

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Κατιούσα Διεργασία Απαμινάσης Αδενοσίνης Από Αίμα Ανθρώπου

Μεταπτυχιακή Εργασία
ΦΩΤΕΙΝΗ Κ. ΜΠΑΡΤΖΩΚΑ

Επιβλέπων Καθηγητής : Καθηγητής Ιωάννης Κλώνης

Φεβρουάριος 2016
ΑΘΗΝΑ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Κατιούσα Διεργασία Απαμινάσης Αδενοσίνης Από Αίμα Ανθρώπου

Μεταπτυχιακή Εργασία
ΦΩΤΕΙΝΗ Κ. ΜΠΑΡΤΖΩΚΑ

Επιβλέπων Καθηγητής : Καθηγητής Ιωάννης Κλώνης

Φεβρουάριος 2016
ΑΘΗΝΑ

Κατιούσα Διεργασία Απαμινάσης Αδενοσίνης Από Αίμα Ανθρώπου

Μεταπτυχιακή Εργασία
ΦΩΤΕΙΝΗ Κ. ΜΠΑΡΤΖΩΚΑ

Επιβλέπων Καθηγητής : Καθηγητής Ιωάννης Κλώνης

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Κλώνης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητής

Περίληψη

Η απαμινάση αδενοσίνης (adenosine deaminase, ADA) είναι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στον μεταβολισμό των πουρινών. Ειδικότερα, καταλύει την μη αντιστρεπτή απαμίνωση αδενοσινουκλεοσιδίων (αδενοσίνης και 2'-δεοξαδενοσίνης) σε ινοσινο-νουκλεοσίδια (ινοσίνη και 2'-δεοξυ-ινοσίνη). Η κληρονομική ανεπάρκεια της ADA ενοχοποιείται για την ονομαζόμενη 'σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια' (ADA-SCID) που οφείλεται σε δυσλειτουργικά T- και B-λεμφοκύτταρα, και αδυναμία ανάκαμψης του οργανισμού ακόμα και από ήπιας μορφής ασθένειες. Η κύρια θεραπευτική μέθοδος προβλέπει τη χορήγηση ADA μόσχου, τροποποιημένης επιφανειακά με πολυαιθυλενογλυκόλη (Pegademase). Ελλείπει εγκεκριμένου κλωνοποιημένου θεραπευτικού προϊόντος, η βελτίωση της κατιούσας διεργασίας ADA από αίμα ανθρώπου εξακολουθεί να παρουσιάζει πρακτικό ενδιαφέρον. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στον μερικό καθαρισμό απαμινάσης αδενοσίνης 1 (ADA1) από ερυθροκύτταρα ανθρώπου. Προς τούτο, τα ερυθροκύτταρα απομονώνονται από αίμα ανθρώπου, λύνονται σε νερό και φυγοκεντρώνονται. Το υπερκείμενο απαλλάσσεται από την αιμοσφαιρίνη μετά από προσρόφηση της τελευταίας σε κατιοντοανταλλάκτη Sephadex C-50, το δε λαμβανόμενο εκχύλισμα (διατηρείται στους -20°C για περίπου 3 εβδομάδες, χωρίς απώλεια δραστηριότητας ADA) καθαρίζεται μερικώς σε στήλη ανιοντοανταλλάκτη Sepharose DE-50 μετά από έκλουση με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl σε ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου-HCl, 30 mM, pH 6. Η εν λόγω στήλη ιοντοανταλλάκτη παρουσιάζει δυναμική χωρητικότητα 0,52 units ADA ανά mL προσροφητή. Τα κλάσματα που συλλέγονται αναλύονται για δραστηριότητα ADA (units) και περιεκτικότητα σε συνολική πρωτεΐνη (A₂₈₀). Εκείνα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη δραστηριότητα (10 mM έως 50 mM NaCl) αναλύονται με τη μέθοδο του Bradford για την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη (ειδική δραστηριότητα 0.27 units/mg και καθαρισμός 5,6-φορές). Το λαμβανόμενο μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα με ADA, αποτελεί το 'αρχικό υλικό' για μελλοντικές μελέτες πλήρους καθαρισμού του ενζύμου, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας βασισμένη σε νέους λογικά σχεδιασμένους συνθετικούς δεσμευτές.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και μελέτη που περιελάμβανε την κλωνοποίηση του γονιδίου της hADA1 σε προκαρυωτικό φορέα. Για την κλωνοποίηση του γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθετικοί κλώνοι του εμπορίου (κατόπιν παραγγελίας), ένας που ήταν "untagged" και ένας που ήταν "tagged" με His₆. Και στις δύο περιπτώσεις το γονίδιο ενισχύθηκε μέσω PCR και κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο χρησιμοποιώντας ομόλογο ανασυνδυασμό. Διαφορετικά στελέχη έκφρασης *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν μέσω ανάλυσης SDS-PAGE. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η σύγκριση των αποτελεσμάτων καθαρισμού ADA που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας αίμα ανθρώπου και προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης.

λέξεις-κλειδιά: απαμινάση αδενοσίνης, ADA1, ερυθροκύτταρα, κατιούσα επεξεργασία

Downstream processing of adenosine deaminase from human blood

Abstract

Adenosine deaminase is an enzyme of the purine metabolism which catalyzes the irreversible deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine, respectively. Inherited ADA deficiency causes severe combined immunodeficiency disease (ADA-SCID) which derives from dysfunctional T- and B-cells and leads to the inability of the organism to thrive even in cases of mild diseases. The main course of treatment consists of enzyme replacement using polyetheneglycol-modified bovine ADA (Pegademase). A potential method of therapy could be the isolation of the human enzyme itself from human blood, which can be found in great quantities. This work focuses on the partial purification of adenosine deaminase, isoenzyme 1 (ADA1) from human red blood cells. Briefly, the erythrocytes from human blood of healthy donors are harvested, disintegrated in cold water and the lysate centrifuged. The supernatant is batch-processed on a cation-exchanger Sephadex C-50 to remove the hemoglobin. The extract (which remains stable at -20°C for approximately 3 weeks without any loss of activity) is then partially purified on an anion-exchanger Sepharose DE-50 column using increasing salt concentrations in 30mM imidazole-HCl, pH 6. The fractions collected are analyzed for ADA activity (units) and total protein content (A_{280}), and those with peak activity (from 10 mM to 50 mM NaCl) are further analyzed using the Bradford method in order to determine their protein concentration (0.27 units/mg and 5.6-purification fold). The partially purified extract (i.e. starting material) should be suitable for future affinity chromatography studies based on novel synthetic materials.

At the same time, a sub-project was implemented which included the cloning of hADA1 in a prokaryotic system. A codon optimized gene of hADA1 was ordered. There were two clones, one tagged and one untagged. The gene, in both cases, was amplified through PCR and cloned in a plasmid using homologous recombination. Different *E. coli* expression strains were tested followed by SDS-PAGE analysis. This sub-project concerns the purification of hADA1 from recombinant bacterial cells and, if promising results are obtained, will be used to assess the enzyme purification processes, starting from human blood and a prokaryotic system.

keywords: adenosine deaminase, ADA1, erythrocytes, downstream processing

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας στις 21/10/2015, κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η Τριμελής Συμβουλευτική/Εξεταστική Επιτροπή της μελέτης.

Περιεχόμενα

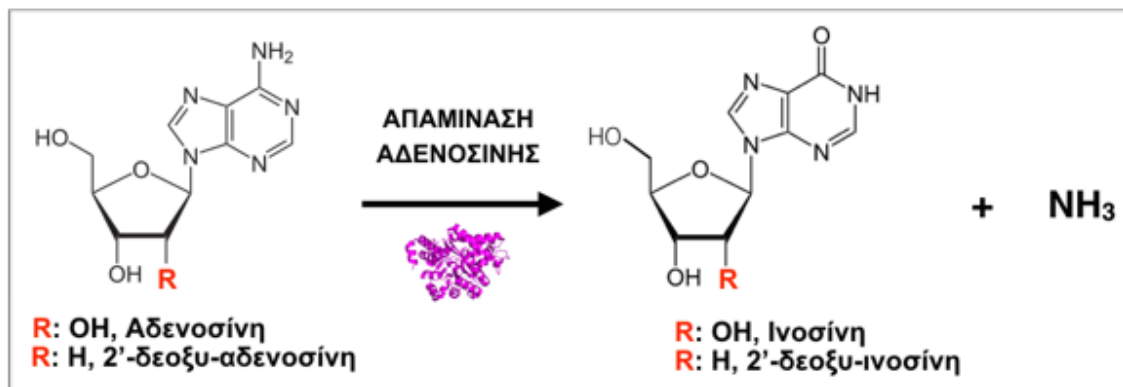
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Απαμινάση αδενοσίνης και φυσιολογικός της ρόλος στο κύτταρο.....	10
1.2. Ισοένζυμα της απαμινάσης αδενοσίνης.....	11
1.3. Δομή της απαμινάσης αδενοσίνης 1 ανθρώπου.....	14
1.4. Καταλυτικός μηχανισμός της απαμινάσης αδενοσίνης.....	16
1.5. Ο ρόλος της αδενοσίνης και η δράση της ως υπόστρωμα της ADA.....	17
1.6. Έλλειψη απαμινάσης αδενοσίνης.....	19
1.7. Κατιούσα διεργασία ενζύμων.....	20
1.7.α. Στάδια κατιούσας διεργασίας.....	20
1.7.β. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	21
1.7.γ. Κατιούσα διεργασία απαμινάσης αδενοσίνης.....	22
1.8. Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	23
2. Υλικά.....	25
2.1. Υλικά.....	26
2.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	27
3. Μέθοδοι.....	28
3.1. Αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης από τον ορό αίματος με εφαρμογή προσροφητή κατιοντοανταλλαγής CM-Sephadex C-50.....	29
3.1.α. Προεπεξεργασία του αίματος: λύση των ερυθροκυττάρων και αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης από τον ορό.....	29
3.1.β. Προσδιορισμός της ποσότητας CM-Sephadex C-50 ανά όγκο ορού αίματος για αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης.....	30
3.1.γ. Αναγέννηση του προσροφητή κατιοντοανταλλαγής CM-Sephadex C-50.....	30

3.2. Μερικός καθαρισμός ADA1 με εφαρμογή χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής σε DEAE-Sepharose CL-6B.....	31
3.2.α. Διαδικασία μερικού καθαρισμού ADA1.....	31
3.2.β. Αναγέννηση της στήλης χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής DEAE-Sepharose CL-6B.....	31
3.3. Φασματοφωτομετρική δοκιμή δραστηκότητας απαμινάσης αδενοσίνης (ADA) κατά SIG-MA.....	32
3.3.α. Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηκότητας απαμινάσης αδενοσίνης.....	33
3.4. Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Bradford.....	34
3.5. Συμπύκνωση πρωτεϊνών.....	34
3.5.α. Κατακρήμιση πρωτεϊνών με TCA-DOC.....	34
3.5.β. Συμπύκνωση διαλύματος πρωτεϊνών σε ‘στήλες συμπύκνωσης’.....	35
4. Αποτελέσματα.....	36
4.1. Καθαρισμός αίματος από αιμοσφαιρίνη με εφαρμογή προσροφητή κατιοντοανταλλαγής CM-Sephadex C-50.....	37
4.2. Μελέτη της σταθερότητας της ADA στο ενζυμικό εκχύλισμα στους -20°C.....	39
4.3. Μερικός καθαρισμός ADA1 με εφαρμογή χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής σε DEAE-Sepharose CL-6B.....	40
4.4. Χωρητικότητα του προσροφητή DEAE-Sepharose CL-6B για το ένζυμο ADA.....	42
5. Συζήτηση.....	45
5.1. Μερικός καθαρισμός της απαμινάσης αδενοσίνης 1.....	46
5.2. Ετερόλογη έκφραση της απαμινάσης αδενοσίνης 1 (ADA1).....	48
5.3. Συγκριτική μελέτη της απαμινάσης αδενοσίνης 1 με την απαμινάση αδενοσίνης 2.....	49
6. Παράρτημα.....	50
Βιβλιογραφία.....	58

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Απαμινάση αδενοσίνης και φυσιολογικός της ρόλος στο κύτταρο

Η απαμινάση αδενοσίνης (Adenosine deaminase; ADA, EC 3.5.4.4) αποτελεί σημαντικό ένζυμο του μεταβολισμού των πουρινών (Cristalli *et al.* 2001). Καταλύει την απαμίνωση της αδενοσίνης και της 2'-δεοξυ-αδενοσίνης σε ινοσίνη και 2'-δεοξυ-ινοσίνη. (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Αντίδραση που καταλύεται από την απαμινάση αδενοσίνης.

Η ADA παρουσιάζει ευρεία φυλογενετική κατανομή και απαντάται τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, με μεγάλη αμινοξική ομολογία υποδηλώνοντας την αναγκαιότητα του ενζύμου στον μεταβολισμό πουρινών και ειδικότερα της αδενοσίνης. Το ένζυμο απαντά σε φυτά, βακτήρια (Lupidi *et al.* 1992), σπονδυλωτά (Aikawa *et al.* 1977), ασπόνδυλα (Ma *et al.* 1968) και θηλαστικά (Brady *et al.* 1965) συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (Daddona 1981). Η ADA έχει ανιχνευθεί στους περισσότερους ιστούς των θηλαστικών και πειραματικά δεδομένα έχουν αποδείξει ότι βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο εξωτερικό του κυττάρου (ecto-enzyme) κυρίως σε αιματοποιητικά κύτταρα (Franco *et al.* 1998 και Aran *et al.* 1991). Ειδικότερα, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η ADA προσδένεται στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων μέσω του παράγοντα ενεργοποίησης CD26 ο οποίος είναι γνωστός και ως ADA-πρωτεΐνη πρόσδεσης (Vonbonin *et al.* 1998). Ο ρόλος του συμπλόκου ADA-CD26 δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός, ωστόσο γνωρίζουμε ότι το CD26 είναι πρωτεολυτικό ένζυμο με μια ευρεία ιστολογική κατανομή. Ειδικότερα, το CD26 αποτελεί

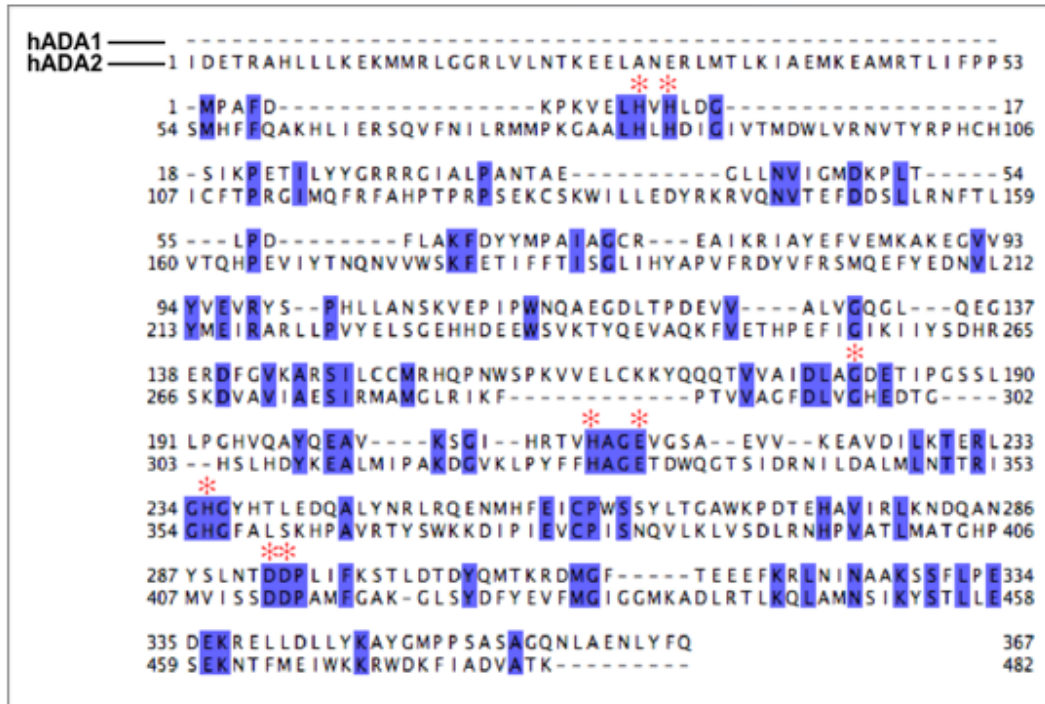
αντιγόνο ενεργοποίησης T λεμφοκυττάρων, το οποίο μπορεί να επιδράσει και να καθορίσει τον πολλαπλασιασμό τους.

Επιπλέον του ρόλου της να βιομετατρέπει ενδογενείς ποσότητες αδενοσίνης, η εξωκυττάρια ADA φαίνεται να εμπλέκεται και σε επιπρόσθετες κυτταρικές λειτουργίες και μηχανισμούς, λόγου χάριν, στην επαγωγή απελευθέρωσης αμινοξέων από το κύτταρο (Catania *et al.* 1991), ενώ πρόσφατα έχουν αποδειχθεί, από συγκεκριμένες ερευνητικές ομάδες (Ciruela *et al.* 1996), αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ADA και υποδοχέων αδενοσίνης (A₁ adenosine receptors, A₁R). Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η ADA διαδραματίζει πολλούς καθοριστικούς ρόλους για την εξασφάλιση της κυτταρικής ευρυθμίας καθώς εμπλέκεται σε πληθώρα λειτουργιών και μηχανισμών.

2. Ισοένζυμα της απαμινάσης αδενοσίνης

Το ένζυμο απαντά ως δύο ισοένζυμα, την απαμινάση αδενοσίνης 1 (ADA1) και απαμινάση αδενοσίνης 2 (ADA2). Η ADA1 έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο συγκριτικά με την ADA2, η ανθρώπινη δομή της οποίας έχει προσδιοριστεί πρόσφατα από τους Zavialov *et al.* (2010). Αντίθετα με την ADA1 η οποία έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί και από άλλους οργανισμούς, για την ADA2 δεν υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα, κυρίως όσον αφορά στα βιοχημικά και βιοφυσικά χαρακτηριστικά, όπως επίσης και τη συμμετοχή της σε κυτταρικές λειτουργίες και μηχανισμούς. Η ADA2 ανήκει σε μια νέα οικογένεια πρωτεϊνών, σε αυτή των αναπτυξιακών παραγόντων απαμινάσης αδενοσίνης (adenosine deaminase growth factors, ADGFs) (Zurovec *et al.* 2002). Η δομή της ανθρώπινης ADA2 προσδιορίστηκε πριν περίπου μια πενταετία με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Οι συνθήκες κρυστάλλωσης είχαν ως αποτέλεσμα το ένζυμο να κρυσταλλώσει ως ένα ομοδιμερές, σε αντίθεση με την ADA1 η κυρίαρχη δομή της οποίας είναι μονομερής (Ugochukwu *et al.* 2009). Τα δύο ένζυμα ανθρώπου, αν και χαρακτηρίζονται από χαμηλό ποσοστό αμινοξικής ομολογίας (~ 30%) (Σχήμα 2), διαθέτουν τρισδιάστατες δομές αρκετά όμοιες (Σχήμα 3). Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι τα

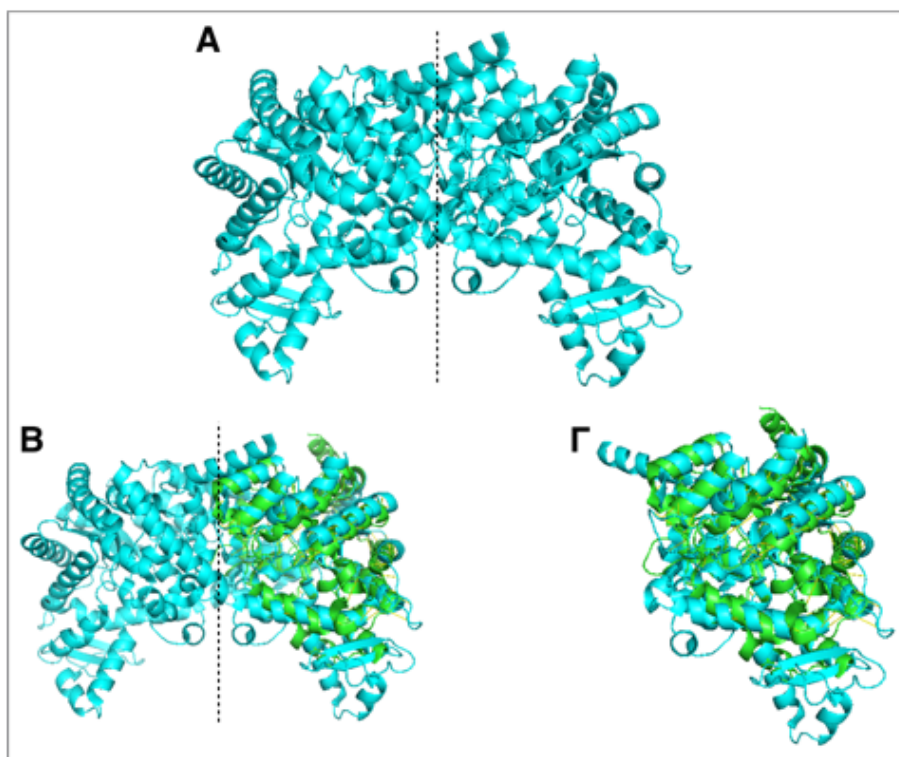
αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συμμετέχουν στη πρόσδεση του υποστρώματος και στην κατάλυση, είναι ίδια και στα δύο ένζυμα (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Σύγκριση των δύο αμινοξικών αλληλουχιών της απαμινάσης αδενοσίνης από άνθρωπο, της hADA1 (Homo sapiens, Uniprot P00813) και hADA2 (Homo sapiens, Uniprot Q9NZK5). Με κόκκινο αστερίσκο σημειώνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα υπεύθυνα για την πρόσδεση του υποστρώματος και την κατάλυση. Η σύγκριση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα CLUSTALW Omega και η τελική εικόνα διαμορφώθηκε με τα προγράμματα JalView και Keynote.

Η οικογένεια πρωτεϊνών ADFG/ADA2, στην οποία ανήκει και η hADA2, μελετήθηκε και αναλύθηκε αρχικά ως πρωτεϊνικοί παράγοντες ανάπτυξης στα έντομα, και σε μεταγενέστερο στάδιο αποδείχθηκε ότι διαθέτουν και καταλυτική δράση απαμινάσης αδενοσίνης (Homma *et al.* 2001). Περαιτέρω πειράματα που επικεντρώθηκαν σε διαγραφή του γονιδίου από τον οργανισμό *Drosophila* έδειξαν ότι η απουσία λειτουργικής πρωτεΐνης είχε ως αποτέλεσμα την υποανάπτυξη του οργανισμού καθώς και την επαγωγή δημιουργίας μελανοκυτταρικών όγκων (Zavialov *et al.* 2010). Η hADA2 αποτελεί ένα εξωκυττάριο ένζυμο, το οποίο μεταφέρεται μετα-μεταφραστικά

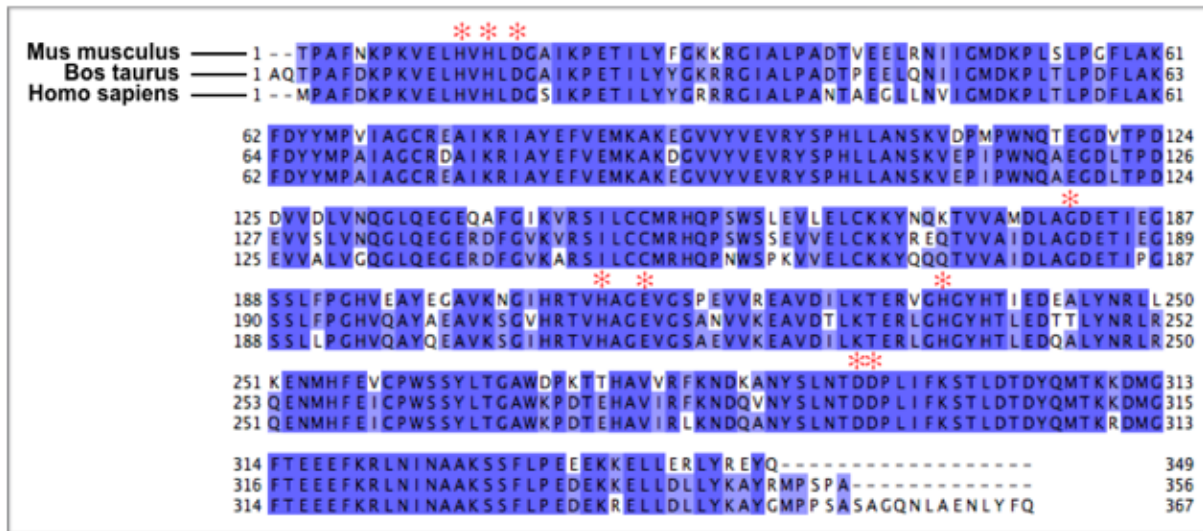
εξωτερικά του κυττάρου με τη βοήθεια ενός πεπτιδίου οδηγού στο N-τελικό άκρο του ενζύμου. Παρά το γεγονός ότι καταλυτική δραση της hADA2 έχει ταυτοποιηθεί σε πλάσμα αίματος ανθρώπου, ο κυρίαρχος ρόλος της φαίνεται να είναι ρυθμιστικός και λειτουργικός, καθώς επάγει και προωθεί τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων κυττάρων ως και των CD4⁺ T κυττάρων. Αντίθετα, ο ρόλος της hADA1 είναι περισσότερο καταλυτικός και είναι επιφορτισμένη με την ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων αδενοσίνης, η οποία μπορεί να καταστεί τοξική για τα λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, τα δύο ισοένζυμα χαρακτηρίζονται από διαφορετικές βιοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες: η hADA1 παρουσιάζει μια υψηλή συγγένεια για την αδενοσίνη με $K_m \sim 20 \mu\text{M}$ και $k_{cat} \sim 200 \text{ s}^{-1}$ ενώ η hADA2 έχει 100 φορές χαμηλότερη συγγένεια για το υπόστρωμα με $K_m \sim 2 \text{ mM}$ και παρόμοια k_{cat} με την hADA1 (Zavialov *et al.* 2010).



Σχήμα 3. Τρισδιάστατες δομές των hADA1 και hADA2. **A.** Ομοδιμερές της hADA2. Η μαύρη κατακόρυφη διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνει την διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο μονομερών. **B.** Αλληλοεπικαλυπτόμενες δομές της hADA1 και hADA2. Με κυανό χρώμα φαίνεται το ομοδιμερές της hADA2 και με πράσινο χρώμα φαίνεται η δομή του μονομερούς της hADA1. **Γ.** Ότι και στο B, με τη διαφορά ότι φαίνεται το μονομερές της hADA2 (κυανό χρώμα). Η γραφική απεικόνιση των δομών έγινε με το πρόγραμμα PyMol 1.7.4.5. και η τελική προετοιμασία της εικόνας με το πρόγραμμα Keynote.

3. Δομή της απαμινάσης αδενοσίνης 1 ανθρώπου

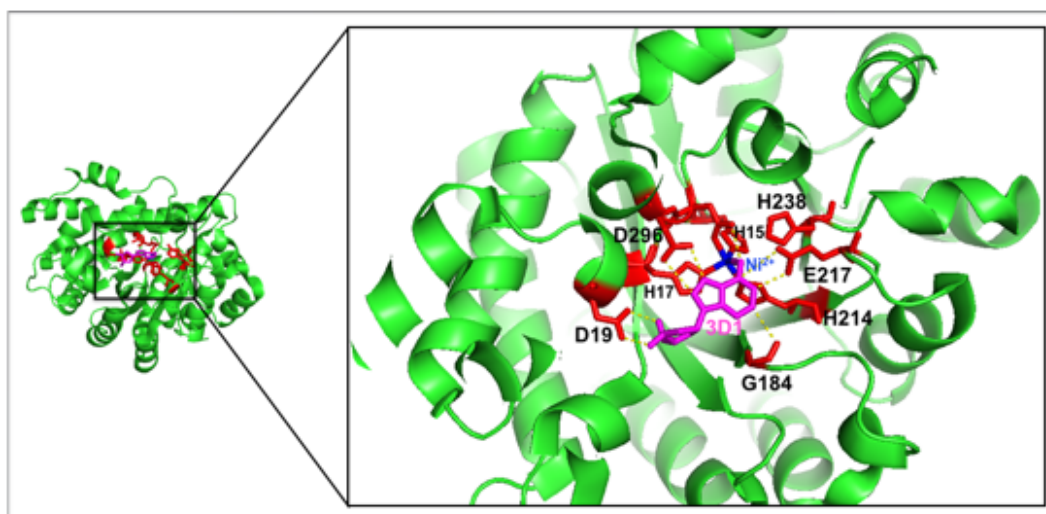
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε αποκλειστικά στην ADA 1 ανθρώπου. Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει μελετηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες και τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα έχουν επιτρέψει μια βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού κατάλυσης, όπως και των λειτουργικών ρόλων μέσα στο κύτταρο. Στους ανώτερους ευκαρυώτες η αμινοξική αλληλουχία της ADA 1 είναι πολύ συντηρημένη. Αυτό φαίνεται και στο **Σχήμα 4** παρακάτω όπου συγκρίνονται ενδεικτικά τρεις αμινοξικές αλληλουχίες, αυτή του ανθρώπου (*Homo sapiens*), του ποντικού (*Mus musculus*) και του ταύρου (*Bos taurus*). Από τη σύγκριση γίνεται άμεσα αντιληπτό το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες αλληλουχίες χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλο ποσοστό ομολογίας, ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία συνθέτουν το ενεργό κέντρο των ενζύμων (υποσημειώνονται με κόκκινο αστερίσκο) είναι απολύτως συντηρημένα.



Σχήμα 4. Σύγκριση τριών αμινοξικών αλληλουχιών της απαμινάσης αδενοσίνης I από άνθρωπο (*Homo sapiens*, Uniprot P00813), ταύρο (*Bos taurus*, Uniprot P56658) και ποντικό (*Mus musculus*, Uniprot P03958). Με κόκκινο αστερίσκο σημειώνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα υπεύθυνα για τη πρόσδεση του υποστρώματος και την κατάλυση. Η σύγκριση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα CLUSTALW Omega και η τελική εικόνα διαμορφώθηκε με τα προγράμματα JalView και Keynote.

Η απαμινάση αδενοσίνης αποτελείται από μία μονή αλυσίδα 352 αμινοξικών καταλοίπων και ένα ιόν ψευδαργύρου που αναδιπλώνεται σε δομή που χαρακτηρίζεται από (α/β) μοτίβα. Το πολικό ενεργό κέντρο εντοπίζεται στο βάθος μιας υδρόφοβης περιοχής και είναι προστατευμένο, διαθέτοντας όμως διάφορα κατάλοιπα ικανά για την πρόσδεση με το υπόστρωμα μέσω δεσμών υδρογόνου. Ορισμένα από τα αμινοξικά κατάλοιπα θεωρούνται κρίσιμα για τη δέσμευση και τον προσανατολισμό των υποστρωμάτων της ADA1 στην κατάλληλη θέση που απαιτείται για την πραγματοποίηση της καταλυτικής αντίδρασης (Gleeson *et al.* 2003).

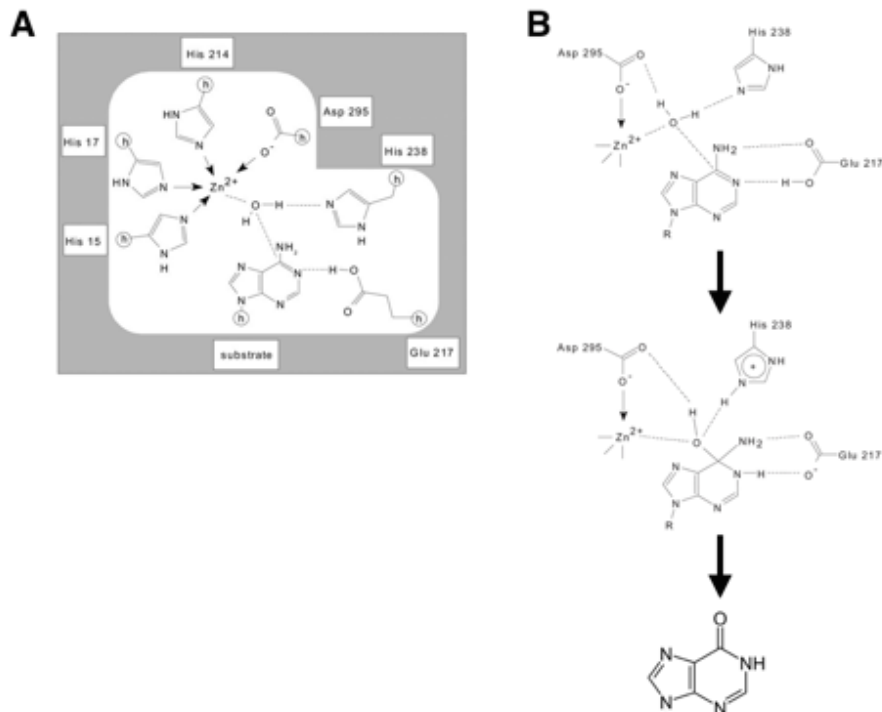
Η ενεργός περιοχή της πρωτεΐνης περιέχει ένα ιόν ψευδαργύρου, το οποίο, σύμφωνα με κρυσταλλογραφική ανάλυση, περιβάλλεται από 4 αμινοξικά κατάλοιπα: His15, His17, His214 και Asp295 (Σχήμα 5). Το μέταλλο πολώνει ένα μόριο νερού που μοιράζεται το κατάλοιπο Asp295, δημιουργώντας ένα υδροξυλιωμένο ιόν που εμπλέκεται στην απαμίνωση της αδενοσίνης. Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα εν λόγω αμινοξικά κατάλοιπα καθιστούν το ένζυμο ανενεργό, γεγονός που υποδεικνύει την σπουδαιότητα της παρουσίας του ψευδαργύρου (Bhau-mik *et al.* 1993).



Σχήμα 5. Τρισδιάστατη δομή της ADA1 και απεικόνιση της δομής του ενεργού κέντρου. Η κρυστάλλωση του ενζύμου εδώ πραγματοποιήθηκε με ένα ιόν νικελίου (Ugochukwu *et al.* 2009). Η γραφική απεικόνιση των δομών έγινε με το πρόγραμμα PyMol 1.7.4.5. και η τελική προετοιμασία της εικόνας με το πρόγραμμα Keynote.

4. Καταλυτικός μηχανισμός της απαμινάσης αδενοσίνης

Η απαμίνωση της αδενοσίνης πραγματοποιείται ως S_N2 αντίδραση (Σχήμα 6). Συνοπτικά, ένα πολωμένο μόριο νερού από το ιόν Zn^{2+} , προσβάλλει την αδενοσίνη, σχηματίζοντας ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο μόριο. Το ενδιάμεσο αυτό μόριο αποδιατάσσεται λόγω πρωτονίωσης της αμινομάδας και αποβάλλεται ως αμμωνία με ταυτόχρονη ελευθέρωση ινοσίνης (Kurz *et al.* 1987). Αναλυτικότερα, ο μηχανισμός κατάλυσης πραγματοποιείται σε δύο στάδια: αρχικά παρατηρείται στερεοεκλεκτική προσθήκη υδροξυλίου στη C6 θέση του αδενοσινο-νουκλεοσιδικού υποστρώματος και σχηματισμός τετραεδρικού ενδιάμεσου, αφαίρεση αμμωνίας και σχηματισμός του ινοσινικού προϊόντος. Εκτός του απαραίτητου ρόλου του Zn^{2+} , τα κατάλοιπα Asp295 και Asp296 είναι εξίσου σημαντικά. Το Asp295 είναι απαραίτητο διότι προσανατολίζει και ενεργοποιεί το καταλυτικό μόριο νερού ενώ είναι απαραίτητο για τη σωστή πρόσδεση του υποστρώματος, σχηματίζοντας υδρογονικό δεσμό με το N7 της πουρίνης. Ειδικότερα, το μεταλλοκατιόν ενεργοποιεί το μόριο νερού που βρίσκεται δεσμευμένο στην καταλυτική περιοχή, το κατάλοιπο His238 λειτουργεί ως βάση και αφαιρεί ένα πρωτόνιο, δημιουργώντας το υδροξύλιο προσβολής στη C6 θέση του υποστρώματος. Τα κατάλοιπα Asp296 και Gly184 αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου με τα N7 και N9 της αδενοσίνης, αντίστοιχα, μειώνοντας τον αρωματικό χαρακτήρα του πουρινικού δακτυλίου και διευκολύνοντας την πυρηνόφιλη προσβολή στη C6 θέση του. Το εισερχόμενο υδροξύλιο προσανατολίζεται βάσει των αλληλεπιδράσεων με τα κατάλοιπα Asp295, His238 και του Zn^{2+} . Το πρωτονιωμένο κατάλοιπο Glu217 διευκολύνει την αντίδραση, προσφέροντας το πρωτόνιο στο N1 της πουρίνης και οδηγεί στο σχηματισμό του τετραεδρικού ενδιάμεσου στη θέση C6. Τελικά, αποβάλλεται αμμωνία, με πιθανότερο δότη πρωτονίου το κατάλοιπο His238 (Clonis 2007).



Σχήμα 6. **A.** Αλληλεπιδράσεις των αμινοξικών καταλοίπων που αποτελούν το ενεργό κέντρο με το ιόν ψευδαργύρου όπως προκύπτουν από την κβαντομηχανική ανάλυση των Gleeson *et al.* (2003). **B.** Ο καταλυτικός μηχανισμός της ADA ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της ινοσίνης (Gleeson *et al.* 2003).

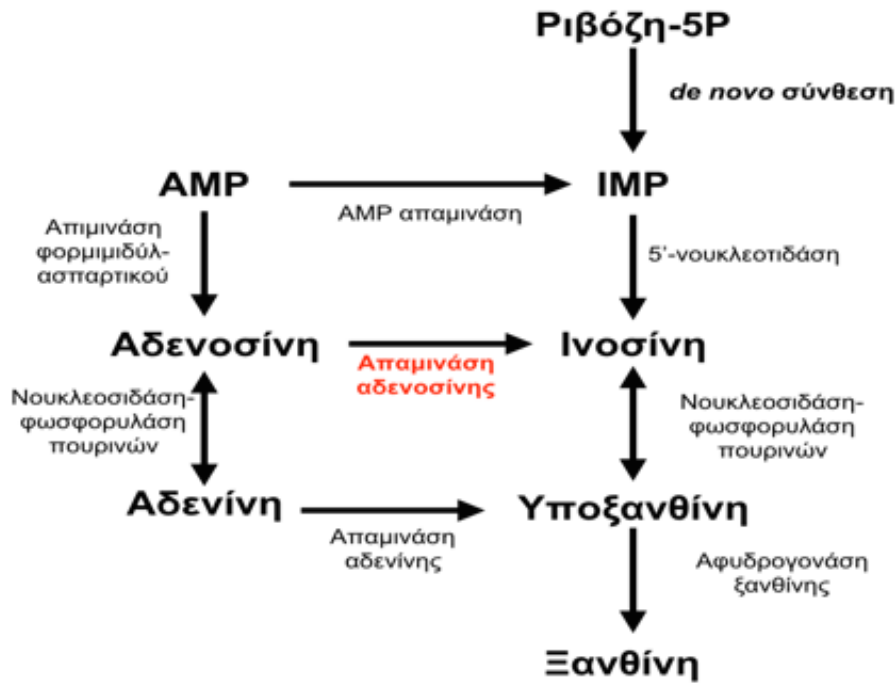
5. Ο ρόλος της αδενοσίνης και η δράση της ως υπόστρωμα της ADA

Η αδενοσίνη (ADO) είναι νουκλεοτίδιο που αποτελεί ένα από τα προϊόντα μερικής υδρολυτικής διάσπασης των ριβονουκλεϊκών οξέων RNA και συμμετέχει στη ρύθμιση της φυσιολογικής δραστηριότητας σε πολλούς ιστούς θηλαστικών. Η ίδια και τα παράγωγά της, εκτός του δομικού τους ρόλου στο DNA και RNA, εμπλέκονται σε μία πληθώρα δραστηριοτήτων (Σχήμα 7). Η δράση της ασκείται μέσω δεσμευμένων μεμβρανικών υποδοχέων, οι οποίοι έχουν χαρακτηριστεί χρησιμοποιώντας βιοχημικές και ηλεκτροφυσιολογικές τεχνικές πρόσδεσης. Η αδενοσίνη κατέχει σημαντικό ρόλο στις βιοχημικές διεργασίες, όπως στη μεταφορά ενέργειας, υπό τη

μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP), καθώς και στη μεταγωγή σήματος ως κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP). Στον άνθρωπο υπάρχουν τέσσερις τύποι υποδοχέων αδενοσίνης, καθένας από τους οποίους κωδικοποιείται από ένα ξεχωριστό γονίδιο και έχει διαφορετικές λειτουργίες, με μικρές επικαλύψεις σε ορισμένες περιπτώσεις (Gao *et al.* 2007). Οι A_1 και οι A_{2A} υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιά, ρυθμίζοντας την κατανάλωση οξυγόνου του μυοκαρδίου και τη ροή του αίματος, ενώ ο A_{2A} υποδοχέας έχει ευρύτερες αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις σε όλο το σώμα (Hasko *et al.* 2008). Αυτοί οι δύο υποδοχείς διαδραματίζουν επίσης σημαντικούς ρόλους στον εγκέφαλο (Calda *et al.* 2006), ρυθμίζοντας την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών, όπως η ντοπαμίνη και το γλουταμινικό (Fuxe *et al.* 2007), τη στιγμή που οι A_{2B} και A_3 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως περιφερειακά και εμπλέκονται σε διεργασίες, όπως οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις και οι ανοσοαποκρίσεις. Η αδενοσίνη αναγνωρίζεται ως νευροδιαβιβαστής και πιστεύεται ότι συμμετέχει στην προώθηση του ύπνου και την καταστολή της διεγέρσεως. Η ενδογενής αδενοσίνη χρησιμοποιείται ως θεραπεία για την ταχυπαλμία και ενεργεί άμεσα για να επιβραδύνει τους ρυθμούς μέσω της δράσης της και στους τέσσερις υποδοχείς στον ιστό της καρδιάς (Cohen *et al.* 2008). Ταυτόχρονα, ασκεί κατασταλτική επίδραση μέσω της δράσης της στους A_1 και A_{2A} υποδοχείς του εγκεφάλου. Παράγωγα ξανθίνης, όπως η καφεΐνη και η θεοφυλλίνη δρουν ως μη-εκλεκτικοί ανταγωνιστές στους A_1 και A_{2A} υποδοχείς, τόσο στην καρδιά όσο και στον εγκέφαλο, με συνέπεια να έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα με την αδενοσίνη, προκαλώντας διέγερση και αυξημένο καρδιακό ρυθμό (Ferre 2008). Η αδενοσίνη έχει εμπλακεί στις φαρμακολογικές δράσεις αρκετών κατηγοριών φαρμάκων (Wilson *et al.* 1992). Ένας αριθμός μελετών δείχνει ότι ο νουκλεοζίτης μπορεί να ρυθμίζει την κυτταρική δραστηριότητα σε πολλές παθολογικές διαταραχές, με αποτέλεσμα παράγωγα αδενοσίνης να εμφανίζονται ως πολλά υποσχόμενοι υποψήφιοι για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών ενώσεων, όπως αντισπασμωδικά, αντι-ισχαιμικά, αναλγητικά και νευροπροστατευτικοί παράγοντες. Η αδενοσίνη παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ροής του αίματος σε διάφορα όργανα μέσω αγγειοδιαστολής (Daval *et al.* 1991).

Η αδενοσίνη, παρουσία του ενζύμου απαμινάση της αδενοσίνης, μετατρέπεται σε ινοσίνη. Η ινοσίνη είναι απαραίτητη για τη σωστή μετάφραση του γενετικού κώδικα και αποτελεί

ενδιάμεσο παράγοντα σε μια αλυσίδα αντιδράσεων που απαιτούνται για την κίνηση των μυών (Liu *et al.* 2006).



Σχήμα 7. Τμήματα μεταβολικών μονοπατιών της αδενοσίνης και τα εμπλεκόμενα ένζυμα.

6. Έλλειψη απαμινάσης αδενοσίνης

Η σημασία της διατήρησης των επιπέδων της ADA σε φυσιολογικά επίπεδα κρίνεται απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων, καθώς η έλλειψή της σχετίζεται με την εμφάνιση μιας μορφής σοβαρής συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας (SCID). Η τοξικότητα που παρουσιάζεται ειδικά στα λεμφοκύτταρα θεωρείται ότι οφείλεται στην υψηλή συσσώρευση της 2-δεοξυ-αδενοσίνης -υπόστρωμα της ADA- και στη μετέπειτα μετατροπή της σε dATP που αναστέλλει την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων (Cohen *et al.* 1978). Οι ασθενείς με SCID προσβάλλονται από σοβαρές βακτηριακές, ιικές και μυκητιακές μολύνσεις στα αρχικά στάδια της ζωής τους. Η ασθένεια αντιμετωπίζεται προς το παρόν με μεταμόσχευση του μυελού των

οστών (Chen *et al.* 1978) -εφόσον υπάρχει κατάλληλος δότης- ενώ ως εναλλακτική θεραπεία προτείνεται η αντικατάσταση του ενζύμου με χορήγηση ADA από μόσχο συνδεδεμένη με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG-ADA) (Hershfield *et al.* 1987).

Εκτός από τη σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια το ένζυμο εμπλέκεται σε μια πληθώρα άλλων ασθενειών, όπως το AIDS, η νόσος του Parkinson, το σύνδρομο Down, η φυματίωση, η λευχαιμία, η αναιμία, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος κ.α.

7. Κατιούσα διεργασία ενζύμων

7.α. Στάδια κατιούσας διεργασίας

Η κατιούσα διεργασία αφορά το σύνολο των σταδίων που έχουν ως σκοπό την απομόνωση και τον καθαρισμό του ενζύμου στον επιθυμητό βαθμό. Ένα πρωτόκολλο κατιούσας διεργασίας συνδυάζει διάφορες μεθόδους και τεχνικές και προκειμένου να σχεδιαστεί επιτυχώς λαμβάνονται υπ' όψιν πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με τη φύση και τα χαρακτηριστικά του ενζύμου καθώς και με το κόστος και την ταχύτητα εκτέλεσής του. Τυπικά, ένα πρωτόκολλο μπορεί να διακριθεί σε 4 στάδια. Στο αρχικό στάδιο γίνεται διαχωρισμός των στερεών από την υγρή φάση συνήθως με φυγοκέντρηση ή διήθηση. Στη συνέχεια ακολουθεί διάρρηξη των κυττάρων με μηχανικές ή μη μηχανικές τεχνικές και τέλος απομακρύνονται οποιαδήποτε στερεά που προκύπτουν από τις προηγούμενες διαδικασίες, είτε με φυγοκέντρηση είτε με διήθηση. Στο στάδιο χαμηλού καθαρισμού απομακρύνονται τα νουκλεϊκά οξέα από το υγρό παρασκεύασμα με κατακρήμνιση ή ενζυμική υδρόλυση και απομακρύνεται μέρος των πρωτεϊνών από το παρασκεύασμα με κατανομή σε υδατικό διασπαστικό σύστημα ή κατακρήμνιση. Στο στάδιο υψηλού καθαρισμού περιλαμβάνεται η υγρή χρωματογραφία στήλης και πραγματοποιείται ο τελικός καθαρισμός του ενζύμου. Η υγρή χρωματογραφία στήλης αποτελείται από χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, χρωματογραφία συγγένειας και χρωματογραφία μοριακού ηθμού. Στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο γίνεται η μορφοποίηση του προϊόντος, η οποία περιλαμβάνει τη συμπύκνωσή του, την απομάκρυνση μικρομοριακών προσμίξεων, τη σταθεροποίηση και τη

συσκευασία του. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η υπερδιήθηση, η κατακρήμνιση και η λυοφιλίωση. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται και ο ποιοτικός έλεγχος του προϊόντος, με ειδικές δοκιμές όπως π.χ. ηλεκτροφόρηση, ανοσοπροσδιορισμό και HPLC. Σε κάθε στάδιο του πρωτοκόλλου κατιούσας επεξεργασίας πρέπει να ελέγχεται η αποτελεσματικότητα της διεργασίας καθαρισμού του ενζύμου, το οποίο επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας τεχνικές προσδιορισμού του βαθμού καθαρότητας των δειγμάτων. Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο κριτήριο καθαρότητας είναι η ειδική δραστικότητα του ενζύμου ενώ δύο άλλοι τρόποι ελέγχου βασίζονται στις τεχνικές της ηλεκτροφόρησης και της HPLC (Clonis 2013).

7.β. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Δεδομένης της ευρείας χρήσης της αλλά και της αξιοποίησης της στην παρούσα μελέτη, θα αναφερθούμε στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι η πιο συνηθισμένη τεχνική χρωματογραφίας, τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η φύση του ενζυμικού μορίου είναι αμφοτερική. Αυτό σημαίνει ότι ανάλογα με το pH του διαλύματος μπορεί να φέρει καθαρό φορτίο θετικό ή αρνητικό. Από την άλλη πλευρά, ο ιοντοανταλλάκτης φέρει φορτισμένες ομάδες, οι οποίες είναι χημικά δεσμευμένες στο πολυμερές υλικό των σφαιριδίων. Οι ιοντοανταλλάκτες παρουσιάζουν υδρόφιλο χαρακτήρα και τα πολυμερή από τα οποία αποτελούνται μπορεί να είναι αγαρόζη, κυτταρίνη, συνθετικά πολυμερή και συμπολυμερή. Ταυτόχρονα, διακρίνονται σε ισχυρούς και ασθενείς, ανάλογα με το εύρος pH στο οποίο διατηρούν το φορτίο τους. Οι φορτισμένες ομάδες του ιοντοανταλλάκτη ποικίλλουν, με συνηθέστερες τις καρβοξυλομάδες και τις αμινομάδες. Σε κάθε περίπτωση κάθε τέτοια ομάδα είναι εξουδετερωμένη καθώς φέρει ηλεκτροστατικά δεσμευμένο ιόν, το αντισταθμιστικό ιόν. Έτσι, περιοχές του ενζυμικού μορίου με φορτίο αντίθετο προς το φορτίο του ιοντοανταλλάκτη συναγωνίζονται και απομακρύνουν το αντισταθμιστικό ιόν, με αποτέλεσμα την αντιστρεπτή δέσμευση του μορίου στον προσροφητή. Ως αποτέλεσμα, τα μη προσροφημένα μόρια απομακρύνονται από τη στήλη με έκπλυση ενώ το ένζυμο που μας ενδιαφέρει εκλούεται

αργότερα από τη χρωματογραφική στήλη είτε με αύξηση της ιοντικής ισχύος είτε με μεταβολή του pH.

Κατά την εφαρμογή της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε το ισοηλεκτρικό σημείο του ενζύμου, pI καθώς και την περιοχή pH στην οποία διατηρείται η ενζυμική δραστηριότητα. Οι δύο αυτοί παράγοντες καθορίζουν την περιοχή του pH που θα χρησιμοποιηθεί με κάποιο συγκεκριμένο ιοντοανταλλάκτη. Το pI ενός ενζύμου είναι εκείνη η τιμή pH στην οποία το συνολικό φορτίο του μορίου είναι μηδέν. Έτσι, σε τιμές $pH < pI$ το ένζυμο έχει θετικό καθαρό φορτίο και προσροφάται σε αρνητικά φορτισμένο κατιοντοανταλλάκτη. Αντίθετα, σε τιμές $pH > pI$ το ένζυμο έχει αρνητικό καθαρό φορτίο και προσροφάται σε θετικά φορτισμένο ανιοντοανταλλάκτη.

Η φόρτωση του ενζύμου πραγματοποιείται ως επί το πλείστον σε συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος καθώς και το pH ρυθμίζεται συνήθως έτσι ώστε να διαφέρει κατά μία μονάδα από το pI του ενζύμου. Από την άλλη πλευρά, η έκλουση μπορεί να πραγματοποιηθεί με συνεχή βαθμίδωση, με σταδιακή βαθμίδωση της υγρής φάσης της στήλης και με έκλουση συγγένειας. Η βαθμίδωση σχετίζεται με τη μεταβολή της σύστασης της υγρής φάσης σε σχέση με το pH ή την ιοντική ισχύ. Ο συνηθέστερος τρόπος έκλουσης στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι η διαβάθμιση της ιοντικής ισχύος. Η σταδιακή αύξηση της ιοντικής ισχύος συνεπάγεται την αντίστοιχη μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που συγκρατούν το ένζυμο στη στήλη, με αποτέλεσμα την έκλουση του ενζύμου (Clonis 2013).

7.γ. Κατιούσα διεργασία απαμινάσης αδενοσίνης

Διαφορετικές τεχνικές υγρής χρωματογραφίας έχουν χρησιμοποιηθεί από τη δεκαετία του 1970 για τον μερικό ή ολικό καθαρισμό της ADA. Η τεχνική της ανιοντοανταλλαγής (με DEAE-cellulose) έχει εφαρμοστεί στον καθαρισμό ADA από πνεύμονα, στόμαχο και ήπαρ ανθρώπου (Ake-do *et al.* 1972). Ένας μερικός καθαρισμός ADA έχει πραγματοποιηθεί, αρχικά, με απομόνωση ερυθροκυττάρων από υγιείς δότες και, ακολούθως, τη χρήση ανιοντοανταλλάκτη (DEAE-Sephadex A-50) (Osborne *et al.* 1972). Μια άλλη μελέτη για τον καθαρισμό ADA προτείνει την απομόνωση ερυθροκυττάρων και τον συνδυασμό χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής (DEAE-

cellulose) και χρωματογραφίας μοριακού ηθμού (Bio-Gel P-60) (Agarwal *et al.* 1974). Ακολουθεί η απομόνωση του ενζύμου από τον σπλήνα μόσχου και το έντερο μόσχου, από το δωδεκαδάκτυλο πτηνού και από ερυθροκύτταρα ανθρώπου. Σε όλες τις περιπτώσεις ο καθαρισμός πραγματοποιείται με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας (σύνδεση του αναστολέα 9-(p-αμινοβενζυλο)αδενίνη σε αγαρόζη Sepharose 4B) (Rossi *et al.* 1975). Ένας πολυπλοκότερος καθαρισμός της ADA από ανθρώπινα ερυθροκύτταρα περιλαμβάνει συνδυασμό χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής (DEAE-Sephadex A-50), χρωματογραφίας μοριακού ηθμού (Sephadex G-100) και χρωματογραφία συγγένειας (σύνδεση του υποστρώματος αδενοσίνη σε αγαρόζη Sepharose 6B) (Schrader *et al.* 1976). Ένα χρόνο αργότερα, προτείνεται ο καθαρισμός της ADA από ανθρώπινα ερυθροκύτταρα με χρωματογραφία συγγένειας, αυτή τη φορά με τη χρήση αντισωμάτων (αντισώματα που προέκυψαν από ενέσεις του ενζύμου σε κουνέλια συνδεδεμένα σε Sepharose 4B). Το 2000 παρουσιάζεται μία μελέτη στην οποία περιγράφεται ο πλήρης καθαρισμός της ADA ως υλικό αναφοράς με σκοπό τη χρήση του σε κλινικά εργαστήρια. Ο καθαρισμός αυτός περιλαμβάνει την απομόνωση ανθρώπινων ερυθροκυττάρων και τον καθαρισμό τους με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (STREAMLINE DEAE) και ακολούθως δύο χρωματογραφίες συγγένειας (σύνδεση νουκλεοσιδίου πουρίνης σε αγαρόζη Sepharose 6B) (Bota *et al.* 2000). Δύο χρόνια αργότερα, περιγράφεται ο ταυτόχρονος καθαρισμός της ADA από σκύατι ανθρώπου και πτηνού, ο οποίος περιλαμβάνει ουσιαστικά τέσσερα στάδια καθαρισμού που αποτελούνται από μία χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (DEAE-cellulose DE-52), μία υδρόφοβη χρωματογραφία (Butyl-Sepharose 4FF) και δύο χρωματογραφίες συγγένειας (IgG anti-calf ADA1 Sepharose και adenosine-Sepharose) (Egawa *et al.* 2002).

8. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Αξιοποιώντας τις προηγούμενες μελέτες, η παρούσα εστιάζει στα προκαταρκτικά στάδια του πρωτόκολλου καθαρισμού, δηλαδή στον μερικό καθαρισμό ADA1 από αίμα ανθρώπου, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη μιας απλής και οικονομικής διεργασίας παρασκευής καθαρής ADA1, κατάλληλης για θεραπευτικούς σκοπούς. Ειδικότερα, τα προκαταρκτικά στάδια θα αφορούν στην προετοιμασία ενός μερικά καθαρισμένου ορού με δραστηκότητα ADA1, ο οποίος θα είναι κατάλληλος προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές μελέτες ανάπτυξης

συνθετικών εκλεκτικών υλικών ‘συγγενείας’ και αντίστοιχων τεχνικών που θα οδηγήσουν σε καθαρή ADA1.

Συνοπτικά, στην παρούσα μελέτη, προβλέπεται η παραλαβή ερυθροκυττάρων από υγιείς δότες, λύση και φυγοκέντρωση τους. Στη συνέχεια, ανάμειξη του υπερκείμενου με κάποιο κατάλληλο κατιοντοανταλλάκτη (π.χ. CM-Sephadex C-50), ώστε να αφαιρεθεί η αιμοσφαιρίνη, ακολούθως δε, μερικός καθαρισμός του ενζυμικού εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας κάποιο κατάλληλο ανιοντοανταλλάκτη (π.χ. DEAE-Sepharose CL-6B). Τα κλάσματα που θα προκύψουν θα αναλυθούν τόσο ως προς την ενζυμική τους δραστηριότητα όσο και ως προς την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη.

2.ΥΔΙΚΑ

1. Υλικά

Χημικά αντιδραστήρια	Εταιρεία
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Panreac
Acrylamide	Sigma-Aldrich
Adenosine	Sigma-Aldrich
Ammonium persulfate	Sigma-Aldrich
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Coomasie brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich
DOC	Fluka
Ethanol	Merck
Glycine	Sigma-Aldrich
Hydrochloric Acid	Merck
Imidazole	Sigma-Aldrich
Methanol	Chem-Lab NV
N,N'-Methylene-bis-acrylamide	Sigma-Aldrich
Potassium phosphate	Sigma-Aldrich
SDS	Sigma-Aldrich
Sodium chloride	Sigma-Aldrich
TCA	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Trizma base	Fluka
Υλικά Χρωματογραφίας Υγρής Στήλης	Εταιρεία
CM-Sephadex C-50	Sigma-Aldrich

DEAE-Sepharose CL-6B	Sigma-Aldrich
Βιολογικά Υλικά	Εταιρεία
Adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) Type X, from 'calf spleen', solution in 50% glycerol, 5mM potassium phosphate, pH 6	Sigma-Aldrich
Αίμα (ληγμένο, αρνητικό σε παθογόνους ιούς)	Περιφερειακό Νοσοκομείο Νίκαιας "Αγ. Παντελεήμων", Τμήμα Αιμοδοσίας

2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

- i. Eppendorf Centrifuge 5804R
- ii. Heraeus Instruments Biofuge primo
- iii. Hitachi U-200 Spectrophotometer
- iv. Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer
- v. pHmeter Orion 410A
- vi. Mini Protean System, Casting Stand, Biorad

3.ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης από τον ορό αίματος με εφαρμογή προσροφητή κατιοντοανταλλαγής CM-Sephadex C-50.

1.α. Προεπεξεργασία του αίματος: λύσης των ερυθροκυττάρων και αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης από τον ορό.

Λύση των ερυθροκυττάρων. Σε σωλήνα τύπου ‘falcon’ των 50 mL, εισάγεται κατάλληλα ποσότητα αίματος (ο ακριβής όγκος εξαρτάται από τις ανάγκες του πειράματος) και φυγοκεντρώνεται στα 8,000g για 1 ώρα. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ στο ίζημα (κύτταρα) προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος NaCl 0.15 M. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε NaCl 0.15 M (αναλογία 1:1) και φυγοκεντρείται στα 8,000g για 10 λεπτά. Η ανωτέρω διαδικασία επαναλαμβάνεται, συνολικά, τρεις φορές. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, το ίζημα αναμιγνύεται με 2 όγκους ddH₂O ώστε να επέλθει λύση των κυττάρων. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται σε 5.8 με HCl (1M) και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 6,000g για 20 λεπτά. Το ίζημα (διαρρηγμένα κύτταρα) απορρίπτεται, ενώ το υπερκείμενο υγρό (‘ορός’) συλλέγεται και, σε περίπτωση που το pH του δεν έχει διατηρηθεί στην επιθυμητή τιμή, ρυθμίζεται εκ νέου σε 5.8.

Αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης από τον ορό. Ακολούθως, στο υπερκείμενο υγρό προστίθεται προσεκτικά υπό ανάδευση κατάλληλη ποσότητα CM-Sephadex C-50 υπό μορφή πηκτής (ενυδατωμένου πολυμερούς, αναλογία 1:2 v/v) και το pH του εναιωρήματος που προκύπτει ελέγχεται εκ νέου. Το εναιώρημα υποβάλλεται σε ελαφριά ανακίνηση για 3 ώρες στους 4°C, οπότε και φυγοκεντρείται στα 2,500 g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο που λαμβάνεται έχει υποκίτρινο χρώμα, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της αιμοσφαιρίνης έχει προσροφηθεί στον κατιοντοανταλλάκτη. Σε περίπτωση που το διάλυμα δεν έχει καθαριστεί επαρκώς από την αιμοσφαιρίνη (ροζ χρώμα), προστίθεται και δεύτερη παρτίδα προσροφητή (αναλογία 1:1 v/v) και αφήνεται για 1 ώρα στους 4°C υπό ανακίνηση.

1.β. Προσδιορισμός της ποσότητας CM-Sephadex C-50 ανά όγκο ορού αίματος για αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης.

Προκειμένου να επιλεγθεί με ακρίβεια η ποσότητα (όγκος) του κατιοντοανταλλάκτη που απαιτείται για την πλήρη απαλλαγή του ορού του αίματος από την αιμοσφαιρίνη (βλέπε ενότητα 1.α), ακολουθείται η εξής διαδικασία: σε 9 falcon των 15 mL εισάγεται 1 mL ορού στο καθένα, μαζί με διαφορετικές ποσότητες ενυδατωμένου πολυμερούς CM-Sephadex C-50 (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 και 10 mL). Τα falcon τοποθετούνται υπό ανάδευση στους 4°C για 3 ώρες και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 1,200g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο από το καθένα συλλέγεται και λαμβάνεται η οπτική του απορρόφηση στα 570 nm (μήκος κύματος στο οποίο απορροφά η αιμοσφαιρίνη). Όσο μικρότερη είναι η απορρόφηση τόσο επιτυχέστερος είναι και ο καθαρισμός του δείγματος από την αιμοσφαιρίνη.

1.γ. Αναγέννηση του προσροφητή κατιοντοανταλλαγής CM-Sephadex C-50.

Ο προσροφητής από τα στάδια (1.α και 1.β) που φέρει δεσμευμένη την αιμοσφαιρίνη προστίθεται σε ψυχρό διάλυμα NaCl 2 M (αναλογία 1:2 v/v) και ανακινείται για περίπου 10 λεπτά στους 4°C, οπότε το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 1,200g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 2 φορές ακόμα. Στη συνέχεια ο προσροφητής προστίθεται σε ψυχρό διάλυμα NaOH 0.1 M (αναλογία 1:1 v/v) και ανακινείται, όπως και με το NaCl, οπότε και φυγοκεντρείται στα 1,200g για 5 λεπτά. Η τελευταία διαδικασία επαναλαμβάνεται για 1 φορά ακόμα. Στο στάδιο αυτό μπορεί να επαναληφθεί το 'βήμα' με το NaCl. Ακολούθως, ο προσροφητής προστίθεται σε 70% αιθανόλη ή 30% ισοπροπανόλη (αναλογία 1:1 v/v) και ακολουθεί ανακίνηση και φυγοκέντρηση όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις. Τέλος, ο προσροφητής πλένεται πολλές φορές με ψυχρό ddH₂O και διατηρείται στους 4°C. Ο προσροφητής πλέον είναι απαλλαγμένος από την αιμοσφαιρίνη ή άλλες πρωτεΐνες, έτοιμος να ξαναχρησιμοποιηθεί.

2. Μερικός καθαρισμός ADA1 με εφαρμογή χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής σε DEAE-Sepharose CL-6B

2.α. Διαδικασία μερικού καθαρισμού ADA1.

Ορός αίματος (εφεξής θα αναφέρεται ως ‘ενζυμικό εκχύλισμα’) από το στάδιο (παράγραφο) 1.α, αναμιγνύεται σε αναλογία 1:1 v/v με ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου-HCl, 60 mM, pH 6.0. Διάλυμα όγκου 30 mL φορτώνεται σε 3 mL προσροφητή ανιοντοανταλλαγής (DEAE-Sepharose CL-6B) που έχει εισαχθεί σε στήλη χρωματογραφίας και εξισορροπηθεί με 30 mL ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου-HCl, 30mM, pH 6.0. Αρχικά, παραλαμβάνεται η υγρή φάση (30 mL) με τα συστατικά του ενζυμικού εκχυλίσματος που δεν έχουν προσροφηθεί στη στήλη (‘flow-through’). Ακολούθως, η στήλη πλένεται με 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης, οπότε και λαμβάνεται επιπλέον υγρή φάση με συστατικά που δεν έχουν προσροφηθεί (‘washings’). Τέλος, ακολουθούν πλύσεις της στήλης με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης NaCl, με 9 mL από κάθε συγκέντρωση, και συλλέγονται κλάσματα των 9 mL καθένα. Κάθε κλάσμα αναλύεται για δραστηριότητα ADA και συνολική πρωτεΐνη (οπτική απορρόφηση στα 280 nm). Σε κλάσματα με ‘μέγιστο’ ενζυμικής δραστηριότητας, πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο κατά Bradford. Η χρωματογραφία μερικού καθαρισμού της ADA πραγματοποιείται στους 4°C.

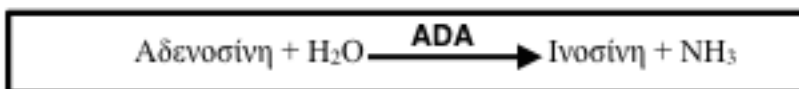
2.β. Αναγέννηση της στήλης χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής DEAE-Sepharose CL-6B.

Μετά το τέλος του καθαρισμού, εισάγονται στη στήλη 9 mL διαλύματος NaCl (2 M) και η στήλη παραμένει κλειστή για 10-15 λεπτά, ώστε να αποσυνδεθούν οι ιοντικά προσροφημένες πρωτεΐνες. Ακολούθως το διάλυμα NaCl αφήνεται να περάσει από τη στήλη, οπότε και εισάγονται 9 mL διαλύματος NaOH (1 M) και η στήλη παραμένει κλειστή για 1-2 ώρες. Με τον τρόπο αυτό αποδιατάσσονται και αποδεσμεύονται οι υδρόφοβα προσροφημένες πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες. Ακολουθεί πλύσιμο της στήλης με τουλάχιστον 3 όγκους στήλης (3-cv) του διαλύματος εξισορρόπησης. Για να απομακρυνθούν υδρόφοβες πρωτεΐνες προσροφημένες πολύ

ισχυρά στον προσροφητή, εισάγονται 4-εν διαλύματος 70% αιθανόλης ή 30% ισοπροπανόλης. Τέλος, η στήλη πλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα εξισσορόπησης, έως ότου επανέλθει στο επιθυμητό pH που πραγματοποιείται ο καθαρισμός, και διατηρείται στο ρυθμιστικό μέχρι να επαναχρησιμοποιηθεί.

3. Φασματοφωτομετρική δοκιμή δραστηριότητας απαμινάσης αδενοσίνης (ADA) κατά SIGMA

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας βασίζεται στην ταχύτητα μετατροπής της αδενοσίνης σε ινοσίνη. Η αντίδραση παρατηρείται φασματοφωτομετρικά, οπότε και υπολογίζεται η μείωση της απορρόφησης στο λ_{\max} 265 nm, οφειλόμενη στην κατανάλωση της αδενοσίνης.



Σε μια τυπική δοκιμή ενζυμικής δραστηριότητας, χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα ('stock') :

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 , 100 mM, pH 7.5.
- ii. 1,35 mM διάλυμα αδενοσίνης σε δις απιονισμένο νερό, pH 7.
- iii. 0,1% w/v διάλυμα αλβουμίνης μόσχου (BSA)

Χρησιμοποιούνται κυψελίδες UV για 'μάρτυρα' και 'δείγμα'. Στις κυψελίδες προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα, το διάλυμα αδενοσίνης και το απιονισμένο νερό, αναδεύονται και τοποθετούνται για 15 min σε υδατόλουτρο 25°C. Ακολούθως, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα αλβουμίνης και ενζυμικού διαλύματος, αναμιγνύονται γρήγορα και λαμβάνονται οι μετρήσεις σε $\lambda_{\max} = 265$ nm.

Αναλυτικότερα, οι όγκοι που χρησιμοποιούνται έχουν ως εξής:

	Μάρτυρας (μL)	Δείγμα (μL)
Ρυθμιστικό διάλυμα	500	500
Νερό	167	317
Αδενοσίνη	33	33
Αλβουμίνη (BSA)	150	150
Ένζυμο (ADA)	150	-
Τελικός όγκος	1000	1000

3.a. Υπολογισμός μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας απαμινάσης αδενοσίνης.

Ως μονάδα μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται η 'ενζυμική μονάδα' (enzyme unit, U) που ισούται με την ποσότητα ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol αδενοσίνης σε ινοσίνη ανά λεπτό, στους 25°C σε pH = 7.5.

Συγκεκριμένα, καταγράφεται η μείωση της οπτικής απορρόφησης (-ΔA) σε χρόνο 30 sec. Αρχικά, λαμβάνεται ευθεία η οποία παρουσιάζει φθίνουσα πορεία, ωστόσο, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης καμπυλώνει. Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας (ανά mL δείγματος) λαμβάνεται υπ' όψη μόνον το ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης και χρησιμοποιείται η εξίσωση

$$U/mL = (\Delta A_{265nm}/min) (V_{\text{συνολ}}) / (\epsilon \cdot V_{\text{δείγματος}}) \times df$$

όπου :

$\Delta A/min$ = καθαρή μεταβολή απορρόφησης στα 265 nm

$V_{\text{συνολ}}$ = συνολικός όγκος αντίδρασης (mL)

$V_{\text{δειγ}}$ = όγκος του ενζύμου στην αντίδραση (mL)

df = συντελεστής αραίωσης

ϵ = συντελεστής μοριακής απόσβεσης ($8,1 \text{ mmol}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$)

4. Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Bradford

Η μέθοδος του πρωτεϊνικού ποσοτικού προσδιορισμού βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει καστανό χρώμα και απορροφά στα 465 nm. Το σύμπλοκο που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση της χρωστικής με την πρωτεΐνη αποκτά μπλε χρώμα και απορροφά στα 595 nm. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης, το πυκνό αντιδραστήριο του Bradford αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1:4 v/v. Σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 950 μL του αραιωμένου διαλύματος μαζί με την κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης μέχρι τελικό όγκο 1 mL. Οι κυψελίδες επωάζονται για 20 min σε σκοτεινό χώρο και σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του απαραίτητου χρόνου, το φωτόμετρο μηδενίζεται με τον 'μάρτυρα' (διάλυμα Bradford χωρίς πρωτεΐνη) και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση για το κάθε δείγμα στα 595 nm.

5. Συμπύκνωση πρωτεϊνών

5.a. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με TCA-DOC

Τα δείγματα που προορίζονται για ηλεκτροφόρηση παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα κατακρημνίζονται σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο: σε eppendorf του 1.5 mL εισάγεται 1 mL δείγματος και προστίθενται 8.5 μL 2% DOC (Na-deoxycholate, τελική συγκέντρωση 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ακολουθεί 'vortex' στο μίγμα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 333 μL 24% TCA (trichloroacetic acid, τελική συγκέντρωση 6%) και το μίγμα αναμιγνύεται σε vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 12.000g για 30 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Στο 'eppendorf' εισάγονται 200 μL παγωμένης ακετόνης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα

12.000g για 5 λεπτά στους 4°C. Τελικά, το ίζημα επαναδιαλύεται στο ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων.

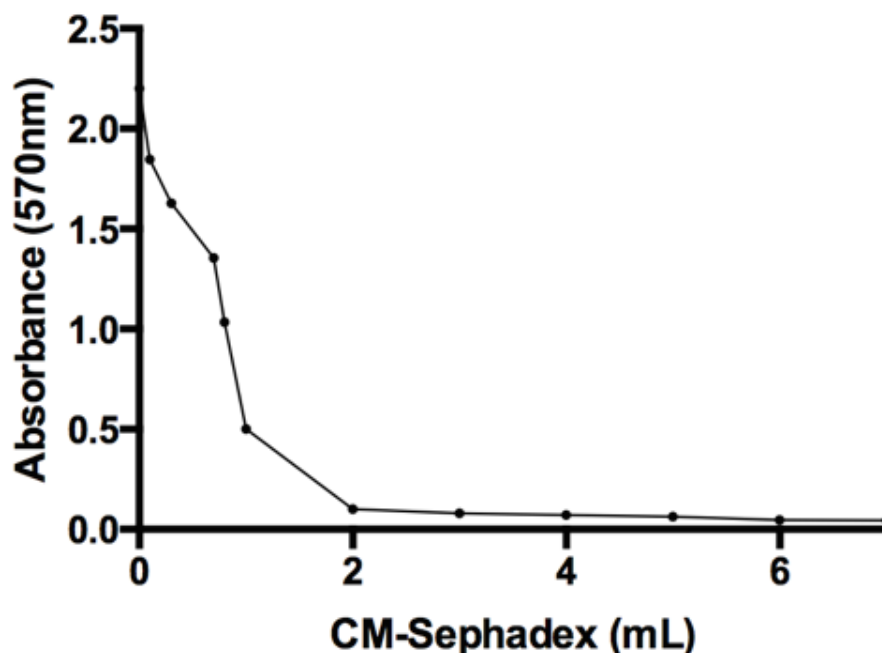
5.β. Συμπύκνωση διαλύματος πρωτεϊνών σε 'στήλες συμπύκνωσης'

Τα δείγματα τα οποία προορίζονται για ηλεκτροφόρηση απουσία αποδιατακτικού παράγοντα συμπυκνώνονται ως εξής: 4 mL δείγματος εισάγονται σε ειδικές 'στήλες συμπύκνωσης' (Amicon® Ultra 15 mL Centrifugal Filters, MWCO 10 KDa) και φυγοκεντρούνται στα 5.000g για περίπου 20 λεπτά, μέχρις ότου ο όγκος να φτάσει τα 500 µL.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Καθαρισμός αίματος από αιμοσφαιρίνη με εφαρμογή προσροφητή κατιοντοανταλλαγής CM-Sephadex C-50

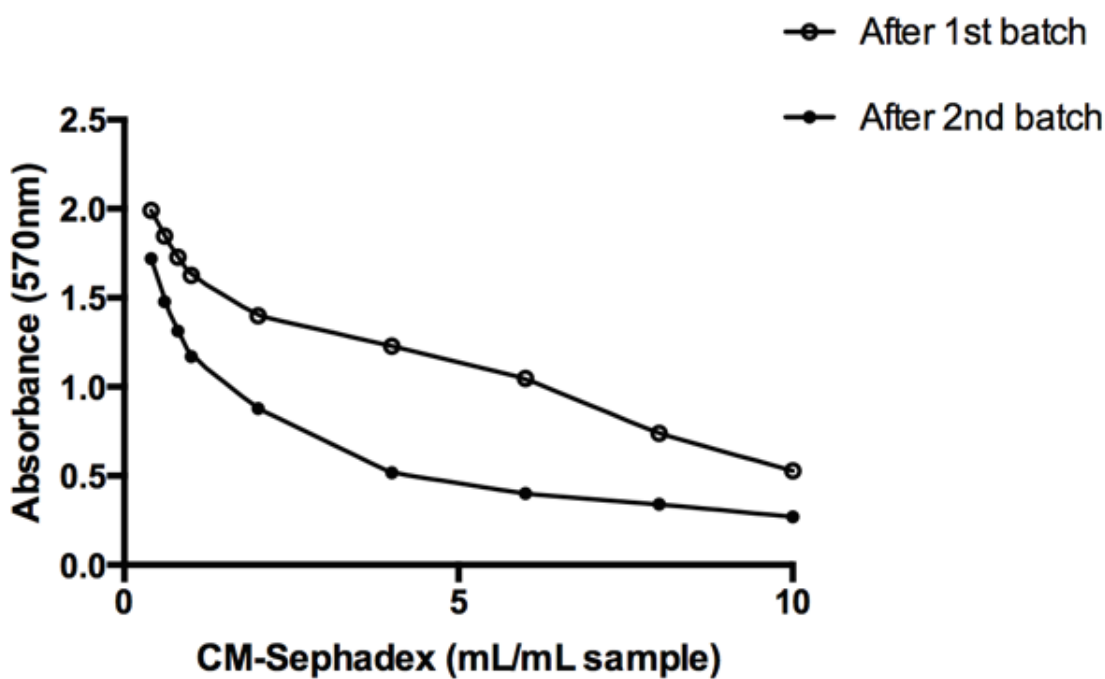
Με στόχο την επιλογή της κατάλληλης ποσότητας προσροφητή που χρειάζεται συγκεκριμένος όγκος αίματος ώστε να απαλλαχθεί από την αιμοσφαιρίνη, πραγματοποιείται πείραμα σύμφωνα με το οποίο εξετάζονται διαφορετικοί όγκοι κατιοντοανταλλάκτη έναντι σταθερού όγκου αίματος. Για τη εξαγωγή του συμπεράσματος, ως ένδειξη “καθαρισμού” χρησιμοποιείται η οπτική απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης στα 570 nm. Σύμφωνα με το γράφημα (Σχήμα 1), παρατηρείται ότι η οπτική απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης πλησιάζει στο μηδέν από τα 2 mL όγκου προσροφητή. Εφόσον ο όγκος αίματος που χρησιμοποιήθηκε είναι 1 mL, η αναλογία ‘αίματος:προσροφητή’ σε κάθε επόμενο πείραμα θα πρέπει να διατηρείται στο 1:2 v/v.



Σχήμα 1. Καμπύλη προσρόφησης της αιμοσφαιρίνης στον κατιοντοανταλλάκτη CM-Sephadex C-50 (απορρόφηση έναντι όγκου προσροφητή).

Στην περίπτωση που δεν είναι επιτυχής η απαλλαγή του αίματος από την αιμοσφαιρίνη και εξακολουθεί να υπάρχει κόκκινο ή ροζ χρώμα, ακολουθεί και δεύτερος “καθαρισμός”,

χρησιμοποιώντας τις ίδιες ποσότητες προσροφητή που χρησιμοποιούνται στην πρώτη φάση της επεξεργασίας. Ενδεικτικά, στο **Σχήμα 2** απεικονίζονται τα αποτελέσματα μίας τέτοιας προσπάθειας, όπου στην πάνω γραμμή (κλειστός κύκλος) καταγράφεται η απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης στα 570 nm ύστερα από το πρώτο τρίωρο επεξεργασίας, ενώ στην κάτω καμπύλη (ανοιχτός κύκλος) καταγράφεται η απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης στα 570 nm, ύστερα από την εκ νέου επεξεργασία του αίματος για μία ώρα.



Σχήμα 2. Καμπύλες προσρόφησης της αιμοσφαιρίνης από τον κατιοντοανταλλάκτη CM-Sephadex C-50, ύστερα από δύο χρόνους (απορρόφηση έναντι όγκου προσροφητή).

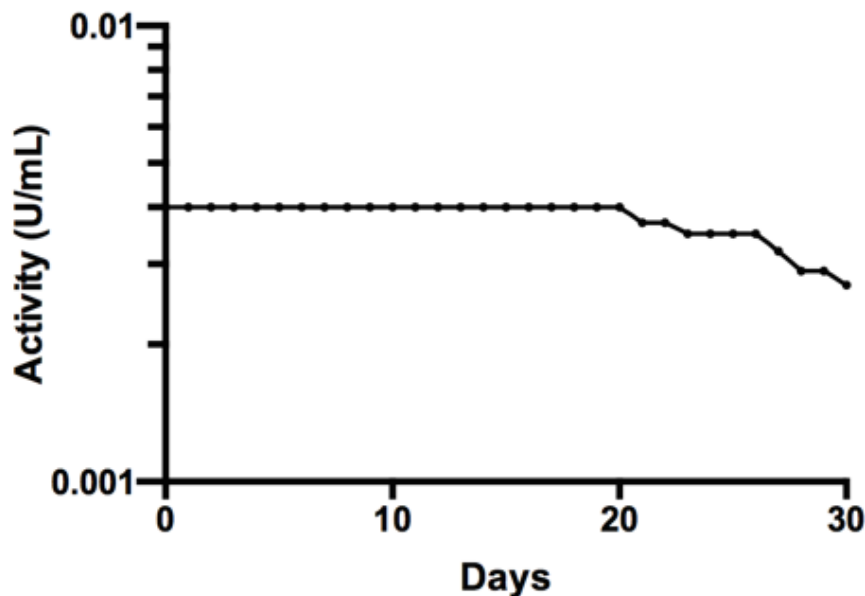
Στη **Φωτογραφία 1** φαίνεται η φιάλη αίματος από την οποία ξεκινάει όλη η ανωτέρω διαδικασία, ως και το ενζυμικό εκχύλισμα που προκύπτει, ύστερα από τη διαδικασία που περιγράφηκε στην Ενότητα 1α των Μεθόδων.



Φωτογραφία 1. Αριστερά: η φιάλη του αίματος, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται. Δεξιά: το ενζυμικό εκχύλισμα που προκύπτει ύστερα από την αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης.

2. Μελέτη της σταθερότητας της ADA στο ενζυμικό εκχύλισμα στους -20°C .

Παρόλο που το ενζυμικό εκχύλισμα παραμένει σταθερό στους 4°C από άποψη δραστηριότητας ADA, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της σταθερότητάς του στους -20°C , ώστε να μπορεί να φυλάσσεται στην κατάψυξη και να αποφεύγονται τυχόν μολύνσεις που μπορεί να προκύψουν λόγω της διατήρησής του στο ψυγείο. Για το σκοπό αυτό, 30 mL αρχικού εκχυλίσματος χωρίστηκαν σε 30 κλάσματα του 1 mL και για 30 μέρες υπολογιζόταν η ενζυμική τους δραστηριότητα (ένα διαφορετικό κλάσμα για κάθε ημέρα) σύμφωνα με το πρωτόκολλο φασματοφωτομετρικής δοκιμής που περιγράφεται στην Ενότητα 3 των Μεθόδων. Σύμφωνα, με το διάγραμμα του **Σχήματος 3**, η ενζυμική δραστηριότητα παραμένει σταθερή για τις 20 πρώτες ημέρες ενώ μετά το πέρας των 20 ημερών η δραστηριότητα αρχίζει να μειώνεται. Έτσι, το ενζυμικό εκχύλισμα μπορεί να διατηρείται στους -20°C για περίπου 3 εβδομάδες, χωρισμένο σε κατάλληλο όγκο κλασμάτων που θα χρειαστούν σε κάποιο από τα επόμενα βήματα του πειράματος (π.χ. μερικός καθαρισμός σε ανιοντοανταλλάκτη). Με τον τρόπο αυτό δεν είναι απαραίτητη κάθε φορά η εκτέλεση της διαδικασίας που περιγράφεται στην ενότητα 1α των Μεθόδων, όπως επίσης και δεν χρειάζεται η αποθήκευση πολλών ασκών ακατέργαστου αίματος για πολύ καιρό που έχει ως άμεση συνέπεια την μείωση της αρχικής ενζυμικής δραστηριότητας της ADA.

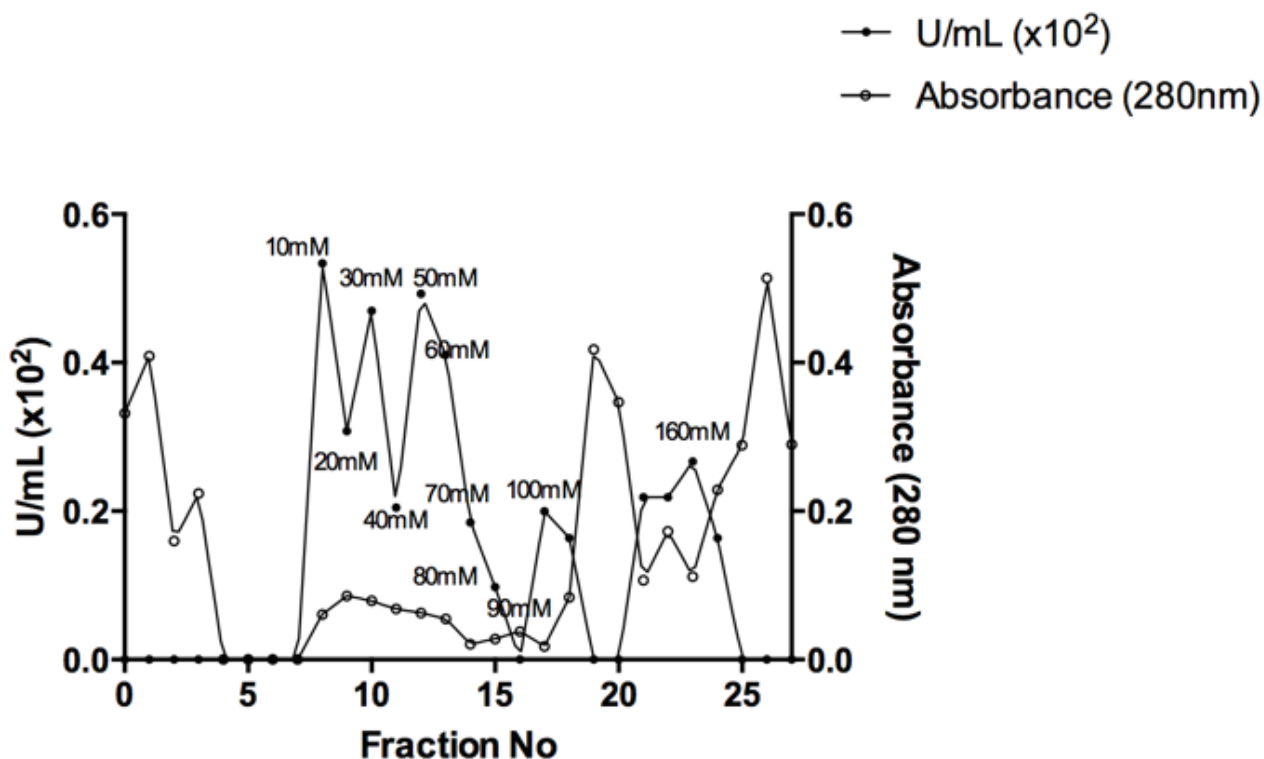


Σχήμα 3. Διάγραμμα σταθερότητας της ενζυμικής δραστηριότητας ADA συναρτήσει του χρόνου.

3. Μερικός καθαρισμός ADA1 με εφαρμογή χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής σε DEAE-Sepharose CL-6B

Ο μερικός καθαρισμός της ADA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διαλύματα NaCl από εύρος συγκέντρωσης 10 mM έως 200 mM (ανά 10 mM η αύξηση της συγκέντρωσης από το ένα διάλυμα στο άλλο). Για κάθε συγκέντρωση αλατιού λαμβάνονταν εκλούσεις των 9 mL, καθεμία από τις οποίες εξετάστηκε για την ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας της ADA σύμφωνα με το πρωτόκολλο φασματοφωτομετρικής δοκιμής που περιγράφεται στην ενότητα 1α των Μεθόδων. Ταυτόχρονα, για κάθε έκλουση λαμβανόταν η οπτική της απορρόφηση στα 280 nm, μήκος κύματος στο οποίο απορροφούν οι πρωτεΐνες κάθε διαλύματος. Έχοντας, λοιπόν, τις μετρήσεις τόσο από τη δοκιμή της ενζυμικής δραστηριότητας όσο και από την απορρόφηση στα 280 nm, δημιουργήθηκε το χρωματογράφημα του μερικού καθαρισμού (**Σχήμα 4**). Στο χρωματογράφημα συμπεριλήφθηκαν και οι αντίστοιχες μετρήσεις από τις πλύσεις που έγιναν στη στήλη του

προσροφητή καθώς και από το φορτίο του ενζυμικού εκχυλίσματος που δεν προσροφήθηκε στη στήλη (Fractions 0-7).



Σχήμα 4. Χρωματογράφημα που προκύπτει από το μερικό καθαρισμό της ADA σε ανιοντοανταλλάκτη DEAE-Sephrose CL-6B.

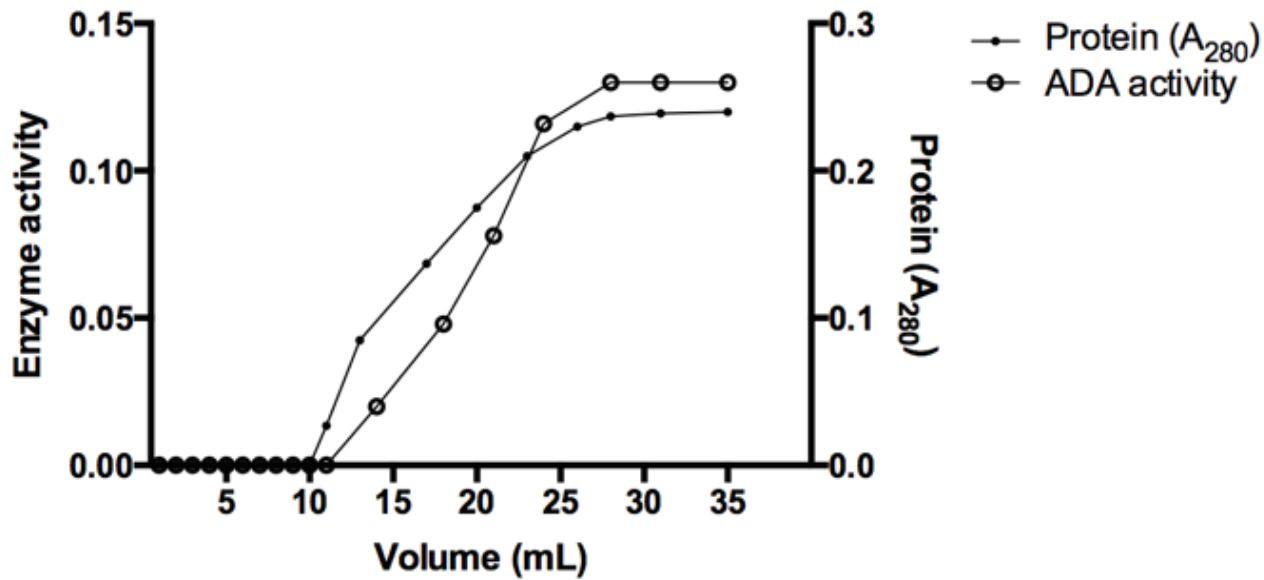
Συνολικά στη στήλη φορτώθηκαν 0.321 μονάδες ενζύμου, οι οποίες ανακτήθηκαν χωρίς απώλειες. Μάλιστα, από το άθροισμα των επιμέρους μονάδων του κάθε κλάσματος φαίνεται ότι ανακτήθηκαν 0.351 μονάδες (περίπου το 109%!!), γεγονός που όμως πιθανότατα αποδίδεται σε σφάλμα του φωτομέτρου και όχι στην πραγματικότητα. Σύμφωνα με το χρωματογράφημα, φαίνεται πως η περισσότερη ενζυμική δραστηριότητα συγκεντρώνεται στο εύρος συγκέντρωσης NaCl από 10-60 mM. Από αυτό το εύρος επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις των 10, 30, 40 και 50 mM στις οποίες υπολογίστηκε η ειδική τους δραστηριότητα σύμφωνα με τη μέθοδο προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford που περιγράφεται στην ενότητα 4 των Μεθόδων.

Step	Units	SA (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
crude extract	0.321	0.048	1	100
10mM	0.048	0.17	3.5	15
30mM	0.042	0.18	3.75	13
40mM	0,0185	0.05	1.04	5.7
50mM	0.044	0.27	5.6	13.7

Πίνακας 1. Σύνοψη των αποτελεσμάτων καθαρισμού.

4. Χωρητικότητα του προσροφητή DEAE-Sepharose CL-6B για το ένζυμο ADA

Ενζυμικό εκχύλισμα (30 mM imidazole-HCl, pH 6) εφαρμόζεται συνεχόμενα (17 mL/h) σε στήλη DEAE-Sepharose CL-6B (1 mL) που έχει προηγουμένος εξισορροπηθεί με 30 mM ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου-HCl σε pH 6. Το εκχύλισμα εφαρμόζεται συνεχόμενα μέχρις ότου η δραστηριότητα της ADA στις εκλούσεις να φτάσει μια σταθερή μέγιστη δραστηριότητα. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν (0.5 mL το καθένα) εξετάζονται για την ενζυμική τους δραστηριότητα στα 265 nm καθώς και προσδιορίζεται η πρωτεΐνη τους με βάση την απορρόφησή τους στα 280 nm (**Σχήμα 5**).



Σχήμα 5. Χωρητικότητα της στήλης DEAE-Sepharose CL-6B για την ADA1.

Ο υπολογισμός της χωρητικότητας (q) του προσροφητή πραγματοποιείται από την κατωτέρω εξίσωση (Tsamadis *et al.*, 1992):

$$q = (V_{1/2} - V_0)C_m/V$$

όπου :

q = χωρητικότητα της στήλης (units/mL),

$V_{1/2}$ = όγκος εκλουσμάτων που αντιστοιχούν στο μισό του μεγίστου δραστηκότητας του ενζύμου στα εκλούσματα (mL),

V_0 = όγκος εκλουσμάτων που αντιστοιχούν στο μισό του μεγίστου απορρόφησης της πρωτεΐνης στα εκλούσματα (στα 280 nm)

C_m = μέγιστος σταθερός αριθμός ενζυμικών μονάδων στα εκλούσματα (units)

V = συνολικός όγκος του προσροφητή (mL)

Από το **Σχήμα 5** υπολογίζονται τα εξής:

$$V_{1/2} = 20 \text{ mL}$$

$$V_0 = 16 \text{ mL}$$

$$C_m = 0.13 \text{ units}$$

Οπότε, βάσει των ανωτέρω, η χωρητικότητα, q , του προσροφητή για την ADA, ισούται με 0.52 units / mL.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στο ένζυμο απαμινάση αδενοσίνης 1 (Adenosine deaminase 1; ADA1) από άνθρωπο. Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει την απαμίνωση της αδενοσίνης προς αμμωνία και ινοσίνη, έχει δε προσελκύσει το επιστημονικό και ιατρικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες καθώς εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα (Giblett *et al.* 1972). Τέτοια ασθένεια είναι η “Συνδυαστική Ανοσοεπάρκεια” (severe combined immunodeficiency; SCID), η οποία αποτελεί μια σύνθετη μεταβολική και ανοσολογική διαταραχή και προκαλείται σε ανθρώπους, στους οποίους η απαμινάση της αδενοσίνης δεν εκφράζεται σωστά με αποτέλεσμα την συσσώρευση πουρινών στο πλάσμα και τα κύτταρα (Cohen *et al.* 1978). Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας να αναπτυχθεί ένας τρόπος αντιμετώπισης της ασθένειας, χωρίς ωστόσο να έχουν επιτευχθεί τα επιθυμητά αποτελέσματα (Onodera *et al.* 1999). Όπως ειπώθηκε και στην εισαγωγή, η απαμινάση της αδενοσίνης εντοπίζεται κυτταρικά στο κυτταρόπλασμα σε ελεύθερη μορφή, όπως επίσης και σε “ακίνητοποιημένη” μορφή σε μεμβρανικές πρωτεΐνες όπου λαμβάνει μέρος σε αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένους υποδοχείς, τους λεγόμενους υποδοχείς της αδενοσίνης A₁Rs (adenosine receptors; A₁Rs) (Gracia *et al.* 2008). Όπως φαίνεται από τα προηγούμενα, η απαμινάση της αδενοσίνης 1 αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο πέρα από την ενζυμική του δράση, χαρακτηρίζεται και από μη καταλυτικές δράσεις ως (ενεργό ή ανενεργό) μόριο το οποίο αλληλεπιδρά με υποδοχείς και καθορίζει διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Για τους παραπάνω λόγους, κρίνεται αναγκαία η σε βάθος μελέτη και κατανόηση των ιδιοτήτων του ενζύμου αυτού, κυρίως από ανθρώπινες πηγές καθώς εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις.

1. Μερικός καθαρισμός της απαμινάσης αδενοσίνης 1

Στη παρούσα πειραματική πορεία, έγιναν προσπάθειες καθαρισμού του ενζύμου από ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Οι βασικότεροι λόγοι επιλογής του συγκεκριμένου ιστού είναι ότι υπάρχει σε αφθονία, μπορεί κάποιος να έχει πρόσβαση σε μεγάλους όγκους αρχικού υλικού, τα δε ερυθροκύτταρα περιέχουν σχεδόν μόνο το ισοένζυμο ADA1 που μας αφορά (Gakis 1996). Είναι σημαντικό, όπου επιχειρείται καθαρισμός ενζύμων από φυσικές πηγές που χαρακτηρίζονται από

χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης ενζύμων και πρωτεϊνών, είναι χρήσιμο να υπάρχουν διαθέσιμες μεγάλες ποσότητες του ιστού. Ωστόσο, η απομόνωση της ADA από ερυθροκύτταρα εμπεριέχει αρκετές δυσκολίες, σημαντικότερη των οποίων είναι η ύπαρξη αιμοσφαιρίνης, η οποία πρέπει να απομονωθεί για τα περαιτέρω χρωματογραφικά βήματα. Ο αποτελεσματικός διαχωρισμός της αιμοσφαιρίνης από το εκχύλισμα του πλάσματος που προέκυψε μετά τη λύση των ερυθροκυττάρων λόγω κατεργασίας τους με νερό, πραγματοποιήθηκε με τον προσροφητή CM-Sephadex-C50 που είναι ένας κατιοντοανταλλάκτης. Ο βέλτιστος χρόνος επώασης του προσροφητή με το εκχύλισμα στους 4 °C για την πιο αποτελεσματική απομόνωση της αιμοσφαιρίνης, βρέθηκε να είναι 3 ώρες. Κατόπιν της βελτιστοποίησης του χρόνου επώασης με τον κατιοντοανταλλάκτη για τον διαχωρισμό της αιμοσφαιρίνης, έγιναν αρκετές προσπάθειες ώστε να προσδιοριστούν οι καλύτερες συνθήκες για το επόμενο χρωματογραφικό βήμα καθαρισμού του ενζύμου. Μετά την αφαίρεση της αιμοσφαιρίνης, το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιώντας τον προσροφητή DEAE-Sepharose CL-6B. Διάφορες συνθήκες μελετήθηκαν, όπως pH και ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να προσδιοριστούν οι άριστες συνθήκες ιοντοανταλλαγής. Τελικά, με βάση και άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα, βρέθηκε ότι καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με τη χρήση ιμιδαζολίου ως ρυθμιστικό διάλυμα, σε pH 6 και συγκέντρωση 30 mM. Επιπλέον, στις ακόλουθες εκλούσεις που πραγματοποιήθηκαν με βαθμίδωση της ιοντικής ισχύος, χρησιμοποιώντας χλωριούχο νάτριο (NaCl), βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ADA εκλύεται στα πρώτα πέντε κλάσματα (κλάσμα ανά 10 mM) στο εύρος 10-50 mM. Σε αυτό το σημείο, κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ότι η ποσότητα του ενζύμου που εκλουόταν σε κάθε επανάληψη του καθαρισμού ήταν μικρή, ακόμη και όταν η διαδικασία περιελάμβανε αρκετά μεγάλο όγκο αίματος στο αρχικό στάδιο (150-200 mL). Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν τόσο χαμηλή που ήταν αναγκαίο να συμπυκνωθεί το κλάσμα έως και 10 φορές, ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford καθώς και να ανιχνευθεί το ένζυμο με τη μέθοδο της μεταφοράς κατά Western (Western Blotting). Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ακόμη μεγαλύτεροι όγκοι αίματος θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αρχικά, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου μετά το πρώτο στάδιο καθαρισμού. Αυτή η παρατήρηση επαληθεύεται και από άλλες μελέτες (Schrader *et al.* 1976) όπου χρησιμοποιήθηκαν πολύ

μεγαλύτεροι αρχικοί όγκοι αίματος (20-25 L) με σκοπό την απόκτηση αποδεκτής καθαρής ποσότητας ενζύμου στο τελικό στάδιο.

2. Ετερόλογη έκφραση της απαμινάσης αδενοσίνης 1 (ADA1)

Λόγω της έκφρασης του ενζύμου σε χαμηλά επίπεδα στα ερυθροκύτταρα, η ετερόλογη έκφραση και παραγωγή του ενζύμου σε *E. coli* με τη μέθοδο του ανασυνδυασμένου DNA θα ήταν πολύ χρήσιμη. Για τον λόγο αυτό, κλωνοποιήθηκε ένα συνθετικό γονίδιο της ανθρώπινης απαμινάσης αδενοσίνης 1, του οποίου η νουκλεοτιδική αλληλουχία είναι βελτιστοποιημένη για ετερόλογη έκφραση στον μικροοργανισμό *E. Coli* (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ). Έχει αποδειχθεί ότι πολλές ευκαρυωτικές πρωτεΐνες δεν εκφράζονται στο *E. coli* λόγω του ότι τα γονίδια τους χαρακτηρίζονται από κάποια κωδικόνια, τα οποία είναι σπάνια για τον μεταφραστικό μηχανισμό του *E. coli*. Για να αποφευχθεί μια τέτοια πιθανή αποτυχία έκφρασης, τα γονίδια ευκαρυωτικών πρωτεϊνών κατασκευάζονται συνθετικά αντικαθιστώντας τα κωδικόνια της φυσικής αλληλουχίας του γονιδίου, με αντίστοιχα που “προτιμά” το *E. coli* και κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ. Τα επίπεδα έκφρασης που μπορούν να επιτευχθούν με την ετερόλογη έκφραση είναι πραγματικά πολύ υψηλά. Μάλιστα υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες, στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί και αποδόσεις της τάξεως των 50 mg καθαρής πρωτεΐνης ανα 1 L θρεπτικού υλικού (Peti *et al.* 2007). Θα ήταν πολύ εποικοδομητικό, λοιπόν, εάν η ανθρώπινη απαμινάση αδενοσίνης μπορούσε να εκφραστεί ετερόλογα χρησιμοποιώντας τα πλασμίδια που ήδη έχουν προετοιμαστεί κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης. Μάλιστα, κάποιες αρχικές προσπάθειες έκφρασης του ένζυμου πραγματοποιήθηκαν και στην παρούσα μελέτη εξετάζοντας διαφορετικά στελέχη *E. coli* για την καλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης, απαιτούνται όμως περαιτέρω πειράματα για την ανάπτυξη ενός επαναλήψιμου πρωτοκόλλου ετερόλογης παραγωγής και καθαρισμού. Σε αυτό το σημείο όμως, θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν θα πρέπει να παραλείπεται η απομόνωση του ενζύμου από τη φυσική πηγή του, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για ένα ανθρώπινο μόριο. Ο βασικότερος λόγος έγκειται στο γεγονός ότι υπάρχουν υψηλές πιθανότητες μια πρωτεΐνη ή ένα ένζυμο να υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως γλυκοζυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση κ.α. οι οποίες δε μπορούν όλες και στον επιθυμητό βαθμό να πραγματοποιηθούν

όταν ακολουθείται ετερόλογος έκφραση. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι η ανθρώπινη απαμινάση αδενοσίνης 1 υπόκειται σε ακετυλίωση. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να καθαριστεί από τη φυσική πηγή (π.χ. ερυθροκύτταρα ή άλλον ιστό ανθρώπου) και από ετερόλογη έκφραση και να συγκριθούν οι ειδικές δραστηριότητες. Ιδανικά, αυτές θα πρέπει να είναι περίπου ίδιες, ώστε να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις και τα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται καθαρό ένζυμο από ετερόλογη έκφραση.

3. Συγκριτική μελέτη της απαμινάσης αδενοσίνης 1 με την απαμινάση αδενοσίνης 2.

Θα ήταν ίσως χρήσιμη η μελέτη και της ADA2, ώστε να γίνει σύγκριση των δύο ισομορφών. Σε πειράματα που έγιναν στην παρούσα μελέτη, μετρήθηκε η συνολική δραστηριότητα ADA, και από τις δύο ισομορφές. Αν και έχει αναφερθεί και αλλού ([Gakis 1996](#)) ότι τα επίπεδα έκφρασης της ADA2 στα ερυθροκύτταρα είναι χαμηλά, θα είχε ενδιαφέρον να χρησιμοποιηθεί κάποιος αναστολέας του ενός ισοενζύμου και να προσδιοριστεί η δραστηριότητα. Μια προσέγγιση θα ήταν να συμπεριληφθεί ο αναστολέας EHNA στο εκχύλισμα, ο οποίος αναστέλλει την δράση της ADA1 ([Kelly et al. 1996](#)). Τότε θα αναμέναμε ελάχιστη έως και καθόλου δραστηριότητα. Ακόμη, θα είχε ενδιαφέρον να γίνουν προσπάθειες ανοσοανίχνευσης (Western-blotting) και της ADA2 στο εκχύλισμα από τα ερυθροκύτταρα, καθώς θα έδινε περαιτέρω πληροφορίες για την παρουσία ή μη του συγκεκριμένου ενζύμου παράλληλα με την ισομορφή 1.

6.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Κλωνοποίηση και δοκιμές έκφρασης της ανθρώπινης απαμινάσης αδενοσίνης 1 (ADA1).

Παράλληλα με το project που περιγράφηκε και αναλύθηκε στις προηγούμενες ενότητες, ξεκίνησε να πραγματοποιείται και ένα δεύτερο, το οποίο αφορά τον καθαρισμό της ADA1 από ανασυνδυασμένα βακτηριακά κύτταρα. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η σύγκριση των αποτελεσμάτων των καθαρισμών της ADA1 τόσο από το ανθρώπινο αίμα όσο και από την έκφραση του ενζύμου σε προκαρυωτικό σύστημα.

Το γονίδιο της ανθρώπινης ADA1 αποτελείται από 1092bp και 363 αμινοξέα με την παρακάτω αμινοξική ακολουθία:

```
MAQTPAFDKPKVELHVHLDGSIKPETILYYGRRRGIALPANTAEGLLNVIGMDKPLTLPD  
FLAKFDYYMPAIAAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVRYSPELLANSKVEPIPWNQ  
AEGDLTPDEVVALVGQGLQEGERDFGVKARSILCCMRHQPNWSPKVVVELCKKYQQQTV  
VAIDLAGEDETIPGSSLLPGHVQAYQEAVKSGIHRVHAGEVGSAAEVVKEAVDILKTERLG  
HGYHTLEDQALYNRLRQENMHFEICPWSSYLTGAWKPDTEHAVIRLKNQANYSLNTD  
DPLIFKSTLTDYQMTKRDMGFTEEEFKRLNINAAKSSFLPEDEKRELLDILLYKAYGMPP  
SASAGQNL
```

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου παραγγέλθηκαν δύο συνθετικοί κλώνοι, ένας που εφεξής θα αναφέρεται ως “untagged” και ένας που θα αναφέρεται ως “tagged”. Ο tagged κλώνος φέρει μια ‘ουρά’ από 6 ιστιδίνες που σε επόμενο στάδιο θα χρησιμεύσουν στον καθαρισμό του ενζύμου με χρωματογραφία συγγένειας. Οι κλώνοι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι συνθετικοί και αποτελούνται από βελτιστοποιημένες τριπλέτες κωδικονίων, έτσι ώστε να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα που θα δημιουργούνταν από την προσπάθεια έκφρασης ενός ευκαρυωτικού γονιδίου σε προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης. Οι δύο κλώνοι ενισχύονται με PCR και κλωνοποιούνται σε πλασμίδιο μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Το πλασμίδιο μετασχηματίζει διαφορετικά στελέχη *E.coli* τα οποία στη συνέχεια εξετάζονται με SDS-PAGE για την ανίχνευση της πρωτεΐνης.

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου είναι οι εξής:

Forward:
5'-GAAGGAGATATACATATGGCACAGACACCGGCATTTGATAAACCG-3'

Reverse (untagged clone):
5'-GTGATGGTGGTGTATGATGTTACAGATTCTGACCTGCGCTTGCGC-3'

Reverse (tagged clone):
5'-GTGATGGTGGTGTATGATGCAGATTCTGACCTGCGCTTGCGC-3'

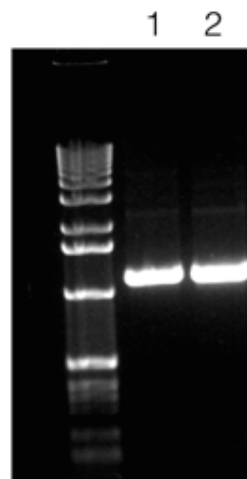
PCR reaction

FW: 2μL
RV: 2μL
dNTPs: 1μL
buffer: 10μL
template: 1μL
Q5 polymerase: 0,5μL
H₂O: 33,5μL

final volume: 50μL

PCR program

1st stage
98 °C → 30"
2nd stage
98 °C → 10"
61 °C → 20"
72 °C → 40" } 30 cycles
3rd stage
72 °C → 120"



1) hADA1 untagged and 2) hADA1 tagged clone

Σχήμα 6. Η αντίδραση και το πρόγραμμα της PCR για την ενίσχυση των γονιδίων.

Το προϊόν της αντίδρασης υποβλήθηκε σε καθαρισμό χρησιμοποιώντας ένα kit σύμφωνα με τις οδηγίες του (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey Nagel). Ο συγκεκριμένος καθαρισμός γίνεται για να απομονωθούν τα διάφορα αντιδραστήρια της αντίδρασης PCR και να αποκτηθεί το τελικό δείγμα επαναδιαλυμένο σε νερό (Σχήμα 6).

Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση είναι ο pETite C-His Kan vector της εταιρείας Lucigen. Στο **Σχήμα 7** φαίνονται οι περιοχές που περιβάλλουν τη θέση κλωνοποίησης στο φορέα καθώς και οι θέσεις ανασυνδυασμού στο πλασμίδιο.

pETite C-His Kan vector



The cloning principle relies on the homologous recombination of two sites at the 5' and 3' respectively of the gene and the plasmid.

Σχήμα 7. Ο φορέας κλωνοποίησης pETite C-His Kan και οι θέσεις για τον ομόλογο ανασυνδυασμό.

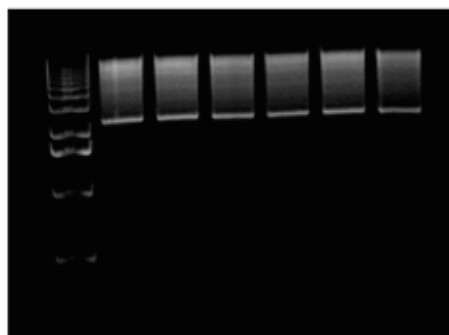
Το πλασμίδιο κόπηκε με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (NcoI και BamHI) έτσι ώστε να αποκτήσουμε γραμμικό κομμάτι πλασμιδιακού DNA. Στο **Σχήμα 8** φαίνεται η διαδικασία της πέψης του πλασμιδίου, το προϊόν της οποίας ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1% w/v.

Plasmid digestion

BSA: 10μL
DNA: 50μL
NcoI: 4μL
BamHI: 4μL
10XBuffer: 10μL
ddH₂O: 22μL

final volume: 100μL

- incubation at 37°C for 2h followed by extraction from 1% agarose gel.



Σχήμα 8. Η διαδικασία της πέψης του πλασμιδίου.

Μετά την πέψη του πλασμιδίου, οι ζώνες στην αгарόζη κόβονται, τοποθετούνται σε eppendorf μαζί με resuspension buffer και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο του kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey Nagel) το οποίο περιλαμβάνει συνεχείς πλύσεις με 70% αιθανόλη και τελικά έκλουση από την ειδική κολώνα με τη χρήση νερού. Ακολουθεί η κλωνοποίηση του γονιδίου της hADA1 (tagged και untagged) στο πλασμίδιο. Για το σκοπό αυτό, εισάγονται σε δεκτικά κύτταρα 10G 3-5 μL κομμένου πλασμιδίου και 5-10 μL του γονιδίου (προϊόν της PCR). Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά και ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 60 δευτερόλεπτα. Το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 2 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται 500 μL θρεπτικού μέσου

(LB/2XYT/SOC) και αφήνεται υπό ανάδευση στους 37 °C για 1 ώρα. Όταν περάσει η 1 ώρα, στρώνονται τρυβλία θρεπτικού μέσου που περιέχουν καναμυκίνη (συγκέντρωση 30 µg/mL) και τοποθετούνται στους 37 °C overnight. Την επόμενη ημέρα και εφόσον έχουν σχηματιστεί αποικίες, κάποιες από αυτές επιλέγονται τυχαία έτσι ώστε να αναλυθούν με PCR (Σχήμα 8) με σκοπό να ελεγχθεί ποια ή ποιες από αυτές περιέχουν το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τη συγκεκριμένη PCR (colony PCR) είναι οι εκκινητές του πλασμιδίου.

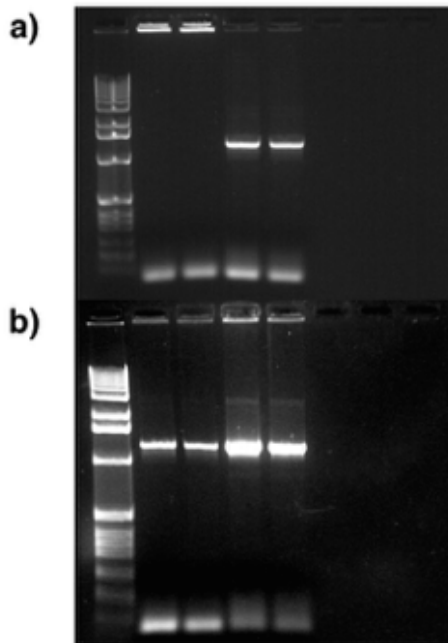
PCR reaction

FW: 1µL
 RV: 1µL
 dNTPs: 1,5µL
 10x buffer: 5µL
 MgCl₂ 50mM: 1,5µL
 Taq polymerase: 0,5µL
 ddH₂O: 40µL
 cells

 final volume: 50µL

PCR program

1st stage
 94 °C ———→ 4'
 2nd stage
 94 °C ———→ 45"
 55 °C ———→ 30"
 72 °C ———→ 2' } 30 cycles
 3rd stage
 72 °C ———→ 10'



a) Positive colonies for the hADA1 untagged and b) positive colonies for the hADA1 tagged clone

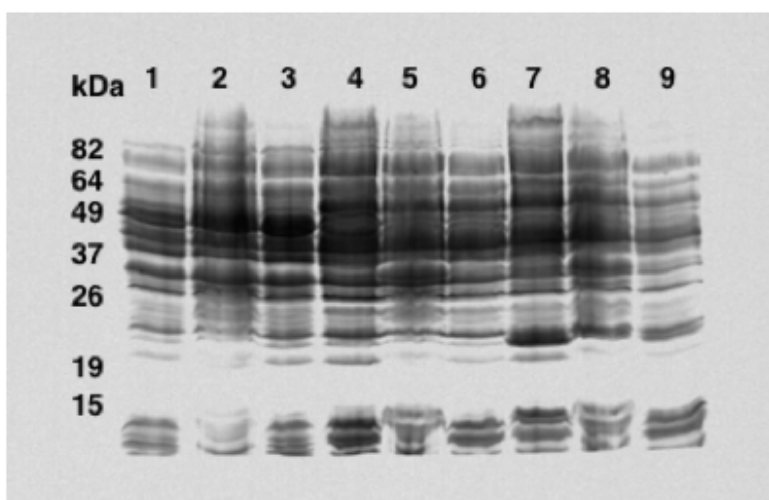
Σχήμα 9. Η αντίδραση και το πρόγραμμα της PCR αριστερά και δεξιά a) οι θετικές αποικίες για τον untagged κλώνο και b) οι θετικές αποικίες για τον tagged κλώνο.

Διαλέγουμε κάποια από τις αποικίες που μας έχουν δώσει 'σήμα' κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης και εμβολιάζουμε σε φλάσκα με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (2XYT) ΤΩΝ 50 mL, στην οποία έχουμε προσθέσει 50 μ L καναμυκίνης (τελική συγκέντρωση 30 μ g/mL). Η φλάσκα αφήνεται υπό ανάδευση overnight στους 37 °C και την επόμενη μέρα η καλλιέργεια χωρίζεται σε 2 μέρη: 15 mL φυγοκεντρώνται στα 6,000 g για 5 λεπτά έτσι ώστε να παραληφθεί η 'πάστα' των κυττάρων και να απομονωθεί το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και 35 mL φυγοκεντρώνται στα 3,000 g για 10 λεπτά έτσι ώστε να παραληφθεί η 'πάστα' των κυττάρων και να αποθηκευθεί στους -80 °C μαζί με γλυκερόλη. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες kit (PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen).

Ακολουθεί μετασχηματισμός διαφορετικών εκφραστικών στελεχών έτσι ώστε να ελεγχθεί η ετερόλογη του συνθετικού γονιδίου της hADA1. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται προέρχονται από διαφορετικά εκφραστικά στελέχη *E. coli*, όπως BL21(DE3), BL21(DE3) Rosetta και BL21(DE3) pLysS. Καθαρό πλασμιδιακό DNA (100ng) εισάγεται σε κάθε είδος κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω στη διαδικασία της κλωνοποίησης. Αφού αναπτυχθούν αποικίες στα τρυβλία, εμβολιάζονται σε φλάσκες που περιέχουν θρεπτικό μέσο ανάπτυξης με αντιβιοτικό (όπως στα προηγούμενα βήματα) και αφήνονται υπό ανάδευση στους 37 °C overnight. Παράλληλα, σκέτα κύτταρα που δεν έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμιδιακό DNA εμβολιάζονται σε φλάσκες που δεν περιέχουν αντιβιοτικό, έτσι ώστε να λειτουργήσουν ως 'μάρτυρες' και να ελεγχθούν για ενδογενείς πρωτεΐνες *E. coli*. Την επόμενη ημέρα, παίρνουμε 2 mL από την κάθε καλλιέργεια και εμβολιάζουμε καινούργιες φλάσκες με θρεπτικό μέσο και αντιβιοτικό. Ύστερα από 1 ώρα, μετράμε την απορρόφηση στην κάθε καλλιέργεια σε μήκος κύματος 600 nm και μόλις φτάσει σε $A_{600}=0.6$ προσθέτουμε IPTG (50 μ L για κάθε 50 mL θρεπτικού). Το IPTG χρησιμοποιείται ως επαγωγέας της έκφρασης των πρωτεϊνών. Όλες οι καλλιέργειες αφήνονται υπό ανάδευση στους 37 °C για 4 ώρες και μετά το πέρας των 4 ωρών φυγοκεντρώνται στα 6,000 g για 15 λεπτά. Το ίζημα που φέρει τα κύτταρα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (εδώ χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7.5), τα κύτταρα λύνονται μέσω υπερήχων (μια μικρή ποσότητα του μίγματος φυλάσσεται έτσι ώστε να εξεταστεί η πιθανότητα ύπαρξης πρωτεϊνικών

συσσωματωμάτων τα οποία κατακρημνίζονται ενδοκυτταρικά κατά τη διάρκεια της (υπερ)έκφρασης και οδηγούν σε παραγωγή ανενεργού ενζύμου) και φυγοκεντρώνονται στα 16,000 g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο εξετάζεται για την παρουσία της πρωτεΐνης μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες.

Στο συγκεκριμένο πείραμα ελέγχθηκε μόνο το γονίδιο που δεν περιείχε την ουρά με τις έξι ιστιδίνες. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης δεν δίνει ξεκάθαρα αποτελέσματα για το αν εκφράζεται ή όχι, παρόλο που διακρίνεται ίσως μια εντονότερη ζώνη (**Φωτογραφία Α**, σειρά 3) σε εύρος kDa 37-49. Ταυτόχρονα, η φασματοφωτομετρική δοκιμή που εφαρμόζεται για την ανίχνευση της ενζυμικής δραστηριότητας της ADA είναι δύσκολο να μας δώσει πληροφορίες, καθώς στο μήκος κύματος στο οποίο πραγματοποιείται (265 nm) ανιχνεύονται περαιτέρω νουκλεϊκά οξέα και άλλα μόρια καθώς πρόκειται για ένα κυτταρικό εκχύλισμα που περιέχει πληθώρα άλλων ουσιών. Κρίνεται, λοιπόν, απαραίτητη η μελέτη του γονιδίου της hADA1 που φέρει την ουρά των έξι ιστιδινών, έτσι ώστε το υπερκείμενο που θα προκύψει από τη λύση των κυττάρων να υποβληθεί σε χρωματογραφία συγγένειας (στήλη νικελίου) και να δώσει ένα πιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα.



Φωτογραφία Α. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. (1) BL21(DE3) 'μάρτυρας', (2) BL21(DE3) insoluble, (3) BL21(DE3) soluble, (4) BL21(DE3) Rosetta 'μάρτυρας', (5) BL21(DE3) Rosetta insoluble, (6) BL21(DE3) Rosetta soluble, (7) BL21(DE3) pLysS 'μάρτυρας', (8) BL21(DE3) pLysS insoluble, και (9) BL21(DE3) pLysS soluble.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη

Agarwal, R.P., Sagar, S.M., Parks, R.E. Jr. (1974). *Adenosine Deaminase from Human Erythrocytes: purification and effects of adenosine analogs*. *Biochemical Pharmacology*. 24:693-701

Aran, J.M., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrons, J.L., Franco, R. (1991). *Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear cells: immunochemical localization using light and electron microscopy*. *J. Histochem. Cytochem.* 39:1001-1008

Aikawa, T., Umemori-Aikawa, Y., Fisher, J.R. (1977) *Purification and properties of the adenosine deaminase from the midgut gland of a marine bivalved mollusk *Atrina* spp.* *Comp. Biochem. Physiol.* 58B:357-364

Akedo, H., Nishihara, H., Shinkai, K., Komatsu, K., Ishikawa, S. (1972). *Multiple forms of human adenosine deaminase. Purification and characterisation of two molecular species*. *Biochim. Biophys. Act.* 276:257-271

Brownson, C., Spencer, N. (1972). *Partial Purification and Properties of the Two Common Inherited Forms of Human Erythrocyte Adenylate Kinase*. *Biochem. J.* 130:797-803

Bhaumik, D., Medin, J., Gathy, K., Coleman, M.S. (1993). *Mutational analysis of active site residues of human adenosine deaminase*. *J. Biol. Chem.* 268(8):5464-5470

Brady, T.G., O'Donovan, C.J. (1965). *A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species*. *Comp. Bioch. Physiol.* 14:101-119

Bota, A., Gella, F.J., Canalias, F. (2000). *Purification of human adenosine deaminase for the preparation of a reference material*. *Journal of Chromatography B.* 737:237-244

Cohen, M.V., Downey, J.M. (2008). *Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection*. *Basic Res. Cardiol.* 103:203-215

Chen, S.H., Ochs, H.D., Scott, C.R., Giblett, E.R., Tingle, A.J. (1978). *Adenosine deaminase deficiency: Disappearance of adenine deoxynucleotides from a patient's erythrocytes after*

successful marrow transplantation. J. Clin. Invest. 62:138-144

Catania, M.V., Sortino, M.A., Rampello, L., Canonico, P.L., Nicoletti, F. (1991). *Adenosine deaminase increases release of excitatory amino acids through a mechanism independent of adenosine depletion. Neuropharmacology 30:153-159*

Ciruela, F., Saura, C., Canela, E.I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (1996). *Adenosine deaminase affects ligand- induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. FEBS Lett. 380(3):219 -223*

Cohen, A., Hirschhorn, R., Horowitz, S.D., Rubinstein, A., Polmar, S.K., Hong, R., Martin, D.W. Jr. (1978). *Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:472-476*

Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., Camaioni, E. (2001). *Adenosine deaminase: Functional Implications and Different Classes of Inhibitors. Med. Res. Rev. 21(2):105-128*

Daval, J.L., Nehlig, A., Nicolas, F. (1991). *Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. Life Sci. 49(20):1435-1453*

Daddona P.E. (1981). *Human adenosine deaminase. J. Biol. Chem. 256:12496-12501*

Fuxe, K., Marcellino, D., Genedani, S., Agnati, L. (2007). *Adenosine A(2A) receptors, dopamine D(2) receptors and their interactions in Parkinson's disease. Mov. Disord. 22:1990–2017*

Franco, R., Valenzuela, A., Lluís, C., Blanco, J. (1998) *Enzymatic and extraenzymatic role of ectoadenosine deaminase in lymphocytes. Immunol. Rev. 161:27-42*

Furuta, H., Okano, M., Matsumoto, S., Kotani, H., McGarrity, G.J., Blaese, R.M., Sakiyama, Y. (1998). *Successful peripheral T-lymphocyte- directed gene transfer for a patient with*

severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. Blood. 91:306

Ferré, S. (2008). *An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine.* J. Neurochem. 105(4): 1067-1079

Gleeson, M.P., Burton, N.A., Hillier, I.H. (2003). *The mechanism of adenosine deaminase catalysis studied by QM/MM calculations: The role of histidine 238 and the activity of the alanine 238 mutant.* Phys. Chem. Chem. Phys. 5:4272-4278

Gakis, C. (1996). *Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role.* Eur. Resp. J. 9:632-633

Gracia, E., Cortes, A., Meana, J.J., Garcia-Sevilla, J., Herhsfield, M.S., Canela, E.I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., Casado, V. (2008). *Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A1 adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for [³H](R)-pilocarpine binding to the caudate nucleus.* J. Neurochem. 107:161-170

Gleeson, M.P., Burton, N.A., Hillier, I.H. (2003). *Prediction of the potency of inhibitors of adenosine deaminase by QM/MM calculations.* Chem. Commun. 7(17):2180-2181

Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B., Pacher, P. (2008). *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases.* Nat. Rev. Drug. Disc. 7:759-770

Homma, K.J., Tanaka, Y., Matsushita, T., Yokoyama, K., Matsui, H., Natori, S. (2001). *Adenosine deaminase activity of insect derived growth factor is essential for its growth factor activity.* J. Biol. Chem. 276(47):43761-43766

Hershfield, M.S., Buckley, R., Greenberg, M.L., Melton, A.L., Schiff, R., Hatem, C., Kurtzberg, J., Markert, M.L., Kabayashi, R.H., Kobayashi, A.L., Abuchowski, A. (1987). *Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethyleneglycol-modified adenosine deaminase.* New Eng. J. Med. 316:589-595

Iwaki-Egawa, S., Watanabe, Y. (2002). *Characterization and purification of adenosine deaminase 1 from human and chicken liver*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*

133:173-182

Kelly, M., Vestling, M.M., Murphy, C.M., Hua, S., Sumpter, T., Fenselau C. (1996). *Primary structure of bovine adenosine deaminase*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

14:1513-1519

Kurz, L., Frieden, C. (1987). *Adenosine deaminase converts purine riboside into an analogue of a reactive intermediate: a ¹³C NMR and kinetic study*. *Biochem.* 26:8450-8457

Lupidi, G., Marmocchi, F., Falasca, M., Venardi, G., Cristalli, G., Grifantini, M., Witthead, E., Riva, F. (1992). *Adenosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*: interaction with ground and transition state analogs*. *Biochim Biophys Acta.* 1122:311-316

Ma, P.F., Fisher J.R. (1968). *Two different hepatic adenosine deaminase in the chicken*.

Biochim. Biophys. Acta 159:153-159

Osborne, W.R.A., Spencer, N. (1973). *Partial Purification and Properties of the Common Inherited Forms of Adenosine Deaminase from Human Erythrocytes*. *Biochem. J.* 133:117-123

Onodera, M., Ariga, T., Kawamura, N., Kobayashi, I., Ohtsu, M., Yamada, M., Tame, A.,

Furuta, H., Okano, M., Matsumoto, S., Kotani, H., McGarrity, G.J., Blaese, R.M., Sakiya

ma, Y. (1998). *Successful peripheral T-lymphocyte- directed gene transfer for a patient with*

severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood.*

91:306.

- Peti, W., Page, R.** (2007). *Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost*. Protein Expression and Purification, 51(1):1-10
- Rossi, C.A., Lucacchini, A., Montali, U., Ronca, G.** (1975). *A general method of purification of adenosine deaminase by affinity chromatography*. Int. J. Peptide Protein Res. 7:81-89
- Schrader, W.P., Stacy, A.R., Pollara, B.** (1975). *Purification of Human Erythrocyte Adenosine Deaminase by Affinity Column Chromatography*. J. Biol. Chem. 251(13):4026-4032
- Trotta, P.P., Smithwick, E.M., Balis, M.E.** (1976). *A normal level of adenosine deaminase activity in the red cell lysates of carriers and patients with severe combined immunodeficiency disease*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 73(1):104-108
- Tsamadis, G., Papageorgakopoulou, N., Clonis, Y.** (1992). *Downstream processing of diagnostic enzymes: Optimised protocols for the simultaneous separation and purification of lactate dehydrogenase and pyruvate kinase from rabbit muscle*. Bioprocess Engineering. 7:213-218
- Ugochukwu, E., Zhang, Y., Hapka, E., Yue, W.W., Bray, J.E., Muniz, J., Burgess-Brown, N., Chaikuad, A., Kavanagh, K.L., Oppermann, U.** (2009). *The crystal structure of human adenosine deaminase*. (to be published)
- Ungerer, J.P.J., Oosthuizen, H.M., Bissbort, S.H., Vermaak, W.J.H.** (1992). *Serum Adenosine Deaminase: Isoenzymes and Diagnostic Application*. Clin. Chem. 38(7):1322-1326
- Vonbonin, A., Huhn, J., Fleischer, B.** (1998). *Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells - Analysis of an alternative T- cell activation pathway*. Immunol. Rev.161:43-53
- Wilson, D.K., Quiocho, F.A.** (1992). *A pre-transition-state-mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water*. Biochemistry 32:1689-1694
- Zavialov, A.V., Yu, X., Spillmann, D., Lauvau, G., Zavialov, A.V.** (2010). *Structural Basis for the Growth Factor Activity of Human Adenosine Deaminase ADA2*. J. Biol. Chem. 285:12367-12377

Zurovec, M., Dolezal, T., Gazi, M., Pavlova, E., Bryant, P.J. (2002). *Adenosine deaminase-related growth factors stimulate cell proliferation in Drosophila by depleting extracellular adenosine*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(7):4403-4408

Ελληνική

Κλώνης, Ι. *Ενζυμολογία*, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Αιγάλεω, 2007.

Κλώνης, Ι. *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη, 3^η έκδοση, 2013