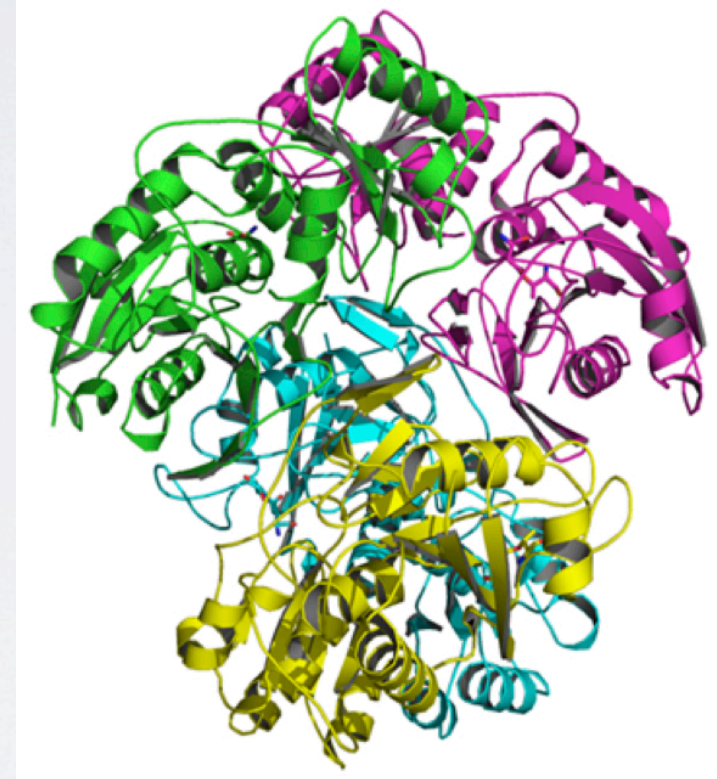
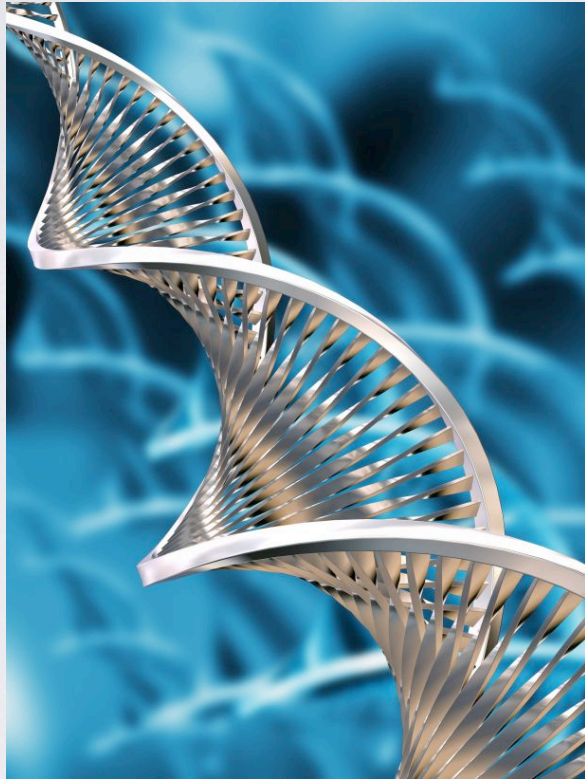


Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του ενζύμου L-ασπαραγινάση.



Μεταπτυχιακή μελέτη
του φοιτητή του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Καραμήτρου Χρήστου

Ιούνιος 2010

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω τα παρακάτω πρόσωπα, τα οποία με τον δικό τους τρόπο συνέβαλλαν στη επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης:

- Τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου για την αέναη και απόλυτη εμπιστοσύνη που μου υπέδειξε όπως επίσης και για την πολύτιμη καθοδήγησή του.
- Την υποψήφια διδάκτωρ Χρονοπούλου Ευαγγελία, όπως επίσης και την κ. Παππά Ευαγγελία, μέλος Ε.Τ.Ε.Π. του εργαστηρίου, για τις συνεχείς υποδείξεις και ουσιαστικές παρεμβάσεις τους, καθώς και την έμπρακτη συμπαράστασή τους.
- Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στους γονείς μου Στέργιο και Μαρία για τη συνεχή, αμέριστη και ανυπέβλητη ψυχολογική υποστήριξη, καθώς και για την απόλυτη κατανόηση και εμπιστοσύνη που μου υπέδειξαν όχι μόνο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης, αλλά κατά τη γενικότερη πορεία μου στο πανεπιστήμιο έως σήμερα.

Στη μνήμη του Andy Hug, OSU.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Δομή και ενζυμική κατάλυση των L-ασπαραγινασών.....	6
1.2 Σημασία και εφαρμογές της L-ασπαραγινάσης.....	11
1.3 Τύποι L-ασπαραγινασών και κυτταρικός εντοπισμός τους.....	14
1.4 Συστήματα ενδοκυτταρικής μεταφοράς ενζύμων στον περιπλασμικό χώρο της <i>E.coli</i>.....	15
1.4.1 Εισαγωγή.....	15
1.4.2 Πλεονεκτήματα μεταφοράς των πρωτεϊνών στον περιπλασμικό χώρο.....	17
1.4.3 Μηχανισμός μεταφοράς τύπου I.....	19
1.4.4 Μηχανισμός μεταφοράς τύπου II.....	21
1.4.4.1 Μονοπάτι SecB.....	22
1.4.4.2 Μονοπάτι SRP.....	24
1.4.4.3 Μονοπάτι TAT.....	25
1.4.5 Εξωκυττάρια Πρωτεϊνική Έκκριση.....	26
1.5 Κατιούσα επεξεργασία και Χρωματογραφία.....	28
1.5.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	29
1.5.2 Χρωματογραφία συγγένειας.....	32
1.6 Ακινητοποίηση της L-ασπαραγινάσης.....	35
1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	38

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	39
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	40
2.1.1 Βιολογικά υλικά.....	40
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	41
2.2 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	41
3. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
3.1 Απομόνωση γονιδίου με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction).....	44
3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.....	49
3.3 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων του βακτηρίου <i>E. coli</i> XL-1 Blue.....	50
3.4 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA.....	52
3.5 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάση σε κύτταρα <i>E. coli</i>.....	54
3.6 Λύσιμο των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος.....	55
3.7 Καθαρισμός του ενζύμου L-ασπαραγινάση με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή 1,4-βουτανεδιόλ-διγλυκιδύλ-αιθέρας-L-Asp-Sepharose-CL6B.....	55
3.7.1 Σύνθεση του προσροφητή.....	55
3.7.2 Πρωτόκολλο χρωματογραφίας συγγένειας.....	56
3.7.3 Μελέτη ισορροπίας προσρόφησης.....	57
3.8 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	59
3.9 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση TCA.....	59
3.10 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	61
3.10.1 Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS).....	61
3.10.2 Προετοιμασία του δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης.....	62
3.10.3 Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250.....	62

3.11 Διαπίδυση.....	63
3.12 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηκότητας της L-ασπαραγινάσης.....	63
3.13 Ακινητοποίηση της L-ασπαραγινάσης μέσω της δημιουργίας διασυνδέσεων με γλουταραλδεϋδη και σχηματισμό βάσεως Schiff.....	64
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	68
4.1 Ανάπτυξη του αριστοποιημένου πρωτοκόλλου εξωκυττάριας παραγωγής της L-ασπαραγινάσης του βακτηριακού στελέχους <i>Erwinia chrysanthemi</i>	69
4.1.1 Μελέτη της ετερόλογης έκφρασης του ενζύμου σε 7 διαφορετικά στελέχη <i>E. coli</i>	69
4.1.2. Η επίδραση της θερμοκρασίας και της σύστασης του θρεπτικού υλικού στην μεγιστοποίηση των επιπέδων ετερόλογης έκφρασης του ενζύμου, στο στέλεχος <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta.....	75
4.2 Ανάπτυξη βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού της L-ασπαραγινάσης του βακτηριακού στελέχους <i>Erwinia chrysanthemi</i>	78
4.2.1 Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής.....	78
4.2.2 Χρωματογραφία Συγγένειας.....	80
4.2.3 Μελέτη ισορροπίας προσρόφησης.....	97
4.2.4 Εφαρμογή του πρωτοκόλλου κατιούσας επεξεργασίας στον καθαρισμό των L-ασπαραγινασών των στελεχών <i>Escherichia coli</i> και <i>Erwinia caratovora</i>	99
4.3 Ακινητοποίηση της L-ασπαραγινάσης του στελέχους <i>Erwinia chrysanthemi</i>	102
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	114

ABSTRACT

Keywords: L-asparaginase, heterologous expression, protein expression and purification, Leukemia treatment

L-asparaginases (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1) are enzymes, which primarily catalyze the deamidation of L-Asn to produce L-Asp and ammonia, but simultaneously, have the ability to hydrolyze to a lesser extent, L-Gln to L-Glu and ammonia. The functional form of L-ASNase exists as a tetramer of identical subunits, with molecular mass in the range of 140-160 kDa. Two types of bacterial L-ASNases have been identified and characterized, type I and type II. Type I L-ASNases are expressed constitutively in the cytoplasm and hydrolyze L-Asn and L-Gln with the same rate. Type II L-ASNases are expressed under anaerobic conditions and are periplasmic enzymes, which exhibit high specific activity against L-Asn. For the past 30 years, L-ASNases II have been used as therapeutic enzymes in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. The anti-neoplastic activity results from cellular protein synthesis inhibition due to the depletion of the circulating pools of L-Asn by L-ASNase. In contrast to normal cells, malignant cells can only synthesize L-Asn slowly and hence, their survival depends on an exogenous supply. Particularly, therapeutic forms from bacterial sources have been studied such as *Erwinia caratovora*, *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli*. The present study focused on L-ASNase II from *Erwinia chrysanthemi* 3937 (Ec-ASNase) with three main aims: i) study and optimization of the extracellular expression of Ec-ASNase in *E. coli* using its native peptide leader, ii) development and optimization of an efficient purification protocol for the extracellular enzyme and iii) immobilization of the L-ASNase using glutaraldehyde as a cross-linking agent. Successful immobilization could offer the possibility of designing and developing a bioreactor, which could be used in leukemia therapy.

Seven different *E.coli* strains were studied for their ability to secrete the recombinant enzyme in the culture medium. The strain, which exhibited the highest expression levels, BL21(DE3) Rosetta, was chosen for further analysis. Additionally, extracellular expression levels were evaluated at 18 °C and 37 °C using 3 different culture media (LB, TB, YT). The results showed, that after 36 hours of expression, approximately 18.000 IU and 5 mg of L-ASNase were secreted in 1 L TB culture medium. Regarding purification, we found that ion exchange chromatography is inappropriate for the purification of the extracellular enzyme. Hence, we focused on the

development of three affinity absorbents, for the chromatographic purification of the enzyme. We used L-Asn, L-Glu and L-Asp as ligands, which were immobilized on Sepharose CL-6B using bis-oxirane chemistry. L-Asp ligand showed the highest purifying ability and hence, the optimized purification protocol was developed using L-Asp as affinity ligand. Eventually, we found that optimum purification can be achieved using 0.1 M NaCl and 20 mM Pi, pH 7.5, as far as the supernatant conditions are concerned. Furthermore, in order to evaluate the effectiveness of the optimized purification protocol for other L-ASNases II, such as the recombinant enzymes from *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli*, we isolated, cloned and expressed the respective genes in *E.coli* BL21(DE3) Rosetta cells. These enzymes were not bound the column indicating the high specificity of immobilized L-Asp and *Erwinia chrysanthemi* L-ASNase under the experimental conditions (e.g. 0.1 M NaCl, 20 mM Pi, pH 7.5). As a last stage of this project, L-ASNase was immobilized using glutaraldehyde as a cross-linking agent and BSA. Four UI of the enzyme were immobilized under 9 different conditions and the condition which demonstrated the highest efficiency, was chosen in order to determine the enzyme's operational stability using as control the free enzyme. The results showed, that after 65 days, the immobilized enzyme retains about 48 % of its initial activity, whereas the free only 15 %.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λέξεις κλειδιά: L-ασπαραγινάση, ετερόλογη έκφραση, καθαρισμός ενζύμων, λευχαιμία

Οι L-ασπαραγινάσες (αμιδο-υδρολάσες της L-ασπαραγίνης, L-ASNase, E.C. 3.5.1.1) αποτελούν ένζυμα, τα οποία καταλύουν τη υδρόλυση της L-ασπαραγίνης σε L-ασπαρτικό οξύ και αμμωνία. Επιπλέον, οι L-ASNases διαθέτουν την ικανότητα να υδρολύουν και την L-γλουταμίνη. Ειδικότερα, με βάση τη συγγενείά 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 και στη δεύτερη κλάση ανήκουν ενζυμικά μόρια, τα οποία καταλύουν την υδρόλυση της L-ασπαραγίνης και της L-γλουταμίνης με παράλληλη αποτελεσματικότητα. 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. Κάθε μονομερές αποτελείται από περίπου 330 αμινοξικά κατάλοιπα, ο συνδυασμός των οποίων, σχηματίζει 14 β-πτυχωτές επιφάνειες και 8 α-έλικες. 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. Οι L-ASNases κατατάσσονται σε 2 τύπους: στον τύπο I και στον τύπο II. Ο τύπος I περιλαμβάνει τις L-ASNases, οι οποίες εκφράζονται στο κυτταρόπλασμα και χαρακτηρίζονται από παρόμοια συγγένεια ως προς την L-ασπαραγίνη και την L-γλουταμίνη. Αντίστοιχα, ο τύπος II των L-ASNases, εμφανίζει μια υψηλή συγγένεια για την L-ασπαραγίνη και μια πολύ μικρότερη για την L-γλουταμίνη. Για το λόγο αυτό, αυτού του τύπου οι L-ASNases χρησιμοποιούνται ως χημειοθεραπευτικά ένζυμα στη περίπτωση της λευχαιμίας και συσπειρώνουν μεγάλο επιστημονικό και ερευνητικό ενδιαφέρον. Οι συγκεκριμένες L-ASNases χαρακτηρίζονται από βακτηριακή πηγή προέλευσης, με κυριότερους εκπροσώπους τα στελέχη *Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi* και *Erwinia caratovora*. Στη παρούσα πειραματική μελέτη, αναπτύχθηκε ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο ετερόλογης έκφρασης, (χρησιμοποιώντας ως ετερόλογο σύστημα έκφρασης το *E. coli*) καθαρισμού και ακινητοποίησης, για την εξωκυτάρια L-ASNase II του βακτηριακού στελέχους *Erwinia chrysanthemi* 3937. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η έκφραση του ενζύμου σε 7 διαφορετικά στελέχη *E. coli* και διερευνήθηκε η πιθανότητα εξωκυτάριας παραγωγής του συγκεκριμένου ενζύμου. Τέσσερα από τα επτά στελέχη, έδειξαν ότι παράγουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη

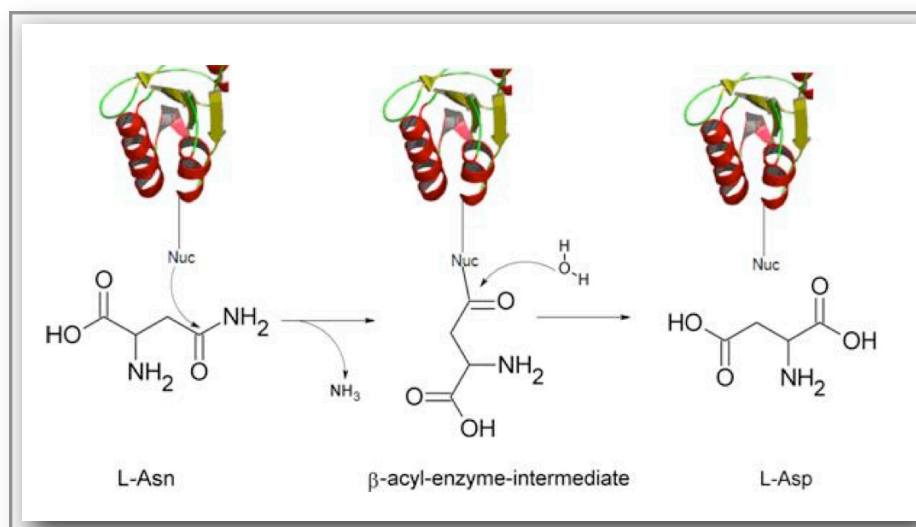
εξωκυττάρια στο θρεπτικό μέσο και επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη, εκείνο, το οποίο παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Το στέλεχος αυτό είναι το BL21(DE3) Rosetta. Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τρία διαφορετικά θρεπτικά μέσα, TB, YT και LB και δύο διαφορετικές θερμοκρασίες έκφρασης 18 °C και 37 °C, με σκοπό τον προσδιορισμό των συνθηκών, κάτω από τις οποίες μπορούν να επιτευχθούν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Τελικά προέκυψε, ότι υψηλότερα επίπεδα εξωκυττάριας έκφρασης, επιτυγχάνονται χρησιμοποιώντας το θρεπτικό μέσο TB σε θερμοκρασία 37 °C. Ειδικότερα, μετά από 36 ώρες έκφρασης, παρήχθησαν περίπου 18.000 IU and 5 mg L-ASNase σε 1 L TB θρεπτικό μέσο. Όσον αφορά τον καθαρισμό, προσδιορίστηκε, ότι η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι ακατάλληλη για τον καθαρισμό του εξωκυττάρια ενζύμου και για το λόγο αυτό οι προσπάθειες στράφηκαν προς την χρωματογραφία συγγένειας. Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικοί προσροφητές συγγένειας, χρησιμοποιώντας ως δεσμευτές τις ενώσεις L-Asn, L-Glu και L-Asp και επιλέχθηκε ο προσροφητής με ακινητοποιημένο δεσμευτή το L-Asp, καθώς παρουσίασε υψηλότερες αποδόσεις καθαρισμού. Με βάση τον προσροφητή αυτόν, προσδιορίστηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες προσρόφησης στη στήλη, είναι τελικά 0.1 M NaCl και 20 mM Pi, pH 7.5. Παράλληλα, διερευνήθηκε και η πιθανότητα εφαρμογής του βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού και για άλλες ανασυνδυασμένες L-ASNases όπως από *Escherichia coli* και *Erwinia caratovora*. Τελικά οι L-ASNases αυτές, δεν προσροφούνται στον προσροφητή κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες. Τέλος, η εξωκυττάρια L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi* 3937 ακινητοποιήθηκε χρησιμοποιώντας γλουταραλδεΐδη ως διδραστικό αντιδραστήριο, κάτω από εννέα διαφορετικές συνθήκες. Από τις συνθήκες αυτές, επελέγη εκείνη, η οποία επέδειξε την υψηλότερη απόδοση, με στόχο τη συγκριτική μελέτη της λειτουργικής σταθερότητας του ενζύμου σε ακινητοποιημένη και ελεύθερη μορφή. Μετά από 65 ημέρες συγκριτικής μελέτης, το ακινητοποιημένο ένζυμο διατηρεί το 48 % της αρχικής δραστικότητάς του, ενώ το ελεύθερο μόλις το 15 %.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

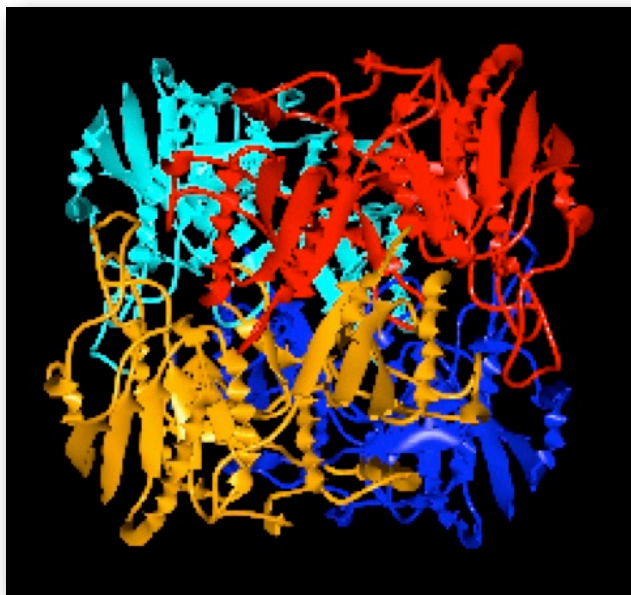
1.1 Δομή και ενζυμική κατάλυση των L-ασπαραγινασών.

Οι L-ασπαραγινάσες (αμιδο-υδρολάσες της L-ασπαραγίνης, L-ASNase, E.C. 3.5.1.1) αποτελούν ένζυμα, τα οποία καταλύουν τη υδρόλυση της L-ασπαραγίνης σε L-ασπαρτικό 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).

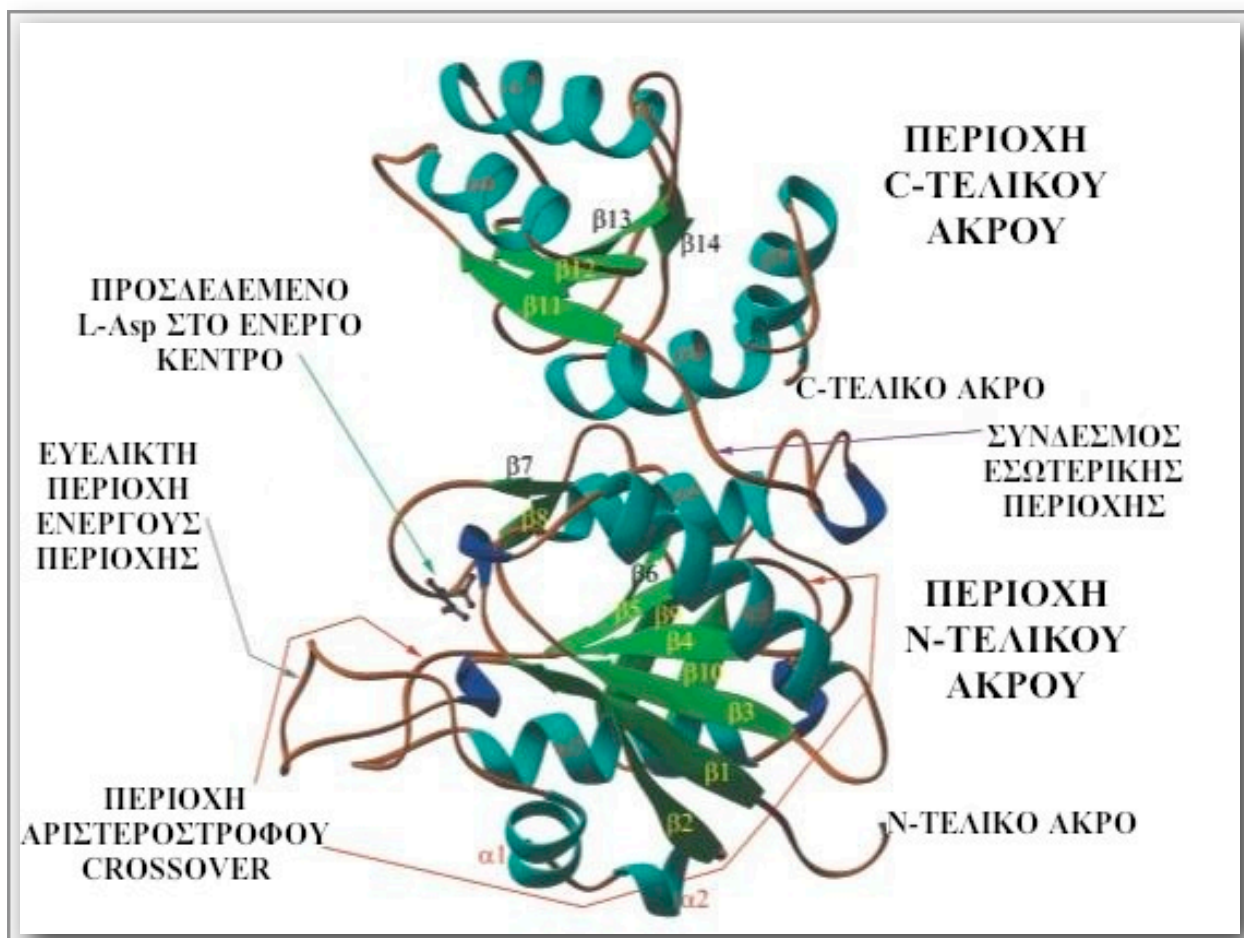


Εικόνα 1.1 Ο τρόπος με τον οποίο η L-ASNase υδρολύει την L-ασπαραγίνη. Αρχικά το ένζυμο μέσω νουκλεόφιλης προσβολής στην αμινική ομάδα του υποστρώματος, σχηματίζει ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο και τελικά με την συνεισφορά του νερού, σχηματίζεται το ασπαρτικό οξύ, ενώ η αμμωνία έχει ήδη σχηματιστεί από το αρχικό στάδιο της αντίδρασης (Labrou et al., 2010).

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 (Εικόνα 1.2), (Aung et al., 2000; Aghaiyrou et al., 2001a,b; Kozak et al., 2002). 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.)

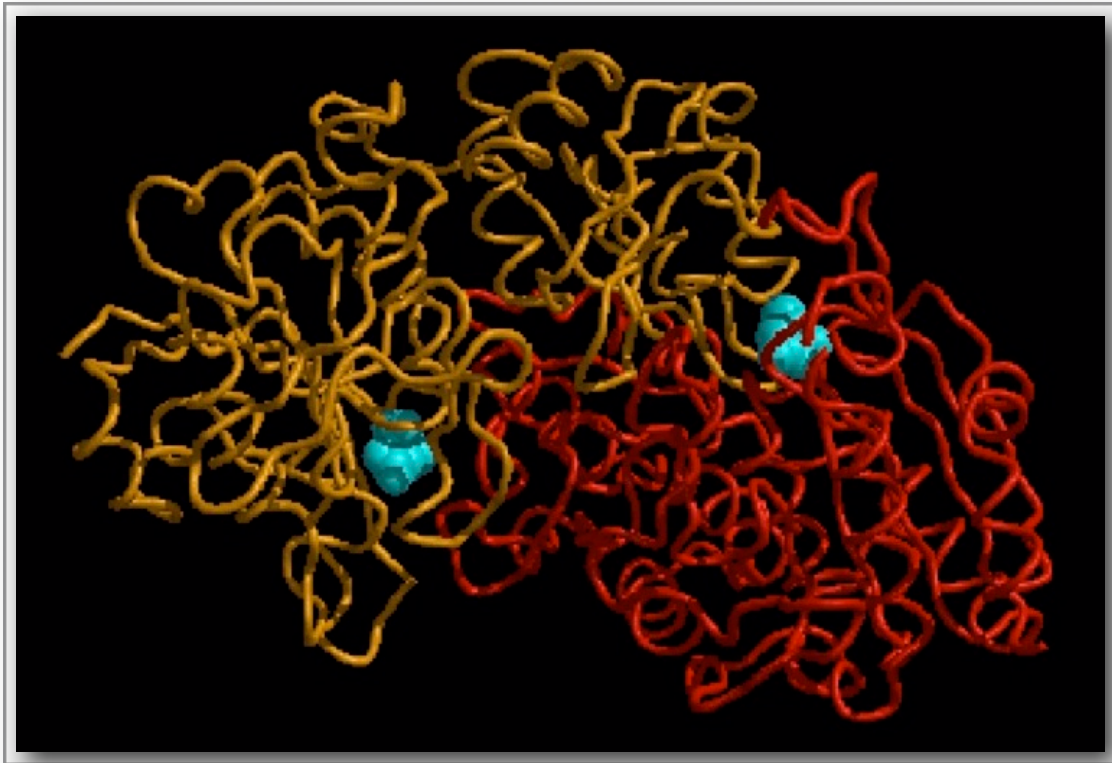


Εικόνα 1.2 Η δομή του τετραμερούς με συμμετρία τύπου 222 της L-ASNase της *E. coli*.



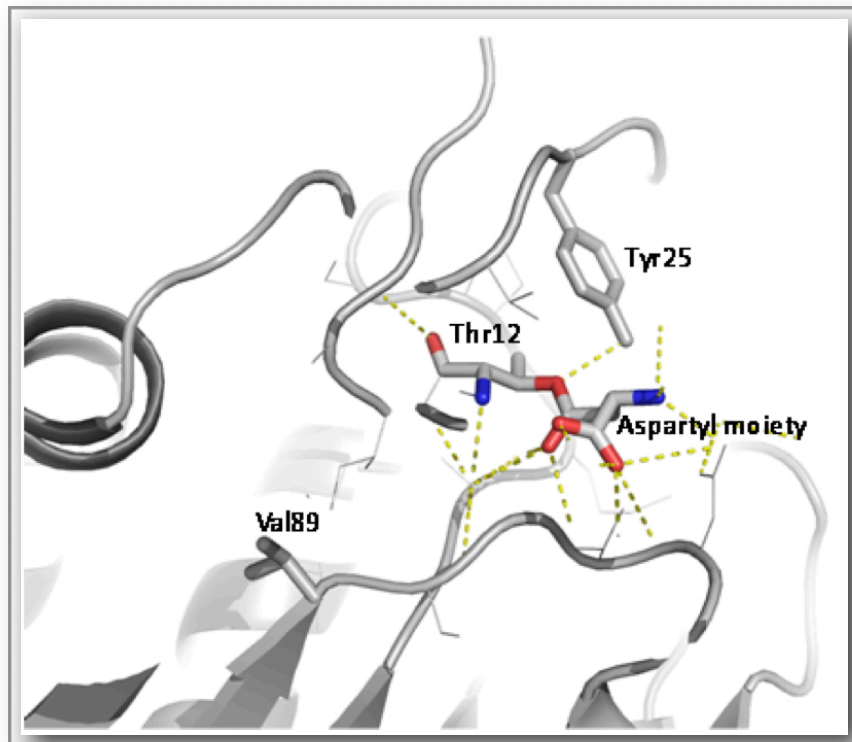
Εικόνα 1.3 Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μονομερούς της L-ASNase του στελέχους *E. chrysanthemi* (Aghaiypour et al., 2001).

Το ενεργό κέντρο της L-ASNase βρίσκεται μεταξύ της C-τελικής περιοχής και της N-τελικής περιοχής 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 είναι μόνο η τετραμερής. Παρακάτω στην Εικόνα 1.4 μπορούμε να παρατηρήσουμε την ύπαρξη δύο μορίων L-ασπαρτικού, ως προϊόντα της υδρόλυσης της L-ασπαραγίνης, στα δύο ενεργά κέντρα ενός διμερούς.



Εικόνα 1.4 Με Van der Waals απεικόνιση (μπλε δομές), παρατηρούμε την ύπαρξη δύο μορίων L-ασπαρτικού στα ενεργά κέντρα ενός διμερούς.

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 άγριων 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 θρεονίνη¹² (Thr¹²) και αποτελεί ένα αμινοξύ υψηλώς συντηρημένο για όλες τις L-ASNases (Εικόνα 1.5), (Aghaiypour et al., 2001; Palm et al., 1996).



Εικόνα 1.5 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).

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, όπως φαίνεται στην εικόνα 5, 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).

1.2 Σημασία και εφαρμογές της L-ασπαραγινάσης.

Η L-ASNase αποτελεί ένα ένζυμο, το οποίο, μεταξύ άλλων χημικών ουσιών, χρησιμοποιείται τα τελευταία 30 χρόνια για την αντιμετώπιση της παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ΟΛΛ/Acute Lymphoblastic Leukemia-ALL) (Bain B. J. 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.

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 περισσότερα 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 Hogkins, το λεμφοσάρκωμα, το μελανοσάρκωμα (Stecher et al., 1999; Duval et al., 2002). Δυστυχώς όμως, η χρήση του ενζύμου αυτού ως μέσο για την αντιμετώπιση τέτοιων ασθενειών με κύριο εκπρόσωπο την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, διαθέτει και σημαντικά μειονεκτήματα όπως η επαγωγή μιας σειράς σοβαρότατων παρενεργειών, οι οποίες ποικίλουν με το στάδιο της ασθένειας και τον οργανισμό του ασθενούς. Ο κυριότερος λόγος για την πρόκληση αυτών των σοβαρών παρενεργειών είναι η ταυτόχρονη δράση του ενζύμου και ως γλουταμινάση (Ollenschlager et al., 1988). Οι κυριότερες 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, Papageorgiou 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). Παράλληλα, η ανάγκη για συνεχείς ενέσεις με L-ASNase στον ασθενή, εκτός των παραπάνω σοβαρών παρενεργειών, δύναται να προκληθούν και επίσης σοβαρότατες αντιδράσεις υπερευαισθησίας, οι οποίες ποικίλουν από απλές αλλεργίες, έως ισχυρά

αναφυλακτικά σοκ, τα οποία μπορεί να αποβούν μοιραία για τον ασθενή (Mashburn et al., 1964; Marlborough et al., 1975; Moola et al., 1994; Soares et al., 2002).

Επιπλέον, ανασταλτικός παράγοντας στη χρήση της L-ASNase, αποτελεί και το γεγονός της άμεσης δράσης των πρωτεασών που υπάρχουν στο αίμα, οι οποίες ανιχνεύουν και αναγνωρίζουν την L-ASNase ως “ξένη” πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα να την αποικοδομούν. Αυτή ακριβώς η πρωτεόλυση, ως αντίδραση από τον οργανισμό, αποτελεί και έναν από τους βασικότερους περιορισμούς και προβληματισμούς στη χρήση της L-ASNase και συντελεί στη μείωση της αποτελεσματικότητας αυτού του ενζύμου για την αντιμετώπιση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Ollenschlager et al., 1988). Ταυτόχρονα, η συγκεκριμένη αντίδραση του οργανισμού και η πρωτεόλυση του ενζύμου, συνιστά τη κυριότερη γενεσιουργό αιτία για την πρόκληση ανοσοαντιδράσεων και αλλεργιών. Σημαντική έρευνα διεξάγεται για την εύρεση τρόπων προστασίας του ενζύμου αυτού έναντι της δράσης των πρωτεασών, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο ημιζωής στο αίμα, διατηρώντας βέβαια τα ίδια επίπεδα δράσης.

Ο αποδοτικότερος 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 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 από 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).

1.3 Τύποι L-ασπαραγινασών και κυτταρικός εντοπισμός τους.

Οι L-ASNases κατηγοριοποιούνται σε 2 τύπους: στον τύπο I και στον τύπο II (Campell et al., 1967). Ο τύπος I περιλαμβάνει τις L-ASNases, οι οποίες εκφράζονται στο κυτταρόπλασμα και χαρακτηρίζονται από μια ισάξια συγγένεια ως προς την L-ασπαραγίνη και την L-γλουταμίνη. Αντίστοιχα, ο τύπος II των L-ASNases, εμφανίζει μια υψηλή συγγένεια για την L-ασπαραγίνη και μια πολύ μικρότερη για την L-γλουταμίνη. Για το λόγο αυτό, αυτού του τύπου οι L-ASNases χρησιμοποιούνται ως χημειοθεραπευτικά ένζυμα στη περίπτωση της λευχαιμίας (Duval et al., 2002; Gokbuget and Hoelzer, 2006; Verma et al., 2007). Επιπλέον, οι L-ASNases τύπου II εκφράζονται στο κυτταρόπλασμα, με τη διαφορά ότι στη συνέχεια μεταφέρονται στον περιπλασματικό χώρο. 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 *πεπτιδίο οδηγός*. Οι δύο αυτοί τύποι L-ASNases εμφανίζουν διαφορετικά βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά. Τα τελευταία 50 χρόνια όμως, το ενδιαφέρον και η έρευνα έχει επικεντρωθεί στις L-ASNases τύπου II, λόγω των ευνοϊκών ιδιοτήτων τους όσον αφορά την αντιμετώπιση της λευχαιμίας. Τέτοιου τύπου L-ASNases ανήκουν στα βακτηριακά στελέχη (Magdy and Al-Omair, 2008): *E. coli* (Khushoo et al., 2004; Derst et al., 1994), *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia and Labrou, 2007) *Erwinia caratovora* (Aghaipour et al., 2001), *Enterobacter aerogenes* (Mukherjee et al., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (El-Bessoumy et al., 2003), *Candida utilis* (Kil et al., 1995), *Thermus thermophilus* (Prista and Kyridio, 2001),

Staphylococcus aureus (Muley et al., 1998). Κρίνεται αναγκαίο και σκόπιμο να αναφέρουμε, ότι οι L-ASNases II απαντώνται και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και μάλιστα στα φυτά είναι και επιφορτισμένες με σημαντικούς ρόλους, όπως για παράδειγμα εμπλέκονται στη διαδικασία θρέψης του φυτού με τον μεταβολισμό του αζώτου (Sodek et al., 1980; El-Shora et al., 2005; Cho et al., 2007).

1.4 Συστήματα ενδοκυτταρικής μεταφοράς ενζύμων στον περιπλασμικό χώρο της *E.coli*.

1.4.1 Εισαγωγή.

Καθώς οι L-ASNases, οι οποίες συσπειρώνουν το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον ανήκουν στον τύπο II και κατ'επέκταση, μεταφέρονται στο περίπλασμα με τη βοήθεια του πεπτιδίου οδηγού τους, κρίνεται αναγκαίο να αναφερθούμε στους μηχανισμούς εκείνους, οι οποίοι εμπλέκονται και κατευθύνουν ένα ένζυμο στο περίπλασμα. Για το λόγο του ότι, στη πλειονότητα των εφαρμογών και των περιπτώσεων ετερόλογης έκφρασης, χρησιμοποιούμε το σύστημα έκφρασης του βακτηριακού στελέχους *E. coli*, θα περιοριστούμε στην αναφορά των μηχανισμών μεταφοράς μόνο της *E. coli*. Θα ήταν όμως, προχειρότητα να θεωρήσουμε ότι μόνο στην *E.coli* απαντώνται οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί. Όλοι οι προκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν τους δικούς τους μηχανισμούς μεταφοράς ενζύμων στον περιπλασμικό χώρο. Οι διαδικασίες μεταφοράς, δεν εξυπηρετούν μόνο τη μεταφορά πρωτεϊνών και ενζύμων στο περίπλασμα, αλλά παράλληλα οδηγούν προς το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου ανεπιθύμητες τοξίνες και διάφορους παράγοντες παθογένειας (Fernandez and Berenguer, 2000).

Γενικά στα Gram αρνητικά βακτήρια όπως το *E. coli*, υπάρχουν 5 μηχανισμοί μεταφοράς, ή διαφορετικά, 5 μονοπάτια μεταφοράς (secretion pathways), τα οποία διαφέρουν σημαντικά. Τα συστήματα αυτά όμως έχουν κοινή την ανάγκη της εξειδικευμένης αναγνώρισης του μορίου, το οποίο πρέπει να μεταφερθεί (Koster et al., 2000). Ειδικότερα, τα συστήματα χωρίζονται σε 5 τύπους: I, II, III, IV, και V. Ο τύπος III είναι χαρακτηριστικός των παθογενών Gram αρνητικών

βακτηρίων (Cornelis and Van Gijsegem, 2000). Ο τύπος IV, έχει επικρατήσει κυρίως σε βακτηριακά συστήματα σύζευξης (Pallen et al., 2003; Christie et al., 2001), ενώ ο μηχανισμός τύπου V σχετίζεται με αυτομεταφορείς και συστήματα μεταφοράς, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους (Pallen et al., 2003; Jacob-Dubuisson et al., 2001). Οι τύποι I και II σχετίζονται άμεσα με τη μεταφορά ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στη περίπτωση που χρησιμοποιείται ως σύστημα έκφρασης η *E. coli* και τα διάφορα στελέχη της και για το λόγο αυτό οι 2 αυτοί τύποι θα περιγραφούν στη συνέχεια όσο πιο περιεκτικά και μεστά γίνεται. Τα ένζυμα μεταφέρονται απο το κυτταρόπλασμα στον περιπλασμικό χώρο και απο εκεί με ποικίλλους τρόπους εξωτερικά του κυττάρου. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το κάθε μονοπάτι μεταφοράς αποτελείται απο μια πληθώρα επιμέρους πρωτεϊνικών και μη, παραγόντων, οι οποίοι δύναται να δρουν ξεχωριστά ή σε σύμπλοκα και πολλές φορές ο χαρακτηρισμός και η μελέτη τους είναι πάρα πολύ δύσκολος έως αδύνατος.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι είναι απολύτως επιθυμητή η μεταφορά των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών κατά την ετερόλογη έκφραση στον περιπλασμικό χώρο και απο κεί στο θρεπτικό μέσο. Η διαδικασία βέβαια αυτή, εξαρτάται άμεσα απο μια σειρά παραγόντων, οι οποίοι αλληλοεπηρεάζονται και καθιστούν το συνολικό σύστημα ιδιαίτερα πολύπλοκο. Για παράδειγμα, ένζυμα των οποίων ο άγριος τύπος διαθέτει πεπτιδιο οδηγό, όταν υπερεκφράζονται στο σύστημα της *E. coli*, δεν παρατηρείται εξωκυττάρια έκκριση των ενζύμων αυτών. Αντίθετα, όταν προσαρμόσουμε το πεπτιδιο οδηγό ενός ενζύμου μέσω σύντηξης, σε κάποιο άλλο ένζυμο, του οποίου ο άγριος τύπος δεν διαθέτει πεπτιδιο οδηγό και εκφράσουμε στην *E. coli*, τότε παρατηρούμε εξωκυττάρια έκκριση (Tan 16 et al., 2001). Όπως γίνεται αντιληπτό, ολόκληρος ο μηχανισμός αναγνώρισης του ενζύμου και ειδικότερα του πεπτιδίου οδηγού που διαθέτει το συγκεκριμένο ένζυμο, απο τους πρωτεϊνικούς παράγοντες του εκάστοτε μονοπατιού μεταφοράς, η μεταφορά του ενζύμου απο το κυτταρόπλασμα στο περίπλασμα και απο κει ενδεχομένως εξωκυττάρια στο θρεπτικό υλικό, αποτελεί μια ιδιαίτερος πολύπλοκη και σύνθετη διαδικασία. Μπορεί ακόμη κανείς να αναλογιστεί την επιπλέον πολυπλοκότητα λαμβάνοντας υπόψη, ότι τα παραπάνω συστήματα και μονοπάτια μεταφοράς είναι άρρηκτα συνδεδεμένα και λειτουργούν ανα πάσα στιγμή υπο την άριστη και απόλυτη συνεργασία με τους μηχανισμούς μετάφρασης.

1.4.2 Πλεονεκτήματα μεταφοράς των πρωτεϊνών στον περιπλασμικό χώρο.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών στον περιπλασμικό 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 περιπλασμικό 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 από τους παράγοντες που αναφέραμε παραπάνω και όχι μόνο (PNGaseF). 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 περιπλασμικό 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 περιπλασμικό 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.

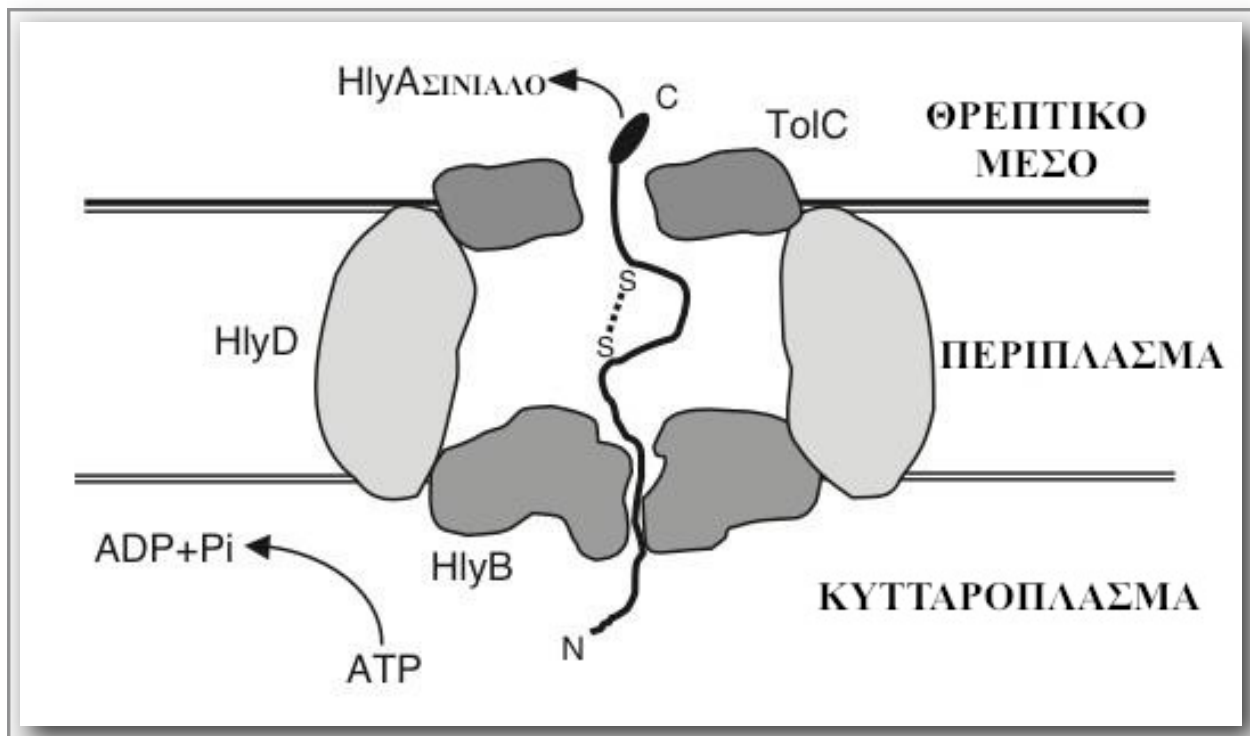
Σε αυτό το σημείο κρίνεται αναγκαίο να ειπωθεί, ότι η μεταφορά των ενζύμων στον περιπλασμικό χώρο αποτελεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία και για το λόγο αυτό δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις όπου παρατηρούνται προβλήματα. Τα πιο συχνά προβλήματα σχετίζονται με ημιτελή μεταφορά των πρωτεϊνών διαμέσω της εσωτερικής μεμβράνης (Baneyx, 1999), ανεπαρκής ανταπόκριση των συστημάτων μεταφοράς και εξαγωγής στο θρεπτικό μέσο (Mergulhao and Monteiro, 2004) και πρωτεολυτική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Huang et al., 2001). Επίσης διάφοροι παράγοντες δύνανται να σχετίζονται με την αποτελεσματική μεταφορά των ανασυνδυασμένων ενζύμων. Ειδικότερα, έχουν δημοσιευθεί περιπτώσεις, όπου το μέγεθος

του πρωτεϊνικού μορίου σχετίζεται άμεσα με την απόδοση της μεταφοράς (Koster et al., 2000; Palacios et al., 2001), όπως επίσης και ότι μεγάλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες είναι αδύνατον να μεταφερθούν διαμέσου των μεμβρανών (Baneyx, 1999; Feilmeier et al., 2000). Ακόμη, πολύ καθοριστικός παράγοντας είναι η αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού, με το οποίο θα αλληλεπιδράσουν και θα προσδεθούν οι διάφοροι παράγοντες των συστημάτων μεταφοράς (Belin et al., 2004; Khokhlova and Nesmeyanova, 2004).

1.4.3 Μηχανισμός μεταφοράς τύπου I.

Ο μηχανισμός αυτός μεταφοράς, σχετίζεται με τη μεταφορά πρωτεϊνών απευθείας διαμέσω των δύο εσωτερικών μεμβρανών του *E. coli*, χωρίς την μεσολάβηση του περιπλασματικού χώρου ως ενδιάμεσο σταθμό (Binet et al., 1997). Το *E. coli* συνήθως χρησιμοποιεί τον συγκεκριμένο τύπο μηχανισμού μεταφοράς, στις περιπτώσεις υψηλού μοριακού βάρους τοξινών και εξωκυτταρικών ενζύμων (Fernandez and de Lorenzo, 2001). Ο μηχανισμός μεταφοράς τύπου I αποτελείται από δύο πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των ATP binding cassette (ABC) και είναι οι HlyB και HlyD και επίσης από μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, η οποία ονομάζεται TolC (Fernandez and de Lorenzo, 2001; Gentschev et al., 2002; Koronakis, 2003). Οι δύο πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης σχηματίζουν ένα σταθερό σύμπλοκο, το οποίο προσδέεται στο πεπτίδιο οδηγό του ανασυνδυασμένου ενζύμου. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο οδηγός, θα πρέπει να διαθέτει μια κατάλληλη αμινοξική αλληλουχία, η οποία θα είναι ικανή να αλληλεπιδράσει με το σύμπλοκο ώστε να προσδεθεί. Η αλληλουχία αυτή καλείται HlyA. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε, ότι η αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόσδεση με τους πρωτεϊνικούς παράγοντες των μηχανισμών μεταφοράς και ειδικότερα σχετίζεται άμεσα με τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και τις δυνάμεις που αναπτύσσονται και είναι απόρροια του συνδυασμού σύνδεσης των αμινοξικών καταλοίπων. Έτσι ο τύπος HlyA του πεπτιδίου οδηγού, εκφράζει τις αλληλουχίες εκείνες, οι οποίες διαθέτουν τις απαιτούμενες ιδιότητες, έτσι ώστε να δύναται η πρόσδεσή τους με το σύμπλοκο HlyB - HlyD. Η μεταφορά του συμπλόκου με το πεπτίδιο οδηγό

διαμέσω του καναλιού που δημιουργείται απο την επιπλέον παρουσία του πρωτεϊνικού τριμερούς TolC, απαιτεί τη παρουσία ATP, το οποίο υδρολύεται απο την HlyB για την εξασφάλιση της απαιτούμενης ενέργειας μεταφοράς (Εικόνα 1.6). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι δεν απαιτείται ATP για τη δημιουργία του αρχικού συμπλόκου HlyB - HlyD - πεπτιδιο οδηγός (Thanabalu et al., 1998). Ο τρόπος, με τον οποίο δομείται ολόκληρος ο μηχανισμός επιτρέπει στην πρωτεϊνική αλληλουχία να συνδέει τις δύο μεμβράνες, την εσωτερική και την εξωτερική. Μετά τη μεταφορά του ενζύμου, το τριμερές TolC αποσυνδέεται απο το σύμπλοκο HlyB - HlyD.

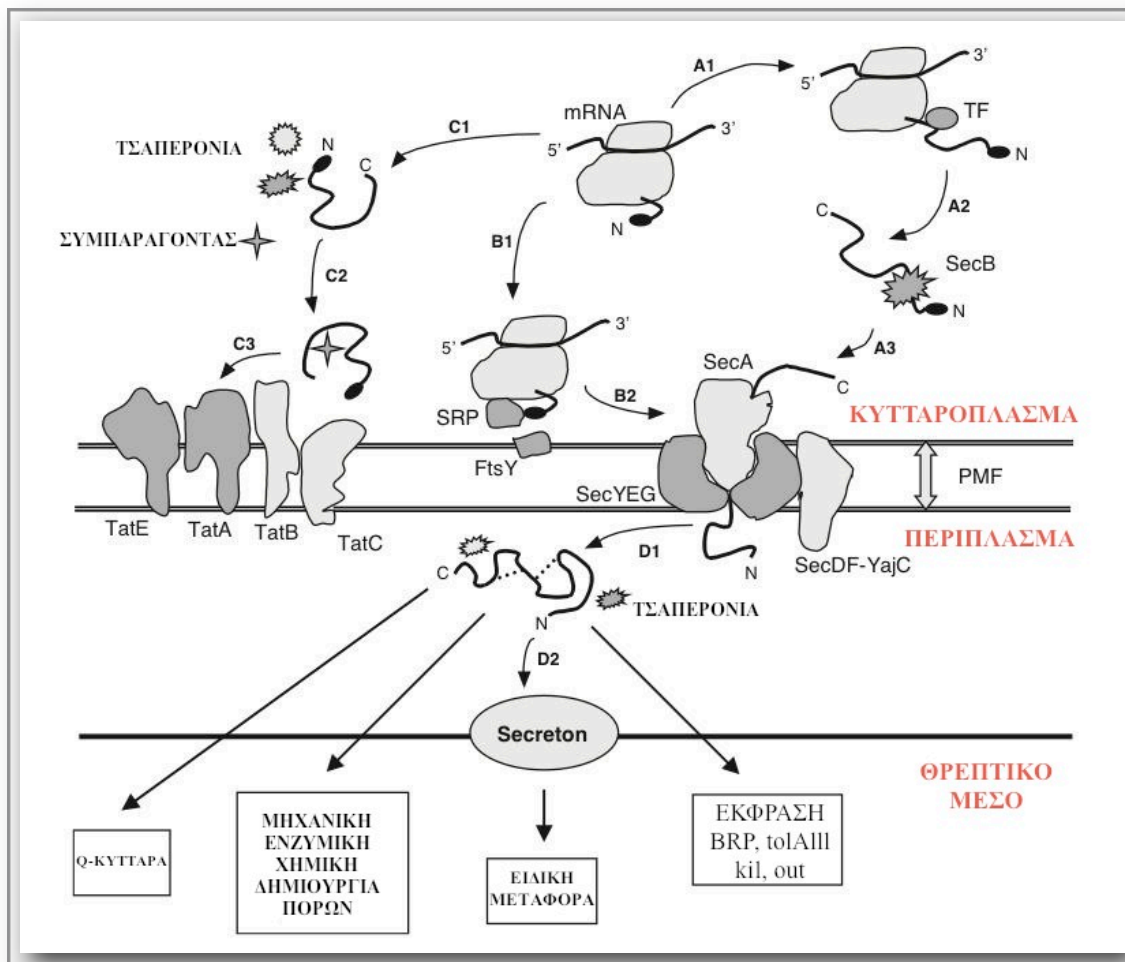


Εικόνα 1.6 Ο μηχανισμός μεταφοράς τύπου I στο *E. coli*. Παρατηρούμε τη σύνδεση του τριμερούς TolC με το σύμπλοκο HlyB - HlyD - πρωτεΐνη (Mergulhao et al., 2005).

Κατά τη διάρκεια μεταφοράς, διαμέσω του δημιουργούμενου καναλιού απο τους πρωτεϊνικούς παράγοντες, πραγματοποιείται και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι συνεισφέρουν στη σταθερότητα της τεταρτοταγούς δομής του ενζυμικού μορίου. Παρά το γεγονός ότι ο τύπος I μεταφοράς διαθέτει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως μεταξύ άλλων το γεγονός ότι μπορεί να μεταφέρει στο θρεπτικό μέσο πολύ μεγάλες πρωτεΐνες (εως 4000 αμινοξέα) (Sapriel et al., 2003). Επίσης η δυνατότητα δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών αποτελεί ένα απο τα σημαντικότερα θετικά στοιχεία του μηχανισμού αυτού. Ταυτόχρονα, διαθέτει και δύο πολύ σημαντικά μειονεκτήματα. Το πρώτο είναι ότι, το πεπτιδίο οδηγός της πρωτεΐνης, η οποία μεταφέρεται, δεν απομακρύνεται απο πρωτεάσες, με αποτέλεσμα να απαιτείται μια επιπλέον διαδικασία απομάκρυνσης του πεπτιδίου κατόπιν της μεταφοράς (Blight and Holland, 1994), και δεύτερον, απαιτείται ταυτόχρονα με την υπερέκφραση της υπο-μελέτη πρωτεΐνης, μια παράλληλη υπερέκφραση των πρωτεϊνικών παραγόντων, οι οποίοι μετέχουν στο σύστημα μεταφοράς, ώστε να δύναται η αποτελεσματική και αποδοτική αλληλεπίδραση και μεταφορά του γονιδιακού προϊόντος (Shokri et al., 2003). Τέλος αξίζει να αναφερθεί το γεγονός, ότι έχουν δημοσιευθεί αρκετές περιπτώσεις όπου ο τύπος I μεταφοράς επηρεάζεται απο την ύπαρξη πρωτεϊνικών παραγόντων διαφορετικών μηχανισμών μεταφοράς όπως για παράδειγμα του SecB μηχανισμού (Sapriel et al., 2002, 2003).

1.4.4 Μηχανισμός μεταφοράς τύπου II.

Ο μηχανισμός μεταφοράς τύπου II χαρακτηρίζεται απο μια διαδικασία, η οποία αποτελείται απο δύο βήματα όσον αφορά την εξωκυττάρια έκκριση των πρωτεϊνών στο θρεπτικό μέσο. Αυτό σημαίνει ότι, κατά τη διάρκεια μεταφοράς ενός ενζύμου απο το κυτταρόπλασμα προς το θρεπτικό μέσο, μεσολαβεί και ο περιπλασμικός εντοπισμός του ενζύμου αυτού πρίν την εξωκυττάρια έκκριση (Koster et al., 2000). Στον τύπο II υπάγονται 3 διαφορετικά μονοπάτια μεταφοράς: το SecB, το TAT και το SRP. Το τελικό βήμα εξωκυττάριας έκκρισης περιλαμβάνει εξειδικευμένες πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται “secretion”. Συνολικά οι μηχανισμοί μεταφοράς τύπου II απεικονίζονται συνοπτικά στην Εικόνα 1.7.



Εικόνα 1.7 Συνοπτική απεικόνιση των τριών μηχανισμών μεταφοράς τύπου II.

1.4.4.1 Μονοπάτι SecB.

Το μονοπάτι SecB σχετίζεται με τη πλειονότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες μεταφέρονται στο περίπλασμα, και απο κει πιθανότατα με κάποιο τρόπο στο θρεπτικό μέσο. Οι πρωτεϊνικοί παράγοντες που συνθέτουν τον συγκεκριμένο μηχανισμό, λειτουργούν μεταμεταφραστικά, αλλά κατά τη διάρκεια της μετάφρασης εξειδικευμένες πρωτεΐνες του μηχανισμού, προσδένονται στα ριβοσώματα (Maier et al., 2003) με σκοπό να εμποδίσουν τους

αντίστοιχους πρωτεϊνικούς παράγοντες του SRP μηχανισμού να προσδεθούν στα ριβοσώματα και να εκκινήσουν τις διαδικασίες μεταφοράς καθώς ο SRP μηχανισμός λειτουργεί συν-μεταφραστικά (Beck et al., 2000; Maier et al., 2003). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του πρωτεϊνικού μορίου από τους παράγοντες του κάθε μηχανισμού και ειδικότερα του κάθε μονοπατιού, παίζει η αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού. Με άλλα λόγια, εκείνο, το οποίο διαφοροποιεί τη πρόσδεση μιας πρωτεΐνης στους πρωτεϊνικούς παράγοντες του ενός ή του άλλου μονοπατιού, είναι η αλληλουχία και οι ιδιότητες του πεπτιδίου οδηγού. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι το πεπτίδιο οδηγός φέρει το σινιάλο πρόσδεσης στον κατάλληλο πρωτεϊνικό παράγοντα και κατ'έκταση την εμπλοκή του ενζύμου στο σωστό μονοπάτι.

Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες, οι οποίες μεταφέρονται στο περίπλασμα μέσω του SecB μονοπατιού διαθέτουν ένα N-τελικό πεπτίδιο οδηγό, το οποίο διαθέτει συνήθως 18-30 αμινοξικά κατάλοιπα και χαρακτηρίζεται συνολικά από μια συγκεκριμένη δομή: ένα θετικά φορτισμένο N-τελικό άκρο, έναν κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα και μια πολική C-τελική περιοχή (Choi and Lee, 2004; Fekkes and Driessen, 1999). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι καθεμία από αυτές τις διαφορετικές περιοχές του πεπτιδίου οδηγού, διαδραματίζει το δικό της ρόλο στη πρόσδεση και τη μεταφορά της πρωτεΐνης προς το περίπλασμα. Για παράδειγμα, η θετικά φορτισμένη αλληλουχία του N-τελικού άκρου συνεισφέρει στη πρόσδεση του μορίου στην αρνητικά φορτισμένη μεμβρανική επιφάνεια. Αύξηση της ισχύος του θετικού φορτίου αυτής της περιοχής, έχει συντελέσει στην αύξηση των επιπέδων μεταφοράς (Fekkes and Driessen, 1999; Wang et al., 2000). Ανάλογο ρόλο διαδραματίζει και η κεντρική υδρόφοβη περιοχή, όπου αυξημένη υδροφοβικότητα συντελεί επίσης σε αυξημένες αποδόσεις μεταφοράς (Wang et al., 2000).

Οι κύριοι πρωτεϊνικοί παράγοντες, οι οποίοι εμπλέκονται στο συγκεκριμένο μονοπάτι μεταφοράς είναι το τσαπερόνιο SecA, το τσαπερόνιο SecB καθώς επίσης και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο SecYEG. Ειδικότερα το SecB προσδέεται στην πρωτεϊνική αλληλουχία με σκοπό να εμποδίσει την έναρξη του μηχανισμού της αναδίπλωσης πριν το πέρας της μετάφρασης (Khokhlova and Nesmeianova, 2003) και ταυτόχρονα τη προσανατολίζει προς το τσαπερόνιο SecA, ενώ ήδη ένας άλλος παράγοντας (trigger factor) έχει προσδεθεί εμποδίζοντας την ενδεχόμενη εμπλοκή πρωτεϊνικών παραγόντων από διαφορετικά μονοπάτια. Ακριβώς σε αυτό το

σημείο έγκειται η σημασία του πεπτιδίου οδηγού, το οποίο αναγνωρίζεται εξειδικευμένα απο το SecA. Το SecA είναι προσδεμένο στην υπομονάδα SecY του συμπλόκου SecYEG και παράλληλα στο SecA έχει προσδεθεί και ένα μόριο ATP, το οποίο υδρολύεται, με αποτέλεσμα το τσαπερόνιο SecB να απελευθερώνεται απο τη μεμβράνη (Εικόνα 1.7). Παράλληλα με την απελευθέρωση του SecB απο την μεμβράνη μετά την υδρόλυση του ATP, απελευθερώνεται και η πρωτεϊνική αλληλουχία εντός του καναλιού, το οποίο σχηματίζεται απο τα τσαπερόνια του μονοπατιού. Η πρωτεΐνη πλέον οδεύει προς τον περιπλασμικό χώρο, όπου θα αποκτήσει τη τελική της τεταρτοταγή διαμόρφωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το τσαπερόνιο SecA φαίνεται να παίζει καθοριστικότατο ρόλο στην όλη διαδικασία μεταφοράς και ένας απο τους βασικότερους ερευνητικούς στόχους, αποτελεί η προσπάθεια υπερπαραγωγής της πρωτεΐνης SecA, με σκοπό την αύξηση των επιπέδων μεταφοράς. Η συγκεκριμένη προσπάθεια όμως αναστέλλεται απο το γεγονός ότι η έκφραση της πρωτεΐνης SecA αυτο-ρυθμίζεται με το να προσδένεται η ίδια πρωτεΐνη στο δικό της mRNA, κάτι που πρέπει να αντιμετωπιστεί ώστε να υπερπαραχθεί. Κλείνοντας, δε θα πρέπει να παραλείψουμε την αναφορά του βασικού μειονεκτήματος του μονοπατιού αυτού, το οποίο είναι ότι ο μηχανισμός του, δεν δύναται να υποστηρίξει τη μεταφορά πλήρως αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, πρωτεΐνες, οι οποίες αναδιπλώνονται ταχύτατα στο κυτταρόπλασμα, ίσως να μην μπορούν να μεταφερθούν ακολουθώντας το συγκεκριμένο μονοπάτι. Σε αυτές τις περιπτώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα δύο επόμενα μονοπάτια, ήτοι το TAT και το SRP.

1.4.4.2 Μονοπάτι SRP.

Το μονοπάτι SRP (signal recognition particle), χρησιμοποιείται απο το *E. coli* κυρίως για τη στόχευση και μεταφορά πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης (Economidou, 1999). Έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις μεταφοράς ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Μάλιστα έχουν ταυτοποιηθεί και ορισμένα πεπτίδια οδηγοί, τα οποία ακολουθούν το συγκεκριμένο μονοπάτι και για αυτό το λόγο έχουν συντηχθεί με πρωτεΐνες με σκοπό την κατευθυνόμενη μεταφορά τους εντός του *E. coli*. Τέτοια πεπτίδια είναι το MtlA-OmpA, το MalF-LacZ, της

ακετυλ-τρανσφεράσης της χλωραμφαινικόλης. Το μονοπάτι SRP αποτελείται, όπως και το SecB, από διάφορους πρωτεϊνικούς παράγοντες, οι οποίοι αναγνωρίζουν το σινιάλο του πεπτιδίου οδηγού της πρωτεΐνης. Το χαρακτηριστικό αυτών των πεπτιδίων οδηγών είναι η υψηλή υδροφοβικότητα του συνόλου της αλληλουχίας του πεπτιδίου, σε αντίθεση με τη περίπτωση του SecB, όπου απαιτείται επίσης και ένα θετικό και ένα πολικό φορτίο στα δύο άκρα αντίστοιχα. Ειδικότερα, πειράματα έδειξαν την θετική εξάρτηση μεταξύ της αυξημένης υδροφοβικότητας και των επιπέδων μεταφοράς (Fekkes and Driessen, 1999). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες του μονοπατιού αυτού αλληλεπιδρούν με τη προς μεταφορά πρωτεΐνη συνμεταφραστικά και για το λόγο αυτό, βασικός παράγοντας του SRP αποτελεί ένα μόριο 4.5S RNA (Herskovits et al., 2000). Οι κύριοι πρωτεϊνικοί παράγοντες του SRP είναι το 4.5S RNA, ο Ffh, ο FtsY, το σύμπλοκο SecAYEG και ο YidC. Παρατηρούμε ότι κατά τη διάρκεια δράσης των μηχανισμών μεταφοράς, μπορεί να έχουμε και κάποιο είδος συνέργειας μεταξύ τους.

1.4.4.3 Μονοπάτι TAT.

Το μονοπάτι TAT (two arginine translocation) εμπλέκεται στη μεταφορά πρωτεϊνών, τα πεπτίδια οδηγοί των οποίων διαθέτουν δύο διαδοχικές και υψηλώς συντηρημένες αργινίνες (Santini et al., 1998; Sargent et al., 1998). Ο μηχανισμός του μονοπατιού αυτού έχει την ικανότητα μεταφοράς πρωτεϊνών προς το περίπλασμα διαμέσω της εσωτερικής μεμβράνης, οι οποίες είναι πλήρως αναδιπλωμένες και μάλιστα χωρίς την απαίτηση ATP (Stanley et al., 2000; Yahr and Wickner, 2001; Bogsch et al., 1998; Santini et al., 1998). Οι βασικοί πρωτεϊνικοί παράγοντες του μονοπατιού αυτού, οι οποίοι συνθέτουν το διαμεμβρανικό κανάλι μεταφοράς, καθώς και τα σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες-υποστρώματα είναι: ο TatA, TatB, TatC, TatD, TatE. Ο επιμέρους ρόλος αυτών των συμπαραγόντων δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη, αν και η λειτουργία τους σε επίπεδο συμπλόκων έχει προσδιοριστεί. Τα πεπτίδια-οδηγοί στη περίπτωση του TAT μονοπατιού διαθέτουν παρόμοια δομή με εκείνα του SecB μονοπατιού, με τη διαφορά ότι αριθμούν κατά μέσο όρο 14 επιπλέον αμινοξικά κατάλοιπα. Τέλος, το TAT μονοπάτι έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως σε περιπτώσεις μεταφοράς αντισωμάτων (De Lisa et al., 2003).

1.4.5 Εξωκυττάρια Πρωτεϊνική Έκκριση.

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. Σε αυτό το σημείο, κρίνεται αναγκαίο να αναφέρουμε, ότι η εξωκυττάρια μεταφορά στο θρεπτικό μέσο, εν τέλει αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία και οι μηχανισμοί, με τους οποίους πραγματοποιείται ποικίλλουν. Οι πρωτεΐνες δύναται να φτάσουν στο θρεπτικό μέσο, μέσω της απελευθέρωσης του περιπλασμικού περιεχομένου λόγω λύσης της εξωτερικής μεμβράνης, από τον μηχανισμό τύπου I ή από τον μηχανισμό τύπου II που μόλις αναλύθηκε παραπάνω (1.4.4). Λόγω του ότι η συντριπτική πλειοψηφία των ανασυνδρασμένων πρωτεϊνών μεταφέρονται μέσω του συστήματος II, θα επικεντρωθούμε στην επιγραμματική αναφορά του τελικού σταδίου μεταφοράς του συστήματος II. Η τελική μεταφορά μιας πρωτεΐνης στη περίπτωση αυτή στο θρεπτικό μέσο, πραγματοποιείται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο (secreton), το οποίο αποτελείται από 12-16 πρωτεΐνες (Lory, 1998; Pugsley et al., 1997; Sandkvist, 2001). Έχει αποδειχθεί ότι το σύμπλοκο αυτό είναι υψηλώς συντηρημένο στα Gram-αρνητικά βακτήρια και ο ρόλος του κάθε πρωτεϊνικού παράγοντα, δεν έχουν ακόμη εξακριβωθεί (Nouwen et al., 1999, 2000; Possot et al., 2000; Sandkvist, 2001). Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι όταν οι πρωτεΐνες φτάσουν στο περίπλασμα, πρέπει να διαμορφώσουν την τελική τους τεταρτοταγή ή ακόμη και πεμπτοταγή διαμόρφωση, έτσι ώστε να αναγνωριστούν από το σύμπλοκο.

Εκτός όμως του συμπλόκου αυτού, η εξωκυττάρια έκκριση μπορεί να επιτευχθεί και από τη δημιουργία πόρων του περιπλάσματος (del Castillo et al., 2001; Rinas and Hoffmann, 2004), η οποία επάγεται από διάφορες αιτίες. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, το περιπλασμικό περιεχόμενο μπορεί να διαχυθεί στο θρεπτικό μέσο, πριν τον σχηματισμό της νέας εξωτερικής μεμβράνης (Mergulhao et al., 2004a). Επιπλέον, η αυξανόμενη συγκέντρωση της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης στο περίπλασμα, μπορεί να αποτελέσει την κινητήριο δύναμη μεταφοράς προς το θρεπτικό μέσο, έτσι ώστε οδηγηθεί το σύστημα σε αποσυμφόρηση (Hasenwinkle et al., 1997). Ακόμη, η υψηλή συγκέντρωση προϊόντος στο

περίπλασμα, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πόρων της εξωτερικής μεμβράνης (Pugsley et al., 1997), με αποτέλεσμα την εξαγωγή προς το θρεπτικό μέσο. Τέλος, ιδιαίτερα σε πολύωρες κυτταρικές βακτηριακές καλλιέργειες, είναι δυνατόν να επαχθεί περιπλαστική λύση και απελευθέρωση του πρωτεϊνικού φορτίου στο θρεπτικό μέσο (Lee et al., 2001). Όπως γίνεται άμεσα και εύκολα αντιληπτό, υπάρχει μια πληθώρα τρόπων, με τους οποίους οι πρωτεΐνες οδηγούνται τελικά στο θρεπτικό μέσο, κάτι το οποίο είναι απολύτως επιθυμητό και αποτελεί τον απώτερο σκοπό κάποιου, ο οποίος μελετά και σχεδιάζει μια εφαρμογή εξωκυττάριας έκκρισης.

Στις προηγούμενες παραγράφους αναφερθήκαμε αρχικά στη δομή και τη λειτουργία του ενζύμου που μελετήθηκε, δηλαδή στην L-ASNase, όπως επίσης και στους λόγους για τους οποίους το συγκεκριμένο ένζυμο συσπειρώνει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Κατόπιν, αναλύσαμε σε μοριακό επίπεδο τους μηχανισμούς, με τους οποίους μια πρωτεΐνη ή ένα ένζυμο δύναται να οδηγηθεί στον περιπλαστικό χώρο και απο κεί στο θρεπτικό μέσο εξωτερικά του κυττάρου του *E. coli*, το οποίο χρησιμοποιείται ως επι το πλείστον σαν σύστημα ετερόλογης έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Αναφέραμε, ότι ένα από τα πλεονηκτήματα της εξωκυττάριας έκκρισης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, μεταξύ άλλων, είναι το γεγονός ότι διευκολύνεται η κατιούσα επεξεργασία και η απομόνωση σε καθαρή μορφή της πρωτεΐνης που εκφράζεται. Ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία της κατιούσας επεξεργασίας, αποτελεί η *χρωματογραφία*. Λόγω του ότι ένας από τους βασικότερους σκοπούς της παρούσας εργασίας, ήταν η βελτιστοποίηση του καθαρισμού της L-ASNase από το στέλεχος *Erwinia chrysanthemi*, σε όσο το δυνατόν καθαρότερη μορφή εφαρμόζοντας μεθόδους χρωματογραφίας, κρίνεται αναγκαία η αναφορά σε αυτές τις μεθόδους.

1.5 Κατιούσα επεξεργασία και Χρωματογραφία.

Η κατιούσα επεξεργασία (downstream processing) περιλαμβάνει τα στάδια εκείνα, τα οποία μεσολαβούν μετά την παραγωγή του ενζύμου και σκοπός τους είναι, να απομονωθεί και να καθαριστεί το παραγόμενο ένζυμο που μας ενδιαφέρει, στον επιθυμητό βαθμό (Κλώνης Ι., 1997). Πρίν γίνει αναφορά και ανάλυση των κυριότερων μεθόδων χρωματογραφίας, κρίνεται αναγκαίο να θιχτεί αρχικά, η ταξινόμηση της κατιούσας επεξεργασίας. Η επιλογή ενός πρωτοκόλλου κατιούσας επεξεργασίας είναι πάντοτε άρρηκτα συνδεδεμένο με τους στόχους καθαρισμού και απομόνωσης που έχουν τεθεί κάθε φορά. Τυπικά ένα πρωτόκολλο κατιούσας επεξεργασίας, θα μπορούσε να διακριθεί σε 4 στάδια. Στο *αρχικό στάδιο*, παραλαμβάνουμε τα κύτταρα της καλλιέργειας συνήθως με φυγοκέντρηση ή διήθηση. Στη συνέχεια ακολουθεί διάρρηξη των κυττάρων εφαρμόζοντας διαφόρων τύπων τεχνικές (μηχανικές ή μη). Σαν τελευταίο μέρος του αρχικού σταδίου, επίσης με φυγοκέντρηση ή διήθηση, απομακρύνουμε όλα τα στερεά που προκύπτουν (μεμβράνες, κυτταρικά θραύσματα, κ.τ.λ.) από τις προηγούμενες διαδικασίες (Κλώνης Ι., 1997).

Το *δεύτερο στάδιο* θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως στάδιο χαμηλού καθαρισμού, όπου με ενζυμική υδρόλυση και κατακρήμνιση απομακρύνονται τα νουκλεϊκά οξέα, όπως επίσης και μέρος των πρωτεϊνών ακολουθώντας ένα διφασικό σύστημα κατανομής (Κλώνης Ι., 1997). Το *τρίτο στάδιο* χαρακτηρίζεται ως στάδιο υψηλού καθαρισμού, το οποίο περιλαμβάνει την υγρή χρωματογραφία στήλης και επιτυγχάνεται ο τελικός καθαρισμός του ενζύμου που μας ενδιαφέρει. Οι τεχνικές υγρής χρωματογραφίας στήλης είναι κυρίως τρεις: η χρωματογραφία διαπερατότητας ή μοριακού ηθμού (gel permeation ή gel filtration), η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (ion exchange chromatography) και η χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography) (Κλώνης Ι., 1997). Στο *τέταρτο και τελευταίο στάδιο* της κατιούσας επεξεργασίας πραγματοποιείται συμπύκνωση του προϊόντος, απομάκρυνση διάφορων μικρομοριακών ουσιών ή ακόμη και κάποιων τοξικών ουσιών που πιθανότατα να παρέμειναν στο δείγμα και τελική σταθεροποίηση και συσκευασία του προϊόντος. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο στάδιο αυτό είναι κυρίως η υπερδιήθηση και η κατακρήμνιση (Κλώνης Ι., 1997).

Ένα απο τα δυσκολότερα στάδια της κατιούσας επεξεργασίας, αποτελεί το στάδιο υψηλού καθαρισμού. Στο στάδιο αυτό, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε φορά του ενζύμου, το οποίο επιθυμούμε να απομονώσουμε και να καθαρίσουμε και αναλόγως να αναπτύξουμε και να εφαρμόσουμε το πρωτόκολλο καθαρισμού. Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός, ότι πολλές φορές στη πράξη, δεν λαμβάνουμε τα αναμενόμενα αποτελέσματα απο τον καθαρισμό, με αποτέλεσμα ο επανασχεδιασμός και η εφαρμογή τροποποιήσεων στο πρωτόκολλο, να αποτελεί επιτακτική και άμεση ανάγκη. Θα λέγαμε, ότι ένας βελτιστοποιημένος καθαρισμός προκύπτει πειραματικά και όχι θεωρητικά, απλά αναλύοντας τις ιδιότητες ενός ενζυμικού μορίου και διαμορφώνοντας ένα πρωτόκολλο καθαρισμού. Για παράδειγμα, είναι πολλές φορές σύνηθες το φαινόμενο, να μην μπορούμε να απομονώσουμε κάποιο ένζυμο με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής παρά μόνο με χρωματογραφία συγγένειας και ας έχουμε αναπτύξει μια ολοκληρωμένη, θεωρητική προσέγγιση για την χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Λαμβάνοντας υπόψη την σημασία και τη πολυπλοκότητα του σταδίου υψηλού καθαρισμού της κατιούσας επεξεργασίας, θα αναφερθούμε στη συνέχεια στις δύο πιο συνήθεις μεθόδους χρωματογραφίας, που εφαρμόζουμε σε εργαστηριακό επίπεδο, την χρωματογραφία συγγένειας και χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.

1.5.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.

Η χρωματογραφία αυτού του τύπου, αποτελεί μια απο 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 Ι., 1997). 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 ιδιότητες αυτές αποτελούν τη βάση διαμόρφωσης και ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, καθώς θα εξαρτηθεί το είδος του ιοντοανταλλάκτη που θα χρησιμοποιήσουμε. Ένα αρνητικά φορτισμένο ενζυμικό μόριο, θα προσροφηθεί σε έναν *ανιοντοανταλλάκτη*. Αντίθετα, ένα θετικά φορτισμένο μόριο, θα προσροφηθεί σε έναν *κατιοντοανταλλάκτη*. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι κάθε φορά θα πρέπει να γνωρίζουμε τη τιμή pI ενός ενζύμου, όπως επίσης και τις τιμές pH τις οποίες μπορεί να

<<ανεχτεί>> ένα ένζυμο έτσι ώστε να μην απηλειθεί η λειτουργικότητά του. Η γνώση και η οριοθέτηση των τιμών αυτών, θα αποτελέσουν τη βάση πάνω στην οποία θα στηριχθεί η επιλογή ενός κατάλληλου κατιοντοανταλλάκτη/ανιοντοανταλλάκτη και η διαμόρφωση του πρωτοκόλλου καθαρισμού. Πολύ σημαντικό ρόλο στην επιλογή του ιοντοανταλλάκτη, παίζουν και οι χημικές ιδιότητές του, οι οποίες με τη σειρά τους όπως είναι φυσικό, εξαρτώνται από τη χημική ομάδα του ανταλλάκτη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι ιοντοανταλλάκτες να διαιρούνται σε ασθενείς και σε ισχυρούς και οι ειδικότερα, οι διαφορές τους απορρέουν από το εύρος pH, στο οποίο διατηρούν το φορτίο τους (Κλώνης Ι., 1997). Ένας ισχυρός ιοντοανταλλάκτη διατηρεί το φορτίο του σε πολύ μεγαλύτερο εύρος pH, σε σχέση με έναν ασθενή ιοντοανταλλάκτη. Επιπλέον, ένα πρόσθετο μέγεθος, που χρησιμοποιείται για τη περιγραφή και τον χαρακτηρισμό ενός ιοντοανταλλάκτη, είναι η χωρητικότητά του. Με τον όρο *χωρητικότητα*, εννοούμε τη μέγιστη ποσότητα ενζύμου, η οποία δεσμεύεται ανά μονάδα όγκου ή βάρους προσροφητή, υπό ορισμένες συνθήκες και εκφράζεται σε meq φορτισμένων ομάδων/ml προσροφητή ή σε g πρωτεΐνης/ml προσροφητή. Θα πρέπει να τονιστεί, ότι η χωρητικότητα ενός προσροφητή μεταβάλλεται και διαφοροποιείται αναλόγως των συνθηκών προσρόφησης του ενζύμου. Με άλλα λόγια, υπό διαφορετικές συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος, η χωρητικότητα δύναται να μειωθεί ή να αυξηθεί (Κλώνης Ι., 1997).

Όσον αφορά την έκλουση (ή εκρόφηση) του προσροφημένου ενζύμου από τη χρωματογραφική στήλη, μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους: με *συνεχή διαβάθμιση*, με *σταδιακή διαβάθμιση* και με *έκλουση 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 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 έκλουσης 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 έκλουσης ενός ενζύμου από κάποιον 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.

1.5.2. Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας, αποτελεί την αποτελεσματικότερη χρωματογραφική τεχνική απομόνωσης και καθαρισμού ενζύμων (Κλώνης Ι., 1997). Η αρχή της συγκεκριμένης τεχνικής βασίζεται στην ιδιότητα που διαθέτουν τα ένζυμα, ως βιολογικοί καταλύτες, να αναγνωρίζουν με εξειδικευμένο και αντιστρεπτό τρόπο χημικές ενώσεις (Donald D. Voet and Judith G. Voet, 2004). Οι ενώσεις αυτές συνήθως αποτελούν τα φυσικά υποστρώματα των ενζύμων, μιμητές των φυσικών υποστρωμάτων, ουσίες δηλαδή που προσεγγίζουν στερεοχημικά και φυσικοχημικά με τα υποστρώματα, όπως επίσης ακόμη και προϊόντα της ενζυμικής κατάλυσης. Γενικότερα, εκτός των υποστρωμάτων, το ένζυμο μπορεί να προσδεθεί και σε αναστολείς, συνένζυμα, μέταλλα και αντισώματα. Όλες οι προηγούμενες ενώσεις καλούνται *δεσμευτές*, καθώς δεσμεύουν το ενζυμικό μόριο με το οποίο θα αλληλεπιδράσουν. Οι δεσμευτές μπορούν να ακινητοποιηθούν σε κατάλληλους *φορείς*, οι οποίοι είναι πολυμερή στερεά υλικά και να διαμορφωθεί έτσι ο αποκαλούμενος *προσροφητής συγγένειας*. Συνήθως ο δεσμευτής συγγένειας γεφυρώνεται χημικά με τον φορέα με κάποιο μόριο, το οποίο ονομάζεται *βραχίονας* και διευκολύνεται κατ'αυτόν τον τρόπο η ακινητοποίηση του δεσμευτή στον φορέα (Κλώνης Ι., 1997). Εν συνεχεία, ο προσροφητής συγγένειας πακετάρεται σε κάποια χρωματογραφική στήλη, στην οποία θα φορτωθεί το δείγμα που περιέχει, εκτός των άλλων και το ένζυμο που επιθυμούμε να

απομονώσουμε. Το ενζυμικό μόριο θα προσροφηθεί εκλεκτικά στον δεσμευτή συγγένειας, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες που δεν παρουσιάζουν κάποια συγγένεια με τον δεσμευτή, θα διαπεράσουν αδέσμευτα τη στήλη. Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να αναφέρουμε τις περιπτώσεις, όπου επιπλέον μόρια εκτός του ενζύμου, προσδένονται ασθενώς στον προσροφητή. Λόγω του ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ασθενείς, μπορούμε εύκολα να απαλλαχθούμε από αυτά τα ανεπιθύμητα μόρια, εκπλένοντας τη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, του οποίου η ιοντική ισχύς είναι αρκετή έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα επιπλέον μόρια. Μετά από τις τελευταίες αυτές πλύσεις, που ως σκοπό έχουν την αποδέσμευση των ασθενώς προσδεδεδμένων ουσιών, μπορούμε να παραλάβουμε το εκλεκτικά δεσμευμένο ένζυμο, εκλούοντάς το με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει αρκετή συγκέντρωση του δεσμευτή. Με αυτόν τον τρόπο, η περίσσεια συγκέντρωση του διαλυτού δεσμευτή συναγωνίζεται τη δέσμευση του ενζύμου στη στήλη, με αποτέλεσμα να εκλούεται από αυτή. Θα ήταν προχειρότητα και επιπολαιότητα να παραλείψουμε την αναφορά περιπτώσεων, όπου συμβαίνει να έχουμε τη μη εκλεκτική δέσμευση ουσιών στον προσροφητή συγγένειας και μάλιστα αρκετά έως πολύ ισχυρά. Σε αυτές τις περιπτώσεις θα πρέπει να τροποποιήσουμε το πρωτόκολλο καθαρισμού όσον αφορά τις συνθήκες προσρόφησης του ενζύμου (ιοντική ισχύς, pH) ή ακόμη και τις αντίστοιχες της έκλουσης. Σε τελευταία ανάλυση, μπορούμε να διαφοροποιήσουμε και τον δεσμευτή, χρησιμοποιώντας κάποιον άλλο περισσότερο εκλεκτικό προς το ένζυμο που μας ενδιαφέρει. Γενικότερα, θα μπορούσαμε να κατατάξουμε τους δεσμευτές σε δύο κύριες κατηγορίες: στους *υψηλής συγγένειας και εκλεκτικότητας* και στους *γενικής συγγένειας* (Κλώνης Ι., 1997). Στη πρώτη περίπτωση, τυπικά ο δεσμευτής αναγνωρίζει και δεσμεύει ένα μόνο ένζυμο και τέτοιες περιπτώσεις είναι οι αλληλεπιδράσεις αντιγόνων-αντισωμάτων, ορμονών-ορμονών, οι αλληλουχίες DNA, οι οποίες αναγνωρίζουν μόνο το περιοριστικό ένζυμο που τις τέμνει. Αντίστοιχα, στη δεύτερη περίπτωση της γενικής συγγένειας δεσμευτών, κατατάσσονται οι συνθετικές τριαζινικές χρωστικές, τα μεταλλοχημικά σύμπλοκα (δημιουργία συμπλόκου μεταλλοκατιόντων σε φορέα που φέρει μινοδιοξικό οξύ), η πρωτεΐνη A. Σύμφωνα με τα προηγούμενα, μια συγγένεια μεταξύ ενός ενζύμου και του υποστρώματός του θεωρείται γενικής συγγένειας, καθώς πρακτικά σχεδόν πάντα έχουμε τη πρόσδεση επιπλέον μορίων εκτός του επιθυμητού μορίου.

Θα πρέπει ακόμη να επισημάνουμε, ότι οι ιδιότητες του φορέα είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου χρωματογραφίας συγγένειας (Κλώνης Ι., 1997). Επιγραμματικά τα βασικότερα χαρακτηριστικά ενός αποτελεσματικού φορέα είναι: να είναι υδρόφιλος ώστε να αποφεύγονται μη εκλεκτικές υδρόφοβες δεσμεύσεις, να απουσιάζουν φορτισμένες ομάδες με σκοπό την αποφυγή μη εκλεκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, να αποτελείται από μεγαλοπορώδη σφαιρίδια ώστε το μέγεθος των πρωτεϊνικών μορίων να μην αποτελεί πρόβλημα, να είναι βιολογικά, μηχανικά και χημικά σταθερός και να φέρει ελεύθερες υδροξυλομάδες για να μπορεί να ακινητοποιηθεί χημικά και αποτελεσματικά ο δεσμευτής.

Τέλος, όσον αφορά την έκλουση του προσροφημένου ενζύμου, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί *εκλεκτικά* ή *μη εκλεκτικά* (Κλώνης Ι., 1997). Στην εκλεκτική έκλουση χρησιμοποιούμε μόρια, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς το δεσμευμένο ένζυμο και είναι συναγωνιστικά του δεσμευτή. Παραδείγματα τέτοιων εκλουτικών παραγόντων είναι οι αναστολείς των συγκεκριμένων ενζύμων, συνένζυμα, υποστρώματα. Αντίστοιχα, στη περίπτωση της μη εκλεκτικής έκλουσης, απλά διαφοροποιούμε τις συνθήκες της υγρής φάσης της στήλης όπως το pH και την ιοντική ισχύ, με αποτέλεσμα την αποδέσμευση του ενζύμου, το οποίο έχει δεσμευτεί με κάποιες συγκεκριμένες συνθήκες. Η χρήση επίσης χαοτροπικών παραγόντων, μπορεί να συμβάλλει στην μη εκλεκτική έκλουση του προσροφημένου ενζυμικού μορίου.

Στη παρούσα μελέτη, οι προσπάθειες καθαρισμού και απομόνωσης της ανασυνδυνασμένης L-ASNase από *Erwinia chrysanthemi*, επικεντρώθηκαν τόσο στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής όσο και στη χρωματογραφία συγγένειας, αλλά όπως θα αναφερθεί και αναλυτικότερα στη συνέχεια, ο βελτιστοποιημένος καθαρισμός επετεύχθει εφαρμόζοντας χρωματογραφία συγγένειας.

1.6 Ακίνητοποίηση της L-ασπαραγινάσης.

Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενη παράγραφο, η σημαντικότερη χρήση της L-ASNase προκύπτει από το γεγονός ότι παρουσιάζει αντι-λευχαιμικές ιδιότητες (Broome J. D., 1961,1968), και ειδικότερα χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Παρά το γεγονός, ότι θεωρείται ένα από τα αποτελεσματικότερα φάρμακα, ταυτόχρονα απορρέουν από τη χρήση της και μια σειρά από παρενέργειες, οι οποίες είναι αποτέλεσμα αφενός μεν του ότι διαθέτει και παράλληλη δράση γλουταμινάσης και αφετέρου δε, ότι επηρεάζει ένα σύνολο πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη πήξη του αίματος, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο θρόμβωση (Bushman et al., 2000; Payne & Vora, 2007). Εκτός της θρόμβωσης, που αποτελεί ίσως τη σοβαρότερη παρενέργεια, προκαλούνται και άλλες παρενέργειες, οι οποίες ποικίλλουν από απλές αντιδράσεις υπερευαισθησίας, έως σοβαρά αναφυλακτικά σοκ (Kravtsoff et al., 1996; Muller et al., 2001), τα οποία δύναται να αποβούν μοιραία για τον ασθενή (Kontzia & Labrou, 2006). Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η χρήση της L-ASNase προκαλεί μια σειρά από σοβαρές παρενέργειες. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια αρκετές επιστημονικές ομάδες έχουν επικεντρωθεί στη προσπάθεια ακίνητοποίησης του ενζύμου αυτού, με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανότητας κατασκευής ενός *βιοαντιδραστήρα*. Το σκεπτικό είναι, ότι ίσως θα μπορούσε να υπάρξει η πιθανότητα φιλτραρίσματος του αίματος του ασθενή εξωσωματικά, μέσω ενός βιοαντιδραστήρα, ο οποίος περιέχει ακίνητοποιημένη L-ASNase. Κατ'αυτόν τον τρόπο, θα μειώνονταν τα επίπεδα L-ασπαραγίνης στο αίμα, το οποίο αποτελεί και στόχο από τη χρήση αυτού του ενζύμου, με παράλληλη αποφυγή των έντονων παρενεργειών του ασθενούς. Επιπλέον το ένζυμο δε θα εισέρχεται στο αίμα, με αποτέλεσμα να μην επάγεται η δράση πρωτεασών ώστε να αποικοδομήσουν τη <<ξένη>> πρωτεΐνη, κάτι που συνεισφέρει στην εκδήλωση παρενεργειών. Ένα ακόμη πλεονέκτημα αυτής της υποτιθέμενης εφαρμογής, αφορά και στο κόστος της χρήσης του φαρμακευτικού αυτού ενζύμου. Το γεγονός ότι η L-ASNase, θα είναι ακίνητοποιημένη, εξασφαλίζει και επαναληψιμότητα όσον αφορά τη χρήση της.

Εκτός όμως της παραπάνω αρκετά φιλόδοξης εφαρμογής του εξωσωματικού βιοαντιδραστήρα, έχει μελετηθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό η ακίνητοποίηση της L-ASNase σε πολυμερή υλικά, τα οποία είναι αδρανή και φιλικά προς τον ανθρώπινο οργανισμό, με σκοπό την *in vivo* χρήση

αυτών των δομών. Η ακινητοποίηση του ενζύμου τροποποιεί τις φυσικοχημικές ιδιότητές του και έχει αποδειχθεί, ότι κατ'αυτόν τον τρόπο όχι μόνο μειώνεται η ανοσολογική αντίδραση (Jorge et al., 1994; Jean-Franceois et al., 1997; DeLoach et al., 1990) και η τοξικότητα όσον αφορά τον οργανισμό ενός ασθενούς, αλλά παράλληλα βελτιώνεται και η ανθεκτικότητα του ενζύμου έναντι της πρωτεόλυσης (Yu-Qing Zhang et al., 2003).

Έχουν εφαρμοστεί και μελετηθεί διάφορες μέθοδοι ακινητοποίησης του ενζύμου αυτού χρησιμοποιώντας διαλυτά και αδιάλυτα πολυμερή και μάλιστα οι πρώτες προσπάθειες εντοπίζονται χρονικά, ακόμη και τριάντα χρόνια πριν. Μια από τις πρώτες ενώσεις που είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά ήταν η *δεξτράνη* (Karsakevich et al., 1987). Η δεξτράνη χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη πολυγλυκίνη, η οποία αρχικά οξειδώθηκε έτσι ώστε να αντιδράσει το ένζυμο ομοιοπολικά, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αζομεθινικών δεσμών (azomethine bonds). Οι προκύπτουσες αλδεϋδικές ομάδες του πολυμερούς, ανήχθησαν με χρήση του τετραϋδροβορικού νατρίου. Η μελέτη του ακινητοποιημένου ενζύμου απέδειξε πολύ μεγαλύτερη θερμοσταθερότητα συγκριτικά με το ελεύθερο ένζυμο, όπως επίσης και αισθητή μείωση της αντιγονικής δραστηριότητας σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Ειδικότερα, μειώθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του ακινητοποιημένου ενζύμου με αντισώματα, των οποίων επάγεται η σύνθεση στη περίπτωση χρήσης του ελεύθερου ενζύμου. Τα αποτελέσματα αυτά, ήταν αρκετά ενθαρρυντικά όσον αφορά τη πιθανότητα χρήσης ακινητοποιημένης L-ASNase *in vivo* και για το λόγο αυτό οι ερευνητικές προσπάθειες συνεχίστηκαν.

Μια ακόμη χημική ένωση, η οποία χρησιμοποιείται γενικότερα και ευρέως στον φαρμακευτικό χώρο, αλλά και στη περίπτωση της L-ASNase, είναι η *πολυ-αιθυλενο-γλυκόλη* (PEG). Η ένωση αυτή εγκρίθηκε για πρώτη φορά από τον αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων το 1970, και από τότε οι φαρμακευτικές εφαρμογές που αφορούν στη χρήση αυτής της ένωσης ποικίλλουν. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της PEG είναι κατάλληλες τόσο για χρήση φαρμάκων δια του στόματος (*per os*) όσο και ως ενέσιμη μορφή (*in vivo*) (Burnham, 1994). Έτσι η επιστημονική βιβλιογραφία είναι γεμάτη από αναφορές στη χρήση PEG για την ακινητοποίηση της L-ASNase (Harms et al., 1991; Wehner et al., 1992; Derst et al., 1992, 1994; Soares et al., 2002; Kotzia et al, 2007). Η χρήση της PEG επιφέρει δομικές τροποποιήσεις στο ενζυμικό μόριο, με αποτέλεσμα τη βελτίωση των θεραπευτικών ιδιοτήτων του. Αυτό σημαίνει ότι

αυξάνεται ο χρόνος ημιζώης του ενζύμου στο πλάσμα του αίματος κατά 24 ώρες σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο λόγω της προστασίας του από τη δράση των πρωτεασών (Derst et al., 1994). Ταυτόχρονα, προκαλεί μειωμένη ανοσοαντίδραση όσον αφορά τον οργανισμό του ασθενούς, καθώς η δράση του ενζύμου περιορίζεται, λόγω του εγκλωβισμού του εντός της δομής που δημιουργεί η PEG (Soares et al., 2002).

Μια ακόμη μέθοδος ακινητοποίησης που έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, σχετίζεται με τη χρήση μιας πρωτεΐνης, της *σερισίνης* (silk sericin), η οποία παράγεται από τον μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* (Zhang Y-Q et al., 2003). Κατά τα διάφορα στάδια παραγωγής μεταξιού από τον συγκεκριμένο οργανισμό, παράγεται η πρωτεΐνη *σερισίνη*. Οι ιδιότητες αυτού του βιομορίου είναι πραγματικά πολύ ιδιαίτερες: αντοχή στην οξειδωση, αντιβακτηριακή δράση, ανθεκτική στην υπεριώδη ακτινοβολία, απορροφά και απελευθερώνει εύκολα υγρασία. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων της, έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις συμπολυμερισμού με διάφορα τεχνητά υλικά, με σκοπό τη βελτίωση των συνολικών ιδιοτήτων του τελικού προϊόντος (Miyairi et al., 1978; Demura et al., 1992; Iwamoto et al., 1995). Πολύ συχνή είναι η χρήση της *σερισίνης* στη κατασκευή βιοϊατρικών υλικών όπως ίνες, μεμβράνες, συνθετικών πολυμερών, αποικοδομούμενων βιο-υλικών κ.α. (Zhang Y-Q, 2002). Στη περίπτωση της L-ASNase, η *σερισίνη* έχει χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση του εν λόγω ενζύμου. Με τη χρήση ενός συγκεκριμένου πρωτοκόλλου (Zhang Y-Q et al., 2003), τα μόρια της *σερισίνης* σχηματίζουν πολυάριθμες δομές μικροσφαιρικών σωματιδίων διαμέτρου μόλις 10 μm. Ταυτόχρονα με τη βοήθεια ενός διδραστικού αντιδραστήριου όπως η γλουταραλδεΰδη, η L-ASNase αντιδρά με τις σφαιρικές αυτές δομές, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ομοιοπολική σύζευξη μεταξύ τους και τελικά το ένζυμο να ακινητοποιείται. Αξίζει να αναφερθεί ότι η *σερισίνη* διαθέτει στην αμινοξική της αλληλουχία, δραστικές ομάδες (π.χ. αμινικές, υδρόξυ-, καρβονυλικές), οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με άλλες δραστικές ομάδες πολυμερών και δημιουργούν τις τελικές συζεύξεις. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν, ότι η ακινητοποιημένη L-ASNase διατήρησε το 62.5% της αρχικής της δραστηριότητας, ενώ η K_m μειώθηκε κατά 8 φορές σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο. Επίσης, αυξήθηκε σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο η ανθεκτικότητα έναντι της θρυψινόλυσης και ακόμη, ιδιαίτερα σημαντική ήταν η βελτίωση της θερμοσταθερότητας του ενζύμου.

Η χρήση σφαιριδίων *αγαρόζης* επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την ακινητοποίηση της L-ASNase (Kotzia & Labrou, 2007). Η αγαρόζη, με εμπορική ονομασία *Sepharose CL-6B*, χρησιμοποιείται πολύ συχνά στις περιπτώσεις σύνθεσης προσροφητών συγγένειας, με σκοπό την απομόνωση και τον καθαρισμό πρωτεϊνών και ενζύμων εφαρμόζοντας χρωματογραφία συγγένειας. Με αντίστοιχο τρόπο, αναπτύχθηκε πρωτόκολλο ακινητοποίησης της L-ASNase χρησιμοποιώντας *Sepharose CL-6B*. Τα σφαιρίδια *αγαρόζης* ενεργοποιήθηκαν αρχικά με NaOH και εν συνεχεία αντέδρασαν με οξιδράσιο, υπο τη παρουσία NaBH₄ (Axarli et al., 2005). Η τελική ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με την ανάμειξη του ενζύμου και των ενεργοποιημένων σφαιριδίων *αγαρόζης*. Και σε αυτή τη περίπτωση ακινητοποίησης, το ένζυμο υπέδειξε αυξημένη θερμοσταθερότητα, όπως επίσης και βελτιωμένη σταθερότητα όσον αφορά την αποθήκευση στους 4 °C έναντι του ελεύθερου ενζύμου. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός, ότι μετά την ακινητοποίησή της, η L-ASNase διατήρησε το 60% της αρχικής δραστηρότητάς της, το οποίο αποτελεί ένα αρκετά ικανοποιητικό ποσοστό.

Μια ακόμη μέθοδος ακινητοποίησης της L-ASNase, η οποία δημοσιεύτηκε πρόσφατα, σχετίζεται με τη χρήση *αλγινικού ασβεστίου* (Youssef & Al-Omair, 2008). Ακολουθώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο (Youssef & Al-Omair, 2008), το ένζυμο εγκλωβίστηκε εντός σφαιριδίων *αλγινικού ασβεστίου* και εν συνεχεία ακολούθησε μελέτη της επίδρασης του pH (6-10) και της θερμοκρασίας (20-8 °C) στο ελεύθερο και στο ακινητοποιημένο ένζυμο. Προσδιορίστηκε ότι η βέλτιστη τιμή pH για τη δράση του ακινητοποιημένου ενζύμου είναι το 8.5, ενώ για το ελεύθερο το 7.5. Η αντίστοιχη τιμή θερμοκρασίας για το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι 50 °C, ενώ για το ελεύθερο 40 °C. Τέλος και σε αυτή τη περίπτωση, σημειώθηκε αισθητή αύξηση της θερμοσταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου.

1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης.

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης, είναι η ανάπτυξη ενός βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου έκφρασης, καθαρισμού και ακινητοποίησης, για την εξωκυττάρια L-ASNase II του βακτηριακού στελέχους *Erwinia chrysanthemi* 3937, χρησιμοποιώντας ως ετερόλογο σύστημα έκφρασης το *E. coli*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1 Υλικά

2.1.1 Βιολογικά υλικά.

- Για την έκφραση του ενζύμου L-ASNase χρησιμοποιήθηκαν διάφορα στελέχη των κυττάρων *E. coli*. Στον ακόλουθο Πίνακα 2.1, παραθέτονται τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των πειραματικών διαδικασιών, όπως επίσης και οι γενότυποι των στελεχών αυτών.

Πίνακας 2.1 Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα πειραματική μελέτη και οι γενότυποι των στελεχών αυτών.

Στέλεχος (strain) <i>E. coli</i>	Γενότυπος	Αναφορά ή Εταιρία
XL1-Blue	endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ) M15] hsdR17(rK- mK+)	Stratagene
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Studier and Moffat, 1986, Novagen
BL21(DE3) Rosetta	lon-, ompT-	Novagen
BL21(DE3) pLysS	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3) pLysS(cmR)	Studier and Moffat, 1986, Novagen
BL21(DE3) STAR	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3) pLysS(cmR)	Invitrogen
TOP 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, MC 1061, Invitrogen.
UT 5600	fepA, ompT-	Elish et al., 1987

- Τα πλασμίδια έκφρασης με κλωνοποιημένα τα γονίδια της L-ASNase II απο *Erwinia chrysanthemi* και *Erwinia caratovora* προέρχονται απο το Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας (Kotzia and Labrou, 2005, 2007).

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια.

Το L-ασπαρτικό οξύ, το L-γλουταμινικό οξύ, η L-ασπαραγίνη, το αντιδραστήριο Nebler, το αντιβιοτικό αμικικιλίνη, το TCA, ο βραχίονας 1,4 βουτανεδιόλ-διγλυκιδύλ-αιθέρας, η πρωτεΐνη ορού μόσχου (BSA), το TEMED, καθώς επίσης και το APS, αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Co (St Louis, Mo U.S.A.). Ο επαγωγέας έκφρασης ισοπρόπυλο-β-D-θειογάλακτοπυρανοζίδιο (IPTG) και η καναμυκίνη αγοράστηκαν από την εταιρεία Genaxis (U.K.). Από την γερμανική εταιρεία Merck αγοράστηκαν το δισόξινο φωσφορικό οξύ (KH_2PO_4) για τη παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος και η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250). Όσον αφορά τη παρασκευή των θρεπτικών LB, TB και YT και τα τριβλύα, το εκχύλισμα ζύμης, η πεπτόνη, το άγαρ, η αγαρόζη και η γλυκερόλη αγοράστηκαν από τον ισπανικό οίκο Scharlau και το χλωριούχο νάτριο από την εταιρεία Riedel de Haen. Η γλουταραλδεύδη (50% v/v) που χρησιμοποιήσαμε κατά την ακινητοποίηση, αγοράστηκε από τη γερμανική εταιρεία Merck. Τέλος, τα σφαιρίδια αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του προσροφητή, αποκτήθηκαν απο την εταιρία Pharmacia με εμπορικό όνομα Sepharose CL-6B.

2.2 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 Hoefler, H.Π.Α. μοντέλο SE 600, η οποία είναι συνδεδεμένη με τροφοδοτικό SP 500 x Ta (500 volt, 400 mA) και αυτό της εταιρείας Hoefler.
- Υδατόλουτρο της εταιρείας BIBBY, Stuart Scientific.
- Ξηρό σύστημα επώασης, Shaking Incubator, LabTech, Daihan LabTech, co., LTD
- Συσκευή PCR, GeneAmp, PCRSystem 9700, Applied Biosystems.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 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) STAR, 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 βιοπολογιστικής 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. Αρχικά σχεδιάστηκαν οι εκκινητές μετά από σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του συγκεκριμένου γονιδίου από άλλα στελέχη *E. coli* (Πίνακας 3.1). Ενδεικτικά παραθέτονται στη συνέχεια κάποιες αλληλουχίες L-ASNase που συγκρίθηκαν, όπως επίσης και οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν τελικά για την απομόνωση του γονιδίου, συμπεριλαμβανομένου και του πεπτιδίου οδηγού στο άμινο-τελικό άκρο.

Πίνακας 3.1 Τα στελέχη *E. coli*, βάση των οποίων σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την απομόνωση του γονιδίου της L-ASNase του στελέχους BL21(DE3) STAR.

gi 170079663_3192773-3193819	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. DH10B
gi 89106884_3098338-3099384	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. W3110 strain K-12
gi 49175990_3097704-3098750	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655
gi 218552585_3169587-3170633	<i>Escherichia coli</i> IAI1
gi 170679574_3186489-3187535	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5
gi 218703261_3435246-3436292	<i>Escherichia coli</i> UMN026

gi|170079663_3192773-3193819 3'-TTAGTACTGATTGAAGATCTGCTGGATCTGCTGCGGATCTTTGGTTTGCG 50
 gi|89106884_3098338-3099384 3'-TTAGTACTGATTGAAGATCTGCTGGATCTGCTGCGGATCTTTGGTTTGCG 50
 gi|49175990_3097704-3098750 3'-TTAGTACTGATTGAAGATCTGCTGGATCTGCTGCGGATCTTTGGTTTGCG 50
 gi|218552585_3169587-3170633 3'-TTAGTACTGATTGAAGATCTGCTGGATCTGCTGCGGATCTTTGGTTTGCG 50
 gi|170679574_3186489-3187535 3'-TTAGTACTGATTGAAGATCTGCTGGATCTGCTGCGGATCTTTGGTTTGCG 50
 gi|218703261_3435246-3436292 3'-TTAGTACTGATTGAAGATCTGCTGGATCTGCTGCGGATCTTTAGTTTGCG 50

gi|170079663_3192773-3193819 CTAAAACCCATAACCAAGTGC GGCAAGTGCCGTCTTTTGA AAAA-CTCCAT-5' 1045
 gi|89106884_3098338-3099384 CTAAAACCCATAACCAAGTGC GGCAAGTGCCGTCTTTTGA AAAA-CTCCAT-5' 1046
 gi|49175990_3097704-3098750 CTAAAACCCATAACCAAGTGC GGCAAGTGCCGTCTTTTGA AAAA-CTCCAT-5' 1047
 gi|218552585_3169587-3170633 CTAAAACCCATAACCAAGTGC GGCAAGTGCCGTCTTTTGA AAAA-CTCCAT-5' 1046
 gi|170679574_3186489-3187535 CTAAAACCCATAACCAAGTGC GGCAAGTGCCGTCTTTTGA AAAA-CTCCAT-5' 1047
 gi|218703261_3435246-3436292 CTAAAACCCATAACCAAGTGC GGCAAGTGCCGTCTTTTGA AAAA-CTCCAT-5' 1047

Παραθέτονται τα αρχικά 50 νουκλεοτίδια των αλληλουχιών (3' άκρο), όπως επίσης και τα τελευταία 50 (5' άκρο), με βάση τα οποία σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την ενίσχυση της γονιδιακής αλληλουχίας με χρήση της PCR. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται με έντονα μαύρα γράμματα παραπάνω στις συγκρινόμενες αλληλουχίες και είναι οι ακόλουθες:

Forward: 5' - ATGGAGTTTTTAAAAGACGGC - 3' 23 Νουκλεοτίδια

Reverse: 5' - TTAGTACTGATTGAAGATCTG - 3' 21 Νουκλεοτίδια.

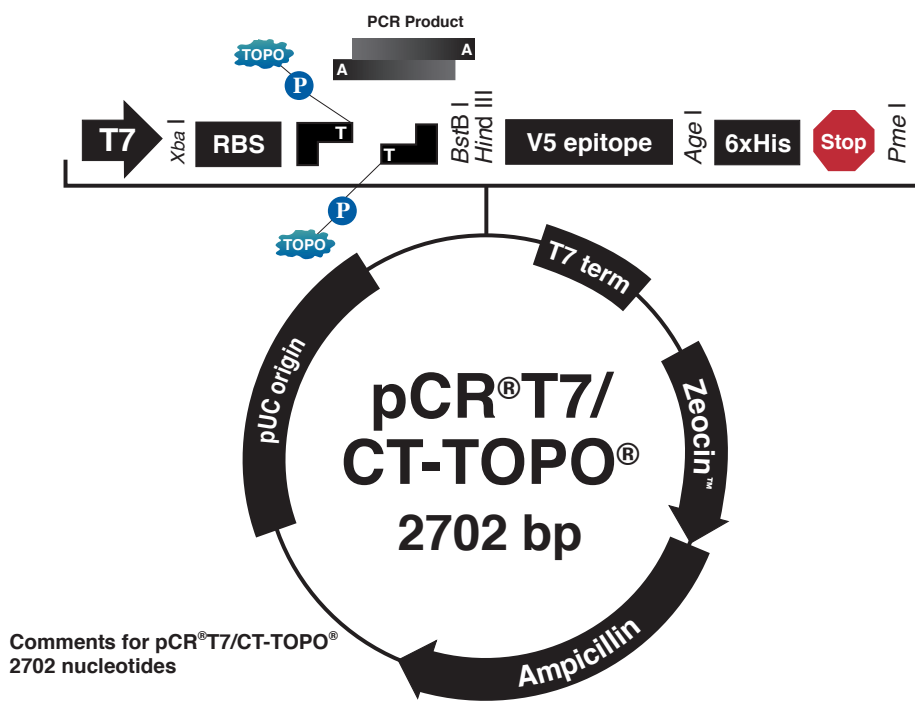
Στη συνέχεια, απομονώθηκε το γενωμικό DNA του στελέχους BL21(DE3) STAR με τη χρήση kit της εταιρίας Invitrogen και εφαρμόστηκε η αντίδραση PCR, από την οποία τελικά ενισχύθηκε η αλληλουχία του γονιδίου μετά από 30 θερμοκύκλους. Οι συνθήκες της αντίδρασης διαμορφώθηκαν από τη προσθήκη 0.2 mM dNTPs, περίπου 100 ng γενωμικό DNA, 2 μονάδες

Pfu πολυμεράσης και 10 pmol απο κάθε εκκινητή. Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 50 μl. Η θερμοκρασία αποδιάταξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 96 °C για 2 λεπτά, στο στάδιο υβριδισμού των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασία 46 °C και στο στάδιο της επιμήκυνσης 72 °C. Πρίν τον πρώτο κύκλο, το δείγμα έμεινε στους 96 °C για 3 λεπτά και μετά τον τελευταίο κύκλο στους 72 °C για 10 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε σε 1 % w/v πηκτή 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 απο 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 180 Volt, ανάλογα με την περιεκτικότητα και το μέγεθος της αγαρόζης 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.

Στο κεφάλαιο 'Αποτελέσματα' παραθέεται η εικόνα (No. 15) απο τη πηκτή αγαρόζης, εντός της οποίας έχει διαχωριστεί το γονίδιο της L-ASNase του στελέχους BL21(DE3) STAR, μετά

την αντίδραση PCR. Μετά τη πιστοποίηση από τη πηκτή αγαρόζης, του ότι τελικά ενισχύθηκε η αλληλουχία του γονιδίου της L-ASNase, το γονίδιο ενώθηκε με τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα pCR T7/CT TOPO, ο νουκλεοτιδικός χάρτης του οποίου φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 3.1 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 προστέθηκαν στο γονίδιο, μετά από τη δράση της Taq πολυμεράσης εν απουσία DNTPs. Όλα τα προηγούμενα, εφαρμόζονται με τη καθοδήγηση του συνοδευτικού εγχειριδίου της εταιρίας Invitrogen, από την οποία αποκτήθηκε ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας.

Με τον πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος πλέον διαθέτει ως ένθετο το γονίδιο της L-ASNase, μετασχηματίζονται δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, τα οποία εμβολιάζονται σε

τρυβλία με άγαρ, όπου περιέχεται το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται επιλογή των κυτταρικών αποικιών του στελέχους BL21(DE3) Rosetta, το οποίο διαθέτει το φορέα με το επιθυμητό γονίδιο. Απο τις αποικίες που αναπτύσσονται, επιλέγονται τυχαία 16 απο όλο το τρυβλίο, με στόχο τον προσδιορισμό της αποικίας, στην οποία το γονίδιο έχει εισέλθει στον πλασμιδιακό φορέα με τον σωστό προσανατολισμό. Αυτό, πρόκειται να προσδιοριστεί με την ενζυμική δραστηριότητα. Οι 16 αποικίες αναπτύχθηκαν σε falcons που περιείχαν το θρεπτικό μέσο S.O.C. (η σύσταση του οποίου αναφέρεται παρακάτω, όπου αναφέρονται οι συστάσεις όλων των θρεπτικών που χρησιμοποιήθηκαν) στους 37 °C, υπο ανάδευση. Μετά απο 12 ώρες καλλιέργειας, προστίθεται ποσότητα IPTG για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της L-ASNase, καθώς όπως φαίνεται στην Εικόνα 2, η ρύθμιση της έκφρασης βρίσκεται υπο τον έλεγχο του προαγωγέα T7, ο οποίος επιτρέπει την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης μόνο υπο τη παρουσία IPTG. Τέσσερις ώρες μετά τη προσθήκη του IPTG, οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται στις 8.000 στροφές ανα λεπτό για 20 λεπτά στους 4 °C και συλλέγεται το ίζημα, το οποίο αποτελείται απο τα βακτηριακά κύτταρα της καλλιέργειας. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.05 M Tris-HCl, pH 8.2 και διαρηγνύονται με εφαρμογή υπερήχων (3 επαναλήψεις απο 12 δευτερόλεπτα). Μετά απο φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανα λεπτό για 20 λεπτά, τα κυτταρικά θραύσματα συσσωρεύονται στη βάση του eppendorf όπου έγινε η λύση των κυττάρων και η φυγοκέντρηση, ενώ το υπερκείμενο περιέχει όλο το πρωτεϊνικό φορτίο των κυττάρων. Κατόπιν ελέγχου όλων των αποικιών για εκδήλωση ενζυμικής δραστηριότητας, τελικά ανιχνεύθηκε δραστηριότητα σε 5 περιπτώσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA απο κλάσματα της καλλιέργειας που είχαν φυλαχθεί πριν την εφαρμογή των υπερήχων. Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια, και περιέχει το γονίδιο της L-ASNase, του στελέχους *E. coli*, BL21(DE3) STAR με τον σωστό προσανατολισμό, το οποίο αποθηκεύεται στους - 20 °C για μελλοντική χρήση.

3.2 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: 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl, pH 8, και 10 mM EDTA, pH 8.
3. Διάλυμα NaOH-SDS
4. CH₃COONH₄- 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 250 rpm.
2. Εν συνεχεία, 1.5 ml απο την καλλιέργεια φυγοκεντρείται εντός erpendorf, στις 13.000 rpm για 2 λεπτά.
3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται τελείως και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.
4. Στη συνέχεια προστίθενται 400 μl 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 μl/ ml) σε παγωμένο CH₃COONH₄, προκειμένου να παρασκευαστεί το διάλυμα CH₃COONH₄ - RNάσης A, και αναμιγνύονται καλά.

7. Μετά απο 5 λεπτά προστίθενται στο δείγμα περίπου 300 μl παγωμένου διαλύματος CH₃COONH₄ - RNάσης A, αναδεύονται καλά και προσεχτικά και το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά.
9. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf, στο οποίο προστίθεται ισοπροπυλική αλκοόλημέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος του erpendorf και μετά απο ανάδευση το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
10. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 15 λεπτά.
11. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με έντονη ανάδευση σε 1 ml 70 % v/v παγωμένης αιθανόλης.
12. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm 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 μl ddH₂O.

3.3 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. Αντίστοιχα σε κάποια άλλη περίπτωση άλλου στελέχους, το πρωτόκολλο εφαρμόζεται ακροβώς όπως εδώ, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται και τα αναγκαία για τη κάθε περίπτωση αντιβιοτικά.

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

1. LB υγρό θρεπτικό μέσο.
2. Διάλυμα TB, το οποίο περιέχει 10 mM MES, 55 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 15 mM χλωριούχο ασβέστιο και 250 mM χλωριούχο κάλιο.

3. Διάλυμα DMSO.
4. Διάλυμα τετρακυκλίνης.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Απο τρυβλίο LB που περιέχει τετρακυκλίνη σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$, 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, υπο συνεχή ανάδευση, στις 250 rpm.
2. Σε κωνική φιάλη προστίθενται 250 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB και μολύνονται με 5 ml απο την αρχική καλλιέργεια.
3. Ακολουθεί επώαση στους 37° C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm να είναι περίπου 0.6.
4. Η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο για 10 λεπτά.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4.000 rpm, έτσι ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα. Η φυγόκεντρος έχει προ-ψυχθεί στους 4° C.
6. Η πάστα κυττάρων επαναιωρείται με παγωμένο διάλυμα TB όγκου ίσου με το 1/10 του αρχικού όγκου καλλιέργειας (25 ml).
7. Το αιώρημα τοποθετείται σε πάγο για 10 λεπτά.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4.000 rpm, με στόχο την κατακρημνιση των κυττάρων. Η φυγόκεντρος έχει προ-ψυχθεί στους 4° C.
9. Το ίζημα επαναιωρείται με παγωμένο διάλυμα TB όγκου ίσου με το 1/5 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας (17 ml).
10. Το αιώρημα τοποθετείται σε πάγο και προστίθεται σε αυτό DMSO τελικής συγκέντρωσης ίσης με 7 % v/v, δηλαδή 1.2 ml, αναδεύοντας προσεχτικά.
11. Μετά απο παραμονή 10 λεπτών στον πάγο, τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα μοιράζονται σε eppendorfs και καταψύχονται με υγρό άζωτο. Η διατήρηση των δεκτικών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα πραγματοποιείται με την αποθήκευσή τους στους -80 ° C.

3.4 Μετασχηματισμός 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. Αμπικιλίνη ή καναμυκίνη.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Σε περίπου 200 μl δεκτικών κυττάρων, προστίθενται 10-50 ng 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 400-600 μl θρεπτικού μέσου LB και το δείγμα αφού αναμιχθεί καλά, επωάζεται στους 37 °C για 1 ώρα.
4. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm 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 τριβλύο με θρεπτικό μέσο LB, το οποίο μπορεί να περιέχει και ως μέσο επιλογής αντιβιοτικό, συνήθως αμπικιλίνη ή καναμυκίνη.
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 των στελεχών *Erwinia caratovora*, *Escherichia coli* και κυρίως του *Erwinia chrysanthemi*, μελετήθηκε η ετερόλογος έκφραση του ενζύμου

αυτού απο το *Erwinia chrysanthemi*, σε 7 διαφορετικά στελέχη του *E.coli* ώστε να προσδιοριστεί εκείνο, το οποίο εκφράζει τη πρωτεΐνη με μεγαλύτερη απόδοση. Τα στελέχη αυτά είναι BL21(DE3), BL21(DE3) STAR, BL21(DE3) Rosetta, BL21(DE3) pLysS, TOP 10, XL-I Blue και το UT 5600. 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.

S.O.C.: 2 % w/v πεπτόνη

0.5 % w/v εκχύλισμα ζύμης

0.05 % w/v NaCl

0.25 % v/v 1 M KCl

1 % v/v 1 M MgCl₂

1 % v/v 1 M MgSO₄

2 % v/v 1 M γλυκόζη

το pH του τελικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.0 με τη προσθήκη NaOH.

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 αμικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml, η χλωραμφενικόλη σε συγκέντρωση 34 µg/ml και η καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50 µg/ml.

3.5 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 αμικικιλίνη 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 500 ml εμβολιάζεται με 50 ml κατάλληλα μετασηματισμένων 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 40 ώρες. Μετά από τις τελευταίες 40 ώρες, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 8000 rpm για 20 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. Το ίδιο πρωτόκολλο ετερόλογης έκφρασης,

ακολουθήθηκε τόσο για την L-ASNase της *Erwinia chrysanthemi* όσο και για την L-ASNase της *Erwinia caratovora* και της *Escherichia coli*.

3.6 Λύσιμο των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος.

Επιθυμητή ποσότητα κυτταρικής μάζας αιωρείται στο τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 0.05 M Tris-HCl, pH 8.2. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με την επίδραση υπερήχων. Η επίδραση αυτή ακολουθείται 3 φορές διάρκειας 12 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 υπέρηχους. Το τελικό αιώρημα το οποίο έχει πλέον αυξημένο ιξώδες, φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 5 min και συλλέγουμε το υπερκείμενο.

3.7 Καθαρισμός του ενζύμου L-ασπαραγινάση με χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιώντας ως προσροφητή 1,4-βουτανεδιόλ-διγλυκιδύλ-αιθέρας-L-Asp-Sepharose-CL6B.

3.7.1 Σύνθεση του προσροφητή.

Sepharose-CL6B (5 g), πλένεται πολύ καλά με κρύο δις-απιονισμένο νερό (περίπου 100 ml και στη συνέχεια αναμιγνύονται με 5 ml 1 M NaOH. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 2 ώρες υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Στη συνέχεια, 5 ml του βραχίονα (Arm Spacer) 1,4-βουτανεδιόλ-διγλυκιδύλ-αιθέρα αναμιγνύονται με το παραπάνω μίγμα και η αντίδραση αφήνεται να πραγματοποιηθεί για 12 ώρες. Κατόπιν, η αгарόζη πλένεται με νερό πολύ καλά όπως αρχικά και αναμιγνύεται με τον δεσμευτή, ο οποίος σε αυτή τη περίπτωση είναι το L-ασπαρτικό οξύ. Πρίν απο αυτή την ανάμιξη, 1 g L-ασπαρτικό οξύ διαλύεται σε 0.5 M ανθρακικού νατρίου, pH 10, σε τελικό όγκο 10 ml. Σε αυτόν το όγκο των 10 ml, αναμείχθηκαν

τα 5 g της αγαρόζης και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για περίπου 64 h υπο ανάδευση. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο προσροφητής πλένεται με 200 ml κρύο δις-απιονισμένο νερό και αποθηκεύεται σε 20 % v/v αιθανόλη-H₂O στους 4 °C.

3.7.2 Πρωτόκολλο χρωματογραφίας συγγένειας.

Στη συνέχεια περιγράφεται ένα τυπικό πρωτόκολλο χρωματογραφίας συγγένειας, το οποίο εφαρμόστηκε στη παρούσα πειραματική μελέτη. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο όμως υποβλήθηκε αρκετές φορές σε τροποποιήσεις, όσον αφορά τα διάφορα διακριτά στάδια, με στόχο τη βελτιστοποίησή του. Οι τροποποιήσεις αυτές σχετίζονται με τις συνθήκες υπο τις οποίες εξισορροπείται το υπερκείμενο, πριν φορτωθεί στη χρωματογραφική στήλη, όπως επίσης και με τις συγκεντρώσεις και το είδος των ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως στο στάδιο των πλύσεων (wash). Έτσι, στη συνέχεια αναφέρεται το αρχικό πρωτόκολλο της χρωματογραφίας συγγένειας που χρησιμοποιήθηκε, μετά τη σύνθεση του προσροφητή με δεσμευτή το L-ασπαρτικό οξύ. Αξίζει να αναφερθεί, ότι ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τη σύνθεση των άλλων δύο προσροφητών, δηλαδή της L-ασπαραγίνης και του L-γλουταμινικού οξέος.

Προσροφητής όγκου 2 ml εξισορροπείται με 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 20 mM και pH 7.5. Στη συνέχεια φορτώνεται το δείγμα που περιέχει το θρεπτικό εκχύλισμα, το οποίο αρχικά έχει υποβληθεί σε διαπίδυση, έτσι ώστε να διαμορφωθούν οι επιθυμητές συνθήκες (pH 7.5), και η στήλη χρωματογραφίας παραμένει κλειστή για 10 min ώστε να μεγιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με το L-ασπαρτικό οξύ και να συγκρατηθούν όλο και περισσότερα μόρια ενζύμου στη στήλη. Κατόπιν ανοίγουμε τη στήλη και παραλαμβάνουμε ποσότητα του ενζυμικού εκχυλίσματος η οποία δεν προσδέθηκε στη στήλη. Ακολουθεί πλύσιμο του προσροφητή με 15 ml ρυθμιστικού εξισορρόπησης (στο τελικό βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο, η στήλη πλένεται μόνο με νερό) και στη συνέχεια η ποσότητα του ενζύμου που προσδέθηκε εκλούεται με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο περιέχει και 20 mM L-ασπαρτικό οξύ pH 7.5 (αντίστοιχα στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως προσροφητές το

L-γλουταμινικό οξύ και η L-ασπαραγίνη, ως εκλυτικοί παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν 20 mM L-γλουταμινικό οξύ και η L-ασπαραγίνη αντίστοιχα). Η συνολική εκλυόμενη ποσότητα παραλαμβάνεται σε κλάσματα του 1 ml. Σε κάθε κλάσμα γίνεται προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας και κατόπιν όπου είναι επιθυμητό πραγματοποιούμε και ποσοτικό προσδιορισμό του ενζύμου με τη μέθοδο Bradford, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια.

3.7.3 Μελέτη ισορροπίας προσρόφησης.

Ποσότητα προσροφητή (0.5 ml) με ακινητοποιημένο L-ασπαρτικό οξύ, επαναιωρείται σε 6 ml ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Pi, pH 7.5, το οποίο περιέχει και 0.1 M NaCl. Οι συνθήκες αυτές αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες καθαρισμού της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi* όπως προέκυψαν πειραματικά ('Αποτελέσματα', 4.2.2). Σε 12 erpendorfs του 1 ml, προστέθηκαν 500 μl αιωρήματος από τον παραπάνω προσροφητή, ποσότητα θρεπτικού εκχυλίσματος, το οποίο περιείχε εξωκυτάρια L-ASNase και ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi, pH 7.5 έως τη συμπλήρωση τελικού όγκου 1.1 ml. Η ποσότητες του θρεπτικού εκχυλίσματος που προστέθηκαν, κάλυψαν ένα εύρος όγκου από 50 έως 600 μl, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 3.2. Επιπλέον, μετά από παραμονή συγκεκριμένου όγκου προσροφητή με ακινητοποιημένο L-ασπαρτικό οξύ, σε συνθήκες κενού με σκοπό την απώλεια της υγρασίας, προσδιορίστηκε, ότι 1 ml προσροφητή ζυγίζει 0.075 g. Κατ' επέκταση, σε κάθε erpendorf, περιέχονται τελικά 0.003125 g προσροφητή. Τα erpendorfs τοποθετήθηκαν στους 4 °C και αφήθηκαν για 120 min υπό ανάδευση, έως ότου επέλθει στο σύστημα εξισορρόπηση. Εν συνεχεία, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και με τη μέθοδο της Bradford (Bradford, 1976) προσδιορίστηκε το πρωτεϊνικό φορτίο, το οποίο παρέμεινε αδέσμευτο από τον προσροφητή. Το δεσμευμένο από τον προσροφητή πρωτεϊνικό φορτίο, προσδιορίστηκε μετά από αφαίρεση του αδέσμευτου φορτίου από το συνολικό φορτίο που προστέθηκε στο erpendorf. Με βάση τους παραπάνω υπολογισμούς, συσχετίστηκε το πρωτεϊνικό φορτίο που δεσμεύτηκε ανά μονάδα βάρους προσροφητή με τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού φορτίου που παρέμεινε αδέσμευτο κατά την εξισορρόπηση. Από το διάγραμμα που

προέκυψε (Διάγραμμα 4.10), προσδιορίστηκαν οι παράμετροι της ισορροπίας προσρόφησης (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 3.2 Οι ποσότητες του θρεπτικού εκχυλίσματος, του αιωρήματος προσροφητή και του ρυθμιστικού διαλύματος, που προστέθηκαν στα 12 erpendorfs.

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (μl)	ΑΙΩΡΗΜΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ (μl)	ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (μl)
50	500	550	1100
100	500	500	1100
150	500	450	1100
200	500	400	1100
250	500	350	1100
300	500	300	1100
350	500	250	1100
400	500	200	1100
450	500	150	1100
500	500	100	1100
550	500	50	1100
600	500	-	1100

3.8 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

Η μέθοδος αυτή 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 465 nm, ενώ το σύμπλοκο χρωστική-πρωτεΐνη είναι χρώματος γαλάζιου και απορροφά στα 595 nm. Αποτελεί μια γρήγορη και αρκετά ακριβή μέθοδο συγκριτικά με άλλες και διαθέτει ένα εύρος προσδιορισμού συγκεντρώσεων μεταξύ 40-200 µg/ml.

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το πυκνό αντιδραστήριο (stock) Bradford αραιώνεται με νερό σε αναλογία $\frac{1}{4}$ 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 950 µl του τελευταίου διαλύματος προσθέσουμε 50 µl κατάλληλης συγκέντρωσης πρωτεΐνης ώστε στη κυψελίδα να υπάρχουν περίπου 2-10 µg πρωτεΐνης. Ακολουθεί επώαση του μίγματος για 20-35 min σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C και εν συνεχεία λαμβάνουμε απορρόφηση στα 595 nm 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.

3.9 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση TCA

Πολλές φορές τυγχάνει να έχουμε πολύ αραιά δείγματα πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να είναι πολύ μικρότερη από εκείνη της απαιτούμενης (50-100 µg) για να ηλεκτροφορήσουμε τα δείγματά μας και να προσδιορίσουμε με αυτόν τον τρόπο τη καθαρότητά τους. Σε αυτές τις περιπτώσεις κρίνεται αναγκαίο να συμπηκνώσουμε τα δείγματα με σκοπό τηναύξηση της συγκέντρωσης εντός πολύ μικρότερου όγκου. Αυτό δύναται να επιτευχθεί με φυσικές τεχνικές, όπως η λυοφιλίωση όπου απομακρύνεται η υγρασία από το

δείγμα με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να συσσωρεύεται στη βάση ενός erppendorf σε στερεή πλέον μορφή και να μπορούμε να την επαναιωρήσουμε σε ό,τι όγκο επιθυμούμε, και χημικές τεχνικές, όπου μεταβάλλουμε δραστικά το pH, όπως στη περίπτωση του TCA, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να μετουσιώνονται και να κατακρημνίζονται. Λόγω του ότι στη παρούσα πειραματική πορεία ακολουθήθηκε η τεχνική του TCA, περιγράφεται στη συνέχεια το πρωτόκολλο κατακρήμνισης.

Παρασκευή Stock διαλύματος TCA: 100 % (w/v) TCA, 500 g TCA διαλύονται σε 350 ml νερού.

1. 1 όγκος TCA αναμιγνύεται με 4 όγκους πρωτεϊνικού δείγματος.
2. Επώαση στον πάγο (4 °C) για 10 λεπτά.
3. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά.
4. Πετάμε το υπερκείμενο, αφήνοντας το ίζημα που δημιουργείται απο τη πρωτεΐνη στη βάση του erppendorf.
5. Πλένουμε το erppendorf, με 200 μl παγωμένης ακετόνης (-20 °C).
6. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 13.000 rpm για 5 λεπτά.
7. Επανάληψη των βημάτων 4-6, έως ότου συμπληρώσουμε ένα συνολικό αριθμό 2 πλύσεων.
8. Στέγνωμα του erppendorf, τοποθετώντας το στους 95 °C για 5-10 λεπτά, έτσι ώστε να στεγνώσει τελείως η ακετόνη.
9. Για SDS-PAGE, προσθέτουμε 2X ή 4X ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, το οποίο περιέχει και αναγωγική ισχύ με τη παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης, βράζουμε το δείγμα στους 95 °C για 5 λεπτά και το φορτώνουμε τελικά σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

3.10 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

3.10.1 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 επιστοιβαξης: Tris/HCL (0.5M) pH 6.8
4. διάλυμα ακρυλαμιδίου: ακρυλαμίδιο (30g, 0.42 mol) και N,N'-μεθυλένο-bis-ακρυλαμίδιο (0.8 g, 5.2 mmol) 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 επιστοιβαξης με περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου 12.5 % w/v.

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού και επιστοιβαξης είναι η ακόλουθη: ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (875 μl) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (70 μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (2937.5 μl). Το μίγμα αραιώνεται με τη προσθήκη νερού και ακολουθεί απαρέωση με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15 λεπτά. Μετά την απαρέωση προσθέτονται TEMED (6.25 μl) και υπερθειικό αμμώνιο (1.5 ml). 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 (625 μl) αναμειγνύεται με διάλυμα SDS (50 μl) και διάλυμα ακρυλαμιδίου (6.25 μl). Το μίγμα αραιώνεται με προσθήκη νερού (3450 μl) και στη συνέχεια απαερώνεται με τη βοήθεια αντλίας νερού για 15 min. Μετά την απαρέωση προσθέτεται TEMED (6.25 μl) και υπερθειϊκό αμμώνιο (1 ml). 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 30 min.

3.10.2 Προετοιμασία του δείγματος και ηλεκτροφόρηση κάτω από συνθήκες μετουσίωσης.

Πρωτεϊνικό δείγμα συγκέντρωσης περίπου 50-100 μg διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (~10 μl) 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 30 mA για κάθε πηκτή.

3.10.3 Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250.

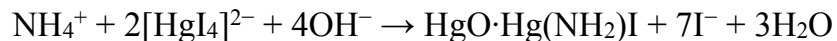
Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μετά από την ηλεκτροφόρηση με στόχο τη βαφή των πρωτεϊνικών ζωνών. Η διαδικασία αυτή έχει ως εξής: κατόπιν της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (40 % v/v), οξικό οξύ (7 % v/v) και Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.025-0.1 % w/v) όπου και επώάζεται 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).

3.11 Διαπίδυση

Το ενζυμικό εκχύλισμα πριν 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 διαπίδυση εφαρμόζεται και όταν επιθυμούμε να απαλλαγεί το ένζυμο από το προσδεδεμένο 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 διαπίδυση έναντι 1000 όγκων ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM φωσφορικών KH_2PO_4 pH 7.5. 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).

3.12 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της L-ασπαραγινάσης.

Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Nebler (Nesslerization) (Vogel et al., 1979). Το αντιδραστήριο Nebler είναι ένα διάλυμα 0.09 mol/L τετρα-ιωδο-υδραργύρου ($\text{K}_2[\text{HgI}_4]$) με 2.5 mol/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 850 μl υποστρώματος, που είναι η L-ασπαραγίνη σε συγκέντρωση 0.01 M, αναμιγνύονται με 120 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 0.01 M, pH 8.2 εντός erpendorf. Το υπόστρωμα έχει διαλυθεί επίσης σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 0.01 M, pH 8.2. Στη συνέχεια σε ένα δεύτερο erpendorf, το οποίο αντιστοιχεί στον μάρτυρα, προσθέτουμε όλα τα προηγούμενα και επιπλέον 50 μl τριχλωροακετικό οξύ (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 2 λεπτά και στη συνέχεια προσθέτονται στο καθένα 30 μl ενζύμου. Ο τελικό όγκος είναι 1050 μl. Το δείγμα και ο μάρτυρας επωάζονται στους 37 °C για 10 λεπτά. Μετά την επώαση, 50 μl TCA προσθέτονται στο δείγμα έτσι ώστε να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση και φυγοκεντρώνονται στις 13.000 rpm για 2 λεπτά ώστε να κατακρημνιστούν τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα μετά τη προσθήκη του TCA. Κατόπιν, σε κυβέτα των 4 ml, προσθέτονται 3.5 ml νερό, 250 μl από το υπερκείμενο του κάθε erpendorf και 0.5 ml αντιδραστήριο Nebler. 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 υπό την επίδραση του TCA. Στη συνέχεια με την κυβέτα που περιέχει τον μάρτυρα μηδενίζουμε το φωτόμετρο στα 436 nm 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 δραστηριότητας προκύπτει πειραματικά.

3.13 Ακίνητοποίηση της L-ασπαραγινάσης μέσω της δημιουργίας διασυνδέσεων με γλουταραλδεΐδη και σχηματισμό βάσεως Schiff.

Η ακίνητοποίηση της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του διδραστικού αντιδραστηρίου, γλουταραλδεΐδη, και της αλβουμίνης ορού μόσχου (BSA). Το ένζυμο ακίνητοποιήθηκε κάτω από 9 διαφορετικές συνθήκες, οι οποίες αφορούν στις

διαφορετικές συγκέντρωσεις της γλουταραλδεϋδης και της αλβουμίνης, που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά. Αντίθετα, η συγκέντρωση του ενζύμου διατηρήθηκε σταθερή σε όλες τις συνθήκες. Έτσι, σε όλες τις περιπτώσεις ακινητοποιήθηκαν 4 ενζυμικές μονάδες. Στη συνέχεια παραθέεται ο πίνακας με τις συγκεντρώσεις των στοιχείων της κάθε συνθήκης και περιγράφεται η συνολική διαδικασία ακινητοποίησης του ενζύμου.

Πίνακας 3.3 Οι συγκεντρώσεις των στοιχείων που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά στη κάθε συνθήκη. Ο τελικός όγκος αντίδρασης είναι 0.5 ml.

ΣΥΝΘΗΚΗ	ΓΛΟΥΤΑΡΑΛΔΕΨΔΗ (% v/v)	BSA (mg)	ENZYMΟ (μl)	BUFFER (μl)
1	1	20	66.6	413.34
2	1.5	20	66.6	403.34
3	2	20	66.6	393.4
4	1	30	66.6	413.34
5	1.5	30	66.6	403.34
6	2	30	66.6	393.4
7	1	40	66.6	413.34
8	1.5	40	66.6	403.34
9	2	40	66.6	393.4

Σε eppendorf του 1.5 ml, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) Tris-HCl 0.01 M, pH 8.2, η ποσότητα της αλβουμίνης (BSA) και επίσης του ενζύμου, που κάθε φορά απαιτούνται σύμφωνα με τον πίνακα παραπάνω. Ακολουθεί πολύ καλό vortex και αν χρειαστεί, χρήση υπερήχων έως ότου διαλυτοποιηθεί τελείως η αλβουμίνη. Όταν διαλυθεί η αλβουμίνη, προσθέτουμε την αντίστοιχη ποσότητα γλουταραλδεϋδης, η οποία έχει υπολογιστεί με βάση τη συγκέντρωσή της για τελικό όγκο αντίδρασης 0.5 ml. Μετά τη προσθήκη της γλουταραλδεϋδης, θα πρέπει πολύ

γρήγορα με μια πιπέτα στην οποία έχουμε προσαρμόσει ένα tip με κομμένο το ρύγχος, να αναμειξουμε πολύ γρήγορα και προσεκτικά το τελικό περιεχόμενο του erpendorf, και να το μεταφέρουμε στη μια εκ των τεσσάρων εσωτερικών πλευρών μιας κυβέτας 4 ml, εντός της οποίας θα πραγματοποιηθεί η ακινητοποίηση του ενζύμου. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται έτσι ώστε η ποσότητα του μίγματος να καλύψει ισόποσα, όλη την επιφάνεια της πλευράς της κυβέτας. Η κάλυψη ολόκληρης της πλευράς, αυξάνει την επιφάνεια επαφής του ενζύμου με το υπόστρωμα κατά τη διενέργεια του assay, με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της ακινητοποίησης. Μετά τη μεταφορά του μίγματος στη κυβέτα, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επέλθει η πήξη του μίγματος και ο τελικός σχηματισμός της χαρακτηριστικής μορφής ενός gel πορτοκαλί χρώματος. Ο χρόνος που απαιτείται για τη πήξη ποικίλλει από 1 έως 5 min αναλόγως της συγκέντρωσης της γλουταραλδεϋδης. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλουταραλδεϋδης, απαιτούν και λιγότερο χρόνο για τη πήξη. Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας μετά την ακινητοποίηση, ακολουθείται ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο από εκείνο που περιγράφηκε παραπάνω στη περίπτωση του ελεύθερου διαλυτού ενζύμου: προσθέτουμε 850 μl L-ασπαραγίνης 0.01 M, διαλυμένης σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, 0.01 M, pH 8.2 και 85 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 0.01 M, pH 8.2. Ο όγκος του ενζύμου που ακινητοποιήθηκε κάθε φορά είναι 66.6 μl. Και σε αυτή τη περίπτωση το άθροισμα του όγκου του ενζύμου, του υποστρώματος και του ρυθμιστικού διαλύματος είναι 1 ml. Η επώαση της αντίδρασης πραγματοποιείται στους 37 °C για 15 min. Πειραματικά προέκυψε, ότι περισσότερος χρόνος επώασης δεν είχε επίδραση στον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας. Κατόπιν, σε κυβέτα των 4 ml, προσθέτονται 3.5 ml νερό, 250 μl από το περιεχόμενο της κυβέτας με το ακινητοποιημένο ένζυμο και 0.5 ml αντιδραστήριο Nebler. Ως μάρτυρας, χρησιμοποιείται κυβέτα των 4 ml με 3.5 ml νερό, 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 0.01 M, pH 8.2 και 0.5 ml αντιδραστήριο Nebler. Στη συνέχεια με την κυβέτα που περιέχει τον μάρτυρα μηδενίζουμε το φωτόμετρο στα 436 nm και μετράμε αντίστοιχα το δείγμα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι μετά τη κάθε αντίδραση του ακινητοποιημένου ενζύμου με το υπόστρωμα με σκοπό τον προσδιορισμό της δραστηριότητας, απαιτείται ένα στάδιο πλύσεων της κυβέτας με στόχο την απομάκρυνση της υπολείπουσας ποσότητας αμμωνιακών ιόντων στο εσωτερικό του gel. Έτσι, προστίθενται 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 0.01 M, pH 8.2 και η κυβέτα αφήνεται

στους 37 °C για 30 min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου επιτευχθεί ένα σύνολο 3 πλύσεων. Στο τέλος της διαδικασίας, η κυβέτα εξισορροπείται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min, προσθέτονται 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, 0.01 M, pH 8.2 και αποθηκεύεται στους 4 °C έως την επαναχρησιμοποίησή της.

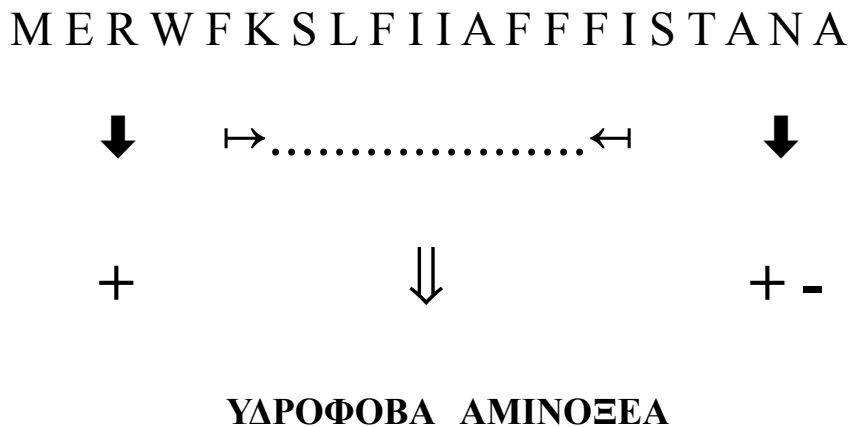
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανάπτυξη του αριστοποιημένου πρωτοκόλλου εξωκυττάριας παραγωγής της L-ασπαραγινάσης του βακτηριακού στελέχους *Erwinia chrysanthemi*.

4.1.1 Μελέτη της ετερόλογης έκφρασης του ενζύμου σε 7 διαφορετικά στελέχη *E. coli*.

Όπως έχει αναφερθεί και αναλυθεί ήδη στην εισαγωγή, η γονιδιακή αλληλουχία της L-ASNase τόσο του βακτηριακού στελέχους *Erwinia chrysanthemi*, το οποίο μελετάται στη παρούσα εργασία, όσο και άλλων βακτηριακών στελεχών, περιλαμβάνει την ύπαρξη μια επιπλέον νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που βρίσκεται στο 5'-άκρο, ακριβώς πριν τη κύρια. Η αλληλουχία αυτή αντιστοιχεί περίπου σε 20-30 αμινοξικά κατάλοιπα και ονομάζεται *πεπτιδίο οδηγός*. Είναι το σινιάλο, το οποίο θα αναγνωριστεί από του πρωτεϊνικούς παράγοντες (μοριακές ακόλουθοι) των μηχανισμών μεταφοράς, με αποτέλεσμα να οδηγηθεί το πρωτεϊνικό μόριο στον περιπλασμικό χώρο και από κει εξωκυτταρικά στο θρεπτικό υλικό. Η αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού του συγκεκριμένου ενζύμου είναι η ακόλουθη:



Σχήμα 4.1 Σχηματική περιγραφή των ιδιοτήτων της αλληλουχίας του πεπτιδίου οδηγού της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*.

Η συγκεκριμένη αλληλουχία του πεπτιδίου οδηγού, ικανοποιεί τις ιδιότητες που απαιτεί το μονοπάτι μεταφοράς SecB, έτσι ώστε να αναγνωρίσει το σινιάλο και να προσδεθεί στη

πρωτεΐνη, με στόχο την μεταφορά της στο περίπλασμα. Όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα, οι πρωτεϊνικοί παράγοντες του μηχανισμού SecB (Choi and Lee, 2004; Fekkes and Driesen, 1999) αναγνωρίζουν αλληλουχίες, οι οποίες διαθέτουν ένα θετικά φορτισμένο αμινοξικό κατάλοιπο στα αρχικά τους αμινοξέα (αμινοξύ αργινίνη-(R), στο παραπάνω σχήμα). Στη συνέχεια ακολουθεί μια αλληλουχία υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων (οριοθετείται από τη φαινυλαλανίνη και την ισολευκίνη, F-I, στο Σχήμα 4.1). Και τελικά, υπάρχει ένα πολικό αμινοξύ στο τέλος της αλληλουχίας, όπως υπάρχει η ασπαραγίνη-N στη παραπάνω αλληλουχία. Σαφώς, όλα τα παραπάνω, αποτελούν ενδείξεις, οι οποίες ενισχύουν τη πιθανότητα, η L-ASNase, η οποία μελετάται, να μεταφέρεται στο περίπλασμα μέσω του μηχανισμού SecB. Για τον ακριβή προσδιορισμό και απόδειξη αυτού του γεγονότος, απαιτείται επιπλέον διερεύνηση και ανάλυση των μηχανισμών αυτών μεταφοράς, με μοριακές μεθόδους.

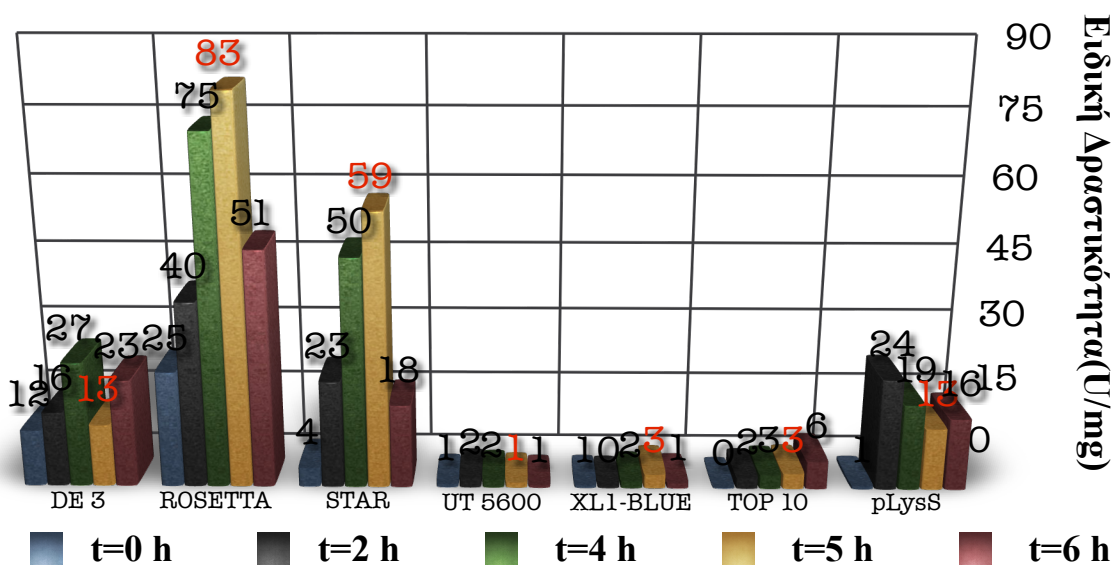
Ένας από τους κύριους παράγοντες, μεταξύ άλλων, ο οποίος συμβάλλει με καθοριστικό τρόπο, στη μεταφορά μια ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο περίπλασμα του *E. coli*, το οποίο χρησιμοποιείται ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών, είναι και το στέλεχος *E. coli* που κάθε φορά εκφράζει την πρωτεΐνη. Ανάλογα 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 προέρχεται από 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 σύνηθες, 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 επιρρεπές.

Με βάση τα προηγούμενα, στα πλαίσια διερεύνησης της πιθανότητας εξωκυττάριας έκκρισης της *Erwinia chrysanthemi* L-ASNase, στο *E. coli*, μελετήσαμε την έκφραση 7 διαφορετικών στελεχών (strains), τα οποία φαίνονται στον αμέσως παρακάτω Πίνακα 4.1. Αρχικά, τα επίπεδα

ενδοκυττάριας έκφρασης, όπως επίσης και τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα, τα οποία μαρτυρούν την έκφραση της L-ASNase φαίνονται παρακάτω στο Διάγραμμα 4.1 και στις Εικόνες 4.1 και 4.2 αντίστοιχα.

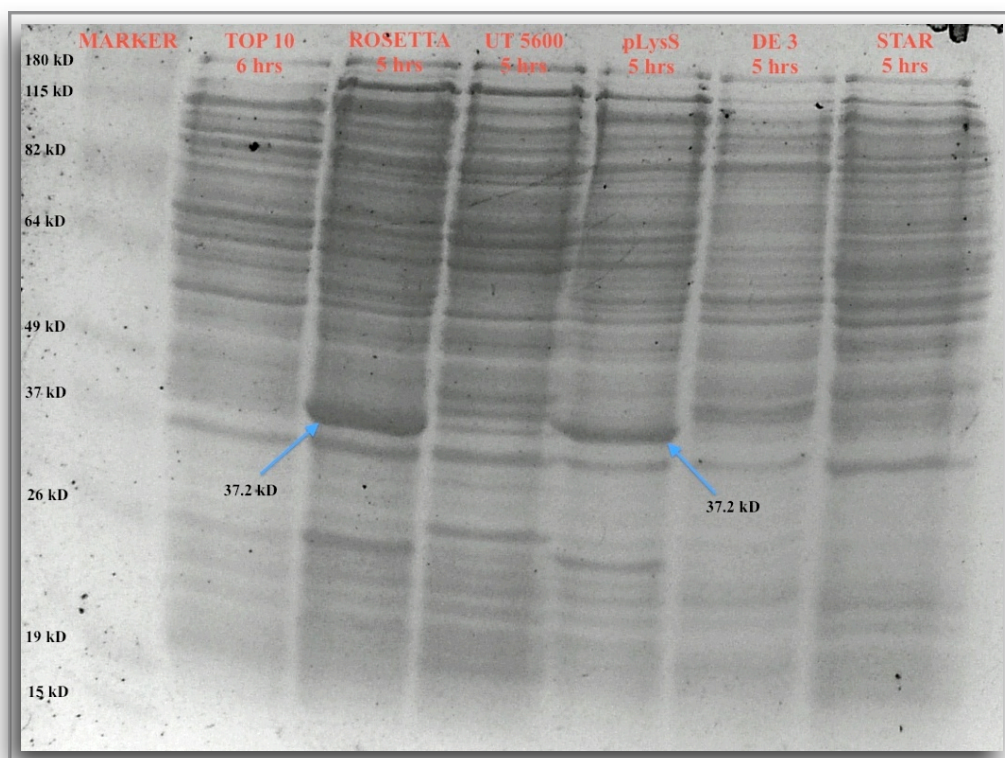
Πίνακας 4.1 Τα διαφορετικά στελέχη *E. coli*, των οποίων μελετήθηκε η ενδοκυττάρια έκφραση της ανασυνδυασμένης L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*.

Στέλεχος (strain) <i>E. coli</i>
XL1-Blue
BL21(DE3)
BL21(DE3) Rosetta
BL21(DE3) pLysS
BL21(DE3) STAR
TOP 10
UT 5600

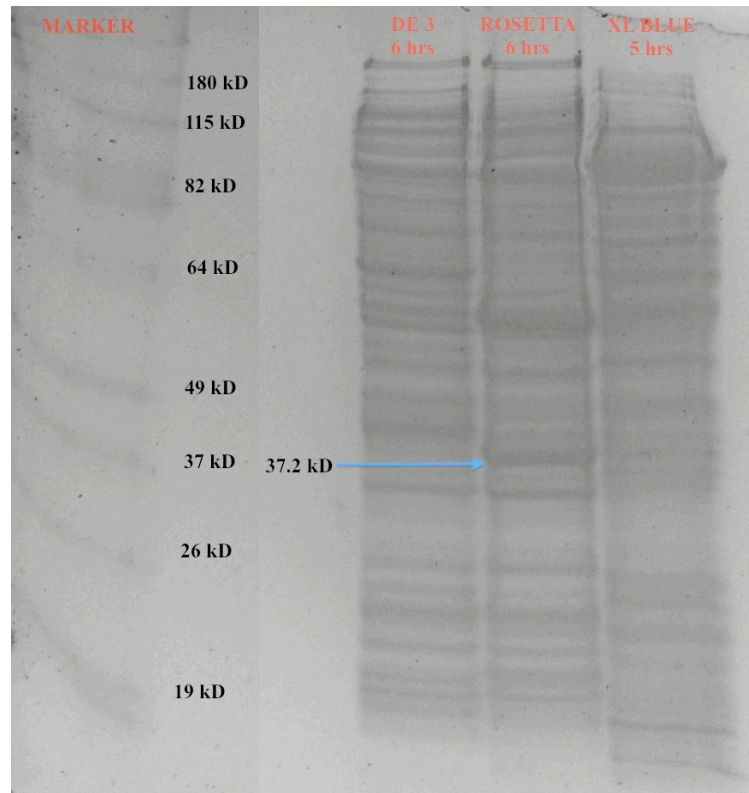


Διάγραμμα 4.1 Ειδικές δραστηκότητες (U/mg) ενδοκυττάριας L-ASNase διαφορετικών στελεχών της *E. coli* στα χρονικά διαστήματα 0, 2, 4, 5 και 6 h μετά τη προσθήκη του IPTG.

Συμπεραίνουμε, ότι το στέλεχος BL21(DE3) Rosetta, εκφράζει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη, όσον αφορά την ενδοκυτταρική έκφραση. Ακολουθεί το στέλεχος BL21(DE3) STAR και έπονται τα στελέχη BL21(DE3) και BL 21(DE3) pLysS που εμφανίζουν σχεδόν τα ίδια επίπεδα. Το ίδιο συνέβη και με τα UT 5600, XL1 BLUE και TOP 10, τα οποία επέδειξαν τα χαμηλότερα εκφραστικά επίπεδα.



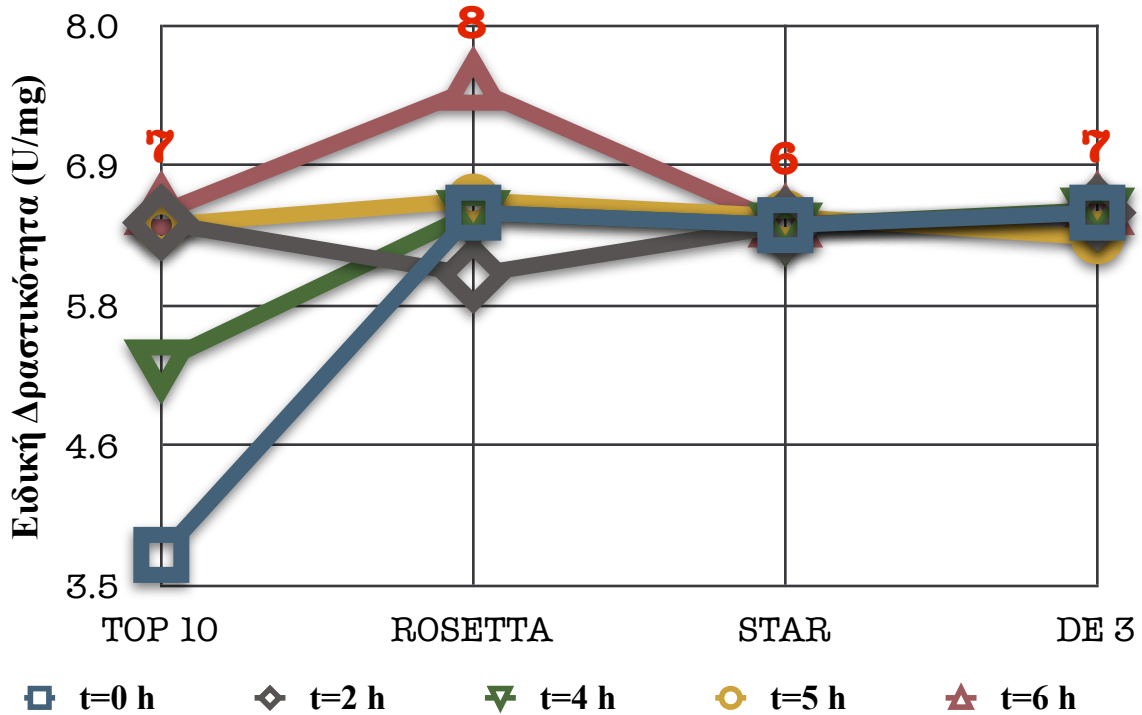
Εικόνα 4.1 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του ενδοκυτταρικού κλάσματος των διαφορετικών στελεχών που μελετήθηκαν. Τα μπλέ βέλη υποδηλώνουν τη παρουσία της L-ASNase, το μέγεθος της οποίας είναι 37.2 kDa. Απο αριστερά προς τα δεξιά έχουμε το αποτύπωμα του μάρτυρα (marker), του στελέχους TOP 10 6 h μετά τη προσθήκη του IPTG καθώς και των BL21(DE3) Rosetta, UT 5600, BL 21(DE3) pLysS, BL21(DE3) και BL21(DE3) STAR, 5 h μετά τη προσθήκη του IPTG.



Εικόνα 4.2 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του ενδοκυτταρικού κλάσματος των στελεχών που μελετήθηκαν. Απο αριστερά προς τα δεξιά, παρατηρούμε το αποτύπωμα του μάρτυρα (marker), του στελέχους BL 21(DE3) και του BL21(DE3) Rosetta 6 h μετά τη προσθήκη του IPTG, καθώς επίσης και του XL1-BLUE, 5 h μετά τη προσθήκη του IPTG.

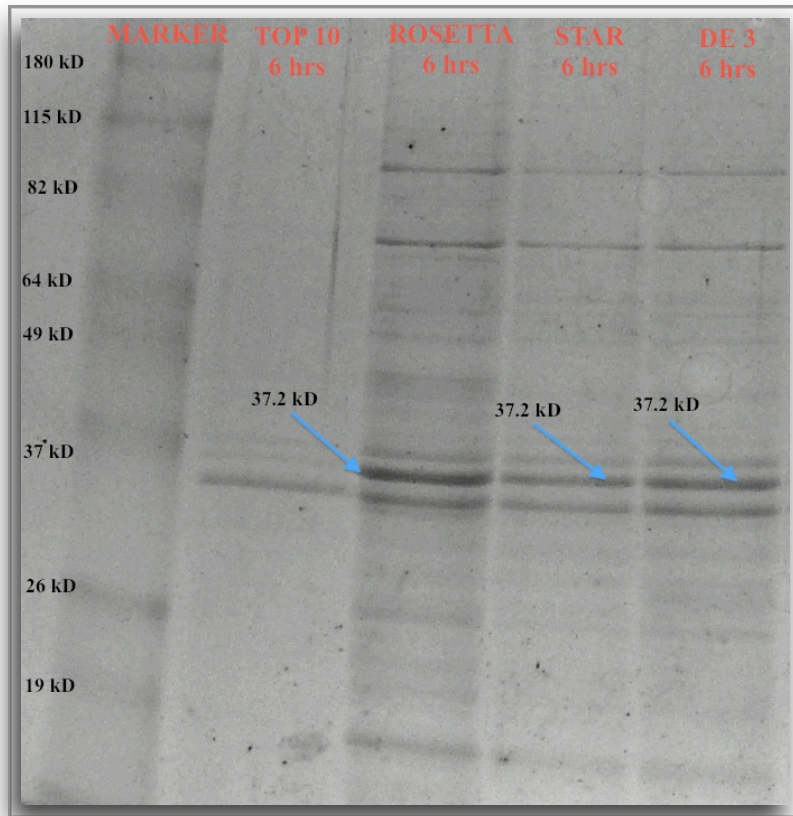
Απο τις παραπάνω εικόνες και το διάγραμμα, μπορεί κανείς εύκολα να συμπεράνει, ότι τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης εμφανίζονται στο στελέχος BL21(DE3) Rosetta και μάλιστα το γεγονός αυτό αποτυπώνεται και στο ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του συγκεκριμένου στελέχους στην Εικόνα 4.1, όπου 5 ώρες μετά την προσθήκη του IPTG, παρατηρείται η εντονότερη παραγωγή της πρωτεΐνης που μεταφράζεται σε υψηλότερη ειδική δραστηριότητα στο Διάγραμμα 4.1.

Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι κατά τη μελέτη έκφρασης των παραπάνω στελεχών, ανιχνεύθηκε ενζυμική δραστηριότητα στο θρεπτικό μέσο σε 4 από τα 7 στελέχη. Οι εξωκυττάρειες ειδικές δραστηριότητες στις περιπτώσεις των τεσσάρων αυτών στελεχών, φαίνονται στο παρακάτω Διάγραμμα 4.2.



Διάγραμμα 4.2 Ειδικές δραστηριότητες (U/mg) εξωκυττάριας L-ASNase, 4 διαφορετικών στελεχών της *E. coli*, στα χρονικά διαστήματα 0, 2, 4, 5 και 6 h μετά τη προσθήκη του IPTG.

Απο το παραπάνω Διάγραμμα 4.2, παρατηρούμε ότι τα τέσσερα στελέχη, στα οποία παρατηρήθηκε εξωκυττάρια έκκριση της L-ASNase είναι τα TOP 10, BL21(DE3) Rosetta, BL21 (DE3) και BL21(DE3) STAR. Ειδικότερα, το στέλεχος, στο οποίο προσδιορίστηκε η υψηλότερη ειδική δραστηριότητα, είναι το BL21(DE3) Rosetta. Το στέλεχος αυτό επιλέχθηκε για τη περαιτέρω μελέτη της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*. Στην επόμενη Εικόνα 4.3, φαίνεται το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του εξωκυττάριου κλάσματος των τεσσάρων στελεχών, στα οποία ανιχνεύθηκε L-ASNase στο θρεπτικό μέσο.

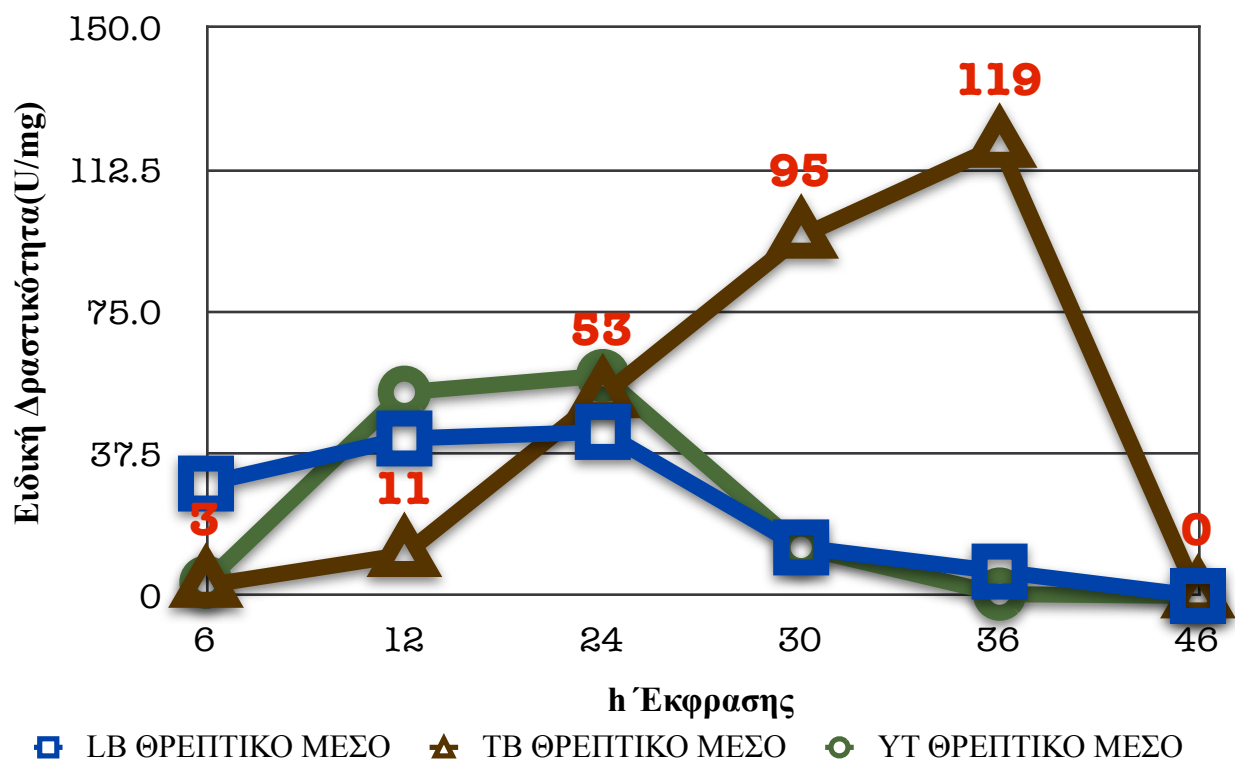


Εικόνα 4.3 Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των τεσσάρων στελεχών, στα οποία η L-ASNase εμφανίζεται στο θρεπτικό υλικό. Απο αριστερά προς τα δεξιά, παρατηρούμε το ηλεκτροφορητικό του μάρτυρα (marker), του στελέχους TOP 10, του BL21(DE3) Rosetta, BL21(DE3) STAR και BL21(DE3) 6 h μετά τη προσθήκη του IPTG. Διακρίνεται η έντονη παρουσία του ενζύμου στη περίπτωση του στελέχους BL21(DE3) Rosetta, 6 h μετά τη προσθήκη IPTG.

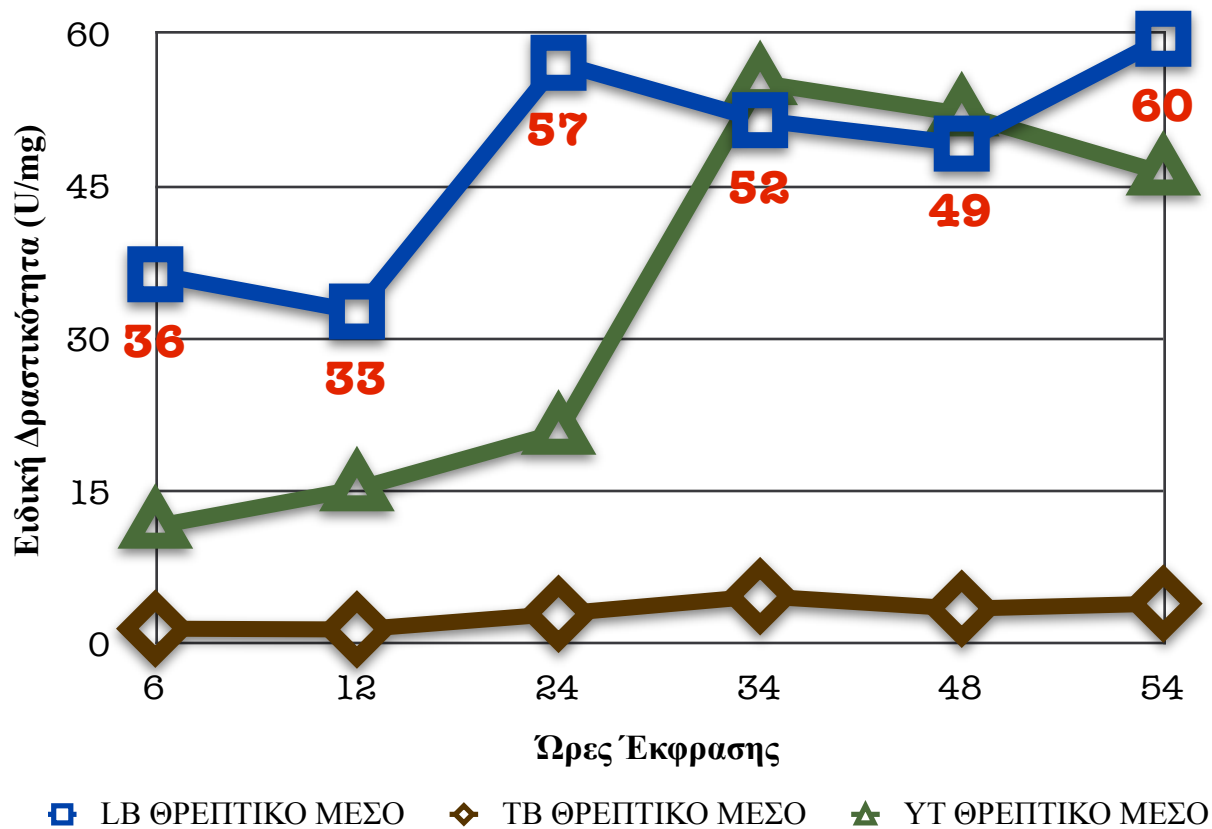
4.1.2 Η επίδραση της θερμοκρασίας και της σύστασης του θρεπτικού υλικού στην μεγιστοποίηση των επιπέδων ετερόλογης έκφρασης του ενζύμου, στο στέλεχος *E. coli* BL21(DE3) Rosetta.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση δύο βασικών παραμέτρων, οι οποίες σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης. Οι παράμετροι αυτές είναι η θερμοκρασία και η σύσταση του θρεπτικού υλικού. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν δύο θερμοκρασίες έκφρασης, 18 °C και 37 °C και τρία

διαφορετικά θρεπτικά υλικά, TB, YT και LB, η σύσταση των οποίων περιγράφεται στο κεφάλαιο “Μέθοδοι”. Επιπλέον, μελετήθηκε η πορεία της έκφρασης για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (54 h), με σκοπό τη διερεύνηση των συνθηκών μεγιστοποίησης των επιπέδων έκφρασης, όπως επίσης και των επιπέδων εξωκυττάριας παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, κάτι που σύμφωνα με αρκετές μελέτες συμβαίνει (Lee et al., 2001; Mergulhao et al., 2005). Αμέσως παρακάτω ακολουθούν τα Διαγράμματα 4.3 και 4.4, που περιγράφουν τη σχέση των επιπέδων έκφρασης με τη θερμοκρασία και τη σύσταση του θρεπτικού υλικού.



Διάγραμμα 4.3 Η εξωκυττάρια ειδική δραστηριότητα στους 37° C, χρησιμοποιώντας τα θρεπτικά μέσα TB, YT και LB.



Διάγραμμα 4.4 Η εξωκυτάρια ειδική δραστηριότητα στους 18 °C, στη περίπτωση των θρεπτικών μέσων TB, YT και LB.

Απο τα παραπάνω διαγράμματα, γίνεται αντιληπτό ότι, η εξωκυτάρια παραγωγή μεγιστοποιείται 36 ώρες μετά τη προσθήκη του IPTG, στη περίπτωση των 37 °C και με χρήση του TB ως θρεπτικό καλλιέργειας. Έτσι, οι βέλτιστες συνθήκες εξωκυτταρικής έκφρασης που προσδιορίστηκαν, με βάση τη πειραματική διαδικασία, η οποία συνοψίζεται στα τελευταία δύο διαγράμματα, είναι η χρήση του θρεπτικού μέσου TB, σε θερμοκρασία 37 °C. Ειδικότερα, υπο αυτές τις συνθήκες, μετά απο 36 ώρες έκφρασης, παρήχθησαν **17.860 UI** και περίπου **5 mg** εξωκυττάριας L-ASNase σε 1 λίτρο καλλιέργειας. Η αντίστοιχη τιμή της συνολικής δραστηριότητας του ενδοκυττάριου ενζύμου στο 1 λίτρο είναι **4.280 UI**. Ακόμη, βλέπουμε την επαλήθευση του γεγονότος, ότι στη περίπτωση της ετερόλογης έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο *E.coli*, οι οποίες φέρουν πεπτίδιο οδηγό με στόχο τη μεταφορά τους στο

περίπλασμα και απο κει πιθανότατα στο θρεπτικό μέσο, μεγιστοποιείται η εξαγωγή τους μετά απο πολλές ώρες έκφρασης (Lee et al., 2001).

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι στους 18 °C, τα αποτελέσματα αντιστρέφονται ολοκληρωτικά όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης. Προέκυψε μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της θρεπτικότητας και των επιπέδων έκφρασης. Όσο θρεπτικότερο είναι ένα θρεπτικό μέσο, τόσο χαμηλότερα τα επίπεδα έκφρασης. Είναι κάτι που απαιτεί μια περαιτέρω διερεύνηση και ανάλυση.

Εφόσον διερευνήθηκε η πιθανότητα εξωκυττάριας παραγωγής της L-ASNase και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης, πραγματοποιήθηκε μελέτη του *καθαρισμού* του εξωκυττάριου ενζύμου. Έγιναν προσπάθειες απομόνωσης, κάνοντας χρήση τόσο χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, όσο και χρωματογραφίας συγγένειας.

4.2 Ανάπτυξη βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού της L-ασπαραγινάσης του βακτηριακού στελέχους *Erwinia chrysanthemi*.

4.2.1 Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής.

Αρχικά, έγιναν προσπάθειες καθαρισμού του εξωκυττάριου ενζύμου, με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Αυτού του είδους η χρωματογραφία, χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για τον καθαρισμό του ενδοκυττάριου ενζύμου (Kotzia and Labrou, 2007). Ο αρχικός προσροφητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *S-Sepharose*, ο οποίος διαθέτει αρνητικά φορτισμένες σουλφονικές ομάδες και αποτελεί έναν ισχυρό κατιοντοανταλλάκτη. Πραγματοποιήθηκαν 3 εναλλακτικές προσπάθειες (πρωτόκολλα 1-3) καθαρισμού με τον συγκεκριμένο ιοντοανταλλάκτη, οι αποδόσεις των οποίων αναφέρονται στη συνέχεια.

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 προσροφητή εξισορροπήθηκαν με 20 mM Pi, pH 5.5. Στη συνέχεια στη στήλη φορτώθηκαν 10 ml θρεπτικού υλικού, το οποίο περιείχε 90 μονάδες ενζύμου και είχε αρχικά ρυθμιστεί σε pH 5.5 με τη προσθήκη 0.01 M HCL. Εν συνεχεία η στήλη πλύθηκε με ρυθμιστικά διαλύματα 20 mM Pi, pH 5.5 και pH 7.5. Τελικά το προσροφημένο ένζυμο εκλούστηκε με μεταβολή του pH, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό με 20 mM Pi, pH 8.5. Η στήλη αναγενήθηκε με 0.5 M NaCl, pH 5.5. Η χωρητικότητα του προσροφητή ήταν 79 μονάδες, από τις οποίες εκλούστηκαν οι 8. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο καθαρισμού παρουσίασε μια **απόδοση 10 %**.

Πρωτόκολλο 2.

Η τροποποίηση του αρχικού πρωτοκόλλου αφορά στο τρόπο με τον οποίο το pH του θρεπτικού εκχυλίσματος, εξισορροπείται σε pH 5.5. Αυτή τη φορά το θρεπτικό διάλυμα υποβλήθηκε σε διαπίδυση με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi, pH 5.5. Στη συνέχεια φορτώθηκαν στη στήλη 64 ενζυμικές μονάδες, αφού αρχικά η στήλη είχε εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi, pH 5.5. Ακολούθησαν πλύσεις με 20 mM Pi, pH 5.5 και 20 mM Pi, pH 7.5 και τελικά το ένζυμο εκλούστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi, pH 8.5. Η στήλη αναγενήθηκε με 1 M NaCl, pH 5.5. Η χωρητικότητα του προσροφητή ήταν 37 μονάδες, από τις οποίες εκλούστηκαν οι 16. Το δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού παρουσίασε μια **απόδοση 43 %**.

Πρωτόκολλο 3.

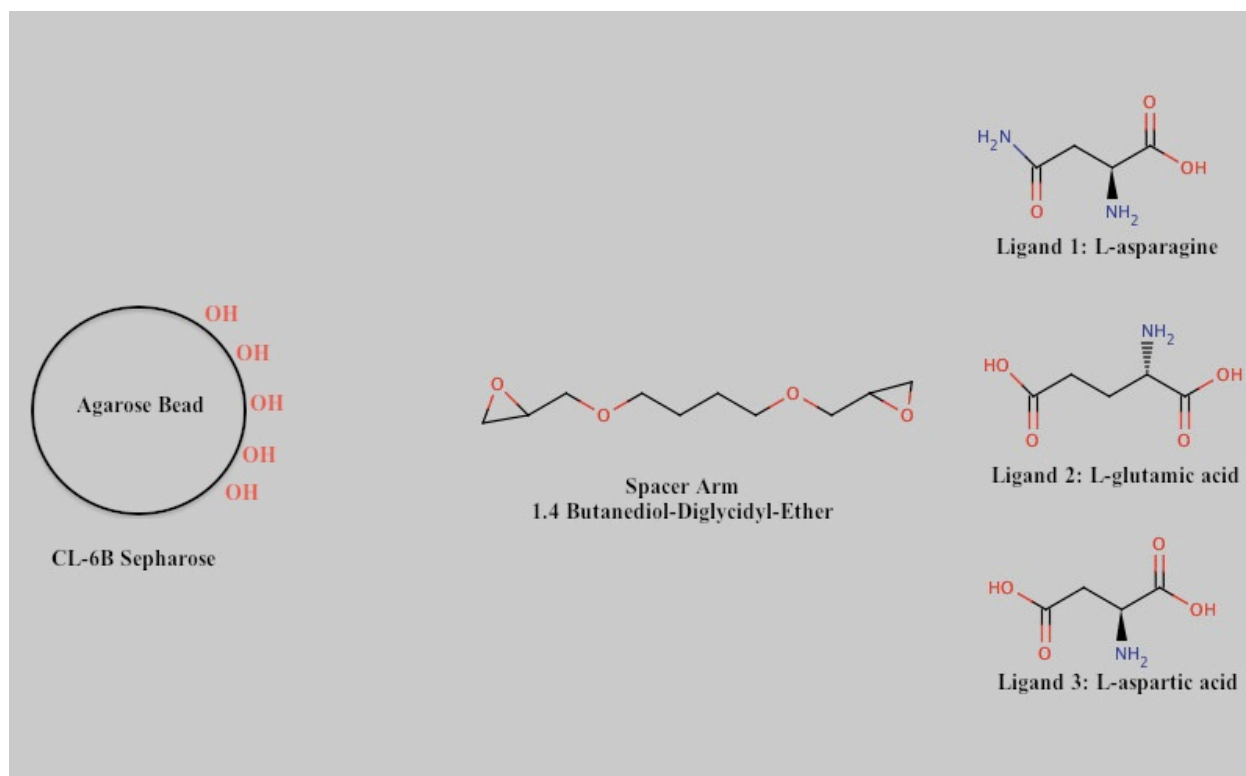
Στη τρίτη προσπάθεια καθαρισμού της L-ASNase, έγινε αλλαγή συνθηκών έκλυσης του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης 20 mM, pH 9, όπως επίσης και ένα δεύτερο διάλυμα με 20 mM γλυκίνη, pH 9 και 0.1 M NaCl. Μετά την εξισορρόπηση της στήλης με 20 mM Pi, pH 5.5, φορτώνονται στη στήλη 54 ενζυμικές μονάδες. Ακολουθούν πλύσεις με 20 mM Pi, pH 5.5 και 20 mM Pi, pH 7.5 και τελικά το ένζυμο εκλούστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi, pH 8.5. Στη συνέχεια, ερευνήθηκε η επίδραση

των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων της γλυκίνης, στο ένζυμο που παρέμεινε προσροφημένο στη στήλη μετά την έκλουση με 20 mM Pi, pH 8.5, το οποίο και τελικά δεν επηρεάστηκε από τη γλυκίνη. Η στήλη αναγεννήθηκε με 1 M NaCl, pH 5.5. Η χωρητικότητα του προσροφητή ήταν 19 μονάδες, από τις οποίες εκλούστηκαν οι 8. Το τρίτο πρωτόκολλο καθαρισμού παρουσίασε μια **απόδοση 42 %**.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συνάγεται το συμπέρασμα, ότι το εξωκυττάριο ένζυμο δεν δύναται να καθαριστεί με ικανοποιητικές αποδόσεις, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από άλλες δοκιμές που έγιναν με άλλους ιοντοανταλλάκτες όπως DEAE Sepharose. Για το λόγο αυτό, οι προσπάθειες καθαρισμού της L-ASNase, η οποία όπως ήδη έχει αναφερθεί αποτελεί ένα φαρμακευτικό ένζυμο και ο καθαρισμός επιβάλλεται να επιφέρει πολύ υψηλή καθαρότητα, επικεντρώθηκαν στη χρωματογραφία συγγένειας.

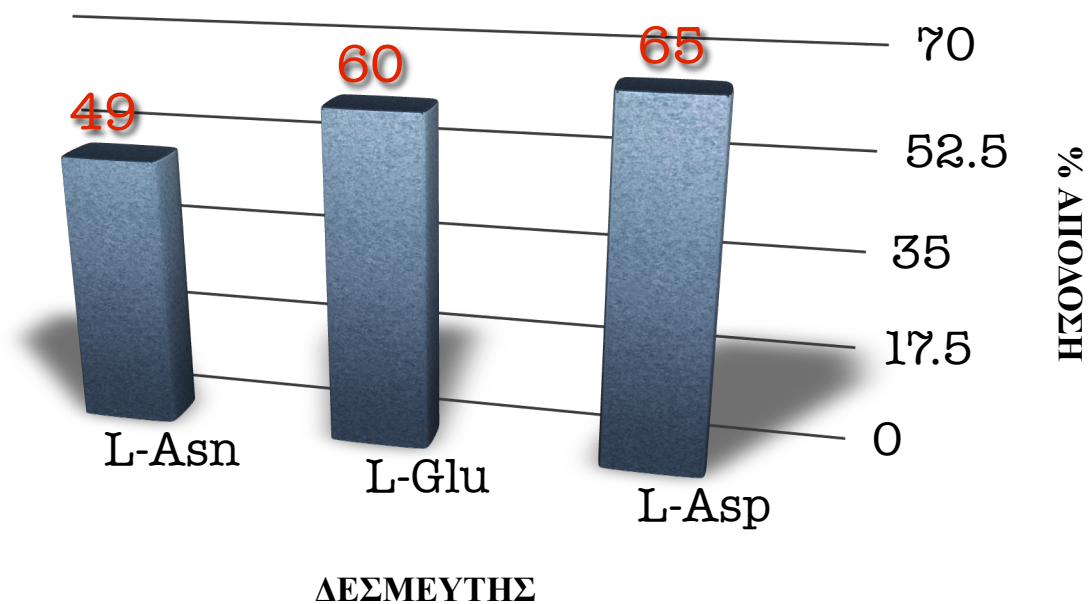
4.2.2 Χρωματογραφία Συγγένειας.

Για τον καθαρισμό της L-ASNase, παρασκευάστηκαν 3 προσροφητές συγγένειας, οι οποίοι προέκυψαν μετά από ακινητοποίηση του υποστρώματος, **L-ασπαραγίνη (L-Asn)** και 2 αναστολέων του ενζύμου, **L-ασπαρτικό οξύ (L-Asp)** και **L-γλουταμινικό οξύ (L-Glu)**. Η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δις-οξυράνιο σαν ενεργοποιητή. Ο τύπος αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε είναι η **Sepharose CL-6B**. Αναλυτικά η διαδικασία ενεργοποίησης των σφαιριδίων αγαρόζης, η αντίδραση με τον βραχίονα *1,4 βουτανεδιόλ-διγλυκιδύλ-αιθέρα* και η τελική αντίδραση ακινητοποίησης του κάθε δεσμευτή, περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο “Μέθοδοι”. Συνοπτικά, η αγαρόζη ενεργοποιείται με υδροξείδιο του νατρίου και στη συνέχεια αντιδρά με τον βραχίονα. Στη συνέχεια, η δραστική ομάδα του εποξειδίου του βραχίονα, αντιδρά με τις υπάρχουσες αμινικές ομάδες των δεσμευτών. Τα στάδια φαίνονται στη παρακάτω Εικόνα 4.4.



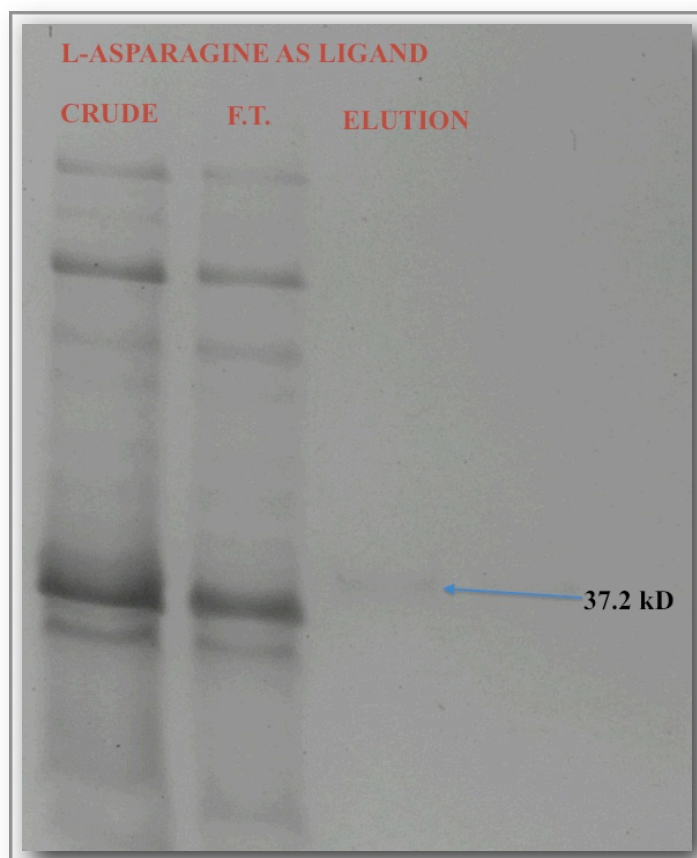
Εικόνα 4.4 Η σύνθεση των τριών δεσμευτών. Παρατηρούμε αριστερά το σφαιρίδιο αγαρόζης με τα διαθέσιμα υδροξύλια, τα οποία ενεργοποιούνται μετά την αντίδραση με NaOH. Στο κέντρο βρίσκεται ο βραχίονας (Spacer Arm), ο οποίος διαθέτει τις έποξυ-δραστικές ομάδες που θα αντιδράσουν στη συνέχεια με τις αμινικές ομάδες των δεσμευτών (Ligands) δεξιά.

Στη συνέχεια το Διάγραμμα 4.5, παρουσιάζει τις αποδόσεις των καθαρισμών χρησιμοποιώντας τους παραπάνω τρεις δεσμευτές. Και στις τρεις περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκαν **2 ml** προσροφητή και φορτώθηκαν στη στήλη **80** μονάδες ενζύμου. Οι στήλες εξισορροπήθηκαν αρχικά με ρυθμιστικό διάλυμα 5 mM Pi, pH 7.5. Οι πλύσεις έγιναν με το ίδιο ρυθμιστικό, ενώ οι εκλούσεις των ενζύμων με 20 mM του κάθε φορά χρησιμοποιούμενου δεσμευτή (L-Asp, L-Glu, L-Asn).



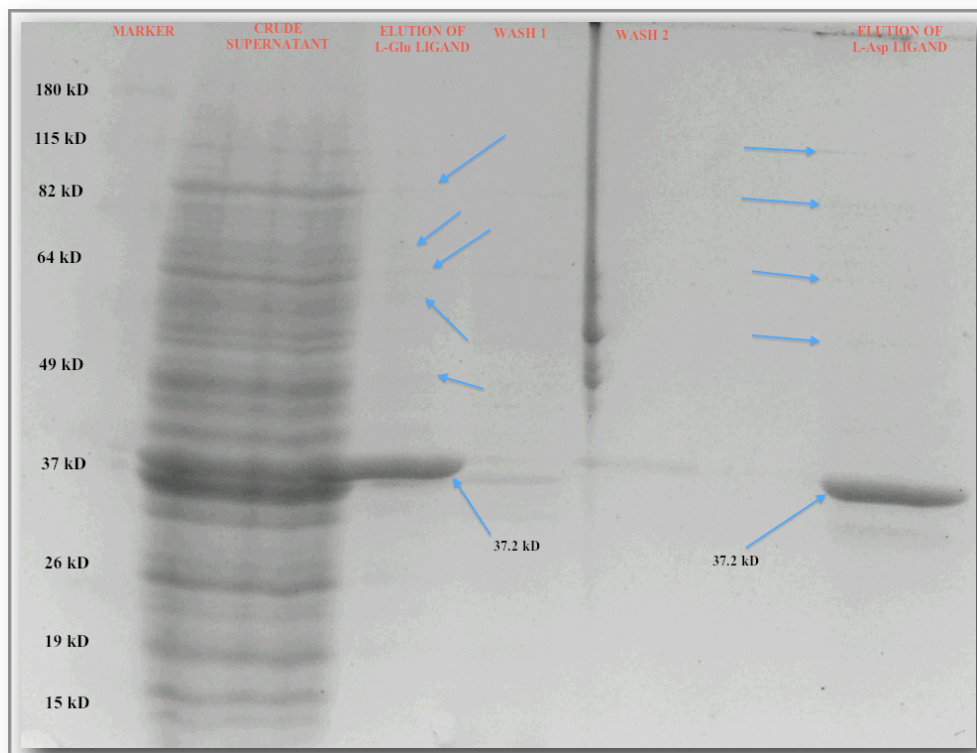
Διάγραμμα 4.5 Οι αποδόσεις των καθαρισμών χρησιμοποιώντας τους τρεις δεσμευτές L-Asp, L-Glu και L-Asn.

Όπως γίνεται αντιληπτό από το Διάγραμμα 4.5, ο δεσμευτής εκείνος ο οποίος εμφάνισε την υψηλότερη απόδοση καθαρισμού είναι το L-Asp (65 %). Ακολούθησε η απόδοση του L-Glu και τέλος της L-Asn. Στις παρακάτω δύο Εικόνες 4.5 και 4.6, φαίνονται τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα των τριών παραπάνω καθαρισμών.



Εικόνα 4.5 Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα στη περίπτωση της L-ασπαραγίνης ως δεσμευτή. Το μπλέ βέλος δείχνει τη πρωτεΐνη, η οποία έχει μέγεθος περίπου 37.2 kDa. Απο αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε το κλάσμα του crude, του μη προσροφημένου κλάσματος (flow through) και τέλος της έκλουσης (elution).

Ένα πρόβλημα στη περίπτωση έκλουσης με L-Asn είναι το γεγονός, ότι κατά τη διάρκεια έκλουσης του ενζύμου με L-ασπαραγίνη, ποσοστό αυτής υδρολύεται από το ένζυμο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό L-ασπαρτικού και αμμωνίας. Η αμμωνία αυτή, ανιχνεύεται κατά τη διαδικασία προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας (κεφάλαιο "Μέθοδοι"), όχι μόνο στο δείγμα, αλλά και στον μάρτυρα του δείγματος, κάτι το οποίο δυσχαιρένει τον υπολογισμό των ενζυμικών μονάδων.



Εικόνα 4.6 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα, το οποίο αποκαλύπτει τη καθαρότητα του ενζύμου, στις περιπτώσεις των L-ασπαρτικού και L-γλουταμινικού οξέος. Τα μπλέ βέλη υποδηλώνουν την ύπαρξη επιπρόσθετων ανεπιθύμητων πρωτεϊνών μετά τον καθαρισμό της L-ASNase. Το βέλος με τον αριθμό 37.2 kD, δείχνει το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της L-ASNase. Απο αριστερά προς τα δεξιά βλέπουμε το αποτύπωμα του μάρτυρα, του crude, της έκλουσης (elution) στη περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ως δεσμευτής το L-γλουταμινικό οξύ, ακολουθεί το αποτύπωμα του wash (5 mM Pi, pH 7.5) στη περίπτωση του L-γλουταμινικού και L-ασπαρτικού αντίστοιχα και τέλος η έκλουση (elution) στη περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ως δεσμευτής το L-ασπαρτικό.

Κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί, ότι το L-ασπαρτικό και L-γλουταμινικό οξύ, αποτελούν δύο αναστολείς του ενζύμου L-ASNase σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει (Jayaram et al., 1987). Ειδικότερα, αναπτύσσονται ισχυρότατες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οξέων αυτών και αμινοξικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου, με αποτέλεσμα να διαμορφώνεται μια συναγωνιστική αναστολή μεταξύ του ενζύμου και των δύο αυτών προϊόντων της ενζυμικής κατάλυσης. Ιδιαίτερα το L-ασπαρτικό οξύ, προσδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός, ότι κατά τη διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου χρησιμοποιώντας ως δεσμευτή το L-ασπαρτικό οξύ, το ένζυμο παρέμεινε δεσμευμένο ακόμη και

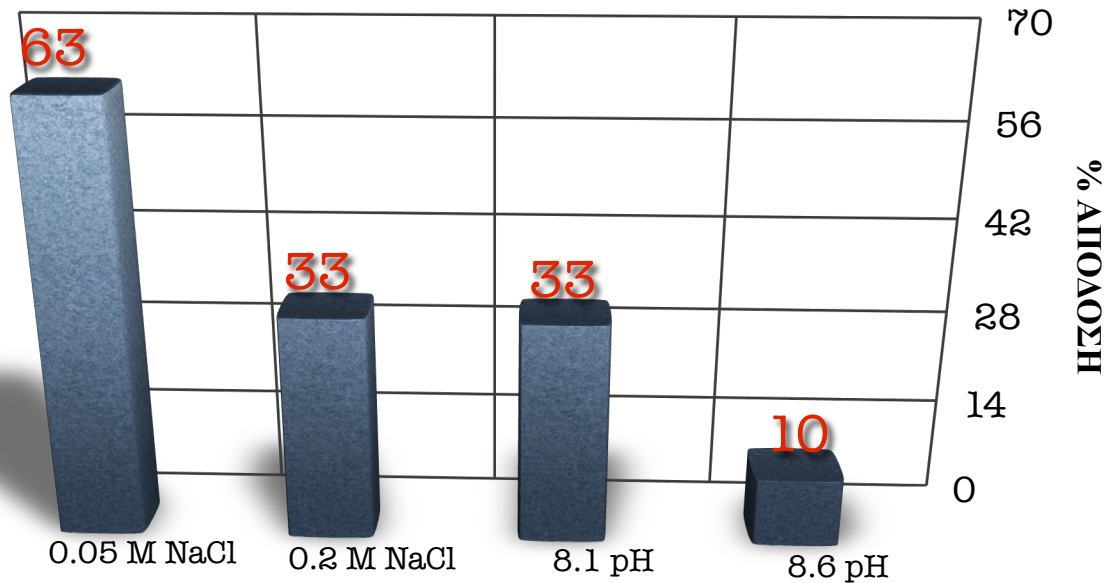
μετά τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο περιείχε 2 M NaCl. Το γεγονός αυτό αξιοποιήθηκε, πλένοντας τη στήλη με το παραπάνω ρυθμιστικό πριν την έκλυση του ενζύμου, με σκοπό την απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί, ότι κάτι αντίστοιχο δεν συμβαίνει με το L-γλουταμινικό οξύ. Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω και με τις αποδόσεις των καθαρισμών, επιλέχθηκε ως δεσμευτής για τη περαιτέρω μελέτη καθαρισμού και την ανάπτυξη του βέλτιστου πρωτοκόλλου καθαρισμού, το **L-ασπαρτικό οξύ**.

Εν συνεχεία, στη προσπάθεια απαλλαγής των επιπλέον πρωτεϊνών που υπάρχουν μετά τον καθαρισμό και τη βελτίωση της καθαρότητας του ενζύμου, εφαρμόστηκαν 4 πρωτόκολλα καθαρισμού με διαφορετικές κάθε φορά συνθήκες φόρτωσης του δείγματος. Έτσι, έγινε διερεύνηση της επίδρασης της **ιοντικής ισχύος** και του **pH**. Επιλέχθηκαν αρχικά δύο τιμές ιοντικής ισχύος, οι συνθήκες των οποίων διαμορφώθηκαν με τη προσθήκη NaCl, και δύο τιμές pH, στις οποίες εξισορροπήθηκε το δείγμα. Οι τιμές αυτές είναι:

Πίνακας 4.2 Οι αρχικές 4 διακριτές συνθήκες, που επιλέχθηκαν για τη βελτίωση του καθαρισμού.

NaCl	pH
0.05 M NaCl , 20 mM Pi, pH 7.5	20 mM Pi, pH 8.1
0.2 M NaCl, 20 mM Pi, pH 7.5	20 mM Pi, pH 8.6

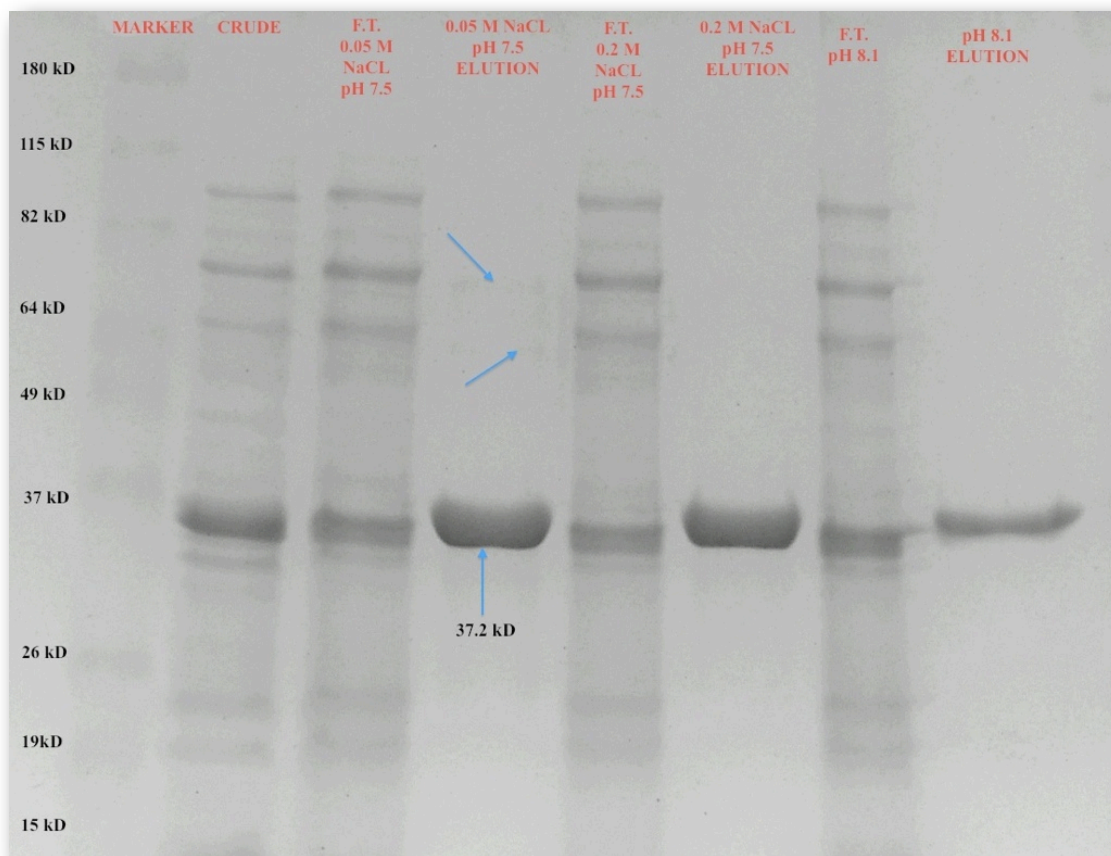
Η εξισορρόπηση του προσροφητή έγινε κάθε φορά με 20 mM Pi, ρυθμισμένο στο εξεταζόμενο pH. Οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο στάδια: 1) χρήση δις-απιονισμένου νερού για απαλλαγή από τις υδρόφοβες πρωτεΐνες και 2) 20 mM Pi, 2 M NaCl. Οι εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος, ρυθμισμένο κάθε φορά στο αντίστοιχο pH του εξεταζόμενου πρωτοκόλλου. Στη συνέχεια ακολουθούν, οι αποδόσεις καθαρισμών αυτών των τροποποιημένων πρωτοκόλλων, όπως επίσης και τα ηλεκτροφορητικά τους προφίλ.



ΣΥΝΘΗΚΕΣ

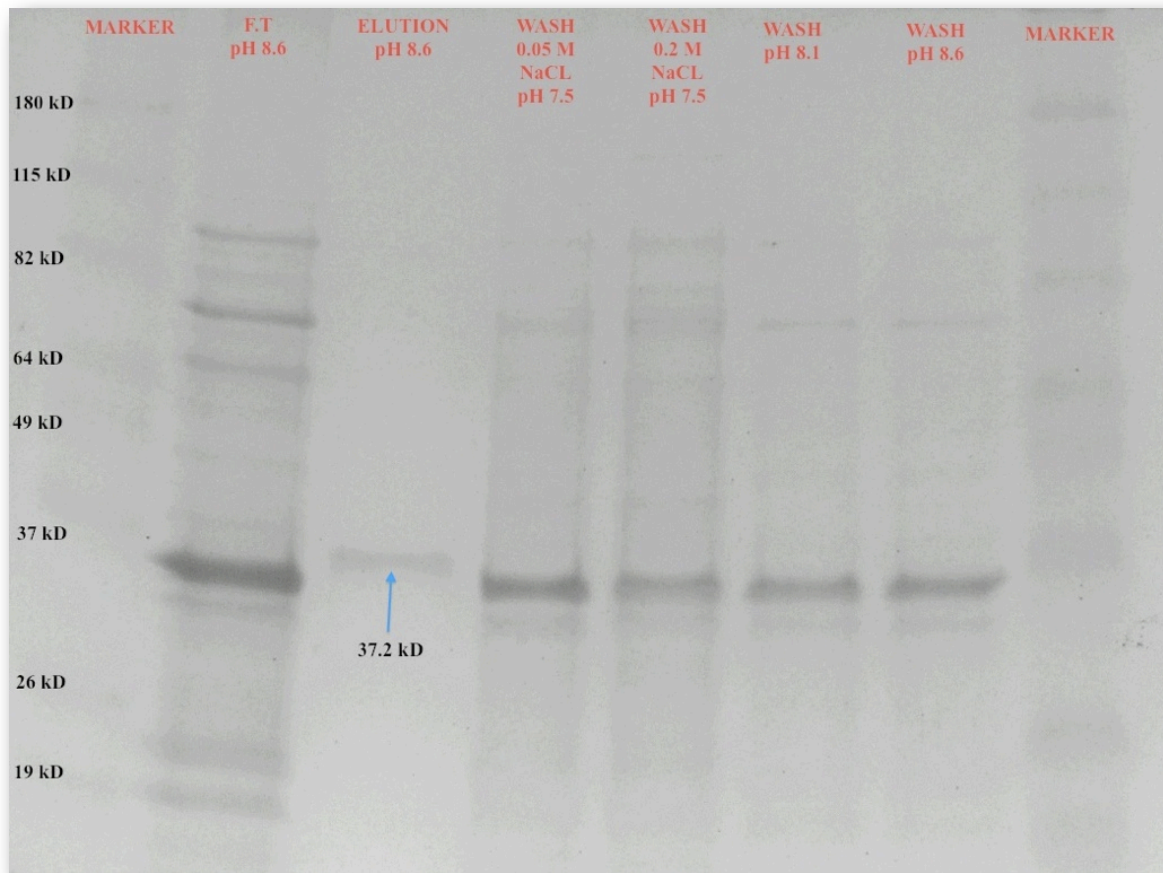
Διάγραμμα 4.6 Οι αποδόσεις των τεσσάρων διαφορετικών καθαρισμών, οι οποίοι προέκυψαν μετά από τη διαμόρφωση τεσσάρων διαφορετικών συνθηκών φόρτωσης του εξωκυττάριου εκχυλίσματος στον προσροφητή. Οι συνθήκες αυτές αφορούν δύο διαφορετικές συνθήκες pH, 8.1 και 8.6 και δύο διαφορετικές συνθήκες ιοντικής ισχύος, 0.05 M NaCl και 0.2 M NaCl, στις οποίες το pH ρυθμίστηκε στο 7.5. Ο προσροφητής εξισορροπήθηκε με 20 mM Pi, pH 7.5, 8.1 και 8.6 αντίστοιχα. Οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο στάδια: αρχικά με κρύο ddH₂O και εν συνεχεία με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi και 2 M NaCl, pH 7.5, ενώ οι εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος.

Απο το Διάγραμμα 4.6, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η συνθήκη στην οποία προέκυψε η υψηλότερη απόδοση καθαρισμού, είναι η περίπτωση χρήσης 0.05 M NaCl, pH 7.5. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα των παραπάνω καθαρισμών, τα οποία αποκαλύπτουν τη καθαρότητα της εκλουόμενης πρωτεΐνης.



Εικόνα 4.7 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των συνθηκών 0.05 M NaCl, 0.2 M NaCl, και pH 8.1. Απο αριστερά προς τα δεξιά, παρατηρούμε τον μάρτυρα (marker), το crude του εξωκυττάριου εκχυλίσματος, το μη προσροφημένο κλάσμα (flow through) και την έκλυση (elution) της συνθήκης 0.05 M NaCl, το μη προσροφημένο κλάσμα (flow through) και την έκλυση (elution) της συνθήκης 0.2 M NaCl και τέλος flow through και την έκλυση (elution) της συνθήκης pH 8.1.

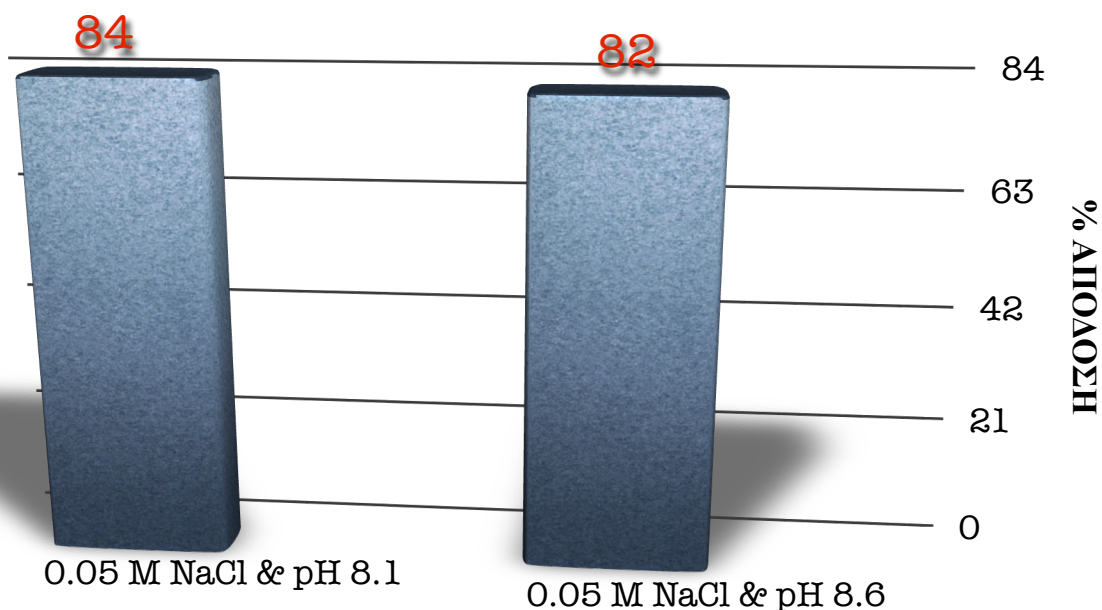
Απο τη παραπάνω Εικόνα 4.7, μπορούμε να δούμε τη καθαρότητα των εκλούσεων στη περίπτωση των συνθηκών 0.05 M NaCl, 0.2 M NaCl, και pH 8.1. Τα μπλέ βέλη που αντιστοιχούν στη περιοχή των 50-70 kD, δείχνουν δύο επιπρόσθετες μεγάλες πρωτεΐνες που υπάρχουν στην έκλυση της συνθήκης 0.05 M NaCl. Αντίθετα, στις περιπτώσεις των συνθηκών 0.2 M NaCl, και pH 8.1, η καθαρότητα είναι η επιθυμητή.



Εικόνα 4.8 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της συνθήκης pH 8.6 και των πλύσεων (wash) των τεσσάρων συνθηκών. Απο αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε τον μάρτυρα (marker), το μη προσροφημένο κλάσμα (flow through) και την έκλουση (elution) της συνθήκης pH 8.6 και διαδοχικά τα αποτυπώματα των πλύσεων (wash) των συνθηκών 0.05 M NaCl, 0.2 M NaCl, pH 8.1 και pH 8.6 και τέλος ένα ακόμη αποτύπωμα του μάρτυρα. Τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα των πλύσεων στη συγκεκριμένη εικόνα, αφορούν στις πλύσεις με 4 °C ddH₂O.

Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η διαφοροποίηση της ιοντικής ισχύς επέδρασε με θετικότερο τρόπο από ό,τι η αύξηση του pH και μάλιστα παρατηρούμε ότι όσο μεγαλύτερη η ιοντική ισχύς (0.2 M NaCl) τόσο ευνοϊκότερη η επίδραση. Από την άλλη πλευρά, η απόδοση στη περίπτωση της αυξημένης ιοντικής ισχύος, βλέπουμε ότι μειώνεται σχεδόν στο μισό συγκριτικά με τη μικρότερη ιοντική ισχύ (0.05 M NaCl), στην οποία, η καθαρότητα δεν είναι η επιθυμητή για μια φαρμακευτική πρωτεΐνη. Επιπλέον, σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι πλύσεις της

κολώνας με 20 mM Pi και 2 M NaCl, pH 7.5, επέδρασαν αρνητικά στην απόδοση του καθαρισμού, καθώς συνέβαλλαν στην απώλεια ενζυμικών μονάδων στο στάδιο των πλύσεων. Με γνώμονα λοιπόν την απόδοση του καθαρισμού, επιλέχθηκε η καλύτερη απόδοση όσον αφορά την ιοντική ισχύ και συνδυάστηκε με τις δύο συνθήκες pH, με σκοπό την διερεύνηση μιας πιθανής θετικής συνέργειας των συνθηκών αυτών, όσον αφορά τόσο τη καθαρότητα, όσο και την απόδοση του προσροφητή. Εξετάστηκαν δηλαδή οι συνθήκες **0.05 M NaCl με pH 8.1 και 0.05 M NaCl με pH 8.6.**

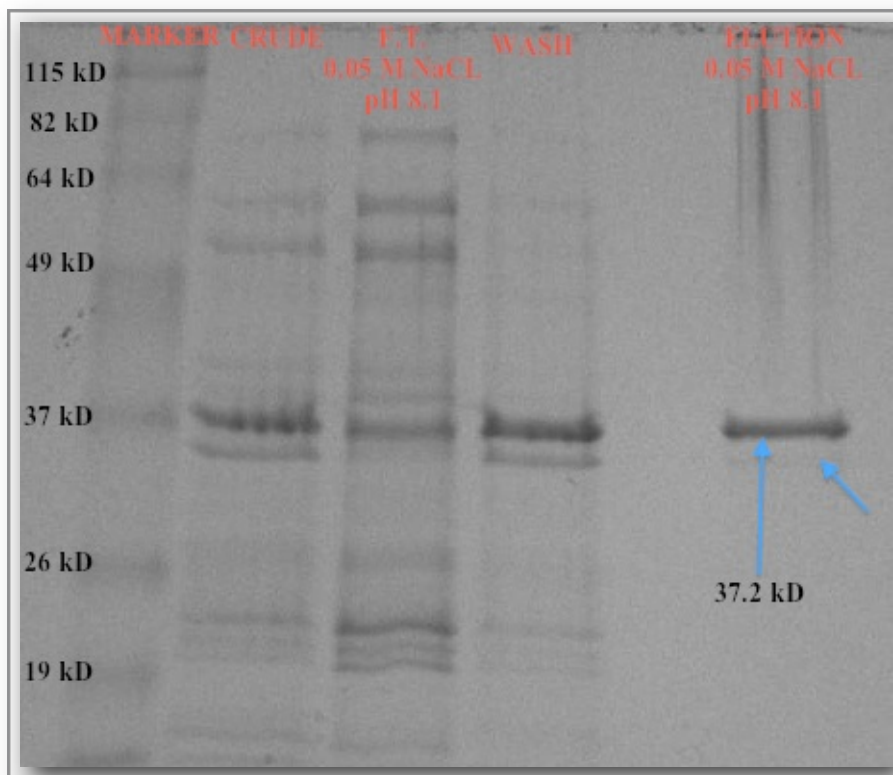


ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Διάγραμμα 4.7 Οι αποδόσεις των συνθηκών καθαρισμού, οι οποίες προκύπτουν από τον συνδυασμό των συνθηκών 0.05 M NaCl με pH 8.1 και 0.05 M NaCl με pH 8.6. Ο προσροφητής εξισορροπήθηκε με 20 mM Pi, pH 8.1 και pH 8.6 αντίστοιχα. Οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ένα στάδιο με 4° C ddH₂O, ενώ οι εκλούσεις με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος.

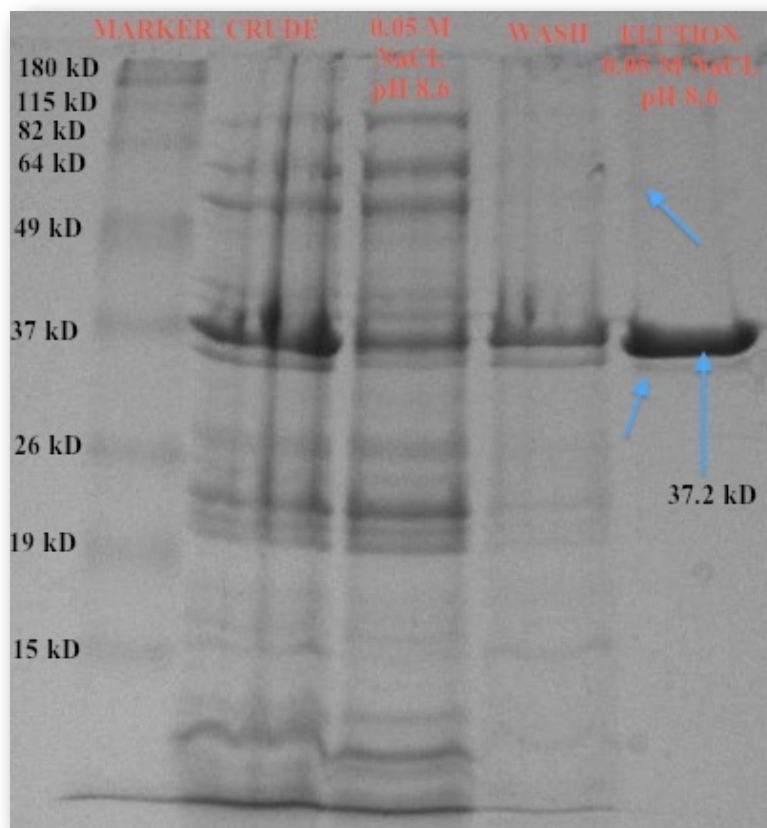
Παρατηρούμε ότι οι αποδόσεις των καθαρισμών, συνδυάζοντας 0.05 M NaCl με τις δύο συνθήκες pH, κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με μια ελαφρά υπεροχή της συνθήκης pH 8.1 &

0.05 M NaCl. Στη συνέχεια παραθέτονται τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα των δύο αυτών καθαρισμών.



Εικόνα 4.9 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της συνθήκης 0.05 M NaCl με pH 8.1. Απο αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε τον μάρτυρα (marker), το crude του εξωκυττάριου εκχυλίσματος, το μη προσροφημένο κλάσμα (flow through), το κλάσμα της πλύσης (wash) και την έκλουση (elution). Οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ένα στάδιο με 4 °C ddH₂O, ενώ οι εκλούσεις με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος.

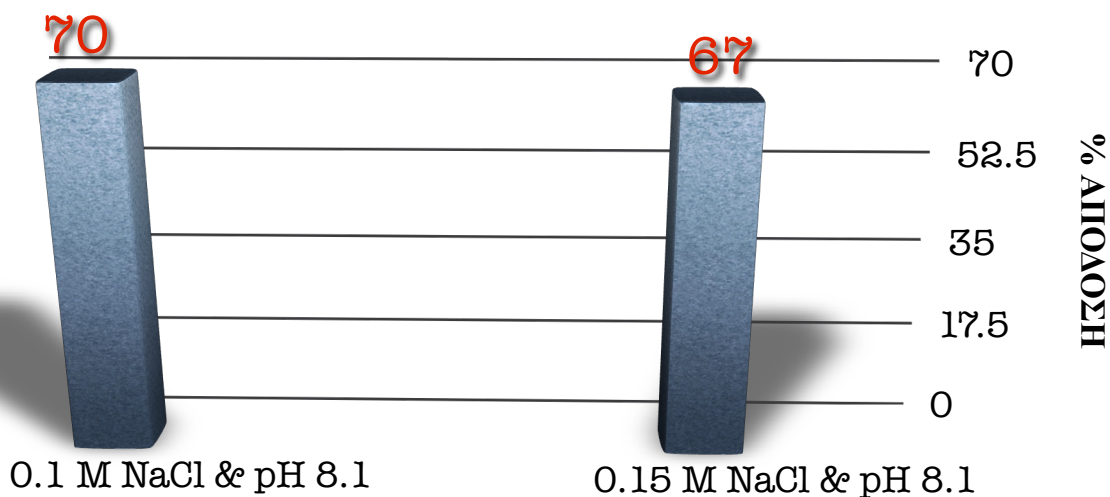
Απο το αποτύπωμα, συμπεραίνουμε ότι τελικά η αύξηση του pH απο 7.5 σε 8.1 οδήγησε σε απαλλαγή απο τις μεγάλες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο ύψος των 50-70 kDa στη περίπτωση του 0.05 M NaCl. Απο την άλλη πλευρά όμως, εμφανίστηκε μια επιπλέον πρωτεϊνική μπάντα ακριβώς κάτω απο εκείνη της L-ASNase η οποία τονίζεται και απο το μπλέ βέλος στη παραπάνω Εικόνα 4.9.



Εικόνα 4.10 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της συνθήκης 0.05 M NaCl με pH 8.6. Απο αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε τον μάρτυρα (marker), το crude του εξωκυττάριου εκχυλίσματος, το μη προσροφημένο κλάσμα (flow through), το κλάσμα της πλύσης (wash) και την έκλουση (elution). Οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ένα στάδιο με 4 °C ddH₂O, ενώ οι εκλούσεις με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος.

Αντίστοιχα συμπεραίνουμε ότι στη περίπτωση του 0.05 M NaCl & pH 8.6, παραμένει η μια απο τις δύο μεγάλες πρωτεΐνες στο ύψος των 50-70 kDa (μπλέ βέλος), όπως επίσης και εκείνη που πρωτοεμφανίστηκε στις συνθήκες 0.05 M NaCl & pH 8.1 (Εικόνα 4.9). Γίνεται αντιληπτό, ότι τελικά οι συνδυασμοί της ιοντικής ισχύος με τις συνθήκες pH, δεν συντέλεσαν σε μια επιθυμητή καθαρότητα. Μπορούμε να πούμε ότι εμφανίστηκε κάποιου είδους συνέργεια, η οποία δεν ήταν η αναμενόμενη. Το επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος ενός πιθανού θετικού συνδυασμού μεταξύ του pH 8.1, το οποίο επέδειξε τόσο καλύτερη απόδοση, όσο και βελτιωμένη καθαρότητα, με δύο ενδιάμεσες τιμές ιοντικής ισχύος του διαστήματος που εξετάστηκε προηγουμένως. Αυτό

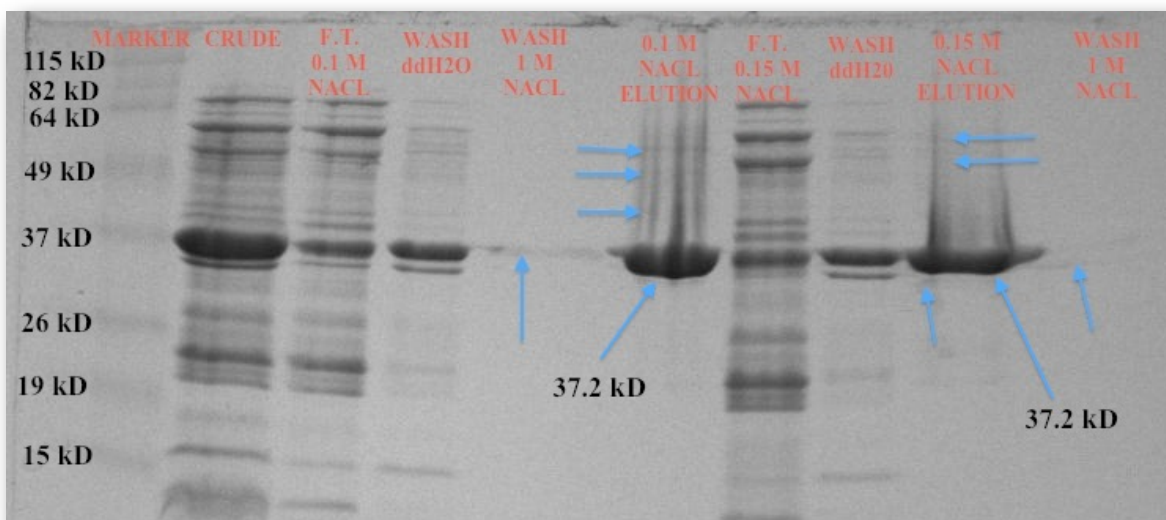
σημαίνει, ότι μελετήθηκαν οι συνθήκες **pH 8.1 & 0.1 M NaCl** και **pH 8.1 & 0.15 M NaCl**, έτσι ώστε να προσδιοριστεί εάν μια ενδιάμεση τιμή ιοντικής ισχύος, θα μπορούσε να επιφέρει μια επιθυμητή καθαρότητα. Οι αποδόσεις και τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα φαίνονται παρακάτω.



ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Διάγραμμα 4.8 Οι αποδόσεις των συνθηκών καθαρισμού, οι οποίες προκύπτουν από τον συνδυασμό των συνθηκών 0.1 M NaCl με pH 8.1 και 0.15 M NaCl με pH 8.1. Ο προσροφητής εξισορροπήθηκε με 20 mM Pi, pH 8.1. Οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο στάδια: αρχικά με 4 °C ddH₂O και εν συνεχεία με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi και 1 M NaCl, pH 8.1, ενώ οι εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος.

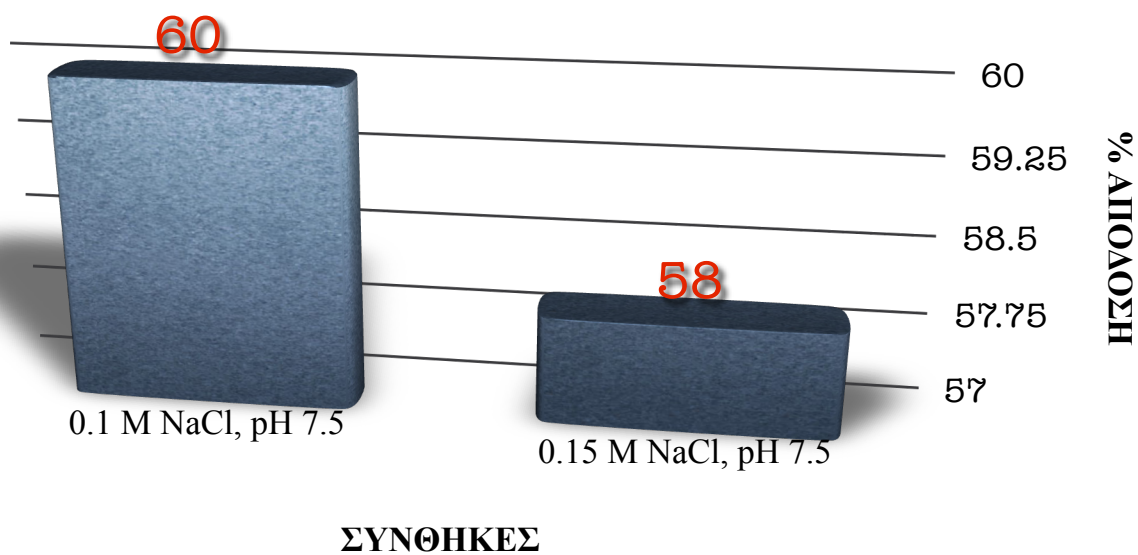
Τελικά προκύπτει, ότι στο pH 8.1, όσο αυξάνεται η ιοντική ισχύς, τόσο μειώνεται η απόδοση. Υπάρχει δηλαδή μια αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση μεταξύ της ιοντικής ισχύος και της συνθήκης pH 8.1



Εικόνα 4.11 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των συνθηκών pH 8.1 & 0.1 M NaCl και pH 8.1 0.15 M NaCl. Απο αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε το αποτύπωμα του μάρτυρα (marker), του crude του εξωκυττάριου εκχυλίσματος, του μη προσροφημένου κλάσματος (flow through), των δύο πλύσεων (wash) με 4 °C ddH₂O και με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi και 2 M NaCl, pH 8.1 και της έκλουσης (elution) της συνθήκης pH 8.1 & 0.1 M NaCl. Ακολουθούν τα αποτυπώματα του μη προσροφημένου κλάσματος (flow through), της πλύσης (wash) με 4 °C ddH₂O, της έκλουσης (elution) και της πλύσης (wash) με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi και 2 M NaCl, pH 8.1 της συνθήκης pH 8.1 & 0.15 M NaCl. Ο προσροφητής εξισορροπήθηκε με 20 mM Pi, pH 8.1, ενώ οι εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος.

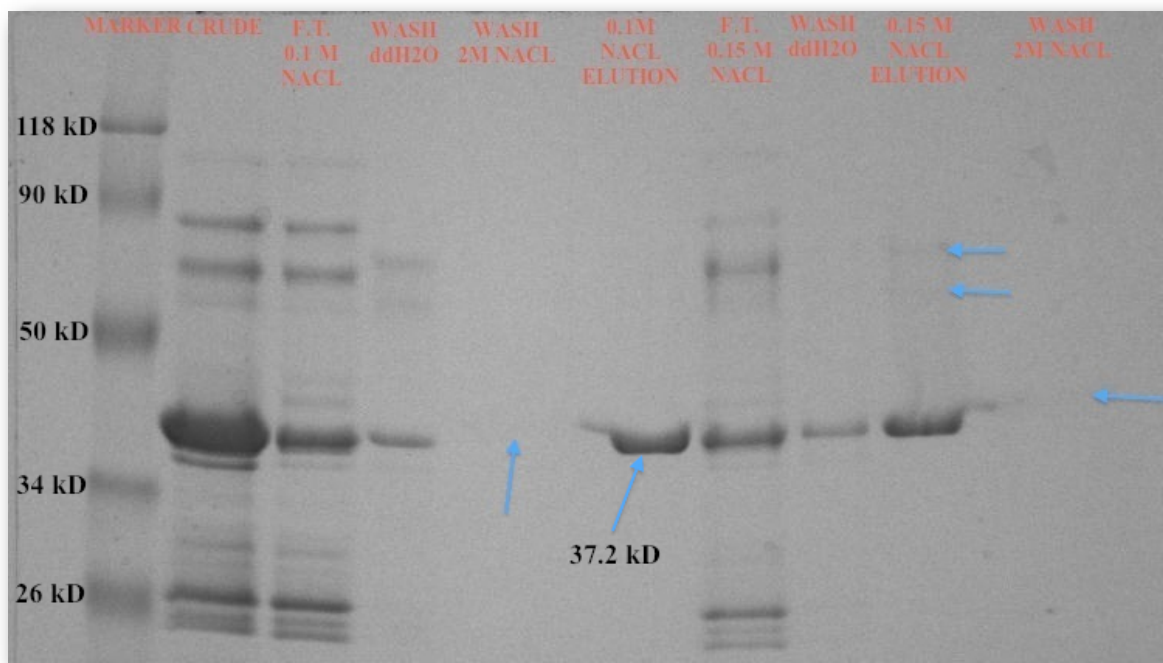
Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα αποκαλύπτει, ότι τελικά ούτε οι τιμές 0.1 & 0.15 M NaCl, άσκησαν θετική επίδραση όσον αφορά τη καθαρότητα της L-ASNase σε συνθήκες pH 8.1. Ένα επίσης σημαντικό στοιχείο, το οποίο είναι εμφανές στη παραπάνω εικόνα είναι ότι οι πλύσεις με 1 M NaCl, τελικά δεν συνεισφέρουν θετικά στο πρωτόκολλο καθαρισμού, καθώς συμβάλλουν σε τμηματική έκπλυση της L-ASNase και δεν φαίνεται ότι εκπλένουν και επιπρόσθετες ανεπιθύμητες πρωτεΐνες, η πλειοψηφία των οποίων έχουν αποδεσμευτεί από τον προσροφητή με την πλύση του νερού. Τα μπλέ βέλη παραπάνω (Εικόνα 4.11) τονίζουν τη παρουσία των επιπλέον πρωτεϊνών στις εκλούσεις της L-ASNase, όπως επίσης και την L-ASNase, που εκπλένεται από τη πλύση με 1 M NaCl.

Απο όλες τις προηγούμενες δοκιμές και προσπάθειες καθαρισμού της L-ASNase, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα, ότι η χρήση συνθηκών pH 8.1 και 8.6 δεν ενδείκνυνται για την εφαρμογή ενός άριστου πρωτοκόλλου καθαρισμού. Απο άποψη καθαρότητας, η επιθυμητή είχε επιτευχθεί στη περίπτωση των αρχικών συνθηκών pH 8.1 και 8.6, όπου δεν είχε χρησιμοποιηθεί καθόλου NaCl για αύξηση της ιοντικής ισχύος. Σε αυτές τις περιπτώσεις όμως οι αντίστοιχες αποδόσεις ήταν αρκετά μικρές. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκαν οι πιθανότητες κάποιας θετικής συνέργειας μεταξύ της αύξησης της ιοντικής ισχύος και των τιμών pH 8.1 και 8.6. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν αρνητικό. Έτσι συνάγεται το συμπέρασμα ότι όλες οι παραπάνω συνθήκες και οι συνδυασμοί αυτών, είναι ακατάλληλες για έναν άριστο καθαρισμό. Το γεγονός αυτό οδήγησε τις προσπάθειες καθαρισμού του ενζύμου, σε μια απο τις αρχικές συνθήκες, δηλαδή στο pH 7.5. Έτσι, εφόσον αρχικά είχε μελετηθεί η συνθήκη 0.05 M NaCl, pH 7.5, αυτή τη φορά μελετήθηκαν οι περιπτώσεις αύξησης της ιοντικής ισχύος με τιμές **0.1 και 0.15 M NaCl, σε pH 7.5**. Οι αποδόσεις όπως επίσης και τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα αυτών των συνθηκών, φαίνονται παρακάτω.



Διάγραμμα 4.9 Οι αποδόσεις των συνθηκών καθαρισμού, οι οποίες προκύπτουν απο τον συνδυασμό των συνθηκών 0.1 M NaCl με pH 7.5 και 0.15 M NaCl με pH 7.5. Ο προσροφητής εξισορροπήθηκε με 20 mM Pi, pH 7.5. Οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο στάδια: αρχικά με 4 °C ddH₂O και εν συνεχεία με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi και 2 M NaCl, pH 7.5, ενώ οι εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος.

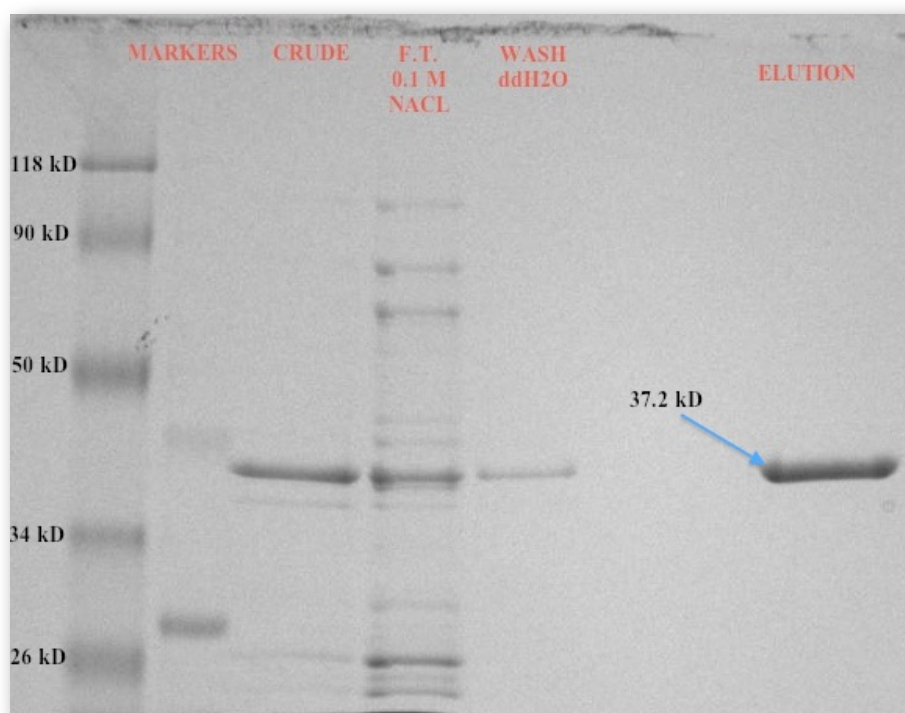
Μπορούμε να παρατηρήσουμε, ότι η συνθήκη 0.1 M NaCl, pH 7.5, εμφανίζει μια οριακά πιο αυξημένη απόδοση σε σχέση με την αντίστοιχη 0.15 M NaCl, pH 7.5.



Εικόνα 4.12 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των συνθηκών pH 7.5 & 0.1 M NaCl και pH 7.5 0.15 M NaCl. Απο αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε το αποτύπωμα του μάρτυρα (marker), του crude του εξωκυττάριου εκχυλίσματος, του μη προσροφημένου κλάσματος (flow through), των δύο πλύσεων (wash) με 4 °C ddH₂O και με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi και 2 M NaCl, pH 7.5 και της έκλουσης (elution) της συνθήκης pH 7.5 & 0.1 M NaCl. Ακολουθούν τα αποτυπώματα του μη προσροφημένου κλάσματος (flow through), της πλύσης (wash) με 4 °C ddH₂O, της έκλουσης (elution) και της πλύσης (wash) με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi και 2 M NaCl, pH 7.5 της συνθήκης pH 7.5 & 0.15 M NaCl. Ο προσροφητής εξισορροπήθηκε με 20 mM Pi, pH 7.5, ενώ οι εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν με 20 mM L-ασπαρτικού οξέος.

Απο το ηλεκτροφορητικό προφίλ, μπορούμε να δούμε αφενός μεν, ότι επιτεύχθηκε η επιθυμητή καθαρότητα στη περίπτωση της συνθήκης 0.1 M NaCl, pH 7.5, σε αντίθεση με εκείνη της 0.15 M NaCl, pH 7.5 όπου παρατηρήθηκαν επιπρόσθετες πρωτεΐνες (μπλε βέλη παραπάνω Εικόνα 4.12) και αφετέρου δε, ότι τελικά και σε αυτές τις περιπτώσεις, οι πλύσεις με 2 M NaCl ασκούν αρνητική επίδραση εκλούοντας μέρος από την προσροφημένη L-ASNase. Αντίθετα, οι πλύσεις

με κρύο ddH₂O, φαίνεται ότι συνεισφέρουν θετικά στην απόδοση του καθαρισμού και στη τελική καθαρότητα της πρωτεΐνης καθώς στο στάδιο αυτό των πλύσεων, απομακρύνονται συνολικά οι ξένες πρωτεΐνες (Εικόνα 4.12). Το γεγονός ότι η πλύση με NaCl εκκλύει μέρος από την προσροφημένη L-ASNase, χωρίς να φαίνεται από το προφίλ ότι εκκλύει και κάποιες άλλες πλεονάζουσες πρωτεΐνες, έθεσε υπο αμφισβήτηση την αναγκαιότητα της ύπαρξης ως στάδιο στο πρωτόκολλο καθαρισμού. Έτσι, στη συνέχεια, εκείνο το οποίο διερευνήθηκε, ήταν να εφαρμοστεί το πρωτόκολλο καθαρισμού με συνθήκες **0.1 M NaCl, pH 7.5**, χωρίς το στάδιο της πλύσης με NaCl, παρά μόνο με κρύο ddH₂O, ώστε να προσδιοριστεί σε αυτή τη περίπτωση τόσο η καθαρότητα, όσο και η απόδοση του προσροφητή. Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα φαίνεται στη συνέχεια.



Εικόνα 4.13 Ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα της συνθήκης 0.1 M NaCl, pH 7.5. Από αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε το αποτύπωμα δύο μαρτύρων (markers), του crude του εξωκυττάριου εκχυλίσματος, του μη προσροφημένου κλάσματος (flow through), της πλύσης (wash) με 4 °C ddH₂O και της έκλυσης (elution).

Μπορούμε να παρατηρήσουμε τη καθαρότητα της εκλουόμενης L-ASNase στη περίπτωση εφαρμογής του πρωτοκόλλου, χωρίς το στάδιο της πλύσης με NaCl. Η πλύση του προσροφητή έγινε μόνο με αρκετά μεγάλη ποσότητα νερού. Επαληθεύοντας τις βέλτιστες συνθήκες καθαρισμού, αυτές είναι: **0.1 M NaCl, pH 7.5** και στο στάδιο της πλύσης το μόνο που απαιτείται, είναι εξαντλητική πλύση με **ddH₂O**. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο καθαρισμού, επέδειξε μια **απόδοση 86 %**.

4.2.3 Μελέτη ισορροπίας προσρόφησης.

Στη συνέχεια, μετά την ανάπτυξη του βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού, έγινε μελέτη του μοντέλου προσρόφησης του ενζύμου, στον προσροφητή L-ασπαρτικό οξύ. Ο προσδιορισμός του μοντέλου αυτού, παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο το ένζυμο αλληλεπιδρά με τον προσροφητή και ουσιαστικά από αυτή τη μελέτη, προκύπτει μια σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του ενζύμου στο διάλυμα και της συγκέντρωσης του ενζύμου που έχει προσροφηθεί, όταν οι δύο φάσεις βρίσκονται σε ισορροπία (Livingston et al., 1989; Platis et al., 2006). Το συχνότερο μοντέλο που αναλύεται και μελετάται, περιλαμβάνει μιας δεύτερης τάξεως αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης μεταξύ του ενζύμου και του προσροφητή και περιγράφεται όπως παρακάτω:

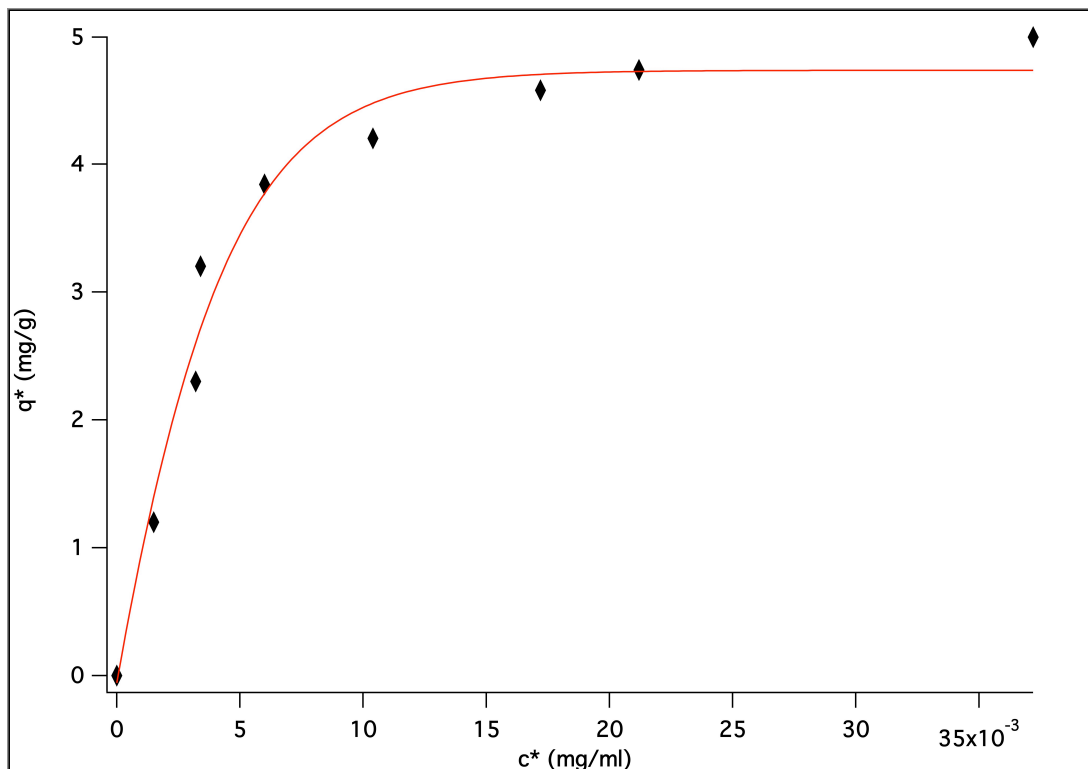


όπου E είναι το ένζυμο στο διάλυμα, L ο δεσμευτής και E - L το σύμπλοκο δεσμευτή - ενζύμου. Οι παράμετροι k₁ και k₂ είναι οι ταχύτητες της αμφίδρομης αντίδρασης παραπάνω. Από τη σχέση (1), προκύπτει η σχέση της ισόθερμης του μοντέλου του Langmuir, το οποίο περιγράφεται από τη παρακάτω σχέση (2) (Livingston et al., 1989):

$$q^* = \frac{q_{\max} c^*}{K_D + c^*} \quad (2)$$

όπου q^* η συγκέντρωση του προσροφημένου ενζύμου κατά την ισορροπία (mg/g), c^* η συγκέντρωση της υγρής φάσης κατά την ισορροπία (mg/ml), q_{\max} η χωρητικότητα του προσροφητή (mg/g) και K_D , η σταθερά διάστασης (dissociation constant) (mg/ml).

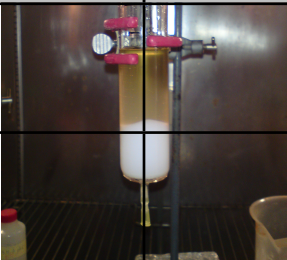
Πρέπει να σημειωθεί, ότι η ισόθερμος του Langmuir, βασίζεται στη παραδοχή ότι κάθε ένζυμο έχει προσδεθεί σε ένα μόνο κέντρο δέσμευσης, το οποίο είναι ενεργειακά ισοδύναμο με κάποιο άλλο γειτονικό, που όμως η απόσταση μεταξύ τους είναι τέτοια που δεν επιτρέπει αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Livingston et al., 1989; Platis et al., 2006).



Διάγραμμα 4.10 Το μοντέλο προσρόφησης της L-ASNase στον προσροφητή με ακινητοποιημένο δεσμευτή L-ασπαρτικό οξύ.

Απο τη καμπύλη προκύπτουν οι τιμές των παρακάτω παραμέτρων, οι οποίες φαίνονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2 Οι τιμές της σταθεράς διάστασης K_D και της χωρητικότητας, q_{max} , όπως προκύπτουν απο το Διάγραμμα 4.10.

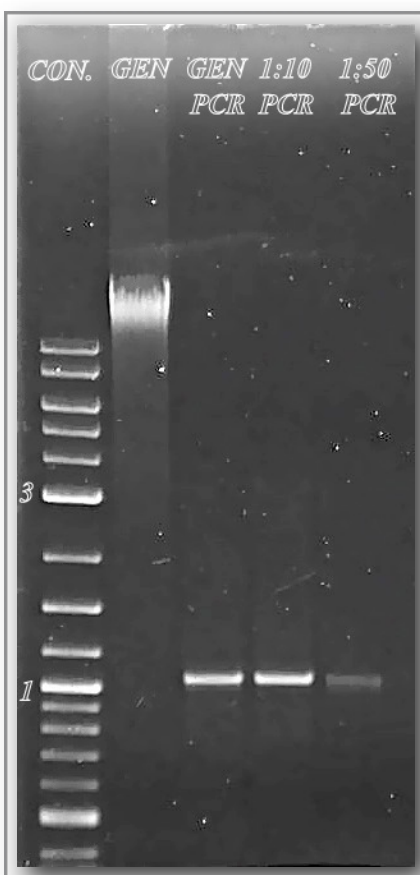
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ		ΤΙΜΗ
K_D		0.21 μM
q_{max}		18.2 mg/g

4.2.4 Εφαρμογή του πρωτοκόλλου κατιούσας επεξεργασίας στον καθαρισμό των L-ασπαραγινασών των στελεχών *Escherichia coli* και *Erwinia caratovora*.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε εάν ο συγκεκριμένος προσροφητής συγγένειας, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό και την απομόνωση, όχι μόνο της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi* για το οποίο αναπτύχθηκε, αλλά ακόμη του ενζύμου απο *Erwinia caratovora* και *Eshcerichia coli*. Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε σε αυτά τα δύο επιπλέον στελέχη, καθώς οι L-ASNase των στελεχών αυτών, μαζί με την αντίστοιχη του *Erwinia chrysanthemi*, εφαρμόζονται στη θεραπεία (π.χ. *Eshcerichia coli* L-ASNase) ή βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές (π.χ. *Erwinia caratovora* L-ASNase) και εξετάζονται για τη δράση τους κατά της λευχαιμίας. Κατ'επέκταση θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να εξεταστεί το εύρος εφαρμογής ενός προσροφητή συγγένειας, όπως αυτός που αναπτύχθηκε παραπάνω.

Για το λόγο αυτό, απομονώθηκε το γονίδιο της L-ASNase από το στέλεχος *Escherichia coli* BL21(DE3) STAR με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τα αντίστοιχα γονίδια των στελεχών *Erwinia chrysanthemi* και *Erwinia caratovora*, είχαν απομονωθεί νωρίτερα για τις ανάγκες προηγούμενων πειραματικών διαδικασιών (Kotzia and Labrou, 2005, 2007). Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα τύπου pCR CT/T7 TOPO. Μετά από επιλογή του φορέα, ο οποίος διαθέτει το γονίδιο με τον σωστό προσανατολισμό, μετασχηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) Rosetta με τον συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε αντιβιοτικό επιλογής των συγκεκριμένων κυττάρων. Μετά από 4 ώρες, προστέθηκε IPTG και ξεκίνησε η υπερέκφραση του γονιδίου, με αποτέλεσμα να υπερπαραχθεί η L-ASNase. Και σε αυτήν τη περίπτωση όπως και στην L-ASNase του *Erwinia chrysanthemi*, το ένζυμο παρήχθη έξωκυττάρια στο θρεπτικό μέσο.

Αντίστοιχα, σε κύτταρα *E. coli* BL 21 DE3 Rosetta, υπερεκφράστηκε και το κλωνοποιημένο γονίδιο της L-ASNase II από το στέλεχος *Erwinia caratovora*. Στη περίπτωση αυτή όμως, τελικά το ένζυμο δεν παρήχθη έξωκυττάρια στο θρεπτικό μέσο, αν και διαθέτει το πεπτίδιο οδηγό του αγρίου τύπου που το οδηγεί στον περιπλασματικό χώρο. Έτσι, ελέγχθηκε η δυνατότητα πρόσδεσης στον προσροφητή, του ενδοκυττάρου ενζύμου.



Εικόνα 4.16 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Απο αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε τον μάρτυρα, το γενωμικό DNA του στελέχους *E. coli* BL21(DE3) STAR, απο το οποίο απομονώθηκε το γονίδιο και στις τρεις τελευταίες θέσεις βρίσκεται το προϊόν της PCR, δηλαδή η ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της L-ASNase, που αντιστοιχεί σε 1047 νουκλεοτίδια.

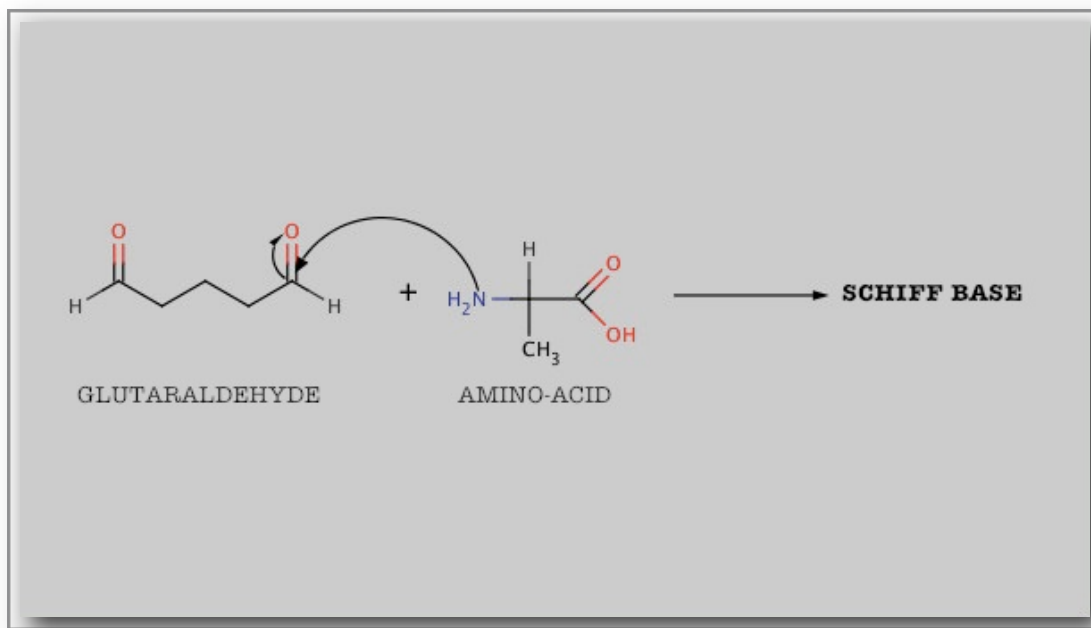
Τελικά, 10 ενζυμικές μονάδες L-ASNase απο το στέλεχος *Erwinia caratovora*, εξισορροπήθηκαν με διαπίδυση σε pH 7.5 και η ιοντική ισχύς διαμορφώθηκε προσθέτοντας 0.1 M NaCl. Κατόπιν εξισορρόπησης και της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Pi, pH 7.5, το σύνολο των μονάδων φορτώθηκε στη στήλη, ακολουθώντας ακριβώς το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο καθαρισμού που αναπτύχθηκε για την L-ASNase του *Erwinia chrysanthemi*. Τελικά, όλες οι μονάδες που φορτώθηκαν αρχικά στη στήλη, ανιχνεύθηκαν στο μη προσροφημένο κλάσμα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κάτω απο τις συνθήκες

που εξετάστηκε το συγκεκριμένο ένζυμο, δεν εμφανίζει συγγένεια με τον προσροφητή. Εφαρμόζοντας ακριβώς την ίδια διαδικασία, προέκυψε ότι ούτε η L-ASNase του στελέχους *Eshcherichia coli* δεν δεσμεύτηκε απο τον προσροφητή συγγένειας.

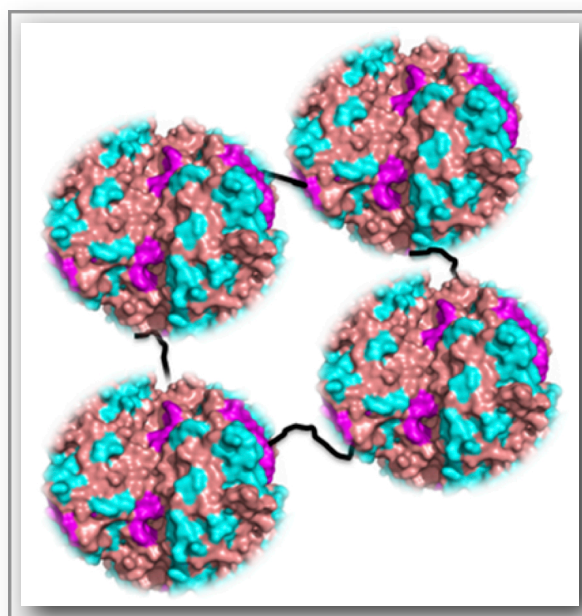
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα το πρωτόκολλο καθαρισμού, που αναπτύχθηκε για τον καθαρισμό και την απομόνωση της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*, δεν μπορεί να εφαρμοστεί για τον καθαρισμό άλλων L-ASNases όπως απο *Eshcherichia coli* και *Erwinia caratovora*.

4.3 Ακίνητοποίηση της L-ασπαραγινάσης του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*.

Μια από τις χημικές μεθόδους ακίνητοποίησης βιομορίων είναι και η μέθοδος δημιουργίας βάσεως Schiff. Η μέθοδος αυτή ακολουθήθηκε και στη παρούσα πειραματική διαδικασία ώστε να ακίνητοποιηθεί η L-ASNase. Η βάση Schiff αποτελεί μια ένωση που λέγεται ιμίνη (ή αλδιμίνη) και είναι αρκετά ασταθής. Για το λόγο αυτό τις περισσότερες φορές απαιτείται η αναγωγή της αντίδρασης της πυρηνόφιλης προσθήκης από την οποία προέρχεται, με κάποιο ισχυρό αναγωγικό όπως το NaBH_4 . Αυτό συμβαίνει για το λόγω του ότι ο διπλός δεσμός μεταξύ του άνθρακα και του αζώτου δεν είναι απόλυτα ένας διπλός δεσμός και έτσι δε συγκεντρώνει τα χαρακτηριστικά σταθερότητας ενός διπλού δεσμού. Κατά την διαδικασία ακίνητοποίησης του ενζύμου, χρησιμοποιήσαμε ως πηγή αμινών, πρωτεΐνη ορού μόσχου (BSA) και για πηγή καρβονυλίων ένα διδραστικό αντιδραστήριο, την γλουταραλδεΐδη, η οποία διαθέτει δύο θέσεις καρβονυλίων προς αντίδραση. Σαφώς στην αντίδραση της πυρηνόφιλης προσθήκης του καρβονυλίου συμμετέχουν και οι διαθέσιμες αμινικές ομάδες του προς ακίνητοποίηση του ενζύμου. Παρακάτω η Εικόνα 4.17, περιγράφει την αντίδραση μεταξύ του καρβονυλίου της γλουταραλδεΐδης με τις αμινικές ομάδες των αμινοξικών καταλοίπων του ενζύμου και της πρωτεΐνης ορού μόσχου.

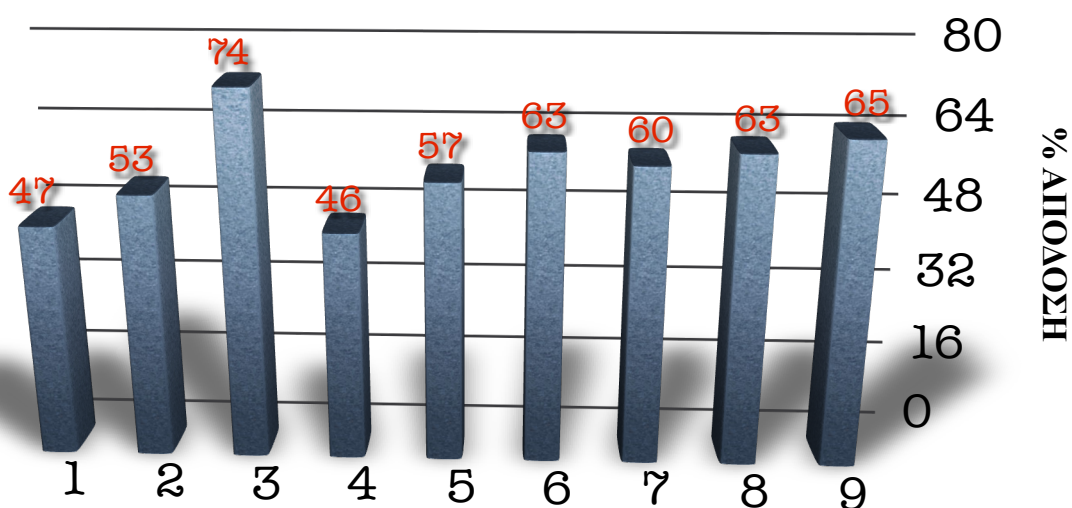


Εικόνα 4.17 Η πυρηνόφιλη προσθήκη στο καρβονύλιο της γλουταραλδεΐδης και ο σχηματισμός της βάσεως Schiff.



Εικόνα 4.18 Ένα σχηματικό μοντέλο που αναπαριστά τον τρόπο διασύνδεσης των ενζυμικών μορίων (Labrou et al., 2010).

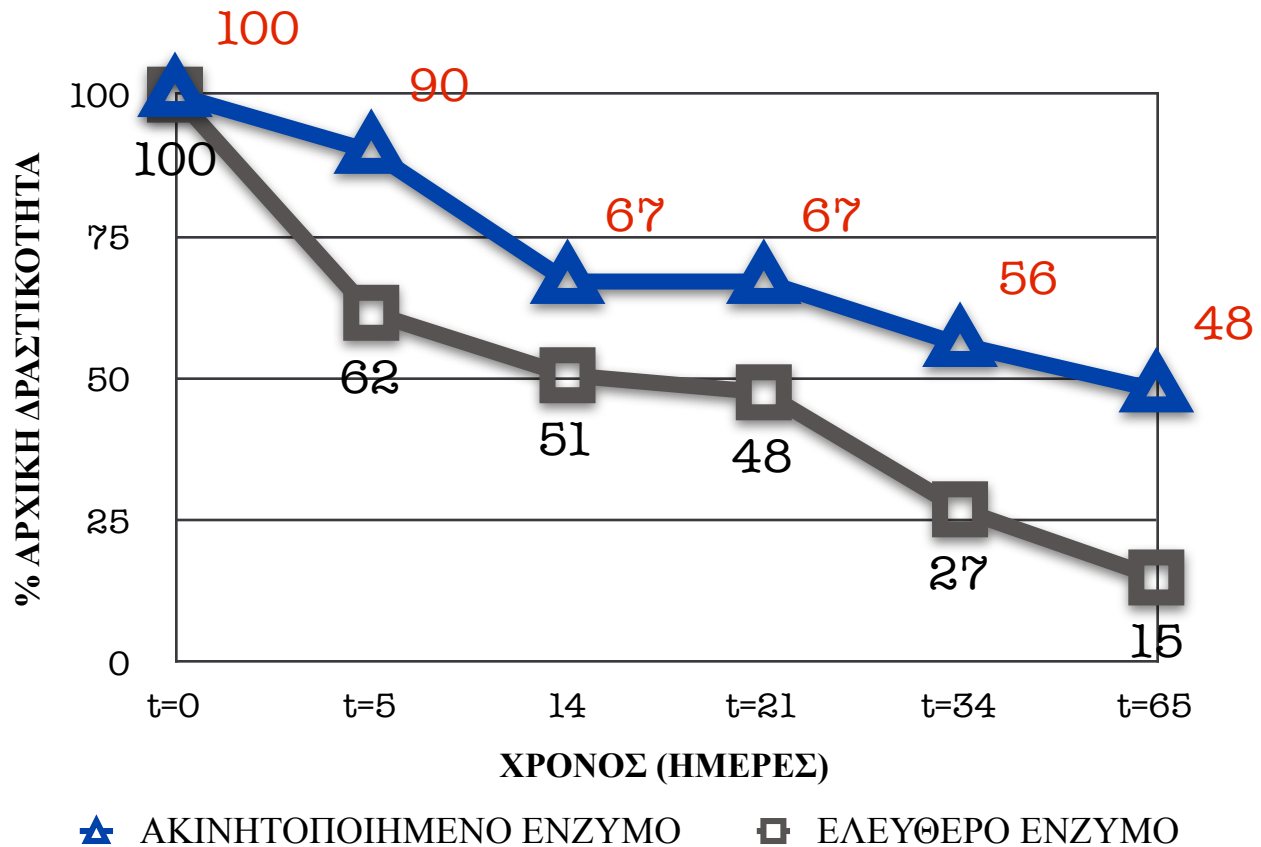
Η απόδοση προσδιορίστηκε απο το πηλίκο των μονάδων που μετρήθηκαν κάθε φορά μετά την ακινητοποίηση, προς το σύνολο των μονάδων που ακινητοποιήθηκαν.



ΣΥΝΘΗΚΗ

Διάγραμμα 4.11 Οι αποδόσεις των εννέα διαφορετικών συνθηκών ακινητοποίησης της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*. Αναλυτικότερα η κάθε συνθήκη περιγράφεται στο κεφάλαιο "Μέθοδοι".

Απο το διάγραμμα προκύπτει, ότι η συνθήκη που παρουσίασε τη μεγαλύτερη απόδοση, είναι η συνθήκη 3 με 20 mg BSA και 2 % (v/v) γλουταραδεΰδη, η οποία έδωσε μια απόδοση 74 %. Η συνθήκη αυτή επιλέχθηκε, ώστε να μελετηθεί η σταθερότητα του ενζύμου υπο ακινητοποιημένη και ελεύθερη μορφή. Το επόμενο Διάγραμμα 4.12 παρουσιάζει τις συγκριτικές καμπύλες που περιγράφουν τη ενζυμική δραστηριότητα, μετά απο ένα διάστημα 65 ημερών.



Διάγραμμα 4.12 Η δραστηριότητα της L-ASNase σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή μετά από 65 ημέρες, εκφρασμένης σε ποσοστό της αρχικής δραστηριότητας.

Απο το διάγραμμα είναι εμφανές το γεγονός, ότι το ένζυμο σε ακινητοποιημένη μορφή παρουσιάζει μεγαλύτερη λειτουργική και δομική σταθερότητα, σε σχέση με εκείνο που βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή. Συμπερασματικά λοιπόν, η L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*, ακινητοποιήθηκε αποτελεσματικά και διατήρησε μέρος της αρχικής της δραστηριότητας για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Το γεγονός αυτό, αποτελεί τη βάση για μελέτη και εφαρμογή ενός βιοαντιδραστήρα, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην αντιμετώπιση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

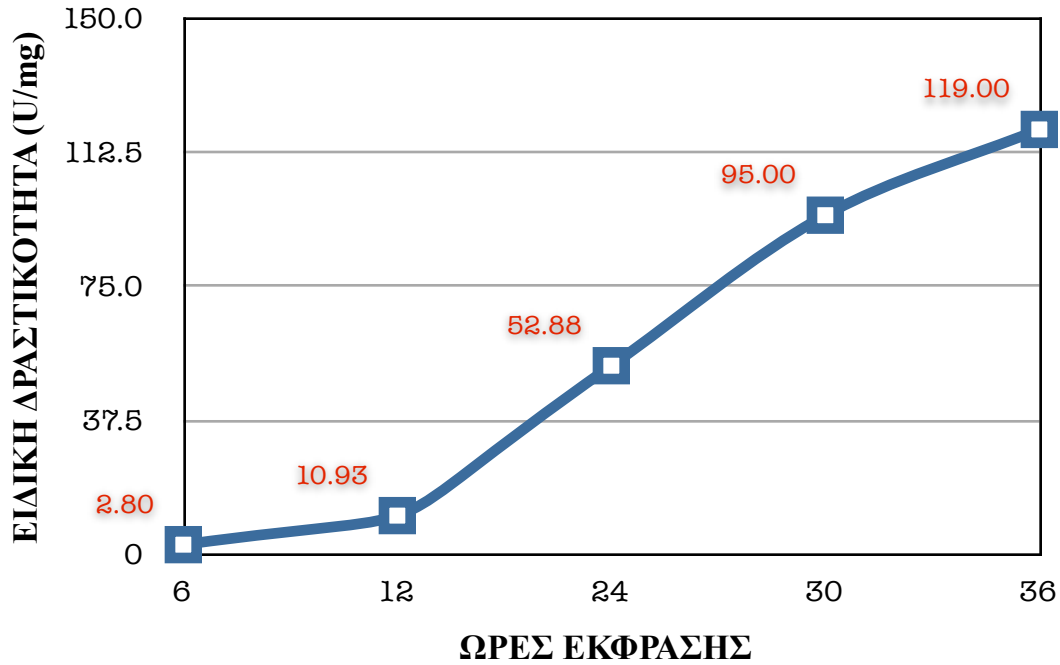
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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 B. J. 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 τον τρόπο με τον οποίο δρα και να το κάνουν περισσότερο επιλεκτικό και αποδοτικό στη κατάλυση (Ollenschlager et al., 1988). 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* (Aghaipoor et al., 2001). Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, τόσο όσον αφορά τη συγγένειά 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.

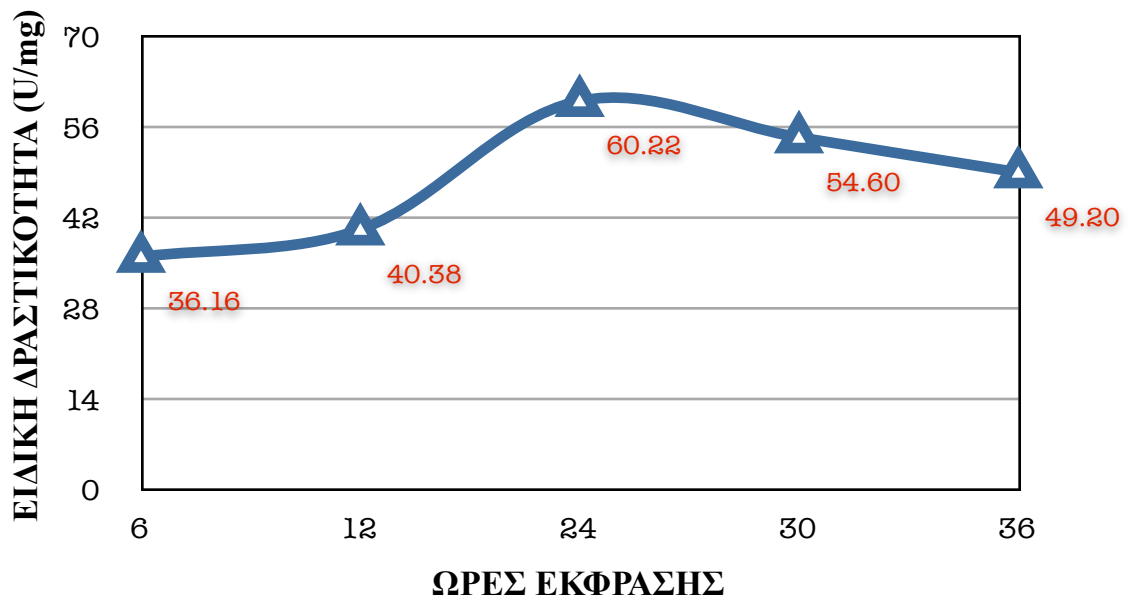
Στη παρούσα πειραματική μελέτη, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου ετερόλογης έκφρασης, χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκφρασης το *E. coli*, όπως επίσης και ενός πρωτοκόλλου καθαρισμού της ανασυνδυασμένης L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*. Η επιλογή του συγκεκριμένου ενζύμου, έγινε με γνώμονα το γεγονός, ότι τα τελευταία χρόνια έχει αποτελέσει πόλο επιστημονικής έλξης καθώς προκαλεί μικρότερης έκτασης παρενέργειες από το αντίστοιχο ένζυμο από *Erwinia caratovora*. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν 7 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. Η εξωκυττάρια έκκριση, μεταξύ άλλων συντελεί και σε μια περισσότερο απλοποιημένη κατιούσα επεξεργασία, καθώς απουσιάζουν από το θρεπτικό μέσο ενδοκυττάρια πρωτεΐνες. Έτσι, μια πιθανή έκκριση της L-ASNase, θα διευκόλυνε το έργο της ανάπτυξης του βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού, εκτός των περαιτέρω πλεονεκτημάτων, τα οποία έχουν συζητηθεί στην Εισαγωγή (Cornelis, 2000; Makrides, 1996; Mergulhao et al., 2004b). Ο άγριος τύπος της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*, διαθέτει στο άμινο-τελικό άκρο του, μια αλληλουχία 21 αμινοξικών καταλοίπων, τα οποία

συνθέτουν το πεπτίδιο οδηγό. Το πεπτίδιο οδηγός, όπως έχει αναφερθεί και στην Εισαγωγή, αποτελεί το σινιάλο εκείνο, το οποίο συμβάλλει στην αναγνώριση της κάθε πρωτεΐνης 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.

Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο, το οποίο αξίζει περαιτέρω διερεύνησης είναι ο τρόπος με τον οποίο τελικά το ένζυμο οδηγείται εξωκυτταρικά στο θρεπτικό μέσο. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός, ότι η εξωκυττάρια έκκριση αυξάνεται σημαντικά μετά από πολλές ώρες έκφρασης, ενώ ξεκινά πολύ νωρίς, μόλις από τη πρώτη ώρα προσθήκης του IPTG. Αντίστοιχα τα ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης, μπορούμε να πούμε, ότι μένουν σχεδόν σταθερά, ή ακριβέστερα, δεν παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις στο χρονικό διάστημα της έκφρασης, όπως φαίνονται στα παρακάτω Διαγράμματα 5.1 και 5.2. Πρωτεΐνες, οι οποίες μεταφέρονται μέσω του μηχανισμού SecB στο περίπλασμα, δύναται να μεταφερθούν στο θρεπτικό μέσο, με τη βοήθεια ενός συμπλόκου πρωτεϊνικών παραγόντων (secreton), οι οποίοι εντοπίζονται χωροταξικά στη εξωτερική μεμβράνη. Μάλιστα, διευκολύνεται η εξαγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες οργανώνονται σε τεταρτοταγή και πεμπτοταγή δομή και αυτό προφανώς ευνοείται στη περίπτωση της L-ASNase, η οποία σχηματίζει τετραμερή.



Διάγραμμα 5.1 Η πορεία αύξησης της ειδικής δραστηρότητας όσον αφορά το εξωκυττάριο ένζυμο.



Διάγραμμα 5.2 Η αντίστοιχη πορεία αύξησης της ειδικής δραστηρότητας του ενδοκυττάριου ενζύμου.

Όπως γίνεται φανερό από τα διαγράμματα παραπάνω, στη περίπτωση του ενδοκυττάρου ενζύμου, παρατηρείται μια σχετική σταθερότητα όσον αφορά την έκφραση. Από τις πρώτες 6 ώρες έως και 30 ώρες αργότερα που παρατηρείται η μέγιστη εξωκυττάρια έκκριση, η ειδική δραστηριότητα του ενδοκυττάρου ενζύμου κυμαίνεται σε περιορισμένα όρια. Αντίθετα, στη περίπτωση του εξωκυττάρου ενζύμου, η ειδική δραστηριότητα ξεκινά από χαμηλά επίπεδα και σταδιακά αυξάνεται έως ότου φτάσει στο μέγιστο σημείο, 36 ώρες μετά την προσθήκη του IPTG, εμφανίζοντας σιγμοειδή εξάρτηση. Πιθανότατα, η σταδιακή συσσώρευση της πρωτεΐνης στο περίπλασμα, αποτελεί και την δύναμη εκείνη, η οποία συμβάλλει στην έκκριση της πρωτεΐνης στο θρεπτικό μέσο, με στόχο την αποσυμφόρηση του περιπλασματικού χώρου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από ερευνητικές ομάδες, στόχος των οποίων είναι η περιγραφή και η μελέτη των συστημάτων μεταφοράς ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο στέλεχος *E. coli* (Mergulhão et al., 2005).

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί, ότι σε πολύωρες καλλιέργειες η έκκριση μιας ετερόλογης πρωτεΐνης αυξάνεται. Το ίδιο συνέβη και στην παρούσα μελέτη, όπου η εξωκυττάρια έκκριση μεγιστοποιήθηκε 36 ώρες μετά προσθήκη του IPTG. Σίγουρα, ένα ποσοστό κυττάρων λύεται, με αποτέλεσμα την απολευθέρωση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου στο θρεπτικό μέσο. Παράλληλα, εάν η παρουσία του ενζύμου στο θρεπτικό μέσο, οφειλόταν αποκλειστικά στην λύση των κυττάρων, τότε θα έπρεπε στο ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του εξωκυττάρου δείγματος, να παίρναμε μια αντίστοιχη εικόνα με εκείνο του ενδοκυττάρου, κάτι που δεν συμβαίνει (για παράδειγμα, Εικόνα 4.1 & 4.3). Το ίδιο ισχύει και όσον αφορά τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού φορτίου, το οποίο στη περίπτωση του εξωκυττάρου δείγματος, είναι κατά πολύ μεγαλύτερο από το αντίστοιχο του ενδοκυττάρου. Είναι λογικό και εύλογο όμως, μετά από 36 ώρες έκφρασης, κάποιο ποσοστό των κυττάρων να λύεται και σίγουρα συμβαίνει. Ας αναλογιστούμε το εξής: ας παραδεχτούμε ότι το ένζυμο δεν μεταφέρεται στο θρεπτικό μέσο, αλλά αποκλειστικά λύνονται τα κύτταρα. Έστω ότι λύεται το 20 % των κυττάρων. Η υπόθεση αυτή καταλήγει σε άτοπο, καθώς σε αυτή τη περίπτωση, θα έπρεπε το υπόλοιπο ποσοστό 80 % των κυττάρων που δεν λύνονται, να περιέχουν το τετραπλάσιο ποσοστό L-ASNase από ό,τι ανιχνεύεται στο θρεπτικό μέσο. Αυτό, όχι μόνο δεν ισχύει, αλλά ισχύει και το αντίθετο, εάν

δουμε προσεκτικά τα πειραματικά αποτελέσματα, όπου η εξωκυττάρια ειδική δραστηριότητα είναι 120 U/mg και η ενδοκυττάρια 50 U/mg.

Ένας σημαντικός παράγοντας, ο οποίος σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα έκφρασης, είναι και η θερμοκρασία, υπο την οποία αναπτύσσεται το *E.coli*. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν 2 θερμοκρασίες έκφρασης, οι 18 °C και 37 °C, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση της L-ASNase. Είναι πολύ σύνηθες το φαινόμενο, η ετερόλογος έκφραση μιας πρωτεΐνης στους 37 °C να μην είναι αποτελεσματική, λόγω τοξικής επίδρασης από τους έντονους ρυθμούς έκφρασης του υπερεκφραζόμενου γονιδίου. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο πολύ μεγάλος αριθμός μεταγραφημάτων, τα οποία πρέπει να μεταφραστούν, αποτελεί τεράστιο πρόβλημα για το κύτταρο, το οποίο δεν δύναται να ανταποκριθεί σε τέτοιες πιεστικές, μη φυσιολογικές καταστάσεις. Μια επιπλέον έκφραση αυτής της κατάστασης, είναι η αδυναμία αναδίπλωσης ενός νεο-μεταφρασμένου πρωτεϊνικού μορίου από τα τσαπερόνια (πρωτεϊνικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών), τα οποία πιέζονται ασφυκτικά υπο τέτοιες καταστάσεις υπερ-λειτουργίας. Το αποτέλεσμα όλων αυτών, είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων από μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια κατακρημνίζονται (Baneyx, 1999). Τα συσσωματώματα αυτά έχει επικρατήσει να αποκαλούνται inclusion bodies. Μια διαφορετική κατάληξη των πρωτεϊνών που δεν αναδιπλώνονται σωστά στο χρονικό σημείο που απαιτείται, είναι η άμεση αποικοδόμησή τους από πρωτεάσες. Αν αναλογιστούμε ότι απελευθερώνεται από τα ριβοσώματα 1 πρωτεΐνη κάθε 35 δευτερόλεπτα και ότι ανά πάσα στιγμή στο κύτταρο του *E.coli* υπάρχουν 400 mg/ml πρωτεϊνών, μπορούμε να προσδιορίσουμε λίγο το εύρος της πιεστικής κατάστασης που χαρακτηρίζει τους μηχανισμούς της μετάφρασης και της αναδίπλωσης (Baneyx, 1999).

Το πρόβλημα αυτό της έκφρασης των ετερόλογων πρωτεϊνών, συνήθως αντιμετωπίζεται με ταυτόχρονη υπερ-έκφραση των πρωτεϊνικών παραγόντων, οι οποίοι είναι επιφορτισμένοι με το έργο της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Ένας περισσότερο απλός τρόπος ώστε να ελεγχθεί μια τέτοια κατάσταση, είναι η χρήση μιας χαμηλότερης θερμοκρασίας όσον αφορά την ανάπτυξη του *E. coli*. Κατ'αυτόν τον τρόπο, ελαττώνεται ο ρυθμός του μεταβολισμού του κυττάρου, και ελέγχεται η ρύθμιση της έκφρασης από το κύτταρο με έναν πιο αποτελεσματικό τρόπο. Με βάση όλα τα παραπάνω, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού και σύγκρισης των επιπέδων

έκφρασης στις δύο θερμοκρασίες 18 °C και 37 °C. Τα αποτελέσματα, έδειξαν ότι τελικά η βέλτιστη θερμοκρασία είναι εκείνη των 37 °C και όχι οι 18 °C. Δεν παρατηρήθηκε κάποιο φαινόμενο τοξικότητας της κυτταρικής καλλιέργειας στους 37 °C, έτσι ώστε να είναι απαγορευτική θερμοκρασία για την ανάπτυξη των κυττάρων. Σίγουρα, κάποιο ποσοστό της εκκρινόμενης πρωτεΐνης, μετουσιώνεται στο περιβάλλον του θρεπτικού μέσου, αλλά αυτό είναι απολύτως αναμενόμενο. Αντίθετα, στους 18 °C οι ρυθμοί έκφρασης περιορίστηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα όπως ήταν αναμενόμενο και φυσιολογικό. Συμπερασματικά λοιπόν, δεν αντιμετωπίστηκαν προβλήματα δημιουργίας inclusion bodies στη περίπτωση ετερόλογης έκφρασης της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi*.

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. Απο 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. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το τελευταίο συμπέρασμα, ισχύει στη περίπτωση που χρησιμοποιήσαμε 37 °C ως θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων. Στους 18 °C, τα αποτελέσματα είναι ακριβώς αντίθετα απο ό,τι στους 37 °C. Το περισσότερο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, οδήγησε τη καλλιέργεια στα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης και το λιγότερο θρεπτικό μέσο στα υψηλότερα. Σαφώς, το συγκεκριμένο γεγονός απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η ακριβής συσχέτιση μεταξύ της θρεπτικότητας ενός θρεπτικού μέσου, της θερμοκρασίας ανάπτυξης και των επιπέδων έκφρασης.

Ένας απο τους βασικότερους στόχους της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν και η ανάπτυξη ενός βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού του εξωκυττάρου ενζύμου. Οι προσπάθειες προσέγγισης του καθαρισμού με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, απέβησαν άκαρπες, αν και το ενδοκυττάριο ένζυμο καθαρίζεται πολύ αποδοτικά με αυτή τη μέθοδο. Αν και δοκιμάστηκαν διάφοροι κατιοντοανταλλάκτες (ασθενείς και ισχυροί), τα αποτελέσματα ήταν αρκετά αποθαρρυντικά. Φαίνεται, ότι το εξωκυττάριο ένζυμο χαρακτηρίζεται απο κάποιες τροποποιημένες φυσικοχημικές ιδιότητες συγκριτικά με το ενδοκυττάριο, οι οποίες είναι πολύ

πιθανό να οφείλονται στον διαφορετικό τρόπο αναδίπλωσης στον περιπλασμικό χώρο, όπως επίσης και στη συνεχή παραμονή του στο περιβάλλον του θρεπτικού μέσου. Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την μεταβολή ενδεχομένως κάποιων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του ενζυμικού μορίου. Για το λόγο αυτό, οι προσπάθειες στράφηκαν προς τη χρωματογραφία συγγένειας. Μελετήθηκαν 3 διαφορετικοί προσροφητές συγγένειας, εκ των οποίων επιλέχθηκε ο πιο αποδοτικός και με βάση αυτόν αναπτύχθηκε το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο. Όπως είναι φανερό και από τα αποτελέσματα, ο περισσότερο αποδοτικός προσροφητής είναι το L-ασπαρτικό οξύ. Η χρήση της L-ασπαραγίνης δημιουργούσε κάποια προβλήματα όσον αφορά τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας (Αποτελέσματα §), αλλά και γενικότερα τα επίπεδα καθαρισμού δεν ήταν τα επιθυμητά. Το L-γλουταμινικό οξύ παρουσίασε ικανοποιητική απόδοση, αλλά εκείνη του L-ασπαρτικού οξέος ήταν μεγαλύτερη. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί, ότι η πρόσδεση της L-ASNase του στελέχους *Erwinia chrysanthemi* στο L-ασπαρτικό οξύ είναι πάρα πολύ ισχυρή και ακόμη και η χρήση 2 M NaCl, δεν επηρέασε τη συγκεκριμένη πρόσδεση. Παράλληλα, ο έλεγχος πρόσδεσης των L-ASNases από τα στελέχη *Erwinia caratovora* και *Escherichia coli* στο L-ασπαρτικό οξύ, έδειξε ότι τα ένζυμα αυτά δεν προσδένονται στον συγκεκριμένο προσροφητή συγγένειας, κάτω από τις συνθήκες που εξετάστηκε. Αυτό είναι και αποτέλεσμα των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των τριών L-ASNases.

Στο τελευταίο μέρος της πειραματικής μελέτης, διερευνήθηκε η δυνατότητα ακινητοποίησης του ενζύμου χρησιμοποιώντας γλουταραλδεΰδη ως διδραστικό αντιδραστήριο και πρωτεΐνη ορού μόσχου ως δότη αμινικών ομάδων για τον σχηματισμό της βάσης Schiff και του πλέγματος εντός του οποίου ακινητοποιείται το ένζυμο. Το ένζυμο ακινητοποιήθηκε κάτω από 9 διαφορετικές συνθήκες και επιλέχθηκε εκείνη που υπέδειξε μεγαλύτερη απόδοση. Επιπρόσθετα, επέδειξε μεγάλη δομική και λειτουργική σταθερότητα μετά από αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα ακινητοποίησης, συγκριτικά με το ελεύθερο ένζυμο. Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι με τον συγκεκριμένο τρόπο, ακινητοποιείται και με μεγάλη απόδοση (74%). Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες στον συγκεκριμένο τομέα, ώστε να ακινητοποιηθεί επιτυχώς η L-ASNase, καθώς αποτελεί ένα μέσο με το οποίο μπορούν να περιοριστούν αρκετά οι παρενέργειες από την

ενέσιμη μορφή του ενζύμου που χρησιμοποιείται κυρίως στις μέρες μας (Karsakevich et al., 1987).

Βιβλιογραφία.

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.

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.

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 guidelin on immunphenotyping in acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin. Lab. Haem.*, **24**: 1-13.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnology*, **10**: 411-421.

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.

Beck, K., Wu, L.F., Brunner, J. and Muller, M. (2000). Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J.*, **19**: 134-143.

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.

Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P. and Wandersman, C. (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters—a review. *Gene*, **192**: 7–11.

Blight, M.A. and I.B., Holland (1994). Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. *Trends Biotechnol.* **12**: 450–5.

Bogsch, E.G., Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Robinson, C. and Palmer, T. (1998). An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **273**: 18003 – 6.

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.

Broome, J. D. (1961). Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. *Nature*, **191**: 1114-1115.

Broome, J. D. (1968). Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *Br. J. Cancer*, **22**: 595-602.

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.

Campbell, H.A., Mashburn, L.T., Boyse, E.A. & L.J., Old (1967). Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity. *Biochemistry*, **6**: 721–730.

Cho, C., Lee, H., Chung, E., Kim, K., Heo, J., Kim, J. and Chung J. (2007). Molecular characterization of the soybean L-asparaginase gene induced by low temperature stress. *J.Mol. Cells*, **23**: 280-286.

Choi, J.H. and Lee, S.Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**: 625–35.

Christie, P.J. (2001). Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.*, **40**: 294–305.

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.

Demura, M., Takenoshita, H., Laneko, M. and Asakura, T. (1992). Enzyme- immobilization on non-woven fabrics by blend coating using silk and silk fibroin. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **61** (1): 66–72.

Derst, C., Hensenling, J. and Rohm, K.H. (1992). Probing the role of threonine and serine residues of *E.coli* asparaginase II by site specific mutagenesis. *Protein Eng.*, **5**: 785-789.

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.

del Castillo, F.J., Moreno, F. and del Castillo, I. (2001). Secretion of the *Escherichia coli* K-12 SheA hemolysin is independent of its cytolytic activity. FEMS Microbiol. Lett., **204**: 281–5.

De Lisa, M.P., Tullman, D. and Georgiou, G. (2003). Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin- arginine translocation pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **100**: 6115–20.

DeLoach, J.R., Andrews, K., Satterfield, W. and Keeling, M. (1990). Intraperitoneal administration of carrier erythrocytes in dogs: an improved method for delivery of l-asparaginase. Biotechnol. Appl. Biochem., **12**: 331–335.

Duval, M., Suciu, S., Ferster, A., Rialland, 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.

Economou, A. (1999). Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. Trends Microbiol., **7**: 315 – 20.

El-Bessoumy A., Sarhan, M. and Mansour J. (2003). Production, isolation and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. J. Biochem. Mol. Biol., **37**: 387-393.

Elish, M.E., Pierce J.R. and Earhart C.F. (1988). Biochemical Analysis of Spontaneous *fepA* Mutants of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1355–1364.

El-Shora, H.M., Youssef, M.M., and Salva A.K. (2005). Production and activation of asparaginase from *Aspergillus niger* under different treatments. *Biochem. Lett.*, **1**: 35-46.

Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. and Phillips, G.J. (2000). Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 4068–76.

Fekkes, P. and A.J., Driessen (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**: 161 – 73.

Fernandez, L.A. and J., Berenguer (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**: 21–44.

Fernandez, L.A. and de Lorenzo, V. (2001) Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. *Mol Microbiol.*, **40**: 332–46.

Gentschev, I., Dietrich, G. and Goebel, W. (2002). The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.*, **10**: 39–45.

Gökbuget, N., & D. Hoelzer (2006). Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Am Soc Hema- tol Educ. Program*, **1**: 133–141.

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.

Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 465–506.

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.

Hasenwinkle, D., Jarvis, E., Kops, O., Liu, C., Lesnicki, G. and Haynes, C. (1997). Very high-level production and export in *Escherichia coli* of a cellulose binding domain for use in a generic secretion–affinity fusion system. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 854–63.

Herskovits, A.A., Bochkareva, E.S. and Bibi, E. (2000). New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway. *Mol. Microbiol.* **38**: 927–39.

Hesterkamp, T., Hauser, S., Lutcke, H. and Bukau, B. (1996). *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 4437–41.

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

Huang, H.C., Sherman, M.Y., Kandror, 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.

Iwamoto, K., Noguchi, T., Yeramoto, A. and Iizuka, E. (1995). Studies on physical properties of mixed membranes of silk sericin and syndiotactic polyvinyl alcohol, and their ability to immobilize an enzyme. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **65** (4): 427–34.

Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. and Antoine, R. (2001). Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* **40**: 306–13.

Jayaram, H.N., Cooney, D.A. and Huang, C.Y. (1987). Interaction between L-aspartic acid and L-asparaginase from *Escherichia coli*: binding and inhibition studies. *J. Enzyme Inhib.*, **1** (2): 151-61.

Jean-Francois, J., D'Urso, E.M. and Fortier, G. (1997). Immobilization of l-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)–albumin hydrogel: evaluation of performance in vivo. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **26**: 203–212.

Jorge, J.C.S., Perez-Soler, R. and Morais, J.G. (1994). Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. *M.E.M. Cruz. 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.

Karsakevich, A.S., Shulichenko, S.N., Buka, M.R., Vina, I.A. and Kashkin A.P. (1987). Immobilization of the enzyme L-asparaginase from *E.coli* on polysaccharides. Academy of sciences of the Latvian SSR, Riga. Translated from Khimiya Prirodnikh Soedinenii, **6**: 766-771.

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

Khokhlova, O.V. and Nesmeianova, M.A. (2003). Interaction of SecB and SecA with the N-terminal region of mature alkaline phosphatase on its secretion in *Escherichia coli*. Mol. Biol. (Mosk) **37**: 712–8.

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.

Koronakis, V. (2003). TolC—the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett.* **555**: 66–71.

Koster, M., Bitter, W. and Tommassen, J. (2000). Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 325 – 31.

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 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., Lam-agnere, J.P., Chassaigne, 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.

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**: 3471–6.

Lee, S.M., Wroble, M.H. and Ross, J.T. (1989). L-asparaginase from *Erwinia caratovora*: an improved recovery and purification process using affinity chromatography. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **22**: 1-11.

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

Livingston, A.G. and Chase, H.A. (1989). Preparation and characterization of adsorbents for use in high-performance liquid affinity chromatography *J. Chromatography*, **481**: 159.

Lory, S. (1998). Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**: 27–35.

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

Maier, R., Eckert, B., Scholz, C., Lilie, H. and Schmid, F.X. (2003). Interaction of trigger factor with the ribosome. *J. Mol. Biol.* **326**: 585 – 92.

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

Marlborough, D.I., Miller, D.S. and Cammack, K.A. (1975). Comparative study on conformational stability and subunit interactions of two bacterial asparaginases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **386**: 576-589.

Maskos, K., Huber-Wunderlich, M. and Glockshuber, R. (2003). DsbA and DsbC-catalyzed oxidative folding of proteins with complex disulfide bridge patterns in vitro and in vivo. *J. Mol. Biol.* **325**: 495–513.

Mashburn, L.T. and Wriston, Jr.J.C. (1964). Tumor inhibitor effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**: 450-452.

Matsushima, A., Nishimura, H., Ashihara, Y., Yokota, Y. and Inada, Y. (1980). Modification of *E.coli* asparaginase with 2,4 bis(*O*-methoxypolyethylenglycol)-6chloro-*S*-triazine (activated PEG2). *Chem. Lett.*, **103**: 773-776.

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.

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.

Miyairi, S. and Sugiura, M. (1978). Properties of b-glucosidase immobilized in sericin membrane. *J. Ferment. Technol.*, **56** (4): 303–8.

Moola, Z.B., Scawen, M.D., Atkinson, T. and Nicols, D.J. (1994). *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem. J.*, **302**: 921-927.

Mukherjee, J., Majumadar S. and Scheper, T. (2000). Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Applied Microbial Biotechnol.*, **53**: 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.

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.

Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A. and Ghazi, A. (2000). Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 8173–7.

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

Palacios, J.L., Zaror, I., Martinez, P., Uribe, F., Opazo, P. and Socias, T. (2001). Subset of hybrid eukaryotic proteins is exported by the type I secretion system of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **183**: 1346–58.

Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R. and Henderson, I.R. (2003). Genomic analysis of secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 519 – 27.

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.

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**: 138.

Possot, O.M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F. and Pugsley, A.P. (2000). Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. *J. Bacteriol.* **182**: 2142 – 52.

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.

Pugsley, A.P., Francetic, O., Possot, O.M., Sauvonnnet, N. and Hardie, K. (1997). Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria—a review. *Gene* **192**: 13 – 9.

Raina, S. and D. Missiakas (1997). Making and breaking disulfide bonds. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 179–202.

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

Rinas, U. and F., Hoffmann (2004). Selective leakage of host-cell proteins during high-cell-density cultivation of recombinant and non-recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **20**: 679–87.

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

Santini, C.L., Ize, B., Chanal, A., Muller, M., Giordano, G. and Wu, L.F. (1998). A novel sec-independent translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**: 101–12.

Sapriel, G., Wandersman, C., Delepelaire, P. (2002). The N terminus of the HasA protein and the SecB chaperone cooperate in the efficient targeting and secretion of HasA via the ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* **277**: 6726 – 32.

Sapriel, G., Wandersman, C. and Delepelaire, P. (2003). The SecB chaperone is bifunctional in *Serratia marcescens*: SecB is involved in the Sec pathway and required for HasA secretion by the ABC transporter. *J. Bacteriol.* **185**: 80 – 8.

Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C. and Berks, B.C. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* **17**: 3640–50.

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.

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.

Sodek, L., Lea, P.J. and J., Benjamin (1980). Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. *Plant Physiol.*, **65**: 22-26.

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 L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. *Pharm. Acta. Helv.*, **74**: 1–9.

Studier F.W. and Moffatt B.A. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J. MoZ. Biol.* **189**: 113-130.

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.

Tan, S., Wu, W., Liu, J., Kong, Y., Pu, Y. and Yuan, R. (2002). Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in *E. coli* using the L-asparaginase II signal sequence. Protein Expression and Purification, **25**: 430–436.

Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V. (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. EMBO J., **17**: 6487–96.

Verma, N., Kumar, K., Kaur, G. and S., Anand (2007). L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. Crit. Rev. Biotechnol., **27**: 45–62.

Veronese, F.M. and Morpurgo, M. (1999). Bioconjugation in pharmaceutical chemistry. Farmacao, **54**: 497-516.

Veronese, F.M. (2001). Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. Biomaterials, **22**: 405-417.

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.

Vogel, A. I. and Svehla, G. (1979). Vogel's Textbook of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis (**5th ed.**)

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., Harms, E., Jennings, M.P., Beacham, I.R., Derst, C., Bast, P. and Rohm K.H. (1992). Site-specific mutagenesis of *Escherichia coli* asparaginase II. None of the three histidine residues is required for catalysis. Eur. J. Biochem., **208**: 475-480.

Yahr, T.L. and W.T., Wickner (2001). Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. EMBO J. **20**: 2472 – 9.

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.

