



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΚΑΙ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ-ΙΜΒΒ/ΙΤΕ**

**«Εγκαθίδρυση in-vitro δοκιμασίας σχηματισμού του
πρωτεϊνικού συμπλόκου MYC/MAX και μελέτη της
ανασταλτικής δράσης στοχευμένων χημικών μορίων»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΛΙΑΦΑΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗΣ ΣΑΒΒΑΣ

**Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο Μάρτιος 2019-Οκτώβριος 2020 στο ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) του τμήματος Βιοϊατρικών Ερευνών στα Ιωάννινα, καθώς και στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η ένταξή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία» μου έδωσε την ευκαιρία να βελτιώσω τις γνώσεις μου σε ένα ευρύ φάσμα της βιολογίας, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε εργαστηριακό-τεχνικό επίπεδο. Η βελτίωση αυτή ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο μετά από την ανάθεση σε μένα, ενός ενδιαφέροντος ερευνητικού έργου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου παρέχοντάς μου μια θέση στην ερευνητική του ομάδα, καθώς και για την εποικοδομητική συνεργασία που είχαμε και την ουσιαστική καθοδήγηση σχετικά με την διεξαγωγή της έρευνας. Ιδιαίτερως, οφείλω να ευχαριστήσω την Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα για την απόλυτη αφοσίωσή της στη σωστή εκπαίδευσή μου, αρχικά, αλλά και στην εκτέλεση των πειραμάτων, στη συνέχεια καθώς και για την συνεχή διαθεσιμότητά της σε ο,τιδήποτε χρειάστηκα. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω την βαθιά μου εκτίμηση και ευγνωμοσύνη στην Ευαγγελία Γούλα, για την αδιάκοπη διάθεσή της να με εκπαιδεύσει σε εργαστηριακές τεχνικές, ανεξάρτητες από την πειραματική μου εργασία, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της εργαστηριακής ομάδας Δέσποινα Γκέκα, Κατερίνα Γαλανοπούλου, Βασιλική Λαζάνη, Βάλια Καραμάνη, Χαρίκλεια Κωνσταντακοπούλου και Λευτέρη Σινάνη, για τον τρόπο με τον οποίο με υποδέχτηκαν ως «νέο» τόσο ως φίλο όσο και ως συνεργάτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της πενταμελούς επιτροπής: τον Ευστάθιο Φριλίγγο, την Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, την Αναστασία Πολίτου και την Μιχαέλα Φίλιου για το χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Κλείνοντας, θα ήθελα να εκφράσω την βαθύτερη ευγνωμοσύνη και αγάπη μου στους δικούς μου ανθρώπους και την οικογένειά μου, που αποτέλεσαν διαρκή στηρίγματα σε όλη μου την πορεία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1. Καρκίνος	6
1.2. Τύποι καρκίνου.....	7
1.3. Γενετική του καρκίνου.....	7
1.4. Πρώτο-ογκογονίδια και ογκογονίδια.....	9
1.5. Ογκοκατασταλτικά γονίδια	10
1.6. Γονίδια Gatekeeper	10
1.7. Προστατευτικά γονίδια.....	10
1.8. Ογκογονίδια σε ανθρώπινους τύπους καρκίνου	11
1.9. Λειτουργία ογκογονιδίων.....	12
1.10. Ογκογονίδιο MYC	13
1.11. Σηματοδότηση και απορρύθμιση του MYC	15
1.11.1. Σηματοδότηση μέσω PI3K/AKT	15
1.12. Δομικά χαρακτηριστικά του γονιδίου Myc.....	16
1.13. Το σύμπλοκο MYC-MAX.....	18
1.14. Προσεγγίσεις για τη θεραπευτική στόχευση του MYC.....	19
1.15 Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1. Πλασμιδιακοί φορείς.....	22
2.2. Θρεπτικά Υλικά και Διαλύματα	24
2.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	27
2.4. Παραγωγή πρωτεϊνών σε βακτηριακή καλλιέργεια	28
2.4.1. Παραγωγή GST-πρωτεϊνών	28
2.4.2. Παραγωγή His-πρωτεϊνών.....	30
2.5. Βακτηριακή λύση	30

2.6. Απομόνωση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.....	31
2.6.1. Από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων	31
2.6.2. Από το βακτηριακό εκχύλισμα ιζήματος.....	33
2.7. Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max.....	34
2.8. Μέθοδος Bradford.....	35
2.8.1. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	35
2.9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά (Western blotting)	35
2.10. Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max.....	36
2.11. Αναστολή του σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
3.1. Παραγωγή 6-His-Myc πρωτεΐνης	40
3.1.1. Καθαρισμός της 6-His-Myc από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta.....	40
3.1.2. Καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Myc από εκχύλισμα ιζήματος βακτηρίων τύπου Rosetta	41
3.1.3. Καθαρισμός της 6-His-Myc από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου BL21DE3.....	42
3.1.4. Καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Myc από εκχύλισμα ιζήματος βακτηρίων τύπου BL21DE3	44
3.2. Παραγωγή 6-His-Max πρωτεΐνης	46
3.2.1. Καθαρισμός της 6- His-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta.....	46
3.2.2. Καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Max από πρωτεϊνικό εκχύλισμα ιζήματος βακτηρίων τύπου Rosetta.....	47
3.2.3. Καθαρισμός της 6-His-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου BL21DE3.....	49
3.2.4. Καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Max από πρωτεϊνικό εκχύλισμα ιζήματος βακτηρίων τύπου BL21DE3.....	51
3.3. Παραγωγή GST-MAX πρωτεΐνης.....	52

3.3.1. Καθαρισμός της GST-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου BL21DE3.....	52
3.3.2. Καθαρισμός της GST-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta.....	55
3.4. Παραγωγή GST-Myc πρωτεΐνης.....	56
3.4.1. Καθαρισμός της GST-Myc από διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου BL21DE3.....	56
3.4.2. Καθαρισμός της GST-Myc από διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta.....	59
3.5. Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max.....	60
3.6. Έλεγχος της δράσης γνωστών χημικών μορίων στη δοκιμασία σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max.....	63
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	70
SUMMARY.....	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72

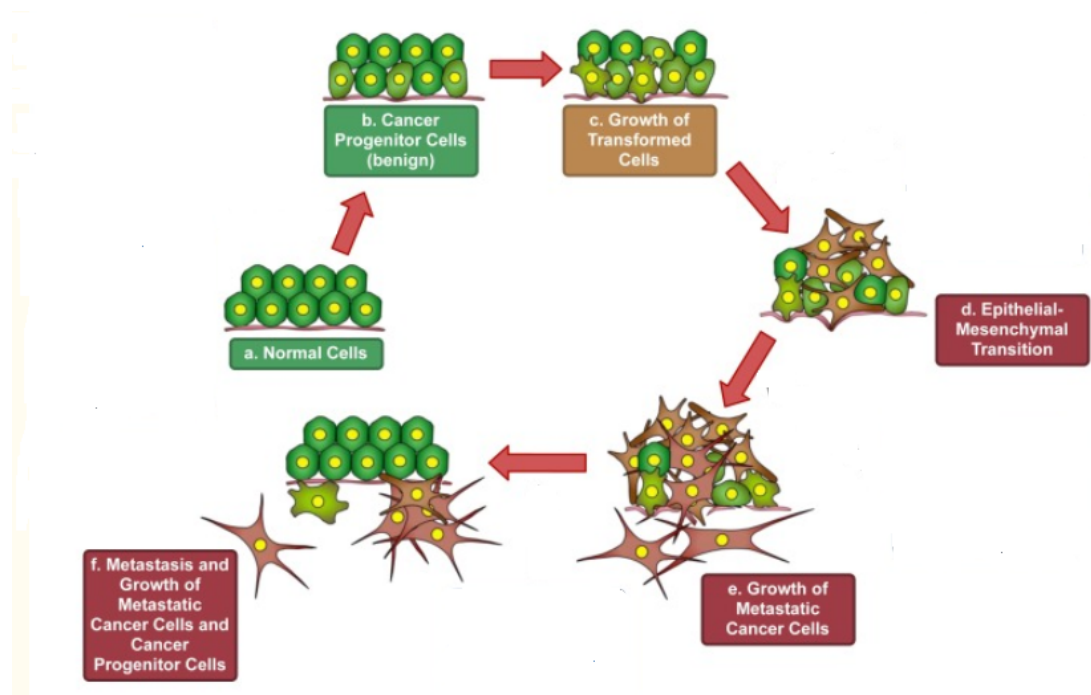
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ATP, (adenosine triphosphate): τριφωσφορική αδενοσίνη
- BSA, (bovine serum albumin): αλβουμίνη ορού βοός
- GST, (glutathione S-transferase): S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης
- GTP, (guanosine triphosphate): τριφωσφορική γουανοσίνη
- iDPS, (intrinsically disordered proteins): ενδογενώς διαταραγμένες πρωτεΐνες
- Max, (Myc-associated factor X): παράγοντας X που σχετίζεται με Myc
- PCR, (polymerase chain reaction): αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- PI3K/AKT, (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B): 3-κινάση της φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης/ πρωτεϊνική κινάση B
- PTEN, (phosphatase and tensin homolog): φωσφατάση και ομόλογο τενσίνης
- RB1, (retinoblastoma protein): πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος
- RTK, (receptor tyrosine kinase): υποδοχέας τυροσινικής κινάσης
- SDS-PAGE, (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis): ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλοθειικού νατρίου
- TCR, (T cell receptor): υποδοχέας T κυττάρων
- TGF-β, (transforming growth factor beta): μετατροπτικός αυξητικός παράγοντας-β

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Καρκίνος

Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων του σώματος αποτελεί την θεμελιώδη κυτταρική δυσλειτουργία που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του καρκίνου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται ως απόκριση σε κατάλληλα εξωκυττάρια σήματα. Η γενικευμένη απώλεια ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης, ως αποτέλεσμα γενετικών μεταλλαγών, επιγενετικών αλλαγών και κυτταρικών απορυθμίσεων, αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται με ανεξέλεγκτο τρόπο αποκτώντας μεταστατικές ιδιότητες, εισβάλλοντας στους φυσιολογικούς ιστούς και όργανα και τελικά εξαπλώνονται σε όλο το σώμα.



Εικόνα 1. Μοντέλο για την ανάπτυξη μεταστατικών προγονικών κυττάρων καρκίνου από μη μεταστατικά προγονικά κύτταρα. Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται το μοντέλο για την ανάπτυξη μεταστατικών προγονικών κυττάρων καρκίνου από μη μεταστατικά προγονικά κύτταρα **a**: εξάγωνα με κίτρινες κουκκίδες αντιπροσωπεύουν φυσιολογικά κύτταρα. **b**: εξασθενημένα πράσινα, παραμορφωμένα εξάγωνα με κίτρινες κουκκίδες αντιπροσωπεύουν καρκινικά προγονικά κύτταρα. **c**: τα προγονικά κύτταρα αυξάνονται σε αριθμό. **d**: τα καφέ κύτταρα που μοιάζουν με αστέρια αντιπροσωπεύουν τη μεταστατική μορφή καρκινικών κυττάρων, έναν μικτό πληθυσμό προγονικών και ενήλικων κυττάρων. **e**: υπερανάπτυξη μεταστατικών κυττάρων. **f**: τα μεταστατικά και τα ενήλικα προγονικά κύτταρα εγκαταλείπουν τον ιστό ανάπτυξης (Sarkar et al., 2013).

1.2. Τύποι καρκίνου

Σε κυτταρικό επίπεδο, η ανάπτυξη του καρκίνου θεωρείται ως μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία προκαλείται από τη συσσώρευση πολλαπλών μεταλλάξεων. Αυτές μπορεί να είναι κληρονομικές μεταλλάξεις, είτε να προκαλούνται αυθόρμητα κατά την κυτταρική ανάπτυξη ή από την επίδραση εξωτερικών παραγόντων.

Ο καρκίνος μπορεί να οφείλεται σε ανώμαλο πολλαπλασιασμό οποιουδήποτε από τα διαφορετικά είδη κυττάρων στο σώμα. Έτσι υπάρχουν πάνω από εκατό ξεχωριστοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι μπορεί να διαφέρουν σημαντικά στη συμπεριφορά τους και στην ανταπόκριση στη θεραπεία. Το πιο σημαντικό θέμα στην παθολογία του καρκίνου είναι η διάκριση μεταξύ καλοηθών και κακοήθων όγκων.

Ένας όγκος είναι οποιοσδήποτε ανώμαλος πολλαπλασιασμός κυττάρων, ο οποίος μπορεί να είναι είτε καλοήθης είτε κακοήθης. Ένας καλοήθης όγκος, όπως ένας συνηθισμένος αδένας δέρματος, παραμένει περιορισμένος στην αρχική του θέση και δεν εισβάλλει στον φυσιολογικό ιστό ούτε εξαπλώνεται σε απομακρυσμένες περιοχές σώματος. Ένας κακοήθης όγκος, ωστόσο, είναι ικανός τόσο να εισβάλλει στον κανονικό ιστό όσο και να εξαπλώνεται σε όλο το σώμα μέσω των κυκλοφορικών ή λεμφικών συστημάτων.

Οι περισσότεροι καρκίνοι εμπίπτουν σε μία από τις τρεις κύριες ομάδες: καρκινώματα, σαρκώματα και λευχαιμίες ή λεμφώματα. Οι τέσσερις πιο συχνές μορφές καρκίνου, που αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το ήμισυ όλων των περιπτώσεων καρκίνου, είναι αυτές του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Ο καρκίνος του πνεύμονα, μακράν ο πιο θανατηφόρος, είναι υπεύθυνος για σχεδόν το 30% όλων των θανάτων από καρκίνο (Cooper, 2000).

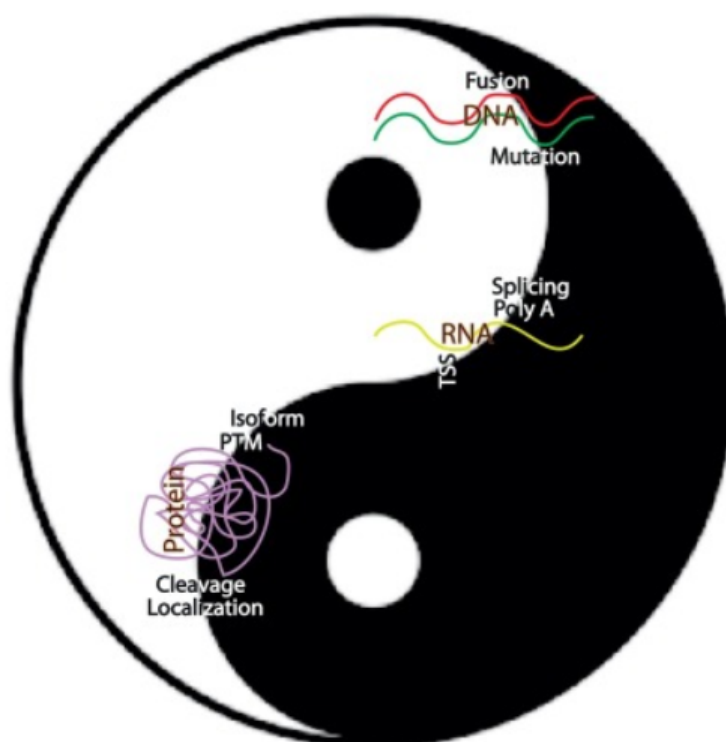
1.3. Γενετική του καρκίνου

Μετά την αρχική ανακάλυψη ότι ο καρκίνος προκαλείται από διαταραχές στη λειτουργία των γονιδίων, τα γονίδια του καρκίνου ταξινομήθηκαν σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση το εάν λειτουργούσαν για την προαγωγή ή την αναστολή της ογκογένεσης. Έτσι τα γονίδια τα οποία προάγουν την ογκογένεση έχουν χαρακτηριστεί ως ογκογονίδια ενώ τα γονίδια με αντίθετη λειτουργία χαρακτηρίζονται ως ογκοκατασταλτικά. Για παράδειγμα, το Myc ανήκει στην οικογένεια των ογκογονιδίων, ενώ το RB1, το οποίο ανήκει στα ογκοκατασταλτικά, καταστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η μελέτη και των δύο τύπων γονιδίων καθίσταται επομένως επιτακτική για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό

θεραπευτικών στρατηγικών κατά ορισμένων μορφών καρκίνου (Bashyam et al., 2019).

Αν και η ταξινόμηση των καρκινικών γονιδίων ως ογκογονιδίων και κατασταλτικών γονιδίων καθιστά πολύ εύκολο να εξηγηθεί, η μοριακή βάση για την έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου μπορεί να μην είναι απολύτως ακριβής. Υπάρχουν πλέον αυξανόμενες ενδείξεις ότι τα καρκινικά γονίδια μπορεί να παρουσιάζουν πολλαπλές και συχνά αντιφατικές λειτουργίες. Πράγματι, υπάρχουν αναφορές κλασικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων που λειτουργούν για την προώθηση της ογκογένεσης και αντίστροφα αυξάνονται. Επομένως, η ταξινόμηση των καρκινικών γονιδίων με βάση το κατά πόσο οι κωδικοποιημένες πρωτεΐνες τους προάγουν ή καταστέλλουν την ογκογένεση μπορεί να οδηγήσει σε ακατάλληλη κατανόηση της ογκογονικής διαδικασίας.

Προηγούμενες μελέτες έχουν ασχοληθεί με το θέμα της διπλής αν και αντίθετης λειτουργικότητας των γονιδίων του καρκίνου (Blagosklonny, 2002). Η αλλαγή της λειτουργίας του καρκινικού γονιδίου από έναν προαγωγό όγκου σε κατασταλτικό ή αντίστροφα μπορεί να ελεγχθεί σε επίπεδα DNA, RNA ή πρωτεΐνης.

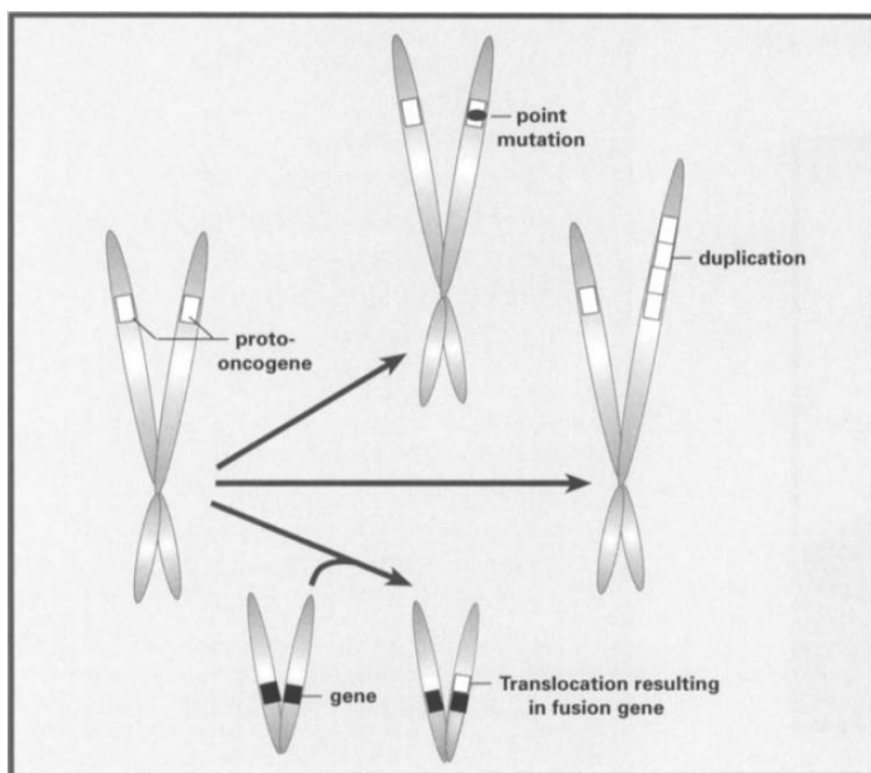


Εικόνα 2. Το Γιν και Γιανγκ των καρκινικών γονιδίων. Τα καρκινικά γονίδια μπορεί να εναλλάσσονται μεταξύ ρόλων που προάγουν και καταστέλλουν τον όγκο. Ο διακόπτης μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορους μηχανισμούς που δρουν σε επίπεδα DNA, RNA ή πρωτεΐνης. TSS

(σημείο έναρξης της μεταγραφής), PTM (μετα-μεταφραστική τροποποίηση) (Bashyam MD et al., 2019).

1.4. Πρώτο-ογκογονίδια και ογκογονίδια

Ένα πρώτο-ογκογονίδιο είναι ένα φυσιολογικό γονίδιο του κυττάρου που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση, αλλά και σε άλλες διαδικασίες στο κύτταρο. Εάν εμφανιστεί ένα σφάλμα (μετάλλαξη) σε ένα πρώτο-ογκογονίδιο, το γονίδιο μπορεί να ενεργοποιηθεί υπέρμετρα. Εάν συμβεί αυτό, το πρώτο-ογκογονίδιο μπορεί να μετατραπεί σε ένα δυσλειτουργικό γονίδιο που ονομάζεται ογκογονίδιο. Τα κύτταρα με αυτό τον τρόπο θα αρχίσουν να ξεφεύγουν από τον έλεγχο και αυτή η ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη οδηγεί σε καρκίνο. Με άλλα λόγια, τα ογκογονίδια αποτελούν μεταλλαγμένες μορφές των πρώτο-ογκογονιδίων.



Εικόνα 3. Τυπική μετάλλαξη σύμφωνα με την οποία προκαλείται διπλασιασμός ή μετατόπιση με αποτέλεσμα τη σύντηξη του γονιδίου ενδιαφέροντος με κάποιο άλλο (Deininger P., 1999).

1.5. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

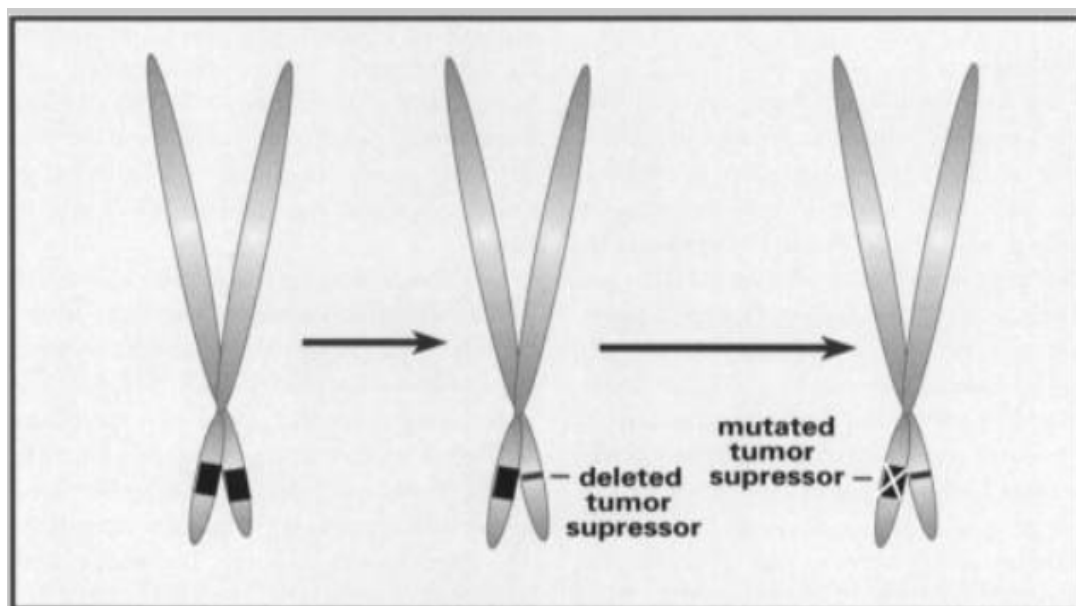
Ένα γονίδιο καταστολής του όγκου, ή ογκοκατασταλτικό, είναι ένα γονίδιο που ρυθμίζει ένα κύτταρο κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης και της αντιγραφής. Αν το κύτταρο μεγαλώσει ανεξέλεγκτα, θα έχει ως αποτέλεσμα τον καρκίνο. Όταν ένα γονίδιο καταστολής του όγκου μεταλλάσσεται, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ή την μείωση της λειτουργίας του και σε συνδυασμό με άλλες γενετικές μεταλλάξεις, αυτό θα μπορούσε να επιτρέψει στο κύτταρο να αναπτύσσεται μη φυσιολογικά. Η απώλεια της λειτουργίας για αυτά τα γονίδια μπορεί να είναι ακόμη πιο σημαντική στην ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκίνων, σε σύγκριση με την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου.

1.6. Γονίδια Gatekeeper

Μετά την ανακάλυψη ότι τα κανονικά γονίδια μπορεί να γίνουν ογκογονίδια, το επόμενο βήμα στην κατανόηση της γενετικής του καρκίνου περιλαμβάνει την ανακάλυψη γονιδίων «gatekeeper» που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο ή την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Όταν και τα δύο αντίγραφα ενός γονιδίου καταστολής του όγκου είναι κατεστραμμένα σε ένα κύτταρο, το ανεσταλμένο γονιδιακό προϊόν δεν μπορεί πλέον να παρασκευαστεί και τα κύτταρα έχουν έναν μικρότερο έλεγχο της ανάπτυξής τους. Αυτό βοηθά στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξη που οδηγεί στην ανάπτυξη των όγκων.

1.7. Προστατευτικά γονίδια

Πολλά από τα γονίδια καταστολής των όγκων παίζουν επίσης κάποιο ρόλο, άμεσα ή έμμεσα, ως «προστατευτικά». Τα προστατευτικά γονίδια είναι γονίδια υπεύθυνα για τη διατήρηση άλλων γονιδίων υγιή (δηλαδή καταστολή της μετάλλαξης). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι αλλαγές που οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου, συνήθως εντοπίζονται στα ογκοκατασταλτικά γονίδια και όχι στα ογκογονίδια.



Εικόνα 4. Απενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο παρουσιάζεται στην περιοχή του μαύρου κουτιού, το γονίδιο υφίσταται διαγραφή και το αντίγραφο για κάποιο μη αποσαφηνισμένο λόγο, αποσιωπάται (Deininge P., 1999).

1.8. Ογκογονίδια σε ανθρώπινους τύπους καρκίνου

Μερικά από τα ογκογονίδια που εντοπίζονται σε όγκους ανθρώπου είναι κυτταρικά ομόλογα ογκογονιδίων που έχουν χαρακτηριστεί από ρετροϊούς, ενώ άλλα είναι νέα ογκογόνα που ανακαλύφθηκαν αρχικά σε καρκίνους ανθρώπων. Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι μόνο ένας από τους τρόπους με τους οποίους τα πρώτο-ογκογονίδια μετατρέπονται σε ογκογονίδια σε όγκους ανθρώπων. Πολλά καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ανωμαλίες στη δομή του χρωμοσώματος, συμπεριλαμβανομένων των μετατοπίσεων, των επικαλύψεων και των διαγραφών.

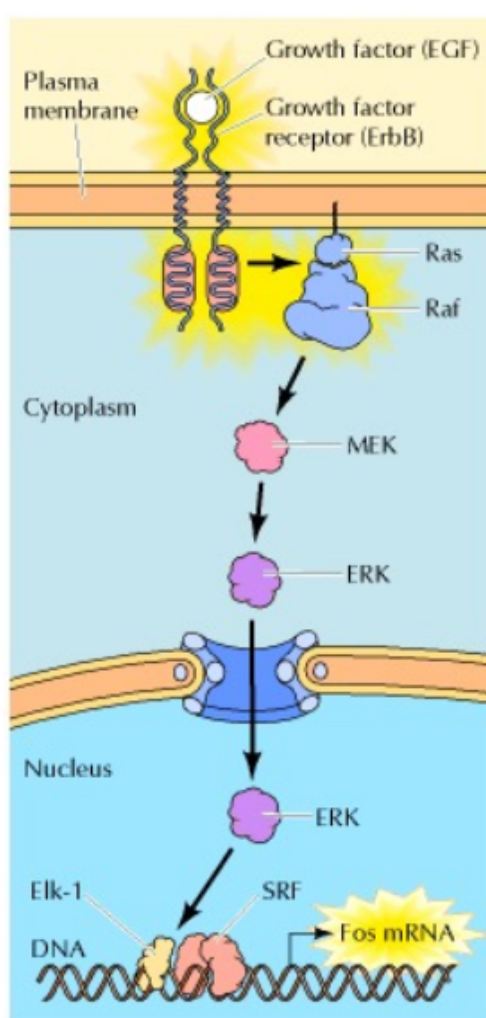
Το πρώτο χαρακτηριστικό παράδειγμα ενεργοποίησης ογκογονιδίων με μετατόπιση χρωμοσωμάτων ήταν η σχέση και η εμπλοκή του *c-Myc* ογκογονιδίου σε ανθρώπινα λεμφώματα Burkitt και πλασματοκύτταρα ποντικού, τα οποία αποτελούν κακοήθειες των Β-λεμφοκυττάρων που παράγουν αντισώματα.

Ένας ξεχωριστός μηχανισμός με τον οποίο τα ογκογονίδια ενεργοποιούνται σε ανθρώπινους όγκους είναι η ενίσχυση του γονιδίου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη γονιδιακή έκφραση. Η ενίσχυση των γονιδίων είναι συνηθισμένη σε κύτταρα του όγκου και συμβαίνει περισσότερο από χίλιες φορές συχνότερα από ότι σε φυσιολογικά κύτταρα. Η ενίσχυση των ογκογονιδίων πιθανόν να παίζει ρόλο

στην πρόοδο πολλών όγκων, επιφέροντας πιο ταχεία ανάπτυξη των καρκινικών όγκων (Cooper GM, 2000).

1.9. Λειτουργία ογκογονιδίων

Οι περισσότερες ογκογονικές πρωτεΐνες αποτελούν μόρια-ρυθμιστές των οδών σηματοδότησης που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την επιβίωση, σε απόκριση της διέγερσης παρουσία κάποιου αυξητικού παράγοντα. Αυτές οι ογκογονικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν πολυπεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, ρυθμιστές ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης και παράγοντες μεταγραφής.



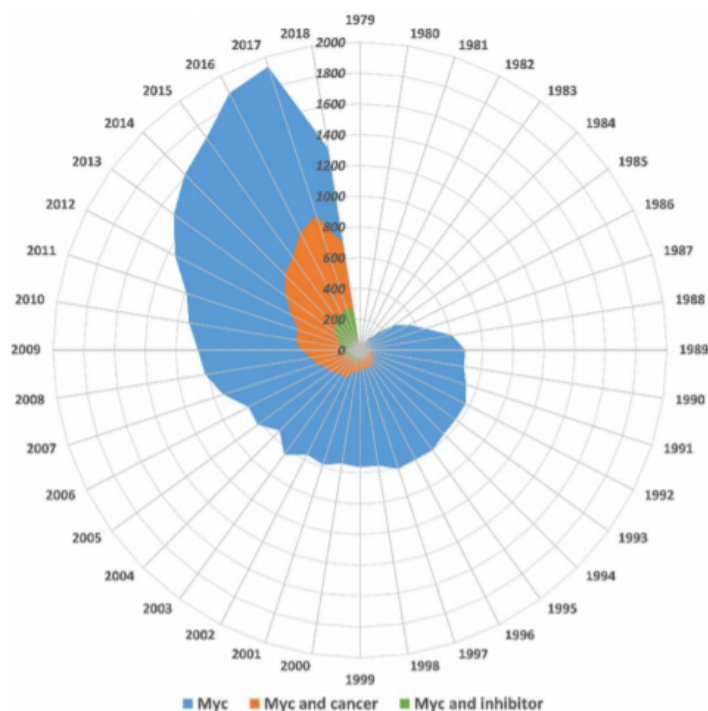
Εικόνα 5. Ογκογονίδια και μεταγωγή του σήματος. Οι ογκογονικές πρωτεΐνες δρουν ως αυξητικοί παράγοντες (π.χ. EGF), υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (π.χ. ErbB) και ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια (Ras και Raf). Ras και Raf ενεργοποιούν την οδό κίνησης ERK MAP (Armelin, H. A. et al., 1984).

Η δράση των αυξητικών παραγόντων ως ογκογονικές πρωτεΐνες, προκύπτει από τη μη φυσιολογική έκφρασή τους, οδηγώντας σε μια κατάσταση σύμφωνα με την οποία ένα καρκινικό κύτταρο παράγει έναν αυξητικό παράγοντα στον οποίο ανταποκρίνεται επίσης. Το αποτέλεσμα είναι η αυτοκρινής διέγερση του κυττάρου που προάγει την έκφραση του αυξητικού παράγοντα, οδηγώντας στον μη φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση.

Μία μεγάλη ομάδα ογκογονιδίων κωδικοποιεί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, οι περισσότεροι από τους οποίους είναι πρωτεϊνικές κινάσες-τυροσίνης. Αυτοί οι υποδοχείς συχνά μετατρέπονται σε ογκογονικές πρωτεΐνες με μεταβολές των αμινοτεματικών τους περιοχών, οι οποίες φυσιολογικά συνδέονται με εξωκυττάρους αυξητικούς παράγοντες (Armelin, H. A. et al., 1984).

1.10. Ογκογονίδιο MYC

Πάνω από 40 χρόνια έχουν περάσει από την ανακάλυψη του *Myc*, ένα σημαντικό ογκογονίδιο που εκτιμάται ότι συμβάλλει τουλάχιστον στο 75% όλων των καρκίνων του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του προστάτη, του μαστού, του παχέος εντέρου και του τραχήλου της μήτρας, στη μυελοειδή λευχαιμία, στα λεμφώματα, στα καρκινώματα των πνευμονικών μικροκυττάρων και στο νευροβλάστωμα, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι επιθετικά και ανταποκρίνονται ελάχιστα στις τρέχουσες θεραπείες. Η πρωτεΐνη που προκύπτει από το *c-Myc* στον άνθρωπο, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Myc* που βρίσκεται στη θέση 8q24.21 σε μια ευρύτερη περιοχή στο χρωμόσωμα 8, το οποίο συχνά ενισχύεται σε καρκίνους.

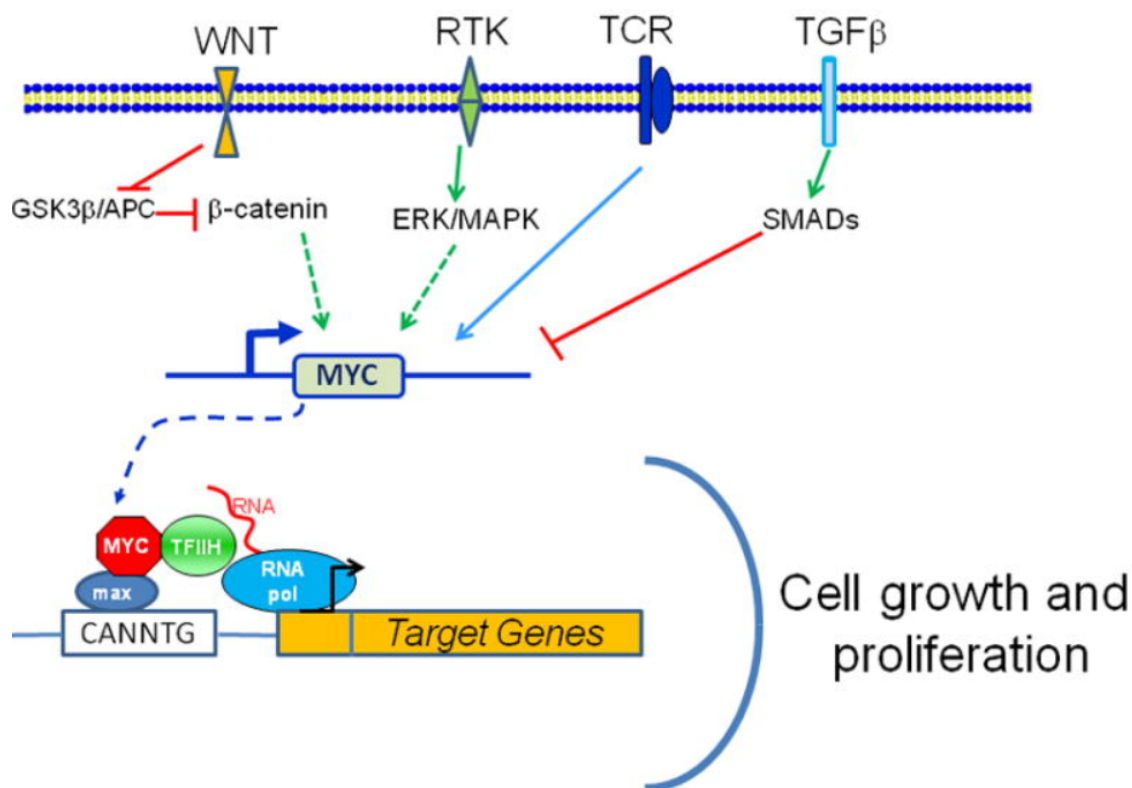


Εικόνα 6. 40 χρόνια μελέτης του γονιδίου *Myc*. Αύξηση του αριθμού των διαθέσιμων δημοσιεύσεων στο NCBI PubMed για το *Myc* γενικότερα (μπλέ χρώμα), *Myc* ειδικότερα στο καρκίνο (πορτοκαλί χρώμα), αναστολή του *Myc* (πράσινο χρώμα) από το 1979 έως το 2018 (Lavinia A. Carabet, et al., 2019).

Το *Myc*, ή αλλιώς *c-Myc* (*cellular-Myc*), είναι ένα γονίδιο που ανήκει σε μια οικογένεια που περιέχει δύο ακόμα γονίδια, το MYCL (*L-Myc*) και το MYCN (*N-Myc*). Η έκφραση του *N-Myc* είναι ιστο-ειδική και μπορεί να υποκαταστήσει το *c-Myc* στα πλαίσια της ανάπτυξης του ποντικού. Ξεκινώντας από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε όγκους κοτόπουλων που προέρχονταν από ογκογόνους ρετροϊούς και οι οποίοι όγκοι εμφάνιζαν φλεγμονώδη συμπεριφορά, ανακαλύφθηκε το ογκογονίδιο *v-Myc* της οικογένειας ALV, που προκαλούσε σαρκώματα και, κυρίως, καρκινώματα σε αυτούς τους οργανισμούς. Ακολούθως, διαπιστώθηκε ότι το *c-Myc* γονίδιο μεταγράφεται σε διάφορους οργανισμούς. Μάλιστα, φαίνεται να διατηρεί εξελικτική σταθερότητα μεταξύ αυτών των διαφόρων ειδών.

Το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται στο σταυροδρόμι πολλών αναπτυξιακών οδών μεταγωγής του σήματος και η καθοδική (“downstream”) έκφρασή του, μπορεί να επηρεάσει τη σύνδεση συμπλόκων με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Η έκφραση του MYC ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό, έτσι ώστε το επίπεδο έκφρασής του να ελέγχεται στενά από έναν αριθμό μηχανισμών που περιλαμβάνουν πολλά

μεταγραφικά ρυθμιστικά μονοπάτια (WNT, RTK, TCR, TGF- β) (Kelly, K. et al., 1983; Dang, Chi V., 2012).



Εικόνα 7. Το γονίδιο MYC παράγει τον παράγοντα μεταγραφής MYC, ο οποίος διμερίζεται με τον παράγοντα MAX και δεσμεύει τις αλληλουχίες DNA στόχου ή τα E-boxes (με την αλληλουχία 5'-CANNTG-3') για τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Η οδός WNT απεικονίζεται με την αρνητικά ρυθμισμένη από APC, β-κατενίνη, η οποία κατά την πυρηνική μετατόπιση συμμετέχει στην ενεργοποίηση του MYC. Επομένως η απώλεια των δράσεων της APC θα οδηγήσει στην συστηματική ενεργοποίηση του ογκογονιδίου (Dang, Chi V., 2012).

1.11. Σηματοδότηση και απορρύθμιση του MYC

1.11.1. Σηματοδότηση μέσω PI3K/AKT

Η οδός PI3K/AKT είναι μία από τις συχνότερα μεταλλαγμένες οδούς στον καρκίνο (Kelly, K. et al., 1983). Η πρωτεΐνη PI3K αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs) στη πλασματική μεμβράνη και μετατρέπει τα εξωκυτταρικά ερεθίσματα σε ενδοκυτταρικά σήματα μέσω της φωσφορυλίωσης ενός δεύτερου μορίου αγγελιοφόρου της διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP2) στην PIP3, ξεκινώντας έναν καταρράκτη μεταγωγής του σήματος μέσω της φωσφορυλίωσης και της ενεργοποίησης της κινάσης σερίνης/θρεονίνης AKT (Kandoth, C. et al., 2013). Το PTEN (ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης)

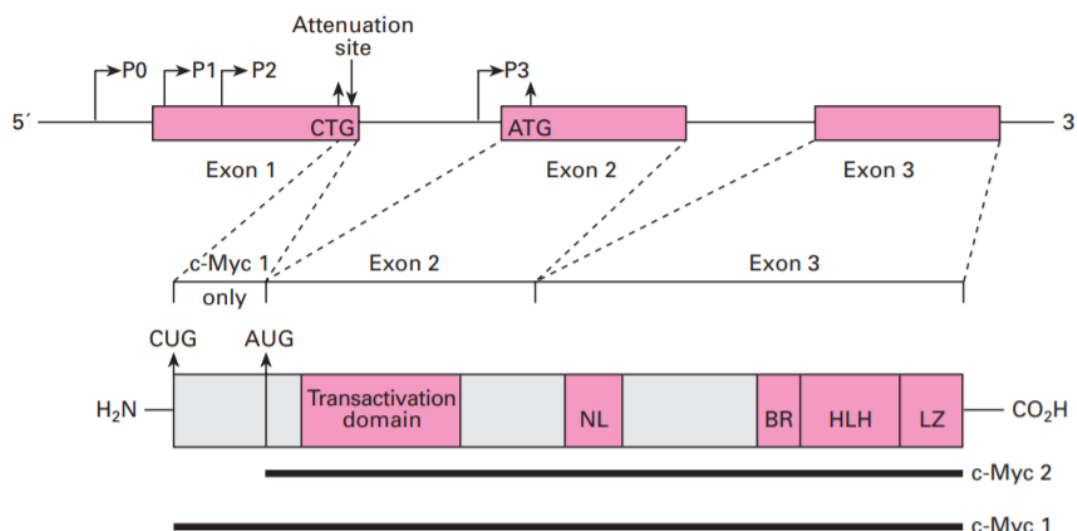
ανταγωνίζεται άμεσα την δραστικότητα της PI3K με την αποφωσφορυλίωση της PIP3 πίσω στην PIP2 (Stokoe D. et al., 1997; Maehama, T. et al., 1998). Αφού ενεργοποιηθεί, η AKT δρα ως κινάση-τελεστής, ρυθμίζοντας έναν αριθμό πρωτεϊνών και οδών σημαντικών για την ογκογένεση, συμπεριλαμβανομένης της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3). Η AKT φωσφορυλιώνει την GSK3 και απενεργοποιεί την κινάση, αναστέλλοντας την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει και να ρυθμίζει αρνητικά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης MYC. Τόσο η PI3K όσο και το PTEN μεταλλάσσονται συνήθως σε πολλούς καρκίνους, με ενεργοποιούμενες μεταλλάξεις στην ελικοειδή περιοχή της υπομονάδος p110α του PI3K (όπως E542K και E545K) απελευθερώνοντας τα ανασταλτικά σήματα της P85 ρυθμιστικής υπομονάδας του PI3K. Οι μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης της PI3K, όπως η H1047K, έχει δείχθει ότι φωσφορυλιώνουν την PIP3 ανεξάρτητα από την RAS-GTP. Αντιστρόφως, το γονίδιο *PTEN* χάνεται συχνά σε πολλούς όγκους, με όλες τις μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων να οδηγούν σε υπερ-ενεργοποιημένη δράση της AKT (Myers M.P. et al., 1998; Zhao L. et al., 2008; Li, J., 1997). Έτσι, η ενεργοποίηση της PI3K/AKT από πολλούς μηχανισμούς μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση του MYC αυξάνοντας τη σταθερότητα του MYC.

1.12. Δομικά χαρακτηριστικά του γονιδίου Myc

Το mRNA του MYC μπορεί να μας δώσει διαφόρων ειδών πολυπεπίδια, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται ένα που ξεκινά από κωδικόνιο CUG, το οποίο βρίσκεται ανοδικά του κανονικού κωδικονίου έναρξης (AUG), και ένα που ξεκινά σε ένα εσωτερικό AUG (Li, J., 1997). Η πρωτεΐνη που μεταφράζεται από το κανονικό κωδικόνιο έναρξης AUG περιλαμβάνει ένα μη δομημένο αμινο-τελικό άκρο, μια κεντρική περιοχή και ένα καρβοξυ-τελικό άκρο. Το αμινο-τελικό άκρο διαθέτει μια περιοχή ρύθμισης της μεταγραφής (transactivation domain, TAD), τις συντηρημένες περιοχές γνωστές ως Myc Boxes I και II, και ακολούθως τις περιοχές Myc Boxes III και IV και μια περιοχή πυρηνικού εντοπισμού. Το Myc Box I μπορεί να αποτελέσει στόχο για την ουβικιτίνη E3 λιγάση, το Myc Box II είναι απαραίτητο για όλες τις γνωστές λειτουργίες του *Myc* και μπορεί να προκαλέσει τη στρατολόγηση του συμπλόκου ακετυλο-τρανσφεράσης των ιστονών, ενώ το Myc Box III είναι υπεύθυνο για τις μεταγραφικές δραστηριότητες και την σταθερότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος του *Myc*.

Το καρβοξυ-τελικό άκρο χαρακτηρίζεται από μια βασική περιοχή που συνδέεται με ένα μοτίβο διμερισμού με την εξής δομική ακολουθία: έλικα-στροφή-έλικα-φερμουάρ λευκίνης (helix-loop-helix-leucine zipper, HLH-Zip) (BR/HLH/LZ). Το μοτίβο αυτό είναι απαραίτητο για της αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA και πρωτεϊνών. Ο παράγοντας Max (Myc-associated factor X) προσδέεται στο Myc μέσω ακριβώς αυτού του μοτίβου στο καρβοξυ-τελικό άκρο (Stambolic, V. et al., 1998).

Οι υποψίες για ένα ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης αυξήθηκαν, όταν η αλληλουχία της *c-Myc* αποδείχτηκε ότι περιέχει μια σειρά μοτίβων αναδίπλωσης που ήταν παρόμοια με ήδη γνωστά μελετημένους μεταγραφικούς παράγοντες. Μοτίβα φερμουάρ-λευκίνης καθώς και περιοχές με μοτίβα έλικα-βρόγχος-έλικα αποδείχτηκε ότι εντοπίζονται στη δομή του C-Myc. Τα δύο αυτά μοτίβα σύμφωνα με άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στο σχηματισμό συμπλεγμάτων παραγόντων μεταγραφής (Blackwood, E. M. et al., 1994).

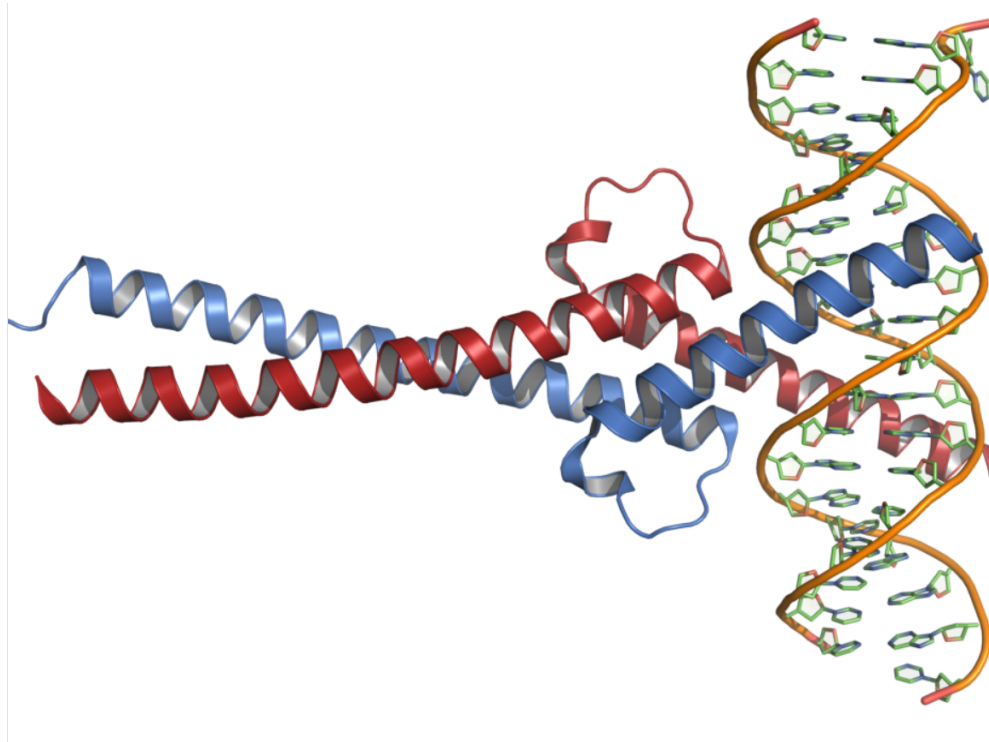


Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της δομής του ανθρώπινου *c-Myc* γονιδίου καθώς και των δύο πιθανών προϊόντων, *c-Myc 1* και *c-Myc 2*. Τα P0, P1, P2 και P3 είναι οι περιοχές των γονιδιακών υποκινητών. Τα δύο κωδικόνια που αναφέρονται μας δείχνουν τις θέσεις έναρξης της μετάφρασης των δύο πρωτεϊνικών προϊόντων. NL: nuclear localization, πυρηνικός εντοπισμός, BR: basic region, βασική περιοχή, HLH: helix-loop-helix, έλικα-στροφή-έλικα, LZ: leucine zipper, φερμουάρ λευκίνης (Kevin M. RYAN et al., 1996).

1.13. Το σύμπλοκο MYC-MAX

Οι λειτουργικές συνέπειες της απορυθμισμένης έκφρασης του MYC και η επίδρασή της στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης καθώς και οι διεργασίες αντιγραφής ή αποκατάστασης του DNA κατά τη φυσιολογική και την ογκογενετική διαδικασία, αποτελούν σημαντικό αντικείμενο έντονης έρευνας σήμερα. Το MYC λειτουργεί συνεργατικά με τον παράγοντα MAX, μέσω της αναγνώρισης ειδικών αλληλουχιών στο DNA.

Αν και οι επιδράσεις του MYC ως μεταγραφικό παράγοντα συχνά θεωρούνται απομονωμένες, είναι σημαντικό να εξεταστεί η λειτουργία του στο πλαίσιο ενός δικτύου σχετικών μεταγραφικών παραγόντων και αλληλεπιδρώντων συν-ρυθμιστικών πρωτεϊνών που έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν τη δέσμευση και έκφραση του γονιδίου στόχου του MYC. Το δίκτυο αυτό, γνωστό ως “Proximal MYC Network (PMN)” περιλαμβάνει τα MAX, MGA, MXD1, MXD3, MXD4, MXI1, MNT, MLX, MLXIP και MLXIPL. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες έχουν συναφείς περιοχές δομής έλικα-βρόγχου-έλικας (bHLHZ) και μπορούν να θεωρηθούν μέλη της υπερικογένειας της MYC bHLHZ. Τα διαφορετικά στοιχεία του δικτύου συνδέονται μέσω διμερισμού με MAX, MLX ή και τα δύο. Το MAX, πέραν του διμερισμού με το MYC, σχηματίζει επίσης ετεροδιμερή με την οικογένεια MXD, που αποτελείται από MXI1, MNT και MGA. Αν και πολύ λιγότερο χαρακτηρισμένοι από τις πρωτεΐνες MYC, αυτοί οι παράγοντες μπορούν να ανταγωνιστούν το MYC για δέσμευση σε MAX και για θέσεις E-box σε κοινά γονίδια-στόχους. Σε αντίθεση με την κυρίαρχη ακολουθία ενεργοποίησης της μεταγραφής του MYC, οι πρωτεΐνες MXD, MXI1, MNT και MGA καταστέλλουν τη μεταγραφή. Αυτές οι αντίθετες μεταγραφικές δράσεις, μαζί με λειτουργικές δοκιμασίες που έχουν πραγματοποιηθεί, δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες MXDs, MNT και MGA μπορούν να ανταγωνίζονται τη μετασχηματιστική δραστηριότητα του MYC σε δοκιμασίες κυτταροκαλλιέργειας και έθεσαν την πιθανότητα ότι λειτουργούν ως καταστολείς των όγκων (Chen, H. et al., 2018).



Εικόνα 9. Δομή του συμπλόκου c-myc (κόκκινο χρώμα) με τον παράγοντα Max (μπλέ χρώμα), με τελική σύνδεση σε αλληλουχία DNA. Η πρωτεΐνη Myc, μέσω της περιοχής με μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα, συνδέεται με αλληλουχία DNA, ενώ με την περιοχή με μοτίβο φερμουάρ λευκίνης προσδένεται με τον παράγοντα Max.

1.14. Προσεγγίσεις για τη θεραπευτική στόχευση του MYC

Για τη στόχευση του Myc έχει χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα στρατηγικών, άμεσων και έμμεσων αξιοποιώντας τους πολλαπλούς μηχανισμούς της ρύθμισής του, όπως είναι η μεταγραφή του Myc και η σταθερότητα του mRNA, η πρωτεϊνική σταθερότητα και η αποικοδόμηση του Myc, καθώς και η σύνδεση του Myc με το διαδραστικό του μόριο (MAX). Μερικές από αυτές τις προσεγγίσεις έχουν αποδώσει τον σχεδιασμό πρωτότυπων αναστολέων που έχουν αρχίσει πρώιμες κλινικές δοκιμές. Αν και έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες τα τελευταία 20 χρόνια, κανένα εγκεκριμένο μόριο-φάρμακο δεν έχει βρεθεί να είναι ικανό να εμποδίζει άμεσα τις αλληλεπιδράσεις Myc-Max ή τη σύνδεση του συμπλόκου με το DNA.

Οι πρωτεΐνες Myc και Max ανήκουν σε μια οικογένεια πρωτεϊνών, γνωστή ως IDPS (intrinsically disordered proteins), οι οποίες δεν διαθέτουν μια σταθερή ή διατεταγμένη τρισδιάστατη δομή. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ελάχιστες δομές και υπάρχουν ως δυναμικά σύνολα υπό φυσιολογικές συνθήκες. Παρά το γεγονός ότι είναι εξαιρετικά ευέλικτες και δεν έχουν σταθερές δευτερογενείς και τριτογενείς

δομές, οι IDPS επηρεάζουν κρίσιμες βιολογικές λειτουργίες. Η πρωτεΐνη Myc εκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο και αποτελεί έναν ελκυστικό στόχο για τον σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων. Ωστόσο λόγω της φύσης των συγκεκριμένων μορίων, καθίσταται σημαντικά δύσκολη η ανεύρεση χημικών μορίων αναστολέων, καθώς στερούνται αναγνωρίσιμων μοτίβων πρωτεϊνικής αναδίπλωσης.

Έχουν αναφερθεί αρκετά πιθανά πρωτότυπα μικρού μοριακού τύπου, αλλά δεν έχουν είτε *in vivo* αποτελεσματικότητα είτε δεν ανταποκρίνονται στα προφίλ ασφαλείας. Από τη μια πλευρά, αυτές οι αδυναμίες ανεύρεσης ικανών μορίων αναστολέων οφείλεται στην έλλειψη ορθολογικού ελέγχου κατά τον σχεδιασμό μορίων με περιορισμένη ειδικότητα. Από την άλλη πλευρά οι προσπάθειες για την ανακάλυψη πιθανών σωστών θεραπευτικών προσεγγίσεων έναντι του Myc, καθυστερούν εξαιτίας της μη διατεταγμένης φύσης του ίδιου του μορίου καθώς και της έλλειψης ποιοτικών δόμων του συμπλέγματος που σχηματίζει.

Με βάση τα αποτελέσματα επιστημονικών ερευνών έχουν ανακαλυφθεί δυο μεγάλες κατηγορίες ικανών μορίων αναστολέων MYC:MAX:

- Μόρια τα οποία δρουν παρεμβαίνοντας στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και μπλοκάρουν τον ετεροδιμερισμό του MYC:MAX
- Μόρια τα οποία εμποδίζουν άμεσα τη δέσμευση του MYC:MAX με το DNA

Είναι σημαντικό ότι και οι δύο τύποι αναστολέων μειώνουν την αφθονία της πρωτεΐνης MYC και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό πολλών κυτταρικών σειρών ανθρώπινου καρκίνου, προκαλώντας ενεργειακή κρίση που χαρακτηρίζεται από την εξάντληση του ATP, τη συσσώρευση ουδέτερων λιπιδίων, τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (Landschulz, W. H. et al., 1988; Schaub, F. X. et al., 2018; McKeown, M.R. et al., 2014; Chen, H. et al., 2018).

1.15. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μιας συνεργατικής μελέτης που σκοπό έχει την ανακάλυψη νέων αναστολέων της Myc, που να έχουν θεραπευτική δράση στους όγκους. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου κρίθηκε απαραίτητη η εγκαθίδρυση μιας *in vitro* δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max, απουσία κυττάρων, η οποία θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ανασταλτικής δράσης νέων χημικών μορίων που στοχεύουν στην αναστολή του σχηματισμού του συμπλόκου αυτού. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, θα έπρεπε

αρχικά να παραχθούν σε επαρκείς ποσότητες και σε καθαρή μορφή οι 2 πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, MYC και MAX.

Πρωταρχικός στόχος λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν η ετερόλογη έκφραση των MYC και MAX πρωτεϊνών σε καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων, ο καθαρισμός τους, η εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου των δύο αυτών πρωτεϊνών και η επιβεβαίωση, με χρήση γνωστών αναστολέων, ότι η δοκιμασία αυτή είναι κατάλληλη για την ανίχνευση της ανασταλτικής δράσης μικρών χημικών μορίων που στοχεύουν στο σύμπλοκο Myc/Max.

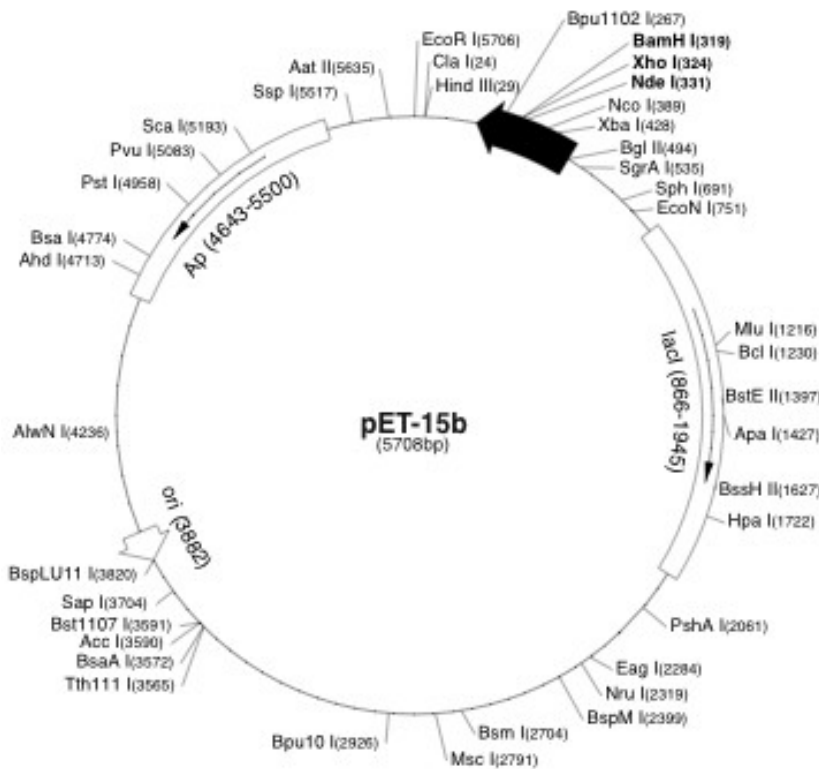
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πλασμιδιακοί φορείς

Προκειμένου να κατασκευαστούν οι κατάλληλοι πλασμιδιακοί φορείς, ακολουθήθηκαν τα επιμέρους βήματα της διαδικασίας της κλωνοποίησης ενός επιθυμητού γονιδίου ή κάποιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Με μια γενικότερη ματιά, η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την επιλεκτική ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου (αντίδραση PCR), την κατάτμηση του DNA με περιοριστικά ένζυμα ώστε να προκύψουν κατάλληλα τμήματα για την ένθεσή τους σε πλασμίδια-φορείς με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, στη συνέχεια τα ανασυνδυασμένα αυτά μόρια θα εισαχθούν σε βακτηριακά κύτταρα (μετασηματισμός) ώστε, τελικά, να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς οι οποίοι είχαν προμηθευτεί και κατασκευαστεί ήδη στο εργαστήριο. Τα δύο γονίδια που μελετήθηκαν, τα προμηθευτήκαμε από το εργαστήριο του κυρίου Ευστρατιάδη, το οποίο υπάγεται στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Οι γονιδιακές αλληλουχίες που παραλήφθηκαν ήταν ενσωματωμένες σε φορέα pET15b, ο οποίος φέρει τον His επίτοπο. Η Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα κλωνοποίησε τα εν λόγω γονίδια με έναν άλλο φορέα, της οικογένειας pGEX, ο οποίος φέρει τη GST ετικέτα.

1) Pet15b πλασμιδιακός φορέας για την έκφραση πρωτεϊνών με την ετικέτα 6-His

- Pet15b-cMyc FL(full length, aa1-454) εισαγωγή σε NdeI-BamHI (cloning site)
- Pet15b-Max FL(full length, aa1-160) εισαγωγή σε NdeI-BamHI (cloning site)

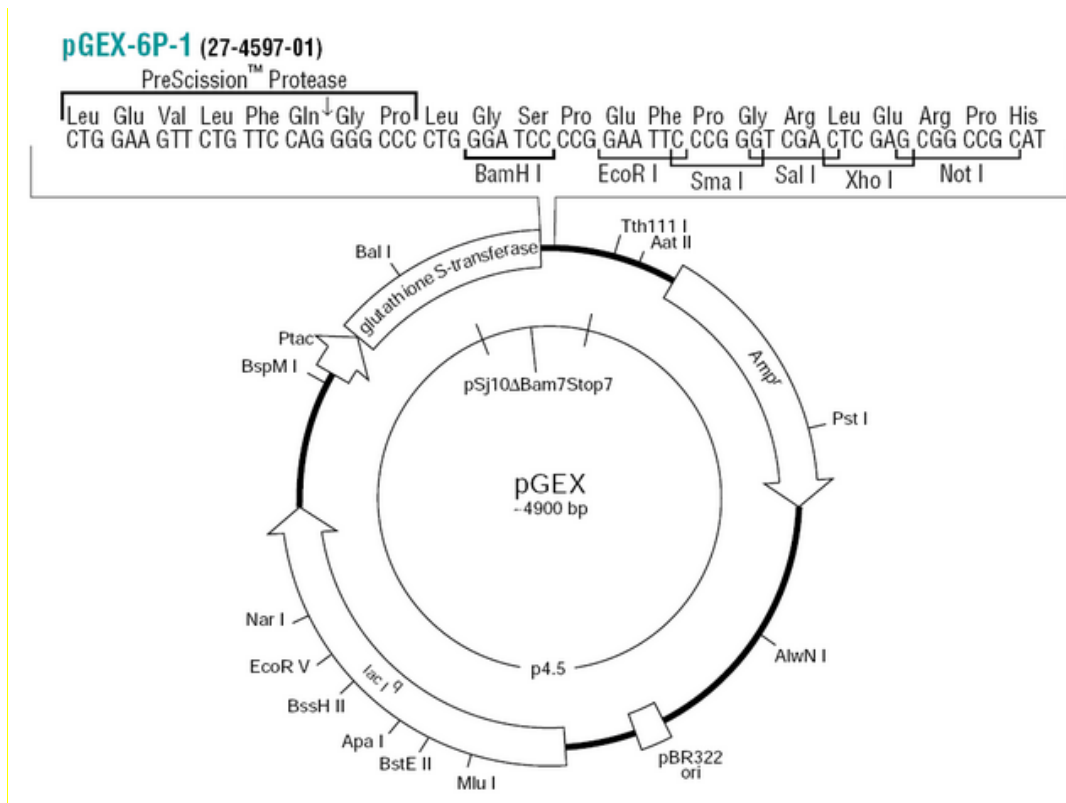


Εικόνα 10. Γενετικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα Pet15b.

Οι προς παραγωγή πρωτεΐνες, Myc και Max, αναμένεται να διαθέτουν 6 αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης (6-His ετικέτα).

2) pGEX-6P-1 πλασμιδιακός φορέας για την έκφραση πρωτεϊνών με την ετικέτα GST

- pGEX-6P-1 c-myc 368-454 εισαγωγή σε NotI/ECORI (cloning site)
- pGEX-6P-1 Max FL(full length) εισαγωγή σε NotI/ECORI (cloning site)



Εικόνα 11. Γενετικός χάρτης πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P-1.

Στο συγκεκριμένο σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι, τα παραγόμενα πρωτεϊνικά μόρια αναμένεται να διαθέτουν τις διαφορετικές ετικέτες (6-His, GST) στο αμινοτελικό τους άκρο (N-terminal), προκειμένου να μην επηρεαστεί η περιοχή του καρβοξυτελικού (C-terminal). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (υποενότητα 1.12.), στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, εντοπίζεται μια περιοχή με μοτίβο αναδίπλωσης bHLHZ, υπεύθυνη για το σχηματισμό του μεταξύ τους συμπλόκου.

2.2. Θρεπτικά Υλικά και Διαλύματα

Luria Broth (LB) θρεπτικό υλικό (1L)

- 1% NaCl (10 g)
- 1% Tryptone (10 g)
- 0,5% Yeast Extract (5 g)

LB παρουσία άγαρ: Στη συνταγή του LB προστίθεται 15% άγαρ (15 g)

M9 ελάχιστο θρεπτικό μέσο (minimal medium) (1L)

200 ml 5x Salt solution

- 2 ml 1M θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) (διηθημένο)
- 0,1 ml 1M χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) (διηθημένο)
- 20ml 20% (w/v) γλυκόζη (διηθημένο)
- Διηθημένο νερό έως όγκο 1L

5x Salt solution (500 ml)

- 16,95 gr όξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4)
- 7,5 gr δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)
- 1,25 gr χλωριούχο νάτριο ($NaCl$)
- 2,5 gr χλωριούχο αμμωνίου (NH_4Cl)

Lysis Buffer (50ml)

His-πρωτεΐνες

- 50mM Tris pH=7,5 (2,5 ml από stock 1M)
- 100mM NaCl (1ml από stock 5M)
- 1mM PMSF (877μl από stock 57mM)
- 1μM Leupeptin (5μl από stock 10mM)
- 1μg/ml Aprotinin (5μl από stock 10μg/μl)
- 0,7μg/ml Pepstatin (35μl από stock 1μg/μl)
- 5μg/ml RNAase (25μl από stock 10μg/μl)
- 5μg/ml DNAase (25μl από stock 10μg/μl)
- 10mM Imidazole pH=8 (0,5ml από stock 1M)
- 0,5% Tween (1,25 ml από stock 20% Tween 20)

GST-πρωτεΐνες

Ίδια σύσταση με των His-πρωτεϊνών, απουσία ιμιδαζολίου

Wash Buffer

- 50mM Tris pH=7,5
- 100mM χλωριούχο νάτριο ($NaCl$)

Wash Buffer παρουσία 20mM Ιμιδαζολίου pH=8 (10 ml)

- 50mM Tris pH=7,5
- 100mM χλωριούχο νάτριο ($NaCl$)

- 20 mM Ιμιδαζολίου pH=8

Wash Buffer παρουσία 50mM Ιμιδαζολίου pH=8 (10 ml)

- 50mM Tris pH=7,5
- 100mM χλωριούχου νατρίου (NaCl)
- 50 mM Ιμιδαζολίου pH=8

Elution Buffer

His-πρωτεΐνες (5ml)

- 50mM Tris pH=7,5 (250μl από stock 1M)
- 100mM NaCl (100μl από stock 5M)
- 250mM imidazole pH=8 (1,25ml από stock 1M)

GST-πρωτεΐνες

- 50mM Tris pH=8,5
- 150mM χλωριούχου νατρίου (NaCl)
- 20mM ανηγμένης γλουταθειόνης pH=8,5

Dialysis Buffer (500 ml)

- 20mM Tris pH=7,5(10 ml από stock 1M)
- 150mM χλωριούχο νάτριο (NaCl) (15 ml από stock 5M)
- 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη (179 μl από stock 14M)
- 10% γλυκερόλη (58 ml 87%)

Cleavage Buffer

- 50mM Tris pH=7,5
- 150mM χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- 1mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)
- 1mM διθειοθρεϊτόλη (DTT)

10x SDS Running Buffer (1L)

- 30,3g Tris base
- 144,4g Γλυκίνη
- 10g SDS

2.3. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Ξεκινώντας, ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε μέσω θερμικού σοκ. Κατά τη διαδικασία αυτή εφαρμόζεται αρχικά, υψηλή θερμοκρασία ώστε να προαχθεί παροδική διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος και να εισαχθεί το πλασμιδιακό DNA. Ακολούθως, η θερμοκρασία μειώνεται απότομα και οι πόροι του κυτταρικού τοιχώματος επανέρχονται στην κλειστή τους κατάσταση. Συγκεκριμένα, 100μl επιδεκτικών κυττάρων μεταφέρονται από τους -80°C σε πάγο, μέχρι να ξεπαγώσουν. Τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε τύπου BL21DE3, είτε τύπου Rosetta. Τα στελέχη τύπου Rosetta είναι παράγωγα των BL21DE3, σχεδιασμένα για να ενισχύουν την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών που περιέχουν κωδικόνια που σπάνια χρησιμοποιούνται σε *E. Coli*. Αυτά τα στελέχη παρέχουν tRNA για κωδικόνια AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA σε ένα πλασμίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη. Έτσι, τα στελέχη τύπου Rosetta παρέχουν τη δυνατότητα «καθολικής» μετάφρασης της πρωτεΐνης στόχου.

Στη συνέχεια, προστίθεται 1μl του πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P-1 κλωνοποιημένο με το γονίδιο ενδιαφέροντος. Κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων αυτών με τον φορέα που φέρει την Max γονιδιακή αλληλουχία, προστίθενται 2μl από αυτόν. Ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- Επώαση στον πάγο για μισή ώρα
- Επώαση της 42°C για 1 λεπτό
- Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά

Στη συνέχεια, σε 250μl προστίθεται το διάλυμα που προέκυψε έπειτα από το θερμικό σοκ και επωάζεται για 1 ώρα της 37°C, υπό ανάδευση. Παραγωγή LB θρεπτικού για τρυβλία Petri.

- Αποστείρωση με υγρή θερμότητα σε αυτόκαυτο (autoclave)
- Αναμονή έως η θερμοκρασία φτάσει περίπου της 60°C
- Προσθήκη επιθυμητών αντιβιοτικών.

Προστίθενται 100μg/ml (stock 100μg/ml) αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη (stock 25μg/ml).

- Διαμοιρασμός σε τρυβλία Petri
- Αναμονή έως πλήρης στερεοποίησης του θρεπτικού

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, στα τρυβλία που κατασκευάσαμε, επιστρώνονται, σε ένα, 50μl από το δείγμα που επωάστηκε, και τα υπόλοιπα 200μl σε

άλλο τρυβλίο. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37°C ολονυκτίως. Την επόμενη ημέρα, συλλέγονται μονές αποικίες, συγκεκριμένα 5 τον αριθμό, και κάθε μία προστίθεται σε 5ml LB που περιέχει αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml, από το ίδιο stock, και πραγματοποιείται επώαση ολονυκτίως της 37°C.

2.4. Παραγωγή πρωτεϊνών σε βακτηριακή καλλιέργεια

2.4.1. Παραγωγή GST-πρωτεϊνών

Η γενικότερη πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Παρασκευή LB θρεπτικών υλικών
- Αποστείρωση με υγρή θερμότητα σε αυτόκαυστο (autoclave)
- Προσθήκη ποσότητας από stock μετασχηματισμένων για το γονίδιο ενδιαφέροντος, βακτηριακών κυττάρων σε ποσότητα LB, για καλλιέργεια μικρής κλίμακας
- Επώαση της 37°C ολονυκτίως υπό ανάδευση
- Εμβολιασμός καθαρού LB με την επωασμένη καλλιέργεια
- Επώαση της 37°C υπό ανάδευση, έως ότου η απορρόφηση στα 600nm να βρίσκεται πλησίον του 0,3
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου
- Όταν η απορρόφηση στα 600nm ισούται με 0,4-0,6, επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη ισοπρόπυλο β-D-1 θειογαλακτοπυρανοσιδη (IPTG)
- Επώαση στη θερμοκρασία δωματίου ολονυκτίως.

Το IPTG που αναφέρεται είναι ένα δομικό, μη μεταβολιζόμενο ανάλογο της αλλολακτόζης. Πρωτεΐνες που εκφράζονται υπό τον έλεγχο του lac οπερονίου βρίσκονται υπό καταστολή όταν δεν έχουν διαθέσιμη λακτόζη στο περιβάλλον της.

Υπό αυτή τη συνθήκη, ο καταστολέας της lac είναι προσδεμένος στον προαγωγέα του ένθετου γονιδίου. Αποτρέπεται, έτσι, η πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης εφόσον δεν εκφράζεται. Κατά την προσθήκη του IPTG, προκαλείται η αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης καταστολέα κι έτσι η θέση του προαγωγέα είναι προσβάσιμη στην T7 RNA. Έτσι, η πολυμεράση αυτή είναι πλέον ικανή να πραγματοποιήσει την έκφραση της πρωτεΐνης που επιθυμούμε (Landschulz, W. H., et al., 1988; Schaub, F. X. Et al., 2018).

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Αρχικά, πραγματοποιείται προκαλλιέργεια μικρής κλίμακας όπου 40ml θρεπτικού μεταφέρονται σε πλαστικό σωλήνα (falcon) των 50ml.
2. Ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων αντιβιοτικών ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση η μεν αμπικιλίνη 100μg/ml και η χλωραμφενικόλη 25μg/ml. Τα stock αυτών είναι 100mg/ml και 25mg/ml αντιστοίχως, οπότε προστίθενται 40μl από το κάθε ένα.

Πραγματοποιείται εμβολιασμός της καλλιέργειας με μεμονωμένη βακτηριακή καλλιέργεια που φυλάσσεται της -80°C σε πλαστικό φιαλίδιο (erpendorf) και επωάζεται της 37°C ολονυκτίως, υπό ανάδευση. Ακολούθως, εμβολιάζεται το προκύπτον διάλυμα με ποσότητα του πλασμιδιακού φορέα που έφερε είτε το Myc είτε το Max. Της αυτές οι διεργασίες πραγματοποιούνταν υπό στείρες συνθήκες και τελικά, αυτό που προέκυπτε, αφέθηκε για ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C .

Η καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας στην παρούσα εργασία αφορά 4L βακτηριακής καλλιέργειας. Έτσι, διατίθενται 4 κωνικές φιάλες, κάθε μια από της οποίες περιέχει 1L αποστειρωμένου LB θρεπτικού υλικού. Αφού έχουν ξεπαγώσει, με τον ίδιο τρόπο, τα αντιβιοτικά, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αυτών ώστε να επιτευχθεί ξανά η επιθυμητή τελική συγκέντρωση. Σε κάθε φιάλη, λοιπόν, προστίθεται 1ml τόσο από την αμπικιλίνη όσο και από τη χλωραμφενικόλη. Στη συνέχεια, κάθε φιάλη με 10 ml προκαλλιέργειας εμβολιάζεται και αφήνεται για επώαση της 37°C υπό ανάδευση.

Ανά διαστήματα κατά τη διάρκεια της ανάδευσης, λαμβάνεται δείγμα 1ml από κάθε αναπτυσσόμενη καλλιέργεια και μετράται η απορρόφησή της στα 600nm όπου παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση τα βακτήρια, μέσω φωτόμετρου, αξιοποιώντας LB ως τυφλό δείγμα. Όταν η τιμή της απορρόφησης υπολογιστεί κοντά στο 0,3 η θερμοκρασία επώασης γίνεται ίση με τη θερμοκρασία δωματίου. Όταν φτάσει τιμή μεταξύ 0,4-0,6 επάγεται η πρωτεϊνική έκφραση με προσθήκη IPTG σε τέτοια ποσότητα ώστε να έχει τελική συγκέντρωση σε κάθε κωνική φιάλη 200μM. Αυτό σημαίνει ότι προστίθενται 200μl από IPTG 1M. Στη συνέχεια αφήνεται για μια τελευταία επώαση υπό ανάδευση και θερμοκρασία δωματίου ολονυκτίως.

2.4.2. Παραγωγή His-πρωτεϊνών

Οι προκαλλιέργειες των πρωτεϊνών αυτών έγιναν σε LB θρεπτικό υλικό παρουσία αμπικιλίνης και χλωραμφενικόλης, σε συγκεντρώσεις της με αυτές που αναφέρθηκαν και της προκαλλιέργειας των GST πρωτεϊνών, και διαδικασία της ίδια.

2.5. Βακτηριακή λύση

Την επόμενη ημέρα, παραλαμβάνεται η βακτηριακή καλλιέργεια και διεξάγεται η λύση των βακτηριακών κυττάρων που περιέχει με την εξής διαδικασία:

- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά της 6000 στροφές το λεπτό (rpm) και σε θερμοκρασία δωματίου
- Λύση βακτηρίων με διάλυμα λύσης
- Φύλαξη της -20°C
- Διάρρηξη βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης με υπέρηχο ή κυτταρική γαλλική πρέσα
- Υπερφυγοκέντρηση για 1 ώρα της 37000 στροφές (rpm), με θερμοκρασία 4°C. Διαχωρισμός υπερκειμένου και ιζήματος
- Επεξεργασία ιζήματος με χρήση ουρίας συγκέντρωσης 8M, σε ορισμένες περιπτώσεις (His-MYC και His-Max)
- Παραλαβή πρωτεΐνης ενδιαφέροντος μέσω χρωματογραφίας συγγένειας

Πιο συγκεκριμένα, όσο αναφορά τη διαδικασία της βακτηριακής λύσης, παραλαμβάνουμε την βακτηριακή καλλιέργεια και τα βακτηριακά κύτταρα που περιέχει συλλέγονται με φυγοκέντρηση, υπό της συνθήκες που αναγράφονται παραπάνω. Η κεφαλή που χρησιμοποιήθηκε είναι η Sorvall SLA-3000 της εταιρίας Cambridge Scientific.

1. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διατηρείται στον πάγο και πραγματοποιείται επαναδιασπορά των κυττάρων με χρήση 50ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer) (περίπου 8ml ανά ίζημα).
2. Το προκύπτον μείγμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20°C. Αυτό συνίσταται διότι η εναλλαγή θερμοκρασίας κατά το πάγωμα-ξεπάγωμα των λυμένων βακτηρίων βοηθά στην καλύτερη διάρρηξή της.
3. Κατά την επόμενη εργαστηριακή ημέρα, τα βακτήρια που έχουν υποστεί λύση και βρίσκονται σε παγωμένη μορφή της -20°C, αφήνονται να ξεπαγώσουν και

ακολουθεί η διάρρηξη της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης και ομογενοποίηση του δείγματος, με χρήση είτε της τεχνικής των υπερήχων είτε με την κυτταρική γαλλική πρέσα (French Pressure, SIMINCO, 1000 PSI). Η συσκευή των υπερήχων ρυθμίζεται σε εύρος (amplitude) 30% και, κάθε δείγμα, υφίσταται 5 επαναλήψεις των 10 δευτερολέπτων. Σημειώνεται ότι τα δείγματα, καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας διατηρούνται στον πάγο ώστε να μην προκληθεί μετουσίωση της πρωτεΐνης.

Κατά την διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων με χρήση της γαλλικής πρέσας, συναρμολογείται η συσκευή και ο μοχλός επαλείφεται με γλυκερόλη. Το δείγμα εισάγεται στη συσκευή μέσω του ειδικού σωληναρίου καθώς ο μοχλός ανεβαίνει, και εξέρχεται από το άλλο ειδικό σωληνάριο καθώς ο μοχλός κατεβαίνει. Με την κάθοδο του μοχλού, ασκείται πίεση στο δείγμα που περιέχεται στη συσκευή κι έτσι τα βακτηριακά κύτταρα διαρρηγνύονται και το μείγμα ομογενοποιείται. Και οι δύο αυτές μέθοδοι φάνηκαν να είναι εξίσου αποτελεσματικές στην παρούσα εργασία.

4. Η επόμενη διεργασία αφορά την υπερφυγοκέντρωση του προϊόντος, με σκοπό το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών συστατικών του από τα βακτηριακά υπολείμματα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κεφαλή 70Ti της εταιρίας Beckmann. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται της 37000 στροφές το λεπτό (100.000g) για 1 ώρα και σε θερμοκρασία 4°C.
5. Παραλαμβάνεται, λοιπόν, η υγρή φάση του προϊόντος που περιέχει της βακτηριακές πρωτεΐνες και φυλάσσεται το ίζημα σε θερμοκρασία -20°C, το οποίο, σε ορισμένες περιπτώσεις που θα αναφερθούν στη συνέχεια, θα επεξεργαστεί με ουρία ώστε να συλλεχθούν και οι πρωτεΐνες που καθίζαναν εντός του.

2.6. Απομόνωση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος

2.6.1. Από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων

Για την απομόνωση και παραλαβή της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος το δείγμα που προέκυψε από την υπερφυγοκέντρωση, επεξεργάζεται μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Η διαδικασία θα περιγραφεί ξεχωριστά για την απομόνωση πρωτεΐνης από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωση και της από το ίζημα. Τα βήματα που ακολουθούνται για την απομόνωση από υπερκείμενο είναι τα εξής:

Προετοιμασία στήλης χρωματογραφίας

- Εισάγονται περίπου 400μl σφαιριδίων (γλουταθειόνης ή νικελίου),
- Πλύση με 5ml 1x PBS,
- Προκειμένου να μη στεγνώσουν, προστίθεται 1ml 1xPBS,
- Επώαση υπερκειμένου μαζί με τα σφαιρίδια σε πλαστικό σωλήνα (falcon) για 1-1,5 ώρα υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία 4°C. Σε περίπτωση που έχω περισσότερους από έναν πλαστικούς σωλήνες, τα σφαιρίδια διαμοιράζονται ισόποσα,
- Swing φυγοκέντρηση της 3600 στροφές το λεπτό (rpm), για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C,
- Αποθήκευση μεγαλύτερου μέρους υπερκειμένου (flowthrough sample) σε θερμοκρασία -20°C,
- Προστίθενται τα σφαιρίδια στη στήλη και το περιεχόμενο διάλυμα αφήνεται, να περάσει,
- Πλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα (Wash buffer), 5x δεκαπλάσιο όγκο περιεχομένων σφαιριδίων,
- Της His πρωτεΐνες οι πλύσεις γίνονται με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου pH= 8 (2x 5ml Wash buffer, 2x 5ml Wash buffer + 20mM ιμιδαζόλιο, 2x 5ml Wash buffer + 50 mM ιμιδαζόλιο).

Έκλυση πρωτεΐνης

- 1^ο κλάσμα: όγκος 50μl μικρότερος από των σφαιριδίων. Κενός όγκος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, δεν περιέχει πρωτεΐνη,
- Επόμενα κλάσματα: όγκος ίσος ή 50μl μεγαλύτερος από τον όγκο των σφαιριδίων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, εδώ περιέχεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.

Η έκλυση των πρωτεϊνών που περιέχουν την ετικέτα πολύ-ιστιδίνης πραγματοποιείται με την χορήγηση διαλύματος ιμιδαζολίου. Το ιμιδαζόλιο δεσμεύεται στα μεταλλικά ιόντα (Νικελίου) της στήλης χρωματογραφίας συγγένειας με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος να απελευθερώνονται και να εκλύονται. Αντίστοιχα η έκλυση των πρωτεϊνών που περιέχουν την ετικέτα GST πραγματοποιείται με την χορήγηση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης. Η

ανηγμένη γλουταθειόνη ανταγωνίζεται τη θέση δέσμευσης του σφαιριδίου γλουταθειόνης με την GST ετικέτα, με τελικό αποτέλεσμα την έκλυση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται, σε κάθε κλάσμα, με τη μέθοδο Bradford.

2.6.2. Από το βακτηριακό εκχύλισμα ιζήματος

Όταν δεν ήταν εφικτό να απομονωθεί η πρωτεΐνη από το διαλυτό κλάσμα των βακτηριακών κυττάρων, η απομόνωση και ο καθαρισμός της γινόταν από το εκχύλισμα του ιζήματος των βακτηρίων. Η διαδικασία που ακολουθείται της ως εξής:

- Προστίθενται 20ml ουρίας 8M (pH=8) ανά γραμμάριο ιζήματος,
- Μηχανική διαλυτοποίηση ιζήματος,
- Επώαση υπό συνεχόμενο ανακάτεμα (Stirring) σε θερμοκρασία δωματίου για δύο εικοσιτετράωρα,
- Φυγοκέντρηση προϊόντος με την κεφαλή Sorval SS-34 της 18000 στροφές το λεπτό (rpm), για μισή ώρα της 18°C,
- Ακολουθείται η διαδικασία προετοιμασίας της στήλης της έχει περιγραφεί προηγουμένως, στην απομόνωση πρωτεΐνης από το υπερκείμενο. Η διαφορά είναι ότι εδώ, προστέθηκε 500μl κατάλληλων σφαιριδίων,
- Υπερκείμενο επωάζεται με τα σφαιρίδια, σε θερμοκρασία δωματίου ολονυκτίως, υπό ανάδευση,
- Όχι υπό σταθερή γωνία φυγοκέντρηση, της 4600 στροφές το λεπτό (rpm), για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου,
- Πλύσεις με 5x δεκαπλάσιο όγκο σφαιριδίων με το κατάλληλο διάλυμα πλύσης (Wash Buffer),
- Έκλυση: Ακολουθείται η διαδικασία της απομόνωσης πρωτεΐνης από το υπερκείμενο,
- Υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, σε κάθε κλάσμα, με τη μέθοδο Bradford.

Στο συγκεκριμένο σημείο αξίζει να τονισθεί ότι, αφού ολοκληρωθεί η παραλαβή του πρωτεϊνικού κλάσματος, ακολουθεί μια διαδικασία διαπίδυσης. Σκοπός αυτής, είναι η απομάκρυνση της ουρίας που εμπεριέχεται στο κλάσμα της έκλυσης, καθώς οδηγεί σε μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση της ουρίας μειώνεται σταδιακά με τελικό στόχο την πλήρη απομάκρυνση της. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην

ανταλλαγή ουσιών μέσω μιας πορώδους μεμβράνης (κυτταρίνης) μεταξύ δυο διαλυμάτων, με αποτέλεσμα την μείωση της συνολικής συγκέντρωσης.

Τα σφαιρίδια που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα πτυχιακή εργασία ήταν δύο ειδών, ακριβώς της και οι μοριακές ετικέτες των πρωτεϊνών που παράγαμε. Όταν επρόκειτο να απομονώσουμε πρωτεΐνη, είτε αυτή του c-Myc είτε του Max, που έφερε την μοριακή ετικέτα του GST, χρησιμοποιούσαμε σφαιρίδια γλουταθειόνης (Sepharose 4Beads, GE Healthcare).

1. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που δρα ως ειδικό υπόστρωμα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST). Όταν γλουταθειόνη ακινητοποιηθεί σε στερεό υλικό, στην προκειμένη στη στήλη της, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να “αιχμαλωτίσει” το GST ως πρωτεΐνη ή οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη φέρει το εν λόγω πρόσδεμα .
2. Το δεύτερο είδος σφαιριδίων που χρησιμοποιήσαμε αφορούσε τον καθαρισμό των πρωτεϊνών που έφεραν την μοριακή ετικέτα 6-His και ήταν σφαιρίδια νικελίου. Αυτά, προσδένονται με τα κατάλοιπα ιστιδίνης του επιτόπου.

2.7. Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max

Της έχει αναφερθεί, η Myc πρωτεΐνη είναι μη διαμορφωμένη στην ελεύθερή της κατάσταση και λαμβάνει τη σωστή διαμόρφωση όταν σχηματίζει σύμπλοκο με τον παράγοντα Max. Σε πρώτη φάση, η GST-Myc πρωτεΐνη θα προσδεθεί στα αντίστοιχα σφαιρίδια (γλουταθειόνης) και ακολούθως θα επωαστεί με την His-Max.

Η διαδικασία ξεκινά ακολουθώντας τα βήματα της περιγράφηκαν παραπάνω μέχρι και το βήμα εκείνο που περιλαμβάνει την φυγοκέντρηση υπό μη σταθερή γωνία.

1. Στην παρούσα φάση, προστίθενται 50μl σφαιριδίων στη στήλη, τα οποία και θα επωαστούν, για 1 ώρα υπό ανάδευση, της 4 °C, με την Max
2. Στο επωαζόμενο διάλυμα προστίθενται και 100μl Wash Buffer, με σύσταση ίδια με αυτή του διαλύματος με το οποίο πραγματοποιούνται οι πλύσεις κατά τον καθαρισμό των GST πρωτεϊνών, επειδή η πρωτεΐνη που είναι προσδεμένη σε σφαιρίδια είναι GST πρωτεΐνη (GST-Myc).

Σκοπός της επώασης της ήταν η πρόσδεση των 2 αυτών πρωτεϊνών και άρα ο σχηματισμός του συμπλόκου της.

3. Μετά την επώαση, το διάλυμα τοποθετείται στη στήλη, αφήνεται να περάσει το περιεχόμενο υγρό και στα εναπομείναντα σφαιρίδια εκτελούμε πλύσεις με

Wash Buffer, 4x τον δεκαπλάσιο όγκο των περιεχόμενων σφαιριδίων. Σε πλαστικό φιαλίδιο (erpendorf) προστίθενται τα σφαιρίδια τα οποία έχουν πλυθεί, με 100μl ρυθμιστικού διαλύματος αποκοπής (Cleavage Buffer) και PresCission πρωτεάση με αναλογία 1 μg ανά 100 μg πρωτεΐνης.

4. Αφήνονται ολονυκτίως για επώαση υπό ανάδευση της 4°C.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της 5000 στροφές το λεπτό (rpm) για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C.
6. Τέλος, υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

2.8. Μέθοδος Bradford

2.8.1. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια φασματοφωτομετρική μέθοδο, η οποία εφαρμόζεται για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Σε πλαστικά φιαλίδια (erpendorf), μεταφέρεται η επιθυμητή ποσότητα της πρωτεΐνης με πιπέτα και συμπληρώνεται μέχρι τελικό όγκο 1ml με το διάλυμα της χρωστικής (εταιρίας Bio-Rad). Προετοιμάζεται, πάντα, κι ένα τυφλό δείγμα (1ml χρωστικής) ώστε να φωτομετρηθεί της, και να αφαιρεθεί η τιμή απορρόφησής του από τα υπόλοιπα δείγματα, θεωρώντας το ως “θόρυβο της αντίδρασης”.

Η πρότυπη καμπύλη σχηματίζεται αξιοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοός (BSA). Η αλβουμίνη πρέπει να είναι διαλυμένη στο ίδιο διάλυμα που είναι και οι πρωτεΐνες, των οποίων η συγκέντρωση υπολογίζεται, δηλαδή σε Bradford. Η εξίσωση που χρησιμοποιούμε στην παρούσα εργασία έχει τον εξής τύπο: $y=0,0671x + 0,0562$.

2.9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά (Western blotting)

Για δείγματα τα οποία προέρχονται από διάλυμα μείγματος πρωτεϊνών, προκειμένου να ηλεκτροφορηθούν, επιλέγεται να προστεθεί ποσότητα πρωτεΐνης ίση με περίπου 80 μg. Για δείγματα που αφορούν πρωτεΐνη έπειτα από καθαρισμό, προστίθενται 4-5 μg της. Σε αυτά προστέθηκε, 1x διάλυμα SB, προσδίδοντας τελική συγκέντρωση στα δείγματα 62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2,3% SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη και 0,05% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, παρουσία 100 mM DTT. Ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά στους 100°C, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (SDS-PAGE) και μεταφορά των

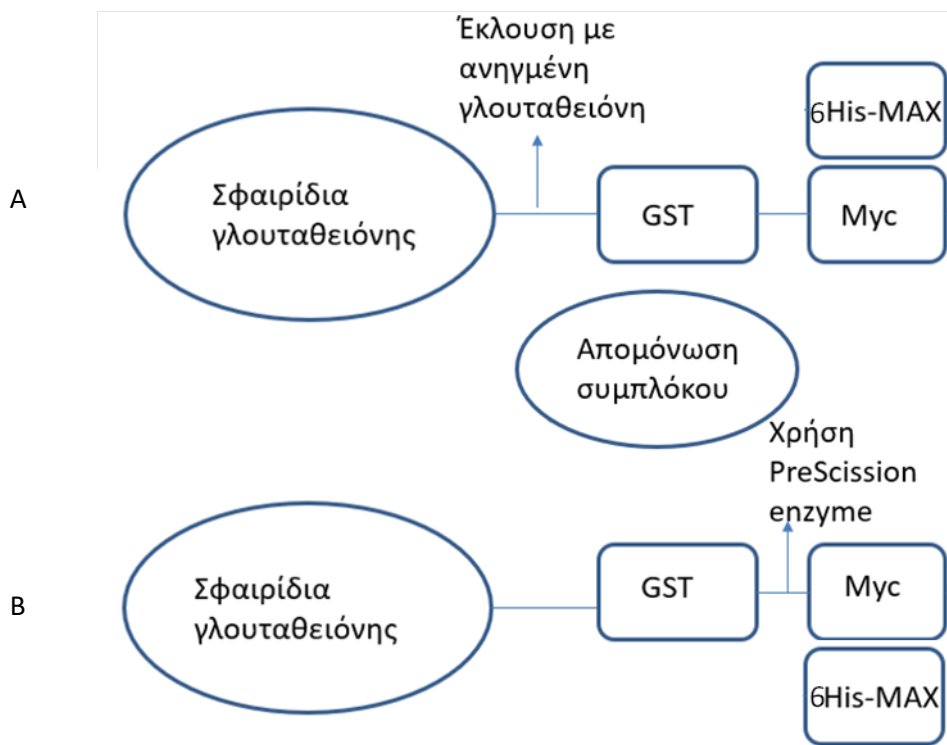
πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Millipore). Για τον έλεγχο της μεταφοράς των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες βάφτηκαν με τη χρωστική Ponceau S (Serva) για 30 δευτερόλεπτα και πλύθηκαν με ddH₂O. Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο BlueStar Prestained Protein Marker (MWP03, Nippon Genetics).

Οι μεμβράνες επώστηκαν για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου (RT), με διάλυμα δέσμησης (5% γάλα σε διάλυμα 0.1% Tween 20 σε 1% PBS) για τη δέσμηση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Ακολούθως, επώστηκαν με πρωτογενή αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης στόχου (αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Myc, aMyc 9E10), (αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης MAX, abcam ab199489).

Ακολούθως, οι μεμβράνες πλύθηκαν 4 φορές για 5 λεπτά με διάλυμα 0.1% Tween 20 + 1% PBS και επώστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP, Jackson Immunoresearch) για 1 ώρα υπό ανάδευση, RT. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών σε διάλυμα Tween 20 + 1 % PBS, επώαση για 5 λεπτά με αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL (Roche Diagnostics GmbH) και εμφάνιση του σήματος σε σκοτεινό θάλαμο.

2.10. Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max

Η πρωτεΐνη Myc είναι μη διαμορφωμένη στην ελεύθερή της κατάσταση και λαμβάνει τη σωστή διαμόρφωση όταν σχηματίζει σύμπλοκο με τον παράγοντα Max. Σε πρώτη φάση, θα προσδεθεί στα αντίστοιχα σφαιρίδια (γλουταθειόνης) η GST-Myc πρωτεΐνη και ακολούθως θα επωαστεί με την His-Max (ολονύκτια επώαση). Η δεύτερη φάση σχηματισμού και απομόνωσης του συμπλόκου περιλαμβάνει την απομόνωση του συμπλόκου, είτε με έκλυση από τα beads γλουταθειόνης με τη χρήση αντίστοιχου διαλύματος έκλυσης (elution buffer), είτε με αποκοπή του GST επιτόπου της Myc πρωτεΐνης με τη χρήση ενζύμου (PreScission).



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της δοκιμασίας σχηματισμού και απομόνωσης του συμπλόκου Myc/Max. α) Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο απομονώνεται, με έκλυση από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με τη χρήση αντίστοιχου διαλύματος έκλυσης (*elution buffer*). **β)** Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο απομονώνεται, με αποκοπή της μοριακής ετικέτας GST της Myc πρωτεΐνης με τη χρήση ενζύμου (*PreScission*).

2.11. Αναστολή του σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max

Η ολοκλήρωση του στόχου της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής προϋποθέτει τον έλεγχο της δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου των 2 προαναφερθέντων πρωτεϊνών, με απώτερο σκοπό την δοκιμασία γνωστών αναστολέων, οι οποίοι στοχεύουν την πρωτεΐνη Myc καθώς και ανεύρεσης νέων ανάλογων μορίων. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν δυο χημικά μόρια αναστολείς, το 10058-F4 και το Mycro 3 (Lavinia A. Carabet et al., 2019). Η διαδικασία σχηματισμού του συμπλόκου ακολουθήθηκε με τα ίδια βήματα μέχρι το σημείο εκείνο που προστίθεται η πρωτεΐνη Max. Η πρωτεΐνη Myc αφήνεται για επώαση με τα προαναφερθέντα μόρια αναστολείς για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολουθεί η ολονύκτια επώαση (o/n) με τη πρωτεΐνη Max σε θερμοκρασία 4 °C.

Συγκεκριμένα η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Εκ νέου καλλιέργεια της πρωτεΐνης GST-Myc η οποία πρόκειται να συνδεθεί στα σφαιρίδια γλουταθειόνης (ακολουθώντας τη διαδικασία της έχει αναφερθεί παραπάνω),
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά της 6000 στροφές το λεπτό (rpm) και σε θερμοκρασία δωματίου),
- Λύση βακτηρίων με διάλυμα λύσης ,
- Φύλαξη της -20°C,
- Διάρρηξη βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης με υπέρηχο ή κυτταρική γαλλική πρέσα,
- Υπερφυγοκέντρηση για 1 ώρα της 37000 στροφές το λεπτό (rpm), με θερμοκρασία 4°C,
- Διαχωρισμός υπερκειμένου και ιζήματος,
- Επώαση του υπερκειμένου με σφαιρίδια γλουταθειόνης για 2 ώρες,
- Φυγοκέντρηση σε 5000 στροφές το λεπτό (rpm) για 2 λεπτά,
- Πλύσεις με τον δεκαπλάσιο όγκο των σφαιριδίων γλουταθειόνης που χρησιμοποιήθηκαν επί 4 επαναλήψεις, με διάλυμα πλύσης (Tris 50 mM, NaCl 100 mM),
- Επώαση των δειγμάτων με διάλυμα blocking (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA 20 mg/ml) για 30 λεπτά με θερμοκρασία 4°C,
- Φυγοκέντρηση σε 5000 στροφές το λεπτό (rpm) για 2 λεπτά,
- Ακολουθούν 2 επαναλήψεις με πλύσεις με διάλυμα πλύσης (Tris 50 mM, NaCl 100 mM),
- Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης με την επικείμενη συνδεδεμένη σε αυτά GST-Myc πρωτεΐνη, διαμοιράζονται σε 2 φιαλίδια erpendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά με της 2 αναστολείς (10058-F4 και Myc3). Η συγκέντρωση των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκε κατά την επώαση με την GST-Myc πρωτεΐνη στο τελικό δείγμα είναι 140 μM,
- Χορήγηση της πρωτεΐνης His-Max στα δείγματα με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης (+GST-Myc + αναστολείς). Η His-Max χορηγείται σε διάλυμα που διαθέτει ορισμένη ποσότητα Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA 10 mg/ml. Ολονύκτια επώαση των δυο πρωτεϊνών σε θερμοκρασία 4°C,

- Την επόμενη εργαστηριακή ημέρα τα δείγματα παραλαμβάνονται από θερμοκρασία 4°C και υφίστανται φυγοκέντρηση σε 5000 στροφές το λεπτό (rpm) για 2 λεπτά,
- Λαμβάνεται το υπερκείμενο που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση το οποίο περιλαμβάνει το ποσοστό των πρωτεϊνών οι οποίες δεν έχουν δεσμευτεί,
- Ακολουθούν πλύσεις με διάλυμα πλύσης (Tris 50 mM, NaCl 100 mM) για 6 επαναλήψεις,
- Επώαση με διάλυμα έκλουσης (elution buffer) όγκου ίσου με τον όγκο των σφαιριδίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου,
- Φυγοκέντρηση σε 5000 στροφές το λεπτό (rpm) για 2 λεπτά,
- Λαμβάνεται το υπερκείμενο που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση το οποίο περιλαμβάνει το προϊόν της έκλουσης. Σε αυτό αναμένεται το πιθανό σχηματιζόμενο ή μη, πρωτεϊνικό σύμπλοκο.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Βασική προϋπόθεση για την εγκαθίδρυση της δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου των πρωτεϊνών Myc και Max, αποτελεί ο καθαρισμός και η απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών σε καθαρή μορφή. Προκειμένου να διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης, απομόνωσης και σχηματισμού συμπλόκου, οι πρωτεΐνες παρασκευάστηκαν σε ανασυνδυασμένη μορφή με χρήση δυο εναλλακτικών μοριακών ετικετών, 6-His και GST. Παρασκευάστηκαν λοιπόν:

- 6-His-Myc πρωτεΐνη,
- 6-His-Max πρωτεΐνη,
- GST-Max πρωτεΐνη,
- GST-Myc πρωτεΐνη.

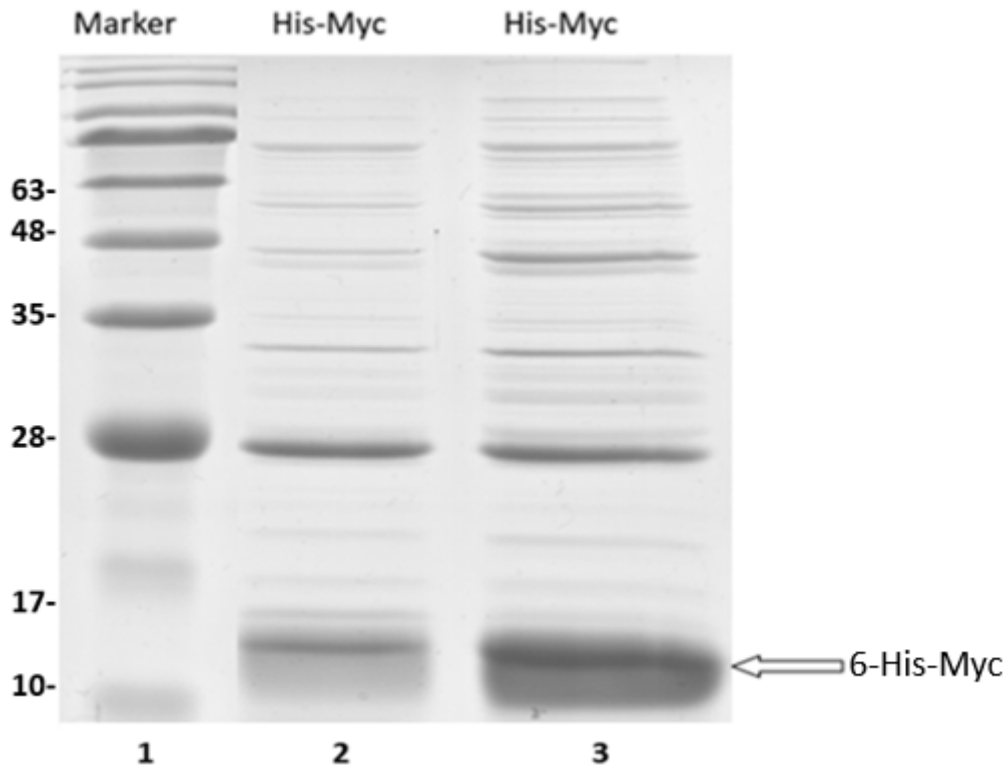
3.1. Παραγωγή 6-His-Myc πρωτεΐνης

3.1.1. Καθαρισμός της 6-His-Myc από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta

Αρχικά πραγματοποιήσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης 6-His-Myc σε καλλιέργεια βακτηρίων τύπου Rosetta σε LB θρεπτικό μέσο, σε θερμοκρασία δωματίου. Της φαίνεται στην εικόνα 13 υπάρχουν δύο κλάσματα που προέκυψαν μετά τη διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από της υπόλοιπες πρωτεΐνες που περιέχονταν στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα του υπερκειμένου. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος έχει μέγεθος περίπου 10kDa. Ωστόσο, το φαινομενικό MB της πρωτεΐνης στην πηκτή είναι περίπου 14 kDa, με βάση τα MB των μαρτύρων. Η διαφορά μεταξύ του πραγματικού (10kDa) και του φαινομενικού MB (14 kDa) είναι πιθανό να οφείλεται στην εκτεταμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης (ανήκει στην οικογένεια των IDPs).

Τα κλάσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν μετά τη διαδικασία καθαρισμού του συνόλου του διαλυτού κλάσματος βακτηριακών κυττάρων και, θεωρητικά, απομονώσαμε την πρωτεΐνη που επιθυμούσαμε.

Στο τελικό παρασκεύασμα διακρίνονται δύο κύριες ζώνες, η 6-His-Myc πρωτεΐνη στα 10 kDa, που αναφέραμε πιο πάνω αλλά και μια ακόμα ζώνη, περίπου στα 27 kDa, η οποία αποτελεί πρόσμιξη κατά τον καθαρισμό. Οι υπόλοιπες ζώνες μικρότερης έντασης αποδίδονται σε προσμίξεις κατά την απομόνωση.



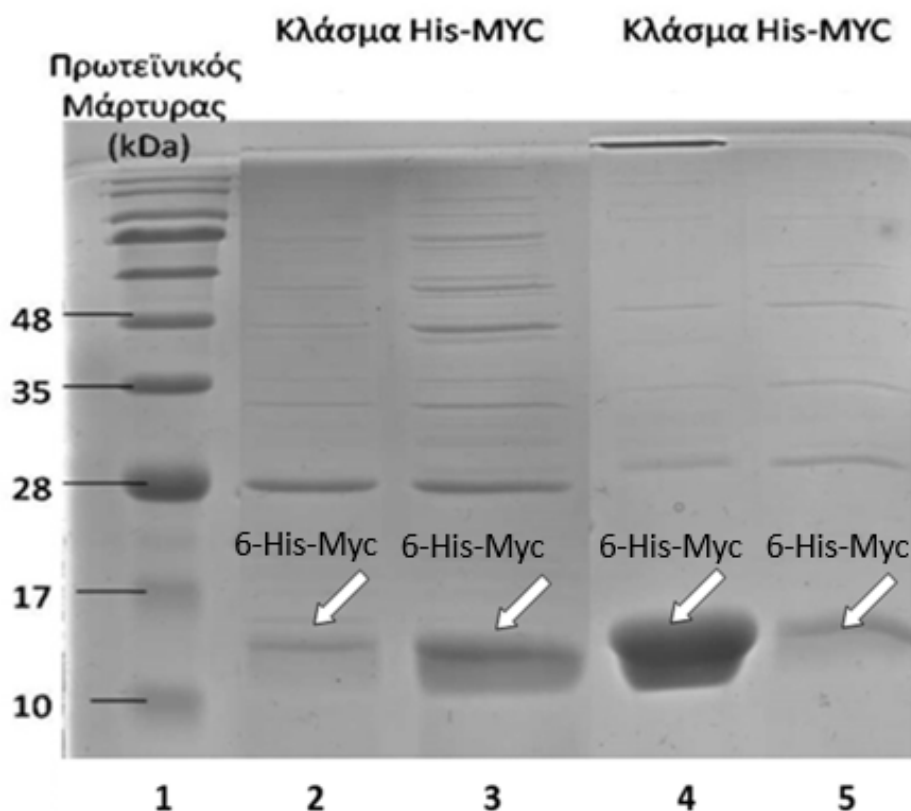
Εικόνα 13. Παραγωγή της πρωτεΐνης 6-His-Myc από βακτήρια τύπου Rosetta σε θρεπτικό μέσο LB. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της 6-His-Myc σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια νικελίου και τα διάφορα κλάσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Της διαδρομές 2 και 3, έχουν αναλυθεί δείγματα τα οποία έχουν προκύψει από της συνθήκες παραγωγής και απομόνωσης. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η, 3^η διαδρομή: πρωτεϊνικά κλάσματα 6-His-Myc.

3.1.2. Καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Myc από εκχύλισμα ιζήματος βακτηρίων τύπου Rosetta

Επειδή σημαντικό μέρος της πρωτεΐνης 6-His-Myc ανιχνεύτηκε στο αδιάλυτο κλάσμα μετά του βακτηριακού εκχυλίσματος, δοκιμάστηκε η απομόνωση της πρωτεΐνης από βακτηριακό εκχύλισμα ιζήματος μέσω επεξεργασίας με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8 M. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα ουρίας 8M και τα πρωτεϊνικά κλάσματα παραλαμβάνονται μέσω στήλης χρωματογραφίας συγγένειας με σφαιρίδια νικελίου.

Της φαίνεται στην εικόνα 14, στο τελικό παρασκεύασμα διακρίνεται μια κύρια ζώνη, η οποία αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη 6-His-Myc. Οι υπόλοιπες ζώνες μικρότερης έντασης που προκύπτουν, αποτελούν προσμίξεις κατά τον καθαρισμό.

Σε σύγκριση με την απομόνωση της εν λόγω πρωτεΐνης από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων φαίνεται ότι, οι προσμίξεις που προκύπτουν μειώνονται αρκετά.

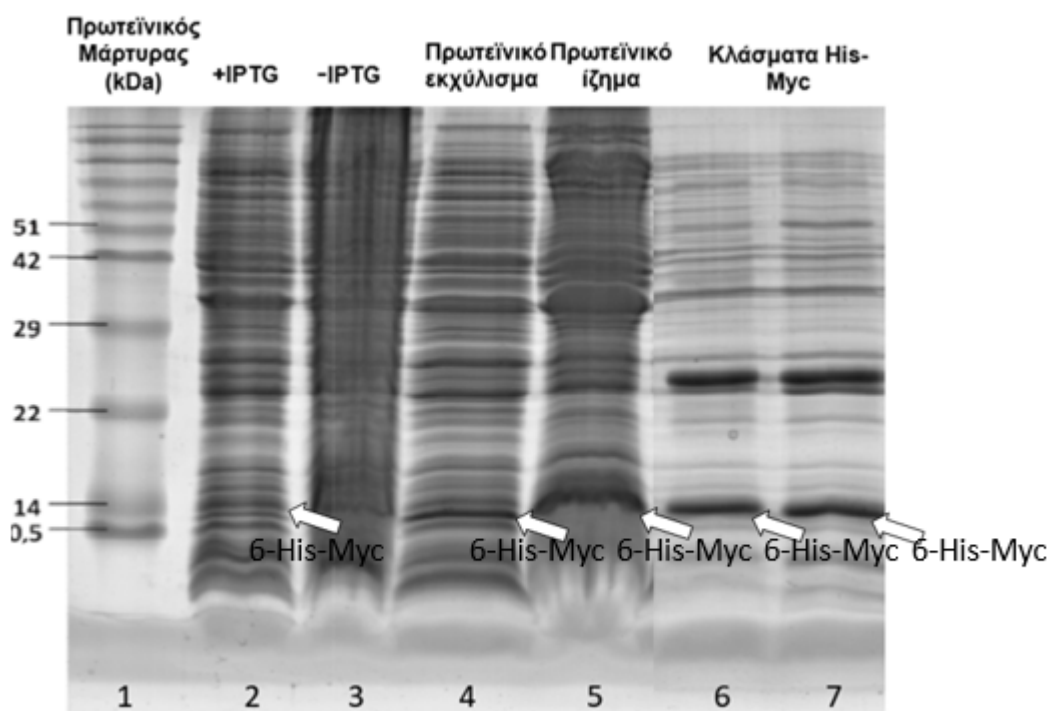


Εικόνα 14. Απομόνωση της πρωτεΐνης 6-His-Myc από εκχύλισμα ιζήματος από καλλιέργεια βακτηρίων τύπου Rosetta. Το βακτηριακό ίζημα επεξεργάστηκε με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8M, ακολούθησε καθαρισμός σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια νικελίου και τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Για λόγους σύγκρισης παρατίθενται και τα αποτελέσματα της απομόνωσης της εν λόγω πρωτεΐνης από το διαλυτό κλάσμα βακτηρίων. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η, 3^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών 6-His-Myc διαλυτού κλάσματος βακτηριακών κυττάρων έπειτα από έκλυση, 4^η, 5^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών 6-His-Myc από εκχύλισμα ιζήματος.

3.1.3. Καθαρισμός της 6-His-Myc από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου BL21DE3

Της είδαμε πιο πάνω, η έκφραση της πρωτεΐνης 6-His-Myc σε βακτήρια τύπου Rosetta φαίνεται ότι οδηγεί στην παραγωγή και την απομόνωση πρωτεϊνικών κλασμάτων τα οποία περιέχουν προσμίξεις άλλων πρωτεϊνών. Για να εξεταστεί αν η έλλειψη καθαρότητας των δειγμάτων που προκύπτουν, οφείλεται στο συγκεκριμένο τύπο βακτηρίων, πραγματοποιήθηκαν εκ νέου καλλιέργειες για την έκφραση της εν

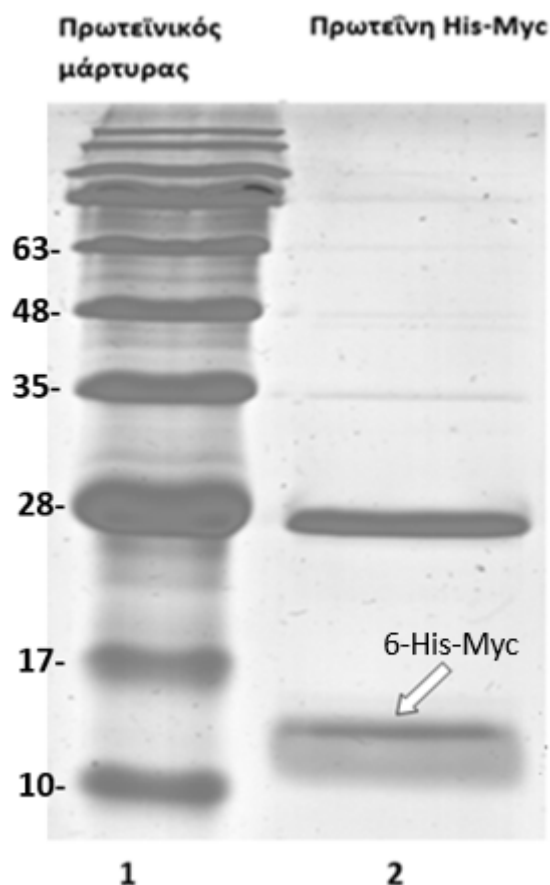
λόγω πρωτεΐνης σε βακτήρια BL21DE3. Τα συγκεκριμένα βακτηριακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 20°C προκειμένου να εξεταστεί αν η θερμοκρασία επηρεάζει την καθαρότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Στην εικόνα 15 που ακολουθεί μπορούμε να δούμε κάποια στάδια της διαδικασίας έκφρασης της πρωτεΐνης της σε βακτήρια BL21DE3.



Εικόνα 15. Στάδια παραγωγής και απομόνωσης της 6-His-Myc πρωτεΐνης από βακτήρια BL21DE3, σε θρεπτικό μέσο LB. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προκύπτουν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η διαδρομή: δείγμα μετά την πρωτεϊνική επαγωγή με προσθήκη IPTG, 3^η διαδρομή: δείγμα πριν πραγματοποιηθεί η πρωτεϊνική επαγωγή με IPTG, 4^η διαδρομή: δείγμα από το υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης του βακτηριακού εκχυλίσματος, 5^η διαδρομή: δείγμα από το ίζημα της υπερφυγοκέντρωσης του βακτηριακού εκχυλίσματος, 6^η-7^η διαδρομή: κλάσματα της πρωτεΐνης 6-His-Myc μετά την έκλουση.

Παρατηρώντας τις διαδρομές 2 και 3, που σχετίζονται με την ύπαρξη και την απουσία του επαγωγικού παράγοντα IPTG, αντίστοιχα, γίνεται ευδιάκριτο το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών της δύο αυτές φάσεις. Συγκεκριμένα, μπορεί να διακριθεί η εμφάνιση μιας ζώνης στη διαδρομή +IPTG, σε ύψος λίγο χαμηλότερο από τα 14 kDa του πρωτεϊνικού μάρτυρα. Η συγκεκριμένη ζώνη αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, η οποία έχει μέγεθος κοντά στα 10 kDa.

Τα κλάσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν μετά τη διαδικασία του καθαρισμού του συνόλου του διαλυτού κλάσματος των βακτηρίων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16, στο τελικό παρασκεύασμα διακρίνονται δυο κύριες ζώνες, η 6-His-MYC πρωτεΐνη στα 10 kDa, αλλά και μια ακόμα έντονη ζώνη, περίπου στα 27 kDa η οποία αποτελεί πρόσμιξη κατά τον καθαρισμό.

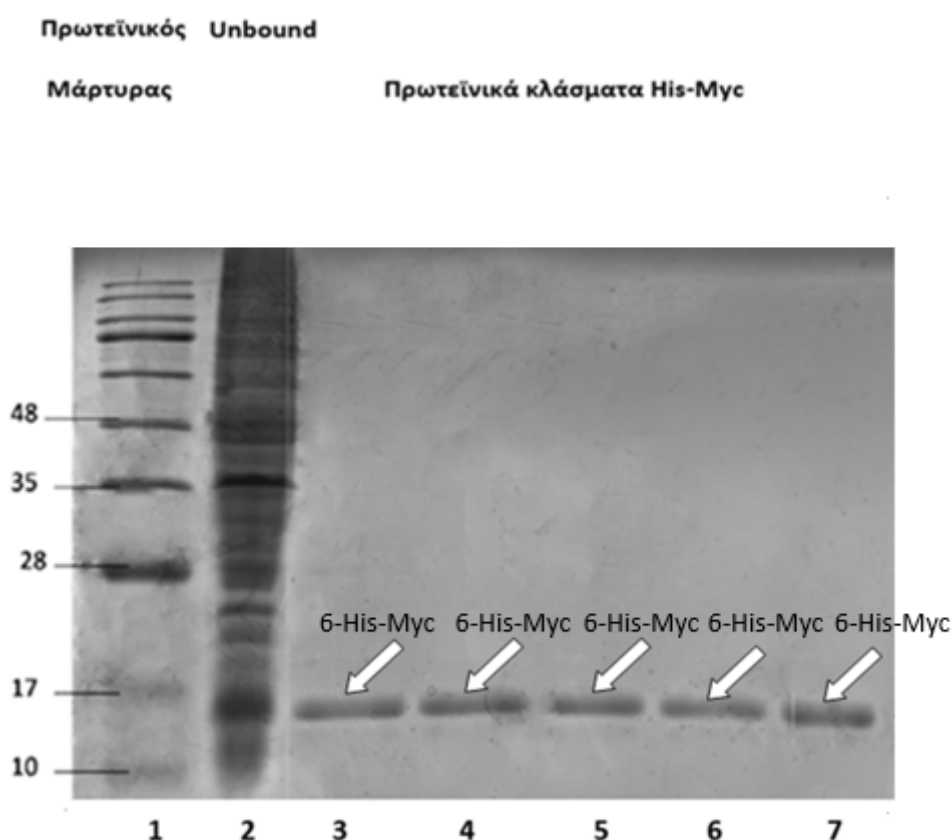


Εικόνα 16. Παραγωγή και απομόνωση της πρωτεΐνης 6-His-Myc από καλλιέργεια βακτηρίων BL21DE3 σε θρεπτικό μέσο LB. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της 6-His-Myc σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια νικελίου και τα διάφορα κλάσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η στήλη: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η στήλη: κλάσμα πρωτεΐνης 6-His-Myc έπειτα από έκλουση.

3.1.4. Καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Myc από εκχύλισμα ιζήματος βακτηρίων τύπου BL21DE3

Η δοκιμασία απομόνωσης της πρωτεΐνης 6-His-Myc από το διαλυτό κλάσμα βακτηρίων BL21DE3, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η εν λόγω πρωτεΐνη απομονώνεται σε μη καθαρή μορφή, καθώς παρατηρήθηκε μια έντονα διακριτή ζώνη στα 27 kDa που αποτελεί πρόσμιξη. Για να εξεταστεί ενδελεχώς η υπόθεση ότι ο

διαφορετικός τύπος βακτηρίων επηρεάζει την καθαρότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης, ελέγχθηκε η απομόνωση της εν λόγω πρωτεΐνης από το εκχύλισμα του βακτηριακού ιζήματος. Το ίζημα υφίσταται επαναδιάλυση με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8 M και τα πρωτεϊνικά κλάσματα παραλαμβάνονται μέσω στήλης χρωματογραφίας συγγένειας με σφαιρίδια νικελίου. Της φαίνεται στην εικόνα 17, στο τελικό παρασκεύασμα προκύπτει μια ζώνη περίπου στα 17 kDa η οποία αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη 6-His-Myc. Η εν λόγω πρωτεΐνη ίσως να περιέχει κάποιο παραπάνω αμινοξικό κατάλοιπο κατά την έκφραση και παραγωγή της, για αυτό και εντοπίζεται σε μεγαλύτερο μοριακό βάρος, από ότι αναμένεται.



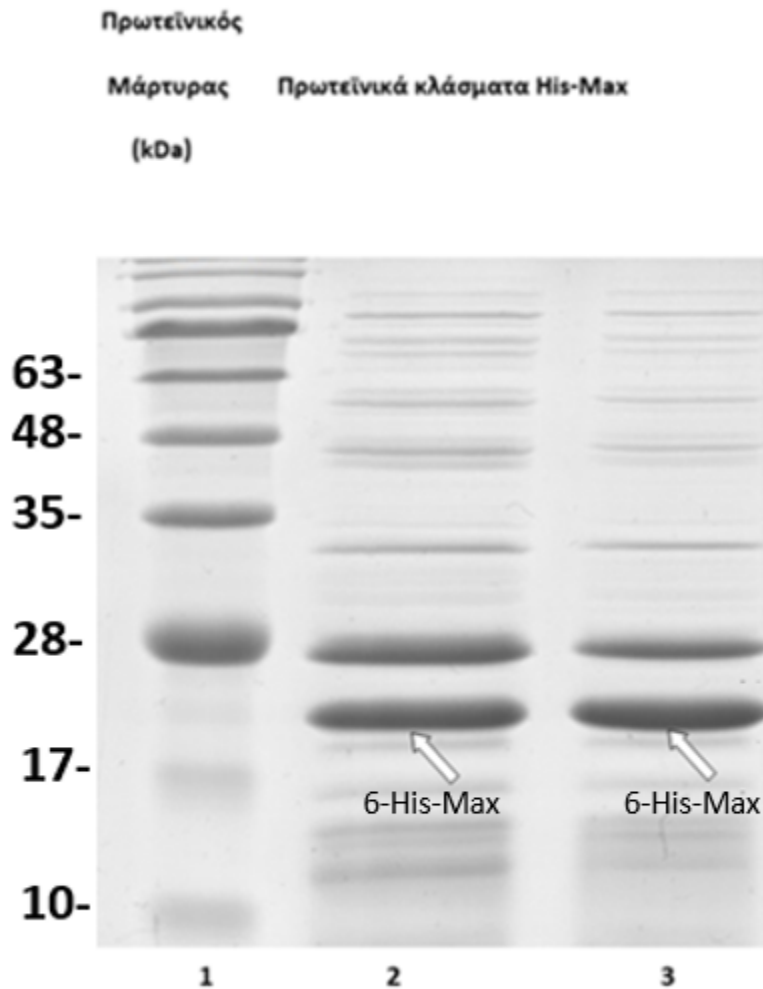
Εικόνα 17. Απομόνωση της πρωτεΐνης 6-His-Myc από εκχύλισμα ιζήματος από καλλιέργεια βακτηρίων τύπου *BL21DE3*. Το βακτηριακό ίζημα επεξεργάστηκε με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8M, ακολούθησε καθαρισμός σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια νικελίου και τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Της διαδρομές 3,4,5,6 και 7 έχουν αναλυθεί δείγματα (*duplicates*) τα οποία έχουν προκύψει από της συνθήκες παραγωγής και απομόνωσης. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η διαδρομή: δείγμα πρωτεϊνών μη συνδεδεμένων στα σφαιρίδια νικελίου (*unbound*). 3^η-7^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών His-Myc έπειτα από καθαρισμό και έκλουση με κατάλληλα διαλύματα.

3.2. Παραγωγή 6-His-Max πρωτεΐνης

3.2.1. Καθαρισμός της 6- His-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta

Αρχικά πραγματοποιήσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης σε καλλιέργεια βακτηρίων τύπου Rosetta σε LB θρεπτικό μέσο, σε θερμοκρασία δωματίου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 18, υπάρχουν 2 κλάσματα που προέκυψαν μετά τη διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από της υπόλοιπες πρωτεΐνες που περιέχονταν στο διαλυτό κλάσμα βακτηρίων. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος έχει μέγεθος περίπου 17 kDa.

Στο τελικό παρασκεύασμα που προκύπτει, διακρίνονται δυο κύριες ζώνες, η 6-His-Max πρωτεΐνη περίπου στα 23-25 kDa, αλλά και μια ακόμη ζώνη στα 27 kDa, η οποία αποτελεί πρόσμιξη κατά τον καθαρισμό. Το φαινομενικό MB της πρωτεΐνης στην πηκτή είναι περίπου 25 kDa, με βάση τα MB των μαρτύρων. Η διαφορά μεταξύ του πραγματικού (17 kDa) και του φαινομενικού MB (15 kDa) είναι πιθανό να οφείλεται στην εκτεταμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης (ανήκει στην οικογένεια των IDPs). Η συγκεκριμένη ζώνη έχει επιβεβαιωθεί ότι αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Max, με χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της. Οι υπόλοιπες ζώνες μικρότερης έντασης αποδίδονται σε προσμίξεις που προκύπτουν κατά τον καθαρισμό.



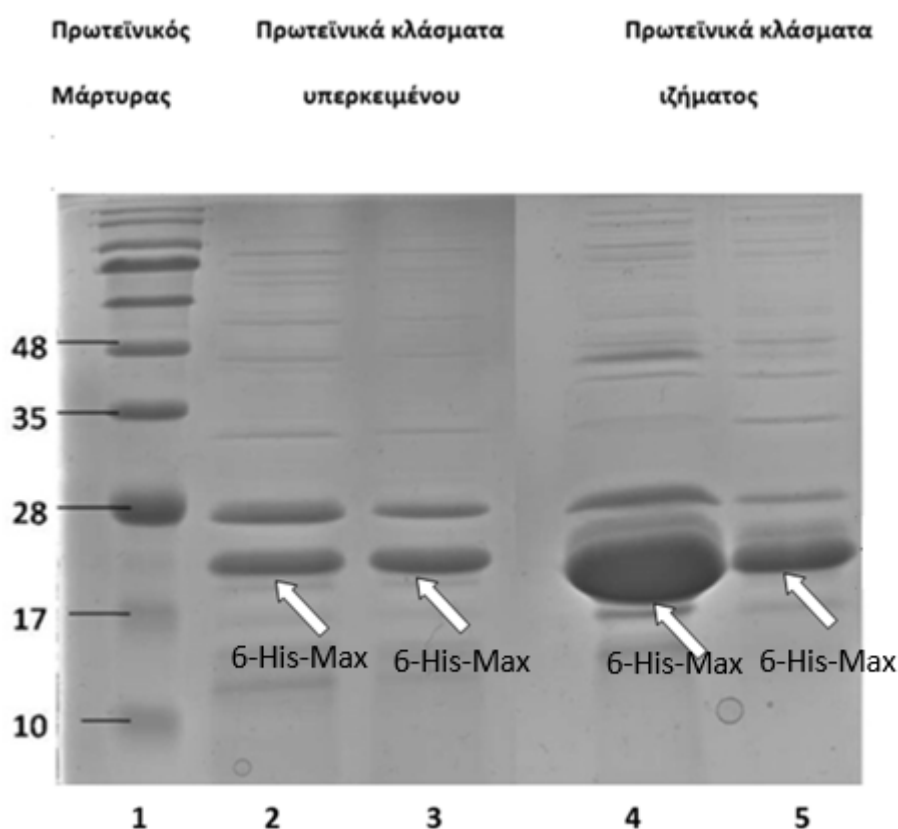
Εικόνα 18. Παραγωγή της πρωτεΐνης 6-His-Max από βακτηριακά κύτταρα Rosetta σε θρεπτικό μέσο LB. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της 6-His-Max σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια νικελίου και τα διάφορα κλάσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Της διαδρομές 2 και 3 έχουν αναλυθεί δείγματα (duplicates) τα οποία έχουν προκύψει από της συνθήκες παραγωγής και απομόνωσης. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η, 3^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών 6-His-Max έπειτα από καθαρισμό και έκλυση με κατάλληλα διαλύματα.

3.2.2. Καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Max από πρωτεϊνικό εκχύλισμα ιζήματος βακτηρίων τύπου Rosetta

Τα αποτελέσματα της απομόνωσης της πρωτεΐνης 6-His-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηρίων Rosetta οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η εν λόγω πρωτεΐνη απομονώνεται σε μη καθαρή μορφή καθώς είναι η διακριτή η παρουσία προσμίξεων. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η καθαρότητα των πρωτεϊνικών κλασμάτων που προκύπτουν από την επεξεργασία του βακτηριακού ιζήματος με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8 M. Το

ίζημα υφίσταται επαναδιάλυση με διάλυμα ουρίας και τα πρωτεϊνικά κλάσματα παραλαμβάνονται μέσω στήλης χρωματογραφίας συγγένειας με σφαιρίδια νικελίου.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 19, στο τελικό παρασκεύασμα διακρίνονται δυο κύριες ζώνες, η 6-His-Max πρωτεΐνη περίπου στα 23-25 kDa αλλά και μια ακόμη ζώνη στα 28 kDa, η οποία αποτελεί προϊόν πρόσμιξης κατά τον καθαρισμό. Οι υπόλοιπες ζώνες μικρότερης εντάσεως αποδίδονται σε προσμίξεις κατά την πρωτεϊνική απομόνωση.

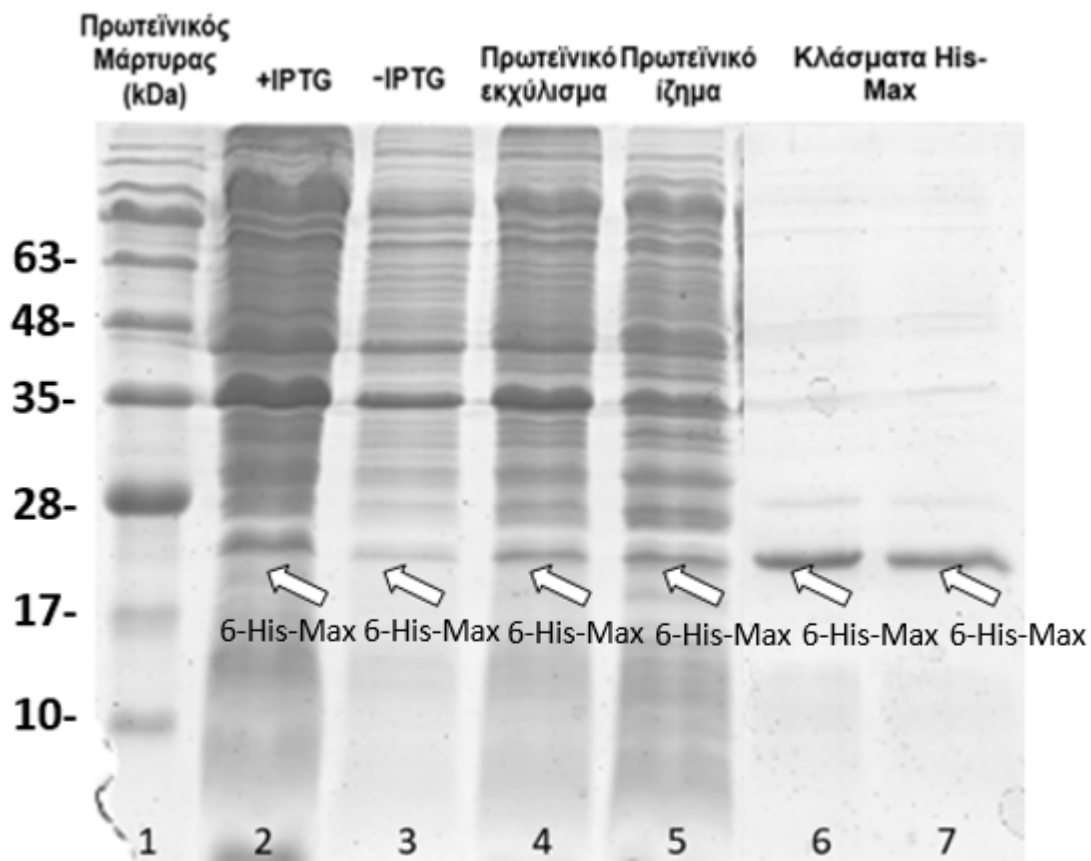


Εικόνα 19. Απομόνωση της πρωτεΐνης 6-His-Max από εκχύλισμα ιζήματος από καλλιέργεια βακτηρίων τύπου *Rosetta*. Το βακτηριακό ίζημα επεξεργάστηκε με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8M, ακολούθησε καθαρισμός σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια νικελίου και τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Για λόγους σύγκρισης παρατίθενται και τα αποτελέσματα της απομόνωσης της εν λόγω πρωτεΐνης από το διαλυτό κλάσμα βακτηρίων. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η, 3^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών 6-His-Max υπερκειμένου έπειτα από έκλυση, 4^η, 5^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών 6-His-Max έπειτα από έκλυση. (επεξεργασία του ιζήματος με διάλυμα ουρίας 8M).

3.2.3. Καθαρισμός της 6-His-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου BL21DE3

Η έκφραση της πρωτεΐνης 6-His-Max σε βακτήρια τύπου Rosetta φαίνεται ότι οδηγεί στην παραγωγή και την απομόνωση πρωτεϊνικών κλασμάτων τα οποία περιέχουν διάφορες προσμίξεις. Για να εξεταστεί αν η έλλειψη καθαρότητας των δειγμάτων που προκύπτουν, οφείλεται στο συγκεκριμένο τύπο βακτηρίων, πραγματοποιήθηκαν εκ νέου καλλιέργειες για την έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης σε βακτήρια BL21DE3.

Επίσης τα συγκεκριμένα βακτηριακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 20°C προκειμένου να εξεταστεί αν η θερμοκρασία επηρεάζει την καθαρότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Τα κλάσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν μετά τη διαδικασία του καθαρισμού του συνόλου του διαλυτού κλάσματος των βακτηρίων και, θεωρητικά, απομονώσαμε την πρωτεΐνη που επιθυμούσαμε. Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, στο τελικό παρασκεύασμα διακρίνεται μια κύρια ζώνη περίπου στα 23-25 kDa, η οποία αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη στόχο. Οι υπόλοιπες ζώνες μικρότερης εντάσεως αποδίδονται σε προσμίξεις κατά τον καθαρισμό.



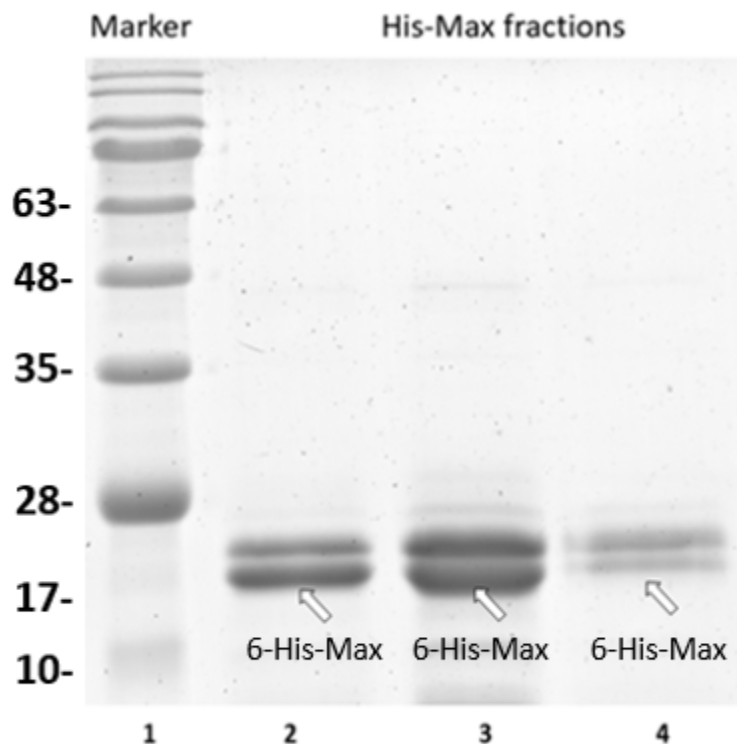
Εικόνα 20. Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Max από βακτηριακά κύτταρα τύπου BL21DE3 σε θρεπτικό μέσο LB. Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης έγινε με τη χορήγηση IPTG. Η πρωτεΐνη 6-His-Max εκφράστηκε σε βακτήρια BL21DE3. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της 6-His-Max σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια νικελίου και τα διάφορα κλάσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Στις διαδρομές 6 και 7 έχουν αναλυθεί δείγματα (duplicates) τα οποία έχουν προκύψει από ίδιες συνθήκες παραγωγής και απομόνωσης. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η διαδρομή: δείγμα μετά την πρωτεϊνική επαγωγή με προσθήκη IPTG, 3^η διαδρομή: δείγμα πριν γίνει η πρωτεϊνική επαγωγή με IPTG, 4^η διαδρομή: δείγμα από το υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης του βακτηριακού εκχυλίσματος, 5^η διαδρομή: δείγμα από το ίζημα της υπερφυγοκέντρωσης του βακτηριακού εκχυλίσματος, 6^η, 7^η διαδρομή: δείγματα πρωτεϊνών 6-His-Max έπειτα από έκλουση.

Παρατηρώντας τις διαδρομές 2 και 3, που σχετίζονται με την ύπαρξη και την απουσία του επαγωγικού παράγοντα IPTG, αντίστοιχα, στη βακτηριακή γίνεται ευδιάκριτο το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών στις δύο αυτές φάσεις. Συγκεκριμένα, μπορεί να διακριθεί η εμφάνιση μιας νέας ζώνης στη διαδρομή +IPTG, σε ύψος λίγο χαμηλότερο από τα 28 kDa του πρωτεϊνικού μάρτυρα. Η συγκεκριμένη ζώνη

αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Η ταυτοποίηση του εν λόγω μορίου, επιβεβαιώνεται με χρήση ειδικού αντισώματος έναντι αυτού.

3.2.4. Καθαρισμός της πρωτεΐνης 6-His-Max από πρωτεϊνικό εκχύλισμα ιζήματος βακτηρίων τύπου BL21DE3

Η απομόνωση της πρωτεΐνης 6-His-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηρίων τύπου BL21DE3, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το τελικό πρωτεϊνικό κλάσμα που προκύπτει είναι σε ικανοποιητικό βαθμό καθαρό, καθώς οι προσμίξεις είναι πολύ μικρής εντάσεως. Ωστόσο εξετάστηκε η απομόνωση της εν λόγω πρωτεΐνης από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα του βακτηριακού ιζήματος προκειμένου να ελεγχθεί η δυνατότητα παραλαβής ενός πρωτεϊνικού κλάσματος μεγαλύτερης καθαρότητας. Το ίζημα υφίσταται επαναδιάλυση με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8 M και τα πρωτεϊνικά κλάσματα παραλαμβάνονται μέσω στήλης χρωματογραφίας συγγένειας με σφαιρίδια νικελίου. Στην εικόνα 21, εντοπίζονται δυο κύριες ζώνες περίπου στα 23-25 kDa. Η πρωτεΐνη 6-His-Max πιθανώς να εντοπίζεται στην κάτω ζώνη, ωστόσο δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί με απόλυτη ακρίβεια. Η εμφάνιση της διπλής ζώνης στη περιοχή των 23-25 kDa , οφείλεται πιθανώς σε πρωτεόλυση της πρωτεΐνης 6-His-Max κατά τη διαδικασία παραγωγής και απομόνωσης της. Οι υπόλοιπες ζώνες μικρότερης εντάσεως αποδίδονται σε προσμίξεις κατά τον καθαρισμό.



Εικόνα 21. Απομόνωση της πρωτεΐνης 6-His-Max από εκχύλισμα ιζήματος από καλλιέργεια βακτηρίων τύπου *BL21DE3*. Το βακτηριακό ίζημα επεξεργάστηκε με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8M, ακολούθησε καθαρισμός σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια νικελίου και τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Στις διαδρομές 2,3 και 4 έχουν αναλυθεί δείγματα (*duplicates*) τα οποία έχουν προκύψει από ίδιες συνθήκες παραγωγής και απομόνωσης. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (*kDa*), 2^η,3^η,4^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών 6-His-Max έπειτα από έκλυση.

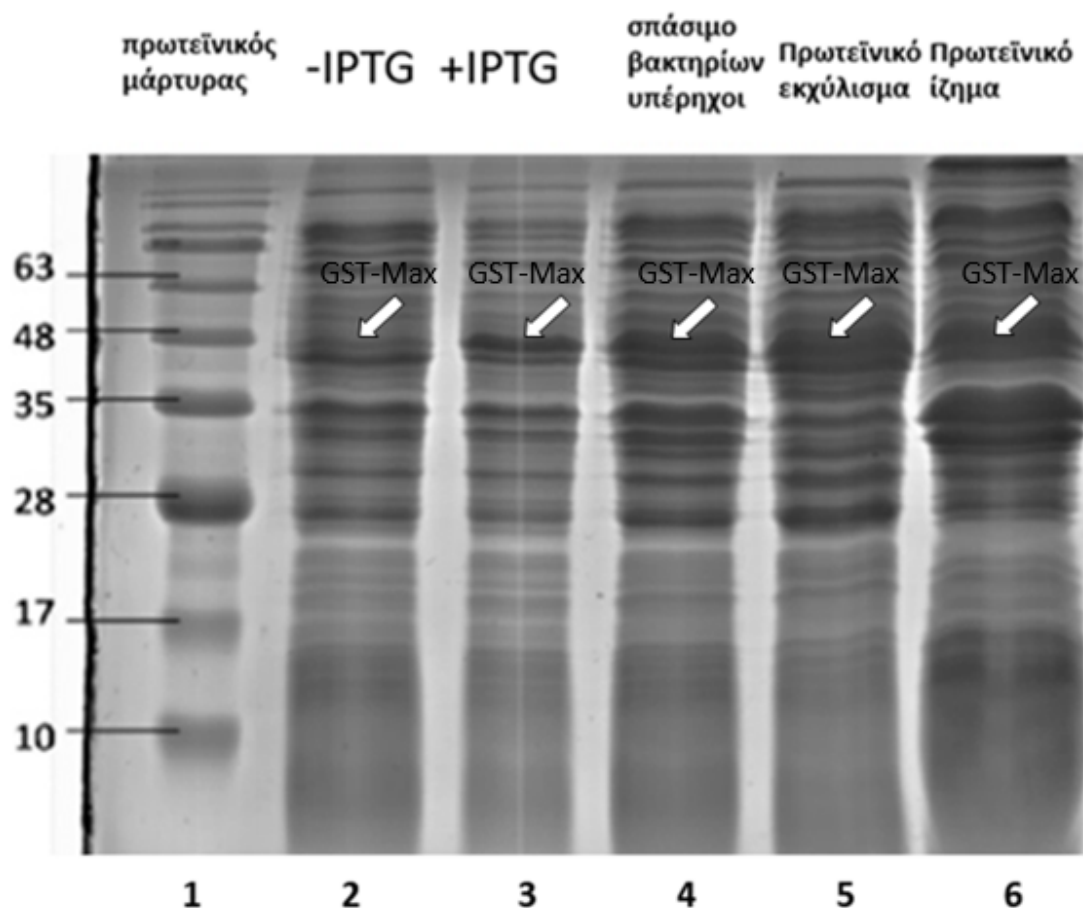
3.3. Παραγωγή GST-MAX πρωτεΐνης

Η παραγωγή των πρωτεϊνών με διαφορετικές μοριακές ετικέτες κρίθηκε αναγκαία για δύο λόγους. Από τη μια για να εξεταστεί αν η διαφορετική μοριακή ετικέτα βελτιώνει ποιοτικά και ποσοτικά την παραγωγή των πρωτεϊνών και από την άλλη για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου των πρωτεϊνών Myc/Max με δύο εναλλακτικούς τρόπους, ώστε να επιλεγεί η βέλτιστη μέθοδος. Για τον λόγο αυτό, δοκιμάστηκε η παραγωγή και η απομόνωση τόσο της GST-Max όσο και της GST-Myc πρωτεΐνης.

3.3.1. Καθαρισμός της GST-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου *BL21DE3*

Αρχικά πραγματοποιήσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης GST-Max σε καλλιέργεια βακτηρίων τύπου *BL21DE3* σε LB θρεπτικό μέσο, σε θερμοκρασία 20°C. Η GST-

MAX πρωτεΐνη υπολογίζεται να έχει μέγεθος περί τα 44 kDa. Στην εικόνα 22 που ακολουθεί μπορούμε να δούμε κάποια στάδια της διαδικασίας έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής σε βακτήρια BL21DE3.

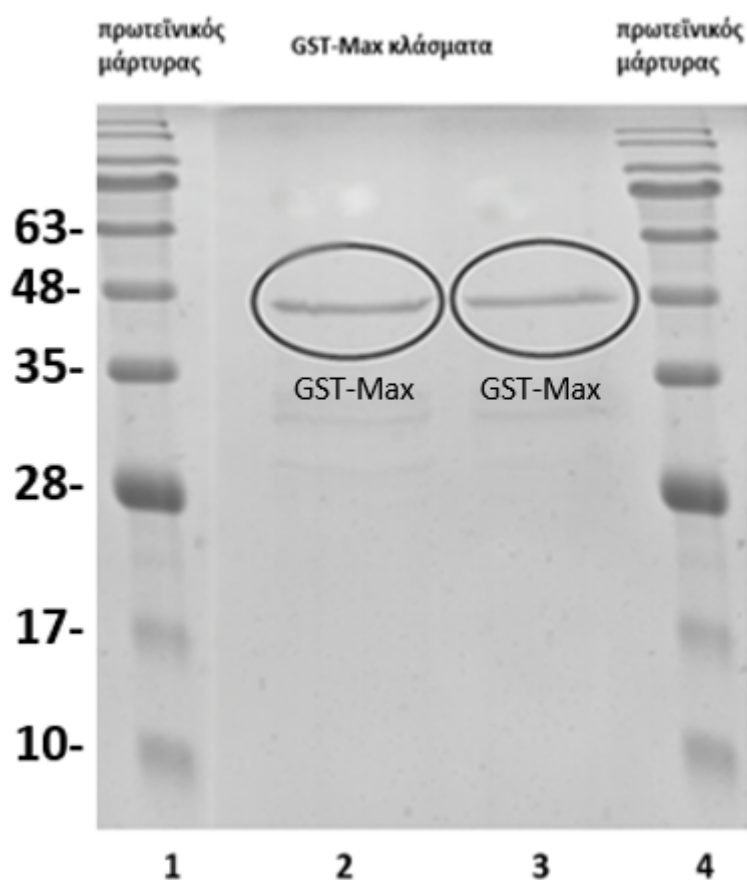


Εικόνα 22. Στάδια παραγωγής και απομόνωση της GST-Max πρωτεΐνης από βακτήρια BL21DE3, σε θρεπτικό μέσο LB. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προκύπτουν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η διαδρομή: δείγμα πριν την πρωτεϊνική επαγωγή με προσθήκη IPTG, 3^η διαδρομή: δείγμα αφού έγινε η πρωτεϊνική επαγωγή με IPTG, 4^η διαδρομή: δείγμα μετά την εφαρμογή της τεχνικής sonication για λύση των βακτηριακών κυττάρων, 5^η διαδρομή: δείγμα από το υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρωσης του βακτηριακού εκχυλίσματος, 6^η διαδρομή: δείγμα από το ίζημα της υπερφυγοκέντρωσης του βακτηριακού εκχυλίσματος.

Παρατηρώντας τις διαδρομές 2 και 3, που σχετίζονται με την απουσία και την ύπαρξη του επαγωγικού παράγοντα IPTG, αντίστοιχα, στη βακτηριακή γίνεται ευδιάκριτο το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών στις δύο αυτές φάσεις. Συγκεκριμένα, μπορεί να διακριθεί η εμφάνιση μιας νέας ζώνης στη διαδρομή +IPTG, σε ύψος λίγο χαμηλότερο από τα 48 kDa του πρωτεϊνικού μάρτυρα. Η συγκεκριμένη ζώνη

αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, η οποία, όπως έχει αναφερθεί, έχει μέγεθος κοντά στα 44 kDa.

Προκειμένου να μελετηθεί η πρωτεϊνική περιεκτικότητα των δειγμάτων που έχουν παραληφθεί μέσω του καθαρισμού της GST-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου BL21DE3, διεξήχθη ποιοτικός έλεγχος αυτών με ηλεκτροφόρηση SDS PAGE 15%. Όπως φαίνεται στην εικόνα 23, στο παρασκεύασμα που προέκυψε είναι διακριτή μια κύρια ζώνη, η πρωτεΐνη GST-Max λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος 48 kDa.

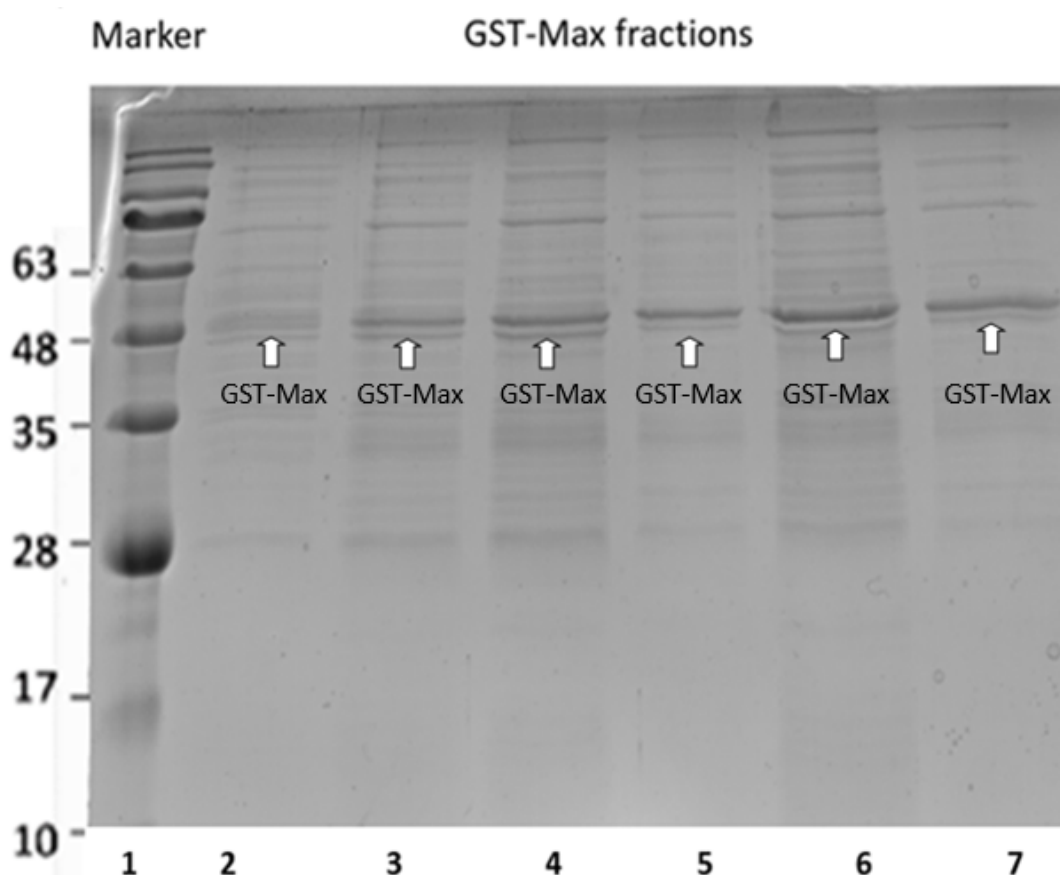


Εικόνα 23. Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-Max από βακτηριακά κύτταρα τύπου BL21DE3 σε θρεπτικό μέσο LB. Η πρωτεΐνη GST-Max εκφράστηκε σε βακτήρια BL21DE3. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της GST-Max σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια γλουταθειόνης και τα διάφορα κλάσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η, 4^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η, 3^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών GST-Max έπειτα από έκλυση με αντίστοιχα διαλύματα.

3.3.2. Καθαρισμός της GST-Max από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta

Όπως φαίνεται στην εικόνα 23, η πρωτεΐνη GST-Max, που προκύπτει μέσω της έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα τύπου BL21DE3, απομονώνεται τόσο σε χαμηλή συγκέντρωση όσο και σε χαμηλή καθαρότητα. Επίσης καθίσταται αδύνατη η απομόνωση πρωτεϊνών με πρόσδεμα GST μέσω επεξεργασίας του βακτηριακού ιζήματος με διάλυμα ουρίας συγκέντρωσης 8 M. Για το λόγο αυτό, θα ελεγχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης GST-Max σε βακτήρια τύπου Rosetta σε θερμοκρασία δωματίου, με απώτερο σκοπό την παραλαβή ενός πιο καθαρού πρωτεϊνικού κλάσματος.

Σύμφωνα με την εικόνα 24, παρατηρείται ότι σε όλα τα δείγματα έκλουσης πρωτεϊνών, διακρίνονται δυο ζώνες περίπου στο μέγεθος των 48 kDa (με βάση τον πρωτεϊνικό μάρτυρα). Υποθέτουμε ότι η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος GST-Max, αντιστοιχεί στην κάτω ζώνη που εμφανίζεται σε μοριακό βάρος 44 kDa. Οι υπόλοιπες ζώνες χαμηλότερης εντάσεως αποδίδονται σε προσμίξεις κατά τον καθαρισμό.



Εικόνα 24. Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης GST-Max από βακτηριακά κύτταρα τύπου Rosetta σε θρεπτικό μέσο LB. Η πρωτεΐνη GST-Max εκφράστηκε σε βακτήρια τύπου

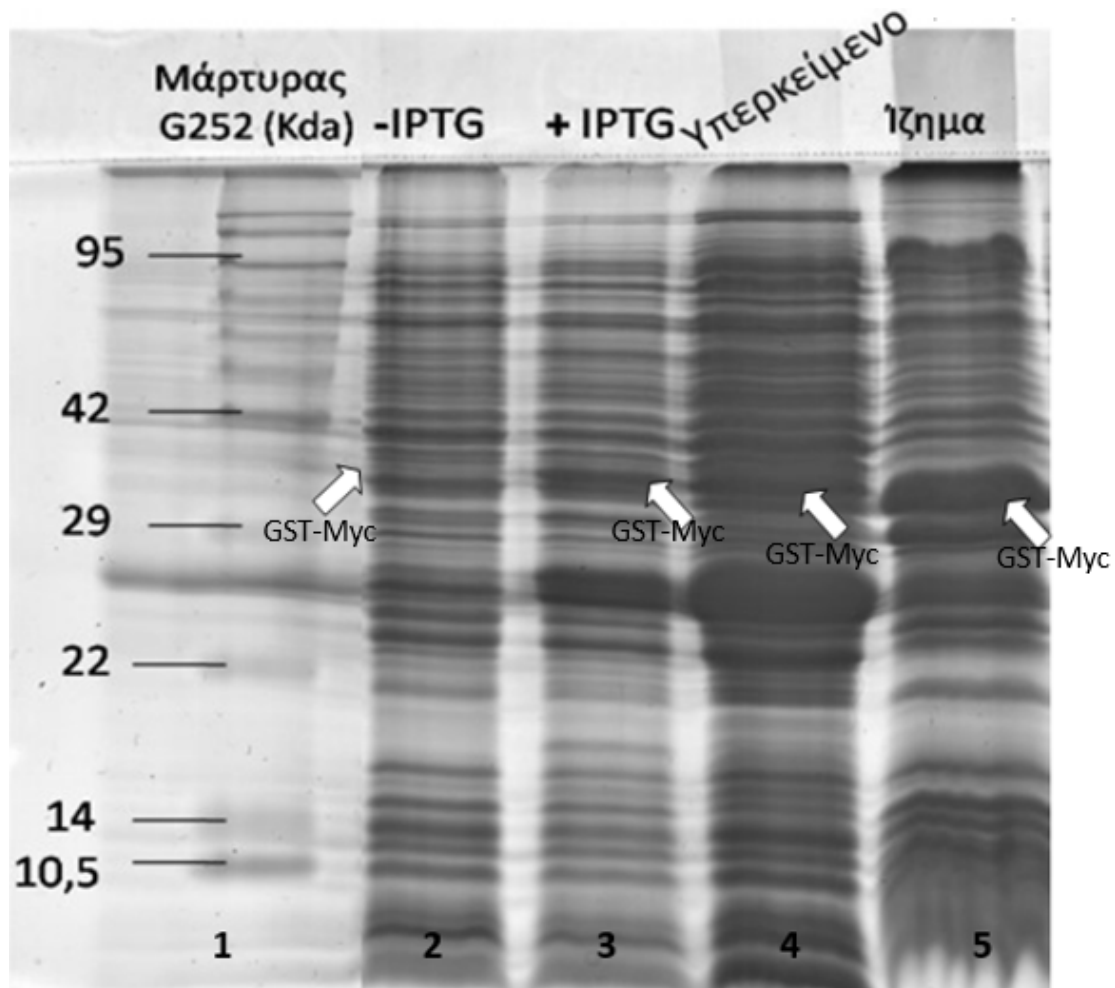
Rosetta. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της GST-Max σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια γλουταθειόνης και τα διάφορα κλάσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η, 6^η διαδρομή: κλάσματα πρωτεϊνών GST-Max έπειτα από έκλυση.

3.4. Παραγωγή GST-Myc πρωτεΐνης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παραγωγή των πρωτεϊνών με διαφορετικά προσδέματα κρίνεται αναγκαία για να εξεταστεί αν το διαφορετικό πρόσδεμα βελτιώνει ποιοτικά και ποσοτικά την παραγωγή των πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, θα ελεγχθεί η δοκιμασία παραγωγής και απομόνωσης της πρωτεΐνης GST-Myc. Η εν λόγω πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος περίπου 37 kDa.

3.4.1. Καθαρισμός της GST-Myc από διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου BL21DE3

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης GST-Myc σε βακτηριακά κύτταρα τύπου BL21DE3. Στην εικόνα 25 που ακολουθεί μπορούμε να δούμε κάποια στάδια της διαδικασίας έκφρασης της πρωτεΐνης GST-Myc.

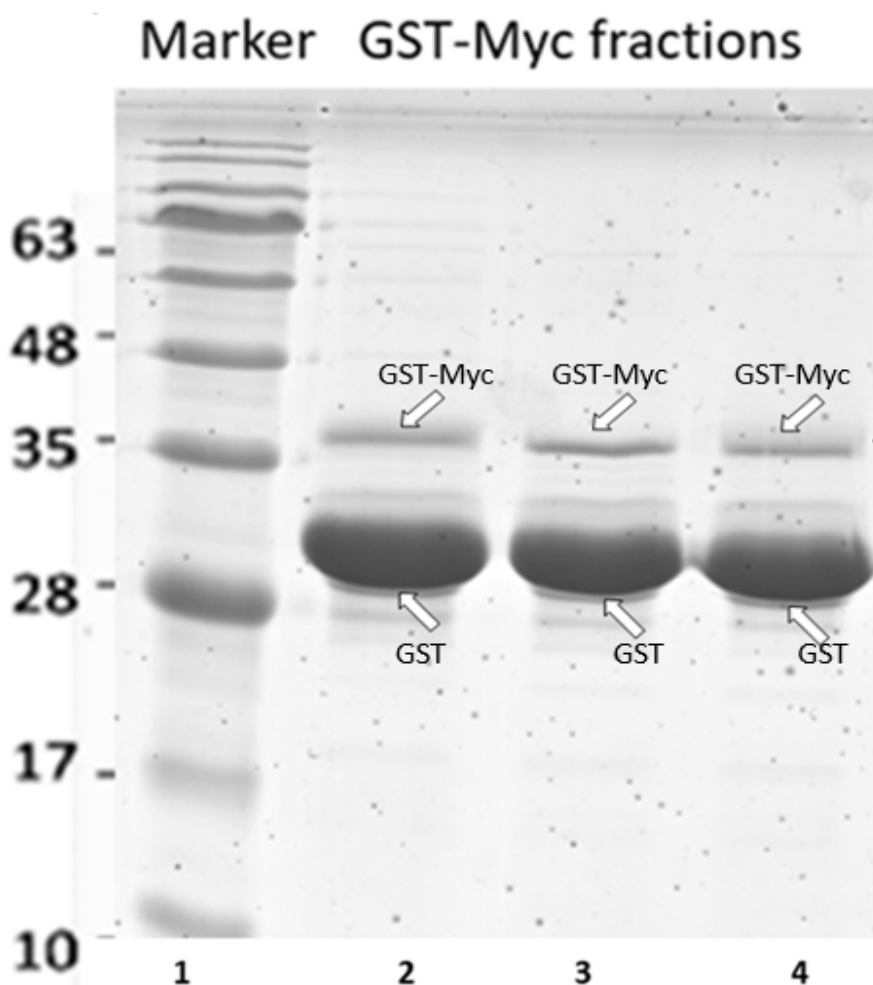


Εικόνα 25. Στάδια παραγωγής και απομόνωσης της *GST-Myc* πρωτεΐνης από βακτήρια *BL21DE3*, σε θρεπτικό μέσο *LB*. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προκύπτουν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση *SDS-PAGE* 15% και χρώση με *Coomassie brilliant blue*. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η διαδρομή: δείγμα πριν την πρωτεϊνική επαγωγή με προσθήκη *IPTG*, 3^η διαδρομή: δείγμα αφού έγινε η πρωτεϊνική επαγωγή με *IPTG*, 4^η διαδρομή: δείγμα από το υπερκείμενο της υπερφυγοκέντρησης του βακτηριακού εκχυλίσματος, 5^η διαδρομή: δείγμα από το ίζημα της υπερφυγοκέντρησης του βακτηριακού εκχυλίσματος.

Παρατηρώντας τις διαδρομές 2 και 3, που σχετίζονται με την ύπαρξη και την απουσία του επαγωγικού παράγοντα *IPTG*, αντίστοιχα, στη βακτηριακή γίνεται ευδιάκριτο το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών στις δύο αυτές φάσεις. Συγκεκριμένα, μπορεί να διακριθεί η εμφάνιση μιας νέας ζώνης στη διαδρομή +*IPTG*, σε ύψος λίγο χαμηλότερο από τα 42 kDa του πρωτεϊνικού μάρτυρα. Η συγκεκριμένη ζώνη αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, *GST-Myc*, με μοριακό βάρος 37 kDa.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 26, στο τελικό παρασκεύασμα διακρίνονται δύο κύριες ζώνες, η *GST-Myc* πρωτεΐνη στα 37 kDa, που αναφέρθηκε πιο πάνω, αλλά και μια

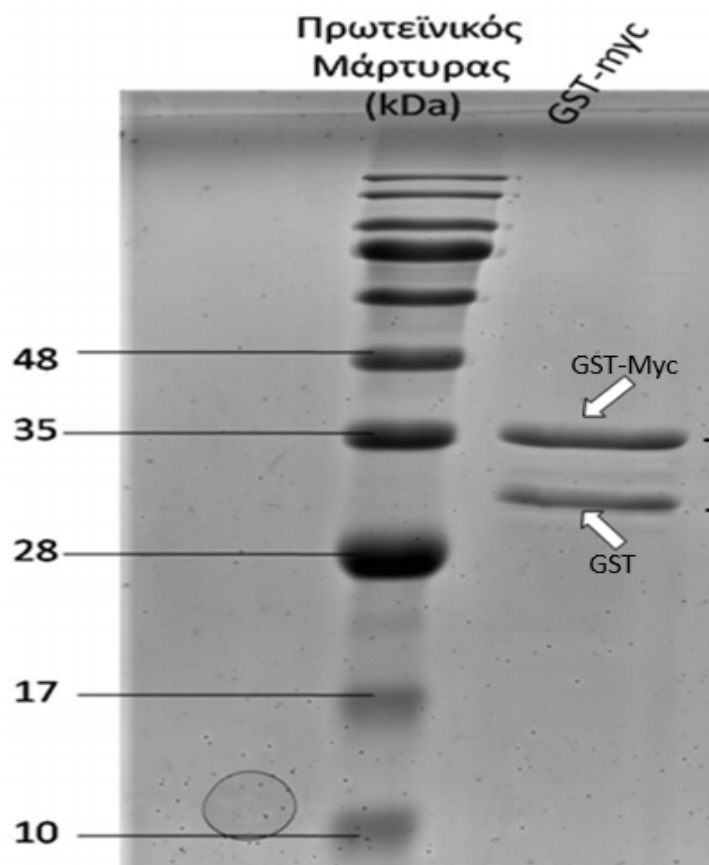
ακόμη ζώνη, περίπου στα 27 kDa, η οποία πιθανώς να αντιστοιχεί στην GST πρωτεΐνη. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι των δυο διαφορετικών πρωτεϊνών, Myc και GST. Η εμφάνιση της ζώνης που αντιστοιχεί στη GST πρωτεΐνη οφείλεται είτε στην ταυτόχρονη παραγωγή της από τα βακτηριακά κύτταρα, είτε στην αποικοδόμηση που πιθανώς υφίσταται η GST-Myc κατά την παραγωγή και απομόνωση της. Οι υπόλοιπες ζώνες μικρότερης εντάσεως αποδίδονται σε προσμίξεις που προκύπτουν κατά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 26. Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης *GST-Myc* από βακτηριακά κύτταρα τύπου *BL21DE3* σε θρεπτικό μέσο *LB*. Η πρωτεΐνη *GST-Myc* εκφράστηκε σε βακτήρια τύπου *BL21DE3*. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της *GST-Myc* σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια γλουταθειόνης και τα διάφορα κλάσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση *SDS-PAGE* 15% και χρώση με *Coomassie brilliant blue*. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η, 3^η, 4^η διαδρομή: δείγματα από κλάσμα πρωτεΐνης *GST-Myc* έπειτα από έκλυση.

3.4.2. Καθαρισμός της GST-Myc από διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta

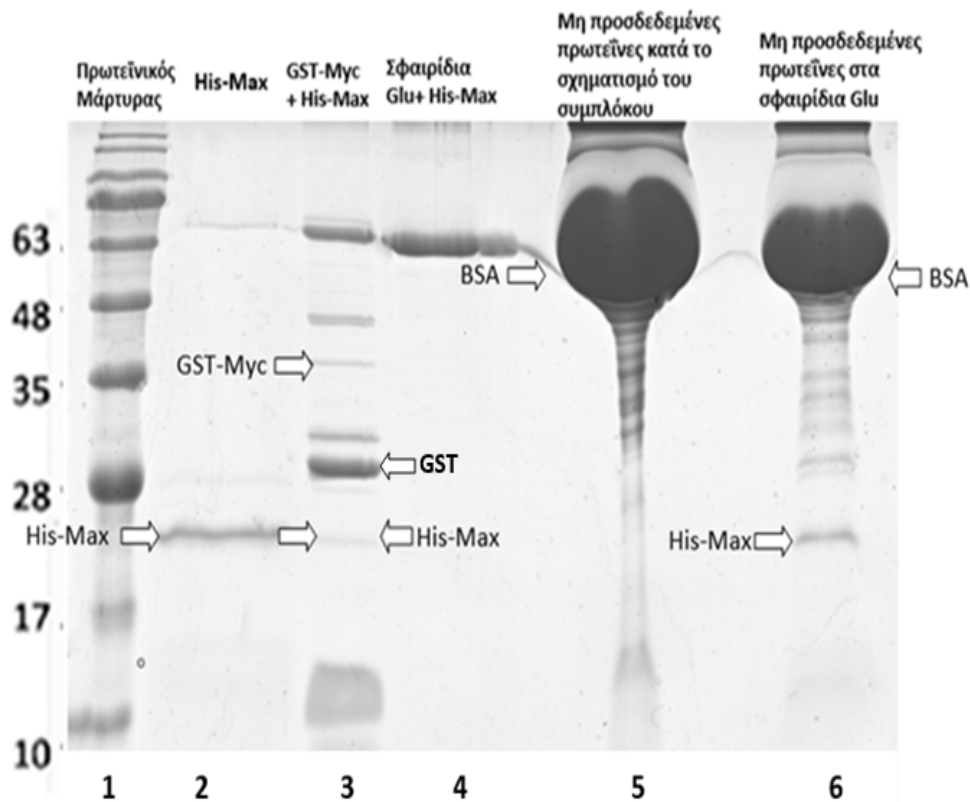
Η διαδικασία της απομόνωσης της πρωτεΐνης GST-Myc από καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων BL21DE3 έδειξε ότι, τα τελικά πρωτεϊνικά κλάσματα περιείχαν τόσο την πρωτεΐνη GST-Myc όσο και την πρωτεΐνη GST. Για την απομόνωση της εν λόγω πρωτεΐνης σε πιο καθαρή μορφή, με την απουσία της GST, εξετάστηκε η έκφραση της σε καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων τύπου Rosetta. Η GST πρωτεΐνη εντοπίζεται περί τα 27 kDa ενώ η MYC στα 10 kDa, οπότε η χημική πρωτεΐνη GST-MYC θα είναι στα 37 kDa περίπου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 27, στο τελικό παρασκεύασμα, διακρίνονται δύο κύριες ζώνες, η GST-Myc πρωτεΐνη στα 37 kDa, που αναφέρθηκε πιο πάνω, αλλά και μια ακόμη ζώνη, περίπου στα 27 kDa, η οποία πιθανώς να αντιστοιχεί στην GST πρωτεΐνη. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι των δυο διαφορετικών πρωτεϊνών, Myc και GST. Η εμφάνιση της ζώνης που αντιστοιχεί στη GST πρωτεΐνη οφείλεται είτε στην ταυτόχρονη παραγωγή της από τα βακτηριακά κύτταρα, είτε στην αποικοδόμηση που πιθανώς υφίσταται η GST-Myc κατά την παραγωγή και απομόνωση της.



Εικόνα 27. Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης *GST-Myc* από βακτηριακά κύτταρα τύπου *Rosetta* σε θρεπτικό μέσο *LB*. Η πρωτεΐνη *GST-Myc* εκφράστηκε σε βακτήρια τύπου *Rosetta*. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της *GST-Myc* σε στήλη χρωματογραφίας με σφαιρίδια γλουταθειόνης και τα διάφορα κλάσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση *SDS-PAGE* 15% και χρώση με *Coomassie brilliant blue*. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η διαδρομή: δείγμα από κλάσμα πρωτεΐνης *GST-Myc* έπειτα από έκλουση.

3.5. Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου *Myc/Max*

Σε προηγούμενα πειράματα, κατέστη δυνατή η παραγωγή και απομόνωση των πρωτεϊνών *Myc*, *Max*, με διαφορετικές μοριακές ετικέτες. Παρασκευάστηκαν οι πρωτεΐνες 6-*His-Myc*, 6-*His-Max*, *GST-Max* και *GST-Myc*. Το επόμενο βήμα της μελέτης αποσκοπεί στην εγκαθίδρυση της δοκιμασίας σχηματισμού του συμπλόκου *Myc/Max*. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ολονύκτια επώαση των δειγμάτων των δύο πρωτεϊνών μαζί και ακολούθως αναλύθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης *SDS-PAGE*, ταυτόχρονα με κλάσμα 6-*His-MAX* πρωτεΐνης, ως δείγμα ελέγχου της θέσης της πρωτεΐνης στην πηκτή. Για το σχηματισμό του εν λόγω συμπλόκου, χρησιμοποιήθηκαν 230μg της *GST-Myc* και 900 μg 6-*His-Max* πρωτεΐνης για επώαση.

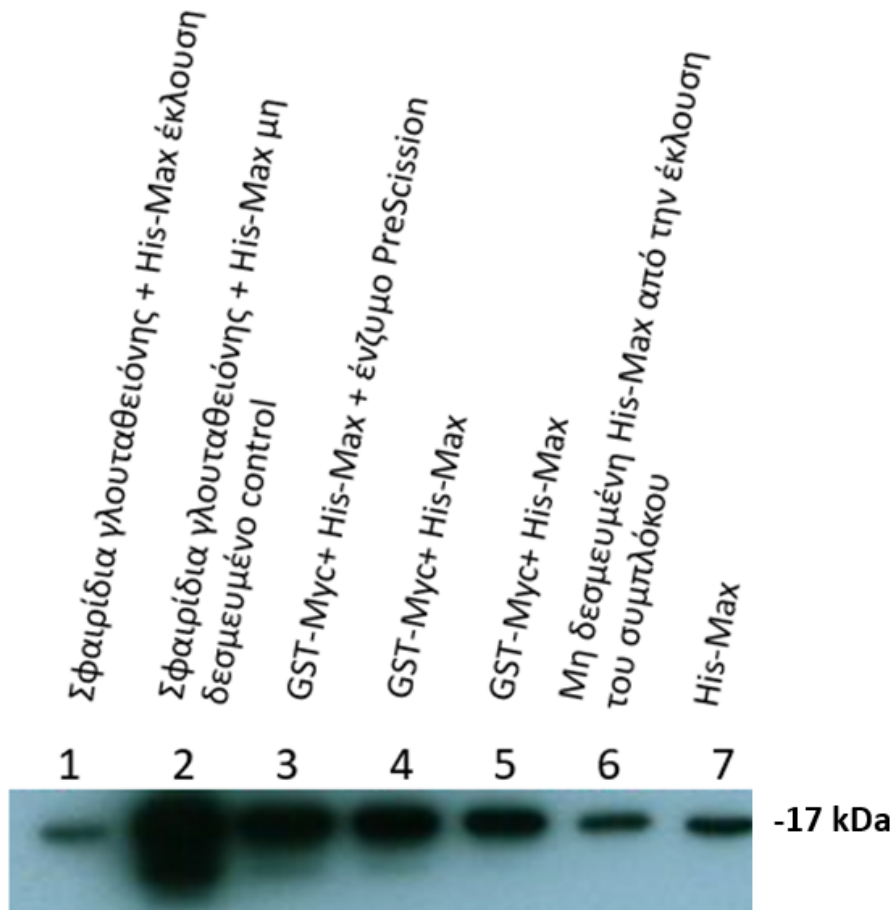


Εικόνα 28. Εγκαθίδρυση δοκιμασίας σχηματισμού του MYC/MAX. Πραγματοποιήθηκε ολονύκτια επώαση των πρωτεϊνών GST-Myc και 6-His-Max με σκοπό, το σχηματισμού του εν λόγω συμπλόκου. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και χρώση με Coomassie brilliant blue. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι τα εξής: 1^η διαδρομή: πρωτεϊνικός μάρτυρας (kDa), 2^η διαδρομή: πρωτεϊνικό κλάσμα 6-His-Max, 3^η διαδρομή: δείγμα του σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max, 4^η διαδρομή: δείγμα από την επώαση σφαιριδίων γλουταθειόνης με την πρωτεΐνη 6-His-Max (ως αρνητικό control της δοκιμασίας σχηματισμού συμπλόκου, το οποίο υποδηλώνει τη μη σύνδεση της 6-His-Max με τα συγκεκριμένα σφαιρίδια), 5^η διαδρομή: μη προσδεσμένη πρωτεΐνη 6-His-Max κατά το σχηματισμό του συμπλόκου, 6^η διαδρομή: μη προσδεσμένη πρωτεΐνη 6-His-Max στα σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Στη τρίτη διαδρομή φαίνεται η επιτυχημένη προσπάθεια του σχηματισμού του συμπλόκου των δύο πρωτεϊνών (Myc/Max), καθώς εντοπίζονται στα σωστά μοριακά βάρη και οι δυο πρωτεΐνες που μελετώνται. Συγκεκριμένα εμφανίζεται η ζώνη της GST-Myc στα 35 kDa, καθώς και η 6-His-Max λίγο πιο πάνω από τα 17 kDa. Τέλος στις διαδρομές 5 και 6 βλέπουμε τα δείγματα που φαίνεται να μη συνδέθηκαν με τη GST-Myc κατά την επώαση για το σχηματισμό του συμπλόκου. Να σημειωθεί ότι η GST-Myc είχε προσδεθεί προηγουμένως σε σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η ζώνη που φαίνεται στα 17 kDa είναι όντως η 6-His-Max, εφαρμόστηκε η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά

Western. Στην εικόνα 29 παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέρχονται από ανεξάρτητο πείραμα σε σχέση με το προηγούμενο. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική προσέγγιση με τη διαφορά ότι διεξήχθη απομόνωση του πρωτεϊνικού συμπλόκου με δυο τρόπους. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην εικόνα 29. Σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν μέσω της τεχνικής Western παρατηρείται ότι το αντίσωμά, το οποίο είναι ειδικό για τη Max, ανιχνεύει την εν λόγω πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, η 6-His-Max πρωτεΐνη συνδέεται με την GST-Myc επιτυχώς και με τους δύο τρόπους απομόνωσης του συμπλόκου. Συγκεκριμένα το πρωτεϊνικό σύμπλοκο απομονώθηκε μέσω έκλυσης της προσδεδεμένης GST-Myc στα σφαιρίδια γλουταθειόνης (διαδρομή 2) καθώς και με επεξεργασία αυτής με το PreScission ένζυμο (διαδρομή 3). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί μια πρωτεάση, η οποία αποκόπτει την μοριακή ετικέτα GST από τη Myc πρωτεΐνη (εικόνα 9). Ενδεικτικό της εξειδίκευσης της σύνδεσης της 6-His-Max με την GST-myc αποτελεί το γεγονός ότι η ποσότητα της 6-His-Max που εκλύεται από την στήλη παρουσία της GST-myc (διαδρομή 2) είναι πολύ μεγαλύτερη από την ποσότητα που εκλύεται στη διαδρομή του αρνητικού μάρτυρα (στήλη που δεν φέρουν την GST-myc, διαδρομή 1).



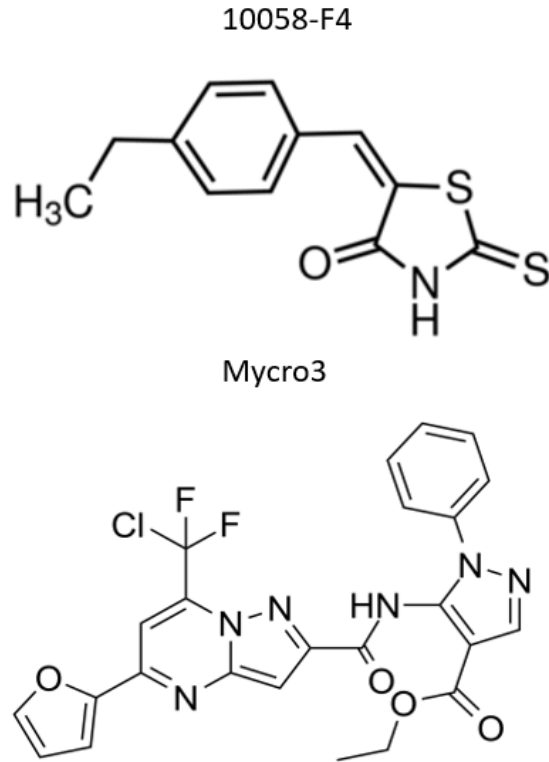
Εικόνα 29. Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western στα δείγματα που προέκυψαν κατά τον σχηματισμό του MYC/MAX συμπλόκου, με χρήση anti-MAX αντισώματος. Τα δείγματα που προκύπτουν κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθησε επώαση με ειδικό αντίσωμα έναντι της Max και ο φθορισμός αυτού αποτυπώθηκε σε φιλμ. Τα δείγματα αναλύθηκαν ως εξής: 1^η διαδρομή: σφαιρίδια γλουταθειόνης+ 6-His-Max (αρνητικό control για τη μη πρόσδεση των σφαιριδίων γλουταθειόνης με τη πρωτεΐνη), 2^η διαδρομή: μη συνδεδεμένη 6-His-Max σε σφαιρίδια γλουταθειόνης που εντοπίζεται στο σύνολο του πρωτεϊνικού διαλύματος, 3^η διαδρομή: πρωτεϊνικό σύμπλοκο μεταξύ των 6-His-Max και GST-Myc πρωτεϊνών (απομόνωση μέσω επεξεργασίας με PreScission ένζυμο), 4^η-5^η διαδρομή: πρωτεϊνικό σύμπλοκο μεταξύ των 6-His-Max και GST-Myc πρωτεϊνών (απομόνωση μέσω έκλυσης), 6^η στήλη: μη συνδεδεμένη 6-His-Max με την πρωτεΐνη GST-Myc κατά το σχηματισμό του συμπλόκου, 7^η στήλη: 6-His-Max πρωτεΐνη.

3.6. Έλεγχος της δράσης γνωστών χημικών μορίων στη δοκιμασία σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max

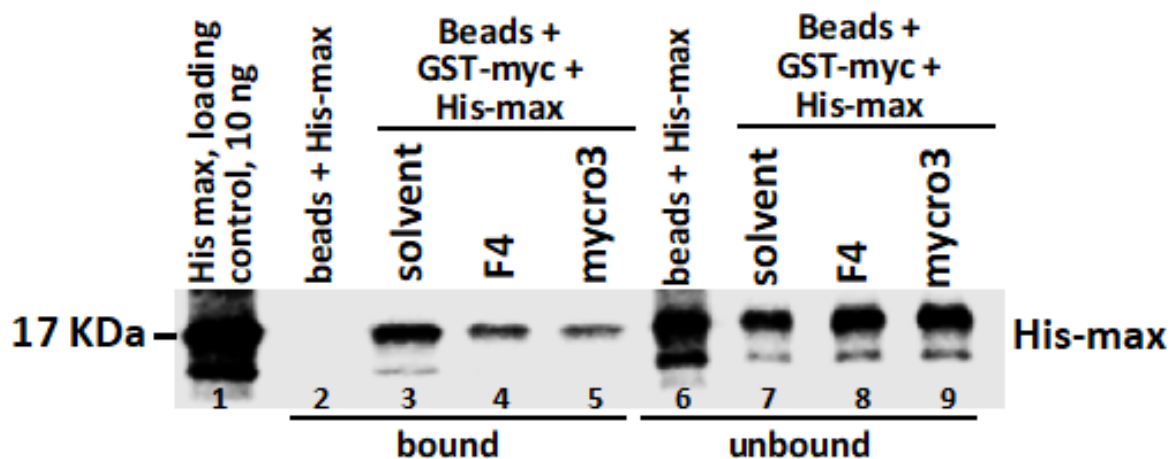
Έχοντας εγκαθιδρύσει τη δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max, στη συνέχεια ελέγχθηκε η δυνατότητα της δοκιμασίας να ανιχνεύει την ανασταλτική δράση των νέων χημικών αναστολέων. Για το σκοπό αυτό, αρχικά ελέγχθηκαν οι γνωστοί αναστολείς Mycro3 και F4 (Lavinia A. Carabet et al., 2019) (βλέπε δομές

στην Εικόνα 30). Τα μόρια αυτά επώαστηκαν με την GST-myc, πριν γίνει η επώαση της με την πρωτεΐνη 6-His-Max. Τα δείγματα που προκύπτουν κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολούθησε επώαση με ειδικό αντίσωμα έναντι της Max και ο φθορισμός αυτού αποτυπώθηκε στην εικόνα 31.

Αρχικά, στην εικόνα αυτή διακρίνεται η συγκατακρήμνιση της 6-His-Max με τα σφαιρίδια που φέρουν την GST-myc στη διαδρομή 3 (συγκριτικά με τη διαδρομή 2 όπου χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια απουσία της GST-myc), γεγονός που καταδεικνύει το σχηματισμό του συμπλόκου GST-Myc/6-His-Max. Επιπρόσθετα, η επώαση της GST-Myc με τους γνωστούς αναστολείς F4 και Myc3 προκαλεί μείωση της ποσότητας της 6-His-Max που σχηματίζει σύμπλοκο με την GST-Myc [στην εικόνα 26, συγκρίνετε τη διαδρομή 3 (που αντιστοιχεί στο δείγμα ελέγχου) με τις διαδρομές 4 και 5, που αντιστοιχούν στους αναστολείς F4 και Myc3, αντίστοιχα]. Σε απόλυτη συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκεται η ποσότητα της 6-His-max που απομένει ασύνδετη με την GST-myc (διαδρομές 6-9, unbound samples), αφού είναι μικρότερη η ποσότητα της μη συνδεδεμένης ποσότητας της 6-His-Max όταν στα σφαιρίδια υπάρχει η GST-Myc (διαδρομή 7) συγκριτικά με το δείγμα που δεν περιέχει τη GST-Myc (διαδρομή 6). Αντίστοιχα, παρουσία των αναστολέων F4 και Myc3 η ποσότητα της μη συνδεδεμένης ποσότητας της 6-His-Max (διαδρομές 8 και 9, αντίστοιχα) είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την ποσότητα που ανιχνεύεται στο δείγμα ελέγχου (διαδρομή 7).



Εικόνα 30. Οι χημικές δομές των αναστολέων **10058-F4**, **Mycro3** (Lavinia A. Carabet et al., 2019). Τα συγκεκριμένα χημικά μόρια, συνδέονται άμεσα με την περιοχή bHLH-zip(έλικα-στροφή-έλικα φερμουάρ λευκίνης) της *Myc* πρωτεΐνης με απώτερο σκοπό την αναστολή του σχηματισμού συμπλόκου με την πρωτεΐνη *Max*. Η εν λόγω περιοχή είναι υπεύθυνη τόσο για τη δέσμευση της *Myc* με αλληλουχίες DNA (έλικα-στροφή-έλικα) όσο και για τη δέσμευση με την *Max* (φερμουάρ λευκίνης).



Εικόνα 31. Μελέτη της ανασταλτικής δράσης των χημικών μορίων αναστολέων *F4*, *Mycro3* κατά το σχηματισμό του συμπλόκου *Myc/Max*. Σφαιρίδια γλουταθειόνης στα οποία προσδέθηκε η *GST-myc*, επωάστηκαν με 6-*His-Max* και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκλυση με ανηγμένη γλουταθειόνη (διαδρομή 3). Σαν δείγμα ελέγχου, επωάστηκε η 6*His-Max* με κενά σφαιρίδια γλουταθειόνης (διαδρομή 2), προκειμένου να ελεγχθεί η μη ειδική σύνδεσή της με τα σφαιρίδια. Στις διαδρομές 4 και 5 αναλύθηκαν δείγματα στα οποία ο σχηματισμός του συμπλόκου έγινε παρουσία των αναστολέων *F4* και *Mycro3* σε συγκέντρωση 100 μM . Στις διαδρομές 6 έως 9 αναλύεται το μη συνδεδεμένο κλάσμα (*unbound*) των δειγμάτων που αντιστοιχούν στις διαδρομές 2 έως 5. Στη διαδρομή 1 φορτώθηκε καθαρή 6-*His-max* για εντοπισμό της θέσης της πρωτεΐνης στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η δοκιμασία που εγκαθιδρύσαμε είναι κατάλληλη να ανιχνεύει νέους αναστολείς σχηματισμού του συμπλόκου *Myc/Max*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ήταν η εγκαθίδρυση *in vitro* δοκιμασίας σχηματισμού του πρωτεϊνικού συμπλόκου Myc/Max και μελέτη της ανασταλτικής δράσης στοχευμένων χημικών μορίων. Βασική προϋπόθεση για την επίτευξη του στόχου αυτού, ήταν η παραγωγή και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών Myc, Max σε καθαρή μορφή. Επιλέχθηκε η παραγωγή των πρωτεϊνών σε ανασυνδυασμένη μορφή, με χρήση δύο εναλλακτικών μοριακών ετικετών, GST και 6-His.

Η παραγωγή των πρωτεϊνών με διαφορετικές μοριακές ετικέτες κρίθηκε αναγκαία για να εξεταστεί αν η διαφορετική μοριακή ετικέτα βελτιώνει ποιοτικά και ποσοτικά την παραγωγή των πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα για να βελτιωθούν οι συνθήκες και τα αποτελέσματα των απομονώσεων της πρωτεΐνης δοκιμάστηκε η παραγωγή της σε δυο διαφορετικούς τύπους βακτηριακών κυττάρων, τα BL21DE3 και τα Rosetta. Η παραλαβή των πρωτεϊνών με την μοριακή ετικέτα 6-His είναι εφικτή, τόσο από το διαλυτό κλάσμα βακτηριακών κυττάρων, όσο και από το εκχύλισμα του βακτηριακού ιζήματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για την παραγωγή των πρωτεϊνών 6-His-Myc και GST-Myc ενδείκνυται ο καθαρισμός από το διαλυτό κλάσμα των ανασυνδυασμένων βακτηρίων τύπου Rosetta, καθώς τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προκύπτουν περιέχουν λιγότερες προσμίξεις. Πιο συγκεκριμένα, η Myc παρασκευάζεται σε μεγαλύτερη ποσότητα όταν έχει το πρόσδεμα GST, αλλά με μικρότερη καθαρότητα. Λόγω της εγγενούς αστάθειας της Myc, ένα μέρος της αποικοδομείται, με αποτέλεσμα να παίρνουμε σαν επιπλέον προϊόν την μοριακή ετικέτα GST. Αυτό όμως, δεν αποτελεί πρόβλημα για τα πειράματα συγκατακρήμισης για το σχηματισμό του συμπλόκου. Αντίστοιχα για την βέλτιστη παραγωγή και απομόνωση των πρωτεϊνών 6-His-Max και GST-Max, απουσία προσμίξεων, προτιμάται ο καθαρισμός από το διαλυτό κλάσμα των ανασυνδυασμένων βακτηρίων τύπου BL21DE3. Η Max, φαίνεται ότι παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα όταν έχει την μοριακή ετικέτα 6-His, ενώ η καθαρότητα είναι παρόμοια είτε χρησιμοποιείται ως μοριακή ετικέτα το GST είτε το 6-His. Ο καθαρισμός των 6-His πρωτεϊνών από το βακτηριακό εκχύλισμα του ιζήματος μπορεί να είναι πιο αποδοτικός όσον αφορά την τελική συγκέντρωση της παραγόμενης πρωτεΐνης, ωστόσο δεν προτιμάται γιατί η ουρία αποτελεί σημαντικό αποδιατακτικό παράγοντα. Όπως έχει προαναφερθεί οι εν λόγω πρωτεΐνες παράχθηκαν και απομονώθηκαν στην καθαρότερη δυνατή μορφή. Κατά τη διαδικασία του

σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max εντοπίζονται εκτός από τις ζώνες ενδιαφέροντος και ζώνες που αποδίδονται σε προσμίξεις κατά τον καθαρισμό. Το πρόβλημα της παρουσίας προσμίξεων στα τελικά πρωτεϊνικά κλάσματα αντιμετωπίζεται με ανάλυση κατά Western, όπου χρησιμοποιούνται ειδικά αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών στόχων. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η μελέτη του ενδεχόμενου σχηματισμού του πρωτεϊνικού συμπλόκου.

Οι πρωτεΐνες Myc και Max που παράχθηκαν με τις μεθόδους που περιεγράφηκαν πιο πάνω, με τις εναλλακτικά μοριακές ετικέτες 6-His και GST, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ελέγχου σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max, με δοκιμασία συγκατακρήμνισης (pull-down). Οι συνδυασμοί των πρωτεϊνών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό του συμπλόκου είναι τέσσερις: 6-His-Max/GST-Myc, GST-Max/6-His-Myc, GST-Myc/6-His-Max και 6-His-Myc/GST-Max. Σε περίπτωση σχηματισμού του συμπλόκου οι δύο πρωτεΐνες συγκατακρημνίζονται και εντοπίζονται και οι δύο στα κλάσματα έκλουσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων κατά Western, ο σχηματισμός του συμπλόκου με το συνδυασμό GST-Myc/6-His-Max πραγματοποιείται σε ικανοποιητικό βαθμό καθώς η 6-His-Max συνδέεται στα σφαιρίδια που φέρουν την GST-Myc με πολύ μεγαλύτερη απόδοση συγκριτικά με τα σφαιρίδια ελέγχου (control).

Τέλος, η ολοκλήρωση του στόχου της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης χημικών μορίων κατά του σχηματισμού του συμπλόκου αυτών των δύο σημαντικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η δράση δυο μορίων αναστολέων, 10058-F4 και Mycro3, οι οποίοι στοχεύουν τη Myc σε εκείνες τις θέσεις σύνδεσης με την πρωτεΐνη Max. Τα αποτελέσματα της επώασης της GST-Myc με τους αναστολείς, κατά το σχηματισμό του συμπλόκου, φαίνεται ότι προκαλούν μείωση της ποσότητας της 6-His-Max που προσδένεται σε αυτή. Επιπρόσθετα, η ποσότητα της 6-His-Max που απομένει ασύνδετη με την GST-Myc, είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που εντοπίζεται στην αντίστοιχο δείγμα ελέγχου (αρνητικό control), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα συγκεκριμένα μόρια αναστολείς παρεμποδίζουν τη σύνδεση της Max πάνω στη Myc σε συγκεκριμένο βαθμό. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, η δοκιμασία ανίχνευσης σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max που εγκαθιδρύθηκε είναι ικανή να ανιχνεύσει την ανασταλτική δράση των χημικών αναστολέων F4 και Mycro3, και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μετέπειτα μελέτες για την ανίχνευση νέων χημικών αναστολέων

του συμπλόκου Myc/Max, με απώτερο στόχο την ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι, η διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη οδήγησε στην διεξαγωγή ποιοτικών συμπερασμάτων όσον αφορά τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν. Συγκεκριμένα, κατέστη δυνατός ο σχηματισμός του πρωτεϊνικού συμπλόκου (Myc/Max) ανεξάρτητα από το γεγονός ότι η ποσότητα και καθαρότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών δεν ήταν ικανοποιητική. Επίσης, με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, δεν προκύπτουν πληροφορίες όσον αφορά τη λειτουργικότητα των μορίων που μελετώνται, καθώς δεν ελέγχεται το λανθασμένο μοτίβο αναδίπλωσης που λαμβάνουν οι πρωτεΐνες στο χώρο. Μελλοντικός στόχος, για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων κατά τον σχηματισμό και την αναστολή του συμπλόκου, αποτελεί η διεξαγωγή πειραματικών τεχνικών φασματοσκοπίας, όπως είναι ο συντονισμός επιφανειακού πλασμονίου (Surface Plasmon Resonance, SPR), η θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) και η φασματοπολωσιμετρία Κυκλικού Διχρωισμού (Circular Dichroism, CD).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος αναπτύσσεται με την πάροδο του χρόνου και περιλαμβάνει την ανεξέλεγκτη διαίρεση κυττάρων. Δύο κατηγορίες γονιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση καρκίνου, τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Ένα από τα πιο γνωστά πρώτο-ογκογονίδια είναι το γονίδιο *Myc*. Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη του *Myc* σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με τον παράγοντα *Max*. Το ενεργοποιημένο μεταγραφικό σύμπλοκο επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών, που συμβάλλουν καθοριστικά στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Στην παρούσα μελέτη, εδραιώθηκε ένα πρωτόκολλο παραγωγής και καθαρισμού των πρωτεϊνών MYC και MAX, με στόχο τον ακόλουθο σχηματισμό του συμπλόκου τους και τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης χημικών μορίων έναντι αυτού. Για τον σκοπό αυτό, δοκιμάστηκε η ετερόλογη πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεϊνών His-Myc, His-Max, GST-Myc και GST-Max στα βακτηριακά στελέχη BL21DE3 και Rosetta, καθώς και η ανάπτυξη αυτών σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Διαπιστώθηκε ότι, για την παραγωγή των πρωτεϊνών His-Myc και GST-Myc ενδείκνυται ο καθαρισμός από το διαλυτό κλάσμα των ανασυνδυασμένων βακτηρίων τύπου Rosetta ενώ για τις His-Max και GST-Max, προτιμάται ο καθαρισμός από το κλάσμα των ανασυνδυασμένων βακτηρίων τύπου BL21DE3. Για τον σχηματισμό του συμπλόκου Myc-Max, η πρωτεΐνη GST-Myc προσδέθηκε σε σφαιρίδια γλουταθειόνης και ακολούθως επώαστηκε με την πρωτεΐνη His-Max. Τέλος, επιβεβαιώθηκε η ανασταλτική δράση των χημικών μορίων 10058-F4 και Mycro3 κατά το σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max, δεδομένου ότι οι παραπάνω χημικοί αναστολείς στοχεύουν τη MYC σε εκείνες τις θέσεις σύνδεσης με την πρωτεΐνη MAX. Τα πειράματα αυτά καταδεικνύουν ότι η δοκιμασία σχηματισμού του συμπλόκου Myc/Max που εγκαθιδρύθηκε, είναι κατάλληλη για την ανίχνευση νέων χημικών αναστολέων.

SUMMARY

Cancer develops over time and involves the uncontrolled division of cells. Two classes of genes play an important role in causing cancer, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes.

One of the best-known proto-oncogenes is the *Myc* gene. The encoded protein of *Myc* forms a heterodimer with the Max factor. The activated transcription complex induces the expression of genes involved in a number of cellular processes, which significantly contribute to the development of cancer.

In the present study, a protocol for the production and purification of MYC and MAX proteins was established, with the aim of subsequently forming of their complex and studying the inhibitory effect of the chemical molecules against this. For this purpose, the heterologous protein expression of His-Myc, His-Max, GST-Myc and GST-Max proteins in the bacterial strains BL21DE3 and Rosetta was tested, as well as their growth under different culture conditions. It was found that, for the production of His-My and GST-My proteins, purification from the soluble fraction of recombinant Rosetta bacteria is indicated, while for His-Max and GST-Max, purification from the fraction of recombinant BL21DE3 bacteria is preferred. To form the MYC/MAX complex, GST-Myc protein was bound to the glutathione beads and then incubated with His-Max protein. Finally, the inhibitory effect of 10058-F4 and Mycro3 molecules against the formation of the Myc/Max complex was confirmed, as the above chemical inhibitors target MYC at those binding sites to the MAX protein. These experiments demonstrate that the established Myc/Max complex formation assay is suitable for the detection of new chemical inhibitors.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Armelin, H. A., Armelin, M. C. S., Kelly, K., Stewart, T., Leder, P., Cochran, B. H., & Stiles, C. D. (1984). Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature*, **310(5979)**, 655–660.

Bashyam MD, Animireddy S, Bala P, Naz A, George SA (2019). The Yin and Yang of cancer genes. *Gene*, **704 (6)**, 121-133.

Blackwood, E. M., Lugo, T. G., Kretzner, L., King, M. W., Street, A. J., Witte, O. N., & Eisenman, R. N. (1994). Functional analysis of the AUG- and CUG-initiated forms of the c-Myc protein. *Molecular Biology of the Cell*, **5(5)**, 597–609.

Blagosklonny M.V. (2002). Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle*, **1(6)**:391-3.

Chen, H., Liu, H., & Qing, G. (2018). Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **3(1)**,

Cooper GM (2000). The Development and Causes of Cancer. *The cell: A Molecular Approach*, **10**: 0-87893-106-6.

Dang, Chi V. (2012). MYC on the Path to Cancer. *Cell*, **149(1)**, 22–35.

Deininger P. (1999). Genetic Instability in Cancer: Caretaker and Gatekeeper Genes. *The Ochsner Journal*. **1(4)**: 206–9.

Hock, H. (2012). A complex Polycomb issue: the two faces of EZH2 in cancer. *Genes & Development*, **26(8)**, 751–755.

Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., ... Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, **502(7471)**, 333–339.

Kevin M. RYAN, George D. BIRNIE. (1996). Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J*, **314 (3)**: 713–721.

Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., & Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, **35(3)**, 603–610.

Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1988). The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins. *Science* **240**, 1759–1764.

Lavinia A. Carabet, Paul S. Rennie, Artem Cherkasov (2019). Therapeutic Inhibition of Myc in Cancer. Structural Bases and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. *Int J Mol Sci*. **20(1)**:120.

- Li, J. (1997). PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science*, **275**(5308), 1943–1947.
- Lobry, C., Oh, P., Mansour, M. R., Look, A. T., & Aifantis, I. (2014). Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood*, **123**(16), 2451–2459.
- Maehama, T., & Dixon, J. E. (1998). The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(22), 13375–13378.
- McKeown, M.R.; Bradner, J.E. (2014). Therapeutic strategies to inhibit MYC. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **4**(10): a014266.
- Myers M.P., Pass I., Batty I.H., Van der Kaay J., Stolarov J.P., Hemmings B.A., Wigler M.H., Downes C.P., Tonks N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of pten is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:13513–13518.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**(10), 21087–21113.
- Schaub, F. X., Dhankani, V., Berger, A. C., Trivedi, M., Richardson, A. B., Shaw, R., ... Liu, Y. (2018). Pan-cancer Alterations of the MYC Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. *Cell Systems*, **6**(3), 282–300.e2.
- Schwerk C, Schulze-Osthoff K (2005). Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell*, **19**(1):1-13.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., ... Mak, T. W. (1998). Negative Regulation of PKB/Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN. *Cell*, **95**(1), 29–39.
- Stokoe D., Stephens L.R., Copeland T., Gaffney P.R., Reese C.B., Painter G.F., Holmes A.B., McCormick F., Hawkins P.T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. **277**:567–570.
- Zhao L., Vogt P.K. (2008). Helical domain and kinase domain mutations in p110 α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**:2652–2657.