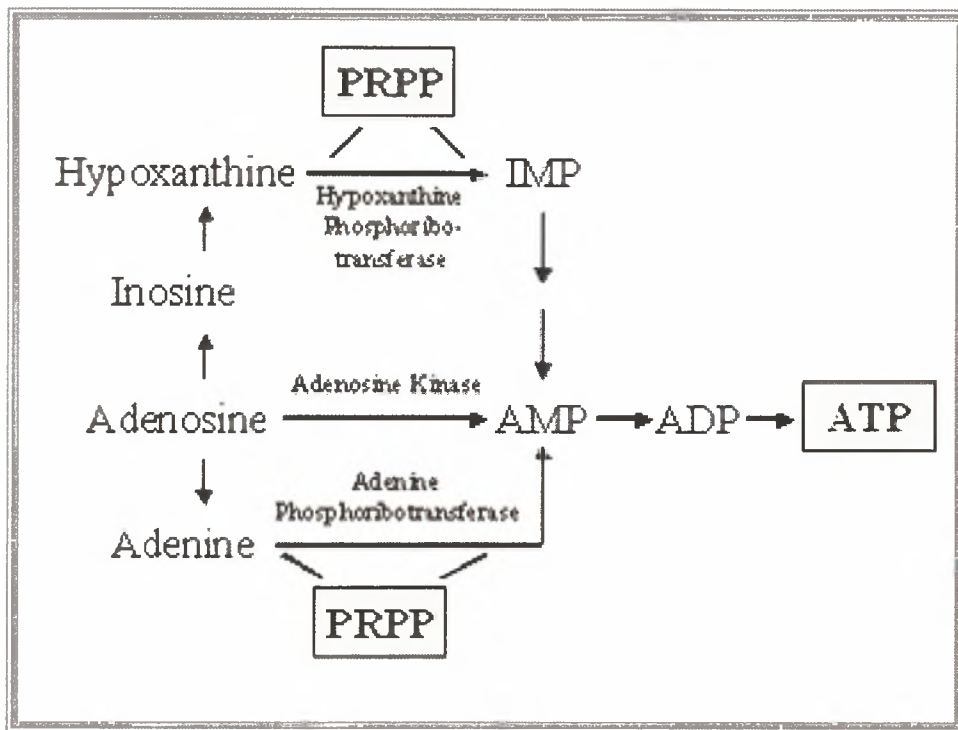




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

IN VITRO ΚΑΙ *IN SILICO* ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΥ
ΠΕΡΙΣΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΥΡΙΝΩΝ.



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΙΤΖΙΘΡΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2008



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

Αριθ. Εισ.: 11629/1
Ημερ. Εισ.: 19-04-2013
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός ΠΤ - ΒΒ
2008
ΜΙΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000115512

In vitro και *in silico* προσέγγιση της οδού περίσωσης των πουρινών
Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- Ζαχαριουδάκης Γεώργιος, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.
- Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Ευχαριστίες: Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους των οποίων οι υποδείξεις, η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για την ομαλή και επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επικ. Καθ. του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε. Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γεώργιο Ζαχαριουδάκη, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ, για την πολύτιμη συμβολή του στην διεξαγωγή των πειραμάτων καθόλη τη διάρκεια της εργασίας. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω τη Σταματίνα Γιαννούλη, υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη μεγάλη βοήθεια που προσέφερε για την επιτυχή διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και όλους τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς και πτυχιακούς φοιτητές, για την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1.1. Η βιολογική σημασία της οδού περίσωσης των πουρινών.	6
1.1.2. Η βιοτεχνολογική σημασία της οδού περίσωσης των πουρινών.	7
1.2. Φωσφοριβοζυλομεταφοράσες (PRTases) των πουρινών και οι αντιδράσεις περίσωσης των πουρινών.	9
1.3. Ο ρόλος της συνθετάσης του 5-φωσφοριβόζυλο-1-πυροφωσφορικού στο μεταβολισμό.	10
1.4. Ο ρόλος της ανόργανης πυροφωσφατάσης του βακτηρίου <i>E.coli</i> .	15
1.5. COPASI (Complex Pathway Simulator).	16
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
3.1. ΥΛΙΚΑ	19
3.1.1. Χημικές ουσίες.	19
3.1.2. Κύτταρα.	20
3.1.3. Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων.	20
3.1.4. Θρεπτικά μέσα.	21
3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα.	22
3.1.6. Πλασμιδιακοί φορείς.	24
3.1.7. Εκκινητές (Primers).	28
3.2. In vitro ΜΕΘΟΔΟΙ	28
3.2.1. Απομόνωση γενομικού DNA από βακτήρια <i>E.coli</i> K-12.	28
3.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR.	28
3.2.3. Διαχωρισμός τμημάτων DNA.	29
3.2.4. Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.	31
3.2.5. Σύνδεση τμημάτων DNA.	31
3.2.6. Μεταφορά πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα <i>E. coli</i> .	32
3.2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep).	32
3.2.8. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού.	33
3.2.9. Διαδικασία υπερέκφρασης των ενζύμων.	34
3.2.10. Διαδικασία απομόνωσης των ενζύμων.	35
3.2.11. Μέθοδος για την μέτρηση της δραστηριότητας της XGPRT.	38
3.3 ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
3.3.1. COPASI	39
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
4.1. Αποτελέσματα <i>In vitro</i> πειραματικής διαδικασίας.	43
4.2. <i>In silico</i> αποτελέσματα.	51

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ ΚΕΙΜΕΝΟΥ	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια σημαντική βιοχημική οδός σχηματισμού πουρινικών μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων πέραν της *de novo* σύνθεσής τους είναι η οδός περίσωσης των πουρινών. Σε αυτό το βιοχημικό μονοπάτι πραγματοποιείται ανακύκλωση των ελεύθερων πουρινικών βάσεων που προκύπτουν από τον καταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων. Η αντίδραση που συμβαίνει κατά την περίσωση των πουρινών είναι η μεταφορά μιας φωσφορικής ριβόζης από το 5-φωσφοριβόζυλο-1-πυροφωσφορικό (PRPP) στην ελεύθερη πουρίνη για το σχηματισμό μονοφωσφορικού νουκλεοτιδίου. Τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση αυτή είναι οι φωσφοριβοζυλομεταφοράσες των πουρινών (PRTάσες). Σε αυτή την εργασία ασχοληθήκαμε σε ένα πρώτο μέρος με την απομόνωση δυο ενζύμων που συμμετέχουν στην οδό περίσωσης των πουρινών, την συνθετάση του PRPP και την PRTάση της ξανθίνης και γουανίνης καθώς και ενός βοηθητικού ενζύμου, της ανόργανης πυροφωσφατάσης. Ο στόχος ήταν η εισαγωγή τροποποιημένων γονιδίων σε πλασμίδια-φορείς, και ακολούθως η συγκαθήλωσή των παραγόμενων ενζύμων μέσω των πρόσθετων ολιγοπεπτιδίων ιστιδίνης σε μια στήλη Νικελίου. Το σχήμα αυτό επιτρέπει την κατασκευή ενός μοντέλου βιοαντιδραστήρα παρασκευής νουκλεοτιδίων που παρέχει μια ευκολία στη μεταχείριση παραμέτρων όπως η σχετική συγκέντρωση ενζύμων. Σε ένα δεύτερο μέρος έγινε μια *in silico* προσέγγιση της μελέτης της συμπεριφοράς του βιοαντιδραστήρα. Για το λόγο αυτό έγινε χρήση του λογισμικού COPASI, με το οποίο εξετάστηκαν μια σειρά παραμέτρων της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα.

ABSTRACT

An important biochemical pathway resulting to the formation of purine nucleotides besides de novo synthesis is that of purine salvage. In this path takes place the recycling of free purine bases produced by the nucleic acids catabolism. The reaction that leads to purine salvage is the transfer of a phosphoribosyl group from 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate to the free purine, forming the nucleotide. The enzymes catalysing this reaction are the purine phosphoribosyltransferases (PRTases). In the present work we attempted in a first part to isolate two enzymes participating in the purine salvage pathway, PRPP synthetase and xanthine-guanine PRTase as well as an auxillary enzyme, inorganic pyrophosphatase. The aim was to introduce the modified genes in vector plasmids and in the following step the co-immobilization of the produced his-tagged enzymes in a Nickel affinity column. This scheme permits the construction of a model bioreactor for the production of nucleotides permitting to easily modify parameters such as the relative enzyme concentration. In a second part an *in silico* approach to the study of the behaviour of the bioreactor was made. To this end the COPASI software was used and a series of parameters of the bioreactor function were tested.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1. Η βιολογική σημασία της οδού περίσωσης των πουρινών.

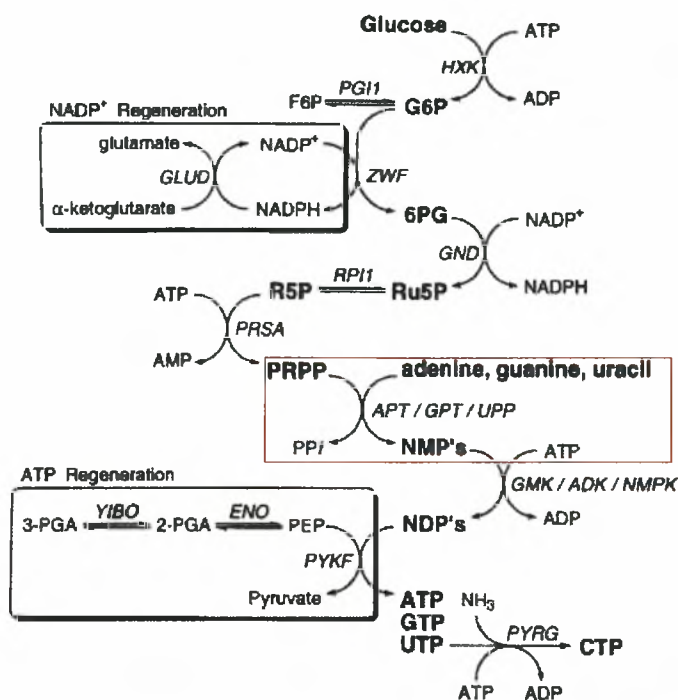
Η οδός περίσωσης των πουρινών είναι ένα εναλλακτικό βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης πουρινικών νουκλεοτιδίων στο οποίο ελεύθερες πουρινικές βάσεις που προέρχονται από τον καταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων επανασχηματίζουν μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια μετά από την αντίδραση τους με έναν δότη φωσφορικής ριβόζης, το 5-φωσφοριβόζυλο1-πυροφωσφορικό (PRPP). Στις αντιδράσεις περίσωσης των πουρινών ουσιαστικά ανακυκλώνονται οι ελεύθερες πουρινικές βάσεις, γεγονός που οδηγεί σε οικονομία κατά τη βιοσύνθεση νέων νουκλεοτιδίων, αφού δεν συντίθεται νέες βάσεις. Επίσης η οδός περίσωσης είναι πολύ πιο απλή σε σχέση με τη *de novo* σύνθεση πουρινικών νουκλεοτιδίων, αφού συμμετέχει μόνο ένα είδος ενζύμων οι φωσφοριβοζυλομεταφοράσες (PRTάσες) των πουρινών, για τις οποίες θα γίνει λόγος πιο κάτω. Ακόμα ένα χαρακτηριστικό αυτής της οδού είναι ότι απαιτεί μικρότερο ενεργειακό κόστος (Stryer. (1997)) σε σχέση με την *de novo* σύνθεση. Σε όλους τους οργανισμούς η περίσωση των πουρινών έχει τον ίδιο ρόλο, αλλά η έλλειψη ή μειωμένη έκφραση της φωσφοριβόζυλομεταφοράσας της υποξανθίνης (HPRT) στον άνθρωπο δημιουργεί την εμφάνιση του σύνδρομου Lesch-Nyhan (LNS) (Nyhan. (1997)). Άτομα με το συγκεκριμένο σύνδρομο εμφανίζουν αυξημένη παραγωγή πουρινών και την επακόλουθη αύξηση ουρικού οξέος που οδηγεί στην εμφάνιση αρθρίτιδας και νευρολιθίασης ακόμα και διαφόρων νευρολογικών παθήσεων όπως η καταναγκαστική συμπεριφορά αυτοκαταστροφής, η σπαστικότητα και νοητική καθυστέρηση (Esther et. al., (2003)). Ακόμα ένα σύνδρομο που σχετίζεται με το ίδιο ένζυμο και είναι ουσιαστικά μια παραλλαγή του LNS είναι το σύνδρομο Kelly-Seemiller (KSS). Στο KSS υπάρχει μόνο μερική έλλειψη της HPRT και εκδήλωση μόνο των μεταβολικών συμπτωμάτων.

Η ύπαρξη νευρολογικών συμπτωμάτων λόγω της έλλειψης της HPRT στο LNS ίσως να οφείλεται στο ότι η λειτουργία του εγκεφάλου εξαρτάται πολύ από την πορεία περίσωσης για την σύνθεση του IMP και του GMP. Τα επίπεδα της HPRT στον εγκέφαλο είναι υψηλότερα από οποιονδήποτε άλλο ιστό και υψηλότερα από τα ένζυμα για την *de novo* σύνθεση. Το LNS αποδεικνύει ότι η οδός περίσωσης δεν είναι περιττή για τη σύνθεση του IMP και του GMP, αλλά παίζει ένα κρίσιμο ρόλο, ο οποίος δεν είναι ακόμα γνωστός. Προς διευκρίνιση μένει επίσης η συνεργασία μεταξύ της *de novo* πορείας και της πορείας περίσωσης.

1.1.2. Η βιοτεχνολογική σημασία της οδού περίσωσης των πουρινών.

Μια εναλλακτική μέθοδος παρασκευής χημικών ενώσεων εκτός από την σύνθεση τους με χημικές αντιδράσεις είναι η παρασκευή τους με τη χρήση ενζύμων, ένα πεδίο που έχει αναπτυχθεί και έχει βρει πολλές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια. Η ενζυμική μέθοδος σύνθεσης χημικών ενώσεων χρησιμοποιείται στη βιοτεχνολογία γιατί παρέχει κάποια πλεονεκτήματα έναντι των χημικών μεθόδων (Heather et. al., (2008)). Τα πλεονεκτήματα αυτά είναι ο μειωμένος χρόνος αντίδρασης, η αυξημένη απόδοση σε προϊόν, η αυξημένη ειδικότητα του προϊόντος, το μειωμένο κόστος παραγωγής και η μειωμένη επίδραση στο περιβάλλον. Λόγω των πλεονεκτημάτων αυτών χρησιμοποιούνται συνδυασμοί ενζύμων από διάφορα μεταβολικά μονοπάτια για την παραγωγή μεγάλης ποικιλίας προϊόντων όπως είναι η βιταμίνη B12 (Roessner et. al., (1994)), σημασμένα ριβονουκλεοτίδια (Heather et. al., (2008)) για τη χρήση τους σε τεχνικές όπως η NMR αλλά και σε διάφορες μεθόδους μέτρησης της ενεργότητας ορισμένων ενζύμων

Η οδός περίσωσης των πουρινών βρίσκει και αυτή τη δική της εφαρμογή στην παρασκευή σημασμένων και μη τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (NTPs). Όπως φαίνεται στην εικόνα 1 (Lilcoln et. al., (2000)), η αρχική ένωση για την σύνθεση των νουκλεοτιδίων είναι η γλυκόζη από την οποία μέσω διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων παράγεται 5-φωσφορική ριβόζη, που με τη σειρά της μέσω της δράσης της συνθετάσης του PRPP μετατρέπεται σε PRPP. Όπως αναφέρθηκε, στην οδό περίσωσης των πουρινών από το PRPP και ελεύθερες πουρίνες παράγονται μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια (εικόνα 1, κόκκινο πλαίσιο), τα οποία μπορούν περαιτέρω να φωσφορυλιωθούν και να μετατραπούν σε τριφωσφορικά νουκλεοτίδια. Σε αυτή την εφαρμογή γίνεται φανερό ότι η οδός περίσωσης των πουρινών είναι το κομβικό σημείο στο οποίο γίνεται η μετάβαση από ένα τριφωσφορυλιωμένο σάκχαρο (PRPP) σε ένα νουκλεοτίδιο. Στην εικόνα 2 (Lilcoln et. al., (2000)) φαίνονται τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή σημασμένων NTPs. Ανάμεσα στα διάφορα ένζυμα βρίσκονται και τα ένζυμα με τα οποία ασχοληθήκαμε στην συγκεκριμένη εργασία δηλαδή την συνθετάση του PRPP και την φωσφοριβόζυλομεταφορά της υποξανθίνης και της γουανίνης. Η ενασχόληση μας με τα δυο αυτά ένζυμα βασίστηκε στη σημαντικότητα της οδού περίσωσης των πουρινών για την παραγωγή μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων.



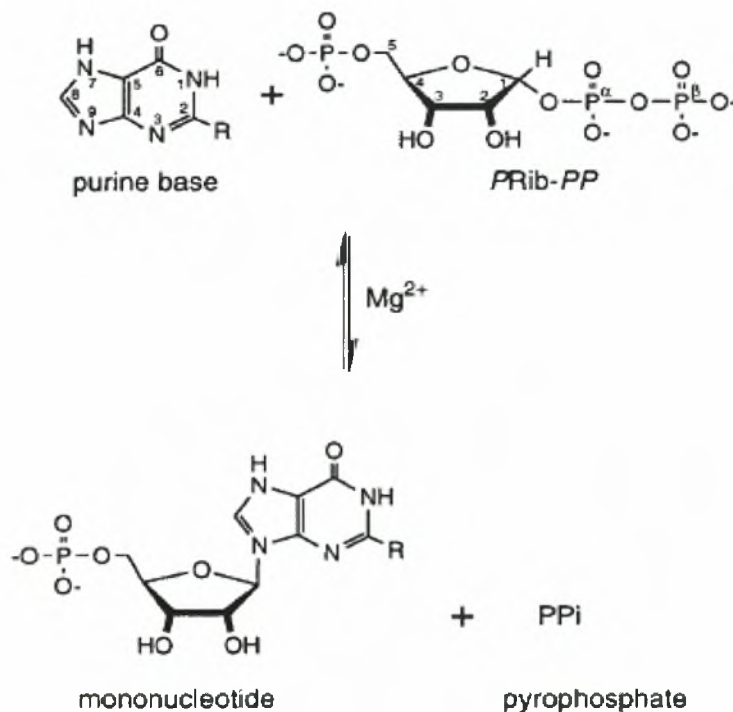
Εικόνα 1: Παραγωγή σημασμένων NTPs με τη χρήση ενζύμων από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Από την γλυκόζη παράγεται PRPP και από το PRPP μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια μέσω της οδού περίσωσης των πουρινών (κόκκινο πλαίσιο).

Enzyme ^b	Abbreviation	EC	Source
Hexokinase	<i>HXK</i>	2.7.1.1	Baker's yeast
Phosphoglucose isomerase (Glucose-6-phosphate isomerase)	<i>PGII</i>	5.3.1.9	Baker's yeast
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	<i>ZWF</i>	1.1.1.49	<i>L. mesenteroides</i>
Phosphogluconate dehydrogenase	<i>GDN</i>	1.1.1.44	<i>Torula</i> yeast
Phosphoriboisomerase (Ribose-5-phosphate isomerase)	<i>RPII</i>	5.3.1.6	Spinach
Phosphoribosylpyrophosphate synthetase (Ribose-phosphatic pyrophosphokinase)	<i>PRSA</i>	2.7.6.1	<i>E. coli</i>
Adenine phosphoribosyltransferase	<i>APT</i>	2.4.2.7	JM109/pTTA6
Uracil phosphoribosyltransferase	<i>UPP</i>	2.4.2.9	JM109/pTTU2
Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase	<i>GPT</i>	2.4.2.22	JM109/pTTG2
Nucleoside-monophosphate kinase	<i>NMPK</i>	2.7.4.4	Bovine liver
Myokinase (Adenylate kinase)	<i>ADK</i>	2.7.4.3	Rabbit muscle
Guanylate kinase	<i>GMK</i>	2.7.4.8	Porcine brain
3-Phosphoglycerate mutase	<i>YIBO</i>	5.4.2.1	Rabbit muscle
Enolase (Phosphopyruvate hydratase)	<i>ENO</i>	4.2.1.11	Baker's yeast
Pyruvate kinase	<i>PYKF</i>	2.7.1.40	Rabbit muscle
Glutamate dehydrogenase	<i>GLUD</i>	1.4.1.3	Bovine liver
CTP synthase	<i>PYRG</i>	6.3.4.2	JM109/pMW5
L-Lactate dehydrogenase	<i>LDH</i>	1.1.1.27	Rabbit muscle

Εικόνα 2: Ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή σημασμένων NTPs. Σε μαύρο πλαίσιο βρίσκονται τα δυο από τα τρία ένζυμα με τα οποία ασχοληθήκαμε στην συγκεκριμένη εργασία.

1.2 Φωσφοριβοζυλομεταφοράσες (PRTases) των πουρινών και οι αντιδράσεις περιώσσης πουρινών.

Οι φωσφοριβοζυλομεταφοράσες ή φωσφοριβόζυλοτρανσφεράσες (PRTάσες) των πουρινών (Siska Vos et al.1998) είναι μέλη μιας ομάδας ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό πουρινικών, πυριμιδινικών και πυριδινικών νουκλεοτιδίων, αλλά και της ιστιδίνης και της τρυπτοφάνης στα βακτήρια και στους κατώτερους ευκαρυώτες. Αυτή η οικογένεια ενζύμων χρησιμοποιεί PRPP (5-φωσφοριβόζυλο-1-πυροφωσφορικό) και νιτρογενείς βάσεις για τον σχηματισμό μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων και την απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi) (εικόνα 3) . Για την επίτευξη αυτών των αντιδράσεων είναι σημαντική η παρουσία ενός δισθενούς ιόντος. Οι PRTases ανάλογα με τη δομή τους χωρίζονται σε τύπου I (Eriksen Tine et al., 2000 Siska Vos et al.1998,) και τύπου II. Οι τύπου I PRTases έχουν ένα συντηρημένο μοτίβο πρόσδεσης του PRPP (Siska Vos et al.1997),. Στον τύπο I ανήκουν και τα ένζυμα περιώσσης των πουρινών. Μόνο μια PRTάση έχει αναγνωριστεί ως τύπου II, η PRTάση του κινολινικού (Siska Vos et al.1998) από το βακτήριο *Salmonella typhimurium*, η οποία φέρει ειδικές α/β δομές στο N- και C- τελικό άκρο.



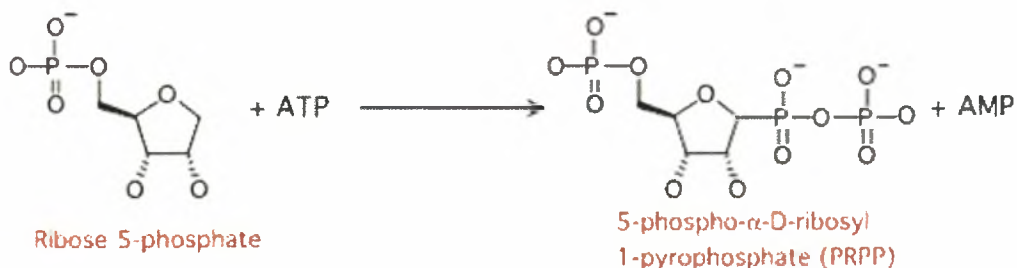
Εικόνα 3: Η αντίδραση που καταλύεται από τις φωσφοριβόζυλομεταφοράσες των πουρινών. Το PRPP αντιδρά με μια πουρινική βάση για τον σχηματισμό μονοφωσφορικού νουκλεοτιδίου και πυροφωσφορικού (PPi). Η αντίδραση απαιτεί Mg^{2+} και είναι αμφίδρομη.

Κατά των καταβολισμό των νουκλεοτιδίων και των νουκλεϊκών οξέων μέσα σε ένα κύτταρο παράγονται ελεύθερες πουρινικές βάσεις. Για την κυτταρική οικονομία αυτές οι βάσεις περισώζονται από τις PRTάσες των πουρινών και επανασηματίζονται πουρινικά νουκλεοτίδια. Έτσι σύμφωνα με την αντίδραση στην εικόνα 3 από τις βάσεις αδερίνη, γουανίνη, ξανθίνη και υποξανθίνη και το δότη της φωσφορικής ριβόζης, PRPP θα επανασηματιστεί AMP, GMP, XMP και IMP αντίστοιχα. Ανάμεσα όμως στους διάφορους οργανισμούς αλλάζει η ειδικότητα των PRTασών ως προς το υπόστρωμα (Miller Richard et al.,1972). Σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών πηγών PRTασών των πουρινών η PRTάση της αδερίνης είναι ένα ξεχωριστό ένζυμο με ειδικότητα στην αδερίνη και η PRTάση της υποξανθίνης και γουανίνης με ειδικότητα παρόμοια για την γουανίνη και την υποξανθίνη είναι ένα επίσης ξεχωριστό ένζυμο. Πολλοί οργανισμοί φέρουν επίσης ξεχωριστή PRTάση που επιδεικνύει ειδικότητα στην ξανθίνη.

Στο βακτήριο *Escherichia coli* με το οποίο ασχοληθήκαμε σε αυτήν την εργασία συμβαίνει το αντίθετο (Krenitsky et al.,1970), υπάρχει μια ξεχωριστή PRTάση με ειδικότητα στην αδερίνη, μια με ειδικότητα στην ξανθίνη και την γουανίνη και μια που εμφανίζει ειδικότητα για την υποξανθίνη. Στην παρούσα εργασία κλωνοποιήσαμε την PRTάση της ξανθίνης και γουανίνης (EC:2.2.4.8) ένα ένζυμο που αποτελείται από 152 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 18,6KDa (Liu et al., 1983) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *gpt*, μεγέθους 460 bp.

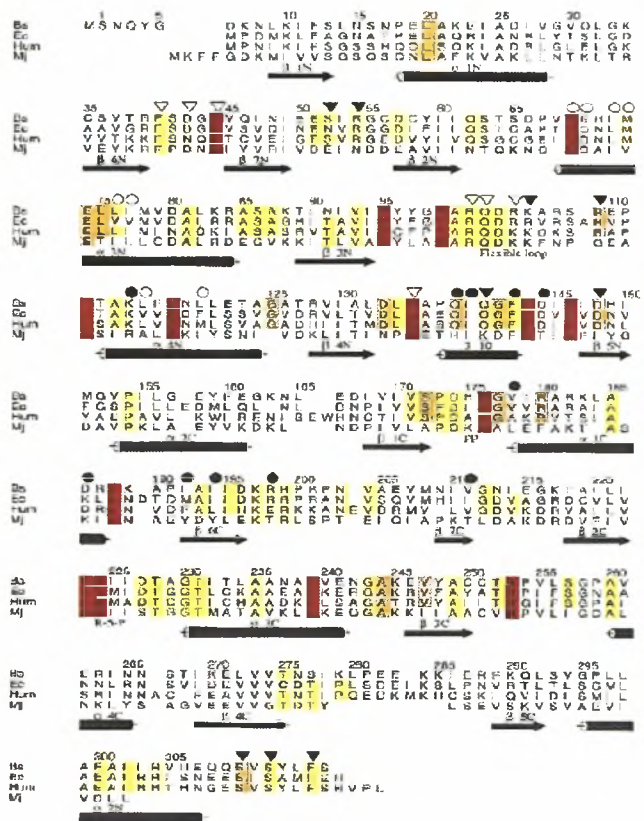
1.3 Ο ρόλος της συνθετάσης του 5-φωσφοριβόζυλο-1-πυροφωσφορικού στο μεταβολισμό

Η συνθετάση του 5-φωσφοριβόζυλο-1-πυροφωσφορικού (PRPP) ή πυροφωσφοκινάση της φωσφορικής ριβόζης (EC: 2.7.6.1) (Bjarne Hove Jensen et al. 1982), είναι ένα από τα κεντρικά ένζυμα στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων Έρευνες για την PRPP συνθετάση στο βακτήριο *Escherichia coli* έδειξαν ότι η PRPP συνθετάση αποτελείται από 314 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 34,060 KDa και κωδικοποιείται από το γονίδιο *prsA* μεγέθους 985 bp (Bjarne Hove Jensen et al 1985). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή της 5-φωσφορικής ριβόζης και του ATP σε PRPP και AMP αντίστοιχα (εικόνα 4) και η δραστηριότητα του εξαρτάται από PO_4^{2+} και Mg^{2+} .



Εικόνα 4: Σύνθεση του PRPP από 5-φωσφορική ριβόζη και ATP με την καταλυτική δράση της συνθετάσης του PRPP.

Εξαιτίας της θέσης κλειδί που καταλαμβάνει στο μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων η συνθετάση του PRPP είναι συντηρημένη σε υψηλό βαθμό ανάμεσα σε διαφορετικούς οργανισμούς (Eriksen Tine et al., 2000) Στην εικόνα 5 φαίνεται μια αμινοξική ομοπαράθεση μεταξύ των PRPP συνθετασών τεσσάρων οργανισμών.

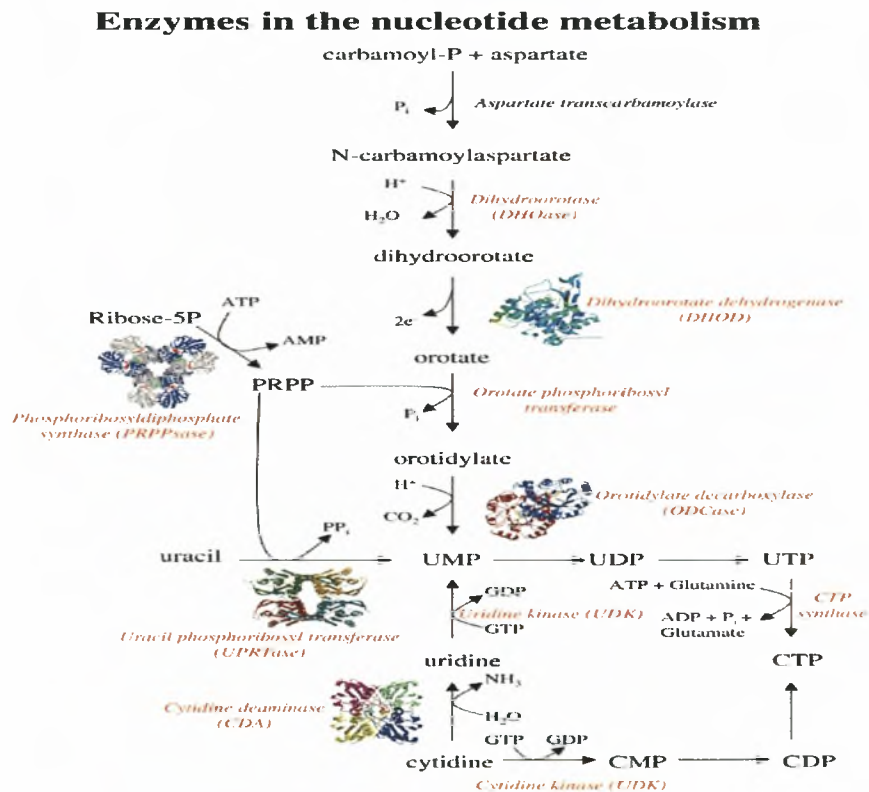


Εικόνα 5: Ομοπαράθεση της αμινοξικής αλληλουχίας της PRPP συνθετάσης μεταξύ των οργανισμών *Bacillus Subtillilis* (Bs), *Escherichia coli* (Ec), *Human isozyme I* (Hum), *Methanococcus jannaschii* (Mj). Τα αμινοξέα που είναι χρωματισμένα με κόκκινο χρώμα είναι τα περισσότερο συντηρημένα και ακολουθούν τα αμινοξέα με το πορτοκαλί χρώμα και τέλος τα αμινοξέα με το κίτρινο χρώμα.

Η σημαντικότητα αυτού του ενζύμου οφείλεται στο ρόλο που διαδραματίζει το PRPP. Ο βασικός ρόλος του PRPP σε όλους τους οργανισμούς, από τους προκαρυωτικούς, όπως είναι τα βακτήρια μέχρι τους ευκαρυωτικούς, όπως τα φυτά, οι μύκητες ακόμα και ανώτερους ευκαρυωτικούς όπως ο άνθρωπος είναι η συμμετοχή του στη βιοσύνθεση των πουρινο- και πυριμιδινο-νουκλεοτιδίων, αλλά και δυο αμινοξέων, της ιστιδίνης και της τρυπτοφάνης. Η προσφορά αυτού του μορίου είναι η 5-φωσφορική ριβόζη (εικόνα 4), δηλαδή είναι ο δότης της μονάδας της φωσφορικής ριβόζης των νουκλεοτιδίων. Στη *de novo* σύνθεση των πουρινο-νουκλεοτιδίων (Stryer. (1997)) το PRPP συμμετέχει στο πρώτο και καθοριστικό βήμα της βιοσύνθεσής τους, στο σχηματισμό δηλαδή της 5-φωσφοριβόζυλο-1-αμίνης από την αντίδραση του PRPP και της γλουταμίνης. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την αμιδοφωσφοριβόζυλο μεταφοράση της

γλουταμίνης-PRPP. Η 5-φωσφοριβόζυλο-1-αμίνης συνεχίζει σε μια σειρά από αντιδράσεις για τον σχηματισμό του πρώτου νουκλεοτιδίου, του ινοσινικού (IMP). Από το IMP έπειτα προκύπτουν το AMP και το GMP. Από τις αντιδράσεις φαίνεται ότι ο πουρινικός δακτύλιος συναρμολογείται σταδιακά πάνω στη φωσφορική ριβόζη που παρέχει το PRPP. Φυσικά το PRPP όπως προαναφέρθηκε λαμβάνει μέρος εκτός από την *de novo* σύνθεση και στις αντιδράσεις περίσωσης των πουρινών

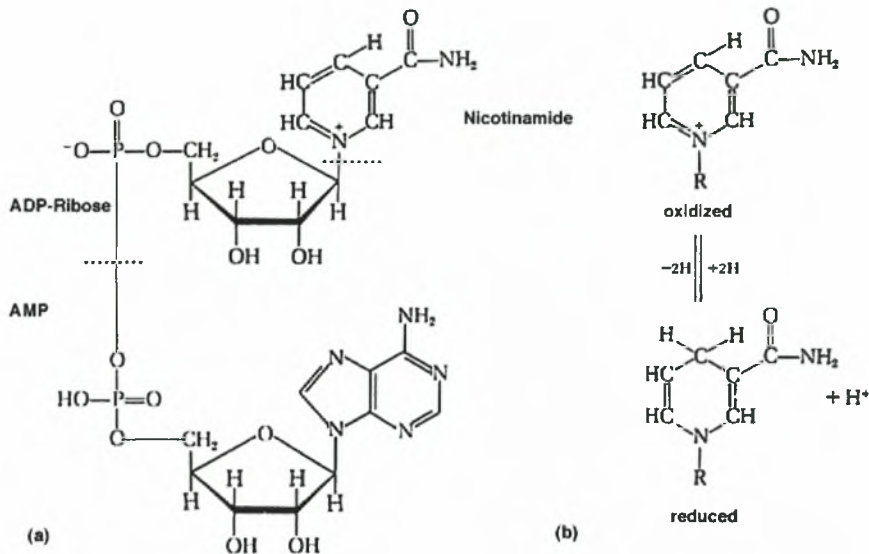
Αντίθετα με τη σύνθεση των πουρινικών νουκλεοτιδίων (Stryer.1997), στη σύνθεση των πυριμιδινικών νουκλεοτιδίων προηγείται η συναρμολόγηση του πυριμιδινικού δακτυλίου και έπεται η συναρμολόγηση του στην φωσφορική ριβόζη. Τα πρόδρομα σύνθεσης του πυριμιδινικού δακτυλίου είναι το φωσφορικό καρβαμίδιο και το ασπαραγινικό. Τα δυο αυτά πρόδρομα αντιδρούν και παράγουν το N-καρβαμούλοασπαραγινικό με τη δράση του ενζύμου ασπαραγινική τρανσκαρβαμούλαση. Το N-καρβαμούλοασπαραγινικό μετατρέπεται διαδοχικά σε διϋδροοροτικό και σε οροτικό. Το οροτικό (μια ελεύθερη πυριμιδίνη) είναι αυτό που αντιδρά με το PRPP (εικόνα 6) υπό τη δράση της φωσφοριβόζυλομεταφοράς του οροτικού για το σχηματισμό του οροτιδυλικού. Από το οροτιδυλικό προκύπτει το UMP με αποκαρβοξυλίωση.



Εικόνα 6: Η συμμετοχή του PRPP στην σύνθεση των πυριμιдино-νουκλεοτιδίων.

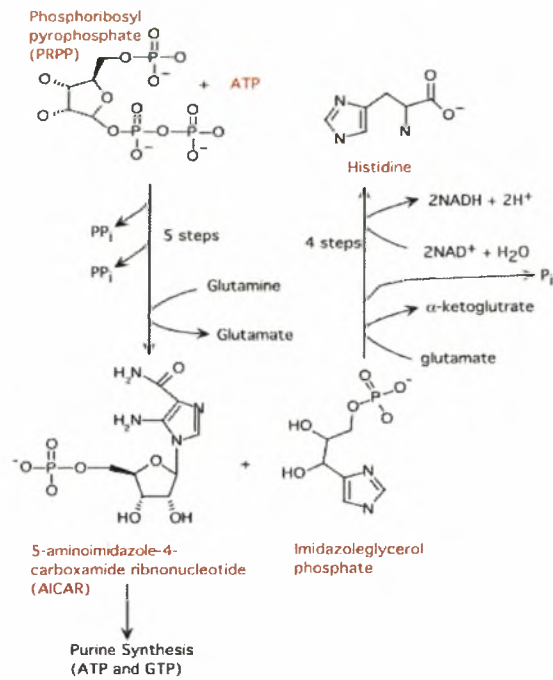
Εκτός από την σύνθεση των πουρινικών και των πυριμιδινικών νουκλεοτιδίων το PRPP συμμετέχει και στη σύνθεση του NAD⁺ (νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο) (Bjarne Hove Jensen et al (1995), Stryer. (1997)).

Το μόριο αυτό είναι πάρα πολύ σημαντικό για τις βιοχημικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, γιατί είναι ικανό να μεταφέρει ηλεκτρόνια. Ενδεικτικά, συμμετέχει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλά και αποτελεί τον συμπαράγοντα για πολλά οξειδοαναγωγικά ένζυμα. Το NAD⁺ (εικόνα 7) αποτελείται από δυο φωσφορικές ριβόζες, η μια φωσφορική ριβόζη είναι συνδεδεμένη στον C1 με μια αδενίνη και η άλλη με μια νικοτιναμιδική ομάδα. Η φωσφορική ριβόζη που συνδέεται με την νικοτιναμιδική ομάδα προέρχεται από το PRPP μετά την αντίδραση του PRPP με το νικοτινικό προς σχηματισμό του νικοτινικού ριβονουκλεοτιδίου.



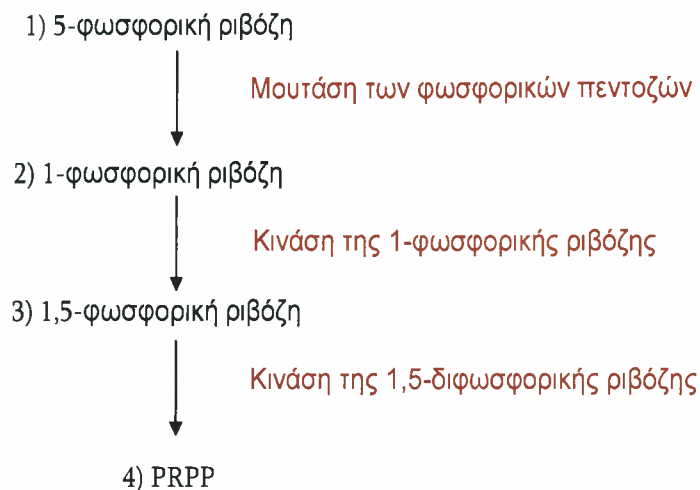
Εικόνα 7: Η δομή του NAD, a: Οι δυο φωσφορικές ριβόζες του NAD. Η φωσφορική ριβόζη που είναι συνδεδεμένη με την νικοτιναμιδική ομάδα προέρχεται από το PRPP, b: Η ικανότητα της νικοτιναμιδικής ομάδας να ανάγεται και να οξειδώνεται.

Η 5-φωσφορική ριβόζη που παρέχει το PRPP είναι μέρος και δυο αμινοξέων της ιστιδίνης (εικόνα 8) και τρυπτοφάνης (Stryer. (1997)). Η ιστιδίνη συντίθεται από ATP, PRPP και γλουταμίνη. Τα πέντε άτομα C της ιστιδίνης προέρχονται από το PRPP, ενώ το έκτο άτομο άνθρακα που βρίσκεται στον ιμιδαζολικό δακτύλιο καθώς και ένα άτομο αζώτου του δακτυλίου από το ATP. Η σύνθεση ενός αμινοξέος από ριβονουκλεοτίδια ίσως είναι ένα κατάλοιπο του αρχέγονου κόσμου του RNA.



Εικόνα 8: Η ιστιδίνη συντίθεται από ATP, PRPP και γλουταμίνη

Η σύνθεση του PRPP σε όλους τους οργανισμούς, κατά κύριο λόγο καταλύεται από την PRPP συνθετάση (EC:2.7.6.1) την οποία κλωνοποιήσαμε και απομονώσαμε στην παρούσα εργασία από το βακτήριο *Escherichia coli*. Η PRPP συνθετάση χρησιμοποιεί ως υποστρώματα την 5-φωσφορική ριβόζη και ATP για τον σχηματισμό του PRPP. Όμως στο βακτήριο *Escherichia coli* εντοπίστηκε ένα ενζυμικό μονοπάτι που δεν εμπλέκεται καθόλου η PRPP συνθετάση. Το μονοπάτι αυτό απαιτεί την ύπαρξη τριών ενζύμων : α) την μούτάση των φωσφορικών πεντοζών β) την κινάση της 1-φωσφορικής-ριβόζης και γ) την κινάση της 1,5-διφωσφορικής-ριβόζης. Η αλληλουχία των αντιδράσεων για την σύνθεση του PRPP φαίνεται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9: Παραγωγή του PRPP χωρίς τη συμμετοχή της PRPP συνθετάσης.

Όπως γίνεται αντιληπτό από όλα τα παραπάνω, η PRTάση της ξανθίνης και γουανίνης αποτελεί τη συνέχεια της συνθετάσης του PRPP στο μεταβολικό μονοπάτι της περίσωσης των πουρινών. Η συγκαθήλωση δυο τέτοιων ενζύμων, που το ένα αποτελεί συνέχεια του άλλου σε μια μεταβολική οδό, πάνω σε ένα στερεό ανενεργό υπόστρωμα προσφέρεται για τη μελέτη της σημασίας της διοχέτευσης ενός υποστρώματος μεταξύ των διαδοχικών αυτών ενζύμων. Η επιλογή της τεχνικής συγκαθήλωσης και των σχετικών συγκεντρώσεων δίνει ένα τρόπο ελέγχου της ευκολίας με την οποία το προϊόν ενός ενζύμου συναντά το ενεργό κέντρο του επόμενου.

1.4. Ο ρόλος της ανόργανης πυροφωσφατάσης του βακτηρίου *Escherichia coli*.

Η ανόργανη πυροφωσφατάση (φωσφουδρολάση του πυροφωσφορικού, EC: 3.6.1.1, Josse et al., 1965) είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 20,000 KDa και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ppa* μεγέθους 531 bp. Η ανόργανη πυροφωσφατάση (PPase) έχει ως ρόλο μέσα στο βακτηριακό κύτταρο να υδρολύει ένα μόριο πυροφωσφορικού (PPi) σε δυο μόρια ορθοφωσφορικού (Pi). Το Pi παράγεται ως παραπροϊόν πολλών βιοσυνθετικών ενζυμικών αντιδράσεων, όπως είναι ο πολυμερισμός των δεοξυ- και ριβονουκλεοτιδίων, η σύνθεση συνενζύμων και η ενεργοποίηση των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων. Ωστόσο κάποιες από τις αντιδράσεις αυτές είναι εξεργονικές έτσι ώστε από μόνες τους δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν αυθόρμητα παρά μόνο με την σύνδεση τους με την υδρόλυση των PPi. Σε αυτή την εργασία ασχοληθήκαμε με τα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στις παρακάτω αντιδράσεις:

- (1) 5-P-Ριβόζη + ATP \Leftrightarrow PRPP + AMP, καταλύεται από την *συνθετάση του PRPP*
 (2) PRPP + υποξανθίνη (Hx) \Leftrightarrow IMP + P*P*i καταλύεται από την *φωσφοριβόζυλομεταφοράση της υποξανθίνης και γουανίνης* (αντίδραση περίσωσης της Hx)
 (3) P*P*i \rightarrow 2P*P*i καταλύεται από την *ανόργανη πυροφωσφατάση*

Όπως φαίνεται στην δεύτερη αντίδραση κατά τη σύνθεση του IMP παράγεται ένα μόριο P*P*i, αν αυτό το μόριο δεν υδρολυθεί στην μη αντιστρεπτή αντίδραση P*P*i \rightarrow 2P*P*i, υπάρχει δυνατότητα μετατόπισης της ισορροπίας της δεύτερης και αντιστρεπτής αντίδρασης προς τα αριστερά έτσι ώστε να μειωθεί η συγκέντρωση του IMP. Η ανόργανη πυροφωσφατάση, λοιπόν στην παρούσα εργασία χρησιμεύει σαν ένα βοηθητικό ένζυμο για την αποτελεσματικότερη παραγωγή του IMP.

1.5. COPASI (Complex Pathway Simulator)

Επειδή στη φύση υπάρχουν πολύπλοκα βιοχημικά συστήματα και μονοπάτια, των οποίων η κατανόηση απαιτεί την εξομοίωση και την μοντελοποίηση τους, έχουν δημιουργηθεί λογισμικά εργαλεία τα οποία μπορούν να εξομοιώνουν πολύπλοκα βιοχημικά μονοπάτια ακόμα και ολόκληρα κυτταρικά συστήματα. Τα λογισμικά αυτά βοηθούν στην μελέτη πολύπλοκων συστημάτων, όπως πολυενζυμικά συστήματα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την παραγωγή ενός προϊόντος.

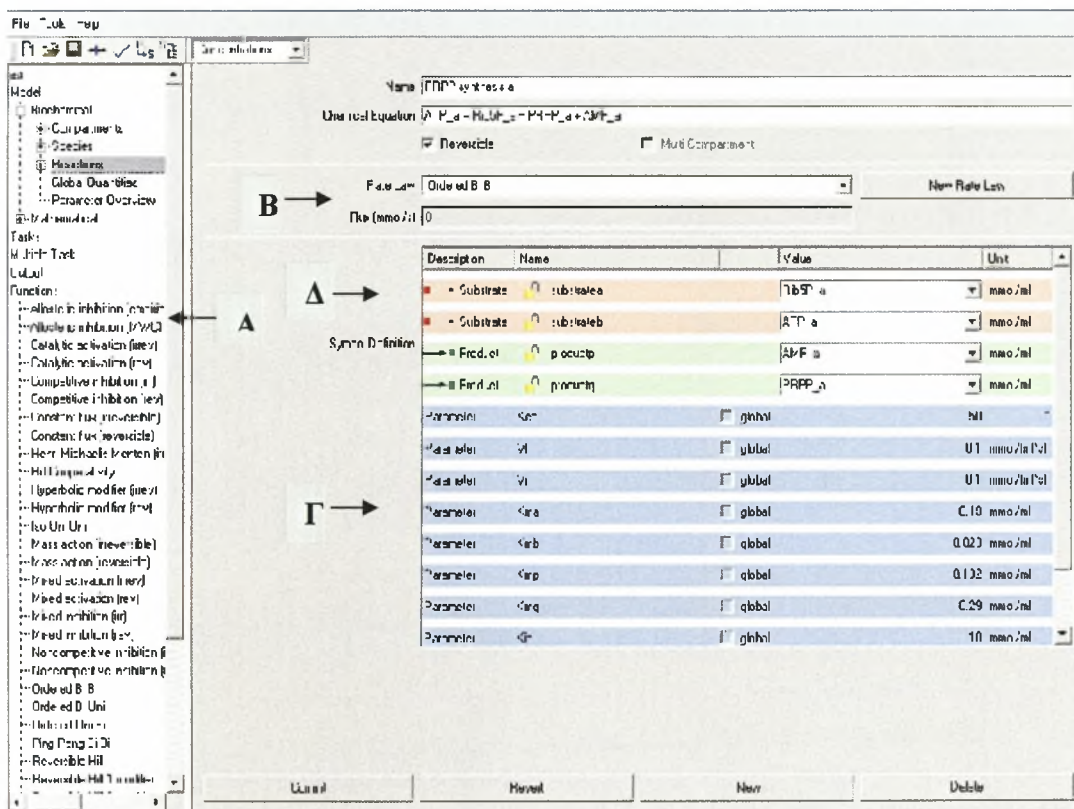
Μερικές δυνατότητες που δίνουν στο χρήστη τα λογισμικά αυτά είναι η ντετερμινιστική εξομοίωση δικτύων αντιδράσεων με την ολοκλήρωση διαφορικών εξισώσεων (ODEs, ordinary differential equations), η στοχαστική εξομοίωση δικτύων αντιδράσεων (πχ με αλγορίθμους), υπολογισμό της σταθερής κατάστασης του συστήματος και της σταθερότητας του, η στοιχειομετρική ανάλυση ενός συστήματος (Schuster et al., 1999), η ανάλυση ευαισθησίας και η βελτιστοποίηση και εκτίμηση παραμέτρων.

Ένα τέτοιο λογισμικό εργαλείο είναι και το COPASI(UI) (complex pathway simulator) (Hoops et al., (2006)) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την προσομοίωση των αντιδράσεων:

- (1) 5-P-Ριβόζη + ATP \Leftrightarrow PRPP + AMP, καταλύεται από την *συνθετάση του PRPP*
 (2) PRPP + υποξανθίνη (Hx) \Leftrightarrow IMP + P*P*i καταλύεται από την *φωσφοριβόζυλομεταφοράση της υποξανθίνης και γουανίνης* (αντίδραση περίσωσης της Hx)
 (3) P*P*i \rightarrow 2P*P*i καταλύεται από την *ανόργανη πυροφωσφατάση*

Το επιθυμητό αποτέλεσμα των δυο πρώτων αντιδράσεων είναι η παραγωγή νουκλεοτιδίων (IMP ή GMP, ανάλογα τη βάση) με την ταυτόχρονη δράση των τριών ενζύμων τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί σε μια χρωματογραφική στήλη Ni- βιοαντιδραστήρα. Ο ρόλος του COPASI(UI) (Stefan et al.) στην παρούσα εργασία είναι να βοηθήσει στον υπολογισμό της σταθερής κατάστασης του συστήματος (steady state), δηλαδή την κατάσταση όπου όλα τα στοιχεία του συστήματος (αντιδρώντα και προϊόντα) έχουν μια συγκεκριμένη συγκέντρωση της οποίας η τιμή μένει σταθερή. Ακόμα με τη βοήθεια του COPASI

υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των στοιχείων συναρτήσει του χρόνου που χρειάζεται το σύστημα για να φτάσει την σταθερή κατάσταση (time course). Το time course δίνει σημαντικές πληροφορίες για τη λειτουργία του συστήματος, μερικές από τις οποίες αναλύονται στα αποτελέσματα. Για να το επιτύχει αυτούς τους υπολογισμούς το COPASI(UI) πρέπει να καθοριστούν κάποια στοιχεία του συστήματος, όπως είναι τα “διαμερίσματα” (compartments) που συμβαίνουν οι αντιδράσεις, οι αντιδράσεις (reactions), οι μηχανισμοί των αντιδράσεων, αν για παράδειγμα είναι Bi Bi σε σειρά αλληλοδιάδοχος ή κάποιος άλλος μηχανισμός (Γεωργάτσος Ι. Ενζυμολογία), καθώς και κάποιες παραμέτρους (όπως οι Km και Ki (Γεωργάτσος Ι. Ενζυμολογία)) ανάλογα τον μηχανισμό της αντίδρασης (δευλικά και μεθόδους). Στην εικόνα 10 φαίνεται το παράδειγμα της ενζυμικής σύνθεσης του PRPP, μια αντίδραση Bi Bi σε σειρά αλληλοδιάδοχος (Ordered Bi Bi) (Ι.Γ Γεωργάτσος Ενζυμολογία).



Εικόνα 10: Στην εικόνα φαίνεται A: Οι μηχανισμοί αντιδράσεων (kinetic functions) που είναι διαθέσιμοι στο COPASI(UI), B: Ο μηχανισμός που χρησιμοποιείται για την συγκεκριμένη αντίδραση (Ordered Bi Bi) η οποία είναι η σύνθεση του PRPP, Γ: Οι παράμετροι που απαιτούνται για τον συγκεκριμένο μηχανισμό, όπως οι Km και οι Ki των υποστρωμάτων Δ: Με ρόζ χρώμα απεικονίζονται τα υποστρώματα και με πράσινο τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η προσέγγιση της μελέτης ενός απλού βιοσυνθετικού συστήματος σε δύο παράλληλα επίπεδα: αφ' ενός η *in silico* θεωρητικοί υπολογισμοί και αφ' ετέρου η κλωνοποίηση των αντιστοίχων ενζύμων για την πειραματική επαλήθευση της συμπεριφοράς του σχήματος.

Η χρήση των "ουρών ιστιδίνης" επιτρέπει θεωρητικά την αντιστρεπτή συγκαθήλωση των επί μέρους ενζύμων του συστήματος σε μεταβλητές αναλογίες, σύμφωνα με τα ευρήματα του λογισμικού μοντελοποίησης.

Ένα τέτοιο σχήμα είναι ενδιαφέρον τόσο ως πρότυπο σύστημα για την μελέτη της συμπεριφοράς βιοαντιδραστήρων όσο και για την εξέταση θεμελιωδών βιοχημικών φαινομένων όπως η διοχέτευση υποστρώματος.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Χημικές ουσίες

- Αγαρόζη (SeaKem)
- Acrylamide (SIGMA)
- Αμπικιλίνη (SIGMA)
- APS (Ammonium Persulfate) (SIGMA)
- ATP (Fluka)
- BamHI (Fermentas)
- Bis-acrylamide (SIGMA)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Merck)
- Bromophenol Blue (Research Organics)
- BSA (New England Biolabs)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- Γλυκόζη (Panreac)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue (Fluka)
- Εκκινητές (Bio-Rad)
- Εκχύλισμα *S. cerevisiae* (Scharlau)
- EDTA (Panreac)
- Go Taq Flexi DNA πολυμεράση (Promega)
- HCl (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- IPTG (Isopropyl ThioGalactosyl) (Fermentas)
- KCl (Merck)
- LB Broth (Scharlau)
- LB Agar (Scharlau)
- Λυσοζύμη
- Μάρτυρας μοριακού βάρους (HyTest Ltd)
- Μεθανόλη (Panreac)
- MgCl_2 για PCR (Finnzymes)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs) (Stratagene)
- NaCl (Panreac)
- NaOH (Merck)
- NdeI (Takara)
- Οξικό οξύ (Merck)
- Paq5000 Taq πολυμεράση (Stratagene)
- PRPP (pyrophosphorylpyrophosphate)
- Ριβονουκλεάση (New England Biolabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (New England Biolabs)
- PMSF
- Proteinase K
- RNaseA
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (SIGMA)
- Taq πολυμεράση (HyTest Ltd)
- T4 λιγάση (New England Biolabs)
- T4 λιγάση (Takara)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Tris base (Merck)
- Tryptone (Merck)
- Χλωραμφαινικόλη (SIGMA)
- X-gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδη) (SIGMA)
- Xylene Cyanol (Merck)
- Υποξανθίν

3.1.2. Κύτταρα

- XL 1 blue: Στέλεχος *E. coli* που στερείται του μηχανισμού αναγνώρισης και καταστροφής ξένων τμημάτων DNA (Novagen), γι' αυτό και χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA. Επιπλέον, διαθέτει γονίδια που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη και χρησιμοποιείται για κλωνοποίηση πλασμιδίων, εισαγόμενων σε αυτό με μετασχηματισμό.
- DH5a: Στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή και κλωνοποίηση πλασμιδιακού DNA.
- BL 21 DE3 : Στέλεχος *E. coli* που δεν διαθέτει κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας.
Strataclone™ Solopack Competent Cells
Τα συγκεκριμένα κύτταρα παρέχονται από το Strataclone PCR Cloning Kit της Stratagene και διαθέτουν την ικανότητα έκφρασης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία απαιτείται για την κυκλοποίηση των γραμμικών μορίων DNA που παράγονται κατά τη διάρκεια του καταλυόμενου από την τοποισομεράση I ligation. Επίσης, τα κύτταρα αυτά υποστηρίζουν την επιλογή βάσει των μπλε και άσπρων αποικιών (blue/white screening) όταν μετασχηματισθούν με το πλασμίδιο pSC-A, το οποίο παρέχεται από το ίδιο kit και εξασφαλίζουν μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης.

3.1.3. Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων (competent cells).

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CaCl_2 .

- Αρχικά σε 3 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB Broth ενοφθαλμίζονται τα κύτταρα που επιθυμούμε να καταστήσουμε επιδεκτικά. Στην περίπτωση των κυττάρων DH5a προστίθεται στο θρεπτικό υλικό και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$. Οι υγρές καλλιέργειες έπειτα τοποθετούνται στους 37 °C και στις 210 rpm για 12-16 ώρες (overnight).
- Από την overnight καλλιέργεια λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100 ml αποστειρωμένο θρεπτικό LB Broth. Έπειτα από ήπια ανάδευση, φωτομετρείται 1 ml από την καλλιέργεια στα 600 nm. Η οπτική απορρόφηση (OD_{600}) πρέπει να είναι γύρω στο 0,04. Ακολούθως η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C και στις 210 rpm. Πραγματοποιούνται φωτομετρήσεις άνα τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου η οπτική απορρόφηση είναι $\text{OD}_{600}=0,4$, καθώς τα κύτταρα στο σημείο εκείνο βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους.
- Τα 100 ml της καλλιέργειας των κυττάρων μοιράζονται (υπό φλόγα) σε δύο αποστειρωμένα και παγωμένα falcons των 50 ml και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 10 λεπτά.

- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίζηνα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 30 ml διάλυμα MgCl₂-CaCl₂ (80 mM/20 mM) και πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Τα falcons φυγοκεντρώνονται εκ νέου στις 4.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα falcons τοποθετούνται ανάποδα.
- Σε κάθε falcon προστίθεται 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl₂ 0.1 M, αναδιαλύεται το ίζημα και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο.
- Εισάγονται 70 μl DMSO σε κάθε falcon και ακολουθεί ανάδευση (το DMSO διατηρεί τα κύτταρα δεκτικά για περισσότερο διάστημα και εμποδίζει τυχόν διαφυγή των τμημάτων τους). Έπειτα αφήνονται στον πάγο για 15 λεπτά.
- Προστίθενται άλλα 70 μl DMSO στα falcons και αφού αναδευτούν, τοποθετούνται στον πάγο.
- Πολύ γρήγορα μοιράζεται η ποσότητα των επιδεικτικών κυττάρων (200 μl ανά σωλήνα των 1.5 ml) και τοποθετούνται προς φύλαξη στους -80 °C.

3.1.4. Θρεπτικά μέσα

❖ Υγρό θρεπτικό μέσο (LB Broth) pH 7,2

Αντιδραστήριο	Τυπική αναλογία (g/l)
Tryptone	10,0
Yeast extract	5,0

Πίνακας 1: Σύσταση υγρού θρεπτικού μέσου (LB Broth) pH 7,2.

Για τελικό όγκο υγρού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

- LB Broth 15g
- NaCl 10g
- Απιονισμένο H₂O

❖ Στερεό θρεπτικό μέσο (LB Agar) pH 7,2

Αντιδραστήριο	Τυπική αναλογία (g/l)
Tryptone	10,0
Yeast extract	5,0
Άγαρ	15,0

Πίνακας 2: Σύσταση στερεού θρεπτικού μέσου (LB Agar) pH 7,2.

Για τελικό όγκο στερεού θρεπτικού μέσου 1L χρησιμοποιούνται:

- LB Agar 30g
- NaCl 10g
- Απιονισμένο H₂O

❖ *SOC medium (υγρό θρεπτικό μέσο) pH 7 για τελικό όγκο 100ml*

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tryptone	2g
Yeast extract	0,5g
NaCl 1M	1ml
KCl 1M	0,25ml
δ/μα Mg ²⁺ 2M	1ml
Γλυκόζη 2M	1ml

Πίνακας 3: Σύσταση SOC medium pH 7 για τελικό όγκο 100ml.

Κατά την παρασκευή του διαλύματος SOC προστίθενται τα 4 πρώτα αντιδραστήρια και αφού προστεθεί απιονισμένο H₂O μέχρι τα 97 ml, γίνεται αποστείρωση. Ακολουθεί προσθήκη των άλλων δύο συστατικών και συμπλήρωση με αποστειρωμένο H₂O μέχρι τα 100ml.

Το διάλυμα Mg²⁺ 2M παρασκευάζεται με 20,33g MgCl₂·6H₂O και 24,65g MgSO₄ σε τελικό όγκο 100ml.

3.1.5. Ρυθμιστικά διαλύματα

❖ *Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (50x) για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.*

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tris base	242g
Οξικό οξύ	57,1ml
EDTA 0,5M pH 8	100ml
Απιονισμένο H ₂ O	Έως 1L

Πίνακας 4: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος TAE (50x).

Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 8,6.

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (10 %).

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Tris base (pH 8,3)	15g
Γλυκίνη	72g
SDS	5g
Απιονισμένο H ₂ O	Έως 1L

Πίνακας 5: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα *loading buffer* (6x) για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Περιεκτικότητα</i>
Bromophenol Blue	0,09%
Xylene Cyanol	0,09%
Γλυκερόλη	60%
EDTA	60mM

Πίνακας 6: Σύσταση *loading buffer*.

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (3x) για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών:

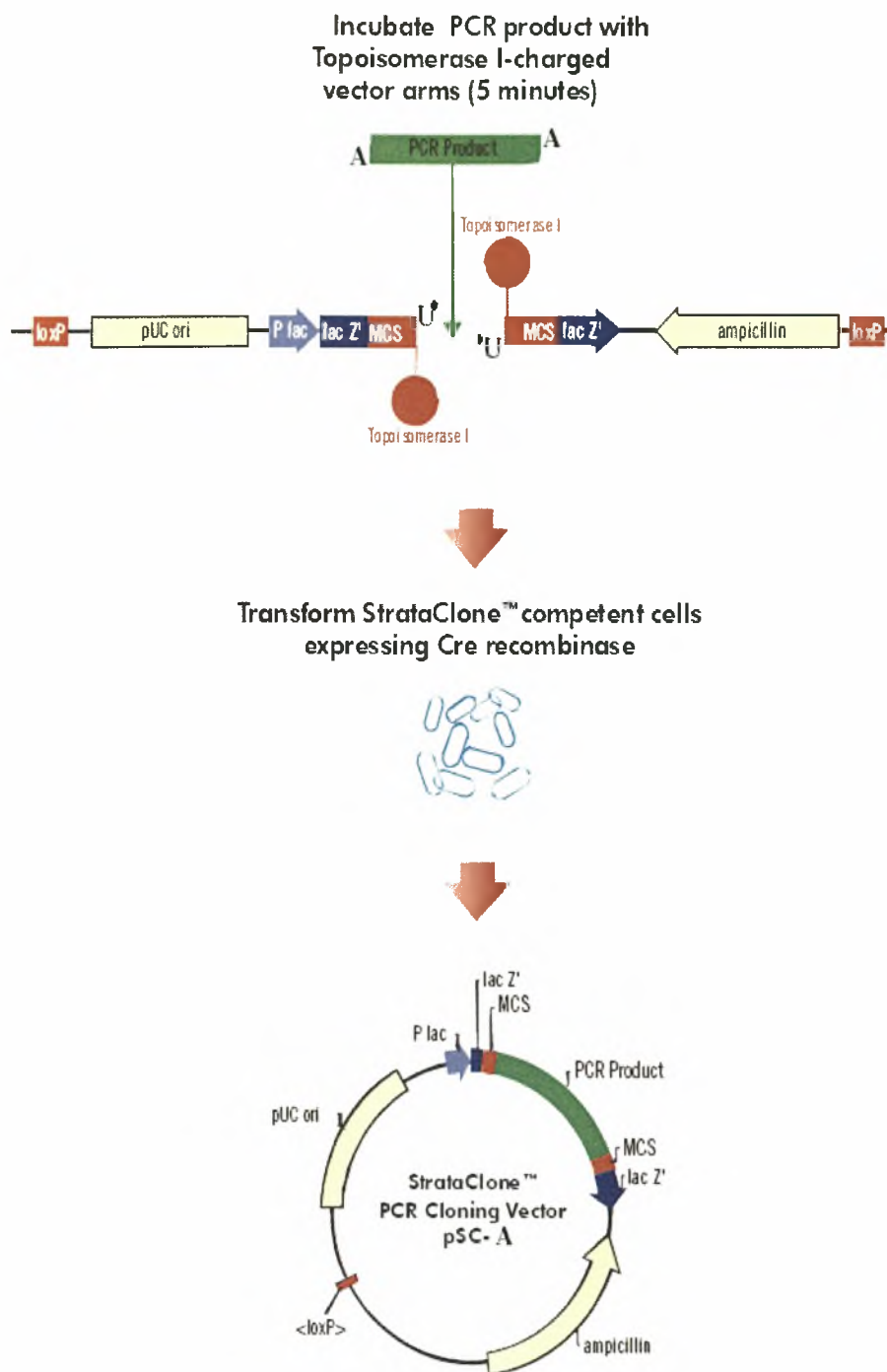
<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Περιεκτικότητα/Συγκέντρωση</i>
Tris-HCl, 0,5M (pH 6,8)	62,5mM
SDS 10% (w/w)	2%
Γλυκερόλη	25%
Απιονισμένο H ₂ O	0.01%

Πίνακας 7: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

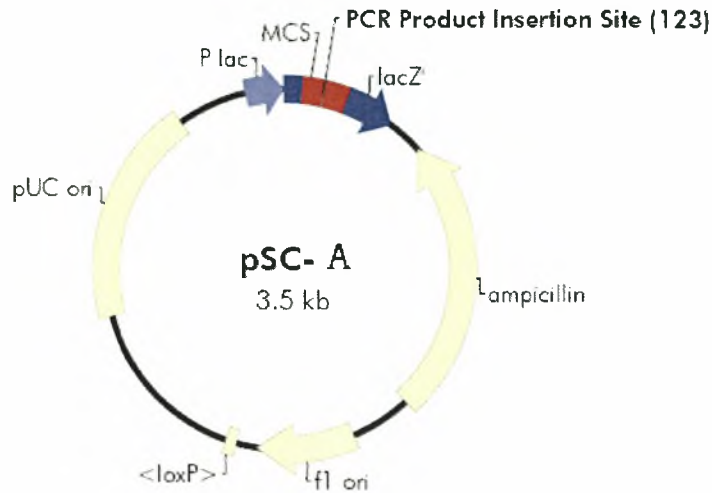
3.1.6. Πλασμιδιακοί φορείς

pSC-A: Πρόκειται για πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 3.5kb που χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση γονιδίων (Stratagene). Η διαδικασία της κλωνοποίησης με το συγκεκριμένο φορέα εκμεταλλεύεται τις συνδιασμένες δράσεις της τοποϊσομεράσης I από το ιό Vaccinia και της ρεκομπινάσης Cre από τον βακτηριοφάγο P1. *In vivo*, η τοποϊσομεράση I συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA χαλαρόνοντας και επανασυνδέοντας τις έλικες του DNA. Ειδικότερα, η τοποϊσομεράση I κόβει τη φωσφοδιεστερική ραχοκοκαλιά μιας αλυσίδας DNA ακριβώς μετά την αλληλουχία '5-CCCTT δημιουργώντας μια ενδιάμεση ένωση DNA-ενζύμου, η οποία συντηρεί την ενέργεια δεσμού που πρόκειται να χρειαστεί για την επανελίκωση του κομμένου DNA πίσω στη σωστή έλικα. Από τη στιγμή που δημιουργηθεί το ενδιάμεσο αυτό, η αντίδραση επανελίκωσης μπορεί επίσης να συμβεί με ένα ετερόλογο τμήμα DNA. Η ρεκομπινάση Cre καταλύει τον ανασυνδιασμό μεταξύ δύο loxP αλληλουχιών αναγνώρισης.

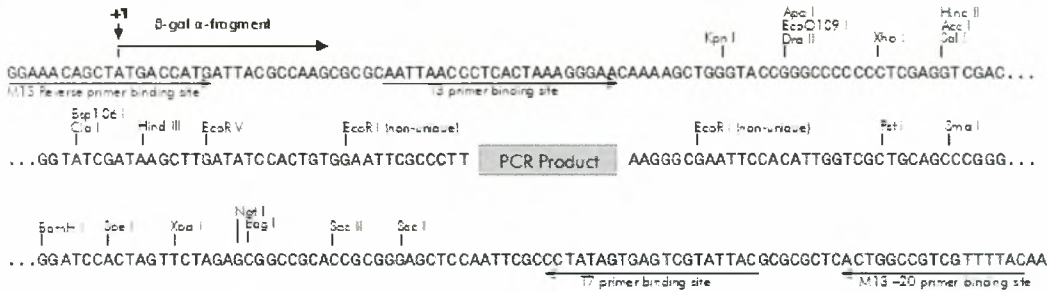
Το μείγμα φορέων που παρέχεται με το PCR cloning kit της Stratagene περιέχει βραχίονες DNA δύο ειδών, καθένας από τους οποίους στο ένα άκρο του φέρει μια τοποϊσομεράση I και στο άλλο μια περιοχή αναγνώρισης loxP. Τα φορτισμένα με την τοποϊσομεράση άκρα διαθέτουν μια προεξοχή τροποποιημένης ουριδίνης (U*). Με αυτόν τον τρόπο τα ενισχυμένα με Taq πολυμεράση προϊόντα της PCR, τα οποία φέρουν '3-A προεξοχές μπορούν να ενωθούν αποτελεσματικά με τους παραπάνω βραχίονες μέσω του σχηματισμού δεσμών A- U*, ακολουθούμενου από την σύνδεση των αλυσίδων DNA με τη βοήθεια της τοποϊσομεράσης I (εικόνα 11). Το γραμμικό μόριο DNA που προκύπτει στη συνέχεια, μετασχηματίζει επιλεκτικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα σύνθεσης της ρεκομπινάσης Cre, η οποία με τη σειρά της ανασυνδιάζει τις περιοχές loxP στα άκρα του γραμμικού μορίου. Έτσι, σχηματίζεται ο κυκλικός φορέας pSC-A (εικόνα 12) που έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο παρουσία αμπικιλίνης και περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ) προκειμένου να είναι δυνατή η επιλογή με white/blue screening.



Εικόνα 11: Σύνοψη της μεθόδου στην οποία στηρίζεται ο μετασχηματισμός με τη βοήθεια του Strataclone PCR cloning kit.



pSC-A PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region
(sequence shown 3460-3469, 1-252)

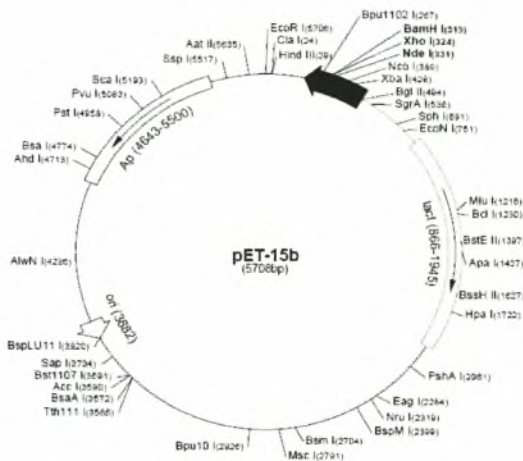


Feature	Nucleotide Position
β -galactosidase α -fragment coding sequence (<i>lacZ'</i>)	1-354
Multiple cloning site (MCS)	57-197
PCR product insertion site	123
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	465-1322
f1 origin of ss-DNA replication	1514-1820
<loxP> (mutant loxP-derived sequence lox δ 6/7); nonfunctional in Cre-mediated recombination)	1887-1920
pUC origin of replication	2461-3128
lac promoter	3350-3469

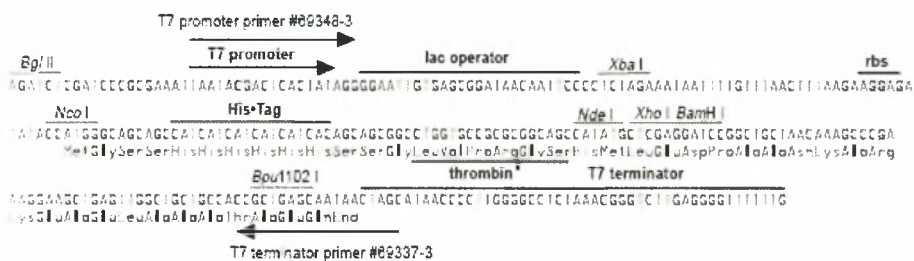
Εικόνα 12: Ο κυκλικός φορέας pSC-A. Ο χάρτης της εικόνας αντιπροσωπεύει το προϊόν της ένωσης των βραχιόνων του φορέα με το επιθυμητό προϊόν της PCR στα πλαίσια μιας αντίδρασης που καταλύεται από την τοποϊσομεράση I και ακολουθείται από Cre-εξαρτώμενο ανασυνδιασμό. Επίσης, παραχωρείται και μια λίστα από σημαντικές αλληλουχίες του φορέα, όπως οι θέσεις κοπής των περιοριστικών ενζύμων, η περιοχή στην οποία οφείλεται η ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη κτλ.

pET-15b: Πρόκειται για πλασμιδιακό φορέα μεγέθους 5708bp (Novagen), ο οποίος διαθέτει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη (εικόνα 13). Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων μέσω της T7 RNA πολυμεράσης. Στο πλασμίδιο pET-15b μετά τον

προαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker), όπου βρίσκονται οι θέσεις αναγνώρισης και κοπής από τα ένζυμα περιορισμού, όπως των NdeI και BamHI που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των γονιδίων *prfA*, *gpt*, *ppa* (εικόνα 14). Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου αυτού γίνεται μετά από την πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης στον προαγωγέα της. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14 πριν το σημείο εισαγωγής του γονιδίου υπάρχει μια περιοχή 6 ιστιδινών οι οποίες μεταφράζονται πριν το γονίδιο και βρίσκονται στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το οποιοδήποτε ένθεμα.



Εικόνα 13: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-15b.



pET-15b cloning/expression region

Εικόνα 14: Ο προαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης και ο πολυσυνδέτης (polylinker) του φορέα pET-15b. Στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη διακρίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων NdeI και BamHI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας. Πριν τον πολυσυνδέτη διακρίνεται η περιοχή His-Tag.

Παρ' όλα αυτά, ο pET-15b δε διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (*lacZ*), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο με blue/white screening, αλλά μόνο με την ανθεκτικότητα στη αμπικικιλίνη.

3.1.7. Εκκινητές (primers)

Για την ενίσχυση των γονιδίων *prsA* και *gpt* από το βακτήριο *E.coli*, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (primers) *prsA* NdeI Forward primer, *prsA* BamHI Reverse primer και *gpt* NdeI Forward primer και *gpt* BamHI Reverse primer (εικόνα 18).

<i>prsA</i> NdeI Forward primer
5' -G GCATATC CCTGATATGAAGCTTTTGG - 3'
GC Content 38,4%

<i>prsA</i> BamHI Reverse primer
5' -G GGATCC TTAGTGTTCGAACATGGCAG - 3'
GC Content 51.8%

<i>gpt</i> NdeI Forward primer
5' -G TCATATC AGCGAAAAATACATCG - 3'
GC Content 57,6%

<i>gpt</i> BamHI Reverse primer
5' -T GGGATCC TTAGVGACCGGAGATTGG - 3'
GC Content 37.5%

Εικόνα 15: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *prsA* της PRPP συνθετάσης και *gpt* της XGPRT από γενομικό DNA του *E.coli*. Τα χρωματισμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν στις επιθυμητές θέσεις κοπής από τα περιοριστικά ένζυμα NdeI (Forward primer) και BamHI (Reverse primer).

Οι εκκινητές περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις θέσεις δράσης των ενζύμων περιορισμού NdeI και BamHI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία για την κλωνοποίηση των γονιδίων.

3.2. *In vitro* ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. Απομόνωση γενομικού DNA

Η απομόνωση γενομικού DNA έγινε από καλλιέργεια 200ml *E.coli* K-12 με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου, η οποία προσδίδει υψηλή καθαρότητα στο εξαγόμενο DNA, λόγω της δυνατότητας μετουσίωσης και επακόλουθης συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών με τη δράση της φαινόλης. Λόγω της

συσσωμάτωσης τους οι πρωτεΐνες είναι εύκολο να απομακρυνθούν με φυγοκέντρηση.

Αρχικά σε 1g ιζήματος των κυττάρων προστέθηκαν 10mL Tris HCl 100mM pH=7,5 και 15μg λυσοζύμης, το ίζημα αναδιαλύθηκε, αναδεύτηκε ήπια και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Με το πέρας των 10 λεπτών προστέθηκαν 200μL EDTA 500 mM, 20μL RNase A 10mg/mL, 180μL πρωτεϊνάση K 10mg/mL, 100μL NaCl 5M και SDS 10%. Έπειτα προστέθηκε ίσος όγκος με το υπερκείμενο φαινόλης/χλωροφορμίου ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 10min και απομάκρυνση της πάνω φάσης (φαινόλη) που δημιουργήθηκε μετά την φυγοκέντρηση (1^η εκχύλιση). Συνολικά έγιναν 4 εκχυλίσσεις. Μετά τις εκχυλίσσεις προστέθηκε 1 όγκος 100% αιθανόλης και το μείγμα αφέθηκε για 30 λεπτά στους -80 °C και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στις 14000rpm και στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 όγκο 70% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε στις 14000rpm και στους 4 °C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και πάλι και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει από την αιθανόλη. Το στεγνό πλέον ίζημα (γενομικό DNA) επαναδιαλύθηκε σε 50μL H₂O.

3.2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου του *prsA* από γενομικό DNA που απομονώθηκε από βακτηριακά κύτταρα *E.coli K-12*. Αρχικά προστίθενται το γενωμικό DNA του βακτηρίου, το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης, η οποία στην προκειμένη περίπτωση είναι η Hytest DNA πολυμεράση, τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), οι εκκινητές (primers) και H₂O. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι *prsA NdeIFd* και *prsA BamHIRv*. Έτσι, μετά το πέρας της αντίδρασης ενίσχυσης των επιθυμητών γονιδίων, προκύπτουν προϊόντα που στα άκρα τους φέρουν θέσεις κοπής για τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI. Πριν τοποθετηθούν τα μείγματα στη συσκευή PCR πραγματοποιείται καλή ανάμειξη όλων των συστατικών. Η αντίδραση PCR ξεκινάει μετά την προσθήκη όλων των συστατικών. Η ενίσχυση προχωρά με συγκεκριμένο αριθμό βημάτων που αποτελούν ένα κύκλο και αποθηκεύονται στο πρόγραμμα της συσκευής PCR. Ο ένας κύκλος αποτελείται από τα εξής βήματα, πρώτο το βήμα της μετουσίωσης του DNA στους 94°C για 4 λεπτά και 94°C για 1 λεπτό ένα στάδιο υβριδισμού για την σύνδεση των εκκινητών στους 58°C για 1 λεπτό και ένα στάδιο πολυμερισμού κατά το οποίο δρα η πολυμεράση στους 72°C για 1 λεπτό. Ακολούθησαν άλλοι 34 κύκλοι. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα στάδιο σε θερμοκρασία υβριδισμού 72°C για 20 λεπτά όπου τοποθετείται επίσης με μεγάλη προσοχή 0,5 μl Hytest πολυμεράση προκειμένου να προστεθεί στα προϊόντα του πολυμερισμού μία πολύ-A ουρά. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μειγμάτων τελικού όγκου 50μl φαίνονται στον Πίνακα 8.

Αντιδραστήρια	Όγκος (methicillin resistant, MR)
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (10x)	5μl
Premixed dNTPs (10 mM)	1,5μl
Εκκινητές prsA NdeIFd	0,5 μl
Εκκινητές prsA BamHIRv	0,5 μl
Γενωμικό DNA	2 μl
Hyttest πολυμεράση	0,5 μl
Sterile H ₂ O	40μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Πίνακας 8. Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την παρασκευή μείγματος για PCR.

3.2.3. Διαχωρισμός τμημάτων DNA

Για το διαχωρισμό τμημάτων DNA και τον προσδιορισμό του μεγέθους του καθενός χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης. Χρησιμοποιείται πηκτική αγαρόζη 0,8% ή 1%, ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε, το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 0,32gr αγαρόζης ή 0,40gr αγαρόζης, αντίστοιχα, σε 40ml TAE buffer 1x. Στη συνέχεια, θερμαίνεται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί όλη η ποσότητα της αγαρόζης και να γίνει διαυγές. Αφού κρυώσει ακολουθεί προσθήκη 3μl βρωμιούχου αιθιδίου 1% , ήπια ανάδευση και στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου και αφήνεται να πήξει. Προετοιμάζονται τα δείγματα και οι μάρτυρες του μοριακού βάρους που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν με την προσθήκη σε αυτά loading buffer 6x. Όταν η πηκτική πήξει, πληρώνεται με TAE buffer 1x μέχρι να καλυφθεί και φορτώνονται τα δείγματα στις ειδικές υποδοχές (πηγαδάκια) της πηκτής. Ακολούθως, συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με τη συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής όπου κατευθύνονται τα δείγματα τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα. Τέλος, εφαρμόζεται τάση 120 V και μετά από 30 περίπου λεπτά είναι δυνατή η ανίχνευση του DNA με τη μορφή ζωνών κάτω από το υπεριώδες φως, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της ενσωμάτωσης των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ουσίας που απορροφά στο υπεριώδες, στις διπλές έλικες του DNA. Ταυτόχρονα, είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνών μέσω της σύγκρισής τους με τους μάρτυρες του μοριακού βάρους.

3.2.4. Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction)

Η απομόνωση και ο καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης (DNA extraction from agarose gels) έγινε με βάση το πρωτόκολλο Invitrogen PureLink Quick Gel Extraction.

1) Εξαγωγή του τμήματος DNA- Διάλυση της πηκτής:

Αρχικά εξάγεται από την πηκτή αγαρόζης η ζώνη με το τμήμα του DNA που επιθυμούμε να απομονώσουμε με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Η εξαγωγή πραγματοποιείται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο περιττός όγκος της πηκτής. Το κομμάτι αυτό διαλύεται σε buffer GS1 σε αναλογία 30μl buffer για κάθε 10mg πηκτής αγαρόζης (για πηκτή αγαρόζης μέχρι και 2%). Η διάλυση επιτυγχάνεται με θέρμανση της πηκτής στους 50°C για 15 λεπτά με ανάδευση κάθε 3 λεπτά. Αφού λιώσει η πηκτή, αφήνω στους 50°C για 5 λεπτά ακόμη. Παράλληλα προθερμαίνω το TE buffer στους 65-70°C.

2) Δέσμευση του DNA- Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

Το δείγμα φορτώνεται σε στήλη, η οποία τοποθετείται σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα. Ακολούθως, προστίθενται ακόμη 500μl GS1 buffer, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g και απομακρύνεται το έκλουσμα. Η στήλη επανατοποθετείται στο συλλεκτικό σωλήνα. Στη συνέχεια, προστίθενται 700μl buffer W9 (περιέχει αιθανόλη) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12000 x g, απομακρύνεται το έκλουσμα και επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα.

3) Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης- Έκλυση του DNA

Τα δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 12000 x g με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση του οποιουδήποτε buffer. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο γιατί έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της αιθανόλης που περιέχει το buffer W9, η οποία είναι πιθανόν να αναστείλει ακόλουθες αντιδράσεις. Ακολούθως, η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα (Recovery Tube) και προστίθενται 50μl του TE buffer που είχε προθερμανθεί. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της έκλυσης του DNA. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12000 x g. Το εκλούμενο DNA φυλάσσεται στους -20°C.

3.2.5. Σύνδεση τμημάτων DNA (ligation)

Επωάζεται γραμμικός φορέας παρουσία των τμημάτων, που επιθυμούμε να συνδέσουμε, σε αναλογία φορέα προς τμήμα DNA 1:3, με την προσθήκη 1 Unit T4 DNA λιγάσης (400u/μl) (Takara). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η προσθήκη στο

διάλυμα του ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος της λιγάσης το οποίο κατασκευάζεται από την ίδια εταιρεία, καθώς επίσης και ATP (50mM) τελικής συγκέντρωσης 5mM. Το διάλυμα επωάζεται για 12-14h στους 16 °C στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ο φορέας pET-15b.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ο πλασμιδιακός φορέας pSC-A, προστίθενται με την ακόλουθη σειρά τα εξής συστατικά:

- 3 μl Strataclone Cloning Buffer
- 2 μl PCR product (5-50ng)
- 1 μl Strataclone Vector Mix

Ακολουθως, πραγματοποιείται επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

3.2.6. Μεταφορά πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα *E. coli* (transformation)

Σε 200μl επιλεκτικών κυττάρων γίνεται προσθήκη 5μl του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και ακολούθως heatshock στους 42°C για 1,5 λεπτά. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 1-2 λεπτά και εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 500μl SOC medium. Ακολουθεί επώαση για 1,5 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (160 rpm). Τέλος, επιστρώνονται 300μl της μετασχηματισμένης καλλιέργειας σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB agar το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ανάλογα με τα γονίδια ανθεκτικότητας που διαθέτει το εκάστοτε πλασμίδιο που χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό (π.χ. αμπικιλίνη). Επίσης, σε περίπτωση που το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται διαθέτει το οπερόνιο της λακτόζης (π.χ. pSC-A), είναι απαραίτητη η προσθήκη 16μl X-gal (50mg/ml) και 100μl IPTG 0,1M (Isopropyl Thio Galactosyl) στα τριβλία άγαρ πριν την επίστρωση των κυττάρων, για να είναι δυνατή, στη συνέχεια, η επιλογή των λευκών αποικιών που θα περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο (blue/white screening). Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα LacIQ από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης. Με αυτόν τον τρόπο, το γονίδιο που έχει εισαχθεί μετά το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης στον πλασμιδιακό φορέα, εκφράζεται. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των τριβλίων στους 37°C για 12-14h.

3.2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Οι αποικίες του ενδιαφέροντός μας ενοφθαλμίζονται σε 3ml LB broth που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί επώαση των καλλιεργειών για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Η ακόλουθη διαδικασία πραγματοποιείται με βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli* NucleoSpin(Plasmid QuickPure).

1) Καλλιέργεια και συλλογή των βακτηριακών κυττάρων:

Μεταφέρονται 1,5ml από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε σε ένα σωλήνα και φυγοκεντρώνονται για 30s στις 11000 x g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα.

2) Λύση των κυττάρων:

Προστίθενται 250μl buffer A1 και επαναδιαλύεται το ίζημα με τη βοήθεια πιπέτας και έντονη ανάδευση στο vortex. Ακολουθεί προσθήκη 250μl buffer A2 και ανάμειξη αναποδογυρίζοντας ήπια μερικές φορές χωρίς τη χρήση του vortex. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 300μl buffer A3 και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας μερικές φορές (6-8) αποφεύγοντας τη χρήση του vortex. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11000 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

3) Δέσμευση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη NucleoSpin (Plasmid QuickPure σε ένα συλλεκτικό σωλήνα (collecting tube) των 2ml στην οποία φορτώνεται το υπερκείμενο που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση του προηγούμενου βήματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

4) Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης:

Επανατοποθετείται η στήλη στο συλλεκτικό σωλήνα και προστίθενται 450μl buffer AQ (με αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 11000 x g όπου και επιτυγχάνεται ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του εκλούσματος και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα.

5) Έκλυση του DNA:

Τοποθετείται η στήλη σε νέο σωλήνα και προστίθενται 50μl buffer AE. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 x g.

3.2.8. Ανάλυση με ένζυμα περιορισμού (digestion)

Η ενζυμική πέψη με τη χρήση ενζύμων περιορισμού έχει σκοπό την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Πλασμιδιακό DNA επωάζεται με το ένζυμο σε αναλογία 2 Units (ενζυμικές μονάδες)/μg DNA, παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο προτείνεται από την κατασκευαστική εταιρεία. Η ενζυμική μονάδα (Unit) ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μg DNA από βακτηριοφάγο σε μια ώρα, στους 37°C. Η αντίδραση διαρκεί περίπου 3 ώρες στους 37°C. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι τα NdeI (10u/ml) και BamHI (10000u/μl) της εταιρείας Takara. Στην εικόνα 16 φαίνονται οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν τα συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα και οι αντίστοιχες θέσεις κοπής τους.



Εικόνα 16: Οι αλληλουχίες του DNA που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI και οι θέσεις κοπής τους.

Στο buffer της Takara που χρησιμοποιήθηκε (10x K) τα ένζυμα είχαν 100% ενεργότητα. Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των συστατικών του buffer.

Συστατικά	Συγκέντρωση (mM)
Tris-Hcl (ph 8,5)	200
MgCl ₂	100
Dithiothreitol	10
KCl	1000

Πίνακας 9: Τα συστατικά του buffer της Takara 10x K που χρησιμοποιήθηκε για τις πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI, BamHI.

Κατά την διαδικασία της ενζυμικής πέψης δεν προστίθεται επιπλέον BSA (100x), διότι υπάρχει στο που χρησιμοποιήθηκε στην πέψη. Το BSA είναι μια ουσία η οποία δεσμεύεται στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων, εμποδίζοντας έτσι την δέσμευση των περιοριστικών ενδονουκλεασών σε αυτά, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η μείωση της δραστηριότητας αυτών των ενζύμων.

3.2.9. Διαδικασία υπερέκφρασης των ενζύμων.

Έλεγχος υπερέκφρασης των ενζύμων (expression test)

Ο έλεγχος της υπερέκφρασης πραγματοποιείται για να προσδιοριστούν οι συνθήκες στις οποίες κάποια πρωτεΐνη εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό, αλλά και για εξετασθεί αν κάποια πρωτεΐνη καθιζάνει μαζί με το ίζημα μετά την ομογενοποίηση των κυττάρων. Η διαδικασία έχει ως εξής: Αρχικά ετοιμάζεται 5 ml καλλιέργεια κυττάρων BL21DE3 (στην οποία προστίθεται πριν τον εμβολιασμό αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml) η οποία επωάζεται overnight. Απο την overnight καλλιέργεια των 5ml προστίθεται 1,5ml σε 100ml LB Broth και αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml έπειτα η νέα καλλιέργεια αφήνεται να επωαστεί στους 37°C και 210 rpm έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 600nm (OD₆₀₀) γίνει 0,6, τότε η καλλιέργεια των 100ml χωρίζεται ανά 20ml σε τέσσερις μικρές φιάλες και προστίθεται εκ νέου αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml. Στην πρώτη φιάλη προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και στην δεύτερη 0,5mM. Οι δυο αυτές φιάλες αφήνονται να επωαστούν στους 37°C και 210 rpm για 5h. Στις άλλες δυο προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και 0,5mM και αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου στις 210 rpm overnight. Τέλος, φυγοκεντρώνονται οι καλλιέργειες στις 12000 rpm για 30 min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C. Έπειτα για την σύγκριση της έκφρασης στις διαφορετικές συνθήκες τα κύτταρα

ομογενοποιούνται όπως περιγράφεται παρακάτω. Μετά την φυγοκέντρηση (14000 rpm, για 30 λεπτά στους 4°C) που ακολουθεί την ομογενοποίηση τα ιζήματα βράζονται σε 200 µl stain solution (πίνακας 13) για 30 min στους 98 °C. Τέλος ιζήματα και υπερκείμενα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακριλαμίδης.

Υπερέκφραση των ενζύμων για την περαιτέρω απομόνωση τους

Σε 5ml LB Broth με αμπικιλίνη (100mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml, ενοφθαλμίζονται κύτταρα BL 21 DE3 που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και επώάζονται για 12-14h στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Ακολουθεί μεταφορά των 2ml της O/N καλλιέργειας σε 200ml από φρέσκο θρεπτικό μέσο LB broth με αμπικιλίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 600nm (OD₆₀₀) και επώαση των καλλιεργειών στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου το OD₆₀₀ φτάσει περίπου το 0,6 που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Προσθέτουμε IPTG (0,1M) (Isopropyl Thio Galactosyl) σε τελική συγκέντρωση 0,5mM (και για τα τρία ένζυμα) καθώς και αμπικιλίνη. Το IPTG δρα ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης της οποίας ο προαγωγέας στο πλασμίδιο pET-15b που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη περίπτωση για την κλωνοποίηση των γονιδίων *prsA*, *gpt* και *ppa*** βρίσκεται μπροστά από τον polylinker. Η έκφραση των γονιδίων αυτών στα κύτταρα του *E. coli* αναστέλλεται από τον καταστολέα LacIQ. Το IPTG δεσμεύει και απομακρύνει τον καταστολέα από το DNA επιτρέποντας έτσι την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με τη σειρά της θα αναγνωρίσει τον προαγωγέα της στο πλασμίδιο και θα μεταγράψει τα γονίδια που βρίσκονται μετά από αυτόν. Μετά την προσθήκη του IPTG συνεχίζεται η επώαση των καλλιεργειών στους 37°C, στις 210rpm για 5 ώρες για την υπερέκφραση της συνθετάσης του PRPP και της XGPRT και σε θερμοκρασία δωματίου, στις 210rpm overnight για την πυροφωσφατάση. Τέλος, φυγοκεντρούνται οι καλλιέργειες στις 12000 rpm για 30 min στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

3.2.10. Διαδικασία απομόνωσης των ενζύμων

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Η ομογενοποίηση των κυττάρων BL 21 DE3, στα οποία έχει προηγηθεί υπερέκφραση του *prsA*, πραγματοποιείται στο διάλυμα ομογενοποίησης (Διάλυμα 1) (Πίνακας 10). Ακολουθεί διάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 1ml του παραπάνω διαλύματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία του σπασίματος των κυττάρων με υπέρηχους (sonicator) και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm, για 30 λεπτά στους 4°C. Διαχωρίζεται το υπερκείμενο από το ίζημα και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης του ενζύμου.

Απομόνωση των ενζύμων.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 14000 rpm για 30 λεπτά και διαχωρισμός του υπερκείμενου από το ίζημα, και τα δύο από τα οποία φυλάσσονται στους -20°C . Το υπερκείμενο μπορεί να κλασματοποιηθεί, περνώντας κάθε δείγμα από στήλη νικελίου (NTA-Ni), η οποία κατακρατά την PRPP συνθετάση μέσω σύνδεσης των ιστιδινών που περιέχει με τα άτομα του νικελίου και αφήνει τις υπόλοιπες πρωτεΐνες να τη διαπεράσουν. Έτσι, είναι δυνατόν να συλλεχθούν κλάσματα τα οποία περιέχουν πρωτεΐνες διαφορετικές της PRPP συνθετάσης. Για την απομάκρυνση πρωτεϊνών διαφορετικών από την PRPP συνθετάση που συνδέονται ασθενώς στη στήλη εφαρμόζεται το Διάλυμα 2. Σε άλλες στήλες νικελίου απαιτείται προσθήκη μικρής συγκέντρωσης ιμιδαζόλης στο Διάλυμα 2 ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικές πρωτεΐνες, όμως στην στήλη που πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη απομόνωση δεν χρειαζόταν η προσθήκη ιμιδαζόλης. Για την ανάκτηση των ενζύμων το ρυθμιστικό διάλυμα πρέπει να περιέχει ιμιδαζόλη σε μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση (150 mM) (Διάλυμα 3), ώστε ο παράγοντας αυτός να μπορέσει να αποδεσμευτεί από τη στήλη. Αυτό που κάνει στην ουσία η ιμιδαζόλη είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται τις his-tagged πρωτεΐνες στη δέσμευση. Κυρίως στα κλάσματα που συλλέχθηκαν μετά τα την εφαρμογή του διαλύματος 3 θα αναζητηθεί στη συνέχεια η ύπαρξη των ενζύμων που μας ενδιαφέρουν.

Αντιδραστήρια	Διάλυμα 1 (ομογενοποίησης)	Διάλυμα 2 (έκπλυσης)	Διάλυμα 3 (έκλουσης)
	Τελική συγκέντρωση		
HEPES pH 7.9	20mM	20mM	20mM
KCl	0.5 M	0.5 M	0.5 M
Triton X-100	0.1%	-	-
Γλυκερόλη	10%	10%	10%
PMSF	0,1 mM	-	-
β - μερκαπτοαιθανόλη	2mM	-	-
Ιμιδαζόλη	-	-	250mM
Lysozyme (from hen egg)	200 $\mu\text{g/ml}$	-	-

Πίνακας 10: Σύσταση των διαλυμάτων ομογενοποίησης (Διάλυμα 1) και έκλουσης (Διαλύματα 2 και 3) διαφορετικών τελικών συγκεντρώσεων ιμιδαζόλης.

Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, η οποία αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, τη πηκτή διαχωρισμού (separating gel) (πίνακας 11) και τη πηκτή συγκέντρωσης (stacking gel) (πίνακας 12).

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>
Ακρυλαμίδιο 30%	2,7 ml
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml
SDS 10%	100 μ l
TEMED	6,0 μ l
APS 10%	100 μ l
ddH ₂ O	Up to 10 ml

Πίνακας 11: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 8%.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>
Ακρυλαμίδιο 30%	0,83 ml
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8)	1,26 ml
SDS 10%	50 μ l
TEMED	5,0 μ l
APS 10%	50 μ l
ddH ₂ O	Up to 5 ml

Πίνακας 12: Σύσταση πηκτής συγκέντρωσης 5%.

Η πηκτή συγκέντρωσης έχει μικρότερη πυκνότητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και συγκεντρώνει τη ποσότητα των δειγμάτων που έχουμε φορτώσει στα πηγάδια, τα οποία όταν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Αρχικά η πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής. Αφού πήξει, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτή συγκέντρωσης ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, η οποία αφήνεται να πήξει. Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (3x) και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται με θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C, για 4 λεπτά, ούτως ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους, το οποίο είναι ενιαίο αρνητικό, εξαιτίας του SDS.

Ακολούθως, αφού εξασφαλιστεί ότι η πηκτική είναι έτοιμη, φορτώνονται τα δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες μοριακού βάρους, στις ειδικές υποδοχές της πηκτικής και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris, γλυκίνη, SDS), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτική. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτική συγκέντρωσης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτική διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 200V.

Το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Ακολουθεί, αφαίρεση της πηκτικής συγκέντρωσης και βάψιμο της πηκτικής διαχωρισμού με το διάλυμα χρωματισμού (stain solution)(πίνακας 13).

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητα-Όγκος</i>
Coomasie Brilliant Blue	0,25g
Ισοπροπανόλη	25ml
Οξικό οξύ	10ml
ddH ₂ O	65ml

Πίνακας 13: Σύσταση διαλύματος χρωματισμού.

Η διαδικασία αυτή διαρκεί 45 λεπτά υπό ανάδευση και στη συνέχεια πραγματοποιείται αποχρωματισμός της πηκτικής με το διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution), το οποίο αποτελείται από 10% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ. Η διαδικασία αποχρωματισμού διαρκεί για περίπου 50 λεπτά, αλλά κάθε 10 λεπτά είναι απαραίτητη η ανανέωση του διαλύματος. Στο τέλος της διαδικασίας είναι ευδιάκριτες οι ζώνες των πρωτεϊνών, εξαιτίας της μπλε χρωστικής Coomasie Brilliant Blue, ενώ είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνικών τμημάτων μέσω της σύγκρισης των ζωνών με τους μάρτυρες μοριακού βάρους.

3.2.11. Μέθοδος για την μέτρηση της δραστηριότητας της PRTάσης της Ξανθίνης και γουανίνης (XGPRT)

Η μέθοδος για την μέτρηση της δραστηριότητας της XGPRT (Keough et al., 1986) στηρίζεται στην αύξηση της οπτικής απορρόφησης στα 257nm λόγω της δημιουργίας του IMP, GMP ή XMP από PRPP και υποξανθίνη, γουανίνη ή Ξανθίνη αντίστοιχα (ανάλογα ποια πουρινική βάση θα χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα για το ένζυμο). Στην συγκεκριμένη εργασία το ένζυμο δεν ήταν καθαρισμένο αλλά προερχόταν από το υπερκείμενο μικρής ποσότητας βακτηρίων BL21DE3 τα οποία είχαν υπερεκφράσει την XGPRT . Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- PRPP 1,6mM
- Buffer αντίδρασης: 5 όγκους (Tris-Hcl pH=8,5 0,2M , Mgcl₂ 0,1M) 2 όγκους υποξανθίνη 1mM και 3 όγκους H₂O

- H₂O αποστειρωμένο

Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της ενεργότητας της XGPRT.

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Τυφλό</u>	<u>Δείγμα</u>
Buffer αντίδρασης	600μl	600μl
Υπερκείμενο (ένζυμο)	-	50μl
H ₂ O	400μl	300μl
PRPP 1,6 mM	-	50μl

Πίνακας 14: Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για το assay.

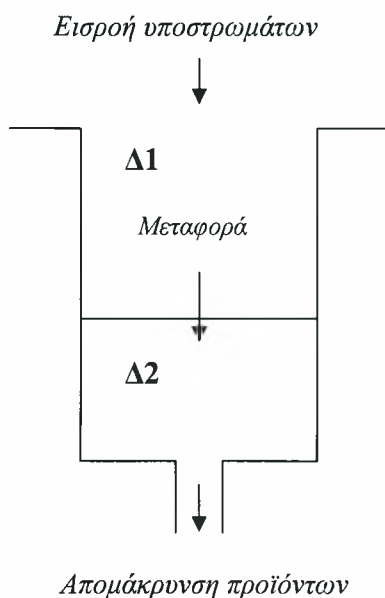
Για την μέτρηση της ενεργότητας της XGPRT ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα: Αρχικά μηδενίζεται το φωτόμετρο στα 275 nm και έπειτα προστίθενται στην κυψελίδα (η οποία είναι από χαλαζία γιατί οι μετρήσεις γίνονται στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας) το buffer αντίδρασης που περιέχει το ένα από τα δυο υποστρώματα του ενζύμου, την υποξανθίνη, το υπερκείμενο και το H₂O. Σε αυτή τη φάση καταγράφονται μετρήσεις της OD₂₅₇ κάθε 1min ώστε να διαπιστωθεί ότι η υποξανθίνη λόγω του πουρινικού της δακτυλίου δεν απορροφά ακτινοβολία και για να διαπιστωθεί ότι δεν γίνεται κάποια παράπλευρη ενζυμική αντίδραση. Εφόσον η OD₂₅₇ παραμένει σταθερή προσθέτουμε και το δεύτερο υπόστρωμα, το PRPP και αναδεύουμε γρήγορα, έπειτα καταγράφονται μετρήσεις της OD₂₅₇ κάθε 15 sec. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα αντιδραστήρια πρέπει να βρίσκονται περίπου στην ίδια θερμοκρασία διότι οι αλλαγές της θερμοκρασίας κατά την ανάμειξη των συστατικών επηρεάζουν την OD₂₅₇.

3.3. ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1. COPASI

Η προσομοίωση του συστήματος μας στηρίχτηκε σε ένα μοντέλο που αποτελείται από δυο διαμερίσματα (compartments) στα οποία γίνονται και οι αντιδράσεις. Το πάνω διαμέρισμα (Δ1) θεωρείται ότι είναι το σημείο εισαγωγής των υποστρωμάτων, στο πάνω μέρος της στήλης-Ni (βιοαντιδραστήρας) και το κάτω διαμέρισμα (Δ2) είναι το σημείο εξόδου των προϊόντων, αλλά και αντιδρώντων που δεν χρησιμοποιήθηκαν. Στα δύο διαμερίσματα συμβαίνουν οι εξής αντιδράσεις: η εισαγωγή των υποστρωμάτων, η αντίδραση των υποστρωμάτων με τα ένζυμα, η μεταφορά υποστρωμάτων και προϊόντων από το Δ1 στο Δ2 όπου και εκεί συμβαίνουν ενζυμικές αντιδράσεις και τέλος απομάκρυνση από το Δ2 προϊόντων και αντιδρώντων που δεν

χρησιμοποιήθηκαν. Στην εικόνα 17 φαίνονται παραστατικά όσα αναφέρθηκαν παραπάνω.



Εικόνα 17: Μοντέλο δυο διαμερισμάτων σε μια χρωματογραφική στήλη Ni, η οποία είναι και ο βιοαντιδραστήρας μας. Το Δ1 είναι το πάνω διαμέρισμα και το Δ2 είναι το κάτω διαμέρισμα. Στο σχήμα δεν εμφανίζονται οι ενζυμικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μέσα στα δυο διαμερίσματα.

Για κάθε διαμέρισμα είναι απαραίτητο να καθοριστούν τα στοιχεία (species) που βρίσκονται σε αυτό καθώς και οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα. Στην εικόνα 18 φαίνονται τα δυο διαμερίσματα και τα στοιχεία τους (species).

Compartment Name	pano	Compartment Name	kato
Simulation Type	fixed	Simulation Type	fixed
Initial Volume (ml)	1	Initial Volume (ml)	1
Volume (ml)	1	Volume (ml)	1
Rate (ml/s)	0	Rate (ml/s)	0
Contained Species	AMP_a ATP_a Hx_a IMP_a PP_a PRPP_a	Contained Species	AMP ATP Hx IMP PP PRPP

Εικόνα 18: Τα δυο διαμερίσματα με τα στοιχεία τους. Υποθέσαμε ότι και στα δυο διαμερίσματα υπάρχουν τα ίδια στοιχεία.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 18 υποθέσαμε ότι στα δυο διαμερίσματα υπάρχουν τα ίδια στοιχεία και για να γίνει διαφοροποίηση μεταξύ των στοιχείων των δυο διαμερισμάτων, τα στοιχεία που ανήκουν στο πάνω διαμέρισμα γράφονται με "_a" στο τέλος. Εκτός από τα ίδια στοιχεία τα διαμερίσματα έχουν και κοινές αλλά και μοναδικές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις, οι μηχανισμοί των αντιδράσεων και το διαμέρισμα που συμβαίνουν αυτές που συμβαίνουν φαίνονται στον πίνακα 15.

Αντίδραση	Μηχανισμός αντίδρασης (functions)	Διαμέρισμα (compartment)
Εισαγωγή ATP	Constant flux (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Εισαγωγή 5-φωσφορικής ριβόζης	Constant flux (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Εισαγωγή υποξανθίνης	Constant flux (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Σύνθεση PRPP	Ordered Bi Bi	Πάνω και Κάτω
Περίσωση υποξανθίνης	Ordered Bi Bi	Πάνω και Κάτω
Υδρόλυση PPi	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Πάνω και Κάτω
Μεταφορά ATP	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Μεταφορά 5-φωσφορικής ριβόζης	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Μεταφορά PRPP	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Μεταφορά AMP	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Μεταφορά υποξανθίνης	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Μεταφορά IMP	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Μεταφορά PPi	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Πάνω
Απομάκρυνση ATP	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Κάτω
Απομάκρυνση 5-φωσφορικής ριβόζης	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Κάτω

Απομάκρυνση PRPP	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Κάτω
Απομάκρυνση AMP	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Κάτω
Απομάκρυνση υποξανθίνης	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Κάτω
Απομάκρυνση IMP	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Κάτω
Απομάκρυνση PPI	Mass action (μη αντιστρεπτή)	Κάτω

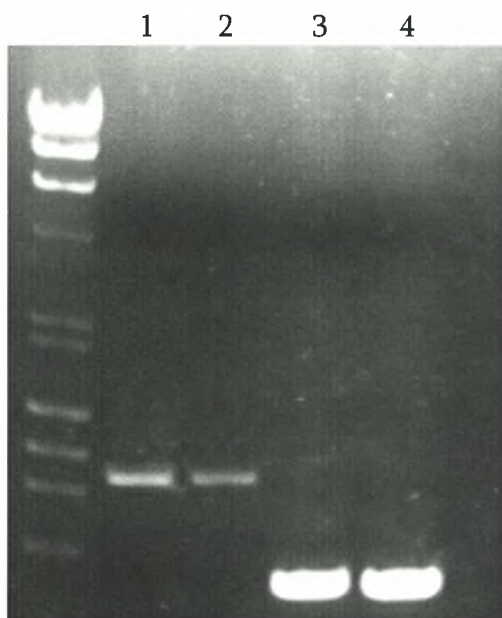
Πίνακας 15: Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν στο μοντέλο των δυο διαμερισμάτων, οι μηχανισμοί των αντιδράσεων καθώς και το/τα διαμέρισμα που συμβαίνουν.

Οι τιμές των σταθερών για τις αντιδράσεις σύνθεσης του PRPP και της πέρισωσης της υποξανθίνης συμπληρώθηκαν σύμφωνα με τους Switzer R. (1978), Switzer R. (1971), Hove-Jensen Bjarne et. al., (2005), Xu et. al., (1997),

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα *In vitro* πειραματικής διαδικασίας

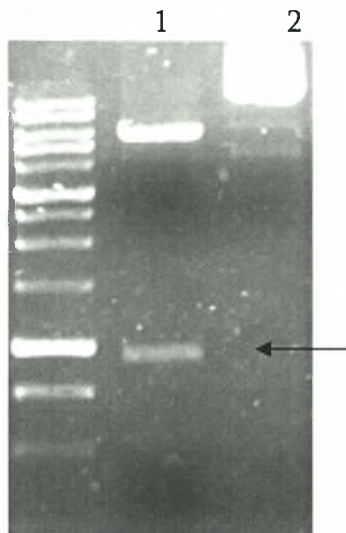
Το πρώτο βήμα για την κλωνοποίηση των ενζύμων συνθετάση του PRPP, της XGPRT και της πυροφωσφατάσης είναι η πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε γενομικό DNA από το βακτήριο *Escherichia coli* για την ενίσχυση των γονιδίων *prsA*, *gpt* και *ppa* αντίστοιχα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης τα προϊόντα της ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του μεγέθους των τμημάτων DNA με βάση τον μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder 1kb). Στην εικόνα 19 φαίνονται τα προϊόντα της ενίσχυσης (δεν υπάρχει εικόνα για την ενίσχυση του *ppa*). Από την εικόνα φαίνεται ότι το *prsA* που βρίσκεται στην στήλη 1 και 2 και έχει μέγεθος 985bp ενισχύθηκε επιτυχώς. Το ίδιο συνέβη και με το *gpt* που φαίνεται στις στήλες 3 και 4.



Εικόνα 19: Τα προϊόντα της PCR. Στις στήλες 1 και 2 φαίνεται το γονίδιο *prsA* μεγέθους 985bp και στις στήλες 3 και 4 φαίνεται το γονίδιο *gpt* μεγέθους 460bp.

Το επόμενο βήμα ήταν η υποκλωνοποίηση των γονιδίων σε φορέα pSC-A (υλικά και μέθοδοι εικόνες 11,12). Όπως αναφέρεται στα υλικά και μεθόδους τα βακτηριακά κύτταρα στα οποία έχει εισέλθει το πλασμίδιο pSC-A ξεχωρίζουν μέσω του χρώματος των αποικιών που είναι άσπρες. Έπειτα τα γονίδια μας μεταφέρθηκαν σε φορέα κλωνοποίησης pET-15b. Με τον pET-15b μετασηματίστηκαν κύτταρα *E.coli* DH5a για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου. Τα κύτταρα στα οποία εισήλθε το πλασμίδιο αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Για την εξακρίβωση της ύπαρξης των γονιδίων μας στον pET-15b των κλώνων που πάρθηκαν από το τρυβλίο πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI*, *BamHI* (εικόνα 20).

Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του μεγέθους των τμημάτων DNA με βάση τον μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder 1kb). Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν την ύπαρξη του γονιδίου *prsA* εντός του φορέα. Για τα γονίδια *gpt* και *ppa* δεν υπάρχει σχετική εικόνα.

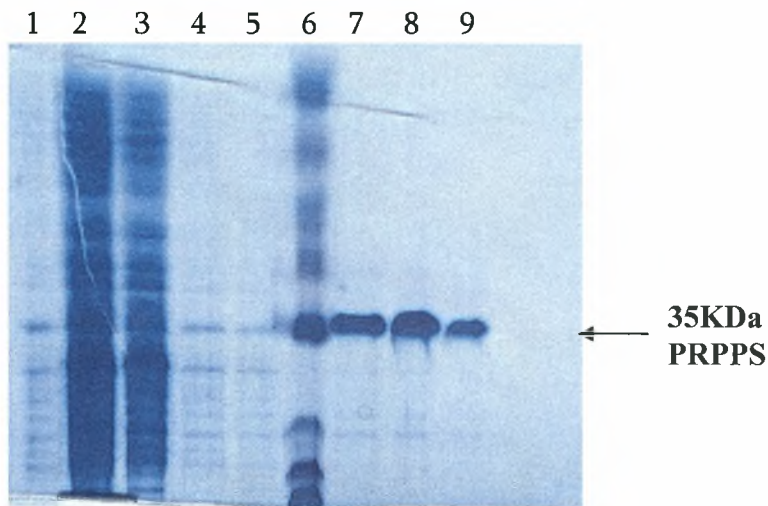


Εικόνα 20: Τα προϊόντα της πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI*, *BamHI*. Η μπάντα στην στήλη 1 που δείχνει το βελάκι αποτελεί το γονίδιο *prsA* μεγέθους 985bp, η πιο μεγάλη μπάντα στην πρώτη στήλη είναι ο πλασμιδιακός φορέας pET-15b μεγέθους 5700bp. Στη στήλη 2 φαίνεται άκοπο πλασμίδιο (control) pET-15b.

Το επόμενο στάδιο στην πειραματική διαδικασία ήταν ο μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων BL21 DE3 με pET-15b ο οποίος περιέχει τα γονίδια των ενζύμων που θέλουμε να υπερεκφράσουμε. Τα βακτήρια BL21 DE3 δεν διαθέτουν κάποια ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό. Ο μετασχηματισμός των BL21 DE3 έγινε ώστε να υπερεκφραστούν τα ένζυμα με την επίδραση του IPTG και να απομονωθούν σε στήλη Ni. Η απομόνωση των ενζύμων έγινε σε στήλη Protino Ni-TED/IDA (MN), όγκου 0,5mL. Από την απομόνωση πάρθηκαν τα εξής κλάσματα:

- ❖ Μετά την προσθήκη του δείγματος στη στήλη προστέθηκαν τέσσερις όγκοι (της στήλης) ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης για την απομάκρυνση των μη ειδικών πρωτεϊνών που δεν έχουν δεσμευτεί στη στήλη (κλάσματα flow trough).
- ❖ Για την έκπλυση της στήλης προστέθηκαν πέντε όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης για την απομάκρυνση των μη ειδικών πρωτεϊνών που έχουν δεσμευτεί στη στήλη (κλάσματα wash).
- ❖ Για την κατακρύμηση του υπό μελέτη ενζύμου προστέθηκαν τρεις όγκοι με ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης που περιείχε ιμιδαζόλιο. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται με τις ιστιδίνες που φέρει το ένζυμο στο N-τελικό του άκρο (κλάσματα elution).

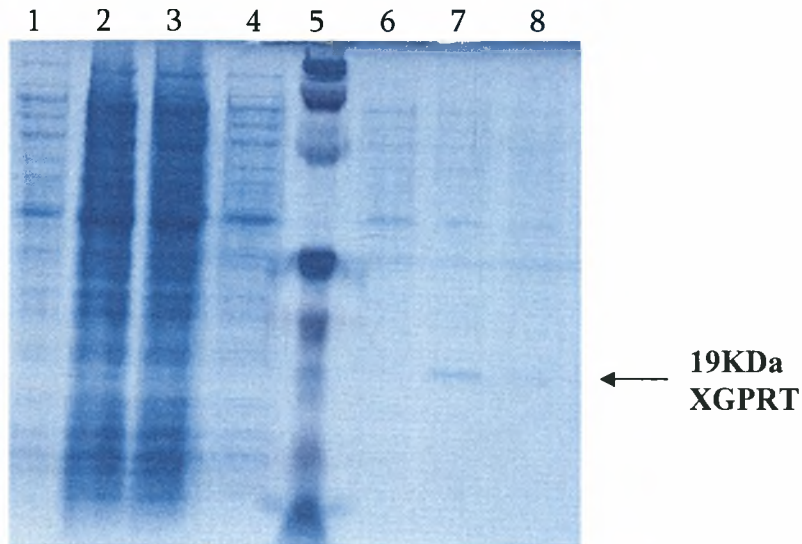
Τα κλάσματα που προέκυψαν από την στήλη Ni ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% και έπειτα υπολογίστηκε το μέγεθος των πρωτεϊνών βάσει του μάρτυρα (εικόνα 21).



Εικόνα 21: Κλάσματα που προέκυψαν από την απομόνωση της συνθετάσης του PRPP (PRPPS). Οι στήλες 1 και 2 αντιστοιχούν στα flow through κλάσματα. Οι στήλες 3, 4 και αντιστοιχούν στα wash. Η στήλη 6 αποτελεί το μάρτυρα και τέλος οι στήλες 7,8 και 9 αντιστοιχούν στα elution.

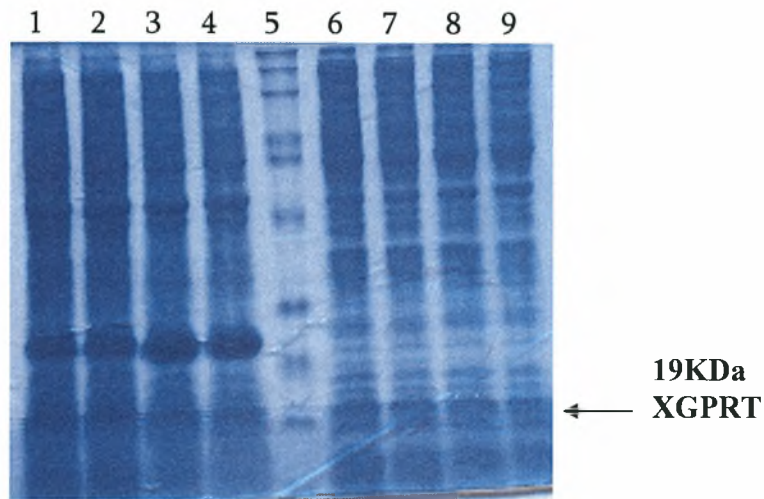
Από την εικόνα 21 της ηλεκτροφόρησης των κλασμάτων φαίνεται πως έγινε μια πολύ καλή απομόνωση της συνθετάσης του PRPP καθώς απομακρύνθηκαν σχεδόν όλες οι μη ειδικές πρωτεΐνες στα κλάσματα flow through και wash (1,2,3,4 και 5) ενώ η συνθετάση μέσω των ιστιδινών απομονώθηκε στη στήλη και κατακρυμνήστηκε στα κλάσματα elution (7,8 και 9), όπως και έπρεπε να γίνει. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στην εισαγωγή αναφέρεται το μέγεθος της συνθετάσης 34,060 KDa και στην ηλεκτροφόρηση εμφανίζεται στα 35 KDa. Αυτή η αύξηση συμβαίνει λόγω της επιπρόσθετης ιστιδινικής ουράς που φέρει το ένζυμο στο N-τελικό του άκρο.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για της απομόνωση της PRTάσης της ξανθίνης και γουανίνης (XGPRT), αλλά όχι με το ίδιο καλά αποτελέσματα (εικόνα 22). Όπως φαίνεται στην εικόνα 22 δεν φαίνεται να έχει απομονωθεί XGPRT (6,7και 8) και αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι δεν υπερέκφράστηκε. Για την εύρεση των συνθηκών όπου η XGPRT εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό πραγματοποιήθηκε έλεγχος υπερέκφρασης . Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος υπερέκφρασης και για την πυροφωσφατάση, ώστε να αποφευχθεί μια αποτυχημένη υπερέκφραση της.



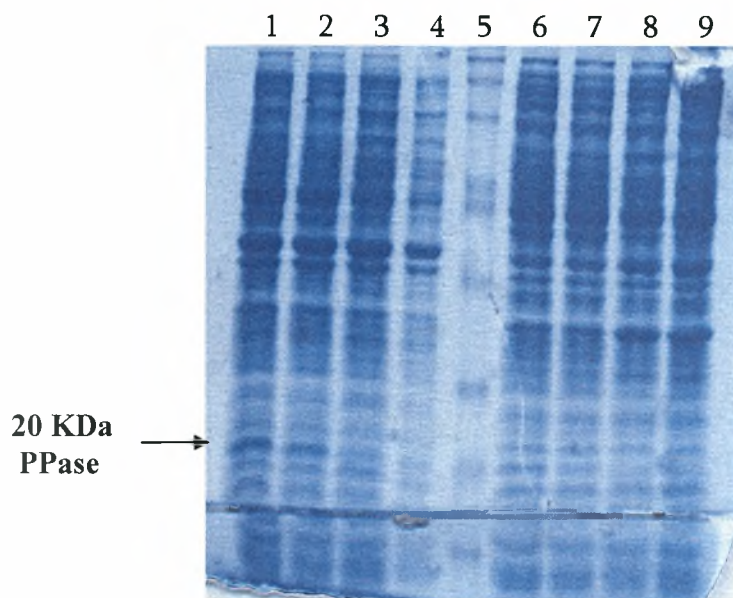
Εικόνα 22: Κλάσματα που προέκυψαν από την απομόνωση της PRTάσης της Ξανθίνης και γουανίνης (XGPRT). Τα κλάσματα 1 και 2 αντιστοιχούν στα flow trough, τα 3,4 και 6 στα wash και τα 7 και 8 στα elution.

Με τον έλεγχο υπερέκφρασης ελέγχθηκε επίσης και το ίζημα το οποίο προκύπτει μετά από την ομογενοποίηση των βακτηριακών κυττάρων για την ύπαρξη των δυο ενζύμων στις μεμβράνες που καθιζάνουν με την φυγοκέντρηση. Οι συνθήκες που δοκιμάστηκε η έκφραση των δυο ενζύμων διέφεραν ως προς την συγκέντρωση του IPTG (0,5 mM και 1 mM), ως προς τη θερμοκρασία ανάπτυξης των βακτηρίων παρουσία του IPTG (37C° και θερμοκρασία δωματίου) και ως προς το χρόνο επώασης παρουσία του IPTG (5h και overnight) . Στην εικόνα 23 παρουσιάζονται τα ηλεκτροφορημένα σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% υπερεκείμενα και ιζήματα του ελέγχου υπερέκφρασης για την XGPRT.



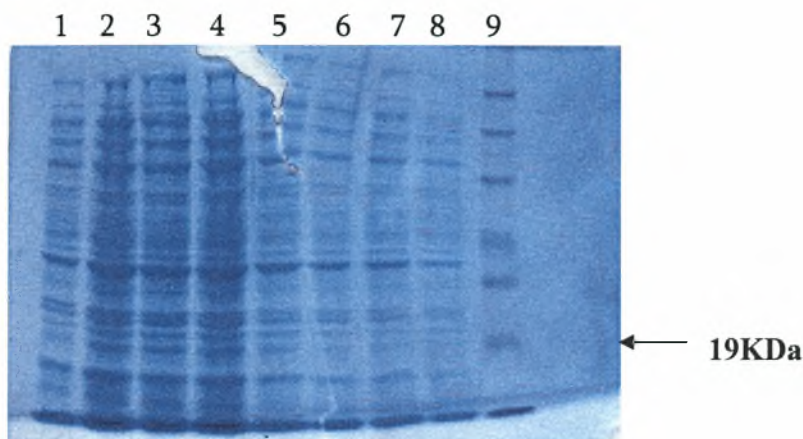
Εικόνα 23: Έλεγχος υπερέκφρασης, οι διαφορετικές συνθήκες έκφρασης της XGPRT. 1: 0,5mM IPTG- θερμοκρασία δωματίου - overnight επώαση (ίζημα), 2:1mM IPTG - θερμοκρασία δωματίου - overnight επώαση (ίζημα), 3: 0,5mM IPTG - 37 C°- 5h επώαση (ίζημα), 4: 1mM IPTG - 37 C° - 5h επώαση (ίζημα), 5: Μάρτυρας, 6: 0,5mM IPTG - θερμοκρασία δωματίου - overnight επώαση (υπερκείμενο), 7: 1mM IPTG - θερμοκρασία δωματίου - overnight επώαση (υπερκείμενο), 8: 0,5mM IPTG - 37 C°- 5h επώαση (υπερκείμενο), 9: 1mM IPTG - 37C° - 5h επώαση (υπερκείμενο).

Η έκφραση της XGPRT φαίνεται να γίνεται καλύτερα σε συνθήκες θερμοκρασίας 37 C°. Προτιμήθηκε για την υπερέκφραση της η συγκέντρωση 0,5mM για το IPTG. Επίσης στο μέγεθος της XGPRT εμφανίζεται ποσότητα πρωτεΐνης στο ίζημα. Γενικά η έκφραση της XGPRT δεν φαίνεται να είναι αρκετά καλή σε καμία από τις διαφορετικές συνθήκες. Με τον ίδιο τρόπο και στις ίδιες συνθήκες έγινε και ο έλεγχος υπερέκφρασης για την πυροφωσφατάση. Τα αποτελέσματα ήταν περίπου τα ίδια και για την πυροφωσφατάση αφού ποσότητα του ενζύμου φάνηκε να βρίσκεται στο ίζημα ενώ η υπερέκφραση του ενζύμου δεν ήταν ικανοποιητική σε καμία από τις διαφορετικές συνθήκες (εικόνα 24).



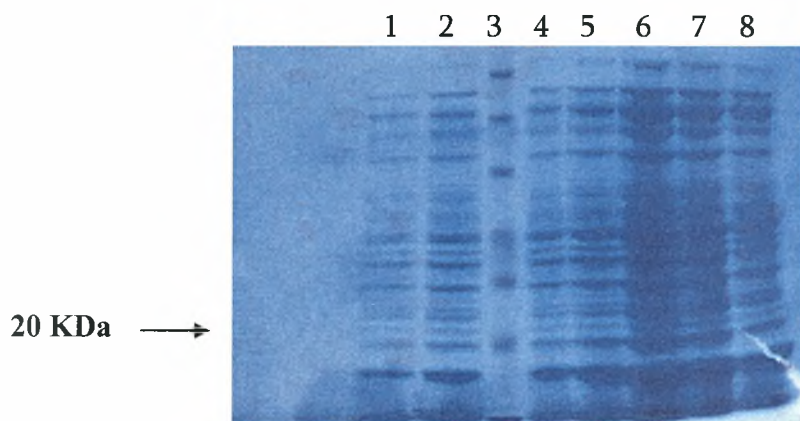
Εικόνα 24: Έλεγχος υπερέκφρασης, οι διαφορετικές συνθήκες έκφρασης της πυροφωσφατάσης (ppase). 1: 0,5mM IPTG - θερμοκρασία δωματίου - overnight επώαση (ίζημα), 2:1mM IPTG - θερμοκρασία δωματίου - overnight επώαση (ίζημα), 3: 0,5mM IPTG - 37 C°- 5h επώαση (ίζημα), 4: 1mM IPTG - 37 C° - 5h επώαση (ίζημα), 5: Μάρτυρας, 6: 0,5mM IPTG - θερμοκρασία δωματίου - overnight επώαση (υπερκεείμενο), 7: 1mM IPTG - θερμοκρασία δωματίου - overnight επώαση (υπερκεείμενο), 8: 0,5mM IPTG - 37 C°- 5h επώαση (υπερκεείμενο), 9: 1mM IPTG - 37C° - 5h επώαση (υπερκεείμενο).

Μετά την ολοκλήρωση των ελέγχων υπερέκφρασης, έγινε η υπερέκφραση των δυο ενζύμων. Για την XGPRT προτιμήθηκαν οι συνθήκες 0,5 mM IPTG, και επώαση στους 37C° για 5h και για την πυροφωσφατάση 0,5 mM IPTG και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Αφού τα ένζυμα υπερεκφράστηκαν έγινε προσπάθεια απομόνωσής τους σε στήλη Ni. Επειδή ποσότητα ενζύμου υπήρχε στο ίζημα και για τα δυο ένζυμα, χρησιμοποιήθηκε απορρυπαντικό triton-X ώστε τα ένζυμα να απελευθερωθούν από τις μεμβράνες και να μην βρίσκονται στο ίζημα μετά την φυγοκέντρηση που ακολουθεί την ομογενοποίηση των βακτηριακών κυττάρων. Στην εικόνα 25 παρουσιάζονται τα κλάσματα από την απομόνωση της XGPRT τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12%.



Εικόνα 25: Κλάσματα από τον καθαρισμό της XGPRT. 1,2,3: Κλάσματα flow through, 4,5,6:Κλάσματα wash, 7,8: Κλάσματα elution, 9: Μάρτυρας.

Ο καθαρισμός της XGPRT (εικόνα 25) δεν ήταν επιτυχής αφού στα κλάσματα elution (7 και 8) υπάρχει σημαντική ποσότητα πολλών μη ειδικών πρωτεϊνών. Επίσης στο μοριακό βάρος που αναμενόταν η XGPRT (19 KDa) δεν εμφανίζεται καμία έντονη μπάντα όπως αυτή της συνθετάσης του PRPP (εικόνα 21). Το ίδιο αποτέλεσμα εμφανίζεται στην εικόνα 26 κατά την απομόνωση της πυροφωσφατάσης, όπου στα elution κλάσματα εμφανίζονται πολλές μη ειδικές πρωτεΐνες και αχνές μπάντες στο μοριακό βάρος που περιμέναμε την εμφάνιση της πυροφωσφατάσης (20 KDa).

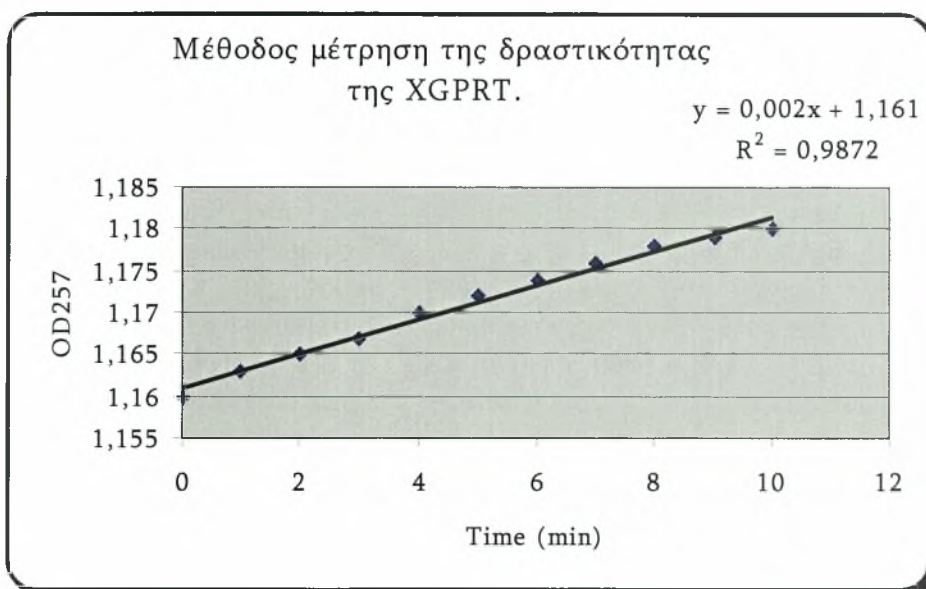


Εικόνα 26: Κλάσματα από τον καθαρισμό της πυροφωσφατάσης. 1,2: Elution, 3:Μάρτυρας 4,5:Wash, 7,8: Flow through

Για μελλοντική μέτρηση της δραστηριότητας τόσο της συνθετάσης του PRPP, όσο και της XGPRT δοκιμάστηκε μια μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας της XGPRT. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αύξηση της οπτικής απορρόφησης στα 257nm λόγω της δημιουργίας του IMP (Keough et al., 1986). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μπορεί να μετρηθεί άμεσα η δραστηριότητα της XGPRT αν προστεθούν τα υποστρώματα, μια διαδικασία που ακολουθήσαμε

και εμείς σε αυτή την εργασία ώστε να δούμε αν δουλεύει ικανοποιητικά η μέθοδος, έτσι ώστε να μπορεί να μετρηθεί σε μελλοντικά πειράματα έμμεσα η δραστικότητα της συνθετάσης του PRPP, αν προστεθεί μια πουρινική βάση (γουανίνη, ξανθίνη ή υποξανθίνη) και XGPRT, εφόσον η συνθετάση παράγει το δεύτερο υπόστρωμα. Σε μελλοντική σύνδεση των δυο ενζύμων θα αποτελεί μια εύχρηστη και απλή μέθοδος για την παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης. Στην παρούσα πειραματική φάση χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο από κύτταρα BL21DE3, τα οποία έφεραν τον φορέα pET-15b με το γονίδιο grt και είχαν αναπτυχθεί παρουσία IPTG και ως εκ τούτου είχαν υπερεκφράσει την XGPRT. Χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο από BL21DE3 επειδή δεν καταφέραμε να απομονώσουμε την XGPRT.

Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 27 στο γράφημα της πορείας αύξησης της οπτικής πυκνότητας (OD) σε σχέση με το χρόνο μέχρι τα 6 min υπάρχει μια πολλή καλή γραμμικότητα στις μετρήσεις.



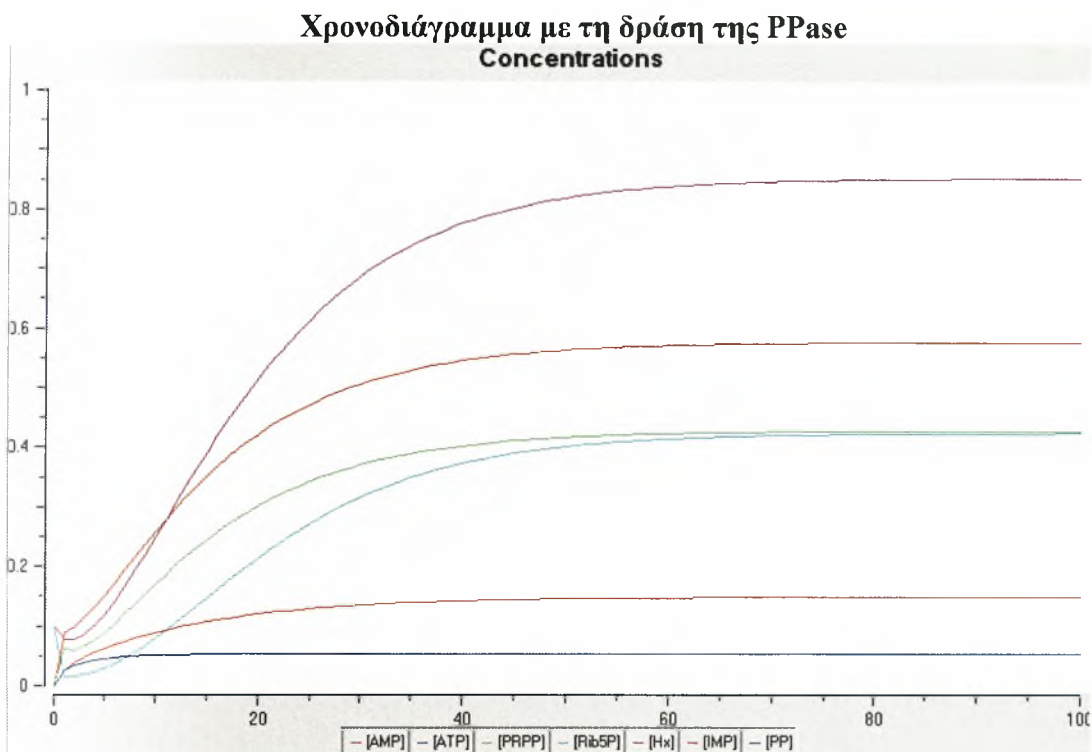
Εικόνα 27: Μέθοδος για την μέτρηση της δραστικότητας της XGPRT. Αύξηση της οπτικής πυκνότητας, λόγω παραγωγής IMP από PRPP και υποξανθίνη, σε σχέση με το χρόνο.

Ο χρόνος των 6 min είναι ένα πολύ καλό χρονικό διάστημα που διατηρείται η γραμμικότητα των μετρήσεων, αφού όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω οι *in silico* υπολογισμοί προτείνουν ότι στην περίπτωση καθήλωσης και σύνδεσης των τριών ενζύμων σε μια στήλη απαιτείται χρόνος μόνο μερικών δευτερολέπτων για την επίτευξη της σταθερής κατάστασης των στοιχείων του συστήματος.

4.2 *In silico* αποτελέσματα

Αποτελέσματα πορείας προς την σταθερή κατάσταση (time course) με δράση και χωρίς δράση της PPase.

Στο μοντέλο δυο διαμερισμάτων, του οποίου η περιγραφή έγινε στις αριθμητικές μεθόδους χρησιμοποιήθηκε η ντετερμινιστική μέθοδος LSODA και έγιναν οι πρώτοι υπολογισμοί για την πορεία του συστήματος προς την σταθερή κατάσταση. Στην εικόνα 28 φαίνεται το διάγραμμα που δείχνει την αλλαγή της συγκέντρωσης των αντιδρώντων και των προϊόντων σε σχέση με το χρόνο.



Εικόνα 28 : Διάγραμμα πορείας του συστήματος προς την σταθερή κατάσταση. Στον άξονα x φαίνεται ο χρόνος σε δευτερόλεπτα (sec) και στον άξονα y οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων σε M. Η μωβ καμπύλη αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της υποξανθίνης (Hx), η αμέσως επόμενη κόκκινη καμπύλη αντιπροσωπεύει το AMP, η πράσινη καμπύλη είναι η συγκέντρωση του PRPP, η γαλάζια καμπύλη δείχνει τη συγκέντρωση της φωσφορικής ριβόζης (Rib5P) και του ATP. Κάτω από τη γαλάζια καμπύλη βρίσκεται με κόκκινη καμπύλη η συγκέντρωση του IMP και τέλος με μπλε καμπύλη απεικονίζεται η συγκέντρωση του πυροφωσφορικού (PPi).

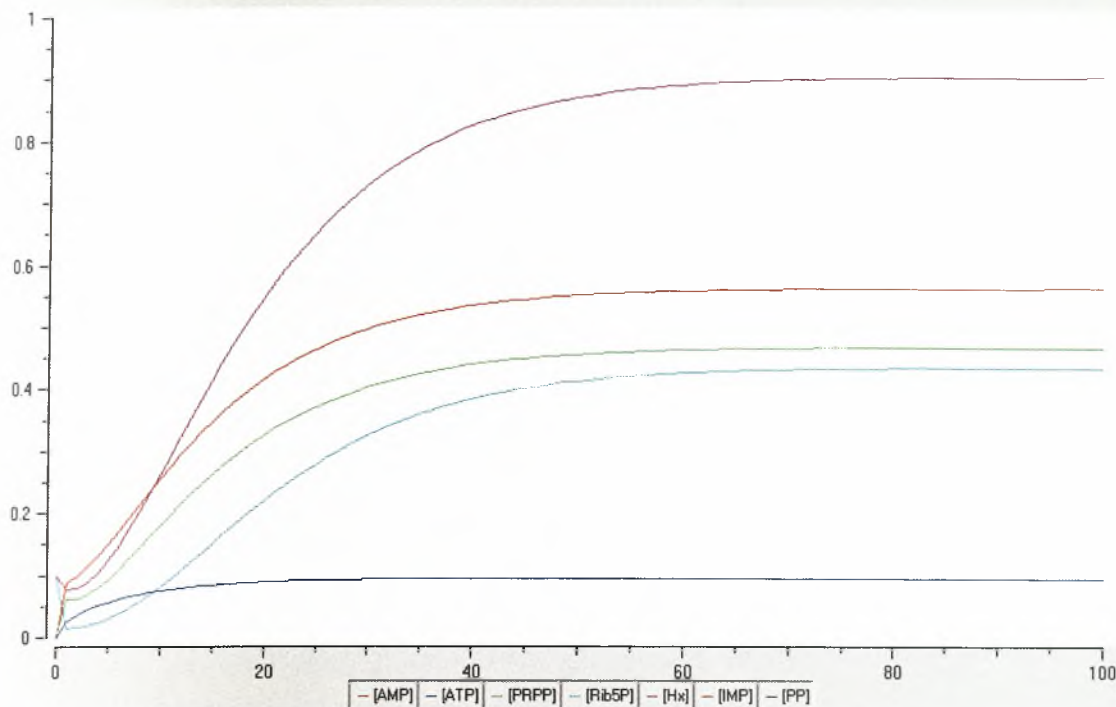
Από την εικόνα 28 φαίνεται πως σε χρόνο 55 sec όλα τα συστατικά του συστήματος βρίσκονται στην σταθερή κατάσταση, δηλαδή σε αυτό το χρόνο η συγκέντρωσή τους έχει πάρει μια τιμή και αυτή η τιμή παραμένει σταθερή. Οι τιμές των συγκεντρώσεων των στοιχείων του συστήματος απεικονίζονται στον πίνακα 16.

Στοιχεία συστήματος	Συγκέντρωση (M) (σταθερή κατάσταση)
ATP	0,4224
Rib5P	0,4224
AMP	0,5754
Hx	0,8513
IMP	0,1487
PPi	0,05383
PRPP	0,4267

Πίνακας 16 : Συγκεντρώσεις των στοιχείων του συστήματος στην σταθερή κατάσταση.

Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι πόσο βοηθάει η υδρόλυση του PPi στην πορεία των αντιδράσεων. Η αύξηση του PPi θα περιμέναμε θα ωθεί τις προηγούμενες αντιδράσεις προς τα αριστερά με αποτέλεσμα να έχουμε μειωμένη παραγωγή προϊόντων (AMP και κυρίως IMP) και αύξηση στην συγκέντρωση του PRPP και της Hx (γίνεται αναφορά στην εισαγωγή). Η αύξηση της συγκέντρωσης της Hx θα ήταν γεγονός μη αποδεκτό σε περίπτωση λειτουργίας ενός βιοαντιδραστήρα εφόσον είναι ένα από τα αντιδραστήρια που προσθέτουμε. Αν αυξηθεί η συγκέντρωση της Hx στην σταθερή κατάσταση σημαίνει ότι μια μεγάλη ποσότητά της δεν χρησιμοποιείται και αποβάλλεται κάτι που είναι οικονομικά ασύμφορο. Για ελεγχθεί η επίδραση της υδρόλυσης του PPi μηδενίστηκε ο ρυθμός υδρόλυσης του ($k_1=0 \text{ s}^{-1}$). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 29.

Χρονοδιάγραμμα χωρίς τη δράση της PPase.
Concentrations



Εικόνα 29 : Διάγραμμα συγκεντρώσεων των στοιχείων του συστήματος μετά από την εξάλειψη της δραστηριότητας της PPase. Στον άξονα x φαίνεται ο χρόνος σε δευτερόλεπτα (sec) και στον άξονα y οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων σε M. Με τη σειρά που εμφανίζονται οι καμπύλες στην σταθερή κατάσταση αντιστοιχούν: η μωβ στην [Hx], η κόκκινη στην [AMP], η πράσινη στην [PRPP], η γαλάζια στην [Rib5P] και στην [ATP] και τέλος η μπλε στην [Pi] και στην [IMP].

Από το διάγραμμα της εικόνας 29 φαίνεται πως το κύριο προϊόν της οδού περίσωσης των πουρινών το IMP το οποίο στην εικόνα 28 εμφανίζεται με κόκκινη καμπύλη και με [IMP] στην σταθερή κατάσταση 0,1487 M έχει εξαφανιστεί αφού η συγκέντρωση του έχει μειωθεί και συμπίπτει πλέον με την αυξημένη συγκέντρωση του PPI (μπλε καμπύλη). Αυξημένη παρουσιάζεται και η [PRPP] κάτι που ήταν αναμενόμενο. Για την καλύτερη σύγκριση των συγκεντρώσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 17 οι συγκεντρώσεις των στοιχείων με τη δράση και χωρίς τη δράση της PPase.

Στοιχεία συστήματος	Συγκέντρωση (M) στοιχείων στην σταθερή κατάσταση με τη δράση της PPase	Συγκέντρωση (M) στοιχείων στην σταθερή κατάσταση χωρίς τη δράση της PPase
ATP	0,4224	0,4353

Rib5P	0,4224	0,4353
AMP	0,5754	0,5625
Hx	0,8513	0,9030
IMP	0,1487	0,09483
PPi	0,05383	0,09483
PRPP	0,4267	0,4677

Πίνακας 17 : Συγκεντρώσεις των στοιχείων του συστήματος στην σταθερή κατάσταση με και χωρίς τη δράση της PPase

Από την εικόνα 29 και τον πίνακα 17 προκύπτει το συμπέρασμα ότι για την αποτελεσματικότερη παραγωγή προϊόντος (IMP) και την μειωμένη χρήση αντιδραστηρίων απαιτείται η δράση της PPase ώστε στις αντιδράσεις σύνθεσης του PRPP και περίσωσης της Hx οι ισορροπίες να μην μετατοπίζονται προς τα αριστερά. Η Hx είναι ένα από τα αντιδρώντα που προσθέτουμε και επηρεάζεται η συγκέντρωσή του (αυξάνεται) από την απουσία της δράσης της PPase.

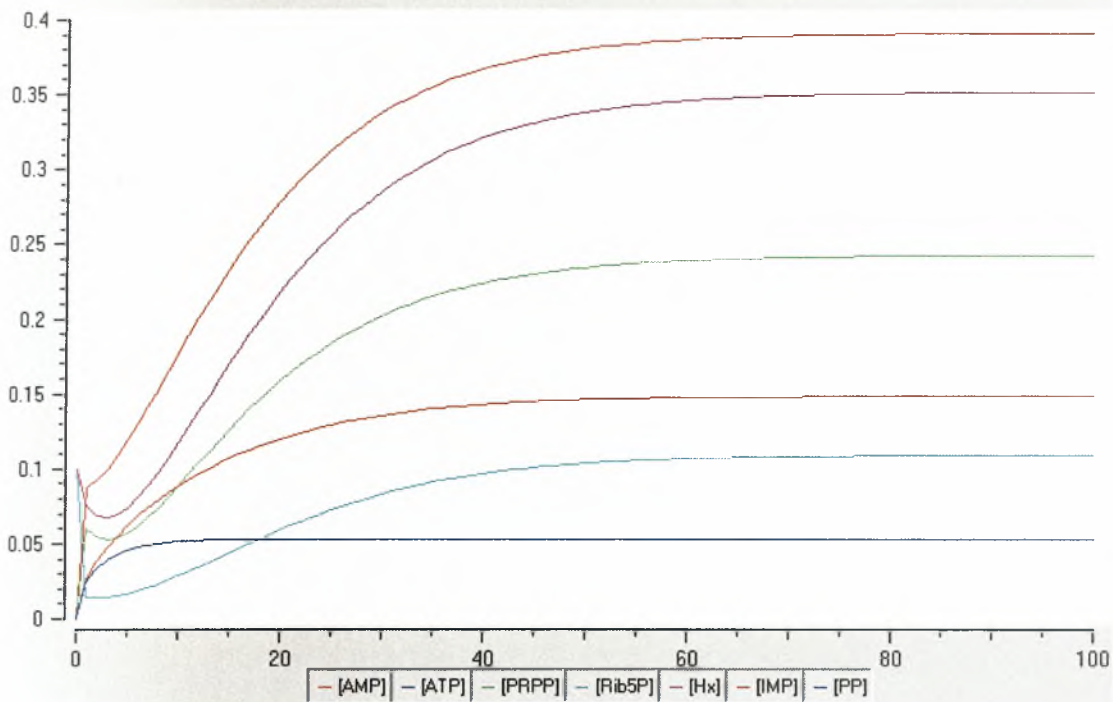
Αποτελέσματα της πορείας προς την σταθερή κατάσταση (time course) μετά από μεταβολές στην ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων.

Όπως προαναφέρθηκε η επακόλουθη αύξηση της [Hx] λόγω έλλειψης της υδρόλυσης του PPi δεν είναι συμφέρουσα στην περίπτωση λειτουργίας ενός βιοαντιδραστήρα, παρόλο όμως την ύπαρξη της PPase στην εικόνα 28 (μωβ χρώμα) φαίνεται ότι η Hx έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στην σταθερή κατάσταση και μάλιστα μεγαλύτερη όχι μόνο από τα αλλά αντιδραστήρια που προσθέτουμε (ATP και Rib5P), αλλά και από τα προϊόντα γεγονός που υποδεικνύει σπατάλη της Hx χωρίς αυτή να χρησιμοποιείται στην αντίδραση περίσωσης της. Η κατανόηση του πόσο μεγαλύτερη είναι η [Hx] σε σχέση με αυτή που χρειάζεται το ένζυμο για να δουλέψει το ένζυμο σε βέλτιστες συνθήκες προκύπτει με την σύγκριση της $K_{m_{Hx}}$ για το ένζυμο XGPRT την [Hx] στην σταθερή κατάσταση. Η $K_{m_{Hx}}$ είναι 0,0024 mM, δηλαδή η [Hx] με την οποία η XGPRT αντιδρά με ταχύτητα $V_{max}/2$. Η [Hx] στην σταθερή κατάσταση είναι 851,3 mM αριθμός που είναι πολλές χιλιάδες φορές μεγαλύτερος της $K_{m_{Hx}}$. Άρα το ένζυμο για το συγκεκριμένο υπόστρωμα είναι κορεσμένο. Η $K_{m_{ATP}}$ για την PRPPS είναι 0,0046mM και η [ATP] στην σταθερή κατάσταση είναι 422,4 mM, δηλαδή περίπου 10000 φορές μεγαλύτερη από την $K_{m_{ATP}}$. Το ίδιο ισχύει και για την Rib5P της οποίας η K_m για την PRPPS είναι 0,16 mM και [Rib5P] στην σταθερή κατάσταση είναι 422,4 mM.

Η μεγάλη συγκέντρωση των υποστρωμάτων στην σταθερή κατάσταση οφείλεται στην μεγάλη ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων. Η ταχύτητα εισόδου ξεπερνά την ταχύτητα κατανάλωσης ενός υποστρώματος με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσής του. Για την βελτιστοποίηση της

άσκοπης απώλειας των υποστρωμάτων μειώθηκαν οι ταχύτητες εισόδου των υποστρωμάτων και εντάχθηκε στο σύστημα η απαραίτητη δραστικότητα της PPase. Η αρχική ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων ήταν $0,1 \text{ mmol/ml} \cdot \text{sec}$ και σε μια πρώτη φάση δοκιμάστηκε η μισή ταχύτητα εισόδου ($0,05 \text{ mmol/ml} \cdot \text{sec}$) και για τα τρία υποστρώματα, δηλαδή την Hx, την Rib5P και το ATP. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 30.

Χρονοδιάγραμμα με ταχύτητες εισόδου των υποστρωμάτων $0,05 \text{ mmol/ml} \cdot \text{sec}$.
Concentrations



Εικόνα 30: Διάγραμμα πορείας του συστήματος προς την σταθερή κατάσταση με μειωμένη την ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων σε $0,05 \text{ mmol/ml} \cdot \text{sec}$. Στον άξονα x φαίνεται ο χρόνος σε δευτερόλεπτα (sec) και στον άξονα y οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων σε M. Με τη σειρά που εμφανίζονται οι καμπύλες στην σταθερή κατάσταση αντιστοιχούν: η κόκκινη στην [AMP], η μωβ στην [Hx], η πράσινη στην [PRPP], η κόκκινη στην [IMP], η γαλάζια στην [Rib5P] και στην [ATP] και τέλος η μπλε στην [Pi].

Στην εικόνα 30 φαίνεται πως μετά την μείωση της ταχύτητας εισόδου των υποστρωμάτων η [Hx] (μωβ χρώμα) που ήταν $0,8513 \text{ M}$ (8 μειώθηκε περισσότερο από το μισό $0,3906 \text{ M} = 390,6 \text{ mM}$ όμως και πάλι η [Hx] είναι πολύ υψηλότερη από το $K_{m_{Hx}}$ ($0,024 \text{ mM}$). Το ίδιο ισχύει και για τα άλλα δυο υποστρώματα αφού η $K_{m_{ATP}} = 0,0046 \text{ mM}$ και η $K_{m_{Rib5P}} = 0,16 \text{ mM}$ ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στην σταθερή κατάσταση είναι $[ATP] = 109,1 \text{ mM} = [Rib5P]$. Το ζητούμενο σε ένα τέτοιο σύστημα είναι να χρησιμοποιείς όσο το δυνατόν λιγότερο υπόστρωμα και να έχει τη μέγιστη δυνατή απόδοση σε προϊόν. Αυτό ακριβώς συμβαίνει και σε αυτό το σύστημα, εφόσον η ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων μειώθηκε στο μισό (άρα και η κατανάλωση μειώθηκε) και η [IMP] δεν επηρεάστηκε σχεδόν καθόλου αφού από $[IMP] = 0,1487 \text{ M}$ έγινε

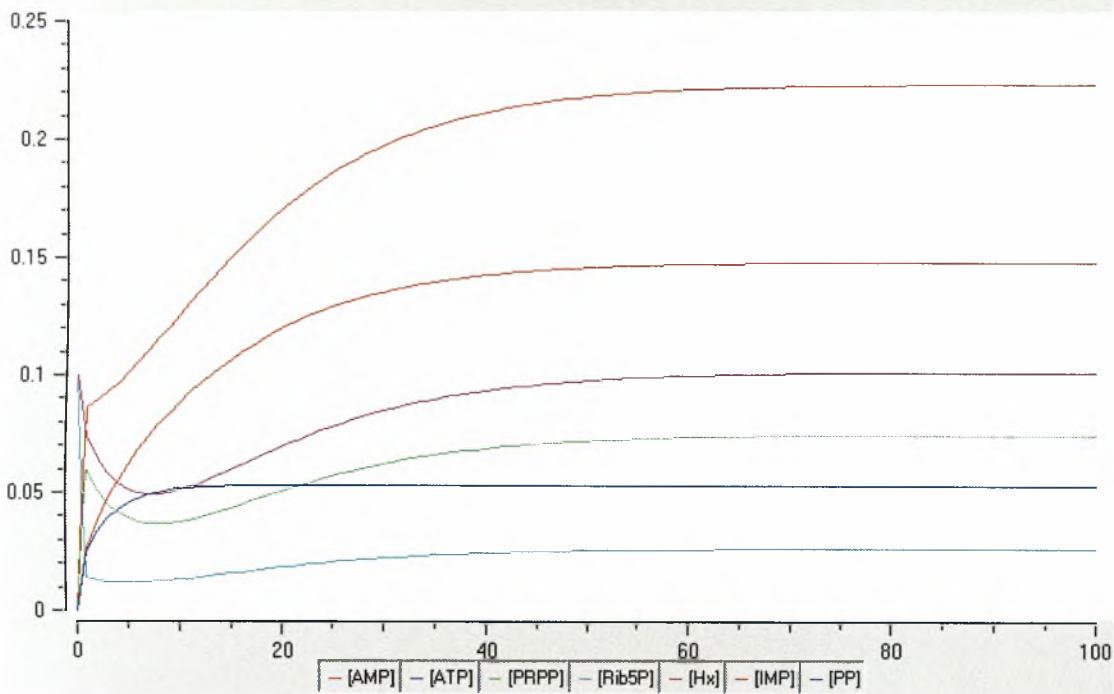
0,1486M. Για την καλύτερη κατανόηση των αλλαγών των συγκεντρώσεων των στοιχείων στην σταθερή κατάσταση μετά την αλλαγή της ταχύτητας εισόδου των τριών υποστρωμάτων παρατίθεται ο πίνακας 18.

Στοιχεία συστήματος	Συγκέντρωση (M) στοιχείων στην σταθερή κατάσταση με ταχύτητα εισόδου υποστρωμάτων 0,1 mmol/ml*sec	Συγκέντρωση (M) στοιχείων στην σταθερή κατάσταση με ταχύτητα εισόδου υποστρωμάτων 0,05 mmol/ml*sec
ATP	0,4224	0,1091
Rib5P	0,4224	0,1091
AMP	0,5754	0,3906
Hx	0,8513	0,3512
IMP	0,1487	0,1486
PPi	0,05383	0,05299
PRPP	0,4267	0,2421

Πίνακας 18 : Συγκεντρώσεις των στοιχείων του συστήματος στην σταθερή με ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων 0,1 mmol/ml*sec και 0,05 mmol/ml*sec. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται το προϊόν της αντίδρασης περίσωσης της Hx το οποίο δεν φαίνεται να μεταβάλλεται με την μείωση της ταχύτητας εισόδου και με μπλε φαίνονται τα τρία υποστρώματα που προστίθενται για την λειτουργία του συστήματος. Και τα τρία υποστρώματα μειώθηκαν δραστικά.

Από τα αποτελέσματα της εικόνας 30 και του πίνακα 18 συμπεραίνουμε ότι υπάρχει δυνατότητα μείωσης ακόμα περισσότερο της ταχύτητας εισόδου των υποστρωμάτων. Η επόμενη δοκιμή έγινε με ταχύτητες ροής 0,025mol/ml*sec. Στην εικόνα 31 παρουσιάζεται το αντίστοιχο διάγραμμα. Και σε αυτή την ταχύτητα μειώθηκαν πολύ οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων , αλλά και πάλι δεν μεταβλήθηκε πολύ η [IMP]. Στον πίνακα 19 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των στοιχείων σταθερή κατάσταση με ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων 0,05 mol/ml*sec και 0,025mol/ml*sec. Η [IMP] έχει μειωθεί ελάχιστα ενώ οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων μειώθηκαν σε μεγάλο βαθμό. Για την ανάγκη περεταίρω μείωσης των ταχυτήτων συγκρίθηκαν οι Km. Η $K_{m_{Hx}}=0,0024mM$ ενώ η $[Hx]=101,3mM$. Η [Hx] είναι ακόμα πολύ μεγάλη σε σχέση με την $K_{m_{Hx}}$, άρα χρειάζεται περεταίρω μείωση της ταχύτητας εισόδου. Η $K_{m_{ATP}}=0,0046mM$ και $K_{m_{Rib5P}}=0,16mM$ ενώ η συγκέντρωση και των δυο είναι 26,6 mM. Αυτή η συγκέντρωση είναι πολύ μεγαλύτερη από την $K_{m_{ATP}}$, αλλά περίπου 100 φορές μεγαλύτερη από την $K_{m_{Rib5P}}$, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ταχύτητας ροής της Rib5P δεν χρειάζεται να μειωθεί πάρα πολύ.

Χρονοδιάγραμμα με ταχύτητες εισόδου των υποστρωμάτων 0,025mmol/ml*sec
Concentrations



Εικόνα 31: Διάγραμμα πορείας του συστήματος στην σταθερή κατάσταση με μειωμένη την ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων σε 0,025 mmol/ml*sec. Στον άξονα χ φαίνεται ο χρόνος σε δευτερόλεπτα (sec) και στον άξονα y οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων σε M. Με τη σειρά που εμφανίζονται οι καμπύλες στην σταθερή κατάσταση αντιστοιχούν: η κόκκινη στην [AMP], η δεύτερη κόκκινη στην [IMP], η μωβ στην [Hx], η πράσινη στην [PRPP], η μπλε στην [Pi], και τέλος η γαλάζια στην [Rib5P] και στην [ATP].

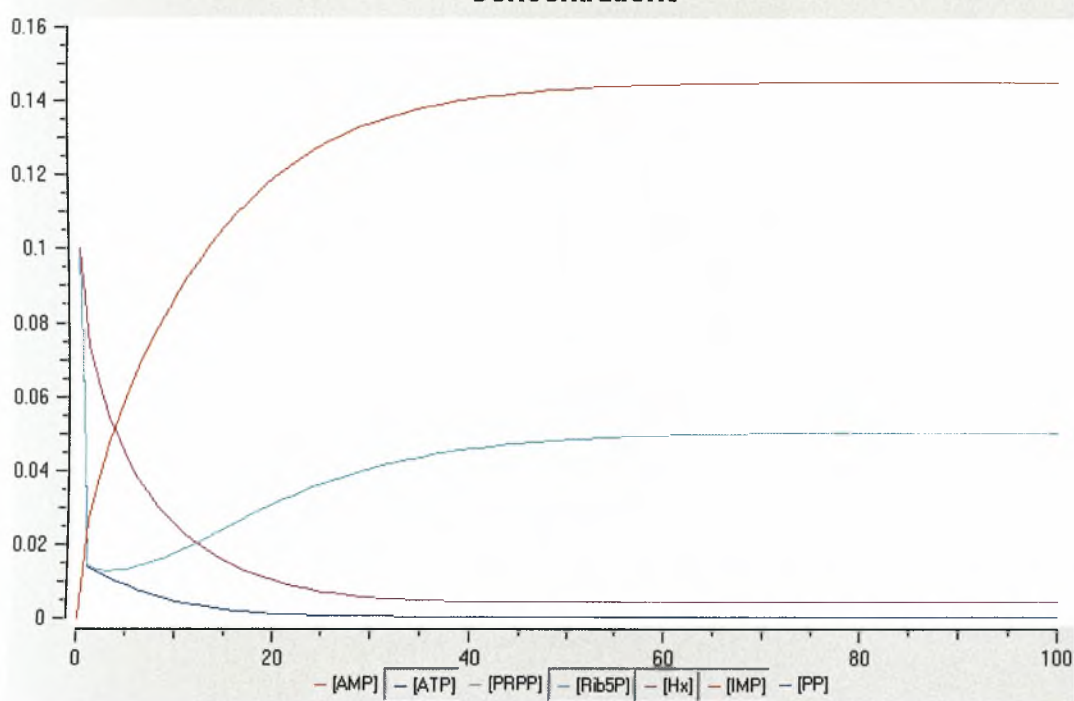
Στοιχεία συστήματος	Συγκέντρωση (M) στοιχείων στην σταθερή κατάσταση με ταχύτητα εισόδου υποστρωμάτων 0,05 mmol/ml*sec	Συγκέντρωση (M) στοιχείων στην σταθερή κατάσταση με ταχύτητα εισόδου υποστρωμάτων 0,025 mmol/ml*sec
ATP	0,1091	0,0266
Rib5P	0,1091	0,0266
AMP	0,3906	0,2234
Hx	0,3512	0,1013
IMP	0,1486	0,1481
PPi	0,05299	0,05325
PRPP	0,2421	0,07468

Πίνακας 19 : Συγκεντρώσεις των στοιχείων του συστήματος στην σταθερή με ταχύτητα εισόδου των υποστρωμάτων 0,05 mmol/ml*sec και 0,025 mmol/ml*sec. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται το

προϊόν της αντίδρασης περίσωσης της Hx του οποίου η συγκέντρωση μειώνεται ελάχιστα. Με μπλε φαίνονται τα τρία υποστρώματα.

Η επόμενη μείωση έγινε με διαφορετικές τιμές για κάθε υπόστρωμα, η ταχύτητα εισόδου για την Hx και το ATP ρυθμίστηκε στα 0,015 mmol/ml*sec και η ταχύτητα εισόδου για τη Rib5P ρυθμίστηκε στα 0,02 mmol/ml*sec. Τα αποτελέσματα της εξομοίωσης φαίνονται στην εικόνα 32. Στο διάγραμμα της εικόνας 32 επιλέχθηκε σκόπιμα η παρουσίαση των συγκεντρώσεων των τριών υποστρωμάτων και του IMP ώστε να είναι ευκολότερη η παρατήρηση των συγκεντρώσεων καθώς μειώνονται οι τιμές τους.

Χρονοδιάγραμμα με ταχύτητες εισόδου 0,015mmol/ml*sec για την Hx και το ATP και 0,02mmol/ml*sec για την Rib5P
Concentrations



Εικόνα 32 : Διάγραμμα πορείας του συστήματος στην σταθερή κατάσταση με μειωμένες τις ταχύτητες εισόδου των υποστρωμάτων. Οι ταχύτητες ρυθμίστηκαν στα 0,015 mmol/ml*sec για την Hx και το ATP και 0,02 mmol/ml*sec για την Rib5P. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται η καμπύλη για τη [IMP], με γαλάζιο χρώμα φαίνεται η καμπύλη για τη [Rib5P], με μωβ χρώμα φαίνεται η καμπύλη της [Hx] και με μπλε χρώμα φαίνεται η καμπύλη της [ATP].

Είναι πλέον φανερό από το διάγραμμα ότι υπάρχει μεγάλη μείωση των υποστρωμάτων χωρίς να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό η ποσότητα του προϊόντος που μας ενδιαφέρει. Η [IMP] στην σταθερή κατάσταση με τις καινούργιες ταχύτητες είναι 0,1455 M ενώ η τιμή της ήταν 0,1481 με ταχύτητες ροής για όλα τα υποστρώματα 0,025 mmol/ml*sec. Η τιμή της ταχύτητας εισόδου για την Hx και το ATP φαίνεται να είναι κρίσιμη μεταξύ 0,014 και 0,015 mmol/ml*sec (όταν η τιμή για την Rib5P είναι 0,02 mmol/ml*sec). Η τιμή 0,013

mmol/ml*sec μειώνει την [IMP] σε 0,1287M, μια αρκετά μεγάλη πτώση. Στην περίπτωση της Rib5P η ταχύτητα εισόδου μπορεί να πάρει την τιμή 0,015 mmol/ml*sec (όταν οι άλλες δυο ταχύτητες είναι 0,015 mmol/ml*sec) με τιμή [IMP]= 0,144M. Φαίνεται πως και για την Rib5P η οριακή ταχύτητα εισόδου είναι 0,015 mmol/ml*sec .

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μονοπάτι περίσωσης των πουρινών είναι ένα βιοχημικό μονοπάτι στο οποίο γίνεται ανακύκλωση ελεύθερων πουρινικών βάσεων προς σχηματισμό πουρινικών μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων. Η σημασία που έχει το μονοπάτι αυτό είναι τόσο βιολογική όσο βιοτεχνολογική. Στον άνθρωπο από την έλλειψη του ενζύμου που συμμετέχει στην συγκεκριμένη οδό προκαλούνται δυο σοβαρά μεταβολικά σύνδρομα, το σύνδρομο Lesch-Nyhan και το σύνδρομο Kelly-Seegmiller, τα οποία αποδεικνύουν της σημαντικότητα της ύπαρξης των αντιδράσεων περίσωσης. Στον βιοτεχνολογικό τομέα τα ένζυμα των αντιδράσεων περίσωσης των πουρινών χρησιμοποιούνται μαζί με ένζυμα από άλλες μεταβολικές οδούς για την παραγωγή σημασμένων NTPs.

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τη βιοτεχνολογική σημασία του μονοπατιού περίσωσης των πουρινών. Ο στόχος της εργασίας ήταν η ακινητοποίηση τριών ενζύμων σε μια στήλη Ni. Τα ένζυμα αυτά είναι η συνθετάση του PRPP (PRPPS), η φωσφοριβοζυλομεταφοράση της Ξανθίνης και της γουανίνης (XGPRT) και η ανόργανη πυροφωσφατάση (PPase). Η στήλη θα είχε το ρόλο του βιοαντιδραστήρα και θα εισάγονταν σε αυτή με συγκεκριμένο ρυθμό τρία απαραίτητα υποστρώματα, το ATP, η φωσφορική ριβόζη (Rib5P) και η υποξανθίνη (Hx). ώστε να παραχθούν νουκλεοτίδια και ειδικότερα IMP. Η προσομοίωση αυτού του ενζυμικού συστήματος ήταν ένα ακόμα ζητούμενο στην παρούσα εργασία.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν τα *in vitro* πειράματα στα οποία έγινε η κλωνοποίηση των γονιδίων των ενζύμων, η υπερέκφραση των ενζύμων και η προσπάθεια απομόνωσης τους. Τα αποτελέσματα από την απομόνωση των ενζύμων ήταν θετικά μόνο για την PRPPS ενώ δεν απομονώθηκαν τα άλλα δυο ένζυμα. Η αδυναμία απομόνωσης των ενζύμων πιθανώς να οφείλεται στο ότι τα ένζυμα δεν υπερεκφράστηκαν σε βαθμό που να μπορούν να απομονωθούν. Τα επόμενα βήματα στα *in vitro* πειράματα είναι η εκ νέου προσπάθεια για απομόνωση των δυο ενζύμων καθώς και η χρήση της μεθόδου μέτρησης της δραστηριότητας της XGPRT, η οποία θα βοηθήσει αφενός στο να παρατηρηθεί κατά πόσο το ένζυμο λειτουργεί μόνο του και αφετέρου θα βοηθήσει στην έμμεση παρατήρηση της λειτουργίας της συνθετάσης του PRPP όταν τα τρία ένζυμα συγκαθλωθούν στη στήλη Ni. Τέλος μένει η συγκαθίλωση των τριών ενζύμων η οποία θα οδηγήσει αρχικά στην παραγωγή πουρινικών νουκλεοτιδίων και έπειτα στην παρασκευή νουκλεοτιδίων, τα οποία θα περιέχουν ραδιενεργά ισότοπα. Επίσης μένει να διευκρινιστεί και πρακτικά αν και κατά πόσο είναι απαραίτητη η δράση της πυροφωσφατάσης.

Εκτός από τα *in vitro* πειράματα ασχοληθήκαμε με το λογισμικό εργαλείο COPASI (UI), ένα πρόγραμμα που μας επέτρεψε να μοντελοποιήσουμε και να προσομοιώσουμε το ενζυμικό σύστημα που θα υπάρχει μέσα στη στήλη και να ερευνήσουμε τις συνθήκες που αυτό θα έχει μια καλή και αποδοτική λειτουργία. Το COPASI έδειξε μια θετική εικόνα από τις δυνατότητες του για το δικό μας σύστημα. Με την ρύθμιση των παραμέτρων του συστήματος το COPASI επιβεβαίωσε την αναγκαιότητα της ύπαρξης δραστηριότητας της PPase για την αποτελεσματικότερη παραγωγή IMP, αφού η παραγωγή PPi μετατοπίζει τις ισορροπίες της σύνθεσης του PRPP και της περίσωσης της υποξανθίνης προς τα αριστερά. Σύμφωνα με το COPASI επίσης οι οριακές τιμές των ταχυτήτων εισαγωγής των τριών υποστρωμάτων για την αποτελεσματικότερη παραγωγή IMP χωρίς την περιττή σπατάλη των υποστρωμάτων είναι 0,015 mmol/ml*sec και για τα τρία υποστρώματα. Η τιμή της ταχύτητας εισαγωγής της Rib5P μπορεί κάλλιστα να πάρει την τιμή 0,02 mmol/ml*sec χωρίς να υπάρχει πολύ μεγαλύτερη σπατάλη της Rib5P και η τιμή της [IMP] στην σταθερή κατάσταση να είναι 0,145 M.

Πέραν των αποτελεσμάτων αυτών που πάρθηκαν από το COPASI, για την καλύτερη προσομοίωση του ενζυμικού μας συστήματος υπάρχει δυνατότητα βελτίωσης του μοντέλου και πλήρους αναζήτησης και άλλων παραμέτρων που επηρεάζουν τη λειτουργία του συστήματος. Με την επιλογή βελτιστοποίησης (optimization) είναι δυνατόν να βρεθούν ακόμα καλύτερες συνθήκες. Μια ακόμα δυνατότητα που υπάρχει για μελλοντική βελτίωση του μοντέλου είναι ότι τα ήδη υπάρχοντα στοιχεία του COPASI μπορούν να αναγνωριστούν και να αναλυθούν από άλλα προγράμματα μέσω της αποθήκευσης των αρχείων σε αρχεία τύπου xml, μια ακόμα δυνατότητα που προσφέρει το COPASI.

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ ΚΕΙΜΕΝΟΥ

- PRTάση: Φωσφοριβόζυλομεταφοράση ή φωσφοριβόζυλοτρανσφεράση
- PRPP: 5-φωσφοριβόζυλο-1-πυροφωσφορικό
- PPi: Πυροφωσφορικό
- Pi: Ορθοφωσφορικό
- IPTG: Isopropyl Thio Galactosyl
- XGPRT: Φωσφοριβόζυλομεταφοράση της ξανθίνης και γουανίνης ή PRTάση της ξανθίνης και γουανίνης
- IMP: Ινοσινικό
- AMP: Αδενυλικό
- PRPPS: Συνθετάση του PRPP
- PPase: πυροφωσφατάση
- NTPs: Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια
- Hx: Υποξανθίνη
- Rib5P= Φωσφορική ριβόζη

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Eriksen T. A., Kadziola A., A K Bentsen, K W Harlow, and S Larsen. (2000). Structural basis for the function of *Bacillus subtilis* phosphoribosylpyrophosphate synthetase. *Nature Structural Biology* 7, no. 4 (April): 303-8. doi:10742175
- Esther Z. F., Bromberg Y., Hirsch J., Feinstein S., Fishberg Y. and Sperling O. (2003). Kelly-Seegmiller syndrome due to a unique variant of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: reduced affinity for 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate manifested only at low, physiological substrate concentrations. *Biochimica et Biophysica acta*. 1500:197-203
- Esther Z. F., Bromberg Y., Hirsch J., Feinstein S., Fishberg Y. and Sperling O. (2003). A novel point (I137T) mutation in the conserved 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate binding motif of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT Jerusalem) in a variant of Lesch-Nyhan syndrome. *Molecular genetics and metabolism*. 78: 158-161
- Heather S. L, Blair R Szymczyna, Lincoln G Scott, and James R Williamson. (2008). Pathway engineered enzymatic de novo purine nucleotide synthesis. *ACS Chemical Biology* 3, no. 8 (August 15): 499-511. doi:10.1021/cb800066p.
- Hoops Stefan, Sven Sahle, Ralph Gauges, et al. (2006). COPASI--a COMplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22, no. 24 (December 15): 3067-74. doi:bt1485
- Hove-Jensen Bjarne, Bentsen K. Ann-Kristin, and Kenneth W Harlow. 2005. Catalytic residues Lys197 and Arg199 of *Bacillus subtilis* phosphoribosyl diphosphate synthase. Alanine-scanning mutagenesis of the flexible catalytic loop. *The FEBS Journal* 272, no. 14 (July): 3631-9. doi:EJB4785
- Hove-Jensen, B. (1982), Phosphoribosylpyrophosphate synthetase, Identification of a mutant enzyme. *Euro. J. Biochemistry* 126, 327-332
- Hove-Jensen, B, K W Harlow, C J King, and R L Switzer. 1986. Phosphoribosylpyrophosphate synthetase of *Escherichia coli*. Properties of the purified enzyme and primary structure of the *prs* gene. *The Journal of Biological Chemistry* 261, no. 15 (May 25): 6765-71. doi:3009477
- Hove-Jensen, B. (1995). Phosphoribosyl diphosphate synthetase-independent NAD de novo synthesis in *Escherichia coli*: a new phenotype of phosphate regulon mutants. *Journal of Bacteriology* 178, no. 3 (February): 714-22. doi:8550505
- Hove-Jensen, Bjarne, Tina J Rosenkrantz, Andreas Haldimann, and Barry L Wanner. (2003). *Escherichia coli* *phnN*, encoding ribose 1,5-bisphosphokinase activity (phosphoribosyl diphosphate forming): dual role in phosphonate degradation and NAD biosynthesis pathways. *Journal of Bacteriology* 185, no. 9 (May): 2793-801. doi:12700258.

- Josse, J. (1965). Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. 1. Purification and catalytic properties. *The Journal of Biological Chemistry* 241, no. 9 (May 10): 1938-47. doi:5329747.
- Keough D., McConachie L., Gordon R., Jersey J., Emerson B., (1986). Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. Development of a spectrophotometric assay and its use in detection and characterization of mutant forms. *Clinica chimica acta*, 163:301-308.
- Krenitsky, T A, S M Neil, and R L Miller. 1970. Guanine and xanthine phosphoribosyltransfer activities of *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*. Their relationship to hypoxanthine and adenine phosphoribosyltransfer activities. *The Journal of Biological Chemistry* 245, no. 10 (May 25): 2605-11. doi:4910918
- Lincoln S.G., Tolbert Thomas J., and Williamson R.James. (2000). [2] Preparation of specifically 2H- and 13C-labeled ribonucleotides. In *RNA - Ligand Interactions, Part A*, Volume 317:18-38. Academic Press
- Liu, S W, and G Milman. 1983. Purification and characterization of *Escherichia coli* guanine-xanthine phosphoribosyltransferase produced by a high efficiency expression plasmid utilizing a lambda PL promoter and CI857 temperature-sensitive repressor. *The Journal of Biological Chemistry* 258, no. 12 (June 25): 7469-75. doi:6305942.
- Miller, R L, G A Ramsey, T A Krenitsky, and G B Elion. 1972. Guanine phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*, specificity and properties. *Biochemistry* 11, no. 25 (December 5): 4723-31. doi:4347700.
- Natsumeda, Yutaka, Tadashi Ikegami, Edith Olah, and George Weber. 1989. Significance of Purine Salvage in Circumventing the Action of Antimetabolites in Rat Hepatoma Cells. *Cancer Res* 49, no. 1 (January 1): 88-92
- Nyhan, W L. 1997. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 20, no. 2 (June): 171-8. doi:9211189
- Roessner, C A, J B Spencer, N J Stolowich, et al. 1994. Genetically engineered synthesis of precorrin-6x and the complete corrinoid, hydrogenobyric acid, an advanced precursor of vitamin B12. *Chemistry & Biology* 1, no. 2 (October): 119-24. doi:9383380.
- Schuster S. et. al.(1999).Detection of elementary flux modes in biochemical net works: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends biotechnol.* 17,53-60.
- Stryer Lubert. (1997). Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2^η έκδοση, τόμος II, κεφάλαια 24 και 25.
- Switzer, Robert L., and Gibson Katharine J.. 1978. [1] Phosphoribosylprophosphate synthetase (ribose-5-phosphate pyrophosphokinase) from *Salmonella typhimurium*. In *Purine and Pyrimidine Nucleotide Metabolism*, Volume 51:3-11. Academic Press.

- Switzer, R L. 1971. Regulation and mechanism of phosphoribosylpyrophosphate synthetase. 3. Kinetic studies of the reaction mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 246, no. 8 (April 25): 2447-58. doi:4324215.
- Vos S, J de Jersey, and J L Martin. 1997. Crystal structure of Escherichia coli xanthine phosphoribosyltransferase. *Biochemistry* 36, no. 14 (April 8): 4125-34. doi:9100006
- Vos, S, R J Parry, M R Burns, J de Jersey, and J L Martin. 1998. Structures of free and complexed forms of Escherichia coli xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Journal of Molecular Biology* 282, no. 4 (October 2): 875-89. doi:9743633
- Wong S. C., D C Hall, and J Josse. (1970). Constitutive inorganic pyrophosphatase of Escherichia coli. 3. Molecular weight and physical properties of the enzyme and its subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 245, no. 17 (September 10): 4335-45. doi:5498420
- Xu, Y., J. Eads, J.C. Sacchettini, and C. Grubmeyer. 1997. Kinetic Mechanism of Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase: Rapid Phosphoribosyl Transfer Chemistry. *Biochemistry* 36, no. 12 (March 25): 3700-3712.
- Γεωρτάτσος Ι., Γιουψάνη Τ., Κυριακίδης Δ.(2001). Εκδόσεις Ζήτη. Κεφάλαιο 11.