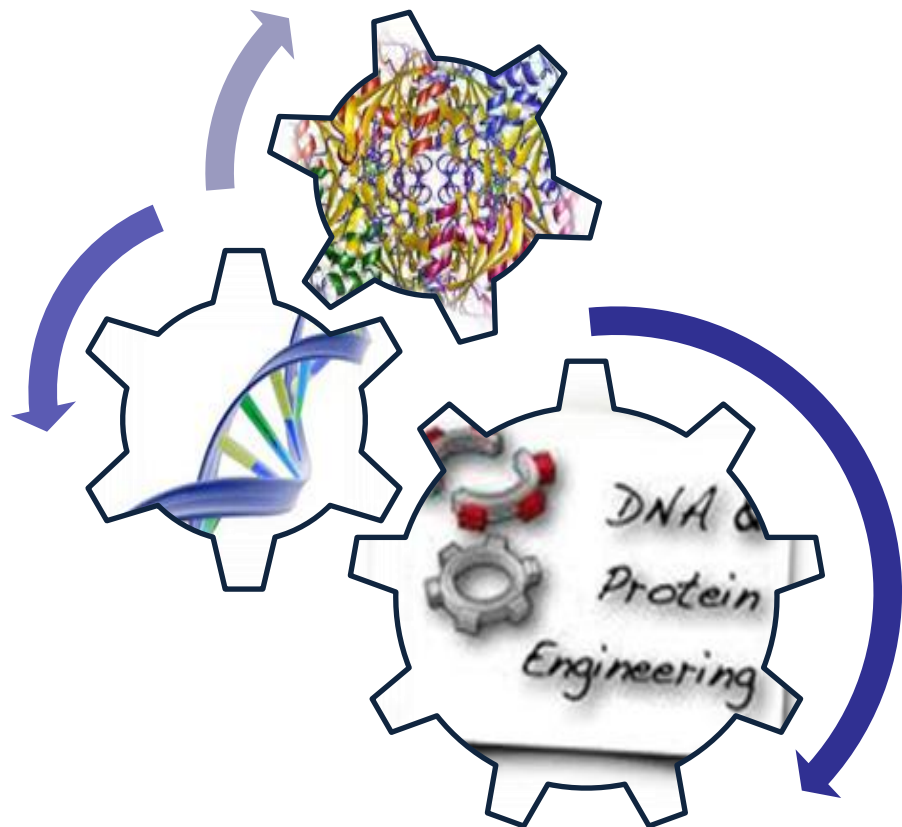


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ  
L-ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΑΣΗ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ  
ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ»



ΚΟΝΤΟΥΡΗ ΚΑΣΣΙΑΝΗ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
ΑΘΗΝΑ 2013

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ**  
**L-ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΑΣΗ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ**  
**ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ»**

**ΚΟΝΤΟΥΡΗ ΚΑΣΣΙΑΝΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
**ΑΘΗΝΑ 2013**

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του τομέα του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή της μελέτης.

**Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:**

Λάμπρου Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής	(Επιβλέπων)
Κλώνης Ιωάννης, Καθηγητής	(Μέλος)
Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής	(Μέλος)

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το Ακαδημαϊκό έτος 2011-2012 στο Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

**ΑΘΗΝΑ 2013**

## Ευχαριστίες

Ελάχιστη υποχρέωσή μου είναι η απόδοση των δέουσων ένθερμων ευχαριστιών μου προς τους εκλεκτούς καθηγητές μου.

Αισθάνομαι πραγματικά την ανάγκη να ευχαριστήσω μέσα από τη καρδιά μου, τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή, Ν. Λάμπρου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα αλλά κυρίως να εργαστώ ως μέλος της ερευνητικής του ομάδας στο εργαστήριο, γεγονός από το οποίο απέκτησα πολύτιμη εμπειρία. Αλλά κυρίως τον ευχαριστώ για την υπομονή, τον χρόνο που μου αφιέρωσε, την καθοδήγηση και τη συνεργασία.

Επίσης να ευχαριστήσω στον Καθηγητή, Ιωάννη Κλώνη για την εμπιστοσύνη και την πολύτιμη καθοδήγηση καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή, Εμμανουήλ Φλεμετάκη για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη φιλική πλαισίωση και υποστήριξή τους, αλλά και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος στο εργαστήριο. Ιδιαίτερως να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Εύη Χρονοπούλου για τη συνεχή βοήθεια στην εργαστηριακή μου εξοικείωση, τις χρήσιμες υποδείξεις στους εκάστοτε προβληματισμούς μου, αλλά και τη φιλική της συμπαράσταση. Ακόμη, την ΕΤΕΠ του εργαστηρίου, Ευαγγελία Παππά και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαριάννα Χατζηκωνσταντίνου για τη συνεργασία τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα τέλος να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Γιώργο και Βάσω και στην αδελφή μου Έρρικα, για την αγάπη, την κατανόηση και για τη συνεχή τους παρουσία δίπλα μου.

## Συντμήσεις

AEP	ασπαραγινυλο-ενδοπεπτιδάση
ALL	Οξεία λεμφοβλαστική λευκαίμια
ASNS	Συνθετάση της ασπαραγίνης
Asn24Arg	Μεταλλαγμένη μορφή Asn24 σε Arg
Asn24Leu	Μεταλλαγμένη μορφή Asn24 σε Leu
Asn24 Ser	Μεταλλαγμένη μορφή Asn24 σε Ser
BSA	Αλβουμίνη από ορό μόσχου
CTSB	Καθεψίνη Β
ddH <sub>2</sub> O	δις-απιονισμένο νερό
EcAI, EcAII	L-ασπαραγινάσες από <i>E.coli</i> τύπου I&II
IPTG	ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτο- πυρανοζίδιο
K <sub>m</sub>	Σταθερά Michaelis-Menten
KOH	καυστικό κάλιο
L-ASNase	L-ασπαραγινάση
L- Asn	L-Ασπαραγίνη
L-Asp	L- Ασπαραγινικό οξύ
L-Gln	L-Γλουταμίνη
L-Glu	L-Γλουταμινικό οξύ
mPEG	μονομέθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλη
NaCl	χλωριούχο νάτριο
PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
pI	Ισοηλεκτρικό σημείο

rpm	Στροφές/λεπτό
SDS	δωδεκανοθειϊκό νάτριο
StEP	διαδικασία της περιορισμένης επιμήκυνσης
TEMED	N,N,N',N'- τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη
Tris	Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο
U(unit)	Ενζυμική μονάδα

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>9</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
1.1 Δομή .....	12
1.2 Καταλυτικός μηχανισμός της L-ασπαραγινάσης .....	15
1.3 Εξειδίκευση υποστρώματος.....	18
1.4 Πηγές απομόνωσης της L- ασπαραγινάσης .....	20
1.5 Σημασία και εφαρμογές της L-ασπαραγινάσης.....	21
1.6 Ανοσολογική αντίδραση .....	23
1.7 Τοξικότητα.....	25
1.8 Εναλλακτικοί τρόποι χορηγήσεως της L-ασπαραγινάσης .....	29
1.8.1 Χημική τροποποίηση με PEG.....	31
1.9 Πλεονεκτήματα μεταφοράς των πρωτεϊνών στο περιπλασμικό χώρο .....	34
1.10 Πρωτεϊνική μηχανική .....	36
1.11 Σκοπός της εργασίας.....	41
<b>ΥΛΙΚΑ</b>	
2.1 Υλικά.....	45
2.2 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα .....	46
2.3 Εξοπλισμός .....	48
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
3.1 Μέθοδοι.....	51
3.1.1 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων του βακτηρίου <i>E. coli</i> XL-1 Blue .....	51
3.1.2 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA.....	52
3.1.3 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάση σε κύτταρα <i>E. coli</i> ...	54
3.1.4 Λύσιμο των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος .....	54
3.1.5 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford .....	55
3.1.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS- PAGE) 56	
3.1.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS) .....	56
3.1.6.2 Προετοιμασία του δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης .....	57
3.1.6.3 Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	57
3.1.7 Διαπίδυση .....	57
3.1.8 Καθαρισμός -Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	58

3.1.9 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της L-ασπαραγινάσης .....	60
3.1.10 Κινητική ανάλυση .....	61
3.1.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.....	62
3.1.12 Απομόνωση γονιδίου με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR:Polymerase Chain Reaction) .....	63
3.1.13 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης.....	65
3.1.14 Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση της L-ασπαραγινάσης και κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων .....	66
3.1.15 Ένωση των προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> XL1-Blue με τα ανασυδασμένα πλασμίδια .....	69
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
4.1 Μελέτη της ετερόλογης έκφρασης του ενζύμου σε 3 διαφορετικά στελέχη <i>E. coli</i> 72	
4.2 Ανάπτυξη βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού της L-ασπαραγινάσης76	
4.3 Κινητική ανάλυση .....	79
4.4 Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση κορεσμού της L-ασπαραγινάσης και κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων .....	81
4.5 Έλεγχος των θετικών κλώνων για ύπαρξη του μεταλλαγμένου γονιδίου στον φορέα pCR <sup>®</sup> T7/CT-TOPO <sup>®</sup> .....	86
4.6 Αλληλούχηση των μεταλλαγμένων γονιδίων .....	87
4.7 Έκφραση και καθαρισμός των μεταλλαγμένων μορφών της L- ασπαραγινάσης.....	89
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
5.1 Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	93
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	98



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Πρωτεϊνική μηχανική του ενζύμου L-ασπαραγινάση με στόχο την τροποποίηση της εκλεκτικότητάς του ως προς το υπόστρωμα

**Κασσιανή Κοντούρη, Νικόλαος Λάμπρου**

*Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Το ένζυμο L-ασπαραγινάση καταλύει την μετατροπή της L-ασπαραγίνης σε L-ασπαραγινικό οξύ και αμμωνία. Η ενδοφλέβια χορήγηση του ενζύμου, που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *E.coli*, έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική στη χημειοθεραπεία κατά της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης μεθόδου έκφρασης και καθαρισμού του ανασυνδυασμένου ενζύμου σε κύτταρα *E.coli* και η δημιουργία τροποποιήσεων στο ένζυμο με μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής, ώστε να προκύψουν νέες μορφές με τροποποιημένη εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα.

Το ένζυμο κλωνοποιήθηκε σε *E.coli* και μελετήθηκε η έκφρασή του σε διαφορετικά στελέχη και διαφορετικά θρεπτικά μέσα με σκοπό τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών που εξασφαλίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Αναπτύχθηκε βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο καθαρισμού του ανασυνδυασμένου ενζύμου με εφαρμογή χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε στήλη CM-Sepharose.

Νέες μορφές L-ασπαραγινάσης σχεδιάστηκαν με βάση δομικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας μοριακή μοντελοποίηση. Δομική ανάλυση έδειξε ότι το κατάλοιπο Asn-24 συμβάλει στη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του ενεργού κέντρου και επιλέχθηκε για περεταίρω μελέτη. Βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων μορφών πραγματοποιήθηκε με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση κορεσμού στη θέση 24 με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR. Οι νέες μορφές που απομονώθηκαν χαρακτηρίστηκαν κινητικά και διαπιστώθηκε ότι η θέση 24 συμβάλει σημαντικά στον καθορισμό και διαμόρφωση της εκλεκτικότητας του ενζύμου ως προς τα υποστρώματα L-ασπαραγίνη και L-γλουταμίνη.

## ABSTRACT

### **Alteration of substrate specificity of L-asparaginase by protein engineering.**

***Kassiani Kondouri and Nikolaos E. Labrou***

*Laboratory of Enzyme Technology, Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens*

L-asparaginase catalyzes the conversion of L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia. The intravenous administration of the enzyme, isolated from the bacterium *E. coli*, has proved very effective in chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia. The purpose of this study is to develop an integrated protocol for the expression and purification of the recombinant enzyme and to design and create mutant enzyme forms with altered substrate specificity.

The expression of the enzyme was investigated in different *E. coli* strains and in different culture media to determine the optimal conditions for achieving higher expression levels. An optimized purification protocol was developed using a single chromatographic step on ion-exchange column CM-Sepharose.

New mutant forms of the enzyme were designed using information from the crystal structure, employing molecular modeling. Structural analysis showed that Asn-24 contributes indirectly to active site architecture and was selected for further study. A library of mutant enzymes was constructed using PCR-based site-saturation mutagenesis at position 24. The library was screened using activity assays and new enzyme variants were isolated and characterized using kinetic analysis. The results showed that the position 24 contributes significant in determining the substrate specificity of the enzyme towards the substrates L-asparagine and L-glutamine.

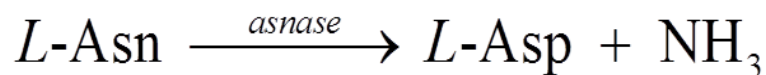
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A decorative graphic consisting of a horizontal dashed line that extends from the left edge of the page to the right edge of the text 'ΕΙΣΑΓΩΓΗ'. From the right end of this horizontal line, a vertical dashed line descends downwards, and then a second horizontal dashed line extends to the right edge of the page.

## 1.1 Δομή

Οι L-ασπαραγινάσες (αμιδο-υδρολάσες της L-ασπαραγίνης, L-ASNase) αποτελούν ένζυμα, τα οποία καταλύουν τη υδρόλυση της L-ασπαραγίνης σε L-ασπαραγινικό οξύ και αμμωνία (Εικόνα 1.1). Ταυτόχρονα, τα συγκεκριμένα ένζυμα διαθέτουν την ικανότητα υδρόλυσης και της L-γλουταμίνης. Ειδικότερα, με βάση τη συγγένειά τους ως προς τα δύο υποστρώματα, την L-ασπαραγίνη και την L-γλουταμίνη, οι βακτηριακές L-αμιδο-υδρολάσες κατατάσσονται σε δύο κλάσεις: στη πρώτη κλάση ανήκουν εκείνα τα ένζυμα, τα οποία πρωταρχικώς υδρολύουν την L-ασπαραγίνη και κατ'επέκταση παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια ως προς την L-ασπαραγίνη εν συγκρίση με την L-γλουταμίνη. Σημαντικοί εκπρόσωποι αυτής της κλάσης είναι οι L-ASNases των *Escherichia coli* (EcA) (Swain et al, 1992), *Erwinia chrysanthemi* (ErA) (Kotzia and Labrou, 2006), *Erwinia caratovora* (Kotzia and Labrou, 2005) και *Wolinella succinogenes* (WsA) (Lubkowski et al., 1996). Στη δεύτερη κλάση ανήκουν ενζυμικά μόρια, τα οποία καταλύουν την υδρόλυση της L-ασπαραγίνης και της L-γλουταμίνης με συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα. Σε αυτή τη κλάση ανήκουν οι L-ASNases των *Pseudomonas 7A* (PGA) (Lubkowski et al., 1994) και *Acinetobacter glutaminasificans* (AGA) (Lubkowski et al., 1994).



**Εικόνα 1.1.** Οι L-ασπαραγινάσες (αμιδο-υδρολάσες της L-ασπαραγίνης, L-ASNase) αποτελούν ένζυμα, τα οποία καταλύουν τη υδρόλυση της L-ασπαραγίνης σε L-ασπαραγινικό οξύ και αμμωνία.

Οι Borek & Jaskolski (2001) ταξινόμησαν όλες τις L-ασπαραγινάσες με βάση τις αμινοξικές τους ακολουθίες. Σύμφωνα με αυτήν την ταξινόμηση οι L-ασπαραγινάσες χωρίζονται σε τρεις τάξεις: στις βακτηριακού τύπου, στις φυτικού τύπου και στις *Rhizobium etli*-τύπου L-ασπαραγινάσες.

Οι L-ασπαραγινάσες βακτηριακού τύπου χωρίζονται με τη σειρά τους σε τύπου I και II. Τύπος I: είναι κυτταροπλασματικά ένζυμα με χαμηλή συγγένεια υποστρώματος (Schwartz et al., 1966). Οι τύπου I χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτές που η ακολουθία τους ομοιάζει περισσότερο με αυτή των λυσοφωσφολιπασών και σε αυτές που εμφανίζουν μεγαλύτερη αμινοξική ομολογία με την α υπομονάδα των αμιδοτρανσφερασών που τροποποιούν το Glu-tRNA. Τύπος II: είναι περιπλασματικά ένζυμα με υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα (Schwartz et al., 1966).

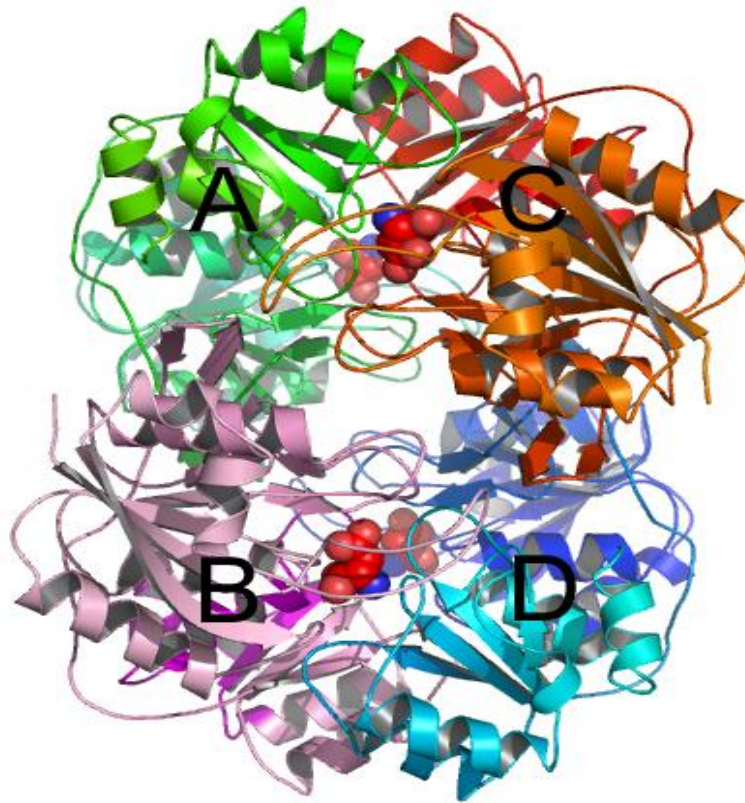
Η *E.coli* έχει δυο ισοένζυμα L-ασπαραγινάσης, δηλαδή τύπου I (EcAI) και τύπου II (EcAII). Οι φυτικού τύπου χωρίζονται επίσης σε δυο κατηγορίες, σε αυτές που η ακολουθία τους μοιάζει με εκείνες των ασπαρτυλγλυκοζαμινιδασών και σε αυτές που έχουν μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας με τις φυτικές L-ασπαραγινάσες.

Η μεταφορά των ενζύμων αυτών στο περίπλασμα αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία και περιλαμβάνει πολύπλοκους μηχανισμούς. Χαρακτηριστικό των ενζύμων, τα οποία μεταφέρονται στο περίπλασμα, είναι η ύπαρξη μιας επιπρόσθετης αμινοξικής αλληλουχίας (το μέγεθος της οποίας ποικίλλει), στην αρχή της κύριας ενζυμικής αλληλουχίας, η οποία διαδραματίζει τον ρόλο του “οδηγού” του ενζύμου προς το περίπλασμα και για το λόγο αυτό καλείται *πεππίδιο οδηγός*.

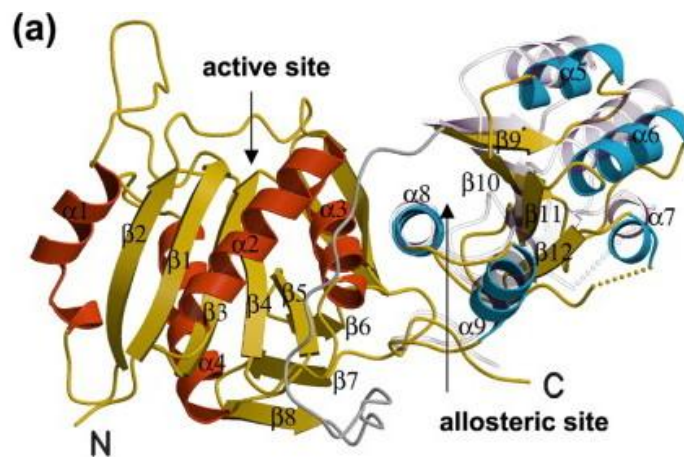
Ο προσδιορισμός των κρυσταλλικών δομών των L-ASNases από διάφορα βακτηριακά στελέχη όπως *E. coli* και *E. chrysanthemi*, αποτέλεσε τη βάση για την βαθύτερη κατανόηση του τρόπου, με τον οποίο τα συγκεκριμένα ένζυμα καταλύουν τη υδρόλυση της L-ασπαραγίνης και της L- γλουταμίνης, αν και ο ακριβής και πλήρης μηχανισμός κατάλυσης των δύο παραπάνω υποστρωμάτων παραμένει άγνωστος. Οι L-ASNases είναι ενεργές μόνο ως τετραμερή, τα οποία παρουσιάζουν μια συμμετρία τύπου 222, και χαρακτηρίζονται από ένα εύρος μοριακής μάζας 140-150 kDa (Aung et al., 2000; Aghaiyrou et al., 2001a,b; Kozak et al., 2002). Η ενεργή τετραμερής μορφή της EcA αποτελείται από 4 πανομοιότυπες υπομονάδες A ,B,C και D. Από τα έξι πιθανά ζεύγη υπομονάδων, εκείνα μεταξύ A καιC και μεταξύ B και D σχηματίζουν δυο πολύ στενά συνδεδεμένα ζεύγη υπομονάδων. Από αυτή την άποψη, το τετραμερές είναι ένα διμερές πανομοιότυπων πολύ στενά συνδεδεμένων διμερών (AC και BD, Εικόνα 1.2).

Κάθε μονομερές αποτελείται από περίπου 330 αμινοξικά κατάλοιπα, ο συνδυασμός των οποίων, σχηματίζει 14 β-πτυχωτές επιφάνειες και 8 α-έλικες (Aghaiyrou et al., 2001). Η δομή ενός μονομερούς χαρακτηρίζεται από 2 διακριτές περιοχές: μια μικρότερη C-τελική περιοχή και μια μεγαλύτερη N-τελική περιοχή, οι οποίες συνδέονται με μια αλληλουχία 20 αμινοξικών καταλοίπων (Εικόνα 1.3).

Το ενεργό κέντρο της L-ASNase βρίσκεται μεταξύ της C-τελικής περιοχής και της N-τελικής περιοχής των δύο γειτονικών μονομερών. Κατ' επέκταση, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι το τετραμερές της L-ASNase σχηματίζεται από ένα διμερές δύο διμερών. Παρόλα αυτά, η ενεργής μορφή του ενζύμου όπως αναφέρθηκε, είναι μόνο η τετραμερής.



**Εικόνα 1.2.** Το τετραμερές της EcA. Τα υποστρώματα (L-ασπαραγινικό) παρουσιάζονται ως σφαίρες. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα PyMOL.



**Εικόνα 1.3.** Δομή της υπομονάδας της L-ASNase της *E. coli*. (α) Μια αναπαράσταση του μονομερούς που δείχνει τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής. Η N-τελική περιοχή, οι α-έλικες που εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα, η C-τελική περιοχή όπου οι α-έλικες είναι μπλε και οι β-κλώνοι είναι σε κίτρινο και στις δύο περιοχές του μορίου. Η συνδετική περιοχή δεικνύεται με γκρι χρώμα. Δεικνύεται και η θέση της περιοχής C-τελική σε σχέση με τη σταθερή N-τελική περιοχή όπου γίνεται η συμπλοκοποίηση με L-ασπαραγίνη (ημιδιαφανές).

Επιπλέον, το ενεργό κέντρο του ενζύμου χαρακτηρίζεται από μια περιοχή, η οποία εμφανίζει μειωμένη ευελιξία και ελαστικότητα και είναι υπεύθυνη για τη πρόσδεση του δεσμευτή, καθώς επίσης και από μια δεύτερη ευέλικτη περιοχή που εξασφαλίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Οι κρυσταλικές δομές των άγγριων τύπων των ενζύμων καθώς επίσης και σημειακές μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο των L-ASNases, έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η καταλυτική δράση των ενζύμων αυτών βασίζεται στην ύπαρξη ενός καθοριστικού νουκλεόφιλου αμινοξέος στην ευέλικτη περιοχή του ενεργού κέντρου. Το αμινοξύ αυτό πιθανότατα είναι η θρεονίνη<sup>12</sup> (Thr<sup>12</sup>) και αποτελεί ένα αμινοξύ υψηλώς συντηρημένο για όλες τις L-ASNases, (Aghaiyrou et al., 2001; Palm et al., 1996).

## 1.2 Καταλυτικός μηχανισμός της L-ασπαραγινάσης

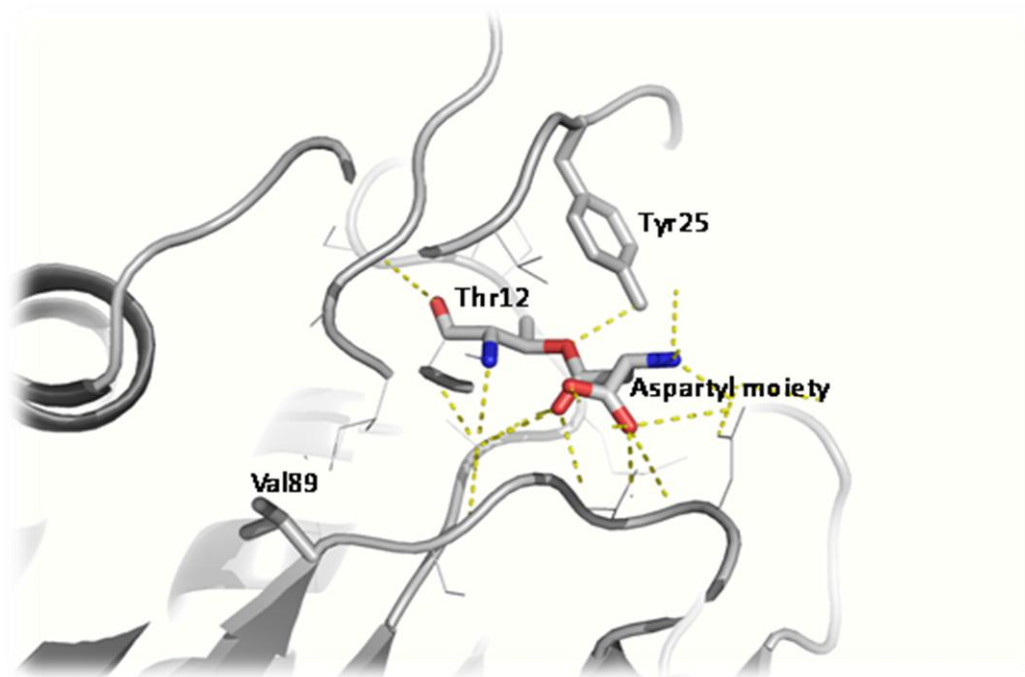
Σύμφωνα με τον επικρατούντα προτεινόμενο ενζυμικό μηχανισμό, η αντίδραση πραγματοποιείται μέσω μιας νουκλεόφιλης προσβολής στη β-αμινική ομάδα της L-ασπαραγίνης, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο ακυλο-ένζυμο και απελευθερώνοντας αμμωνία. Στη συνέχεια με τη βοήθεια ενός μορίου νερού που παίζει το ρόλο νουκλεόφιλου, πραγματοποιείται το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, η απακυλίωση, όπου διασπάται το ενδιάμεσο ακυλο-ένζυμο και απελευθερώνεται το προϊόν (L-ασπαραγινικό).

Για την κατανόηση του μηχανισμού αντίδρασης των L-ασπαραγινάσεων σε μοριακό επίπεδο κρίθηκε απαραίτητη η δομική μελέτη της EcA. Έξι αμινοξικά κατάλοιπα ( Thr-12, Tyr-25, Thr-89, Ser-58, Asp-90, Lys-162) φαίνεται να είναι σημαντικά για την καταλυτική δραστηριότητα (Wehner et al., 1994, Palm et al., 1996). Οι Swan et al. (1993) μελέτησαν το περιβάλλον αυτών των καταλοίπων με σκοπό να ανακαλύψουν γειτονικά κατάλοιπα που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το νουκλεόφιλο χαρακτήρα τους.

Το μόνο κατάλοιπο σε απόσταση υδρογονικού δεσμού είναι η Tyr-25, η οποία όμως δεν επηρεάζει τη νουκλεοφιλικότητα της Thr-12. Η υδροξυλομάδα της Tyr-25 απέχει ~ 4 Å από το δεσμευμένο ασπαραγινικό, υποδεικνύοντας ότι αν αυτή ήταν το νουκλεόφιλο κατάλοιπο, τότε κατά την κατάλυση θα είχε πραγματοποιηθεί είτε μια αλλαγή στη διαμόρφωση της κύριας αλυσίδας ή μια μεγάλη μετατόπιση στη θέση του προϊόντος, κάτι που δεν παρατηρείται (Swain et al., 1993). Όσον αφορά στη Ser-58, η μόνη πολική πλευρική αλυσίδα σε απόσταση υδρογονικού δεσμού από αυτήν είναι της Thr-91, η οποία δε θα ήταν ιδιαίτερος ικανή να τροποποιήσει το νουκλεόφιλο χαρακτήρα της Ser-58. Επιπλέον, για να είναι η Ser-58 το νουκλεόφιλο, θα έπρεπε η ασπαραγίνη να είχε το

αντίθετο προσανατολισμό από αυτόν που έχει βρεθεί για το ασπαραγινικό (Swain et al., 1993).

Η ενεργός θέση χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο καταλοίπων Thr (Thr 89 και Thr12) σε διαμετρικά αντίθετες θέσεις πάνω και κάτω από το CG ζεύγος του υποστρώματος. Και οι δύο θρεονίνες είναι απαραίτητες για τον μηχανισμό της αντίδρασης. Πρώιμες μελέτες έδειξαν ότι η Thr89 θα ενεργούσε ως το πυρηνόφιλο, το οποίο θα δώσει το άτομο C του δεσμού που έχει αποκοπεί. Η μετάλλαξη της Thr89 σε Val είχε σαν αποτέλεσμα τη σχεδόν αδρανή μετάλλαξη χωρίς αξιοσημείωτες αλλαγές σε σύγκριση με την άγρια μορφή (Εικόνα 1.4.). Ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ της ομάδας υδροξυλίου της Thr89 και της αμινομάδας Lys162, υποδεικνύουν επίσης τη σημαντικότητα του τελευταίου κατάλοιπου (Palm et al., 1996).



**Εικόνα 1.4.** Η πρόσδεση του ενδιάμεσου συμπλόκου στο ενεργό κέντρο της L-ASNase. Στο κέντρο της εικόνας διαφαίνεται η παρουσία της νουκλεόφιλης Thr12 (Labrou et al., 2010).

Ένας απομακρυσμένος δεσμός υδρογόνου μεταξύ Thr12 και Tyr25 εξηγεί περαιτέρω ότι η Tyr25 θα μπορούσε να συμμετέχει στην αφαίρεση πρωτονίων με την ενίσχυση της πυρηνοφιλικότητας της Thr12. κατά συνέπεια, προτάθηκε μία εναλλακτική καταλυτική τριάδα περιλαμβάνουσα Thr12, Tyr25 και Glu294. Με βάση λοιπόν τα διαθέσιμα δεδομένα ένας μηχανισμός πινγκ-πονγκ σε δύο στάδια έχει τελικά υποβάλει τη συμμετοχή



δύο καταλοίπων θρεονίνης, έκαστη σε διαφορετικό στάδιο της καταλυτικής αντίδρασης. Σε αυτή την περίπτωση οι L-ασπαραγινάσες εμφανίζονται να διαφέρουν από άλλα ένζυμα, λόγω της χρήσης δύο καταλυτικών τριάδων αντί για μία (Dodson et al., 1998).

Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τη παρουσία της Thr15 στο ενεργό κέντρο, η L-ASNase διαθέτει επιπλέον μια θρεονίνη, την Thr95. Μετά όμως από ανάλυση και μελέτη της κρυσταλικής δομής του ενδιάμεσου συμπλόκου του ενζύμου με το υπόστρωμα του μεταλλαγμένου ενζύμου Thr89Val, ενισχύθηκε η άποψη, ότι το νουκλεόφιλο αμινοξύ είναι η Thr15 (Palm et al., 1996). Επιπρόσθετα, μεταξύ του αμινοξέος Tyr25 και του προϊόντος της αντίδρασης L-ασπαρτικού οξέος, αναπτύσσονται πολύ ισχυροί δεσμοί υδρογόνου.

Οι τελευταίοι, σε συνδυασμό με επίσης πολύ ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της νουκλεόφιλης Thr12 και του L-ασπαρτικού, δημιουργούν μια πολύ ισχυρή πρόσδεση του L-ασπαρτικού στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Σημαντικά είναι τα αποτελέσματα μελετών, τα οποία αποδεικνύουν ότι το L-ασπαρτικό οξύ αποτελεί έναν συναγωνιστικό αναστολέα της L-ASNase (Jayaram et al., 1986).

Η Ser-120, είναι ένα επιπλέον σημαντικό κατάλοιπο στην EcA, αν και δεν βρίσκεται κοντά στην ενεργή περιοχή σύμφωνα με τους Swain et al., (1993). Η απόσταση μεταξύ του ασπαραγινικού εντός της ενεργού περιοχής και της Ser-120 είναι ~12,5Å. Το κατάλοιπο αυτό εντοπίζεται στο βρόγχο που σχηματίζει την αριστερόστροφη διασταύρωση μεταξύ των κλώνων Nβ4 και Nβ5. Ο βρόγχος αυτός συνδέεται με την άκρη του εύκαμπτου βρόγχου που καλύπτει την ενεργή περιοχή. Το καρβονυλικό οξυγόνο της Ala-20 στον εύκαμπτο βρόγχο σχηματίζει υδρογονικό δεσμό με το άζωτο της κύριας αλυσίδας της Met-121.

Επιπλέον, σε όλες τις γνωστές δομές L-ασπαραγινάσων κοντά στην ενεργή περιοχή είναι συντηρημένα δέκα μόρια νερού (Palm et al., 1996). Ένα δακτυλίδι πέντε μορίων νερού ενώνει όλα τα σημαντικά κατάλοιπα της ενεργού περιοχής με υδρογονικούς δεσμούς. Δύο από τα πέντε μόρια νερού μπορεί να συμμετέχουν στο μονοπάτι της ανταλλαγής της αμμωνίας με νερό κατά την ενζυμική αντίδραση. Μια άλλη ομάδα τεσσάρων μορίων νερού και τα κατάλοιπα Glu-93, Glu-94 και Arg-272 σταθεροποιούν το άζωτο και το οξυγόνο της κύριας αλυσίδας της Lys-162.

Το δεσμευμένο ασπαραγινικό έχει τη β-καρβοξυλομάδα του τοποθετημένη σε απόσταση υδρογονικού δεσμού από τη Thr-89 και με δεδομένο ότι η θέση και ο προσανατολισμός

του προιόντος είναι ίδιος με του υποστρώματος, τότε η Thr-89 είναι το πιθανότερο υποψήφιο νουκλεόφιλο. Το μόνο βασικό κατάλοιπο της ενεργού περιοχής, η Lys -162, θα μπορούσε να επηρεάσει το νουκλεόφιλο χαρακτήρα της Thr-89.

Αν η Thr-89 είναι το νουκλεόφιλο, οι θέσεις των Thr-12 και Tyr-25 είναι τέτοιες που μπορούν να σταθεροποιήσουν ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο. Το άζωτο της αμιδικής ομάδας του ασπαραγινικού είναι τοποθετημένο σε απόσταση υδρογονικού δεσμού από τα Gln-59 και Asp-90, καθώς και από τα Asn-248C και Glu-283C (της γειτονικής πολύ στενά συνδεδεμένης υπομονάδας), πιθανά για τη διευκόλυνση της δέσμευσης του υποστρώματος ή της σταθεροποίησης των μεταβατικών σταδίων (Swain et al., 1993).

Η παρουσία ενός κατάλοιπου Asp (Asp90) κοντά στην Thr 89 και στην Lys162 οδήγησε στην πρόταση μιας καταλυτικής μηχανικής τριάδας η οποία θα λειτουργεί παρόμοια προς εκείνη των πρωτεασών σερίνης. Ωστόσο μια μεταλλαγμένη Thr12Ala βρέθηκε επίσης να έχει αμελητέα καταλυτική δραστηριότητα, ενώ κατά την επώαση της L-Asn με ένα μεταλλάκτη της Thr89 σε Val , μία ασπαρτυλική ομάδα βρέθηκε ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την Thr12 που μοιάζει με μια ενδιάμεση συμπεριφορά ακυλο-ενζύμου. Επιπροσθέτως, μία δομική μελέτη με ανάλογα της γλουταμίνης και της ασπαραγίνης που έδρασαν ως αναστολείς του ενζύμου, υποστήριξε επίσης τον ρόλο του Thr12 ως το πρωταρχικό πυρηνόφιλο . Έτσι το ερώτημα ποιο από αυτά τα δύο κατάλοιπα θρεονίνης δρα ως πρωτογενής πυρηνόφιλο βρίσκεται υπό συνεχή συζήτηση (Palm et al., 1996).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό , ότι από τα σημαντικά για την καταλυτική δραστηριότητα αμινοξικά κατάλοιπα, οι θρεονίνες είναι σε ευνοϊκές θέσεις για νουκλεόφιλη προσβολή στο υπόστρωμα, δηλαδή το προτεινόμενο ως πρώτο στάδιο της αντίδρασης (Palm et al., 1996). Με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος των καταλοίπων έχουν πραγματοποιηθεί αμινοξικές υποκαταστάσεις σε διάφορες θέσεις και έχουν μελετηθεί οι μεταλλαγμένες μορφές που προέκυψαν.

### **1.3 Εξειδίκευση υποστρώματος**

Η δραστηριότητα L-γλουταμινάσης της EcA, ανέρχεται περίπου στο 2% της δραστηριότητάς της έναντι της L-ασπαραγίνης. Η L-γλουταμίνη είναι η κύρια μορφή μεταφοράς του αμινο αζώτου στο αίμα καθώς επίσης και δότης αμινομάδας σε πολλές βιοσυνθετικές αντιδράσεις. Επομένως, μια παρατεταμένη μείωση των επιπέδων L-γλουταμίνης στο πλάσμα ( σε κανονικό ορρό αίματος οι συγκεντρώσεις της L-ασπαραγίνης και L-

γλουταμίνης είναι περίπου 50 και 600μM αντίστοιχα) θα παρεμπόδιζε μια ποικιλία βιοχημικών λειτουργιών, ιδίως εκείνων του ήπατος.

Με βάση όλα αυτά τα γεγονότα τα καταλληλότερα ένζυμα για τη θεραπεία της ALL, θα είναι εκείνα με υψηλή δραστικότητα και εκλεκτικότητα (υψηλή συγγένεια) για L-ασπαραγίνη, έναντι της L-γλουταμίνης. Οι EcA και ErA ανταποκρίνονται περισσότερο σε αυτές τις απαιτήσεις ενώ άλλες L-ασπαραγινάσες υδρολύουν κατά προτίμηση L-γλουταμίνη.

Οι Derst et al. (2000) μελέτησαν την εξειδίκευση υποστρώματος των τύπου II γλουταμινασών/ασπαραγινασών, δηλαδή τη σχετική προτίμησή τους για ένα από τα εναλλακτικά υποστρώματα L-γλουταμίνη και L-ασπαραγίνη. Για το σκοπό αυτό πραγματοποίησαν αμινοξικές υποκαταστάσεις σε κάταλοιπα που παίρνουν μέρος στη δέσμευση του υποστρώματος και στην κατάλυση. Όλες οι γνωστές τύπου II L-ασπαραγινάσες με υψηλή δραστικότητα L-γλουταμινάσης έχουν αλανίνη στη θέση 57, ενώ οι EcA έχουν γλυκίνη. Κρίνοντας από τη θέση αυτή θα περίμενε κανείς ότι μεταλλάξεις στη θέση αυτή θα επηρέαζον τη δέσμευση του υποστρώματος. Παρ' όλα αυτά υποκατάσταση της Gly-57 με αλανίνη είχε μικρή επίδραση στην εξειδίκευση υποστρώματος ενώ αντίθετα επηρέαζε την κατάλυση (Derst et al., 2000).

Επίσης μόνο οι EcA έχουν γλουταμίνη στη θέση 59, ενώ γλουταμινικό υπάρχει στη θέση αυτή στα υπόλοιπα τύπου II ένζυμα. Η απομάκρυνση της πλευρικής αλυσίδας από τη θέση 59 ή η μείωση του μεγέθους της επηρέασαν τη δραστικότητα L-γλουταμινάσης σε μεγάλο βαθμό. Κινητικές μελέτες μάλιστα έδειξαν πως η Gln-59 είναι όντως απαραίτητη για αποτελεσματική δέσμευση του υποστρώματος (Derst et al., 2000).

Οι Derst et al. (2000) συνεπώς έδειξαν ότι η εξειδίκευση υποστρώματος των τύπου II γλουταμινασών/ασπαραγινασών, συντονίζεται από πλευρικές αλυσίδες καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με την α-αμινομάδα των υποστρωμάτων. Επίσης ανάμεσα σε αυτά τα κατάλοιπα η Asn-248 φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η Asn-248 παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της θεμελιώδους και μεταβατικής κατάστασης της κατάλυσης. Εκτός από τον καταλυτικό ρόλο, η Asn-248 είναι και ένας σημαντικός παράγοντας σταθεροποίησης του τετραμερούς της EcA, αφού εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με υδρογονικούς δεσμούς μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων.

#### 1.4 Πηγές απομόνωσης της L- ασπαραγινάσης

Οι L-ασπαραγινάσες υπάρχουν σε πολλούς ιστούς ζώων, σε βακτήρια, σε φυτά και στον ορρό συγκεκριμένων τρωκτικών, αλλά όχι στους ανθρώπους. Η πρώτη L- ασπαραγινάση με αντι-λευχαιμικές ιδιότητες που απομονώθηκε από τον ορρό ινδικού χοιριδίου ποτέ δεν χαρακτηρίστηκε εκτενώς με κλινικές μελέτες, αφού η παραγωγή του ενζύμου είναι περιορισμένη. Μια μικροβιακή L- ασπαραγινάση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli* ήταν η πρώτη που μελετήθηκε λεπτομερώς και που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.

Η συστηματική μελέτη για την ταυτοποίηση άλλων πιθανών πηγών L- ασπαραγινάσης πραγματοποιήθηκαν σε φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς που υδρολύουν την L-ασπαραγίνη για παραγωγή ενέργειας. Οι μελέτες αυτές προσδιόρισαν βακτηριακά είδη, εκτός του *E.coli*, (Mercado & Arenas, 1999), τα οποία εμφάνιζαν ανάλογη δραστικότητα L-ασπαραγινάσης. Από αυτά τα είδη η *Erwinia carotovora* , που αργότερα μετονομάστηκε σε *Erwinia chrysanthemi* (ErA, Maladkar et al., 1993, Miller et al., 1993, Aghaiypour et al., 2001) , εμφάνισε την υψηλότερη δραστικότητα L- ασπαραγινάσης και συνεπώς χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή του ενζύμου σε μεγαλύτερη κλίμακα (Wade et al., 1971, Muller & Boos 1998).

Άλλοι μικροοργανισμοί στους οποίους παράγεται L- ασπαραγινάση είναι οι: *Enterobacter aerogenes* (Mukherjee et al., 2000), *Corynebacterium glutamicum* (Mesas et al., 1990), *Candida utilis* (Kil et al., 1995), *Staphylococcus aureus* (Muley et al., 1998), *Thermus thermophilus* (Pritsa & Kyriakidis, 2001), *Pisum sativum* (Sieciechowicz & Ireland, 1989), *Wolinella succinogenes* (Lubkowski et al., 1996), *Acinetobacter glutaminasificans* (Housset et al., 1994), *Pseudomonas 7A* ( Jakob et al., 1997), *Serratia marcescens* (Stern et al., 1976), *Pseudomonas aeruginosa* 50071 (El- Bessoumy et al., 2004), *Aspergillus terreus* (Ali et al., 1994).

Αν και η L- ασπαραγινάση υπάρχει σε διάφορους μικροοργανισμούς, όπως σε ζύμες, μύκητες και σε πολλά βακτήρια, τα ένζυμα από διαφορετικές πηγές δεν είναι όλα κλινικά ενεργά .Δύο είναι εκείνα που έχουν επαρκή ενζυμική δραστικότητα και τέτοιο χρόνο ημιζωής στο αίμα που να τα καθιστά κατάλληλα για κλινική χρήση. Τα ένζυμα αυτά είναι βακτηριακής προέλευσης και είναι τα εξής: το ισοένζυμο II, η L- ασπαραγινάση από *E.coli* (EcAII) και το ισοένζυμο από *Erwinia chrysanthemi* ( ErA) (Albertsen et al., 2001).

### 1.5 Σημασία και εφαρμογές της L-ασπαραγινάσης

Το ενδιαφέρον για τις L-ασπαραγινάσες προέκυψε από την παρατήρηση ότι το ένζυμο αυτό εμφανίζει αντιλεμφοματική δράση. Κάποια είδη καρκινικών κυττάρων αδυνατούν να συνθέσουν το βασικό αμινοξύ L-Asn και επομένως στηρίζονται σε εξωκυτταρική παροχή του αμινοξέος αυτού (Muller et al., 1998). Αντίθετα, τα υγιή κύτταρα προστατεύονται από την έλλειψη ασπαραγίνης, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν αυτό το αμινοξύ με το ένζυμο συνθετάση της L-ασπαραγίνης (Duval et al., 2002).

Συνεπώς η αντιλεμφοματική δράση της L-ασπαραγινάσης οφείλεται στην εξάντληση όλων των αποθεμάτων L-ασπαραγίνης από την κυκλοφορία του αίματος. Ταχεία μείωση της L-Asn και της L-Gln στον ορό των ασθενών, εξασφαλίζει τη βέλτιστη εξόντωση των λευχαιμικών κυττάρων μέσω απόπτωσης. Σε αντίθεση, μια σταδιακή ή ελλιπή εξάντληση των L-Asn ή L-Gln μπορεί να επιτρέπει στα λευχαιμικά κύτταρα να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν (Avramis et al., 2002).

Η L-ασπαραγινάση (L-ASNase) αποτελεί ένα ένζυμο, το οποίο, μεταξύ άλλων χημικών ουσιών, χρησιμοποιείται τα τελευταία 30 χρόνια για την αντιμετώπιση της παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Acute Lymphoblastic Leukemia-ALL) (Bain et al., 2002). Η λευχαιμία είναι η υπερβολική αύξηση παθολογικών λευκών αιμοσφαιρινών, χωρίς καμία προφανή αιτία. Προσβάλλει το αιμοποιητικό σύστημα που αποτελείται από διάφορα κύτταρα με διαφορετική μορφή και λειτουργία, τα οποία παράγονται στον μυελό των οστών. Όταν κάποιο άτομο νοσήσει από λευχαιμία, ξεκινά μια υπερπαραγωγή παθολογικών λευκών αιμοσφαιρίων στον μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά δεν επιτελούν τη φυσιολογική τους λειτουργία, η οποία είναι η προστασία του οργανισμού από ανεπιθύμητες λοιμώξεις. Για το λόγο αυτό η λευχαιμία ονομάζεται και καρκίνος του αίματος ή και καρκίνος του μυελού των οστών (Εικόνα 1.5.).

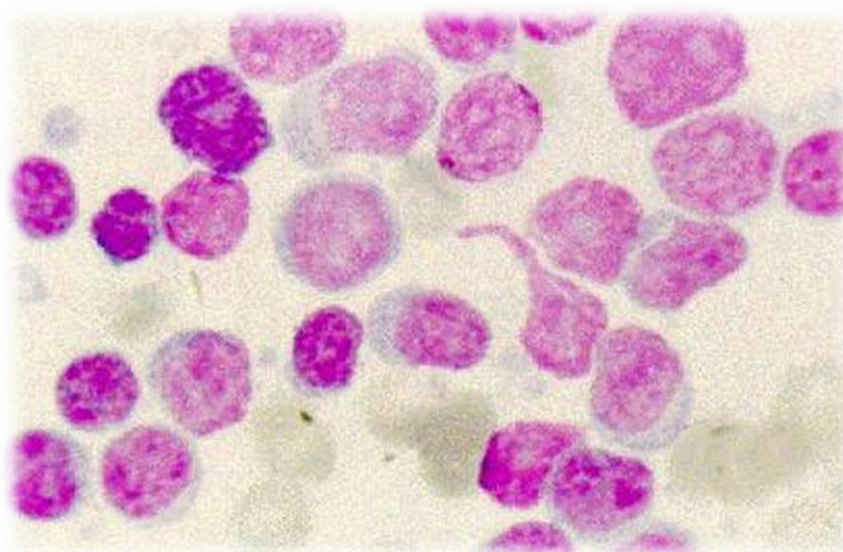
Η λευχαιμία χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: στις χρόνιες και στις οξείες. Οι οξείες παρουσιάζονται κυρίως στα παιδιά (βρέφη έως 20 ετών), ενώ οι χρόνιες προσβάλλουν άτομα από τα 50 έτη και πλέον. Τα περισσότερο συνηθισμένα είδη λευχαιμίας είναι η μυελογενής και η λεμφοβλαστική και μπορεί με τη σειρά τους να είναι οξείες ή χρόνιες (Riley R. et al., 2002). Κατ' επέκταση, μπορούμε να έχουμε 4 είδη λευχαιμίας:

1. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία - Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)
2. Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία - Chronic Lymphoblastic Leukemia (CLL)
3. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία - Acute Myelogenous Leukemia (AML)

#### 4. Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία - Chronic Myelogenous Leukemia (CML).

Ένα από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων στη περίπτωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, είναι η αδυναμία τους να συνθέσουν το απαραίτητο για την πρωτεϊνοσύνθεση αμινοξύ L-ασπαραγίνη. Η αδυναμία τους αυτή, απορρέει από το γεγονός ότι η συνθετάση της ασπαραγίνης στα κύτταρα αυτά υπολειτουργεί (Keating et al., 1993; Moola et al., 1994). Αυτό σημαίνει ότι η πρωτεϊνοσύνθεση αυτών των κυττάρων εξαρτάται άμεσα και καταλυτικά από την εξωκυττάρια συγκέντρωση L-ασπαραγίνης στο αίμα (Holcenberg et al., 2005).

Σε αυτό ακριβώς το σημείο διαδραματίζει το ρόλο της η L-ASNase, η οποία καταλύει την υδρόλυση της διαθέσιμης L-ασπαραγίνης που υπάρχει στο αίμα (Keating et al., 1993; Lee et al., 1989). Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την έναρξη της μείωσης της εξωκυττάριας L-ασπαραγίνης, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα μη μπορώντας να πρωτεϊνοσυνθέσουν, να οδηγούνται στον θάνατο. Αξίζει να σημειωθεί, ότι μια αρκετά μεγάλη μείωση των επιπέδων συγκέντρωσης της L-ασπαραγίνης στο αίμα (< 10% των φυσιολογικών επιπέδων) πρέπει να επιτευχθεί, έτσι ώστε να οδηγηθούμε σε μια αποτελεσματική θεραπεία. Σε αυτό το σημείο κρίνεται αναγκαίο να αναφέρουμε ότι η L-ASNase δεν συντελεί μόνο στην αντιμετώπιση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, αλλά και σε μια σειρά επιπλέον ασθενειών όπως η χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία, η ασθένεια του Hodgkins, το λεμφοσάρκωμα, το μελανοσάρκωμα (Stecher et al., 1999; Duval et al., 2002).



**Εικόνα 1.5.** Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL) όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο.

Λεπτομερείς φαρμακοκινητικές (PK) και φαρμακοδυναμικές (PD) αξιολογήσεις ανάμεσα σε χιλιάδες ατομικές προσομοιώσεις ασθενών, έχουν αποκαλύψει την πολυπλοκότητα των σχέσεων μεταξύ της δραστηριότητας της L-ασπαραγινάσης και της εξάντλησης των στόχων της στον ορό. Επιπλέον, η *de novo* βιοσύνθεση για την παραγωγή της L-Asn απαιτεί L-Gln για την πηγή της αμμωνίας και σε ένα στάδιο καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση της ασπαραγίνης (ASNS). Οι τιμές δραστηριότητας των ASNS μπορεί να ποικίλουν μεταξύ των ατόμων, ανάλογα με την ηλικία και την ηπατική τοξικότητα, και μπορεί εύκολα να υπερεκφράζονται μετά από έκθεση σε L-ASNase. Ως εκ τούτου, η παραγωγή της L-Asn πιθανότατα αυξάνεται όσο η δραστηριότητα της L-ASNase μειώνεται με τον χρόνο, έχοντας ως αποτέλεσμα την πρόωρη απώλεια της εξάντλησης των αμινοξέων σε μια περίοδο επαρκούς δραστηριότητας της ασπαραγινάσης.

Η διαδικασία της παραγωγής της L-Asn από ασπαρατικό οξύ και γλουταμίνη ως πηγή αμμωνίας μέσω της κατάλυσης των συνθετασών της ασπαραγίνης (ASNS) σε πολλά όργανα και ιστούς ξενιστών καθώς και της L-Asn από τα θρεπτικά συστατικά όπου οι ασθενείς λαμβάνουν το ελάχιστο της L-Asn λόγω της ενζυματικής κατάλυσης με την L-ASNase, σε κάθε δεδομένη στιγμή ονομάζεται μέγιστη  $I_{max}$  εισόδου της L-Asn., δηλ. αντιπροσωπεύει τη συνολική βιοσύνθεση της L-Asn και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις στον ορό των L-Asp και L-Gln. Ωστόσο, σε απουσία L-Gln, οι ASNS δεν μπορούν να συνθέσουν L-Asn. Ως εκ τούτου, η χρήση μιας νέας και καθαρότερης L-ASNase με επαρκή δραστηριότητα γλουταμινάσης είναι επιθυμητή για τις μελλοντικές κλινικές χρήσεις.

### **1.6 Ανοσολογική αντίδραση**

Παρά τη σημασία των L-ASNases ως θεραπευτικών παραγόντων, έχουν προκύψει μια σειρά από μειονεκτήματα. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ασπαραγινάση, η επανειλημμένη χρήση του φαρμάκου είναι συνήθως απαραίτητη λόγω του ότι το ένζυμο έχει σχετικά σύντομο χρόνο ημιζωής που οφείλεται στη χαμηλή δομική σταθερότητα και την πρόωρη αδρανοποίηση του από πρωτεάσες του ορού. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της θρυψίνης στον ορό του αίματος αυξάνουν σημαντικά σε 10 και 20 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας με L-Asnase. Επιπλέον οι Patel et al. (2009), έχουν εντοπίσει δύο λυσοσωμικές πρωτεάσες κυστεΐνης, την καθεψίνη B (CTSB) και την ασπαραγινυλο-ενδοπεπτιδάση (AEP) σε λεμφοβλάστες, οι οποίες μπορούν να υδρολύσουν την L-ASNase και ως εκ τούτου να διαμορφώσουν την θεραπευτική δράση

της. Αυτή η νέα υδρόλυση μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνη και για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι της ασπαραγινάσης (Ab).

Οι CTSB και AEP υδρολύουν την δράση της L-ASNase όπως αναφέρεται παραπάνω. Ειδικότερα, η CTSB εκφράζεται ακριβώς με την ίδια σύσταση τόσο από φυσιολογικά όσο και από λευχαιμικά κύτταρα και διασπά τις EcAII και ErA. Η AEP, η οποία υπερεκφράζεται κατά κύριο λόγο σε σύνολα ατόμων με υψηλού κινδυνού ALL, υδρολύει τη EcAII. Η AEP καταστρέφει επομένως την δραστικότητα της EcAII και οδηγεί σε αλλεργικές αντιδράσεις. Το κατάλοιπο της Asn24 του εύκαμπτου ενεργού βρόγχου ταυτοποιήθηκε ως το πρωταρχικό για τη θέση αναγνώρισης από την AEP. Η AEP διασπά την EcAII στη θέση Asn24, η οποία εντοπίζεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου και καθορίζει την διαμόρφωση και κινητικότητα του ευέλικτου βρόγχου στο N-τελικό άκρο. Η μεταλλαγμένη μορφή Asn24Gly της EcAII είναι ανθεκτική στην AEP, αλλά δυστυχώς οι μελέτες έδειξαν πως ήταν λιγότερο δραστική όταν συγκρίνεται με αυτή του άγριου τύπου (σχετική ενεργότητα 45%).

Σε περίπτωση βέβαια ανοσολογικής αντίδρασης από ένα παρασκεύασμα L-ασπαραγινάσης είναι δυνατή η συνέχιση της θεραπείας επιλέγοντας ένα ένζυμο από διαφορετική βιολογική πηγή, αφού πλέον είναι διαθέσιμες L-ασπαραγινάσες από διαφορετικά βακτηριακά στελέχη οι οποίες εμφανίζουν διαφορετικά ανοσολογικά χαρακτηριστικά. Κλινικές δομικές έδειξαν ότι μόνο 20-25% των ασθενών εμφανίζουν πάλι παρόμοια υπερευαισθησία όταν υποκατασταθεί με άλλο το φαρμακευτικό παρασκεύασμα που τους χορηγείται, συνεπώς η θεραπεία μπορεί να ολοκληρωθεί στο 90% των ασθενών.

Η θεραπεία συχνά ξεκινά με κάποιο παρασκεύασμα που περιέχει L-ασπαραγινάση από *E.coli*. Όταν εμφανίζονται αντιδράσεις υπερευαισθησίας τότε η φαρμακευτική αγωγή τροποποιείται, συνήθως με κάποιο παρασκεύασμα που περιέχει ένζυμο από *Erwinia chrysanthemi* (Ohnuma et al., 1972, Billett et al., 1992).

Οι θεραπευτικές L-ασπαραγινάσες που χρησιμοποιούνται εκδηλώνουν τόσο ανοσογονικές όσο και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και εκτός από την επίδρασή τους στα λευχαιμικά κύτταρα, καταστέλλουν ελαφρά και τη φυσιολογική λειτουργία του μυελού των οστών, οδηγώντας έτσι σε αύξηση μολύνσεων κατά τη θεραπεία. Οι Johnston et al., ανέφεραν μεγαλύτερο ποσοστό μολύνσεων από gram αρνητικά βακτήρια (που οδήγησαν ακόμα και σε θάνατο) σε ασθενείς που τους χορηγούνταν συνδυασμός χημειοθεραπείας που



περιείχε L-ασπαραγινάση, συγκριτικά με ασθενείς που κατά τα άλλα είχαν όμοια θεραπευτική αγωγή.

Οι προσπάθειες της πρωτεϊνικής-μηχανικής για τη δημιουργία νέων μορφών της L-ASNase πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τη σταθερότητα των ενζύμων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Συγκριτικές μελέτες σταθερότητας της πρωτεΐνης έχουν, σε γενικές γραμμές, αγνοηθεί στο παρελθόν. Η EcAII και ErA που χρησιμοποιούνται σήμερα στις θεραπείες έχουν ουσιαστικά διαφορετικούς χρόνους ημιζωής στο αίμα. Η πρόσφατη ταυτοποίηση των νέων L-ASNase οδήγησε σε μια πιο προσεκτική ματιά των θερμοδυναμικών σταθεροτήτων τους σε σύγκριση με τις L-ασπαραγινάσες που υπήρχαν ήδη στο εμπόριο. Οι Kotzia and Labrou, (2009) διερεύνησαν την δυνατότητα για την *in vitro*, δημιουργία μιας νέας παραλλαγής του ενζύμου με βελτιωμένη θερμική σταθερότητα. Μια βιβλιοθήκη των μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου δημιουργήθηκε με τη διαδικασία της περιορισμένης επιμήκυνσης (StEp) χρησιμοποιώντας τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις L-ασπαραγινάσες από την ErA και EwA. Οι αλληλουχίες των γονιδίων των L-ασπαραγινάσεων έχουν 77% ομολογία, αλλά η θερμοκρασία αδρανοποίησής τους τους διαφέρει κατά 10°C.

Μια θερμοσταθερή παραλλαγή της ErA ταυτοποιήθηκε ότι περιείχε μία σημειακή μετάλλαξη (Asp133Val). Η  $T_m$  αυτής της παραλλαγής ήταν 55,8°C ενώ το ένζυμο αγρίου τύπου έχει  $T_m$  46,4°C. Ανάλυση του ηλεκτροστατικού δυναμικού του ενζύμου αγρίου τύπου έδειξε ότι η Asp133 βρίσκεται σε ουδέτερη περιοχή στην επιφάνεια του ενζύμου και κάνει μια σημαντική και δυσμενή ηλεκτροστατική συνεισφορά στη συνολική σταθερότητα.

### 1.7 Τοξικότητα

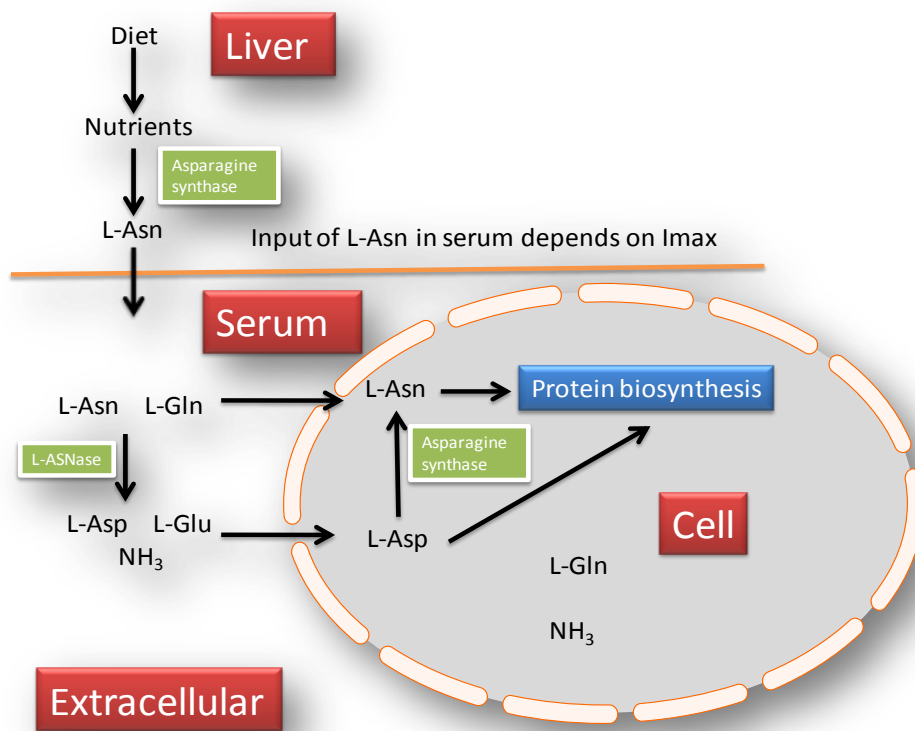
Μετά τη χορήγηση L-ασπαραγινάσης, το μη βασικό αμινοξύ L-ασπαραγίνη υδρολύεται σε L-ασπαραγινικό και αμμωνία και έτσι η L-ασπαραγίνη του πλάσματος εξαντλείται. Τα κακοήθη κύτταρα που ανταποκρίνονται στη θεραπεία προφανώς είναι ανίκανα να εξασφαλίσουν τη δική τους παροχή L-ασπαραγίνης λόγω της μειωμένης, συγκριτικά με το φυσιολογικά κύτταρα, δραστηριότητας σύνθεσής της L-ασπαραγίνης που διαθέτουν. Συνεπώς τα κύτταρα αυτά εξαρτώνται από την εξωκυτταρική διαθεσιμότητα αυτού του αμινοξέος. Η έλλειψη της L-ασπαραγίνης εμποδίζει την πρωτεϊνική σύνθεση, οδηγώντας στη συνέχεια σε παρεμπόδιση της σύνθεσης DNA και RNA και συνεπώς σε βλάβη της κυτταρικής λειτουργίας και στον κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 1.6.), (Müller &Boos, 1998).

Ο προαναφερόμενος μηχανισμός λειτουργίας της L-ασπαραγινάσης είναι διαφορετικός από εκείνους των άλλων ουσιών που εφαρμόζονται στη θεραπεία κακοηθειών, συνεπώς μόνο μικρού βαθμού τοξικότητα έναντι των φυσιολογικών κυττάρων και οργανικών συστημάτων ήταν αναμενόμενη όταν το ένζυμο αρχικά εισήχθη στα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Όμως όταν εφαρμόστηκαν αυτά τα πρωτόκολλα σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών ήταν εμφανές ότι εκτός από ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι του ενζύμου, συχνά επηρεάζονταν και τα υγιή κύτταρα. Οι επιδράσεις αυτές αποδόθηκαν κυρίως σε δυο λόγους, στην ανοσολογική ευαισθητοποίηση προς την ξένη πρωτεΐνη και στην παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης (Graham, 2003).

Η παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης επηρεάζει όλα τα κύτταρα ανάλογα με τη συνθετική τους ικανότητα και επομένως οι προκαλούμενες από την L-ασπαραγινάση παρενέργειες περιλαμβάνουν πολλά οργανικά συστήματα. Ο αριθμός των ασθενών που προσβλήθηκαν σε κλινικές έρευνες είναι μικρός και μειώνεται με τη χρήση πιο καθαρών παρασκευασμάτων τα οποία είναι τώρα διαθέσιμα. Επιπλέον, επειδή η χορήγηση L-ασπαραγινάσης συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, μπορεί να είναι δύσκολο να συσχετιστεί κάποια παρενέργεια καθαρά με ένα εξειδικευμένο φάρμακο. Οι κυριότερες τοξικότητες της L-ασπαραγινάσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.7.

Δυστυχώς όπως αναφέρθηκε, η χρήση του ενζύμου αυτού ως μέσο για την αντιμετώπιση ασθενειών με κύριο εκπρόσωπο την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, διαθέτει σημαντικά μειονεκτήματα όπως η επαγωγή μιας σειράς σοβαρότατων παρενεργειών, οι οποίες ποικίλουν με το στάδιο της ασθένειας και τον οργανισμό του ασθενούς. Ένας από τους κυριότερους λόγους για την πρόκληση αυτών των σοβαρών παρενεργειών είναι η ταυτόχρονη δράση του ενζύμου και ως γλουταμινάση (Ollenschlager et al., 1988).

Η τοξικότητα των L-ασπαραγινάσεων οφείλεται εν μέρει στη δραστικότητα L-γλουταμινάσης που εμφανίζουν αυτά τα ένζυμα. Έχει παρατηρηθεί πως οι L-ασπαραγινάσες που έχουν υψηλή συγγένεια με την L-Asn και χαμηλή έως αμελητέα με την L-Gln παρουσιάζουν λιγότερα προβλήματα κατά την αντικαρκινική θεραπεία (Hawkins et al., 2004). Για παράδειγμα η αντικαρκινική δράση του PGA, που αποδείχθηκε σε μελέτες με ποντίκια, συνοδευόταν και από διάφορες παρενέργειες, οι οποίες (σε κάποιο ποσοστό τουλάχιστον) συνδέονταν με τη δραστικότητα της L-γλουταμινάσης αυτού του ενζύμου (Distasio et al., 1982).



**Εικόνα 1.6.** Μηχανισμός δράσης L-ασπαραγινάσης. Μετά τη χορήγηση L-ασπαραγινάσης, το μη βασικό αμινοξύ L-ασπαραγίνη υδρολύεται σε L-ασπαραγινικό και αμμωνία και έτσι η L-ασπαραγίνη του πλάσματος εξαντλείται. Τα κακοήθη κύτταρα που ανταποκρίνονται στη θεραπεία είναι ανίκανα να εξασφαλίσουν τη δική τους παροχή L-ασπαραγίνης λόγω της μειωμένης, συγκριτικά με το φυσιολογικά κύτταρα, δραστηριότητας συνθετάσης της L-ασπαραγίνης που διαθέτουν. Συνεπώς τα κύτταρα αυτά εξαρτώνται από την εξωκυτταρική διαθεσιμότητα αυτού του αμινοξέος.

Τα πιο κοινά συμπτώματα που εμφανίζονται με τη χορήγηση πολλαπλών δόσεων του ενζύμου μέσα σε λίγες ώρες ή λίγες μέρες είναι: διέγερση, ερυθρότητα, οίδημα στο σημείο της ένεσης, ρίγη, κόπωση, εξάνθημα, πυρετός, κεφαλαλγία, ευερεθιστότητα, πόνος στις αρθρώσεις, απώλεια της όρεξης, πόνος στους μυς, ναυτία, εξάνθημα, έμετος, απώλεια βάρους. Ενώ εμφανίζονται και σε μια σειρά από αλλεργικές αντιδράσεις: εξάνθημα, κνίδωση, δυσκολία στην αναπνοή, σφίξιμο στο στήθος, διόγκωση του στόματος, του προσώπου, τα χείλη ή τη γλώσσα. Όλα αυτά τα συμπτώματα είναι τύπου II ανοσολογικές αλλεργικές αντιδράσεις που οφείλονται σε παραγωγή IgG αντι-ASNase αντισωμάτων. Ωστόσο, τα σκοτεινά ούρα, παραισθήσεις, υψηλός πυρετός, δυσκολία της αναπνοής και κώμα είναι επίσης σοβαρές ανοσολογικές αντιδράσεις τύπου I λόγω της παραγωγής υψηλών επιπέδων των IgE αντι-ASNase αντισωμάτων (Avramis, 2011).

**Πίνακας 1.7.** Οι κυριότερες τοξικότητες της θεραπείας με L-ασπαραγινάση (Graham, 2003)

<p><b><u>Τοξικότητες L-ασπαραγινάσης</u></b></p> <p><b>Υπερευαισθησίες</b> Ουρτικάρια (αλλεργική νόσος) Άλλο εξάνθημα Βρογχοσπασμός Υπόταση</p> <p><b>Ηπατικές δυσλειτουργίες</b> Υποαλβουμιναιμία/υπολευκωματοδαιμία Ανωμαλίες λιποπρωτεϊνών Αυξημένες τιμές τρανσαμινασών, χολερυθρίνης, αλκαλικής φωσφατάσης</p> <p><b>Ανεπάρκεια προθρομβωτικών παραγόντων και παραγόντων πήξεως</b></p> <p><b>Παγκρεατίτιδα</b></p> <p><b>Εγκεφαλικές δυσλειτουργίες</b> Λήθαργος Αποπροσανατολισμός Κόμμα Εγκεφαλικά</p> <p><b>Παρωτίτιδα</b></p> <p><b>Καταστολή ανοσοποιητικού συστήματος</b></p>
---

Οι κυριότερες όμως παρενέργειες που προκαλούνται σε ασθενείς είναι δυσλειτουργίες του ήπατος, παγκρεατίτιδα, διαβήτης, υπεργλυκαιμία, ανοσοκαταστολή νευρολογικές διαταραχές, αιμορραγία και θρόμβωση (Duval et al., 2002; Kontzia and Labrou, 2007, Parageorgiou et al., 2008). Η θρόμβωση είναι μια από τις σοβαρότερες παρενέργειες από τη χρήση της L-ASNase και συνδέεται άμεσα με τους πηκτικούς παράγοντες του αίματος. Το πρόβλημα προκύπτει από το γεγονός ότι η L-ASNase επιδρά και μειώνει τα επίπεδα συγκέντρωσης της αντι-θρομβίνης (anti-thrombin-AT), μιας πρωτεΐνης, η οποία συντελεί στη διατήρηση της πήξης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα (Payne and Vora, 2007).

Δυσλειτουργίες του ήπατος και του παγκρέατος παρουσιάζονται ως θρομβοπάθειες και παγκρεατίτιδες, με δυσλειτουργία του ΚΝΣ να παρατηρείται λιγότερο συχνά. Οι θρομβοπάθειες φαίνεται να είναι πιο εμφανής σε ενήλικες ασθενείς με ALL και σε υψηλότερο ποσοστό από ό, τι σε παιδιά ασθενείς. Ωστόσο, σε ακραίες περιπτώσεις, αυτή η μορφή της τοξικότητας μπορεί να είναι σοβαρή. Υπερευαισθησία λόγω παραγωγής

αντισωμάτων Ab(+) είναι η πιο κοινή. Η σοβαρότητα των κλινικών συμπτωμάτων της αλλεργίας που κυμαίνονται από εντοπισμένο ερέθισμα στο σημείο της ένεσης μέχρι σε συστηματική αναφυλαξία έχουν αναφερθεί στα δύο τρίτα των ασθενών που λαμβάνουν εντατική θεραπεία.

Σε μια μεγάλη κλινική μελέτη που αφορούσε τις L-ASNs, κλινικές εκδηλώσεις και δείκτες για σακχαρώδη διαβήτη, παγκρεατίτιδα και υπερλιπιδαιμία, νευροτοξικότητα και εγκεφαλικοί παράμετροι παρακολουθούνται σε κύρια βάση. Αλλαγές στην πήξη και ινωδολύση θα πρέπει να παρακολουθούνται καθ' όλη την θεραπεία. Τοξικότητες από αυτές τις εκδηλώσεις περιλαμβάνουν, τοξικότητες οργάνων όπως: παγκρεατίτιδα και συναφείς υπεργλυκαιμία, γλυκοζουρία, κετοξέωση, εγκεφαλικές δυσλειτουργίες, υπολευκωματιναιμία, υπερέυπηκτη κατάσταση που οδηγεί σε διαταραχές της πήξης συμπεριλαμβανομένης της θρόμβωσης της κοίλης φλέβας και άλλων μεγάλων αιμοφόρων αγγείων, μείωση της αντιθρομβίνης III και άλλων παραγόντων πήξης και ενδεχομένως εγκεφαλικό επεισόδιο.

Στο κομμάτι της τοξικότητας, εκτός από την παραγωγή των αντισωμάτων, έχει μελετηθεί και ο μηχανισμός των ASNs όπου αναφέρθηκαν παραπάνω. Η ρύθμιση του μηχανισμού αντίστασης των ASNs στην ασπαραγινάση μείωσε τα λευχαιμικά κύτταρα όπως αποδείχτηκε *in vitro*. Σε κλινικές αξιολογήσεις, απεδείχθη ότι θεραπεία ασθενών με ασπαραγινάση προκάλεσε έκφραση του mRNA για ASNs. Ωστόσο, η υπερέκφραση του γονιδίου δεν σχετίζονταν με αλλαγή στην κλινική απόκριση ασθενών με ALL που δέχονταν ένα πολυφαρμακευτικό σχήμα σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία (Avramis et al., 2005).

### **1.8 Εναλλακτικοί τρόποι χορηγήσεως της L-ασπαραγινάσης**

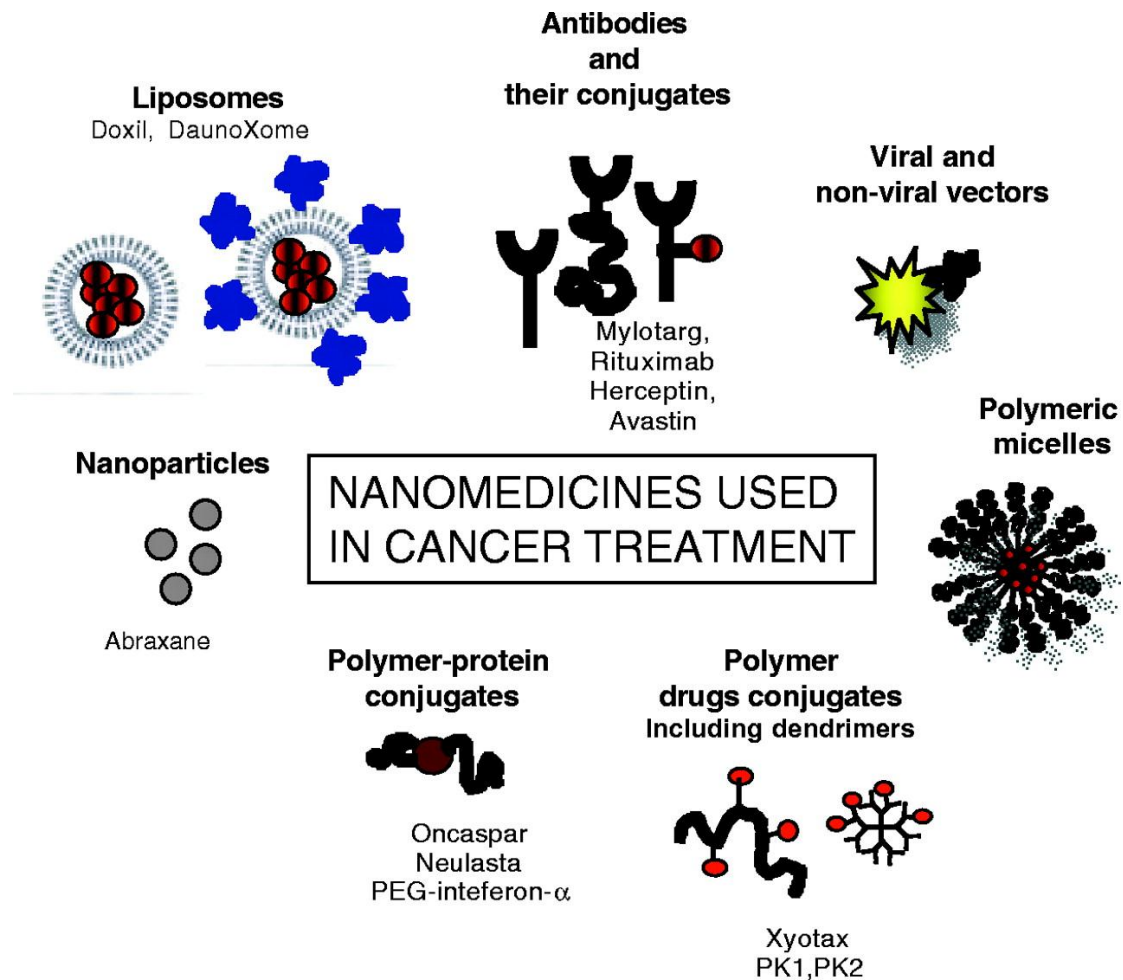
Η αποτελεσματικότητα των περισσότερων θεραπευτικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων περιορίζεται σημαντικά από τη χημική αστάθειά τους στην κυκλοφορία του αίματος, αφού αποικοδομούνται γρήγορα και προκαλούν αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος. Από τις διάφορες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση τέτοιων πρωτεϊνών, αυτή που έχει τα καλύτερα αποτελέσματα είναι η χημική τροποποίηση της πρωτεΐνης ή ενζύμου με κάποιο υδρόφιλο φυσικό ή συνθετικό πολυμερές όπως η δεξτράνη ή η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), αντίστοιχα. Τα πολυμερή αυτά προσδένονται ομοιοπολικά στις πρωτεΐνες και συχνά τα σύμπλοκα που προκύπτουν είναι πιο σταθερά από τις άγριου τύπου πρωτεΐνες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η σταθεροποίηση αυτή των πρωτεϊνών μάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι η τροποποίηση με τα πολυμερή μειώνει την

αναγνώρισή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη χημική αποικοδόμηση αλλά και ανοσογένεια αυτών των πρωτεϊνών. Τα περισσότερα προϊόντα πρωτεΐνης-πολυμερούς διατηρούν τη φαρμακολογική δραστικότητα της πρωτεΐνης, σε μικρότερο όμως βαθμό από την άγριου τύπου πρωτεΐνη.

Η σύγχρονη χημεία των πολυμερών οδηγεί στη δημιουργία πολύπλοκων δομών πολυμερών που περιλαμβάνουν τα πολυμερή με πολλά σθένη, τα διακλαδιζόμενα πολυμερή, τα συμπολυμερή με τυχαία διακλάδωση ή με διακλάδωση σχήματος αστεριού και τα πολυμερή με βιομιμητική αρχιτεκτονική τριών διαστάσεων, όπως τα δένδρομερή και τα δένδροειδή πολυμερή (Duncan, 2003).

Το θεραπευτικό ένζυμο L-ασπαραγινάση στον ανθρώπινο ορρό παρουσιάζει μείωση της δραστικότητάς του μετά από 30 λεπτά. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία μη εξειδικευμένων αντισωμάτων και πρωτεασών στον ορρό. Με άλλα λόγια, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο ανθρώπινος ορρός περιέχει από πριν φυσικά αντισώματα και/ή πρωτεάσες που είναι ικανά να αδρανοποιήσουν την L-ασπαραγινάση. Όπως ήδη έχει αναφερθεί μερικές επιπλοκές κατά τη θεραπεία με L-ασπαραγινάση μπορούν να ξεπεραστούν με την αντικατάσταση της *E.coli* L-ασπαραγινάσης με αυτήν από *Erwinia*, αφού οι αντιγονικές θέσεις των δύο αυτών ενζύμων είναι διαφορετικές. Το ένζυμο από *Erwinia* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ασθενών που εμφανίζουν αλλεργικές αντιδράσεις στο ένζυμο από *E.coli*, και αντιστρόφως. Επειδή η αντικατάσταση του ενζύμου δεν είναι αποτελεσματική σε όλες τις περιπτώσεις, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες τροποποίησης του ενζύμου με σκοπό τη βελτίωση των φαρμακοδυναμικών του παραμέτρων και τη μείωση των ανοσογόνων ιδιοτήτων του.

Αυτές οι μελέτες περιλαμβάνουν τη φυσική εγκαψυλίωση της L-ασπαραγινάσης σε λιποσώματα (Jorge et al., 1994), σε νανοσωματίδια από πολύ-(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) (Gaspar et al., 1998) και σε ερυθροκύτταρα (Satterfield & Keeling, 1990), καθώς και τη χημική τροποποίηση του ενζύμου με μη-ανοσογόνα φυσικά και τεχνητά πολυμερή όπως για παράδειγμα η αλβουμίνη (Poznansky et al., 1982), η δεξτράνη (Wileman, 1991), η πολυαιθυλενογλυκόλη (Ashihara et al., 1978) και η πολυβίνυλο αλκοόλη (Nambu, 1986), (Εικόνα 1.8).



**Εικόνα 1.8.** Σχηματική απεικόνιση τεχνολογιών και θεραπευτικών τα οποία χρησιμοποιούνται στην κλινική ανάπτυξη/αγορά για τον καρκίνο και που μπορούν να θεωρηθούν ως νανοφάρμακα.

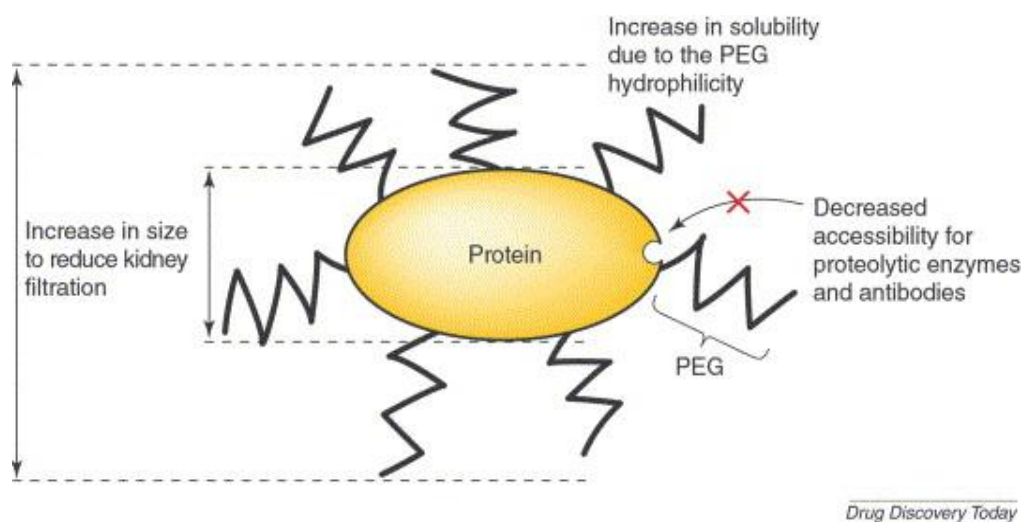
### 1.8.1 Χημική τροποποίηση με PEG

Ο αποδοτικότερος όμως τρόπος προστασίας θεραπευτικών πρωτεϊνών όσον αφορά την αντιμετώπιση από την πρωτεόλυση και κατ' επέκταση την αύξηση του χρόνου ημιζωής και την μείωση αντιδράσεων υπερευαισθησίας από τον οργανισμό, είναι η χρήση της πολυαιθυλενογλυκόλης [poly-(ethylen-glycol), PEG] (Burnham, 1994; Veronese, 2001; Veronese and Paut, 2005).

Η πολυαιθυλενογλυκόλη ξεκίνησε να χρησιμοποιείται στο φαρμακευτικό χώρο το 1970, όταν εγκρίθηκε από τον αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA). Η έγκριση βασίστηκε στις κατάλληλες φαρμακευτικές ιδιότητες που διαθέτει η συγκεκριμένη ένωση,

κυριότερες των οποίων είναι: χαμηλή τοξικότητα σε χρήση *per os*, όπως επίσης και ως ενέσιμο παρασκεύασμα (Burnham, 1994).

Η τροποποίηση μιας πρωτεΐνης με PEG οδηγεί σε αύξηση της μάζας της πρωτεΐνης, πιθανότατα λόγω της ενυδάτωσης της PEG. Όμως ακόμα και η διαμόρφωση και οι ηλεκτροστατικές ιδιότητες δέσμευσης της τροποποιημένης με PEG πρωτεΐνης μπορεί να είναι διαφορετικές από εκείνες της μη τροποποιημένης. Όταν ένα μόριο PEG προστίθεται σε μια πρωτεΐνη, τότε το αποτέλεσμα είναι ένα υβρίδιο πολυμερούς-πρωτεΐνης, το οποίο δεν διατηρεί απαραίτητα τις φυσικές ιδιότητες της πρωτεΐνης, (Εικόνα 1.9). Οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του συμπλόκου PEG-πρωτεΐνης εξαρτώνται από τη θέση στην οποία δεσμεύεται η PEG, τη μοριακή μάζα της χρησιμοποιούμενης PEG, τον αριθμό των μορίων PEG που δεσμεύονται στη πρωτεΐνη και τη σταθερότητα του δεσμού μεταξύ της PEG και της πρωτεΐνης (Mehvar, 2000).



**Εικόνα 1.9.** Κύρια πλεονεκτήματα της τροποποιημένης πρωτεΐνης. Το σχήμα παριστά τη σύζευξη πολυμερούς-πρωτεΐνης. Το πολυμερές, PEG, θωράκιζει την επιφάνεια της πρωτεΐνης από παράγοντες αποικοδόμησης με στερεοχημική παρεμπόδιση.

Η πολυαιθυλενογλυκόλη συνδέεται ομοιοπολικά με αμινοξέα (κυρίως λυσίνη) τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζυμικού μορίου. Η φύση της ομοιοπολικής αντίδρασης διασφαλίζει την απαιτούμενη σταθερότητα του συμπλόκου. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται και κάποιες επιπρόσθετες, ενδιάμεσες, ετεροκυκλικές ενώσεις, οι οποίες με τη σειρά τους συνεισφέρουν στην επιτυχή πραγματοποίηση της αντίδρασης κάτω από φιλικές συνθήκες ιοντικής ισχύος, pH και θερμοκρασίας (Matsushima et al., 1980; Matsuyama et al., 1991). Μετά απο μελέτες της L-ASNase, η οποία είχε αντιδράσει αρχικά με πολυαιθυλενογλυκόλη, τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της ανοσογονικότητας του



ενζύμου, βελτιωμένα φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά, αυξημένη αντοχή έναντι της πρωτεόλυσης και ακόμη αύξηση του χρόνου ημιζωής στο αίμα (Inada et al., 1995; Matsushima et al., 1996; Bonora et al., 1997; Veronese et al., 1999; Baran et al., 2003; Harris et al., 2003).

Στην περίπτωση της L-ασπαραγινάσης, λόγω του σχηματισμού αντισωμάτων και της πρωτεόλυσης, ο χρόνος ημιζωής της στο αίμα μπορεί να μειωθεί στις 2,5 ώρες (Wolf et al., 2003). Η τροποποίησή της όμως με PEG την προστατεύει προάγοντας στερική παρεμπόδιση, αφού οι αλυσίδες της PEG παρεμποδίζουν τη δέσμευση των μη εξειδικευμένων αντισωμάτων ή την ενζυμική υδρόλυση από τις πρωτεάσες του αίματος.

Συγκεκριμένα οι Ho et al. (1986) αναφέρουν ότι με την ομοιοπολική σύνδεση αλυσίδων PEG στην L-ασπαραγινάση, ο χρόνος ημιζωής της αυξήθηκε στις 15 μέρες ενώ η ανοσογένεια μειώθηκε. Επιπλέον, μέσω της συμπλοκοποίησης της με PEG, τροποποιούνται οι φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες της και με αυτόν τον τρόπο μειώνονται οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας κατά τη χορήγησή της (Zhang et al., 2004).

Συμπερασματικά η συμπλοκοποιημένη με PEG L-ασπαραγινάση από *E. coli* αποτελεί μια ασφαλή και αποτελεσματική εναλλακτική θεραπεία κατά της λευχαιμίας, αλλά δεν πρέπει να υποκαθιστά συχνά το μη τροποποιημένο ένζυμο (Holle 1997). Μελέτες έδειξαν ότι η χρήση του τροποποιημένου ενζύμου πιθανά σχετίζεται με αυξημένα φαινόμενα παγκρεατίτιδας (Alvarez & Zimmerman, 2000).

Σε άλλη μελέτη, οι Newsted et al. (1995) έδειξαν ότι οι L-ASNases μπορούν να καταστούν ανθεκτικές στην θρυψίνη με γενετική σύντηξη του γονιδίου με εκείνη ενός αντισώματος μονής αλυσίδας που προέρχεται από ένα προεπιλεγμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ικανό να παρέχει προστασία κατά της θρυψίνης. Η χιμαιρική L-ASNase διατήρησε το 75% της αρχικής δραστηριότητας της κατά την έκθεση σε θρυψίνη, ενώ η φυσική L-ASNase ήταν εντελώς αδρανοποιημένη. Πιο πρόσφατα, οι Zhang et al. (2006) ανέφεραν επίσης την ομοιοπολική σύνδεση των πεπτιδίων silk-σερίνης στην L-ASNase παράγοντας έτσι βιο-συζεύκτες που είναι πιο σταθεροί, λιγότερο ανοσογόνοι και έχουν εκτεταμένο χρόνο ημιζωής *in vitro* σε ανθρώπινο ορό. Επιπλέον, η χημική τροποποίηση με πολυσιαλικό οξύ βελτίωσε την αντικαρκινική δραστηριότητα του ενζύμου.

## 1.9 Πλεονεκτήματα μεταφοράς των πρωτεϊνών στο περιπλασματικό χώρο

Η μεταφορά των πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο και απο κει ενδεχομένως στο θρεπτικό μέσο, διαθέτει ένα σύνολο πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με την ενδοκυττάρια παρουσία των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Επιγραμματικά θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι, τα πλεονεκτήματα αυτά είναι η απλοποιημένη κατιούσα επεξεργασία, η αυξημένη βιολογική λειτουργία που είναι απόρροια της υψηλότερης σταθερότητας και διαλυτότητας και η εξασφάλιση της αυθεντικότητας του N-τελικού άκρου του ενζυμικού μορίου (Cornelis, 2000; Makrides, 1996; Mergulhao et al., 2004b).

Η σταθερότητα και η λειτουργικότητα ενός πρωτεϊνικού μορίου εξαρτάται άμεσα απο τη σωστή αναδίπλωση του μορίου (protein folding), η οποία επιτελείται απο εξειδικευμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (fold-ases) κατά τη διάρκεια της μετάφρασης συν-μεταφραστικά ή και κατόπιν της μετάφρασης, μετα-μεταφραστικά.

Η αναδίπλωση της πρωτεΐνης είναι μια πολύ σύνθετη διαδικασία, η οποία στηρίζεται στην ύπαρξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και αποτελεί την διαδικασία εκείνη, απο την οποία το ενζυμικό μόριο θα αποκτήσει την αναγκαία για την λειτουργία, τελική τεταρτοταγή δομή του. Καθοριστικός παράγοντας για την επίτευξη της τεταρτοταγούς δομής του ενζύμου αποτελεί και ο σχηματισμός κατάλληλων δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι συνεισφέρουν στη δομική σταθερότητα του μορίου (Kadokura et al., 2003; Maskos et al., 2003; Raina and Missiakas, 1997). Ο σχηματισμός όμως των δεσμών αυτών είναι ιδιαίτερα δύσκολος στο αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος, σε αντίθεση με τον περιπλασματικό χώρο όπου η ύπαρξη μιας σειράς εξειδικευμένων πρωτεϊνών (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, SurA, RotA, FklB, FkpA) προωθούν και συνεισφέρουν στην εξασφάλιση της αποτελεσματικής δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών και κατ'επέκταση στην βελτιωμένη σταθερότητα του ενζυμικού μορίου (Shokri et al., 2003).

Επιπλέον, όταν υπερεκφράζεται μια πρωτεΐνη στο σύστημα της *E. coli*, είναι πολύ πιθανόν ένα μεγάλο ποσοστό των παραγόμενων μορίων, να σχηματίζουν συσσωματώματα μεταξύ τους (inclusion bodies) με αποτέλεσμα την ημιτελή αναδίπλωσή τους και την απώλεια της λειτουργικότητάς τους. Αυτό συμβαίνει λόγω αδυναμίας των πρωτεϊνικών συστημάτων αναδίπλωσης (fold-ases, chaperones), να συνεισφέρουν στην ολοκληρωμένη διαμόρφωση της τεταρτοταγούς δομής, καθώς δεν δύνανται να ανταπεξέλθουν στους ρυθμούς της υπερέκφρασης και στον μεγάλο αριθμό ενζυμικών μορίων, τα οποία πρέπει να

αναδιπλωθούν (Hoffmann et al., 2004). Αντίθετα, η μεταφορά των μορίων αυτών στο περίπλασμα, θα μπορούσαμε να πούμε ότι συμβάλλει στην αποσυμφόρηση των μηχανισμών αναδίπλωσης του κυτταροπλάσματος, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ολοκλήρωση της διαμόρφωσης της τεταρτοταγούς δομής στο περίπλασμα.

Κατ'επέκταση, αποφεύγεται η αδυναμία αναδίπλωσης των υπεράριθμων ενζυμικών μορίων της υπερέκφρασης, διατηρώντας σε υψηλά επίπεδα την διαλυτότητα των πρωτεϊνών και την απόδοση της έκφρασης (Loo et al., 2002; Makrides, 1996). Παράλληλα η ύπαρξη περιορισμένου αριθμού πρωτεασών στον περιπλασματικό χώρο και στο θρεπτικό μέσο, αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα, ο οποίος συνεισφέρει στην αυξημένη σταθερότητα του γονιδιακού προϊόντος (Gottesman, 1996; Mergulhao et al., 2004b).

Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι μέσω της μεταφοράς του ενζύμου στο περίπλασμα, εξασφαλίζεται η αυθεντικότητα του N-τελικού άκρου της πεπτιδικής αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι η αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού, αφαιρείται με τη δράση ορισμένων πρωτεασών, εφόσον το ένζυμο έχει μεταφερθεί στον περιπλασματικό χώρο (Mergulhao et al., 2000). Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η πιθανή παρουσία ενός ανεπιθύμητου αρχικού κωδικονίου μεθειονίνης, η οποία φυσιολογικά δεν εμπεριέχεται στην πρωτεϊνική αλυσίδα. Η παρουσία μιας ενδεχόμενης μεθειονίνης μπορεί να αποτελέσει αιτία μείωσης της δομικής και λειτουργικής σταθερότητας του ενζύμου (Liao et al., 2004), όπως επίσης και να αποτελέσει εναρκτήριο παράγοντα ανοσοαντίδρασης στη περίπτωση θεραπευτικών πρωτεϊνών.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως, ο κύριος λόγος, για τον οποίο έχει προκληθεί τόσο μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τους μηχανισμούς μεταφοράς των πρωτεϊνών στο σύστημα έκφρασης του *E. coli*, είναι τα βασικά πλεονεκτήματα που απορρέουν από μια ενδεχόμενη έκκριση της υπο-μελέτη πρωτεΐνης στο θρεπτικό μέσο. Μεταξύ των άλλων το πλεονέκτημα είναι το γεγονός ότι διευκολύνεται η κατιούσα επεξεργασία και η απομόνωση σε καθαρή μορφή της πρωτεΐνης που εκφράζεται.

### 1.10 Πρωτεϊνική μηχανική

Πρωταρχικός σκοπός της πρωτεϊνικής μηχανικής είναι η δημιουργία μιας νέας πρωτεΐνης με κάποια βελτιωμένη ή νέα ιδιότητα σε σχέση με την υπάρχουσα πρωτεΐνη. Στη φύση οι μηχανισμοί εξέλιξης εξασφαλίζουν την προσαρμογή του οργανισμού στο συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Η εξέλιξη όμως δεν πραγματοποιείται προς κάποια συγκεκριμένη κατεύθυνση, ούτε υπάρχει κάποιος σκοπός. Οι διαδικασίες συμβαίνουν αυθόρμητα κατά την αναπαραγωγή και την επιβίωση ολόκληρου του οργανισμού. Σε αντίθεση, κατά την κατευθυνόμενη εξέλιξη υπάρχει ένας συγκεκριμένος σκοπός και οι διαδικασίες (μετάλλαξη, ανασυνδυασμός ή επιλογή) ελέγχονται *in vitro*, (Εικόνα 1.10). Προκειμένου να δημιουργηθούν ένζυμα με επιθυμητές ιδιότητες, υπάρχουν δυο δυνατές προσεγγίσεις: ο ορθολογιστικός σχεδιασμός και η κατευθυνόμενη εξέλιξη (Chen, 2001). Η κυριότερη διαφορά μεταξύ αυτών των προσεγγίσεων είναι ότι για την εφαρμογή του ορθολογιστικού σχεδιασμού είναι απαραίτητη προϋπόθεση η γνώση των σχέσεων δομής-λειτουργίας του ενζύμου, ενώ αυτό δεν είναι απαραίτητο για την εφαρμογή της κατευθυνόμενης εξέλιξης.

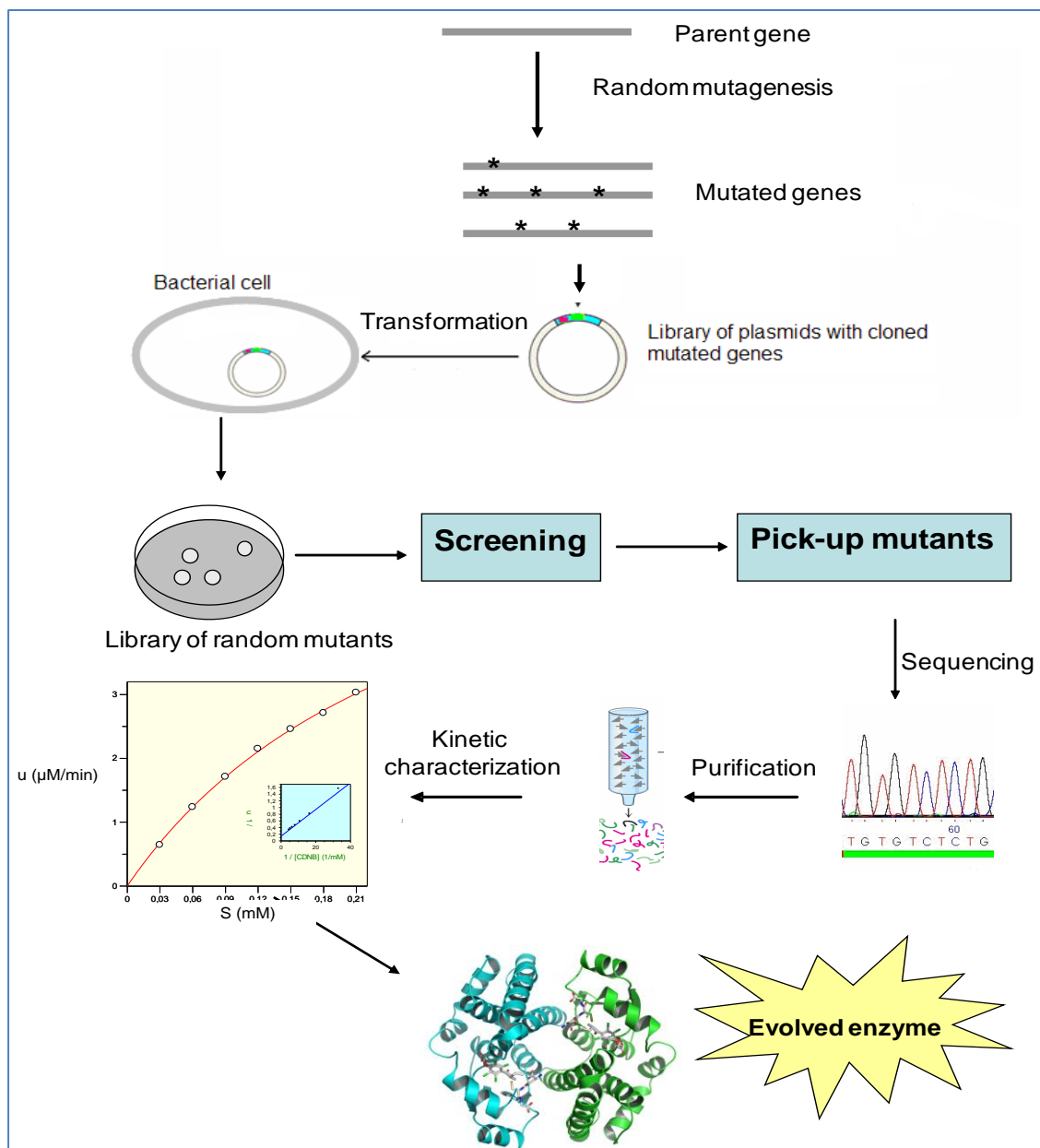
Η ορθολογιστική προσέγγιση χρησιμοποιεί τα δεδομένα της πρωτοταγούς και τριτοταγούς δομής του ενζύμου καθώς και τις πληροφορίες πάνω στη σχέση δομής-λειτουργίας προκειμένου να προβλέψει με ένα «λογικό» τρόπο θέσεις στο ένζυμο, οι οποίες αν τροποποιηθούν με προκαθορισμένο τρόπο, μέσω σημειακής μεταλλαξογένεσης, να προσδώσουν στο ένζυμο επιθυμητές ιδιότητες. Όταν αναγνωριστούν τα “θεωρητικά” σημαντικά αμινοξικά κατάλοιπα, εφαρμόζεται κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση και τα μεταλλαγμένα ένζυμα που προκύπτουν ελέγχονται για επιθυμητές ιδιότητες.

Αν και η κατευθυνόμενη σημειακή μεταλλαξογένεση χρησιμοποιείται ευρύτατα, δεν είναι πάντα εφικτή λόγω της περιορισμένης γνώσης της σχέσης πρωτεϊνικής δομής-λειτουργίας και του γεγονότος ότι τα προγράμματα μοντελοποίησης αντιλαμβάνονται κατά προσέγγιση τη δομή των ενζύμων. Επιπλέον, οι μέθοδοι ορθολογιστικού σχεδιασμού μπορεί να αποτύχουν λόγω των απρόσμενων επιδράσεων που ασκούνται από την υποκατάσταση ενός ή περισσοτέρων αμινοξικών καταλοίπων. Ένας εναλλακτικός τρόπος για τη δημιουργία ενζύμων με πολύ εξειδικευμένες ιδιότητες είναι η κατευθυνόμενη εξέλιξη μέσω τυχαίας μεταλλαξογένεσης ή τυχαίου ανασυνδυασμού του DNA.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τη δημιουργία συνδυαστικών βιβλιοθηκών εφαρμόζοντας κατευθυνόμενη εξέλιξη. Μερικές από αυτές είναι η τυχαία μεταλλαξογένεση με τη χρήση της error-prone PCR, η ανασυναρμολόγηση του DNA (DNA shuffling), η διαδικασία της περιορισμένης επιμήκυνσης (StEP), ο in vitro ανασυνδυασμός με τυχαίο υβριδισμό των εκκινητών (random-priming in vitro recombination, RPR), και η δημιουργία υβριδίων ενζύμων με σταδιακή περικοπή των γονιδίων τους (incremental truncation for the creation of hybrid enzymes, ITCHY). Ο ανασυνδυασμός του DNA συγκριτικά με την τυχαία μεταλλαξογένεση είναι πιο αποτελεσματικός και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρύτατα.

Η τυχαία μεταλλαξογένεση είναι μια μέθοδος κατευθυνόμενης εξέλιξης η οποία εισάγει τυχαίες σημειακές μεταλλάξεις σε ολόκληρα γονίδια. Η πιο συνηθισμένη τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα λόγω της απλότητας και της καθολικής χρησιμότητά της, είναι η PCR με προδιάθεση για λάθη ("error-prone" PCR). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σημαντικά αυξημένη συχνότητα λάθους της Taq DNA πολυμεράσης κατά την PCR.

Η κατευθυνόμενη εξέλιξη μέσω του ανασυνδυασμού του DNA μπορεί να περιγραφεί ως μια πλήρως αναπτυσσόμενη τεχνολογία για την επίσπευση της πρωτεϊνικής εξέλιξης. Η εξέλιξη είναι ένας αποτελεσματικός αλγόριθμος με αποδεδειγμένη ικανότητα να τροποποιεί την ενζυμική λειτουργία και να ρυθμίζει τις ενζυμικές ιδιότητες. Οι μέθοδοι της κατευθυνόμενης εξέλιξης χρησιμοποιούν τη διαδικασία της φυσικής επιλογής, όμως με έναν κατευθυνόμενο τρόπο (Altreuter & Clark, 1999). Το κυριότερο και πρωταρχικό στάδιο σε ένα τυπικό πείραμα κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης είναι η δημιουργία μιας ομάδας μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου. Στη συνέχεια οι καλύτερες μορφές αναγνωρίζονται με διαδικασίες υψηλής ανάλυσης σάρωσης ή επιλογής. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί ωστόσο βρεθεί ένα ένζυμο με τον επιθυμητό βαθμό βελτίωσης. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να δημιουργηθεί σε μικρό χρονικό διάστημα μια γενεά μορίων με αυξημένο αριθμό απογόνων, οι οποίοι θα μπορούν να υποβληθούν σε πιέσεις επιλογής που δεν συναντώνται στη φύση (Arnold, 2001), (Εικόνα 1.11).



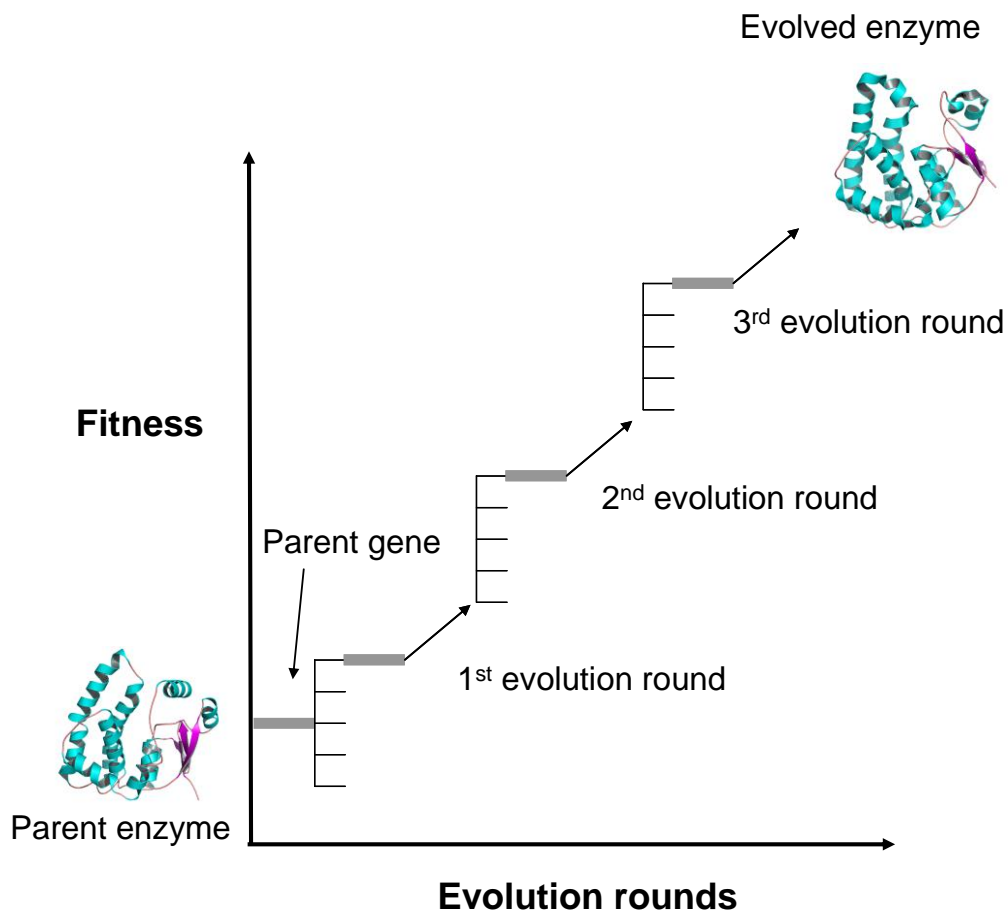
**Εικόνα 1.10.** Δημιουργία τροποποιήσεων στο ένζυμο με μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής, ώστε να προκύψουν νέες μορφές με τροποποιημένη εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα. Μεταλλαξογένεση κορεσμού ,δημιουργία βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων μορφών, έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών και επιλογή εκείνων που εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα ασπαραγινάσης. Στη συνέχεια αλληλούχιση και κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών, καθαρισμός και προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας τους σε σχέση με τον άγριο τύπο του ενζύμου. Τέλος, κινητική ανάλυση των ενζύμων που προκύπτουν και μοριακή μοντελοποίηση.

Στη μέθοδο του Stemmer, μια ομάδα συγγενών γονιδίων τεμαχίζονται έτσι ώστε να δημιουργήσουν ένα πληθυσμό (μια τράπεζα) τυχαίων τμημάτων, τα οποία στη συνέχεια επανενώνονται τυχαία σε πλήρους μεγέθους γονίδια, μέσω μιας διαδικασίας παρόμοιας με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), στην οποία όμως τα ίδια τα τμήματα δρουν ως εκκινητές. Ακολουθεί πολλαπλασιασμός των ανασυναρμολογημένων (και συνεπώς ανασυνδυασμένων) γονιδίων με τη βοήθεια μιας κανονικής αυτή τη φορά PCR αντίδρασης.

Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία βιβλιοθήκης με χιμαιρικά γονίδια, λόγω της εναλλαγής της μήτρας, στα οποία είναι ενσωματωμένες σε μικρό ποσοστό και κάποιες σημειακές μεταλλάξεις. Στη συνέχεια τα επιθυμητά γονίδια επιλέγονται με κάποια διαδικασία σάρωσης.

Η διαδικασία περιορισμένης επιμήκυνσης (StEP), που αναπτύχθηκε από τους Zhao et al. (1998), βασίζεται στην εναλλαγή της μήτρας κατά το στάδιο της επιμήκυνσης της PCR. Ο σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η επίτευξη μεγαλύτερης συχνότητας ανασυνδυασμού μέσω περισσότερων εναλλαγών μήτρας. Αποτελείται από μικρής χρονικής διάρκειας κύκλους υβριδισμού/επιμήκυνσης, οι οποίοι διακόπτονται από θερμική αποδιάταξη. Σε κάθε κύκλο τα κομμάτια που έχουν ήδη προκύψει μπορεί να υβριδίσουν σε διαφορετική μητρική ακολουθία, λόγω της συμπληρωματικότητας των ακολουθιών και να συνεχίσουν την επιμήκυνση τους. Από τους πολλαπλούς κύκλους μερικής επιμήκυνσης τελικά δημιουργείται μια βιβλιοθήκη χιμαιρικών ακολουθιών πλήρους μήκους.

Η μέθοδος αυτή ανασυνδυασμού των γονιδίων πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Αρχικά σε μια πρώτη PCR αναμιγνύονται τα μητρικά γονίδια που πρόκειται να ανασυνδυαστούν και δημιουργούνται τμήματα DNA, συνήθως μικρότερου μήκους από τα αρχικά γονίδια, που όμως η ακολουθία τους είναι ένα μίγμα ακολουθιών των μητρικών γονιδίων. Στη συνέχεια, από τα προϊόντα αυτής της PCR απομακρύνεται το μητρικό DNA και έπειτα ενισχύονται τα ανασυνδυασμένα πλέον γονίδια.



**Εικόνα 1.11.** Οι μέθοδοι της πρωτεϊνικής μηχανικής χρησιμοποιούν τη διαδικασία της φυσικής επιλογής, όμως με έναν κατευθυνόμενο τρόπο. Το κυριότερο και πρωταρχικό στάδιο σε ένα τυπικό πείραμα κατευθυνόμενης ενζυμικής εξέλιξης είναι η δημιουργία μιας ομάδας μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου. Στη συνέχεια οι καλύτερες μορφές αναγνωρίζονται με διαδικασίες υψηλής ανάλυσης σάρωσης ή επιλογής. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί ωςότου βρεθεί ένα ένζυμο με τον επιθυμητό βαθμό βελτίωσης.

Ο *in vitro* ανασυνδυασμός με τυχαίο υβριδισμό των εκκινητών αποτελεί μια απλή και αποτελεσματική μέθοδο για την *in vitro* μεταλλαξογένεση και τον ανασυνδυασμό DNA ακολουθιών. Οι πλήρους μήκους ακολουθίες προκύπτουν από ανασυναρμολόγηση μικρότερων τμημάτων DNA, τα οποία προέρχονται από μια τυπική DNA σύνθεση με χρήση τυχαίων εκκινητών. Συνήθως χρησιμοποιούνται εξανουκλεοτίδια ως τυχαίοι εκκινητές. Αντίθετα από τη μέθοδο του Stemmer (DNA shuffling), η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί και σε μονόκλωνες και σε δίκλωνες μητρικές DNA ακολουθίες, αλλά και σε RNA ακολουθίες.



Ο ανασυνδυασμός του DNA έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμος για τη δημιουργία ενζύμων με βελτιωμένες ιδιότητες ή με νέες ιδιότητες οι οποίες δεν απαντώνται στη φύση. Για το σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλοκληρα γονίδια ή και τα τμήματα DNA που κωδικοποιούν για υπομονάδες ή για λειτουργικές δομικές ενότητες των ενζύμων (π.χ. ενεργή περιοχή). Κάποιες από τις βασικές ενζυμικές ιδιότητες που μέχρι τώρα έχουν αποτελεσματικά τροποποιηθεί είναι η σταθερότητα, η λειτουργία σε μη φυσικά περιβάλλοντα (όπως οι οργανικοί διαλύτες), η αναστολή προϊόντος, η έκφραση σε ανασυνδυασμένο ξενιστή και η εξειδίκευση υποστρώματος.

### 1.11 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης μεθόδου έκφρασης και καθαρισμού του ανασυνδυασμένου ενζύμου σε κύτταρα *E. coli* και η δημιουργία τροποποιήσεων στο ένζυμο με μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής, ώστε να προκύψουν νέες μορφές με τροποποιημένη εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα. Όπως αναφέρθηκε, η τοξικότητα των L-ασπαραγινάσων οφείλεται εν μέρει τη δραστηριότητα L-γλουταμινάσης που εμφανίζουν αυτά τα ένζυμα. Έχει παρατηρηθεί πως οι L-ασπαραγινάσες που έχουν υψηλή συγγένεια με την L-Asn και χαμηλή έως αμελητέα με την L-Gln παρουσιάζουν λιγότερα προβλήματα κατά την αντικαρκινική θεραπεία (Hawkins et al., 2004).

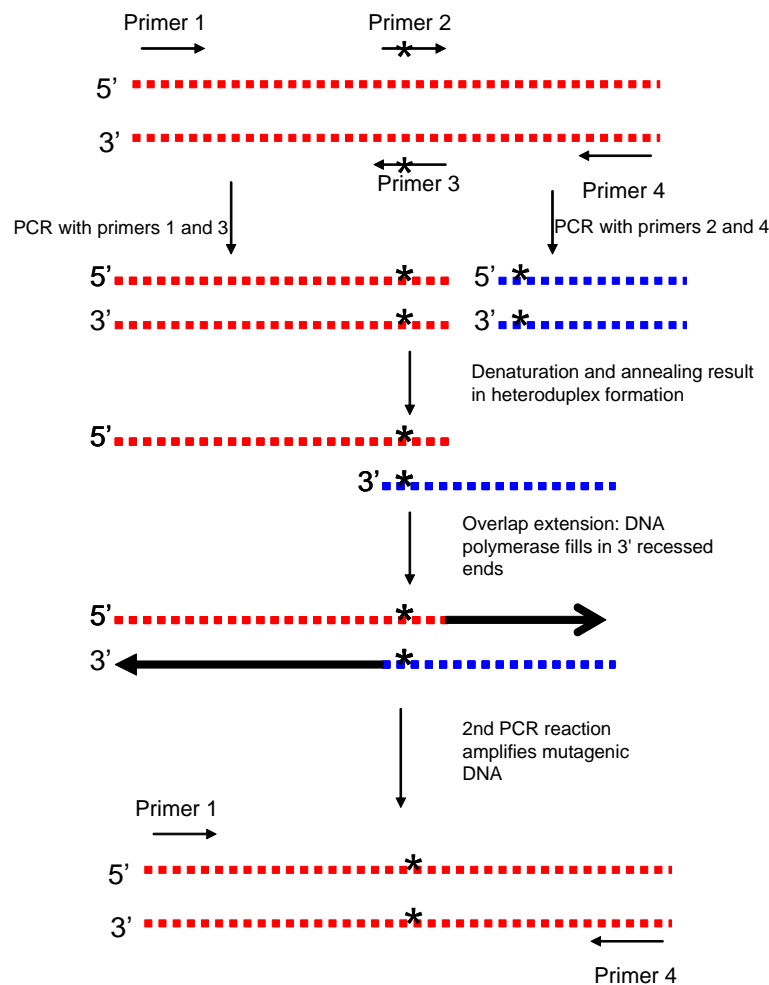
Στην προσπάθεια να βρεθούν L-ασπαραγινάσες που θα παρουσιάζουν λιγότερες παρενέργειες, αρκετά ομόλογα μέλη της οικογένειας των ενζύμων αυτών έχουν μελετηθεί επί σειρά ετών. Επιπλέον, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να αυξηθεί ο χρόνος ημιζωής της L-ασπαραγινάσης στο αίμα, με πιο αποτελεσματική τη σύνδεσή της μέσω χημικού ομοιοπολικού δεσμού με το μακρομόριο μονομέθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλη (mPEG) (Veronese & Pasut, 2005).

Δυστυχώς καμία από αυτές τις προσεγγίσεις δεν έχει οδηγήσει στην αποτελεσματική μείωση των μειονεκτημάτων της θεραπείας με L-ασπαραγινάση. Συνεπώς, η χρήση προηγμένων μεθόδων, όπως η πρωτεϊνική μηχανική, είναι αναγκαία για την παραγωγή μορφών του ενζύμου με αμελητέα, αν είναι δυνατό, μηδενική δράση της L-γλουταμινάσης, αλλά και πιο σταθερών μορφών του ενζύμου, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν ως ενέσιμα φάρμακα ή σε συσκευές αιμοκάθαρσης.

Η τροποποίηση της εξειδίκευσης του υποστρώματος ενός ενζύμου είναι πολύ χρήσιμη διότι παρέχει αποτελεσματικούς βιοκαταλύτες με προμελετημένη εξειδίκευση υποστρώματος, αλλά και πολύτιμες πληροφορίες για το μηχανισμό αναγνώρισης του υποστρώματος. Σε πολλές περιπτώσεις η εξειδίκευση του υποστρώματος έχει τροποποιηθεί με εφαρμογή ορθολογιστικών προσεγγίσεων. Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο όταν είναι γνωστή η τεταρτοταγής δομή της πρωτεΐνης και τα αποτελέσματά τους είναι συνήθως μέτρια (Chen, 2001). Αντίθετα τα αποτελέσματα των συνδυαστικών μεθόδων (StEP κτλ) είναι πολύ πιο εντυπωσιακά και σε πολλές περιπτώσεις έχει αποδειχθεί πως οι μεταλλάξεις που οδήγησαν στην τροποποίηση της εξειδίκευσης του υποστρώματος εντοπίζονται σε περιοχές απομακρυσμένες από την ενεργή περιοχή του ενζύμου. Οι ερευνητές πλέον πιστεύουν ότι έχοντας ως βάση τα αποτελέσματα των συνδυαστικών μεθόδων και τη δομή των ενζύμων μπορούν να προβλέψουν με μεγαλύτερη ακρίβεια πιθανές θέσεις για μεταλλαξογένεση. Οι προβλέψεις αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον ως βάση για την περαιτέρω τροποποίηση των ενζύμων με σκοπό τη βελτίωση των επιθυμητών ιδιοτήτων τους (Hsu et al., 2004).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μεταλλαξογένεσης κορεσμού, (Εικόνα 1.12). Μέσω της μεθόδου αυτής είναι δυνατή η δημιουργία μιας βιβλιοθήκης από μεταλλαγμένες ακολουθίες, οι οποίες θα περιέχουν όλες τις πιθανές υποκαταστάσεις σε μια ή περισσότερες προκαθορισμένες θέσεις προκειμένου να προσδιοριστεί το πιο κατάλληλο αμινοξικό κατάλοιπο για την εκάστοτε θέση (Zheng et al., 2004). Στους κλώνους που προκύπτουν πραγματοποιούνται μελέτες προκειμένου να διαπιστωθούν οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων στη συμπεριφορά των ενζύμων.

Η μεταλλαξογένεση κορεσμού έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά την κατευθυνόμενη εξέλιξη για την διερεύνηση μη φυσικών μονοπατιών εξέλιξης και για την επίτευξη ταχείας βελτίωσης κάποιων πρωτεϊνικών χαρακτηριστικών. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε μεταλλαξογένεση κορεσμού στην αμινοξική θέση 24 της L-ασπαραγινάσης της *E.coli*, προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο η τυχαία αμινοξική υποκατάσταση είναι η καλύτερη δυνατή όσον αφορά στη τροποποίηση της εκλεκτικότητας του ενζύμου και την ενίσχυση της δράσης του ως ασπαραγινάση. Η μεταλλαξογένεση κορεσμού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (overlap extension), χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR.



**Εικόνα 1.12.** Προσεγγίσεις για κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση χρησιμοποιώντας τη τεχνική της PCR. Υπόστρωμα DNA ενισχύεται χρησιμοποιώντας την PCR στην οποία ένας εκκινητής περιέχει μια προκαθορισμένη μεταβολή της αλληλουχίας (\*). Αμφότεροι οι κλώνοι του τελικού προϊόντος PCR περιέχουν την μετάλλαξη. Εκκινητές 1 και 4 ορίζουν την έκταση του μεταλλαγμένου τελικού προϊόντος. Εκκινητές 2 και 3 περιέχουν την επιθυμητή αλλαγή αλληλουχίας και είναι συμπληρωματικοί. Το DNA ενισχύεται με εκκινητές 1 και 3 σε μία αντίδραση και τους εκκινητές 2 και 4 σε μία δεύτερη αντίδραση. Τα προκύπτοντα προϊόντα PCR περιέχουν το καθένα τη μετάλλαξη και στα δύο σκέλη τους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΛΙΚΑ



## 2.1 Υλικά

### Βιολογικά υλικά

Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης PCR<sup>®</sup>T7/CT-TOPO<sup>®</sup> που χρησιμοποιήθηκε για τις κλωνοποιήσεις των γονιδίων των άγριων τύπων και διαφόρων τροποποιημένων γονιδίων αυτής της εργασίας, τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* στα οποία πραγματοποιήθηκε η επιλογή, ο πολλαπλασιασμός και η διατήρηση των μετασχηματισμένων πλασμιδίων (XL1-Blue, DH5α) καθώς και τα δεκτικά κύτταρα *E. coli* (*BL21Rosetta*, *BL21pLysS*, *BL21STAR*) στα οποία πραγματοποιήθηκε η έκφραση όλων των γονιδίων, προήλθαν από το PCR<sup>®</sup>T7/CT-TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit της εταιρείας Invitrogen.

### Ένζυμα και πρωτεΐνες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες DpnI (20 U/μl) από την εταιρεία Biolabs, Taq DNA πολυμεράση (5 U/μl) (Biolabs), Pfu DNA πολυμεράση (3 U/μl) (Invitrogen), Hifi DNA πολυμεράση

### Χημικά αντιδραστήρια, Kits και λοιπά υλικά

Το αντιδραστήριο Tris, το δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS), το Trizma base, η πρωτεΐνη ορού μόσχου (BSA), τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη αγοράστηκαν από τον οίκο Sigma Co. Ο επαγωγέας έκφρασης ισοπροπυλο-β-D-θειογάλακτοπυρανοζίδιο (IPTG) και η αγαρόζη αγοράστηκαν από την εταιρεία AppliChem και Invitrogen αντίστοιχα. Αντιδραστήριο Nessler από τη Fluca. Η L-ασπαραγίνη, L-γλουταμίνη από την εταιρεία Serva. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250), δισόξινο φωσφορικό οξύ (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), NaCl από τον οίκο Merck. Το εκχύλισμα ζύμης, η πεπτόνη, το άγαρ από την εταιρεία Scharlau.

Τα χρωματογραφικά υλικά CM-Sepharose αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Co.

Όλοι οι εκκινητές συντέθηκαν και καθαρίστηκαν από την εταιρεία Invitrogen.

Οι δείκτες μοριακών μαζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις ηλεκτροφορήσεις DNA της παρούσας εργασίας ήταν οι εξής: 1Kb DNA ladder, 100bp DNA ladder από την εταιρεία Biolabs. Ο δείκτης μοριακών μαζών Protein Marker Broad Range που χρησιμοποιήθηκε στις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών, αγοράστηκε από την εταιρεία Biolabs.

Το QIAquick<sup>™</sup>Gel Extraction Kit και το QIAquick<sup>™</sup> Mini Prep Kit αγοράστηκαν από την εταιρεία Qiagen.

## 2.2 Διαλύματα και θρεπτικά μέσα

### Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων και σχετικά αντιδραστήρια

- ✓ LB υγρό θρεπτικό μέσο  
0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) NaCl, 1%(w/v) πεπτόνη. Για στερεό θρεπτικό μέσο προστίθεται 1,5 % (w/v) άγαρ.
- ✓ TB υγρό θρεπτικό μέσο  
2,4% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 0,4% (w/v) γλυκερόλη, 1,2%(w/v) πεπτόνη, με pH του τελικού διαλύματος 7,2 με προσθήκη KOH.
- ✓ YT υγρό θρεπτικό υλικό  
0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 0,5% (w/v) NaCl, 1,6%(w/v) πεπτόνη, με pH του τελικού διαλύματος 7,2 με προσθήκη KOH.
- ✓ IPTG (ισοπροπυλο-β-D- θειογαλακτο-πυρανοζίδιο) 238,3 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται στους -20°C.

### Διαλύματα ενζύμων και απομόνωσης πλασμιδιακού και χρωμοσωμικού DNA

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων  
Για την Παρασκευή 3ml διαλύματος αναμιγνύονται 150μl 0,5M Tris-Cl pH 8, 60μl 0,5M EDTA pH 8 και 75μl 2M γλυκόζης.
- ✓ Διάλυμα NaOH/SDS  
Για την παρασκευή 5ml διαλύματος αναμιγνύονται 114μl 10M NaOH και 568μl 10% (w/v) SDS
- ✓ Διάλυμα CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/ RNάσης A  
Για την παρασκευή 4,5ml διαλύματος αναμιγνύονται 4,5ml CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (7,5M) pH 7,8 και 45μl διαλύματος RNάσης A.
- ✓ RNάσης A

Διάλυμα RNάσης A 10mg/ml σε 100mM Tris-Cl pH 7,4 15mM NaCl. Το διάλυμα επωάζεται σε υδατόλουτρο 100°C για 15 min και αφού κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου φυλάσσεται στους -20 °C.

### **Διαλύματα ηλεκτροφόρησης DNA**

- ✓ 50x Ρυθμιστικό διάλυμα TAE  
Διάλυμα 1L περιέχει 24,2g Tris-base, 100ml 0,5M EDTA pH 8,0, 57ml CH<sub>3</sub>COOH
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο  
5mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4 °C.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης  
Για 10ml διαλύματος αναμιγνύονται 10 ml γλυκερόλης 50% (w/v), 200μl EDTA 0,5M pH 8,0 και 25mg της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης.

### **Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)**

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων 10x  
Το διάλυμα αποτελείται από 0,25M Tris, 1,92M γλυκίνη και 1% SDS (w/v), pH 8,3. Διάλυμα 1L περιέχει 30,3g Tris-base, 144g γλυκίνη και 10 g SDS.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού  
Το διάλυμα αποτελείται από 3M Tris-Cl, pH 8,8
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης  
Το διάλυμα αποτελείται από 0,5M Tris-Cl, pH 6,8
- ✓ Διάλυμα ακρυλαμίδιου  
Ακρυλαμίδιο (30g, 0,42 mol) και N,N'-μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (0,8g, 5,2 mmol), διαλύονται σε 100 ml νερού. Το διάλυμα φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί και αποθηκεύεται σε σκοτεινόχρωμο δοχείο στους 4 °C.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων

Το διάλυμα αποτελείται από 0,125M Tris-Cl, pH 6,8, 4% SDS (w/v), 20% γλυκερόλη (w/v) και 10% β-μερκαπτοαιθανόλη (v/v).

- ✓ Διάλυμα SDS  
10% SDS(w/v)
  
- ✓ Διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου  
1,5% υπεθειϊκό αμμώνιο. Παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φορά που γίνεται ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

### 2.3 Εξοπλισμός

Οι φυγόκεντροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή των κυττάρων καθώς ακόμη και για τον διαχωρισμό των κυτταρικών θραυσμάτων και του ενζυμικού εκχυλίσματος ήταν:Heraeus SEPATECH Contrifuge 17RS και Varifuge 20RS όπως επίσης και Heraeus Instruments Biofuge primo.

Για το λύσιμο των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υπερήχων Sonics & Materials Inc. Vibra Cell

Η πεχαμέτρηση των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε με χρήση της συσκευής ORION 410A.

Ο καθαρισμός του ενζύμου έγινε με τη βοήθεια του προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-Λασπαρτικό οξύ-Sepharose CL-6B.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε σε συσκευή της εταιρείας Hoefer, Η.Π.Α. μοντέλο SE 600, η οποία είναι συνδεδεμένη με τροφοδοτικό SP 500 x Τα (500 volt, 400 mA) και αυτό της εταιρείας Hoefer.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης έγινε σε συσκευή του οίκου Hoefer, Η.Π.Α. μοντέλο HE 99X.

Υδατόλουτρο της εταιρείας BIBBY, Stuart Scientific.

Ξηρό σύστημα επώασης, Shaking Incubator, LabTech, Daihan LabTech, co., LTD

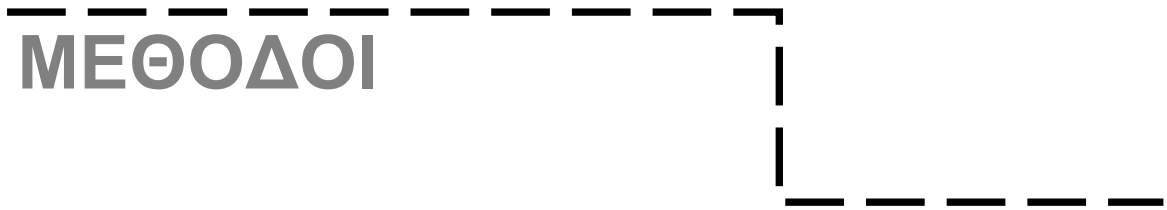


Συσκευή PCR, GeneAmp, PCRSystem 9700, Applied Biosystems.

Οι προσδιορισμοί της ενζυμικής δραστηρότητας έγιναν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, ορατού-υπεριώδους, του οίκου Hitachi (μοντέλο U-2000, μήκος οπτικής διαδρομής 10mm) που έφερε θερμοστατούμενη υποδοχή κυψελίδας.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

## ΜΕΘΟΔΟΙ



### 3.1 Μέθοδοι

#### 3.1.1 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων του βακτηρίου *E. coli* XL-1 Blue

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο που περιγράφεται σε αυτή τη παράγραφο, αναφέρεται ενδεικτικά στη περίπτωση χρήσης του στελέχους XL-1 Blue.

Τα διαλύματα και τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου είναι τα ακόλουθα:

1. LB υγρό θρεπτικό μέσο.
2. Διάλυμα 25mM και 75mM χλωριούχο ασβέστιο
3. Αντιβιοτικό αμπικιλλίνης

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Από τρυβλίο LB που περιέχει αμπικιλλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml, λαμβάνεται μονή αποικία του βακτηριακού στελέχους *E. coli* XL-Blue I, και αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 14-16 ώρες στους 37 °C, υπό συνεχή ανάδευση, στις 250 rpm.
2. Σε κωνική φιάλη προστίθενται 100ml υγρού θρεπτικού μέσου LB και μολύνονται με 1ml από την αρχική καλλιέργεια.
3. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα στα 550 nm να είναι περίπου 0.5
4. Η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο για 10 λεπτά.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4.500rpm, έτσι ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα. Η φυγόκεντρος έχει προ-ψυχθεί στους 4 °C.
6. Η πάστα κυττάρων επαναιωρείται με παγωμένο διάλυμα 25 mM CaCl<sub>2</sub> (50 ml).
7. Το αιώρημα τοποθετείται σε πάγο για 10 λεπτά.

8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4.000rpm, με στόχο την κατακρήμνιση των κυττάρων. Η φυγόκεντρος έχει προ-ψυχθεί στους 4 °C.

9. Το ίζημα επαναιωρείται με παγωμένο διάλυμα 75mM CaCl<sub>2</sub> (6,65 ml).

10. Το αιώρημα τοποθετείται σε πάγο

11. Μετά από παραμονή 10 λεπτών στον πάγο, τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα μοιράζονται σε erpendorfs.

*Η διατήρηση των δεκτικών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα πραγματοποιείται με την αποθήκευσή τους στους -80 °C.*

### **3.1.2 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA**

Τα διαλύματα και τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου είναι τα ακόλουθα:

1. LB υγρό θρεπτικό μέσο.
2. Αμπικιλλίνη

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Σε περίπου 200ml δεκτικών κυττάρων, προστίθενται 10-50ng πλασμιδιακού DNA. Αναμιγνύονται καλά με ήπιο τρόπο και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 30 λεπτά.
2. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων με επώασή τους στους 42-43 °C για 90 δευτερόλεπτα και έπειτα αφήνονται στον πάγο για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία τους.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 400-600ml θρεπτικού μέσου LB και το δείγμα αφού αναμιχθεί καλά, επωάζεται στους 37 °C για 1 ώρα.
4. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση στις 2.000rpm για 2 λεπτά, προκειμένου τα κύτταρα να συγκεντρωθούν στη βάση του erpendorf.

5. Αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκειμένου και σε αυτό που μένει, επαναδιαλύονται με ήπιο τρόπο τα κύτταρα.

6. Η ποσότητα αυτή του δείγματος επιστρώνεται σε τριβλίο με θρεπτικό μέσο LB, το οποίο μπορεί να περιέχει και ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό, συνήθως αμπικιλίνη.

7. Τα τρυβλία επωάζονται στη συνέχεια στους 37 °C για 12-16 ώρες.

Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού, που περιγράφηκε αμέσως προηγουμένως, τα κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν έτσι ώστε να παράξουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, της οποίας το γονίδιο υπάρχει ως ένθετο στον πλασμιδιακό φορέα. Στη παρούσα πειραματική μελέτη, η οποία επικεντρώθηκε στην L-ASNase της *E. coli*, μελετήθηκε η ετερόλογος έκφραση του ενζύμου αυτού, σε 3 διαφορετικά στελέχη του *E. coli* ώστε να προσδιοριστεί εκείνο, το οποίο εκφράζει τη πρωτεΐνη με μεγαλύτερη απόδοση.

Τα στελέχη αυτά είναι BL21(DE3) STAR, BL21(DE3) Rosetta, BL21(DE3) pLysS. Παράλληλα μελετήθηκαν και 3 διαφορετικά θρεπτικά μέσα με διαφορετική σύσταση το καθένα. Αυτά είναι τα LB, TB και YT.

Η σύσταση του καθενός είναι η ακόλουθη:

LB: 0.5 % w/v εκχύλισμα ζύμης

1 % w/v πεπτόνη

1 % w/v NaCl

TB: 2.4 % w/v εκχύλισμα ζύμης

1.2 % w/v πεπτόνη

0.4 % v/v γλυκερόλη

το pH του τελικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.2 με τη προσθήκη KOH.

YT: 0.5 % w/v εκχύλισμα ζύμης

1.6 % w/v πεπτόνη

0.5 % w/v NaCl

το pH του τελικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.2 με τη προσθήκη KOH.

Η επίδραση των θρεπτικών μέσων, όπως επίσης και τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών στελεχών, παρουσιάζονται στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα". Στη συνέχεια περιγράφεται μια τυπική διαδικασία έκφρασης, η οποία όμως ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων, επιδέχεται κάθε φορά τροποποιήσεις. Για παράδειγμα, η χρήση διαφορετικών στελεχών *E. coli* για ετερόλογο έκφραση συνεπάγεται και χρήση διαφορετικών αντιβιοτικών ως επί το πλείστον. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη πειραματική μελέτη είναι η αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml, η χλωραμφενικόλη σε συγκέντρωση 34 µg/ml.

### **3.1.3 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάση σε κύτταρα *E. coli***

Η καλλιέργεια των κυττάρων για την έκφραση του επιθυμητού ενζύμου πραγματοποιείται εντός φιαλών Erlenmeyer σε υγρό θρεπτικό μέσο TB, η σύσταση του οποίου είναι: 1.2 % πεπτόνη, 0.4 % γλυκερόλη και 2.4 % εκχύλισμα ζύμης. Επιπλέον περιέχονται και τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση στη καλλιέργεια 100 µg/ml και αναλόγως του στελέχους *E. coli*, που χρησιμοποιείται για την ετερόλογο έκφραση, χρησιμοποιούμε και το αντίστοιχο αντιβιοτικό.

Η διαδικασία έχει ως εξής: θρεπτικό μέσο όγκου 350 ml εμβολιάζεται με 35ml κατάλληλα μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* τα οποία προέρχονται από ολονύκτια επώαση 12-16 h στους 37 °C υπό συνθήκες ανάδευσης. Τη χρονική στιγμή κατά την οποία η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας είναι περίπου 0.6-0.7 στα 600 nm, προσθέτουμε IPTG συγκέντρωσης 1 mM ώστε να επαχθεί η έκφραση του ενζύμου. Από αυτό το στάδιο και έπειτα η ανάπτυξη της καλλιέργειας συνεχίζεται για περίπου 6 ώρες.

Μετά από τις τελευταίες 6 ώρες, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 8000rpm για 12 min στους 4 °C με αποτέλεσμα τη συλλογή των κυττάρων, όπως επίσης και του θρεπτικού υλικού, το οποίο περιέχει πολύ μεγάλη ποσότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Τα κύτταρα, αλλά και το υπερκείμενο μπορούν να αποθηκευτούν στους -20 °C έως την επαναχρησιμοποίησή τους.

### **3.1.4 Λύσιμο των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος**

Επιθυμητή ποσότητα κυτταρικής μάζας αιωρείται στο τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με την

επίδραση υπερήχων. Η επίδραση αυτή ακολουθείται 5 φορές διάρκειας 10 δευτερολέπτων η καθεμία με ένα μεσοδιάστημα ενός λεπτού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τα μεσοδιαστήματα το δείγμα μεταφέρεται σε πάγο (2-4 °C) προς αποφυγή μετουσίωσης των πρωτεϊνών λόγω της παραγόμενης θερμότητας από τους υπερήχους. Το τελικό αιώρημα το οποίο έχει πλέον αυξημένο ιξώδες, φυγοκεντρείται στις 13000rpm για 5min και συλλέγουμε το υπερκείμενο.

### **3.1.5 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford**

Η μέθοδος πρωτεϊνικού ποσοτικού προσδιορισμού βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον (Bradford, 1976). Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο χρωστική-πρωτεΐνη είναι χρώματος γαλάζιου και απορροφά στα 595nm. Αποτελεί μια γρήγορη και αρκετά ακριβή μέθοδο συγκριτικά με άλλες και διαθέτει ένα εύρος προσδιορισμού συγκεντρώσεων μεταξύ 40-200μg/ml.

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το πυκνό αντιδραστήριο (stock) Bradford αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1:4, δηλαδή 1 μέρος πυκνού αντιδραστηρίου Bradford και 4 μέρη νερού. Το διάλυμα που προκύπτει το διατηρούμε σε σκοτεινό δοχείο και υπό θερμοκρασία δωματίου 25 °C. Το άγνωστο δείγμα πρωτεΐνης θα προσδιοριστεί αφού σε 950μl του τελευταίου διαλύματος προσθέσουμε 50μl κατάλληλης συγκέντρωσης πρωτεΐνης ώστε στη κυψελίδα να υπάρχουν περίπου 2-10μg πρωτεΐνης.

Ακολουθεί επώαση του μίγματος για 20-35min σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C και εν συνεχεία λαμβάνουμε απορρόφηση στα 595nm έχοντας ως μάρτυρα διάλυμα χωρίς να περιέχει πρωτεΐνη. Η αναγωγή της οπτικής απορρόφησης σε μονάδες συγκέντρωσης γίνεται βάση πρότυπης καμπύλης, η οποία έχει προκύψει από πρωτεΐνη γνωστών συγκεντρώσεων (λ.χ. αλβουμίνη) και έτσι υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης βάση του νόμου Beer-Lambert.

### 3.1.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

#### 3.1.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS)

Η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία SDS έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli (1979) σε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων που αποτελούνται από:

1. ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων Tris (0,025 M)-γλυκίνη (0,192 M), SDS (0,1%w/v) pH 8,3.
2. ρυθμιστικό διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού: Tris/HCL (3M) pH 8.8
3. ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης: Tris/HCL (0.5M) pH 6.8
4. διάλυμα ακρυλαμιδίου: ακρυλαμίδιο (30g, 0.42mol) και N,N'-μεθυλένο-bis-ακρυλαμίδιο (0.8 g, 5.2mmol) διαλυμένα σε 100 ml νερού.
5. ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων: Tris/HCL (0,125M) pH 6.8, SDS (4% w/v), γλυκερόλης (20% v/v) και β-μερκαπτοαιθανόλη (10% v/v).
6. διάλυμα SDS (10% w/v)
7. διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (1.5% w/v).

Ειδικότερα στο πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού και επιστοίβαξης με περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου (12.5 % w/v).

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού και επιστοίβαξης είναι η ακόλουθη: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (875μl) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (70μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (2937.5μl). Το μίγμα αραιώνεται με τη προσθήκη νερού και ακολουθεί απαραίτηση με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15 λεπτά. Μετά την απαραίτηση προσθέτονται TEMED (6.25μl) και υπερθειικό αμμώνιο (1.5ml). Το μίγμα αναδεύεται ελαφρά και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι με διαστάσεις 1.5 mm πάχος και 12cm βάθος. Η επιφάνεια της πηκτής καλύπτεται με διάλυμα βουτανόλης κορεσμένης με νερό και αφήνεται να πολυμεριστεί για 1 h στους 20-25 °C.



Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός απομακρύνεται το διάλυμα της βουτανόλης και εφόσον ξεπλυθεί με νερό η επιφάνεια της πηκτής, εισάγεται η πηκτή επιστοίβαξης, η παρασκευή της οποίας γίνεται ως εξής: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (625μl) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (50μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (6.25μl). Το μίγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (3450 μl) και στη συνέχεια απαιτείται με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15min. Μετά την απαραίτητη προσθήκη TEMED (6.25μl) και υπερθειϊκό αμμώνιο (1ml). Το δείγμα αναδεύεται ελαφρά και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι. Πρίν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, εισάγεται στη κορυφή της πηκτής κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 30min.

### **3.1.6.2 Προετοιμασία του δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης**

Πρωτεϊνικό δείγμα συγκέντρωσης περίπου 50-100 μg διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (~10μl) όπου θερμαίνεται στους 75-100 °C. Σε κάθε δείγμα προστίθεται ως μάρτυρας η μπλέ χρωστική της βρωμοκρεζόλης (0.02 % w/v). Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό δείγμα εισάγεται στα κανάλια της πηκτής και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται (20-25 °C) υπό σταθερή ένταση 30mA για κάθε πηκτή.

### **3.1.6.3 Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250**

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μετά από την ηλεκτροφόρηση με στόχο τη βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών. Η διαδικασία αυτή έχει ως εξής: κατόπιν της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (40 % v/v), οξικό οξύ (7 % v/v) και Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.025-0.1 % w/v) όπου και επωάζεται για 1 h περίπου. Ο αποχρωματισμός της πηκτής πραγματοποιείται μετά από επώαση 5 h στο καθένα από τα επόμενα δύο υδατικά διαλύματα τα οποία περιέχουν: α) μεθανόλη (50 % v/v) και οξικό οξύ (10 % v/v) και β) μεθανόλη (5% v/v) και οξικό οξύ (7 % v/v).

### **3.1.7 Διαπίδυση**

Το ενζυμικό εκχύλισμα πρίν τον καθαρισμό υποβάλλεται σε μια διαδικασία με την οποία απομακρύνονται τυχόν υποπροϊόντα του μεταβολισμού του κυττάρου, τα οποία πιθανόν να ασκήσουν αρνητική επίδραση στη χρωματογραφική συμπεριφορά του ενζύμου.

Παράλληλα ρυθμίζεται το pH σε επιθυμητή τιμή, έτσι ώστε να διαμορφωθούν οι συνθήκες εκείνες που απαιτούνται για τη πρόσδεση του ενζύμου στον δεσμευτή. Επιπλέον, πολλές φορές διαπίδωση εφαρμόζεται και όταν επιθυμούμε να απαλλαγεί το ένζυμο από το προσδεμένο υπόστρωμα που απέκτησε κατά τον καθαρισμό. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης και στην αρχή ότι μεταξύ δύο φάσεων διαφορετικών συγκεντρώσεων, γίνεται μεταφορά μορίων προς εκείνη τη κατεύθυνση ώστε να εξισορροπηθούν οι συγκεντρώσεις. Με βάση αυτή τη λογική το ενζυμικό εκχύλισμα υποβάλλεται σε διαπίδωση έναντι 2000 όγκων ρυθμιστικού διαλύματος 20mM φωσφορικών  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 8. Ειδικότερα χρησιμοποιείται ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης με όριο αποκλεισμού 12 KDa (Sigma, U.S.A.). Η συνολική διαδικασία διαρκεί 18-24 h και πραγματοποιείται στους 4 °C. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η απομάκρυνση όλων των ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος (<12 KDa).

### **3.1.8 Καθαρισμός -Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής**

Η χρωματογραφία αυτού του τύπου, αποτελεί μια από τις συνηθέστερες μεθόδους, όχι μόνο σε εργαστηριακή, αλλά και σε βιομηχανική κλίμακα. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονίσουμε, ότι γίνεται η αναφορά στον διαχωρισμό εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα, καθώς οι συνθήκες υπο τις οποίες πραγματοποιούνται και εφαρμόζονται τα πρωτόκολλα καθαρισμού, είναι τελείως διαφορετικές στις δύο περιπτώσεις. Είναι πολύ πιθανό για παράδειγμα, ένα ένζυμο να απομονώνεται και να καθαρίζεται με πολύ μεγάλη απόδοση ακολουθώντας μια συγκεκριμένη μέθοδο στο εργαστήριο, η οποία όμως μέθοδος να είναι απαγορευτική σε βιομηχανική κλίμακα.

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η φύση του ενζυμικού μορίου είναι αμφοτερική. Αυτό σημαίνει ότι το φορτίο του ενζύμου δύναται να διαφοροποιηθεί σε διαφορετικές συνθήκες pH. Έτσι, οποιοδήποτε ενζυμικό μόριο μπορεί να προσροφηθεί σε κατάλληλο ιοντοανταλλάκτη και εν συνεχεία, με διαφοροποίηση των συνθηκών pH ή και ιοντικής ισχύος, να παραλάβουμε το προσροφημένο ένζυμο. Με λίγα λόγια, η προσρόφηση του ενζύμου είναι αντιστρεπτή.

Ο ιοντοανταλλάκτης είναι χημικά δεσμευμένος σε πολυμερή, τα οποία παρουσιάζουν υδρόφιλο χαρακτήρα. Τέτοια πολυμερή είναι η αγαρόζη, η κυτταρίνη, η δεξτράνη, διάφορα συνθετικά πολυμερή όπως πολυακρυλαμίδιο, πολυακρυλικά, αλλά και συνδυασμοί πολυμερών (συμπολυμερή) όπως η αγαρόζη/δεξτράνη, αγαρόζη/πολυακρυλαμίδιο κ.α. (Κλώνης, 1997). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης CM-

Sepharose CL6B pH 8. Ο προσροφητής διαθέτει μια μεγαλοπορώδη δομή, έτσι ώστε και πολύ μεγάλες πρωτεΐνες να μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό και να αλληλεπιδράσουν με τις φορτισμένες ομάδες του ιοντοανταλλάκτη. Οι φορτισμένες ομάδες του ιοντοανταλλάκτη ποικίλλουν, με πιο συνηθισμένες τις καρβοξυλομάδες, τις τριτοταγείς αμινομάδες και τις σουλφονικές. Αξίζει να σημειωθεί, ότι όλες οι παραπάνω χημικές ομάδες είναι εξουδετερωμένες από ιόντα αντίθετου φορτίου του διαλύματος. Κατ'επέκταση, οι χημικές ομάδες του ενζύμου που διαθέτουν φορτίο αντίθετο του ιοντοανταλλάκτη και έλκονται απ' αυτόν, συναγωνίζονται και απωθούν το αντισταθμιστικό ιόν, με αποτέλεσμα να προσροφάται το ένζυμο στον ιοντοανταλλάκτη.

Όταν εφαρμόζουμε χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, είναι πρωτίστης σημασίας να γνωρίζουμε το ισοηλεκτρικό σημείο ( $pI$ ) του ενζύμου, όπως επίσης και το εύρος pH εντός του οποίου είναι λειτουργικό το ένζυμο. Για παράδειγμα, στη περίπτωση που κάποιο ένζυμο αδρανοποιείται σε pH 5, θα πρέπει να αποφύγουμε αντίστοιχες συνθήκες οξύτητας κατά τη διαδικασία της χρωματογραφίας. Ισοηλεκτρικό σημείο ενός ενζύμου, είναι εκείνη η τιμή pH, στην οποία το συνολικό φορτίο του ενζύμου είναι μηδέν (0).

Είναι προφανές ότι σε τιμές  $pH > pI$ , το ένζυμο είναι φορτισμένο αρνητικά και στην αντίθετη περίπτωση όπου  $pH < pI$ , το μόριο είναι θετικά φορτισμένο. Οι ιδότητες αυτές αποτελούν τη βάση διαμόρφωσης και ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, καθώς θα εξαρτηθεί το είδος του ιοντοανταλλάκτη που θα χρησιμοποιήσουμε.

Όσον αφορά την έκλυση (ή εκρόφηση) του προσροφημένου ενζύμου από τη χρωματογραφική στήλη, μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους: με *συνεχή διαβάθμιση*, με *σταδιακή διαβάθμιση* και με *έκλυση συγγένειας* (Donald D. Voet and Judith G. Voet, 2004). Με τον όρο διαβάθμιση, εννοούμε τη μεταβολή των συνθηκών pH και ιοντικής ισχύος της υγρής φάσης της στήλης, όπως επίσης ακόμη και τη προσθήκη κάποιας επιπλέον βοηθητικής ουσίας, ώστε να εκλουστεί το προσροφημένο ένζυμο.

Η συνεχής διαβάθμιση παρουσιάζεται κατά κάποιο τρόπο προβληματική, λόγω του ότι ο ιοντοανταλλάκτης έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τις μεταβολές του pH που επιφέρονται, με αποτέλεσμα το τελικό pH στη στήλη να είναι διαφορετικό από το εκείνο που επιθυμούμε. Αντίθετα, με τη σταδιακή διαβάθμιση μπορούμε να επιτύχουμε αποτελεσματικότερη ρύθμιση των συνθηκών της στήλης και ιδιαίτερα του pH. Ο πιο συνήθης τρόπος έκλυσης στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι η διαβάθμιση της ιοντικής ισχύος. Χρησιμοποιώντας διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετική ιοντική ισχύ,

μπορούμε να τροποποιήσουμε το περιβάλλον προσρόφησης του ενζύμου, καθώς τα διάφορα διαλύματα δρουν αθροιστικά, με αποτέλεσμα το ένζυμο να εκλούεται.

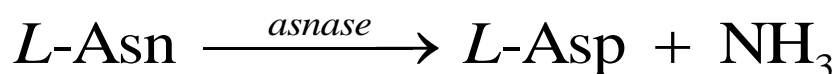
Η αύξηση της ιοντικής ισχύος συνεπάγεται μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες συγκρατούν το ένζυμο στη στήλη και έτσι σταδιακά το ένζυμο εκλούεται. Ο τρίτος τρόπος έκλυσης ενός ενζύμου από κάποιο ιοντοανταλλάκτη, αφορά στη χρήση κάποιου κατάλληλου μορίου δεσμευτή, το οποίο εμφανίζει συγγένεια με το προσροφημένο ένζυμο και κατ' αυτόν τον τρόπο συναγωνίζεται τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του προσροφητή, οι οποίες ευθύνονται για τη πρόσδεση του μορίου στον ιοντοανταλλάκτη. Για να ενισχυθεί η πρόσδεση του δεσμευτή με το ενζυμικό μόριο, φέρει ισχυρό φορτίο αντίθετο με εκείνο του ενζύμου, γεγονός το οποίο αποδυναμώνει και τη σύνδεσή του με τον προσροφητή και τελικά εκλούεται.

Στην παρούσα εργασία όπως αναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης CM-Sepharose. Για την εξισορρόπηση του pH των σφαιριδίων έγιναν πλύσεις με περίπου 20ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  200mM pH 8 και περίπου 20ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20mM pH 8. Για τις εκλούσεις δοκιμάστηκαν 2 διαλύματα  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20mM pH 8 με  $\text{NaCl}$  0,1M (10 εκλούσεις των 2ml) και  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20mM pH 8 με  $\text{NaCl}$  0,05M (10 εκλούσεις των 2ml). Τελικά αριστοποιήθηκε το πρωτόκολλο καθαρισμού για το συγκεκριμένο ένζυμο όπως φαίνεται και στο κεφάλαιο με τα αποτελέσματα.

### **3.1.9 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηρότητας της L-ασπαργινάσης**

Η δραστηρότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Nessler (Nesslerization) (Vogel et al., 1979). Το αντιδραστήριο Nessler είναι ένα διάλυμα 0.09 mol/L τετρα-ιωδο-υδραργύρου ( $\text{K}_2[\text{HgI}_4]$ ) με 2.5mol/L υδροξείδιο του καλίου και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων αμμωνίας. Στη περίπτωση ύπαρξης αμμωνιακών ιόντων, πραγματοποιείται αλλαγή χρώματος και σχηματίζεται υποκίτρινο χρώμα. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται σε επίπεδα προσδιορισμού  $> 0.3\mu\text{g NH}_3$  ανα μονάδα όγκου διαλύματος.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η παρακάτω:



Αρχικά 1ml υποστρώματος, που είναι η L-ασπαραγίνη σε συγκέντρωση 0.2 M, αναμιγνύονται με 100ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 0.05 M, pH 8,6 εντός erpendorf. Το υπόστρωμα έχει διαλυθεί σε νερό. Στη συνέχεια σε ένα δεύτερο erpendorf, το οποίο αντιστοιχεί στον μάρτυρα, προσθέτουμε όλα τα προηγούμενα και επιπλέον 100ml τριχλωροακετικό οξύ 1,5M (TCA). Το TCA προσθέτεται με σκοπό τη κατακρήμνιση του ενζύμου όταν αυτό προστεθεί, έτσι ώστε να μην πραγματοποιηθεί αντίδραση. Τα δύο erpendorfs εξισορροπούνται στους 37 °C για 5-6 λεπτά και στη συνέχεια προσθέτονται στο καθένα 10ml ενζύμου. Ο τελικό όγκος είναι 1210ml. Το δείγμα και ο μάρτυρας επωάζονται στους 37 °C για 20 λεπτά. Μετά την επώαση, 100ml TCA προσθέτονται στο δείγμα έτσι ώστε να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση και φυγοκεντρούνται στις 13.000rpm για 2 λεπτά ώστε να κατακρημνιστούν τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα μετά τη προσθήκη του TCA.

Κατόπιν, σε κυβέτα των 1,7ml, προσθέτονται 860ml νερό, 40ml από το υπερκείμενο του κάθε erpendorf και 100ml αντιδραστήριο Nessler. Η παρουσία αμμωνιακών ιόντων υποδηλώνεται με τον μεταχρωματισμό που αναφέρθηκε παραπάνω. Όσο πιο έντονο κίτρινο χρώμα, τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση αμμωνίας υπάρχει στο δείγμα. Σαφώς στη περίπτωση του μάρτυρα, δεν υπάρχει μεταχρωματισμός καθώς το ένζυμο είχε μετουσιωθεί υπο την επίδραση του TCA.

Στη συνέχεια με την κυβέτα που περιέχει τον μάρτυρα μηδενίζουμε το φωτόμετρο στα 436nm και μετράμε αντίστοιχα το δείγμα. Το αποδεκτό εύρος της απορρόφησης είναι από 0.02-0.35. Εύλογο είναι το γεγονός, ότι ο όγκος ενζύμου που χρησιμοποιείται κάθε φορά για τον προσδιορισμό της δραστηκότητας προκύπτει πειραματικά.

### 3.1.10 Κινητική ανάλυση

Κινητική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 0.05 M, pH 8,6 μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των υποστρωμάτων L-Asn και L-Gln. Η ενζυμική δραστηκότητα της L-Asnase έναντι αυτών των υποστρωμάτων υπολογίστηκε με βάση τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς, όπως περιγράφονται παραπάνω. Για την

επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του προγράμματος Grafit 4. Οι κινητικές σταθερές  $K_m$ , υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Grafit.

### **3.1.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης**

Τα διαλύματα και τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου είναι τα ακόλουθα:

1. LB υγρό θρεπτικό μέσο
2. Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων, το οποίο περιέχει: 50mM γλυκόζη, 25mM Tris-Cl, pH 8, και 10mM EDTA, pH 8.
3. Διάλυμα NaOH-SDS
4.  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ - RNάσης A
5. RNάση A
6. Ισοπροπυλική αλκοόλη
7. Αιθανόλη 70 % v/v.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους αναπτύσσεται σε LB υγρό θρεπτικό μέσο, συνήθως με παρουσία αντιβιοτικού, στους 37°C για 12-16 ώρες υπο συνεχή ανάδευση στις 250rpm.
2. Εν συνεχεία, 1.5ml απο την καλλιέργεια φυγοκεντρείται εντός eppendorf, στις 13.000rpm για 2 λεπτά.
3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται τελείως και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.
4. Στη συνέχεια προστίθενται 400μl απο το διάλυμα NaOH-SDS.

5. Το δείγμα αναμιγνύεται προσεκτικά και επωάζεται σε πάγο για 5 λεπτά ακριβώς.
6. Κατά τη διάρκεια των λεπτών αυτών, προστίθεται RNάση A (10  $\mu$ l/ ml) σε παγωμένο  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , προκειμένου να παρασκευαστεί το διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  - RNάσης A, και αναμιγνύονται καλά.
7. Μετά από 5 λεπτά προστίθενται στο δείγμα περίπου 300  $\mu$ l παγωμένου διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  - RNάσης A, αναδεύονται καλά και προσεχτικά και το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 10 λεπτά.
9. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf, στο οποίο προστίθεται ισοπροπυλική αλκοόλη μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος του erpendorf και μετά από ανάδευση το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
10. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 15 λεπτά.
11. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε 1ml 70% v/v παγωμένης αιθανόλης.
12. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 10 λεπτά.
13. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τελικά το ίζημα (DNA), αφού στεγνώσει (έχει εξαφανιστεί η μυρωδιά της αιθανόλης) σε θερμοκρασία δωματίου, επαναδιαλυτοποιείται σε 30-50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

### **3.1.12 Απομόνωση γονιδίου με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)**

Το γονίδιο της L-ASNase του στελέχους *E. coli* απομονώθηκε από το γενωμικό DNA του στελέχους BL21(DE3) rLysS, με τη χρήση PCR. Αρχικά, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές της αντίδρασης, μετά από ανάλυση και σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων των L-ASNases από διάφορα στελέχη *E. coli*, που έχουν προσδιοριστεί και κατατεθεί στη βάση δεδομένων του NCBI. Όλα τα προηγούμενα, υλοποιήθηκαν με τη

βοήθεια της βιουπολογιστικής και συγκεκριμένα των εφαρμογών BLASTN και CLUSTALW, οι οποίες μας παρέχουν τη δυνατότητα σύγκρισης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών, έτσι ώστε να μπορούμε να προσδιορίσουμε ποσοστά ομολογίας μεταξύ γονιδίων και κατ' επέκταση να προβλέψουμε και να σχεδιάσουμε σωστά ζεύγη εκκινητών, για την απομόνωση γονιδίων από συγγενή στελέχη. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται με έντονα μαύρα γράμματα στον Πίνακα 3.1 και είναι οι ακόλουθες:

**Πίνακας 3.1.** Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών

<u>Εκκινητές</u>	<u>Νουκλεοτιδική αλληλουχία</u>
<b>Forward:</b>	<b>5' - ATGGAGTTTTTAAAAAGACGGC - 3' 23 Νουκλεοτίδια</b>
<b>Reverse:</b>	<b>5' - TTAGTACTGATTGAAGATCTG - 3' 21 Νουκλεοτίδια</b>

Στη συνέχεια, απομονώθηκε το γενωμικό DNA του στελέχους BL21(DE3) rLysS με τη χρήση kit της εταιρίας Invitrogen και εφαρμόστηκε η αντίδραση PCR, από την οποία τελικά ενισχύθηκε η αλληλουχία του γονιδίου μετά από 30 θερμοκύκλους. Οι συνθήκες της αντίδρασης διαμορφώθηκαν από τη προσθήκη 0.2mM dNTPs, περίπου 100ng γενωμικό DNA, 1 μονάδα Hifi πολυμεράσης και 8pmol από κάθε εκκινητή. Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 50 μl. Η θερμοκρασία αποδιάταξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 94 °C για 1 λεπτό, στο στάδιο υβριδισμού των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασία 45 °C για 1 λεπτό και στο στάδιο της επιμήκυνσης 72 °C για 3 λεπτά.

Πριν τον πρώτο κύκλο, το δείγμα έμεινε στους 94 °C για 3 λεπτά και μετά τον τελευταίο κύκλο στους 72 °C για 10 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε σε 0,5 % w/v πηχτή αγαρόζης.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε διάλυμα 1x TAE (διάλυμα Tris, οξικού οξέος και EDTA) και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
2. Μετά τη διάλυση της αγαρόζης και τη μείωση της θερμοκρασίας από την εφαρμογή των μικροκυμάτων, προστίθεται ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου, ώστε η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 0.5 μg/ml.



3. Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης, στην οποία τοποθετείται επίσης και ειδική χτένα για τη δημιουργία ειδικών εσοχών εντός των οποίων θα τοποθετηθούν αργότερα τα δείγματα. Η πηκτή αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Όταν στερεοποιηθεί η πηκτή, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρείται με κατάλληλη ποσότητα 1x TAE.

5. Στα προς ανάλυση δείγματα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος και χρωστικής, έτσι ώστε να είναι εμφανή κατά τη φόρτωση στη συσκευή.

6. Τέλος τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια και εφαρμόζεται συνεχής τάσης μεταξύ 75 και 150Volt, ανάλογα με την περιεκτικότητα και το μέγεθος της αгарόζης και την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού.

7. Μετά το πέρας τη παραπάνω διαδικασίας, η πηκτή αναλύεται με τη βοήθεια υπεριώδης ακτινοβολίας, η οποία αντιδρά με το περιεχόμενο βρωμιούχο αιθίδιο, με αποτέλεσμα την οπτικοποίηση του DNA εντός της πηκτής.

### **3.1.13 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αгарόζης**

Για την απομόνωση συγκεκριμένου κλάσματος DNA από κάποιο δείγμα παρασκευάζεται πηκτή αгарόζης περίπου 0,5-1% (w/v) και το δείγμα αναλύεται ηλεκτροφορητικά μέχρις ότου επιτευχθεί ο μέγιστος δυνατός διαχωρισμός του κλάσματος που πρόκειται να απομονωθεί από τα υπόλοιπα. Ακολούθως η πηκτή τοποθετείται σε γυάλινη πλάκα και μεταφέρεται σε συσκευή που εκπέμπει υπεριώδες φως. Εκεί με τη βοήθεια ξυραφιού κόβεται το τμήμα της πηκτής που περιέχει το ζητούμενο κλάσμα DNA και τοποθετείται σε eppendorf. Στη συνέχεια για τον καθαρισμό ακολουθείται η μέθοδος που περιγράφεται στο εμπορικό σκεύασμα QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen) και βασίζεται στη μέθοδο προσρόφησης του DNA σε silica gel παρουσία χρομοφωρικών παραγόντων.

### 3.1.14 Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση της L-ασπαραγινάσης και κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση της EcaL-Asnase με σκοπό να μεταλλαχθεί η Asn24, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (overlap extension) χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR, (Εικόνα 3.3). Το ζεύγος των εκκινητών γύρω από τη θέση μεταλλαξογένεσης (θέση 24) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Οι εκκινητές αυτοί στην αντίστοιχη θέση περιέχουν κωδικόνιο NNN που κωδικοποιεί για οποιοδήποτε αμινοξύ. Οι εκκινητές των άκρων παρουσιάζονται σε παραπάνω πίνακα, ενώ οι ποσότητες των συστατικών όλων των PCR αντιδράσεων αλλά και το πρόγραμμα των κύκλων που πραγματοποιήθηκαν για τη μεταλλαξογένεση περιγράφονται στη συνέχεια. Η απομάκρυνση του μητρικού DNA από το προϊόν της αντίδρασης PCR επιτεύχθηκε με χρήση της ενδονουκλεάσης DpnI. Αρχικά με τις δυο πρώτες PCR τμήματα του γονιδίου εκατέρωθεν της θέσης μεταλλαξογένεσης, που όμως περιείχαν και την μετάλλαξη το ένα στο τέλος και το άλλο στην αρχή του. Τα προϊόντα αυτών των PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης, όπου και επιβεβαιώθηκε ότι είχαν μέγεθος περίπου 900bp και 100bp αντίστοιχα. Αναλυτικά θα παρουσιαστούν στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων.

**Πίνακας 3.2.** Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που φέρουν το τροποποιημένο κωδικόνιο

<u>Εκκινητής</u>	<u>Νουκλεοτιδική αλληλουχία</u>
<b>Mutant Forward:</b>	<b>5'- ACC AAA TCT <i>NNN</i> TAC ACA GTG GG -3' 23 Νουκλεοτίδια</b>
<b>Mutant Reverse:</b>	<b>5'- CC CAC TGT GTA <i>NNN</i> AGA TTT GGT -3' 21 Νουκλεοτίδια</b>

Οι συνθήκες των δυο αντιδράσεων διαμορφώθηκαν από τη προσθήκη 1μl DNTPs, περίπου 1μl αραιωμένο γενωμικό DNA, 1 μονάδα Hifi πολυμεράσης και 8μl από κάθε εκκινητή. Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 50 μl. Στην πρώτη αντίδραση οι εκκινητές ήταν: (mutant forward και reverse) ενώ στη δεύτερη αντίδραση ήταν: (forward και mutant reverse). Για την πρώτη αντίδραση, η θερμοκρασία αποδιάταξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 98 °C για 20 δευτερόλεπτα, στο στάδιο υβριδισμού των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασία 45 °C για 1 λεπτό και στο στάδιο της επιμήκυνσης 72 °C για 1 λεπτό. Πριν τον

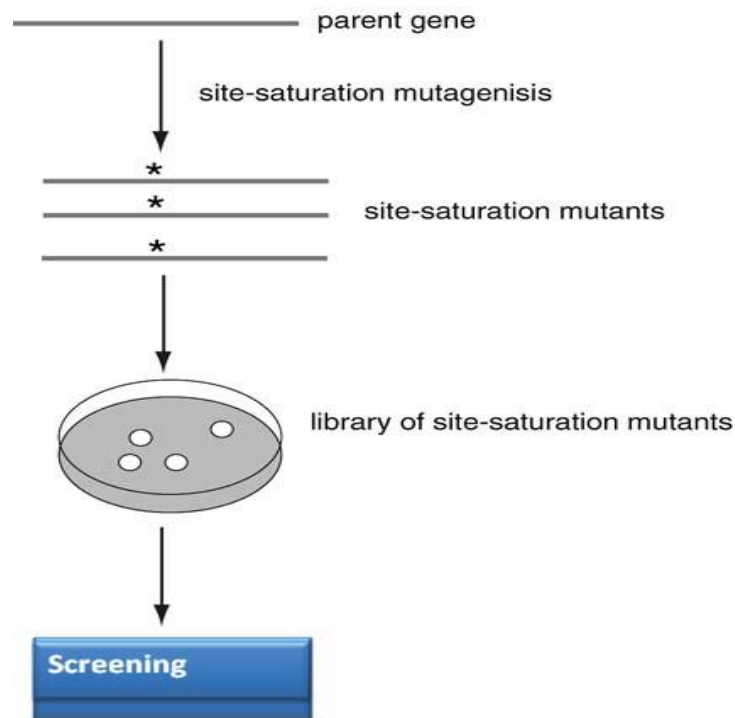
πρώτο κύκλο, το δείγμα έμεινε στους 95 °C για 4 λεπτά και μετά τον τελευταίο κύκλο στους 72 °C για 10 λεπτά.

Για την δεύτερη αντίδραση, η θερμοκρασία αποδιάταξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 98 °C για 20 δευτερόλεπτα, στο στάδιο υβριδισμού των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασία 45 °C για 30 δευτερόλεπτα και στο στάδιο της επιμήκυνσης 72 °C για 15 δευτερόλεπτα. Πριν τον πρώτο κύκλο, το δείγμα έμεινε στους 95 °C για 4 λεπτά και μετά τον τελευταίο κύκλο στους 72 °C για 10 λεπτά.

Βασικό στάδιο για την πραγματοποίηση της τελικής PCR που σαν προϊόν θα έδινε το πλήρους μήκους μεταλλαγμένο γονίδιο ήταν η απομάκρυνση του μητρικού DNA. Η τελευταία επιτεύχθηκε με τη χρήση της ενδονουκλεάσης DpnI. Η ενδονουκλεάση DpnI αναγνωρίζει την παλλινδρομική ακολουθία 5' – GATC- 3', την οποία όμως πέπτει μόνο αν η αδενίνη είναι μεθυλιωμένη. Συγκεκριμένα για να δράσει πρέπει το DNA να είναι δίκλωνο και η αδενίνη να είναι μεθυλιωμένη και στους δύο κλώνους.

Υπό αυτές τις προϋποθέσεις η πέψη πραγματοποιείται, ταυτόχρονα και στους δύο κλώνους, μεταξύ αδενίνης και θυμίνης. Τα πλασμίδια που απομονώνονται από βακτηριακά κύτταρα *E. coli* είναι μεθυλιωμένα στην αδενίνη της συγκεκριμένης ακολουθίας εξαιτίας της δράσης της *dam* ή *dcm* μεθυλάσης. Το αποτέλεσμα λοιπόν της δράσης της ενδονουκλεάσης DpnI στα προϊόντα των δύο πρώτων PCR ήταν η πέψη μόνο του πλασμιδιακού (μητρικού) DNA και όχι των τμημάτων που παρήχθησαν από την PCR. Κάθε αντίδραση πέψης περιέχει 15 units DpnI και επωάζεται για 3 ώρες στους 37°C.

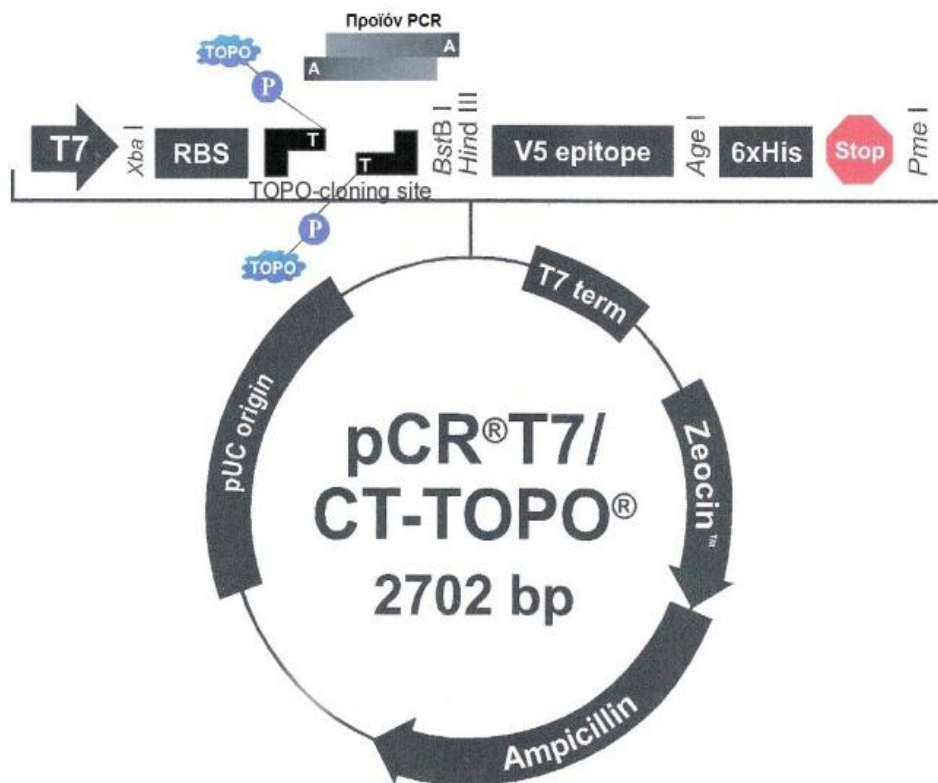
Στη συνέχεια αφού επωάστηκαν τα δείγματα στους 80°C για 20 min, προκειμένου να σταματήσει η δράσης της DpnI, πραγματοποιήθηκε η τελική PCR. Οι συνθήκες της τρίτης αντίδρασης διαμορφώθηκαν από τη προσθήκη 1μl DNTPs, 1μl από το PCR προϊόν της πρώτης αντίδρασης και 1μl από το PCR της δεύτερης αντίδρασης DNA, 1 μονάδα Hifi πολυμεράσης και 8pmol από κάθε εκκινητή( Forward και Reverse). Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 50μl. Η θερμοκρασία αποδιάταξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 98 °C για 20 δευτερόλεπτα, στο στάδιο υβριδισμού των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασία 55 °C για 30 δευτερόλεπτα και στο στάδιο της επιμήκυνσης 72 °C για 1,10 λεπτά. Πριν τον πρώτο κύκλο, το δείγμα έμεινε στους 95 °C για 4 λεπτά και μετά τον τελευταίο κύκλο στους 72 °C για 10 λεπτά.



**Εικόνα 3.3.** Τα κύρια πειραματικά στάδια σε μια *in vitro* κατευθυνόμενη διαδικασία μεταλλαξογένεσης κορεσμού. Μία διαλογή ή διαδικασία επιλογής χρησιμοποιείται για την απομόνωση των μετασχηματισμένων κυττάρων με την επιθυμητή δραστηριότητα.

Το προϊόν της αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για το πλήρους μήκους μεταλλαγμένο γονίδιο και ακολούθως κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR®T7/CT-TOPO®. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5A.

Η κλωνοποίηση και ο μετασχηματισμός έγιναν με τη τεχνολογία του TOPO-Cloning (Invitrogen), όπως περιγράφεται παρακάτω. Ο πλασμιδιακός φορέας pCR®T7/CT-TOPO® που παρέχεται από το pCR®T7/CT-TOPO® TA Expression Kit της εταιρείας Invitrogen, παρουσιάζεται στην παρακάτω Εικόνα 3.4.



**Εικόνα 3.4.** Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCR T7/CT TOPO. Το προϊόν της PCR, ενώθηκε εντός των άκρων που φαίνονται παραπάνω με προεξέχοντα άκρα θυμίνης (T). Στο σημείο αυτό, δρά το ένζυμο τοποϊσομεράση, η οποία ενώνει τα προεξέχοντα άκρα αδενίνης (A) του γονιδίου, με τα άκρα θυμίνης του φορέα. Τα άκρα αδενίνης εισάγονται στο γονίδιο, μετά απο τη δράση της Taq πολυμεράσης. Όλα τα προηγούμενα, εφαρμόζονται με τη καθοδήγηση του συνοδευτικού εγχειριδίου της εταιρίας Invitrogen, απο την οποία αποκτήθηκε ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας.

### 3.1.15 Ένωση των προϊόντων PCR στον πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* XL1-Blue με τα ανασυδασμένα πλασμίδια

Τα στάδια που ακολουθήκαν έχουν ως εξής: Αρχικά πραγματοποιήθηκε προσθήκη καταλοίπων αδενίνης στο 3' άκρο του PCR προϊόντος, αφού για να μπορέσει να γίνει η πρόσδεση του PCR προϊόντος σε αυτούς τους πλασμιδιακούς φορείς πρέπει να εισαχθούν στο 3' άκρο κατάλοιπα αδενίνης. Για την επίτευξη αυτής της αντίδρασης αναμιγνύονται 50μl PCR προϊόντος με 2 Units Taq πολυμεράσης.

Το δείγμα επωάζεται για 10 min στους 72 °C. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αντίδραση κλωνοποίησης του PCR προϊόντος στον πλασμιδιακό φορέα (TOPO Cloning Reaction), όπου αναμιγνύονται 0,5μl αποστειρωμένου δις-απιονισμένου νερού, 1μl διαλύματος αλάτων, 4μl από το προϊόν της PCR αντίδρασης και 0,5μl φορέα pCR<sup>®</sup>T7/CT-TOPO<sup>®</sup>. Η αντίδραση επωάζεται για 5 min στους 25 °C και έπειτα τοποθετείται στον πάγο για 30min. Ακολουθεί μετασχηματισμός XL1-Blue δεκτικών κυττάρων όπως περιγράφεται παραπάνω.

Η ύπαρξη των επιθυμητών μεταλλάξεων πιστοποιήθηκε με DNA αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CEMIA. Για το σκοπό αυτό αρχικά απομονώθηκαν τα πλασμίδια στα οποία ήταν κλωνοποιημένα τα γονίδια με τη βοήθεια του QIAquick<sup>™</sup> Mini Prep Kit. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε για το κάθε δείγμα αλληλούχιση και των δύο κλώνων, χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινήτες. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν για τη μετάφραση των γονιδίων μέσω του προγράμματος Translate (<http://www.us.expasy.org/tools/dna.html>) και την ταυτοποίηση των σωστών αναγνωστικών πλαισίων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A decorative graphic consisting of a horizontal dashed line that extends from the left edge of the page to the right edge of the text 'ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ'. From the right end of this horizontal line, a vertical dashed line descends downwards, and then a horizontal dashed line extends to the right, ending at the right edge of the page.

#### 4.1 Μελέτη της ετερόλογης έκφρασης του ενζύμου σε 3 διαφορετικά στελέχη *E. coli*

Το γονίδιο του ενζύμου κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε σε *E. coli*. Πραγματοποιήθηκε επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού μέσου και αριστοποιήθηκαν οι συνθήκες έκφρασης .

Ένας απο τους κύριους παράγοντες, μεταξύ άλλων, ο οποίος συμβάλλει με καθοριστικό τρόπο, στη μεταφορά μια ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο περίπλασμα του *E. coli*, το οποίο χρησιμοποιείται ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, είναι και το στέλεχος *E. coli* που κάθε φορά εκφράζει την πρωτεΐνη. Ανάλογα με τις ανάγκες και τους στόχους έκφρασης, έχουν δημιουργηθεί με τη βοήθεια γενετικών μεταλλαγών (mutations), διάφορα στελέχη *E. coli*, τα οποία εξυπηρετούν διάφορες εκφραστικές ανάγκες που προκύπτουν στα πλαίσια των πειραμάτων. Έτσι για παράδειγμα, το στέλεχος *E. coli*, BL21(DE3) Rosetta χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις που προσπαθούμε να εκφράσουμε μια πρωτεΐνη, η οποία κωδικοποιείται απο μια νουκλεοτιδική αλληλουχία που περιέχει σπάνια κωδικόνια (Kane, 1995; Kurland and Gallant, 1996; Goldman et al., 1995). Το μεταφραστικό σύστημα του στελέχους αυτού, υποστηρίζει και αναγνωρίζει τα σπάνια κωδικόνια, με αποτέλεσμα να δύναται η τελική μετάφραση της πρωτεΐνης. Το φαινόμενο αυτό είναι πολύ σύνθηες, όταν προσπαθούμε να εκφράσουμε μια ευκαρυωτική πρωτεΐνη στην *E. coli*. Επιπλέον το στέλεχος BL21(DE3) pLysS, υπερεκφράζει τη λυσοζύμη, η οποία επιδρά στο κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου, με αποτέλεσμα να το κάνει δομικά περισσότερο ασταθές.

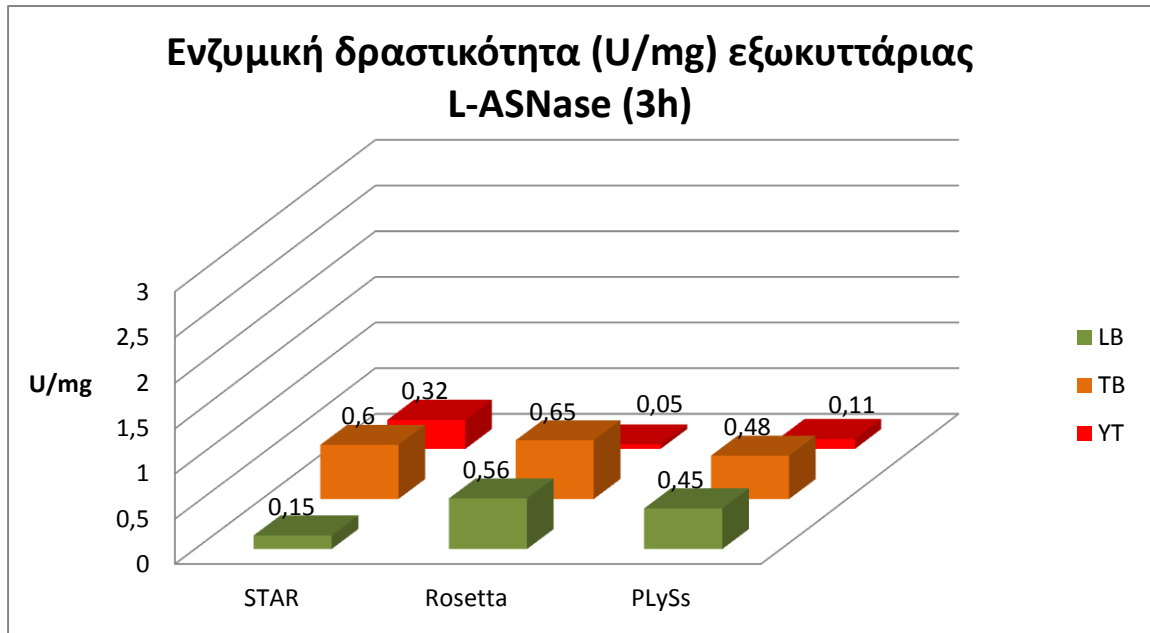
Με βάση τα προηγούμενα, στα πλαίσια διερεύνησης της έκφρασης της *E. coli* L-ASNase, στο *E. coli*, μελετήσαμε την έκφραση 3 διαφορετικών στελεχών (strains) BL21(DE3) STAR, BL21(DE3) Rosetta, BL21(DE3) PLysS, (Πίνακας 4.1) σε 3 διαφορετικά θρεπτικά μέσα (LB, TB, YT) στα χρονικά διαστήματα των 3 και 6 h μετά την προσθήκη του IPTG. Μελετήθηκε τόσο η ενδοκυττάρια έκφραση του ενζύμου, όσο και η εξωκυττάρια έκκριση, δηλαδή έγινε προσδιορισμός των ειδικών δραστηριοτήτων ώστε να επιλεγεί το κατάλληλο στέλεχος, θρεπτικό μέσο και ο κατάλληλος χρόνος έκφρασης και στις δύο περιπτώσεις .



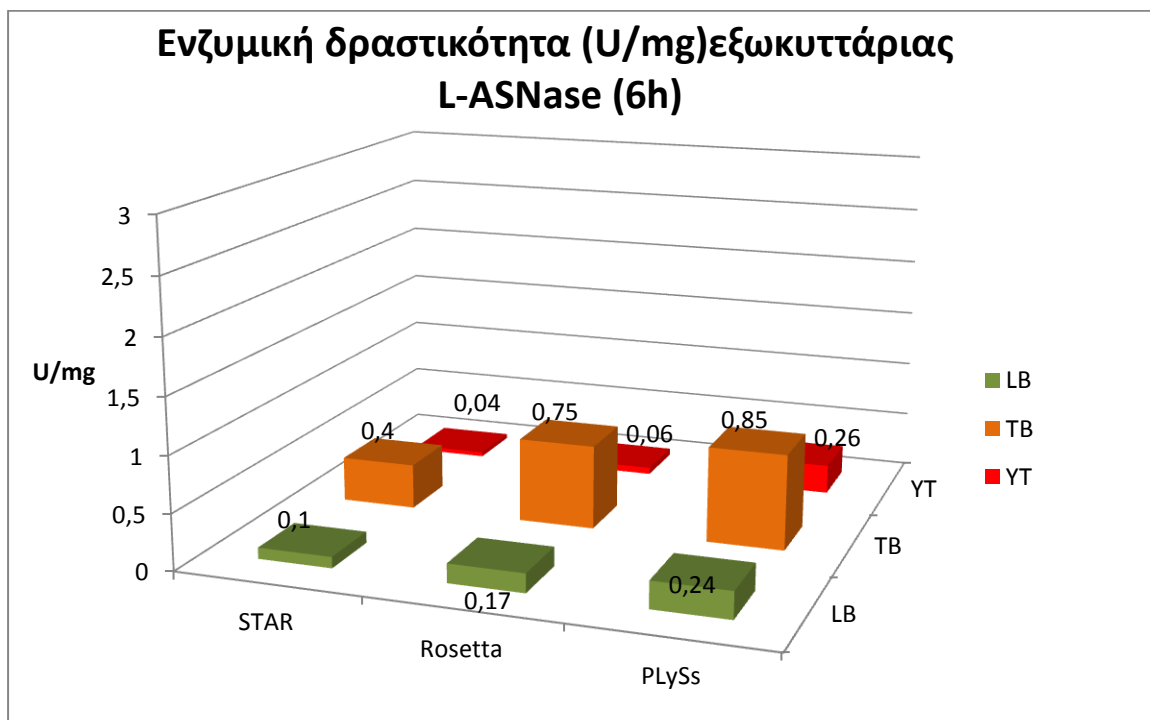
Πίνακας 4.1. Τα στελέχη *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα πειραματική μελέτη και οι γενότυποι των στελεχών αυτών.

Στελέχη <i>E. coli</i> που χρησιμοποιήθηκαν	Γενότυποι	Αναφορές
XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Studier FW & Moffatt BA, 1986.
BL21 (DE3) Star	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3),(cm <sup>R</sup> )	Invitrogen
Rosetta	Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Novagen
BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3) pLysS(cm <sup>R</sup> )	Studier FW & Moffatt BA, 1986

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 4.1 & 4.2) παρουσιάζεται η μεταβολή της ειδικής δραστηριότητας (U/mg) εξωκυττάριας L-ASNase των διαφορετικών στελεχών της *E. coli*, σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, 3 και 6 h μετά την προσθήκη του IPTG.

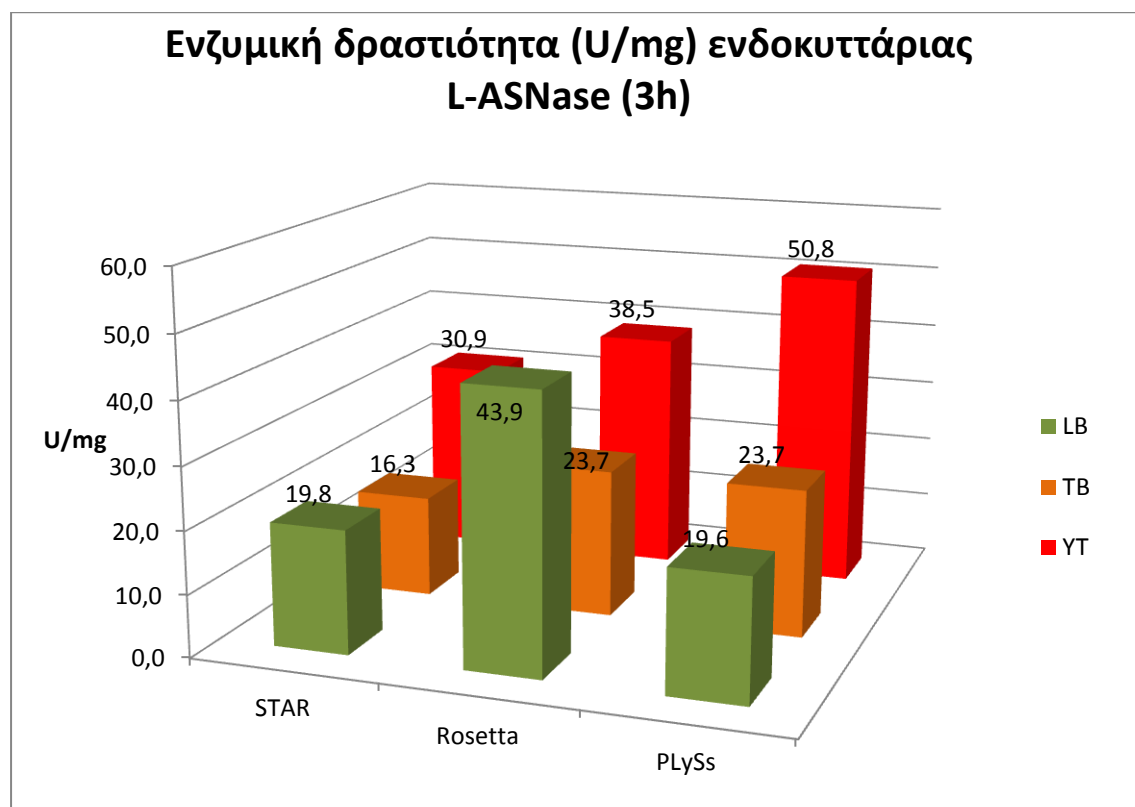


**Εικόνα 4.1.** Παρουσιάζεται η μεταβολή της ειδικής δραστηριότητας (U/mg) εξωκυττάριας L-ASNase των διαφορετικών στελεχών της *E. coli* (STAR,Rosetta,PLySs),σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, (LB,TB,YT) 3h μετά από προσθήκη IPTG



**Εικόνα 4.2.** Παρουσιάζεται η μεταβολή της ειδικής δραστηριότητας (U/mg) εξωκυττάριας L-ASNase των διαφορετικών στελεχών της *E. coli* (STAR,Rosetta,PLySs),σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, (LB,TB,YT) 6h μετά από προσθήκη IPTG

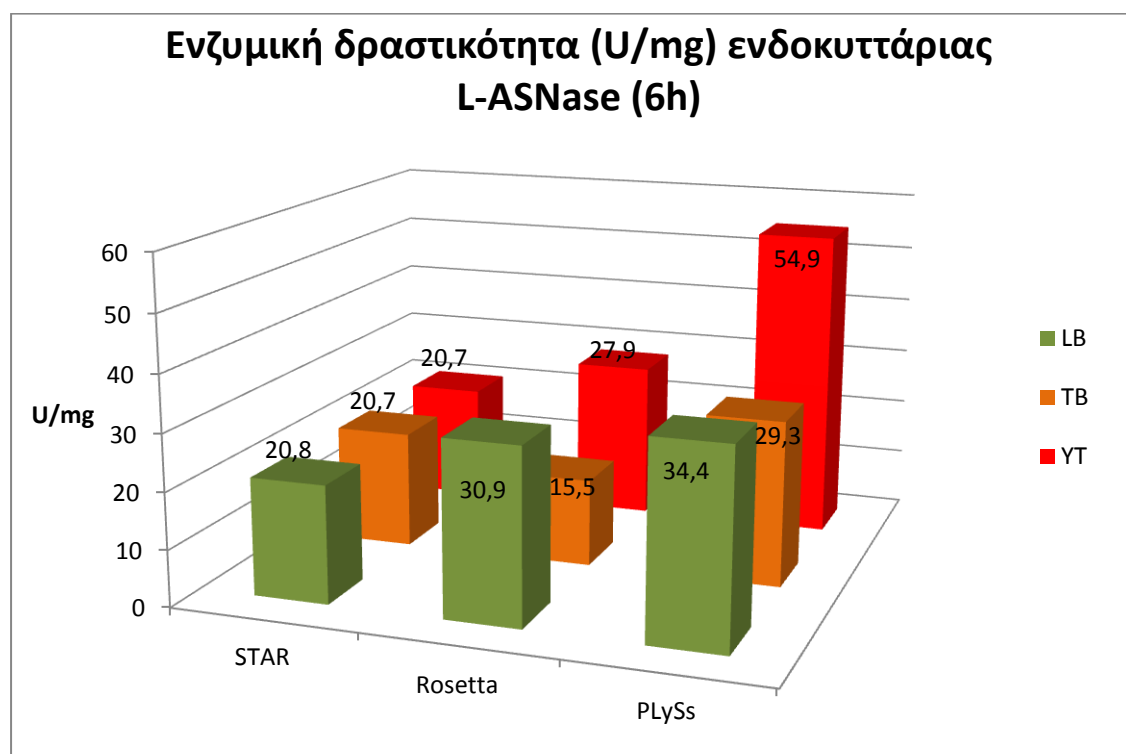
Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 4.3 & 4.4) παρουσιάζεται η μεταβολή της ειδικής δραστηριότητας (U/mg) ενδοκυττάριας L-ASNase των διαφορετικών στελεχών της *E.coli* ,σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα ,στα χρονικά διαστήματα 3 και 6 h μετά την προσθήκη του IPTG.



**Εικόνα 4.3.** Παρουσιάζεται η μεταβολή της ειδικής δραστηριότητας (U/mg) ενδοκυττάριας L-ASNase των διαφορετικών στελεχών της *E.coli* (STAR,Rosetta,PLysS),σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, (LB,TB,YT) 3h μετά από προσθήκη IPTG

Από τα διαγράμματα συμπεραίνουμε πως το στέλεχος PLYSs, εκφράζει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη, όσον αφορά στην εξωκυτταρική έκφραση. Φαίνεται αυτό να συμβαίνει σε όλα τα θρεπτικά μέσα μετά από 6 ώρες από την προσθήκη του IPTG. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο μετά από 3 ώρες από τη προσθήκη του IPTG όπου φαίνεται να εμφανίζουν υψηλή ειδική δραστηριότητα τα στελέχη STAR και Rosetta, ειδικά στο TB. Συμπεραίνουμε ότι το στέλεχος PLYSs, εκφράζει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη, και όσον αφορά στην ενδοκυτταρική έκφραση τόσο στο χρονικό διάστημα των 3 ωρών όσο και των 6 ωρών μετά τη προσθήκη του IPTG. Φαίνεται ότι το στέλεχος αυτό διατηρεί τα υψηλά επίπεδα ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου και στα 3 θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν, με μοναδική εξαίρεση την υψηλότερη ειδική

δραστικότητα του ενζύμου του στελέχους Rosetta σε LB, 3 ώρες μετά την προσθήκη του IPTG.



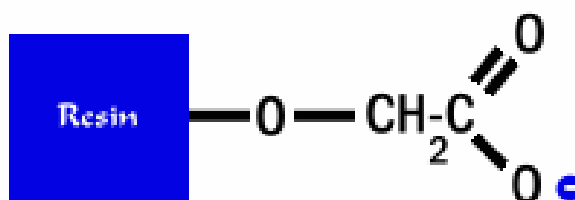
**Εικόνα 4.4.** Παρουσιάζεται η μεταβολή της ειδικής δραστικότητας (U/mg) ενδοκυττάριας L-ASNase των διαφορετικών στελεχών της *E. coli* (STAR,Rosetta,PLYsS),σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, (LB,TB,YT) 6h μετά από προσθήκη IPTG

Καταλήγουμε λοιπόν ότι το καταλληλότερο στέλεχος για την έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάση είναι το PLYsS, το καταλληλότερο θρεπτικό υλικό είναι το YT και ο καταλληλότερος χρόνος έκφρασης είναι οι 6 ώρες μετά από τη προσθήκη του IPTG.

#### 4.2 Ανάπτυξη βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού της L-ασπαραγινάσης

Έγινε καθαρισμός του ενζύμου, με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Αυτού του είδους η χρωματογραφία, χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για τον καθαρισμό του ενδοκυττάρια ενζύμου (Kotzia and Labrou, 2007). Ο αρχικός προσροφητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *CM-Sepharose*, ο οποίος διαθέτει αρνητικά φορτισμένες ομάδες και αποτελεί έναν ασθενή κατιοντοανταλλάκτη, (Εικόνα). Πραγματοποιήθηκαν 2 πρωτόκολλα καθαρισμού με

διαφορετικές συνθήκες φόρτωσης του δείγματος. Έτσι έγινε διερεύνηση της επίδρασης της ιοντικής ισχύος. Επιλέχθηκαν δυο τιμές ιοντικής ισχύος, οι συνθήκες των οποίων διαμορφώθηκαν με τη προσθήκη NaCl. Οι αποδόσεις των καθαρισμών αναφέρονται στην Εικόνα 4.5.



### CM-cation exchanger

Προσροφητής CM-Sepharose ο οποίος διαθέτει αρνητικά φορτισμένες ομάδες και αποτελεί έναν ασθενή κατιοντοανταλλάκτη.

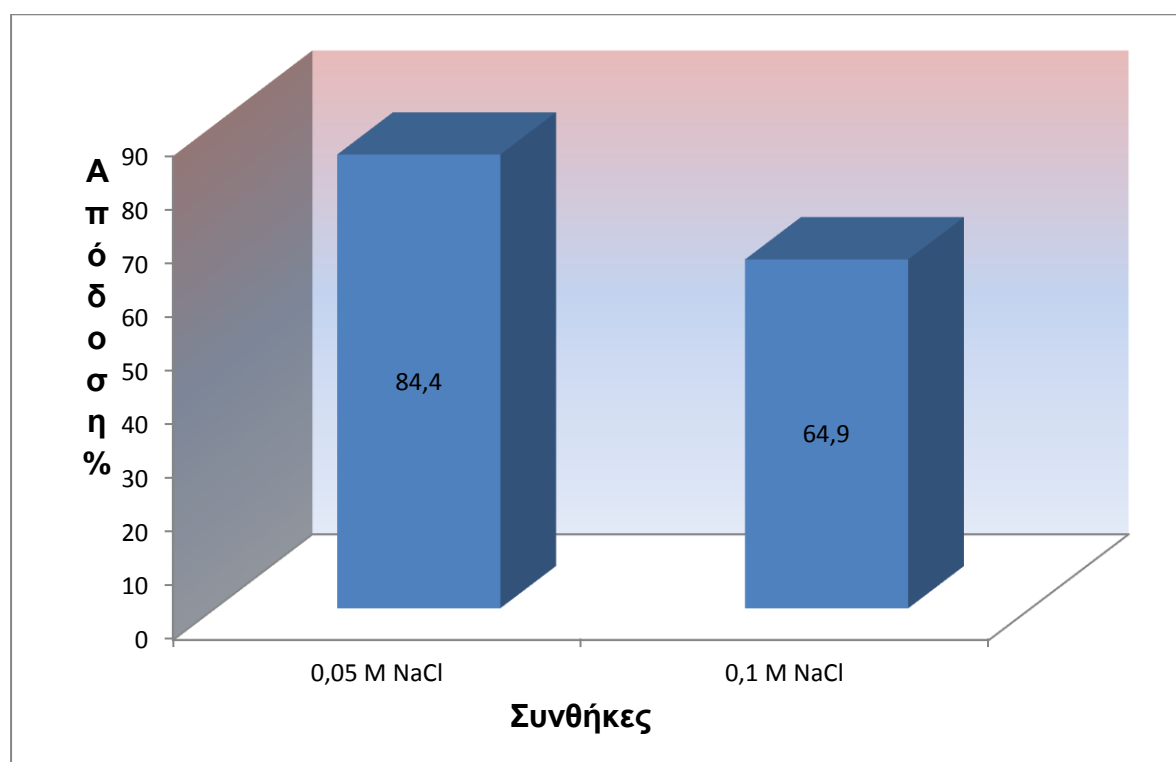
Αναφέρεται ότι ως απόδοση ορίζεται το πηλίκο των ενζυμικών μονάδων, οι οποίες προσδιορίζονται στις εκλούσεις, προς τις μονάδες που κρατήθηκαν στον προσροφητή μετά τη φόρτωση του δείγματος.

Πρωτόκολλο 1.

1.5 ml περίπου προσροφητή CM –Sepharose εξισοροπήθηκαν με 20 mM Pi, pH 8. Στη συνέχεια στη στήλη φορτώθηκαν περίπου 1 ml εκχυλίσματος. Εν συνεχεία η στήλη πλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi, pH 8 (12 ml). Τελικά το προσροφημένο ένζυμο εκλούστηκε , χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό με 20 mM Pi το οποίο περιέχει και **0,05 M NaCl**, pH 8. Η στήλη αναγεννήθηκε με 20 mM Pi που περιέχει 2 M NaCl, pH8 και στη συνέχεια με CH<sub>3</sub>COONa 0,1M που να περιέχει 1 M NaCl pH5.

## Πρωτόκολλο 2.

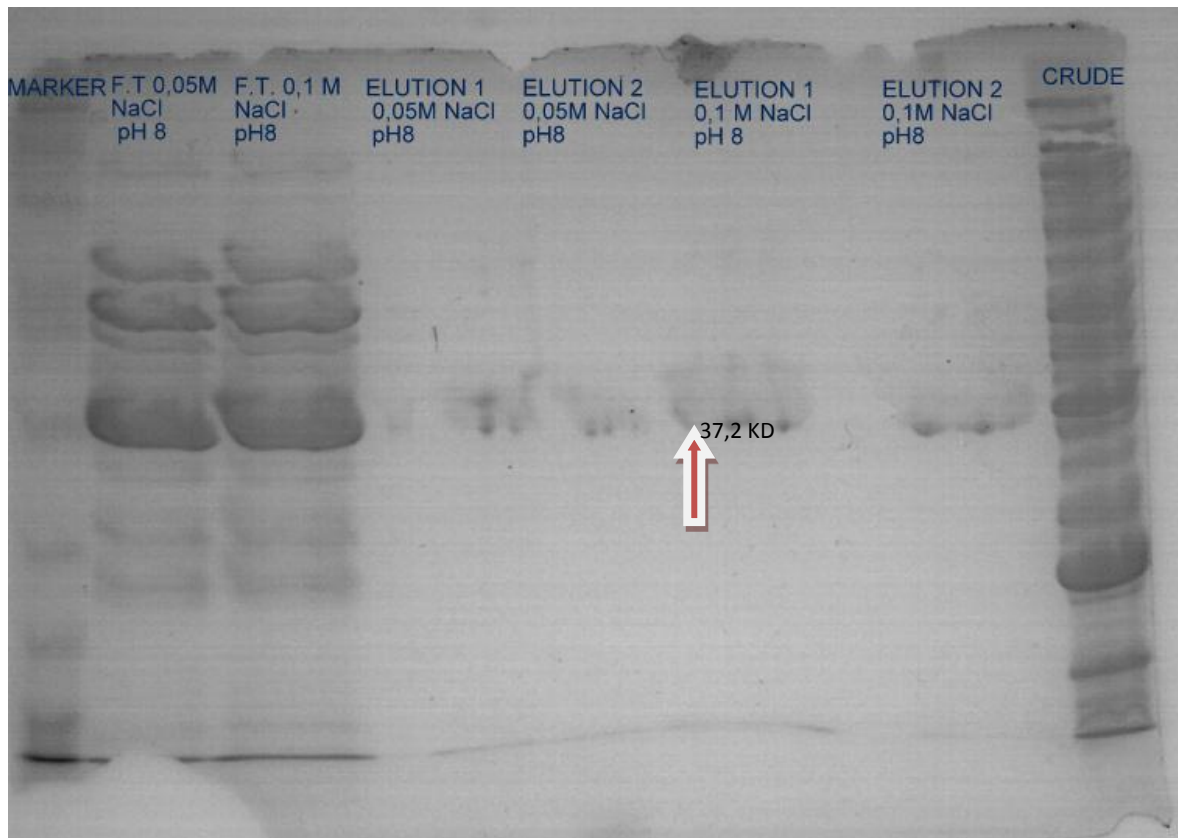
1.5 ml περίπου προσροφητή CM-Sepharose εξισορροπήθηκαν με 20 mM Pi, pH 8. Στη συνέχεια στη στήλη φορτώθηκαν περίπου 1 ml εκχυλίσματος. Εν συνεχεία η στήλη πλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi, pH 8 (12 ml). Τελικά το προσροφημένο ένζυμο εκλούστηκε, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό με 20 mM Pi το οποίο περιέχει και **0,1 M NaCl**, pH 8. Η στήλη αναγεννήθηκε με 20 mM Pi που περιέχει 2 M NaCl, pH8 και στη συνέχεια με CH<sub>3</sub>COONa 0,1M που να περιέχει 1 M NaCl pH5.



**Εικόνα 4.5.** Οι αποδόσεις των δυο διαφορετικών καθαρισμών, οι οποίοι προέκυψαν μετά από τη διαμόρφωση διαφορετικών συνθηκών φόρτωσης του εκχυλίσματος στον προσροφητή. Οι συνθήκες αυτές αφορούν δύο διαφορετικές συνθήκες ιοντικής ισχύος, 0.05 M NaCl και 0.1 M NaCl, στις οποίες το pH ρυθμίστηκε στο 8.

Από την Εικόνα 4.5 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η συνθήκη στην οποία προέκυψε η υψηλότερη απόδοση καθαρισμού, είναι η περίπτωση χρήσης 0.05 M NaCl, pH 8.

Στη συνέχεια (Εικόνα 4.6), παρουσιάζονται τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα των παραπάνω καθαρισμών, τα οποία αποκαλύπτουν τη καθαρότητα της εκλουόμενης πρωτεΐνης.



**Εικόνα 4.6.** Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των συνθηκών 0.05 M NaCl, 0.1 M NaCl, pH 8. Από αριστερά προς τα δεξιά, παρατηρούμε τον μάρτυρα (marker), το μη προσροφημένο κλάσμα (flow through) και στις δυο συνθήκες, εκλούσεις (elutions) της συνθήκης 0.05 M NaCl, εκλούσεις (elutions) της συνθήκης 0.1 M NaCl και τέλος το crude του εκχυλίσματος.

Από την παραπάνω εικόνα μπορούμε να δούμε την καθαρότητα των εκλούσεων στη περίπτωση των συνθηκών 0.05 M NaCl και 0.1 M NaCl, στις οποίες το pH ρυθμίστηκε στο 8. Η καθαρότητα είναι η επιθυμητή και στις δυο συνθήκες. Άρα μπορούμε να συμπεράνουμε από το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα ότι οι τιμές της ιοντικής ισχύος 0,05M και 0,1 M είναι ικανοποιητικές όσον αφορά στη καθαρότητα της L-ασπαραγινάσης.

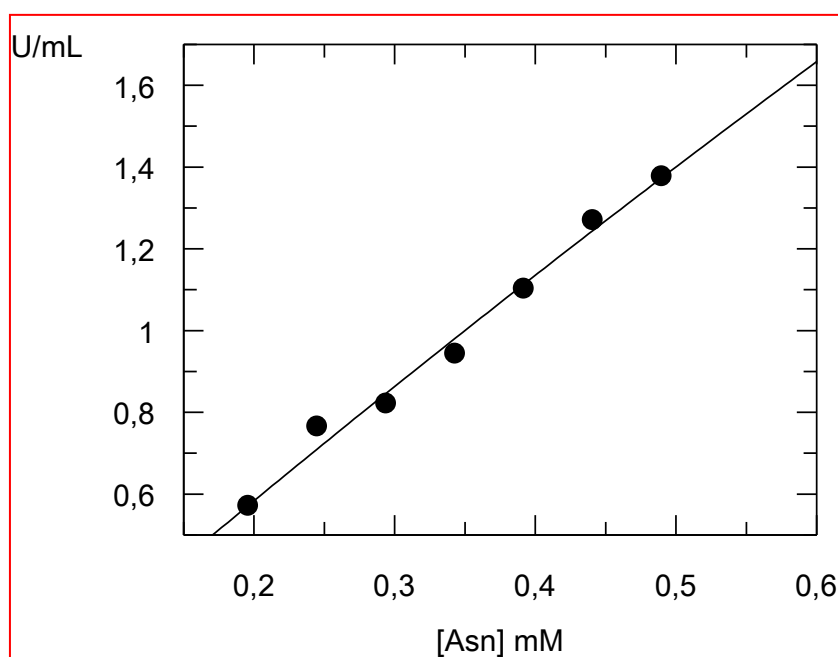
### 4.3 Κινητική ανάλυση

Κινητική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 0.05 M, pH 8,6 μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των υποστρωμάτων L-Asn και L-Gln. Η ενζυμική δραστηριότητα της L-Asnase έναντι αυτών των υποστρωμάτων υπολογίστηκε με βάση τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς, όπως περιγράφονται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του προγράμματος Grafit

4. Οι κινητικές σταθερές  $K_m$ , υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Grafit, (Εικόνα 4.7 & 4.8)

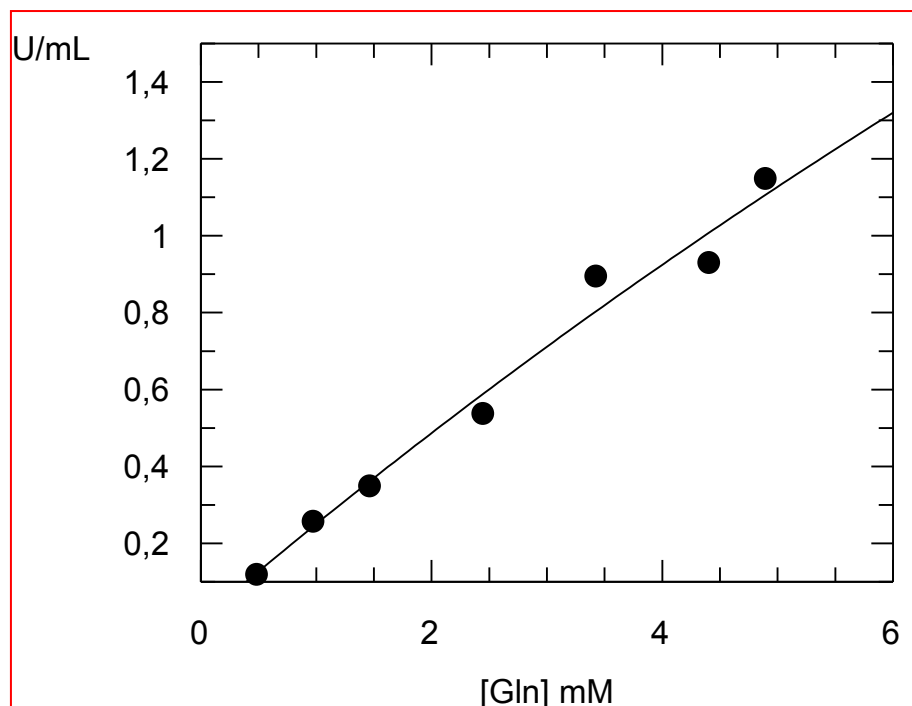
Από τη μελέτη της κινητικής μια ενζυμικής αντίδρασης αντλούνται σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό της αντίδρασης, τη σειρά με την οποία τα υποστρώματα ενώνονται ή απομακρύνονται από το ένζυμο και τη χημική φύση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Επιπλέον υπολογίζονται βασικές κινητικές σταθερές και από αυτές εκτιμάται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση διαφόρων μεταβολιτών, η φυσιολογική φορά κάθε αντίδρασης καθώς και οι *in vitro* ρυθμιστές των ενζυμικών αντιδράσεων.

Οι κινητικές σταθερές της L-ASNase από *E. coli* υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα Grafit. Η τιμή της  $K_m$  για το υπόστρωμα L-Asn είναι  $K_m = 0.05 \text{ mM}$  ενώ η τιμή της  $K_m$  για το υπόστρωμα L-Gln είναι  $K_m = 35.7 \text{ mM}$



**Εικόνα 4.7.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντιδράσεως της L-ASNase, χρησιμοποιώντας σαν μεταβαλλόμενο υπόστρωμα την L-Asn.



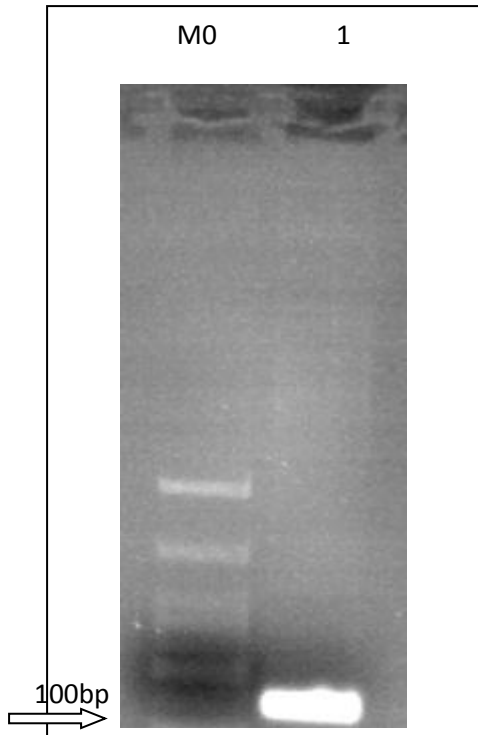


**Εικόνα 4.8.** Εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντιδράσεως της L-ASNase, χρησιμοποιώντας σαν μεταβαλλόμενο υπόστρωμα την L-Gln.

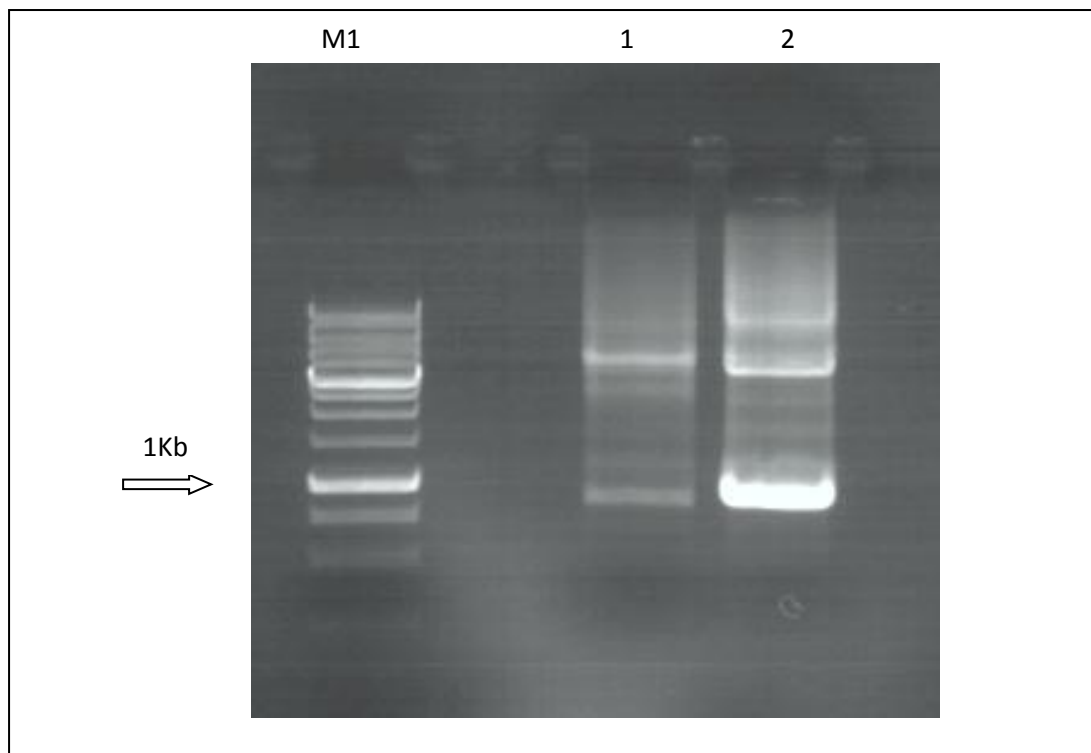
Το ένζυμο παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με την ασπαραγίνη ( $K_m=0.05$  mM) συγκριτικά με τη γλουταμίνη ( $K_m=37,5$  mM).

#### 4.4 Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση κορεσμού της L-ασπαραγινάσης και κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση της EcaL-Asnase με σκοπό να μεταλλαχθεί η Asn24, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επικαλυπτόμενης επιμήκυνσης (overlap extension) χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR. Αρχικά με τις δυο πρώτες PCR τμήματα του γονιδίου εκατέρωθεν της θέσης μεταλλαξογένεσης, που όμως περιείχαν και την μετάλλαξη το ένα στο 3' άκρο και το άλλο στο 5' άκρο. Τα προϊόντα αυτών των PCR αναλύθηκαν σε πηκτική αγαρόζη, όπου και επιβεβαιώθηκε ότι είχαν μέγεθος περίπου 900bp (Εικόνα 4.9) και 100bp (Εικόνα 4.10) αντίστοιχα.



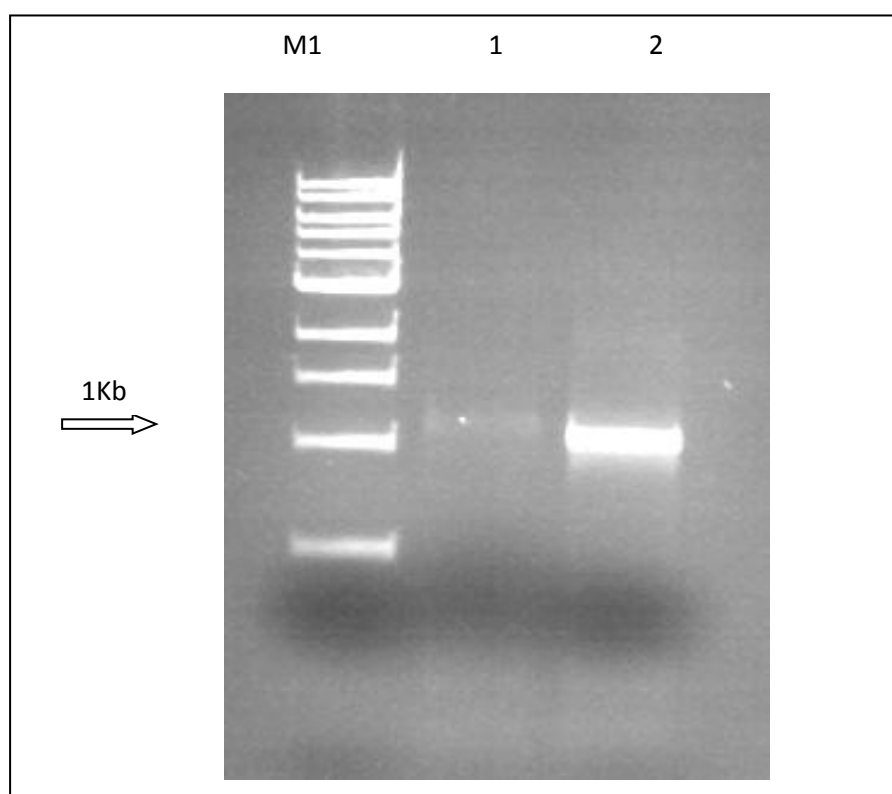
**Εικόνα 4.9.** Προϊόν 1<sup>ης</sup> PCR, 100bp. Αριστερά φαίνεται ο low molecular Ladder (M0), ενώ δεξιά(1) φαίνεται το προϊόν της αντίδρασης.



**Εικόνα 4.10.** Προϊόν 2<sup>ης</sup> PCR. Αριστερά φαίνεται ο 1Kb DNA ladder(M1). Δεξιά (2) φαίνεται το προϊόν της δεύτερης PCR, το οποίο υπολογίζεται στα 900bp. Στη θέση (1) θα έπρεπε να παίρνουμε το προϊόν της 1<sup>ης</sup> PCR, περίπου 100bp, κάτι που δεν συμβαίνει.

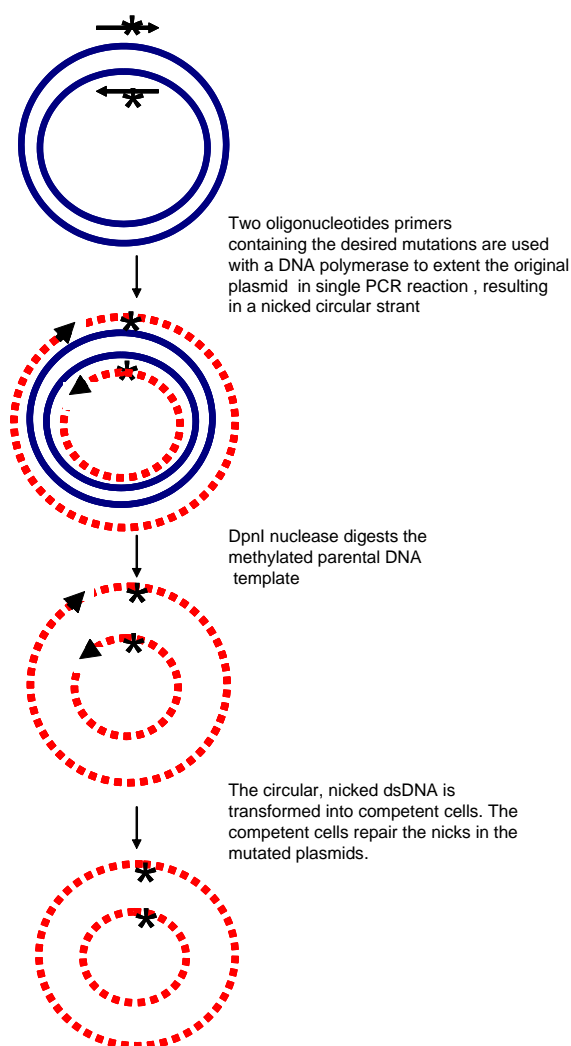
Στη συνέχεια αφού επωάστηκαν τα δείγματα με DpnI στους 37 °C και ακολούθως στους 80°C για 20 min, προκειμένου να σταματήσει η δράσης της DpnI, πραγματοποιήθηκε η τελική PCR. Βασικό στάδιο ήταν η πραγματοποίηση της τελικής, δηλαδή της τρίτης PCR (Εικόνα 4.11) που σαν προϊόν θα έδινε το πλήρους μήκους μεταλλαγμένο γονίδιο περίπου 1000 bp.

Το προϊόν της PCR αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για το πλήρους μήκους μεταλλαγμένο γονίδιο και ακολούθως κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα PCR<sup>®</sup>T7/CT-TOPO<sup>®</sup>. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* XL-Blue. Η κλωνοποίηση και ο μετασχηματισμός έγιναν με τη τεχνολογία του TOPO-Cloning (Invitrogen), όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η ύπαρξη των επιθυμητών μεταλλάξεων πιστοποιήθηκε με DNA αλληλούχηση που πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CEMIA.



**Εικόνα 4.11.** Προϊόν 3<sup>ης</sup> PCR περίπου 1000bp. Αριστερά ο 1Kb Ladder (M1). Για να μελετηθεί ποια πολυμεράση δίνει ικανοποιητικό σήμα του προϊόντος, χρησιμοποιήθηκε η HiFi πολυμεράση (1), που δίνει αχνό σήμα όπως φαίνεται και από την άλλη (2) χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση, η οποία δίνει έντονο σήμα του προϊόντος.

Στο σημείο αυτό να αναφέρουμε ότι δοκιμάστηκε και μια ακόμη μέθοδος μεταλλαξογένεσης σε ένα στάδιο, στην οποία ενισχύεται ολόκληρο το πλασμίδιο (Εικόνα 4.12). Δηλαδή, οι δυο μεταλλαξογόνοι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί στις αντίθετες αλυσίδες από το δίκλωνο πλασμιδιακό DNA. Οι εκκινητές αυτοί περιέχουν τυχαία νουκλεοτίδια NNN ώστε να μπορούν να δώσουν οποιοδήποτε από τα 20 αμινοξέα. Στο προϊόν της PCR εκτός από το μητρικό πλασμίδιο, έχουμε και τα μεταλλαγμένα πλασμίδια (δηλαδή εκείνα τα οποία περιέχουν γονίδια όπου ένα αμινοξύ έχει αντικατασταθεί από τα υπόλοιπα 19 αμινοξέα).

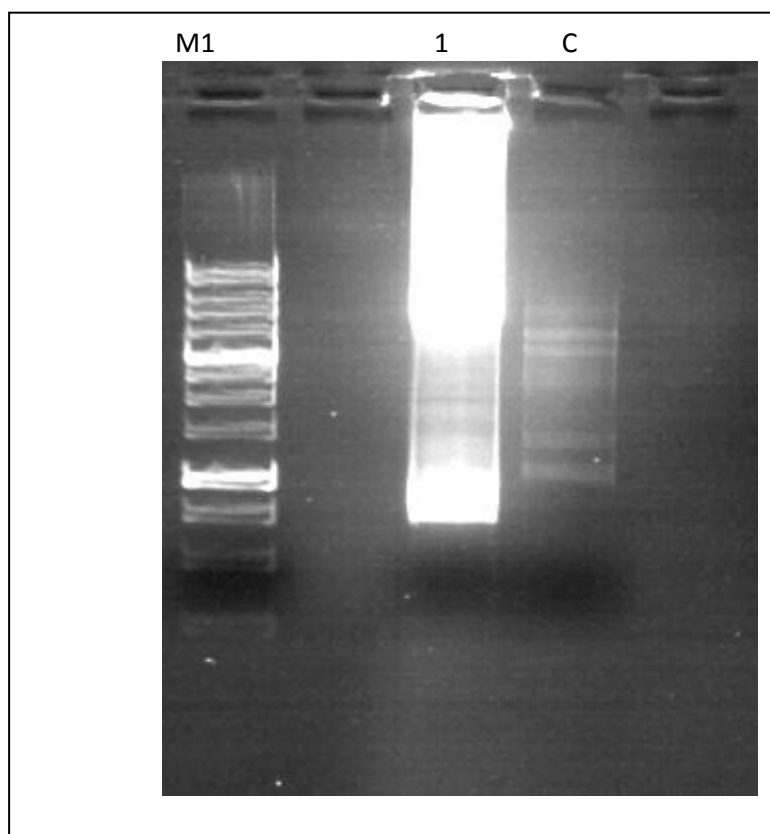


**Εικόνα 4.12.** Μεταλλαξογένεση κορεσμού σε ολόκληρο το πλασμίδιο. Με (\*) σημειώνονται οι μεταλλάξεις.

Το άγριου τύπου πλασμίδιο επιλεκτικά αποικοδομείται χρησιμοποιώντας DpnI ενδονουκλεάση. Η DpnI αναγνωρίζει την αλληλουχία GmATC και δημιουργεί θράυσεις μεταξύ του A και T έτσι ώστε να δημιουργήσει θραύσματα με ομαλοποιημένα άκρα. Η DpnI απαιτεί μεθυλιωμένα κατάλοιπα αδενίνης για δραστικότητα και έτσι μόνον κόβει G<sup>m</sup>ATC

αλληλουχίες που περιέχουν N<sup>6</sup>-μεθυλαδενίνη. Σε αντίθεση με το μητρικό πλασμίδιο, τα πρόσφατα συντεθημένα μεταλλαγμένα γονίδια δεν περιέχουν μεθυλιωμένο DNA και κατά συνέπεια, δεν υδρολύονται. Το συνθετικό πλασμίδιο στη συνέχεια μετασχηματίζεται απευθείας σε κύτταρα *E. coli* και το «γυμνό» DNA επισκευάζεται *in vivo* με τον μηχανισμό του κυττάρου για να δώσει ένα μεταλλαγμένο, κυκλικό πλασμίδιο.

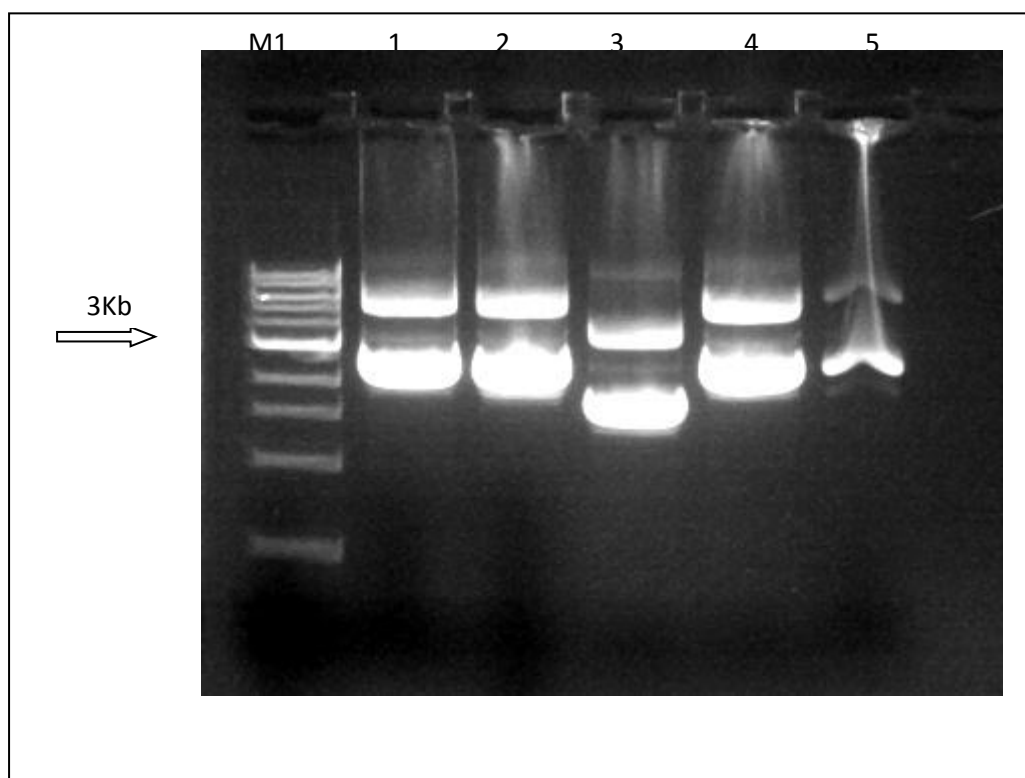
Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR φαίνονται στο παρακάτω gel ηλεκτροφόρησης DNA (Εικόνα 4.13). Η μέθοδος αυτή όμως εγκαταλείφθηκε γιατί δεν αναπτύχθηκαν αποικίες βακτηριακών κυττάρων στα τριβλία και μετά από αρκετές δοκιμές, ώστε να γίνει περαιτέρω μελέτη των μεταλλαγμένων μορφών. Το πρόβλημα εντοπίζεται στην μη εκλεκτική υβριδοποίηση των εκκινητών στο γονίδιο που θέλουμε να ενισχύσουμε.



**Εικόνα 4.13.** Προϊόν Single Round PCR αντίδρασης. (M1) είναι ο 1Kb DNA Ladder, (1) προϊόν της αντίδρασης PCR.(C) Μάρτυρας, χρησιμοποιείται δείγμα πλασμιδιακού DNA απουσία μεταλλαξογόνων εκκινητών.

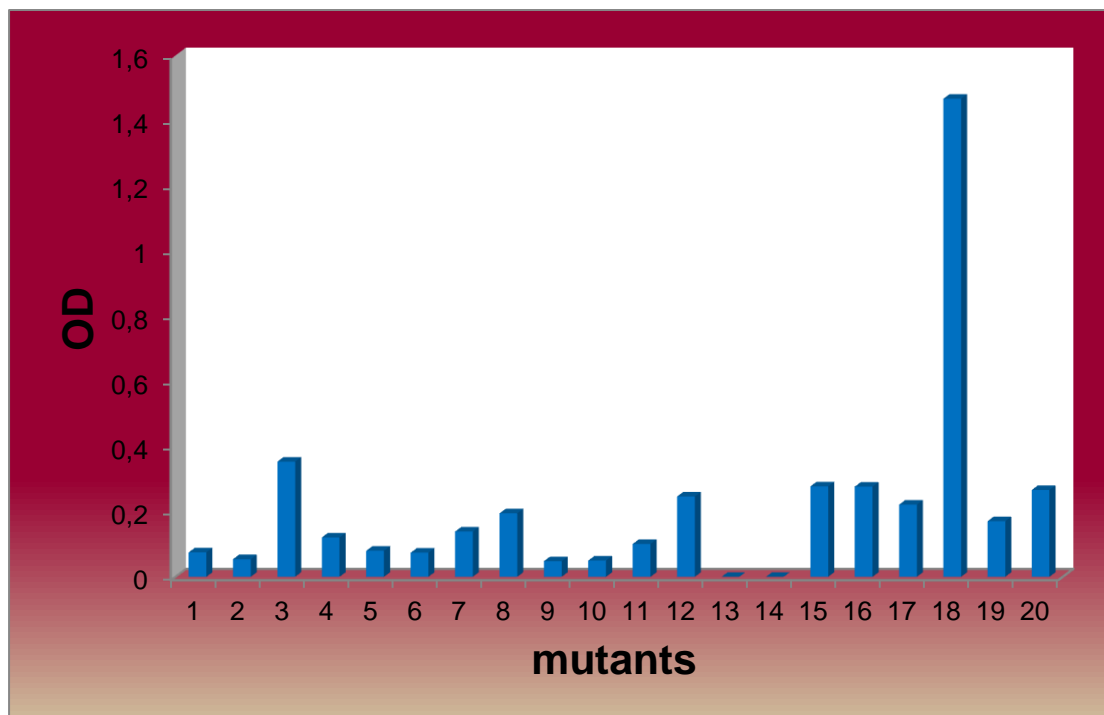
#### 4.5 Έλεγχος των θετικών κλώνων για ύπαρξη του μεταλλαγμένου γονιδίου στον φορέα pCR®T7/CT-TOPO®

Από τη βιβλιοθήκη των μεταλλαγμένων μορφών που προέκυψε επιλέχθηκαν τυχαία 20 δείγματα τα οποία ελέγχθηκαν για την ύπαρξη του μεταλλαγμένου γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα, (Εικόνα 4.14).



**Εικόνα 4.14.** Έλεγχος για την ύπαρξη του μεταλλαγμένου γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα σε 5 τυχαία δείγματα της βιβλιοθήκης που προέκυψε. (M1) είναι ο 1Kb DNA Ladder, ενώ τα δείγματα ακολουθούν (1,2,3,4,5). Η ίδια διαδικασία έγινε για 20 τυχαία δείγματα.

Στη συνέχεια οι αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν τα πλασμίδια αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία αμπικιλίνης (100μg/ml). Ακολούθησε η διαδικασία επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων με 1mM IPTG. Μετά το πέρας της έκφρασης τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε η λύση τους με επίδραση υπερήχων. Ακολούθως έγινε δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας για τα ένζυμα χρησιμοποιώντας το φωτομετρικό προσδιορισμό της L-ασπαραγινάσης, (Εικόνα 4.15). Επίσης μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.



**Εικόνα 4.15.** Έλεγχος δραστηριότητας 20 τυχαίων δειγμάτων από τη βιβλιοθήκη που προέκυψε μετά το TOPO-Cloning.

#### 4.6 Αλληλούχιση των μεταλλαγμένων γονιδίων

Η ύπαρξη των επιθυμητών μεταλλάξεων πιστοποιήθηκε με DNA αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία CEMIA. Για το σκοπό αυτό αρχικά απομονώθηκαν τα πλασμίδια στα οποία ήταν κλωνοποιημένα τα γονίδια με τη βοήθεια του QIAquick™ Mini Prep Kit. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε για το κάθε δείγμα αλληλούχιση και των δύο κλώνων, χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν για τη μετάφραση των γονιδίων μέσω του προγράμματος Translate (<http://www.us.expasy.org/tools/dna.html>) και την ταυτοποίηση των σωστών αναγνωστικών πλαισίων.

Στον Πίνακα 4.2. φαίνονται οι αμινοξικές αλληλουχίες των μεταλλαγμένων γονιδίων σε σχέση με την αμινοξική αλληλουχία του άγριου τύπου του γονιδίου. Η θέση μετάλλαξης σημειώνεται με κόκκινο χρώμα. Από την αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε επιλέχτηκαν οι κλώνοι 1, 12 και 15. Οι μεταλλάξεις αντίστοιχα ήταν:

**Asn24Leu, Asn24Arg, Asn24Ser**

Πίνακας 4.2. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των μεταλλαγμένων γονιδίων της L-Asnase σε σχέση με την αμινοξική αλληλουχία του άγριου τύπου του γονιδίου. Η θέση μετάλλαξης σημειώνεται με κόκκινο χρώμα.

#### Wild Type

MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATK  
S **N**YTVGKVGVENLVNAV PQLKDIANVKGEQV V NIGSQDMNDDV  
WLT LAKKINTDCDKTDG FVITHGTD TMEETAYFLDLTVKCDKPV  
VMVGAMRPSTSMSADGPFNL YNAV VTAADKASANRGV LVVMN  
DTVLDGRDVTKTNTT DVATFKSVNYG PLGYIHNGKIDYQRTPAR  
KHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGI  
VSAGVGN GN LYKSVFDTLATAAKTGTAVV RSSRVPTGAT TQD  
AEVDDAKYGFV ASGTLN P Q K

1

MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATK  
S **L**YTVGKVGVENLVNAV PQLKDIANVKGEQV V NIGSQDMNDDV  
WLT LAKKINTDCDKTDG FVITHGTD TMEETAYFLDLTVKCDKPV  
VMVGAMRPSTSMSADGPFNL YNAV VTAADKASANRGV LVVMN  
DTVLDGRDVTKTNTT DVATFKSVNYG PLGYIHNGKIDYQRTPAR  
KHTSDTPFDVSKLNELPKVXIVYNYANASDLPAKXXVDAGYDGI  
VSAGVGN GNLYKT VFDTLATAAKNGTAVV RSSRVPTGATTQDA  
EVDDAKYGFV ASGTLNPQK

12

MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATK  
S **R**YTVGKVGVENLVNAV PQLKDIANVKGEQV V NIGSQDMNDDV  
WLT LAKKINTDCDKTDG FVITHGTD TMEETAYFLDLTVKCDKPV  
VMVGAMRPSTSMSADGPFNL YNAV VTAADKASANRGV LVVMN  
DTVLDGRDVTKTNTT DVATFKSVNYG PLGYIHNGKIDYQRTPAR  
KHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGI  
VSAGVGN GNLYKT VFDTLATAAKTALQ

15

MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATK  
S **S**YTVGKVGVENLVNAV PQLKDIANVKGEQV V NIGSQD MNDDV  
WLT LAKKINTDCDKTDG FVITHGTD TMEETAYFLDLTVKCDKPV  
VMVGAMRPSTSMSADGPFNL YNAV VTAADKASANRGV LVVMN  
DTVLDGRDVTKTNTT DVATFKSVNYG PLGYIHNGKIDYQRTPAR  
KHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGIV  
SAGVV TATCIKP YLTP LQPLRKRHCS SAFFPRTDGRYH



Για να αποδειχθεί ότι πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη έγινε αντιστοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών με το πρόγραμμα ClustalW, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3. Ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών του άγριου τύπου και των 3 μεταλλαγμένων κλώνων της L-ASNase. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι σημειακές μεταλλάξεις.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVENLVNA 60W.T
MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSLYTVGKVGVENLVNA 60Mutant1
MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSRYTVGKVGVENLVNA 60mutant12
MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSSYTVGKVGVENLVNA 60mutant15

VPQLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDDVWLTAKKINTDCDKTDGFVITHGTDMEETAYF 120W.T
VPQLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDDVWLTAKKINTDCDKTDGFVITHGTDMEETAYF 120Mutan1
VPQLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDDVWLTAKKINTDCDKTDGFVITHGTDMEETAYF 120mutant12
VPQLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDDVWLTAKKINTDCDKTDGFVITHGTDMEETAYF 120mutant15

LDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGR 180W.T
LDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGR 180mutant1
LDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGR180mutant12
LDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDTVLDGR180mutant15

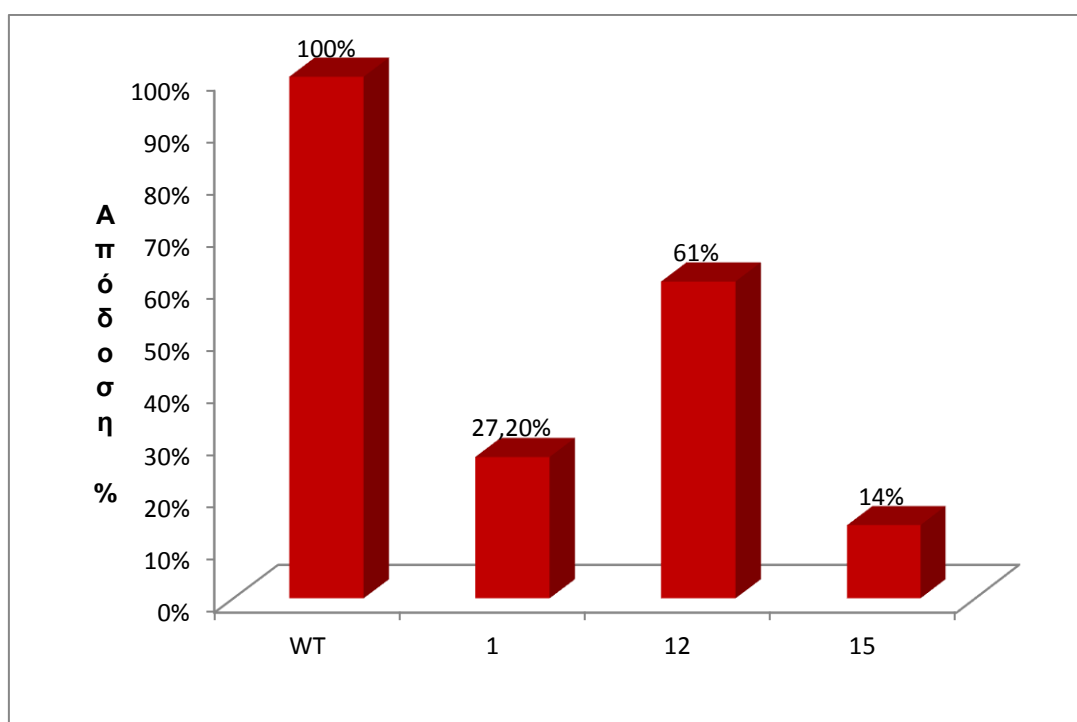
DVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVY 240W.T
DVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVY 240Mutant1
DVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVY 240mutant12
DVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVY 240mutant15

NYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSSRVPTGAT 300W.T
NYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSSRVPTGAT 300Mutant1
NYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGNLYKTVFDTLATAAKTALQ----- 288mutant12
NYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVVTATCIKPYLTPLQPLRKRHCSSAFFPRT---- 295mutant15
```

#### 4.7 Έκφραση και καθαρισμός των μεταλλαγμένων μορφών της L-ασπαραγινάσης

Οι αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων που φέρουν τα πλασμίδια αναπτύχθηκαν παρουσία αμπικιλίνης (100μg/ml). Ακολούθησε η διαδικασία επαγωγής της έκφρασης των γονιδίων με 1mM IPTG. Μετά το πέρας της έκφρασης τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε η λύση τους με επίδραση υπερήχων. Ακολούθως έγινε δοκιμή ενζυμικής

δραστικότητας για τα ένζυμα χρησιμοποιώντας το φωτομετρικό προσδιορισμό της L-ασπαραγινάσης. Επίσης μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford. Από τα αποτελέσματα αυτά προσδιορίστηκε η ειδική δραστικότητα των μεταλλαγμένων μορφών **Asn24Leu**, **Asn24Arg**, **Asn24Ser** είναι 2,5, 23,52 και 13,3 U/mg αντίστοιχα, σε σχέση με το control που υπολογίστηκε σε 17,08 U/mg πρωτεΐνης. Υπολογίστηκαν επίσης οι αποδόσεις των καθαρισμένων μεταλλαγμένων μορφών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 4.16).



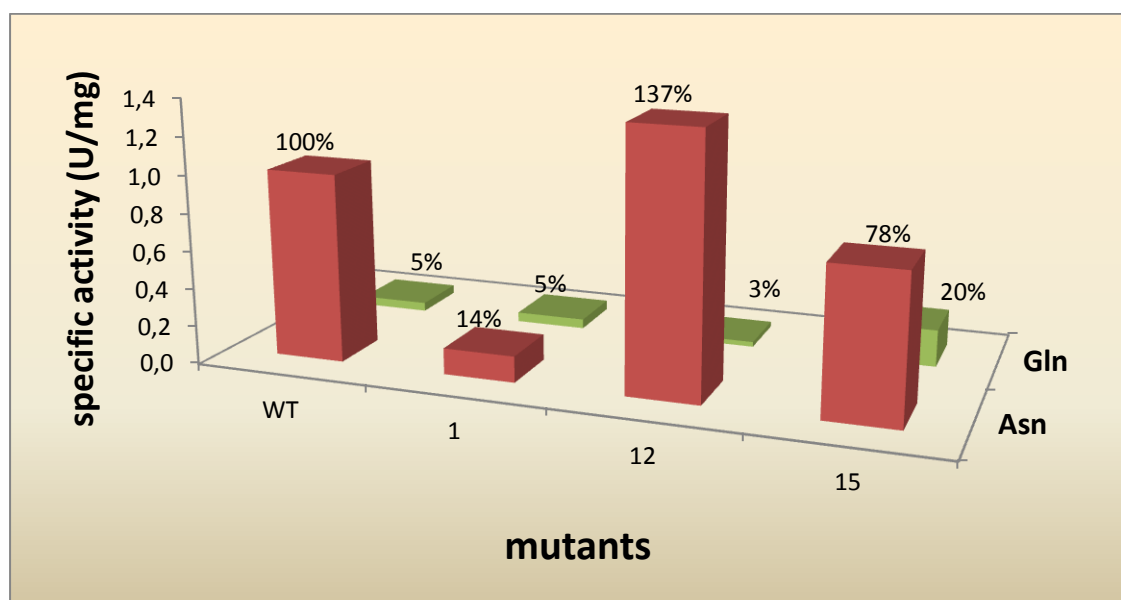
**Εικόνα 4.16.** Οι αποδόσεις καθαρισμού των μεταλλαγμένων μορφών Asn24Leu(1), Asn24Arg(12) , Asn24Ser(15), σε σχέση με τον άγριο τύπο.

Ο καθαρισμός των μεταλλαγμένων μορφών πραγματοποιήθηκε στον CM-Sepharose όπως έχει ήδη περιγραφεί στις Μεθόδους. Τα κλάσματα των 4 καθαρισμών συλλέχθηκαν και έγινε έλεγχος της ενζυμικής δραστικότητας και προσδιορισμός της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η ασπαραγίνη αλλά και η γλουταμίνη ώστε να μελετηθεί η δράση του ενζύμου τόσο ως ασπαραγινάση, όσο και ως γλουταμινάση. Αυτό έγινε και για τον άγριο τύπο αλλά και για τις μεταλλαγμένες μορφές, (Εικόνα 4.17).

Τα αποτελέσματα για τον άγριο τύπο είναι τα αναμενόμενα, δηλαδή το ένζυμο παρουσιάζει υψηλή δράση ασπαραγινάσης αλλά ταυτόχρονα χαμηλή δράση γλουταμινάσης. Αυτό αποδείχθηκε και από την κινητική ανάλυση του ενζύμου και τον

υπολογισμό της κινητικής σταθεράς  $K_m$ . Από την αντίστοιχη μελέτη των μεταλλαγμένων μορφών, παρατηρούμε πως η μεταλλαγή της Asn24 σε Leu, φαίνεται να ελαχιστοποιεί τη δράση του ενζύμου τόσο ως ασπαραγινάση όσο και ως γλουταμινάση.

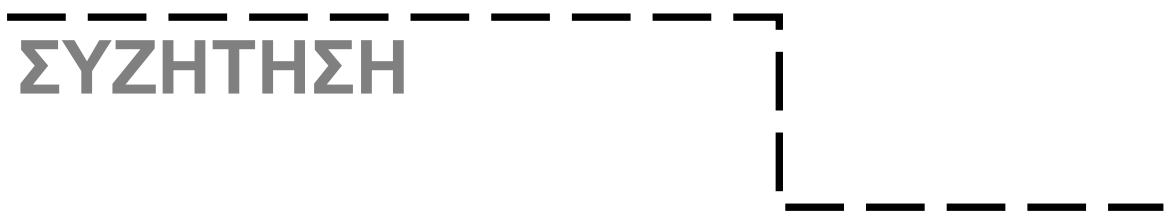
Από την άλλη η μεταλλαγή από Asn24 σε Arg, ελαχιστοποιεί τη δράση του ενζύμου ως γλουταμινάση, είναι βέβαια υψηλότερη από του άγριου τύπου ενώ ταυτόχρονα ενισχύει τη δράση του ως ασπαραγινάση, μάλιστα σε υψηλότερα επίπεδα από εκείνα του άγριου τύπου. Ακόμα η μεταλλαγή από Asn24 σε Ser φαίνεται να μειώνει τη δράση του ενζύμου ως ασπαραγινάση σημαντικά, ενώ ως γλουταμινάση τα επίπεδα είναι σημαντικά αυξημένα σε σχέση με του άγριου τύπου.



**Εικόνα 4.17.** Απεικόνιση της ειδικής ενεργότητας του ενζύμου L-ασπαραγινάση των μεταλλαγμένων μορφών, Asn24Leu(1),Asn24Arg(12), Asn24Ser(15) σε σχέση με τον άγριο τύπο(WT), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ασπαραγίνη(κόκκινες στήλες) και τη γλουταμίνη (πράσινες στήλες).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ



## 5.1 Συζήτηση- Συμπεράσματα

Η L-ASNase αποτελεί ένα ένζυμο, το οποίο συσπειρώνει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον, όχι μόνο ερευνητικό, αλλά και φαρμακευτικό καθώς χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Bain et al., 2002). Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες ερευνητικές ομάδες προσπαθούν να διερευνήσουν και να μελετήσουν τη δράση του ενζύμου αυτού, να τροποποιήσουν με μεθόδους ενζυμικής μηχανικής (αλλαγή της εξειδίκευσης και της εναντιοεκλεκτικότητας του ενζύμου, τροποποιημένη θερμοσταθερότητα, αυξημένη δραστικότητα κ.α.), τον τρόπο με τον οποίο δρα και να το κάνουν περισσότερο επιλεκτικό και αποδοτικό στη κατάλυση. (Chen et al., 1999, Bornscheuer & Pohl, 2001, Zaks, 2001, Panke & Wubbolts, 2002).

Η προέλευση των L-ASNases, οι οποίες εφαρμόζονται ή βρίσκονται σε κλινικές μελέτες, είναι βακτηριακή και κυρίως από τα γένη *Escherichia coli* (Khushoo et al., 2004; Derst et al., 1994), *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia and Labrou, 2007) και *Erwinia caratovora* (Aghairour et al., 2001). Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, τόσο όσον αφορά τη συγγενειά τους ως προς τα υποστρώματα, αλλά και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Επιπλέον ερευνητικό ενδιαφέρον, έχει προκύψει και για το αντίστοιχο ένζυμο του ανθρώπου (human L-asparaginase), το οποίο μελετάται κυρίως συγκριτικά με τα βακτηριακά ισοένζυμα.

Στη παρούσα πειραματική μελέτη σε πρώτο στάδιο έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου ετερόλογης έκφρασης, χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκφρασης το *E. coli*. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν 3 διαφορετικά στελέχη του *E. coli* και επιλέχθηκε εκείνο, το οποίο παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Παράλληλα, βασική επιδίωξη και στόχος της μελέτης, ήταν ο προσδιορισμός κάποιου στελέχους, το οποίο θα παράγει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εξωκυττάρια στο θρεπτικό υλικό.

Το πεπτιδίο οδηγός, όπως έχει αναφερθεί και στην Εισαγωγή, αποτελεί το σινιάλο εκείνο, το οποίο συμβάλλει στην αναγνώριση της κάθε πρωτεΐνη από τους μηχανισμούς μεταφοράς του κυττάρου, οι οποίοι μετα μεταφραστικά ή συν μεταφραστικά ανάλογα με το σινιάλο που έχουν δεχτεί, προσδένονται στη πρωτεΐνη και την μεταφέρουν στο περίπλασμα (Belin et al., 2004; Khokhlova and Nesmeyanova, 2004). Από το περίπλασμα, υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους δύναται ένα ενζυμικό μόριο να εξέλθει προς το θρεπτικό μέσο. Οι τρόποι αυτοί εξαρτώνται από τις ιδιότητες του στελέχους που χρησιμοποιείται κάθε φορά για την ετερόλογο έκφραση, από τη σύσταση του θρεπτικού

μέσου, από τις συνθήκες έκφρασης, από τον πλασμιδιακό φορέα, από τον μηχανισμό, με τον οποίο μεταφέρεται η πρωτεΐνη στο περίπλασμα, από την τεταρτοταγή και πεμπτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Από τα δεδομένα μας βέβαια, όπως φαίνονται στα αποτελέσματα φαίνεται όσον αφορά στην έκκριση τα επίπεδα της ενδοκυττάριας πρωτεΐνης να είναι υψηλά και για τα τρία στελέχη και με την επιπλέον παραμονή των στελεχών με IPTG, να παραμένουν είτε στα ίδια υψηλά επίπεδα, είτε να αυξάνουν ακόμη περισσότερο. Αντίστοιχα, τα επίπεδα της εξωκυττάριας πρωτεΐνης είναι πολύ χαμηλά και παραμένουν σταθερά χαμηλά και μετά την παρέλευση περισσότερων ωρών με IPTG.

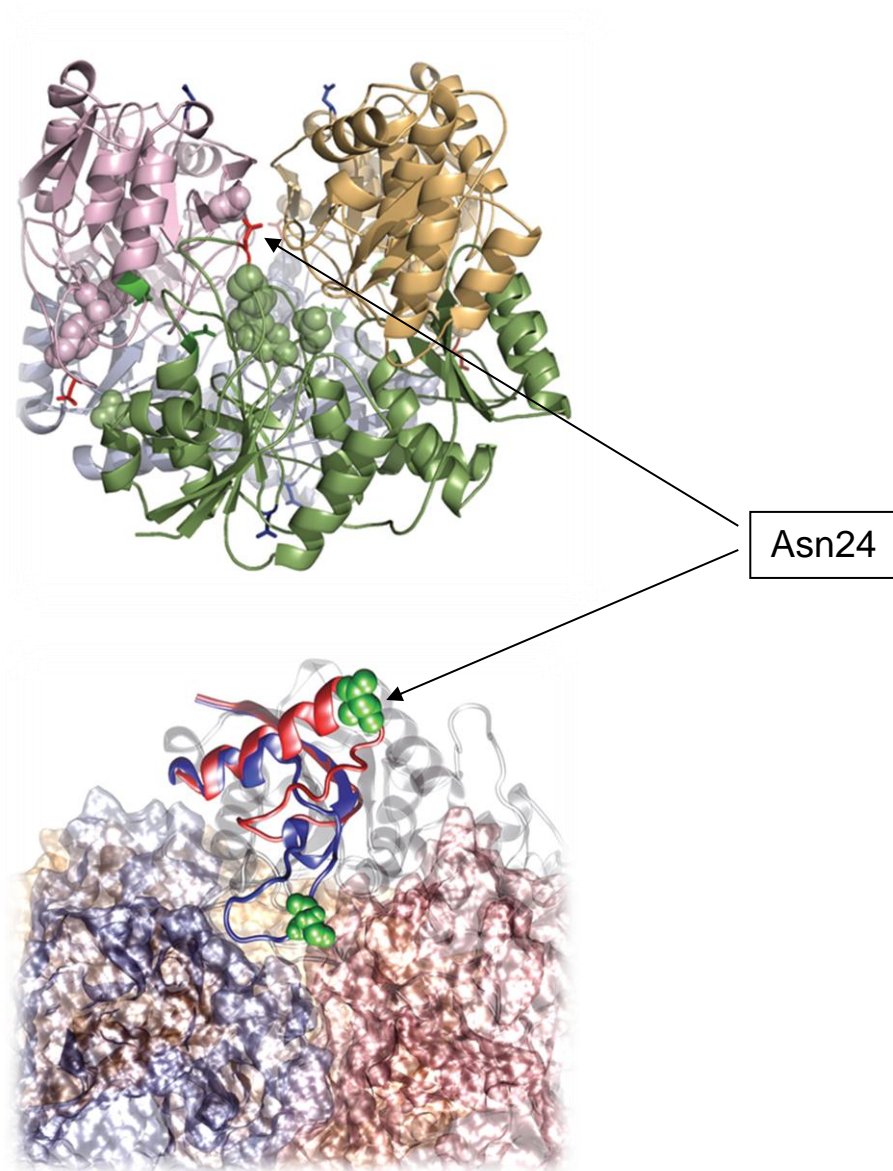
Ένας επιπρόσθετος παράγοντας, ο οποίος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και τα επίπεδα έκφρασης, είναι και η θρεπτική αξία του μέσου που χρησιμοποιείται. Στη παρούσα πειραματική μελέτη, διερευνήθηκε η επίδραση 3 διαφορετικών θρεπτικών μέσων στα επίπεδα έκφρασης της ετερόλογης πρωτεΐνης. Από τα αποτελέσματα, προκύπτει θετική επίδραση της αυξανόμενης θρεπτικότητας, στα επίπεδα έκφρασης. Αυτό σημαίνει, ότι όσο περισσότερο θρεπτικό είναι ένα μέσο ανάπτυξης, τόσο υψηλότερα τα επίπεδα ανάπτυξης

Ένας από τους βασικότερους στόχους της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν και η ανάπτυξη ενός βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού του ενζύμου, τόσο του άγριου τύπου όσο και των μεταλλαγμένων μορφών. Χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία κατιοντοανταλλαγής σε στήλη CM-Sepharose. Στα Αποτελέσματα φαίνεται συγκριτικά η απόδοση του καθαρισμού και η επί % καθαρότητα του ενζύμου.

Σε τελικό στάδιο μελετήθηκε η δημιουργία μοριακών τροποποιήσεων στο ένζυμο με μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής, ώστε να προκύψουν νέες μορφές με τροποποιημένη εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα. Το αμινοξικό κατάλοιπο Asn24 το οποίο εντοπίζεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου φάνηκε να καθορίζει την εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα.

Κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση κορεσμού στη θέση 24 με τη χρήση μεταλλαξογόνων εκκινητών, οδήγησε στη δημιουργία βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων μορφών. Από τα μεταλλαγμένα στελέχη επιλέχθηκαν τυχαία 20 στα οποία έγινε αλληλούχιση του DNA. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν για τη μετάφραση των γονιδίων και την ταυτοποίηση των σωστών αναγνωστικών πλαισίων. Προκειμένου να εκφραστούν οι

μεταλλαγμένες μορφές του γονιδίου της L-ασπαραγινάσης πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli*. Μετά το πέρας της έκφρασης, έγινε δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας για τα ένζυμα χρησιμοποιώντας το φωτομετρικό προσδιορισμό της L-ασπαραγινάσης. Έτσι προσδιορίστηκε η ειδική δραστηριότητα των μεταλλαγμένων μορφών.



**Εικόνα 5.1.** Διαμόρφωση της Asn24. Η εικόνα αντιπροσωπεύει το περιβάλλον της Asn24, στην οποία εφαρμόζεται η μετάλλαξη. Το αμινοξικό κατάλοιπο Asn24 το οποίο εντοπίζεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου φάνηκε να καθορίζει την διαμόρφωση και κινητικότητα του ευέλικτου βρόγχου στο N-τελικό άκρο.

Τα αποτελέσματα της κατευθυνόμενης εξέλιξης έδειξαν πως στη βιβλιοθήκη που προέκυψε υπήρχαν μεγάλες διαφορές στις μετρούμενες ειδικές δραστηριότητες. Οι τιμές κάποιων κλώνων ήταν σχεδόν όμοιες με εκείνες του άγριου τύπου, ενώ κάποιων άλλων ήταν ενδιάμεσες των τιμών του άγριου τύπου.

Ο καθαρισμός των μεταλλαγμένων μορφών πραγματοποιήθηκε στον προσροφητή CM-Sepharose. Με το καθαρό πλέον ένζυμο πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της L-ασπαραγινάσης. Η δομική ανάλυση έδειξε ότι το κατάλοιπο Asn-24 συμβάλει στη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του ενεργού κέντρου και επιλέχτηκε για περαιτέρω μελέτη.

Στόχος της εξέλιξης ήταν η δημιουργία ενζύμων, τα οποία είτε να έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ή να είναι πιο σταθερά. Τα ένζυμα με διαφορετική δράση L-γλουταμινάσης θα μπορούσαν να αξιολογηθούν ως ενέσιμα φάρμακα συγκριτικά με τα μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενα, και τα πιο σταθερά θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στη δημιουργία συσκευής για την απομάκρυνση της L-Asn από το αίμα ή στη δημιουργία βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό L-Asn σε βιολογικά δείγματα.

Από τις μεταλλάξεις που προέκυψαν αξίζει να σχολιάσουμε τις Mutant 1: Asn24Leu, Mutant 12: Asn24Arg, Mutant 15: Asn24Ser. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το καταλληλότερο ένζυμο για τη θεραπεία της ALL, θα ήταν εκείνο που θα είχε υψηλή δράση ασπαραγινάσης και παράλληλα ικανοποιητική δράση γλουταμινάσης, καθώς έτσι παρουσιάζονται λιγότερα προβλήματα κατά την αντικαρκινική θεραπεία (βλ. Εισαγωγή). Η βιβλιοθήκη για αυτό το λόγο αρχικά ελέγχθηκε για ενζυμικές μορφές με μειωμένη δραστηριότητα L-γλουταμινάσης. Οι μορφές αυτές έπρεπε επιπλέον να διαθέτουν και σε ικανοποιητικά επίπεδα δραστηριότητα L-ασπαραγινάσης. Από την αντίστοιχη μελέτη των μεταλλαγμένων μορφών, παρατηρούμε πως η μεταλλαγή της Asn24 σε Leu, φαίνεται να ελαχιστοποιεί τη δράση του ενζύμου τόσο ως ασπαραγινάση όσο και ως γλουταμινάση.

Από την άλλη η μεταλλαγή από Asn24 σε Arg, ελαχιστοποιεί τη δράση του ενζύμου ως γλουταμινάση, είναι βέβαια υψηλότερη από του άγριου τύπου ενώ ταυτόχρονα ενισχύει τη δράση του ως ασπαραγινάση, μάλιστα σε υψηλότερα επίπεδα από εκείνα του άγριου τύπου. Ακόμα η μεταλλαγή από Asn24 σε Ser φαίνεται να μειώνει τη δράση του ενζύμου ως ασπαραγινάση σημαντικά, ενώ ως γλουταμινάση τα επίπεδα είναι σημαντικά αυξημένα σε σχέση με του άγριου τύπου.



Αν μπορούσαμε να δώσουμε μια ερμηνεία στα παραπάνω θα λέγαμε πως η μετάλλαξη της Asn σε Leu, ένα αμινοξύ με εντελώς διαφορετικές ιδιότητες ίσως τροποποιεί τη διαμόρφωση του βρόγχου με αποτέλεσμα να μην συνδέεται καλά το υποστρώμα είτε αυτό είναι γλουταμίνη είτε είναι ασπαραγίνη.

Από την άλλη η μετάλλαξη σε Arg, φαίνεται να επηρεάζει τη διαμόρφωση του βρόγχου, αφού υπάρχουν διαφοροποιήσεις στις αλληλεπιδράσεις δέσμησης του υποστρώματος.

Καταλαβαίνουμε από τα παραπάνω ότι η μέθοδος της κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης κορεσμού και η μελέτη των μεταλλαγμένων μορφών του ενζύμου έδειξε ότι η θέση 24 συμβάλει σημαντικά στον καθορισμό της εκλεκτικότητας του ενζύμου ως προς τα υποστρώματα L-ασπαραγίνη και L-γλουταμίνη.

Επί του παρόντος, η κατευθυνόμενη εξέλιξη έχει κερδίσει αξιοσημείωτη προσοχή σαν μια τεχνολογικά σημαντική στρατηγική για το γρήγορο σχεδιασμό μορίων με ιδιότητες φτιαγμένες ειδικά για την κάλυψη των αναγκών της βιοτεχνολογικής και φαρμακευτικής αγοράς. Τα τελευταία χρόνια, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη βελτίωση ενζύμων με βιομηχανική και θεραπευτική σημασία, όπως είναι τα αντισώματα, οι κυτοκινίνες και τα ένζυμα (Kurtzman et al., 2001).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Aghaipour, K., Wlodowes A., and Lubkowski J.** 2001. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry*, **40**: 5655-5664.

**Albertsen BK, Schröder H, Ingerslev J, Jakobsen P, Avramis VI, Müller HJ, Carlsen NT, Schmiegelow K.** Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system. *Br J Haematol.* 2001 Dec;115(4):983-90.

**Altreuter, D.H. & Clark, D.S. (1999).** Combinatorial biocatalysis: taking the lead from nature. *Curr. Opin. Biotechnol.*10, 130-136

**Alvarez, O.A. & Zimmerman, G. (2000).** Pegaspargase-induced pancreatitis. *Med. Pediatric. Oncol.*34,200-205

**Arnold, F.H. (2001).** Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* 409,253-257

**Aung, H.P., Bocola, M., Schleper, S. and Rohm, K.H. (2000).** Dynamics of a mobile loop at the active site of *Escherichia coli* asparaginase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1481**: 349-359.

**Avramis VI, Panosyan EH.** Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(4):367-93. Review.

**Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, Ettinger AG, Ettinger LJ, Franklin J, Gaynon PS, Hilden JM, Lange B, Majlessipour F, Mathew P, Needle M, Neglia J, Reaman G, Holcenberg JS, Stork L.** A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):1986-94. Erratum in: *Blood* 2002 Sep 1;100(5):1531.

**Axarli, I., Prigipaki, A. and Labrou, N.E.** (2005). Engineering cytochrome P450 CYP102A2 substrate specificity by directed evolution: production of an efficient enzyme for bioconversion of fine chemicals. *Biomol. Eng.*, **22**: 81-88

**Bain, B. J., Barnett, D. and Linch, D.** (2002). Revised guidelines on immunophenotyping in acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin. Lab. Haem.*, **24**: 1-13.

**Baran, E.T., Ozer, N. and Hasirci, V.** (2003). Solid phase enzyme modification via affinity chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **794**: 311-322.

**Belin, D., Guzman, L.M., Bost, S., Konakova, M., Silva, F. and Beckwith, J.** (2004). Functional activity of eukaryotic signal sequences in *Escherichia coli*: the ovalbumin family of serine protease inhibitors. *J. Mol. Biol.*, **335**: 437 – 53.

**Bonora, G.M., Ivanova, E., Zarytova, V., Burchovich, B. and Veronese F.M.** (1997). Synthesis and characterization of high-molecular mass polyethylene glycol-conjugated oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.*, **8**: 793-797.

**Borek, D. & Jaskolski, M. (2001).** Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochim. Pol.* 48(4), 893-902.

**Bornscheuer, U.T., & Pohl, M. (2001).** Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 137-143

**Burnham, N.L.,** (1994). Polymers for delivering peptides and proteins. *Am. J. Hosp. Pharm.*, **51**:210-218.

**Bushman, J.E., Palmieri, D., Whinna, H.C. and Church, F.C.** (2000). Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of antithrombin III in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, **24**: 559–565.

**Chen, R. (2001).** Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends Biotechnol.* 19, 13-14

**Clonis, Y.D.** (1997). *Enzymic Biotechnology, Downstream processing.* Chapter 3, pp: 47-105.

**Cornelis, P.** (2000). Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**: 450 – 4.

**Cornelis, G.R. and Van Gijsegem, F.** (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**: 735 – 74.

**Derst, C., Henseling, J. & Rohm, K.H. (2000).** Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase. II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. *Protein Sci.*9(10), 2009-2007.

**Derst, C., Wehner, A., Specht, V. and Rohm K.H.** (1994). States and functions of tyrosine residues in *Escherichia coli* asparaginase II. *Eur. J. Biochem.*, **224** :533-540.

**Dodson, G. & Wlodawer, A. (1998).** Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* 23, 347-352

**Duncan R. (2003).** The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews, Drug discovery* 2, 347-360.

**Duval, M., Suci, S., Ferster, A., Riolland, X., Nelken, B., Lutz, P., Benoit, Y., Robert, A., Manel, A.M. and E. Vilmer (2002).** Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer – Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*, **99**: 2734–2739.

**Gaspar, M.M., Blanco, D., Cruz, M.E. & Alonso, M.J. (1998).** Formulation of L-asparaginase-loaded poly ( lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *J. Control Rel.*52, 53-62.

**Graham, M.L. (2003).** Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv. Drug Delivery Reviews* 55, 1923-1303.

**Goldman, E., Rosenberg, A.H., Zubay, G. and Studier, F.W.** (1995). Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **245**: 467–473.

**Harris, J.M. and Chess, R.B.** (2003). Effect of PEGylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**: 214-221.

**Harms, E., Wehner, A., Aung, H.P. and Rohm, K.H.** (1991). A catalytic role for threonine-12 of *E. coli* asparaginase II as established by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.*, **285**: 55-58.

**Hawkins, D.S., Park, J.R., Thomson, B.G., Felgenhauer, J.L., Holcenberg, J.S., Panosyan, E.H. & Avramis, V.I.** (2004). Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycolconjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 10(16), 5335-5341.

**Holcenberg, J.** (2005). New insights on asparaginase. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **27**: 246–247.

**Huang, H.C., Sherman, M.Y., Kandrор, O. and Goldberg, A.L.** (2001). The molecular chaperone DnaJ is required for the degradation of a soluble abnormal protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**: 3920–8.

**Inada, Y., Furukawa, M., Sasaki, H., Kodera, Y., Hiroto, M., Nishimura, H. and Matsushima, A.** (1995). Biomedical and biotechnological applications of PEG and Pmodified proteins. *Trend Biotechnol.*, **13**: 86-91.

**Jakob, C.G., Lewinski, K, LaCount, M.W., Roberts, J.& Lebioda, L.** (1997). Ion binding induces closed conformation in Pseudomonas 7A glutaminase-asparaginase (PGA): crystal structure of the PGA-SO<sub>4</sub>-NH<sub>4</sub> complex at 1.7 resolution. *Biochemistry* 36(4), 923-931

**Jorge, J.C.,Perez-Soler, R., Morais, J.G & Cruz, M.E.** (1994). Liposomal palmitoyl-L-asparaginase :characterization and biological activity. *Cancer Chemother. Pharmacol.*34, 230-234

**Kadokura, H., Katzen, F. and Beckwith, J.** (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 111 – 35.

**Kane, J.F.** (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 494–500.

**Keating, M.J., Holmes, R., Lerner, S. and Ho, D.H.** (1993). L-asparaginase and PEGasparaginase: past, present, and future. *Leuk. Lymphoma*, **10**: 153-157.

**Khokhlova, O.V. and Nesmeyanova, M.A.** (2004). Interdependent effects of the charge of the N-terminal region of the signal peptide, SecA, and SecB on secretion of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. (Mosk)* **38**: 239 – 46.

**Khushoo, A., Pal, Y., Singh, B.N. and K.J., Mukherjee K.J.** (2004). Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. *Protein Expression Purification*, **38**: 29-36.

**Kil, J.O., Kim, G.N. and Park I.** (1995). Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**: 749-750.

**Kotzia G.A. and Labrou N.E.** (2005). Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *J. Biotechnol.* **119(4)**: 309-23.

**Kotzia G.A. and Labrou N.E.** (2006). Directed Molecular Evolution and Structure-guided design: Key Methods for Unlocking the Value of Natural Enzymes.

**Kotzia, G.A. and N.E. Labrou** (2007). L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. *J. Biotechnology*, **127**: 657-669.

**Kozak, M., Borek, D., Janowski, R. and Jaskolski, M.** (2002). Crystallization and preliminary crystallographic studies of five crystal forms of *Escherichia coli* L-asparaginase II (Asp90Glu mutant). *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.*, **58**: 130-132.

**Kravtsoff, R., Colombat, P.H., Desbois, I., Linassier, C., Muh, J.P., Philip, T., Blay, J.Y., Gardenbas, M., Poumier-Gaschard, P., Lamagnere, J.P., Chassaingne, M. and Ropars, C.** (1996). Tolerance evaluation of L-asparaginase loaded in red blood cells. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **51**: 221–225.

**Kurland, C. and Gallant, J.** (1996). Ribosome bypassing at serine codons as a test of the model of selective transfer RNA charging. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 489–493.

**Kurtzman, A.L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J.T., Heinrichs, V. & Pattern, P.A.** (2001). Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 361-370.

**Labrou N.E., Papageorgiou, A.C., Avramis V.I.** (2010). Structure-Function Relationships and Clinical Applications of L-Asparaginases. *Current Medicinal Chemistry*, **17(13)**: 2183-2195.

**Lee, H.C. and H.D, Bernstein** (2001). The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**: 347.

**Liao, Y.D., Jeng, J.C., Wang, C.F., Wang, S.C. and Chang, S.T.** (2004). Removal of Nterminal methionine from recombinant proteins by engineered *E. coli* methionine aminopeptidase. *Protein Sci.* **13**: 1802–10.

**Loo, T., Patchett, M.L., Norris, G.E. and Lott, J.S.** (2002). Using secretion to solve a solubility problem: high-yield expression in *Escherichia coli* and purification of the bacterial glycoamidase PNGase F. *Protein Expr. Purif.* **24**: 90 – 8.

**Lubkowski, J., Wlodawer, A., Housset, D., Weber, I.T., Ammon, H.L., Murphy, K.C. and Swain, A.L.** (1994). Refined crystal structure of *Acinetobacter glutaminasificans* glutaminase/asparaginase. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **50**: 826–832.

**Lubkowski, J., Palm, G.J., Gilliland, G.L., Derst, C, Rohm, K.H. and Wlodawer, A.** (1996). Crystal structure and amino acid sequence of *Wolinella succinogenes* L-asparaginase. *Eur. J. Biochem.*, **241**: 201–207.

**Magdy, M. M. and Mohammed A. Al-Omair.** (2008) Cloning, Purification, Characterization and Immobilization of L-asparaginase II from *E.coli* W3110. *Asian Journal of Biochemistry* **3 (6)**: 337-350.

**Makrides, S.C.** (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512 – 38.

**Maladkar, N.K., Singh, V.K. & Naik, S.R.** (1993). Fermentative production and isolation of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, EC-113. *Hindustan Antibiot. Bull.* **35** (1-2), 77-86.

**Matsushima, A., Kodera, Y., Hiroto, M., Nishimura, H. and Inada, Y.** (1996). Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2**: 1-17.

**Matsuyama, H., Taguchi, R. and Ikezawa, H.** (1991). Phospholipase D modified with a polyethylene glycol derivative. *Chem. Pharm. Bull.*, **39** (3): 743-746.

**Mehvar R.** (2000). Modulation of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of proteins by polyethylene glycol conjugation. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **3**, 125-136.

**Mercado, L. & Arenas, G.** (1999). *Escherichia coli* L-asparaginase induces phosphorylation of endogenous polypeptides in human immune cells. *Sange (Barc)*. **44**(6), 438-442.

**Mesas, J.M., Gil, J.A. & Martin, J.F.** (1990). Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* **136**(3), 515-519.

**Mergulhao, F. and G., Monteiro** (2004). Secretion capacity limitations of the Sec pathway in *Escherichia coli*. *J. Microb. Biotechnol.* **14**: 128–33.

**Mergulhao, F., Monteiro, G., Kelly, A., Taipa, M. and Cabral, J.** (2000). Recombinant human proinsulin: a new approach in gene assembly and protein expression. *J. Microb. Biotechnol.* **10**: 690–3.

**Miller, M., Rao, J.K., Wlodawer, A. & Gribskov, M.R.** (1993). A left-handed crossover involved in aminohydrolase catalysis. Crystal structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase with bound L-aspartate. *FEBS Lett.* **328**(3), 275-279.



**Mukherjee, J., Majumdar, S. & Scheper, T. (2000).** Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*53(2), 180-184.

**Muley, R.G., Sarker, S., Ambedkar, S. and Nail, S.R. (1998).** Influence of alkali treated corn steep liquor containing medium on protein production by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.*, **43**: 31-34.

**Müller, H.J. & Boos, J. (1998).** Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 28, 97-113.

**Muller, H.J., Beier, R., Loning, L., Blutters-Sawatzki, R., Dorffel, W., Maass, E., Muller-Wehrich, S., Scheel-Walter, H.G., Scherer, F., Stahnke, K., Schrappe, M., Horn, A., Lumkemann, K. and Boos, J. (2001).** Pharmacokinetics of native *Escherichia coli* asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL- BFM 95 reinduction treatment. *Br.J. Haematol.*, **114**: 794–799.

**Ollenschlager, G., Roth, E., Linkesch, W., Jansen, S., Simmel, A. & Modder, B.(1988).** Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side-effects. *Eur. J.Clin. Invest.* 18(5),512-516.

**Palm, G. J., Lubkowski, J., Derst, C., Schleper, S., Rohm, K. H., and Wlodawer, A. (1996).** Preparation and preliminary X-ray diffraction studies of a new crystal form of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **390**: 211 216.

**Panke, S., &Wubbolts, M.G. (2002).** Enzyme technology and bioprocess engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*13, 111-116.

**Papageorgiou, A.C., Posypanova G.A., Andersson C.S., Sokolov, N.N. and Krasotkina, J. (2008).** Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *FEBS Journal*, **275**: 4306–4316.

**Payne, J.H. and Vora, A.J. (2007).** Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **138**: 430–445.

**Platis, D., Sotriffer, C.A., Clonis, Y.D. and Labrou N.E.** (2006). Lock-and-key motif as a concept for designing affinity adsorbents for protein purification. *J. Chromatography A* **1128**:

**Prista, A.A. and D.A., Kyridio** (2001). L-asparaginase of *thermo thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino-acids for catalytic activity. *Mol. Cell. Biochem.*, **216**: 93-101.

**Riley, R., Massey, D., Jackson-Cook, C.** (2002). Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.*, **16**: 245-299

**Sandkvist, M.** (2001). Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **40**: 271–83.

**Schwartz, J.H., Reeves, J.Y. & Broome, J.D.** (1966). Two L-asparaginases from *E.coli* and their action against tumors. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **56**, 1516-1519.

**Shokri, A., Sanden, A.M. and Larsson, G.** (2003). Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 654–64.

**Sieciechowicz, K. & Ireland, R.** (1989). Isolation and properties of an asparaginase from leaves of *Pisum sativum*. *Phytochem.* **28**, 2275.

**Soares, A.L., Guimaraes, G.M., Polakiewicz, B., de Moraes Pitombo, R.N. and Abrahao-Neto, J.** (2002). Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E.coli* L-asparaginase. *Int. J. Pharm.*, **237**: 163-170.

**Stanley, N.R., Palmer, T. and Berks, B.C.** (2000). The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 11591–6.

**Stecher, A.L., de Deus, P.M., Polikarpov, I. and Abrahao-Neto, J.** (1999). Stability of Lasparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. *Pharm. Acta. Helv.*, **74**: 1–9.

**Swain, A.L., Jaskolski, M., Housset, D., Mohana, R.J.K. and Wlodawer A. (1992).** Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci., **90**: 1474-1478.

**Veronese, F.M. and Pasut, G. (2005).** PEGylation: successful approach to drug delivery. Drug Discov. Today, **10**: 1451-1458.

**Voet, D. and Voet J.G. (2004).** Biochemistry. Chapter **6-3**, pp: 133-141.

**Wang, L., Miller, A. and Kendall, D.A. (2000).** Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity. J. Biol. Chem. **275**: 10154–9.

**Wehner, A., Derst, C., Specht, V., Aung, H.P. & Röhm, K.H. (1994).** The catalytic mechanism of *Escherichia coli* asparaginase II. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **375**, 108.

**Wileman, T.E., (1991).** Properties of L-asparaginase-dextran conjugates. Adv. Drug Delivery Rev. **6**(2), 167-180.

**Wolf, M., Wirth, M., Pittner, F. & Gabor, F. (2003).** Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres. Int. J. Pharm. **256**(1-2), 141-152.

**Zaks, A. (2001).** Industrial biocatalysis. Curr. Opin. Chem. Biol. **5**, 130-136.

**Zhang, J.F., Shi, L.Y. & Wei, D.Z. (2004).** Chemical modification of L-asparaginase from *Escherichia coli* with a modified polyethyleneglycol under substrate protection conditions. Biotechnol. Lett. **26**, 753-756.

**Zhang, Y.Q. (2002).** Application of natural silk sericin protein in biomaterials. Biotechnol. Adv. **20**: 91–100.

**Zhang, Y.Q., Tao, M.L., Shen, W.D., Zhou, Y.Z., Ding, Y., Ma, Y. and Zhou W.L. (2003).** Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. Biomaterials, **25**: 3751–3759.