



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ (M.Sc.):
« Μελέτες δραστηριότητας ενός τεχνητού περιοριστικού ενζύμου με νέα ειδικότητα »



Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας

Υπεύθυνος Καθηγητής: Κοκκινίδης Μιχάλης

Άγγελος Λεμονάκης
Ηράκλειο, 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του τμήματος Βιολογίας με υπεύθυνο Καθηγητή τον κ. Μιχάλη Κοκκινίδη. Η απόλυτη υποστήριξή του και η υπομονή του σε όλη την πορεία της μεταπτυχιακής μου διατριβής ήταν κομβικής σημασίας, πέραν των χρήσιμων συμβουλών του και της εμπιστοσύνης που εισέπραξα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά την Καθηγήτρια κ. Ειρήνη Αθανασάκη και τον Κύριο Ερευνητή του IMBB (ΙΤΕ) κ. Κυριάκο Πετράτο για τη συνεισφορά τους στη συγγραφή της διατριβής.

Καθοριστική καθοδήγηση σε πειραματικό και θεωρητικό επίπεδο έλαβα από τον μεταδιδάκτορα ερευνητή και επιβλέποντά μου Στράτο Μυλωνά, ενώ σε τεχνικό υπόβαθρο άμεση ήταν η συμβολή των κ. Μ. Προβιδάκη και Α. Κοτσιφάκη. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Κρυσταλλογραφίας για τη συνεργασία τους και για το πολύ ευχάριστο κλίμα στον εργασιακό μας χώρο και να τους ευχηθώ ξεχωριστά καλή επαγγελματική σταδιοδρομία. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου, χωρίς την οποία δεν θα μπορούσα να έχω οποιεσδήποτε βλέψεις για σπουδές.

Η διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Ερευνητικό Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα «Innov Crete-REGPOT».

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Συστήματα περιορισμού-τροποποίησης στα βακτήρια.....	3
1.2 Ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II.....	4
1.2.1 Γενικά.....	4
1.2.2 Ονοματολογία.....	4
1.2.3 Μηχανισμός Βιολογικής Δράσης.....	5
1.2.4 Εξέλιξη και δομικά χαρακτηριστικά.....	6
1.3 Ενδονουκλεάση περιορισμού PvuII.....	7
1.3.1 Γενικά.....	7
1.3.2 Διμερισμός της R.PvuII και αναγνώριση του DNA.....	8
1.3.3 Μηχανισμός κατάλυσης της R.PvuII.....	10
1.3.4 Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου R.PvuII-DNA.....	10
1.3.4.1 Επιφάνεια διμερισμού των υπομονάδων.....	11
1.3.4.2 Καταλυτική περιοχή.....	11
1.3.4.3 Περιοχή αναγνώρισης του DNA.....	12
1.4 Ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV.....	13
1.4.1 Γενικά.....	13
1.4.2 Μηχανισμός αναγνώρισης του DNA.....	14
1.4.3 Μηχανισμός κατάλυσης.....	15
1.4.4 Κρυσταλλική δομή της R. EcoRV.....	16
1.4.4.1 Υποεπικράτεια διμερισμού.....	17
1.4.4.2 Υποεπικράτεια πρόσδεσης του DNA.....	17
1.4.4.3 Ενεργό κέντρο.....	18
1.5 Δομική ομολογία μεταξύ των R.PvuII και R.EcoRV.....	18
1.6 Εφαρμογές και προοπτικές των ενζύμων περιορισμού.....	20
1.6.1 Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II ως μοριακά «ψαλίδια».....	20
1.6.2 Καινοτομικά ανασυνδυασμένα περιοριστικά ένζυμα EcoRV και PvuII.....	21
1.6.2.1 Ενδονουκλεάση περιορισμού PvuII μονής αλυσίδας (single chain).....	21
1.6.2.2 Η R.PvuII ως πρωτεΐνη σύντηξης.....	22
1.6.2.3 Πρωτεϊνική μηχανική του περιοριστικού ενζύμου EcoRV.....	23
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Μετασηματισμός κυττάρων E.Coli από πλασμιδιακό φορέα.....	27

2.2 Αποθήκευση βακτηριακών δειγμάτων σε διάλυμα γλυκερόλης προς μακρά συντήρηση.....	28
2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Midipreps).....	28
2.4 Πέψη πλασμιδιακού φορέα.....	28
2.5 Επάγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (EcoRV-PvuII) σε μικρή και μεγάλη κλίμακα.....	29
2.6 Διάρρηξη κυττάρων με τη χρήση υπερήχων.....	30
2.6.1 Διάρρηξη κυττάρων υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	30
2.6.2 Διάρρηξη κυττάρων υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.....	31
2.7 Απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (EcoRV-PvuII) μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας.....	31
2.7.1 Χρωματογραφία Συγγένειας υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	31
2.7.2 Χρωματογραφία Συγγένειας υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.....	32
2.8 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	33
2.9 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting).....	34
2.10 Συγκέντρωση πρωτεϊνών.....	34
2.11 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop.....	35
2.12 Δοκιμές πέψης της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII με υπόστρωμα DNA.....	35
2.13 Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε γέλη αγαρόζης.....	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
3.1 Ταυτοποίηση του γονιδίου για την EcoRV-PvuII.....	38
3.2 Έκφραση μέσω επαγωγής της EcoRV-PvuII.....	39
3.3 Απομόνωση της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII.....	40
3.3.1 Απομόνωση υπό αποδιατακτικές συνθήκες μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας.....	40
3.3.2 Απομόνωση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας.....	42
3.4 Δοκιμές δραστηριότητας της EcoRV-PvuII με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA.....	45
3.4.1 Δοκιμές με απομονωμένη EcoRV-PvuII υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	45
3.4.1.1 Επίδραση των ιόντων Mg ²⁺ στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII.....	45
3.4.1.2 Επίδραση της θερμοκρασίας και της χρονικής διάρκειας επώασης στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII παρουσία απορρυπαντικού.....	46
3.4.2 Δοκιμές με μερικώς απομονωμένη EcoRV-PvuII υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.....	48
3.4.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας και του απορρυπαντικού Triton στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII.....	48

3.4.2.2 Επίδραση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος στη δραστικότητα της EcoRV-PvuII.....	49
3.4.2.3 Δοκιμή διπλής πέψης πλασμιδιακού DNA από την EcoRV-PvuII και το περιοριστικό ένζυμο XbaI και επίδραση της ένωσης EDTA.....	51
3.4.2.4 Σύγκριση της πέψης πλασμιδιακού DNA από την EcoRV-PvuII με αυτές των EcoRV και PvuII αγρίου τύπου.....	52
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II αποτελούν τα σύγχρονα «ψαλίδια» της μοριακής βιολογίας με ποικίλες εφαρμογές στη βιοϊατρική έρευνα, τη βιοτεχνολογία και τη διάγνωση. Εκτενείς μελέτες μετά τα μέσα του προηγούμενου αιώνα έχουν εστιάσει στη βιολογική τους δράση στα βακτηριακά κύτταρα, ενώ η επανάσταση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA αποτέλεσε τα μέσα για περαιτέρω έρευνα στις σχέσεις δομής-λειτουργίας αυτών των ενζύμων.

Μεταξύ αυτών, το περιοριστικό ένζυμο EcoRV είναι μια από τις πιο καλά μελετημένες πρωτεΐνες, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει μια από τις πιο μικρές ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II, η PvuII. Τα δυο αυτά ένζυμα, μολονότι στερούνται ιδιαίτερης ομολογίας στην πρωτοταγή τους αλληλουχία, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη δομική ομοιότητα. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε τον κινητήριο μοχλό για τη δημιουργία μιας τεχνητής πρωτεΐνης σύντηξης, σχεδιασμένης να επιτελεί μια καινούργια εξειδικευμένη αντίδραση ενδονουκλεολυτικής πέψης, στα πλαίσια της γενικότερης προσέγγισης για ανακάλυψη καινοτομικών ενζύμων. Πρόκειται για την πρωτεΐνη μονής αλυσίδας (single chain) EcoRV-PvuII, η οποία ενσωματώνει τις γενετικά τροποποιημένες πρωτεϊνικές επικράτειες των δυο εν λόγω ενζύμων.

Η πρωτεΐνη EcoRV-PvuII σχεδιάστηκε στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του κ. Κοκκινίδη και η υλοποίηση της παραγωγής και της μελέτης της αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας διατριβής. Αρχικός στόχος ήταν η έκφρασή της σε διαλυτή μορφή, μιας και έτσι εκδηλώνουν τα περιοριστικά ένζυμα τη βιολογική τους δράση. Εν συνεχεία έγιναν προσπάθειες απομόνωσης της πρωτεΐνης, με αώτερο στόχο την αξιοποίηση της σε δοκιμές πέψης με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA, καθώς και τον εν δυνάμει δομικό χαρακτηρισμό της.

Μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας και τη χρήση κολώνας Ni-NTA αγαρόζης, η πρωτεΐνη απομονώθηκε αποτελεσματικά σε συγκέντρωση 300 mM Ιμιδαζολίου υπό την παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων, λόγω της εμφάνισης πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (inclusion bodies). Ωστόσο, εξαιτίας μη ειδικής δραστηριότητας που παρατηρήθηκε στις δοκιμές πέψης με DNA, πραγματοποιήθηκε μερικός καθαρισμός σε μη αποδιατακτικούς παράγοντες. Προς έκπληξή μας, μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης, διαπιστώθηκε εμφανής βελτίωση στην εξειδίκευση της EcoRV-PvuII, που ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό στην ειδικότητα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης PvuII. Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί σημαντική παρακαταθήκη για μελλοντική μελέτη της πρωτεΐνης, που ενδεχομένως να απομονωθεί πιο αποτελεσματικά υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα Κρυσταλλογραφικής ανάλυσης με ακτίνες X. Παράλληλα, εκκρεμούν δοκιμές πέψης με ολιγονουκλεοτιδικό υπόστρωμα DNA, που πιθανώς να πιστώσουν περισσότερο τον εξειδικευμένο χαρακτήρα της EcoRV-PvuII.

ABSTRACT

Type II restriction enzymes are the modern 'scissors' of molecular biology with various applications in biomedical research, biotechnology and diagnostics. Extensive studies in the second half of the last century have focused on their biological activity in bacterial cells, while the revolution of recombinant DNA technology was the means to further research on the structure-function relationship of these enzymes.

Among them, the restriction enzyme EcoRV is one of the most well-studied proteins, and PvuII, one of the smallest type II restriction endonucleases, has been the subject of numerous structural studies. Although lacking significant homology in their primary sequence, these two enzymes exhibit remarkable structural similarity. This was the driving force for the creation of an artificial fusion protein, designed to perform a new specialized endonucleolytic digestion reaction, within the framework of engineering innovative enzymes. The single chain protein EcoRV-PvuII incorporates the genetically engineered protein domains of the restriction enzymes EcoRV and PvuII.

The EcoRV-PvuII protein was designed in the Crystallography laboratory of Prof. Kokkinidis and its production and study was the subject of the present thesis. The initial aim was the expression of the protein in a soluble form, since restriction enzymes normally exhibit their biological activity in solution. Subsequently, the protein was isolated, in order to use it for digestion assays, with plasmid DNA as a substrate, and potential structural characterization.

Using Affinity Chromatography, the protein was isolated effectively from a Ni-NTA agarose column in the presence of denaturing agents, since it forms inclusion bodies. However, due to non-specific activity observed in the digestion assays with DNA, a new experimental protocol was employed that allowed for the partial purification of the protein. Partial purification was performed in non-denaturing conditions. Surprisingly, electrophoretic analysis revealed visible improvement on the specific activity of EcoRV-PvuII, but it resembles greatly the specificity of the restriction endonuclease PvuII. This, rather unexpected, result calls for further investigation of the EcoRV-PvuII protein, and, if it can be isolated more efficiently under non-denaturing conditions, Crystallographic analysis experiments with X-rays. The specificity of EcoRV-PvuII can be established more thoroughly through digestion test experiments with oligonucleotide DNA substrates, which are in progress.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

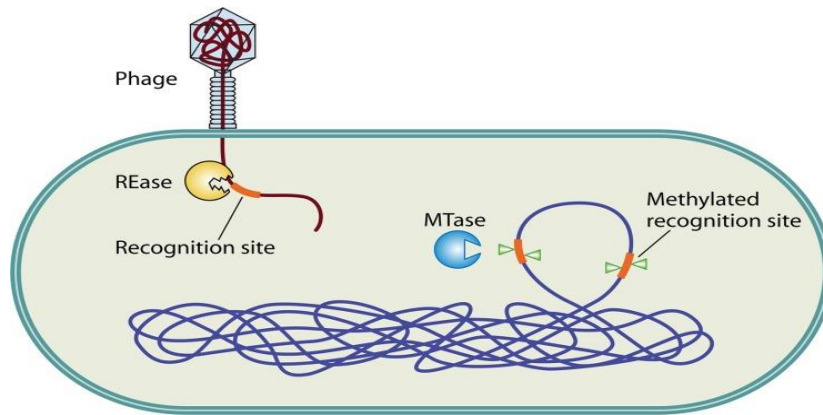
1.1. Συστήματα περιορισμού-τροποποίησης στα βακτήρια

Σε διάφορους μονοκύτταρους οργανισμούς, κατά κύριο λόγο στα βακτήρια, έχει βρεθεί η ύπαρξη ενός συστήματος κυτταρικής άμυνας έναντι της εισβολής εξωγενούς DNA. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει τη δραστηριότητα δύο διαφορετικών τύπων ενζύμων: μίας ενδονουκλεάσης περιορισμού, η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πέψη μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και μίας μεθυλοτρανσφεράσης, ρόλος της οποίας στο βακτήριο είναι η διάκριση εαυτού και ξένου DNA, προκειμένου να προστατευτούν οι αντίστοιχες αλληλουχίες-στόχοι των ενδογενών ενζύμων περιορισμού (**Εικόνα 1**) [1].

Πιο συγκεκριμένα, οι ενδονουκλεάσες περιορισμού πέπτουν το φωσφοδιεστερικό δεσμό του σκελετού του DNA σχηματίζοντας 5' και 3' κολλώδη ή λεία άκρα [1]. Οι μεθυλοτρανσφεράσες από την άλλη μεταφέρουν τη μεθυλική ομάδα από την S-αδενοσυλ-μεθειονίνη στον άνθρακα C-5 ή στην N-4 αμινοομάδα της κυτοσίνης, είτε στην N-6 αμινοομάδα της αδενίνης [2].

Οι πρώιμες περιγραφές αυτού του συστήματος περιορισμού-τροποποίησης (R-M) δημοσιεύτηκαν αρχικά το 1952 [3], ενώ έκτοτε μέχρι το 2010, 3945 βιοχημικά ή γενετικά χαρακτηρισμένα ένζυμα περιορισμού μαζί με τις συναφείς τους πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε συστήματα R-M είχαν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων REBASE [4]. Τα συστήματα R-M έχουν κατηγοριοποιηθεί κυρίως σε 4 τύπους (I-IV) με βάση τη σύσταση των υπομονάδων τους, την αναγνώριση της αλληλουχίας και τη θέση πέψης στο DNA, την απαίτηση συμπαραγόντων, καθώς και την εξειδίκευση σε διακριτές αλληλουχίες του DNA [1].

Ο τύπος I περιλαμβάνει ετερο-ολιγομερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα με ενσωματωμένες δραστηριότητες περιορισμού και τροποποίησης, τα οποία προσδένονται σε δίκλωνη αλληλουχία DNA και κόβουν από 100 μέχρι και χιλιάδες νουκλεοτιδικές βάσεις μακριά από την αλληλουχία στόχο. Εν αντιθέσει, ο τύπος II περιέχει ξεχωριστά ένζυμα για πέψη και τροποποίηση. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II έχουν ομοδιμερή ή ομοτετραμερή τεταρτοταγή δομή και κόβουν το DNA εντός ή παρακαίμενα της αλληλουχίας στόχο. Τα ένζυμα τύπου III είναι ετεροτριμερή ή ομοτετραμερή με ενσωματωμένες ενεργότητες περιορισμού, τροποποίησης και DNA-εξαρτώμενης NTPάσης. Αναγνωρίζουν ασύμμετρες αλληλουχίες 5-6 ζευγών βάσεων και κόβουν σε απόσταση περίπου 25 ζευγών βάσεων από το 3' άκρο της θέσης στόχο, ενώ μετατοπίζονται κατά μήκος του DNA. Τέλος, τα συστήματα τύπου IV πέπτουν μόνο υποστρώματα DNA με μεθυλωμένες, υδροξυλιομεθυλωμένες και γλυκοσυλ-υδροξυλιομεθυλωμένες βάσεις σε συγκεκριμένες αλληλουχίες [1].



Εικόνα 1. Σύστημα περιορισμού-τροποποίησης (R-M) ως μηχανισμός άμυνας. Τα συστήματα R-M αναγνωρίζουν την κατάσταση μεθυλίωσης του εξωγενούς DNA, π.χ. γονιδιώματα φάγων. Οι μεθυλιωμένες αλληλουχίες αναγνωρίζονται ως εαυτές, ενώ οι αλληλουχίες του εισέρχοντος DNA που στερούνται μεθυλίωσης αναγνωρίζονται ως ξένες και πέπτονται από την ενδονουκλεάση περιορισμού. Η κατάσταση μεθυλίωσης στις ενδογενείς αλληλουχίες αναγνώρισης υποστηρίζεται από τη συγγενή μεθυλοτρανσφεράση του συστήματος R-M [1].

1.2 Ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II

1.2.1 Γενικά

Όπως και οι άλλοι τύποι περιοριστικών ενζύμων, οι ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II συναντώνται αποκλειστικά σε μονοκύτταρους μικροοργανισμούς, κυρίως σε προκαρυώτες όπως τα βακτήρια και τα αρχαία. Σκοπός τους είναι η προστασία των κυττάρων από ιικά και άλλα μολυσματικά μόρια DNA. Πάραυτα, μια ομάδα μεγάλων ιών που προσβάλλουν το ευκαριωτικό άλγος *Chlorella* επίσης κωδικοποιεί για ένζυμα περιορισμού τύπου II και μεθυλοτρανσφεράσες. Πολύ σπάνια εμφανίζονται και σε βακτηριοφάγους, σε αντίθεση με την έκφραση μεθυλοτρανσφερασών, ως μέρος της ικής αυτοπροστασίας. Τα γονίδια που εκφράζουν τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II εντοπίζονται συνήθως σε χρωμοσωμικό DNA και περιστασιακά σε στοιχεία ικανά για μετάδοση, όπως πλασμίδια, τρανσποζόνια και αλληλουχίες ένθεσης [5].

Το 1987 ο Hamilton Smith με τους συνεργάτες του ανακάλυψαν το πρώτο περιοριστικό ένζυμο τύπου II. Πρόκειται για το HindII και εντοπίστηκε στο βακτήριο *Haemophilus influenza*. Από τότε, 4000 ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II με περισσότερες από 350 διαφορετικές ειδικότητες έχουν ταυτοποιηθεί [5].

1.2.2 Ονοματολογία

Σύμφωνα με την αρχική πρόταση των Smith και Nathans, τα περιοριστικά ένζυμα γενικότερα, κατ' επέκταση και αυτά του τύπου II κατονομάζονται βάσει της ταξινόμιας του οργανισμού που ανακαλύφθηκαν. Το πρώτο γράμμα του ενζύμου αναφέρεται στο γένος του οργανισμού και το δεύτερο και τρίτο γράμμα στο είδος. Ακολουθούν γράμματα ή/και αριθμοί που προσδιορίζουν το απομονωμένο στέλεχος.

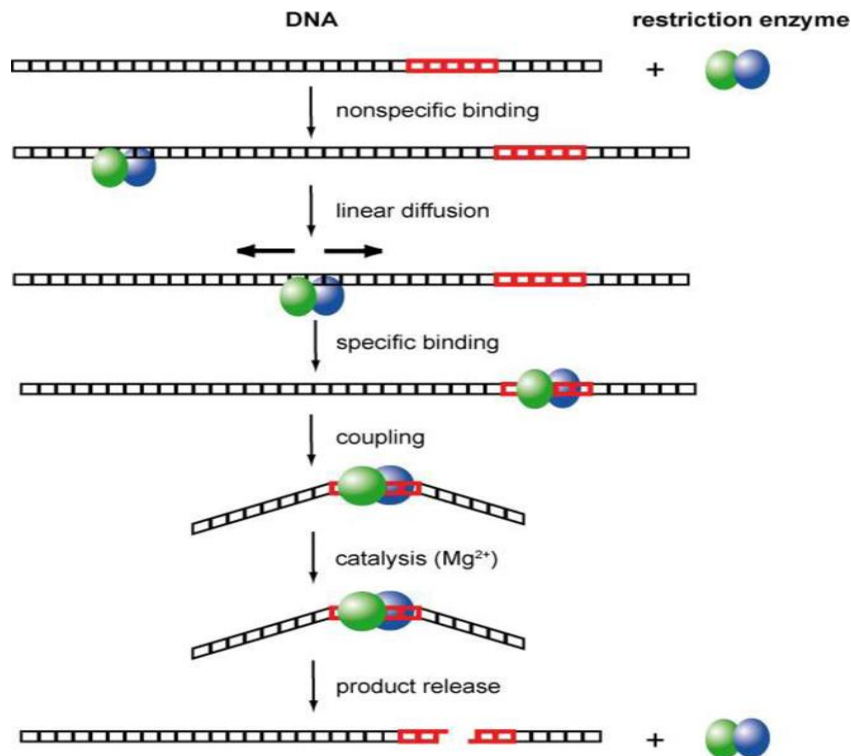
Τέλος, ρωμαϊκοί αριθμοί χρησιμοποιούνται για να υποδηλώσουν τα διαφορετικά ενζύμα από τον ίδιο οργανισμό [5].

1.2.3 Μηχανισμός βιολογικής δράσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω [1], το κύριο κριτήριο για να χαρακτηριστεί ένα ένζυμο περιορισμού ως τύπου II είναι ότι κόβει ειδικά εντός ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισής του, ενώ ταυτόχρονα δεν απαιτεί την υδρόλυση του ATP προκειμένου να εκδηλώσει τη νουκλεολυτική του δράση [6]. Η πλειοψηφία των περιοριστικών ενζύμων τύπου II («ορθόδοξα») είναι ομοδιμερή με μοριακή μάζα περίπου $2 \times 30\text{kDa}$ και αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες μήκους 4-8 ζευγών βάσεων. Με την παρουσία ιόντων Mg^{2+} κόβουν τους δυο κλώνους του DNA και αποδίδουν ως προϊόν 5'- φωσφορικά και 3'-υδροξυλιακά άκρα[6]. Εκτός των ιόντων Mg^{2+} τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II μπορούν να χρησιμοποιήσουν για την καταλυτική τους δράση μια ποικιλία κατιόντων όπως Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , και Cu^{2+} . Τα ιόντα Ca^{2+} αναστέλλουν την κατάλυση συνήθως, αλλά όχι πάντοτε [5].

Στην **Εικόνα 2** [5] παρουσιάζεται η διαδικασία αλληλεπίδρασης των περιοριστικών ενζύμων τύπου II, καθώς και γενικότερα των περιοριστικών ενδονουκλεασών, με το DNA, που οδηγεί στην παραγωγή θραυσμάτων λόγω νουκλεολυτικής πέψης. Αρχικά το ένζυμο προσδέεται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA και ακολουθεί μια γραμμική διάχυση του πρώτου στο δεύτερο. Εάν η θέση αναγνώρισης δεν είναι μακριά από το αρχικό σημείο της επαφής είναι πιθανό η αναγνώριση να γίνει με ένα μονό γεγονός πρόσδεσης. Στην ειδική θέση αναγνώρισης, πραγματοποιούνται αλλαγές διαμόρφωσης του ενζύμου που ωθούν την ενεργοποίηση του καταλυτικού κέντρου. Μετά την πέψη των φωσφοδιεστερικών δεσμών στους δυο κλώνους του DNA, το προϊόν ελευθερώνεται, είτε με άμεση αποδέσμευση του συμπλόκου ενζύμου- προϊόντος, ή με τη μεταφορά του ενζύμου σε μη ειδικές θέσεις του ίδιου μορίου DNA [6].

Η μη ειδική πρόσδεση του ενζύμου συνήθως δεν εμπλέκει αλληλεπιδράσεις με τις αζωτούχες βάσεις του DNA, αλλά μόνο με το σκελετό του. Αντίθετα, η ειδική πρόσδεση χαρακτηρίζεται από μια ενδιάμεση συνεργασία μεταξύ άμεσης (αλληλεπίδραση με τις βάσεις) και έμμεσης (αλληλεπίδραση με το σκελετό) ανάγνωσης του νουκλεϊκού μακρομορίου. Τυπικά περίπου 15 με 20 δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του διμερούς ενζύμου και των βάσεων της αλληλουχίας αναγνώρισης, μαζί με αρκετές επαφές van der Waals στις βάσεις και δεσμούς υδρογόνου με το σκελετό, με τη διαμεσολάβηση νερού [6].



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων που εμπλέκονται στη δέσμευση του DNA και την πέψη του από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II [5].

1.2.4 Εξέλιξη και δομικά χαρακτηριστικά

Τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II παρουσιάζουν ελάχιστα έως καθόλου αμινοξική ομολογία και ως εκ τούτου θα ήταν προφανές ότι δεν συνδέονται εξελικτικά. Παρ' όλα αυτά οι φαινοτυπικές τους ιδιότητες (αλληλουχία αναγνώρισης στο DNA, σημείο πέψης) έχουν αποδείξει το αντίθετο. Επιπλέον, η μεταξύ τους δομική ομοιότητα υποδηλώνει ότι έχουν έναν κοινό, κατά τα άλλα μακρινό εξελικτικό πρόγονο [6].

Συγκεκριμένα, όλα τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II έχουν έναν δομικά όμοιο καταλυτικό πυρήνα που αποτελείται από ένα β-φύλλο πέντε β-κλώνων που πλαισιώνεται από δυο α-έλικες [7]. Από αυτή τη δευτεροταγή δομή τα τέσσερα από τα πέντε β- φύλλα είναι απολύτως συντηρημένα, με τα δυο να εμπλέκονται απευθείας στην κατάλυση και τα άλλα δυο στο σχηματισμό του υδρόφοβου πυρήνα του μορίου και της β-πτύχωσης [6]. Αυτός ο συντηρημένος πυρήνας φέρει σε χωρική γειτνίαση τρία απαραίτητα φορτισμένα αμινοξέα, συνήθως δύο όξινα (καρβοξύλια από γλουταμικό ή ασπαρτικό) και μια λυσίνη [7].

Όλα τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούνται από υπο-επικράτειες, η μια εκ των οποίων περιέχει τον κοινό πυρήνα με το καταλυτικό κέντρο. Οι άλλες υπο-επικράτειες, που είναι εν μέρει υπεύθυνες για την πρόσδεση στο DNA και το διμερισμό του ενζύμου, είναι περισσότερο διαφορετικές δομικά από τον καταλυτικό πυρήνα [6].

Λαμβάνοντας υπόψη τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δομών και των λειτουργιών, η φυλογένεια που έχει προταθεί για την υπεριοικογένεια των περιοριστικών

ενδονουκλεασών περιλαμβάνει το διαχωρισμό σε δυο οικογένειες: την οικογένεια που ομοιάζει στο ένζυμο EcoRI και την οικογένεια που ομοιάζει στο ένζυμο EcoRV. Τα ένζυμα της πρώτης προσδένονται στη μεγάλη άλυκα του DNA και παράγουν κολλώδη άκρα με 5' προεξοχές, ενώ αυτά της δεύτερης προσεγγίζουν τη μικρή άλυκα του DNA δίνοντας σαν προϊόντα λεία άκρα. Αυτό το γεγονός έχει συνέπειες στην τοποθέτηση των δυο ενεργών κέντρων του ενζύμου και συνεπώς στη διάταξη των δύο υπομονάδων στο ομοδιμερές. Συμπερασματικά, ο πιο σημαντικός περιορισμός για τον τρόπο διμερισμού των περιοριστικών ενζύμων φαίνεται να είναι η φύση του προτύπου πέψης και όχι αυτή καθ'αυτή η αλληλουχία αναγνώρισης στο DNA [6].

1.3 Ενδονουκλεάση περιορισμού PvuII

1.3.1 Γενικά

Το 1981 εξετάστηκαν από τον Gingeras και την ερευνητική του ομάδα διάφορα στελέχη του γένους *Proteus* για την παρουσία περιοριστικών ενδονουκλεασών τύπου II. Ένα είδος, το *Proteus vulgaris* και συγκεκριμένα το στέλεχος ATCC 13315 βρέθηκε ότι φέρει τα ένζυμα PvuI and PvuII, τα οποία απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Ιδιαίτερα για το PvuII, ήταν η πρώτη φορά που περιγράφηκε μια τέτοια ειδικότητα μεταξύ των περιοριστικών ενζύμων τύπου II. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο αναγνωρίζει την εξανουκλεοτιδική αλληλουχία CAGCTG και η καταλυτική του λειτουργία πέψης εδράζεται στο κεντρικό δινουκλεοτίδιο GC [8].

Το πλασμίδιο pPvu1 από το *Proteus vulgaris* έχει βρεθεί ότι φέρει τα γονίδια για το σύστημα περιορισμού-τροποποίησης του PvuII [9]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για το περιοριστικό ένζυμο R.PvuII περιέχει ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο 157 αμινοξέων, ενώ το μοριακό βάρος του ενζύμου (σε μονομερή μορφή) είναι 18 kDaltons. Η περιοχή ανόδικά του γονιδίου για την R.PvuII περιέχει την αλληλουχία του υποκινητή για το γονίδιο της μεθυλάσης που μεταγράφεται με αντίθετη κατεύθυνση [10]. Έχει ταυτοποιηθεί επίσης ένα ρυθμιστικό γονίδιο (pnuIIc) μεταξύ των αποκλινόντων προσανατολισμένων γονιδίων για την PvuII(M) μεθυλάση και την PvuII ενδονουκλεάση περιορισμού, το οποίο έχει τον ίδιο προσανατολισμό και είναι μερικώς επικαλυπτόμενο με τη δεύτερη. Το προϊόν του έχει δράση in trans και απαιτείται για τη μεταγραφή της R.PvuII [11], ενώ μπορεί να διεγείρει την έκφρασή της έως και 10^5 φορές [12].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το ένζυμο R.PvuII αποτελείται από 157 αμινοξέα [10] και είναι ένα από τα μικρότερα σε μέγεθος γνωστά περιοριστικά ένζυμα [13]. Η δραστική μορφή του είναι ένα ομοδιμερές με ένα καταλυτικό κέντρο σε κάθε υπομονάδα. Τα δυο αυτά χωρικά ανεξάρτητα κέντρα δρουν συνεργατικά: κάθε υπομονάδα δρα στον ένα κλώνο του δίκλωνου DNA, ώστε και οι δυο κλώνοι να κοπούν διαδοχικά μέσω ενός ενιαίου γεγονότος πρόσδεσης. Η υδρολυτική αυτή διάσπαση του εξανουκλεοτιδίου (με φορά 5'-3') CAGCTG αποδίδει ως προϊόντα 5'-φωσφορικά και 3'-υδροξυλιακά λεία άκρα. Προϋπόθεση για τη νουκλεολυτική πέψη

της ενδονουκλεάσης περιορισμού R.PvuII είναι η απουσία δράσης της συγγενούς μεθυλάσης PvuII(M), η οποία αναγνωρίζει την ίδια αλληλουχία και τροποποιεί την εσωτερική κυτοσίνη σε κάθε κλώνο, παράγοντας την N4-μεθυλοκυτοσίνη.

Κάθε υπομονάδα της R.PvuII έχει τρεις δομικές περιοχές: την καταλυτική, την επιφάνεια διμερισμού και την περιοχή αναγνώρισης του DNA (**Εικόνα 3**). Από αυτές, η περιοχή κατάλυσης παρουσιάζει μια κοινή αρχιτεκτονική που παρατηρείται και σε άλλα δομικώς χαρακτηρισμένα περιοριστικά ένζυμα τύπου II (EcoRI, EcoRV, BamHI) και άλλες νουκλεάσες [13].

1.3.2 Διμερισμός της R.PvuII και αναγνώριση του DNA

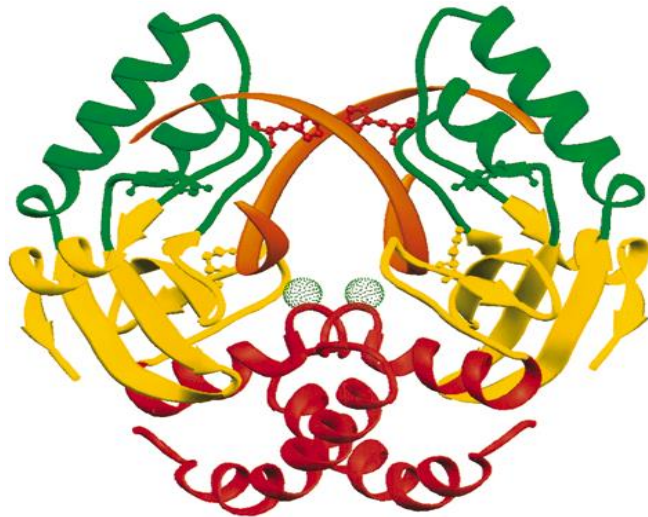
Η επιφάνεια διμερισμού απλώνεται κυρίως στην πλευρά της μικρής αύλακας του DNA, ενώ αυτή της αναγνώρισης του DNA έρχεται σε επαφή με τη μεγάλη αύλακα (**Εικόνα 3**). Αν και οι λειτουργίες του διμερισμού και των περιοχών αναγνώρισης του DNA είναι ξεχωριστές, υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ τους [13].

Πιο αναλυτικά, το αμινοξύ His85 που βρίσκεται εντός της περιοχής αναγνώρισης του DNA εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση των υπομονάδων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεση μέσω δεσμών υδρογόνου του ίδιου αμινοξέος μεταξύ των υπομονάδων, η οποία ευθύνεται για το κλείσιμο της σχισμής της περιοχής πρόσδεσης του DNA (**Εικόνα 3**). Με παρόμοιο τρόπο το αμινοξύ Asp34 της επιφάνειας διμερισμού συμμετέχει στην αναγνώριση του DNA: κάθε πλευρική ομάδα του Asp34 των δυο υπομονάδων δημιουργεί άμεσες και έμμεσες (με παρεμβολή νερού) επαφές στην εσωτερική γουανίνη που εντοπίζεται στη μικρή αύλακα της αλληλουχίας αναγνώρισης.

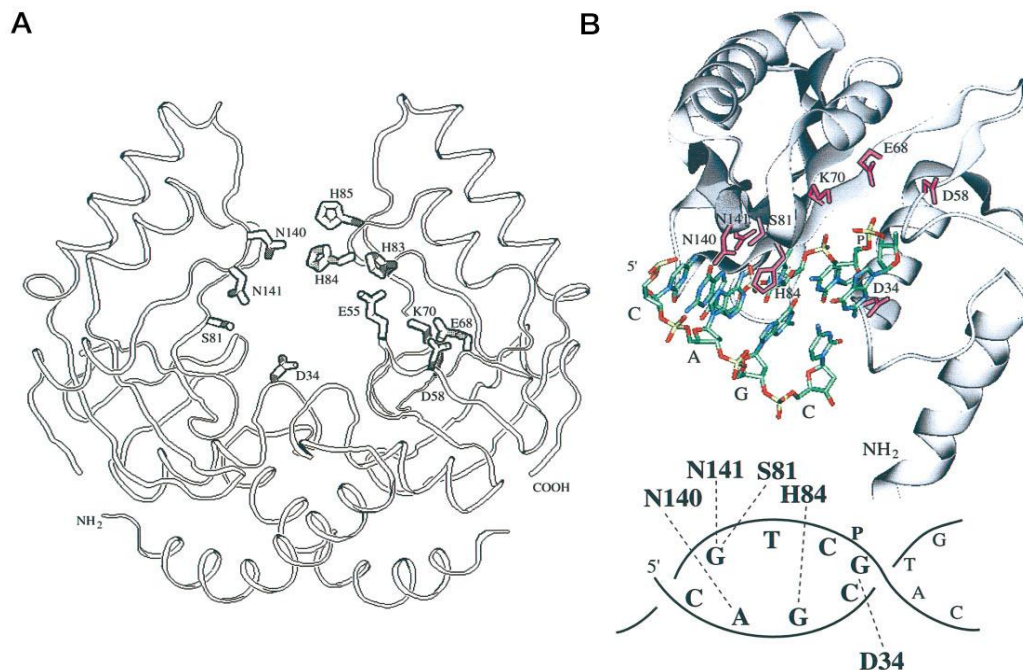
Έρευνες με μεταλλαγμένες R.PvuII στα εν λόγω αμινοξέα έδειξαν σοβαρές επιδράσεις στη συμπεριφορά του ενζύμου. Για παράδειγμα, η αντικατάσταση της His85 από την αλανίνη (H85A) είχε ως αποτέλεσμα μη ανιχνεύσιμη καταλυτική πέψη στην αλληλουχία στόχο, καθώς και πιο αδύναμη πρόσδεση στο DNA, σε σχέση με την αγρίου τύπου R.PvuII. Επίσης, ένα μετάλλαγμα του Asp34 σε γλυκίνη (D34G) (**Εικόνα 3**) έχασε τη δεσμευτική διάκριση για τις κεντρικές GC του εξανουκλεοτιδίου και μείωσε την καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου περίπου 10^{-4} φορές [13].

Επιπλέον, οι επαφές του ενζύμου με τη μεγάλη αύλακα του DNA πραγματοποιούνται από διάφορα αμινοξέα που βρίσκονται σε ένα ζεύγος αντιπαράλληλων β-κλώνων. Η His85 (αλληλεπίδραση με τις κεντρικές GC) μαζί με τις His83 και His84 (αλληλεπίδραση με κεντρικές G του δίκλωνου DNA) αποτελούν μια τριπλέτα ιστιδινών στην περιοχή αναγνώρισης του DNA. Εκτός απ'αυτήν υπάρχει το ζεύγος ασπαρτικών Asn140 (επαφή με πρώτη A στον ένα κλώνο) - Asn141(επαφή με τελευταία G στον ένα κλώνο) και η Ser81(επαφή επίσης με τελευταία G στον ένα κλώνο). Μια άλλη σημαντική περιοχή περιλαμβάνει το βρόχο L-AB, ανάμεσα στις πρώτες α-έλικες του ενζύμου. Τα αμινοξέα Gln33, Asp34 και Asn35 αυτού του βρόχου αποτελούν τη βάση της σχισμής πρόσδεσης στο DNA, «αντικρύζοντας» τη μικρή αύλακα και δημιουργούν άμεσες επαφές με τις

φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA και το κεντρικό ζεύγος βάσεων GC της αλληλουχίας στόχου (**Εικόνα 4**) [14, 15].



Εικόνα 3. Το ομοδιμερές μετάλλαγμα D34G σε σύμπλοκο με το DNA. Οι υπομονάδες αναπαρίστανται με κόκκινο, κίτρινο και πράσινο χρώμα για την εικονογράφηση των περιοχών διμερισμού, κατάλυσης και αναγνώρισης του DNA, αντίστοιχα. Ο σκελετός του DNA χρωματίζεται με πορτοκαλί. Περιλαμβάνονται και αναπαραστάσεις μερικών αμινοξέων σε σχήμα μπάλας και ράβδου: το Asp58 με κίτρινο, η His85 με κόκκινο και η Tyr94 με γκρι χρώμα. Τα άτομα Ca της Gly34 παρουσιάζονται ως πράσινες διακεκομμένες σφαίρες [13].



Εικόνα 4. Θέση διαφόρων μεταλλαγμένων αμινοξέων στη δομή της R.PvuII. Α, το διμερές της R.PvuII σε διάγραμμα ribbon. Το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο του δεξιού μονομερούς σημειώνονται. Οι πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων που έχουν τροποποιηθεί από τυχαία μεταλλαξιγένεση (Asp34, Ser81, Asn141, Asn140) εμφανίζονται στο αριστερό μονομερές. Τα αμινοξέα που έχουν προκύψει από θεση-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

(Glu55, Asp58, Glu68, Lys70, His83, His84, and His85) εμφανίζονται στο δεξί μονομερές. Β, ένα διάγραμμα α-ελικών/ β πτυχωτών φύλλων του δεξιού μονομερούς από το Α μαζί με DNA, ως κάτοψη του Α, και μία σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων του μονομερούς αυτού και της θέσης στόχου στο DNA. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνονται οι πλευρικές αλυσίδες που αλληλεπιδρούν ειδικά με το DNA, καθώς και τα πρώτα 4 ζεύγη βάσεων της αλληλουχίας στόχου. Σημειώνονται επίσης το αμινοτελικό άκρο του μονομερούς και η αποκομμένη φωσφορική ομάδα (P) της μιας νουκλεοτιδικής αλυσίδας [14].

1.3.3 Μηχανισμός κατάλυσης της R.PvuII

Δυο ενζυμικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες τύπου II: το μοντέλο υποβοήθησης υποστρώματος ενός μεταλλικού ιόντος και το μοντέλο δυο μεταλλικών ιόντων. Συνοπτικά, όσον αφορά την R.PvuII, και οι δύο μηχανισμοί εμπλέκουν δυο όξινα (Asp58 and Glu68) και ένα βασικό αμινοξύ (Lys70). Στο σύμπλοκο ενζύμου-DNA σχηματίζεται μια θέση πρόσδεσης του συμπαραγόντα Mg^{2+} μέσω της συνεργασίας των πλευρικών αλυσίδων των Asp58 και Glu68. Το αμινοξύ Lys70 σταθεροποιεί την κατάσταση μετάβασης και δρα ως οξύ κατά Lewis στην αντίδραση. Σύμφωνα με το μηχανισμό υποβοήθησης υποστρώματος ενός μεταλλικού ιόντος, η φωσφορική ομάδα της T της αλληλουχίας-στόχου δρα ως μια γενική βάση μέσω της οποίας ένα επιτιθέμενο μόριο νερού 'α' αποπρωτονώνεται. Στον υποτιθέμενο μηχανισμό δύο ιόντων, ένα δεύτερο ιόν Mg^{2+} συντονίζεται στη θέση Glu55/Asp58 και εξουδετερώνει το φορτίο της αποκομμένης φωσφορικής ομάδας της δεύτερης C της αλληλουχίας-στόχου [13].

Τέσσερα μόρια νερού (a,b,c,d) στην εμπλεκόμενη περιοχή σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με τα τρία καταλυτικά αμινοξέα (Asp58, Glu68, Lys70) και τις φωσφορικές ομάδες των προαναφερθέντων αζωτούχων βάσεων C και T. Απ' αυτά, τα τρία (a,b,c) βρίσκονται στη διεπιφάνεια ενζύμου-DNA, ενώ ανάλογα μόρια έχουν παρατηρηθεί στα ενεργά κέντρα των δομών των περιοριστικών ενζύμων R.EcoRV και R.BamHI σε σύμπλοκο με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες-στόχους [13].

Πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι η R.PvuII δεν μπορεί να κόψει DNA το οποίο έχει μεθυλωθεί στη θέση N4 της εσωτερικής κυτοσίνης της αλληλουχίας αναγνώρισης. Αντιθέτως, η μεθυλίωση στη θέση C5 της ίδιας κυτοσίνης επιτρέπει στο ένζυμο να εκδηλώσει καταλυτική δράση, έστω και πολύ πιο αργά [13].

1.3.4 Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου R.PvuII-DNA

Το 1994 οι Αθανασιάδης, Βλάσση, Κοτσιφάκη, Tucker, Cheng, Wilson και Κοκκινίδης προσδιόρισαν μέσω Κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X τη δομή μικτής αρχιτεκτονικής α/β της R.PvuII [24], ενώ την ίδια χρονιά προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της διμερούς R.PvuII με το νουκλεοτιδικό υπόστρωμά της [15]. Όπως διαπιστώθηκε, στην «ανοιχτή» διαμόρφωση του ελεύθερου από υπόστρωμα διμερούς ενζύμου (όπου εμφανίζεται μία ευρεία σχισμή), το ένζυμο δεν μπορεί να κάνει εκτεταμένες επαφές με το DNA. Ωστόσο, στα πρώιμα στάδια της αναγνώρισης του DNA (στα κεντρικά ζεύγη βάσεων της αλληλουχίας-

στόχου) επάγονται κινήσεις μεταξύ των δύο υπομονάδων, που έχουν ως αποτέλεσμα μια εμφανώς πιο «κλειστή» διαμόρφωση, ικανή για πρόσδεση του DNA [24]. Στη διαμόρφωση αυτή κρίσιμο ρόλο για την κατάλυση παίζει ο προσανατολισμός και η απόσταση μεταξύ των καταλυτικών πλευρικών αλυσιδών και του νουκλεϊκού δεσμού-στόχου, και όχι η παραμόρφωση της κλασικής μορφής B του DNA που παρατηρείται σε άλλα περιοριστικά ένζυμα, όπως το EcoRV [15]. Στην **Εικόνα 5** παρουσιάζεται η δομή και ένα διάγραμμα θέσεων για τα δομικά στοιχεία σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Η σχισμή που διχοτομεί το ομοδιμερές R.PvuII σε σχήμα U παρέχει την περιοχή δέσμευσης του DNA. Κάθε υπομονάδα περιέχει 5 α -έλικες και 8 β -κλώνους, συγκεκριμένα τις έλικες A-E και τους β κλώνους 1-8 με κατεύθυνση από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο (**Εικόνα 5D**). Οι βρόχοι μεταξύ των ελικών A(α A) και B(α B) και μεταξύ των β κλώνων 1 (β 1) και 2(β 2) αναφέρονται ως L-AB and L-12, αντίστοιχα [15]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η κάθε υπομονάδα του διμερούς αποτελείται από τις περιοχές κατάλυσης, αναγνώρισης του DNA και την επιφάνεια διμερισμού [13].

1.3.4.1 Επιφάνεια διμερισμού των υπομονάδων

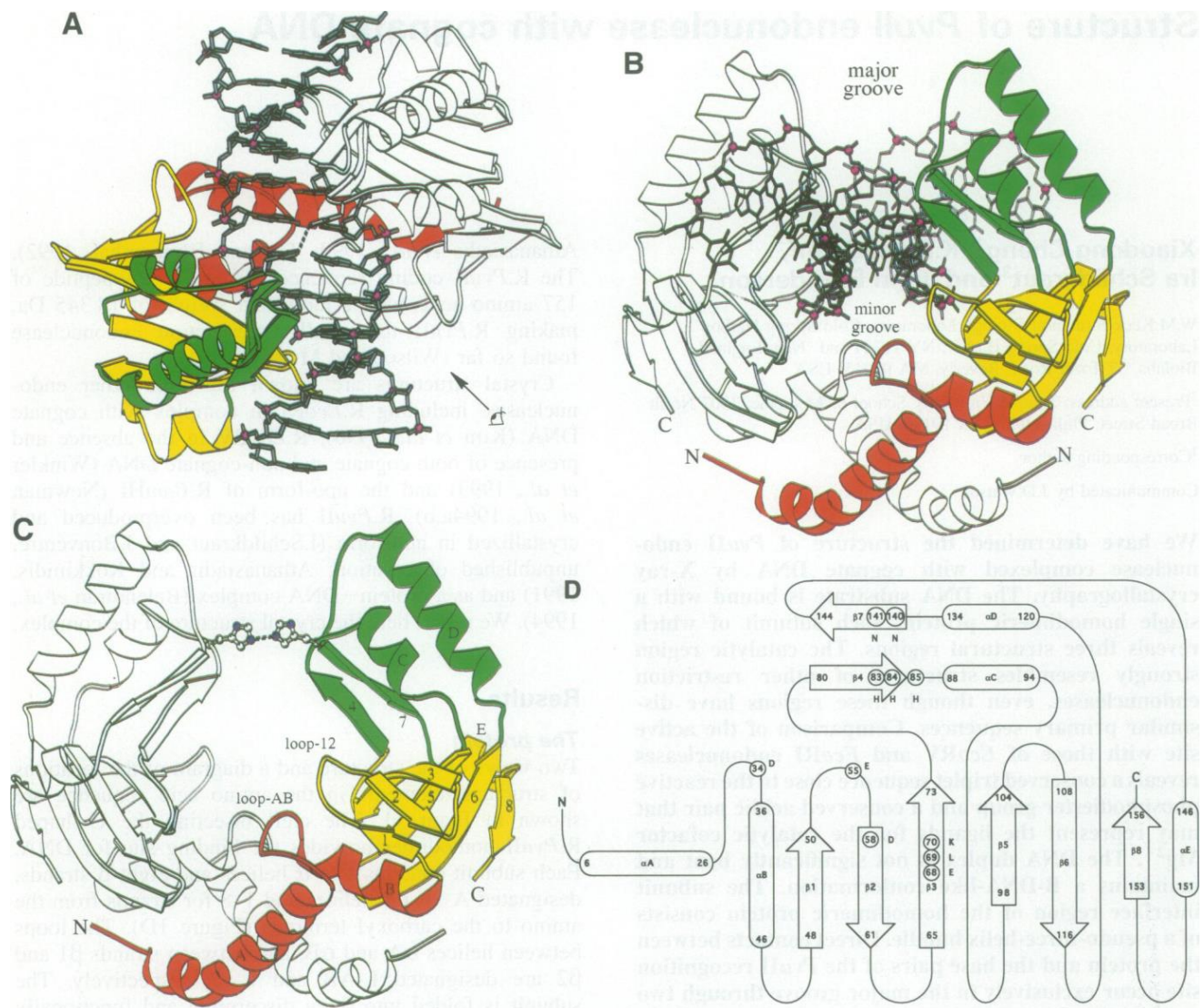
Τα πρώτα 46 αμινοτελικά αμινοξέα του κάθε μονομερούς σχηματίζουν την διεπιφάνεια των υπομονάδων μέσω των α A και α B που συνδέονται από το βρόχο L-AB. Οι δύο α A έλικες του διμερούς διασταυρώνονται με αποτέλεσμα το αμινοτελικό άκρο της μίας υπομονάδας να γειτονεύει με το καρβοξυτελικό άκρο της άλλης (**Εικόνα 5B**). Οι δύο βρόχοι L-AB του διμερούς έρχονται σε επαφή μέσω των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσουν μεταξύ τους τα άτομα των πλευρικών αλυσιδών τους, γεγονός που ομοιάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο β -φύλλων (**Εικόνα 1C**). Τα 10 αμινοξέα των δύο α B ελικών ευθυγραμμίζονται «κατά μέτωπο» στο διμερές με τους δυο βρόχους ενδιάμεσα, θυμίζοντας τη δομή μιας μονής έλικας με μια συστροφή στη μέση. Συνεπώς, αυτές οι δύο δομές έλικας-βρόχου-έλικας διατάσσονται σαν μια δέσμη ψευδο-3-ελικών, με τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες από τις τέσσερις έλικες του διμερούς να πακετάρονται σε έναν υδρόφοβο πυρήνα στο κέντρο της δέσμης [15]. Κρίσιμο ρόλο παίζει και το αμινοξύ H85 [13] που ανήκει στο βρόχο L-4C [15].

1.3.4.2 Καταλυτική περιοχή

Η καταλυτική περιοχή αποτελείται από ένα μίγμα αντιπαράλληλου/ παράλληλου β φύλλου που σχηματίζεται από τρεις κοντούς κλώνους (β 1, β 2, β 8) και τρεις μακρείς κλώνους (β 3, β 5, β 6) με μία έλικα (α B ή α E) σε κάθε άκρο του φύλλου. Το φύλλο περιβάλλει τον κλώνο β 3 του οποίου το μισό αμινοτελικό άκρο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τον κλώνο β 2 και το μισό καρβοξυτελικό άκρο αλληλεπιδρά με τον κλώνο β 5. Ως αποτέλεσμα, η φουρκέτα των κλώνων β 5 και β 6 διατάσσεται σχεδόν κάθετα στη φουρκέτα των κλώνων β 1 και β 2 (**Εικόνα 5C**). Εν δυνάμει καταλυτικά αμινοξέα βρίσκονται στο βρόχο L-12, στο αμινοτελικό άκρο του κλώνου β 2 και στη μέση του περιστρεφόμενου κλώνου β 3, όλα εκ των οποίων στην περιοχή της δραστηκής φωσφοδιεστερικής ομάδας [15].

1.3.4.3 Περιοχή αναγνώρισης του DNA

Η περιοχή αναγνώρισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας περιλαμβάνει δύο υποδομές από δύο διαφορετικές θέσεις στην πρωτοταγή αλληλουχία του μονομερούς ενζύμου και συγκεκριμένα έναν β κλώνο και μία α -έλικα. Ο κλώνος $\beta 4$ και η έλικα αC των αμινοξέων 80-94, βρίσκονται αντιπαράλληλα με την έλικα αD και τον κλώνο $\beta 7$ των αμινοξέων 120-144 (**Εικόνα 5D**). Οι αντιπαράλληλοι β κλώνοι του κάθε μονομερούς που προκύπτουν εγκαθιδρύουν ειδικές αλληλεπιδράσεις με τις νουκλεοτιδικές βάσεις της μεγάλης αύλακας του DNA [15]. Ο ρόλος των επιμέρους αμινοξέων που εδράζονται στην περιοχή αναγνώρισης του DNA περιγράφεται στην ενότητα 1.3.2 [14].



Εικόνα 5. Δομή της R.PvuII. Οι τρεις περιοχές της μιας υπομονάδας χρωματίζονται με κόκκινο, κίτρινο και πράσινο χρώμα για τις περιοχές αλληλεπίδρασης του διμερούς, κατάλυσης και αναγνώρισης του DNA, αντίστοιχα. Για το τμήμα της προσδεδεμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στόχου χρησιμοποιείται το μοντέλο μπάλας και ράβδου. (A)

Μπροστινή όψη του συμπλόκου ενζύμου-DNA. (B) Πλευρική όψη του συμπλόκου ενζύμου-DNA από μια γωνία σε σχέση με το (A). (C) Ίδια όψη όπως το (B) της δομής του διμερούς χωρίς το DNA. Όπως φαίνεται, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πλυρικών αλυσιδών της H85 του κάθε μονομερούς είναι υπεύθυνη για το κλείσιμο της σχισμής πρόσδεσης του DNA (D) Θέσεις των δευτεροταγών δομικών στοιχείων στην αμινοξική αλληλουχία [15, 24].

1.4 Ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV

1.4.1 Γενικά

Το σύστημα περιορισμού-τροποποίησης EcoRV σε διάφορα στελέχη *E.Coli* αποτελεί αντικείμενο μελέτης από τη δεκαετία του 1980. Συγκεκριμένα, το 1984 χαρακτηρίστηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις R.EcoRV και M. EcoRV, με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες να έχουν μοριακό βάρος 29 και 32 kDaltons, αντίστοιχα. Τα δύο γονίδια εκφράζονται σε αντίθετες κατευθύνσεις με μία ενδιάμεση γονιδιακή περιοχή 310 ζευγών βάσεων.

Τα γονίδια για την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV βρέθηκαν στο πλασμίδιο pLB1 μεγέθους 6.2 kb, το οποίο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε. Η έκφραση της πρωτεΐνης απέφερε μία αισθητή ικανότητα περιορισμού του φάγου λ, ενώ βρέθηκε ότι βρίσκεται υπό αυστηρό έλεγχο. Ο ρυθμός της μετάφρασής της μπορεί να αλλάξει κατά την έναρξή της λόγω της μειωμένης ικανότητας πρόσδεσης του ριβοσώματος, καθώς και κατά το στάδιο της επιμήκυνσης, που επηρεάζεται από τη χρήση κωδικονίων του κυττάρου έκφρασης. Ένας επιπλέον μηχανισμός ρύθμισης εμπλέκει την επίδραση τη δευτεροταγούς δομής του αντίστοιχου mRNA της R.EcoRV [16].

Την ίδια χρονιά ταυτοποιήθηκε η θέση την οποία η R.EcoRV αναγνωρίζει και ασκεί την καταλυτική της δράση. Πρόκειται για το εξανουκλεοτίδιο GATATC, με το ένζυμο να το πέπτει ανάμεσα στις κεντρικές βάσεις TA, δημιουργώντας λεία άκρα DNA [17]. Μάλιστα, η αλλαγή σε μόλις ένα ζεύγος βάσεων σ' αυτή την αλληλουχία είναι ικανή να μειώσει το λόγο k_{cat}/K_m της πέψης του DNA μέχρι και 10^6 φορές [18]. Το DNA του βακτηρίου *E. coli* μεθυλιώνεται από την αντίστοιχη μεθυλάση EcoRV στην πρώτη αδενίνη της αλληλουχίας αναγνώρισης και έτσι η αλληλουχία GA_{CH3}TATC προστατεύεται από την πέψη [19].

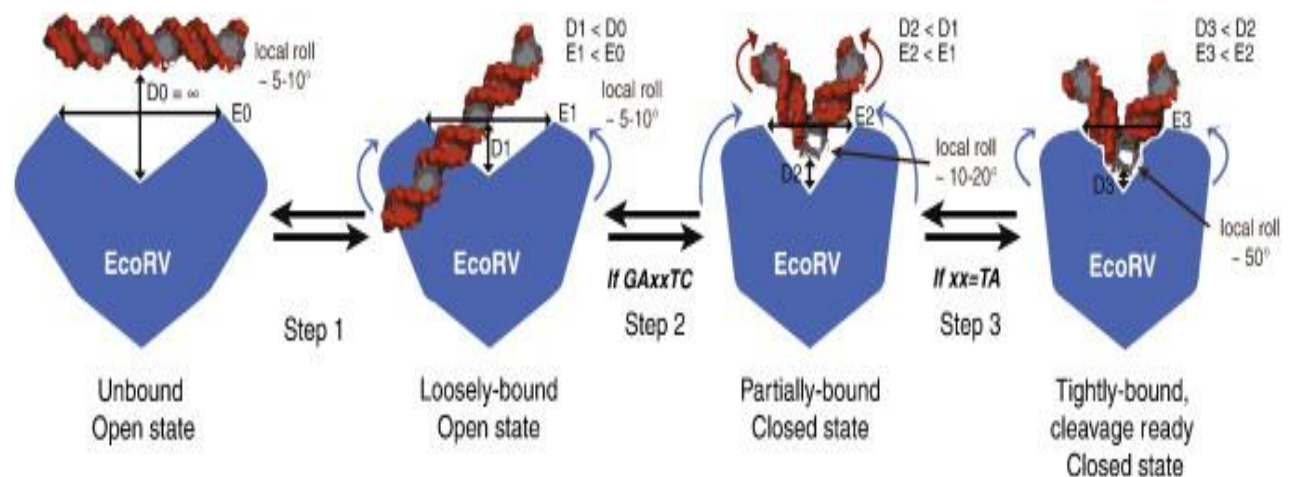
Παρουσία ιόντων Mg^{2+} , η ενδονουκλεάση EcoRV πέπτει την αλληλουχία GATATC, τουλάχιστον ένα εκατομμύριο φορές πιο ειδικά από οποιαδήποτε άλλη αλληλουχία. Η συγγένεια του ενζύμου για τα ιόντα Mg^{2+} αυξάνεται κατά την αναγνώριση της αλληλουχίας στόχου. Απουσία αυτών, το ένζυμο προσδέεται με την ίδια συγγένεια σε όλο το μήκος του DNA. Όταν το ένζυμο εντοπίζεται σε μία εναλλακτική αλληλουχία, μειώνεται η συγγένεια για τα ιόντα Mg^{2+} , αλλά είναι σε θέση να προσδέσει ιόντα Mn^{2+} και να πέψει μη ειδικές θέσεις. Επομένως, η αντικατάσταση των ιόντων Mg^{2+} από ιόντα Mn^{2+} μειώνει τη δραστηριότητα, καθώς και την ειδικότητα του ενζύμου για την αλληλουχία στόχο του [21].

Η ομοιότητα της θέσης στόχου της R.EcoRV με αυτήν της R.EcoRI (GAATTC) προσέλκυσε το ενδιαφέρον των επιστημόνων για να διαλευκανθεί η σχέση που παρουσιάζουν τα δύο αυτά συστήματα [16]. Στις μέρες μας, η R.EcoRV είναι ένα από

τα καλύτερα χαρακτηρισμένα περιοριστικά ένζυμα. Αποτελείται από ένα διμερές με κάθε μια από τις δύο υπομονάδες να απαρτίζεται από 245 αμινοξέα [19]. Το κάθε μονομερές περιέχει τις επικράτειες διμερισμού και πρόσδεσης DNA/ κατάλυσης, τους βρόχους Q και R καθώς και τέσσερις εύκαμπτους συνδέτες [20].

1.4.2 Μηχανισμός αναγνώρισης του DNA

Ο συνδυασμός της προσομοίωσης μέσω Μοριακής Δυναμικής με τα δεδομένα που έχουν καταγραφεί από την ανάλυση διαφόρων συμπλόκων R.EcoRV-DNA, έχει προτείνει έναν πιθανό μηχανισμό αναγνώρισης της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας GATATC από το ένζυμο. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει τρία στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, η διμερής πρωτεΐνη βρίσκεται σε μια ανοιχτή διαμόρφωση, αλληλεπιδρώντας χαλαρά με το DNA και κινείται κατά μήκος του. Στο δεύτερο στάδιο, τα δύο εξωτερικά ζεύγη βάσεων (GAXxTC) αναγνωρίζονται και οι βρόχοι R γίνονται πιο διατεταγμένοι μέσω δυνατών αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνων. Κρίσιμο ρόλο παίζουν οι ειδικοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της Asn185 και της πρώτης αδενίνης. Πρόκειται για το μερικώς προσδεμένο, κλειστής κατάστασης σύμπλοκο EcoRV-DNA, όπου το DNA έχει μια προτιμώμενη γωνία κλίσης μέχρι και 10° , ενώ η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μια κλειστή κατάσταση αλληλεπιδρώντας πιο χαλαρά με το DNA. Στο τελικό τρίτο στάδιο, η αναγνώριση των κεντρικών ζευγών βάσεων TA, οδηγεί σε ένα ισχυρά προσδεμένο σύμπλοκο, έτοιμο για την καταλυτική πέψη από το ένζυμο, με το σχηματισμό μιας θερμοδυναμικά ευνοούμενης γωνίας κλίσης περίπου 50° σε σχέση με την αρχική κατάσταση [19] (Εικόνα 6).



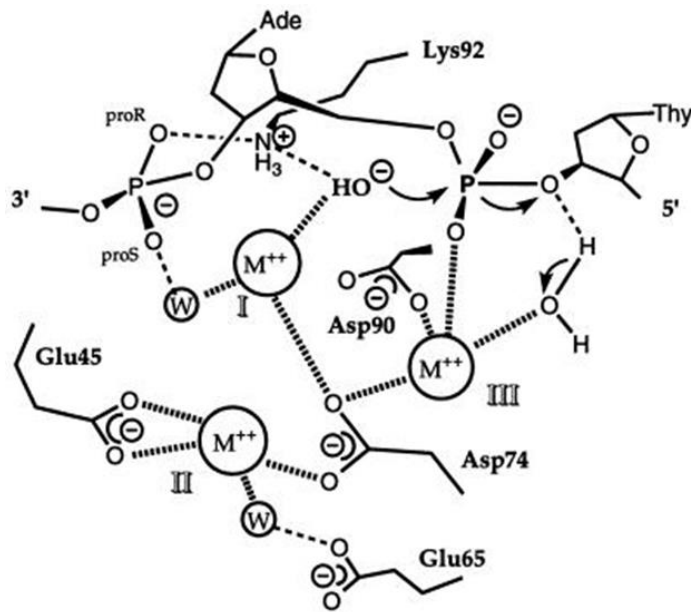
Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού αναγνώρισης της αλληλουχίας του DNA από την R.EcoRV, όπου φαίνονται μόνο οι πιο σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταστάσεων του συμπλόκου. Η απόσταση μεταξύ των «βραχιόνων» της πρωτεΐνης, E, μειώνεται από το βήμα 1 έως το βήμα 3 ($E_0 < E_1 < E_2 < E_3$). Ταυτόχρονα, μικραίνει και η απόσταση μεταξύ της πρωτεΐνης και του DNA, D ($D_0 < D_1 < D_2 < D_3$) [19].

1.4.3 Μηχανισμός κατάλυσης

Τα πιο πιθανό βιοχημικό μονοπάτι σχετικά με την αντίδραση υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού σκελετού του DNA από το περιοριστικό ένζυμο EcoRV που έχει προταθεί από πειράματα κβαντικής και μοριακής μηχανικής ανάλυσης, περιλαμβάνει έναν περισσότερο αποδιατακτικό, παρά συνδετικό χαρακτήρα. Η ελευθέρωση της αποχωρούσας φωσφορικής ομάδας διευκολύνεται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου ενός ενεργοποιημένου από μαγνήσιο μορίου νερού. Το ενεργό κέντρο διευθετεί τη σκισμένη απ'την αντίδραση φωσφορική ομάδα με τρόπο τέτοιο ώστε τα συντονισμένα από μαγνήσιο μόρια νερού να μπορούν άμεσα να συνεισφέρουν στην κατάλυση. Ένα αμινοξύ ασπαρτικού το οποίο τοποθετείται κατάλληλα με τη συμβολή του απαραίτητου μεταλλικού ιόντος Mg^{2+} , δρα σαν μία γενική βάση και προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο για τη δημιουργία του νουκλεόφιλου. Το ηλεκτροστατικό περιβάλλον που παρέχεται από την πρωτεΐνη ξεπερνά τα εμπόδια των καταλυτικών βημάτων, όπου υπάρχει μεταφορά φορτίου (π.χ. πρωτόνια) [22].

Ένα λεπτομερές μοντέλο της διαμόρφωσης της προ-μεταβατικής κατάστασης στην R.EcoRV χαρακτηρίζει τρία δισθενή ιόντα ανά ενεργό κέντρο και υποδεικνύει τη βοήθεια μιας συντηρημένης λυσίνης, η οποία σταθεροποιεί και προσανατολίζει το επιτιθέμενο ιόν υδροξειδίου ως νουκλεόφιλο, παρέχοντας ένα πυκνό εντοπισμένο θετικό φορτίο. Η λυσίνη αυτή επίσης προσφέρει ένα δεσμό υδρογόνου στο pro-Rp οξυγόνο της παρακείμενης 3' φωσφορικής ομάδας. Πρόκειται για την Lys-92, η αντικατάσταση της οποίας με αλανίνη ή γλουταμίνη μειώνει την ενεργότητα της πένης παραπάνω και από 10^{-4} φορές. Ο μηχανισμός τριών μεταλλικών ιόντων περιγράφεται στην **Εικόνα 7** [23].

Αρχικά ένα μεταλλικό ιόν στη θέση I (**Εικόνα 7**) συνδέεται μέσω νερού στην 3' φωσφορική ομάδα. Ένα δεύτερο μόριο νερού εσωτερικής σφαίρας σε αυτό το μέταλλο αποσυνδέεται για να παρέχει το επιτιθέμενο ιόν υδροξειδίου, γεγονός που υποβοηθείται από την Lys-92. Το μεταλλικό ιόν στη θέση III σταθεροποιεί το αρχικό αρνητικό φορτίο στην πορεία της κατάστασης μετάβασης. Ένα άλλο μόριο νερού εσωτερικής σφαίρας σ' αυτό το μέταλλο βρίσκεται σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από το εγκαταλείπον 3' οξυγόνο. Συνεπώς, το μεταλλικό ιόν στη θέση III είναι επίσης ενεργό στη μείωση της pKa αυτού του νερού, έτσι ώστε αυτό να αποσυνδεθεί και να πρωτονιώσει κατευθείαν το αποχωρούν ανιόν. Το μέταλλο της θέσης II είναι αποκλειστικά δομικού χαρακτήρα και εξυπηρετεί σημαντικά στον σωστό προσανατολισμό του κρίσιμου καρβοξυλίου του Asp-74. Ο ζωτικός ρόλος του συγκεκριμένου αμινοξέος φάνηκε από τα μεταλλάγματα D74A και D74N, τα οποία απέφεραν μια μείωση δραστηριότητας έως και 10^{-4} φορές [23].

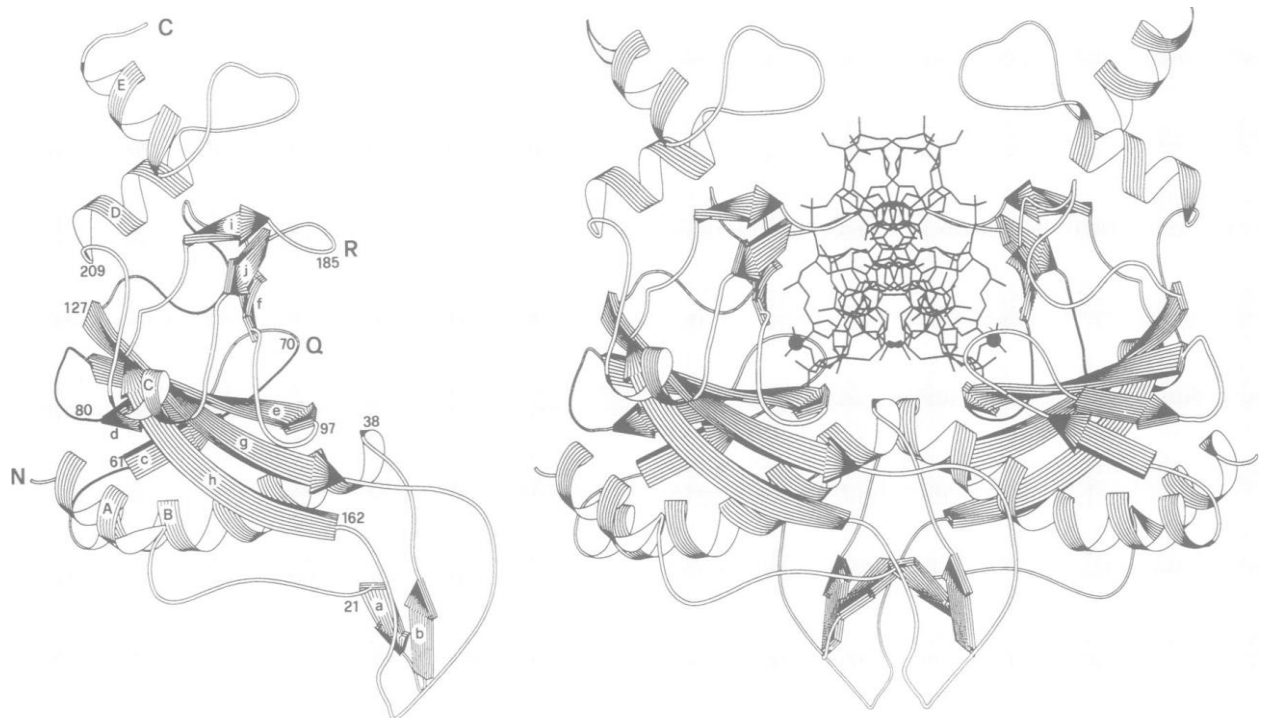


Εικόνα 7. Προτεινόμενη κατάσταση μετάβασης για την μεσολαβούμενη αντίδραση πέψης του DNA μέσω μεταλλικού ιόντος από την R.EcoRV. Το μεταλλικό ιόν στη θέση I δημιουργεί το επιτιθέμενο νουκλεόφιλο, το οποίο σταθεροποιείται και προσανατολίζεται από την Lys-92. Το μεταλλικό ιόν στη θέση III διευκολύνει την αποχώρηση του 3' ανιόντος και αντισταθμίζει το αναπτυσσόμενο αρνητικό φορτίο στη μεταβατική κατάσταση. Ο ρόλος του μεταλλικού ιόντος στη θέση II είναι δομικός. Οι επαφές μεταλλικού προσδέτη- εσωτερικής σφαίρας εμφανίζονται ως στενά παράλληλες γραμμές. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν δεσμούς υδρογόνου [23].

1.4.4 Κρυσταλλική δομή της R. EcoRV

Ο Winkler και οι συνεργάτες του το 1993 ανέλυσαν τη δομή της ενδονουκλεάσης EcoRV και των συμπλόκων της με ειδικές και μη ειδικές αλληλουχίες DNA. Κατά το σχηματισμό των συμπλόκων παρατηρούνται σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στο ένζυμο καθώς και στο DNA. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στην περίπτωση της ειδικής αλληλουχίας DNA πραγματοποιείται ένα κεντρικό τύλιγμα της νουκλεοτιδικής αλυσίδας με κλίση 50° , η οποία απαιτείται για να προσφέρει μια θέση πρόσδεσης υψηλής συγγένειας για τα ιόντα Mg^{2+} και παίζει σημαντικό ρόλο στη διάκριση του ενζύμου έναντι των μη συγγενών αλληλουχιών.

Η δραστηκή μορφή της R.EcoRV περιέχει 244 αμινοξέα και αποτελείται από ένα ομοδιμερές με μια μεικτή αρχιτεκτονική α ελικών/ β κλώνων. Ο πυρήνας του κάθε μονομερούς (Εικόνα 8) περιέχει ένα μικτό παράλληλο/αντιπαράλληλο β φύλλο που σχηματίζεται από τρεις μακρείς β κλώνους (βe , βg και βh), το οποίο προεκτείνεται από το ένα άκρο του κλώνου βe από τους δυο μικρότερους αντιπαράλληλους κλώνους βd και βc . Τα 60 αμινοτελικά αμινοξέα που περιέχουν τις έλικες αA και αB και ένας μακρύς βρόχος (αμινοξέα 141-161) που συνδέει τα άκρα των αντιπαράλληλων κλώνων βg και βh , βρίσκονται στην κάτω επιφάνεια του μεικτού φύλλου. Στην αντίθετη επιφάνεια, ένα μικρό αντιπαράλληλο β φύλλο τριών β κλώνων (βi , βj και βf) και τρεις μικρές α έλικες (αC , αD και αE) ορίζουν την επάνω πλευρά του μονομερούς. Παρ'όλα αυτά η δομή του ενζύμου περιέχει κάποια φτωχά διατεταγμένα τμήματα, όπως τα εκτεθειμένα αμινοξέα 13-18, 141-149 και 221-229, ενώ παρατηρείται μια εγγενής ελαστικότητα για το καρβοξυτελικό άκρο [18].



Εικόνα 8. Διαγράμματα κορδέλας της R.EcoRV. Αριστερά: μονομερής δομή με α έλικες και β κλώνους. Τα γράμματα N και C υποδεικνύουν το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, τα Q και R τη θέση της στροφής Q (αμινοξέα 68-71) και το βρόχο αναγνώρισης (αμινοξέα 182-187), αντίστοιχα, σημαντικές δομές για την αλληλεπίδραση με το DNA. Επιπλέον, οι κατά προσέγγιση θέσεις των επιλεγμένων στην εικόνα αμινοξέων υποδεικνύονται με τους αντίστοιχους αριθμούς της πρωτοταγούς αλληλουχίας. Δεξιά: δομή διμερούς με ένα μοντέλο ραβδιού του προσδεμένου ειδικού θραύσματος DNA. Οι δύο συμμετρικά διατεταγμένες αποκομμένες φωσφοδιεστερικές ομάδες διακρίνονται με μαύρους κύκλους [18].

1.4.4.1 Υποεπικράτεια διμερισμού

Στο ένζυμο υπάρχουν δύο δομικά συντηρημένες υποεπικράτειες που συνδέονται με διαφορετικούς σχετικούς προσανατολισμούς. Η μικρότερη από τις δύο περιέχει τα αμινοξικά τμήματα 19-32 και 150-160 και αποτελεί την υποεπικράτεια διμερισμού, που σχηματίζει κατά κύριο λόγο την διεπιφάνεια του διμερούς. Κατά το διμερισμό παρατηρείται ένα αντιπαράλληλο β φύλλο τεσσάρων β κλώνων με τους β κλώνους βα and βb της κάθε υπομονάδας (**Εικόνα 8**). Συμπεριλαμβανομένων και των επαφών από ένα σύνολο θαμμένων υδροφοβικών πλευρικών αλυσίδων, αυτό το ζευγάριωμα συντηρείται δομικά σε μεγάλο βαθμό [18].

1.4.4.2 Υποεπικράτεια πρόσδεσης του DNA

Η δεύτερη, μεγαλύτερη συντηρημένη υποδομή περιλαμβάνει την αμινοτελική έλικα αA και εκτός του τμήματος 141-166, όλα τα αμινοξέα από την αρχή της έλικας αB μέχρι το καρβοξυτελικό άκρο (**Εικόνα 8**). Πρόκειται για την υποεπικράτεια πρόσδεσης του DNA. Τα υπόλοιπα τμήματα (13-18, 33-37, 141-149 και 161-165) λειτουργούν σαν συνδέτες των δυο υποεπικρατειών με έναν ελαστικό τρόπο. Οι δύο

αμινοτελικές στροφές της έλικας αB συνεισφέρουν επίσης σε αυτή την ευέλικτη άρθρωση, ενώ ορισμένα αμινοξέα τους εμπλέκονται άμεσα και στην επιφάνεια διμερισμού, την πρόσδεση του DNA και πιθανόν την κατάλυση. Ο βρόχος μεταξύ των αμινοξέων 182 και 187 προσεγγίζει το κεντρικό τμήμα του DNA και από τις δύο πλευρές μέσα στη μεγάλη αύλακα και εγκαθιδρύει όλες τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις με τις βάσεις, αποτελώντας το βρόχο αναγνώρισης, R. Ωστόσο, είναι διατεταγμένος σε μικρό βαθμό στη δομή του ενζύμου και στο σύμπλοκο του ενζύμου με μη συγγενή αλληλουχία. Ο άλλος βρόχος (Q) σχηματίζει μία β στροφή και αλληλεπιδρά κυρίως με το σκελετό σακχάρων-φωσφορικών δεσμών. Περιλαμβάνει τα αμινοξέα Gln68, Gln69, Asn70 και His71 και αναπτύσσει επαφές επίσης με τις βάσεις στη μικρή αύλακα και στα δύο άκρα της αλληλουχίας αναγνώρισης. Παρ' όλα αυτά στο μη συμπλοκοποιημένο με DNA ένζυμο, ο βρόχος Q loop είναι ελάχιστα διατεταγμένος, υποδεικνύοντας ότι η διαμόρφωσή του ποικίλει απουσία DNA [18].

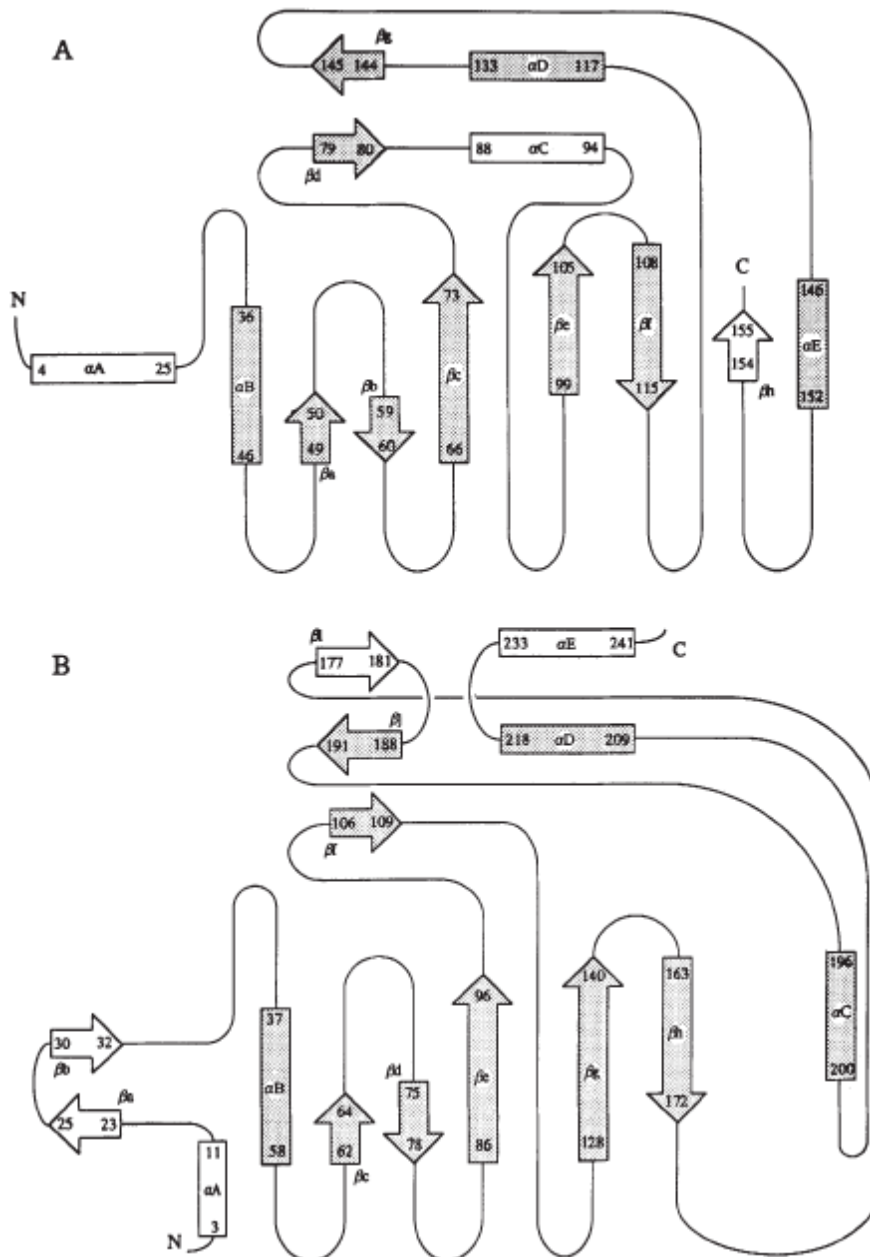
1.4.4.3 Ενεργό κέντρο

Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Asp74, Asp90, Lys92 και Asn188 εντοπίζονται κοντά στις αντιδραστικές φωσφορικές ομάδες κατά το σχηματισμό συμπλόκου της R.EcoRV με τη συγγενή αλληλουχία DNA. Πειράματα θεσηκατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης σε αυτές τις θέσεις έδειξαν μια αξιοσημείωτη μείωση της καταλυτικής δράσης, επιβεβαιώνοντας έτσι τη συμμετοχή των εν λόγω αμινοξέων στην κατάλυση του ενζύμου [18].

1.5 Δομική ομολογία μεταξύ των R.PvuII και R.EcoRV

Παρά την απουσία αμινοξικής ομολογίας, εκτεταμένες τοπολογικές και δομικές ομολογίες έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των περιοριστικών ενζύμων EcoRV και PvuII. Η χωρική ευθυγράμμιση των δύο ενζύμων έχει αποκαλύψει ένα σύνολο δευτεροταγών δομικών στοιχείων που είναι παρόν σε τοπολογικά ισοδύναμες θέσεις των δύο δομών (**Εικόνα 9**). Αναλυτικότερα, στην R.PvuII αυτό το σύνολο περιλαμβάνει τις α έλικες B, D, E και τους β κλώνους a, b, c, d, e, f, g (**Εικόνα 9A**), και είναι τοπολογικά ισοδύναμο με τις α έλικες B, D, C και τους β κλώνους c, d, e, f, g, h και j αντίστοιχα από την R.EcoRV (**Εικόνα 9B**). Η έλικα αB της R.PvuII είναι τοπολογικά ισοδύναμη μόνο με το αμινοτελικό κομμάτι της λυγισμένης έλικας αB της R.EcoRV. Επομένως, το μεγαλύτερο μέρος της R.PvuII σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την υποεπικράτεια πρόσδεσης του DNA της R.EcoRV [24]. Πάραυτα, υπάρχει δομική απόκλιση στις υποεπικράτειες διμερισμού των δύο ενζύμων, οι οποίες αντίθετα από τη διαφορά μεγέθους των ενζύμων, είναι παρομοίου μεγέθους μεταξύ τους [6]. Η χωρική ευθυγράμμιση έχει δείξει ότι τα περισσότερα δευτεροταγή δομικά στοιχεία που είναι τοπολογικά ισοδύναμα επικαλύπτονται πλήρως ή μερικώς. Ειδικότερα, 46 αμινοξέα της R.PvuII (περίπου το 30% της πρωτεΐνης) από τις α έλικες αB, αD, αC και τους β-κλώνους βc, βd, βe, βg επικαλύπτονται με αμινοξέα

από τα αντίστοιχα τμήματα της R.EcoRV, βάσει της μέτρησης r.m.s.d. (root-mean-square deviation) για τις θέσεις του Ca άνθρακα. Η σειρά με την οποία τα δευτεροταγή δομικά στοιχεία εμφανίζονται στις πρωτοταγείς αλληλουχίες είναι ίδια για τα δυο ένζυμα με εξαίρεση το τμήμα που περιέχει τις αD, αE και τον βg στην R.PvuII. Ιδιαίτερα, η τοπολογική ισοδυναμία των α-ελικών αD των δυο πρωτεϊνών αντικατοπτρίζεται από την πρωτοταγή αλληλουχία τους που περιέχει ένα ασύνηθες ποσοστό αρωματικών αμινοξέων [24].



Εικόνα 9. Τοπολογική αναπαράσταση των A, R.PvuII και B, R.EcoRV. Τα δευτεροταγή δομικά στοιχεία του κάθε ενζύμου που έχουν τοπολογικά ισοδύναμες αντιστοιχίες στο άλλο ένζυμο αναπαρίστανται με σκίαση [24].

Επιπρόσθετα, μέσω χωρικής ευθυγράμμισης προκύπτει ότι περιοχές της R.PvuII πλούσιες σε αμινοξέα ικανά για πρόσδεση του DNA μέσω γέφυρας αλάτων ή

σηματισμό δεσμών υδρογόνου, αντιστοιχούν σε στροφές πρόσδεσης του DNA από την R.EcoRV. Ο αποδιαταγμένος βρόχος μεταξύ των β-κλώνων βα και ββ της R.PvuII είναι ισοδύναμος με την Q-στροφή της περιοχής πρόσδεσης του DNA της R.EcoRV. Εντούτοις, μία περιοχή της R.PvuII που περιέχει ένα τμήμα με τρία διαδοχικά αμινοξέα ιστιδινών (His83, His84, His85) και ένα τμήμα με δύο συνεχόμενα αμινοξέα ασπαραγινών (Asn 140, Asn 141) αντιστοιχούν με την R-στροφή της περιοχής πρόσδεσης του DNA στην R.EcoRV. Ειδικότερα, εάν τα δύο διμερή ευθυγραμμιστούν, η His84 της R.PvuII επικαλύπτεται με αμινοξέα της R.EcoRV που εμπλέκονται στην ειδική αναγνώριση των βάσεων του DNA. Ένα επιπρόσθετο κοινό χαρακτηριστικό αυτών των δομικά ομόλογων περιοχών των δύο ενζύμων είναι η παρατηρούμενη ελαστικότητά τους. Πρόκειται για ένα κρίσιμο γνώρισμα για τις αλληλεπιδράσεις με το DNA και μάλιστα έχει προταθεί η ομαδοποίηση των δομών των ενδονουκλεασών περιορισμού που βασίζεται στις θέσεις των σκισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA που προκύπτουν από την κατάλυση [24].

Όσον αφορά τα κρίσιμα για την κατάλυση αμινοξέα, τα Asp74 και Asp90 και η Lys92 της R.EcoRV επικαλύπτονται αρκετά με τα Asp58, Glu68 και Lys70 της R.PvuII, ενώ τα τμήματα όπου εδράζονται είναι τοπολογικά ισοδύναμα. Τα δύο περιοριστικά ένζυμα, όπως και γενικότερα τα ένζυμα περιορισμού τύπου II μοιράζονται ένα μοτίβο αλληλουχίας που καθορίζεται από τα καταλυτικά αμινοξέα και είναι της μορφής: ...PDX_n(D/E)ZK...(n=10-30, τα X και Z μπορεί να είναι οποιαδήποτε αμινοξέα). Μία σημαντική παρατήρηση είναι ότι το αμινοξύ Z και στα δυο ένζυμα βρίσκεται σε έναν εξωτερικό β-κλώνο του κεντρικού β-φύλλου, απέναντι από τον υδρόφοβο πυρήνα [24].

1.6 Εφαρμογές και προοπτικές των ενζύμων περιορισμού

1.6.1 Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού τύπου II ως μοριακά «ψαλίδια»

Οι ενδονουκλεάσες τύπου II αποτελούν τα εργαλεία αιχμής της σύγχρονης μοριακής βιολογίας μιας και χρησιμοποιούνται καθημερινά σε εργαστήρια γονιδιακής κλωνοποίησης και ανάλυσης του DNA. Η αντίδραση πέψης που διεκπεραιώνουν παράγει με συνεπή επαναληψιμότητα θραύσματα DNA και αναμενόμενα πρότυπα στην ηλεκτροφόρηση γέλης, ιδιότητες που καθιστούν τα ένζυμα αυτά πολύτιμα αντιδραστήρια για τον εργαστηριακό χειρισμό του DNA και την έρευνα [5]. Επιπλέον, έχουν αποδειχθεί ως εξαιρετικά συστήματα-μοντέλα για τη μελέτη υψηλά εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-νουκλεϊκών οξέων, την εμβάθυνση γνώσης στις σχέσεις δομής-λειτουργίας και την κατανόηση των μηχανισμών της εξέλιξης εντός μιας μεγάλης οικογένειας λειτουργικώς σχετιζόμενων ενζύμων [6].

Ενδεικτικά παραδείγματα χρήσης τους σε επιστημονικές εφαρμογές της γενετικής μηχανικής αποτελούν η παραγωγή ορμονών του ανθρώπου στην ιατρική, η απομόνωση αναμενόμενων θραυσμάτων DNA μέσω της μεθόδου «shotgun», η κλωνοποίηση επιθυμητών τμημάτων DNA και η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους

θραύσματος περιορισμού (RFLP), οι μέθοδοι Southern blotting, η ενίσχυση DNA τμημάτων μέσω της μεθόδου PCR και οι γεωργικές μοριακές εφαρμογές. Μέσω αυτών των τεχνικών τα επιθυμητά γονίδια μπορούν να αξιοποιηθούν, κάνοντας τη γενετική μηχανική μία διαδικασία κερδοφόρα και απλή [25]. Εύκολα κατανοητός μπορεί να γίνει συνεπώς και ο βαθμός στον οποίο συνεισφέρουν τα ένζυμα περιορισμού σε διαγνωστικές εφαρμογές. Ενδεικτικός είναι ο κεντρικός ρόλος του R.PvuII στην ανάλυση RFLP απομονωμένων στελεχών του είδους *Mycobacterium tuberculosis* [28].

Αξιοσημείωτο επίσης είναι το ότι στις μέρες μας ολοένα και περισσότερο δίνεται έμφαση σε εφαρμογές υψηλής τεχνολογίας, όπως η επεξεργασία γονιδιωμάτων και η βιοιατρική έρευνα. Σε αυτό το πεδίο εντάσσεται και η πρόοδος στη γονιδιακή θεραπεία διάφορων γενετικών νόσων, μεταξύ των οποίων η προσέγγιση αντιμετώπισης του καρκίνου που αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση [26]. Τα χιμαιρικά περιοριστικά ένζυμα είναι μια νέα ομάδα επιστημονικά σχεδιασμένων τεχνητών νουκλεασών στις οποίες η επικράτεια πέψης μη ειδικού DNA της πρωτεΐνης FokI (τύπος IIS περιοριστικών ενδονουκλεασών) είναι συντηγμένη με άλλα μοτίβα πρόσδεσης DNA. Αυτά τα μοτίβα είναι ευκαρυωτικής προέλευσης: έλικα-στροφή-έλικα, δάκτυλο ψευδαργύρου, φερμουάρ λευκίνης. Αυτά τα καινοτόμα ένζυμα είναι ικανά για ειδικές πέψεις *in vitro* πολύ κοντά στις αναμενόμενες αλληλουχίες αναγνώρισης και μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν στη γονιδιακή μηχανική και κατ'επέκταση στη γονιδιακή θεραπεία [27].

1.6.2 Καινοτομικά ανασυνδυνασμένα περιοριστικά ένζυμα EcoRV και PvuII

1.6.2.1 Ενδονουκλεάση περιορισμού PvuII μονής αλυσίδας (single chain)

Το περιοριστικό ένζυμο PvuII αποτελεί μια πρωτεΐνη στόχο για μελέτες δομής-λειτουργίας και πρωτεϊνική μηχανική, όντας μια από τις μικρότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες περιορισμού με έναν περιορισμένο αριθμό αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-DNA, σύμφωνα και με την κρυσταλλική της δομή [14]. Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου έδειξε ότι το καρβοξυτελικό άκρο της μιας υπομονάδας βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από το αμινοτελικό άκρο της άλλης, γεγονός που διευκολύνει το σχεδιασμό ενός ενζύμου μονής αλυσίδας (sc), μέσω σύνδεσης των άκρων του με έναν μικρό πεπτιδικό συνδέτη όπως ο Gly-Ser-Gly-Gly. Το νέο αυτό ένζυμο είναι ένας εν δυνάμει καταλύτης και μπορεί να χρησιμεύσει ως πολύτιμο εργαλείο σε μελέτες πρωτεϊνικής μηχανικής, τόσο στη βασική έρευνα, όσο και σε πρακτικές εφαρμογές. Συγκεκριμένα, μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη προγραμματίσιμων περιοριστικών ενδονουκλεασών για πέψη του DNA με μεγάλη εξειδίκευση, ικανή για την ανάλυση γονιδιωματικού DNA ή για στόχευση μεμονωμένων γονιδίων σε σύνθετα γονιδιώματα [29].

Έχει βρεθεί ότι η scPvuII ομοιοπολικά συνδεδεμένη μέσω ενός διλειτουργικού διασταυρούμενου συνδέτη σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο τριπλού σχηματισμού ελικών (TFO) πέπτει ειδικά DNA υψηλού μοριακού βάρους σε θέσεις αναγνώρισης της R.PvuII, εάν αυτές βρίσκονται σε απόσταση περίπου μιας ελικοειδούς στροφής από

μια θέση τριπλού σχηματισμού έλικας (TFS) που είναι συμπληρωματική στο TFO, ενώ άλλες θέσεις παραμένουν ανέπαφες. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα TFOs μπορούν να συντεθούν προς σχηματισμό τριπλών ελικών με οποιαδήποτε αλληλουχία θα ήθελε κάποιος ερευνητής να διευθύνει και ότι ο σχηματισμός τριπλής έλικας μπορεί να χρησιμεύσει στη στόχευση γονιδίων *in vivo*, το μετάλλαγμα της scPvuII μπορεί να θεωρηθεί ένα προγραμματίσιμο περιοριστικό ένζυμο που προσφέρει μια εναλλακτική προσέγγιση στο σχεδιασμό νουκλεασών δακτύλου ψευδαργύρου σε αρκετά αποτελεσματικές εφαρμογές ενδογενούς διόρθωσης γονιδίων [29].

Η κυκλική μετάθεση (CP) είναι μια μέθοδος για τη διαφοροποίηση υπάρχοντων πρωτεϊνικών δομών που μέσω πρωτεϊνικής μηχανικής μπορεί να αποδώσει πρωτεΐνες με διαφοροποιημένη δομή και λειτουργία, αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα, καθώς και βελτιωμένη σταθερότητα [30]. Δεδομένης της μεγάλης ομοιότητας των κρυσταλλικών δομών των PvuII και scPvuII [29], η scPvuII έχει επανασχεδιαστεί μέσω της CP. Η μέθοδος αυτή οδηγεί σε αναδιοργάνωση των πρωτεϊνών πολυπεπτιδικών αλυσιδών με μετατόπιση των άκρων, επομένως η προκύπτουσα πρωτεΐνη από CP έχει νέα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα, τα οποία σε μελλοντικές μελέτες μπορούν να αξιοποιηθούν για τη σύντηξη με άλλες επικράτειες ρυθμιστικών πρωτεϊνών, όπως στοιχεία πρόσδεσης του DNA ή αισθητήριες επικράτειες ελεγχόμενες από το φως [30].

1.6.2.2 Η R.PvuII ως πρωτεΐνη σύντηξης

Τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν σημαντικά καινοτομικά εργαλεία για τη γονιδιακή στόχευση και μπορούν να αξιοποιηθούν ως συστατικά πρωτεϊνών σύντηξης. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα είναι οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs) με ενσωματωμένα δάκτυλα ψευδαργύρου ως επικράτεια πρόσδεσης του DNA και την επικράτεια πέψης μη ειδικού DNA της ενδονουκλεάσης περιορισμού FokI ως μονάδα πέψης του DNA. Αυτή η αρχιτεκτονική εφαρμόζεται και από τις νουκλεάσες TALE (TALENs), στις οποίες τα στοιχεία πρόσδεσης του DNA αντί των δακτύλων ψευδαργύρου βασίζονται σε πρωτεΐνες τελεστές που ομοιάζουν σε ενεργοποιητές μεταγραφής (TALE). Επίσης έχουν σχεδιαστεί και παραχθεί μεταλλαγμένες TALENs με αντικατάσταση της καταλυτικής επικράτειας του FokI από την R.PvuII. Αυτές αναγνωρίζουν μόνο το μικτό σημείο αναγνώρισης που περιέχει τη θέση στόχο της TALE και την αλληλουχία αναγνώρισης της R.PvuII (διευθυνόμενο σημείο), αλλά όχι τις απομονωμένες θέσεις αναγνώρισης της TALE ή της PvuII (μη διευθυνόμενα σημεία), ακόμα και σε αφθονία της πρωτεΐνης σύντηξης έναντι του DNA σε μεγάλες χρονικά επώσεις. Μάλιστα, η προτίμησή τους *in vitro* για τη διευθυνόμενη θέση είναι υψηλότερη έως και 34000 φορές σε σχέση με τη μη διευθυνόμενη θέση, ενώ είναι ενεργές και σε κύτταρα χωρίς ιδιαίτερη κυτταροτοξικότητα [31].

Μία νέα προσέγγιση για το σχεδιασμό νουκλεασών υψηλής εξειδίκευσης έγκειται στη σύντηξη καταλυτικά ανενεργών μεταλλαγμάτων της ενδονουκλεάσης I-SceI, ως στοιχείο πρόσδεσης στο DNA, με το περιοριστικό ένζυμο PvuII, ως στοιχείο πέψης, συνδεδεμένα μέσω ενός συνδέτη. Οι συγκεκριμένες αυτές νέες πρωτεΐνες σύντηξης είναι σε θέση να αναγνωρίσουν μια μικτή θέση που περιλαμβάνει τη θέση

αναγνώρισης της R.PvuII που πλαισιώνεται από τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου I-SceI. Το πιο ειδικό μετάλλαγμα έχει δείξει μια προτίμηση έως και 1000 φορές περισσότερη για τη μικτή αυτή θέση, συγκριτικά με την μεμονωμένη θέση αναγνώρισης της R.PvuII. Επομένως, η χρήση ενός εξειδικευμένου περιοριστικού ενζύμου, όπως η R.PvuII, ως στοιχείο πέψης, μπορεί να προσφέρει μια εναλλακτική προσέγγιση αντί της καταλυτικής επικράτειας του ενζύμου FokI, το οποίο από μόνο του δεν είναι σε θέση να συνεισφέρει στην ειδικότητα μιας σχεδιασμένης νουκλεάσης [32].

1.6.2.3 Πρωτεϊνική μηχανική του περιοριστικού ενζύμου EcoRV

Η ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV είναι ένα από τα πιο μελετημένα περιοριστικά ένζυμα και έχει ερευνηθεί στον τομέα της πρωτεϊνικής μηχανικής. Έχουν σχεδιαστεί διάφορα μεταλλάγματα της τα οποία είναι ικανά να διακρίνουν μεταξύ θέσεων αναγνώρισης με διαφορετικές γειτονικές αλληλουχίες, μέσω της δημιουργίας νέων επαφών με τις βάσεις της μεγάλης αύλακας του DNA που προηγούνται της θέσης αναγνώρισης της R.EcoRV και την διαδέχονται. Η θέση της Ala181, βάσει της δομής του ενζύμου σε σύμπλοκο με το DNA, εμπλέκεται σε μια επαφή μεσολαβούμενου του νερού με τις βάσεις που γειτνιάζουν με την αλληλουχία αναγνώρισης στο 5' άκρο, επομένως έχει επιλεγεί ως αρχικό σημείο της επιμήκυνσης της ειδικότητας της R.EcoRV. Μεταλλαγές σε αυτή την αλανίνη μπορούν να αλλάξουν τη διεπιφάνεια πρωτεΐνης-DNA και δυνητικά να αυξήσουν την εκλεκτικότητα της R.EcoRV για την αλληλουχία αναγνώρισής της εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής, μέσω της δημιουργίας νέων επαφών. Μερικά μεταλλάγματα της Ala181 με αμινοξέα μακρών και ογκώδων πλευρικών αλυσιδών οδήγησαν σε διαφορετικές προτιμήσεις του ενζύμου για τα γειτονικά ζεύγη βάσεων της αλληλουχίας αναγνώρισης. Για παράδειγμα, το μετάλλαγμα A181K είναι ικανό να διακρίνει μεταξύ βάσεων πουρινών και πυριμιδινών στο 5' άκρο της αλληλουχίας αναγνώρισης, μέσω πιθανώς ενός δεσμού υδρογόνου στο N7 άτομο της πουρίνης. Αντιθέτως, το μετάλλαγμα A181E προτιμάει σε μεγάλο βαθμό μια βάση θυμίνης στο 5' άκρο της αλληλουχίας αναγνώρισης, λόγω ενδεχομένως του σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του πρωτονιομένου γλουταμικού οξέος και του ατόμου O4 της θυμίνης [33].

Μέσω πειραμάτων κατευθυνόμενης εξέλιξης και τυχαίας μεταλλαξιγένεσης έχουν προκύψει μεταλλάγματα της R.EcoRV, που έχουν μία επιμηκυσμένη αλληλουχία αναγνώρισης. Μεταξύ αυτών, ορισμένα αρκετά ενεργά μεταλλάγματα προτιμούν σε μεγάλο βαθμό παρακείμενες θέσεις πέψης AT (π.χ. 183A/Q224R, T93S/I103F/S183A/T222S ή N97T/S183A/T222S) και άλλα προτιμούν παρακείμενες GC (π.χ. K104N/A181T). Δεδομένου ότι η αγρίου τύπου R.EcoRV δεν διακρίνει μεταξύ αυτών των θέσεων πέψης, η δημιουργία τέτοιων μεταλλαγμάτων θα μπορούσε να αποτελέσει μια προοπτική για τον επανασχεδιασμό της R.EcoRV, ώστε να αναγνωρίζει και να πέπτει αλληλουχίες DNA μήκους 8 ή 10 ζευγών βάσεων. Παρόμοια ένζυμα συναντώνται πολύ σπάνια στη φύση και ως εκ τούτου θα ήταν αρκετά χρήσιμα για το χειρισμό μεγάλων θραυσμάτων DNA [34].

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Εκμεταλλεύόμενοι προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRV και PvuII, βάσει των οποίων αυτά τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν μια εκτεταμένη δομική ομοιότητα [24], μας δόθηκε το κίνητρο να μελετήσουμε μια τεχνητή πρωτεΐνη που εν δυνάμει θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο, καινοτομικά σχεδιασμένο περιοριστικό ένζυμο. Πρόκειται για την πρωτεΐνη σύντηξης (fusion) μονής αλυσίδας (single chain) EcoRV-PvuII, η οποία αποτελείται από τις δύο επικράτειες των εν λόγω ενζύμων, με κάποιες αλλαγές σε σχέση με τις αγρίου τύπου EcoRV και PvuII, που παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω (**Εικόνα 10**). Από παλαιότερη μελέτη εξάλλου, είχε προκύψει η σταθερότητα και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης PvuII μονής αλυσίδας που σχεδιάστηκε μέσω κυκλικής μετάθεσης (circular permutation) [30].

Η πρωτεΐνη αυτή σχεδιάστηκε με την προοπτική μιας καινούργιας εξειδίκευσης που ουσιαστικά θα συνδύαζε τις δραστηριότητες των δυο ενζύμων. Συγκεκριμένα, η καινούργια αυτή ειδικότητα θα εστιαζόταν στο εξανουκλεοτίδιο, με φορά 5'-3', CAGATC και συνεπώς στη συμπληρωματική αλληλουχία του με φορά 3'-5', δηλαδή την GTCTAG. Το δυνητικά ενεργό ένζυμο θα έπεπτε την αλληλουχία αυτή στο κεντρικό δινουκλεοτίδιο 5'-3' GA (άρα και στο συμπληρωματικό 3'-5' CT), αξιοποιώντας τις ειδικότητες των επιμέρους ενζύμων (5'-3' CAGCTG για το PvuII [8] και 5'-3' GATATC για το EcoRV [17]). Σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα, στην πρωτεΐνη σύντηξης, η καταλυτική υποεπικράτεια PvuII θα ήταν σε θέση να αναγνωρίσει το τρινουκλεοτίδιο 5'-3' CAG, ενώ η υποεπικράτεια EcoRV το τρινουκλεοτίδιο 5'-3' GAT και μαζί να εκδηλώσουν καταλυτική δράση παράγοντας λεία άκρα DNA, διχοτομώντας το προαναφερθέν εξανουκλεοτίδιο.

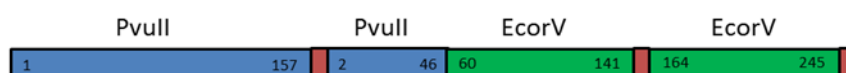
Η πρωτεΐνη σύντηξης EcoRV-PvuII αποτελείται από μια ενιαία πολυπεπτιδική αλυσίδα 374 αμινοξέων (**Εικόνα 10**). Στην πρωτοταγή αυτή αλληλουχία συμπεριλαμβάνεται η ουρά 6 Ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο, η οποία προσδίδει στην πρωτεΐνη την ικανότητα απομόνωσης μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας, καθώς και ταυτοποίησης της κατά την ανοσοαποτύπωση Western blot. Αρχικά, με φορά από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο διακρίνονται τα πρώτα 157 αμινοξέα που συνθέτουν την επικράτεια της R.PvuII, τα οποία συνδέονται μέσω ενός συνδέτη με μια επιπρόσθετη υποεπικράτεια διμερισμού της R.PvuII, προκειμένου να επιτευχθεί ο σχηματισμός του εν δυνάμει καταλυτικού διμερούς της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ο λόγος επιλογής της υποεπικράτειας διμερισμού της R.PvuII έναντι της R.EcoRV έγκειται στην απλότητα και το μέγεθος της πρώτης, (αποτελούμενη μόνο από τις έλικες αA, αB), σε σχέση με τη σαφώς πιο σύνθετη επιφάνεια διμερισμού της δεύτερης (αA, αB, βa, βb). Βοηθητικό ρόλο στη συνολική δομή επιτελεί ο συνδέτης GSGSG που ακολουθεί, μιας και τα μικρού μεγέθους αμινοξέα G και S προσδίδουν την απαιτούμενη ελαστικότητα για μία τέτοια δομή. Ακολουθεί η αλληλουχία της R.EcoRV από το 60ό αμινοξύ της, ούτως ώστε να απουσιάζει η υποεπικράτεια διμερισμού αυτού του ενζύμου και ο διμερισμός της πρωτεΐνης σύντηξης να διεκπεραιώνεται μόνο από τις δύο υποεπικράτειες διμερισμού

της R.PvuII. Γι' αυτό το σκοπό αφαιρέθηκε επίσης το τμήμα 142-163 της R.EcoRV, που περιέχει αμινοξέα με ρόλο στο διμερισμό του ενζύμου και στη θέση του προστέθηκε ένας δεύτερος συνδέτης GSG. Το τμήμα 60-245 περιέχει την υποεπικράτεια αναγνώρισης του DNA, καθώς και τα καταλυτικά αμινοξέα της R.EcoRV. Ο διμερισμός του μορίου της EcoRV-PvuII μέσω υπολογιστικής μελέτης προέκυψε ότι θα είναι σε θέση να δώσει στα αμινοξέα αναγνώρισης του DNA και κατάλυσης των δύο επικρατειών (αναλύθηκαν στις Ενότητες **1.3.2**, **1.3.3**, **1.4.4.2**, **1.4.4.3**) τις κατάλληλες τοπολογίες για να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. Η πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης περατώνεται από τα διαδοχικά αμινοξέα L και E (χρήση των συνεχόμενων κωδικονίων τους για πέψη από το ένζυμο XhoI) και την ουρά 6 ιστιδινών, που παρέχονται από τον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+). Η αναπαράσταση της δομής για την EcoRV-PvuII παρουσιάζεται στην **Εικόνα 11**.

```

1MSHPDLNKLELWPHIQEYQDLALKHGINDIFQDNGGKLLQVLLIGGLTVLPGREGNDAVDNAGQEYELKSI
NIDLTGFGFSTHHHMPNVIIAKYRQVPWIFAIYRGIAIEAIYRLEPKDLEFYDQWERKWYSDGHKINNPKIPVK
YVMEHGTKIY157
GSGSG
2SHPDLNKLELWPHIQEYQDLALKHGINDIFQDNGGKLLQVLLIG46
60GYIVEEPKQONHYPDFLYKPEPNKKIAIELKTTYTNKENEKIKFTLGGYTSFIRNNTKNIVYFPDQYIAHWII
GYVYTRV141
GSG
164KGVKVFLLQDKWVIAGDLAGSGNTTNGISIAHYKDFVEGKGFDFSEDFLDYWRNYERTSQLRNDKYNNI
SEYRNWIYGRK245
LEHHHHHH

```



Εικόνα 10. Επάνω: Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης σύντηξης EcoRV-PvuII, μαζί με την αλληλουχία LEHHHHHH, με κατεύθυνση από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο (αντίστοιχα θέσεις 1-245) Κάτω: Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς αλληλουχίας της ανασυνδυασμένης πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Απώτερος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αρχικά να εκφράσουμε μέσω επαγωγής την πρωτεΐνη σύντηξης EcoRV-PvuII και εν συνεχεία να την απομονώσουμε, ώστε να είναι εφικτός ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της. Απαραίτητη προϋπόθεση γι' αυτό ήταν η συλλογή της σε υδατοδιαλυτή μορφή, κάτι που θα εξυπηρετούσε και σε μετέπειτα δομικές μελέτες. Προς επίτευξη αυτού του στόχου ήταν απαραίτητη η εξέταση διαφόρων συνθηκών, ώστε να επιλεγθούν αυτές που εξασφαλίζουν τη βέλτιστη διαλυτότητα και καθαρότητα της πρωτεΐνης, καθώς και τη βέλτιστη ειδικότητα και δραστικότητα της έναντι νουκλεοτιδικών υποστρωμάτων. Η δημιουργία της λειτουργικά εξειδικευμένης EcoRV-PvuII θα ήταν χρήσιμη για μελλοντική χρήση της πρωτεΐνης σε βιομηχανική κλίμακα, καθώς και στη γενικότερη προσπάθεια ανακάλυψης καινοτομικών ενζύμων με καινούργια εξειδίκευση.

Ταυτόχρονα, ο ενδεχόμενος δομικός χαρακτηρισμός αυτής της πρωτεΐνης εντάσσεται στο κύριο αντικείμενο έρευνας του παρόντος Εργαστηρίου Κρυσταλλογραφίας του κ. Μιχάλη Κοκκινίδη, από το οποίο κατέστη δυνατός ο υπολογιστικός σχεδιασμός της EcoRV-PvuII.

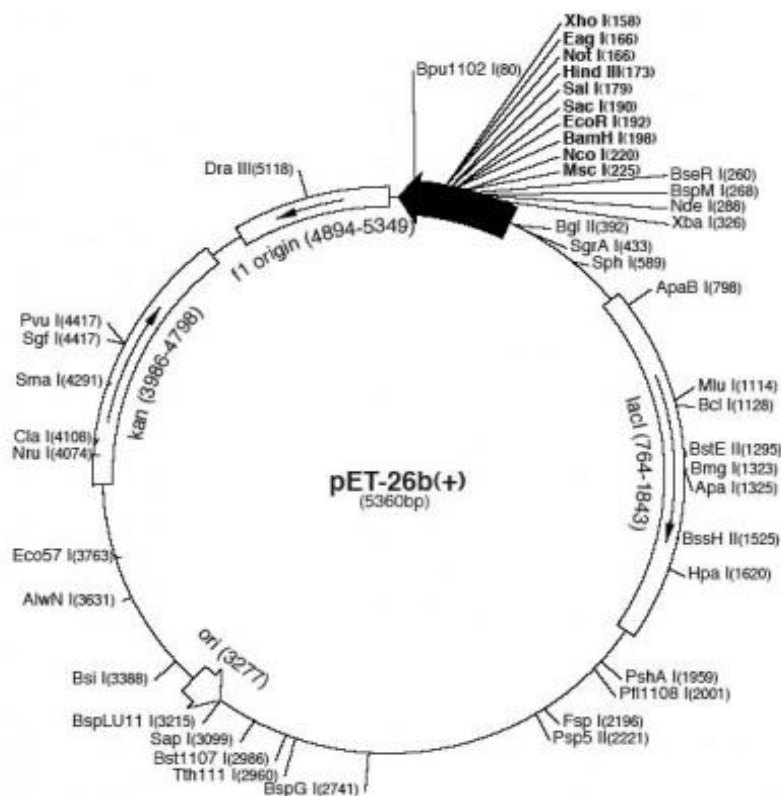


Εικόνα 11. Δομική αναπαράσταση του συμπλόκου της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης EcoRV-PvuII με την αναμενόμενη αλληλουχία αναγνώρισης ολιγονουκλεοτιδικού DNA, μέσω του προγράμματος PyMOL. Στο επάνω μέρος της εικόνας διακρίνεται η επιφάνεια διμερισμού της πρωτεΐνης, από τις δύο α -έλικες με χρώμα μπλε και πράσινο. Στο άκρο της μπλε έλικας εντοπίζεται το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Στη μέση του κάτω μέρους της εικόνας διακρίνεται ένα ολιγονουκλεοτιδικό υπόστρωμα της EcoRV-PvuII που περιέχει την εξανουκλεοτιδική αλληλουχία στόχο. Σ' αυτή την αλληλουχία το τρινουκλεοτίδιο 5'-3' CAG (χρωματίζεται με κίτρινο) με το συμπληρωματικό του 3'-5' GTC αναγνωρίζεται από την υποεπικράτεια αναγνώρισης του DNA της PvuII, ενώ το τρινουκλεοτίδιο 5'-3' GAT (χρωματίζεται με γαλάζιο) με το συμπληρωματικό 3'-5' CTA αναγνωρίζεται από την υποεπικράτεια αναγνώρισης του DNA της EcoRV, που περιέχονται στην EcoRV-PvuII.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μετασχηματισμός κυττάρων *E.Coli* από πλασμιδιακό φορέα

25 ng του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+) (Εικόνα 12) με ενσωματωμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί για την επιθυμητή πρωτεΐνη (προμηθεύτηκε από την εταιρία GenScript) επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο με επιδεκτικά στελέχη *E.Coli* DE3 (BL21). Πραγματοποιήθηκε 1,5 λεπτό θερμικό σοκ στους 42°C και 2 λεπτά επώαση σε πάγο. Προστέθηκαν 400 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB (για 1 lt διαλύματος Luria-Bertani Medium: 10 gr tryptone-peptone, 10 gr NaCl, 5 gr yeast extract και ακολούθησε επώαση για μία ώρα στους 37°C, υπό ανάδευση. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιείχε καναμυκίνη (25μg/mL), ώστε να γίνει η επιλογή τους και επώαστηκαν ολονυκτάς στους 37°C.



Εικόνα 12. Θέσεις περιορισμού από τις αντίστοιχες ενδονουκλεάσες περιορισμού στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+) (Novagen).

2.2 Αποθήκευση βακτηριακών δειγμάτων σε διάλυμα γλυκερόλης προς μακρά συντήρηση

Αφότου δημιουργηθεί ο επιθυμητός μετασχηματισμένος γενότυπος ενός βακτηριακού στελέχους εμφανίζεται η ανάγκη για αποθήκευσή του ωστέ να μπορεί να χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα σε πολλαπλές καλλιέργειες. Ειδικότερα, μετά την ολονύκτια επώαση των κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο επιλογής συλλέχθηκαν μοναδιαίες αποικίες από αυτό, εμβολιάστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/Καναμυκίνης (25μg/mL) και επώαστηκαν ολονυκτώσ στους 37⁰C, υπό ανάδευση. Η αποθήκευση των κυττάρων που παράγουν την πρωτεΐνη EcoRV-PvuII πραγματοποιήθηκε στους -80⁰C σε διάλυμα 40% αποστειρωμένης γλυκερόλης έπειτα από την ολονύκτια επώαση. Η προσθήκη γλυκερόλης διασφαλίζει την αποφυγή διαταραχών στη μεμβράνη των κυττάρων και τη μείωση πιθανότητας θανάτωσης τους, επιτρέποντας τη μακροπρόθεσμη συντήρησή τους.

2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Midipreps)

Αποικία από τα μετασχηματισμένα κύτταρα ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/καναμυκίνης και ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 37⁰C, υπό ανάδευση. Έπειτα η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στις 3300 rpm και χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο « Low-copy plasmid purification (Midi)» για την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα pET-26b(+) από το kit «Plasmid DNA Purification» της εταιρίας Macherey-Nagel. Ο φορέας αποθηκεύτηκε σε διάλυμα αποστειρωμένου νερού στους -20⁰C, προς μελλοντική χρήση.

2.4 Πέψη πλασμιδιακού φορέα

Εκατέρωθεν της αλληλουχίας του γονιδίου προς έκφραση (**Εικόνα 13**) που είναι ενσωματωμένη στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+), υπάρχουν θέσεις περιορισμού για τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI, στις θέσεις 288 και 158, αντίστοιχα (**Εικόνα 12**). Το γονίδιο είχε κλωνοποιηθεί μεταξύ των θέσεων 158-225 (πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης του φορέα). Η κατασκευή του pET26b(+) με το γονίδιο της EcoRV-PvuII ανέρχεται στο μοριακό βάρος περίπου των 6,2 kb.

Σε μείγμα πέψης συνολικού όγκου 20 μL προστέθηκαν τα αντίστοιχα ένζυμα σε τελική συγκέντρωση 1u/μL έκαστο, DNA πλασμιδιακός φορέας (1μg), ρυθμιστικό διάλυμα K (1X) (προμηθευμένο από την εταιρία Minotech) και διπλά απιονισμένο νερό, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η επιτυχής ενσωμάτωση του γονιδίου EcoRV-PvuII στον πλασμιδιακό φορέα. Το δείγμα επώαστηκε για 15 λεπτά στους 37⁰C.

ATG
 TCGCACCCGGACCTGAATAAAGTCTGGAACTGTGGCCGCACATCCAAGAATACCAAGACCTGGCACTGAAACAT
 GGCATCAACGACATCTTCAGGATAACGGCGTAAACTGCTGCAAGTGTGCTGATGGCGGTCTGACCGTTCTG
 CCGGGCCGTGAGGGTAAACGATGCAAGTGGACAATGCTGGCCAGGAATATGAACTGAAATCGATTAACATCGATCTG
 ACCAAAGGTTTTAGCACGCATCACCACATGAATCCGGTCAATATCGCAAAATACCGTCAGGTGCGGTGATCTTC
 GCTATTTATCGTGGCATTGCGATCGAAGCCATTTACCGCCTGGAACCGAAAGATCTGGAATTTTATACGACAAA
 TGGGAACGCAAATGGTATAGCGATGCCACAAGACATCAACAATCCGAAATTCGGTCAAATATGTATGGAA
 CACGGTACCAAATCTACGGCAGCGTTCTGGCAGTCAATCCGGATCGAACAAGTTACTGGAACCTGTGGCCGCAT
 ATTCAGGAATATCAGGATCTGGCACTGAAACATGGTATCAACGATATTTCCAGGACAATGGCGTAAACTGCTG
 CAGGTTCTGCTGATCGGCGGTACATTGTGGAAGAACCAGCAAAACCACTATCCGGATTTTACCCGTGAC
 AAACCGTCCGAAACCGAATAAGAAAATGCGATCGACATCAAAACCACTACGAAACAAAAGAAAACGAAAAATC
 AAATTTACCCCTGGGCGGTACACGAGCTTCATCCGTAACAACCAAAAAACATCGTTTACCCGTTGATCAGTAC
 ATTGCCCATTTGATTATCGGCTATGTTTACACGCGCGTCCGGTCTGGCAAAGGTGTGAAAGTTTTTCTGCAAGAT
 AAATGGGTGATTGCCGTTGACCTGGCGGGTTCGGTAAACCAACCAATATCCGGTCAATTCACGCGCATACAAA
 GATTTCTGTTGAAGGCAAAGGTATCTTCGATTTGAAAGCAATTCCTGATATTTGGCGTAATACGAAACGCC
 AGTCAGCTGCGTAATGACAAATACAAACATCTCAGAATACCGCAACTGGATCTATCGTGGTCCGCAA

Εικόνα 13. Γονιδιακή αλληλουχία του γονιδίου της EcoRV-PvuII με κατεύθυνση 5'-3' κατά μήκος του DNA. Η αλληλουχία αποτελείται από 1122 ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί για 374 αμινοξέα.

2.5 Επάγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (EcoRV-PvuII) σε μικρή και μεγάλη κλίμακα

Αποθηκευμένα μετασηματισμένα κύτταρα E.Coli DE3 (BL21) από τους -80°C εμβολιάστηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο των 50 mL LB/Καναμυκίνης (25μg/μL) και εν συνεχεία επώαστηκαν ολονυκτώσ στους 37°C υπό ανάδευση. Ακολούθησε αραίωση 1/20 της αρχικής καλλιέργειας σε 250mL υγρού θρεπτικού μέσου LB/Καναμυκίνης (25μg/μL) και επώαση υπό ανάδευση στους 37°C, μέχρις ότου η Οπτική Πυκνότητα που μετρήθηκε από το φασματοφωτόμετρο να κυμανθεί μεταξύ 0,6-0,8. Προστέθηκε 1mM IPTG (IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside) ώστε να επαχθεί η έκφραση σε καλλιέργειες όγκου 50 mL στις εξής συνθήκες :

- 28°C, 4 ώρες επώαση υπό ανάδευση
- 37°C, 4 ώρες επώαση υπό ανάδευση
- 16°C, Ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση
- 28°C, Ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση
- 37°C, Ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση

Πριν καθώς και μετά την προσθήκη IPTG συλλέχθηκε δείγμα πελέτας που προέκυψε από φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 2 λεπτά ενός mL υγρής καλλιέργειας, προκειμένου να αναλυθεί κατά την ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε σε επίπεδο μικρής κλίμακας για τον έλεγχο της βέλτιστης έκφρασης βάσει χρόνου και θερμοκρασίας. Σε μετέπειτα στάδιο ακολούθησε με τον ίδιο τρόπο επαγωγή έκφρασης σε μεγάλη κλίμακα για ακόλουθο καθαρισμό σε αποδιατακτικές συνθήκες με καλλιέργεια 2 lt που επώαστηκε για 4 ώρες υπό ανάδευση στους 37°C. Η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε από το μηχάνημα Megafuge 40R (της εταιρείας Thermo Scientific) για 30 λεπτά στους 6°C στις 4.300 rpm για να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο, ξεπλύθηκε σε 20 mL Buffer: 20mM Tris pH=8, 100mM NaCl και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου σε μηχάνημα JOUAN

για 20 λεπτά στις 6.000 rpm σε θερμοκρασία 20°C, ώστε να συλλεχθούν τα κύτταρα σε μορφή ιζήματος και να αποθηκευτούν στους -20°C προς άμεση χρήση. Η εν λόγω διαδικασία επαναλήφθηκε κάθε φορά που επιδιώχθηκε παραγωγή και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε αποδιατακτικές και μη συνθήκες, ενώ οι κυτταρικές πελέτες των 2lt που προέκυπταν αποθηκεύονταν στους -80°C προς μελλοντική χρήση. Για τον καθαρισμό σε μη αποδιατακτικές συνθήκες εφαρμόστηκε παρόμοιο πρωτόκολλο έκφρασης, με τη διαφορά ότι η υγρή καλλιέργεια των 2 lt επωάστηκε παρουσία 1 mM IPTG για 4 ώρες στους 28°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στο μηχάνημα JOUAN στους 5°C για 30 λεπτά στις 4.300 rpm και ξανά φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 20 λεπτά στους 20°C και αποθήκευση των κυττάρων στους -20°C.

2.6 Διάρρηξη κυττάρων με τη χρήση υπερήχων

2.6.1 Διάρρηξη κυττάρων υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Με τη χρήση υπερήχων επιτυγχάνεται η διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών συστατικών. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη δημιουργία ηχητικών ωστικών κυμάτων συχνότητας περίπου 20 kHz, τα οποία απελευθερώνονται στο κυτταρικό εναιώρημα από την άκρη μιας μεταλλικής ράβδου. Η διάρρηξη αυτή όμως συνοδεύεται και από την απελευθέρωση διαφόρων υδρολυτικών ενζύμων, όπως πρωτεασών, κι έτσι είναι απαραίτητη η προσθήκη ειδικών αναστολέων στο διάλυμα ομογενοποίησης. Η διαδικασία θα πρέπει ανά τακτά χρονικά διαστήματα να διακόπτεται γιατί κατά την εφαρμογή των υπερήχων αυξάνεται η θερμοκρασία του συστήματος και υπάρχει κίνδυνος μετουσίωσης των πρωτεϊνικών μορίων. Τα κυτταρικά ιζήματα των 2lt, που προέκυψαν από την φυγοκέντρηση που περιγράφηκε στην παραπάνω ενότητα, επαναδιαλύθηκαν και επωάστηκαν ολονυκτώσ σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση σε 50 mL διαλύματος λύσης των κυττάρων (Lysis buffer), με συστατικά 50 mM Tris pH=8, 50 mM NaCl, 8M Urea, 5% Glycerol, 5 mM Imidazole. Οποιοδήποτε διάλυμα των παρόντων πειραμάτων περιείχε Urea επωάστηκε για μερικά λεπτά σε αναδευτήρα στους 70°C, δεδομένης της δυσδιαλυτότητάς της σε υδατικά διαλύματα. Πριν τη διάρρηξη προστέθηκε ο αναστολέας των πρωτεασών PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν υπέρηχοι με συνολική διάρκεια 3 λεπτά με ενδιάμεσα διαλείμματα ενός λεπτού ανά μισό λεπτό υπερήχων και ακολούθησε φυγοκέντρηση στο μηχάνημα JOUAN στις 12500 rpm για 45 λεπτά στους 25°C (λόγω της δημιουργίας των κρυστάλλων ουρίας σε χαμηλές θερμοκρασίες), έτσι ώστε να κατακρημνιστεί οτιδήποτε μη διαλυτό στη μορφή πελέτας. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση χρωματογραφίας συγγενείας που θα περιγραφεί παρακάτω.

2.6.2 Διάρρηξη κυττάρων υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

Για τη διάσπαση κυττάρων που αντιστοιχούσαν σε 500 mL υγρής καλλιέργειας σε μη αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυσή τους υπό ανάδευση για περίπου 15 λεπτά σε 60 mL Lysis buffer: 150mM NaCl, 20mM Tris pH8, 5% Glycerol, 0,5% Triton X-100. Ακολούθησε διάρρηξη μέσω υπερήχων παρουσία 1mM PMSF με συνολική διάρκεια 2 λεπτών και ενδιάμεσα διαλείμματα 1' ανά μισό λεπτό υπερήχων και έπειτα φυγοκέντρηση στο μηχάνημα JOUAN στις 12.500 rpm για 50 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης διατηρήθηκε στους 4°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί στη χρωματογραφία συγγένειας.

2.7 Απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (EcoRV-PvuII) μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας

2.7.1 Χρωματογραφία Συγγένειας υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Για τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε κολώνα Ni-NTA αραρόζης της Qiagen. Στην κολώνα αυτή τα ιόντα Ni^{2+} σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με τη χηλιποιητική ένωση NTA (Nitritotriacetic acid), η οποία με τη σειρά της είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε σφαιρίδια αραρόζης και το όλο σύμπλοκο συνιστά το χρωματογραφικό υλικό. Το στρώμα Ni-NTA εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον ιμιδαζολικό δακτύλιο, ο οποίος αποτελεί τμήμα της δομής των ιστιδινών. Η ουρά των έξι ιστιδινών, που έχουν προστεθεί στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και παρέχονται από τον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+), προδένεται στα ακινητοποιημένα ιόντα Ni^{2+} τα οποία και αλληλεπιδρούν με τους δακτυλίους του ιμιδαζολίου, μέσω της χρήσης τους ως δότες ηλεκτρονίων σε μεταλλοκατιόντα, όπως τα Ni^{2+} . Σε χαμηλές συγκεντρώσεις διαλύματος ιμιδαζολίου αποφεύγεται η πρόσδεση στην κολώνα πρωτεϊνών με χαμηλή συγγένεια. Στα διαλύματα έκλουσης η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου αυξάνεται προκειμένου η πρωτεΐνη να αποχωριστεί από την κολώνα και να εκλουστεί, καθώς το ιμιδαζόλιο δεν μπορούν να το συναγωνιστούν οι ιστιδίνες ως προς την πρόσδεση. Γενικότερα, η μέθοδος βασίζεται στη ροή των υδατικών δειγμάτων δια μέσου της κολώνας που επιτυγχάνεται μέσω της βαρύτητας και οδηγεί στη συλλογή των εν λόγω δειγμάτων που εξέρχονται της κολώνας συγγένειας.

Αρχικά έγινε εξισορρόπηση των 10 mL χρωματογραφικού υλικού με 200 mL lysis buffer (50 mM Tris pH=8, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 8M Urea). Στη συνέχεια, από την κολώνα πέρασε το πρωτεϊνικό υδατικό δείγμα των 50 mL (Load) που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρηση που διαδέχθηκε τη χρήση υπερήχων υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Αφότου συλλέχθηκε το διάλυμα που διαπερνά το υλικό (flow through), το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά του Load που δεν προσδένονται στα ιόντα Ni^{2+} , φορτώθηκαν διαδοχικά τα διαλύματα πλύσης Wash 1- Wash 7 και τελικά τα διαλύματα έκλουσης Elution1- Elution 10. Η σύσταση των συγκεκριμένων διαλυμάτων περιγράφεται στον **Πίνακα 1**.

Η παραπάνω διαδικασία του καθαρισμού έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη συλλογή του Wash 6, διότι όλα τα προηγούμενα διαλύματα περιέχουν ουρία, η οποία δημιουργεί μια δομή κρυστάλλων σε χαμηλές θερμοκρασίες, γεγονός που αλλοιώνει τη σύσταση των δειγμάτων. Τα επόμενα διαλύματα (Wash7-Elution10), επομένως, συλλέχθηκαν σε ψυχώμενο περιβάλλον, προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανότητα αποδιάταξης της πρωτεΐνης.

Διάλυμα	Tris pH8	NaCl	Imidazole	Urea	Όγκος	Αριθμός κλασμάτων
Wash 1	50 mM	300 mM	10 mM	8M	100 mL	1x100 mL
Wash 2	50 mM	300 mM	30 mM	6M	100 mL	1x100 mL
Wash 3	50 mM	300 mM	30 mM	4M	100 mL	1x100 mL
Wash 4	50 mM	300 mM	30 mM	2M	100 mL	1x100 mL
Wash 5	50 mM	300 mM	30 mM	1M	100 mL	1x100 mL
Wash 6	50 mM	300 mM	30 mM	0,5M	100 mL	1x100 mL
Wash 7	50 mM	300 mM	30 mM	-	100 mL	1x100 mL
Elutions 1-2	50 mM	300 mM	100 mM	-	20 mL	2x10 mL
Elutions 3-8	50 mM	300 mM	300 mM	-	60 mL	6x10mL
Elutions 9-10	50 mM	300 mM	500 mM	-	20 mL	2x10 mL

Πίνακας 1. Αναλυτική περιγραφή της σύστασης των διαλυμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την έκλυση της EcoRV-PvuII από την κολώνα Ni-NTA αгарόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες

2.7.2 Χρωματογραφία Συγγένειας υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

Η προσπάθεια απομόνωσης της EcoRV-PvuII υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε στο σύνολό της σε ψυχώμενο χώρο σε σύγκριση με τον καθαρισμό υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η εξισορρόπηση της μικρής κολώνας (συνολικού όγκου 10 mL) Ni-NTA αгарόζης (1 mL χρωματογραφικού υλικού) έλαβε χώρα με 10 mL Lysis buffer: 150mM NaCl, 20mM Tris pH8, 5% Glycerol, 0,5% Triton. Στη συνέχεια, από την κολώνα πέρασε το πρωτεϊνικό υδατικό δείγμα των 60 mL (Load) που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρηση που διαδέχθηκε τη χρήση υπερήχων σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Αφότου συλλέχθηκε το διάλυμα που διαπερνά το υλικό (flow through), φορτώθηκαν διαδοχικά τα διαλύματα πλύσης Wash 1- Wash 3 και τελικά τα διαλύματα έκλυσης Elution1- Elution 6. Η σύσταση των συγκεκριμένων διαλυμάτων περιγράφεται στον **Πίνακα 2**.

Διάλυμα	Tris pH8	NaCl	Imidazole	Όγκος	Αριθμός κλασμάτων
Wash 1	20 mM	150 mM	10 mM	10 mL	1x10 mL
Wash 2	20 mM	150 mM	20 mM	10 mL	1x10 mL
Wash 3	20 mM	150 mM	30 mM	10 mL	1x10 mL
Elution 1	20 mM	150 mM	300 mM	1 mL	1x1 mL
Elution 2	20 mM	150 mM	300 mM	1 mL	1x1 mL
Elution 3	20 mM	150 mM	300 mM	1 mL	1x1 mL
Elution 4	20 mM	150 mM	300 mM	1 mL	1x1 mL
Elution 5	20 mM	150 mM	300 mM	1 mL	1x1 mL
Elution 6	20 mM	150 mM	300 mM	15 mL	15x1 mL

Πίνακας 2. Αναλυτική περιγραφή της σύστασης των διαλυμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την έκλουση της EcoRV-PvuII από την κολώνα Ni-NTA αραρόζης, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

2.8 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Τα πρωτεϊνικά δείγματα που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών και τον καθορισμό της υπερέκφρασής τους και βασίζεται στο ηλεκτρικό φορτίο που διαθέτουν τα μόρια. Το SDS έχει την ιδιότητα να αποδιατάσσει τα πρωτεϊνικά μόρια και να τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, δίνοντάς τους έτσι τη δυνατότητα να μετακινηθούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο, βάσει του μοριακού τους βάρους.

Τα δείγματα λοιπόν που συλλέχθηκαν μετά την έκφραση της EcoRV-PvuII, καθώς και αυτά από την κολώνα συγγένειας αναλύθηκαν σε πήκτωμα με συγκέντρωση ακρυλαμίδης 12,5% w/v, προκειμένου να εξετασθεί σε ποιες συνθήκες υπήρξε υπερέκφραση και σε ποια δείγματα έχει εκλουστεί το προς απομόνωση πρωτεϊνικό δείγμα, αντίστοιχα. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο LMW μάρτυρας της εταιρείας GE Healthcare Life Sciences Pharmacia, ενώ το πήκτωμα βάφτηκε για 20 λεπτά με τη μπλε χρωστική Coomassie Blue R-250 σε διάλυμα χρώσης (50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) και στη συνέχεια ξεβάφτηκε με διάλυμα αποχρωματισμού (10% Acetic Acid, 5% Methanol), το οποίο απομακρύνει τη μπλε

χρωστική από τις μη πρωτεϊνικές ζώνες. Μετά τη διαδικασία αυτή τα πρωτεϊνικά δείγματα εμφανίζονται ως μπλε μπάντες σε διάφανο φόντο.

2.9 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Το ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος μεταφοράς των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης, και ανίχνευσής τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του αποτυπώματος είναι ότι οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα όταν βρίσκονται στην επιφάνεια του φίλτρου και όχι στο πήκτωμα. Οι μεμβράνες PVDF που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western συγκρατούν αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες «σκληρές» συνθήκες, π.χ. παρουσία οργανικών διαλυτών ή σε ιδιαίτερα υψηλά/χαμηλά pH, ενώ η μεγαλύτερη μηχανική ανθεκτικότητά τους, τις καθιστά πλεονεκτικότερες σε σχέση με μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή μεμβράνες νάιλον. Η λογική της ευαίσθητης αυτής τεχνικής έγκειται στο γεγονός της ειδικής σύνδεσης που επιτελούν τα αντισώματα. Το πρωτογενές αντίσωμα στοχεύει στην πρωτεΐνη-στόχο (π.χ. στις ουρές ιστιδινών). Αφού ξεπλυθεί καλά η μεμβράνη ώστε να απομακρυνθεί το μη-προσδεμένο αντίσωμα και να διασπαστούν οι ασθενείς μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντίσωματος, η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές, και συγκεκριμένα την Fc σταθερή περιοχή του, η οποία είναι χαρακτηριστική και ειδική του ζώου στο οποίο παρασκευάστηκε το αντίσωμα. Συνήθως το δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με ένα ένζυμο (horseradish peroxidase, HRP ή alkaline phosphatase, AP), έτσι ώστε κατά την εξειδικευμένη ταυτοποίηση της πρωτεΐνης να παραχθεί ένα οπτικά παρατηρήσιμο σήμα ανίχνευσης.

Για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης σύντηξης EcoRV-PvuII, η οποία φέρει την ουρά 6 καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό της άκρο, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ανοσοεντοπισμού με αντισώματα Anti-His από συγκεκριμένο kit (QIA express Detection and Assay handbook) της εταιρίας QIAGEN. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε από πήκτωμα SDS-PAGE 12,5% στην κατάλληλη μεμβράνη PVDF, με διάρκεια 1 ώρα στα 300 mA, σε ψυχώμενο περιβάλλον. Τα πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης ηλεκτροφορήθηκαν παρουσία του μάρτυρα «PageRuler Prestained Protein Ladder» της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, που περιείχε κατά φθίνουσα σειρά τα μοριακά βάρη (σε kDa): 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10.

2.10 Συγκέντρωση πρωτεϊνών

Τα στάδια καθαρισμού ελέγχθηκαν με SDS PAGE ηλεκτροφόρηση και τα καθαρότερα κλάσματα ενώθηκαν προκειμένου να πραγματοποιηθεί διαπίδυση με ολονύκτια επώαση σε ψυχώμενο περιβάλλον. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα της περίπτωσης κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα τελικού όγκου 2lt, εντός των οποίων τοποθετήθηκαν μεμβράνες υπερδιηθήσεως που περιείχαν τα επιθυμητά

κλάσματα έκλυσης πρωτεϊνών. Απώτερος στόχος ήταν να αλλάξει η σύσταση του περιβάλλοντος της EcoRV-PvuII και να απομακρυνθεί το μιδαζόλιο προς αξιοποίηση της πρωτεΐνης σε επόμενο στάδιο. Μετά την ολονύκτια διαπίδυση τα πρωτεϊνικά μείγματα συγκεντρώθηκαν σε ειδικό falcon με μεμβράνη πόρων (Amicon ultra 15, 10.000 cut off) με συνεχείς φυγοκentrήσεις στις 3.100 rpm (από το μηχάνημα της Kubota) και σε θερμοκρασία 4⁰C, μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος. Μετά από κάθε φυγοκέντρωση το υδατικό διάλυμα της πρωτεΐνης που διαπερνούσε τους πόρους του Amicon ultra 15 (flowthrough) αποθηκευόταν ξεχωριστά.

2.11 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης έγινε με μέτρηση οπτικής απορρόφησης με την τεχνολογία του «nanodrop», μέθοδος η οποία στηρίζεται στην απορρόφηση του υπεριώδους φωτός. Οι πρωτεΐνες απορροφούν φως σε δύο περιοχές του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας, κυρίως στα 280 και 200nm. Η απορρόφηση οφείλεται στην πρόσληψη ενός φωτονίου από ένα ηλεκτρόνιο και τα ηλεκτρόνια που διεγείρονται στα 280 nm εντοπίζονται στους αρωματικούς δακτυλίους διαφόρων αμινοξέων. Τα αμινοξέα που φέρουν αρωματικό δακτύλιο είναι η φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη, η ιστιδίνη και η τυροσίνη.

Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης είναι το NanoDrop ND-1000 της εταιρείας Thermo Scientific, το οποίο μετράει απορρόφηση δειγμάτων DNA, RNA, πρωτεϊνών και χρωστικών και καλύπτει φάσμα από τα 220-750 nm. Για να είναι ο υπολογισμός πιο ακριβής χρησιμοποιήθηκαν το μοριακό βάρος (44,47 kDa) και το molar extinction coefficient (88,24) της EcoRV-PvuII, όπως αυτά υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα ExPASy με βάση την πεπτιδική της αλληλουχία. Η συγκεκριμένη τεχνολογία εμφανίζει το πλεονέκτημα της μέτρησης μικρού όγκου δειγμάτων, όπου σταγόνα 2 μl του δείγματος συγκρατείται μέσω επιφανειακής τάσης και συμπιέζεται ελαφρώς από το βραχίονα και τη βάση του μηχανήματος. Αυτό γίνεται έτσι ώστε να δημιουργηθεί η επιθυμητή απόσταση του 1mm για τη μέτρηση, με βάση την οποία γίνεται και η αντίστοιχη ποσοτικοποίηση του δείγματος. Με την παραπάνω τεχνική δεν είναι αναγκαία η χρήση κυψελίδων για την τοποθέτηση των δειγμάτων.

2.12 Δοκιμές πέψης της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII με υπόστρωμα DNA

Στα πλαίσια της μελέτης δραστηριότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης EcoRV-PvuII πραγματοποιήθηκαν πειράματα πέψης με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA. Η εν δυνάμει καταλυτική πρωτεΐνη, μετά την έκθεσή της σε συγκεκριμένα ρυθμιστικά διαλύματα μέσω διαπίδυσης και την ακόλουθη συγκέντρωσή της, προστέθηκε σε υδατικά διαλύματα τελικού όγκου αντίδρασης 20 μL. Για να ελεγχθεί η δραστηριότητα

της πρωτεΐνης εξετάστηκαν διάφορες συνθήκες κρίσιμες για την αντίδραση της πέψης, μεταξύ των οποίων:

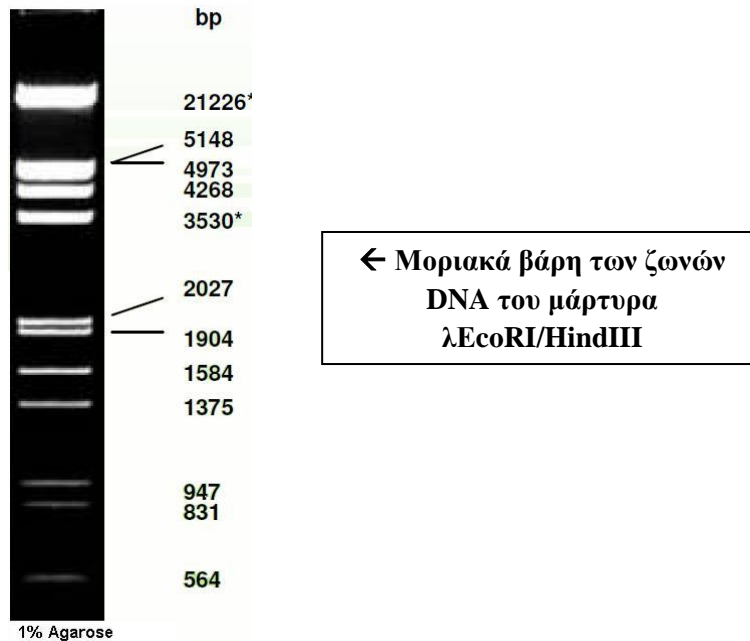
- Διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης
- Διαφορετικές χρονικές διάρκειες επώασης
- Διαφορετικές συστάσεις πρωτεϊνικού διαλύματος (pH, αλατότητα, παρουσία απορρυπαντικού ή γλυκερόλης)
- Διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνικού διαλύματος
- Διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος πλασμιδιακού DNA
- Διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα πέψης (προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες NEB και Minotech)
- Διαφορετικές συγκεντρώσεις του συμπάροντα Mg^{2+}
- Παρουσία και απουσία απορρυπαντικού (Triton) και γλυκερόλης

Για τον έλεγχο της πέψης έγιναν πειράματα θετικού ελέγχου (Positive controls) χρησιμοποιώντας εμπορικά ένζυμα της εταιρίας NEB (πλην των HpaI και XbaI της Minotech) και ως υπόστρωμα το ίδιο πλασμιδιακό DNA με αυτό των αντιδράσεων με την EcoRV-PvuII, ενώ για να πιστοποιηθεί η κατάλυση ή όχι της πέψης του υποστρώματος από την πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκαν πειράματα αρνητικού ελέγχου (Negative controls), απουσία αυτής από το μίγμα των αντιδράσεων. Επίσης, προκειμένου να αποφευχθεί η προσκόλληση των πρωτεϊνών στα φυαλίδια της αντίδρασης (ependorfs) ή στα πλαστικά tips, και να σταθεροποιηθούν τα εμπορικά περιοριστικά ένζυμα και η δυνητικά καταλυτική EcoRV-PvuII, προστέθηκε η πρωτεΐνη BSA (Bovine serum albumin). Η BSA είναι επίσης ικανή να αυξάνει το σήμα στις δοκιμές πέψης, ενώ παράλληλα έχει φθινό κόστος και δεν επηρεάζει τις περρισσότερες βιοχημικές αντιδράσεις. Οι συνθήκες και τα συστατικά των δοκιμών παρουσιάζονται αναλυτικά στην ενότητα **Αποτελέσματα**, προς αποφυγή πλεονασμού.

2.13 Ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε γέλη αгарόζης

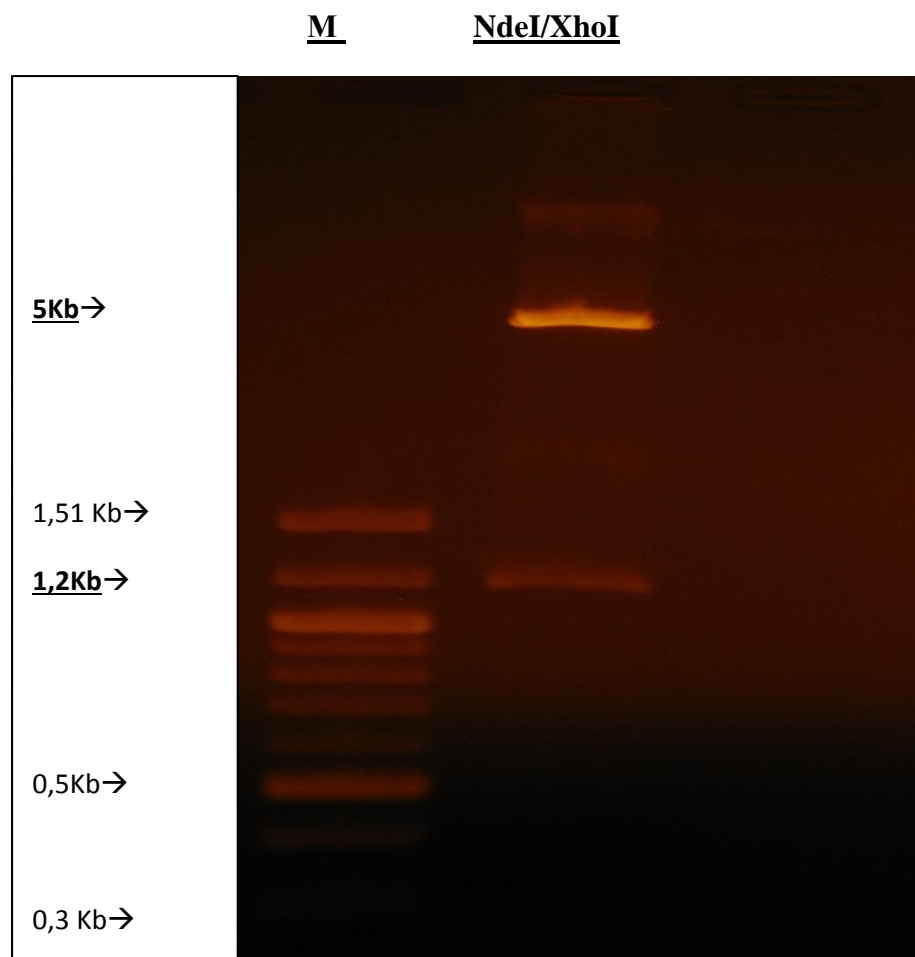
Η ταυτοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την EcoRV-PvuII, καθώς και τα αποτελέσματα των δοκιμών της πέψης από την EcoRV-PvuII αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά από πήκτωμα αгарόζης. Στη συγκεκριμένη τεχνική τα βιομόρια, όπως π.χ. τα θραύσματα DNA απομονώνονται βάσει του μεγέθους τους μέσω της εφαρμογής ενός ηλεκτρικού πεδίου που επάγουν τη μετανάστευση των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA (λόγω των φωσφορικών ομάδων του) προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Το δυναμικό ρυθμίζεται στην κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης, συνήθως στα 100-200 Volts και ανάλογα με το μέγεθος των βιομορίων προς ανάλυση. Η γέλη αгарόζης είναι μια τρισδιάστατη μήτρα που σχηματίζεται από ελικοειδή μόρια αгарόζης οργανωμένα σε υπερελικοειδείς δέσμες, δημιουργώντας μια δομή με κανάλια και πόρους από τους οποίους διέρχονται τα βιομόρια κατά την ηλεκτροφόρηση. Το μέγεθος των πόρων στα πήκτωμα 1% w/v αгарόζης που

χρησιμοποιήθηκαν κυρίως, κυμαίνεται μεταξύ 100- 500 nm. Τα πηκτώματα περιείχαν 1 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο μπορεί να προσδεθεί στο DNA, προκειμένου να παραχθεί φθορίζον σήμα πορτοκαλί χρώματος κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και να παρατηρηθούν οι ζώνες DNA διαφορετικού μεγέθους. Σε όλα τα πειράματα πέψης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ζωνών DNA γνωστού μοριακού βάρους ο λEcoRI/HindIII (βλέπε στην εικόνα παρακάτω), ενώ για την ταυτοποίηση του γονιδίου για την EcoRV-PvuII ο 100bp ladder N3231 της εταιρείας NEB.



3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

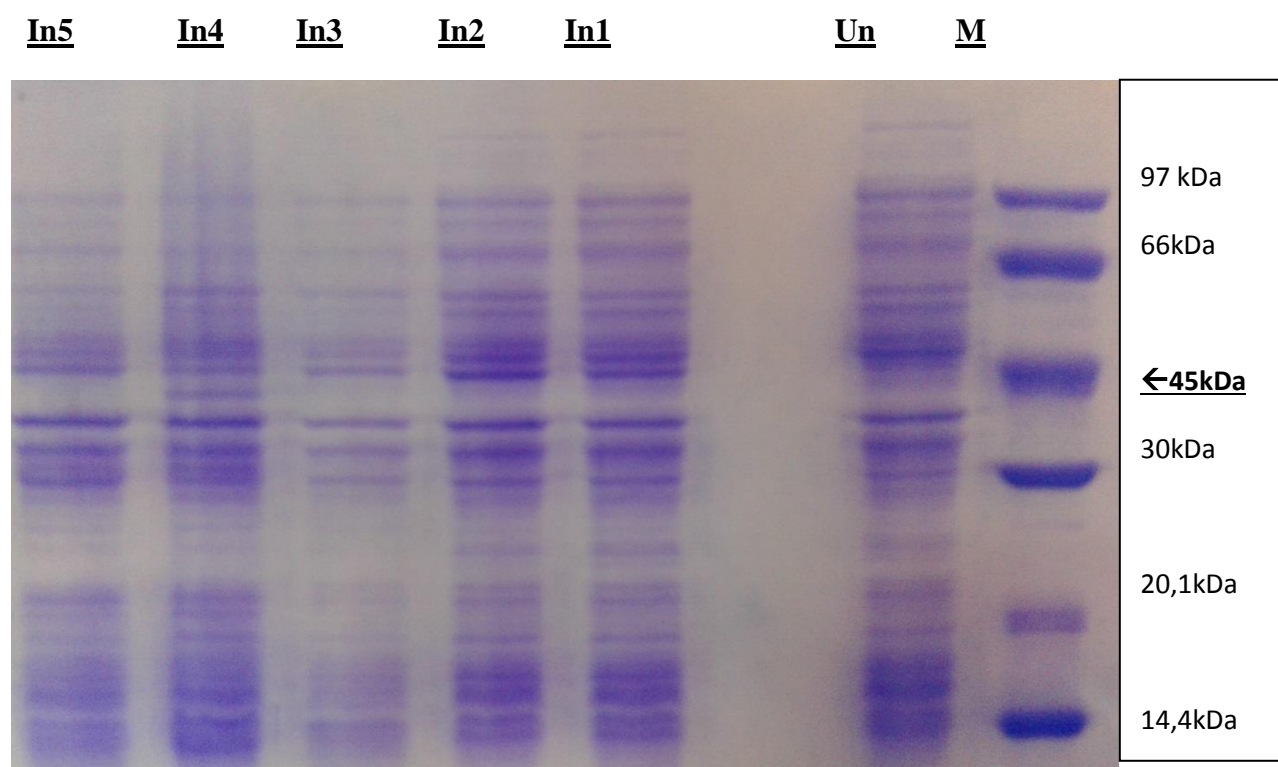
3.1 Ταυτοποίηση του γονιδίου για την EcoRV-PvuII



Εικόνα 14. Gel αγαρόζης (0,8%). M: 100bp μάρτυρας, NdeI/XhoI: Δείγμα που προέκυψε μετά από πέψη 1μg του pET 26b(+) από τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI σε τελική συγκέντρωση 1u/μL κατά την επώαση 15 λεπτών στους 37⁰C. Στο δείγμα τελικού όγκου 20 μL περιεχόταν 1X ρυθμιστικό διάλυμα K και διπλά απιονισμένο νερό .

Το πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής ήταν η ταυτοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την EcoRV-PvuII. Το γονίδιο είχε συντεθεί και κλωνοποιηθεί από την εταιρεία GenScript στον πλασμιδιακό φορέα pET26b(+) μεταξύ των θέσεων περιορισμού για τα ένζυμα NdeI και XhoI με τελικό μέγεθος στις 6,2 kb. **Στην Εικόνα 14** φαίνεται η ταυτοποίηση του συγκεκριμένου γονιδίου που είναι της τάξης των 1,2 kb, έτσι όπως προέκυψε κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (0,8%). Τα περιοριστικά ένζυμα πραγματοποίησαν δίκλωνες τομές εκατέρωθεν του γονιδίου στον pET26b(+), ο οποίος χωρίς την ενσωμάτωσή του επιθυμητού γονιδίου ανέρχεται στις 5 kb.

3.2 Έκφραση μέσω επαγωγής της EcoRV-PvuII

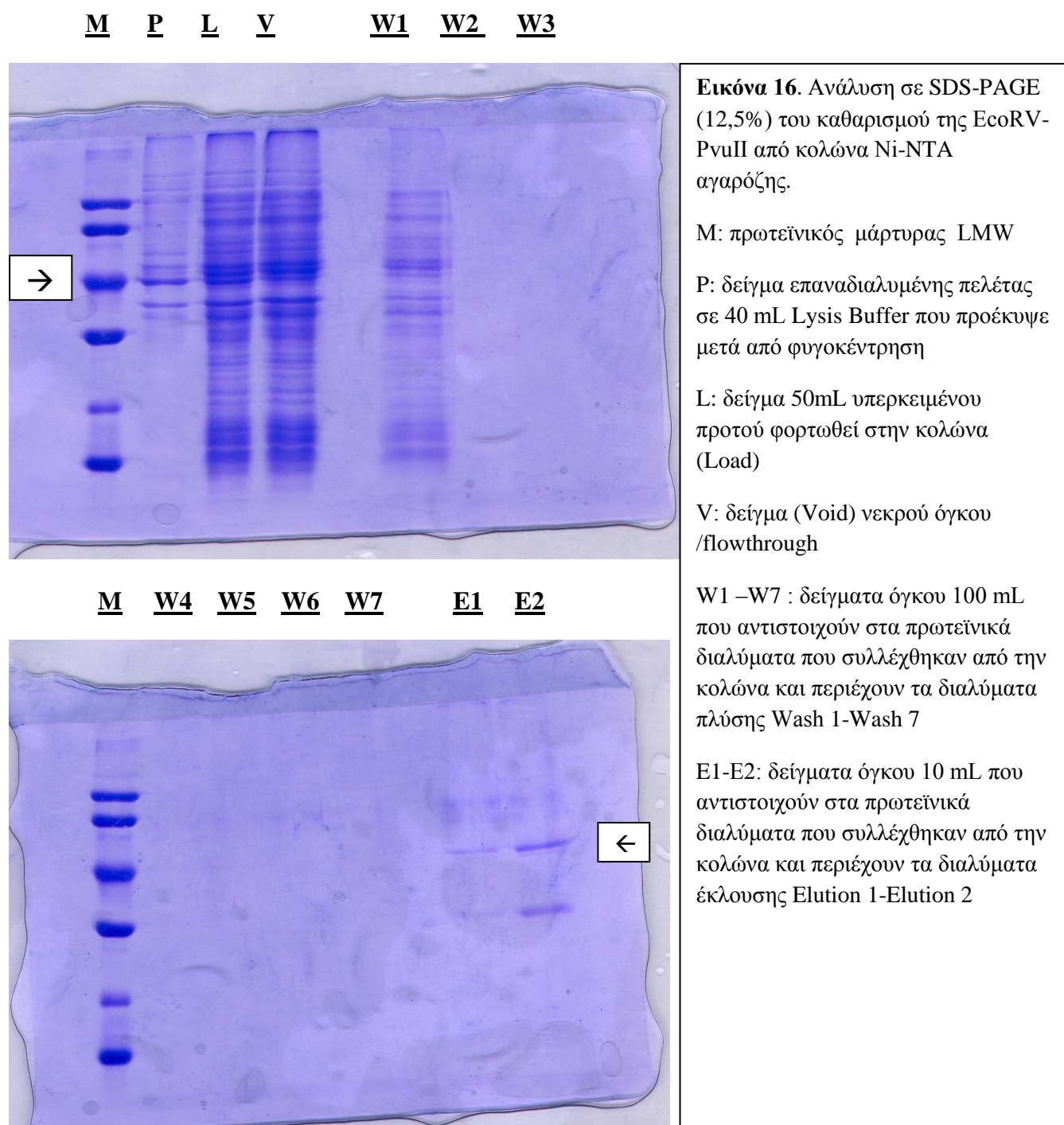


Εικόνα 15. SDS-PAGE (12,5%). M: πρωτεϊνικό μίγμα (LMW μάρτυρας), Un: Δείγμα μη επαγόμενο (Uninduced) από IPTG, In1,In2: Δείγματα που αντιστοιχούν σε επαγωγή (Induced) από 1 mM IPTG μετά από 4 ώρες, στους 28^oC και 37^oC αντίστοιχα, υπό ανάδευση, In3, In4, In5: Δείγματα που αντιστοιχούν σε ολονύκτια επαγωγή (Induced) από 1mM IPTG στους 16^oC, 28^oC και 37^oC αντίστοιχα, υπό ανάδευση.

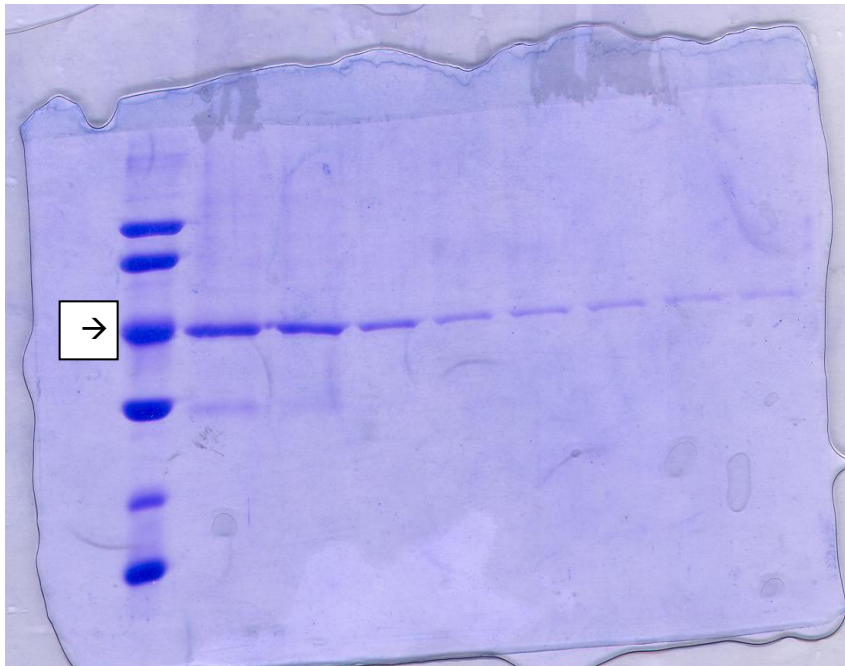
Αφού ταυτοποιήθηκε η επιτυχής ενσωμάτωση του γονιδίου για την EcoRV-PvuII στον pET26b(+) και πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός στα επιλεκτικά στελέχη *E.Coli* DE3 (BL21), ήταν επιτακτική η ανάγκη για έλεγχο των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης μέσω επαγωγής της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII. Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 15**, υπάρχει μια σαφής ένδειξη ότι η επιθυμητή πρωτεΐνη, η οποία έχει μοριακό βάρος 44,47 kDa, εκφράστηκε αποτελεσματικά στις 4 ώρες, στις θερμοκρασίες 28^oC και 37^oC (δείγματα In1, In2). Υπάρχει ένα σαφώς μικρότερο ποσό έκφρασης στις ολονύκτιες συνθήκες (δείγματα In3, In4, In5), όμως η ένταση των μπαντών στις 4 ώρες και κυρίως στους 37^oC μας υποδεικνύει ότι η ιδανική συνθήκη για επαγόμενη από 1mM IPTG έκφραση της EcoRV-PvuII είναι στις 4 ώρες, 37^oC, υπό ανάδευση (δείγμα In2).

3.3 Απομόνωση της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII

3.3.1 Απομόνωση υπό αποδιατακτικές συνθήκες μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας



M E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10



Εικόνα 16 (συνέχεια).

E3-E10: : δείγματα όγκου 10 mL που αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά διαλύματα που συλλέχθηκαν από την κολώνα και περιέχουν τα διαλύματα έκλουσης Elution 3-Elution 10

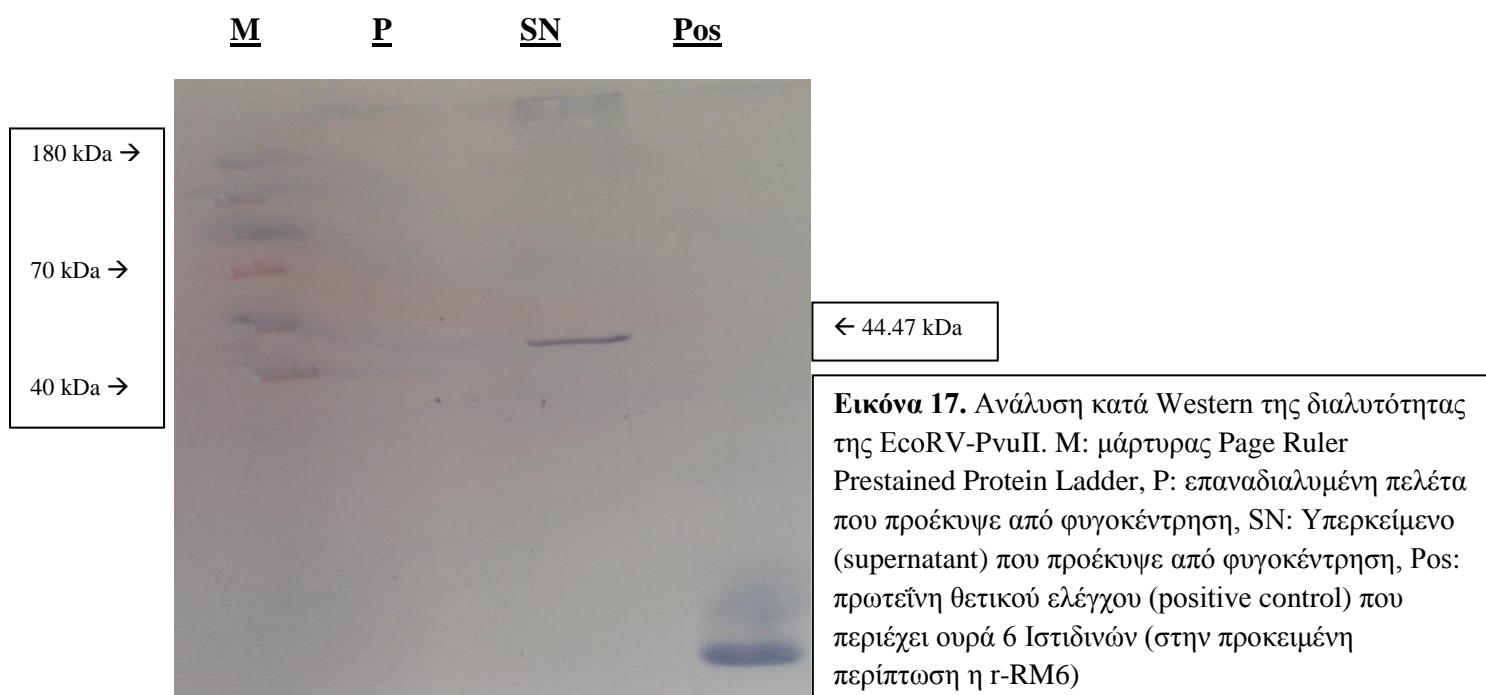
Τα διαλύματα που εκλούστηκαν (E1-E10) συλλέχθηκαν παρουσία 10% Glycerol.

Τα βελάκια υποδεικνύουν το αναμενόμενο μοριακό βάρος της EcoRV-PvuII, που ανέρχεται στα 44,47 kDa, σε συνέπεια με την μπάντα των 45 kDa του μάρτυρα.

Προκειμένου να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη της EcoRV-PvuII, αφού ελέγξαμε τις ιδανικές συνθήκες έκφρασης, προχωρήσαμε σε απομόνωσή της μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας και της χρήσης κολώνας Ni-NTA αγαρόζης. Λόγω τεχνικών προβλημάτων στη διαλυτότητα της πρωτεΐνης επιλέξαμε τη μέθοδο του καθαρισμού υπό αποδιατακτικούς παράγοντες (Ουρία 8M), με σταδιακή μείωση της συγκέντρωσής της Ουρίας στα διαλύματα πλύσης (Washes), ούτως ώστε η πρωτεΐνη κατά την έκλουσή της να συλλεχθεί παρουσία μη αποδιατακτικών παραγόντων. Ο σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν η πρωτεΐνη να επαναδιπλωθεί αυθόρμητα σε ψυχώμενο περιβάλλον, προκειμένου να είναι σε θέση να εκδηλώσει,απομονωμένη πλέον, τη βιοχημική της δράση.

Στην **Εικόνα 16** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης της EcoRV-PvuII υπό αποδιατακτικές συνθήκες, όπως αυτά προέκυψαν σύμφωνα με την ανάλυση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (12,5%). Όπως παρατηρείται, η πρωτεΐνη παρουσιάζει ικανοποιητική συγγένεια για το χρωματογραφικό υλικό μιας και η μεγαλύτερη ποσότητα παραμένει προσδεδεμένη στα ιόντα Ni²⁺, μέχρι αυτή να εκλουστεί, λαμβάνοντας υπόψη και την ένταση της αναμενόμενης μπάντας στο αραιό δείγμα Load. Συγκεκριμένα, στα πρώτα διαλύματα έκλουσης που αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 300 mM Ιμιδαζολίου (δείγματα E3, E4, E5) καταγράφεται το βέλτιστο αποτέλεσμα έκλουσης, ενώ η πρωτεΐνη εκλούεται σε κάποιο βαθμό στην ίδια συγκέντρωση Ιμιδαζολίου (δείγματα E6, E7, E8), καθώς και στα 100 mM Ιμιδαζολίου (δείγματα E1, E2) και λιγότερο στα 500 mM Ιμιδαζολίου (δείγματα E9, E10) (η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων έκλουσης και πλύσης περιγράφεται στον **Πίνακα 1**). Παράλληλα, δεν παρατηρείται έκλουση στα διαλύματα πλύσης (δείγματα Wash1 – Wash7) και ταυτόχρονα μία μικρή ποσότητα της πρωτεΐνης φαίνεται να μην

προσδένεται στην κολώνα και να εμφανίζεται στο νεκρό όγκο (Void). Ωστόσο, όπως παρατηρείται στο δείγμα P (πελέτα), αξιοσημείωτη ποσότητα της πρωτεΐνης κατακρημνίζεται ως ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση των διασπασμένων κυττάρων που είχαν υποστεί μηχανική ρήξη μέσω υπερήχων. Παρ' όλα αυτά λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική εικόνα του πειράματος, η πρωτεΐνη EcoRV-PvuII υπό αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία ουρίας, τείνει να εμφανίζεται σε διαλυτή μορφή, κάτι που έρχεται και σε συμφωνία με αρχικό πείραμα διαλυτότητας και ανάλυσης κατά Western (**Εικόνα 17**).

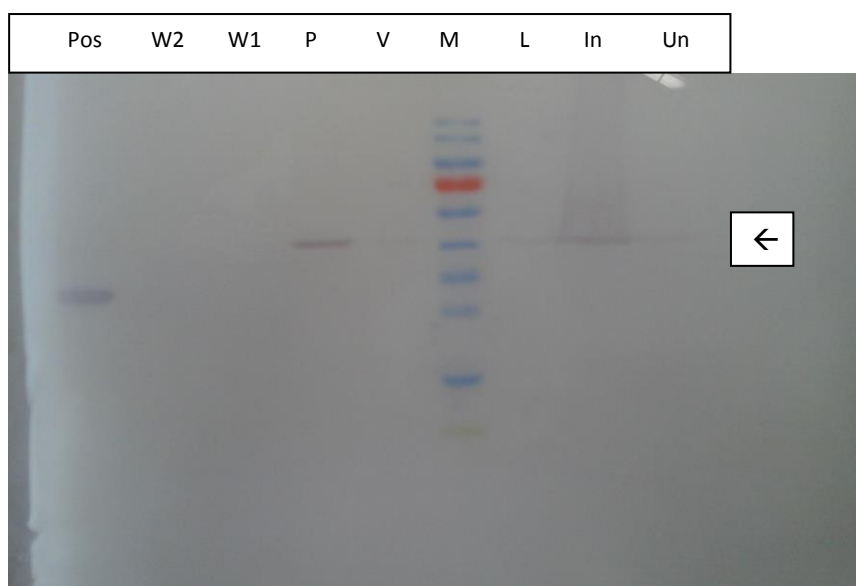


Στο συγκεκριμένο πείραμα ανάλυσης διαλυτότητας της EcoRV-PvuII, μετά από έκφραση μικρής κλίμακας και διάρρηξη των κυττάρων παρουσία Buffer: 50mM Tris pH8, 50 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 8 M Urea, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (11.000 rpm, 20°C, 50 min), τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα. Όπως φαίνεται φανερά από το ανοσοαποτύπωμα κατά Western, παρουσία 8 M ουρίας η πρωτεΐνη (44,47 kDa) εντοπίζεται συντριπτικά στο διαλυτό κλάσμα (σε ύψος λίγο πιο πάνω από τα 40 kDa) σε σχέση με τα κατακρημνισμένα συστατικά.

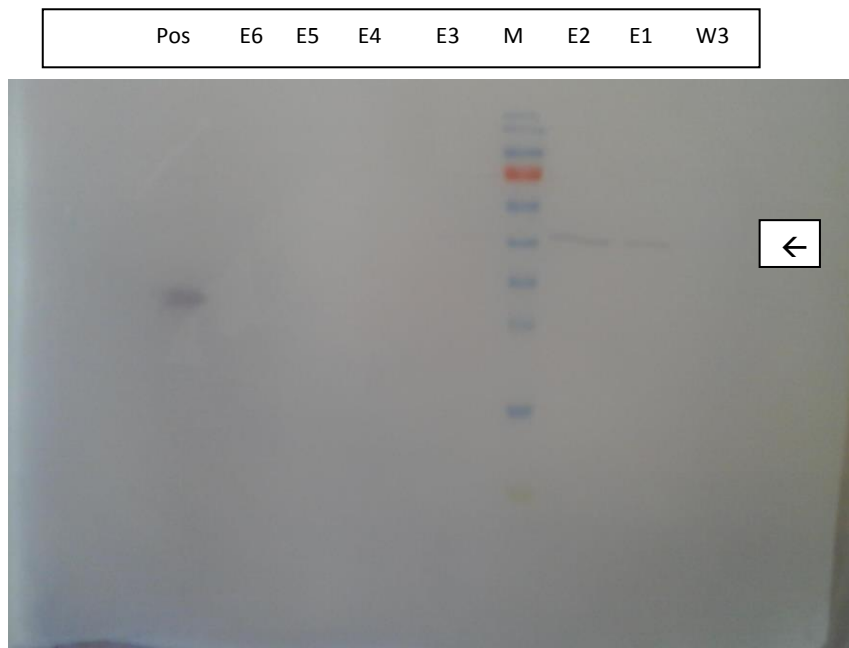
3.3.2 Απομόνωση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας

Η πρωτεΐνη που συλλέχθηκε κατά την απομόνωση παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων, παρουσίασε ξανά επιπλοκές στη διαλυτότητα και κατ'επέκταση στην ειδική της δραστηριότητα, όπως διαπιστώθηκε κατά τη δοκιμή πέψης με DNA που θα περιγραφεί στην ενότητα **3.4.1**. Γι' αυτό το λόγο θεωρήθηκε σκόπιμος ο καθαρισμός της πρωτεΐνης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, με την όποια ποσότητά της μπορεί

να προκύψει σε διαλυτή μορφή μετά από διάρρηξη κυττάρων που συλλέχθηκαν από υγρή καλλιέργεια 2 lt και φυγοκέντρηση. Στην **Εικόνα 18** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης της EcoRV-PvuII, όπως αυτά προέκυψαν σύμφωνα με την ανάλυση κατά Western έπειτα από ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών της αντίστοιχης πηκτής πολυακρυλαμίδης (12,5%) σε μεμβράνη PVDF. Όπως παρατηρείται, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες η πρωτεΐνη εντοπίστηκε σε μεγάλο βαθμό στο μη υδατοδιαλυτό κλάσμα (πελέτα). Μολοταύτα, η διαλυτή ποσότητα της πρωτεΐνης δεν εμφανίζεται στο νεκρό όγκο (Void), υποδεικνύοντας ικανοποιητική συγγένεια για τα ιόντα Ni²⁺ της κολώνας.



Εικόνα 18. Ανάλυση κατά Western της απομόνωσης της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII. M: μάρτυρας Page Ruler Prestained Protein Ladder, Pos: πρωτεΐνη θετικού ελέγχου (positive control) που περιέχει ουρά 6 Ιστιδινών (στην προκειμένη περίπτωση η BA3943), Un: δείγμα μη επαγόμενο από IPTG, In: αραιό δείγμα που προέκυψε μετά την επαγωγή από 1mM IPTG L: δείγμα 60mL υπερκειμένου προτού φορτωθεί στην κολώνα (Load), V: δείγμα (Void) νεκρού όγκου/ flowthrough, P: δείγμα επαναδιαλυμένης πελέτας σε 60 mL Lysis Buffer που προέκυψε μετά από φυγοκέντρηση, W1-W2: δείγματα όγκου 10 mL που αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά διαλύματα που συλλέχθηκαν από την κολώνα και περιέχουν τα διαλύματα πλύσης Wash 1-Wash 2.



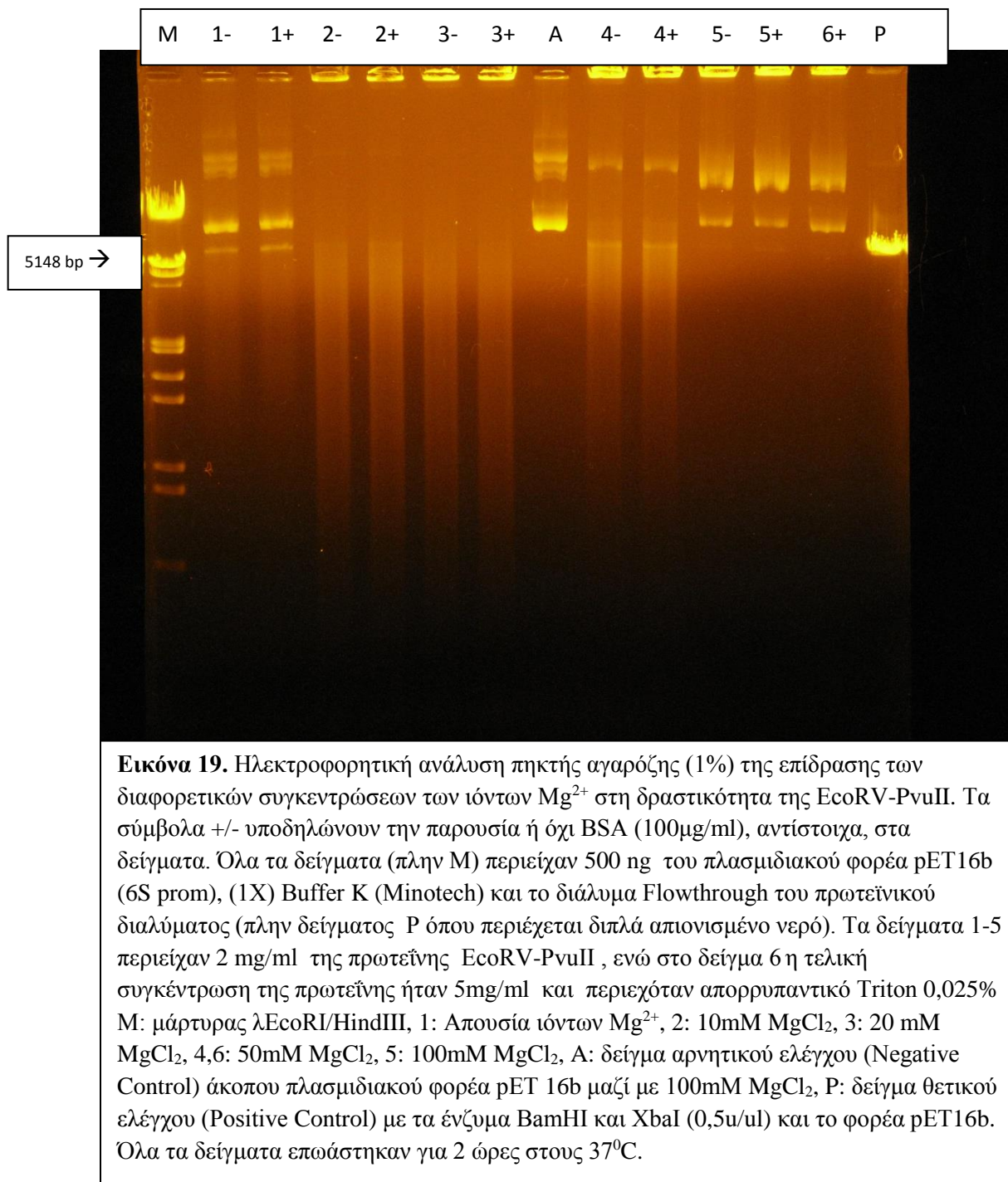
Εικόνα 18 (συνέχεια). W3: δείγμα όγκου 10 mL που αντιστοιχεί στο πρωτεϊνικό διάλυμα που συλλέχθηκε από την κολώνα και περιέχει το διάλυμα πλύσης Wash 3, E1-E6: δείγματα όγκου 1 mL που αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά διαλύματα που συλλέχθηκαν από την κολώνα και περιέχουν τα διαλύματα έκλουσης Elution 1-Elution 6. Τα βελάκια υποδεικνύουν τον εντοπισμό της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII, μεταξύ των μπαντών του μάρτυρα που αντιστοιχούν στα 40 και 55 kDa, Pos: πρωτεΐνη θετικού ελέγχου (positive control) που περιέχει ουρά 6 Ιστιδινών (στην προκειμένη περίπτωση η BA3943)

Η έκλυση πραγματοποιείται αποτελεσματικά στα πρωτεϊνικά διαλύματα E1 και E2 που συλλέγονται πρώτα χρονικά και αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 300 mM Ιμιδαζολίου, όπως και στα υπόλοιπα διαλύματα έκλουσης. Η απουσία της πρωτεΐνης στο μη επαγόμενο δείγμα δείχνει την αποτελεσματικότητα του 1 mM IPTG, συγκριτικά με το επαγόμενο αραιό δείγμα, όπου όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18** η EcoRV-PvuII εμφανίζεται σε μικρό βαθμό. Τέλος, η πρωτεΐνη δεν εκλύεται στα διαλύματα πλύσης Wash1-Wash3 (η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων πλύσης και έκλουσης περιγράφεται στον **Πίνακα 2**). Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος των 44,47 kDa (λίγο πιο πάνω από την μάντα των 40 kDa του μάρτυρα, βλέπε βελάκι), μέσω της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης κατά Western, δείχνει ότι η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει επιπλοκές πρωτεολυτικής πέψης πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τον καθαρισμό της, διατηρώντας μάλιστα ακέραιη την ουρά των 6 Ιστιδινών που ανιχνεύεται από την εν λόγω ευαίσθητη μέθοδο.

3.4 Δοκιμές δραστηριότητας της EcoRV-PvuII με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA

3.4.1 Δοκιμές με απομονωμένη EcoRV-PvuII υπό αποδιατακτικές συνθήκες

3.4.1.1 Επίδραση των ιόντων Mg^{2+} στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII



Τα δισθενή ιόντα Mg^{2+} αποτελούν κατά κύριο λόγο το συμπάραγοντα που εμπλέκεται στην καταλυτική δράση των περιοριστικών ενζύμων τύπου II. Η υπό αποδιατακτικές συνθήκες απομονωμένη πρωτεΐνη EcoRV-PvuII ελέγχθηκε σε ποικίλες συνθήκες ως προς την επίδραση διαφόρων παραγόντων στη δραστηριότητά

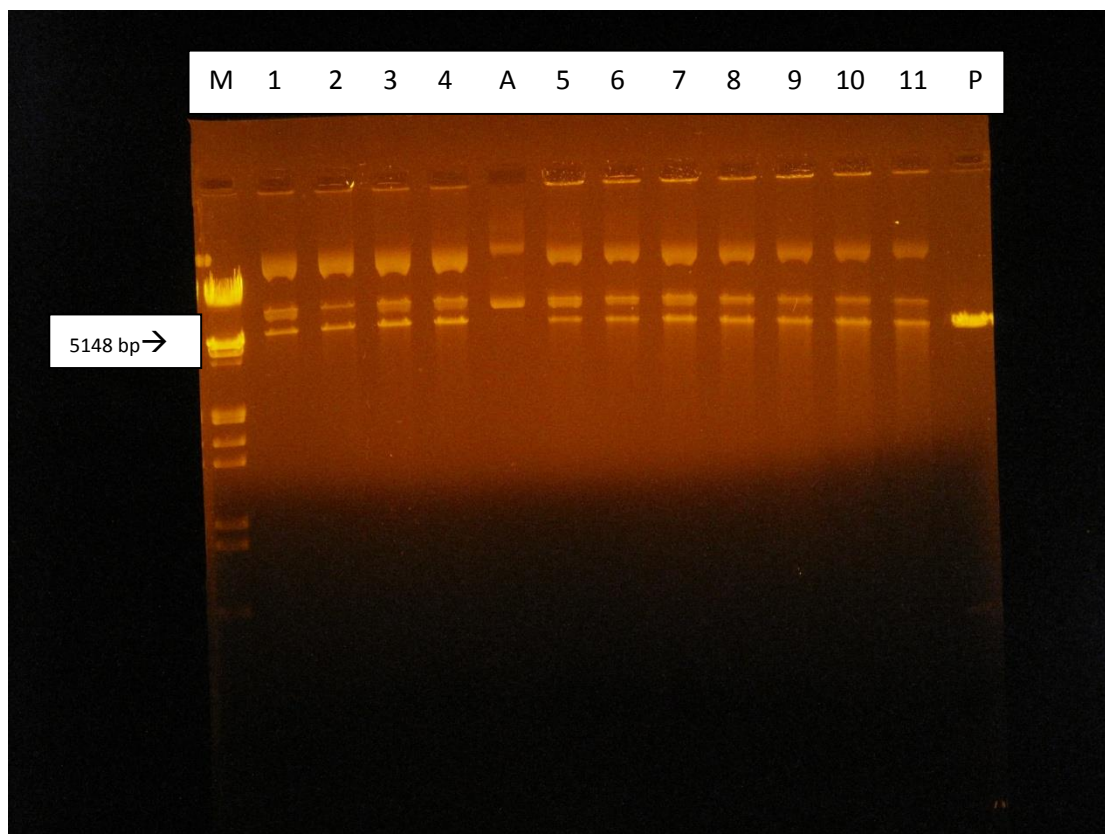
της έναντι πλασμιδιακού DNA ως υποστρώματος. Μεταξύ αυτών των παραγόντων αυτών, εξετάστηκε η επίδραση της παρουσίας των ιόντων Mg^{2+} σε διάφορες τελικές συγκεντρώσεις, στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII έναντι του πλασμιδιακού φορέα pET16b (με ενσωματωμένο το γονίδιο 6S prom) (**Εικόνα 19**). Τα ιόντα προέκυψαν απ'τη διάσταση του $MgCl_2$ σε Mg^{2+} και Cl^- σε υδατικό διάλυμα. Η πρωτεΐνη πριν από αυτή τη δοκιμή διατηρούνταν σε διάλυμα: Glycerol 10%, NaCl 100mM, Glycine pH10 100mM, παρουσία ή όχι 0,5% Triton από τα στάδια της διαπίδυσης και της μετέπειτα συγκέντρωσής της, ενώ αρχικά είχε απομονωθεί από την κολώνα Ni-NTA με διαβάθμιση μειωμένης συγκέντρωσης ουρίας (αποδιατακτικός παράγοντας).

Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 19**, η πρωτεΐνη φαίνεται να είναι ιδιαίτερα δραστική στις συγκεντρώσεις 10 και 20 mM $MgCl_2$ (δείγματα 2,3 αντίστοιχα), μιας και μετά βίας φαίνονται διακριτές ζώνες (εμφάνιση 'κηλίδας'), ενώ στα 50 mM (δείγμα 4) υπάρχει και πάλι η εικόνα της 'κηλίδας' (smear), αλλά σε μικρότερο βαθμό. Σχεδόν καμία δραστηριότητα δεν φαίνεται στα 100mM $MgCl_2$ (δείγμα 5), αν ληφθεί υπόψη και η σύγκριση με την εικόνα του άκοπου πλασμιδιακού φορέα (A), αντιθέτως, απουσία αυτών παρουσιάζεται μια μικρή δραστηριότητα (δείγμα 1), βάσει του εμφανιζόμενου 'smear'. Τέλος, δεν παρουσιάζεται δραστηριότητα παρουσία του απορρυπαντικού Triton (0,025%) και σε συγκέντρωση 50mM $MgCl_2$ (δείγμα 6). Συνοπτικά, η παρουσία των ιόντων Mg^{2+} φαίνεται να επηρεάζει θετικά τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης, εκτός εάν αυτά βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπου φαίνεται να δρουν ανασταλτικά. Παρ'όλα αυτά ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι του συγκεκριμένου συμπαραγόνα, η πρωτεΐνη δείχνει να έχει μη ειδικές νουκλεολυτικές ιδιότητες, σύμφωνα με την παρουσία του smear ή έστω σε κάποιο βαθμό να παρουσιάζει ειδική δράση, λαμβάνοντας υπόψη την μπάντα που παρουσιάζεται λίγο πιο πάνω από τις 5148 bp (βλ. εικόνα).

3.4.1.2 Επίδραση της θερμοκρασίας και της χρονικής διάρκειας επώασης στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII παρουσία απορρυπαντικού

Ένας άλλος παράγοντας, κρίσιμος για τη δραστηριότητα των ενζύμων γενικότερα είναι η θερμοκρασία, καθώς και η χρονική διάρκεια έκθεσης των υποστρωμάτων σε αυτά. Στην **Εικόνα 20** παρατηρούνται μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης αгарόζης (1%) τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την επώαση του πλασμιδιακού φορέα pET16b (συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου 6S prom) με την απομονωμένη υπό αποδιατακτικές συνθήκες πρωτεΐνη EcoRV-PvuII στις θερμοκρασίες των 25 και 37°C για διάφορες χρονικές διάρκειες, παρουσία του απορρυπαντικού Triton. Το διάλυμα διατήρησης της πρωτεΐνης πριν τη χρήση της ήταν: Triton 0,5%, Tris pH8 100mM, NaCl 100mM και $MgCl_2$ 10mM, και η πρωτεϊνική συγκέντρωση ανήλθε στα 4 mg/ml (η πραγματική συγκέντρωση πρωτεΐνης διαφέρει λόγω της απορρόφησης του απορρυπαντικού Triton στο ίδιο εύρος φάσματος της UV με τις πρωτεΐνες). Η χρήση του απορρυπαντικού Triton έγινε λόγω τεχνικών προβλημάτων που αφορούσαν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης μετά τη συλλογή της μέσω της Χρωματογραφίας Συγγένειας. Όπως φαίνεται και από την εικόνα, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία

αυξάνεται και η δραστικότητα της πρωτεΐνης (με τη μορφή smear), ενώ η επώαση στους 37°C φαίνεται να κάνει την πρωτεΐνη πιο δραστική, συγκριτικά με τους 25°C. Συγκρίνοντας με το δείγμα αρνητικού ελέγχου (A), ο πλασμιδιακός φορέας δεν πέπτει πλήρως, σύμφωνα με τις πρώτες μπάντες από το πηγάδι, παρ'όλα αυτά η επιπρόσθετη μπάντα (λίγο πάνω από τις 5148bp) στα δείγματα 1-11 υποδηλώνει την εν μέρει εκδήλωση ειδικής δραστικότητας της EcoRV-PvuII.



Εικόνα 20. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πηκτής αгарόζης (1%) της επίδρασης της θερμοκρασίας και της χρονικής διάρκειας επώασης στη δραστικότητα της EcoRV-PvuII. Τα δείγματα (πλην M) περιείχαν 500 ng πλασμιδιακού φορέα pET16b (6S prom), Buffer K (1X), 100μg/ml BSA (πλην P) και το διάλυμα Flowthrough του πρωτεϊνικού διαλύματος (πλην δειγμάτων P και A που περιείχαν διπλά απιονισμένο νερό). M: μάρτυρας λEcoRI/HindIII, 1-4: δείγματα που επώαστηκαν στους 25°C για 5,6,7 και 8 ώρες, αντίστοιχα με 2mg/ml του πρωτεϊνικού διαλύματος της EcoRV-PvuII, A: δείγμα αρνητικού ελέγχου (Negative Control) άκοπου πλασμιδιακού φορέα pET 16b, 5-11: δείγματα που επώαστηκαν στους 37°C για 2,3,4,5,6,7 και 8 ώρες, αντίστοιχα, με 1 mg/ml του πρωτεϊνικού διαλύματος της EcoRV-PvuII, P: δείγμα θετικού ελέγχου (Positive Control) με τα ένζυμα BamHI και XbaI (0,5u/ul). Τα δείγματα A και P επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C.

Παρ'όλα αυτά, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του πειράματος της ενότητας 3.4.1.1, προκύπτει ότι η απομονωμένη υπό αποδιατακτικές συνθήκες EcoRV-PvuII δε φαίνεται να παρουσιάζει την ειδική δραστικότητα για την οποία είναι σχεδιασμένη,

μιας και η πέψη με το συγκεκριμένο υπόστρωμα θα έπρεπε να αποδώσει 2 θραύσματα DNA μήκους περίπου 1700 και 4500 bp.

3.4.2 Δοκιμές με μερικώς απομονωμένη EcoRV-PvuII υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

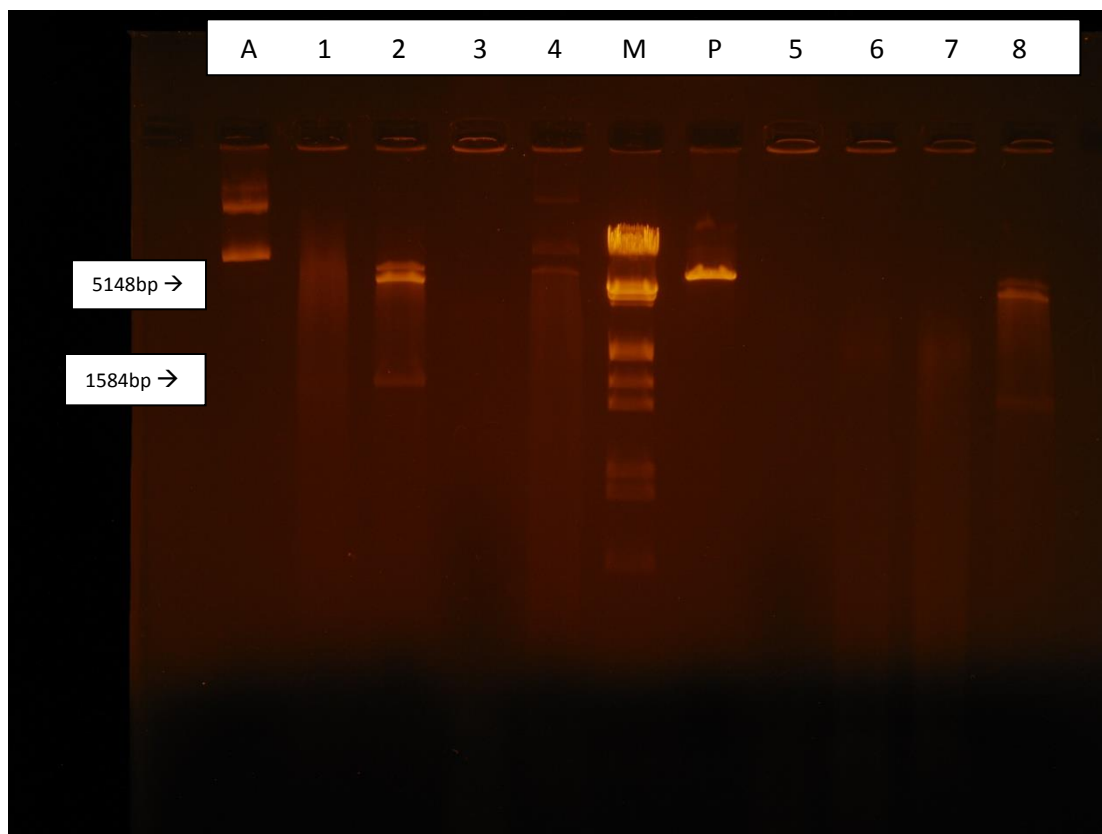
Η εμφάνιση του smear στις δοκιμές πέψης DNA της απομονωμένης υπό αποδιατακτικές συνθήκες EcoRV-PvuII, καθώς και μπαντών με μοριακά βάρη που δεν αναμένονταν βάσει του σχεδιασμού της, αποτελούν ένδειξη μη ειδικής δραστηριότητας. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι μετά από πληθώρα πειραμάτων ελέγχου για το βέλτιστο χημικό περιβάλλον (π.χ. παρουσία απορρυπαντικών, χαμηλής ή υψηλής οξύτητας, βασικότητας, ή αλατότητας) της υπό αποδιατακτικές συνθήκες απομονωμένης πρωτεΐνης (δεν περιγράφονται στην παρούσα διατριβή), αυτή δεν κατέστη δυνατό να συλλεχθεί σε αμιγώς υδατοδιαλυτή μορφή, σχηματίζοντας έγκλειστα σωάτια (inclusion bodies). Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος αποφασίστηκε η πραγματοποίηση πειραμάτων πέψης, με την υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, απομονωμένη πρωτεΐνη, η οποία προέκυψε σε μικρές ποσότητες από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης που ακολούθησε τη διάρρηξη των κυττάρων *E.Coli* (DE3-BL21) που την εξέφρασαν. Το αντίστοιχο πρωτόκολλο καθαρισμού που εφαρμόστηκε αναλύεται στην ενότητα **2.6.2**.

3.4.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας και του απορρυπαντικού Triton στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII

Για την αποφυγή πιθανής παρουσίας inclusion bodies, η πρωτεΐνη διατηρήθηκε μετά τον εν μέρει καθαρισμό της σε διάλυμα: Glycerol 5%, Tris 20mM pH8, NaCl 150mM, παρουσία ή όχι Triton 0,5 %. Πρώτο βήμα, στα συγκεκριμένα πειράματα πέψης (με απομονωμένη την EcoRV-PvuII υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες), ήταν να εξετάσουμε ξανά την επίδραση της παραμέτρου της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα της πρωτεΐνης, καθώς και αν η παρουσία ή απουσία του απορρυπαντικού Triton επηρεάζει τη συμπεριφορά της κατά την αντίδραση της πέψης με υπόστρωμα τον πλασμιδιακό φορέα pET16b (με ενσωματωμένο το γονίδιο 6S prom).

Στην **Εικόνα 21** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης γέλης αгарόζης (1%) κατά την επώαση του πλασμιδιακού φορέα pET16b (6S prom) με την πρωτεΐνη EcoRV-PvuII στις θερμοκρασίες των 25 και 37°C με πυκνά και αραιά πρωτεϊνικά διαλύματα, παρουσία ή όχι ιχνών Triton. Όπως φαίνεται, στα πυκνά πρωτεϊνικά διαλύματα (1,3,5,7) παρατηρείται η ύπαρξη smear ή παντελής έλλειψη οπτικού αποτελέσματος (εκτεταμένος θρυματισμός του DNA), ενώ η ίδια εικόνα γενικότερα παρατηρείται στους 37°C (δείγματα 5-8) και παρουσία Triton (δείγματα 3-6). Πάραυτα, απουσία Triton στα αραιά πρωτεϊνικά δείγματα 2 και 8 η εικόνα του smear περιορίζεται και για πρώτη φορά παρατηρήθηκαν διακριτές ζώνες DNA κοντά στα αναμενόμενα

μοριακά βάρη (υπόδειξη του ύψους τους με βέλος). Εμφανής εν συγκρίσει με το δείγμα αρνητικού ελέγχου (A) είναι η υψηλή δραστηριότητα της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII σε όλες τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω. Συμπερασματικά, η αύξηση της θερμοκρασίας και η παρουσία του Triton, φαίνεται να δρουν ως επιβαρυντικοί παράγοντες στην εξειδικευμένη δράση της EcoRV-PvuII, με συνέπεια την εμφάνιση smear που μαρτυρά μη ειδική δραστηριότητα, ενώ κάποιο ρόλο στον έλεγχο του δεύτερου επιτελεί και η πυκνότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος.



Εικόνα 21. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πηκτής αгарόζης (1%) της επίδρασης της θερμοκρασίας και του απορρυπαντικού Triton στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII. Τα δείγματα (πλην M) περιείχαν 500 ng πλασμιδιακού φορέα pET16b (6S prom), Buffer K (1X), 100μg/ml BSA (πλην P), 10mM MgCl₂ (πλην P) και διπλά απιονισμένο νερό. Τα δείγματα 3,4,5 και 6 περιείχαν Triton σε ίχνη. M: μάρτυρας λEcoRI/HindIII, Τα δείγματα 1-4 επωάστηκαν για 1 ώρα στους 25°C και περιείχαν τελικές πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις: 0,5 0,05 7,65 και 0,77 mg/ml, αντίστοιχα. Οι συνθήκες των δειγμάτων 5,6,7,8 ήταν ίδιες με αυτές των 3,4,1,2, αντίστοιχα, με τη διαφορά ότι επωάστηκαν στους 37°C. M: μάρτυρας λEcoRI/HindIII, A: δείγμα αρνητικού ελέγχου (Negative Control) άκοπου πλασμιδιακού φορέα pET 16b, P: δείγμα θετικού ελέγχου (Positive Control) με τα ένζυμα BamHI και XbaI (0,5u/ul). Τα δείγματα A και P επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37°C.

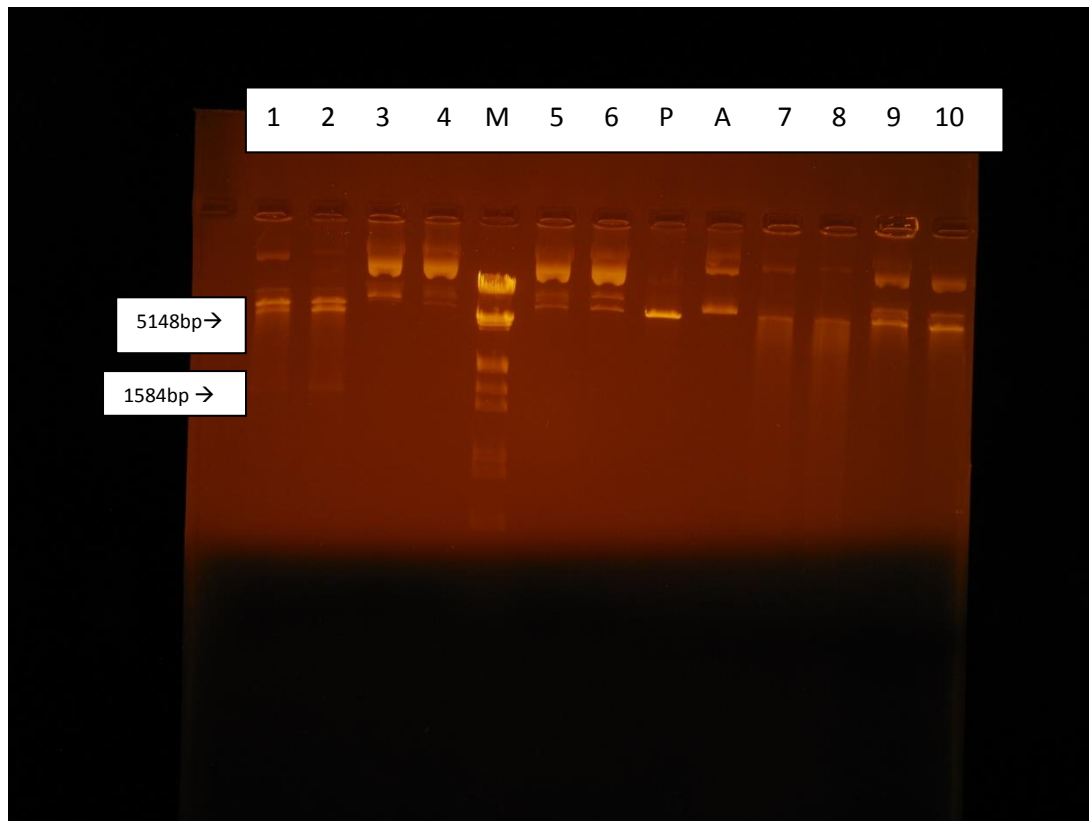
3.4.2.2 Επίδραση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος στη δραστηριότητα της EcoRV-PvuII

Τα αποτελέσματα του πειράματος της ενότητας 3.4.2.1 έδειξαν ότι η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος στις δοκιμές πένης αποτελεί έναν παράγοντα επίδρασης

δραστηριότητας της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII, που θα έπρεπε να εξεταστεί σε μεγαλύτερο βάθος. Ούτως ή άλλως, η συγκέντρωση των ενζύμων στις αντιδράσεις που επιτελούν γενικότερα, είναι μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους που επηρεάζουν άμεσα τη δραστηριότητά τους.

Στην **Εικόνα 22** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης αγαρόζης (1%) κατά την επώαση μισής και μίας ώρας του πλασμιακού φορέα pET16b (6S prom) με την πρωτεΐνη EcoRV-PvuII σε διάφορες συγκεντρώσεις του πρωτεϊνικού της διαλύματος στους 25⁰C, παρουσία ή όχι ιχνών Triton. Το διάλυμα διατήρησης της πρωτεΐνης πριν τη χρήση της ήταν: Glycerol 5%, Tris 20mM pH8, NaCl 150mM, παρουσία ή όχι Triton 0,5 %. Όπως παρατηρείται, στα πιο πυκνά διαλύματα που δεν περιείχαν Triton (1,2), η δραστηριότητα παρουσιάζεται αυξημένη, σύμφωνα με την εμφάνιση του smear και εν μέρει ειδική, λόγω της τελευταίας μάντας του DNA, περίπου στο ύψος των 1500 ζευγών βάσεων, (υποδεικνύεται με το βέλος). Η εξειδίκευση των περισσότερων αραιών χωρίς Triton δειγμάτων 9 και 10 μειώνεται, καθώς η εν λόγω μάντα εξαφανίζεται, ενώ αισθητά μειωμένη δραστηριότητα παρατηρείται στα ακόμα πιο αραιά δείγματα 5,6 λαμβάνοντας υπόψη και το δείγμα αρνητικού ελέγχου (A). Από την άλλη πλευρά, τα δείγματα με ίχνη Triton 3 και 4 δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη δραστηριότητα, καθώς όπως φαίνεται δεν εμφανίζεται καποιο smear ή κάποια μάντα, ενώ τα ακόμα πιο αραιά δείγματα με αρκετά υποτυπώδη περιεκτικότητα σε Triton (7,8) εμφανίζουν εκτεταμένο smear υποδηλώνοντας νουκλεολυτική δραστηριότητα.

Άμεσο συμπέρασμα των παραπάνω είναι ότι η μεγαλύτερη περιεκτικότητα (από αυτές που εξετάστηκαν) του πρωτεϊνικού διαλύματος της EcoRV-PvuII επιδρά θετικά στη δραστηριότητα και την ειδικότητα της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με την παρουσία του απορρυπαντικού Triton, το οποίο σε όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκεται στο διάλυμα πέψης, τόσο περισσότερο μειώνει την ειδικότητα της πρωτεΐνης (κάτι που συνάδει και με τα αποτελέσματα της ενότητας 3.4.2.1). Πρέπει ταυτόχρονα να ληφθεί υπόψη ότι παρουσία Triton 0,5% στο διάλυμα διατήρησης, η πρωτεΐνη τείνει να βρίσκεται περισσότερο σε διαλυτή μορφή και συνεπώς είναι σε θέση να συγκεντρωθεί σε μεγαλύτερο βαθμό. Ενδεχομένως η μεγαλύτερη συγκέντρωση της πρωτεΐνης (ταυτόχρονα, εμφανώς υπερεκτιμημένη λόγω του φάσματος απορρόφησης του Triton), συγκριτικά με τα πρωτεϊνικά δείγματα που συγκεντρώθηκαν απουσία Triton, να φέρει ευθύνη για τα παραπάνω αποτελέσματα.



Εικόνα 22. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πηκτής αγαρόζης (1%) της επίδρασης της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού διαλύματος στη δραστικότητα της EcoRV-PvuII. Τα δείγματα (πλην M) περιείχαν 500 ng πλασμιδιακού φορέα pET16b (6S prom), Buffer K (1X), 100μg/ml BSA (πλην P), 10mM MgCl₂ (πλην P) και διπλά απιονισμένο νερό. Τα δείγματα 1,3,5,7,9 επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 25°C, ενώ τα 2,4,6,8 και 10 για μια ώρα στην ίδια θερμοκρασία. Τα δείγματα 1,2 περιείχαν τελική πρωτεϊνική συγκέντρωση 0,05 mg/ml, τα 3,4: 0,39 mg/ml, τα 5,6: 0,01 mg/ml, τα 7,8: 0,15 mg/ml και τα 9,10: 0,025 mg/ml. Επίσης, τα δείγματα 3,4,7,8 περιείχαν Triton σε ίχνη. M: μάρτυρας λEcoRI/HindIII, A: δείγμα αρνητικού ελέγχου (Negative Control) άκοπου πλασμιδιακού φορέα pET 16b, P: δείγμα θετικού ελέγχου (Positive Control) με τα ένζυμα BamHI και XbaI (0,5u/ul). Τα δείγματα A και P επώαστηκαν για 1 ώρα στους 25°C.

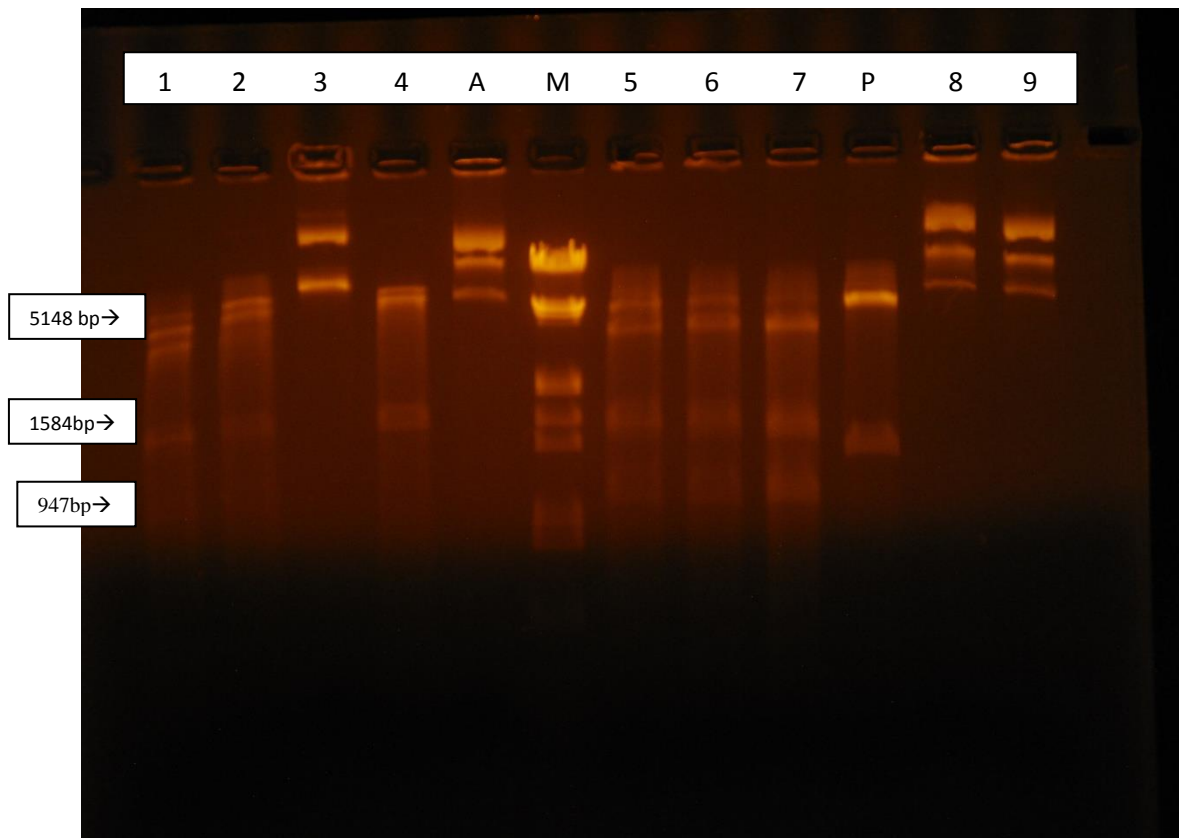
3.4.2.3 Δοκιμή διπλής πέψης πλασμιδιακού DNA από την EcoRV-PvuII και το περιοριστικό ένζυμο XbaI και επίδραση της ένωσης EDTA

Προς αποφυγή της μη επιθυμητής δραστικότητας που εμφανίζεται κατά την παρουσία του απορρυπαντικού Triton στο υδατικό διάλυμα της EcoRV-PvuII, τα ακόλουθα πειράματα πέψης πραγματοποιήθηκαν απουσία αυτού. Στα πλαίσια της διερεύνησης της ειδικότητας της πρωτεΐνης, θα ήταν χρήσιμη η δοκιμή διπλής πέψης από βιομηχανικό ένζυμο με γνωστή και εξειδικευμένη δραστικότητα. Επίσης, προκειμένου να μελετηθεί η δραστικότητα της πρωτεΐνης απουσία επίδρασης του συμπαραγόντα των μεταλλικών ιόντων, εξετάστηκε η παρουσία της μεταλλοδεσμευτικής ένωσης EDTA στο μίγμα της δοκιμής πέψης. Τα αποτελέσματα

της **Εικόνας 23** προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης (1%), όπου εξετάστηκε η επίδραση του EDTA στη δραστικότητα της EcoRV-PvuII και το μίγμα πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+) με την EcoRV-PvuII και το περιοριστικό ένζυμο XbaI. Το πρωτεϊνικό διάλυμα διατήρησης της EcoRV-PvuII περιείχε: Glycerol 5%, Tris pH8 20mM, NaCl 150mM. Όπως φαίνεται από τα δείγματα 3,8 και 9, η ένωση EDTA λειτουργεί ανασταλτικά στη δραστικότητα της EcoRV-PvuII, μιας και τα πλασμιδιακά υποστρώματα των αντίστοιχων δειγμάτων φαίνονται άθικτα, με παρόμοια εικόνα μπαντών με το δείγμα αρνητικού ελέγχου (A). Εμφανής είναι η ύπαρξη δραστικότητας του μίγματος της EcoRV-PvuII με το XbaI, ενώ η εμφάνιση των πολλαπλών μπαντών (δείγματα 1,2,5,6,7) ενδεχομένως να υποδεικνύει τη συνδυαστική δράση των δυο αυτών πρωτεϊνών. Τα πιο πυκνά πρωτεϊνικά διαλύματα (5,6,7) φαίνεται να εκδηλώνουν διαφορετική δραστικότητα στον pET26b(+) σε σχέση με τα αραιά (1,2), λαμβάνοντας υπόψη τις επιπλέον μπάντες που φαίνονται, ενώ οι διαφορετικές χρονικές επωάσεις δεν έχουν κάποιο ουσιαστικό ρόλο στις αντιδράσεις. Παρ'όλα αυτά, οι αναμενόμενες ζώνες DNA που θα προέκυπταν από τη συνδυαστική δράση της EcoRV-PvuII και του ενζύμου XbaI στο φορέα pET26b(+) και σε συμφωνία με τη σχεδιασμένη ειδικότητα της EcoRV-PvuII, θα ήταν της τάξης των 2080 και 3320 bp. Επομένως οι μπάντες που αντιστοιχούν στα ύψη περίπου στις 1500 bp (δείγματα 1,2) και 1000 bp (δείγματα 5,6,7) δεν συνάδουν με τα αναμενόμενα αποτελέσματα, υποδηλώνοντας την εμφάνιση star activity (μη ειδικής δραστικότητας), η οποία συμπληρώνεται και με την παρουσία του smear (εκτεταμένου θρυματισμού του DNA) στα εν λόγω δείγματα.

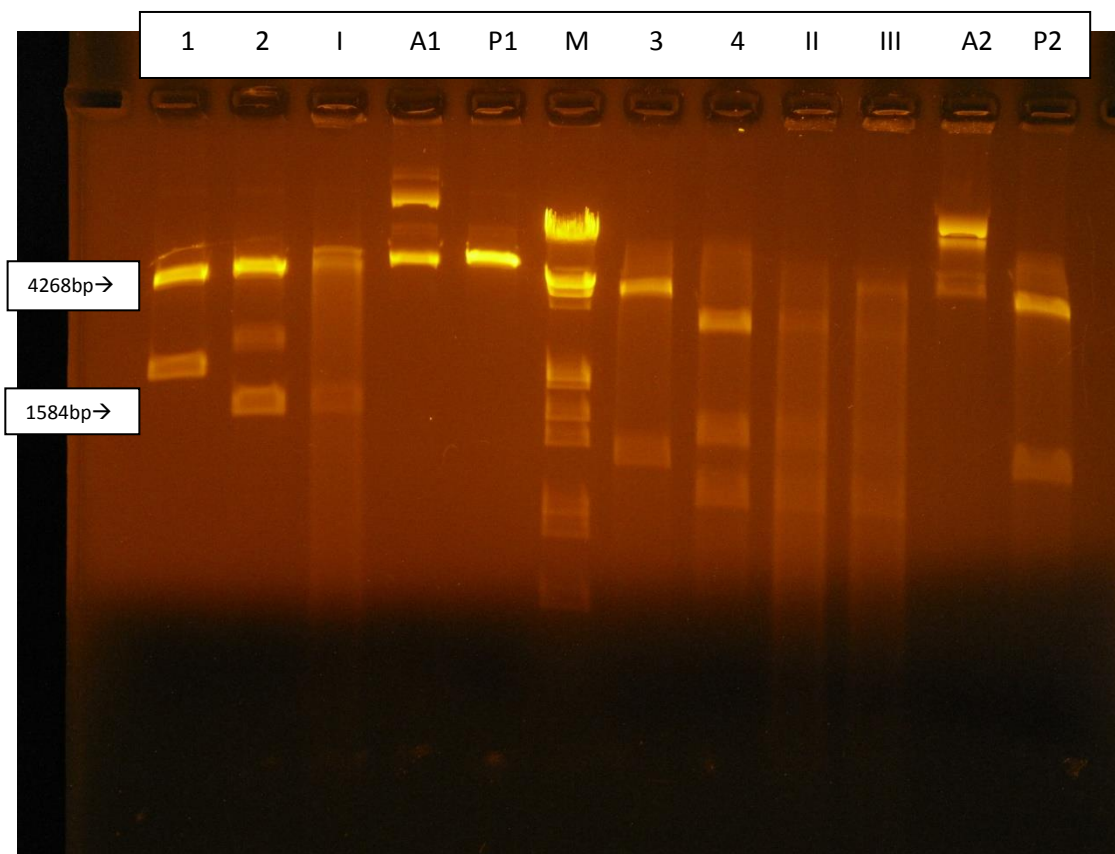
3.4.2.4 Σύγκριση της πέψης πλασμιδιακού DNA από την EcoRV-PvuII με αυτές των EcoRV και PvuII αγρίου τύπου

Στα πλαίσια της περαιτέρω έρευνας για ταυτοποίηση της ειδικότητας της EcoRV-PvuII, θα ήταν εύστοχη η σύγκριση των πέψεων που επιτελούν τα περιοριστικά ένζυμα αγρίου τύπου EcoRV και PvuII με τη δραστικότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση DNA σε γέλη αγαρόζης (1%) αποκάλυψε τη σύγκριση αυτή των πέψεων πλασμιδιακού φορέα από την EcoRV-PvuII, με τις πέψεις από τα περιοριστικά ένζυμα EcoRV και PvuII, μεμονωμένα (**Εικόνα 24**). Τα πρωτεϊνικά διαλύματα διατήρησης της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII περιείχαν: Glycerol 5%, Tris pH8 20mM, NaCl 150mM. Όπως φαίνεται στην εικόνα, προκύπτει το ίδιο πρότυπο πέψης από την EcoRV-PvuII (δείγμα I) και την αγρίου τύπου PvuII (δείγμα 2) με εξαίρεση την παρουσία μιας ενδιάμεσης μπάντας στο δείγμα 2 και το smear στο δείγμα I. Παρόμοια συσχέτιση του δείγματος I δεν παρατηρείται με το δείγμα 1 της αγρίου τύπου EcoRV. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρούνται και κατά τη διπλή πέψη με το ένζυμο XbaI και την EcoRV-PvuII (δείγμα II) σε σύγκριση με τα δείγματα 3 και 4, όπου πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη από τα ένζυμα EcoRV και PvuII, αντίστοιχα με το ένζυμο XbaI. Στο δείγμα III που προστέθηκε το ένζυμο HpaI (με θέση πέψης την 1618-1623) και η EcoRV-PvuII, εκτός του εκτεταμένου smear, παρατηρήθηκαν ζώνες DNA που θα αναμενονταν κατά τη διπλή πέψη του pET26b(+) από τα ένζυμα HpaI και PvuII.



Εικόνα 23. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πηκτής αгарόζης (1%) της δοκιμής διπλής πένης πλασμιδιακού DNA από την EcoRV-PvuII και το XbaI και της επίδρασης του EDTA. Τα δείγματα 3,4 περιείχαν 500 ng πλασμιδιακού φορέα pET16b (6S prom), αντιθέτως όλα τα υπόλοιπα 420 ng του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+). Όλα τα δείγματα περιείχαν (1X) Buffer K, 100μg/ml BSA (πλην P) και διπλά απιονισμένο νερό, ενώ τα δείγματα 3,A,8,9 περιείχαν 50 mM EDTA και τα δείγματα 1, 2, 4, 5, 6, 7 10mM MgCl₂. Τα δείγματα 1, 2, 5, 6, 7, P επώαστηκαν παρουσία του ενζύμου XbaI σε συγκέντρωση 0,5 u/μL. Οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων που περιείχαν την EcoRV-PvuII ήταν: 0,5 mg/ml για τα δείγματα 3 και 8, 0,05 mg/ml για τα δείγματα 4,5,6,7,9 και 0,025 mg/ml για τα δείγματα 1 και 2. Τα δείγματα 8 και 9 επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C, το δείγμα 5 για 30 λεπτά στους 25°C, τα 1 και 7 για 2 ώρες στους 25°C, τα 2,4,6 για μία ώρα στην ίδια θερμοκρασία και το δείγμα 3 για 1 ώρα στους 37°C. M: μάρτυρας λEcoRI/HindIII, A: δείγμα αρνητικού ελέγχου (Negative Control) άκοπου πλασμιδιακού φορέα pET 26b, P: δείγμα θετικού ελέγχου (Positive Control) με τα ένζυμα HpaI και XbaI (0,5u/ul) και το φορέα pET26b(+). Τα δείγματα A και P επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C.

Οι μπάντες στα δείγματα 1,2,3,4 αντιστοιχούσαν στα αναμενόμενα μοριακά βάρη κατά την πέψη των αντίστοιχων πλασμιδιακών φορέων από τα ένζυμα EcoRV, PvuII και XbaI σύμφωνα με τους πλασμιδιακούς χάρτες θέσεων περιορισμού. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον pET 16b, μαζί με το γονίδιο 6S prom (544 bp) ανέρχεται στις 6138 bp. Επομένως τα αναμενόμενα μοριακά βάρη σε bp (κατά προσέγγιση) είναι τα εξής: δείγμα 1 → 2000, 4140, δείγμα 2 → 90, 1500, 4550



Εικόνα 24. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πηκτής αγαρόζης (1%) της σύγκρισης της πέψης πλασμιδιακού DNA από την EcoRV-PvuII με την πέψη από τα βιομηχανικά ένζυμα περιορισμού EcoRV και PvuII. Τα δείγματα 1,2, I, A1 και P1 περιείχαν 500 ng πλασμιδιακού φορέα pET16b (6S prom), αντιθέτως όλα τα υπόλοιπα 420 ng του πλασμιδιακού φορέα pET26b(+). Όλα τα δείγματα περιείχαν (1X) Buffer K και διπλά απιονισμένο νερό, τα δείγματα I, II, III, A1, A2 περιείχαν 100μg/ml BSA και 10 mM MgCl₂, ενώ τα δείγματα I, II και III περιείχαν πρωτεϊνικό διάλυμα της EcoRV-PvuII σε τελική συγκέντρωση 0,05 mg/ml. Τα δείγματα P1, 3, 4, II, P2 επώαστηκαν παρουσία του ενζύμου XbaI σε συγκέντρωση 0,5 u/μL, ενώ τα III και P2 περιείχαν 0,5 u/μL HpaI και το P1 0,5 u/μL BamHI. Το ένζυμο EcoRV (0,5 u/μL) προστέθηκε στα δείγματα 1 και 3 και το PvuII σε ίδια συγκέντρωση στα δείγματα 2 και 4. Τα δείγματα 1, 2, A1, P1, 3, 4, A2 και P2 επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C και τα I, II και III για 2 ώρες στους 25°C. M: μάρτυρας λEcoRI/HindIII. Ουσιαστικά τα δείγματα 1,2,3,4 ήταν δείγματα θετικού ελέγχου μαζί με τα P1 και P2, τα δείγματα A1 και A2 ήταν τα δείγματα άκοπου πλασμιδιακού φορέα (αρνητικού ελέγχου) και ως εκ τούτου οι δοκιμές με την EcoRV-PvuII πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα I, II και III.

Στα δείγματα 3 και 4 που περιέχουν το φορέα pET 26b(+) και το ένζυμο XbaI αναμένονταν κατά προσέγγιση τα μοριακά βάρη (σε bp): δείγμα 3 → 120, 1230, 4050, δείγμα 4 → 100, 1000, 2920, 1380 (οι μπάντες που αντιστοιχούν σε μικρά μοριακά βάρη <500bp δε γίνονται αντιληπτές στα παρόντα πηκτώματα αγαρόζης, λόγω της 1% w/v περιεκτικότητάς της).

Συμπερασματικά, από το συγκεκριμένο πείραμα προέκυψε η σημαντική ομοιότητα της δραστηριότητας της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII με το περιοριστικό ένζυμο PvuII με ταυτόχρονη εμφάνιση μη ειδικής δράσης από την πρώτη, σύμφωνα με την εμφάνιση smear. Αντιθέτως, η πέψη που επιτελεί η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την ειδική δραστηριότητα του περιοριστικού ενζύμου EcoRV.

Είναι τέλος σημαντικό να αναφερθεί ότι έπειτα από μελέτη του Εργαστηρίου Πρωτεομικής του ΙΤΕ, μέσω Φασματοσκοπίας Μάζας, προέκυψε ότι το πρωτεϊνικό δείγμα που περιείχε την EcoRV-PvuII δεν συμπεριελάμβανε άλλες πρωτεΐνες με νουκλεολυτική δραστηριότητα και ειδικότητα που θα ομοιάζε σε αυτή της παρούσας. Κάτι τέτοιο πιστώνει την παρατηρούμενη εξειδικευμένη ενεργότητα στην πρωτεΐνη EcoRV-PvuII. Τα δεδομένα ανάλυσης της Φασματοσκοπίας Μάζας για την EcoRV-PvuII ήταν τα εξής: Score- 1431,92. Coverage- 79,32. Unique peptides: 35. Peptides: 37. PSMs- 84. Area- 5,451E8. Mw[kDa]- 44,4. Calc. PI- 7,25.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στις μέρες μας, ολοένα και περισσότερη έμφαση δίνεται στη δημιουργία καινοτομικά σχεδιασμένων ενζύμων, με απώτερο σκοπό τη χρήση τους σε σύγχρονους τομείς όπως η βιοϊατρική έρευνα και η τροποποίηση γονιδιωμάτων. Για την πρόοδο μίας τέτοιας προσέγγισης σημαντικό ρόλο επιτελεί η αναδυόμενη τεχνολογία της πρωτεϊνικής μηχανικής σε συνδυασμό με τεχνικές δομικής ανάλυσης μεγάλης ευκρίνειας, συμπεριλαμβανομένης της Κρυσταλλογραφίας με ακτίνες Χ. Στα πλαίσια αυτής της λογικής και δεδομένης της εκτεταμένης δομικής ομολογίας που παρουσιάζουν τα περιοριστικά ένζυμα EcoRV και PvuII, επιχειρήθηκε μέσω της παρούσας εργασίας η παραγωγή και μελέτη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης EcoRV-PvuII. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σύντηξης (fusion) μονής πολυπεπτιδικής αλυσίδας περιέχει τις τροποποιημένες επικράτειες των προαναφερθέντων ενζύμων και ταυτόχρονα είναι σχεδιασμένη για τη διεκπεραίωση της αναγνώρισης και της κατάλυσης πέψης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 5' CAGATC 3', ώστε η τελευταία να διχοτομείται λόγω της συνδυαστικής δράσης των δύο ενζύμων.

Με τελικό στόχο να μελετηθεί η δραστηριότητα και η ειδικότητα της πρωτεΐνης EcoRV-PvuII, οι πειραματικές διαδικασίες που έπρεπε να προηγηθούν ήταν η απόκτηση της πρωτεΐνης σε υδατοδιαλυτή μορφή, μιας και τα περιοριστικά ένζυμα δρουν στο κυτταρόπλασμα και η απομόνωσή της από τα κυτταρικά συστατικά. Μέσω μιας σειράς πειραμάτων διαλυτότητας, διαπιστώθηκε η ύπαρξη συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης, με τη μορφή έγκλειστων σωματίων (inclusion bodies). Αυτό το γεγονός υποδηλώνει μη επιτυχή αναδίπλωση της πρωτεϊνικής δομής της EcoRV-PvuII με επακόλουθες αρνητικές συνέπειες στην ειδική δραστηριότητά της. Προς αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος πραγματοποιήθηκε απομόνωση της πρωτεΐνης με τη χρήση Χρωματογραφίας Συγγένειας, παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα Ουρίας. Η πρωτεΐνη, περιέχοντας μια ουρά 6 Ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της, απομονώθηκε αποτελεσματικά, ενώ η ταυτοποίηση της ουράς των Ιστιδινών, καθώς και η ακεραιότητα και απουσία υδρολυτικής πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Πάραυτα, σε επόμενο στάδιο συγκέντρωσής της, η EcoRV-PvuII κατακρημνιζόταν, μαρτυρώντας ξανά την ύπαρξη συσσωματωμάτων. Για την επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος έλαβε χώρα κατά τη διαπίδυση η επώασή της σε διαλύματα διαφορετικού pH, αλατότητας, παρουσία απορρυπαντικών και/ή Γλυκερόλης. Οι δύο τελευταίοι παράγοντες, και ειδικότερα η χρήση του απορρυπαντικού Triton X-100 (0,5%) βοήθησαν στον αισθητό περιορισμό της εμφάνισης έγκλειστων σωματίων, επιτρέποντας τη συγκέντρωσή της. Ωστόσο, έπειτα από ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών δοκιμών πέψης της EcoRV-PvuII με υπόστρωμα πλασμιδιακό DNA, θεωρήθηκε ότι η πρωτεΐνη είχε δεχθεί ανεπανόρθωτη βλάβη στην ορθή αναδίπλωσή της, εξαιτίας της κατά τα άλλα επιτυχημένης απομόνωσής της παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα της Ουρίας. Απόδειξη για αυτό ήταν η παρατήρηση «κηλίδας» (smear), επομένως και εκτεταμένου

νουκλεοτιδικού θρυμματισμού στα αντίστοιχα δείγματα της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης του DNA, υποδεικνύοντας τη μη ειδική δραστικότητα της EcoRV-PvuII έναντι του υποστρώματός της. Παρά την ύπαρξη της μη επιθυμητής αυτής δραστικότητας όμως, αποκαλύφθηκε η σαφής επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων ιόντων Mg^{2+} στην ενεργότητα της πρωτεΐνης, γεγονός που ομοιάζει στη γενικότερη συμπεριφορά των περιοριστικών ενζύμων, παρουσία ποικίλων περιεκτικότητων του συγκεκριμένου συμπάροντα στο μίγμα της αντίδρασης. Επιπλέον, η διαφορετική δραστικότητα των περιοριστικών ενζύμων τύπου II υπό την επίδραση μιας πληθώρας διαφόρων δισθενών ιόντων (Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) [5], δίνει το κίνητρο για νέες μελέτες πέψης με προσθήκη των αντίστοιχων ατόμων.

Η αδυναμία βιοχημικού χαρακτηρισμού της πρωτεΐνης εξαιτίας της μη ειδικής δραστικότητας αποφασίστηκε να αντιμετωπιστεί μέσω της εκ νέου προσπάθειας καθαρισμού της με χρήση Χρωματογραφίας Συγγένειας, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Σύμφωνα με ανάλυση SDS-PAGE, η απόδοση του καθαρισμού της EcoRV-PvuII δεν ήταν ικανοποιητική. Παράλληλα, η ανάλυση κατά Western έδειξε ότι μολονότι η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται ως επί το πλείστον, εντοπίζεται σε ιδιαίτερα χαμηλή συγκέντρωση στα διαλύματα έκλουσης. Η ύπαρξή της σε υδατοδιαλυτή μορφή αποτέλεσε το κίνητρο για διερεύνηση της δραστικότητάς της, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη μετά την μετάφρασή της είχε διπλωθεί ορθά αποκτώντας την τρισδιάστατη δομή της (folding).

Οι μελέτες ηλεκτροφορητικής ανάλυσης του πλασμιδιακού DNA (ως υπόστρωμα) που πραγματοποιήθηκαν στο τελικό στάδιο της παρούσας διατριβής ήταν σε θέση να μας δώσουν δυο χρήσιμα συμπεράσματα. Το πρώτο ήταν ότι η μεγαλύτερη θερμοκρασία και συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος της EcoRV-PvuII, να μεν αυξάνουν την ενεργότητα της πρωτεΐνης, αντιθέτως όμως δρουν σαν επιβαρυντικοί παράγοντες στην ειδική της δραστικότητα. Ιδιαίτερα ο παράγοντας της υψηλής ενζυμικής συγκέντρωσης είναι σύνηθες να επηρεάζει αρνητικά τις ειδικότητες διαφόρων περιοριστικών ενζύμων. Το δεύτερο συμπέρασμα έγκειται στην ομοιότητα της ειδικότητας της EcoRV-PvuII με αυτήν της περιοριστικής ενδονουκλεάσης PvuII. Μια πιθανή εξήγηση του γεγονότος αυτού είναι ο σχηματισμός ομοδιμερών μεταξύ διαφορετικών μορίων της EcoRV-PvuII, τα οποία εμπεριέχουν εξ ορισμού τις πρωτεϊνικές υποεπικράτειες διμερισμού μόνο του ενζύμου PvuII.

Η επικράτεια του EcoRV που περιλαμβάνεται στην πρωτοταγή αλληλουχία της πρωτεΐνης, ενδέχεται να εμπλέκεται σε μοριακές αλληλεπιδράσεις με το DNA, ενώ αντιθέτως δεν επιτελεί ουσιαστική καταλυτική δράση. Για την απόκτηση ειδικής δραστικότητας της επικράτειας αυτής θεωρείται αναγκαίος ένας καινούργιος σχεδιασμός της πρωτεΐνης, που θα προσδώσει την ικανότητα αναγνώρισης της αλληλουχίας-στόχου του DNA από τα αντίστοιχα αμινοξέα της EcoRV, καθώς και την ικανότητα κατάλυσης στα συντηρημένα κατάλοιπα που ευθύνονται για την πέψη του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Προς αυτό το σκοπό είναι πιθανή η αντικατάσταση της υποεπικράτειας διμερισμού της PvuII από αυτήν της EcoRV, ενώ κρίσιμο ρόλο ενδέχεται να παίζει η επιμήκυνση του συνδέτη GSGG. Μέσω αυτών των αλλαγών, ενδεχομένως τα εν λόγω αμινοξέα της EcoRV να βρίσκονται στις κατάλληλες

τοπολογίες, και σε συνεργασία με τα αντίστοιχα για αναγνώριση του DNA και κατάλυση της PvuII να είναι σε θέση να διχοτομήσουν την αλληλουχία στόχο 5'-CAGATC-3'. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία και επομένως και η συμπληρωματική της (5'-GATCTG-3') δεν είναι παλίνδρομες, προκύπτει ότι η συχνότητα εμφάνισής τους στο DNA είναι $2 \times (1/4)^6$, γεγονός που ενδεχομένως να τις καταστήσει αλληλουχίες στόχους προς αντιμετώπιση γενετικών διαταραχών και να αξιοποιηθεί από τον τομέα της βιοϊατρικής έρευνας και τροποποίησης γονιδιωμάτων. Επιπρόσθετα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη των περιοριστικών ενζύμων τύπου II θα παρουσιάσει η δημιουργία μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης τύπου II με νέα ειδικότητα έναντι μη παλίνδρομων αλληλουχιών.

Τέλος, για τη διαλεύκανση του ρόλου των επιμέρους υποεπικρατειών της EcoRV-PvuII, θα ήταν ουσιαστική η ανάλυση κρυσταλλογραφικής περίθλασης μέσω ακτίνων X. Ο δομικός χαρακτηρισμός της παρούσας πρωτεΐνης θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντική παρακαταθήκη για τη γενικότερη μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας, που εστιάζεται στα περιοριστικά ένζυμα τύπου II. Επιπλέον, μέσω του Κυκλικού Διχρωισμού είναι εφικτό να καθοριστούν τα δευτεροταγή δομικά στοιχεία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και επομένως να ταυτοποιηθεί το σωστό δίπλωμά της (folding).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kommireddy Vasu, Valakunja Nagarajaa. (2013). Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1): 53-72
2. Xiaodong Cheng. (1995). Structure and function of DNA methyltransferases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 24: 293-318.
3. Wil A. M. Loenen, David T. F. Dryden, Elisabeth A. Raleigh, Geoffrey G. Wilson, Noreen E. Murray. (2014). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes, *Nucleic Acids Research*, 42 (1): 3–19
4. Richard J. Roberts, Tamas Vincze, Janos Posfai, Dana Macelis. (2014). REBASE- a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes, *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, Issue D1, Pp. D298-D299
5. Alfred Pingoud, Geoffrey G. Wilson, Wolfgang Wende. (2014). Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more, *Nucleic Acids Research*, 42(12): 7489–7527
6. Alfred Pingoud, Albert Jeltsch. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases, *Nucleic Acids Research*, 29(18): 3705-3727
7. Rhet A Kovall, Brian W Matthews. (1999). Type II restriction endonucleases: structural, functional and evolutionary relationships, *Current Opinion in Chemical Biology* 1999, 3: 578–583
8. T.R.Gingeras, L.Greenought, I.Schildkrautt and R.J.Roberts. (1981). Two new restriction endonucleases from *Proteus vulgaris*, *Nucleic Acids Research*, 9 (18): 4525-36
9. Michelle D. Calvin Koons, Robert M. Blumenthal. (1995). Characterization of pPvu1, the autonomous plasmid from *proteus vulgaris* that carries the genes of the PvuII restriction-modification system. 157: 73–79
10. A. Athanasiadis, M. Gregoriu, D. Thanos, M. Kokkinidis , J. Papamatheakis. (1990). Complete nucleotide sequence of the PvuII restriction enzyme gene from *Proteus vulgaris*. *Nucleic Acids Research*, 18(21): 6434
11. Roy M. Vijesurier, Leon Carlock, Robert M. Blumenthal, Joan C. Dunbar. (2000). Role and Mechanism of Action of C·PvuII, a Regulatory Protein Conserved among Restriction-Modification Systems, *Journal of Bacteriology*, Vol. 182(2): 477-487
12. Tao Tao, Robert M. Blumenthal. (1992). Sequence and Characterization of pvuIIR, the PvuII Endonuclease Gene, and of pvuIIC, Its Regulatory Gene, *Journal of Bacteriology*, Vol. 174(10): 3395-3398
13. John R. Horton, Horacio G. Nasti, Paul D. Riggs. (1998). Asp34 of PvuII Endonuclease is Directly Involved in DNA Minor Groove Recognition and Indirectly Involved in Catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 284(5): 1491-1504

14. Horacio G. Nastri, Paul D. Evans‡, Iris H. Walker, and Paul D. Riggs. (1997). Catalytic and DNA Binding Properties of PvuII Restriction Endonuclease Mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (41): 25761–25767
15. Xiaodong Cheng, K.Balendiran, Ira Schildkraut, John E.Anderson. (1994). Structure of PvuII endonuclease with cognate DNA. *The EMBO Journal*, 13(17): 3927 - 3935
16. L.Bougueleret, M.Schwarzstein, A.Tsugita, M.Zabeau. (1984). Characterization of the genes coding for the EcoRV restriction and modification system of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 12 (8): 3659-3676
17. Ira Schildkraut, Carl D.B. Banner, Craig S. Rhodes, Shirish Parekh. (1984) The Cleavage Site for the Restriction Endonuclease EcoRV is 5'-GAT/ATC-3'. *Gene*, 27(3): 327–329
18. Fritz K.Winkler, David W.Banner, Christian Oefner, Demetrius Tsernoglou, Raymond S.Brown, Stephen P.Heathman, Richard K.Bryan, Philip D.Martin, Kyriakos Petratos, Keith S.Wilson. (1993). The crystal structure of EcoRV endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments. *The EMBO journal*, 12(5): 1781 -1795
19. Mai Zahran, Isabella Daidone, Jeremy C. Smith, Petra Imhof. (2010). Mechanism of DNA Recognition by the Restriction Enzyme EcoRV. *The Journal of Molecular Biology*, 401(3): 415-432
20. Amy M. Martin, My D. Sam, Norbert O. Reich, John J. Perona. (1999). Structural and energetic origins of indirect readout in site-specific DNA cleavage by a restriction endonuclease. *Nature Structural Biology*, 6(3): 269-277
21. CL Vermote, IB Vipond, SE Halford. (1992). EcoRV Restriction Endonuclease: Communication between Catalytic Metal Ions and DNA Recognition. *Biochemistry*, 31 (26): 6089-6097
22. Petra Imhof, Stefan Fischer, Jeremy C. Smith. (2009). Catalytic Mechanism of DNA Backbone Cleavage by the Restriction Enzyme EcoRV: A Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Analysis. *Biochemistry*, 48 (38): 9061–9075
23. Nancy C. Horton, Kate Juliet Newberry, John J. Perona. (1998). Metal ion-mediated substrate-assisted catalysis in type II restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* , 95(23): 13489–13494
24. A. Athanasiadis, M. Vlassi, D. Kotsifaki, PA Tucker, KS Wilson, M. Kokkinidis (1994). Crystal structure of PvuII endonuclease reveals extensive structural homologies to EcoRV. *Nature Structural Biology*, 1(7):469-75
25. D.C Nwankwo, M.E. Abalaka (2011). Restriction enzymes and their uses in specific sequencing to produce predictable fragment of DNA making genetic engineering simply. *Journal of Pharmaceutical Research And Opinion* 1(5): 148 – 152
26. David S. Goodsell. (2002). The Molecular Perspective: Restriction Endonucleases. *The Oncologist*, 7(1): 82-83
27. Srinivasan Chandrasegaran, Jeff Smith. (1999). Chimeric Restriction Enzymes: What Is Next?. *Biological Chemistry*, 380(0): 841–848

28. D van Soolingen, PE de Haas, RM Blumenthal, K Kremer, M Sluiter, JE Pijnenburg, LM Schouls, JE Thole, MW Dessens-Kroon, JD van Embden, PW Hermans. (1996). Host-Mediated Modification of PvuII Restriction in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 178(1): 78-84
29. Chrysi Meramveliotaki, Dina Kotsifaki, Maria Androulaki, Athanasios Hountas, Elias Eliopoulos, Michael Kokkinidis. (2007). Purification, crystallization, X-ray diffraction analysis and phasing of an engineered single-chain PvuII restriction endonuclease. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(10): 836–838
30. Benno Schierling, Wolfgang Wende, Alfred Pingoud. (2012). Redesigning the single-chain variant of the restriction endonuclease PvuII by circular permutation. *FEBS Letters*, 586(12): 1736-41
31. Mert Yanik, Jamal Alzubi, Thomas Lahaye, Toni Cathomen, Alfred Pingoud, Wolfgang Wende. (2013). TALE-PvuII Fusion Proteins – Novel Tools for Gene Targeting. *PLoS One*, 8(12): e82539
32. Ines Fonfara, Ute Curth, Alfred Pingoud, Wolfgang Wende. (2012). Creating highly specific nucleases by fusion of active restriction endonucleases and catalytically inactive homing endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 40(2): 847–860
33. Sylvia Schöttler, Christian Wenz, Thomas Lanio, Albert Jeltsch, Alfred Pingoud. (1998). Protein engineering of the restriction endonuclease EcoRV Structure-guided design of enzyme variants that recognize the base pairs flanking the recognition site. *European Journal of Biochemistry/ FEBS*, 258 (1):184-191
34. Thomas Lanio, Albert Jeltsch and Alfred Pingoud. (1998). Towards the Design of Rare Cutting Restriction Endonucleases: Using Directed Evolution to Generate Variants of EcoRV Differing in Their Substrate Specificity by Two Orders of Magnitude. *Journal of Molecular Biology*, 283(1): 59-69