



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μοριακός και Βιοχημικός Χαρακτηρισμός Δομικών
Περιοχών της Φωσφολιπάσης C ζήτα (PLCζ)**

**ΜΑΡΙΑ ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2014

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μοριακός και Βιοχημικός Χαρακτηρισμός Δομικών Περιοχών της Φωσφολιπάσης
C ζήτα (PLCζ)

ΜΑΡΙΑ ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ

A.M.: 0000000062722

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Βοργιάς, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Νούνεσης, Ερευνητής Α΄ Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ντία Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κωνσταντίνος Βοργιάς, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Νούνεσης, Ερευνητής Α΄ Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος

Κωνσταντίνος Δημόπουλος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αθανασία Σιαφάκα, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Ευαγγελία Λιβανίου, Ερευνήτρια Α΄ Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 10/02/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη PLCζ, που εντοπίζεται αποκλειστικά στο σπέρμα, ενεργοποιεί την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη επάγοντας ενδοκυτταρικές ταλαντώσεις Ca^{2+} σε ωάρια θηλαστικών όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση. Η PLCζ αποτελεί την μικρότερη ισομορφή PLC των θηλαστικών, με την πιο στοιχειώδη οργάνωση δομικών περιοχών. Η PLCζ καταλύει την υδρόλυση του μεμβρανικού φωσφοϊνοσιτιδίου PtdInsP_2 παράγοντας ταλαντώσεις Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της InsP_3 . Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο οι δομικές περιοχές της PLCζ συμβάλουν στις νέες βιοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες της πρωτεΐνης αυτής και συντελούν στην έκλυση Ca^{2+} στο γονιμοποιούμενο ωάριο. Χρησιμοποιήθηκε ένας αριθμός τεχνικών που περιλαμβάνουν σύνθεση χιμαιρικών αλληλουχιών, σημείο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, μικροέγχυση cRNA σε ωάρια ποντικού, έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, *in vitro* ενζυμικές δοκιμασίες, επίστρωση πρωτεΐνης σε λιπίδια και δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η δομική περιοχή EF hands δεν είναι η μόνη υπεύθυνη για την ευαισθησία της PLCζ στο Ca^{2+} και ότι η δομική περιοχή C2 και ο συνδέτης XY μεσολαβούν στην πρόσδεση της PLCζ στη μεμβράνη και στη δέσμευσή της στην PtdInsP_2 . Σε αντίθεση με τις PLC των σωματικών κυττάρων, ο συνδέτης XY της PLCζ δεν προκαλεί αυτοαναστολή της ενζυμικής της δραστηριότητας, από τη στιγμή που τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα στην αλληλουχία του συνδέτη XY διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της PLCζ με την PtdInsP_2 για την παραγωγή ταλαντώσεων Ca^{2+} που είναι απαραίτητες για τη γονιμοποίηση στα θηλαστικά. Επίσης, παρουσιάζονται οι ειδο-ειδικές διαφορές στην *in vivo* ικανότητα επαγωγής ταλαντώσεων Ca^{2+} των PLCζ του ανθρώπου και του ποντικού. Η χιμαιρική ανάλυση έρχεται να προτείνει ένα νέο ρόλο για τις δομικές περιοχές των EF hands και του συνδέτη XY στις ειδο-ειδικές διαφορές στην δραστηριότητα της PLCζ.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φωσφολιπάση C

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: κυτταρική σηματοδότηση, φωσφολιπάση C ζήτα, ταλαντώσεις Ca^{2+} , γονιμοποίηση, ανδρική υπογονιμότητα

SUMMARY

Sperm-specific phospholipase C ζ (PLC ζ) activates early embryo development by triggering intracellular calcium (Ca²⁺) oscillations in mammalian oocytes indistinguishable from those seen at fertilization. PLC ζ is the smallest with the most elementary domain organization among all mammalian PLC isoforms. Sperm-delivered PLC ζ catalyzes the hydrolysis of its membrane-bound phospholipid substrate PtdInsP₂, generating cytosolic Ca²⁺ oscillations via the InsP₃ signaling pathway. The aim of this study was to investigate how discrete PLC ζ domains contribute to the novel biochemical and enzymatic properties of this protein resulting in Ca²⁺ release in the fertilizing oocyte. A number of techniques were employed including a chimeric analysis approach, site directed mutagenesis, cRNA microinjection in mouse oocytes, recombinant protein expression and purification, *in vitro* enzymatic assays, protein-lipid overlay and liposome binding assays. These data suggest that the EF hand domains are not solely responsible for the high Ca²⁺ sensitivity of PLC ζ and that the membrane association and binding of PLC ζ to PIP₂ is mediated by the C2 domain and the XY-linker region. Unlike somatic PLCs, the sperm PLC ζ XY-linker does not mediate auto-inhibition of its enzymatic activity since the positively-charged residues within the XY-linker play an important role in the PLC ζ interaction with PIP₂ required for generating the Ca²⁺ oscillations essential for mammalian fertilization. It is also demonstrated species-specific differences in the *in vivo* Ca²⁺ oscillation-inducing activity of human and mouse PLC ζ . Chimeric analysis suggests a novel role of the EF hands and XY-linker region in the species-specific differences in PLC ζ activity.

SUBJECT AREA: Phospholipase C

KEYWORDS: Cell signalling, phospholipase C zeta, Ca²⁺ oscillations, fertilization, sperm, male infertility

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	22
1.1. Υπογονιμότητα	23
1.1.1. Ανδρική υπογονιμότητα.....	24
1.2. Γονιμοποίηση	24
1.2.1. Ωογένεση.....	25
1.2.2 Μορφολογία ωαρίου.....	26
1.2.3. Σπερματογένεση	29
1.2.4. Μορφολογία σπερματοζωαρίου	31
1.2.5. Μοριακός μηχανισμός γονιμοποίησης	33
1.3. Ο ζωτικός ρόλος του Ca^{2+} στη γονιμοποίηση	41
1.3.1. Ο μηχανισμός επαγωγής ταλαντώσεων Ca^{2+} κατά τη γονιμοποίηση των θηλαστικών.....	42
1.3.2. Φωσφοϊνοσιτίδια	46
1.3.3. Θεωρίες γένεσης των ταλαντώσεων Ca^{2+} σε γονιμοποιημένα ωάρια	47
1.3.4. Θεωρία του σπερματικού παράγοντα.....	49
1.3.5. Από τη θεωρία του σπερματικού παράγοντα στην ανακάλυψη της φωσφολιπάσης C ζήτα (PLCζ)	50
1.4. Η οικογένεια των φωσφολιπασών C.....	52
1.4.1. Φωσφολιπάση C βήτα (PLCβ)	56

1.4.2. Φωσφολιπάση C γάμμα (PLCγ).....	58
1.4.3. Φωσφολιπάση C δέλτα (PLCδ).....	61
1.4.4. Φωσφολιπάση C έψιλον (PLCε).....	62
1.4.5. Φωσφολιπάση C ήτα (PLCη)	63
1.4.6. Φωσφολιπάση C ζήτα	63
1.5. Σκοπός της μελέτης	64
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</u>	66
2.1. Εκκινητές	67
2.2. Πλασμιδιακοί φορείς	67
2.3. Ενίσχυση του DNA με PCR	71
2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	72
2.5. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	73
2.6. Κλωνοποίηση.....	74
2.7. Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων	74
2.8. Μετασχηματισμός	75
2.9. Ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.....	76
2.10. Αλληλούχηση.....	78
2.11. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA	78
2.12. Σύνθεση cRNA.....	78
2.13. Μεταλλαξιγένεση.....	80
2.14. Έκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών με ετικέτα GST	80

2.15. Έκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών με ετικέτα 6His	82
2.16. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	83
2.17. Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα	86
2.18. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνες	87
2.19. Ανάλυση κατά Western.....	88
2.20. Επίστρωση πρωτεΐνης σε λιπίδια	90
2.21. Προσδιορισμός δραστικότητας PLC	91
2.22. Μικροέγχυση και μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} και της λουσιφεράσης σε ωάρια ποντικού	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	96
3.1. Κλωνοποίηση των PHδ1-PLCζ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCζ-LUC, PLCζΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCζΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC, PLCζΔC2-C2δ1-LUC και ΔPHPLCδ1-LUC στον πλασμιδιακό φορέα pCR3	97
3.2. Έκφραση των PHδ1-PLCζ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCζ-LUC, PLCζΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCζΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC, PLCζΔC2-C2δ1-LUC και ΔPHPLCδ1-LUC σε ωάρια ποντικού	107
3.3 Κλωνοποίηση των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔΧΥ-ΧΥδ1, PLCζΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔPHPLCδ1 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pETMM60.....	112
3.4. Έκφραση και καθαρισμός των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔΧΥ-ΧΥδ1, PLCζΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔPHPLCδ1.....	114
3.5. Μελέτη των ενζυμικών ιδιοτήτων των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔΧΥ-ΧΥδ1, PLCζΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔPHPLCδ1.....	115
3.6. Σύνδεση των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔΧΥ-ΧΥδ1, PLCζΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔPHPLCδ1 στο PtdInsP ₂ και το PtdIns(3)P.....	119

3.7. Κλωνοποίηση των PLCζΔXYlinker-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC στον πλασμιδιακό φορέα pCR3.....	122
3.8. Έκφραση των PLCζΔXYlinker-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC σε ωάρια ποντικού.....	126
3.9. Κλωνοποίηση των PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1.....	129
3.10. Έκφραση και καθαρισμός των PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker.....	129
3.11. Επίδραση της απαλοιφής του συνδέτη XY στις ενζυμικές ιδιότητες της PLCζ	131
3.12. Κλωνοποίηση της δομικής περιοχής του συνδέτη XY της PLCζ, της δομικής περιοχής C2 της PLCζ και της δομικής περιοχής PH της PLCδ1 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1.....	134
3.13. Έκφραση και καθαρισμός της δομικής περιοχής του συνδέτη XY της PLCζ, της δομικής περιοχής C2 της PLCζ και της δομικής περιοχής PH της PLCδ1	136
3.14. Σύνδεση της δομικής περιοχής του συνδέτη XY και της δομικής περιοχής C2 της PLCζ στην PtdInsP ₂	137
3.15. Έκφραση των PLCζ ^{K374A} -LUC, PLCζ ^{K374,5AA} -LUC και PLCζ ^{K374,5,7AAA} -LUC σε ωάρια ποντικού.....	139
3.16. Έκφραση και καθαρισμός των PLCζ ^{K374A} , PLCζ ^{K374,5AA} ΚΑΙ PLCζ ^{K374,5,7AAA}	143
3.17. Επίδραση των μεταλλάξεων της δομικής περιοχής του συνδέτη XY στις ενζυμικές ιδιότητες της PLCζ	144
3.18. Σύνδεση της PLCζ και των μεταλλαγμένων μορφών της στην PtdInsP ₂	146
3.19. Κλωνοποίηση των hPLCζ, mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔC2-mC2 και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker	147
3.20. Έκφραση και καθαρισμός των hPLCζ, mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔC2-mC2 και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker	157

3.21. Μελέτη των ενζυμικών ιδιοτήτων των hPLCζ, mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔC2-mC2 και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker	159
---	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 163

4.1 Η PLCζ αποτελεί το έναυσμα των ταλαντώσεων Ca^{2+} κατά τη γονιμοποίηση των θηλαστικών.....	163
---	-----

4.2. Η PLCζ εντοπίζεται στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων των θηλαστικών.	164
--	-----

4.3. Η PLCζ εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και όχι στην πλασματική μεμβράνη των ωαρίων των θηλαστικών.....	166
---	-----

4.4. Η δομική περιοχή του συνδέτη XY, η καταλυτική περιοχή XY και η δομική περιοχή C2 συμμετέχουν στην επαγωγή των ταλαντώσεων Ca^{2+}	166
--	-----

4.5. Η δομική περιοχή του συνδέτη XY ρυθμίζει τη δραστηριότητα της PLCζ.....	170
--	-----

4.6. Η δομική περιοχή του συνδέτη XY κατεύθυνει την PLCζ σε ενδοκυτταρικές δεξαμενές PtdInsP ₂	172
--	-----

4.7. Η ανθρώπινη PLCζ υπερισχύει της PLCζ του ποντικού στην επαγωγή ταλαντώσεων Ca^{2+} σε ωάρια ποντικού.	175
---	-----

4.8. Οι δομικές περιοχές των EF hands και του συνδέτη XY ευθύνονται για την αξιοσημείωτη δραστηριότητα της ανθρώπινης PLCζ.	176
--	-----

4.9. Κλινικές εφαρμογές της PLCζ	178
--	-----

4.10. Μελλοντικές κατευθύνσεις της παρούσας μελέτης.....	181
--	-----

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ 184

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ 187

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι..... 189

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ..... 190

ΑΝΑΦΟΡΕΣ 191

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας	24
Σχήμα 1.2: Ωογένεση.....	26
Σχήμα 1.3: Μορφολογία ωαρίου θηλαστικών	28
Σχήμα 1.4: Σπερματογένεση	30
Σχήμα 1.5: Μορφολογία σπερματοζωαρίου.....	31
Σχήμα 1.6: Οδοί μεταγωγής σήματος για την απόκτηση ικανότητας γονιμοποίησης (Naz and Rajesh, 2004).....	34
Σχήμα 1.7: Οδοί μεταγωγής σήματος κατά την ακροσωμική αντίδραση (Breitbart and Spungin, 1997)	37
Σχήμα 1.8: Μηχανισμός σύντηξης σπερματοζωαρίου-ωαρίου (Evans, 2002)	40
Σχήμα 1.9: Ταλαντώσεις Ca^{2+} μετά από in vitro γονιμοποίηση σε ωάρια ποντικού	42
Σχήμα 1.10: Ομοιόσταση του Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα	43
Σχήμα 1.11: Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας των περιοχών του IP3R	45
Σχήμα 1.12: Η ενζυμική δράση της PLC.....	46
Σχήμα 1.13: Μεταβολισμός φωσφοϊνοσιτιδίων (Balla et al, 2003)	47
Σχήμα 1.14: Συνοπτική παρουσίαση των σταδίων της γονιμοποίησης και του μηχανισμού πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} από την PLCζ	51
Σχήμα 1.15: (Α) Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών C. (Β) Φυλογενετικό δέντρο όλων των ισομορφών PLC που δείχνει ότι η PLCζ εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με τις PLC της ομάδας δ (Katan, 2005).	53
Σχήμα 1.16: Οι δομικές περιοχές της φωσφολιπάσης C δ1 (Katan, 1999).....	54
 Σχήμα 2.1: Πλασμιδιακός φορέας pETMM60	68
Σχήμα 2.2: Πλασμιδιακός φορέας pCR 3.....	68
Σχήμα 2.3: Πλασμιδιακός φορέας pGEX-5X-2	69
Σχήμα 2.4: Πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1	70
Σχήμα 2.5: Πλασμιδιακός φορέας pGL2	71
Σχήμα 2.6: Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα	87
Σχήμα 2.7: Η ενδεδειγμένη διάταξη της πηκτής πολυακρυλαμίδιου και της μεμβράνης PVDF στη συσκευή ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer).	88
Σχήμα 2.8: Ο μηχανισμός της ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών με χημειοφωταύγεια.	90

Σχήμα 2.9: Εμπορικά διαθέσιμη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ενσταλαγμένα φωσφοϊνοσιτίδια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.	91
Σχήμα 2.10: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος μικροέγχυσης	95
Σχήμα 3.1: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PHδ1-PLCΖ-LUC .	98
Σχήμα 3.2: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC	99
Σχήμα 3.3: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC	101
Σχήμα 3.4: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC	103
Σχήμα 3.5: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCΖΔC2-C2δ1-LUC	105
Σχήμα 3.6: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας ΔPHPLCδ1-LUC	106
Σχήμα 3.7: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών PHδ1-PLCΖ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC, PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC, PLCΖΔC2-C2δ1-LUC και ΔPHPLCδ1-LUC που εκφράστηκαν σε ωάρια ποντικού.....	108
Σχήμα 3.8: Η συμπεριφορά του Ca^{2+} (μαύρες καταγραφές) και η φωταύγεια ωαρίων ποντικού (κόκκινες καταγραφές) που ενέθηκαν με cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCΖ-LUC, PHδ1-PLCΖ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC, PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC, PLCΖΔC2-C2δ1-LUC, PLCδ1-LUC και ΔPHPLCδ1-LUC	112
Σχήμα 3.9: Πηκτή αгарόζης 1% που δείχνει επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης των αλληλουχιών PHδ1-PLCΖ, EFδ1-ΔEFPLCΖ, PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1, PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1, PLCΖΔC2-C2δ1 και ΔPHPLCδ1 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pETMM60. Στη διαδρομή 1 ηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας μοριακών βαρών....	113
Σχήμα 3.10: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτών πολυακρυλαμιδίου 7% (αριστερά παράθυρα) και αποτυπώματα κατά Western με το αντίσωμα αντι-NusA (δεξιά παράθυρα) των πρωτεϊνών NusA-6His-PLCΖ, NusA-6His-PHδ1-PLCΖ, NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCΖ, NusA-6His-PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1, NusA-6His-PLCΖΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1. Ηλεκτροφορήθηκε 1μg από κάθε πρωτεΐνη	115

Σχήμα 3.11: Ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1-PLCζ, NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1. Είκοσι pmol κάθε πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε δοκιμασία υδρόλυσης [³ H]PtdInsP ₂ και η ραδιενέργεια του προϊόντος μετρήθηκε σε υγρό σπινθηριστή. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές παρτίδες πρωτεΐνης και για κάθε παρτίδα εις διπλούν	117
Σχήμα 3.12: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1-PLCζ, NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1.....	118
Σχήμα 3.13: Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1/PLCζ, NusA-6His-EFδ1/PLCζ, NusA-6His-PLCζ/XYlinkerδ1, NusA-6His- PLCζ-XYδ1, NusA-6His-PLCζ/C2δ1, NusA-6His-PLCδ1, NusA-6His-ΔPH/PLCδ1 και NusA	121
Σχήμα 3.14: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCζΔXYlinker-LUC	123
Σχήμα 3.15: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCδ1ΔXYlinker-LUC	124
Σχήμα 3.16: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών PLCζ-LUC, PLCζΔXYlinker-LUC, PLCδ1-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC που εκφράστηκαν σε ωάρια ποντικού ..	126
Σχήμα 3.17: Η συμπεριφορά του Ca ²⁺ (μαύρες καταγραφές) και η φωταύγεια ωαρίων ποντικού (κόκκινες καταγραφές) που ενέθηκαν με cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ-LUC, PLCζΔXYlinker-LUC, PLCδ1-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC	128
Σχήμα 3.18: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτής πολυακρυλαμιδίου 7% (αριστερό παράθυρο) και ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το αντίσωμα αντι-GST των πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker. Ηλεκτροφορήθηκε 1μg από κάθε πρωτεΐνη	130
Σχήμα 3.19: Ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker. Είκοσι pmol κάθε πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε δοκιμασία υδρόλυσης [³ H]PtdInsP ₂ και η ραδιενέργεια του προϊόντος μετρήθηκε σε υγρό σπινθηριστή. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές παρτίδες πρωτεΐνης και για κάθε παρτίδα εις διπλούν	132

Σχήμα 3.1: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker.....	129
Σχήμα 3.21: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker.....	133
Σχήμα 3.22: Σχηματική απεικόνιση των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών GST-PHδ1, GST-C2ζ και GST-XYlinkerζ που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες σύνδεσης σε λιπίδια.....	135
Σχήμα 3.23: Πηκτή αγαρόζης 1% που δείχνει επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης των αλληλουχιών XYlinkerζ, PHδ1 και C2ζ στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1. Στη διαδρομή 1 ηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας μοριακών βαρών.....	135
Σχήμα 3.24: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτής πολυακρυλαμιδίου 7% των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών GST-C2ζ, GST-PHδ1 και GST-XYlinkerζ.....	137
Σχήμα 3.25: Επίστρωση των GST-XYlinkerζ, GST-C2ζ και GST-PHδ1 σε λιπίδια	138
Σχήμα 3.26: Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών GST-PHδ1, GST-C2ζ και GST-XYlinkerζ. Η πρωτεΐνη GST χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας	139
Σχήμα 3.27: Σχηματική απεικόνιση της PLCζ με έμφαση στις μεταλλάξεις που εισήχθησαν στη δομική περιοχή του συνδέτη XY (K374A, K374,5AA, K374,5,7AAA) ..	140
Σχήμα 3.28: Η συμπεριφορά του Ca ²⁺ (μαύρες καταγραφές) και η φωταύγεια ωαρίων ποντικού (κόκκινες καταγραφές) που ενέθηκαν με cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ-LUC, PLCζ ^{K374A} -LUC, PLCζ ^{K374,5AA} -LUC και PLCζ ^{K374,5,7AAA} -LUC	142
Σχήμα 3.29: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτής πολυακρυλαμιδίου 7% (αριστερό παράθυρο) και ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το αντίσωμα αντι-GST των πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζ ^{K374A} , GST-PLCζ ^{K374,5AA} και GST-PLCζ ^{K374,5,7AAA} . Ηλεκτροφορήθηκε 1μg από κάθε πρωτεΐνη.....	144
Σχήμα 3.30: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζ ^{K374A} , GST-PLCζ ^{K374,5AA} και GST-PLCζ ^{K374,5,7AAA}	145
Σχήμα 3.31: Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών GST-PLCδ1, GST-PLCζ, GST-PLCζ ^{D210R} , GST-PLCζΔC2, GST-PLCζ ^{K374A} , GST-PLCζ ^{K374,5AA} και GST-PLCζ ^{K374,5,7AAA}	147

Σχήμα 3.32: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας mEF-ΔEFhPLCΖ-LUC	149
Σχήμα 3.33: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας hPLCΖΔC2-mC2-LUC	150
Σχήμα 3.34: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας hPLCΖΔXYlinker-mXYlinker-LUC.....	152
Σχήμα 3.35: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών hPLCΖ-LUC, mPLCΖ-LUC, mEF-ΔEFhPLCΖ-LUC, hPLCΖΔC2-mC2-LUC και hPLCΖΔXYlinker-mXYlinker-LUC που εκφράστηκαν σε ωάρια ποντικού.....	154
Σχήμα 3.36: Η συμπεριφορά του Ca^{2+} (μαύρες καταγραφές) και η φωταύγεια ωαρίων ποντικού (κόκκινες καταγραφές) που ενέθηκαν με cRNA που κωδικοποιεί για τις hPLCΖ-LUC, mPLCΖ-LUC, mEF-ΔEFhPLCΖ-LUC, hPLCΖΔC2-mC2-LUC και hPLCΖ ΔXYlinker-mXYlinker-LUC	156
Σχήμα 3.37: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτής πολυακρυλαμιδίου 7% (επάνω παράθυρο) και αποτυπώματα κατά Western με το αντίσωμα αντι-NusA (κάτω παράθυρα) των πρωτεϊνών NusA-6His-hPLCΖ, NusA-6His-mPLCΖ, NusA-6His-hPLCΖΔXYlinker-mXYlinker, NusA-6His-mEF-ΔEFhPLCΖ και NusA-6His-hPLCΖΔC2-mC2. Ηλεκτροφορήθηκε 1μg από κάθε πρωτεΐνη	159
Σχήμα 3.38: Ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-hPLCΖ, NusA-6His-mPLCΖ, NusA-6His-hPLCΖΔXYlinker-mXYlinker, NusA-6His-mEF-ΔEFhPLCΖ και NusA-6His-hPLCΖΔC2-mC2. Είκοσι pmol κάθε πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε δοκιμασία υδρόλυσης [3H]PtdInsP ₂ και η ραδιενέργεια του προϊόντος μετρήθηκε σε υγρό σπινθηριστή. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές παρτίδες πρωτεΐνης και για κάθε παρτίδα εις διπλούν	160
Σχήμα 3.39: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-hPLCΖ, NusA-6His-mPLCΖ, NusA-6His-mEF-ΔEFhPLCΖ και NusA-6His-hPLCΖΔC2-mC2	160
Σχήμα 4.1: Αμινοξική ομοπαράθεση των αλληλουχιών του συνδέτη XY της PLCΖ του ανθρώπου και του ποντικού. Ταυτόσημα αμινοξέα δείχνονται σε σκιασμένα κίτρινα κουτιά και συντηρημένες υποκαταστάσεις σε γκρι.....	178
Σχήμα 4.2: Υποθετικός μηχανισμός δράσης της PLCΖ	182

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Ενδεικτικά % ποσοστά πηκτής αγαρόζης για διαφορετικά μεγέθη προϊόντων PCR	73
Πίνακας 2.2: Δοσολογία αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού	85
Πίνακας 2.3: Δοσολογία αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής επιστίβαξης	85
Πίνακας 2.4: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις κατά Western.....	89
Πίνακας 3.1: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα μικροέγχυσης cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ-LUC, PHδ1-PLCζ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCζ-LUC, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1-LUC, PLCζΔXY-XYδ1-LUC, PLCζΔC2-C2δ1-LUC, PLCδ1-LUC και της ΔPHPLCδ1-LUC σε ωάρια ποντικού	112
Πίνακας 3.2: Συνοπτική παρουσίαση των ενζυμικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1-PLCζ, NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1	119
Πίνακας 3.3: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα μικροέγχυσης cRNA που κωδικοποιούν για τις PLCζ-LUC, PLCδ1-LUC, PLCζΔXYlinker-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC σε ωάρια ποντικού	129
Πίνακας 3.4: Συνοπτική παρουσίαση των ενζυμικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker	134
Πίνακας 3.5: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα μικροέγχυσης cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ-LUC, PLCζ ^{K374A} -LUC, PLCζ ^{K374,5AA} -LUC ΚΑΙ PLCζ ^{K374,5,7AAA} -LUC σε ωάρια ποντικού.....	143
Πίνακας 3.6: Συνοπτική παρουσίαση των ενζυμικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζ ^{K374A} , GST-PLCζ ^{K374,5AA} και GST-PLCζ ^{K374,5,7AAA}	145
Πίνακας 3.7: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα μικροέγχυσης cRNA που κωδικοποιεί για τις hPLCζ-LUC, mPLCζ-LUC, mEF-ΔEFhPLCζ-LUC, hPLCζΔC2-mC2-LUC και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker-LUC σε ωάρια ποντικού	157

Πίνακας 3.8: Συνοπτική παρουσίαση των ενζυμικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-hPLCζ, NusA-6His-mPLCζ, NusA-6His-hPLCζΔXYlinker-mXYlinker, NusA-6His-mEF-ΔEFhPLCζ και NusA-6His-hPLCζΔC2-mC2	161
---	-----

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η φυλετική αναπαραγωγή των οργανισμών επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της γονιμοποίησης, της σύντηξης, δηλαδή, αρσενικού και θηλυκού γαμέτη. Η γονιμοποίηση ακολουθείται από την ενεργοποίηση του ωαρίου που οδηγεί στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου (Ca^{2+}) θεωρείται ικανή και αναγκαία συνθήκη για την ενεργοποίηση των ωαρίων όλων των οργανισμών και αποδείχθηκε ότι οφείλεται στην έκλυση Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα θηλαστικά, η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} έχει τη μορφή ταλαντώσεων. Η έκλυση Ca^{2+} προκαλείται από τη διάνοιξη του διαύλου Ca^{2+} του υποδοχέα τριφωσφορικής ινοσιτόλης που βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Η τριφωσφορική ινοσιτόλη είναι προϊόν της υδρόλυσης της διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης που καταλύεται από τη φωσφολιπάση C φωσφοϊνοσιτιδίων (PLC). Το 2002, διαπιστώθηκε ότι η PLC που ευθύνεται για την πρόκληση των ταλαντώσεων Ca^{2+} είναι η PLCζ.

Η PLCζ είναι η μικρότερη ισομορφή PLC και εντοπίζεται αποκλειστικά στο σπέρμα. Η PLCζ εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με την PLCδ1, με τη διαφορά ότι δε διαθέτει τη δομική περιοχή PH, καθώς και ότι η δομική περιοχή του συνδέτη XY είναι εκτενέστερη και θετικά φορτισμένη. Ένα χαρακτηριστικό που την κάνει να ξεχωρίζει από τις άλλες PLC είναι ότι παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα ακόμα και σε πολύ χαμηλά επίπεδα Ca^{2+} , γεγονός που της επιτρέπει να είναι δραστική σε συνθήκες που το ωάριο είναι σε κατάσταση ηρεμίας. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αποσαφήνιση του ρόλου που διαδραματίζουν οι επιμέρους δομικές περιοχές της PLCζ στη λειτουργία της.

Η εργασία αυτή έλαβε χώρα στο Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Εθνικού Κέντρου Φυσικών Επιστημών (Ε.ΚΕ.Φ.Ε.) “Δημόκριτος”, από όπου έλαβα υποτροφία για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής, καθώς και στο Wales Heart Research Institute (W.H.R.I.) του Πανεπιστημίου του Cardiff και παρουσιάστηκε στο Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Δρα Μιχαήλ Νομικό, επιστημονικό συνεργάτη στο Wales Heart Research Institute (W.H.R.I.) και τον Καθηγητή F.A. Lai, Διευθυντή του Wales Heart Research Institute (W.H.R.I.) που μου εμπιστεύτηκαν ένα τόσο ενδιαφέρον

θέμα και για την ευκαιρία που μου έδωσαν να εκτελέσω μεγάλο μέρος των πειραμάτων μου στο Εργαστήριο Κυτταρικής Σηματοδότησης του παραπάνω Ινστιτούτου.

Ειδικότερα, ευχαριστώ το Δρα Μιχαήλ Νομικό για την αδιάληπτη καθοδήγηση που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, τόσο πρακτικά, όσο και θεωρητικά και για το λεπτομερή σχεδιασμό των πειραμάτων. Επίσης τον ευχαριστώ για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της διδακτορικής διατριβής και για τις επικοδομητικές συζητήσεις μας.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή F.A. Lai για τη φιλοξενία, την παροχή πολύτιμων αντιδραστηρίων για την ολοκλήρωση των πειραμάτων μου και για τις διαφωτιστικές συζητήσεις μαζί του.

Ευχαριστώ το Δρα Γεώργιο Νούνεση, υπεύθυνο του Εργαστηρίου Βιομοριακής Φυσικής στο Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. του Ε.ΚΕ.Φ.Ε. “Δημόκριτος” για την ελευθερία και την ευελιξία που μου παρείχε να εκτελώ τα πειράματά μου σε δύο εργαστήρια, για την όλη του στήριξη και βοήθεια και για τη διόρθωση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ το Δρα Κωνσταντίνο Βοργιά, καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α., μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου και για τη διόρθωση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ τη Δρα Ευαγγελία Λιβανίου, υπεύθυνη του Εργαστηρίου Ανοσοπεπτιδικής Χημείας στο Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. του Ε.ΚΕ.Φ.Ε. “Δημόκριτος” για την προσεκτική ανάγνωση και διόρθωση της διδακτορικής διατριβής καθώς και την τιμή που μου έκανε να είναι μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή του Τμήματος Γυναικολογίας και Μαιευτικής του Πανεπιστημίου του Cardiff, Karl Swann για τη φιλοξενία στο εργαστήριο του και για την οργάνωση της διαδικασίας των μικροεγχύσεων καθώς και τους δόκτορες Kalil Elgmati, Yuasong Yu και Raul Gonzalez για την εκτέλεση των μικροεγχύσεων στα ωάρια ποντικών.

Ευχαριστώ το δόκτορα Άγγελο Θανάσουλα, το δόκτορα Αθανάσιο Παπαδόπουλο, τον υποψήφιο διδάκτορα Φιλήμονα Σταύρο καθώς και τους συναδέλφους μου στο W.H.R.I. για τη συμβολή τους στο υποδειγματικό κλίμα που επικρατούσε στα εργαστήρια κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ειδικότερα, ευχαριστώ το δόκτορα Άγγελο Θανάσουλα για την τεχνική του βοήθειά κατά το τελικό στάδιο της συγγραφής της διδακτορικής μου διατριβής.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., Δρα Ντία Γαλανοπούλου, επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής για το ειλικρινές ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή του διδακτορικού μου, για τη συνεχή και ανεξάντλητη βοήθειά της, για την ενδελεχή διόρθωση της διδακτορικής μου διατριβής και για τις καίριες συμβουλές της.

Τέλος, ευχαριστώ τους καθηγητές Δρα Κωνσταντίνο Δημόπουλο, Δρα Θωμά Μαυρομούστακο και Δρα Αθανασία Σιαφάκα για την τιμή που μου έκαναν να είναι μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Υπογονιμότητα

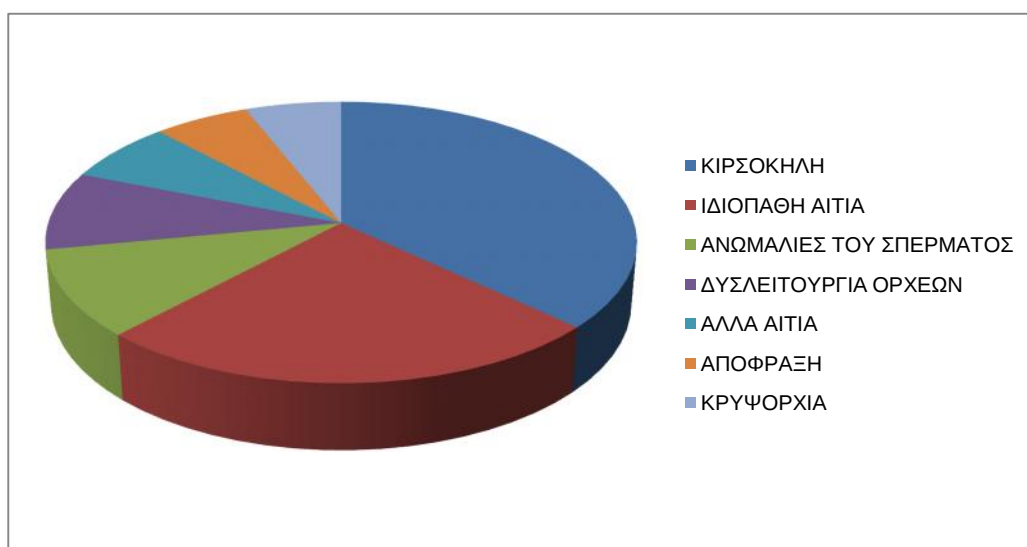
Το 2009, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας [World Health Organization (WHO)] και η Διεθνής Επιτροπή Παρακολούθησης της Τεχνολογίας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής [International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART)] αποφάσισαν από κοινού να κατατάξουν την στειρότητα στην κατηγορία της ασθένειας (disease) [1]. Το γεγονός αυτό αντανakλά τόσο την επιδείνωση του προβλήματος της υπογονιμότητας τα τελευταία χρόνια, όσο και την αδυναμία αποτελεσματικής αντιμετώπισής του. Κάθε χρόνο, περίπου ογδόντα εκατομμύρια ζευγάρια, αριθμός που αντιστοιχεί στο 15% των ζευγαριών παγκοσμίως, απευθύνονται σε κάποιον ειδικό καθώς αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας [2]. Σε ορισμένες χώρες, όπως η Γαλλία, το ποσοστό αυτό αγγίζει το 18%. Στην Ελλάδα, παρόλο που δεν υπάρχουν επίσημα στατιστικά στοιχεία, υπολογίζεται ότι περίπου τριακόσιες χιλιάδες ζευγάρια αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας. Εξάλλου, η επιτυχία των μεθόδων τεχνητής αναπαραγωγής στις οποίες καταφεύγουν τα υπογόνιμα ζευγάρια τις περισσότερες φορές δε ξεπερνά το 25%.

Παλαιότερα, επικρατούσε η άποψη ότι υπεύθυνη για την υπογονιμότητα ενός ζευγαριού είναι η γυναίκα. Αν και η αντίληψη αυτή είναι πλέον ξεπερασμένη για τους περισσότερους, δυστυχώς συνεχίζει να ταλανίζει γυναίκες σε χώρες που η θέση τους είναι υποβαθμισμένη και η ανδροκρατούμενη κοινωνία δεν είναι ακόμα σε θέση να αποδεχθεί ότι η υπογονιμότητα δεν είναι ένα αποκλειστικά γυναικείο πρόβλημα. Απεναντίας, τα στοιχεία δείχνουν ότι, όπως και στη γονιμοποίηση, όπου η συνεισφορά χρωμοσωμάτων είναι ίση από πλευράς γυναίκας και άνδρα, έτσι και στην υπογονιμότητα, η συνεισφορά τους σε αυτήν είναι ίση, καθώς το 50% της υπογονιμότητας στα ζευγάρια οφείλεται στη γυναίκα και το άλλο 50% οφείλεται στον άνδρα.

1.1.1. Ανδρική υπογονιμότητα

Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας συνοψίζονται στο Σχήμα 1.1. Η κίρσοκήλη είναι η κύρια αιτία ανδρικής υπογονιμότητας (37%). Τα ιδιοπαθή αίτια ευθύνονται για το 25% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας. Το 10% των υπογόνιμων ανδρών παρουσιάζει ανώμαλίες στο σπέρμα ενώ το 9% δυσλειτουργία των όρχεων. Η απόφραξη και η κρυφορχία ευθύνονται για το 6% της ανδρικής υπογονιμότητας η κάθε μία. Τέλος, παράγοντες που δεν κατονομάζονται ευθύνονται για το υπόλοιπο 7% της ανδρικής υπογονιμότητας [3]. Τέτοιοι μπορεί να είναι η περιβαλλοντική επιβάρυνση και η αλλαγή του τρόπου ζωής των σύγχρονων κοινωνιών.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το 25% των υπογόνιμων ανδρών δε γνωρίζουν ποιά είναι η αιτία της υπογονιμότητάς τους. Για το λόγο αυτό οι έρευνες των τελευταίων ετών έχουν στραφεί στη γενετική προσέγγιση του προβλήματος αυτού.



Σχήμα 1.1: Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας

1.2. Γονιμοποίηση

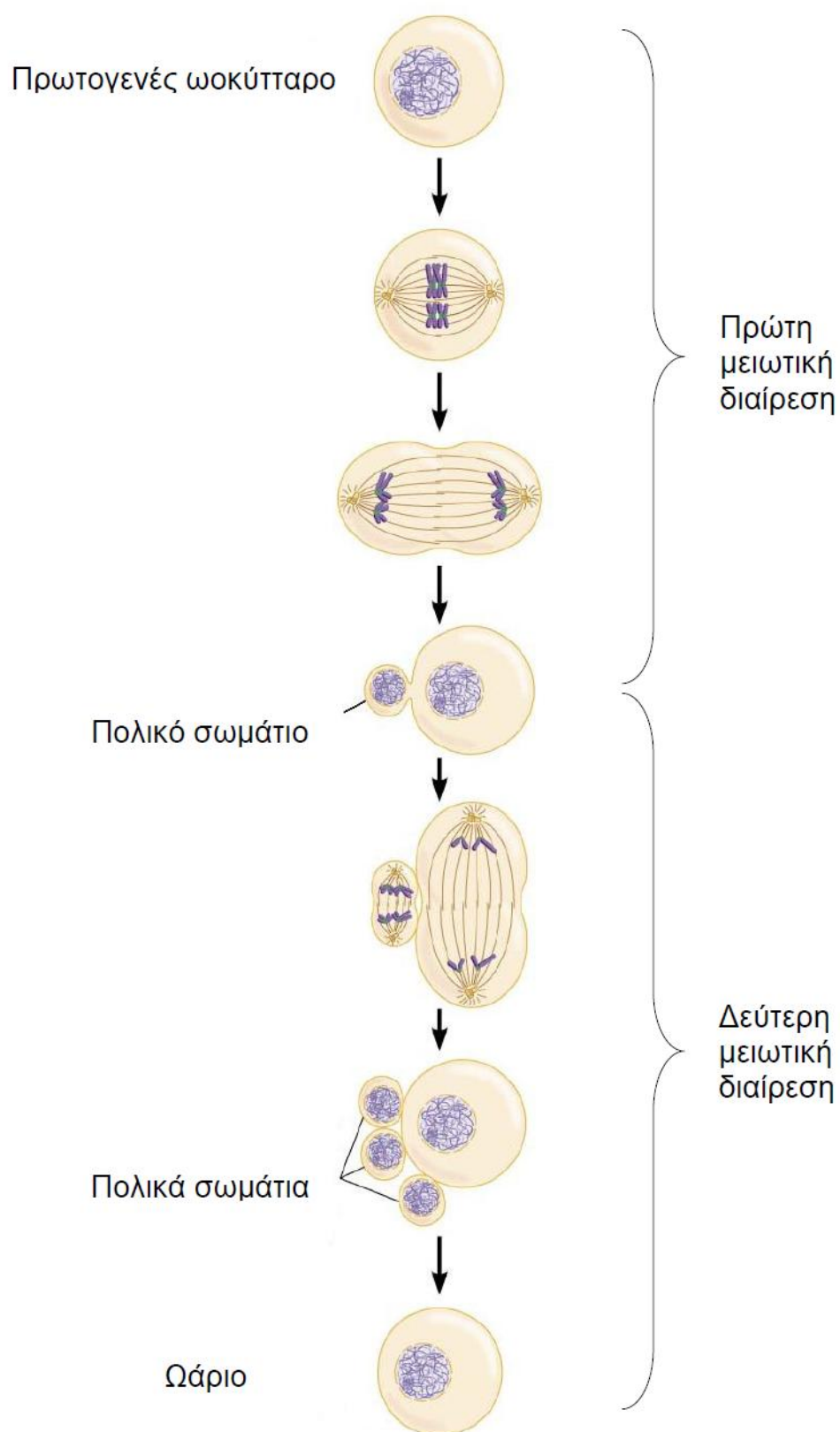
Στη φυλετική αναπαραγωγή, η γονιμοποίηση είναι η διαδικασία της διείσδυσης του σπερματοζωαρίου στο ωάριο και της σύντηξης των δύο αυτών απλοειδών γαμετών που συντελούν στο σχηματισμό του ζυγωτού. Οι αρσενικοί γαμέτες (σπερματοζωάρια) παράγονται με μείωση από τα γαμετικά κύτταρα (σπερματογόνια) μέσα στους όρχεις με τη διαδικασία της

σπερματογένεσης και οι θηλυκοί γαμέτες (ωάρια) παράγονται με μείωση από τα γαμετικά κύτταρα (ωογόνια) μέσα στις ωοθήκες με τη διαδικασία της ωογένεσης.

Μετά τη σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωαρίου, ακολουθεί η ενεργοποίηση του ωαρίου και η σύντηξη των πυρήνων των δύο γαμετών οδηγώντας στο σχηματισμό του διπλοειδούς ζυγωτού που ξεκινά να διαιρείται με μίτωση για να σχηματίσει μία μάζα 64 κυττάρων, τη βλαστοκύστη. Από το εξωτερικό μέρος της βλαστοκύστης θα προκύψει ο πλακούντας και από την εσωτερική κυτταρική μάζα, το έμβρυο.

1.2.1. Ωογένεση

Ωογένεση είναι η διαδικασία παραγωγής ωαρίων με μείωση από τα ωογόνια (Σχήμα 1.2). Τα ωογόνια, πολλαπλασιάζονται γρήγορα με μιτωτικές διαιρέσεις, ενώ αρχίζει η διεργασία της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Η διεργασία της μείωσης αρχίζει περίπου την 8η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής και διακόπτεται στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, κατά την οποία τα διπλά χρωμοσώματα έχουν διαταχθεί ανά ζεύγη. Τα ωοκύτταρα πλέον καλούνται πρωτογενή ωοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του, το πρωτογενές ωοκύτταρο περιβάλλεται από ένα στρώμα επίπεδων θυλακιακών κυττάρων της ωοθήκης και ο σχηματισμός αυτός ονομάζεται πρωτογενές ωοθυλάκιο. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα παραμένουν αδρανή σε αυτό το στάδιο τουλάχιστον μέχρι την εφηβεία ενώ κάποια από αυτά μέχρι και την εμμηνόπαυση. Σε κάθε έμμηνο κύκλο, τα επίπεδα της ωχρινοποιητικής ορμόνης (Luteinizing Hormone, LH) αυξάνονται πριν την ωοθυλακιορρηξία. Η αύξηση των επιπέδων αυτών προκαλεί επανεκκίνηση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση, το κυτταρόπλασμα του πρωτογενούς ωοκυττάρου διαιρείται άνισα και το κύτταρο που περιέχει ελάχιστο κυτταρόπλασμα ονομάζεται πολικό σωμάτιο. Στη συνέχεια, το ωοκύτταρο και το πρώτο πολικό σωμάτιο εισέρχονται στη δεύτερη μειωτική διαίρεση, από την οποία προκύπτει το δευτερογενές ωοκύτταρο ή ωάριο και τρία πολικά σωμάτια.



Σχήμα 1.2: Ωογένεση

1.2.2 Μορφολογία ωαρίου

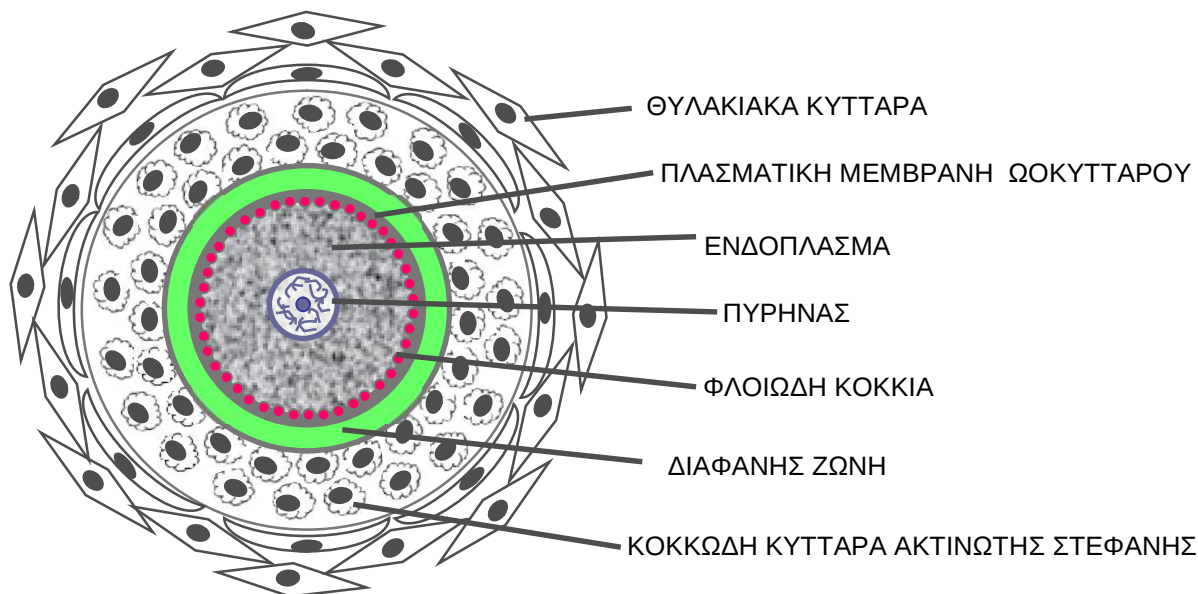
Το ωάριο είναι το μεγαλύτερο κύτταρο των οργανισμών και έχει σφαιρική ή ωοειδή μορφή. Στον άνθρωπο και τον αχινό έχει διάμετρο 100 μm , στα αμφίβια και τα ψάρια, 1-2 mm και στα πτηνά και τα ερπετά, μερικά εκατοστά. Πρόκειται για το μοναδικό κύτταρο που είναι ολοδύναμο (totipotent), που έχει δηλαδή τη δυνατότητα να δώσει γένεση σε κάθε κυτταρικό τύπο του νέου οργανισμού. Διαθέτει όλα τα υποκυτταρικά οργανίδια ενός τυπικού κυττάρου. Επιπλέον, όμως, διαθέτει και ένα μοναδικό υποκυτταρικό συστατικό, τη λέκιθο. Το ιδιαίτερα αυξημένο μέγεθος των ωαρίων πτηνών και ερπετών οφείλεται κυρίως στη συσσώρευση λεκίθου.

Η λέκιθος αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή αποθήκευσης θρεπτικών συστατικών στο ωάριο. Το κυριότερο συστατικό της είναι μία πρωτεΐνη 470 kDa που ονομάζεται λεκιθογενίνη. Στο εσωτερικό των ωαρίων, αυτή διίσταται στη φωσβιτίνη, μία φωσφοπρωτεΐνη και τις λιποπρωτεΐνες, λιπολεκιθίνη I και II. Οι πρωτεΐνες αυτές ενσωματώνονται μέσα σε διακριτές δομές, τα λεκιθικά κοκκία.

Το κυτταρόπλασμα του ωαρίου είναι οργανωμένο σε δύο περιοχές, το φλοιό και το ενδόπλασμα. Ο φλοιός είναι μία κυτταροπλασματική στιβάδα που βρίσκεται ακριβώς κάτω από την πλασματική μεμβράνη και διαφοροποιείται από το ενδόπλασμα στο ότι έχει μεγαλύτερο ιξώδες. Στη στιβάδα αυτή περιέχονται εκκριτικά κοκκία που ονομάζονται φλοιώδη κοκκία. Πρόκειται για σφαιρικές δομές διαμέτρου 0,8-2 μm που περιβάλλονται από μεμβράνη και περιέχουν όξινους βλεννοπολυσακχαρίτες και υδρολυτικά ένζυμα. Η έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων αυτών συντελεί στο φραγμό στην πολυσπερμία, για τον οποίο θα γίνει λόγος στη συνέχεια. Το ενδόπλασμα αποτελεί το εσωτερικό κυτταρόπλασμα και περιέχει όλα τα τυπικά υποκυτταρικά οργανίδια.

Στα θηλαστικά, το ωάριο περιβάλλεται από δύο προστατευτικές στιβάδες, μία εξωτερική, την ακτινωτή στεφάνη που αποτελείται από περίπου 5000

θυλακιακά κύτταρα βυθισμένα σε ένα στρώμα υαλουρονικού οξέος και μία εσωτερική, τη διαφανή ζώνη (zona pellucida), που είναι γλυκοπρωτεϊνικής φύσης (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3: Μορφολογία ωαρίου θηλαστικών

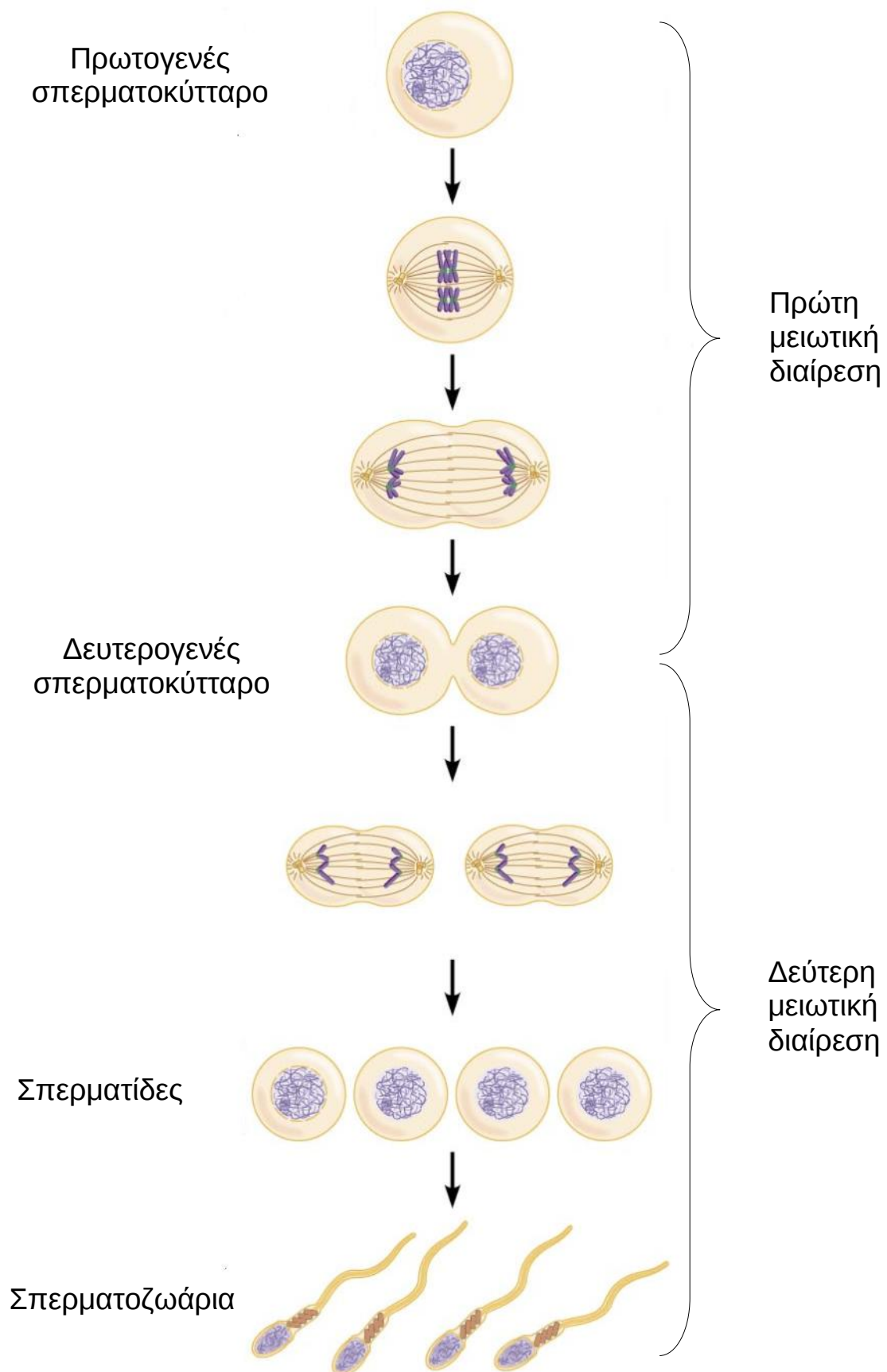
Οι γλυκοπρωτεΐνες που απαρτίζουν τη διαφανή ζώνη είναι οι ZP1 (zona pellucida 1), ZP2 (zona pellucida 2) και ZP3 (zona pellucida 3) [4]. Η ZP1 απαντάται ως διμερές μοριακού βάρους 200 kDa, ενώ οι ZP2 και ZP3 ως μονομερή μοριακού βάρους 120 kDa και 83 kDa αντίστοιχα. Σχετικά πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι στη διαφανή ζώνη του ανθρώπινου ωαρίου υπάρχει και μία τέταρτη γλυκοπρωτεΐνη, η ZPB/ZP4 [5].

Επώαση σπερματοζωαρίων με απομονωμένη ZP3 και ακόλουθη προσθήκη ωαρίων στο διάλυμα προξενεί αναστολή της σύνδεσης σπερματοζωαρίου-ωαρίου. Ωστόσο, η σύνδεση σπερματοζωαρίου-ωαρίου πραγματοποιείται κανονικά με την επώαση σπερματοζωαρίων με απομονωμένη ZP1 και ZP2 [6]. Επομένως, η ZP3 είναι η μόνη γλυκοπρωτεΐνη της διαφανούς ζώνης που εμπλέκεται άμεσα στη διαδικασία της γονιμοποίησης, όπως θα αναφερθεί αναλυτικότερα και στη συνέχεια.

Η ZP3 προέρχεται από τη γλυκοζυλίωση ενός πρόδρομου μορίου 424 αμινοξέων. Η υδατανθρακική ομάδα της N-ακετυλογλυκοζαμίνης συνδέεται στα άτομα οξυγόνου της πλευρικής αλυσίδας καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης, σχηματίζοντας O-γλυκοζιτικούς δεσμούς και στα άτομα του αζώτου της πλευρικής ομάδας καταλοίπων ασπαραγίνης, σχηματίζοντας N-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η ώριμη ZP3 προέρχεται από την πρωτεόλυση της αμινοτελικής σηματοδοτικής αλληλουχίας 22 αμινοξέων και ενός καρβοξυτελικού τμήματος 71 αμινοξέων από το πρόδρομο μόριο [7-8]. Το 80% της ZP3 (45-304 αα) καταλαμβάνεται από την περιοχή ZP που είναι παρούσα και στις ZP1 και ZP2 και περιέχει οκτώ συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης [9]. Δεδομένου ότι το καρβοξυτελικό τμήμα της ZP3 έχει υποστεί τις μεγαλύτερες αλλαγές στην πορεία της εξέλιξης και ότι η σύνδεση σπερματοζωαρίου-ωαρίου λαμβάνει χώρα στην περιοχή αυτή, γίνεται αντιληπτό ότι η εξειδίκευση της θέσης αναγνώρισης του ωαρίου ενός οργανισμού από το αντίστοιχο σπερματοζωάριο αποτελεί εμπόδιο στη γονιμοποίηση ατόμων από διαφορετικά είδη [2].

1.2.3. Σπερματογένεση

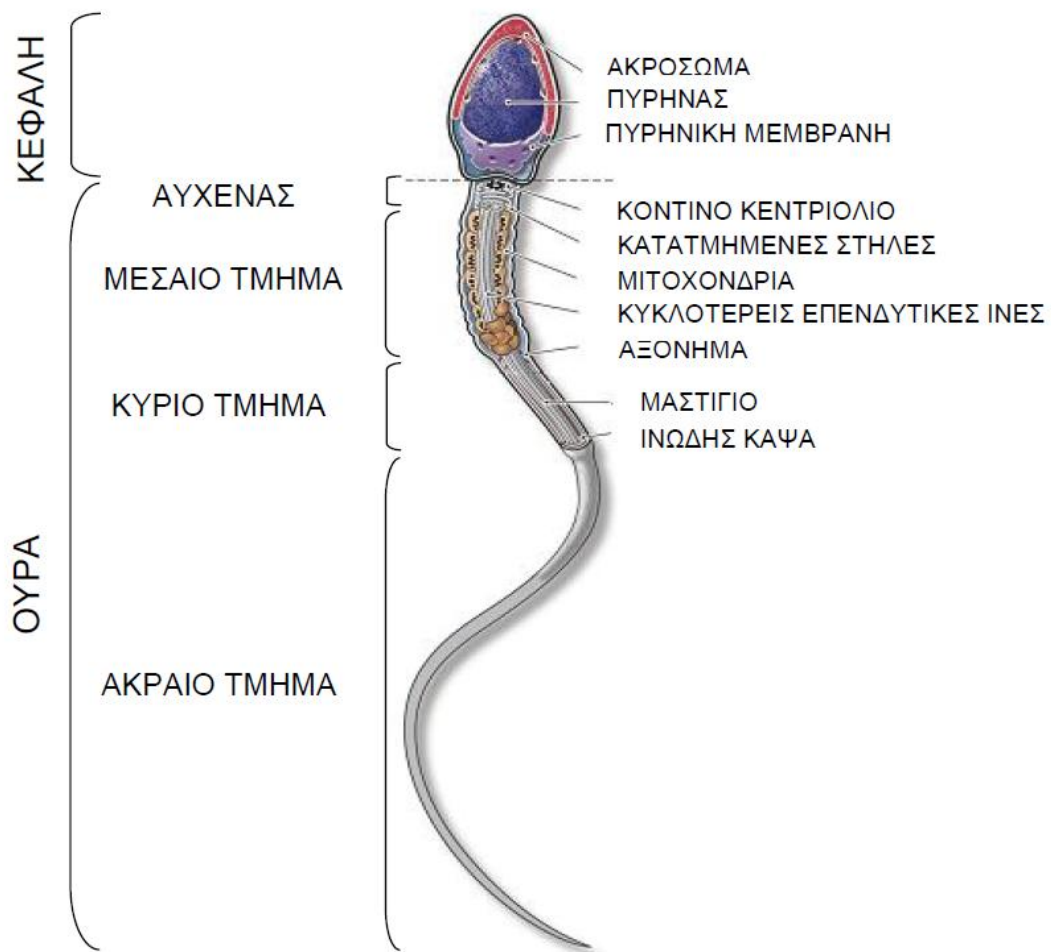
Σπερματογένεση είναι η διαδικασία παραγωγής σπερματοζωαρίων με μείωση από τα σπερματογόνια (Σχήμα 1.4). Τα σπερματογόνια αρχικά μετατρέπονται σε πρωτοταγή σπερματοκύτταρα. Το πρωτοταγές σπερματοκύτταρο με την πρώτη μειωτική διαίρεση διαιρείται σε δύο δευτεροταγή σπερματοκύτταρα που είναι μικρά, σφαιρικά, απλοειδή κύτταρα. Στη συνέχεια, τα δευτεροταγή σπερματοκύτταρα με τη δεύτερη μειωτική διαίρεση σχηματίζουν 4 απλοειδείς σπερματίδες. Οι σπερματίδες σταδιακά χάνουν το κυτταρόπλασμά τους και μετατρέπονται σε ώριμα σπερματοζωάρια, με μια εκτεταμένη διεργασία διαφοροποίησης, γνωστή ως σπερμιογένεση. Μετά την οριστική διαφοροποίησή τους, τα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, υπό την επίδραση της τεστοστερόνης, για να καταλήξουν, μέσω του ορχικού δικτύου, στις επιδιδυμίδες.



Σχήμα 1.4: Σπερματογένεση

1.2.4. Μορφολογία σπερματοζωαρίου

Το σπερματοζώαριο είναι συνήθως το μικρότερο κύτταρο των οργανισμών. Η μορφολογία του σπερματοζωαρίου εξυπηρετεί τους λειτουργικούς του σκοπούς, την κίνηση του προς το ωάριο και τη σύντηξή του με αυτό. Ως εκ τούτου, το κυτταρόπλασμά του είναι σχεδόν ανύπαρκτο ενώ απουσιάζουν πολλά υποκυτταρικά οργανίδια. Τα σπερματοζώαρια των περισσότερων οργανισμών είναι επιμήκεις νηματοειδείς δομές με μικρή κεφαλή και μακριά ουρά (Σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5: Μορφολογία σπερματοζωαρίου

Η κεφαλή παρουσιάζει μικρή εσωτερική οργάνωση αφού το μεγαλύτερο μέρος της καταλαμβάνεται από τον απλοειδή πυρήνα. Η χρωματίνη στο εσωτερικό του πυρήνα παρουσιάζει εκτεταμένη συμπύκνωση με αποτέλεσμα τον περιορισμό της μεταγραφικής δραστηριότητας στο

σπερματοζωάριο. Στο πρόσθιο τμήμα του πυρήνα εντοπίζεται ένα εκκριτικό κυστίδιο που περιέχει υδρολυτικά ένζυμα και ονομάζεται ακρόσωμα. Το ακρόσωμα είναι υπεύθυνο για την ακροσωμική αντίδραση, μία αλληλεπίδραση καθοριστική για τη γονιμοποίηση, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια. Η οπίσθια περιοχή του ακροσώματος καλείται ισημερινή περιοχή και αποτελεί τη θέση της πρώτης επαφής σπερματοζωαρίου-ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση.

Η ουρά του σπερματοζωαρίου μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα μέρη, τον αυχένα, το μεσαίο τμήμα, το κυρίως τμήμα και το ακραίο τμήμα. Ο αυχένας αποτελεί το τμήμα σύνδεσης κεφαλής-ουράς. Εκεί εντοπίζονται δύο κεντριόλια τοποθετημένα κάθετα μεταξύ τους. Το πλησιέστερο στον πυρήνα καλείται κοντινό κεντριόλιο και το άλλο, μακρινό κεντριόλιο. Το μακρινό κεντριόλιο είναι παράλληλο στο αξόνημα, δηλαδή στον επιμήκη άξονα του σπερματοζωαρίου και αποτελεί το κέντρο οργάνωσης του μαστιγίου της ουράς.

Η κίνηση της ουράς του σπερματοζωαρίου οφείλεται στην κάμψη του μαστιγίου. Το μαστίγιο αποτελείται από δύο ανεξάρτητους κεντρικούς μικροσωληνίσκους που περιβάλλονται από εννέα ζεύγη μικροσωληνίσκων, μία διάταξη γνωστή ως “9+2” διάταξη. Κατά μήκος των μικροσωληνίσκων, συνδέονται οι κινητήριες πρωτεΐνες δυνείνες, η καθεμία από τις οποίες αποτελείται από δύο σφαιρικές κεφαλές με δραστικότητα ATPάσης και μία ουρά. Η ουρά κάθε δυνείνης προσδένεται σταθερά σε ένα μικροσωληνίσκο, ενώ οι κεφαλές προσδένονται σε ένα γειτονικό μικροσωληνίσκο. Η υδρόλυση ATP παρέχει στις κεφαλές την ενέργεια να αποσυνδέονται από το μικροσωληνίσκο και να επανασυνδέονται μαζί του σε γειτονικό σημείο με αποτέλεσμα οι μικροσωληνίσκοι να διολισθαίνουν μεταξύ τους. Επειδή, όμως, τα γειτονικά ζεύγη μικροσωληνίσκων συνδέονται μεταξύ τους και με άλλες, δομικές πρωτεΐνες, μία παράλληλη ολίσθηση μεταξύ των ζευγών μικροσωληνίσκων οδηγεί σε κάμψη του μαστιγίου της ουράς.

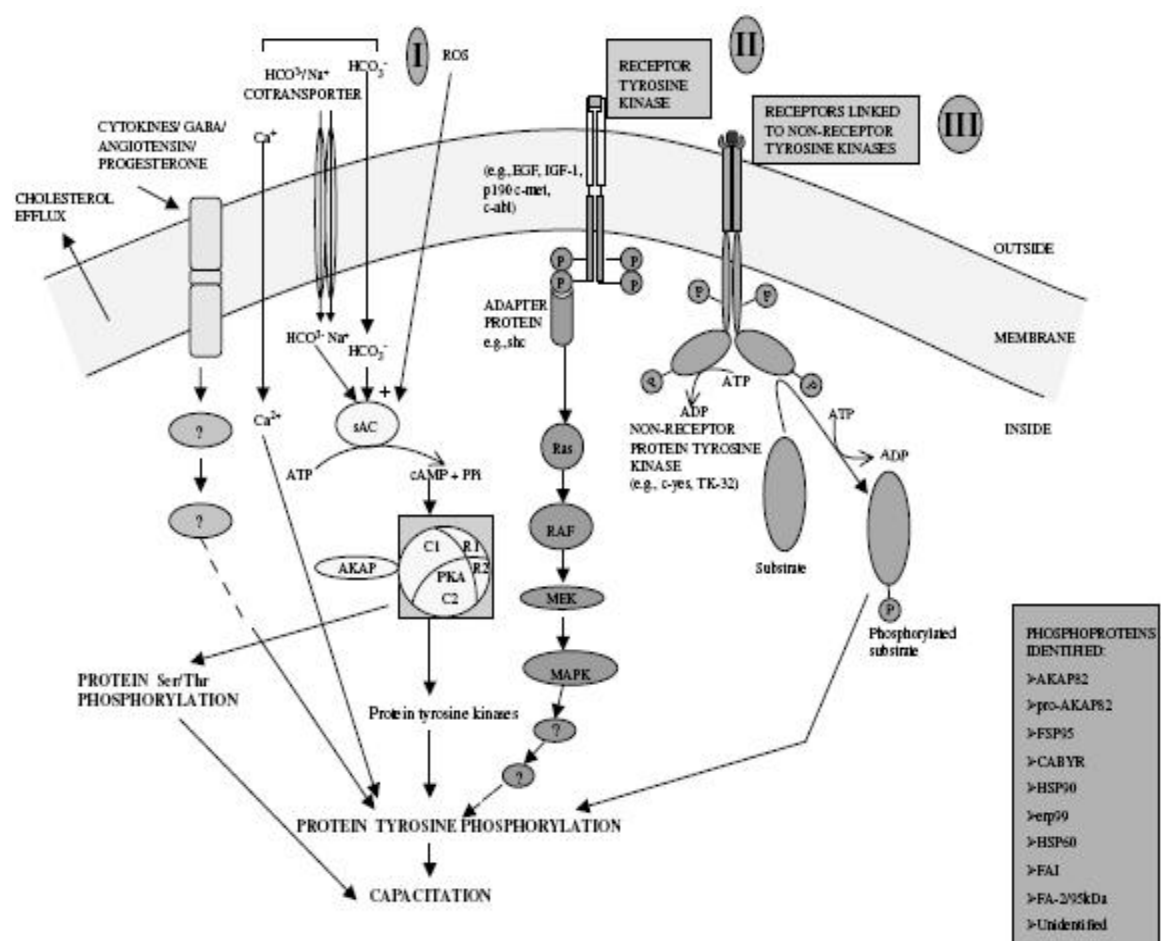
Στο μεσαίο τμήμα της ουράς του σπερματοζωαρίου, το αξόνημα περιβάλλεται από εννέα κυκλοτερείς επενδυτικές ίνες και μια κάψα από επιμήκη μιτοχόνδρια, διευθετημένα το ένα πίσω από το άλλο. Έτσι σχηματίζεται μία έλικα που περιβάλλει το μαστίγιο. Τα μιτοχόνδρια αυτά

είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ATP που απαιτείται για τη δράση της δυνείνης και την κίνηση του σπερματοζωαρίου. Το μεσαίο τμήμα της ουράς ακολουθείται από το κυρίως τμήμα, που φέρει ινώδη κάψα και η ουρά καταλήγει στο ακραίο τμήμα του σχήματος.

1.2.5. Μοριακός μηχανισμός γονιμοποίησης

1.2.5.1. Απόκτηση ικανότητας γονιμοποίησης

Η διαδικασία της γονιμοποίησης χαρακτηρίζεται από μία σειρά αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών σπερματοζωαρίου και ωαρίου. Ωστόσο, το σπερματοζωάριο είναι ανίκανο να γονιμοποιήσει το ωάριο, εάν προηγουμένως δεν παραμείνει ένα χρονικό διάστημα στον ωαγωγό του θηλυκού ατόμου. Η διαδικασία της ενεργοποίησης του σπερματοζωαρίου καλείται απόκτηση ικανότητας γονιμοποίησης (capacitation) [10-11]. Η ικανότητα γονιμοποίησης αποκτάται με φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης πρωτεϊνών του σπερματοζωαρίου. Η φωσφορυλίωση συντελείται με την ενεργοποίηση τριών οδών μεταγωγής σήματος, της σηματοδοτικής οδού που εξαρτάται από το κυκλικό AMP (cAMP-dependent pathway), της σηματοδοτικής οδού των υποδοχέων με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης [Receptor Tyrosine Kinase (RTK) pathway] και της σηματοδοτικής οδού των υποδοχέων που συνδέονται με ανεξάρτητες τυροσινικές κινάσες [Non-Receptor Tyrosine Kinase (NRTK) pathway] (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6: Οδοί μεταγωγής σήματος για την απόκτηση ικανότητας γονιμοποίησης (Naz and Rajesh, 2004)

Η λιπιδική σύσταση της πλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου διαφέρει από κάθε σωματικό κύτταρο διότι έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθερικά φωσfolιπίδια, όπως είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF), καθώς και μεγάλες ποσότητες χοληστερόλης που καθιστούν τη μεμβράνη αρκετά συμπαγή. Με την είσοδο του σπερματοζωαρίου στον ωαγωγό, η αλβουμίνη που βρίσκεται σε αυτόν δεσμεύει τόσο τον PAF, όσο και τη χοληστερόλη της πλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου κάνοντας τη μεμβράνη πιο ρευστή. Μετά την προσωρινή δέσμευση του PAF στην αλβουμίνη, αυτός προσδένεται στον υποδοχέα του που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου και ενεργοποιεί διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος [12]. Η απομάκρυνση της χοληστερόλης ενεργοποιεί την αδενυλική

κυκλάση (SAC) που μετατρέπει το ATP σε cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) που φωσφορυλιώνει άλλες κινάσες. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες του σπερματοζωαρίου ώστε το σπερματοζώριο να αποκτήσει ικανότητα γονιμοποίησης. Η είσοδος HCO_3^{3+} και δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) στο σπερματοζώριο ενεργοποιούν τη σηματοδοτική οδό που εξαρτάται από το cAMP με τον ίδιο τρόπο.

Στην πλασματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων υπάρχουν οι οικογένειες MAPK, EGF, IGF-1, p190 c-met και c-abl υποδοχέων RTK. Η σύνδεση των RTK με τον προσδέτη τους προκαλεί το διμερισμό τους και την επαφή των ενδοκυτταρικών ουρών τους που φέρουν περιοχές με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Η επαφή αυτή ενεργοποιεί την ενζυμική τους δραστηριότητα με αποτέλεσμα η κινάση του ενός υποδοχέα να φωσφορυλιώνει την κινάση του άλλου σε πλευρικές αλυσίδες τυροσίνης. Οι RTK στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν άλλες κινάσες ώστε να προσδώσουν στο σπερματοζώριο ικανότητα γονιμοποίησης.

Οι κινάσες c-yes και TK32 του σχήματος δεν είναι, όπως αναφέρθηκε, υποδοχείς, αλλά συνδέονται με υποδοχείς για να ενεργοποιηθούν και να φωσφορυλιώσουν άλλα μόρια που οδηγούν στην απόκτηση ικανότητας γονιμοποίησης από το σπερματοζώριο.

Τέλος, τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}), η προγεστερόνη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) καθώς και κυτοκίνες εμπλέκονται στην απόκτηση ικανότητας γονιμοποίησης από το σπερματοζώριο χωρίς να έχει εξακριβωθεί πλήρως ο ρόλος τους [13].

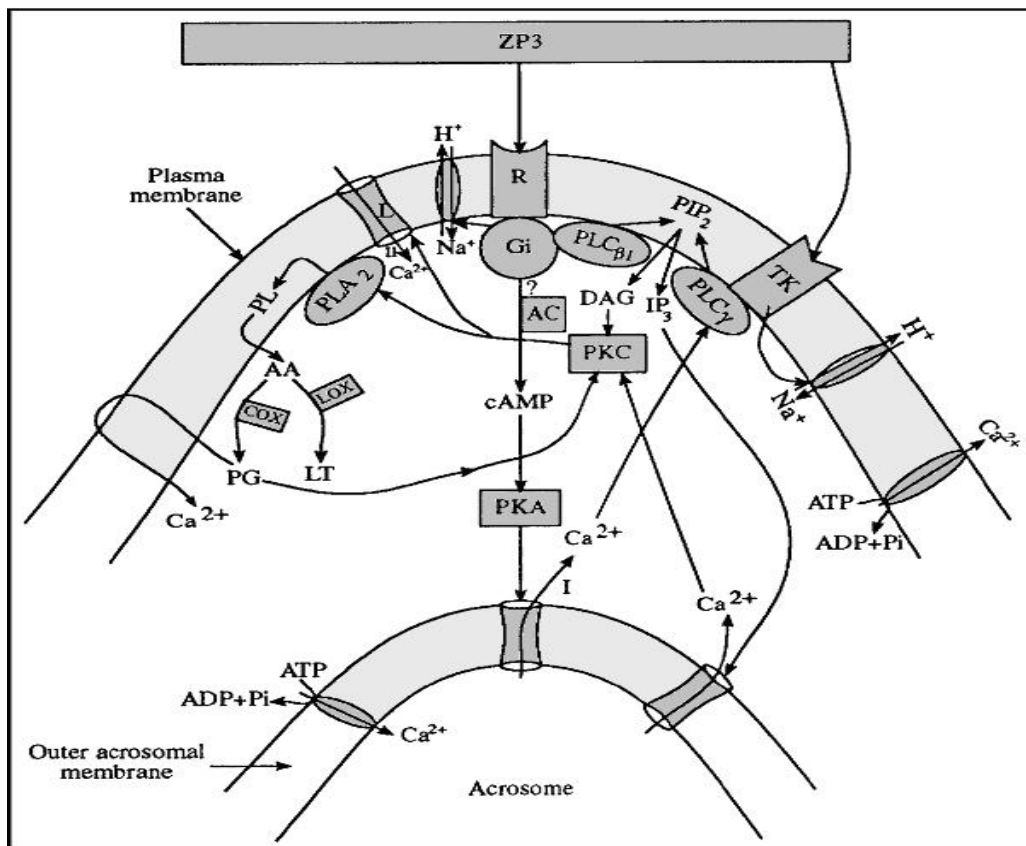
1.2.5.2. Ακροσωμική αντίδραση

Αφού το σπερματοζώριο αποκτήσει την ικανότητα γονιμοποίησης, είναι πλέον σε θέση να διεισδύσει στις προστατευτικές μεμβράνες του ωαρίου και να το γονιμοποιήσει. Το σπερματοζώριο φέρει στη μεμβράνη του ένα ένζυμο με δραστηριότητα υαλουρονιδάσης ώστε, όταν έρχεται σε επαφή με το ωάριο στον ωαγωγό, να είναι σε θέση να διεισδύσει στην ακτινωτή στεφάνη και να προσδεθεί στη διαφανή ζώνη. Η πρόσδεση στη διαφανή

ζώνη επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση της α -1,4-γαλακτοσυλτρανσφεράσης (GalT) που εντοπίζεται στην επιφάνεια του σπερματοζωαρίου με τις υδατανθρακικές ομάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης των γλυκοπρωτεϊνών ZP3 της διαφανούς ζώνης [14].

Το σπερματοζωάριο είναι ικανό να διεισδύσει στη διαφανή ζώνη μόνο αφού έχει ολοκληρώσει την ακροσωμική αντίδραση. Το ακρόσωμα είναι ένα εκκριτικό κυστίδιο (Σχήμα 1.5) που, αν και περιβάλλεται από απλή μεμβράνη, συχνά αναφέρεται ότι αποτελείται από μία εσωτερική και μία εξωτερική μεμβράνη, με την εσωτερική να καλύπτει τον πυρήνα και την εξωτερική να βρίσκεται κάτω από την πλασματική μεμβράνη. Η ακροσωμική αντίδραση περιλαμβάνει πολλαπλές συντήξεις μεταξύ της εξωτερικής ακροσωμικής μεμβράνης και της πλασματικής μεμβράνης στο πρόσθιο τμήμα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, εκτενή σχηματισμό μεμβρανικών κυστιδίων και έκθεση των συστατικών της εσωτερικής ακροσωμικής μεμβράνης. Η GTPάση Rab3A και οι SNARE [Soluble NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) Attachment protein REceptors], που συμμετέχουν στη σύντηξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανών στα σωματικά κύτταρα, φαίνεται να συμμετέχουν και στη σύντηξη των μεμβρανών κατά την ακροσωμική αντίδραση [15-17]. Έχει βρεθεί ότι και η φωσφολιπάση C δέλτα 4 (PLC δ 4) απαιτείται ώστε η ακροσωμική αντίδραση να διεξαχθεί κανονικά [18].

Κατά την ακροσωμική αντίδραση, η ZP3 προσδένεται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς συνδεδεμένους με πρωτεΐνες G (G-protein coupled receptor, GPCR) (Σχήμα 1.7).



Σχήμα 1.7: Οδοί μεταγωγής σήματος κατά την ακροσωμική αντίδραση (Breitbart and Spungin, 1997)

Οι πρωτεΐνες G αποτελούνται από τις υπομονάδες α , β και γ . Σε κατάσταση ηρεμίας, η υπομονάδα α ($G\alpha$) είναι συνδεδεμένη με GDP. Η σύνδεση της ZP3 στον GPCR προκαλεί την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την πρωτεΐνη G. Η αλληλεπίδραση αυτή συνεπάγεται την αντικατάσταση του GDP από GTP στην υπομονάδα $G\alpha$ που οδηγεί στη διάσπαση της υπομονάδας $G\alpha$ από το σταθερό ετεροδιμερές των υπομονάδων β και γ ($G\beta\gamma$).

Η υπομονάδα Gα ενεργοποιεί τη sAC, την PLCβ1 και μία αντλία K⁺/Na⁺. Η sAC μετατρέπει το ATP σε cAMP, το οποίο ενεργοποιεί την PKA. Η PKA διεγείρει τους ταση-ελεγχόμενους διαύλους Ca²⁺ που βρίσκονται στην ακροσωμική μεμβράνη και προκαλεί την έκλυση Ca²⁺ από το εσωτερικό του ακροσώματος στο κυτταρόπλασμα του σπερματοζωαρίου, οδηγώντας σε μια πρώτη μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του Ca²⁺. Η αύξηση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της PLCγ1.

Οι PLCβ1 και PLCγ1 καταλύουν την υδρόλυση της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης [PtdIns(4,5)P₂] που βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της λιπιδικής διπλοστιβάδας της πλασματικής μεμβράνης σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (InsP₃) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η InsP₃ ενεργοποιεί τα κανάλια Ca²⁺ που βρίσκονται στη μεμβράνη του ακροσώματος και προκαλεί την έκλυση Ca²⁺ από το εσωτερικό του ακροσώματος στο κυτταρόπλασμα του σπερματοζωαρίου. Το Ca²⁺ μαζί με τη DAG ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) που μετατοπίζεται στη μεμβράνη του σπερματοζωαρίου, διεγείρει τους τασιο-ελεγχόμενους διαύλους Ca²⁺ που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και προκαλεί την είσοδο Ca²⁺ από το εξωτερικό στο κυτταρόπλασμα του σπερματοζωαρίου, οδηγώντας σε μία δεύτερη μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης του Ca²⁺.

Η PKC μπορεί να ενεργοποιήσει τη φωσφολιπάση A₂ (PLA₂) που απελευθερώνει αραχιδονικό οξύ από τα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης. Το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται σε προσταγλανδίνες και λευκοτριένια μέσω της κυκλοξυγονάσης και της λιποξυγονάσης αντίστοιχα.

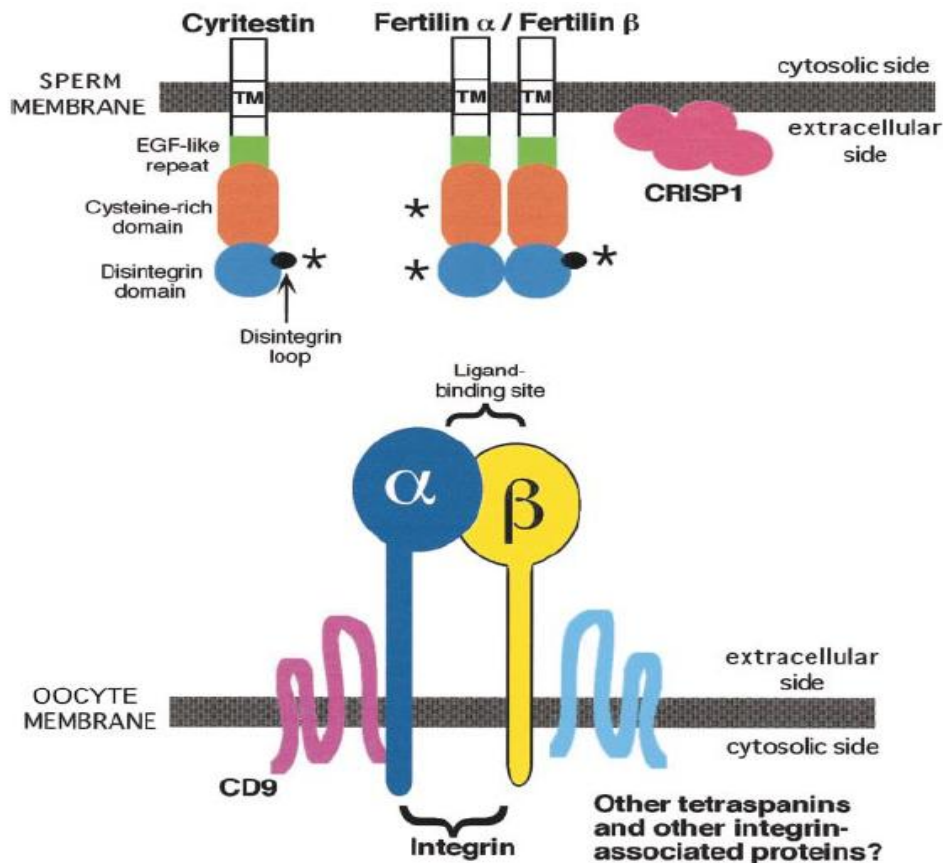
Η αντλία ιόντων K⁺/Na⁺ χρησιμοποιεί την ενέργεια υδρόλυσης του ATP για να αποβάλλει ιόντα Na⁺ προς το εξωτερικό του σπερματοζωαρίου και να αντλήσει ιόντα K⁺ προς το εσωτερικό του, αντίθετα προς τις ηλεκτροχημικές βαθμιδώσεις τους με αποτέλεσμα να αυξάνει το pH του κυτταροπλάσματος.

Τέλος, η ZP3 μπορεί να προσδεθεί και σε RTK που ενεργοποιούν τόσο την PLCγ1, όσο και την αντλία K⁺/Na⁺. Η αύξηση της συγκέντρωσης Ca²⁺ και του pH οδηγεί στην έκκριση των υδρολυτικών ενζύμων του ακροσώματος και τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη [19].

Είναι φανερό ότι, κατά την ακροσωμική αντίδραση, ενεργοποιείται πλήθος οδών μεταγωγής σήματος, σε μερικές δε από αυτές συμμετέχουν φωσφολιπάσες C (PLCδ4, PLCβ1, PLCγ1). Η βιοχημεία ειδικά των ενζύμων αυτών θα αναπτυχθεί στο Κεφάλαιο 1.4.

1.2.5.3. Σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωαρίου

Αφού το σπερματοζωάριο διαπεράσει τη διαφανή ζώνη, φτάνει στην πλασματική μεμβράνη του ωαρίου. Η πρόσδεσή του στην πλασματική μεμβράνη του ωαρίου επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών της οικογένειας ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease domain) του σπερματοζωαρίου και των ιντεγκρινών του ωαρίου [20-21]. Οι πρωτεΐνες ADAM πήραν την ονομασία τους από μία περιοχή δυσιντεγκρίνης και μία περιοχή μεταλλοπρωτεάσης που διαθέτουν. Οι πρωτεΐνες ADAM που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση του σπερματοζωαρίου με το ωάριο είναι η φερτιλιζίνη-α (ADAM1), η φερτιλιζίνη-β (ADAM2) και η κυριτεστίνη (ADAM3) (Σχήμα 1.8). Οι φερτιλιζίνες α και β σχηματίζουν ένα λειτουργικό ετεροδιμερές, ενώ η κυριτεστίνη δρα ανεξάρτητα. Οι πρωτεΐνες ADAM αλληλεπιδρούν με την ιντεγκρίνη α6β1. Η πρόσδεση επιτελείται στην περιοχή του ωαρίου που εφάπτεται στην πλευρική επιφάνεια της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Για τη σύντηξη απαιτείται μία ακόμη πρωτεΐνη του ωαρίου, η CD9. Η CD9 ανήκει στην οικογένεια των τετρασπανινών, διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που συνδέονται μεταξύ τους, όπως και με τις ιντεγκρίνες β1 [22]. Πιστεύεται ότι η CD9 συνδέεται με την ιντεγκρίνη α6β1 που αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες ADAM και ρυθμίζει την αλληλεπίδραση αυτή που οδηγεί στη σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωαρίου [23]. Με τη σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωαρίου, το ωάριο ενεργοποιείται.



Σχήμα 1.8: Μηχανισμός σύντηξης σπερματοζωαρίου-ωαρίου (Evans, 2002)

1.2.5.4. Ενεργοποίηση του ωαρίου

Ο όρος “ενεργοποίηση του ωαρίου” περιλαμβάνει τα γεγονότα που ακολουθούν τη γονιμοποίηση του ωαρίου. Η σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωαρίου προκαλεί την εξωκύττωση των φλοιωδών κοκκίων που εντοπίζονται στην περιοχή του κυτταροπλάσματος που υπόκειται της πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου. Τα φλοιώδη κοκκία περιέχουν ένζυμα που προκαλούν τη διασύνδεση των υδατανθρακικών ομάδων των πρωτεϊνών ΖΡ, κάνοντας τη διαφανή ζώνη αδιαπέραστη για τα υπόλοιπα σπερματοζωάρια. Στη συνέχεια, ολοκληρώνεται η μείωση στον πυρήνα του ωαρίου και στη συνέχεια στρατολογούνται τα μητρικά mRNA για την κάλυψη των αναγκών του γονιμοποιημένου ωαρίου [24].

1.3. Ο ζωτικός ρόλος του Ca^{2+} στη γονιμοποίηση

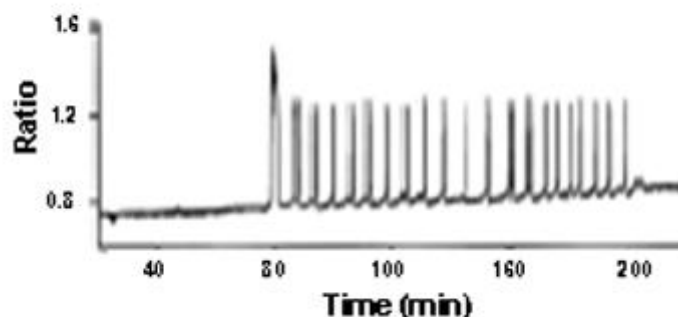
Το 1898, ο Loeb πρότεινε την ενεργοποίηση του ωαρίου ως αποτέλεσμα μίας αλλαγής στη συγκέντρωση ιόντων στο ωάριο [25]. Τέσσερα χρόνια αργότερα, ο ίδιος πρότεινε το σπερματοζωάριο ως υπεύθυνο για την αλλαγή αυτή, θεώρησε δε ότι την προκαλεί μέσω ενός σπερματικού παράγοντα που εισάγει στο ωάριο. Το 1913, ο Frank Lillie πρότεινε την ενεργοποίηση ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης ενός προσδέτη του σπερματοζωαρίου με τον υποδοχέα του στο ωάριο [26]. Ήταν αρχές της δεκαετίας του 1930 όταν για πρώτη φορά ερευνητές, ορμώμενοι από πειράματα επαγωγής τεχνητής ενεργοποίησης του ωαρίου, συνέλαβαν την ιδέα ότι το Ca^{2+} λειτουργεί ως σήμα για την ενεργοποίηση του ωαρίου [27-29].

Το 1974, η ερευνητική ομάδα του R.A. Steinhardt έδειξε ότι το ιονοφόρο Ca^{2+} A23187 ενεργοποιούσε τα ωάρια του αχινού, του αστερία και του ινδικού χοιριδίου [30]. Το 1977, με τη χρήση της ασβεστιοδεσμευτικής φωταυγούς πρωτεΐνης ακουορίνης, καταγράφηκε, για πρώτη φορά, η αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} κατά τη γονιμοποίηση των ωαρίων του ψαριού medaka. Η ενεργοποίηση του ωαρίου επαγόταν ακόμα με την έγχυση ρυθμιστικού διαλύματος Ca^{2+} στο εσωτερικό του ωαρίου, ενώ αναστελλόταν με προ-έγχυση του χηλικού παράγοντα EGTA στο εσωτερικό του ωαρίου. Σήμερα, η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} θεωρείται ικανή και αναγκαία συνθήκη για την ενεργοποίηση των ωαρίων όλων των οργανισμών [31].

Παρόλο που η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} κατά τη γονιμοποίηση είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό που μοιράζονται όλοι ανεξαιρέτως οι οργανισμοί, η μορφή με την οποία εκδηλώνεται αυτή η αύξηση διαφέρει μεταξύ των οργανισμών [32].

Ένας πρώτος διαχωρισμός μπορεί να γίνει ανάμεσα σε δευτεροστόμια και πρωτοστόμια ζώα. Στα γονιμοποιημένα ωάρια των δευτεροστόμιων ζώων (εχινόδερμων, όπως ο αχινός και ο αστερίας και χορδωτών, όπως τα ασκίδια και τα σπονδυλωτά), η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} παρουσιάζει παροδικές αυξομειώσεις, έχοντας τη

μορφή κυμάτων Ca^{2+} , γνωστών και ως ταλαντώσεων Ca^{2+} (Σχήμα 1.9). Οι ταλαντώσεις αυτές οφείλονται σε έκλυση Ca^{2+} από τις αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου. Ο αριθμός, η συχνότητα και η διάρκειά τους διαφέρει από είδος σε είδος.



Σχήμα 1.9: Ταλαντώσεις Ca^{2+} μετά από *in vitro* γονιμοποίηση σε ωάρια ποντικού

Αντίθετα, στα γονιμοποιημένα ωάρια των πρωτοστόμιων ζώων (από τους νημερτίνους έως τις αννελίδες), η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} συμβαίνει, με ελάχιστες εξαιρέσεις, μία και μόνο φορά χωρίς να επαναληφθεί. Στην περίπτωση αυτή, η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} οφείλεται σε εισροή Ca^{2+} από το εξωτερικό του ωαρίου.

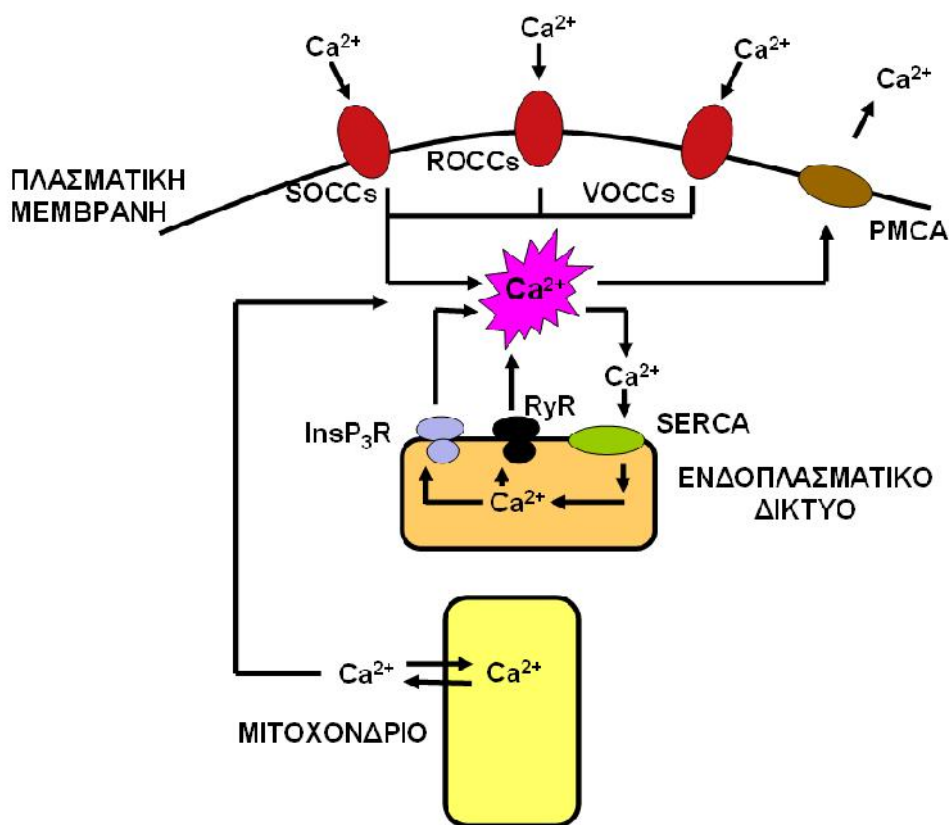
Πρόσφατα, προτάθηκε ότι το μοτίβο των ταλαντώσεων Ca^{2+} στους οργανισμούς διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο για τη σειρά με την οποία θα διεξαχθούν τα γεγονότα που απαρτίζουν την ενεργοποίηση του ωαρίου.

1.3.1. Ο μηχανισμός επαγωγής ταλαντώσεων Ca^{2+} κατά τη γονιμοποίηση των θηλαστικών

Στη συνέχεια, το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στην ανακάλυψη του μηχανισμού μέσω του οποίου επάγονται οι ταλαντώσεις Ca^{2+} που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση. Η συγκέντρωση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου υπολογίζεται στα 100nM, ενώ η συγκέντρωση Ca^{2+} στο ενδοπλασματικό δίκτυο μπορεί να φτάσει σε μερικές εκατοντάδες

mM [33]. Το ωάριο ενεργοποιείται όταν η συγκέντρωση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα αυξηθεί από 100nM σε 1μM ή περισσότερο [34].

Η ομοιόσταση του Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζεται από μία πλειάδα διαύλων Ca^{2+} που εντοπίζονται τόσο στην πλασματική μεμβράνη, όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και στα μιτοχόνδρια (Σχήμα 1.10).



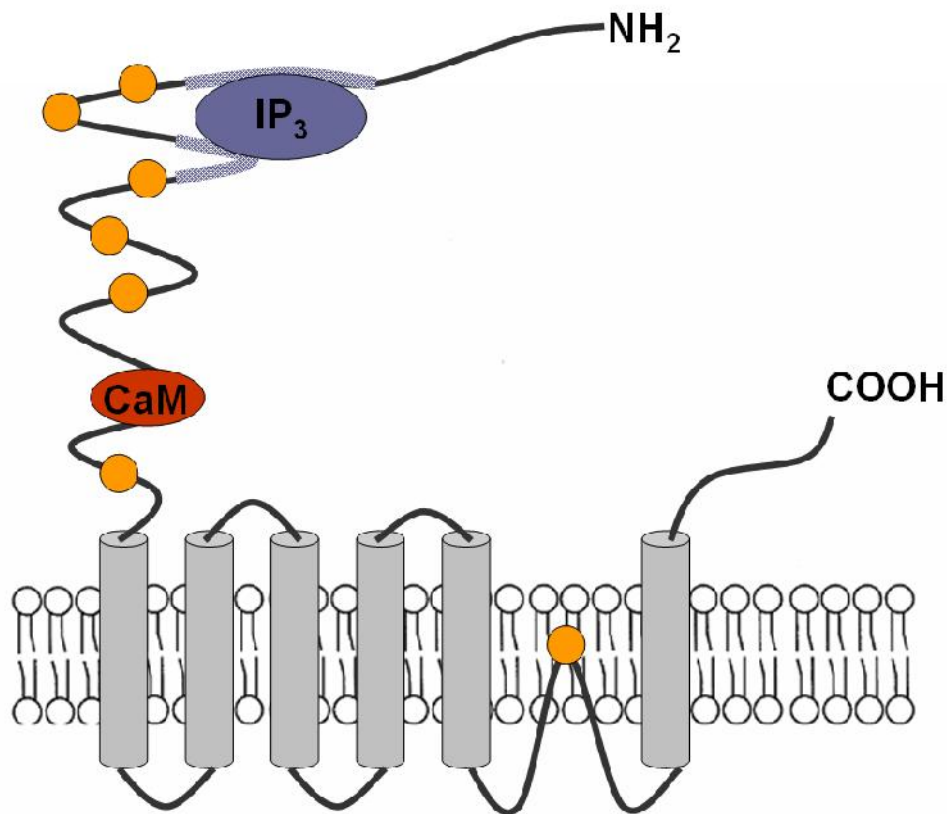
Σχήμα 1.10: Ομοιόσταση του Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα

Η πλασματική μεμβράνη διαθέτει τρία είδη διαύλων Ca^{2+} , τους διαύλους VOCC (voltage-operated calcium channels) που ανοίγουν ως απόκριση σε αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης, τους ROCC (receptor-operated calcium channels) που είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς και ανοίγουν ως απόκριση της σύνδεσης προσδέτη-υποδοχέα και τους SOCC (store-operated calcium channels) που ανοίγουν όταν τα αποθέματα Ca^{2+} στο ενδοπλασματικό δίκτυο εξαντληθούν. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο συναντούνται δύο τύποι διαύλων Ca^{2+} , οι υποδοχείς ρυανοδίνης RyR

(Ryanodine Receptors) και οι υποδοχείς τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Inositol trisphosphate Receptors, IP₃R).

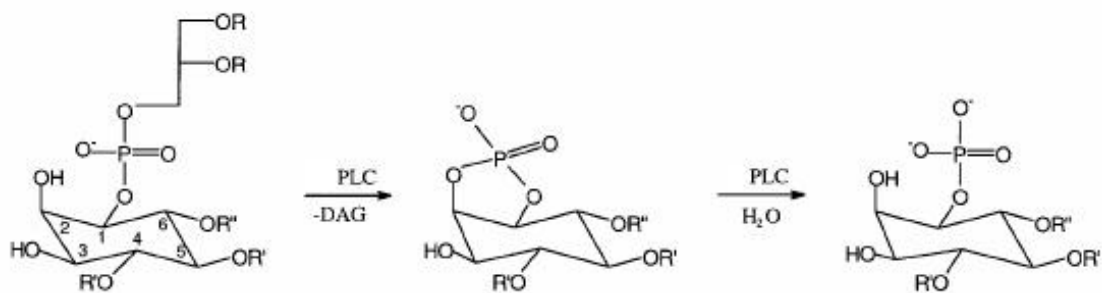
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ταλαντώσεις Ca²⁺ οφείλονται σε έκλυση Ca²⁺ από τις αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου. Αναστολή με αντισώματα της ενεργοποίησης των δύο τύπων υποδοχέων έδειξε ότι τελικά οι ταλαντώσεις Ca²⁺ που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση συντελούνται μέσω των IP₃R. Αν και στα θηλαστικά υπάρχουν τρία γονίδια των IP₃R, τα ωάρια εκφράζουν κυρίως την πρώτη από τις τρεις ισομορφές, τον IP₃R τύπου 1 (IP₃R-1), ο οποίος μάλιστα κατανέμεται στην περιοχή του φλοιού όπου παρατηρείται αρχικά η αύξηση της συγκέντρωσης Ca²⁺. Αναστολή της λειτουργίας του υποδοχέα με έγχυση, στα ωάρια, του μονοκλωνικού αντισώματος 18A10 (έναντι του IP₃R-1) ή ηπαρίνης που δρα σαν ανταγωνιστικός αναστολέας του IP₃R-1 είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή των ταλαντώσεων Ca²⁺ [35-36]. Κατιούσα ρύθμιση των IP₃R-1 με την έγχυση αδενοφωστίνης A, ανταγωνιστικού αναστολέα του IP₃R-1, σε ωάρια πριν τη γονιμοποίησή τους οδηγούσε στην καταστολή των ταλαντώσεων Ca²⁺ μετά τη γονιμοποίηση. Με τα πειράματα αυτά αποδείχθηκε η συμμετοχή του IP₃R-1 στην έκλυση Ca²⁺ από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες κατά τη γονιμοποίηση [37].

Ο IP₃R-1 δρα σαν τετραμερές με τις τέσσερις υπομονάδες να μοιράζονται την ίδια οργάνωση. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια κυτταροπλασματική αμινοτελική περιοχή που περιέχει τη θέση πρόσδεσης για την InsP₃, μια μεμβρανική καρβοξυτελική περιοχή όπου βρίσκεται το κανάλι Ca²⁺, το οποίο απαρτίζεται από έξι διαμεμβρανικές έλικες και μια ρυθμιστική περιοχή που περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης καθώς και θέσεις πρόσδεσης Ca²⁺ και άλλων ρυθμιστικών μορίων κι ενζύμων (Σχήμα 1.11).



Σχήμα 1.11: Σχηματική απεικόνιση της τοπολογίας των περιοχών του IP₃R

Αν η ενεργοποίηση των IP₃R από την InsP₃ ευθύνεται για την πρόκληση των ταλαντώσεων Ca²⁺ κατά τη γονιμοποίηση, τότε προκύπτει εύλογα η απορία για το ποιο μόριο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της InsP₃ στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Η InsP₃ μαζί με τη DAG είναι τα προϊόντα της υδρόλυσης της PtdInsP₂ από την PI-PLC (Σχήμα 1.12). Η DAG προκαλεί την ενεργοποίηση της PKC και η InsP₃ προσδένεται στους IP₃R του ενδοπλασματικού δικτύου προκαλώντας μεταβολή στη στερεοχημική τους διαμόρφωση και ως εκ τούτου τη διάνοιξη των διαύλων Ca²⁺ ώστε να εκλυθεί το Ca²⁺.



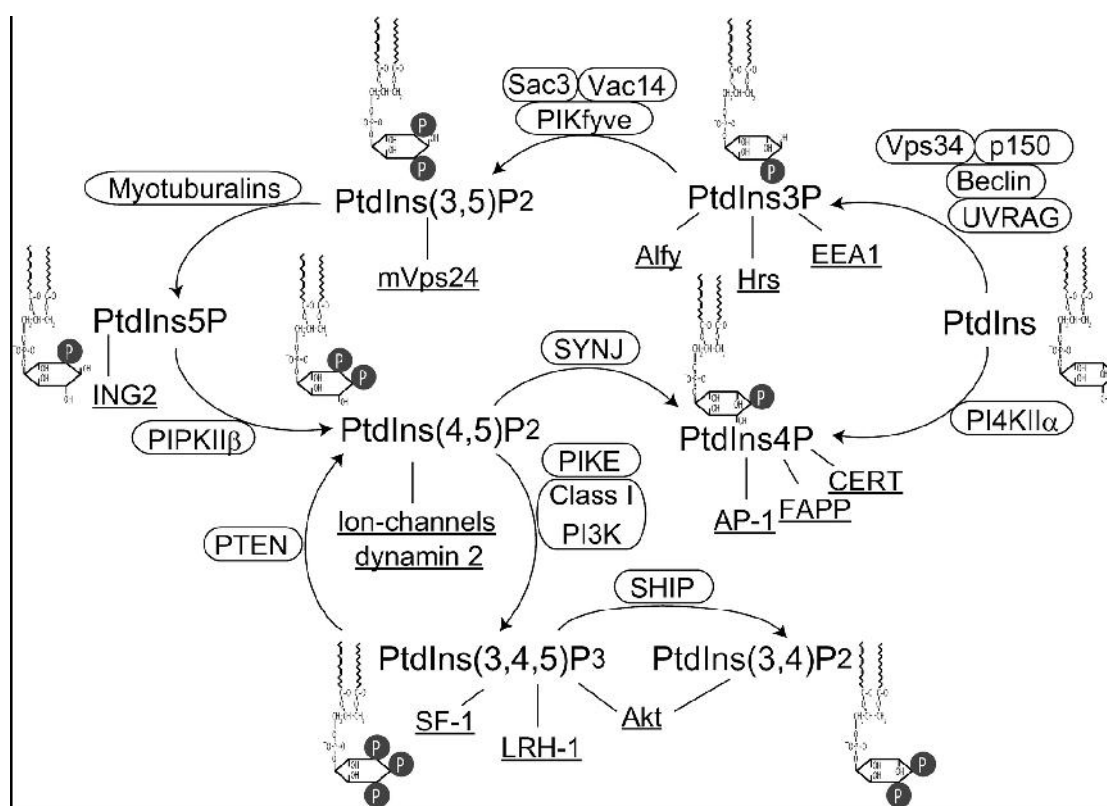
Σχήμα 1.12: Η ενζυμική δράση της PLC

1.3.2. Φωσφοϊνοσιτίδια

Τα φωσφοϊνοσιτίδια είναι μία οικογένεια φωσφορυλιωμένων παραγώγων του μεμβρανικού λιπιδίου φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns). Τα λιπίδια αυτά είναι συχνά συγκεντρωμένα σε διακριτές δεξαμενές που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη, στα ενδοσώματα ή και στον πυρήνα, όπου λειτουργούν είτε ως παραγωγοί δευτέρων μηνυμάτων, είτε ως προσδέτες για πρωτεΐνες που δεσμεύουν φωσφοϊνοσιτίδια. Οι περισσότερες μελετημένες δομικές περιοχές των πρωτεϊνών που δεσμεύουν φωσφοϊνοσιτίδια είναι η περιοχή PH (plekstrin homology domain), η περιοχή PX (Phox domain) και η περιοχή FYVE (Fab1p-YOPB-Vps27p-EEA1). Αυτές οι περιοχές εντοπίζονται σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος, τη μεμβρανική μεταφορά και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού [38].

Η PtdIns αποτελεί την πρόδρομη ένωση όλων των φωσφοϊνοσιτιδίων. Η φωσφορυλίωση μίας, δύο ή τριών ομάδων υδροξυλίου του δακτυλίου ινοσιτόλης της PtdIns οδηγεί στην παραγωγή επτά πολυφωσφοϊνοσιτιδίων. Συγκεκριμένα, πρόκειται για τις μονοφωσφορυλιωμένες 3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns3P), 4-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns4P), 5-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns5P), τις διφωσφορυλιωμένες 3,4-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη [PtdIns(3,4)P₂] και PtdIns(4,5)P₂ και την τριφωσφορυλιωμένη 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη [PtdIns(3,4,5)P₃].

Η $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί το υπόστρωμα των PLC και δίνει γένεση στην InsP_3 και την DAG που συμμετέχουν σε σημαντικές οδούς μεταγωγής σήματος.



1.3.3. Θεωρίες γένεσης των ταλαντώσεων Ca^{2+} σε γονιμοποιημένα ωάρια

47

διοχετεύεται στο ωάριο μέσω της σύντηξης σπερματοζωαρίου-ωαρίου [39]. Ωστόσο, αν και η έγχυση Ca^{2+} ή του ιοντοφόρου A23187 είναι σε θέση να επάγουν την έκλυση Ca^{2+} από τις αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου του ωαρίου [30,40], η συγκέντρωση Ca^{2+} που περιέχεται στο σπέρμα δεν επαρκεί για να προκαλέσει έκλυση Ca^{2+} . Εξάλλου, η θεωρία αυτή αδυνατεί να εξηγήσει την χρονική υστέρηση των ταλαντώσεων Ca^{2+} στα ωάρια των θηλαστικών σε σχέση με το χρόνο σύντηξης σπερματοζωαρίου-ωαρίου [41].

Μία δεύτερη θεωρία, παρόμοια με την πρώτη, κάνει λόγο για σύντηξη της κεφαλής του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη που επιτρέπει την εισροή Ca^{2+} από το εξωτερικό του ωαρίου στο εσωτερικό του, υπερφόρτωση των αποθηκών με Ca^{2+} και τελικά έκλυση του Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο (conduit hypothesis) [42]. Ωστόσο, η παρατήρηση ότι οι ταλαντώσεις Ca^{2+} πραγματοποιούνται κανονικά απουσία εξωκυττάριου Ca^{2+} , υπέδειξε ότι η εισροή εξωκυτταρικού Ca^{2+} δεν είναι απαραίτητη για την πρόκληση των ταλαντώσεων Ca^{2+} στα ωάρια [43,44].

Μία ακόμα θεωρία, η θεωρία επαφής, προτείνει ότι κατά την επαφή σπερματοζωαρίου-ωαρίου, μία αλληλεπίδραση προσδέτη-υποδοχέα στην επιφάνειά τους ενεργοποιεί μία σηματοδοτική οδό που καταλήγει στην έκλυση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου (contact hypothesis). Η σηματοδοτική οδός που ενεργοποιεί τις PLCβ θεωρήθηκε ότι εμπλέκεται στην έκλυση Ca^{2+} στα ωάρια όπως παρατηρήθηκε σε πειράματα έγχυσης ενεργοποιητών και αναστολέων των α_q υπομονάδων πρωτεϊνών G που συνδέονται με τις PLCβ [45,46]. Ωστόσο, αντισώματα έναντι των α_q υπομονάδων πρωτεϊνών G, που ενέθηκαν στα ωάρια πριν την τεχνητή γονιμοποίηση, απέτυχαν να αναστείλουν τις ταλαντώσεις Ca^{2+} [47], υποδηλώνοντας ότι η έκλυση Ca^{2+} δε γίνεται μέσω των PLCβ. Η ενεργοποίηση της PLCγ από την οικογένεια των τυροσινικών κινάσων Src [48-50] προτάθηκε ως μία εναλλακτική σηματοδοτική οδός επαγωγής των ταλαντώσεων Ca^{2+} . Η αναστολή της ενεργοποίησης της PLCγ λόγω υπερέκφρασης των SH2 περιοχών απέτρεψε την μεσολαβούμενη από σπέρμα αύξηση του Ca^{2+} σε ωάρια αχινού [48]. Ωστόσο, όταν αυτά τα πειράματα διεξήχθησαν σε ωάρια θηλαστικών, η υπερέκφραση των SH2

περιοχών αδυνατούσε να αναστείλει τη μεσολαβούμενη από σπέρμα έκλυση Ca^{2+} [51,52]. Επιπλέον, η έγχυση ανασυνδυασμένης $\text{PLC}\gamma$ δεν κατάφερε να αποδείξει τη συμμετοχή αυτής της σηματοδοτικής οδού στην πρόκληση ταλαντώσεων Ca^{2+} στα ωάρια [53].

1.3.4. Θεωρία του σπερματικού παράγοντα

Το 1990, ο K. Swann έδειξε ότι η έγχυση σπερματικού εκχυλίσματος ινδικού χοιριδίου σε ωάρια επάγει ταλαντώσεις Ca^{2+} παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση. Στα ωάρια ποντικού, οι ταλαντώσεις που προκλήθηκαν από τα σπερματικά εκχυλίσματα ινδικού χοιριδίου είχαν υψηλότερη συχνότητα από αυτή που παρατηρείται κατά τη γονιμοποίηση. Παρόλη τη διαφορά στη συχνότητα των ταλαντώσεων, η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην θεωρία του σπερματικού παράγοντα (sperm factor hypothesis), μία θεωρία που προτείνει ότι ένας κυτταροπλασματικός παράγοντας του σπέρματος, πιθανώς μία πρωτεΐνη που επάγει τις ταλαντώσεις Ca^{2+} , εισάγεται στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου μετά τη συνένωση σπερματοζωαρίου-ωαρίου [54]. Η θεωρία αυτή ενισχύθηκε από το γεγονός ότι οι ταλαντώσεις Ca^{2+} επάγονται στα ανθρώπινα ωάρια μετά την ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) σε αυτά, δηλαδή χωρίς την προϋπόθεση της επιφανειακής αλληλεπίδρασης σπερματοζωαρίου-ωαρίου. Οι ταλαντώσεις Ca^{2+} αδυνατούν να συμβούν σε ωάρια CD9-knockout ποντικών, όπου η επαφή σπερματοζωαρίου-ωαρίου υπάρχει αλλά η σύντηξη είναι αδύνατη. Επομένως, η κυτταροπλασματική σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωαρίου αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την επαγωγή ταλαντώσεων Ca^{2+} [55].

Οι πρώτοι υποψήφιοι για τη θέση του σπερματικού παράγοντα ήταν μικρά μόρια, όπως η InsP_3 [56], το μονοξείδιο του αζώτου (NO) [57] ή το NAADP⁺ (nicotinic acid–adenine dinucleotide phosphate) [58]. Αν και τα μόρια αυτά έχουν την ικανότητα να επάγουν την έκλυση Ca^{2+} από τις ενδοκυτταρικές

αποθήκες σε κατώτερους οργανισμούς, δεν είναι σε θέση να μιμηθούν το πρότυπο των ταλαντώσεων Ca^{2+} στα ωάρια των θηλαστικών [37].

Πιο πρόσφατες μελέτες, που περιελάμβαναν τεχνικές κλασμάτωσης, πρότειναν ότι ο σπερματικός παράγοντας είναι μία πρωτεΐνη [43, 59, 60] μοριακού βάρους μεταξύ 30 και 100kDa [61-62]. Διάφορες πρωτεΐνες διεκδίκησαν τον τίτλο του σπερματικού παράγοντα, όπως μια πρωτεΐνη 33kDa, καλούμενη οσιλλίνη (oscillin) [63] και μια αποκομμένη μορφή του υποδοχέα *kit* [64] χωρίς καμία τους να τον κατακτήσει τελικά, αφού δε κατάφεραν να προκαλέσουν ταλαντώσεις Ca^{2+} όταν εγχύθηκαν σε ωάρια θηλαστικών [60, 65, 66].

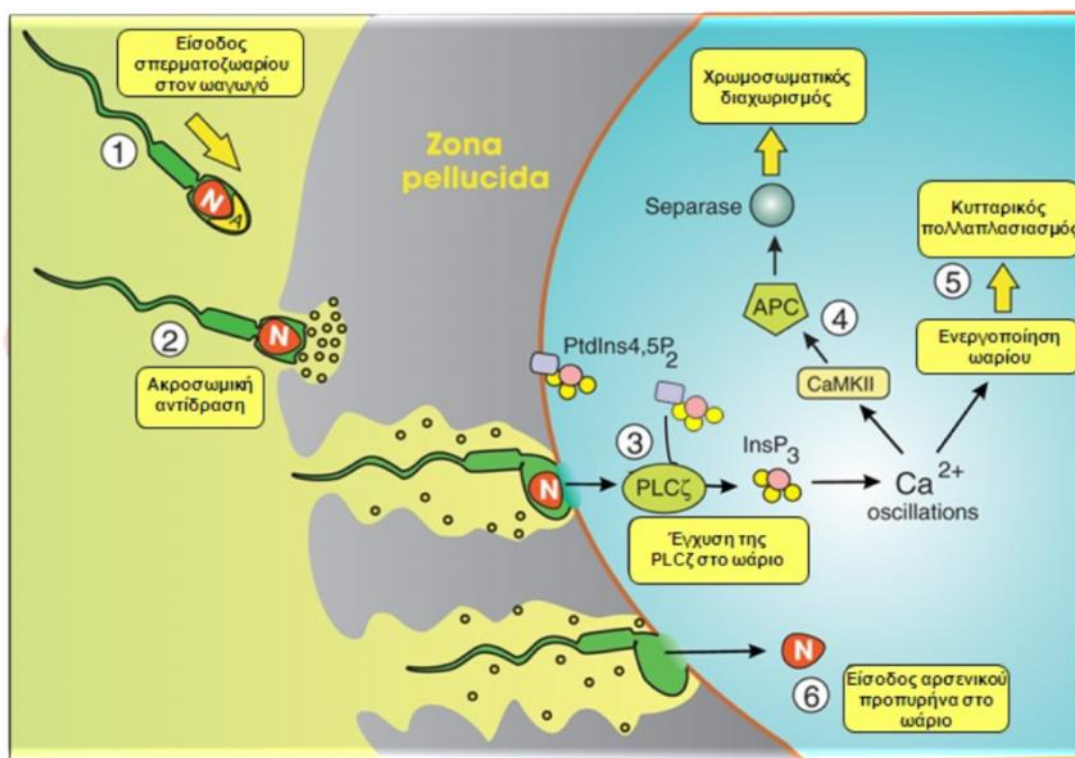
Σπερματικά εκχυλίσματα, που ελέγχθηκαν για την παρουσία δραστηριότητας PLC, έδειξαν ότι διαθέτουν δραστηριότητα PLC, εκατό φορές μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρείται σε ιστούς όπου είναι γνωστό ότι εκφράζονται PLC [61]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ενζυμική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων παρατηρούνταν ακόμα και σε επίπεδα Ca^{2+} της τάξης των 10 μM , επιπέδων δηλαδή που καταγράφονται στο εσωτερικό του ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση. Αυτές οι παρατηρήσεις υπέδειξαν ότι ο σπερματικός παράγοντας πιθανώς να είναι μία PLC.

1.3.5. Από τη θεωρία του σπερματικού παράγοντα στην ανακάλυψη της φωσφολιπάσης C ζήτα (PLCζ)

Η ερευνητική ομάδα του F.A.Lai ήταν αυτή που τελικά κατάφερε να βρει ότι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τις ταλαντώσεις Ca^{2+} και την ενεργοποίηση του ωαρίου είναι μία νέα ισομορφή PLC, η PLCζ [67-68].

Η PLCζ είναι μικρότερη από κάθε άλλη ισομορφή PLC και η έκφρασή της εντοπίζεται αποκλειστικά στο σπέρμα. Μικροέγχυση cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ του ποντικού, του ανθρώπου και του χιμπατζή προκάλεσε, σε ωάρια ποντικού, ταλαντώσεις Ca^{2+} παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση. Επιπλέον, μικροέγχυση συμπληρωματικού RNA (cRNA) που κωδικοποιεί για τις PLCζ ανθρώπου και χοίρου στα αντίστοιχα ωάρια προκάλεσε ταλαντώσεις Ca^{2+} και ενεργοποίηση του ωαρίου. Οι ταλαντώσεις Ca^{2+} αποτράπηκαν όταν έγινε

αναστολή της δράσης της PLCζ με αντι-PLCζ αντίσωμα. Μικροέγχυση ανασυνδυασμένης PLCζ ποντικού, παραγόμενης μέσω σύστηματος βακιλοϊού, σε ωάρια ποντικού προκάλεσε ταλαντώσεις Ca^{2+} . Μελέτες ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η PLCζ εντοπίζεται σε τρεις διακριτούς πληθυσμούς, την ακροσωμική περιοχή, την ισημερινή περιοχή και την μετα-ακροσωμική περιοχή της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, γεγονός που συνάδει με τη θεωρία ότι ο σπερματικός παράγοντας πρέπει να βρίσκεται σε μία περιοχή του σπερματοζωαρίου που του δίνει γρήγορη πρόσβαση στο ωάριο για να εκκινήσει τις ταλαντώσεις Ca^{2+} [69]. Εξάλλου, δύο πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι ορισμένες μορφές ανδρικής στειρότητας οφείλονται σε ελλειματική έκφραση ή παρουσία μη φυσιολογικών μορφών της PLCζ στα σπερματοζωάρια του ανθρώπου [70-71]. Όλα αυτά τα στοιχεία αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι ο σπερματικός παράγοντας είναι η PLCζ (Σχήμα 1.14).



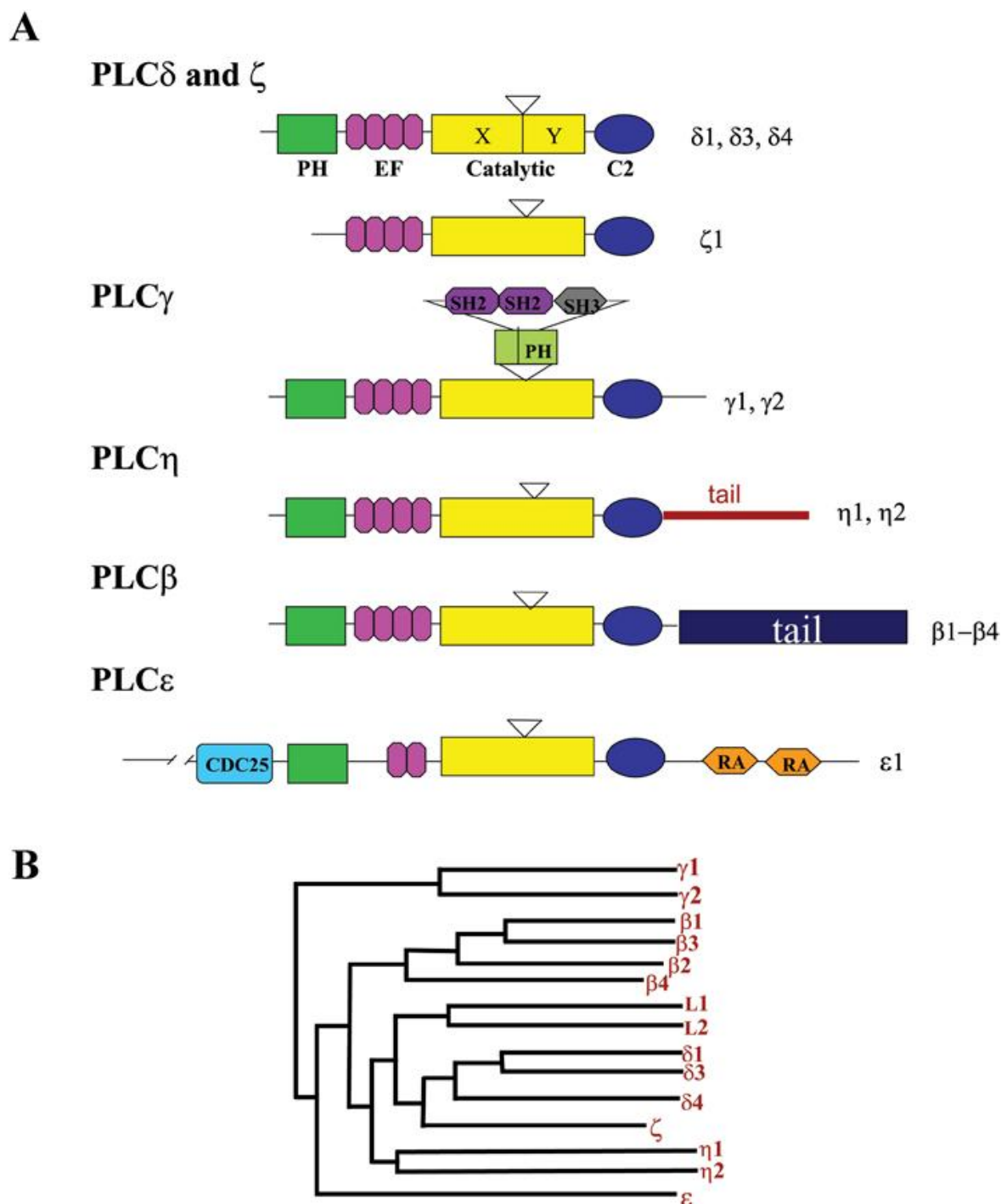
Σχήμα 1.14: Συνοπτική παρουσίαση των σταδίων της γονιμοποίησης και του μηχανισμού πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} από την PLCζ

1.4. Η οικογένεια των φωσφολιπασών C

Η οικογένεια των φωσφολιπασών C φωσφοϊνοσιδίων (PLC) είναι μία οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση σε δύο βήματα της PtdInsP_2 σε InsP_3 και DAG, μέσω των οποίων διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών οδών μεταγωγής σήματος για τη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών.

Η κατάλυση γίνεται μέσω του μηχανισμού κατάλυσης οξέος-βάσης. Τα κατάλοιπα Glu341 και Glu390 δρουν ως βάσεις και προκαλούν την αποπρωτονίωση της 2-υδροξυλομάδας της PtdInsP_2 με τη βοήθεια του Ca^{2+} . Το κατάλοιπο His356 δρα ως οξύ και καταλύει την πρωτονίωση της αποχωρούσας ομάδας της διακυλογλυκερόλης. Το ιόν Ca^{2+} καθώς και το κατάλοιπο His311 σταθεροποιεί την μεταβατική κατάσταση κατά το σχηματισμό του ενδιάμεσου της κυκλικής φωσφορικής ινοσιτόλης που συνδέεται με το ένζυμο. Στη συνέχεια, το κατάλοιπο His356 δρα ως βάση και προκαλεί την πυρηνόφιλη προσβολή του H_2O , ενώ τα κατάλοιπα Glu341 και Glu390 δρουν ως οξέα και οδηγούν στο σχηματισμό της InsP_3 (Σχήμα 1.12) [72].

Μέχρι τώρα, έχουν ταυτοποιηθεί δεκατέσσερις ισομορφές PLC που χωρίζονται σε έξι ομάδες, ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργία τους, τις PLC-β, -γ, -δ, -ε, -ζ και -η (Σχήμα 1.15). Κάθε PLC αποτελείται από ένα συνδυασμό δομικών περιοχών (domains) που αν και σε αδρές γραμμές είναι κοινός για όλες τις PLC, οι διαφοροποιήσεις που υπάρχουν σε κάθε μία από αυτές, τις καθιστούν δεκτικές σε διαφορετικούς τρόπους ενεργοποίησης και συμμετοχής σε διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς [73,74].

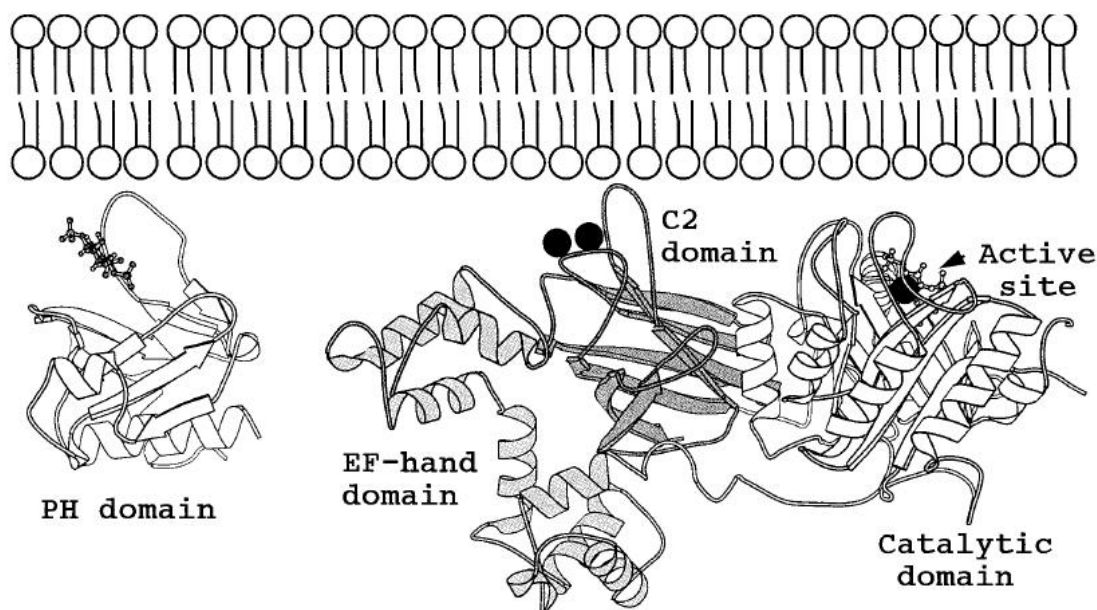


Σχήμα 1.15: (A) Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών C. (B) Φυλογενετικό δέντρο όλων των ισομορφών PLC που δείχνει ότι η PLC ζ εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με τις PLC της ομάδας δ . Τα γράμματα L1 και L2 συμβολίζουν καταλυτικά ανενεργές πρωτεΐνες που ομοιάζουν με τις PLC (phospholipase-C-related catalytically inactive proteins, PRIPs) (Katan, 2005).

ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ XY

Η καταλυτική περιοχή XY (XY catalytic domain) αποτελείται από τις δομικές περιοχές X και Y. Πρόκειται για την πιο συντηρημένη περιοχή των PLC με

αμινοξική ομολογία 60% μεταξύ όλων των PLC και ακόμα μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ των PLC της ίδιας ομάδας. Οι περιοχές X και Y οργανώνονται σε οκτώ επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες β-πτυχωτών επιφανειών/α-ελίκων, σχηματίζοντας ένα αποδιαταγμένο βαρέλι (Σχήμα 1.16) [75]



Σχήμα 1.16: Οι δομικές περιοχές της φωσφολιπάσης C δ1 (Katan and Williams, 1999)

Έχει προταθεί ότι όλες οι PLC μοιράζονται έναν κοινό μηχανισμό κατάλυσης του υποστρώματός τους και ότι οι διαφορές στην ενζυμική κινητική οφείλονται σε ρυθμιστικές περιοχές εντός της καταλυτικής περιοχής XY. Στη συμπαγή οργάνωση της καταλυτικής περιοχής παρεμβάλλεται ένας ευέλικτος βρόχος, η αλληλουχία του συνδέτη X/Y (XY linker), που διαφέρει σημαντικά μεταξύ των PLC ισομορφών. Στην ισομορφή PLCδ, η αλληλουχία του συνδέτη X/Y είναι σχετικά μικρή (46 αμινοξέα). Πρωτεόλυση αυτής της περιοχής οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενζύμου [74-75].

ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ PH

Η δομική περιοχή με ομολογία στην πλεξτρίνη (Pleckstrin Homology domain, PH domain) είναι ένα δομικό μοτίβο 120 περίπου αμινοξέων που ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στην πλεξτρίνη από όπου πήρε και την ονομασία της και μέχρι σήμερα έχει βρεθεί σε περισσότερες από 100 πρωτεΐνες. Οι περισσότερες απαιτούν σύνδεση με τη μεμβράνη για να επιτελέσουν τη δράση τους. Παρόλη την περιορισμένη ομολογία στις αλληλουχίες τους, η τριτοταγής τους διαμόρφωση είναι αξιοσημείωτα όμοια. Η περιοχή PH της PLCδ1 αποτελείται από επτά αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες που σχηματίζουν μια δομή που θυμίζει βαρέλι (barrel-like structure) και από μία α-έλικα στο καρβοξυτελικό άκρο (Σχήμα 1.16) [76]. Δομική ανάλυση της περιοχής PH της PLCδ1 κατέδειξε κατάλοιπα (Lys30, Lys32, Arg40 and Lys57) που δεσμεύουν $\text{InsP}_3/\text{PtdInsP}_2$ και που έχουν άμεση σχέση με τη δραστηριότητα του ενζύμου [77-78].

Τα βασικά αμινοξέα που εντοπίζονται στη θέση πρόσδεσης της InsP_3 της περιοχής PH της PLCδ1 δεν είναι συντηρημένα στις περιοχές PH των PLCβ και PLCγ [79], γεγονός που θα μπορούσε να εξηγεί την υψηλή συγγένεια της περιοχής PH των PLCγ για την InsP_3 και όχι για την PtdInsP_2 . Οι περιοχές PH των PLCβ δεσμεύονται ισχυρά στις μεμβράνες ανεξάρτητα από την παρουσία φωσφοϊνοσιτιδίων [79]. Έχει βρεθεί ότι η αλληλεπίδραση της περιοχής PH της PLCβ1 με την InsP_3 οδηγεί το ένζυμο στην ενεργοποιημένη κίνηση της InsP_3 [80].

ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ EF

Η δομική περιοχή EF (Elongation Factor hand domain, EF hand domain) αποτελείται από τέσσερα μοτίβα έλικας-στροφής-έλικας που χωρίζονται σε δυο ζεύγη λοβών (Σχήμα 1.16). Η περιοχή EF υπάρχει σε ζεύγη διότι ο ένας λοβός σταθεροποιεί τον άλλο [76]. Αυτές οι περιοχές σχηματίζουν έναν ευέλικτο συνδέτη ανάμεσα στην περιοχή PH και την περιοχή XY. Στην PLCδ1, η περιοχή EF διαθέτει κατάλοιπα που δεσμεύουν Ca^{2+} [81], κάτι που συμβαίνει και με άλλες ασβεστιοδεσμευτικές πρωτεΐνες, όπως η καλμοδουλίνη. Στην PLCδ1, το πρώτο ζεύγος της περιοχής EF βρέθηκε να

είναι απαραίτητο για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση της περιοχής PH με την PtdInsP₂ στην πλασματική μεμβράνη [82]. Το δεύτερο ζεύγος της περιοχής EF αλληλεπιδρά με την περιοχή C2, για την οποία θα γίνει λόγος παρακάτω, σταθεροποιώντας την αναδίπλωση του ενζύμου [83].

Στην PLCδ1, σημειακές μεταλλάξεις των καταλοίπων Asp153, Asp157 και Glu164 που βρίσκονται στην περιοχή EF φαίνεται να έχουν επίπτωση στη δραστικότητα της PLCδ1 καθώς επηρεάζουν τη δομή της [84].

ΔΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ C2

Η δομική περιοχή με ομολογία στην πρωτεϊνική κινάση C τύπου II (PKC-homology type II domain, C2 domain) αποτελείται από περίπου 120 αμινοξέα και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στην πρωτεϊνική κινάση C II από όπου πήρε και την ονομασία της. Οργανώνεται σε οκτώ β-πτυχωτές επιφάνειες, σχηματίζοντας ένα αντιπαράλληλο β-sandwich (Σχήμα 1.16). Η δομική περιοχή C2 ενέχεται στην εξαρτώμενη από το Ca²⁺ αλληλεπίδραση των φωσφολιπασών με φωσφολιπίδια [84]. Η δομική περιοχή C2 της PLCδ1 δεσμεύει τρία ιόντα Ca²⁺ και αλληλεπιδρά με τη μεμβρανική φωσφατιδυλοσερίνη για να σχηματίσει ένα τριμερές σύμπλοκο που βοηθά στην αγκυροβόληση της PLCδ1 στην μεμβράνη και στην ενζυμική της δραστικότητα [85].

1.4.1. Φωσφολιπάση C βήτα (PLCβ)

Η ομάδα των PLCβ αποτελείται από τέσσερις ισομορφές (PLCβ1-4) που διαφέρουν στην ιστοειδική τους κατανομή και στον τρόπο ενεργοποίησής τους από πρωτεΐνες G. Η PLCβ1 είναι η πιο ευρέως εκφραζόμενη ισομορφή με μεγαλύτερη συγκέντρωση σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Η PLCβ2 εκφράζεται κυρίως στα αιμοποιητικά κύτταρα. Η PLCβ3 εκφράζεται ευρέως με υψηλότερη συγκέντρωση στον εγκέφαλο, το ήπαρ και την παρωτίδα. Τέλος, η PLCβ4 εκφράζεται κυρίως στον αμφιβληστροειδή και σε νευρικά κύτταρα [79, 80].

Η καταλυτική δράση των PLCβ επιτελείται μέσω της ενεργοποίησής τους από τις ετεροτριμερείς πρωτεΐνες G. Η σύνδεση ενός προσδέτη, όπως είναι η βραδυκίνη, η μπομπεσίνη, η αγγειοτενσίνη, η ισταμίνη, η βαζοπρεσίνη ή η ακετυλοχολίνη στον GPCR προκαλεί την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την πρωτεΐνη G. Οι υπομονάδες Gα και βγ ενεργοποιούν τις PLCβ, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση της PtdInsP₂ σε InsP₃ και DAG. Η ενεργοποίηση των PLCβ διαρκεί όσο διαρκεί η σύνδεσή τους με τις υπομονάδες. Όταν η εγγενής δραστηριότητα GTPάσης της υπομονάδας Gα προκαλέσει την υδρόλυση του GTP σε GDP, η υπομονάδα Gα διίσταται από την PLCβ, επανασυνδέεται με το ετεροδιμερές Gβγ και σχηματίζει την ανενεργό πρωτεΐνη G. Η διαδικασία ρυθμίζεται από μια οικογένεια πρωτεϊνών, γνωστών ως ρυθμιστών της σηματοδοτικής οδού των πρωτεϊνών G (regulators of G protein signalling), που οδηγεί στην επανασύνδεση της υπομονάδας Gα με το ετεροδιμερές Gβγ [80].

Όλα τα μέλη της υποοικογένειας G_q (α_q, α₁₁, α₁₄ και α₁₆) ενεργοποιούν τις PLCβ, αλλά αδυνατούν να ενεργοποιήσουν τις PLCγ, PLCδ και PLCε [86-88]. Η εξήγηση βασίζεται στη δομική διαφοροποίηση των PLCβ ισομορφών έναντι των PLCγ, PLCδ και PLCε. Οι PLCβ διαθέτουν μια χαρακτηριστική καρβοξυτελική ουρά 400 αμινοξέων προσαρτημένη στη C2 δομική περιοχή που δεν απαντάται στις άλλες PLC. Έχει βρεθεί ότι μια ομάδα βασικών αμινοξέων που εντοπίζεται σε περιοχές της καρβοξυτελικής ουράς είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση των PLCβ στις ενεργοποιημένες υπομονάδες G_q [89-90].

Τα ετεροδιμερή βγ ενεργοποιούν τις PLCβ με εξαίρεση την PLCβ4. Το ετεροδιμερές στην περίπτωση αυτή πιθανώς να προέρχεται από μια ανασταλτική πρωτεΐνη G (G_i). Η PLCβ1 εμφανίζει ήπια ενεργοποίηση από το ετεροδιμερές Gβγ, ενώ οι PLCβ2 και PLCβ3 ενεργοποιούνται ισχυρά από αυτό [87,91]. Η δομική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση των PLCβ με τα ετεροδιμερή βγ είναι η περιοχή PH. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από την παρατήρηση ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη PHβ2-ΔPHPLCδ1, όπου η περιοχή PH της PLCδ1 αντικαταστάθηκε από την περιοχή PH της PLCβ2 εμφάνισε τον ίδιο βαθμό ενεργοποίησης από το ετεροδιμερές βγ με την PLCβ2 [92]. Εξάλλου,

αποκοπή της καρβοξυτελικής ουράς της PLCβ2 αποτρέπει την ενεργοποίησή της από την υπομονάδα G_α, αλλά δεν επηρεάζει την ενεργοποίησή της από το ετεροδιμερές Gβγ [93].

Έχει επίσης προταθεί ότι οι PLCβ μπορεί να αγκυροβολούν στην μεμβράνη μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες γνωστές ως ρυθμιστικοί παράγοντες ανταλλαγής Na⁺/K⁺ (Na⁺/K⁺ exchanger regulatory factors, NHERFs). Η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα μέσω της καρβοξυτελικής αλληλουχίας (Ser/Thr)-X-(Val/Leu)-COOH του μοτίβου PZD, που απαντάται στις PLCβ [94].

1.4.2. Φωσφολιπάση C γάμμα (PLCγ)

Η ομάδα των PLCγ αποτελείται από δύο ισομορφές (PLCγ1,2). Οι PLCγ απαντώνται σε όλους σχεδόν τους ιστούς, με την PLCγ2 να εκφράζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα αιμοποιητικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση των PLCγ κινητοποιεί τις αποθήκες Ca²⁺ και ενεργοποιεί πολλαπλές οδούς μεταγωγής σήματος μέσω πρωτεϊνικών κινασών που ελέγχουν διαδικασίες όπως η κυτταρική διαίρεση, η μεταμόρφωση, η διαφοροποίηση, το σχήμα, η κίνηση και η απόπτωση [79].

Οι PLCγ διαφοροποιούνται από τις άλλες PLC στο ότι διαθέτουν τρεις περιοχές με ομολογία στην Src (δύο περιοχές SH2 που ακολουθούνται από μια περιοχή SH3) εμβόλιμα στην περιοχή του συνδέτη X/Y. Οι περιοχές SH2 διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ενεργοποίηση των PLCγ καθώς μέσω αυτών οι PLCγ προσδένονται στους RTK και ενεργοποιούνται [79,95].

Ορισμένοι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων όπως αυτοί του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGF), του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) και του νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF) διαθέτουν εγγενή ενεργότητα τυροσινικής κινάσης. Τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης των υποδοχέων λειτουργούν ως ειδικές θέσεις πρόσδεσης για τις SH2 περιοχές πρωτεϊνών, όπως οι PLCγ. Οι πρωτεΐνες αυτές φωσφορυλιώνονται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης που διαθέτουν

και ενεργοποιούνται [79,80,95]. Οι PLCγ1 και PLCγ2 φωσφορυλιώνονται από τους RTK στα αμινοξέα Tyr771 και Tyr783. Αν και το αμινοξύ Tyr783 είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση των PLCγ [96], το κατάλοιπο Tyr771 πιθανώς να λειτουργεί ανασταλτικά, καθώς η αφαίρεση του ενισχύει την ενεργοποίηση των PLCγ. Μία ακόμα θέση φωσφορυλίωσης είναι το κατάλοιπο Tyr1254 στο καρβοξυτελικό άκρο της PLCγ1, αλλά ο ρόλος του δεν είναι διευκρινισμένος, ενώ απουσιάζει από την αλληλουχία της PLCγ2 [79].

Διαφορετικοί RTK διαθέτουν διαφορετικό αριθμό θέσεων αυτοφωσφορυλίωσης. Οι RTK των αυξητικών παραγόντων PDGF και NGF διαθέτουν μια θέση αυτοφωσφορυλίωσης όπου προσδένονται οι περιοχές SH της PLCγ1, ενώ οι RTK του αυξητικού παράγοντα EGF διαθέτουν πολλές δυνητικές θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης με διαφορετική συγγένεια για την PLC [97]. Η αποκοπή αυτών των θέσεων αναγνώρισης εμποδίζει τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης της PLCγ1 από τους RTK και κατ' επέκταση αναστέλλει την ενεργοποίησή της [79].

Οι τυροσινικές φωσφατάσες (protein tyrosine phosphatases, (PTPases) διαδραματίζουν έναν αντισταθμιστικό ρόλο ως προς τους RTK υποδοχείς καθώς αφαιρούν τις φωσφορικές ομάδες από τις φωσφορυλιωμένες μέσω RTK υποδοχέων πρωτεΐνες, όπως οι PLCγ. Η αναστολή των φωσφατασών αυτών είναι απαραίτητη για την αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των τυροσινών των πρωτεϊνών και επιτυγχάνεται μέσω των δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) [79, 80].

Τα κατάλοιπα τυροσίνης των PLCγ δεν είναι τα μόνα που υπόκεινται σε φωσφορυλίωση, καθώς οι PLCγ μπορούν να φωσφορυλιωθούν και σε επιλεγμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης ως απόκριση σε κατάλληλα ερεθίσματα [98]. Η κύρια θέση φωσφορυλίωσης μοιάζει να είναι το κατάλοιπο Ser1248 που μπορεί να φωσφορυλιωθεί είτε από την PKA είτε από την PKC. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση σερίνης/θρεονίνης των PLCγ φαίνεται να μην επαρκεί για την ενεργοποίησή τους και ενδέχεται να είναι το κρίσιμο εκείνο στάδιο της απευαισθητοποίησης των σηματοδοτικών οδών που ενεργοποιούν τις PLCγ [79].

Οι PLCγ ενεργοποιούνται και από NRTK. Οι υποδοχείς των B και T κυττάρων, οι υποδοχείς των Fc των IgE, IgG, IgA και IgM και οι υποδοχείς των ιντερλευκινών IL1, IL4, IL5 και IL7 είναι πολλαπλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που ολιγομερίζονται για να σχηματίσουν ένα λειτουργικό υποδοχέα και συνδέονται με ανεξάρτητες κινάσες των οικογενειών Src, Syc, και Tec για να ρυθμίσουν διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Οι NRTK αυτοφωσφορυλιώνονται και τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης λειτουργούν ως ειδικές θέσεις πρόσδεσης για τις SH2 περιοχές πρωτεϊνών, όπως οι PLCγ. Η θέση σύνδεσης του προσδέτη στον υποδοχέα απαρτίζεται από πολλές διαφορετικές αλυσίδες, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες μεταξύ τους προσφέροντας εξειδίκευση στη δέσμευση του προσδέτη [79, 80].

Οι PLCγ ενεργοποιούνται εμμέσως και από τη σύνδεση αυξητικών παραγόντων, αντιγόνων ή κυτοκινών σε GPCR. Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό Ras/MAPK/ERK. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων GPCR επάγει εμμέσως την ενεργοποίηση των υποδοχέων RTK. Μετά την ενεργοποίησή τους, οι υποδοχείς RTK λειτουργούν όπως θα λειτουργούσαν αν συνδέονταν με τον φυσιολογικό τους προσδέτη, ενεργοποιώντας τις PLCγ [79, 80].

Το φωσφατιδικό οξύ είναι ένας πιθανός ενεργοποιητής των φωσφορυλιωμένων και μη μορφών της PLCγ1, αυξάνοντας τη συγγένεια της για το υπόστρωμα [99-100]. Το αραχιδονικό οξύ έχει βρεθεί ότι διεγείρει την ενεργότητα της PLCγ ανεξαρτήτως φωσφορυλίωσης με την παρουσία της πρωτεΐνης tau [101].

Η περιοχή SH3 της PLCγ1 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που περιέχουν αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη (PXXP motif) [102]. Η Cbl, η SOS1 και η δυναμίνη έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με την περιοχή SH3 της PLCγ1 [96, 103-104].

1.4.3. Φωσφολιπάση C δέλτα (PLCδ)

Η ομάδα των PLCδ αποτελείται από τέσσερις ισομορφές (PLCδ1-4). Η PLCδ1 είναι η πιο ευρέως εκφραζόμενη ισομορφή, αν και τα επίπεδα έκφρασής της είναι χαμηλά συγκρινόμενα με εκείνα των PLCβ και PLCγ. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στους σκελετικούς μύες, το σπλήνα, τους όρχεις και τους πνεύμονες [79]. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των PLCδ δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Ωστόσο, η υψηλή ευαισθησία των PLCδ ισομορφών στο Ca^{2+} σε σχέση με τις άλλες PLC φανερώνει το ρόλο που μπορεί να παίζει το Ca^{2+} στη ρύθμιση της ενεργότητάς τους. Οι PLCδ ισομορφές ενεργοποιούνται σε συγκεντρώσεις Ca^{2+} που κυμαίνονται μεταξύ 10^{-7} και 10^{-5} M. Η δέσμευση Ca^{2+} στην περιοχή EF hands της PLCδ1 είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση της περιοχής PH με το υπόστρωμα (PtdInsP_2) [82]. Επιπλέον, η δέσμευσή του στην καταλυτική περιοχή είναι απαραίτητη για την ενζυμική δραστηριότητα της PLCδ1 [81,105]. Τέλος, η δέσμευσή του στην περιοχή C2 οδηγεί στο σχηματισμό ενός τριμερούς συμπλόκου, αποτελούμενου από την περιοχή C2, τα ιόντα Ca^{2+} και την φωσφατιδυλοσερίνη της μεμβράνης που αγκιστρώνει την PLCδ1 στη μεμβράνη [85]. Η ολοκληρωτική συμμετοχή του Ca^{2+} στη λειτουργία της PLCδ1 υποδηλώνει ότι μια αύξηση στη συγκέντρωση του Ca^{2+} αρκεί για την ενεργοποίηση της PLCδ1.

Μία πρωτεΐνη που δεσμεύει GTP, γνωστή ως πρωτεΐνη G μεγάλου μοριακού βάρους (G_h), μπορεί να παίζει επίσης ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης της PLCδ1. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~80kDa με δραστηριότητα τρανσγλουταμινάσης (transglutaminase II, TGII) που έχει βρεθεί ότι δεσμεύει και ενεργοποιεί την PLCδ1 [106]. Στην οδό μεταγωγής σήματος μέσω του υποδοχέα ωκυτοκίνης (GPCR), η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης G_h οδηγεί στην ενεργοποίηση της PLCδ1 [107]. Ωστόσο, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο $\alpha 1$ -αδρενεργικός υποδοχέας (GPCR) συνδέεται με την PLCδ1 μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη G_h [108] και οδηγεί σε αναστολή της ενεργότητας της PLCδ1 [109].

Η δραστικότητα της PLCδ1 υπόκειται και σε ρύθμιση από φωσφολιπίδια, με τη σφιγγομυελίνη να είναι ο πιο αποτελεσματικός αναστολέας. Η αναστολή της ενεργότητας της PLCδ1 από την σφιγγομυελίνη ενισχύεται από τη σπερμίνη και το Ca^{2+} , ενώ καταστέλλεται από τη σφιγγοσίνη [110,111].

1.4.4. Φωσφολιπάση C έψιλον (PLCε)

Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί δυο παραλλαγές της PLCε του ανθρώπου 1994 και 2303 καταλοίπων αντίστοιχα, που διαφέρουν μόνο στο αμινοτελικό του άκρο και μία PLCε ισομορφή του αρουραίου 2281 καταλοίπων. Οι ισομορφές αυτές εκφράζονται σε μία ποικιλία ιστών, αλλά σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στον καρδιακό μυ [83]. Οι PLCε στερούνται περιοχών PH και EF από την αλληλουχία τους. Αντίθετα, διαθέτουν μία Ras-GEF-ομοιάζουσα περιοχή στο αμινοτελικό τους άκρο και δύο περιοχές που δεσμεύουν Ras (RA1-RA2) στο καρβοξυτελικό τους άκρο [80, 112]. Η παρουσία αυτών των περιοχών στην αλληλουχία των PLCε καθιστά τις PLCε τόσο ενεργοποιητές της σηματοδοτικής οδού του Ras, όσο και στόχους της Ras πρωτεΐνης.

Οι περιοχές RA είναι συντηρημένες σε μία ποικιλία πρωτεϊνών και αλληλεπιδρούν άμεσα με την οικογένεια των πρωτεϊνών Ras. Οι Ras είναι μικρές μονομερείς πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η ογκογένεση [100, 113]. Έχει βρεθεί ότι οι περιοχές RA2 της PLCε του αρουραίου δεσμεύουν H-Ras και ότι η αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος (K2150E) στη περιοχή RA2 είναι ικανή να αποτρέψει την αλληλεπίδραση με την H-Ras. Η δέσμευση της H-Ras στην περιοχή RA2 εξαρτάται από το GTP. Αντίθετα, οι περιοχές RA1 έχουν χαμηλή συγγένεια με την H-Ras και αλληλεπιδρούν μαζί της με έναν τρόπο που δεν εξαρτάται από το GTP [112, 114]. Οι PLCε είναι περισσότερο συγγενικές με τις PLCβ και γι' αυτό αναμένεται να έχουν κοινά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Όπως οι PLCβ, έτσι και οι PLCε μπορούν να διεγερθούν από υπομονάδες G_{α} , πιο πιθανά από την $G_{\alpha_{12}}$ [85], ενώ και τα ετεροδιμερή βγ έχουν βρεθεί να διεγείρουν την δραστικότητα των PLCε [115].

1.4.5. Φωσφολιπάση C ήτα (PLCη)

Τα δύο μέλη (PLCη1-2) που απαρτίζουν την ομάδα των PLCη ταυτοποιήθηκαν μόλις πρόσφατα [116-117]. Η PLCη1 είναι μια πρωτεΐνη 115kDa και είναι περισσότερο συγγενική με την PLCδ1. Το γονίδιο της PLCη ακολουθεί διαφορετικές πορείες εναλλακτικού ματίσματος κατά τη μεταγραφή του. Το μετάγραφο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη των 115kDa εντοπίζεται αποκλειστικά στον εγκέφαλο και τους πνεύμονες. *In situ* υβριδοποίηση σε εγκεφαλικό ιστό αποκάλυψε ότι η PLCη1 εκφράζεται σε αφθονία μόνο στον φλοιό των ημισφαιρίων, τον ιππόκαμπο, την αβέβαιη ζώνη και τα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας. Ανασυνδυασμένη PLCη1 εμφάνισε καταλυτική δραστηριότητα που εξαρτάται από το Ca^{2+} με το μέγιστο της δραστηριότητας να παρατηρείται σε συγκέντρωση Ca^{2+} της τάξης των 10 μM [113].

Η PLCη2 ταυτοποιήθηκε στον εγκέφαλο του ποντικού. Αποτελείται από 1164 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 125kDa. Η PLCη2 παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την PLCη1 αλλά περιέχει 290 επιπλέον αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο. Η PLCη2 εμφάνισε υψηλή ευαισθησία στο Ca^{2+} , καθώς είναι δραστική σε συγκεντρώσεις Ca^{2+} μικρότερες από 10nM. *In situ* υβριδοποίηση σε εγκεφαλικό ιστό αποκάλυψε ότι η PLCη2 εκφράζεται σε αφθονία στα πυραμοειδή κύτταρα του ιππόκαμπου, στον φλοιό των ημισφαιρίων και τον οσφρητικό λοβό. Αυτά τα όργανα εμπλέκονται στη λειτουργία της μνήμης και πιθανώς η PLCη2 να παίζει κάποιο ρόλο στη λειτουργία αυτή [117].

1.4.6. Φωσφολιπάση C ζήτα

Η πρωτεΐνη PLCζ έχει μοριακό βάρος περίπου 70kDa και βρίσκεται αποκλειστικά στο σπέρμα. Όταν εγχύεται στα αντίστοιχα ωάρια προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} , όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση και επάγει την ενεργοποίηση του ωαρίου, οδηγώντας σε πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η PLCζ παρουσιάζει ομολογία με την εκτενώς

μελετημένη και χαρακτηρισμένη PLCδ1, με τη διαφορά ότι δε διαθέτει την περιοχή PH στο αμινοτελικό της άκρο. Μία ακόμα διαφορά στη δομή των δύο πρωτεϊνών είναι ότι η αλληλουχία του συνδέτη X/Y είναι ελαφρώς εκτενέστερη στην PLCζ από ότι στη PLCδ1, καθώς περιέχει ένα τμήμα που περιλαμβάνει πολύ βασικά αμινοξέα [67, 118]. Μία σημαντική διαφορά όσον αφορά στη δραστικότητα των δύο πρωτεϊνών είναι ότι η PLCζ παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα ακόμα και σε πολύ χαμηλά επίπεδα Ca^{2+} , γεγονός που της επιτρέπει να είναι δραστική σε συνθήκες που το κύτταρο είναι σε κατάσταση ηρεμίας [68, 119, 120]. Η δράση της σταματά όταν, μέσω της αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Sequence, NLS) που βρίσκεται στην περιοχή του συνδέτη XY, οδηγείται στον πυρήνα [70].

1.5. Σκοπός της μελέτης

Η PLCζ είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται αποκλειστικά στο σπέρμα και όταν εγχυθεί στα ωάρια προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} , όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση και οδηγεί σε πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη [67, 118]. Η PLCζ συγκεντρώνει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που την διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες PLC. Πρώτον, είναι η μικρότερη ισομορφή PLC που έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα καθώς, σε αντίθεση με όλες τις άλλες PLC, είναι η μόνη που στερείται τη δομική περιοχή PH από το αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας της. Δεύτερον, η PLCζ διαθέτει έναν θετικά φορτισμένο συνδέτη XY σε σχέση με όλες τις άλλες που διαθέτουν έναν αρνητικά φορτισμένο συνδέτη XY. Τέλος, ένα χαρακτηριστικό που κάνει την PLCζ να ξεχωρίζει από τις άλλες PLC είναι ότι είναι δραστική ακόμα και όταν το ωάριο είναι σε κατάσταση ηρεμίας [67, 119-120]. Αντίθετα, οι PLC των ομάδων β, γ και δ είναι είτε πλήρως ανενεργές [121], είτε πολύ λιγότερο αποτελεσματικές στο να επάγουν την έκλυση Ca^{2+} από τις αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου όπως κάνει με επιτυχία η PLCζ όταν εγχυθεί στα ωάρια [53, 120].

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να χαρακτηρίσουμε μοριακά και βιοχημικά αυτή την αρχέτυπη μορφή PLC και να ανακαλύψουμε τον τρόπο που μια

τόσο θεμελιώδης στη δομή της πρωτεΐνης συμπυκνώνει τόσο αξιοσημείωτες βιοχημικές και ενζυμικές ιδιότητες. Θα χρησιμοποιηθεί ένας αριθμός τεχνικών που περιλαμβάνουν σύνθεση χημικών αλληλουχιών, σημειοκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, μικροέγχυση cRNA σε ωάρια ποντικού, έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, *in vitro* ενζυμικές δοκιμασίες, επίστρωση πρωτεΐνης σε λιπίδια και δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Εκκινητές

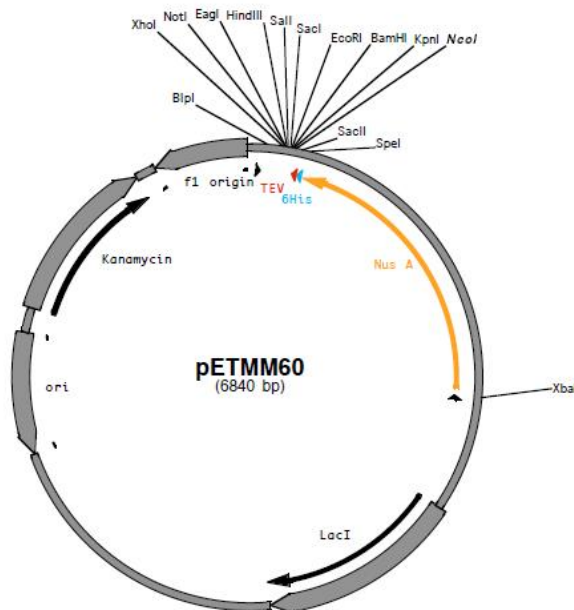
- Εκκινητές (Sigma) (Παράρτημα Ι)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR παρελήφθησαν σε μορφή λυοφιλιωμένου ιζήματος και επαναιωρήθηκαν σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου απιονισμένου H₂O ώστε να προκύψουν διαλύματα 100μM, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Έγινε 1:10 αραίωση με H₂O για την παρασκευή της επιθυμητής συγκέντρωσης 10μM και οι εκκινητές αποθηκεύθηκαν στους -20°C.

2.2. Πλασμιδιακοί φορείς

- **pETMM60** (Invitrogen)

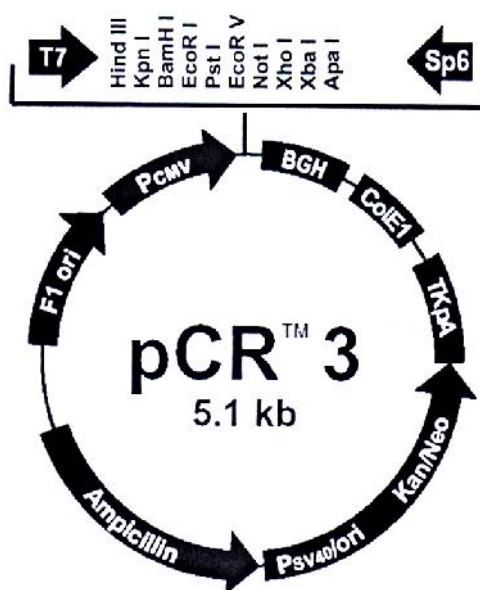
Ο πλασμιδιακός φορέας pETMM60 περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη NusA, την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την ετικέτα των έξι ιστιδίων (6His), την αλληλουχία αναγνώρισης από την πρωτεάση TEV στο 3' άκρο του πολυσυνδέτη. Περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην канаμυκίνη για επιλογή σε κύτταρα *E.coli*. Το πλασμίδιο pETMM60 παρέχει δυνατότητα καθαρισμού μέσω χρωματογραφίας συγγένειας λόγω της ετικέτας 6His που διαθέτει.



Σχήμα 2.1: Πλασμιδιακός φορέας pETMM60

- **pCR 3** (προσφορά καθηγητή F.A.Lai, WHRI, Cardiff, UK)

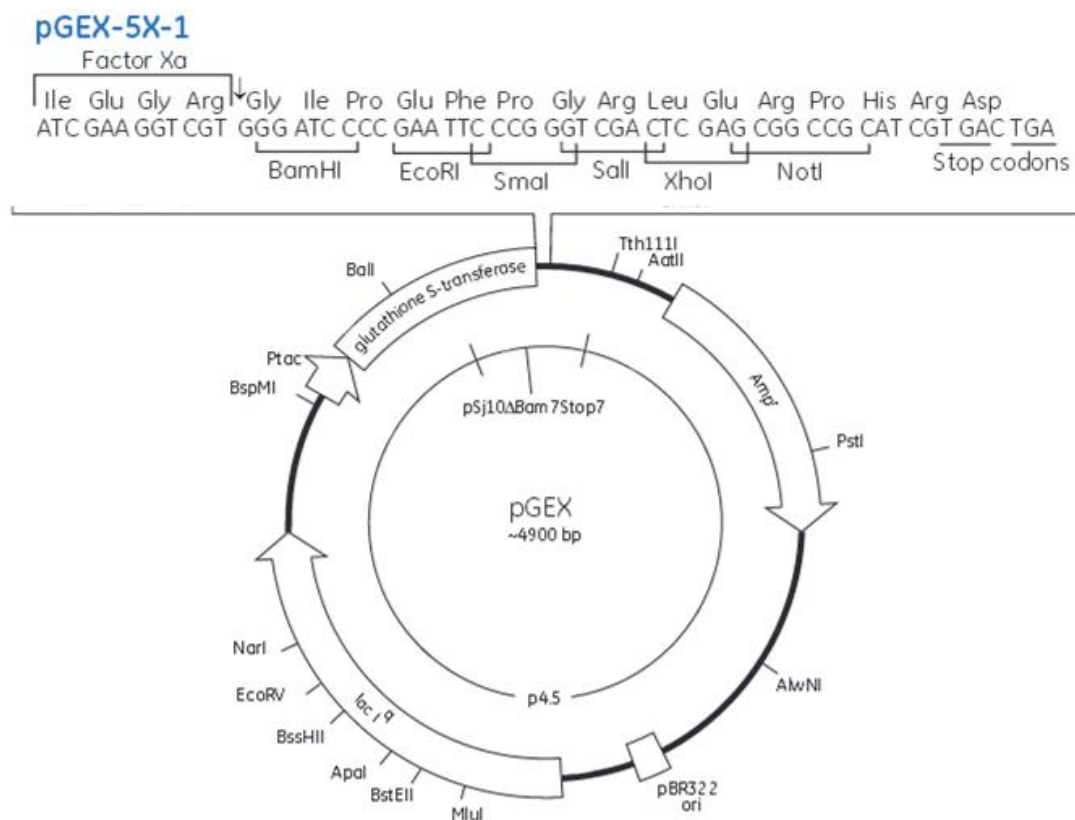
Ο πλασμιδιακός φορέας pCR 3 περιέχει T7 υποκινητή πριν τη θέση του πολυσυνδέτη, για in vitro έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο TNT T7 σύστημα ταχείας συζευγμένης μεταγραφής και μετάφρασης και για σύνθεση cRNA. Περιέχει επίσης το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.



Σχήμα 2.2: Πλασμιδιακός φορέας pCR 3

- **pGEX-5X-2** (εργαστήριο καθηγητή F.A.Lai, WHRI, Cardiff, UK)

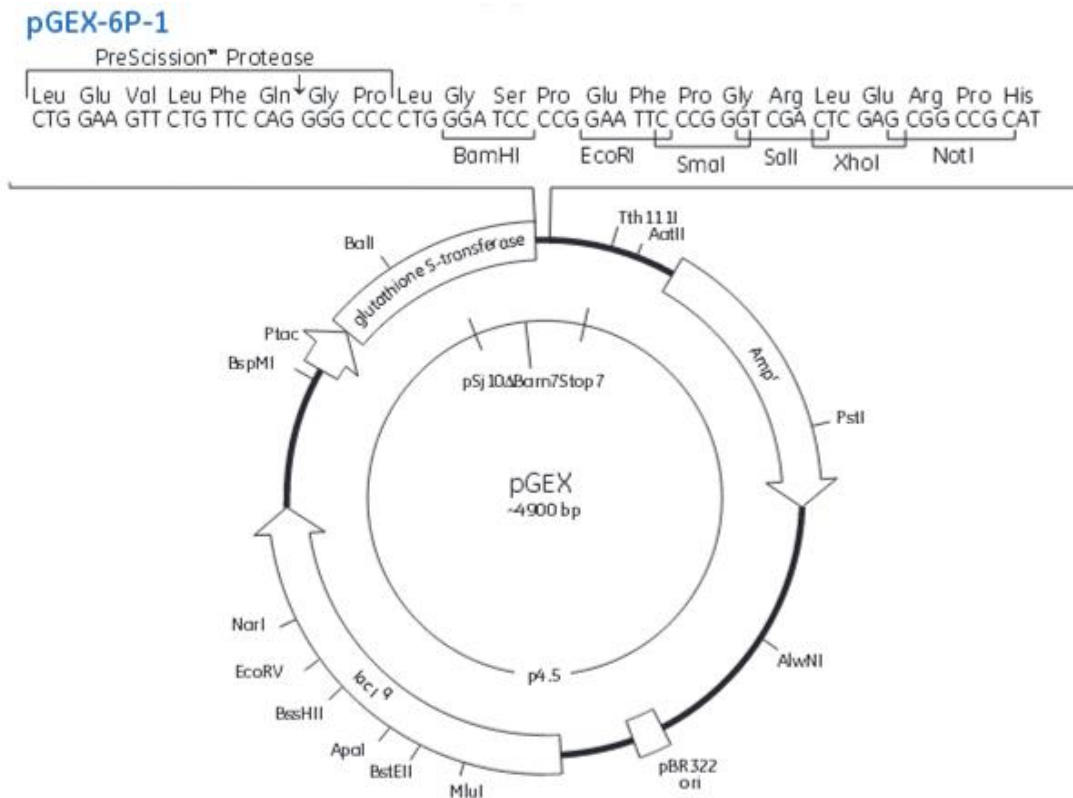
Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-5X-2 περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και την αλληλουχία αναγνώρισης από τον παράγοντα Factor Xa στο 3' άκρο του πολυσυνδέτη. Περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Στο πλασμίδιο αυτό κλωνοποιήθηκαν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για την mPLCζ και την rPLCδ1.



Σχήμα 2. 3: Πλασμιδιακός φορέας pGEX-5X-2

- **pGEX-6P-1** (προσφορά καθηγητή F.A.Lai, WHRI, Cardiff, UK)

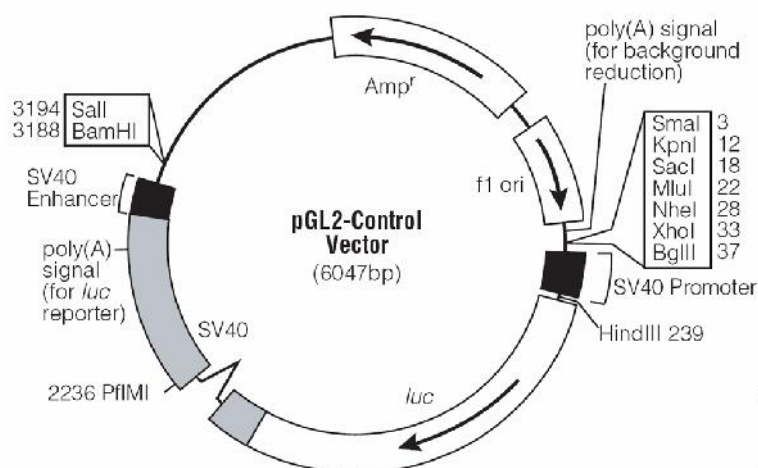
Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1 περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και την αλληλουχία αναγνώρισης από τον παράγοντα Factor Xa στο 3' άκρο του πολυσυνδέτη. Περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.



Σχήμα 2.4: Πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1

- **pGL2** (προσφορά καθηγήτη F.A.Lai, WHRI, Cardiff, UK)

Ο πλασμιδιακός φορέας pGL2 περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης. Η λουσιφεράση είναι πολύτιμο εργαλείο για τη εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σε ό,τι αφορά την έκφραση μίας πρωτεΐνης, καθώς επιτρέπει να γίνεται ορατή η έκφρασή της στα κύτταρα. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα DNA για την ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας της λουσιφεράσης.



Σχήμα 2.5: Πλασμιδιακός φορέας pGL2

2.3. Ενίσχυση του DNA με PCR

- 5x ρυθμιστικό διάλυμα Phusion DNA πολυμεράσης (200 mM Tris-HCl pH 8,8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1mg/ml BSA, 1% Triton® X-100) (NEB)
- διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων (dNTP), το καθένα συγκέντρωσης 10 mM (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP) (NEB)
- πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές συγκέντρωσης 10 μM
- Phusion DNA πολυμεράση συγκέντρωσης 3U/μl σε ρυθμιστικό διάλυμα φύλαξης (50 mM Tris-HCl pH 8,2, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,05% CHAPS, 50% γλυκερόλη) (NEB)
- H₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease-free H₂O)
- θερμοκυκλοποιητής GeneAmp 2400 PCR system (Perkin-Elmer)

Οι ενίσχυσεις με PCR έγιναν σε τελικό όγκο 50 μL με την προσθήκη σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου 10 μL 5x buffer, 0,2 mM dNTP, 0,4 μM πρόσθιου εκκινητή, 0,4 μM οπίσθιου εκκινητή, 1 unit Phusion πολυμεράση

(NEB) και 50 ng μήτρας DNA και με τη χρήση του παρακάτω προγράμματος.

		35 κύκλοι		
				
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	98°C	98°C	72°C	72°C
ΧΡΟΝΟΣ	30 sec	5-10 sec	30sec/kb	5-10 min

2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

- 50x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE (242g/L Tris-base, 57,1 mL/L CH₃COOH, 18,6 g/L EDTA) αραιωμένο σε απιονισμένο H₂O με αναλογία 1:50
- αγαρόζη (BioRad)
- βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/mL (Sigma)
- 6x διάλυμα φόρτωσης (40% v/v σακχαρόζη, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης)
- μάρτυρας μοριακών βαρών (1kb DNA ladder, NEB)
- εκμαγείο και χτένες
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- τράπεζα UV
- φωτογραφική μηχανή

Τα προϊόντα των PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης σε παράθεση με μάρτυρα μοριακών βαρών για τον προσδιορισμό του μεγέθους τους. Το % ποσοστό της πηκτής αγαρόζης ήταν εξάρτηση του μεγέθους που αναμενόταν να έχει το εκάστοτε PCR προϊόν (Πίνακας 2.2). Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστέθηκε στον ανάλογο όγκο 1x TAE, για να προκύψει πηκτή με το επιθυμητό ποσοστό σε αγαρόζη και το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων ώστε η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και να προκύψει διαυγές διάλυμα. Το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει

κάτω από τους 50°C και στη συνέχεια προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/mL) σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml. Το διάλυμα εγχύθηκε σε εκμαγείο και σε αυτό ενσωματώθηκε χτένα για το σχηματισμό των φρεατίων. Η πηκτή που σχηματίστηκε μεταφέρθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1x TAE και αφαιρέθηκε η χτένα. Το PCR προϊόν, καθώς και ο μάρτυρας μοριακών βαρών αναμίχθηκαν με 6x διάλυμα φόρτωσης, τοποθετήθηκαν στα φρεάτια της πηκτής και η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 90V, έως ότου η χρωστική που περιέχεται στο διάλυμα φόρτωσης να μετακινηθεί κατά τα δύο τρίτα της πηκτής. Στη συνέχεια, η πηκτή μεταφέρθηκε σε τράπεζα UV για να γίνουν ορατές οι ζώνες DNA και λήφθηκε φωτογραφία της με φωτογραφική μηχανή που διαθέτει UV φίλτρο.

Πίνακας 2.1: Ενδεικτικά % ποσοστά πηκτής αγαρόζης για διαφορετικά μεγέθη προϊόντων PCR

Πηκτή αγαρόζης	0,5-0,7%	0,7-1,2%	1,2-2%
Μέγεθος PCR προϊόντος	>2500bp	~1000bp	<500bp

2.5. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- PCR Purification Kit (Qiagen)
- ρυθμιστικά διαλύματα περιοριστικών ενδονουκλεασών (NEB) (πίνακας 2.3)
- BSA (NEB)
- περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NEB) (Παράρτημα II)
- απιονισμένο H₂O
- μικροφυγόκεντρος
- υδατόλουτρο

Το προϊόν PCR καθαρίστηκε με τη χρήση του PCR Purification Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ένα μg προϊόντος PCR και διακόσια μg πλασμιδίου υποβλήθηκαν σε πέψη με 4 units της κατάλληλης περιοριστικής ενδονουκλεάσης στους 37°C για 4 ώρες. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης για επιβεβαίωση της πέψης, καθαρίστηκαν με το PCR Purification Kit και όπου χρειάστηκε υποβλήθηκαν σε δεύτερη πέψη με 4 units μιας δεύτερης περιοριστικής ενδονουκλεάσης στους 37°C για 4 ώρες. Τα προϊόντα καθαρίστηκαν και πάλι με το PCR Purification Kit, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους φωτομετρικά.

2.6. Κλωνοποίηση

- ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 1 mM ATP pH 7,5) (NEB)
- T4 DNA λιγάση σε ρυθμιστικό διάλυμα φύλαξης (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% γλυκερόλη) (NEB)
- απιονισμένο H_2O
- θερμικός κυκλοποιητής GeneAmp 2400 PCR system (Perkin-Elmer)

Οι κλωνοποιήσεις έγιναν στη συνιστώμενη μοριακή αναλογία 3:1, δηλαδή χρησιμοποιήθηκαν 300ng ενθέματος προς 100ng πλασμιδίου. Η κλωνοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας 2 U T4 DNA λιγάσης (NEB) στο χορηγούμενο από την εταιρεία ρυθμιστικό διάλυμα στους 16°C για 15 ώρες. Το μείγμα κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli*.

2.7. Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

- επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα TOP10 και Rossetta (DE3) pLysS
- θρεπτικό μέσο Luria-Bertrani (LB) (1% w/v τρυπτόνη, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 0,5% w/v NaCl) (Applichem)
- 100% γλυκερόλη

- 1M CaCl₂
- απιονισμένο H₂O
- 50 mM CaCl₂
- διάλυμα φύλαξης (50 mM CaCl₂, 20% w/v γλυκερόλη)
- ξηρός πάγος
- επωαστικός κλίβανος
- κυψελίδα χαλαζία
- φωτόμετρο (Perkin-Elmer MBA 2000)
- φυγόκεντρος Sorvall

Μία αποικία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων TOP10 ή Rossetta ενοφθαλμίστηκε σε 10 ml θρεπτικού μέσου και επωάστηκε στους 37°C για 14 ώρες με συνεχή ανάδευση στις 225 rpm. Το επόμενο πρωί, 3 mL της υγρής καλλιέργειας προστέθηκαν σε 300 ml θρεπτικού μέσου LB και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 30°C έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει το 0,5. Η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρωσης και επωάστηκε στον πάγο για 1 ώρα. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 6000g στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύθηκε και το ίζημα επαναιώρηθηκε με 150 ml ψυχρού διαλύματος 50 mM CaCl₂ και επωάστηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, το υπερκείμενο αποχύθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 15mL διαλύματος φύλαξης. Τα κύτταρα μοιράστηκαν σε δόσεις των 100 µL, αφέθηκαν σε ξηρό πάγο για 30 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.8. Μετασχηματισμός

- επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα TOP10 και Rossetta (DE3) pLysS
- θρεπτικό υλικό LB
- στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ (1% w/v τρυπτόνη, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 0,5% w/v NaCl, 1,5% άγαρ)

- αντιβιοτικά (αμπικιλλίνη 50 mg/mL, καναμυκίνη 25 mg/mL, χλωραμφενικόλη 34 mg/mL)
- τρυβλία Petri
- υδατόλουτρο
- επωαστικός κλίβανος

Για κάθε μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκε μια δόση (100μL) από τα κατάλληλα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα (TOP10 ή Rossetta). Τα κύτταρα αφέθηκαν στον πάγο έως ότου επέλθει η τήξη τους. Στη συνέχεια, 2-3 μL (5-10 ng DNA) από το μείγμα κλωνοποίησης προστέθηκε στα κύτταρα, έγινε ήπια ανάμιξη και τα κύτταρα αφέθηκαν στον πάγο για 30 min. Μετά από 30 min, τα κύτταρα εμβάπτιστηκαν σε υδατόλουτρο 42°C για 45 sec και επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 min. Εννιάκόσια μL θρεπτικού μέσου LB προστέθηκαν στο κυτταρικό εναιώρημα και επωάστηκαν στους 37°C για μία ώρα με συνεχή ανάδευση στις 225 rpm. Διακόσια μL της κυτταρικής καλλιέργειας επιστρώθηκαν σε τριβλίο που περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες.

2.9. Ανάλυση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

- Phusion DNA πολυμεράση συγκέντρωσης 3 U/μl σε ρυθμιστικό διάλυμα φύλαξης (50 mM Tris-HCl pH 8,2, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,05% CHAPS, 50% γλυκερόλη) (NEB)
- 5x ρυθμιστικό διάλυμα Phusion DNA πολυμεράσης (200 mM Tris-HCl pH 8,8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1mg/mL BSA, 1% Triton® X-100) (NEB)
- διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων (dNTP), το καθένα συγκέντρωσης 10 mM (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP) (NEB)
- πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές συγκέντρωσης 10 μM
- H₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease-free H₂O)

- θερμοκυκλοποιητής GeneAmp 2400 PCR system (Perkin-Elmer)
- 50x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE αραιωμένο σε απιονισμένο H₂O σε αναλογία 1:50
- αγαρόζη (BioRad)
- βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/mL (Sigma)
- 6x διάλυμα φόρτωσης (40% v/v σακχαρόζη, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης)
- μάρτυρας μοριακών βαρών (1kb DNA ladder, Promega)
- εκμαγείο και χτένες
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- τράπεζα UV
- Wizard® Plus SV Minipreps purification system (Promega)
- PCR Purification Kit (Qiagen)
- περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NEB) (Παράρτημα II)
- ρυθμιστικά διαλύματα περιοριστικών ενδονουκλεασών (NEB)
- BSA (NEB)
- απιονισμένο H₂O
- μικροφυγόκεντρος
- υδατόλουτρο

Για να διαπιστωθεί ποιες από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στο τριβλίο περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έγιναν ενισχύσεις με PCR με εκκινητές ειδικούς για το κάθε ένθεμα. Με τη βοήθεια ακροφύσιου, 10-15 αποικίες ενοφθαλμίστηκαν σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου ως μήτρα DNA για τη διεξαγωγή των ενισχύσεων με PCR. Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζη και οι αποικίες που βρέθηκαν θετικές για την παρουσία ανασυνδυασμένου πλασμιδίου υποβλήθηκαν σε υγρή καλλιέργεια για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και την πέψη του τελευταίου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για επιβεβαίωση της

παρουσίας του ενθέματος στο πλασμίδιο. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη βοήθεια του Wizard® Plus SV Minipreps purification system σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η έκλυση του DNA έγινε στα 50 μ L. Πεντακόσια ng πλασμιδιακού DNA υποβλήθηκαν σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και το κομμένο DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του ενθέματος.

2.10. Αλληλούχηση

- BigDye terminator sequencing kit (Perkin-Elmer)
- αναλύτης αλληλουχίας ABI Prism 377 sequencer (Perkin-Elmer)

Η τελική επιβεβαίωση της παρουσίας του ενθέματος στο πλασμίδιο έγινε με αλληλούχηση του πλασμιδιακού DNA με τη βοήθεια του BigDye terminator sequencing kit σε θερμικό κυκλοποιητή και σε αναλύτη αλληλουχίας ABI Prism 377.

2.11. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA

- απιονισμένο H_2O
- κυψελίδα χαλαζία
- φασματοφωτόμετρο (Perkin-Elmer MBA 2000)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA έγινε φωτομετρικά μετρώντας την οπτική απορρόφηση στα 260nm (A_{260}). Δύο όμοιες αραιώσεις (1:100) του πλασμιδιακού DNA εισήχθησαν διαδοχικά σε κυψελίδα χαλαζία, η οποία τοποθετήθηκε σε φασματοφωτόμετρο και μετρήθηκε η απορρόφησή τους. Μία μονάδα (unit) A_{260} αντιστοιχεί σε 50 μ g/mL δίκλωνου DNA.

2.12. Σύνθεση cRNA

- περιοριστική ενδονουκλέαση NdeI (NEB)
- φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, pH 5.2)

- 100% ισοπροπανόλη
- 3M οξικό νάτριο (pH 8.2)
- DEPC-H₂O
- αντι-RNάση (Ambion)
- mMESSAGE mMACHINE® RNA transcription system (Ambion)
- Poly(A) Tailing Kit (Ambion)
- χλωριούχο λίθιο (LiCl)
- 70% αιθανόλη
- υδατόλουτρο
- μικροφυγόκεντρος

Δέκα µg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου ευθυγραμμίστηκε με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση NdeI στους 37°C για 18 ώρες με σκοπό να προκύψουν μετάγραφα ίσου μήκους μετά το 3' άκρο του ενθέματος. Το ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο, καθαρίστηκε με εκχύλιση με φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη. Ίσοι όγκοι πλασμιδίου και φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1, pH 5,2) αναμίχθηκαν για 1 min. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 14000g στους 4°C για 2min και η υπερκείμενη υδατική φάση που περιείχε το DNA μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα. Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε μια φορά ακόμα και η υπερκείμενη υδατική φάση αναμείχθηκε με ίσο όγκο ισοπροπανόλης και 0,1 όγκο 3 M οξικού νατρίου (pH 8,2) και αφέθηκε στους -80°C για 45 min. Μετά από 45 min, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 14000g στους 4°C για 30 min, το υπερκείμενο αποχύθηκε και το ίζημα που περιείχε το DNA αφέθηκε να στεγνώσει. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 5µL DEPC-H₂O και 1 µL αντι-RNάση και μεταφέρθηκε σε ένα κατεργασμένο με DEPC σωλήνα μικροφυγοκέντρου. Η σύνθεση του cRNA έγινε κάνοντας χρήση του mMESSAGE mMACHINE® RNA transcription system της Ambion σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα μετάγραφα RNA που προέκυψαν πολυαδενυλιώθηκαν με τη βοήθεια του Poly(A) Tailing Kit της

Ambion σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάκτηση του cRNA επιτεύχθηκε με την προσθήκη 1,5 όγκου χλωριούχου λιθίου (LiCl) και την επώαση του διαλύματος στους -80°C για 20 ώρες ώστε να γίνει η κατακρήμνιση του cRNA. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 20000g στους 4°C για 30 min, το υπερκείμενο αποχύθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 1 mL 70% αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο αποχύθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει. Αφού στέγνωσε, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 9 μL DEPC- H_2O και 1 μL αντι-RNάση. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του cRNA έγινε φωτομετρικά μετρώντας την απορρόφηση στα 280nm (A_{280}). Μία μονάδα (unit) A_{280} αντιστοιχεί σε 50 $\mu\text{g/mL}$ μονόκλωνου RNA.

2.13. Μεταλλαξιγένεση

- **QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit** (Agilent)

Η εισαγωγή μεταλλάξεων στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες έγινε με το QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.14. Έκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών με ετικέτα GST

- Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα Rosetta (DE3) pLysS
- θρεπτικό υλικό LB
- αντιβιοτικά (αμπικιλλίνη 50 mg/mL, καναμυκίνη 25 mg/mL, χλωραμφενικόλη 34 mg/mL)
- 0,1M IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
- PBS pH 7,4 (8 g/L NaCl, 0,24 g/L KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 , 0,2 g/L KH_2PO_4)
- 1mg/mL λυσοζύμη
- αναστολείς πρωτεασών σερίνης και κυστεΐνης (Complete, EDTA-free, Roche)

- β-μερκαπτοαιθανόλη
- σφαιρίδια GSH sepharose (Glutathione-Sepharose 4B, Amersham)
- διάλυμα έκλουσης (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM ανηγμένη γλουταθειόνη)
- Snakeskin dialysis tubing 10 kDa MWCO (Pierce)
- φίλτρα (Millipore)
- 40% γλυκερόλη
- επωαστικός κλίβανος
- συσκευή υπερήχων
- φυγόκεντρος
- BCA (Pierce)

Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα Rosetta (DE3) pLysS μετασχηματίζονται με το εκάστοτε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει την ετικέτα GST (GST-tag). Μία από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν ενοφθαλμίστηκε σε 10mL θρεπτικού υλικού LB που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό και επώαστηκε στους 37°C για 14 ώρες με συνεχή ανάδευση στους 225 rpm. Το επόμενο πρωί, 5mL της υγρής καλλιέργειας προστέθηκαν σε 1L θρεπτικού υλικού LB που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό και η καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37°C με συνεχή ανάδευση στις 225 rpm έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm να φτάσει το 0,6. Στη συνέχεια, προστέθηκε 0,5 mg/mL IPTG για την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης και η καλλιέργεια επώαστηκε στους 16°C για 16 ώρες με συνεχή ανάδευση στους 225 rpm. Το επόμενο πρωί, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 6000 g στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο αποχύθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 mL/L (σε σχέση με τον αρχικό όγκο της καλλιέργειας) PBS που περιείχε 1mg/mL λυσοζύμη, αναστολείς πρωτεασών και β-μερκαπτοαιθανόλη. Καθ' όλη τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων και του καθαρισμού της πρωτεΐνης, το δείγμα διατηρούνταν συνεχώς στους 4°C. Το εναιώρημα επώαστηκε για 1 ώρα, ακολούθησε κατεργασία του με υπερήχους 3 φορές για 15 min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα

15000g για 15 min και κρατήθηκε το υπερκείμενο. Η απομόνωση της πρωτεΐνης έγινε με χρωματογραφία συγγένειας. Μετά την εξισορρόπηση με PBS, 1 mL σφαιριδίων GSH-sepharose (Glutathione-Sepharose 4B, Amersham) προστέθηκε στο υπερκείμενο και το εναιώρημα αναδεύτηκε για 2 ώρες. Εν συνεχεία, φυγοκεντρήθηκε στα 500g για 15 min και το υπερκείμενο αποχύθηκε. Τα σφαιρίδια πλύθηκαν 3 φορές με 10 mL PBS ανά mL σφαιριδίων. Οι πρωτεΐνες με ετικέτα GST εκλούστηκαν με δυο πλύσεις των 3 mL διαλύματος έκλουσης ανά mL σφαιριδίων. Τα εκλούσματα διαπιδύθηκαν με Snakeskin dialysis tubing σε PBS στους 4°C για 16 ώρες. Η διαπιδυμένη πρωτεΐνη συγκεντρώθηκε με φίλτρα (Millipore) και η συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε με δοκιμασία BCA. Η πρωτεΐνη αποθηκεύτηκε στους -80°C σε PBS με 40% γλυκερόλη.

2.15. Έκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών με ετικέτα 6His

- θρεπτικό υλικό LB
- αντιβιοτικά (αμπικιλίνη 50 mg/mL, καναμυκίνη 25 mg/mL, χλωραμφενικόλη 34 mg/mL)
- 0,1M IPTG
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50mM Tris, 300mM NaCl pH 8)
- 1mg/mL λυσοζύμη
- αναστολείς πρωτεασών
- β-μερκαπτοαιθανόλη
- NTA agarose resin (Qiagen)
- διάλυμα έκλουσης (50mM Tris, 300mM NaCl pH 8, 250mM ιμιδαζόλιο)
- Snakeskin dialysis tubing 10 kDa MWCO (Pierce)
- φίλτρα (Millipore)
- 40% γλυκερόλη
- επωαστικός κλίβανος

- ομογενοποιητής υπερήχων
- φυγόκεντρος
- BCA (Pierce)

Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα Rosetta (DE3) pLysS μετασχηματίζονται με το εκάστοτε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει την ετικέτα των έξι ιστιδινών (6His-tag). Η ανάπτυξη των κυττάρων και η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης έγινε όπως ακριβώς και για τις πρωτεΐνες με ετικέτα των έξι ιστιδινών. Μετά την επαγωγή, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 6000g στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο αποχύθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 20 mL/L (σε σχέση με τον αρχικό όγκο της καλλιέργειας) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιείχε 1mg/mL λυσοζύμη, αναστολείς πρωτεασών και 10 mM ιμιδαζόλιο. Καθ' όλη τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων και του καθαρισμού της πρωτεΐνης, το δείγμα διατηρούνταν συνεχώς στους 4°C. Το εναιώρημα επωάστηκε για 1 ώρα, ακολούθησε κατεργασία του με υπερήχους 3 φορές για 15 min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 15000 g για 15 min και κρατήθηκε το υπερκείμενο. Μετά την εξισορρόπηση με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 2 mL NTA-agarose resin ανά λίτρο αρχικής καλλιέργειας προστέθηκαν στο υπερκείμενο και το εναιώρημα αναδεύτηκε για 2 ώρες. Εν συνεχεία, διήλθε μέσω χρωματογραφικής στήλης και απομακρύνθηκαν οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στα μόρια της ρητίνης. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με διαλύματα 2 διαφορετικών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου (20 mM και 50 mM) και τελικά οι πρωτεΐνες με την ετικέτα των έξι ιστιδινών εκλούστηκαν με διάλυμα 250 mM ιμιδαζολίου. Τα εκλούσματα διαπιδύθηκαν με Snakeskin dialysis tubing σε PBS στους 4°C για 16 ώρες. Η διαπιδυμένη πρωτεΐνη συγκεντρώθηκε με φίλτρα (Millipore) και η συγκέντρωσή της προσδιορίστηκε με δοκιμασία BCA. Η πρωτεΐνη αποθηκεύτηκε στους -80°C σε PBS με 40% γλυκερόλη.

2.16. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

- ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Tris, 1,5 M, pH 8,8, 0,04% SDS)

- ρυθμιστικό διάλυμα επιστίβαξης (Tris, 0,5 M, pH 6,8, 0,04% SDS)
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x running buffer) (15 g/L Tris, 72 g/L γλυκίνη, 5g/L SDS)
- ακρυλαμίδιο [Acrylamide/Bis (37.5:1), 40%]
- υπερθειϊκό αμμώνιο, 10%
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine)
- απιονισμένο H₂O
- εκμαγείο και χτένες (BioRad)
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- 5x διάλυμα φόρτωσης (0,3M Tris-HCl pH 6,8, 10% w/v SDS, 50% v/v γλυκερόλη, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη)
- βαφή Coomassie (1 g coomassie, 480 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 420 mL H₂O)

Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE) σε παράθεση με μάρτυρα μοριακών βαρών για τον προσδιορισμό του μεγέθους τους. Το % ποσοστό της πηκτής διαχωρισμού ήταν εξάρτηση του μεγέθους που αναμενόταν να έχει η πρωτεΐνη προς ηλεκτροφόρηση (Πίνακας 2.2). Η σύνθεση της εκάστοτε πηκτής διαχωρισμού έγινε σύμφωνα με τη δοσολογία του Πίνακα 2.5. Το μίγμα εγχύθηκε με τη βοήθεια ακροφύσιου σε εκμαγείο (BioRad) μέχρι ορισμένου σημείου και το υπόλοιπο πληρώθηκε με νερό. Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής διαχωρισμού, παρασκευάστηκε η πηκτή επιστίβαξης αφού πρώτα αποχύθηκε το νερό και απομακρύνθηκαν με διηθητικό χαρτί τυχόν εναπομείναντα σταγονίδια. Το % ποσοστό της πηκτής επιστίβαξης ήταν πάντα 4,5% και η δοσολογία φαίνεται στον Πίνακα 2.3. Το μείγμα εγχύθηκε με τη βοήθεια ακροφύσιου πάνω από την πηκτή διαχωρισμού και ενσωματώθηκε χτένα για το σχηματισμό των φρεατίων. Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστίβαξης, αφαιρέθηκε η χτένα και η διφασική πλέον πηκτή μεταφέρθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που

περιείχε 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x Running buffer). Οι πρωτεΐνες αφού αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης και θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 min, εισάχθηκαν στα φρεάτια της πηκτής σε παράθεση με τον μάρτυρα μοριακών βαρών και η ηλεκτροφόρηση διεξάχθηκε στα 140V, έως ότου η χρωστική που περιέχεται στο διάλυμα φόρτωσης να φτάσει στο κάτω άκρο της πηκτής. Στη συνέχεια, η πηκτή είτε χρώσθηκε με βαφή Coomassie, είτε μεταφέρθηκε σε μεμβράνη για την διεξαγωγή αποτύπωσης κατά Western.

Πίνακας 2. 2: Δοσολογία αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού

Πηκτή Διαχωρισμού	<8%	10%	12%	15%
Μεγέθη πρωτεϊνών	>70kDa	30-100kDa	15-50kDa	<30kDa
Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Tris, 1,5M, pH 8,8, 0,04% SDS)	1,25Ml	1,25mL	1,25mL	1,25mL
Acrylamide/Bis (37.5:1), 40%	1Ml	1,2mL	1,5mL	1,875 mL
H ₂ O	2,7Ml	2,5mL	2,2mL	1,825 mL
Υπερθειικό αμμώνιο, 10%	50μL	50μL	50μL	50μL
TEMED	5μL	5μL	5μL	5μL

Πίνακας 2. 3: Δοσολογία αντιδραστηρίων για την παρασκευή της πηκτής επιστίβαξης

Πηκτή επιστίβαξης	4,5%
Ρυθμιστικό διάλυμα επιστίβαξης (Tris, 0,5M, pH 6,8, 0,04% SDS)	1mL

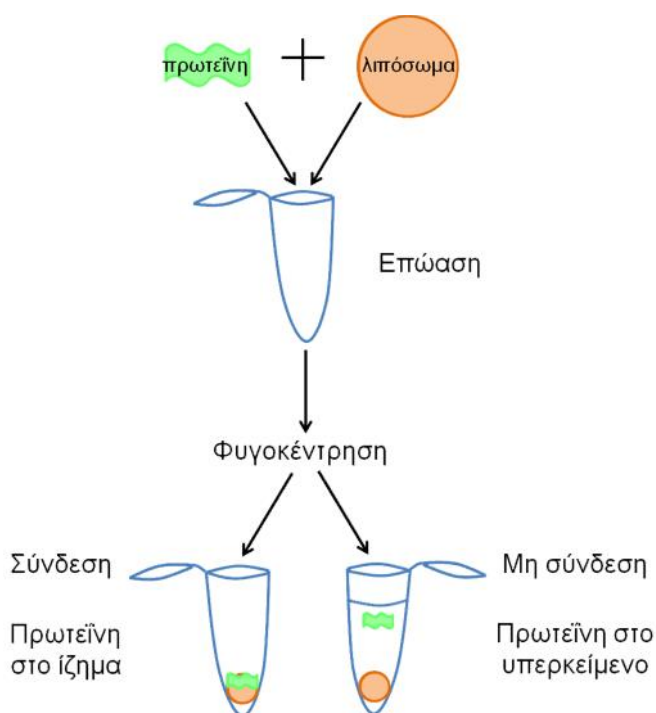
Acrylamide/Bis (37.5:1), 40%	0,45MI
H ₂ O	2,55MI
Υπερθειϊκό αμμώνιο, 10%	30μL
TEMED	5μL

2.17. Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα

- λιποσώματα
- φυγόκεντρος
- ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (Tris, 1.5 M, pH 8.8, 0,04% SDS)
- ρυθμιστικό διάλυμα επιστίβαξης (Tris, 0.5 M, pH 6.8, 0,04% SDS)
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x running buffer) (15 g/L Tris, 72 g/L γλυκίνη, 5g/L SDS)
- Ακρυλαμίδιο [Acrylamide/Bis (37.5:1), 40%]
- Υπερθειϊκό αμμώνιο, 10%
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine)
- απιονισμένο H₂O
- εκμαγείο και χτένες (BioRad)
- συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad)
- 5x διάλυμα φόρτωσης (0,3M Tris-HCl pH 6,8, 10% w/v SDS, 50% v/v γλυκερόλη, 0,25% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη)
- βαφή Coomassie (1 g coomassie, 480 mL μεθανόλη, 100 mL οξικό οξύ, 420 mL H₂O)

Οι πρωτεΐνες επώαστηκαν με τα λιποσώματα για 4 ώρες. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν στις 20000 x g και αφού αναμίχθηκαν με το διάλυμα

φόρτωσης, εισάχθηκαν στα φρεάτια της πηκτής σε παράθεση με τον μάρτυρα μοριακών βαρών και η ηλεκτροφόρηση διεξάχθηκε στα 140V, έως ότου η χρωστική που περιέχεται στο διάλυμα φόρτωσης να φτάσει στο κάτω άκρο της πηκτής. Στη συνέχεια, η πηκτή χρώσθηκε με βαφή Coomassie.



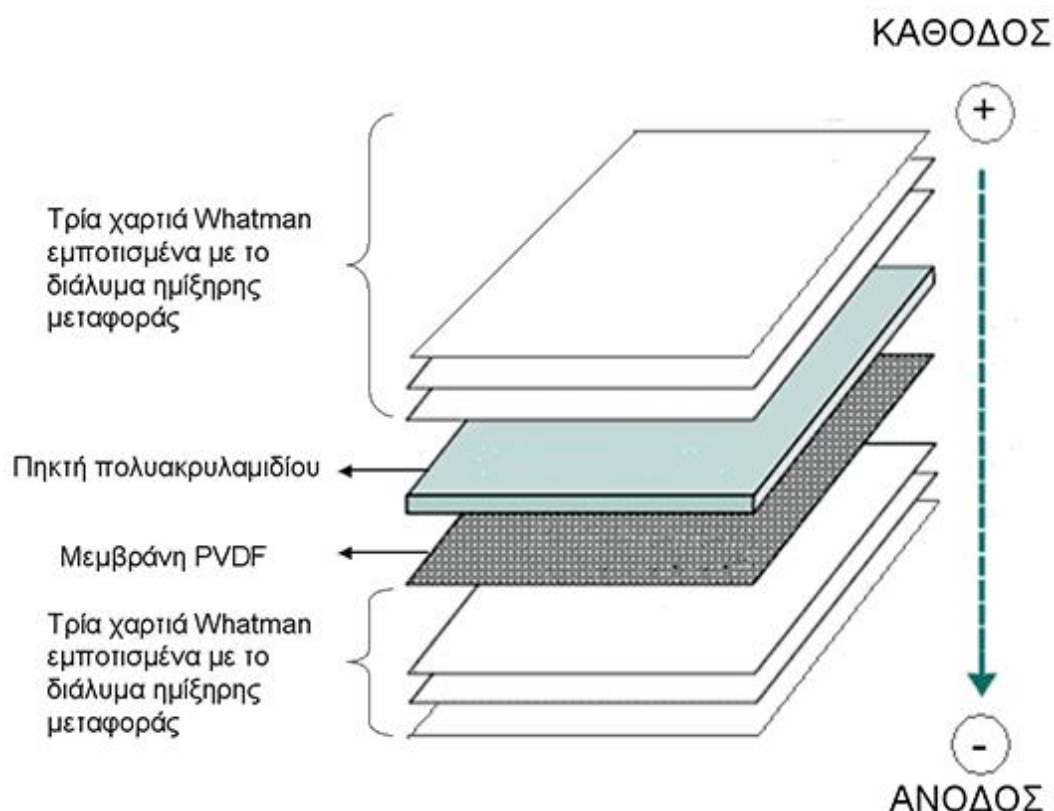
Σχήμα 2.6: Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα

2.18. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνες

- μεμβράνη πολυβινυλοδιφθοριδίου (PVDF, Immobilon-P, Millipore)
- ρυθμιστικό διάλυμα ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer buffer) (48mM Tris, 39mM γλυκίνη, 0.0375% w/v SDS, 20% v/v μεθανόλη)
- 100% μεθανόλη
- συσκευή ημίξηρης μεταφοράς (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad)

Η διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μια μεμβράνη PVDF επιτεύχθηκε με τη χρήση μιας

συσσκευής ημίξηρης μεταφοράς. Τόσο η πηκτή, όσο και η μεμβράνη προ-επωάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer buffer) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, αφού προηγουμένως η μεμβράνη PVDF εμβαπτίστηκε σε μεθανόλη για 1 min. Στη συνέχεια, η πηκτή και η μεμβράνη τοποθετήθηκαν στη συσκευή με τη διάταξη του Σχήματος 2.7 και η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε στα 20V για 1 ώρα.



Σχήμα 2.6: Η ενδεδειγμένη διάταξη της πηκτής πολυακρυλαμιδίου και της μεμβράνης PVDF στη συσκευή ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer).

2.19. Ανάλυση κατά Western

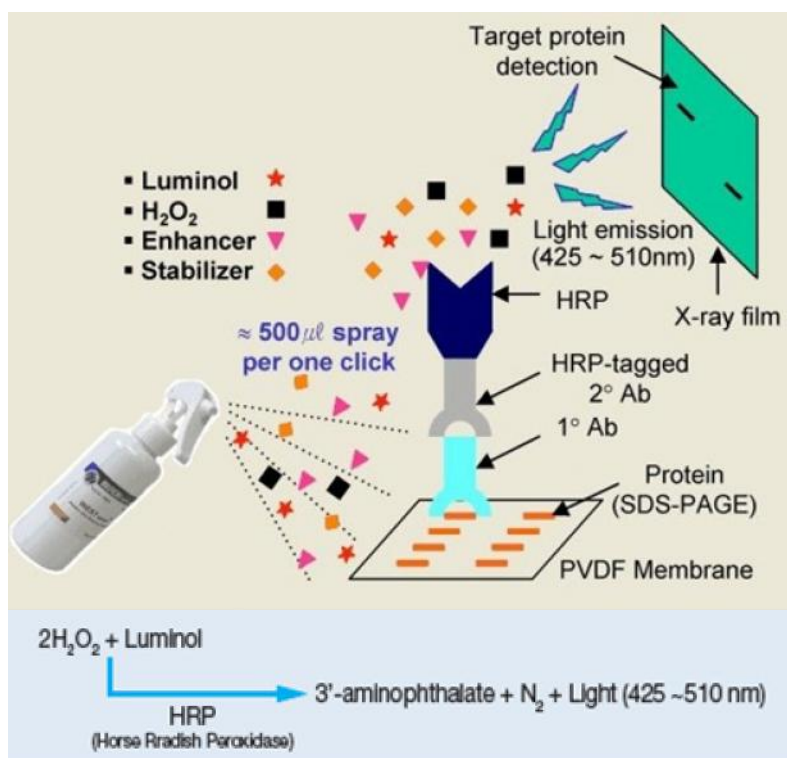
- ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T (0.2M Tris, 1.37M NaCl pH 7,5)
- σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος (Marvel)
- αντισώματα (πίνακας 2.4)
- ECL Western Blotting Detection system (GE Health Care)
- κασέτα εμφάνισης
- film (Kodak)

- διαλύματα εμφάνισης (developer, fixer)

Πίνακας 2.4: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις κατά Western

Πρωτοταγές αντίσωμα	T103 rabbit anti-GST polyclonal antibody (εργαστήριο καθηγητή F.A. Lai)
Πρωτοταγές αντίσωμα	Penta-His monoclonal antibody (BioRad)
Πρωτοταγές αντίσωμα	NusA monoclonal antibody (BioRad)
Δευτεροταγές αντίσωμα	Goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate (BioRad)
Δευτεροταγές αντίσωμα	Donkey anti-mouse IgG (H+L) HRP Conjugate (BioRad)

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, αυτή επώαστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T που περιείχε 5% (w/v) σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος (TBS-T/Marvel) για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση σε TBS-T/Marvel που περιείχε το πρωτοταγές αντίσωμα (σε αραιώση 1:20000) στους 4°C για 14 ώρες, 3 πλύσεις των 10 min με TBS-T/Marvel, επώαση της μεμβράνης σε TBS-T/Marvel που περιείχε το δευτεροταγές αντίσωμα (σε αραιώση 1:2000) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και άλλες τρεις πλύσεις των 10 min με TBS-T. Στη συνέχεια, η ανοσοανίχνευση έγινε με το σύστημα ανίχνευσης που αναφέρεται στα Υλικά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.8 και η φωτογραφία λήφθηκε με σαρωτή (scanner).



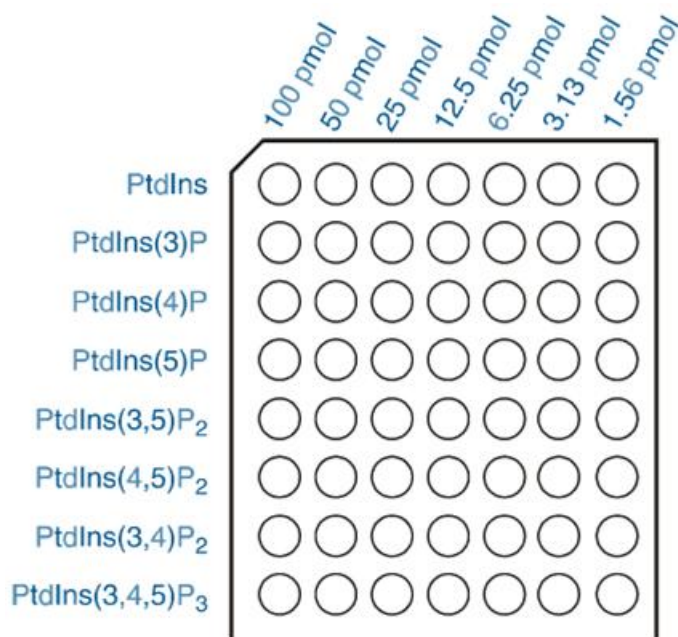
Σχήμα 2.7: Ο μηχανισμός της ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών με χημειοφωταύγεια.

2.20. Επίστρωση πρωτεΐνης σε λιπίδια

- μεμβράνη PIP arrays (Molecular Probes)
- ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T (0.2M Tris, 1.37M NaCl pH 7,5)
- σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος (Marvel)
- αντισώματα (πίνακας 2.7)
- ECL Western Blotting Detection system (GE Health Care)
- κασέτα εμφάνισης
- film (Kodak)
- διαλύματα εμφάνισης (developer, fixer)

Οι πρωτεΐνες επώαστηκαν στην μεμβράνη, αφού αυτή επώαστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T που περιείχε 5% (w/v) σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος (TBS-T/Marvel) για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση σε TBS-T/Marvel που περιείχε το πρωτοπαγές αντίσωμα (σε αραιώση 1:20000) στους 4°C για 14 ώρες, 3

πλύσεις των 10 min με TBS-T/Marvel, επώαση της μεμβράνης σε TBS-T/Marvel που περιείχε το δευτεροταγές αντίσωμα (σε αρραίωση 1:2000) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και άλλες τρεις πλύσεις των 10 min με TBS-T. Στη συνέχεια, η ανοσοανίχνευση έγινε με το σύστημα ανίχνευσης που αναφέρεται στα Υλικά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2 και η φωτογραφία λήφθηκε με σαρωτή (scanner).



Σχήμα 2.8: Εμπορικά διαθέσιμη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ενσταλαγμένα φωσφοϊνοσιτίδια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

2.21. Προσδιορισμός δραστικότητας PLC

- NaCl
- χολικό νάτριο
- CaCl₂
- EGTA
- BSA
- β-μερκαπτοαιθανόλη
- Tris-HCl pH 6.8
- PtdInsP₂ 220 μM

- [³H]PtdInsP₂ ειδικής ραδιενέργειας 0,05 μCi (Perkin-Elmer)
- Scintisafe Scintillation cocktail (Fisher Scientific)
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών (Packard Tri-Carb 2100TR)

Η δοκιμασία υδρόλυσης της PtdInsP₂ είναι μια παραλλαγή της δοκιμασίας που δημοσιεύσαν οι Katan και Parker το 1987 [121, 123]. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 50 μL με την προσθήκη σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου 100 mM NaCl, 0.4% χολικού νατρίου (w/v), 2 mM CaCl₂, 4 mM EGTA, 20 μg BSA, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, pH 6.8, της πρωτεΐνης και του υποστρώματος PIP₂. Η τελική συγκέντρωση της PtdInsP₂ στην αντίδραση ήταν 220 μM και περιείχε 0,05 μCi [³H]PtdInsP₂, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 20 pmol πρωτεΐνης. Το μίγμα επωάστηκε σε υδατόλουτρο 37°C για 15 min και η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη 0,25 mL χλωροφορμίου: μεθανόλης: πυκνού HCl (100:100:0.6 v/v) και στη συνέχεια προσθήκη 0,075 mL πυκνού HCl. Το δείγμα αναμίχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 2000 g για 2 min, 0,2 mL από την υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρθηκαν σε ειδικά φιαλίδια, προστέθηκαν 10 ml του ειδικού υγρού σπινθηρισμού και η ραδιενέργεια μετρήθηκε σε μετρητή σπινθηρισμού υγρών.

2.22. Μικροέγχυση και μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του ενδοκυτταρικού Ca²⁺ και της λουσιφεράσης σε ωάρια ποντικού

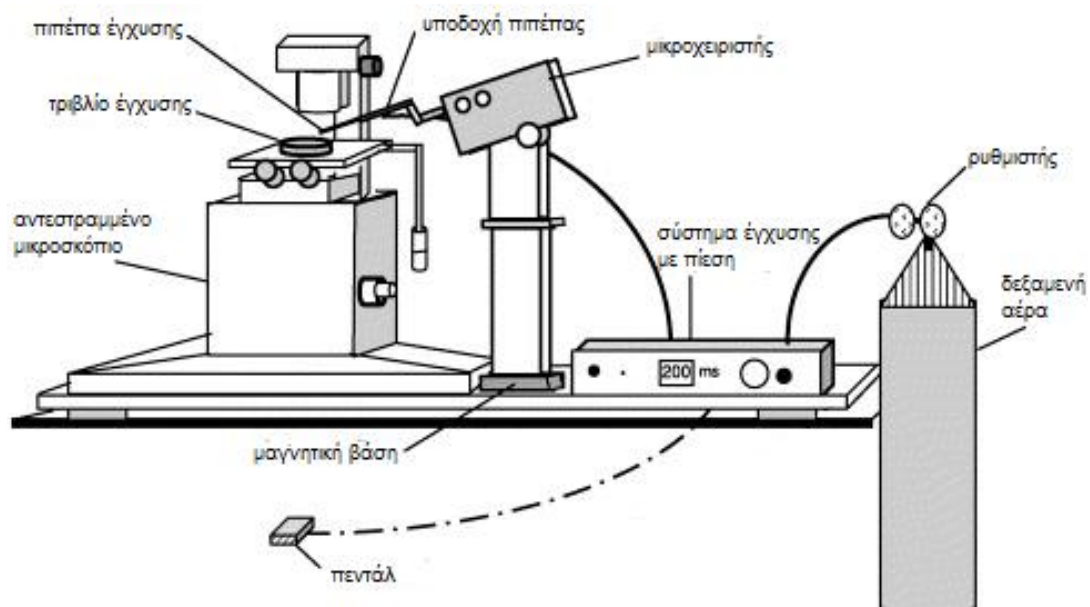
- ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη (Intervet)
- μέσο H-KSOM (Hepes-Potassium Simplex Optimized Medium)
- μεταλλικό έλαιο
- Oregon Green BAPTA dextran (Molecular Probes)
- ρυθμιστικό διάλυμα KCl/Hepes (120 mM KCl, 20 mM Hepes, pH 7.4)
- λουσιφερίνη
- PBS

- 1mM Mg.ATP
- 0,5% Triton X-100
- μικροσκόπιο Leica
- μικροσκόπιο TE2000
- μικροσκόπιο Zeiss Axiovert 100

Σε θηλυκά MF1 ποντίκια έγινε επαγωγή της ωορρηξίας μέσω ενδο-περιτονεϊκής έγχυσης 7,5IU γοναδοτροπίνης ορού εγκύου μητέρας και σε διάστημα 48 ωρών, 5IU ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης (hCG). Δεκατέσσερις περίπου ώρες μετά την έγχυση της hCG, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και οι ωοθήκες αφαιρέθηκαν και διατηρήθηκαν σε μέσο H-KSOM. Με τη χρήση μικροσκοπίου, τα ωοθηλάκια αφαιρέθηκαν από τις ωοθήκες και διατηρήθηκαν σε μέσο H-KSOM που περιείχε υαλουρονιδάση. Τα ωάρια συλλέχθηκαν, πλύθηκαν τρεις φορές με H-KSOM και διατηρήθηκαν σε 100μL σταγόνων H-KSOM κάτω από μεταλλικό έλαιο στους 37°C.

Οι μικροεγχύσεις εκτελέστηκαν πάνω σε αντεστραμμένο μικροσκόπιο Leica χρησιμοποιώντας χειριστές Narishige. Τα ωάρια ακινητοποιήθηκαν με τη βοήθεια μίας πιπέττας σταθεροποίησης και οι μικροεγχύσεις επιτυγχάνονταν με μία πιπέττα έγχυσης που διαπερνούσε τη διαφανή ζώνη και την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου. Με τη βοήθεια ενός παλμού πίεσης που διοχετευόταν από ένα σύστημα έγχυσης με πίεση (PicoPump pressure injection system, WPI), η πιπέττα έγχυσης απελευθέρωνε τμήμα του περιεχομένου της, που κάλυπτε το 3-5% του όγκου του ωαρίου, στο εσωτερικό του. Τα ωάρια ενέθηκαν με το κατάλληλο cRNA, αφού προηγουμένως αυτό αναμίχθηκε με ίσο όγκο 1mM Oregon Green BAPTA dextran σε ρυθμιστικό διάλυμα KCl/Hepes. Κατόπιν, διατηρήθηκαν σε μέσο H-KSOM με 100 μM λουσιφερίνη (υπόστρωμα λουσιφεράσης) και παρατηρήθηκαν είτε σε μικροσκόπιο Nikon TE2000, είτε σε Zeiss Axiovert 100, εφοδιασμένο με ψυχόμενη μεγεθυντική CCD κάμερα (Photek Ltd, UK). Οι αλλαγές στα επίπεδα του Ca^{2+} παρατηρήθηκαν στη διάρκεια 4 ωρών μετά την μικροέγχυση με μέτρηση του φθορισμού της Oregon Green

BAPTA dextran με φως χαμηλών επιπέδων εκπομπής, προερχόμενου από λάμπα αλογόνου. Η Oregon Green BAPTA dextran είναι ένας υδρόφιλος πολυσακχαρίτης συζευγμένος με τον φθορίζοντα ιχνηθέτη Oregon Green BAPTA. Μετά τη σύνδεση με το Ca^{2+} , ο ιχνηθέτης παρουσιάζει αύξηση στην ένταση εκπομπής φθορισμού και μία μικρή αλλαγή στο μήκος κύματος από τα οποία γίνεται αντιληπτή η έκλυση Ca^{2+} στο εσωτερικό του ωαρίου. Μετά από 4 ώρες, στα ίδια ωάρια μετρήθηκαν και τα επίπεδα φωταύγειας για 20 min χρησιμοποιώντας την ίδια CCD κάμερα. Το σήμα φθορισμού είναι συνήθως 10-100 φορές εντονότερο από το σήμα φωταύγειας. Οι μετρήσεις του Ca^{2+} θεωρούνταν έγκυρες μόνο εφόσον τα ωάρια εμφάνιζαν φωταύγεια. Τα ωάρια που εμφάνισαν φωταύγεια, συλλέχθηκαν και εισήχθησαν σε δοκιμαστικό σωλήνα, που ήταν προσαρτημένος σε αναλυτή φωταύγειας, εφοδιασμένο με ψυχόμενο S20 φωτοπολλαπλασιαστή (Electron Tubes Ltd, UK) και περιείχε PBS με 1mM Mg.ATP και 100μM λουσιφερίνη. Τα ωάρια λύθηκαν με 0.5% Triton X-100 και το εκπεμπόμενο φως συγκρίθηκε με αυτό που εκπέμπεται από γνωστές ποσότητες ανασυνδυασμένης λουσιφεράσης. Η δραστικότητα λουσιφεράσης που μετρήθηκε διαιρέθηκε διά του αριθμού των φωταυγών ωαρίων για να προκύψει μία τιμή για την έκφραση της κάθε πρωτεΐνης ανά ωάριο.



Σχήμα 2.10: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος μικροέγχυσης.

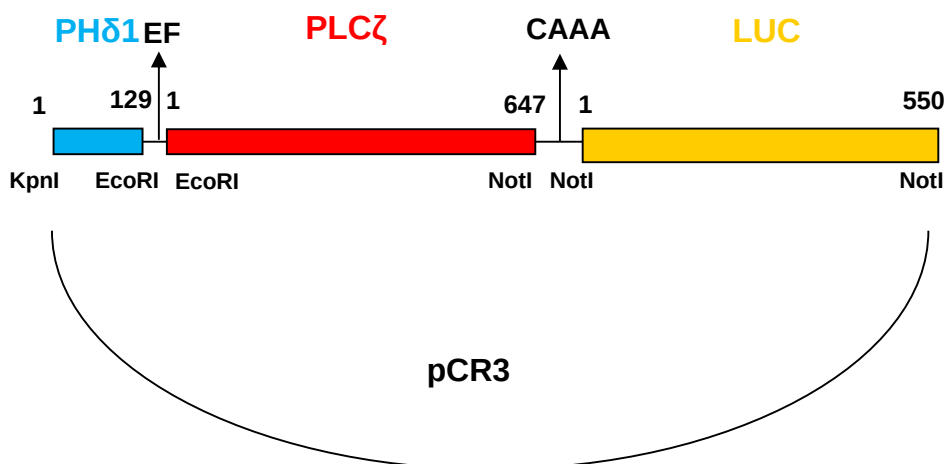
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Κλωνοποίηση των PHδ1-PLCΖ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC, PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC, PLCΖΔC2-C2δ1-LUC και ΔRHPLCδ1-LUC στον πλασμιδιακό φορέα pCR3

Για την κλωνοποίηση των χιμαιρικών αλληλουχιών PHδ1-PLCΖ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC, PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC, PLCΖΔC2-C2δ1-LUC καθώς και της αλληλουχίας ΔRHPLCδ1-LUC στον πλασμιδιακό φορέα pCR3 χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Συγκεκριμένα, για την κλωνοποίηση των χιμαιρικών αλληλουχιών PHδ1-PLCΖ-LUC, PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC καθώς και της αλληλουχίας ΔRHPLCδ1-LUC χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ενώ για την κλωνοποίηση των χιμαιρικών αλληλουχιών EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC και PLCΖΔC2-C2δ1-LUC χρησιμοποιήθηκε η PCR αλληλεπικάλυσης-επέκτασης (Overlap-Extension PCR) σε συνδυασμό με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Σχήματα 3.1-3.6). Οι ενισχύσεις με PCR, καθώς και οι πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες των επιμέρους τμημάτων προς κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι.

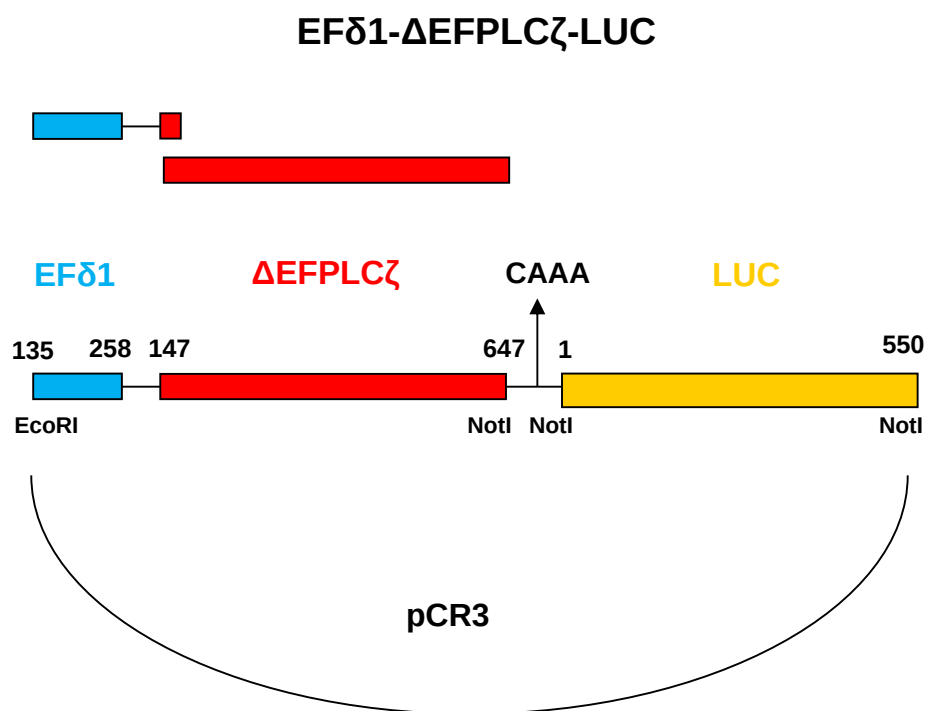
PHδ1-PLCζ-LUC



Σχήμα 3.2: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PHδ1-PLCζ-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή PH της PLCδ1 ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας, ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-2-rPLCδ1. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο PHd1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI στο 5' άκρο και ο PHd1R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες KpnI και EcoRI. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την περιοχή PH της PLCδ1 στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για ολόκληρη την PLCζ χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-mPLCζ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 5' άκρο και ο Z647R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-PHδ1, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-PHδ1 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI

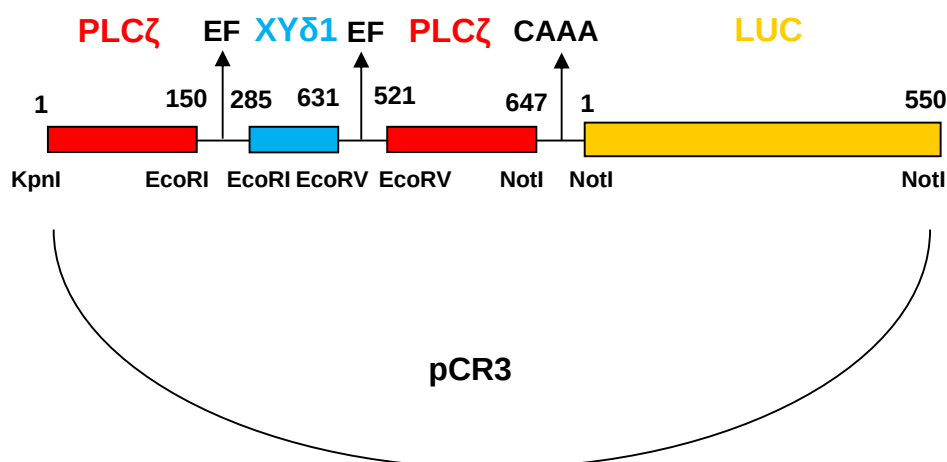
και NotI. Μετά και την επιτυχή δεύτερη κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-PHδ1-PLCζ-LUC που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GAATTC) μεταξύ της αλληλουχίας PHδ1 και της PLCζ. Το τρίτο και τελευταίο βήμα περιελάμβανε την κλωνοποίηση της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση στο 3' άκρο της pCR3-PHδ1-PLCζ αλληλουχίας. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-PHδ1-PLCζ, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3- PHδ1-PLCζ-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας PHδ1-PLCζ και LUC.



Σχήμα 3.3: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας EFδ1-ΔEFPLCζ-LUC

Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τη δομική περιοχή EF της PLCδ1 και για τη ΔEFPLCΖ ενισχύθηκαν με PCR. Συγκεκριμένα, για την ενίσχυση της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή EF της PLCδ1 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές EFd1F και EFd1R. Ο EFd1F φέρει στο 5' άκρο την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI και ο EFd1R περιλαμβάνει στο 3' άκρο του μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων από το 5' άκρο της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη ΔEFPLCΖ. Για την ενίσχυση της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη ΔEFPLCΖ χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ΔEFZF και ΔEFZR. Ο ΔEFZF στο 5' άκρο του περιλαμβάνει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων που επικαλύπτει εκείνη που βρίσκεται στο 3' άκρο της αλληλουχίας που ενισχύθηκε με εκκινητές τους EFd1F και EFd1R και ο ΔEFZR φέρει στο 3' άκρο του την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Μετά την ενίσχυση των παραπάνω αλληλουχιών, ακολούθησε μια OE-PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις παραπάνω αλληλουχίες κι ως εκκινητές τους EFd1F και ΔEFZR με σκοπό να ενωθούν οι αλληλουχίες μεταξύ τους και να προκύψει η χιμαιρική αλληλουχία EFδ1-ΔEFPLCΖ. Η χιμαιρική αλληλουχία EFδ1-ΔEFPLCΖ κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCRXL και στη συνέχεια πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα τόσο αυτή, όσο και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και NotI. Το τρίτο και τελευταίο βήμα περιελάμβανε την κλωνοποίηση της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση στο 3' άκρο της αλληλουχίας pCR3-EFδ1-ΔEFPLCΖ. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-EFδ1-ΔEFPLCΖ, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας EFδ1-ΔEFPLCΖ και LUC.

PLCΖΔXY-XYδ1-LUC

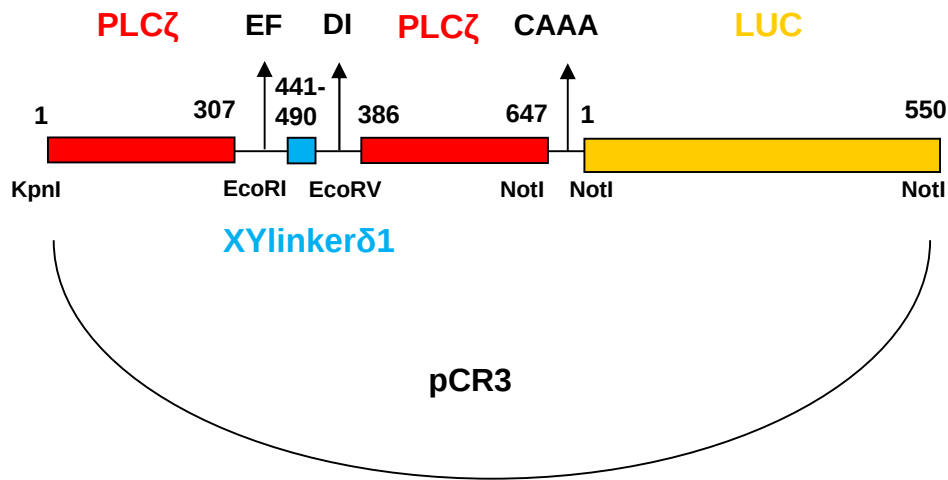


Σχήμα 3.4: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCΖΔXY-XYδ1-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τα πρώτα 150 αμινοξέα της PLCΖ (PLCΖ¹⁻¹⁵⁰) ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας, ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-2-mPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI στο 5' άκρο και ο Z150R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες KpnI και EcoRI. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την PLCΖ¹⁻¹⁵⁰ στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή XY της PLCδ1 χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-rPLCδ1. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο XYd1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 5' άκρο και ο XYd1R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-PLCΖ¹⁻¹⁵⁰, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-PLCΖ¹⁻¹⁵⁰ κόπηκαν με τις περιοριστικές

ενδονουκλεάσες EcoRI και EcoRV. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3- PLCζ¹⁻¹⁵⁰-ΧΥδ1 που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GAATTC) μεταξύ της αλληλουχίας PLCζ¹⁻¹⁵⁰ και της δομικής περιοχής ΧΥδ1. Στη συνέχεια, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τα τελευταία 127 αμινοξέα της PLCζ (PLCζ⁵²¹⁻⁶⁴⁷) χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-mPLCζ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z521F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 5' άκρο και ο Z647R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-PLCζ¹⁻¹⁵⁰-ΧΥδ1, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-PLCζ¹⁻¹⁵⁰-ΧΥδ1 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRV και NotI. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-PLCζ¹⁻¹⁵⁰-ΧΥδ1-PLCζ⁵²¹⁻⁶⁴⁷ που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GATATC) μεταξύ της δομικής περιοχής ΧΥδ1 και της αλληλουχίας PLCζ⁵²¹⁻⁶⁴⁷. Τέλος, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας pCR3-PLCζ¹⁻¹⁵⁰-ΧΥδ1-PLCζ⁵²¹⁻⁶⁴⁷. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-PLCζ¹⁻¹⁵⁰-ΧΥδ1-PLCζ⁵²¹⁻⁶⁴⁷, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-PLCζ¹⁻¹⁵⁰-ΧΥδ1-PLCζ⁵²¹⁻⁶⁴⁷-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας PLCζ⁵²¹⁻⁶⁴⁷ και της LUC.

PLCΖΔXYlinker-XYlinkerδ1-LUC

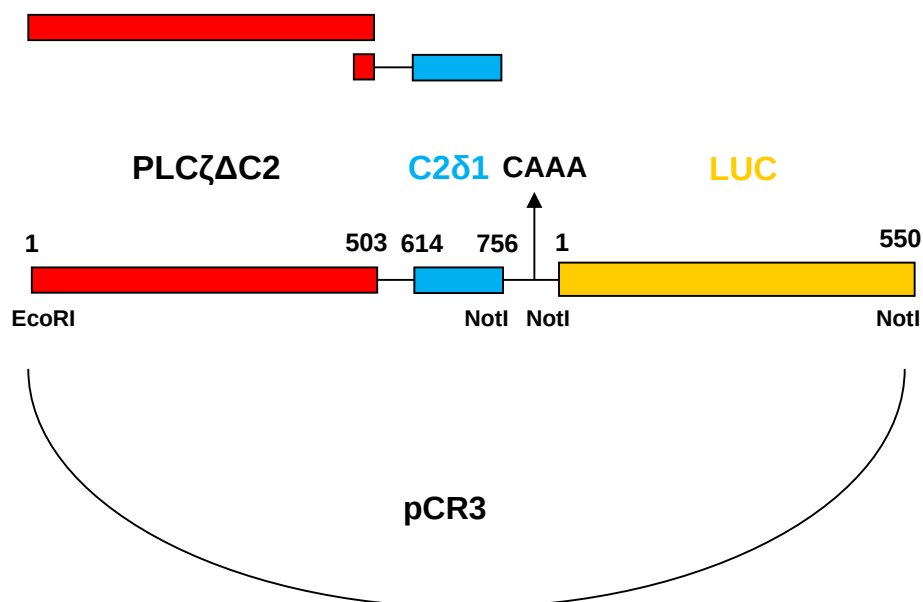


Σχήμα 3.4: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCΖΔXYlinker-XYlinkerδ1-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τα πρώτα 307 αμινοξέα της PLCΖ (PLCΖ¹⁻³⁰⁷) ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας, ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-2-mPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI στο 5' άκρο και ο Z307R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες KpnI και EcoRI. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την PLCΖ¹⁻³⁰⁷ στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή του συνδέτη XY της PLCδ1 χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-rPLCδ1. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο XYlinkerd1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 5' άκρο και ο XYlinkerd1R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 3' άκρο. Το

προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-PLCΖ¹⁻³⁰⁷, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-PLCΖ¹⁻³⁰⁷ κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και EcoRV. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3- PLCΖ¹⁻³⁰⁷-XYlinkerδ1 που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GAATTC) μεταξύ της αλληλουχίας PLCΖ¹⁻³⁰⁷ και του συνδέτη XY. Στη συνέχεια, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τα τελευταία 262 αμινοξέα της PLCΖ (PLCΖ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷) χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-mPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z386F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 5' άκρο και ο Z647R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-PLCΖ¹⁻³⁰⁷-XYInkerδ1, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-PLCΖ¹⁻³⁰⁷-XYlinkerδ1 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRV και NotI. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-PLCΖ¹⁻³⁰⁷-XYδ1-PLCΖ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷ που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GATATC) μεταξύ της δομικής περιοχής XYδ1 και της αλληλουχίας PLCΖ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷. Τέλος, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας pCR3-PLCΖ¹⁻³⁰⁷-XYlinkerδ1-PLCΖ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-PLCΖ¹⁻³⁰⁷-XYlinkerδ1-PLCΖ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-PLCΖ¹⁻³⁰⁷-XYlinkerδ1-PLCΖ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας PLCΖ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷ και της LUC.

PLCΖΔC2-C2δ1-LUC

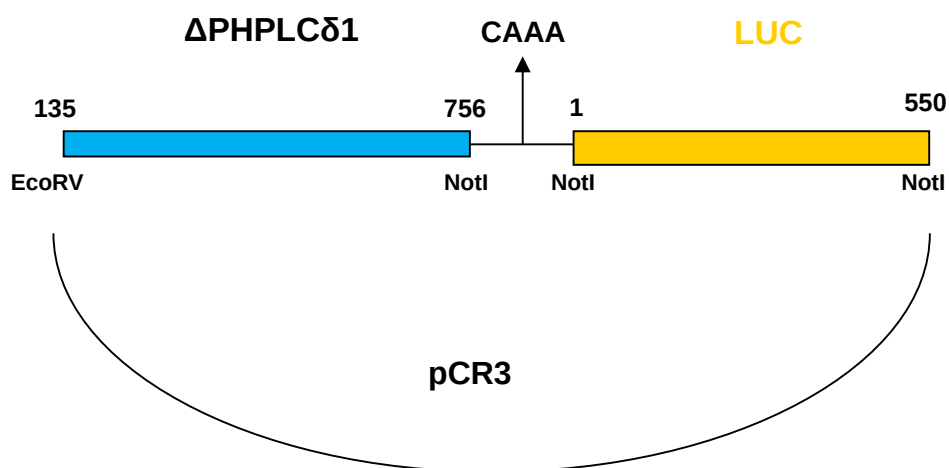


Σχήμα 3. 5: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCΖΔC2-C2δ1-LUC

Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τη δομική περιοχή C2 της PLCδ1 και την PLCΖΔC2 ενισχύθηκαν με PCR. Για την ενίσχυση της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή C2 της PLCδ1 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές C2d1F και C2d1R. Ο C2d1F περιλαμβάνει στο 5' άκρο του μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων από το 3' άκρο της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την PLCΖΔC2 και ο C2d1R φέρει στο 3' άκρο την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Για την ενίσχυση της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την PLCΖΔC2 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ZΔC2F και ZΔC2R. Ο ZΔC2F φέρει στο 5' άκρο του την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση PmeI και ο ZΔC2R στο 3' άκρο περιλαμβάνει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων που επικαλύπτει εκείνη που βρίσκεται στο 5' άκρο της αλληλουχίας που ενισχύθηκε με εκκινητές τους C2d1F και C2d1R.

Μετά την ενίσχυση των παραπάνω αλληλουχιών, ακολούθησε μια OE-PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις παραπάνω αλληλουχίες κι ως εκκινητές τους ZΔC2 και C2d1R με σκοπό να ενωθούν οι αλληλουχίες μεταξύ τους και να προκύψει η χιμαιρική αλληλουχία PLCζΔC2-C2δ1. Η χιμαιρική αλληλουχία PLCζΔC2 κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCRXL και στη συνέχεια πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα τόσο αυτή, όσο και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PmeI και NotI. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας PLCζΔC2-C2δ1. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-PLCζΔC2-C2δ1, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-PLCζΔC2-C2δ1-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας PLCζΔC2 και της LUC.

ΔΡΗPLCδ1-LUC

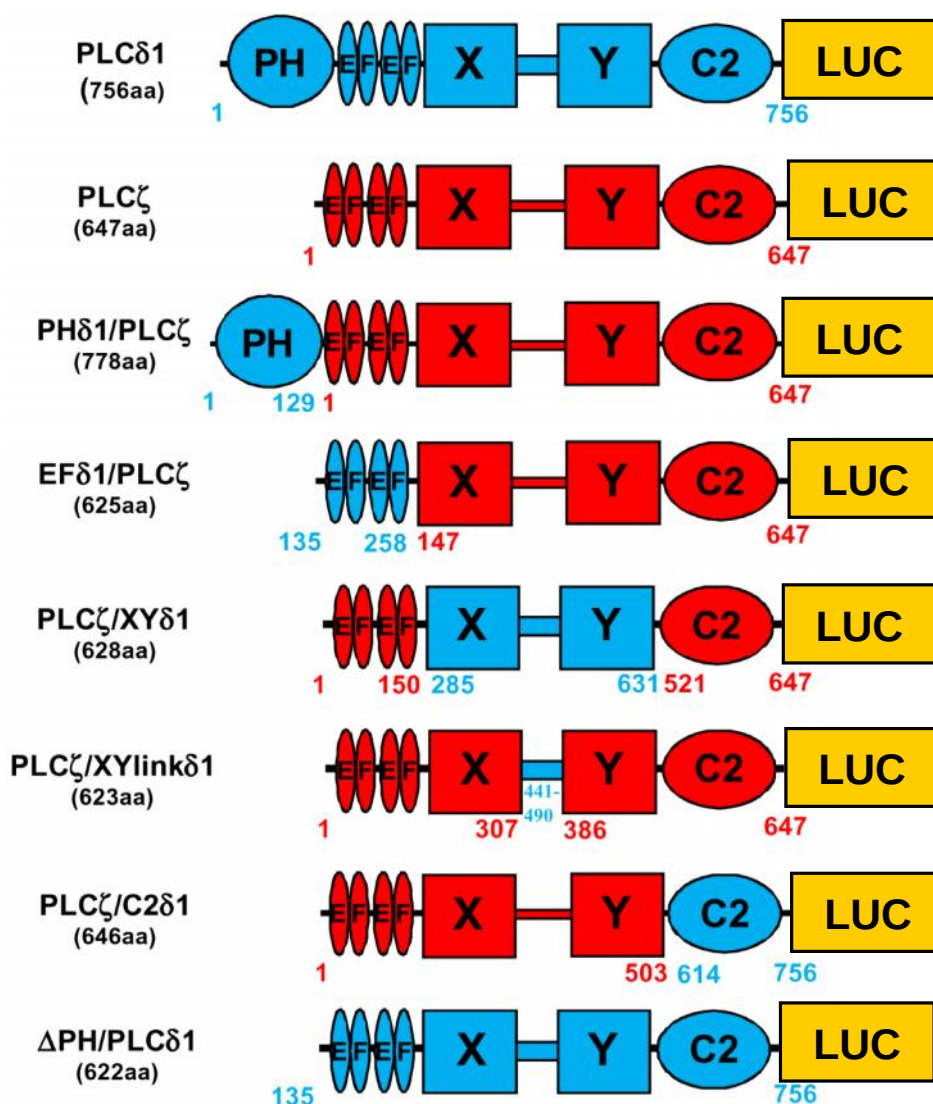


Σχήμα 3.6: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας ΔΡΗPLCδ1-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για την PLCδ1 χωρίς τη δομική περιοχή PH (ΔPHPLCδ1) ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας, ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-2-rPLCδ1. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο ΔPHd1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 5' άκρο και ο C2d1R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRV και NotI. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την ΔPHPLCδ1 στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, ακολούθησε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-ΔPHPLCδ1, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-ΔPHPLCδ1CΖ-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας PHδ1-PLCΖ και LUC.

3.2. Έκφραση των PHδ1-PLCΖ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC, PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC, PLCΖΔC2-C2δ1-LUC και ΔPHPLCδ1-LUC σε ωάρια ποντικού

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση όλων των επιθυμητών αλληλουχιών στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, παρασκευάστηκαν τα cRNA που κωδικοποιούν για τις χιμαιρικές πρωτεΐνες PHδ1-PLCΖ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCΖ-LUC, PLCΖΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC, PLCΖΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC, PLCΖΔC2-C2δ1-LUC καθώς και για την ΔPHPLCδ1-LUC (σχήμα 3.7). Επιπλέον, παρασκευάστηκαν τα cRNA που κωδικοποιούν για τις PLCΖ-LUC και PLCδ1-LUC, που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCR3-PLCΖ-LUC και pCR3-PLCδ1-LUC ήταν μία ευγενική παραχώρηση του Δρος Μιχαήλ Νομικού.



Σχήμα 3.7: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών PHδ1-PLCζ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCζ-LUC, PLCζΔXY-XYδ1-LUC, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1-LUC, PLCζΔC2-C2δ1-LUC και ΔPHPLCδ1-LUC που εκφράστηκαν σε ωάρια ποντικού

Τα cRNA παρασκευάστηκαν με τη βοήθεια του mMACHINE[®] RNA transcription system, όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Στη συνέχεια έγινε μικροέγχυση των cRNA σε ωάρια ποντικού, όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Η συμπεριφορά του Ca^{2+} στο εσωτερικό των ωαρίων παρακολουθήθηκε για 4 συναπτές ώρες μετά την μικροέγχυση, ενώ στη συνέχεια μετρήθηκε η φωταύγεια των ωαρίων. Τα δεδομένα που αφορούσαν στη συμπεριφορά του Ca^{2+} στα ωοκύτταρα καταχωρούνταν ως έγκυρα μόνο εφόσον τα ωάρια εμφάνιζαν

φωταύγεια. Το σχήμα 3.8 και ο πίνακας 3.1 συνοψίζουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικροέγχυσης cRNA σε ωάρια ποντικού.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ-LUC σε 17 ωάρια ποντικού προκάλεσε ταλαντώσεις Ca^{2+} (28 κορυφές/2 ώρες), παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση (Σχήμα 3.8). Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε σε φωταύγεια 0,53 cps (counts per second).

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την ΡΗδ1-PLCζ-LUC σε 13 ωάρια ποντικού προκάλεσε ελαφρώς λιγότερες ταλαντώσεις Ca^{2+} (21 κορυφές/2 ώρες), σε σχέση με την PLCζ (Σχήμα 3.8). Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε σε φωταύγεια 0,21 cps, δηλαδή απαιτήθηκε λιγότερη ποσότητα ΡΗδ1-PLCζ-LUC συγκριτικά με την ποσότητα της PLCζ-LUC που χρειάστηκε να εκφραστεί για την πρόκληση της πρώτης κορυφής.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την ΕΦδ1-ΔΕFPLCζ-LUC σε 20 ωάρια ποντικού προκάλεσε ελαφρώς λιγότερες ταλαντώσεις Ca^{2+} (17 κορυφές/2 ώρες), σε σχέση με την PLCζ (Σχήμα 3.8). Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε σε φωταύγεια 0,5 cps, δηλαδή χρειάστηκε να εκφραστεί σχεδόν η ίδια ποσότητα ΕΦδ1-ΔΕFPLCζ-LUC και PLCζ-LUC για την πρόκληση της πρώτης κορυφής.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC σε 26 ωάρια ποντικού δεν οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} στο εσωτερικό τους (Σχήμα 3.8). Εντούτοις, η εμφάνιση φωταύγειας στα ωάρια δηλώνει ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράστηκε σωστά αλλά ήταν ανίκανη να προκαλέσει ταλαντώσεις Ca^{2+} .

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζΔΧΥ-ΧΥδ1-LUC σε 21 ωάρια ποντικού είχε το ίδιο αποτέλεσμα με την PLCζΔΧΥlinker-ΧΥlinkerδ1-LUC καθώς δε κατάφερε να προκαλέσει ταλαντώσεις Ca^{2+} (Σχήμα 3.8), παρόλο που και τα 21 ωάρια εμφάνισαν φωταύγεια.

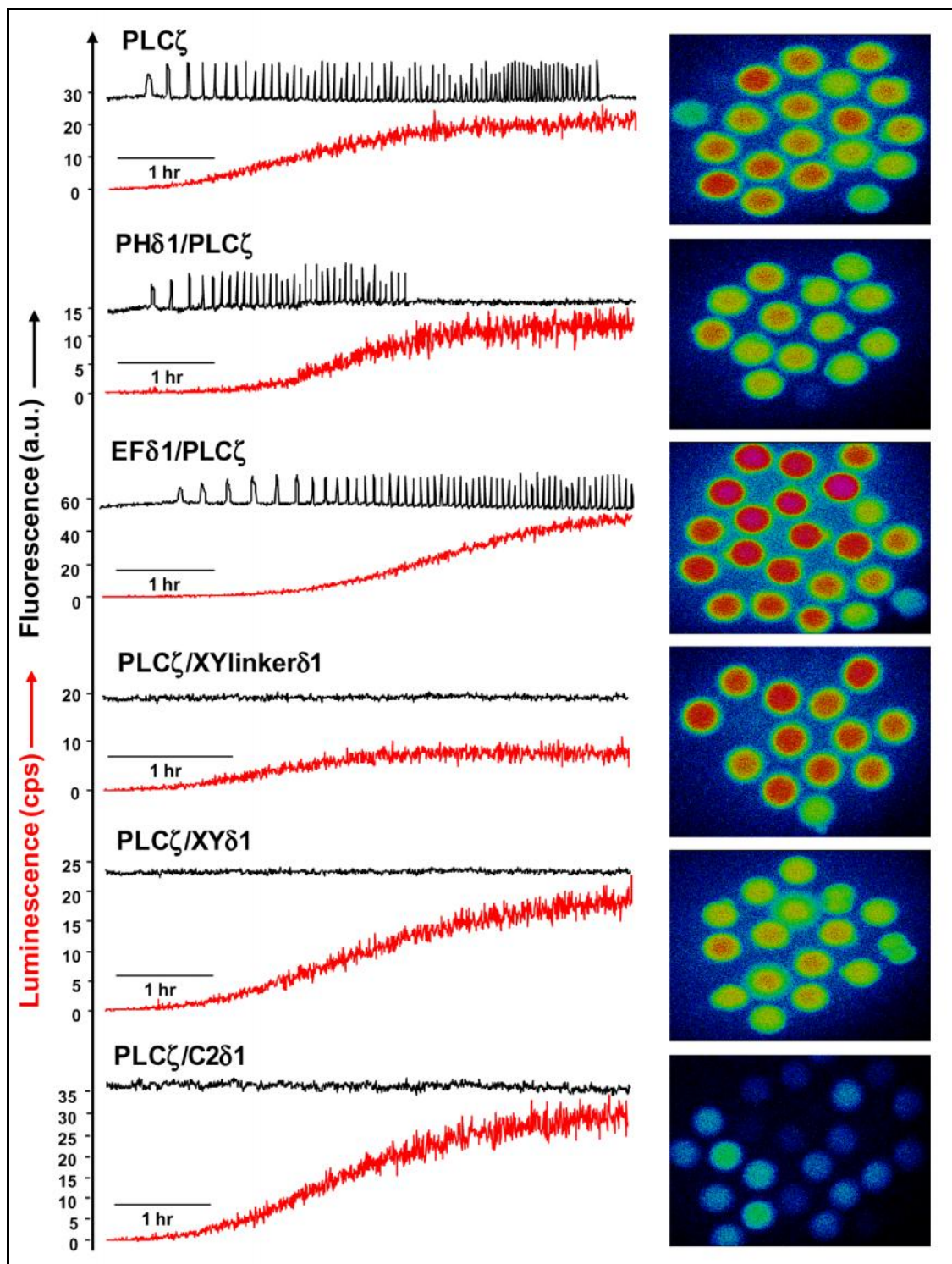
Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζΔC2-C2δ1-LUC σε 19 ωάρια ποντικού δε κατάφερε να προκαλέσει ταλαντώσεις Ca^{2+} (Σχήμα 3.8), παρόλο που και τα 19 ωάρια εμφάνισαν φωταύγεια.

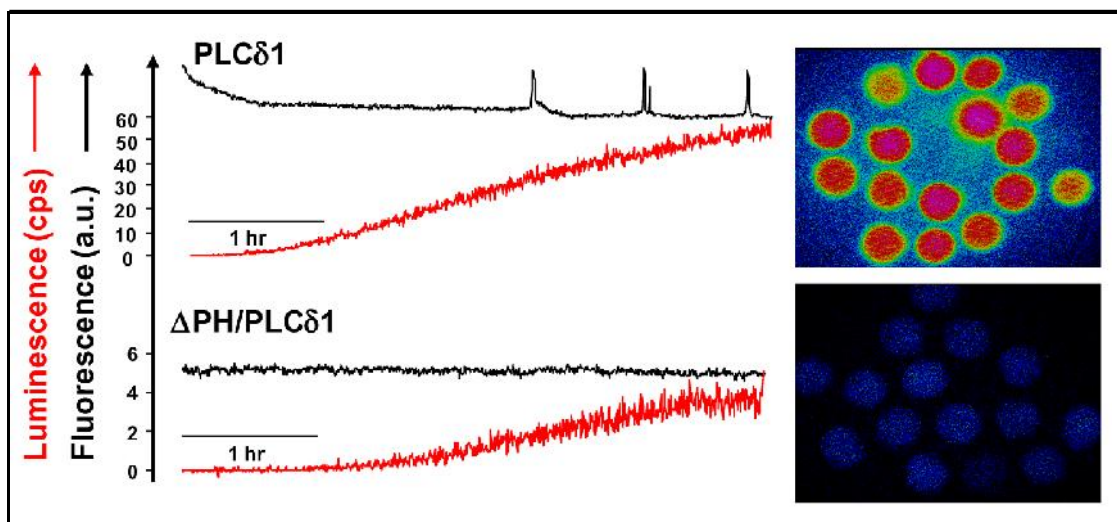
Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCδ1-LUC σε 17

ωάρια ποντικού προκάλεσε μόλις 2 ταλαντώσεις Ca^{2+} (2 κορυφές/2 ώρες), την ίδια ώρα που η PLCζ προκαλεί 28 ταλαντώσεις Ca^{2+} (Σχήμα 3.8). Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο ότι για την πρόκληση της πρώτης κορυφής χρειάστηκε να εκφραστεί 38 φορές περισσότερη PLCδ1 (20,3 cps) σε σχέση με την PLCζ (0,53 cps).

Τέλος, η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την ΔΡΗPLCδ1-LUC σε 14 ωάρια ποντικού δε κατάφερε να προκαλέσει ταλαντώσεις Ca^{2+} (Σχήμα 3.8), παρόλο που και τα 14 ωάρια εμφάνισαν φωταύγεια.

Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η προσθήκη της δομικής περιοχής ΡΗ στο αμινοτελικό άκρο της PLCζ καθώς και η υποκατάσταση της δομικής περιοχής ΕF της PLCζ από την αντίστοιχη της PLCδ1 δεν αλλάζει ουσιαστικά την ικανότητα της PLCζ να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} . Αντίθετα, η υποκατάσταση των δομικών περιοχών του συνδέτη ΧΥ, ΧΥ και C2 της PLCζ από τις αντίστοιχες της PLCδ1 καταργεί την ικανότητα της PLCζ να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} . Τέλος, η απαλοιφή της δομικής περιοχής ΡΗ από το αμινοτελικό άκρο της PLCδ1, ώστε να ομοιάζει δομικά στην PLCζ, δεν την καθιστά ικανή να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} όπως η PLCζ.





Σχήμα 3.8: Η συμπεριφορά του Ca^{2+} (μαύρες καταγραφές) και η φωταύγεια ωαρίων ποντικού (κόκκινες καταγραφές) που ενέθηκαν με cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ-LUC, PHδ1-PLCζ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCζ-LUC, PLCζΔXY-XYδ1-LUC, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1-LUC, PLCζΔC2-C2δ1-LUC, PLCδ1-LUC και ΔPHPLCδ1-LUC

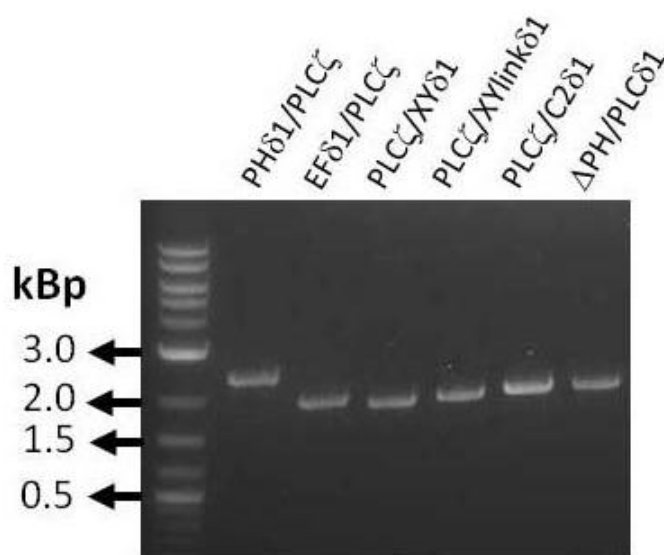
Πίνακας 3.1: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα μικροέγχυσης cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ-LUC, PHδ1-PLCζ-LUC, EFδ1-ΔEFPLCζ-LUC, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1-LUC, PLCζΔXY-XYδ1-LUC, PLCζΔC2-C2δ1-LUC, PLCδ1-LUC και της ΔPHPLCδ1-LUC σε ωάρια ποντικού

cRNA	ΑΡΙΘΜΟΣ ΩΑΡΙΩΝ	ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ Ca^{2+} (ΚΟΡΥΦΕΣ/2 ΩΡΕΣ)	ΜΕΓΙΣΤΗ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (cps)	ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΚΟΡΥΦΗ (cps)
PLCζ	17	27,9±1,20	19,1±1,20	0,53±0,03
PHδ1/PLCζ	13	20,7±1,10	11,4±0,50	0,21±0,04
EFδ1/PLCζ	20	16,5±1,20	45,3±2,50	0,50±0,11
PLCζ/XYlinkδ1	26	0	6,6±0,46	0
PLCζ/XYδ1	21	0	18,5±1,00	0
PLCζ/C2δ1	19	0	16,4±1,00	0
PLCδ1	17	1,8±0,12	45,0±1,76	20,3±0,30
ΔPH/PLCδ1	14	0	4,0±0,44	0

3.3 Κλωνοποίηση των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔPHPLCδ1 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pETMM60

Με σκοπό την *in vitro* μελέτη των ενζυμικών ιδιοτήτων των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-

C2δ1 και ΔRHPLCδ1 και τη σύγκριση των ιδιοτήτων αυτών με τις ιδιότητες των πρωτεϊνών PLCζ και PLCδ1, αποφασίστηκε η κλωνοποίηση των αλληλουχιών που τις κωδικοποιούν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pETMM60. Ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pETMM60 διαθέτει δύο ετικέτες. Η ετικέτα των έξι ιστιδινών χρησιμεύει στον καθαρισμό των πρωτεϊνών ενώ η ετικέτα NusA αυξάνει τη σταθερότητα των πρωτεϊνών. Έχει αποδειχθεί ότι η NusA είναι η καταλληλότερη ετικέτα για την PLCζ, καθώς αυξάνει σημαντικά την έκφραση διαλυτής PLCζ σε βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli*, ενώ αυξάνει και τη σταθερότητα της καθαρισμένης πρωτεΐνης σε βάθος χρόνου. Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔRHPLCδ1 ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCR3-PHδ1-PLCζ-LUC, pCR3-EFδ1-ΔEFPLCζ-LUC, pCR3-PLCζΔXY-XYδ1-LUC, pCR3-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1-LUC, pCR3-PLCζΔC2-C2δ1-LUC και pCR3-ΔRHPLCδ1-LUC. Το σχήμα 3.9 δείχνει την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης των αλληλουχιών PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔRHPLCδ1.

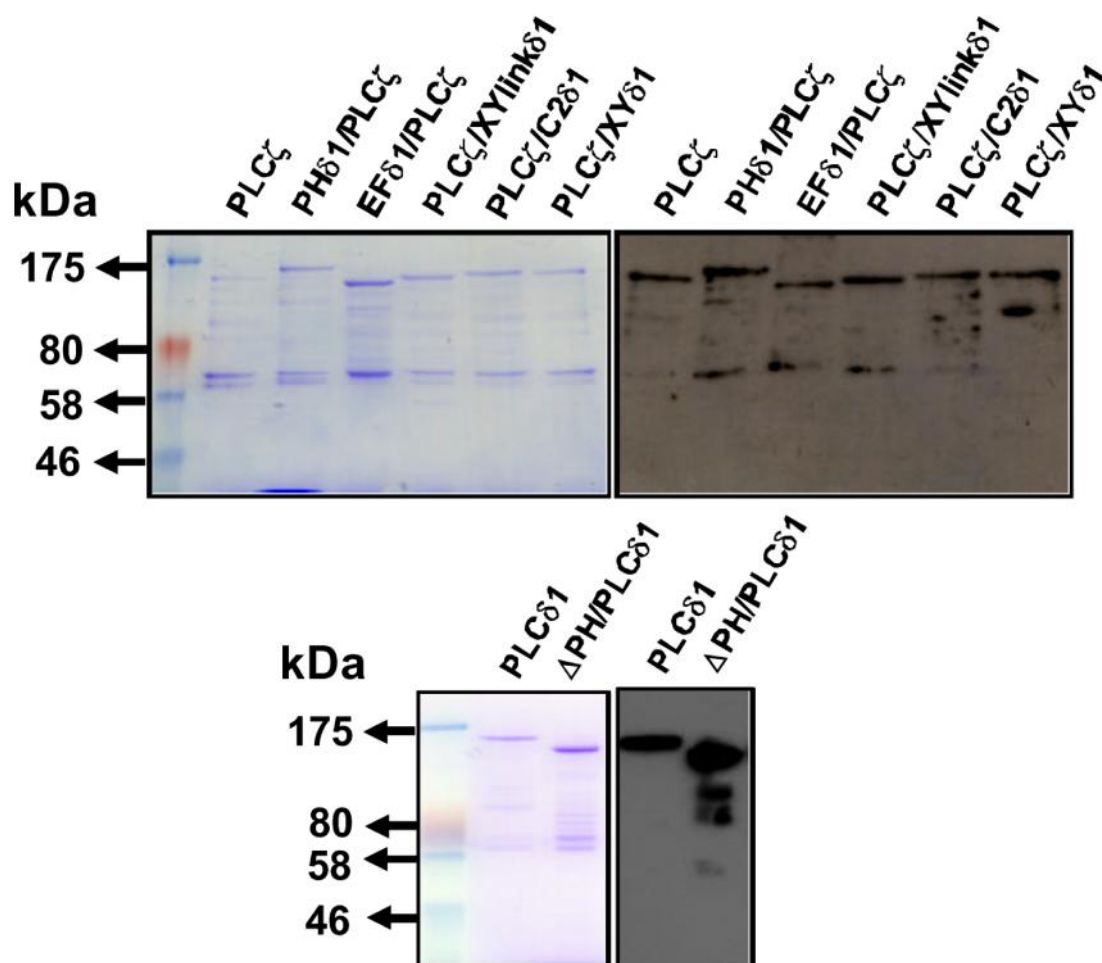


Σχήμα 3.9: Πηκτή αγαρόζης 1% που δείχνει επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης των αλληλουχιών PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔRHPLCδ1 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pETMM60. Στη διαδρομή 1 ηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας μοριακών βαρών

3.4. Έκφραση και καθαρισμός των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔPHPLCδ1

Οι πρωτεΐνες NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1 εκφράστηκαν σε *Escherichia coli* Rosetta (DE3) κύτταρα. Η βέλτιστη έκφραση των NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1 επιτεύχθηκε με ανάδευση των βακτηριακών καλλιέργειών στις 200rpm στους 37°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα έφτανε το 0,6 και ακολουθούσε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με την προσθήκη 0,1 mM IPTG και 18 ώρες ανάδευσης στις 200rpm στους 16°C. Μετά το πέρας των 18 ωρών, οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για την παραλαβή του ιζήματός τους και οι NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1 απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Παράλληλα, εκφράστηκαν και απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες NusA-6His-PLCζ και NusA-6His-PLCδ1 που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τη σύγκριση των ενζυμικών ιδιοτήτων των χιμαιρικών πρωτεϊνών με τις δικές τους. Στο αριστερό παράθυρο του Σχήματος 3.10 φαίνονται οι χρώσεις με βαφή Coomassie Brilliant-Blue των πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1-PLCζ, NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1. Στο δεξί παράθυρο του Σχήματος 3.10 φαίνονται τα αποτυπώματα κατά Western των παραπάνω πρωτεϊνών με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος αντι-NusA. Οι κυρίαρχες ζώνες τόσο στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου, όσο και στα αποτυπώματα κατά Western αντιστοιχούσαν σε μοριακά βάρη που ανταποκρίνονται στο μέγεθος των παραπάνω πρωτεϊνών. Πέρα, όμως, από τις κυρίαρχες ζώνες, μπορεί κανείς να διακρίνει κάποιες αχνές ζώνες χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες εντοπίστηκαν και από το αντίσωμα αντι-NusA και ήταν πιθανόν το

αποτέλεσμα πρωτεόλυσης κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων καθαρισμού των πρωτεϊνών.

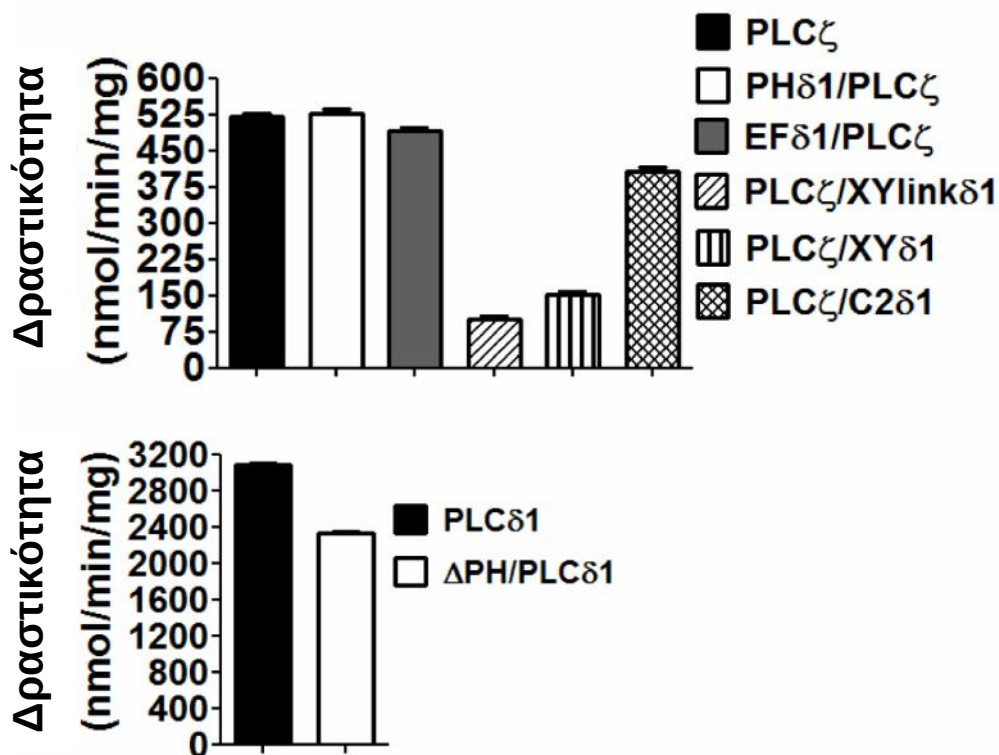


Σχήμα 3.10: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτών πολυακρυλαμιδίου 7% (αριστερά παράθυρα) και αποτυπώματα κατά Western με το αντίσωμα αντι-NusA (δεξιά παράθυρα) των πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1-PLCζ, NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1. Ηλεκτροφορήθηκε 1μg από κάθε πρωτεΐνη.

3.5. Μελέτη των ενζυμικών ιδιοτήτων των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔPHPLCδ1

Η ενζυμική δραστηριότητα των ανασυνδυασμένων PLC πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία υδρόλυσης [^3H]PtdInsP₂ [123]. Οι δραστηριότητες των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν στο υπάρχον Ca^{+2} (χωρίς προσθήκη EGTA, ~1mM). Σαν αρνητικός μάρτυρας,

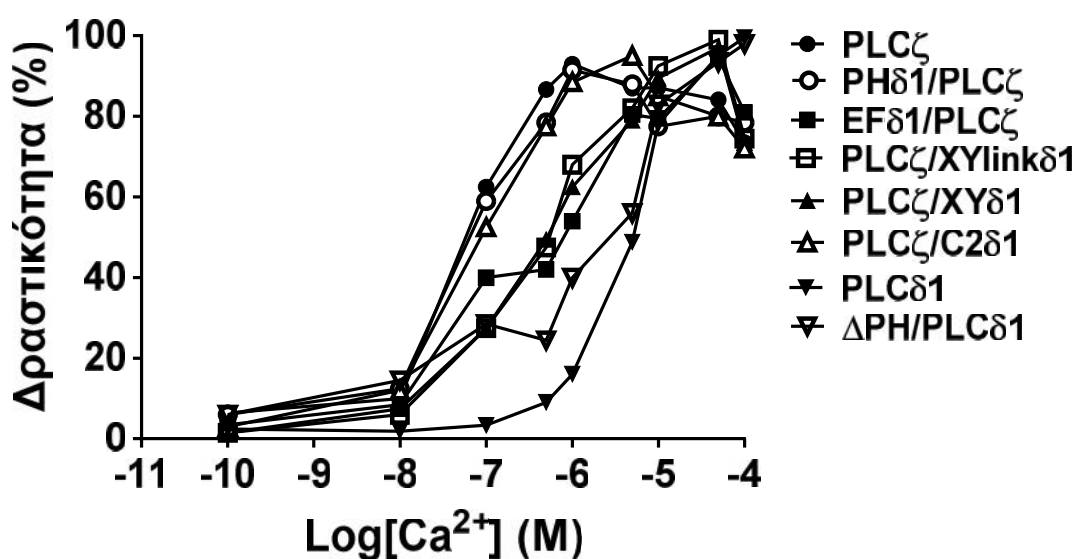
απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε NusA. Το ιστόγραμμα του Σχήματος 3.11 και ο πίνακας 3.2 συνοψίζουν τις τιμές δραστηριότητας που λήφθηκαν για κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και καταδεικνύουν ότι η PLCζ αγρίου τύπου ($521 \pm 11 \text{ nmol/min/mg}$), η PHδ1-PLCζ ($528 \pm 21 \text{ nmol/min/mg}$) και η EFδ1-ΔEFPLCζ ($493 \pm 12 \text{ nmol/min/mg}$) παρουσίασαν παρόμοια *in vitro* δραστηριότητα, ενώ η PLCζΔC2-C2δ1 εμφάνισε ελαφρώς μειωμένη δραστηριότητα ($409 \pm 24 \text{ nmol/min/mg}$) που αντιστοιχεί στο 80% της δραστηριότητας της PLCζ αγρίου τύπου. Το πιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα αυτής της σειράς πειραμάτων αφορούσε στις χιμαιρικές πρωτεΐνες PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1 και PLCζΔXY-XYδ1 που εμφάνισαν μια δραματική μείωση στη δραστηριότητά τους (100 ± 8 και $152 \pm 13 \text{ nmol/min/mg}$), διατηρώντας κατά προσέγγιση μόνο το 20% και 30% της δραστηριότητας της PLCζ αγρίου τύπου, αντιστοίχως. Τέλος, η ΔPH-PLCδ1 διατήρησε το 75% της δραστηριότητας της PLCδ1 αγρίου τύπου (2325 ± 25 έναντι $3070 \pm 38 \text{ nmol/min/mg}$), ενώ εμφάνισε 4,5 φορές υψηλότερη *in vitro* δραστηριότητα σε σύγκριση με την PLCζ αγρίου τύπου (2325 ± 25 έναντι $521 \pm 11 \text{ nmol/min/mg}$). Οι τιμές δραστηριότητας (cpm) του αρνητικού μάρτυρα (NusA) έχουν αφαιρεθεί από τις παραπάνω τιμές. Ο υπολογισμός των δραστηριοτήτων έγινε όπως περιγράφεται παρακάτω. Η συνολική συγκέντρωση $^3\text{[H]PtdInsP}_2$ που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση ήταν γνωστή και αντιστοιχούσε σε γνωστή τιμή cpm. Με βάση τις τιμές cpm που έδωσαν οι αντιδράσεις για κάθε πρωτεΐνη έγινε η αναγωγή στην αντίστοιχη συγκέντρωση $^3\text{[H]PtdInsP}_2$ που καταλύουν. Οι τιμές που προκύπτουν διαιρούνται διά του χρόνου της αντίδρασης και οι νέες τιμές με την ποσότητα της κάθε πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε.



Σχήμα 3.11: Ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1-PLCζ, NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1. Είκοσι pmol κάθε πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε δοκιμασία υδρόλυσης $[^3\text{H}]\text{PtdInsP}_2$ και η ραδιενέργεια του προϊόντος μετρήθηκε σε υγρό σπινθηριστή. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές παρτίδες πρωτεΐνης και για κάθε παρτίδα εις διπλούν.

Για να διερευνηθεί το πώς επιδρά η αντικατάσταση κάθε επιμέρους δομικής περιοχής της PLCζ στην ευαισθησία της στο Ca^{2+} μελετήσαμε την ικανότητα της PLCζ αγρίου τύπου και των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1, ΔPHPLCδ1, PLCδ1 αγρίου τύπου να υδρολύουν $[^3\text{H}]\text{PtdInsP}_2$ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Ca^{2+} , κυμαινόμενες από 0,1 nM έως 0,1 mM. Η παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της υδρολυτικής ικανότητας των παραπάνω πρωτεϊνών παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} ήταν η EC_{50} (Effective Concentration 50). Η τιμή EC_{50} εκφράζει τη συγκέντρωση Ca^{2+} που απαιτείται για την επιτεύξη του 50% της μέγιστης δραστικότητας. Η EC_{50} για τις PLCζ αγρίου τύπου (68 nM), PHδ1-PLCζ (84 nM) και PLCζΔC2-C2δ1 (105 nM) ήταν παρόμοια. Σε σύγκριση με την PLCζ αγρίου τύπου, η αντικατάσταση της δομικής

περιοχής EF hands της PLCζ από την αντίστοιχη της PLCδ1 αύξησε την EC_{50} 10 φορές (690 nM έναντι 68 nM), ενώ η αντικατάσταση της δομικής περιοχής XY ή του συνδέτη XY αύξησε την EC_{50} κατά προσέγγιση 8 και 7 φορές αντιστοίχως (538 και 490 nM). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η διαγραφή της δομικής περιοχής PH από την PLCδ1 αύξησε την ευαισθησία της ΔPHPLCδ1 σε Ca^{2+} , μειώνοντας την EC_{50} από 4200 nM (PLCδ1) σε 2000 nM (ΔPH-PLCδ1), (Σχήμα 3.12, Πίνακας 3.2).



Σχήμα 3.12: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστηριότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1-PLCζ, NusA-6His-EFδ1-ΔEFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔPHPLCδ1

Για τη σύγκριση της κινητικής της PLCζ αγρίου τύπου και των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔEFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1, ΔPHPLCδ1, PLCδ1 αγρίου τύπου, χρησιμοποιήθηκε η σταθερά Michaelis-Menten, K_m . Η K_m εκφράζει τη συγκέντρωση υποστρώματος, στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης έχει τη μισή τιμή της μέγιστης ταχύτητας και δείχνει τη χημική συγγένεια μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. Οι τιμές K_m που λήφθηκαν για τις PLCζ αγρίου τύπου (100 μ M), PHδ1-PLCζ (96 μ M), EFδ1-ΔEFPLCζ (120 μ M) και PLCζΔC2-C2δ1 (106 μ M) ήταν σχεδόν ταυτόσημες. Αντίθετα, οι τιμές K_m για τις PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1 και PLCζΔXY-XYδ1 ήταν κατά προσέγγιση 36

και 24 φορές υψηλότερες από την Km της PLCζ αγρίου τύπου, αντιστοίχως (3602 και 2431 μM). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αντικατάσταση της καταλυτικής περιοχής XY ή του συνδέτη XY της PLCζ, μειώνει δραματικά την *in vitro* συγγένεια της PLCζ για το υπόστρωμά της, PtdInsP₂. Επιπλέον, η Km για την ΔΡΗPLCδ1 ήταν 10 φορές υψηλότερη από εκείνη για την PLCδ1 αγρίου τύπου (746 μM έναντι 76 μM), γεγονός που υποδηλώνει ότι η απαλοιφή της δομικής περιοχής PH μειώνει την *in vitro* συγγένεια της PLCδ1 για το υπόστρωμα της, PtdInsP₂ (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Συνοπτική παρουσίαση των ενζυμικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1-PLCζ, NusA-6His-EFδ1-ΔΕFPLCζ, NusA-6His-PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, NusA-6His-PLCζΔXY-XYδ1, NusA-6His-PLCζΔC2-C2δ1, NusA-6His-PLCδ1 και NusA-6His-ΔΡΗPLCδ1

Πρωτεΐνη	Δραστικότητα (nmol/min/mg)	Km (μM)	EC ₅₀ (nM)
PLCζ	521±11	100	68
PHδ1/PLCζ	528±21	96	84
EFδ1/PLCζ	493±12	120	690
PLCζ/XYlinkerδ1	100±8	3602	490
PLCζ/XYδ1	152±13	2431	538
PLCζ/C2δ1	409±24	106	105
PLCδ1	3070±38	76	4200
ΔΡΗ/PLCδ1	2325±25	747	2000

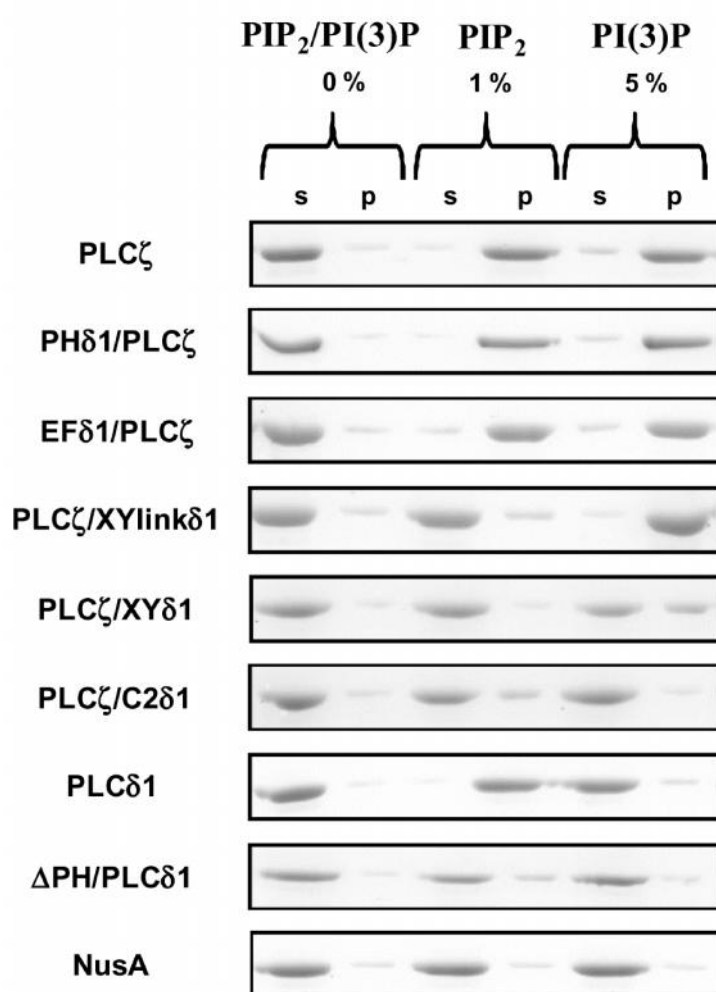
3.6. Σύνδεση των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔΕFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1 και ΔΡΗPLCδ1 στο PtdInsP₂ και το PtdIns(3)P

Για να μελετηθεί η ικανότητα σύνδεσης της PLCζ αγρίου τύπου και των PHδ1-PLCζ, EFδ1-ΔΕFPLCζ, PLCζΔXY-XYδ1, PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, PLCζΔC2-C2δ1, PLCδ1 και ΔΡΗPLCδ1 με το PtdInsP₂ και PtdIns(3)P χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα (Liposome Binding Assay), όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Η επιλογή των φωσφοϊνοσιτιδίων δεν έγινε τυχαία, καθώς η PtdInsP₂

αποτελεί το κατεξοχήν υπόστρωμα των PLC, ενώ για την PtdIns(3)P υπάρχουν ενδείξεις ότι αλληλεπιδρά με τη δομική περιοχή C2 της PLCζ. Για τις ανάγκες του πειράματος συνθέθηκαν τρεις κατηγορίες μονοστοιβαδικών λιποσωμάτων με βασική τους σύσταση τα λιπίδια φωσφατιδυλοχολίνη: χοληστερόλη: φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PtdCho:CHOL:PtdEtn) σε αναλογία 4:2:1. Στην πρώτη κατηγορία λιποσωμάτων δεν ενσωματώθηκαν φωσφοϊνοσιτίδια, στη δεύτερη ενσωματώθηκε 1% PtdInsP₂ και στην τρίτη ενσωματώθηκε 5% PtdIns(3)P. Προκειμένου να περιοριστεί κάθε μη ειδική σύνδεση των πρωτεϊνών σε εξόχως φορτισμένα λιπίδια, η δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα εκτελέστηκε παρουσία σχεδόν φυσιολογικής συγκέντρωσης MgCl₂ (0,5 mM). Για την δοκιμασία σύνδεσης με λιποσώματα, η PLCδ1 και PLCζ λειτούργησαν ως θετικοί μάρτυρες, ενώ η πρωτεΐνη NusA ως αρνητικός μάρτυρας, καθώς δεν εμφάνισε ειδική σύνδεση με καμία από τις τρεις κατηγορίες λιποσωμάτων.

Η PLCζ αγρίου τύπου εμφάνισε ισχυρή σύνδεση μόνο με τα λιποσώματα που περιέχουν 1% PtdInsP₂ ή 5% PtdIns(3)P, καθώς ανιχνεύθηκε στο ίζημα του διαλύματος των λιποσωμάτων αυτών. Όπως ήταν αναμενόμενο, η PLCδ1 εμφάνισε ισχυρή σύνδεση μόνο με τα λιποσώματα που περιείχαν 1% PtdInsP₂ (η PLCδ1 ανιχνεύθηκε στο ίζημα), ενώ η απαλοιφή της δομικής περιοχής PH από την αλληλουχία της PLCδ1, οδήγησε σε απώλεια της σύνδεσης με τα λιποσώματα που περιείχαν 1% PtdInsP₂ (η ΔPHPLCδ1 ανιχνεύθηκε στο υπερκείμενο). Οι χιμαιρικές πρωτεΐνες PHδ1-PLCζ και EFδ1-ΔEFPLCζ εμφάνισαν παρόμοιο πρότυπο σύνδεσης με την PLCζ αγρίου τύπου, αφού εμφάνισαν ισχυρή σύνδεση μόνο σε λιποσώματα που περιείχαν 1% PtdInsP₂ ή 5% PtdIns(3)P. Στην περίπτωση της PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, η πλειονότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης (~90%) ανιχνεύθηκε στο υπερκείμενο του διαλύματος λιποσωμάτων που δεν περιείχαν φωσφοϊνοσιτίδια ή περιείχαν 1% PtdInsP₂ και στο ίζημα του διαλύματος λιποσωμάτων που περιείχαν 5% PtdIns(3)P, γεγονός που μαρτυρά την ισχυρή σύνδεση της PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1 με το 5% PtdIns(3)P. Η χιμαιρική πρωτεΐνη PLCζΔXY-XYδ1, παρόμοια με την PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1, δε συνδέεται με λιποσώματα που δεν περιείχαν φωσφοϊνοσιτίδια ή περιείχαν 1 % PtdInsP₂, όμως η σύνδεση σε

λιποσώματα που περιείχαν 5% PtdIns(3)P ήταν αρκετά ασθενέστερη (~40%). Τέλος, η χιμαιρική πρωτεΐνη PLCζΔC2-C2δ1 δεν εμφάνισε σύνδεση με λιποσώματα που δεν περιείχαν φωσφοϊνοσιτίδια ή που περιείχαν 5 % PtdIns(3)P, ενώ παρατηρήθηκε μια αδύναμη σύνδεση (~25%) σε λιποσώματα που περιέχουν 1% PtdInsP₂. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο συνδέτης XY είναι υπεύθυνος για τη φυσιολογική αλληλεπίδραση PLCζ με το υπόστρωμά της, PtdInsP₂, ενώ η δομική περιοχή C2 συμβάλλει στην αλληλεπίδραση της PLCζ με την PtdIns(3)P (Σχήμα 3.13).



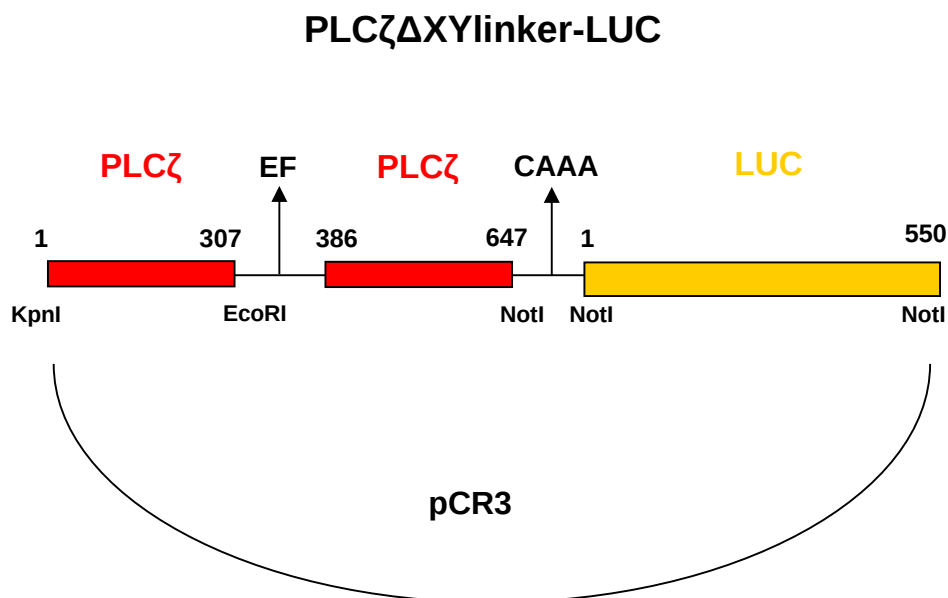
Σχήμα 3.13: Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-PLCζ, NusA-6His-PHδ1/PLCζ, NusA-6His-EFδ1/PLCζ, NusA-6His-PLCζ/XYlinkerδ1, NusA-6His- PLCζ-XYδ1, NusA-6His-PLCζ/C2δ1, NusA-6His-PLCδ1, NusA-6His-ΔPH/PLCδ1 και NusA

3.7. Κλωνοποίηση των PLCζΔXYlinker-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC στον πλασμιδιακό φορέα pCR3

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, η PLCζ είναι η μόνη ισομορφή PLC που διαθέτει έναν ιδιαίτερα θετικά φορτισμένο συνδέτη XY. Αντίθετα, οι PLCβ, δ και ε διαθέτουν έναν ιδιαίτερα αρνητικά φορτισμένο συνδέτη XY. Το 2008, οι Hicks και συνεργάτες πρότειναν ένα μηχανισμό αυτοαναστολής της δραστηριότητας των PLCβ, δ και ε μέσω της περιοχής του συνδέτη XY. Συγκεκριμένα, έδειξαν ότι οι αρνητικά φορτισμένοι συνδέτες XY αυτών των PLC εμποδίζουν την πρόσβαση του υποστρώματος PtdInsP₂ στο ενεργό κέντρο μέσω ενός συνδυασμού στερεοχημικού αποκλεισμού και ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων συνδετών XY και της αρνητικά φορτισμένης PtdInsP₂ [124]. Όπως, αναφέρθηκε επίσης στην Εισαγωγή, έχειδειχθεί ότι η PLCγ ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης εντός της δομικής περιοχής του συνδέτη XY, ο οποίος διαθέτει πρόσθετες ρυθμιστικές δομικές περιοχές σε σχέση με τις άλλες PLC που περιλαμβάνουν μια δομική περιοχή PH, δύο δομικές περιοχές SH2 και μία δομική περιοχή SH3 [79]. Το 2010, οι Gresset και συνεργάτες έδειξαν ότι ο γενικός μηχανισμός αυτοαναστολής της δραστηριότητας των PLC μέσω της περιοχής του συνδέτη XY ισχύει και για τις PLCγ και συγκεκριμένα ότι είναι η δομική περιοχή SH2 στο καρβοξυτελικό άκρο του συνδέτη XY που διαδραματίζει τον αυτοανασταλτικό αυτό ρόλο [125].

Ο μηχανισμός ρύθμισης της δραστηριότητας της PLCζ στο εσωτερικό των ωαρίων είναι επί του παρόντος άγνωστος. Η εμπλοκή του συνδέτη XY στη ρύθμιση της δραστηριότητας των άλλων PLC έκανε ιδιαίτερα δελεαστική, τη διερεύνηση της υπόθεσης ο συνδέτης XY της PLCζ να ρυθμίζει τη δραστηριότητά της. Για να μελετηθεί αυτή η υπόθεση, χρησιμοποιήθηκαν η PLCζ και μια ελλειμματική της μορφή, από την οποία απουσιάζει ο συνδέτης XY και αναλύθηκε η επίδραση αυτής της αποκοπής στην *in vivo* ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca²⁺ και την *in vitro* δραστηριότητα υδρόλυσης PtdInsP₂. Για συγκριτική μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν η PLCδ1, για την οποία είναι ήδη γνωστό ότι ισχύει ο μηχανισμός αυτοαναστολής μέσω του συνδέτη X και μια ελλειμματική της μορφή, από την οποία

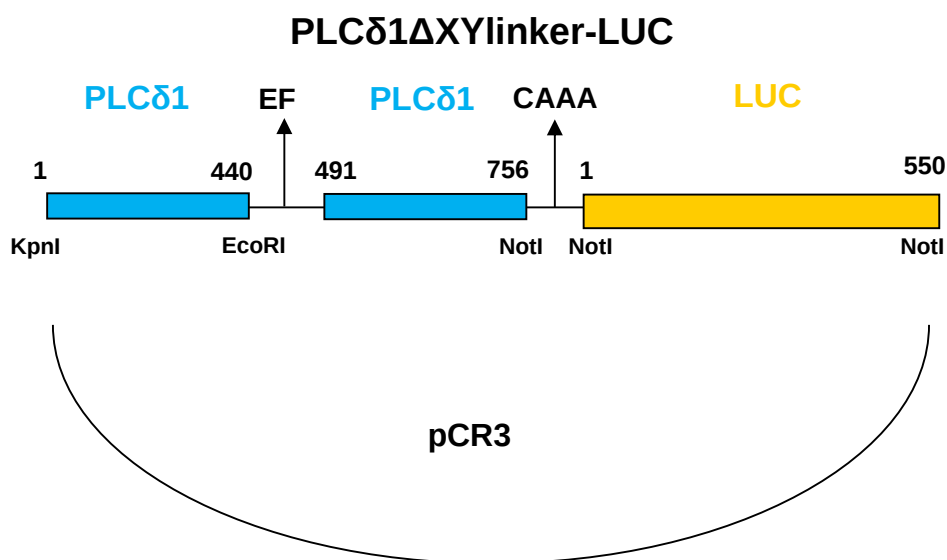
απουσιάζει ο συνδέτης XY και αναλύθηκε η επίδραση αυτής της αποκοπής στην *in vivo* ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} και την *in vitro* δραστικότητα υδρόλυσης PtdInsP_2 (Σχήμα 3.14).



Σχήμα 3.14: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCΖΔXYlinker-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τα πρώτα 307 αμινοξέα της PLCΖ (PLCΖ^{1-307}) ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας, ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-2-mPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI στο 5' άκρο και ο Z307R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες KpnI και EcoRI. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την PLCΖ^{1-307} στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τα τελευταία 262 αμινοξέα της PLCΖ ($\text{PLCΖ}^{386-647}$) χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-mPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z386EcoRIF που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική

ενδονουκλεάση EcoRI στο 5' άκρο και ο Z647R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-PLCζ¹⁻³⁰⁷, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-PLCζ¹⁻³⁰⁷ κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και NotI. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-PLCζ¹⁻³⁰⁷-PLCζ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷ που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GAATTC) μεταξύ της αλληλουχίας PLCζ¹⁻³⁰⁷ και της αλληλουχίας PLCζ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷. Τέλος, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας pCR3-PLCζ¹⁻³⁰⁷-PLCζ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-PLCζ¹⁻³⁰⁷-PLCζ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-PLCζ¹⁻³⁰⁷-PLCζ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας PLCζ³⁸⁶⁻⁶⁴⁷ και της LUC.

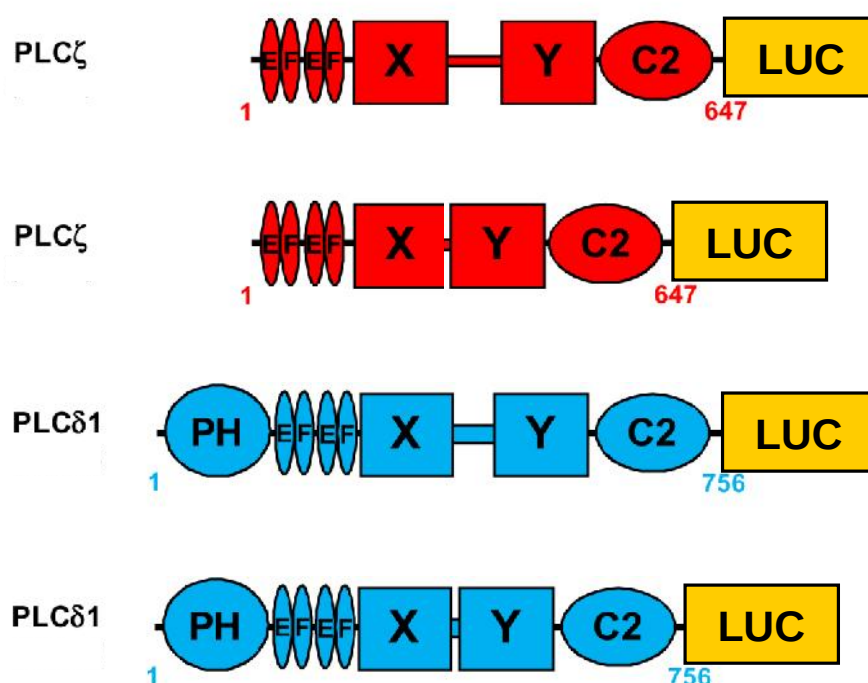


Σχήμα 3.15: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας PLCδ1ΔXYlinker-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τα πρώτα 440 αμινοξέα της PLCδ1 (PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰) ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας, ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-rPLCδ1. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο D1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 5' άκρο και ο D440R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και EcoRV. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰ στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τα τελευταία 266 αμινοξέα της PLCδ1 (PLCζ⁴⁹¹⁻⁷⁵⁶) χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-rPLCδ1. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο D491F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 5' άκρο και ο D756R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰ κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRV και NotI. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰-PLCζ⁴⁹¹⁻⁷⁵⁶ που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GATATC) μεταξύ της αλληλουχίας PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰ και της αλληλουχίας PLCζ⁴⁹¹⁻⁷⁵⁶. Τέλος, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας pCR3-PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰-PLCζ⁴⁹¹⁻⁷⁵⁶. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰-PLCζ⁴⁹¹⁻⁷⁵⁶, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-PLCδ1¹⁻⁴⁴⁰-PLCζ⁴⁹¹⁻⁷⁵⁶ -LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας PLCζ⁴⁹¹⁻⁷⁵⁶ και της LUC.

3.8. Έκφραση των PLCζΔXYlinker-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC σε ωάρια ποντικού

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση των επιθυμητών αλληλουχιών στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, παρασκευάστηκαν τα cRNA που κωδικοποιούν για τις χιμαιρικές πρωτεΐνες PLCζΔXYlinker-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC (σχήμα 3.16). Επιπλέον, παρασκευάστηκαν τα cRNA που κωδικοποιούν για τις PLCζ-LUC και PLCδ1-LUC, που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCR3-PLCζ-LUC και pCR3-PLCδ1-LUC ήταν μία ευγενική παραχώρηση του Δρος Μιχαήλ Νομικού.



Σχήμα 3.16: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών PLCζ-LUC, PLCζΔXYlinker-LUC, PLCδ1-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC που εκφράστηκαν σε ωάρια ποντικού

Τα cRNA παρασκευάστηκαν με τη βοήθεια του mMACHINE[®] RNA transcription system και ακολούθησε μικροέγχυση των cRNA σε ωάρια ποντικού. Η συμπεριφορά του Ca²⁺ στο εσωτερικό των ωαρίων παρακολουθήθηκε για 4 συναπτές ώρες μετά την μικροέγχυση, ενώ στη συνέχεια μετρήθηκε η φωταύγεια των ωαρίων. Τα δεδομένα που αφορούσαν στη συμπεριφορά του Ca²⁺ στα ωοκύτταρα καταχωρούνταν ως

έγκυρα μόνο εφόσον τα ωάρια εμφάνιζαν φωταύγεια. Το σχήμα 3.17 και ο πίνακας 3.3 συνοψίζουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικροέγχυσης cRNA σε ωάρια ποντικού.

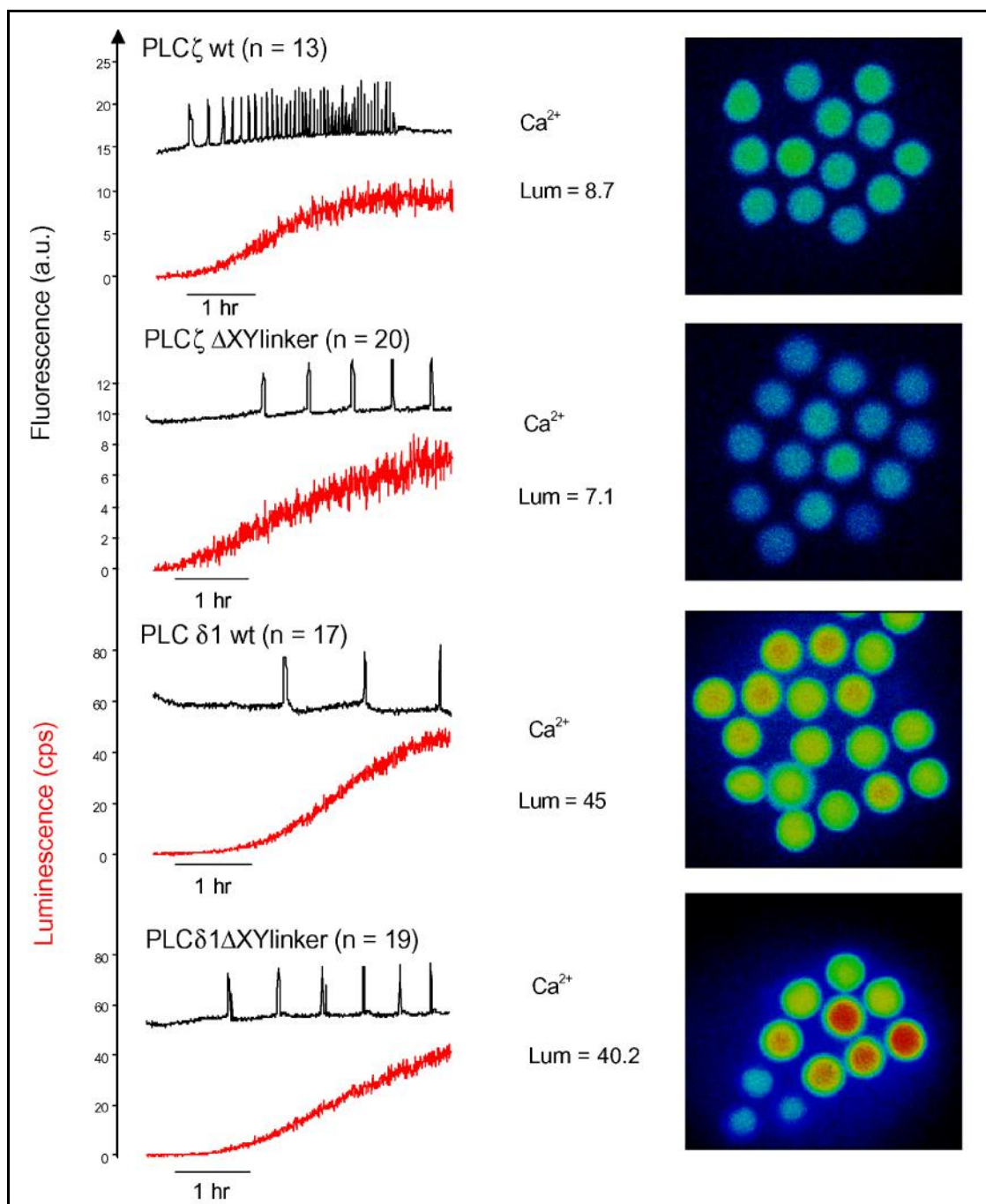
Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ-LUC σε 13 ωάρια ποντικού προκάλεσε ταλαντώσεις Ca^{2+} (24,5 κορυφές/2 ώρες), παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται κατά τη γονιμοποίηση. Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε σε φωταύγεια που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική έκφραση 0,52 cps (counts per second).

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζΔXYlinker-LUC σε 20 ωάρια ποντικού προκάλεσε 85% μείωση στη συχνότητα των ταλαντώσεων Ca^{2+} (3,4 κορυφές/2 ώρες), σε σχέση με την PLCζ αγρίου τύπου. Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε σε φωταύγεια 3,6 cps, δηλαδή απαιτήθηκε 7 φορές μεγαλύτερη ποσότητα PLCζΔXYlinker-LUC συγκριτικά με την ποσότητα της PLCζ-LUC που χρειάστηκε να εκφραστεί για την πρόκληση της πρώτης κορυφής.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCδ1-LUC σε 17 ωάρια ποντικού προκάλεσε μόλις 1,8 ταλαντώσεις Ca^{2+} (2 κορυφές/2 ώρες). Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε σε φωταύγεια που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική έκφραση 20,4 cps (counts per second).

Τέλος, η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCδ1ΔXYlinker-LUC σε 19 ωάρια ποντικού προκάλεσε 3,3 ταλαντώσεις Ca^{2+} (3,3 κορυφές/2 ώρες). Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε σε φωταύγεια 17,2 cps.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η απαλοιφή της δομικής περιοχής του συνδέτη XY από την αλληλουχία της PLCζ αλλάζει δραματικά την ικανότητα της να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} στα ωάρια ποντικών αφού μειώνει τη συχνότητα των ταλαντώσεων Ca^{2+} και αυξάνει την ποσότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται να εκφραστεί για την εκδήλωση της πρώτης κορυφής. Αντίθετα, η απαλοιφή της δομικής περιοχής του συνδέτη XY από την αλληλουχία της PLCδ1 αυξάνει την ικανότητά της να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} στα ωάρια ποντικών, καταλήγοντας σε διπλασιασμό της συχνότητας ταλαντώσεων Ca^{2+} .



Σχήμα 3.17: Η συμπεριφορά του Ca^{2+} (μαύρες καταγραφές) και η φωταύγεια ωαρίων ποντικού (κόκκινες καταγραφές) που ενέθηκαν με cRNA που κωδικοποιεί για τις PLC ζ -LUC, PLC ζ Δ XYlinker-LUC, PLC δ 1-LUC και PLC δ 1 Δ XYlinker-LUC

Πίνακας 3. 3: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα μικροέγχυσης cRNA που κωδικοποιούν για τις PLCζ-LUC, PLCδ1-LUC, PLCζΔXYlinker-LUC και PLCδ1ΔXYlinker-LUC σε ωάρια ποντικού

cRNA	ΑΡΙΘΜΟΣ ΩΑΡΙΩΝ	ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ Ca^{2+} (ΚΟΡΥΦΕΣ/ 2 ΩΡΕΣ)	ΜΕΓΙΣΤΗ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (cps)	ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΚΟΡΥΦΗ (cps)
PLCζ	13	$24,5 \pm 0,88$	$8,7 \pm 1,16$	$0,5 \pm 0,06$
PLCζΔXYlinker	20	$3,4 \pm 0,27$	$7,1 \pm 0,20$	$3,6 \pm 0,20$
PLCδ1	17	$1,8 \pm 0,10$	$45,0 \pm 1,7$	$20,4 \pm 3,00$
PLCδ1ΔXYlinker	19	$3,3 \pm 0,20$	$40,2 \pm 1,7$	$17,2 \pm 0,35$

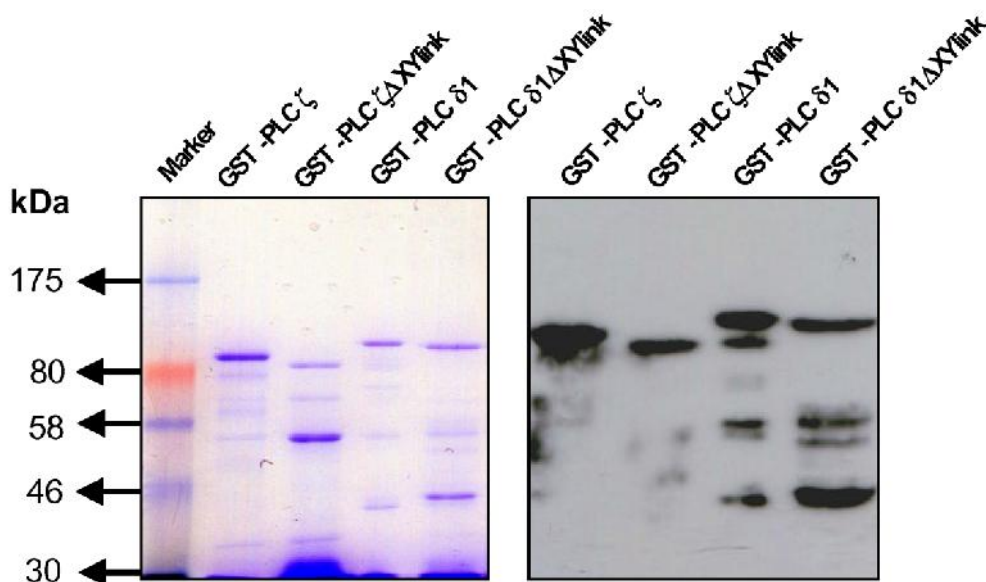
3.9. Κλωνοποίηση των PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1

Για να μελετηθεί το αποτέλεσμα που είχε η απαλοιφή του συνδέτη XY από τις αλληλουχίες των PLCζ και PLCδ1 στην *in vitro* ικανότητα υδρόλυσης PtdInsP_2 , αποφασίστηκε η κλωνοποίηση των αλληλουχιών που κωδικοποιούν για τις PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1 που διαθέτει την ετικέτα GST. Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCR3-PLCζΔXYlinker-LUC και pCR3-PLCδ1ΔXYlinker-LUC. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση Sall στο 5' άκρο (ZSallIF και d1SallIF) και την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο (ZNotIF και d1NotIR). Τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν στον pGEX-6P1, αφού πρώτα τόσο τα προϊόντα της PCR, όσο και ο pGEX-6P1 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες Sall και NotI.

3.10. Έκφραση και καθαρισμός των PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker

Οι πρωτεΐνες PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker εκφράστηκαν σε *Escherichia coli* Rosetta (DE3) κύτταρα. Η βέλτιστη έκφραση PLCζ,

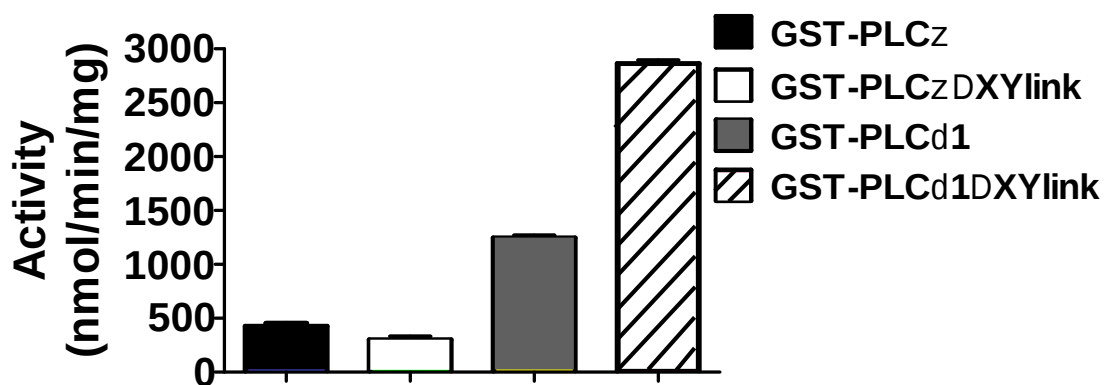
PLCδ1, PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker επιτεύχθηκε με ανάδευση των βακτηριακών καλλιέργειών στις 200rpm στους 37°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα έφτανε το 0,6 και ακολουθούσε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με την προσθήκη 0,1 mM IPTG και 18 ώρες ανάδευσης στις 200rpm στους 16°C. Μετά το πέρας των 18 ωρών, οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για την ανάκτηση του ιζήματός τους και οι PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Παράλληλα, εκφράστηκαν και απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες PLCζ και PLCδ1 που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τη σύγκριση των ενζυμικών ιδιοτήτων των χιμαιρικών πρωτεϊνών με τις δικές τους. Το Σχήμα 3.18 δείχνει τις καθαρισμένες GST-πρωτεΐνες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (αριστερό παράθυρο) και σε ανοσοαποτύπωμα κατά Western με αντι-GST αντίσωμα (δεξί παράθυρο). Το προβλεπόμενο μοριακό βάρος για τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker, συμπεριλαμβανομένης της ετικέτας GST ήταν 100, 94, 111 και 107 kDa, αντίστοιχα. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με τα προβλεπόμενα μοριακά βάρη παρατηρήθηκαν ως οι υψηλότερες ζώνες τόσο στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όσο και στο ανοσοαποτύπωμα κατά Western.



Σχήμα 3.18: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτής πολυακρυλαμιδίου 7% (αριστερό παράθυρο) και ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το αντίσωμα αντι-GST των πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker. Ηλεκτροφορήθηκε 1μg από κάθε πρωτεΐνη.

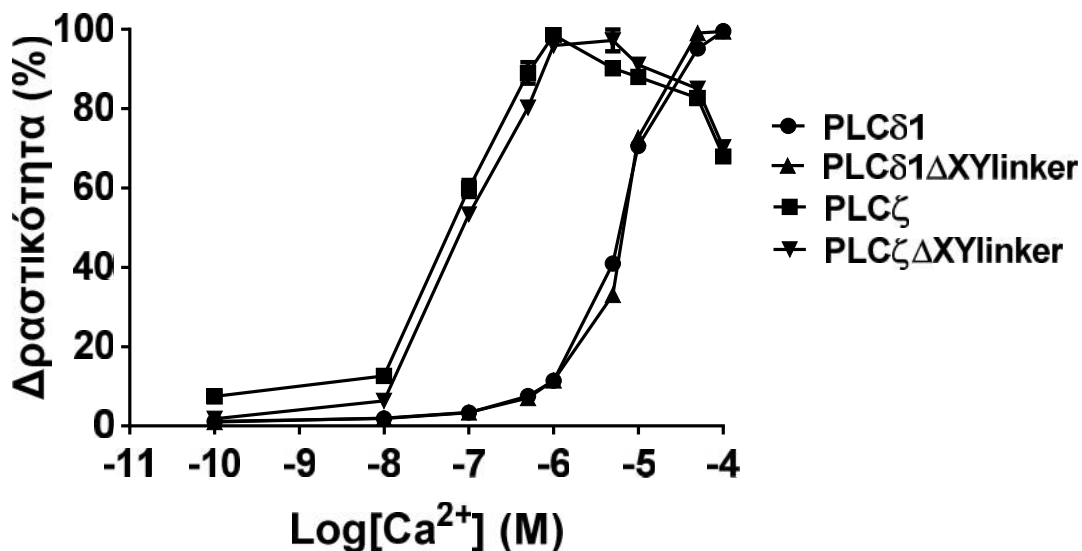
3.11. Επίδραση της απαλοιφής του συνδέτη XY στις ενζυμικές ιδιότητες της PLCζ

Η ενζυμική δραστηριότητα για κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία υδρόλυσης [^3H]PtdInsP₂ [123]. Οι δραστηριότητες των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν στο υπάρχον Ca²⁺ (χωρίς προσθήκη EGTA, ~1mM). Σαν αρνητικός μάρτυρας, απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε GST. Το ιστόγραμμα του Σχήματος 3.19 και ο πίνακας 3.4 συνοψίζουν τις τιμές δραστηριότητας που λήφθηκαν για κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Η PLCζΔXYlinker διατήρησε το 70% της δραστηριότητας της PLCζ αγρίου τύπου (302±58 έναντι 425±51 nmol/min/mg). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η δομική περιοχή του συνδέτη XY είναι απαραίτητη ώστε η PLCζ να επιτύχει μέγιστη δραστηριότητα. Αντίθετα, η PLCδ1ΔXYlinker έδειξε 2,3 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σύγκριση με την PLCδ1 αγρίου τύπου (2865±54 έναντι 1249±40 nmol/min/mg), συστήνοντας ένα διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης της ενζυμικής δραστηριότητας της μέσω του συνδέτη XY σε σχέση με την PLCζ. Οι τιμές δραστηριότητας (cpm) του αρνητικού μάρτυρα (NusA) έχουν αφαιρεθεί από τις παραπάνω τιμές. Ο υπολογισμός των δραστηριοτήτων έγινε όπως περιγράφεται παρακάτω. Η συνολική συγκέντρωση ^3H]PtdInsP₂ που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση ήταν γνωστή και αντιστοιχούσε σε γνωστή τιμή cpm. Με βάση τις τιμές cpm που έδωσαν οι αντιδράσεις για κάθε πρωτεΐνη έγινε η αναγωγή στην αντίστοιχη συγκέντρωση ^3H]PtdInsP₂ που καταλύουν. Οι τιμές που προκύπτουν διαιρούνται διά του χρόνου της αντίδρασης και οι νέες τιμές με την ποσότητα της κάθε πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε.



Σχήμα 3. 19: Ενζυμική δραστηριότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLC ζ , GST-PLC ζ ΔXYlinker, GST-PLC δ 1 και GST-PLC δ 1ΔXYlinker. Είκοσι pmol κάθε πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε δοκιμασία υδρόλυσης [3 H]PtdInsP $_2$ και η ραδιενέργεια του προϊόντος μετρήθηκε σε υγρό σπινθηριστή. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές παρτίδες πρωτεΐνης και για κάθε παρτίδα εις διπλούν

Για να μελετηθεί η χημική συγγένεια μεταξύ των GST-PLC ζ , GST-PLC ζ ΔXYlinker, GST-PLC δ 1 και GST-PLC δ 1ΔXYlinker και του υποστρώματος PtdInsP $_2$ υπολογίστηκε η σταθερά Km. Οι τιμές Km για την GST-PLC δ 1 αγρίου τύπου (93 μ M) και GST-PLC δ 1ΔXYlinker (63 μ M) ήταν πολύ παρόμοια. Αντίθετα, η τιμή Km για την GST-PLC ζ ΔXYlinker ήταν περίπου 36 φορές (3936 μ M) υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη της PLC ζ αγρίου τύπου (110 μ M). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η απαλοιφή του συνδέτη XY μειώνει δραματικά τη χημική συγγένεια της PLC ζ για το υπόστρωμα PtdInsP $_2$.



Σχήμα 3.20: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker

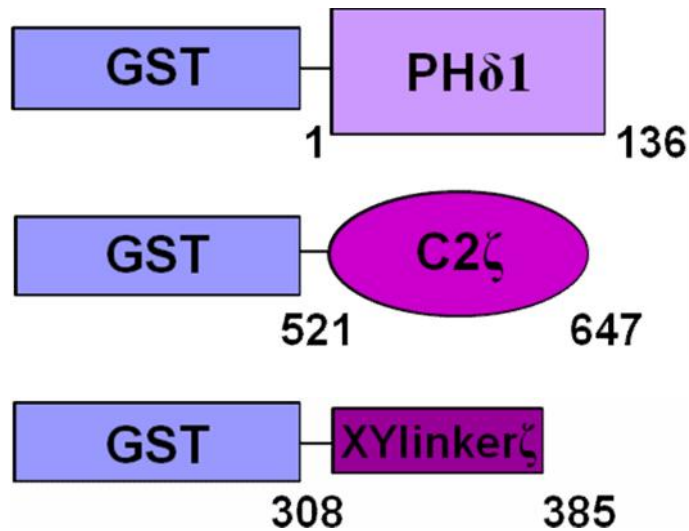
Για να μελετηθεί το αποτέλεσμα που είχε η απαλοιφή της δομικής περιοχής του συνδέτη XY στην ευαισθησία της PLCζ και PLCδ1 στο Ca^{2+} , εξετάστηκε η ικανότητα των PLCζΔXYlinker και PLCδ1ΔXYlinker να υδρολύουν $[\text{}^3\text{H}]\text{PtdInsP}_2$ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Ca^{2+} , κυμαινόμενες από 0,1 nM έως 0,1 mM. Η παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της υδρολυτικής ικανότητας των παραπάνω πρωτεϊνών παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} ήταν η EC_{50} . Η τιμή EC_{50} ήταν σχεδόν ίδια για την PLCζ αγρίου τύπου και την PLCζΔXYlinker (91nM έναντι 84nM), (σχήμα 3.20, πίνακας 3.4). Η απαλοιφή του συνδέτη XY από την αλληλουχία της PLCδ1 τροποποίησε ελαφρώς τη τιμή EC_{50} από 6,3 σε 7,0 μM . Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν σαφώς ότι η απαλοιφή της δομικής περιοχής του συνδέτη XY δεν επηρεάζει την ευαισθησία της PLCζ στο Ca^{2+} .

Πίνακας 3.4: Συνοπτική παρουσίαση των ενζυμικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζΔXYlinker, GST-PLCδ1 και GST-PLCδ1ΔXYlinker

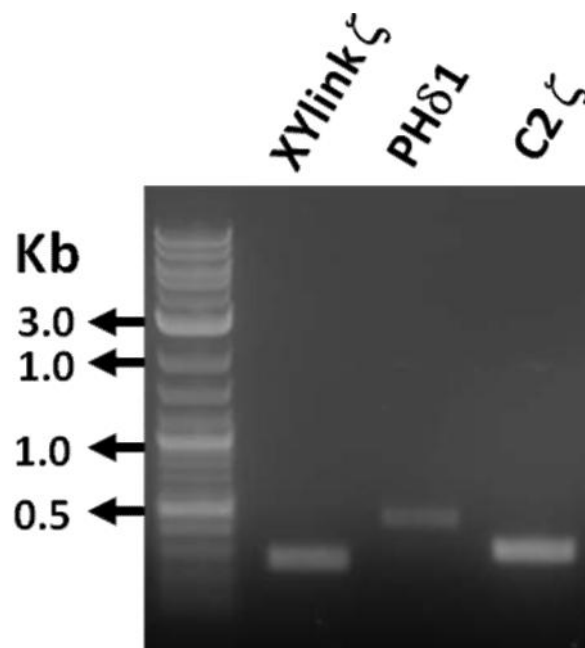
Πρωτεΐνη	Δραστικότητα (nmol/min/mg)	EC ₅₀ (nM)	K _m (mM)
PLCζ	425±51	91	110
PLCζΔXYlinker	302±58	84	3936
PLCδ1	1249±40	6289	93
PLCδ1ΔXYlinker	2865±54	6973	63

3.12. Κλωνοποίηση της δομικής περιοχής του συνδέτη XY της PLCζ, της δομικής περιοχής C2 της PLCζ και της δομικής περιοχής PH της PLCδ1 στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1

Κατά τη δοκιμασία σύνδεσης των χιμαιρικών πρωτεϊνών PLCζ/PLCδ1 σε λιποσώματα, οι δομικές περιοχές που ξεχώρισαν για την ικανότητα τους να συνδέονται σε φωσφοινοσιτίδια ήταν η δομική περιοχή του συνδέτη XY της PLCζ που συνδέεται ισχυρά με PtdInsP₂ και η δομική περιοχή C2 της PLCζ που συνδέεται ισχυρά με PtdIns(3)P. Για να μελετηθούν οι δομικές αυτές περιοχές σαν αυτούσιες πρωτεϊνικές οντότητες ως προς τη χημική τους συγγένεια με το PtdInsP₂, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν για αυτές κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1. Επίσης, στον ίδιο πλασμιδιακό φορέα κλωνοποιήθηκε η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή PH της PLCδ1 που είναι γνωστό ότι συνδέεται ισχυρά με PtdInsP₂ και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Ο pGEX-6P1 φέρει την ετικέτα GST και δίνει τη δυνατότητα καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας. Το σχήμα 3.21 απεικονίζει σχηματικά τις τρεις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-PHδ1, GST-C2ζ και GST-XYlinkerζ καθώς και τις αντίστοιχες συντεταγμένες τους. Το σχήμα 3.22 δείχνει την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης με PCR για τις GST-PHδ1, GST-C2ζ και GST-XYlinkerζ.



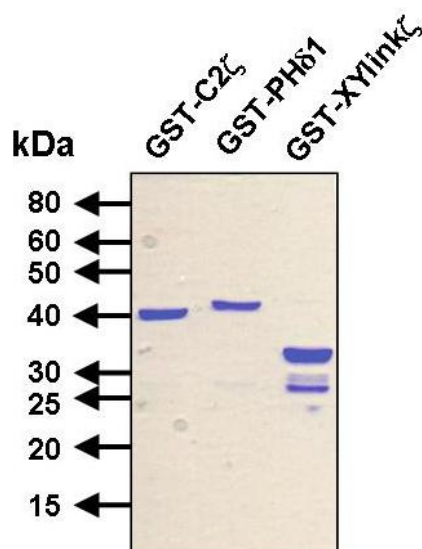
Σχήμα 3.21: Σχηματική απεικόνιση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PHδ1, GST-C2ζ και GST-XYlinkerζ που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες σύνδεσης σε λιπίδια



Σχήμα 3.22: Πηκτή αгарόζης 1% που δείχνει επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης των αλληλουχιών XYlinkerζ, PHδ1 και C2ζ στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1. Στη διαδρομή 1 ηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας μοριακών βαρών.

3.13. Έκφραση και καθαρισμός της δομικής περιοχής του συνδέτη XY της PLCΖ, της δομικής περιοχής C2 της PLCΖ και της δομικής περιοχής PH της PLCδ1

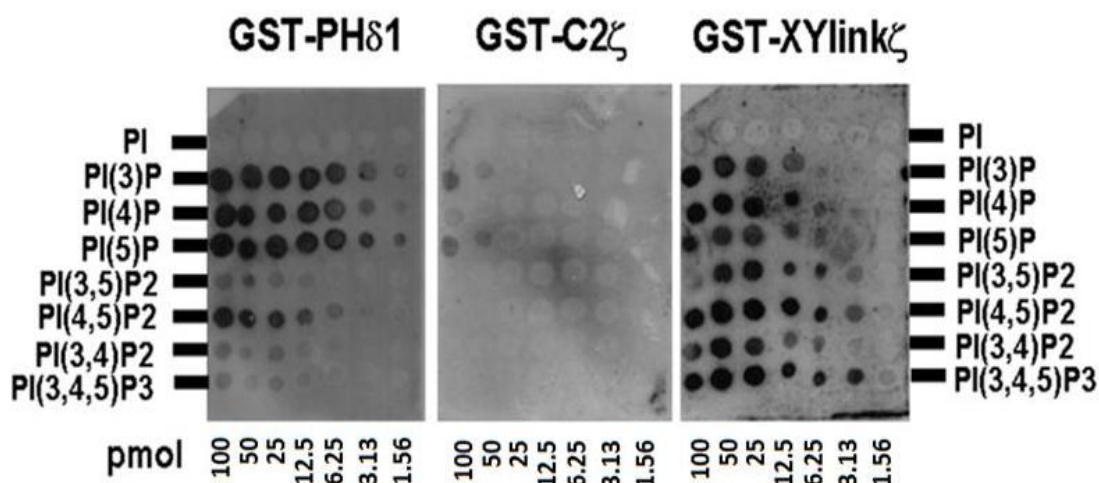
Οι πρωτεΐνες GST-PHδ1, GST-C2Ζ και GST-XYlinkerΖ εκφράστηκαν σε *Escherichia coli* Rosetta (DE3) κύτταρα. Η βέλτιστη έκφραση GST-PHδ1, GST-C2Ζ και GST-XYlinkerΖ επιτεύχθηκε με ανάδευση των βακτηριακών καλλιέργειών στις 200rpm στους 37°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα έφτανε το 0,6 και ακολουθούσε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με την προσθήκη 0,1 mM IPTG και 18 ώρες ανάδευσης στις 200rpm στους 16°C. Μετά το πέρας των 18 ωρών, οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για την ανάκτηση του ιζήματός τους και οι GST-PHδ1, GST-C2Ζ και GST-XYlinkerΖ απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Το Σχήμα 3.23 δείχνει τις καθαρισμένες GST-πρωτεΐνες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (αριστερό παράθυρο) και σε ανοσοαποτύπωμα κατά Western με αντι-GST αντίσωμα (δεξί παράθυρο). Το προβλεπόμενο μοριακό βάρος συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης GST (26 kDa), για το GST-XYlinkerΖ, GST-C2Ζ και GST-PHδ1, ήταν 34, 39 και 41 kDa αντίστοιχα. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με τις προβλεπόμενες μοριακές μάζες παρατηρήθηκαν οι κύριες ζώνες τόσο στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου, όσο και στο ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Επιπλέον, μια χαμηλότερη ζώνη μοριακού βάρους ~26 kDa ήταν επίσης παρούσα, που αντιστοιχούσε στο μοριακό βάρος που έχει η GST μόνη της, γεγονός που υποδηλώνει ότι κάποια αποικοδόμηση πρωτεΐνης συνέβη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού.



Σχήμα 3.23: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτής πολυακρυλαμιδίου 7% των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-C2ζ, GST-PHδ1 και GST-XYlinkerζ.

3.14. Σύνδεση της δομικής περιοχής του συνδέτη XY και της δομικής περιοχής C2 της PLCζ στην PtdInsP₂

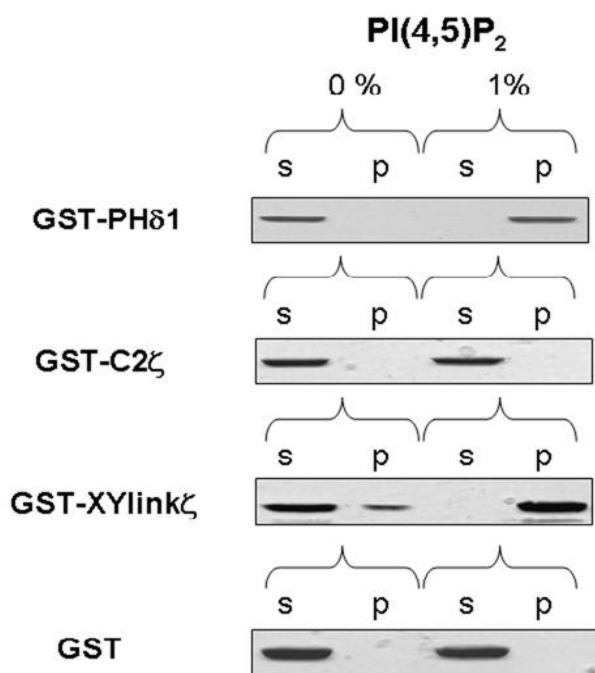
Για τη μελέτη της ικανότητας της δομικής περιοχής του συνδέτη XY και της δομικής περιοχής C2 να συνδέονται με το PtdInsP₂ χρησιμοποιήθηκαν δύο προσεγγίσεις, η επίστρωση πρωτεΐνης σε λιπίδια (protein-lipid overlay) και η δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα (liposome binding assay). Η επίστρωση πρωτεΐνης σε λιπίδια, χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμη μεμβράνη ενσταλαγμένη με συστοιχίες φωσφοινοσιτιδίων, έδειξε ότι η GST-XYlinkerζ ήταν ικανή να συνδέεται με όλα τα φωσφοϊνοσιτιδία εκτός από την PtdIns (σχήμα 3.24). Η ισχυρότερη αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε με τα πολυσθενή φωσφοϊνοσιτιδία, PtdInsP₂ και PtdIns(3,4,5)P₃, ακόμη και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (π.χ. σε 3,13 pmol). Αντίθετα, η GST-C2ζ συνδέεται πολύ ασθενώς μόνο σε PtdIns(3)P και PtdIns(5)P στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (50-100 pmol), ενώ η GST-PHδ1 επέδειξε ισχυρή σύνδεση ειδικά για τα τρία μονοφωσφορικά και φυσικά την PtdInsP₂, όπως ήταν αναμενόμενο [85]. Τα αποτελέσματα της επίστρωσης πρωτεϊνών σε λιπίδια υποδηλώνουν ότι η δομική περιοχή του συνδέτη XY έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με ένα ευρύ φάσμα φωσφοϊνοσιτιδίων που εκτείνεται σε μονο- δι- και τριφωσφορικά, ενώ η δομική περιοχή C2 εμφανίζει αμελητέα σύνδεση στα φωσφοινοσιτιδία.



Σχήμα 3.24: Επίστρωση των GST-XYlinkerζ, GST-C2ζ και GST-PHδ1 σε λιπίδια

Η ικανότητα της GST-XYlinkerζ και GST-C2ζ να συνδέονται με PtdInsP₂ διερευνήθηκε και με τη δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα χρησιμοποιώντας μονοστοιβαδικά λιποσώματα που αποτελούνται από PC:CHOL:PE (4:2:1), χωρίς φωσφοϊνοσιτίδια ή με την ενσωμάτωση 1 % PtdInsP₂. Για αυτή την δοκιμασία σύνδεσης σε λιπίδια, η GST-PHδ1 λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας, ενώ η πρωτεΐνη GST ήταν ο αρνητικός μάρτυρας. Η GST-PHδ1 εμφάνισε ισχυρή σύνδεση με λιποσώματα που περιείχαν 1% PtdInsP₂ (σχήμα 3.25, πρώτη σειρά) και παρέμεινε στο υπερκείμενο απουσία PtdInsP₂, ενώ η GST δεν παρουσίασε καμία ειδική σύνδεση σε λιποσώματα με ή χωρίς PtdInsP₂ (Σχήμα 3.25, τέταρτη σειρά). Για την GST-XYlinkerζ, η πλειονότητα (~90%) της ανιχνεύθηκε στο υπερκείμενο του διαλύματος των λιποσωμάτων που δεν περιείχαν PtdInsP₂. Αντίθετα, η παρουσία μιας σχεδόν φυσιολογικής συγκέντρωσης PtdInsP₂ (1%) στα λιποσώματα παρείχε την ικανότητα στην GST-XYlinkerζ να συνδέεται έντονα μαζί τους, καθώς όλη η GST-XYlinkerζ ανιχνεύθηκε στο ίζημα του διαλύματος των λιποσωμάτων (Σχήμα 3.25, τρίτη σειρά). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σύνδεση της GST-C2ζ με λιποσώματα με ή χωρίς PtdInsP₂ (Εικόνα 3,25, δεύτερη σειρά). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με τη εφαρμογή δύο διαφορετικών δοκιμασιών σύνδεσης σε λιπίδια παρείχαν ομόφωνες αποδείξεις ότι μόνο η δομική περιοχή του

συνδέτη XY και όχι η δομική περιοχή C2 έχει την ικανότητα να συνδέεται με την PtdInsP₂.

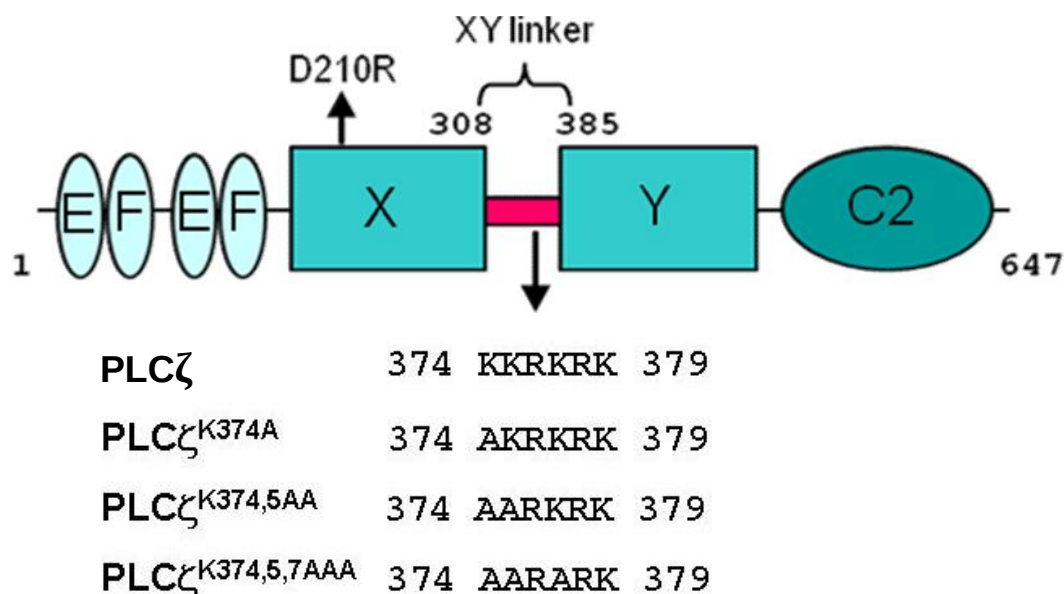


Σχήμα 3.25: Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PHδ1, GST-C2ζ και GST-XYlinkerζ. Η πρωτεΐνη GST χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας

3.15. Έκφραση των PLCζ^{K374A}-LUC, PLCζ^{K374,5AA}-LUC και PLCζ^{K374,5,7AAA}-LUC σε ωάρια ποντικού

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η σημαντικότητα της δομικής περιοχής του συνδέτη XY της PLCζ και συγκεκριμένα του τμήματος εκείνου που περιλαμβάνει πολύ βασικά αμινοξέα, εκτελέστηκε σημείο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση για να παραχθούν τρεις συσσωρευμένες μεταλλάξεις εντός αυτής της θετικώς φορτισμένης περιοχής της PLCζ. Έτσι, τα τρία κατάλοιπα λυσίνης στις θέσεις K374, K375 και K377 της αλληλουχίας της PLCζ αντικαταστάθηκαν διαδοχικά από το ουδέτερο αμινοξύ αλανίνη για τη δημιουργία τριών εκδοχών της PLCζ αγρίου τύπου με μια (PLCζ^{K374A}), δύο (PLCζ^{K374,5AA}) και τρεις (PLCζ^{K374,5,7AAA}) μεταλλάξεις στην αλληλουχία της (Σχήμα 3.26). Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα των PLCζ^{K374A}, PLCζ^{K374,5AA} και PLCζ^{K374,5,7AAA} να προκαλούν ταλαντώσεις Ca²⁺ σε ωάρια ποντικού, η μεταλλαγμένες αλληλουχίες κλωνοποιήθηκαν στον

πλασμιδιακό φορέα pCR3, μέσω του οποίου επιτεύχθηκε η παραγωγή cRNA για μικροέγχυση σε ωάρια ποντικού. Στο 5' άκρο των μεταλλαγμένων αλληλουχιών κλωνοποιήθηκε η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-PLCζ-LUC που ήταν μία ευγενική παραχώρηση του Δρος Μιχαήλ Νομικού.



Σχήμα 3.26: Σχηματική απεικόνιση της PLCζ με έμφαση στις μεταλλάξεις που εισήχθησαν στη δομική περιοχή του συνδέτη XY (K374A, K374,5AA, K374,5,7AAA)

Τα cRNA παρασκευάστηκαν με τη βοήθεια του mMMESSAGE mMACHINE® RNA transcription system και ακολούθησε μικροέγχυση τους σε ωάρια ποντικού, Η συμπεριφορά του Ca^{2+} στο εσωτερικό των ωαρίων παρακολουθήθηκε για 4 συναπτές ώρες μετά την μικροέγχυση, ενώ στη συνέχεια μετρήθηκε η φωταύγεια των ωαρίων. Τα δεδομένα που αφορούσαν στη συμπεριφορά του Ca^{2+} στα ωοκύτταρα καταχωρούνταν ως έγκυρα μόνο εφόσον τα ωάρια εμφάνιζαν φωταύγεια. Το Σχήμα 3.27 και ο Πίνακας 3.5 συνοψίζουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικροέγχυσης cRNA σε ωάρια ποντικού.

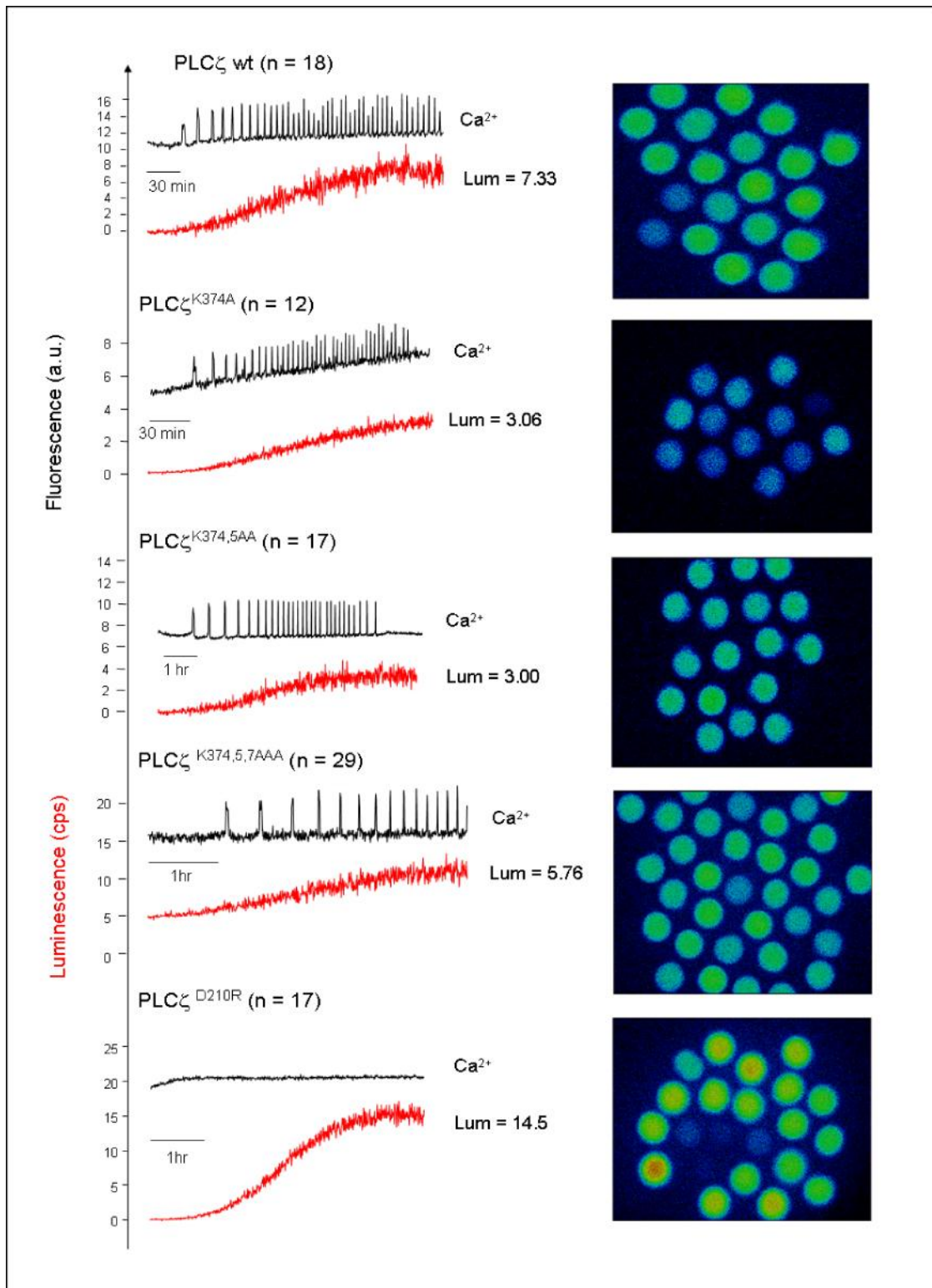
Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ-LUC σε 17 ωάρια ποντικού προκάλεσε 19 ταλαντώσεις Ca^{2+} σε 2 ώρες. Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε ~30 min μετά τη μικροέγχυση σε φωταύγεια 0,35 cps.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ^{K374A}-LUC σε 12 ώρια ποντικού προκάλεσε 17 ταλαντώσεις Ca²⁺ σε 2 ώρες, πολύ κοντά στον αριθμό ταλαντώσεων που προκαλεί η PLCζ αγρίου τύπου. Παρόμοια με την PLCζ αγρίου τύπου, η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε ~30 min μετά τη μικροέγχυση σε φωταύγεια που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική έκφραση 0,28 cps.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ^{K374,5AA}-LUC σε 16 ώρια ποντικού προκάλεσε ~60% μείωση στη συχνότητα των ταλαντώσεων Ca²⁺ (8 κορυφές/2 ώρες) σε σχέση με την PLCζ αγρίου τύπου. Μάλιστα, η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε ~65 min μετά τη μικροέγχυση σε φωταύγεια που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική έκφραση 0,93 cps.

Τέλος, η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ^{K374,5,7AAA}-LUC σε 29 ώρια ποντικού προκάλεσε 86% μείωση στη συχνότητα των ταλαντώσεων Ca²⁺ (2,6 κορυφές/2 ώρες) σε σχέση με την PLCζ αγρίου τύπου. Και πάλι υπήρχε καθυστέρηση ~65 min ως προς την εμφάνιση της πρώτης κορυφής, ενώ η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε σε φωταύγεια 1,43 cps.

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η υποκατάσταση δύο ή περισσότερων καταλοίπων λυσίνης σε αλανίνη εντός του θετικώς φορτισμένου τμήματος του συνδέτη XY αλλάζει δραματικά την ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca²⁺ σε ώρια ποντικού μειώνοντας τη συχνότητα ταλαντώσεων Ca²⁺ και αυξάνοντας τόσο τον χρόνο, όσο και την ποσότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που απαιτείται να εκφραστεί για την πρόκληση της πρώτης κορυφής.



Σχήμα 3.27: Η συμπεριφορά του Ca^{2+} (μαύρες καταγραφές) και η φωταύγεια ωαρίων ποντικού (κόκκινες καταγραφές) που ενέθηκαν με cRNA που κωδικοποιεί για τις PLC ζ -LUC, PLC ζ^{K374A} -LUC, PLC $\zeta^{\text{K374,5AA}}$ -LUC και PLC $\zeta^{\text{K374,5,7AAA}}$ -LUC

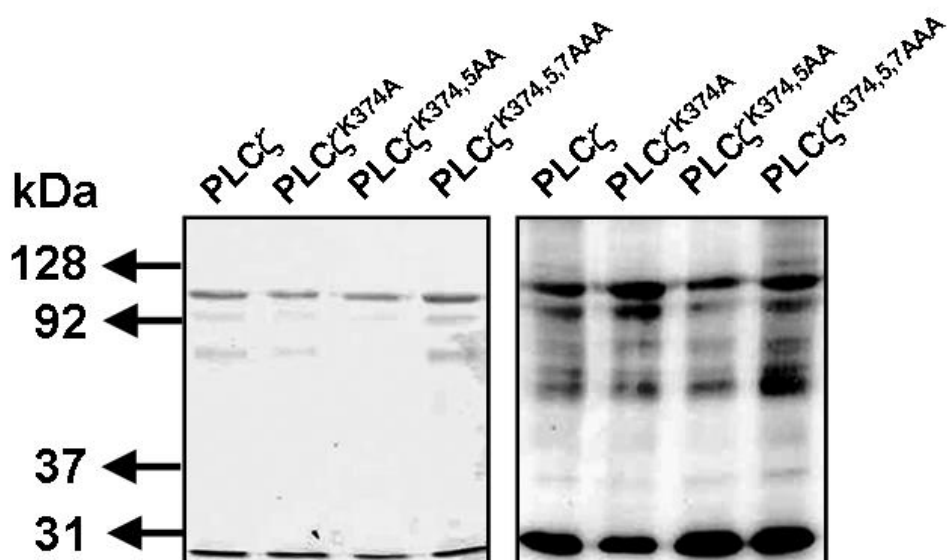
Πίνακας 3.5: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα μικροέγχυσης cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ-LUC, PLCζ^{K374A}-LUC, PLCζ^{K374,5AA}-LUC ΚΑΙ PLCζ^{K374,5,7AAA}-LUC σε ωάρια ποντικού

cRNA	ΑΡΙΘΜΟΣ ΩΑΡΙΩΝ	ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ Ca ²⁺ (ΚΟΡΥΦΕΣ/ 2 ΩΡΕΣ)	ΜΕΓΙΣΤΗ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (cps)	ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΚΟΡΥΦΗ (cps)	ΧΡΟΝΟΚΑ ΘΥΣΤΕΡΗ ΣΗ (min)
PLCζ	17	19 ± 0,14	7,3 ± 0,38	0,35 ± 0,037	30
PLCζ ^{K374A}	12	17 ± 1,0	3,1 ± 0,23	0,28 ± 0,03	30
PLCζ ^{K374,5AA}	16	8,0 ± 0,30	3,0 ± 0,10	0,93 ± 0,07	65
PLCζ ^{K374,5,7AAA}	29	2,6 ± 0,50	5,8 ± 1,5	1,43 ± 0,30	65
PLCζ ^{D210R}	17	0	14,5 ± 0,87	0	-

3.16. Έκφραση και καθαρισμός των PLCζ^{K374A}, PLCζ^{K374,5AA} ΚΑΙ PLCζ^{K374,5,7AAA}

Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις PLCζ^{K374A}, PLCζ^{K374,5AA} και PLCζ^{K374,5,7AAA} κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1 που φέρει την ετικέτα GST. Οι GST-PLCζ^{K374A}, GST-PLCζ^{K374,5AA} και GST-PLCζ^{K374,5,7AAA} εκφράστηκαν σε *Escherichia coli* Rosetta (DE3) κύτταρα. Η βέλτιστη έκφραση GST-PLCζ^{K374A}, GST-PLCζ^{K374,5AA} και GST-PLCζ^{K374,5,7AAA} επιτεύχθηκε με ανάδευση των βακτηριακών καλλιιεργειών στις 200rpm στους 37°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα έφτανε το 0,6 και ακολουθούσε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με την προσθήκη 0,1 mM IPTG και 18 ώρες ανάδευσης στις 200rpm στους 16°C. Μετά το πέρας των 18 ωρών, οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για την ανάκτηση του ιζήματός τους και οι GST-PLCζ^{K374A}, GST-PLCζ^{K374,5AA} και GST-PLCζ^{K374,5,7AAA} απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Το Σχήμα 3.28 δείχνει τις καθαρισμένες GST-πρωτεΐνες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (αριστερό παράθυρο) και σε ανοσοαποτύπωμα κατά Western με αντι-GST αντίσωμα (δεξί παράθυρο). Το προβλεπόμενο μοριακό βάρος συμπεριλαμβανομένης της ετικέτας GST (26 kDa), ήταν 100 kDa αντίστοιχα. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες με το προβλεπόμενο μοριακό βάρος παρατηρήθηκαν ως κύριες ζώνες τόσο στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όσο και στο ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Μια ζώνη που μεταναστεύει στα ~26 kDa τόσο στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου,

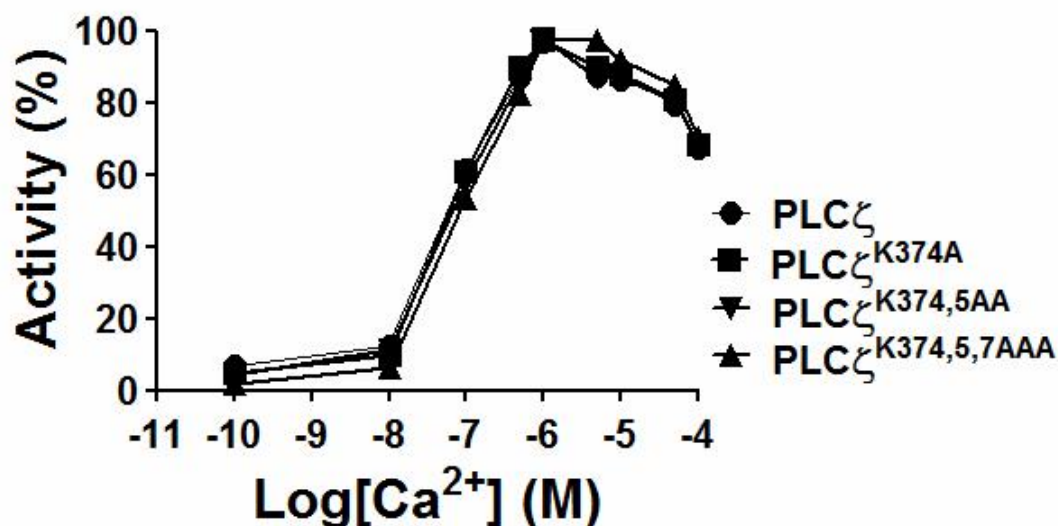
όσο και στο ανοσοαποτύπωμα κατά Western συμφωνεί με το μοριακό βάρος της GST. Η παρουσία αυθύπαρκτης της GST, σε συνδυασμό με την παρουσία και άλλων αχνότερων ζωνών ενδιάμεσου μοριακού βάρους που ανιχνεύθηκαν από το αντίσωμα αντι-GST υποδηλώνει ότι συνέβη κάποια πρωτεώλυση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού.



Σχήμα 3.28: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτής πολυακρυλαμιδίου 7% (αριστερό παράθυρο) και ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το αντίσωμα αντι-GST των πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζ^{K374A}, GST-PLCζ^{K374,5AA} και GST-PLCζ^{K374,5,7AAA}. Ηλεκτροφορήθηκε 1μg από κάθε πρωτεΐνη

3.17. Επίδραση των μεταλλάξεων της δομικής περιοχής του συνδέτη XY στις ενζυμικές ιδιότητες της PLCζ

Για να μελετηθεί ο αντίκτυπος που είχαν οι μεταλλάξεις της δομικής περιοχής του συνδέτη XY στην ευαισθησία της PLCζ στο Ca^{2+} , εξετάστηκε η ικανότητα των PLCζ^{K374A}, PLCζ^{K374,5AA} και PLCζ^{K374,5,7AAA} να υδρολύουν [^3H]PtdInsP₂ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Ca^{2+} , κυμαινόμενες από 0,1 nM έως 0,1 mM. Η παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της υδρολυτικής ικανότητας των παραπάνω πρωτεϊνών παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} ήταν η EC₅₀. Τα πειράματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ως προς την ευαισθησία στο Ca^{2+} , καθώς η τιμή EC₅₀ ήταν σχεδόν ίδια για την PLCζ αγρίου τύπου και τις τρεις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες (81-90 nM).



Σχήμα 3.29: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστηριότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζ^{K374A}, GST-PLCζ^{K374,5AA} και GST-PLCζ^{K374,5,7AAA}

Για να μελετηθεί η κινητική της PLCζ αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων PLCζ υπολογίστηκε η σταθερά Michaelis-Menten, K_m για την PtdInsP₂. Οι τιμές K_m που ελήφθησαν για την PLCζ αγρίου τύπου (80 μ M) και την PLCζ^{K374A} (88 μ M) ήταν παρόμοιες. Αντίθετα, η τιμή K_m για την PLCζ^{K374,5AA} και την PLCζ^{K374,5,7AAA} ήταν ~9 φορές (752 μ M) και 61 φορές (4919 μ M) υψηλότερη από εκείνη της PLCζ αγρίου τύπου, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η διαδοχική εξουδετέρωση των τριών αυτών θετικώς φορτισμένων καταλοίπων εντός του συνδέτη μειώνει την *in vitro* συγγένεια της PLCζ για την PtdInsP₂ χωρίς να επηρεάζει την ευαισθησία του ενζύμου στο Ca²⁺.

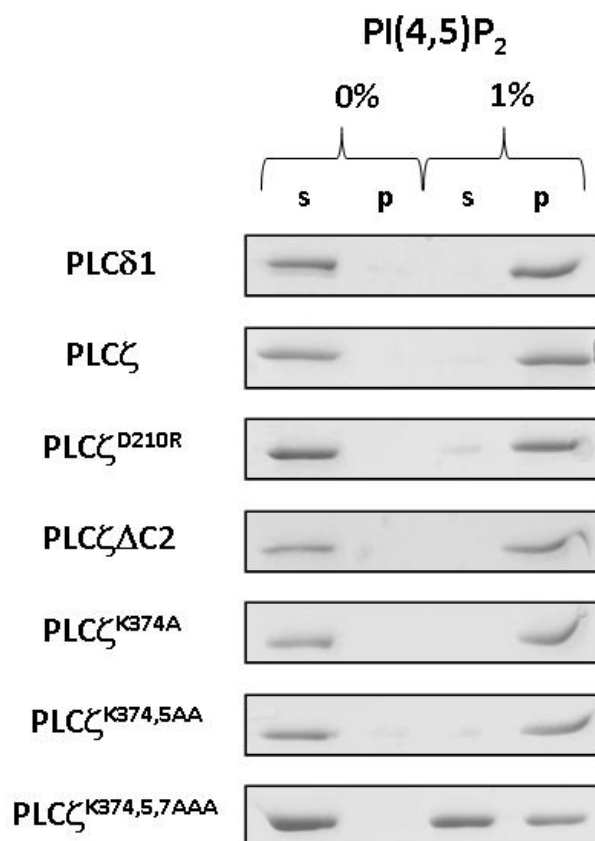
Πίνακας 3.6: Συνοπτική παρουσίαση των ενζυμικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLCζ, GST-PLCζ^{K374A}, GST-PLCζ^{K374,5AA} και GST-PLCζ^{K374,5,7AAA}

Πρωτε	EC ₅₀ (nM)	K _m (mM)
PLCζ	88	80
PLCζ ^{K374A}	90	88
PLCζ ^{K374,5AA}	89	752
PLCζ ^{K374,5,7AAA}	81	4919

3.18. Σύνδεση της PLCζ και των μεταλλαγμένων μορφών της στην PtdInsP₂

Για να μελετηθεί η ικανότητα σύνδεσης της PLCζ αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της με το PtdInsP₂ επιστρατεύθηκε για ακόμα μια φορά η δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα, χρησιμοποιώντας μονοστοιβαδικά λιποσώματα που αποτελούνται από PC:CHOL:PE (4:2:1), χωρίς φωσφοϊνοσιτίδια ή με την ενσωμάτωση 1 % PtdInsP₂. Για τον περιορισμό μη ειδικής σύνδεσης σε εξόχως φορτισμένα λιπίδια, η δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα διεξάχθηκε παρουσία μιας σχεδόν φυσιολογικής συγκέντρωσης MgCl₂ (0,5 mM). Εκτός από την PLCζ αγρίου τύπου και τις τρεις μεταλλαγμένες μορφές της, μελετήθηκε η ικανότητα σύνδεσης των PLCδ1, PLCζΔC2 και PLCζ^{D210R} στο PtdInsP₂, παρέχοντας χρήσιμους μάρτυρες για αυτό το πείραμα. Η καλά χαρακτηρισμένη PLCδ1 χρησίμευσε ως θετικός μάρτυρας για τη δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα. Η PLCζΔC2, μία ελλειμματική αλληλουχία της PLCζ από την οποία παραλήφθηκε η δομική περιοχή C2, το οποίο έχει ήδη χαρακτηριστεί [122] χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί κατά πόσο η απουσία της δομικής περιοχής C2 έχει καμία επίδραση σε οποιαδήποτε πιθανή αλληλεπίδραση της PLCζ με το PtdInsP₂. Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα σύνδεσης της καταλυτικά ανενεργής μεταλλαγμένης μορφής της PLCζ, PLCζ^{D210R} για να διερευνηθεί κατά πόσον η σύνδεση της PLCζ στο PtdInsP₂ οφείλεται στην ένωση του ενεργού καταλυτικού πυρήνα αυτού του ενζύμου με το υπόστρωμα του PtdInsP₂. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.30, οι ανασυνδυασμένες GST-PLCζ, GST-PLCζ^{D210R}, GST-PLCζΔC2, GST-PLCζ^{K374A} και GST-PLCζ^{K374,5,7AAA} πρωτεΐνες εμφανίζουν ισχυρή σύνδεση μόνο σε λιποσώματα που περιέχουν 1% PtdInsP₂, παρόμοια με το θετικό μάρτυρα, PLCδ1. Αντίθετα, για την PLCζ^{K374,5,7AAA}, η πλειονότητα (~60%) της ανιχνεύθηκε στο υπερκείμενο του διαλύματος των λιποσωμάτων που περιείχε 1% PtdInsP₂. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν σαφώς ότι, αν και η PLCζ στερείται της δομικής περιοχής PH, εντούτοις συνδέεται με PtdInsP₂ και ότι υποκατάσταση τριών θετικώς φορτισμένων καταλοίπων λυσίνης στο ουδέτερο αμινοξύ αλανίνη, στο τμήμα των βασικά φορτισμένων αμινοξέων

της δομικής περιοχής του συνδέτη XY έχει μια δραματική επίδραση στην αλληλεπίδρασή της με PtdInsP₂.



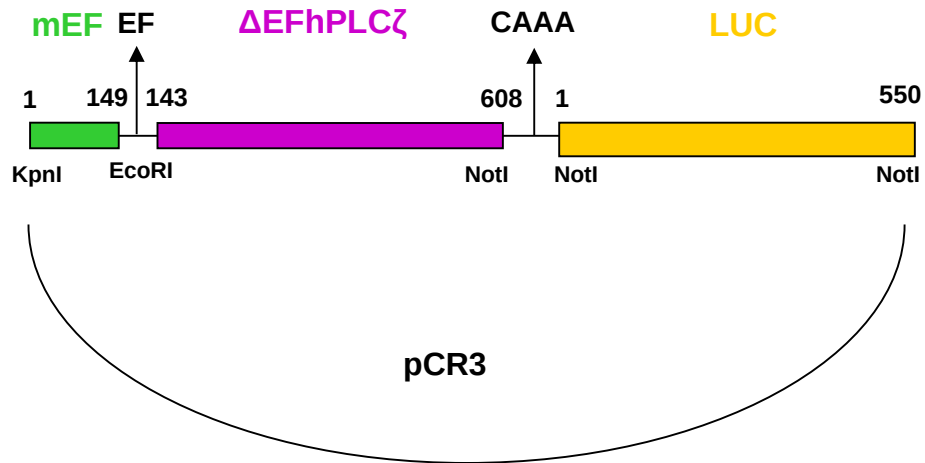
Σχήμα 3.30: Δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών GST-PLCδ1, GST-PLCζ, GST-PLCζ^{D210R}, GST-PLCζΔC2, GST-PLCζ^{K374A}, GST-PLCζ^{K374,5AA} και GST-PLCζ^{K374,5,7AAA}.

3.19. Κλωνοποίηση των hPLCζ, mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔC2-mC2 και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker

Έχει δειχθεί ότι υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στη σχετική δραστικότητα της PLCζ από διαφορετικά είδη [126]. Προηγούμενες παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι η PLCζ του ανθρώπου μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην πρόκληση ταλαντώσεων Ca²⁺. Χρειάζεται περίπου 100 φορές λιγότερο cRNA που κωδικοποιεί για την ανθρώπινη PLCζ σε σχέση με εκείνο του ποντικού για να προκαλέσει ταλαντώσεις Ca²⁺ σε ωάρια ποντικού (6). Έχει επίσης δειχθεί ότι το cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ του ποντικού είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικό στην παραγωγή Ca²⁺ ταλαντώσεις σε ανθρώπινα ωάρια (19). Ωστόσο, τα ακριβή επίπεδα

έκφρασης δεν μετρήθηκαν ποσοτικώς σε αυτά τα πειράματα. Επιπλέον, η δομική περιοχή ή οι δομικές περιοχές της ανθρώπινης PLCζ που μπορεί να συμβάλλουν σε αυτή τη μοναδική ικανότητα της ανθρώπινης PLCζ είναι επί του παρόντος άγνωστες. Για να συγκριθεί η ικανότητα των PLCζ του ανθρώπου και του ποντικού να προκαλούν ταλαντώσεις Ca^{2+} στην ίδια παρτίδα ωαρίων ποντικού, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για την PLCζ του ανθρώπου κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3 και στο 5' άκρο της κλωνοποιήθηκε η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-mPLCζ-LUC ήταν μία ευγενική παραχώρηση του Δρος Μιχαήλ Νομικού. Επιπλέον, για να διερευνηθεί η πιθανή σημαντικότητα των δομικών περιοχών της ανθρώπινης PLCζ ως προς τις ειδο-ειδικές διαφορές που παρατηρούνται στην δραστικότητα μεταξύ των PLCζ ανθρώπου και ποντικού, σχεδιάστηκαν τρεις χιμαιρικές αλληλουχίες, οι mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔXYlinker-mXYlinker και hPLCζΔC2-mC2 όπου οι δομικές περιοχές EF hands, XY linker και C2 της hPLCζ αντικαταστάθηκαν από εκείνες της mPLCζ αντίστοιχα. Όμοια με τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις PLCζ του ανθρώπου και του ποντικού, οι χιμαιρικές αλληλουχίες κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pCR3 για παραγωγή cRNA που θα μικροεγχυόταν στα ωάρια ποντικού, ενώ στο 5' άκρο τους κλωνοποιήθηκε η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ώστε να υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονης ποσοτικοποίησης της έκφρασης των πρωτεϊνών και της δραστικότητάς τους.

mEF-ΔEFhPLCζ-LUC

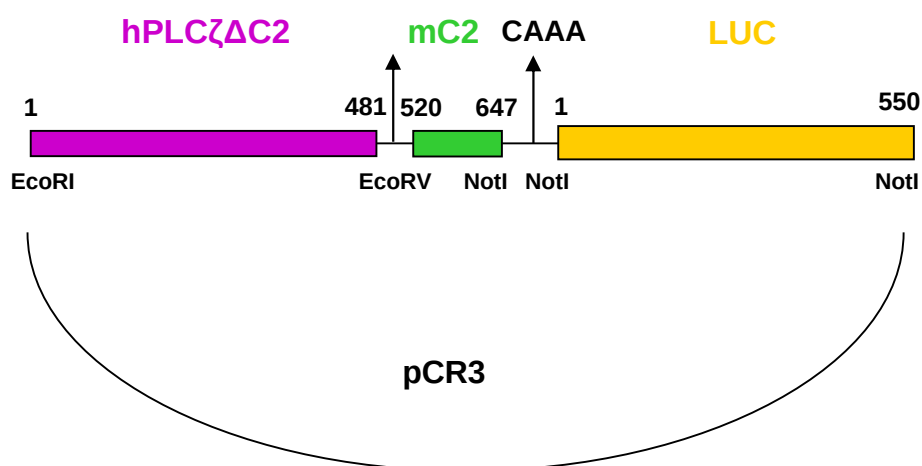


Σχήμα 3.31: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας mEF-ΔEFhPLCζ-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή EF hands της PLCζ του ποντικού (mEF) ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας, ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-mPLCζ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI στο 5' άκρο και ο ZEFR που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες KpnI και EcoRI. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή EF hands της PLCζ του ποντικού στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την ΔEFhPLCζ χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-hPLCζ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο ΔEFhPLCζF που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 5' άκρο και ο hZ608R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-mEF, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-mEF κόπηκαν με τις περιοριστικές

ενδονουκλεάσες EcoRI και NotI. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-mEF-ΔEFhPLCζ που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GAATTC) μεταξύ της αλληλουχίας mEF και της αλληλουχίας ΔEFhPLCζ. Τέλος, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας pCR3-mEF-ΔEFhPLCζ. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-mEF-ΔEFhPLCζ, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-mEF-ΔEFhPLCζ-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας ΔEFhPLCζ και της LUC.

hPLCζΔC2-mC2-LUC

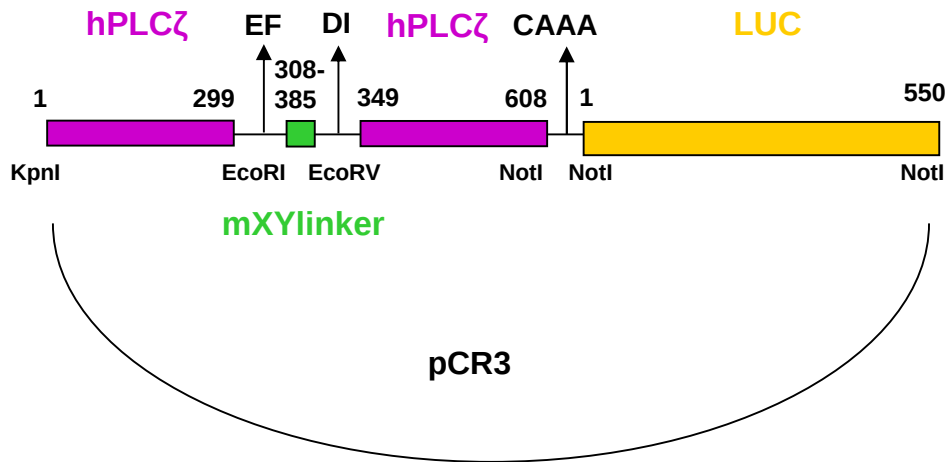


Σχήμα 3.32: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας hPLCζΔC2-mC2-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για την hPLCζΔC2 χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-hPLCζ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο Z1EcoRIF που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 5' άκρο και ο hPLCζΔC2R που

φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και EcoRV. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την hPLCΖΔC2 στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή C2 της PLCΖ του ποντικού, χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-mPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο ZC2F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 5' άκρο και ο Z647R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3-hPLCΖΔC2, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3-hPLCΖΔC2 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRV και NotI. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-hPLCΖΔC2-mC2 που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GATATC) μεταξύ της αλληλουχίας hPLCΖΔC2 και της αλληλουχίας mC2. Τέλος, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας pCR3-hPLCΖΔC2-mC2. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-hPLCΖΔC2-mC2, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-hPLCΖΔC2-mC2-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας mC2 και της LUC.

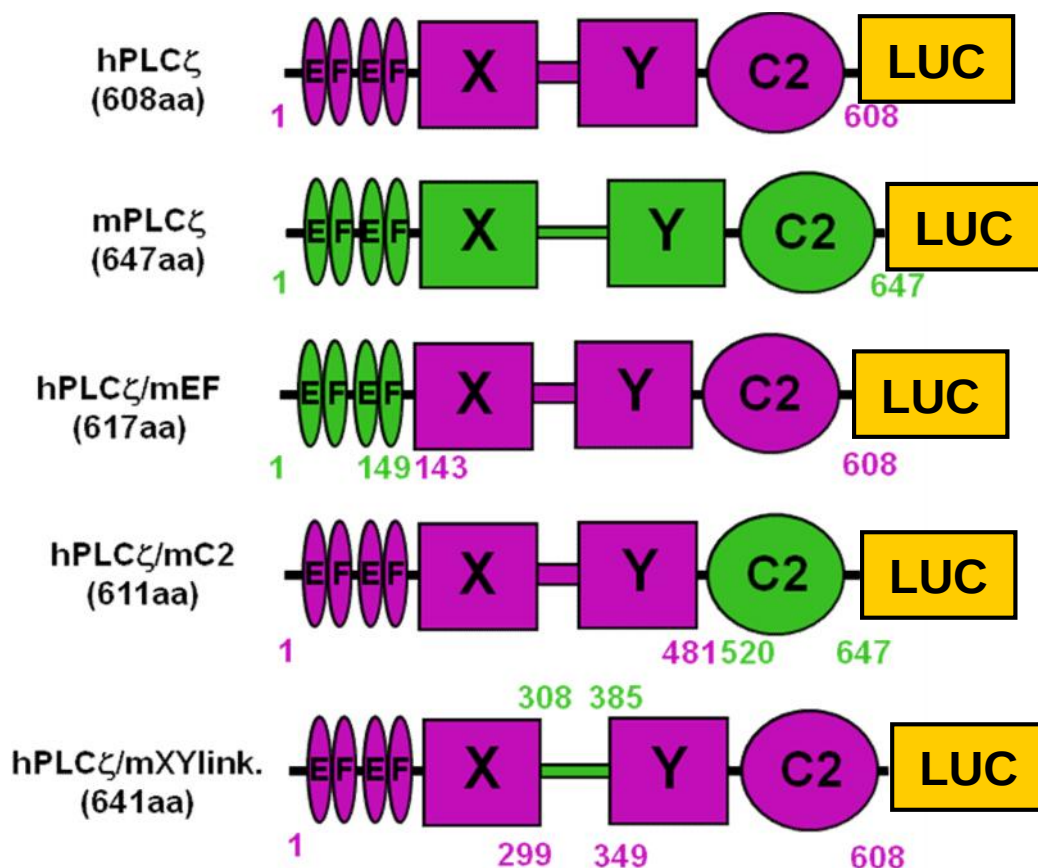
hPLCΖΔXYlinker-XYlinkerδ1-LUC



Σχήμα 3.33: Στρατηγική κλωνοποίησης της χιμαιρικής αλληλουχίας hPLCΖΔXYlinker-mXYlinker-LUC

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τα πρώτα 299 αμινοξέα της PLCΖ του ανθρώπου (PLCΖ¹⁻²⁹⁹) ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας, ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-2-hPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο hZ1F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI στο 5' άκρο και ο hZ299R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, αφού πρώτα το προϊόν της PCR και το πλασμίδιο pCR3 κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες KpnI και EcoRI. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την hPLCΖ¹⁻²⁹⁹ του ανθρώπου στον πλασμιδιακό φορέα pCR3, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τη δομική περιοχή του συνδέτη XY της PLCΖ του ποντικού (mXYlinker) χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-mPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο XYlinkermzF που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI στο 5' άκρο και ο XYlinkermzR που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε

στον pCR3-hPLCΖ¹⁻²⁹⁹, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-hPLCΖ¹⁻²⁹⁹ κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και EcoRV. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3- PLCΖ¹⁻²⁹⁹-mXYlinker που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GAATTC) μεταξύ της αλληλουχίας PLCΖ¹⁻²⁹⁹ και του συνδέτη XY. Στη συνέχεια, σειρά είχε η ενίσχυση με PCR της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για τα τελευταία 260 αμινοξέα της PLCΖ (PLCΖ³⁴⁹⁻⁶⁰⁸) χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-5X-hPLCΖ. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο hZ349F που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV στο 5' άκρο και ο hZ608R που φέρει την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 3' άκρο. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στον pCR3-PLCΖ¹⁻²⁹⁹-mXYlinker, αφού πρώτα τόσο το προϊόν της PCR, όσο και ο pCR3-PLCΖ¹⁻²⁹⁹-mXYlinker κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRV και NotI. Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση προέκυψε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCR3-PLCΖ¹⁻²⁹⁹-mXYlinker-PLCΖ³⁴⁹⁻⁶⁰⁸ που έφερε μία γέφυρα έξι νουκλεοτιδίων (GATATC) μεταξύ της δομικής περιοχής XYδ1 και της αλληλουχίας PLCΖ³⁴⁹⁻⁶⁰⁸. Τέλος, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση κλωνοποιήθηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας pCR3-PLCΖ¹⁻²⁹⁹-XYlinkerδ1-PLCΖ³⁴⁹⁻⁶⁰⁸. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA τον πλασμιδιακό φορέα pGL2. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ο LUCF και ο LUCR που και οι δύο φέρουν την αλληλουχία αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο pCR3-PLCΖ¹⁻²⁹⁹-XYlinkerδ1-PLCΖ³⁴⁹⁻⁶⁰⁸, αφού προηγήθηκε πέψη τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Τελικά, προέκυψε το επιθυμητό πλασμίδιο pCR3-PLCΖ¹⁻²⁹⁹-XYlinkerδ1-PLCΖ³⁴⁹⁻⁶⁰⁸-LUC που έφερε μία γέφυρα δώδεκα νουκλεοτιδίων (TACGCGGCCGCG) μεταξύ της αλληλουχίας PLCΖ³⁴⁹⁻⁶⁰⁸ και της LUC.



Σχήμα 3.34: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών hPLC ζ -LUC, mPLC ζ -LUC, mEF- Δ EFhPLC ζ -LUC, hPLC ζ Δ C2-mC2-LUC και hPLC ζ Δ XYlinker-mXYlinker-LUC που εκφράστηκαν σε ωάρια ποντικού

Τα cRNA παρασκευάστηκαν με τη βοήθεια του mMACHINE[®] RNA transcription system και ακολούθησε μικροέγχυση τους σε ωάρια ποντικού. Η συμπεριφορά του Ca²⁺ στο εσωτερικό των ωαρίων παρακολουθήθηκε για 4 συναπτές ώρες μετά την μικροέγχυση, ενώ στη συνέχεια μετρήθηκε η φωταύγεια των ωαρίων. Τα δεδομένα που αφορούσαν στη συμπεριφορά του Ca²⁺ στα ωοκύτταρα καταχωρούνταν ως έγκυρα μόνο εφόσον τα ωάρια εμφάνιζαν φωταύγεια. Το Σχήμα 3.35 και ο Πίνακας 3.7 συνοψίζουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικροέγχυσης cRNA σε ωάρια ποντικού.

Σε συνέπεια με προηγούμενα πειράματα, η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την mPLC ζ -LUC σε 17 ωάρια ποντικού προκάλεσε 30,8 ταλαντώσεις Ca²⁺ σε 2 ώρες. Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε ~30 min μετά τη μικροέγχυση σε φωταύγεια 0,20 cps.

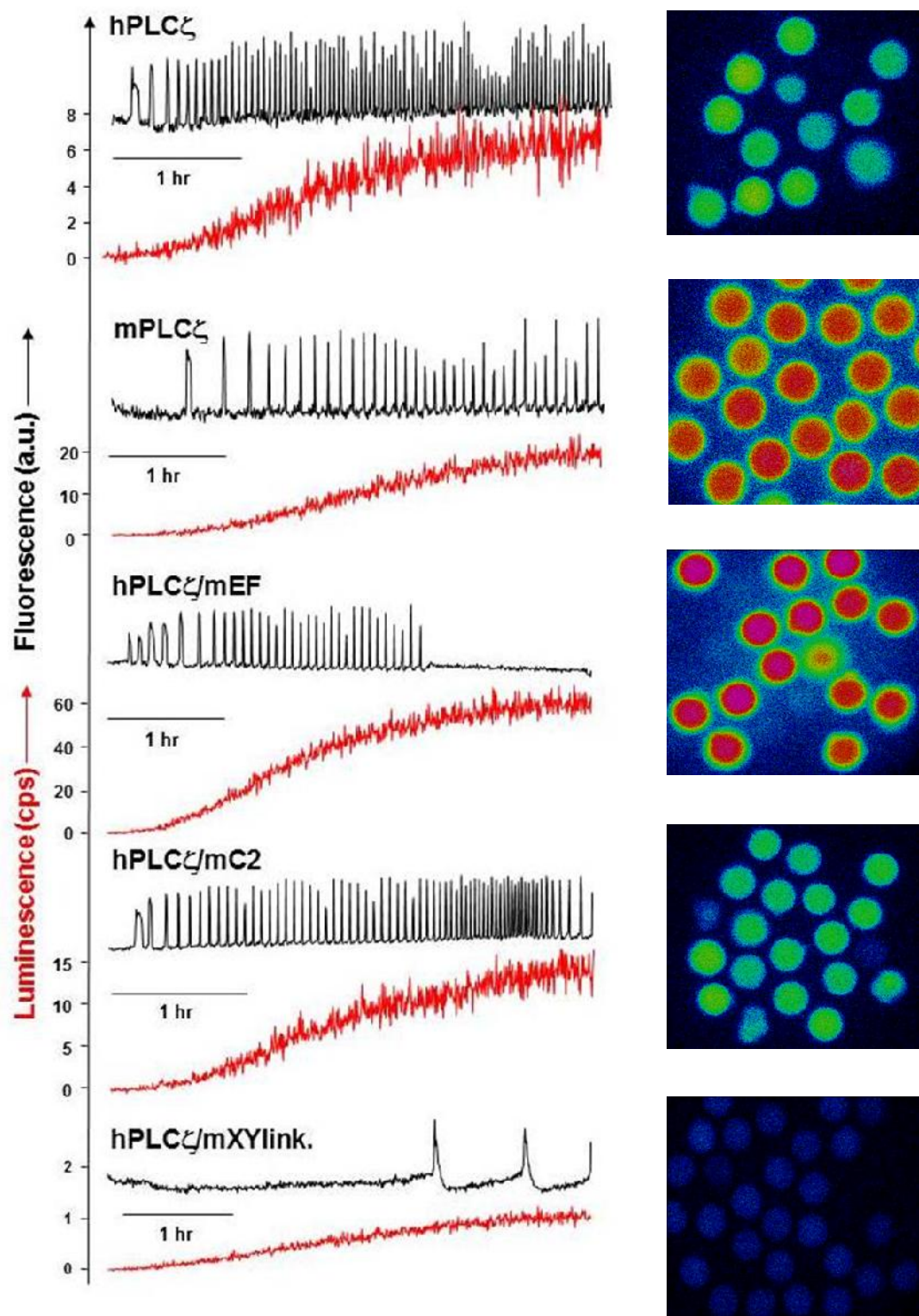
Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την hPLCΖ-LUC σε 11 ώρια ποντικού προκάλεσε 46,2 ταλαντώσεις Ca^{2+} σε 2 ώρες. Η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε ~20 min μετά τη μικροέγχυση σε φωταύγεια που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική έκφραση 0,17cps.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την hPLCΖ/mC2-LUC σε 17 ώρια ποντικού προκάλεσε παρόμοιο αριθμό ταλαντώσεων Ca^{2+} (49,1 κορυφές/2 ώρες) σε σχέση με την hPLCΖ. Μάλιστα, η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε ~20 min μετά τη μικροέγχυση σε φωταύγεια που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική έκφραση 0,32 cps.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την mEF-ΔEFhPLCΖ-LUC σε 12 ώρια ποντικού προκάλεσε μείωση στον αριθμό ταλαντώσεων Ca^{2+} (32,4 κορυφές/2 ώρες) σε σχέση με την hPLCΖ. Μάλιστα, η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε ~25 min μετά τη μικροέγχυση σε φωταύγεια που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική έκφραση 1,42 cps.

Η μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για την hPLCΖΔXYlinker-mXYlinker-LUC σε 28 ώρια ποντικού προκάλεσε μείωση στον αριθμό ταλαντώσεων Ca^{2+} (2,5 κορυφές/2 ώρες) σε σχέση με την hPLCΖ. Μάλιστα, η πρώτη κορυφή παρατηρήθηκε ~130 min μετά τη μικροέγχυση σε φωταύγεια που αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική έκφραση 0,60 cps.

Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η ανθρώπινη PLCΖ είναι πολύ πιο αποτελεσματική στην επαγωγή ταλαντώσεων Ca^{2+} σε σύγκριση με την PLCΖ του ποντικού, ακόμη και σε ένα ετερόλογο σύνολο ωαρίων. Επιπλέον, παρόλο που η αντικατάσταση της δομικής περιοχής C2 της ανθρώπινης PLCΖ από την αντίστοιχη του ποντικού δεν μετέβαλλε την ικανότητα της να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} , η αντικατάσταση της δομικής περιοχής EF hands της ανθρώπινης PLCΖ από την αντίστοιχη του ποντικού μείωσε σημαντικά την ικανότητα της να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} . Τέλος, η αντικατάσταση της δομικής περιοχής του συνδέτη XY της ανθρώπινης PLCΖ από την αντίστοιχη του ποντικού του, επηρέασε δραματικά τα επίπεδα έκφρασης της ανθρώπινης PLCΖ στα ώρια ποντικού.



Σχήμα 3.35: Η συμπεριφορά του Ca^{2+} (μαύρες καταγραφές) και η φωταύγεια ωαρίων ποντικού (κόκκινες καταγραφές) που ενέθηκαν με cRNA που κωδικοποιεί για τις hPLCζ-LUC, mPLCζ-LUC, mEF-ΔEFhPLCζ-LUC, hPLCζΔC2-mC2-LUC και hPLCζ ΔXYlinker-mXYlinker-LUC

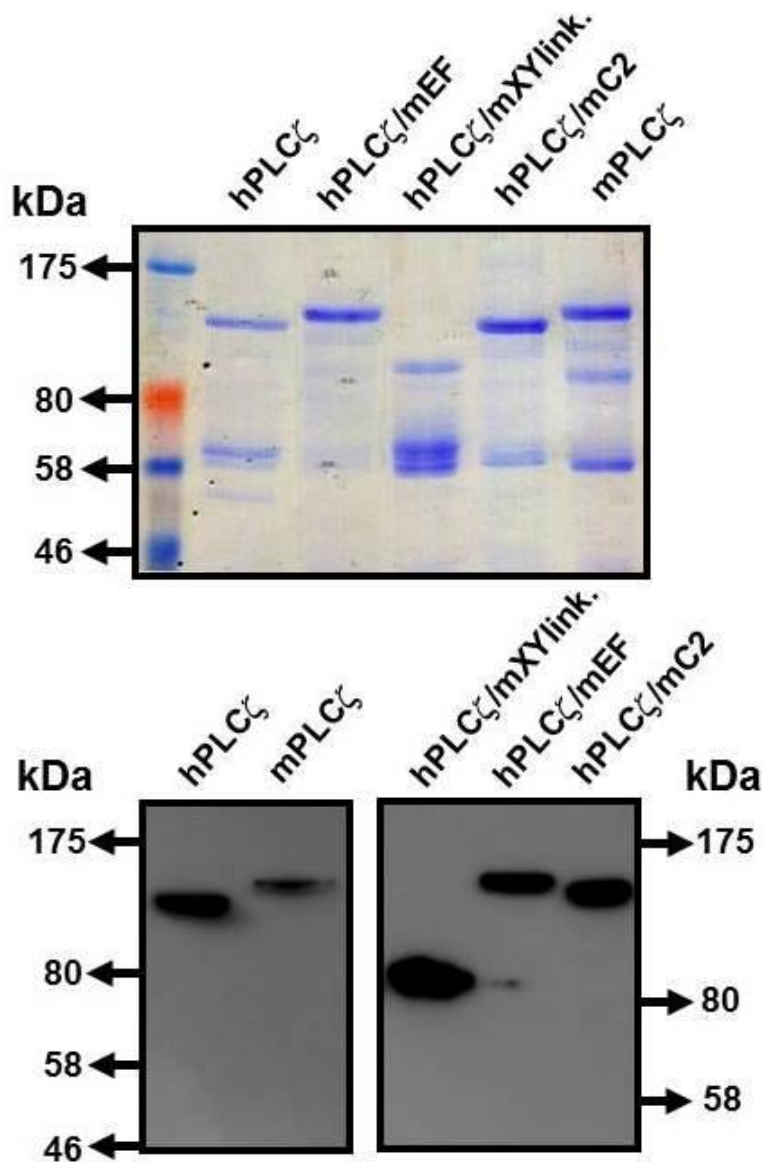
Πίνακας 3.7: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα μικροέγχυσης cRNA που κωδικοποιεί για τις hPLCζ-LUC, mPLCζ-LUC, mEF-ΔEFhPLCζ-LUC, hPLCζΔC2-mC2-LUC και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker-LUC σε ώρια ποντικού

cRNA	ΑΡΙΘΜΟΣ ΩΑΡΙΩΝ	ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ Ca ²⁺ (ΚΟΡΥΦΕΣ/ 2 ΩΡΕΣ)	ΜΕΓΙΣΤΗ ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ (cps)	ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ ΣΤΗΝ 1 ^η ΚΟΡΥΦΗ (cps)	ΧΡΟΝΟΚΑΘΥ ΣΤΕΡΗΣΗ ΜΕΧΡΙ ΤΗΝ 1 ^η ΚΟΡΥΦΗ (min)
hPLCζ	11	46,2 ± 5,40	7,60±1,28	0,17±0,03	~ 20
mPLCζ	17	30,8 ± 1,50	4,70±1,60	0,20±0,05	~ 30
hPLCζ/Mef	12	32,4 ± 1,90	51,50±3,16	1,42±0,18	~ 25
hPLCζ/mC2	17	49,1 ± 2,89	14,6±0,89	0,32±0,03	~ 20
hPLCζ/mXY linker	28	2,5 ± 0,40	0,77±0,03	0,60±0,03	~ 130

3.20. Έκφραση και καθαρισμός των hPLCζ, mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔC2-mC2 και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker

Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις hPLCζ, hPLCζ/mEF, hPLCζ/mC2 και hPLCζ/mXYlinker κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pETMM60 που φέρει τις ετικέτες NusA και 6His. Οι NusA-6His-hPLCζ, NusA-6His-hPLCζ/mEF, NusA-6His-hPLCζ-mC2 και NusA-6His-hPLCζ-mXYlinker εκφράστηκαν σε *Escherichia coli* Rosetta (DE3) κύτταρα. Η βέλτιστη έκφραση NusA-6His-hPLCζ, NusA-6His-hPLCζ/mEF, NusA-6His-hPLCζ-mC2 και NusA-6His-hPLCζ-mXYlinker επιτεύχθηκε με ανάδευση των βακτηριακών καλλιέργειών στις 200rpm στους 37°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα έφτανε το 0,6 και ακολουθούσε επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης με την προσθήκη 0,1 mM IPTG και 18 ώρες ανάδευσης στις 200rpm στους 16°C. Μετά το πέρας των 18 ωρών, οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν για την ανάκτηση του ιζήματός τους και οι NusA-6His-hPLCζ, NusA-6His-hPLCζ/mEF, NusA-6His-hPLCζ-mC2 και NusA-6His-hPLCζ-mXYlinker απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Παράλληλα, εκφράστηκε και απομονώθηκε η πρωτεΐνη NusA-6His-mPLCζ. Το Σχήμα 3.36 δείχνει τις καθαρισμένες NusA-6His-

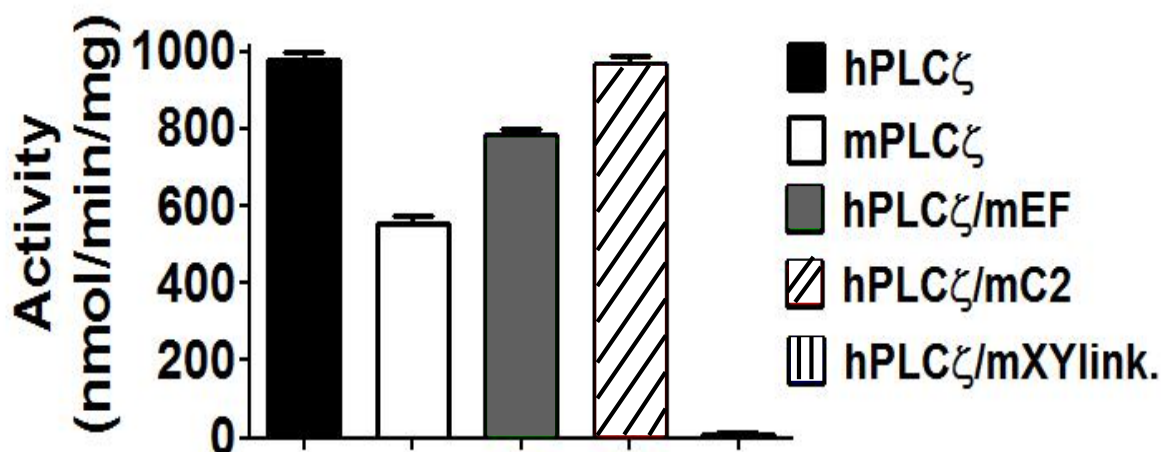
πρωτεΐνες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (επάνω παράθυρο) και σε ανοσοαποτύπωμα κατά Western με αντίσωμα Penta-His (κάτω παράθυρο). Οι κυρίαρχες ζώνες τόσο στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όσο και στα αποτυπώματα κατά Western αντιστοιχούσαν σε μοριακά βάρη που ανταποκρίνονται στο μέγεθος των παραπάνω πρωτεϊνών. Είναι ενδιαφέρον ότι, στην περίπτωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης hPLCζΔXYlinker-mXYlinker, η κύρια ζώνη αντί της αναμενόμενης ~133 kDa εμφανίστηκε να είναι ~103 kDa, υποδηλώνοντας πρωτεόλυση εντός της δομικής περιοχής του συνδέτη XY και αξιοσημείωτη αστάθεια της καθαρισμένης χιμαιρικής πρωτεΐνης. Αυτή η αστάθεια πιθανώς να εξηγεί τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτής της χιμαιρικής πρωτεΐνης στα ωάρια ποντικού.



Σχήμα 3.36: Χρώση με βαφή Coomassie Brilliant-Blue πηκτής πολυακρυλαμιδίου 7% (επάνω παράθυρο) και αποτυπώματα κατά Western με το αντίσωμα αντι-NusA (κάτω παράθυρα) των πρωτεϊνών NusA-6His-hPLCζ, NusA-6His-mPLCζ, NusA-6His-hPLCζΔXYlinker-mXYlinker, NusA-6His-mEF-ΔEFhPLCζ και NusA-6His-hPLCζΔC2-mC2. Ηλεκτροφορήθηκε 1μg από κάθε πρωτεΐνη

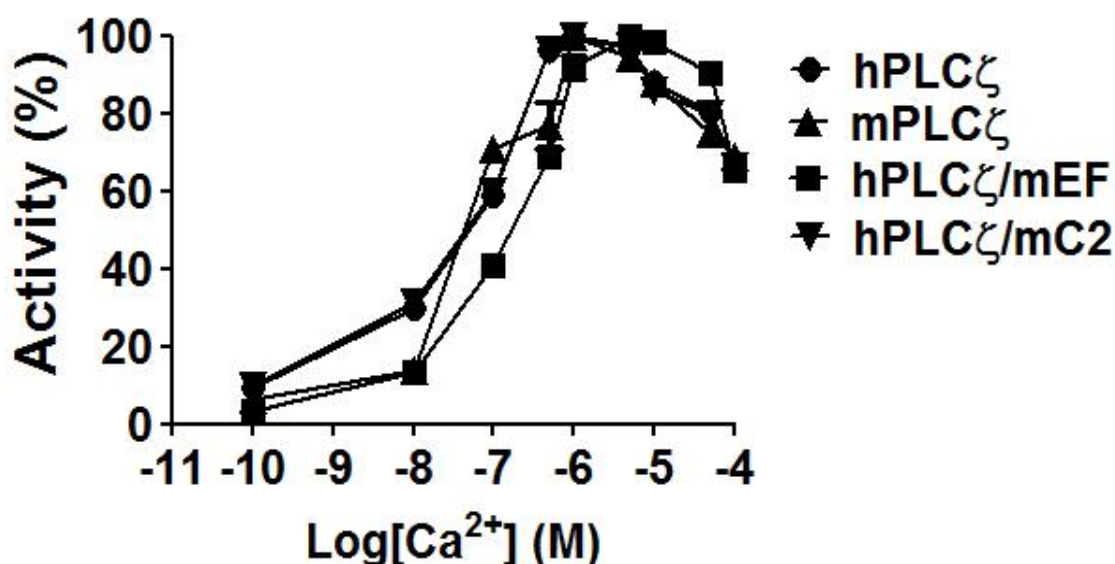
3.21. Μελέτη των ενζυμικών ιδιοτήτων των hPLCζ, mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔC2-mC2 και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker

Η ενζυμική δραστηριότητα για κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία υδρόλυσης [^3H]PtdInsP₂ [123]. Οι δραστηριότητες των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν στο υπάρχον Ca^{+2} (χωρίς προσθήκη EGTA, ~1mM). Σαν αρνητικός μάρτυρας, απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε NusA. Το ιστόγραμμα του Σχήματος 3.37 και ο πίνακας 3.10 συνοψίζουν τις τιμές δραστηριότητας που λήφθηκαν για κάθε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Τα ευρήματα σχετικά με τη δραστηριότητα των PLCζ του ανθρώπου και του ποντικού είναι σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα και αποκαλύπτουν ότι η hPLCζ παρουσιάζει ~44% υψηλότερη δραστηριότητα από την mPLCζ (978 ± 34 έναντι 556 ± 29 nmol/min/mg). Η δραστηριότητα για την hPLCζΔC2/mC2 ήταν παρόμοια με την δραστηριότητα της hPLCζ (970 ± 42 έναντι 978 ± 34 nmol/min/mg), σε αντίθεση με την mEF-ΔEFhPLCζ που έδειξε μια ελαφρά μειωμένη δραστηριότητα (~20%) σε σύγκριση με την hPLCζ (782 ± 33 έναντι 978 ± 34 nmol/min/mg). Όπως ήταν αναμενόμενο, η hPLCζΔXYlinker-mXYlinker δεν εμφάνισε *in vitro* δραστηριότητα.



Σχήμα 3.37: Ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-hPLCζ, NusA-6His-mPLCζ, NusA-6His-hPLCζΔXYlinker-mXYlinker, NusA-6His-mEF-ΔEFhPLCζ και NusA-6His-hPLCζΔC2-mC2. Είκοσι pmol κάθε πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε δοκιμασία υδρόλυσης $[^3\text{H}]\text{PtdInsP}_2$ και η ραδιενέργεια του προϊόντος μετρήθηκε σε υγρό σπινθηριστή. Η δοκιμασία εκτελέστηκε σε τρεις διαφορετικές παρτίδες πρωτεΐνης και για κάθε παρτίδα εις διπλούν

Για να μελετηθεί ο αντίκτυπος που είχε η αντικατάσταση των δομικών περιοχών EF hands, του συνδέτη XY και C2 της hPLCζ στην ευαισθησία της hPLCζ στο Ca^{2+} , εξετάστηκε η ικανότητα των mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔC2-mC2 και hPLCζΔXYlinker-mXYlinker να υδρολύουν $[^3\text{H}]\text{PtdInsP}_2$ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Ca^{2+} , κυμαινόμενες από 0,1 nM έως 0,1 mM. Η παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της υδρολυτικής ικανότητας των παραπάνω πρωτεϊνών παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} ήταν η EC_{50} . Η EC_{50} για τις hPLCζ (49nM) , mPLCζ (43nM) και hPLCζΔC2-mC2 (40nM) ήταν παρόμοια. Ωστόσο, η αντικατάσταση των EF hands της hPLCζ στην χιμαιρική πρωτεΐνη mEF-ΔEFhPLCζ αύξησε ~3 φορές την τιμή EC_{50} (148nM).



Σχήμα 3.38: Ασβεστιο-εξαρτώμενη ενζυμική δραστικότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-hPLCζ, NusA-6His-mPLCζ, NusA-6His-mEF-ΔEFhPLCζ και NusA-6His-hPLCζΔC2-mC2

Για να συγκρίνουμε την κινητική ενζύμου των PLCζ του ανθρώπου και του ποντικού, καθώς και των χιμαιρικών , υπολογίστηκε η σταθερά K_m . Οι τιμές

K_m που λαμβάνονται για την hPLCζ (75 μM), την mPLCζ (99μM) και την hPLCζΔC2-mC2 (89μM) ήταν παρόμοια. Αντίθετα, η σταθερά K_m για την mEF-ΔEFhPLCζ ήταν ~6.3 φορές (475μM) υψηλότερη από εκείνη της hPLCζ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντικατάσταση της δομικής περιοχής EF hands της hPLCζ μειώνει την *in vitro* συγγένεια της hPLCζ για την PtdInsP₂.

Πίνακας 3.8: Συνοπτική παρουσίαση των ενζυμικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών NusA-6His-hPLCζ, NusA-6His-mPLCζ, NusA-6His-hPLCζΔXYlinker-mXYlinker, NusA-6His-mEF-ΔEFhPLCζ και NusA-6His-hPLCζΔC2-mC2

Πρωτεΐνη	Δραστικότητα (nmol/min/mg)	EC ₅₀ (nM)	K _m (μM)
hPLCζ	978±34	49	75
mPLCζ	556±29	43	99
hPLCζ/Mef	782±33	148	475
hPLCζ/mC2	970±42	40	89
hPLCζ/mXYlinker	10±4	-	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Η PLCζ αποτελεί το έναυσμα των ταλαντώσεων Ca^{2+} κατά τη γονιμοποίηση των θηλαστικών.

Από την ανακάλυψή της, το 2002 μέχρι σήμερα συγκεντρώνονται όλο και περισσότερα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη PLCζ, που εντοπίζεται αποκλειστικά στους όρχεις και το σπέρμα, αποτελεί το μοναδικό φυσιολογικό ερέθισμα για την ενεργοποίηση των ωαρίων και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη κατά τη γονιμοποίηση των θηλαστικών. Η PLCζ μεταφέρεται από το σπέρμα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου προκαλώντας ταλαντώσεις Ca^{2+} που είναι υπεύθυνες για την επαγωγή όλων των μείζονων γεγονότων της ενεργοποίησης του ωαρίου, όπως της εξωκύτωσης των φλοιωδών κοκκίων, του φραγμού στην πολυσπερμία και της επανεκκίνησης της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης και της έναρξης του πρώτου μιτωτικού κυτταρικού κύκλου. Η PLCζ καταλύει την υδρόλυση του μεμβρανικού φωσφοϊνοσιτιδίου $PtdInsP_2$, προκαλώντας ταλαντώσεις Ca^{2+} μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης της $InsP_3$ [127].

Ανοσοκαταστολή της PLCζ σε σπερματικά εκχυλίσματα κατέστειλε την ικανότητά τους να εκλύουν Ca^{2+} [67], ενώ πειράματα κλασματοποίησης του σπέρματος κατέδειξαν ότι μόνο τα κλάσματα εκείνα που περιείχαν PLCζ, είχαν την ικανότητα να προκαλούν ταλαντώσεις Ca^{2+} [61]. Επιπλέον, σπερματικά εκχυλίσματα και cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ ενός είδους ήταν σε θέση να προκαλέσουν έκλυση Ca^{2+} μετά από μικροέγχυση σε ωάρια ενός άλλου είδους [118]. Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι η μικροέγχυση είτε cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ, είτε αυτούσιας της PLCζ σε ωάρια ποντικού προκάλεσε ένα πρότυπο ταλαντώσεων Ca^{2+} παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται κατά τη γονιμοποίηση, ενώ συντήρησε την εμβρυϊκή ανάπτυξη μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης [67,118,120,128]. Επιπλέον, διαγονιδιακά ποντίκια που μέσω πειραμάτων παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi) εμφάνισαν διαταραχές της έκφρασης της PLCζ στους όρχεις, παρήγαγαν σπέρμα που προκαλούσε

πρόωρα τερματιζόμενες ταλαντώσεις Ca^{2+} , και ενώ δεν ήταν στείρα, παρουσίασαν μειωμένο αριθμό νεογνών [129]. Ωστόσο, τα στοιχεία εκείνα που ουσιαστικά καθιερώνουν την PLCζ ως το μόνο φυσιολογικό ερέθισμα για την ενεργοποίηση των ωαρίων προέρχονται από κλινικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, ορισμένες μορφές ανδρικής υπογονιμότητας/στεριότητας και η αποτυχία ενεργοποίησης ωαρίου έχουν συσχετιστεί με ανώμαλες μορφές ή μη φυσιολογική λειτουργία της PLCζ. Σπέρμα υπογόνιμων ανδρών που απέτυχε να γονιμοποιήσει με κλινικές εφαρμογές ρουτίνας όπως στην *in vitro* γονιμοποίηση (*in vitro* fertilization, IVF) και στην ενδοκυτταροπλασματική σπερματική έγχυση (intracytoplasmic sperm injection, ICSI), είτε δεν προκάλεσε ταλαντώσεις Ca^{2+} , είτε προκάλεσε πρότυπα ταλαντώσεων διαφοροποιημένα από εκείνα που παρατηρούνται σε γόνιμους άνδρες, με μικρότερη συχνότητα και πλάτος ταλαντώσεων [70-71]. Επιπλέον, πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης αποκάλυψαν ότι υπογόνιμοι άνδρες των οποίων το σπέρμα απέτυχε να γονιμοποιήσει με ICSI και δεν ήταν σε θέση να προκαλέσει ταλαντώσεις Ca^{2+} , παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα ή παντελή απουσία της PLCζ από την κεφαλή των σπερματοζωαρίων [70-71].

4.2. Η PLCζ εντοπίζεται στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων των θηλαστικών.

Παραπάνω αναφέρθηκε ότι υπογόνιμοι άνδρες παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα ή παντελή απουσία της PLCζ από την κεφαλή των σπερματοζωαρίων. Επομένως έχει ενδιαφέρον να αναλυθεί ο τρόπος που ο υποκυτταρικός εντοπισμός μπορεί να επηρεάζει τη λειτουργικότητα της PLCζ. Μέχρι σήμερα, η PLCζ έχει ταυτοποιηθεί σε 54 είδη, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι θηλαστικά. Εντοπίζεται σε διακριτές περιοχές της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, που συνιστούν έναν διαφορετικό λειτουργικό ρόλο για κάθε πληθυσμό της PLCζ [130-132]. Το γεγονός ότι η PLCζ εντοπίζεται ως επί το πλείστον στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων βρίσκεται σε συμφωνία με την πρόταση ότι η PLCζ είναι ο σπερματικός παράγοντας, και ως τέτοιος θα πρέπει να εντοπίζεται σε περιοχές που

διευκολύνουν την ταχεία διάχυσή του στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου ώστε να ξεκινήσουν οι ταλαντώσεις όσο το δυνατόν πιο σύντομα [127].

Στο σπέρμα του ποντικού, του ινδικού χοιριδίου και του αγριόχοιρου, εντοπίστηκαν δύο πληθυσμοί της PLCζ, στην ακροσωμική και την μετά-ακροσωμική περιοχή [119, 131,]. Στο σπέρμα του αλόγου, η PLCζ εντοπίζεται στην ακροσωμική περιοχή, την ισημερινή περιοχή και το κύριο τμήμα της ουράς [133]. Στο σπέρμα χοίρων, η PLCζ εντοπίστηκε στην μετα-ακροσωμική περιοχή και την ουρά [134]. Επιπλέον, εντοπίστηκαν τρεις πληθυσμοί της PLCζ, στην ακροσωμική, την ισημερινή και την μετα-ακροσωμική περιοχή [70,71,130]. Μια πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε η PLCζ αλλάζει θέση μέσα στο σπέρμα του ποντικού μετά την απόκτηση ικανότητας γονιμοποίησης και την ακροσωμική αντίδραση [131]. Οι Grasa και συνεργάτες οδηγήθηκαν στο ίδιο συμπέρασμα με πειράματα τους σε ανθρώπινα σπερματοζωάρια που είτε είχαν είτε δεν είχαν αποκτήσει ικανότητα γονιμοποίησης [130]. Ωστόσο, όπως παρατήρησαν οι Kashir και συνεργάτες η διασπορά της PLCζ στο σπερματοζωάριο γόνιμων ανδρών και ανδρών που απέτυχαν να γονιμοποιήσουν με ICSI είναι τόσο μεγάλη που ήταν αδύνατη η στοιχειοθέτηση ενός μοτίβου εντοπισμού της PLCζ που να διαφοροποιείται μεταξύ γόνιμων ανδρών και ανδρών που απέτυχαν να γονιμοποιήσουν με ICSI [135].

Ενώ δεν είναι ακόμα σαφές εάν απαιτείται ένα συγκεκριμένο μοτίβο εντοπισμού της PLCζ ή ένας συνδυασμός πληθυσμών PLCζ που να εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές της κεφαλής του σπερματοζωαρίου για τη λειτουργική ικανότητα του ενζύμου, είναι γεγονός ότι οι πληθυσμοί PLCζ στην ισημερινή και μετα-ακροσωμική περιοχή θα επέτρεπαν την ταχεία πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου μετά τη σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωαρίου. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω στοιχεία για να ελεγχθεί εάν όντως υπάρχουν τόσοι ξεχωριστοί πληθυσμοί της PLCζ στο σπέρμα, και εάν αυτοί εκτελούν και άλλες λειτουργίες πέραν της ενεργοποίησης του ωαρίου. Δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί εάν οι διαφορετικοί πληθυσμοί PLCζ που εντοπίζονται με αυτές τις μελέτες οφείλονται σε είδο-ειδικότητα, ή εάν απλώς αντανakλούν την χαμηλή ειδικότητα του αντισώματος και την ακαταλληλότητα του εργαστηριακού

πρωτοκόλλου. Επομένως, απαιτούνται πιο ειδικά εργαλεία για την έρευνα σχετικά με τον πιθανό ρόλο των πολλαπλών ισομορφών της PLCζ .

4.3. Η PLCζ εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και όχι στην πλασματική μεμβράνη των ωαρίων των θηλαστικών.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της PLCζ έχει ήδη μελετηθεί διεξοδικά είτε με μικροέγχυση cRNA που κωδικοποιεί για την συζευγμένη με Venus ή YFP PLCζ , είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Και οι δύο προσεγγίσεις έχουν δείξει ότι η PLCζ δεν εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, αλλά φαίνεται να κατανέμεται ομοιόμορφα εντός του κυτταροπλάσματος του ωαρίου [136-137]. Σε ωάρια ποντικού, αυτή η ομοιόμορφη κατανομή της PLCζ στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου αντανακλά τη σύνδεσή της σε μικρά ενδοκυτταρικά κυστίδια κατανεμημένα στο κυτταρόπλασμα των ωαρίων, με παρόμοια μικρά κυστίδια να εμφανίζουν την ιδιότητα να περιέχουν PtdInsP₂ [138]. Πράγματι, μελέτες δείχνουν ότι σε γονιμοποιημένα ωάρια ασκιδίων, οι ταλαντώσεις Ca²⁺ μπορεί να καθοδηγούνται από Ca²⁺-εξαρτώμενη δραστικότητα PLC ανάλογη με αυτήν της PLCζ , μόνο με την παρουσία μιας ενιαίας κυτταροπλασματικής πηγής PtdInsP₂ [139]. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί που διέπουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό της PLCζ σε κυστίδια ή οργανίδια και η πιθανότητα ο υποκυτταρικός αυτός εντοπισμός να είναι ίδιος για τις PLCζ άλλων ειδών μένουν να αποσαφηνιστούν.

4.4. Η δομική περιοχή του συνδέτη XY, η καταλυτική περιοχή XY και η δομική περιοχή C2 συμμετέχουν στην επαγωγή των ταλαντώσεων Ca²⁺.

Η PLCζ, που εντοπίζεται αποκλειστικά στο σπέρμα, είναι η μικρότερη γνωστή PLC, με την απλούστερη οργάνωση δομικών περιοχών μεταξύ όλων των ισομορφών PLC που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα [127]. Επομένως, η PLCζ θα μπορούσε να θεωρηθεί μια αρχέτυπη ισομορφή PLC των θηλαστικών, γεγονός που συνάδει με το θεμελιώδη ρόλο που διαδραματίζει στα πρώιμα στάδια της γονιμοποίησης των θηλαστικών.

Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η PLCζ διαθέτει ένα μοναδικό ρυθμιστικό μηχανισμό, διαφορετικό από το μηχανισμό που ρυθμίζει τις PLC των σωματικών κυττάρων των θηλαστικών [127,140]. Η PLCζ παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία με την PLCδ1, στερείται, όμως, της δομικής περιοχής PH από την αλληλουχία της. Η δομική περιοχή PH είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της PLCδ1 με το υπόστρωμά της, PtdInsP₂, που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη. Προσάρτηση της δομικής περιοχής PH της PLCδ1 στην αλληλουχία της PLCζ δεν μετέβαλε τις ενζυμικές της ιδιότητες *in vitro* και, κατά συνέπεια, ούτε την ικανότητά της να προκαλεί ταλαντώσεις Ca²⁺ στα μη γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού (Πίνακες 3.1 και 3.2). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι προκαταρκτικά πειράματα δείχνουν ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη PHδ1/PLCζ, παρόμοια με την PLCζ, κατευθύνεται στην PtdInsP₂ που εντοπίζεται ενδοκυτταρικά και όχι στις δεξαμενές PtdInsP₂ της πλασματικής μεμβράνης (αδημοσίευτα δεδομένα). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ένα μοναδικό μηχανισμό στόχευσης της PLCζ, που προϋποθέτει την ύπαρξη και άλλων συνιστωσών, όπως μιας αλληλεπίδρασης με ένα άλλο φωσφολιπίδιο ή μια πρωτεΐνη του ωαρίου, δεδομένου ότι ακόμη και η προσάρτηση της δομικής περιοχής PH δεν οδηγεί την PLCζ στην πλασματική μεμβράνη, όπου αφθονεί η PtdInsP₂ αλλά την κατευθύνει σε διακριτές κυστιδικές δομές στο εσωτερικό των ωαρίων. Η PtdIns(3)P μπορεί να αποτελεί έναν πιθανό φυσιολογικό προσδέτη για την PLCζ αφού προηγούμενα πειραματικά στοιχεία έχουν δείξει ότι η δομική περιοχή C2 της PLCζ συνδέεται ισχυρά *in vitro* σε PtdIns(3)P και με χαμηλότερη συγγένεια σε PtdIns(5)P [122,141]. Η PtdIns(3)P είναι προϊόν φωσφορυλίωσης της PtdIns από την κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης τύπου III, γνωστής ως Vps34 (σχήμα 1.10) η οποία εντοπίζεται αποκλειστικά στις μεμβράνες των πρώιμων ενδοσωμάτων [142]. Η PtdIns(3)P βοηθά στην πρόσληψη μιας σειράς πρωτεϊνών, πολλές από τις οποίες εμπλέκονται στην διακίνηση πρωτεϊνών, από τις μεμβράνες. Για να διερευνηθεί περαιτέρω εάν η PLCζ συνδέεται με PtdIns(3)P, ποιά δομική περιοχή ευθύνεται για αυτή την αλληλεπίδραση καθώς και ποιά δομική περιοχή ευθύνεται για την αλληλεπίδραση της PLCζ με το υπόστρωμα PtdInsP₂, εφαρμόστηκε η δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα. Τα μέχρι τώρα στοιχεία δείχνουν ότι η PLCζ συνδέεται ισχυρά

με λιποσώματα που περιέχουν PtdInsP₂ και PtdIns(3)P και ότι η δομική περιοχή EF hands δεν ευθύνεται για αυτές τις αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 3.13). Έχει προταθεί ότι η δομική περιοχή EF hands διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην ευαισθησία της PLCζ στο Ca²⁺, καθώς η απαλοιφή της δομικής περιοχής EF hands από την αλληλουχία της PLCζ αυξάνει δραματικά την τιμή EC₅₀ από 82 nM σε 30 μM [122]. Στην παρούσα μελέτη, η αντικατάσταση της δομικής περιοχής EF hands της PLCζ από την αντίστοιχη της PLCδ1 μείωσε 10 φορές την ευαισθησία της PLCζ στο Ca²⁺, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την ενζυμική δραστικότητα *in vitro* ή τη χημική συγγένεια για την PtdInsP₂ (Πίνακας 3.2). Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγεί την ελαφρώς μειωμένη ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca²⁺ της EFδ1-ΔEFPLCζ σε ωάρια ποντικού (Πίνακας 3.1), αλλά δείχνει επίσης ότι η δομική περιοχή EF hands δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για την ευαισθησία της PLCζ στο Ca²⁺ καθώς μπορεί να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες. Αντικατάσταση της δομικής περιοχής του συνδέτη XY ή της καταλυτικής περιοχής XY της PLCζ από τις αντίστοιχες δομικές περιοχές της PLCδ1, μείωσε δραματικά την *in vitro* ενζυμική δραστικότητα και τη χημική συγγένεια της PLCζ για την PtdInsP₂. Οι PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1 και PLCζΔXY-XYδ1 παρουσίασαν επίσης μια αυξημένη τιμή EC₅₀ ως προς την ευαισθησία τους στο Ca²⁺, η οποία μπορεί να υποδηλώνει τη συμβολή τους στην ευαισθησία που εμφανίζει η PLCζ στο Ca²⁺ (Πίνακας 3.2). Κατά τη δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα, οι PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1 και PLCζΔXY-XYδ1 ήταν ανίκανες να συνδεθούν σε λιποσώματα που περιέχουν PtdInsP₂ (Σχήμα 3.13). Είναι ενδιαφέρον ότι ενώ η PLCζΔXYlinker-XYlinkerδ1 συνδέεται ισχυρά σε λιποσώματα που περιέχουν PtdIns(3)P, η PLCζΔXY-XYδ1 έδειξε αισθητά μειωμένη σύνδεση (Σχήμα 3.13), το οποίο μπορεί να υποδηλώνει ότι η καταλυτική περιοχή XY διαδραματίζει έναν επικουρικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της PLCζ με την PtdIns(3)P. Όλα αυτά τα *in vitro* δεδομένα εξηγούν την αδυναμία των δύο χιμαιρικών πρωτεϊνών να προκαλούν ταλαντώσεις Ca²⁺ σε ωάρια ποντικού (Σχήμα 3.8, Πίνακας 3.1). Παλαιότερες και τρέχουσες έρευνες δείχνουν ότι η δομική περιοχή C2 της PLCζ είναι διαφορετική από εκείνη της PLCδ1 και διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη λειτουργία της PLCζ. Αντικατάσταση της δομικής περιοχής C2 της PLCζ από την αντίστοιχη της PLCδ1 εξάλειψε

πλήρως την ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} σε ωάρια ποντικού (Σχήμα 3.8α, Πίνακας 3.1), αν και η ευαισθησία στο Ca^{2+} και η συγγένεια του ενζύμου για την PtdInsP_2 παρέμεινε ανεπηρέαστη (Πίνακας 3.2). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα, όπου απαλοιφή της δομικής περιοχής C2 από την PLCζ οδήγησε σε αδυναμία πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} σε ωάρια ποντικού, αν και διατηρήθηκε η ενζυμική της δραστηριότητα και η ευαισθησία της στο Ca^{2+} [122]. Παρά το γεγονός ότι δομικές περιοχές C2 πολλών ενζύμων δεσμεύουν Ca^{2+} , μια κρίσιμη συνιστώσα για τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών, υπάρχουν και δομικές περιοχές C2 που δε δεσμεύουν Ca^{2+} , αλλά φωσφολιπίδια με σχετικά χαμηλή συγγένεια και ειδικότητα [143]. Η δομική περιοχή C2 της PLCδ1 δεσμεύει τρία ιόντα Ca^{2+} και αλληλεπιδρά με το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο PS για να σχηματίσει ένα τριμερές σύμπλοκο που βοηθά στην αγκυροβόληση της PLCδ1 στην μεμβράνη και στην ενίσχυση της ενζυμικής της δραστηριότητας [85]. Δεν υπάρχει ακόμη καμία ένδειξη για τη σύνδεση της δομικής περιοχής C2 της PLCζ σε PS ή άλλα μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Ωστόσο, εάν η αλληλεπίδραση της PLCζ με PtdIns(3)P παίζει σημαντικό ρόλο στη στόχευση της PLCζ στο αντίστοιχο ενδοκυτταρικό κυστίδιο που περιέχει PtdInsP_2 , η δομική περιοχή C2 είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που μεσολαβεί σε αυτή την αλληλεπίδραση, καθώς η αντικατάσταση αυτής της δομικής περιοχής της PLCζ από την αντίστοιχη της PLCδ1, οδηγεί σε πλήρη απώλεια της σύνδεσης της PLCζ σε λιποσώματα που περιέχουν PtdIns(3)P (Σχήμα 3.13). Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί η δομική περιοχή C2 είναι απαραίτητη για την ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} σε μη γονιμοποιημένα ωάρια. Μια άλλη υπόθεση που μπορεί να εξηγήσει την ενδοκυτταρική στόχευση της PLCζ είναι ότι η PLCζ αλληλεπιδρά μέσω της δομικής περιοχής C2 με μια ειδική πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος του ωαρίου που οδηγεί τη PLCζ σε μικρά κυστίδια και όχι στην πλασματική μεμβράνη. Επιπλέον, εάν η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται αποκλειστικά στο ωάριο θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί η PLCζ είναι τόσο αποτελεσματική στην πρόκληση ταλαντώσεων Ca^{2+} σε ωάρια και όχι σε άλλους τύπους κυττάρων [144].

4.5. Η δομική περιοχή του συνδέτη XY ρυθμίζει τη δραστικότητα της PLCζ.

Ένα σημαντικό ερώτημα που τίθεται για να απαντηθεί είναι ο τρόπος που η δραστικότητα της PLCζ ρυθμίζεται *in vivo*. Ποιος είναι ο μοριακός μηχανισμός που ρυθμίζει τη δραστικότητα της PLCζ μέσα στο ωάριο; Πρόσφατες δομικές και βιοχημικές μελέτες παρέχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η δομική περιοχή του συνδέτη XY των PLCβ, γ, δ και ε μεσολαβεί στην αυτοαναστολή της δραστικότητας αυτών των PLC [124-125]. Η PLCζ περιέχει ένα τμήμα βασικών αμινοξέων στη δομική περιοχή του συνδέτη XY. Καμία από τις PLC των σωματικών κυττάρων δε διαθέτει έναν τόσο θετικά φορτισμένο συνδέτη XY. Αντιθέτως, οι PLCβ, δ και ε περιέχουν έναν εξαιρετικά αρνητικά φορτισμένο συνδέτη XY, ο οποίος έχει προταθεί ότι μεσολαβεί στην αυτοαναστολή της δραστικότητας των PLCβ,δ και ε, εμποδίζοντας την πρόσβαση της PtdInsP₂ στο ενεργό κέντρο των ενζύμων μέσω ενός συνδυασμού στερεοχημικού αποκλεισμού και ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων συνδετών XY και της αρνητικά φορτισμένης PtdInsP₂. Η δομική περιοχή του συνδέτη XY της PLCγ διαθέτει επιπλέον ρυθμιστικές δομικές περιοχές, σε σχέση με τις άλλες PLC, που περιλαμβάνουν μια δομική περιοχή PH, δυο δομικές περιοχές SH2 και μια δομική περιοχή SH3. Η PLCγ ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης εντός της δομικής περιοχής του συνδέτη XY [125]. Μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι ο γενικός μηχανισμός αυτοαναστολής μέσω της δομικής περιοχής του συνδέτη XY ισχύει και για την PLCγ και ότι η κρίσιμη συνιστώσα για την αυτοαναστολή είναι η δομική περιοχή SH2 στο καρβοξυτελικό άκρο του συνδέτη XY [125]. Είναι ενδιαφέρον ότι οι δομικές περιοχές του συνδέτη XY των ισομορφών της PLCη δεν είναι σε όλο τους το μήκος αρνητικά φορτισμένες, αλλά περιέχουν τμήματα με όξινα αμινοξέα κοντά στα άκρα τους. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί εάν ο συνδέτης XY της PLCη διαδραματίζει έναν αντίστοιχο αυτοανασταλτικό ρόλο όπως στις άλλες PLC.

Στη συγκεκριμένη διατριβή διερευνήθηκε εάν ο προτεινόμενος γενικός μηχανισμός αυτοαναστολής των PLC από τη δομική περιοχή του συνδέτη

ΧΥ ισχύει και για την PLCζ. Για τις ανάγκες του πειράματος, σχεδιάστηκε μια ελλειμματική αλληλουχία της PLCζ από την οποία απαλείφθηκε η δομική περιοχή του συνδέτη ΧΥ, προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση αυτής της απαλοιφής στην ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} *in vivo* και την ενζυμική δραστικότητα της PLCζ *in vitro*. Για συγκριτική ανάλυση, εξετάστηκε η επίδραση της απαλοιφής του συνδέτη ΧΥ της PLCδ1 στην ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} *in vivo* και την ενζυμική δραστικότητα της PLCδ1 *in vitro*. Η PLCδ1 δεν έχει ανιχνευθεί σε διαφοροποιημένες σπερματίδες και σπερματοζώαρια και είναι απίθανο να είναι ο σπερματικός παράγοντας ενεργοποίησης των ταλαντώσεων Ca^{2+} κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης των θηλαστικών. Ωστόσο, λειτούργησε ως χρήσιμος μάρτυρας στις *in vivo* και *in vitro* μελέτες. Μολονότι η PLCδ1 εμφάνισε πολύ υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα *in vitro* σε σύγκριση με την PLCζ (Πίνακας 3.4), η ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} στα ωάρια ποντικού ήταν πολύ χαμηλότερη (Πίνακας 3.3). Είναι ενδιαφέρον ότι η απαλοιφή του συνδέτη ΧΥ από την PLCδ1 διπλασίασε τις ταλαντώσεις Ca^{2+} σε ωάρια ποντικού. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας υδρόλυσης PtdInsP_2 , τα οποία έδειξαν ότι η PLCδ1ΔΧΥlinker είχε ~2,3 φορές υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα σε σύγκριση με την PLCδ1 (Πίνακας 3.4). Υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή InsP_3 και, κατά συνέπεια, σε αύξηση της ικανότητας πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} . Αντίθετα, η απαλοιφή του συνδέτη ΧΥ από την PLCζ μείωσε την ενζυμική δραστικότητα και τη χημική συγγένεια της PLCζΔΧΥlinker για την PtdInsP_2 , που θα μπορούσε να εξηγήσει την μείωση κατά 5 φορές της ικανότητας πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} σε ωάρια ποντικού, δεδομένου ότι η απαλοιφή της δομικής περιοχής του συνδέτη ΧΥ δεν φαίνεται να μεταβάλλει την ευαισθησία της PLCζΔΧΥlinker στο Ca^{2+} (Πίνακες 3.3 και 3.4). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η δομική περιοχή του συνδέτη ΧΥ της PLCζ διαδραματίζει ένα μοναδικό ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία και τον τρόπο ρύθμισης αυτής της πρωτεΐνης σε σύγκριση με την PLCδ1 και πιθανώς άλλες ισομορφές PLC. Η κρίσιμη συνιστώσα για αυτή τη διαφορά μπορεί να είναι το τμήμα με τα βασικά αμινοξέα που απουσιάζουν από την ομόλογη περιοχή της PLCδ1.

4.6. Η δομική περιοχή του συνδέτη XY κατεύθυνει την PLCζ σε ενδοκυτταρικές δεξαμενές PtdInsP₂.

Το 2007, οι Nomikos και συνεργάτες πρότειναν ότι το τμήμα των διαδοχικών θετικά φορτισμένων αμινοξέων του συνδέτη XY της PLCζ παίζει ρόλο στη στόχευση του ενζύμου σε βιολογικές μεμβράνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την αρνητικά φορτισμένη PtdInsP₂. Πειράματα FRET με ένα συνθετικό πεπτίδιο που αντιστοιχεί σε ένα τμήμα του συνδέτη XY έχουν δείξει ότι βασικά αμινοξέα μπορούν να βοηθήσουν την αγκυροβόληση της PLCζ στη μεμβράνη και να ενισχύσουν την τοπική συγκέντρωση [PtdInsP₂] στην καταλυτική περιοχή της PLCζ [145].

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε η ικανότητα των δομικών περιοχών του συνδέτη XY και C2 της PLCζ να αλληλεπιδρούν με PtdInsP₂. Για το σκοπό αυτό οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις δομικές περιοχές του συνδέτη XY και C2 της PLCζ κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P-1, εκφράστηκαν σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* και απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας (Σχήμα 3.23). Τα αποτελέσματα της επίστρωσης του συνδέτη XY και της δομικής περιοχής C2 της PLCζ σε λιπίδια και της δοκιμασίας σύνδεσης σε λιποσώματα υποδεικνύουν ότι μόνο ο συνδέτης XY συνδέεται ισχυρά σε εμπορικά διαθέσιμες μεμβράνες ενσταλαγμένες με PtdInsP₂ (Σχήμα 3.24) ή σε λιποσώματα που περιέχουν μια σχεδόν φυσιολογική συγκέντρωση PtdInsP₂ (1%) (Σχήμα 3.25). Η επίστρωση της δομικής περιοχής C2 σε λιπίδια αποκάλυψε ότι η δομική περιοχή C2 συνδέεται μόνο με τα μονοφωσφορικά φωσφοϊνοσιτίδια, PtdIns(3)P και PtdIns(5)P (Σχήμα 3.24). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις που έδειξαν με μια παρόμοια τεχνική ότι η δομική περιοχή C2 της PLCζ συνδέεται με PtdIns(3)P και με χαμηλότερη συγγένεια με PtdIns(5)P [122,141]. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι η αλληλεπίδραση της δομικής περιοχής C2 με PtdIns(3)P ή PtdIns(5)P διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στη στόχευση της PLCζ σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Ωστόσο, μια τέτοια αλληλεπίδραση μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας της PLCζ, αφού έχει

παρατηρηθεί ότι η PtdIns(3)P μειώνει την ενζυμική δραστηριότητα της PLCζ [122] .

Σε αντίθεση με τη δομική περιοχή C2, η δομική περιοχή του συνδέτη XY της PLCζ εμφανίζει ισχυρή σύνδεση σε όλα τα φωσφοϊνοσιτίδια, με μεγαλύτερη προτίμηση στην PtdInsP₂ και την PtdIns(3,4,5)P₃ (Σχήμα 3.24). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της επίστρωσης πρωτεϊνών σε λιπίδια, η δοκιμασία σύνδεσης σε λιποσώματα έδειξε ότι μόνο ο συνδέτης XY συνδέεται σε λιποσώματα που περιέχουν PtdInsP₂ (Σχήμα 3.25). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του θετικά φορτισμένου συνδέτη XY της PLCζ μπορεί να συμβάλλουν καταλυτικά στη φυσιολογική αλληλεπίδραση της PLCζ με την PtdInsP₂, αν και χωρίς περαιτέρω μελέτη της κινητικής του ενζύμου και επίγνωση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, δεν μπορεί να αποκλειστεί και ο ρόλος που μπορεί να διαδραματίζουν οι υπόλοιπες δομικές περιοχές της PLCζ .

Εφόσον, η θεωρία ότι η PLCζ στοχεύει το υπόστρωμά της μέσω του συνδέτη XY βασίζεται στην ύπαρξη θετικά φορτισμένων αμινοξέων στην αλληλουχία του συνδέτη που έλκουν ηλεκτροστατικά την αρνητικά φορτισμένη PtdInsP₂, γεννάται εύλογα το ερώτημα για το ποιός θα ήταν ο αντίκτυπος της εξουδετέρωσης του θετικού φορτίου στη δομική περιοχή του συνδέτη XY. Θα επηρέαζε την *in vivo* ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca²⁺ και τις *in vitro* ενζυμικές ιδιότητες της PLCζ; Για τη μελέτη αυτής της υπόθεσης χρησιμοποιήθηκε σημείο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση για να παραχθούν τρεις συσσωρευμένες μεταλλάξεις εντός του συνδέτη XY της PLCζ που θα εξουδετέρωναν το θετικό φορτίο της συγκεκριμένης περιοχής. Έτσι, τρία κατάλοιπα λυσίνης στις θέσεις K374, K375 και K377 της αλληλουχίας της PLCζ, που εντοπίζονται στην περιοχή του συνδέτη XY αντικαταστάθηκαν διαδοχικά από το ουδέτερο αμινοξύ αλανίνη για τη δημιουργία τριών εκδοχών της PLCζ αγρίου τύπου με μια (PLCζ^{K374A}), δύο (PLCζ^{K374,5AA}) και τρεις (PLCζ^{K374,5,7AAA}) μεταλλάξεις στην αλληλουχία της (Σχήμα 3.26). Μικροέγχυση του cRNA που κωδικοποιεί για τις PLCζ-LUC, PLCζ^{K374A}-LUC, PLCζ^{K374,5AA}-LUC και PLCζ^{K374,5,7AAA}-LUC σε ωάρια ποντικού οδήγησε στην έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και ακολουθήθηκε από την έναρξη

ταλαντώσεων Ca^{2+} που συντηρήθηκαν για αρκετές ώρες (Σχήμα 3.27). Η $\text{PLC}\zeta^{\text{K374A}}\text{-LUC}$ εμφάνισε μια αμελητέα μείωση της συχνότητας των ταλαντώσεων Ca^{2+} της τάξεως του 10%, η $\text{PLC}\zeta^{\text{K374,5AA}}\text{-LUC}$ μια σημαντική μείωση της συχνότητας των ταλαντώσεων Ca^{2+} της τάξεως του 60% και τέλος, η $\text{PLC}\zeta^{\text{K374,5,7AAA}}\text{-LUC}$ μια συντριπτική μείωση της συχνότητας των ταλαντώσεων Ca^{2+} της τάξεως του 86% σε σχέση με την $\text{PLC}\zeta\text{-LUC}$, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απώλεια δύο ή περισσότερων θετικών φορτίων στην περιοχή του συνδέτη XY αλλάζει δραστικά την ικανότητα της $\text{PLC}\zeta$ να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} . Συγκεκριμένα, για τις $\text{PLC}\zeta^{\text{K374,5AA}}\text{-LUC}$ και $\text{PLC}\zeta^{\text{K374,5,7AAA}}\text{-LUC}$ υπήρχε μια καθυστέρηση (~65 min) πριν από την εμφάνιση της πρώτης κορυφής Ca^{2+} σε σύγκριση με την $\text{PLC}\zeta$ αγρίου τύπου (~30 λεπτά). Επιπλέον, απαιτήθηκαν υψηλότερα επίπεδα φωταύγειας (πρωτεϊνικής έκφρασης) των δύο αυτών πρωτεϊνών (266% και 409% έναντι της $\text{PLC}\zeta$ αγρίου τύπου) για την εμφάνιση της πρώτης κορυφής Ca^{2+} (Πίνακας 3.5). Η απαίτηση για αυξημένα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών για την εμφάνιση της πρώτης κορυφής Ca^{2+} , σε συνδυασμό με τη μειωμένη συχνότητα ταλαντώσεων Ca^{2+} που εμφάνισαν υποδηλώνει ότι η μείωση του καθαρού θετικού φορτίου του συνδέτη κατά 2 ή περισσότερο μειώνει τη χημική συγγένεια της $\text{PLC}\zeta$ ως προς την αρνητικά φορτισμένη PtdInsP_2 .

Για να προσδιοριστεί η επίδραση των μεταλλάξεων K374A, K374,5AA και K374,5,7AAA στις ενζυμικές ιδιότητες της $\text{PLC}\zeta$, οι $\text{PLC}\zeta^{\text{K374A}}$, $\text{PLC}\zeta^{\text{K374,5AA}}$ και $\text{PLC}\zeta^{\text{K374,5,7AAA}}$ κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P-1, εκφράστηκαν σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* και απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας (Σχήμα 3.28). Παλαιότερος χαρακτηρισμός της δραστικότητας της $\text{PLC}\zeta$ έχει δείξει μια οξεία εξάρτηση από το Ca^{2+} , με νανομοριακή τιμή EC_{50} (82nM), σε αντίθεση με την $\text{PLC}\delta 1$ που έχει μικρομοριακή EC_{50} (6 μM). Δε βρέθηκε κανένα στοιχείο που να συσχετίζει τα κατάλοιπα λυσίνης στην περιοχή του συνδέτη XY με την ευαισθησία της $\text{PLC}\zeta$ στο Ca^{2+} , καθώς όλες οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες εμφάνισαν παρόμοια EC_{50} με εκείνη της $\text{PLC}\zeta$ αγρίου τύπου (Πίνακας 3.6). Η τιμή K_m για τις $\text{PLC}\zeta^{\text{K374,5AA}}$ και $\text{PLC}\zeta^{\text{K374,5AAA}}$ ήταν περίπου 9 και 61 φορές υψηλότερη από εκείνη της $\text{PLC}\zeta$ αγρίου τύπου (Πίνακας 3.6),

γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαδοχική συσσωρευτική εξουδετέρωση των βασικών αυτών καταλοίπων εντός της περιοχής του συνδέτη ουσιαστικά μειώνει την *in vitro* συγγένεια της PLCζ ως προς την PtdInsP₂, χωρίς να επηρεάζει την ευαισθησία του ενζύμου αυτού στο Ca²⁺ (Πίνακας 3.6). Αυτά τα δεδομένα ενισχύουν τη θεωρία ότι αυτό το θετικά φορτισμένο τμήμα του συνδέτη XY παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της PLCζ με την PtdInsP₂.

4.7. Η ανθρώπινη PLCζ υπερσχύει της PLCζ του ποντικού στην επαγωγή ταλαντώσεων Ca²⁺ σε ωάρια ποντικού.

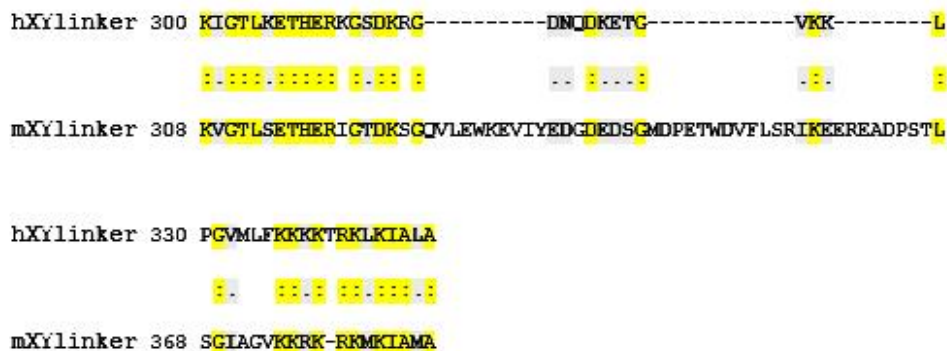
Έχει δειχθεί ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην σχετική δραστηριότητα της PLCζ από διαφορετικά είδη [126]. Στην παρούσα διατριβή, έγινε συγκριτική μελέτη, ποσοτικά και ποιοτικά, της ικανότητας των PLCζ του ανθρώπου και του ποντικού να επάγουν ταλαντώσεις Ca²⁺ σε μη γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού. Η hPLCζ προκάλεσε μεγαλύτερη συχνότητα ταλαντώσεων Ca²⁺ σε ωάρια ποντικού από την mPLCζ (46,2 κορυφές/2 ώρες έναντι 30,8 κορυφές/2 ώρες), παρόλο που μικροεγχύθηκε 20 φορές λιγότερο cRNA που κωδικοποιεί για την hPLCζ από ότι για τη mPLCζ. Η μικροέγχυση τόσο λιγότερου cRNA είχε ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα έκφρασης hPLCζ στα ωάρια ποντικού σε σχέση με τη mPLCζ. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ποσοτικά ότι η hPLCζ είναι πολύ πιο αποτελεσματική στην πρόκληση ταλαντώσεων Ca²⁺ σε ωάρια ποντικού από ότι η mPLCζ. Αυτή η αξιοσημείωτη διαφορά μπορεί σε μεγάλο βαθμό να εξηγηθεί από τις διαφορές στις *in vitro* ενζυμικές ιδιότητες των PLCζ ανθρώπου και ποντικού. Η hPLCζ παρουσίασε ~44% μεγαλύτερη δραστηριότητα από τη mPLCζ (978±34 έναντι 556±29 nmol/min/mg), αλλά οι δύο πρωτεΐνες εμφάνισαν σχεδόν ταυτόσημες τιμές EC₅₀ και Km (Πίνακας 3.8), υποδηλώνοντας παρόμοια ευαισθησία για το Ca²⁺ και παρόμοια συγγένεια για την PtdInsP₂. Η πλήρης εξήγηση γιατί η hPLCζ είναι πιο δραστική από τη mPLCζ μπορεί να χρειαστεί περαιτέρω διερεύνηση. Ωστόσο, μπορούν να γίνουν εικασίες ως προς το γιατί το ανθρώπινο σπέρμα μπορεί να περιέχει ένα πραγματικά πιο ενεργό ένζυμο. Η hPLCζ και η mPLCζ είναι διαφορετικές σε μορφή, αλλά όχι σημαντικά

διαφορετικές σε μέγεθος, και παρόλο που η ποσότητα της PLCζ δεν έχει ποσοτικοποιηθεί στο ανθρώπινο σπέρμα μπορεί να είναι παρόμοια με εκείνη στο σπέρμα του ποντικού. Αν συμβαίνει κάτι τέτοιο, τότε το ανθρώπινο σπέρμα αντιμετωπίζει μια μεγαλύτερη πρόκληση στην ενεργοποίηση του ωαρίου. Η PLCζ που προέρχεται από το σπέρμα υποτίθεται ότι διανέμεται ομοιόμορφα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου μετά την σύντηξη των γαμετών. Ωστόσο, ο όγκος του ανθρώπινου ωαρίου είναι περίπου 5 φορές μεγαλύτερος από εκείνον του ωαρίου του ποντικού, επομένως η hPLCζ χρειάζεται να προκαλέσει ταλαντώσεις σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Στην παρούσα μελέτη προτείνεται ότι αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με τουλάχιστον 5 φορές μεγαλύτερη ικανότητα πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} από πλευράς της hPLCζ. Η διαφοροποίηση μεταξύ των δραστηριοτήτων των PLCζ διαφορετικών ειδών μπορεί να επιτρέπει την ακριβή ρύθμιση της αποτελεσματικής “δόσης” PLCζ που μεταφέρεται από το σπέρμα κάθε είδους, η οποία προσαρμόζεται στο μέγεθος και την ευαισθησία του ωαρίου του ίδιου είδους.

4.8. Οι δομικές περιοχές των EF hands και του συνδέτη XY ευθύνονται για την αξιοσημείωτη δραστηριότητα της ανθρώπινης PLCζ.

Εφόσον η hPLCζ είναι πιο αποτελεσματική στην πρόκληση ταλαντώσεων Ca^{2+} σε ωάρια ποντικού από ότι η mPLCζ, προκύπτει το ερώτημα για το ποιά ή ποιές είναι οι δομικές περιοχές που συνεισφέρουν στην υψηλή δραστηριότητα της hPLCζ. Για την απάντηση του παραπάνω ερωτήματος, σχεδιάστηκαν τρεις χιμαιρικές αλληλουχίες, οι mEF-ΔEFhPLCζ, hPLCζΔXYlinker-mXYlinker και hPLCζΔC2-mC2 όπου οι δομικές περιοχές EF hands, XY linker και C2 της hPLCζ αντικαταστάθηκαν από εκείνες της mPLCζ αντίστοιχα. Η αντικατάσταση της δομικής περιοχής C2 της hPLCζ από την αντίστοιχη της mPLCζ είχε μόνο μικρή επίδραση στις *in vitro* ενζυμικές ιδιότητες της hPLCζ και, κατά συνέπεια, στην ικανότητά της να προκαλεί ταλαντώσεις Ca^{2+} σε μη γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού. Αντίθετα, η αντικατάσταση της δομικής περιοχής EF hands της hPLCζ από την αντίστοιχη της mPLCζ, είχε ως αποτέλεσμα μια ελαφρώς μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα, αλλά μείωσε κατά 3 φορές την ευαισθησία της

hPLCζ στο Ca^{2+} , και αύξησε κατά 6 φορές την τιμή K_m για την PtdInsP_2 , γεγονός που υποδηλώνει μειωμένη συγγένεια του ενζύμου για την PtdInsP_2 . Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να εξηγήσουν τη μείωση της ικανότητας πρόκλησης ταλαντώσεων Ca^{2+} σε ωάρια ποντικού, και συνιστούν ότι η δομική περιοχή EF hands δεν είναι υπεύθυνη μόνο για την ευαισθησία της PLCζ στο Ca^{2+} αλλά πιθανώς και για συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα του. Η πιο δραματική επίδραση στη hPLCζ παρατηρήθηκε μετά την αντικατάσταση της δομικής περιοχής του συνδέτη XY της hPLCζ από την αντίστοιχη της mPLCζ. Αυτή η αντικατάσταση οδήγησε σε μια αποσταθεροποίηση της hPLCζ με αποτέλεσμα την ταχεία πρωτεόλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, εντός της δομικής περιοχής του συνδέτη XY, κατά τη διάρκεια των σταδίων καθαρισμού (Σχήμα 3.36). Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης της hPLCζΔXYlinker-mXYlinker σε ωάρια ποντικού (Πίνακας 3.8). Έχει προταθεί ότι η δομική περιοχή του συνδέτη XY της PLCζ διευκολύνει την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης σε βιολογικές μεμβράνες μέσω μη ειδικών αλληλεπιδράσεων με το αρνητικά φορτισμένο PtdInsP_2 [141,145]. Ανάλυση ομοπαράθεσης των αλληλουχιών των PLCζ διαφορετικών ειδών έδειξε ότι η δομική περιοχή του συνδέτη XY είναι η λιγότερο συντηρημένη μεταξύ των ειδών [127]. Η δομική περιοχή του συνδέτη XY της hPLCζ είναι μικρότερη και πιο θετικά φορτισμένη από εκείνη της mPLCζ, εμφανίζοντας μόνο 34.2 % ταυτότητα και 18% ομοιότητα (Σχήμα 4.1). Η σημασία αυτής της ποικιλομορφίας είναι ακόμα ασαφής, αλλά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η διαφοροποίηση αυτή συμβάλλει στα διαφορετικά ποσοστά υδρόλυσης PtdInsP_2 και σχετικής δραστηριότητας στην επαγωγή ταλαντώσεων Ca^{2+} μεταξύ αυτών των δύο ισομορφών PLCζ.



Σχήμα 4. 1: Αμινοξική ομοπαράθεση των αλληλουχιών του συνδέτη XY της PLCΖ του ανθρώπου και του ποντικού. Ταυτόσημα αμινοξέα δείχνονται σε σκιασμένα κίτρινα κουτιά και συντηρημένες υποκαταστάσεις σε γκρι

4.9. Κλινικές εφαρμογές της PLCΖ

Η πρόοδος στην κατανόηση της ενεργοποίησης των ωαρίων μέσω του μηχανισμού δράσης και ρύθμισης της PLCΖ αναμένεται να προσφέρει σημαντικό όφελος στην τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Ενώ η ART έχει οδηγήσει επιτυχώς, ως άμεσο αποτέλεσμα των πρωτοποριακών τεχνολογιών της IVF και της ICSI, σε ποσοστά γεννήσεων που πλησιάζουν το ~7% σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες [132,146], διάφορες περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας παραμένουν ανιάτες. Ποσοστό 1-5% των κύκλων ICSI εξακολουθούν να αποτυγχάνουν, πλήττοντας τουλάχιστον 1.000 ζευγάρια το χρόνο μόνο στο Ηνωμένο Βασίλειο [146], με την ανεπάρκεια στην ενεργοποίηση του ωαρίου να θεωρείται επί του παρόντος ως η κύρια αιτία της αποτυχίας της ICSI [132] .

Μια σειρά από κλινικές μελέτες έχουν συσχετίσει βλάβες στην ανθρώπινη PLCΖ με περιπτώσεις ανεπάρκειας ενεργοποίησης του ωαρίου (Oocyte Activation Deficiency, OAD). Σπέρμα υπογόνιμων ανδρών που επανειλημμένως απέτυχαν να γονιμοποιήσουν με IVF και ICSI, είτε αδυνατεί να προκαλέσει ταλαντώσεις Ca^{2+} μετά από μικροέγχυσή του σε ωάρια ποντικού, είτε προκαλεί ταλαντώσεις διακριτές από εκείνες που προκαλεί η μικροέγχυση σπέρματος από γόνιμους άνδρες, καθώς οι ταλαντώσεις αυτές παρουσιάζουν μείωση τόσο στη συχνότητα όσο και στο πλάτος τους σε σχέση με τις φυσιολογικές [70-71]. Πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι άνδρες που απέτυχαν

να γονιμοποιήσουν με ICSI παρουσίασαν μειωμένα ή μηδαμινά επίπεδα PLCζ στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων τους [70-71]. Επιπλέον, η ταυτοποίηση δύο σημειακών μεταλλάξεων στην αλληλουχία της PLCζ (H233L και H398P) σε άνδρα που απέτυχε να γονιμοποιήσουν με ICSI υποδεικνύει ότι η PLCζ δε συμβάλλει μόνο στην ανδρική στειρότητα, αλλά ίσως και σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας [147]. Τα παραπάνω στοιχεία υπογραμμίζουν την κλινική δυναμική της PLCζ είτε ως θεραπευτικής παρέμβασης, είτε ως προγνωστικού δείκτη της OAD.

Η OAD επί του παρόντος αντιμετωπίζεται με μεθοδολογίες υποβοηθούμενης ενεργοποίησης του ωαρίου (Assisted Oocyte Activation, AOA), όπως η χρήση ιοντοφόρου Ca^{2+} ή χλωριούχου στροντίου [148-149]. Πράγματι, η χρήση ιοντοφόρου Ca^{2+} σε ασθενείς με βλάβη στην PLCζ κατάφερε να ενεργοποιήσει τεχνητά τα ωάρια μετά από ICSI με αποτέλεσμα υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης και επιτυχημένη εγκυμοσύνη [149]. Ωστόσο, οι χημικές ουσίες μπορεί να είναι επιζήμιες για τη βιωσιμότητα του εμβρύου, γεγονός που εγείρει ανησυχία σχετικά με την υγείας τους μακροπρόθεσμα λόγω πιθανών κυτταροτοξικών, μεταλλαξιγόνων και τερατογόνων επιδράσεων σε ωάρια και έμβρυα [150]. Τα μοτίβα έκλυσης Ca^{2+} μετά από θεραπεία με ιοντοφόρο δεν μιμούνται εκείνο που παρατηρείται κατά τη φυσιολογική γονιμοποίηση [71].

Τρέχοντα πρωτόκολλα AOA μπορεί να μην είναι ευεργετικά για όλους τους ασθενείς που παρουσιάζουν προβλήματα που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του ωαρίου, καθώς ενισχύουν τα ποσοστά γονιμοποίησης σε περιπτώσεις επιτυχούς γονιμοποίησης, αλλά όχι σε περιπτώσεις με χαμηλά ποσοστά επιτυχούς γονιμοποίησης [151]. Επιπλέον, το ανώμαλο σήμα Ca^{2+} που προκαλείται, το οποίο συχνά εκδηλώνεται ως μία μόνο παροδική αύξηση Ca^{2+} , αποτελεί μια πιθανή απειλή για την ανάπτυξη σε μεταγενέστερα στάδια, με πιθανές επιπτώσεις στις επιγενετικές διεργασίες [152]. Επομένως, ένας ενδογενής θεραπευτικός παράγοντας απαιτείται επειγόντως για να αντικαταστήσει την τρέχουσα μεθοδολογία που προσπαθεί να αποκαταστήσει το πρόβλημα της υπογονιμότητας με τεχνητούς τρόπους.

Οι Yoon και συνεργάτες απέδειξαν ότι οι ανωμαλίες στην PLCζ μπορούσαν να αποκαταστάθουν με συνέγχυση mRNA της PLCζ του ποντικού [70], ενώ οι Rogers και συνεργάτες παρουσίασαν την παρθενογενετική γενιά βλαστοκύστεων με έγχυση cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ σε ανθρώπινα ωάρια [153]. Ωστόσο, η θεραπευτική χρήση cRNA που κωδικοποιεί για την PLCζ δεν μπορεί να είναι βιώσιμη, αφού ανεξέλεγκτη μεταγραφή της PLCζ θα ήταν επιζήμια για την προεμφυτευτική ανάπτυξη, με αναπτυξιακές ανωμαλίες να παρατηρούνται σε ορισμένα έμβρυα [153]. Ως εκ τούτου, η σύνθεση καθαρής και δραστηκής ανασυνδυασμένης PLCζ αποτέλεσε βασικό στόχο κατά τα τελευταία χρόνια, ένας στόχος που φαίνεται να έχει τελικά επιτευχθεί μετά από μια πρόσφατη μελέτη [128]. Οι Nomikos και συνεργάτες κατόρθωσαν να παράγουν καθαρισμένη ανασυνδυασμένη ανθρώπινη PLCζ σε μια σταθερή κατάσταση που ήταν σε θέση να επάγει ταλαντώσεις Ca^{2+} σε φυσιολογική κλίμακα. Σε αυτή τη μελέτη, επίσης, αποδείχθηκε ότι τα επιβλαβή αποτελέσματα των μεταλλαγμένων μορφών της PLCζ μπορούν να υπερσκελιστούν αποτελεσματικά με τη χρησιμοποίηση της ανασυνδυασμένης PLCζ [128]. Ωστόσο, αν και άκρως ενθαρρυντική, η χρησιμοποίηση της ανασυνδυασμένης PLCζ πρέπει να μεταπηδήσει από εργαστηριακές σε κλινικές δοκιμές, πριν από την ευρεία χρήση της σε κλινικές γονιμότητας.

Λαμβάνοντας υπόψη την προαναφερθείσα συζήτηση σχετικά με τη συμβολή της PLCζ στην επιτυχή γονιμοποίηση και την εμβρυογένεση, η PLCζ μπορεί να αποτελέσει ένα ισχυρό βιολογικό δείκτη με τον οποίο θα μπορεί να εξετάζεται η λειτουργική ικανότητα του σπέρματος. Μια πρόσφατη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε η PLCζ ως βιοδείκτης έδειξε ότι η Αξιολόγηση Κινητικότητας Σπέρματος-Μορφολογίας Οργανιδίων [Motile Sperm Organelle Morphology Evaluation (MSOME)], μια μεθοδολογία που βασίζεται σε μεγέθυνση μεγάλης ισχύος του ανθρώπινου σπέρματος, πριν την εφαρμογή της ICSI, μπορεί να επιλέξει σπέρματα με τα υψηλότερα επίπεδα PLCζ.

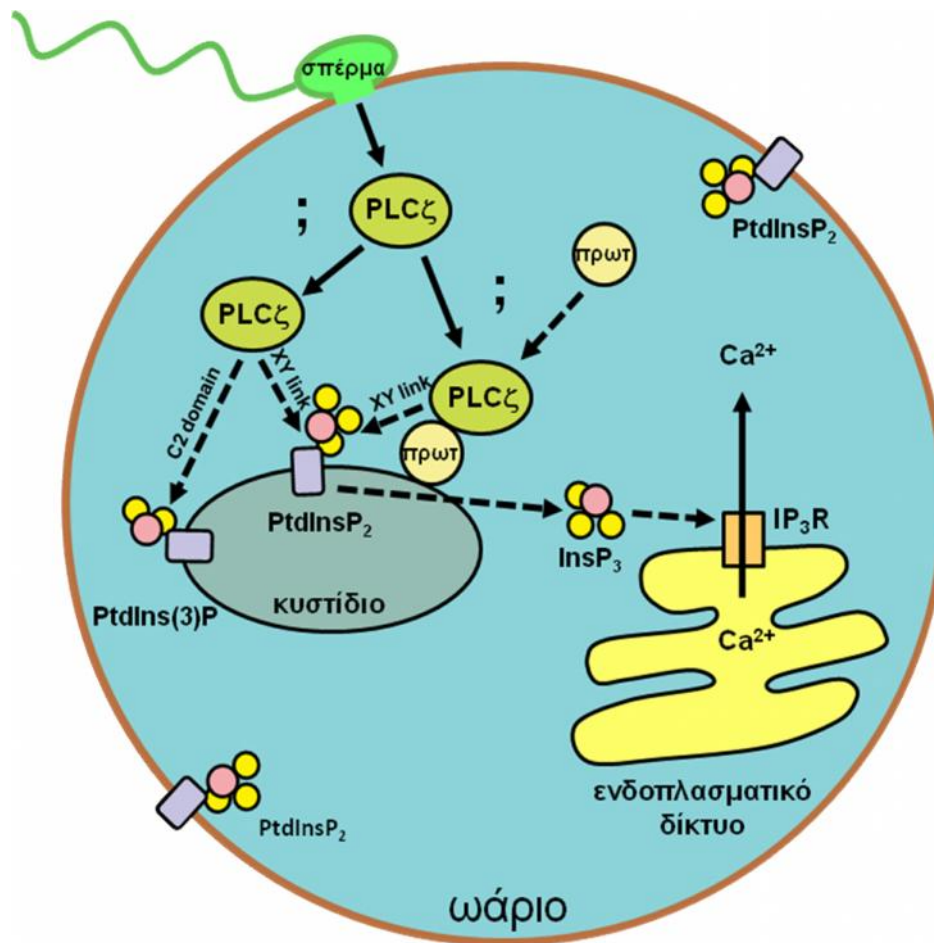
Επομένως, μια σημαντική εφαρμογή της PLCζ μπορεί να είναι ως προγνωστικός δείκτης της ικανότητας ενεργοποίησης του ωαρίου από το σπέρμα, και ως εκ τούτου της γονιμότητας ενός άνδρα. Ένα διαγνωστικό

τεστ που βασίζεται στη μικροέγχυση ανθρώπινου σπέρματος σε ωάρια ποντικού, γνωστό ως δοκιμασία ενεργοποίησης ωαρίου ποντικού (Mouse Oocyte Activation Test, MOAT) έχει προηγουμένως αναπτυχθεί ως ένα ετερόλογο μοντέλο αξιολόγησης της ικανότητας ενεργοποίησης του ωαρίου από το ανθρώπινο σπέρμα [132]. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη ότι η ανθρώπινη PLCζ είναι πιο δραστική σε σχέση με την PLCζ του ποντίκου, η MOAT μπορεί να ανιχνεύσει μόνο ακραίες περιπτώσεις ανεπάρκειας της PLCζ, όπως όταν η PLCζ απουσιάζει εντελώς από το σπέρμα, και όχι όταν υπάρχει μια μικρή μείωση της ικανότητας ενεργοποίησης του ωαρίου. Όλα αυτά σε συνδυασμό με την ανάγκη κτιριακών εγκαταστάσεων, εξειδικευμένου εξοπλισμού και προσωπικού, η MOAT δε μπορεί να θεωρηθεί ένα βιώσιμο διαγνωστικό τεστ για την ανίχνευση της ικανότητας ενεργοποίησης των ωαρίων από τα σπερματοζωάρια [132].

Μια πιο ελκυστική επιλογή θα ήταν η άμεση εξέταση της PLCζ του σπέρματος. Μελέτες έδειξαν ότι το σπέρμα από γόνιμους άνδρες παρουσίασε σταθερά υψηλότερες αναλογίες σπερματοζωαρίων που εμφάνιζαν ανοσοφθορισμό της PLCζ σε σύγκριση με σπέρμα από στείρους άνδρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο καθορισμός του αριθμού των σπερματοζωαρίων που εμφανίζουν PLCζ σε ένα συγκεκριμένο δείγμα μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα πιο χρήσιμο διαγνωστικό τεστ.

4.10. Μελλοντικές κατευθύνσεις της παρούσας μελέτης

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αποδείχθηκαν κάποιες σημαντικές βιοχημικές ιδιότητες της PLCζ. Με βάση αυτά τα ευρήματα, προτείνεται ένας υποθετικός μηχανισμός δράσης της PLCζ όπως συνοψίζεται στο σχήμα 4.2.



Σχήμα 4.2: Υποθετικός μηχανισμός δράσης της PLCζ

Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, αναπτύχθηκαν νέες και εξελίχθηκαν παλαιότερες πειραματικές προσεγγίσεις, οι οποίες αποδείχθηκαν ιδιαίτερα πολύτιμες στη μελέτη της PLCζ. Ο σχεδιασμός των αλληλουχιών με προσθήκη LUC έδωσε τη δυνατότητα ταυτόχρονης ποσοτικοποίησης της έκφρασης των πρωτεϊνών και της δραστηρότητάς τους. Η έκφραση και η απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτηριακά κύτταρα αποδείχθηκε ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη των ενζυμικών ιδιοτήτων της PLCζ αγρίου τύπου και των χιμαιρικών, ελλειματικών ή μεταλλαγμένων μορφών της. Στο μέλλον, τα εργαλεία αυτά μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω μελέτες για την απάντηση πολλών ερωτημάτων που παραμένουν ανοιχτά σχετικά με το μηχανισμό δράσης της PLCζ και το ρόλο της στη γονιμοποίηση.

Ένα βήμα προς τα εμπρός στην ανάλυση των μοριακών ιδιοτήτων της PLCζ θα είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ υψηλής πιστότητας καθαρισμένης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης PLCζ, κατά προτίμηση χωρίς ετικέτα. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ θα αποκαλύψει όλες τις κρίσιμες θέσεις δέσμευσης ιόντων και λιπιδίων ή πρωτεϊνών στην PLCζ και θα παράσχει ένα χρήσιμο εργαλείο για την περαιτέρω διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της PLCζ με ιόντα, λιπίδια ή πρωτεΐνες, τα οποία μπορούν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της.

Για να ελεγχθεί εάν ο υποκυτταρικός εντοπισμός της PLCζ μεσολαβείται από αλληλεπιδράσεις της δομικής περιοχής του συνδέτη XY ή της δομικής περιοχής C2 με κάποια πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος του ωαρίου, η οποία μεταφέρει τη PLCζ σε μια πλούσια σε PtdInsP₂ μεμβράνη, θα είναι πολύτιμη η χρήση του συστήματος διπλού υβριδίου ζύμης που μπορεί να ακολουθηθεί από μια πιο εξειδικευμένη δοκιμασία για τους μηχανισμούς αυτών των αλληλεπιδράσεων, όπως η ανοσοκαταβύθιση.

Για να διερευνηθούν αλληλεπιδράσεις της PLCζ με λιπίδια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική του συντονισμού πλασμονίου επιφανείας (Surface Plasmon Resonance, SPR). Η τεχνική αυτή μετρά την κινητική της ενδομοριακής ενώσης με υψηλό βαθμό ακρίβειας, σε πραγματικό χρόνο. Η SPR έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για τη διερεύνηση την κινητική δέσμευσης λιπιδίων άλλων δομικών περιοχών C2, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των PLA2, PKC και PLCδ1.

Η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-hPLCζ είναι ανεκτίμητη. Εάν αυτά τα μονοκλωνικά αντισώματα αναστέλλουν την έναρξη και τη συντήρηση των ταλαντώσεων Ca²⁺ θα είναι μια άλλη επιβεβαίωση ότι PLCζ είναι το μοναδικό μόριο υπεύθυνο για την παραγωγή των ταλαντώσεων Ca²⁺ κατά τη γονιμοποίηση. Επιπλέον, αυτά τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση του ανθρώπινου σπέρματος παρέχοντας μια καλύτερη κατανόηση για την ανδρική υπογονιμότητα δεδομένου ότι το 40% των αποτυχημένων ICSI οφείλονται στην αποτυχία της ενεργοποίησης του ωαρίου.

Απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για την αποσαφήνιση του τρόπου ενεργοποίησης και ρύθμισης της PLCζ. Αυτό θα συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των θεμελιωδών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των ωαρίων και την εμβρυογένεση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
ADAM	πρωτεΐνη σπέρματος
AOA	υποβοηθούμενη ενεργοποίηση ωαρίου
ART	τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής
BSA	αλβουμίνη βόειου ορού
cRNA	συμπληρωματικό RNA
DAG	διακυλογλυκερόλη
EGF	επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
GPCRs	υποδοχείς που συνδέονται με πρωτεΐνες G
GST	S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
hCG	ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη
hPLCζ	φωσφολιπάση C ζ του ανθρώπου
ICSI	ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος
IL	ιντερλευκίνη
InsP ₃	τριφωσφορική ινοσιτόλη
InsP ₃ R	υποδοχέας τριφωσφορικής ινοσιτόλης
IPTG	ισοπροπυλοβ-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδη
IU	διεθνείς μονάδες (international units)
IVF	τεχνητή γονιμοποίηση
LH	ωχρινοποιητική ορμόνη
LUC	λουσιφεράση
MAPK	πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα
MOAT	δοκιμασία ενεργοποίησης ωαρίου ποντικού
mPLCζ	φωσφολιπάση C ζ του ποντικού
MSOME	αξιολόγηση κινητικότητας σπέρματος-μορφολογίας οργανιδίων
NGF	νευρικός αυξητικός παράγοντας
NLS	αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού
NRTKs	κινάσες της τυροσίνης που δεν είναι υποδοχείς

OAD	ανεπάρκεια ενεργοποίησης ωαρίου
PAF	παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PtdInsP ₂	διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PDGF	αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας
PKA	πρωτεϊνική κινάση A
PKC	πρωτεϊνική κινάση C
PLA	φωσφολιπάση A
PLC	φωσφολιπάση
PTPases	πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης
ROS	δραστικές ρίζες οξυγόνου
RTK	υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης
RyR	υποδοχέας ρυανοδίνης
sAC	διαλυτή αδενολική κυκλάση
SPR	συντονισμού πλασμονίου επιφανείας
ZP1	γλυκοπρωτεΐνη διαφανούς ζώνης zona pellucida 1
ZP2	γλυκοπρωτεΐνη διαφανούς ζώνης zona pellucida 2
ZP3	γλυκοπρωτεΐνη διαφανούς ζώνης zona pellucida 3

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

ADAM	a disintegrin and metalloprotease domain
AOA	assisted oocyte activation
ART	assisted reproduction technology
BSA	bovine serum albumine
cRNA	complementary RNA
DAG	diacylglycerol
EGF	epidermal growth factor
GPCR	G-protein coupled receptor
GST	glutathione S tranferase
hCG	human chorionic gonadotropin
hPLCζ	human phospholipase C ζ
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
IL	interleucine
InsP ₃	inositol trisphosphate
InsP ₃ R	inositol trisphosphate receptor
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IU	international units
IVF	<i>in vitro</i> fertilization
LH	luteinizing hormone
LUC	luciferase
MAPK	mitogen activated protein kinase
MOAT	mouse oocyte activation test
mPLCζ	mouse PLCζ
MSOME	motile sperm organelle morphology evaluation
NLS	nuclear localization sequence
NGF	nerve growth factor
NRTK	non-receptor tyrosine kinase
OAD	oocyte activation deficiency

PAF	platelet activating factor
PtdInsP ₂	phosphatidylinositol biphosphate
PDGF	platelet-derived growth factor
PH	plekstrin homology
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLA	phospholipase A
PLC	phospholipase C
PTPase	protein tyrosine phosphatase
ROS	reactive oxygen species
RTK	receptor tyrosine kinase
RyR	ryanodine receptor
sAC	soluble adenylyl cyclase
SNARE	soluble NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) attachment protein receptors
SPR	surface plasmon resonance
ZP1	zona pellucida 1
ZP2	zona pellucida 2
ZP3	zona pellucida 3

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις ενισχύσεις με PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'άκρο-3'άκρο)	T _m (°C)
PHd1F	GCGCGGTACCATGGACTCGGGTAGGGACTTCC	73,3
PHd1R	AACGGAATTCGGAGCCGGAGTGGTGGAT	60,9
ZF	CACGGAATTCATGGAAAGCCAACTTCATGA	63,0
Z647R	CCGATGCGGCCGCGCACTCTCTGAAGTACCAAAC	72,2
EFd1F	AACGGAATTCATGGACCAGCGGCAGAAGCTG	69,1
EFd1R	CATCACATTCTGATGAAAACAT	55,8
ΔEFZF	ATGTTTTTCATCAGAATGT	39,9
ΔEFZR	TCGATGCGGCCGCGCACTCTCTGAAGTACCAAAC	75,5
ZΔC2F	TCCCGAATTCATGGAAAGCCAACTTCATGA	63,0
ZΔC2R	AAAGCCCAGGGTTGTATC	51,5
C2d1F	CACCGCGGCCGCTTAGTCCTGGATGGAGATCTTC	61,2
C2d1R	CACCGCGGCCGCTTAGTCCTGGATGGAGATCTTC	74,5
Z1F	CACAGGTACCATGGAAAGCCAACTTCATGA	65,5
Z307R	TCCCGAATTCCTGTGTTTTTCACTAATATTTTG	60,6
Z150R	TCCCGAATTCCTGTGATGAAAACATGTATC	60,9
Z521F	TCCCGATATCACCTCACAATCCGAATCATC	55,5
Z386F	TCCCGATATCTTATCTGATCTTGTCAATTTATAC	61,0
aZ386F	TACGGAATCCTTATCTGATCTTGTCAATTTATAC	61,0
D1440R	ACCCGATATCCTTCCCTTTCAACAGGATC	65,5
D1491F	TGACGATATCGAGCTCTCCGACATGATCATTTAC	66,4
MPLCZR	CGAAGCGGCCGCTCACTCTCTGAAGTACCAAAC	70,8
PLCd1F	TAACGTCGACATGGACTCGGGTAGGGACTTCC	72,2
PLCd1R	CGCAGCGGCCGCTCAGTCCTGGATGGAGATCTTCAC	76,0
EFD135SALF	ACGAGTCGACATGGACCAGCGGCAGAAGCTGCAG	86,3
XYIzF	CTGATTATCTGATCTTGTCAATTTATAC	60,0
XYIzR	TTTCATTTATCTGATCTTGTCAATTTATAC	63,4
C2zF	TCATTTATCTGATCTTGTCAATTTATAC	61,1
C2ZR	CCAAACTTATCTGATCTTGTCAATTTATAC	62,8
PH1F	GGACTTCTTATCTGATCTTGTCAATTTATAC	63,6
PH136R	CGGAGTGTTATCTGATCTTGTCAATTTATAC	73,3
Mut3771F	GGCGTCGCTGCTAGGGAGAGGAAGATGAAAATAGCC	81,2
Mut3771R	GGCTAATTTTCATCTTCCTCTCCCTAGCAGCGACGCC	81,2
Mut3772F	GGCGTCGCTGCTAGGGCGAGGAAGATGAAAATAGCC	83,7
Mut3772R	GGCTATTTTCATCTTCCTCGCCCTAGCAGCGACGCC	83,7
HZ1	GCGCGGTACCATGGAAATGAGATGGTTTTTGTG	66,5
HZ143F	GCCTGAATTCATGTGTCTACTGTTTAAAAATGAATG	63,2
HZ608R	CACCGCGGCCGCTTATCTGACGTACCAAACATAAAC	69,0
MousChimSal1F	CCTAGTCGACATGGAAAGCCAACTTCATGAGC	76,8
MousChimNotR	CTAAGCGGCCGCTCACTCTCTGAAGTACCAAACATA	78,3
HumChimSal1F	CCTAGTCGACATGGAAATGAGATGGTTTTTGTG	74,2
HumChimNotR	CTAAGCGGCCGCTCATCTGACGTACCAAACATAAAC	79,4
LUCF	TACTGCGGCCGCGATGGAAGACGCCAAAAACATA	71,1
LUCR	TTGCGGCCGCTTACAATTTGGACTTTCC	66,5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν στην πέψη
πλασμιδίων/προϊόντων PCR

Περιοριστική ενδονουκλεάση	Αλληλουχία αναγνώρισης	Ρυθμιστικό διάλυμα	Συνθήκες
BamHI	GGATCC CCTAGG	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 µg/ml BSA pH 7,9	4 h στους 37°C
EcoRI	GAATTC CTTAAG	50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,025% Triton X-100 pH 7,5	4 h στους 37°C
EcoRV	GATATC CTATAG	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 µg/ml BSA pH 7,9	4 h στους 37°C
HindIII	GCTTTC CGAAAG	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 µg/ml BSA pH 7,9	4 h στους 37°C
KpnI	GGTACC CCATGG	10 mM Bis-Tris- Propane-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100µg/mL BSA pH 7	4 h στους 37°C
NdeI	CATATG GTATAC	50 mM CH ₃ COOK, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ , 100 µg/ml BSA pH 7,9	4 h στους 37°C
NotI	GCGGCCGC CGCCGGCG	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 µg/ml BSA pH 7,9	4 h στους 37°C
PmeI	GTTTAAAC CAAATTTG	50 mM Potassium Acetate 20 mM Tris-acetate 10 mM Magnesium Acetate 100 µg/ml BSA pH 7,9	4 h στους 37°C
Sall	GTCGAC CAGCTG	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100µg/mL BSA pH 7,9	4 h στους 37°C

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Zegers-Hochschild F. et al. (2009) The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Hum Reprod* **24**, 2683-2687.
2. Wassarman, P.M. (2002) Sperm Receptors and Fertilization in Mammals *M Sinai J Med*, **69**, 148-155.
3. Poongothai J., Gopenath T.S. and Manonayaki S. (2009) Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* **50**, 336-347.
4. Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1980) Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* **76**, 185-202
5. Lefievre, L. et al. (2004) Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod*, **19**, 1580-1586
6. Bleil, J.D. and Wassarman, P.M., (1980) Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**, 873-882
7. Litscher, E.S., Qi, H., and Wassarman, P.M. (1999) Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. *Biochemistry* **38**, 12280-12287
8. Williams, Z. and Wassarman, P.M. (2001) Secretion of mouse ZP3, the sperm receptor, requires cleavage of its polypeptide at a consensus furin cleavage site. *Biochemistry* **40**, 929-937

9. Bork, P. and Sander, C. (1992) A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Letts* **300**, 237-240
10. Austin, C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* **4**, 581-596
11. Chang, M.C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**, 697-698
12. Honda, Z. et al. (1991) Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* **349**, 342-346
13. Naz, R.K., and Rajesh P.B., (2004) Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/ acrosome reaction. *Reprod. Biol. Endocr.* **2**, 75-83
14. Miller, D.J., Gong, X. and Shur, B.D. (1993) Sperm require beta-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* **118**, 1279-1289
15. Iida, H. et al. (1999) Identification of Rab3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm. *Dev. Biol.* **211**, 144-155
16. Yunes, R. et al. (2000) Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol. Reprod.* **62**, 1084-1089
17. Ramalho-Santos, J. et al. (2000) SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Dev. Biol.* **223**, 54-69
18. Fukami, K. (2001) Structure, regulation and function of phospholipase C isozymes. *J. Biochem.* **131**, 293-299

- 19.** Breitbart, H. and Spungin B. (1997) The biochemistry of the acrosome reaction *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 195-202
- 20.** Yuan, R., Primakoff, P. and Myles, D.G. (1998) A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J. Cell Biol.* **137**, 105-112
- 21.** Evans, J.P. (2002) The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum. Reprod.* **8**, 297-311
- 22.** Hemler, M.E. (1998) Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 578-58
- 23.** Chen, M.S. et al. (1999) Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11830-11835
- 24.** Ducibella, T. et al. (2002) Egg to embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number. *Dev. Biol.* **250**, 280-291
- 25.** Loeb, J. (1899) On the nature of the process of fertilization and the artificial production of normal larvae (Plutei) from the unfertilized eggs of the sea urchin. *Am. J. Physiol.* **3**, 135-138
- 26.** Lillie, F.R. (1913) The mechanism of fertilization. *Science* **38**, 524-528
- 27.** Heilbrunn, L. V. (1928) The colloid chemistry of protoplasm. Verlag von Gebrueder Borntraeger, Berlin, Germany
- 28.** Mazia, D. (1937) The release of calcium in Arbacia eggs on fertilization. *J. Cell Comp. Physiol.* **99**, 137-175

- 29.** Moser, F. (1939) Studies on a cortical layer response to stimulating agents in the Arbacia egg. I. Response to insemination. *J. Exp. Zool.* **80**, 423-445
- 30.** Steinhardt, R.A. et al. (1974) Is calcium ionophore a universal activator for eggs? *Nature* **252**, 41-43
- 31.** Miyazaki, S. and Ito, M. (2006) Calcium signals for egg activation in mammals. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 542-552
- 32.** Stricker, S.A. (1999) Comparative biology of calcium signalling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol.* **211**, 157-176
- 33.** Meldolesi, J. and Pozzan, T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 10-14
- 34.** Bootman, M.D. et al. (2001) Calcium signalling – An overview. *Cell Dev. Biol.* **12**, 3-10
- 35.** Miyazaki, S. et al. (1992) Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillations by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* **257**, 251-255
- 36.** Brind, S., Swann, K. and Carroll, J. (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are downregulated in mouse oocytes in response to sperm or adenophostin A but not to increases in intracellular Ca^{2+} or egg activation. *Dev. Biol.* **223**, 251-265
- 37.** Swann, K. (1994) Ca^{2+} oscillations and sensitization of Ca^{2+} release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calc.* **15**, 331-339
- 38.** Sasaki, T. et al. (2007) The Physiology of Phosphoinositides. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1599-1604

- 39.** Jaffe, L.F. (1983) Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev. Biol.* **99**, 256-276
- 40.** Fulton, B.P. and Whittingham, D.G. (1978) Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* **273**, 149-151
- 41.** Lawrence, Y., Whitaker, M. and Swann, K. (1997) Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilisation in the mouse. *Development* **124**, 233-294
- 42.** Jaffe, L.F. (1991) The path of calcium in cytosolic calcium oscillations: A unifying hypothesis. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9883-9887
- 43.** Swann, K. (1996) Soluble sperm factors and Ca^{2+} release in eggs at fertilisation. *Rev. Reprod.* **1**, 33-39
- 44.** Jones, K.T., Soeller, C. and Cannell, M.B. (1998) The passage of Ca^{2+} and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* **125**, 4627-4635
- 45.** Miyazaki, S. (1988) Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J. Cell Biol.* **106**, 345-353
- 46.** Fissore, R. A. and Robl, J.M. (1994) Mechanisms of calcium oscillations in fertilized rabbit eggs. *Dev. Biol.* **166**, 634-642
- 47.** Williams, C.J. et al. (1998) Evidence that the G_q family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilisation. *Dev. Biol.* **198**, 116-127
- 48.** Carroll, J. et al. (1997) Calcium release at fertilisation in starfish eggs is mediated by phospholipase $\text{C}\gamma$. *J. Cell Biol.* **138**, 1303-1311

- 49.** Shearer, J. et al. (1999) Role of phospholipase C γ at fertilisation and during mitosis in sea urchin eggs and embryos. *Development* **126**, 2273-2284
- 50.** Sato, K. et al. (2000) Tyrosine kinase-dependent activation of phospholipase C gamma is required for calcium transient in *Xenopus* egg fertilization. *Dev. Biol.* **224**, 453-469
- 51.** Mehlmann, L.M. et al. (1998) SH2 domain-mediated activation of phospholipase C is not required to initiate Ca²⁺ release at fertilisation of mouse eggs. *Dev. Biol.* **203**, 221-232
- 52.** Runft, L.L., Watras, J. and Jaffe, L.A. (1999) Calcium release at fertilization of *Xenopus* eggs requires type I IP₃ receptor, but not SH2 domain-mediated activation of PLC γ or G_q-mediated activation of PLC β . *Dev. Biol.* **214**, 399-411
- 53.** Mehlmann, L.M. et al. (2001) Evidence that Phospholipase C from the sperm is not responsible for initiating Ca²⁺ release at fertilisation of mouse eggs. *Dev. Biol.* **236**, 492-501
- 54.** Swann, K. (1990) A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilisation in hamster eggs. *Development* **110**, 1295-1302
- 55.** Swann, K. et al. (2006) PLC ζ (zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* **17**, 264-273
- 56.** Tosti, E., Palumbo, A. and Dale, B. (1993) Inositol trisphosphate in human and ascidian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **3**, 373-383

- 57.** Kuo, R.C. et al. (2000) NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilisation. *Nature* **406**, 633-636
- 58.** Lim, D. et al. (2001) NAADP⁺ initiates the Ca²⁺ response during fertilization of starfish oocytes. *FASEB J.* **15**, 2257-2267
- 59.** Stricker, S.A. (1997) Intracellular injections of soluble sperm factor trigger calcium oscillations and meiotic maturation in unfertilized oocytes of a marine worm. *Dev. Biol.* **186**, 185-201
- 60.** Wu H. et al. (1998) Partial characterisation of the calcium-releasing activity of porcine sperm cytosolic extracts. *Dev. Biol.* **203**, 369-381
- 61.** Rice, A. et al. (2000) Mammalian sperm contain a Ca²⁺ sensitive phospholipase C activity that can generate InsP₃ from PIP₂ associated with intracellular organelles. *Dev. Biol.* **228**, 125-135
- 62.** Parrington, J. et al. (2002) Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca²⁺ release in eggs. *Reproduction* **123**, 31-39
- 63.** Parrington, J. et al. (1996) Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* **379**, 364-368
- 64.** Sette, C. et al. (1997) Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* **124**, 2267-2274
- 65.** Wolosker, H. et al. (1998) Molecularly cloned mammalian glucosamine-6-phosphate deaminase localises to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB J.* **12**, 91-99

- 66.** Wolny, Y.M. et al. (1999) Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca^{2+} release in mammalian oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **52**, 277-287
- 67.** Saunders, C.M. et al. (2002) PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**, 3533-3544
- 68.** Larman, M.G. et al. (2004) Cell cycle-dependent Ca^{2+} oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. *J. Cell Sci* **117**, 2513-2521
- 69.** Kashir, J. et al. (2012) Motile sperm organelle morphology evaluation-selected globozoospermic human sperm with an acrosomal bud exhibits novel patterns and higher levels of phospholipase C zeta. *Hum Reprod* **27**, 3150-3160.
- 70.** Yoon, S.Y. et al. (2008) Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development. *Clin. Invest.* **118**, 3671-3681
- 71.** Heytens, E. et al. (2009) Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod.* **24**, 2417-2428
- 72.** Katan, M. and Williams, R.L. (1997) Phosphoinositide-specific phospholipase C: structural basis for catalysis and regulatory interactions. *Cell Dev. Biol.* **8**, 287-296
- 73.** Katan, M., (2005) New insights into the families of PLC enzymes: looking back and going forward. *Biochem. J.* 87-89

- 74.** Suh, P.G. et al. (2008) Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Reports* **3**, 415-434
- 75.** Ellis, M.V. et al. (1998) Catalytic domain of phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC). Mutational analysis of residues within the active site and hydrophobic ridge of plcdelta1. *J. Biol. Chem.* **273**, 11650-11659
- 76.** Williams, R.L. (1999) Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase-C. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**, 255-267
- 77.** Lomasney, J.W. et al. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding to the pleckstrin homology domain of phospholipase C- δ 1 enhances enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 25316-25326
- 78.** Yagisawa, H. et al. (1998) Replacement of single basic amino acids in the pleckstrin homology domain of phospholipase C- δ 1 alter the ligand binding, phospholipase activity, and interaction with the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 417-424
- 79.** Rebecchi, M.J. and Pentyla, S.N. (2000) Structure, function and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* **80**, 1291-1335
- 80.** Rhee, S.G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281-312
- 81.** Essen, L.O. et al. (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase-C delta. *Nature* **380**, 595-602
- 82.** Yamamoto, T. et al. (1999) Involvement of EF hand motifs in the Ca^{2+} -dependant binding of the pleckstrin homology domain to phosphoinositides. *Eur. J. Bioch.* **265**, 481-490

- 83.** Nakashima, S. et al. (1995) Deletion and site-directed mutagenesis of EF-hand domain of phospholipase C-delta1: effects on its activity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **211**, 365-369
- 84.** Nalefski, E.A. and Falke, J.J. (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Prot. Sci.* **5**, 2375-2390
- 85.** Lomasney, J.W. et al. (1999) Activation of phospholipase C delta1 through C2 domain by a Ca^{2+} -enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 21995-22001
- 86.** Taylor, S.J. et al. (1991) Activation of the $\beta 1$ isozyme of phospholipase C by α subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* **350**, 516-518
- 87.** Smrcka, A.V. and Sternweis, P.C. (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 9667-9674
- 88.** Lopez, I. et al. (2001) A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by $\text{G}\alpha_{12}$ and stimulates the Ras/MAP kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 2758-2765
- 89.** Park, D. et al. (1993) Removal of the carboxyl-terminal region of phospholipase C-beta1 by calpain abolishes activation by G alpha q. *J. Biol. Chem.* **268**, 3710-3714
- 90.** Wu, D.Q. et al. (1993) Identification of critical regions on phospholipase C-beta1 required for activation by G-proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 3704-3709
- 91.** Lee, C.W. et al. (1994) Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. *J. Biol. Chem.* **269**, 25335-25338

- 92.** Wang, T. et al. (2000) Pleckstrin homology domain of PLC-beta2 links the binding of G- $\beta\gamma$ to activation of the catalytic core. *J. Biol. Chem.* **275**, 7466-7469
- 93.** Lee, S.B. et al. (1993) Activation of phospholipase C-beta 2 mutants by G protein alpha q and beta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 25952-25957
- 94.** Hwang, J.I. et al. (2000) Regulation of phospholipase C- β 3 activity by Na⁺/K⁺ exchanger regulatory factor 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 16632-16637
- 95.** Rhee, S.G. and Bae, Y.S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 15045-15048
- 96.** Kim, M.J. et al. (2000) Direct interaction of SOS1 Ras exchange protein with the SH3 domain of phospholipase C- γ 1 *in vivo*. *Biochemistry* **39**, 8674-8682
- 97.** Soler, C. et al. (1994) Potent SHC tyrosine phosphorylation by epidermal growth factor at low receptor density or in the absence of receptor autophosphorylation sites. *Oncogene* **9**, 2207-2215
- 98.** Wahl, M.I. et al. (1989) Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalization and extracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 1568-1572
- 99.** Jones, G.A. and Carpenter, G. (1993) The regulation of phospholipase C-gamma 1 by phosphatidic acid. Assessment of kinetic parameters. *J. Biol. Chem.* **268**, 20845-20850

- 100.** Zhou, C. et al. (1999) Action of phosphatidylinositol-specific phospholipase C γ 1 on soluble and micellar substrates. Separating effects on catalysis from modulation of the surface. *J. Biol. Chem.* **274**, 2786-2793
- 101.** Hwang, S.C. et al. (1996) Activation of phospholipase C- γ by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* **271**, 18342-18349
- 102.** Pawson, T. and Nash, P. (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* **14**, 1027-1047
- 103.** Seedorf, K. et al. (1994) Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C- γ and GRB-2. *J. Biol. Chem.* **269**, 16009-16014
- 104.** Graham, L.J. et al. (1998) Sequences surrounding the Src-homology 3 domain of phospholipase C- γ 1 increase the domain's association with Cbl. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **249**, 537-541
- 105.** Grobler, J.A. and Hurley, J.H. (1998) Catalysis by phospholipase-C δ 1 requires that calcium bind to the catalytic domain, but not the C2 domain. *Biochemistry* **37**, 5020-5028
- 106.** Feng, J.F., Rhee, S.G. and Im, M.J. (1996) Evidence that phospholipase C δ 1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signalling. *J. Biol. Chem.* **271**, 16451-16454
- 107.** Park, E.S. et al. (1998) Phospholipase C- δ 1 and oxytocin receptor signalling: evidence of its role as an effector. *Biochem. J.* **331**, 283-289
- 108.** Nakaoka, H. et al. (1994) G η : a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signalling function. *Science* **264**, 1593-1596

- 109.** Murthy, S.N. et al. (1999) Interactions of G(h)/transglutaminase with phospholipase C δ 1 and with GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11815-11819
- 110.** Matecki, A. and Pawelczyk, T. (1997) Regulation of phospholipase C δ 1 by sphingosine. *Biochim. Biophys. Acta* **1325**, 287-296
- 111.** Pawelczyk, T. and Matecki, A. (1997) Structural requirements of phospholipase C δ 1 for regulation by spermine, sphingosine and sphingomyelin. *Eur. J. Biochem.* **248**, 459-465
- 112.** Kelley, G.G. et al. (2001) Phospholipase C ϵ : a novel Ras effector. *EMBO J.* **20**, 743-754
- 113.** Ponting, C.P. and Benjamin, D.R. (1996) A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 422-425
- 114.** Song, C. et al. (2001) Regulation of a novel phospholipase C, PLC- ϵ , through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.* **276**, 2752-2757
- 115.** Wing, M.R. et al. (2001) Activation of PLC- ϵ by heterotrimeric G protein $\beta\gamma$ -subunits. *J. Biol. Chem.* **276**, 48257-48261
- 116.** Hwang, J.I. et al. (2005) Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC- η . *Biochem. J.* **389**, 181-186
- 117.** Nakahara, M. et al. (2005) A novel phospholipase C, PLC(η)2, is a neuron-specific isozyme. *J. Biol. Chem.* **280**, 29128-29134

- 118.** Cox, L.J. et al. (2002) Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* **124**, 611-623
- 119.** Fujimoto, S. et al. (2004) Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev. Biol.* **96**, 317-323
- 120.** Kouchi, Z. et al. (2004) Recombinant phospholipase C ζ has high Ca²⁺ sensitivity and induces Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. *J. Biol. Chem.* **279**, 10408-10412
- 121.** Jones, K.T. et al. (2000) Different Ca²⁺-releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochem J.* **346**, 743-749
- 122.** Nomikos, M. et al. (2005) Role of phospholipase C-zeta domains in Ca²⁺-dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca²⁺ oscillations. *J. Biol. Chem.* **280**, 31011-31018
- 123.** Katan, M. and Parker, P.J. (1987) Purification of a phosphoinositide-specific phospholipase C from a particulate fraction of bovine brain. *Eur. J. Biochem.* **168**, 413-418
- 124.** Hicks, S.N. et al. (2008) General and Versatile autoinhibition of PLC isozymes. *Mol Cell* **31**, 383-394.
- 125.** Gresset, A. et al. (2010) Mechanism of phosphorylation induced activation of phospholipase C-gamma isozymes. *J Biol Chem* **285**, 35836-35847.
- 126.** Cooney, M.A. et al. (2010) Species-specific differences in the activity and nuclear localization of murine and bovine phospholipase C zeta 1. *Biol Reprod* **83**, 92-101.

- 127.** Nomikos, M., Swann, K. and Lai, F.A. (2012) Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilizes the Ca^{2+} signal that induces egg activation and embryo development: an essential phospholipase C with implications for male infertility. *Bioessays* **34**,126-134.
- 128.** Nomikos, M. et al. (2013) PLC ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility. *Fertil Steril* **99**, 76-85
- 129.** Knott, J.G. et al. (2005) Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase Czeta in triggering Ca^{2+} oscillations during fertilization. *Biol Reprod* **72**,992-996.
- 130.** Grasa, P. et al. (2008) The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C zeta, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Hum Reprod* **23**, 2513-2522.
- 131.** Young, C. et al. (2009) Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction *Fertil Steril* **91**, 2230-2242.
- 132.** Kashir, J. et al. (2010) Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum Reprod Update* **16**, 690-703.
- 133.** Bedford-Guaus, S.J. et al. (2011) Molecular cloning and characterization of phospholipase C zeta in equine sperm and testis reveals species-specific differences in expression of catalytically active protein. *Biol Reprod* **85**, 78-88.
- 134.** Nakai, M. et al. (2011) Pre-treatment of sperm reduces success of ICSI in the pig. *Reproduction* **142**, 285-293.

- 135.** Kashir, J. et al. (2013) Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability. *Fertil Steril* **99**, 107-117.
- 136.** Yoda, A. et al. (2004) Ca^{2+} oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Dev Biol* **268**:245-257.
- 137.** Yu, Y. et al. (2008) Regulation of diacylglycerol production and protein kinase C stimulation during sperm- and PLCzeta-mediated mouse egg activation. *Biol Cell* **100**, 633-643.
- 138.** Yu, Y. et al. (2012) PLC(zeta) ζ causes Ca^{2+} oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane PI(4,5)P₂. *Mol Biol Cell* **23**, 371-380.
- 139.** Swann, K. and Lai, F.A. (2013) PLC ζ and the initiation of Ca^{2+} oscillations in fertilizing mammalian eggs. *Cell Calcium* **53**, 55-62.
- 140.** Nomikos, M. et al. (2011) Novel regulation of PLC ζ activity via its XY-linker. *Biochem J* **438**, 427-432.
- 141.** Nomikos, M. et al. (2011) Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5)P₂ requires the XY-linker region. *J Cell Sci* **124**, 2582-2590.
- 142.** Gillooly, D. J., Raiborg, C. and Stenmark, H. (2003) Phosphatidylinositol 3-phosphate is found in microdomains of early endosomes. *Histochem Cell Biol* **120**, 445-453
- 143.** Hurley, J.H. and Misra, S. (2000) Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 49-79.

- 144.** Phillips, S.V. et al. (2011) Divergent effect of mammalian PLC ζ in generating Ca²⁺ oscillations in somatic cells compared with eggs. *Biochem J* **438**, 545-553.
- 145.** Nomikos, M. et al. (2007) Binding of phosphoinositide-specific phospholipase C-zeta (PLC-zeta) to phospholipid membranes: potential role of an unstructured cluster of basic residues. *J Biol Chem* **282**, 16644-16653.
- 146.** Ramadan, W.M. et al. (2012) Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Cell Commun Signal* **10**:12.
- 147.** Kashir, J. et al. (2012) A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility. *Hum Reprod* **27**, 222-231.
- 148.** Heindryckx, B. et al. (2008) Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online* **17**, 662-668.
- 149.** Taylor, S.L. et al. (2010) Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online* **20**, 559-564.
- 150.** Nasr-Esfahani, M.H., Deemeh, M.R. and Tavalaei, M. (2010) Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **94**, 520-526.
- 151.** Vanden Meerschaut, F. et al. (2013) Diagnostic and prognostic value of calcium oscillatory pattern analysis for patients with ICSI fertilization failure. *Hum Reprod* **28**, 87-98.

152. Ciapa, B. and Arnoult, C. (2011) Could modifications of signalling pathways activated after ICSI induce a potential risk of epigenetic defects? *Int J Dev Biol* **55**, 143-152.

153. Rogers, N.T. et al. (2004) Phospholipase C ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* **128**, 697-702.