

Izražanje in izolacija proteina fenilalanin tRNA-sintetaze (FARS)

Špela Rapuš^{1,*}, mag. Urša Čerček², prof. dr. Boris Rogelj^{1,2,*}

1: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2: Institut Jožef Stefan, Oddelek za biotehnologijo

Uvod

- Razširitvena mutacija G4C2 na genu *c9orf72* po več mehanizmih vpliva na razvoj nevrodegenerativnih bolezni kot sta ALS in FTD.
- Protismerni prepis RNA se veže na protein FARS, kar vodi v inhibicijo aminoacilacije tRNA^{Phe} in upad zastopanosti fenilalanina v proteomu.
- Za boljše razumevanje načina vezave in interakcije smo protein FARS izrazili v *E.coli* BL21[DE3] in izolirali.

Metode

- Transformacija bakterij,
- izražanje rekombinantnih proteinov,
- NaDS-PAGE,
- prenos western in barvanje s Coomassie Blue,
- PCR,
- agarozna gelska elektroforeza,
- čiščenje produktov PCR,
- molekulsko kloniranje z Gibsonovo reakcijo,
- izolacija plazmidov,
- restrikcijska analiza in določanje nukleotidnega zaporedja,
- izolacija proteina.

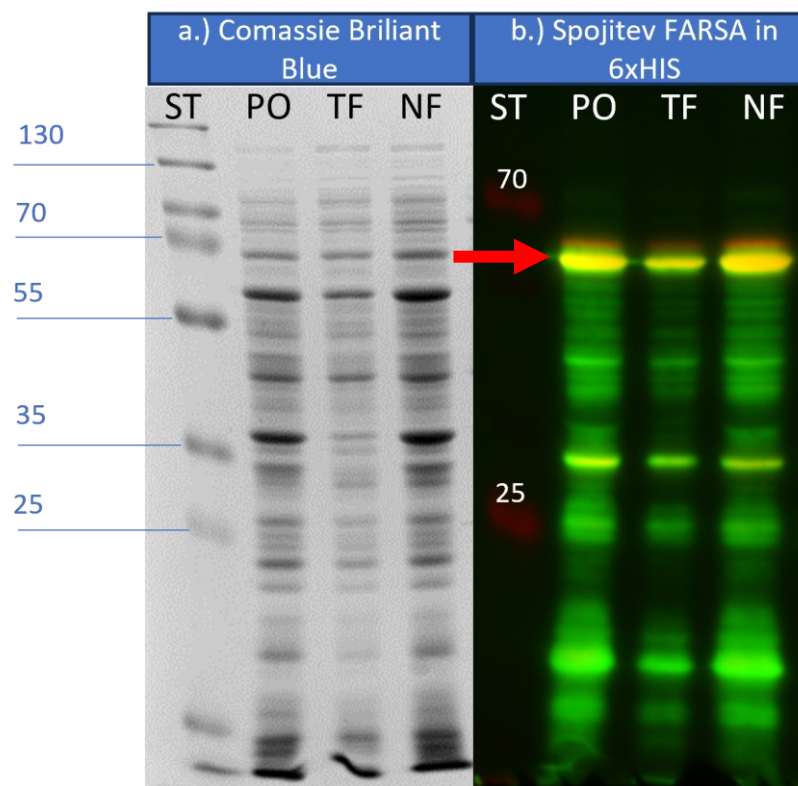
Zaključek

- ✓ Obe podenoti proteina FARS smo uspeli izraziti v *E. coli* v zadostni količini
- ✓ FARS se boljše izraža pri nižji temperaturi, skupaj s fuzijskim partnerjem MBP
- ✓ FARS smo uspeli izolirati v manjši količini z afinitetno kromatografijo.
- ✓ V prihodnosti bi morali optimizirati postopek izolacije in izvesti študije interakcije z RNA

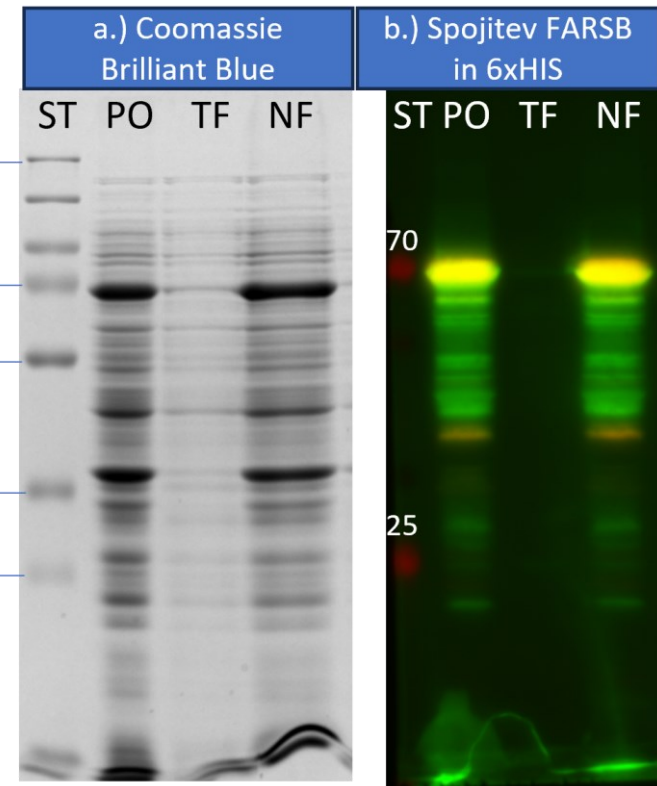
Rezultati in diskusija

Izražanje pri 18 °C

Po izražanju pri 23 °C (ni prikazano) smo FARS izražali pri 18 °C, da bi dobili več proteina v topni frakciji. Podenoto FARSA smo dobili nekaj več v topni frakciji medtem ko podenoto FARSB v topni frakciji nismo zaznali.



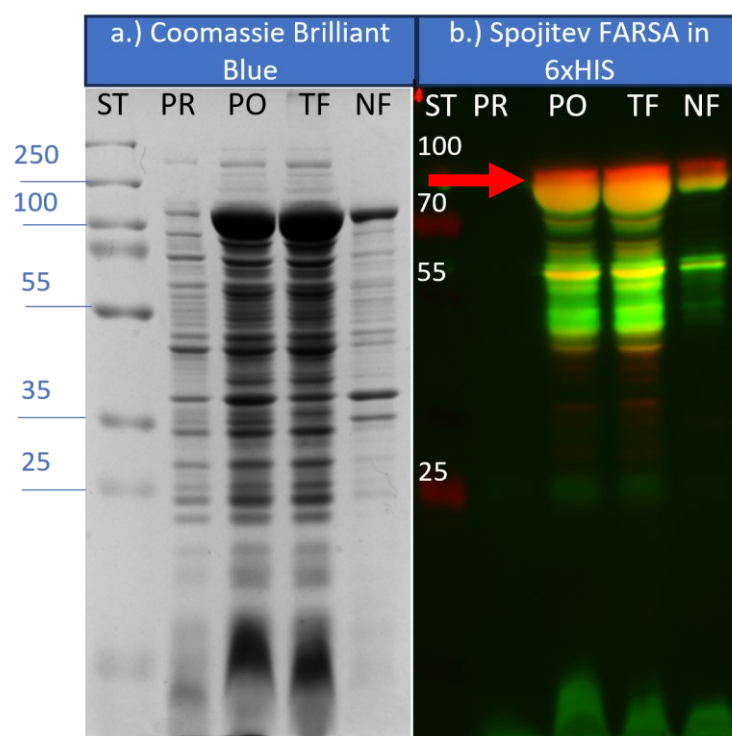
Slika 1: a) vsi proteini barvani s CBB, b) imunodetekcija proti FARSA in heksahistidinski oznaki



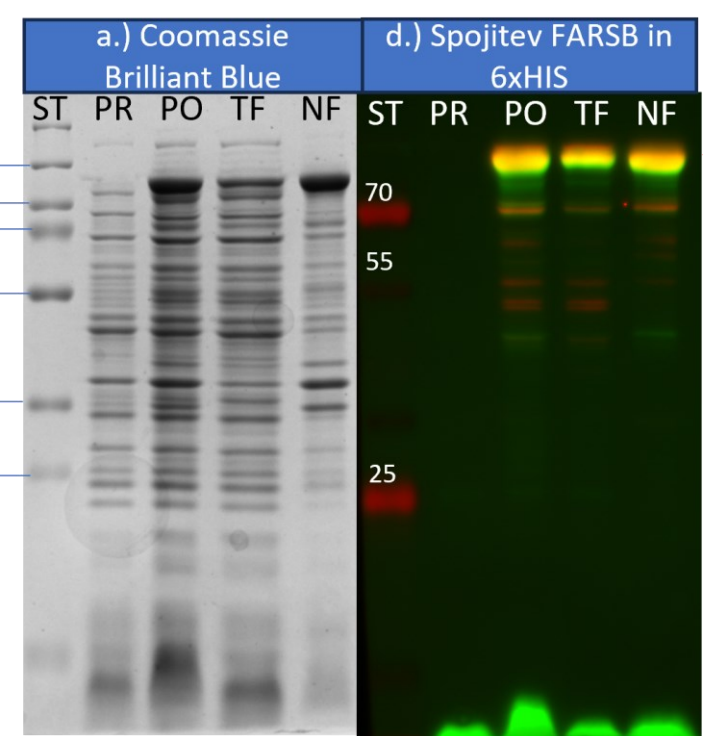
Slika 2: a) vsi proteini barvani s CBB, b) imunodetekcija proti FARSB in heksahistidinski oznaki

Izražanje pri 18 °C z dodanim MBP (maltoza vezavni protein)

Fuzijski partner MBP pomaga pri zvijanju proteina, da ga tako nastane več v topni frakciji. Podenoto FARSA smo uspeli v 90 % izraziti v topni frakciji, FARSB pa 50 %.



Slika 3: a) vsi proteini barvani s CBB, b) imunodetekcija proti FARSA in heksahistidinski oznaki

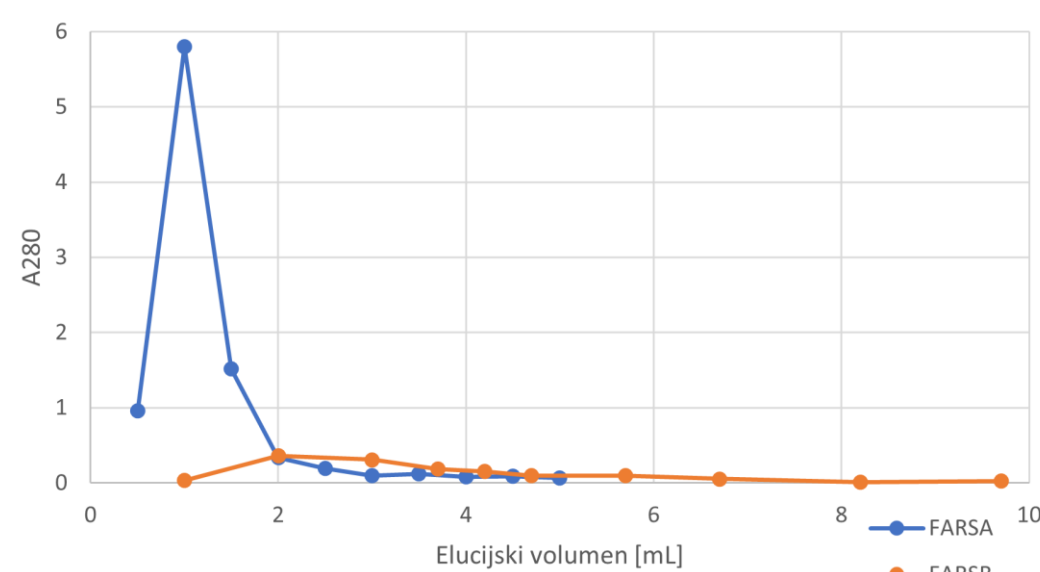


Slika 4: a) vsi proteini barvani s CBB, b) imunodetekcija proti FARSB in heksahistidinski oznaki

Poskusna izolacija

Izolacijo smo izvedli z nikljevo afinitetno kromatografijo. V primeru FARSA smo največ proteina zbrali v prvih treh eluatih (3,65 mg), v primeru FARSB pa v eluatih 2–5 (1,77 mg). Začetni volumen bakterijske kulture je bil 400 mL. Kljub uporabi inhibitorjev proteaz in delu na ledu, je prišlo do proteolitične razgradnje, kar bi lahko izboljšali z delom v hladni sobi.

Graf odvisnosti A280 od elucijskega volumna



Viri

*korespondenčni avtor: boris.rogelj@ijs.si, * spela.rapus@gmail.com

- [1] M. DeJesus-Hernandez, I. R. Mackenzie, B. F. Boeve, A. L. Boxer, M. Baker, N.J. Rutherford, A. M. Nicholson, N. C. A. Finch, H. Flynn, J. Adamson, et al.: Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011, 72, 245–256.
- [2] R. Balendra, A. M. Isaacs: C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol* 2018, 14, 544–558.
- [3] J. P. Taylor, R. H. Brown, D. W. Cleveland: Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 2016, 539, 197–206.

