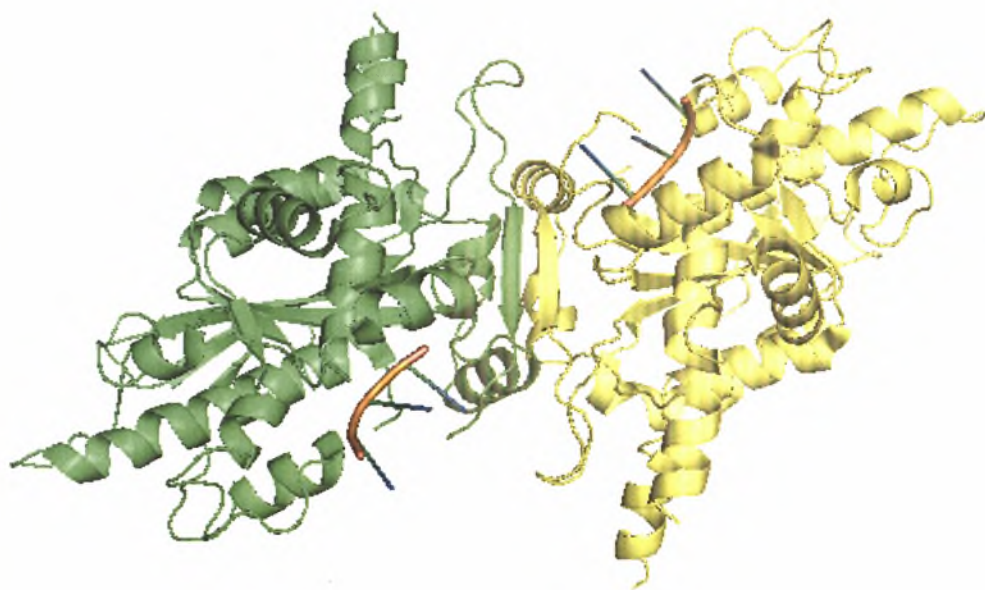




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΚΦΡΑΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ
ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ
poly(A) -specific ribonuclease (PARN)**



**ΚΑΡΑΓΙΩΡΓΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΑΘΗΝΑ 2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7662/1
Ημερ. Εισ.: 09-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087168

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΤΕΧΝΙΚΟ ΕΚΧΕΙΡΙΣΤΗΡΙΟ
Αριθ. Έργου: 705
Ημερομηνία: 30-9-2009



Δρ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

Κύριος Ερευνητής του Ινστιτούτου Οργανικής και
Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Δομικής Βιολογίας και
Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών



Δρ. ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Λέκτορας Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



Δρ. ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ

Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2009- Ιούλιος 2009, στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με το Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, όπου και πραγματοποιήθηκε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητή του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του και για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε. Οι συμβουλές, η καθοδήγηση και η βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας υπήρξαν για εμένα πολύτιμες. Αλλά περισσότερο θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τον εξαιρετο ανθρώπινο χαρακτήρα του, που για εμένα στάθηκε ορόσημο στα πρώτα μου επιστημονικά βήματα.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Δρ. Μπαλατσό Νικόλαο που από την πρώτη στιγμή με καθοδήγησε και με εμπιστεύτηκε ώστε να έχω την δυνατότητα να αγωνιστώ και να πετύχω το στόχο μου.

Επίσης, θα ήταν τεράστια παράλειψη να μην ευχαριστήσω την Βιοχημικό-Βιοτεχνολόγο Βασιλική Τσιρκώνη για την εξαιρετική συνεργασία που είχα μαζί της και για την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στο Δρ. Σπύρο Ζωγράφο, την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Δράκου, την μεταπτυχιακή φοιτήτρια και καλή φίλη Κεραμιώτη Μαρία, τον διδακτορικό φοιτητή Πέτρο Γκιάστα και την φίλη μου Φένια Παπαγιάννη καθώς και τη βιοχημικό Δρ.Σκαμνάκη Βασιλική και τη χημικό Δρ. Τσιτσάνου Κατερίνα για την προθυμία τους να με βοηθήσουν σε οτιδήποτε χρειάστηκε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Νίκο και Πόλυ καθώς και τις αδερφές μου, Αιμιλία και Μαρία που βρίσκονται πάντα δίπλα μου και με βοηθούν να εκπληρώνω τα όνειρα μου.

ABSTRACT

Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) is a poly(A)-specific 3' exoribonuclease that mediates eukaryotic mRNA turnover and thus is actively involved in the regulation of gene expression. Human PARN consists of 639 amino acids. The crystal structure of C-terminal truncated human PARN (residues 1-430), designated as PARNn, is determined in two states (free and RNA-bound forms) and revealed that PARN is folded into two domains, an R3H domain and a nuclease domain. PARNn forms a tight homodimer, with the R3H domain of one subunit partially enclosing the active site of the other subunit with poly(A) bound in a deep cavity of its nuclease domain in a sequence-nonspecific manner. The R3H domain and possibly, the cap-binding domain are involved in poly(A) binding but these domains alone do not appear to contribute to poly(A) specificity. Mutations disrupting dimerization abolish both the enzymatic and RNA-binding activities, suggesting that the PARN dimer is a structural and functional unit. We have established conditions for expression and purification of soluble forms of recombinant human PARN and PARN (residues 1-523), designated as PARNt. Both forms were expressed using a pET33 plasmid in BL21(DE3) E.coli and 1 mg of soluble protein was purified per culture litre. The purification protocol included His-tag affinity chromatography, HiTrap QFF ion exchange chromatography and 7-Me-GTP-Sepharose affinity chromatography. This purification protocol resulted in a 90-95% pure sample of protein. Dynamic Light Scattering (DLS) experiments have shown that recombinant PARN is a tetramer in the solution while screening of more than 200 different crystallization solutions has led to the establishment of crystallization conditions for PARN and PARNt.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ριβονουκλεάση PARN είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση, ειδική στην poly(A) περιοχή, η οποία συμβάλλει στην αναδιοργάνωση του ευκαρυωτικού mRNA και λόγω αυτού εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη PARN αποτελείται από 639 αμινοξέα. Η κρυσταλλική δομή του C-τελικού άκρου της ανθρώπινης PARN (αμινοξέα 1-430), που ονομάζεται PARNn, έχει προσδιοριστεί σε δύο καταστάσεις (ελεύθερη και δεσμευμένη στο RNA) και απεκάλυψε ότι η PARN αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές: την R3H και την περιοχή νουκλεάσης. Η PARNn είναι ένα συμπαγές ομοδιμερές, στο οποίο η R3H περιοχή της μιας υπομονάδας περιβάλλει το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην άλλη υπομονάδα. Το υπόστρωμα poly(A), συνδέεται σε μια βαθιά κοιλότητα της περιοχής-νουκλεάσης, με τρόπο ο οποίος είναι ανεξάρτητος από την νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η R3H περιοχή και πιθανόν η cap-δεσμευμένη περιοχή εμπλέκονται στην δέσμευση του υποστρώματος, αν και δεν φαίνεται να συμβάλλουν στην εξειδίκευση του ενζύμου. Μεταλλαγές που εμποδίζουν το διμερισμό, καταστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα και εμποδίζουν την δέσμευση της πρωτεΐνης στο RNA, υποδηλώνοντας ότι το διμερές της PARN αποτελεί μια ανεξάρτητη δομική και λειτουργική μονάδα. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία διεξήχθη έκφραση και καθαρισμός των διαλυτών μορφών των ανασυνδυασμένων ανθρώπινων πρωτεϊνών, PARN και PARN (αμινοξέα 1-523), που ονομάζεται PARNt. Οι δύο πρωτεΐνες εκφράστηκαν χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pET33 σε κύτταρα BL21(DE3) του βακτηρίου E.coli και απομονώθηκε 1mg πρωτεΐνης ανά 1 λίτρο καλλιέργειας. Το πρωτόκολλο καθαρισμού περιλάμβανε χρωματογραφία συγγενείας (His-tag affinity), χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής HiTrap QFF και χρωματογραφία συγγενείας 7-Me-GTP-Sepharose. Το πρωτόκολλο καθαρισμού οδήγησε στην απομόνωση δείγματος με βαθμό καθαρότητας 90-95%. Πειράματα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) έδειξαν ότι η ανασυνδυασμένη PARN στο διάλυμα είναι ένα τετραμερές. Επίσης διεξήχθη σάρωση με αυτοματοποιημένο σύστημα κρυστάλλωσης περισσότερων από 200 διαφορετικών συνθηκών κρυστάλλωσης η οποία οδήγησε στον προσδιορισμό των συνθηκών κρυστάλλωσης για τις PARN και PARNt.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	4

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων	8-13
1.1 Γενικά	8-10
1.2 Μέθοδοι στις οποίες βασίζεται ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων	10-13
2. Σχεδιασμός φαρμάκων και καρκίνος/ Ο ρόλος των ριβονουκλεασών	14-16

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών	18
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών	19-20
4. Υγρή χρωματογραφία	21-24
4.1 Ιστορική αναδρομή	21-22
4.2 Αρχές χρωματογραφίας- Υγρή χρωματογραφία	22-24
5. Η ειδική poly(A) ριβονουκλεάση (PARN)	25-31
5.1 Γενικά	25-26
5.2 Η δομή της PARN	27
5.3 Γενική περιγραφή της δομής	28
5.4 Ομοιότητα της PARN με άλλες εξωνουκλεάσες DEDD.....	29-30
5.5 Ενεργή περιοχή και καταλυτικός μηχανισμός.....	30-31
5.6 Η περιοχή R3H της PARN	31
6. Κρυσταλλογραφία.....	32-42
6.1 Γενικά	32-33
6.2 Περίθλαση ακτίνων-X και η συμβολή τους στην κρυσταλλογραφία	34
6.3 Στάδια προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης.....	35-36
6.4 Κρυστάλλωση πρωτεΐνης	36-37
6.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.....	37-38
6.6 Σχεδιασμός κρυστάλλωσης	39-41
6.7 Τεχνικές κρυστάλλωσης	42
7. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).....	43-46
7.1 Γενικά	43
7.2 Σκέδαση του Φωτός	44
7.3 Θεωρία στην οποία βασίζεται το DLS	44-45
7.4 Ρύθμιση του DLS	45-46
8. Σκέδαση Μικρής Γωνίας (SAXS/SANS)	47

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. Αντικείμενο μελέτης	49
9.1 Αντιδραστήρια/Υλικά.....	50-52
9.2 Καλλιέργεια κυττάρων για την απομόνωση της PARN.....	53
9.2.1 Καθαρισμός της PARN χρησιμοποιώντας στήλη συγγένειας νικελίου(His-tag)	53-56
9.2.2 Καθαρισμός της PARN χρησιμοποιώντας στήλη ιοντοανταλλαγής HiTrapQFF	56
9.2.3 Καθαρισμός της PARN χρησιμοποιώντας στήλη συγγένειας 7-methyl-GTP-sepharose	57-59
9.2.4 DLS μέθοδος για την PARN	59-61
9.2.5 Κρυστάλλωση πρωτεΐνης PARN	62
9.3 Καλλιέργεια κυττάρων για την απομόνωση της PARNt.....	63
9.3.1 Καθαρισμός της PARNt χρησιμοποιώντας στήλη συγγένειας νικελίου(His-tag)	64
9.3.2 Καθαρισμός της PARNt χρησιμοποιώντας στήλη ιοντοανταλλαγής HiTrapQFF	65-66
9.3.3 Καθαρισμός της PARNt χρησιμοποιώντας στήλη μοριακής διήθησης Superdex 200	66-67
9.3.4 Κρυστάλλωση πρωτεΐνης PARNt.....	68
9.3.5 Μέθοδος SAXS για την PARNt.....	69

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

10. Συμπεράσματα	70
-------------------------------	-----------

Βιβλιογραφία	71
---------------------------	-----------

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1) ΓΕΝΙΚΑ

Τα τελευταία χρόνια ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων, παρουσιάζει αλματώδη ανάπτυξη. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας είναι σημαντικό και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι των περισσότερων ερευνητικών προγραμμάτων παραγωγής φαρμάκων. Τα πρώτα εγχειρήματα ξεκίνησαν στα μέσα της δεκαετίας του '80 ενώ στις αρχές της δεκαετίας του '90 έγιναν οι πρώτες δημοσιεύσεις.

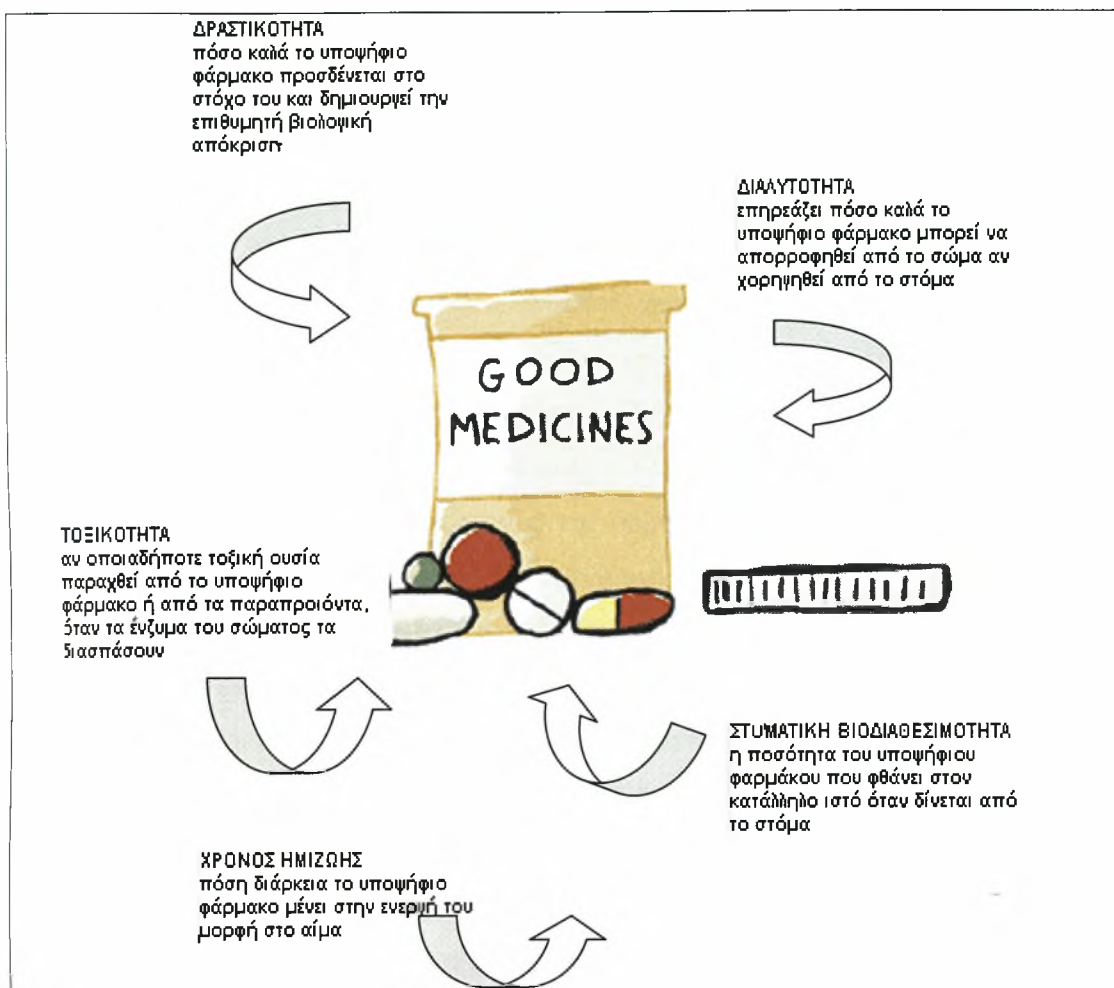
Ο ιδανικότερος στόχος για κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκου είναι ένα μακρομόριο που σχετίζεται στενά με την ανθρώπινη ασθένεια και η δράση του είναι αναγκαία για την εμφάνιση της ασθένειας. Έτσι, διάφορα κατάλληλα σχεδιασμένα μικρά μόρια θα πρέπει να συνδέονται στο μακρομόριο και να αναστέλλουν αποτελεσματικά τη λειτουργία του. Ο βιολογικός στόχος για τα περισσότερα φάρμακα είναι μια πρωτεΐνη. Έχουν όμως αναφερθεί και άλλοι φαρμακευτικοί στόχοι όπως λιπίδια ή πρωτεολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και νουκλεϊνικά οξέα.

Οι τεχνικές της μοριακής βιολογίας έδωσαν την δυνατότητα έτσι ώστε να παράγονται μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης-στόχου ιδιαίτερα ανθρώπινων μέσω της ετερόλογης έκφρασης σε βακτήρια. Οι μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού των πρωτεϊνών βελτιώνονται και αυτές συνεχώς χάρη στις σύγχρονες αυτοματοποιημένες μεθόδους υγρής χρωματογραφίας. Έτσι, βελτιωμένα συστήματα υπερέκφρασης και απομόνωσης πρωτεϊνών διευκολύνουν σήμερα, την παραγωγή διαφόρων μορφών μίας πρωτεΐνης όπως π.χ. μεταλλαγμένων μορφών ή επισημασμένων με C13 ή N15 οι οποίες χρειάζονται για τον προσδιορισμό της μακρομοριακής δομής με φασματοσκοπία NMR. Επίσης, η κρυσταλλογραφία ακτίνων X, η πλέον διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής μακρομορίων, εμφανίζει τα τελευταία χρόνια αλματώδη ανάπτυξη λόγω της χρήσης ειδικών ρομπότ για την ανάπτυξη κρυστάλλων, της διαθεσιμότητας πηγών ακτίνων-X μεγάλης ισχύος, καθώς και της ανακάλυψης τεχνικών ψύξης των κρυστάλλων σε θερμοκρασία 100 K.

Όλες αυτές οι ανακαλύψεις έχουν σαν αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του αριθμού των πρωτεϊνών για τις οποίες γνωρίζουμε σήμερα την τρισδιάστατη δομή τους. Έτσι σήμερα βρίσκονται κατατεθειμένες περισσότερες από 59000 δομές πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων στη διεθνή βάση πρωτεϊνικών δομών (RSCB PDB).

Κάτι το οποίο δεν πρέπει να ξεχνάμε είναι ότι ο προσδιορισμός της δομής αποτελεί ένα πολύ μικρό κομμάτι της συνολικής διαδικασίας που ακολουθείται για την δημιουργία ενός φαρμάκου. Υπάρχει αρκετός δρόμος από την ανακάλυψη ή τον σχεδιασμό ενός στενά συνδεδεμένου μορίου μιας πρωτεΐνης-στόχου και της εμπορικής διαθεσιμότητας ενός φαρμάκου. Ένας αναστολέας, που με επιτυχία ανακαλύφθηκε και σχεδιάστηκε μπορεί να είναι αρκετά τοξικός, να μεταβολίζεται και να απεκκρίνεται γρήγορα, να προκαλεί τερατογένεση, να έχει υψηλό κόστος παραγωγής κ.ά.

Τα κριτήρια για να επιτραπεί μια καινούργια ένωση να χορηγηθεί σε πληθυσμούς ατόμων είναι αρκετά αυστηρά και αυτός είναι ο λόγος που τα περισσότερα εν δυνάμει φάρμακα δεν φτάνουν στις προθήκες των φαρμακείων. Επομένως, απαιτούνται χρόνια έρευνας ώστε ένα εν δυνάμει φαρμακευτικό μόριο να μετατραπεί σε φαρμακευτικό σκεύασμα. Σημαντικά και χρονοβόρα προβλήματα, όπως ο μεταβολισμός, η τοξικότητα, η διαθεσιμότητα, η σταθερότητα και οι τυχόν παρενέργειες πρέπει να αντιμετωπισθούν προκειμένου να κριθεί κατάλληλο προς χρήση ένα φάρμακο [Army C.Anderson,2003].



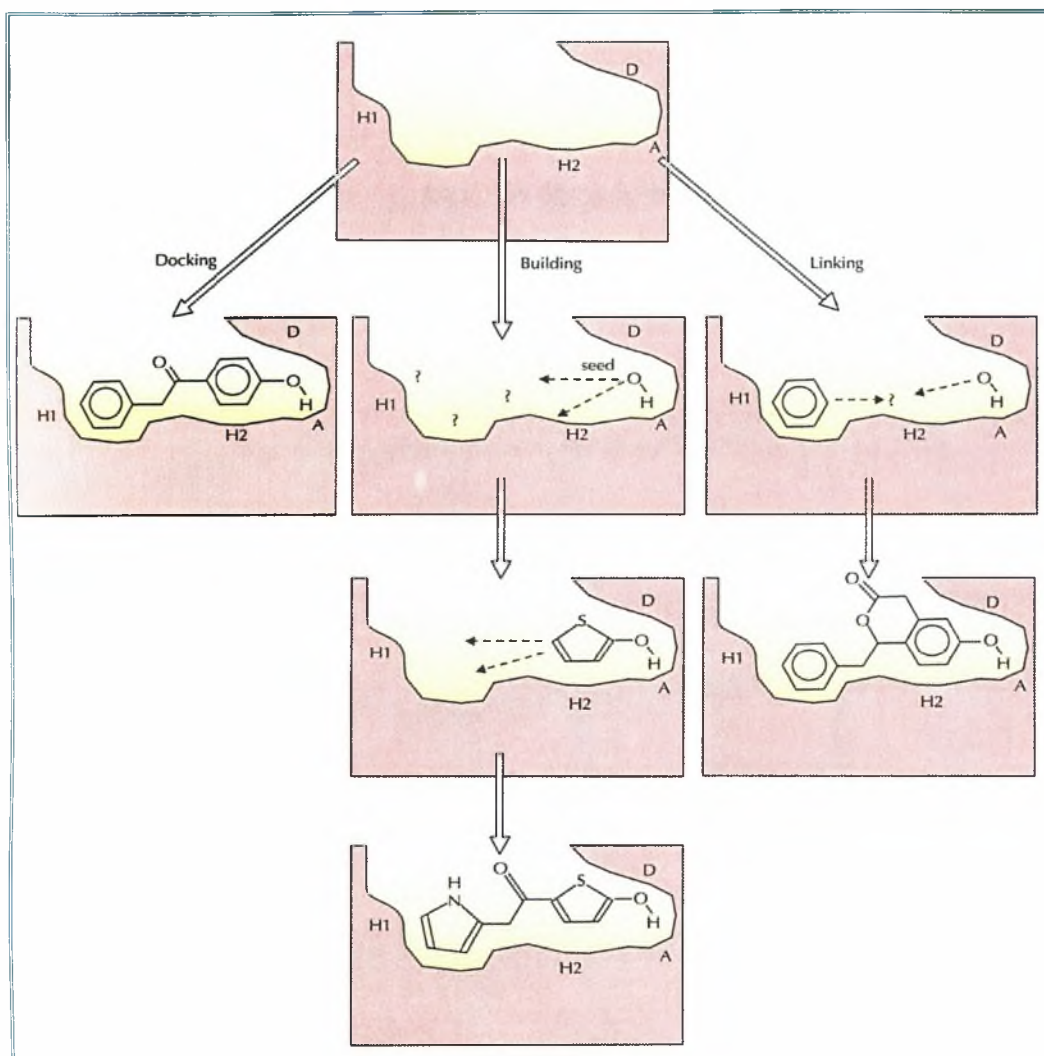
ΕΙΚΟΝΑ 1.1: Προκλινικές προϋποθέσεις ενός εν δυνάμει φαρμάκου για την είσοδο του σε κλινικές δοκιμές.

1.2) ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ Ο ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων βασίζεται στη γνώση της τρισδιάστατης δομής του φαρμακευτικού στόχου. Τρεις είναι οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μιας δομής : η φασματοσκοπία NMR, ο μοντελισμός με βάση την ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία (homology modeling) και η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Χρησιμοποιώντας τη δομή του στόχου, σχεδιάζονται με υπολογιστικές μεθόδους διάφορες ενώσεις με βάση την αρχιτεκτονική του κέντρου σύνδεσης με τρόπο ώστε να παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια και επιλεκτικότητα έναντι του στόχου.

Οι μέθοδοι για τον κατευθυνόμενο από την δομή σχεδιασμό φαρμάκων, μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: Η πρώτη κατηγορία σχετίζεται με την ‘εύρεση’ προσδετών για έναν υποδοχέα. Στην περίπτωση αυτή, με τη βοήθεια υπολογιστικών αλγορίθμων, διάφορες ενώσεις από βάσεις δεδομένων τοποθετούνται σε κάποια επιλεγμένη περιοχή της δομής. Αυτές οι ενώσεις βαθμολογούνται και κατατάσσονται ανάλογα με τις στερικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσουν με την επιλεγμένη περιοχή. Οι ενώσεις που εμφανίζονται να έχουν καλύτερη πρόσδεση ελέγχονται με κινητικά πειράματα ώστε να προσδιοριστεί ο βαθμός της συγγένειας τους για τον μακρομοριακό στόχο. Στο δεύτερο κύκλο, γίνεται προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου της πρωτεΐνης-στόχου με τις επιλεγμένες ενώσεις. Η δομική ανάλυση της σύνδεσης του αναστολέα στην πρωτεΐνη-στόχο αποκαλύπτει τρόπους για την τροποποίηση του αναστολέα ώστε να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητά του.

Στη συνέχεια ακολουθούν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι βελτιστοποίησης και προσδιορισμού του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης έως ότου φτάσει σε σημείο να εμφανίζει τη μέγιστη δυνατή συγγένεια. Αυτή η μέθοδος συνήθως αναφέρεται ως ‘κατευθυνόμενος από τη δομή του προσδέτη σχεδιασμός φαρμάκων’. Μία άλλη κατηγορία, σχετίζεται με την ‘κατασκευή’ προσδετών, η οποία συνήθως αναφέρεται ως ‘κατευθυνόμενος από τον υποδοχέα σχεδιασμός φαρμάκων’. Στην περίπτωση αυτή, οι προσδέτες δημιουργούνται σταδιακά μέσω της αρχιτεκτονικής των διαφόρων υποκέντρων της περιοχής πρόσδεσης, συναρμολογώντας μικρά τμήματα προσδετών. Τα τμήματα αυτά μπορεί να είναι άτομα ή θραύσματα [Christophe L.M.J Verlinde,1994].



ΕΙΚΟΝΑ 1.2: Μέθοδοι κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού αναστολέα.

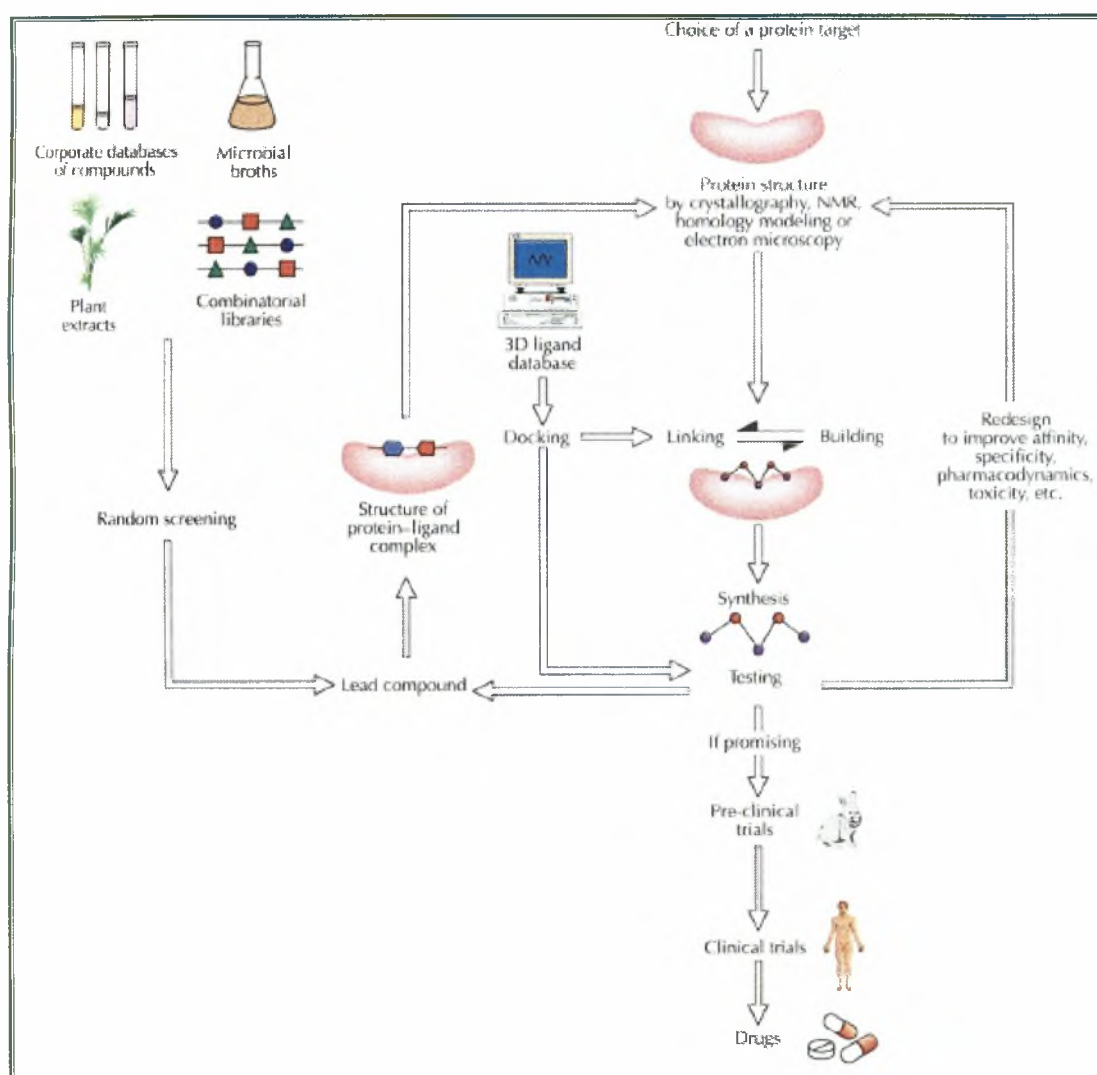
Αν και η πρόβλεψη της συγγένειας μιας ένωσης για ένα μακρομοριακό στόχο, παραμένει μια τεράστια πρόκληση, ένας αριθμός κανόνων για τον σχεδιασμό υψηλής συγγένειας προσδετών έχουν δημιουργηθεί με βάση τις κρυσταλλογραφικές δομές συμπλόκων πρωτεΐνης-προσδέτη:

- i. Απαιτείται εξαιρετική στερική και ηλεκτρονική συμπληρωματικότητα της ένωσης έναντι του βιομακρομοριακού στόχου
- ii. Μια επαρκή ποσότητα υδροφοβικών επιφανειών του προσδέτη πρέπει να εγκολώνεται στην πρωτεΐνη για ισχυρή σύνδεση
- iii. Επαρκή δομική ακαμψία είναι απαραίτητη ώστε η απώλεια εντροπίας επί του προσδέτη να είναι σημαντική

Τέλος, τρία ακόμα κριτήρια πρέπει να ληφθούν υπόψη στο σχεδιασμό ενός εν δυνάμει αναστολέα:

- iv. Χημική σταθερότητα
- v. Επαρκή διαλυτότητα στο νερό για δοκιμές αναστολής και δομικές μελέτες
- vi. Ευκολία σύνθεσης, συμπεριλαμβανομένου της αποφυγής μειγμάτων τα οποία συνθετικά δεν είναι εύκολα να υπόκεινται σε αρκετές μεταβολές

Μερικά από αυτά τα κριτήρια και τους κανόνες 'ενσωματώθηκαν' σε έναν αριθμό προγραμμάτων αυτόματου σχεδιασμού αναστολέων [Christophe L.M.J Verlinde,1994].



ΕΙΚΟΝΑ 1.3: Η διαδικασία που ακολουθείται για την παραγωγή φαρμάκων

2.ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ

Ο Ιπποκράτης ήταν αυτός που έδωσε στην πάθηση του καρκίνου το όνομα της. Παρομοίασε τον όγκο με την εικόνα του κάβουρα(καρκίνου). Πολύ αργότερα, ο Valsalva, το 1704 υποστήριξε ότι αρχικά ο καρκίνος ήταν ένα τοπικό φαινόμενο που μπορούσε να αφαιρεθεί χειρουργικά ενώ σε πιο προχωρημένο στάδιο ο καρκίνος μπορούσε μέσω των λεμφαγγείων να μεταφερθεί σε άλλα σημεία του σώματος.

Με τον όρο καρκίνο εννοούμε μια γενετική ασθένεια που προκύπτει από αλλαγές σε συγκεκριμένα γονίδια. Δεν πρόκειται όμως για κληρονομική ασθένεια αλλά οφείλεται σε αλλαγές του DNA στα σωματικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Εξαιτίας των γενετικών αλλαγών τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Αρχικά συνιστούν μια μάζα και αργότερα ένα συμπαγή όγκο που αυξάνει απεριόριστα.

Η ανάπτυξη του καρκίνου σε ένα οργανισμό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες εκ των οποίων άλλοι εξαρτώνται άμεσα από τη γενετική σύσταση του ατόμου και άλλοι από το περιβάλλον και τον τρόπο ζωής. Στην πρώτη περίπτωση, ορισμένα άτομα κληρονομούν από τους γονείς τους μεταλλαγμένα γονίδια με αποτέλεσμα να είναι επιρρεπή στην καρκινογένεση. Στη δεύτερη περίπτωση, οι καρκίνοι φαίνεται να προέρχονται από δύο διαφορετικές κατηγορίες καρκινογόνων: σε παράγοντες που προκαλούν βλάβη στα γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των κυττάρων και σε παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, γεγονός που ευνοεί την πρόκληση νέων μεταλλάξεων που είναι απαραίτητες για το μετασχηματισμό τους σε καρκινικά.

Ο καρκίνος είναι μια πάθηση η οποία μπορεί να προσβάλλει κάθε ιστό και όργανο του σώματος. Ο όρος αναφέρεται σε περίπου 150-200 διαφορετικές παθήσεις ωστόσο έχουν 2 κοινά χαρακτηριστικά στοιχεία: την απεριόριστη αύξηση των κυττάρων και τις δυσλειτουργίες τις οποίες προξενεί αυτή.

Φυσιολογικά, τα κύτταρα ενός οργανισμού αναπτύσσονται με έναν συγκεκριμένο ρυθμό έτσι ώστε να αντικαθιστούν αυτά που πεθαίνουν. Σε αρκετές όμως περιπτώσεις ο οργανισμός μπορεί να παράγει περισσότερα κύτταρα από εκείνα που πραγματικά χρειάζεται. Η συγκέντρωση αυτών των παραπάνω κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία όγκων. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι συνήθως

αβλαβείς. Για να γίνει ένας όγκος επικίνδυνος πρέπει τα κύτταρα που τον αποτελούν να εισβάλλουν σε ιστούς και να μεταφερθούν σε άλλα μέρη του σώματος.

Οι περισσότεροι καρκίνοι ξεκινούν από την απώλεια ελέγχου ενός και μόνο κυττάρου. Το κύτταρο αυτό πολλαπλασιάζεται και δίνει μια ομάδα κυττάρων, των οποίων η αύξηση δεν ελέγχεται, γιατί η ισορροπία μεταξύ κυτταρικής διαίρεσης και φυσιολογικού θανάτου έχει διαταραχθεί. (Εικόνα 2)

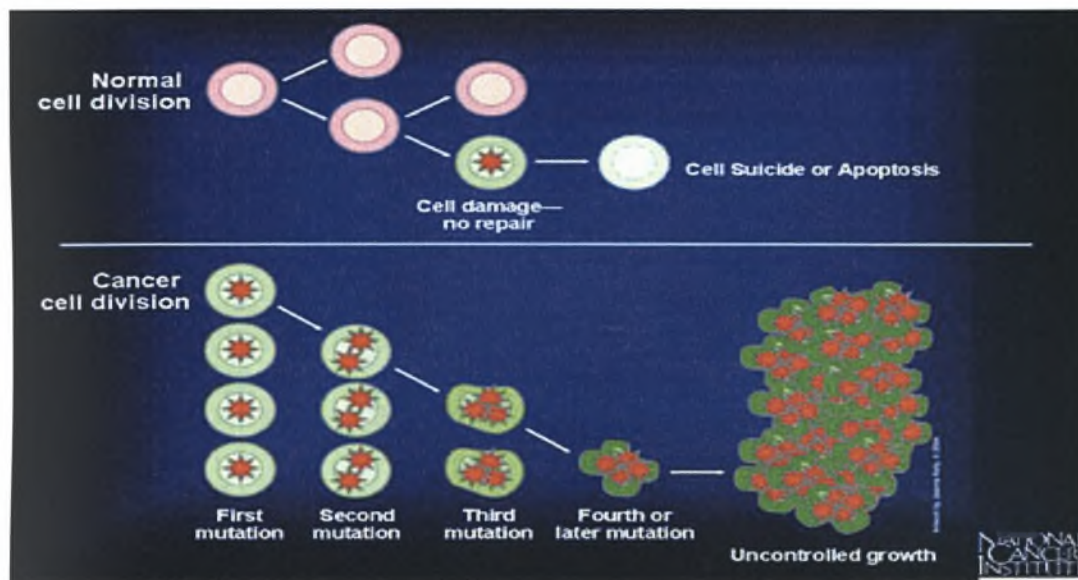
Οι τρόποι αντιμετώπισης του καρκίνου είναι οι εξής: χειρουργικές μέθοδοι, χημειοθεραπείες και ακτινοβολίες. Αν και με τους παραπάνω τρόπους η μάζα του όγκου περιορίζεται, παρόλα αυτά δεν επαρκούν για την καταπολέμηση του ενώ έχουν και πολλές παρενέργειες καθώς εκτός από τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφονται και αρκετά υγιή.

Ως γνωστό για την όσο το δυνατόν πιο επιτυχημένη αντιμετώπιση του καρκίνου χρειάζεται αφενός η έγκαιρη διάγνωση και αφετέρου ο σχεδιασμός φαρμάκων με επιλεκτική δράση στα καρκινικά κύτταρα.

Η ανάπτυξη μοριακών μεθόδων διάγνωσης (ανίχνευση μεταλλαγών σε ειδικά γονίδια, ανίχνευση πρωτεϊνών που εμφανίζονται στην ανάπτυξη όγκων) παρέχει πληροφορίες για την επιλογή της καταλληλότερης αγωγής. Η μοριακή μάλιστα διάγνωση έχει αρχίσει ήδη να έχει εφαρμογές. Ο σχεδιασμός όμως κατάλληλων φαρμάκων συναντά δυσκολίες γιατί οι στόχοι εντοπίζονται και στα φυσιολογικά κύτταρα. Για να μην υπάρχουν λοιπόν σοβαρές παρενέργειες θα πρέπει τα φάρμακα να επηρεάζουν όσο το δυνατόν πιο εξειδικευμένες διεργασίες. Αρκετές θεραπευτικές προσεγγίσεις εφαρμόζονται και νέες κατηγορίες φαρμάκων εμφανίζονται, για τα οποία γίνονται κλινικές μελέτες. Όπως είναι φυσικό, γίνονται συνεχώς προσπάθειες για σχεδιασμό νέων τεχνικών για την αντιμετώπιση της νόσου. Από τις βασικότερες στρατηγικές είναι: α) η ανοσοθεραπεία, β) η γονιδιακή θεραπεία, γ) η καταστολή της ενεργότητας πρωτεϊνών-προϊόντων ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων και δ) η καταστολή της αγγειογένεσης.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια για να αξιοποιηθούν οι ριβονουκλεάσες στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Οι ριβονουκλεάσες είναι ένζυμα, τα οποία καταλύουν την υδρόλυση του RNA σε μικρά νουκλεοτίδια. Οι ριβονουκλεάσες έχουν κυτταροτοξικές ιδιότητες διότι λόγω της υδρόλυσης του mRNA στα κύτταρα γίνεται αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών και επαγωγή της απόπτωσης. Οι ριβονουκλεάσες έχουν ακόμα την ικανότητα να επηρεάζουν πολλές λειτουργίες των κυττάρων του όγκου ταυτόχρονα και να ενισχύσουν την

κυτταροτοξικότητα από μια ποικιλία αντικαρκινικών παραγόντων. Διαφορετικές ριβονουκλεάσες, όπως onconases, bovine seminal RNase, RNase T1, a-sarcin, RNase P, actibind and RNaseT2, έχουν πρόσφατα μελετηθεί για την θεραπεία διαφορετικών τύπων καρκίνου[Internet Journal of Oncology, 2008 by Saleem Javed et al.]



ΕΙΚΟΝΑ 2: Διαφορές μεταξύ φυσιολογικής κυτταρικής διαίρεσης και καρκινικής κυτταρικής διαίρεσης, που οδηγεί στην ανάπτυξη όγκου.

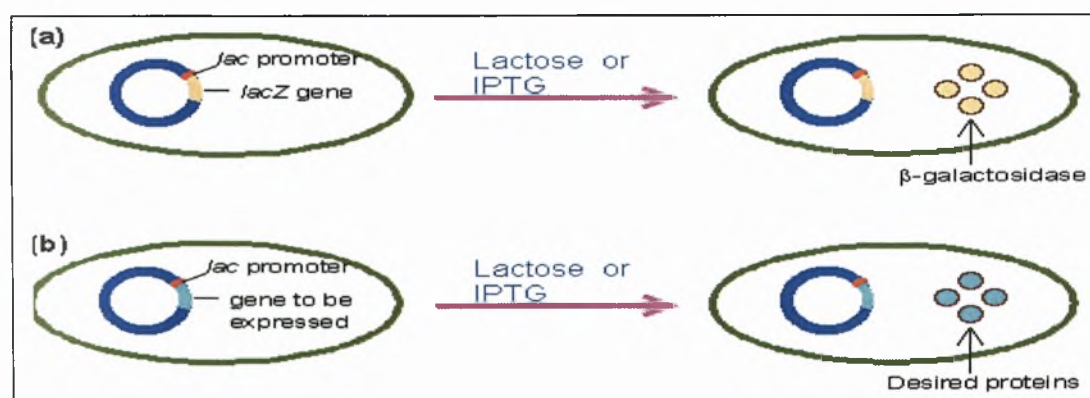
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μερικές από τις πρώτες εφαρμογές της γενετικής μηχανικής στα βακτήρια ήταν η βιοσύνθεση πρωτεϊνών που έχουν βιοτεχνολογικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Το DNA του ανθρώπου αλλά και άλλων οργανισμών είναι δυνατό να εκφράζεται σε βακτηριακά κύτταρα. Έτσι άνοιξε ο δρόμος της βιομηχανικής παραγωγής πρωτεϊνών, ορμονών και άλλων ουσιών.

Οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα για την παραγωγή πρωτεϊνών. Καλλιεργούνται εύκολα, τροποποιούνται γενετικά σχετικά εύκολα και οι καλλιέργειες τους καταλαμβάνουν μικρό χώρο. Από τους μικροοργανισμούς, το βακτήριο *E.coli* χρησιμοποιείται κυρίως για τη βιοσύνθεση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, γιατί παρουσιάζει αρκετά πρόσθετα πλεονεκτήματα: Η γενετική σύσταση του βακτηρίου είναι πού καλά γνωστή, έχει αποκρυπτογραφηθεί πλήρως το γονιδιώμα του, μπορεί να επιδιωχθεί η βιοσύνθεση μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών και είναι γνωστά τα βιοχημικά μονοπάτια της δράσης πολλών ενζύμων.

Πολλές πρωτεΐνες φαρμακευτικού ή βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος εκφράζονται φυσιολογικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μέσω της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, μπορεί να παραχθεί μια πολύ μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών. Αυτό περιλαμβάνει την εισαγωγή του γονιδίου που εκφράζει την επιθυμητή πρωτεΐνη σε ένα πλασμίδιο, που περιέχει έναν υποκινητή έτσι ώστε η πρωτεΐνη να εκφραστεί και στη συνέχεια την είσοδο του πλασμιδίου στο βακτήριο [Τριανταφυλλίδης Κ., Βιοτεχνολογία Ζώων]



ΕΙΚΟΝΑ 3: Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Α) Ο φορέας περιέχει τον υποκινητή *lac* και το γειτονικό γονίδιο *lacZ* που κωδικοποιεί την β-γαλακτοζιδάση. Η λακτόζη ή κάποιο ανάλογό της (IPTG) διεγείρουν την έκφραση της β-γαλακτοζιδάσης. Β) Εάν το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης αντικατασταθεί από το γονίδιο της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, η λακτόζη ή το IPTG διεγείρουν την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

3.1) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η απομόνωση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών είναι ουσιαστικά το πρώτο βήμα για την κατανόηση της λειτουργίας τους. Ξεκινώντας με καθαρές πρωτεΐνες μπορούμε να προσδιορίσουμε την αλληλουχία των αμινοξέων της και να ερευνήσουμε τη βιοχημική της λειτουργία. Ακόμη, μπορούμε να την κρυσταλλώσουμε και έτσι να αποκτήσουμε στοιχεία από μελέτες με ακτίνες $-X$ που μας δίνουν την εικόνα της τριτοταγούς δομής, η οποία αποτελεί και το πραγματικό λειτουργικό πρόσωπο μιας πρωτεΐνης.

Η απομόνωση θα δώσει ένα δείγμα πρωτεΐνης που θα περιέχει μόνο την πρωτεΐνη για την οποία ενδιαφέρεται ο βιοχημικός σε καθαρότητα μεγαλύτερη από 95%. Το δείγμα μπορεί να είναι μόνο το 1% του αρχικού υλικού, είτε το υλικό είναι κύτταρα σε καλλιέργεια είτε ένα συγκεκριμένο όργανο φυτού ή ζώου. Ο βιοχημικός χρειάζεται έναν τρόπο να αναγνωρίζει την πρωτεΐνη και ο τρόπος αυτός ονομάζεται δοκιμασία (assay). Ο προσδιορισμός της κατάλληλης δοκιμασίας είναι συχνά δύσκολος, όσο πιο εξειδικευμένη όμως είναι η δοκιμασία τόσο πιο αποτελεσματικός γίνεται ο καθαρισμός. Για τον σχεδιασμό του καθαρισμού χρειάζεται ακόμα μία πληροφορία: την ποσότητα της πρωτεΐνης που υπάρχει στο μείγμα που επεξεργαζόμαστε. Υπάρχουν πολλοί γρήγοροι και ακριβείς τρόποι για να καθορίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Έτσι π.χ. γνωρίζοντας την τιμή της ενζυμικής δραστηριότητας και τη συγκέντρωση ενός ενζύμου, μπορούμε να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα, που είναι ο λόγος της ενζυμικής δραστηριότητας προς την ποσότητα της πρωτεΐνης. Όσο θα αυξάνεται η ειδική δραστηριότητα, τόσο καλύτερος θα είναι ο καθαρισμός.

Για να καθαρίσουμε μια πρωτεΐνη πρέπει αρχικά να την απομονώσουμε από το κύτταρο. Τα πρωτόκολλα καθαρισμού αποφασίζονται με δοκιμές και, με βάση προηγούμενες εμπειρίες. Στο πρώτο στάδιο ομογενοποιείται το δείγμα, καταστρέφοντας την κυτταρική μεμβράνη. Στη συνέχεια το μείγμα κλασματώνεται με φυγοκέντρηση, δίνοντας ένα ίζημα στον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα και ένα διαλυτό υπερκείμενο επάνω από το ίζημα. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται και πάλι σε μεγαλύτερη ταχύτητα και διαχωρίζεται σε νέο ίζημα και νέο υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή, που ονομάζεται διαφορική φυγοκέντρηση, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κλασμάτων ελαττούμενης πυκνότητας τα οποία περιέχουν χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες και τα οποία δοκιμάζονται για την δραστηριότητα που προσπαθούμε να απομονώσουμε. Συνήθως ένα κλάσμα θα έχει αυξημένη

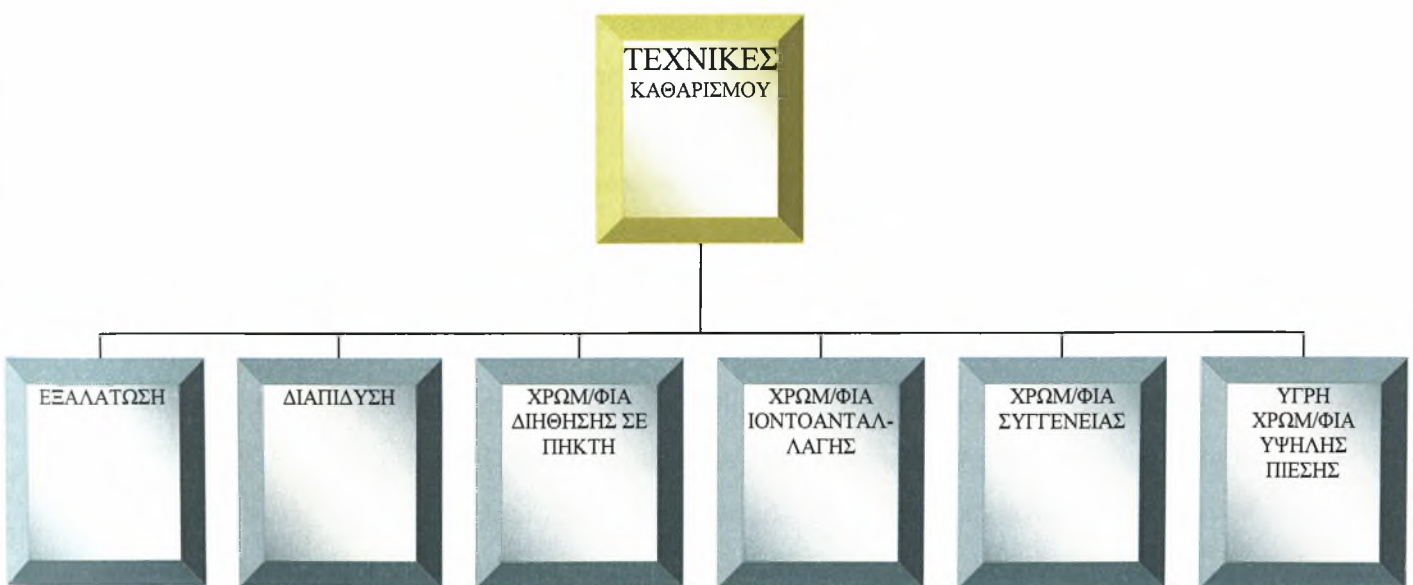
δραστικότητα και αυτό θα χρησιμοποιηθεί για τον περαιτέρω καθαρισμό με άλλες πιο ευαίσθητες τεχνικές.

Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν βάσει της διαλυτότητας, του μεγέθους, του φορτίου και της δεσμευτικής συγγένειας για άλλα μόρια. Σε κάθε στάδιο καθαρισμού το παρασκεύασμα δοκιμάζεται και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Για να προσδιορίσουμε την τριτοταγή δομή και τον μηχανισμό δράσης απαιτείται αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης σε επίπεδο χιλιοστών του γραμμαρίου (mg). Επομένως, η συνολική απόδοση στην απομόνωση μίας πρωτεΐνης είναι σημαντικός παράγοντας σε ένα πρωτόκολλο καθαρισμού.

Αφού η πρωτεΐνη έχει υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία ακολουθεί ο καθαρισμός του πρωτεϊνικού διαλύματος με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας στήλης. Η προεπεξεργασία είναι συνήθως τέτοια, ώστε το ενζυμικό διάλυμα:

- ❖ να μην περιέχει αδιάλυτα συστατικά
- ❖ να έχει χαμηλό ιξώδες
- ❖ να έχει κατάλληλα ρυθμισμένους τους παράγοντες pH, ιοντική ισχύ, θερμοκρασία και σταθεροποιητές της ενζυμικής δραστηριότητας [Stryer, L., Berg, J.M., and Tymoczko, J.L. 2002]

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία τεχνικών καθαρισμού, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα:



4. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

4.1) ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ανακάλυψη της χρωματογραφίας αποδίδεται στο Ρώσο βοτανολόγο M. Tswett, ο οποίος το 1906 δημοσίευσε το διαχωρισμό φυτικών χρωστικών, με κινητή φάση πετρελαϊκό αιθέρα και πολική στερεή φάση, εντός κατακόρυφης υάλινης στήλης, ορίζοντας παράλληλα τη χρωματογραφία ως εξής: « η χρωματογραφία είναι μία μέθοδος, στην οποία τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται σε μία στήλη προσρόφησης, που είναι μέρος ενός συστήματος ροής». Τα επόμενα 25 χρόνια δεν υπάρχουν αναφορές σχετικές με την χρωματογραφία, μέχρι που οι R.Kuhn, A.Winterstein, και E.Lederer το 1931 χρησιμοποίησαν οξείδια του πυριτίου, του αργιλίου και του μαγνησίου ως προσροφητικά υλικά για το διαχωρισμό καροτενίων.

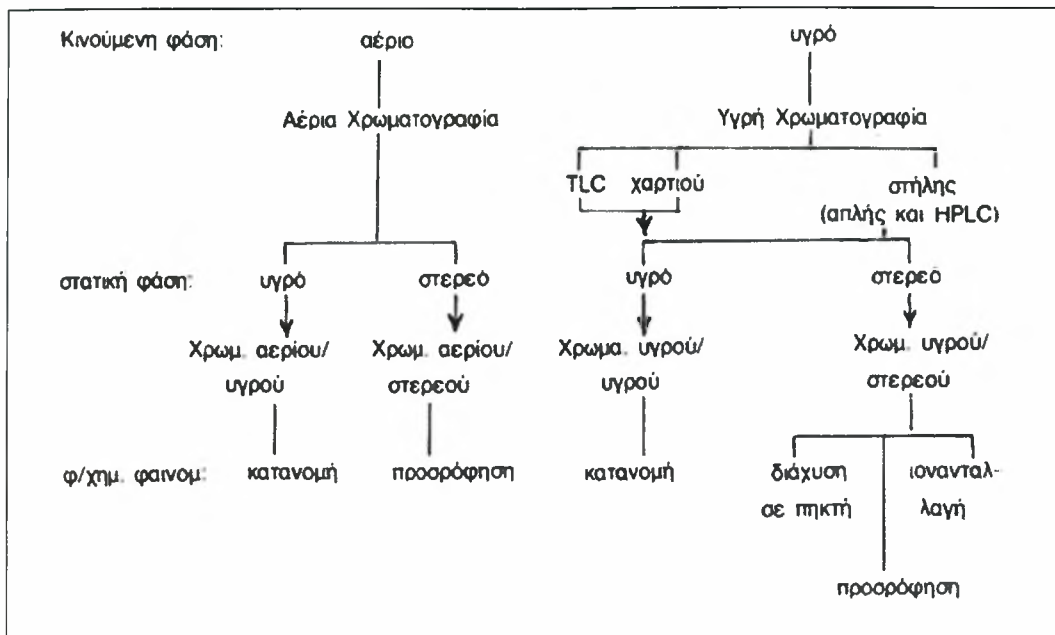
Το 1941 οι A. Martin και R. Synge στην προσπάθειά τους να διαχωρίσουν αμινοξέα, εισάγουν την ιδέα της υγρής-υγρής χρωματογραφίας, δηλαδή υγρή κινητή φάση σε συνδυασμό με υγρή στατική φάση επί στερεού υποστρώματος, η οποία βασίζεται στο μηχανισμό της κατανομής και παράλληλα εισάγουν την έννοια των θεωρητικών πλακών. Η θεωρία των θεωρητικών πλακών οδηγεί το Van Deemter το 1956 στην περιγραφή των θερμοδυναμικών και κινητικών διαδικασιών κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού και στην εξαγωγή εξισώσεων που σχετίζουν την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης με τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Το 1952 οι A. Martin και R. Synge τιμώνται με το βραβείο Nobel, την ίδια χρονιά που οι A. Martin και A. James δημοσιεύουν την πρώτη εργασία στην οποία χρησιμοποιείται ως κινητή φάση αέριο και επομένως επινοούν την τεχνική της αερίου χρωματογραφίας. Πέντε χρόνια αργότερα το 1957, ο M. Golay, υπό την εταιρεία Perkin-Elmer Corp., έπειτα από μελέτες καταλήγει στο συμπέρασμα ότι οι διαχωρισμοί της αερίου χρωματογραφίας βελτιώνονται σημαντικά με τη χρήση στηλών μεγάλου μήκους (90 έως 180 m) και μικρής εσωτερικής διαμέτρου (0,25 mm) και έτσι εισάγονται στο εμπόριο οι τριχοειδείς στήλες αερίου χρωματογραφίας. Το 1959 οι P. Flodin και J. Porath εισάγουν την τεχνική της χρωματογραφίας αποκλεισμού κατά μέγεθος, χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης στηλών διακλαδισμένους πολυσακχαρίτες.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1960, άρχισε μία προσπάθεια βελτίωσης των διαχωρισμών της υγρής χρωματογραφίας, η οποία στην εξέλιξή της οδήγησε στη διαμόρφωση της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, όπως είναι γνωστή σήμερα. Ο

J. Giddings, πρώτος μεταξύ άλλων, αναγνώρισε την ανάγκη κατασκευής πληρωτικών υλικών μικρών σωματιδίων, τα οποία να είναι ανθεκτικά στη χημική διάβρωση και στις υψηλές πιέσεις. Η σημαντικότερη εξέλιξη προς αυτήν την κατεύθυνση έγινε από τον J. Kirkland, ο οποίος το 1969 δημοσίευσε την κατασκευή πληρωτικού υλικού από σφαιρίδια μεμβράνης, τα οποία αποτελούνται από στερεό πυρήνα μεγέθους 30-40 μm επικαλυμμένο με υγρή στιβάδα πάχους 2 μm (pellicular particles) και το 1973 την κατασκευή πληρωτικού υλικού από πορώδη σωματίδια οξειδίου του πυριτίου, διαμέτρου 10 μm , χημικώς τροποποιημένα με αντιδράσεις σιλανισμού. Από τη δεκαετία του 1970 και έπειτα υπήρξε μία συνεχής βελτίωση των συστημάτων υγρής χρωματογραφίας, κυρίως σε τρεις τομείς: α) οι στήλες έγιναν περισσότερο ανθεκτικές στη χημική διάβρωση και στις υψηλές πιέσεις και απέκτησαν μικρότερες διαστάσεις και μικρότερο μέγεθος σωματιδίων, β) οι αντλίες απέκτησαν καλύτερη ακρίβεια στη ροή της κινητής φάσης και γ) οι ανιχνευτές απέκτησαν μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία. Αποτέλεσμα των παραπάνω εξελίξεων είναι η βελτίωση των διαχωρισμών (οξύτερες κορυφές, αύξηση θεωρητικών πλακών κ.τ.λ.), με συνέπεια η υγρή χρωματογραφία να αποκαλείται πλέον χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

4.2) ΑΡΧΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ –ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Σύμφωνα με τον ορισμό κατά IUPAC, ως χρωματογραφία ορίζεται το σύνολο των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος, στις οποίες τα συστατικά κατανέμονται ανάμεσα σε δύο μη αναμιγνυόμενες φάσεις, η μία από τις οποίες είναι στατική και η άλλη κινείται (κινητή φάση). Το είδος της χρωματογραφίας καθορίζεται από την επιλογή των δύο φάσεων και την φύση των δυνάμεων που καθορίζουν την κατανομή των συστατικών ανάμεσα στις φάσεις. Τα είδη της χρωματογραφίας φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



ΕΙΚΟΝΑ 4: Τα είδη της χρωματογραφίας

Τα είδη της χρωματογραφίας ταξινομούνται με βάση τις παρακάτω παραμέτρους:

- ❖ Το μηχανισμό διαχωρισμού
- ❖ Τη φύση της κινητής φάσης
- ❖ Τη διάταξη της στατικής φάσης
- ❖ Τη διεργασία ανάπτυξης
- ❖ Την κλίμακα εφαρμογής

Στην υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση είναι *υγρή*. Με την υγρή χρωματογραφία είναι δυνατός ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός πολικών, μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ενώσεων οι οποίες δεν μπορούν να αναλυθούν απευθείας με την αέρια χρωματογραφία. Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών, και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή χρωματογραφία επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες ροής, που συνεπάγονται μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού, με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και τη χρήση μικρότερων σωματιδίων σαν υλικών πλήρωσης της στήλης (HPLC χρωματογραφία). Το εύρος ροής στην υγρή χρωματογραφία είναι από 0,5 έως 5 ml/min και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε πιέσεις 300-7500psi. Οι συνηθισμένες στήλες με υλικό πλήρωσης 5μm, λειτουργούν με ροή 1ml/min και πιέσεις 1000-2000 psi.

Η έκλυση γίνεται είτε ισοκρατικά όπου η σύσταση της κινητής φάσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε βαθμωτά όπου η ισχύς της κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό. Με την ισοκρατική έκλυση, όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά είναι δύσκολο να διαχωριστεί, ενώ παράλληλα τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκλύονται πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους. Με τη βαθμωτή έκλυση γίνεται ανάμειξη ενός ασθενούς με έναν ισχυρό διαλύτη σε ποσοστά που μπορεί να μεταβάλλονται με το χρόνο, με την περιεκτικότητα του ισχυρού διαλύτη διαρκώς αυξανόμενη. Έτσι διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκλύονται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο.

Η κινητή φάση είναι μίγμα δύο ή περισσότερων διαλυτών (συνήθως μέχρι 4) με ή χωρίς προσθήκη πρόσθετων ουσιών (πχ. ρυθμιστικά διαλύματα). Οι παράμετροι για την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών είναι η πολικότητά τους και η εκλεκτικότητα. Η επιλογή της κινητής φάσης γίνεται έτσι ώστε να διαφέρει η πολικότητά της από αυτή της στατικής φάσης ώστε να υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός στα συστατικά του δείγματος που αναλύεται. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης η ισχύς της κινητής φάσης αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητάς της, ενώ στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης συμβαίνει το αντίθετο. Η εκλεκτικότητα του διαλύτη εξαρτάται από την ικανότητά του να δρα ως πρωτονιοδέκτης, πρωτονιοδότης, ή με ισχυρές διπολικές ροπές σε σχέση με τις διάφορες ουσίες.

5. Η ΕΙΔΙΚΗ poly(A) ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ (PARN)

5.1) ΓΕΝΙΚΑ

Η διαμόρφωση της σταθερότητας του mRNA έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον ποιοτικό έλεγχο της βιογένεσης του mRNA και στην αντική προστασία. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο σε ζύμες και ανθρώπινα κύτταρα έχουν προσδιορίσει δύο γενικά μονοπάτια φθοράς του mRNA. Το πρώτο βήμα στην αναδιοργάνωση του mRNA στους ευκαρυώτες είναι η αποαδενυλίωση. Στις ζύμες, το κυρίαρχο σύμπλοκο αποαδενυλίωσης περιλαμβάνει δύο κύριες νουκλεάσες, τις Ccr4p και Pop2p. Η Ccr4p είναι μέλος της ExoIII οικογένειας νουκλεασών, ενώ η Pop2p έχει αναδίπλωση παρόμοια με αυτή των δεοξυριβονουκλεασών (DNases) της οικογένειας DnaQ. Το σύμπλοκο που περιλαμβάνει τις Ccr4p και Pop2p είναι συντηρημένο σε όλους τους ευκαρυώτες και έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει και στην αποαδενυλίωση του mRNA της *Drosophila*.

Στα κύτταρα των θηλαστικών ένα πρόσθετο ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την αποαδενυλίωση είναι η ειδική-poly(A) εξωνουκλεάση, η οποία αναφέρεται και ως ειδική-poly(A) ριβονουκλεάση (PARN). Οι σημαντικές ιδιότητες της PARN είναι η υψηλή εξειδίκευση έναντι της poly(A) περιοχής και η απαίτηση μιας 3'υδροξυλομάδας για την δραστηριότητα της. Αποτελέσματα αναλύσεων δείχνουν ότι η PARN ανήκει επιπλέον και στην υπεροικογένεια των ριβονουκλεασών RNase D καθώς έχει μία συντηρημένη R3H περιοχή, η οποία βοηθά την δέσμευση της PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA. Η PARN είναι συντηρημένη σε πολλούς ευκαρυώτες, ενώ απουσιάζει από τον *Saccharomyces cerevisiae* και την *Drosophila melanogaster*.

Στα θηλαστικά κύτταρα η δραστηριότητα της PARN αναστέλλεται από την πρωτεΐνη Pab1p, η οποία δεσμεύεται στην poly(A) περιοχή. Βιοχημικές μελέτες και πειράματα μεταλλαξιγένεσης δείχνουν ότι η PARN είναι ένα ολιγομερές, του οποίου η δραστηριότητα εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα. [Mousheng Wu et al.]. Επίσης, η PARN είναι μία πρωτεΐνη σύνδεσης άκρου (cap binding) και η αλληλεπίδρασή της με το 5' άκρο όχι μόνο διεγείρει την αποαδενυλίωση αλλά ενισχύει και την εξέλιξη της.

Η οικογένεια των ριβονουκλεασών RNase D ανήκει στην υπεροικογένεια DEDD, αποτελούμενη από RNases καθώς επίσης και από DNases. [Mousheng Wu et al.]. Καθορίζεται από τέσσερα συντηρούμενα όξινα αμινοξέα, τρία ασπαρτικά οξέα (D) και ένα γλουταμινικό οξύ (E) καταναμεημένα μεταξύ τριών ξεχωριστών διαδοχικών

μοτίβων (ExoI-III). Αυτά τα τέσσερα συντηρημένα αμινοξέα αποτελούν την ενεργή περιοχή και συμμετέχουν στην δέσμευση των δύο μεταλλικών ιόντων, τα οποία είναι απαραίτητα για την κατάλυση.[Mousheng Wu et al.]. Η υπεροικογένεια DEDD μπορεί να διαιρεθεί σε δύο υποομάδες, τις DEDDy και DEDDh, οι οποίες διακρίνονται ανάλογα με το αν το πέμπτο συντηρημένο αμινοξύ είναι τυροσίνη (Y) ή ιστιδίνη (H). Με βάση τις κρυσταλλικές δομές της εξωνουκλεάσης DNA πολυμεράσης I (Pol I) και της ε-υποομάδας της DNA πολυμεράσης III (ε186), η τυροσίνη (Y) και η ιστιδίνη (H) καλούνται να παίξουν έναν ισοδύναμο ρόλο στην ενεργοποίηση ενός μορίου ύδατος ή ενός υδροξειδίου κατά τη λύση του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Πρόσφατα, έχουν καθοριστεί οι κρυσταλλικές δομές των ριβονουκλεασών της υπεροικογένειας DEDD, Pop2, ISG20, RNase D της *Escherichia coli*, DEDD-σχετική εξωριβονουκλεάση και αντική εξωριβονουκλεάση που εξαρτάται από την ιντερφερόνη. [Mousheng Wu et al.].

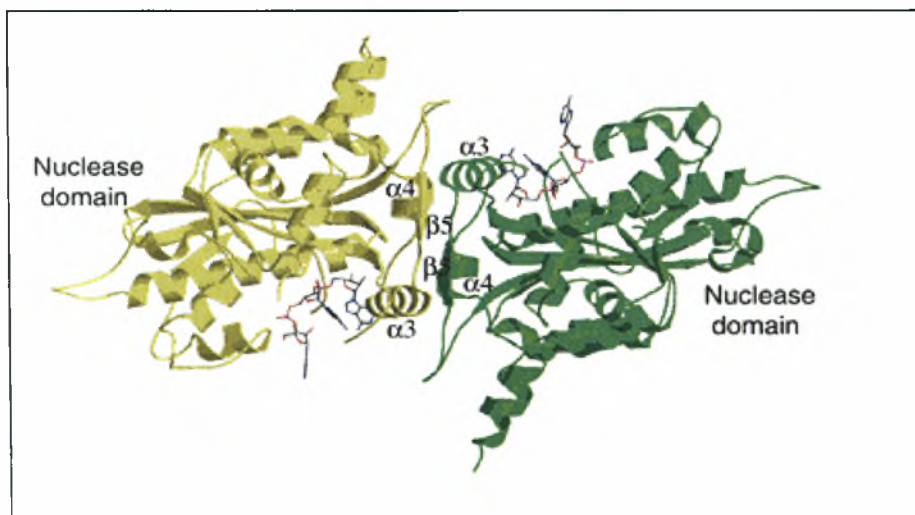
Για τη διαλεύκανση του μηχανισμού αναγνώρισης της poly(A) περιοχής αλλά και του καταλυτικού μηχανισμού της PARN και της σχέσης δομής-λειτουργίας της, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την κρυσταλλική δομή της PARN τόσο στην ελεύθερη μορφή της όσο και όταν βρίσκεται συνδεδεμένη με τον προσδέτη. Οι πρόσφατα προσδιορισμένες δομές [Mousheng Wu et al.] έδειξαν ότι η PARN αναδιπλώνεται σε δύο περιοχές: την περιοχή νουκλεάσης και την περιοχή R3H. Η περιοχή νουκλεάσης της PARN (PARNn) αποτελεί ένα ομοδιμερές μόριο και η κάθε υποομάδα του συνδέει ένα RNA νουκλεοτίδιο. Πειράματα μεταλλαξιγένεσης σε συνδυασμό με την ανάλυση της δομής της, προτείνουν ότι η διμερής αυτή μορφή της PARNn είναι σημαντική για την ειδική δραστηριότητα της έναντι της περιοχής poly(A). [Mousheng Wu et al.]. Ο καταλυτικός μηχανισμός της PARN και ο μηχανισμός διέγερσης της δράσης της από τη δέσμευση της cap-περιοχής δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί.

5.2) Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ PARN

Η ανθρώπινη PARNn (1-430 αμινοξέα) η οποία αποτελείται μόνο από τα τμήματα της νουκλεάσης και της περιοχής R3H εκφράστηκε στην *E.coli*. Η μορφή αυτή της πρωτεΐνης είναι καταλυτικά ενεργή για τη λύση ενός πολυνουκλεοτιδίου 15 βάσεων, αν και εμφανίζει χαμηλότερη δραστικότητα από τη φυσική πρωτεΐνη. Κρύσταλλοι της PARNn μαζί με ένα πολυαδενυλικό νουκλεοτίδιο 10 βάσεων, αναπτύχθηκαν παρουσία 5mM EDTA και ανήκαν στη ομάδα συμμετρίας χώρου P2₁2₁2₁ με δύο σύμπλοκα πρωτεΐνη-RNA ανά ασύμμετρη μονάδα. [Mousheng Wu et al.].

Η δομή του συμπλόκου αυτού της PARNn προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 2.6 Å [Mousheng Wu et al.]. Από τα δέκα νουκλεοτίδια που είναι παρόντα στους κρυστάλλους, μόνο τα τελευταία τρία νουκλεοτίδια αδενοσίνης (A₈₋₁₀) είναι προσδιορισμένα στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Τέσσερις περιοχές του συμπλόκου PARNn-RNA δεν είναι καθορισμένες στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας και πιθανόν είναι αποδιατεταγμένα, τα αμινοξέα 41-45, 144-256, 370-374 και 424-430 για το μόριο A και τα αμινοξέα 40-49, 144-260, 370-374 και 424-430 για το μόριο B [Mousheng Wu et al.].

Κρύσταλλοι της ελεύθερης PARNn αναπτύχθηκαν παρουσία 5mM MgCl₂. Η δομή της ελεύθερης PARNn προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο την περιοχή νουκλεάσης του συμπλόκου PARNn-RNA.

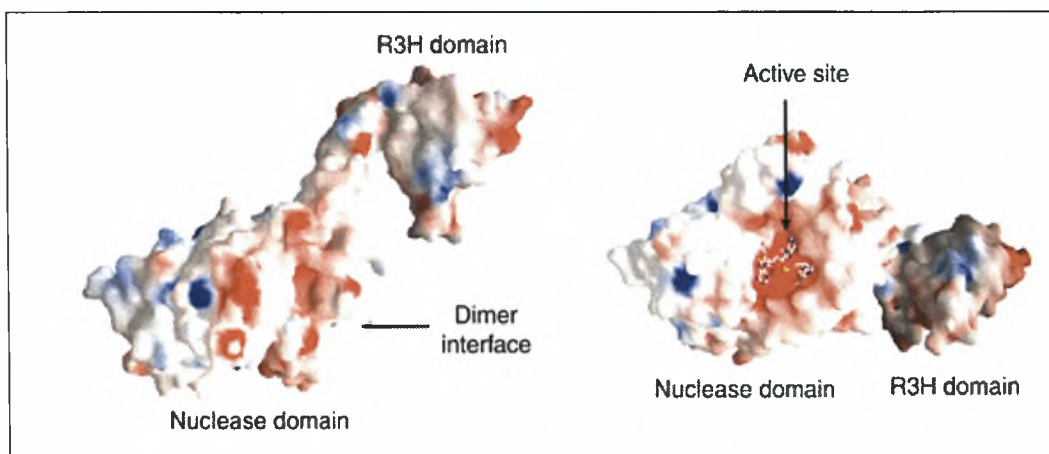


ΕΙΚΟΝΑ 5: Σχηματική απεικόνιση της δομής του συμπλόκου PARNn-RNA

5.3) ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 5, η PARNn σχηματίζει ένα ομοδιμερές μόριο στο σύμπλοκο PARNn-RNA, όπου η κάθε υποομάδα συνδέεται σε τρία νουκλεοτίδια αδενοσίνης. Η μία υποομάδα της PARNn έχει δομή τύπου α/β, με μία μεγάλη β-πτυχωτή επιφάνεια, που αποτελείται από οκτώ β-ελάσματα, στο κέντρο δίπλα σε δώδεκα α-έλικες. Το πέμπτο β-έλασμα (β5) και το αντίστοιχο β-έλασμα από την άλλη υπομονάδα δημιουργούν μία μικρή αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια. Αυτή η επιφάνεια σε συνδυασμό με τις έλικες α3 και α4 και από τις δύο υπομονάδες αποτελούν την μεσεπιφάνεια των δύο μονομερών. Οι δομές των δύο υπομονάδων είναι αρκετά όμοιες. Το τρινουκλεοτίδιο είναι προσδεμένο σε μια μεγάλη κοιλότητα η οποία βρίσκεται σε αντίθετες πλευρές του διμερούς. Η περιοχή R3H, η οποία υποτίθεται ότι βρίσκεται μεταξύ των α5 και α8 ελίκων, είναι αποδιατεταγμένη [Mousheng Wu et al.].

Στην δομή της PARNn, απουσία του ολιγονουκλεοτιδίου, η πολυπεπτιδική αλυσίδα διατάσσεται σε δύο τμήματα: το τμήμα της νουκλεάσης και το τμήμα της R3H. Η γενική μορφή της δομής θυμίζει έναν υπόκαμπο (εικόνα 5.1). Η μακριά έλικα α8, η οποία είναι μερικώς αποδιατεταγμένη στο σύμπλοκο PARNn-RNA, συνδέει την R3H με το τμήμα νουκλεάσης.



ΕΙΚΟΝΑ 5.1: Δομή της PARNn, απουσία της ολιγο(A) περιοχής.

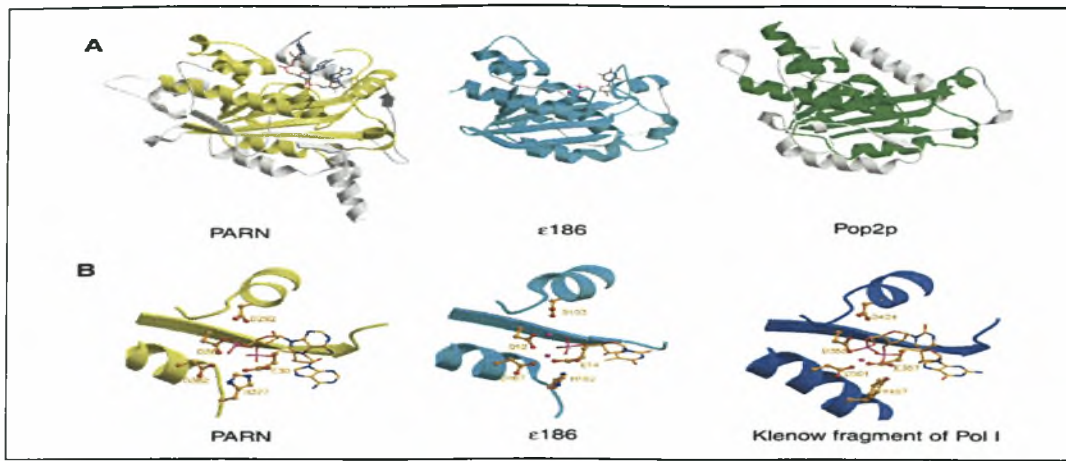
5.4) ΟΜΟΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ PARN ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΕΞΩΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ DEDD

Χρησιμοποιώντας το πακέτο προγραμμάτων DALI προσδιορίστηκε μία έντονη δομική ομοιότητα μεταξύ του τμήματος νουκλεάσης της PARN και άλλων 3'-5' εξωνουκλεασών. Τα δομικά αυτά ομόλογα της PARN περιέχουν τα τμήματα νουκλεάσης της Pop2p, της ε186, της εξωνουκλεάσης I της E.coli (ExoI) και της ISG20. Όλες αυτές οι εξωνουκλεάσες, εκτός της Pop2p, ανήκουν στην DEDDh οικογένεια, όπως και η PARN.

Συγκρίνοντας τη δομή του τμήματος νουκλεάσης της PARNn, με αυτή της ε186 βλέπουμε ότι το βασικό τμήμα των περιοχών αυτών είναι αρκετά όμοιο. Παρά το γεγονός ότι η PARN και η Pop2p εμφανίζουν ομοιότητες μόνο στο 17% της αλληλουχίας τους και η Pop2p περιλαμβάνει δύο μη-κανονικά αμινοξέα σε κάθε ενεργή περιοχή, οι δομές του τμήματος νουκλεάσης της PARNn και της Pop2p έχουν σημαντική ομολογία.

Παρά τις ομοιότητες αυτές, μερικές αξιοσημείωτες δομικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ των τμημάτων νουκλεάσης των εξωνουκλεασών PARN, ε186 και Pop2p. Για παράδειγμα, δύο βρόχοι που συνδέουν τις έλικες α12 με την α13 και την α13 με την α14 αντίστοιχα, παρουσιάζουν μεγάλες δομικές διαφορές. Το C- τελικό άκρο της PARNn είναι πολύ μακρύτερο από αυτό της ε186 και παρουσιάζει διαφορετική διαμόρφωση από το αντίστοιχο της Pop2p. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της PARN είναι ότι τμήμα νουκλεάσης περιέχει την περιοχή R3H σε αντίθεση με ότι παρατηρείται στις ε186 και Pop2p.

Πιθανώς η πιο σημαντική διαφορά είναι ότι το τμήμα νουκλεάσης της PARN είναι ένα ομοδιμερές, ενώ τα αντίστοιχα τμήματα των ε186 και Pop2p είναι μονομερή. [Mousheng Wu et al.].



ΕΙΚΟΝΑ 5.2: Σύγκριση της PARNn με τα άλλα μέλη της οικογένειας των DEDD εξωνουκλεασών. Α) Σύγκριση δομών του τμήματος νουκλεάσης της PARNn με αυτά των ε186 και Pop2p. Β) Δομές των ενεργών θέσεων της PARNn, της ε186 της Pol III και του Klenow θραύσματος της Pol I.

5.5) ΕΝΕΡΓΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Βασιζόμενοι σε μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες θέσεις και συγκρίνοντας την αλληλουχία της PARN με την αλληλουχία 3'-5' εξωνουκλεασών της DEDD υπεροικογένειας, προσδιορίστηκαν τέσσερα αμινοξέα (Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382), τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική δραστηριότητα της PARN και τα οποία είναι απαραίτητα για την δέσμευση δισθενών μεταλλικών ιόντων σε αυτή [Mousheng Wu et al.]. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, προτάθηκε ότι η PARN χρησιμοποιεί το μηχανισμό δύο μεταλλικών ιόντων για την κατάλυση, αν και ο αναλυτικός καταλυτικός μηχανισμός παραμένει ακόμα ασαφής.

Και στις δύο μορφές της PARN (ελεύθερη και σε σύμπλοκο με ολιγονουκλεοτίδιο) τα αμινοξέα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 δημιουργούν μία αρνητικά φορτισμένη κοιλότητα. Το τρινουκλεοτίδιο συνδέεται σε αυτήν την κοιλότητα. Κατά τη σύνδεση του ολιγονουκλεοτιδίου δεν παρατηρούνται σημαντικές δομικές μεταβολές στα αμινοξέα Asp28, Asp292 και Asp382, ενώ παρατηρείται μία μικρή μετατόπιση της θέσης του Glu30. Οι παρατηρήσεις αυτές συνάδουν με τη διαπίστωση ότι τα τέσσερα αυτά κατάλοιπα δεν απαιτούνται για την σταθεροποίηση του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος. Επίσης, ιόντα Mg^{2+} δεν βρέθηκαν στην ενεργή περιοχή της ελεύθερης μορφής της PARNn, έστω και αν περιλαμβάνονται 5mM $MgCl_2$ στο διάλυμα κρυστάλλωσης. Συγκριτική δομική ανάλυση έδειξε ότι τα αμινοξέα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 του συμπλόκου PARNn-RNA μπορούν

να ευθυγραμμιστούν χωροταξικά με τα αμινοξέα της ενεργής θέσης Asp12, Glu14, Asp103 και Asp167 στο σύμπλοκο ε186-TMP, με μικρές διαφορές στις θέσεις των μόνο των ατόμων της πλευρικής αλυσίδας. Τα μεταλλικά ιόντα που λείπουν μπορούν ενδεχομένως να καταλαμβάνουν θέσεις παρόμοιες με αυτές των δύο ιόντων Mg^{2+} στο σύμπλοκο ε186-TMP. Το αμινοξύ His162 της ε186, το οποίο προτάθηκε πως έχει ένα παρόμοιο ρόλο με αυτό της Tyr497 στην περιοχή εξωνουκλεάσης της Pol I, αντιστοιχεί χωροταξικά στο αμινοξύ His377 της PARN, επιβεβαιώνοντας ότι η PARN ανήκει στην DEDDh υπεροικογένεια. Σύμφωνα με το ρόλο της His377 στην κατάλυση, η αντικατάσταση της His377 με Ala στην PARN(1-537), αναστέλλει την δραστηριότητα της PARN, δείχνοντας ότι η His377 είναι ουσιαστικής σημασίας για την καταλυτική δράση της PARN. [Mousheng Wu et al.].

Αν και δεν υπάρχουν μεταλλικά ιόντα στις ενεργές θέσεις των δομών της PARN, βιοχημικά πειράματα και μελέτες μεταλλαξιγένεσης δείχνουν ότι τα αμινοξέα Asp28, Glu30, Asp292 και Asp382 συμμετέχουν στον συντονισμό των μεταλλικών ιόντων. Η υψηλή ομοιότητα των δομών των ενεργών θέσεων μεταξύ της PARN και της ε186, υποδηλώνει ότι τα πέντε συντηρημένα αμινοξέα στα δύο αυτά ένζυμα έχουν τους ίδιους καταλυτικούς ρόλους, καθώς και ότι οι καταλυτικοί μηχανισμοί των δύο αυτών ενζύμων είναι πανομοιότυποι.

5.6Η ΠΕΡΙΟΧΗ R3H ΤΗΣ PARN

Η περιοχή R3H είναι ένα συντηρημένο επαναλαμβανόμενο μοτίβο, το οποίο έχει προσδιοριστεί σε περισσότερες από 100 πρωτεΐνες από διαφορετικά είδη οργανισμών. Το πλέον σημαντικό χαρακτηριστικό της περιοχής R3H είναι η παρουσία μίας αργινίνης και μίας ιστιδίνης, οι οποίες διαχωρίζονται από τρία αμινοξέα. Οι τρισδιάστατες δομές της περιοχής R3H από την PARN του ανθρώπου και του ποντικού, προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία NMR και έδειξαν ότι η περιοχή R3H που αποτελείται από ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο και δύο α-έλικες, είναι δομικά ομόλογο με την C-τελική περιοχή του παράγοντα έναρξης μετάφρασης (IF3). [Mousheng Wu et al.].

Στην δομή της PARNn, η περιοχή R3H από το ένα μόριο του ομοδιμερούς, βρίσκεται στην κορυφή της θέσης σύνδεσης poly(A) από το άλλο μόριο, χρησιμεύοντας σαν 'καλούπι' εγκολώνοντας την κοιλότητα της σύνδεσης του poly(A).

6. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ

6.1) ΓΕΝΙΚΑ

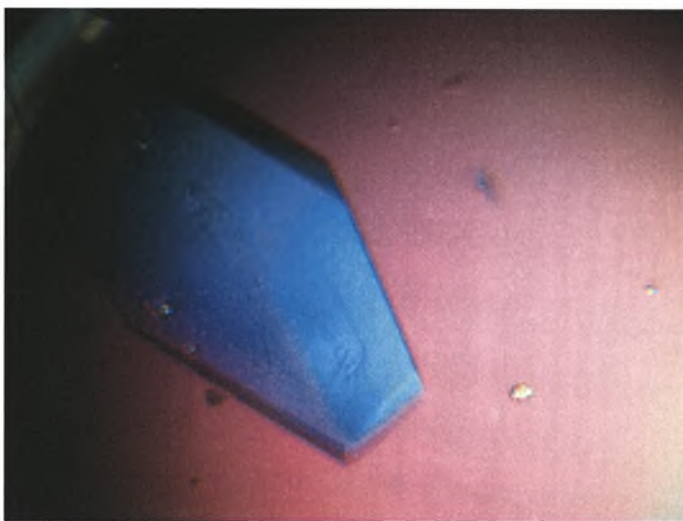
Κρυσταλλογραφία ονομάζεται γενικά η μελέτη του κρυσταλλικού πλέγματος, δηλαδή της γεωμετρικής δόμησης των κρυστάλλων. Με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας και των μεθόδων που ακολουθεί αυτή, οι επιστήμονες ανακαλύπτουν τη γεωμετρική διάταξη των σωματιδίων που συγκροτούν τους κρυστάλλους. Δέσμη ακτίνων-X, περνώντας μέσα από τα μικροσκοπικά σωματίδια του κρυστάλλου, δημιουργούν ένα σχήμα από κηλίδες πάνω σε φιλμ που τελικά στη συνέχεια προσκρούουν. Από το σχήμα αυτό που αποτυπώνεται στο φιλμ, οι ειδικοί μελετητές αναγνωρίζουν έτσι τη γεωμετρική δόμηση. Η κρυσταλλογραφία που εφαρμόζεται με ακτίνες-X καλείται κρυσταλλογραφία ακτίνων-X.

Η κρυσταλλογραφία των πρωτεϊνών αναπτύχθηκε το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα για τρεις κυρίως λόγους: α) χρησιμοποιήθηκε σαν μέσο για τον καθορισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ακάθαρτα μίγματα, την εποχή που δεν υπήρχαν πολλές μέθοδοι καθαρισμού πρωτεϊνών, β) χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν μια πρωτεΐνη ήταν καθαρή και γ) ήταν ένα αξιοπερίεργο εργαστηριακό αντικείμενο. Οι δύο πρώτοι λόγοι αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη της κρυσταλλογραφίας τον 19ο αιώνα και οι βιοχημικοί όπως ο Osborn, τη χρησιμοποίησαν κατά κόρον για να απομονώσουν και να χαρακτηρίσουν πρωτεΐνες. Αυτοί οι πρώτοι ερευνητές έδωσαν και τα πρώτα στοιχεία για την ανάπτυξη κρυστάλλων, τα οποία χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα [McPherson, 2004].

Οι ακτίνες-X ή ακτίνες Röntgen αποτελούν ένα τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με περιοχή μήκους κύματος μεταξύ 10nm με 10pm, που αντιστοιχεί σε περιοχή συχνότητας από 30PHz-30HHz. Αυτό το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ των τμημάτων της υπεριώδους ακτινοβολίας και των ακτίνων- γ. Η δεύτερη ονομασία της ακτινοβολίας προέρχεται από το όνομα ενός από τους πρώτους ερευνητές της, του Γερμανού φυσικού Wilhelm Röntgen που τις ανακάλυψε το 1895. Οι ακτίνες-X πρωταρχικά χρησιμοποιήθηκαν από την ιατρική ως διαγνωστικό εργαλείο με τη μορφή της ακτινογραφίας και από τη φυσική και τη χημεία με τη μορφή της κρυσταλλογραφίας.

Μια σημαντική εξέλιξη στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών προήλθε από την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA τη δεκαετία του 1980. Οι

τεχνολογίες του ανασυνδυσμένου DNA και της ετερόλογης έκφρασης επέτρεψε στους επιστήμονες να παράγουν επαρκείς ποσότητες σπάνιων πρωτεϊνών. Σήμερα, η πλειονότητα των πρωτεϊνών που μελετώνται με περίθλαση ακτίνων-X προέρχονται από ετερόλογη έκφραση. Μια άλλη συνέπεια είναι ότι πλέον χρησιμοποιούμε ομογενή πρωτεϊνικά δείγματα τα οποία εμφανίζουν μεγάλη επαναληψιμότητα. Αυτό έδωσε μεγάλη ώθηση στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, διεύρυνε το πεδίο εφαρμογών της και τη χρήση της από τους βιοχημικούς και τους μοριακούς βιολόγους.



ΕΙΚΟΝΑ 6: Πρωτεϊνικός κρύσταλλος

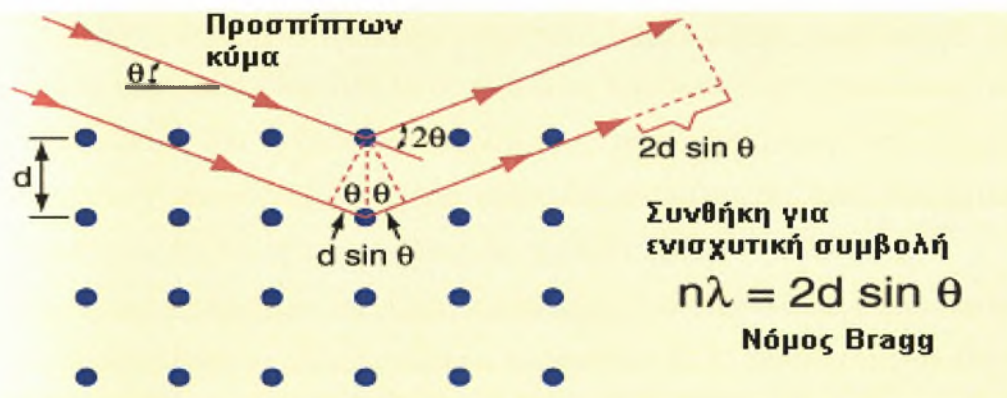
ΙΣΤΟΡΙΚΟΙ ΣΤΑΘΜΟΙ:

Το 1915, ο Άγγλος φυσικός Γουίλιαμ Μπραγκ (1862-1942) με την βοήθεια του γιου του Λόρενς Μπραγκ ανακαλύπτει την κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Αργότερα, η Αγγλίδα βιοχημικός Ντόροθι Χόντζκιν με τη βοήθεια της τεχνικής αυτής ανακαλύπτει τη δομή της πενικιλίνης και της βιταμίνης B12. Το 1953, η επίσης Αγγλίδα κρυσταλλογράφος Ρόζαλιντ Φράνκλιν (1920-1958), αξιοποιώντας την τεχνική των ακτίνων-X, ανακαλύπτει τη δομή του DNA.

6.2 ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ-X ΚΑΙ Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ

Η ανακάλυψη της περίθλασης των ακτίνων -X από κρυστάλλους το 1912, από τον Max von Laue, αρχικά και τους W.H Bragg και W.L Bragg στη συνέχεια, σημείωσε τη γέννηση της κρυσταλλογραφίας των ακτίνων-X.

Η περίθλαση των ακτίνων-X ως βιοφυσική μεθοδολογία προσδιορισμού της δομής βιομορίων και βιολογικών δομών, βασίζεται στις φυσικές αρχές της περίθλασης ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Επειδή πολλά πρωτεϊνικά μόρια έχουν διαστάσεις μερικών δεκάδων Å και οι χημικές ομάδες τους έχουν διαστάσεις μερικών Å, είναι φανερό ότι για να διακρίνουμε λεπτομέρειες της μοριακής δομής πρέπει να χρησιμοποιήσουμε 'φως' με μήκος κύματος της τάξης του 1 Å, άρα ηλεκτρομαγνητικά κύματα ή σωματίδια που ισοδυναμούν με ηλεκτρομαγνητικό κύμα αυτού του μήκους κύματος. Οι ακτίνες-X, τα νετρόνια και τα ηλεκτρόνια με επιμέρους πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, χρησιμοποιούνται στη μελέτη και στην αποτύπωση βιοδομών.



ΕΙΚΟΝΑ 6.1:Περίθλαση Bragg ακτίνων-X από τα σημεία διαδοχικών επιπέδων που απέχουν απόσταση d . Η γωνία που σχηματίζει η προσπίπτουσα δέσμη με τα επίπεδα είναι θ .

Τα περιθλασίμετρα ακτίνων-X είναι συνήθως μεγάλες διατάξεις που περιλαμβάνουν μηχανικά μέρη για τον κατάλληλο προσανατολισμό των κρυστάλλων-δειγμάτων ως προς τη δέσμη των ακτίνων-X, συστήματα καταγραφής των διαγραμμάτων περίθλασης (φωτογραφικά φιλμς ή ανιχνευτές), καθώς και κατάλληλα υπολογιστικά συστήματα για υπολογισμούς και καταγραφή των ποσοτικών δεδομένων (π.χ εντάσεις των ανακλώμενων δεσμών).

6.3)ΣΤΑΔΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής ενός βιολογικού μακρομορίου είναι ένα πολύ δύσκολο πρόβλημα. Ενδεικτικά αναφέρουμε τα διάφορα στάδια για τη 'λύση' της δομής μιας πρωτεΐνης:

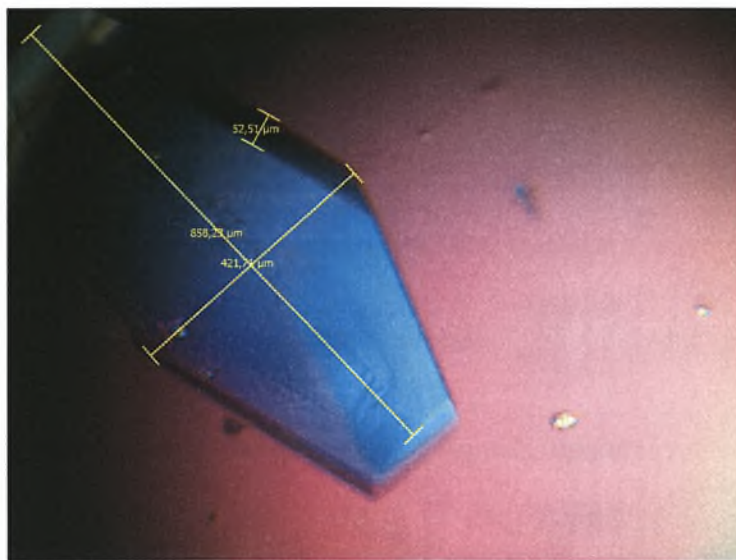
- ❖ Απομόνωση –καθαρισμός: Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η απομόνωση του μακρομορίου και η λήψη μιας καθαρής ποσότητας της τάξης των mg.
- ❖ Κρυστάλλωση: Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η κρυστάλλωση του μακρομορίου, π.χ της πρωτεΐνης, για να ληφθούν διαγράμματα περίθλασης πολύ καλής ποιότητας. Αυτό είναι ένα πολύ δύσκολο στάδιο, γιατί κάθε πρωτεΐνη παρουσιάζει ιδιαιτερότητες και απαιτούνται πολλές προσπάθειες μέχρι να επιτευχθεί η βέλτιστη κρυστάλλωση (μικρή διάσταση κρυστάλλου, απουσία 'προσμίξεων' ή άλλων ελαττωμάτων στο πλέγμα). Στο στάδιο αυτό παρασκευάζονται και παράγωγα του μακρομορίου με 'βαριά' άτομα, ισόμορφα της φυσικής δομής του κρυστάλλου.
- ❖ Περίθλαση ακτίνων-X (συλλογή-καταγραφή διαγραμμάτων περίθλασης): Στο στάδιο αυτό καταγράφονται τα διαγράμματα περίθλασης των κρυστάλλων και τουλάχιστον δύο ισόμορφων παραγώγων τους, αρχίζοντας από χαμηλή διακριτική ικανότητα (~ 5 Å) και φθάνοντας σε καλύτερες τιμές διακριτικής ικανότητας της τάξης του μεγέθους των χημικών δεσμών(~ 2 Å).
- ❖ Παραγωγή χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας: Στο στάδιο αυτό γίνεται πρώτα ο προσδιορισμός των ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων με τη βοήθεια της ανάλυσης Fourier και υπολογιστή. Έπειτα γίνεται η αναπαράσταση σε χώρους δύο και τριών διαστάσεων των ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων που έχουν υπολογισθεί (χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας) που δίνει μια στερεοσκοπική άποψη του μακρομορίου.
- ❖ Ερμηνεία των χαρτών-βελτιστοποίηση της δομής: Στο στάδιο αυτό συνδυάζονται οι πληροφορίες που δίνει ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας με αυτές της δευτεροταγούς και πρωτοταγούς δομής του μακρομορίου για να κατασκευαστεί ένα ατομικό ή μοριακό μοντέλο. Στη συνέχεια ακολουθούν διορθώσεις της δομής, με διαδοχικές συσχετίσεις με διάφορους συντελεστές ακριβείας, που καταλήγουν στη βελτίωση της προτεινόμενης δομής. Η αύξηση της υπολογιστικής ικανότητας των σύγχρονων ηλεκτρονικών υπολογιστών έχει

συμβάλλει θεαματικά στην επιτάχυνση των διαδικασιών ερμηνείας – βελτίωση της δομής των μακρομορίων και στην ανάπτυξη ευκολότερου στη χρήση λογισμικού για την τεχνική της περίθλασης των ακτίνων-X σε βιοδομές.

6.4)ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι μια βιοχημική τεχνική που αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον έλεγχο καθαρότητας των πρωτεϊνών, καθώς η μικροκρυσταλλικότητα των μορίων είναι ένδειξη καθαρότητάς τους. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της κρυστάλλωσης για το σκοπό αυτόν έχει εγκαταλειφθεί καθώς οι κρύσταλλοι μπορούν να περιέχουν μέχρι και 10% άλλες προσμίξεις. Για την δομική μελέτη μορίων με ακτίνες X η κρυστάλλωση του μορίου αποτελεί το πρωταρχικό βήμα. Τα πρώτα περιθλασιγράμματα ακτίνων-X από κρυστάλλους πρωτεϊνών πάρθηκαν από κρυστάλλους πεψίνης από τους Bernal και Crowfoot (D.Hodgkin) το 1934. Οι κρύσταλλοι σχηματίστηκαν στην Ουψάλα, από ένα δείγμα που τυχαία αφέθηκε ανέπαφο για αρκετές εβδομάδες και είναι ενδεικτικό για τον τρόπο που ξεκινούσαν όλες σχεδόν οι αρχικές κρυσταλλογραφικές μελέτες. Η επιλογή των πρωτεϊνών γινόταν με βάση την διαθεσιμότητα τους και την ευκολία με την οποία μπορούσαν να κρυσταλλωθούν και όχι με βάση την βιολογική τους σημασία, καθώς το ενδιαφέρον της δομικής βιολογίας τα πρώτα εκείνα χρόνια, ήταν στην ανάπτυξη των μεθόδων για τη λύση δομών παρά στην μεθόδευση των διαδικασιών κρυστάλλωσης. Σήμερα με την βοήθεια των εργαλείων της βιοτεχνολογίας είναι μάλλον ευκολότερο να αποκτήσει ο ερευνητής τα απαιτούμενα ποσά πρωτεϊνών για κρυσταλλώσεις (μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις αρκετά mg), καθώς ο στόχος δεν είναι μόνο η ανάπτυξη κρυστάλλων αλλά και το κατάλληλο μέγεθος αυτών. Η ένταση των περιθλωμένων ακτίνων-X είναι ανάλογη με τον όγκο του κρυστάλλου και αντίστροφα ανάλογη με τον όγκο της στοιχειώδους κυψελίδας που δεν είναι μικρότερος από μια πρωτεϊνική υπομονάδα. Οι ακτίνες-X σκεδάζονται ασθενώς από ένα μόνο μόριο, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με ένα κρύσταλλο που περιέχει μεγάλο αριθμό μορίων διευθετημένων κανονικά (ένας συνηθισμένος κρύσταλλος έχει περίπου 10^{15} - 10^{18} μόρια). Για παράδειγμα, πρωτεΐνες μοριακού βάρους μικρότερο από 50.000 Dalton που θα σχημάτιζαν κρύσταλλο 0.1mm σε όλες

τις διαστάσεις, θα παρήγαγαν περιθλασίγραμμα μόνο με βασικά δεδομένα, ενώ για ανάλυση δομής σε υψηλή διακριτικότητα απαιτούνται κρύσταλλοι 0.3 mm σε όλες τις διαστάσεις με 30 φορές μεγαλύτερο όγκο. [Χαμόδρακας Σ., Παύλου Κ.]



ΕΙΚΟΝΑ 6.2: Παρουσίαση κρυστάλλων από στερεοσκόπιο

6.5) ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ

Η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και η αύξηση των κρυστάλλων εξαρτάται από πολλές παραμέτρους που αναφέρονται παρακάτω:

I) Ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι

- ❖ Υπερκορεσμός (συγκέντρωση πρωτεΐνης και παραγόντων κατακρήμνισης)
- ❖ Μεταβολές θερμοκρασίας και pH
- ❖ Χρόνος (ρυθμοί εξισορρόπησης και αύξησης)
- ❖ Ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών (φύση των παραγόντων κατακρήμνισης, ρυθμιστικά διαλύματα, επιπρόσθετες χημικές ουσίες)
- ❖ Διάχυση και μεταφορά (πηκτώματα, μικροβαρύτητα)
- ❖ Όγκος και γεωμετρία του δείγματος και των πειραματικών συσκευών (επιφάνεια των συσκευών κρυστάλλωσης)

- ❖ Στερεά σωματίδια, αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα και με τις διάμεσες επιφάνειες (ομοιογενής, ετερογενής πυρήνωση)
- ❖ Φαινόμενα εξαρτημένα από την πυκνότητα ή το ιξώδες (διαφορές μεταξύ κρυστάλλου και μητρικού υγρού)
- ❖ Πίεση, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία
- ❖ Δονήσεις και ήχος (ακουστικά κύματα)
- ❖ Σειρά των γεγονότων, επαναληψιμότητα (ερευνητής ή ρομπότ)

II) Βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι

- ❖ Ευαισθησία της δομής της πρωτεΐνης σε φυσικές παραμέτρους (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, διαλύτες .
- ❖ Δέσμευση άλλων υποκαταστατών (υποστρώματα, συμπαράγοντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα)
- ❖ Ειδικές πρόσθετες ουσίες (ανταγωνιστικές ουσίες, μη ιοντικά απορρυπαντικά, πολυαμίνες)
- ❖ Ιδιότητες των πρωτεϊνών (οξειδωση, υδροφοβικότητα, υδροφιλικότητα)
- ❖ Γήρανση του δείγματος (οξειδοαναγωγικές μεταβολές, αποδιάταξη, αποικοδόμηση)

III) Βιολογικοί παράμετροι

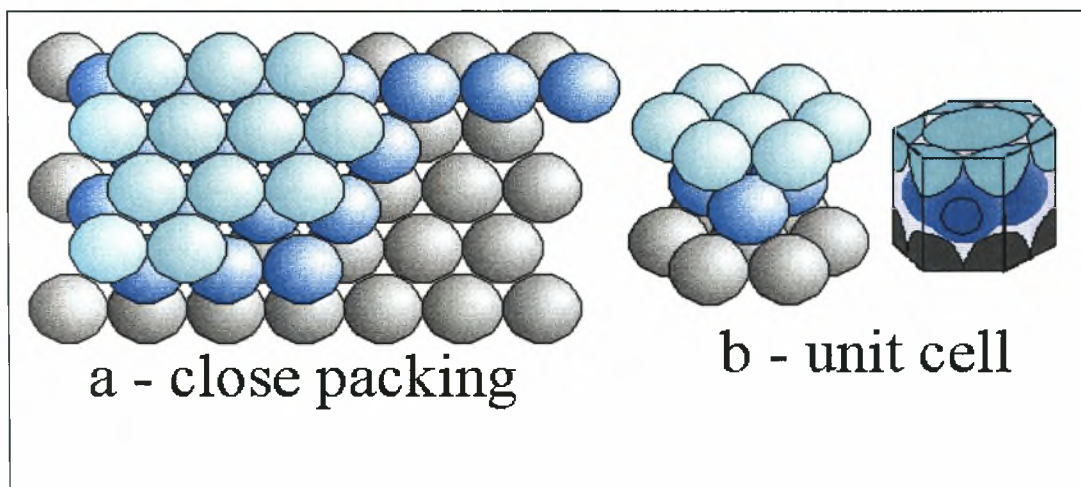
- ❖ Πολύ μικρές ποσότητες των περισσοτέρων πρωτεϊνών στην φύση
- ❖ Βιολογικές πηγές και φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών ή των κυττάρων που περιέχουν τις πρωτεΐνες (θερμόφιλοι, ψυχρόφιλοι, αλλόφιλοι, μεσόφιλοι οργανισμοί, στατική ή αναπτυσσόμενη φάση κυττάρων)
- ❖ Βακτηριακές μολύνσεις

IV) Καθαρότητα των μακρομορίων

- ❖ Μακρομοριακές επιμολύνσεις (με άλλα μακρομόρια ή άλλα μικρά μόρια)
- ❖ (Μικρο)ετερογένεια της ακολουθίας (κοψίματα από πρωτεάσες ή νουκλεάσες) -τα κλάσματα μακρομορίων μπορεί να κρυσταλλώνουν ευκολότερα-, μερικές ή ετερογενείς μεταφραστικές τροποποιήσεις
- ❖ Δομική (μικρο)ετερογένεια (βαθμός και τρόπος πολυμερισμού συσσωματώματα, αποδιάταξη) [Χαμόδρακας Σ., Παύλου Κ.]

6.6 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

Κρύσταλλος είναι η κανονική, επαναλαμβανόμενη διευθέτηση ατόμων ή μορίων σε τρεις διαστάσεις. Αποτελείται από όμοιες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα. Η μονάδα όγκου του πλέγματος με πλευρές a , b , c ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα, μπορεί να επιλεγεί με διαφόρους τρόπους και περιορίζονται να έχουν σχήματα τα οποία επαναλαμβανόμενα με μετατόπιση να μην αφήνουν κενά. Στην απλούστερη περίπτωση η στοιχειώδης κυψελίδα περιέχει ένα μόνο μόριο, συνήθως όμως αποτελείται από δύο ή περισσότερα μόρια, συνδεόμενα με κάποιο είδος συμμετρικής διευθέτησης, έτσι ώστε να συμπληρώνουν τον χώρο πιο ικανοποιητικά παρά αν ήταν το καθένα μόνο του. Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος. Απαιτείται η μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα των πρωτεϊνών για τα πειράματα κρυστάλλωσης, καθώς η ανομοιογένεια λόγω βιοχημικών τροποποιήσεων (πρωτεόλυση, φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση) ή άλλων παραγόντων οδηγεί τις πρωτεΐνες να μην κρυσταλλώνουν ή να κρυσταλλώνουν δύσκολα. [Χαμόδρακας Σ., Παύλου Κ.]



ΕΙΚΟΝΑ 6.3: Ο κρύσταλλος αποτελείται από όμοιες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό

Για την κρυσταλλογραφική μελέτη μίας πρωτεΐνης απαιτούνται μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι, γι' αυτό σε πρώτη φάση πρέπει να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης και να αφεθούν στην μετασταθερή ζώνη για να μεγαλώσουν. Αυτό προϋποθέτει ότι η πρωτεΐνη θα υπερβεί ένα φράγμα ενέργειας προκειμένου να μπορέσει να κρυσταλλώσει, ανάλογο με αυτό των τυπικών χημικών αντιδράσεων, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



ΕΙΚΟΝΑ 6.4: Διάγραμμα ελεύθερης ενέργειας (ΔG) σε σχέση με το χρόνο (t). Η πρωτεΐνη θα υπερβεί ένα φράγμα ενέργειας προκειμένου να μπορέσει να κρυσταλλώσει

Το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να περάσει από την διαλυτή φάση στην ζώνη πυρήνωσης και να παραμείνει εκεί για σύντομο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης που οδηγούν σε πολλούς και μικρότερου όγκου κρυστάλλους (η αύξηση του όγκου των κρυστάλλων σε διάλυμα με πολλούς πυρήνες κρυστάλλωσης οδηγεί σε επικαλύψεις κρυσταλλικών πλεγμάτων, άρα σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους). Στην συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα όταν μεταπέσει στην μετασταθερή ζώνη, οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν και θα δώσουν καλοσχηματισμένους κρυστάλλους. Όσο οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν τόσο η συγκέντρωση της διαλυμένης πρωτεΐνης μικραίνει, με αποτέλεσμα η μετασταθερή ζώνη να μετατοπίζεται. Έτσι κυριότερο μέλημα στα πειράματα κρυστάλλωσης είναι η δημιουργία συνθηκών συνεχούς

παρακολούθησης της μετασταθερής ζώνης. Από τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει ότι ο τρόπος ελάττωσης της διαλυτότητας της πρωτεΐνης στο διάλυμα, πρέπει να είναι ελεγχόμενος . Ταχεία ελάττωση της διαλυτότητας οδηγεί σε άμορφα ιζήματα, γι' αυτό η προσέγγιση του σημείου υπερκορεσμού γίνεται αργά, αλλάζοντας βαθμιαία παράγοντες όπως η συγκέντρωση, η ιοντική ισχύς, το pH, ή η διηλεκτρική σταθερά του πρωτεϊνικού διαλύματος. [Χαμόδρακας Σ., Παύλου Κ.]



ΕΙΚΟΝΑ 6.5: Στερεοσκόπιο και ρομποτικό σύστημα κρυστάλλωσης πρωτεϊνών στο εργαστήριο Δομικής Βιολογία και Χημείας, ΕΙΕ

6.7)ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

ΤΕΧΝΙΚΗ BATCH Η' ΑΜΕΣΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ

- ┆ Η πρωτεΐνη διαλύεται σε χαμηλή ιοντική ισχύ για να δώσει διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης
- ┆ Ο παράγοντας κατακρήμνισης(αλάτι ή οργανικός δ/της)προστίθεται ώστε να φέρει το διάλυμα σε κατάσταση κορεσμού

ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΞΑΤΜΙΣΗΣ Η' ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΤΜΩΝ

- ┆ Κλασσική μέθοδος κρυστάλλωσης μικρότερων μορίων, όχι πρωτεϊνών
- ┆ Επίδραση στην αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος με εξάτμιση του διαλύτη.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΔΙΑΠΙΔΥΣΗΣ

- ┆ Χρήση μεμβράνης διαπίδυσης για εξισορρόπηση δ/τη και μικρών ιόντων. Δεν διαπερνάται από μόρια πρωτεΐνης
- ┆ Η ιοντική ισχύς και το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται σε μια τέτοια μεμβράνη ρυθμίζεται με εξισορρόπηση έναντι του ελεύθερου πρωτεϊνής διαλύματος

7. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ (DLS)

7.1) ΓΕΝΙΚΑ

Το DLS είναι μια από τις πιο γνωστές τεχνικές που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μεγέθους των μορίων. Ακτινοβολώντας μια μονοχρωματική δέσμη φωτός, όπως οι ακτίνες λέιζερ, σε ένα διάλυμα με σφαιρικά σωματίδια σε κίνηση Brown προκαλεί αλλαγή φαινομένου Doppler όταν το φως χτυπήσει το κινούμενο σωματίδιο, αλλάζοντας το μήκος κύματος του εισερχόμενου φωτός. Η αλλαγή αυτή σχετίζεται με το μέγεθος των σωματιδίων. Είναι δυνατόν να υπολογιστεί το μέγεθος της σφαιρικής κατανομής και να δοθεί μια περιγραφή της κίνησης των σωματιδίων στο ενδιάμεσο, μετρώντας τον συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων και χρησιμοποιώντας την συνάρτηση αυτοσυσχέτισης.

Αυτή η μέθοδος έχει αρκετά πλεονεκτήματα: πρώτα απ'όλα η διάρκεια του πειράματος είναι μικρή και είναι σχεδόν όλα αυτοματοποιημένα ώστε για μετρήσεις ρουτίνας δεν είναι απαραίτητη εκτεταμένη εμπειρία. Επιπλέον η μέθοδος αυτή έχει μικρό κόστος ανάπτυξης.

Εμπορικά συστήματα μέτρησης μεγέθους σωματιδίων κινούνται κυρίως σε μια μόνο γωνία (90^0) και χρησιμοποιούν κόκκινο φως (675nm). Συνήθως, σε αυτά τα συστήματα, η εξάρτηση από τη συγκέντρωση είναι αμελητέα. Χρησιμοποιώντας πιο εξελιγμένο πειραματικό εξοπλισμό (projector, μικρού μήκους κύματος πηγή φωτός), οι μέθοδοι μπορεί να μην είναι τόσο σημαντικά εκτεταμένες, αλλά περισσότερο πολύπλοκες και ακριβές.

Αν και η τεχνική DLS, είναι καταρχήν, ικανή να διακρίνει αν μια πρωτεΐνη είναι μονομερής ή διμερής, είναι πολύ λιγότερο ακριβής να διακρίνει μικρά ολιγομερή απ'ότι η κλασική σκέδαση φωτός. Το πλεονέκτημα της χρήσης του DLS είναι η δυνατότητα ανάλυσης δειγμάτων που περιέχουν ευρεία κατανομή ειδών διαφορετικών μοριακών μαζών (π.χ μια φυσική πρωτεΐνη και διαφόρων μεγεθών μείγματα) και ότι ανιχνεύει πολύ μικρά ποσά, υψηλότερης μάζας είδη (<0,01% σε πολλές περιπτώσεις). Ακόμα, με αυτή την τεχνική είναι δυνατόν να ληφθούν ακριβείς μετρήσεις, πολλών παραμέτρων, όπως το μοριακό βάρος, η ακτίνα περιστροφής κ.ά. Ωστόσο, η ανάλυση μπορεί να είναι δύσκολη για τα μη-στέρεα μακρομόρια. [Marta Sartor, Uniresity of California]

7.2)ΣΚΕΔΑΣΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ

Σύμφωνα με την ημι-κλασική θεωρία σκέδασης φωτός (*Berne and Pecora, 'Dynamic Light Scattering' John Wiley, 1975*), όταν το φως προσκρούει στο υλικό, το ηλεκτρικό πεδίο του φωτός προκαλεί ταλαντωμένη πόλωση των ηλεκτρονίων στα μόρια. Γι'αυτό και τα μόρια παράγουν μια δευτερεύουσα πηγή φωτός και στη συνέχεια σκεδιάζουν το φως. Οι συχνές μετατοπίσεις, η γωνιακή διανομή, η πόλωση και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός, καθορίζονται από το μέγεθος, το σχήμα και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις στο σκεδαζόμενο υλικό.

Διάφορες μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της δυναμικής του συστήματος με σωματίδια σε κίνηση κατά Brown, εξαρτώμενοι από τη χρονική κλίμακα των μοριακών διακυμάνσεων.

Μία συσκευή μονοχρωματισμού ή ένα φίλτρο τοποθετείται από φωτοπολλαπλασιαστή και χρησιμοποιείται όταν το χρονικό διάστημα των διακυμάνσεων είναι πάνω από ένα μικροδευτερόλεπτο (συχνότητα μεγαλύτερη από 1MHz). Η μέση DC εξόδου του φωτοπολλαπλασιαστή είναι ανάλογη προς τη φασματική πυκνότητα του διάχυτου φωτός στο φίλτρο συχνοτήτων. Ύστερα, το φίλτρο σαρώνεται μέσω μιας σειράς συχνοτήτων.

Για διαδικασίες μεγαλύτερες από ένα πικοδευτερόλεπτο ($f > 10$ GHz), φράκτες διάθλασης χρησιμοποιούνται ως φίλτρα και για τις αργές διακυμάνσεις μεταξύ πικοδευτερολέπτου και μικροδευτερολέπτου χρησιμοποιούνται Fabry-Perot ιντερφερόμετρα. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται όταν οι διακυμάνσεις είναι πιο αργές από ένα μικροδευτερόλεπτο ($f < 1$ MHz). [Marta Sartor, University of California]

7.3)ΘΕΩΡΙΑ ΣΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΤΟ DLS

Η θεωρία του πειράματος βασίζεται κυρίως σε δύο παραδοχές. Η πρώτη προϋπόθεση είναι ότι τα μόρια βρίσκονται σε κίνηση Brown. Στην κατάσταση αυτή ξέρουμε ότι η συνάρτηση πιθανότητας-πυκνότητας, δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$P(\mathbf{r}, t | 0, 0) = (4\pi Dt)^{-3/2} \exp(-r^2/4Dt) \quad (1)$$

Όπου D είναι η σταθερά διάχυσης.

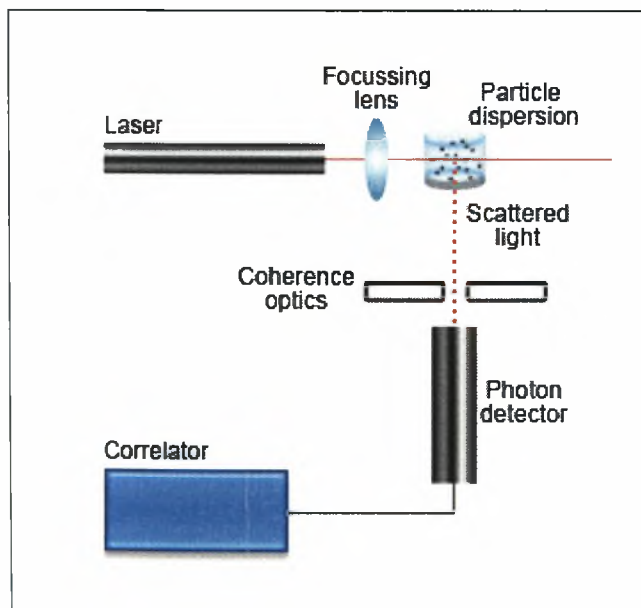
Η δεύτερη παραδοχή είναι ότι τα σφαιρίδια που χρησιμοποιούνται στο πείραμα, είναι σφαιρικά μόρια με διάμετρο μικρή σε σύγκριση με τις μοριακές διαστάσεις. Αν είναι έτσι, τότε είναι δυνατή η εφαρμογή της σχέσης Stoke-Einstein, και συνεπώς, υπάρχει ένας τύπος για την σταθερά διάδοσης:

$$D = k_B T / 6\pi\eta a \quad (2)$$

Όπου a είναι η ακτίνα των σφαιριδίων, k_B η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin και η το ιξώδες του διαλύτη. Δεδομένου ότι από την σκέδαση του φωτός είναι δυνατόν να συλλεχθούν πληροφορίες σχετικές με τη θέση των μορίων, με βάση τους παραπάνω τύπους είναι εύκολο να υπολογιστεί και η ακτίνα τους. [Marta Sartor, University of California]

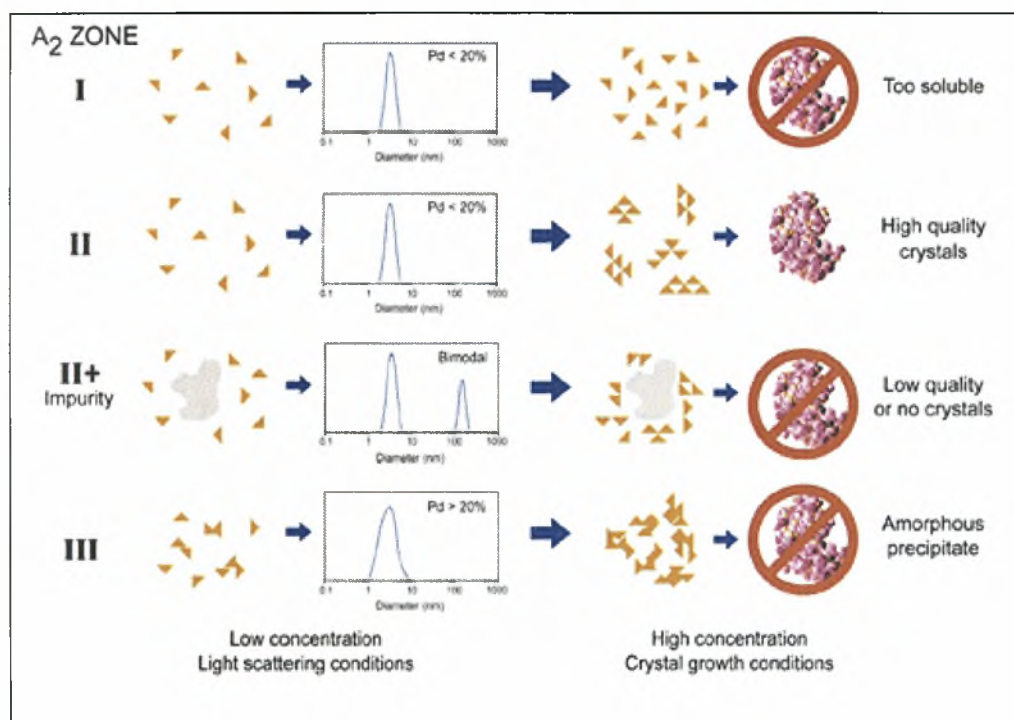
7.4) ΠΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ DLS

Οι ακτίνες laser διέρχονται μέσα από μια συσκευή δέσμης σωματιδίων και στη συνέχεια χτυπά το δείγμα με το διάλυμα. Το φως διαχέεται και ανιχνεύεται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή όπου μετατρέπει την απόκλιση της έντασης σε απόκλιση ηλεκτρικής τάσης (εικόνα 7).



ΕΙΚΟΝΑ 7: Σχηματική απεικόνιση μιας συμβατής, 90⁰ συσκευής δυναμικής σκέδασης φωτός

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, υπάρχει ακόμα ένας φακός σκόπευσης πριν από τον φωτοπολλαπλασιαστή. Η χρήση και των δύο φακών είναι σημαντική. Ο πρώτος φακός επιτρέπει να εστιάσουμε τη δέσμη φωτός στο κύτταρο, έτσι ώστε η περιοχή που θα 'χτυπηθεί' θα είναι αρκετά μακριά από την πλευρά του κυττάρου. Ο δεύτερος φακός χρησιμοποιείται για να αποκτήσει ένα ποσό του διάχυτου φωτός, το οποίο δεν είναι ούτε πολύ ούτε ανεπαρκές. Ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι τοποθετημένος σε γωνία σκέδασης 90° . Μετά τον φωτοπολλαπλασιαστή, το σήμα προενισχύεται και μέσω του υπολογιστή επεξεργάζεται. [Marta Sartor, University of California]



ΕΙΚΟΝΑ 8: Σχηματική απεικόνιση που εμφανίζει τους τύπους συναθροίσεων που παρατηρούνται σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις για διάφορα πρωτεϊνικά δείγματα.

8.ΣΚΕΔΑΣΗ ΜΙΚΡΗΣ ΓΩΝΙΑΣ (SAXS/SANS)

Ενώ ο νόμος Bragg θέτει όρια στις διαστάσεις της μικρότερης δομής που μπορούμε να δούμε, δεν θέτει όρια στις διαστάσεις μιας μεγαλύτερης δομής. Και στην πράξη υπάρχουν πολλές σημαντικές μορφολογίες με μεγαλύτερες από ατομικές διαστάσεις. Έτσι, για να δούμε (και) δομές με μεγαλύτερες διαστάσεις από το μήκος κύματος που χρησιμοποιούμε, χρησιμοποιούμε την σκέδαση μικρής γωνίας (Small Angle Scattering). Συνήθως χρησιμοποιούνται τα ακρωνύμια SAXS (Small Angle X-ray Scattering) και SANS (Small Angle Neutron Scattering) για να υποδηλώσουν το είδος της ακτινοβολίας. Έτσι για παράδειγμα έχουν κατασκευαστεί ειδικά όργανα που μπορούν να μετρήσουν την σκέδαση σε γωνίες μικρότερες από 1 χιλιοστό της μοίρας. Αυτό σημαίνει ότι με ακτίνες X μπορούμε να δούμε δομές με κλίμακα 1μ.

Τα χαρακτηριστικά των υλικών σε αυτές, τις μεγαλύτερες από ατομική κλίμακες, είναι πολύ διαφορετικά απ'ότι σε ατομικές κλίμακες. Ενώ σε ατομική κλίμακα έχουμε υψηλό βαθμό τάξης και απλά και ομογενή δομικά υλικά (άτομα), σε κλίμακα νάνο και μεγαλύτερες σπάνια έχουμε καλή οργάνωση και τα δομικά υλικά είναι πολύπλοκα και ανομοιογενή. Στην συγκεκριμένη μέθοδο έχουμε σκέδαση από σκεδαστές (όπου σκεδαστής είναι οποιαδήποτε διακριτή ανομοιογένεια του υλικού σε επίπεδο $<1\mu$). Οι σκεδαστές μπορούν να έχουν ομοιόμορφη ή ανομοιόμορφη δομή. Παραδείγματα σκεδαστών με ομοιόμορφη δομή είναι:

- ❖ Μακρομόρια (π.χ πρωτεΐνες, αλυσίδες πολυμερών)
- ❖ Απλά κολλοειδή (π.χ λάτεξ)
- ❖ Μικρορωγμές, πόροι κλπ

Παραδείγματα σκεδαστών με ανομοιόμορφη δομή είναι:

- ❖ DNA
- ❖ Συμπλέγματα πρωτεϊνών
- ❖ Ιοί κλπ. [<http://tety248.edu.physics.uoc.gr/saxs.pdf>]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ
ΜΕΡΟΣ

9.ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελεί η απομόνωση, ο καθαρισμός και οι δομικές μελέτες των πρωτεϊνών PARN και PARNt. Η μελέτη περιελάμβανε τα εξής στάδια: καλλιέργεια κυττάρων για την απομόνωση των πρωτεϊνών, χρήση συγκεκριμένων στηλών καθαρισμού ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη καθαρότητα στις πρωτεΐνες και τέλος εφαρμογή της τεχνικής DLS για τον υπολογισμό του μεγέθους της πρωτεΐνης. Παράλληλα, διεξήχθησαν πειράματα SAXS σε διαλύματα της PARN και δοκιμές κρυστάλλωσης της PARN για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών κρυστάλλωσης διαφόρων μορφών της πρωτεΐνης.

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται, μέρος της οποίας είναι και η παρούσα εργασία, είναι η κατανόηση της σχέσης λειτουργίας - μοριακής δομής της PARN, και η αξιοποίηση της γνώσης αυτής στο σχεδιασμό νέων εν δυνάμει φαρμάκων.

Προϋπόθεση για την είσοδο μιας εν δυνάμει φαρμακευτικής ένωσης σε κλινικές δοκιμές είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εξειδίκευση έναντι του πρωτεϊνικού της στόχου. Ο σχεδιασμός εξειδικευμένων αναστολέων αποτελεί σήμερα έναν από τους πλέον δύσκολους στόχους στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, αφού απαιτεί την γνώση της δομής και λειτουργίας του, αλλά και των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση του αναστολέα στο μακρομοριακό στόχο.

9.1) ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ:

❖ **TB- 1L(x2):** Διαλύουμε σε 800ml ddH₂O: 12g Tryptone και 24g Yeast Extract
Προσθέτουμε 4ml glycerol και συμπληρώνουμε μέχρι τα 900ml. Επίσης
διαλύουμε σε 100 ml ddH₂O: 12,54gr K₂HPO₄ και 2,31gr KH₂PO₄. Αναμιγνύουμε
τα δύο διαλύματα.

❖ **Extraction buffer 100ml:** 20mM HEPES pH 7.9
0.5M KCl
0.5% TRITON-X 100
10% glycerol
2 mM β-mercaptoethanol
2.5 mM imidazole

❖ **Wash buffer 50ml(1):** 20mM HEPES pH 7.9
0.5M KCl
10% glycerol
5 mM imidazole

❖ **Wash buffer 50ml(2):** 20mM HEPES pH 7.9
0.2mM EDTA
10% glycerol
200mM KCl

❖ **Elution buffer 50ml:** 20mM HEPES pH 7.9
0.5M KCl
10% glycerol
150mM imidazole

- ❖ **Equilibration buffer D 500ml:** 20mM HEPES pH 7.0
0.2mM EDTA
10% glycerol
- ❖ **Equilibration buffer D 50ml:** 20mM HEPES pH 7.0
0.2mM EDTA
10% glycerol
50mM KCl
- ❖ **Elution buffer D 500ml(1):** 20mM HEPES pH 7.0
0.2mM EDTA
10% glycerol
300mM KCl
- ❖ **Elution buffer D 500ml(2):** 20mM HEPES pH 7.0
0.2mM EDTA
10% glycerol
2M KCl
- ❖ **Buffer D 500ml:** 20mM HEPES pH 7.0
0.2mM EDTA
10% glycerol
- ❖ **BUFFER A (50ml):** 50mM KCl
50mM HEPES
0,5mM EDTA
- ❖ **PhenylMethylSulphonyl Fluoride/PMSF**(stock=100mM)
- ❖ **Lysozyme** 0,125% w/v
- ❖ **Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside/IPTG** (stock=100mM)
- ❖ **Kanamycin** (stock=10mg/ml)
- ❖ **Ampicillin** (stock=50mg/ml)
- ❖ **Benzonase**

ΟΡΓΑΝΑ-ΥΛΙΚΑ:

Ζυγός	Orma(Italy)
Κυψελίδες	Hellma QS(Hellma, Germany) Οπτική διαδρομή 1cm
Πεχάμετρο	Metrohm 691 (Metrohm, Switzerland)
Πιπέτες	Gilson P1000-P10 (Gilson,France)
Φασματοφωτόμετρο	Carry1E(Varian,USA).Ορατού- υπεριώδους
Υπερφυγόκεντρος	Beckman (Beckman, Germany)
Φυγόκεντρος	Centurion Scientific Ltd
Robot Κρυσταλλώσεων	Douglas Instruments
Στήλη υγρής χρωματογραφίας	ÄKTA purifier



ΕΙΚΟΝΑ 9: Στήλη υγρής χρωματογραφίας ÄKTA purifier στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, ΕΙΕ

9.2) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ PARN

Για την ετερόλογη έκφραση της PARN, χρησιμοποιήσαμε την τροποποιημένη κυτταρική σειρά της *Escherichia coli* BL21(DE3). Αρχικά παρασκευάσαμε μια μικρή υγρή καλλιέργεια των 50ml και την εμβολιάσαμε με 500μl πλασμιδίου pET33 που περιείχε το γονίδιο για την PARN. Πριν τον εμβολιασμό είχαμε προσθέσει αντιβιοτικό καναμυκίνη (C=10 μg/ml) για την αποφυγή επιμολύνσεων της βακτηριακής καλλιέργειας μιας και η κυτταρική σειρά BL21(DE3) είναι ανθεκτική σε αυτό το αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια επώαστηκε υπό συνεχή ανάδευση για μία νύχτα, στους 37°C. Στην συνέχεια μετά την επώαση της μικρής καλλιέργειας, παρασκευάσαμε τέσσερις μεγάλες καλλιέργειες των 500ml. Οι μεγάλες αυτές καλλιέργειες περιείχαν 500ml TB, 2,5ml αντιβιοτικό καναμυκίνη (C=50 μg/ml, stock 10mg/ml) και 10ml από την μικρή καλλιέργεια των 50ml. Τις καλλιέργειες αυτές τις βάλουμε για επώαση στους 37°C, υπό συνεχή ανάδευση για 1,5 ώρα. Μετά από 1,5 ώρα πήραμε δείγμα 1ml από τις καλλιέργειες και μετρήσαμε την οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 595nm (ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήσαμε TB). Όταν η τιμή της οπτικής πυκνότητας ήταν μεγαλύτερη από 0,5 προσθέσαμε στις καλλιέργειες IPTG το οποίο επάγει την ενεργοποίηση του οπερόνιου της λακτόζης στα βακτήρια. Στο πείραμα μας η OD₅₉₅ ήταν 0,718. Μετά από τη μέτρηση αυτή προσθέσαμε 5ml IPTG στην κάθε καλλιέργεια (C_{IPTG}=1mM). Έπειτα από την προσθήκη του IPTG, βάλουμε τις καλλιέργειες για επώαση στους 37°C, υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες. Μετά το πέρας των 3 ωρών, οι καλλιέργειες χωρίστηκαν σε 4 μεγάλους πλαστικούς σωλήνες και ακολούθησε φυγοκέντρηση (20min, 5000rpm, 4°C). Ύστερα από την φυγοκέντρηση, αφαιρέσαμε το υπερκείμενο και φυλάξαμε το κυτταρικό ίζημα στους -20°C.[Per Nilsson,2006]

9.2.1) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PARN ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΣΤΗΛΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΝΙΚΕΛΙΟΥ (His-tag Affinity)

Αρχικά έγινε λύση των κυττάρων (pellets στους -20°C). Για την λύση των κυττάρων χρειαστήκαμε τα εξής:

- ❖ 0,125% w/v Lysozyme
- ❖ 20ml extraction buffer
- ❖ 2mM PMSF

- ❖ 1μl benzonase
- ❖ Rotate 15λεπτά, 4⁰C

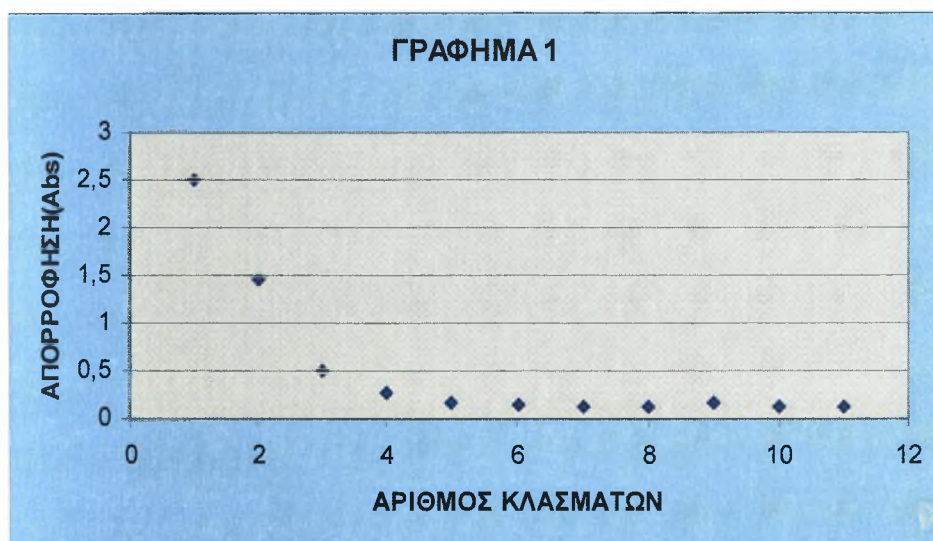
Δημιουργήσαμε ένα διάλυμα που περιείχε: 20ml extraction buffer, 2mM PMSF και 0,125% w/v λυσοζύμης και με αυτό έγινε λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων. Έπειτα προσετέθη στο μίγμα αυτό 1μl βενζονάσης και αφέθηκε για ανακίνηση 15 λεπτά στους 4⁰C. Για την αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων, το κυτταρικό μείγμα τοποθετήθηκε σε συσκευή υπερήχων (6 x10s με διάλλειμα 15s σε πάγο). Μετά τη λύση των κυττάρων, ακολούθησε υπερφυγοκέντρηση του δείγματος για 30 λεπτά, στους 4⁰C και στις 42000 στροφές/λεπτό. [Per Nilsson,2006]

Μετά την υπερφυγοκέντρηση το υπερκείμενο υγρό αναμίχθηκε με Ni-NTA agarose στους 4⁰C για 1ώρα. Στη συνέχεια, διεξήχθη υγρός χρωματογραφικός διαχωρισμός συγγένειας (His-tag Affinity). Μετά τον μηδενισμό της οπτικής απορρόφησης στο εκλουόμενο από τη στήλη διάλυμα όπως εμφανίζεται στις παρακάτω τιμές της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 280 nm:

OD ₂₈₀ -κλάσμα 1	2.5772
OD ₂₈₀ - κλάσμα 2	2.5384
OD ₂₈₀ - κλάσμα 3	1.4412
OD ₂₈₀ - κλάσμα 4	0.6209
OD ₂₈₀ - κλάσμα 5	0.3775
OD ₂₈₀ - κλάσμα 6	0.2468
OD ₂₈₀ - κλάσμα 7	0.4257
OD ₂₈₀ - κλάσμα 8	0.1253
OD ₂₈₀ - κλάσμα 9	0.0893
OD ₂₈₀ - κλάσμα 10	0.0946
OD ₂₈₀ - κλάσμα 11	0.0907
OD ₂₈₀ - κλάσμα 12	0.0709
OD ₂₈₀ - κλάσμα 13	0.0697
OD ₂₈₀ - κλάσμα 14	0.0529

Η έκλυση της PARN που είχε συνδεθεί στην στήλη επιτευχθεί με 22 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης έχει υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, το οποίο βοηθά στη διάσπαση των δεσμών μεταξύ του νικελίου και των ιστιδινών της ανασυνδιασμένης PARN. Η εκλυόμενη πρωτεΐνη συλλέχθηκε σε κλάσματα των 2ml. Οι οπτικές πυκνότητες σε μήκος κύματος 280 nm που πήραμε ήταν οι εξής:

OD ₂₈₀ - κλάσμα 1	2.5036
OD ₂₈₀ - κλάσμα 2	1.4677
OD ₂₈₀ - κλάσμα 3	0.4954
OD ₂₈₀ - κλάσμα 4	0.2690
OD ₂₈₀ - κλάσμα 5	0.1741
OD ₂₈₀ - κλάσμα 6	0.1403
OD ₂₈₀ - κλάσμα 7	0.1343
OD ₂₈₀ - κλάσμα 8	0.1305
OD ₂₈₀ - κλάσμα 9	0.1647
OD ₂₈₀ - κλάσμα 10	0.1254
OD ₂₈₀ - κλάσμα 11	0.1224

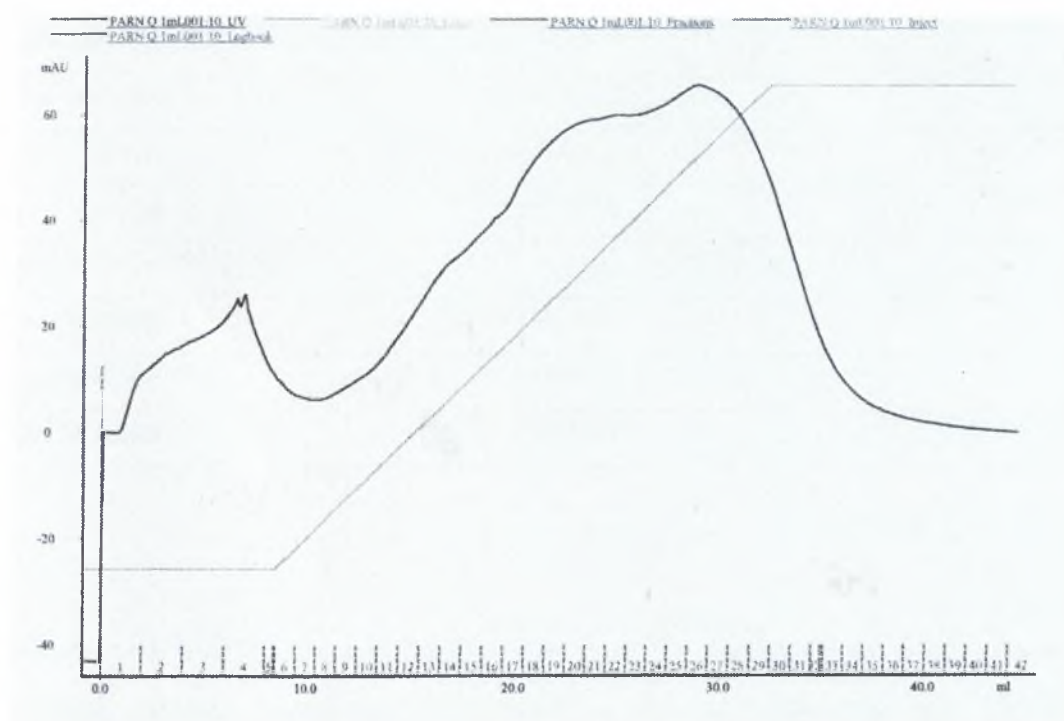


Στη συνέχεια τα κλάσματα 1-4, τα οποία όπως φαίνεται και από το γράφημα 1 περιείχαν την περισσότερη ποσότητα πρωτεΐνης τοποθετήθηκαν για διαπίδυση για

μία νύχτα έναντι 500ml ρυθμιστικού διαλύματος D για την απομάκρυνση της περίσσειας του άλατος ιμιδαζολίου.

9.2.2) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PARN ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΣΤΗΛΗ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ HiTrap OFF(1ml)

Μετά από την διαπίδυση, το πρωτεϊνικό δείγμα τοποθετήθηκε στην στήλη ιοντοανταλλαγής HiTrap QFF(1ml). Για την στήλη αυτή χρησιμοποιήσαμε τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα: i) ρυθμιστικό διάλυμα D (500ml) και ii) ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης D 50ml (1). Το χρωματογράφημα που πήραμε είναι το εξής:



ΕΙΚΟΝΑ 9.1) Χρωματογράφημα της PARN μετά τη στήλη ιοντοανταλλαγής Hi- Trap QFF(1ml)

Με βάση το χρωματογράφημα, η πρωτεΐνη μας βρίσκεται στα κλάσματα 11-30. Τα κλάσματα αυτά τοποθετήθηκαν για διαπίδυση για μία νύχτα έναντι 500ml ρυθμιστικού διαλύματος D για την απομάκρυνση της περίσσειας του άλατος ιμιδαζολίου.

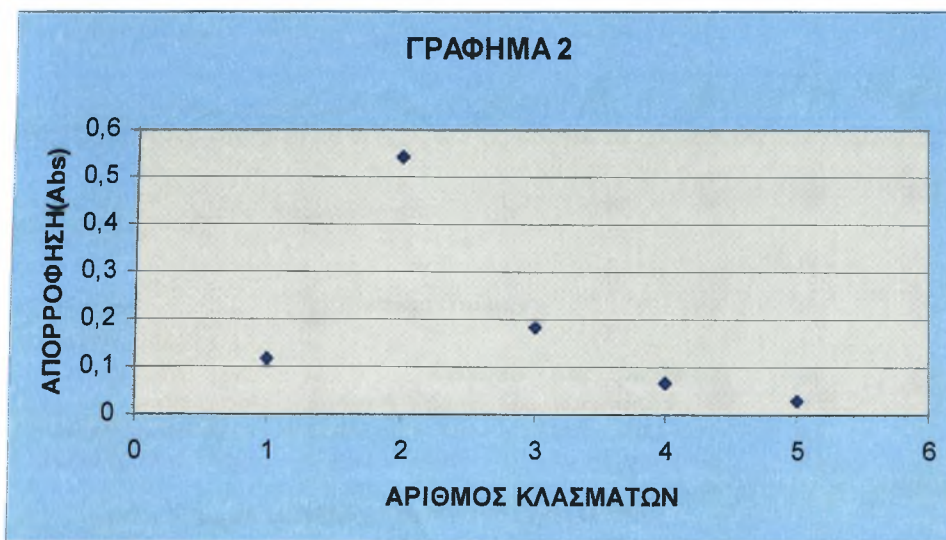
9.2.3) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PARN ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΣΤΗΛΗ **ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ 7-methyl-GTP-sepharose**

Για την στήλη αυτή χρειαστήκαμε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης D. Η στήλη ήταν 1ml. Αφού εξισορροπήθηκε με 5 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης D, στη συνέχεια περάσαμε το δείγμα μας (20ml) και η στήλη εκπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης D [Per Nilsson,2006]. Μετά τον μηδενισμό της οπτικής απορρόφησης στο εκλουόμενο από τη στήλη διάλυμα όπως εμφανίζεται στις παρακάτω τιμές της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 280 nm:

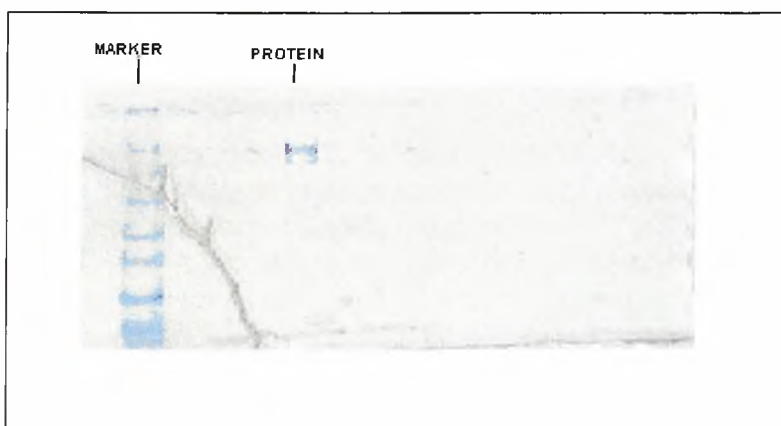
OD ₂₈₀ - κλάσμα 1	0.1634
OD ₂₈₀ - κλάσμα 2	0.1692
OD ₂₈₀ - κλάσμα 3	0.1519
OD ₂₈₀ - κλάσμα 4	0.0643
OD ₂₈₀ - κλάσμα 5	0.0523
OD ₂₈₀ - κλάσμα 6	0.0656
OD ₂₈₀ - κλάσμα 7	0.1103
OD ₂₈₀ - κλάσμα 8	0.1282
OD ₂₈₀ - κλάσμα 9	0.0418
OD ₂₈₀ - κλάσμα 10	0.0483

Η έκλυση της PARN που είχε συνδεθεί στην στήλη επιτευχθεί με 5 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης έχει υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, το οποίο βοηθά στη διάσπαση των δεσμών μεταξύ του νικελίου και των ιστιδινών της ανασυνδιασμένης PARN. Η εκλουόμενη πρωτεΐνη συλλέχθηκε σε κλάσματα των 2ml. Οι οπτικές πυκνότητες σε μήκος κύματος 280 nm που πήραμε ήταν οι εξής:

OD ₂₈₀ - κλάσμα 1	0.1151
OD ₂₈₀ - κλάσμα 2	0.5412
OD ₂₈₀ - κλάσμα 3	0.1820
OD ₂₈₀ - κλάσμα 4	0.0677
OD ₂₈₀ - κλάσμα 5	0.0312



Μετά το τέλος του χρωματογραφικού διαχωρισμού στα κλάσματα 1-5 έγινε ηλεκτροφόρηση πηκτικής γέλης. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται παρακάτω:



ΕΙΚΟΝΑ 9.2)
Ηλεκτροφόρηση
πηκτώματος γέλης
για την ανίχνευση
της PARN

Όπως φαίνεται η πρωτεΐνη μας μετά από την τρίτη στήλη είχε καθαριστεί σε μεγάλο ποσοστό. Στη συνέχεια συμπυκνώσαμε την πρωτεΐνη μας από τα 500μl στα 50μl έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της να είναι 10mg/ml. Έπειτα προσδιορίστηκε η ακριβή συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford ως 11mg/ml.

9.2.4) DLS ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ PARN

Η πρώτη μέτρηση, η οποία έγινε στους 20°C, έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

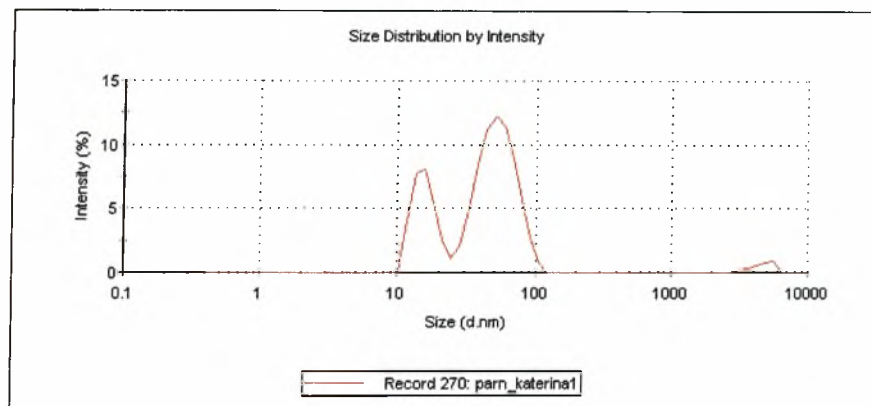
Cumulant Results

Count Rate (kcps): 170,7
 Z-Average (d.nm): 32,28
 Pdl: 0,349
 % Polydispersity: 59,1
 Est. Mol. Wt. (kDa): 2257,2

Distribution Results

	Size (d.nm):	% Int.	Est. MW (kDa)	%Pd
Peak 1:	53,78	68,5	7450,6	31,1
Peak 2:	15,82	28,7	425,2	19,9
Peak 3:	4594	2,8	246427116,1	18,0

Sample is NOT suitable for crystal trials



Υπάρχουν τρεις κορυφές, οι οποίες αποδίδονται με σειρά έντασης σκεδαζόμενου φωτός (laser beam 605nm). Η πρωτεΐνη μας βρίσκεται στη δεύτερη κορυφή. Η πρώτη και η τρίτη είναι συσσωματώματα ή σκόνη.

Η σημαντική πληροφορία της μέτρησης είναι το μέγεθος του σωματιδίου, το οποίο λέγεται υδροδυναμική ακτίνα και η διασπορά (λόγος ημιεύρους προς ύψος, polydispersity) που είναι η τελευταία στήλη. Η τιμή 19.9% είναι πάρα πολύ καλή για να βάλουμε κρυσταλλώσεις. Η εκτίμηση που κάνει για το μοριακό βάρος στηρίζεται σε κάποιο εσωτερικό πρότυπο που έχει το λογισμικό (υδροδυναμική διάμετρο σφαιρικής πρωτεΐνης). Η απόκλιση από το θεωρητικό MW του τετραμερούς μας που είναι 300kDa δεν είναι σημαντική..

Εξάλλου και για την εξαγωγή της υδροδυναμικής ακτίνας έχουμε κάνει μερικές προσεγγίσεις, όπως ότι το ιξώδες του διαλύματος και ο δείκτης διάθλασης του φωτός είναι ίσα με τα αντίστοιχα διαλύματος PBS. Στο σημείο αυτό υπεισέρχεται το μεγαλύτερο σφάλμα της μέτρησης.

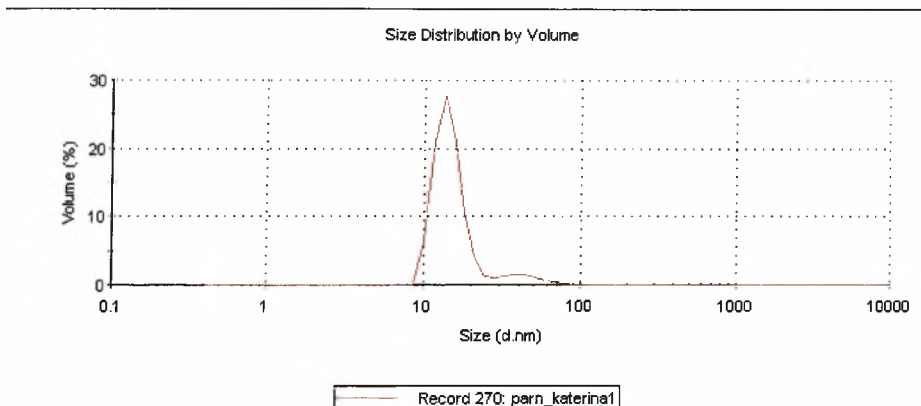
Αντίθετα για τη διασπορά δεν κάνουμε καμία προσέγγιση και γι' αυτό η πληροφορία αυτή είναι σημαντική.

Το λογισμικό κάνει αποτίμηση των αποτελεσμάτων και συμπεραίνει:

The predicted MW of the protein is: 425 kDalton
 with a relative polydispersity of : 20 % - indicating the sample is really good and very monodisperse.
 The relative amount of signal from this peak is: 29 % of the total intensity.

Επίσης υπολογίζει την κατά μάζα (την αναφέρει %volume) περιεκτικότητα σε καθένα από τα είδη του διαλύματος. Λαμβάνει υπόψη του ότι τα μεγάλα σωματίδια σκεδάζουν περισσότερο φως από τα μικρότερα.

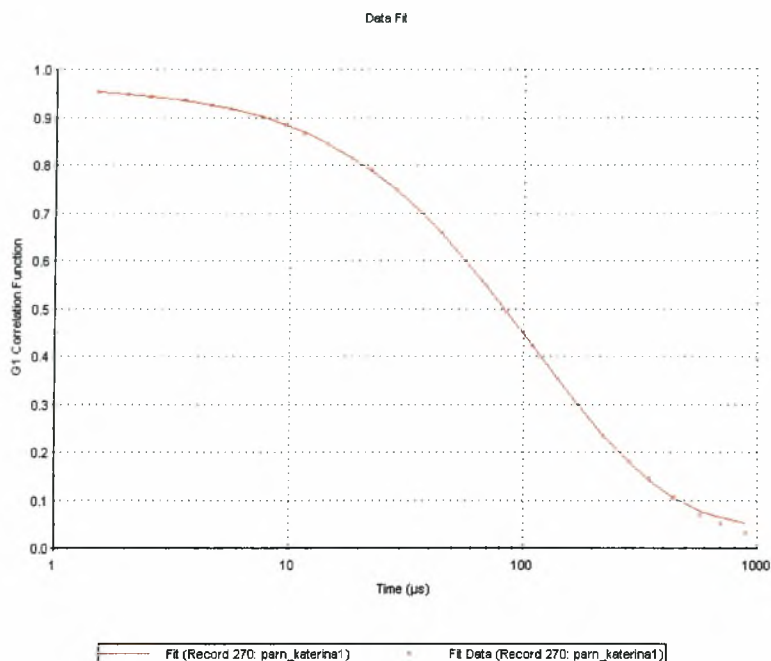
	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 32,28	Peak 1: 43,29	7,7	13,17
Pdl: 0,349	Peak 2: 14,54	92,2	3,247
Intercept: 0,986	Peak 3: 4365	0,1	1000
Result quality : Good			



Το τετραμερές βρίσκεται σε ποσοστό 92.2%.

Οι αποκλίσεις στα μεγέθη κάθε είδους, σε σχέση με αυτά της κατανομής κατά ένταση οφείλονται και πάλι στις λάθος τιμές του ιξώδους και του δείκτη διάθλασης. Γενικώς στην κατανομή κατά όγκο αποδίδεται μικρότερη υδροδυναμική διάμετρος.

Επομένως τα δεδομένα είναι αρκετά καλά όπως δείχνει η καμπύλη συσχέτισης δεδομένων:



Η μέτρηση έγινε και στους 12°C, αλλά τα νούμερα είναι λιγότερο αξιόπιστα, διότι απομακρυνόμαστε πολύ από την πραγματική τιμή του ιξώδους.

Μετά από φυγοκέντρηση για 15min στις 16000g με την ελπίδα να απαλλαγούμε από τα συσσωματώματα, πήραμε τα ίδια στατιστικά αποτελέσματα.

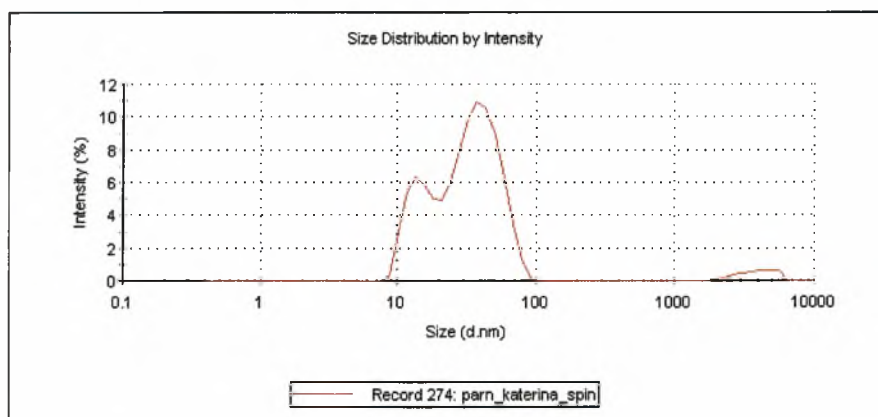
Cumulant Results

Count Rate (kcps): 314,8
 Z-Average (d.nm): 27,14
 Pdl: 0,258
 % Polydispersity: 50,8
 Est. Mol. Wt. (kDa): 1503,4

Distribution Results

	Size (d.nm)	% Int.	Est. MW (kDa)	%Pd
Peak 1:	40,48	67,1	3833,1	34,2
Peak 2:	15,18	29,4	386,2	23,4
Peak 3:	3931	3,5	171104864,8	27,6

Sample is NOT suitable for crystal trials

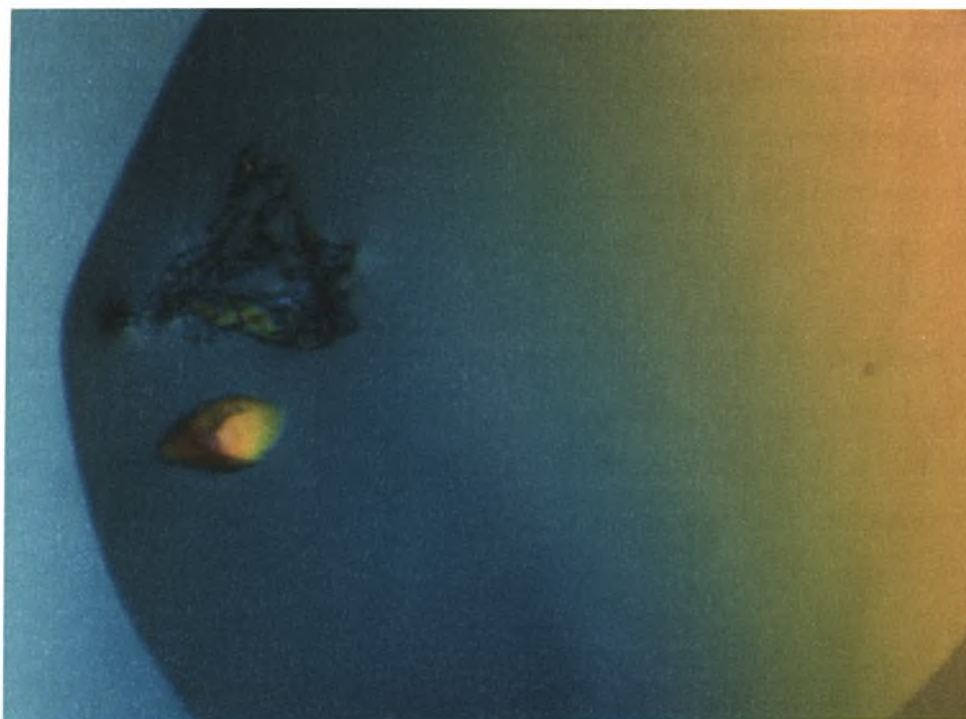


9.2.5)ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PARN

Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, διεξήχθησαν πειράματα κρυστάλλωσης με ρομπότ κρυσταλλώσεων για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών κρυστάλλωσης. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εμπορικά διαθέσιμες σειρές πρότυπων διαλυμάτων κρυστάλλωσης:

- ❖ Structure Screen I & II HT96 (Molecular Dimensions Limited)
- ❖ JCSG-plus Screen HT96 (Molecular Dimensions Limited)
- ❖ Wizard I &II (Emerald BioSystems)

Από την συνθήκη G2-Wizard II [30% (v/v) PEG-400 ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M CHES pH 9.5] πήραμε τον παρακάτω κρύσταλλο της PARN.



ΕΙΚΟΝΑ 9.3) Κρύσταλλος της πρωτεΐνης PARN

9.3) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ PARNt

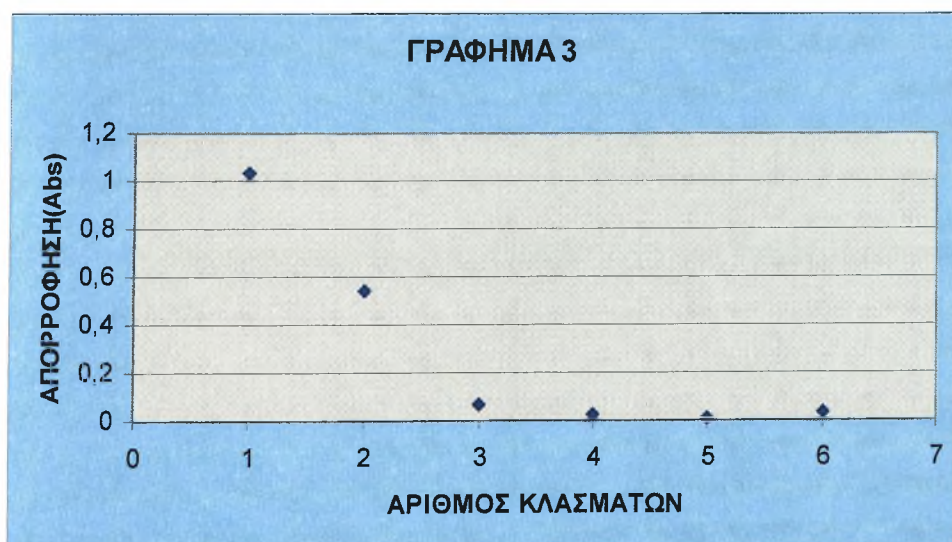
Για την ετερόλογη έκφραση της PARNt, χρησιμοποιήσαμε την τροποποιημένη κυτταρική σειρά της *Escherichia coli* BL21(DE3). Αρχικά παρασκευάσαμε μια μικρή υγρή καλλιέργεια των 50ml και την εμβολιάσαμε με 500μl πλασμιδίου pET33 που περιείχε το γονίδιο για την PARNt. Πριν τον εμβολιασμό είχαμε προσθέσει αντιβιοτικό αμικικιλίνη ($C=50 \mu\text{g/ml}$) για την αποφυγή επιμολύνσεων της βακτηριακής καλλιέργειας μιας και η κυτταρική σειρά BL21(DE3) είναι ανθεκτική σε αυτό το αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια επώαστηκε υπό συνεχή ανάδευση για μία νύχτα, στους 37°C . Στην συνέχεια μετά την επώαση της μικρής καλλιέργειας, παρασκευάσαμε τέσσερις μεγάλες καλλιέργειες των 500ml. Οι μεγάλες αυτές καλλιέργειες περιείχαν 500ml TB, 2,5ml αντιβιοτικό αμικικιλίνη ($C=50 \mu\text{g/ml}$, stock 10mg/ml) και 10ml από την μικρή καλλιέργεια των 50ml. Τις καλλιέργειες αυτές τις βάλαμε για επώαση στους 37°C , υπό συνεχή ανάδευση για 1,5 ώρα. Μετά από 1,5 ώρα πήραμε δείγμα 1ml από τις καλλιέργειες και μετρήσαμε την οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 595nm (ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήσαμε TB). Όταν η τιμή της οπτικής πυκνότητας ήταν μεγαλύτερη από 0,5 προσθέσαμε στις καλλιέργειες IPTG το οποίο επάγει την ενεργοποίηση του οπερόνιου της λακτόζης στα βακτήρια. Στο πείραμα μας η OD_{595} ήταν 0,502. Μετά από τη μέτρηση αυτή προσθέσαμε 5ml IPTG στην κάθε καλλιέργεια ($C_{\text{IPTG}}=1\text{mM}$). Έπειτα από την προσθήκη του IPTG, βάλαμε τις καλλιέργειες για επώαση στους 37°C , υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες. Μετά το πέρας των 3 ωρών, οι καλλιέργειες χωρίστηκαν σε 4 μεγάλους πλαστικούς σωλήνες και ακολούθησε φυγοκέντρηση (20min , 5000rpm , 4°C). Ύστερα από την φυγοκέντρηση, αφαιρέσαμε το υπερκείμενο και φυλάξαμε το κυτταρικό ίζημα στους -20°C . [Per Nilsson,2006]

9.3.1) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PARNt ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΣΤΗΛΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΝΙΚΕΛΙΟΥ (His-tag Affinity)

Η διαδικασία για την απομόνωση της PARNt με τη χρήση της στήλης υγρής χρωματογραφίας συγγένειας νικελίου (His-tag affinity) ήταν όμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της PARN με την ίδια στήλη (παράγραφος 9.2.1).

Οι οπτικές απορροφήσεις που πήραμε για τα διάφορα κλάσματα από την στήλη ήταν οι εξής:

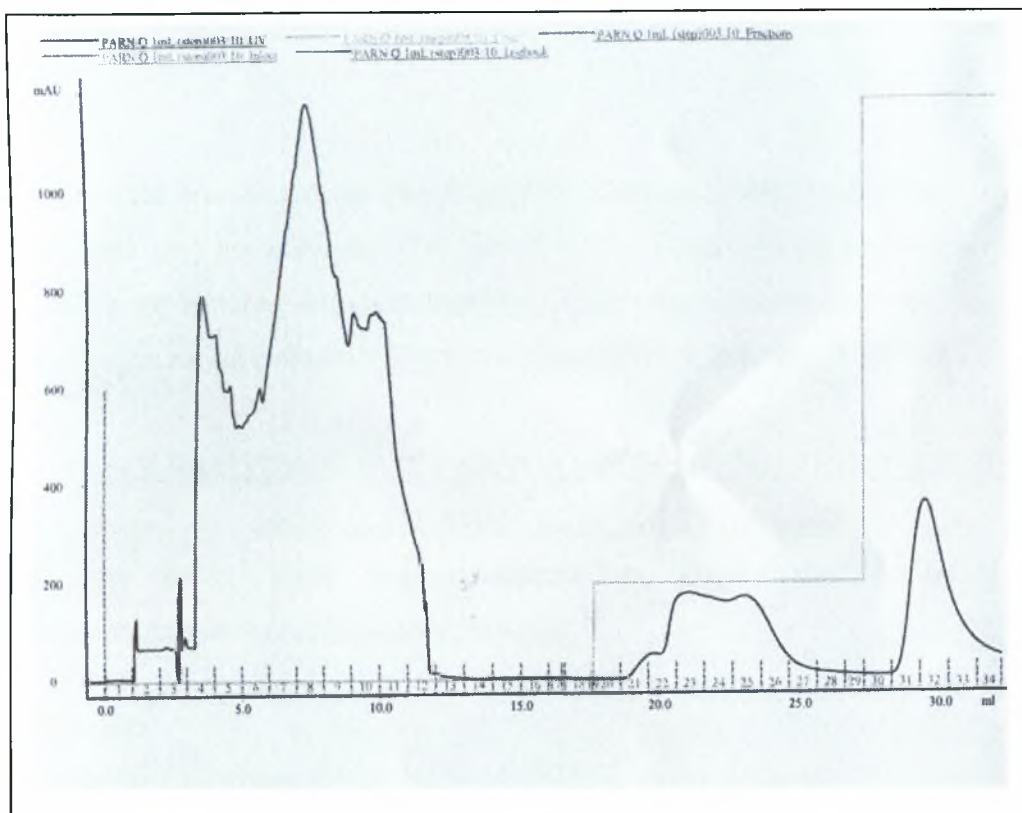
OD ₂₈₀ - κλάσμα 1	1.0318
OD ₂₈₀ - κλάσμα 2	0.5423
OD ₂₈₀ - κλάσμα 3	0.0705
OD ₂₈₀ - κλάσμα 4	0.0281
OD ₂₈₀ - κλάσμα 5	0.0095
OD ₂₈₀ - κλάσμα 6	0.0327



Τα κλάσματα 1 και 2, τα οποία όπως φαίνεται και από το γράφημα 3 περιέχουν την περισσότερη ποσότητα πρωτεΐνης τοποθετήθηκαν για διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος D για την απομάκρυνση της περίσσειας του άλατος.

9.3.2) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PARnt ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗ ΣΤΗΛΗ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ HiTrap QFF(1ml)

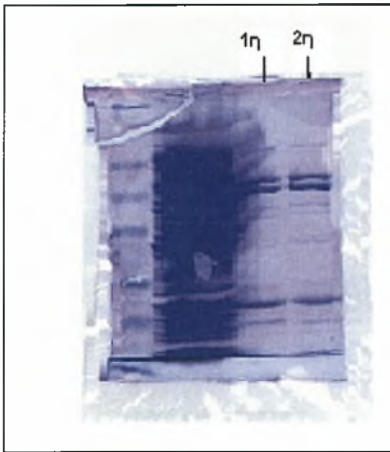
Η διαδικασία για την απομόνωση της PARnt με τη χρήση της στήλης υγρής χρωματογραφίας ιονοανταλλαγής (HiTrao QFF) ήταν όμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της PARN με την ίδια στήλη (παράγραφος 9.2.2).



ΕΙΚΟΝΑ 9.4) Χρωματογράφημα της PARnt μετά την στήλη ιονοανταλλαγής HiTrap QFF(1ml)

Με βάση το χρωματογράφημα, η πρωτεΐνη μας βρίσκεται στα κλάσματα 31-34. Τα κλάσματα αυτά τα βάλουμε για διαπίδυση έναντι 500ml ρυθμιστικό διαλύματος D.

Η πρωτεΐνη που πήραμε περιείχε αλάτι συγκέντρωσης 300mM και χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα A, συμπυκνώνοντας την, η πρωτεΐνη περιείχε τελικά αλάτι συγκέντρωσης 50mM. Έπειτα έγινε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος γέλης στο δείγμα μας για τον έλεγχο καθαρότητας της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται παρακάτω:



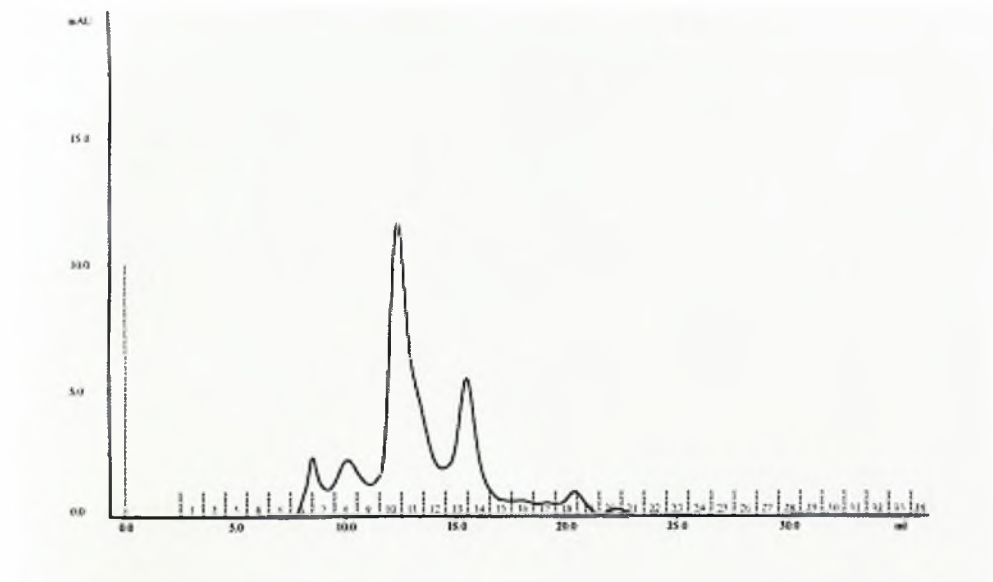
ΕΙΚΟΝΑ 9.5) Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος γέλης, για τη σύγκριση του επίπεδου καθαρότητας της πρωτεΐνης μετά την 1^η και 2^η στήλη.

Η σειρά των δειγμάτων στο παραπάνω πήκτωμα γέλης είναι η εξής: δείκτες, διάλυμα λύσης των κυτάρων, 1^η στήλη, 2^η στήλη. Παρατηρούμε λοιπόν ότι και μετά το τέλος της δεύτερης στήλης η πρωτεΐνη μας δεν είχε καθαρίσει αρκετά.

Η τρίτη στήλη καθαρισμού ήταν η στήλη μοριακής διήθησης Superdex 200.

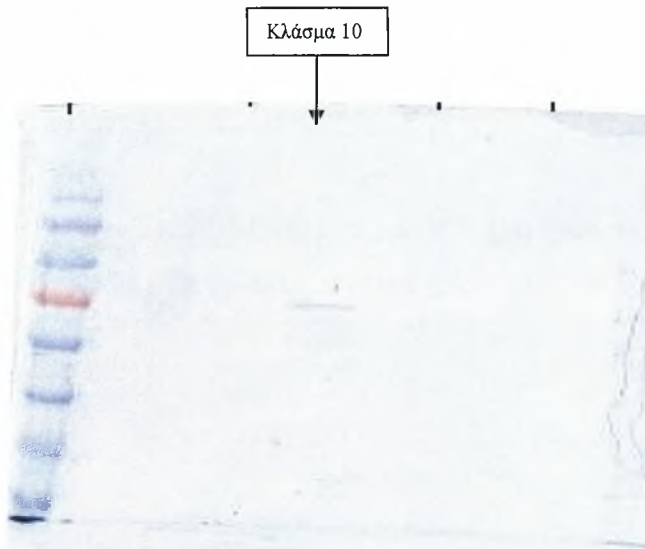
9.3.3) ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ PARnt ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗ ΣΤΗΛΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ SUPERDEX 200

Για την στήλη αυτή χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Α. Το χρωματογράφημα που πήραμε είναι το εξής:



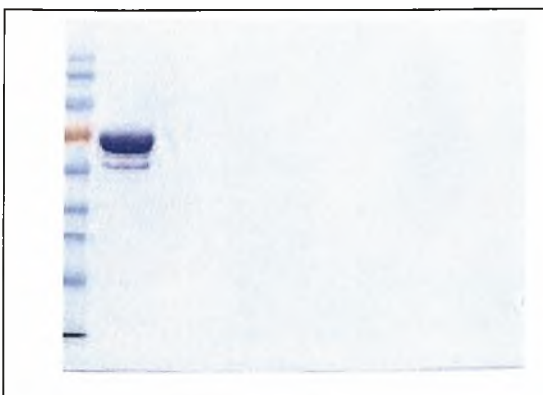
ΕΙΚΟΝΑ 9.6) Χρωματογράφημα της PARnt μετά την στήλη μοριακής διήθησης Superdex 200

Στο παραπάνω χρωματογράφημα κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία πρωτεΐνη, καθώς με την στήλη αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Για να συμπεράνουμε ποια από τις παραπάνω κορυφές αντιστοιχεί στην δική μας πρωτεΐνη, κάναμε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος γέλης στα κλάσματα 6, 8, 10, 13 και 18. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται στο παρακάτω πήκτωμα γέλης.



ΕΙΚΟΝΑ 9.7) Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος γέλης μετά την στήλη μοριακής διήθησης Superdex 200

Σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση πηκτώματος γέλης, η πρωτεΐνη μας βρίσκεται στο κλάσμα 10. Το κλάσμα που πήραμε ήταν 2ml. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση του κλάσματος προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford ως 0,0188mg/ml και γι' αυτό την συμπυκνώσαμε στα 50μl ώστε να αυξήσουμε την συγκέντρωση της στα 7,54mg/ml. Με το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό δείγμα διεξήχθη ηλεκτροφόρηση πηκτώματος γέλης, το οποίο παρουσιάζεται παρακάτω:



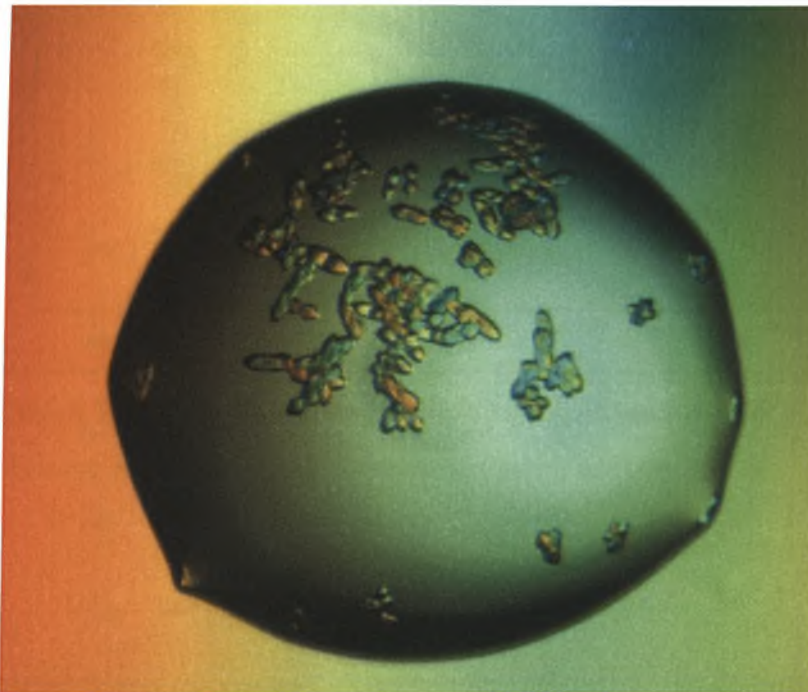
ΕΙΚΟΝΑ 9.8) Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος γέλης για την ανίχνευση της PARNt

9.3.4)ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PARNt

Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, διεξήχθησαν πειράματα κρυστάλλωσης με ρομπότ κρυσταλλώσεων για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών κρυστάλλωσης. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εμπορικά διαθέσιμες σειρές πρότυπων διαλυμάτων κρυστάλλωσης:

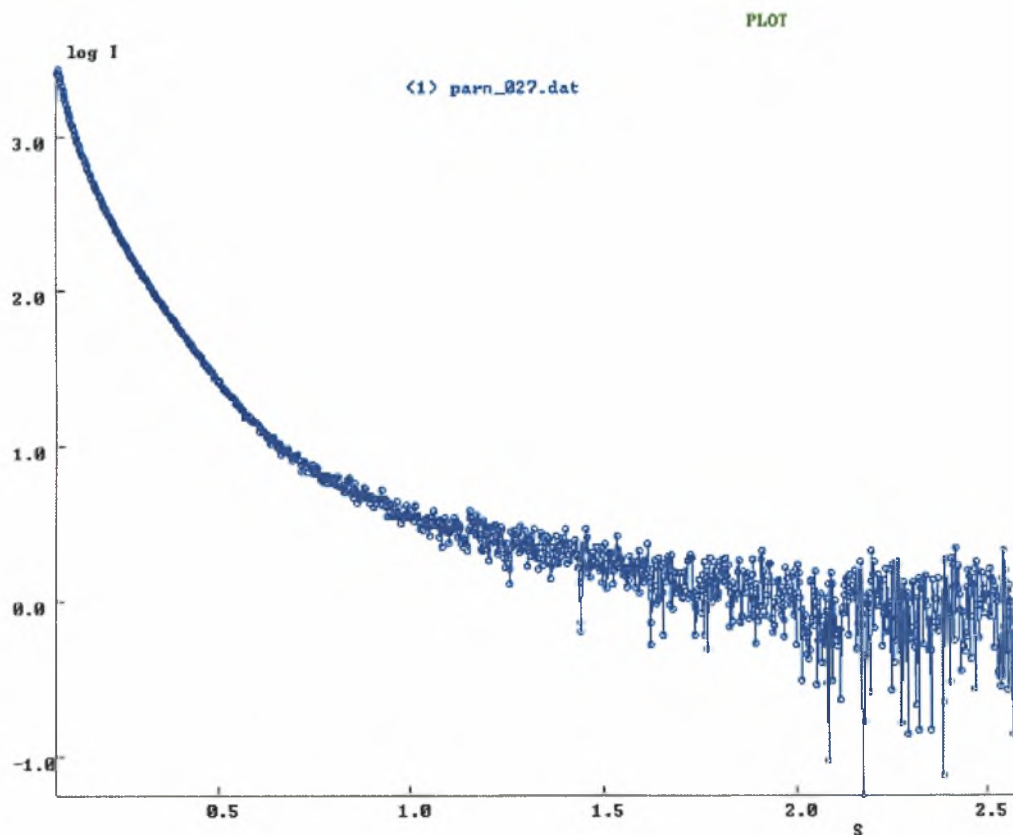
- ❖ Structure Screen I & II HT96 (Molecular Dimensions Limited)
- ❖ 6%PEG 6000, 100mM MES pH=6.0
- ❖ 8%PEG 6000, 100mM MES pH=6.0
- ❖ 10%PEG 6000, 100mM MES pH=6.0
- ❖ 12%PEG 6000, 100mM MES pH=6.0

Από την συνθήκη C3-Structure I & II HT96 (ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Na HEPES, pH 7.5, 1.5 M θειικό λίθιο), πήραμε τον παρακάτω κρύσταλλο της PARNt:



ΕΙΚΟΝΑ 9.9) Εμφάνιση πρωτεϊνικών κρυστάλλων της PARNt.

9.3.5) ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ SAXS ΓΙΑ ΤΗΝ PARNt



ΕΙΚΟΝΑ 9.10) Διάγραμμα της έντασης της σκέδαση ακτίνων X από διάλυμα της PARNt ως προς τη σκεδαζόμενη γωνία με τη μέθοδο SAXS

Όπως βλέπουμε και από το παραπάνω διάγραμμα, ο άξονας Y δίνει αυθαίρετες τιμές της έντασης στη λογαριθμική κλίμακα, ενώ ο άξονας X προκύπτει από την εξίσωση $S = \sin(2\theta)/\lambda$, όπου θ είναι οι σκεδαζόμενες γωνίες. Οπότε η μονάδα είναι 1/nm. Η μεγάλη διακύμανση που εμφανίζεται στο εύρος γωνιών $0.5^\circ - 2.5^\circ$ οφείλεται στην παρουσία στο δείγμα περισσότερων του ενός τύπου πρωτεϊνικών σωματιδίων (τετραμερή, οκταμερή, κλπ). Η διακύμανση αυτή δεν μας επιτρέπει να προσαρμόσουμε κάποιο θεωρητικό μοντέλο της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης στην καμπύλη αυτή και μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμός του πρωτεϊνικού δείγματος ως προς τα ανώτερα πολυμερή.

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά τα κυριότερα αποτελέσματα της πτυχιακής εργασίας ήταν:

- ❖ Η απόδοση του πρωτόκολλου καθαρισμού της ανασυνδυασμένης PARN είναι μέτρια. Από δύο λίτρα βακτηριακής καλλιέργειας απομονώνεται περίπου 1 mg καθαρής πρωτεΐνης.
- ❖ Από πειράματα φασματοσκοπίας DLS προσδιορίστηκε το επίπεδο του ολιγομερισμού της PARN η οποία σε ποσοστό 92.2%. είναι τετραμερή.
- ❖ Οι προσπάθειες κρυστάλλωσης της PARN ήταν επιτυχείς. Εντούτοις, το μέγεθος των κρυστάλλων της PARN που ήταν πολύ μικρό, δεν επέτρεψε τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων X. Έτσι, απαιτείται προσπάθεια βελτίωσης του μεγέθους των κρυστάλλων μέσω μικρής διαφοροποίησης των αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης που ευρέθησαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.
- ❖ Τέλος η φασματοσκοπία SAXS δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα για την PARNt καθώς στο προς μέτρηση δείγμα υπήρχε ένα ποσοστό (μικρότερο από 5%) ανομοιογένειας ως προς το μέγεθος των πρωτεϊνικών σωματιδίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ **Anderson, A.C. (2003).** The process of structure-based drug design. *Clem. Biology*. **10**, 787-797
- ❖ **Javed S., Bibhu Prasad P., Suruchi S. (2005).** RNase: A novel enzyme for treatment of cancers. *Internet Journal of Oncology*
(www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_oncology)
- ❖ **McPherson, A., (1997),** Crystallization of biological macromolecules, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- ❖ **McPherson, A. (2004).** Introduction to protein crystallography. *Methods*, **34**, 254-265.
- ❖ **Nilsson P., Virtanen A. (2006).** Expression and purification of recombinant poly(A)-specific ribonuclease (PARN). *Cell and Molecular Biology*. **2**, 1-2
- ❖ **Sartor M.** Dynamic Light Scattering. *University of California, San Diego*. 3-6
- ❖ **Stryer L., Berg J.M., and Tymoczko J.L.(2002).** Biochemistry 5th ed. W.H. Freeman
- ❖ **Τριανταφυλλίδης Κ. (2006).** Βιοτεχνολογία Ζώων, Έκδοση 1^η, Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη, Αθήνα
- ❖ **Verlinde L.M.J Christophe, Wim G.J. Hol (1994).** Structure-based drug design: progress, results and challenges. *Elsevier Science Ltd*
- ❖ **Wu Mousheng, Reuter M. (2005).** Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO JOURNAL*
- ❖ **Χαμόδρακας Ι.Σ., Παύλου Σ.Κ.(2002).** Κρυστάλλωση πρωτεϊνών. *Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής*. Πανεπιστήμιο Αθηνών
(<http://biophysics.biol.uoa.gr/courses/biophysics/crystallization>)
- ❖ <http://tety248.edu.physics.uoc.gr/saxs.pdf>

