

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ  
«ΧΑΡΥΒΔΙΝΗΣ» ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ *Charybdis  
maritima agg.***

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΟΜΙΑΝΟΣ**

Επιβλέπων καθηγητής: Δ. Γανωτάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

Πίνακας Συντομογραφιών

|                  |  |
|------------------|--|
| ATP              | Αδενόσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας  |
| cm               | Εκατοστόμετρο  |
| DNA              | Δεόξυριβονουκλεϊκό οξύ   |
| DTT              | Διθειοθρεϊτόλη   |
| EDTA             | Αιθυλενο-διάμινο-τετραοξικό οξύ  |
| ESI              | Electron Spray Ionization/ Τεχνική ιονισμού μορίων με ψεκασμό ηλεκτρονίων          |
| g                | Στροφές φυγοκέντρου  |
| gr               | Γραμμάρια  |
| IC <sub>50</sub> | Half Maximal Inhibitory Concentration/το ήμισυ της μέγιστης συγκέντρωσης αναστολής |
| kDa              | Kilodalton   |
| min              | λεπτό  |
| ml               | Χιλιοστόλιτρα  |
| mM               | mili Molarity  |
| mm               | Χιλιοστόμετρο  |
| MS               | Mass Spectrometry/ Φασματοσκοπία μάζας   |
| M.W              | Μοριακό Βάρος  |
| pI               | Ισοηλεκτρικό σημείο πρωτεΐνης  |
| PMSF             | Φαίνυλο-μέθυλο-σουλφόνυλο-φθορίδιο   |
| RIP              | Ribosome Inactivating Protein/ Πρωτεΐνη Αναστολέας Ριβοσωμάτων                     |
| rRNA             | Ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ   |

## Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| Περίληψη.....   | 5  |
| Εισαγωγή.....   | 6  |
| 1. Το φυτό <i>Charybdis maritima</i> .....  | 6  |
| 1.1 Περιγραφή του οργανισμού <i>Charybdis maritima</i> .....  | 6  |
| 1.2 Ονοματολογία .....  | 9  |
| 1.3 Βιότοπος .....  | 10 |
| 1.4 Συστατικά του φυτού <i>Charybdis maritima</i> .....   | 10 |
| 1.5 Χρήση και εφαρμογή του <i>Charybdis maritima</i> στην Ιατρική.....  | 10 |
| 2. Πρωτεΐνες Ribosome Inactivating Proteins (RIP): Πρωτεΐνες αναστολείς των ριβοσωμάτων .....                       | 11 |
| 2.1 Πρωτεΐνες τύπου RIP.....  | 11 |
| 2.2 Τύποι πρωτεϊνών RIP.....  | 11 |
| 2.3 Μηχανισμός δράσης των RIP .....   | 12 |
| 2.4 Δομή των RIP .....  | 13 |
| 2.5 Χρήσεις και εφαρμογές των RIP.....  | 14 |
| 3. Η πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη» .....   | 15 |
| Σκοπός.....   | 16 |
| Υλικά και Μέθοδοι .....   | 17 |
| 1. Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» .....   | 17 |
| 1.1 Απομόνωση της «Χαρυβδίνης» με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις .....   | 17 |
| 1.2 Απομόνωση της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» με κολώνες χρωματογραφίας.....   | 18 |
| 2. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.....   | 19 |
| 3. Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης.....  | 20 |
| 4. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA.....   | 20 |
| 5. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE .....   | 21 |
| 6. Ταυτοποίηση πεπτιδίων.....   | 22 |
| 7. Φασματομετρία Μάζας (MALDI TOF/TOF) .....  | 24 |
| Αποτελέσματα .....  | 25 |
| 1. Αποτελέσματα για την διαδικασία απομόνωσης της «Χαρυβδίνης» με τη διαδικασία των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων. .... | 25 |
| 2. Αποτελέσματα για την διαδικασία απομόνωσης της «Χαρυβδίνης» με τη διαδικασία των χρωματογραφικών κολώνων. ....   | 29 |
| Συζήτηση Αποτελεσμάτων .....  | 31 |
| Συμπεράσματα- Προοπτικές .....  | 33 |

Βιβλιογραφία ..... 34

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη» από το βολβό του φυτού *Charybdis maritima*. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 29kDa, η οποία ανήκει στην ευρύτερη ομάδα των πρωτεϊνών RIP που αναστέλλουν μη αντιστρεπτά τη δράση των ριβοσωμάτων. Η «Χαρυβδίνη» παρότι ανήκει στην ομάδα των πρωτεϊνών RIP, διαφέρει από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της ομάδας αυτής καθώς στο ενεργό της κέντρο έχει στη θέση 79 μια βαλίνη αντίθετα από τις υπόλοιπες RIP που έχουν τυροσίνη στη θέση αυτή, ενώ τα υπόλοιπα τρία αμινοξέα του ενεργού κέντρου είναι τα ίδια με όλες τις RIP πρωτεΐνες. Η απομόνωση της εν λόγω πρωτεΐνης έγινε στην παρούσα εργασία με δύο διαφορετικούς τεχνικές, η πρώτη τεχνική περιλάμβανε την απομόνωση της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» με τη χρήση θεϊκού αμμωνίου προκειμένου να καταβυθιστεί έπειτα από διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, ενώ η δεύτερη, οδηγούσε στην απομόνωσή της «Χαρυβδίνης» έπειτα από το διαχωρισμό των συστατικών του αλέσματος του βολβού του φυτού *Charybdis maritima*, από δύο διαφορετικές χρωματογραφικές κολώνες, μια υδροφοβικής χρωματογραφίας (phenyl sepharose) και μια χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής (Q-sepharose). Τα δείγματα από την πειραματική μέθοδο με τις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF/TOF), ενώ η ταυτοποίηση των δειγμάτων από την πειραματική διεργασία με τις χρωματογραφικές κολώνες βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η πρωτεΐνη που απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε είναι όντως η «Χαρυβδίνη».

# Εισαγωγή

## 1. Το φυτό *Charybdis maritima*

### 1.1 Περιγραφή του οργανισμού *Charybdis maritima*

Ο οργανισμός *Charybdis maritima* ή *Drimia maritima* ή αλλιώς σκυλοκρεμμύδα, ανήκει στην οικογένεια των Λειριωδών, είναι ένα πολυετές φυτό, με πολύ μεγάλο βολβό και φύεται σε ξηρότοπους (εικόνα 1). Έχει ένα απιοειδές βολβό, με διάμετρο έως 20cm και αποτελείται από ομόκεντρες κλίμακες, από τις οποίες οι εξωτερικές είναι λεπτές και μεμβρανώδεις, ενώ οι εσωτερικές είναι υπόλευκες, παχιές, σαρκώδεις. Το βάρος του βολβού είναι 2kg, αν και έχουν βρεθεί και φυτά με βάρος βολβού που φτάνει και έως τα 5kg. Ο βολβός καταλήγει σε δυνατές και ινώδεις ρίζες.



Εικόνα 1 Ο οργανισμός *Charybdis maritima*

[http://lilife.com/Encyclopedia/BULBS/Family/Hyacinthaceae/18255/Charybdis\\_maritima](http://lilife.com/Encyclopedia/BULBS/Family/Hyacinthaceae/18255/Charybdis_maritima)

Το φυτό, έχει μακρύ στέλεχος, με ιώδες χρώμα, ύψους 80-90cm και καταλήγει σε μια πυκνή, μακριά και ωοειδή ταξιανθία. Τα άνθη της είναι μικρά και λευκά, ενώ η πρόοδος της άνθισης είναι βαθμιαία από κάτω προς τα πάνω (εικόνα 2). Όταν το λουλούδι κλείνει, τα πέταλα δεν πέφτουν, αλλά κλείνουν και επαναλαμβάνουν μία κυλινδρική δομή παρόμοια με αυτή των μπουμπουκιών, κάτι που καθιστά την άνθιση της ταξιανθίας αξιοσημείωτη. Ο ρόλος των κλειστών πετάλων είναι η προστασία της αναπτυσσόμενης ωothήκης που σχηματίζεται σε μέσα καψοειδής σχηματισμούς. Οι σχηματισμοί αυτοί μετατρέπονται σε επιμήκη κάψα με διαμήκη διόγκωση. Όταν επέλθει ωρίμανση, διασπώνται σε τρία μέρη προκειμένου να απελευθερωθούν οι μαύροι φτερωτοί του σπόροι. Σε κάθε κάψα

υπάρχουν περίπου 25 σπόροι με μήκος 5mm ο καθένας, που μπορεί να τους μεταφέρει ο αέρας εύκολα σε μεγάλη απόσταση, λόγω της ελαφριάς δομής τους.



Εικόνα 2 Η μακριά και ωσειδής ταξιανθία του *Charybdis maritima*  
[www.bees.gr](http://www.bees.gr)

Τα φύλλα του φυτού είναι πολύ μεγάλα, με μήκος 30-60cm και πλάτος 3-6cm, επιπλέον είναι λεία και λαμπερά με βαθύ πράσινο χρώμα. Αυξάνονται σε συστάδες άμεσα από τον καφέ βολβό ο οποίος προεξέχει ελαφρώς επάνω από το έδαφος (εικόνα 3). Τα φύλλα εμφανίζονται έπειτα από την εμφάνιση των ανθέων, γύρω στο τέλος του καλοκαιριού με αρχές φθινοπώρου.

Έχουν περιγραφεί συνολικά περίπου 25 διαφορετικές ποικιλίες του οργανισμού *Charybdis maritima*, που παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος και το χρώμα των βολβών, των φύλλων και των ανθέων. Οι πιο διαδοσμένες όμως ποικιλίες είναι η λευκή και η κόκκινη. Στη λευκή ποικιλία, οι κάλυκες των βολβών είναι υπόλευκοι ή κιτρινωποί, ενώ στην κόκκινη οι εξωτερικοί κάλυκες είναι καφεκόκκινοι ενώ οι εσωτερικοί ασπροκιτρινωποί. Στις ενδιάμεσες μορφές εμφανίζεται μία ροζ επιδερμίδα. Τα δύο αυτά είδη είναι άφθονα σε ένα πικρό, πυκνό χυμό, που σύμφωνα με ειδικούς περιέχουν οξαλικό ασβέστιο, δεξτρόζη, άμυλο, πτητικά έλαια και ορυκτά άλατα (Bentley and Trimen, 1880).



Εικόνα 3 Συστάδες φύλλων του *Charybdis maritima*  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Drimia\\_maritima#/media/File:Urginea\\_Maritima.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Drimia_maritima#/media/File:Urginea_Maritima.jpg)  
[luirig.altervista.org](http://luirig.altervista.org)

Η σκυλοκρεμμύδα έχει ένα παράξενο κύκλο ζωής επειδή το φυτικό και αναπαραγωγικό της μέρος αναπτύσσεται σε διαφορετικές περιόδους του έτους. Καθώς είναι προσαρμοσμένη στο μεσογειακό κλίμα (εναλλαγή υγρής και άνυδρης περιόδου), διαθέτει φύλλα τα οποία φυτρώνουν απευθείας από το έδαφος αμέσως μετά τα πρωτοβρόχια. Αυτά είναι μεγάλα και φαρδιά όπως αναφέρθηκε και παραπάνω προκειμένου να φωτοσυνθέτουν όλη την υγρή περίοδο και να στέλνουν θρεπτικά συστατικά με αυτό τον τρόπο στο βολβό που αναπτύσσεται και διογκώνεται συνεχώς. Μόλις φτάσει το τέλος της άνοιξης τα φύλλα αρχίζουν και ξεραίνονται και λίγο πριν πέσουν μεταφέρουν μεγάλο μέρος του υλικού που περιέχουν, στο βολβό που θα το χρειαστεί κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Ιδιαίτερα αυξημένη ανάγκη υλικών χρειάζεται το φυτό κατά το μήνα Αύγουστο όπου ανθίζει και δημιουργείται ένας μακρύς, πάνω από ένα μέτρο, ανθικός άξονας στην κορυφή του οποίου υπάρχουν τα άνθη. Ο ψηλός αυτός ανθικός άξονας ευθύνεται για τον εύκολο «εντοπισμό» των λουλουδιών από τις μέλισσες και κατ' επέκταση τη γονιμοποίησή τους, αφού προεξέχει από τους τριγύρω θάμνους. Η πληροφορία για την άνθιση του φυτού τη δεδομένη περίοδο εικάζεται ότι δίνεται από τα φύλλα στο βολβό το μήνα Μάρτιο παράλληλα με τη μεταφορά των υλικών. Αφού την περίοδο της άνθισης δεν έχει το φυτό φύλλα τα οποία μπορούν να αντιληφτούν την εποχή από τη διάρκεια της ημέρας και να δώσουν το κατάλληλο «σήμα» για την άνθιση. Η άνθιση του φυτού αυτή την περίοδο είναι πολύ σημαντική καθώς αποτελεί πηγή τροφής και για τα έντομα που το γονιμοποιούν, και στη συνέχεια τον επόμενο καιρό πρόκειται να γονιμοποιήσουν άλλα φυτά, καθώς είναι ένα από τα ελάχιστα φυτά που ανθίζουν αυτή την περίοδο.



## 1.2. Ονοματολογία

Το πρώτο επιστημονικό όνομα που δόθηκε στον εν λόγω οργανισμό είναι το *Scilla maritima* από τον Linnaeus το 1753, το οποίο μετατράπηκε σε *Urginea maritima* από τον Steinheil το 1834, ο οποίος μελέτησε το φυτό και το αφαίρεσε από το γένος *Scilla*. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο γενών *Urginea* και *Scilla* είναι πως το πρώτο γένος έχει επίπεδους δισκοειδείς σπόρους, ενώ το δεύτερο είναι με τρεις οξείες γωνίες. Το 1873, ο Baker ονόμασε το φυτό αυτό *Urginea maritima* διατηρώντας την ονομασία του φυτού *Scilla* ως τυπικό όνομα. Έπειτα, ο Stearn το 1978, το ονόμασε *Drimia maritima* και τελικά ο Speta το 1998 άλλαξε την επιστημονική ονομασία του φυτού σε *Charybdis maritima* με βάση τις πλαστιδιακές ακολουθίες DNA της οικογένειας *Hyacinthaceae* (Pfosser and Speta, 2004).

Άλλα ονόματα που χρησιμοποιούνται για αυτό το φυτό είναι *Urgibea indica*, *White Squill*, *Urginea Scilla*, *Urginea pancratium*, *Sea Squill*, *Sea Onion*, ενώ στην ελληνική γλώσσα απαντώνται ονομασίες όπως σκυλοκρεμμύδα, ασκέλλα, αγριοκρεμμύδα, μποτσίκι και διάφορα άλλα.

Το φυτό αυτό λοιπόν, ανήκει στην οικογένεια *Hyacinthaceae* και στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η ταξινόμησή του σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης Dahlgren.

Πίνακας 1 Κατάταξη με το σύστημα Dahlgren

|               |                           |
|---------------|---------------------------|
| Βασίλειο      | <i>Plantae</i>            |
| Υποβασίλειο   | <i>Cormobionta</i>        |
| Υπέρφυλο      | <i>Embryophyta</i>        |
| Φύλο          | <i>Tracheophyta</i>       |
| Υπόφυλο       | <i>Spermatophyta</i>      |
| Υπερκλάση     | <i>Angiospermatae</i>     |
| Κλάση         | <i>Magnoliopsida</i>      |
| Υποκλάση      | <i>Magnoliidae</i>        |
| Υπερτάξη      | <i>Lilianae</i>           |
| Τάξη          | <i>Asparagales</i>        |
| Οικογένεια    | <i>Hyacinthaceae</i>      |
| Υποοικογένεια | <i>Urgineoideae</i>       |
| Γένος         | <i>Charybdis</i>          |
| Είδος         | <i>Charybdis maritima</i> |

### 1.3 Βιότοπος

Το φυτό *Charybdis maritima* έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται εύκολα σε όλους τους τύπους κλίματος και χάρη σε αυτή την ικανότητα συναντάται σε διάφορες περιοχές όπως ανομοιόμορφα, σκληρά και εξαντλημένα από την υπερβοσκηση εδάφη, σε άγρια δάση καθώς και στις ξηρές και αμμώδεις παράκτιες περιοχές της μεσογείου. Έτσι το συναντάμε σε μεγάλη αφθονία σε χώρες όπως την Ελλάδα, την Ισπανία, την Πορτογαλία, την Ιταλία, το Μαρόκο, την Αλγερία, τη Μ. Ασία και διάφορες άλλες (Quezel and Santa, 1963).

### 1.4 Συστατικά του φυτού *Charybdis maritima*

Τα συστατικά που περιέχονται στο εν λόγω φυτό δεν έχουν ακόμα εξακριβωθεί πλήρως, παρόλα αυτά έχουν προσδιορισθεί τρεις γλυκοζίτες ο scillitoxin, ο scillipicrin και ο scillin. Οι δύο πρώτοι φαίνεται πως έχουν καρδιοτονωτική δράση, ενώ ο τρίτος προκαλεί μούδιασμα και εμετό. Ένας ακόμα γλυκοζίτης ο οποίος έχει προσδιοριστεί από το βολβό του φυτού αυτού είναι ο scilliroside, ο οποίος είναι υψηλής τοξικότητας και είναι το κύριο ενεργό συστατικό του φυτού (Verbiscar et al., 1986). Ενώ έχουν βρεθεί και διάφορα άλλα χημικά συστατικά του φυτού όπως οι βουφαδιενολίδες (Lizuka et al., 2001). Σε μεγάλη ποσότητα έχει βρεθεί επίσης ο υδατάνθρακας με μοριακό τύπο  $C_6H_{10}O_5$ , καθώς επίσης υπάρχουν και χρωστικές ανθοκυανίνες, πολυσακχαρίτες, λιπαρά οξέα και φλαβονοειδή (Vega et al., 1972) (Praznik and Spies, 1993). Τέλος, σε μεγάλη ποσότητα στο βολβό του φυτού βρίσκεται και οξαλικό ασβέστιο με τη μορφή δεσμίδων μακρών βελονοειδών κρυστάλλων, οι οποίοι διαπερνούν εύκολα το δέρμα και προκαλούν αλλεργία. (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1999).

### 1.5 Χρήση και εφαρμογή του *Charybdis maritima* στην Ιατρική

Το συγκεκριμένο φυτό χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια για την αντιμετώπιση διαφόρων προβλημάτων υγείας δρώντας ως εμετικό, διουρητικό ή ακόμα και καρδιοτονωτικό (Grieve, 1984), (Chevallier, 1996). Επίσης, έχει βρεθεί πως σε μικρή δοσολογία προκαλεί ναυτία και μείωση του σφυγμού καθώς και ελέγχει την υπερβολική έκκριση στις βλεννώδεις επιφάνειες. Επιπρόσθετα, βοηθά στην αντιμετώπιση διαφόρων νοσημάτων του αναπνευστικού συστήματος όπως για παράδειγμα η βρογχίτιδα ή ο δυνατός βήχας.

Οι φαρμακευτικές αυτές ιδιότητες που έχει το φυτό αυτό αποδίδονται στην πληθώρα των φαρμακευτικών ουσιών που περιέχονται κυρίως στο βολβό του φυτού. Οι χημικές αυτές ουσίες είναι διαφορετικές στις δύο κύριες ποικιλίες του φυτού, με αποτέλεσμα η λευκή ποικιλία να περιέχει σε μεγαλύτερο βαθμό τις φαρμακευτικές χημικές ουσίες αυτές, ενώ η κόκκινη περιέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό την τοξική ουσία scilliroside.

Παρόλα αυτά όμως η χορήγησή του και η χρήση του για την αντιμετώπιση ή και θεραπεία των διαφόρων αυτών προβλημάτων, πρέπει να γίνεται μικρές δοσολογίες, διαφορετικά η λήψη μεγάλων ποσοτήτων μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο σε διάστημα 10-24 ωρών λόγω γαστρεντερίτιδας, νεφρίτιδας ή ανακοπής της καρδιάς.

## **2. Πρωτεΐνες Ribosome Inactivating Proteins (RIP): Πρωτεΐνες αναστολείς των ριβοσωμάτων**

### **2.1 Πρωτεΐνες τύπου RIP**

Οι πρωτεΐνες RIP είναι μια ομάδα πρωτεϊνών, κυρίως φυτικής ή σε κάποιες περιπτώσεις και βακτηριακής, προέλευσης που έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν μη αντιστρεπτά τη λειτουργία των ριβοσωμάτων. Αυτό γίνεται διότι οι πρωτεΐνες αυτές καταλύουν την υδρόλυση του N-γλυκοζιτικού δεσμού ενός συγκεκριμένου καταλοίπου αδενοσίνης στο rRNA.

Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες θεωρούνται ως μια συγκεκριμένη κατηγορία ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση του N-γλυκοζιτικού δεσμού του καταλοίπου της αδενοσίνης δρώντας τόσο στην 28S υπομονάδα του ριβοσώματος του αρουραίου όσο στην 60S υπομονάδα του ριβοσώματος των θηλαστικών και την 23S υπομονάδα του ριβοσώματος κάποιων βακτηρίων (Endo and Tsurugi, 1988)(Stirpe et al.,1988). Οι πρωτεΐνες RIP πιστεύεται πως εκτός από τη δράση που έχουν στο rRNA, δρουν και στο DNA και το RNA αλλά και πως ενδεχομένως να υπάρχουν και σε ορισμένους ζωικούς οργανισμούς (Barbieri et al., 1994, 2000)(Barbieri et al., 2001).

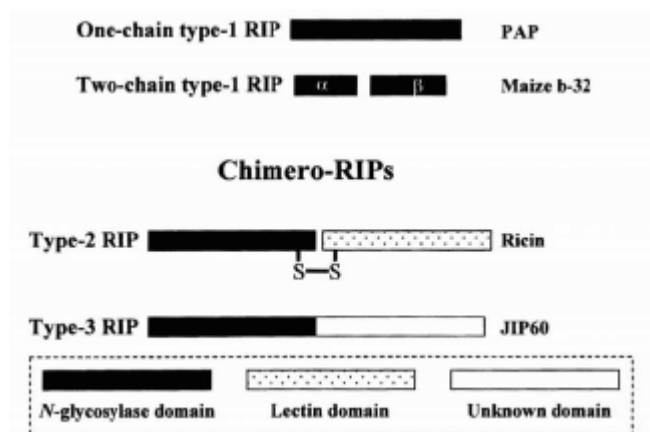
### **2.2 Τύποι πρωτεϊνών RIP**

Οι πρωτεΐνες RIP, ανήκουν σε τρεις ευρείες ομάδες (Girbes et al., 1996), οι ομάδες αυτές είναι οι εξής:

- **RIP τύπου 1:** Σε αυτή την ομάδα ανήκουν οι πρωτεΐνες RIP που αποτελούνται από μία πεπτιδική αλυσίδα στην οποία περιέχεται η ανασταλτική δράση έναντι των ριβοσωμάτων, και έχουν βάρος περίπου 30kDa. Στην ομάδα αυτή ανήκουν και πρωτεΐνες που απαρτίζονται από δύο μικρές πεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς (Walsh et al., 1991).
- **RIP τύπου 2:** Σε αυτή την ομάδα ανήκουν πρωτεΐνες που είναι είτε διμερείς ή μονομερείς και απαρτίζονται από μια ενζυμικά ενεργή αλυσίδα, η οποία ενώνεται μέσω δισουλφιδικού δεσμού με μία δεύτερη πεπτιδική αλυσίδα. Η πρώτη αλυσίδα είναι παρόμοια με τις RIP τύπου 1, ενώ η δεύτερη αλυσίδα έχει παρόμοιες ιδιότητες με τη λεκτίνη και υψηλή συγγένεια στη γαλακτόζη και στα σάκχαρα που παράγονται από αυτή (Lord et al., 1994).

- RIP τύπου 3: Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην ομάδα αυτή είναι πρωτεΐνες που αποτελούνται μόνο από μία πεπτιδική αλυσίδα η οποία στο καρβοξυτελικό της άκρο περιέχει μια εκτεταμένη περιοχή της οποίας η λειτουργία δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα (Dueneva and Gorschen, 1999).

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 4) φαίνεται μια σχηματική αναπαράσταση της μοριακής δομής των τριών αυτών ομάδων των πρωτεϊνών RIP (Hartley et al., 1996).

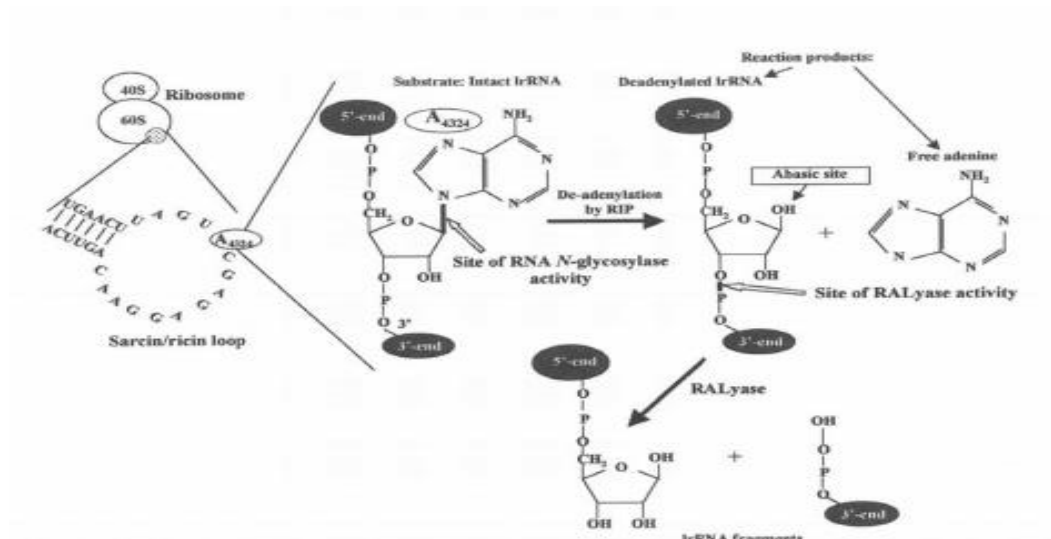


Εικόνα 4 Σχηματική αναπαράσταση της δομής των πρωτεϊνών RIP (van Damme et al., 2001)

Μεγαλύτερη και πιο ισχυρή τοξικότητα εμφανίζουν οι πρωτεΐνες RIP τύπου 2 και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η δεύτερη πεπτιδική αλυσίδα αυτών των πρωτεϊνών συνδέεται στην επιφάνεια των κυττάρων και επιτρέπει στην πρώτη αλυσίδα που περιέχει την ανασταλτική δράση, να εισέλθει στο κύτταρο και να αναστείλει τα ριβοσώματα. Σύμφωνα με αυτό τον μηχανισμό και οι πρωτεΐνες RIP τύπου 1 δυνητικά μπορούν να γίνουν ισχυρά τοξικές εάν συνδεθούν με κάποια ένωση που θα έχει τη δυνατότητα να προσκολλάται στο κύτταρο και να επιτρέπει την είσοδό τους μέσα στο κύτταρο.

### 2.3 Μηχανισμός δράσης των RIP

Πρώτη φορά παρατηρήθηκε πως η Ρισίνη, μια από τις πρωτεΐνες RIP, δρούσε διασπώντας το γλυκοζιτικό δεσμό της αδενίνης A4324 (εικόνα 5), η οποία βρίσκεται σε μια ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή κοντά στο νουκλεοτίδιο GA4324GA (Endo et al., 1987). Εν συνεχεία, διαπιστώθηκε πως με τον ίδιο τρόπο λειτουργούσαν και άλλες RIP, και έτσι όλες οι RIP που δρουν κατά αυτό τον τρόπο ανήκουν στην ομάδα rRNA N-γλυκοζιδάσες (Stripe et al., 1988).

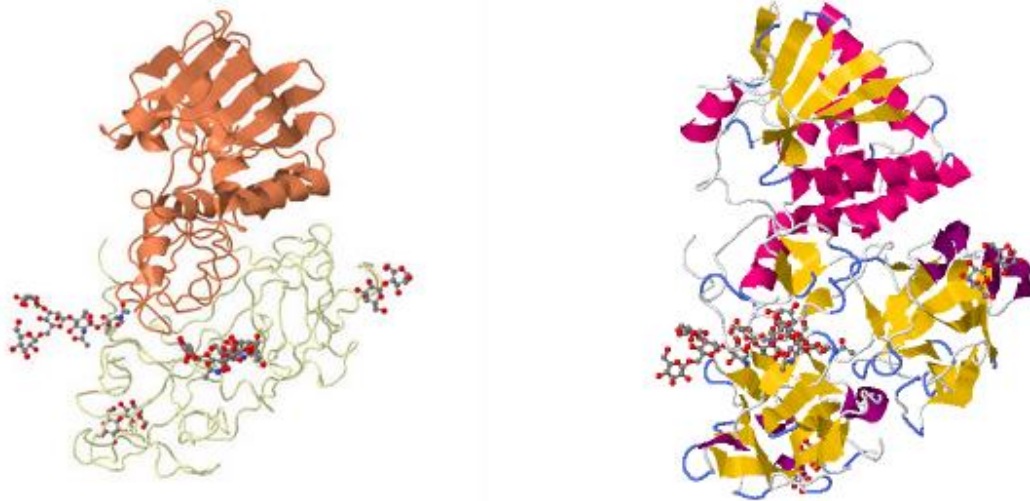


Εικόνα 5 Μηχανισμός δράσης RIP(van Damme et al., 2001)

Ακόμα βρέθηκε πως οι RIP έχουν την ικανότητα να δρουν και σε μη θηλαστικά και να αναστέλλουν τη λειτουργία των ριβοσωμάτων, όπως για παράδειγμα στα έντομα, τα φυτά, τους μύκητες και τα βακτήρια. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν σε αυτή την περίπτωση είναι η αφαίρεση των πουρινών και κάποιες φορές και περισσότερα από ένα κατάλοιπα αδενίνης σε κάθε ριβόσωμα. Ακόμα έχει βρεθεί πως μπορούν και αφαιρούν κατάλοιπα αδενίνης και από το DNA εκτός από το rRNA (Barbieri et al., 1994)(Nicolas et al., 1998, 2000).

## 2.4 Δομή των RIP

Όσον αφορά την δομή και ειδικότερα την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών RIP πρώτη φορά μελετήθηκε από την πρωτεΐνη Ρισίνη (εικόνα 6) (Montfort 1987) και οι περισσότερες μελέτες για τη δομή του ενεργού κέντρου των πρωτεϊνών RIP έχουν γίνει με βάση τη Ρισίνη. Έτσι τα αποτελέσματα από τις μελέτες έδειξαν πως το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης αυτής, στο οποίο δεσμεύεται η αδενίνη για να υποστεί τη N-γλυκοζιδική δράση, σχηματίζεται από τα αμινοξέα Tyr80, Tyr123, Glu177, Arg180, Trp211. Τα αμινοξέα είναι συντηρημένα σε όλους τους τύπους των RIP πρωτεϊνών. Ακόμα, υπάρχουν άλλα έξι αμινοξέα τα οποία βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο και είναι σημαντικά για το σχηματισμό αυτού, αυτά είναι τα Asn78, Arg134, Gln173, Ala178, Glu208 και Asn209.



Εικόνα 6 Τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης Ricin  
<http://www.chem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM2402/Crime/Toxicity.html>

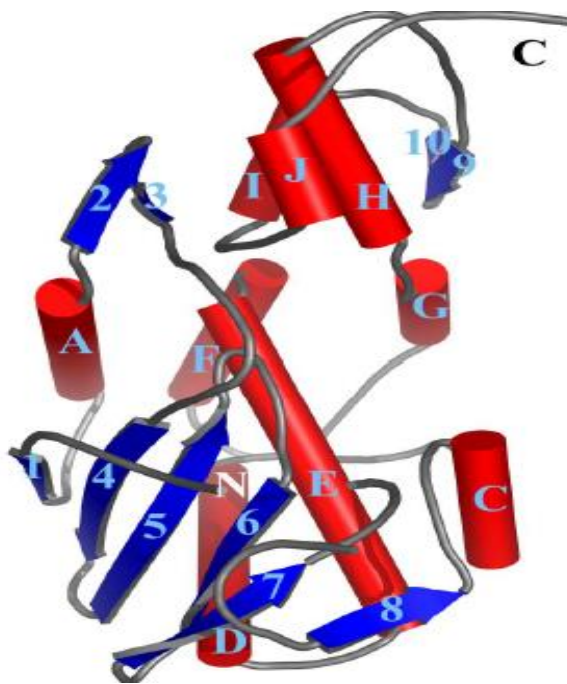
## 2.5 Χρήσεις και εφαρμογές των RIP

Οι πρωτεΐνες αυτές λόγω των αντιμυκητιστακών, αντικών και εντομοκτόνων ιδιοτήτων που εμφανίζουν εκτιμάται πως μπορεί να έχουν χρήσιμη εφαρμογή τόσο στην ιατρική όσο και στη γεωργία.

Διάφορες μελέτες έχουν γίνει όσον αφορά τον τομέα της ιατρικής, ειδικότερα έχει μελετηθεί η αντική τους δράση έναντι του ιου HIV αλλά έχουν γίνει και μελέτες, ως επί το πλείστον *in vitro*, για την αντικαρκινική τους δράση έναντι καρκινικών κυττάρων για κάποιες περιπτώσεις καρκίνου. Αυτές οι μελέτες βασίζονται στη σύζευξη των RIP με μονοκλωνικά αντισώματα ή άλλα σηματοδοτικά μόρια όπως οι ορμόνες ώστε να κατασκευαστούν ανοσοτοξίνες. Με παρόμοιο τρόπο εξετάζονται και οι εφαρμογές που έχουν στον τομέα της γεωργίας καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκτός από αντικοί και αντιμυκητιστακοί παράγοντες και ως εντομοκτόνοι παράγοντες.

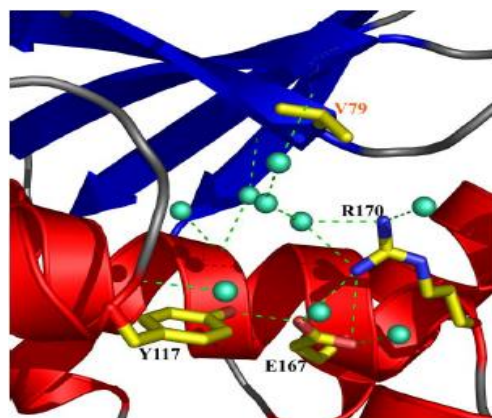
### 3. Η πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη»

Η πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη» (εικόνα 7) είναι μία πρωτεΐνη η οποία πρώτη φορά απομονώθηκε, χαρακτηρίστηκε και προσδιορίστηκε η αλληλουχία της από τον βολβό του φυτού *Charybdis maritima* (Τουλουράκης et al., 2006). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 29kDa περίπου και οι μελέτες έδειξαν ότι παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τις πρωτεΐνες RIP.



Εικόνα 7 Τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» (Τουλουράκης et al., 2006)

Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έπειτα από αυτές τις μελέτες χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη RIP. Παρόλα αυτά, εμφανίζει μια σημαντική διαφορά με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες RIP που έχουν ήδη μελετηθεί. Η διαφορά αυτή είναι πως στο ενεργό κέντρο της έχει γίνει μία αντικατάσταση στη θέση 79 και αντί για το κατάλοιπο της τυροσίνης έχει αυτό της βαλίνης, ενώ τα υπόλοιπα τρία κατάλοιπα είναι τα ίδια με αυτά στις άλλες RIP (εικόνα 8).



Εικόνα 8 Το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» (Τουλουράκης et al., 2006)

Το test ενεργότητας που έγινε για την εν λόγω πρωτεΐνη έδειξε πως παρουσιάζει  $IC_{50}$  ίσο με 24,8nM. Αυτό σημαίνει πως η «Χαρυβδίνη» συγκριτικά με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες RIP δεν είναι τόσο ισχυρός παράγοντας αναστολής της λειτουργίας των ριβοσωμάτων. Και αυτό το γεγονός ίσως οφείλεται στην ύπαρξη της βαλίνης αντί της τυροσίνης στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, κάτι που ίσως την καθιστά παράγοντα αποθήκευσης αφού βρίσκεται σε τόσο μεγάλο ποσοστό της πρωτεϊνικής σύστασης του φυτού.

## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» με δύο διαφορετικές πειραματικές μεθόδους, η μια περιλάμβανε την απομόνωση της πρωτεΐνης με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και η άλλη με τη χρήση δυο κολώνων χρωματογραφίας η μια εκ των οποίων ήταν υδροφοβικής χρωματογραφίας και η άλλη ιοντικής χρωματογραφίας. Και εν συνεχεία ακολούθησε η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης μέσω φασματομετρίας μάζας. Οπότε κατ' επέκταση, σκοπό αποτέλεσε και η σύγκριση των δυο αυτών πειραματικών διεργασιών.



## Υλικά και Μέθοδοι

Προκειμένου να απομονωθεί η πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη» ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι. Ο πρώτος περιλάμβανε την καταβύθιση της πρωτεΐνης αυτής με τη χρήση θεϊκού αμμωνίου και με τη βοήθεια διαδοχικών φυγοκεντρήσεων, ενώ ο δεύτερος τρόπος περιλάμβανε το διαχωρισμό και απομόνωση της πρωτεΐνης από τα υπόλοιπα συστατικά του βολβού του φυτού *Charybdis maritima*, με τη χρήση δυο διαφορετικών χρωματογραφικών κολώνων. Η μια ήταν υδροφοβικής χρωματογραφίας (phenyl sepharose) και η άλλη χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής(Q-sepharose).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Merck, Serva, Sigma, ενώ τα απορρυπαντικά ήταν Sigma και Bio-Rad. Τα αντιδραστήρια επίσης ήταν ποιότητας analytical grade καθώς το νερό που χρησιμοποιήθηκε καθόλη την πειραματική διαδικασία ήταν απιονισμένο με στήλη ιονανταλλακτικών ρητίνων. Για την ηλεκτροφόρηση και τη διαδικασία της θρυψινοποίησης χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό.

### 1. Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης»

#### 1.1 Απομόνωση της «Χαρυβδίνης» με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις.

Επιλέγονται οι βολβοί του φυτού που θα χρησιμοποιηθούν, καθαρίζονται προσεκτικά από το εξωτερικό μέρος και τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια. Για την συγκεκριμένη πειραματική μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν 100g λευκής ποικιλίας *Charybdis maritima*.

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διαδικασία αυτή ήταν το εξής:

1. Διάλυμα αλέσεως: 60mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM DTT, 1mM PMSF και 1,5% w/v PVP, pH=7,2

#### Διαδικασία:

Αρχικά 100gr λευκής ποικιλίας *Charybdis maritima* ομογενοποιήθηκαν με 300ml διαλύματος αλέσεως. Το εκχύλισμα που προέκυψε από αυτή τη διαδικασία φιλτραρίστηκε με τετραπλό φύλλο γάζας ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και τμήματα του φυτού. Το φιλτραρισμένο εκχύλισμα, φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά στα 20000g και στους 4°C. Στο υπερκείμενο διάλυμα προστέθηκε θεϊκό αμμώνιο ώστε να προκύψει συγκέντρωση 10% κατά βάρος και φυγοκεντρήθηκε ξανά στους 4°C και στα 20000g. Στη συνέχεια στο υπερκείμενο διάλυμα προστέθηκε ξανά θεϊκό αμμώνιο ώστε να προκύψει συγκέντρωση 20% κατά βάρος και φυγοκεντρήθηκε πάλι στους 4°C και στα 20000g. Έπειτα, στο υπερκείμενο διάλυμα προστέθηκε ξανά θεϊκό αμμώνιο για να προκύψει 40% κατά βάρος συγκέντρωση και φυγοκεντρήθηκε ξανά στους 4°C και στα 20000g. Τέλος, στο υπερκείμενο διάλυμα προστέθηκε πάλι θεϊκό αμμώνιο ώστε τελικά να έχουμε 60% κατά

βάρος θειικό αμμώνιο στο διάλυμα και φυγοκεντρήθηκε ξανά στους 4°C και στα 20000g. Σημειώνεται εδώ, πως το θειικό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την καταβύθιση της πρωτεΐνης καθώς λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της εξαλάτωσης. Σε εαυτό το φαινόμενο, τα μόρια του άλατος, στην προκειμένη περίπτωση του θειικού αμμωνίου, ανταγωνίζονται τα μόρια πρωτεϊνών για την διαλυτοποίησή τους, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά μόρια νερού στο διάλυμα για την διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών και έτσι αυτές σχηματίζουν ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους από ότι με τα μόρια του νερού. Ως αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων πρωτεϊνών τα οποία καταβυθίζονται. Ακολούθως, το υπερκείμενο διάλυμα που προέκυψε από την τελευταία φυγοκέντρηση αφέθηκε υπό ανάδευση στους 4°C για 24 ώρες και μετά το πέρας των 24 ωρών φυγοκεντρήθηκε 20000g και στους 4°C. Τελικά, το διάλυμα που προέκυψε από αυτή τη φυγοκέντρηση, στην οποία δεν προέκυψε ίζημα, αναμενόταν να περιείχε την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός μας (σύμφωνα με την μεταπτυχιακή εργασία του Αλεξανδρίδη Νικόλαου). Σημειώνεται, πως έπειτα από κάθε φυγοκέντρηση με προσθήκη θειικού αμμωνίου συλλεγόταν ένα μικρό δείγμα. Έτσι εν συνεχεία αυτά τα δείγματα μαζί με δείγμα από το εκχύλισμα του φυτού χρησιμοποιήθηκαν για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Το gel που προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση και τη χρώση, υπέστη τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και τελικά, τα δείγματα υποβλήθηκαν στη φασματομετρία μάζας MALDI προκειμένου να ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη.

## 1.2 Απομόνωση της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» με κολώνες χρωματογραφίας

Επιλέγονται οι βολβοί του φυτού που θα χρησιμοποιηθούν, καθαρίζονται προσεκτικά από το εξωτερικό μέρος και τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια. Για την συγκεκριμένη πειραματική μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν 100g λευκής ποικιλίας *Charybdis maritima*.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την πειραματική διαδικασία είναι τα εξής:

1. Διάλυμα αλέσεως: 60mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100mM  $\text{NaCl}$ , 5mM EDTA, 5mM DTT, 1mM PMSF και 1,5% w/v PVP, pH=7,2.
2. Διάλυμα dialysis(1): 60mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,75M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH=7,2.
3. Διάλυμα έκλουσης 1<sup>ης</sup> κολώνας: 60mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,3M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .
4. Διάλυμα dialysis(2): 50mM ρυθμιστικού διαλύματος Hepes, pH=7,7.
5. Διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (1): 15mM  $\text{NaCl}$ , 50mM Hepes, pH=7,7 .
6. Διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (2): 50mM  $\text{NaCl}$ , 50mM Hepes, pH=7,7.
7. Διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (3): 100mM  $\text{NaCl}$ , 50mM Hepes, pH=7,7 .
8. Διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (4): 300mM  $\text{NaCl}$ , 50mM Hepes, pH=7,7.
9. Διάλυμα καθαρισμού 2<sup>ης</sup> κολώνας: 2M  $\text{NaCl}$ .

### Διαδικασία:

Αρχικά 100gr του βολβού του φυτού *Charybdis maritima* ομογενοποιήθηκαν με 300ml διαλύματος αλέσεως στους 4°C. Το εκχύλισμα που προέκυψε από τη συγκεκριμένη διαδικασία, φιλτραρίστηκε μέσα από τετραπλό φύλλο γάζας ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και τμήματα του φυτού. Το φιλτραρισμένο εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 34000g για μισή ώρα στους 4°C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε με διηθητικό χαρτί και ακολούθησε η διαδικασία της dialysis για 24 ώρες, για το διάλυμα που προήλθε από τη διήθηση με το διάλυμα dialysis(1). Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στην απομάκρυνση των υπαρχόντων προσμίξεων που βρίσκονται στο διάλυμα μαζί με την πρωτεΐνη, πράγμα που επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της ωσμωτικής πίεσης καθώς το διάλυμα εσωκλείεται μέσα σε μια μεμβράνη από τους πόρους της οποίας διαφεύγουν τα διάφορα ιόντα ή άλατα που υπάρχουν και περνάνε στο εξωτερικό διάλυμα, ενώ μέσα στη μεμβράνη παραμένει η πρωτεΐνη. Εν συνεχεία, το διάλυμα αφού υπέστη τη διαδικασία της dialysis, φορτώθηκε σε κολώνα υδρόφοβης χρωματογραφίας phenyl-Sepharose (L-4B 1x10cm). Και έγινε η έκλουση της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης 1<sup>ης</sup> κολώνας με ταχύτητα ροής 0,75ml/min. Το διάλυμα που εκλούστηκε ήταν στα 15ml και αυτό υπέστη τη διαδικασία της dialysis για 24 ώρες με το διάλυμα dialysis(2). Ακολούθως, το δείγμα φορτώθηκε σε κολώνα ιοντικής χρωματογραφίας Q-Sepharose και ακολούθησε βαθμιδωτή έκλουση της πρωτεΐνης με τα διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (1), διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (2), διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (3), διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (4). Από τη διαδικασία αυτή τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ήταν 50ml το καθένα εκτός από το κλάσμα που προέκυψε από το διάλυμα καθαρισμού 2<sup>ης</sup> κολώνας που ήταν περίπου 10ml. Μετά από τη διαδικασία αυτή έγινε καταβύθιση της πρωτεΐνης από τα εν λόγω δείγματα με διάλυμα TCA 10% και στη συνέχεια τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μαζί με το εκχύλισμα του φυτού για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Το gel που προέκυψε μετά την ηλεκτροφόρηση και τη χρώση, υπέστη τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και τελικά τα δείγματα υποβλήθηκαν στη φασματομετρία μάζας MALDI προκειμένου να ταυτοποιηθεί η πρωτεΐνη.

## **2. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων**

Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ή IEX) είναι μια διαδικασία που επιτρέπει τον διαχωρισμό ιόντων και πολικών μορίων με βάση την συγγενείά τους προς τον εναλλάκτη ιόντων (Williams et al., 2000).

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρωματογραφίας βασίζεται στην αντιστρεπτή αλληλεπίδραση μεταξύ μιας φορτισμένης πρωτεΐνης και ενός αντίθετα φορτισμένου μέσου χρωματογραφίας. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατόν να διαχωριστούν και βιομόρια τα οποία παρουσιάζουν μεταξύ τους μικρές διαφορές στο καθαρό φορτίο επιφάνειάς τους, και πολύ υψηλή ανάλυση επιτυγχάνεται με την επιλογή του βέλτιστου ανταλλάκτη ιόντων και συνθήκες διαχωρισμού. Είναι μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος προκειμένου να καθαριστεί μια πρωτεΐνη..

Το καθαρό φορτίο επιφάνειας μιας πρωτεΐνης ποικίλλει ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος. Τυπικά, όταν το pH > pI της πρωτεΐνης τότε αυτή συνδέεται με ένα θετικά

φορτισμένο ανταλλάκτη ανιόντων. Ενώ στην περίπτωση που το  $pH < pI$  της, η πρωτεΐνη συνδέεται με ένα αρνητικά φορτισμένο ανταλλάκτη κατιόντων.

Οι εναλλάκτες ανιόντος και κατιόντος ταξινομούνται ως ισχυροί ή ασθενείς, ανάλογα με το πόσο η κατάσταση ιονισμού των λειτουργικών ομάδων ποικίλλει ανάλογα με το pH. Ένας ισχυρός εναλλάκτης ιόντων (π.χ., Q, S, ή SP) έχει την ίδια πυκνότητα φορτίου στην επιφάνεια του σε μία ευρεία περιοχή pH, ενώ η πυκνότητα φορτίου ενός ασθενούς ανταλλάκτη ιόντων (π.χ., DEAE ή CM) μεταβάλλεται με το pH.

Στην IEX, οι πρωτεΐνες προσδένονται όπως αυτές φορτώνονται στη στήλη σε χαμηλή ιοντική ισχύ. Εν συνεχεία η συνθήκες μεταβάλλονται προκειμένου οι δεσμευμένες ουσίες να εκλούονται ξεχωριστά η καθεμία. Η έκλυση πραγματοποιείται συνήθως με αύξηση της συγκέντρωσης άλατος ή αλλαγή του pH σταδιακά.

Η έκλυση πιο συχνά εκτελείται από μια συνεχή διαβάθμιση ή αύξηση κλιμακωτή σε ιονική ισχύ, συνήθως χρησιμοποιώντας NaCl, αλλά κι άλλα άλατα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.

Στην παρούσα εργασία ως πληρωτικό υλικό της στήλης χρησιμοποιήθηκε η Q-Sepharose. Το πακετάρισμα της στήλης έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes και η έκλυση έγινε με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes και με ταχύτητα ροής 0,75 ml/ min. Το Hepes είναι το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα διότι μπορεί να προσομοιάσει πολύ καλά το pH που βρίσκεται φυσιολογικά στα κύτταρα, επομένως προσομοιάζει το φυσικό περιβάλλον της πρωτεΐνης πολύ καλά.

### **3. Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης**

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία χρωματογραφίας είναι ένα πολύτιμο «εργαλείο» που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό πρωτεϊνών (Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications, Justin T. McCue).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να απομακρύνει προσμίξεις από την πρωτεΐνη και να την καθαρίσει από διάφορα αδρανή προϊόντα. Ο διαχωρισμός των ενώσεων αυτών από την πρωτεΐνη-στόχο που πρόκειται να καθαριστεί βασίζεται στη διαφορά των υδροφοβικών ιδιοτήτων που έχουν από την πρωτεΐνη.

Στην παρούσα εργασία ως πληρωτικό υλικό της στήλης χρησιμοποιήθηκε η phenyl-sepharose και το πακετάρισμα έγινε με τη χρήση του διαλύματος αλέσεως και η έκλυση έγινε με 0,3M  $(NH_4)_2SO_4$  σε φωσφορικό νάτριο με ταχύτητα ροής 0,75ml/min.

### **4. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA**

Σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα προστίθεται TCA 10% και το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 16 ώρες. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στη συνέχεια, προστίθεται παγωμένη ακετόνη, σε ίσο όγκο με

αυτόν του πρωτεϊνικού δείγματος, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 13.000 g για 15 λεπτά και απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο. Η διαδικασία της πλύσης με παγωμένη ακετόνη επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Το ίζημα που προκύπτει αφήνεται να στεγνώσει. Έπειτα επαναδιαλυτοποιείται στην απαιτούμενη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης SDS- Tricine (sample buffer), επωάζεται σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά περίπου, με ενδιάμεσα διαλύματα των 5 λεπτών, και το δείγμα τέλος φορτώνεται στην πηκτή ακρυλαμιδίου.

Η φόρτωση ενός πρωτεϊνικού δείγματος στην πηκτή ακρυλαμιδίου απαιτεί συγκεκριμένη πρωτεϊνική συγκέντρωση. Λόγω του ότι κάποια δείγματα έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση από την απαιτούμενη, υπόκεινται συμπίκνωση με τη χρήση τριχλωροοξικού οξέος (TCA).

Η συγκεκριμένη διαδικασία της κατακρήμνισης γίνεται προκειμένου να συμπτυκνωθούν τα πρωτεϊνικά διαλύματα επειδή αυτά είχαν προκύψει από διαδικασίες που τα καθιστούσαν πολύ αραιά όσον αφορά τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

## 5. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση είναι η κίνηση σωματιδίων σε ένα υγρό κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Στην βιοχημεία η ηλεκτροφόρηση πηκτής χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση μιγμάτων ουσιών.

Στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE χρησιμοποιούνται πηκτές ακρυλαμιδίου για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών. Η ταχύτητα μετακίνησης μιας πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο μιας πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (t).

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

Κατά τη διαδικασία αυτή το διάλυμα μέσα στο οποίο βρίσκονται τα μόρια των πρωτεϊνών κατεργάζεται με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (sample buffer) που τις μετουσιώνει και τις φορτίζει αρνητικά. Όταν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια των πρωτεϊνών βρεθούν στο ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται κινούνται κατευθυνόμενα προς την κάθοδο διαμέσου της πηκτής ακρυλαμιδίου. Η πηκτή που έχει πόρους ορισμένου μεγέθους επιτρέπει στα μικρότερα μόρια να κινηθούν γρηγορότερα ενώ τα μεγαλύτερα μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Η πηκτή κοσκινίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα μόρια των πρωτεϊνών οδηγεί στη δημιουργία περιοχών με συσσωρευμένα τα όμοια μόρια μιας πρωτεΐνης σε ένα σημείο, μοναδικό για κάθε πρωτεΐνη, μέσα στο πήγμα που εμφανίζονται ως «μπάντες» έπειτα από την κατάλληλη χρώση.

Η πηκτή ακρυλαμιδίου είναι αποτέλεσμα συμπολιμερισμού του ακρυλαμιδίου με N, N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδιο. Οι δυο αυτές ενώσεις σχηματίζουν πολυμερές κατάλληλο για χρήση σε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, με την προσθήκη ενός εκκινητή ελευθέρων ριζών, του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS), και ενός διαδοτή της N,N-τετραμεθυλαθουλενοδιαμίνης (TEMED). Στην πηκτή προστίθεται ακόμη SDS, ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, με σκοπό την αποδιάταξη της πρωτεΐνης αφού καταστρέφει κάθε αλληλεπίδραση μέσα στο μόριο αυτής πλην των ομοιοπολικών. Η πηκτή αποτελείται από δύο διαφορετικά στρώματα το ένα εκ των οποίων έχει μικρότερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και βρίσκεται πλησίον της περιοχής τοποθέτησης του δείγματος (stacking gel). Σκοπό έχει να συγκεντρώσει και να

στοιβάξει το δείγμα πριν αρχίσει ο διαχωρισμός του στο δεύτερο και μεγαλύτερο κομμάτι της πηκτής που περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου αλλά και την αποδιατακτική ουρία (running gel). Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν τοποθετηθούν στις ειδικά διαμορφωμένες θέσεις της πηκτής αναμειγνύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (sample buffer), επωάζονται για 0,5-24 ώρες και φυγοκεντρώνονται. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η συσκευή αποσυναρμολογείται και η πηκτή τοποθετείται στο κατάλληλο διάλυμα χρώσης.

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε μία και δύο διαστάσεις (SDS-PAGE 1D). Για την παρασκευή των gels χρησιμοποιήθηκε gel ουρίας (Schagger et al., 1987).

Η χρώση με την οποία εμφανίστηκαν οι πρωτεΐνες είναι η Blue Silver, η οποία έχει μεγάλη ευαισθησία (Candiano et al., 2004) και είναι συμβατή με την διαδικασία ταυτοποίησης πεπτιδίων με φασματομετρία MALDI.

Για πολύ αραιά δείγματα που δεν εμφανίζονται στο gel με την Blue Silver χρησιμοποιείται η χρώση αργύρου η οποία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και είναι και αυτή συμβατή με την διαδικασία ταυτοποίησης πεπτιδίων με φασματομετρία MALDI.

## 6. Ταυτοποίηση πεπτιδίων

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία αυτή ήταν τα εξής:

1. Διάλυμα αποχρωματισμού: 50% Acetonitrile.
2. Διάλυμα ABS: 50 mM Ammonium bicarbonate (φιλτραρισμένο).
3. Διάλυμα DTT: 10 mM Dithiothreitol σε διάλυμα ABS.
4. Διάλυμα IAA: 55 mM Iodoacetamide σε διάλυμα ABS.

Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να είναι φρέσκα και να έχει χρησιμοποιηθεί νερό καθαρότητας nanopure.

### Διαδικασία:

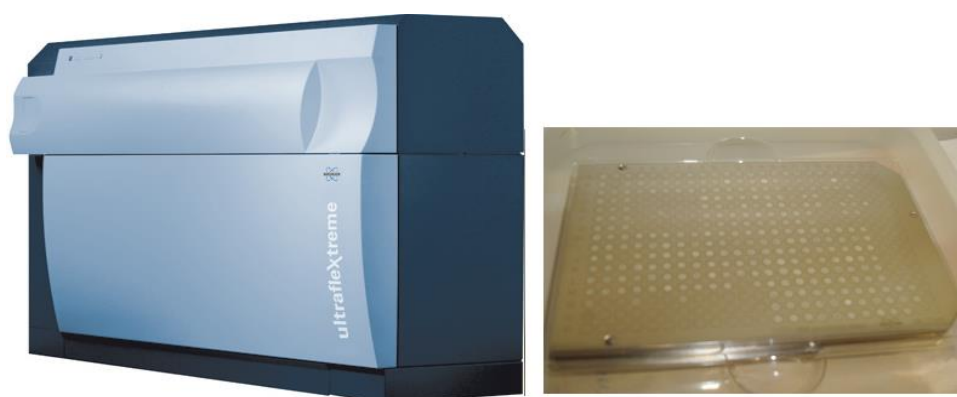
Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται στο πρωτόκολλο των Shevchenko et al. Στόχος της διαδικασίας είναι η αποτελεσματική θρυψινοποίηση πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται σε αποδιατακτικό gel, ώστε να ταυτοποιηθεί η αλληλουχία πεπτιδίων με φασματοσκοπία μάζας.

1. Οι μπάντες προς ταυτοποίηση κόβονται με νυστέρι, αφαιρούνται από το gel και κόβονται περαιτέρω σε μικρούς κύβους.
2. Τοποθετούνται σε αποστειρωμένα erpendorf.
3. Καλύπτονται με διάλυμα αποχρωματισμού και αναδεύονται για 15 λεπτά.

4. Αφαιρείται το διάλυμα, τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα ABS και αναδεύονται για 15 λεπτά.
5. Το διάλυμα αφαιρείται και το βήμα 3 και 4 επαναλαμβάνεται ακόμα 2 φορές (αν κάποιο δείγμα δεν έχει αποχρωματιστεί, τότε συνεχίζεται ξανά ο ίδιος κύκλος).
6. Προστίθεται 100% Acetonitrile και τα δείγματα αναδεύονται για 15 λεπτά (παρατηρούνται λευκά κομμάτια, συρρικνωμένα).
7. Αφαιρείται το διάλυμα και αφήνεται σε ροή αέρα προς ξήρανση.
8. Τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα 10 mM DTT και αναδεύονται για 45 λεπτά στους 56°C, ώστε να αναχθούν πλήρως οι πρωτεΐνες και να αποδιατακτούν.
9. Αφαιρείται το διάλυμα και επαναλαμβάνονται τα βήματα 3, 4, 6 και 7.
10. Προστίθεται διάλυμα 55 mM IAA και αναδεύονται για 45λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πραγματοποιηθεί αλκυλίωση των πρωτεϊνών.
11. Αφαιρείται το διάλυμα και επαναλαμβάνονται τα βήματα 3,4,5,6 και 7.
12. Στα κομμάτια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης (125ng/δείγμα) και αφήνεται όλο το βράδυ στους 37°C (αν δεν έχουν καλυφθεί προστίθεται λίγο ακόμα διάλυμα θρυψίνης ή διάλυμα ABS).
13. Μεταφέρεται το διάλυμα σε νέο, αποστειρωμένο erpendorf. Στο διάλυμα αυτό περιέχονται τα πεπτίδια της πρωτεΐνης που έχουν εξαχθεί από τα κομματάκια του gel. Για αυτό το λόγο το διάλυμα το τοποθετούμε σε νέο αποστειρωμένο erpendorf.
14. Τα κομμάτια καλύπτονται με διάλυμα 0,1% TFA σε διάλυμα αποχρωματισμού και αναδεύονται για 30 λεπτά.
15. Το διάλυμα μεταφέρεται στο νέο erpendorf του βήματος 13.
16. Προστίθεται 100% ACN στα κομμάτια και αναδεύονται για 30λεπτά.
17. Το διάλυμα μεταφέρεται στο νέο erpendorf του βήματος 13.
18. Χρησιμοποιείται το Speed Vac για να εξατμιστεί ο παγωμένος διαλύτης και να παραμείνουν τα πεπτίδια στη μορφή σκόνης.
19. Στα πεπτίδια προστίθεται διάλυμα μήτρας και τοποθετούνται στον ειδικό στόχο για να ταυτοποιηθούν μέσω φασματομετρίας μάζας MALDI.

## 7. Φασματομετρία Μάζας (MALDI TOF/TOF)

Ο φασματογράφος μάζας είναι της εταιρίας Bruker Daltonics (εικόνα 10). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της αργής εξαγωγής (delayed extraction) και με τη χρήση του ανακλαστήρα. Το laser smartbeam II είναι συχνότητας 200Hz. Για τα φάσματα MS χρησιμοποιήθηκε τάση επιτάχυνσης 20,15kV για την Πηγή Ιοντισμού 1 και 18,10kV για την Πηγή Ιοντισμού 2, 90ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλού μοριακού βάρους 600kDa. Αντίστοιχα, για τα φάσματα MS/MS (LIFT) χρησιμοποιήθηκε τάση επιτάχυνσης 19,06kV για την Πηγή Ιοντισμού 1 και 3,80kV για την Πηγή Ιοντισμού 2. Ο ανακλαστήρας τέθηκε στην κατάσταση ανάλυσης θετικών ιόντων με κλάσμα τάσης 2,3 και ελήφθησαν φάσματα με εύρος μαζών από 700-3900 kDa.



Εικόνα 9 Ο φασματογράφος μάζας Ultraflex Xtreme (Bruker Daltonics) και ο στόχος

Τα φάσματα που ελήφθησαν βαθμονομήθηκαν εξωτερικά με το μίγμα εννέα πεπτιδίων Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik GmbH), καθώς επίσης έγινε και εσωτερική βαθμονόμηση με δύο πεπτιδία (Bradykinin Fragment 1-7: 756,3997 Da και ACTH Fragment 18-39: 2454,1989 Da, Sigma) χρησιμοποιώντας το λογισμικό flexcontrol 3.3 (Bruker Daltonics). Για κάθε τελικό φάσμα μάζας αθροίστηκαν 1000 έως και 2000 επιμέρους φάσματα. Όλα τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό flexanalysis 3.3 (Bruker Daltonics) για την εξομάλυνσή τους, το φιλτράρισμα του θορύβου και την επιλογή των μόνο-ισοτοπικών κορυφών, ενώ μέσω του λογισμικού BioTools version 3.2 (Sequence editor version) έγινε η αναζήτηση στο Mascot server χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων για τα πράσινα φυτά στο NCBI και τη μηχανή αναζήτησης Mascot δείχνει την ομολογία της πρωτεΐνης σε σχέση με άλλες ήδη γνωστές. Το περιθώριο λάθους ορίστηκε στα 30ppm, ο μέγιστος αριθμός αποτυχημένων πρωτεολύσεων σε 1 και οι πιθανές τροποποιήσεις αμινοξέων ορίστηκαν οι καρβαμιδομεθυλίωση των κυστεϊνών και η οξειδωση των μεθειονινών.

Το σύνολο της διαδικασίας (λήψη και επεξεργασία φασμάτων, αναζήτηση πεπτιδίων) πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή Γ. Τσιώτη.



## Αποτελέσματα

Αφού απομονώθηκε η πρωτεΐνη που μας ενδιέφερε να ταυτοποιήσουμε για την παρούσα εργασία, είτε με τη διαδικασία των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων ή με τη χρήση στηλών χρωματογραφίας φορτώθηκε σε gel ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE προκειμένου να προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα που ήταν η ταυτοποίηση της. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έγινε μια φορά για την κάθε διαδικασία.

### 1. Αποτελέσματα για την διαδικασία απομόνωσης της «Χαρυβδίνης» με τη διαδικασία των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων.

Έπειτα από την απομόνωσης της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» με τη διαδικασία των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων που αναφέρθηκε παραπάνω, η εν λόγω πρωτεΐνη φορτώθηκε σε gel ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (εικόνα 10) προκειμένου να μπορέσουμε μετά να την ταυτοποιήσουμε μέσω της ταυτοποίησης των πεπτιδίων με τη φασματομετρία μάζας MALDI TOF/TOF.

Μετά από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE που έγινε προκειμένου να λάβουμε την πρωτεΐνη με τη μορφή μπάντας στο gel της ηλεκτροφόρησης πήραμε την εικόνα 11 στην οποία φαίνονται τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διαδικασίας.



Εικόνα 10 Gel ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE από την διαδικασία των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων.

Στην εικόνα αυτή φαίνεται στο πρώτο πηγαδάκι πως έχουν φορτωθεί 7μl του marker (Unstained Protein marker, Broad Range 2-212 kDa) ενώ στο δεύτερο πηγαδάκι (2) έχει φορτωθεί δείγμα από την άλεση του φυτού (crude). Στα πηγαδάκια 3-6 έχουν φορτωθεί δείγματα από τις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με αυξανόμενη συγκέντρωση θειικού αμμωνίου. Πιο συγκεκριμένα στο πηγαδάκι (3) έχουμε συγκέντρωση 10% θειικό αμμώνιο, στο (4) συγκέντρωση 20% θειικό αμμώνιο, στο (5) συγκέντρωση 40% θειικό αμμώνιο και στο (6) συγκέντρωση 60% θειικό αμμώνιο.

Στην εικόνα 10 βλέπουμε επίσης, πως η πρωτεΐνη βρέθηκε στα δείγματα crude και στο δείγμα που περιείχε 10% κατά βάρος θειικό αμμώνιο, ενώ στα επόμενα δεν είχαμε καθόλου πρωτεΐνη. Πράγμα που ίσως να οφείλεται στο ότι η πρωτεΐνη καταβυθιζόταν παρουσία του θειικού αμμωνίου και απομακρυνόταν με το ίζημα.

Οι μπάντες που είναι κυκλωμένες στην εικόνα 10 υποδηλώνουν την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός μας για την παρούσα εργασία. Αυτές οι μπάντες, κόπηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί ανωτέρω ούτως ώστε να ετοιμαστούν τα δείγματα για να ταυτοποιηθούν μέσω της φασματομετρίας μάζας (MALDI TOF/TOF).

Τα αποτελέσματα από τη φασματομετρία μάζας έδειξαν ότι εν τέλει από τις δύο αυτές μπάντες η πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη» ταυτοποιήθηκε στη μπάντα από το πηγαδάκι (2) που ήταν το δείγμα από την άλεση του φυτού (crude). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 29462Da. Η ταυτοποίηση αυτή έγινε με σκορ 49 όπως υποδηλώνεται και από το ειδικό πρόγραμμα και μάλιστα ταυτοποιήθηκαν και δύο πεπτίδια που φαίνονται με κόκκινα γράμματα στην εικόνα 11.

## **MASCOT** Mascot Search Results

### Protein View

Match to: gi|114152136 Score: 49  
 RecName: Full=Ribosome-inactivating protein charybdin; AltName: Full=rRNA N-glycosidase [Drimia maritima]

Nominal mass (M<sub>r</sub>): 29462; Calculated pI value: 5.79  
 NCBI BLAST search of gi|114152136 against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Drimia maritima](#)  
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
[gi|110590853](#) from [Drimia maritima](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 12%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 SQCKAMTVKF IVELDIERLT GQTYDFIKN LRRSLATWYL HGVFVPLPLYN
51 QEADPRGFDL KLTFRGQVIT VIHRDDLVL RGIQMQGAGK WLELERPSTQ
101 TGHLEGSSEL LEFGPSYEEL AAAAQDILD ISYKNALQD AVSKLAVSTN
151 TRDRARSLIV VSQMFCEATR FVDIANHFAP NLESSEPVKL PQWMQNDLEK
201 NWRVRSFPHL KSNADPCYKF EPQTIYGKII KTADELLNLF GIVEQHPDTR
251 SPFCAAG
  
```

Show predicted peptides also

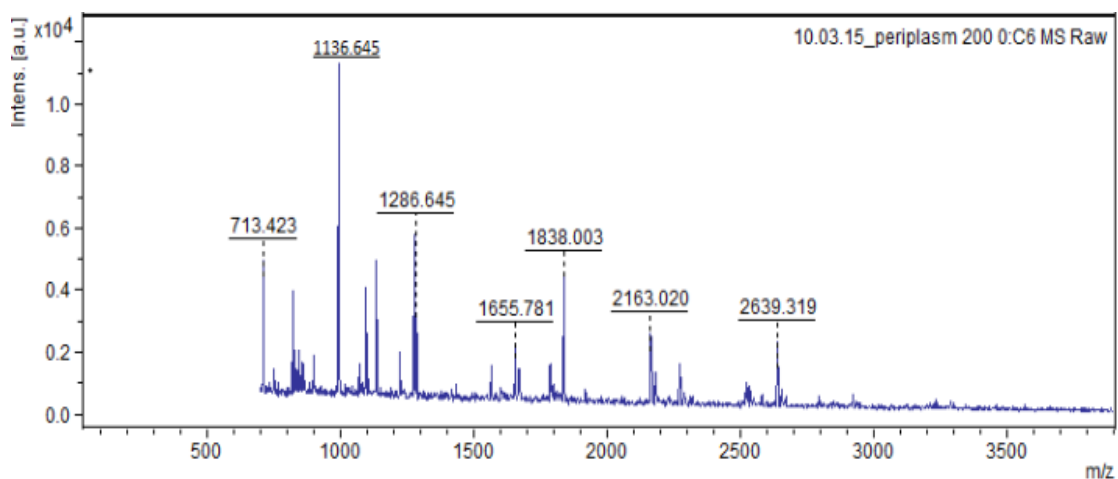
Sort Peptides By  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

| Start - End | Observed  | Mr(expt)  | Mr(calc)  | ppm | Miss | Sequence                                     |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----|------|--|
| 34 - 56     | 2639.3194 | 2638.3121 | 2638.3544 | -16 | 0    | R.SLATWYLHGVFVPLPLYNQEADPR.G (Ions score 34) |
| 73 - 81     | 1136.6447 | 1135.6375 | 1135.6462 | -8  | 1    | R.IHRDDLVL.R.G (Ions score 15)               |

Εικόνα 11 Ταυτοποίηση της πρωτεΐνης "Χαρυβδίνης" από το δείγμα crude.

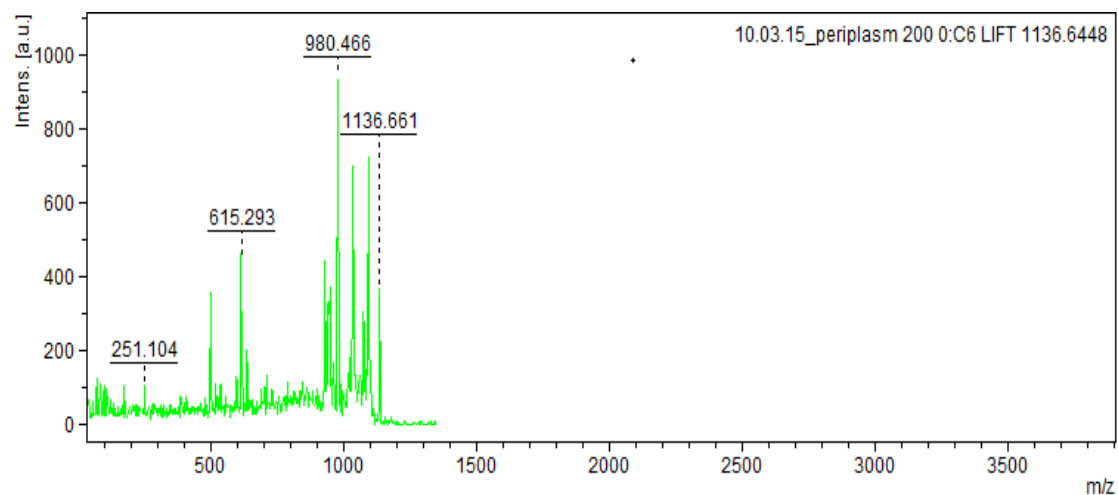
Στην εικόνα 11, επίσης φαίνεται μέσα σε πλαίσιο το ένα από τα δύο πεπτίδια που ταυτοποιήθηκαν από την πρωτεΐνη. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο είναι αυτό που περιέχει στη θέση 79 του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης το κατάλοιπο της Βαλίνης αντί του καταλοίπου της τυροσίνης.

Στην εικόνα 12, φαίνεται το φάσμα μάζας (MS) της πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε. Στην εικόνα αυτή βλέπουμε τα πεπτίδια στα οποία θραυσματοποιήθηκε η πρωτεΐνη τα οποία στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε επόμενη φασματομετρία μάζας για να ταυτοποιηθούν περαιτέρω. Τα πεπτίδια τα οποία προχώρησαν για MS/MS και ταυτοποιήθηκαν είναι αυτά με λόγο μάζας-προς-φορτίο ( $m/z$ ) 1136.645 και 2639.319.



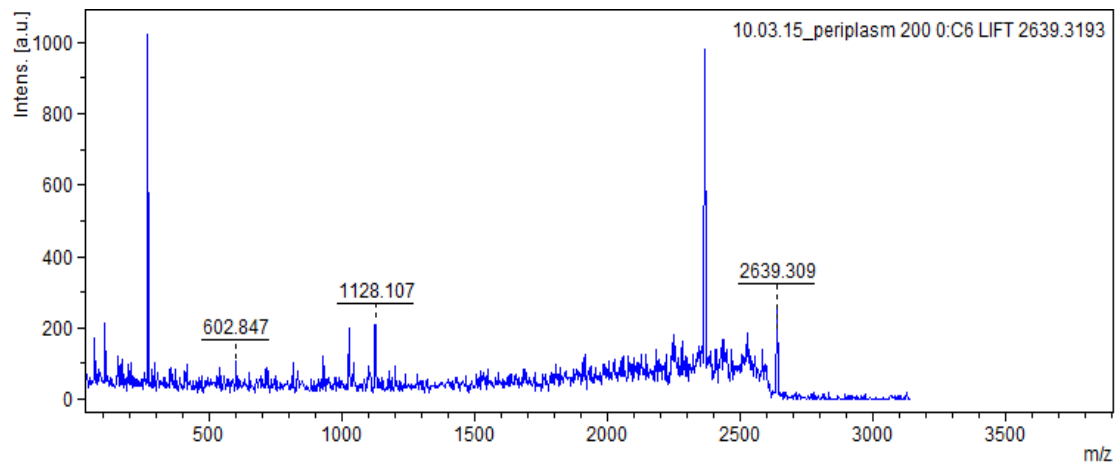
Εικόνα 12 Φάσμα μάζας MS της πρωτεΐνης

Στην επόμενη εικόνα (εικόνα 13) φαίνεται το φάσμα MS/MS για το πρώτο πεπτίδιο με λόγο  $m/z=1136.645$  που είναι αυτό που περιέχει και τη βαλίνη στη θέση 79 όπως έχει προαναφερθεί.

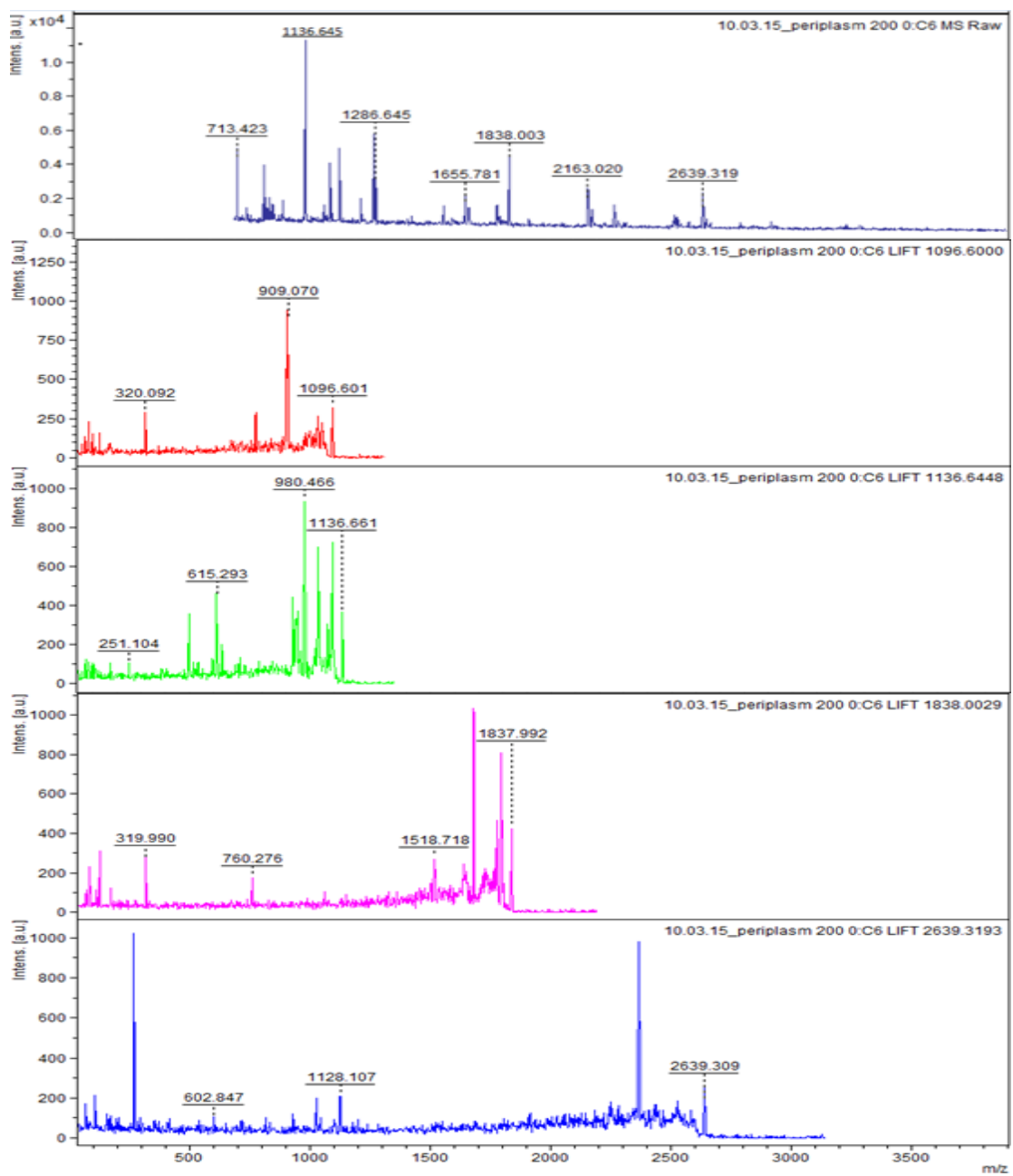


Εικόνα 13 Φάσμα μάζας MS/MS του πεπτιδίου με  $m/z=1136.645$

Στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 14) παρουσιάζεται το φάσμα μάζας MS του δεύτερου πεπτιδίου της πρωτεΐνης που ταυτοποιήθηκε με την διαδικασία αυτή και έχει λόγο  $m/z=2639.319$ .



Εικόνα 64 Φάσμα μάζας MS/MS του πεπτιδίου με  $m/z=2639.319$



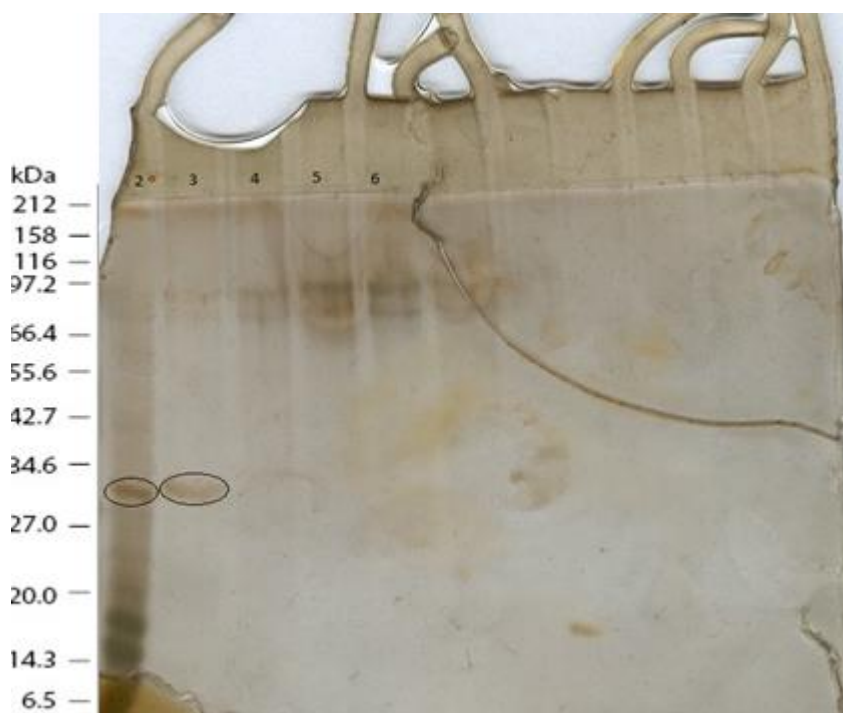
Εικόνα 75 Φάσμα μάζας MS της πρωτεΐνης και Φάσματα MS/MS των πεπτιδίων.

Στην παραπάνω εικόνα (εικόνα 15), φαίνονται συγκεντρωμένα το φάσμα μάζας MS της πρωτεΐνης μαζί με όλα τα φάσματα MS/MS των πεπτιδίων που προέκυψαν είτε αυτά ταυτοποιήθηκαν ή όχι.

## 2. Αποτελέσματα για την διαδικασία απομόνωσης της «Χαρυβδίνης» με τη διαδικασία των χρωματογραφικών κολώνων.

Έπειτα από την απομόνωση της πρωτεΐνης «Χαρυβδίνης» με τη διαδικασία των κολώνων χρωματογραφίας που αναφέρθηκε παραπάνω, η εν λόγω πρωτεΐνη φορτώθηκε σε gel ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE(εικόνα 16) προκειμένου να μπορέσουμε μετά να την ταυτοποιήσουμε μέσω της ταυτοποίησης των πεπτιδίων με τη φασματομετρία μάζας MALDI TOF/TOF.

Μετά από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE που έγινε προκειμένου να λάβουμε την πρωτεΐνη με τη μορφή μπάντας στο gel της ηλεκτροφόρησης, πήραμε την εικόνα 16 στην οποία φαίνονται τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διαδικασίας.



Εικόνα 16 Gel ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE από τη διαδικασία απομόνωσης της "Χαρυβδίνης" με τις χρωματογραφικές κολώνες. Έχει υποστεί χρώση Αργύρου διότι οι "μπάντες" ήταν αχνές.

Στην εικόνα αυτή (εικόνα 16) φαίνεται στο πρώτο πηγαδάκι (1) πως έχουν φορτωθεί 7μl του marker (Unstained Protein marker, Broad Range 2-212 kDa), ενώ στο δεύτερο πηγαδάκι (2) έχει φορτωθεί δείγμα από την άλεση του φυτού (crude). Στο πηγαδάκι 3 έχει φορτωθεί δείγμα από το κλάσμα που συγκεντρώθηκε από τη δεύτερη κολώνα χρωματογραφίας με 100mM NaCl και 50mM Hepes, ενώ στο πηγαδάκι 4 έχει φορτωθεί δείγμα από το ίδιο κλάσμα. Αντίστοιχα στα πηγαδάκια 5 και 6, έχουν φορτωθεί

δείγματα από το κλάσμα της δεύτερης κολώνας χρωματογραφίας με 300mM NaCl και 50mM Hepes.

Στην εικόνα 16, βλέπουμε πως η πρωτεΐνη βρέθηκε στα δείγματα crude και στο δείγμα που είχε εκλουστεί από τη δεύτερη κολώνα χρωματογραφίας (Q-sepharose). Το δείγμα αυτό εκλούστηκε από την κολώνα με το διάλυμα έκλουσης 2<sup>ης</sup> κολώνας (3): 100mM NaCl και 50mM Hepes, ενώ στα επόμενα δεν βρέθηκε καθόλου πρωτεΐνη. Πράγμα που ίσως να οφείλεται στο ότι η πρωτεΐνη βρισκόταν σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση παρότι είχε γίνει καταβύθιση με TCA10%.

Οι μπάντες που είναι κυκλωμένες στην εικόνα 16, υποδηλώνουν την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός μας για την παρούσα εργασία. Αυτές οι μπάντες, κόπηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί ανωτέρω ούτως ώστε να προετοιμαστούν τα δείγματα για να ταυτοποιηθούν μέσω της φασματομετρίας μάζας (MALDI TOF/TOF).

Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας τα οποία θα μας δείξουν αν η πρωτεΐνη που απομονώθηκε με την πειραματική διαδικασία των χρωματογραφικών κολώνων βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη.

## Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα των πειραματικών δεδομένων της παρούσας εργασίας, έδειξαν πως η πρωτεΐνη που εντοπίστηκε σε εκχυλίσματα του βολβού του συγκεκριμένου φυτού είναι όντως η πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη» όπως ταυτοποιήθηκε μέσω φασματομετρίας μάζας.

Πιο συγκεκριμένα, τα πειραματικά δεδομένα ταιριάζουν με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Και έτσι σύμφωνα με τα αποτελέσματα και τη βιβλιογραφία εξάγουμε το συμπέρασμα πως η πρωτεΐνη που μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος  $29462\text{Da} \approx 29\text{kDa}$  η οποία βρίσκεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες στο βολβό του φυτού *Charybdis maritima*.

Όπως έδειξαν και τα αποτελέσματα από τη φασματομετρία μάζας (MALDI TOF/TOF) η πρωτεΐνη της παρούσας εργασίας ταυτοποιήθηκε με την πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη» με σκορ 49 και όνομα «Ribosome-inactivating protein charybdin», σύμφωνα με το ειδικό λογισμικό. Επιπλέον, μέσω της φασματομετρίας μάζας ανηχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και δύο συγκεκριμένα πεπτίδια της πρωτεΐνης όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω.

Από τα δυο αυτά πεπτίδια, το ένα είναι το πεπτίδιο που περιέχει στη θέση 79 το κατάλοιπο της Βαλίνης. Αυτό το αποτέλεσμα βεβαιώνει την αρχική μας υπόθεση πως η υπό μελέτη πρωτεΐνη είναι η «Χαρυβδίνη», αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί η διαφορά της εν λόγω πρωτεΐνης από τις υπόλοιπες RIP είναι η ύπαρξη της Βαλίνης αντί της Τυροσίνης στο ενεργό κέντρο.

Όσον αφορά τις δύο πειραματικές μεθόδους στις οποίες στηριχθήκαμε για να πραγματοποιήσουμε το πειραματικό μέρος της εργασίας θα πρέπει να τονιστεί ότι αναμένεται η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης με τις κολώνες χρωματογραφίας να είναι περισσότερο αποτελεσματική αλλά και πιο ακριβής από ό,τι η μέθοδος με τις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις.

Και αυτό διότι στη μέθοδο με τις κολώνες χρωματογραφίας τα δείγματα που θα εξεταστούν τελικά είναι απαλλαγμένα από τυχόν προσμίξεις καθώς έχουν υποστεί τη διαδικασία «dialysis» αλλά και έχουν διέλθει μέσα από δυο κολώνες χρωματογραφίας, γεγονός που τα καθιστά ακόμα πιο καθαρά και απαλλαγμένα από προσμίξεις. Έτσι στα δείγματα αυτά περιέχεται μόνο η υπό μελέτη πρωτεΐνη αλλά σε χαμηλή συγκέντρωση.

Αντίθετα, στη διαδικασία με τις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις αν και τα δείγματα που μελετήθηκαν δεν είχαν μικρές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης που εξετάστηκε ενδεχομένως να περιείχαν και διάφορες προσμίξεις οι οποίες να μην είχαν καταβυθιστεί με τη βοήθεια του θειικού αμμωνίου που χρησιμοποιήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυτού. Ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θειικού αμμωνίου, όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παράλληλα με τις προσμίξεις που καταβυθίζονται και απομακρύνονται καταβυθίζεται και η ίδια η πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα να την χάνουμε μαζί με τα απόβλητα.

Αυτός πιθανότατα να είναι και ο λόγος που τα αποτελέσματα της ταυτοποιημένης πρωτεΐνης προήλθαν από το δείγμα από το άλεσμα του φυτού και όχι από τα υπόλοιπα δείγματα.

Από την άλλη μεριά πάλι, αυτό μας ενισχύει την αρχική υπόθεση πως μελετούσαμε την πρωτεΐνη «Χαρυβδίνη» καθώς όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως αυτή αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό του φυτού. Αυτός είναι και ο λόγος που καταφέραμε και

ταυτοποιήσαμε την πρωτεΐνη σε αυτό το δείγμα παρότι υπήρχαν και άλλες πρωτεΐνες ταυτόχρονα στο ίδιο δείγμα αλλά σε μικρότερη ποσότητα.

Παρόλα αυτά όμως θα έχουμε πληρέστερη άποψη με την περάτωση και της δεύτερης πειραματικής μεθόδου, γνωρίζοντας τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης μέσω της φασματομετρίας μάζας και για αυτή την μέθοδο. Τότε θα μπορούμε να συγκρίνουμε καλύτερα τις δυο μεθόδους απομόνωσης της πρωτεΐνης καθώς θα μπορούμε να εστιάσουμε στα αποτελέσματα και των δυο τεχνικών.



## Συμπεράσματα- Προοπτικές

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ταιριάζουν με τις προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στο ίδιο θέμα και δείχνουν πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη που μελετήθηκε βρίσκεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες στο βολβό του φυτού *Charybdis maritima*.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα των πειραματικών διεργασιών σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας έδειξαν πως η πρωτεΐνη που μελετήθηκε είναι μια πρωτεΐνη βάρους 29462Da η οποία έχει μεγάλη ομολογία με τις πρωτεΐνες της κατηγορίας RIP. Η μόνη διαφορά της με αυτές της πρωτεΐνες είναι στη θέση 79 του ενεργού κέντρου που αντί για κατάλοιπο τυροσίνης έχει κατάλοιπο Βαλίνης.

Από τα αποτελέσματα αυτά δημιουργείται η υποψία πως ίσως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη να μη δρα όπως οι υπόλοιπες RIP, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, αλλά να κατέχει αποθηκευτικό ρόλο όπως στην περίπτωση της πρωτεΐνης Cinnamomin για παράδειγμα.

Για αυτό το λόγο για μελλοντική έρευνα, θα ήταν ενδιαφέρον να προσδιορισθεί ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης αυτής στον οργανισμό *Charybdis maritima*. Ούτως ώστε να γνωρίζουμε πώς ακριβώς λειτουργεί και έτσι ίσως γνωρίσουμε και επιπλέον πράγματα ακόμα πιο ενδιαφέροντα.

Τέλος, μια ακόμα πιο ενδιαφέρουσα προσπάθεια για μελλοντική έρευνα θα ήταν η προσπάθεια για κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση για την αντικατάσταση του καταλοίπου της βαλίνης από τυροσίνη στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και στη συνέχεια να μελετηθούν οι επιδράσεις αυτής της αλλαγής στην ενεργότητα και τη δομή της πρωτεΐνης. Έτσι θα είναι εύκολο να κατανοηθεί ο ρόλος της «Χαρυβδίνης» αλλά και ο λόγος που παρουσιάζει αυτή τη σοβαρή διαφορά με της υπόλοιπες RIP πρωτεΐνες στο ενεργό της κέντρο.

## Βιβλιογραφία

- Barbieri L, Valbonesi P, Govoni M, Pession A, Stirpe F (2000). *Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on various forms of mammalian DNA*. Biochem Biophys Acta, 1480, 258-266.
- Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Castiglioni P, Stirpe F (1994). *Unexpected activity of saporins*. Nature, 372, 624.
- Barbieri L, Valbonesi P, Bondioli M, Alvarez ML, Dal Monte P, Landini MP, Stirpe F (2001). *Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins*. FEBS Lett, 505, 196-197.
- Bentley Rand Trimen H (1880). Med Plants, 281.
- Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P.G. Righetti, *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis, 2004. 25(9): p. 1327-1333.
- Chevallier A (1996). *The Encyclopedia of Medicinal Plants* Dorling Kindersley. London.
- Dueneva M and Gorschen E (1999). *RIP-JIP60 alters conformation of ribosomes in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 258, 572-573.
- Endo Y and Tsurugi K (1988). *The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA*. J Biol Chem, 263, 8735-8739.
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki K, Tsurugi K (1987). *The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins*. J Biol Chem, 262, 5908-5912.
- Girbes T, de Torre C, Iglesias R, Ferreras JM, Mendez E (1996). *RIP for viruses*. Nature, 379, 777-778.
- Grieve (1984). *A Modern Herbal*. Penguin.
- Hartley MR, Chaddock JA, Bonness MS (1996). *The structure and function of ribosome-inactivating proteins*. Trends Plant Sci, 1, 254-260.
- Iizuka M, Warashina T, Noro T (2001). *Bufadienolides and a New Lignan from the Bulbs of Urginea maritima*. Chem Pharm Bull, 49, (3), 282-286.
- Lord JM, Roberts LM, Robertus JD (1994). *Ricin: structure, mode of action, and some current applications*. FASEB J, 8, 201-208.
- Montfort W, Villafranca JE, Monzingo AF, Ernst SR, Katzin B, Rutember E, Xuong NH, Hamlin R, Robertus JD (1987). J Biol Chem, 262 (11), 5398-5403.
- Nicolas E, Beggs JM, Haltiwanger BM, Taraschi TF (1998). *A new class of DNA glycosylase/apurinic/apurimidinic lyases that act on specific adenines in single-stranded DNA*. J Biol Chem, 273, 17216-17220.
- Nicolas E, Beggs JM, Taraschi TF (2000). *Gelonin is an unusual DNA glycosylase that removes adenine from single-stranded DNA, normal base pairs and mismatches*. J Biol Chem, 275, 31399-31406.
- Pfosser MF and Speta F (2004). *From Scilla to Charybdis – is our voyage safer now?* Plant Syst Evol, 246, 245-263.
- Praznik W and Spies T (1993). *Fructo-oligosaccharides from Urginea maritima*. Carbohydr Res, 243, 91-97.
- Quezel P and Santa S (1963). *New flora of Algeria and of southernmost desert areas*. ED. CNRS.
- Schagger, H. and G. Vonjagow. *Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-Kda to 100-Kda*. Analytical Biochemistry, 1987. 166(2): p. 368-379

- Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen, and M. Mann. *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nature Protocols, 006. 1(6): p. 2856-2860.
- Stirpe F (2004). *Ribosome-inactivating proteins*. *Toxicon*, 44, 371-383.
- Stirpe F, Bailey S, Miller SP, Bodley JW (1988). *Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants*. *Nucleic Acids Res*, 16, 1349-1357.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *Veterinary Medicines Evaluation Unit, Urginea maritima Summary Report*, EMEA/MRL/603/99-FINAL.
- Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications Justin T. McCue
- Touloupakis E, Gessmann R, Kavelaki K, Christofakis E, Petratos K, Ghanotakis DF (2006). *Isolation, characterization, sequencing and crystal structure of charybdin, a type 1 ribosome-inactivating protein from Charybdis maritima agg.* *FEBS Journal*, 273, 2684-2692.
- Van Damme EJM, Hao Q, Barre A, Vandenbussche F, Desmyter S, Rouge P, Peumans WJ (2001). *Ribosome inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes*. *Crit Rev Plant Sci*, 20, 395-465.
- Vega FA, Garcia-Jalon I, Fernandez M, Renedo J (1972). *Anthocyanins of red squill, Urginea maritima*. *Phytochemistry*, 11, 2896.
- Verbiscar AJ, Patel J, Banigan TF, Schatz RA (1986). *Scilliroside and Other Scilla Compounds in Red Squill*. *J Agric. Food Chem.* 34, 973-979.
- Walsh TA, Morgan AE Hey TD (1991). *Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment*. *J Biol Chem*, 266, 23422-23427.
- Williams, A., K. Taylor, K. Dambuleff, and R.M. Kennedy, *Packing high-performance sepharose ion-exchange media in large-scale, 80-and 120-cm-diameter columns: Robust protocol*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2000. 219: p. U191-U191