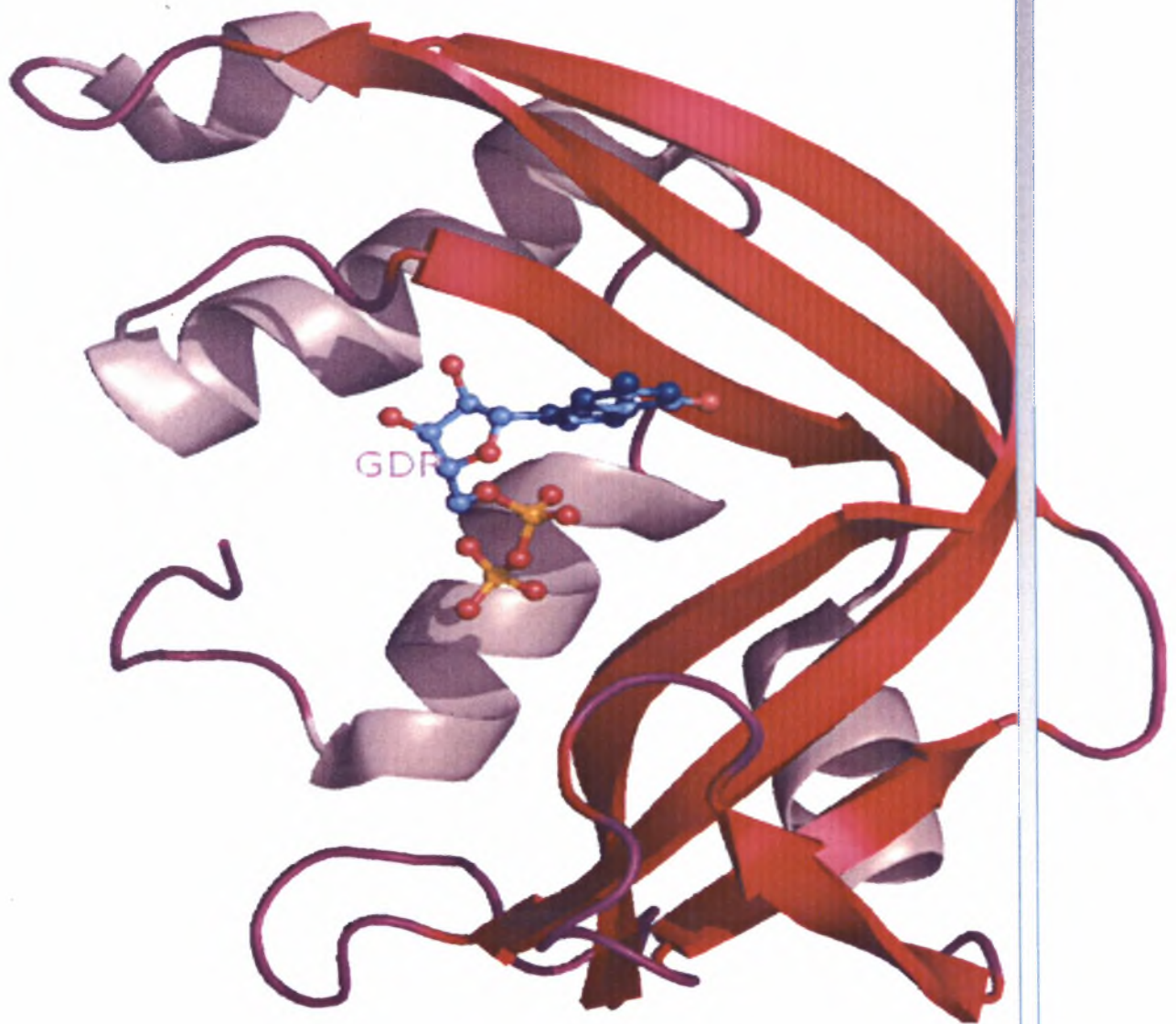


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
<<Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας>>  
<<Βιοτεχνολογία-Ποιότητα Διατροφής και  
Περιβάλλοντος>>



Η σύνδεση της 5' διφωσφορικής γουανοσίνης στη νευροτοξίνη των  
ηωσινόφιλων κυττάρων: Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες



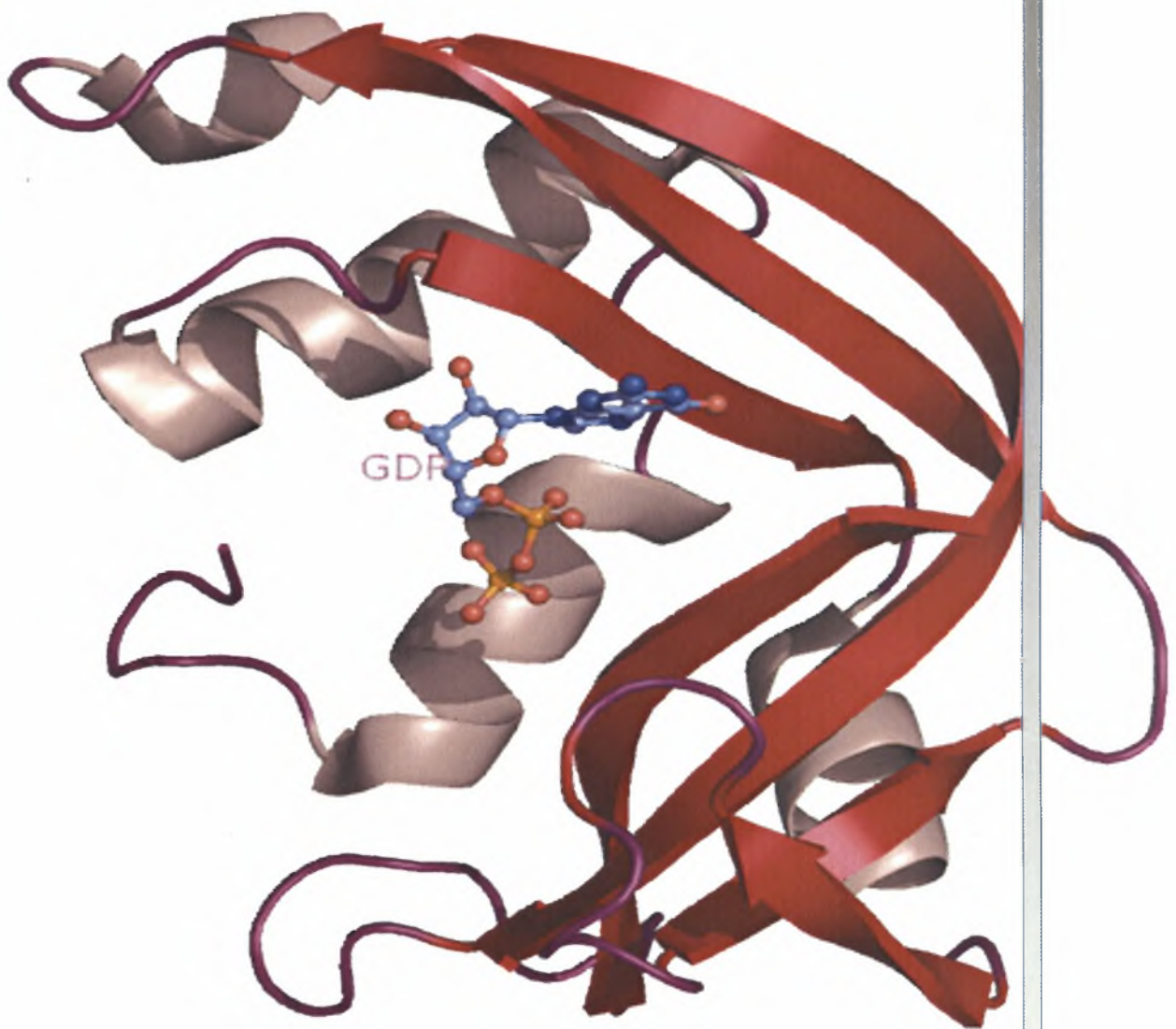
Σπανού Χριστίνα

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
<<Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας>>  
<<Βιοτεχνολογία-Ποιότητα Διατροφής και  
Περιβάλλοντος>>



Η σύνδεση της 5' διφωσφορικής γουανοσίνης στη νευροτοξίνη των ηωσινόφιλων κυττάρων: Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες



Σπανού Χριστίνα

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

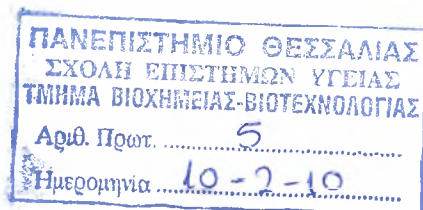
Αριθ. Εισ.: 8110/1  
Ημερ. Εισ.: 06-05-2010  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
572.6  
ΣΠΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087077

Η σύνδεση της 5' διφωσφορικής γουανοσίνης στη νευροτοξίνη των  
ηωσινόφιλων κυττάρων: Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Δρ. Δημήτρης Δ. Λεωνίδας**



Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του  
Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δρ. Δημήτρης Κομιώτης**



Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής  
Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου

**Δρ. Κοντού Μαρία**



Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Τμήματος  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2009- Ιανουάριος 2010, στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με το Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, όπου και πραγματοποιήθηκε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, υπό την επίβλεψη του οποίου εκπόνησα την μεταπτυχιακή μου εργασία και καθ' όλη τη διάρκεια της οποίας, οι συμβουλές, η σωστή καθοδήγηση και η βοήθεια του υπήρξαν πολύτιμες.

Ταυτόχρονα, οφείλω να ευχαριστήσω και την Λέκτορα Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Κοντού Μαρία για την πολύ ζεστή υποδοχή της από την πρώτη στιγμή που την επισκέφθηκα στο γραφείο της, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την αμέριστη εμπιστοσύνη της στο πρόσωπο μου. Την ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να γνωρίσω την ίδια αλλά και τους αξιόλογους συνεργάτες της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην μετακαλούμενη ερευνήτρια Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική για την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε στη διάρκεια της εργασίας και για την προθυμία της να μοιραστεί μαζί μου την επιστημονική γνώση και εμπειρία της χωρίς κανένα ενδοιασμό.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στο Δρ. Σπύρο Ζωγράφο, ο οποίος ανεξάρτητα από τις επαγγελματικές του υποχρεώσεις, μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθεια του.

Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις μεταπτυχιακές φοιτήτριες και φίλες Τσιρκώνη Βασιλική και Χριστίνα Δράκου, για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους.

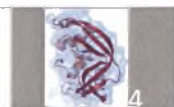
Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος στο εργαστήριο. Νιώθω ιδιαίτερα ευτυχής που μου δόθηκε η ευκαιρία στα αρχικά αυτά στάδια της δραστηριότητάς μου σε εργαστηριακό χώρο, να γνωρίσω τόσο αξιόλογους ανθρώπους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας αρχικά διεξήχθη ετερόλογη έκφραση, απομόνωση και καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης (EDN) μέσω μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε με κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα η σύνδεση της της 5' διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP) στην EDN. Η GDP ευρέθηκε να είναι ένας ισχυρός αναστολέας την EDN με  $IC_{50}=30 \mu M$ . Ο προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου EDN-GDP από κρυσταλλογραφικά δεδομένα ακτίνων Χ σε υψηλή ευκρίνεια ( $1.5 \text{ \AA}$ ) απεκάλυψε πως στο μόριο της EDN προσδένεται ένα μόριο αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο και η θέση όλων των ατόμων του αναστολέα είναι πολύ καλά καθορισμένη στο χάρτη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ο αναστολέας GDP προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με μια εκτεταμένη διαμόρφωση με την ΡΒ φωσφορική ομάδα να βρίσκεται στην υποπεριοχή  $P_1$ (His-15, Lys 38, His-129) ενώ η γουανίνη εντοπίζεται μακριά από την υποπεριοχή  $B_2$ , κοντά στην  $B_1$ .

Συγκριτική δομική ανάλυση της σύνδεσης της GDP και άλλων νουκλεοτιδικών αναστολέων στην EDN απεκάλυψε τη δομική βάση της ενζυμικής αναστολής από την GDP. Επίσης συγκριτική δομική ανάλυση της σύνδεσης της GDP στην EDN και της dGMP στην RNase A απεκάλυψε τα δομικά χαρακτηριστικά της διαφοράς στην συγγένεια για νουκλεοτιδικούς αναστολείς που παρουσιάζουν τα δύο αυτά ομόλογα ένζυμα.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.....	8-10
1.1.1 Γενικά.....	8-9
1.1.2 Η Δομή της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης .....	9-10
1.2 Το καταλυτικό κέντρο και ο καταλυτικός μηχανισμός.....	11-13
1.3 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος.....	14
1.4 Αναστολείς Ενζυμικών Αντιδράσεων.....	15-16
1.4.1 Γενικά.....	15
1.4.2 Τύποι αναστολής .....	16
2.1 Κρυσταλλογραφία.....	17-35
2.1.1 Γενικά .....	17-30
Κρύσταλλοι πρωτεϊνών .....	17-20
Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης.....	20-21
Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών.....	21-23
Στάδια κρυστάλλωσης .....	24-26
Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση .....	27-29
Ο διαλύτης συγκρυστάλλωσης .....	29
Παράγοντες καθίζησης .....	29-30
2.1.2 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων .....	31-35
Ακτίνες Χ .....	31
Πηγές Ακτίνων Χ και ανιχνευτές .....	32-35





## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Υλικά .....	37
2. Εργαστηριακός εξοπλισμός .....	38
3. Πλασμιδιακοί φορείς .....	39-40
4. Η E. Coli ως κύτταρο ξενιστής για την έκφραση της EDN .....	40-44
5. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	44
6. Έκφραση και παραγωγή της EDN.....	45-47
7. Συλλογή των κυττάρων.....	47-48
8. Λύση των κυττάρων .....	48-50
9. Πλύση των κυττάρων και ομογενοποίηση .....	50
10. Εγκλεισμός της πρωτεΐνης (incubation) .....	50-51
11. Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding) .....	51-52
12. Συμπύκνωση της πρωτεΐνης .....	52
13. Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN .....	53-54
14. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE).....	55-60
15. Κινητική μελέτη της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης .....	61-65
16. Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A.....	66-68
17. Μέθοδοι κρυστάλλωσης .....	69-70

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Έκφραση και καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης .....	72-76
2. Κινητικά πειράματα .....	77-84
3. Κρυστάλλωση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης .....	84-94

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη

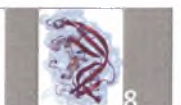
### 1.1.1 Γενικά.

Τα κοκκία των ηωσινόφιλων κυττάρων του ανθρώπου περιλαμβάνουν 2 βασικές πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP) και ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των ριβονουκλεασών

Παρόλο που ο φυσιολογικός τους ρόλος δεν είναι ακόμα γνωστός, έχει αποδειχτεί ότι έχουν νευροτοξική ικανότητα και συγκεκριμένα επάγουν το «φαινόμενο του Gordon» στα κουνέλια, το οποίο χαρακτηρίζεται από δυσκαμψία, αταξία παράλυση καταστροφή των ινών Purkinje και εκφυλισμό της παρεγκεφαλίδας (Durack D.T., et al., 1979, 1981, Gleich, G. J., et al., 1986). Επίσης, όσο αναφορά την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, αυτή εμφανίζει επίσης κυτταροτοξικότητα ενάντια σε έλμινθες, σε RNA μονόκλωνους ιούς και σε αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα, γεγονότα που υποδηλώνουν πως το ένζυμο έχει και έναν επιπλέον ρόλο στον αμυντικό μηχανισμό του ανθρώπου (Rosenberg, H. F., 1998).

Παράλληλα, φαίνεται πως αυτές οι πρωτεΐνες έχουν και αρνητικές επιδράσεις στον ανθρώπινο πληθυσμό και η δράση τους μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο (Aldhous, P., 1991). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι μερικώς υπεύθυνες για κάποιες ανωμαλίες νευρολογικής φύσεως σε ασθενείς με το «Υπερηωσινόφιλο Σύνδρομο» (Chusid, M. J., et al., 1975). Ακόμα, εντυπωσιακό είναι το γεγονός, ότι το φαινόμενο της υπερηωσινόφιλης σχετίζεται και με άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο της ηωσινόφιλης μυαλγίας, που συνδέεται με την κατανάλωση της L-τροπτοφάνης, (Hertzman, P. A., et al., 1990, Silver, R. M., et al., 1990), με άτομα που εμφανίζουν νευρίτιδα (Vulpitt, K. J. et al., 1990), (Roubenoff, R., et al., 1990), (Martin, R. W. et al., 1990) αλλά και με άτομα που εμφανίζουν πλήθος διαφόρων νευρολογικών επιπλοκών (Ng, S.C., et al., 1989, Tolander, L. M. et al., 1991, Kaufman, L. D., et al., 1991).

Το 1980 απομονώθηκαν πολλές φαινομενικά μη σχετιζόμενες με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A πρωτεΐνες από άλλους ιστούς. Τα γονίδια τους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν και βρέθηκε τελικά ότι παρουσιάζουν σημαντική



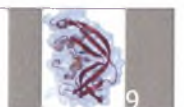
ομολογία με την ριβονουκλεάση A. Οι πρωτεΐνες αυτές έγιναν μέλη της υπεροικογένειας της παγκρεατικής Ριβονουκλεάσης A. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται και η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN: ριβονουκλεάση 2) και μερικές άλλες ακόμα κυτταροτοξίνες (Helene F. Rosenberget et al, 2008).

Όλες οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπεροικογένειας έχουν μερικά κοινά χαρακτηριστικά. Περιέχουν από 6 - 8 κυστεΐνες που σχηματίζουν δισφουλφιδικούς δεσμούς και όλες έχουν 2 ιστιδίνες και μία λυσίνη, σε ένα σταθερό μοτίβο αλληλουχίας (CKXXNTF). Τέλος, κατά κανόνα οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπεροικογένειας βρίσκονται σε ένα μόνο εξώνιο στο χρωμόσωμα 14 (Helene F. Rosenberg et al, 2008).

### 1.1.2 Η Δομή της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης.

Οι πρωτεΐνες γενικά σχηματίζονται από είκοσι διαφορετικά αμινοξέα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Κάθε αμινοξύ σχηματίζει μικρής η μεγάλης εμβέλειας αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα αμινοξέα. Η διαμόρφωση που θα πάρει στο χώρο η εκάστοτε αμινοξική αλληλουχία προσδίδει σταθερότητα και καθορίζει την λειτουργία που θα επιτελεί η πρωτεΐνη. Η αλλαγή ενός και μόνο αμινοξέος μπορεί να προκαλέσει αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις από την φυσιολογική πρωτεΐνη. Συνεπώς, είναι σημαντικό να κατανοηθούν οι ιδιότητες του κάθε αμινοξέος ξεχωριστά ώστε να βγουν σωστά συμπεράσματα για τον τρόπο αναδίπλωσης και για την λειτουργία της ενδιαφερομένης πρωτεΐνης (Eri Chatani & Rikimaru Hayashi, 2001).

Η κρυσταλλική δομή της ανασυνδυασμένης ηωσινόφιλης νευροτοξίνης προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1996 σε ευκρίνεια 1.83 Å (Mosimann S.C. et al, 1996) και από τότε, η κρυσταλλική της δομή έχει προσδιοριστεί σε ευκρίνεια 0.9 Å (Swaminathan et, al (2002).



Η δομή της EDN συγκροτείται από τέσσερις  $\alpha$ -έλικες, έξι  $\beta$ -ελάσματα και 9 βρόχους. Τα αμινοξέα που παίρνουν μέρος στο σχηματισμό των παραπάνω δομών παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα( Πιν. 1) που ακολουθεί.

Έλικες	$\beta$ -ελάσματα	Βρόχοι
$\alpha 1$ Thr6-Ile16	$\beta 1$ Asn39-Leu45	L1 Lys1-Phe5
$\alpha 2$ Gln22-Arg35	$\beta 2$ Pro58-Cys 62	L2 Asn17-Gln21
$\alpha 3$ Thr47-Cys55	$\beta 3$ Asn69- Ser74	L3Arg36-Lys38
$\alpha 4$ Asn92-Cys96	$\beta 4$ Val78-Pro88	L4 Gly56-Asn57
	$\beta 5$ Arg97-Arg114	L5 Pro63-Ser64
	$\beta 6$ Pro124-Ile134	L6 Lys66-Lys69
		L7 Ser75-Gln77
		L8 Ser89-Gln91
		L9Asp115-Tyr123

Ένα ιδιαίτερα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης είναι οι δισουλφιδικοί της δεσμοί. Υπάρχουν τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των κυστεϊνών 23-83, 37-96, 55-111 και 62-71. Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει από την εικόνα ο δισουλφιδικός δεσμός 23-83 συνδέει την έλικα  $\alpha 2$  με το έλασμα  $\beta 4$ , ο δεσμός 55-111 την έλικα  $\alpha 3$  με το έλασμα  $\beta 5$ , ο 37-96 δεσμός το βρόχο L3 με την έλικα  $\alpha 4$  και ο δισουλφιδικός δεσμός 62-71 συνδέει δύο  $\beta$ -ελάσματα μεταξύ τους, το  $\beta 2$  με το  $\beta 3$ . Οι τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί είναι ασυνήθιστα πολλοί για πρωτεΐνη τέτοιου μεγέθους, και συμβάλλουν σημαντικά στη σταθερότητα της. Αντικατάσταση οποιασδήποτε κυστεΐνης με αλανίνη ή σερίνη μειώνει τη-σταθερότητα του ενζύμου. Οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί (23-83 και 55-111) ανάμεσα στις  $\alpha$ -έλικες και τα  $\beta$ -ελάσματα συμβάλλουν περισσότερο στη σταθερότητα από ότι οι άλλοι δύο (Stewart et al, 1990).

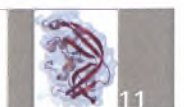
## 1.2 Το καταλυτικό κέντρο και ο καταλυτικός μηχανισμός

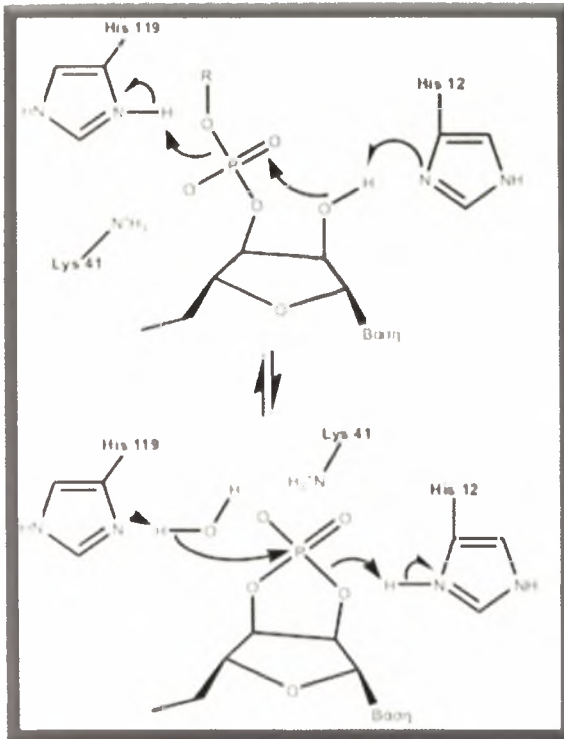
Όπως έχει προαναφερθεί η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ως μέλος της οικογένειας των ριβονουκλεασών καταλύει την διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών του RNA. Η υδρόλυση που καταλύεται από την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι ίδια με αυτήν που καταλύεται από το κύριο μέλος της οικογένειας των ριβονουκλεασών, τη ριβονουκλεάση A, κατάλυση που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω και ισχύει και για την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη. Τα ομόλογα αμινοξέα της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης της καταλυτικής τριάδας στην ριβονουκλεάση A, His12, Lys41 και His119, είναι τα αμινοξέα His15, Lys38 και His129.

Η υδρόλυση γίνεται σε δύο στάδια, μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα (Εικ. 1). Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5' θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος και ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικού-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 ομάδα (Mohamed Moussaoui et al, 1998 ).

Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο αλλά ένα κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση (Stryer et al, 2002).

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





**Εικόνα 2 :** Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η κατάλυση.

Τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην κατάλυση είναι η His12, His119 και η Lys 41 (στην EDN τα ομόλογα είναι His15, Lys38 και His129) (Εικ.2). Η αντίδραση αρχίζει με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διαπάται από το 2'-Ο με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιονισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-ΟΗ, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του Ο. Την ίδια

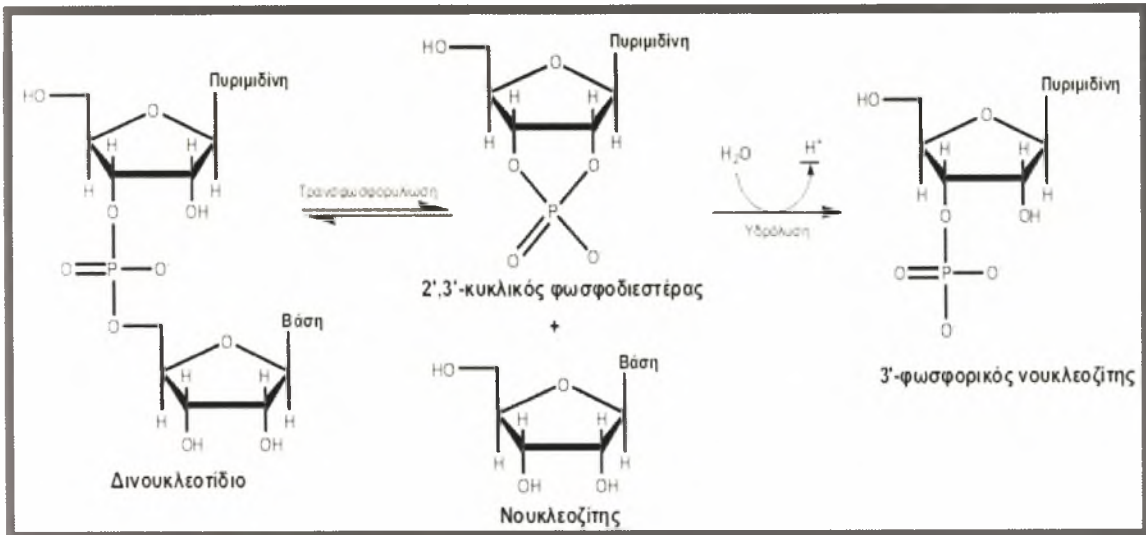
στιγμή η πρωτονιωμένη μορφή της His119 παρέχει το πρωτόνιο της στο 5'-Ο, και το

2'-Ο σχηματίζει δεσμό με το Ρ, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από την θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ Ρ και του 5'-Ο διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο Ο. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του Ρ και του 2'-Ο παράγοντας το 2',3'-κυκλικό ενδιάμεσο.

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

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 στο κέντρο, τρία άτομα



**Εικόνα 1** : Η αντίδραση που καταλύεται από την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.

οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιάμεσου, το απερχόμενο 5'-O βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-O βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας. Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιάμεσου ένα άτομο O από ένα μόριο ύδατος βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-O βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, η μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρινόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται (Stryer et al, 2002).



### 1.3 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος

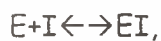
Κρυσταλλογραφικές μελέτες συμπλόκων της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με διάφορα ανάλογα υποστρώματος και με μια σειρά πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης σε αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου οδήγησαν στον προσδιορισμό έξι βοηθητικών περιοχών πρόσδεσης του υποστρώματος, τις P<sub>-1</sub>, P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> και B<sub>3</sub>. Από αυτές τις 6 βοηθητικές περιοχές οι P<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub>, αποτελούν τον πυρήνα του καταλυτικού κέντρου του ένζυμου. Τα αμινοξέα που σχηματίζουν αυτές τις περιοχές η His15, Lys38, His129 στην P<sub>1</sub>, η Thr42 και η Leu130 στην B<sub>1</sub>, Asp71 και Glu111 στην B<sub>2</sub>. Επίσης, οφείλουμε να αναφέρουμε ότι στην περιοχή B<sub>1</sub> προσδένονται μόνο πυριμιδίνες, ενώ στην περιοχή B<sub>2</sub> υπάρχει προτίμηση για πουρίνες, όπως συμβαίνει και με τις υπόλοιπες ριβονουκλεάσες. Όμως, για την EDN έχει βρεθεί ότι με πολυνουκλεοτιδικά υποστρώματα, το ένζυμο έχει 20 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για κυτιδίνες συγκριτικά με τις ουριδίνες στην περιοχή B<sub>1</sub> και 100 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για αδενosίνες στην περιοχή B<sub>2</sub> (Sorrentino, S et al., 1992). Τέλος, οι υποπεριοχές P<sub>-1</sub>, P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, είναι θέσεις πρόσδεσης φωσφορικών ομάδων και ειδικά στις θέσεις P<sub>-1</sub>, P<sub>1</sub>, έχουν βρεθεί να προσδένονται και θειικά ανιόντα (SO<sub>4</sub><sup>-</sup>) (Mosimann, S.C., et al, 1996).

## 1.4 Αναστολείς Ενζυμικών Αντιδράσεων.

### 1.4.1 Γενικά

Όταν μια ουσία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας μπορεί να είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά τη δραστηριότητά του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο του ενεργού κέντρου και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική αντίδραση. Ο αναστολέας στην περίπτωση αυτή δεσμεύεται συνήθως με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα (Georgatsos, J.G., 2001).

Αντίθετα, οι αντιστρεπτοί αναστολείς από τη μια μεριά δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι, ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως στην παρακάτω σχέση:



όπου το I είναι ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα.

Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, η σταθερά δηλαδή της παραπάνω αντίδρασης, δίνεται από τη σχέση:

$$K_i = [EI]/[E][I]$$

Από την παραπάνω σχέση, είναι εύκολο να αντιληφθούμε πως η σταθερά  $K_i$  αποτελεί το αντίστροφο της αγχιστείας ενζύμου-αναστολέα.

Τέλος, μπορούμε να διακρίνουμε 4 τύπους ενζυμικής αναστολής: τη συναγωνιστική, τη μη συναγωνιστική, την ανταγωνιστική και τη μικτή (Georgatsos, J.G., 2001).

### 1.4.2 Τύποι αναστολής

#### A. Συναγωνιστική αναστολή

Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός αναστολέας. Με τη συμμετοχή πλέον του αναστολέα στην καταλυτική αντίδραση παρατηρούμε πως από τη μια μεριά η τιμή της  $V_{max}$  δεν μεταβάλλεται, ενώ αντίθετα η τιμή της  $K_m$  μεγαλώνει.

#### B. Μη συναγωνιστική αναστολή

Στην περίπτωση αυτή, αν αντί ο αναστολέας I να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα S για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή στο ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή, τότε αναφερόμαστε σε μη συναγωνιστική αναστολή. Ενώ λοιπόν στη συναγωνιστική αναστολή η ταυτόχρονη δέσμευση αναστολέα και υποστρώματος στο ένζυμο αποκλείεται, στη μη συναγωνιστική αναστολή δεν αποκλείεται και μπορεί να δημιουργηθεί ένα τριπλό σύμπλοκο του τύπου EIS. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, η τιμή της  $V_{max}$  να μειώνεται, ενώ αντίθετα η τιμή της  $K_m$  παραμένει σταθερή.

#### Γ. Μικτή αναστολή

Στην μικτή αναστολή η τιμή της  $K_m$  μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί, ενώ η τιμή της  $V_{max}$  πάντα θα μειώνεται.

#### Δ. Ανταγωνιστική αναστολή

Στις προηγούμενες τρεις περιπτώσεις αναστολής, οι αναστολείς μπορούν να δεσμεύονται απευθείας με το ένζυμο. Στην περίπτωση της ανταγωνιστικής αναστολής, η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και αυτό συνεπάγεται μείωση των τιμών τόσο της  $K_m$ , όσο και της  $V_{max}$ .

## 2.1 Κρυσταλλογραφία

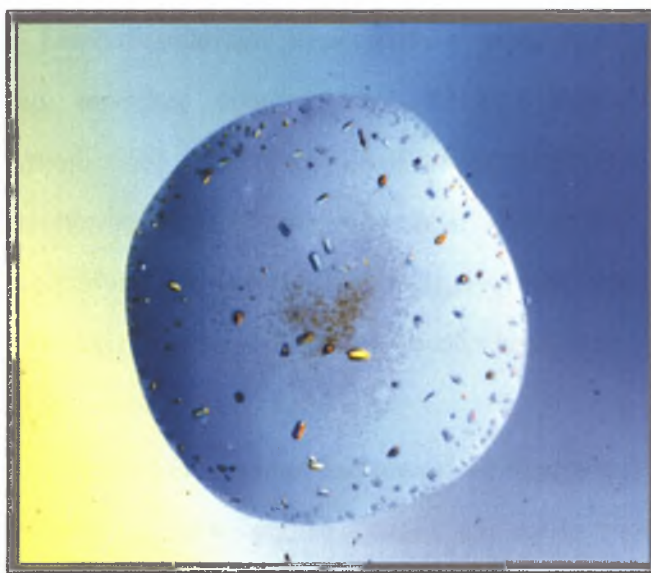
### 2.1.1 Γενικά.

Η κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι μια βιοχημική τεχνική που αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον έλεγχο καθαρότητας των πρωτεϊνών, καθώς η μικροκρυσταλλικότητα των μορίων είναι ένδειξη καθαρότητας τους.

Σήμερα με την βοήθεια των εργαλείων της βιοτεχνολογίας είναι μάλλον ευκολότερο να αποκτήσει ο ερευνητής τα απαιτούμενα ποσά πρωτεϊνών για κρυσταλλώσεις (μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις αρκετά mg), καθώς ο στόχος δεν είναι μόνο η ανάπτυξη κρυστάλλων αλλά και το κατάλληλο μέγεθος αυτών (McPherson, 2004). Η ένταση των περιθλώμενων ακτίνων-Χ είναι ανάλογη με τον όγκο του κρυστάλλου και αντίστροφα ανάλογη με τον όγκο της στοιχειώδους κυψελίδας που δεν είναι μικρότερος από μια πρωτεϊνική υπομονάδα. Οι ακτίνες-Χ σκεδάζονται ασθενώς από ένα μόνο μόριο, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με ένα κρύσταλλο που περιέχει μεγάλο αριθμό μορίων διευθετημένων κανονικά.

#### Κρύσταλλοι πρωτεϊνών.

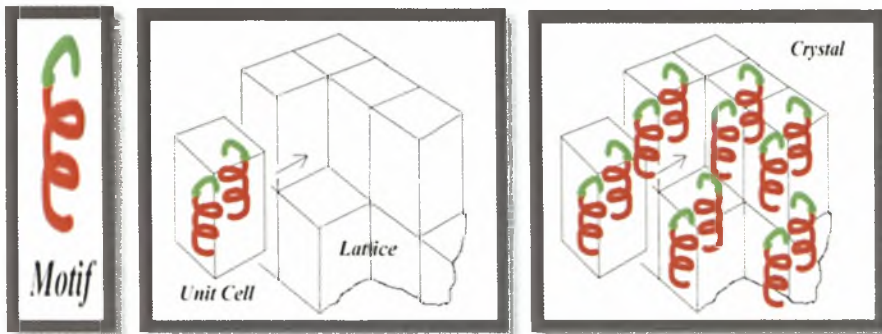
Τα στοιχεία και οι χημικές ενώσεις εμφανίζονται σε τρεις καταστάσεις, στερεή, υγρή και αέρια. Οι κρύσταλλοι είναι μια φάση της στερεάς κατάστασης, στην οποία τα μόρια (ή άτομα) που αποτελούν τον κρύσταλλο (Εικ.3) είναι περιοδικά διευθετημένα στο χώρο. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι κάθε περιοδική διευθέτηση



Εικόνα 3 Κρύσταλλοι της EDN

μορίων δε συνεπάγεται ότι πρόκειται για κρύσταλλο. Η διάκριση των κρυστάλλων βασίστηκε αρχικά στα εξωτερικά τους γνωρίσματα και στις ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορεί να εμφανίζουν. Τα κυριότερα γνωρίσματα των κρυστάλλων

είναι: η συμμετρία, η περιοδικότητα και το γεγονός ότι παρουσιάζουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τη διευθέτησή τους, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ανισότροπα υλικά.



**Εικόνα 4:** Ένας κρύσταλλος που αποτελείται από όμοιες κυψελίδες.

Ένας κρύσταλλος αποτελείται από όμοιες μοναδιαίες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα (Εικ.4). Σαν στοιχειώδης ή μοναδιαία κυψελίδα ορίζεται η μικρότερη στοιχειώδης ομάδα, η οποία αντιπροσωπεύει πλήρως την κρυσταλλική δομή. Η στοιχειώδης κυψελίδα μπορεί να επιλεγεί με διάφορους τρόπους αρκεί να έχουν σχήματα τα οποία επαναλαμβανόμενα με μετατόπιση να μην αφήνουν κενά. Στην απλούστερη περίπτωση η στοιχειώδης κυψελίδα περιέχει ένα μόνο μόριο, συνήθως όμως αποτελείται από δύο ή περισσότερα μόρια συνδεδεμένα με κάποιο είδος συμμετρικής διευθέτησης, έτσι ώστε να συμπληρώνουν τον χώρο πιο ικανοποιητικά παρά αν ήταν το καθένα μόνο του. Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος.

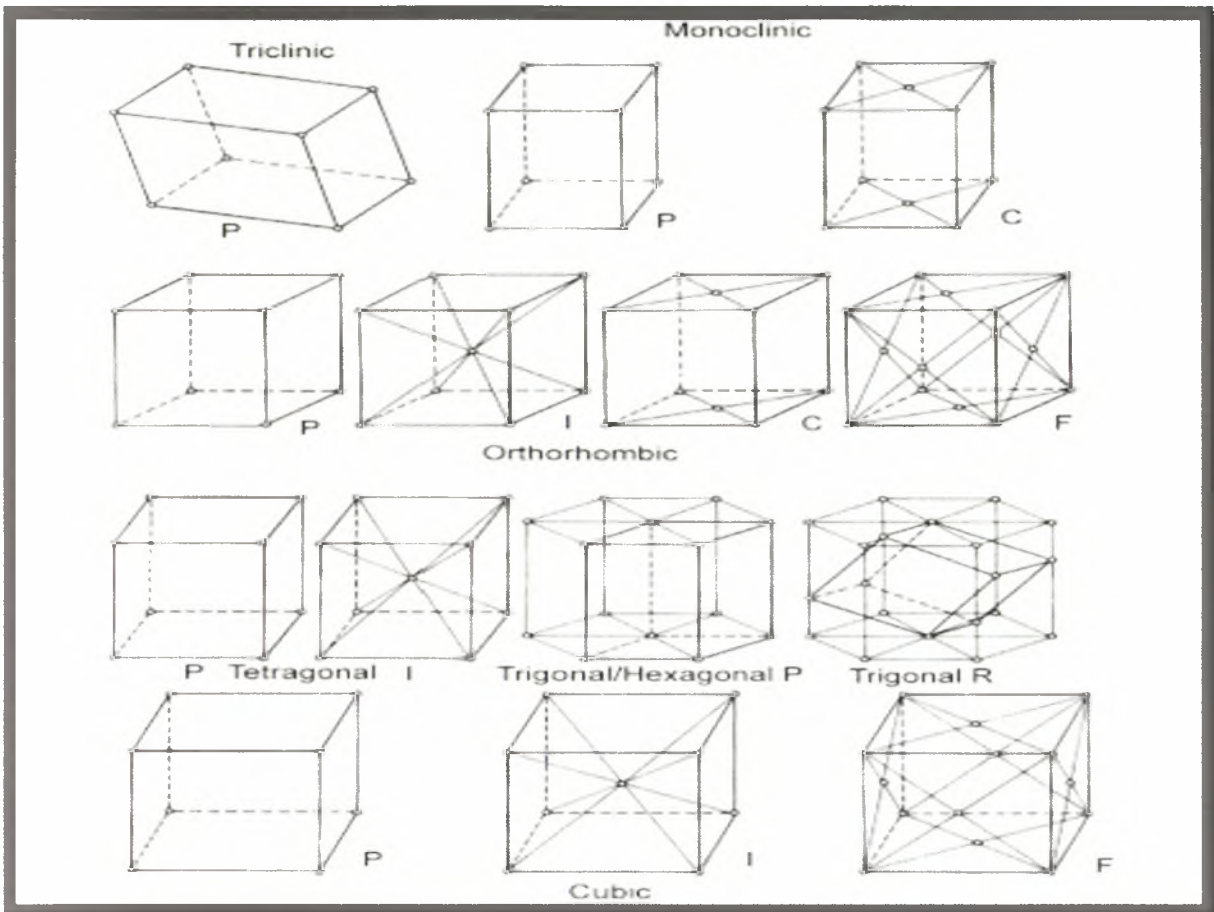
Το μέγεθος και η μορφή της στοιχειώδους κυψελίδας μπορεί να περιγραφεί από τρία διανύσματα **a**, **b**, **c** τα οποία έχουν κοινό σημείο επαφής μία γωνία της κυψελίδας και καλούνται κρυσταλλογραφικοί άξονες. Ένα διάνυσμα προσδιορίζεται πλήρως, όταν εκτός από το μέτρο, είναι γνωστή και η γωνία η οποία σχηματίζει με κάποιο άξονα αναφοράς. Συνεπώς, το σύνολο των αντισμάτων **a**, **b**, **c** και των γωνιών  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , που σχηματίζουν μεταξύ τους, ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι και

ορίζουν πλήρως τη στοιχειώδη κυψελίδα. Αντίστοιχα, το σημειακό πλέγμα του κρυστάλλου της πρωτεΐνης είναι δυνατό να ορισθεί με ακρίβεια αν μετατοπιστούν διαδοχικά τα διανύσματα **a, b, c**. Μόλις επτά διαφορετικά είδη στοιχειωδών κυψελίδων χρειάζονται για να καλυφθούν τα δυνατά σημειακά πλέγματα (Πίν. 2), (Εικ. 5).

Ο προσανατολισμός των δικτυωτών επιπέδων μπορεί επίσης να παρασταθεί με βάση το σύστημα που εισήγαγε ο Άγγλος κρυσταλλογράφος Miller. Κάθε εσωτερικό επίπεδο του κρυστάλλου περιγράφεται από τις συντεταγμένες των σημείων όπου τέμνει τους κρυσταλλογραφικούς άξονες. Όταν ένα επίπεδο είναι παράλληλο σε κάποιον κρυσταλλογραφικό άξονα, το σημείο τομής αυτών βρίσκεται στο άπειρο. Προκειμένου να αποφευχθεί η έννοια του απείρου, ο Miller όρισε τους δείκτες *h, k, l* με τέτοιο τρόπο, ώστε οι συντεταγμένες των σημείων τομής του επιπέδου με τους κρυσταλλογραφικούς άξονες να ισοδυναμούν με  $1/h, 1/k, 1/l$  και οι αντίστοιχες αποστάσεις των σημείων τομής από την αυθαίρετα ορισμένη αρχή των αξόνων να είναι  $a/h, b/k, c/l$  (G. Rhodes, 2006).

Σύστημα	Γεωμετρικά χαρακτηριστικά	Πλέγματα Bravais	Παράδειγμα
Κυβικό	$a=b=c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P, I, F	NaCl
Τετραγωνικό	$a=b \neq c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P, I	Zn
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P, I, F, C	Ρομβικό S
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c, \alpha=\gamma=90^\circ, \beta \neq 90^\circ$	P, C	Μονοκλινές S
Τρικλινές	$a \neq b \neq c, \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	P	$K_2Cr_2O_7$
Τριγωνικό/ρομβοεδρικό	$a=b=c, \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	R	$CaCO_3$
Εξαγωνικό	$a=b \neq c, \alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$	P	Γραφίτης, Χαλαζίας

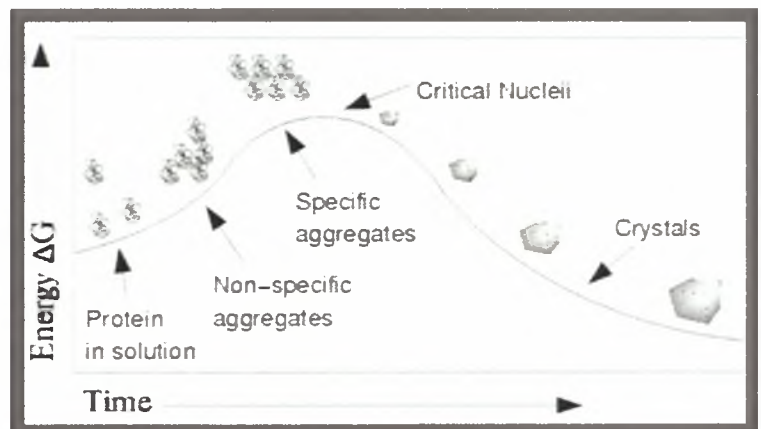
**Πίνακας 2:** Παρουσίαση των επτά κρυσταλλικών συστημάτων και των αντίστοιχων σημειακών πλεγμάτων (πλέγματα Bravais) (Παπιδιάννου, 2004).



**Εικόνα 5:** Χαρακτηριστικά σχήματα κρυσταλλικών δομών

### Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης.

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση δεν αρκεί μόνο να ευνοείται θερμοδυναμικά αλλά απαραίτητη προϋπόθεση είναι και να μπορεί να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα (Εικ.6). Η ενέργεια που απαιτείται για να δημιουργηθεί αυτή η ενεργειακά αναβαθμισμένη μεταβατική κατάσταση,



**Εικόνα 6:** Γράφημα της ελεύθερης ενέργειας σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης.

μέσω της οποίας οδηγούμαστε στα προϊόντα, καλείται ενέργεια ενεργοποίησης και είναι αυτή που καθορίζει την κινητική της χημικής αντίδρασης.

Για να επιτευχθεί κρυστάλλωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού. Η κατάσταση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης οπότε και οδηγούμαστε στη δημιουργία κρυσταλλικού ή άμορφου ιζήματος. Το χημικό δυναμικό κάθε συστατικού είναι ίδιο και για τις δυο φάσεις και δίνεται από την σχέση:

$$\mu_{ic} = \mu_{is} = \mu_{io} + RT \ln \gamma c_i$$

όπου,  $\mu_{ic}$ ,  $\mu_{is}$  και  $\mu_{io}$  είναι τα χημικά δυναμικά στον κρύσταλλο, στο διάλυμα και το πρότυπο δυναμικό αντίστοιχα, ενώ  $\gamma$  είναι η ενεργότητα και  $c$  η συγκέντρωση (Ρακιντζής, 1994).

Η κατάσταση υπερκορεσμού επιτυγχάνεται όταν το χημικό δυναμικό του συστατικού  $i$  στο διάλυμα γίνει μεγαλύτερο απ' ό,τι στον κρύσταλλο, και εκφράζεται με την παράμετρο  $\beta$  η οποία ονομάζεται βαθμός υπερκορεσμού και ορίζεται ως εξής:

$$\beta = c / c_s,$$

όπου  $c$  η συγκέντρωση και  $c_s$  η διαλυτότητα στο συγκεκριμένο διάλυμα. Στα πρωτεϊνικά διαλύματα, που προορίζονται για κρυστάλλωση, ο βαθμός υπερκορεσμού κυμαίνεται συνήθως από 2 έως 10, ενώ για την κρυστάλλωση μικρομορίων είναι τις περισσότερες φορές αρκετά μικρότερος (Mikol & Giege, 1992).

Η κατάσταση υπερκορεσμού μπορεί να διακριθεί σε δυο στάδια: α) **Μετασταθής κατάσταση**, όπου αναπτύσσονται οι ήδη υπάρχοντες κρύσταλλοι αλλά δεν δημιουργούνται νέοι πυρήνες κρυστάλλωσης και β) **Ασταθής κατάσταση**, όπου επιτυγχάνεται η αυθόρμητη δημιουργία πυρήνων και η ανάπτυξή τους.

Κατά την κρυστάλλωση υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να σχηματιστεί ένα άμορφο ίζημα, αντί μιας σαφώς διατεταγμένης κρυσταλλικής δομής. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως όταν η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται με μεγάλη ταχύτητα με αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά μόρια να μην έχουν τον απαιτούμενο χρόνο να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και να διευθετηθούν κατάλληλα (McPherson, 1999).

#### Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Η ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων αποτελεί το σημαντικότερο αλλά και το δυσκολότερο στάδιο στην όλη κρυσταλλογραφική μελέτη, λόγω του μεγάλου



αριθμού των παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξή τους και στην περιορισμένη γνώση που έχουμε για την πορεία ανάπτυξης των κρυστάλλων.

Η μέθοδος που εφαρμόζεται συνήθως είναι αυτή της δοκιμής-σφάλματος (trial-error and method), δοκιμάζοντας τις μέχρι τώρα γνωστές συνθήκες κρυστάλλωσης.



**Εικόνα 7:** Ρομποτικό σύστημα κρυστάλλωσης πρωτεϊνών στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, ΕΙΕ

Σήμερα έχουν επίσης αναπτυχθεί συστήματα ρομποτικής για τη γρηγορότερη ανάλυση, βελτιστοποίηση των συνθηκών αλλά και την ελαχιστοποίηση της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται (Εικ. 7).

**Θερμοκρασία.** Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αταξίας των διαλυμένων μορίων, με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτές μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, εφόσον οι παράμετροι της εντροπίας τείνουν να επικρατήσουν αυτών της ενθαλπίας. Επιπλέον η διηλεκτρική σταθερά μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (McMurry, 2001).

**pH.** Αλλαγές στο pH επηρεάζουν τόσο το διαλύτη, όσο και τη διαλυμένη ουσία. Το pH εκείνο στο οποίο η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει φορτίο ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και η διαλυτότητάς της σ' αυτό είναι η ελάχιστη δυνατή. Παράλληλα σε αυτό το σημείο η πρωτεΐνη διογκώνεται και η ποσότητα του δεσμευμένου νερού ελαχιστοποιείται. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων (McMurry, 2001).

**Άλατα.** Τα άλατα μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους κάποιοι από τους οποίους είναι οι εξής:

1. Είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση μεταξύ ηλεκτρολυτών του ίδιου φορτίου μειώνεται.

2. Μπορούν να σχηματίσουν απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξέα (αργινίνη, λυσίνη, ασπαρτικό, γλουταμικό) στην επιφάνεια των πρωτεϊνών.

3. Δρουν με διπολικές - μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικό δεσμοί, αμινο-, υδροξυ-, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης.

4. Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξέων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών αλάτων (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών) (McMurry, 2001).

**Ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου.** Μόρια όπως η ουρία, το φορμαμίδιο και τα γουανιδινικά άλατα, σε υψηλές συγκεντρώσεις ( $C \geq 4 M$ ) ανταγωνίζονται τους δεσμούς υδρογόνου των μορίων του νερού και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης, δρώντας σαν αποδιατακτικοί παράγοντες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση σταθεροποιούν τους υδροφοβικούς δεσμούς (McMurry, 2001).

**Οργανικοί διαλύτες.** Τροποποιούν τη διηλεκτρική σταθερά προκαλώντας αλλαγές σε διάφορες αλληλεπιδράσεις. Με μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς παρουσιάζεται αύξηση της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ ανόμοιων φορτίων, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το γεγονός ότι οι οργανικοί διαλύτες ορισμένες φορές μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες και οδηγούν σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα (McMurry, 2001).

## Στάδια κρυστάλλωσης

Το πιο σημαντικό ίσως σημείο στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας. Για να είναι ένας κρύσταλλος «καλός» πρέπει να είναι απαλλαγμένος από προσμίξεις, να είναι απόλυτα συμμετρικός και να έχει τρισδιάστατη επαναλαμβανόμενη δομή. Τα σχήματα των κρυστάλλων μπορεί να ποικίλουν, από τέλειους κύβους μέχρι και μακριές λεπτές βελόνες. Ο χρόνος που απαιτείται για να προκύψει ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος (από μερικές εβδομάδες μέχρι και κάποιους μήνες) γι' αυτό απαιτείται συχνά αρκετή προσπάθεια και υπομονή από τον ερευνητή καθώς και συνεχής έλεγχος, εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους (Acharya & Rees, 1997).

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

1. **Πυρήνωση.** Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν συσσωματώματα γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης. Το μέγεθος του συσσωματώματος προσδιορίζει τη συνολική ελεύθερη ενέργεια, η οποία παρουσιάζει μέγιστο όταν σχηματιστεί ο πυρήνας, δηλαδή αποκτήσει κρίσιμο μέγεθος. Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί η ανάπτυξη μιας νέας φάσης στο υπερκορεσμένο διάλυμα, πρέπει το σύστημα να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα το οποίο καλείται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης και ορίζεται ως εξής:

$$\Delta G_g = \{-[KT(4r^3\pi)] / (V\ln\beta)\} + 4r^2\pi\gamma$$

Όπου K: η σταθερά Boltzman,

T: η απόλυτη θερμοκρασία,

r: η ακτίνα του πυρήνα του κρυστάλλου,

V: ο όγκος ενός μορίου στον κρύσταλλο,

β: ο βαθμός υπερκορεσμού και

γ: η διφασική ενέργεια διαλύματος- κρυστάλλου (Kam et al., 1978).

Για να μπορέσει να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα και να αναπτυχθεί ο κρύσταλλος, πρέπει ο βαθμός υπερκορεσμού να είναι αρκετά υψηλός έτσι ώστε το εύρος των ενεργειακών διακυμάνσεων να είναι ικανοποιητικό (Mikol & Giege,

1992). Από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί ένας πυρήνας τότε ξεκινά αυθόρμητα η ανάπτυξή του, ενώ μικρότερα συσσωματώματα τείνουν να διαλυτοποιηθούν (Kam et al., 1978). Ανάλογα με την κρυσταλλική δομή ο πυρήνας αποτελείται από 10 έως 200 μόρια, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για να σχηματιστεί ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες (Blundell & Johnson, 1976).

Η πυρήνωση αποτελεί το πιο κατανοητό στάδιο της κρυστάλλωσης. Η ποιοτική και ποσοτική περιγραφή της μπορεί να γίνει μέσω θερμοδυναμικών εξισώσεων. Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα η πυρήνωση θεωρείται ως μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού συσσωματωμάτων. Δυο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο της πυρήνωσης. Η μία οδηγεί στο σχηματισμό της κρυσταλλικής δομής και η άλλη στη δημιουργία άμορφου ιζήματος (Kam et al., 1978).

2. **Ανάπτυξη πυρήνων.** Μετά το στάδιο της πυρήνωσης αρχίζει η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων με επικάθιση μορίων πρωτεΐνης στους πυρήνες, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η πρωτεϊνική συγκέντρωση του διαλύματος. Μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης αυτής επιτυγχάνεται στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του κρυστάλλου με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς αυτή και να υπάρχει μια διαρκής μεταφορά μάζας (Kam et al., 1978).

Ο ρυθμός εναπόθεσης πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου ορίζεται από το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας:

$$dM/dt = D(dC/dt)_s S,$$

όπου  $(dC/dt)_s$  είναι η βαθμίδα συγκέντρωσης στην επιφάνεια του κρυστάλλου,  $S$  είναι η επιφάνεια της κρυσταλλικής περιοχής και  $D$  ο μέσος συντελεστής διάχυσης. Θεωρώντας ότι η ανάπτυξη προχωράει μέσω σύνδεσης μονομερών, η σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης μπορεί να προσδιοριστεί από τη σχέση:

$$dM/dt = K[C_i(0) - C_i] Sd$$

όπου  $C_i(0)$  είναι η συγκέντρωση στην κατάσταση κορεσμού,  $C_i$  είναι η συγκέντρωση του διαλύματος και  $K$  ο συντελεστής ταχύτητας ανάπτυξης, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός της μορφολογίας του υπό ανάπτυξη κρυστάλλου (Φιλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998). Το στάδιο της ανάπτυξης των

κρυστάλλων μπορεί να μελετηθεί με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας υπεριώδους ακτινοβολίας (Kam et al., 1978).

**Αναστολή της ανάπτυξης.** Με βάση το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας, αν ο μέσος συντελεστής διάχυσης  $D$  είναι μεγαλύτερος του συντελεστή ταχύτητας ανάπτυξης  $K$ , τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Δεδομένου ότι τα συστήματα κρυστάλλωσης είναι συνήθως κλειστά, δηλαδή δεν μπορεί να προστεθεί πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Με βάση διάφορα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει παρατηρηθεί ότι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, η αναστολή της ανάπτυξης των κρυστάλλων δεν είναι αποτέλεσμα της εξάντλησης της περιεχόμενης στο διάλυμα πρωτεΐνης. Η αναστολή της ανάπτυξης οφείλεται στη μεταβολή κάποιων ιδιοτήτων της επιφάνειας του κρυστάλλου (Kam et al., 1978). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται δηλητηρίαση των επιφανειακών κέντρων σύνδεσης και προκαλείται είτε λόγω της εναπόθεσης προσμίξεων στα κέντρα αυτά, είτε λόγω της αδρανοποίησης της επιφάνειας των κρυστάλλων. Η ύπαρξη ξένων σωματιδίων, τα οποία λειτουργούν ως κέντρα σύνδεσης, επιταχύνουν τη διαδικασία της πυρήνωσης και γι' αυτό το λόγο η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό καθαρότητας. Αποτέλεσμα της ύπαρξης προσμίξεων είναι να αναπτύσσονται γρηγορότερα οι κρύσταλλοι, οι οποίοι όμως είναι μικρότερου μεγέθους, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό (Blundell & Johnson, 1976).

### Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των μακρομορίων (Πίν. 3).

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
Θερμοκρασία/διακυμάνσεις	pH	Καθαρότητα
Θερμοκρασίας	Είδος παράγοντα καθίζησης	Επίδραση προσδέτη
Μεθοδολογία/τρόπος προσέγγισης της ισορροπίας	Συγκέντρωση παράγοντα καθίζησης	Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
Βαρύτητα	Ιοντική ισχύς	Μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις
Πίεση	Ειδικά ιόντα	Πηγή
Χρόνος	Βαθμός υπερκορεσμού	Πρωτεόλυση /υδρόλυση
Δονήσεις/ήχος/μηχανική διαταραχή	Αναγωγικό /οξειδωτικό περιβάλλον	Χημική τροποποίηση
Ηλεκτρικό/μαγνητικό πεδίο	Συγκέντρωση πρωτεΐνης	Γενετικές τροποποιήσεις
Διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου	Μεταλλικά ιόντα	Συμμετρία
Ιξώδες (viscosity)	Σταυροδεσμοί	Σταθερότητα
Κατάσταση ισορροπίας	Επιφανειοδραστικές ουσίες/αμφολύτες	Ισοηλεκτρικό σημείο
Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων κρυστάλλωσης	Προσμίξεις	Ιστορικό δείγματος

**Πίνακας 3:** Παρουσίαση φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών (McPherson, 1997).

Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την πιθανότητα εμφάνισης κρυστάλλων, το ρυθμό και την πιθανότητα εμφάνισης πυρήνων κρυστάλλωσης, το ρυθμό ανάπτυξης των κρυστάλλων καθώς και το μέγεθος και την ποιότητα τους. Μεγάλη σημασία έχουν το pH και οι συγκεντρώσεις των αλάτων και των παραγόντων κατακρήμισης. Ένας ακόμη καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη κρυστάλλων είναι η συγκέντρωση του μακρομορίου, η οποία μπορεί να ποικίλει από 2mg/ml έως και 100mg/ml.

Κάποιοι παράμετροι μπορεί να μην είναι τόσο σημαντικοί αλλά να παίζουν καθοριστικό ρόλο σε ορισμένες περιπτώσεις. Τέτοιοι σχετικοί παράγοντες είναι, η παρουσία ή απουσία προσδέτη ή αναστολέα, η ποικιλία αλάτων ή ρυθμιστικών διαλυμάτων, η τεχνική που χρησιμοποιείται για την επίτευξη της ισορροπίας, η

Θερμοκρασία και η παρουσία απορρυπαντικών. Παράμετροι με κάπως μικρότερη σημαντικότητα είναι η βαρύτητα, τα ηλεκτρικά, μαγνητικά πεδία και το ιξώδες. Γενικά, δε μπορεί να προβλεφθεί ποιος από αυτούς τους παράγοντες θα είναι σπουδαιότερος για ένα μακρομόριο και η επίδραση καθενός θα πρέπει να καθοριστεί από μια σειρά εμπειρικών δοκιμών.

Ένα ενδιαφέρον πρόβλημα είναι ποια επιπλέον συστατικά ή σύμπλοκα υπάρχουν στο μητρικό διάλυμα εκτός από το διαλύτη, την πρωτεΐνη και τον παράγοντα καθίζησης. Οι πιθανότεροι τελεστές είναι αυτοί, οι οποίοι διατηρούν την πρωτεΐνη σε απλή, ομογενής και αμετάβλητη κατάσταση. Αναγωγικοί παράγοντες όπως η γλουταθειόνη ή η β-μερκαπτοαιθανόλη χρησιμεύουν στο να διατηρούν τις σουλφυδρυλικές ομάδες και να αποτρέπουν την οξειδωση. Το EDTA και το EGTA είναι αποτελεσματικά στο να προστατεύουν την πρωτεΐνη από βαριά μεταλλικά ιόντα. Ο αποκλεισμός τέτοιων παραγόντων χρειάζεται συνήθως όταν η διαδικασία της κρυστάλλωσης διαρκεί μεγάλο διάστημα μέχρι την ολοκλήρωσή της. Όταν η ανάπτυξη των κρυστάλλων γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου θα πρέπει να ληφθεί μέριμνα για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων, γιατί συνήθως εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία καταστρέφουν την πρωτεΐνη.

Σε πολλές περιπτώσεις, η ύπαρξη στο διάλυμα υποστρώματος, συνενζύμου ή αναστολέα, συμβάλλει στην πιο συμπαγή και σταθερή στοίβαξη του ενζύμου. Έτσι, σε ένα πληθυσμό μακρομορίων μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερος βαθμός δομικής ομοιογένειας και μικρότερο επίπεδο στατιστικής απόκλισης, αναμειγνύοντας την πρωτεΐνη με ένα φυσικό προσδέτη της πριν την κρυστάλλωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα σύμπλοκα μιας πρωτεΐνης με τον προσδέτη της μπορεί να έχουν τελείως διαφορετική φυσική συμπεριφορά και να θεωρούνται, από κρυσταλλογραφικής απόψεως, σαν ξεχωριστό πρόβλημα. Τα σύμπλοκα ενδεχομένως να δίνουν επιπλέον πιθανότητες για ανάπτυξη κρυστάλλων εάν η φυσική πρωτεΐνη είναι διαθλαστική με υποστρώματα, συνένζυμα και αναστολείς. Εξ' άλλου, τέτοια σύμπλοκα συγκεντρώνουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον και από τη βιοχημική σκοπιά.

Περιστασιακά, έχει παρατηρηθεί ότι κάποια ιόντα μετάλλων προάγουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Συνήθως, αυτά τα ιόντα είναι

επίσης απαραίτητα και για την δραστικότητα των πρωτεϊνών και συνεισφέρουν στη διατήρηση κάποιων δομικών χαρακτηριστικών του μορίου. Σε άλλες περιπτώσεις ωστόσο, τα μεταλλικά ιόντα φαίνεται να προωθούν την ανάπτυξη κρυστάλλων χωρίς να παίζουν κάποιο γνωστό ρόλο στη δραστικότητα των μακρομορίων και πιθανότατα, συμβάλλουν σαν συζευκτικοί παράγοντες. (McPherson, 2004).

### Ο Διαλύτης συγκρυστάλλωσης

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

### Παράγοντες καθίζησης

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

1. Άλατα (π.χ. θειικό αμμώνιο)
2. Οργανικοί διαλύτες (π.χ. αιθανόλη)
3. Πολυαιθυλενογλυκόλες

Εάν τοποθετήσουμε μια καθαρή πρωτεΐνη σε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος τότε αυτή θα υποστεί εξαλάτωση. Αυτό σημαίνει πρακτικά ότι θα μειωθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης επειδή τα μόρια του νερού, που υπό άλλες συνθήκες θα



συνδέονταν στην επιφάνεια της και θα τη διαλυτοποιούσαν, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μικρά ιόντα του άλατος. Αν η συγκέντρωση των ιόντων γίνει αρκετά μεγάλη, τότε τα μακρομόρια εξουδετερώνουν τα επιφανειακά τους φορτία αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους. Τα δισθενή ή τρισθενή ιόντα σχηματίζουν πιο εύκολα δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού και επομένως είναι περισσότερο αποτελεσματικά (McPherson, 1999).

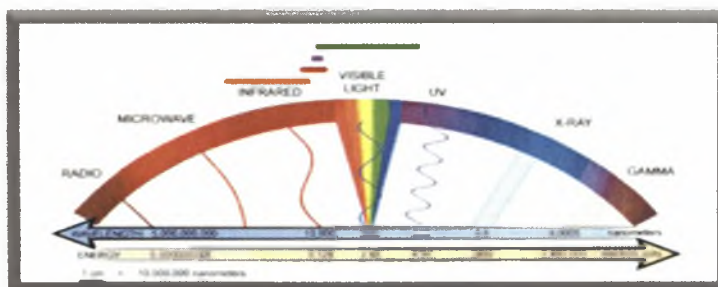
Παρόμοια δράση με τα άλατα έχουν και οι οργανικοί διαλύτες. Τα μόριά τους ενώνονται με τα μόρια του νερού και μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την καθίζηση των πρωτεϊνών ή την κρυστάλλωσή τους. Φυσικά, η χρήση των οργανικών διαλυτών απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί πολλές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

## 2.2 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

### Ακτίνες X (Röntgen)

Η μελέτη των κρυσταλλικών δομών γίνεται με τη βοήθεια των ακτίνων X. Οι ακτίνες X αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 100-0.1 Å (Εικόνα 8) και ανακαλύφθηκαν το 1895 από τον Wilhelm Conrad Röntgen. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X βασίζεται στο φαινόμενο της περίθλασης ακτίνων X από τα διάφορα επίπεδα που ορίζονται από τις θέσεις των συστατικών των κρυσταλλικών σωμάτων. Έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες συσκευές και μεθοδολογίες (XRD: X-ray Diffraction) που έχουν τη δυνατότητα να ταυτοποιούν, να μετρούν και να υπολογίζουν τις σταθερές του πλέγματος των κρυσταλλικών σωμάτων από την περίθλαση ακτίνων X (Rhodes, 2006).

Το ερώτημα που γεννάται είναι γιατί γίνεται χρήση ακτίνων-X για να επιτευχθεί ατομική



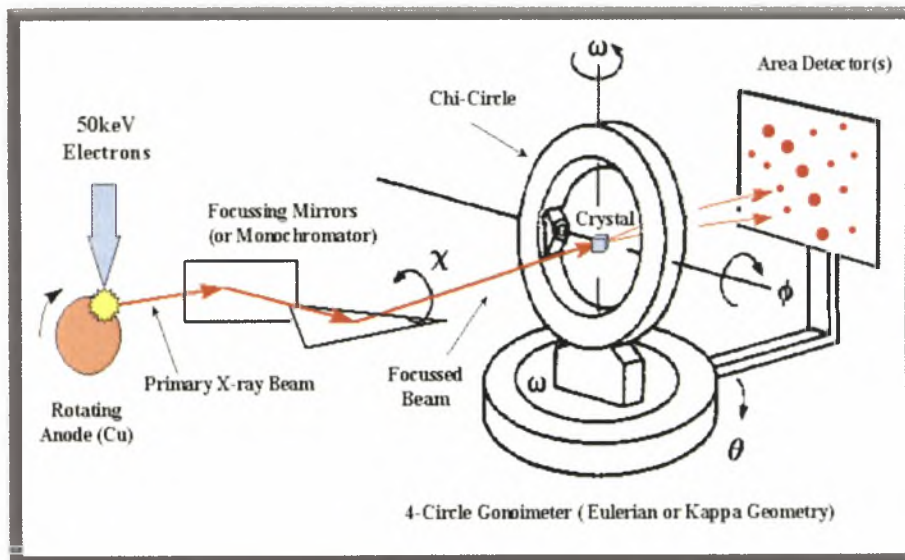
ευκρίνεια. Ένα μήκος κύματος

**Εικόνα 8:** Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

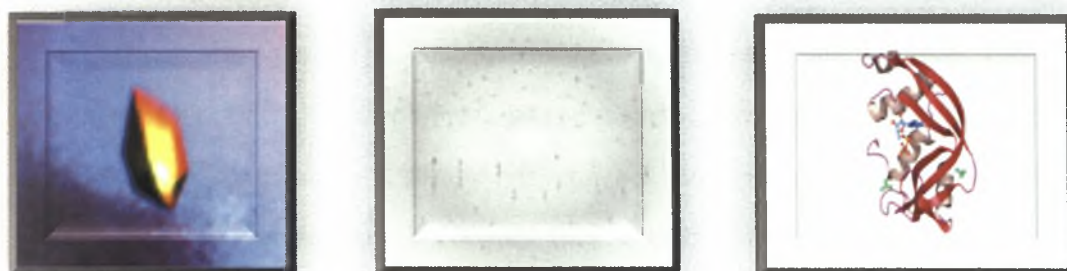
περιγράφεται πλήρως από το πλάτος, τη φάση και τη διεύθυνση διάδοσης. Η μέση απόσταση μεταξύ των ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων στα πρωτεϊνικά μόρια είναι περίπου 1.4 Å. Για να επιτύχουμε λοιπόν ατομική ευκρίνεια είναι απαραίτητη ακτινοβολία με διαστάσεις μήκους κύματος ανάλογο με τις διαστάσεις αυτές. Το ορατό φως είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκη κύματος μεταξύ 400-700nm, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διακρίνει τα άτομα στις πρωτεΐνες (Εικ. 8) (Rhodes, 2006).

## Πηγές ακτίνων Χ και ανιχνευτές

Το πείραμα περίθλασης ακτίνων Χ από κρυστάλλους απαιτεί δύο κύρια όργανα, την πηγή και τον ανιχνευτή ακτίνων Χ. Στην εικόνα παρουσιάζεται η διάταξη κατά το πείραμα της περίθλασης ακτίνων Χ από κρυστάλλους (Εικ. 9). Η πηγή ακτίνων Χ εκπέμπει δέσμη ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο (κρυσταλλικό πλέγμα). Ο κρύσταλλος περιθλά ακτινοβολία ίσου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τη βοήθεια του ανιχνευτή καταγράφεται το περιθλασίγραμμα, στο οποίο εντοπίζονται οι κηλίδες έντασης των περιθλάσεων και τελικά με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων βρίσκουμε τη δομή της πρωτεΐνης (Εικ. 10). (Rhodes, 2006).



**Εικόνα 9:** Παρουσίαση της διάταξης κατά το πείραμα της περίθλασης των ακτίνων Χ.



**Εικόνα 10:** Από τον κρύσταλλο, στο περιθλασίγραμμα και κατόπιν στην πρωτεΐνη.

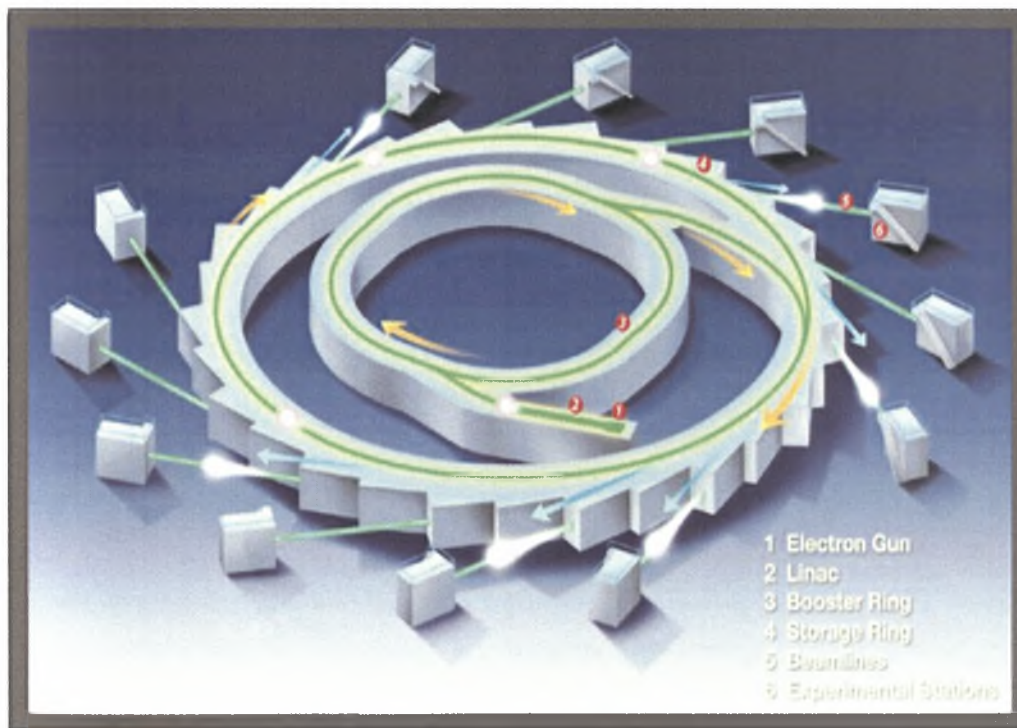
Σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως δύο είδη πηγών ακτινοβολίας Χ, οι συμβατικές πηγές που ελευθερώνουν ακτινοβολία μετά από την επιτάχυνση ηλεκτρονίων (εντός ηλεκτρικού πεδίου) την πρόσκρουση τους σε κάποιο μεταλλικό υλικό (συνήθως Cu ή Mo) και τη μετάπτωση των ηλεκτρονίων του μετάλλου και οι συγχροτρονικές πηγές όπου επιταχυντές σωματιδίων (ηλεκτρονίων, ποζιτρονίων) αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται σχεδόν με ταχύτητα του φωτός και τα οποία αποδίδουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατά την αλλαγή της κατεύθυνσης τους. Οι πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας είναι μεγάλες εγκαταστάσεις με δακτυλίους κίνησης των σωματιδίων διαμέτρου από 10 έως μερικές εκατοντάδες μέτρα (Εικ.11). Τα ηλεκτρόνια (ποζιτρόνια) διατηρούνται σε μία κυκλική τροχιά με τη βοήθεια ισχυρών μαγνητών. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μαγνητικών πεδίων στους δακτυλίους αποθήκευσης σωματιδίων: οι μαγνήτες κλίσης, που αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται σε κυκλική τροχιά και άλλες τρεις συσκευές, που επεκτείνουν και ενισχύουν το φάσμα σε μικρότερα μήκη κύματος χωρίς να προκαλούν καθαρή μετατόπιση από την κυκλική τροχιά π.χ. σύστημα μετατόπισης μήκους κύματος (Rhodes, 2006)

Το κύριο πλεονέκτημα της συγχροτρονικής ακτινοβολίας είναι η έντασή της που είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από αυτή των συμβατικών πηγών. Η ισχυρή ακτινοβολία χρησιμοποιείται για κρυσταλλικά δείγματα που περιθλούν ασθενώς, όπως μικροί κρύσταλλοι ή κρύσταλλοι με μεγάλη μοναδιαία

κυψελίδα. Επίσης, λόγω της χαμηλής απόκλισης (divergence) της ακτίνας οι κηλίδες είναι πιο διακριτές

Μία άλλη διαφορά των πηγών συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις συμβατικές πηγές είναι η δυνατότητα που προσφέρουν για ρύθμιση του μήκους κύματος (tunability). Οποιοδήποτε μήκος κύματος από την περιοχή του υπέρυθρου μέχρι αυτή των ακτίνων Χ μπορεί να επιλεγεί. Αυτή η δυνατότητα χρησιμοποιείται σε πειράματα ανώμαλης σκέδασης από ακτίνες πολλαπλών μηκών κύματος. Συνήθως επιλέγονται ακτίνες Χ μήκους κύματος  $1 \text{ \AA}$  ή ακόμα και μικρότερου μήκους κύματος με αποτέλεσμα τον περιορισμό απωλειών λόγω της απορρόφησης από τον αέρα κατά την πορεία της ακτίνας αλλά και εντός του κρυστάλλου, περιορίζοντας και την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος του κρυστάλλου (Rhodes, 2006).

Ο προσδιορισμός της δομής μίας πρωτεΐνης (ή ενός μακρομορίου) με περίθλαση ακτίνων Χ απαιτεί την καταγραφή όλων (ή ενός μεγάλου ποσοστού) των



**Εικόνα 11:** Διάγραμμα ενός επιταχυντή ηλεκτρονίων απ' όπου παράγονται ισχυρές δέσμες ακτίνων-Χ.

σκεδαζόμενων ακτινών. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει όλα τα κρυσταλλικά σημεία του αντίστροφου πλέγματος να βρεθούν σε κατάσταση περίθλασης, δηλαδή εντός σφαίρας ακτίνας  $1/\lambda$ , με περιστροφή του κρυστάλλου. Έτσι, ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα απαιτεί τις ακόλουθες συσκευές:

1. Το μηχανισμό περιστροφής του κρυστάλλου
2. Μία συσκευή μέτρησης της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας.

Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή των δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αρχικά η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ, ενώ σήμερα χρησιμοποιούνται συστήματα που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή, αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου (Dreath, 2002).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Υλικά		
Άγαρ	sodium salt	ProteinMarkers(New England Biolabs)
Αγαρόζη (Sigma)	DTT (Sigma)	Ressource S (Pharmacia)
Ακρυλαμίδιο	EDTA (Serva)	Rnase-free water (Biochemica)
Αμπικιλίνη- Ampicillin (Sigma)	GDP	TEMED
APS	Guanidine hydrochloride	Tris (Sigma)
ATP (Sigma)	GSH	Triton-X 100
Βενζονάση	GSSG	Yeast tRNA(Sigma)
Bacto-Thryptone (Sigma)	Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης	Φίλτρα υπερδιήθησης Amicon ultra 10 MWCO (Millipore)
Bacto yeast Extract (Sigma)	IPTG (Sigma)	
Bradford Reagent (Sigma)	Καρβεσιλίνη (Sigma)	
Bovine Pancreatic Ribonouclease A (Sigma)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
BSA	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
Γλυκερόλη	Λυσοζύμη	
Γλυκόζη (Sigma)	L-arginine	
Coommassie Blue (Sigma)	Lanthanum Nitrate	
C>p (cytidine 2'3' cyclic) monophosphate (Sigma)	2mercaptoethanol (Serva)	
Deoxycholic acid	MgCl <sub>2</sub> (Sigma)	
	MES	
	NaCl (Sigma)	
	Perchloric acid	
	Proteinase inhibitor: Complete (Roche)	



## 2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Αποστειρωμένα σιφώνια των 5, 10, 25, 50 ml

Αποστειρωμένοι σωλήνες erpendorf (1,5 ml) και σωλήνες falkon (15, 50 ml)

Αποστειρωμένα τρυβλία

Επωαστήρας ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας

Ζυγός ακριβείας

Ηλεκτρόδιο μέτρησης pH Metrohm 744

Θερμοστατούμενο φασματοφωτόμετρο UV/VIS (Hitachi U2000)

Καλυπτρίδες

Κλίβανος αποστείρωσης

Κυψελίδες, Hellma QS (Hellma Germany)

Μικροφυγόκεντρος για σωλήνες erpendorf

Πιπέττες ακριβείας Gilson

Πλαστικές κυψελίδες φωτομέτρου

Plates κρυσταλλώσεων

Στήλες χρωματογραφίας (Sigma, Amersham Biosciences)

Συσκευή ανάδευσης καλλιιεργειών (shaker)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (BIO RAD)

Συσκευή ήπιας ανάδευσης (roller)

Συσκευή παραγωγής υπερήχων

Συσκευή παρασκευής πάγου

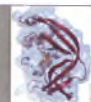
Συσκευή vortex

Σύστημα χρωματογραφίας που περιλαμβάνει αντλία, συσκευή συλλογής κλασμάτων (fraction collector) και ανιχνευτή υπεριώδους (Biorad UV econo)

Υδατόλουτρο

Φασματοφωτόμετρο Curry 100

Φυγόκεντρος Sorvall, RC5-C (Sorvall, USA)

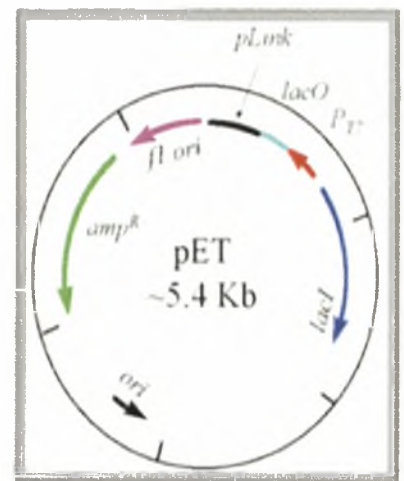


### 3. Πλασμιδιακοί φορείς

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά μόρια DNA τα οποία έχουν την ικανότητα να αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή. Τα πλασμίδια όμως για να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ανασυνδυασμένου DNA πρέπει να έχουν κάποιες βασικές ιδιότητες:

- Μικρό μέγεθος
- Σημείο έναρξης της αντιγραφής (*ori C*)
- Γονίδια δείκτες (*selectable genetic markers*) που συνήθως είναι γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Έτσι επιτυγχάνεται η επιλογή των κυττάρων που περιέχουν το ανασυνδυασμένο DNA.
- Περιοχή κατάλληλη για την εισαγωγή ξένου DNA, η οποία συνήθως αποτελείται από μια αλληλουχία DNA που περιέχει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ονομάζεται πολυσύνδεσμος (*polylinker* ή *multiple cloning site*).
- Στη περίπτωση που ο φορέας θα χρησιμοποιηθεί και για την έκφραση του γονιδίου τότε το πλασμίδιο περιέχει επιπρόσθετα 3 ακόμα περιοχές που κωδικοποιούν α) τον υποκινητή (*P*), β) τον χειριστή (*O*) και γ) τον καταστολέα (*I*) του υποκινητή ο οποίος συνδέεται στον χειριστή και ρυθμίζει τον υποκινητή.

Στην παρούσα εργασία επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε τον pET11c πλασμιδιακό φορέα της εταιρείας Novagen για τη κλωνοποίηση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, ο οποίος αποτελείται από ένα γονίδιο *lacI* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη καταστολέα *lac*, τον T7 υποκινητή που είναι αποκλειστικά ειδικός για την T7 RNA πολυμεράση (μη βακτηριακή) και η οποία δεν εντοπίζεται στο βακτηριακό γονιδίωμα, τον χειριστή *lac* που μπορεί να εμποδίζει τη μεταγραφή, τον πολυσύνδεσμο, τον παράγοντα



Εικόνα 1 Ο pET πλασμιδιακός φορέας.

f1 (origin of replication) και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι ενσωματωμένο στην περιοχή του πολυσυνδέσμου.

#### 4. Η *E. Coli* ως κύτταρο ξενιστής για την έκφραση της EDN

Η *E. coli* είναι ένας δυνητικά αναερόβιος, χημειοετερότροφος, αρνητικός κατά Gram βάκιλος και ανήκει στην φυσική χλωρίδα του εντέρου. Πρόκειται για μεσόφιλο βακτήριο με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C, το οποίο απαιτεί στο περιβάλλον ανάπτυξης του την παρουσία οργανικών ενώσεων ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, όπως επίσης άζωτο, θείο και άλατα.

Η *E. Coli* είναι το συνηθέστερο βακτηριακό είδος που χρησιμοποιείται για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, λόγω των παρακάτω πλεονεκτημάτων: α) ευκολία καλλιέργειας και χειρισμού με οικονομικό εργαστηριακό εξοπλισμό, β) διαθεσιμότητα ποικίλων συμβατών φορέων DNA και στελεχών-ξενιστών για τη βελτιστοποίηση της έκφρασης ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες, γ) δυνατότητα τροποποίησης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για την παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Το κύριο μειονέκτημα χρήσης της *E. coli* είναι η απουσία μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων στα κύτταρα αυτά.

##### 4.1 Βακτηριακά στελέχη *E. coli*

Στο εμπόριο διατίθενται πάρα πολλά διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *E. coli*, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις ιδιότητες που τους έχουν προσδώσει οι κατασκευαστές τους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη:

#### 4.1.1 Βακτηριακό στέλεχος B834

Το βακτηριακό στέλεχος B834 που χρησιμοποιήσαμε έχουν το εξής γονιδίωμα:

F<sup>-</sup>omp T hsdS<sub>B</sub>(r<sub>b</sub><sup>-</sup>m<sub>b</sub><sup>-</sup>) gal dcm met (DE3) p LysS (cam<sup>R</sup>)

#### 4.2 Καλλιέργεια *E. coli*

Με τον όρο καλλιέργειες κυττάρων εννοούμε την ανάπτυξη μεγάλων πληθυσμών κυττάρων σε συγκεκριμένες συνθήκες. Συνήθως ενδιαφέρει η ανάπτυξη καλλιεργείων ενός μόνο τύπου κυττάρου, δηλαδή η ανάπτυξη ομοιογενών καλλιεργείων που δεν περιέχουν άλλα κύτταρα εκτός από αυτά που μας ενδιαφέρουν. Τέτοιες καλλιέργειες ονομάζονται αξενικές και για την ανάπτυξή τους απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες. Αυτό προϋποθέτει ότι ο χώρος εργασίας, καθώς επίσης και όλα τα σκευή και υλικά είναι αποστειρωμένα (χρησιμοποιείται λύχνος Bunsen και όλα τα διαλύματα αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο).

Στις εργαστηριακές καλλιέργειες μας ενδιαφέρει η εκθετική φάση (φάση όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά και θεωρούνται μεταβολικώς ενεργά), για την παραγωγή όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης, η οποία για την *E. coli* αντιστοιχεί σε OD= 0,6-0,8. Ο προσδιορισμός της φάσης στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια γίνεται με φασματοφωτομέτρηση στα 600 nm, όπου μετρίεται σε ειδική κυψελίδα η οπτική πυκνότητα 1 ml καλλιέργειας. Ο εμβολιασμός όλων των καλλιεργείων γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η επώαση στους 37 °C.

#### 4.2.1 Θρεπτικά υλικά για τις καλλιέργειες

Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό, όπου για την *E. coli* είναι το T. B. medium (Terrific Broth). Για την παρασκευή 1L θρεπτικού υλικού ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- α. Διαλύουμε σε 800ml ddH<sub>2</sub>O 12g Tryptone και 24g Yeast Extract
- β. Προσθέτουμε 4ml glycerol και συμπληρώνουμε μέχρι τα 900ml.
- γ. Διαλύουμε σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O 12,54gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 2,31gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- δ. Αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα.

Για την παρασκευή τρυβλίων LB-άγαρ φτιάχνεται διάλυμα η σύσταση του οποίου είναι: 1% w/v bacto-tryptone, 1% w/v NaCl, 0,5% w/v yeast extract, και 1,5 %w/v άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο οπότε διαλύεται και το άγαρ. Στη συνέχεια αφήνεται να χαμηλώσει η θερμοκρασία του (θερμοκρασία <60 °C), προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικών και μοιράζεται σε αποστειρωμένα τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία αφήνονται να ψυχθούν και να στερεοποιηθούν και αποθηκεύονται ανεστραμμένα (για ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού) στους του 4 °C. Στο πείραμά μας, χρησιμοποιήσαμε ως αντιβιοτικό στο στρώσιμο του τρυβλίου, το αντιβιοτικό καρβεσιλίνη (Crb).

#### 4.2.2 Επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας με χρήση αντιβιοτικών

Άλλη μέθοδος αποφυγής επιμόλυνσεων αλλά και ο πιο διαδεδομένος τρόπος επιλογής μετασχηματισμένων βακτηρίων είναι η προσθήκη αντιβιοτικών στις καλλιέργειες. Έτσι εξασφαλίζεται η ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων βακτηρίων, καθώς η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά προσδίδεται συνήθως με την ύπαρξη κατάλληλων γονιδίων στο πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε. Η ποσότητα και το είδος του αντιβιοτικού που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το βακτηριακό στέλεχος και τον τύπο του πλασμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί. Τα αντιβιοτικά

ταξινομούνται σε κατηγορίες βάση του τρόπου με τον οποίο δρουν και οι οποίοι είναι:

- Παρεμποδίζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος
- Καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη
- Παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση
- Παρεμποδίζουν τη σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε τα αντιβιοτικά:

### **Αμπικιλλίνη (Amp)**

Είναι αντιβιοτικό που ανήκει στη κατηγορία των β-λακταμών και δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Η στρατηγική που ακολουθούν τα ανθεκτικά στελέχη για την επιβίωσή τους είναι η απενεργοποίηση του αντιβιοτικού μέσω της παραγωγής του ενζύμου β-λακταμάση, η οποία εκκρίνεται στον περιπλασμικό χώρο και καταλύει την υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου του μορίου της αμπικιλλίνης. Το γονίδιο bla που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση βρίσκεται στα πλασμίδια που χρησιμοποιηθήκαν έτσι μετά από ένα μετασχηματισμό σε τρυβλίο που περιέχει amp επιβιώνουν μόνο τα κύτταρα *E. coli* που περιέχουν τα πλασμίδια αυτά.

### **Καρβενισιλίνη (Crb)**

Είναι συνθετικό ανάλογο της αμπικιλλίνης και ανήκει στη κατηγορία των β-λακταμών

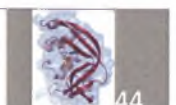
### Παρασκευή διαλυμάτων:

Συνήθως φτιάχνονται διαλύματα αντιβιοτικών συγκεκριμένης συγκέντρωσης (είτε σε απιονισμένο νερό είτε σε αιθανόλη ανάλογα με το αντιβιοτικό), αποστειρώνονται με διήθηση μέσω φίλτρου μεγέθους πόρων 0,22 μm και αποθηκεύονται στους -20 °C (stock solutions). Τα αντιβιοτικά προστίθενται σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό ακριβώς πριν τον εμβολιασμό. Για το πείραμά μας, παρασκευάσαμε διαλύματα stock με συγκέντρωση 50mg/ml.

## 5. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Μετασχηματισμός ονομάζεται η διαδικασία εισαγωγής γενετικού υλικού σε ζωντανά προκαρυωτικά κύτταρα και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία της τεχνολογίας του ανασυνδυσμένου DNA. Κατά την διαδικασία αυτή ανασυνδυασμένα μόρια DNA εισάγονται σε κύτταρα ξενιστές, συνήθως βακτηριακά (*E. coli*), και πολλαπλασιάζονται εντός των κυττάρων δημιουργώντας ένα σημαντικό αριθμό από αντίγραφα που μεταφέρουν το τμήμα του DNA που κλωνοποιήθηκε. Επίσης όταν τα κύτταρα ξενιστές (*E. coli*) διπλασιάζονται, περνούν και στην επόμενη γενεά αντίγραφα του ανασυνδυσμένου DNA. Μετά από πολλές διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις δημιουργούνται κλώνοι κυττάρων οι οποίοι περιέχουν το καθένα τουλάχιστον ένα μόριο ανασυνδυσμένου DNA.

Στην παρούσα εργασία ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τοποθέτηση μικρής ποσότητας του πλασμιδιακού φορέα (2μl) σε βακτηριακά κύτταρα B834, τα οποία τα αφήνουμε στον πάγο για 1/2h. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού, μεταφέρουμε τα κύτταρα και το πλασμίδιο στη συσκευή heat-block στους 42°C για 35 δευτερόλεπτα.



## 6. Έκφραση και παραγωγή της EDN

Κατά την πορεία έκφρασης και απομόνωσης μιας πρωτεΐνης, τα βασικά σημεία που πρέπει να καθοριστούν πριν από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα είναι:

1. Οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας (θερμοκρασία, αερισμός, θρεπτικό υλικό, διάρκεια επώασης )
2. Η συγκέντρωση IPTG που απαιτείται κατά την επαγωγή καθώς επίσης και θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η επαγωγή

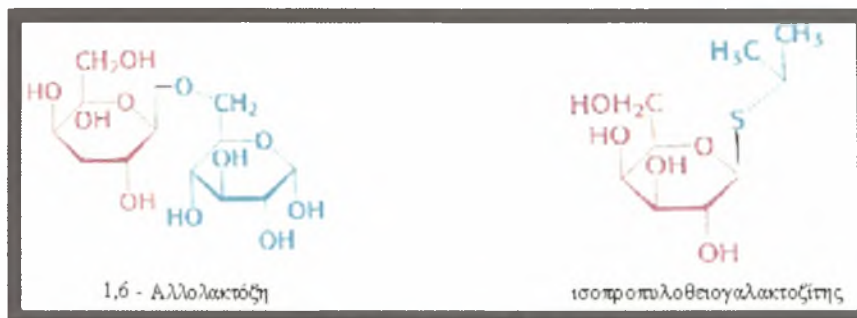
Επίσης πριν από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα, γίνεται διερεύνηση ως προς τον εντοπισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης στο διαλυτό ή στο αδιάλυτο κλάσμα, καθώς επίσης και αν αλληλεπιδρά με άλλα κυτταρικά συστατικά

Αρχικά λοιπόν γίνεται μια προκαταρκτική ανάλυση των επιπέδων και συνθηκών έκφρασης σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Βάσει των αποτελεσμάτων, σχεδιάζεται η πορεία καθαρισμού της πρωτεΐνης ελέγχοντας την αποτελεσματικότητα διαφόρων μεθόδων. Στη συνέχεια εφαρμόζεται η τελική πορεία καθαρισμού σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας, έτσι ώστε να ληφθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα δραστικής πρωτεΐνης σε σχετικά καθαρή μορφή. Για το σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου καθαρισμού πρέπει να γνωρίζουμε τη μετέπειτα χρήση της πρωτεΐνης, καθώς διαφορετικά επίπεδα καθαρότητας απαιτούνται για διαφορετικές χρήσεις π.χ. απαιτείται καθαρότητα 95-99% για μεθόδους κρυσταλλογραφίας ενώ καθαρότητα <95% είναι αρκετή για παραγωγή αντισώματος, κινητικές μελέτες κ.α. Συνήθως απαιτούνται πάνω από ένα στάδια για την επίτευξη του επιθυμητού επιπέδου καθαρότητας. Όμως σε κάθε στάδιο παρατηρείται απώλεια μέρους της πρωτεΐνης επειδή η απόδοση κάθε μεθόδου δεν αγγίζει ποτέ 100%, επομένως μια πορεία καθαρισμού θα πρέπει να σχεδιαστεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να περιλαμβάνει όσο το δυνατόν λιγότερα στάδια. Επίσης οι τεχνικές θα πρέπει να εφαρμοστούν σε λογική σειρά ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ανάγκη ενδιάμεσων σταδίων προσαρμογής των συνθηκών του δείγματος.



## 6.1 Επαγωγή

Στην παραγωγή EDN χρησιμοποιήθηκε σαν επαγωγέας η ένωση IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης) διότι εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη (Εικ. 2) και επιπλέον μιας και δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου, δεν καταβολίζεται εξασφαλίζοντας έτσι συνεχή επαγωγή.



**Εικόνα 2:** Η χημική δομή της 1,6-αλλολακτόζης και του ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτη

Κλασικά πειράματα της δεκαετίας του 1960 από το εργαστήριο του Monod έδειξαν ότι η δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης μπορεί να αποκατασταθεί σε ένα βακτήριο αν υπάρχουν δύο μεταλλαγμένα αντίγραφα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, που φέρουν μεταλλάξεις σε διαφορετικές επικράτειες του ενζύμου, παρόλο που το κάθε γονίδιο ξεχωριστά κωδικοποιεί β-γαλακτοσιδάση χωρίς ενζυμική δραστηριότητα.

Εναλλακτικά, όταν συνδυαστεί ένα γονίδιο που κωδικοποιεί το ενζυμικά ανενεργό αμινοτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης (α-τμήμα) με ένα άλλο γονίδιο που κωδικοποιεί το επίσης ενζυμικά ανενεργό καρβοξυτελικό άκρο της β-γαλακτοσιδάσης (ω-τμήμα) στο ίδιο κύτταρο *E. coli*, τότε παράγεται δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης. Πολλοί φορείς κλωνοποίησης φέρουν την αλληλουχία που κωδικοποιεί το α-τμήμα (επίτοπος *lacZα*) γιατί το τμήμα αυτό είναι μικρό και έτσι όταν ο φορέας αυτός εισέλθει σε βακτήριο που εκφράζει το ω-τμήμα τότε παράγεται β-γαλακτοσιδάση. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται άλφα συμπληρωματικότητα (Sambrook et al., 2001).

### Πειραματική διαδικασία:

1. Λαμβάνεται μια μονή αποικία των επιθυμητών κυττάρων από φρέσκο τρυβλίο που αποθηκεύεται στους 4 °C και εμβολιάζεται κατάλληλη ποσότητα LB / αντιβιοτικού Crb ( $c=0,4\text{mg/ml}$ ) σε ασηπτικές συνθήκες.
2. Η μικρή καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C ολονύκτια, υπό ανάδευση (στο shaker) στις 250 rpm.
3. Η μικρή καλλιέργεια αραιώνεται 1:100 σε κατάλληλη ποσότητα TB / αντιβιοτικού Amp ( $c=0,4\text{mg/ml}$ ), σε 1L (αν πρόκειται για παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα) και επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση στις 250 rpm, μέχρι η  $OD_{600\text{nm}}$  να πάρει την τιμή 0,6-0,8 (αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης για την *E. coli*). Στο πείραμά μας, μετά από 3h, πήραμε τιμή  $OD_{600\text{nm}}=0,750$ .
4. Προστίθεται ο επαγωγέας IPTG ( $c=1\text{mM}$ ) και η καλλιέργεια επωάζεται στη κατάλληλη θερμοκρασία, υπό ανάδευση στις 250 rpm για χρονικό διάστημα 4 h.

## 7. Συλλογή των κυττάρων

Οι παραγόμενες πρωτεΐνες μπορούν να εντοπιστούν είτε στο κυτταρικό ίζημα είτε στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε μεγάλες ταχύτητες. Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μαζί με το θρεπτικό υλικό, ενώ οι σχετιζόμενες με την κυτταρική μεμβράνη και οι ενδοκυτταρικές εντοπίζονται στο κυτταρικό ίζημα.

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μια μη διαλυτή ενδοκυτταρική πρωτεΐνη και επομένως όταν η επαγωγή τελειώσει, συλλέγεται το κυτταρικό ίζημα. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρησης και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται σε 1500 g για 15 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη

φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο το οποίο θα πρέπει να είναι διαυγές (αν δεν είναι διαυγές επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση διότι αυτό σημαίνει ότι δεν έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα), και το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται μπορεί να υποστεί αμέσως περαιτέρω επεξεργασία ή εναλλακτικά να αποθηκευτεί στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 8. Λύση των κυττάρων

Η λύση των κυττάρων είναι ένα κρίσιμο βήμα στη πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης καθώς μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική της ενεργότητα και τη συνολική της ποσότητα. Η λύση των κυττάρων μπορεί να γίνει ενζυμικά, μηχανικά ή με την εφαρμογή οσμωτικής πίεσης. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο μηχανικός τρόπος λύσης των κυττάρων με χρήση υπερήχων και η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται πρώτα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων.

Το διάλυμα λύσης αποτελείται από δύο επιμέρους διαλύματα A ( $V=40\text{ml}$ ,  $\text{pH}=8$ ) και B ( $V=10\text{ml}$ ) και περιέχει τα εξής:

### Διαλύματα A ( $V=40\text{ml}$ , $\text{pH}=8$ )

- Αναστολείς πρωτεασών (πχ PMSF, Complete, Roche ) για την αποφυγή τυχόν πρωτεόλυσης.
- 0,1% Μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X-100 για την διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης
- 2 mM EDTA -χηλικός παράγοντας που δεσμεύει ιόντα απαραίτητα για τη δράση των πρωτεασών
- 10 mM Tris-HCl, (ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση του pH σε κατάλληλη τιμή).

### Διαλύματα Β (V=10ml)

- 4% w/v Sodium deoxy collate.

Για να πραγματοποιηθεί καλύτερα η λύση των κυττάρων προσθέτουμε επικουρικά βενζονάση και λυσοζύμη.

2. Διαλυτοποίηση του ίζηματος των κυττάρων (pellet) στο διάλυμα Α από το lysis buffer, σε θερμοκρασία 0°C. Κατόπιν γίνεται προσθήκη 1 ml από το διάλυμα Β και το διάλυμα αφήνεται σε πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 40 mg λυσοζύμης. Η λυσοζύμη χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων μέσω υδρόλυσης των β (1-4) γλυκοζιτικών δεσμών ανάμεσα στα κατάλοιπα Ν-ακέτυλο-μουραμικού οξέος (NAM) και Ν-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης (NAG) σε κάποιους πολυσακχαρίτες. Τέλος, προστίθενται 2ml βενζονάσης.

2. Παραμονή του διαλύματος των κυττάρων με το διάλυμα της λύσης για 15 λεπτών σε θερμοκρασία 4° C υπό ήπια ανάδευση.

3. Το διάλυμα στη συνέχεια υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή των πρωτεϊνών.

4. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4° C, για 1h στις 9200g και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης κρατάμε και πάλι το ίζημα, γιατί όπως έχουμε προαναφέρει η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μια μη διαλυτή πρωτεΐνη.

## 9. Πλύση των κυττάρων και ομογενοποίηση

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται 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 φυγοκέντρησης, κρατάμε τα κυτταρικά ιζήματα, τα οποία και ομογενοποιούμε με την ειδική συσκευή ομογενοποίησης.

Το διάλυμα της πλύσης (**V=300ml, pH=8**) αποτελείται από:

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

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

Η διαδικασία των πλύσεων είναι η εξής:

- 1<sup>η</sup> φυγοκέντρηση-→πλύση με Triton και ομογενοποίηση.
- 2<sup>η</sup> φυγοκέντρηση-→πλύση με Triton και ομογενοποίηση.
- 3<sup>η</sup> φυγοκέντρηση-→πλύση χωρίς Triton και ομογενοποίηση.

Μετά το πέρας και των τριών φυγοκεντρήσεων, κρατάμε τα κυτταρικά ιζήματα, τα οποία και φυλάμε στους -20° C. Ουσιαστικά, αυτά τα κυτταρικά ιζήματα δεν είναι τίποτα άλλο από τα λεγόμενα **inclusion bodies**, δηλαδή ειδικές δομές που σχηματίζουν κάποιες πρωτεΐνες, τα μόρια των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εγκλείονται μέσα σε φωσφολιπίδια .

## 10. Εγκλεισμός της πρωτεΐνης (incubation).

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα incubation με τη βοήθεια του ομογενοποιητή.

Το διάλυμα του εγκλεισμού (**V=15ml, pH=8,5**) αποτελείται από:

- 6M guanidine hydrochloride

- 0,1M Tris
- 80mM reduced GSH
- 2mM EDTA

Κατόπιν το διάλυμα εγκλεισμού τοποθετείται στην συσκευή roller για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 25° C, για χρονικό διάστημα 10 λεπτών στις 20000 G, ώστε να διαυγάσει το διάλυμα και συλλέγουμε το υπερκείμενο. Ταυτόχρονα, με τη μέθοδο Bradford μετρούμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα.

### 10.1 Μέθοδος Bradford

Τυφλό	200μl αντιδραστήριο Bradford	800 μl H <sub>2</sub> O	
Δείγμα	200μl αντιδραστήριο Bradford	795μl H <sub>2</sub> O	5μl δείγμα

Πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του δείγματος σε μήκος κύματος 595nm και υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε mg/ml με τη χρήση του παρακάτω τύπου :  $OD_{595nm} * 20/V$  δείγματος .

## 11. Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)

Η διαδικασία της αναδίπλωσης πραγματοποιείται για χρονικό διάστημα 48-72h σε θερμοκρασία 4° C. Συγκεκριμένα, τοποθετούμε το ρυθμιστικό διάλυμα της αναδίπλωσης σε κωνική φιάλη στους 4° C και με τη βοήθεια προχοϊδας, ρίχνουμε πολύ αργά το διάλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη στο ρυθμιστικό διάλυμα της αναδίπλωσης, το οποίο και αναδεύεται ελαφρώς.

Το διάλυμα της αναδίπλωσης (V=615ml, pH=8,5) αποτελείται από:

- 0,1M Tris-acetate
- 0,5M L-arginine

- 0.5 mM GSSG (ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του GSSH γίνεται με τον τύπο  $GSH/GSSH=4/1$ ).

Επίσης, ο υπολογισμός του τελικού όγκου του διαλύματος της αναδίπλωσης που χρησιμοποιούμε, υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης που έχουμε, ώστε τελικά η συγκέντρωσή της να μειωθεί και να φτάσει σε 0.1mg/ml.

## 12. Συμπύκνωση της πρωτεΐνης.

Πριν ακόμα ξεκινήσουμε τη διαδικασία της συμπύκνωσης, ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο οποίο έχει ήδη πραγματοποιηθεί η αναδίπλωση σε τιμή pH=5. Έπειτα, φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία 4° C στις 5000 στροφές (7000 g) για 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν όλες εκείνες οι πρωτεΐνες που δεν είναι διαλυτές σε pH 5. Τέλος, φιλτράρουμε το διάλυμα με την πρωτεΐνη, ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία συμπύκνωσης.

Η διαδικασία της συμπύκνωσης πραγματοποιείται 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 50ml.

Το ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης ( $V=2000ml$ ,  $pH=5$ ) αποτελείται από:

- 0,15M Sodium acetate

## 13. Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN

### 13.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία πραγματοποιείται στον ψυκτικό θάλαμο σε θερμοκρασία 4 °C, και ο απαραίτητος εξοπλισμός περιλαμβάνει αντλία για τη ρύθμιση της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων στη στήλη και συσκευή συλλογής κλασμάτων (fraction collector).

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη και επομένως για τον καθαρισμό της θα χρησιμοποιήσουμε μια κατιοανταλλακτική στήλη. Συγκεκριμένα, θα χρησιμοποιήσουμε τη στήλη με την εμπορική ονομασία Resource S (Pharmacia) δύο φορές.

Είναι ήδη γνωστό ότι η συλλογή της πρωτεΐνης μας γίνεται σε 20% του διαλύματος B.

Ως διαλύματα έκλουσης χρησιμοποιούνται τα εξής:

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

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

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης.

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Το δείγμα πρέπει να βρίσκεται στο διάλυμα εξισορρόπησης. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με διαπίδυση. Στην δική μας όμως περίπτωση έγινε αλλαγή στο διάλυμα ταυτόχρονα με τη συμπύκνωση. Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν το κατάλληλο φορτίο διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται (κλάσμα νεκρού όγκου). Ο όγκος του δείγματος όπως και η συγκέντρωσή του δεν επηρεάζουν το διαχωρισμό.



3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη. Γίνεται συλλογή των κλασμάτων έκπλυσης.

4. Έκλουση (elution) της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης από τη στήλη με διαβίβαση ρυθμιστικού διαλύματος με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2M. Με τη σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ της πρόσδεσης τους σε αυτή. Αρχικά λοιπόν θα εκλουθούν οι ασθενώς προσδεδεμένες πρωτεΐνες, ενώ οι ισχυρά προσδεδεμένες θα ληφθούν στα τελευταία κλάσματα με τη μέγιστη συγκέντρωση άλατος.

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα.

## 14. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE)

Ηλεκτροφόρηση καλείται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο μπορεί να μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης ( $u$ ) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ( $E$ ), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης ( $z$ ) και τον συντελεστή τριβής ( $f$ ).

$$u = E \cdot z / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη  $E \cdot z$  που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής  $f \cdot u$  που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου. Ο συντελεστής τριβής  $f$  εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από το ιξώδες ( $\eta$ ) του μέσου. Για μια σφαίρα με ακτίνα  $r$

$$f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r$$

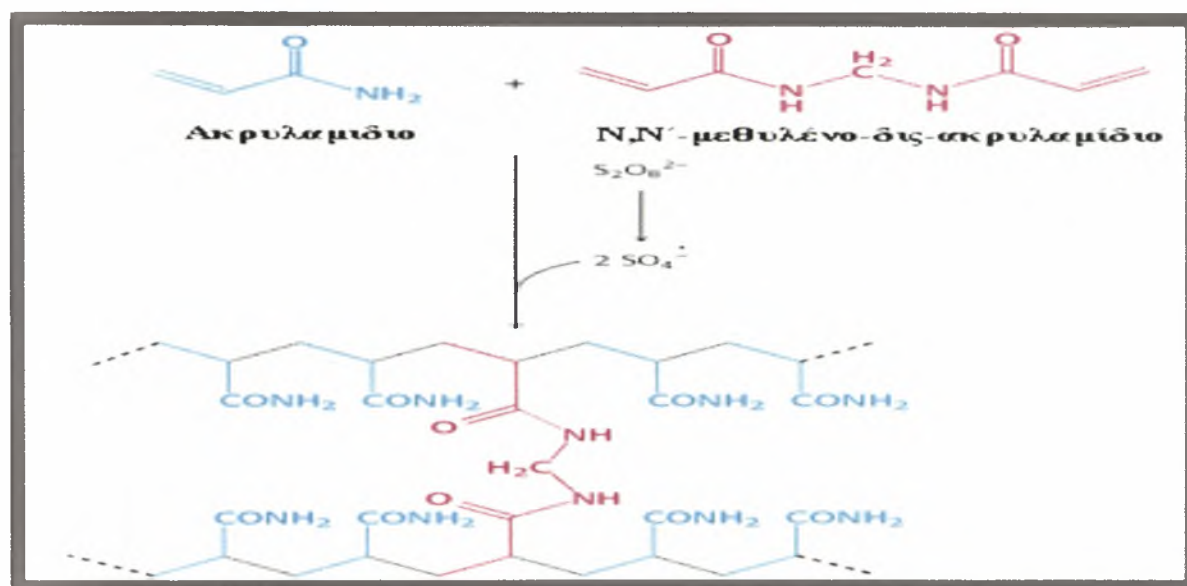
Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντοτε σε πήκτη διότι η πήκτη λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Η κατεύθυνση ροής είναι από πάνω προς τα κάτω. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται διότι το υλικό είναι χημικά ουδέτερο, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών, ιονικής ισχύος και η παρασκευή της πηκτής είναι εύκολη.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακριών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που

συνδέονται 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 (Εικ. 3). 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 (απαρχητής) όπως π.χ. το υπερθειικό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι το Ν,Ν,Ν',Ν'-τετραμέθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το



**Εικόνα 3:** Αντίδραση σχηματισμού της πηκτής ακρυλαμιδίου.

σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και έτσι η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O<sub>2</sub>, αφού αυτό μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή μάζα τους. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται SDS (sodium dodecyl sulfate-δωδεκάκυλο-θειικό νάτριο) 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 οι πρωτεΐνες να αποδιατάσσονται, να διαχωρίζονται στις υπομονάδες τους και να δημιουργούνται σύμπλοκα πρωτεΐνης- SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, που έχουν όλα αρνητικό φορτίο, 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 μέγεθος. 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, α) με τη χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως π.χ. 2-μερκαπτοαιθανόλη β) με θέρμανση στους 100 °C 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 επιστοίβασης και την πηκτή διαχωρισμού οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβασης, 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 μπορεί να γίνει ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση με 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 βαφή αργύρου όπου με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0,02 μg πρωτεΐνης ανά ταινία.

## Πειραματική διαδικασία

### 1. Παρασκευή πηκτής:

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

Οι πηκτές επιστοίβασης και διαχωρισμού παρασκευάζονται συμφωνά με τον πίνακα 10 όπου φαίνονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων εξαρτώνται από τον αριθμό των πηκτών που θα φτιάξουμε και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το μοριακό βάρος των υπό διαχωρισμό πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως πηκτή με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 15%.

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

Πηκτή διαχωρισμού(A)	8%	10%	12%	15%	Πηκτή επιστοίβασης(B)	5%
H <sub>2</sub> O	2,6 ml	2,35 ml	2,1 ml	1,7 ml	H <sub>2</sub> O	2,22 ml
40% ακρυλαμίδιο	1 ml	1,25 ml	1,5 ml	1,9 ml	40% ακρυλαμίδιο	0,38 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1.0 M Tris-HCl pH 6.8	0,38 ml
10% SDS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	10% SDS	30 μl
APS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	10% APS	30 μl
TEMED	3 μl	2 μl	2 μl	2 μl	TEMED	3 μl

**Πίνακας 1 :** Παρουσίαση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πηκτών επιστοίβασης (B) και διαχωρισμού (A).

## 2. Προετοιμασία δειγμάτων:

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση τα δείγματα αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος 5X (loading buffer- με σύσταση 250mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % w/v SDS, 0,5 % w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 500mM μερκαπτοαιθανόλη, 50 % v/v γλυκερόλη) σε αναλογία δείγμα/ loading buffer ίσο με 4/1. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται γιατί αυξάνει το ειδικό βάρος του δείγματος ώστε να παραμείνει στο πηγαδάκι και η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης βάφει το δείγμα ώστε να διακρίνεται το μέτωπο του δείγματος στη πηκτή. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται για 10 λεπτά στους 95 °C και φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά 13 000 rpm.

## 3. Τοποθέτηση δειγμάτων:

Πριν την ηλεκτροφόρηση αφαιρείται το χτενάκι και συναρμολογείτε η συσκευή ηλεκτροφόρησης (οι πλάκες με τις πηκτές τοποθετούνται κατακόρυφα).

Στη συσκευή τοποθετείται στη συνέχεια ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ( 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0,1% w/v SDS, pH 8,3-SDS Running Buffer) έτσι ώστε να διαβρέχονται οι ελεύθερες επιφάνειες της πηκτής μεταξύ των πλακών και να σχηματιστεί κλειστό κύκλωμα με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια, συνδέονται τα ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 100V. Αφού τα δείγματα εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται σε 120-150 V και τερματίζεται όταν το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος της πηκτής.

#### 4.Χρώση της πηκτής:

Η πηκτή (gel) τοποθετείται για 20 λεπτά υπό ανάδευση σε διάλυμα χρώσης (0,1% w/v Coomassie Blue R-250, 50% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ-staining solution). Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (5% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ-destaining solution) υπό ανάδευση, μέχρι να απομακρυνθεί η μη ειδικά συνδεδεμένη με την πηκτή χρωστική.

## 15. Κινητική μελέτη της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης

### 15.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας ηωσινόφιλης νευροτοξίνης

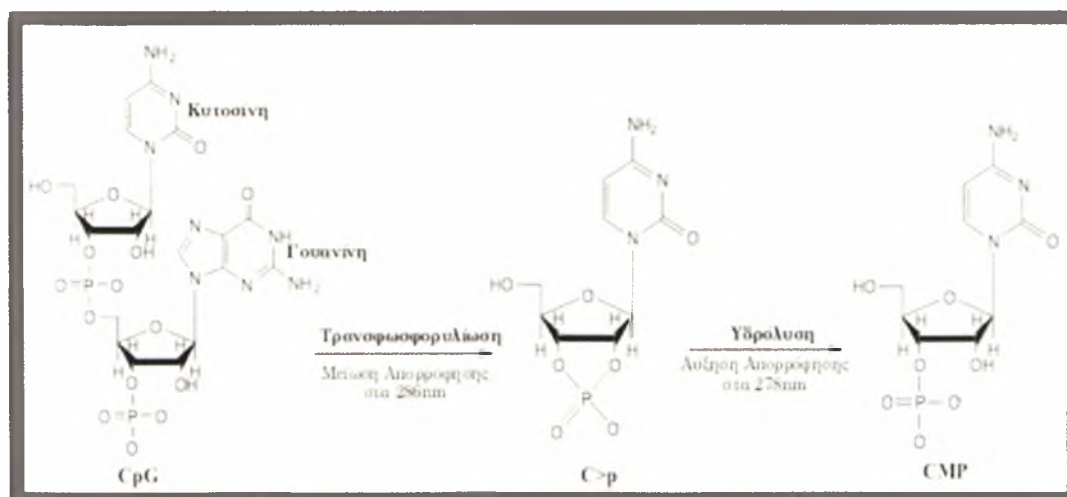
Η ειδική δραστηριότητα (specific activity,  $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ ) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα  $\text{mg}$  του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος (ή παρασκευή 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος)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

#### 15.1.1 Μέτρηση συγκεντρώσεων.

Η συγκέντρωση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 280nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης  $\epsilon_{280}=17460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1cm. Η συγκέντρωση του yeast tRNA προσδιορίζεται επίσης φωτομετρικά σε μήκος κύματος 260nm θεωρώντας ότι τιμή της οπτικής απορρόφησης ίση με τη μονάδα αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με 1.42 $\mu\text{M}$ .

#### 15.1.2 Περιγραφή της μεθόδου.

Η αποικοδόμηση του RNA από την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Εικ. 4), το στάδιο της τρανσφωφο-ρυλίωσης και το στάδιο της υδρόλυσης του κυκλικού ενδιάμεσου. Η ταχύτητα της τρανσφωφορυλίωσης είναι μεγαλύτερη από αυτήν της υδρόλυσης και ποικίλει



**Εικόνα 4:** Τα στάδια της κατάλυσης του CpG μέσω του κυκλικού ενδιάμεσου Cyp. Αναφέρονται οι διακυμάνσεις στην απορρόφηση ανάλογα με το στάδιο της αντίδρασης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα τόσο το CpG όσο και το Cyp.



ανάλογα με το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν έχουν συνήθως τον ίδιο συντελεστή μοριακής απορρόφησης, ενώ το κυκλικό ενδιάμεσο εμφανίζει μικρότερη απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος. Η ταχύτητα της υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά από τη μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε μήκος κύματος που εμφανίζει τη μέγιστη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ του υποστρώματος και του κυκλικού ενδιαμέσου.

**Πειραματική διαδικασία** (Anfinsen et al, 1954), (Slifman and colleagues, 1986).

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

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός διαλύματος χρήσης (reaction buffer) που περιέχει τα εξής αντιδραστήρια (Πίν. 2): 50mM Sodium Phosphate pH 7,4 και 2nM ενζύμου.

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος αντιδραστηρίων (μl)
Edn	300nM	0.2nM	5
Rnase-free water	----	----	245

**Πίνακας 2:** Παρουσίαση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της EDN.

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. Το πρωτεϊνικό δείγμα της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, αραιώνεται κατάλληλα ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0,2nM. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 0,8ml ενώ η έναρξη της αντίδραση γίνεται με τη προσθήκη 150μl διαλύματος με tRNA, ενώ η αντίδραση σταματά σε διαφόρους χρόνους

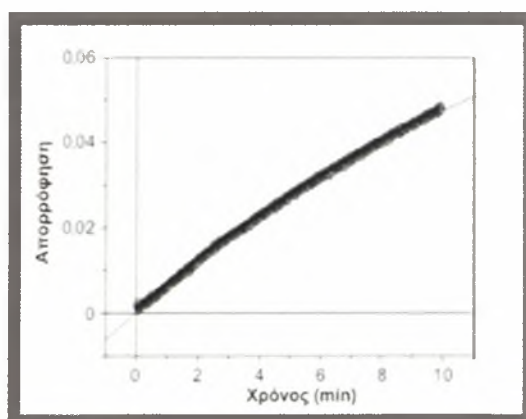
αναμειγνύοντας 150 μl από το διάλυμα της αντίδρασης με 150μl διαλύματος (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid. Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30 °C σε pH 7.4, και για αυτό πριν την αντίδραση το διάλυμα χρήσης επωάζεται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν προστίθεται το υπόστρωμα, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Η αντίδραση σταματά σε διάφορους χρόνους με τη χρήση του stop solution. Έπειτα, φυγοκεντρώνται τα δείγματά σε θερμοκρασία 4°C, στις 12000 στροφές (10000 g), όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Παραλαμβάνονται 250 μl από το υπερκείμενο δείγμα και φωτομετρείται.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA που παράγεται πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα που λαμβάνονται επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit.

## 15.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ )

Η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_M$ ), αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ).

Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (tRNA). Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) είναι : 1μM, 2μM, 4μM, 6μM, και 8μM, ενώ η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται



**Εικόνα 5:** Γραφική απεικόνιση των δεδομένων που λαμβάνονται από τα κινητικά πειράματα.

είναι αυτή που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 16.1 για τον προσδιορισμό της ειδική δραστηριότητας. Για κάθε αντίδραση συλλέγεται ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης (Εικ. 5). Η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι με τη χρήση του προγράμματος Graffit (Robin J. Leatherbarrow, 1989) προσδιορίστηκε η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία. Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό, ο οποίος μπορεί να μετατραπεί σε ταχύτητα αντίδρασης (καταλυτικές μονάδες, 1/s) σύμφωνα με τον τύπο:

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

Όπου, Slope: η κλίση της ευθείας

$\epsilon$ : συντελεστής απορρόφησης=516.4

[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 μη γραμμικής παλινδρόμησης (non-linear regression) η οποία παρέχει και τις τυπικές αποκλίσεις ( $\sigma^2$ ) των τιμών (explicit weighting). Ο υπολογισμός των τιμών της  $K_m$  και της  $V_{max}$  γίνεται από την εξίσωση των Michaelis-Menten:

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

Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίζει την  $K_m$  και τη  $V_{max}$  με το τυπικό σφάλμα για την καθεμία.

### 15.3 Κινητική μελέτη της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης παρουσία αναστολέα

Για την κινητική μελέτη της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης παρουσία αναστολέα επιλέγουμε να βρούμε την τιμή της σταθεράς  $IC_{50}$ . Ως  $IC_{50}$  ορίζουμε τη συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος. Ως αναστολέα χρησιμοποιούμε το GDP. Για την εύρεση της σταθεράς αυτής οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στις ίδιες συνθήκες με αυτές που έγιναν τα πειράματα στην ενότητα 15.1.2. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται αρχικά η αντίδραση που θα αποτελέσει το control και η οποία ουσιαστικά αποτελεί αντίδραση μέγιστης ενζυμικής ενεργότητας για τη δεδομένη συγκέντρωση υποστρώματος, αφού στο διάλυμα χρήσης περιέχονται μόνο το ένζυμο και το υπόστρωμα. Οι επόμενες αντιδράσεις που πραγματοποιούνται περιέχουν εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα και διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα η κάθε μία. Να σημειώσουμε ότι ο αναστολέας επωάζεται μαζί με το ένζυμο και το ρυθμιστικό διάλυμα. Η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2μM και η συγκέντρωση του ενζύμου 2nM.

#### Πειραματική διαδικασία

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήσαμε τις εξής συγκεντρώσεις αναστολέα: 2μM, 10 μM, 20μM, 30 μM, 40 μM, 60 μM, 80 μM. Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, βρίσκουμε το %ποσοστό της αναστολής για κάθε συγκέντρωση αναστολέα, χρησιμοποιώντας τον τύπο:  $\{(a-x)/a\} * 100\%$ , όπου

a: κλίση της ευθείας χωρίς αναστολή

X: κλίση της ευθείας με αναστολέα

## 16. Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A

### 16.1 Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A παρουσία αναστολέα.

#### 16.1.2 Μέτρηση συγκεντρώσεων.

Η συγκέντρωση της βοείας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 278nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης  $\epsilon_{278}=9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1cm (Sela & Amfisen, 1957, Dostal & Matousek, 1973). Η συγκέντρωση του C>p προσδιορίζεται επίσης φωτομετρικά σε μήκος κύματος 268nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης  $\epsilon_{278}=8400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1cm (Boix et al, 1999).

#### 16.1.3 Περιγραφή της μεθόδου.

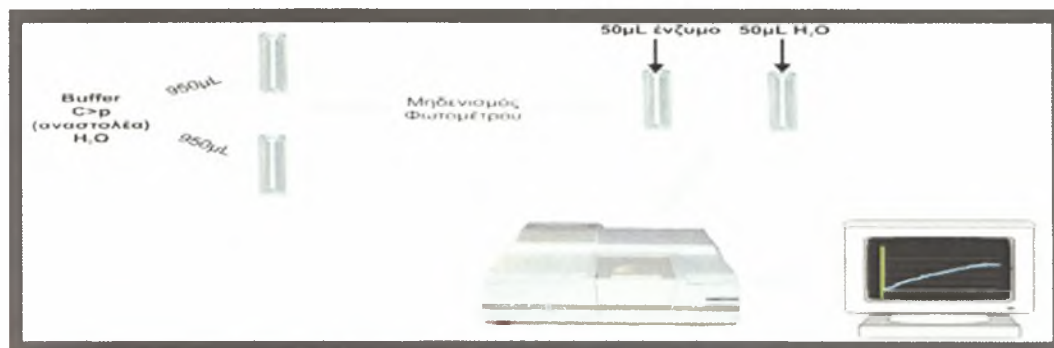
Η αποικοδόμηση του RNA από την ριβονουκλεάση A πραγματοποιείται όπως ακριβώς και στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, σε δύο στάδια, το στάδιο της τρανσφωσφο-ρυλίωσης και το στάδιο της υδρόλυσης του κυκλικού ενδιάμεσου. Η ταχύτητα της τρανσφωσφορυλίωσης είναι μεγαλύτερη από αυτήν της υδρόλυσης και ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν έχουν συνήθως τον ίδιο συντελεστή μοριακής απορρόφησης ενώ το κυκλικό ενδιάμεσο εμφανίζει μικρότερη απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος. Η ταχύτητα της υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά από τη μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε μήκος κύματος που εμφανίζει τη μέγιστη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ του υποστρώματος και του κυκλικού ενδιάμεσου. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα το κυκλικό ενδιάμεσο C>p, όπως στην παρούσα εργασία, μπορούμε να μετρήσουμε την ταχύτητα της υδρόλυσης από την αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος (CMP). Το C>p εμφανίζει χαμηλότερη απορρόφηση από το CMP, που είναι το προϊόν της υδρόλυσης σε μήκος κύματος 278nm. Έτσι, καθώς προχωρά η

υδρόλυση παράγεται όλο και περισσότερο προϊόν με αποτέλεσμα να αυξάνει και η απορρόφηση στο επιλεγμένο μήκος κύματος ( $\lambda=296\text{nm}$ )(Leonidas et al, 2005).

Αρχικά, επειδή είναι γνωστή η τιμή της  $K_m$  του ενζύμου για το C>p χρησιμοποιήθηκε μία μόνο συγκέντρωση υποστρώματος, δηλαδή 0,5 mM. Για τη διαδικασία προετοιμάζουμε το διάλυμα χρήσης, που αποτελείται από RNase A σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M MES, 0.1M NaCl pH 6.0. Για κάθε πείραμα χρησιμοποιούμε δύο κυψελίδες υπεριώδους, από τις οποίες η μία έχει το ρόλο του διαλύματος αναφοράς (τυφλού) ενώ στην άλλη πραγματοποιείται η αντίδραση (Εικ. 6). Έτσι, από αυτά τα διαλύματα που προετοιμάσαμε, προσθέτουμε στις δύο κυψελίδες από 950μl και μηδενίζουμε το φασματοφωτόμετρο. Κατόπιν, προσθέτουμε στη μία εκ των δύο, 50 μl υδατικού διαλύματος ριβονουκλεάσης ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση ενζύμου 10μM, για να ξεκινήσει η αντίδραση, ενώ στην άλλη κυψελίδα συμπληρώνουμε με 50 μl απιονισμένο ύδωρ για να παραμείνει σταθερός ο τελικός όγκος (1ml) του μίγματος αντίδρασης και οι συγκεντρώσεις. Τα δείγματα τοποθετούνται στο φασματοφωτόμετρο όπου καταγράφεται η διαφορά απορρόφησης μεταξύ των δυο δειγμάτων σε μήκος κύματος 296nm επί τέσσερα λεπτά (Leonidas et al, 2005).

Η απορρόφηση που καταγράφεται από το φασματοφωτόμετρο είναι η διαφορά μεταξύ της απορρόφησης των δύο δειγμάτων, του τυφλού (κυψελίδα χωρίς ένζυμο) και του δείγματος όπου γίνεται η αντίδραση. Συνεπώς, καθώς υδρολύεται το C>p μόνο στη μία κυψελίδα, παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης, λόγω της παραγωγής CMP, μόνο σε αυτή. Η διαφορά αυτή καταγράφεται σε σχέση με το χρόνο και μας δίνει την ταχύτητα της υδρόλυσης του C>p. Με προσέγγιση, για μικρό χρονικό διάστημα από την εκκίνηση της αντίδρασης, η καμπύλη της απορρόφησης μπορεί να θεωρηθεί ευθεία γραμμή και από την κλίση της μπορούμε να προσδιορίσουμε την ταχύτητα της αντίδρασης.

Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της τιμής της σταθεράς  $IC_{50}$  του αναστολέα GDP για την ριβονουκλεάση A, επιλέγοντας τις εξής συγκεντρώσεις του αναστολέα: 0.2mM, 0.3mM, 0.4mM, 0.5 mM, 0.7mM και 0.8 mM.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθείται κατά τη διεξαγωγή των κινητικών πειραμάτων.

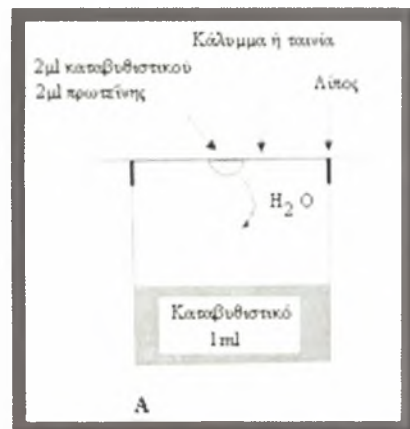
## 17. Μέθοδοι κρυστάλλωσης (McPherson, A., 1997.)

### 17.1 Διάχυση ατμών

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών είναι η πλέον συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και εφαρμόζεται συνήθως με τις τεχνικές της κρεμάμενης σταγόνας, της καθήμενης σταγόνας και της σταγόνας sandwich. Για την επίτευξη της κρυστάλλωσης το υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με διάλυμα ενός καταβυθιστικού (precipitant) που είναι συνήθως κάποιο άλας, PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει.

#### 17.1.1 Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop)

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

**Εικόνα 6:** Η μέθοδος διάχυσης ατμών σαν μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών στην τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας.

σύστημα όπου δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ύλης και ενέργειας (Εικ 6). 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 ως ότου 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.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία ως στόχος τέθηκε η έκφραση και ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ηωσινόφιλης νευροτοξίνης από κύτταρα *E. coli* και η μελέτη της σύνδεσης της 5' διφωσφορικής γουανοσίνης στην EDN με κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα με απώτερο σκοπό τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό αναστολέων του ενζύμου μικρού μοριακού βάρους η οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά μέσα για την αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται η EDN.

## 1. Έκφραση και καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης

Για την παραγωγή της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης χρησιμοποιήθηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pET11c της εταιρείας Novagen. Ο φορέας pET11c της εταιρείας Novagen όπως προαναφέρθηκε (σελ. 32) επιτρέπει την έκφραση του γονιδίου, στο οποίο έχει εισαχθεί επιπλέον το κωδικόνιο AUG που κωδικοποιεί το αμινοξύ μεθειονίνη.

Το πλασμίδιο pET11c χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* B834(DE3) σύμφωνα με το πρωτόκολλο μετασχηματισμού που περιγράφηκε παρουσία του αντιβιοτικού σε τελική συγκέντρωση 0,4 mg/ml.

### 1.1 Παραγωγή της πρωτεΐνης

- Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* B834(DE3) με χρήση του αντιβιοτικού Crb (0,4 mg/ml).
- Καλλιέργεια 1L βακτηριακών κυττάρων σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση στις 250 rpm, μετά από αραιώση 1:100 των προκαλλιιεργειών, με χρήση των αντιβιοτικών Car. (75 μg/ml) και Chl (30 μg/ml) για 3 ώρες μέχρι η OD<sub>600</sub> =0,5

- Επαγωγή σε θερμοκρασία 37°C για 4 ώρες με χρήση IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,1 mM
- Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση (4000g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C). Το κυτταρικό ίζημα αφού πρώτα ζυγιστεί (~20 g), φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την χρήση του ή χρησιμοποιείται στα επόμενα βήματα απομόνωσης
- Επαναδιασπορά των κύτταρων σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (20 ml) στο οποίο προστίθενται αναστολείς πρωτεασών (1 δισκίο μίγματος αναστολέων (Complete, Roche) ανά 10 ml διαλύματος λύσης). Ακολουθεί η λύση των κυττάρων με υπερήχους και η κλασμάτωση των κυτταρικών συστατικών με φυγοκέντρηση. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο το οποίο χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης.

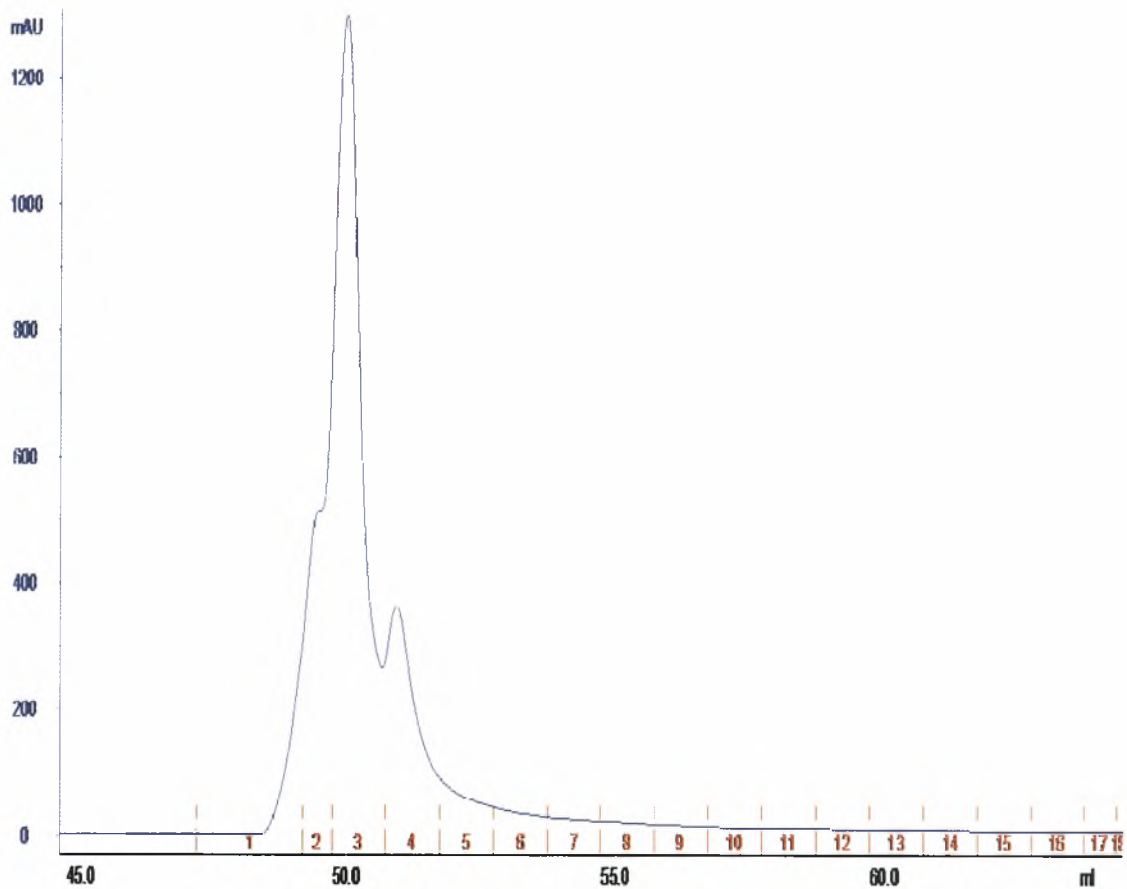
## 1.2 Απομόνωση και καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης.

Για τον καθαρισμό της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης χρησιμοποιήθηκε 1 είδος χρωματογραφίας:

Χρωματογραφία κατιονοανταλλαγής Resource S (Pharmacia) δύο φορές.

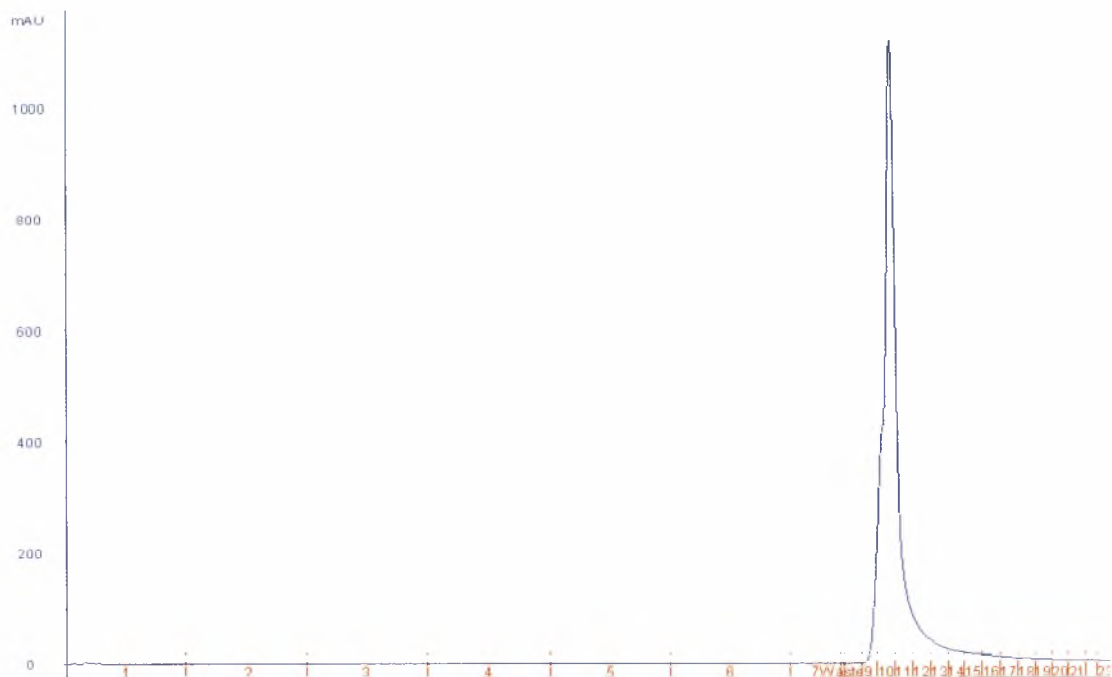
### 1.2.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Το διάλυμα της πρωτεΐνης που προέκυψε μετά τη συμπύκνωση, φορτώθηκε σε στήλη Resource S εξισορροπημένη στο ρυθμιστικό διάλυμα 0,15M Sodium acetate, pH= 5 με ροή 1ml/min και ακολούθησε έκπλυση της στήλης με το ίδιο διάλυμα μέχρι μη ανιχνεύσιμης απορρόφησης στα 280 nm. Η πρωτεΐνη στη συνέχεια εκλούστηκε από τη στήλη με διαβίβαση ρυθμιστικού διαλύματος Sodium acetate 0,15M, pH= 5 με συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM. Συλλέχθηκαν 3 κλάσματα (2,3 και 4) του 1ml, τα οποία εκλούστηκαν σε συγκέντρωση NaCl που αντιστοιχεί σε 400 mM (εικ. 1).



**Εικόνα 1:** Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S. Η έκλυση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM

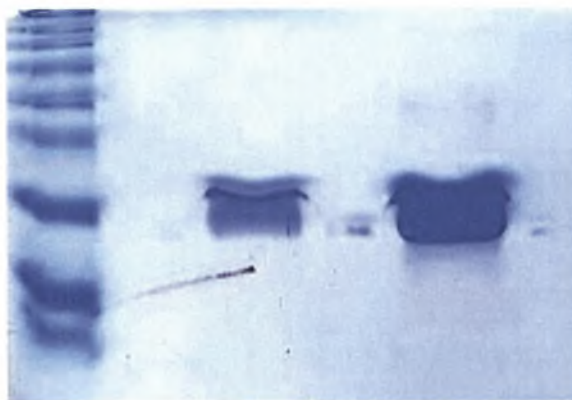
Τα 3 κλάσματα που εκλούστηκαν από την πρώτη στήλη, αφού τα ενώσαμε, τα ξανατρέξαμε στην ίδια στήλη διατηρώντας ακριβώς τις ίδιες συνθήκες. Και από αυτή τη στήλη, κρατήσαμε επίσης 3 κλάσματα, τα οποία όπως φαίνεται και στην (Εικ.2) αντιστοιχούν στην μοναδική κορυφή που εμφανίστηκαν στο χρωματογράφημα και τα οποία εκλούστηκαν πάλι σε συγκέντρωση NaCl που αντιστοιχεί σε 400 mM.



**Εικόνα 2** : Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource 5 για 2<sup>η</sup> φορά. Η έκλουση έγινε με βαθμιδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM

Μετά την πραγματοποίηση των 2 χρωματογραφιών κατιονοανταλλαγής, πραγματοποιήσαμε την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS, το αποτέλεσμα της οποίας απεικονίζεται ακριβώς παρακάτω.

M.B. 15 KDa



Κατόπιν, με τη μέθοδο Bradford βρέθηκε η συγκέντρωση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης **0,88 mg/ml**. Για να μπορέσουμε, όμως να πραγματοποιήσουμε τις κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες του ενζύμου, πρέπει να αυξήσουμε την συγκέντρωση του ενζύμου. Συνεπώς, συμπυκνώνουμε την EDN, ώστε να έχει

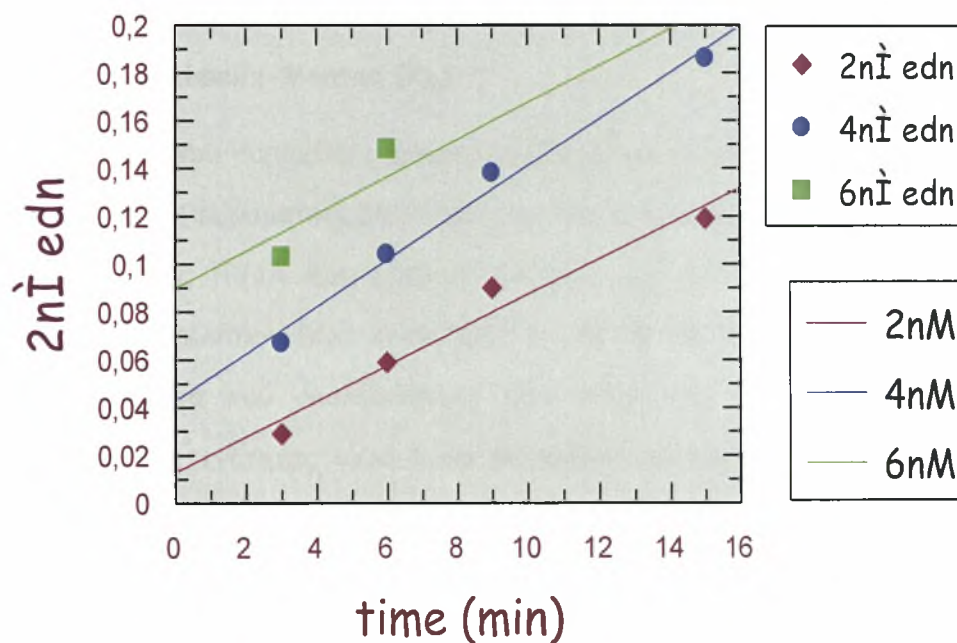
τελική συγκέντρωση 3,5 mg/ml και παραλαμβάνουμε διάλυμα όγκου 770μl. Ταυτόχρονα με την συμπύκνωση, απομακρύνουμε και το αλάτι που βρίσκεται στο διάλυμα της πρωτεΐνης και τελικά την αποθηκεύουμε σε πολύ μικρούς όγκους των 25μl σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  σε RNase-free water.

### 1.2.2 Απόδοση του καθαρισμού

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή **2.64 mg** καθαρής πρωτεΐνης ανά λίτρο καλλιέργειας.

## 2. Κινητικά πειράματα

Για τα κινητικά πειράματα για την εύρεση της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ), αρχικά διεξήχθησαν πειράματα για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης του ενζύμου. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις ενζύμου 2nM, 4 nM και 6 nM, συγκέντρωση tRNA 1μM και χρόνοι 3, 6, 9 και 15 min, ενώ όλες οι άλλες συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας όπως περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 16.1 της ενότητας «Υλικά και Μέθοδοι» για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας. Το αποτέλεσμα της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα.



Όπως φαίνεται στο παραπάνω γράφημα, η κινητική της αντίδρασης είναι ευθύγραμμη για συγκέντρωση του ενζύμου 2nM. Ταυτόχρονα, για την κάθε συγκέντρωση και για τον κάθε χρόνο υπολογίζουμε και τα ποσοστά μετατροπής του υποστρώματος, και όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα, τα χαμηλότερα ποσοστά μετατροπής αντιστοιχούν στη χαμηλότερη συγκέντρωση των 2 nM.



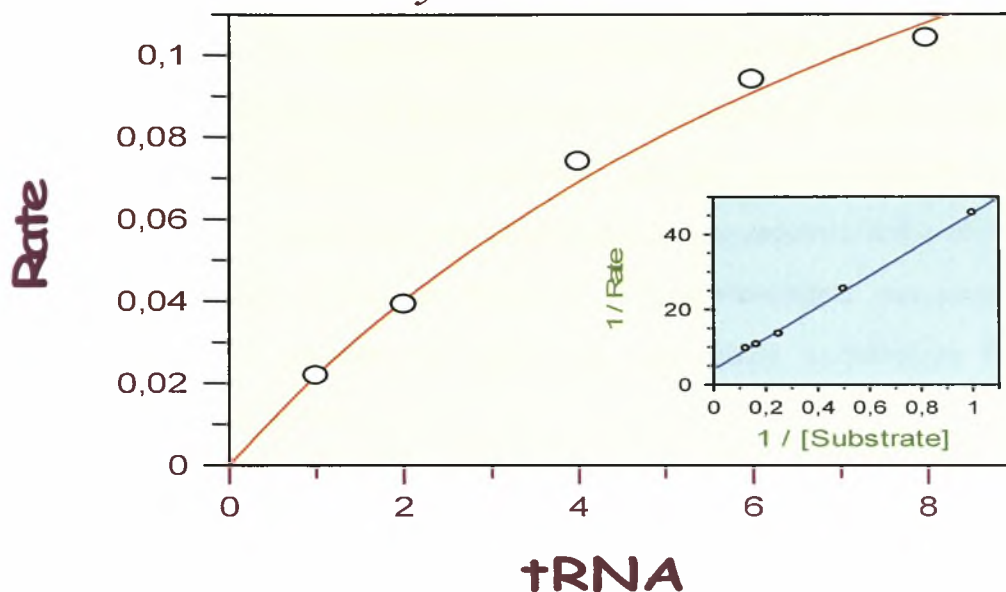
Επομένως, όπως προκύπτει από τα παραπάνω, επιλέγουμε ως συγκέντρωση του ενζύμου που είναι ίση με 2nM.

T (min)	% ποσοστό μετατροπής σε		
	2nM EDN	4nM EDN	6nM EDN
3	10,32028	23,84342	36,65480
6	20,99644	37,01068	52,66904
9	32,02847	49,11032	58,00712
1	42,34875	66,19217	71,88612

### 2.1 Υπολογισμός Michaelis-Menten ( $K_M$ )

Η πρωτεΐνη που παράχθηκε χρησιμοποιήθηκε για το προσδιορισμό της  $K_M$  και  $V_{max}$  του ενζύμου (πειραματική διαδικασία σελ.) σε pH 7,4 και θερμοκρασία 30 °C. Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) είναι: 2μM, 4 μM, 6 μM και 8 μM, ενώ η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 15.1 της ενότητας «Υλικά και Μέθοδοι» για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστικότητας.

## Enzyme Kinetics Data



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	0,2449	0,0257
Km	10,1555	1,5216

**Εικόνα 3:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος, tRNA (2, 4, 6, και 8 μM) σε pH 7,4 και θερμοκρασία 30 °C, για τον προσδιορισμό της  $K_M$  και  $V_{max}$  του ενζύμου.

Ταυτόχρονα, με βάση τα παραπάνω υπολογίζουμε την τιμή της  $K_{cat}=2,55 \pm 0,59 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_m=10.1 \text{ μM}$  καθώς και το λόγο  $K_{cat}/K_m=0,25 \cdot 10^6 \text{ μM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

## 2.2 Κινητική ανάλυση της σύνδεσης GDP στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN)

Πρώτα απ' όλα, πρέπει να αναφέρουμε πως ο αναστολέας συναγωνίζεται το υπόστρωμα για σύνδεση στο ενεργό κέντρο και επομένως θεωρείται πρόκειται για συναγωνιστική αναστολή. Οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 30°C. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην υποενότητα 15.3 των «Υλικά και Μέθοδοι». Τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων για τη σύνδεση της GDP στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) παρουσιάζονται στον **πίνακα 1**.

GDP concentration(μM)	tRna concentration(μM)	Inhibition (%)
2	2	11
10	2	19
20	2	30
30	2	59
40	2	75
60	2	82
80	2	100

**Πίνακας 1** : Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων του συμπλόκου EDN- GDP.

Η τιμή της IC<sub>50</sub> βρέθηκε ίση με 30,4759 ± 4,3316μM. Χρησιμοποιώντας την σχέση  $K_i = IC_{50} / (S / K_m + 1)$  μπορούμε να μετατρέψουμε την τιμή της IC<sub>50</sub> σε τιμή K<sub>i</sub>. Δηλαδή, η τιμή της K<sub>i</sub> είναι περίπου ίση με 25μM. Μπορούμε να πούμε πως η τιμές αυτές ανταποκρίνονται τόσο με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που περιγράφονται παρακάτω, όσο και με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας για αναστολείς με παρόμοια δράση, όπως οι: 5' ADP και 3'-5' ADP. Πιο συγκεκριμένα,

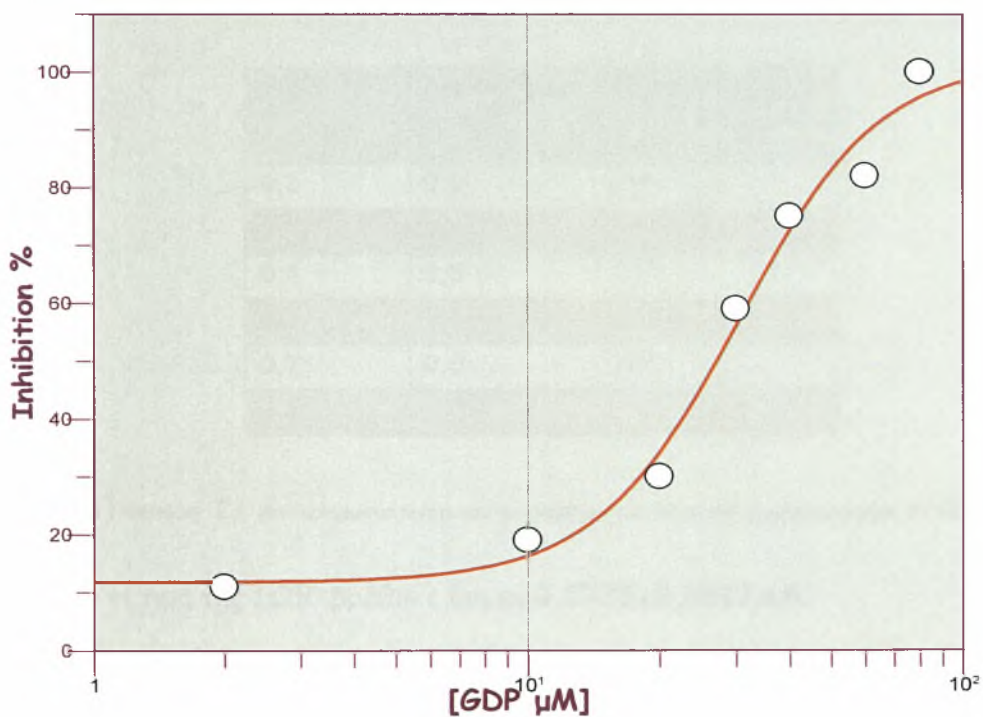
αναφέρεται πως αυτοί οι 2 αναστολείς έχουν τιμές  $K_i$  ίσες με 92 και 32 $\mu$ M αντίστοιχα (Leonidas, D.D. et al, 2001).

Ο υπολογισμός της αναστολής έγινε με χρήση του τύπου:

$$(1 - a) * 100\% = \text{αναστολή}$$

Όπου  $a$  = κλίση του δείγματος / κλίση του control

και έτσι προέκυψε η καμπύλη αναστολής σε σχέση με την συγκέντρωση του αναστολέα μέσω του προγράμματος GRAFIT (Εικ. 4).



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	90,3815	14,9185
IC 50	30,4759	4,3316
Slope factor	-2,6353	0,8856
Background	11,8283	5,4988

**Εικόνα 4:** Καμπύλη της αναστολής της EDN συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα GDP και υπολογισμός της IC50.

### 2.3 Κινητική ανάλυση της σύνδεσης GDP στη ριβονουκλεάση A.

Προκειμένου να συγκρίνουμε την αναστολή της EDN από την GDP με την αναστολή της RNase A από τον ίδιο αναστολέα και υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες διεξάγαμε κινητικά πειράματα για την εύρεση της IC50 της GDP για την RNase A. Και σε αυτή την περίπτωση, έχουμε συναγωνιστική αναστολή. Για την κινητική μελέτη της σύνδεσης GDP στη ριβονουκλεάση A ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στην υποενότητα 16.4 των «Υλικά και Μέθοδοι». Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον πίνακα 2 από τα οποία προέκυψε η καμπύλη της εικόνας.

GDP (mM)	c>p (mM)	Inhibition (%)
0,2	0,5	11
0,3	0,5	20
0,4	0,5	35
0,5	0,5	50
0,7	0,5	71
0,8	0,5	82

**Πίνακας 2:** Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων του συμπλόκου ριβονουκλεάση A- GDP

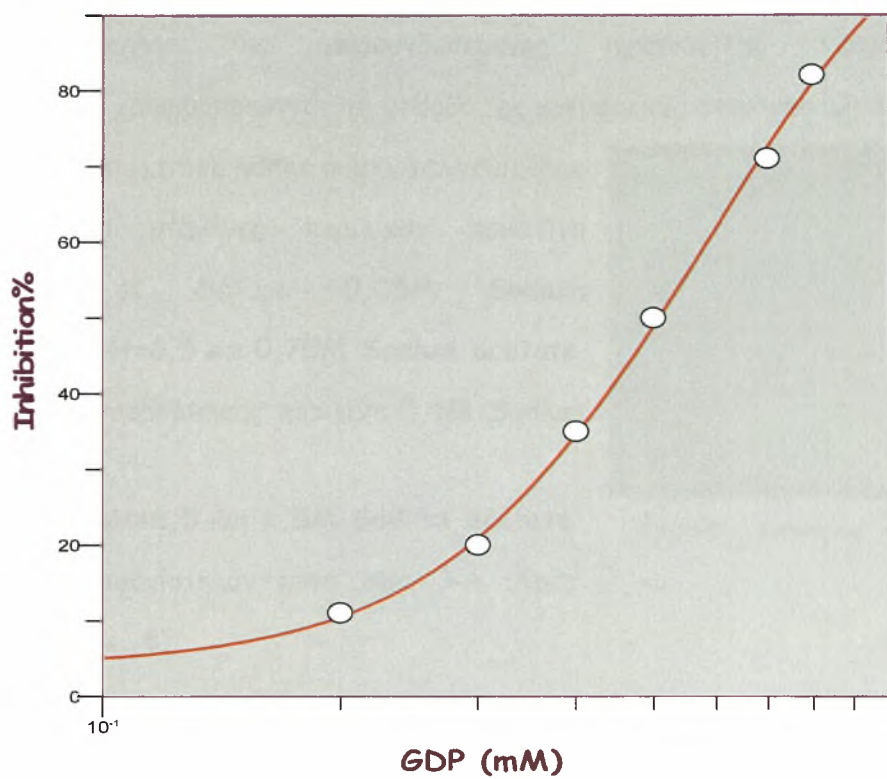
Η τιμή της IC50 βρέθηκε ίση με  $0.5725 \pm 0,0827 \text{mM}$ .

Ο υπολογισμός της αναστολής έγινε πάλι με χρήση του τύπου:

$$(1 - a) * 100\% = \text{αναστολή}$$

Όπου  $a =$  κλίση του δείγματος / κλίση του control

και έτσι προέκυψε η καμπύλη αναστολής σε σχέση με την συγκέντρωση του αναστολέα μέσω του προγράμματος GRAFIT(Εικ. 5).

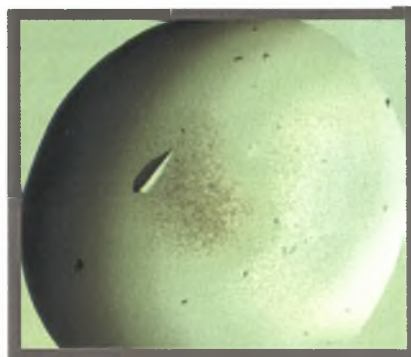


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	109,2967	26,4197
IC 50	0,5725	0,0827
Slope factor	-2,6093	0,7123
Background	3,9457	5,1317

**Εικόνα 5:** Καμπύλη της αναστολής της ριβονουκλεάσης A συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα GDP και υπολογισμός της IC<sub>50</sub>.

### 3. Κρυστάλλωση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης

Κρύσταλλοι της ανασυνδυσμένης ηωσινόφιλης νευροτοξίνης αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η κρυστάλλωση είναι οι εξής: Οι σταγόνες περιείχαν πρωτεΐνη (3,5mg/ml) σε διάλυμα 0,05M Sodium Cacodylate, pH=6,5 και 0,75M Sodium acetate. Το διάλυμα εξισορρόπησης περιείχε 0,1M Sodium Cacodylate, pH=6,5 και 1,5M Sodium acetate. Κρύσταλλοι εμφανίστηκαν μετά από 3-4 μέρες στους 16°C (Εικ. 6)



Εικόνα 6 Κρύσταλλος της EDN

#### 3.1 Κρυσταλλογραφική ανάλυση συμπλόκου EDN-GDP

Το σύμπλοκο EDN-GDP σχηματίστηκε με εμβάπτιση των κρυστάλλων της EDN σε διάλυμα 20 mM GDP σε 0,1M Sodium Cacodylate, pH=6,5, 1,5M Sodium acetate για 20 ώρες σε θερμοκρασία 20° C. Οι κρύσταλλοι έδωσαν περίθλαση σε ευκρίνεια 1.5 Å με τη χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο σταθμό X13 ( $\lambda=0.81$  Å) EMBL-Hamburg outstation, DESY Germany σε θερμοκρασία 100K (χρησιμοποιήθηκε ως κρυσπροστατευτικό διάλυμα 0,1M Sodium Cacodylate, pH=6,5, 1,5M Sodium acetate και 20 % v/v γλυκερόλη χρησιμοποιώντας ανιχνευτή MARCCD (165 mm). Οι κρύσταλλοι ανήκουν στην ομάδα συμμετρίας χώρου  $P2_12_12_1$  με διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας για το σύμπλοκο ηωσινόφιλης νευροτοξίνης -GDP  $a=52.651\text{\AA}$ ,  $b=56.865\text{\AA}$  και  $c=42.011\text{\AA}$ . Υπάρχει μόνο ένα μόριο πρωτεΐνης σε κάθε κρυσταλλογραφική ασύμμετρη μονάδα και το 50% περίπου του κρυστάλλου αποτελείται από ύδωρ. Αναλυτικά, στον πίνακα 3 αναφέρονται όλα τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα.

EDN complex		GDP
Ομάδα συμμετρίας χώρου		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Διαστάσεις κυψελίδας	μοναδιαίας	a=52.651Å, b=56.865Å, c=42.011Å,
Resolution (Å)		30-1.5
Εξωτερική στοιβάδα		1.53-1.5
Αριθμός μετρήσεων		745736
Μοναδικές ανακλάσεις (F > 0)		20570 (1381)
$R_{sym}^a$		0.040 (0.386)
Πληρότητα (%)		98.2 (99.2)
<I/σI >		
$R_{cryst}^b$		0.164 (0.174)
$R_{free}^c$		0.186 (0.247)
Αριθμός μορίων ύδατος		187
r.m.s. απόκλιση από το ιδεατό		
Σε μήκος δεσμών (Å)		0.009
Σε γωνίες (°)		1.26
Μέσος τελεστής B		
Άτομα πρωτεΐνης (Å <sup>2</sup> )		10.6
Άτομα ύδατος (Å <sup>2</sup> )		28.15
Άτομα GDP (Å <sup>2</sup> )		23.36

**Πίνακας 3:** Στατιστικά στοιχεία από την κρυσταλλογραφική μελέτη EDN-GDP

<sup>a</sup> $R_{sym} = \sum_h \sum_i |I(h) - I(h)| / \sum_h \sum_i I(h)$  όπου  $I(h)$  και  $I(h)$  είναι η  $i$ η και η μέση μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της περιθλάσης  $h$ . <sup>b</sup> $R_{cryst} = \sum_h |F_o - F_c| / \sum_h F_o$ , όπου  $F_o$  και  $F_c$  είναι τα πλάτη των πειραματικών και θεωρητικών δομικών παραγόντων της περιθλάσης  $h$ , αντίστοιχα. <sup>c</sup>Ο  $R_{free}$  υπολογίζεται όπως και ο  $R_{cryst}$  από ένα τυχαίο υποσύνολο (5% του συνόλου) των περιθλάσεων το οποίο δεν χρησιμοποιείται στη διαδικασία της βελτιστοποίησης. Οι τιμές σε παρένθεση είναι για την εξωτερική στοιβάδα.

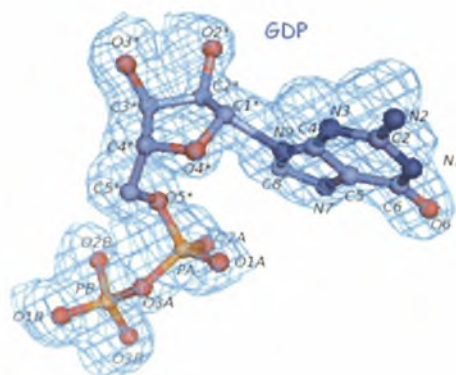


Από την έκθεση του κρυστάλλου του συμπλόκου της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με τον αναστολέα GDP σε συγχροτρονική ακτινοβολία Χ, συλλέχθηκαν τα δεδομένα περίθλασης και υπολογίστηκε ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας εκ διαφοράς Fourier. Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας έδειξε πρόσθετη πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο της EDN, γεγονός που υποδηλώνει τη χωρίς αμφιβολία σύνδεση GDP. Το μοντέλο του GDP προσαρμόστηκε στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα με μικρή μεταβολή των διεδρων γωνιών, με τη βοήθεια του προγράμματος COOT. Κατόπιν έγινε η βελτιστοποίηση του μοντέλου που προέκυψε μέσω του προγράμματος REFMAC.

Τέλος, μπορούμε να αναφέρουμε ότι όλα τα αμινοξέα της EDN είναι πολύ καλά καθορισμένα από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα.

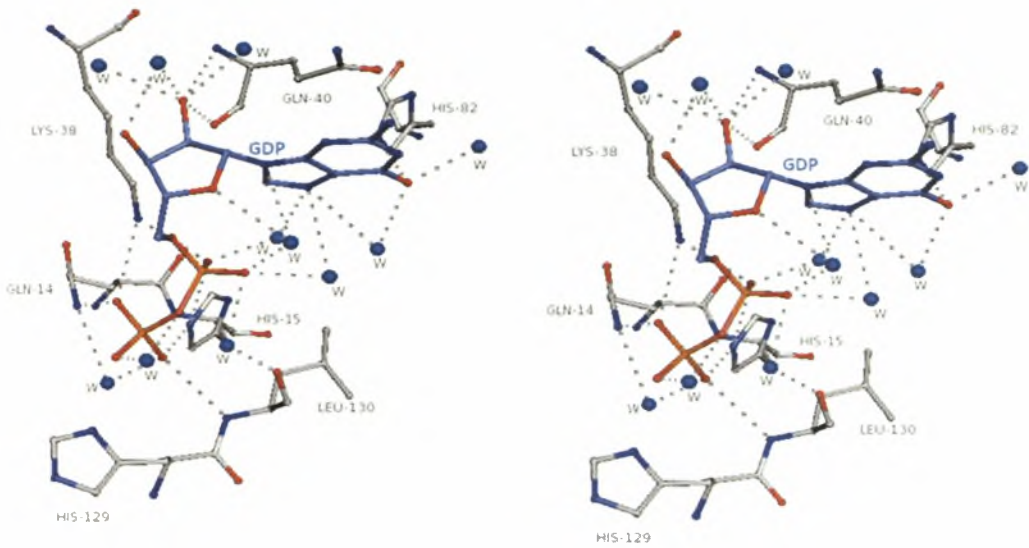
### 3.2 Η πρόσδεση του GDP

Η δομική μελέτη του συμπλόκου της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με την 5' διφωσφορική γουανοσίνη (GDP) έδειξε ότι στο μόριο της EDN προσδένεται ένα μόριο αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο. Η θέση όλων των ατόμων του αναστολέα είναι πολύ καλά καθορισμένη στο χάρτη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Εικ. 7).

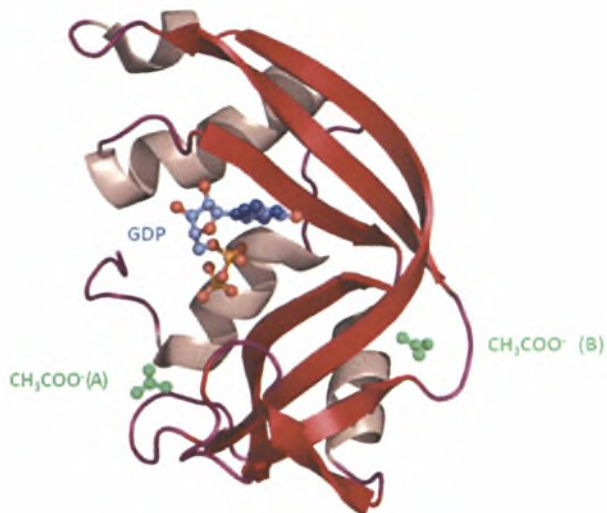


**Εικόνα 7:** Το μοντέλο του GDP με τα ονόματα των ατόμων του και την ηλεκτρονιακή πυκνότητα.

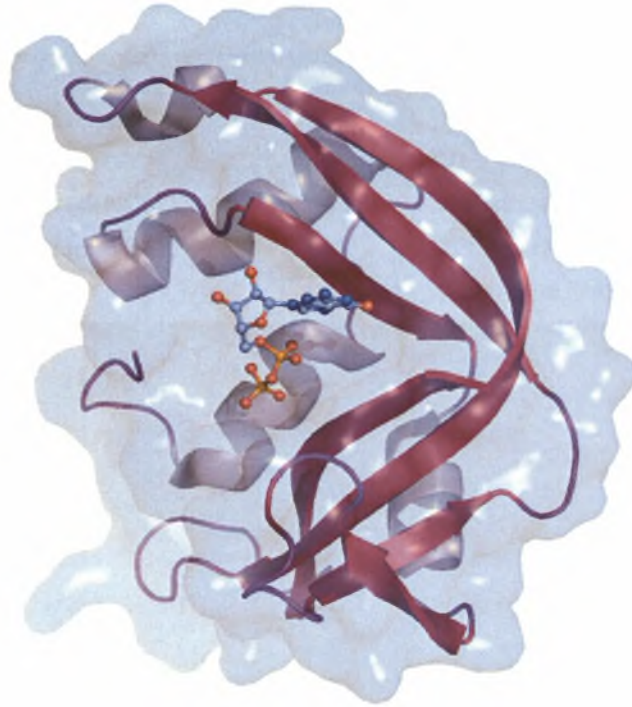
Ο αναστολέας GDP προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με μια εκτεταμένη διαμόρφωση με την PB φωσφορική ομάδα να βρίσκεται στην υποπεριοχή P<sub>1</sub>(His-15, Lys 38, His-129) ενώ η γουανίνη εντοπίζεται μακριά από την υποπεριοχή B<sub>2</sub>, κοντά στην B<sub>1</sub>. Η PB φωσφορική ομάδα σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα του αζώτου των αμινικών ομάδων των αμινοξέων Gln-14 His-15, His-129, Lys 38 και Leu-130. Η PA φωσφορική ομάδα σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα του αζώτου των αμινικών ομάδων των αμινοξέων την Lys 38, και His-15. Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε στην παραπάνω δομή που περιγράψαμε δέθηκαν και 2 οξικά ανιόντα (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) που προέρχονται από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Παρακάτω, στους πίνακες και στις εικόνες που ακολουθούν αναφέρονται και αναπαριστώνται αναλυτικά η ανάπτυξη όλων των δεσμών και όλων των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο μόριο του αναστολέα και την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.



**Εικόνα 8:** Στερεοδιάγραμμα του δικτύου δεσμών υδρογόνου στο σύμπλοκο EDN-GDP.



**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου EDN-GDP παρουσία και των 2 οξικών ανιόντων



**Εικόνα 10:** Απεικόνιση της μοριακής επιφάνειας του συμπλόκου EDN-GDP.

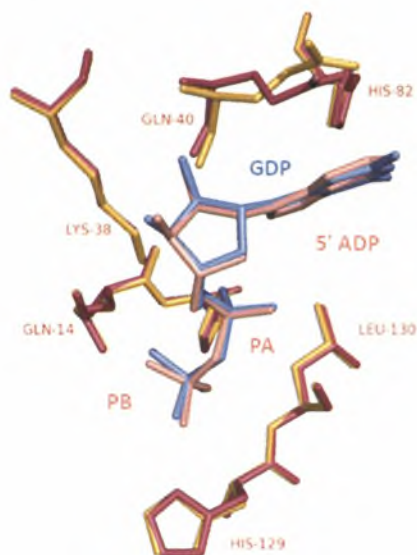
GDAtom	EDN-GDP	GDAtom	EDN-GDP
O1A	Water135 (2.6)	O3A	Water85 (2.4)
O1A	Water192(2.7)	O3A	Water158 (3.1)
O1A	Water85(2.8)		
O1B	His129 Nδ1(2.7)	O3B	His15 Nε2(2.7)
O1B	Water158(2.7)	O3B	Leu130 N (3.0)
		O3	Water95 (2.8)
O2*	Gln40 N (3.2)	O4*	Water192(3.0)
O2*	Gln40 O (3.3)		
O2	Water4 (2.9)		
O2*	Water159 (2.7)		
O2*	Water88 (3.1)		
O2A	Lys38 Nζ (3.0)	O6	His82 Nε2 (3.2)
O2A	His15 Nε2 (3.4)	O6	Water128 (2.7)
O2A	Water96(2.7)	O6	Water58 (3.0)
O2B	Gln14 Nε2 (2.8)	N7	Water58 (3.4)
O2B	Lys38 Nζ (3.4)	N7	Water96 (3.1)
		N7	Water135 (3.3)
O3*	Water4 (2.7)	N9	Water192 (3.1)
O3*	Water159 (2.7)		

**Πίνακας 3:** Δεσμοί υδρογόνου του συμπλόκου EDN-GDP.

GDAtom	EDN-GDP
C4	Water192 (3.0)
C5	Water192(3.5)
C8	Water96(3.4)
C2	Gln40 N(3.4)
N3	Gln40 N(3.3)
C4	Gln40 Cγ (3.4)
C8	Gln40 O(3.3)
N9	Gln40 Cγ (3.5)
C2*	Gln40 O(3.3)
O2A	His15 N γ ε(3.1)
PA	Water85(3.2)
Total	<b>11 contacts</b> <b>( 2 residues)</b>

**Πίνακας 4 :** Αλληλεπιδράσεις Van der Waals στο σύμπλοκο EDN-GDP.

## Σύγκριση της σύνδεσης της GDP και της 5'ADP στην EDN

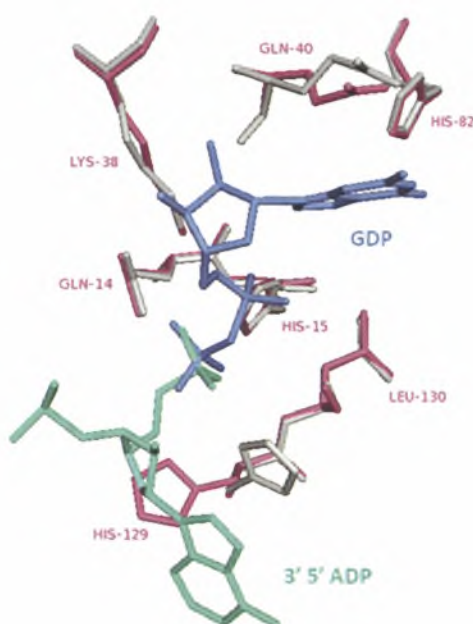


**Εικόνα 11** Υπέρθεση των δομών των συμπλόκων της EDN με GDP (μωβ) και ADP (πορτοκαλί) στο καταλυτικό κέντρο

Ο αναστολέας 5' ADP προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με μια εκτεταμένη διαμόρφωση με την PB φωσφορική ομάδα και όχι την PA φωσφορική ομάδα, να βρίσκεται στην υποπεριοχή P<sub>1</sub>, ενώ η αδενοσίνη εντοπίζεται μακριά από την υποπεριοχή B<sub>2</sub>, κοντά, αλλά όχι ακριβώς, στην B<sub>1</sub> (Leonidas et al., 2001). Η PB φωσφορική ομάδα σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων Gln-14 His-15, His-129 και με το άζωτο του πεπτιδικού δεσμού της Leu-130. Η PA φωσφορική ομάδα σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την ε-αμινική ομάδα της Lys 38 και η 2' υδροξυλική ομάδα της ριβόζης σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα της κύριας αλυσίδας της Gln-40. Επιπλέον, το σύμπλοκο EDN-ADP σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα εξής αμινοξέα: Trp-7, Gln-14, Arg-36, Asn-39, Gln-40, Val-128, Leu-130 και Asp-131. Τέλος, το σύμπλοκο σχηματίζει αλληλεπιδράσεις Van der Waals με την His-82 (Leonidas, D.D, et al, 2001). Ο αναστολέας GDP φαίνεται να προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με τον ίδιο σχεδόν τρόπο που προσδένεται και ο αναστολέας 5' ADP

(Εικόνα 11) με εξαίρεση ένα δεσμό υδρογόνου μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας της His82 και του ατόμου O6 της GDP που δεν υφίσταται με την ADP (υπάρχει αμινοομάδα στην 6' θέση αντί της υδροξυλομάδας της GDP). Η σταθερά αναστολής της GDP είναι περίπου 3.5 φορές μικρότερη από αυτήν της ADP, διαφορά που πιθανώς οφείλεται στον επιπρόσθετο δεσμό υδρογόνου της GDP με ο ιμιδαζόλιο της His82.

### Σύγκριση της σύνδεσης της GDP και της 3',5'ADP στην EDN

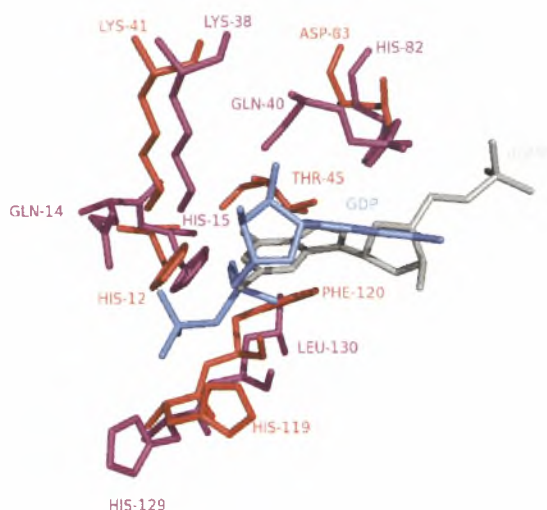


**Εικόνα 12** :Υπέρθωση των δομών των συμπλόκων της EDN με GDP και 3',5' ADP στο καταλυτικό κέντρο

Ο αναστολέας 3'5' ADP προσδένεται στις υποπεριοχές  $P_1$ - $B_2$  του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Συγκεκριμένα, προσδένεται στην υποπεριοχή  $P_1$  και σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους των His-15 και His-129. Επίσης, η 5' φωσφορική ομάδα συνδέεται στην υποπεριοχή  $P_1$  και σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα της Gln-14 και την αμινοομάδα της Leu-130. Τέλος, η αδενοσίνη συνδέεται στην  $B_2$  υποπεριοχή με

τέτοιο τρόπο που η αζωτούχος βάση έρχεται σε παράλληλη διάταξη με τον δακτύλιο της His-129. (Leonidas, D.D, et al, 2001). Η σύνδεση των GDP και 3'5' ADP στην EDN διαφέρει σημαντικά (Εικόνα 12) και μόνο η β-φωσφορική ομάδα της GDP συνδέεται στην ίδια θέση με την 5' φωσφορική ομάδα της 3'5' ADP (υποπεριοχή σύνδεσης P<sub>1</sub>). Αν και η GDP συνδέεται σε διαφορετική περιοχή από αυτή στην οποία συνδέεται η 3'5' ADP και οι δύο αναστολείς έχουν παρόμοιες σταθερές αναστολής (25 μM και 32 μM, αντίστοιχα) που μάλλον οφείλεται στο γεγονός πως και οι δύο αναστολείς εμπλέκονται σε ισοδύναμες αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της πρωτεΐνης (Πίνακες 3 και 4, Leonidas et al, 2001).

### Σύγκριση της σύνδεσης της GDP στην EDN και της dGMP στην RNase A



Εί

**Εικόνα 13** :Υπέρθωση των δομών των συμπλόκων EDN-GDP και RNase A - dGMP (2qca.pdb) στο καταλυτικό κέντρο

Όπως έχουμε αναφέρει και στην εισαγωγή, ο πυρήνας του καταλυτικού κέντρου της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης αποτελείται από τις περιοχές P1(His -12,



Lys-41, His-119), B<sub>1</sub>(Thr-45, Phe-120) και B<sub>2</sub>. Η B<sub>1</sub> είναι θέση πρόσδεσης πυριμιδινών, ενώ η B<sub>2</sub> θέση πρόσδεσης πουρινών.

Στη δομή του συμπλόκου RNase-dGMP (pdb code: **2qca**) παρατηρείται ότι στο μόριο της ριβονουκλεάσης έχουν προσδεθεί 2 μόρια του αναστολέα 2'-δεόξυγουανοσίνη-5' μονοφωσφορικό (dGMP). Όπως ήταν αναμενόμενο, το ένα μόριο dGMP, ως πουρίνη, προσδένεται στην υποπεριοχή B<sub>2</sub>.

Το άλλο μόριο, που αποτελεί και μέτρο σύγκρισης για την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, δεν συμπεριφέρεται ως ένα τυπικό πουρινικό νουκλεοτίδιο. Μπλοκάρει και σε κάποιο βαθμό γεμίζει την περιοχή που θεωρείται θέση πρόσδεσης των πυριμιδινών με τον πουρινικό του δακτύλιο και επομένως ο προσανατολισμός του είναι αντισυμβατικός. Οι θέσεις του σακχάρου και της βάσης είναι αντεστραμμένες σε σχέση με αυτές που θα καταλάμβαναν και τα δύο μόρια αν η υποπεριοχή B<sub>1</sub> καταλαμβάνόταν από κάποια πυριμιδίνη (Larson, S.B. et al, 2007).

Η παραπάνω ιδιαιτερότητα που παρουσιάζει η σύνδεση του dGMP, εξηγείται γιατί η γουανίνη μπορεί και σχηματίζει 2 επιπλέον δεσμούς υδρογόνου. Αναλυτικότερα, όταν στην κρυστάλλωση της ριβονουκλεάσης με μόρια που περιέχουν τη βάση γουανίνη, όπως είναι και αυτό που συζητούμε στην παρούσα εργασία, υπάρχουν ομάδες SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ή PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, οι οποίες κανονικά καταλαμβάνουν την P<sub>1</sub> υποπεριοχή, τότε η B<sub>1</sub> σταματά να δείχνει επιλεκτικότητα για πυριμιδίνες και προτιμά να δένει γουανιδίνες, εφόσον ήδη η P<sub>1</sub> έχει καταληφθεί από τις ομάδες που προαναφέραμε. Επομένως, σε αυτές τις συγκεκριμένες δομές φαίνεται πως η θέση πρόσδεσης πυριμιδινών διαταράσσεται (Larson, S.B. et al, 2007). Υπέρθεση των δομών του συμπλόκου EDN-GDP, με αυτήν του συμπλόκου RNase-dGMP δείχνει πως θέση σύνδεσης της β-φωσφορικής ομάδας του GDP συμπίπτει με την θέση της 5'-φωσφορικής ομάδας της dGMP που συνδέεται στην υποπεριοχή B<sub>2</sub>. Η γουανίνη όμως της GDP παρόλο που συνδέεται στην υποπεριοχή B<sub>1</sub> του καταλυτικού κέντρου της EDN έχει τελείως αντίθετο προσανατολισμό από αυτόν της dGMP στην RNase A. Έτσι, η θέση σύνδεσης του εξαμελή δακτυλίου της γουανίνης

πλησιάζει τη θέση σύνδεσης του δακτυλίου της ριβόζης της dGMP της RNase A και η θέση σύνδεσης της α-φωσφορικής ομάδας της GDP πλησιάζει τη θέση σύνδεσης του εξαμελή δακτυλίου της γουανίνης στην dGMP στο σύμπλοκο της RNase A. Η δομική αυτή σύγκριση υποδηλώνει πως παρόλο που τα καταλυτικά κέντρα των EDN και RNase A είναι συντηρημένα δομικά ο τρόπος σύνδεσης παρόμοιων νουκλεοτιδίων διαφέρει σημαντικά.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Anfinsen CB, Redfield RR, Choate WL, Page J, Carroll WR, (1954).** Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem.* 1954 Mar;207(1):201-10.

**Blundell, T.L., and Johnson, L.N. (1976).** *Protein Crystallography.* Academic Press, Lond.

**Boix E, Nikolovski Z, Moiseyev GP, Rosenberg HF, Cuchillo CM, Nogués MV(1999).** Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity. *J Biol Chem.* 1999 May 28;274(22):15605-14.

**Bulpitt KJ, Verity MA, Clements PJ, Paulus HE, (1990).** Association of L-tryptophan and an illness resembling eosinophilic fasciitis. Clinical and histopathologic findings in four patients with eosinophilia-myalgia syndrome. *Arthritis Rheum.* 1990 Jul;33(7):918-29. Department of Medicine, University of California, Los Angeles School of Medicine.

**Γεωργατσός, Ι. Γ., (2001).** *Ενζυμολογία. Εκδόσεις Ζήτη.*

**Chatani E, Hayashi R, Moriyama H, Ueki T, (2001).** Conformational strictness required for maximum activity and stability of bovine pancreatic ribonuclease A as revealed by crystallographic study of three Phe120 mutants at 1.4 Å resolution. Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo, Kyoto 606-8502, Japan.

**Chusid MJ, Dale DC, West BC, Wolff SM (1975).** The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1975 Jan;54(1):1-27. Review.

**Dostál J, Matousek J (1972).** Purification of aspermatogenic substance in bull seminal vesicle fluid. *J Reprod Fertil.* 1972 Nov;31(2):273-4. No abstract available.

**Dreath, J., (2002).** *Principles of protein x-ray crystallography,* Springer, New York.

**Durack DT, Sumi SM, Klebanoff SJ (1979).** Neurotoxicity of human eosinophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Mar;76(3):1443-7

**Durack DT, Ackerman SJ, Loegering DA, Gleich GJ(1981).** Purification of human eosinophil-derived neurotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Aug;78(8):5165-9.

**Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ (1986).** Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 May;83(10):3146-50.

- Hertzman PA, Blevins WL, Mayer J, Greenfield B, Ting M, Gleich GJ (1990). Association of the eosinophilia-myalgia syndrome with the ingestion of tryptophan. *N Engl J Med*. 1990 Mar 29;322(13):869-73.
- Kam Z, Shore HB, Feher G (1978). On the crystallization of proteins. *J Mol Biol*. 1978 Aug 25;123(4):539-55.
- Kaufman LD, Gruber BL, Gregersen PK, (1991). Clinical follow-up and immunogenetic studies of 32 patients with eosinophilia-myalgia syndrome. *Lancet*. 1991 May 4;337(8749):1071-4.
- Larson SB, Day JS, Cudney R, McPherson A (2007). A new crystal form of bovine pancreatic RNase A in complex with 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2007 Sep 1;63(Pt 9):728-33. Epub 2007 Aug 31.
- Leatherbarrow, R.J. (1992). *GraFit version 3.0. Erithacus Software Ltd Staines, U.K.*
- Leonidas DD, Boix E, Prill R, Suzuki M, Turton R, Minson K, Swaminathan GJ, Youle RJ, Acharya KR (2001). Mapping the ribonucleolytic active site of eosinophil-derived neurotoxin (EDN). High resolution crystal structures of EDN complexes with adenylic nucleotide inhibitors. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):15009-17. Epub 2001 Jan 11.
- Martin RW, Duffy J, Engel AG, Lie JT, Bowles CA, Moyer TP, Gleich GJ, (1990). The clinical spectrum of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with L-tryptophan ingestion. Clinical features in 20 patients and aspects of pathophysiology. *Ann Intern Med*. 1990 Jul 15;113(2):124-34.
- Mosimann SC, Newton DL, Youle RJ, James MN, (1996). X-ray crystallographic structure of recombinant eosinophil-derived neurotoxin at 1.83 Å resolution. *J Mol Biol*. 1996 Jul 26;260(4):540-52. Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- McMurry J. (2001). *Οργανική Χημεία, Τόμοι I & II, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.*
- McPherson, A., (1997). *Crystallization of biological macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallography. *Methods*, 34, 254-265.
- Moussaoui M, Noques V, Guash A, Barman T, Travers F, Cuchillo CM (1998). The subsites structure of bovine pancreatic ribonuclease A accounts for the abnormal kinetic behavior with Cytidine 2',3'-cyclic phosphate, vol.273, No.40, pp25565-25572.
- Ng SC, Lee MK, Teh A, (1989). Acute organic brain syndrome due to drug-induced eosinophilia. Department of Pathology, Medical Faculty, University of Malaya, Kuala Lumpur. *Postgrad Med J*. 1989 Nov;65(769):843-4.

- Ρακιντζής Θ. Ν.**, (1994), Φυσικοχημεία, Έκδοση 3<sup>η</sup>, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
- Rosenberg HF (1998)**. Isolation of recombinant secretory proteins by limited induction and quantitative harvest. *Biotechniques*. 1998 Feb;24(2):188-90, 192.
- Rosenberg Helene F (2008)**. RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story, *Journal of Leukocyte Biology* Volume 83, DOI:10.1189/jlb.1107725.
- Roubenoff R, Coté T, Watson R, Levin ML, Hochberg MC (1990)**. Eosinophilia-myalgia syndrome due to L-tryptophan ingestion. Report of four cases and review of the Maryland experience. *Arthritis Rheum*. 1990 Jul;33(7):930-8.
- Sela M, Anfinsen CB (1957)**. Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease. *Biochim Biophys Acta*. 1957 May;24(2):229-35.
- Silver RM, Heyes MP, Maize JC, Quearry B, Vionnet-Fuasset M, Sternberg EM(1990)**. Scleroderma, fasciitis, and eosinophilia associated with the ingestion of tryptophan. *N Engl J Med*. 1990 Mar 29;322(13):874-81.
- Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ, (1986)**. Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol*. 1986 Nov 1;137(9):2913-7.
- Sorrentino S. (1998)**. Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*. 54,785-794.
- Stryer, L., Berg, J.M., and Tymoczko, J.L. 2002**. *Biochemistry*, 5th ed. W.H. Freeman, pp. 1050.
- Swaminathan GJ, Holloway DE, Veluraja K, Acharya KR, (2002)**. Atomic resolution (0.98 Å) structure of eosinophil-derived neurotoxin. *Biochemistry*. 2002 Mar 12;41(10):3341
- Tolander LM, Bamford CR, (1991)**. Central and peripheral nervous system involvement in the L-tryptophan associated eosinophilia myalgia syndrome. *Int J Neurosci*. 1991 Nov;61(1-2):69-75.
- Tolander LM, Bamford CR, Yoshino MT, Downing S, Bryan G, (1991)**. Neurologic complications of the tryptophan-associated eosinophilia-myalgia syndrome. *Arch Neurol*. 1991 Apr;48(4):436-8.