

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η HPNAP (Helicobater Pylori Neutrophil Activating Protein) είναι μια δωδεκαμερής πρωτεΐνη του παθογόνου μικροοργανισμού *Helicobacter pylori*, η οποία έχει αποδειχθεί ότι προάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης της σειράς CD11b/CD18 στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα, προκαλώντας την πρόσδεσή τους στο ενδοθήλιο και την αυξημένη χημειοταξία τους. Επίσης αλληλεπιδρά με τα ουδετερόφιλα, προκαλώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και την καταστροφή των ιστών του ξενιστή.

Με σκοπό την αλληλεπίδραση της περιοχής που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τα ουδετερόφιλα το αμινοτελικό άκρο της HPNAP (αμινοξέα 1-57) κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pET11a. Ο ανασυνδυασμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli* BL21(DE3). Η υπερέκφραση έγινε με την χρήση IPTG και τα κύτταρα λύθηκαν με την χρήση υπερήχων. Το κυτταρικό εκχύλισμα αιωρήθηκε σε διάλυμα 6M Urea, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M NaCl.

Εν συνεχεία το κυτταρικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε κλασματική κατακρήμνιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και το κλάσμα που περιείχε το μεγαλύτερο τμήμα της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα βήματα. Η διάλυση του κλάσματος με την χρήση με την χρήση διαλυμάτων χαμηλής ιονικής ισχύος είχε ως αποτέλεσμα την κατακρήμνιση του αμινοτελικού άκρου με τις άλλες πρωτεΐνες του διαλύματος. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος όλες οι διαδικασίες καθαρισμού διενεργήθηκαν με την χρήση διαλυμάτων συγκεντρώσεως 2M σε ουρία η μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες διαδικασίες καθαρισμού, όπως η χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής, χωρίς όμως επιτυχία. Η περιοχή αυτή της HPNAP αποτελείται από δυο α-έλικες, οι οποίες συνδέονται με έναν βρόγχο. Η μία α-έλικα η οποία είναι υδρόφιλος εκτίθεται προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης και πιθανόν να εμπλέκεται στην διαδικασία πρόσληψης και εναπόθεσης σιδήρου. Η άλλη έλικα είναι υδρόφοβη και προστατεύεται από άλλα δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης. Κατά την διαδικασία της υπερέκφρασης το πεπτίδιο εκτίθεται σε διάφορα κυτταρικά στοιχεία με τα οποία θα μπορούσε θεωρητικά να αναπτύξει αλληλεπιδράσεις η να αποδιοργανώνεται δομικά. Και στις δύο περιπτώσεις οι πιθανές αλληλεπιδράσεις οδηγούν στην συσσωμάτωση του με άλλες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατός ο καθαρισμός του. Ο καθαρισμός του τμήματος αυτού επετεύχθη τελικώς με την κλωνοποίηση του γονιδίου του στον πλασμιδιακό φορέα pET29c και την υπερέκφραση του ως χημικτικής πρωτεΐνης συνδεδεμένης με ουρά 6 ιστιδινών. Η διαδικασία καθαρισμού

επετεύχθη σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα το κυτταρικό εκχύλισμα εκλούστηκε από μια στήλη αγκιστείας Ni-NTA. Το δεύτερο βήμα περιελάμβανε την κλασματική κατακρήμνιση με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, οπότε και το πρωτεϊνικό αυτό τμήμα απομονώθηκε με μεγάλη καθαρότητα στο κλάσμα 40%.

Για να γίνει κατανοητή η μοναδική και απροσδόκητη συμπεριφορά της αμινοτελικού άκρου της HPNAP, μελετήθηκαν οι δομικές της ιδιότητες και η σταθερότητά της με την χρήση τεχνικών μοριακής δυναμικής και του προγράμματος NAMD. Χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων CHARMM27 για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Το τμήμα αποκόπηκε από την κρυσταλλική δομή της HPNAP και προσομοιώθηκε σε σφαίρα νερού σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από 300 έως 340 K, με σκοπό να γίνει κατανοητή η αξιοσημείωτη αντίστασή του στον καθαρισμό του με την χρήση καθιερωμένων μεθόδων της βιοχημείας. Η δομή του μορίου εμφανίζεται να είναι σταθερή στους 320, ενώ σταδιακά η πρωτεΐνη μετουσιώνεται από τους 320 στους 340.