

VPLIV OZNAKE FLAG NA FAZNO SEPARACIJO TEKOČE-TEKOČE

Avtor: Žiga Koren
Mentor: doc. dr. San Hadži

Ključne besede: fazna separacija tekoče-tekoče, oznaka FLAG, FPLC, UV-Vis, kloniranje s sestavljanjem *in vivo*

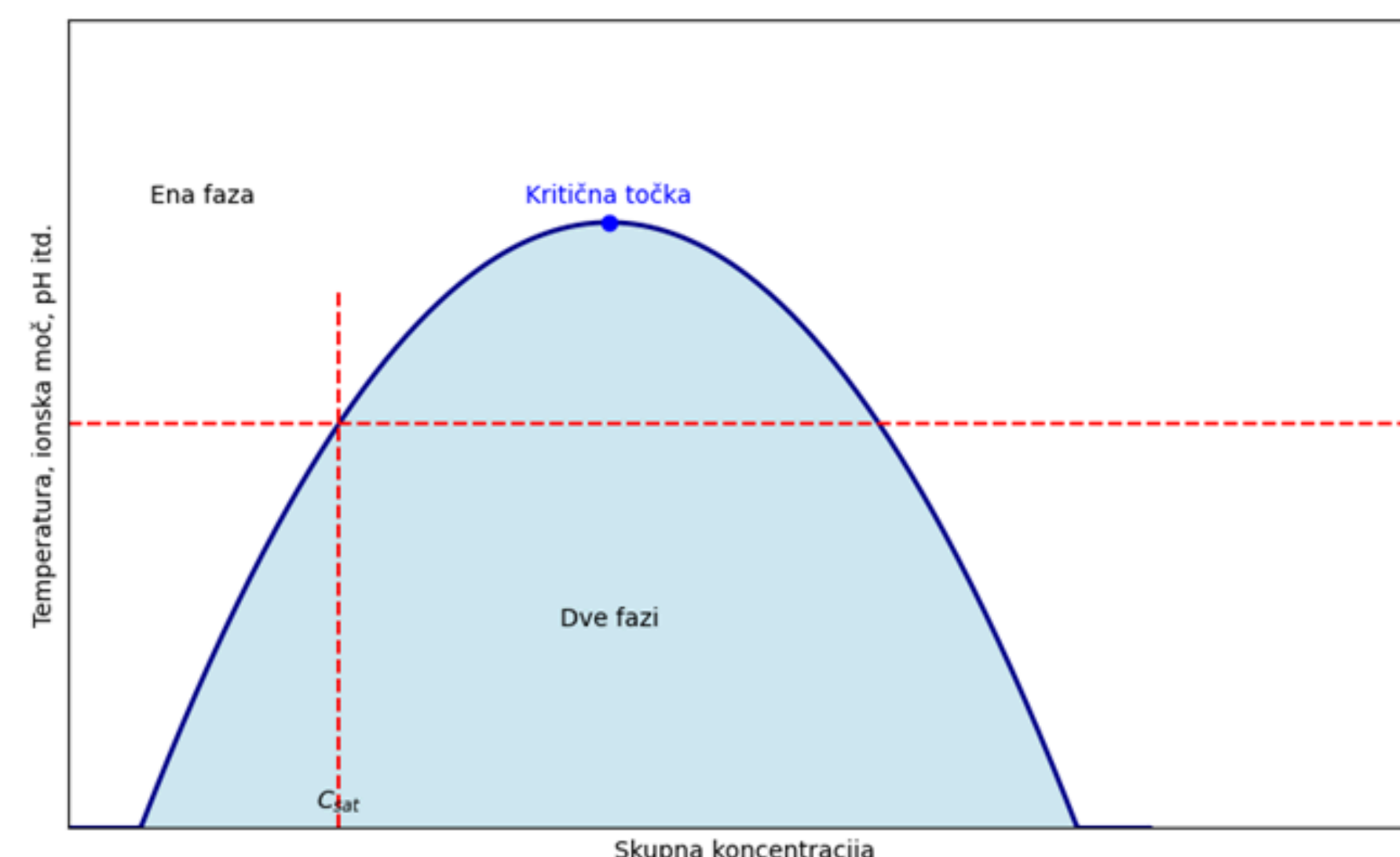
UNIVERSITY
OF LJUBLJANA

FKKT

Faculty of Chemistry
and Chemical Technology

Uvod

Fazna separacija tekoče-tekoče (LLPS) je način fazne separacije, v katerem raztopine makromolekul, na primer proteinov ali nukleinskih kislin, kondenzirajo v bolj gosto tekočo fazno stanje, podobno kapljam. Bolj kondenzirana faza soobstaja z redkejšo fazo. Do LLPS pride zaradi intramolekularnih sil, kot so kation-anion, dipol-dipol, π - π in kation- π interakcije. Nastanek kondenzatov je odvisen od koncentracije makromolekule ter od zunanjih dejavnikov. Odvisno od teh dveh parametrov se makromolekula lahko nahaja v eni ali v dveh fazah. LLPS je v celicah ključen za tvorbo brezmembranskih organelov, pospeševanje biokemijskih reakcij in za varovanje celic pred variacijami v koncentracijah makromolekul, saj so koncentracije znotraj faz konstantne, menjuje se le volumski delež med njimi.

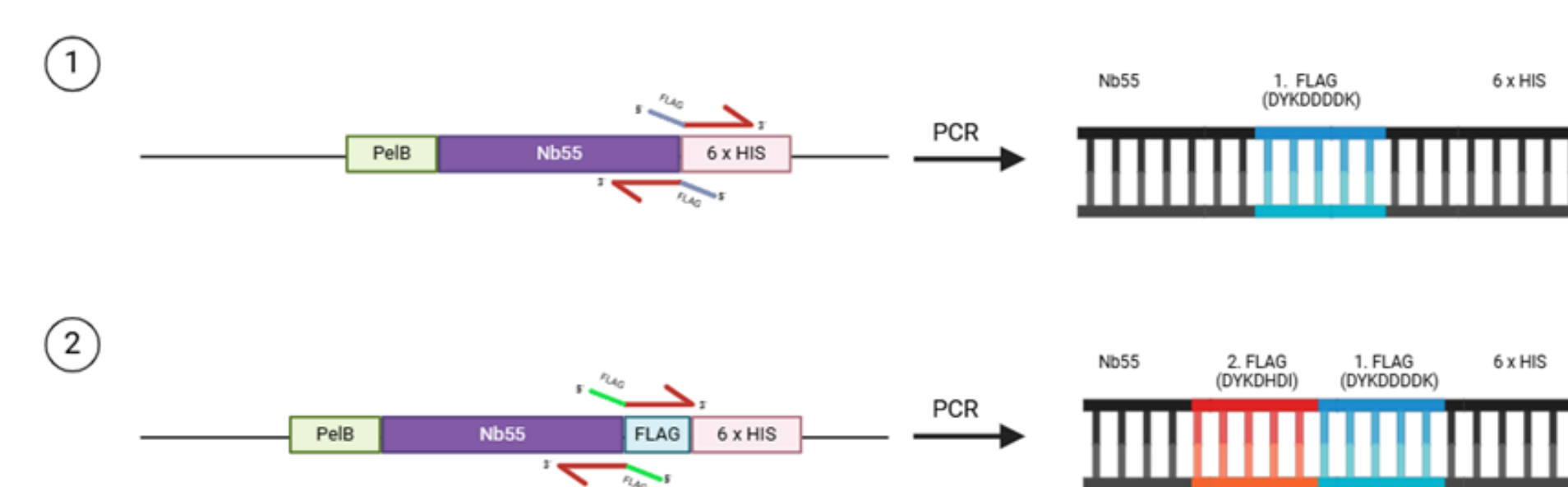


Namen

Tvorba kondenzatov z LLPS lahko vpliva na fizikalne lastnosti in na funkcijo proteina. Sintetični epitop FLAG je pogosto uporabljen fuzijski partner. Zanimalo nas je, če dodatek oznake FLAG vzpodbudi tvorbo LLPS, saj lahko fenomen predstavlja potencialen vpliv na druge raziskave.

Metode

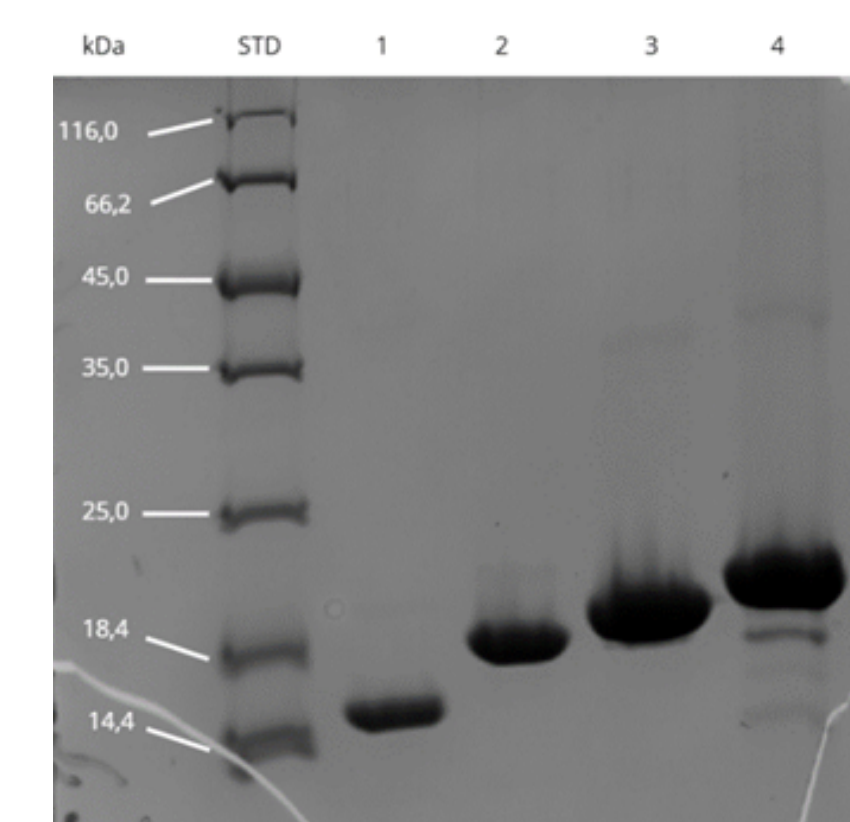
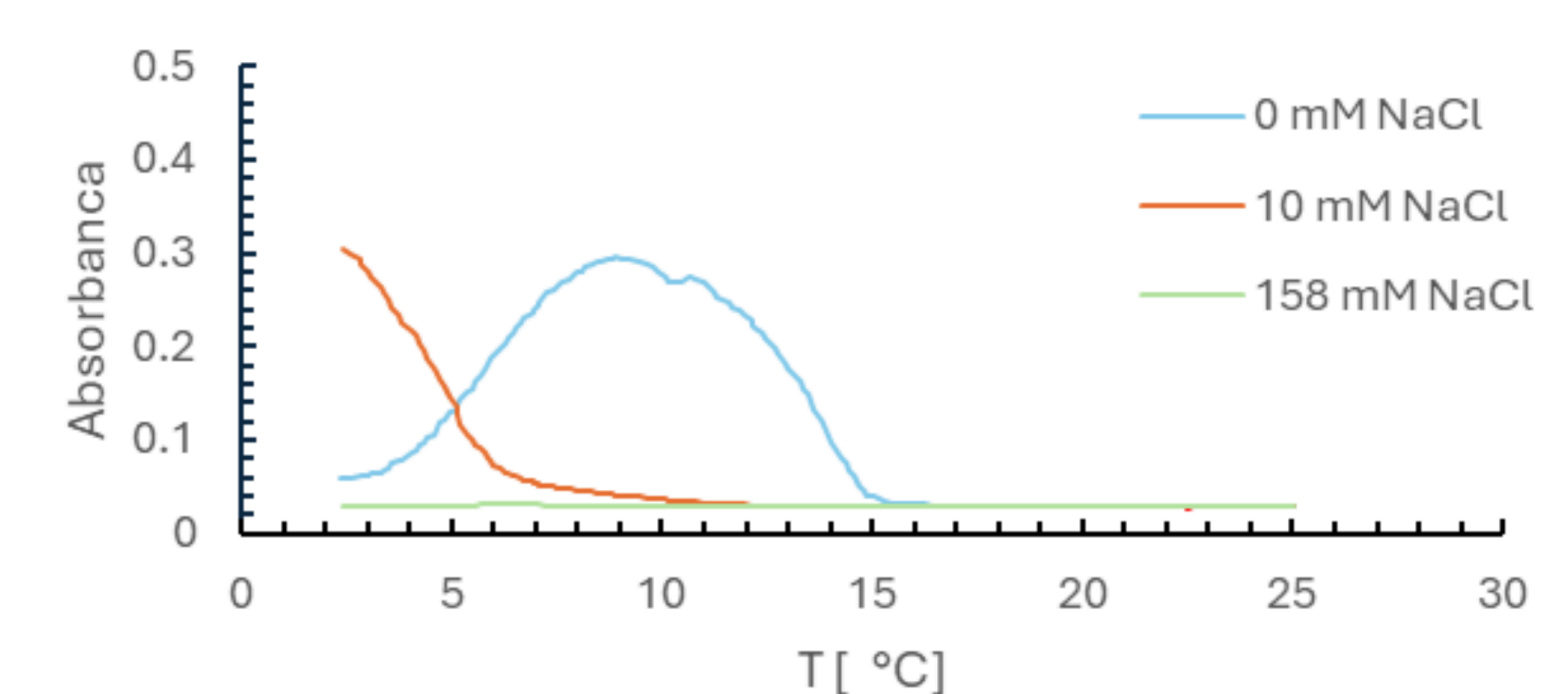
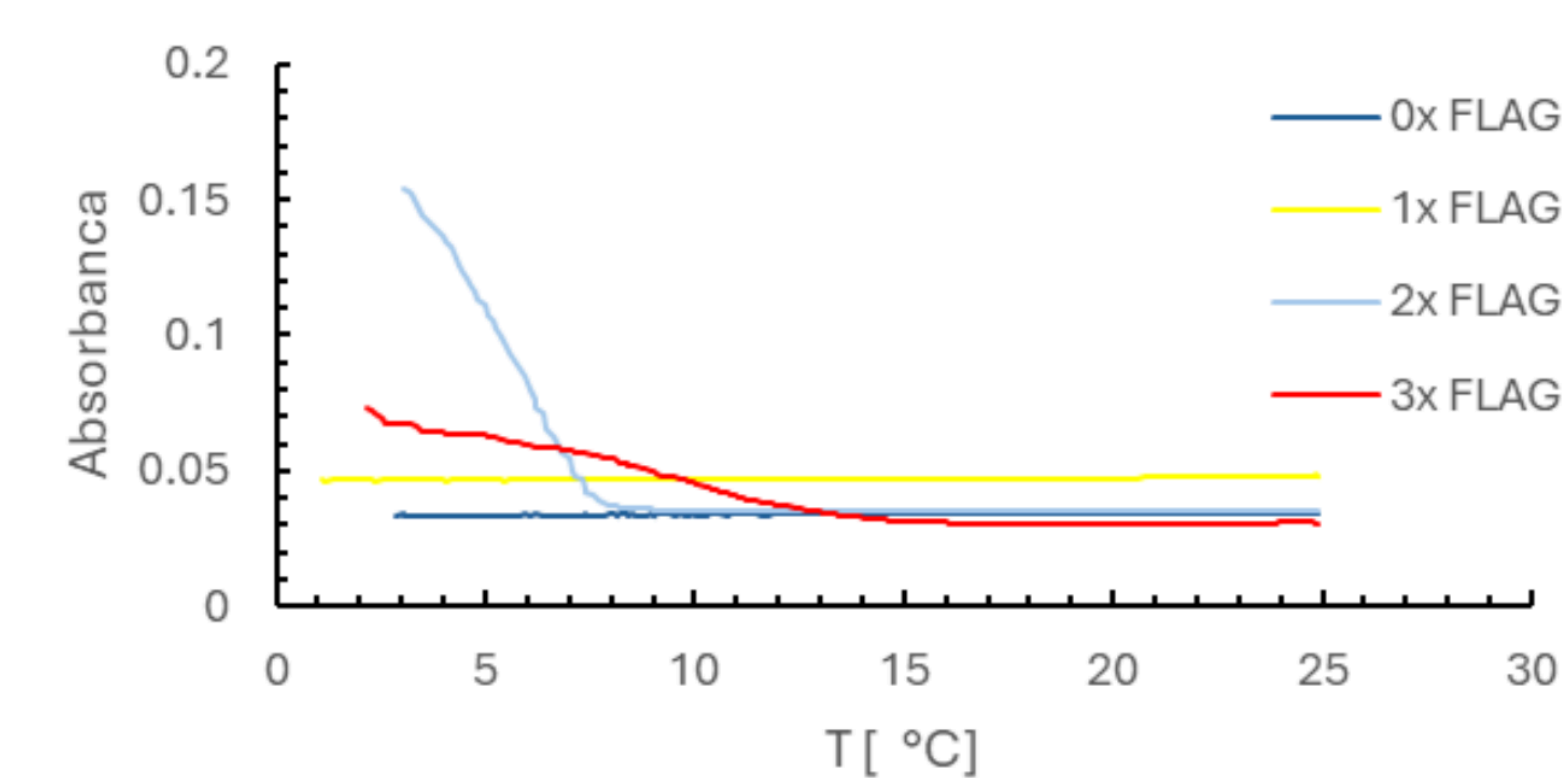
Pripravili smo konstrukte preiskovanega proteina (nanotelesa 55) z 0x, 1x, 2x in 3x oznako FLAG z uporabo kloniranja s sestavljanjem *in vivo* (IVA). Proteine smo izolirali s kovinsko-kelatno imobilizirano kromatografijo (IMAC), pojavu smo sledili z UV-Vis spektrofotometrom pri 550 nm s hlajenjem s hitrostjo 0,1 °C/min.



Rezultati in diskusija

Rezultate izolacije rekombinantnih proteinov, pridobljenih s kloniranjem IVA, smo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom. Proteini so se med seboj razlikovali v zapisu za 1x FLAG (DYKDDDDK), pričakovali smo razlike okoli 1 kDa, kar se tudi sklada s pridobljenimi rezultati. Ob hlajenju smo pojav LLPS zaznali kot porast absorbance, do katerega pride zaradi sipanja svetlobe po pojavu goste faze. Vzorec 3x FLAG je tvoril kondenzate pri temperaturi 13 °C, vzorec 2x FLAG pa pri 8 °C. Pri vzorcih 1x FLAG in 0x FLAG do pojava ni prišlo, kar ponazarja pomembnost prisotnosti intramolekularnih sil, ki jih omogoča oznaka FLAG, za tvorbo kondenzatov. Pojav smo spremljali tudi pri naraščajoči koncentraciji NaCl, pri čemer smo ugotovili, da nizke koncentracije soli zavirajo, višje pa popolnoma zatrejo LLPS.

Z eksperimenti smo pokazali, da prisotnost oznake FLAG poveča nagnjenost proteina k temu, da tvori biomolekularne kondenzate. Kondenzati vplivajo na različne biokemijske lastnosti makromolekul, ki jih tvorijo. Lokalno koncentrirani encimi hitreje vršijo biokemijske reakcije kot tisti, ki se ne nahajajo v kondenzatih, saj so kondenzati dinamične strukture, ki omogočajo hitrejšo izmenjavo snovi. Proteini v kondenzatih lahko tudi zavirajo biokemijske reakcije, saj služijo kot fizične ovire, ali pa se zaradi LLPS narobe zvijejo, kar ovira njihovo funkcijo. Glede na uporabnost oznake FLAG pri detekciji in izolaciji proteinov, je pomembno, da se pred raziskavami, posebej pri raziskavah kinetičnih lastnosti encimov, preveri, če do pojava pride, saj lahko zaradi LLPS pride do neskladanja med rezultati *in vitro* in med dogajanjem *in vivo*.



Zaključek

Uspešno smo pripravili in izrazili proteinske produkte in potrdili povezavo med številom ponovitev oznake FLAG in med tvorbo LLPS. V prihodnjih raziskavah bi bilo dobro pripraviti samostojen polipeptid FLAG in preveriti, če tvori LLPS. Sam pojav je viden na makroskopski ravni, kar v prihodnje omogoča tudi slikanje kondenzatov pod mikroskopom. Ugotovili smo tudi, da prisotnost soli zavira pojav, kar bi lahko pripomoglo k preprečevanju pojava pri raziskavah, kjer LLPS bistveno spremeni lastnosti obravnavanega proteina.

Reference

- Z. Gao, W. Zhang, R. Chang, S. Zhang, G. Yang, G. Zhao: Liquid-Liquid Phase Separation: Unraveling the Enigma of Biomolecular Condensates in Microbial Cells. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 751880.
S. Alberti, A. Gladfelter, T. Mittag: Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* 2019, 176, 419– 434.
W. Li, C. Jiang, E. Zhang: Advances in the phase separation-organized membraneless organelles in cells: a narrative review. *Transl Cancer Res* 2021, 10, 4929–4946.