



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Ετερόλογη έκφραση των εξωκυττάρων τμημάτων του ανθρώπινου νευρωνικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.

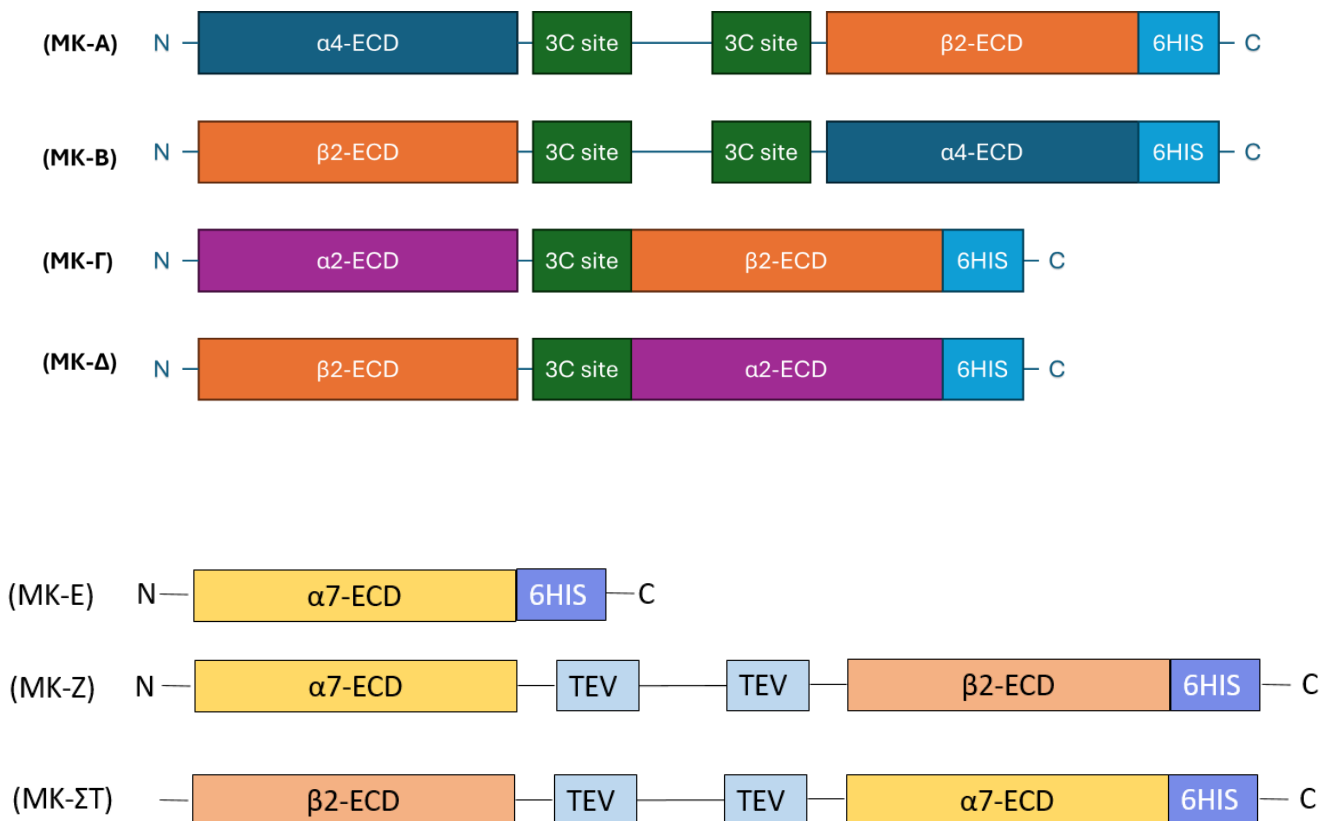
ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΖΗΣΙΜΟΠΟΥΛΟΥ (ΕΙΠ)

Ετερόλογη έκφραση των εξωκυττάριων τμημάτων του ανθρώπινου νευρωνικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

A) Ετερόλογη έκφραση των εξωκυττάριων τμημάτων του ανθρώπινου νευρωνικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης

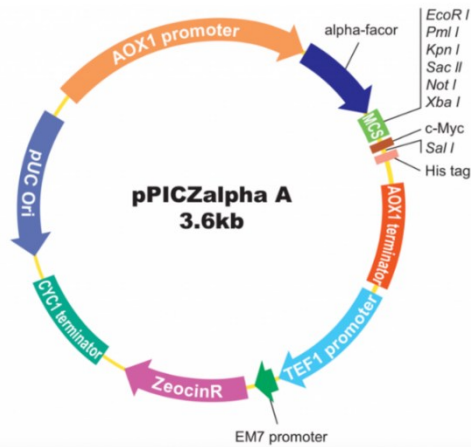
Σχεδιάστηκαν μοριακές κατασκευές για την ετερόλογη έκφραση συγκαταμερικών κατασκευών που περιλάμβαναν τις εξωκυττάριες περιοχές (ECDs) των υπομονάδων $\alpha 4$, $\alpha 2$, $\alpha 7$ και $\beta 2$ του ανθρώπινου νευρωνικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR). Επίσης, σχεδιάστηκε και η μοριακή κατασκευή του σκέτου $\alpha 7$ -ECD. Οι μοριακές κατασκευές (MK) αυτές ήταν οι παρακάτω:



Όλες οι κατασκευές φέρουν καρβοξυτελικό επίτοπο έξι ιστιδινών (6HIS) για το πρώτο στάδιο καθαρισμού τους με χρωματογραφία συγγένειας (Ni-NTA). Όλες οι συγκαταμερικές κατασκευές MK-A έως και MK-Δ καθώς και οι MK-Z και MK-ΣΤ φέρουν μεταξύ των υπομονάδων του nAChR πολυσυνδύη μήκους 56-60 αμινοξέων, ο οποίος πλαισιώνεται από πρωτεολυτικά τμήματα αναγνώρισης από την 3C πρωτεάση στην περίπτωση των MK-A έως και MK-Δ ή από την TEV πρωτεάση στην περίπτωση των MK-Z και MK-ΣΤ.

Οι παραπάνω μοριακές κατασκευές κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pPICZαA, γραμμικοποιήθηκαν με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση SacI και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό X33 κυττάρων

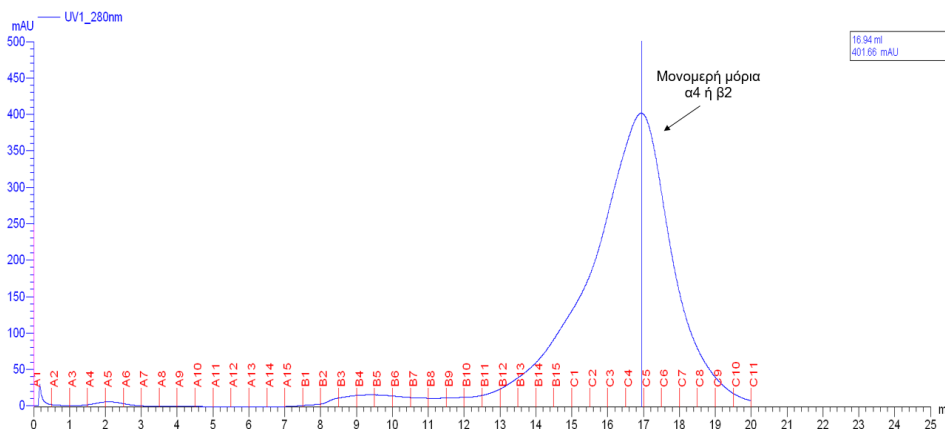
Pichia (Komagatella) pastoris με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Τα μετασηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεές καλλιέργειες και έγινε επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων υπό την πίεση του αντιβιοτικού ζεοσίνη, στην οποία παρέχει ανθεκτικότητα το πλασμίδιο (Εικόνα 68).



Εικόνα 68. Χάρτης του πλασμιδίου pPICZαΑ που χρησιμοποιήθηκε για το μετασηματισμό κυττάρων ζυμομύκητα με τις κατάλληλες υπομονάδες nAChR

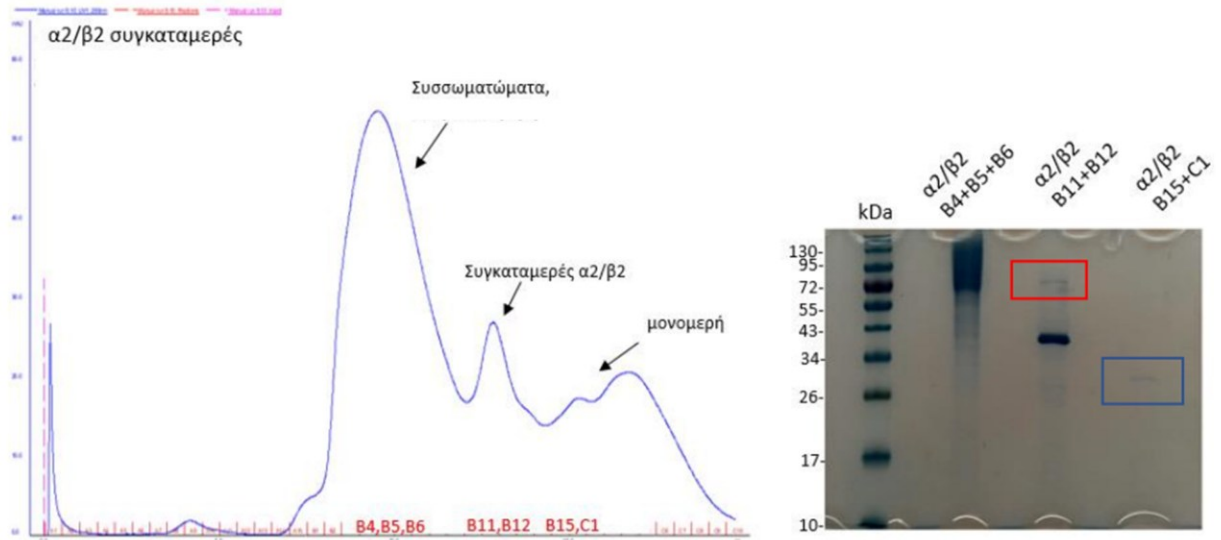
Έγινε επιλογή 20 ανασυνδυασμένων κλώνων για την κάθε μοριακή κατασκευή με τους οποίους διεξήχθη δοκιμασία έκφρασης των πρωτεϊνών και σάρωσή τους για την επιλογή του καλύτερου κλώνου. Η διαδικασία αυτή περιλάμβανε την υγρή καλλιέργεια σε μικρή κλίμακα του κάθε κλώνου, τη διαδικασία υπερέκφρασης για 3 ημέρες με την επαγωγή του μεθανολο-επαγώμενου υποκινητή AOX1 και έπειτα τη συλλογή των υπερκείμενων των καλλιέργειών που δυνητικά περιείχαν την προς έκφραση πρωτεΐνη (προηγείται πεπτιδιο-οδηγός που σηματοδοτεί την έκκριση των εκπεφρασμένων πρωτεϊνών). Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της έκφρασης έγινε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης σε κηλίδες (Dot-Blot) χρησιμοποιώντας αντίσωμα που αναγνωρίζει τον 6HIS επίτοπο και εμφάνιση του ανοσοποτυπώματος με δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με HRP. Βάσει οπτικής παρατήρησης της έντασης των κηλίδων μετά την εμφάνιση έγινε η διαλογή του βέλτιστου κλώνου για την κάθε μοριακή κατασκευή. Έγινε καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα των μοριακών κατασκευών. Πιο συγκεκριμένα, για την κάθε καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια όγκου 1 Lt και επαγωγή της έκφρασης για 3 ημέρες με την χρήση μεθανόλης. Έπειτα, έγινε συλλογή των υπερκείμενων και απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Από τη χρωματογραφία συγγένειας έγινε μία πρώτη αξιολόγηση των αποδόσεων των καλλιεργειών με σκοπό να ακολουθήσει περαιτέρω καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

Σχετικά με τις συγκαταμερικές κατασκευές α4/β2: Και για τις δύο μοριακές κατασκευές (MK-A και MK-B) λήφθηκαν πολύ μικρές ποσότητες πρωτεΐνης, με λίγο καλύτερη την περίπτωση της MK-B. Γι' αυτό το λόγο τα υπόλοιπα πειράματα βελτιστοποίησης των συνθηκών καλλιέργειας διεξήχθησαν μόνο με τη MK-B. Πραγματοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια όγκου 3 Lt και επαγωγή της έκφρασης για 3 ημέρες με την χρήση μεθανόλης. Έγινε τροποποίηση του θρεπτικού καλλιέργειας (pH, σύσταση) έτσι ώστε να βελτιωθούν τα αποτελέσματα της απόδοσης. Έπειτα, έγινε συλλογή του υπερκείμενου και απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Από τη χρωματογραφία συγγένειας έγινε μία πρώτη αξιολόγηση της απόδοσης με σκοπό να ακολουθήσει περαιτέρω καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Εικόνα 69). **Αποτέλεσμα:** Ενώ, επιτεύχθηκε η απομόνωση σε υψηλό βαθμό της πρωτεΐνης, αυτή φάνηκε να εκλούεται σε πολύ μικρότερα μοριακά βάρη από τα αναμενόμενα κατά τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Πιο συγκεκριμένα η πρωτεΐνη εκλούστηκε σε μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε μονομερή μόρια (είτε α4 είτε β2), κάτι που αποδόθηκε σε πιθανή πρωτεόλυση της μοριακής κατασκευής εντός του συστήματος έκφρασης.



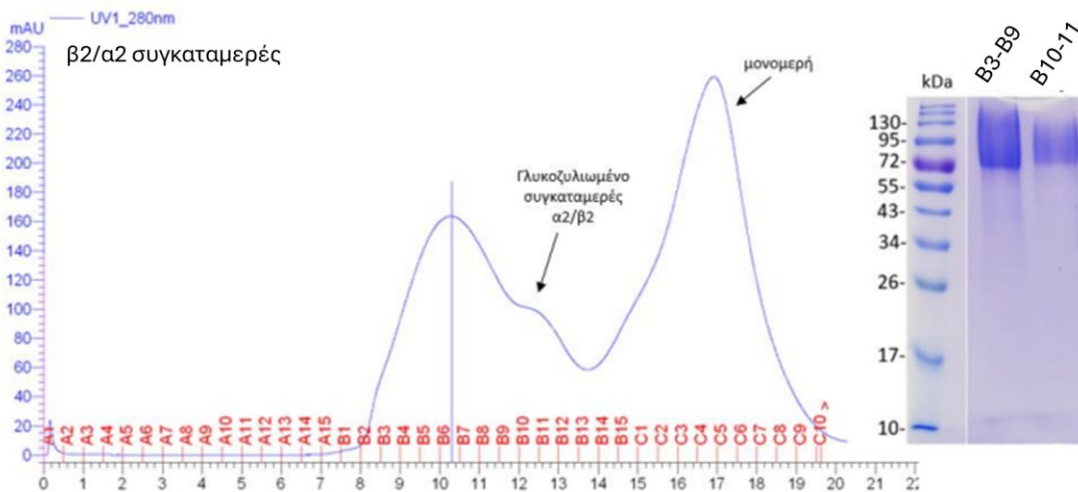
Εικόνα 69. Προφίλ έκλυσης της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Superdex 200 Increase (10/300) για την γλυκοζυλιωμένη MK-B ($\alpha 4/\beta 2$).

Σχετικά με τις συγκαταμερικές κατασκευές $\alpha 2/\beta 2$: Έπειτα, ακολούθησε η αξιολόγηση των υπόλοιπων δύο μοριακών κατασκευών (MK-Γ & MK-Δ) ως προς τα επίπεδα έκφρασης σε μεγάλη κλίμακα. Πιο συγκεκριμένα, για την κάθε καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια όγκου 1 Lt και επαγωγή της έκφρασης για 3 ημέρες με την χρήση μεθανόλης. Έπειτα, έγινε συλλογή των υπερκείμενων και απομόνωση της πρωτεΐνης ομοίως με τις MK-A και B. Από τη χρωματογραφία συγγένειας έγινε μία πρώτη αξιολόγηση των αποδόσεων των καλλιεργειών και ακολούθησε περεταίρω καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Η ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε επίσης και με ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (SDS-PAGE). **Αποτέλεσμα:** Και για τις δύο μοριακές κατασκευές (MK-Γ & MK-Δ) λήφθηκαν ικανοποιητικές ποσότητες πρωτεΐνης, όμως στην περίπτωση της MK-Γ τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα, διότι στην περίπτωση που ήταν η $\alpha 2$ υπομονάδα στο N- άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας φάνηκε να υπάρχει πιθανά πρωτεόλυση του πολυπεπτιδίου (από την ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμιδίου) και δεν επιτεύχθηκε η απομόνωση ολόκληρης της πολυπρωτεϊνικής αλυσίδας σε ικανοποιητική ποσότητα. Το προφίλ έκλυσης φαίνεται στην Εικόνα 70. Για τους παραπάνω λόγους για τις διαδικασίες κρυστάλλωσης επιλέχθηκε να προχωρήσουμε με την MK-Δ ($\beta 2-\alpha 2$).



Εικόνα 70. Προφίλ έκλυσης της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Superdex 200 Increase (10/300) για την γλυκοζυλιωμένη MK-Γ (α2/β2).

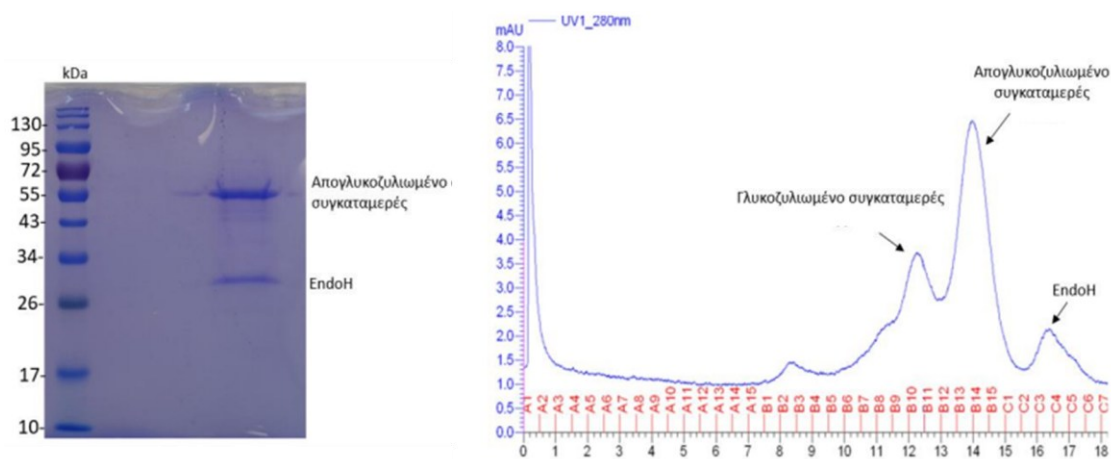
Έγινε εκ νέου μεγάλη κλίμακας καλλιέργεια για την MK-Δ για να ληφθούν ποσότητες ικανές για κρυσταλλογραφικές μελέτες του συγκαταμερούς. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια όγκου 4 Lt και επαγωγή της έκφρασης για 3 ημέρες με την χρήση μεθανόλης. Έπειτα, έγινε συλλογή των υπερκείμενων και απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Ακολούθησε περεταίρω καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Η ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε επίσης και με ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (SDS-PAGE). Το προφίλ έκλυσης στη στήλη μοριακού αποκλεισμού και η ανάλυση SDS-PAGE φαίνονται στην Εικόνα 71.



Εικόνα 71. Προφίλ έκλυσης της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Superdex 200 Increase (10/300) για την γλυκοζυλιωμένη MK-Δ (α2/β2).

Απογλυκοζύλιωση της ΜΚ-Δ (α2/β2) για δοκιμασίες κρυστάλλωσης:

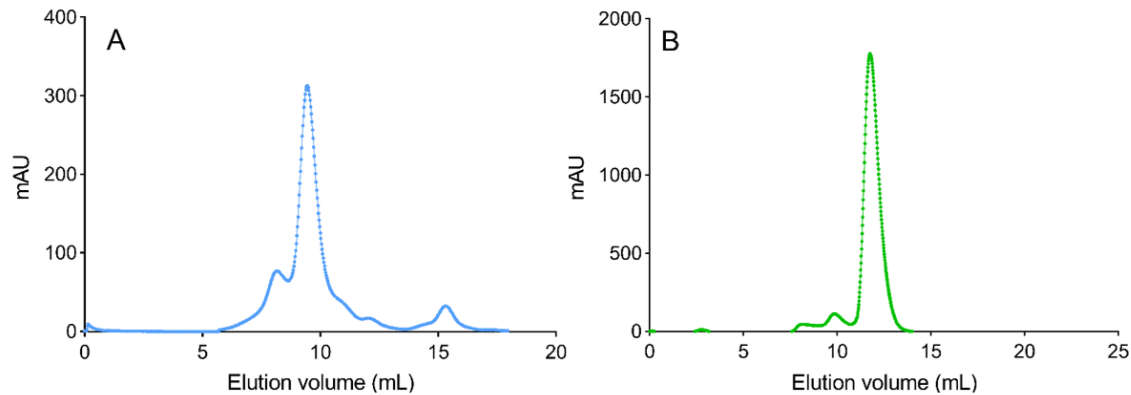
Τα πρωτεϊνικά δείγματα προτού χρησιμοποιηθούν για κρυσταλλογραφική μελέτη πρέπει να υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία για τη υποβοήθηση της πιθανότητας κρυστάλλωσης. Ένα μέρος αυτής της διαδικασίας είναι εξασφάλιση υψηλής καθαρότητας με τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, ενώ δεύτερο και πολύ σημαντικό μέρος είναι η ενζυματική απογλυκοζύλιωση των πρωτεϊνών. Οι γλυκοζυλίωσεις, παρόλο που είναι πολύ σημαντικές για την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, μπορεί να είναι ένας παράγοντας αποτρεπτικός όσον αφορά την ικανότητα των μορίων να δημιουργήσουν κρυσταλλικές δομές. Γι' αυτό το λόγο η ΜΚ-Δ προτού χρησιμοποιηθεί για κρυσταλλώσεις απογλυκοζυλιώθηκε *in vitro* με τη χρήση της ενδογλυκοσιδάσης EndoH. Η πρωτεΐνη μετά τη διαδικασία αυτή καθαρίστηκε εκ νέου σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και αξιολογήθηκε η επιτυχία της απογλυκοζύλιωσης με SDS-PAGE ανάλυση των εκλουόμενων κορυφών (Εικόνα 72).



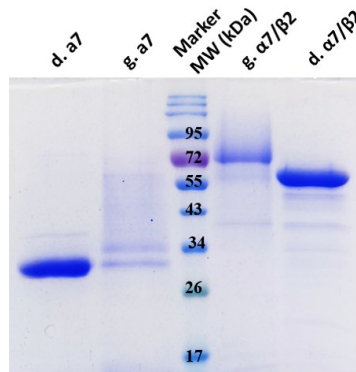
Εικόνα 72. Προφίλ έκλυσης της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Superdex 200 Increase (10/300) για την απογλυκοζυλιωμένη ΜΚ-Δ (α2/β2).

Τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στο απογλυκοζυλιωμένο συγκαταμερές συλλέχθηκαν και με τη χρήση της πρωτεάσης 3C έγινε απομάκρυνση του πολυσυνδέτη που ένωνε τις δύο υπομονάδες. Το προϊόν της πέψης αυτής χρησιμοποιήθηκε για δοκιμές κρυστάλλωσης χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα kit για τη σάρωση πολλών διαφορετικών συνθηκών.

Σχετικά με την κατασκευή α7 και τις συγκαταμερικές κατασκευές α7/β2: α7-ECD: Το προϊόν έκφρασης της μοριακής κατασκευής ΜΚ-Ε αφορά στο εξωκυττάριο (ECD) τμήμα του α7 nAChR, το οποίο έχει μελετηθεί ενδελεχώς από την ερευνητική μας ομάδα στο παρελθόν. Το μόριο αυτό εκφράζεται και απομονώνεται ως πενταμερές (~150KDa). Στα πλαίσια αυτού του έργου βελτιστοποιήθηκε η ομοιογένεια των εκπεφρασμένων α7 ECD μορίων, τα οποία ακόμη και μετά από την ενζυμική τους απογλυκοζύλιωση (με χρήση της απογλυκοσιδάσης EndoH) διατηρούν υψηλό βαθμό ομοιογένειας όπως φαίνεται στην Εικόνα 73. **Συγκαταμερή α7/β2:** Αρχικά έγινε έκφραση των πρωτεϊνικών κατασκευών ΜΚ-Ζ και ΜΚ-ΣΤ σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Μετά από την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα υπερκείμενα των καλλιέργειών έγινε ο ποιοτικός τους έλεγχος με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Στην περίπτωση της ΜΚ-ΣΤ (η β2 υπομονάδα ήταν στο αμινοτελικό τμήμα του συγκαταμερούς) υπήρξε απειροελάχιστη έκφραση, ενώ στην περίπτωση της ΜΚ-Ζ (η α7 υπομονάδα ήταν στο αμινοτελικό τμήμα του συγκαταμερούς) υπήρξε ικανοποιητική έκφραση. Προχωρήσαμε λοιπόν σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας για το μόριο ΜΚ-Ζ (α7/β2), απομόνωση με χρωματογραφία συγγένειας, απογλυκοζύλιωση και τελικό στάδιο καθαρισμού με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 74, πετύχαμε την έκφραση συγκαταμερών μορίων στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (~60 KDa) και μάλιστα με εξαιρετική ομοιογένεια που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για διεξαγωγή κρυσταλλώσεων.



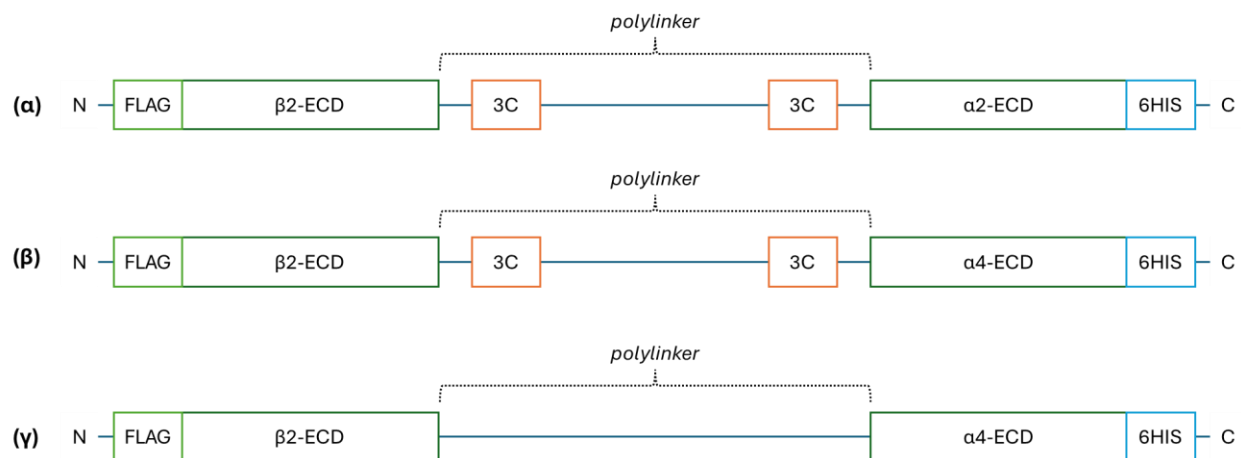
Εικόνα 73: Χρωματογραφικό προφίλ εκλούσης απογλυκοζυλιωμένου πενταμερούς $\alpha 7$ nAChR (A) και απογλυκοζυλιωμένου μονομερούς $\alpha 7/\beta 2$ συγκαταμερούς nAChR (B) σε στήλη Superdex 200 increase.



Εικόνα 74: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου των $\alpha 7$ ECD και $\alpha 7/\beta 2$ συγκαταμερούς στην απογλυκοζυλιωμένη (d) και γλυκοζυλιωμένη (g) μορφή τους. Η μετατόπιση προς τα κάτω και το στένωση της ζώνης υποδεικνύουν την επιτυχή απογλυκοζύλιωση.

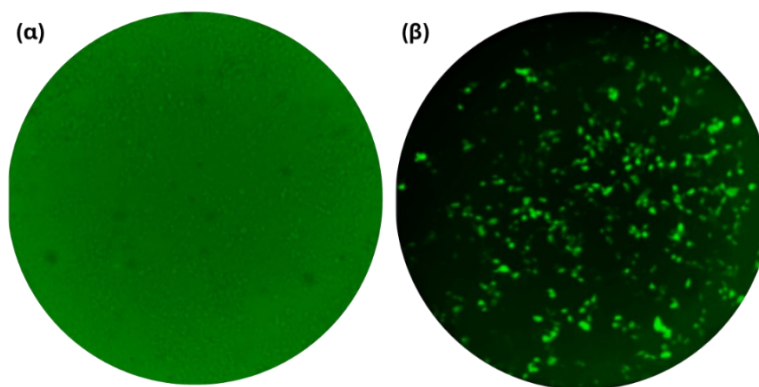
Εκφράσεις συγκαταμερών $\beta 2-\alpha 2$, και $\beta 2-\alpha 4$ υπομονάδων σε κύτταρα θηλαστικών:

Θελήσαμε να δοκιμάσουμε την έκφραση των $\alpha 2/\beta 2$ και $\alpha 4/\beta 2$ συγκαταμερών και σε ανώτερο σύστημα έκφρασης και πιο συγκεκριμένα σε κύτταρα HEK293S-GnTI τα οποία εκτός των άλλων οδηγούν και σε πιο ομοιογενή γλυκοζύλιωση. Ο στόχος παραμένει επίσης η κρυστάλλωση και η κρυσταλλογραφική μελέτη της ελάχιστα μελετημένης διεπιφάνειας των $\alpha 2-\beta 2$ υπομονάδων, καθώς και η διεξοδικότερη μελέτη των $\alpha 4-\beta 2$ υπομονάδων.



Εικόνα 75. Μοριακές κατασκευές συγκαταμερών των εξωκυττάρων περιοχών (ECDs) του νευρικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης για έκφραση σε κύτταρα θηλαστικών.

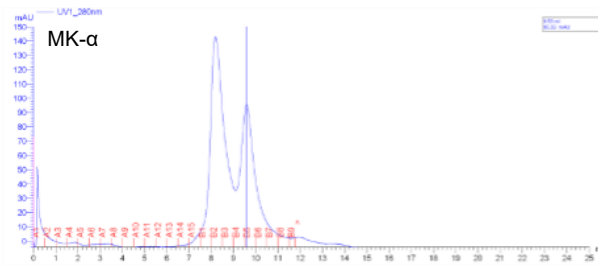
Οι παραπάνω μοριακές κατασκευές (Εικόνα 75) κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pIRES2-eGFP, και χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση κυττάρων HEK293S-GnTI με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου. Η χρήση του συγκεκριμένου πλασμιδίου διευκόλυνε την αξιολόγηση της επιτυχίας της διαμόλυνσης και μεταγραφής της κατασκευής, μέσω της ανίχνευσης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) που εκφράζεται από το ίδιο δισιστρονικό mRNA, με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.



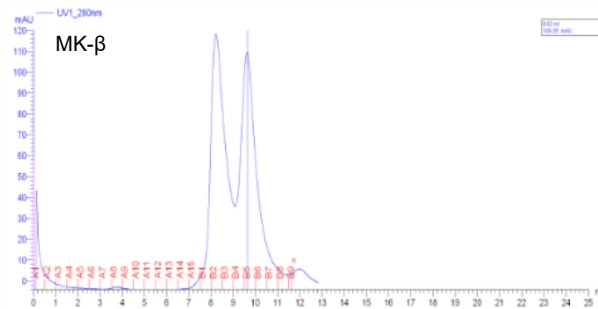
Εικόνα 76. Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού σε (α) ορατό φως (σύνολο κυττάρων) και (β) κατόπιν διέγερσης της GFP (395 nm excitation, 509nm emission)

Μετά την πρώτη αξιολόγηση της διαμόλυνσης μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης (Εικόνα 76), ελέγχθηκαν τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών ως προς την ύπαρξη των ετερόλογων συγκαταμερών. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν, έγινε διαπίδυση σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και έγινε απομόνωση των ετερόλογων πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Η απομονωθείσα πρωτεΐνη καθαρίστηκε περαιτέρω και αξιολογήθηκε ως προς την ολιγομερική της κατάσταση με χρωματογραφία μοριακού ηθμού (SEC) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με αποδιατακτικούς παράγοντες (SDS-PAGE) (Εικόνα 77). Παρά τον μεγάλο αριθμό επαναλήψεων των καλλιιεργειών ή/και βελτιστοποιήσεων στις συνθήκες για την έκφραση των συγκαταμερών, δεν φάνηκε να υπάρχει θετική έκφρασή τους, αφού η μπάντα που εμφανίζεται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη στο SDS-PAGE (~70KDa) δεν εμφανίζεται στο Western blot, υποδηλώνοντας ότι αυτή πρόκειται πιθανότατα για την BSA που υπήρχε στο υλικό της καλλιιεργειας (Εικόνα 77).

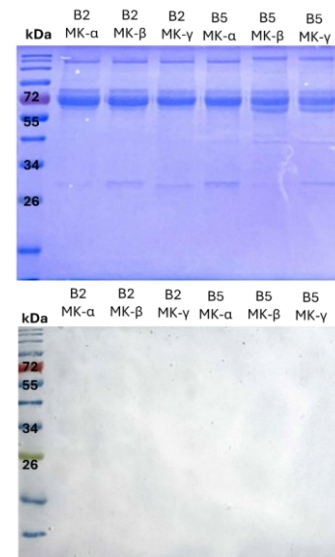
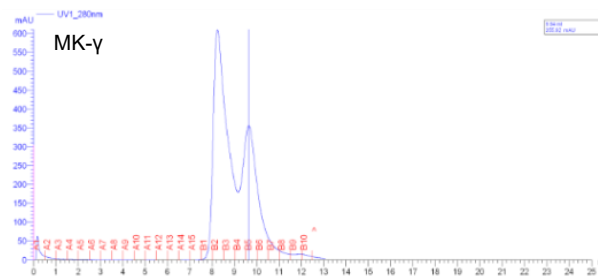
β2-3C-α2



β2-3C-α4



β2-α4



Εικόνα 77. Αριστερά: Χρωματογραφία μοριακού ηθμού των απομονωμένων πρωτεϊνών από το υπερκείμενο των καλλιιεργειών HEK κυττάρων. Δεξιά: ανάλυση των κλασμάτων της χρωματογραφίας σε (πάνω) SDS-PAGE και (κάτω) Western blot με αντίσωμα που αναγνωρίζει επίτοπους 6 ισιδίων.

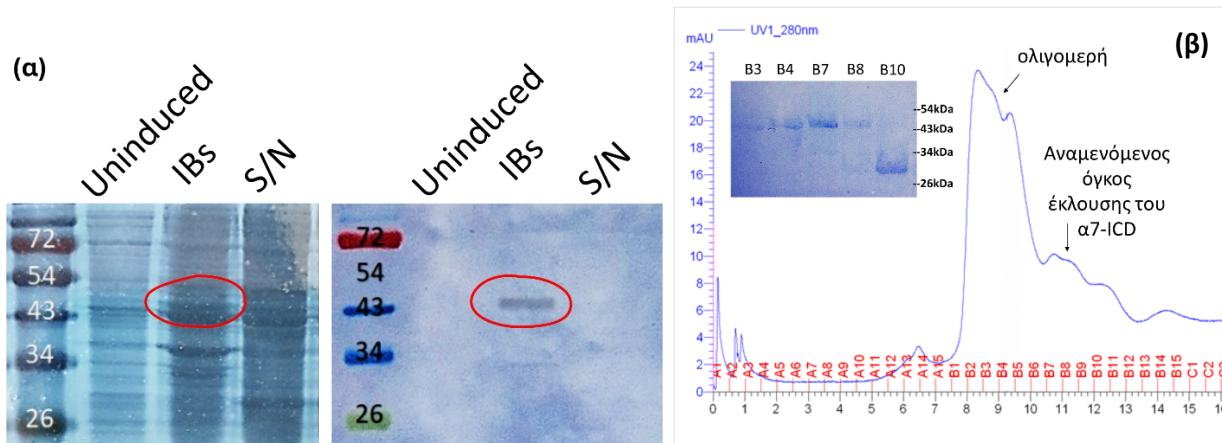
Εκφράσεις ενδοκυττάρων περιοχών α7 και α9 υπομονάδων σε βακτήρια:

Στο πλαίσιο του έργου πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές ετερόλογης έκφρασης και καθαρισμού ενδοκυττάρων περιοχών (Intracellular Domains, ICDs) νευρωνικών νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης (nAChRs), με έμφαση στις υπομονάδες α7 και α9. Οι συγκεκριμένες περιοχές επιλέχθηκαν καθώς αποτελούν τις λιγότερο μελετημένες δομικές περιοχές των nAChRs, ενώ υπάρχουν ενδείξεις πιθανά ανοσογόνο δράση και στόχο «ορφανών» αντισωμάτων που σχετίζονται με τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Για τους παραπάνω λόγους σχεδιάστηκαν οι παρακάτω μοριακές κατασκευές (78), οι οποίες κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pGEX-6P και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό κυττάρων *E. Coli* BL21.



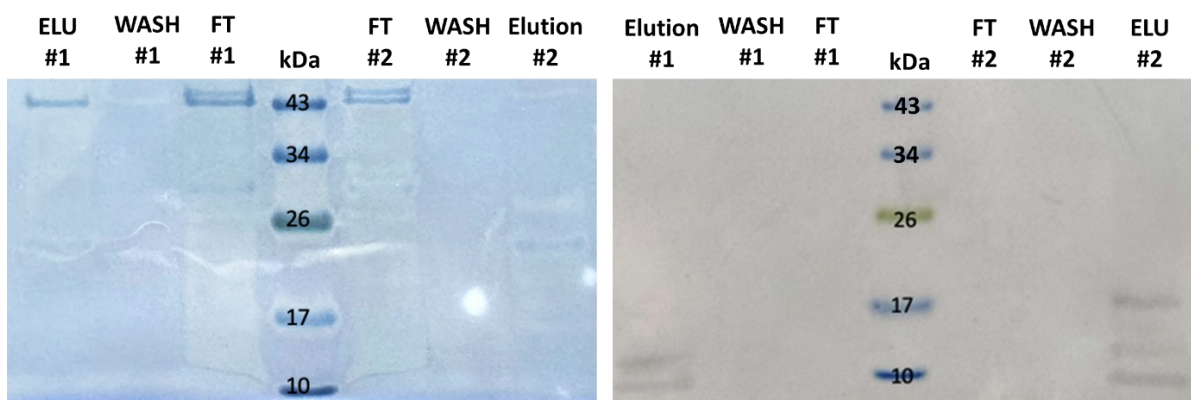
Εικόνα 78. Μοριακές κατασκευές των ενδοκυττάρων περιοχών υπομονάδων του α7 και α9 νευρικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

Για την υπομονάδα α7, πραγματοποιήθηκε έκφραση της ICD περιοχής σε σύστημα *E. coli*, με στόχο την παραγωγή επαρκούς ποσότητας πρωτεΐνης για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων καθαρισμού και αξιολόγησης της διαλυτότητας και της ολιγομερικής κατάστασης. Η αρχική διαλογή συνθηκών έδειξε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται κυρίως υπό τη μορφή σωμάτων εγκλεισμού (inclusion bodies). Τα σώματα εγκλεισμού απομονώθηκαν, διαλυτοποιήθηκαν και ακολούθησε αναδίπλωση της πρωτεΐνης επί στήλης Ni-NTA. Η αναδιπλωμένη πρωτεΐνη εκλούστηκε με ιμιδαζόλη και αναλύθηκε με χρωματογραφία μοριακού ηθμού (SEC) και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή απομόνωση της α7-ICD σε διαλυτή μορφή και επαρκή καθαρότητα για περαιτέρω βιοχημικές μελέτες (Εικόνα 79).



Εικόνα 79. (α) Ανίχνευση του α7-ICD στα σώματα εγκλεισμού με ανοσοαποτύπωση και (β) ανάλυση του *in vitro* αναδιπλωμένου α7-ICD σε χρωματογραφία μοριακού ηθμού και SDS-PAGE.

Για την υπομονάδα α9, ακολουθήθηκε αντίστοιχη στρατηγική έκφρασης της ICD περιοχής σε βακτηριακό σύστημα, ωστόσο, τα αποτελέσματα κρίθηκαν μη ικανοποιητικά, καθώς μετά από καθαρισμό με Ni-NTA και ανάλυση μέσω Western blot ανιχνεύθηκαν μόνο ίχνη της πρωτεΐνης στόχου, συνοδευόμενα από εκτεταμένη πρωτεολυτική αποδόμηση (Εικόνα 80). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν αυξημένη δομική αστάθεια της α9-ICD στο συγκεκριμένο σύστημα και τεκμηριώνουν την ανάγκη επανασχεδιασμού της πειραματικής προσέγγισης.



Εικόνα 80. Ανάλυση σε (αριστερά) SDS-PAGE και (δεξιά) Western Blot των κλασμάτων έκλουσης (ELU), πλύσης (WASH) και πρωτεϊνών που δεν έδεσαν (FT) από τη στήλη Ni-NTA δύο καλλιιεργειών του α9-ICD.

Έκφραση α9 υπομονάδας σε ζυμομύκητα:

Σχεδιάστηκε η μοριακή κατασκευή που περιλάμβανε την εξωκυττάρια περιοχή (ECD) της α9 υπομονάδας του νευρικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (α9-ECD) συζευγμένη με έναν επίτοπο 6 ιστιδινών, βελτιστοποιημένη για έκφραση σε ζυμομύκητα *Pichia pastoris* (Εικόνα 81). Η κατασκευή κλωνοποιήθηκε

σε πλασμίδιο pPICZαA, γραμμικοποιήθηκε με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση SacI και χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό X33 κυττάρων *Pichia (Komagataella) pastoris* με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεές καλλιέργειες και έγινε επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων υπό την πίεση του αντιβιοτικού ζεοσίνη, στην οποία παρέχει ανθεκτικότητα το πλασμίδιο.

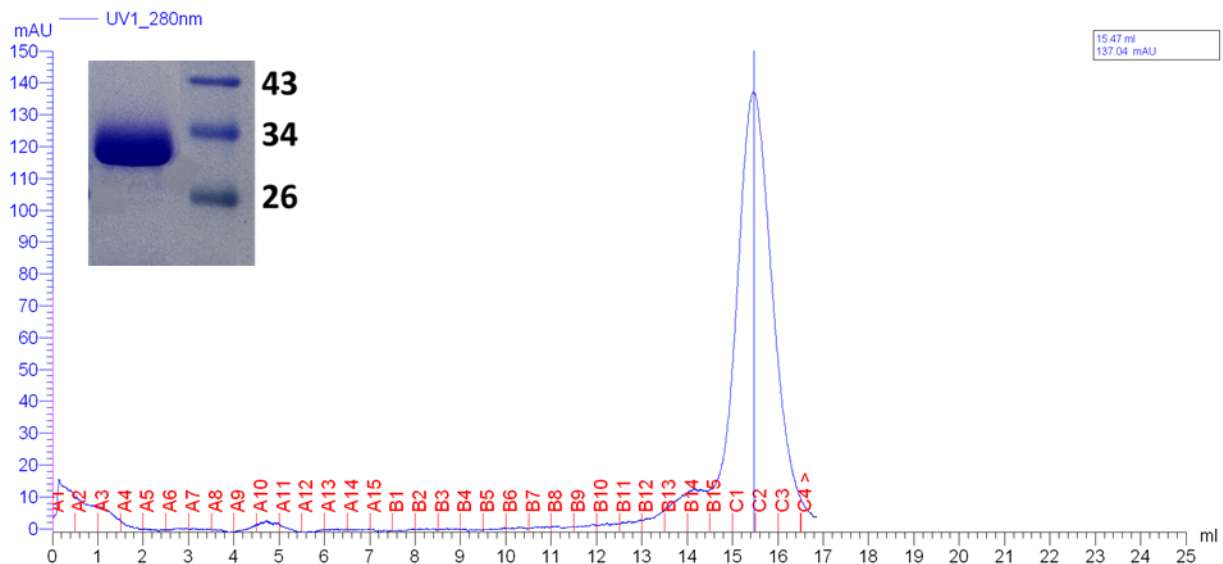


Εικόνα 81. Μοριακή κατασκευή του εξωκυττάριου μέρους της α9 υπομονάδας του νευρικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

Έγινε επιλογή 20 ανασυνδυασμένων κλώνων για την μοριακή κατασκευή με τους οποίους διεξάχθηκε δοκιμασία έκφρασης της πρωτεΐνης και σάρωσή τους για την επιλογή του καλύτερου κλώνου. Η διαδικασία αυτή περιλάμβανε την υγρή καλλιέργεια σε μικρή κλίμακα του κάθε κλώνου, τη διαδικασία υπερέκφρασης για 3 ημέρες με την επαγωγή του μεθανολο-επαγόμενου υποκινητή AOX1 και έπειτα τη συλλογή των υπερκείμενων των καλλιέργειών που δυνητικά περιείχαν την προς έκφραση πρωτεΐνη.

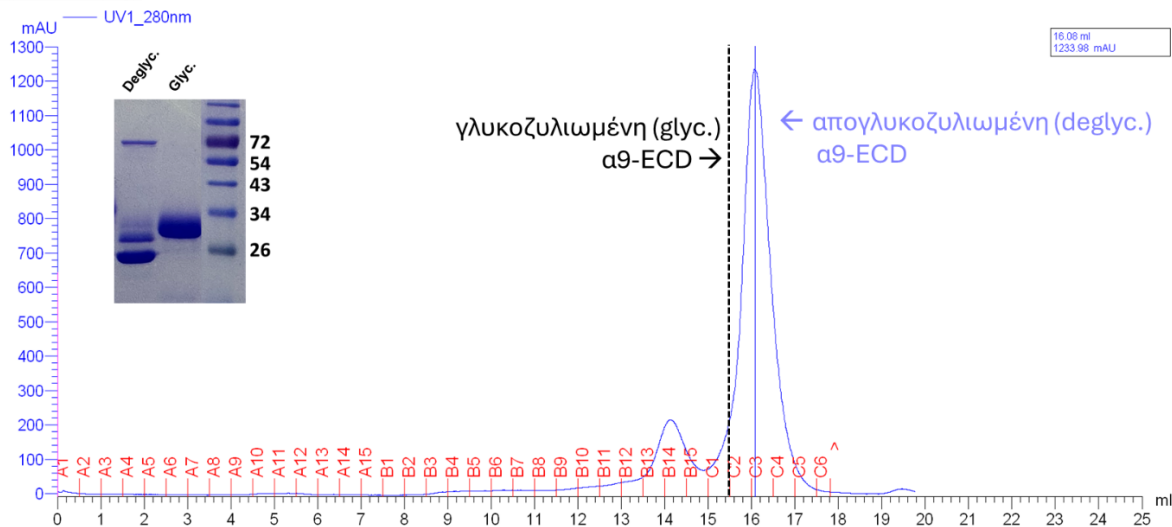
Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της έκφρασης έγινε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης σε κηλίδες (Dot-Blot) χρησιμοποιώντας αντίσωμα που αναγνωρίζει τον επίτοπο ιστιδινών και εμφάνισή του ανοσοαποτυπώματος με δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με HRP. Βάσει οπτικής παρατήρησης της έντασης των κηλίδων μετά την εμφάνιση έγινε η διαλογή του βέλτιστου κλώνου για την κάθε μοριακή κατασκευή.

Έγινε καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα της μοριακής κατασκευής. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε υγρή καλλιέργεια όγκου 1 Lt και επαγωγή της έκφρασης για 3 ημέρες με την χρήση μεθανόλης. Έπειτα, έγινε συλλογή των υπερκείμενων και απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC). Η ετερόλογη α9-ECD καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και αναλύθηκε σε SDS-PAGE (**Εικόνα 82**).



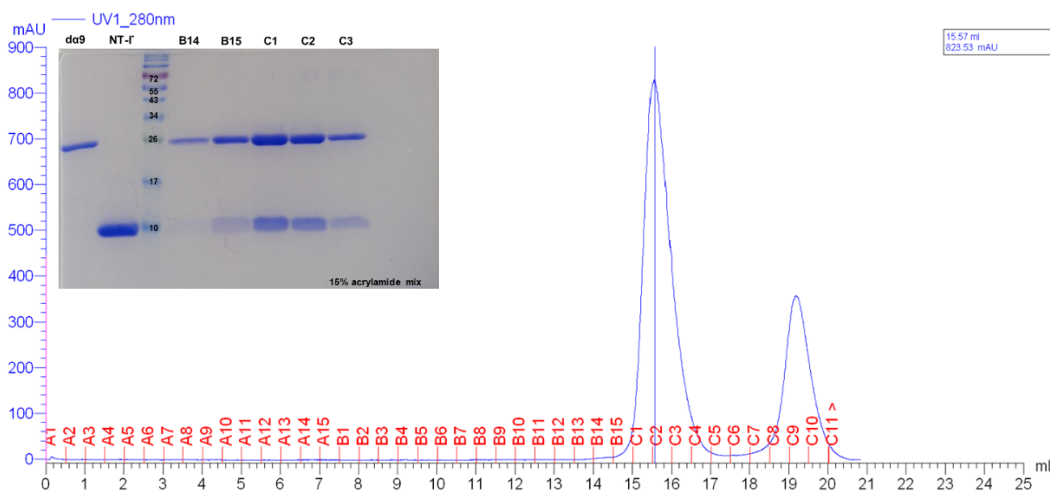
Εικόνα 82. Ανάλυση σε χρωματογραφία μοριακού ηθμού και σε SDS-PAGE της α9-ECD.

Η υψηλής καθαρότητας πρωτεΐνη α9-ECD υποβλήθηκε σε ενζυματική απογλυκοζυλίωση με το ένζυμο EndoHf και εκ νέου καθαρισμός με χρωματογραφία μοριακού ηθμού που αποδεικνυε και την επιτυχή απογλυκοζυλίωση (**Εικόνα 83**).



Εικόνα 83. Ανάλυση σε χρωματογραφία μοριακού ηθμού της απογλυκοζυλιωμένης α9-ECD και SDS-PAGE ανάλυση της κορυφής έκλουσης.

Η απογλυκοζυλιωμένη α9-ECD που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για δοκιμασία συμπλοκοποίησης με τη νευροτοξίνη NT-1 που απομονώνεται από το είδος *Naja oxiana*. Το σύμπλοκο επωάστηκε για τον κατάλληλο χρόνο και έπειτα αναλύθηκε ως προς την επιτυχή επίτευξή του με χρωματογραφία μοριακού ηθμού (Εικόνα 84). Το απομονωμένο σύμπλοκο υποβλήθηκε σε δοκιμασία κρυστάλλωσης χρησιμοποιώντας εμπορικά πακέτα συνθηκών κρυστάλλωσης (crystallization kits).



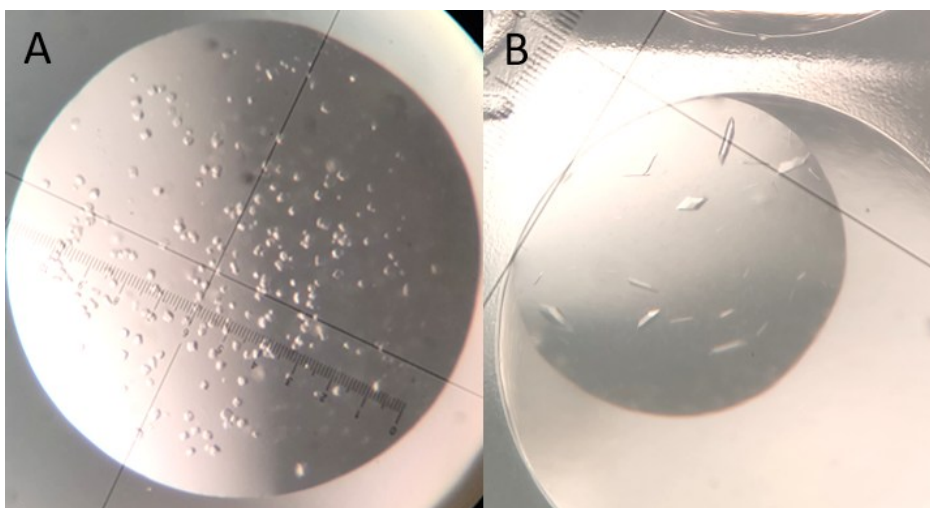
Εικόνα 84. Χρωματογραφία μοριακού ηθμού του συμπλόκου α9-ECD/NT-1 και ανάλυση σε SDS-PAGE των κλασμάτων έκλουσης.

Β) Συγκρυστάλλωση νευρωνικών υποδοχέων με φαρμακευτικά μόρια ή πεπτιδία και επίλυση δομής

Προκειμένου να μελετηθούν δομικά οι $\alpha 2/\beta 2$, $\alpha 7$ και $\alpha 7/\beta 2$, πραγματοποιήθηκαν εκτεταμένες δοκιμές κρυστάλλωσης χρησιμοποιώντας ρομπότ κρυσταλλώσεων, που διαθέτει η ομάδα μας. Οι δοκιμές κρυστάλλωσης έγιναν σε πιάτα 96 θέσεων, χρησιμοποιώντας 3 κρυσταλλογραφικά kit (PACT, MORPHEUS και Proplex, του οίκου Molecular Dimensions), 96 συνθήκες έκαστο. Για την κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της καθημένης σταγόνας. Επιπλέον, δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις για την κάθε πρωτεΐνη (4, 8 και 10 mg/mL) και διαφορετικές θερμοκρασίες (4, 16 και 18°C), ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες κρυστάλλωσης.

Αποτέλεσμα: Όσον αφορά στην περίπτωση της $\alpha 2/\beta 2$ δεν έχουν προκύψει κρύσταλλοι μέχρι στιγμής. Στην περίπτωση όμως των $\alpha 7$ και $\alpha 7/\beta 2$ προέκυψαν κρύσταλλοι σε συγκεκριμένες συνθήκες (Εικόνα 85), οι οποίοι απεστάλησαν σε υποδομή synchrotron στο DESY (Αμβούργο, Γερμανία), όπου η Ομάδα μας έχει συνεχή πρόσβαση μέσω του Ευρωπαϊκού δικτύου iNEXT. Κατά την συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ, οι κρύσταλλοι $\alpha 7$ και $\alpha 7/\beta 2$ έδωσαν δεδομένα σε χαμηλή ανάλυση (~11 Å). Αυτή τη στιγμή γίνεται προσπάθεια βελτιστοποίησης των κρυστάλλων αυτών, ώστε να πραγματοποιηθεί η επίλυση της δομής τους.

Επίσης, δοκιμάστηκε συγκρυστάλλωση των $\alpha 7$ και $\alpha 7/\beta 2$ με τους γνωστούς προσδέτες της $\alpha 7$, methyllycaconitine (MLA) και d-tubocurarine. Πραγματοποιήθηκε προεπίλυση σε δύο συγκεντρώσεις του εκάστοτε προσδέτη - 5x και 10x μοριακή περίσσεια και σάρωση πολλών συνθηκών κρυστάλλωσης, χωρίς όμως κάποιο επιτυχές αποτέλεσμα μέχρι στιγμής.

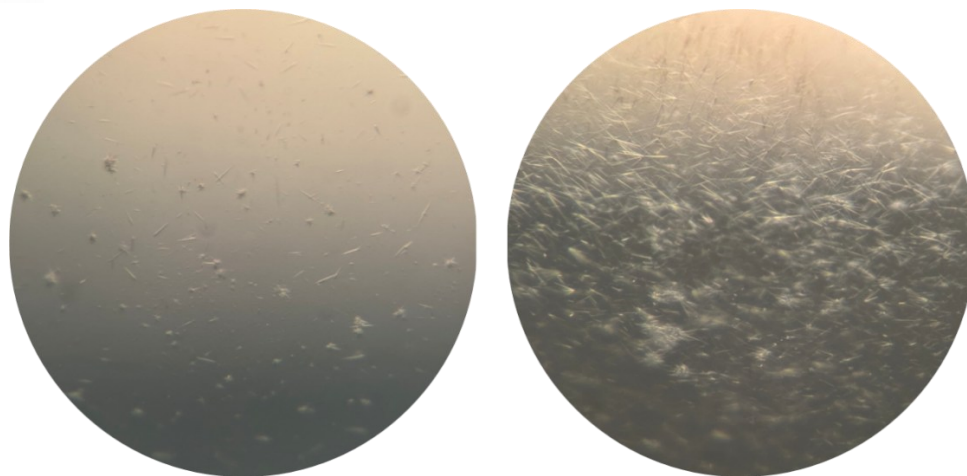


Εικόνα 85. Κρύσταλλοι της $\alpha 7$ -ECD (A) και του $\alpha 7/\beta 2$ συγκαταμερούς απουσία προσδέτη

Σχετικά με συγκρυσταλλώσεις της $\alpha 9$ -ECD:

Οι αρχικές δοκιμασίες συγκρυστάλλωσης της $\alpha 9$ -ECD με τη νευροτοξίνη NT-1 ανέδειξαν 9 συνθήκες που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα, οι οποίες επιλέχθηκαν για να γίνουν εκτενέστερες δοκιμασίες κρυστάλλωσης για την παραλαβή μεγάλου αριθμού ευμεγεθών κρυστάλλων. Οι συνθήκες αυτές απέδωσαν σε αριθμό αλλά χρήζουν βελτιστοποίησης ως προς το μέγεθος των κρυστάλλων για να είναι ικανοί για συλλογή δεδομένων υψηλής ευκρίνειας (

Εικόνα 86).



Εικόνα 86. Βελονοειδείς (needle-like) κρύσταλλοι συμπλόκου $\alpha 9$ -ECD με τη νευροτοξίνη NT-1.