



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

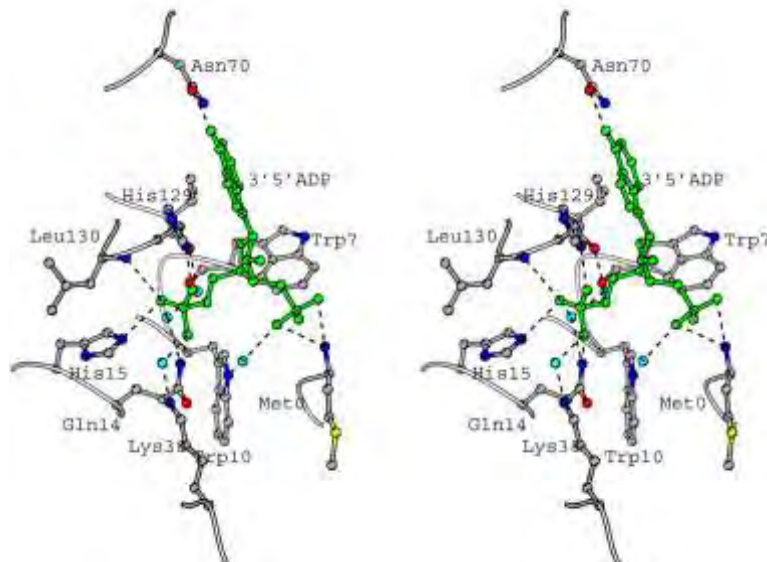
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία:

Κινητικές μελέτες της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης

(Kinetic studies of eosinophil-derived neurotoxin)



Τελοπούλου Αικατερίνη

Λάρισα, Ακαδημαϊκό Έτος 2013-14

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

Υπεύθυνος Καθηγητής:

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

Τριμελής επιτροπή:

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

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

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

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, και ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ.Λεωνίδα, Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο δομικής και λειτουργικής βιοχημείας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες, Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου-κυρίως -καθώς και Βύρωνα Γοργογιέτα, για την πολύτιμη καθοδήγηση και υπομονή τους, καθ'όλη τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τέλος, θα ήταν μεγάλη παράλειψη από μέρους μου να μην ευχαριστήσω την συμφοιτήτριά μου Μαριάννα Γρινιεζάκη για την άψογη συνεργασία που είχαμε και την ηθική υποστήριξη καθ'όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου τόσο για τη συνεργασία τους όσο και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Abstract	5
Περίληψη	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Τα ηωσινόφιλα και η δράση τους.....	7
1.2 Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN).....	12
1.3 Η δομή της EDN.....	18
1.4 Το ενεργό κέντρο της EDN-Καταλυτικός μηχανισμός.....	20
1.5 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος	23
1.6 Η ενζυμική αναστολή.....	26
1.7 Αναστολείς.....	28
1.8 Οι νουκλεοζίτες και οι θεραπευτική τους δράση	29
1.9 Μηχανισμός δράσης νουκλεοζιτών.....	31
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	33
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1^ο ΣΤΑΔΙΟ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΝΗΣ	34
2. Πειραματικό τμήμα	34
2.1 Πλασμιδιακοί φορείς.....	34
2.2 Η Escherichia Coli ως κύτταρο ξενιστής	36
2.3 Καλλιέργεια κυττάρων E.coli.....	37
2.3.1 Χρήση αντιβιοτικών ως επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας.....	38
2.3.2 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων για παραγωγή EDN.....	39
2.4 Επαγωγή.....	39
2.5 Συλλογή των κυττάρων.....	41
2.6 Λύση των κυττάρων.....	41
2.7 Πλύση των κυττάρων & Ομογενοποίηση.....	42
2.8 Αποδιάταξη της πρωτεΐνης.....	43

2.9 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford.....	44
2.10 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)	45
2.11 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης.....	46
2.12 Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN.....	47
2.13 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE).....	49
2.13.1 Πειραματική διαδικασία.....	51
2.13.2 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue Staining.....	52
2.14 Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.....	52
2.15 Εισαγωγή Κρυσταλλώσεων.....	53
2.15.1 Διάχυση ατμών.....	53
2.15.2 Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop).....	54
2^ο ΣΤΑΔΙΟ:ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ EDN	
2.16 Κινητική μελέτη της EDN.....	54
2.16.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης..	54
2.16.2 Περιγραφή της μεθόδου.....	55
2.16.3 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (Km).....	55
2.16.4 Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα.....	57
2.16.5 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό Km και IC50...	58
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	
3.1 Χρωματογραφικός καθαρισμός EDN με στήλη ιοντοανταλλαγής.....	61
3.2 Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων.....	63
3.3 Απόδοση καθαρισμού.....	63
3.4 Κρυστάλλωση.....	64
3.5 Κινητικά Αποτελέσματα.....	64
ΣΗΖΗΤΗΣΗ.....	
3.5 Κινητικά Αποτελέσματα.....	64
4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	
4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

Abstract

Eosinophil- derived neurotoxin (EDN) is one of the four major proteins found in cytoplasmic granules of human eosinophilic leukocytes. It's characterized as a neurotoxin because of its ability to cause the occurrence of Gordon phenomenon when administered intrathecally in microgram quantities in rabbits. EDN is released under allergic and parasitic conditions, and it has been found to be involved in asthma and inflammatory disorders. EDN belongs to ribonuclease A (RNase A)-, superfamily , shows significant structural and enzymatic similarities with RNase A and its enzymatic activity is a prerequisite for its biological actions. Since its ribonucleolytic activity is directly related to its pathological actions, research efforts are being made in order to discover inhibitors that could be used for therapeutic applications. Due to structural similarities with RNase A, especially on the active site, the design of appropriate inhibitors of EDN based on RNase A inhibitors has been facilitated. In the present work, after heterologous expression, isolation and purification of EDN, we studied the inhibitory potency of a nucleotide derivative (6b), which is a potent inhibitor of RNase A. Our studies showed that the compound is a moderate inhibitor of the enzyme and provided a model for studying other RNase A inhibitors with respect to the specificity of the active site of EDN.

Περίληψη

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) είναι μία από τις τέσσερις κύριες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία των ανθρώπινων ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων. Χαρακτηρίζεται ως νευροτοξίνη εξαιτίας της ικανότητας της να προξενεί την εμφάνιση του φαινομένου Gordon όταν χορηγείται ενδοραχιαίως σε ποσότητες μικρογραμμαρίων σε κουνέλια. Απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια αλλεργικών και παρασιτικών καταστάσεων και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στο άσθμα και σε φλεγμονές. Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ανήκει στην υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A (RNase A), παρουσιάζει σημαντικές δομικές και ενζυμικές ομοιότητες με την RNase A και η ενζυματική της δράση συνδέεται με τις βιολογικές της δράσεις. Επειδή η ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα σχετίζεται άμεσα με τις παθολογικές της δράσεις, γίνονται προσπάθειες για την εύρεση ισχυρών ενζυμικών αναστολέων της, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων κατά των παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται. Χάρη στις δομικές ομοιότητες με την RNase A, κυρίως όσον αφορά το ενεργό κέντρο, έχει διευκολυνθεί ο σχεδιασμός αναστολέων έναντι της EDN που βασίζεται σε ενώσεις που παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση (της τάξεως των μM), στην RNase A. Στην παρούσα εργασία, μετά την ετερόλογη έκφραση, απομόνωση και τον καθαρισμό της EDN, μελετήθηκε ένα νουκλεοτιδικό παράγωγο (6b), το οποίο παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση στη Ριβονουκλεάση Α. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι ο αναστολέας παρουσιάζει μέτρια ανασταλτική δράση στην EDN και απεκάλυψε πως διάφοροι αναστολείς της RNase A μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην EDN για την διερεύνηση της εξειδίκευσης του καταλυτικού της κέντρου.

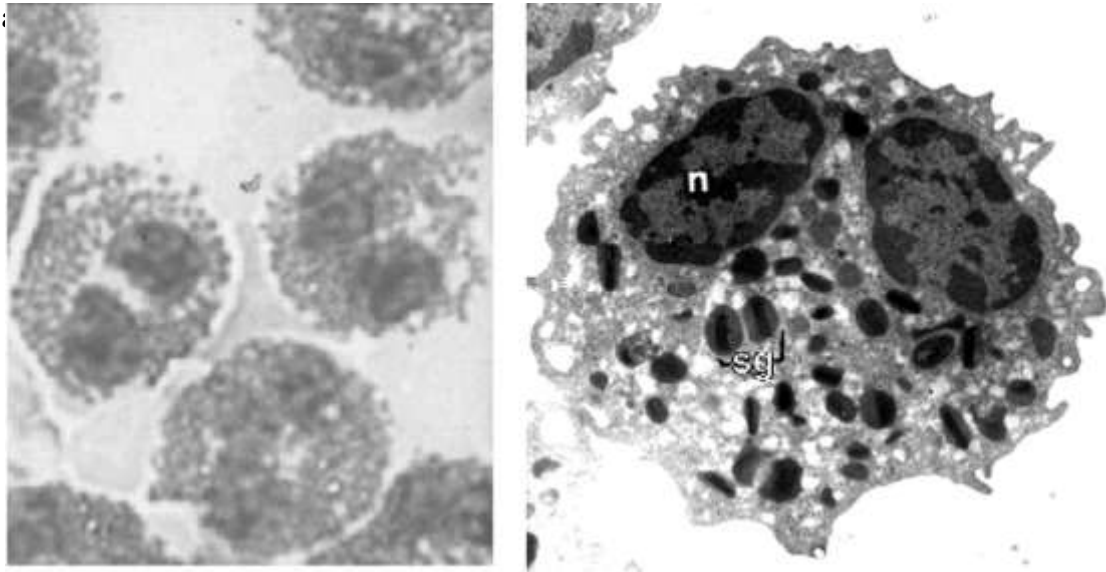
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Τα ηωσινόφιλα και η δράση τους

Τα ηωσινόφιλα ή εωσινόφιλα είναι φαγοκύτταρα και αποτελούν μαζί με τα ουδετερόφιλα και τα βασεόφιλα τα κοκκιόκυτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος¹. Η ονομασία τους πηγάζει από την ικανότητα του κυτταροπλάσματος τους να βάφεται από την όξινη χρωστική εωσίνη (μέθοδος Romanowsky). Χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη χημική συγγένεια των κοκκίων τους για όξινες χρωστικές².

Συνιστούν, το 1-5 % των περιφερικών λευκοκυττάρων και έχουν μέγεθος 12-17 mm. Η δομή ενός τυπικού ηωσινόφιλου περιλαμβάνει, το κυτταρικό τοίχωμα που το περιβάλλει, τον πυρήνα του ο οποίος αποτελείται από δύο λοβούς και το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα που περιέχει τα εκκριτικά κοκκία (εικόνα 1). Το ηωσινόφιλο περιέχει τρεις τύπους εκκριτικών κοκκίων, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής του στο μυελό των οστών και συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη: (α) τα ειδικά ή δευτερογενή κοκκία που παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με την ηωσίνη και περιέχουν τις παρακάτω κυτταροτοξικές ουσίες: μείζονα βασική πρωτεΐνη (MBP), ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP), ηωσινόφιλη υπεροξειδάση (EPO), ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) και β-γλυκουρονιδάση³ (β) τα μικρά κοκκία που περιέχουν κυρίως υδρολυτικά ένζυμα, όπως όξινη φωσφατάση κι αρυλσουλφατάση, ενώ μπορεί να περιέχουν και καταλάσες, και (γ) τα πρωτογενή κοκκία τα οποία είναι στρογγυλά, ομοιογενούς πυκνότητας, παρατηρούνται χαρακτηριστικά στα ηωσινόφιλα προμυελοκύτταρα και μυελοκύτταρα και περιέχουν την κρυσταλλική πρωτεΐνη Charcot-Leyden (CLC, galectin-10). Τα ηωσινόφιλα περιέχουν επίσης σωματίδια κι οργανύλια πλούσια σε λιπίδια (όπως το αραχιδονικό οξύ), όπου γίνεται η σύνθεση λευκοτριενίων, που δε συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη και αυξάνονται σε αριθμό κατά την ενεργοποίησή τους, καθώς και στα ηωσινόφιλα των ασθενών που πάσχουν από ηωσινοφιλία. Η δράση των σωματιδίων αυτών δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη.

Ωστόσο, αυτό που είναι πλέον βέβαιο είναι πως η δραστηριότητα λύσης των ηωσινόφιλων πηγάζει από τις βασικές ή κατιονικές πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στα χαρακτηριστικά κοκκία και απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αποκοκκίωσης με εξωκύττωση ή κυτταρόλυση⁴. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν τους διαμεσολαβητές των θετικών και αρνητικών επιδράσεων που προκαλούν τα ηωσινόφιλα⁵. Το γεγονός δε ότι παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα τόσο ενάντια διαφόρων παρασιτικών οργανισμών όσο και των κυττάρων του ίδιου του οργανισμού που τα παράγει είναι ο κύριος λόγος που πλήθος εργαστηρίων παγκοσμίως ασχολείται με τη μελέτη της δομής και δράσης των πρωτεϊνών αυτών⁶.



(A)

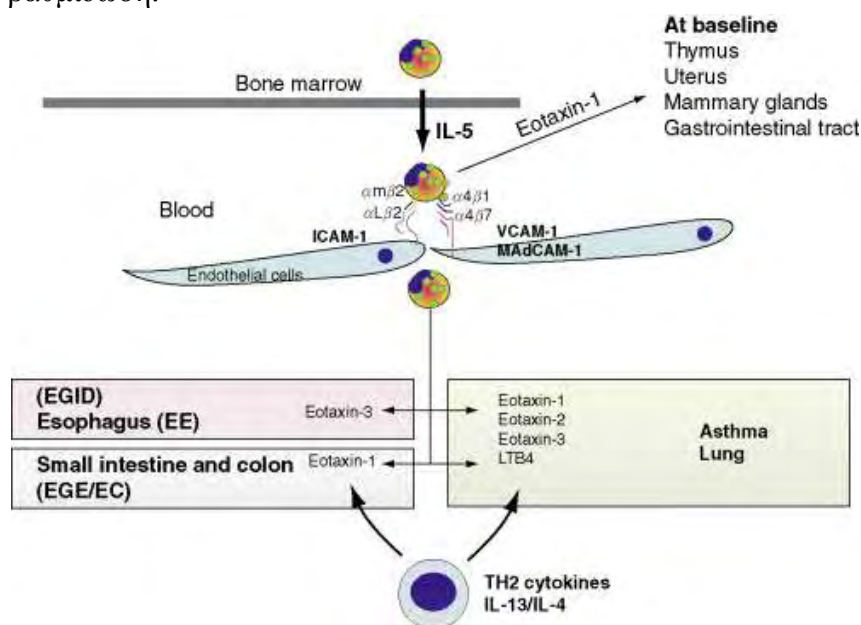
(B)

Εικόνα 1. Τα ανθρώπινα ηωσινοφιλικά λευκοκύτταρα. (Α) Εικόνα από μικροσκόπιο ηωσινοφίλων του ανθρώπινου περιφερικού αίματος που παρασκευάζεται με χρώση Giemsa. (Β) Ηλεκτρονική μικρογραφία ενός ανθρώπινου ηωσινοφίλου στο περιφερειακό αίμα αποδεικνύουν το χαρακτηριστικό δίλοβο πυρήνα και τα κυτταροπλασματικά κοκκία που περιέχουν τις ριβονουκλεάσεις EDN και ECP. Ευγενική προσφορά του Dr Arne Eggesten, Πανεπιστήμιο του Lund, στη Σουηδία.

Τα ηωσινόφιλα παράγονται στο μυελό των οστών από πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα όπως και τα υπόλοιπα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, υπόκειται σε διαφοροποίηση έτσι ώστε να μετατραπούν σε ώριμα ηωσινόφιλα με την βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων (όπως GATA-1) και κυτοκινών (IL-5, IL-3, και GM-CSF). Η IL-5 αποτελεί τη σημαντικότερη κυτταροκίνη για την παραγωγή των ηωσινοφίλων, κατευθύνοντας επιλεκτικά τη διαφοροποίηση των προγονικών ηωσινοφίλων-βασεόφιλων κυττάρων προς την ηωσινοφιλική σειρά². Μετά την ωρίμανσή τους, η IL-5 φαίνεται να διεγείρει τη μετανάστευσή τους στην περιφερική κυκλοφορία όπου παραμένουν για 8-18 ώρες, μέχρι να μετακινηθούν στους ιστούς στόχους (το θύμο αδένα, τη γαστρεντερική οδό, τη μήτρα και το μαστικό αδένα). Αυτές οι κυτταροκίνες, φαίνεται να ευθύνονται και για την ενεργοποίησή τους. Συγκεκριμένα, σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους, η οποία πυροδοτείται μετά από την πρόσδεση ποικίλων παραγόντων στους πολυάριθμους υποδοχείς που φέρουν στην επιφάνειά τους. Μερικοί από τους παράγοντες που έχει βρεθεί πως ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα είναι ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), η IL-3 και η IL-5^{7,8,9}.

Μετά την διαδικασία της ωρίμανσης στο μυελό των οστών, η ηωταξίνη-1 οδηγεί τα ηωσινόφιλα στο θύμο, τη μήτρα, το μαστικό αδένα, και τη γαστρεντερική οδό (GI). Τα ηωσινόφιλα εκφράζουν μόρια προσκόλλησης (ιντεγκρίνες) που επιτρέπουν την προσκόλληση στην επιφάνεια του ενδοθηλίου (VCAM-1, MadCAM-1, ICAM-1). Η έκφραση χημειοκίνης από τους ιστούς επιτρέπει το σχηματισμό μιας χημειοτακτικής βαθμίδωσης που καθοδηγεί τα ηωσινόφιλα στον ιστό. Σε περίπτωση

ασθενειών παρατηρείται αύξηση στην έκφραση χημειοκίνης. Στον ασθματικό πνεύμονα, η ηωταξίνη-1, 2, και 3 είναι αυξημένη καθώς και άλλα μόρια όπως ο παράγοντας LTB₄. Στην εικόνα 2 περιγράφεται αναλυτικά η χημειοτακτική βαθμίδωση.



Εικόνα 2. Παράγοντες που παίζουν ρόλο στην μετανάστευση των ηωσινοφίλων

Τα ηωσινόφιλα έχουν την τάση να συνθέτουν πολλές κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες σε πολυάριθμες φυσιολογικές διαδικασίες και φλεγμονώδεις καταστάσεις. Ενώ συνήθως κυτοκίνες παράγονται σε μικρές ποσότητες στα ηωσινόφιλα υπό φυσιολογικές συνθήκες, κάποιες κυτταροκίνες παράγονται σε μεγάλο βαθμό σε περίοδο φλεγμονωδών καταστάσεων (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, και TGF- α/β), χημειοκίνες (RANTES και εοταξίνη-1), και μεσολαβητές λιπιδίων (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και λευκοτριενίων (LT) C₄)¹⁰.

Η ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών των σιτευτικών κυττάρων κυρίως μέσω της απελευθέρωσης των πρωτεϊνών στα κόκκια και των κυτοκινών αποτελεί μία λειτουργία των ηωσινοφίλων. Η επώαση κυτταρικών σειρών από περιτοναϊκό ιστό αρουραίων με πρωτεΐνες MBP, EPO και ECP (αλλά όχι EDN), οδηγεί σε εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση απελευθέρωση ισταμίνης¹¹. Ανθρώπινο αίμα ομφάλιου λώρου που προέρχεται από σιτευτικά κύτταρα μπορεί να ενεργοποιηθεί από την MBP πρωτεΐνη και να απελευθερώσει ισταμίνη, PGD-2, GM-CSF, TNF α , και IL-8¹².

Στη μήτρα εντοπίζεται μεγάλος αριθμός ηωσινοφίλων κυρίως στο στρώμα του ενδομητρίου και ανάμεσα στο ενδομήτριο και το μυομήτριο¹³. Ενώ η μετακίνηση

των ηωσινόφιλων ρυθμίζεται από την IL-5, η παρουσία τους στο υποεπιθηλιακό στρώμα δεν επηρεάζεται από την ανεπάρκεια της IL-5¹⁴. Πειράματα σε ποντικούς έδειξαν ότι η διείσδυση στη μήτρα συσχετίζεται με την έκφραση της ηωταξίνης-1. Σε ποντικούς με ανεπάρκεια της ηωταξίνη-1, τα ηωσινόφιλα της μήτρας παρουσίαζαν μια ανεπάρκεια στη λειτουργία τους όπως επίσης και μια καθυστέρηση στην έναρξη του οίστρου¹⁵. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ένα ρόλο για τα ηωσινόφιλα στην ωρίμανση της μήτρας, ενώ δεν έχει αποδειχθεί αν παίζουν κάποιο ρόλο κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης του εμβρύου και της κύησης.

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με το ρόλο των ηωσινόφιλων στο ανοσοποιητικό σύστημα αποδείχθηκε ότι τα ηωσινόφιλα είναι ικανά να επεξεργάζονται και να παρουσιάζουν μια ποικιλία μικροβιακών, ιικών (ανθρώπινο ρινοϊό-16)¹⁶, και παρασιτικών αντιγόνων, καθώς και υπεραντιγόνα (Staphylococcus εντεροτοξίνες A, B, και E)¹⁷ και αλλεργιογόνα¹⁸, έτσι ώστε να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων¹⁹. Τα ηωσινόφιλα εκκρίνουν πλήθος κυτοκινών που διεγείρουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων^{18,19}. Επιπλέον, προωθούν την παραγωγή και έκκριση των κυτοκινών IL-4, IL-5, και την έκκριση της κυτοκίνης IL-13 από τα CD4 κύτταρα^{18,20}.

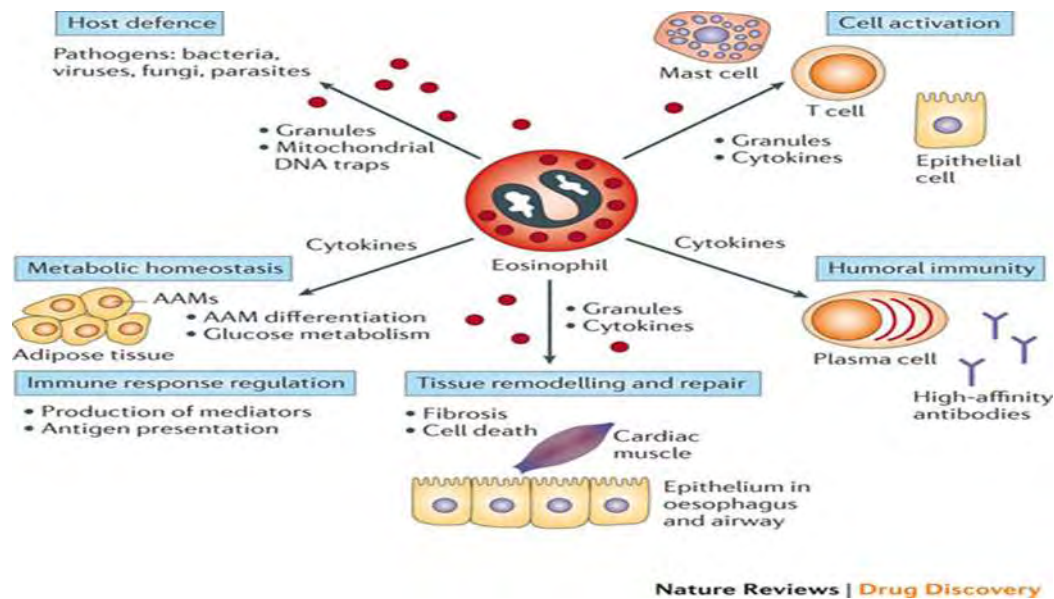
Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι τα ηωσινόφιλα είναι σε θέση να παράγουν εξωκυττάρια παγίδες. Οι DNA παγίδες από ουδετερόφιλα έχουν αντι-μικροβιακή δράση, ασφαλώς λόγω της παρουσίας των ιστονών. Είναι ενδιαφέρον ότι, τα ηωσινόφιλα απελευθερώνουν ταχέως μιτοχονδριακό DNA ως απόκριση σε έκθεση σε βακτήρια. Επιπλέον, αυτή η διαδικασία απαιτεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω της δράσης της NADP οξειδάσης. Οι παγίδες περιέχουν την πρωτεΐνη ECP και την MBP των κοκκίων, και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση²¹. Αυτή η δράση δείχνει ότι τα ηωσινόφιλα μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία έναντι στα βακτήρια, χρησιμοποιώντας ένα μοναδικό μηχανισμό.

Επίσης, είναι αποδεδειγμένη η μυκητοκτόνα δράση των ηωσινόφιλων, τα οποία απελευθερώνουν τις κυτταροτοξικές πρωτεΐνες των κοκκίων τους στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και επί της επιφανείας των μυκητικών οργανισμών με σκοπό την εξολόθρευση τους. Έρχονται σε επαφή με τους μύκητες λόγω της ικανότητάς τους να συνδέονται στη β-γλυκάνη στο τοίχωμα των μυκήτων μέσω του μορίου τους, β2-ιντεγκρίνη²².

Επιπλέον, είναι πλέον αποδεδειγμένη η αποτελεσματική εξωκυττάρια πέψη μεγάλων σε μέγεθος μολυσματικών παραγόντων, όπως είναι οι παρασιτικοί σκώληκες, οι οποίοι αδυνατούν να προσληφθούν στο εσωτερικό του κυττάρου και να αντιμετωπιστούν αναλόγως από ενδογενή κύτταρα. Έτσι λοιπόν, τα ηωσινόφιλα χαρακτηρίζονται από εντονότερη εξωκυτταρική απ' ό,τι ενδοκυτταρική δράση όταν διεγείρεται η κυτταρική τους μεμβράνη²³.

Τα ηωσινόφιλα είναι πολυλειτουργικά λευκοκύτταρα που εμπλέκονται στην παθογένεση πολυάριθμων φλεγμονωδών διεργασιών. Τα ηωσινόφιλα μαζί με τα βασεόφιλα και τα σιτευτικά κύτταρα, είναι σημαντικοί διαμεσολαβητές αλλεργικών αποκρίσεων και εμπλέκονται στη παθογένεση αλλεργικών ασθενειών όπως το αλλεργικό άσθμα και η ατοπική δερματίτιδα. Τρεις είναι οι λόγοι για τη σύνδεση των ηωσινόφιλων με αυτές τις παθήσεις: 1) εντοπίζονται σε ασθματικούς αεραγωγούς (και σχετικούς ιστούς σε άλλες αλλεργικές παθήσεις), 2) οι διαμεσολαβητές τους σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου και 3) η απομάκρυνση των ηωσινόφιλων σχετίζεται με τη βελτίωση της ασθένειας²⁴. Είναι δραστικά έναντι αντιγόνων που προκαλούν την παραγωγή των IgE-αντισωμάτων και έτσι, στα σημεία εκδήλωσης αντιδράσεων άμεσης (αλλεργικού τύπου) υπερευαισθησίας παρατηρείται ιστική συνάθροιση ηωσινόφιλων. Θεωρείται μάλιστα ότι παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση των σιτευτικών κυττάρων, τα οποία σχετίζονται με το άσθμα. Οι πρωτεΐνες των κοκκίων: MBP, ECP και EDN ενεργοποιούν τα σιτευτικά κύτταρα προκαλώντας απελευθέρωση ισταμίνης. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες MBP, ECP, EPO που απελευθερώνονται είναι τοξικές για τα επιθηλιακά κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου και τα λευκοτριένια όπως τα LTC-4 επιδρούν στο λείο μυ των αεραγωγών με καταστροφικές συνέπειες²⁴. Η MBP μάλιστα είναι εκλεκτικός ανταγωνιστής των M2 μουςκαρινικών υποδοχέων, και η απώλεια της λειτουργίας των υποδοχέων αυτών οδηγεί σε βρογχική υπερευαισθησία²⁵.

Τα ηωσινόφιλα παίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία των αλλεργικών αναπνευστικών ασθενειών με αρνητικές κυρίως επιδράσεις: παρόλα αυτά έχουν επίσης αναδειχθεί ως κύτταρα που συμμετέχουν στην άμυνα του ξενιστή. Οι ιοί του αναπνευστικού (RSV, rhinovirus, adenovirus) συγκαταλέγονται στους κύριους παράγοντες που επιδεινώνουν το άσθμα, καθώς προάγουν την παθογένεση. Τα ηωσινόφιλα παίζουν ρόλο στην επίκτητη ανοσία αφού όπως έχει βρεθεί, επιστρατεύονται αποκρινόμενα σε μολύνσεις από ιούς του αναπνευστικού, κυρίως του RSV (respiratory syncytial virus), αλλά και του ιού PIV (parainfluenza virus). Αναστέλλουν λοιπόν τη μολυσματικότητα των συγκεκριμένων ιών²⁶, γεγονός που οφείλεται στις RNάσες που περιέχουν, και συγκεκριμένα την EDN και την ECP. Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται ο πολλαπλός ρόλος των ηωσινόφιλων.



Εικόνα 3. Πολλαπλός ρόλος των ηωσινόφιλων. Τα ηωσινόφιλα παίζουν ρόλο στην άμυνα του ξενιστή, στην ενεργοποίηση των σιτευτικών κυττάρων, των T κυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων, στην προαγωγή της επιβίωσης των μακρόβιων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και στη μεταβολική ομοιόσταση μέσω της διατήρησης των εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων (AAMs) στο λιπώδη ιστό. Επιπλέον, εμπλέκονται στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων καθώς και την επούλωση των ιστών.

1.2 Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN)

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 18,4 kDa, αποτελεί μία από τις τέσσερις μεγάλες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κυτταροπλασματικά κοκκία των ανθρώπινων ηωσινοφιλικών λευκοκυττάρων και απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια αλλεργικών και παρασιτικών καταστάσεων²⁷.

Η ώριμη πρωτεΐνη συντίθεται από ένα πρόδρομο μόριο, μια πρωτεΐνη 161 αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένου ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου 27 αμινοξέων, το οποίο αποκόπτεται. Το γονίδιο της EDN συνίσταται από δύο εξόνια που χωρίζονται από ένα μόνο ιντρόνιο, αλλά το δεύτερο εξόνιο είναι αυτό που περιέχει ολόκληρη την κωδική αλληλουχία και τις 3'-αμετάφραστες περιοχές. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 στο γενετικό τόπο (14q24q31), μαζί με το γονίδιο της ECP²⁸. αξιοσημείωτο είναι ότι έχει ταυτοποιηθεί μια περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης C/EBP στη θέση -124 του υποκινητή του γονιδίου της EDN, γεγονός που υποδεικνύει τη σημασία της οικογένειας των C/EBP στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της.

Η αμινοτελική αλληλουχία της EDN καταγράφηκε από τον Gleich και την ομάδα του²⁹, το 1986 και αποδείχθηκε ότι είναι όμοια με την αμινοτελική αλληλουχία της ECP, αλλά και με αυτή της ανθρώπινης παγκρεατικής ριβονουκλεάσης. Έτσι, ο Slifman και η ομάδα του³⁰ έδειξαν ότι η EDN είναι μια ενζυμικά ενεργή ριβονουκλεάση, ικανή να αναγεννά όξινα διαλυτά ριβονουκλεοτίδια από όξινα αδιάλυτα πολυμερικά υποστρώματα σχεδόν εξίσου αποτελεσματικά με την RNase A. Η μοριακή κλωνοποίηση της EDN επιβεβαίωσε την κατά 89% ομολογία των cDNA αλληλουχιών μεταξύ των EDN και ECP και τις ενέταξε στην υπεροικογένεια της RNase A. Η EDN και η ECP λόγω των βιοδράσεων τους, ανήκουν επίσης στην ενδιαφέρουσα ομάδα των RNAsών που λέγονται RISBASES ή “ριβονουκλεάσες με ειδικές βιολογικές δράσεις”. Οι ειδικές δράσεις που σχετίζονται με αυτές τις RNάσες, οι οποίες απουσιάζουν από πολλές πιο δραστικές RNάσες, τις καθιστούν πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες.

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN), είναι μια μικρή, κατιονική πρωτεΐνη που ανήκει, όπως προαναφέρθηκε, στην υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A. Βάση κρυσταλλογραφικών μελετών, έχει βρεθεί ότι η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη παρουσιάζει σημαντικές δομικές ομοιότητες με την RNάση A, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται υψηλό επίπεδο ομολογίας στις περιφερικές θέσεις δέσμευσης υποστρώματος. Για τον λόγο αυτό, η EDN συχνά αναφέρεται στην παγκόσμια βιβλιογραφία και ως RNάση 2. Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας αυτής, μεταξύ των οποίων είναι η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3) και πλήθος κυτταροτοξινών, εμφανίζει τα εξής κοινά χαρακτηριστικά: στην αλληλουχία τους εντοπίζονται 6-8 κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς και έχουν από δύο ιστιδίνες και μία λυσίνη, με ένα συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας (CKXXNTF). Επιπρόσθετα, τα γονίδια των ριβονουκλεασών αυτών εδράζονται σε ένα μοναδικό εξώνιο στο χρωμόσωμα 14^{31,32}.

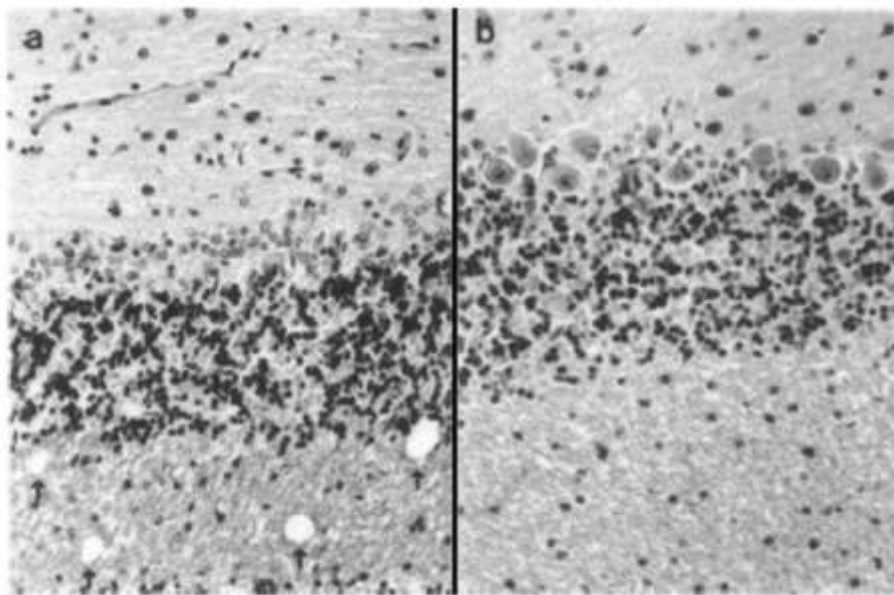
Το φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζει αυτές τις σχέσεις ομολογίας των πρωτεϊνών της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης A παρατίθεται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4: Φυλογενετικό δέντρο της υπεροικογένειας της Ριβονουκλεάσης Α, στο οποίο απεικονίζονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ επιλεγμένων μελών της υπεροικογένειας αυτής.

Η νευροτοξική δράση της EDN έγινε γνωστή το 1930, όταν ο M. H. Gordon, χορήγησε αιώρημα ανθρώπινου λεμφαδένα σε κουνέλια στην προσπάθειά του να εντοπίσει την αιτία για την νόσο Hodgkin. Το 1933, ο Gordon ανέφερε ότι η ενδοεγκεφαλική ένεση από αιωρήματα ανθρώπινου λεμφαδένα σε κουνέλια ή ινδικούς χοίρους προκαλεί μυϊκή ακαμψία, έλλειψη συντονισμού, αταξία, σπαστική παράλυση και απώλεια βάρους που συνήθως οδηγεί στο θάνατο μέσα σε 3 ημέρες με 1 μήνα. Το σύνδρομο αυτό έγινε γνωστό ως το φαινόμενο Gordon. Ο παθογόνος παράγοντας στο εκχύλισμα του λεμφαδένα υπεύθυνος για την καταστροφή των κυττάρων Purkinje της παρεγκεφαλίδας ταυτοποιήθηκε ότι είναι τα ηωσινόφιλα. Δύο πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τα ηωσινόφιλα, η EDN νευροτοξίνη και η ECP κατιονική πρωτεΐνη. Η δραστηριότητα ριβονουκλεάσης της EDN είναι παρόμοια με εκείνη της RNAάσης Α, ενώ η ECP είναι περίπου 100 φορές λιγότερο δραστική από την EDN. Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη πλέον έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολυάριθμων ερευνητικών κέντρων παγκοσμίως εξαιτίας της ικανότητας της να επάγει το νευροτοξικό φαινόμενο (φαινόμενο Gordon) στα κουνέλια, όπου με τη νευροτοξική της δράση καταστρέφει τα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας. Τόσο ο Durack με την ομάδα του όσο και ο Fredens με την ομάδα του³⁴ περιέγραψαν την παθολογία του συνδρόμου: ακαμψία, αταξία και παράλυση, με ιστολογικές βλάβες όπως η απώλεια των κυττάρων Purkinje (Εικόνα 5) της παρεγκεφαλίδας και τη

σπογγώδη εκφύλιση της. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν είναι ακόμη γνωστός, καθώς υπάρχουν αρκετά σημεία του, τα οποία δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Ένα από αυτά είναι το κατά πόσο η τοξικότητα που ασκείται στα κύτταρα του Purkinje, η εκφύλιση των οποίων αποτελεί χαρακτηριστικό του φαινομένου αυτού είναι άμεση ή αν η κυτταρική απώλεια που παρατηρείται οφείλεται σε έμμεση ενεργοποίηση ενός άλλου τύπου κυττάρων, τα οποία προκαλούν την απελευθέρωση ενός κυτταροτοξικού μεσολαβητή. Στον άνθρωπο δεν έχει παρατηρηθεί τέτοια επίδραση. Επιπλέον, ερευνάται η πιθανότητα στην δραστηριότητα αυτή να εμπλέκεται η ογκονάση, μια πρωτεΐνη που σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία του καρκίνου, αλληλουχγήθηκε πρόσφατα και βρέθηκε να είναι ένα μέλος της υπερικογενείας RNase, 30% ταυτόσημη με την RNase A και περίπου 33% ταυτόσημη με τις EDN και ECP^{33,34,35}.



Εικόνα 5: Ιστοπαθολογικές ανωμαλίες στην παρεγκεφαλίδα κουνελιού ως απόκριση στην EDN. Δεξιά (σχήμα a) απεικονίζεται φυσιολογικός εγκεφαλικός ιστός, στον οποίο είναι εμφανή τα κύτταρα του Purkinje και η ανέπαφη λευκή ουσία. Αριστερά (σχήμα b) παρατηρείται εγκεφαλικός ιστός μετά από χορήγηση 50µg καθαρής EDN. Τα κύτταρα του Purkinje έχουν εξαφανιστεί και έχουν σχηματιστεί κενोटόπια στη λευκή ουσία.

Η EDN από μόνη της παρουσιάζει μικρού βαθμού κυτταροτοξικότητα για τα σωματικά κύτταρα, εκτός από την προαναφερθείσα νευροτοξικότητα. Έχει γνωστοποιηθεί πως όταν προσδένεται σε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα της τρανσφερίνης (sFv), η EDN εσωτερικεύεται ως δραστική ριβονουκλεολυτική κυτοτοξίνη. Ο Newton και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι τα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα τρανσφερίνης ήταν ευαίσθητα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις EDNsFv της τάξης των nanomolar. Με βάση την πληροφορία αυτή και μετά από τη διεξαγωγή πειραμάτων σε έγκλειστα της *E.coli*, έχει διαπιστωθεί πως όταν ανθρώπινα κύτταρα που σχετίζονται με την εμφάνιση λευχαιμίας εκφράζουν τον υποδοχέα της τρανσφερίνης, εμφανίζουν ευαισθησία σε νανομοριακές συγκεντρώσεις EDNsFv, προτείνοντας με αυτόν τον

τρόπο ότι τα ανθρώπινα ένζυμα μπορούν να παράγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ικανά να αποκτήσουν κυτταροτοξικές ιδιότητες όταν συντήκονται με αντισώματα. Επομένως, ένζυμα όπως η EDN εμπλέκονται στην παραγωγή πρωτεϊνών μέσω της ανοσολογικής σύντηξης που, οι οποίες θα είναι λιγότερο ανοσογονικές συγκριτικά με ανοσοτοξίνες οι οποίες περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες τοξινών βακτηριακής ή φυτικής προέλευσης³³. Ομοίως, σύντηξη της EDN με την κυτοτοξίνη ογκονάση, οδήγησε στον σχηματισμό μιας χιμαιρικής ριβονουκλεάσης η οποία χαρακτηρίζονταν από αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα, συγκριτικά πάντα με την EDN, αλλά και αυξημένη κυτταροτοξικότητα. Οι παρατηρήσεις είναι εξαιρετικά σημαντικές καθώς είναι πολύ πιθανό πως θα συμβάλουν δυναμικά στη σχεδίαση καινοτόμων θεραπειών ενάντια στον καρκίνο³⁶.

Ο ιός RSV (respiratory syncytial virus) θεωρείται ότι είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παθογόνους παράγοντες σε όλο τον κόσμο που δημιουργούν αναπνευστικά προβλήματα. Όπως έχει αναφερθεί πολλές μελέτες έχουν εμπλέξει τα ηωσινόφιλα στην παθογένεση της RSV νόσου. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα ηωσινόφιλα προσλαμβάνονται και αποκοκκιώνονται στο παρέγχυμα του πνεύμονα σε περίπτωση σοβαρής λοίμωξης από τον ιό RSV^{37,38}, όπως επίσης ότι τα RSV-μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν μια ποικιλία πιθανών χημειοτακτικών ουσιών που προσελκύουν τα ηωσινόφιλα³⁹. Ωστόσο, έχουν ξεκινήσει μελέτες που, εξετάζουν τη δυνατότητα τα ηωσινόφιλα να έχουν επίσης και ευεργετικό ρόλο λόγω των ριβονουκλεοτικής δράσης της EDN (η/και ECP). Η ανασυνδιασμένη EDN (rhEDN) δρώντας μόνη της φαίνεται να μειώνει τη μολυσματικότητα του ιού RSV-B^{37,38}, ο οποίος σχετίζεται με την εμφάνιση άσθματος, κατά ένα δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η μεταλλαγμένη rhEDNdK38 που έχει υποστεί απενεργοποίηση της ριβονουκλεολυτικής της δραστηριότητας δεν παρουσιάζει την ίδια δράση. Ούτε η RNase A φαίνεται να έχει αντική δράση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η EDN αλληλεπιδρά με το στόχο της με κάποιο βαθμό εξειδίκευσης που απαιτεί την ριβονουκλεολυτική της δράση αλλά χωρίς να είναι επαρκής μόνο αυτή³⁸.

Το χαρακτηριστικό που διακρίνει την EDN από τις υπόλοιπες ριβονουκλεάσες είναι ότι φέρει μια ένθεση εννιά αμινοξέων στο βρόχο L7 του καρβοξυτελικού της άκρου, όπως προκύπτει από σύγκριση με την αντίστοιχη περιοχή στην RNase A, που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τους ιούς. Υπάρχουν τρία κρίσιμα κατάλοιπα σε αυτόν: Arg117, Pro120, και Gln122 τα οποία διαφέρουν μεταξύ της EDN, ECP, και RNase A. Μετάλλαξη σε αυτά τα κατάλοιπα οδήγησε σε μείωση της αντικής δράσης παρόλο της ύπαρξης της ριβονουκλεολυτικής δράσης πράγμα που δηλώνει την εμπλοκή του L7 βρόχου. Ο βρόχος L7 αλληλεπιδρά και επηρεάζει τη διαμόρφωση του αμινοτελικού άκρου της EDN ενώ επίσης αλληλεπιδρά άμεσα με τα virions του RSV και διευκολύνει την πρόσβαση της πρωτεΐνης στο ΐκό γονιδίωμα, μέσω διείσδυσης από το ΐκό καψίδιο⁴⁰. Η ριβονουκλεολυτική δράση της EDN εμφανίζεται μόνο όταν η πρωτεΐνη έρχεται σε επαφή με το ΐκό RNA ως συνέπεια της παραγωγικής αλληλεπίδρασης

πρωτεΐνης- ιού, στην οποία το κατάλοιπο Arg117 παίζει ρόλο κλειδί. Αξίζει να σημειωθεί και πάλι ότι καμία εκ των υπόλοιπων ριβονουκλεασών (RNaseA, onconase, RNaseK6) δεν παρουσιάζει αντϊκή δράση, παρά τη μεγαλύτερη δραστικότητα τους.

Η EDN σύμφωνα με *in vitro* μελέτες με βάση το υπερκείμενο μικτών καλλιιεργειών λευκοκυττάρων⁴¹ δρα και κατά του υποτύπου 1 του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1).

Σε πρόσφατες μελέτες η EDN και η ομόλογη πρωτεΐνη στον ποντικό, (mEAR2), έχει αναφερθεί ότι ενεργούν ως επιλεκτικά χημειοτακτικοί παράγοντες για τα δειδριτικά κύτταρα (DCs)⁴². Προωθούν την ενεργοποίηση και την ωρίμανση των DC⁴³ και την αύξηση των τύπου 2 βοηθητικά T-κυττάρων (Th2) με έναν τρόπο που εξαρτάται από τον υποδοχέα 2 (TLR2)⁴⁴. Ο TLR2 υποδοχέας εκφράζεται επί της επιφανείας μιας ευρείας ποικιλίας κυττάρων συμπεριλαμβανομένου των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα⁴⁵, καθώς και των μικρογλοιακών κυττάρων⁴⁶ και των κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως τα δειδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα⁴⁷.

Μια προηγούμενη μελέτη⁴⁸ έδειξε ότι η πρωτεΐνη δέσμεισης μαλτόζης συντηγμένη με την EDN (MBP-EDN) θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με κύτταρα Beas-2B, τα οποία είναι ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα με περιορισμένη έκφραση των μεταγράφων του γονιδίου TLR2⁴⁵. Πρότεινε δηλαδή, ότι το σύμπλοκο MBP-EDN μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα συστατικά (εκτός από τον TLR2) επί της επιφανείας των κυττάρων Beas-2B. Αποδείχθηκε ότι η πρόσδεση της EDN στα κύτταρα απαιτεί την πρόσδεση σε επιφανειακές γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs), που εκφράζονται στα κύτταρα Beas-2B, πχ ηπαρίνη (γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες ουρονικού οξέος και εξοζαμίνης)⁴⁹ και η δεσμειντική δύναμη μεταξύ της EDN και των GAGs εξαρτάται από τα επίπεδα θείωσης των GAGs⁵⁰.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα επίπεδα της EDN, προσδιοριζόμενα με τη μέθοδο ELISA, πιστεύεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης (biomarker) για τη διάκριση μεταξύ του άσθματος που επιδεινώνεται από την ασπιρίνη (Aspirin-exacerbated respiratory disease- AERD) και του άσθματος που δεν επηρεάζεται από την ασπιρίνη (Aspirin Tolerant Asthma-ATA)⁵¹. Η ευαισθησία και εξειδίκευση των επιπέδων της EDN του πλάσματος είναι 95% και 60%, αντίστοιχα, για την πρόβλεψη του AERD χρησιμοποιώντας την ανάλυση MLR. Τα αποτελέσματα δεν δείχνουν μεγάλη εξειδίκευση, δείχνουν όμως μεγάλη ευαισθησία και μάλιστα η AUC (Area Under the Curve) της καμπύλης ROC, που ήταν 0.74, υποδηλώνει υψηλή διαγνωστική ακρίβεια.

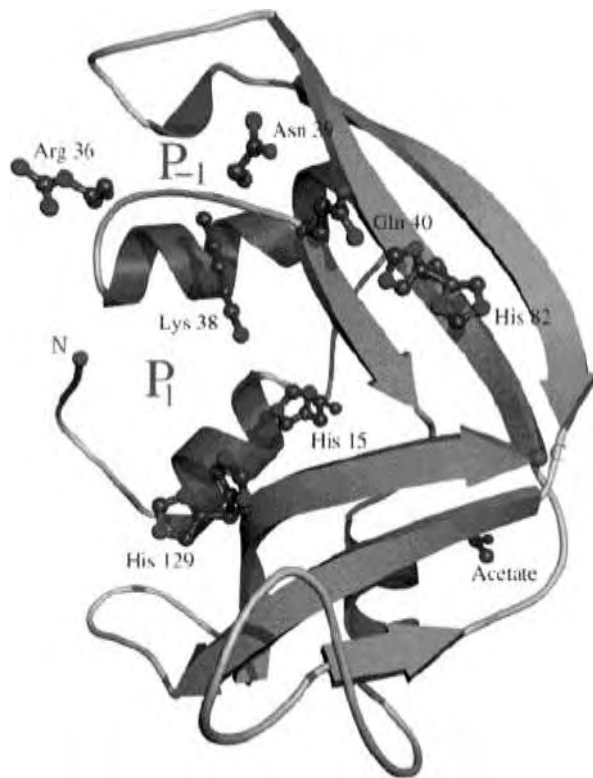
Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η EDN μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης της ηωσινοφιλικής οισοφαγίτιδας⁵² και της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης⁵³.

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μερικώς υπεύθυνη για κάποιες ανωμαλίες νευρολογικής φύσεως σε ασθενείς με το “Υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο”⁵⁴.

Ακόμα, εντυπωσιακό είναι το γεγονός, ότι το φαινόμενο της υπερηωσινοφιλίας σχετίζεται και με άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο της ηωσινοφιλικής μυαλγίας, που συνδέεται με την κατανάλωση της L-τρυπτοφάνης⁵⁵, με άτομα που εμφανίζουν νευρίτιδα^{56,57} αλλά και με άτομα που εμφανίζουν πλήθος διαφόρων νευρολογικών επιπλοκών.

1.3 Η δομή της EDN

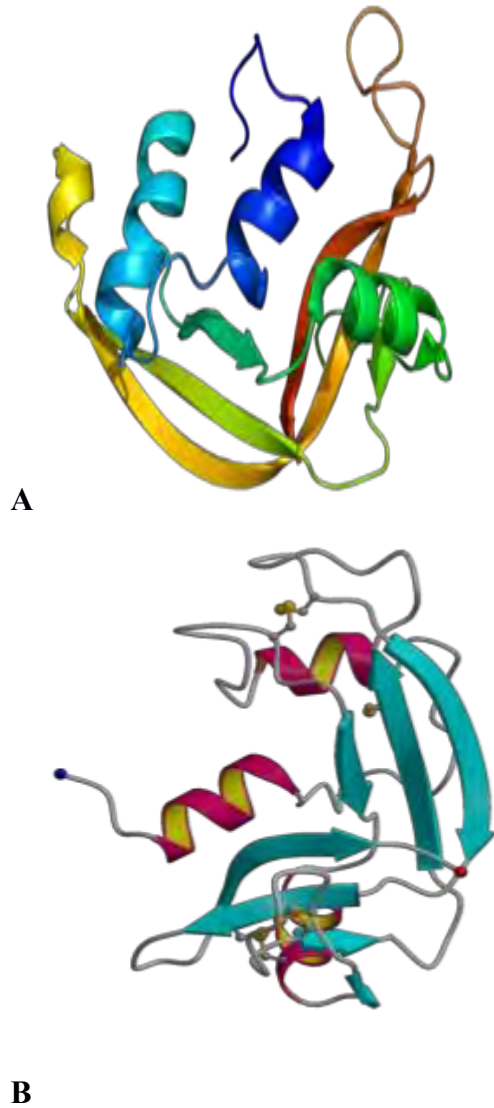
Η κρυσταλλική δομή της ανασυνδυσμένης ηωσινόφιλης νευροτοξίνης προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1996 σε ευκρίνεια 1.83 \AA ⁵⁸ κέντρου μέσω κρυσταλλογραφία ακτίνων X μελετών σύνδεσης μικρών νουκλεοτιδίων και έκτοτε η κρυσταλλική της δομή έχει προσδιοριστεί σε ακόμα μεγαλύτερη ευκρίνεια (0.98 \AA)⁵⁹ (εικόνα 7). Επιπλέον, έχει προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή μίας μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης μορφής της EDN, στην οποία είχαν προστεθεί τέσσερα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο, σε ευκρίνεια 1.0 \AA ³⁶. Από τη μελέτη αυτή, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τόσο η τροποποιημένη όσο και η φυσική δομή της EDN είναι ουσιαστικά η ίδια.



Εικόνα 7. Αναπαράσταση της ανασυνδιασμένης rEDN σε ευκρίνεια 0,98Å. Στην εικόνα εμφανίζεται υποπεριοχή P₁ (Subsite P₁) η οποία αποτελείται από τα εξής αμινοξέα: His15, Lys38, and His129. Επιπλέον γίνεται ορατή η υποπεριοχή P₋₁ η οποία αποτελείται από Arg36, Asn39, και Gln40. Επίσης, παρατηρείται η His82 της B₁ δευτερεύουσας περιοχής. Τέλος, στη δομή αυτή παρουσιάζεται και ένα μόριο οξικού άλατος.

Από όλες αυτές τις μελέτες, έγινε γνωστό ότι η EDN συγκροτείται από τέσσερις α-έλικες, έξι β-ελάσματα και εννέα βρόχους(εικόνα 8)⁶⁰. Τα αμινοξέα που βρίσκονται στις α-έλικες και στα β-πτυχωτά φύλλα απεικονίζονται στον Πίνακα 1⁵⁸. Η κρυσταλλική δομή της EDN αποκάλυψε σημαντική δομική ομοιότητα με την RNase A, το κυριότερο μέλος αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών, αλλά οι περιφερειακές θέσεις δέσμησης του υποστρώματος δεν είναι πολύ συντηρημένες.

Η δευτεροταγής δομή της RNase A (εικόνα 8B) αποτελείται από τρεις α-έλικες και επτά αντιπαράλληλα β-φύλλα, ενώ σχηματίζονται τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ 8 καταλοίπων Cys : 26-84, 40-95, 58-110, 67-72..



Εικόνα 8: Η δευτεροταγής δομή της ηωσινόφιλης-νευροτοξίνης (**A**) και της RNase A (**B**) αντίστοιχα.

Πίνακας 1. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη δευτεροταγή δομή της EDN

Έλικες	β-ελάσματα	Βρόχοι
α1 Thr6-Ile16	β1 Asn39-Leu45	L1 Lvs1-Phe5
α2Gln22Arg35	β2 Pro58-Cys 62	L2 Asn17-Gln21
α3Thr47Cys55	β3 Asn69- Ser74	L3 Arg36-Lvs38
α4Asn92Cys96	β4 Val78-Pro88	L4 Glv56-Asn57
	β5 Arg97-Arg114	L5 Pro63-Ser64
	β6 Pro124-Ile134	L6 Lvs66-Lvs69
		L7 Ser75-Gln77
		L8 Ser89-Gln91
		L9 Asp115-Tyr123

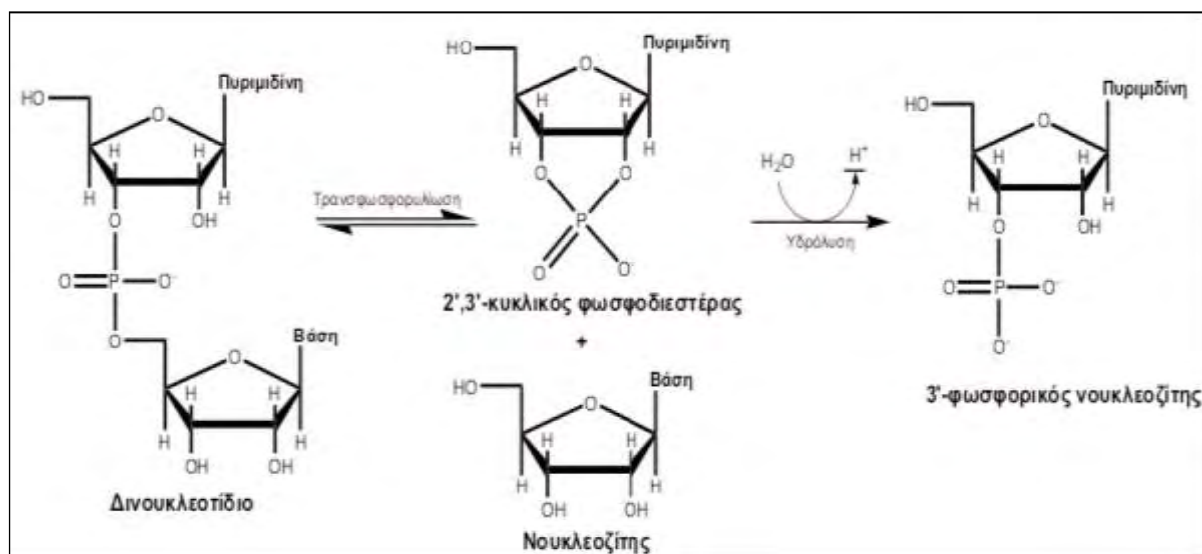
Η πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα για την οποία ευθύνονται οι τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των κυστεϊνών 23-83, 37-96, 55-111 και 62-7148. Ο πρώτος δεσμός συνδέει την έλικα α4 με το έλασμα β4, ο δεύτερος δεσμός συνδέει την έλικα α4 με το βρόγχο L3, ο τρίτος δεσμός συνδέει την έλικα α3 με το έλασμα β5 και ο τέταρτος δισουλφιδικός δεσμός συνδέει τα ελάσματα β2 και β3. Στους δεσμούς αυτούς, αντικατάσταση οποιασδήποτε κυστεϊνης με αλανίνη ή σερίνη οδηγεί σε μειωμένη σταθερότητα του ενζύμου. Ο πρώτος και ο τρίτος δισουλφιδικός δεσμός (23-83 και 55-111), συμβάλλουν περισσότερο στη σταθερότητα του ενζύμου^{58,60}.

1.4 Ενεργό κέντρο-Καταλυτικός μηχανισμός της EDN

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων RNA μορίων, διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών ριβονουκλεοτιδίων, που είναι συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες και η συγκεκριμένη αντίδραση κατάλυσης που θα περιγραφεί διεξοδικά παρακάτω, είναι η αντίδραση της RNase A και ισχύει και για την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος RNA. Έχει ειδικότητα πρόσδεσης στις πυριμιδίνες της 3' θέσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται και στις πουρίνες της 5' θέσης που συνήθως ακολουθείται από γουανίνη. Εντοπίζεται σε μια σχισμή (cleft) κεντρικά του ενζύμου και σχηματίζεται από τρία κύρια κατάλοιπα: His15, Lys38 και His129, τα οποία εμφανίζουν ομολογία με αυτά της RNase A -His12, Lys41 και His119⁶⁰. Η λυσίνη λόγω του θετικού της φορτίου αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες ενώ οι δύο ιστιδίνες συμμετέχουν στην υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Η υδρόλυση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση A γίνεται σε δύο στάδια, μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστερα (Εικόνα 9). το πρώτο στάδιο, επιτυγχάνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5'θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης του πρώτου σταδίου είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος, ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστερα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο, το μόριο του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστερα υδρολύεται δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα⁶¹. Το δεύτερο στάδιο που είναι η αντίδραση της υδρόλυσης είναι μία μη αντιστρεπτή διαδικασία σε αντίθεση με την αντίδραση της τρανσφωσφορυλίωσης που είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστερας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση⁶². Ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο χωρίς να το στρεβλώσει για αυτό και το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη.



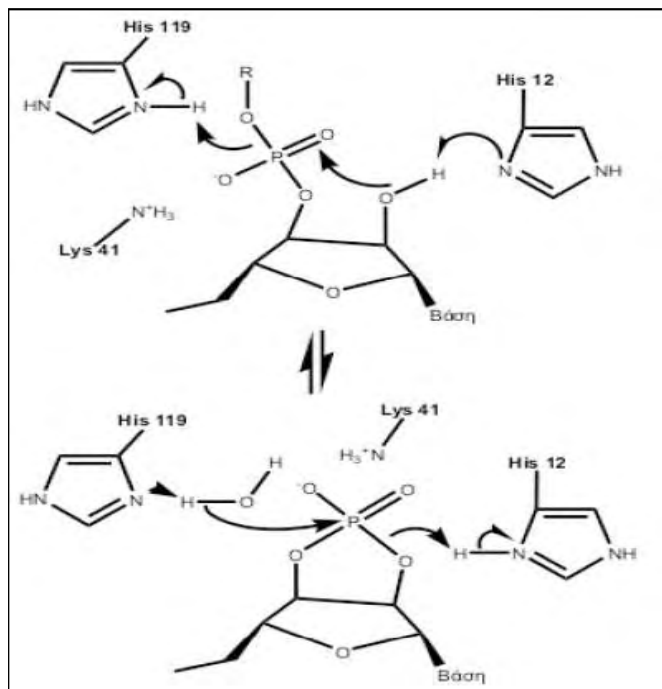
Εικόνα 9. Η αντίδραση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση A και την EDN

Η αντίδραση αρχίζει με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-O με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιοντισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του O. Την ίδια στιγμή η πρωτονιωμένη μορφή της His19 παρέχει το πρωτόνιό της στο 5'-O, και το 2'-O σχηματίζει δεσμό με το P, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από τη θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ P και του 5'-O διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο O. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του P και του 2'-O παράγοντας το 2',3'-κυκλικό ενδιάμεσο.

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

Η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης έχει ενδιαφέρον. Όταν ο φώσφορος γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού 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 το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-O βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρηνόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται (εικόνα 10)⁶².



Εικόνα 10. Ο μηχανισμός κατάλυσης

1.5 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη και η ριβονουκλεάση A εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας όσον αφορά την αμινοξική τους αλληλουχία όπως έχει ήδη αναφερθεί και ο πυρήνας του ενεργού κέντρου και των δυο πρωτεϊνών αποτελείται από τις υποπεριοχές B1,P1,B2 οι οποίες είναι κοινές. Οι δύο πρωτεΐνες, ωστόσο διαφέρουν στις επιμέρους περιφερειακές υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος⁶³ Μετά από κρυσταλλογραφικές μελέτες συμπλόκων της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, με διάφορα ανάλογα υποστρώματος, καθώς επίσης και από μια σειρά πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης σε αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου, προσδιορίστηκαν και ταξινομήθηκαν έξι βοηθητικές περιοχές πρόσδεσης του υποστρώματος: οι P₋₁, P₀, P₁, P₂, B₁, B₂ και B₃⁶⁴.

Όλα τα μέλη της υπερικογένειας της RNase A περιέχουν κεντρικά τοποθετημένες τις ενεργές υποπεριοχές B₁, P₁ και B₂. Αυτές οι υποπεριοχές φιλοξενούν τις νουκλεοτιδικές βάσεις που βρίσκονται τοποθετημένες ανοδικά (B₁)

και καθοδικά (B_2) του φωσφοδιεστερικού δεσμού, όπου λαμβάνει χώρα η διάσπαση του RNA μορίου (P_1). Αυτές οι περιοχές είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ της RNase A και της EDN, οι υπόλοιπες όμως περιφερικές υποπεριοχές που ευθύνονται για την πρόσδεση του φωσφοδιεστερα ανοδικά της B_1 υποπεριοχής και καθοδικά της B_2 υποπεριοχής (αντίστοιχα των P_0 και P_2) διαφέρουν ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Επιπλέον, μια νέα υποπεριοχή, η P_{-1} , έχει εντοπιστεί στην EDN (Εικόνα 11).

Επίσης, αξίζει να αναφέρουμε ότι στην υποπεριοχή B_1 προσδένονται μόνο πυριμιδίνες τόσο στην EDN όσο και στην RNase A ενώ η υποπεριοχή B_2 εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για πουρίνες, όπως συμβαίνει και με τις υπόλοιπες ριβονουκλεάσες⁶⁵. Οι δομικές διαφορές ωστόσο στις υποπεριοχές B_1 και B_2 , οδηγούν σε αλλαγές στην εξειδίκευση του υποστρώματος. Γενικά, 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_1 και 100 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για αδενοσίνες στην περιοχή B_2 ⁶⁶.

Η υποπεριοχή P_1 της EDN έχει την ικανότητα πρόσδεσης της φωσφορικής ομάδας μετά τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, καθώς και θεικών ανιόντων⁵⁸. Αποτελείται από τρία κρίσιμα κατάλοιπα: His15, Lys38 και His129, τα οποία σχηματίζουν μια τριάδα η οποία είναι συντηρημένη σε όλες τις παγκρεατικού τύπου ριβονουκλεάσες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Η P_1 εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο της EDN και μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με Gln14 $N_{\epsilon 2}$, His15 $N_{\epsilon 2}$, His129 $N_{\delta 1}$ και Leu130 N_{21} .

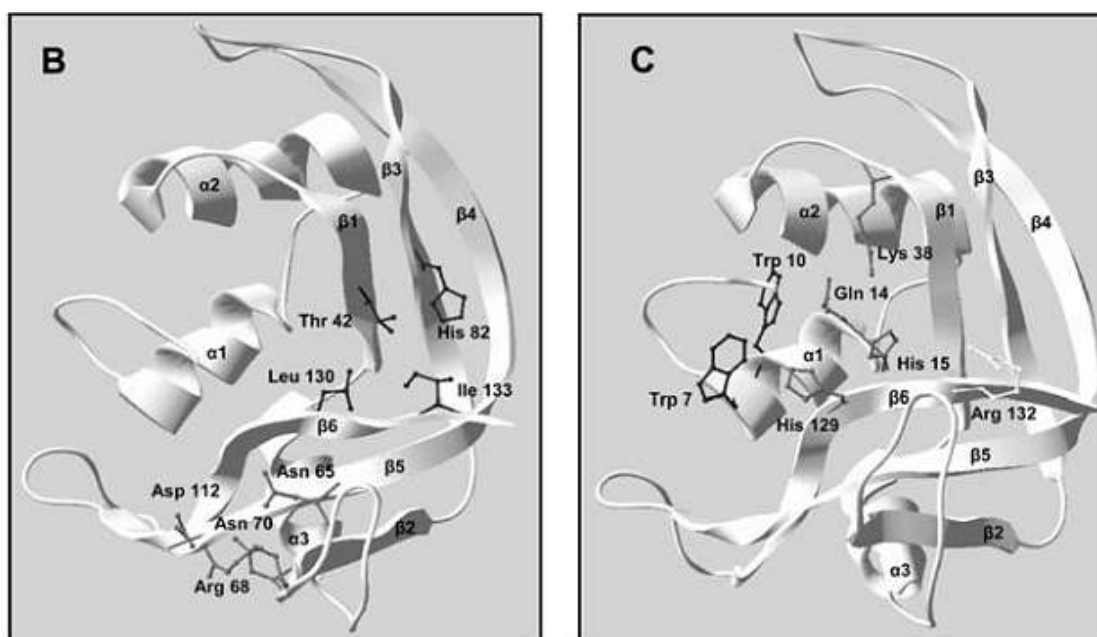
Η υποπεριοχή P_2 αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3'-θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου όπου είναι συνδεδεμένο στη B_2 περιοχή. Περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Trp10 και Trp7.

Η υποπεριοχή P_0 , που έχει την ικανότητα να προσδένει φωσφορικές ομάδες⁵⁸, αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου που είναι συνδεδεμένο στη υποπεριοχή B_1 , ενώ η υποπεριοχή P_2 αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3'-θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου που είναι συνδεδεμένο στην περιοχή B_2 . Οι περιοχές αυτές διαφέρουν μεταξύ της EDN και της RNase A και αποτελούνται από τα εξής κατάλοιπα: Ser64, Trp7 και Trp10, από τα οποία απουσιάζει η ικανότητα πρόσδεσης θεικών ανιόντων^{58,59}.

Η υποπεριοχή B_1 της EDN, που είναι συντηρημένη συγκριτικά με αυτή της ριβονουκλεάσης A, αποτελείται από τα εξής κατάλοιπα: Thr42, Leu130, His82 και Ile133. Η περιοχή αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική χάρη στη Thr42 που όπως και στην RNase A (Thr45), έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με πυριμιδίνες⁵⁹ -μια κυτοσίνη ή ουρακίλη του ενεργού κέντρου του συνδεδεμένου υποστρώματος. Αυτοί οι δεσμοί επηρεάζουν την προτίμηση της EDN για κυτοσίνη παρά για ουρακίλη. Έτσι, η ειδικότητα του ενζύμου για poly(C) είναι μεγαλύτερη από ότι για poly(A), ενώ δεν έχει καθόλου ειδικότητα για poly(G).

Η υποπεριοχή B₂ του καταλυτικού κέντρου της EDN είναι μερικώς συντηρημένη με αυτή της ριβονουκλεάσης A και περιλαμβάνει τα κατάλοιπα αμινοξέων Arg68, Asn70, Asn65 και Asp112. Στην υποπεριοχή αυτή, δεσμεύεται η νουκλεοτιδική βάση που βρίσκεται καθοδικά του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υφίσταται τη διάσπαση και χαρακτηρίζεται από υψηλή προτίμηση για πουρίνες. Δύο από τα αμινοξέα που την απαρτίζουν, η Arg68 και Asp112, μπορούν να αποκτούν δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις, που δεν έχουν κάποια φυσιολογική σημασία αλλά είναι ενδεικτικές της διαμορφωτικής ελευθερίας που χαρακτηρίζει τα αμινοξέα αυτά. Οι εναλλακτικές διαμορφώσεις αυτών των αμινοξέων εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά μόρια νερού⁵⁹.

Η P₋₁ είναι μια νέα υποπεριοχή που ταυτοποιήθηκε μόνο στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη και δεν υπάρχει στις υπόλοιπες ριβονουκλεάσες η οποία προσδένειθειικά ανιόντα (SO₄). Περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Arg36, Asn39, και Gln40. Σε πρόσφατες μελέτες, μάλιστα βρέθηκε ότι η υποπεριοχή P₋₁ είναι κρίσιμη για τη δραστηριότητα ριβονουκλεάσης της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης⁶⁷.



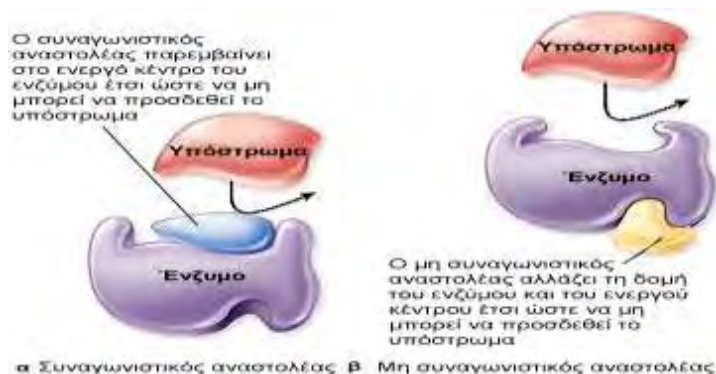
Εικόνα 11: Απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της EDN. Στη B παρατηρούμε τα κατάλοιπα με μαύρο χρώμα που περιλαμβάνονται στη B₁ και με γκρι χρώμα στη B₂ υποπεριοχή αντίστοιχα. Στη C τα κατάλοιπα με μαύρο χρώμα αποτελούν την υποπεριοχή P₂, με γκρι χρώμα την P₁ και με λευκό την P₀.

1.6 Η ενζυμική αναστολή

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Οποιαδήποτε ένωση λοιπόν ελαττώνει την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να θεωρηθεί ως αναστολέας. Αυτός ο τρόπος της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει το ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα. Πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν μέσω της αναστολής των ενζύμων. Η αναστολή από ειδικές χημικές ουσίες μπορεί να είναι πηγή για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης.

Έτσι λοιπόν ως αναστολέας χαρακτηρίζεται μία ένωση η οποία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης, και μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτός είτε μη αντιστρεπτός. Ως αντιστρεπτός αναστολέας ορίζεται ο αναστολέας εκείνος ο οποίος μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος με σχετικά εύκολες μεθόδους, και όταν πραγματοποιηθεί η αφαίρεση αυτή, το ένζυμο επανακτά πλήρως τη δραστηριότητα του. Αντίθετα, ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο του ενεργού κέντρου, και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Στην περίπτωση αυτή, της μη αντιστρεπτής αναστολής δηλαδή, ο αναστολέας συνήθως δεσμεύεται με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπιες μεθόδους. Πολλές φορές, οι συνέπειες μίας μη αντιστρεπτής αναστολής μπορούν να αντιστραφούν με χημικά μέσα, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μπορεί να δράσει ξανά. Οι όροι αντιστρεπτός και μη αντιστρεπτός αναστολέας περιγράφουν κυρίως το πόσο γρήγορα μπορεί να αποδεσμευτεί ο αναστολέας από το ένζυμο. Για τον λόγο αυτό, συχνά χρησιμοποιούνται οι όροι απενεργοποιητής (inactivator) και επανενεργοποίηση (reactivation).

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι: συναγωνιστική (competitive inhibition), μη-συναγωνιστική (non-competitive inhibition)(εικόνα 11), ασυναγωνιστή ή ανταγωνιστική (uncompetitive inhibition), μκτή (mixed type inhibition) και βραδείας δεσμεύσεως (slow-binding inhibition)^{68,69}.



Εικόνα 11. α) Συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του υποστρώματος, β) Μη συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα σε άλλη θέση και όχι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Με αυτό τον τρόπο αλλάζει η δομή του ενζύμου και η πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του είναι αδύνατη.

❖ Συναγωνιστική Αναστολή

Σε περίπτωση που ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για τη δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός αναστολέας⁶⁷. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υποστρώματα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο αναστολέας αυτός, ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης, με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Η παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα αυξάνει την K_m ως προς το υπόστρωμα, αλλά δεν επηρεάζει τη V_{max} . Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα μπορεί να φτάσει στη μέγιστη τιμή της (V_{max}), διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος, η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Μετά από κινητικές μελέτες, παρατηρούμε λοιπόν ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια ιδιαίτερη ενζυμική ταχύτητα. Επιπλέον, παρατηρείται μεταβολή στην φαινομενική τιμή της K_m . Αυτή η νέα τιμή, η οποία ονομάζεται K ισούται με:

$$K = K_m (1 + [I]/K_i),$$

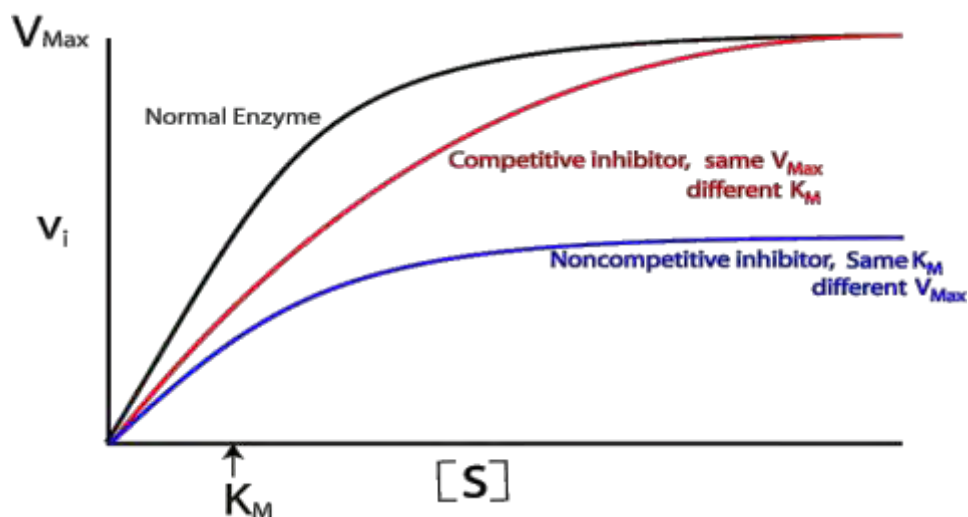
όπου [I] η συγκέντρωση του αναστολέα και K_i η σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα.

Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα, αυξάνεται και η K. Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια μέγιστη ταχύτητα όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως επίσης και όταν δεν υπάρχει.

❖ Μη συναγωνιστική αναστολή

Σε περίπτωση που ο αναστολέας I δεν συναγωνίζεται με το υπόστρωμα S για τη δέσμευση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή, τότε η αναστολή καλείται μη συναγωνιστική⁶⁸. Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα τριπλό σύμπλοκο του τύπου EIS. Ένα σύμπλοκο όμως ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος (ESI) δεν μπορεί να παράγει προϊόν. Η μη-συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή δε μπορεί να ξεπεραστεί με

την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Συνεπώς η ταχύτητα δε μπορεί να φτάσει σε μέγιστη τιμή V_{max} ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Το ουσιαστικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αναστολέα-ενζύμου θα είναι η αφαίρεση μορίων ενζύμου από το σύστημα και έτσι η ολική συγκέντρωση του ενζύμου ελαττώνεται. Έτσι συνάμα ελαττώνεται και η τιμή της V_{max} σε μια νέα τιμή που καλείται V_{max}^{app} ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_{max} . Στην εικόνα 13 παρουσιάζεται η κινητική της συναγωνιστικής και μη συναγωνιστικής αναστολής.



Εικόνα 13. Διάγραμμα που απεικονίζει την κινητική συναγωνιστικού αναστολέα, μη-συναγωνιστικού αναστολέα, και χωρίς αναστολέα.

❖ Μικτή αναστολή

Στους αναστολείς μικτού τύπου μεταβάλλονται τόσο η K_m όσο και η V_{max} . Η K_m μπορεί να αυξηθεί ή να ελαττωθεί από τον αναστολέα, ενώ η v_{max} πάντα θα ελαττώνεται⁶⁷.

❖ 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} ⁶⁸.

1.7 Οι αναστολείς

Οι ριβονουκλεάσες είναι ενδονουκλεάσες που ελέγχουν μετα-μεταγραφικά τον πληθυσμό των μορίων RNA σε κύτταρα. Οι ριβονουκλεάσες και ιδιαίτερα η RNA ase A, έχουν αποδειχθεί ότι είναι εξαιρετικά μοντέλα για τη μελέτη της δομής

της πρωτεΐνης, την αναδίπλωση και την σταθερότητα, και την ένζυμική κατάλυση. Κατά την τελευταία δεκαετία αρκετά ομόλογα της RNase A υπεροικογένειας έχουν βρεθεί να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη παθολογία. Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (Ang), ένας ισχυρός επαγωγέας της νεοαγγείωσης *in vivo*, είναι ένας σημαντικός στόχος για πολλές ασθένειες που εξαρτώνται από την αγγειογένεση και άλλες μη νεοπλασματικές ασθένειες. Οι ηωσινόφιλες ριβονουκλεάσες, ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) και η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP) και οι δύο εμπλέκονται στο σύστημα ανοσοαπόκρισης και σε φλεγμονώδεις διαταραχές. Η βιολογική δραστηριότητα όλων αυτών των ομολόγων της RNase A συνδέεται με την ενζυματική δραστηριότητα τους, γι αυτό το λόγο, αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν στόχους για την ορθολογική σχεδίαση ειδικών αναστολέων οι οποίοι θα μπορούν να καταστρέψουν την δραστηριότητά τους και να ρυθμίσουν τις παθολογικές δράσεις τους.

Το ενεργό κέντρο όλων των RNασών είναι εξαιρετικά διατηρημένο και σε αλληλουχία και δομική αρχιτεκτονική όπως ήδη έχει αναφερθεί. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες διαφορές στις περιφερικές θέσεις πρόσδεσης του RNA μπορεί να προκαλέσουν διακυμάνσεις στην εξειδίκευση ως προς διαφορετικά υποστρώματα και μπορεί να παρέχουν ενδείξεις για την ορθολογική σχεδίαση ειδικών προσδετών για κάθε RNAάση. Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A όπως αναφέρθηκε παραπάνω παρουσιάζει 36% ομολογία με την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ενώ το κεντρικό καταλυτικό της κέντρο (P₁) είναι απόλυτα συντηρημένο με αυτό της RNase A. Επιπροσθέτως, τα περιφερειακά κέντρα σύνδεσης B₁ και B₂ είναι επίσης σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα. Έτσι λοιπόν ορισμένοι από τους αναστολείς της RNase A, οι οποίοι καλύπτουν υποπεριοχές με συντηρημένα αμινοξέα και στα δυο ένζυμα, δοκιμάστηκαν και στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.

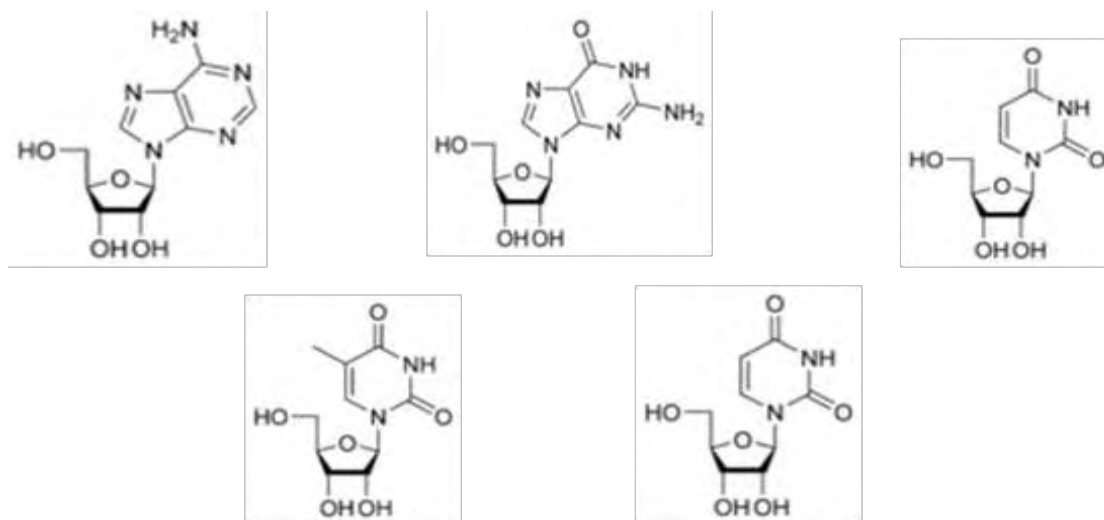
Πρόσφατα έχουν μελετηθεί στην παγκρεατική ριβονουκλεάση A, μια σειρά νουκλεοζιτών, (η δράση των οποίων θα αναφερθεί παρακάτω), οι οποίοι παρουσίασαν μια πολύ ισχυρή αναστολή με σταθερές αναστολής της τάξης των μΜ. Οι νουκλεοζίτες αυτοί αποτελούνται από βάσεις πυριμιδίνης, είναι απαλλαγμένοι από φωσφορικές ομάδες, και κάποιιοι από αυτούς διαθέτουν ένα τριαζολικό δακτύλιο ο οποίος αυξάνει κατά πολύ την αναστολή⁷⁰.

1.8 Οι νουκλεοζίτες και η θεραπευτική τους δράση

Νουκλεοζίτης ονομάζεται μια μονάδα που αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένη με ένα σάκχαρο, μια πεντόζη. Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη, ενώ στο DNA ονομάζονται δεοξυαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη. Σε κάθε περίπτωση, το N-9 μιας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C-1 του σακχάρου. Η βάση βρίσκεται πάνω από το

επίπεδο του σακχάρου όταν η δομή γράφεται με τον κλασικό τρόπο. Με άλλα λόγια, η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού N είναι β⁶⁹.

Οι νουκλεοζίτες εξαιτίας του δομικού τους ρόλου στο DNA και στο RNA, απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς μέσα στη φύση. Στην Εικόνα 14 φαίνονται ορισμένα παραδείγματα νουκλεοζιτών:



Εικόνα 14: Νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, γουανοσίνη, θυμιδίνη, κυτιδίνη, ουριδίνη).

Οι νουκλεοζίτες, καθώς και τα ανάλογά νουκλεοζιτών, παρουσιάζουν τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτό οφείλεται στις ιδιαίτερες ιδιότητες τους, οι οποίες τους καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιαρκικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες⁷¹. Συγκεκριμένα, οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν μελετηθεί ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες καθώς παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες⁷². Έχει διαπιστωθεί η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών. Επιπλέον, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, σαν ουσίες που μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξείδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα⁷³.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι από τα εξήντα αντικαρκινικά μόρια που έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα από τον FDA, έντεκα είναι αντιμεταβολίτες και δέκα από τα έντεκα είναι νουκλεοζίτες ή συγγενικά μόρια, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους. Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC), 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθροπεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), έχουν μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους

ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο ενάντια στη λευχαιμία και τα λεμφώματα, αλλά και σε κακοήθεις όγκους.

Είναι πλέον βέβαιο πως ένας μεγάλος αριθμός φυσικών αντιβιοτικών με σημαντική αντική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Προκειμένου, λοιπόν, να διερευνηθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους, έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών⁷⁰.

1.9 Μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά, ωστόσο έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται με παθητική διάχυση στα κύτταρα. Τα νουκλεοτιδία που είναι οι δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA παράγονται ενδοκυτταρικά με τροποποίηση των νουκλεοζιτών.

Η ικανότητά των νουκλεοζιτών για παθητική διάχυση εκμεταλλεύθηκε για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, δηλαδή μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Η δραστική ουσία των φαρμάκων είναι κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, έτσι λοιπόν για να είναι δραστικά επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα όπως υποδοχείς, διάλυτους ιόντων, ένζυμα και μόρια μεταφορείς.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, γιατί μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα.

Τα αντικαρκινικά και τα αντικαρκινικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Η φαρμακολογική τους δράση εξαρτάται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση τους αφού αρχικά είναι ανενεργά προφάρμακα.. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Οι ιικές

πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντικών φαρμάκων. Κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού τα αντικά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ικές πολυμεράσες, μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαιρετική δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

Επίσης τα ανάλογα των νουκλεοζιτών δρουν και ως προφάρμακα. Για να δράσουν πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους. Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντική θεραπεία.

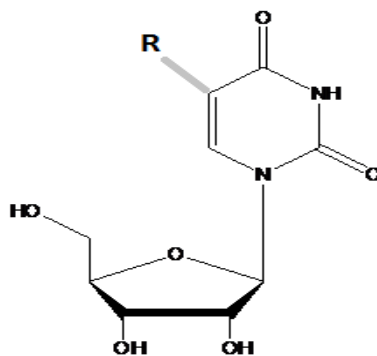
Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ικές-κινάσες που συχνά καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζιτή (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή. Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες. Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών⁷⁰.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

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

Για την παγκρεατική ριβονουκλεάση A, έχει μελετηθεί μία σειρά συνθετικών νουκλεοζιτών οι οποίοι παρουσίαζαν μία αρκετά ικανοποιητική συναγωνιστική αναστολή της τάξης των μM . Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως οι τιμές της σταθεράς διάστασης K_i ήταν χαμηλότερες (επομένως ήταν ισχυρότερη η αναστολή) όταν ο αναστολέας είχε στο μόριο του τριαζολικό δακτύλιο, σε σχέση πάντα με τους αναστολείς που μελετήθηκαν και δεν είχαν στο μόριο τους τριαζολικό δακτύλιο ⁵³.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολής της δραστηριότητας της EDN από τον αναστολέα 6b. Η σταθερά αναστολής του στη ριβονουκλεάση A είναι $44.1 \pm 6.4 \mu\text{M}$. Ο 6b αναστολέας δεν έχει τριαζολικό δακτύλιο ανάμεσα στη ριβόζη και τη βάση και φέρει ως υποκαταστάτη το μεθύλιο – CH_3 . Η χαρακτηριστική δομή του φαίνεται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Δομή αναστολέα 6b, όπου R – CH_2 .

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολής της EDN από τον αναστολέα αυτό. Απώτερος σκοπός αποτελεί ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός βελτιωμένων αναστολέων του ενζύμου μικρού μοριακού βάρους, οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά μέσα για την αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται η EDN.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1ο ΣΤΑΔΙΟ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΝΗΣ (EDN)

2. Πλασμιδιακοί φορείς και επαγωγή της έκφρασης της EDN

2.1 Βακτηριακά στελέχη *E.coli*

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

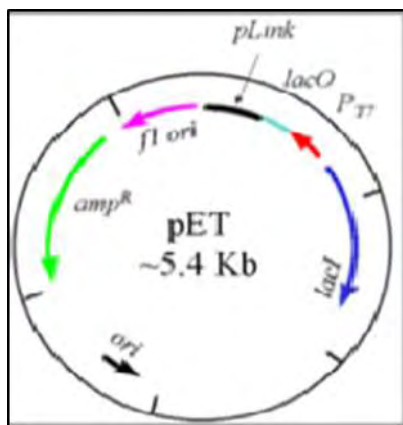
Τα γενετικά στοιχεία αυτά ως φορείς κλωνοποίησης, χαρακτηρίζονται από τις εξής ιδιότητες:

- ❖ Έχουν μικρό γονιδίωμα, εύκολο στην απομόνωση και τον χειρισμό,
- ❖ Περιέχουν ανεξάρτητη περιοχή έναρξης της αντιγραφής (*ori C*), προκειμένου η παραγωγή πλασμιδίου στα κύτταρα να συντελείται ανεξάρτητα από τον άμεσο χρωμοσωματικό έλεγχο,
- ❖ Περιέχουν την περιοχή του πολυσυνδέτη, μία περιοχή κατάλληλη για την εισαγωγή εξω-χρωμοσωμικού DNA με πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες,
- ❖ Βρίσκονται μέσα στον οργανισμό σε πολλαπλά αντίγραφα, έτσι να είναι δυνατή η ενίσχυση του DNA τους,
- ❖ Διαθέτουν επιλέξιμους δείκτες, π.χ. γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και γονίδια αναφοράς, οι οποίοι διευκολύνουν την ανίχνευση και επιλογή κυτταρικών κλώνων που με τα επιθυμητά πλασμίδια,

- ❖ Τέλος, όταν ο φορέας χρησιμοποιείται για την έκφραση κάποιου γονιδίου, τότε το πλασμίδιο διαθέτει τρεις επιπλέον περιοχές που κωδικοποιούν τον υποκινητή (P), τον χειριστή (O) και τον καταστολέα (I) του υποκινητή²⁹.

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

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



Εικόνα 15: Ο πλασμιδιακός φορέας pET11c.

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

Τα μέλη του γένους *E. coli* είναι δυνητικά αναερόβια, χημειοετερότροφα, αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ανήκουν στην φυσική χλωρίδα του εντέρου. Πιθανώς να έχουν κάποιο ρόλο στη θρέψη μέσω σύνθεσης βιταμινών, ιδιαίτερα βιταμίνης K. Τα περισσότερα στελέχη της *E. coli* είναι ακίνδυνα για τον οργανισμό. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη είναι παθογόνα και συνδέονται με την εμφάνιση τροφικών δηλητηριάσεων στον οργανισμό. Πρόκειται για μεσόφιλα βακτήρια με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C, τα οποία απαιτούν στο περιβάλλον ανάπτυξης τους την παρουσία οργανικών ενώσεων ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, όπως επίσης άζωτο, θείο και άλατα.

Λόγω συγκεκριμένων πλεονεκτημάτων η *E. Coli* είναι το συνηθέστερο βακτηριακό είδος που χρησιμοποιείται για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- ❖ ευκολία στην καλλιέργεια και τον χειρισμό, διότι έχουν διαλευκανθεί πλήρως τα βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά της, με οικονομικό εργαστηριακό εξοπλισμό,
- ❖ διαθεσιμότητα ποικίλων συμβατών φορέων DNA και στελεχών-ξενιστών για τη βελτιστοποίηση της έκφρασης ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας
- ❖ δυνατότητα τροποποίησης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων προκειμένου να εκφραστεί το επιθυμητό γονίδιο και να παραχθεί η εξεταζόμενη πρωτεΐνη.

Το κύριο μειονέκτημα χρήσης της *E. coli* είναι η απουσία μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων στα κύτταρα αυτά. Επίσης παρατηρείται δυσκολία στην απομόνωση-καθαρισμό του προϊόντος λόγω διατήρησης των πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο.

Στο εμπόριο είναι διαθέσιμα λοιπόν, πάρα πολλά διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *E. coli*, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις ιδιότητες που τους έχουν προσδώσει οι κατασκευαστές τους. Στην παρούσα πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος B834, το οποίο έχει το εξής γονιδίωμα:

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

2.3 Καλλιέργεια κυττάρων *E. Coli*

Με τον όρο καλλιέργεια κυττάρων περιγράφεται η ανάπτυξη συγκεκριμένου στελέχους ή είδους οργανισμού σε εργαστηριακό θρεπτικό μέσο. Συνήθως ενδιαφέρει η ανάπτυξη καλλιιεργειών ενός μόνο τύπου κυττάρου, δηλαδή η ανάπτυξη ομοιογενών καλλιιεργειών που δεν περιέχουν άλλα κύτταρα εκτός από αυτά που μας ενδιαφέρουν. Τέτοιες καλλιιεργειες ονομάζονται αξενικές και για την ανάπτυξή τους απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες. Αυτό προϋποθέτει πως ο χώρος εργασίας, καθώς και όλα τα σκεύη και υλικά να είναι αποστειρωμένα (χρησιμοποιείται λύχνος Bunsen και όλα τα διαλύματα αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο).

Όταν τα κύτταρα καλλιιεργούνται εργαστηριακά, οι ερευνητές παρεμβαίνουν και σταματούν την ανάπτυξή τους στην εκθετική φάση, όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά και θεωρούνται πλήρως ενεργά όσον αφορά το μεταβολισμό τους. Έτσι εξασφαλίζεται η κατά δύναμιν μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός της φάσης στην οποία βρίσκεται η καλλιιεργεια των κυττάρων γίνεται μέσω φασματοφωτομέτρησης στα 600nm σε τακτά χρονικά διαστήματα, όπου μετριέται σε ειδική κυψελίδα η οπτική πυκνότητα 1 ml καλλιιεργειας, έτσι ώστε η οπτική απορρόφηση να μην υπερβεί την τιμή 0,6-0,8. Ο εμβολιασμός όλων των καλλιιεργειών γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η επώαση στους 37 °C.

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα των καλλιιεργειών.

- Για τη δημιουργία των μικρών καλλιιεργειών :
 - ✓ Προετοιμασία θρεπτικού υλικού LB (*Lysogeny Broth*) – Άγαρ

Χρησιμοποιήθηκε το LB-Άγαρ, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο σε μορφή σκόνης.

- ❖ Για την παρασκευή 200 ml LB και γνωρίζοντας πως για 1 L καλλιιεργειας απαιτούνται 25g LB, ζυγίζουμε 5g LB από το stock.
- ❖ Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος.
- ❖ Το LB αποστειρώνεται και φυλάσσεται στο ψυγείο.

- Για τη δημιουργία μεγάλων καλλιιεργειών:
 - ✓ Προετοιμασία θρεπτικού υλικού TB (*Terrific Broth*)

Παρασκευάστηκε 1L TB medium (*Terrific Broth*). Η διεργασία παρασκευής ήταν η εξής:

- ❖ Διάλυση 12g *Tryptone* και 24g *Yeast Extract* σε 800ml *ddH₂O*.
- ❖ Προσθήκη 4ml *glycerol* και συμπλήρωση με *ddH₂O* μέχρι τα 900ml.
- ❖ Διάλυση 12,54g *K₂HPO₄* και 2,31g *KH₂PO₄* σε 100ml *ddH₂O*.
- ❖ Ανάμιξη των δύο διαλυμάτων μέχρι τον τελικό όγκο (1 L).
- ❖ Σε δύο κωνικές φιάλες του 1L, προσθέτω από 500ml του θρεπτικού TB medium που παρασκευάστηκε.

- ❖ Ακολουθεί αποστείρωση των δύο κωνικών φιαλών και αποθήκευση στο ψυγείο.

2.3.1 Χρήση αντιβιοτικών ως επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας

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

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

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

2.3.2. Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων για παραγωγή EDN

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αρχικά σε δύο μικρές υγρές καλλιέργειες (των 5ml) και κατόπιν σε δύο μεγάλες καλλιέργειες (των 500ml).

- Παρασκευή μικρών καλλιεργειών

Σε δύο αποστειρωμένα falcon προστίθενται από:

- ❖ 5ml θρεπτικού LB
- ❖ 20μl amp (αρχικής συγκέντρωσεως 100 mg/ml και κατ'επέκταση τελικής συγκέντρωσεως 0,4 mg/ml σε τελικό όγκο 5ml).

Στην συνέχεια, πραγματοποιείται ο εμβολιασμός από stock κυττάρων E.coli (με ετερόλογο φορέα ενσωματωμένο), που ονομάζεται glycerol stock, καθώς εκτός από τα κύτταρα περιέχει και γλυκερόλη ώστε να επιτρέπεται η φύλαξη στους -80 °C. Τέλος, τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 16h υπό ήπια ανάδευση, στα 250 rpm.

- Παρασκευή μεγάλων καλλιεργειών

Οι δύο αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 2L που περιέχουν 500mL θρεπτικό TB medium, εμβολιάζονται με 5ml μικρής καλλιέργειας, η καθεμία. Στη συνέχεια, προστίθενται 500μl amp σε κάθε κωνική φιάλη και ακολουθεί επώαση των δύο μεγάλων υγρών καλλιεργειών στους 37 °C και υπό 210 rpm, μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600 nm να κυμαίνεται μεταξύ 0,6 και 0,8 ($OD_{600} = 0,6-0,8$).

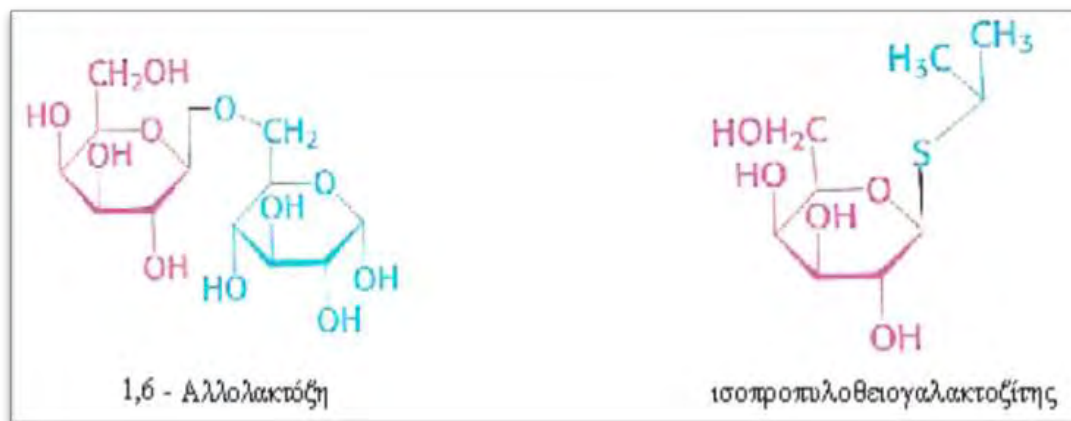
Στην παρούσα εργασία, μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος των 7h η OD_{600} πήρε την επιθυμητή τιμή 0,575, καθώς τα βακτήρια βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Η παρασκευή των μικρών και μεγάλων καλλιεργειών όσο και η φασματοφωτομέτρηση, γίνονται με ιδιαίτερη προσοχή σε στείρες συνθήκες. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και σκεύη, και το πείραμα διεξάγεται σε πάγκους οι οποίοι έχουν καθαριστεί με αιθανόλη.

2.4 Επαγωγή

Ο IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) ή ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης είναι χρήσιμο εργαλείο στην εργαστηριακή έρευνα για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης, καθώς αποτελεί ανάλογο της λακτόζης και είναι ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης της β-γαλακτοζιδάσης. Το σημαντικό είναι ότι δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου και έτσι δεν καταβολίζεται, εξασφαλίζοντας συνεχή επαγωγή.

Επιτρέπει λοιπόν την συνεχή διεξαγωγή της γονιδιακής έκφρασης λόγω της ικανότητας του να αδρανοποιεί τον καταστολέα lac. Εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη (Εικόνα 18), ένα παραπροϊόν της αντίδρασης της β-γαλακτοζιδάσης που παράγεται σε χαμηλά επίπεδα από τα λίγα μόρια της β-γαλακτοζιδάσης που υπάρχουν πριν από την επαγωγή και η οποία δρα ως επαγωγέας του οπερονίου lac. Έτσι εξηγείται η χρήση της συγκεκριμένης ένωσης ως επαγωγέα, για την αύξηση στην έκφραση πρωτεϊνών.



Εικόνα 16: Η χημική δομή της 1,6-αλλολακτόζης και του IPTG

Επιπλέον, ένα πλεονέκτημα του IPTG που καθιστά συχνή τη χρήση του στις πειραματικές διαδικασίες είναι ότι η *E.coli* αδυνατεί να υδρολύσει και γενικά να καταβολίσει την ένωση αυτή, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της να παραμένει σταθερή σε όλη τη διαδικασία της κυτταρικής αντιγραφής.

Όσον αφορά τη δράση του IPTG, όπως και η αλλολακτόζη, συνδέεται με τον καταστολέα lac και απελευθερώνει τον τετραμερή καταστολέα από το χειριστή lac με αλλοστερικό τρόπο, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων, όπως είναι το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης, στο οπερόνιο lac. Σε αντίθεση όμως με την αλλολακτόζη, το IPTG περιέχει ένα μόριο θείου στο μόριο του, το οποίο δημιουργεί έναν χημικό δεσμό, μη-υδρολύσιμο από το κύτταρο, εμποδίζοντας έτσι το κύτταρο να μεταβολίσει την ένωση. Συνεπώς, η συγκέντρωση του IPTG παραμένει σταθερή και η έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται από το συγκεκριμένο οπερόνιο δεν αναστέλλεται κατά τη διάρκεια του πειράματος. Όσον αφορά την πρόσληψη του IPTG από τα κύτταρα *E.coli*, έχει βρεθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις εισέρχεται στα κύτταρα μέσω της περμεάσης της λακτόζης, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα ανεξάρτητα από την περμεάση, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις επαγωγής. Συμπεραίνουμε δηλαδή, ότι η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις IPTG.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, , προστίθεται επαγωγέας IPTG, μόλις η τιμή της OD₆₀₀ φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο. Η τελική συγκέντρωση του επαγωγέα που προστέθηκε στις κωνικές φιάλες με τις μεγάλες υγρές καλλιέργειες, ήταν 1 mM, δηλαδή προσθέσαμε 1 ml επαγωγέα. Μετά την προσθήκη του

επαγωγέα, ακολούθησε επώαση για 4h στις ίδιες συνθήκες όπου έγινε η καλλιέργεια των κυττάρων, δηλαδή στους 37 °C υπό ανάδευση στις 250 rpm . Μετά το πέρας των 4h, τα κύτταρα βγαίνουν από τον επωαστήρα και φυλάσσονται στο ψυγείο.

2.5. Συλλογή των κυττάρων

Οι πρωτεΐνες που παράγονται εντοπίζονται είτε στο κυτταρικό ίζημα είτε στο υπερκείμενο ύστερα από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε μεγάλες ταχύτητες. Οι εξοκυτταρικές 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 EDN επειδή είναι μια μη-διαλυτή ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, εντοπίζεται στο κυτταρικό ίζημα. Πρέπει να σημειωθεί ότι το υπερκείμενο που απορρίπτεται, θα πρέπει να είναι διαυγές ως ένδειξη ότι έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα. Η φυγοκέντρηση θα πρέπει να επαναληφθεί εάν δεν ισχύει κάτι τέτοιο.

Πραγματοποιείται λοιπόν φυγοκέντρηση στους 4°C και στις 5000 rpm για 20min, προκειμένου να καθιζάνουν τα κύτταρα. Το κυτταρικό ίζημα συλλέγεται για περαιτέρω επεξεργασία ή αποθηκεύεται στους -20°C.

2.6. Λύση των κυττάρων

Σε κάθε πορεία απομόνωσης, η λύση των κυττάρων είναι ένα κρίσιμο στάδιο καθώς είναι σε θέση να επηρεάσει τόσο την συνολική ποσότητα όσο και τη βιολογική ενεργότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η λύση των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους: ενζυμικά, μηχανικά ή μέσω εφαρμογής οσμωτικής πίεσης. Στο πείραμα αυτό, πραγματοποιήθηκε μηχανική λύση των κυττάρων, που έγινε μέσω υπερήχων. Το κυτταρικό ίζημα συλλέγεται και επαναδιαλύεται σε lysis buffer. Έπειτα πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων.

Το Lysis Buffer αποτελείται από δύο επιμέρους διαλύματα, Α και Β, η σύσταση των οποίων είναι η ακόλουθη:

- **Διάλυμα Α** (V=100ml, pH=8)
- ❖ Αναστολέα πρωτεασών PMSF 1mM (από stock 0,1% w/v) για την αποφυγή τυχόν πρωτεόλυσης.
- ❖ 0,1% w/v 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 (pH=8).

- **Διάλυμα B** ($V=10ml$)
 - ❖ 4% w/v *Sodium Deoxycholate* που διαταράσσει και αποτρέπει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Τα ιζήματα των κυττάρων (pellet) διαλυτοποιούνται με το διάλυμα A του lysis buffer. Η διαλυτοποίηση γίνεται με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και χρησιμοποιείται τόσος όγκος διαλύματος A όσος χρειάζεται, προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή διαλυτοποίηση των ιζημάτων. Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε falcon 1ml Διαλύματος B και ακολουθεί επώαση για 10min στο cold-room, μέσα σε πάγο. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 40 mg λυσοζύμης, η οποία χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων μέσω υδρόλυσης των β (1-4) γλυκοζιτικών δεσμών ανάμεσα στα κατάλοιπα N-ακέτυλο-μουραμικού οξέος (NAM) και N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης (NAG) σε κάποιους πολυσακχαρίτες.

Τέλος, προστίθενται 2ml βενζονάσης σε κάθε falcon. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητικότερη λύση των κυττάρων και πέψη του DNA.

Μετά το βήμα αυτό, τα κύτταρα παραμένουν για 15min στο cold-room ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) υπό ήπια ανάδευση.

Η λύση πραγματοποιείται με υπερήχους σε 4 κύκλους. Το διάλυμα υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η διαδικασία γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή των πρωτεϊνών.

Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και πάλι για 1h, στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ στις 10.000 rpm και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης κρατάμε και πάλι το ίζημα, γιατί όπως έχουμε προαναφέρει η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μια μη διαλυτή πρωτεΐνη. Έτσι, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα φυλάσσεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.7. Πλύση των κυττάρων & Ομογενοποίηση

Σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (wash buffer), επαναδιαλύεται με τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε στο προηγούμενο βήμα. Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιούνται στις εξής συνθήκες:

- ❖ θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1h στις 9200g.

Μετά το τέλος κάθε φυγοκέντρωσης, τα υπερκείμενα απορρίπτονται και τα κυτταρικά ιζήματα, ομογενοποιούνται με την ειδική συσκευή ομογενοποίησης. Η διαδικασία πρέπει να γίνεται σε πάγο και να μη ξεπερνά τα 5-6 min.

Το διάλυμα πλύσης ($V=500\text{ml}$, $\text{pH}=8$) περιέχει:

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

Διαχωρίζουμε το διάλυμα πλύσης (500 ml) σε δύο επιμέρους διαλύματα. Στο ένα διάλυμα (300 ml) προστίθεται Triton 0,1% w/v ενώ στο άλλο διάλυμα (200 ml) δεν προστίθεται Triton. Προσθέτουμε έπειτα 50 ml του διαλύματος πλύσης με Triton σε κάθε σωλήνα που περιέχει το ίζημα.

Η διαδικασία των πλύσεων είναι η παρακάτω και για την κάθε φυγοκέντρωση ισχύει: 1h, 4°C και 9200g

- ❖ *1η φυγοκέντρωση → πλύση με Triton και ομογενοποίηση.*
 - *Λήψη του ιζήματος, και επαναδιάλυση με διάλυμα πλύσης με Triton σε κάθε σωλήνα που περιέχει το ίζημα.*
- ❖ *2η φυγοκέντρωση → πλύση με Triton και ομογενοποίηση.*
 - *Λήψη του ιζήματος, και επαναδιάλυση με το διάλυμα πλύσης με Triton σε κάθε σωλήνα που περιέχει το ίζημα.*
- ❖ *3η φυγοκέντρωση → πλύση με Triton και ομογενοποίηση.*
 - *Λήψη του ιζήματος, και επαναδιάλυση με το διάλυμα πλύσης χωρίς Triton σε κάθε σωλήνα που περιέχει το ίζημα.*
- ❖ *4η φυγοκέντρωση → πλύση χωρίς Triton και ομογενοποίηση.*

Η τελευταία πλύση του ιζήματος είναι προαιρετική αλλά πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία προκειμένου να διασφαλιστεί η απομάκρυνση του Triton από τα κύτταρα, το οποίο είναι τοξικό για τις μεμβράνες των κυττάρων.

Τα κυτταρικά ιζήματα που κρατήθηκαν μετά το πέρας όλων των φυγοκεντρήσεων, φυλάχθηκαν στους -20°C . Στο συγκεκριμένο βήμα επιτεύχθηκε η διάσπαση των εγκλειστών σωματιδίων (inclusion bodies), ειδικών δομών, που σχηματίζουν ορισμένες πρωτεΐνες, τα μόρια των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εγκλείονται μέσα σε φωσφολιπίδια. Μέσα σε αυτά, βρίσκεται η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη. Το ίζημα λοιπόν, θα πρέπει απέκτησε μια κρεμώδη υφή που μαρτυρά ότι τα έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies) διασπάστηκαν πλήρως.

2.8. Αποδιάταξη της πρωτεΐνης

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

Το διάλυμα αποδιάταξης ($V=15\text{ml}$, $\text{pH}=8,5$) περιέχει:

- ❖ *6 M guanidine hydrochloride*
- ❖ *0,1 M Tris*

❖ 80 mM reduced GSH

❖ 2 mM EDTA

Κατόπιν, το μείγμα του κυτταρικού ιζήματος με το διάλυμα εγκλεισμού τοποθετήθηκε στην συσκευή roller για 3h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνει η αποδιάταξη. Έπειτα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα θα μετρηθεί με τη μέθοδο Bradford.

Είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί φυγοκέντρωση πριν την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης, στους 25 °C και στις 18,500 rpm, για 10-15 min. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται έτσι ώστε να διαλυθεί το διάλυμα και να συλλεχθεί το υπερκείμενο. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση παρακάμφθηκε το βήμα αυτό, επειδή υπήρχε μεγάλος κίνδυνος απώλειας σημαντικής ποσότητας πρωτεΐνης.

2.9. Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford

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

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm με μια πρότυπη καμπύλη που σχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεΐνης BSA με την απορρόφησή τους στα 595 nm. Με βάση τη μέθοδο αυτή, κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα (Πίνακας 2).

Τα διαλύματα αυτά επώαστηκαν στο σκοτάδι, αφού το αντιδραστήριο Bradford είναι ευαίσθητο στο φως, για 5min και στη συνέχεια φωτομετρήθηκαν στα 595nm. Με βάση τις οπτικές απορροφήσεις, κατασκευάζεται μία καμπύλη, η εξίσωση της οποίας μας δίνει την ποσότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης που βρίσκεται μέσα στα κλάσματα. Το βήμα αυτό θεωρείται απαραίτητο για την εκτίμηση της ποσότητας η οποία πρέπει να φορτωθεί σε γέλη ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 2: Τα διαλύματα που κατασκευάστηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης Bradford.

mg/ml BSA	BSA (stock -20°C [(10mg/ml)]	Διάλυμα αποδιάταξη	Αντιδραστήριο Bradford
Τυφλό	-	20 μl	980 μl
0,2	0,4μl	19,6 μl	980 μl
0,4	0,8μl	19,2 μl	980 μl
0,6	1,2μl	18,8 μl	980 μl
0,8	1,6μl	18,4 μl	980 μl
1,00	2μl	18 μl	980 μl
1,2	2,4μl	17,6 μl	980 μl

Παρασκευάζεται, ένα επιπλέον διάλυμα (διάλυμα 7) στο οποίο βρίσκεται η EDN.

Το δείγμα αυτό περιέχει:

- ❖ 15μl Buffer, 5μl EDN και 980μl αντιδραστηρίου Bradford.

Όπως γίνεται κατανοητό, η αραίωση του συγκεκριμένου δείγματος είναι 4:1. Η αραίωση αυτή πραγματοποιείται διότι το δείγμα είναι ιδιαίτερα πυκνό και σε μικρότερη αραίωση η τιμή της οπτικής απορρόφησης υπερβαίνει τα όρια των οπτικών απορροφήσεων των διαλυμάτων που αναγράφονται στον πίνακα.

Με βάση την πρότυπη καμπύλη που προέκυψε από τις OD₅₉₅, βρέθηκε ότι η ποσότητα της EDN που βρίσκονταν μέσα στο διάλυμα ήταν 3,48 mg/ml.

2.10 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)

Για τον υπολογισμό του τελικού όγκου του διαλύματος της αναδίπλωσης (refolding buffer), χρησιμοποιήθηκε η τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που βρέθηκε πως υπάρχει μέσα στο διάλυμα μέσω της μεθόδου Bradford . Με βάση την αρχική συγκέντρωση της EDN (3,48 mg/ml), τον αρχικό όγκο του διαλύματος στον οποίον αυτή βρισκόταν (15 ml) και την τελική συγκέντρωση στην οποία έπρεπε να μεταβεί (0,15 mg/ml), υπολογίστηκε ότι έπρεπε να παρασκευαστούν 348 ml refolding buffer.

Η σύσταση του διαλύματος αναδίπλωσης (V=348 ml, pH=8,5) είναι η εξής:

- ❖ 0,1 M Tris-acetate
- ❖ 0,5 M L-arginine
- ❖ 0,85 mM GSSG (oxidized GSH)

Σημειώνεται ότι ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του GSSH γίνεται με βάση τον τύπο $GSH/GSSH = 4/1$. Στην παρούσα εργασία η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν $GSH/GSSH = 7/1$.

Η πρωτεΐνη με τη χρήση πουάρ προστίθεται σταγόνα-σταγόνα στα 348 ml διαλύματος αναδίπλωσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα αναδίπλωσης (refolding buffer) σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας παραμένει αναδεύεται. Η αναδίπλωση πραγματοποιείται στον ψυκτικό θάλαμο (4 °C) και διαρκεί 72h. Αυτό το χρονικό διάστημα είναι απαραίτητο προκειμένου να μπορέσει η πρωτεΐνη να αναδιπλωθεί σωστά και να σχηματίσει τους τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που επιθυμούμε. Για τον λόγο αυτό, είναι εξαιρετικά σημαντικό να πέφτει η πρωτεΐνη με πολύ αργό ρυθμό μέσα στο διάλυμα αναδίπλωσης.

2.12. Συμπύκνωση της πρωτεΐνης

Πριν τη διαδικασία της συμπύκνωσης, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο οποίο έχει ήδη πραγματοποιηθεί η αναδίπλωση, σε τιμή pH=5 και ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4 °C, 5.000 g για 10 min. Σκοπός είναι να καθιζάνουν όλα τα αδιάλυτα στοιχεία , οι πρωτεΐνες που δεν είναι διαλυτές σ' αυτό το pH και η μη σωστά αναδιπλωμένη EDN, που ενδεχομένως υπάρχουν στο διάλυμα. Αντιθέτως, η EDN που είναι διαλυτή σε pH=5 θα μείνει στο υπερκείμενο. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο φυλάσσεται σε beaker.

Η διαδικασία της συμπύκνωσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4 °C (στο ψυκτικό θάλαμο) με τη βοήθεια της ειδικής συσκευής filtraρίσματος Millipore-Pellicon XL Device (Millipore, Bedford, MA). Αρχικά ξεπλένεται η συσκευή με 500 ml dH₂O, έπειτα γίνεται εξισορρόπηση με το ρυθμιστικό διάλυμα (~ 300 ml) και στη συνέχεια διέρχεται το δείγμα πρωτεϊνών. Σημειώνεται ότι το ρυθμιστικό διάλυμα που διαπερνάει την κασέτα είναι αυτό μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη, δηλαδή το ρυθμιστικό διάλυμα αναδίπλωσης. Η συμπύκνωση ολοκληρώνεται όταν ο όγκος του δείγματος από 348 ml γίνει πλέον 40ml, σε περίπου 1 h. Τέλος, συλλέγονται όσες πρωτεΐνες έχουν πιθανόν παραμείνει μέσα στην συσκευή.

2.12. Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN

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

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

Η EDN είναι μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη, και επομένως για τον καθαρισμό της χρησιμοποιήθηκε κατιοανταλλακτική στήλη, και συγκεκριμένα η Resource S με χωρητικότητα 1ml. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Η μέγιστη πίεση που μπορεί να ασκηθεί στη στήλη αυτή είναι 1,5 MPa.

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

Πρέπει να σημειωθεί ότι, το δείγμα υποβλήθηκε 2 φορές σε χρωματογραφικό καθαρισμό.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύματα με συγκεκριμένη σύσταση, φιλτραρισμένα και απαερωμένα:

- ❖ *Buffer A* (0,15M Sodium acetate, $pH=5$), $V=2 L$
- ❖ *Buffer B* (0,15M Sodium acetate, $pH=5$, 2M NaCl), $V= 2 L$

Αρχικά, η στήλη ξεπλένεται με διάλυμα που περιέχει 20 % αιθανόλη και ακολουθεί η εξισορρόπησή της με Buffer A, ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης. Για μια εξισορρόπηση απαιτούνται πέντε όγκοι στήλης. Έπειτα, το πρωτεϊνικό δείγμα φορτώνεται στην στήλη και περνά με ροή 1ml/min. Το δείγμα πρέπει να βρίσκεται στο διάλυμα εξισορρόπησης και αυτό επιτεύχθηκε με τη βοήθεια της διαπίδυσης που πραγματοποιήθηκε μετά τη συμπύκνωση. Στο στάδιο αυτό, οι πρωτεΐνες που δε διαθέτουν το κατάλληλο φορτίο διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

Ακολουθεί η έκπλυση της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Η έκπλυση αυτή εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη.

Τέλος πραγματοποιείται έκπλυση της EDN από τη στήλη με τη βοήθεια του Buffer B. Είναι γνωστό ότι η συλλογή της πρωτεΐνης EDN γίνεται στο 20% του Buffer B. Το άλας συνδέεται με το υλικό της στήλης και έτσι αποδεσμεύει τις πρωτεΐνες.

Δηλαδή με τη σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη διαδοχικά ανάλογα με την ισχύ της πρόσδεσης τους σε αυτή.

Το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη και ταυτόχρονα διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητά 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. Τα κλάσματα που περιέχεται η EDN έχουν στο διάγραμμα οπτικής απορρόφησης την μεγαλύτερη OD στα 280 nm. Τα κλάσματα αυτά φυλάσσονται στο ψυγείο προκειμένου να υποβληθούν σε περαιτέρω έλεγχο καθαρότητας στο επόμενο στάδιο του πειράματος.

Επιπλέον, πρέπει να επισημανθεί ότι μεταξύ των δύο χρωματογραφικών καθαρισμών, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση. Η διαπίδυση ως μέθοδος διαχωρισμού χρησιμοποιείται συχνά στον καθαρισμό των πρωτεϊνών, ορμονών και ενζύμων.

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

Η πρωτεΐνη τοποθετείται σε μεμβράνες διαπίδυσης, και έπειτα σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης και πραγματοποιείται η διαδικασία της διαπίδυσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης ($V=2000\text{ml}$, $\text{pH}=5$) περιέχει $0,15\text{M}$ οξικό νάτριο. Λόγω όσμωσης, το γλωριούχο νάτριο μετακινείται προς τα έξω, ενώ το οξικό νάτριο προς τα μέσα. Γι' αυτό το λόγο απαιτείται και η αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος. Έτσι, η πρωτεΐνη βρίσκεται πλέον στο buffer A.

2.14. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.14.1. Πειραματική διαδικασία

Από την ποσότητα της EDN που αποκτήσαμε μετά τη δεύτερη στήλη, τα 15 μl χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση. Με βάση το μικρό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (18,4kDa), παρασκευάζεται πυκνό gel 15% SDS και ηλεκτροφορείται στα 120V.

Αφού συναρμολογηθεί κατάλληλα η συσκευή ηλεκτροφόρησης, αρχικά φορτώνεται το Running Gel. Το TEMED πρώτα και το APS έπειτα, προστίθενται πάντα τελευταία, πριν τη φόρτωση του gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πάνω από αυτό, τοποθετείται H_2O ή ισοπροπανόλη προκειμένου να αποφευχθεί η αντίδραση μεταξύ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου με το gel, και ο επακόλουθος πολυμερισμός. Μόλις πήξει το running gel, αφαιρείται το H_2O ή η ισοπροπανόλη που έχει προστεθεί, και τοποθετείται το stacking gel, το οποίο έχει παραχθεί κατά τον ίδιο τρόπο. Πάνω σε αυτό εφαρμόζονται και τα ειδικά χτενάκια, τα οποία θα δημιουργήσουν τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.

Πριν φορτωθούν τα δείγματα υφίστανται την παρακάτω επεξεργασία:

1. Με βάση τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης με Bradford πριν τη Resource S, τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου erpendorf 20 μl από κάθε υπό εξέταση δείγμα (εκτός από την EDN final που φορτώθηκαν 15 μl), μαζί με 5 μl loading buffer. Ως υπό εξέταση δείγματα θεωρούνται το δείγμα με τις ολικές πρωτεΐνες ($\text{EDN}_{\text{Total}}$) πριν τον καθαρισμό, το δείγμα μετά την πρώτη στήλη ($\text{EDN}_{\text{1st MONO S}}$) και το δείγμα με την τελική πρωτεΐνη ($\text{EDN}_{\text{Final}}$), δηλαδή όλα εκείνα τα κλάσματα που προέκυψαν από τον χρωματογραφικό καθαρισμό με την μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση στα 280nm.
2. Τα φιαλίδια τύπου erpendorf που περιέχουν τα υπό εξέταση δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5min μαζί με τη χρωστική. Μετά το πέρας των 5min, φορτώνονται στο gel.

Μαζί με τα δείγματα, στη γέλη φορτώνεται και ο μάρτυρας αναφοράς (ladder) (5 μl).

2.14.2 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue Staining

Αρχικά παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα:

✓ *Διάλυμα χρώσης (Staining solution) 1L :*

- ❖ 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 2,5g
- ❖ 50% μεθανόλη 500 ml
- ❖ 10% οξικό οξύ 100 ml
- ❖ υπερκάθαρο νερό 400 ml

Το διάλυμα φιλτράρεται μέσω φίλτρου Whatman No.1 για να απομακρυνθούν οι μολύνσεις.

✓ *Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Solution) 1 L :*

- ❖ υπερκάθαρο νερό 785 ml
- ❖ αιθανόλη 165 ml
- ❖ οξικό οξύ 50 ml

Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε κατάλληλο δοχείο το οποίο περιέχει διάλυμα χρώσης (περίπου 100 mL). Το δοχείο τοποθετείται σε ανακινούμενη πλάκα και αφήνεται να αναδευτεί ελαφρά για τουλάχιστον 1 ώρα. Στην συνέχεια αφού απομακρύνεται το διάλυμα χρώσης και η γέλη ξεπλένεται με D-H₂O, προστίθεται το διάλυμα αποχρωματισμού και η ανάδευση συνεχίζεται για αρκετές ώρες. Με την διαδικασία αυτή η πηκτή γέλης (gel) αποχρωματίζεται και παραμένουν χρωματισμένες (μπλέ – μώβ) μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά πρότυπα παρατηρούνται σε φωτεινή τράπεζα. Με την διαδικασία αυτή ανιχνεύτηκαν ζώνες που περιείχαν το λιγότερο 0,1–1μg πρωτεΐνης.

2.15. Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης

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

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

Όπου,

A: η οπτική απορρόφηση της πρωτεΐνης (μετρήθηκε ότι A=0,696)

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

b: το πάχος της κυψελίδας (1 cm)

c: συγκέντρωση εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση της EDN σε 0,424 mg /ml.

2.16.Εισαγωγή κρυσταλλώσεων

2.16.1Διάχυση ατμών

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών είναι αυτή της διάχυσης ατμών. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται τις περισσότερες φορές με τις τεχνικές της α)κρεμάμενης σταγόνας, β)της καθήμενης σταγόνας και γ)της σταγόνας sandwich. Για να δημιουργηθούν οι κρύσταλλοι ο υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με διάλυμα ενός καταβυθιστικού (precipitant), το οποίο είναι συνήθως κάποιο άλας, PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει. Η συγκέντρωση των ιόντων άλατος είναι μεγαλύτερη στο καταβυθιστικό διάλυμα που βρίσκεται στο εσωτερικό του θαλάμου κρυστάλλωσης από το μίγμα του πρωτεϊνικού διαλύματος με το καταβυθιστικό διάλυμα που βρίσκεται στην επιφάνεια και γι αυτό το λόγο τα μόρια διαλύτη θα κινηθούν από τη σταγόνα της πρωτεΐνης προς το δοχείο με διάχυση ατμών στην αέρια φάση. Η διαλυτότητα της πρωτεΐνης στη σταγόνα ελαττώνεται καθώς πραγματοποιείται η διαδικασία που αναφέρθηκε. Το διάλυμα της πρωτεΐνης στη σταγόνα τελικά γίνεται υπερκορεσμένο, μια κατάσταση που είναι θερμοδυναμικά ασταθής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μέρος της πρωτεΐνης στη σταγόνα να σχηματίσει κρυσταλλικούς πυρήνες που τελικά θα μεγαλώσουν για να γίνουν μεγάλοι κρύσταλλοι πρωτεΐνης.

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

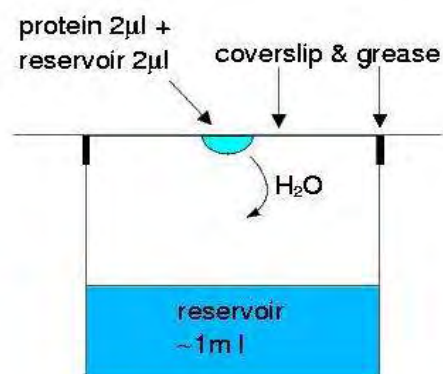
Μια σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος καταβυθιστικού τοποθετείται στο μέσο μιας υδρόφοβης καλυπτρίδας (σταγόνα κρυστάλλωσης). Η σταγόνα αποτελείται από διάλυμα της πρωτεΐνης και του καταβυθιστικού σε αναλογία 1:1 (συνήθως αναμιγνύονται 2-5 μl από το κάθε διάλυμα). Η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω από σχετικά μεγάλο όγκο (700- 1000 μl) διαλύματος καταβυθιστικού (δεξαμενή) και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς δημιουργώντας έτσι ένα απομονωμένο σύστημα όπου δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ύλης και ενέργειας (Εικόνα 19). Αποτέλεσμα των πιο πάνω είναι, η συγκέντρωση του καταβυθιστικού να είναι μεγαλύτερη στη δεξαμενή από ότι στη σταγόνα και αυτό για ένα κλειστό σύστημα σημαίνει ότι για την αποκατάσταση της ισορροπίας απομακρύνεται νερό από το αραιό διάλυμα, δηλ. τη σταγόνα, και μετατοπίζεται προς τη δεξαμενή ωστόσο η τάση ατμών της σταγόνας και της δεξαμενής να εξισωθούν. Η απομάκρυνση νερού όμως έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των συστατικών της σταγόνας. Όταν η συγκέντρωση του καταβυθιστικού και της πρωτεΐνης φτάσει στην βέλτιστη τιμή τότε η πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται.

Για να κρυσταλλωθεί η EDN, αρχικά συμπυκνώθηκε σε συγκέντρωση 8mg/mL χρησιμοποιώντας συσκευές φυγοκεντρικού φίλτρου με όρια ονομαστικής τιμής μοριακού βάρους 3000 (3000 cut off). Αυτό συμβαίνει διότι, προκειμένου να δημιουργηθούν κρύσταλλοι, η συγκέντρωση της EDN στη σταγόνα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3,5mg/ml.

Επιπλέον, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα κρυστάλλωσης (reservoir solution) το οποίο αποτελούνταν από:

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

Στο ρεζερβουάρ κάθε πλακιδίου κρυστάλλωσης τοποθετούνται 700 μ L από το παραπάνω διάλυμα, και στη συνέχεια στην καλυπτρίδα αναμιγνύονται 1 μ L από το διάλυμα του ρεζερβουάρ με 1 μ L από το διάλυμα της EDN. Οι καλυπτρίδες εφαρμόζονται και σφραγίζονται πάνω από τα ρεζερβουάρ του πλακιδίου. Μετά το πέρασ 7-10 ημερών γίνεται ορατό αν έχουν σχηματιστεί ή όχι κρύσταλλοι.



Εικόνα 17. Η μέθοδος διάχυσης ατμών στην τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας.

2^ο ΣΤΑΔΙΟ: ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΝΗΣ

2.17 Κινητική μελέτη της EDN

2.17.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηρότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης

Η ειδική δραστηρότητα (specific activity) ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μ mol υποστρώματος ή παρασκευή 1 μ mol προϊόντος ανά 1 λεπτό κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Οι μονάδες της ειδικής δραστηρότητα είναι

μmol/min x mg. Η ειδική δραστηριότητα εκφράζει όχι μόνο τη δραστηριότητα αλλά και την ποσότητα του εξεταζόμενου ενζύμου⁶⁸.

2.17.2. Περιγραφή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, ακολουθήθηκε μια μέθοδος κατακρήμνισης με υπόστρωμα tRNA ζύμης σύμφωνα με τα πειράματα των Afinsen et al. Η αποικοδόμηση του RNA από την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη πραγματοποιείται όπως ακριβώς και από την ριβονουκλεάση A, σε δύο στάδια, το στάδιο της τρανσφωσφο-ρυλίωσης και το στάδιο της υδρόλυσης του κυκλικού ενδιάμεσου.

Το στάδιο της τρανσφωσφορυλίωσης πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ταχύτητα από την υδρόλυση που 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.

2.17.3. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (Km)

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

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός ρυθμιστικού διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υπόστρωμα (tRNA) και περιέχει τα έξι αντιδραστήρια:

✓ 0,05 M NaH₂PO₄ με pH 7,4.

Αρχικά, παρασκευάζονται μεγάλης συγκέντρωσης διαλύματα (stock solutions) όλων των αντιδραστηρίων, κατάλληλοι όγκοι των οποίων αναμιγνύονται για την παρασκευή του διαλύματος χρήσης λίγο πριν πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Ο προσδιορισμός αυτός, απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (tRNA). Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (Km) είναι : 2μM, 3μM, 4μM, 5μM και 6μM.

Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

Μετά τη διάλυση του tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 300 μl , ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις προστεθεί το ένζυμο. Η EDN έχει αραιωθεί με MilliQ H_2O , ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 60 nM. Η αντίδραση σταματά μετά από 5 min αναμιγνύοντας 300 μl από το διάλυμα αντίδρασης με 300 μl διαλύματος (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid (συμβάλλουν στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA).

Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30°C και σε pH 7,4. Γι αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης μαζί με το υπόστρωμα επωάζονται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν, προστίθεται το ένζυμο, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά από 5 min αφού έχει προστεθεί η EDN, σταματάμε την αντίδραση με stop solution και τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία 4 °C, στις 13.200 στροφές (rpm) για 17 min, όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Έπειτα, παραλαμβάνονται 560 μl από το υπερκείμενο και φωτομετρούνται. Για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους και πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (tRNA=0), το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα, με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο πριν φωτομετρήσουμε το δείγμα. Επιπλέον παρασκευάζεται και ένα διάλυμα για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο, των οποίων οι απορροφήσεις αφαιρούνται από αυτές των δειγμάτων, έτσι ώστε να αφαιρείται η τιμή του ενδογενώς υδρολυμένου tRNA. Τα διαλύματα αυτά αποτελούν τα τυφλά (blank).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA που παράγεται, πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm⁷⁴. Τέλος, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit. Παρακάτω δίνονται οι πίνακες με τις σχετικές ποσότητες των τυφλών (πίνακας 3) και των διαλυμάτων (πίνακας 4) που κατασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της K_m .

Πίνακας 3: Ποσότητες των τυφλών διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της K_m της EDN

10nMEDN								
t=5min								
K_m								
T=30oC								
tRNA conc	0 μ M	2 μ M	3 μ M	4 μ M	5 μ M	6 μ M		
δ/μ αντιδρ.(pH7.4)	150	150	150	150	150	150		
tRNA(60μM)	0	10	15	20	25	30		
dH2O	150	140	135	130	125	120		
STOP buffer	300	300	300	300	300	300		
ABS260								

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

10nMEDN								
t=5min								
K_m								
T=30oC								
tRNA conc		2 μ M	3 μ M	4 μ M	5 μ M	6 μ M		
δ/μ αντιδρ.(pH7.4)		150	150	150	150	150		
tRNA(60μM)		10	15	20	25	30		
EDN(60Mm)		50	50	130	125	120		
dH2O		90	85	80	75	70		
STOP buffer		300	300	300	300	300		
ABS260								

2.17.4. Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης του tRNA και απελευθέρωσης μορίων CMP. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με τα γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής. Ο προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} , που ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας, προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση tRNA.

Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της IC_{50} είναι 2 μ M. Ακολουθείται ακριβώς η ίδια πειραματική

διαδικασία με αυτή για τον προσδιορισμό της K_m με τη διαφορά ότι σε κάθε διάλυμα προστίθεται και διάλυμα αναστολέα διαφορετικής συγκέντρωσης.

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα μg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες. Οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης του tRNA και έπειτα, ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών συνήθως δεν είναι μεγάλες και δεν είναι δυνατή η πραγματοποίηση μεγάλου αριθμού πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Το σημαντικό είναι, ο ερευνητής να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%.

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

❖ Υπολογισμός K_m

Αρχικά, έγιναν κινητικά πειράματα, εις τριπλούν, για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που επιλέχθηκε (2, 3, 4, 5, 6 μM) και για κάθε αντίδραση συλλέχθηκε ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης. Για μικρό μόνο χρονικό διάστημα η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι με τη χρήση του προγράμματος Grafit (GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK) προσδιορίστηκε η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία⁷⁵. Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό, ο οποίος μπορεί να μετατραπεί σε ταχύτητα αντίδρασης (v , καταλυτικές μονάδες, 1/s) σύμφωνα με τον τύπο:

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

όπου, Slope: η κλίση της ευθείας,

ε : συντελεστής απορρόφησης,

λ : μήκος κύματος (278 nm) ,

[EDN] : η συγκέντρωση του ενζύμου.

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

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

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

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

❖ Υπολογισμός IC_{50}

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

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

όπου 516,4: είναι ο συντελεστής απορρόφησης του tRNA

0,00000001: η συγκέντρωση σε M του ενζύμου στην αντίδραση

300: 5 x 60 sec

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

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

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

$\mathbf{s.a.}_i$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

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

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

όπου: s : η κλίση της ευθείας

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

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

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

Όπου $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος.

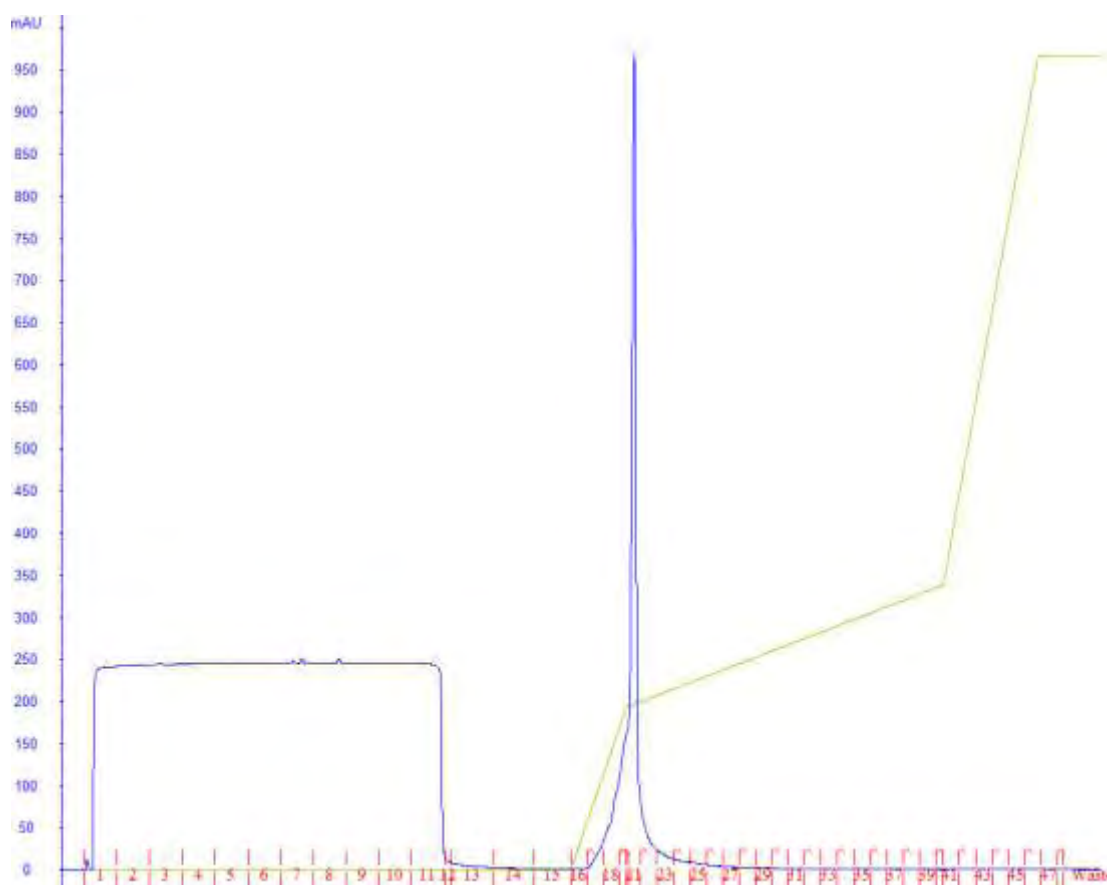
Εν συνεχεία, γίνεται μετατροπή της τιμής IC_{50} σε K_i σύμφωνα με τον τύπο:

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

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1.Χρωματογραφικός προσδιορισμός της EDN

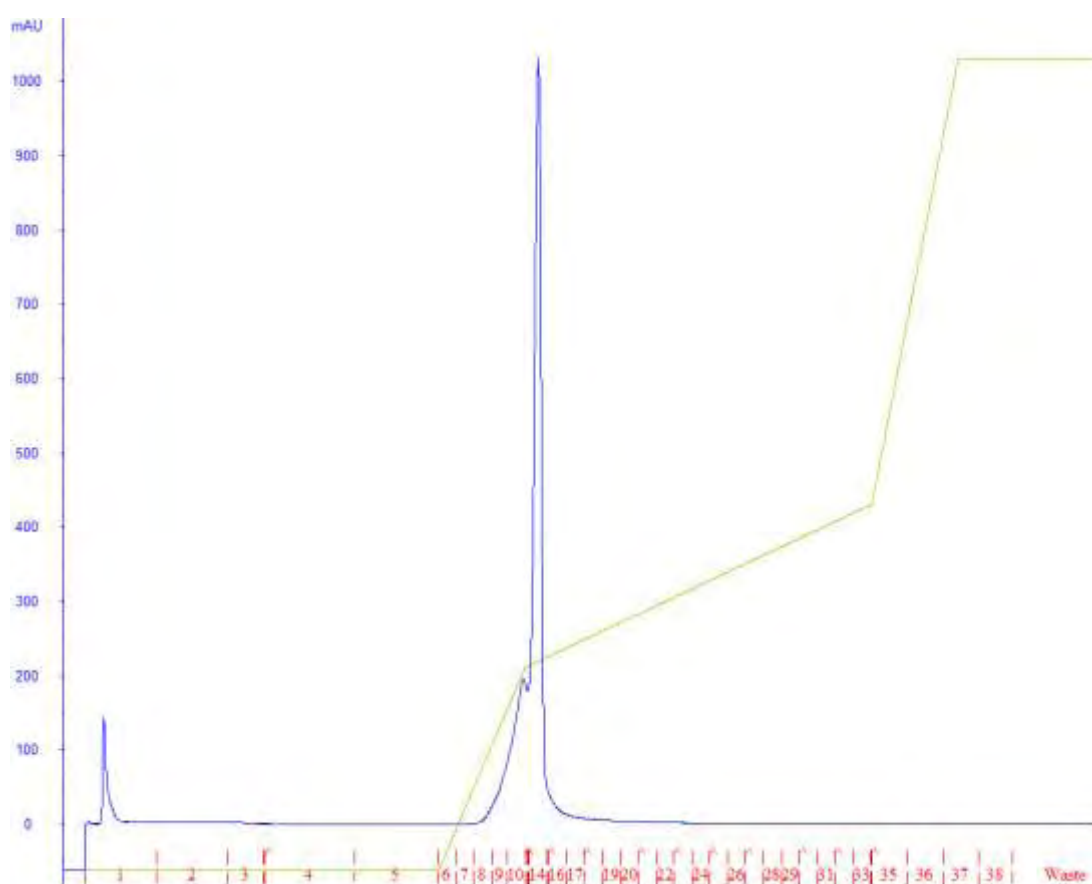
Το διάλυμα της πρωτεΐνης που προέκυψε μετά τη διαδικασία της συμπύκνωσης, φορτώθηκε σε στήλη Resource S και εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 0,15M οξικό νάτριο (Sodium acetate), pH= 5 με ροή 1ml/min . Για την εξισορρόπηση χρησιμοποιήθηκαν 5 όγκοι στήλης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυσή της με το ίδιο διάλυμα μέχρι τη στιγμή μη ανιχνεύσιμης απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, δηλαδή τη στιγμή εκείνη που δεν ανιχνεύονταν πρωτεΐνη OD₂₈₀=OA. Έπειτα, ακολούθησε έκλυση της EDN από τη στήλη μέσω διαβίβασης ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου (Sodium acetate) 0,15M, pH= 5 με βαθμίδωση της συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S. Η έκλυση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM.

Συλλέχθηκαν 6 κλάσματα (17-22) των 2 ml, τα οποία εμφάνισαν την κορυφή στο 20 % του buffer B. Τα κλάσματα στα οποία παρατηρούνταν η μεγαλύτερη απορρόφηση στα 280 nm, συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και καθαρίστηκαν περαιτέρω μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, ακολουθώντας την ίδια ακριβώς διαδικασία (εικόνα 20).

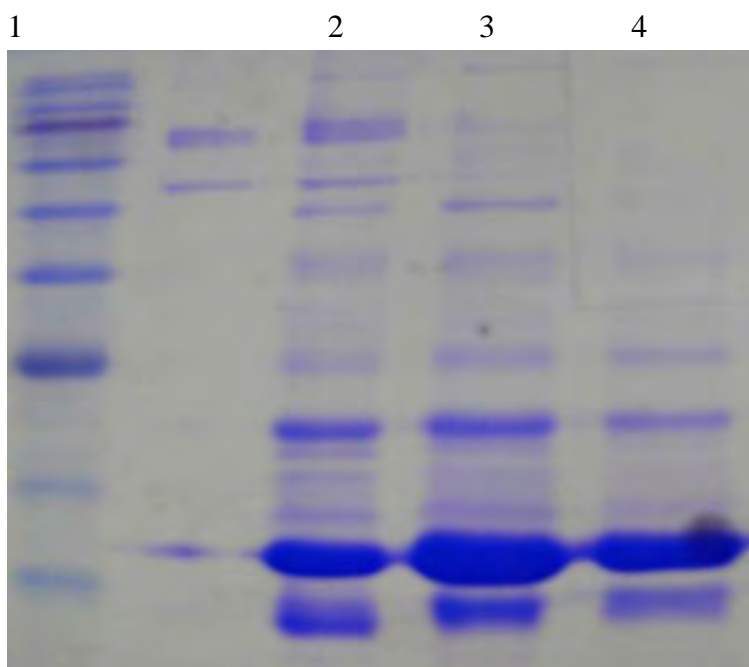
Η κορυφή εμφανίστηκε στα κλάσματα (9-15) στο 25,70 % του buffer B. Παρόλα αυτά, στα κλάσματα (11-14) συλλέχτηκε λιγότερο από 1 ml με αποτέλεσμα η συνολική ποσότητα πρωτεϊνών που πήραμε να είναι 3 ml.



Εικόνα 20: Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S για 2^η φορά. Η έκλουση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM.

3.2. Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων

Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS στα 120V και ακολούθησε χρώση της πηκτής αυτής με Coomassie Brilliant Blue Staining (εικόνα 21). Η πρώτη διαδρομή από τα αριστερά είναι ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε. Η τελευταία μπάνα αυτού του marker είναι στα 15 kDa (1). Η δεύτερη διαδρομή από τα δεξιά είναι το ολικό δείγμα πρωτεϊνών (2). Η επόμενη διαδρομή είναι η EDN που πήραμε μετά την 1^η στήλη (3) και η τελευταία στα δεξιά διαδρομή είναι η EDN μετά τη 2^η στήλη (4). Τη βλέπουμε στα 18,4kDa, που είναι και το επιθυμητό.



Εικόνα 21: Gel ηλεκτροφόρησης EDN μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue Staining.

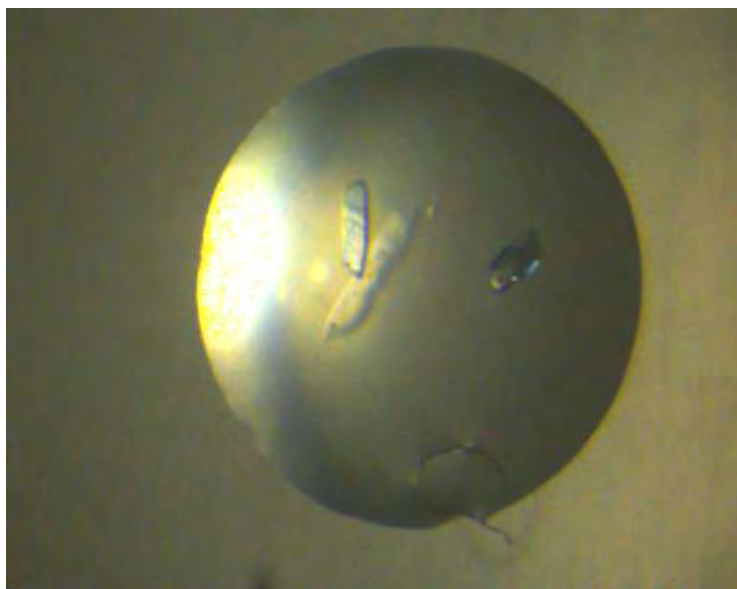
3.3. Απόδοση καθαρισμού

Η συγκέντρωση της καθαρής EDN που προέκυψε μετά τον καθαρισμό ήταν 0,424 mg/ml και η οποία υπολογίστηκε από τον τύπο Beer-Lambert, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω. Στη συνέχεια, η καθαρή ηωσινοφιλική νευροτοξίνη συμπυκνώθηκε σε συγκέντρωση 8,5 mg/ml προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι, για τους οποίους η απαιτούμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι 3,5 mg/ml. Σύμφωνα με τον νόμο της συμπύκνωσης υπολογίζεται ότι τα 3ml που

προέκυψαν από τη χρωματογραφία θα πρέπει να μειωθούν στα 125μl. Η συμπύκνωση επιτεύχθηκε με συνεχείς φυγοκεντρήσεις σε φίλτρα συμπύκνωσης.

3.4. Κρυστάλλωση

Οι κρύσταλλοι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης σχηματίστηκαν με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας και εμφανίστηκαν μετά από 3 - 4 μέρες στους 16 °C. Η διαδικασία επαναλήφθηκε διότι στα πρώτα πειράματα κρυστάλλωσης αναπτύχθηκε μεγάλος αριθμός κρυστάλλων μικρού μεγέθους πιθανώς λόγω της υψηλής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Όταν το πείραμα επαναλήφθηκε με χαμηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης, σε κάθε σταγόνα αναπτύχθηκαν 1-2 κρύσταλλοι ικανοποιητικού μεγέθους (εικόνα 22).



Εικόνα 22: Κρύσταλλος της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.

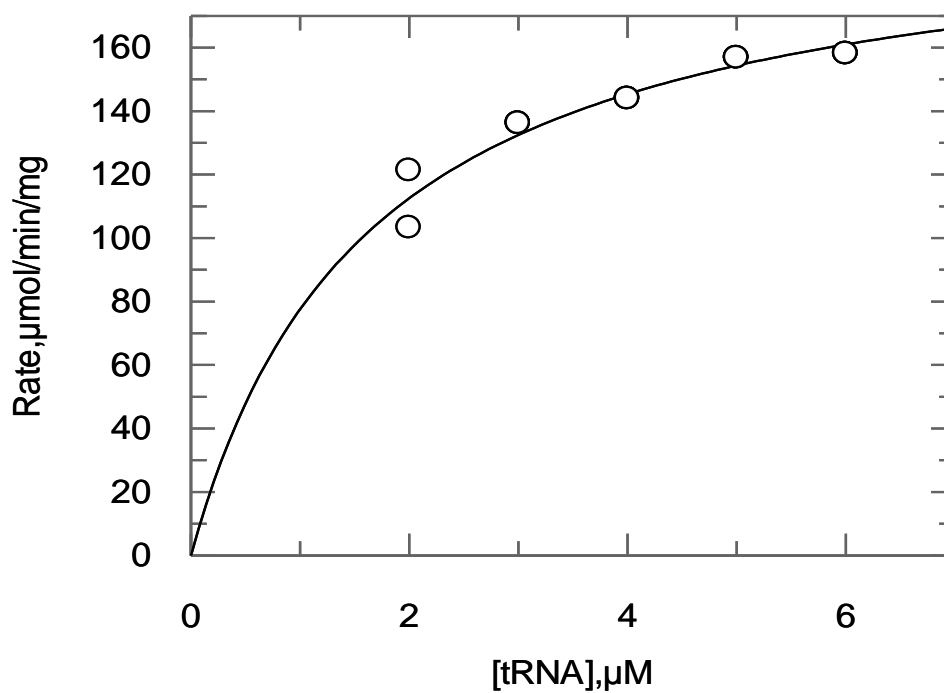
3.5. Κινητικά αποτελέσματα

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης (εικόνες 23,24) παρασκευάστηκαν με βάση το πρωτόκολλο που δίνεται στην αντίστοιχη υποενότητα του πειραματικού τμήματος. Η επιλογή των συγκεντρώσεων της EDN και του tRNA που χρησιμοποιήθηκαν έγινε μετά από αρκετές δοκιμές κάτω υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες. Έτσι κρίθηκε κατάλληλη η επώαση των δειγμάτων στους 30 °C καθώς και ο χρόνος αντίδρασης (5min).

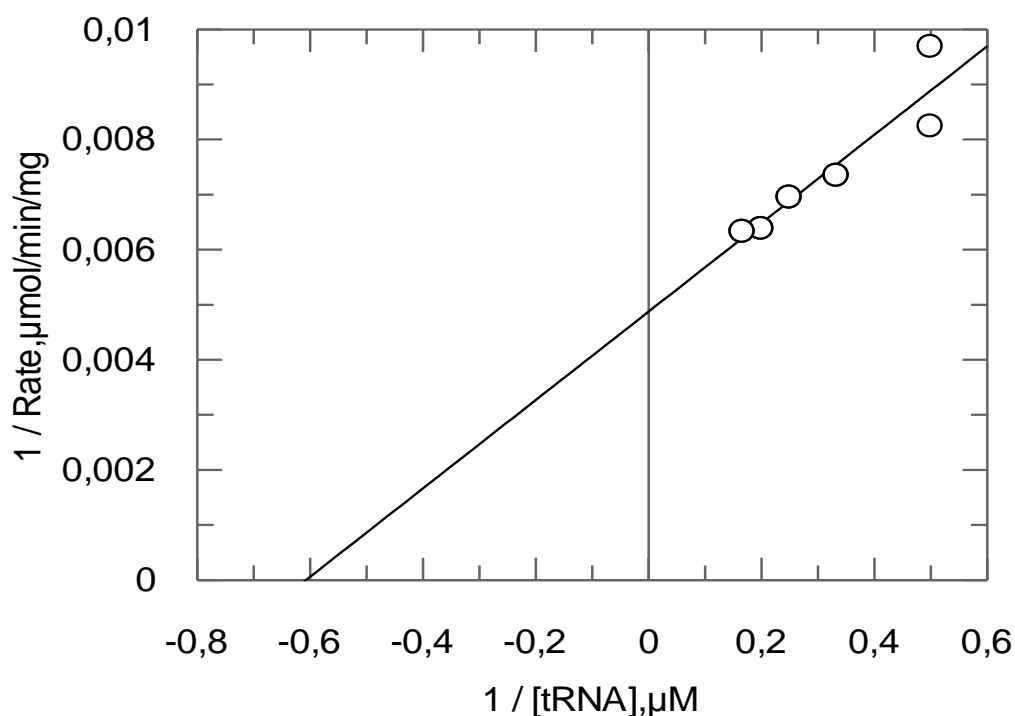
Μετά από επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Graffit βρέθηκε πως τα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου είναι τα ακόλουθα:

$K_m = 1,65 \pm 0,28 \mu\text{M}$, και

$V_{\text{max}} = 205,2 \pm 11,14 \mu\text{mol CMP/mg/min}$



Εικόνα 23: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της EDN σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 μM). Α. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.



Εικόνα 24: Το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

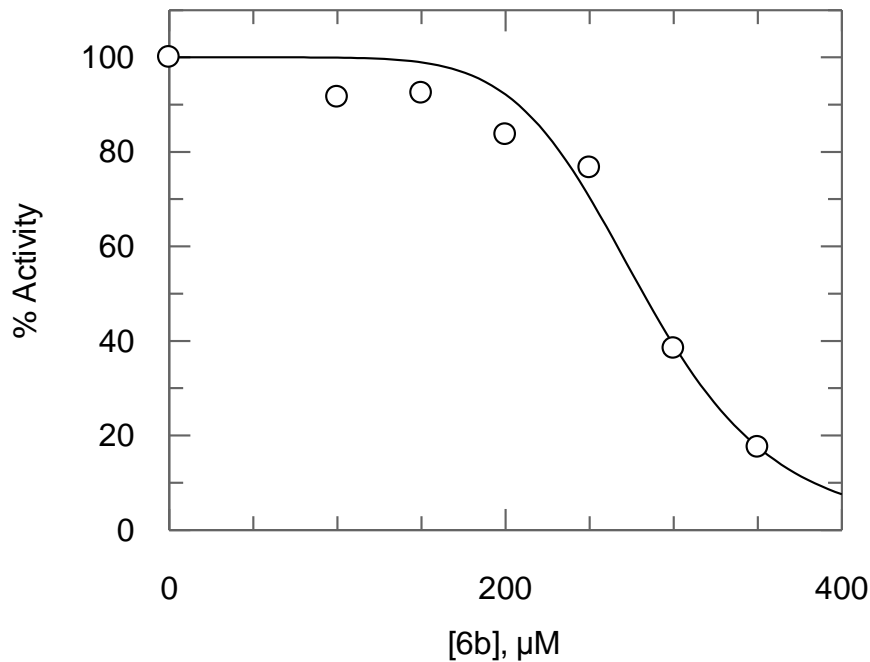
Για τη μελέτη της αναστολής της EDN από τον αναστολέα **6b**, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέων και συγκέντρωση υποστρώματος **2μM και 4μM αντίστοιχα**. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο σχετικό εδάφιο. Από τα αποτελέσματα προέκυψαν τα παρακάτω:

$$IC_{50} = 282,06 \pm 4,74 \mu M \text{ και}$$

$$K_i = 146,78 \pm 29,46 \mu M$$

Ο υπολογισμός της IC_{50} του αναστολέα **6b** έγινε μέσω του προγράμματος **Grafit**, ενώ η μετατροπή της τιμής της IC_{50} σε K_i πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα **EUREKA** και τη σχέση $K_i = \frac{IC_{50}}{(S / K_m + 1)}$. Στην εικόνα 25, δίνεται η επί

της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση του αναστολέα που χορηγείται κάθε φορά. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα **300 μM** χορηγούμενου αναστολέα **6b** με βάση το διάγραμμα.



Εικόνα 25: Η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 300 μM χορηγούμενου 6b αναστολέα

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η EDN έχει προσελκύσει εδώ και αρκετά χρόνια το ενδιαφέρον πολυάριθμων ερευνητικών κέντρων εξαιτίας της νευροτοξικής της δράσης και της εμπλοκής της σε αλλεργικές παθήσεις αλλά και φλεγμονές που σχετίζονται με τα ηωσινόφιλα. Επιτακτική είναι λοιπόν η ανάγκη για σχεδιασμό μορίων με ανασταλτική δράση, που θα μπορούσαν να περιορίσουν τις παθολογίες που προκαλεί η EDN σε υπερηωσινοφιλικά σύνδρομα. Χρησιμοποιώντας λοιπόν ως δεδομένο ότι η ριβονουκλεολυτική δράση της EDN σχετίζεται άμεσα με τις βιολογικές της δράσεις και με βάση τα δεδομένα μελετών που έχουν καταγραφεί σε παλαιότερες μελέτες για την ριβονουκλεάση A , γίνονται μελέτες αναστολής με στόχο την χαρτογράφηση της εξειδίκευσης του καταλυτικού της κέντρου αλλά και της διαλεύκανσης του καταλυτικού της μηχανισμού.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα χαρακτηριστικά της EDN, μετά από κινητικές μελέτες βρέθηκαν ότι είναι $K_m = 1,65 \pm 0,28 \mu M$ και $V_{max} = 205,2 \pm 11,14 \text{ mol CMP/mg/min}$ και στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητα αναστολής της EDN

από την ένωση 6b. Ο αναστολέας αυτός είναι ένας νουκλεοζίτης, ο οποίος δεν φέρει τριαζολικό δακτύλιο και ως υποκαταστάτη έχει μια μεθυλοομάδα. Ο συγκεκριμένος αναστολέας επιλέχθηκε λόγω της ικανότητας του να αναστέλλει σε ικανοποιητικό βαθμό τη δράση της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A μετά από πρόσδεση στο ενεργό της κέντρο. Ειδικότερα, βρέθηκε πως η σταθερά αναστολής K_i του 6b για την RNase A ισούται με $44.1 \pm 6.4 \mu\text{M}^{59}$, ενώ στα πειράματα που έλαβαν χώρα στην παρούσα διπλωματική εργασία, η σταθερά αναστολής K_i του 6b βρέθηκε να ισούται με $146,78 \pm 29,46 \mu\text{M}$. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η πρόσδεση και η ανασταλτική δράση του 6b, είναι σημαντικά πιο αποτελεσματική στην ριβονουκλεάση A σε σχέση με την EDN. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αναστολέας προσδέεται σε υποπεριοχές που δεν είναι συντηρημένες στις δύο ριβονουκλεάσες. Ωστόσο, και για τα δύο ένζυμα η σταθερά αναστολής είναι της τάξεως των μM , γεγονός που πρακτικά σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας προκαλεί σημαντική μείωση της δραστηριότητας της EDN. Επίσης, σε σύγκριση με αναστολείς που μελετήθηκαν στην EDN και οι οποίοι έφεραν τριαζολικό δακτύλιο στο μοριό τους, ο 6b προκάλεσε μικρότερη αναστολή της ενζυμικής δράσης της EDN. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την σημαντικότητα της τριαζολικής ομάδας για την αποτελεσματική αναστολή. Η παρούσα μελέτη και τα αποτελέσματα της ενισχύουν την ερευνητική προσπάθεια για την ανάπτυξη αναστολέων ειδικών για την EDN μέσω της τροποποίησης αναστολέων της RNase A. Μελλοντικές έρευνες καθώς και δεδομένα ακτίνων-X, αναμένεται να δώσουν ακόμη περισσότερες πληροφορίες τόσο όσον αφορά τη δομική βάση του μηχανισμού αναστολής του 6b στην EDN, όσο και για την στερεοεξειδίκευση του καταλυτικού της κέντρου.

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]: Hillman, R.S., Kenneth, A.A., Rinder, H.M. (2005). “Hematology in Clinical Practice” 4th Edition, Published by McGraw-Hill, Blacklick, Ohio, U.S.A.
- [2]: Gleich, G.J., Loegering, D.A.(1984). “Immunobiology of Eosinophils”, *Annu Rev Immunol*, **2**, 429-59.
- [3] : Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol*. 1986;39:177-253.
- [4] : Helene F. Rosenberg, Kimberly D. Dyer & Paul S. Foster. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 13, 9-22 (January 2013) | doi:10.1038/nri3341.
- [5]: Rothenberg ME, Hogan SP. *Ann. Rev. Immunol* 2006;24:147–174. [PubMed: 16551246].
- [6] : Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J. (2007). Ανοσολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
- [7]: Rosenberg , H .F. , and J .B. Domachowke. 2001. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J. Leukoc. Biol.* 70 :691 – 698 .
- [8]: Pearce , E.J. , and A.S. MacDonald . 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2 :499 – 511 .
- [9]: Walsh , G .M. 2001 . Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr. Opin. Hematol.* 8 : 28 – 33.
- [10]:Shen, Z. J., Esnault, S., and Malter, J. S. (2005). The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates the stability of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA in activated eosinophils. *Nat. Immunol.* 6, 1280–1287.
- [11]:Zheutlin, L. M., Ackerman, S. J., Gleich, G. J., and Thomas, L. L. (1984). Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. *J. Immunol.* 133, 2180–2185.
- [12]:Piliponsky, A., Gleich, G., Bar, I., and Levi-Schaffer, F. (2002). Effects of eosinophils on mast cells: A new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. *Mol. Immunol.* 38,1369–1372.
- [13]Sferruzzi-Perri, A. N., Robertson, S. A., and Dent, L. A. (2003). Interleukin-5 transgene expression and eosinophilia are associated with retarded mammary gland development in mice. *Biol. Reprod.* 69, 224–233.

- [14]:Robertson, S. A., Mau, V. J., Young, I. G., and Matthaei, K. I. (2000). Uterine eosinophils and reproductive performance in interleukin 5-deficient mice. *J. Reprod. Fertil.* 120, 423–432.
- [15]:Gouon-Evans, V., Lin, E. Y., and Pollard, J. W. (2002). Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 4, 155–164.
- [16]:Handzel, Z. T., Busse, W. W., Sedgwick, J. B., Vrtis, R., Lee, W. M., Kelly, E. A., and Gern, J. E.(1998). Eosinophils bind rhinovirus and activate virus-specific T cells. *J. Immunol.* 160,1279–1284.
- [17]:Mawhorter, S. D., Kazura, J. W., and Boom, W. H. (1994). Human eosinophils as antigenpresenting cells: Relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. *Immunology* 81, 584–591.
- [18]:MacKenzie, J. R., Mattes, J., Dent, L. A., and Foster, P. S. (2001). Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J. Immunol.* 167,3146–3155.
- [19]:Shi, H. (2004). Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J. Leuko. Biol.* 76, 520–527.
- [20]:Shi, H. Z., Humbles, A., Gerard, C., Jin, Z., and Weller, P. F. (2000). Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J. Clin. Invest.* 105, 945–953.
- [21]:Yousefi, S., Gold, J. A., Andina, N., Lee, J. J., Kelly, A. M., Kozlowski, E., Schmid, I.,Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G. J., and Simon, H. U. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat.Med.* 14, 949–953.
- [22]Yoon, J., Ponikau, J. U., Lawrence, C. B., and Kita, H. (2008). Innate antifungal immunity of human eosinophils mediated by a beta2 integrin, CD11b. *J. Immunol.* 181, 2907–2915.
- [23]: Todd I., Spickett G. (2008) *Ανοσολογία*. 5th Edition. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου.
- [24]: Wardlaw AJ, Brightling C, Green R, Woltmann G, Pavord I. Eosinophils in asthma and other allergic diseases. *Br Med Bull.* 2000;56(4):985-1003.

[25]: Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD. Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. *Am J. Physiol* 1997; 273: L93-103.

[26] :Domachowske, J. B., C. A. Bonville, K. D. Dyer and H. F. Rosenberg, 1998a Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. *Nucleic Acids Res.* 26: 5327–5332.

[27]: Slifman NR, Venge P, Peterson CG, McKean DJ, Gleich GJ. *J Immunol* 1989;143(7):2317–2322. [PubMed: 2506283].

[28]: Hamann, K. J., Ten, R. M., Loegering, D. A., Jenkins, R. B., Heise, M. R., Schad, C. R., Pease, L. R., Gleich, G. J., and Barker, R. L. (1990) *Genomics* 7, 535–546.

[29]: 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 USA* 83:3 146-3 150.

[30]: Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ (1986) Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol* 137:29 13-29 17.

[31]: Hamann KJ, Barker RL, Loegering DA, Gleich GJ. *J. Parasitol* 1987;73:523–529. [PubMed: 3598802].

[32]: Ackerman, S. J., Gleich, G. J., Loegering, D. A., Richardson, B. A., and Butterworth, A. E.(1985). Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 735–745.

[33]: Newton, D. L., Walbridge, S., Mikulski, S. M., Ardelt, W., Shogen, K., Ackerman, S. J., Rybak, S. M., Youle, R. J. (1994) Toxicity of an antitumor ribonuclease to Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 14, 538–544.

[34]: Fredens K, Dahl R, Venge P (1982) *J Allergy Clin Immunol* 70(5): 361-366.

[35]: Sorrentino S, Glitz DG, Hamann KJ, Loegering DA, Checkel JL, Gleich GJ (1992) *J Biol Chem* 267(21): 14859-65.

[36]: Newton DL, Xue Y, Boqué L, Wlodawer A, Kung HF, Rybak SM (1997) *Protein Eng* 10(4): 463-70.

- [37.] :Garofalo R, Kimpen JL, Welliver RC, Ogra PL. *J Pediatr* 1992;120(1):28–32. [PubMed: 1731020]
- [38.] :Harrison AM, Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(6):1918–1924. [PubMed: 10351940]
- [39] Jacobsen EA, Ochkur SI, Lee NA, Lee JJ. *Curr. Allergy Asthma Rep* 2007;7(1):18–26. [PubMed:17504657]
- [40]: Sikriwal Deepa, Divya Seth, Shama Parveen, Anu Malik, Shobha Broor, and Janendra K. Batra (2012). An Insertion in Loop L7 of Human Eosinophil-Derived Neurotoxin Is Crucial for its Antiviral Activity. *Journal of Cellular Biochemistry* 113:3104-3112 (2012).
- [41]:Rugeles , M.T. , C.M. Trubey , V.I. Bedoya , L.A. Pinto , J.J. Oppenheim , S.M. Rybak , and G.M. Shearer . 2003 . Ribonuclease is partly responsible for the HIV-1 inhibitory effect activated by HLA alloantigen recognition. *AIDS* . 17 : 481 – 486 .
- [42]. Yang, D.; Rosenberg, H.F.; Chen, Q.; Dyer, K.D.; Kurosaka, K.; Oppenheim, J.J. Eosinophil-derived neurotoxin (edn), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood* **2003**, *102*, 3396–3403.
- [43]. Yang, D.; Chen, Q.; Rosenberg, H.F.; Rybak, S.M.; Newton, D.L.; Wang, Z.Y.; Fu, Q.; Tchernev, V.T.; Wang, M.; Schweitzer, B.; *et al.* Human ribonuclease a superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 6134–6142.
- [44] Yang, D.; Chen, Q.; Su, S.B.; Zhang, P.; Kurosaka, K.; Caspi, R.R.; Michalek, S.M.; Rosenberg, H.F.; Zhang, N.; Oppenheim, J.J. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* **19083** activate the tlr2-myd88 signal pathway in dendritic cells and enhances th2 immune responses. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 79–90.
- [45]:Mayer, A.K.; Muehmer, M.; Mages, J.; Gueinzius, K.; Hess, C.; Heeg, K.; Bals, R.; Lang, R.; Dalpke, A.H. Differential recognition of tlr-dependent microbial ligands in human bronchialepithelial cells. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 3134–3142.
- [46]: Jack, C.S.; Arbour, N.; Manusow, J.; Montgrain, V.; Blain, M.; McCrea, E.; Shapiro, A.; Antel, J.P. Tlr signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 4320–4330.

- [47]: Zarembek, K.A.; Godowski, P.J. Tissue expression of human toll-like receptors and differential regulation of toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 554–561.
- [48]. Hung, S.C.; Lu, X.A.; Lee, J.C.; Chang, M.D.; Fang, S.L.; Fan, T.C.; Zulueta, M.M.; Zhong, Y.Q. Synthesis of heparin oligosaccharides and their interaction with eosinophil-derived neurotoxin. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 760–772.
- [49]. Prydz, K.; Dalen, K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 193–205.
- [50]: Ta-Jen Hung 1, Wei-Tang Chang 1, Noboru Tomiya 2, Yuan-Chuan Lee 1,2, Hao-Teng Chang 3, Chien-Jung Chen 1, Ping-Hsueh Kuo 1, Tan-chi Fan 4 and Margaret Dah-Tsyr Chang 1,5,* Basic Amino Acid Residues of Human Eosinophil Derived Neurotoxin Essential for Glycosaminoglycan Binding *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 19067-19085; doi:10.3390/ijms140919067
- [51]: Shin S-W, Park JS, Park C-S (2013) Elevation of Eosinophil-Derived Neurotoxin in Plasma of the Subjects with Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease: A Possible Peripheral Blood Protein Biomarker. *PLoS ONE* 8(6): e66644. doi:10.1371/journal.pone.0066644.
- [52]. Kephart, G.M.; Alexander, J.A.; Arora, A.S.; Romero, Y.; Smyrk, T.C.; Talley, N.J.; Kita, H. Marked deposition of eosinophil-derived neurotoxin in adult patients with eosinophilic esophagitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2010**, *105*, 298–307.
- [53]. Liu, G.T.; Hwang, C.S.; Hsieh, C.H.; Lu, C.H.; Chang, S.L.; Lee, J.C.; Huang, C.F.; Chang, H.T. Eosinophil-derived neurotoxin is elevated in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*, 421389.
- [54]: 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.
- [55]: 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.
- [56]: 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.

- [57]: 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.
- [58]: 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.* 260 (4): 540–52. doi:10.1006/jmbi.1996.0420. PMID 8759319.
- [59]: 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
- [60]: Chang C, Newton DL, Susanna M, Rybak M, S and Wlodawer A (2002). *J. Mol. Biol.* 317: 119-130.
- [61]: Moussaoui M, Noques V, Guash A, Barman T, Travers F, Cuchillo CM (1998). *J Biol Chem.* **273(40)**:25565-25572.
- [62]: Stryer, L., Berg J.M. and Tymoczko, J.L. (2002). *Biochemistry*, 5th ed. W.H. Freeman, pp 1050.
- [63]: 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.
- [64]: A new remote subsite in ribonuclease A. Barbra M. Fisher, Juneko E. Grilley, Ronald T. Raines (1998). *Journal of Biological Chemistry* 273, 34134 - 34138.
- [65]: Giuseppe D' Alessio and Riordan JF (1998). *Protein Science* 7:804-805.
- [66]: 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.
- [67]: Sikriwal Deepa, Divya Seth and Janendra K. Batra (2009). Role of catalytic and non-catalytic subsite residues in ribonuclease activity of human eosinophil-derived neurotoxin. *Biol. Chem.*, Vol390, pp.225-234, March, 2009.
- [68]: Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουψάνης Τ.Α., Κυριακίδης Δ.Α (2001). *Ενζυμολογία. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.*
- [69]: Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L. (2009) *Βιοχημεία, Τόμος Ι. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.*

[70]: Parmenopoulou V., Chatzileontiadou DSM , Manta S, Bougiatioti S, Maragozidis P, Gkaragkouni ND., Kaffesaki E, Kantsadi AL., Skamnaki VT, Zographos SE, Zounpoulakis P, Balatsos NAA, Komiotis D. and Leonidas DD. (2012). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **20**: 7184–7193.

[71]Manta, S., G. Agelis, et al. (2008). "Unsaturated fluoro-ketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-4-keto-beta-d-glucopyranosyl derivatives of N(4)-benzoyl cytosine and N(6)-benzoyl adenine." Eur J Med Chem **43**(2): 420-428.

[72]Lui V.W.Y.W., Lau C.P.Y.P., Cheung C.S.F.S., HO K., Ng M.H.L.H., Cheng S.H.H., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T. *Biochemical pharmacology* 2010, p.79, 1772–1780.

[73]Halliwell, B. Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences* 2001

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

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

