



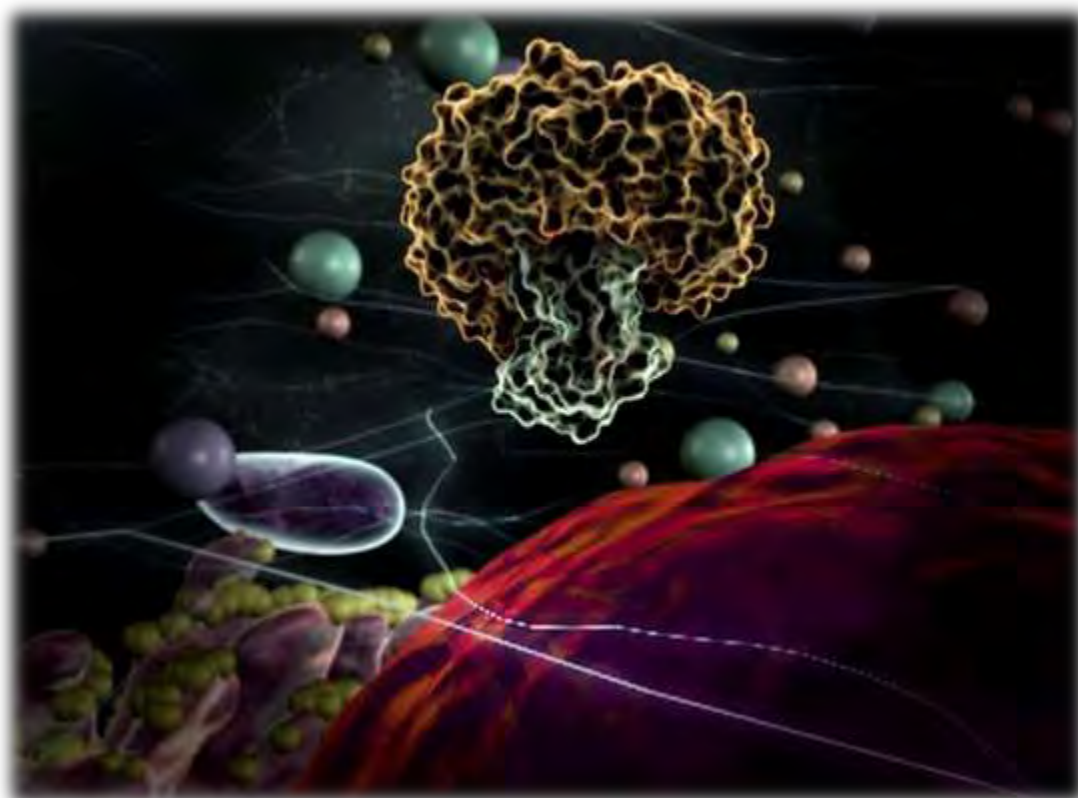
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία:

***Κινητικές & Κρυσταλλογραφικές μελέτες της ηωσινοφιλικής
νευροτοξίνης***

***(Kinetic and Crystallographic studies of eosinophil- derived
neurotoxin)***



Κολινδρή Παρασκευή

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτρης Δ. Λεωνίδας

Λάρισα, Ακαδημαϊκό Έτος 2012-13

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

Υπεύθυνος Καθηγητής:

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

Τριμελής επιτροπή:

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

Κοντού Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, και τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ.Λεωνίδα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ στο εργαστήριο δομικής και λειτουργικής βιοχημείας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις διδακτορικές φοιτήτριες, Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου και Αναστασία Καντσάδη, καθώς και τον τότε μεταπτυχιακό φοιτητή Γιώργο Στραβοδότη, για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου έδειξαν όλο το διάστημα που διήρκησε η διπλωματική μου εργασία. Τέλος, θα ήταν μεγάλη παράλειψη από μέρους μου να μην ευχαριστήσω την συμφοιτήτριά μου Ελένη Προκόβα για την άψογη συνεργασία που είχαμε, καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τόσο για συνεργασία τους όσο και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο όλον αυτόν τον καιρό.

Περιεχόμενα

<i>Abstract</i>	5
<i>Περίληψη</i>	6
1. Εισαγωγικό τμήμα	8
1.1 Η Βιολογία των ηωσινοφίλων	8
1.2 Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN)	10
1.3 Η δομή της EDN	13
1.4 Καταλυτικός μηχανισμός της EDN	16
1.5 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος	19
1.6 Η ενζυμική αναστολή	21
1.7 Νουκλεοζίτες	25
1.8 Μηχανισμός δράσης νουκλεοζιτών	26
2. Πειραματικό τμήμα	30
2.1 Πλασμυδιακοί φορείς	30
2.2 Η <i>Escherichia Coli</i> ως κύτταρο ξενιστής	31
2.3 Καλλιέργεια κυττάρων <i>E.coli</i>	32
2.3.1 Γενικές πληροφορίες.....	32
2.3.2 Παρασκευή θρεπτικών μέσων για τις καλλιέργειες	32
2.3.3 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων για παραγωγή EDN	33
2.3.4 Χρήση αντιβιοτικών ως επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας	34
2.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	35
2.5 Επαγωγή	35
2.6 Λύση των κυττάρων	37
2.7 Πλύση των κυττάρων & Ομογενοποίηση	38
2.8 Εγκλεισμός & Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης	39
2.8.1 Μέθοδος Bradford	39
2.9 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)	40
2.10 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης	41

2.11 Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN.....	42
2.12 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE)	43
2.12.1 Πειραματική διαδικασία	46
Πίνακας 4: Σύσταση Running και Stacking Gel 15% SDS.....	46
2.12.2 Χρώση με Silver Staining.....	47
2.13 Εισαγωγή Κρυσταλλώσεων.....	48
2.13.1 Διάχυση ατμών	48
2.13.2 Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop).....	48
2.14 Κινητική μελέτη της EDN.....	49
2.14.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.....	49
2.14.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.....	50
2.14.3 Περιγραφή της μεθόδου	50
2.14.4 Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα	52
2.14.5 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό K_m και IC_{50}	53
3. Αποτελέσματα	57
3.1 Χρωματογραφικός καθαρισμός EDN με στήλη ιοντοανταλλαγής.....	58
3.2 Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων.....	59
3.3 Απόδοση καθαρισμού	60
3.4 Κρυστάλλωση.....	60
3.5 Κινητικά Αποτελέσματα	61
4. Συζήτηση.....	64
5. Βιβλιογραφία	66

Abstract

Eosinophil- derived neurotoxin (EDN) is one of the four major proteins found in cytoplasmic granules of human eosinophilic leukocytes. EDN is released under allergic and parasitic conditions. It's characterized as a neurotoxin because of its ability to cause the occurrence of Gordon phenomenon when administered intrathecally in microgram quantities in rabbits and guinea pigs. EDN possesses helminthotoxic, antiviral and bactericidal activities and it is implicated in a variety of eosinophil-related inflammatory and allergic diseases. EDN belongs to ribonuclease A (RNase A) superfamily and its enzymatic activity is a prerequisite for its biological actions. Biochemical studies on EDN's enzymatic activity can probe the mechanism by which this activity is related to other biological actions of EDN. In the present work, we studied the inhibitory capacity of small molecule inhibitor (4e), which is a potent inhibitor of RNase A. Our studies showed that 4e is a moderate inhibitor of the enzyme and provided a model for studying other RNase A inhibitors with respect to the specificity of the active site of EDN.

Περίληψη

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) είναι μία από τις τέσσερις κύριες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία των ανθρώπινων ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων. Απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια αλλεργικών και παρασιτικών καταστάσεων, και χαρακτηρίστηκε ως νευροτοξίνη εξαιτίας της ικανότητας της να προξενεί την εμφάνιση του φαινομένου Gordon όταν χορηγείται ενδοραχιαίως σε ποσότητες μικρογραμμαρίων σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια. Η EDN εμφανίζει αντική, αντιπαρασιτική και αντιελμινθική δράση και εμπλέκεται σε αλλεργικές παθήσεις και φλεγμονές που συνδέονται με τα ηωσινόφιλα. Η EDN είναι μέλος της υπερικογένειας της Ριβονουκλεάσης Α (RNase A) και η ενζυματική της δράση συνδέεται με τις βιολογικές της δράσεις. Η κατανόηση της ενζυματικής δράσης της EDN μπορεί να βοηθήσει στη διαλεύκανση των μηχανισμών των βιολογικών της δράσεων. Σημαντικές πληροφορίες προσφέρουν βιοχημικές μελέτες της επίδρασης αναστολέων στην EDN. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η επίδραση ενός συνθετικού νουκλεοζίτη 4e, ισχυρού αναστολέα της RNase A, στην δραστηριότητα της EDN. Οι μελέτες μας έδειξαν πως η ένωση 4e είναι αναστολέας μέτριας ισχύος της EDN, και έδειξε πως αναστολείς της RNase A μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην EDN για την διερεύνηση της εξειδίκευσης του καταλυτικού της κέντρου.



ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

1. Εισαγωγικό τμήμα

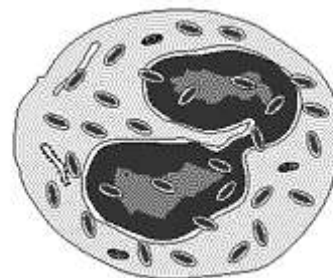
1.1 Η Βιολογία των ηωσινοφίλων

Τα ηωσινόφιλα ή εωσινόφιλα είναι φαγοκύτταρα, τα οποία παράγονται στον μυελό των οστών από πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα και μεταναστεύουν σε όλους τους ιστούς με τη βοήθεια του αίματος. Η ονομασία τους πηγάζει από την ικανότητα του κυτταροπλάσματος τους να βάφεται από την όξινη χρωστική εωσίνη (μέθοδος Romanowsky) και γενικά χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη χημική συγγένεια των κοκκίων τους για όξινες χρωστικές ή χρωστικές ανιλίνης¹. Παρά το γεγονός ότι διαφέρουν τόσο σε μορφολογία όσο και σε διάφορα άλλα χαρακτηριστικά, αποτελούν μαζί με τα ουδετερόφιλα και τα βασεόφιλα τα

κοκκιοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος². Στην *Εικόνα 1* δίνεται η εικόνα ενός τυπικού ηωσινοφίλου, όπου γίνεται ορατό το κυτταρικό τοίχωμα που το περιβάλλει, ο πυρήνας του ο οποίος αποτελείται από δύο λοβούς και το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα³.

Τα ηωσινόφιλα, είναι αρκετά διαδεδομένα σε όλους τους ιστούς, παρόλο που αποτελούν μόλις το 1-5% των περιφερικών λευκοκυττάρων του αίματος. Ο αριθμός τους αυξάνεται σημαντικά στο αίμα και στους προσβεβλημένους ιστούς σε αλλεργικές καταστάσεις, κατά τη διάρκεια της φλεγμονής και σε περιπτώσεις παρασιτικών παθήσεων. Αυτή η αύξηση πυροδοτείται μετά από την πρόσδεση ποικίλων παραγόντων στους πολυάριθμους υποδοχείς που φέρουν στην επιφάνειά τους. Μερικοί από τους παράγοντες που έχει βρεθεί πως ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα είναι όπως είναι ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), η IL-3 και η IL-5⁴.

Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί η έντονη χημειοτακτική απόκριση των ηωσινοφίλων σε αρκετούς παράγοντες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης, αλλά και η περιορισμένη ικανότητα τους να φαγοκυτταρώνουν, συγκριτικά πάντα με άλλα κύτταρα που εμφανίζουν την ίδια ικανότητα. Ωστόσο, είναι πλέον αποδεδειγμένη η αποτελεσματική εξωκυττάρια πέψη μεγάλων σε μέγεθος μολυσματικών παραγόντων, όπως είναι οι παρασιτικοί σκώληκες, οι οποίοι αδυνατούν να προσληφθούν στο εσωτερικό του κυττάρου και να αντιμετωπιστούν αναλόγως από ενδογενή κύτταρα. Με άλλα λόγια, τα ηωσινόφιλα χαρακτηρίζονται



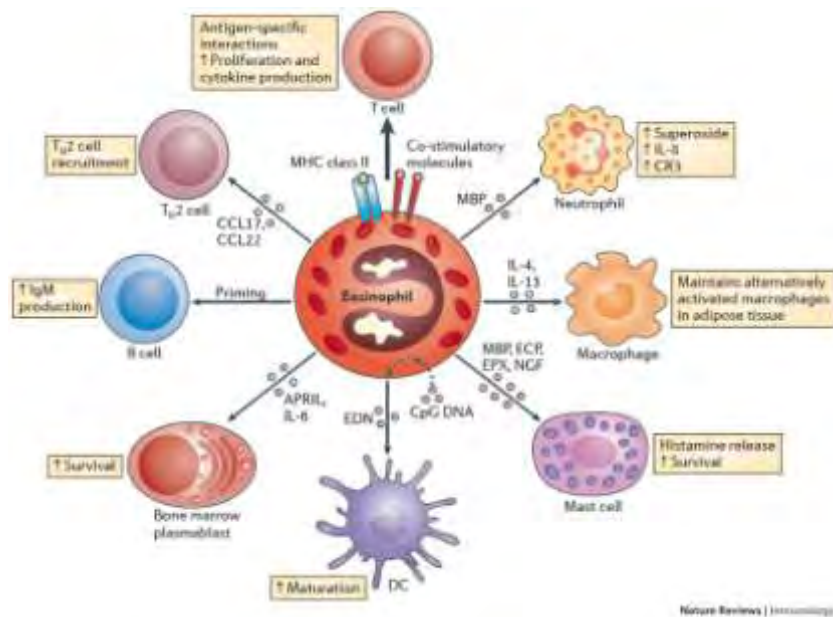
Εικόνα 1: Απεικόνιση της τυπικής μορφολογίας του ηωσινοφίλου. Παρατηρούνται το κυτταρικό τοίχωμα, ο πυρήνας με τους δύο λοβούς και το κοκκιώδες κυτταρόπλασμά του. Επίσης, γίνονται ορατοί οι πυρήνες κάθε κοκκίου του κυτταροπλάσματος³.

από εντονότερη εξωκυτταρική απ' ότι ενδοκυτταρική δράση όταν διεγείρεται η κυτταρική τους μεμβράνη⁴.

Επίσης, έχει ανιχνευθεί έντονη οξειδωτική δράση μέσω παραγωγής H₂O₂ και πιθανότατα μέσω παραγωγής ανιόντος υπεροξειδίου. Βέβαια, βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη η ικανότητα των ηωσινοφίλων να παράγουν άλλες οξυγονούχες ρίζες με μεγαλύτερη δραστηριότητα που ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο στα ουδετερόφιλα. Ωστόσο, αυτό που είναι πλέον βέβαιο είναι πως η δραστηριότητα λύσης των ηωσινοφίλων πηγάζει από τις βασικές ή κατιοντικές πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στα χαρακτηριστικά κοκκία και απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αποκοκκίωσης. Τα

κοκκία αυτά αποτελούνται κατά κύριο λόγο από τη μείζονα βασική πρωτεΐνη (MBP) και από άλλες πρωτεΐνες όπως είναι η κατιοντική πρωτεΐνη των ηωσινοφίλων (ECP), η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) και η υπεροξειδάση των ηωσινοφίλων (EPX).

Το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα



Εικόνα 2: Τα ηωσινόφιλα εκτός από την ικανότητα τους να ανταποκρίνονται σε διάφορα ερεθίσματα από το περιβάλλον, έχουν πολύ μεγάλη επίδραση στη δράση άλλων λευκοκυττάρων. Στην εικόνα αυτή απεικονίζονται τα κύτταρα που επηρεάζονται από τη δράση των ηωσινοφίλων, οι μεσολαβητές που εκκρίνονται από τα ηωσινόφιλα και προκαλούν τις μεταβολές στα κύτταρα αυτά και, τέλος, δίνονται οι μεταβολές αυτές⁶.

τόσο ενάντια διαφόρων παρασιτικών οργανισμών όσο και των κυττάρων του ίδιου του οργανισμού που τα παράγει είναι ο κύριος λόγος που πλήθος εργαστηρίων παγκοσμίως ασχολείται με τη μελέτη της δομής και δράσης των πρωτεϊνών αυτών^{1,2,3,4,5}. Η δράση των ηωσινοφίλων συνοψίζεται στην *Εικόνα 2*. Σύμφωνα με την εικόνα αυτή, τα ηωσινόφιλα εκτός από την ικανότητα να ανταποκρίνονται στα ποικίλα ερεθίσματα, τα οποία δέχονται, μπορούν να έχουν μεγάλη επίδραση στη δράση άλλων λευκοκυττάρων. Τα ηωσινόφιλα μπορούν να εκφράσουν μόρια MHC της τάξης II και συν-διεγερτικά μόρια, να αντιμετωπίσουν αντιγόνα και να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, καθώς επίσης και να προάγουν την παραγωγή κυτοκινών σε ένα αντιγονο-εξαρτώμενο μοτίβο. Επιπλέον, δρώντας μαζί με τα δενδριτικά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των TH₂ κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης μετά από ευαισθητοποίηση με αλλεργιογόνο. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την παραγωγή CC-17,

συνδέτη χημειοκίνης (CCL17) και CCL22. Επίσης, τα ηωσινόφιλα προάγουν την αντιγονο-ειδική παραγωγή IgM από τα Β κύτταρα και παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των κυττάρων του πλάσματος στο μυελό των οστών ποντικού μέσω της παραγωγής ενός συνδέτη (APRIL) και της ιντερλευκίνης-6(IL-6). Τα ηωσινόφιλα τα οποία διεγείρονται από CpG DNA προκαλούν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Πράγματι, η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) προωθεί την ωρίμανση και ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και η κύρια βασική πρωτεΐνη (MBP) ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα, προκαλώντας την απελευθέρωση υπεροξειδίου και IL-8, και οδηγώντας σε αύξηση του αριθμού των μορίων του υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας της ιντεγκρίνης 3 του συμπληρώματος (CR3). Εναλλακτικά, τα ηωσινόφιλα, διατηρούν ενεργοποιημένα τα μακροφάγα στο λιπώδη ιστό μέσω παραγωγής IL-4 και IL-13. Οι πρωτεΐνες των κοκκίων MBP, ECP και EPX ενεργοποιούν τα σιτευτικά κύτταρα προκαλώντας απελευθέρωση ισταμίνης. Ομοίως, ο ηωσινοφιλικός αυξητικός παράγοντας των νεύρων (NFG) παρατείνει την επιβίωση των σιτευτικών κυττάρων⁶.

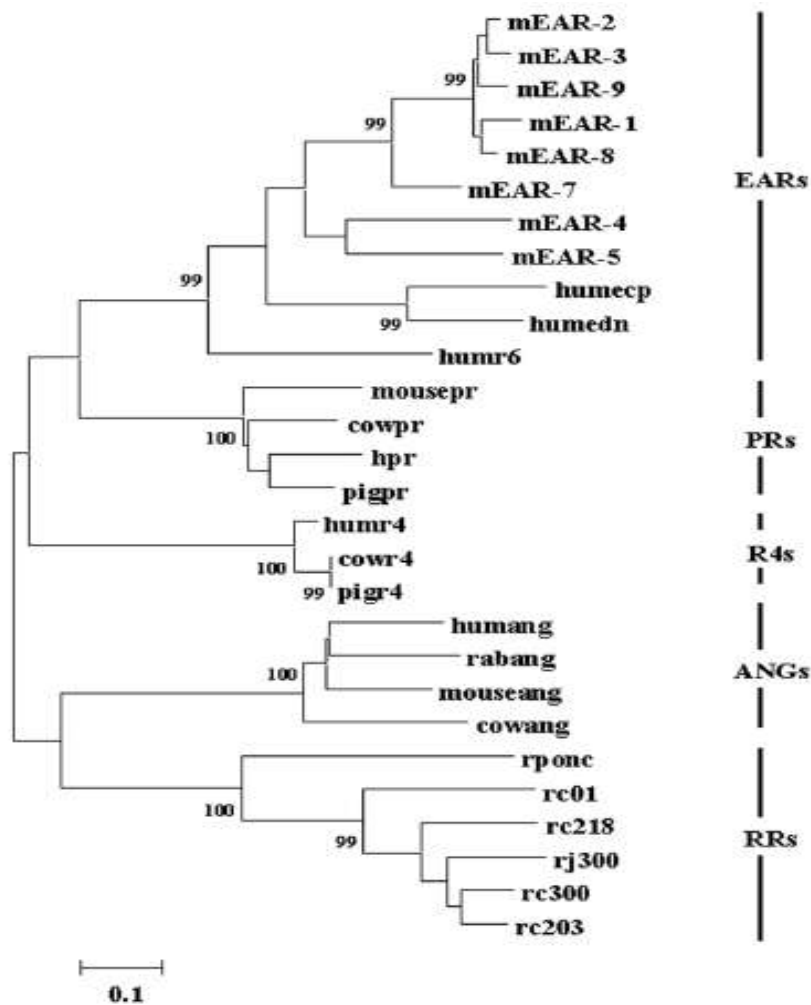
1.2 Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη είναι μία από τις τέσσερις μεγάλες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία των ανθρώπινων ηωσινοφιλικών λευκοκυττάρων. Απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια αλλεργικών και παρασιτικών καταστάσεων. Χαρακτηρίστηκε ως νευροτοξίνη στη δεκαετία του 1930, όταν ο M. H. Gordon, στην προσπάθεια του να εντοπίσει μία μολυσματική αιτιολογία για τη νόσο Hodgkin, περιέγραψε ένα νευροτοξικό σύνδρομο μετά από ενδοεγκεφαλική χορήγηση αιωρήματος ανθρώπινου λεμφαδένα σε κουνέλια. Τελικά, αυτό που διαπιστώθηκε ήταν πως αυτή η νευροτοξικότητα προερχόταν από τα διηθημένα ηωσινόφιλα και από μία πρωτεΐνη με MB ~ 18kDa, η οποία προξενεί την εμφάνιση του φαινομένου Gordon όταν χορηγείται ενδοραχιαίως σε ποσότητες μικρογραμμαρίων σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια. Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη απομονώθηκε και από τον Durack και τους συνεργάτες του το 1981 και από τους Peterson και Venge το 1983. Παρόλο, που οι δύο ερευνητικές ομάδες δεν γνώριζαν ότι είχαν απομονώσει την ίδια πρωτεΐνη, σύντομα διαπιστώθηκε πως η EDN του Durack και η πρωτεΐνη X ή EPX των Peterson και Venge αποτελούσαν το ίδιο πρωτεϊνικό μόριο^{7,8,9}. Η EDN ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των ηωσινοφιλικών κοκκίων λόγω του χαμηλού ισοηλεκτρικού της σημείου, αφού τα ισοηλεκτρικά σημεία των MBP, ECP και EPO είναι περίπου 11, ενώ της EDN μόλις 9. Αυτό πρακτικά σημαίνει, πως σε ιστοκαλλιέργεια, και ειδικότερα σε δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και *in vitro* τοξικότητας ελμίνθων, η EDN παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα συγκριτικά με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες.

Ωστόσο, αυτό που είναι πλέον ξεκάθαρο είναι πως η EDN είναι μία ενζυμικά ενεργή ριβονουκλεάση και με τη βοήθεια της αλληλούχισης διαπιστώθηκε πως η πρωτεΐνη αυτή, ανήκει στην υπερικογένεια της ριβονουκλεάσης A (RNase A)

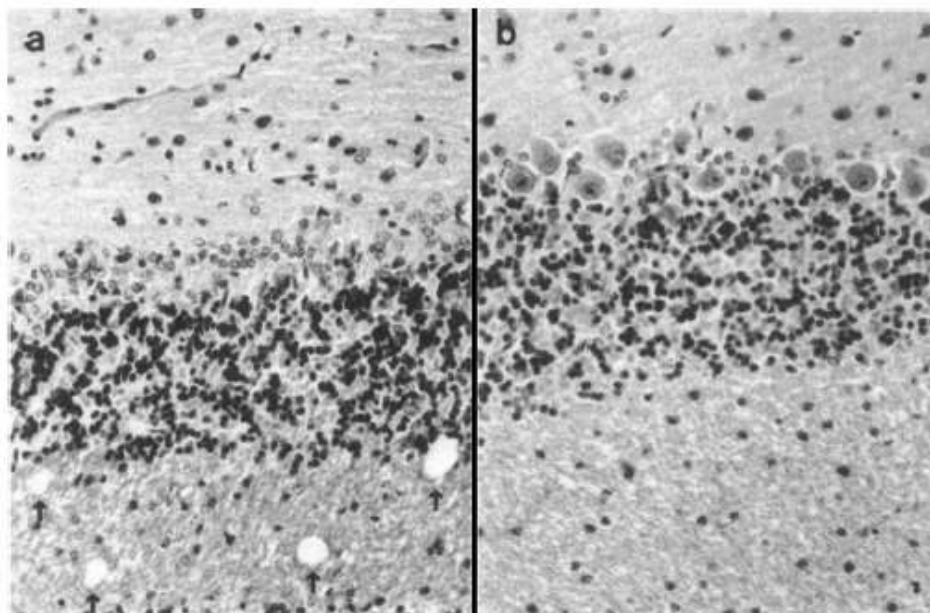
(Εικόνα 3). Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της υπερικογένειας αυτής, μεταξύ των οποίων είναι η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινοφιλή κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3) και πλήθος κυτταροτοξινών, εμφανίζει τα εξής κοινά χαρακτηριστικά: στην αλληλουχία τους εντοπίζονται 6-8 κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς και έχουν από δύο ιστιδίνες και μία λυσίνη, με ένα συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας (CKXXNTF). Επιπρόσθετα, τα γονίδια των ριβονουκλεασών αυτών εδράζονται σε ένα μοναδικό εξόνιο στο χρωμόσωμα 14.

Βάση κρυσταλλογραφικών μελετών, έχει βρεθεί ότι η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη παρουσιάζει σημαντικές δομικές ομοιότητες με την RNAάση A, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται υψηλό επίπεδο διατήρησης στις περιφερικές θέσεις δέσμησης υποστρώματος. Για τον λόγο αυτό, η EDN συχνά αναφέρεται στην παγκόσμια βιβλιογραφία και ως RNAάση 2. Επιπλέον, το μοριακό της βάρος έχει βρεθεί πως είναι 18,4kDa, ενώ η ακριβής της θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι ο βραχίονας q του χρωμοσώματος 14^{7,10,11}.



Εικόνα 3: Φυλογενετικό δέντρο της υπερικογένειας της Ριβονουκλεάσης Α, στο οποίο απεικονίζονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ επιλεγμένων μελών της υπερικογένειας αυτής¹⁰.

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολυάριθμων ερευνητικών κέντρων παγκοσμίως εξαιτίας της ικανότητας της να αναπαράγει το νευροτοξικό φαινόμενο (φαινόμενο Gordon). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν είναι ακόμη γνωστός, καθώς υπάρχουν αρκετά σημεία του, τα οποία δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Ένα από αυτά είναι το κατά πόσο η τοξικότητα που ασκείται στα κύτταρα του Purkinje, η εκφύλιση των οποίων αποτελεί χαρακτηριστικό του φαινομένου αυτού (Εικόνα 4) είναι άμεση ή αν η κυτταρική απώλεια που παρατηρείται οφείλεται σε έμμεση ενεργοποίηση ενός άλλου τύπου κυττάρων, τα οποία προκαλούν την απελευθέρωση ενός κυτταροτοξικού μεσολαβητή. Επιπλέον, ερευνάται η πιθανότητα η EDN να ασκεί τη δράση της σε συνδυασμό με άλλες ριβονουκλεάσες, όπως είναι η ECP και η ογκονάση, καθώς έχει βρεθεί πως η συνδυαστική δράση αυτών των δύο προκαλεί το νευροτοξικό φαινόμενο όταν ενίονται σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό χοίρων^{12,13,14}.



Εικόνα 4: Ιστοπαθολογικές ανωμαλίες στην παρεγκεφαλίδα κουνελιού ως απόκριση στην EDN. Δεξιά (a) απεικονίζεται φυσιολογικός εγκεφαλικός ιστός, στον οποίο είναι εμφανή τα κύτταρα του Purkinje και η ανέπαφη λευκή ουσία. Αριστερά (b) παρατηρείται εγκεφαλικός ιστός μετά από χορήγηση 50μgr καθαρής EDN. Τα κύτταρα του Purkinje έχουν εξαφανιστεί και έχουν σχηματιστεί κενोटόπια στη λευκή ουσία.⁸

Εκτός από την πρόκληση του παραπάνω φαινομένου, η EDN από μόνη της παρουσιάζει μικρή ή και καθόλου κυτταροτοξικότητα στα σωματικά κύτταρα. Ωστόσο, αυτό που έχει γνωστοποιηθεί είναι πως όταν προσδένεται σε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια του υποδοχέα της τρανσφερίνης (sFv), η EDN εσωτερικεύεται ως δραστική ριβονουκλεολυτική κυτοτοξίνη. Με βάση την πληροφορία αυτή και μετά από τη διεξαγωγή πειραμάτων σε έγκλειστα της *E.coli*, έχει διαπιστωθεί πως όταν ανθρώπινα κύτταρα που σχετίζονται με την εμφάνιση λευχαιμίας εκφράζουν τον υποδοχέα της τρανσφερίνης, εμφανίζουν ευαισθησία σε νανομοριακές συγκεντρώσεις EDNsFv, προτείνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι τα ανθρώπινα ένζυμα μπορούν να παράγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ικανά να

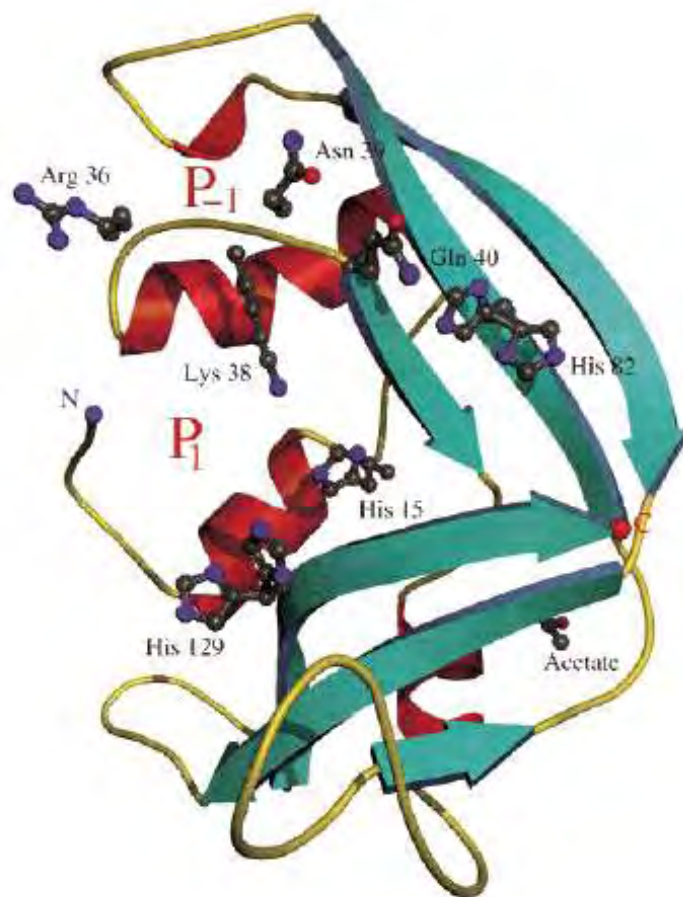
αποκτήσουν κυτταροτοξικές ιδιότητες όταν συντήκονται με αντισώματα. Επομένως, ένζυμα όπως η EDN εμπλέκονται στην παραγωγή πρωτεϊνών μέσω της ανοσολογικής σύντηξης που περιγράφηκε παραπάνω, οι οποίες θα είναι λιγότερο ανοσογονικές συγκριτικά με ανοσοτοξίνες οι οποίες περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες τοξινών βακτηριακής ή φυτικής προέλευσης¹⁵. Ομοίως, σύντηξη της EDN με την κυτοτοξίνη ογκονάση, οδήγησε στον σχηματισμό μιας χιμαιρικής ριβονουκλεάσης η οποία χαρακτηρίζονταν από αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα, συγκριτικά πάντα με την αρχική EDN, αλλά και αυξημένη κυτταροτοξικότητα. Οι παρατηρήσεις είναι εξαιρετικά σημαντικές καθώς είναι πολύ πιθανό πως θα συμβάλουν δυναμικά στη σχεδίαση καινοτόμων θεραπειών ενάντια στον καρκίνο¹⁶.

Επιπλέον, έχει βρεθεί πως ανασυνδυασμένη EDN (rhEDN) μειώνει τη μολυσματικότητα του ιού RSV-B, ο οποίος συνδέεται με την εμφάνιση άσθματος, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω άμεσης ριβονουκλεολυτικής καταστροφής των εξωκυττάρων λοιμογόνων παραγόντων του ιού. Όσον αφορά το θέμα αυτό αξίζει να τονιστεί ότι, η ανασυνδυασμένη EDN έχει μοναδικά χαρακτηριστικά πάνω στη μείωση της μολυσματικότητας του ιού αυτού, καθώς άλλες ριβονουκλεάσες, όπως η RNAάση A, δεν παρουσίαζαν καμία αντική δράση. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στην μελλοντική χρήση της rhEDN ως μελλοντικός θεραπευτικός παράγοντας ασθενειών που προκαλούνται από τον RSV¹⁷.

Επίσης, να αναφερθεί πως η EDN ταξινομείται μεταξύ των alarmins, οι οποίοι αποτελούν μεσολαβητές που εκκρίνονται μετά από μόλυνση ή τραυματισμό του ιστού και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως είναι τα δενδριτικά, συνδέοντας με αυτόν τον τρόπο την έμφυτη με την επίκτητη ανοσία. Η δράση αυτή της EDN πραγματοποιείται μέσω πρόσδεσής της στον TRL-2 υποδοχέα, ο οποίος εκφράζεται σε μεγάλο αριθμό κυττάρων, μεταξύ των οποίων είναι τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα. Δυστυχώς, και σε αυτή την περίπτωση ο μηχανισμός δράσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης δεν είναι ακόμη γνωστός^{7,18}.

1.3 Η δομή της EDN

Εκτός από τον μηχανισμό δράσης της EDN, είναι ιδιαίτερα σημαντική η διασαφήνιση της δομής της πρωτεΐνης αυτής. Η δομή της EDN προσδιορίστηκε αρχικά σε ευκρίνεια 1.8 Å²¹ και στη συνέχεια χαρτογραφήθηκε η αρχιτεκτονική του καταλυτικού της κέντρου μέσω κρυσταλλογραφικών μελετών της σύνδεσης μικρών νουκλεοτιδίων²³. Πρόσφατα, η δομή της προσδιορίστηκε σε ακόμα μεγαλύτερη ευκρίνεια (0.98 Å) και έγιναν σαφείς οι πιθανές ελεύθερες διαμορφώσεις των δευτερευουσών περιοχών της rEDN¹⁹ (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Αναπαράσταση της rEDN σε ευκρίνεια 0,98Å. Στην εικόνα εμφανίζεται υποπεριοχή P₁ (Subsite P₁) η οποία αποτελείται από τα εξής αμινοξέα: His15, Lys38, and His129. Επιπλέον γίνεται ορατή η υποπεριοχή P₋₁ η οποία αποτελείται από Arg36, Asn39, και Gln40. Επίσης, παρατηρείται η His82 της B₁ δευτερεύουσας περιοχής. Το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αναπαρίστανται ως μπλε και κόκκινες σφαίρες, αντίστοιχα. Τέλος, στη δομή αυτή παρουσιάζεται και ένα μόριο οξικού άλατος.

Επίσης η ομάδα των L. Newton, S.M. Rybak και A. Wlodawer προσδιόρισε την κρυσταλλική δομή μίας μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης μορφής της EDN, στην οποία είχαν προστεθεί τέσσερα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο σε ευκρίνεια 1.0 Å. Από τη μελέτη αυτή, βγήκε το συμπέρασμα ότι η δομή της τροποποιημένης και της φυσικής EDN είναι ουσιαστικά η ίδια. Από όλες αυτές τις μελέτες, έγινε γνωστό ότι η EDN συγκροτείται από τέσσερις α-έλικες, έξι β-ελάσματα και εννέα βρόχους²⁰. Στον Πίνακα 1 δίνονται τα αμινοξέα τα οποία συμμετέχουν στις διαμορφώσεις αυτές²¹.

Πίνακας 1: Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τις δευτεροταγές δομές από τις οποίες αποτελείται η EDN²¹.

Έλικες	β-ελάσματα	Βρόχοι
α1 Thr6-Ile16	β1 Asn39-Leu45	L1 Lys1-Phe5
α2 Gln22-Arg35	β2 Pro58-Cys 62	L2 Asn17-Gln21
α3 Thr47-Cys55	β3 Asn69- Ser74	L3Arg36-Lys38
α4 Asn92-Cys96	β4 Val78-Pro88	L4 Gly56-Asn57
	β5 Arg97-Arg114	L5 Pro63-Ser64
	β6 Pro124-Ile134	L6 Lys66-Lys69
		L7 Ser75-Gln77
		L8 Ser89-Gln91
		L9Asp115-Tyr123

Επιπλέον, βρέθηκε ότι ένας σημαντικός αριθμός αμινοξέων ευθύνεται για τις εναλλακτικές διαμορφώσεις τις οποίες μπορεί να εκλάβει η EDN. Τέτοιου είδους διαμορφώσεις είναι πλέον βέβαιο πως είναι δυνατόν να προκύψουν εξαιτίας 18 αμινοξέων. Στον *Πίνακα 2* δίνονται τα αμινοξέα που έχει βρεθεί πως συμμετέχουν στην εμφάνιση εναλλακτικών διαμορφώσεων, καθώς επίσης και οι παράμετροι που συνεισφέρουν στην εμφάνιση των διαμορφώσεων αυτών.

Πίνακας 2: Παράμετροι για τα αμινοξέα που δείχνουν εναλλακτικές διαμορφώσεις.

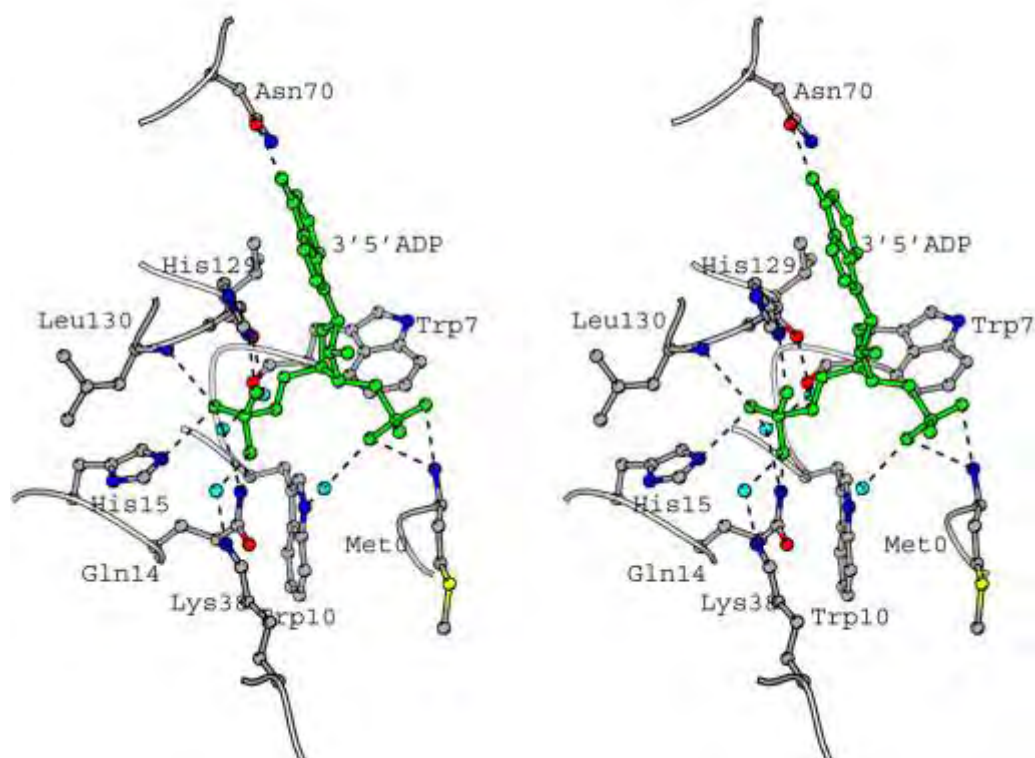
Residue	Number	Occupancy	Temperature factor (Å ²)	χ ₁ (deg.)	χ ₂ (deg.)	χ ₃ (deg.)	χ ₄ (deg.)	χ ₅ (deg.)
Phe	5A	0.54	14.94	-72	87			
	5B	0.46	16.56	-56	129			
Gln	22A	0.54	12.32	-65	-66	-47		
	22B	0.46	13.56	-165	-112	-162		
Asn	25A	0.64	22.35	-66	-21			
	25B	0.36	29.43	-172	-61			
Ile	30A	0.75	14.34	-67	170			
	30B	0.25	10.18	-67	53			
Asn	32A	0.62	17.21	-79	-22			
	32B	0.38	25.69	-180	106			
Arg	36A	0.47	21.67	68	-169	-87	-80	0
	36B	0.53	23.42	56	180	-154	94	0
Asn	39A	0.59	19.56	-161	48			
	39B	0.41	18.74	-57	-67			
Gln	40A	0.69	23.40	177	-64	148		
	40B	0.31	22.31	50	-170	151		
Met	60A	0.47	20.92	59	179	-75		
	60B	0.53	31.89	82	175	-5		
Arg	68A	0.72	28.78	-75	-39	-61	-83	-1
	68B	0.28	26.43	-52	-80	-169	68	0
Ile	81A	0.80	17.67	-59	165			
	81B	0.20	29.50	-59	-47			
His	82A	0.69	16.39	-61	-64			
	82B	0.31	18.24	-161	52			
Ile	93A	0.38	40.74	-72	-16			
	93B	0.62	27.06	-72	168			
Gln	100A	0.54	14.92	178	159	-2		
	100B	0.46	11.62	60	-113	-28		
Val	109A	0.68	10.96	63				
	109B	0.32	10.48	-93				
Asp	115A	0.61	14.94	-171	76			
	115B	0.39	16.56	174	143			
Pro	120A	0.61	19.20	25	-37			
	120B	0.39	20.50	-26	45			
His	129A	0.61	16.19	-63	-66			
	129B	0.39	16.58	178	97			

Τέλος, διαπιστώθηκε η ύπαρξη τεσσάρων δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι ευθύνονται για την μεγάλη σταθερότητα που χαρακτηρίζει την πρωτεΐνη. Οι δεσμοί αυτοί αναπτύσσονται μεταξύ των κυστεϊνών 23-83, 37-96, 55-111 και 62-71. Ο πρώτος δεσμός συνδέει την έλικα α4 με το έλασμα β4, ο δεύτερος δεσμός συνδέει την έλικα α4 με το βρόγχο L3, ο τρίτος δεσμός συνδέει την έλικα α3 με το έλασμα β5 και ο τέταρτος και τελευταίος δισουλφιδικός δεσμός συνδέει τα ελάσματα β2 και β3. Στους δεσμούς αυτούς, αντικατάσταση οποιασδήποτε κυστεΐνης με αλανίνη ή σερίνη οδηγεί σε μειωμένη σταθερότητα του ενζύμου. Ο πρώτος και ο τρίτος δισουλφιδικός δεσμός (23-83 και 55-111), συμβάλλουν περισσότερο στη σταθερότητα του ενζύμου^{20,21}.

1.4 Καταλυτικός μηχανισμός της EDN

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη ασκεί την καταλυτική της δραστηριότητα, διασπάζει δηλαδή φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του RNA, με τον ίδιο ακριβώς μηχανισμό που χρησιμοποιεί η ριβονουκλεάση A, η οποία αποτελεί το κυριότερο μέλος της υπερικογένειας των ριβονουκλεασών στην οποία ανήκει η EDN. Η δομή της EDN παρουσιάζει την τυπική αναδίπλωση της ριβονουκλεάσης, όπου το ενεργό κέντρο εντοπίζεται σε μία σχισμή κεντρικά του ενζύμου. Τα καταλυτικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου της EDN είναι ομόλογα με αυτά της RNase A - His12, Lys41 και His119- και είναι τα εξής: His15, Lys38 και His129²⁰. Στην *Εικόνα 6*

παρουσιάζεται η αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου της EDN τη στιγμή πρόσδεσης με έναν αναστολέα (ανάλογο υποστρώματος).



Εικόνα 6: Στερεοδιάγραμμα της σύνδεσης του 3',5' – ADP στο καταλυτικό κέντρο της EDN. Παρουσιάζονται τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου που αλληλεπιδρούν με τον αναστολέα και οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με στικτές γραμμές²³.

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη διασπά τους RNA φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μέσω υδρόλυσης. Η υδρόλυση αυτή συντελείται σε δύο στάδια, μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα. Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρυσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5'θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος, ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα²². Η αντίδραση τρυσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρυσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρυσφωσφορυλίωση²⁴.

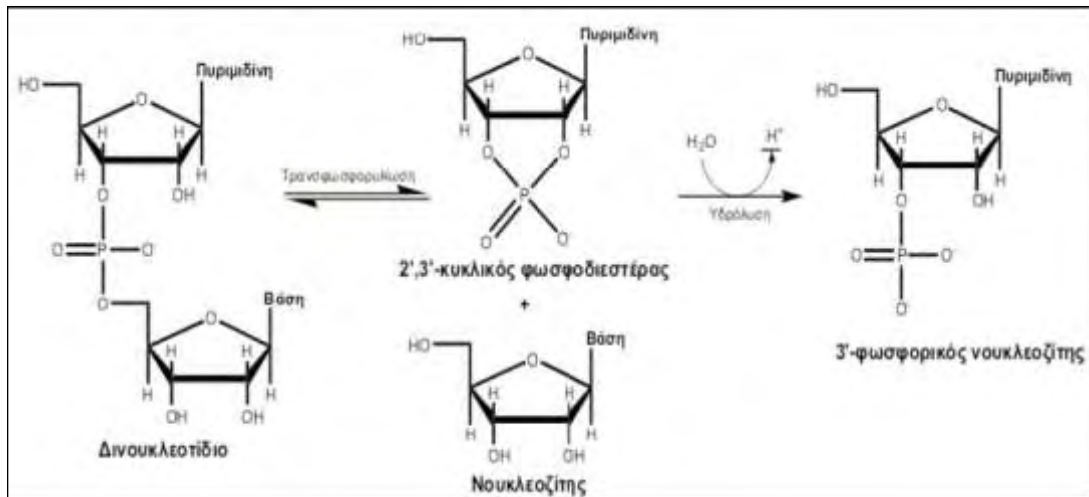
Το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη, γιατί ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο χωρίς να το στρεβλώσει.

Όπως προαναφέρθηκε, τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην εκδήλωση της καταλυτικής δραστηριότητας της RNάσης είναι η His12, His119 και η Lys41. Η αντίδραση ξεκινά με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-O με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιοντισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του O. Την ίδια στιγμή, η πρωτονιωμένη μορφή της His119 παρέχει το πρωτόνιό της στο 5'-O, και το 2'-O σχηματίζει δεσμό με το P, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από τη θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ P και του 5'-O διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο O. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του P και του 2'-O παράγοντας το 2',3'-κυκλικό ενδιάμεσο.

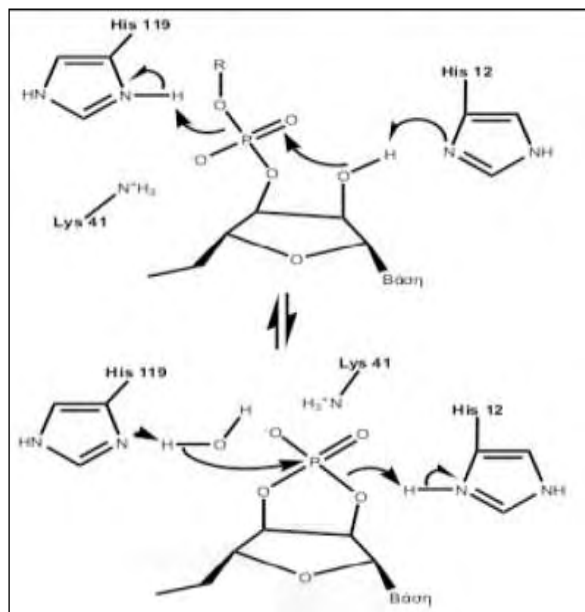
Το δεύτερο στάδιο αυτής της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του κυκλικού ενδιαμέσου, είναι σχεδόν μία αντίστροφη πορεία του πρώτου σταδίου με τη διαφορά ότι ένα μόριο ύδατος αντικαθιστά το 5'-O που είχε απομακρυνθεί. Τώρα ο δότης πρωτονίων είναι η His12 και ο δέκτης πρωτονίων είναι η His119. Η παρουσία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

Η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης έχει ενδιαφέρον. Όταν ο φώσφορος γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιαμέσου, το απερχόμενο 5'-O βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-O βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας. Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιαμέσου ένα άτομο O από το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-O βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρινόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται²⁴.

Στις εικόνες που ακολουθούν συνοψίζονται όλα όσα αναφέρθηκαν στην παράγραφο αυτή. Ειδικότερα, στην *Εικόνα 7* απεικονίζεται η αντίδραση που καταλύεται από την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη, και στην *Εικόνα 8* απεικονίζεται ο μηχανισμός της κατάλυσης.



Εικόνα 7: Η αντίδραση που καταλύεται από την EDN.



Εικόνα 8: Ο καταλυτικός μηχανισμός.

1.5 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος

Όλα τα μέλη της υπερικογένειας της RNase A περιέχουν κεντρικά τοποθετημένες τις ενεργές υποπεριοχές B₁, P₁ και B₂. Αυτές οι υποπεριοχές φιλοξενούν τις νουκλεοτιδικές βάσεις που βρίσκονται τοποθετημένες ανοδικά (B₁) και καθοδικά (B₂) του φωσφοδιεστερικού δεσμού, όπου λαμβάνει χώρα η διάσπαση του RNA μορίου (P₁). Αυτές οι περιοχές είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ της RNase A και της EDN, οι υπόλοιπες όμως περιφερικές υποπεριοχές που ευθύνονται για την

πρόσδεση του φωσφοδιεστέρα ανοδικά της B₁ υποπεριοχής και καθοδικά της B₂ υποπεριοχής (αντίστοιχα των P₀ και P₂) διαφέρουν ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Εκτός από αυτές τις δευτερεύουσες περιοχές, μία νέα υποπεριοχή έχει (αναφερόμενη ως P₋₁) έχει εντοπιστεί στην EDN. Ειδικότερα, το καταλυτικό κέντρο της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης αποτελείται από τις εξής υποπεριοχές:

- a. Η P₁ υποπεριοχή της EDN αποτελείται από τα εξής αμινοξέα: His15, Lys38 και His129 τα οποία σχηματίζουν μια τριάδα η οποία είναι συντηρημένη σε όλες της παγκρεατικού τύπου ριβονουκλεάσες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα¹⁹. Η P₁ εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο της EDN και μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με Gln14 N^{e2}, His15 N^{e2}, His129 N^{d1} και Leu130 N²¹. Επιπλέον, έχει την ικανότητα πρόσδεσης φωσφορικών ομάδων και θεικών ανιόντων²¹.
- b. Η B₁ υποπεριοχή της EDN αποτελείται από τα ακόλουθα αμινοξέα: Thr42, Leu130 και Ile133. Η περιοχή αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς είναι αυτή που προσδίδει την εξειδίκευση για την RNA διάσπαση μεταξύ των βάσεων, η οποία τόσο στην περίπτωση της RNάσης όσο και της EDN βρίσκεται καθοδικά νουκλεοτιδίων πυριμιδίνης¹⁹.
- c. Η B₂ υποπεριοχή της EDN αποτελείται από τα εξής αμινοξέα: Arg68, Asn70 και Asp112, και είναι εν μέρει διατηρημένη μεταξύ της EDN και της RNάσης A. Η υποπεριοχή αυτή, φιλοξενεί τη νουκλεοτιδική βάση που βρίσκεται καθοδικά του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υφίσταται διάσπαση και χαρακτηρίζεται από υψηλή προτίμηση για πουρίνες. Δύο από τα αμινοξέα που την απαρτίζουν, η Arg68 και Asp112 εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά μόρια νερού, επιτρέποντας έτσι στο μόριο να αποκτήσει δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις. Να σημειωθεί ότι, οι διαμορφώσεις αυτές δεν έχουν κάποια φυσιολογική σημασία για το μόριο της πρωτεΐνης, ωστόσο είναι ενδεικτικές της διαμορφωτικής ελευθερίας που χαρακτηρίζει τα αμινοξέα αυτά¹⁹.
- d. Οι P₀ και P₂ υποπεριοχές της EDN εμπλέκονται στην πρόσδεση συνδέσεων φωσφοδιεστέρων ανοδικά της B₁ υποπεριοχής και καθοδικά της B₂ υποπεριοχής. Στην EDN οι περιοχές αυτές δεν είναι συντηρημένες και αντιπροσωπούνται από τα ακόλουθα αμινοξέα: Ser64, Trp7, and Trp10, από τα οποία απουσιάζει η ικανότητα πρόσδεσης θεικών ανιόντων^{19,21}. Κλείνοντας, όσον αφορά τις υποπεριοχές αυτές, να αναφερθεί ότι η P₀ υποπεριοχή έχει ικανότητα πρόσδεσης φωσφορικών ομάδων²¹.
- e. Η υποπεριοχή P₋₁ της EDN αποτελείται από τα εξής αμινοξέα: Arg36, Asn39, και Gln40, κι έχει βρεθεί πως συμμετέχει στην πρόσδεση θεικών ανιόντων και φωσφορικών ομάδων²¹.

Κλείνοντας το κεφάλαιο αυτό, να αναφερθεί ότι έχει βρεθεί πως το ένζυμο αυτό παρουσιάζει είκοσι φορές μεγαλύτερη προτίμηση για κυτιδίνες συγκριτικά με ουριδίνες στην B₁ δευτερεύουσα περιοχή και εκατό φορές μεγαλύτερη προτίμηση για αδενοσίνες στην B₂ δευτερεύουσα περιοχή²⁵.

1.6 Η ενζυμική αναστολή

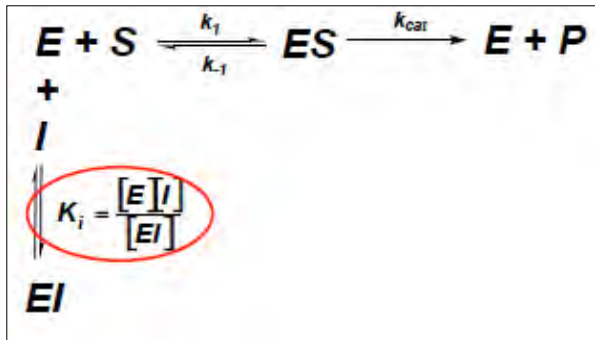
Ως αναστολέας χαρακτηρίζεται μία ουσία η οποία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης, και μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτός είτε μη αντιστρεπτός. Ως αντιστρεπτός αναστολέας ορίζεται ο αναστολέας εκείνος ο οποίος μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος με σχετικά εύκολες μεθόδους, και όταν πραγματοποιηθεί η αφαίρεση αυτή, το ένζυμο επανακτά πλήρως τη δραστηριότητά του. Αντίθετα, ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο του ενεργού κέντρου, και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Στην περίπτωση αυτή, της μη αντιστρεπτής αναστολής δηλαδή, ο αναστολέας συνήθως δεσμεύεται με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπιες μεθόδους. Πολλές φορές, οι συνέπειες μίας μη αντιστρεπτής αναστολής μπορούν να αντιστραφούν με χημικά μέσα, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μπορεί να δράσει ξανά.

Γενικά οι δύο αυτοί όροι περιγράφουν κυρίως το πόσο γρήγορα μπορεί να αποδεσμευτεί ο αναστολέας από το ένζυμο. Για τον λόγο αυτό, συχνά χρησιμοποιούνται οι όροι απενεργοποιητής και απενεργοποίηση. Η διάκριση ενός αντιστρεπτού από έναν μη αντιστρεπτό αναστολέα γίνονται με τη βοήθεια κινητικών μελετών, στις οποίες γίνεται μέτρηση των ταχυτήτων κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα. Για την επίτευξη της διάκρισης αυτής, υπολογίζεται η K_i σταθερά διάσπασης, η οποία αποτελεί την αντίστροφη σχέση της συγγένειας ενζύμου-αναστολέα.

Γενικά, υπάρχουν οι παρακάτω τύποι αναστολής:

Συναγωνιστική Αναστολή

Σε περίπτωση που ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για τη δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός αναστολέας. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην περίπτωση αυτή είναι οι εξής (*Εικόνα 9*):

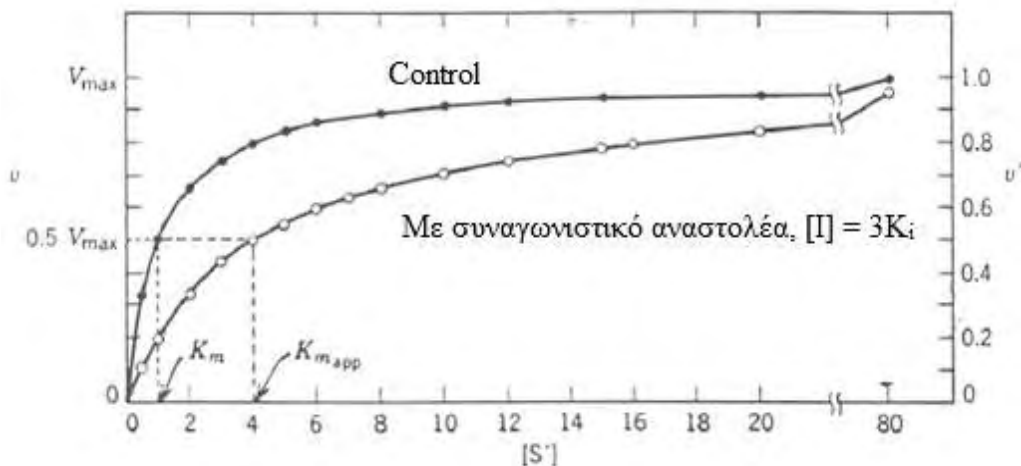


Εικόνα 9: Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της συναγωνιστικής αναστολής. Ως E, S, ES, P, I και EI δίνονται οι συγκεντρώσεις του ενζύμου, του υποστρώματος, του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, του τελικού προϊόντος, του αναστολέα και του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Ως k_{cat} ορίζεται ο αριθμός μετατροπής ενός ενζύμου ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα^{26,27}.

Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας στην αντίδραση, η ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να φτάσει στη μέγιστη τιμή της (V_{max}). Αυτό συμβαίνει, επειδή αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Το γεγονός αυτό, αποτελεί την «σφραγίδα γνησιότητας» αυτού του τύπου της αναστολής. Επιπλέον, παρατηρείται μεταβολή στην φαινομενική τιμή της K_M . Αυτή η νέα τιμή, οποία ονομάζεται K_M^{app} ισούται με:

$$K_M^{app} = K_M (1 + [I]/K_i),$$

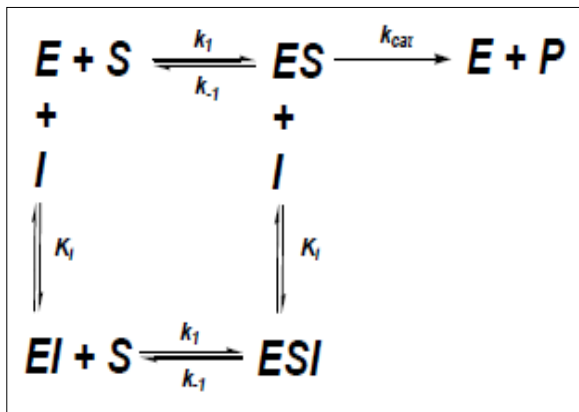
όπου $[I]$ η συγκέντρωση του αναστολέα και K_i η σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα, αυξάνεται και η K_M^{app} . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια μέγιστη ταχύτητα όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως επίσης και όταν δεν υπάρχει (Εικόνα 10)^{26,27}.



Εικόνα 10: Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία συναγωνιστικού αναστολέα²⁷.

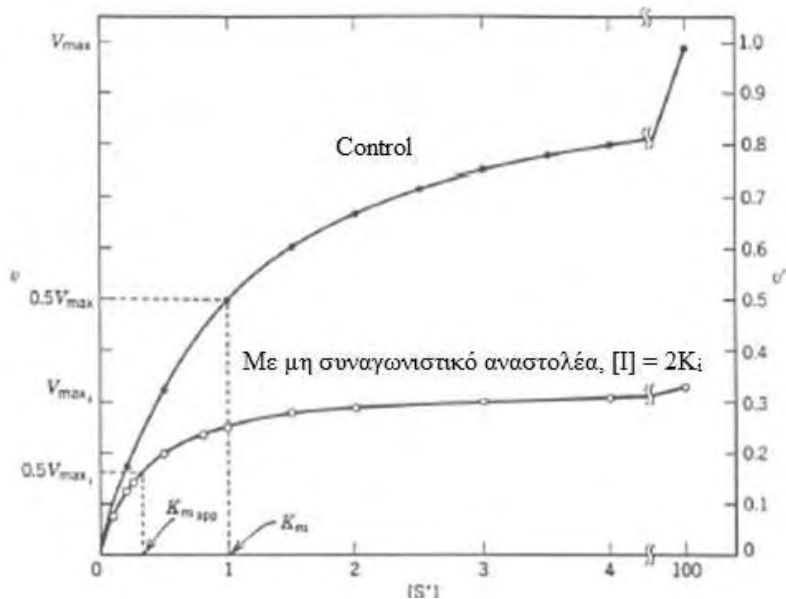
✚ Μη συναγωνιστική αναστολή

Σε περίπτωση που ο αναστολέας I δεν συναγωνίζεται με το υπόστρωμα S για τη δέσμευση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή, τότε η αναστολή καλείται μη συναγωνιστική. Επομένως, ενώ στη συναγωνιστική αναστολή αποκλείεται η ταυτόχρονη δέσμευση στο ένζυμο αναστολέα και υποστρώματος, στη μη συναγωνιστική αναστολή δεν αποκλείεται. Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα τριπλό σύμπλοκο του τύπου EIS. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σ' αυτόν τον τύπο αναστολής είναι οι παρακάτω (Εικόνα 11):



Εικόνα 11: Αλληλουχία των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη μη συναγωνιστική αναστολή. Ως E, S, ES, P, I, EI και ESI δίνονται οι συγκέντρωσεις του ενζύμου, του υποστρώματος, του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, του τελικού προϊόντος, του αναστολέα, του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα. Ως k_{cat} ορίζεται ο αριθμός μετατροπής ενός ενζύμου ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα^{26,27}.

Είναι εύλογο ότι, παρόλο που το υπόστρωμα μπορεί να προσδεθεί στο σύμπλοκο



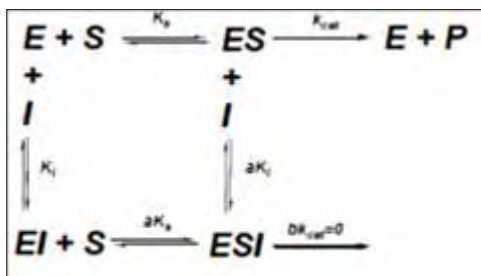
Εικόνα 12: Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα.

ενζύμου-αναστολέα, δεν παράγεται προϊόν. Η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μία νέα τιμή του καλείται V_M^{app} , ενώ δεν παρατηρείται αλλαγή στην τιμή της K_M . Αυτό που συμβαίνει ουσιαστικά σε αυτόν τον τύπο της αναστολής είναι ότι ο αναστολέας μειώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου, ενώ το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του

ενζύμου. Συνεπώς, δεν μπορεί να παρατηρηθεί παρεμπόδιση της συναγωνιστικής αναστολής μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του υποστρώματος (Εικόνα 12)^{26,27}.

✚ Μικτή αναστολή

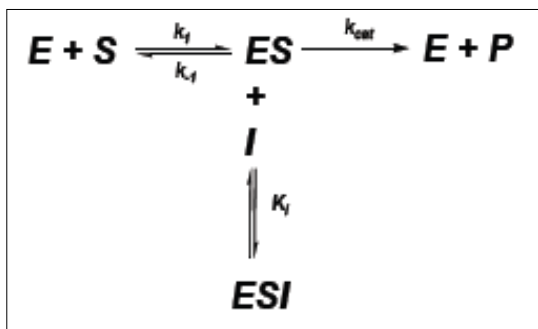
Σε αυτόν τον τύπο αναστολής, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί αύξηση ή μείωση στην τιμή της K_M , ενώ η τιμή της V_{max} θα μειώνεται σε κάθε περίπτωση (Εικόνα 13)²⁶.



Εικόνα 13: Αντιδράσεις που συμβαίνουν στον μικτό τύπο αναστολής. Το απλούστερο μικτό σύστημα είναι αυτό όπου το EI έχει μικρότερη συγγένεια για το S απ' ό,τι για το E και το σύμπλοκο ESI είναι ανενεργό²⁶.

✚ Ανταγωνιστική αναστολή

Ενώ, στους προηγούμενους τύπους αναστολής οι αναστολείς μπορούν να δεσμευτούν απευθείας με το ένζυμο, σε αυτόν τον τύπο αναστολής, η δέσμευση του αναστολέα πραγματοποιείται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των τιμών της K_M και V_{max} (Εικόνα 14)²⁶.

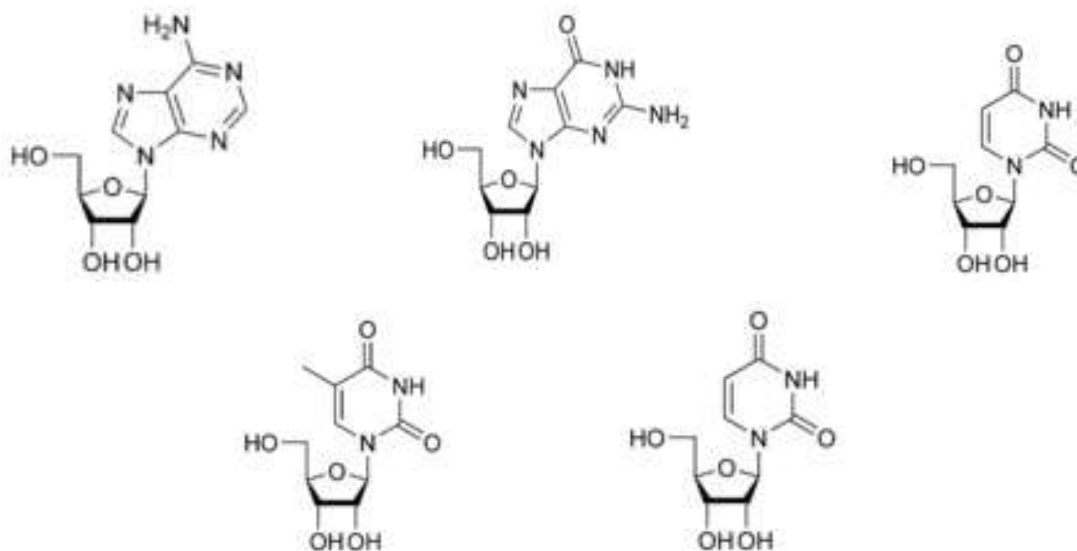


Εικόνα 14: Αντιδράσεις που παρατηρούνται στην ανταγωνιστική αναστολή. Η δέσμευση του αναστολέα, ελαττώνει το ποσό του ενζύμου που είναι στην κατάλληλη μορφή να δώσει προϊόντα, την ES δηλαδή, και αυτό οδηγεί σε μείωση της V_{max} . Το γεγονός αυτό, όμως, θα οδηγήσει σε μείωση και του ρυθμού διάστασης του συμπλόκου ES, με αποτέλεσμα τη μείωση της K_M του ενζύμου²⁶.

1.7 Νουκλεοζίτες

Μια μονάδα που αποτελείται από μία βάση δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο ονομάζεται νουκλεοζίτης. Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη, ενώ στο DNA ονομάζονται δεοξυαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη. Σε κάθε περίπτωση, το N-9 μιας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C-1 του σακχάρου. Η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου όταν η δομή γράφεται με τον κλασικό τρόπο. Με άλλα λόγια, η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού N είναι β.

Οι νουκλεοζίτες εξαιτίας του δομικού τους ρόλου στο DNA και στο RNA, απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς μέσα στη φύση. Δύο πολύ γνωστοί νουκλεοζίτες είναι τα γνωστά σε όλους ενεργειακά νομίσματα των οργανισμών, ATP και GMP²⁷. Στην *Εικόνα 15* δίνονται ορισμένα παραδείγματα νουκλεοζιτών.



Εικόνα 15: Ορισμένα παραδείγματα νουκλεοζιτών (αδενοσίνη, γουανοσίνη, θυμιδίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη).

Οι νουκλεοζίτες, καθώς και τα ανάλογά νουκλεοζιτών, παρουσιάζουν τα τελευταία ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτό οφείλεται στις ιδιαίτερες ιδιότητες τους, οι οποίες τους καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιαρκικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Είναι πλέον βέβαιο πως ένας μεγάλος αριθμός φυσικών αντιβιοτικών με σημαντική αντική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Προκειμένου, λοιπόν, να διερευνηθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους, έχουν γίνει

πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.

1.8 Μηχανισμός δράσης νουκλεοζιτών

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται αφενός ενδοκυτταρικά, ωστόσο έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης, τροποποιούνται ενδοκυτταρικά έτσι ώστε να παραχθούν τα νουκλεοτίδια. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA.

Τα φάρμακα, τα οποία έχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να εμφανίσουν δραστικότητα. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάλυτοι ιόντων, τα ένζυμα και τα μόρια μεταφορείς. Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος και το AIDS, είναι η ικανότητα τους να τροποποιηθούν δομικά, και να παράγουν, τελικά, φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα .

Τα αντικαρκινικά και τα αντικά ανάλογα δρουν εμποδίζοντας τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, τα οποία εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν

διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ικές πολυμεράσες. Οι ικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντικών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντικά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ικό γονιδίωμα από τις ικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαιρετική δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

Επίσης, τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να δράσουν και ως προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν, γεγονός που αποτελεί «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους. Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και δημιουργεί ανταγωνισμό μεταξύ αυτών και των φυσικών νουκλεοτιδίων για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών πιθανότατα έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντική θεραπεία .

Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ικές-κινάσες που συχνά καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή . Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές

κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες,. Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών²⁸.

Όσον αφορά την παγκρεατική ριβονουκλεάση A, έχει μελετηθεί μία σειρά νουκλεοζιτών οι οποίοι παρουσίαζαν μία αρκετά ικανοποιητική συναγωνιστική αναστολή της τάξης των μM (micromolar). Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως οι τιμές της σταθεράς διάστασης K_i ήταν χαμηλότερες (επομένως ήταν ισχυρότερη η αναστολή) όταν ο αναστολέας είχε στο μόριο του τριαζολικό δακτύλιο, σε σχέση πάντα με τους αναστολείς που μελετήθηκαν και δεν είχαν στο μόριο τους τριαζολικό δακτύλιο.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολής της δραστηριότητας της EDN του 4e αναστολέα. Ο αναστολέας αυτός, μέσω κρυσταλλογραφίας, έχει αποδειχθεί πως προσδένεται στον ενεργό κέντρο της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A, προκαλώντας σημαντική αναστολή της δράσης της. Αυτό το αποτέλεσμα, οφείλεται εν μέρει στη δομή του αναστολέα αυτού, ο οποίος περιέχει στο μόριο του έναν τριαζολικό δακτύλιο και ένα άτομο φθορίου ως υποκαταστάτη. Γνωρίζοντας, λοιπόν, όλα τα παραπάνω και δεδομένου ότι η EDN παρουσιάζει σημαντικές δομικές ομοιότητες με την RNase A, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολής της πρώτης από τον αναστολέα αυτό²⁸.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

2. Πειραματικό τμήμα

2.1 Πλασμιδιακοί φορείς

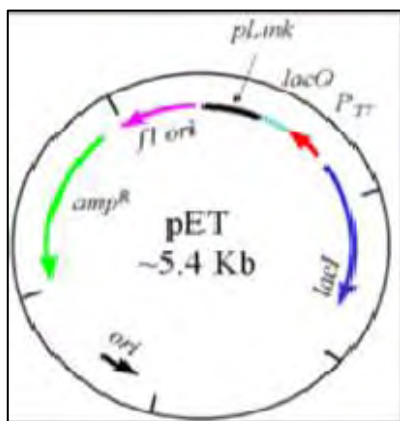
Τα πλασμίδια είναι μικρά γενετικά στοιχεία που υφίστανται και αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του ξενιστή. Στο μεγαλύτερο ποσοστό αποτελούνται από δίκλωνο DNA και, ενώ τα περισσότερα είναι κυκλικά μόρια, ωστόσο υπάρχει ένα μικρό ποσοστό τα οποία είναι γραμμικά. Τα πλασμίδια εντοπίζονται στο γονιδίωμα των προκαρυωτών σε ένα ή περισσότερα αντίγραφα, και συχνά περιέχουν γονίδια των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα προσδίδουν σημαντικές ιδιότητες στο κύτταρο-ξενιστή, παραδείγματος χάρη ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό. Ακριβώς γι αυτό το λόγο, επειδή δηλαδή διαθέτουν γονίδια που προσδίδουν σημαντικές ιδιότητες στους ξενιστές τους, χρησιμοποιούνται ως φυσικοί φορείς κλωνοποίησης.

Ως φορείς κλωνοποίησης, αυτά τα γενετικά στοιχεία χαρακτηρίζονται από τις εξής πολύ χρήσιμες ιδιότητες:

- ✓ Έχουν μικρό γονιδίωμα, εύκολο στην απομόνωση και τον χειρισμό,
- ✓ Περιέχουν ανεξάρτητη περιοχή έναρξης της αντιγραφής (ori C), προκειμένου η παραγωγή πλασμιδίου στα κύτταρα να συντελείται ανεξάρτητα από τον άμεσο χρωμοσωματικό έλεγχο,
- ✓ Περιέχουν την περιοχή του πολυσυνδέτη, μία περιοχή κατάλληλη για την εισαγωγή εξω-χρωμοσωμικού DNA με πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες,
- ✓ Βρίσκονται μέσα στον οργανισμό σε πολλαπλά αντίγραφα, έτσι να είναι δυνατή η ενίσχυση του DNA τους,
- ✓ Διαθέτουν επιλέξιμους δείκτες, π.χ. γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και γονίδια αναφοράς, οι οποίοι διευκολύνουν την ανίχνευση και επιλογή κυτταρικών κλώνων που με τα επιθυμητά πλασμίδια,
- ✓ Τέλος, όταν ο φορέας χρησιμοποιείται για την έκφραση κάποιου γονιδίου, τότε το πλασμίδιο διαθέτει τρεις επιπλέον περιοχές που κωδικοποιούν τον υποκινητή (P), τον χειριστή (O) και τον καταστολέα (I) του υποκινητή²⁹.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET11c της εταιρίας Novagen (*Εικόνα 16*). Ο φορέας αυτός αποτελείται από:

1. το γονίδιο lacI που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη καταστολέα lac,
2. τον υποκινητή T7, ο οποίος είναι ειδικός για την T7 (μη βακτηριακή) RNA πολυμεράση,
3. τον χειριστή lac, ο οποίος μπορεί να εμποδίσει τη μεταγραφή,
4. την περιοχή του πολυσυνδέτη, στην οποία ενσωματώνεται το γονίδιο της EDN
5. τον παράγοντα fl (origin of replication),
6. ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.



Εικόνα 16: Ο πλασμδιακός φορέας pET11c.

2.2 Η *Escherichia Coli* ως κότταρο ξενιστής

Τα μέλη του γένους *E.coli* είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδόμορφα, χημειοετρότροφα και προαιρετικά αερόβια βακτήρια. Εντοπίζονται στον εντερικό σύστημα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και πιθανότατα έχουν κάποιο ρόλο στη θρέψη μέσω σύνθεσης βιταμινών, ιδιαίτερα βιταμίνης K. Τα περισσότερα στελέχη της *E.coli* είναι ακίνδυνα για τον οργανισμό. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη είναι παθογόνα και συνδέονται με την εμφάνιση τροφικών δηλητηριάσεων στον οργανισμό. Η *E.coli* αναπτύσσεται άριστα σε θερμοκρασία 37° C και για την ανάπτυξή του είναι αναγκαία η παρουσία οργανικών ενώσεων, αζώτου, θείου και αλάτων στο θρεπτικό υπόστρωμα²⁹.

Η *E.coli* είναι το βακτηριακό είδος που χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Αυτό οφείλεται στους παρακάτω λόγους:

- ✓ Έχουν διαλευκανθεί πλήρως τα βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά της, με αποτέλεσμα ο χειρισμός της να είναι εύκολος για τους ερευνητές.
- ✓ Καλλιεργείται εύκολα με αρκετά οικονομικό εργαστηριακό εξοπλισμό.
- ✓ Είναι διαθέσιμοι ποικίλοι συμβατοί φορείς DNA και στελέχη-ξενιστές, οδηγώντας έτσι στη βελτιστοποίηση της έκφρασης με βάση τις εκάστοτε ανάγκες της πειραματικής διεργασίας.
- ✓ Προσφέρουν δυνατότητα τροποποίησης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων προκειμένου να εκφραστεί το επιθυμητό γονίδιο και να παραχθεί η εξεταζόμενη πρωτεΐνη.

Βέβαια, η έκφραση πρωτεϊνών στην *E.coli* αντιμετωπίζει ορισμένα προβλήματα, όπως είναι η απουσία συστήματος για τις απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και η δυσκολία στην απομόνωση-καθαρισμό του προϊόντος λόγω διατήρησης των πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο. Όμως, τα θετικά της χαρακτηριστικά υπερισχύουν των αρνητικών με αποτέλεσμα την ευρεία χρήση της στον τομέα της κλωνοποίησης.

Όπως γίνεται εύκολα κατανοητό, λόγω της ευρείας χρήσης της ως κύτταρο ξενιστής, είναι διαθέσιμα στο εμπόριο πολλά διαφορετικά ως προς τις ιδιότητες βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Στην πειραματική διεργασία που θα περιγραφεί παρακάτω χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος B834, το οποίο έχει το εξής γονιδίωμα:

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

2.3 Καλλιέργεια κυττάρων *E.coli*

2.3.1 Γενικές πληροφορίες

Με τον όρο καλλιέργεια κυττάρων περιγράφεται η ανάπτυξη συγκεκριμένου στελέχους ή είδους οργανισμού σε εργαστηριακό θρεπτικό μέσο. Τις περισσότερες φορές, είναι επιθυμητή η ανάπτυξη αμιγών καλλιεργειών, δηλαδή καλλιεργειών που αποτελούνται από ένα μόνο είδος μικροοργανισμών³⁰. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός, σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας γίνεται χρήση αποστειρωμένων υλικών και σκευών, κι επιπλέον ο χώρος εργασίας είναι απαραίτητο να έχει απολυμανθεί με αιθανόλη.

Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται εργαστηριακά, η ανάπτυξή τους σταματά (μετά από παρέμβαση των ερευνητών) στην εκθετική φάση, όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά και θεωρούνται πλήρως ενεργά όσον αφορά το μεταβολισμό τους. Ο χειρισμός αυτός πραγματοποιείται καθώς με αυτόν τον τρόπο παράγεται περισσότερη πρωτεΐνη. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως ο προσδιορισμός της φάσης στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται μέσω φασματοφωτομέτρησης στα 600nm σε τακτά χρονικά διαστήματα, έτσι ώστε η οπτική απορρόφηση να μην υπερβεί το φάσμα 0,6-0,8.

2.3.2 Παρασκευή θρεπτικών μέσων για τις καλλιέργειες

Στην παρούσα πειραματική διεργασία, η καλλιέργεια των κυττάρων έλαβε χώρα αρχικά σε δύο μικρές υγρές καλλιέργειες (των 5ml) και κατόπιν σε δύο μεγάλες καλλιέργειες (των 500ml). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα των καλλιεργειών. Για τις μικρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε το LB-Άγαρ, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο σε μορφή σκόνης. Από το stock, έγινε χρήση 5g LB σε τελικό όγκο 0,2l.

Στη συνέχεια, το LB αποστειρώθηκε και αποθηκεύτηκε στο ψυγείο. Για τις μεγάλες καλλιέργειες, παρασκευάστηκε 1l T.B medium (Terrific Broth). Η διεργασία παρασκευής ήταν η εξής:

- ✓ Διάλυση 12g Tryptone και 24g Yeast Extract σε 800ml ddH₂O.
- ✓ Προσθήκη 4ml glycerol και συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι τα 900ml.
- ✓ Διάλυση 12,54g K₂HPO₄ και 2,31g KH₂PO₄ σε 100ml ddH₂O.
- ✓ Ανάμιξη των δύο διαλυμάτων.

Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν από 500ml T.B medium σε δύο κωνικές φιάλες των 1000ml, αποστειρώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο.

2.3.3 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων για παραγωγή EDN

Παρασκευή μικρών καλλιεργειών

Σε δύο αποστειρωμένα falcon τοποθετούνται τα εξής:

- ✓ 5ml LB
- ✓ 20μl Αμπικιλίνης 0,4g/ml.

Έπειτα πραγματοποιείται εμβολιασμός με τα βακτηριακά στελέχη *E.coli*. Τέλος, τα κύτταρα επωάζονται για 16h στους 37°C στα 210rpm.

Παρασκευή μεγάλων καλλιεργειών

Στις δύο αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που περιέχουν το T.B. medium, πραγματοποιείται εμβολιασμός με 5ml μικρής καλλιέργειας. Πριν πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός, φυλάσσεται σε μία κυψελίδα 1ml αποστειρωμένου T.B. medium, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500μl Αμπικιλίνης σε κάθε κωνική φιάλη και ακολούθησε επώαση των δύο κωνικών στους 37°C στα 210rpm, μέχρι OD₆₀₀= 0,6-0,8.

Στην πειραματική διεργασία που περιγράφεται στη διπλωματική αυτή, η επώαση διήρκησε 7-8h, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος η OD₆₀₀ πήρε τις τιμές 0,6 και 0,762 στις δύο φιάλες.

Να τονιστεί, ότι τόσο η παρασκευή των μικρών και μεγάλων καλλιέργειών όσο και η φασματοφωτομέτρηση, γίνονται σε στείρες συνθήκες και παρουσία αυτόκαυστου. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και σκεύη, και το πείραμα διεξάγεται σε πάγκους οι οποίοι έχουν καθαριστεί με αιθανόλη.

2.3.4 Χρήση αντιβιοτικών ως επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας

Ο συχνότερος τρόπος επιλογής μετασχηματισμένων βακτηρίων, αλλά και μία μέθοδος αποφυγής ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών σε μία κυτταρική καλλιέργεια, είναι η χρήση αντιβιοτικών. Το αντιβιοτικό αποτελεί χημική ένωση που παράγεται από έναν μικροοργανισμό και προκαλεί τον θάνατο ή την αναστολή της ανάπτυξης κάποιου άλλου μικροοργανισμού. Τα αντιβιοτικά ομαδοποιούνται με βάση τη χημική δομή ή τον τρόπο δράσης τους. Στα βακτήρια, σημαντικότεροι στόχοι των ενώσεων αυτών είναι το κυτταρικό τοίχωμα (παρεμπόδιση σύνθεσης του), η κυτταροπλασματική μεμβράνη (καταστροφή της), οι βιοσυνθετικές πορείες της πρωτεϊνοσύνθεσης (παρεμπόδιση) και η βιοσύνθεση νουκλεϊκών οξέων (παρεμπόδιση).

Όπως γίνεται κατανοητό από όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, το είδος του μικροοργανισμού, και κατ' επέκταση το βακτηριακό στέλεχος και ο τύπος του πλασμιδίου που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα καθορίζουν την ποσότητα και το είδος του αντιβιοτικού που θα χρησιμοποιηθεί. Στη μελέτη αυτή, έγινε χρήση της αμπικιλίνης. Η αμπικιλίνη αποτελεί ημισυνθετική πενικιλίνη με διευρυμένο φάσμα αντιβιοτικής δραστηριότητας, στο οποίο περιλαμβάνονται και ορισμένα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Οι δομικές διαφορές στις N-ακυλομάδες επιτρέπουν σε αυτές τις ημισυνθετικές πενικιλίνες να διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και να αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος³⁰. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής του ενζύμου β-λακταμάση, η οποία εκκρίνεται στον περιπλασμικό χώρο και καταλύει την υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου του μορίου της αμπικιλίνης. Το γονίδιο bla που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση βρίσκεται στα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν. Επομένως, μετά από έναν μετασχηματισμό σε καλλιέργεια που περιέχει αμπικιλίνη επιβιώνουν μόνο εκείνα τα κύτταρα *E. coli* τα οποία έχουν προσλάβει τα πλασμίδια αυτά.

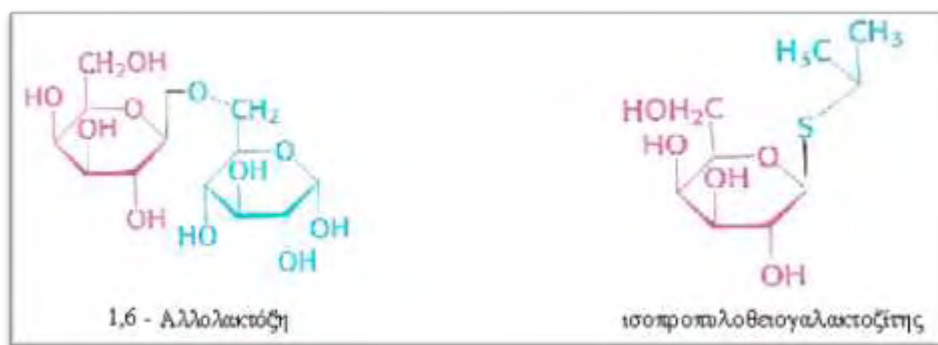
2.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Ως μετασχηματισμός αναφέρεται η διαδικασία εισαγωγής εξωγενούς γενετικού DNA σε βακτήρια-δέκτες και αποτελεί το σημαντικότερο βήμα της κλωνοποίησης. Κατά τη διαδικασία αυτή, γίνεται επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων μέσω επίστρωσης τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, στο οποίο υπάρχει ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Από αυτή τη δοκιμασία, θα επιζήσουν μόνο εκείνα τα κύτταρα που περιέχουν τα πλασμίδια, στα οποία βρίσκεται και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Από τη διαίρεση κάθε ανθεκτικού βακτηριακού κυττάρου προκύπτει μία αποικία βακτηρίων. Τα βακτήρια κάθε αποικίας έχουν προέλθει από ένα μόνο κύτταρο, το οποίο περιέχει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA. Τελικά, προκύπτει μία βιβλιοθήκη μέσω του πολλαπλασιασμού του συνόλου των ανασυνδυασμένων τμημάτων DNA στο εσωτερικό των βακτηρίων³¹.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τοποθέτηση μικρής ποσότητας του πλασμιδιακού φορέα (2μl) σε βακτηριακά κύτταρα B834, τα οποία τα αφέθηκαν στον πάγο για 30min. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, τα κύτταρα και το πλασμίδιο μεταφέρθηκαν στη συσκευή heat-block στους 42°C για 35sec.

2.5 Επαγωγή

Ως επαγωγέας για την παραγωγή της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης χρησιμοποιήθηκε η ένωση IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside). Η ένωση αυτή αποτελεί αντιδραστήριο της μοριακής βιολογίας κι αποτελεί ανάλογο της λακτόζης. Έχει την ικανότητα να αδρανοποιεί τον καταστολέα lac, επιτρέποντας έτσι την διεξαγωγή της γονιδιακής έκφρασης. Το IPTG εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη (*Εικόνα 17*), η οποία προκύπτει φυσικά και δρα ως επαγωγέας του οπερονίου lac. Ακριβώς γι αυτόν τον λόγο, η συγκεκριμένη ένωση χαρακτηρίζεται ως επαγωγέας και χρησιμοποιείται για την αύξηση στην έκφραση πρωτεϊνών.



Εικόνα 17: Η χημική δομή της 1,6-αλλολακτόζης και του IPTG

Εκτός από τα παραπάνω, το IPTG χρησιμοποιείται ως επαγωγέας σε αυτήν και σε πολλές άλλες πειραματικές διαδικασίες για έναν επιπλέον λόγο: η *E.coli* αδυνατεί να υδρολύσει και γενικά να καταβολίσει την ένωση αυτή, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της να παραμένει σταθερή σε όλη τη διαδικασία της κυτταρικής αντιγραφής.

Η δράση του IPTG είναι η εξής: όπως και η αλλολακτόζη, το IPTG συνδέεται με τον καταστολέα lac και απελευθερώνει τον τετραμερή καταστολέα από το χειριστή lac με αλλοστερικό τρόπο, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων (πχ το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης) στο οπερόνιο lac. Αντίθετα με την αλλολακτόζη, το IPTG περιέχει ένα μόριο θείου στο μόριο του το οποίο δημιουργεί έναν χημικό δεσμό, μη-υδρολύσιμο από το κύτταρο, εμποδίζοντας έτσι το κύτταρο να μεταβολίσει την ένωση μεταβολίζον ή να υποβαθμίσει με οποιονδήποτε τρόπο την επαγωγή. Συνεπώς, η συγκέντρωση του IPTG παραμένει σταθερή και η έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται από το συγκεκριμένο οπερόνιο δεν αναστέλλεται κατά τη διάρκεια του πειράματος. Όσον αφορά την πρόσληψη του IPTG από τα κύτταρα *E.coli*, έχει βρεθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις εισέρχεται στα κύτταρα μέσω της περμεάσης της λακτόζης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, όμως, μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα ανεξάρτητα από την περμεάση. Η τελευταία κατάσταση, είναι αυτή που επικρατεί στις περιπτώσεις επαγωγής. Με άλλα λόγια, επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις IPTG^{32,33}.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, μόλις η τιμή της OD₆₀₀ φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, προστίθεται ο επαγωγέας IPTG. Η τελική συγκέντρωση του επαγωγέα ήταν 1mM. Μετά την προσθήκη του επαγωγέα, ακολούθησε επώαση για 4h στις ίδιες συνθήκες όπου έγινε η καλλιέργεια των κυττάρων. Μετά το πέρας των 4h, τα κύτταρα βγαίνουν από τον επωαστήρα και φυλάσσονται στο ψυγείο O/N.

2.6 Λύση των κυττάρων

Η λύση των κυττάρων είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό στάδιο σε κάθε πορεία απομόνωσης καθώς είναι σε θέση να επηρεάσει τόσο την συνολική ποσότητα όσο και την τελική βιολογική ενεργότητα της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Η λύση των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους: ενζυμικά, μηχανικά ή μέσω εφαρμογής οσμωτικής πίεσης. Στο πείραμα αυτό, έγινε χρήση του δεύτερου τρόπου. Η μηχανική λύση των κυττάρων έγινε μέσω υπερήχων.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

Αρχικά, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 20min σε 5.000rpm στους 4°C. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα συλλέγεται για περαιτέρω επεξεργασία ή αποθηκεύεται στους -20°C. Σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν είναι διαυγές, συμπεραίνεται ότι δεν έχουν καθιζάνει όλα τα κύτταρα, κι επομένως επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση.

Να υπογραμμιστεί, πως εφόσον η EDN είναι μία μη διαλυτή ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, μετά το τέλος της επαγωγής εντοπίζεται στο κυτταρικό ίζημα. Ανάλογη συμπεριφορά έχουν όλες οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την κυτταρική μεμβράνη και είναι ενδοκυτταρικές. Αντίθετα, οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, εντοπίζονται στο υπερκείμενο.

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται σε lysis buffer κι έπειτα πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων. Το Lysis Buffer αποτελείται από δύο επιμέρους διαλύματα, Α και Β, η σύσταση των οποίων είναι η ακόλουθη:

Διάλυμα Α (V=100ml, pH=8)

- PMSF 1mM
- 0,1% w/v Triton X-100
- 2mM EDTA
- 10mM Tris-HCl pH=8

Διάλυμα Β (V=10ml)

- 4% w/v Sodium Deoxy Collate

Τα pellet διαλυτοποιούνται με το διάλυμα Α του lysis buffer. Η διαλυτοποίηση γίνεται με τη βοήθεια ράβδου. Να σημειωθεί, πως στο στάδιο αυτό δεν έχει σημασία πόσος όγκος διαλύματος Α χρησιμοποιείται καθώς σκοπός του βήματος

αυτού, είναι η όσο γίνεται καλύτερη διαλυτοποίηση των ιζημάτων. Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο (0°C). Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε falcon 1ml Διαλύματος Β κι ακολουθεί επώαση για 10min στο cold-room και μέσα σε πάγο. Έπειτα, έγινε προσθήκη 40mgr λυσοζύμης και 2μl βενζονάσης σε κάθε falcon. Το βήμα αυτό έγινε προκειμένου να γίνει ικανοποιητικότερα η λύση των κυττάρων. Μετά το βήμα αυτό, τα κύτταρα παρέμειναν για 15min στο cold-room υπό ανάδευση. Ακολούθησε σπάσιμό τους με υπερήχους (3-4 κύκλοι). Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 1h, στους 4°C σε 10.000rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα φυλάχθηκε στους -20°C.

2.7 Πλύση των κυττάρων & Ομογενοποίηση

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε στο προηγούμενο βήμα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (wash buffer) σε τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται στις εξής συνθήκες: θερμοκρασία 4° C, 1h στις 9200g. Μετά το τέλος κάθε φυγοκέντρωσης, τα υπερκείμενα απορρίφθηκαν και τα κυτταρικά ιζήματα, ομογενοποιήθηκαν με ειδική συσκευή ομογενοποίησης.

Η σύσταση του διαλύματος πλύσης ($V=400ml$, $pH=8$) ήταν η εξής:

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

Στα 200ml από αυτό το διάλυμα, προστέθηκε Triton 0,1% w/c.

Η διαδικασία των πλύσεων ήταν η παρακάτω:

- ✓ 1^η φυγοκέντρωση-→πλύση με Triton και ομογενοποίηση.
- ✓ 2^η φυγοκέντρωση-→πλύση με Triton και ομογενοποίηση.
- ✓ 3^η φυγοκέντρωση-→πλύση χωρίς Triton και ομογενοποίηση.
- ✓ 4^η φυγοκέντρωση-→πλύση χωρίς Triton και ομογενοποίηση.

Η τέταρτη και τελευταία πλύση του ιζήματος δεν είναι υποχρεωτική. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο προκειμένου να διασφαλιστεί η απομάκρυνση του Triton από τα κύτταρα.

Μετά το πέρας όλων των φυγοκεντρήσεων, κρατήθηκαν τα κυτταρικά ιζήματα και φυλάχθηκαν στους -20° C. Αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε προκειμένου να

απομονωθούν τα *inclusion bodies*, οι ειδικές δομές, δηλαδή, που σχηματίζουν ορισμένες πρωτεΐνες, τα μόρια των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εγκλείονται μέσα σε φωσφολιπίδια. Μέσα σε αυτά, βρίσκεται η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη.

2.8 Εγκλεισμός & Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε στο προηγούμενο στάδιο, επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα εγκλεισμού (incubation buffer) με τη βοήθεια του ομογενοποιητή.

Η σύσταση του διαλύματος εγκλεισμού (V=15ml, pH=8,5) ήταν η εξής:

- ✓ 6M guanidine hydrochloride
- ✓ 0,1M Tris
- ✓ 80mM reduced GSH
- ✓ 2mM EDTA

Κατόπιν, το μείγμα του κυτταρικού ιζήματος με το διάλυμα εγκλεισμού τοποθετήθηκε στην συσκευή roller για 2,30 h σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί φυγοκέντρηση πριν την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης. Κατάλληλες συνθήκες είναι οι 25° C, 18,500rpm για χρονικό διάστημα 10-15min. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται έτσι ώστε να διαυγάσει το διάλυμα και συλλεχθεί το υπερκείμενο. Ωστόσο, στην παρούσα πειραματική διαδικασία, παρακάμφθηκε το βήμα αυτό επειδή υπήρχε μεγάλος κίνδυνος απώλειας σημαντικής ποσότητας πρωτεΐνης.

2.8.1 Μέθοδος Bradford

Για την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης ακολουθήθηκε η μέθοδος Bradford. Με βάση της μέθοδο αυτή, κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα (*Πίνακας 3*). Τα διαλύματα αυτά επωάστηκαν στο σκοτάδι, αφού το αντιδραστήριο Bradford είναι ευαίσθητο στο φως, για 5min και στη συνέχεια φωτομετρήθηκαν στα

595nm. Με βάση τις οπτικές απορροφήσεις, κατασκευάζεται μία καμπύλη, η εξίσωση της οποίας μας δίνει την ποσότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης.

Πίνακας 3: Τα διαλύματα που κατασκευάστηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης Bradford. Με βάση αυτά, υπολογίζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης που βρίσκεται μέσα στα κλάσματα. Το βήμα αυτό θεωρείται απαραίτητο για την εκτίμηση της ποσότητας η οποία πρέπει να φορτωθεί στο gel ηλεκτροφόρησης, που περιγράφεται παρακάτω.

mg/ml BSA	BSA (stock -20°C [(10mg/ml)]	Buffer στο οποίο βρίσκεται η EDN	Αντιδραστήριο Bradford
Τυφλό	-	20 μl	980 μl
0,2	0,4μl	19,6 μl	980 μl
0,4	0,8μl	19,2 μl	980 μl
0,6	1,2μl	18,8 μl	980 μl
0,8	1,6μl	18,4 μl	980 μl
1,00	2μl	18 μl	980 μl
1,2	2,4μl	17,6 μl	980 μl

Παρασκευάστηκε, ένα επιπλέον διάλυμα στο οποίο βρίσκονταν η EDN. Στο δείγμα αυτό υπήρχαν τα εξής: 15μl Buffer, 5μl EDN και 980μl αντιδραστηρίου Bradford. Όπως γίνεται κατανοητό, η αραίωση του συγκεκριμένου δείγματος ήταν 3:1 (15μl Buffer:5μl EDN). Η αραίωση αυτή έγινε καθώς το δείγμα ήταν ιδιαίτερα πυκνό και σε μικρότερη αραίωση δεν η τιμή της οπτικής απορρόφησης θα ήταν εκτός των ορίων των οπτικών απορροφήσεων των διαλυμάτων που αναγράφονται στον πίνακα.

Με βάση την εξίσωση που προέκυψε από τις OD₅₉₅, βρέθηκε ότι η ποσότητα της EDN που βρίσκονταν μέσα στο διάλυμα ήταν 4,5mg/ml.

2.9 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)

Με βάση την ποσότητα της EDN που βρέθηκε πως υπάρχει μέσα στο διάλυμα, κατασκευάστηκε ο ανάλογος όγκος διαλύματος αναδίπλωσης (refolding buffer).

Έχοντας υπόψη την αρχική συγκέντρωση της EDN (4,5mg/ml), τον αρχικό όγκο του διαλύματος στον οποίον αυτή βρισκόταν (14ml) και την τελική συγκέντρωση στην οποία έπρεπε να μεταβεί (0,15mg/ml), υπολογίστηκε ότι έπρεπε να παρασκευαστούν 406ml refolding buffer. Οι υπολογισμοί ήταν οι παρακάτω:

$$C_1V_1=C_2V_2 \Rightarrow 4,5\text{mg/ml} \times 14\text{ml} = 0,15\text{mg/ml} \times V_2 \Rightarrow V_2= 420\text{ml}.$$

420ml-14ml EDN που βρίσκονται στο διάλυμα=406ml refolding buffer.

Η σύσταση του διαλύματος αναδίπλωσης (V=406ml, pH=8,5) ήταν η εξής:

- ✓ 0,1M Tris-acetate
- ✓ 0,5M L-arginine
- ✓ 0,69 mMGSOG (ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του GSOG έγινε με βάση τον τύπο GSOG/GSSH=4/1).

Η πρωτεΐνη τοποθετήθηκε σε προχοΐδα προκειμένου να πέφτει σταγόνα-σταγόνα στα 406ml διαλύματος αναδίπλωσης. Το refolding buffer σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ήταν πάνω σε stirrer και αναδεύονταν με μαγνητάκι. Η αναδίπλωση έλαβε χώρα στο cold-room (4° C) και διήρκεσε 48-72h. Το στάδιο αυτό είχε τη συγκεκριμένη διάρκεια προκειμένου να μπορέσει η πρωτεΐνη να αναδιπλωθεί σωστά και να σχηματίσει τους τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που επιθυμούμε. Για τον λόγο αυτό, είναι εξαιρετικά σημαντικό να πέφτει η πρωτεΐνη με πολύ αργό ρυθμό μέσα στο διάλυμα αναδίπλωσης.

2.10 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης

Αρχικά, ρυθμίζεται το pH της πρωτεΐνης στο 5 κι ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4° C, 7.000G για 15min. Το βήμα αυτό διεξήχθη προκειμένου να καθιζάνουν όλα τα αδιάλυτα στοιχεία που ενδεχομένως υπάρχουν στο διάλυμα. Στη συνέχεια, φιλτράρουμε ο διάλυμα με την πρωτεΐνη έτσι ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία της συμπύκνωσης.

Η διαδικασία της συμπύκνωσης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4° C με τη βοήθεια της ειδικής συσκευής φιλτραρίσματος Pellicon (Millipore, Bedford, MA). Η συμπύκνωση ολοκληρώνεται όταν ο όγκος του δείγματός είναι πλέον 40ml. Τέλος, η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 0.15 M οξικού νατρίου/HCl (V=3l, pH=5). Πραγματοποιήθηκαν τρεις αλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος κατά τη διάρκεια

της διαδικασίας διαπίδυσης. Σε κάθε αλλαγή χρησιμοποιούνταν 1l από το ρυθμιστικό διάλυμα. Η αλλαγή γίνονταν ανά 24 ώρες. Το βήμα αυτό διεκπεραιώθηκε προκειμένου να γίνει αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη.

2.11 Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN

Για τον καθαρισμό της EDN εφαρμόζεται χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Με αυτό το είδος χρωματογραφίας, διαχωρίζονται φορτισμένα συστατικά, παραδείγματος χάρη πρωτεΐνες, πεπτίδια και αμινοξέα, καθώς περνούν από μία φορτισμένη στατική φάση. Η στατική φάση είναι συνήθως μία φορτισμένη ρητίνη η οποία φέρει λειτουργικές ομάδες οι οποίες αλληλεπιδρούν με αντίθετα φορτισμένες ομάδες συστατικών του υπό εξέταση μορίου.

Με βάση τα παραπάνω, και γνωρίζοντας ότι η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη είναι μία θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη, είναι εύλογο πως για τον καθαρισμό της χρησιμοποιείται μία κατιοανταλλακτική στήλη. Ειδικότερα, έγινε χρήση της στήλης Mono –S Resource-S. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

Να αναφερθεί ότι, το δείγμα υποβλήθηκε 2 φορές σε χρωματογραφικό καθαρισμό.

Τα διαλύματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- ✓ Διάλυμα A (0,15M Sodium acetate, pH=5)
- ✓ Διάλυμα B (0,15M Sodium acetate, pH=5, 2M NaCl)

Από αυτά τα δύο διαλύματα, το διάλυμα A χρησιμοποιήθηκε για την εξισορρόπηση της στήλης (equilibration buffer), έτσι ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης σε αυτήν. Το διάλυμα B χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σταδιακής αύξησης της ιονικής ισχύος. Όσο αυξάνεται η ιονική ισχύς, απομακρύνονται πρωτεΐνες από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ πρόσδεσής τους σε αυτή. Επομένως, αρχικά θα παρατηρηθεί έκλυση των ασθενώς προσδεδεμένων πρωτεϊνών και στη συνέχεια εκλούνται οι ισχυρότερα προσδεδεμένες. Επομένως, μόλις η συγκέντρωση του Buffer B στη στήλη φτάσει το 100%, θα εκλουσθεί η ισχυρότερα προσδεδεμένη σε αυτή πρωτεΐνη, η EDN.

Τα κλάσματα στα οποία βρίσκεται η EDN έχουν στο διάγραμμα οπτικής απορρόφησης την μεγαλύτερη OD στα 280nm. Τα κλάσματα αυτά φυλάσσονται στο ψυγείο προκειμένου να υποβληθούν σε έλεγχο καθαρότητας στο επόμενο στάδιο του πειράματος.

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

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

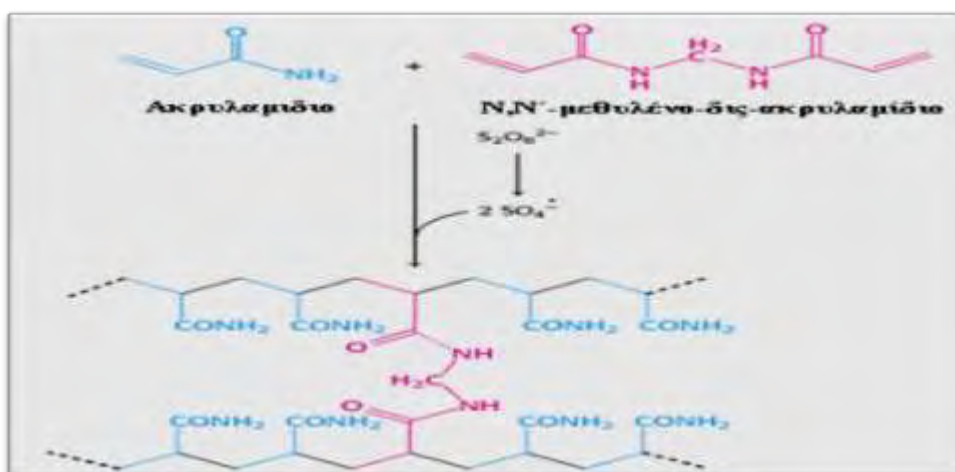
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων όταν είναι αναγκαία μεγάλη διακριτική ικανότητα, ακόμη και μεταξύ μορίων που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο κατά 0,1%. Αντίθετα, τα πηκτώματα αгарόζης παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού μεταξύ των μορίων³⁴.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, έγινε χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Η κατεύθυνση ροής είναι από πάνω προς τα κάτω. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται επειδή το υλικό της είναι χημικά ουδέτερο, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών, ιονικής ισχύος και επειδή η παρασκευή της είναι απλή.

Η πηκτική πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται μεταξύ τους με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου, δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωσή τους (Εικόνα 18). Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε.

Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες, όπως είναι το υπερθεϊκό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι το N,N,N',N'-τετραμέθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Επομένως, η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να πραγματοποιηθεί απουσία O₂, αφού το τελευταίο μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται SDS (sodium dodecyl sulfate) το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους, τον διαχωρισμό των υπομονάδων τους και τη δημιουργία συμπλόκων πρωτεΐνης- SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, τα οποία όλα



Εικόνα 18: Η αντίδραση σχηματισμού πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

είναι αρνητικά φορτισμένα, ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται είναι πολύ μεγαλύτερο από ότι το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο και έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών στη πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται ταχύτερα στους πόρους της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας.

Συνήθως γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, πριν την ηλεκτροφόρηση, είτε με χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως είναι η 2-μερκαπτοαιθανόλη ή με θέρμανση στους 100 °C. Τα βήματα αυτά γίνονται έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Η πιο δημοφιλής τεχνική SDS-PAGE είναι αυτή που αναπτύχθηκε από τον Laemmli. Πρόκειται για μια μη συνεχή ηλεκτροφόρηση πηκτής: η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (running gel) οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών.

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

2.12.1 Πειραματική διαδικασία

Με βάση το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (18,4kDa) παρασκευάστηκε πηκτή 15% SDS και ηλεκτροφορήθηκε στα 120V. Η σύσταση της πηκτής αυτής δίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Σύσταση Running και Stacking Gel 15% SDS.

Running Gel (10ml)		Stacking Gel (15ml)	
H ₂ O	2,3ml	H ₂ O	3,4ml
30% Acrylamid Mix	5ml	30% Acrylamid Mix	0,83ml
1,5M Tris HCl pH=8,8	2,5ml	1M Tris HCl pH=6,8	0,63ml
10% SDS	0,1ml	10% SDS	0,05ml
10% APS	100μl	10% APS	50μl
TEMED	40μl	10% APS	5μl

Όσον αφορά την κατασκευή των running και stacking gel, να τονιστεί ότι και στις δύο περιπτώσεις το APS και το TEMED προστίθενται πάντα τελευταία, ταυτόχρονα και πριν τη φόρτωση του gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Αφού συναρμολογηθεί κατάλληλα η συσκευή ηλεκτροφόρησης, αρχικά φορτώθηκε το Running Gel. Πάνω από αυτό, τοποθετείται H₂O ή ισοπροπανόλη προκειμένου να αποφευχθεί η αντίδραση μεταξύ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου με το gel, και ο επακόλουθος πολυμερισμός. Μόλις πήξει το running gel, αφαιρείται το H₂O ή η ισοπροπανόλη που έχει προστεθεί, και τοποθετείται το stacking gel, πάνω στο οποίο εφαρμόζονται και τα ειδικά χτενάκια, τα οποία θα δημιουργήσουν τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.

Τα δείγματα φορτώνονται αφού έχει πήξει το gel. Πριν φορτωθούν, όμως, υφίστανται την παρακάτω επεξεργασία:

1. Με βάση τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης, τοποθετήθηκαν σε eppendorf 20μl από κάθε υπό εξέταση δείγμα, μαζί με 5μl loading buffer. Ως υπό εξέταση δείγματα θεωρούνται όλα εκείνα τα κλάσματα που προέκυψαν από τον χρωματογραφικό καθαρισμό με την μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση στα 280nm.
2. Τα eppendorf που περιέχουν τα υπό εξέταση δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5min. Μετά το πέρας των 5min, φορτώνονται στο gel.

Μαζί με τα δείγματα, στο gel φορτώνεται και ο μάρτυρας (5μl). Τέλος, πριν την έναρξη της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται για λόγους ασφαλείας έλεγχος διαρροής με Running Buffer 1%.

2.12.2 Χρόση με Silver Staining

Το gel χρωματίστηκε με silver staining για λόγους ευαισθησίας και ακρίβειας. Η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

1. 50% μεθανόλη 50ml
2. Fixation 150ml
 - ✓ 0,0775g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε 150ml ddH₂O
3. AgNO_3 250ml
 - ✓ 0,25g AgNO_3 σε 250ml ddH₂O

Προσοχή: Το διάλυμα αυτό είναι φωτοευαίσθητο. Μετά την Παρασκευή του φυλάσσεται στο σκοτάδι.

4. Developer 250ml
 - ✓ 5g Na_2CO_3 σε 250ml ddH₂O.

Πριν τη ρίψη στο gel προστίθενται στο διάλυμα αυτό 100ml φορμαλδεύδης.

5. Stopper 250ml
 - ✓ 12,5μl οξικό οξύ σε 250ml ddH₂O.

- ❖ Όλα τα διαλύματα υφίστανται ανάδευση σε RT
- ❖ Όλα τα διαλύματα διατηρούνται στους 4°C πριν τη χρήση

Η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

- a. Το stacking αφαιρείται με τη βοήθεια σπάτουλας και τοποθετήθηκε το Fixation Buffer (150ml) για 20min.
- b. Αφαίρεση Fixation Buffer και προσθήκη methanol 50% για 10min.
- c. Αφαίρεση methanol 50% και προσθήκη ddH₂O είτε O/N ή πραγματοποιούνται 5/6 πλύσεις διάρκειας 10min η κάθε μία.
- d. Αφαίρεση ddH₂O και προσθήκη sensitive buffer (Na₂S₂O₃) για 20-30sec.
- e. Αφαίρεση sensitive buffer και ξέπλυμα δύο φορές με ddH₂O (1min/πλύση).
- f. Προσθήκη AgNO₃ για 20min.
- g. Αφαίρεση AgNO₃ και προσθήκη developer buffer. Ήπια ανακίνηση του gel μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες (~6-7min).
- h. Αφαίρεση developer και προσθήκη stopper.

2.13 Εισαγωγή Κρυσταλλώσεων

2.13.1 Διάχυση ατμών

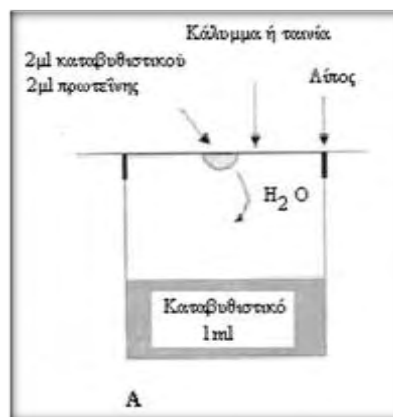
Η πιο συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών είναι αυτή της διάχυσης ατμών, και εφαρμόζεται τις περισσότερες φορές με τις τεχνικές της α) κρεμάμενης σταγόνας, β) της καθήμενης σταγόνας και γ) της σταγόνας sandwich. Για τη δημιουργία κρυστάλλων το υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με διάλυμα ενός καταβυθιστικού (precipitant), το οποίο είναι συνήθως κάποιο άλας, PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει.

2.13.2 Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop)

Η μέθοδος κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν αυτή της κρεμάμενης σταγόνας. Η τεχνική περιγράφεται ως εξής:

Μια σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος καταβυθιστικού τοποθετείται στο μέσο μιας υδρόφοβης καλυπτρίδας (σταγόνα κρυστάλλωσης). Η σταγόνα αποτελείται από διάλυμα της πρωτεΐνης και του καταβυθιστικού σε αναλογία 1:1 (συνήθως αναμιγνύονται 2-5 μl από το κάθε διάλυμα). Η καλυπτρίδα

τοποθετείται πάνω από σχετικά μεγάλο όγκο (700-1000 μl) διαλύματος καταβυθιστικού (δεξαμενή) και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς δημιουργώντας έτσι ένα απομονωμένο σύστημα όπου δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ύλης και ενέργειας (Εικόνα 19). Αποτέλεσμα των πιο πάνω είναι, η συγκέντρωση του καταβυθιστικού να είναι μεγαλύτερη στη δεξαμενή από ότι στη σταγόνα και αυτό για ένα κλειστό σύστημα σημαίνει ότι για την αποκατάσταση της ισορροπίας απομακρύνεται νερό από το αραιό διάλυμα, δηλ. τη σταγόνα, και μετατοπίζεται προς τη δεξαμενή ωστόσο η τάση ατμών της σταγόνας και της δεξαμενής να εξισωθούν. Η απομάκρυνση νερού όμως έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των συστατικών της σταγόνας. Όταν η συγκέντρωση του καταβυθιστικού και της πρωτεΐνης φτάσει στην βέλτιστη τιμή τότε η πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται.



Εικόνα 19: Απεικόνιση της τεχνικής της κρεμάμενης σταγόνας για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών.

Για να κρυσταλλωθεί η EDN, αρχικά συμπυκνώθηκε μέχρι ο τελικός της όγκος να γίνει 8,74ml. Να σημειωθεί ότι, προκειμένου να δημιουργηθούν κρύσταλλοι, πρέπει η συγκέντρωση της EDN να είναι τουλάχιστον 3,5mg/ml.

Επιπλέον, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα κρυστάλλωσης το οποίο αποτελούνταν από:

- ✓ 0,1M Sodium Cacodylate/HCl pH 6,5
- ✓ 1,5M Sodium Acetate

Στο ρεζερβουάρ κάθε πλακιδίου κρυστάλλωσης τοποθετούνται 700 μL από το παραπάνω διάλυμα, και στη συνέχεια στην καλυπτρίδα αναμιγνύονται 1.5 μL από το διάλυμα του ρεζερβουάρ με 1.5 μL από το διάλυμα της EDN. Οι καλυπτρίδες εφαρμόζονται και σφραγίζονται πάνω από τα ρεζερβουάρ του πλακιδίου. Μετά το πέρας 7-10ημερών γίνεται ορατό αν έχουν σχηματιστεί ή όχι κρύσταλλοι.

2.14 Κινητική μελέτη της EDN

2.14.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης

Η ειδική δραστηριότητα ή καθαρότητα (specific activity) ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος ανά 1 λεπτό κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Οι μονάδες της ειδικής δραστηριότητας είναι $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$. Η ειδική δραστηριότητα εκφράζει όχι μόνο τη δραστηριότητα αλλά και την ποσότητα του εξεταζόμενου ενζύμου²⁶.

2.14.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης

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

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

όπου A: η οπτική απορρόφηση της πρωτεΐνης,

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

b: το πάχος της κυψελίδας,

c: συγκέντρωση εξεταζόμενης πρωτεΐνης.

2.14.3 Περιγραφή της μεθόδου

Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο του Anfinsen (1954), όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Slifman (1986).

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υπόστρωμα (tRNA) και περιέχει τα εξής αντιδραστήρια: 0,05 M NaH_2PO_4 με pH 7,4.

Αρχικά, παρασκευάζονται μεγάλης συγκέντρωσης διαλύματα (stock solutions) όλων των αντιδραστηρίων, κατάλληλοι όγκοι των οποίων αναμιγνύονται για την παρασκευή του διαλύματος χρήσης λίγο πριν πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Ο προσδιορισμός αυτός, απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (tRNA). Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) είναι: 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM και 6 μM . Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη. Μετά τη διάλυση του tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 300 μl , ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις

προστεθεί το ένζυμο. Η EDN έχει αραιωθεί με MilliQ H₂O , ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 60 nM. Η αντίδραση σταματά μετά από 5min αναμιγνύοντας 300 μl από το διάλυμα αντίδρασης με 300 μl διαλύματος (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid (συμβάλλουν στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA). Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30°C σε pH 7,4. Γι αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα χρήσης μαζί με το υπόστρωμα επωάζονται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν, όπως προαναφέραμε, προστίθεται το ένζυμο, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά από 5 min αφού έχει προστεθεί η EDN, σταματάμε την αντίδραση με stop solution και τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία 4 °C, στις 13.200 στροφές (rpm) για 17 min, όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Έπειτα, παραλαμβάνονται 560μl από το υπερκείμενο και φωτομετρούνται. Να σημειωθεί πως για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους και πως πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό) το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα, με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο πριν φωτομετρήσουμε το δείγμα. Επιπλέον, εκτός από το διάλυμα αναφοράς (tRNA=0), παρασκευάζεται και ένα διάλυμα για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο, των οποίων οι απορροφήσεις αφαιρούνται από αυτές των δειγμάτων, έτσι ώστε να αφαιρείται η τιμή του ενδογενώς υδρολυμένου tRNA. Τα διαλύματα αυτά αποτελούν τα τυφλά (blank).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA που παράγεται, πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm³⁵. Τέλος, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit. Παρακάτω δίνονται οι πίνακες με τις σχετικές ποσότητες των τυφλών και των διαλυμάτων που κατασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της K_m.

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

10nM EDN	t=5min		Km		T=30oC	
tRNA conc	0μM	2μM	3μM	4μM	5μM	6μM
δ/μα αντιδρ.(pH 7.4)	150	150	150	150	150	150
tRNA (60μM)	0	10	15	20	25	30
dH2O	150	140	135	130	125	120
STOP buffer	300	300	300	300	300	300
ABS260						

Πίνακας 6: Ποσότητες των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της K_m της EDN.

10nM EDN	t=5min		Km		T=30oC	
tRNA conc	2μM	3μM	4μM	5μM	6μM	
δ/μα αντιδρ.(pH 7.4)	150	150	150	150	150	
tRNA (60μM)	10	15	20	25	30	
EDN (60μM)	50	50	50	50	50	
dH2O	90	85	80	75	70	
STOP buffer	300	300	300	300	300	
ABS260						

2.14.4 Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα

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

Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση tRNA. Η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της IC_{50} είναι η 5μM. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς η ίδια με αυτή για τον προσδιορισμό της K_m με τη μόνη διαφορά ότι σε κάθε διάλυμα προστίθεται και διάλυμα εκχυλίσματος διαφορετικής συγκέντρωσης.

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

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

Συνήθως, οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Σκοπός του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, ως αναστολέας της δράσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης χρησιμοποιήθηκε ο 4e σε συγκεντρώσεις 30 μM, 50μM, 100μM, 150 μM.

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

Υπολογισμός K_m

Αρχικά, έγιναν κινητικά πειράματα, εις τριπλούν, για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που επιλέχθηκαν (2, 3, 4, 5, 6 μM). Για κάθε αντίδραση συλλέχθηκε ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, για μικρό χρονικό διάστημα η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι με τη χρήση του προγράμματος Grafit (GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK) προσδιορίστηκε η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία³⁶. Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό, ο οποίος μπορεί να μετατραπεί σε ταχύτητα αντίδρασης (v , καταλυτικές μονάδες, 1/s) σύμφωνα με τον τύπο:

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

όπου, Slope: η κλίση της ευθείας,

ϵ : συντελεστής απορρόφησης,

λ : μήκος κύματος (278 nm) ,
[EDN] : η συγκέντρωση του ενζύμου.

Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της K_m και της V_{max} . Στη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression), η οποία παρέχει και τις τυπικές αποκλίσεις (σ^2) των τιμών (explicit weighting). Ο υπολογισμός των τιμών K_m και V_{max} γίνεται από την εξίσωση των Michaelis-Menten:

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

Το πρόγραμμα GRAFIT χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίζει την K_m και τη V_{max} με το τυπικό σφάλμα. Τέλος, γίνεται από το ίδιο πρόγραμμα το γράφημα Lineweaver-Burk. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται και ο υπολογισμός της K_m και V_{max} της EDN.

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

Υπολογισμός IC_{50}

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Graftit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simple weighting'). Εφ' όσον η αντίδραση πραγματοποιείται σε έναν μόνο χρόνο, 1 min, η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας είναι η εξής:

$$\text{Sp. activity} = \frac{(\text{OD-Blank})}{516,4 * 0,00000001 * 300} \mu\text{moles CMP/ min} * M \text{ ενζύμου}$$

όπου 516,4: είναι ο συντελεστής απορρόφησης του tRNA

0,00000001: τα M του ενζύμου στην αντίδραση

300: 5min * 60 sec

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC₅₀, οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

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

όπου: **S.a._{control}** : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

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

Η τιμή IC₅₀ υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

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

όπου: s: η κλίση της ευθείας

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

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC₅₀ θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC₅₀ προκύπτει από το διάγραμμα **%αναστολή=f([I])**. Από την τιμή της IC₅₀ προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

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

Όπου [S] η συγκέντρωση του υποστρώματος.

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

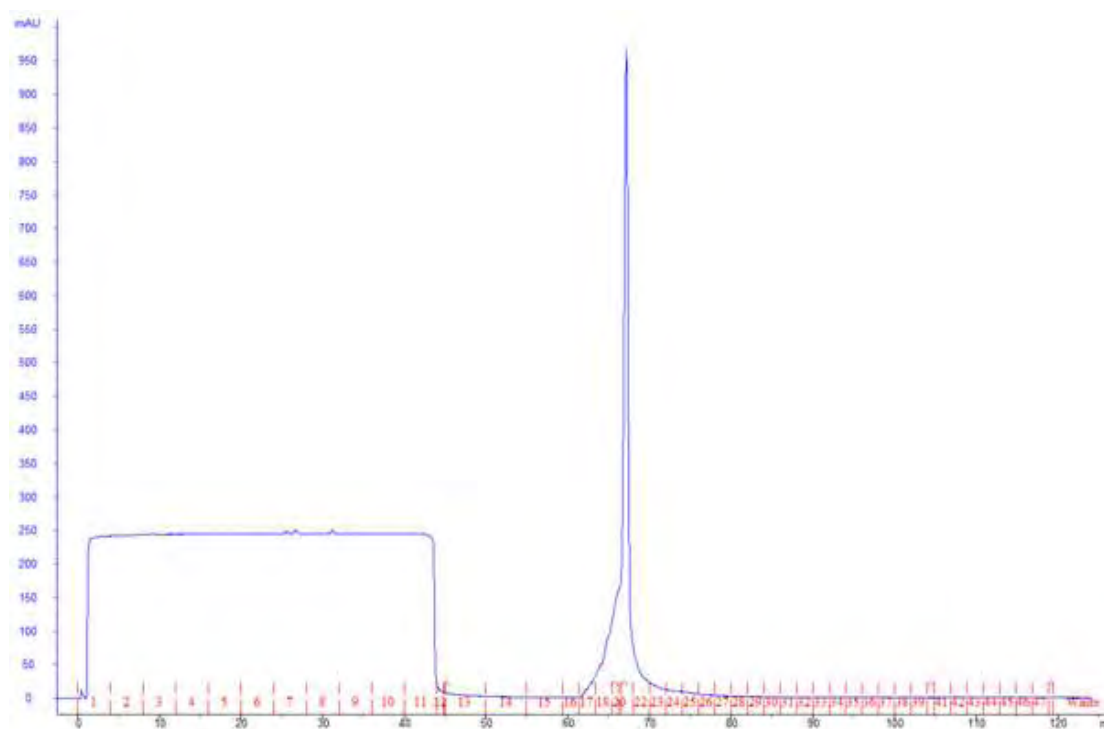
$$K_i = \frac{IC_{50}}{(S / Km + 1)} .$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Αποτελέσματα

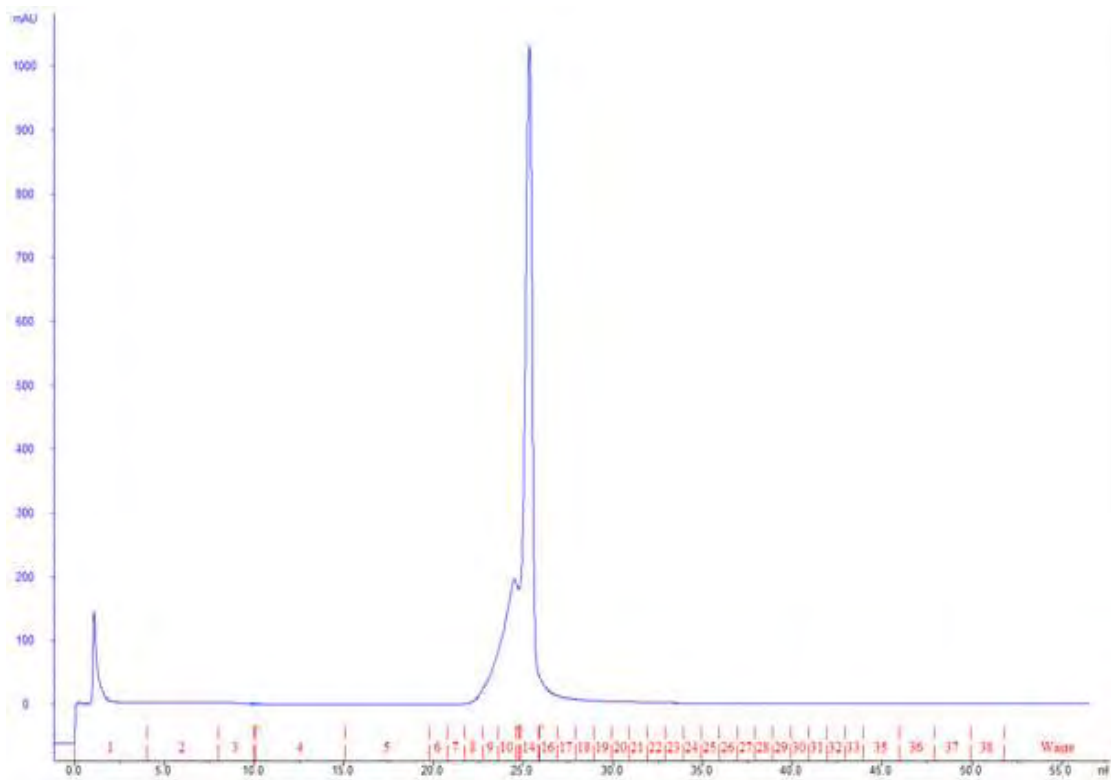
3.1 Χρωματογραφικός καθαρισμός EDN με στήλη ιοντοανταλλαγής

Το διάλυμα της πρωτεΐνης που προέκυψε μετά τη διαδικασία της συμπύκνωσης, φορτώθηκε σε στήλη Mono S-Resource S και εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 11 0,15M Sodium acetate pH= 5. Για την εξισορρόπηση χρησιμοποιήθηκαν 5 όγκοι στήλης. Η ροή της στήλης ήταν 1ml/min και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυση της με το ίδιο διάλυμα μέχρι τη στιγμή εκείνη που δεν ανιχνεύονταν πρωτεΐνη, μέχρι τη στιγμή δηλαδή που OD₂₈₀=0 A. Έπειτα, ακολούθησε έκλυση της EDN από τη στήλη μέσω διαβίβασης ρυθμιστικού διαλύματος 11 Sodium acetate 0,15M pH= 5, με συγκέντρωση NaCl 0-2000mM (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S. Η έκλυση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM.

Τα κλάσματα στα οποία παρατηρούνταν η μεγαλύτερη απορρόφηση στα 280 nm, συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και καθαρίστηκαν περαιτέρω μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, ακολουθώντας της ίδια ακριβώς διαδικασία (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: : Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S για 2^η φορά. Η έκλουση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM.

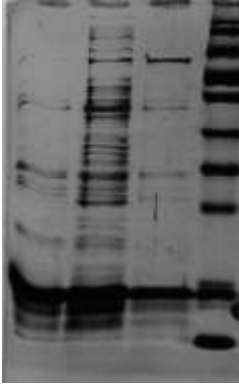
Για άλλη μια φορά έγινε συλλογή των κλασμάτων εκείνων που εμφάνιζαν την μεγαλύτερη απορρόφηση στα 280nm. Τα κλάσματα αυτά ηλεκτροφορήθηκαν έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η καθαρότητα της EDN που προέκυψε από τη διαδικασία απομόνωσης.

3.2 Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS στα 120V και στη συνέχεια, ακολούθησε χρώση της πηκτής αυτής με Silver Staining (Εικόνα 22). Αυτά που γίνονται ορατά στην Εικόνα 22 είναι τα παρακάτω:

- ✓ Η πρώτη διαδρομή από τα δεξιά είναι ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε. Η τελευταία μπάντα αυτού του marker είναι στα 10kDa και η πρωτελευταία στα 16 kDa.
- ✓ Η δεύτερη διαδρομή από τα δεξιά είναι η EDN που πήραμε μετά την 1^η στήλη.

- ✓ Η επόμενη διαδρομή είναι το ολικό δείγμα πρωτεϊνών, και
- ✓ Η τελευταία στα αριστερά διαδρομή είναι η EDN μετά την δεύτερη στήλη. Τη βλέπουμε στα 18,4kDa, που είναι και το επιθυμητό.



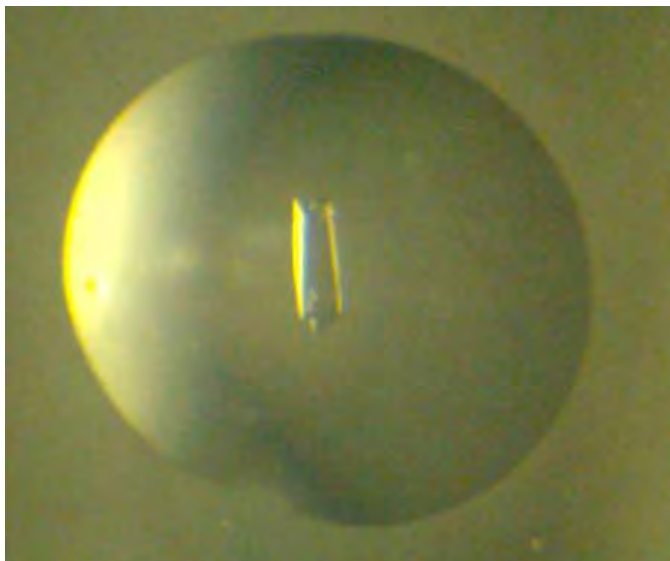
Εικόνα 22: Gel ηλεκτροφόρησης EDN μετά από χρώση με Silver Staining.

3.3 Απόδοση καθαρισμού

Η καθαρή EDN που προέκυψε μετά τον καθαρισμό ήταν 0,437mg/ml. Στη συνέχεια, η καθαρή ηωσινοφιλική νευροτοξίνη συμπυκνώθηκε στα 8,74mg/ml προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι.

3.4 Κρυστάλλωση

Κρύσταλλοι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης σχηματίστηκαν με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας μέσω της διαδικασίας που αναφέρθηκε στο πειραματικό κομμάτι. Οι πρώτοι κρύσταλλοι εμφανίστηκαν μετά από 3-4 μέρες στους 16°C. Οι κρύσταλλοι που προέκυψαν δίνονται στην *Εικόνα 23*.



Εικόνα 23: Κρύσταλλος της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.

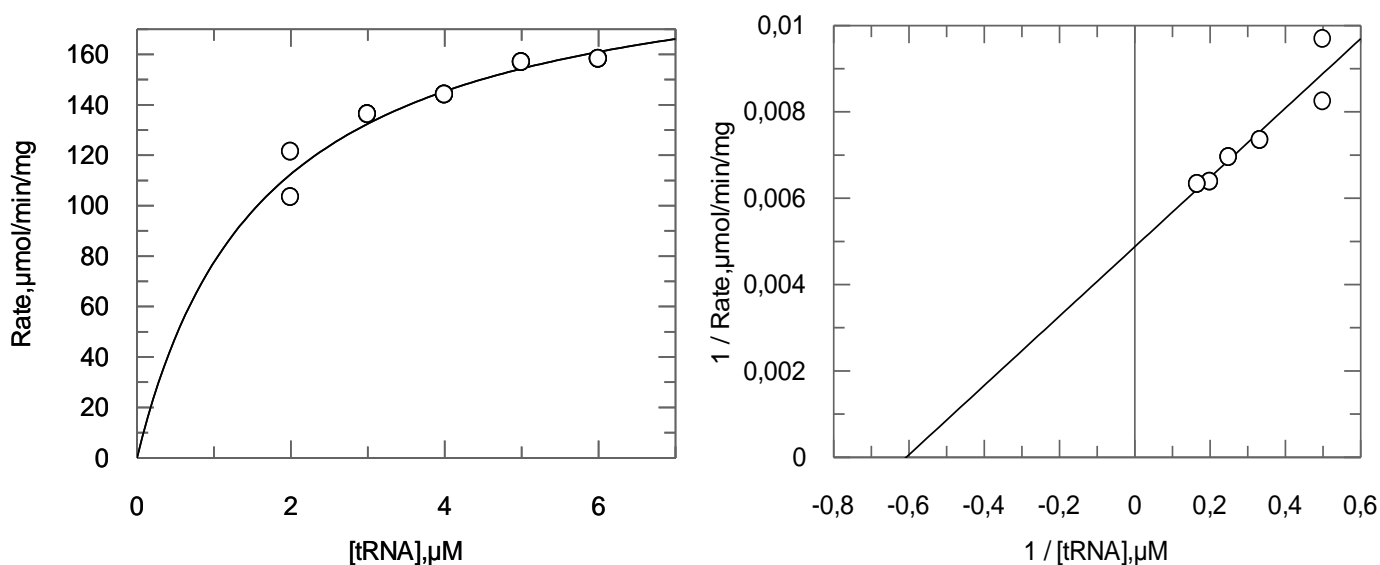
3.5 Κινητικά Αποτελέσματα

Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρασκευάστηκαν με βάση το πρωτόκολλο που δίνεται στην αντίστοιχη υποενότητα του πειραματικού τμήματος. Να σημειωθεί, πως η επιλογή των συγκεντρώσεων της EDN και του tRNA που χρησιμοποιήθηκαν έγινε μετά από αρκετές δοκιμές κάτω υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες. Με βάση τις δοκιμές αυτές, κρίθηκε κατάλληλη η επώαση των δειγμάτων στους 30°C καθώς και ο χρόνος αντίδρασης (5min).

Από τα πειράματα αυτά, και μετά από επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Graffit βρέθηκε πως τα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου είναι τα ακόλουθα:

- ✚ $K_m=1,65 \pm 0.28 \mu\text{M}$, και
- ✚ $V_{max}=205,2 \pm 11.14 \mu\text{mol CMP/mg/min}$.

Τα ευρήματα αυτά, συνοψίζονται στην *Εικόνα 24*.



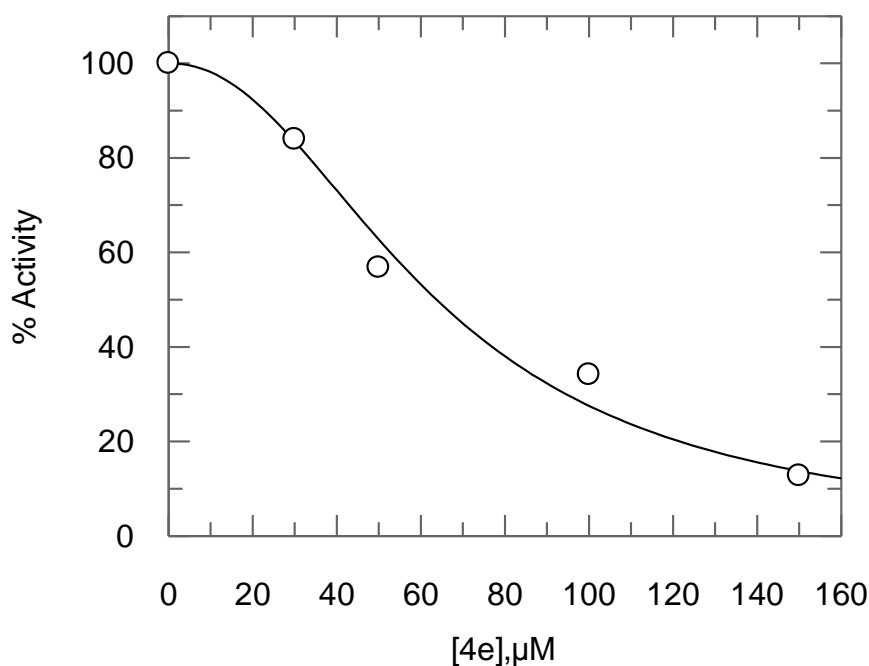
Εικόνα 24: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της EDN σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA (2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 μM). Α. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Β. Το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

Για τη μελέτη της αναστολής της EDN από τον αναστολέα 4e πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο σχετικό εδάφιο. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν τα παρακάτω:

✚ $IC_{50} = 63.74 \pm 5.9 \mu\text{M}$, και

✚ $K_i = 15,81 \pm 3,13 \mu\text{M}$.

Ο υπολογισμός της IC_{50} του 4e αναστολέα έγινε μέσω του προγράμματος Graffit, ενώ η μετατροπή της τιμής της IC_{50} σε K_i πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα EUREKA. Στην *Εικόνα 25* δίνεται η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση του αναστολέα που χορηγείται κάθε φορά. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 150 μM χορηγούμενου 4e αναστολέα. με βάση το διάγραμμα, γίνεται κατανοητό ότι η μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας στη συγκεκριμένη συγκέντρωση αναστολέα είναι μεγαλύτερη του 80%.



Εικόνα 25: Η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 150 μM χορηγούμενου 4e αναστολέα.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3 Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε και στο εισαγωγικό τμήμα, η EDN έχει προσελκύσει εδώ και αρκετά χρόνια το ενδιαφέρον πολυάριθμων ερευνητικών κέντρων εξαιτίας της εμπλοκής της σε αλλεργικές παθήσεις και φλεγμονές που σχετίζονται με τα ηωσινόφιλα. Γνωρίζοντας, πως η ριβονουκλεολυτική δράση της EDN σχετίζεται άμεσα με τις βιολογικές της δράσεις γίνονται μελέτες αναστολής με στόχο την χαρτογράφηση της εξειδίκευσης του καταλυτικού της κέντρου αλλά και της διαλεύκανσης του καταλυτικού της μηχανισμού. Αρωγοί στην εύρεση των κατάλληλων αναστολέων, στέκονται τα δεδομένα μελετών που αφορούν την RNase A, με την οποία η EDN μοιράζεται πολλά κοινά δομικά χαρακτηριστικά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε η ικανότητα αναστολής της EDN από την ένωση 4e. Ο αναστολέας αυτός είναι ένας νουκλεοζίτης, ο οποίος φέρει έναν τριαζολικό δακτύλιο και ένα άτομο φθορίου ως υποκαταστάτη και επιλέχθηκε λόγω της ικανότητας του να αναστέλλει σε ικανοποιητικό βαθμό τη δράση της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A μετά από πρόσδεση στο ενεργό της κέντρο. Ειδικότερα, βρέθηκε πως η σταθερά αναστολής K_i του 4e για την RNase A ισούται με $38.45 \pm 4.44 \mu\text{M}^{28}$. Αντίστοιχα, στα πειράματα που έλαβαν χώρα στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε η ανασταλτική δράση του 4e σε συγκεντρώσεις 30 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , και βρέθηκε πως η σταθερά αναστολής K_i ισούται με $15,81 \pm 3,13 \mu\text{M}$. Αυτό που παρατηρείται, είναι πως και για τα δύο ένζυμα η σταθερά αναστολής είναι της τάξεως των μM , γεγονός που πρακτικά σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας προκαλεί σημαντική μείωση της δραστηριότητας της EDN.

Μελλοντικές έρευνες καθώς και δεδομένα ακτίνων-X, αναμένεται να δώσουν ακόμη περισσότερες πληροφορίες τόσο όσον αφορά τη δομική βάση του μηχανισμού αναστολής του 4e στην EDN, όσο και για την στερεοεξειδίκευση του καταλυτικού της κέντρου.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. Βιβλιογραφία

- [1]: Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J. (2007). Ανοσολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- [2] Boyce, J. A., Friend, D., Matsumoto, R., Austen, K. F., and Owen, W. F. (1995). *J. Exp. Med.* **182**: 49–57.
- [3]: Hillman RS, Kenneth AA, Rinder HM (2005). “Hematology in Clinical Practice”. 4th Edition, Copyright B. Published by McGraw-Hill, Blacklick, Ohio, U.S.A..
- [4]: Todd I., Spickett G. (2008) Ανοσολογία. 5th Edition. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου.
- [5]: Horobin RW and Walter KJ (1987). *Histochemistry* **86(3)**:331-336.
- [6]: Rosenberg HF, Dyer KD & Foster PS (2013). *Nature Reviews Immunology* **13**: 9-22.
- [7]: Rosenberg HF (2008). *Curr Pharm Biotechnol.* **9(3)**: 135–140.
- [8]: Durack DT, Ackerman SJ, Loegering DA, Gleich GJ (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78(8)**: 5165–5169.
- [9]: Peterson CG, Venge P. (1983) *Immunology* **50(1)**:19–26.
- [10]: Rosenberg HF and Domachowske JB (2001) *Journal of Leukocyte Biology* **70**: 691-698.
- [11]: Rosenberg HF and Domachowske JB (2008). *Immunol Lett* **181(1)**: 6-12.
- [12]: Newton DL, Walbridge S, Mikulski SM, Ardelt W, Shogen K, Ackerman SJ, Rybak SM, Youle RJ (1994) *The Journal of Neuroscience* **14(2)**: 538-544.
- [13]: Fredens K, Dahl R, Venge P (1982) *J Allergy Clin Immunol* **70(5)**: 361-366.
- [14]: Sorrentino S, Glitz DG, Hamann KJ, Loegering DA, Checkel JL, Gleich GJ (1992) *J Biol Chem* **267(21)**: 14859-65.
- [15]: Newton DL, Nicholls PJ, Rybak SM, Youle RJ (1994) *J Biol Chem* **269(43)**: 26739-45.
- [16]: Newton DL, Xue Y, Boqué L, Wlodawer A, Kung HF, Rybak SM (1997) *Protein Eng* **10(4)**: 463-70.
- [17]:. Domachowske JB, Dyer KD, Bonville CA, Rosenberg HF (1998) *J Infect Dis* **177(6)**: 1458-64.

- [18]: Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D (2007). *Adv Exp Med Biol.* **601**:185-94.
- [19]: Swaminathan GJ, Holloway DE, Veluraja K, Acharya KR (2002) *Biochemistry* **41**: 3341-3352.
- [20]: Chang C, Newton DL, Susanna M, Rybak M, S and Wlodawer A (2002). *J. Mol. Biol.* **317**: 119-130.
- [21]: Mosimann SC., Newton DL., Youle RJ. and. James MGN. (1996). *J. Mol. Biol.* **260**: 540-552.
- [22]: Moussaoui M, Noques V, Guash A, Barman T, Travers F, Cuchillo CM (1998). *J Biol Chem.* **273(40)**:25565-25572.
- [23]: Leonidas et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 15009-15017.
- [24]: Stryer, L., Berg J.M. and Tymoczko, J.L. (2002). *Biochemistry*, 5th ed. W.H. Freeman, pp 1050.
- [25]: Giuseppe D' Alessio and Riordan JF (1998). *Protein Science* **7**:804-805.
- [26]: Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουσάνης Τ.Α., Κυριακίδης Δ.Α (2001). *Ενζυμολογία. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.*
- [27]: Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L. (2009) *Βιοχημεία, Τόμος Ι.* Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- [28]: Parmenopoulou V., Chatzileontiadou DSM, Manta S, Bougiatioti S, Maragozidis P, Gkaragkouni ND., Kaffesaki E, Kantsadi AL., Skamnaki VT, Zographos SE, Zounpoulakis P, Balatsos NAA, Komiotis D. and Leonidas DD. (2012). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **20**: 7184–7193.
- [29]: Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2007). “Brock, Βιολογία των μικροοργανισμών” Τόμος Ι Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- [30]: Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2011) “Brock, Βιολογία των μικροοργανισμών” Τόμος ΙΙ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- [31]: Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA (2007). “Ανασυνδυασμένο DNA. Γονίδια και Γονιδιώματα-Μία συνοπτική παρουσίαση”. Τρίτη αγγλική έκδοση-Πρώτη ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, Ι. Μπάσδρα & Σία Ο.Ε..
- [32]: Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ (1998). *Curr Microbiol* **36(6)**: 341-347.
- [33]: Marbach A, Bettenbrock K (2012). *J Biotechnol* **157(1)**: 82-88.
- [34]: Sambrook J, MacCallum P, Russell D (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[35]: Anfinsen C.B. et al. *J Biol. Chem.* 1954.

[36]: Leatherbarrow, R.J. (1992) Grafit version 3.0. Erithacus Software Ltd Staines, U.K.