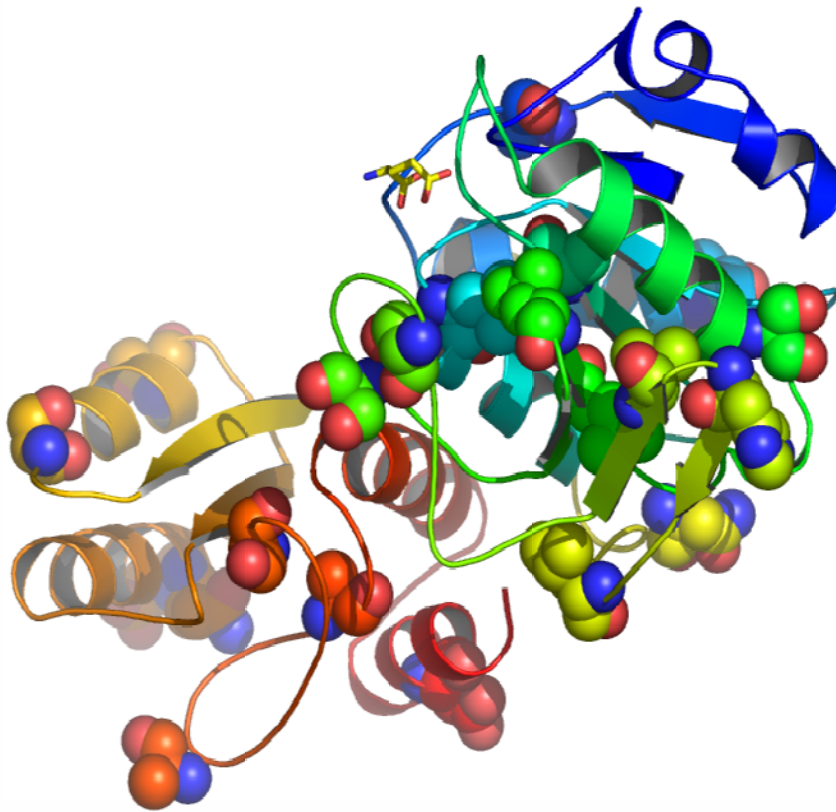


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη καθαρισμού και χημική τροποποίηση με
πολυαιθυλενογλυκόλη του ενζύμου L-ασπαραγινάση
από *E. chrysanthemi*



Πτυχιακή Μελέτη
του φοιτητή του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Κωνσταντίνου Γάκου

Αθήνα 2011

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Ενζυμικής Τεχνολογίας του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

- 1) Αναπληρωτής Καθηγητής Λάμπρου Νικόλαος Άμεσος Επιβλέπων
- 2) Καθηγητής Κλώνης Ιωάννης Μέλος
- 3) Επίκουρος Καθηγητής Φλεμετάκης Εμμανουήλ Μέλος

Ευχαριστίες

Έχοντας ολοκληρώσει την παρούσα μελέτη, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω:

- Τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου για την εμπιστοσύνη που μου υπέδειξε καθώς και για την συνεχή και πολύτιμη καθοδήγηση του.
- Τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Κλώνη Ιωάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ.
- Την υποψήφια διδάκτωρ Χρονοπούλου Ευαγγελία, τον μεταπτυχιακό φοιτητή Καραμήτρο Χρήστο και την κ. Παππά Ευαγγελία, μέλος Ε.Τ.Ε.Π του εργαστηρίου που με τις ουσιαστικές υποδείξεις τους με βοήθησαν να ολοκληρώσω τη μελέτη αυτή.

Συντομογραφίες

BSA: ορός αλβουμίνης

L-ASNase: L-ασπαραγινάση

L-asn: αμινοξύ L-ασπαραγίνη

L-asp: αμινοξύ L-ασπαραγινικό οξύ

L-Gln: αμινοξύ L-γλουταμίνη

Thr: αμινοξύ θρεονίνη

Lys: αμινοξύ λυσίνη

EcAI: τύπος L-ασπαραγινάσης από βακτήριο *E. coli*

EcAII: τύπος L-ασπαραγινάσης από βακτήριο *E. coli*

ErA: τύπος L-ασπαραγινάσης από βακτήριο *Erwinia amylovora*

ΟΛΛ: οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία

Cn: αντιβιοτικό χλωροαμφενικόλη

Amp: αντιβιοτικό αμπικιλίνη

TCA: Τρι-χλωρο οξικό οξύ

TEMED: Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη

APS: Υπερθεϊκό αμμώνιο

SDS: Δωδεκαωνοθεϊκό νάτριο

ddH₂O: δις-απιονισμένο νερό

NaCl: χλωριούχο νάτριο

kDa: μονάδα μέτρησης ατομικής ή μοριακής μάζας

Pi: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

CH₃COONa: οξικό νάτριο

IPTG: ισοπρόπυλο1-β-D- θειογαλακτοζίδιο

TB: θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας

NH₃: αμμωνία

mPEG-SNHS: N-υδροξυ-ηλεκτρικός εστέρας της ηλεκτρικής μεθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλης

pH: μέτρο οξύτητας ή βασικότητας ενός διαλύματος

U: μονάδα μέτρησης ενζυμικών μονάδων (units)

C: συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/mL)

S.A: ειδική δραστηριότητα ενζύμου

rpm: στροφές/min

nm: μονάδα μήκους κύματος του φωτός

M(Molarity): μονάδα μέτρησης της μοριακής συγκέντρωσης μιας ουσίας σε ένα διάλυμα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες	4
Περίληψη	8
Abstract	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Δομή και ενζυμική λειτουργία των L-ασπαραγινασών	11
1.2 Εφαρμογές της L-ασπαραγινάσης.....	13
1.2.1 Εισαγωγή.....	13
1.2.2 Εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων	14
1.2.3 Εφαρμογή στην θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας	15
1.2.4 Προβλήματα χρήσης ως φάρμακο	16
1.3 Καθαρισμός του ενζύμου L-ASNase με χρωματογραφία συγγένειας και ανταλλαγής ιόντων	17
1.4 Χημική τροποποίηση L-ασπαραγινάσης με πολυαιθύλενο γλυκόλη (PEG).....	18
1.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	22
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 Υλικά	23
2.1.1 Βιολογικά υλικά.....	23
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια	23
2.2 Εξοπλισμός.....	24
2.3 Μέθοδοι	25
2.3.1 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάσης από <i>Erwinia chrysanthemi</i> σε <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta με φορέα TOPO	25
2.3.2 Λύση των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος	26
2.3.3 Διαπίδυση	26
2.3.4 Καθαρισμός του ενζύμου με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας και χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.	26

2.3.4.1 Πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας	27
2.3.4.2 Πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων σε προσροφητή S-Sepharose FF	27
2.3.4.3 Πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων σε προσροφητή DEAE- Sepahrose	28
2.3.5 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηρότητας της L-ασπαραγινάσης.....	28
2.3.6. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	29
2.3.7 Τροποποίηση της L-ASNaσης με πολυαιθύλενο γλυκόλη (PEG)	31
2.3.8 Λυοφιλίωση.....	31
2.3.9 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση TCA	32
2.3.10 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε ασυνεχή πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκαθειϊκού νατρίου (SDS).....	32
2.3.11 Τυπολόγιο	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
3.1 Ετερόλογη έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάση από <i>Erwinia chrysanthemi</i> σε <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta	36
3.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου καθαρισμού της L-ασπαραγινάσης.....	36
3.2.1 Ανάπτυξη πρωτόκολλου καθαρισμού εξωκυττάριου ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας.....	36
3.2.2 Ανάπτυξη πρωτόκολλου καθαρισμού ενδοκυττάριου ενζύμου με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.	39
3.2.2.1 Καθαρισμός ενδοκυττάριου ενζύμου σε ανταλλάκτη κατιόντων S-Sepharose FF .	39
3.2.2.2 Ανάπτυξη πρωτόκολλου καθαρισμού ενδοκυττάριου ενζύμου σε ανταλλάκτη ανιόντων DEAE-Sepharose.....	40
3.3 Ανάπτυξη και μελέτη πρωτόκολλου τροποποίησης της L-ασπαραγινάσης με δραστικό ανάλογο της πολυαιθύλενο γλυκόλης	43
3.3.1 Τροποποίηση εξωκυττάριας L-ασπαραγινάσης	43
3.3.2 Τροποποίηση ενδοκυττάριας L-ασπαραγινάσης.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	46
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
Βιβλιογραφία.....	50

Περίληψη

Το ένζυμο L-ασπαραγινάση (L-ASNase) καταλύει την μετατροπή της L-ασπαραγίνης (L-asparagine) σε L-ασπαραγινικό και αμμωνία. Χρησιμοποιείται ευρέως για την θεραπεία αιμοποιητικών ασθενειών όπως οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και λεμφωμάτων. Το ένζυμο προέρχεται από κύτταρα βακτηρίων κυρίως από *E. coli* και *Erwinia chrysanthemi*.

Η χρήση του ενζύμου ως φαρμακευτικό ενέχει προβλήματα τοξικότητας και παρενεργειών στους ασθενείς. Λόγω αυτών των προβλημάτων οι φαρμακευτικές εταιρείες και πληθώρα επιστημόνων ερευνούν μεθόδους τροποποίησης για τη βελτιστοποίηση της δραστηριότητας του ως φάρμακο καθώς και μεθόδους καθαρισμού για τη μείωση της τοξικότητας και των παρενεργειών του.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ενζύμου L-ASNase από *E. chrysanthemi* χρησιμοποιώντας διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές. Ειδικότερα, εφαρμόστηκε τόσο χρωματογραφία συγγένειας, σε ακινητοποιημένο L-Asp, όσο και χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων με συνδυασμό ανταλλάκτη ανιόντων και κατιόντων. Και οι δύο μέθοδοι έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μελέτη τροποποίησης του ενζύμου με δραστικό παράγωγο πολυαιθύλενο γλυκόλης (N-υδροξυ-ηλεκτρικός εστέρας της ηλεκτρικής μεθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλης, mPEG-SNHS) και διερευνήθηκε η επίδραση της τροποποίησης στα καταλυτικά και μοριακά του χαρακτηριστικά.

Λέξεις κλειδιά : L-ασπαραγινάση, τροποποίηση με πολυαιθύλενο γλυκόλη (PEG), χρωματογραφία συγγένειας, χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ), παρενέργειες

Abstract

The enzyme L-asparaginase (L-ASNase, E.C. 3.5.1.1) catalyzes the conversion of L-asparagine to L-aspartate and ammonia. L-asparaginases of *Erwinia chrysanthemi* and *E. coli* have been employed for many years as effective drugs in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. The main restrictions to the use of L-ASNase as a therapeutic agent include its premature inactivation and rapid clearance, thus necessitating frequent injections to maintain therapeutic levels, and several types of side effects. To date, the most promising approach to extending the half-life and reducing the immunogenicity and antigenicity of therapeutic proteins is to covalently couple them to poly(ethylene glycol) (PEG).

In the present work we report the expression of L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* in *E. coli* and the development of an efficient purification protocol. Purification was carried out using affinity chromatography on L-Asp-Sepharose CL6B affinity adsorbent and ion exchange chromatography. The purified enzyme was PEGylated using methoxypolyethylene glycol-succinate N-hydroxysuccinimide ester. The modified form of the enzyme retained most of its original catalytic activity and exhibited higher stability.

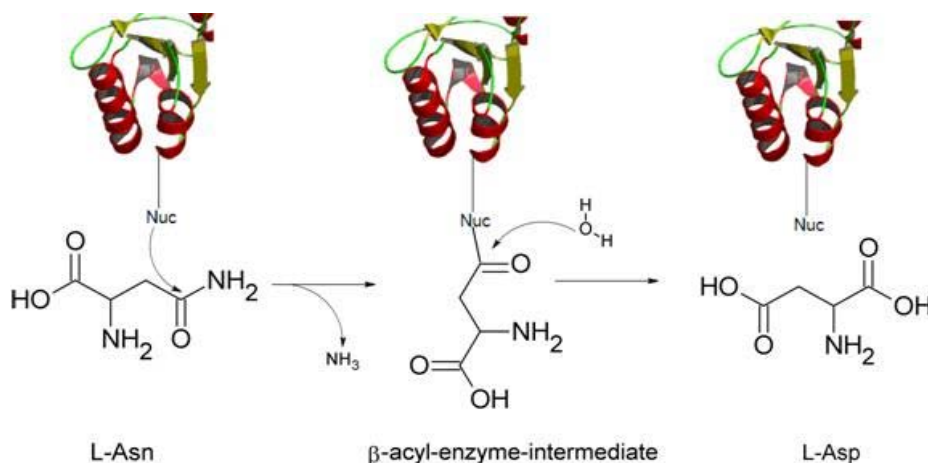
Keywords: L-asparaginase; PEGylation; affinity chromatography; ion exchange chromatography; acute lymphoblastic leukemia (ALL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δομή και ενζυμική λειτουργία των L-ασπαραγινασών

Οι L-ασπαραγινάσες (αμιδο-υδρολάσες της L-ασπαραγίνης, L-ASNase, E.C (3.5.1.1), είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση της L-ασπαραγίνης (L-asn) σε L-ασπαραγινικό οξύ (L-asp) και αμμωνία (Εικόνα 1.1). Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να υδρολύουν αποτελεσματικά και την L-γλουταμίνη (L-Gln) ανάλογα σε ποια κατηγορία ανήκουν (Κλώνης Ι., 2007; Labrou et al., 2010).



Εικόνα 1.1 Η αντίδραση υδρόλυσης της L-ασπαραγίνης από την αμιδοϋδρολάση L-ασπαραγινάση παρουσία νερού. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι η αμμωνία και το ασπαραγινικό οξύ (Labrou et al., 2010).

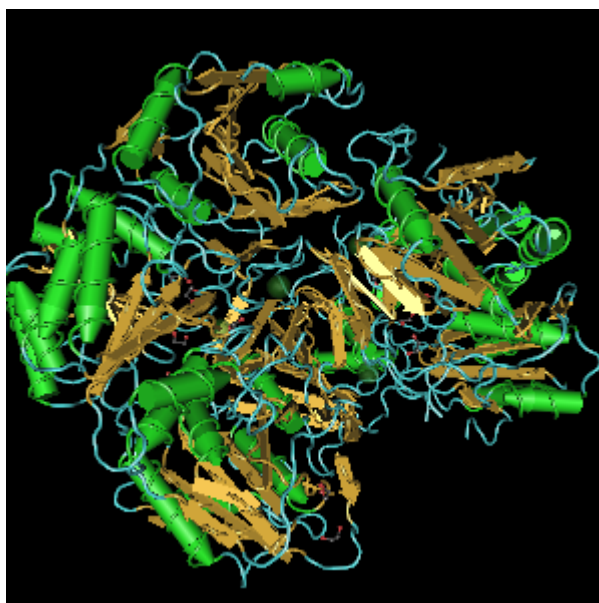
Αρχικά, πηγή παραλαβής ήταν ο ορός από ινδικά χοιρίδια, στη συνέχεια όμως χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι μικροοργανισμοί όπως *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* και *E. coli* (Κλώνης Ι., 2007).

Οι βακτηριακές L-ASNases κατατάσσονται σε δύο τύπους ενζύμων ανάλογα με την συγγένεια που παρουσιάζουν έναντι στην υδρόλυση των υποστρωμάτων L-ασπαραγίνη και L-γλουταμίνη. Ειδικότερα, το βακτήριο *E. coli* περιέχει δύο ισοένζυμα L-ασπαραγινασών που ανήκουν στους τύπους I (ή EcAI) και II (ή EcAII). Οι δύο τύποι ισοενζύμων παρουσιάζουν διαφορές στις καταλυτικές τους ιδιότητες και στην αμινοξική αλληλουχία τους.

Σημαντική διαφορά είναι η περιοχή του κυττάρου στο οποίο βρίσκονται. Το μεν τύπου II ένζυμο βρίσκεται στην περιπλασματικό χώρο, μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και της

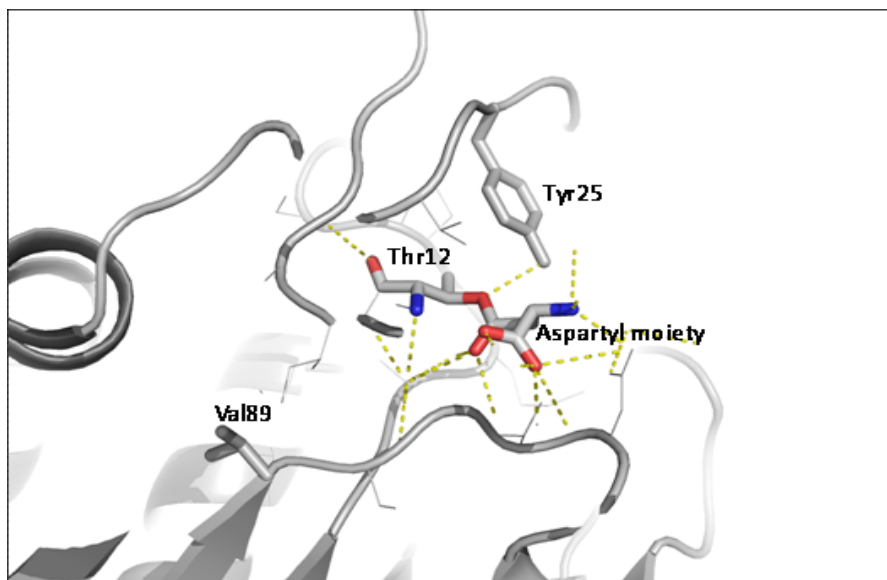
εξωτερικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου, το δε τύπου I ένζυμο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Μόνο τα ένζυμα τύπου II μπορούν να υδρολύουν και την L-Gln. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι L-ASNases από τα βακτήρια *E. coli* (EcAII) και από το *Erwinia chrysanthemi* (ErA) (Borek & Jaskolski, 2001; Labrou et al., 2010, Kurtzberg, 2000).

Η ενεργή λειτουργική μορφή των L-ASNase αποτελείται από ένα τετραμερές ομοίων υπομονάδων A,B,C,D, με συμμετρία τύπου 222 (Εικόνα 1.2). Η μοριακή μάζα του είναι 140-160 kDa και αποτελείται από 4 μονομερή. Το κάθε μονομερές αποτελείται από περίπου 330 αμινοξικά κατάλοιπα, που σχηματίζουν 8 α-έλικες και 14 β-πτυχωτές επιφάνειες (Kotzia & Labrou, 2005; Kotzia & Labrou, 2006; Kotzia et al., 2007; Labrou et al., 2010). Τα μονομερή οργανώνονται σε δύο εμφανείς τομείς, το μεγαλύτερο N-τελικό άκρο και τον μικρότερο C-τελικό άκρο, οι οποίοι και συνδέονται μεταξύ τους με περίπου 20 αμινοξικά κατάλοιπα (Kotzia & Labrou, 2005). Τα ενεργά κέντρα του ενζύμου βρίσκονται μεταξύ του N-τελικού άκρου και του C-τελικού άκρου δύο γειτονικών μονομερών. Γι' αυτό και το τετραμερές της L-ασπαραγινάσης θεωρείται και ως διμερές δύο διμερών. Παρά το γεγονός αυτό, η ενεργή μορφή του ενζύμου όπως αναφέραμε παραπάνω είναι το τετραμερές (Kotzia & Labrou, 2006; Labrou et al., 2010).



Εικόνα 1.2 Δομή L-ασπαραγινάσης από *E. coli*. Φαίνονται οι 4 υπομονάδες που απαρτίζουν το τετραμερές (Yun et al., 2007).

Αξίζει να αναφέρουμε ότι κρυσταλλογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι στο ενεργό κέντρο των βακτηριακών L-ασπαραγινασών υπάρχει μια πολύ συντηρημένη περιοχή αμινοξικών καταλοίπων. Διακρίνονται, επίσης δύο περιοχές, η μία με μειωμένη ελαστικότητα που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του δεσμευτή και μία άλλη πιο ευέλικτη και ελαστική περιοχή (βρόγχος), υπεύθυνη για τον έλεγχο της δέσμευσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Η καταλυτική δράσης της τελευταίας περιοχής οφείλεται στην παρουσία του νουκλεόφιλου αμινοξέος θρεονίνη 12 (Thr 12) (Εικόνα 1.3). Ο ευέλικτος βρόγχος βρίσκεται σε διάφορες διαμορφώσεις ανάλογα με την παρουσία ή απουσία ενός δεσμευμένου υποκαταστάτη στο ενεργό κέντρο (Labrou et al., 2010).



Εικόνα 1.3 Δομή ενεργού κέντρου της L-ασπαραγινάσης. Στο ενεργό κέντρο διαφαίνεται το νουκλεόφιλο αμινοξύ Thr 12στη θέση που είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο της δέσμευσης του υποστρώματος σ' αυτό (Labrou et al., 2010).

1.2 Εφαρμογές της L-ασπαραγινάσης

1.2.1 Εισαγωγή

Η L-ασπαραγινάση μελετάται τόσο από την επιστημονική κοινότητα όσο και από τις φαρμακευτικές βιομηχανίες και τις βιομηχανίες μεταποίησης τροφίμων. Αυτό συμβαίνει διότι η L-ασπαραγινάση χρησιμοποιείται για την μείωση του καρκινογόνου ακρυλαμιδίου

στα τρόφιμα και σαν φάρμακο στην θεραπεία της παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.

Όπως αναφέραμε παραπάνω το ένζυμο χρησιμοποιείται στην επεξεργασία τροφίμων. Η L-ασπαραγινάση λοιπόν χρησιμεύει ως βοήθημα στα τρόφιμα για την μείωση του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου στα αμυλούχα τρόφιμα. Το ακρυλαμίδιο είναι μια ένωση που σχηματίζεται σε ψημένα ή τηγανητά αμυλούχα τρόφιμα και πιθανώς να έχει καρκινογόνο δράση.

Κατά τη διάρκεια θέρμανσης (διαδικασία αμαύρωσης) το αμινοξύ ασπαραγινικό οξύ, που απαντάται φυσικά στα τρόφιμα αυτά, μετατρέπεται σε ακρυλαμίδιο μέσω της αντίδρασης Maillard. Η αντίδραση αυτή είναι υπεύθυνη για το καφετί χρώμα, την κρούστα και την ψημένη γεύση. Η αντίδραση Maillard, πραγματοποιείται μεταξύ αμινομαδών των αμινοξέων, πρωτεϊνών, αμινών και ελεύθερων καρβονυλίων αναγωγικών σακχάρων (αλδόζης ή κετόζης) (Κλώνης Ι., 1997). Προσθέτοντας λοιπόν την ασπαραγινάση πριν το ψήσιμο ή το τηγάνισμα η ασπαραγίνη μετατρέπεται σε ασπαρτικό οξύ και αμμώνιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η ασπαραγίνη να μην λαμβάνει μέρος στην αντίδραση Maillard και ως εκ τούτου μειώνεται ο σχηματισμός ακρυλαμιδίου. Η χρήση στην μεταποίηση τροφίμων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση 90% σε μια σειρά αμυλούχων τροφίμων χωρίς να παραποιείται η γεύση και η εμφάνιση του τελικού προϊόντος (Hendriksen et al., 2009; Kornbrust et al., 2010).

1.2.2 Εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων

Όπως αναφέραμε παραπάνω το ένζυμο χρησιμοποιείται στην επεξεργασία τροφίμων. Η L-ασπαραγινάση λοιπόν χρησιμεύει ως βοήθημα στα τρόφιμα για την μείωση του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου στα αμυλούχα τρόφιμα. Το ακρυλαμίδιο είναι μια ένωση που σχηματίζεται σε ψημένα ή τηγανητά αμυλούχα τρόφιμα και πιθανώς να έχει καρκινογόνο δράση.

Κατά τη διάρκεια θέρμανσης (διαδικασία αμαύρωσης) το αμινοξύ ασπαραγινικό οξύ, που απαντάται φυσικά στα τρόφιμα αυτά, μετατρέπεται σε ακρυλαμίδιο μέσω της αντίδρασης Maillard. Η αντίδραση αυτή είναι υπεύθυνη για το καφετί χρώμα, την κρούστα και την ψημένη γεύση. Η αντίδραση Maillard, πραγματοποιείται μεταξύ αμινομαδών των

αμινοξέων, πρωτεϊνών, αμινών και ελεύθερων καρβονυλίων αναγωγικών σακχάρων (αλδόζης ή κετόζης) (Κλώνης Ι., 1997). Προσθέτοντας λοιπόν την ασπαραγινάση πριν το ψήσιμο ή το τηγάνισμα η ασπαραγίνη μετατρέπεται σε ασπαρτικό οξύ και αμμώνιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η ασπαραγίνη να μην λαμβάνει μέρος στην αντίδραση Maillard και ως εκ τούτου μειώνεται ο σχηματισμός ακρυλαμιδίου. Η χρήση στην μεταποίηση τροφίμων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση 90% σε μια σειρά αμυλούχων τροφίμων χωρίς να παραποιείται η γεύση και η εμφάνιση του τελικού προϊόντος (Hendriksen et al., 2009; Kornbrust et al., 2010).

1.2.3 Εφαρμογή στην θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας

Τα τελευταία 30 χρόνια η L-ασπαραγινάση χρησιμοποιείται στην θεραπεία της παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Warangkar & Khobragade, 2009). Το ενδιαφέρον για την μελέτη του ενζύμου ξεκίνησε έπειτα από την παρατήρηση του Kidd και την ανακάλυψη του ενζύμου από τον Broome. Ο μεν πρώτος παρατήρησε ότι ο ορός από ινδικό χοιρίδιο έχει δράση κατά των όγκων ενώ ο δε ανακάλυψε το ένζυμο αυτό και περιέχεται στον ορό του πειραματόζωου είναι υπεύθυνο για την δράση έναντι των όγκων. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους καθώς προσδιορίστηκε ότι είναι σημαντικός παράγοντας κατά των όγκων (Manna et al., 1995).

Έπειτα, από κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους η L-ασπαραγινάση II από *E. coli* (EcAII) και *Erwinia chrysanthemi* (ErAII), χρησιμοποιείται στην θεραπευτική αγωγή κατά της λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Labrou et al., 2010). Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ), είναι μια μορφή καρκίνου του αίματος. Εμφανίζεται πιο συχνά στην παιδική ηλικία μεταξύ 2-5 ετών με ποσοστό ίασης 80% και στην τρίτη ηλικία. Στους ενήλικες το ποσοστό ίασης ανέρχεται στο 45-60%. Η ασθένεια αυτή προσβάλλει το αιμοποιητικό σύστημα του ασθενή, προκαλώντας αυξημένη παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων. Τα κακοήθη και ανώριμα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και παράγονται συνεχώς στο μυελό των οστών. Η ΟΛΛ μπορεί να προκαλέσει βλάβες ακόμα και θάνατο από την μείωση παραγωγής φυσιολογικών κυττάρων. Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να βιοσυνθέτουν από μόνα τους το αμινοξύ L-ασπαραγίνη χρησιμοποιώντας το ένζυμο συνθετάση της ασπαραγίνης (Κλώνης Ι., 1997). Εν αντίθεση, τα καρκινωματώδη λεμφοκύτταρα δεν το παράγουν και είναι απαραίτητη η εξωγενής χορήγησή της L-asn

μέσω της διατροφής. Η χορήγηση εξωγενώς της L-ασπαραγινάσης, μειώνει την συγκέντρωση της ασπαραγίνης στο αίμα, παρεμποδίζοντας έτσι τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Βέβαια, τα υγιή κύτταρα επιζούν και δεν επηρεάζονται και συνεχίζουν την παραγωγή της ασπαραγίνης (Κλώνης Ι., 1997).

Αξίζει να σημειωθεί πως η χορήγηση της L-aspar μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη ύφεση της ασθένειας σε ποσοστό έως και 80% (Manna et al., 1995). Επιπλέον, ως φάρμακο έχει μειωμένη τοξικότητα καθώς ο θεραπευτικός δείκτης (λόγος τοξικότητας προς κανονική θεραπευτική δόση) είναι περίπου 1000 ενώ για άλλα φάρμακα είναι κάτω του 10 (Κλώνης Ι., 1997). Ωστόσο, η χρήση του ενζύμου στην θεραπευτική αγωγή τέτοιων ασθενειών όπως η λεμφοβλαστική λευχαιμία ενέχει προβλήματα.

1.2.4 Προβλήματα χρήσης ως φάρμακο

Η L-ασπαραγινάση μπορεί να δράσει και ως γλουταμινάση προκαλώντας στον ασθενή σοβαρές παρενέργειες. Κάποιες από αυτές είναι η αναφυλαξία, ανοσοκαταστολή, παγκρεατίτιδα, δυσλειτουργία ήπατος, διαβήτη, υπογλυκαιμία, νευρολογικές διαταραχές, αιμορραγία και θρόμβωση (Manna et al., 1995; Kotzia & Labrou, 2007).

Εκτός των παραπάνω παρενεργειών, η συχνή χρήση του ενζύμου μπορεί να προκαλέσει σοβαρές αντιδράσεις υπερευαισθησίας όπως αλλεργίες και αναφυλακτικά σοκ. Βέβαια αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί κάνοντας χρήση του ενζύμου είτε από *E. coli* είτε από *Erwinia chrysanthemi* ως εναλλακτικές θεραπείες καθώς παρουσιάζουν ανοσολογικές ιδιαιτερότητες (Kotzia & Labrou, 2005; Warangkar & Khobragade, 2009).

Επιπλέον η χρήση του ως θεραπευτική ουσία, περιορίζεται λόγω του μικρού χρόνου παραμονής στον οργανισμό υπό δραστική μορφή και των ανοσοδιεγερτικών παρενεργειών όπως αναφυλαξία. Οι περιορισμοί αυτοί οφείλονται στον μειωμένο χρόνο ημιζωής που περιορίζεται στις 18 ώρες στον άνθρωπο λόγω των πρωτεασών του αίματος (Κλώνης Ι., 1997; Kotzia & Labrou, 2005). Ο οργανισμός αναγνωρίζει ως "ξένο" σώμα το ένζυμο και ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα. Με την διαδικασία της πρωτεόλυσης, οι πρωτεάσες αποικοδομούν την L-aspar, μειώνοντας την αποτελεσματικότητά της στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Όσον αφορά τις ανοσοδιεγερτικές παρενέργειες αυτό

οφείλεται στην χαμηλή συγγένεια του ενζύμου προς το υπόστρωμα του. Αυτό που επιδιώκουμε να βελτιώσουμε είναι όσο το δυνατόν υψηλή συγγένεια του ενζύμου έναντι του υποστρώματος.

Οι περιορισμοί που αναφέραμε παραπάνω αντιμετωπίζονται με χημική τροποποίηση του ενζύμου με πολυαιθύλενο γλυκόλη (PEG) (Kozlowski & Harris, 2001; Roberts et al., 2002; Caliceti & Veronese, 2003; Tsuberty et al., 2004).

1.3 Καθαρισμός του ενζύμου L-ASNase με χρωματογραφία συγγένειας και ανταλλαγής ιόντων

Το σύστημα χρωματογραφίας συγγένειας αποτελείται από τη στατική φάση (stationary phase) και την κινητή φάση. Η στατική φάση αποτελείται από τον φορέα που μπορεί να είναι κάποιο υγρό, στερεό, πήκτωμα ή μικρό μόριο που ακινητοποιείται σε κάποιο αδιάλυτο πολυμερές. Το πολυμερές αυτό ονομάζεται φορέας και το σύστημα στατικής φάσης και φορέα λέγεται προσροφητής.

Με βάση την μέθοδο αυτή το ένζυμο που περιέχεται μαζί με άλλα βιομόρια στο ενζυμικό εκχύλισμα (κινητή φάση) περνάει μέσα από την στατική φάση της στήλης. Καθώς η κινητή φάση ρέει μέσω της στατικής φάσης, τα βιομόρια που περιέχει εκκλύονται. Τα μόρια που έχουν μικρότερη τάση να προσροφηθούν μετακινούνται γρηγορότερα προς το κάτω μέρος της στήλης σε σχέση με το ένζυμο που προσροφάτε λόγω μεγαλύτερης συγγένειας με τον προσροφητή L-ασπαρτικό οξύ.

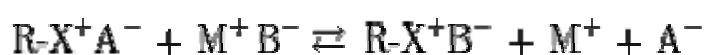
Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων είναι μια διαδικασία που επιτρέπει το διαχωρισμό των ιόντων και των πολικών μορίων βάση του φορτίου τους. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σχεδόν για οποιοδήποτε είδος μορίου συμπεριλαμβανομένων των μεγάλων πρωτεϊνών, των μικρών νουκλεοτιδίων και αμινοξέων. Διατηρεί αναλυτά τα μόρια στη στήλη με βάση ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Η σταθερή φάση στην επιφάνεια της εμφανίζει ιοντικές λειτουργικές ομάδες (RX), που αλληλεπιδρούν με τα ιόντα αντίθετου φορτίου της αναλύομενης ουσίας. Αυτό το είδος της χρωματογραφίας υποδιαιρείται σε χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων και χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων. Η ιοντική ένωση που

αποτελείται από τα ιονικά είδη (M⁺) και (B⁻) μπορεί να παρακρατηθεί από τη στατική φάση.

Η χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων διατηρεί τα θετικά φορτισμένα ιόντα επειδή η στατική φάση εμφανίζει μια αρνητικά φορτισμένη λειτουργική ομάδα:



Αντίστοιχα, στην χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων διατηρούνται τα ανιόντα επειδή η στατική φάση εμφανίζει μια θετικά φορτισμένη λειτουργική ομάδα:



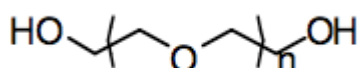
Σημειώστε ότι η δύναμη των ιόντων C⁺ ή A⁻ στην κινητή φάση μπορεί να προσαρμοστεί στο μετατόπιση της θέσης ισορροπίας και συνεπώς στο χρόνο διατήρησης.

Οι πρωτεΐνες έχουν πολλές λειτουργικές ομάδες που μπορεί να έχουν τόσο θετικά όσο και αρνητικά φορτία. Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων χωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το φορτίο τους, που εξαρτάται από τη σύνθεση της κινητής φάσης. Με τη ρύθμιση του pH ή της συγκέντρωσης ιόντων της κινητής φάσης, διάφορα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να διαχωριστούν. Για παράδειγμα, αν μια πρωτεΐνη έχει ένα καθαρό θετικό φορτίο σε pH=7, τότε θα συνδεθεί με μια στήλη από αρνητικά φορτισμένα σφαιρίδια, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δεν θα συνδεθεί. Με την αλλαγή του pH, η πρωτεΐνη θα πρέπει να έχει εκλουστεί.

1.4 Χημική τροποποίηση L-ασπαραγινάσης με πολυαιθύλενο γλυκόλη (PEG)

Τα κυριότερα προβλήματα στην χρήση θεραπευτικών πρωτεϊνών όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι η πρωτεόλυση τους, ο περιορισμένος χρόνος ημιζωής και οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας (Veronese, 2000; Deiters et al., 2004; Brocchini et al. 2007; Fishburn, 2007). Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων τροποποιούμε τις πρωτεΐνες με την χημική ένωση πολυαιθύλενο γλυκόλη (PEG).

Η PEG είναι ένα συνθετικό πολυμερές αιθέρα, ολιγομερές ή πολυμερές, συνήθως κατασκευασμένα με υδατική ανιονικού πολυμερισμού οξειδίου του αιθυλενίου, με μοριακό βάρος μεταξύ 1000- 50.000g/mol (Greenwald et al., 2002). Υπάρχουν διάφορες μορφές PEG που είναι διαθέσιμες και εξαρτώνται από την χρήση τους στην μέθοδο πολυμερισμού, οι συχνότερες από τις οποίες αποτελεί ο μονολειτουργικός μέθυλο αιθέρας PEG (methoxy poly(αιθυλενογλυκόλης), συντομογραφία MPEG. Η πολυαιθύλενο γλυκόλη έχει την παρακάτω δομή (Εικόνα 1.4): HO-CH₂-(CH₂-O-CH₂)_n-CH₂-OH.



Εικόνα 1.4 Δομή της πολυαιθύλενο γλυκόλης.

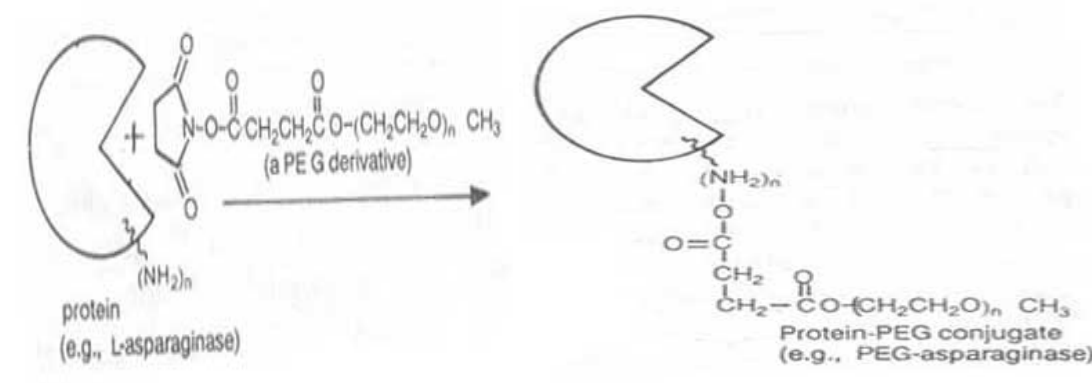
Αξίζει να αναφερθεί πως τα αντιδραστήρια PEG κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, στην πρώτη είναι αυτά της πρώτης γενιάς με χαμηλό μοριακό βάρος (<20kDa) αποτελούμενα από γραμμικά πολυμερή PEG. Ωστόσο λόγω της χημείας που χρησιμοποιήθηκε για την σχεδίαση τους, δημιουργούσε προβλήματα όπως παρενέργειες, μη αποτελεσματική σύνδεση με τα πολυπεπίδια. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν αυτά της δεύτερης γενιάς με υψηλό μοριακό βάρος (>20kDa), τα οποία σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να αποφεύγονται τα προβλήματα χρήσης της πρώτης γενιάς όπως έλλειψη επιλεκτικότητας τροποποίησης, ασταθείς δεσμούς (Greenwald, 2001; Roberts et al., 2002).

Οι ιδιότητες που θα έχει ένα αντιδραστήριο πολυαιθύλενο γλυκόλης εξαρτώνται από τον αριθμό των αλυσίδων PEG που ενώνονται στο πολυπεπίδιο, το μοριακό βάρος και η δομή των αλυσίδων της PEG, οι θέσεις που έχουν οι αλυσίδες πάνω στο πολυπεπίδιο και τέλος και σημαντικότερο η χημεία που εφαρμόστηκε για να γίνει η σύνδεση της PEG στο πολυπεπίδιο (Roberts et al., 2002).

Η πολυαιθύλενο γλυκόλη ξεκίνησε να χρησιμοποιείται στον φαρμακευτικό χώρο το 1990, όταν ο αμερικανικός οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων (FDA) χορήγησε την άδεια κυκλοφορίας του τροποποιημένου φαρμάκου διαμινάση της αδενοσίνης (Fishburn, 2007). Οι λόγοι έγκρισης της ήταν καθαρά φαρμακευτικοί διότι παρουσίαζε ορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως διαλυτότητα σε υδατικό διάλυμα, έλλειψη τοξικότητας, υψηλή κινητικότητα σε διαλύματα, έλλειψη ανοσογονικότητας, συγκεκριμένη συσσώρευση σε

όργανα του ασθενούς και εύκολη απομάκρυνση από τον οργανισμό (Kozlowski & Harris, 2001; Fee & Alstine, 2005; Pasut & Veronese, 2007).

Τα μόρια της πολυαιθύλενο γλυκόλης συνδέονται μέσω ομοιοπολικού δεσμού στις ε-αμινομάδες του αμινοξέος λυσίνης (Lys) του ενζυμικού μορίου (Εικόνα 1.5). Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι μεταξύ της νουκλεόφιλης αμινομάδας της πρωτεΐνης με μια ηλεκτρονιόφιλη ομάδα της PEG (Koumenis et al., 2000). Η λυσίνη είναι το τρι-λειτουργικό αμινοξύ που δρα ως βραχίονας, όπου δύο μόρια PEG συνδέονται με τις α- και ε-αμινομάδες ενώ η καρβοξυλική ομάδα ενεργοποιείται ως -OSu (Veronese, 2000). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούμε ένα προστατευτικό κάλυμμα γύρω από την επιφάνεια της ασπαραγινάσης προστατεύοντας την από τις πρωτεάσες. Το ποσοστό σύνδεσης ανέρχεται στο 64%. Δημιουργώντας το χημικό σύμπλοκο L-ασπαραγινάσης-PEG, επιτυγχάνουμε 50% διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας, μείωση των αντιδράσεων υπερευαισθησίας και αύξηση του χρόνου ημιζωής (Κλώνης Ι., 1997).



Εικόνα 1.5 Σχηματική παρουσίαση της αντίδρασης της L-ασπαραγινάσης με την PEG, σχηματίζοντας το αντίστοιχο τροποποιημένο σύμπλοκο.

1.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν η ανάπτυξη βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού του ενζύμου L-ASNase από *Erwinia chrysanthemi* χρησιμοποιώντας τόσο χρωματογραφία συγγένειας όσο και χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Επιπλέον μελετήθηκε η χημική τροποποίηση της L-ασπαραγινάσης με δραστικό

ανάλογο πολυαιθύλενο γλυκόλης (PEG), με στόχο τη δημιουργία τροποποιημένου ενζύμου που να παρουσιάζει υψηλότερη δραστική σταθερότητα και βελτιωμένα ανοσολογικά χαρακτηριστικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Βιολογικά υλικά

Για την έκφραση του ενζύμου L-ASNase II χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος των κυττάρων *E. coli* BL21 (DE) Rosetta μετασχηματισμένο με TOPO φορέα που περιείχε το γονίδιο της L-asparaginase II από *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia & Labrou, 2007).

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Για την ανάπτυξη και έκφραση της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος TB. Η τρυπτόνη (ενζυματική πέψη από καζεΐνη) και το αντιβιοτικό χλωροαμφενικόλη (cn), [C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅, Mr=323,14] αγοράστηκε από την εταιρεία Fluka (Ελβετία). Το εκχύλισμα ζύμη σε σκόνη (yeast extract) και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (amp) [C₁₆H₁₈N₃O₄SNa, Mr=371,4] αγοράστηκαν από την εταιρεία Serva (Γερμανία). Η γλυκερόλη (CH₂(OH).CH(OH).CH₂(OH), Mr=92.09) αγοράστηκε από την εταιρεία BDH (Αγγλία) και τον επαγωγέα έκφρασης ισοπρόπυλο1-β-D-θειογάλακτοζίδιο (IPTG) από την εταιρεία HT (Η.Π.Α.).

Για την χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια χλωριούχο νάτριο NaCl (Mr=58,44g/mol), το δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH₂PO₄ (Mr=136,09 g/mol, σκόνη) αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Το οξικό νάτριο CH₃COONa (Mr=82,03g/mol) αγοράστηκε από την εταιρεία Riedel-de Haen (Γερμανία) και το Tris-HCl (Trizma base, minimum 99,9% titration, C₄H₁₁NO₃, F.W=121.14, σκόνη) από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.). Επίσης, το L-ασπαργινικό οξύ (aspartic acid, C₄H₇NO₄, Mr=133,11g/mol), καθαρότητα >99% από την εταιρεία Fluka (Ελβετία).

Στην χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων σε ανταλλάκτη ανιόντων S-Sepharose FF της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α) και σε ανταλλάκτη κατιόντων χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια το χλωριούχο νάτριο NaCl (Mr=58,44g/mol), το δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH₂PO₄ (Mr=136,09g/mol, σκόνη) αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Το οξικό νάτριο CH₃COONa (Mr=82,03g/mol) αγοράστηκε από την εταιρεία Riedel-de Haen (Γερμανία).

Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό της L-ASNase II χρησιμοποιήθηκαν το αντιδραστήριο Nessler's reagent ($K_2[HgI_4]$) και το Tris-HCl (Trizma base, minimum 99,9% titration, $C_4H_{11}NO_3$, F.W=121.14, σκόνη) της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α). Από την εταιρεία Fluka(Ελβετία) αγοράστηκε η L-ασπαραγίνη άνυδρη ($C_4H_8N_2O_3$, Mr=132.12) και από την εταιρεία Merck (Γερμανία) αγοράστηκε το τριχλωροξικό οξύ (TCA) [trichloroacetic acid, CCl_3COOH , Mr=163.39g/mol, solid, assay (acidimetric) >99,5%].

Για τον προσδιορισμό πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250) και η πρωτεΐνη αλβουμίνη (BSA) που αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck και Sigma-Aldrich (Η.Π.Α) αντίστοιχα.

Για την χημική τροποποίηση της L-ASNaseII χρησιμοποιήθηκε το δραστικό ανάλογο της PEG (N-υδροξυ-ηλεκτρικός εστέρας της ηλεκτρικής μεθοξυ-πολυαιθυλενογλυκόλης) που αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α). Επίσης, από την ίδια εταιρεία αγοράστηκε το TEMED. Το APS αγοράστηκε από την εταιρεία Applichem (Γερμανία). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν η αιθανόλη της εταιρείας Panreac (PRS, Ισπανία), η ακετόνη από την εταιρεία Lab-scan και η γλυκερόλη από την εταιρεία BDH (Αγγλία).

Ο καθαρισμός του ενζύμου έγινε με τη βοήθεια του προσροφητή 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρας-L-ασπαρτικό οξύ-Sepharose CL-6B (χρωματογραφία συγγένειας) και στους προσροφητές DEAE-Sepharose ανταλλάκτης κατιόντων και S-Sepharose FF ανταλλάκτης ανιόντων της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α).

2.2 Εξοπλισμός

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συσκευές:

- Για την πεχαμέτρηση των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε χρήση της συσκευής ORION μοντέλο 410A.
- Οι φυγόκεντροι που χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή κυττάρων και για τον διαχωρισμό των κυτταρικών θραυσμάτων και του ενζυμικού εκχυλίσματος ήταν Heraeus Instruments Biofuge primo και eppendorf centrifuge 5804R.

- Για το λύσιμο των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υπερήχων Sonics & Materials Inc Vibra Cell.
- Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε σε συσκευή της εταιρείας Hoefer H.P.A, μοντέλο SE 600, η οποία είναι συνδεδεμένη με τροφοδοτικό SP 500x Ta (500 Volt,400 mA) της ίδιας εταιρείας.
- Υδατόλουτρο της εταιρείας BIBBY, Stuart Scientific.
- Ξηρό σύστημα επώασης, shaking Incubator, LabTech, Daihan LabTech, Co., LTD
- Ο ενζυμικός προσδιορισμός έγινε με το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer UV/Vis spectrometer της εταιρείας Lambda Bio.
- Η φωτογράφιση των πηκτών ηλεκτροφόρησης έγιναν στην φωτογραφική συσκευή Mini Bis Pro 25mm της εταιρείας Kodak.

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Ετερόλογος έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάσης από *Erwinia chrysanthemi* σε *E. coli BL21 (DE3) Rosetta* με φορέα TOPO

Η καλλιέργεια των κυττάρων για την έκφραση της L-ασπαραγινάσης πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο TB, η σύσταση του οποίου είναι: 6g/L τρυπτόνης, 12g/L εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και 2mL/Λ γλυκερόλης. Στην κωνική φιάλη προστέθηκαν 500mL θρεπτικού και τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (amp) και χλωροαμφενικόλη (cp) σε τελικές συγκεντρώσεις 100μg/mL και 34μg/mL, αντίστοιχα στην καλλιέργεια. Στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε για να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: αρχικά ποσότητα όγκου 50mL TB, με τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και χλωροαμφενικόλη εμβολιάστηκε με 20μL μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli BL21 (DE3) Rosetta*. Η παραπάνω σύνθεση αποτέλεσε την προκαλλιέργεια των κυττάρων, η οποία επώαστηκε υπό ανάδευση για 12-16h στους 37°C. Στη συνέχεια εμβολιάζουμε με την προκαλλιέργεια και αφήνουμε για επώαση 45min-1,5h στους 37°C. Κατά τη διάρκεια της επώασης αφαιρούμε ανά τακτά χρονικά διαστήματα 1mL και φωτομετρούμε στα 600nm, έως η οπτική απορρόφηση (O.D) της καλλιέργειας είναι περίπου 0,6-0,7. Σε αυτό το στάδιο προσθέτουμε τον επαγωγέα IPTG συγκέντρωσης 1mM, ώστε να επαχθεί η έκφραση του ενζύμου. Μετά την προσθήκη

του IPTG η ανάπτυξη της καλλιέργειας συνεχίζεται για 36-37h. Μετά το πέρας της επώασης η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 8000rpm για 20min στους 4°C για να γίνει η συλλογή της πάστας των κυττάρων και του υπερκείμενου διαλύματος το οποίο περιέχει μεγάλη ποσότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Η πάστα κυττάρων και το υπερκείμενο συντηρούνται στους -20°C έως να χρησιμοποιηθούν.

2.3.2 Λύση των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος

Η λύση των κυττάρων έγινε με την επίδραση υπερήχων. Η επίδραση αυτή ακολουθήθηκε για 6 φορές διάρκειας 10 δευτερολέπτων με ενδιάμεσα διαλείμματα 1min. Κατά τη διάρκεια της λύσης το δείγμα διατηρείται στον πάγο, για να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών από την παραγόμενη θερμότητα από τους υπερήχους. Μετά το πέρας της διαδικασίας ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000rpm για 20min (4°C), ώστε να συλλέξουμε το υπερκείμενο που περιέχει το ανασυνδυασμένο ένζυμο.

2.3.3 Διαπίδυση

Σε διαπίδυση υποβλήθηκε το ενζυμικό εκχύλισμα (ενδοκυτταρικής ή εξοκυτταρικής έκφρασης), που λάβαμε έπειτα από φυγοκέντρηση. Μέσω αυτής της διαδικασίας απομακρύνονται από το ενζυμικό εκχύλισμα τυχόν προϊόντα του μεταβολισμού του κυττάρου αλλά και ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Βελτιώνουμε έτσι την χρωματογραφική συμπεριφορά του εκχυλίσματος. Επιπλέον, με την διαπίδυση απομακρύνονται ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση του ενζύμου, όπως η PEG και ρυθμίζουμε το pH ώστε να γίνει πιο εύκολη η πρόσδεση του ενζύμου στον δεσμευτή. Η διαδικασία διαπίδυσης επιτυγχάνεται μέσω ωσμωτικών φαινομένων σε 18–24h στους 4°C. Τα ενζυμικά εκχυλίσματα τοποθετούνται σε ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) με όριο αποκλεισμού 12kDa. Χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα (20mM φωσφορικών KH_2PO_4 , pH=7.5) σε όγκους 1000mL έως 5000mL.

2.3.4 Καθαρισμός του ενζύμου με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας και χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.

2.3.4.1 Πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας

Αρχικά, η στήλη με τον προσροφητή που είναι συνδεδεμένο το L-ασπαραγινικό οξύ αναγεννάτε με 20mL από τα εξής διαλύματα: 2M NaCl διαλυμένο σε 20mM Pi, pH=7,5, 0,1M CH₃COONa με 1M NaCl, pH=5,5 διαλυμένο σε ddH₂O και 0,1M Tris-HCl με 1M NaCl, pH=8,5. Ακολουθεί η εξισορρόπηση του προσροφητή με 25mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 20mM, pH=7,5. Στη συνέχεια φορτώνεται το δείγμα που περιέχει το ένζυμο, αφού πρώτα έχει υποστεί διαπίδυση. Κατόπιν παραλαμβάνουμε την ποσότητα του εκχυλίσματος που δεν προσδέθηκε στη στήλη. Ακολουθεί πλύσιμο της στήλης με 50mL ddH₂O (4°C) και εν συνεχεία ακολουθεί η έκλυση του ενζύμου με 10mL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει L-Asp (20mM) σε 20mM Pi, pH=7,5. Η συνολική εκλούμενη ποσότητα παραλαμβάνεται σε κλάσματα του 1mL. Μετά το τέλος της έκλυσης επαναλαμβάνεται το στάδιο της αναγέννησης και η στήλη συντηρείται με 3-4mL 20mM Pi, pH=7,5. Σε κάθε κλάσμα γίνεται ενζυμικός προσδιορισμός με το αντιδραστήριο Nessler και όπου επιθυμούμε γίνεται και ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.

2.3.4.2 Πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων σε προσροφητή S-Sepharose FF

Μετά την έκφραση, ανασυνδυασμένα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνα falcon και προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM φωσφορικών, pH=5,5. Μετά τη λύση των κυττάρων και την φυγοκέντρηση (Παράγραφος 2.3.2) το υπερκείμενο φορτώνεται στη στήλη. Εξισορροπούμε την στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα 20mM φωσφορικών, pH=5,5 (50-60mL συνολικά). Φορτώνουμε το υπερκείμενο και συλλέγουμε σε falcon το εκχύλισμα που δεν προσδέθηκε στην στήλη.

Μετά από το στάδιο αυτό ξεπλένουμε με 15mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 20mM, pH=7,5 και γίνεται η έκλυση του ενζύμου με 15mL φωσφορικών 20mM, pH=8,5. Η εκλούμενη ποσότητα συλλέγεται σε 5 κλάσματα των 2mL. Τέλος, γίνεται αναγέννηση της στήλης με 10mL από τα εξής διαλύματα: 2M NaCl διαλυμένο σε 20mM Pi, pH=7,5, 0,1M CH₃COONa με 1M NaCl, pH=5,5. Η στήλη συντηρείται με 2-3mL ρυθμιστικού διαλύματος Pi, 20mM, pH=7,5.

2.3.4.3 Πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων σε προσροφητή DEAE- Sepahrose

Τα πρώτα στάδια για την συλλογή του υπερκείμενου είναι ίδια όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενο πρωτόκολλο. Αρχικά, εξισορροπούμε την στήλη με 10mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 20mM, pH=8,5. Φορτώνουμε το υπερκείμενο και συλλέγουμε την ποσότητα του ενζυμικού διαλύματος που δεν προσδέθηκε στον προσροφητή. Ακολουθεί πλύσιμο της στήλης με 10mL φωσφορικών 20mM Pi, pH=8,5. Έπειτα το ένζυμο εκλύεται με διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών (20mM, pH=8,5) που περιέχει NaCl (0.05-0.3M) σε έξι κλάσματα των 4mL σε διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως φαίνεται παρακάτω:

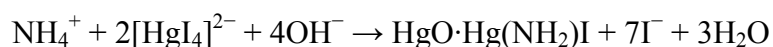
- 20mM Pi, pH=8,5 σε υδατικό διάλυμα 0,05M NaCl
- 20mM Pi, pH=8,5 σε υδατικό διάλυμα 0,1M NaCl
- 20mM Pi, pH=8,5 σε υδατικό διάλυμα 0,15M NaCl
- 20mM Pi, pH=8,5 σε υδατικό διάλυμα 0,2M NaCl
- 20mM Pi, pH=8,5 σε υδατικό διάλυμα 0,25M NaCl
- 20mM Pi, pH=8,5 σε υδατικό διάλυμα 0,3M NaCl

Μετά την έκλυση του ενζύμου, πραγματοποιείται αναγέννηση της στήλης με 10mL από τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα: 2M NaCl διαλυμένο σε 20mM Pi, pH=7,5 και 0,1M CH₃COONa με 1M NaCl, pH=5,5 διαλυμένο σε ddH₂O. Η στήλη συντηρείται με 2-3mL ρυθμιστικού διαλύματος Pi, 20mM, pH=8,5. Στο πείραμα αυτό φορτώθηκαν τα 2mL καθαρού ενζύμου από την έκλυση 2 από τον καθαρισμό σε ανταλλάκτη ανιόντων S-Sepharose FF. Εν συνεχεία ακολούθησαν όλα τα παραπάνω στάδια.

2.3.5 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηρότητας της L-ασπαραγινάσης

Η δραστηρότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε με την βοήθεια του αντιδραστηρίου Nessler. Το αντιδραστήριο Nessler είναι ένα διάλυμα τετρα-ιωδο-υδραργύρου (0.09mol/L, K₂[HgI₄]) και υδροξείδιο του καλίου (2.5mol/L, KOH). Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αμμωνίας και αμμωνιακών αλάτων. Όταν υπάρχουν αμμωνιακά ιόντα, πραγματοποιείται σχηματισμός χρώματος σε υποκίτρινο-πορτοκαλί. Η μέθοδος έχει ευαισθησία

προσδιορισμού >0.3μg NH₃ ανά μονάδα όγκου (mL) διαλύματος. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η παρακάτω:



Αρχικά, για τον ενζυμικό προσδιορισμό προσθέτουμε σε erpendorf 850-940μL υποστρώματος, που είναι η L-ασπαραγίνη συγκέντρωσης 0.01M σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,01M, pH=8,2. Έπειτα σε άλλο erpendorf, που είναι ο μάρτυρας, προσθέτουμε όλα τα προηγούμενα μαζί με 50μL τριχλωροξικό οξύ (TCA). Το TCA το προσθέτουμε εξ' αρχής στον μάρτυρα για να γίνει η μετουσίωση του ενζύμου όταν προστεθεί, για να μην γίνει η αντίδραση. Στα δύο erpendorfs προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος και ενζυμικού εκχυλίσματος, σε τελικό όγκο 1050μL. Στη συνέχεια επωάζονται στους 37°C 20min. Μετά την επώαση, προσθέτουμε γρήγορα 50μL TCA στο δείγμα για να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση και φυγοκεντρούμε στις 13.000rpm για 2min. Αυτό γίνεται ώστε να κατακρημνιστούν οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Εν συνεχεία, σε κυβέτα των 4mL προσθέτονται 3,5mL νερό, 250μL από το υπερκείμενο του κάθε erpendorf και 0,5mL αντιδραστήριο Nessler. Οι κυβέτες, εξισορροπούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min ανακινώντας συχνά. Τέλος, με τον μάρτυρα μηδενίζουμε το φωτόμετρο στα 436nm και μετράμε αντίστοιχα το δείγμα.

2.3.6. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595nm. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,04mg/mL έως 0,20mg/mL (40–200μg/mL).

Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής: Η χρωστική (100mg) διαλύεται σε 100mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50%v/v). Στο διάλυμα προστίθενται 100mL πυκνού φωσφορικού οξέος (85%w/v). Όλα τα υλικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που προκύπτει αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford, το οποίο διατηρείται στους 25°C.

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το παραπάνω αντιδραστήριο αραιώνεται με νερό σε αναλογία ¼ δηλαδή 1 μέρος πυκνού αντιδραστηρίου Bradford και 4 μέρη νερού και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 25°C για 24h. Για τον προσδιορισμό αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης, σε 950μL του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται 50μL πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10μg πρωτεΐνης. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 25°C για 20-35min σε σκοτεινό μέρος και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595nm, έχοντας ως αναφορά διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη (σε 950μL του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται 50μL δις αποσταγμένου νερού). Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς, από την οποία υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης. Η καμπύλη αναφοράς σχεδιάζεται έχοντας ως πρότυπο γνωστές ποσότητες (2-10mg) αλβουμίνης από ορό μόσχου.

Συγκεκριμένα για το εξωκυττάριο ενζυμικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες: στο μη προσροφημένο κλάσμα (flow through), στην πλύση (wash) και στις πέντε πρώτες εκλούσεις με 900μL αραιωμένο διάλυμα Bradford και 100μL εκχυλίσματος από κάθε κλάσμα. Στους μάρτυρες αντίστοιχα είχαμε 900μL αραιωμένο διάλυμα Bradford και 100μL ρυθμιστικό διάλυμα.

Για το ενδοκυττάριο ενζυμικό εκχύλισμα, το οποίο επεβλήθη σε καθαρισμό ανταλλαγής ιόντων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες: στο μη προσροφημένο κλάσμα (flow through) και στην πλύση (wash) χρησιμοποιήσαμε 950μL αραιωμένο διάλυμα Bradford και 50μL εκχυλίσματος. Αντίστοιχα στους μάρτυρες είχαμε 950μL αραιωμένο διάλυμα Bradford και 50μL απιονισμένο νερό. Στις εκλούσεις χρησιμοποιήσαμε 900μL αραιωμένο διάλυμα Bradford και 100μL ένζυμο και στους μάρτυρες αντίστοιχα είχαμε 900μL αραιωμένο διάλυμα Bradford και 100μL ρυθμιστικό διάλυμα.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης έγινε με τον παρακάτω τύπο :

$$c = A * V_{\text{τελ}} / \epsilon * l * V_{\text{ενζ}}$$

όπου A: τιμή απορρόφησης στα 595nm

V_{τελ}: τελικός όγκος δείγματος

V_{ενζ}: όγκος ενζύμου

ε: κλίση πρότυπης καμπύλης Bradford

l: μήκος οπτικής διαδρομής (cm)

Σε όσα δείγματα έγινε mini Bradford χρησιμοποιήθηκε ο τύπος: $c=A* V_{\text{τελ}} / 0.05*80$, όπου $V_{\text{τελ}}=1000\mu\text{L}$.

2.3.7 Τροποποίηση της L-ASNaσης με πολυαιθύλενο γλυκόλη (PEG)

Στην παρούσα εργασία εκτός από τη μελέτη καθαρισμού του ενζύμου μας απασχόλησε και το θέμα της τροποποίησης της L-ASNase με την ένωση πολυαιθύλενο γλυκόλη (PEG). Στόχος μας ήταν να μελετήσουμε την επίδραση της PEG στη λειτουργικότητα του ενζύμου. Στο πείραμα που διεξήγαμε χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές ποσότητες 0,1-4mg από PEG και τις προσθέσαμε στο ένζυμο διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα NaCl 2M σε 20mM Pi, pH=7,5 και σε 20mM Pi, pH=8,5. Εν συνεχεία προσδιορίσαμε την ενζυμική δραστηριότητα της L-ASNaσης. Αρχικά για το πρώτο πείραμα έγινε τροποποίηση στο εξωκυττάριο ένζυμο και συγκεκριμένα σε ποσότητα 2mL κλάσματος έκλουσης που πήραμε από τον καθαρισμό ενζυμικού εξωκυττάρου εκχυλίσματος με χρωματογραφία συγγένειας, προσθέσαμε 1mg PEG.

Εν συνεχεία διεξήγαμε έναν δεύτερο πείραμα μεταβάλλοντας την ποσότητα της PEG. Σε 4 μικρά πλαστικά falcon προσθέσαμε 3mL καθαρού ενζύμου (αφού ακολούθησε καθαρισμός σε χρωματογραφική στήλη συγγένειας) και 0,1mg PEG, 0,5mg PEG, 1mg PEG, 2mg PEG. Αφήσαμε για επώαση στους 4°C όλο το βράδυ.

Ακολούθως, για την τροποποίηση ενδοκυττάρου ενζύμου χρησιμοποιήσαμε 3mL καθαρού ενζύμου, έπειτα από τον καθαρισμό του με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Χωρίσαμε τα 3mL ενζύμου σε έξι erpendorf των 1,5mL ανά 0,5mL το καθένα. Το ένα erpendorf δεν προσθέσαμε PEG ενώ στα άλλα πέντε προσθέσαμε με τη σειρά 0,1mg PEG, 0,5mg PEG, 1mg PEG, 2mg PEG, 4mg PEG.

2.3.8 Λυοφιλίωση

Κατά τη διάρκεια του πειράματος έτυχε να έχουμε πολύ αραιά δείγματα πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της να είναι πολύ μικρότερη από την απαιτούμενη για να τα ηλεκτροφορήσουμε. Έτσι, με την λυοφιλίωση, μειώνουμε τον όγκο των δειγμάτων με εξάχνωση, ώστε να συμπυκνώσουμε το διάλυμα με την πρωτεΐνη. Τα δείγματα ετοιμάζονται σε erpendorf, στα οποία έχουν ανοιχτεί μικρές τρύπες. Στην συνέχεια

τοποθετούνται σε φλάσκα στη συσκευή λυοφιλίωσης, η οποία ψύχεται μεταξύ -50°C και -80°C . Μετά από εφαρμογή χαμηλής πίεσης για 24h, παραλαμβάνονται τα δείγματα σε στερεή μορφή στην βάση των erpendorf και στη συνέχεια τα επαναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο.

2.3.9 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση TCA

Χρησιμοποιείται για τους ίδιους λόγους όπως και η λυοφιλίωση. Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και κατακρημνίζονται, με μεταβολή του pH παρουσία TCA.

Παρακάτω περιγράφονται τα στάδια του πρωτόκολλου κατακρήμνισης:

1. Σε έναν όγκο πρωτεϊνικού δείγματος προστίθενται 4 όγκοι 1,5M TCA.
2. Επιάζουμε στον πάγο για 20min, μετά την προσθήκη του TCA.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για 9min στις 13.000rpm.
4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 150μL παγωμένης ακετόνης (-20°C) και φυγοκεντρούμε στις 13.000rpm για 8min.
5. Απομακρύνουμε την ακετόνη και επαναλαμβάνουμε το στάδιο 4 για άλλη μια φορά.
6. Τοποθετούμε το erpendorf στο υδατόλουτρο (95°C) για 5-8min για να εξατμιστεί η ακετόνη.

2.3.10 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε ασυνεχή πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκαθειϊκού νατρίου (SDS)

Η μελέτη προσδιορισμού της καθαρότητας της L-ASNase πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης (μέθοδος Laemmli, 1970). Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το φορτίο των πλευρικών ομάδων τους. Στην ηλεκτροφόρηση σε ασυνεχή πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS χρησιμοποιούνται δύο πηκτές ακρυλαμιδίου τοποθετημένες σε σειρά. Στην πάνω πηκτή, λεγόμενη και πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) εισάγονται τα δείγματα. Αυτή έχει χαμηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (5%w/v) και προκαλεί συσσώρευση σε στενές ζώνες του πρωτεϊνικού δείγματος πριν εισέλθει στην πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η πηκτή αυτή έχει υψηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (8-20%w/v).

Παρουσία όμως SDS ο διαχωρισμός γίνεται αποκλειστικά με την μοριακή μάζα και όχι με το φορτίο. Είναι ένα ισχυρό απορρυπαντικό που αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες και οδηγεί

στην ολική αποδιάταξη τους αυτών και των υπομονάδων τους ώστε να προκύψουν πολύ ανιονικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων. Επίσης, προσδίδει ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα πρωτεΐνης, ενώ η συγκέντρωση της πηκτικής δραστικής ως μοριακό κόσκινο, όπου το μέγεθος των πόρων της καθορίζουν την σχετική κινητικότητα. Παρακάτω ακολουθεί το πρωτόκολλο της μεθόδου, όπου η περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου 12,5%w/v.

Προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος πηκτικής διαχωρισμού (separating buffer)

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτικής διαχωρισμού (875μL) αναμειγνύονται με διάλυμα SDS 10%w/v (70μL), διάλυμα ακρυλαμιδίου 30%w/v (2,935μL), δις-απιονισμένο νερό (2.935μL), διάλυμα APS (170μL) και τέλος στον απαγωγό προσθέτουμε το TEMED (6.24μL) επειδή είναι καρκινογόνο. Αναδεύουμε το διάλυμα και το εισάγουμε σε γυάλινο κάθετο καλούπι και αφήνουμε να γίνει ο πολυμερισμός για 20-30min. Καλύπτουμε την επιφάνεια 1mL υδατικού διαλύματος βουτανόλης 50%, για αποτροπή δημιουργίας φυσαλίδων. Ξεπλένουμε έπειτα με νερό για 2-3 φορές και εισάγουμε την πηκτική συσσώρευσης (stacking gel). Αυτή αποτελείται από δις απιονισμένο νερό (3,450μL), ακρυλαμίδη 30% (625μL), διάλυμα επιστοίβαξης (625μL), APS (170μL), SDS 10%w/v (50μL) και TEMED (6,25μL). Αφήνουμε να γίνει ο πολυμερισμός για 20-30min. Ακολουθεί η παρασκευή του διαλύματος φόρτωσης (running buffer) που αποτελείται από 50mL running buffer και 450mL ddH₂O.

Προετοιμασία δειγμάτων

Για να ηλεκτροφορήσουμε τα δείγματα μας προηγήθηκε ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford. Προετοιμάζουμε το δείγμα συγκέντρωσης 50μg, που διαλύεται με 20μL loading buffer. Τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο στους 95°C για 5min. Ακολουθεί vortex και spin. Το loading buffer (1X SDS gel-loading buffer) αποτελείται από: 50mM Tris-Cl (pH=6.8), 100mM dithiothreitol, 2%w/v SDS, 0,1%w/v μπλέ βρωμοφαινόλη, 10%w/v γλυκερόλη. Φορτώνουμε τα δείγματα στα αυλάκια της πηκτικής μέχρι τα 20μL ενώ χρησιμοποιούμε και 10μL από τον μάρτυρα. Συνδέουμε τα ηλεκτρόδια με την συσκευή παροχής ρεύματος, ρυθμίζοντας την ένταση στα 20mA.

Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250

Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (45%v/v), οξικό οξύ (7%v/v) και Coomassie Brilliant Blue (0,25–1%w/v), για 20min. Στη συνέχεια η πηκτή αποχρωματίζεται για 1h στο υδατικό διάλυμα Destayning I: μεθανόλη (40%v/v) και οξικό οξύ (7%v/v) ενώ αφήνεται όλη την νύχτα στο Destayning II: μεθανόλη (5%v/v) και οξικό οξύ (7%v/v).

2.3.11 Τυπολόγιο

Για τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες του κεφαλαίου 3, οι υπολογισμοί έγιναν με τους εξής εξισώσεις:

- Για τον υπολογισμό των ενζυμικών μονάδων: $U/mL = A \cdot V_{ολ} / \epsilon \cdot t \cdot d \cdot V_{ενζ}$

όπου A: τιμή απορρόφησης στα 436nm

$V_{ολ}$: συνολικός όγκος αντιδράσεως

$V_{ενζ}$: όγκος ενζύμου

ϵ : συντελεστής μοριακής απορρόφησης

t: χρόνος επώασης

d: μήκος οπτικής διαδρομής (cm)

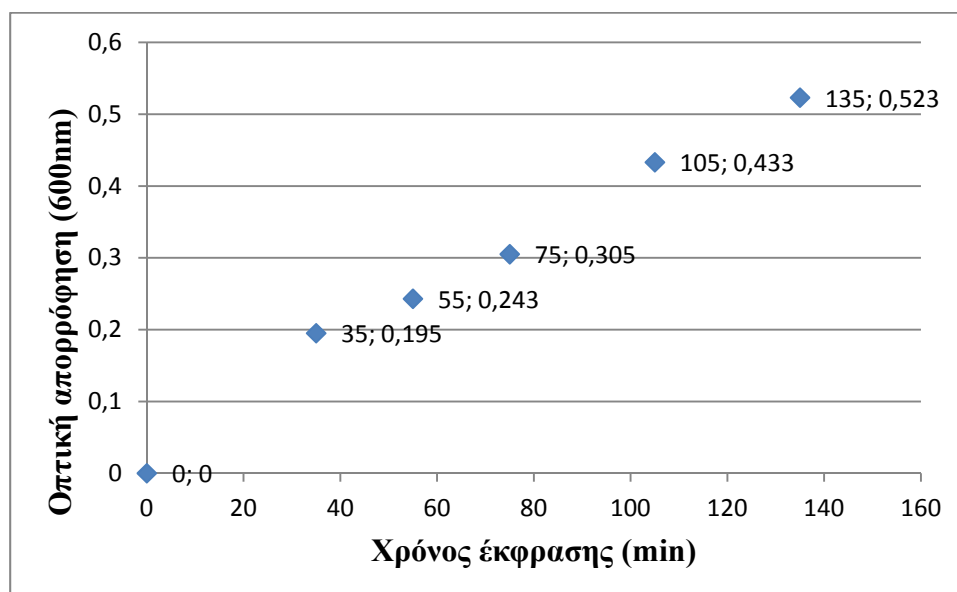
- Ειδική δραστηριότητα (SA): $SA = U/mL / C(mg/mL)$
- Απόδοση (Yield%)=[ενζυμικές μονάδες ανά mL έκλουσης * όγκο έκλουσης/ενζυμικές μονάδες ανά mL αρχικού εκχυλίσματος * όγκο αρχικού εκχυλίσματος] * 100
- Καθαρισμός (purification fold)=SA έκλουσης/ SA αρχικού εκχυλίσματος πριν τον καθαρισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ετερόλογη έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάση από *Erwinia chrysanthemi* σε *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta

Για την έκφραση του ενζύμου L-ασπαραγινάσης έγινε καλλιέργεια κύτταρων *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta σε θρεπτικό μέσο TB. Τα κύτταρα επώστηκαν για 36-37h στους 37°C. Κατά την διάρκεια επώασης και όταν η οπτική απορρόφηση (O.D) της καλλιέργειας είναι περίπου 0,6-0,7 (Εικόνα 1.1), προστίθεται IPTG συγκέντρωσης 1mM, ώστε να επαχθεί η έκφραση του ενζύμου.



Εικόνα 1.1 Διάγραμμα ανάπτυξης των κυττάρων *E. coli* BL21 (DE3) πριν της προσθήκης του επαγωγέα IPTG. Σε κάθε σημείο φαίνεται ο χρόνος επώασης (min) και η οπτική απορρόφηση (600nm).

3.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου καθαρισμού της L-ασπαραγινάσης

3.2.1 Ανάπτυξη πρωτόκολλου καθαρισμού εξωκυττάρου ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας

Πριν φορτώσουμε το ενζυμικό εκχύλισμα στην χρωματογραφική στήλη συγγένειας, υποβάλλεται σε διαπίδυση. Τοποθετήσαμε σε μεμβράνες κυτταρίνης 20mL εξωκυττάρου ενζυμικό εκχύλισμα σε 5L ρυθμιστικού διαλύματος 20mM φωσφορικών KH_2PO_4 , pH=7.5. Ο τύπος αгарόζης που χρησιμοποιήθηκε ως προφορητής ήταν Sepharose CL-6B με

δεσμευτή L-ασπαρτικό οξύ, ακινητοποιημένο με 1,4-βουτανεδιολ-διγλυκιδυλ-αιθέρα (Kotzia & Labrou, 2005, 2007).

Στην στήλη φορτώθηκαν 10mL με 141,16U. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.4.1. Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 1.2) παρουσιάζεται το χρωματογράφημα ακολουθώντας τα στάδια του πρωτοκόλλου. Παρατηρούμε πως η μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου λαμβάνεται στις εκλούσεις 2 και 3. Στις εκλούσεις 2 και 3 προσδιορίστηκαν 27,02U και 25,35U, αντίστοιχα.

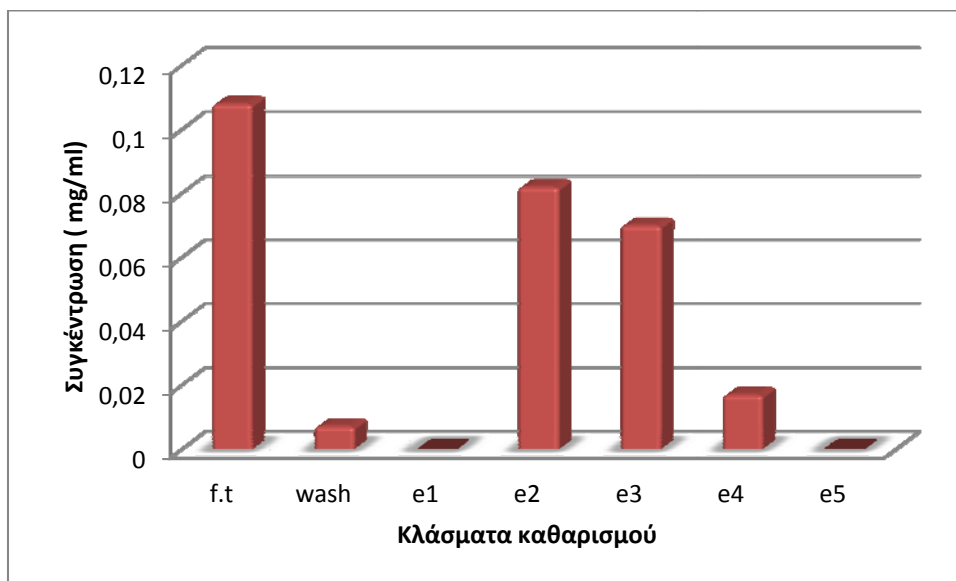


Εικόνα 1.2. Χρωματογράφημα καθαρισμού εξωκυττάριου ενζύμου στήλη συγγένειας.

Ακολούθως, στα κλάσματα μετά τον καθαρισμό πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της L-ασπαραγινάσης με την μέθοδο Bradford. Στην Εικόνα 1.3 και 1.4 παρουσιάζονται σε διάγραμμα οι απορροφήσεις των κλασμάτων στα 595nm και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, αντίστοιχα.



Εικόνα 1.3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford των κλασμάτων κατά τον χρωματογραφικό καθαρισμό.



Εικόνα 1.4. Διάγραμμα που απεικονίζει τη συγκέντρωση πρωτεΐνης κάθε κλάσματος.

Στον παρακάτω Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τον καθαρισμό του εξωκυττάριου ενζύμου. Το πρωτόκολλο καθαρισμού παρουσιάζει συνολική απόδοση 37% και λαμβάνουμε καθαρό ένζυμο με ειδική δραστητικότητα 329,51-362,14U/mg.

Πίνακας 1.1 Καθαρισμός του ενδοκυττάριου ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας.

	V (mL)	U/mL	U(units)	C (mg/mL)	SA (mg/mL)	Απόδοση (%)	Καθαρισμός (φορές)
crude	10	14,16	141,16	0,179	79,10	100	1
E2	1	27,02	27,02	0,082	329,51	19,1	4,17
E3	1	25,35	25,35	0,070	362,14	17,9	4,57

3.2.2 Ανάπτυξη πρωτόκολλου καθαρισμού ενδοκυττάριου ενζύμου με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.

Αυτό το είδος χρωματογραφίας χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για τον καθαρισμό του ενδοκυττάριου ενζύμου (Kotzia & Labrou, 2007). Αρχικά, ο πρώτος καθαρισμός του ενζύμου έγινε σε προσροφητή S-Sepharose FF, ο οποίος είναι ισχυρός ανταλλάκτης κατιόντων. Ο δεύτερος καθαρισμός έγινε σε προσροφητή DEAE-Sepharose, ο οποίος είναι ασθενής ανταλλάκτης ανιόντων.

3.2.2.1 Καθαρισμός ενδοκυττάριου ενζύμου σε ανταλλάκτη κατιόντων S-Sepharose FF

Φορτώθηκαν στην στήλη 4,5mL ενδοκυττάριου ενζύμου με 114,7U. Από τις αρχικές 114,7U εκλούστηκαν 187,5U στην δεύτερη έκλουση, καθώς σε αυτήν λάβαμε την μεγαλύτερη ποσότητα του καθαρού ενδοκυττάριου ενζύμου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5.

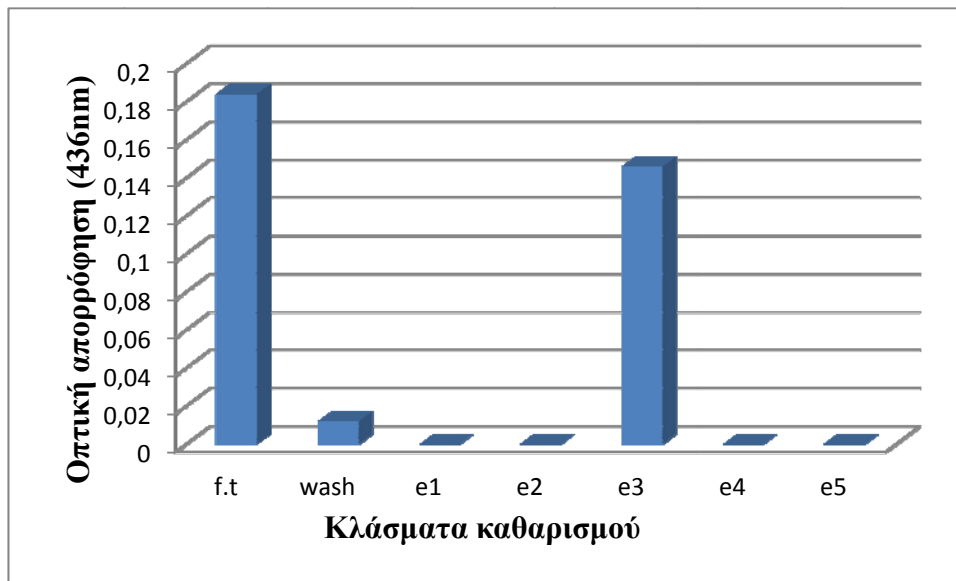


Εικόνα 1.5. Χρωματογράφημα καθαρισμού του ενζύμου σε ανταλλάκτη κατιόντων S-Sepharose FF.

Εν συνεχεία με την μέθοδο Bradford πραγματοποιήσαμε ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεΐνης στο αρχικό ενζυμικό εκχύλισμα (crude) και στην έκλουση 2 (e2). Οι συγκεντρώσεις των παραπάνω ήταν 2,78mg/mL και 0,045mg/mL, αντίστοιχα. Δείγματα από τα κλάσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 1.7.

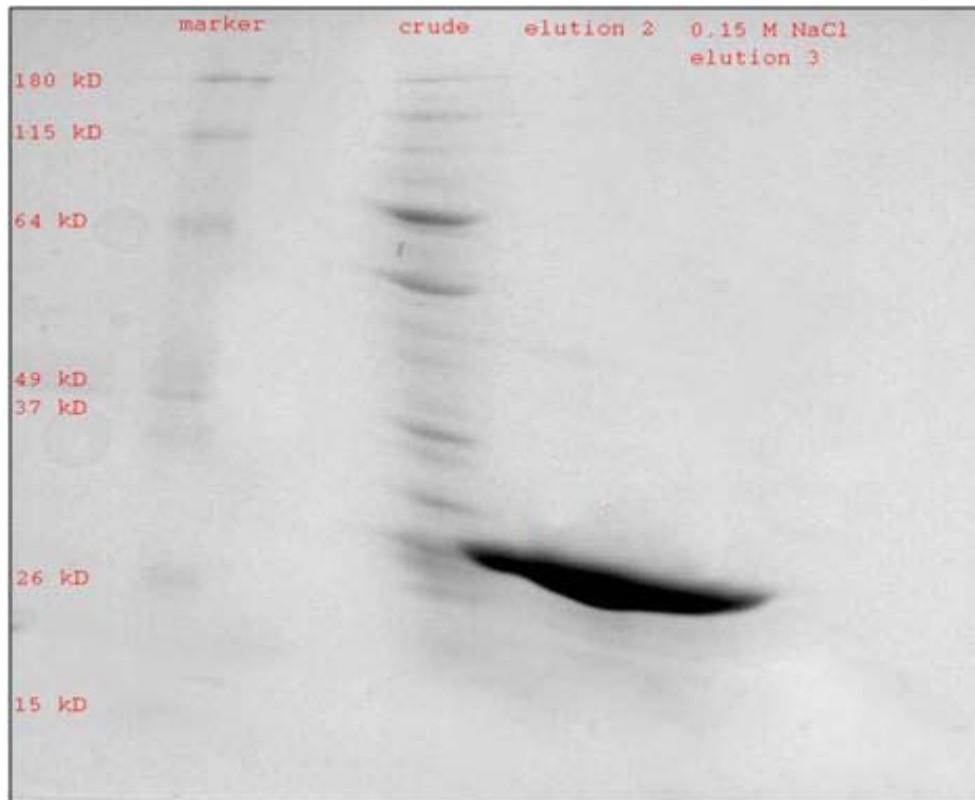
3.2.2.2 Ανάπτυξη πρωτόκολλου καθαρισμού ενδοκυττάριου ενζύμου σε ανταλλάκτη ανιόντων DEAE-Sepharose

Η καθαρή ποσότητα ενζύμου που λάβαμε με τον προηγούμενο καθαρισμό σε S-Sepharose FF, υποβλήθηκε επιπλέον σε δεύτερο στάδιο καθαρισμού χρησιμοποιώντας ανταλλάκτη ανιόντων ως προσροφητή. Στην στήλη φορτώθηκαν 2mL ενζύμου από την έκλουση 2 του προηγούμενου καθαρισμού ανταλλαγής ιόντων. Μετά την παραλαβή των κλασμάτων έκλουσης ακολούθησε ενζυμικός προσδιορισμός δραστηκότητας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6.



Εικόνα 1.6 Χρωματογραφικός προσδιορισμός σε ανταλλάκτη κατιόντων DEAE-Sepharose. Η μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης εμφανίζεται στην έκλουση 3 (e3) στον χειρισμό με 0,15 M NaCl.

Αντίστοιχα, όπως και προηγουμένως υποβάλλαμε τα κλάσματα σε ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford. Το τρίτο κλάσμα έκλουσης περιείχε την μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου και εκλούστηκε στον χειρισμό με 0,15M NaCl. Το κλάσμα έκλουσης υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS. Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 1.7.



Εικόνα 1.7 Το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα του καθαρισμού με ανταλλαγή ιόντων. Διακρίνονται από τα αριστερά προς τα δεξιά τον μάρτυρα (marker), το αρχικό ενζυμικό εκχύλισμα (crude) η έκλουση 2 του πρώτου καθαρισμού (έκλουση 2) και η έκλουση 3 από τον δεύτερο καθαρισμό.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα δύο είδη της χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων, των οποίων αναπτύξαμε τα πρωτόκολλα λειτούργησαν με πολύ μεγάλη επιτυχία. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.7 τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα των δύο εκλούσεων δίνουν μια πρωτεϊνική ζώνη.

Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζουμε ποσοτικά δεδομένα που προέκυψαν από τη χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Πρέπει να αναφέρουμε ότι λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που λάβαμε στον δεύτερο καθαρισμό (e3, 0,15M NaCl), δεν μπορέσαμε να πραγματοποιήσουμε τον ποσοτικό προσδιορισμό με την μέθοδο Bradford και δεν έχουμε την αντίστοιχη τιμή στον πίνακα. Οι αποδόσεις >100% που λαμβάνονται πιθανότατα να οφείλονται στον ατελή προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας στο ακατέργαστο αρχικό εκχύλισμα. Πιθανότατα αυτό να οφείλεται στην ύπαρξη ενζυμικών αναστολέων στο ενδοκυττάριο ένζυμο.

Πίνακας 1.2 Καθαρισμός του ενζύμου με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.

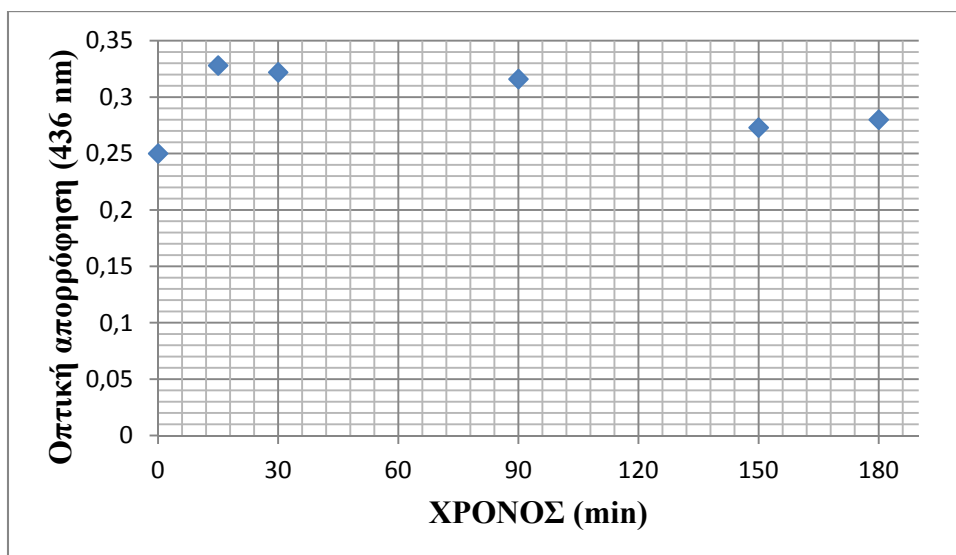
	V (mL)	U/mL	U (units)	C (mg/mL)	SA (mg/mL)	Απόδοση (%)	Καθαρισμός (φορές)
crude	4,5	25,49	114,7	2,78	9,169	100	1
E2	2	93,74	187,5	0,045	2083	163,4	227,1
E3 (0,15M NaCl)	4	36,5	146	-	-	127,3	-

3.3 Ανάπτυξη και μελέτη πρωτόκολλου τροποποίησης της L-ασπαραγινάσης με δραστικό ανάλογο της πολυαιθύλενο γλυκόλης

Η τροποποίηση της L-ασπαραγινάσης έγινε με N-υδροξυ-ηλεκτρικός εστέρας της ηλεκτρικής μεθοξυ-πολυαιθυλενο γλυκόλης (mPEG-SNHS). Το ένζυμο που τροποποιήσαμε προήλθε τόσο από την εξωκυττάρια έκφραση του από τα βακτηριακά στελέχη όσο και από την ενδοκυττάρια.

3.3.1 Τροποποίηση εξωκυττάριας L-ασπαραγινάσης

Αρχικά, σε 2mL κλάσματος έκλουσης που πήραμε από τον καθαρισμό ενζυμικού εξωκυττάριου εκχυλίσματος με χρωματογραφία συγγένειας, προστέθηκε 1mg mPEG-SNHS. Στη συνέχεια για να μελετήσουμε την επίδραση της τροποποίησης στην ενζυμική δραστηριότητα, πραγματοποιήθηκε ενζυμικός προσδιορισμός με το αντιδραστήριο Nessler. Οι τιμές απορρόφησης παρατίθενται στην Εικόνα 1.8.

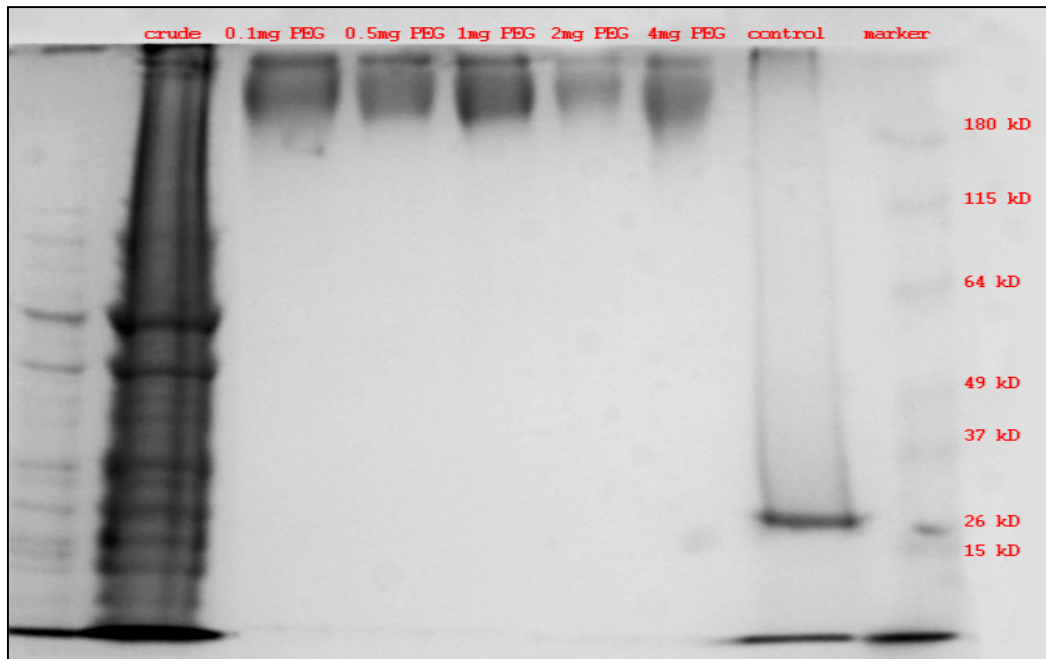


Εικόνα 1.8. Πορεία τροποποίησης του ενζύμου (25,35U) με mPEG-SNHS (1mg). Στα 0min η τιμή απορρόφησης αντιστοιχεί στον μάρτυρα μας, που δεν περιέχει mPEG-SNHS.

Παρατηρούμε πως η τροποποίηση με mPEG-SNHS δεν δημιουργεί προβλήματα στην ενζυμική δραστηριότητα η οποία διατηρείται σχετικά σε σταθερά επίπεδα.

3.3.2 Τροποποίηση ενδοκυττάριας L-ασπαραγινάσης

Για την τροποποίηση ενδοκυττάριας ενζύμου χρησιμοποιήσαμε καθαρό ένζυμο, έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης mPEG-SNHS στην τροποποίηση του ενζύμου. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις mPEG-SNHS (0.1mg, 0.5mg, 1,0mg, 2,0mg και 4,0 mg).



Εικόνα 1.9. Ηλεκτροφορικό αποτύπωμα του τροποποιημένου ενζύμου με mPEG-SNHS. Διακρίνονται από τα αριστερά προς τα δεξιά: το αρχικό ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα (crude), το τροποποιημένο ένζυμο με διαφορετικές συγκεντρώσεις mPEG-SNHS (0.1, 0.5, 1,0, 2,0, και 4,0mg), το μη τροποποιημένο ένζυμο (control) και ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών (marker).

Μετά το πέρας αυτού του πειράματος τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Στην Εικόνα 1.9 φαίνεται το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα των δειγμάτων. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν πως η μοριακή μάζα του τροποποιημένου ενζύμου αυξάνεται σημαντικά εξαιτίας της πρόσδεσης μορίων PEG. Επίσης σε όλες τις συγκεντρώσεις mPEG-SNHS που χρησιμοποιήθηκαν το ένζυμο τροποποιήθηκε στον ίδιο βαθμό όπως φαίνεται ηλεκτροφορητικά από την ίδια αύξηση της μοριακής μάζας σε όλα τα δείγματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η L-ASNase, ως ένζυμο έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον μελέτης σε ερευνητικό επίπεδο εξαιτίας κυρίως της φαρμακευτικής της δράσης. Αυτό συμβαίνει διότι χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό φάρμακο για την αντιμετώπιση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Warangkar & Khobragade, 2009; Labrou et al., 2010). Στόχος των ερευνών είναι η μελέτη τόσο της ενζυμικής λειτουργίας όσο και της βελτίωσης των φαρμακολογικών της ιδιοτήτων. Η χρήση του ενζύμου στην θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας ενέχει ορισμένα προβλήματα, όπως μειωμένη αντοχή στην πρωτεόλυση που οδηγεί και στη μείωση του χρόνου παραμονής στον οργανισμό του ασθενή και εμφάνιση αντιδράσεων υπερευαισθησίας (Kotzia & Labrou, 2006). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η παραγωγή του ενζύμου και ο καθαρισμός του ώστε να παραλαμβάνουμε όσον το δυνατόν καθαρότερο προϊόν, για να μην δημιουργεί προβλήματα τοξικότητας στους ασθενείς. Οι L-ASNases που χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές ή εφαρμόζονται ήδη στη θεραπεία προέρχονται από τα βακτήρια *Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi* και *Erwinia carotovora* (Labrou et al., 2010).

Στην παρούσα πειραματική μελέτη έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου καθαρισμού σε χρωματογραφική στήλη ανταλλαγής ιόντων. Επίσης, μελετήθηκε η τροποποίηση του ενζύμου με mPEG-SNHS και των επιδράσεων που είχε στην λειτουργία του ενζύμου.

Όσον αφορά τον καθαρισμό του ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε τόσο ενδοκυτταρικής προέλευσης όσο και εξωκυτταρικής προέλευσης ένζυμο. Για την εξωκυτταρική L-ASNase, εφαρμόστηκε χρωματογραφία συγγένειας σε ακινητοποιημένο L-Asp. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού κρίνονται ικανοποιητικά καθώς λάβαμε την μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου στην 2 και 3 έκλυση με απόδοση 17,9% και 19,1%, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1 και στον Πίνακα 1.1.

Για τον καθαρισμό της ενδοκυτταρικής προέλευσης L-ASNase, εφαρμόστηκε ανταλλαγή ιόντων. Το πρώτο στάδιο καθαρισμού έγινε με προσροφητή S-Sepharose FF και το δεύτερο στάδιο σε προσροφητή DEAE-Sepharose. Τα αποτελέσματα που πήραμε ήταν ικανοποιητικά καθώς η απόδοση του καθαρισμού ήταν πολύ υψηλή 163,4% (S-Sepharose FF) και 127,3% (DEAE-Sepharose) και το ένζυμο καθαρίστηκε 227,1 φορές (S-Sepharose FF), όπως φαίνεται στις Εικόνες 1.5 & 1.6 και στον Πίνακα 1.2 στο Κεφάλαιο 3. Η

επιτυχία του καθαρισμού πιστοποιήθηκε με το ηλεκτροφορητικό αποτύπωμα (εικόνα 1.7), λαμβάνοντας μια πρωτεϊνική ζώνη. Το γεγονός αυτό δείχνει πως η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων είναι μια αποτελεσματική μέθοδος καθαρισμού με πολύ καλή απόδοση καθαρισμού και εύκολα εφαρμόσιμη, που χρήζει περαιτέρω μελέτη ακόμα και σε βιομηχανική κλίμακα. Οι αποδόσεις >100% που λαμβάνονται πιθανότατα να οφείλονται στον ατελή προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας στο ακατέργαστο αρχικό εκχύλισμα. Πιθανότατα αυτό να οφείλεται στην ύπαρξη ενζυμικών αναστολέων στο ενδοκυττάριο ένζυμο.

Συγκρίνοντας τα δύο είδη χρωματογραφίας, παρατηρούμε πως οι αποδόσεις της χρωματογραφίας συγγένειας είναι πάρα πολύ χαμηλές σε σχέση με της χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων. Αξίζει να αναφέρουμε πως λάβαμε και περισσότερες ενζυμικές μονάδες του ενζύμου με αυτό το είδος χρωματογραφίας σε σχέση με την χρωματογραφία συγγένειας. Όλα τα ενισχύουν τα αποτελέσματα μας, για την εφαρμογή της χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων ως κύρια μέθοδο καθαρισμού για ενδοκυττάρια προέλευσης L-ASNase. Θα μπορούσε αυτό το είδος χρωματογραφίας να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα για τον καθαρισμό ενδοκυττάριας προέλευσης L-ASNase, ύστερα από αντίστοιχες μελέτες.

Στο δεύτερο μέρος της πειραματικής μελέτης έγινε προσπάθεια τροποποίησης με mPEG-SNHS της L-ASNase, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της τροποποίησης στην ενζυμική δραστηριότητα. Όπως γνωρίζουμε η PEG έχει χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση αρκετών ενζύμων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος ώστε να αντιμετωπίσουμε προβλήματα όπως μειωμένος χρόνος ημιζωής, μειωμένη αντοχή στην πρωτεόλυση, φαινόμενα τοξικότητας (Veronese & Morpurgo, 1999; Brocchin et al., 2007). Αρχικά, τροποποιήσαμε εξωκυτταρικής προέλευσης ένζυμο με 1mg ποσότητας MPEG-SNHS και παρατηρήσαμε πως η ενζυμική δραστηριότητα του αυξάνει με την πάροδο του χρόνου εν αντίθεση με την δραστηριότητα του πριν την τροποποίηση του. Βέβαια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.8 παρατηρείται μια μείωση μετά από 2h, όμως τα επίπεδα δραστηριότητας παραμένουν πιο υψηλά από αυτά πριν την τροποποίηση (Εικόνα 1.8). Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι η mPEG-SNHS δεν ενώνεται στις αμινομάδες των αμινοξέων όπως της λυσίνης, που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και δεν αναστέλλει την λειτουργία του

καθώς δεν του αλλάζει την δομή του. Έτσι, το ενεργό κέντρο είναι ελεύθερο να δεσμεύσει το υπόστρωμα καθώς παράλληλα προστατεύεται από τις πρωτεάσες του αίματος.

Σημαντικός παράγοντας για ένα φαρμακευτικό ένζυμο όπως η L-ASNase, είναι ο χρόνος παραμονής στον οργανισμό. Όταν αυτό εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό, αναγνωρίζεται ως ξένο και ο οργανισμός ενεργοποιεί μια ομάδα πρωτεϊνών, τις πρωτεάσες οι οποίες καταστρέφουν το φάρμακο. Έτσι, έγινε προσπάθεια τροποποίησης L-ASNase με διάφορες ποσότητες mPEG-SNHS (0,1mg, 0,5mg, 1mg, 2mg, 4mg) και υποβλήθηκαν τα δείγματα σε ηλεκτροφόρηση. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν πως η μοριακή μάζα του τροποποιημένου ενζύμου αυξάνεται σημαντικά εξαιτίας της πρόσδεσης μορίων PEG. Επίσης σε όλες τις συγκεντρώσεις mPEG-SNHS που χρησιμοποιήθηκαν το ένζυμο τροποποιήθηκε στον ίδιο βαθμό όπως φαίνεται ηλεκτροφορητικά από την ίδια αύξηση της μοριακής μάζας σε όλα τα δείγματα.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως η PEG, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στα χέρια των ερευνητών για την βελτιστοποίηση της δράσης της L-ASNase. Η τροποποίηση της αυξάνει το χρόνος ημιζωής χωρίς παράλληλα να χάνει την λειτουργικότητα της. Επομένως, η χρήση της πολυαιθύλενος γλυκόλης (PEG) αποτελεί εργαλείο για την βελτίωση των προβλημάτων και παρενεργειών που δημιουργείται από την χρόνια χρήση της θεραπευτικής L-ASNase.

Βιβλιογραφία

- Borek D., Jaskolski M.(2001).** Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica*, 48 No.4/2001: 893-902.
- Brocchini S., Godwin A., Balan S., Choi J., Zloh M., Shaunak S.(2008).** Disulfide bridge based PEGylation of proteins. *Adv. Drug Del. Reviews*,60: 3-12.
- Cooney D.A., Moore A.L., Zhagats R.(1972).** A colometric technique for the demonstration of L-asparaginase in the electropherograms. *CCA*, 40: 249-257.
- Caliceti P., Veronese F.M.(2003).** Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)- protein conjugates. *Adv. Drug Del. Reviews*, 55: 1261-1277.
- Deiters A., Cropp T. A., Summerer D., Mukherji M., Schultz.(2004).** Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids. *Biorg. & Med. Chem. Letters*,14: 5743-5745.
- Derst C., Henseling J., Rohm K.H.(1992).** Probing the role of threonine and serine residues of E.coli asparaginase II by site-specific mutagenesis. *Protein Engineering*,5: 785-789.
- Fishburn C. S.(2007).** The pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics. *J. of Pharm. Sciences*, 10.1002.
- Fee C.J., Van Alstine J.M.(2005).** PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chem. Eng. Sc.*,61: 924-939. *Adv. Drug Del. Reviews*, 55: 217-250.
- Greenwald R.B.(2001).**PEG drugs : an overview. *J.of cont.release*,74: 159-171.
- Greenwald R.B., Choe Y. H., McGuire J., Conover C.D.(2003).** Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Delivery Rev*, 55: 217-250.
- Harris J.M., Veronese F.M.(2003).** Peptide and protein pegylation II- clinical evaluation. *Advan. Drug delivery reviews*, 55: 1259-1260.
- Hendriksen H.V., Kornbrust B.A., Østergaard P.R., Stringer M.A.(2009).** Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *aspergillus oryzae*. *Journal of Agricul. and Food Chemistry*, 57: 4168-4176.

Karube I., Ishimori Y., Suzuki S.(1978). Photocontrol of Affinity Chromatography: Purification of Asparaginase by Photosensitive AHA-Gel. *Biot. And Bioeng*, XX: 1775-1783.

Κλώνης Ι.(1997).Ενζυμολογία, Εκδόσεις Έμβρυο, σελ.441 & σελ.522.

Κλώνης Ι.(2007). Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ.259 & σελ.276 & σελ.301.

Kornbrust B.A., Stringer, M.A., Lange, N.K., Hendriksen, H.V.(2010). Asparaginase – an enzyme for acrylamide reduction in food products. *Enzymes in Food Technology*, 2nd Edition,pp. 59-87.

Kotzia G.A., Labrou N.E.(2005). Cloning, expression and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *J. of Biotech*, 119: 309-323.

Kotzia G.A., Labrou N.E.(2006). L-asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. *J. of Biotech*, 127: 657-669.

Kotzia G.A., Labrou N.E.(2009). Engineering thermal stability of L- asparaginase by in vitro directed evolution. *The FEBS Journal*, 276: 1750-1761.

Kotzia G.A., Lappa K., Labrou N.E.(2007). Tailoring structure- function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. *Biochem J.*, 404: 337-343.

Kozlowski A., Harris M.J.(2001). Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. *Journal of controlled release*, 72: 217-224.

Kurtzberg J.(2000). Asparaginase. *Cancer Medicine*, 51

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

Leonidou Koumenis I., Shahrokh Z., Leong S., Hsei V., Deforge L., Gerardo Z.(1999). Modulating pharmacokinetics of an anti- interleukin-8 F(ab')₂ by amine-specific PEGylation with preserved bioactivity. *Int. journal of pharm*, 198: 83-95.

Manna S., Sinha A., Sadhukhan R., Chakrabarty S.L.(1995). Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. *Current Microbiology*, 30: 291-298.

Paust G., Veronese F.M.(2007). Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Prog. in Polymer Science*, 32: 933-961.

Ratto J.J., O' Conner S.R., Distler A.R., Wu G., Hummel D., Treuheit M.J., Herman A.C., Davis J.M.(1997). Ethanol- sodium chloride mobile phase for size-exclusion chromatography of poly(ethylene glycol) modified proteins. *J. of Chromatography A*, 763: 337-344.

Roberts M.J., Bentley M.D., J.M. Harris.(2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Delivery Reviews*, 54: 459-476.

Tirelli N., Lutolf M.P., Napoli A., Hubbell J.A.(2002). Poly(ethylene glycol) block copolymers. *Molecular Biotechnology*, 90: 3-15.

Tsubery H., Mironchik M., Fridkin M., Shechter Y.(2004). Prolonging the action of protein and peptide drugs by a novel approach of reversible polyethylene glycol modification. *J.B.C. Papers*, 37: 38118-38124

Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S.(2007). L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. *Critical reviews in Biotechnology*, 27: 45-62.

Verma N., Kumar K., Kaur G.(2007). E.coli K-12 asparaginase-based asparagine biosensor for leukaimia. *Artif. Cells, Blood Subs., and Biotechnology*, 35: 449-456.

Veronese F.M.(2000). Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions, *Biomaterials*, 22: 405-417.

Veronese F.M., Harris J.M.(2008). Peptide and protein PEGylation III: advances in chemistry and clinical applications. *Advan. Drug delivery reviews*, 60: 1-2.

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

Vinogradova N.N., Vina I.A., Zhagat A.(1975). L-Asparaginase bound in a polyacrylamide gel. *Chemistry of Natural Compounds*, 3: 382-384.

Warangkar S.C., Khobragade C.N.(2009). Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L- asparaginase. *Enzyme Research*, 2010: 10 pages.