomain