

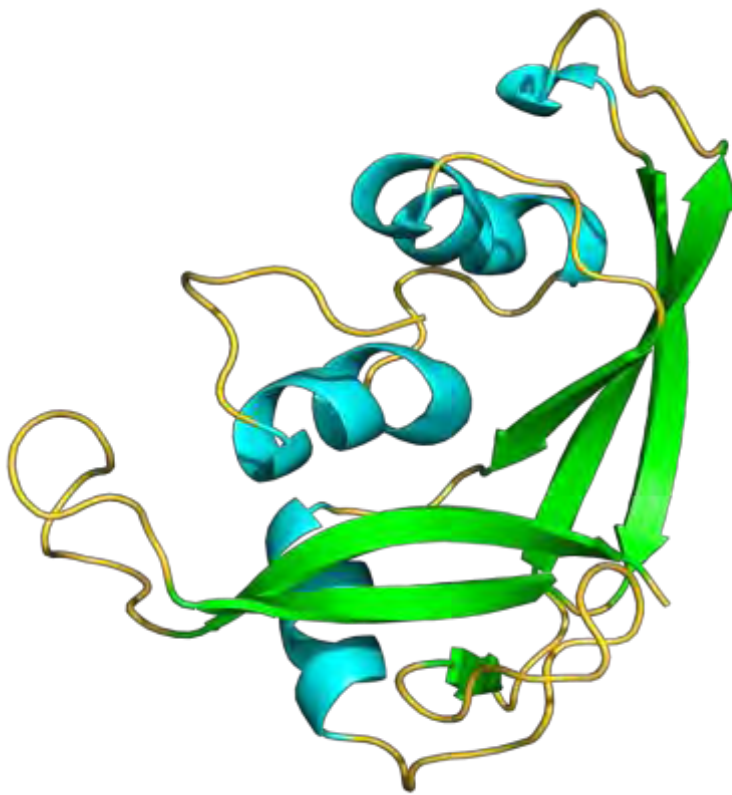


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

**Αξιολόγηση τριτερπενίων ως αναστολείς της ηωσινοφιλικής
νευροτοξίνης**



Ευαγγελοπούλου Μαριάννα

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτρης Δ. Λεωνίδας

Λάρισα,

Ακαδημαϊκό Έτος: 2015-2016

***An evaluation of triterpenes as inhibitors of eosinophil-derived
neurotoxin***

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής επιτροπή:

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, και πρωτίστως τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Λεωνίδα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο δομικής και λειτουργικής βιοχημείας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα, Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου έδειξε όλο το διάστημα που διήρκησε η διπλωματική μου εργασία, καθώς και τον επίσης υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Στραβοδήμο. Τέλος, θα ήταν μεγάλη παράλειψη εκ μέρους μου να μην ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τόσο για την συνεργασία τους, όσο και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Abstract	5
Περίληψη	6
1. Θεωρητικό μέρος	7
1.1 Η Βιολογία και η δράση των ηωσινόφιλων	7
1.2 Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN)	17
1.3 Η δομή της EDN	22
1.4 Το ενεργό κέντρο της EDN – Καταλυτικός μηχανισμός	25
1.5 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος	28
1.6 Η ενζυμική αναστολή	29
1.7 Τριτερπένια	33
1.8 Εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία	39
Σκοπός της εργασίας	45
2. Πειραματικό μέρος	46
2.1 Καλλιέργεια κυττάρων E.coli	46
2.1.1 Γενικές πληροφορίες	46
2.1.2 Μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων E.coli B834 (DE3) με πλασμιδιακό φορέα, με τη μέθοδο του θερμικού σοκ	47
2.1.3 Θρεπτικά υλικά για τις καλλιέργειες	48
2.1.4 Επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας με χρήση αντιβιοτικών	48
2.1.5 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων για παραγωγή EDN	49
2.2 Υπερέκφραση της EDN	50
2.3 Συλλογή των κυττάρων	52
2.4 Λύση των κυττάρων	52
2.5 Πλύση των κυττάρων και ομογενοποίηση	54
2.6 Αποδιάταξη της πρωτεΐνης	54
2.7 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford	55

2.8 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)	56
2.9 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης.....	56
2.10 Διαπίδυση	58
2.11 Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN	62
2.12 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE)	60
2.12.1 Πειραματική διαδικασία	62
2.12.2 Χρώση με Coomassie Blue.....	64
2.13 Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.....	65
2.14 Εισαγωγή Κρυστάλλωσεων.....	65
2.14.1 Διάχυση ατμών	65
2.14.2 Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop)	66
2.15 Κινητική μελέτη της EDN	67
2.15.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης	67
2.15.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης	67
2.15.3 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)	68
2.15.4 Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα.....	70
2.15.5 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό K_m και IC_{50}	71
3. Αποτελέσματα	75
3.1 Χρωματογραφικός καθαρισμός EDN με σήλη ιοντοανταλλαγής	75
3.2 Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων.....	77
3.3 Απόδοση καθαρισμού.....	77
3.4 Κρυστάλλωση.....	78
3.5 Κινητικά Αποτελέσματα	78
Συζήτηση.....	92
Βιβλιογραφία	95

ABSTRACT

Eosinophil-derived neurotoxin (EDN) is one of the four major proteins found in cytoplasmic granules of human eosinophilic leukocytes. It is characterized as a neurotoxin due to its ability to cause the Gordon phenomenon when administered intrathecally in microgram quantities in rabbits. EDN is released under allergic and parasitic conditions, and is involved in asthma and inflammatory disorders. EDN belongs to ribonuclease A (RNase A) superfamily, showing significant structural similarities with RNase A. Since its ribonucleolytic activity is directly related to its pathological actions, research efforts are being made in order to discover inhibitors that could be used for therapeutic applications. In the present work, after heterologous expression, isolation and purification of EDN, we studied the inhibitory potency of thirtyone triterpenes, which are secondary metabolites of plants. Our studies showed that four of them are potent inhibitors of the enzyme, presenting the necessity for crystallographic studies of the triterpenes' binding to EDN in order to reveal the structural basis of their inhibition mechanism.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) είναι μία από τις τέσσερις κύριες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία των ανθρώπινων ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων. Χαρακτηρίζεται ως νευροτοξίνη εξαιτίας της ικανότητας της να προκαλεί το φαινόμενο Gordon, όταν χορηγείται ενδοραχιαίως σε ποσότητες μικρογραμμαρίων σε κουνέλια. Απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια αλλεργικών και παρασιτικών καταστάσεων και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στο άσθμα και σε φλεγμονώδεις παθήσεις. Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ανήκει στην υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A (RNaseA) και παρουσιάζει σημαντικές δομικές ομοιότητες με την RNaseA. Επειδή η ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα σχετίζεται άμεσα με τις παθολογικές της δράσεις, γίνονται προσπάθειες για την εύρεση ισχυρών αναστολέων της ριβονουκλεολυτικής της δράσης, που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων φαρμάκων εναντίων παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται. Στην παρούσα εργασία, μετά την ετερόλογη έκφραση, απομόνωση και καθαρισμό της EDN, μελετήθηκαν τριάντα ένα τριτερπένια, τα οποία είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι τέσσερις από τις ουσίες αυτές παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση στην EDN, γεγονός που υπογραμμίζει την αναγκαιότητα για δομικές μελέτες της σύνδεσης τους με το ένζυμο, προκειμένου να αποκαλυφθεί η δομική βάση του μηχανισμού αναστολής.

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

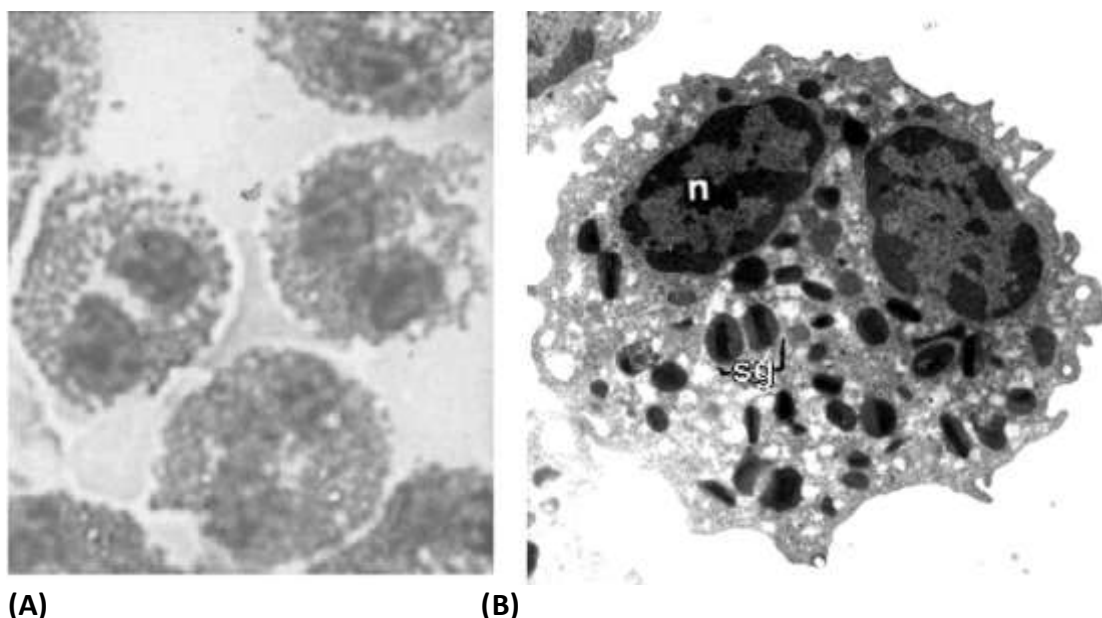
1.1 Η βιολογία και η δράση των ηωσινόφιλων

Τα ηωσινόφιλα ή εωσινόφιλα είναι ένας τύπος λευκών αιμοσφαιρίων και αποτελούν μαζί με τα ουδετερόφιλα και τα βασεόφιλα τα κοκκιοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιτελούν φαγοκυττάρωση, αν και ο φαγοκυτταρικός τους ρόλος είναι πολύ μικρότερης σημασίας από τον αντίστοιχο των ουδετερόφιλων (*Kindt T.J. et al, 2007*). Τα ηωσινόφιλα αποτελούν μικρό ποσοστό (1-5%) των περιφερικών λευκοκυττάρων του αίματος, αλλά ο αριθμός τους είναι μεγαλύτερος στους ιστούς. Παίζουν ρόλο, τόσο στην ανοσοαπόκριση ενάντια σε παράσιτα, όσο και σε φλεγμονώδεις διαδικασίες, μέσω της έκκρισης του περιεχομένου των ηωσινόφιλων κοκκίων τους, το οποίο προκαλεί βλάβες στη δομή της μεμβράνης των παρασίτων (*Todd I. et al, 2008; Kindt T.J. et al, 2007*). Μάλιστα, ο αριθμός τους αυξάνεται, τόσο στο αίμα όσο και στους προσβεβλημένους ιστούς, σε αλλεργικές και παρασιτικές λοιμώξεις. Επιπλέον, εκδηλώνουν χημειοτακτική απόκριση σε αρκετούς παράγοντες, που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης, όπως ο ηωσινοφιλικός χημειοτακτικός παράγοντας της αναφυλαξίας (ECF-A), η αναφυλατοξίνη του συμπληρώματος C5a και κάποιες χημειοκίνες. Οι παράγοντες ECF-A και C5a εκδηλώνουν συνεργατική δράση επιδρώντας στα ηωσινόφιλα (*Todd I. et al, 2008*).

Ο πρώτος που παρατήρησε τα ηωσινόφιλα ήταν ο Wharton Jones το 1846 (*Liao W. et al, 2015*). Το 1879, όμως, ο Paul Ehrlich τους έδωσε το όνομά τους, αφότου κατέγραψε το βαθμό συγγένειας μιας υποομάδας λευκών αιμοσφαιρίων για την όξινη χρωστική εωσίνη (*Blanchard C. et al, 2009*). Πέρα από το γεγονός ότι το κυτταρόπλασμα των ηωσινόφιλων βάφεται από την όξινη χρωστική εωσίνη (μέθοδος Romanowsky), τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη χημική συγγένεια των κοκκίων τους για όξινες χρωστικές ή χρωστικές ανιλίνης (*Todd I. et al, 2008*).

Αν και τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα και τα ουδετερόφιλα ανήκουν στην κατηγορία των κοκκιοκυττάρων, διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη μορφολογία

και τα χαρακτηριστικά των κοκκίων τους (Kindt T.J. et al, 2007). Εικόνες από οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οι οποίες παρουσιάζονται και στην **Εικόνα 1**, αποκαλύπτουν ότι τα ηωσινόφιλα διαθέτουν ένα δίλοβο πυρήνα και μεγάλα κυτταροπλασματικά κοκκία. Τα κοκκία είναι οι θέσεις αποθήκευσης ενός μεγάλου αριθμού διαμεσολαβητών, με σημαντικότερους εκπροσώπους τις τέσσερις κατιονικές κοκκιώδεις πρωτεΐνες: τη μείζον βασική πρωτεΐνη (major basic protein, MBP), την κατιονική πρωτεΐνη των ηωσινόφιλων (eosinophilic cationic protein, ECP), την ηωσινοφιλική υπεροξειδάση (eosinophil peroxidase, EPO) και την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (eosinophil-derived neurotoxin, EDN ή EPX) (Rosenberg H.F. et al, 2001).



Εικόνα 1: Τα ανθρώπινα περιφερικά ηωσινόφιλα λευκοκύτταρα του αίματος. (A) Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση Giemsa. (B) Ηλεκτρονική μικρογραφία, όπου παρουσιάζεται ο χαρακτηριστικός δίλοβος πυρήνας τους (n) και τα ειδικά κυτταροπλασματικά κοκκία (sg), τα οποία περιέχουν τις ηωσινόφιλες εκκριτικές ριβονουκλεάσες EDN και ECP (Rosenberg H.F. et al, 2001).

Τα χαρακτηριστικά κοκκία των ηωσινόφιλων διαθέτουν έναν κρυσταλλοειδή πυρήνα, ο οποίος αποτελείται κυρίως από τη μείζονα βασική πρωτεΐνη, και ένα περιφερειακό στρώμα, το οποίο αποτελείται από την κατιονική πρωτεΐνη των ηωσινόφιλων, την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη και την ηωσινοφιλική υπεροξειδάση. Άλλα μικρότερα κοκκία περιέχουν τα ένζυμα αρυλοσουλφατάση και όξινη φωσφατάση. Η ακριβής θέση άλλων ενζύμων, που απελευθερώνονται από το κύτταρο, όπως είναι η ισταμινάση, η β-γλυκουρονιδάση και η φωσφολιπάση D, δεν

έχει εντοπιστεί. Σε διάφορους ιστούς και σωματικά υγρά, στους οποίους λαμβάνει χώρα η αποκοκκίωση των ηωσινόφιλων, παρατηρούνται οι λεγόμενοι κρύσταλλοι Charcot-Leyden, οι οποίοι σχηματίζονται από μια γαλεκτίνη (*Leonidas et al, 1995; Ackerman et al, 2002*) που εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των ηωσινόφιλων. Τα ηωσινόφιλα, επίσης, μεταβολίζουν το αραχιδονικό οξύ για να παράγουν μεγάλες ποσότητες PAF λευκοτριενίων, όπως το λευκοτριένιο B₄ (LTB₄), το λευκοτριένιο C₄ (LTC₄) και η προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂). Οι κατιονικές πρωτεΐνες και οι μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, που προέρχονται από τα ηωσινόφιλα, συνεισφέρουν, μαζί με τα προϊόντα των σιτευτικών κυττάρων, στις οξείες και χρόνιες φάσεις της αλλεργικής φλεγμονής. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι πιθανοί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, που παράγονται από τα ηωσινόφιλα (η ισταμινάση, η PGE₂, η MBP, η αρυλοσουλφατάση, η υπεροξειδάση και η φωσφολιπάση), οι οποίοι επιδρούν ανασταλτικά στους διαμεσολαβητές των σιτευτικών κυττάρων (*Todd I. et al, 2008*).

Άλλοι διαμεσολαβητές, που βρίσκονται αποθηκευμένοι στα κοκκία των ηωσινόφιλων, αποτελούν: χημειοκίνες (RANTES (CCL5), εοταξίνη-1 (CCL11) και growth-related oncogene-α), οι ιντερλευκίνες IL-2, -3, -4, -5, -6, -10, -12, και -13, η ιντερφερόνη γ (IFN-γγ), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF), ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκύτταρων-μακροφάγων (GM-CSF), ο παράγοντας βλαστοκυττάρων (SCF) και ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας α (TGF-α) (**Εικόνα 2**). Τα κρυσταλλοειδή κοκκία είναι περιοχές εντοπισμού υποδοχέων χημειοκινών, κυτταροκινών, λευκοτριενίων (cysLT₁ και cysLT₂), καθώς και πουρινεργικών υποδοχέων, γεγονός που πιθανώς διευκολύνει την ικανότητα λειτουργίας των κοκκίων ως ανεξάρτητων εκκριτικών οργανιδίων (*Muniz V.S. et al, 2012*). Οι σημαντικότεροι από αυτούς τους υποδοχείς είναι η υπομονάδα α του υποδοχέα της IL-5 (IL-5Rα), ο υποδοχέας 3 των CC χημειοκινών (CCR3), η λεκτίνη-8 με περιοχή ανοσοσφαιρίνης που προσδένει σιαλικό οξύ (SIGLEC-8) στους ανθρώπους και η SIGLEC-F στα ποντίκια, οι κυστεΐνυλ-υποδοχείς, ο υποδοχέας υψηλής συγγένειας για την προσταγλανδίνη τύπου 2 (PGD2), οι υποδοχείς του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και ορισμένες οικογένειες υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων (PRRs) (*Liao W. et al, 2015*). Επιπλέον, αποτελούν πιθανές θέσεις εντοπισμού μορίων RNA και DNA,

γεγονός που καθιστά πιθανή τη διεξαγωγή πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσα στα κοκκία. Περιέχουν εσωτερικές μεμβράνες, οι οποίες ίσως εμπλέκονται στη διαλογή και επιλεκτική έκκριση των ενδοκοκκιωδών πρωτεϊνών. (Muniz V.S. et al, 2012).



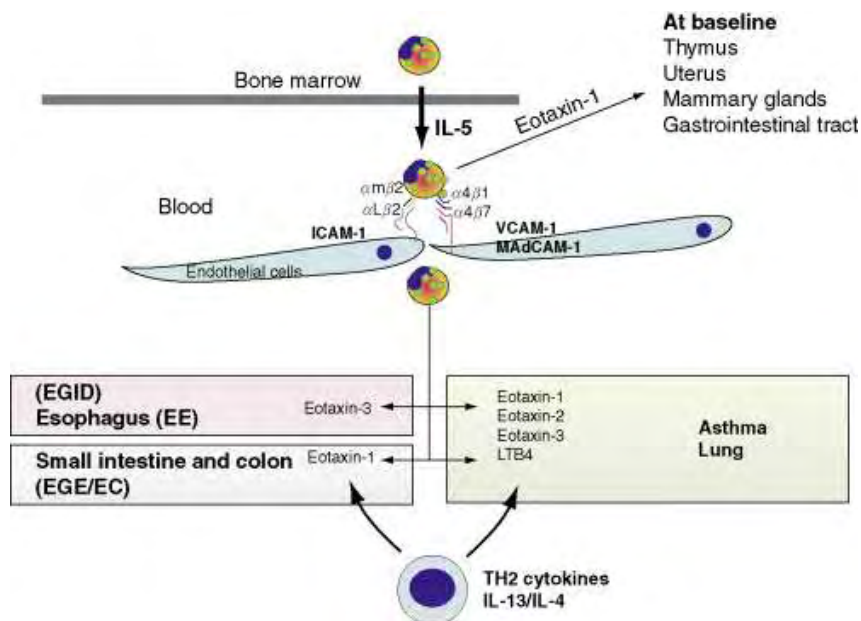
Εικόνα 2: Παράγοντες που εμπεριέχονται ή εκκρίνονται από τα ηωσινόφιλα. (Todd I. et al, 2008).

Τα ηωσινόφιλα παράγονται στο μυελό των οστών από πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να ακολουθήσουν δύο μονοπάτια διαφοροποίησης δίνοντας γένεση είτε σε ένα λεμφοειδές προγονικό κύτταρο, είτε σε ένα μυελοειδές προγονικό κύτταρο. Για την παραγωγή ηωσινόφιλων ακολουθείται το μονοπάτι διαφοροποίησης που καταλήγει σε ένα μυελοειδές προγονικό κύτταρο. Αυτό, με τη σειρά του, διαφοροποιείται, επιτρέποντας την ανάπτυξη ενός προγονικού κυττάρου λευκών αιμοσφαιρίων (βασεόφιλων, ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων, μονοκυττάρων, μαστοκυττάρων, δενδριτικών κυττάρων), της μυελοβλάστης, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή είτε ηωσινόφιλων είτε βασεόφιλων (Blanchard C. et al, 2009; Kindt T.J. et al, 2007). Η επιλογή του κατάλληλου μονοπατιού διαφοροποίησης σε καθένα από τα βήματα που προαναφέρθηκαν, προκειμένου να παραχθούν τελικά τα ώριμα ηωσινόφιλα, εξαρτάται από διαλυτούς διαμεσολαβητές και μεταγραφικούς παράγοντες.

Συγκεκριμένα, απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση σε μυελοειδές κύτταρο είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην αλληλουχία CCAAT του ενισχυτή C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein family). Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει και ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1, ένα μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων που περιέχουν την επικράτεια ETS, καθώς τα υψηλά επίπεδα του PU.1 οδηγούν σε διαφοροποίηση προς μυελοειδή κύτταρα. Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1, που αποτελεί μια πρωτεΐνη-κλειδί κατά την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, είναι και ο πιο σημαντικός σε αυτό το βήμα και δρα συνεργιστικά με τον PU.1. Σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση και ωρίμανση των ηωσινόφιλων παίζουν, επίσης, κυτταροκίνες, όπως η IL-3, ο GM-CSF και η IL-5. Η IL-5 αποτελεί τη σημαντικότερη κυτταροκίνη για την παραγωγή των ηωσινόφιλων, κατευθύνοντας επιλεκτικά τη διαφοροποίηση της μυελοβλάστης προς την ηωσινοφιλική σειρά. Μετά την ωρίμανσή των ηωσινόφιλων, η IL-5 φαίνεται να διεγείρει τη μετανάστευσή τους στην περιφερική κυκλοφορία, όπου παραμένουν για 8-18 ώρες. Εν συνεχεία, ως απόκριση στις εοταξίνες, μεταναστεύουν σε όργανα όπως ο θύμος, η γαστρεντερική οδός, ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, οι αδένες του μαστού και η μήτρα. Τα όργανα αυτά υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι πλούσια σε ηωσινόφιλα, καθώς τα κύτταρα αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες ομοιόστασης (Blanchard C. et al, 2009; Liao W. et al, 2015). Οι ρόλοι των ηωσινόφιλων στα όργανα αυτά ποικίλλουν. Τα ηωσινόφιλα συμβάλλουν στην ωρίμανση της μήτρας, ενώ η παρουσία τους στους μαζικούς αδένες έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του επιθηλίου του μαστού πιθανότατα λόγω της έκκρισης του παράγοντα TGF-β. Επίσης, μπορούν να δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) και να εκφράζουν συν-διεγερτικά μόρια. Συγκεκριμένα, τα ηωσινόφιλα του θύμου αδένος εκφράζουν μόρια της τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και χαμηλά επίπεδα μορίων τάξης I. Επιπλέον, χαμηλά επίπεδα έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων, CD86 και CD153, στην επιφάνεια των ηωσινόφιλων του θύμου αδένος, υποδεικνύουν ότι μπορούν να λειτουργήσουν και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα ηωσινόφιλα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ελεύθερων ριζών εξαιτίας της δράσης της οξειδάσης του NADPH, προωθώντας

πιθανόν την απόπτωση των αναπτυσσόμενων θυμοκυττάρων (*Blanchard C. et al, 2009*).

Οι διαμεσολαβητές, που προαναφέρθηκαν, οι οποίοι βρίσκονται αποθηκευμένοι στα ηωσινοφιλικά κοκκία, μπορεί να εκφραστούν και να εκκριθούν υπό φυσιολογικές συνθήκες από τα ηωσινόφιλα, αλλά και ως απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα. Παρότι οι διαμεσολαβητές αυτοί παράγονται σε μικρές ποσότητες υπό φυσιολογικές συνθήκες, μερικοί από αυτούς επάγονται σε μεγάλο βαθμό υπό φλεγμονώδεις συνθήκες και ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα μέσω δέσμησης των αντίστοιχων υποδοχέων, καθώς και των υποδοχέων των ανοσοσφαιρινών και του συμπληρώματος. Ως απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα, η πορεία των ηωσινόφιλων ξεκινά από την παραγωγή τους στο μυελό των οστών και ακολουθείται από τη μετανάστευσή τους στο αίμα, όπου τα ηωσινόφιλα εκφράζουν μόρια προσκόλλησης (ιντεγκρίνες) (VCAM-1, MadCAM-1, ICAM-1), που επιτρέπουν την προσάρτησή τους στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τελικά, καταλήγουν, με τη βοήθεια διαφόρων εσταξινών, στους περιφερικούς ιστούς, όπου η επιβίωσή τους είναι παρατεταμένη (*Rosenberg H.F. et al, 2013*) **(Εικόνα 3)**. Εκεί τα ενεργοποιημένα ηωσινόφιλα είναι ικανά να εκκρίνουν μεγάλη ποικιλία προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 και TGF- α/β), χημειοκινών (RANTES και εσταξίνη-1) και λιπιδιακών διαμεσολαβητών (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και λευκοτριένιο C4). Επίσης, συνθέτουν και εκκρίνουν τον GM-CSF, ο οποίος μαζί με την IL-5 λειτουργεί ως παράγοντας αυτοκρινούς επιβίωσης και στρατολόγησης για τα ενεργοποιημένα ηωσινόφιλα (*Blanchard C. et al, 2009*).



Εικόνα 3: Η μετακίνηση των ηωσινοφίλων υπό φυσιολογικές και υπό φλεγμονώδεις συνθήκες (Blanchard C. et al, 2009).

Τα ηωσινόφιλα κοκκία περιέχουν εκκριτικούς μηχανισμούς που τα καθιστούν ικανά να κινητοποιούνται επιλεκτικά, να εκκρίνουν ειδικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο ενδοκυττάρια και να λειτουργούν ως εκκριτικά οργανίδια εξωκυττάρια μετά από λύση των ηωσινοφίλων (Muniz V.S. et al, 2012).

Η κύρια δραστηριότητα λύσης των ηωσινοφίλων οφείλεται στις κατιονικές πρωτεΐνες των κοκκίων, τα οποία εξωκυτταρώνονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της αποκοκκίωσης (Todd I. et al, 2008). Κατά τη διαδικασία αυτή, οι κατιονικές πρωτεΐνες απελευθερώνονται με εξωκύτωση ή κυτταρόλυση (Rosenberg H.F. et al, 2013). Τα ηωσινόφιλα αποκοκκιώνονται γρήγορα παρουσία χημειοτακτικών παραγόντων, αλλά και όταν οι συνδεδεμένες με τη μεμβράνη ανοσοσφαιρίνες IgG ή IgE δημιουργούν σύμπλοκα με αντιγόνα (Todd I. et al, 2008). Ωστόσο, η διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει ιστικές βλάβες, καθώς οι πρωτεΐνες MBP, ECP και EPO είναι τοξικές για διάφορους ιστούς μεταξύ των οποίων η καρδιά, ο εγκέφαλος και το επιθήλιο των βρόγχων (Blanchard C. et al, 2009).

Οι ποικίλοι και ιδιαίτερα σημαντικοί ρόλοι των ηωσινοφίλων απεικονίζονται στην **Εικόνα 4**. Τα ηωσινόφιλα διαθέτουν ανοσορρυθμιστικές λειτουργίες, καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση της φλεγμονής, διατηρούν τη λειτουργία τους ως επιθηλιακά φράγματα, επηρεάζουν την αναδιαμόρφωση ιστού και συνδέουν την εγγενή με την επίκτητη ανοσία. Πολλές από αυτές τις λειτουργίες προέρχονται από

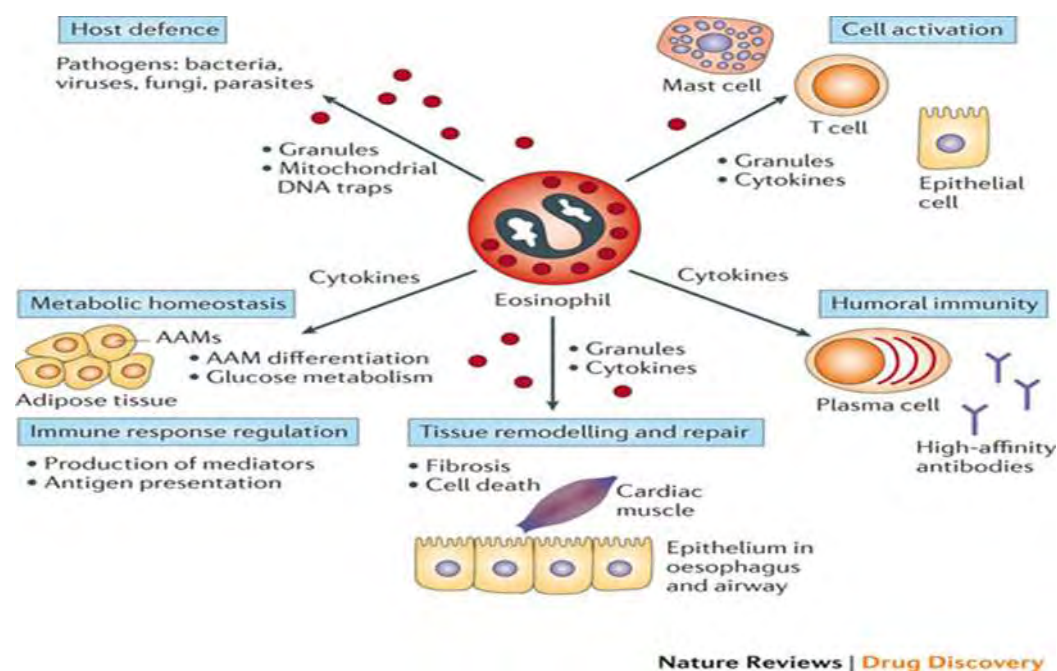
την ικανότητα τους να αποθηκεύουν προσχηματισμένες Th1, Th2 και ρυθμιστικές κυτταροκίνες, χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και άλλα ανοσορρυθμιστικά μόρια, διαθέσιμα για άμεση απελευθέρωση. Το γεγονός ότι αυτοί οι διαμεσολαβητές υπάρχουν ως προσχηματισμένα μόρια και εκκρίνονται ταχέως υπογραμμίζει τον αναγκαίο ρόλο των ηωσινόφιλων στην άμεση εγγενή ανοσοαπόκριση και στη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος σε σημεία διείσδυσης παθογόνων ή τραυματισμού (*Muniz V.S. et al, 2012*). Επιπλέον, τα ηωσινόφιλα μαζί με άλλα μη ειδικά, αλλά και αντιγονοειδικά κύτταρα, συνεισφέρουν στο μηχανισμό της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας. Στο πλαίσιο αυτού του μηχανισμού, τα ηωσινόφιλα μπορούν να χρησιμοποιούν τα αντισώματα ως υποδοχείς για την αναγνώριση και την στόχευση των κυττάρων που πρόκειται να θανατωθούν (*Kindt T.J. et al, 2007*). Μπορούν, επίσης, να παρουσιάσουν αποτελεσματικά διαλυτά αντιγόνα σε CD4⁺ T-κύτταρα, προωθώντας έτσι τον πολλαπλασιασμό και την πόλωση των T-κυττάρων. Προκειμένου να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων είναι ικανά να επεξεργαστούν και να παρουσιάσουν μια ποικιλία μικροβιακών, ιϊκών και παρασιτικών αντιγόνων, καθώς επίσης και σουπεραντιγόνων και αλλεργιογόνων. Ακόμη, εκκρίνουν μια ομάδα κυτταροκινών (IL-2, IL-2, IL-6, IL-12, IL-10), ικανών να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, την ενεργοποίηση των Th1 ή την πόλωση των Th2 κυττάρων. Τα ηωσινόφιλα μπορούν να προωθήσουν μόνο τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων-τελεστών, αλλά όχι των παρθένων T-κυττάρων. Ως επίσης, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τις λειτουργίες των σιτευτικών κυττάρων, μέσω της απελευθέρωσης των κοκκιωδών πρωτεϊνών και κυτταροκινών (*Blanchard C. et al, 2009*). Ένας άλλος ρόλος των ηωσινόφιλων αφορά την επιβίωση των B-κυττάρων του πλάσματος στο μυελό των οστών. Επιπλέον, η παρουσία τους έχει αναγνωριστεί και ως δείκτης για την οξεία αντίδραση μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή, που εμφανίζεται κατά την απόρριψη μοσχεύματος. Ο μηχανισμός, όμως, δεν είναι ακόμη γνωστός. Τέλος, είναι πιθανό να συνεισφέρουν σε προκαρκινικές ή/και σε αντικαρκινικές δράσεις (*Liao W. et al, 2015*).

Τα ηωσινόφιλα, όπως προαναφέρθηκε, είναι πολυλειτουργικά λευκοκύτταρα που εμπλέκονται στην παθογένεση πολυάριθμων φλεγμονωδών διεργασιών. Ανάμεσα σε αυτές συγκαταλέγονται οι λοιμώξεις από έλμινθες, από ιούς, από

μύκητες και από βακτήρια. Συγκεκριμένα, τα ηωσινόφιλα διαμεσολαβούν στην εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα εναντίον ελμίνθων με έναν ανοσορρυθμιστικό τρόπο. Όσον αφορά τις λοιμώξεις από ιούς, οι ηωσινοφιλικές κοκκιώδεις πρωτεΐνες με δράση ριβονουκλεάσης (όπως οι ανθρώπινες ECP και EDN και τουλάχιστον 11 ορθόλογα ηωσινοφιλοσυσχετιζόμενων ριβονουκλεασών στα ποντίκια) έχει αποδειχθεί ότι αποικοδομούν το μονόκλωνο RNA των RNA ιών. Δηλαδή, φαίνεται ότι τα ηωσινόφιλα έχουν έναν προστατευτικό ρόλο εναντίον ιών όπως ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV) και ο ιός της πνευμονίας των ποντικών (PVM). Μάλιστα, είναι πιθανό να αποτελούν και ένα σημαντικό "όπλο" εναντίον του ιού HIV-1. Επιπλέον, τα ηωσινόφιλα απελευθερώνουν τις κυτταροτοξικές κοκκιώδεις πρωτεΐνες τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον και πάνω στην επιφάνεια των μυκήτων και έτσι τους σκοτώνουν εξ επαφής. Το μιτοχονδριακό DNA και οι κοκκιώδεις πρωτεΐνες, που απελευθερώνονται από τα ηωσινόφιλα, σχηματίζουν εξωκυττάρια δομές που προσδένουν και σκοτώνουν βακτήρια, σε συνθήκες φλεγμονής (*Blanchard C. et al, 2009*).

Το άσθμα είναι ένα σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή των αεραγωγών, διατάραξη του επιθηλιακού τοιχώματος των αεραγωγών, αυξημένη παραγωγή βλέννης, αυξημένα επίπεδα IgE και υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών (*Liu Z. et al, 2015*). Τα ηωσινόφιλα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ασθένειας αυτής. Κοκκιώδεις πρωτεΐνες, όπως η MBP, έχουν βρεθεί στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με άσθμα σε συγκεντρώσεις που επαρκούν για να επάγουν, *in vitro*, κυτταροτοξικότητα σε ποικίλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος. Η MBP εμπλέκεται έμμεσα στην υπεραντιδραστικότητα του αεραγωγού εξαιτίας της ικανότητας της να αυξάνει άμεσα την αντιδραστικότητα του λείου μυός. Επιπρόσθετα, η MBP μπορεί να πυροδοτήσει την αποκοκκίωση των σιτευτικών κυττάρων και των βασεόφιλων, γεγονός που πιθανόν εμπλέκεται στην παθογένεση του άσθματος. Τα ηωσινόφιλα, επίσης, παράγουν μεγάλες ποσότητες κυστεΐνυλ-λευκοτριενίων, οι οποίες πιθανόν οδηγούν στην αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων, στην έκκριση βλέννης και στη συστολή του λείου μυός (*Blanchard C. et al, 2009*).

Τέλος, το υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο (HES) είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια ευρεία ποικιλία ηωσινοφιλικών διαταραχών χωρίς γνωστή αιτιολογία. Το κυριότερο χαρακτηριστικό αυτού του συνδρόμου είναι η επίμονη, αξιοσημείωτη εμφάνιση ηωσινοφιλίας συνδυαζόμενη με την ανεξήγητη δυσλειτουργία οργάνων/οργανισμού, η οποία σχετίζεται είτε με τη διήθηση των ηωσινόφιλων, είτε δευτερευόντως με την ηωσινοφιλικά-συσχετιζόμενη καταστροφή των ιστών. Το υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο παρουσιάζει κλινική ετερογένεια και μεγάλη ποικιλότητα στην διάγνωση. Η διάγνωση του συνδρόμου είναι δύσκολη, καθώς η υπερηωσινοφιλία είναι ένα συνηθισμένο εύρημα που συχνά αποτελεί και δευτερογενή παράγοντα σε διάφορες διαταραχές, όπως σε παρασιτικές ασθένειες, στην αλλεργία, σε αντιδράσεις σε φάρμακα και σε κακοήθεις ασθένειες ή αγγειίτιδες (Wilkins H. J. et al, 2005).



Εικόνα 4: Πολλαπλός ρόλος των ηωσινόφιλων. Τα ηωσινόφιλα παίζουν ρόλο στην άμυνα του ξενιστή, στην ενεργοποίηση των σιτευτικών κυττάρων, των Τ-κυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων, στην προαγωγή της επιβίωσης των μακρόβιων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και στη μεταβολική ομοιόσταση μέσω της διατήρησης των εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων (AAMs) στο λιπώδη ιστό. Επιπλέον, εμπλέκονται στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων, καθώς και την επούλωση των ιστών (Fulkerson P.C. et al, 2013).

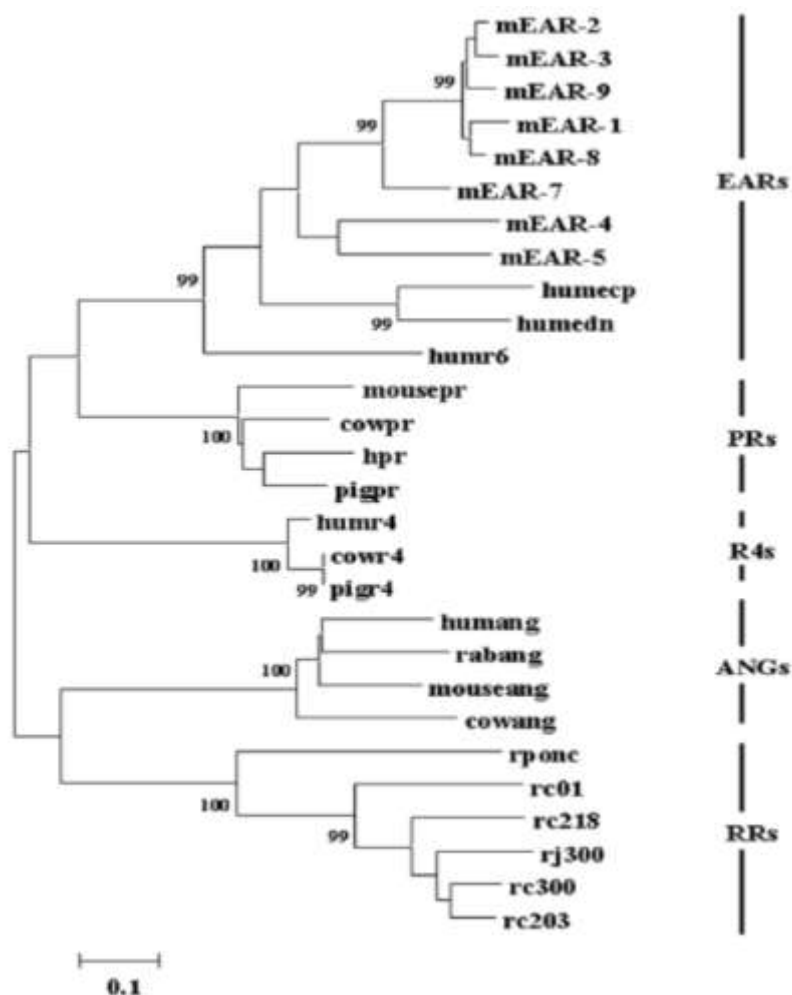
1.2 Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN)

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN), επίσης γνωστή και ως ηωσινοφιλική πρωτεΐνη-Χ, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 18,4 kDa και είναι, όπως προαναφέρθηκε, μία από τις τέσσερις κατιονικές πρωτεΐνες, που συναντώνται στα μεγάλα κυτταροπλασματικά κοκκία των ανθρώπινων ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων (*Muniz V.S. et al, 2012; Rosenberg H.F., 2008, b*). Ωστόσο, είναι επίσης παρούσα στα βασεόφιλα και στα κοκκία των ουδετερόφιλων, ενώ έχει βρεθεί ότι συνδέεται στις μεμβράνες των ηωσινόφιλων και των ουδετερόφιλων μέσω μιας άγκυρας γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (GPI) (*Debierre-Grockiego F. et al, 2003*). Αποτελεί μια πρωτεΐνη που παρουσιάζει αντιϊκή δράση, αλλά και νευροτοξικότητα (*Blanchard C. et al, 2009*).

Το πρόδρομο μόριο της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης είναι μία πρωτεΐνη 161 αμινοξέων, ενώ η ώριμη πρωτεΐνη αποτελείται από 134 αμινοξέα και προκύπτει μετά την αποκοπή των 27 καταλοίπων της αμινοτελικής, υδρόφοβης αλληλουχίας-οδηγού από το πρόδρομο μόριο της πρωτεΐνης. (*Muniz V.S. et al, 2012, Rosenberg H.F. et al, 1989*) Το γονίδιο της EDN αποτελείται από δύο εξόνια, ανάμεσα στα οποία βρίσκεται ένα μόνο ιντρόνιο. Η κωδική αλληλουχία, όμως, βρίσκεται αποκλειστικά στο δεύτερο εξόνιο, όπου εντοπίζονται και οι 3' αμετάφραστες περιοχές. Το γονίδιο για την ανθρώπινη EDN εντοπίζεται στο βραχίονα q του χρωμοσώματος 14, και συγκεκριμένα στο γενετικό τόπο 14q24q31 (*Hamann K. J. et al, 1990*).

Το 1986, ο Gleich και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η αμινοτελική αλληλουχία της EDN παρουσιάζει ομοιότητα όχι μόνο με αυτή της ECP, αλλά και με την αμινοτελική αλληλουχία της ανθρώπινης παγκρεατικής ριβονουκλεάσης (RNase A). Ακολούθως, ο Slifman και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η EDN είναι μια ενζυμικά ενεργή ριβονουκλεάση, ικανή να δημιουργεί όξινα διαλυτά ριβονουκλεοτίδια από όξινο αδιάλυτο πολυμερές υπόστρωμα με αποδοτικότητα που είναι συγκρίσιμη με αυτή της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης. Η μοριακή κλωνοποίηση της EDN επιβεβαίωσε την κατά 89% ομολογία της αλληλουχίας του cDNA της με αυτή της ECP και έτσι οι δύο αυτές πρωτεΐνες εντάχθηκαν στην υπεροικογένεια της RNase A. Γι' αυτό το λόγο, η EDN είναι γνωστή και ως RNase 2. Τα βασικά μέλη αυτής της υπεροικογένειας, που φαίνονται και στην **Εικόνα 5**, είναι

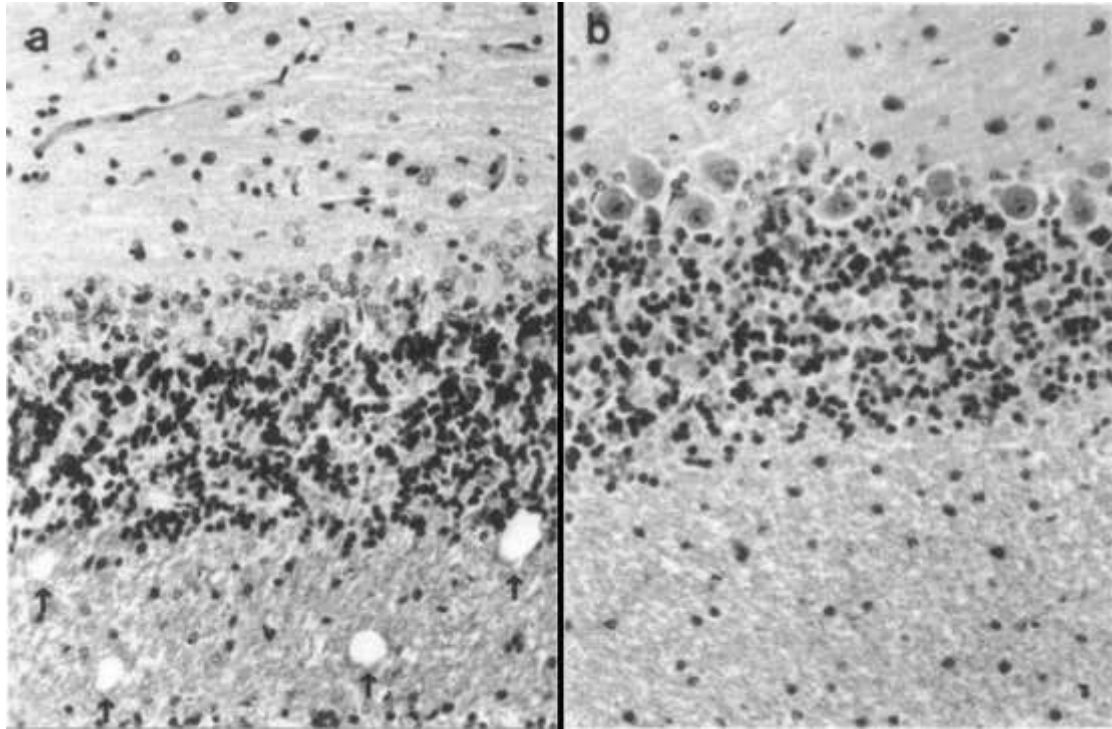
η αγγειογενίνη (RNase 5), η κατιονική πρωτεΐνη των ηωσινόφιλων (RNase 3) και η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (RNase 2). Οι πρωτεΐνες της υπεροικογένειας αυτής έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν μόρια RNA. Καθεμία από αυτές δείχνει ορισμένη προτίμηση σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια των υποστρωμάτων RNA, χωρίς να υπάρχει συγκεκριμένη θέση κοπής. Τα κοινά χαρακτηριστικά των μελών της υπεροικογένειας είναι ότι οι κωδικές αλληλουχίες τους ξεκινούν με μια σηματοδοτική αλληλουχία, ενώ οι ώριμες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν: 6-8 κυστεΐνες που σχηματίζουν διακριτούς δισουλφιδικούς δεσμούς, δύο καταλυτικές ιστιδίνες και μία λυσίνη(K) που εντοπίζεται στην αλληλουχία-μοτίβο (CKXXNTF) (Rosenberg H.F., 2008, a).



Εικόνα 5: Η υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης Α. Φυλογενετική ανάλυση, όπου παρουσιάζονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ επιλεγμένων μελών της υπεροικογένειας της RNase A, συμπεριλαμβανομένων των ριβονουκλεασών που σχετίζονται με τα ηωσινόφιλα (EARs), μεταξύ των οποίων και οι ανθρώπινες EDN και ECP, των ριβονουκλεασών παγκρεατικού τύπου (PRs), των ριβονουκλεασών 4s (R4s), των αγγειογενινών (ANGs) και των ριβονουκλεασών του βαθύφωνου βατράχου Rana (RRs) (Rosenberg H.F. et al, 2001).

Συγκριτικά με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των κοκκίων των ηωσινόφιλων, η EDN είναι η λιγότερο κατιονική πρωτεΐνη, καθώς το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι ~9, ενώ τα ισοηλεκτρικά σημεία των ECP, MBP και EPO είναι ~11. Επίσης, σε δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας σε ιστοκαλλιέργειες και σε δοκιμασίες τοξικότητας εναντίον των ελμίνθων *in vitro*, η EDN εμφανίζει σχετικά μικρή δραστηριότητα συγκριτικά με τις άλλες κοκκιώδεις πρωτεΐνες (Rosenberg H.F., 2008, b). Η EDN και η ECP εμφανίζουν 67% ομολογία μεταξύ των πρωτεϊνικών αλληλουχιών τους, αλλά η EDN είναι 100 φορές πιο δραστική ριβονουκλεάση (Blanchard C. et al, 2009.)

Στη δεκαετία του 1930, ο M.H. Gordon περιέγραψε, στο πλαίσιο της έρευνάς του για τη μολυσματική αιτία της ασθένειας του Hodgkin, ένα νευροτοξικό σύνδρομο, που παρατηρείται μετά από ενδοεγκεφαλική έγχυση ανθρώπινου λεμφαδενικού εναιωρήματος σε κουνέλια, και το οποίο ονομάστηκε φαινόμενο Gordon. Τελικά, αποδείχθηκε ότι η πηγή της νευροτοξικότητας ήταν τα διηθημένα ηωσινόφιλα. Ο Durack και οι συνεργάτες του, και οι Peterson και Venge, κατάφεραν να απομονώσουν ένα από τα δύο νευροτοξικά στοιχεία, τα οποία αναπαρήγαγαν το φαινόμενο Gordon, μετά από έγχυση μικρογραμμάτων (μg) του στοιχείου αυτού ενδοραχιαίως σε κουνέλια ή σε ινδικά χοιρίδια. Ήταν μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~18 kDa, την οποία ο Durack και οι συνεργάτες του ονόμασαν ηωσινοφιλική νευροτοξίνη, ενώ οι Peterson και Venge ηωσινοφιλική πρωτεΐνη X, αν και όπως αποδείχθηκε αργότερα επρόκειτο για την ίδια πρωτεΐνη. Σε πειραματόζωα που εμφάνιζαν το φαινόμενο Gordon παρατηρήθηκε αταξία και παράλυση με ιστολογικές αλλοιώσεις (**Εικόνα 6**), συμπεριλαμβανομένης της απώλειας των κυττάρων Purkinje και της σπογγώδους εκφύλισης της παρεγκεφαλίδας. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο η EDN προκαλεί νευροτοξικότητα παραμένει άγνωστος (Rosenberg H.F., 2008, b).



Εικόνα 6: Ιστοπαθολογικές ανωμαλίες στην παρεγκεφαλίδα κουνελιού ως απόκριση στην EDN. Δεξιά, ο ιστός της παρεγκεφαλίδας εμφανίζεται φυσιολογικός, με προεξέχοντα τα κύτταρα Purkinje και ανέπαφη τη λευκή ουσία. Αριστερά, τα κύτταρα του Purkinje έχουν εξαφανιστεί και παρατηρείται σχηματισμός κενотоπιών στη λευκή ουσία, ως απόκριση στην EDN σε ποσότητα 50 µg (Rosenberg H.F., 2008, b).

Η EDN από μόνη της παρουσιάζει ελάχιστη έως καθόλου κυτταροτοξικότητα εναντίον των σωματικών κυττάρων. Ωστόσο, όταν συνδέεται με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (sFv) εναντίον του υποδοχέα της τρανσφερίνης, ενδοκυτταρώνεται ως μία ενζυμικά ενεργή κυτταροτοξίνη. Μάλιστα, ανακαλύφθηκε ότι το σύμπλοκο EDNsFv παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα έναντι λευχαιμικών κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα της τρανσφερίνης (Newton D.L. et al, 1994). Επιπλέον, η χημική πρωτεΐνη, που προέρχεται από την σύντηξη της EDN με την ογκογονάση, εμφανίζει ενισχυμένη ενζυμική δραστηριότητα και επαυξημένη κυτταροτοξικότητα συγκριτικά με την EDN, εύρημα που θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη βελτιωμένων αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Newton D.L. et al, 1997).

Μια άλλη δράση της EDN είναι η επαγωγή της χημειοταξίας των πρόδρομων δενριτικών κυττάρων με έναν δόσο-εξαρτώμενο και διαμεσολαβούμενο από πρωτεΐνες G τρόπο, χωρίς, όμως, να είναι γνωστό αν αυτό εξαρτάται από τη ριβονουκλεολυτική της δράση. Επιπλέον, έχει τη δυνατότητα, όπως και άλλοι χημειοτακτικοί παράγοντες, να επάγει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης

που ενεργοποιείται από μιτογόνο (MAPK) p44/42. Τέλος, προωθεί την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων (Yang D. et al, 2003).

Η EDN μπορεί να λειτουργήσει ως ενδογενής προσδέτης για τον υποδοχέα τύπου Toll 2 (toll-like receptor 2, TLR2), ο οποίος είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της φυσικής και της ειδικής ανοσίας στους σπονδυλωτούς οργανισμούς. Μία σηματοδοτική πορεία που επάγεται από τον TLR2 εξαρτάται από την πρωτεΐνη 88 των διαφοροποιημένων μυελικών κυττάρων (myeloid differentiation primary response gene 88) και οδηγεί στην ενεργοποίηση των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων. Επίσης, η EDN ενισχύει τις αντιγονοειδικές ανοσοαποκρίσεις, που βασίζονται στα T βοηθητικά κύτταρα (2) (T helper, T_h2), όπως φαίνεται από την παραγωγή των ιντερλευκινών IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 και από τα υψηλότερα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης IgG1 έναντι αυτών της IgG2a. Αυτό σημαίνει ότι η EDN έχει την ικανότητα να προάγει τις αντιγονοειδικές T_h2-ανοσοαποκρίσεις του συστήματος της επίκτητης ανοσίας. Γι' αυτό, λοιπόν, χαρακτηρίζεται και ως alarmin, δηλαδή ως πρώιμο προειδοποιητικό σήμα ενεργοποίησης τόσο της εγγενούς, όσο και της επίκτητης ανοσίας (Rosenberg H .F. et al, 2001; Yang D. et al, 2003).

Οι ιοί του αναπνευστικού (RSV, rhinovirus, adenovirus) είναι μεταξύ των σημαντικότερων παραγόντων που επιδεινώνουν το άσθμα, μια ασθένεια στην παθογένεση της οποίας εμπλέκονται τα ηωσινόφιλα (Rosenberg H.F., 2008, b). Τα ηωσινόφιλα, και συγκεκριμένα η ανασυνδυσασμένη EDN (rhEDN) μπορεί να μειώσει τη μολυσματικότητα του ιού RSV-B στα επιθηλιακά κύτταρα-στόχους του, με έναν τρόπο που εξαρτάται άμεσα από τη ριβονουκλεολυτική δράση της EDN. Έτσι, φαίνεται πως η EDN θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη ή τη θεραπεία της ασθένειας που προκαλείται από τον RSV (Domachowske J.B. et al, 1998). Γενικά, η απελευθέρωση των κοκκιωδών πρωτεϊνών από τα ηωσινόφιλα εμπλέκεται σε πολλές εκφάνσεις του άσθματος, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της υπεραντιδραστικότητας των βρόγχων και της φραγής του αεραγωγού (Sedgwick J.B. et al, 2004). Μάλιστα, η EDN του ορού θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο βιοδείκτη για τη διάγνωση, τη θεραπεία και τον έλεγχο του άσθματος και άλλων αλλεργικών παθήσεων, καθώς τα επίπεδά της είναι αυξημένα σε άτομα που εμφανίζουν την ασθένεια (Kim C.K., 2013). Επιπλέον, τα ηωσινόφιλα

της κυκλοφορίας του αίματος ατόμων με άσθμα παρουσιάζουν αυξημένη φλεγμονώδη δράση, εξαιτίας των υψηλότερων ενδοκοκκιωδών συγκεντρώσεων της EDN (*Sedgwick J.B. et al, 2004*). Μεταξύ των ασθματικών ατόμων εμφανίζεται η αναπνευστική νόσος που επιδεινώνεται από την ασπιρίνη (aspirin-exacerbated respiratory disease, AERD), η διάγνωση της οποίας είναι δύσκολη κυρίως λόγω της ανεπαρκούς σύνδεσης μεταξύ λήψης ασπιρίνης και επιδείνωσης του άσθματος. Σε σχετική μελέτη, παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του γονιδίου που κωδικοποιεί για την EDN στο πλάσμα ατόμων που εμφάνιζαν τη νόσο σε σχέση με ασθματικούς που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην ασπιρίνη (aspirin-tolerant asthma, ATA). Άρα, η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη αποτελεί έναν καινοτόμο βιοδείκτη για τη διάκριση της AERD από το ATA (*Shin S.W. et al, 2013*).

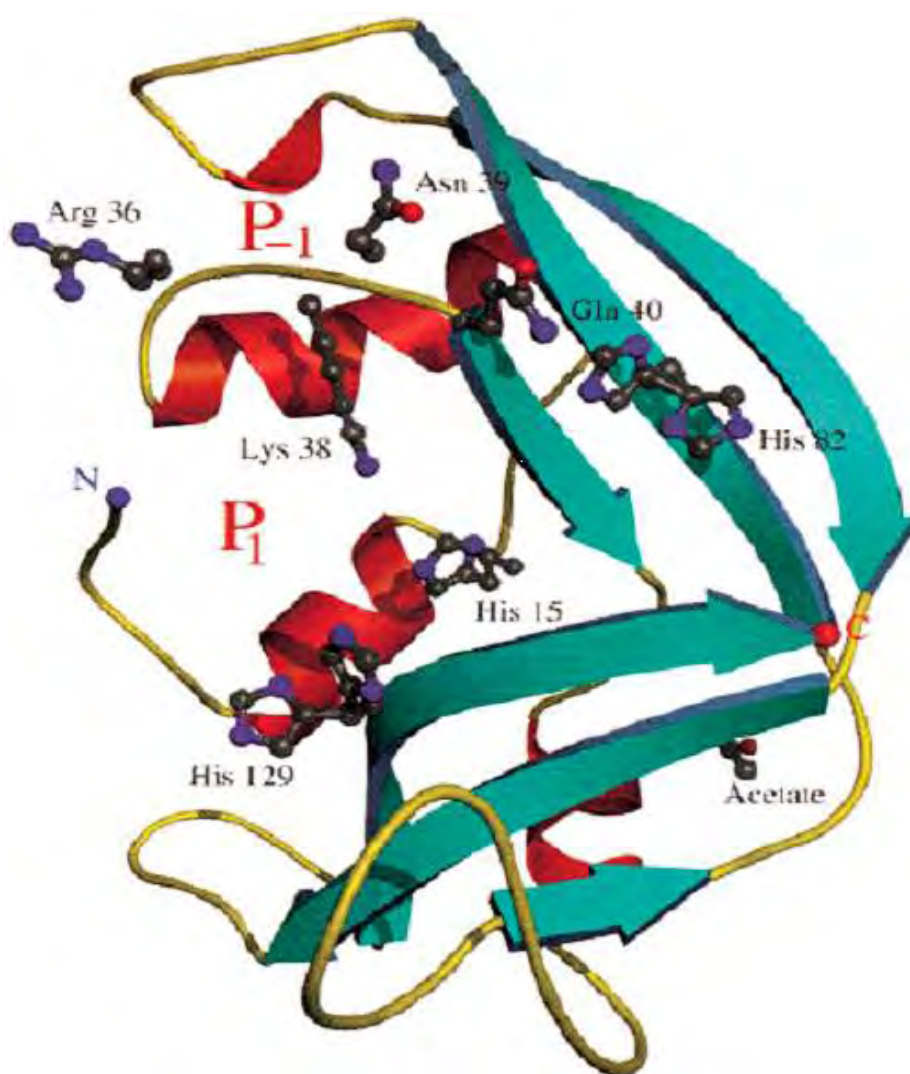
Η συγκέντρωση της EDN στα ούρα ασθενών με ατοπική δερματίτιδα είναι ένας χρήσιμος κλινικός δείκτης για την παρακολούθηση της ασθένειας, η οποία είναι μία φλεγμονώδης ασθένεια με αυξημένα τα επίπεδα της IgE του ορού και κύριους διαμεσολαβητές τα T_H2 κύτταρα και τα ηωσινόφιλα. Μετά από μέτρηση των συγκεντρώσεων της EDN στα ούρα ασθενών μέσω ELISA και υπολογισμό του αριθμού των ηωσινόφιλων στην περιφερική κυκλοφορία βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της EDN στα ούρα ασθενών συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της ασθένειας, χωρίς όμως να συσχετίζονται με τον αριθμό των ηωσινόφιλων στην κυκλοφορία του αίματος (*Goto G. et al, 2007; Kindt T.J. et al, 2007*).

Τέλος, η EDN φαίνεται πως εμφανίζει αντιϊκή δράση εναντίον του ιού του HIV (*Yang D. et al, 2008*).

1.3 Η δομή της EDN

Με απώτερο σκοπό την επέκταση των έως τότε γνώσεων για τη δομή και τη λειτουργία των κυτταροτοξικών RNAσών των σπονδυλωτών προσδιορίστηκε, για πρώτη φορά το 1996, η κρυσταλλική δομή της ανασυνδυασμένης ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης, σε ευκρίνεια 1,83 Å, με τη βοήθεια των ακτίνων X (*Mosimann S.C. et al, 1996*). Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι τόσο η αναδίπλωση της EDN όσο και η αρχιτεκτονική του ενεργού της κέντρου, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με την RNase A, με το ενεργό κέντρο να είναι συντηρημένο μεταξύ όλων των μελών της

υπεροικογένειας της RNase A. Παρόλα αυτά, η EDN εμφανίζει σημαντικές διαφορές στις περιφερειακές θέσεις σύνδεσης του υποστρώματος (Leonidas D.D. et al, 2001). Η δομή της EDN έχει προσδιοριστεί και σε ακόμα μεγαλύτερη ευκρίνεια (0,98 Å) (Swaminathan G.J. et al, 2002), καθώς επίσης, έχει προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή μιας μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης μορφής της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης με τέσσερα επιπλέον κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο της, σε ευκρίνεια 1 Å. Δομική ανάλυση της τροποποιημένης δομής, έδειξε ότι η αλλαγή αυτή δεν επηρεάζει τη διαμόρφωση της EDN (Chang C. et al, 2002).



Εικόνα 7: Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής (0.98 Å) της ανθρώπινης ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης. Απεικονίζονται οι σχετικές θέσεις των καταλοίπων του καταλυτικού της κέντρου His15, His129 και Lys38 (Rosenberg H.F., 2015).

Πρόκειται λοιπόν για μια μικρή, κατιονική και γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 18,4 kDa, που συγκροτείται από τέσσερις α-έλικες, έξι β-ελάσματα και εννέα βρόχους (**Εικόνα 7**). Στον **Πίνακα 1** δίνονται τα αμινοξέα τα οποία συμμετέχουν στις διαμορφώσεις αυτές. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, είναι οι τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί που περιέχει, οι οποίοι συμβάλλουν στη μεγάλη δομική σταθερότητα του μορίου. Οι δεσμοί αυτοί αναπτύσσονται μεταξύ των κυστεϊνών στις θέσεις 23-83, 37-96, 55-111 και 62-71. Ο πρώτος δεσμός (23-83) συνδέει την έλικα α4 με το έλασμα β4, ο δεύτερος δεσμός (37-96) συνδέει την έλικα α4 με το βρόγχο L3, ο τρίτος δεσμός (55-111) συνδέει την έλικα α3 με το έλασμα β5 και ο τέταρτος δισουλφιδικός δεσμός(62-71) συνδέει τα ελάσματα β2 και β3 μεταξύ τους. Μάλιστα, αντικατάσταση οποιασδήποτε κυστεΐνης με αλανίνη ή σερίνη μειώνει τη σταθερότητα του ενζύμου, ενώ οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί στις θέσεις (23-83) και (55-111), συνεισφέρουν περισσότερο στη σταθερότητα του ενζύμου απ' ό,τι οι άλλοι δύο δεσμοί (*Durack et al., 1981; Mosimann S.C. et al, 1996; Rosenberg H.F. et al, 2001*).

Πίνακας 1: Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη δευτεροταγή δομή της EDN. (*Mosimann S.C. et al, 1996*)

α-έλικες	β-ελάσματα	Βρόχοι
a1 Thr6-Ile16	b1 Asn39-Leu45	L1 Lys1-Phe5
a2 Gln22-Arg35	b2 Asn70-Ser74	L2 Asn17-Gln21
a3 Thr47-Cys55	b3 Val78-Thr87	L3 Arg36-Lys38
a4 Asn92-Cys96	b4 Arg97-Asn104	L4 Gly56-Lys69a,b
	b5 Met105-Arg114	L5 Gly75-Gln77
	b6 Pro124-Ile134	L6 Pro88-Cys96a,b
		L7 Asp115-Tyr123b,c
		L8 Ser89-Gln91
		L9 Asp115-Tyr123

Οι βρόχοι L2, L3 και L6 ίσως παίζουν έναν ιδιαίτερο ρόλο αναφορικά με τη λειτουργία της EDN, καθώς οι διαμορφώσεις τους διαφέρουν σημαντικά από τις αντίστοιχες άλλων RNAσών των σπονδυλωτών. Επιπλέον, στη δομή της EDN παρατηρείται μια μεγάλη εσοχή που σχηματίζεται από τα αμινοξέα Asp115-Tyr123, η οποία απαντάται και στην ECP, γεγονός που θα μπορούσε να συσχετίζεται με τις μοναδικές ιδιότητες τους, δηλαδή με τον ρόλο που διαδραματίζουν στην άμυνα του ξενιστή και την κυτταροτοξικότητα τους εναντίον παρασίτων (*Mosimann S.C. et al, 1996*).

1.4 Το ενεργό κέντρο της EDN – Καταλυτικός μηχανισμός

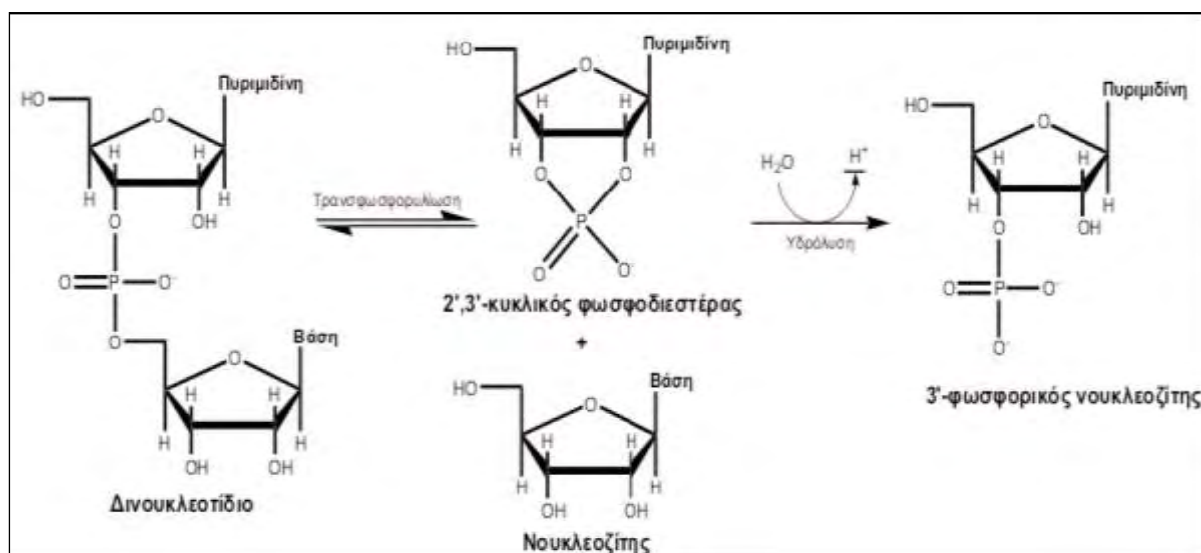
Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων μορίων RNA. Συγκεκριμένα, ασκεί την καταλυτική της δράση διασπώντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του RNA και ο μηχανισμός κατάλυσης της είναι ίδιος με αυτόν της RNase A. Γι' αυτό, παρακάτω θα περιγραφεί αναλυτικά ο μηχανισμός κατάλυσης της RNase A (**Εικόνα 9**).

Το ενεργό κέντρο της EDN είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος RNA. Έχει ειδικότητα πρόσδεσης στις πυριμιδίνες της 3' θέσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται και στις πουρίνες της 5' θέσης που συνήθως ακολουθείται από γουανίνη. Το ενεργό κέντρο της EDN, που εντοπίζεται σε μια σχισμή (cleft) κεντρικά του ενζύμου, σχηματίζεται από τρία κύρια κατάλοιπα: His15, Lys38 και His129, τα οποία είναι ομόλογα με αυτά της RNase A: His12, Lys41 και His119 (*Chang C. et al, 2002*).

Η αποικοδόμηση του RNA, που καταλύεται από την RNase A, λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια (**Εικόνα 8**). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5'-θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2'-θέση του γειτονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος και ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστερα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο, αλλά και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστερα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα (*Cuchillo C.M. et al, 2011*).

Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά ένα κανονικό προϊόν, καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση (Berg J.M. et al, 2012).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο, πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη, γιατί ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο των ριβονουκλεασών χωρίς να το στρεβλώσει (Cuchillo C.M. et al, 2011).



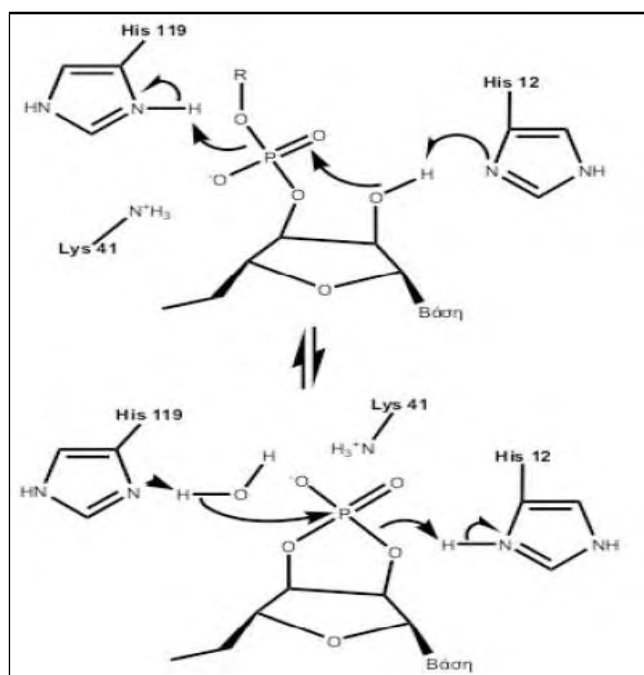
Εικόνα 8: Η αντίδραση που καταλύεται από την RNase A και την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (Berg J.M. et al, 2002).

Η αντίδραση αρχίζει με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-O με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιονισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του O. Την ίδια στιγμή η πρωτονιωμένη μορφή της His119 παρέχει το πρωτόνιο της στο 5'-O, και το 2'-O σχηματίζει δεσμό με τον φώσφορο, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από την θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ P και 5'-O διασπάται, όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει

μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο Ο. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του Ρ και του 2'-Ο, παράγοντας τον 2',3'-κυκλικό φωσφοδιεστέρα.

Το δεύτερο στάδιο αυτής της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του κυκλικού ενδιάμεσου, είναι σχεδόν μία αντίστροφη πορεία του πρώτου σταδίου με τη διαφορά ότι ένα μόριο ύδατος αντικαθιστά το 5'-Ο που είχε απομακρυνθεί. Τώρα ο δότης πρωτονίων είναι η His12 και ο δέκτης πρωτονίων είναι η His119. Η παρουσία της His στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων οφείλεται στην ικανότητα της να δρα είτε ως οξύ είτε ως βάση σε φυσιολογικό pH.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης. Όταν ο φώσφορος γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιάμεσου, το απερχόμενο 5'-Ο βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας. Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιάμεσου ένα άτομο Ο από το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-Ο βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρηνόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται (Berg J.M. et al, 2012).



Εικόνα 9: Ο καταλυτικός μηχανισμός της RNase A και της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης (Berg J.M. et al, 2012)

1.5 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος

Το ενεργό κέντρο όλων των μελών της υπερικογένειας της RNase A απαρτίζεται από τις υποπεριοχές B₁, P₁ και B₂. Αυτές οι υποπεριοχές αναγνωρίζουν και προσδένουν τις νουκλεοτιδικές βάσεις, που βρίσκονται τοποθετημένες ανοδικά (B₁) και καθοδικά (B₂) του φωσφοδιεστερικού δεσμού, όπου λαμβάνει χώρα η διάσπαση του μορίου RNA (P₁). Είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ της RNase A και της EDN, σε αντίθεση με τις υποπεριοχές, P₀ και P₂, οι οποίες ευθύνονται για την πρόσδεση των φωσφορικών ομάδων ανοδικά της B₁ υποπεριοχής και καθοδικά της B₂ υποπεριοχής, αντίστοιχα. Εκτός από αυτές τις δευτερεύουσες περιοχές, μία νέα υποπεριοχή, αναφερόμενη ως P₋₁, έχει εντοπιστεί στην EDN (Leonidas D.D. et al, 2001).

Πιο αναλυτικά, το καταλυτικό κέντρο της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης αποτελείται από τις εξής υποπεριοχές:

- P₁: αποτελείται από τα αμινοξέα His15, Lys38 και His129, μια τριάδα αμινοξέων συντηρημένη σε όλες τις παγκρεατικού τύπου ριβονουκλεάσες. Η P₁ μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Gln14, His15, His129 και N. Επιπλέον, έχει την ικανότητα πρόσδεσης φωσφορικών ομάδων και θειικών ανιόντων (Leonidas D.D. et al, 2001; Mosimann S.C. et al, 1996).
- B₁: αποτελείται από τα αμινοξέα Thr42, Leu130 και Ile133 και παίζει σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση για τη διάσπαση μεταξύ των βάσεων του RNA. Η διάσπαση τόσο στην περίπτωση της RNase A όσο και της EDN λαμβάνει χώρα καθοδικά νουκλεοτιδίων πυριμιδίνης, .
- B₂: αποτελείται από τα αμινοξέα Arg68, Asn70 και Asp112 και είναι εν μέρει διατηρημένη μεταξύ της EDN και της RNase A. Η υποπεριοχή αυτή προσδέει τη βάση που βρίσκεται καθοδικά του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υφίσταται διάσπαση και χαρακτηρίζεται από υψηλή προτίμηση για πουρίνες. Δύο από αυτά τα Arg68 και Asp112, εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά μόρια νερού, επιτρέποντας έτσι στην πρωτεΐνη να αποκτήσει δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις. Να σημειωθεί ότι οι διαμορφώσεις αυτές δεν έχουν κάποια φυσιολογική σημασία για το μόριο της πρωτεΐνης,

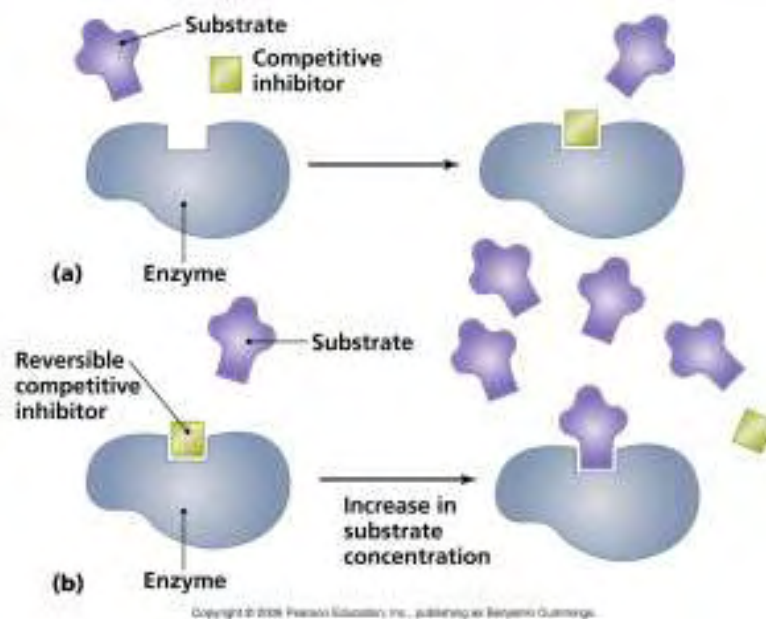
ωστόσο είναι ενδεικτικές της διαμορφωτικής ελευθερίας που χαρακτηρίζει τα αμινοξέα αυτά.

- P_0 και P_2 : Η υποπεριοχή P_0 , αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου που είναι συνδεδεμένο στη B_1 υποπεριοχή, ενώ η υποπεριοχή P_2 αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3' θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου που είναι συνδεδεμένο στη B_2 περιοχή. Οι περιοχές αυτές διαφέρουν μεταξύ της EDN και της RNase A και αποτελούνται από τα εξής κατάλοιπα: Ser64, Trp7 και Trp10, από τα οποία απουσιάζει η ικανότητα πρόσδεσηςθεικών ανιόντων (Mosimann, S.C. et al, 1996).
- P_{-1} : αποτελείται από τα αμινοξέα Arg36, Asn39, και Gln40 και έχει βρεθεί πως συμμετέχει στην πρόσδεσηθεικών ανιόντων και φωσφορικών ομάδων (Mosimann, S.C. et al, 1996).

Τέλος, έχει βρεθεί πως, για πολυνουκλεοτιδικά υποστρώματα, το ένζυμο παρουσιάζει 20 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για κυτιδίνες συγκριτικά με ουριδίνες στην υποπεριοχή B_1 και 100 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για αδενοσίνες στην υποπεριοχή B_2 (Sorrentino S. et al., 1992).

1.6 Ενζυμική αναστολή

Όταν μια ουσία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας μπορεί να είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός (**Εικόνα 10**). Οι όροι αντιστρεπτός και μη αντιστρεπτός αναστολέας περιγράφουν κυρίως το πόσο γρήγορα μπορεί να αποδεσμευτεί ο αναστολέας από το ένζυμο. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο του ενεργού κέντρου και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Ο αναστολέας στην περίπτωση αυτή δεσμεύεται συνήθως με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα.

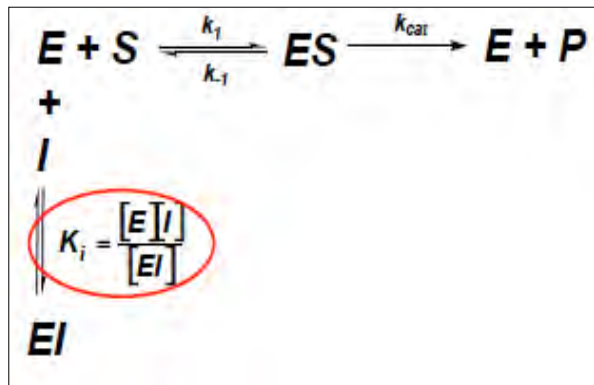


Εικόνα 10: Απεικόνιση της δράσης ενός μη αντιστρεπτού και ενός αντιστρεπτού συναγωνιστικού αναστολέα, αντίστοιχα. Στην περίπτωση του αντιστρεπτού αναστολέα, αυτός απομακρύνεται μετά από αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Διακρίνουμε 4 κύριους τύπους ενζυμικής αναστολής: συναγωνιστική, μη συναγωνιστική, ανταγωνιστική και μικτή.

➤ *Συναγωνιστική αναστολή (competitive inhibition)*

Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S , τότε τα I και S συναγωνίζονται για τη δέσμευση και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός. Το σχήμα των αντιδράσεων στο σύστημα φαίνεται στην **Εικόνα 11**.



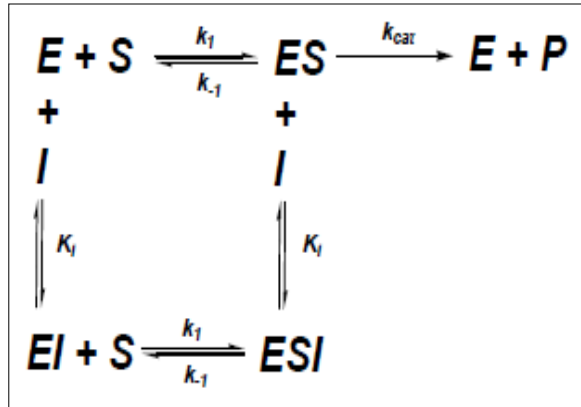
Εικόνα 11: Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της συναγωνιστικής αναστολής. Ως E, S, ES, P, I και EI παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του ενζύμου, του υποστρώματος, του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, του τελικού προϊόντος, του αναστολέα και του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα, αντίστοιχα. Ως K_i ορίζεται η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα και αποτελεί το αντίστροφο της αχιστείας του ενζύμου με τον αναστολέα. Η k_1 είναι η κινητική σταθερά της αντίδρασης κατά την οποία ένα ένζυμο αντιδρά με το υπόστρωμα για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, ενώ η k_{-1} είναι η κινητική σταθερά της αντίδρασης κατά την οποία το σύμπλοκο αυτό διασπάται σε ένζυμο και υπόστρωμα. Ως k_{cat} ορίζεται ο αριθμός μετατροπής ενός ενζύμου ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα (Berg J.M. et al, 2012).

Στην περίπτωση της συναγωνιστικής αναστολής, η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της σταθεράς Michaelis (K_m) αυξάνεται. Η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα ($[I]$) είναι υψηλή ή όταν η τιμή της $[S]$ είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αναστολή εξαφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι πολύ χαμηλή ή όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ υψηλή.

➤ *Μη συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition)*

Αν αντί ο αναστολέας I να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα S για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή, τότε αναφερόμαστε σε μη συναγωνιστική αναστολή. Ενώ, λοιπόν, στη συναγωνιστική αναστολή η ταυτόχρονη δέσμευση αναστολέα και υποστρώματος στο ένζυμο αποκλείεται, στη μη συναγωνιστική αναστολή δεν

αποκλείεται και μπορεί να δημιουργηθεί ένα τριπλό σύμπλοκο του τύπου EIS. Έτσι, το σχήμα των αντιδράσεων σ' αυτή την περίπτωση θα είναι αυτό της **Εικόνας 12**.



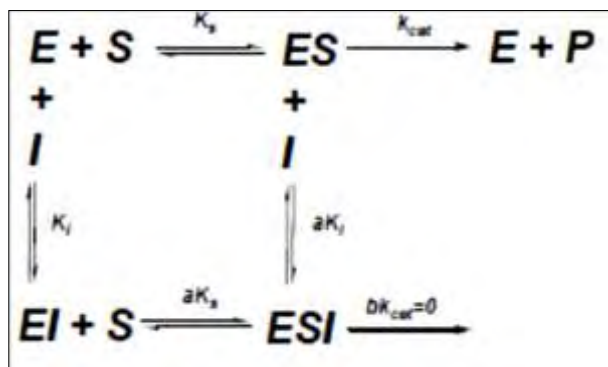
Εικόνα 12: Αλληλουχία των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη μη συναγωνιστική αναστολή. Ως ESI παρουσιάζεται η συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα (Berg J.M. et al, 2012).

Σε αυτή την περίπτωση, η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μία νέα τιμή που καλείται V_{app} , ενώ δεν παρατηρείται μεταβολή στην τιμή της K_m .

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και περιπτώσεις μερικής συναγωνιστικής αναστολής (όπου ο αναστολέας ελαττώνει την αγκιστεία του ενζύμου για το υπόστρωμά του, χωρίς ν' αποκλείει τελείως τη δημιουργία συμπλόκου EIS), καθώς και μερικής μη συναγωνιστικής αναστολής (όπου το σύμπλοκο EIS μπορεί να δώσει προϊόντα).

➤ *Μικτή αναστολή (mixed inhibition)*

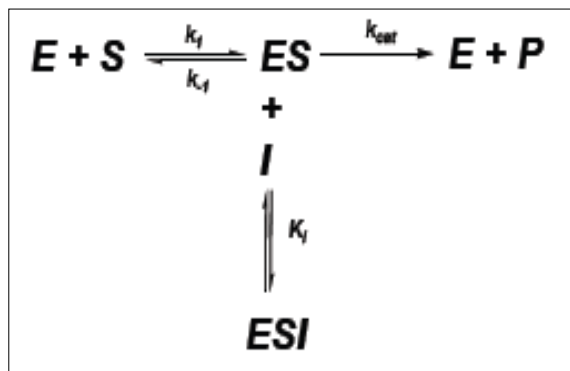
Στο είδος αυτό αναστολής, μεταβάλλονται τόσο η K_m όσο και η V_{max} . Η K_m μπορεί ν' αυξηθεί ή να ελαττωθεί από τον αναστολέα, ενώ η V_{max} πάντα θα ελαττώνεται. Το σχήμα των αντιδράσεων σε περίπτωση μικτής αναστολής παρουσιάζεται στην **Εικόνα 13**.



Εικόνα 13: Αντιδράσεις που συμβαίνουν στον μικτό τύπο αναστολής. Το απλούστερο μικτό σύστημα είναι αυτό όπου το EI έχει μικρότερη συγγένεια για το S απ' ότι για το E και το σύμπλοκο ESI είναι ανενεργό (Berg J.M. et al, 2012).

➤ Ανταγωνιστική αναστολή (*uncompetitive inhibition*)

Στις προηγούμενες τρεις περιπτώσεις αναστολής, οι αναστολείς μπορούν να δεσμεύονται απευθείας με το ένζυμο. Στην περίπτωση της ανταγωνιστικής αναστολής, η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Το σχήμα αντιδράσεων για ένα τέτοιο σύστημα φαίνεται στην **Εικόνα 14**.



Εικόνα 14: Αντιδράσεις που παρατηρούνται στην ανταγωνιστική αναστολή (Berg J.M. et al, 2012).

Σε αυτό το είδος αναστολής, η δέσμευση του αναστολέα θα ελαττώσει το ποσό του ενζύμου που είναι στην κατάλληλη μορφή να δώσει προϊόντα, δηλαδή την ES, και ως εκ τούτου θα ελαττωθεί και η V_{max} . Αυτό όμως θα ελαττώσει και τον ρυθμό διασάσεως του συμπλόκου ES σ' ελεύθερο ένζυμο και υπόστρωμα με αποτέλεσμα να ελαττωθεί και η K_m .

Να σημειωθεί ότι κι εδώ, όπως στις περιπτώσεις της συναγωνιστικής αναστολής, εκτός από την πλήρη ανταγωνιστική αναστολή υπάρχει (θεωρητικά τουλάχιστον) και περίπτωση μερικής ανταγωνιστικής αναστολής, όπου το σύμπλοκο EIS δίσταται σε E+I+προϊόντα. (Γεωργάτσος Ι.Γ. et al, 2001)

1.7 Τριτερπένια

Τα τερπένια (terpenes) ή τερπενοειδή (terpenoids) είναι μια μεγάλη κατηγορία φυτικών ενώσεων και συγκεκριμένα αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά. Οι περισσότερες από τις διαφορετικές ενώσεις της ομάδας αυτής είναι αδιάλυτες σε νερό. Όλα τα τερπένια προέρχονται από τη συνένωση συστατικών με πέντε άτομα άνθρακα (C_5 μονάδες) που έχουν τον

διακλαδισμένο σκελετό του ισοπεντανίου. Οι βασικές δομικές μονάδες των τερπενίων μερικές φορές ονομάζονται και μονάδες ισοπρενίου, επειδή τα τερπένια μπορεί να αποσυντεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες και να σχηματίσουν ισοπρένιο. Κατά συνέπεια, τα τερπένια μερικές φορές αναφέρονται και ως ισοπρενοειδή (Taiz L. et al, 2012).

Τα τερπένια παράγονται από τα φυτά, διότι διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στη φυσιολογία και στην οικολογία τους. Όσον αφορά τη φυσιολογία των φυτών, τα τερπένια μπορούν να δράσουν ως ορμόνες, ως αλειφατικά μόρια-άγκυρες της μεμβράνης και ως συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών που τις σταθεροποιούν. Τα πιο πολλά τερπένια, όμως, είναι τοξίνες και ανεπιθύμητα ως τροφή από πολλά φυτοφάγα έντομα και θηλαστικά, γι' αυτό και παίζουν σημαντικούς αμυντικούς ρόλους στο φυτικό βασίλειο. Πέρα από τους ρόλους τους στα φυτά, όμως, τα τερπένια έχουν διάφορες εφαρμογές στη βιομηχανία, λειτουργώντας ως προσθετικά γεύσης και αρώματος, αλλά και ως φάρμακα. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για χημικά και βιοκαύσιμα (Jiang Z. et al, 2015).

Όσον αφορά τη βιοσύνθεση των τερπενίων, συντίθενται στα ανώτερα φυτά είτε μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος, είτε μέσω της οδού της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης. Οι ενεργοποιημένες δομικές μονάδες των 5 ατόμων άνθρακα της βιοσύνθεσης των τερπενίων, που ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μεγαλύτερα μόρια, είναι το διφωσφορικό ισοπεντύλιο (IPP) και το διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP). Τα τερπένια ταξινομούνται σύμφωνα με τον αριθμό των μονάδων C₅ που περιέχουν, αν και μερικές φορές μπορεί να καταστεί δύσκολη η αναγνώριση των καταλοίπων με τα πέντε άτομα άνθρακα, λόγω των εκτεταμένων μεταβολικών τροποποιήσεων που υφίστανται τα αρχικά μόρια. Συγκεκριμένα, τερπένια με 10 άτομα άνθρακα, που αποτελούνται από δύο μονάδες C₅, ονομάζονται μονοτερπένια. Τερπένια με 15 άτομα άνθρακα (τρεις μονάδες C₅) ονομάζονται σεσκιτερπένια και τερπένια με 20 άτομα άνθρακα (τέσσερις μονάδες C₅) ονομάζονται διτερπένια. Τα τερπένια με 30 άτομα άνθρακα, αποτελούμενα από 6 μονάδες ισοπρενίου ονομάζονται τριτερπένια. Τέλος, αυτά με 40 άτομα άνθρακα (8 μονάδες C₅) ονομάζονται τετρατερπένια και πολυτερπενοειδή ονομάζονται τα τερπένια με [C₅]_n άτομα άνθρακα, όπου n>8 (Taiz L. et al, 2012).

Τα τριτερπένια είναι η κυριότερη υποομάδα τερπενίων, η οποία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών εργαστηρίων παγκοσμίως για τη διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης, αλλά κυρίως για τη χρήση τους ως εν δυνάμει θεραπευτικοί παράγοντες. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι εξ ορισμού τα τριτερπένια είναι υδρογονάνθρακες και δεν διαθέτουν ετεροάτομα, ενώ αυτά που διαθέτουν ετεροάτομα ονομάζονται τριτερπενοειδή.

Τα τριτερπένια είναι πρόδρομα μόρια πολλών φυσικών προϊόντων των φυτών και βρίσκονται σε κήρους επιδερμίδας φύλλων, στις ρίζες, στους καρπούς και στους κάλλους, μπορεί να αποτελούν συστατικά μεμβρανικών συστημάτων και χημειοταξονομικούς δείκτες (*Patočka J., 2003*). Περισσότερα από 20.000 τριτερπενοειδή μπορούν να σχηματιστούν μετά από πολλαπλές τροποποιήσεις της δομής του βασικού σκελετού τους (*Yadav V.R. et al, 2010*).

Τα τριτερπένια σχηματίζονται μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος, που λαμβάνει χώρα στο κυτοδιάλυμα (*Taiz L. et al, 2012*). Το πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης τους είναι το ευθύγραμμο, υδρογονανθρακικό (30 άτομα άνθρακα) μόριο του σκουαλενίου, το οποίο οξειδώνεται μέσω της εποξειδάσης του σκουαλενίου, παράγοντας 2,3-οξειδοσκουαλένιο. Το μόριο αυτό, στη συνέχεια, κυκλοποιείται οδηγώντας στην παραγωγή είτε στερολών μέσω συνθασών των στερολών, είτε τριτερπενοειδών μέσω συνθασών των τριτερπενοειδών. Δηλαδή, στην πρώτη περίπτωση οδηγούμαστε μέσω της κυκλοαρτενόλης στις cucurbitacines (στεροειδείς ουσίες που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών έναντι φυτοφάγων ζώων) ή στη χοληστερόλη και περαιτέρω στις φυτοστερόλες, στα καρδιακά γλυκοσίδια και τις στεροειδείς σαπωνίνες, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παράγονται τετρακυκλικά και πεντακυκλικά τριτερπένια (*Abe I. et al, 1993*).

Παρότι έχουν απομονωθεί άκυκλα, μονοκυκλικά, δικυκλικά, τρικυκλικά και εξακυκλικά τριτερπενοειδή από φυσικές πηγές, τα περισσότερα τριτερπενοειδή είναι τετρακυκλικά και κυρίως πεντακυκλικά (*Xu et al, 2004*). Οι πιο συνηθισμένες δομές τριτερπενίων περιλαμβάνουν τα πεντακυκλικά τριτερπένια των οικογενειών oleanane, ursane, taraxerane, taraxastane, lupane και τα τετρακυκλικά τριτερπένια των οικογενειών dammarane και cucurbitane (*Nazaruk J. et al, 2015*). Μερικά από τα κυριότερα τριτερπενοειδή είναι της οικογενείας oleanane το ολεανολικό οξύ, η ερυθροδιόλη και η β-αμυρίνη, της οικογένειας ursane το ουρσολικό οξύ και η

ουβαόλη και της οικογένειας lupane η λουπεόλη, η μπετουλίνη και το μπετουλινικό οξύ (Han N. et al, 2015). Μία άλλη σημαντική κατηγορία τριτερπενοειδών, που έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον πολλών εργαστηρίων λόγω των ποικίλων δράσεων που εμφανίζουν τα μέλη της, είναι τα οξέα Boswellic, μια σειρά πεντακυκλικών τριτερπενοειδών που παράγονται από φυτά του γένους *Boswellia*.

Οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί έως σήμερα αποκαλύπτουν ότι τα τριτερπενοειδή εμφανίζουν ποικίλες δράσεις, ορισμένα από αυτά, μάλιστα, έχουν κυκλοφορήσει και ως φάρμακα για συγκεκριμένες ασθένειες, ενώ άλλα βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών. Μία καλά μελετημένη ομάδα τριτερπενοειδών είναι, όπως προαναφέρθηκε, τα οξέα Boswellic. Το εκχύλισμα από τη ρετσίνη του φυτού *Boswellia serrata* αποτελεί ένα από τα κύρια φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του άσθματος σε επίπεδο κλινικών δοκιμών, αφού μειώνει σημαντικά τις επιπτώσεις της ασθένειας και πιο συγκεκριμένα εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση (Zhou X. et al, 2015). Θεωρείται ότι ο κύριος μηχανισμός που εξυπηρετεί τη δράση αυτή είναι η καταστολή της σύνθεσης των λευκοτριενίων μέσω αναστολής της 5-λιποοξυγενάσης (ένζυμο κλειδί στη σύνθεση των λευκοτριενίων) (Liu Z. et al, 2015). Τα οξέα Boswellic εμφανίζουν και αντικαρκινικές δράσεις, οι οποίες οφείλονται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ιδιότητα τους να εμποδίζουν την ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, μια ιδιότητα κοινή για όλα τα τριτερπενοειδή που επάγουν αυτού του είδους τις δράσεις. Τα συγκεκριμένα τριτερπενοειδή μπορούν, όμως, και να επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους, την εισβολή, τη μετάσταση και την αγγειογένεση. Να σημειωθεί, βέβαια, ότι τριτερπενοειδή ποικίλων οικογενειών βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών, καθώς αποτελούν εν δυνάμει αντικαρκινικούς παράγοντες (Yadav V.R. et al, 2010). Σημαντικός είναι και ο ανοσορρυθμιστικός ρόλος των οξέων Boswellic. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι σε υψηλές δόσεις μπορούν να μειώσουν τον αριθμό των πρωτογενών αντισωμάτων, ενώ σε χαμηλότερες δόσεις ενισχύουν τα δευτερογενή αντισώματα. Επιπλέον, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, παρότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η δράση τους είναι ανασταλτική, ενισχύουν την φαγοκυτταρική δράση των μακροφάγων και αναστέλλουν τον σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου και πρωτεασών, που μπορούν να οδηγήσουν σε

καταστροφή των ιστών με επακόλουθη ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων. Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι μπορούν να συμβάλλουν και στην καταπολέμηση ενός συγκεκριμένου αυτοάνοσου νοσήματος, της ασθένειας του Crohn (*Ammon H.P. et al, 2010*). Έχουν μελετηθεί οι θεραπευτικές επιδράσεις τους σε διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως στο έλκος της στοματικής κοιλότητας, στον καρδιακό πόνο, στους ρευματισμούς, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και στην ελκώδη κωλίτιδα, και έχουν αποδοθεί στο γεγονός ότι επιδρούν σε διαμεσολαβητές της φλεγμονής, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους (*Zhou X. et al, 2015*). Τέλος, ένα συγκεκριμένο οξύ Boswellic βελτιώνει τις παραμέτρους πήξης του πλάσματος, προστατεύει το ενδοθήλιο από αιμόσταση που προκαλείται από τραυματισμό και εμποδίζει την αιμόσταση που προκαλείται από δυσλειτουργία της αγγειοδιαστολής (*Wang M. et al, 2015*).

Άλλη μία αξιοσημείωτη οικογένεια τριτερπενοειδών είναι αυτή των σαπωνινών. Οι σαπωνίνες εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση (*Li D.W. et al, 2002*). Ένα τριτερπενοειδές της οικογένειας αυτής, μάλιστα, φαίνεται να εμπλέκεται στην καταστολή της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων σε φλεγμονώδεις ασθένειες (*Hwang T.L. et al, 2010*). Μελέτες σε μοντέλα αρουραίων έδειξαν ότι το ίδιο τριτερπενοειδές μπορεί να οδηγήσει σε μείωση ή εξασθένηση των παθολογικών αλλαγών που σχετίζονται με την αρτηριοσκλήρυνση, μια ασθένεια που προκαλείται λόγω δημιουργίας μιας πλάκας στο εσωτερικό τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων (*Lu S.H. et al, 2015*). Επιπλέον, αποτελεί έναν εν δυνάμει θεραπευτικό παράγοντα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, αφού επάγει την απόπτωση των αντίστοιχων ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων (*Liu B.X. et al, 2014*). Τροποποιημένες μορφές της σαπωνίνης αυτής εμφανίζουν αντιμυκητιακή και αντιϊκή δράση (*Lee M.W. et al, 2001*). Τέλος, διάφορες τριτερπενοειδείς σαπωνίνες εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα (*Chwalek M. et al, 2006*).

Σημαντικές δράσεις εμφανίζουν και οι πιο συνηθισμένες δομές πεντακυκλικών τριτερπενίων, δηλαδή αυτές των οικογενειών lupane, oleanane, ursane, και lanostane. Μετά από μελέτη σε μοντέλα ποντικών βρέθηκε ότι ένα τριτερπενοειδές της οικογένειας lupane μπορεί να οδηγήσει σε εξασθένηση της φλεγμονής των αεραγωγών, που παρατηρείται στο άσθμα (*Vasconcelos J.F. et al, 2008*). Ένα άλλο τριτερπενοειδές της ίδιας οικογένειας αναστέλλει τη δράση του

HIV, εμφανίζει αντιβακτηριδιακή, αντιελμινθική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αναλγητική δράση και δρα, επίσης, κατά της ελονοσίας και του απλού έρπη τύπου 1 (HSV-1) (Moghaddam, M.G. et al, 2012). Τριτερπενοειδή της οικογένειας oleanane εμφανίζουν ηπατοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές δράσεις (Pollier J. et al, 2012). Να τονίσουμε ότι ένα τριτερπενοειδές της οικογένειας αυτής κυκλοφορεί στην αγορά της Κίνας ως φάρμακο δια του στόματος για διαταραχές του ήπατος στον άνθρωπο. Ο μηχανισμός της ηπατοπροστασίας, πιθανόν, να περιλαμβάνει την αναστολή της ενεργοποίησης τοξικών ουσιών και την ενίσχυση των συστημάτων άμυνας του οργανισμού. Αποτελεσματικό στην προστασία εναντίον τραυματισμού του ήπατος, όμως, είναι και ένα τριτερπενοειδές της οικογένειας ursane. Αυτά τα δύο τριτερπενοειδή εμφανίζουν, επιπλέον, αντιφλεγμονώδεις και αντιλιπιδαιμικές ιδιότητες σε πειραματόζωα, καθώς και αντικαρκινικές δράσεις (Liu J. et al, 1995). Κυτταροτοξικές δράσεις εμφανίζουν διάφορα τριτερπενοειδή των οικογενειών ursane και lanostane (Hill R.A. et al, 2015). Επιπλέον, ποικίλα τριτερπενοειδή, που ανήκουν τις οικογένειες ursane, lupane, oleanane αλλά και τα οξέα Boswellic, θα μπορούσαν να αναστείλουν την παραγωγή προηγμένων τελικών προϊόντων της γλυκοζυλίωσης και να μειώσουν άμεσα το οξειδωτικό και το φλεγμονώδες στρες. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα θα ήταν η μείωση του στρες που προκαλείται λόγω γλυκοζυλίωσης. Συγκεκριμένα τριτερπένια, λοιπόν, είναι πιθανοί αντιγλυκοζυλιωτικοί παράγοντες και πιθανόν να ωφελούν στην παρεμπόδιση ή/και στην θεραπεία των ασθενειών που σχετίζονται με τη γλυκοζυλίωση, όπως στο σακχαρώδη διαβήτη και στη νόσο του Alzheimer (Yin M.C., 2015).

Αναφορικά με τον σακχαρώδη διαβήτη, τριτερπένια διαφόρων οικογενειών μπορούν να αναστείλουν τη δράση ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και να κανονικοποιούν τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στο πλάσμα. Επιπλέον, αυτά τα τριτερπένια εκδηλώνουν υπολιπιδαιμική δράση και δρουν κατά τις παχυσαρκίας. Τέλος, η ικανότητά τους να αναστέλλουν την παραγωγή προηγμένων τελικών προϊόντων της γλυκοζυλίωσης, τα καθιστά παράγοντες παρεμπόδισης επιλοκών του διαβήτη, όπως η νεφροπάθεια, η εμβρυοπάθεια, η νευροπάθεια και οι διαταραχές στην επούλωση τραυμάτων (Nazaruk J. et al, 2015).

1.8 Εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία

Οι κρύσταλλοι είναι μια φάση τις στερεάς κατάστασης, στην οποία τα μόρια (ή άτομα) που αποτελούν τον κρύσταλλο είναι περιοδικά διευθετημένα στο χώρο. Ωστόσο, κάθε περιοδική διευθέτηση μορίων δεν αποτελεί σίγουρα κρύσταλλο. Η διάκριση των κρυστάλλων, αρχικά, βασίστηκε στα εξωτερικά τις γνωρίσματα και τις ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορεί να εμφανίζουν. Τα κυριότερα γνωρίσματα των κρυστάλλων είναι η συμμετρία, η περιοδικότητα και το γεγονός ότι παρουσιάζουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τη διευθέτησή τους, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ανισότροπα υλικά.

Ένας κρύσταλλος αποτελείται από όμοιες μοναδιαίες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα. Σαν στοιχειώδης ή μοναδιαία κυψελίδα ορίζεται η μικρότερη στοιχειώδης ομάδα, η οποία αντιπροσωπεύει πλήρως την κρυσταλλική δομή. Στην απλούστερη περίπτωση, η στοιχειώδης κυψελίδα περιέχει ένα μόνο μόριο, συνήθως, όμως, αποτελείται από δύο ή περισσότερα μόρια συνδεδεμένα με κάποιο είδος συμμετρικής διευθέτησης, έτσι ώστε να συμπληρώνουν τον χώρο πιο ικανοποιητικά (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15: Δομές μορίου, κυψελίδας και κρυστάλλου.

Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι τις σε κάθε οργανωμένη βασική

μονάδα μορίων που περιέχεται στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος (*Rhodes G., 2006*).

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.

Για να επιτευχθεί κρυστάλλωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού. Η κατάσταση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης οπότε και οδηγούμαστε στη δημιουργία κρυσταλλικού ή άμορφου ιζήματος (*Ρακιντζής Θ.Ν., 1994*).

Η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και η αύξηση των κρυστάλλων εξαρτάται από τις παραμέτρους (*Blundell T.L. et al, 1976*):

- *Ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι*, τις υπερκορεσμός (συγκέντρωση πρωτεΐνης και παραγόντων κατακρήμνισης), θερμοκρασία, pH (μεταβολές), ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών (φύση των παραγόντων κατακρήμνισης, ρυθμιστικά διαλύματα, επιπρόσθετες χημικές ουσίες).
- *Βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι*, τις η ευαισθησία τις δομής τις πρωτεΐνης σε φυσικές παραμέτρους (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, διαλύτες) και η δέσμευση άλλων υποκαταστατών (υποστρώματα, συμπαραγόντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα).
- *Βιολογικοί παράμετροι*, τις βιολογικές πηγές και φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών ή των κυττάρων που περιέχουν τις πρωτεΐνες (θερμόφιλοι, ψυχρόφιλοι, αλόφιλοι, μεσόφιλοι οργανισμοί, στατική ή αναπτυσσόμενη φάση κυττάρων και βακτηριακές μολύνσεις).

Το πιο σημαντικό, ίσως, σημείο στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας. Για να είναι τις κρύσταλλος «καλός» πρέπει να είναι απαλλαγμένος από προσμίξεις, να είναι απόλυτα συμμετρικός και να έχει τρισδιάστατη επαναλαμβανόμενη δομή. Τα σχήματα των κρυστάλλων μπορεί να ποικίλουν, από τέλειους κύβους μέχρι και μακριές λεπτές βελόνες. Ο

χρόνος που απαιτείται για να αναπτυχθεί ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος (από εβδομάδες μέχρι και μήνες), γι' αυτό απαιτείται συχνά αρκετή προσπάθεια και υπομονή από τον ερευνητή καθώς και συνεχής έλεγχος, εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους.

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

1. *Πυρήνωση*: Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τις και να σχηματίσουν συσσωματώματα γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης. Το μέγεθος του συσσωματώματος προσδιορίζει τη συνολική ελεύθερη ενέργεια, η οποία παρουσιάζει μέγιστο όταν σχηματιστεί ο πυρήνας, δηλαδή αποκτήσει κρίσιμο μέγεθος. Προκειμένου, λοιπόν, να επιτευχθεί η ανάπτυξη μιας τις φάσης στο υπερκορεσμένο διάλυμα, πρέπει το σύστημα να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα το οποίο καλείται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης. Η πυρήνωση αποτελεί το πιο κατανοητό στάδιο τις κρυστάλλωσης. Η ποιοτική και ποσοτική περιγραφή τις μπορεί να γίνει μέσω θερμοδυναμικών εξισώσεων. Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα, η πυρήνωση θεωρείται ως μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού συσσωματωμάτων. Δυο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο αυτό. Η μία οδηγεί στο σχηματισμό τις κρυσταλλικής δομής και η άλλη στη δημιουργία άμορφου ιζήματος (Kametal, 1978).
2. *Ανάπτυξη πυρήνων*: Μετά το στάδιο τις πυρήνωσης αρχίζει η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων με εναπόθεση μορίων πρωτεΐνης τις πυρήνες, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η πρωτεϊνική συγκέντρωση του διαλύματος. Μεγαλύτερη μείωση τις συγκέντρωσης τις επιτυγχάνεται στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του κρυστάλλου, με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται τις αυτή και να υπάρχει μια διαρκής μεταφορά μάζας (Kametal, 1978).
3. *Αναστολή τις ανάπτυξης*: Με βάση το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας, αν ο μέσος συντελεστής διάχυσης είναι μεγαλύτερος του συντελεστή ταχύτητας ανάπτυξης, τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Δεδομένου ότι τα συστήματα

κρυστάλλωσης είναι συνήθως κλειστά, δηλαδή δεν μπορεί να προστεθεί πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Η ύπαρξη ξένων σωματιδίων, τα οποία λειτουργούν ως κέντρα σύνδεσης, επιταχύνουν τη διαδικασία της πυρήνωσης και γι' αυτό το λόγο η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό καθαρότητας. Αποτέλεσμα της ύπαρξης προσμίξεων είναι να αναπτύσσονται γρηγορότερα οι κρύσταλλοι, οι οποίοι τις είναι μικρότερου μεγέθους, γεγονός μη επιθυμητό (*Blundell T.L. et al, 1976*).

Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνικών κρυστάλλων και των κρυστάλλων που σχηματίζουν τα μικρότερα μόρια είναι ότι οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης περιέχουν σημαντική ποσότητα υγρού διαλύτη (συνήθως ύδωρ). Οι κρύσταλλοι γενικά αποτελούνται από δυο φάσεις: μια στερεή, που αποτελείται από τα σημεία επαφής των μακρομορίων και δημιουργεί το κρυσταλλικό πλέγμα και μια υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Τα μόρια του διαλύτη που βρίσκονται πιο κοντά στα πρωτεϊνικά μακρομόρια, είναι σαφώς πιο οργανωμένα και συνδέονται με τις επιφανειακές πολικές ομάδες της πρωτεΐνης με ισχυρές αλληλεπιδράσεις, ενώ εκείνα που εισχωρούν στα κανάλια που σχηματίζει η πρωτεΐνη είναι αποδιοργανωμένα (*Blundell T.L. et al, 1976*).

Για να κρυσταλλωθεί μια πρωτεΐνη είναι απαραίτητη η χρήση κάποιων ουσιών, οι οποίες ονομάζονται παράγοντες καθίζησης. Οι παράγοντες καθίζησης μπορούν να χωριστούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

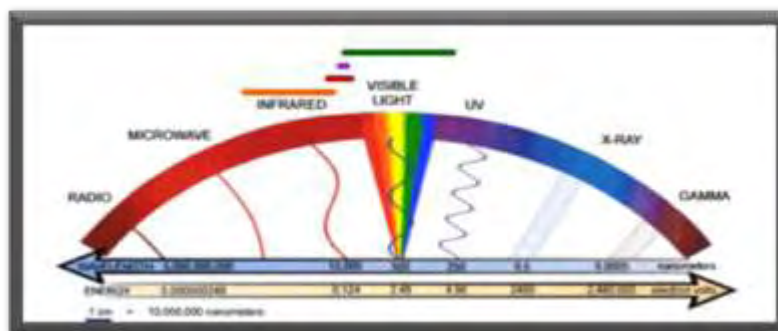
- i. Άλατα (π.χ. θειικό αμμώνιο)
- ii. Οργανικοί διαλύτες (π.χ. αιθανόλη)
- iii. Πολυαιθυλενογλυκόλες

Εάν τοποθετήσουμε μια καθαρή πρωτεΐνη σε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος τότε αυτή θα υποστεί εξαλάτωση. Αυτό σημαίνει πρακτικά ότι θα μειωθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης επειδή τα μόρια του νερού, που υπό άλλες συνθήκες θα συνδέονταν στην επιφάνεια της και θα τη διαλυτοποιούσαν, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μικρά ιόντα του άλατος. Αν η συγκέντρωση των ιόντων γίνει αρκετά μεγάλη, τότε τα μακρομόρια εξουδετερώνουν τα επιφανειακά τις φορτία αλληλεπιδρώντας μεταξύ τις. Τα δισθενή ή τρισθενή ιόντα σχηματίζουν πιο εύκολα

δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού και επομένως είναι περισσότερο αποτελεσματικά (McPherson A., 1999).

Παρόμοια δράση με τα άλατα έχουν και οι οργανικοί διαλύτες. Τα μόριά τους ενώνονται με τα μόρια του νερού και μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την καθίζηση των πρωτεϊνών ή την κρυστάλλωσή τους. Φυσικά, η χρήση των οργανικών διαλυτών απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, γιατί τις περισσότερες φορές οι διαλύτες αυτοί μπορούν και να μετουσιώσουν τις πρωτεΐνες. Γι' αυτό, η επιλογή των κατάλληλων παραγόντων καθίζησης είναι σημαντική (McPherson A., 1999).

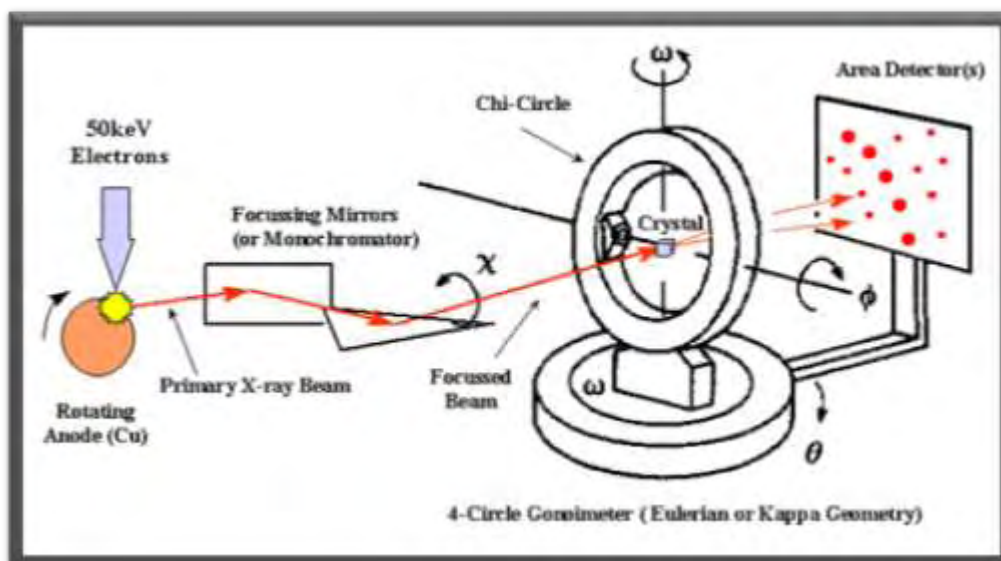
Η μελέτη των κρυσταλλογραφικών δομών γίνεται με τη βοήθεια των ακτίνων Χ. Οι ακτίνες Χ αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 100-0.1 Å (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ βασίζεται στο φαινόμενο της περίθλασης ακτίνων Χ από τα διάφορα επίπεδα που ορίζονται από τις θέσεις των συστατικών των κρυσταλλικών σωμάτων. Έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες συσκευές και μεθοδολογίες που έχουν τη δυνατότητα να ταυτοποιούν, να μετρούν και να υπολογίζουν τις σταθερές του πλέγματος των κρυσταλλικών σωμάτων από την περίθλαση ακτίνων Χ. Για να επιτευχθεί ατομική ευκρίνεια είναι απαραίτητη ακτινοβολία με διαστάσεις μήκους κύματος ανάλογο με τις διαστάσεις του πρωτεϊνικού μορίου που μελετάται (Rhodes G., 2006).

Το πείραμα περίθλασης ακτίνων Χ από κρυστάλλους απαιτεί δύο κύρια όργανα, την πηγή και τον ανιχνευτή ακτίνων Χ, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17: Παρουσίαση τις διατάξης κατά την περίθλαση ακτίνων Χ.

Η πηγή ακτίνων Χ εκπέμπει δέσμη ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο και εν συνεχεία ο κρύσταλλος περιθλά ακτινοβολία ίσου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τη βοήθεια του ανιχνευτή καταγράφεται το περιθλασίγραμμα, στο οποίο εντοπίζονται οι κηλίδες έντασης των ανακλάσεων και τελικά με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων βρίσκουμε τη δομή τις πρωτεΐνης (Rhodes G., 2006)

Ο προσδιορισμός τις δομής μιας πρωτεΐνης με περίθλαση ακτίνων Χ απαιτεί την καταγραφή όλων των σκεδαζόμενων ακτίνων. Αυτό επιτυγχάνεται μόνο με περιστροφή του κρυστάλλου. Έτσι λοιπόν, ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα απαιτεί δύο συσκευές: το μηχανισμό περιστροφής του κρυστάλλου και μία συσκευή μέτρησης τις έντασης τις περιθλώμενης ακτινοβολίας.

Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή των δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αρχικά, η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ ενώ σήμερα χρησιμοποιούνται συστήματα που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή, αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αρχικά, ως στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τέθηκε η ετερόλογη έκφραση και ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης (EDN) από κύτταρα *E.coli*. Η ποσότητα της EDN που ανακτήθηκε, αξιοποιήθηκε για την κινητική μελέτη παρουσία αναστολέων και για το σχηματισμό κρυστάλλων.

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη ανήκει στην υπερικογένεια της RNase A και βρέθηκε ότι παρουσιάζει πολλές δομικές ομοιότητες με τη παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A). Για το λόγο αυτό, αρκετές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της RNase A, έχουν δοκιμαστεί ως πιθανοί αναστολείς της EDN.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήσαμε την ικανότητα αναστολής φυσικών μορίων και όχι χημικά συντεθειμένων, στη δραστικότητα της EDN. Για το σκοπό αυτό επιλέξαμε μια σειρά τριτερπενικών ουσιών, βάσει του γεγονότος πως οι οργανικές αυτές ενώσεις εμφανίζουν ποικίλες δράσεις, συμπεριλαμβανομένου αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική και κυτταροτοξική δράση, καθώς και ο ανοσορρυθμιστικός ρόλος που διαθέτουν. Απώτερος σκοπός αποτελεί ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός βελτιωμένων αναστολέων του ενζύμου, οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά μέσα για την αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται η EDN.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Καλλιέργεια κυττάρων *E. coli*

2.1.1 Γενικές πληροφορίες

Με τον όρο καλλιέργεια εννοούμε την ανάπτυξη μεγάλων πληθυσμών κυττάρων σε συγκεκριμένες συνθήκες. Συνήθως, είναι επιθυμητή η ανάπτυξη καλλιιεργειών ενός μόνο τύπου κυττάρου, δηλαδή η ανάπτυξη ομοιογενών καλλιιεργειών που δεν περιέχουν άλλα κύτταρα εκτός από αυτά που μας ενδιαφέρουν. Τέτοιες καλλιιεργειες ονομάζονται αξενικές και για την ανάπτυξή τους απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες (*Madigan M.T. et al, 2011*). Για να το επιτύχουμε αυτό, όταν εργαζόμαστε με καλλιιεργειες φροντίζουμε ο χώρος εργασίας να έχει απολυμανθεί με αιθανόλη, καθώς επίσης όλα τα σκευή και υλικά να είναι αποστειρωμένα, γι' αυτό και χρησιμοποιείται λύχνος Bunsen και όλα τα διαλύματα αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο.

Στις εργαστηριακές καλλιιεργειες μάς ενδιαφέρει η εκθετική φάση, δηλαδή η φάση κατά την οποία τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά και θεωρούνται μεταβολικώς ενεργά, για την παραγωγή όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός της φάσης στην οποία βρίσκεται η καλλιιεργεια γίνεται με φασματοφωτομέτρηση σε μήκος κύματος 600 nm, όπου μετράται σε ειδική κυψελίδα η οπτική πυκνότητα (OD) 1 mL καλλιιεργειας. Η εκθετική φάση για την *E. coli* αντιστοιχεί σε OD₆₀₀: 0,6-0,8, γι' αυτό η καλλιιεργεια παρακολουθείται από τον ερευνητή σε τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε η OD₆₀₀ να μην υπερβεί αυτό το εύρος τιμών. Ο εμβολιασμός όλων των καλλιιεργειών γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η επώαση στους 37 °C.

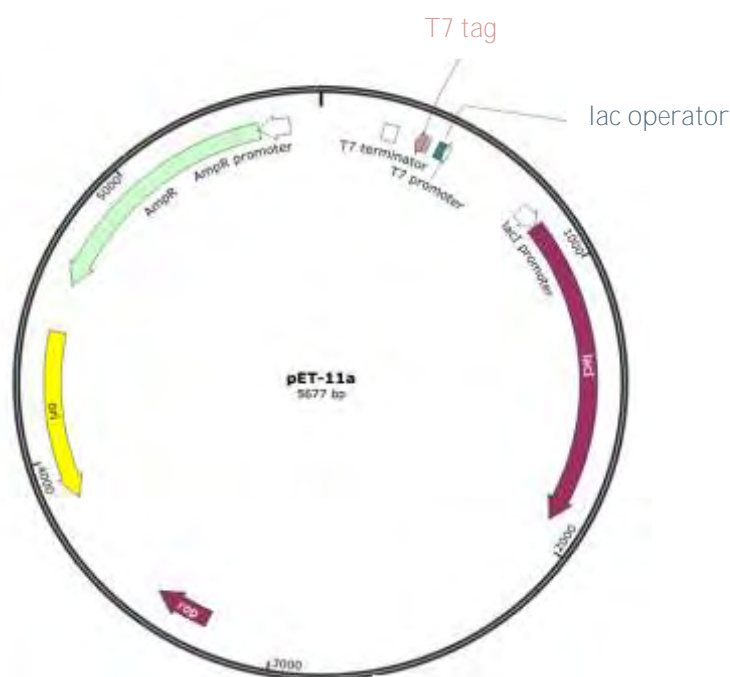
Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της EDN αποτελούν τα κύτταρα *E. coli* B834, το οποίο έχει το εξής γονιδίωμα:

F⁻ omp T hsdS_B(r_b⁻ m_b⁻) gal dcm met (DE3) p LysS (cam^R)

Ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο που εκφράζει για την ανθρώπινη EDN αποτελεί το πλασμίδιο pET-11a της εταιρίας Novagen. Το

πλασμίδιο αυτό, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 18**, έχει μέγεθος 5.677 bp και αποτελείται από:

- ✓ τον παράγοντα f1 (origin of replication).
- ✓ τον πολυσυνδέτη, όπου ενσωματώνεται το γονίδιο που κωδικοποιεί την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη.
- ✓ το γονίδιο lacI, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-καταστολέα lac.
- ✓ τον χειριστή lac, που μπορεί να εμποδίσει τη μεταγραφή.
- ✓ τον T7 υποκινητή, που είναι ειδικός αποκλειστικά για την T7 RNA πολυμεράση (μη βακτηριακή).
- ✓ ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.



Εικόνα 18: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-11a

2.1.2 Μετασηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* B834 (DE3) με πλασμιδιακό φορέα, με τη μέθοδο του θερμικού σοκ

Εναιώρημα 100 μL επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* B834 (DE3) τοποθετείται στον πάγο, για μερικά λεπτά, μέχρι να ξεπαγώσει. Αμέσως μόλις ξεπαγώσει, προστίθενται σε αυτό 1-100 ng του πλασμιδιακού φορέα pET-11a που φέρει το γονίδιο της EDN. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και στη συνέχεια επώαση για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθως, τα βακτήρια υποβάλλονται σε σύντομο θερμικό

σοκ, στους 42 °C, για 45 δευτερόλεπτα. Η αλλαγή στη θερμοκρασία αυξάνει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας στο μόριο του DNA να εισέλθει εντός του κυττάρου. Το δείγμα τοποθετείται άμεσα στον πάγο και επωάζεται για 2 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 0,9 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth, το οποίο είναι προθερμασμένο στους 37 °C και ακολουθεί επώαση των μετασχηματισμένων κυττάρων στους 37 °C για 1 ώρα, υπό ανάδευση (220 rpm). Τέλος, 50-100 μL των κυττάρων επιστρώνονται σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο LB Άγαρ, στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό επιλογής αμπικιλίνη, σε συγκέντρωση 100 μg/ mL. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C, για 16 ώρες.

2.1.3 Θρεπτικά υλικά για τις καλλιέργειες

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* καλλιεργήθηκαν, αρχικά, σε δύο μικρές υγρές καλλιέργειες και έπειτα σε δύο μεγάλες. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό το οποίο αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και στο οποίο έπειτα προστίθενται 100 μg/ mL αμπικιλίνης.

Για τις μικρές καλλιέργειες της *E. coli* το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι το LB medium (Lysogeny Broth), ενώ για τις μεγάλες το Terrific Broth (TB medium), το οποίο και παρασκευάζεται ως εξής:

Για θρεπτικό υλικό όγκου 1,5 L:

- Σε 1,2 L ddH₂O, διαλύονται 18 g τρυπτόνης και 36 g εκχυλίσματος ζύμης. Προστίθενται 6 mL γλυκερόλης και συμπληρώσαμε μέχρι τα 1350 mL.
- Σε 150 mL ddH₂O, διαλύονται 18,81 g K₂HPO₄ και 3,465 g KH₂PO₄.
- Αναμιγνύονται τα δύο διαλύματα και προστίθεται ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 1,5 L.

2.1.4 Επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας με χρήση αντιβιοτικών

Η χρήση αντιβιοτικών σε μία κυτταρική καλλιέργεια, πέρα από ένας εύκολος τρόπος επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων, είναι και μία μέθοδος αποφυγής ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Το αντιβιοτικό είναι μια χημική ένωση που παράγεται από έναν μικροοργανισμό και προκαλεί τον θάνατο ή την αναστολή της ανάπτυξης κάποιου άλλου μικροοργανισμού. Τα αντιβιοτικά ομαδοποιούνται με βάση τη χημική δομή ή τον τρόπο δράσης τους. Στα βακτήρια,

οι σημαντικότεροι στόχοι των ενώσεων αυτών είναι το κυτταρικό τοίχωμα (παρεμπόδιση σύνθεσης), η κυτταροπλασματική μεμβράνη (καταστροφή), η πρωτεϊνοσύνθεση (παρεμπόδιση) και η βιοσύνθεση νουκλεϊκών οξέων (παρεμπόδιση).

Η ποσότητα και το είδος του αντιβιοτικού που θα χρησιμοποιηθεί καθορίζεται από το είδος του μικροοργανισμού, και κατ' επέκταση από το βακτηριακό στέλεχος και τον τύπο του πλασμιδίου που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (amp). Η αμπικιλίνη αποτελεί ημισυνθετική πενικιλίνη με διευρυμένο φάσμα αντιβιοτικής δραστηριότητας, στο οποίο περιλαμβάνονται και ορισμένα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Οι δομικές διαφορές στις N-ακυλομάδες επιτρέπουν σε αυτές τις ημισυνθετικές πενικιλίνες να διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και να αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Madigan M.T. et al, 2011). Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν, όμως, φέρουν το γονίδιο bla, το οποίο κωδικοποιεί τη β-λακταμάση. Το ένζυμο β-λακταμάση, που εκκρίνεται στον περιπλασμικό χώρο, καταλύει την υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου του μορίου της αμπικιλίνης, παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση της. Επομένως, μετά από καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αμπικιλίνη επιβιώνουν μόνο εκείνα τα κύτταρα E. coli τα οποία έχουν προσλάβει τα πλασμίδια αυτά.

Να τονιστεί ότι πριν τη χρήση της η amp, όπως και όλα τα αντιβιοτικά, αποστειρώνεται με διήθηση μέσω φίλτρου μεγέθους πόρων 0,22 μm και αποθηκεύεται στους -20 °C (stock solutions).

2.1.5 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων για την παραγωγή EDN

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αρχικά σε δύο μικρές υγρές καλλιέργειες (των 10mL) και κατόπιν σε δύο μεγάλες καλλιέργειες (των 750mL), κάτω ασηπτικές συνθήκες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

➤ Παρασκευή μικρών καλλιεργειών

Σε δύο αποστειρωμένα falcon προστέθηκαν:

- 10 mL θρεπτικού LB

- 20 µL amp (διότι η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος stock της amp ήταν 50 mg/mL και η τελική συγκέντρωση θέλαμε να είναι 100 µg/mL σε τελικό όγκο 10 mL).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός με μία μοναδιαία αποικία από κάθε τρυβλίο στο οποίο είχαν αναπτυχθεί αποικίες μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli*, στο καθένα από τα falcon. Τέλος, τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37 °C για 16h υπό ανάδευση, στα 250 rpm.

➤ *Παρασκευή μεγάλων καλλιιεργειών*

Σε κάθε αποστειρωμένη κωνική φιάλη χωρητικότητας 2L που περιείχε 750mL θρεπτικό TB medium προστέθηκαν:

- 1500 µL amp (διότι η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος stock της amp ήταν 50 mg/mL και η τελική συγκέντρωση θέλαμε να είναι 100 µg/mL σε τελικό όγκο 750mL)
- 7,5 mL από τη μικρή βακτηριακή καλλιέργεια (αναλογία 1/100).

Ακολούθησε επώαση των δύο μεγάλων υγρών καλλιιεργειών στους 37 °C σε 210 rpm, μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600 nm να έχει τιμή μεταξύ 0,6 και 0,8 ($OD_{600} = 0,6-0,8$).

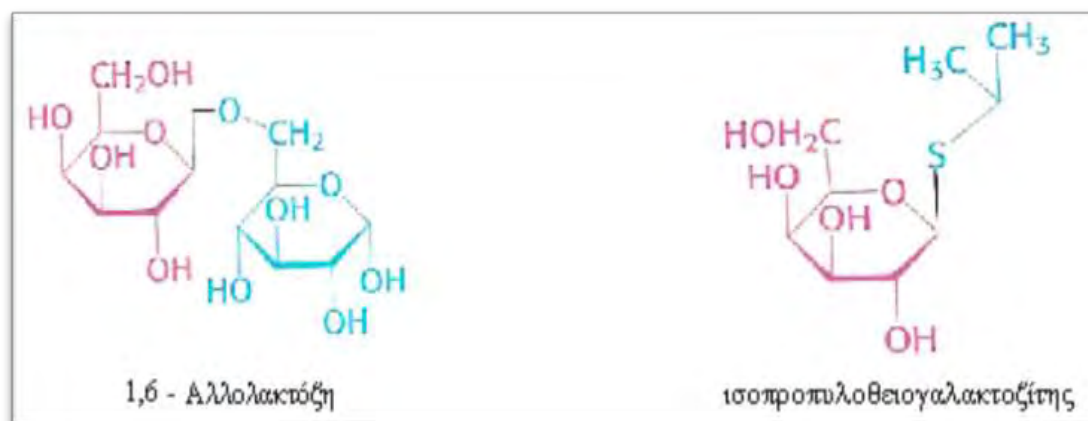
Στην παρούσα εργασία, η επώαση διήρκησε 4,5-5,5 h, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος η OD_{600} πήρε τις τιμές 0,770 και 0,726 στις δύο φιάλες, υποδεικνύοντας ότι τα βακτήρια βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

2.2 Υπερέκφραση της EDN

Για την παραγωγή της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης, χρησιμοποιήθηκε ως επαγωγέας η ένωση ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG). Ο IPTG είναι χρήσιμος στην εργαστηριακή έρευνα ως εργαλείο για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης, καθώς αποτελεί ανάλογο της λακτόζης και είναι ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης της β-γαλακτοζιδάσης. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι ότι δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου και έτσι δεν καταβολίζεται, εξασφαλίζοντας συνεχή επαγωγή. Έχει την ικανότητα να

αδρανοποιεί τον καταστολέα *Iac*, επιτρέποντας έτσι την διεξαγωγή της γονιδιακής έκφρασης.

Ο IPTG εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη (**Εικόνα 19**), ένα παραπροϊόν της αντίδρασης της β-γαλακτοζιδάσης, το οποίο παράγεται σε χαμηλά επίπεδα από τα λίγα μόρια της β-γαλακτοζιδάσης που υπάρχουν πριν από την επαγωγή. Η συγκεκριμένη ένωση χρησιμοποιείται ως επαγωγέας, για την αύξηση στην έκφραση πρωτεϊνών.



Εικόνα 19: Η χημική δομή της 1,6-αλλολακτόζης και του IPTG.

Ένα πλεονέκτημα του IPTG, στο οποίο οφείλεται και η συχνή χρήση του στις πειραματικές διαδικασίες, είναι ότι η *E.coli* αδυνατεί να υδρολύσει και γενικά να καταβολίσει την ένωση αυτή, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή της να παραμένει σταθερή σε όλη τη διαδικασία της κυτταρικής αντιγραφής.

Όσον αφορά τη δράση του IPTG, όπως και η αλλολακτόζη, συνδέεται με τον καταστολέα *Iac* και απελευθερώνει τον τετραμερή καταστολέα από το χειριστή *Iac* με αλλοστερικό τρόπο, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων στο οπερόνιο *Iac*, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης. Σε αντίθεση όμως με την αλλολακτόζη, ο IPTG περιέχει ένα μόριο θείου στο μόριο του το οποίο δημιουργεί έναν χημικό δεσμό, μη υδρολύσιμο από το κύτταρο, εμποδίζοντας έτσι το κύτταρο να μεταβολίσει την ένωση. Συνεπώς, η συγκέντρωση του IPTG παραμένει σταθερή και η έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται από το συγκεκριμένο οπερόνιο δεν αναστέλλεται κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η πρόσληψη του IPTG από τα κύτταρα *E.coli* διακρίνεται σε δύο περιπτώσεις: σε χαμηλές συγκεντρώσεις εισέρχεται στα κύτταρα μέσω της περμεάσης της λακτόζης,

ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα ανεξάρτητα από την περμεάση, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις επαγωγής. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις IPTG (Marbach, A. et al, 2012; Hansen L.H. et al, 1998).

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, μόλις η τιμή της OD₆₀₀ φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, προστίθεται ο επαγωγέας IPTG. Η τελική συγκέντρωση του επαγωγέα που προστέθηκε στις μεγάλες υγρές καλλιέργειες, ήταν 1 mM. Μετά την προσθήκη του επαγωγέα, ακολούθησε επώαση για 3,5 επιπλέον ώρες στις ίδιες συνθήκες όπου έγινε η καλλιέργεια των κυττάρων. Μετά το πέρας των 3,5 h, τα κύτταρα φυλάχθηκαν στο ψυγείο.

2.3 Συλλογή των κυττάρων

Οι πρωτεΐνες που παράγονται εντοπίζονται είτε στο κυτταρικό ίζημα, είτε στο υπερκείμενο, ύστερα από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας. Οι εξωκυττάριες πρωτεΐνες εντοπίζονται στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μαζί με το θρεπτικό υλικό, ενώ οι σχετιζόμενες με την κυτταρική μεμβράνη και οι ενδοκυττάριες εντοπίζονται στο κυτταρικό ίζημα.

Η EDN είναι μια μη διαλυτή ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, οπότε όταν τελειώσει η επαγωγή συλλέγεται το κυτταρικό ίζημα. Να τονίσουμε ότι το υπερκείμενο που απορρίπτεται θα πρέπει να είναι διαυγές ως ένδειξη ότι έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα.

Οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν σε 2300 g (rcf) στους 4°C για 15 min. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα φυλάχθηκε στους -20°C.

2.4 Λύση των κυττάρων

Η λύση των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους, ενζυμικά, μηχανικά ή μέσω εφαρμογής οσμωτικής πίεσης. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήθηκε μηχανική λύση των κυττάρων, συγκεκριμένα μέσω υπερήχων. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται μετά από επαναδιαλυτοποίηση

του κυτταρικού ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) το οποίο αποτελείται από:

Διάλυμα λύσης ($V=40\text{ ml}$, $pH=8$)

- 0,5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), που είναι αναστολέας πρωτεασών, καθώς επιθυμούμε την αποφυγή τυχόν πρωτεόλυσης.
- Μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X-100, από stock 0,1% w/v, για τη διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης.
- 2 mM EDTA, χηλικός παράγοντας που δεσμεύει ιόντα απαραίτητα για τη δράση των πρωτεασών.
- 10 mM Tris, ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση του pH σε κατάλληλη τιμή ($pH=8$).

Αρχικά, το κυτταρικό ίζημα διαλυτοποιείται σε 40 mL διαλύματος λύσης και επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά έπειτα από προσθήκη 0,1 % (w/v) δεοξυχολικού νατρίου, ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που βοηθά στη διάσπαση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 0,04 g λυσοζύμης, η οποία είναι ικανή να διασπά τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων μέσω υδρόλυσης των β -(1,4)-γλυκοζιτικών δεσμών ανάμεσα στα κατάλοιπα N-ακέτυλο-μουραμικού οξέος (NAM) και N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης (NAG) των πολυσακχαριτών. Τέλος, προστίθενται 500 U βενζονάσης, μίας DNάσης, που βοηθά στην ικανοποιητικότερη λύση των κυττάρων και πέψη του DNA. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 15 λεπτά υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4 °C.

Η μηχανική λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με υπερήχους. Το διάλυμα υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 sec με ενδιάμεσες παύσεις των 30 sec μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 5 φορές. Να τονιστεί ότι λαμβάνει χώρα σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή των πρωτεϊνών.

Τέλος, το διάλυμα των κυττάρων φυγοκεντρείται στα 9200 g, στους 4°C, για 50 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα, γιατί όπως προαναφέρθηκε η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μια μη διαλυτή πρωτεΐνη.

2.5 Πλύση των κυττάρων και ομογενοποίηση

Το κυτταρικό ίζημα, που συλλέχθηκε στο προηγούμενο βήμα, επαναδιαλύθηκε σε 100 mL δ/τος πλύσης που περιέχει επιπλέον 0,1 % (v/v) Triton X-100, υφίσταται μηχανική διάτμηση με τη χρήση ομογενοποιητή και φυγοκεντρείται σε 9.200 g, στους 4 °C, για 50 min. Το ίζημα επαναδιαλύεται εκ νέου σε 100 mL δ/τος πλύσης, ομογενοποιείται και φυγοκεντρείται όπως και προηγουμένως για δύο ακόμη φορές. Την τελευταία φορά δεν προστίθεται απορρυπαντικό (Triton) στο διάλυμα πλύσης.

Η σύσταση του *διαλύματος πλύσης* ($V=300\text{ mL}$, $pH=8$) είναι η εξής:

- 50 mM Tris-HCl
- 2 mM EDTA
- 0,3 M NaCl

Στα 200 mL από τα 300 mL του διαλύματος, προστέθηκε 0,1% v/v Triton.

Αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε προκειμένου να απομονωθούν τα *έγκλειστα σωμάτια*, οι ειδικές δομές, δηλαδή, που σχηματίζονται στα βακτηριακά κύτταρα από ορισμένες πρωτεΐνες, τα μόρια των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εγκλείονται μέσα σε φωσφολιπίδια. Μέσα στα έγκλειστα σωμάτια βρίσκεται και η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη.

2.6 Αποδιάταξη της πρωτεΐνης

Τα κυτταρικά ιζήματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης με τη βοήθεια του ομογενοποιητή. Το *διάλυμα αποδιάταξης* ($V=15\text{ mL}$, $pH=8,5$) περιέχει:

- 6 M υδροχλωρική γουανιδίνη, που είναι αποδιατακτικός παράγοντας.
- 0,1 M Tris
- 80 mM ανηγμένη GSH, ένα ένζυμο που ανάγει τις κυστεΐνες, διασπώντας έτσι τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών.
- 2 mM EDTA

Κατόπιν, τοποθετήθηκε στην συσκευή roller για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνει η αποδιάταξη. Έπειτα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford.

2.7 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford

Η μέτρηση της ποσότητας της πρωτεΐνης πραγματοποιείται είτε με φωτομέτρηση στο φάσμα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), είτε με τη μέθοδο Bradford. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford, η οποία στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος αυτή είναι απλή, γρήγορη και ευαίσθητη, γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 1 mg πρωτεΐνης.

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm με μια πρότυπη καμπύλη που σχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεΐνης BSA (αλβουμίνη του ορού των βοοειδών) με την απορρόφησή τους στα 595 nm. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό δείγματος άγνωστης συγκέντρωσης, λοιπόν, κατασκευάστηκαν τα διαλύματα που φαίνονται στον **Πίνακα 2**.

Τα διαλύματα αυτά επώαστηκαν στο σκοτάδι, διότι το αντιδραστήριο Bradford είναι ευαίσθητο στο φως, για 5min και στη συνέχεια φωτομετρήθηκαν στα 595 nm. Με βάση τις οπτικές απορροφήσεις και την εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η ποσότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης που βρίσκεται μέσα στα κλάσματα.

Πίνακας 2: Τα διαλύματα που κατασκευάστηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό δείγματος άγνωστης συγκέντρωσης μέσω της μεθόδου Bradford.

	Δείγμα (μL)	ddH ₂ O (μL)	Διάλυμα αποδιάταξης (μL)	Αντιδραστήριο Bradford (μL)	Απορρόφηση στα 595 nm (OD ₅₉₅)
Τυφλό 1	-	798	2	200	-
Τυφλό 2	-	790	10	200	-
Δείγμα 1	2	798	-	200	0,360
Δείγμα 2	10	790	-	200	1,174

Η μέτρηση της απορρόφησης κάθε δείγματος έγινε αφότου μηδενίσαμε με το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα. Να επισημάνουμε ότι η μέτρηση της απορρόφησης στο δείγμα 2 ήταν εκτός των ορίων της πρότυπης καμπύλης, οπότε και δεν τη λαμβάνουμε υπόψη.

Με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη για τη μέθοδο Bradford ($y=0,869x+0,015$) και την απορρόφηση του δείγματος 1 βρέθηκε ότι η ποσότητα της EDN που βρισκόταν μέσα στο διάλυμα ήταν 3,97 mg/mL.

2.8 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)

Για τον υπολογισμό του τελικού όγκου του διαλύματος της αναδίπλωσης (refolding buffer), χρησιμοποιήθηκε η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που βρέθηκε πως υπάρχει μέσα στο διάλυμα μέσω της μεθόδου Bradford. Με βάση την αρχική συγκέντρωση της EDN (3,97 mg/mL), τον αρχικό όγκο του διαλύματος στον οποίο αυτή βρισκόταν (15 mL) και την τελική συγκέντρωση στην οποία έπρεπε να βρίσκεται κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης (0,1 mg/mL), υπολογίστηκε ότι έπρεπε να παρασκευαστούν 595,5 mL διαλύματος αναδίπλωσης.

Η σύσταση του διαλύματος αναδίπλωσης ($V=600$ mL, $pH=8,5$) είναι η εξής:

- 0,1 M Tris-acetate
- 0,5 M L-arginine
- 0,5 mM GSSG (oxidized GSH) (ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του GSSG γίνεται με βάση τον λόγο $GSH/GSSG=4/1$.)

Η πρωτεΐνη με τη χρήση πουάρ προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα στα 600 mL διαλύματος αναδίπλωσης και το διάλυμα αναδεύτηκε στους 4 °C για 72 h.

Αυτό το χρονικό διάστημα είναι απαραίτητο προκειμένου να μπορέσει η πρωτεΐνη να αναδιπλωθεί σωστά και να σχηματίσει τους τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που διαθέτει.

2.9 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης

Πριν ακόμα ξεκινήσουμε τη διαδικασία της συμπύκνωσης, ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο οποίο έχει ήδη πραγματοποιηθεί η αναδίπλωση, σε τιμή $pH=5$ και ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4 °C, στα 7000 g για 10 min. Σκοπός είναι να

καθιζάνουν οι πρωτεΐνες που δεν είναι διαλυτές σ' αυτό το pH και η μη σωστά αναδιπλωμένη EDN. Η EDN, όμως, που είναι διαλυτή σε pH=5 θα παραμείνει στο υπερκείμενο, το οποίο εν συνεχεία συμπυκνώνεται. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο φυλάσσεται σε beaker.

Η συμπύκνωση του πρωτεϊνικού δείγματος διεξάγεται σε θερμοκρασία 4 °C με τη βοήθεια της ειδικής συσκευής φιλτραρίσματος Millipore-Pellicon XL Device (Millipore, Bedford, MA). Αρχικά, γίνεται πλύση της συσκευής με 500 mL dH₂O, έπειτα εξισορρόπηση με το ρυθμιστικό διάλυμα συμπύκνωσης (~ 200 mL) και στη συνέχεια διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος. Η συμπύκνωση ολοκληρώνεται όταν ο όγκος του δείγματος φτάσει τα 50 mL (περίπου 4 h). Τέλος, συλλέγονται όσες πρωτεΐνες έχουν πιθανόν παραμείνει μέσα στη συσκευή και αποθηκεύονται στους 4 °C.

Τέλος, συλλέγονται όσες πρωτεΐνες έχουν πιθανόν παραμείνει μέσα στην συσκευή, αποθηκεύονται στους 4 °C και η συσκευή ξεπλένεται .

Το ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης ($V=2000\text{ mL}$, $pH=5$), που χρησιμοποιήθηκε, αποτελείται από:

- 0,15 M οξικό νάτριο (Sodium acetate trihydrate)

2.10 Διαπίδυση

Η διαπίδυση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού με βάση το μέγεθος, κατά την οποία χρησιμοποιείται μια ημιπερατή μεμβράνη για να διαχωρίσει την πρωτεΐνη από διάφορες μικρομοριακές προσμίξεις ή να αλλάξει το ρυθμιστικό διάλυμα. Οι ημιπερατές μεμβράνες, συνήθως, κατασκευάζονται από κυτταρίνη με διάμετρο πόρων 1-5 nm. Το δείγμα τοποθετείται στη μεμβράνη αυτή και εμβαπτίζεται σε διάλυμα του οποίου η σύσταση διαφέρει από αυτή του δείγματος. Εάν η συγκέντρωση ενός συστατικού είναι διαφορετική εκατέρωθεν της μεμβράνης η δημιουργούμενη βαθμίδωση συγκέντρωσης παρέχει την κινητήρια δύναμη για τη διάχυσή της κατά μήκος της μεμβράνης. Έτσι, τα μικρά σωματίδια μπορούν να διέρχονται ελεύθερα μέσω της μεμβράνης, ενώ τα μεγαλύτερα κατακρατούνται.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 0.15 M οξικού

νατρίου/HCl ($V=2$ L, $pH=5$). Η πρωτεΐνη, που βρίσκεται στο διάλυμα αναδίπλωσης σε $pH=5$, τοποθετήθηκε σε μεμβράνες διαπίδυσης μεγέθους πόρων (cut-off) 7.000 Da. Έπειτα, τοποθετήθηκε σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιείχε το ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της διαπίδυσης. Λόγω όσμωσης, το οξικό νάτριο μετακινείται προς τα μέσα κι έτσι η πρωτεΐνη βρίσκεται πλέον στο ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης.

2.11 Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN

Ο καθαρισμός της EDN γίνεται με τη βοήθεια χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Με αυτό το είδος χρωματογραφίας, διαχωρίζονται φορτισμένα συστατικά, παραδείγματος χάριν πρωτεΐνες, πεπτίδια και αμινοξέα, καθώς περνούν από μία φορτισμένη στατική φάση. Η στατική φάση είναι συνήθως μία φορτισμένη ρητίνη, η οποία φέρει λειτουργικές ομάδες που αλληλεπιδρούν με αντίθετα φορτισμένες ομάδες συστατικών του υπό εξέταση μορίου.

Σε περίπτωση που το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε $pH=7$ είναι θετικό, τότε πρόκειται να δεσμευτεί σε στήλη από κόκκους που περιέχουν καρβοξυλικά ιόντα, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δε θα δεσμευτεί στη στήλη αυτή. Η θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη σε μια τέτοια στήλη στη συνέχεια εκλύεται με αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου ή άλλου άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Τα ιόντα νατρίου συναγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη. Οι πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή συγκέντρωση θετικών φορτίων εκλύονται πρώτες και ακολούθως εκλύονται οι πρωτεΐνες που έχουν υψηλότερη συγκέντρωση θετικών φορτίων.

Η EDN είναι μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη, άρα για τον καθαρισμό της χρησιμοποιήθηκε κατιοανταλλακτική στήλη, και συγκεκριμένα η Resource S με χωρητικότητα 1 mL. Ο χρωματογραφικός καθαρισμός έγινε με χρήση του συστήματος FPLC-AKTA purifier UPC900 (Fast Protein Liquid Chromatography). Η μέγιστη πίεση που μπορεί να ασκηθεί στη στήλη αυτή είναι 1,5 MPa.

Η χρωματογραφία πραγματοποιείται στον ψυκτικό θάλαμο σε θερμοκρασία 4 °C και το δείγμα υποβλήθηκε 2 φορές σε χρωματογραφικό καθαρισμό με την ίδια στήλη.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύματα με συγκεκριμένη σύσταση, φιλτραρισμένα και απαερωμένα:

- Διάλυμα A (0,15 M Sodium acetate trihydrate), $V=2\text{ L}$, $pH=5$
- Διάλυμα B (0,15 M Sodium acetate trihydrate, 2M NaCl), $V= 1\text{ L}$, $pH=5$

Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη Resource S περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (διάλυμα εξισορρόπησης) με πέντε όγκους στήλης (5 mL), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.
2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Το δείγμα πρέπει να βρίσκεται στο διάλυμα εξισορρόπησης.
3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη. Γίνεται συλλογή των κλασμάτων έκπλυσης.
4. Έκλουση (elution) της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης από τη στήλη με διαβίβαση ρυθμιστικού διαλύματος με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2 M. Με τη σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ της πρόσδεσης τους σε αυτή. Αρχικά, λοιπόν, θα εκλουσθούν οι ασθενώς προσδεδωμένες πρωτεΐνες, ενώ οι ισχυρά προσδεδωμένες θα ληφθούν στα τελευταία κλάσματα με τη μέγιστη συγκέντρωση άλατος.
5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη, διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα.

Η ταχύτητα ροής σε όλα τα παραπάνω βήματα ήταν 1 mL/ min.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση μεταξύ των δύο χρωματογραφικών καθαρισμών. Στις μεμβράνες διαπίδυσης τοποθετήθηκαν τα κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά τον πρώτο χρωματογραφικό καθαρισμό και περιείχαν την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη και έπειτα αυτές

τοποθετήθηκαν στο ποτήρι ζέσεως που περιείχε το διάλυμα Α. Λόγω όσμωσης, το χλωριούχο νάτριο μετακινείται προς τα έξω, ενώ το οξικό νάτριο προς τα μέσα. Έτσι, μετά το πέρας της διαδικασίας, η πρωτεΐνη βρίσκεται πλέον στο διάλυμα Α.

2.12 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης με εφαρμογές σε ποικίλα επιστημονικά πεδία. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος, καθώς και για το διαχωρισμό μειγμάτων μορίων, τα οποία δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιοδήποτε μόριο το οποίο φέρει φορτίο. Η διαδικασία της μεθόδου βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες, διότι έχουν διαφορετικά φορτία και μάζες.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, έγινε χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Ο σχηματισμός της πηκτής πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιείται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και Ν,Ν'-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακριών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται μεταξύ τους με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου, δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωσή τους. Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε χρησιμοποιείται η κατάλληλη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου.

Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες, όπως είναι το υπερθεϊκό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι το Ν,Ν,Ν',Ν'-τετραμέθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό

ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Το σημαντικό είναι επομένως, η όλη αντίδραση πολυμερισμού να πραγματοποιηθεί απουσία O_2 , το οποίο μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται δωδεκάκυκλο-θειικό νάτριο (SDS), το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους, τον διαχωρισμό των υπομονάδων τους και τη δημιουργία συμπλόκων πρωτεΐνης- SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, τα οποία όλα είναι αρνητικά φορτισμένα, ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται είναι πολύ μεγαλύτερο από ότι το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο και έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών στη πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται ταχύτερα στους πόρους της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας.

Πολλές φορές πραγματοποιείται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, πριν την ηλεκτροφόρηση, έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως είναι η 2-μερκαπτοαιθανόλη ή θέρμανση στους $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η πιο δημοφιλής τεχνική SDS-PAGE είναι αυτή που αναπτύχθηκε από τον Laemmli. Πρόκειται για μια μη συνεχή ηλεκτροφόρηση πηκτής που η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (running gel), οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών.

Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να ανιχνευθούν μετά την ηλεκτροφόρηση με χρώση Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals. Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει μέχρι 0,1 µg πρωτεΐνης ανά ταινία. Η χρώση μπορεί να γίνει και με χρώση αργύρου (silver staining), η οποία χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία (ικανότητα ανίχνευσης ng πρωτεΐνης). Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνών, καθώς η τεχνική αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα και πολύπλοκη, συγκριτικά με την Coomassie Blue.

2.12.1. Πειραματική διαδικασία

Οι πηκτές επιστοίβασης (stacking gel-5%) και διαχωρισμού (running gel-5%-15%) παρασκευάζονται συνήθως σε επίπεδη, κατακόρυφη μορφή, πάχους 0,8-2 mm και ποικίλων διαστάσεων σύμφωνα με το πρωτόκολλο Laemmli. Για την παρασκευή τους χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες και ειδικές διαχωριστικές ταινίες (spacers) σε κατάλληλη διάταξη.

Τα αντιδραστήρια APS και TEMED προστίθενται στο τέλος ακριβώς πριν να μεταφερθούν τα διαλύματα εντός των πλακών, ώστε να μην αρχίσει ο πολυμερισμός πολύ νωρίς. Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται πρώτη και μεταφέρεται στο χώρο μεταξύ των πλακών γεμίζοντας το 75% του χώρου. Η πηκτή καλύπτεται με ισοπροπανόλη για προστασία της πηκτής από το οξυγόνο. Η ισοπροπανόλη αφαιρείται όταν ο πολυμερισμός έχει τελειώσει και οι δυο φάσεις έχουν διαχωριστεί. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβασης και διαβιβάζεται στο χώρο μεταξύ των πλακών σχηματίζοντας μια στοιβάδα πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, μέχρι την επιφάνεια. Αμέσως τοποθετείται κατάλληλο πλαστικό χτενάκι για το σχηματισμό καθορισμένου αριθμού πηγαδιών. Οι πηκτές παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά περίπου μέχρι να πολυμεριστούν πλήρως.

Λόγω του μικρού μοριακού βάρους της πρωτεΐνης (18,4kDa), παρασκευάζεται πηκτή με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 12 % (**Πίνακας 3**).

Πίνακας 3: Παρουσίαση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πηκτών επιστοιβάσης (B) και διαχωρισμού (A).

Πηκτή διαχωρισμού (A)	12%	Πηκτή επιστοιβάσης (B)	5%
H ₂ O	3,3 mL	H ₂ O	3,4 mL
30% ακρυλαμίδιο	4,0 mL	30% ακρυλαμίδιο	0,83 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 mL	1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0,63 mL
10% SDS	0,1 mL	10% SDS	0,05 mL
10% APS	0,1 mL	10% APS	0,05 mL
TEMED	0,004 mL	TEMED	0,005 mL

Πριν φορτωθούν τα δείγματα υφίστανται την παρακάτω επεξεργασία:

1. Με βάση τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης με Bradford πριν τη Resource S, τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου erpendorf 5 μ L loading buffer 5X και 20 μ L από κάθε υπό εξέταση δείγμα. Ως υπό εξέταση δείγματα θεωρούνται το δείγμα με τις ολικές πρωτεΐνες (EDN_{Total}) πριν τον καθαρισμό, το δείγμα μετά την πρώτη στήλη (EDN_{1st MONO S}) και το δείγμα με την τελική πρωτεΐνη (EDN_{Final}), δηλαδή όλα εκείνα τα κλάσματα που προέκυψαν από τον χρωματογραφικό καθαρισμό με την μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση στα 280nm.
2. Τα φιαλίδια τύπου erpendorf που περιέχουν τα υπό εξέταση δείγματα θερμαίνονται στους 95 °C για 5 min μαζί με τη χρωστική. Μετά το πέρας των 5min, φορτώνονται στην πηκτή.

Μαζί με τα δείγματα, στην πηκτή φορτώνεται και ο μάρτυρας αναφοράς (ladder) (5 μ L).

Στη συσκευή τοποθετείται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (1,5 g Tris, 7,2 g γλυκίνη, 0,5 g SDS, pH 8,3-SDS) έτσι ώστε να διαβρέχονται οι ελεύθερες επιφάνειες της πηκτής μεταξύ των πλακών και να σχηματιστεί κλειστό κύκλωμα με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων. Στη συνέχεια, φορτώνονται τα δείγματα στα

πηγαδάκια, συνδέονται τα ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 100V. Αφού τα δείγματα εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού, η τάση αυξάνεται σε 120-150 V και τερματίζεται όταν το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος της πηκτής.

2.12.2 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue

Παρασκευάζονται τα εξής διαλύματα:

- *Διάλυμα χρώσης (Staining solution) (V=1 L) :*
 - 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (διότι θέλουμε 0,1% v/v)
 - 500 mL μεθανόλη (διότι θέλουμε 50% αιθανόλη)
 - 100 mL οξικό οξύ (διότι θέλουμε 10% οξικό οξύ)
 - 400 mL ddH₂O
- *Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Solution) (V=1 L) :*
 - 785 mL υπερκάθαρο νερό
 - 165 mL αιθανόλη
 - 50 mL οξικό οξύ

Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε κατάλληλο δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα χρώσης (περίπου 100 mL). Το δοχείο τοποθετείται σε ανακινούμενη πλάκα και αφήνεται να αναδευτεί ελαφρά για τουλάχιστον 1 ώρα. Στην συνέχεια, αφού απομακρύνεται το διάλυμα χρώσης και η πηκτή ξεπλένεται με ddH₂O, προστίθεται το διάλυμα αποχρωματισμού και η ανάδευση συνεχίζεται για αρκετές ώρες. Με την διαδικασία αυτή η πηκτή αποχρωματίζεται και παραμένουν χρωματισμένες (μπλέ – μώβ) μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Έτσι, ανιχνεύτηκαν ζώνες που περιείχαν το λιγότερο 0,1–1 μg πρωτεΐνης.

2.13 Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης

Η συγκέντρωση της EDN προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση στα 280 nm, με τη βοήθεια του νόμου των Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times b \times c,$$

Όπου,

A: η οπτική απορρόφηση της πρωτεΐνης (μετρήθηκε ότι $A=0,500$)

ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της πρωτεΐνης (για την EDN είναι γνωστό ότι $\epsilon=1,64$),

b: το πάχος της κυψελίδας (1 cm)

c: συγκέντρωση εξεταζόμενης πρωτεΐνης.

2.14 Εισαγωγή Κρυσταλλώσεων

2.14.1 Διάχυση ατμών

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών είναι αυτή της διάχυσης ατμών, και εφαρμόζεται τις περισσότερες φορές με τις τεχνικές της α) κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop) , β) της καθήμενης σταγόνας (sitting drop) και γ) της σταγόνας sandwich. Για τη δημιουργία κρυστάλλων το υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με διάλυμα εξισορρόπησης το οποίο περιέχει ένα ρυθμιστικό διάλυμα και έναν καταβυθιστικό παράγοντα (precipitant), όπως κάποιο άλας, ή πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει. Επειδή η συγκέντρωση των ιόντων άλατος είναι μεγαλύτερη στο διάλυμα εξισορρόπησης που βρίσκεται στο εσωτερικό του θαλάμου κρυστάλλωσης από το μίγμα του πρωτεϊνικού διαλύματος με το διάλυμα εξισορρόπησης που βρίσκεται στην επιφάνεια, μόρια διαλύτη θα κινηθούν από τη σταγόνα της πρωτεΐνης προς το δοχείο με διάχυση ατμών στην αέρια φάση.

Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η διαλυτότητα της πρωτεΐνης στη σταγόνα ελαττώνεται. Το διάλυμα της πρωτεΐνης στη σταγόνα τελικά γίνεται υπερκορεσμένο, μια κατάσταση που είναι θερμοδυναμικά ασταθής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μέρος της πρωτεΐνης στη σταγόνα να σχηματίσει κρυσταλλικούς πυρήνες που τελικά θα μεγαλώσουν για να γίνουν μεγάλοι κρύσταλλοι πρωτεΐνης.

2.14.2. Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (*hanging drop*)

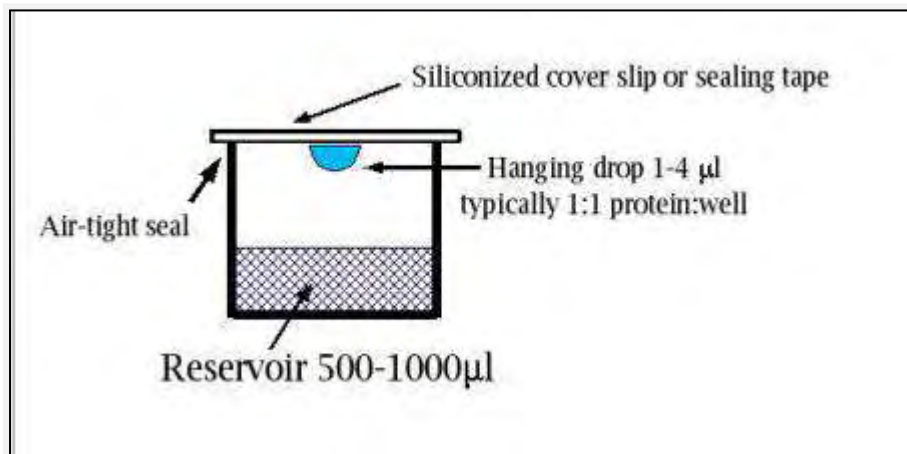
Η μέθοδος κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν αυτή της κρεμάμενης σταγόνας (**Εικόνα 20**) κατά την οποία: μια σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος εξισορρόπησης τοποθετείται στο μέσο μιας υδρόφοβης καλυπτρίδας (σταγόνα κρυστάλλωσης). Η σταγόνα αποτελείται από διάλυμα της πρωτεΐνης και του διαλύματος εξισορρόπησης σε αναλογία 1:1 (συνήθως αναμιγνύονται 2-5 μL από το κάθε διάλυμα). Η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω από σχετικά μεγάλο όγκο (700-1000 μL) διαλύματος εξισορρόπησης (δεξαμενή) και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς δημιουργώντας έτσι ένα απομονωμένο σύστημα όπου δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ύλης και ενέργειας. Αποτέλεσμα των πιο πάνω είναι η συγκέντρωση του καταβυθιστικού παράγοντα να είναι μεγαλύτερη στη δεξαμενή από ότι στη σταγόνα και αυτό για ένα κλειστό σύστημα σημαίνει ότι για την αποκατάσταση της ισορροπίας απομακρύνεται νερό από το αραιό διάλυμα, δηλ. τη σταγόνα, και μετατοπίζεται προς τη δεξαμενή ωςότου η τάση ατμών της σταγόνας και της δεξαμενής να εξισωθούν. Η απομάκρυνση νερού, όμως, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των συστατικών της σταγόνας. Όταν η συγκέντρωση του καταβυθιστικού και της πρωτεΐνης φτάσει στην βέλτιστη τιμή τότε η πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται.

Για να κρυσταλλωθεί η EDN, αρχικά συμπυκνώθηκε σε συγκέντρωση 5 mg/mL χρησιμοποιώντας συσκευές φυγοκεντρικού φίλτρου με όρια μοριακού βάρους 3000 (3000 cut off). Αυτό συμβαίνει διότι, προκειμένου να δημιουργηθούν κρύσταλλοι, η συγκέντρωση της EDN στη σταγόνα πρέπει να είναι τουλάχιστον 2,5 mg/ml.

Επιπλέον, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα εξισορρόπησης, το οποίο αποτελούνταν από:

- 0,1 M κακοδυλικού νατρίου (Sodium Cacodylate), pH 6,5
- 1,5 M οξικού νατρίου (Sodium Acetate)

Στη δεξαμενή τοποθετούνται 700 μL διαλύματος εξισορρόπησης και στην καλυπτρίδα αναμιγνύονται 1,5 μL από το διάλυμα εξισορρόπησης με 1,5 μL από το διάλυμα της EDN η οποία είναι διαλυτοποιημένη σε υπερκάθαρο νερό. Οι καλυπτρίδες εφαρμόζονται και σφραγίζονται πάνω από τις δεξαμενές. Μετά το πέρας 4-7 ημερών γίνεται ορατό αν έχουν σχηματιστεί ή όχι κρύσταλλοι.



Εικόνα 20: Η τεχνική hanging drop.

2.15 Κινητική μελέτη της EDN

2.15.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος ανά 1 λεπτό κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Οι μονάδες της ειδικής δραστηριότητας είναι $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$. Η ειδική δραστηριότητα εκφράζει όχι μόνο τη δραστηριότητα, αλλά και την ποσότητα του εξεταζόμενου ενζύμου. (Γεωργάτσος Ι.Γ. *et al*, 2001)

2.15.2. Περιγραφή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης, ακολουθήθηκε μια μέθοδος κατακρήμνισης με υπόστρωμα tRNA, η οποία βασίστηκε στη μέθοδο του Anfinsen (1954), όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Slifman (1986).

Η αποικοδόμηση του RNA από την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη πραγματοποιείται, όπως ακριβώς και από την ριβονουκλεάση A, σε δύο στάδια, το στάδιο της τρανσφωσφορυλίωσης και το στάδιο της υδρόλυσης του κυκλικού ενδιάμεσου. Το στάδιο της τρανσφωσφορυλίωσης πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ταχύτητα από την υδρόλυση, η ταχύτητα της οποίας ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν έχουν συνήθως τον ίδιο συντελεστή μοριακής απορρόφησης, ενώ το κυκλικό ενδιάμεσο εμφανίζει

μικρότερη απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος. Η ταχύτητα της υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 260 nm από τη μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε μήκος κύματος που εμφανίζει τη μέγιστη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ του υποστρώματος και του κυκλικού ενδιάμεσου.

2.15.3. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο του Anfinsen (1954), όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Slifman (1986). Ο προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (tRNA). Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αυτό είναι: 2μM, 3μM, 4μM, 5μM και 6μM. Επιπλέον, απαιτείται η παρασκευή ενός ρυθμιστικού διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υπόστρωμα (tRNA), ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 60 μM. Το διάλυμα χρήσης περιέχει τα εξής αντιδραστήρια:

- ✓ 0,05 M NaH_2PO_4 με pH 7,4.

Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

Αφού διαλυθεί το tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 300 μL, ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται αμέσως μόλις προστεθεί το ένζυμο. Η EDN αραιώνεται σε υπερκάθαρο νερό (MilliQ H_2O), ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκέντρωσης 60 nM. Η αντίδραση σταματά μετά από 5 min, αναμιγνύοντας 300 μL από το διάλυμα αντίδρασης με 300 μL διαλύματος τερματισμού (*stop buffer*), το οποίο συμβάλλει στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA και αποτελείται από:

- ✓ 40 mM Lanthanum Nitrate και
- ✓ 6% Perchloric acid.

Το πείραμα πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 30 °C σε pH 7,4. Γι' αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα χρήσης μαζί με το υπόστρωμα επωάζονται για 10 min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν, προστίθεται το ένζυμο σε τελική συγκέντρωση 10 nM, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά τον

τερματισμό της αντίδρασης, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 15 min και κατόπιν φυγοκεντρώνονται στις 13700 rpm, για 15 min, στους 4 °C, προκειμένου να καθιζάνει το μη υδρολυμένο υπόστρωμα. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του υδρολυμένου tRNA που παράγεται, παραλαμβάνονται 500 µL υπερκειμένου και καταγράφεται η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm (A_{260}). Για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους (κυψελίδα χαλαζία διαδρομής 1 cm) και πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό), το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα, με το οποίο μηδενίζουμε την τιμή της απορρόφησης. Επιπλέον, εκτός από το διάλυμα αναφοράς (tRNA=0), παρασκευάζεται και ένα διάλυμα για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος, το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο, και αφαιρούνται οι απορροφήσεις αυτών των διαλυμάτων από αυτές των δειγμάτων, έτσι ώστε να αφαιρείται η τιμή του ενδογενώς υδρολυμένου tRNA. Τα διαλύματα αυτά αποτελούν τα τυφλά (blank) (Anfinsen C. B et al, 1954; Slifman N. R., et al, 1986).

Τέλος, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit. Παρακάτω δίνονται οι πίνακες με τις σχετικές ποσότητες των τυφλών (πίνακας 4) και των διαλυμάτων (πίνακας 5) που κατασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της K_m .

Πίνακας 4: Ποσότητες των τυφλών διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της K_m της EDN.

ΤΥΦΛΑ t=5min T=30 °C						
tRNA	0 µM	2 µM	3 µM	4 µM	5 µM	6 µM
Reaction buffer	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
tRNA (60 µM)	0 µL	10 µL	15 µL	20 µL	25 µL	30 µL
ddH ₂ O	150 µL	140 µL	135 µL	130 µL	125 µL	120 µL
STOP buffer	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
ABS ₂₆₀						

Πίνακας 5: Ποσότητες των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της K_m της EDN.

EDN 10nM t=5 min T=30 °C					
tRNA	2μM	3μM	4μM	5μM	6μM
Reaction buffer	150 μL	150 μL	150 μL	150 μL	150 μL
tRNA (60 μM)	10 μL	15 μL	20 μL	25 μL	30 μL
ddH ₂ O	140 μL	135 μL	130 μL	125 μL	120 μL
EDN (60 nM)	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
STOP buffer	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL
ABS ₂₆₀					

2.15.4 Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης του tRNA και απελευθέρωσης μορίων κυτιδιλικού οξέος (CMP). Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή, σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα, η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου με ποικίλες συγκεντρώσεις αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} για συγκεκριμένη συγκέντρωση tRNA που βρίσκεται κοντά στην τιμή της K_m του ενζύμου. Αυτή είναι και η διαφορά της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας σε σχέση με αυτή για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_i .

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της IC_{50} είναι 6 μM. Ακολουθείται ακριβώς η ίδια πειραματική διαδικασία με αυτή για τον προσδιορισμό της K_m , με τη μόνη διαφορά ότι σε κάθε διάλυμα προστίθεται και διάλυμα αναστολέα διαφορετικής συγκέντρωσης, όπου ο αναστολέας είναι αρχικά διαλυτοποιημένος σε 100 % (v/v) DMSO. Μετά από τις αραιώσεις των μορίων αναστολέων είναι απαραίτητο να ελεγχθεί κινητικά ότι η υψηλότερη συγκέντρωση DMSO που περιέχεται στην αντίδραση δεν προκαλεί αναστολή της δράσης του ενζύμου.

Αρχικά, οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης του tRNA. Έπειτα, ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

2.15.5. Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό K_m και IC_{50}

➤ Υπολογισμός K_m

Αρχικά, έγιναν κινητικά πειράματα, εις τριπλούν, για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που επιλέχθηκε (2, 3, 4, 5, 6 μM). Για κάθε αντίδραση συλλέχθηκε ένα σύνολο σημείων, τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης. Για μικρό χρονικό διάστημα η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι, με τη χρήση του προγράμματος Grafit (GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK) προσδιορίστηκε η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία (Leatherbarrow R. J., 1998). Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό, ο οποίος μπορεί να μετατραπεί σε ταχύτητα αντίδρασης (ν , καταλυτικές μονάδες, 1/s) σύμφωνα με τον τύπο:

$$\nu(s^{-1}) = \frac{\text{Slope}(min^{-1}cm^{-1})}{\epsilon(M^{-1}cm^{-1})60(sec)[EDN](M)}$$

όπου, Slope: η κλίση της ευθείας,

ϵ : συντελεστής απορρόφησης,

λ : μήκος κύματος (278 nm) ,

[EDN] : η συγκέντρωση του ενζύμου.

Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της K_m και της V_{max} . Οι τιμές των ταχυτήτων (ν) της αντίδρασης και το τυπικό τους σφάλμα (σ^2) υπολογίζονται εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (nonlinear regression) και θεωρώντας ότι η κάθε πειραματική τιμή εμπεριέχει τυχαίο σφάλμα, δηλαδή η τυπική απόκλιση (σ^2) είναι σταθερή ("simple weighting").

Εφόσον η αντίδραση πραγματοποιείται σε έναν μόνο χρόνο, η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας της EDN είναι η εξής:

$$Sp. activity = \frac{(OD - Blank)}{516.4 \times 10^{-8} \times 5} \mu moles \text{ CMP} / \text{min} * M \text{ ενζύμου}$$

όπου 516,4: είναι ο συντελεστής απορρόφησης του tRNA

10^{-8} : η συγκέντρωση του ενζύμου (M)

5: ο χρόνος της αντίδρασης, 5 min

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} , καθώς και για την εξαγωγή των διαγραμμάτων Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk, το πρόγραμμα επεξεργάζεται τις τιμές των ταχυτήτων για όλες τις συγκεντρώσεις υποστρώματος που προέκυψαν από την παραπάνω εξίσωση εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση των δεδομένων και των τυπικών αποκλίσεων τους («proportional weighting»). Ο υπολογισμός των τιμών K_m και V_{max} γίνεται με βάση την εξίσωση των Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$$

Η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί από υπόστρωμα. Οι τιμές των K_m των ενζύμων ποικίλουν. Για τα περισσότερα ένζυμα, η K_m έχει τιμές μεταξύ 10^{-1} και 10^{-7} M. Η τιμή K_m για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

➤ Υπολογισμός IC_{50}

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και

θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simple weighting').

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{s.a._{\text{control}} - s.a._i}{s.a._{\text{control}}} \times 100\%$$

όπου: $s.a._{\text{control}}$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

$s.a._i$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Η τιμή IC_{50} υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s}$$

όπου s : η κλίση της ευθείας

Στην εξίσωση θεωρείται ότι η παράμετρος y μειώνεται όσο η x αυξάνει.

Η μέτρηση της IC_{50} γίνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια, εφόσον έχει μετρηθεί εκατέρωθεν της τιμής της η δραστηριότητα παρουσία τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεων αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα $\% \text{αναστολή} = f([I])$. Από την τιμή της IC_{50} προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία, όμως, ενός αναστολέα βάσει του τύπου:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου [S] η συγκέντρωση του υποστρώματος.

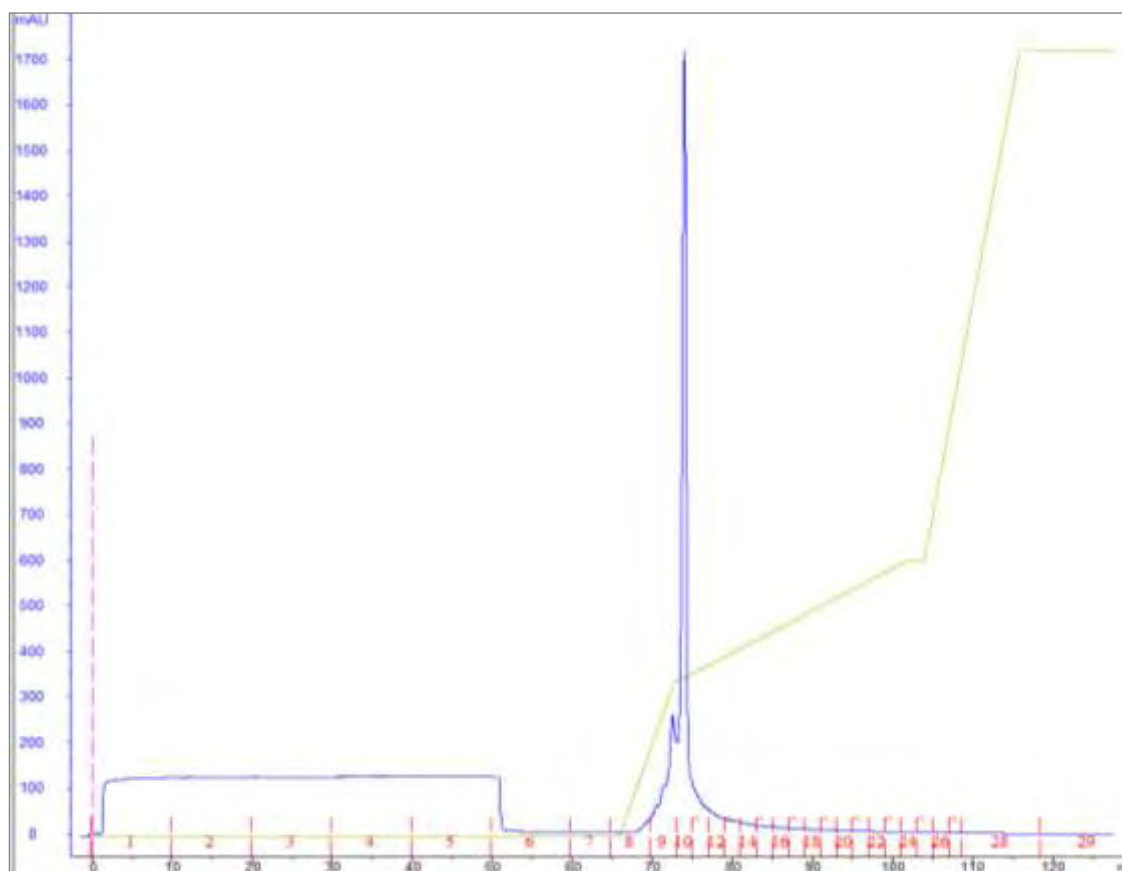
Εν συνεχεία, γίνεται μετατροπή της τιμής IC_{50} σε K_i σύμφωνα με τον τύπο:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{(S / Km + 1)}$$

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Χρωματογραφικός προσδιορισμός της EDN με στήλη ιοντοανταλλαγής

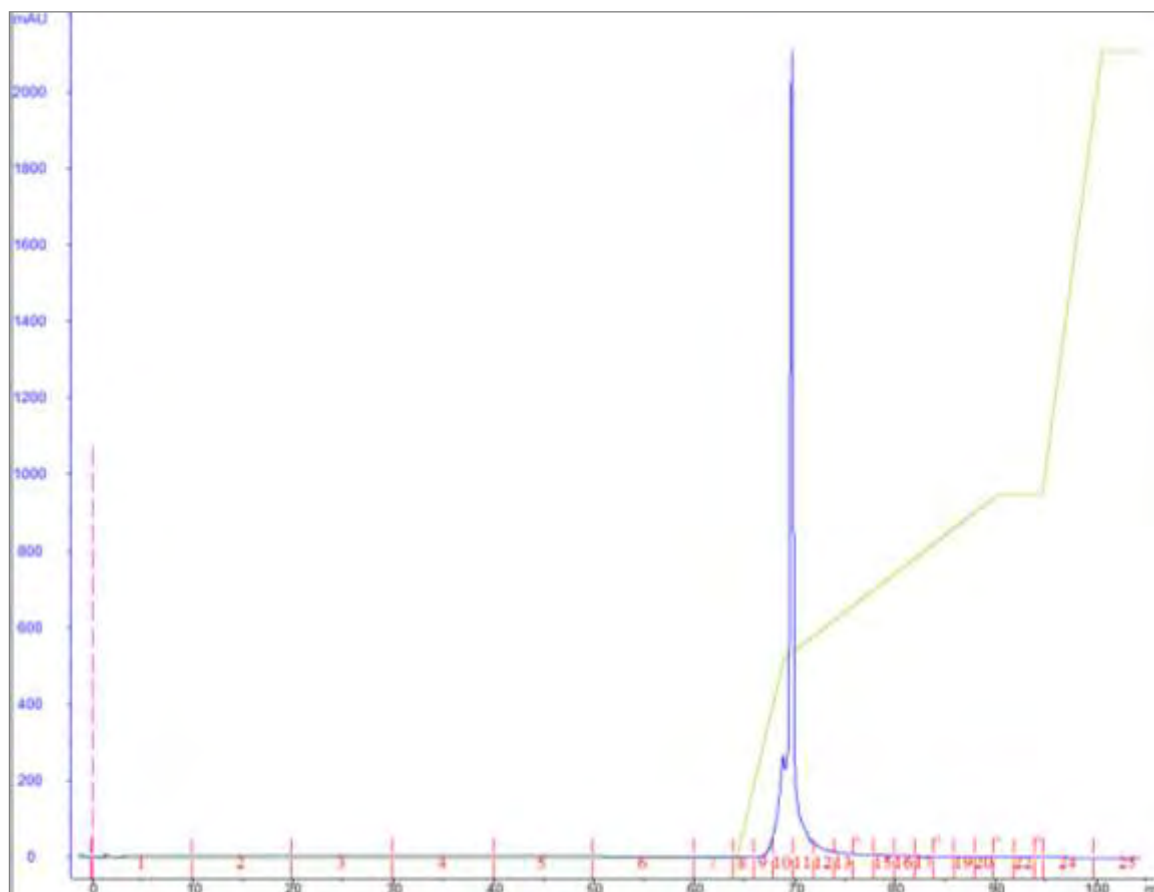
Το διάλυμα της πρωτεΐνης που προέκυψε μετά τη διαδικασία της συμπύκνωσης, φορτώθηκε σε στήλη Resource S έπειτα από την εξισορρόπησή της με 5 όγκους στήλης, με ρυθμιστικό διάλυμα 0,15 M Sodium acetate, pH=5. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έκπλυσή της με το ίδιο διάλυμα μέχρι τη στιγμή μη ανιχνεύσιμης απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών γίνεται με γραμμική διαβάθμιση από το δ/μα Α στο δ/μα Β σύμφωνα με τα εξής βήματα: 15 όγκοι στήλης 100 % διαλύματος Α, 7 όγκοι στήλης 20 % διαλύματος Β, 40 όγκοι στήλης 35 % διαλύματος Β και 12 όγκοι στήλης 100 % διαλύματος Β. Η ταχύτητα ροής σε όλα τα στάδια ήταν 1 mL/ λεπτό (**Εικόνα 21**).



Εικόνα 21: Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S. Η έκλουση έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης του διαλύματος Β (πράσινη γραμμή στο γράφημα). Με μπλε γραμμή φαίνεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

Συλλέχθηκαν 6 κλάσματα (8-15) των 2 mL, τα οποία εμφάνισαν την κορυφή στο 35 % του διαλύματος B.

Τα κλάσματα, στα οποία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm, συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και καθαρίστηκαν περαιτέρω μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, με την ίδια στήλη. Η εξισορρόπηση και η έκπλυση έγιναν και πάλι με 5 όγκους στήλης διαλύματος A, ενώ η έκλουση με τα εξής βήματα: 10 όγκοι στήλης 100 % διαλύματος A, 5 όγκοι στήλης 25 % διαλύματος B, 20 όγκοι στήλης 45 % διαλύματος B και 5 όγκοι στήλης 100 % διαλύματος B (**Εικόνα 22**).

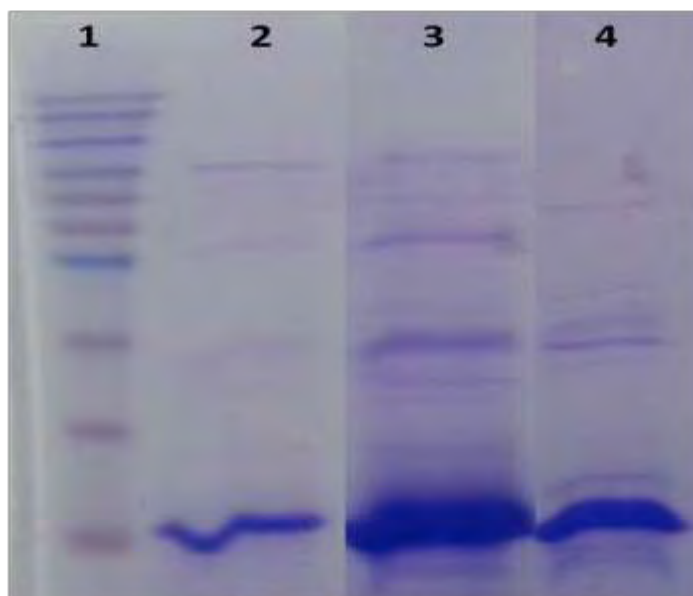


Εικόνα 22: Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S για 2^η φορά. Η έκλουση έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης του διαλύματος B (πράσινη γραμμή στο γράφημα). Με μπλε γραμμή φαίνεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

Στη δεύτερη φορά, η κορυφή εμφανίστηκε στα κλάσματα (9-12) στο 24,8 % του διαλύματος B.

3.2. Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων

Πραγματοποιήθηκε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ακολούθησε χρώση της πηκτής αυτής με Coomassie Brilliant Blue Staining (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 23: Πήκτωμα 10% SDS πολυακρυλαμιδίου, μετά από χρώση με Coomassie brilliant blue R-250. Στη διαδρομή 1 παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας με την τελευταία μπάντα να αντιστοιχεί στα 15 kDa. Η διαδρομή 2 αντιστοιχεί στο ολικό δείγμα πρωτεϊνών, η διαδρομή 3 στο πρωτεϊνικό κλάσμα μετά την 1^η στήλη Resource S και η διαδρομή 4 στο πρωτεϊνικό κλάσμα μετά τη 2^η στήλη. Η EDN φαίνεται στα 18,4kDa.

3.3. Απόδοση καθαρισμού

Η EDN που προέκυψε μετά τον καθαρισμό ήταν 1,5 mg / 1,5 L βακτηριακής καλλιέργειας. Ακολούθησε διαπίδυση του πρωτεϊνικού δείγματος σε υπερκάθαρο νερό και μέρος της ποσότητας αυτής συμπυκνώθηκε σε συγκέντρωση 5 mg/mL για τη διαδικασία των κρυσταλλώσεων. Η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη μοιράστηκε σε κλάσματα των 20 μ L και μετά από άμεση ψύξη σε υγρό άζωτο αποθηκεύτηκε στους -80 °C. Τουπόλοιπο πρωτεϊνικό δείγμα αραιώθηκε κατά 50 % γλυκερόλη και αποθηκεύτηκε στους -20 °C για κινητικές μελέτες.

3.4. Κρυστάλλωση

Οι κρύσταλλοι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης σχηματίστηκαν με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας. Οι κρύσταλλοι εμφανίστηκαν μετά από 3 - 4 μέρες στους 16 °C και σε κάθε σταγόνα αναπτύχθηκαν 1-2 κρύσταλλοι ικανοποιητικού μεγέθους (**Εικόνα 24**).



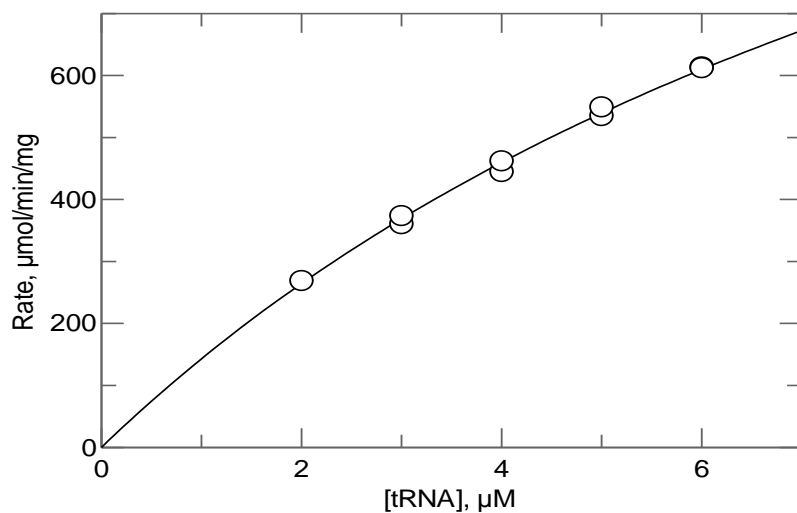
Εικόνα 24: Κρύσταλλος της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.

3.5. Κινητικά αποτελέσματα

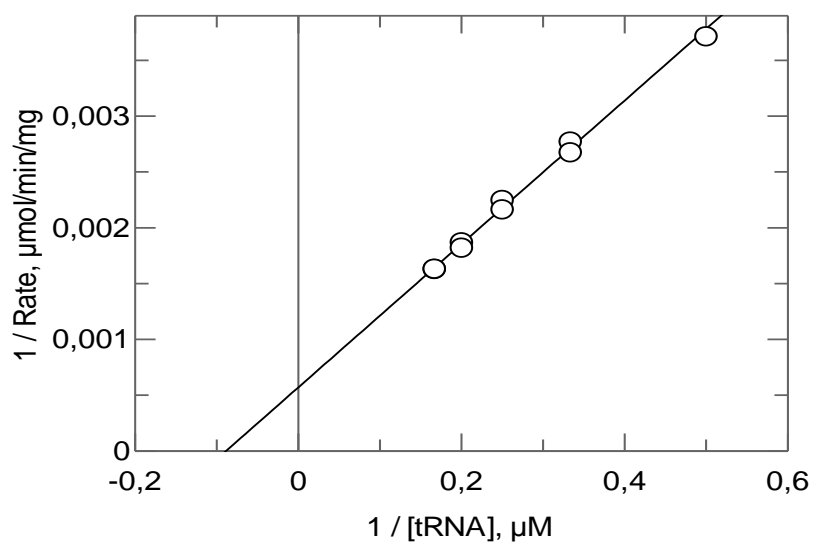
Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης (**Εικόνες 25, 26**) παρασκευάστηκαν με βάση το πρωτόκολλο που δίνεται στην αντίστοιχη υποενότητα του πειραματικού τμήματος. Μετά από επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Graffit βρέθηκε πως τα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου είναι τα ακόλουθα:

$$K_m = 11,29 \pm 1.16 \mu\text{M} \text{ και}$$

$$V_{max} = 1757, 22 \pm 132.42 \mu\text{mol CMP/mg/min.}$$



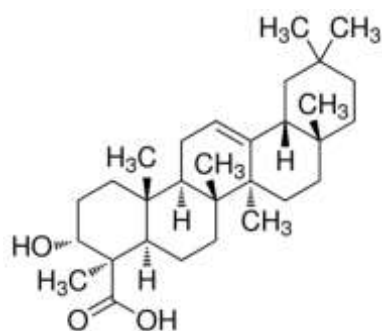
Εικόνα 25: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της EDN σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 μM). Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.



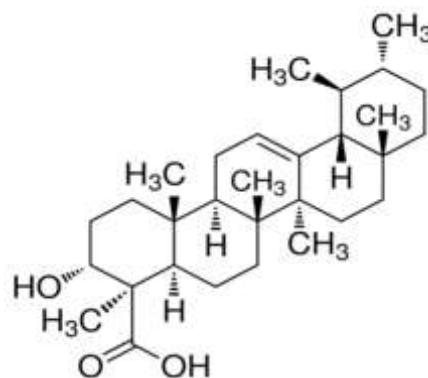
Εικόνα 26: Το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

Προκειμένου να εξετάσουμε την ανασταλτική τους ισχύ στην EDN, σαρώσαμε σε πρώτη φάση μια σειρά τριτερπενικών ουσιών (**Πίνακας 6**) και έπειτα από αυτά διαλέξαμε τα τριτερπένια που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ανασταλτική ισχύ για να προχωρήσουμε σε υπολογισμό της IC_{50} . Τα τριτερπένια αυτά ήταν τέσσερα: TFC0-010 (a-Boswellic acid), TFC0-011 (b-Boswellic acid), TFC0-012 (a-acetylboswellic acid) και TFC0-013 (b-acetylboswellic acid). Η δομή αυτών των τεσσάρων τριτερπενίων είναι η εξής:

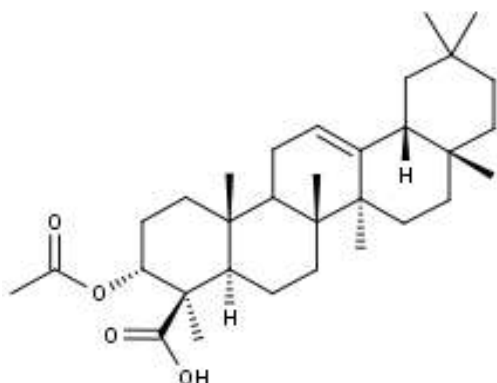
TFC0-010



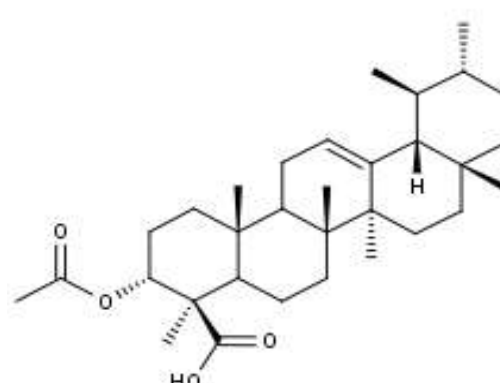
TFC0-011



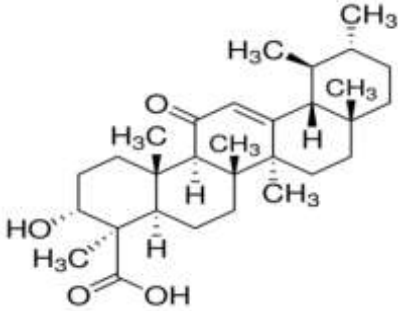
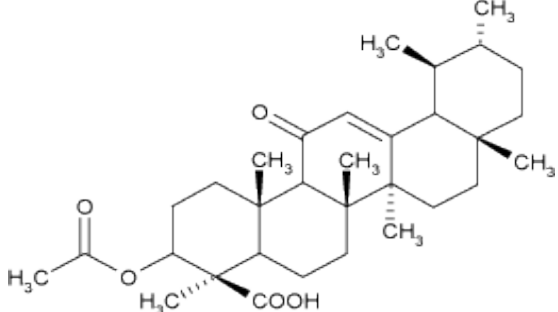
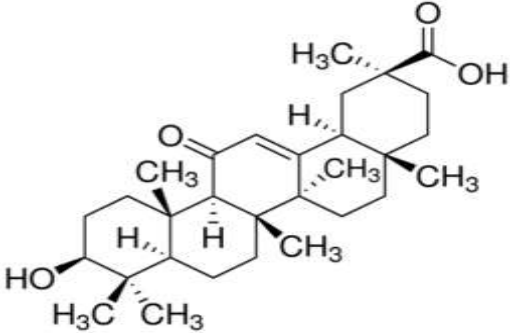
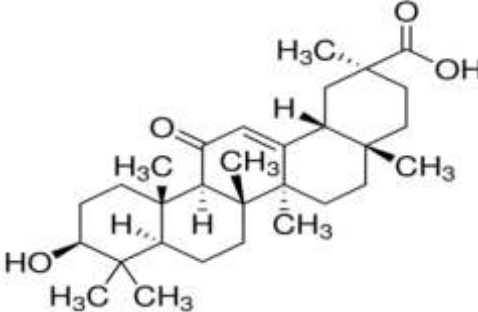
TFC0-012

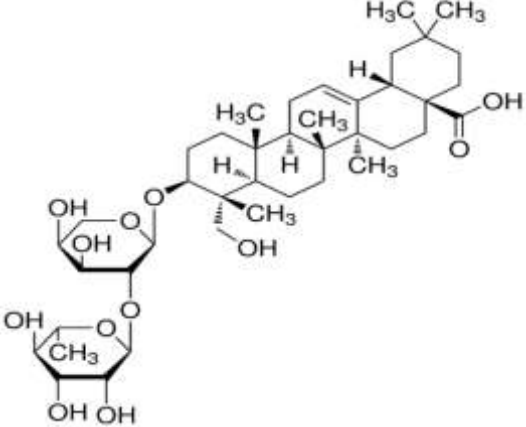
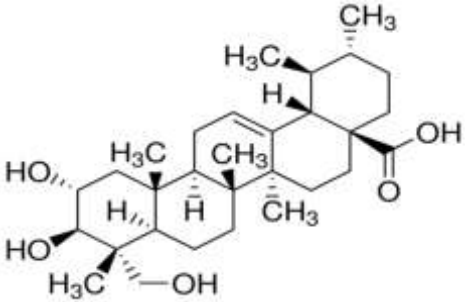
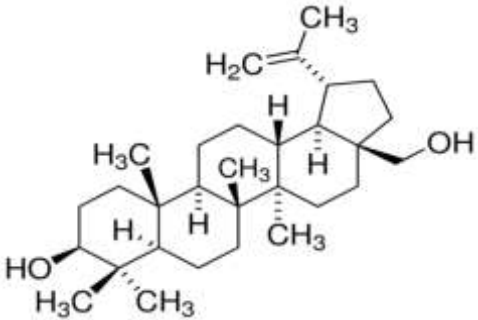
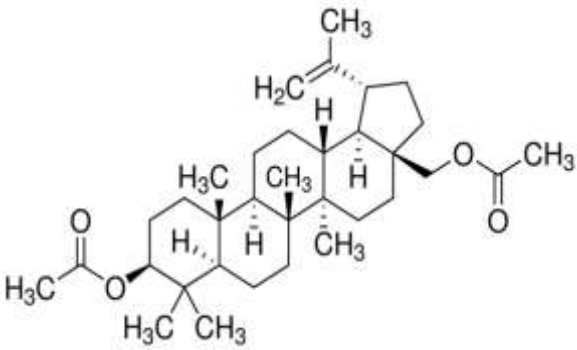


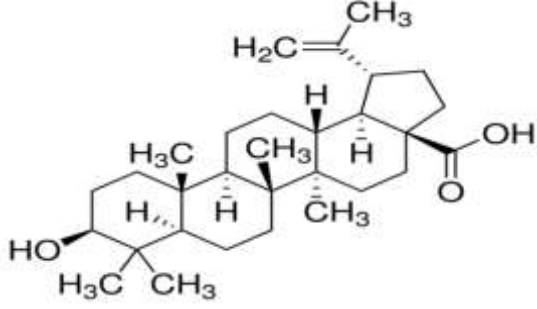
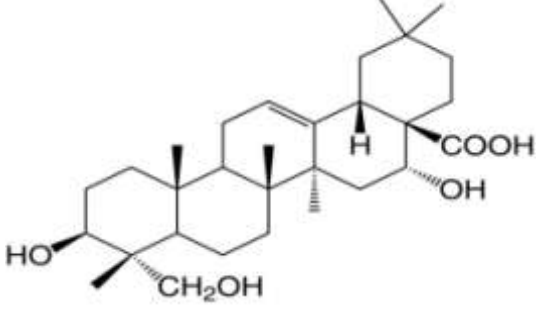
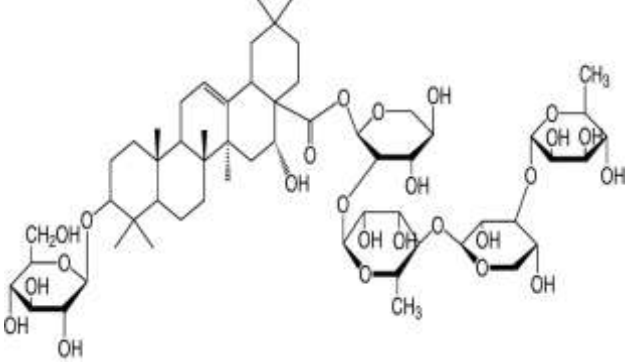
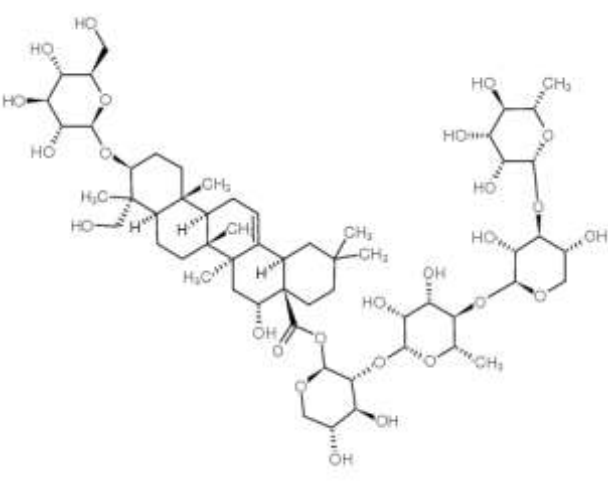
TFC0-013

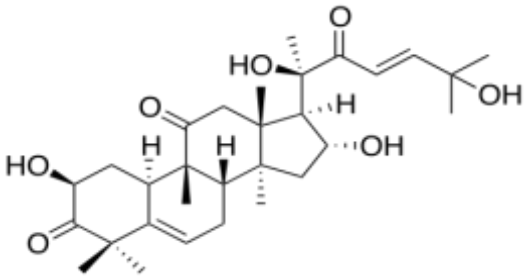
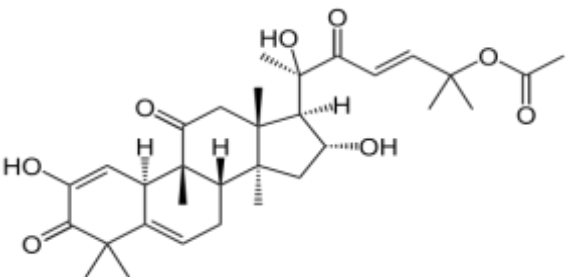
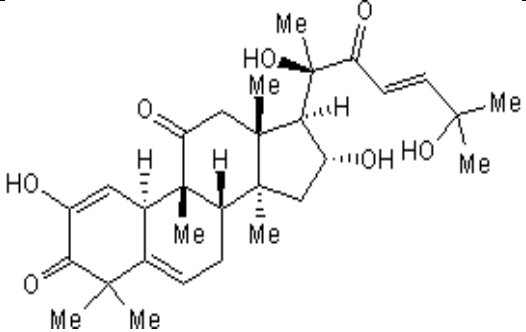
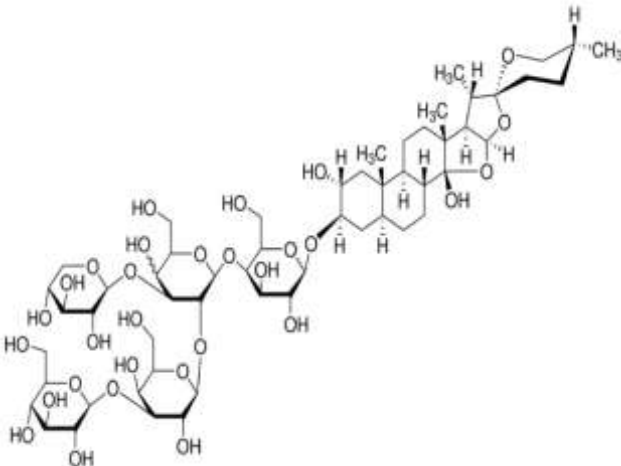
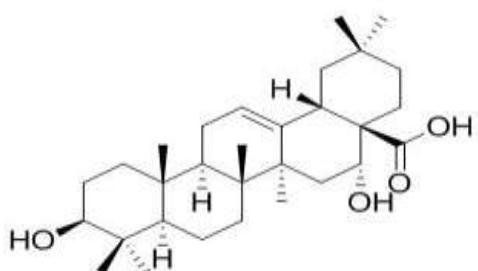


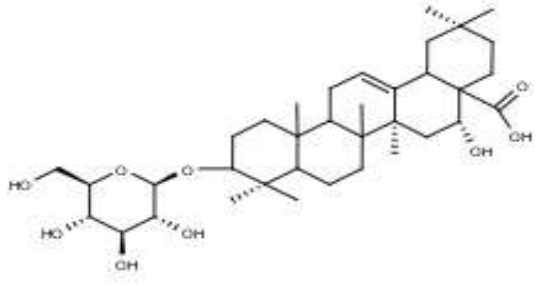
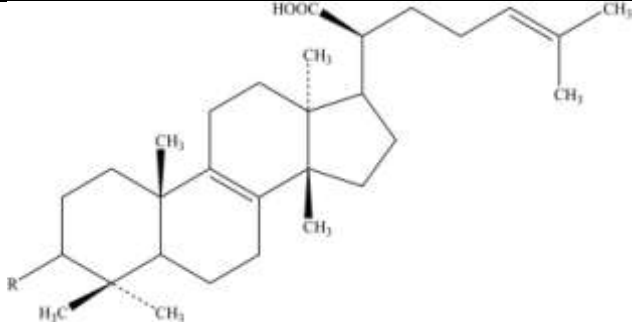
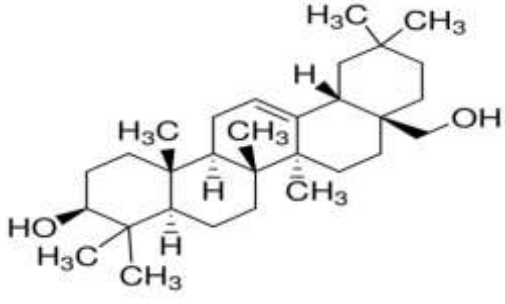
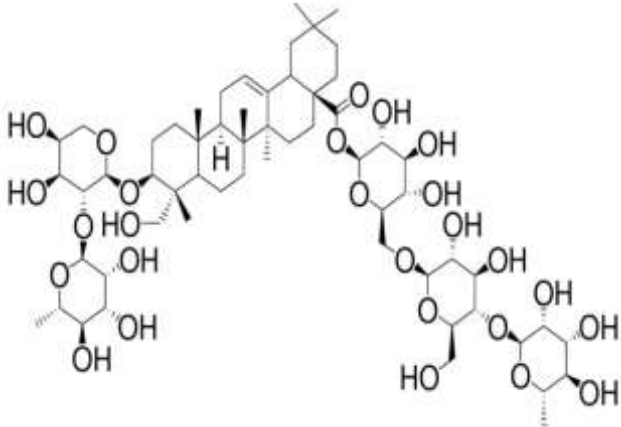
Πίνακας 6: Οι τριτερπενικές ουσίες που αξιολογήθηκαν ως πιθανοί αναστολείς της EDN, η δομή τους και η % αναστολή στην EDN.

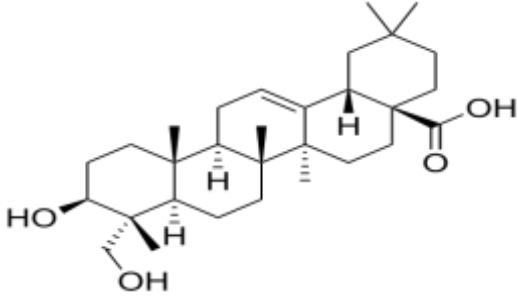
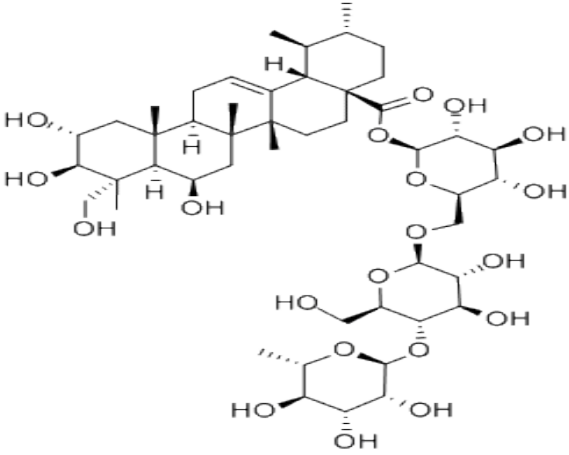
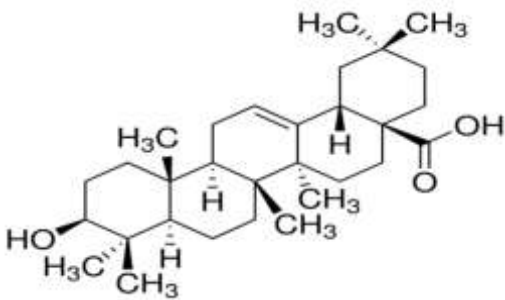
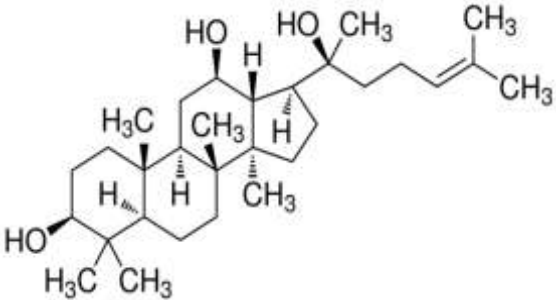
ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ	ΔΟΜΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ (%)
TFC0-001 11-ketobeta Boswellic acid	 <p>The structure shows a pentacyclic triterpene core with a ketone group at C-11, a hydroxyl group at C-13, and a carboxylic acid group at C-28. Methyl groups are present at C-1, C-2, C-3, C-4, C-14, C-15, and C-16.</p>	1μM: 0% 10μM: 0%
TFC0-002 3-O-Acetyl-11- ketobeta Boswellic acid	 <p>The structure is similar to 11-ketobeta-Boswellic acid but features an acetyl group at C-3 and a carboxylic acid group at C-28. Methyl groups are present at C-1, C-2, C-4, C-14, C-15, and C-16.</p>	1μM: 0% 10μM: 0%
TFC0-003 18a-Glycyrrhetic acid	 <p>The structure shows a pentacyclic triterpene core with a hydroxyl group at C-13, a carboxylic acid group at C-28, and methyl groups at C-1, C-2, C-3, C-4, C-14, C-15, and C-16.</p>	10μM: 0%
TFC0-004 18b- Glycyrrhetic acid	 <p>The structure is similar to 18a-Glycyrrhetic acid but has a different stereochemistry at C-13, with a hydroxyl group pointing down. Methyl groups are present at C-1, C-2, C-3, C-4, C-14, C-15, and C-16.</p>	10μM: 0%

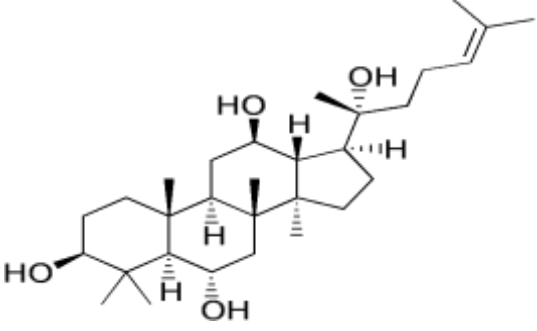
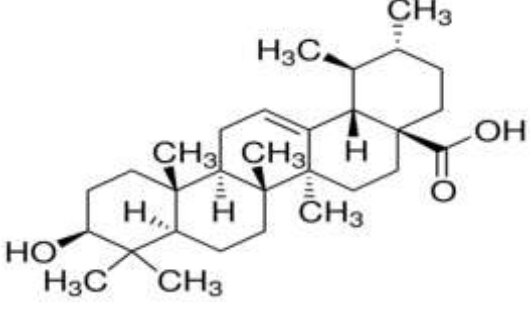
<p>TFC0-008</p> <p>α-Hederin</p>		<p>10μM: 0%</p>
<p>TFC0-009</p> <p>Asiatic acid</p>		<p>10μM: 0%</p>
<p>TFC0-014</p> <p>Betulin</p>		<p>10μM: 7,76%</p>
<p>TFC0-015</p> <p>Betulin diacetate</p>		<p>10μM: 0%</p>

<p>TFCO-016</p> <p>Betulinic acid</p>		<p>1μM: 0%</p> <p>10μM: 10%</p>
<p>TFCO-017</p> <p>Caulophyllogenin</p>		<p>1μM: 0%</p> <p>10μM: 21,69%</p>
<p>TFCO-018</p> <p>Chrysanthellin A</p>		<p>10μM: 0%</p>
<p>TFCO-019</p> <p>Chrysanthellin B</p>		<p>10μM: 0%</p>

<p>TFC0-020</p> <p>Cucurbitacin D</p>	 <p>The structure of Cucurbitacin D is a complex pentacyclic triterpene. It features a pentacyclic core with a decalin-like system fused to a five-membered ring. The structure is highly substituted with multiple hydroxyl groups (HO) and a complex side chain containing a ketone group (C=O) and a terminal hydroxyl group (OH).</p>	<p>10μM: 0%</p>
<p>TFC0-021</p> <p>Cucurbitacin E</p>	 <p>The structure of Cucurbitacin E is similar to Cucurbitacin D but features a different side chain. It has a pentacyclic core with a decalin-like system and a side chain that includes a ketone group (C=O) and an acetate ester group (O-C(=O)-CH₃).</p>	<p>10μM: 0%</p>
<p>TFC0-022</p> <p>Cucurbitacin I</p>	 <p>The structure of Cucurbitacin I is a pentacyclic triterpene with a decalin-like core. It is heavily substituted with methyl groups (Me) and hydroxyl groups (HO). The side chain is complex, containing a ketone group (C=O) and multiple methyl and hydroxyl substituents.</p>	<p>10μM: 0%</p>
<p>TFC0-025</p> <p>Digitonin</p>	 <p>The structure of Digitonin is a complex pentacyclic triterpene with a decalin-like core. It is highly substituted with multiple hydroxyl groups (HO) and a complex side chain that includes a ketone group (C=O) and a methyl group (CH₃). The structure is highly branched and complex.</p>	<p>1μM: 0%</p> <p>10μM: 3,87%</p>
<p>TFC0-026</p> <p>Echinocystic acid</p>	 <p>The structure of Echinocystic acid is a pentacyclic triterpene with a decalin-like core. It is substituted with multiple hydroxyl groups (HO) and a complex side chain that includes a ketone group (C=O) and a methyl group (CH₃).</p>	<p>10μM: 0%</p>

<p>TFCO-027</p> <p>Echinocystic acid 3-O-glycoside</p>		<p>10μM: 0%</p>
<p>TFCO-028</p> <p>Elemolic acid</p>		<p>10μM: 0%</p>
<p>TFCO-029</p> <p>Erythrodiol</p>		<p>10μM: 0%</p>
<p>TFCO-031</p> <p>Hederacoside C</p>		<p>10μM: 0%</p>

<p>TFC0-032</p> <p>Hederagenin</p>		<p>10μM:18,89%</p>
<p>TFC0-037</p> <p>Madecassoside</p>		<p>10μM:4,37%</p>
<p>TFC0038</p> <p>Oleanolic acid</p>		<p>1μM: 0%</p> <p>10μM: 0%</p>
<p>TFC0-039</p> <p>Protopanaxadiol</p>		<p>10μM:10,74%</p>

<p>TFCO-040</p> <p>Protopanaxatriol</p>		<p>10μM: 9,54%</p>
<p>TFCO-041</p> <p>Ursolic acid</p>		<p>1μM: 0%</p> <p>10μM: 0%</p>

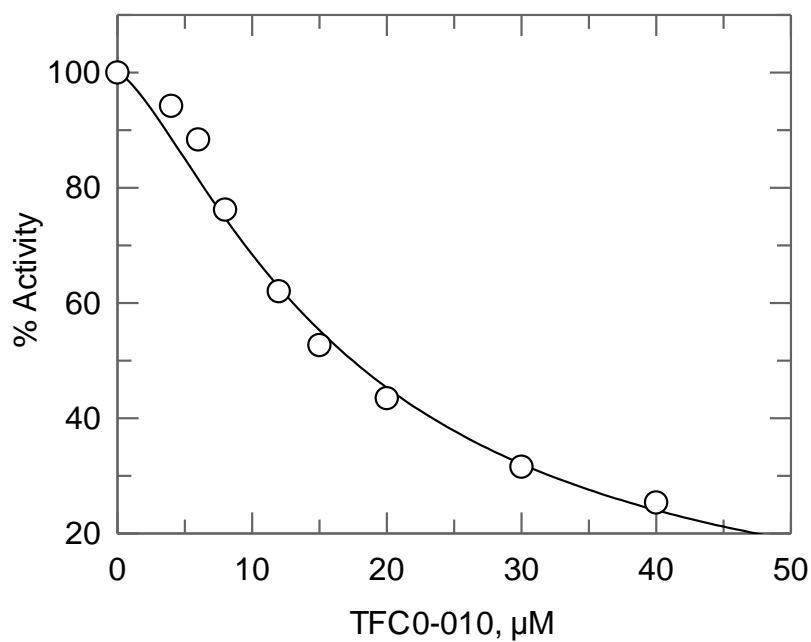
Για τη μελέτη της αναστολής της EDN από τις ενώσεις **TFCO-010**, **TFCO-011**, **TFCO-012** και **TFCO-013**, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέων και συγκέντρωση υποστρώματος **6μM**. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο σχετικό εδάφιο.

Ο υπολογισμός των IC_{50} των προαναφερθέντων αναστολέων έγινε μέσω του προγράμματος **Graffit**, ενώ η μετατροπή της τιμής της IC_{50} σε K_i σύμφωνα με τη

σχέση $K_i = \frac{IC_{50}}{(S / Km + 1)}$. Στις **Εικόνες 27, 28, 29 και 30**, δίνεται η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση του αναστολέα που χορηγείται κάθε φορά. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης, βάσει των διαγραμμάτων, παρατηρείται:

- ✓ στα **40 μM** χορηγούμενου **TFCO-010** αναστολέα,
- ✓ στα **50 μM** χορηγούμενου **TFCO-011** αναστολέα,
- ✓ στα **20 μM** χορηγούμενου **TFCO-012** αναστολέα και
- ✓ στα **100 μM** χορηγούμενου **TFCO-013** αναστολέα

TFC0-010

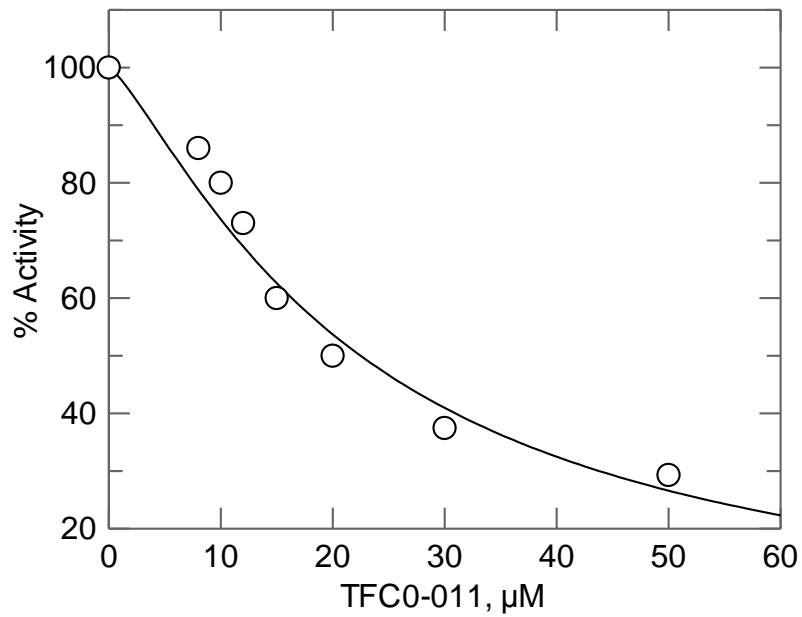


Εικόνα 27: Η επί της εκατό ενζυμική δραστικότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα. Η μικρότερη ενζυμική δραστικότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστικότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 40 μM χορηγούμενου TFC0-010 αναστολέα.

$IC_{50} = 17.45 \pm 0.55 \mu M$, (για συγκέντρωση υποστρώματος 6 μM)

$K_i = 11,39 \pm 1,44 \mu M$

TFC0-011

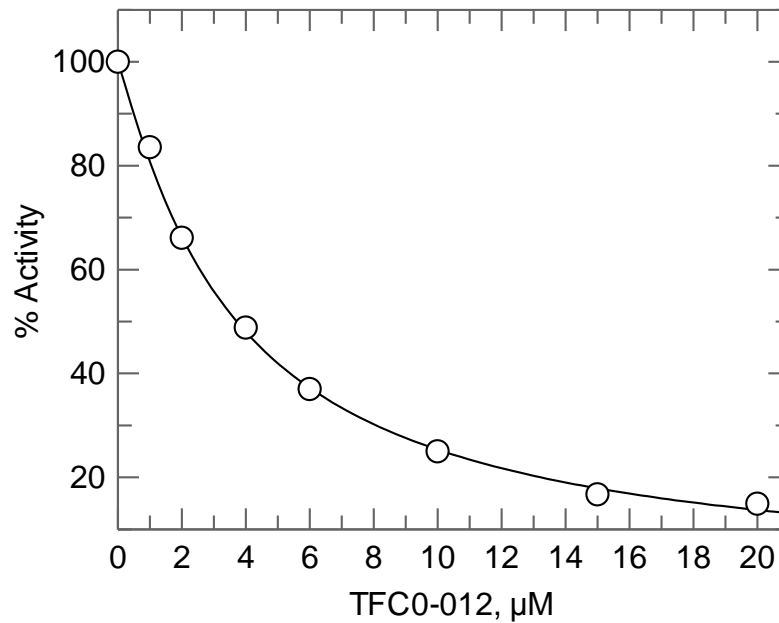


Εικόνα 28: Η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 50 μM χορηγούμενου TFC0-011 αναστολέα.

$IC_{50} = 22.48 \pm 1.29 \mu\text{M}$, (για συγκέντρωση υποστρώματος 6 μM)

$K_i = 14,68 \pm 1,99 \mu\text{M}$

TFC0-012

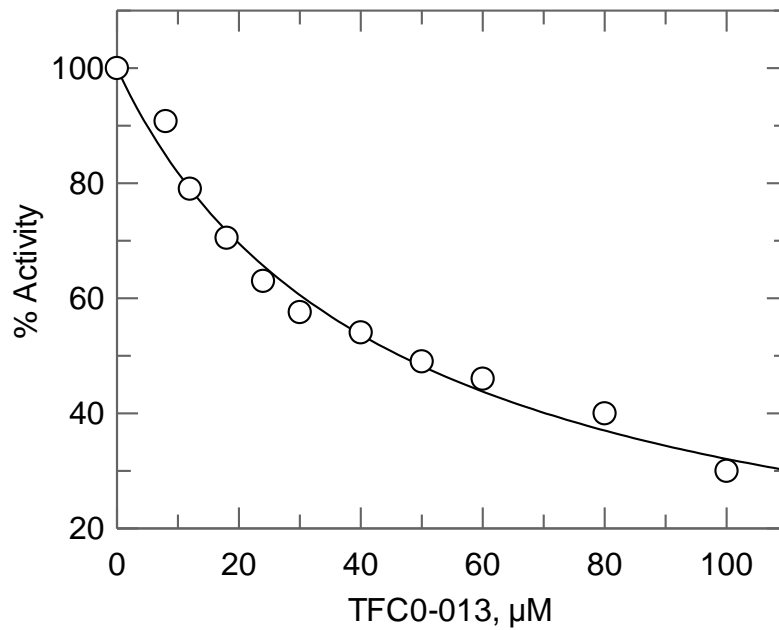


Εικόνα 29: Η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 20 μM χορηγούμενου TFC0-012 αναστολέα.

$IC_{50} = 3.72 \pm 0.17 \mu M$, (για συγκέντρωση υποστρώματος 6 μM)

$K_i = 2,43 \pm 0,32 \mu M$

TFC0-013



Εικόνα 30: Η επί της εκατό ενζυμική δραστικότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα. Η μικρότερη ενζυμική δραστικότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστικότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 100 μM χορηγούμενου TFC0-013 αναστολέα.

$IC_{50} = 46.44 \pm 1.69 \mu M$, (για συγκέντρωση υποστρώματος 6 μM)

$K_i = 30,32 \pm 3,88 \mu M$

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η EDN έχει προσελκύσει εδώ και αρκετά χρόνια το ενδιαφέρον πολυάριθμων ερευνητικών κέντρων εξαιτίας της νευροτοξικής της δράσης και της εμπλοκής της σε αλλεργικές παθήσεις, καθώς και σε φλεγμονές που σχετίζονται με τα ηωσινόφιλα. Έτσι, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για σχεδιασμό μορίων με ανασταλτική δράση, που θα μπορούσαν να περιορίσουν τις παθολογίες που προκαλεί η EDN. Έως σήμερα, έχουν διεξαχθεί μελέτες αναστολής της EDN βάσει δεδομένων από παλαιότερες μελέτες για την ριβονουκλεάση A και οι υπό εξέταση, χημικώς συντεθειμένες ουσίες βρέθηκαν να είναι μέτριοι αναστολείς της EDN. Τα αποτελέσματα αυτά έθεσαν τη βάση για την αναζήτηση φυσικών μορίων, που θα μπορούσαν να εμφανίζουν ανασταλτική δράση στην EDN.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μετά από κινητικές μελέτες βρέθηκε ότι τα χαρακτηριστικά της EDN είναι: $K_m = 11,29 \pm 1.16 \mu\text{M}$ και $V_{max} = 1757,22 \pm 132.42 \mu\text{mol CMP/mg/min}$. Έπειτα, εξετάστηκε η ικανότητα αναστολής της EDN από μια σειρά τριάντα ένα τριτερπενίων και τελικά προχωρήσαμε σε υπολογισμό των τιμών IC_{50} των τριτερπενίων a-Boswellic acid (TFCO-010), b-Boswellic acid (TFCO-011), a-acetylboswellic acid (TFCO-012) και b-acetylboswellic acid (TFCO-013), που εμφάνισαν και τη μεγαλύτερη ανασταλτική ισχύ σε πρώτη φάση.

Τα τριτερπένια είναι οργανικές ενώσεις με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες το καθένα, που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, και επιλέχθηκαν, διότι αποτελούν μια κατηγορία φυσικών μορίων που εμφανίζουν ποικίλες, σημαντικές δράσεις. Παρατηρούμε ότι και τα τέσσερα τριτερπένια, των οποίων προσδιορίστηκαν οι τιμές IC_{50} , ανήκουν στην οικογένεια των οξέων Boswellic. Τα οξέα Boswellic είναι οργανικά οξέα που συγκροτούνται από ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο, μια καρβοξυλική ομάδα και τουλάχιστον μία επιπλέον λειτουργική ομάδα. Προέρχονται από τα φυτά του γένους *Boswellia* και εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, κυτταροτοξικές δράσεις, καθώς επίσης διαθέτουν ανοσορρυθμιστικό ρόλο. Επιπλέον, το εκχύλισμα από τη ρετσίνη του φυτού *Boswellia serrata* είναι ένα από τα κύρια φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του άσθματος σε επίπεδο κλινικών δοκιμών,

αφού μειώνει σημαντικά τις επιπτώσεις της ασθένειας και πιο συγκεκριμένα εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση. Οι ουσίες αυτές είναι αντιγλυκοζυλιωτικοί παράγοντες, γι' αυτό και θα μπορούσαν να ωφελούν στην παρεμπόδιση ή/και στην θεραπεία των ασθενειών που σχετίζονται με τη γλυκοζυλίωση, όπως στο σακχαρώδη διαβήτη και στη νόσο του Alzheimer. Τέλος, το b-Boswellic acid βελτιώνει τις παραμέτρους πήξης του πλάσματος, προστατεύει το ενδοθήλιο από αιμόσταση που προκαλείται από τραυματισμό και εμποδίζει την αιμόσταση που προκαλείται από δυσλειτουργία της αγγειοδιαστολής. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το 3-O-Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) (TFCO-002, Πίνακας 6), το τριτερπένιο που έχει μελετηθεί περισσότερο απ' όλα και εμφανίζει τις περισσότερες ίσως δράσεις, δεν ασκεί ανασταλτική δράση στην EDN.

Στα πειράματα που έλαβαν χώρα στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι σταθερές αναστολής K_i των τεσσάρων οξέων Boswellic βρέθηκαν να ισούνται με:

a-Boswellic acid: $K_i = 11,39 \pm 1,44 \mu\text{M}$

b-Boswellic acid: $K_i = 14,68 \pm 1,99 \mu\text{M}$

a-acetylboswellic acid: $K_i = 2,43 \pm 0,32 \mu\text{M}$

b-acetylboswellic acid: $K_i = 30,32 \pm 3,88 \mu\text{M}$

Παρατηρείται, λοιπόν, ότι η ανασταλτική δράση των οξέων Boswellic στην EDN ασκείται, κατά φθίνουσα σειρά ισχύος, από: το a-acetylboswellic acid, το a-Boswellic acid, το b-Boswellic acid και το b-acetylboswellic acid. Το a-acetylboswellic acid, που παρουσιάζει εξαιρετικά ισχυρή ανασταλτική δράση, διαθέτει μία επιπρόσθετη ακετυλομάδα και διαφέρει από το b-acetylboswellic acid, που εμφανίζει την λιγότερο ισχυρή ανασταλτική δράση μεταξύ των τεσσάρων οξέων Boswellic, μόνο στη δομή του τριτερπενικού του σκελετού. Ισχυρή ανασταλτική δράση εμφανίζουν τα a-Boswellic acid και b-Boswellic acid, τα οποία διαθέτουν μία επιπρόσθετη ομάδα υδροξυλίου και διαφέρουν μεταξύ τους, επίσης, μόνο στη δομή του τριτερπενίου. Και για τις τέσσερις αυτές τριτερπενικές ουσίες οι σταθερές αναστολής είναι της τάξεως των μM , γεγονός που πρακτικά σημαίνει ότι οι συγκεκριμένοι αναστολείς προκαλούν σημαντική μείωση της δραστηριότητας της EDN. Συγκριτικά με χημικά συνθετισμένους αναστολείς που έχουν μελετηθεί στην EDN, φαίνεται ότι προκαλούν σημαντικά μεγαλύτερη αναστολή της ενζυμικής της δράσης.

Η παρούσα μελέτη και τα αποτελέσματα της θα μπορούσαν να κατευθύνουν την έρευνα προς την χρήση φυσικών μορίων, προκειμένου να αναπτυχθούν αναστολείς ειδικοί για την EDN. Μελλοντικές έρευνες και δεδομένα ακτίνων-Χ, αναμένεται να δώσουν ακόμη περισσότερες πληροφορίες όσον αφορά τη δομική βάση του μηχανισμού αναστολής της EDN από τα μέλη της, πολυπληθούς και ιδιαίτερα σημαντικής από βιολογικής άποψης, οικογένειας των τριτερπενίων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abe, I., Rohmer, M., Prestwich, G.D. Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes. *Chem. Rev.* **93**, 2189-2206 (1993).
2. Ackerman, S.J., Liu, L., Kwatia, M.A., Savage, M.P., Leonidas, D.D., Swaminathan, G.J., Acharya, K.R. Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. *J Biol Chem.* **277(17)**, 14859-14868 (2002).
3. Ammon, H.P., Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomedicine* **17**, 862–867 (2010).
4. Anfinsen, C. B., Redfield, R. R., Choate, W. L., Page, J. & Carroll, W. R. Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem* **207**, 201-210 (1954).
5. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L, Βιοχημεία, Έκδοση 1^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2012)
6. Blanchard, C., Rothenberg, M. E., Biology of the Eosinophil. *Adv Immunol.* **101**, 81–121 (2009).
7. Blundell, T.L., Johnson, L.N. Protein crystallograpy. Academic Press (1976).
8. Chang, C., Newton, D.L., Rybak, S.M., Wlodawer, A. Crystallographic and Functional Studies of a Modified Form of Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN) with Novel Biological Activities. *Mol. Biol.* **317**, 119-130 (2002).
9. Chwalek, M., Lalun, N., Bobichon, H., Plé K., Voutquenne-Nazabadioko, L. Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1760 (9)**, 1418–1427 (2006).
10. Cuchillo, M.V., Nogués, C.M., Raines, R.T. Bovine Pancreatic Ribonuclease: 50 Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism. *Biochemistry* **50(37)**, 7835–7841 (2011).
11. Debierre-Grockiego, F., Desaint, C., Fuentes, V., Poussin, M., Socie, G., Azzouz, N., Schwarz R.T., Prin, L., Gouilleux-Gruart, V. Evidence for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored eosinophil-derived neurotoxin (EDN) on human granulocytes. *FEBS Lett* **537(1-3)**, 111-116 (2003)
12. Domachowske, J.B., Dyer, K.D., Bonville, C.A., Rosenberg, H.F. Recombinant Human Eosinophil-Derived Neurotoxin/Rnase 2 Functions as an Effective Antiviral Agent against Respiratory Syncytial Virus. *The Journal of Infectious Diseases* **177**, 1458–1464 (1998).
13. Durack, D.T., Ackerman, S.J., Loegering, D.A., Gleich, G.J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 5165–5169 (1981).

14. Fulkerson, P.C., Rothenberg, M.E. Targeting Eosinophils in Allergy, Inflammation and Beyond. *Nat Rev Drug Discov.* **12(2)**, 117-129 (2013).
15. Goto, T., Morioka, J., Inamura, H., Yano, M., Kodaira, K., Igarashi, Y., Abe, S., Kurosawa, M. Urinary Eosinophil-derived Neurotoxin Concentrations in Patients with Atopic Dermatitis: A Useful Clinical Marker for Disease Activity. *Allergol. Int.* **56 (4)**, 433-438 (2007).
16. Hamann, K.J., Ten, R.M., Loegering, D.A., Jenkins, R.B., Heise, M.R., Schad, C.R., Pease, L.R., Gleich, G.J., Barker, R.L. Structure and chromosome localization of the human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein genes: evidence for intronless coding sequences in the ribonuclease gene superfamily. *Genomics* **7**, 535–546 (1990).
17. Han, N., Bakovic, M. Biologically Active Triterpenoids and Their Cardioprotective and Anti- Inflammatory Effects. *J Bioanal Biomed* 01(S12) (2015).
18. Hansen, L.H., Knudsen, S., Sørensen, S.J. The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Curr Microbiol.* **36(6)**, 341-347 (1998).
19. Hill, R.A., Connolly, J.D. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **32(2)**, 273-327 (2015).
20. Hwang, T.L., Wang, C.C., Kuo, Y.H., Huang, H.C., Wu, Y.C., Kuo, L.M., Wu, Y.H. The hederagenin saponin SMG-1 is a natural FMLP receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation. *Biochem Pharmacol.* **80(8)** 1190-1200 (2010).
21. Jiang, Z., Kempinski, C., Bush, C.J., Nybo, S.E., Chappell, J. Engineering Triterpene and Methylated Triterpene Production in Plants Provides Biochemical and Physiological Insights into Terpene Metabolism. *Plant Physiol.* Pp.01548 (2015).
22. Kim, C.K. Eosinophil-derived neurotoxin: a novel biomarker for diagnosis and monitoring of asthma. *Korean J Pediatr* **56**, 8–12. (2013).
23. Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. Ανοσολογία. 5^η Ελληνική Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης (2007)
24. Leatherbarrow, R. J. GraFit version 4.06. *Erithacus Software Ltd. Staines, U.K.* (1998).
25. Lee, M.W., Kim, S.U., Hahn, D.R. Antifungal Activity of Modified Hederagenin Glycosides from the Leaves of *Kalopanax pictum* var. *chinense*. *Biol. Pharm. Bull.* **24(6)**, 718—719 (2001).
26. Leonidas, D.D., Elbert, B.L., Zhou, Z., Leffler, H., Ackerman, S.J., Acharya, K.R. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure* **12**, 1379-1393(1995).
27. Leonidas, D.D., Boix, E., Prill, R., Suzuki, M., Turton, R., Minson, K., Swaminathan, G.J., Youle, R.J., Acharya, K. R. Mapping the Ribonucleolytic

- Active Site of Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN). *J Biol Chem.* **276(18)**, 15009-15017 (2001)
28. Li, D.W., Lee, E.B., Kang, S.S., Hyun, J.E., Whang W.K. Activity-Guided Isolation of Saponins from *Kalopanax pictus* with Anti-inflammatory Activity. *Chem. Pharm. Bull.* **50(7)**, 900–903 (2002).
 29. Liao, W., Long, H., Chang, C.C.C., Lu, Q. The Eosinophil in Health and Disease: from Bench to Bedside and Back. *Clinic Rev Allerg Immunol* 1-15 (2015).
 30. Liu, B.X., Zhou, J.Y., Li, Y., Zou, X., Wu, J., Gu, J.F., Yuan, J.R., Zhao, B.J., Feng, L., Jia, X.B., Wang R.P. Hederagenin from the leaves of ivy (*Hedera helix* L.) induces apoptosis in human LoVo colon cells through the mitochondrial pathway. *BMC Complement Altern Med.* **14**, 412 (2014).
 31. Liu, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 57-68 (1995).
 32. Liu, Z., Liu, X., Sang, L., Liu, H., Xu, Q., Liu, Z. Boswellic acid attenuates asthma phenotypes by downregulation of GATA3 via pSTAT6 inhibition in a murine model of asthma. *Int J Clin Exp Pathol* **8(1)**, 236-243 (2015).
 33. Lu, S.H., Guan, J.H., Huang, Y.L., Pan, Y.W., Yang, W., Lan, H., Huang, S., Hu, J., Zhao, G.P. Experimental Study of Antiatherosclerosis Effects with Hederagenin in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015, 456354 (2015).
 34. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. “Brock, Βιολογία των μικροοργανισμών” Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2011).
 35. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. “Brock, Βιολογία των μικροοργανισμών” Τόμος I Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2007).
 36. Marbach, A., Bettenbrock, K. *lac* operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA *J Biotechnol* **157(1)**, 82-88 (2012).
 37. McPherson, A. Crystallization of Biological Macromolecules. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999).
 38. Moghaddam, M.G., Ahmad, F. B., Samzadeh-Kermani, A. Biological Activity of Betulinic Acid: A Review. *Pharmacology & Pharmacy* **3**, 119-123 (2012).
 39. Mosimann, S.C., Newton, D.L., Youle, R.J., James, M.N. X-ray Crystallographic Structure of Recombinant Eosinophil-derived Neurotoxin at 1.83 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **260(4)**, 540-552 (1996).
 40. Muniz, V.S., Weller, P.F., Neves, J.S. Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *J Leukoc Biol.* **92(2)**, 281–288 (2012).
 41. Nazaruk, J., Borzym-Kluczyk, M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications, *Phytochem Rev* **14**, 675–690 (2015).
 42. Newton, D.L., Nicholls, P.J., Rybak, S.M., Youle, R.J. Expression and Characterization of Recombinant Human Eosinophil-derived Neurotoxin and

- Eosinophil-derived Neurotoxin-Anti-transferrin Receptor sFv*. *J Biol Chem.* **269(43)**, 26739-26745 (1994).
43. Newton, D.L., Xue, Y., Boque',L., Wlodawer, A., Kung, H.F., Rybak, S.M. Expression and characterization of a cytotoxic human–frog chimeric ribonuclease: potential for cancer therapy. *Protein Eng.* **10(4)**, 463-470 (1997).
 44. Patočka J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine* **1**, 7–12 (2003).
 45. Pollier, J., Goossens, A. Oleanolic acid. *Phytochemistry* **77**, 10–15 (2012).
 46. Rhodes, G. *Crystallography Made Crystal Clear, Third Edition: A Guide for Users of Macromolecular Models.* 3rd edition, (Academic Press, 2006).
 47. Rosenberg, H. F. RNase A Ribonucleases and Host Defense: an Evolving Story. *J Leukoc Biol.* **83**, 1079-87 (2008).
 48. Rosenberg, H. F., Dyer, K. D., Foster, P. S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* **13**, 9-22 (2013).
 49. Rosenberg, H.F. Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN/RNase 2) and the Mouse Eosinophil-Associated RNases (mEars): Expanding Roles in Promoting Host Defense. *Int J Mol Sci* **16(7)**, 15442-15455 (2015).
 50. Rosenberg, H.F. Eosinophil-derived Neurotoxin / RNase 2: connecting the past, the present and the future. *Curr Pharm Biotechnol.* **9**, 135–140 (2008).
 51. Rosenberg, H.F., Domachowke, J.B. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 691–698 (2001).
 52. Rosenberg, H.F., Tenen, D.G., Ackerman, S.J. Molecular cloning of the human eosinophil-derived neurotoxin: A member of the ribonuclease gene family. *Proc. Natd. Acad. Sci.* **86**, 4460-4464 (1989).
 53. Sedgwick, J.B., Vrtis, Jansen K.J., Kita H., Bartemes K., Busse W.W. Peripheral blood eosinophils from patients with allergic asthma contain increased intracellular eosinophil-derived neurotoxin. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 568-574 (2004).
 54. Shin, S.W., Park, J.S., Park, C.S. Elevation of Eosinophil-Derived Neurotoxin in Plasma of the Subjects with Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease: A Possible Peripheral Blood Protein Biomarker. *Plos one* **8(6)**, 1-6 (2013).
 55. Slifman, N. R., Leogering, D. A., McKean, D. J. & Gleich, G. J. Ribonuclease-activity associated with human eosinophil derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J. Immunol.* **137**, 2913-2917 (1986).
 56. Sorrentino, S., Glitz, D.G., Hamann, K.J. , Loegering, D.A., Checkel, J.L., Gleich, G.J. Eosinophil-derived Neurotoxin and Human Liver Ribonuclease. *J Biol Chem.* **267(21)**, 14859-14865 (1992).

57. Swaminathan, G.J., Holloway, D.E., Veluraja, K., Acharya, K.R. Atomic Resolution (0.98 Å) Structure of Eosinophil-Derived Neurotoxin. *Biochemistry* **41 (10)**, 3341–3352 (2002).
58. Taiz, L., Zeiger, E., Φυσιολογία φυτών, 1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις Уτορία (2012)
59. Todd, I., Spickett, G. Ανοσολογία. 5^η Έκδοση. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου (2008).
60. Vasconcelos, J.F., Teixeira, M.M., Barbosa-Filho, J.M. Lúcio, A.S., Almeida, J.R., de Queiroz, L.P., Ribeiro-dos-Santos, R., Soares, M.B. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Int Immunopharmacol.* **8(9)**, 1216-1221 (2008).
61. Wang, M., Chen, M., Ding, Y., Zhu, Z., Zhang, Y., Wei, P., Wang, J., Qiao, Y., Li, L., Li, Y., Wen, A. Pretreatment with β-Boswellic Acid Improves Blood Stasis Induced Endothelial Dysfunction: Role of eNOS Activation. *Sci Rep* **5**, 15357 (2015).
62. Watson, J.D., Caudy, A.A., Myers, R.M., Witkowski, J.A. “Ανασυνδυασμένο DNA. Γονίδια και Γονιδιώματα-Μία συνοπτική παρουσίαση”. Τρίτη αγγλική έκδοση-Πρώτη ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, Ι. Μπάσδρα & Σία Ο.Ε. (2007).
63. Wilkins, H.J., Crane, M.M., Copeland, K., Williams, W.V. Hypereosinophilic Syndrome: An Update. *American Journal of Hematology* **80**, 148–157 (2005).
64. Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, S.P. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **65(3)**, 261-291 (2004).
65. Yadav, V.R., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R., Aggarwal, B.B., Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins* **(10)** 2428–2466 (2010).
66. Yang, D, Chen, Q., Shao, B.S., Zhang, P., Kurosaka, K., Caspi, R. R., Michalek, S. M., Rosenberg, H.F., Zhang, N., Oppenheim, J.J. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2 – MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med.* **205(1)**, 79-90 (2008).
67. Yang, D., Rosenberg, H.F., Chen, Q., Dyer, K. D., Kurosaka, K., Oppenheim, J. J. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood* **102 (9)**, 3396 - 3403 (2003).
68. Yin, M.C., Inhibitory effects and actions of pentacyclic triterpenes upon glycation. *BioMedicine* **5(3)**, 1-8 (2015).
69. Zhou, X., Cai, J.G., Zhu, W.W., Zhao, H.Y., Wang, K., Zhang, X.F. Boswellic acid attenuates asthma phenotype by downregulation of GATA3 via inhibition of PSTAT6. *Genet. Mol. Res.* **14 (3)**, 7463-7468 (2015)
70. Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουψάνης Τ.Α., Κυριακίδης Δ.Α., Ενζυμολογία, Εκδόσεις Ζήτη, (2001).

71. Ρακιντζής Θ.Ν., Φυσικοχημεία, Έκδοση 3^η, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα (1994).