



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Δομικές μελέτες της χιτοβιάσης από *S. marcescens*
ως συμπλόκου με παράγωγα N-ακετυλο-
γλυκοζαμίνης με πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία
ακτίνων-Χ**

**ΚΑΡΑΜΟΛΕΓΚΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2015

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Δομικές μελέτες της χιτοβίασης από *S. marcescens* ως συμπλόκου με παράγωγα Ν-ακετυλο-γλυκοζαμίνης με πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

ΚΑΡΑΜΟΛΕΓΚΟΥ ΜΑΡΙΑ

A.M.: 61303

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Δρ Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Καθηγήτρια Ντία Γαλανοπούλου
2. Καθηγητή Κωνσταντίνο Βοργιά
3. Επίκουρο καθηγητή Δημήτρη Χατζηνικολάου

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 7/10/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χιτίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από κατάλοιπα N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης (GlcNAc) τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με β -1-4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Μετά την κυτταρίνη, αποτελεί τον δεύτερο σε αφθονία πολυσακχαρίτη στη φύση. Μελέτες δείχνουν ότι το *Serratia marcescens* είναι από τους πιο αποτελεσματικούς μικροοργανισμούς για την αποικοδόμηση της χιτίνης. Τα ένζυμα που διασπούν τη χιτίνη σε αυτόν τον μικροοργανισμό είναι οι χιτινάσες, η χιτοβιάση και η GBP21. Οι διάφορες κατηγορίες χιτινασών αποικοδομούν την χιτίνη παράγοντας ολιγοσακχαρίτες και διμερή (GlcNAc)₂. Το τελικό στάδιο της αποικοδόμησης πραγματοποιείται από τη χιτοβιάση που υδρολύει τον β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό του διμερούς και άλλων ολιγοσακχαριτών με αποτέλεσμα την παραγωγή μονομερών GlcNAc. Η χιτοβιάση είναι μια μονομερής πρωτεΐνη (98.5 kDa) που αποτελείται από τέσσερις δομικά αυτοτελείς περιοχές (domains). Η ώριμη πρωτεΐνη φέρει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν το μόριο, ενώ δεν χρειάζεται συμπαραγοντες, προσδότες ή μέταλλα για να είναι λειτουργική. Η καταλυτική της περιοχή ανήκει στην οικογένεια 20 των γλυκοζιδικών υδρολασών. (GH20). Η χιτοβιάση εμφανίζει σημαντική δομική ομοιότητα με την ανθρώπινη εξοζαμινιδάση, η οποία ανήκει στην ίδια οικογένεια, και έχει συσχετιστεί με ασθένειες όπως η Tay-Sachs και η Sandoff. Η ομοιότητα αυτή αποτέλεσε το έναυσμα για την χρήση της χιτοβιάσης ως μοριακού μοντέλου για την ανθρώπινη εξοζαμινιδάση. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η τρισδιάστατη δομή της χιτοβιάσης καθώς και η δομή της παρουσία των τριών αναστολέων, παραγώγων GlcNAc, για τους οποίους έχουν ήδη πραγματοποιηθεί οι κινητικές μελέτες για την διευκρίνηση της ανασταλτικής τους δράσης. Αναπτύχθηκαν εκ νέου κρύσταλλοι της χιτοβιάσης στη φυσική διαμόρφωση, σε νέες συνθήκες από τις προηγούμενα δημοσιευμένες, παρουσία PEG3350 και κιτρικού νατρίου. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν δεδομένα περίθλασης με χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας σε υψηλή ευκρίνεια και για τα τρία παράγωγα με τη μορφή συμπλόκου με το ένζυμο αλλά και για το ένζυμο στη φυσική του διαμόρφωση, σε διακριτική ικανότητα 1.31 Å. Όλες οι νέες κρυσταλλικές δομές που προέκυψαν ανήκαν στην ομάδα χώρου συμμετρίας $P2_1$ και τα μόρια είχαν διαφορετική διεύθυνση στο χώρο

έναντι της αναμενόμενης από την ήδη γνωστή δομή (ομάδα χώρου συμμετρίας $P2_12_12$). Η νέα δομή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συμπλόκων χιτοβιάση:ένωση 1, 2, 3. Και οι τρεις προσδέτες βρέθηκε ότι συνδέονται κατά μήκος του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελίου της ενεργής περιοχής του ενζύμου. Οι μεν δύο εξ αυτών (ενώσεις 1,3) δεν προκαλούν μεταβολές στο καταλυτικό κέντρο γεγονός που αντανακλάται στην ισχυρή αναστολή που επιδεικνύουν στη δράση της χιτοβιάσης. Ο τρίτος αναστολέας είναι πολύ ασθενέστερος και αντίθετα με τους άλλους δύο αλλάζει τη διαμόρφωση ενός εκ των καταλυτικών αμινοξέων κατά τη σύνδεσή του. Στην περίπτωση της ένωσης 3, παρατηρείται ένα επιπλέον μόριο προσδέτη στη διεπιφάνεια μεταξύ δύο συμμετρικών μορίων της χιτοβιάσης προκαλώντας επιμήκυνση της μιας εκ των τριών διαστάσεων της μοναδιαίας κυψελίδας κατά $\sim 6 \text{ \AA}$. Συγκριτικές μελέτες για την αποτύπωση της ομολογίας της χιτοβιάσης με την ανθρώπινη εξοζαμινιδάση έδειξαν ότι τόσο τα δύο καταλυτικά αμινοξέα των ενζύμων όσο και αμινοξέα που συνθέτουν την ευρύτερη περιοχή του καταλυτικού κέντρου διατηρούνται και στα δύο ένζυμα. Τα αμινοξέα αυτά ενδεχομένως να ευνοούν τον προσανατολισμό των ολιγοσακχαριτών στο καταλυτικό κέντρο. Μελέτες της δομικής ομολογίας που παρουσιάζουν τα δύο ένζυμα έδειξαν ότι η χιτοβιάση και η ανθρώπινη β -εξοζαμινιδάση επιδεικνύουν z-score ~ 35 που αντιστοιχεί σε υψηλή συμφωνία γεγονός που επιβεβαιώνει τις προσπάθειες που έχουν γίνει έως σήμερα να αξιοποιηθεί η χιτοβιάση ως μοντέλο για την καλύτερη κατανόηση της δομής-δράσης της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης. Επιπρόσθετα, αναζητήθηκαν άλλες ομόλογες πρωτεΐνες τόσο σε επίπεδο ακολουθίας όσο και σε επίπεδο τρισδιάστατης δομής της χιτοβιάσης. Η έρευνα που αφορά στη χιτοβιάση και τον *S. marcescens* παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κι αυτό γιατί η καλύτερη κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού δράσης του ενζύμου θα μπορούσε να οδηγήσει στην αξιοποίησή του για βιοτεχνολογικές εφαρμογές με εκμετάλλευση του ρόλου του στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Δομική βιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Χιτίνη, N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη, χιτοβιάση, εξοζαμινιδάση, ασθένειες Tay-Sachs and Sandoff, κρυσταλλογραφία ακτίνων-X

ABSTRACT

Chitin is a long-chain polymer of N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) linked by β -1-4-glycosidic bonds. It is the second most abundant oligosaccharide in nature. Studies have shown that *Serratia marcescens* is one of the most effective microorganisms for chitin degradation. Additional enzymes that degrade chitin are chitinases, chitobiase and GBP21. Chitinases degrade chitin producing oligosaccharides and dimers (GlcNAc)₂. The last step in chitobiase induced degradation involves hydrolysis of β -1,4 glucosidic bond of the dimer and other oligosaccharides that produces GlcNAc. Chitobiase is a monomeric protein (98.5 kDa) that comprises four distinct domains. The protein bears three disulfide bonds that stabilize the molecule. It is independent of any other co-factors or metal ions that would facilitate its action. The catalytic domain belongs to family 20 of the glycosidic hydrolases. Chitobiase presents considerable structural homology with human hexosaminidase that belongs to the same family and has been associated with Tay-Sachs and Sandoff diseases. This homology has been the driving force for ChB as molecular model for human hexosaminidase. In the frame of the present study the three dimensional study of chitobiase along with the structures of the three complexes GlcNAc derivatives for which previously performed kinetic studies showed that they are strong inhibitors. New chitobiase crystals were grown in the presence of PEG3350 and citric acid in the primitive monoclinic lattice. Diffraction data were collected at high resolution using synchrotron radiation sources for all three derivatives and for the native enzyme (the latter at 1.31 Å). All the new crystal structures belonged to the same spacegroup $P2_1$ as compared to the $P2_12_12$ that the previously one was grown. The new native structure was used for the determination of the complex structures chitobiase:ligand 1, 2, 3. All three ligands were bound along the $(\beta\alpha)_8$ -barrel of the active site. Out of these, two ligands (compounds 1,3) did not cause any modifications upon binding at the catalytic site as reflected at the significant inhibition they exhibit. The third ligand is weaker and unlike the other two changes the conformation of one of the catalytic amino acids upon binding. One more ligand molecule is observed at the interface between the two chitobiase symmetry related molecules

inducing slight extension of the b-axis of the unit cell by ~6 Å. Comparison studies for the homology of chitobiase with human hexosaminidase showed that the two catalytic aminoacids of the enzymes remain conserved along with the broader area that these belong. These aminoacids might facilitate the orientation of the oligosaccharides upon binding at the catalytic site. Studies on the structural homology that the two enzymes exhibit showed that chitobiase and human hexosaminidase and the two enzymes share z-score ~35 that corresponds to high structural homology. The latter confirms the efforts that have taken place until present using chitobiase as a model for shedding light in the structure-function relations of human hexosaminidase. In addition, a search for more sequence and structural homologues has been performed. The research conducted on chitobiase and *S. marcescens* is of special interest in order to improve the existing knowledge on the catalytic action of the enzyme with ultimate aim its use for biotechnological applications making the most of its role in the survival and reproduction of the microorganism.

SUBJECT AREA: Structural Biology

KEYWORDS: Chitin, N-acetyl-glucosamine, chitobiase, hexosaminidase, X-ray crystallography, Tay-Sachs and Sandoff diseases

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. καθηγήτρια Ντία Γαλανοπούλου για τις γνώσεις που μου παρείχε μέσα από το μάθημά της και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την παρούσα διπλωματική εργασία στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού μου στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον κ. καθηγητή Κωνσταντίνο Βοργιά ο οποίος παρείχε το ένζυμο χιτοβιάση για τις δομικές μελέτες καθώς και τον κ. επίκουρο καθηγητή Δημήτρη Χατζηνικολάου.

τις καθηγήτριες μου κα. Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα, κα. Μαίρη Μαυρή και τον καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο για τη βοήθεια, τις γνώσεις που μου παρείχαν κατά τη διδασκαλία των μαθημάτων.

την Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα γιατί όλο αυτό το διάστημα στάθηκε δίπλα μου, με καθοδηγούσε, με συμβούλευε και με τις γνώσεις της με βοήθησε να γνωρίσω και να αγαπήσω τον κόσμο της δομικής βιολογίας. Η αγάπη της για την δουλειά της μου έδιναν συνεχώς αφορμές για να ενθουσιάζομαι όλο και περισσότερο με αυτόν τον τομέα.

την Μαρία Δημαρόγκωνα για τη συνεργασία και τις συμβουλές της κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

τους υπευθύνους στο Diamond Light Source, Oxford, UK για τη βοήθεια που μας προσέφεραν κατά τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων καθώς και το πρόγραμμα BioStruct-X, για τη χρηματοδότηση της επίσκεψης μου εκεί.

όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για την καθημερινή τους θετική ενέργεια και ιδιαίτερα τον Γιώργο Οικονομάκο γιατί πάντα είχε μια λύση όταν προέκυπτε κάποιο τεχνικό θέμα στο εργαστήριο και την Αναστασία Σωτηροπούλου για το καθημερινό της χαμόγελο που με τροφοδοτούσε με διάθεση και όρεξη για δουλειά.

τους γονείς μου, τα αδέρφια μου και την νύφη μου για τη στήριξη τους όλο αυτό το διάστημα.

τον Μάριο Γαβριήλ γιατί η ύπαρξη του στην ζωή μου με γεμίζει χαμόγελα και μου δίνει δύναμη και κουράγιο να κάνω όνειρα, να βάζω στόχους και να παλεύω ώστε να τα πραγματοποιήσω!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	22
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	22
1.1 Βιοτεχνολογία – Ορισμός και κλάδοι Βιοτεχνολογίας	22
1.1.1 Κόκκινη Βιοτεχνολογία	22
1.1.2 Λευκή Βιοτεχνολογία	23
1.1.3 Πράσινη Βιοτεχνολογία	23
1.1.4 Γαλάζια Βιοτεχνολογία	24
1.1.5 Χρυσή Βιοτεχνολογία	24
1.2 Οι εφαρμογές των μικροοργανισμών στην βιοτεχνολογία	25
1.2.1 Η συνεισφορά των μικροοργανισμών στην ανάπτυξη των φυτών... ..	26
1.2.2 Η συνεισφορά των μικροοργανισμών στην παραγωγή τροφίμων και αλκοολούχων ποτών	27
1.2.3 Η συνεισφορά των μικροοργανισμών στην κατεργασία των ραδιενεργών αποβλήτων	28
1.3 Η Βιοτεχνολογία τον 21 ^ο αιώνα	28
1.4 Γενικές πληροφορίες για την χιτίνη και σύνδεση της με την βιοτεχνολογία.....	29
1.4.1 Η δομή της χιτίνης.....	30
1.4.2 Η αποικοδόμηση της χιτίνης.....	31
1.4.3 Οι εφαρμογές της χιτίνης και των παραγώγων της στη βιοτεχνολογία	33
1.4.4 Το <i>Serratia marcescens</i> και ο ρόλος του στην αποικοδόμηση της χιτίνης.....	35
1.5 Η τρισδιάστατη δομή της χιτοβιάσης (ρόλος του καταλυτικού κέντρου και των άλλων υπομονάδων).....	37
1.5.1 Πώς καταλύει η χιτοβιάση τη διάσπαση του διμερούς (GlcNac) ₂	39

1.6	Κινητικές μελέτες για την επίδραση των GlcNAc παραγώγων στις εξοζαμινιδάσες και τη χιτοβίαση	44
1.7	Η σπουδαιότητα της δομικής βιολογίας στην κατανόηση της λειτουργίας των μακρομορίων	47
1.8	Παραγωγή και προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε υψηλή καθαρότητα.....	48
1.9	Βασικοί μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνικής δομής σε 3 διαστάσεις.	49
1.9.1	Βασικές αρχές κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ	51
1.9.1.2	Μέθοδοι κρυστάλλωσης πρωτεϊνών	53
1.9.2	Πηγές ακτινών Χ.....	57
1.9.3	Συλλογή και ανάλυση δεδομένων περίθλασης.....	58
1.9.4	Πρόβλημα Φάσης- Πολλαπλή Ισόμορφη Αντικατάσταση.....	60
1.9.5	Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, κατασκευή και βελτιστοποίηση του πρωτεϊνικού μοντέλου	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2		65
2.1	Αντικείμενο μελέτης.....	65
2.2	Υλικά / αντιδραστήρια.....	65
2.3	Εργαστηριακά όργανα.....	66
2.4	Πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού της χιτοβίασης.....	66
2.5	Ανάπτυξη κρυστάλλων χιτοβίασης με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας	69
2.6	Συγκρυστάλλωση της χιτοβίασης με την ένωση 2 (CO-IV (N)).....	71
2.7	Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της χιτοβίασης ως συμπλόκου με παράγωγα GlcNAc	71
2.7.1	Ανάλυση και συγκριτική μελέτη των νέων τρισδιάστατων δομών της χιτοβίασης και των συμπλόκων αυτής.....	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....		76

3.1	Η τρισδιάστατη δομή της φυσικής χιτοβιάσης	77
3.2	Δομικές μελέτες του συμπλόκου της χιτοβιάσης με την ένωση 1 (CO-II (NMe ₃))	85
3.3	Δομικές μελέτες του συμπλόκου της χιτοβιάσης με την ένωση 2 (CO-IV (N))	92
3.4	Δομικές μελέτες του συμπλόκου της χιτοβιάσης με την ένωση 3 CO-IV (NMe ₃).....	101
3.5	Συγκριτικές μελέτες της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης και της χιτοβιάσης από <i>S. marcescens</i>	113
3.5.1	Ομολογία της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης στην αμινοξική ακολουθία με τη χιτοβιάση από <i>S. marcescens</i>	113
3.5.2	Δομική ομολογία της χιτοβιάσης από <i>S. marcescens</i> με την ανθρώπινη εξοζαμινιδάση.....	118
3.6	Αναζήτηση άλλων ομόλογων πρωτεϊνών της χιτοβιάσης από το <i>S. marcescens</i>	119
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	122
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΑ.....	126
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Α) το μόριο της κυτταρίνης είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από μόρια γλυκόζης Β) Το μόριο της χιτίνης είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από GlcNAc	30
Σχήμα 2. Η απακετυλίωση της χιτίνης σε χιτοζάνη παρουσία του ενζύμου της απακετυλάσης.....	32
Σχήμα 3 Σχηματική αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της Χιτοβιάσης Α) στη φυσική διαμόρφωση απουσία προσδέτη (PDB κωδικός: 1QBA) και Β) παρουσία ενός δισακχαρίτη GlcNAc ως προσδέτη (PDB κωδικός: 1QBB) ⁶⁶	38
Σχήμα 4. Η δομή του καταλυτικού κέντρου της χιτοβιάσης, δομή ανάλογη του (βα) ₈ -βαρέλι	39
Σχήμα 5. Αναπαράσταση του καταλυτικού μηχανισμού της αποικοδόμησης των σακχάρων που έχει προταθεί για την εξοζαμινιδάση της οικογένειας GH20, τα αντίστοιχα αμινοξέα εντοπίζονται και στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης από <i>S. marcescens</i> τα οποία όμως βρίσκονται στις θέσεις Asp539 (αντί για Asp 313) και Glu540 (αντί για Glu314) ⁷⁵	41
Σχήμα 6. Αναπαράσταση των ομοδιμερών και ετεροδιμερών των ισομορφών του ενζύμου της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης.....	42
Σχήμα 7. Παρουσιάζεται η δομή των ενώσεων 1, 2 και 3 οι οποίες χαρακτηρίστηκαν για την ανασταλτικής τους δράση στο ένζυμο της χιτοβιάσης από <i>S. marcescens</i> και σε εξοζαμινιδάσες που προέρχονται από δύο διαφορετικούς οργανισμούς.....	47
Σχήμα 8 Διάγραμμα φάσεων ⁸⁸	54
Σχήμα 9. Νόμος του Bragg	60
Σχήμα 10. Σχηματική απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της φυσικής χιτοβιάσης.....	80
Σχήμα 11. Υπέρθωση της νέας δομής της χιτοβιάσης που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία (με κυανό χρώμα) με την 1QBA (με κίτρινο χρώμα)	81

Σχήμα 12. Υπέρθωση των δομικά αυτοτελών περιοχών I (Α), II (Β) και IV (Γ) της νέας δομής της χιτοβιάσης (με κυανό χρώμα) και της 1QBA (με κίτρινο χρώμα).....	81
Σχήμα 13. Σχηματική αναπαράσταση των αμινοξέων που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με μόρια της συμμετρικής υπομονάδας στη νέα δομή της χιτοβιάσης (Α) και στη δομή 1QBA (Β) και βρίσκονται στο περιβάλλον των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου, Α: με μωβ χρώμα η περιοχή III της χιτοβιάσης και με πράσινο οι συμμετρικές αυτής, Β: με ανοιχτό πράσινο χρώμα η περιοχή III της 1QBA και με κίτρινο οι συμμετρικές αυτής.....	83
Σχήμα 14. Σύγκριση των καταλυτικών αμινοξέων Asp539 και Glu540 στη νέα δομή της χιτοβιάσης (με μωβ χρώμα) ως προς την 1QBA (με κίτρινο χρώμα)	84
Σχήμα 15. Σχηματική απεικόνιση της δομής της χιτοβιάσης παρουσία της ένωσης 1 και του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του προσδετη κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera ¹⁰⁰	87
Σχήμα 16. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 1 κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό, Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα <i>LIGPLOT</i> ⁹⁹	90
Σχήμα 17. Σχηματική απεικόνιση της ένωσης στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης με έμφαση στη σχετική της θέση ως προς το καταλυτικό αμινοξύ Asp539.....	90
Σχήμα 18. Υπέρθωση της φυσικής δομής της χιτοβιάσης (μπλε) με το σύμπλοκο χιτοβιάση- ένωση 1 (κίτρινο).....	91
Σχήμα 19. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του προσδετη 2 στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιασης, η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera ¹⁰⁰	94

Σχήμα 20. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 2 κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό, η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα <i>LIGPLOT</i> ⁹⁹	97
Σχήμα 21. Σχηματική απεικόνιση της ένωσης 2 στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης με έμφαση στη σχετική της θέση ως προς το καταλυτικό αμινοξύ Asp539.....	98
Σχήμα 22. (Πάνω) Υπέρθυση της φυσικής δομής της χιτοβιάσης (μπλέ) με το σύμπλοκο χιτοβιάση-ένωση 1 (κίτρινο) και το σύμπλοκο χιτοβιάση-ένωση 2 (μωβ), (Κάτω). δίδεται έμφαση στα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και στη διαμόρφωση που λαμβάνουν στις δύο δομές των συμπλόκων του ενζύμου με την ένωση 1 (πράσινο) και με την ένωση 2 (μπλε)	99
Σχήμα 23. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του προσδετη 3 στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιασης (αριστερά) και σε ένα νέο, επιπλέον κέντρο σύνδεσης, η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera ¹⁰⁰ .	104
Σχήμα 24. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 3 κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό, η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα <i>LIGPLOT</i> ⁹⁹	108
Σχήμα 25. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 3 κατά τη σύνδεσή του περιφεριακά του ενζύμου στην δομική περιοχή IV, οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό, η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα <i>LIGPLOT</i> ⁹⁹	109
Σχήμα 26. Σχηματική αναπαράσταση της δεύτερης θέσης πρόσδεσης μεταξύ των δύο συμμετρικών μορίων (υποδεικνύονται με γκρι και πράσινο χρώμα)	

(A) καθώς και της διευθέτησης των μορίων στην μοναδιαία κυψελίδα (B, Γ), υποδεικνύονται οι σχετική θέση των δύο μορίων της ένωσης 3, η διεύθυνση της b διάστασης της κυψελίδας είναι σε οριζόντια παράλληλα με το επίπεδο της εικόνας..... 110

Σχήμα 27. Υπέρθωση της δομής του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 3 (πράσινο) με τη δομή του το σύμπλοκο χιτοβιάσης:ένωση 1 (μωβ) 111

Σχήμα 28. Υπέρθωση της δομής του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 3 (πράσινο) με τη δομή του το σύμπλοκο χιτοβιάσης:ένωση 1 (μωβ) στη δεύτερη θέση σύνδεσης, με αποχρώσεις του κίτρινου υποδεικνύονται τα αμινοξέα της συμμετρικής υπομονάδας και για τα δύο σύμπλοκα 111

Σχήμα 29. Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας της χιτοβιάσης (από την κατατεθειμένη στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων δομή 1QBA) με την α υπομονάδα της εξοζαμινιδάσης (από την κατατεθειμένη δομή 2GJX) έδειξε 20.1 % ταυτότητα σε ποσοστό κάλυψης αμινοξέων 59.1%, τα ίδια αμινοξέα υποδεικνύονται με λευκό χρώμα σε κόκκινο φόντο ενώ τα ομόλογα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα σε λευκό φόντο, με πράσινο υποδεικνύονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται ενώ στο σχήμα αποτυπώνονται τα δευτεροταγή στοιχεία της πρωτεΐνης..... 116

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Κόκκινες αποικίες του <i>S. marcescens</i> λόγω της προδιγιοσίνης ⁵⁹ ...	36
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της αποικοδόμησης της χιτοβιάσης ⁶⁴ ..	37
Εικόνα 3. Ο καταλυτικός ρόλος της HexA στην παραγωγή GM3 γαγγλιοσιδίων ⁷⁷	43
Εικόνα 4 Α. Μονάδα φασματοσκοπίας NMR και Β. Πηγή πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ εγκατεστημένες στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.	50
Εικόνα 5. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο το οποίο χρησιμοποιεί την δέσμη των ηλεκτρονίων για να απεικονίσει το δείγμα. Δύναται να φτάσει σε πολύ μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα έναντι αυτής ενός οπτικού μικροσκοπίου καθώς τα ηλεκτρόνια έχουν μήκος κύματος 10^5 φορές μικρότερο αυτού του ορατού φωτός ⁸³	51
Εικόνα 6. Μέθοδος κρυστάλλωσης micro-batch	55
Εικόνα 7 Οι τρεις κατηγορίες της μεθόδου διάχυσης ατμών ανάλογα με τη διάταξη που χρησιμοποιείται.....	56
Εικόνα 8. Μέθοδος διαπίδυσης.....	57
Εικόνα 9 Α. Μονοχρωματική πηγή ακτίνων-Χ Β. πολυχρωματική πηγή ακτίνων-Χ (συγχροτρόνιο) ⁹⁰	57
Εικόνα 10. Διάταξη συλλογής δεδομένων περίθλασης	59
Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας πριν και μετά την τοποθέτηση των αμινοξέων στις αντίστοιχες θέσεις σύμφωνα με την αμινοξική ακολουθία.....	63
Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων από την παραγωγή των κρυστάλλων μέχρι τον προσδιορισμό της 3D δομής στον χώρο.....	64
Εικόνα 13. Στερεοσκόπιο Leica MZ16	66
Εικόνα 14. Ρομποτική διάταξη κρυστάλλωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του ΙΒΦΧΒ/ΕΙΕ. ⁹¹	67
Εικόνα 15. Τα κλάσματα από το SP Sepharose	69

Εικόνα 16. Αναπαράσταση της μικροπλάκας κρυστάλλωσης της χιτοβιάσης. Υποδεικνύεται η διάταξη μιας εκ των θέσεων που τοποθετείται το δείγμα προς κρυστάλλωση ως προς το διάλυμα κρυστάλλωσης εφαρμόζοντας τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας.....	70
Εικόνα 17. Η διάταξη του πιάτου που χρησιμοποιήθηκε για την συγκρυστάλλωση της χιτοβιάσης με την ένωση 2. Στις θέσεις A1 έως A5 και B1 έως B5 τοποθετείται το διάλυμα κρυστάλλωσης στις συνθήκες A ₁ και A ₂ , αντίστοιχα	71
Εικόνα 18. Οι κρύσταλλοι της χιτοβιάσης από <i>S. marcescens</i>	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Παρατίθενται οι τιμές IC ₅₀ (μM) και K _i (μM) της ανασταλτικής δράσης που παρουσιάζουν χιτινοολιγοσακχαρίτες έναντι διαφόρων εξοζαμινιδασών και της χιτοβιάσης από <i>S. marcescens</i> ⁸⁰	46
Πίνακας 2. Πλέγματα Bravais σε τρεις διαστάσεις στο χώρο	52
Πίνακας 3. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης της νέας δομής της χιτοβιάσης.....	78
Πίνακας 4. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 1.....	85
Πίνακας 5. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 1 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης	88
Πίνακας 6. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 1 και των μορίων ύδατος και των αμινοξέων της χιτοβιάσης	89
Πίνακας 7. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 2.....	93
Πίνακας 8. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 2 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης	95
Πίνακας 9. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 2 και των μορίων ύδατος και των αμινοξέων της χιτοβιάσης	96
Πίνακας 10. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 3.....	101
Πίνακας 11. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 3 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης	105
Πίνακας 12. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 3 και των μορίων ύδατος και των αμινοξέων στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης ...	105

Πίνακας 13. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 3 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο νέο κέντρο σύνδεσης της χιτοβιάσης	108
Πίνακας 14. Κατάλογος των πρώτων είκοσι αποτελεσμάτων του BLAST....	120

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοτεχνολογία – Ορισμός και κλάδοι Βιοτεχνολογίας

Ο όρος βιοτεχνολογία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ούγγρο Kark Ereky το 1919 ^{1, 2}. Στο βιβλίο του ορίζει την βιοτεχνολογία ως τη «διαδικασία παραγωγής προϊόντων από ακατέργαστα υλικά με τη βοήθεια των ζωντανών οργανισμών» ¹. Ταυτόχρονα την ίδια περίοδο, ο Dr. Chaim κατάφερε να αναπτύξει μια διαδικασία που παρήγαγε μαζικά ακετόνη με ζύμωση ². Στις μέρες μας, ο ορισμός της βιοτεχνολογίας έχει τροποποιηθεί και πλέον αναφέρεται σε «κάθε τεχνολογική εφαρμογή που χρησιμοποιεί βιολογικά συστήματα, ζωντανούς οργανισμούς ή παράγωγα τους για να δημιουργήσει ή να τροποποιήσει προϊόντα ή διαδικασίες για συγκεκριμένη χρήση» ³. Η βιοτεχνολογία αποτελεί ένα πεδίο που εκμεταλλεύεται τις βιολογικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται στους οργανισμούς, στα κύτταρα ή στα κυτταρικά διαμερίσματα, και τις αξιοποιεί για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών. Τα νέα εργαλεία και τα προϊόντα που αναπτύχθηκαν από βιοτεχνολόγους είναι χρήσιμα στον τομέα της έρευνας, της γεωργίας, της βιομηχανίας καθώς και της ιατρικής ³. Η επιστήμη της βιοτεχνολογίας μπορεί να ταξινομηθεί στους ακόλουθους κλάδους

1.1.1 Κόκκινη Βιοτεχνολογία

Η κόκκινη βιοτεχνολογία, ή αλλιώς γνωστή ως φαρμακευτική Βιοτεχνολογία, έχει εφαρμογές στην ιατρική ³. Οι εφαρμογές της γίνονται μέσω της γενετικής και ο στόχος της είναι η βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου. ² Το 1832 απομονώθηκε το πρώτο ένζυμο ενώ το 1976 έγινε εφικτή η μεταφορά γονιδίων από έναν μικροοργανισμό σε έναν άλλο. Με αυτό τον τρόπο, οι επιστήμονες δημιούργησαν μικροοργανισμούς με επιπλέον χαρακτηριστικά ώστε να έχουν υψηλότερα επίπεδα απόδοσης ².

Οι τομείς με τους οποίους ασχολείται η κόκκινη βιοτεχνολογία είναι: η γονιδιακή θεραπεία, τα ανασυνδιασμένα εμβόλια (recombinant vaccines), τα εμβόλια που φέρουν γενετικό υλικό (DNA vaccines), η βιοπληροφορική, η

γονιδιωματική (genomics), η πρωτεομική (proteomics) και χρησιμοποιεί βιοφαρμακευτικές και βιοϊατρικές μεθόδους. Το αρχικό βήμα για την ανάπτυξη της κόκκινης βιοτεχνολογίας ήταν η αντικατάσταση της παραδοσιακής ιατρικής από την μοριακή ιατρική. Η βασική διαφορά είναι ότι η παραδοσιακή ιατρική εστιάζει στα συμπτώματα της ασθένειας και προσπαθεί να τα καταπολεμήσει ενώ η μοντέρνα ιατρική ψάχνει την πραγματική αιτία της ασθένειας και προσπαθεί να την καταπολεμήσει από την ρίζα της. Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα του 21^{ου} αιώνα είναι ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2001. Κατ' αυτόν τον τρόπο έχουν γίνει πολλές αντιστοιχίσεις γονιδίων με ασθένειες. Έχοντας αυτές τις βασικές γνώσεις έχουν γίνει προσπάθειες για την αντιμετώπιση ενός μεγάλου εύρους ασθενειών ².

1.1.2 Λευκή Βιοτεχνολογία

Η λευκή βιοτεχνολογία εφαρμόζεται κυρίως στην βιομηχανία ⁴. Η εξάντληση των μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση ανανεώσιμων πηγών, χρησιμοποιώντας ζωντανά κύτταρα ή ενζυμικά προϊόντα για την παραγωγή χημικών ουσιών, υλικών και καυσίμων. Ο κλάδος αυτός παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς σχετίζεται με τις προσπάθειες για μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και την μείωση της έκλυσης αερίων που προκαλούν το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Επιπλέον διερευνά τρόπους για την αντιμετώπιση της συσσώρευσης των αποβλήτων, χρησιμοποιώντας βιολογικά συστήματα για την αποικοδόμησή τους ⁵.

1.1.3 Πράσινη Βιοτεχνολογία

Η πράσινη βιοτεχνολογία αφορά σε γεωργικές εφαρμογές όπου η βασική έρευνα έχει χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση των γενετικών μηχανισμών που χρησιμοποιούν οι φυτικοί οργανισμοί ³. Ένας από τους βασικούς στόχους της πράσινης βιοτεχνολογίας είναι η δημιουργία φυτικών οργανισμών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και η προστασία των καλλιεργειών από έντομα παράσιτα και ασθένειες. Τα «εργαλεία» που χρησιμοποιούνται για αυτόν το σκοπό είναι οι συνθετικοί υποκινητές για την επεξεργασία του γονιδιώματος

(genome-editing tools), οι ανασυνδυάσες ειδικής θέσης (site-specific recombinases), καθώς και η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. Χρησιμοποιώντας αυτές τις τεχνικές μπορούν σε πολύ σημαντικό βαθμό να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα στις καλλιέργειες και στο περιβάλλον ⁶.

1.1.4 Γαλάζια Βιοτεχνολογία

Η γαλάζια βιοτεχνολογία αφορά «στην εξερεύνηση και την εκμετάλλευση των διαφόρων θαλάσσιων οργανισμών με σκοπό την ανάπτυξη νέων προϊόντων» ^{3,7}.

Η θάλασσα περιέχει μια τεράστια βιοποικιλότητα με πολλά διαφορετικά οικοσυστήματα και οργανισμούς. Σύμφωνα με τα δεδομένα που έχουν βρεθεί έως σήμερα η θάλασσα φιλοξενεί περίπου μισό εκατομμύριο είδη. Το ενδιαφέρον των επιστημόνων γι αυτόν τον τομέα έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία 15 χρόνια. Ωστόσο, η γνώση για τα θαλάσσια περιβάλλοντα είναι περιορισμένη. Ένα από τα πιο γνωστά ευρήματα της θαλάσσιας βιοτεχνολογίας είναι η GFP (Green fluorescent protein) μια πρωτεΐνη, η οποία χρησιμοποιείται εκτενώς σε πολλές εφαρμογές της μοριακής βιολογίας. Επιλέχθηκε μεταξύ των άλλων φθορίζουσών πρωτεϊνών γιατί δεν εμφανίζει τοξικότητα στα κύτταρα, είναι σταθερή και η ποσοτικοποίηση της είναι εύκολη. Η GFP αρχικά απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό *Aequorea Victoria*. Πρόκειται για μια μέδουσα που βρέθηκε στην βόρεια Αμερική και εμφανίζει χαρακτηριστικό βιοφωτισμό. Σε αυτή την ανακάλυψη δόθηκε το νόμπελ χημείας το 2008. Άλλες αξιοσημείωτες εφαρμογές της θαλάσσιας βιοτεχνολογίας αφορούν στην βιοϊατρική και ειδικότερα σε αντικαρκινικά φάρμακα όπως το Yondelis (trabectedin το οποίο απομονώνεται από το ασκίδιο *Ecteinascidia turbinata* καθώς και στην παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαιθανόλη, βιοντίζελ) από φύκη, τα οποία περιέχουν υψηλά επίπεδα λιπιδίων ⁸.

1.1.5 Χρυσή Βιοτεχνολογία

Η Χρυσή βιοτεχνολογία αποτελεί τον πλέον πρόσφατο τομέα της βιοτεχνολογίας και συνδυάζει την κλασσική βιοτεχνολογία με την

βιοπληροφορική με έμφαση στην τελευταία. Η ανάγκη για τον τομέα αυτό προέκυψε προκειμένου να καταστεί δυνατή η διαχείριση και η αξιοποίηση του τεράστιου όγκου πληροφοριών που προέκυψε τα τελευταία χρόνια. Ο προσδιορισμός του γενετικού κώδικα ήταν καθοριστικός για την μελέτη των κυττάρων και των κυτταρικών λειτουργιών. Η βιοπληροφορική βοηθά στην γρήγορη οργάνωση και την ανάλυση των βιολογικών και γενετικών δεδομένων και εφαρμόζεται στην λειτουργική γονιδιωματική, τη δομική γονιδιωματική και την πρωτεομική ⁹.

Εκτός από τους βασικούς κλάδους που προαναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλοι κλάδοι της Βιοτεχνολογίας όπως η Κίτρινη βιοτεχνολογία (που αφορά στην διατροφή), η Καφέ βιοτεχνολογία (που αφορά την έρημο), η μωβ βιοτεχνολογία (που αφορά τα Διπλώματα ευρεσιτεχνίας, εκδόσεις, εφευρέσεις, τα δικαιώματα πνευματικής ιδιοκτησίας) και η Σκοτεινή βιοτεχνολογία (που αφορά τους βιολογικούς πολέμους) ⁹.

1.2 Οι εφαρμογές των μικροοργανισμών στην βιοτεχνολογία

Ο ανθρώπινος πληθυσμός αυξάνεται με ταχύτατους ρυθμούς και οι ανάγκες για την εύρεση καινούργιων φαρμάκων καθώς και για αύξηση των τροφίμων είναι υψηλές. Μέσω της βιοτεχνολογίας επιτρέπεται η βελτίωση της βιωσιμότητας και η παραγωγή καλύτερης ποιότητας προϊόντων. Προς αυτήν την κατεύθυνση καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται σε πλήθος βιοχημικών και μεταβολικών διεργασιών. Οι μικροοργανισμοί ταξινομούνται σε βακτήρια, μύκητες, αρχαία, πρωτόζωα, φύκη και στους ιούς. Εκτός από την γενετική ποικιλομορφία που παρουσιάζουν, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα στα ενδιαίτηματα που αναπτύσσονται και αναπαράγονται ¹⁰.

Η βιοτεχνολογία χρησιμοποιεί τους μικροοργανισμούς για την παραγωγή προϊόντων που παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον. Για τον σκοπό αυτό ως κύρια τεχνική, εφαρμόζεται αυτή του ανασχεδιασμένου DNA. Ειδικότερα, για αιώνες οι άνθρωποι χρησιμοποιούν τους μικροοργανισμούς στην παραγωγή τροφίμων και ποτών αλλά χωρίς να γνωρίζουν τις διεργασίες που

συμμετέχουν στην παραγωγή τους. Η παλαιότερη εφαρμογή των μικροοργανισμών στην βιοτεχνολογία αναφέρεται στην Βαβυλώνα κοντά στο 6000 π.Χ. για την παραγωγή μπύρας. Οι Σουμέριοι παρασκεύαζαν είκοσι διαφορετικούς τύπους μπύρας γύρω στο 3000 π.Χ.^{2, 11-13}. Η βελτιστοποίηση της ζύμωσης με τα χρόνια οδήγησε στην ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών ή και ουσιών που εκκρίνουν οι μύκητες και τα βακτήρια που μπορούν να αντικαταστήσουν τα συνθετικά προϊόντα. Έτσι, στην περίπτωση της σύνθεσης βιοδραστικών μορίων η βιοτεχνολογία έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη πιο αποτελεσματικών φαρμάκων. Τα τελευταία χρόνια η κατανόηση των βιοσυνθετικών οδών και των ρυθμιστικών μηχανισμών ελέγχου που χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς για την παραγωγή μεταβολιτών έχει αυξηθεί μέσω της ανάπτυξης της βιοχημείας

Η μικροβιακή βιοτεχνολογία διαχωρίζεται σε δύο κλάδους. Ο πρώτος είναι η «παραδοσιακή μικροβιακή βιοτεχνολογία» όπου περιλαμβάνει της ζυμώσεις (παραγωγή αλκοολούχων ποτών, γαλακτοκομικών προϊόντων, παρασκευή του ψωμιού κλπ.), ενώ ο δεύτερος είναι η «σύγχρονη μικροβιακή βιοτεχνολογία» που περιλαμβάνει την χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών³. Κάποια παραδείγματα συνεισφοράς των μικροοργανισμών στην βιοτεχνολογία αναφέρονται παρακάτω.

1.2.1 Η συνεισφορά των μικροοργανισμών στην ανάπτυξη των φυτών

Η παρουσία των μικροοργανισμών στο έδαφος κοντά στις ρίζες των φυτικών οργανισμών, είναι πολύ σημαντική καθώς βοηθούν στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από τις ρίζες. Τα φυτά από την πλευρά τους παρέχουν στους μικροοργανισμούς προϊόντα που είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό τους. Αυτή η αμοιβαία σχέση και οι ευεργετικές ιδιότητες των μικροοργανισμών οδήγησαν στην εκμετάλλευσή τους με στόχο την παραγωγή βιολογικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων¹⁰.

Λόγω της ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η γεωργία έχει προχωρήσει δραστικά. Οι φυτικοί οργανισμοί, έχουν βελτιωθεί σε υψηλό βαθμό ενισχύοντας τις δυνατότητες τους στην ανάπτυξη καθώς και την αύξηση της απόδοσης τους. Ακόμα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή σε

φυσικούς θηρευτές και παράσιτα, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων και των μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες. Επίσης, παρήχθησαν υβρίδια που φέρουν ωφέλιμα χαρακτηριστικά από τον συνδυασμό διαφορετικών στελεχών ή ακόμη και διαφορετικών ειδών. Τέτοιες γενετικές τροποποιήσεις προσφέρουν στα φυτά επιθυμητές και ωφέλιμες ιδιότητες.

1.2.2 Η συνεισφορά των μικροοργανισμών στην παραγωγή τροφίμων και αλκοολούχων ποτών

Ένας από τους πιο διαδεδομένους μικροοργανισμούς για αυτό τον σκοπό είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Ο μύκητας αυτός χρησιμοποιείται ως οργανισμός αναφοράς τόσο για τη μελέτη των ευκαρυωτικών κυττάρων (και κατ' επέκταση των ανθρώπινων κυττάρων), όσο και στην παρασκευή τροφίμων και αλκοολούχων ποτών όπως η μπύρα και το κρασί¹³. Μια ακόμα πολύ γνωστή εφαρμογή του είναι στην παρασκευή του ψωμιού με προζύμι. Η διαδικασία αυτή ήταν γνωστή από την αρχαία Αίγυπτο¹⁴. Έφτασε μόλις το 1960 για να αποδειχθεί επισήμως από τον Pasteur ότι αυτές οι διεργασίες πραγματοποιούνται παρουσία μυκήτων¹⁵. Πλέον γίνονται αρκετές μελέτες για τη βελτίωση των στελεχών των μυκήτων με βιοτεχνολογικούς σκοπούς. Η ενίσχυση των ιδιοτήτων του μύκητα με τεχνικές όπως η μεταλλαξιγένεση και η χρήση της γενετικής μηχανικής [15-17] υποβοηθούν τη διαδικασία της ζύμωσης βελτιώνοντας την ποιότητα των προϊόντων αυτής¹⁶⁻¹⁸.

Η συνεισφορά της βιοτεχνολογίας είναι εξίσου σημαντική στην παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων. Το κυρίαρχο στέλεχος για αυτόν τον σκοπό είναι οι *Lactobacillus*, θετικοί κατά gram μικροοργανισμοί. Το γένος αυτό περιλαμβάνει πάνω από 100 είδη και υποείδη. Ο βασικός τους ρόλος είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες; η μεν πρώτη μετατρέπει τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ ενώ η δεύτερη μετατρέπει τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα στο περιβάλλον ανάπτυξης τους καθώς μπορούν να επιβιώσουν σε διάφορα ενδιαιτήματα όπως τα φυτά, τα ζώα, το γάλα καθώς και τα έντομα. Έχουν χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες στη συντήρηση των τροφίμων, σε γαλακτοκομικά προϊόντα, σε

αλλαντικά (π.χ. λουκάνικα) που έχουν υποστεί ζύμωση και σε ψάρια. Επίσης οι μικροοργανισμοί του γένους *Lactobacillus* έχουν προταθεί ως προβιοτικά¹⁹. Ένας άλλος μικροοργανισμός με εφαρμογές στα γαλακτοκομικά είναι το *penicillium roqueforti* που συμβάλει στην παραγωγή των μπλε τυριών²⁰.

1.2.3 Η συνεισφορά των μικροοργανισμών στην κατεργασία των ραδιενεργών αποβλήτων

Η συνεισφορά της βιοτεχνολογίας για την κατεργασία των ραδιενεργών αποβλήτων είναι πολύ σημαντική. Πολλοί έμβιοι και νεκροί οργανισμοί συσσωρεύουν βαρέα μέταλλα και ραδιονουκλίδια (radionuclides). Η βιοτεχνολογία προσφέρει αρκετές δυνατότητες για την απομάκρυνση των ραδιονουκλιδίων από το υδάτινα απόβλητα. Γι αυτό τον σκοπό χρησιμοποιούνται τα βιοπολυμερή ενώ παράλληλα εξετάζεται η δυνατότητα της χρήσης του βιομηχανικού διαχωρισμού, της γενετικής μηχανικής και των μονοκλωνικών αντισωμάτων²¹.

Πέρα από τα προαναφερθέντα υπάρχουν και πολλές άλλες εφαρμογές όπως είναι η παραγωγή μικροβιακών εντομοκτόνων (*Bacillus thuringensis*), η δημιουργία τεχνητού χιονιού (*Pseudomonas syringae*), η παραγωγή ινσουλίνης με την χρήση του ανασυνδιασμένου DNA, η παραγωγή του εμβολίου της ηπατίτιδας Β, η εξόρυξη του χαλκού χρησιμοποιώντας βακτήρια κ.ά.

1.3 Η Βιοτεχνολογία τον 21^ο αιώνα

Πολλοί είναι οι ερευνητές που σήμερα θεωρούν πώς ο 21^{ος} αιώνας θα είναι ο αιώνας της Βιοτεχνολογίας. Όπως προκύπτει και από τα λίγα παραδείγματα που αναφέρθηκαν, η βιοτεχνολογία και οι εφαρμογές της στην βιομηχανία εξελίσσονται με ταχύτατο ρυθμό. Βασικός της ρόλος είναι η εκμετάλλευση των φυσικών πόρων, η αξιοποίηση των μικροοργανισμών για την παραγωγή αμινοξέων, πρωτεϊνών, ενζύμων, εμβολίων καθώς επίσης και η παραγωγή ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους όπως οι πρωτογενείς και οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Ένας άλλος βασικός στόχος είναι η παραγωγή πολυσακχαριτών και λιπιδίων. Άλλες εφαρμογές της είναι η βιοαποικοδόμηση, η οξειδωση των αποβλήτων καθώς και η εκχύλιση μετάλλων.

Στις μέρες μας, η βιοτεχνολογία είναι ένας πολλά υποσχόμενος κλάδος. Οι πρόσφατες ανακαλύψεις για τη βιοενέργεια, τη συνθετική βιολογία, τη σύνδεση του DNA με τους υπολογιστές, την ανάπτυξη της γονιδιωματικής, της πρωτεομικής, της βιοπληροφορικής και της βιο-νανοτεχνολογίας έχουν μετατρέψει την βιοτεχνολογία σε έναν ισχυρά ανερχόμενο κλάδο.

Οι περισσότεροι που ασχολούνται με την βιοτεχνολογία και τις εφαρμογές της πιστεύουν ότι στο μέλλον, θα έχει σημαντικές επιπτώσεις στην παγκόσμια οικονομία. Πολλοί ερευνητές βασίζουν τις ελπίδες τους σε αυτήν για την αντιμετώπιση παγκόσμιων προβλημάτων όπως είναι οι επιδημίες, οι θανατηφόρες ασθένειες, η υπερθέρμανση του πλανήτη, ακόμα και για τη φτώχεια.

Παρόλα αυτά, υπάρχει ένα τεράστιο εύρος απόψεων σχετικά με τους διαγονιδιακούς οργανισμούς και τις επιπτώσεις που θα έχουν στην εξέλιξη. Ένας άλλος προβληματισμός που προκύπτει στις μέρες μας είναι η εφαρμογή των νέων βιοτεχνολογικών μεθόδων για την ανάπτυξη βιολογικών όπλων. Οι παραπάνω είναι λίγοι μόνο λόγοι για τους οποίους ένας νέος κλάδος της επιστήμης αναπτύχθηκε παράλληλα με τη Βιοτεχνολογία, αυτός της Βιοηθικής³.

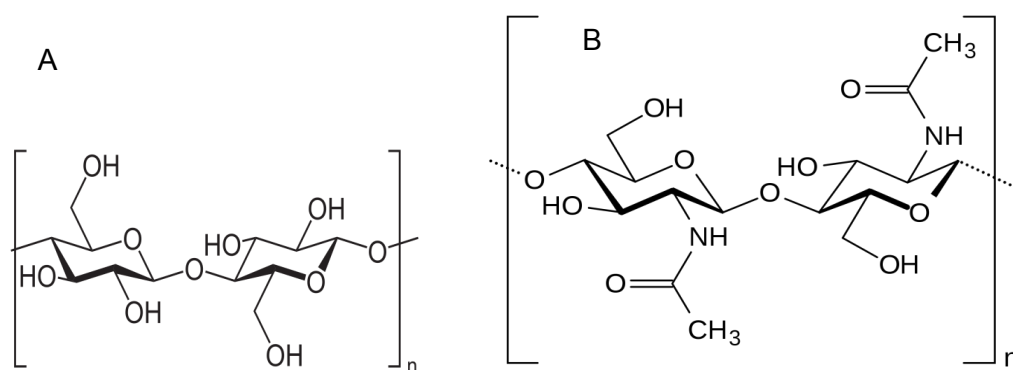
1.4 Γενικές πληροφορίες για την χιτίνη και σύνδεση της με την βιοτεχνολογία

Η χιτίνη ανακαλύφθηκε το 1884 και αποτελεί, μετά την κυτταρίνη, έναν από τους πιο άφθονους πολυσακχαρίτες στην φύση. Η εκτιμώμενη ετήσια παραγωγή της είναι 10 γιγατόνοι²²⁻²⁴. Η μεγάλη αφθονία της είναι ένας από τους βασικότερους λόγους που την καθιστά ένα σημαντικό υλικό για εμπορική εκμετάλλευση. Στη φύση, η χιτίνη απαντάται με τη μορφή κρυσταλλικών μικροϊνιδίων και εμφανίζεται σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών καθώς συνεισφέρει στον σχηματισμό του σκελετού των αρθροπόδων, στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων και των ζυμομυκήτων, στο εξωτερικό κάλυμμα των αραχνοειδών, στο ρύγχος των κεφαλοπόδων, στα κελύφη των αυγών, στον εξωσκελετό κάποιων εντόμων και στα κοχύλια των καρκινοειδών. Επιπλέον παράγεται από κάποια φυτά και έχει συσχετιστεί με τη δημιουργία ανθεκτικών

και ενισχυμένων καλυμμάτων που προστατεύουν το φυτικό οργανισμό²⁵. Οι ιδιότητες τόσο της χιτίνης όσο και των παραγώγων της, κέντρισαν το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητών που δραστηριοποιούνται στη βιοϊατρική, την φαρμακευτική, τα τρόφιμα και το περιβάλλον (ιδιαίτερως για βιομηχανικές εφαρμογές) μια και αποτελεί σημαντική ανανεώσιμη πηγή, η οποία απ' ό,τι διαφαίνεται δεν αξιοποιείται στον μέγιστο δυνατό βαθμό²⁶.

1.4.1 Η δομή της χιτίνης

Η χιτίνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης, που αποτελείται από επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα N-ακετυλο-β-D-γλυκοζαμίνη (N-acetyl-β-D-glucosamine, GlcNAc). Η δομή της χιτίνης είναι παρόμοια με αυτήν της κυτταρίνης με την μόνη διαφορά ότι η χιτίνη έχει μια ακετυλιωμένη αμινομάδα που αντικαθιστά την υδροξυλομάδα του άνθρακα δύο της κυτταρίνης (Σχήμα 1). Η κυτταρίνη και η χιτίνη έχουν κάποιες κοινές χαρακτηριστικές ιδιότητες όπως ότι είναι αδιάλυτες σε νερό, σχηματίζουν κρυσταλλικές δομές λόγω της β(1,4) σύνδεσης των μονάδων γλυκόζης και το μόριο του δισακχαρίτη θεωρείται η δομική και λειτουργική τους μονάδα.



Σχήμα 1. A) το μόριο της κυτταρίνης είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από μόρια γλυκόζης B) Το μόριο της χιτίνης είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από GlcNAc

Υπάρχουν πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για να συνθέτουν και να διασπούν την χιτίνη. Η διάσπαση ή η σύνθεση της χιτίνης εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού και τις ανάγκες του. Η χιτίνη συντίθεται από μονομερή ουριδινο-διφωφορική-N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (UDP-N-acetyl-D-glucosamine) που πολυμερίζονται σχηματίζοντας β-1,4 γλυκοζιτικούς

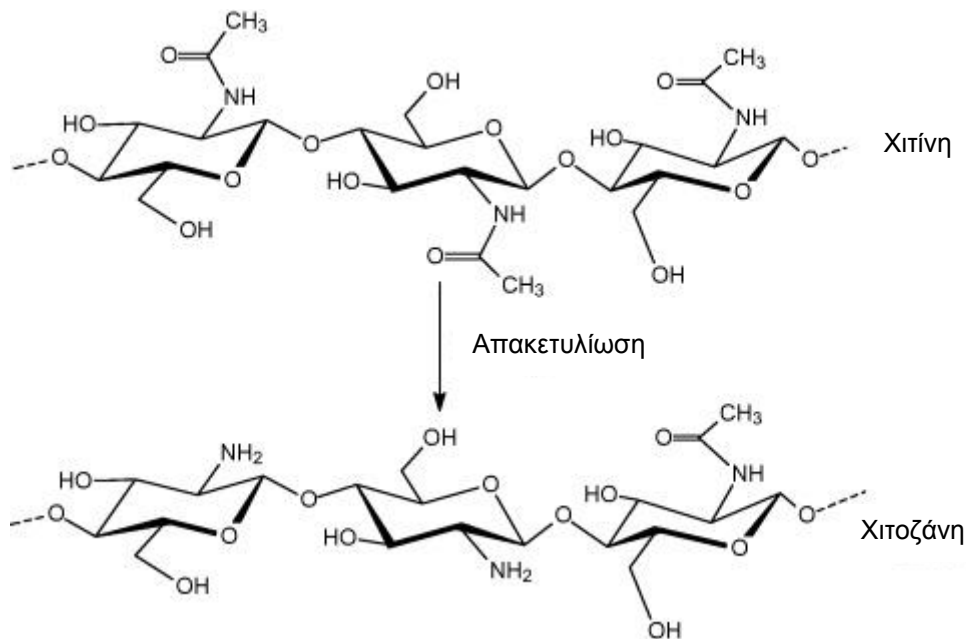
δεσμούς ώστε να παραχθεί η χιτίνη. Τα μόρια της χιτίνης δεν έχουν όλα το ίδιο μέγεθος αλλά εμφανίζονται στην φύση σε διάφορα μεγέθη και φτιάχνουν πολυμορφικούς σχηματισμούς. Όπως αναφέρθηκε τα μόρια της χιτίνης δεν διακλαδίζονται παρόλα αυτά οι αλυσίδες τους τοποθετούνται η μια δίπλα στην άλλη και αλληλεπιδρούν συνάπτοντας δεσμούς υδρογόνου. Τα GlcNAc μονομερή της χιτίνης παρουσιάζουν 180° στροφή ως προς το ακριβώς επόμενο μονομερές²⁷.

Το μόριο της χιτίνης ανάλογα με την διευθέτηση των αλυσίδων στον χώρο διαχωρίζεται σε:

- α-χιτίνη, η οποία αποτελεί την επικρατέστερη δομή στην φύση και απαρτίζεται από αντιπαράλληλες αλυσίδες^{28, 29}
- β-χιτίνη, η οποία αποτελείται από παράλληλες αλυσίδες^{30, 31}
- γ-χιτίνη, η οποία εμφανίζει δύο παράλληλες και μια αντιπαράλληλη αλυσίδα³²

1.4.2 Η αποικοδόμηση της χιτίνης

Το ένζυμο «χιτίνη-N-απακετυλάση» (Chitin-N-deacetylase) καταλύει την απακετυλίωση της χιτίνης (deacetylation) σε χιτοζάνη (Σχήμα 2). Η χιτοζάνη είναι ένα ετεροπολυμερές αποτελούμενο από κατάλοιπα GlcNAc και D-γλυκοζαμίνες (D-glucosamine, GlcN)²⁴. Η χιτίνη σε συνδυασμό με την χιτοζάνη αποτελούν τα κυριότερα δομικά συστατικά των καρκινοειδών, των εντόμων, των μαλακίων και του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών³³.



Σχήμα 2. Η απακετυλίωση της χιτίνης σε χιτοζάνη παρουσία του ενζύμου της απακετυλάσης

Η αποικοδόμηση της χιτίνης πραγματοποιείται κυρίως από τις χιτινάσες και τη λυσοζύμη. Ενώ η αποικοδόμηση της χιτοζάνης πραγματοποιείται από την χιτοζανάση (chitosanase). Τα ένζυμα αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα και απαντώνται κυρίως στα φυτά, τα ζώα, τα έντομα και στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

Οι μύκητες όπως και τα βακτήρια μπορούν να κάνουν ενζυμική διάσπαση της χιτίνης κυρίως χρησιμοποιώντας τους χιτινολυτικούς τους μηχανισμούς. Η αποικοδόμηση αυτή είναι σημαντική καθώς εμπλουτίζονται με άζωτο και άνθρακα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, μπορούν να παράγουν έναν μεγάλο αριθμό ενζύμων για να μετατρέψουν την χιτίνη σε διαλυτό προϊόν μέσω των μεταβολικών τους οδών. Από την άλλη πλευρά, οι μύκητες που φέρουν ήδη στα κυτταρικά τους τοιχώματα χιτίνη χρειάζονται την παρουσία ενζύμων για την διάσπαση της κατά την διάρκεια της κυτταρικής τους διαίρεσης και της σποριογένεσης. Η διάσπαση της χιτίνης μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους με κυριότερο εκείνον που υδρολύεται ο β(1,4)-γλυκοζιτικός δεσμός. Τα ένζυμα που προκαλούν την υδρόλυση λέγονται χιτινάσες και ανήκουν στις οικογένειες 18 και 19 των υδρολασών (glycoside hydrolase (GH) families 18 and 19). Μια εναλλακτική οδός που έχει ήδη αναφερθεί για την αποικοδόμηση της χιτίνης είναι η απακετυλίωση της χιτίνης σε χιτοζάνη από τις

απακετυλάσες της χιτίνης (Chitin deacetylases). Η περαιτέρω υδρόλυση των χιτοζανών γίνεται από τις χιτοζανάσες. (chitosanases)³⁴.

1.4.3 Οι εφαρμογές της χιτίνης και των παραγώγων της στη βιοτεχνολογία

Η χιτίνη έχει χαμηλή τοξικότητα και μπορεί να διασπαστεί από ένα μεγάλο εύρος χιτινασών που υπάρχουν στη φύση. Οι χιτινάσες απαντώνται σε βακτήρια, σε μύκητες, σε φυτά καθώς και στο πεπτικό σύστημα πολλών ζώων. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν την χιτίνη ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Οι χιτινάσες, έχουν πολύ σημαντικό ρόλο καθώς, εμπλέκονται στην άμυνα του οργανισμού απέναντι στα βακτήρια. Επιπρόσθετα, οι μηχανισμοί άμυνας φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με την χιτίνη καθώς έχει παρατηρηθεί ότι σε συνδυασμό με την 6-Ο-καρβοξυμεθυλοχιτίνη (6-O-carboxymethylchitin) ενεργοποιούνται τα μακροφάγα *in vivo* και αναστέλλεται η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια. Ακόμη, ενεργοποιεί τη μη ειδική άμυνα σε λοιμώξεις από *E.coli* και βοηθά στην επιτάχυνση της επούλωσης των πληγών³⁴.

Μια από τις πρακτικές εφαρμογές της χιτίνης είναι η χρήση της ως πληρωτικό υλικό για την απομόνωση των λεκτινών με χρωματογραφία συγγένειας³⁵. Επιπλέον έχει χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση ενζύμων καθώς και ολόκληρων κυττάρων με πολλαπλές εφαρμογές. Ειδικότερα, τα ακινητοποιημένα ένζυμα χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην βιομηχανία των τροφίμων (π.χ. για την παρασκευή χυμών, γάλακτος). Επιπρόσθετα, έχει χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή βιοαισθητήρων και ως βασικό υλικό για την επεξεργασία των βιοχημικών ρύπων^{36, 37}.

Η κατανόηση του τρόπου διάσπασης της χιτίνης και των παραγώγων της με σκοπό την παραγωγή ενέργειας προς όφελος του ανθρώπου και του περιβάλλοντος είναι ιδιαίτερης σπουδαιότητας. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της χιτίνης είναι ότι παράγεται από φυσικές πηγές και είναι επαναδιαθέσιμη στην φύση²⁴. Επίσης, η μορφολογία της, είναι συντηρημένη ανάμεσα στα φυτά και στα ζώα άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί καθολικά. Αυτές οι πληροφορίες οδήγησαν στην εμπορευματοποίηση της χιτίνης και των

παραγώγων της ³⁸. Στη συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες εφαρμογές αυτής:

Καθαρισμός λυμάτων. Οι κατιονικές χιτοζάνες σχηματίζουν σύμπλοκα με αρνητικά φορτισμένα πολυμερή και μεταλλικά ιόντα. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στην εμφάνιση ιζημάτων ^{39, 40}. Η παραπάνω ιδιότητα έχει χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό των λυμάτων. Η πρώτη της εφαρμογή ήταν το 1975 στην Ιαπωνία ως ένας κατιονικός παράγοντας για την αφυδάτωση και την κροκίδωση της λάσπης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται και στις μέρες μας για τον καθαρισμό των μολυσμένων νερών, την ανάκτηση πρωτεϊνών και μετάλλων από τα βιομηχανικά λύματα, την απομόνωση βιοενεργών ενώσεων από τα ούρα και την απομάκρυνση των ενδοτοξινών από τα υδατικά διαλύματα ³³. Επίσης, παρουσία της χιτοζάνης, απομακρύνονται ραδιενεργά ισότοπα από το νερό και το ουράνιο από το θαλασσίνο και το γλυκό νερό.

Γεωργία. Ένας άλλος κλάδος που βρίσκουν εφαρμογή η χιτίνη και η χιτοζάνη είναι στην γεωργία. Σε αυτή την περίπτωση τα κελύφη από τις γαρίδες, τα όστρακα και τα καβούρια χρησιμοποιούνται ως λιπάσματα. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της χιτίνης και της χιτοζάνης είναι ότι βιοαποικοδομούνται, άρα η παρουσία της στο έδαφος συνεισφέρει στην αύξηση της μικροβιακής χλωρίδας του εδάφους. Παράλληλα αυξάνεται η χρήσιμη χλωρίδα ενώ μειώνεται η επιβλαβής, άρα παρατηρείται αύξηση της ανάπτυξης των καλλιεργούμενων φυτών ^{41, 42}. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί πως η παρουσία των χιτινασών στους σπόρους των φυτών παρεμποδίζει τις λοιμώξεις από μικροοργανισμούς ⁴³.

Ζωοτροφές και Τρόφιμα. Οι ζωοτροφές και τα τρόφιμα είναι ένα άλλο πεδίο που έχει χρησιμοποιηθεί τόσο η χιτίνη όσο και η χιτοζάνη. Το ποσοστό της χιτίνης στα μανιτάρια, τις ζύμες και τις γαρίδες είναι 3-25%. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον ότι η χιτίνη και οι ολιγοσακχαρίτες αποτελούν αυξητικό παράγοντα για κάποια βακτήρια του εντερικού συστήματος των ζωικών οργανισμών ⁴⁴. Κατ' επέκταση η χορήγηση της χιτίνης και της χιτοζάνης στα ζώα έχει συνδεθεί με την αύξηση της πέψης τους σε 80%. Ακόμα, η χιτοζάνη χρησιμοποιείται σε αρκετά τρόφιμα σαν πρόσθετο για τη μείωση της ανάπτυξης των βακτηρίων και των μυκήτων σε αυτά ⁴². Εκτός από τα

παραπάνω, η χορήγηση της χιτοζάνης έχει συσχετισθεί με την υποχοληστεριναιμική λειτουργία στο έντερο των ζωικών οργανισμών ⁴⁵⁻⁴⁸.

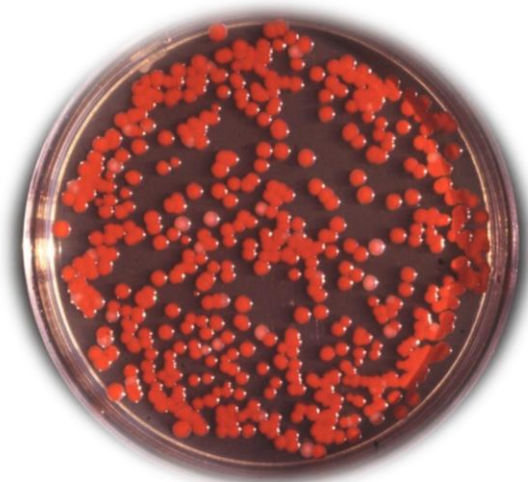
Επιπρόσθετα, άλλοι τομείς που χρησιμοποιούν τη χιτίνη είναι η βιοϊατρική και η φαρμακευτική ⁴⁹. Η χιτίνη και τα παράγωγα της είναι εύπεπτα βιοπολυμερή και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της επαγωγής των παραγόντων άμυνας συμπεριλαμβανομένου της λυσοζύμης και της χιπινάσης. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εύπεπτο υλικό με τη μορφή επικάλυψης στην παρασκευή των φαρμάκων. Από την άλλη πλευρά, τα παράγωγα της χιτοζάνης είναι χρησιμοποιήσιμα σε μεμβράνες αιμοκάθαρσης και σε τεχνικά αιμοφόρα αγγεία ⁵⁰. Ένα άλλο ενδιαφέρον πεδίο, είναι η χρήση τους ως αντικαρκινικά σκευάσματα, καθώς, οι ενέσεις της χιτοζάνης ή χιτίνης έχουν συσχετισθεί με αντικαρκινική δράση ⁵¹. Επιπλέον, η επούλωση των πληγών έχει δείχθει ότι γίνεται πιο γρήγορα παρουσία της χιτίνης ή της χιτοζάνης, επειδή ένας από τους παράγοντες που ενεργοποιούν είναι η λυσοζύμη με αποτέλεσμα την ενίσχυση της επούλωσης του τραύματος ⁵². Όπως περιγράφηκε προηγουμένως η χιτίνη αποτελεί συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, άρα η αποικοδόμηση της είναι σημαντικός μηχανισμός άμυνας.

Ένα τελευταίο παράδειγμα της εφαρμογής της είναι η χρήση της ως συστατικά καλλυντικών, αφού έχουν συσχετιστεί με την προστασία από λοιμώξεις του δέρματος και με την πρόληψη κατά της γήρανσης.

1.4.4 Το *Serratia marcescens* και ο ρόλος του στην αποικοδόμηση της χιτίνης.

Το γένος *Serratia* είναι μέλος της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και ανακαλύφθηκε από τον Bizio (Ιταλός φαρμακοποιός) το 1819. Αρχικά είχε θεωρηθεί ένας μη παθογόνος σαπροφυτικός υδρόβιος οργανισμός και χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικός δείκτης λόγω των κόκκινων αποικιών που αναπτύσσει ^{53, 54} (Εικόνα 1). Το χρώμα των αποικιών του οφείλεται στην σύνθεση του κόκκινου αντιβιοτικού προδιγιοσίνη (prodigiosin) ⁵⁴⁻⁵⁸. Στις μέρες μας γνωρίζουμε πως είναι ένα από τα παθογόνα που προκαλούν νοσοκομειακές μολύνσεις. Μπορεί να προσβάλει το πεπτικό, το

αναπνευστικό, και το ουροποιητικό σύστημα καθώς και το περίνεο των νεογνών. Επιπλέον, μερικές μηνιγγίτιδες οφείλονται στο *S. marcescens*⁵³.



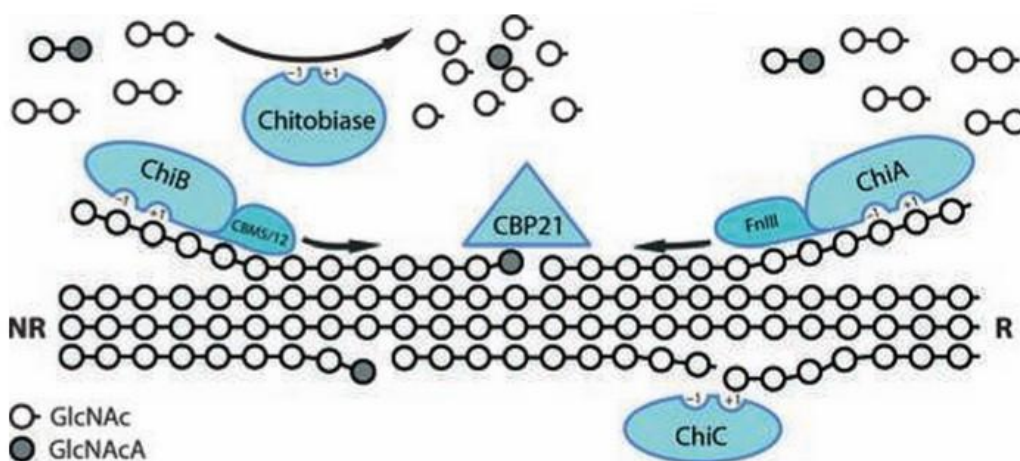
Εικόνα 1. Κόκκινες αποικίες του *S. marcescens* λόγω της προδιγιοσίνης⁵⁹

Μια πρωτοποριακή μελέτη που έγινε το 1969 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το *Serratia marcescens* σε σύγκριση με 100 άλλους μικροοργανισμούς είναι ο πιο αποτελεσματικός για την αποικοδόμηση της χιτίνης⁵⁵. Αυτός ο λόγος συντέλεσε ώστε να γίνει ένα από τα κυριότερα συστήματα μελέτης του μηχανισμού αποικοδόμησης της χιτίνης^{60, 61}.

Τα ένζυμα που διασπούν την χιτίνη σε αυτόν τον μικροοργανισμό είναι οι χιτινάσες, η χιτοβιάση και η GBP21. Στην ομάδα των χιτινασών περιλαμβάνονται οι ChiA, ChiB, ChiC1, ChiC2, που ανήκουν στις γλυκοσιδικές υδρολάσες της οικογένειας 18 (glycoside hydrolase 18, GH18). Η δομικά αυτοτελής περιοχή (domain) του καταλυτικού τους κέντρου έχει τη δομή ενός $(\beta/\alpha)_8$ βαρελιού. Επιπλέον, μόλις πρόσφατα διαπιστώθηκε πως η GBP21 έχει ενζυμικές ιδιότητες, ο βασικός της ρόλος είναι να αλληλεπιδρά με την επιφάνεια της χιτίνης και να διασπά τα πολυμερή δημιουργώντας οξειδωμένα άκρα⁶². Με αυτόν τον τρόπο, η αποικοδόμησή της από τις χιτινάσες είναι πιο εύκολα προσβάσιμη. Από την άλλη πλευρά οι χιτινάσες μετατρέπουν την χιτίνη σε ολιγοσακχαρίτες και διμερή GlcNAc. Το τελικό στάδιο της αποικοδόμησης πραγματοποιείται από τις χιτοβιάσες. Οι τελευταίες υδρολύουν τον β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό του διμερούς και άλλων ολιγοσακχαριτών με αποτέλεσμα την παραγωγή μονομερών.

Αναλυτικότερα, η διάσπαση της χιτίνης στο *S. marcescens* πραγματοποιείται με τον εξής τρόπο: Η ChiB αποικοδομεί τις αλυσίδες της χιτίνης από τα μη αναγωγικά άκρα (NR) και η ChiA από τα αναγωγικά άκρα. Και τα δύο ένζυμα παράγουν χιτοβιόζη. Επιπλέον, η ChiC διασπά σε άμορφα σημεία των αλυσίδων που γίνονται πλέον προσβάσιμα στις ChiA και ChiB. Από την άλλη πλευρά, η CBP21 κόβει την χιτίνη στις οργανωμένες και κρυσταλλικές περιοχές παράγοντας αλδολικά οξέα. GlcNAcA. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζει νέα άκρα στις αλυσίδες. Η χιτοβιάση με την σειρά της μετατρέπει την χιτοβιόζη σε μονομερή ή ολιγοσακχαρίτες^{63, 64} (Εικόνα 2).

Η παρούσα εργασία εστιάζει σε δομικές μελέτες της χιτοβιάσης

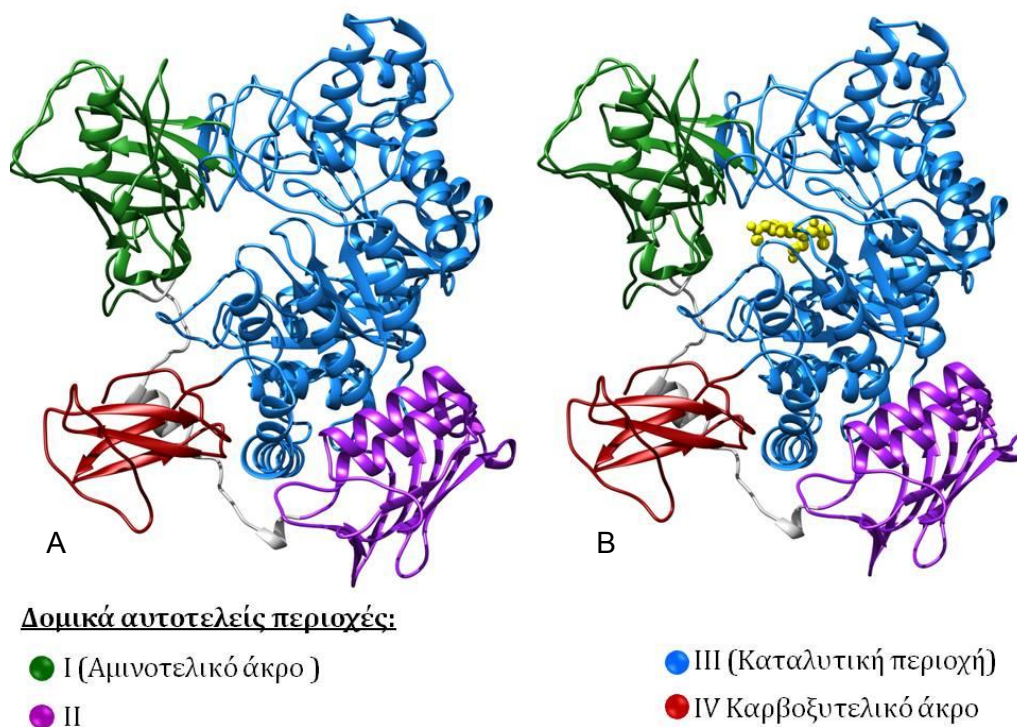


Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της αποικοδόμησης της χιτοβιάσης⁶⁴

1.5 Η τρισδιάστατη δομή της χιτοβιάσης (ρόλος του καταλυτικού κέντρου και των άλλων υπομονάδων)

Η κλωνοποίηση του γονιδίου της χιτοβιάσης έγινε το 1989 και ο προσδιορισμός της δομής της το 1996^{65, 66}. Η χιτοβιάση είναι μια μονομερής πρωτεΐνη (98.5 kDa) που αποτελείται από τέσσερις δομικά αυτοτελείς περιοχές. Η νεοσυντιθέμενη αλληλουχία μεταφέρεται στην περιπλασματική περιοχή και υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από το πεπτιδίο οδηγητή. Η ώριμη πρωτεΐνη φέρει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν το μόριο, ενώ δεν χρειάζονται συμπαραγοντες, προσδέτες ή μέταλλα για να είναι λειτουργική⁶⁶. Αναλυτικότερα για την χιτοβιάση, όπως αναφέρθηκε

προηγουμένως, απαρτίζεται από τέσσερις δομικά αυτοτελείς περιοχές εκ των οποίων οι τρεις είναι στο ίδιο επίπεδο ενώ η τέταρτη προεξέχει⁶⁶(Σχήμα 3).



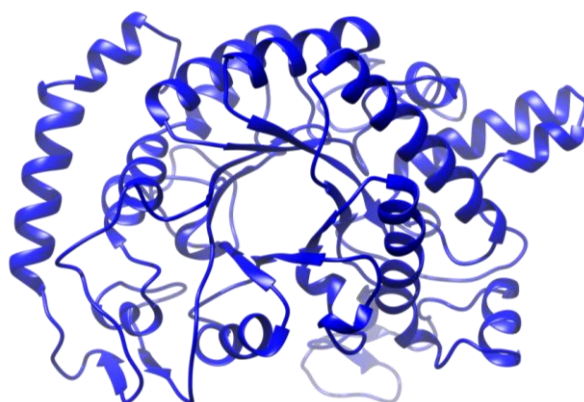
Σχήμα 3 Σχηματική αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της Χιτοβιάσης **A)** στη φυσική διαμόρφωση απουσία προσδέτη (PDB κωδικός: 1QBA) και **B)** παρουσία ενός δισακχαρίτη GlcNAc ως προσδέτη (PDB κωδικός: 1QBB)⁶⁶

Η δομικά αυτοτελής περιοχή I αποτελεί το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και φαίνεται να έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην δέσμευση του υποστρώματος. Η υπόθεση αυτή, δεν έχει αποδειχθεί ακόμα πειραματικά. Αναλυτικότερα η περιοχή I εκτείνεται από το αμινοξύ 28 έως το 181 και αποτελείται από δύο β-φύλλα και μια α-έλικα που εμφανίζεται πριν την πρώτη β-πτυχωτή επιφάνεια. Αυτή η δομική περιοχή είναι όμοια με δομικές περιοχές που δεσμεύουν την κυτταρίνη (cellulose binding domain (CBD))⁶⁶.

Η δομικά αυτοτελής περιοχή II (214-335) φέρει το μοτίβο α+β έχοντας δύο α-έλικες και επτά β-πτυχωτές επιφάνειες. Ο πιθανός ρόλος αυτής της περιοχής παραμένει άγνωστος.

Όσον αφορά στη δομικά αυτοτελή περιοχή III, είναι η περιοχή που καταλύει την αποικοδόμηση των ολιγοσακχαριτών ή του διμερούς σε μονομερή.

Μορφολογικά, σχηματίζει ένα $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι και ανήκει στην οικογένεια των γλυκοσιδικών υδρολασών και συγκεκριμένα στην GH20^{67, 68}(Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Η δομή του καταλυτικού κέντρου της χιτοβιάσης, δομή ανάλογη του $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι

Το καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της δομικά αυτοτελούς περιοχής III στο οποίο δεσμεύονται τα $(\text{GlcNAc})_2$. Εμφανίζει διαφοροποιήσεις από ένα τυπικό $(\beta\alpha)_8$ -βαρέλι αφού αποτελείται από μόνο επτά έλικες. Στο κέντρο αυτό απαντώνται εκτεταμένοι βρόχοι που ακολουθούν τις β -πτυχωτές επιφάνειες και αλληλεπιδρούν με τη δομικά αυτοτελή περιοχή I. Επιπλέον, μια β -πτυχωτή επιφάνεια και μια έλικα (7 στροφών), ολοκληρώνουν τη δομικά αυτοτελή περιοχή III και συνθέτουν το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η πρόσθετη αυτή έλικα αλληλεπιδρά επίσης με την περιοχή II.

Όσον αφορά στις δομικά αυτοτελής περιοχές IV, και I, αποτελούνται από δύο β -πτυχωτές επιφάνειες. Αυτή η περιοχή είναι παρόμοια με την ανοσοσφαιρίνη όπου η διεύθετηση στο χώρο προσομοιάζει ένα β -σαντουιτς⁶⁶.

1.5.1 Πώς καταλύει η χιτοβιάση τη διάσπαση του διμερούς $(\text{GlcNAc})_2$

Ο μηχανισμός κατάλυσης των ενζύμων της οικογένειας GH20, στην οποία ανήκει και η χιτοβιάση, απαιτεί την παρουσία δύο αμινοξέων, το μεν πρώτο χαρακτηρίζεται ως καταλυτικό αμινοξύ ενώ το δεύτερο δρα ως νουκλεόφιλη

βάση⁶⁹. Τα αμινοξέα αυτά είναι συντηρημένα και συνήθως περιλαμβάνουν το ασπαρτικό και το γλουταμικό οξύ⁷⁰.

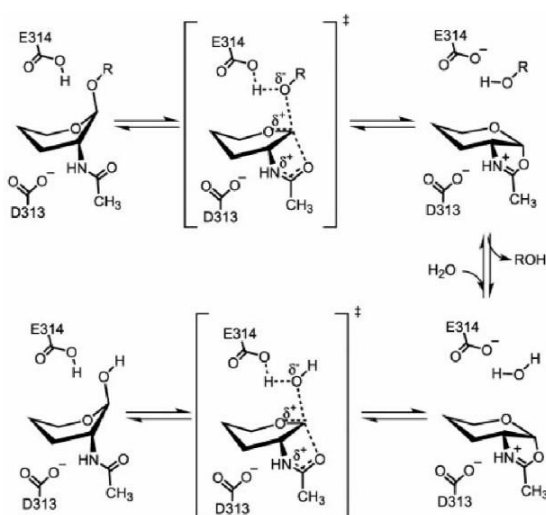
Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της χιτοβιάσης από *S. marcescens* έγινε για πρώτη φορά από τους Tews et al., το 1996 και χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως μοντέλο για τη μελέτη του ενζύμου της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης. Το ένζυμο αυτό είχε συσχετισθεί με τις ασθένειες Tay Sachs και Sanhoff, οι οποίες αφορούσαν σε διαταραχές της λειτουργίας των λυσοσωμάτων⁷¹ και η δομή του δεν ήταν γνωστή. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρεις διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου οι οποίες εμφανίζονται στον οργανισμό είτε ως ομοδιμερή, είτε ως ετεροδιμερή αποτελούμενα από α και β υπομονάδες (για λεπτομέρειες βλ. §1.5.1.1) Η αμινοξική ομοιότητα μεταξύ της α-υπομονάδας της HexA και της χιτοβιάσης του *S.marcescens* είναι περίπου 26%. Η ομοιότητα μεταξύ της χιτοβιάσης και της α ή β υπομονάδας της εξοζαμινιδάσης περιορίζεται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Η διερεύνηση και η ανίχνευση συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων στο καταλυτικό κέντρο και των δύο ενζύμων οδήγησε στο συμπέρασμα πως οι καταλυτικοί μηχανισμοί είναι παρόμοιοι. Επιπλέον, η αρχιτεκτονική και των δύο ενεργών κέντρων έχει δομή ανάλογη με (βα)₈-βαρέλι⁷².

Ειδικότερα, οι ανθρώπινες εξοζαμινιδάσες έχουν συσχετιστεί με την απομάκρυνση N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (GlcNAc) και N-ακετυλογαλακτοζαμίνης (GalNAc) από το μη αναγωγικό άκρο των ολιγοσακχαριτών και των γλυκοσυζευγμάτων.

Τόσο για το ένζυμο της χιτοβιάσης όσο και για την εξοζαμινιδάση έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για την αποσαφήνιση του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιείται η κατάλυση. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση της χιτοβιάσης, τα καταλυτικά αμινοξέα είναι το Asp539 και το Glu540. Η σπουδαιότητα αυτών των δύο αμινοξικών καταλοίπων έχει αποδειχθεί από τις μελέτες των Prag et al. το 2000⁷³. Μελέτες κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης στα δύο παραπάνω αμινοξέα (με σημειακές μεταλλάξεις) ακολουθούμενες από μελέτες που αφορούν στον τρόπο σύνδεσης του ενζύμου με το υπόστρωμα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα Asp539 και Glu540 είναι σημαντικά για τη δραστηριότητα της χιτοβιάσης. Ειδικότερα, το μεν

Asp539 φαίνεται να υποβοηθά τον προσανατολισμό του υποστρώματος κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο σε θέση τέτοια που να ευνοεί την κατάλυση ενώ το Glu540 λειτουργεί ως πρωτεϊνικός δέκτης. Η σύνδεση του μη αναγωγικού άκρου του σακχάρου σταθεροποιείται από έναν απευθείας δεσμό υδρογόνου τον οποίο σχηματίζει το αμινοξύ Arg349 με το σάκχαρο. Η σύνδεση του δισακχαρίτη στο ενεργό κέντρο οδηγεί στην στρέβλωση του σακχάρου ⁷⁴.

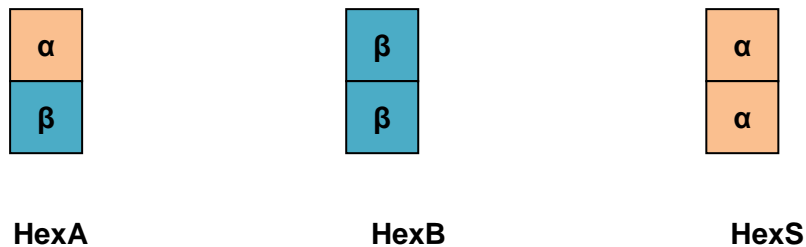
Αντίστοιχος είναι και ο μηχανισμός κατάλυσης των εξοζαμινιδάσεων και συγκεκριμένα της εξοζαμινιδάσης από τον *Streptomyces plicatus* ⁷⁵. Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται ο προτεινόμενος μηχανισμός για τον τρόπο λειτουργίας της εξοζαμινιδάσης. Αρχικά, η ομάδα ακεταμιδίου του σακχάρου που βρίσκεται στον άνθρακα 2 αλληλεπιδρά με το υδρογόνο του Glu314 το οποίο δρα ως δότης πρωτονίων. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην αλλαγή των φορτιών του σακχάρου από ουδέτερα σε θετικά. Ένα άλλο σημαντικό γεγονός είναι η σταθεροποίηση του σακχάρου παρουσία του Asp313 ώστε να ολοκληρωθεί η κατάλυση. Με αυτόν τον τρόπο αποδεσμεύεται το μονομερές από τον δισακχαρίτη ή τον ολιγοσακχαρίτη. Τέλος ένα μόριο ύδατος λειτουργεί ως ενδιάμεσο και αποκαθιστά την κατανομή φορτίου τόσο στο ένζυμο όσο και στο σάκχαρο.



Σχήμα 5. Αναπαράσταση του καταλυτικού μηχανισμού της αποικοδόμησης των σακχάρων που έχει προταθεί για την εξοζαμινιδάση της οικογένειας GH20, τα αντίστοιχα αμινοξέα εντοπίζονται και στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης από *S. marcescens* τα οποία όμως βρίσκονται στις θέσεις Asp539 (αντί για Asp 313) και Glu540 (αντί για Glu314) ⁷⁵

1.5.1.1 Κατηγορίες των ανθρώπινων εξοζαμινιδασών

Στον άνθρωπο απαντώνται τρία βασικά ισοένζυμα των β-εξοζαμινιδασών, η β-εξοζαμινιδάση A (HexA), η β-εξοζαμινιδάση B (HexB) και η β-εξοζαμινιδάση S (HexS) ⁷² τα οποία έχουν αποτελέσει αντικείμενο βιοχημικών και βιοϊατρικών μελετών. Η τρίτη ισομορφή δεν έχει ανιχνευθεί σε υγιείς ιστούς. Όλες οι ισομορφές εμφανίζονται στον οργανισμό ως είτε ομοδιμερή είτε ως ετεροδιμερή. Η HexA είναι ένα ετεροδιμερές και αποτελείται από α και β υπομονάδες, η HexB είναι ομοδιμερές και αποτελείται από δύο β υπομονάδες, ενώ η HexS είναι ένα ομοδιμερές αποτελούμενο από δύο α υπομονάδες (Σχήμα 6). Η ομολογία των υπομονάδων α και β στην αμινοξική τους ακολουθία είναι 60%.

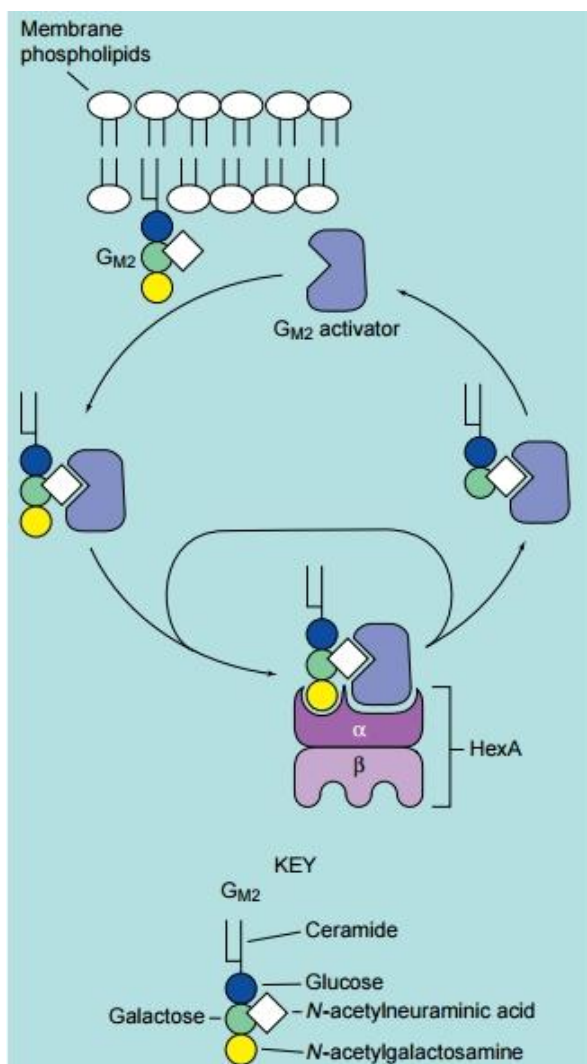


Σχήμα 6. Αναπαράσταση των ομοδιμερών και ετεροδιμερών των ισομορφών του ενζύμου της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης

Η HexA εμπλέκεται στην υδρόλυση των GM2 γαγγλιοσιδίων σε GM3. Πιο συγκεκριμένα, ο GM2 πρωτεϊνικός ενεργοποιητής αλληλεπιδρά με τα GM2 που βρίσκονται ενσωματωμένα στη μεμβράνη των λυσοσώματων (στην οποία συγκρατούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με τα φωσφολιπίδια). Στη συνέχεια το μακρομοριακό σύμπλοκο που σχηματίζεται συνδέεται με την HexA όπου και πραγματοποιείται η υδρόλυση με διάσπαση των β-1,4 δεσμών μεταξύ των N-ακετυλογλυκοζαμινών από τα GM2 γαγγλιοσίδια ⁷⁶ (Εικόνα 3) για την παραγωγή ενός GM3 γαγγλιοσιδίου.

Στην αντίδραση αυτή συμμετέχει κυρίως η α υποομάδα καθώς εκεί γίνεται η κατάλυση. Αντιθέτως, με βάση τα όσα είναι γνωστά έως σήμερα η β-υπομονάδα δεν δύναται να έχει αυτή την ειδική δράση. Παρόλα αυτά και οι δύο υπομονάδες είναι σημαντικές για τη σωστή λειτουργία της εξοζαμινιδάσης. Αν μια από τις δύο υπομονάδες δεν φέρει την σωστή

διαμόρφωση στον χώρο, η HexA δεν μπορεί να συμμετέχει στο σχηματισμό του παραπάνω μακρομοριακού συμπλόκου με αποτέλεσμα να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση⁷⁶.



Εικόνα 3. Ο καταλυτικός ρόλος της HexA στην παραγωγή GM3 γαγγλιοσιδίων⁷⁷

Μεταλλάξεις στην HexA μπορούν να οδηγήσουν είτε σε δυσλειτουργία της α υπομονάδας είτε στην καθολική απενεργοποίησή της. Τέτοιες μεταλλάξεις μπορούν να κληρονομηθούν από τους γονείς στα παιδιά με υπολειπόμενο τρόπο. Αν αδρανοποιηθεί η α υπομονάδα τότε δεν πραγματοποιείται η υδρόλυση των GM2 γαγγλιοσιδίων και έτσι παρατηρείται συσσώρευση των GM2 γαγγλιοσιδίων στα λυσοσώματα. Αυτά τα μη φυσιολογικά λυσοσώματα συσσωρεύονται στα κύτταρα και δεν επιτρέπουν άλλες κυτταρικές διεργασίες με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται σε θάνατο. Στο νευρικό σύστημα η συσσώρευση GM2 γαγγλιοσιδίων μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές ασθένειες

όπως είναι η Tay Sachs. Οι διαταραχές χαρακτηρίζονται από ενδολυσosomalική συσσώρευση ενός όξινου γλυκολιπιδίου του GM2 γαγγλιοσιδίου, αρχικά στον εγκέφαλο και μετά στον περιφερικό νευρικό ιστό. Τα συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν την τύφλωση, την παράλυση και την ψύχωση. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ασθενείς πεθαίνουν από την πρώιμη παιδική ηλικία^{78, 79}.

1.6 Κινητικές μελέτες για την επίδραση των GlcNAc παραγώγων στις εξοζαμινιδάσες και τη χιτοβιάση

Οι κινητικές μελέτες βασίζονται στις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων. Η βασική τους δράση είναι η επιτάχυνση των βιολογικών αντιδράσεων²³. Όπως είναι γνωστό τα ένζυμα δεν επηρεάζουν την ισορροπία μεταξύ των αντιδρώντων και των προϊόντων αλλά επηρεάζουν το πόσο γρήγορα επιτυγχάνεται αυτή η ισορροπία μέσω της μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης. Κατά τις ενζυμικές καταλύσεις, το ένζυμο συνδέεται με το υπόστρωμα, σχηματίζοντας το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος και έπειτα απομακρύνεται το προϊόν.

Οι Halila et al. 2013 δημοσίευσαν μια μελέτη που αναφερόταν στην αναστολή που προκαλούν ενώσεις του TMG-chito oligomycins, CO-n(NMe3) καθώς και οι πρόδρομες ενώσεις αυτών (CO-N(N) και CO-N(NMe3)) στην δραστηριότητα τόσο του ενζύμου της χιτοβιάσης όσο και ενζύμων της εξοζαμινιδάσης⁸⁰. Γι αυτό τον σκοπό μελετήθηκε η αναστολή τους σε εξοζαμινιδάσες που προέρχονται από δύο διαφορετικούς οργανισμούς όπως είναι του *Aspergillus oryzae* (AoHex, μύκητας), του *Canavalia ensiformis* (CeHex, φυτικός οργανισμός) καθώς και στην χιτοβιάση του *S. marcescens*. Τα αποτελέσματα των μελετών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. (

Πίνακας 1)

Πίνακας 1. Παρατίθενται οι τιμές IC₅₀ (μM) και K_i (μM) της ανασταλτικής δράσης που παρουσιάζουν χιτινοολιγοσακχαρίτες έναντι διαφόρων εξοζαμινιδασών και της χιτοβιάσης από *S. marcescens*⁸⁰

HexNAcases	NAG-thiazoline K _i	n	CO-n (NMe ₃)		CO-n (N)	
			IC ₅₀	K _i	IC ₅₀	K _i
SmCHB	>200 ^a	II	n.d. ^b	0.04 ± 0.03	n.d.	167 ± 12 ^c
		IV	n.d.	0.12 ± 0.01	n.d.	50 ± 7 ^c
		V	n.d.	0.13 ± 0.01	n.d.	14.1 ± 1.5 ^c
AoHex	76.5 ± 7.8	II	56.7 ± 4.2	100 ± 12	>3000 ^d	n.d.
		IV	2.3 ± 0.08	1.00 ± 0.07	>250 ^e	n.d.
		V	0.97 ± 0.08	1.20 ± 0.01	>250 ^f	n.d.
CeHex	0.71 ± 0.06	II	No inhibition			
		IV				
		V				

^a <28% inhibition at 200 μM.

^b n.d. for not determined.

^c Reference 7.

^d <29% inhibition at 3 mM.

^e <20% inhibition at 250 μM.

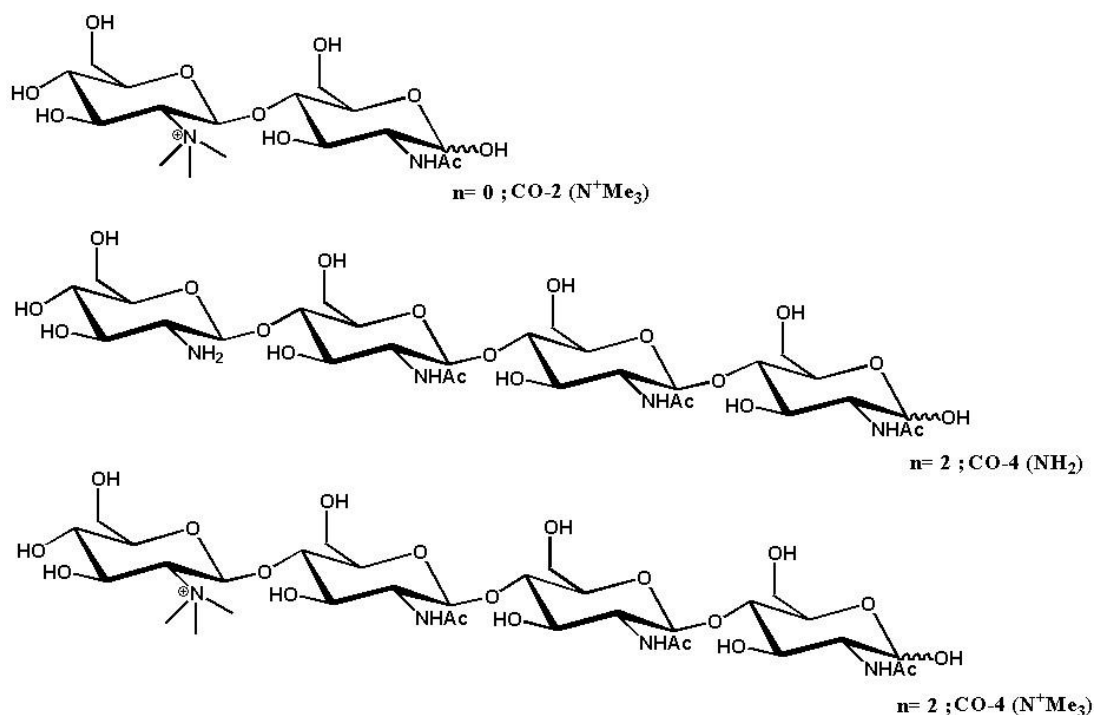
^f <40% inhibition at 250 μM.

Τα κινητικά αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή και εκλεκτική αναστολή όλων των ενζύμων που μελετήθηκαν παρουσία των χιτινο-ολιγοσακχαριτών με τιμές K_i στο εύρος των 200 έως 0,04 μM, εκτός από την CeHex όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή της δραστηρότητάς της. Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο είναι η διαφοροποίηση της αναστολής ανάλογα με τον οργανισμό προέλευσης των ενζύμων και το μήκος της αλυσίδας της χιτίνης από την οποία αποτελείτο ο κάθε αναστολέας.

Όσον αφορά στη χιτοβιάση, η ένωση CO-II(NMe₃) (ένωση 1) παρουσίασε K_i σε 0.04 μM. Η απομάκρυνση των τριών ομάδων μεθυλίου και προσθήκη δύο ακόμα GlcNAc υπομονάδων, CO-IV(N) (ένωση 2), οδήγησε σε έναν ασθενέστερο αναστολέα με τιμή K_i 50 μM. Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της τριμεθυλο-ομάδας, μελετήθηκε επίσης η κινητική συμπεριφορά της ένωσης CO-IV (NMe₃) (ένωση 3), η οποία έδειξε αναστολή K_i 0.12 μM, σαφώς βελτιωμένη έναντι της ένωσης 2 ασθενέστερη όμως της ένωσης 1. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η αύξηση του πλήθους των μονάδων εξόζης δεν ήταν ευνοϊκή όταν ο προσδέτης έφερε την τριμεθυλο ομάδα ως υποκαταστάτη (ένωση 1 vs 3). Η ένωση 3 υπεβλήθη σε περαιτέρω αύξηση του πλήθους των μονάδων εξόζης, προσθήκη μιας τέταρτης Glc-NAc μονάδας στο αναγωγικό άκρο, όπου παρατηρήθηκε ότι η σταθερά αναστολής K_i παρέμεινε χαμηλά με τιμή 0,13 μM (Σχήμα 7).

Οι συγγραφείς βασιζόμενοι σε δεδομένα από NMR αιτιολογούν πως η διαφορά των τιμών οφείλεται σε διαφορετική διαμόρφωση στον χώρο της

πρώτης μονάδας εξόξης της πολυσακχαρικής αλυσίδας που βρίσκεται στην μη αναγωγική πλευρά. Υποστηρίζεται ότι το CO-IV (NMe₃) έχει διαμόρφωση λουτήρα ενώ το GlcNH₂ εμφανίζει την δομή ανάκλιντρου. Σε κάθε περίπτωση είναι πολύ σημαντικό ότι οι αναστολείς CO-n (NMe₃) εμφάνιζαν πολύ μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε σύγκριση με τους CO-n (N) ⁸⁰.



Σχήμα 7. Παρουσιάζεται η δομή των ενώσεων 1, 2 και 3 οι οποίες χαρακτηρίστηκαν για την ανασταλτική τους δράση στο ένζυμο της χιτοβιάσης από *S. marcescens* και σε εξοζαμινιδάσες που προέρχονται από δύο διαφορετικούς οργανισμούς

1.7 Η σπουδαιότητα της δομικής βιολογίας στην κατανόηση της λειτουργίας των μακρομορίων

Η δομική βιολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με τη μελέτη της τρισδιάστατης δομής των βιολογικών μορίων και μακρομορίων όπως: οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Η δομή των μακρομορίων καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις των μορίων τους και αποτελεί βασικό εργαλείο για την προσδιορισμό της λειτουργία τους. Κάποια βασικά παραδείγματα που επισφραγίζουν την σπουδαιότητα της ορθής γνώσης της δομής είναι η απόκτηση πληροφοριών για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των ορμονών με τους υποδοχείς τους, των αντισωμάτων με το αντιγόνο, των

ενζύμων με τα υποστρώματα τους και άλλα. Επίσης, ο συνδυασμός της δομής με τη γνώση της λειτουργίας μπορεί να είναι καθοριστικός για την εύρεση εξειδικευμένων φαρμάκων. Ο προσδιορισμός της δομής των πρωτεϊνών σε ατομική διακριτική ικανότητα επιτρέπει την ορθή σχεδίαση μικρών μορίων με δυνάμει θεραπευτικές ιδιότητες. Συνεπώς, η γνώση της 3D δομής έχει διπλό ρόλο αφού βοηθάει τόσο στην κατανόηση των λειτουργιών των κυττάρων όσο και στην εύρεση φαρμάκων θεραπεύοντας μια σειρά ασθενειών.

1.8 Παραγωγή και προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε υψηλή καθαρότητα

Για να γίνει ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών πρέπει τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν να είναι πολύ υψηλής καθαρότητας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται καθολικά για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών είναι η απομόνωση τους είτε από φυσικό ιστό (φυτικό ή ζωικό) είτε από καλλιέργεια ανασυνδισμένων κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση ακολουθούνται κατάλληλα τροποποιημένα πρωτόκολλα καθαρισμού, τουλάχιστον για τα πρώτα στάδια της διαδικασίας. Μια κλασική μέθοδος καθαρισμού είναι η φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου κατά την οποία απομονώνεται ένα σύνολο πρωτεϊνών στο οποίο εμπεριέχεται και πρωτεΐνη στόχος. Στη συνέχεια, αξιοποιούνται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της μελετώμενης πρωτεΐνης (διαλυτότητα, φορτίο, κλπ) προκειμένου να επιτευχθεί ο καθαρισμός αυτής. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται κλασμάτωση του συνόλου των πρωτεϊνών με βάση το φορτίο που φέρουν (χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής), το μέγεθός τους (χρωματογραφία μοριακής διήθησης) είτε τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν με άλλες ουσίες (χρωματογραφία συγγενείας). Το πρωτεϊνικό δείγμα συγκρατείται στο πληρωτικό υλικό στηλών χρωματογραφίας και εκλούεται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Στη συνέχεια το άλας απομακρύνεται με διαπίδυσης έναντι ρυθμιστικού διαλύματος. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της μεθόδου καθαρισμού γίνεται με προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης, εφόσον πρόκειται για ένζυμο και με ηλεκτροφόρηση.

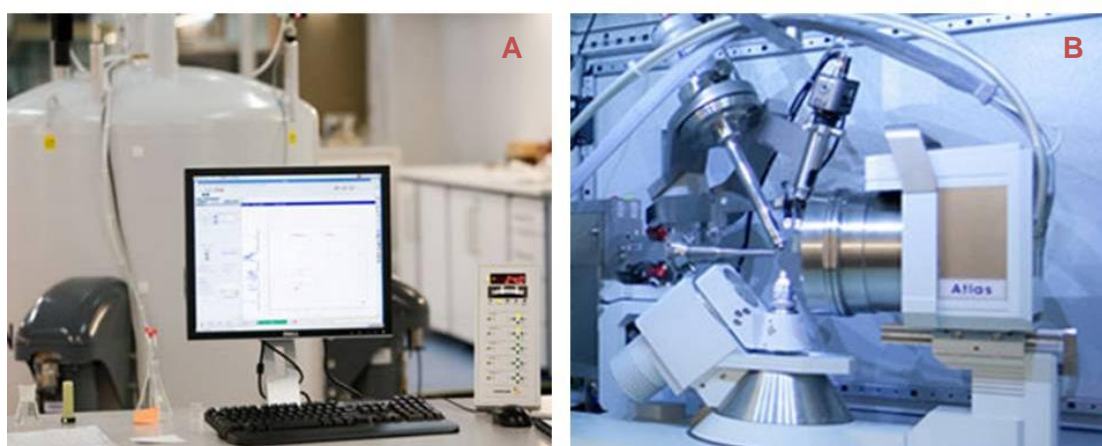
1.9 Βασικοί μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνικής δομής σε 3 διαστάσεις

Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών είναι αυτή της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ η οποία χρονολογείται από τη δεκατία του '70. Δέκα χρόνια μετά, ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τον προσδιορισμό της δομής πρωτεϊνών ενώ τα τελευταία 20 χρόνια η ηλεκτρονική μικροσκοπία (EM) συγκαταλέγεται στις μεθόδους επιλογής για τον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών. Άλλες υβριδικές μέθοδοι όπως η υπό μικρή γωνία σκέδαση ακτίνων-Χ (SAXS) εφαρμόζονται επίσης, ιδιαίτερα σε μακρομοριακά σύμπλοκα. Οι τεχνικές αυτές παρέχουν συμπληρωματικά στοιχεία που μπορούν να αξιοποιηθούν συνδυαστικά για την καλύτερη κατανόηση της δομής-δράσης των μακρομορίων.

Αναλυτικότερα, η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ απαιτεί την ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων υψηλής περιθλαστικής ικανότητας, το στάδιο αυτό αποτελεί ένα από τα πλέον κρίσιμα στάδια της μεθόδου (εκτενέστερη ανάλυση της μεθόδου ακολουθεί στην §1.9.1. Οι κρύσταλλοι εκτίθενται σε δέσμη ακτίνων-Χ και η περιθλώμενη ακτινοβολία αποτυπώνεται με τη μορφή περιθλασιγραμμάτων από τα οποία προκύπτει η συμμετρία του κρυστάλλου, οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας καθώς και το πλήθος των μορίων που βρίσκονται σε αυτή. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό της 3D δομής διάφορων βιολογικών συστημάτων όπως οι ιοί, τα μακρομοριακά σύμπλοκα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα σύμπλοκα πρωτεϊνών με τα νουκλεϊκά οξέα κ.ά. Ένας πολλά υποσχόμενος τομέας εφαρμογής της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ είναι ο κατευθυνόμενος- από την δομή-σχεδιασμός φαρμάκων ⁸¹.

Η μέθοδος του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη και κατ' αυτό τον τρόπο γίνεται εφικτή η μελέτη των φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων αυτής. Ειδικότερα όταν τα άτομα τοποθετούνται σε ομογενές, στατικό μαγνητικό πεδίο και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο,

παρατηρούνται αλλαγές στον πυρήνα τους. Αν και οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες δεν ανήκουν όλοι σε αυτή την κατηγορία. Η δομή των χημικών ενώσεων μελετάται με την φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης, ενώ τα πολυπλοκότερα μόρια όπως οι πρωτεΐνες μελετώνται με την φασματοσκοπία NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων (πολυδιάστατο NMR). Ακόμα το NMR χρησιμοποιείται για τη μελέτη ενώσεων σε διαλύματα καθώς και σε στερεά μορφή (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 A. Μονάδα φασματοσκοπίας NMR και B. Πηγή πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ εγκατεστημένες στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Η πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ καθώς και η φασματοσκοπία NMR 0ππροσδιορίζουν τις δομές των πρωτεϊνών σε πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα. Ωστόσο, βασικό μειονέκτημα της φασματοσκοπίας NMR έναντι της κρυσταλλογραφικής μεθόδου είναι ότι εμφανίζει περιορισμό στο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών προς ανάλυση (<50 kDa) γεγονός που λειτουργεί ανασταλτικά στην καθολική χρήση της μεθόδου σε όλες τις πρωτεΐνες. Αντίθετα, η μέθοδος πλεονεκτεί στο ότι οι πρωτεΐνες είναι σε μορφή διαλύματος^{81, 82}.

Η μέθοδος της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας εφαρμόζεται σε πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους ή μοριακά σύμπλοκα (πχ. ιικά σωματίδια, ριβοσωμάτια κλπ) ή σε μακρομόρια που είναι δύσκολο να αναπτυχθούν κρύσταλλοι ώστε να προσδιοριστεί η δομή τους στο χώρο. Η διακριτική ικανότητα αυτής της τεχνικής είναι ωστόσο, χαμηλή. Εξάιρεση αποτελούν περιπτώσεις συμπλοκών

που σχηματίζουν διδιάστατους κρυστάλλους και ο θόρυβος που καταγράφεται από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μειώνεται ώστε να είναι διακριτό το σχήμα των υποομάδων ή σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις η κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Τα τελευταία χρόνια η αξιοποίηση των τελευταίων επιτευγμάτων τόσο στον εξοπλισμό όσο και στην ανάπτυξη εξειδικευμένου λογισμικού με χρήση αλγορίθμων έχει καταστεί δυνατό να προσδιορισθεί η δομή ενός μακρομορίου σε ευκρίνεια της τάξης των 3.5 Å (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο το οποίο χρησιμοποιεί την δέσμη των ηλεκτρονίων για να απεικονίσει το δείγμα. Δύναται να φτάσει σε πολύ μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα έναντι αυτής ενός οπτικού μικροσκοπίου καθώς τα ηλεκτρόνια έχουν μήκος κύματος 10^5 φορές μικρότερο αυτού του ορατού φωτός⁸³

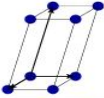
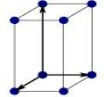
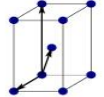
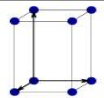
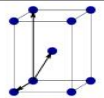
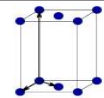
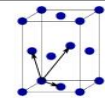
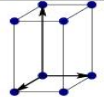
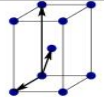
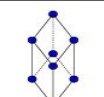
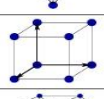
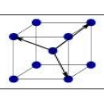
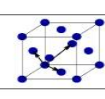
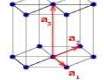
1.9.1 Βασικές αρχές κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ

1.9.1.1 Η γεωμετρία των κρυστάλλων – Πλέγματα Bravais

Όπως έχει ήδη αναφερθεί για να μελετηθεί η τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου υψηλής περιθλαστικής ικανότητας. Η διευθέτηση των μορίων στο κρυσταλλικό πλέγμα ακολουθεί συγκεκριμένους κανόνες γεωμετρίας, σύμφωνα με τους οποίους σχηματίζονται κρύσταλλοι ενδεχομένως ίδιας μορφολογίας, διαφορετικής ωστόσο συμμετρίας. Διακρίνονται επτά μεγάλες κατηγορίες στις οποίες εμπίπτουν όλες οι δυνατές διευθετήσεις των μακρομορίων στον χώρο. (Πίνακας 2**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**) Τα πρωτεϊνικά μόρια μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα συγκρατούνται σχηματίζοντας είτε απευθείας

αλληλεπιδράσεις είτε εμέσως με τη βοήθεια μορίων ύδατος. Τα τελευταία, συγκροτούν τον διαλύτη της πρωτεΐνης και δημιουργούν ένα τέτοιο μικροπεριβάλλον το οποίο προσομοιάζει στο φυσικό περιβάλλον της πρωτεΐνης σε διάλυμα ⁸⁴.

Πίνακας 2. Πλέγματα Bravais σε τρεις διαστάσεις στο χώρο

Bravais lattice	Parameters	Simple (P)	Volume centered (I)	Base centered (C)	Face centered (F)
Triclinic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} \neq \alpha_{23} \neq \alpha_{31}$				
Monoclinic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$ $\alpha_{12} \neq 90^\circ$				
Orthorhombic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Tetragonal	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Trigonal	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} < 120^\circ$				
Cubic	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Hexagonal	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = 120^\circ$ $\alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				

Η ανάπτυξη των κρυστάλλων ενός πρωτεϊνικού διαλύματος εξαρτάται από την θερμοκρασία, το pH, την πρωτεϊνική συγκέντρωση, τη φύση του διαλύτη και την παρουσία κάποιων προσδετών ή επιπρόσθετων ιόντων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη των κρυστάλλων είναι η καθαρότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος (> 98%). Μικρές τροποποιήσεις σε κάποια από τις συνθήκες κρυστάλλωσης πχ. διαφορετικό pH, θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαφορετικό τρόπο διευσθέτησης των μορίων στο χώρο και άρα σε διαφορετικά κρυσταλλικά πλέγματα για την ίδια πρωτεΐνη. Παρά την διαφορετική διευσθέτηση των μορίων στον κρύσταλλο η πρωτεΐνη στο σύνολό της διατηρεί την τρισδιάστατη δομή της σχεδόν αναλλοίωτη πλην κάποιων περιοχών οι οποίες αλλάζουν διαμόρφωση είτε γιατί είναι πιο εύκαμπτες, λόγω της έκθεσής τους στον διαλύτη, είτε γιατί εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με συμμετρικά μόρια που προέρχονται από την ίδια τη

μοναδιαία κυψελίδα είτε από κάποια γειτονική αυτής. Η διευθέτηση των μορίων μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα μπορεί να έχει μικρότερη ή μεγαλύτερη «τάξη». Οι διάφορες τάξεις διευθέτησης αποτυπώνονται στο διάγραμμα περίθλασης των ακτινών Χ (περιθλασίγραμμα).

1.9.1.2 Μέθοδοι κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

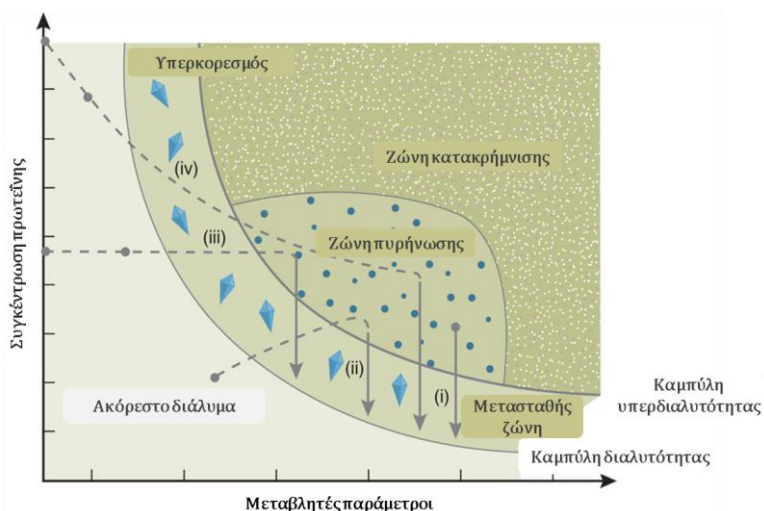
Η διαδικασία της κρυστάλλωσης σε ένα διάλυμα αντιπροσωπεύει ένα αναστρέψιμο φαινόμενο ισορροπίας και οφείλεται στην ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος πρωτεΐνη-διαλύτης⁸⁵. Αυτή η συσσώρευση των μακρομορίων μπορεί να οδηγήσει είτε στο σχηματισμό άμορφου ιζήματος είτε στην ανάπτυξη κρυστάλλων. Τα άμορφα ιζήματα ευνοούνται συνήθως και τείνουν να κυριαρχούν αναστέλλοντας το σχηματισμό κρυστάλλων και δυσχεραίνοντας έτσι το επιθυμητό αποτέλεσμα. Λόγω της εξαιρετικής δυσκολίας που σημειώνεται, οι τεχνικές ανάπτυξης κρυστάλλων έχουν αποτελέσει ανεξάρτητο αντικείμενο έρευνας.

Ειδικότερα, τα επί μέρους στάδια της κρυστάλλωσης διακρίνονται στην πυρήνωση, την ανάπτυξη του κρυστάλλου και τέλος την παύση της ανάπτυξης. Οι επί μέρους φάσεις-στάδια της κρυστάλλωσης απεικονίζονται στο διδιάστατο σχήμα που καλείται διάγραμμα φάσεων (Σχήμα 8). Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα υπάρχουν δύο διακριτές ζώνες, η ακόρεστη και η υπέρκορη. Η καμπύλη που διαχωρίζει αυτές τις δύο ζώνες καλείται καμπύλη διαλυτότητας. Κάθε σημείο πάνω σε αυτήν την καμπύλη αντιστοιχεί σε μια συγκέντρωση στην οποία το διάλυμα βρίσκεται σε ισορροπία με τον παράγοντα καθίζησης. Αν το προς κρυστάλλωση σύστημα βρίσκεται στην ακόρεστη ζώνη τότε δεν είναι εφικτή η κρυστάλλωση. Εάν σε ένα ακόρεστο διάλυμα που βρίσκεται σε ισορροπία προστεθούν περισσότερα μόρια το σύστημα υποβάλλεται σε εσωτερικές αλλαγές μέχρις ότου σχηματιστεί ένα υπέρκορο διάλυμα. Υπό αυτές τις συνθήκες το σύστημα δεν είναι πλέον σε ισορροπία και καθοδηγείται θερμοδυναμικά προς μια νέα κατάσταση ισορροπίας. Γι αυτόν τον λόγο, τα μεμονωμένα μόρια σχηματίζουν μη ομοιοπολικούς δεσμούς με τα γειτονικά τους, ελαχιστοποιώντας έτσι την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Αντίστοιχα, όταν το σύστημα βρίσκεται στην υπέρκορη ζώνη, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι μεγαλύτερη από

αυτή που είχε στην κατάσταση ισορροπίας. Η υπέρκορη ζώνη υποδιαιρείται σε τρεις επί μέρους ζώνες:

1. στη ζώνη καθίζησης όπου η περίσσεια πρωτεϊνικών μορίων διαχωρίζεται αμέσως από το διάλυμα και σχηματίζονται άμορφα συσσωματώματα.
2. στη ζώνη πυρήνωσης όπου η περίσσεια των μορίων πρωτεΐνης εμφανίζει κρυσταλλική μορφή. Κατά την κρυστάλλωση είναι γνωστό ότι μειώνεται η ελεύθερη ενέργεια των πρωτεϊνών κατά περίπου 3-6 kcal / mole σε σχέση με την αυτήν που έχει στο διάλυμα ⁸⁶. Κοντά στην ζώνη καθίζησης, σχηματίζονται πολλοί μικροκρυστάλλοι, οι οποίοι ενδέχεται να συσσωματώνονται προς σχηματισμό ιζήματος.
3. στη μετασταθή ζώνη όπου τα υπέρκορα διαλύματα δεν κρυσταλλώνονται για μεγάλο χρονικό διάστημα, εκτός εάν η ισορροπία διαταραχθεί από εξωτερικό αίτιο π.χ. εάν προστεθεί ένας κρύσταλλος που θα λειτουργήσει ως πυρήνας κρυστάλλωσης.

Για να αναπτυχθούν καλά οργανωμένοι κρύσταλλοι μεγάλου μεγέθους, οι βέλτιστες συνθήκες είναι να σχηματιστεί ο πυρήνας κρυστάλλωσης στην ζώνη πυρήνωσης αλλά λίγο πάνω από τα όρια της μετασταθούς ζώνης ⁸⁷.

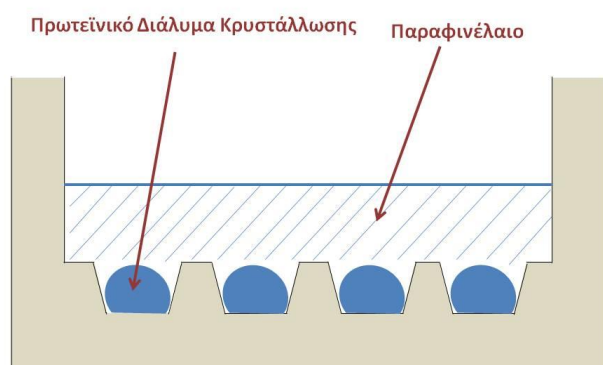


Σχήμα 8 Διάγραμμα φάσεων ⁸⁸

Οι πιο συνήθεις μέθοδοι κρυστάλλωσης πρωτεϊνών είναι η micro-batch, η μέθοδος διάχυσης ατμών (vapour-diffusion) και η μέθοδος διαπίδυσης.

Μέθοδος micro-batch.

Η πρωτεΐνη αναμειγνύεται με το διάλυμα κρυστάλλωσης το οποίο αποτελείται από διακριτά συστατικά σε ένα κλειστό σύστημα. Ο στόχος είναι να παραχθεί ένα υπέρκορο διάλυμα που θα μπορούσε να οδηγήσει στον σχηματισμό κρυστάλλων. Το μείγμα κρυστάλλωσης τοποθετείται σε βοθρίο μικροπλάκας 96 (ή και λιγότερων) θέσεων και καλύπτεται από παραφινέλαιο προκειμένου να παρεμποδιστεί η εξάτμιση της σταγόνας (Εικόνα 6). Η μικροπλάκα φυλάσσεται συνήθως στους 16 °C ενώ άλλες θερμοκρασίες που διερευνώνται ως κατάλληλες για την ανάπτυξη κρυστάλλων είναι οι 4, 25 και 36 °C. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα μεταβάλλεται λόγω του σχηματισμού κρυστάλλων ή άμορφου ιζήματος ενώ αυτή του παράγοντα καθίζησης παραμένει η ίδια ⁸⁷.



Εικόνα 6. Μέθοδος κρυστάλλωσης micro-batch

Μέθοδος διάχυσης ατμών (vapour diffusion)

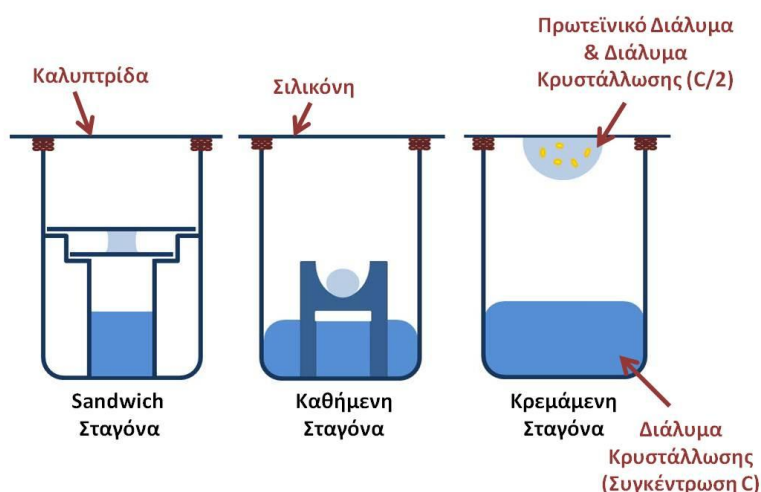
Η μέθοδος αυτή αξιοποιεί την εξάτμιση και στη συνέχεια τη διάχυση μορίων ύδατος με τη μορφή ατμών μεταξύ δύο διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ως μέσω επίτευξης του υπερκορεσμού σε πρωτεϊνικά διαλύματα. Η πρωτεΐνη με τη μορφή σταγόνας βρίσκεται σε διάλυμα παρουσία των υπολοίπων συστατικών κρυστάλλωσης ενώ στο βοθρίο περιέχεται διάλυμα υψηλότερης όμως συγκέντρωσης στα επί μέρους συστατικά (reservoir). Η διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ των δύο διαλυμάτων προκαλεί την εξάτμιση του διαλύτη από την σταγόνα και τη μεταφορά ατμών ύδατος προς το βοθρίο με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στη σταγόνα και να δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες για τον

σχηματισμό κρυστάλλων. Η διάχυση των ατμών συνεχίζεται έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Η μέθοδος διάχυσης ατμών ανάλογα με τη διάταξη που χρησιμοποιείται διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες (Εικόνα 7):

α) Sandwich σταγόνα. Η σταγόνα περιορίζεται ανάμεσα σε δύο επιφάνειες και έτσι αποφεύγεται η εξάτμισή της με αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερών συνθηκών που ευνοούν την κρυστάλλωση⁸⁹.

β) Καθήμενη σταγόνα (sitting drop). Η σταγόνα τοποθετείται σε μία υπερυψωμένη θέση μέσα στο βοθρίο. Είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική για την κρυστάλλωση μακρομορίων.

γ) Κρεμάμενη σταγόνα (hanging drop). Η σταγόνα που περιέχει το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται σε καλυπτρίδα, η οποία με τη σειρά της χρησιμοποιείται ως κάλυμμα του βοθρίου.

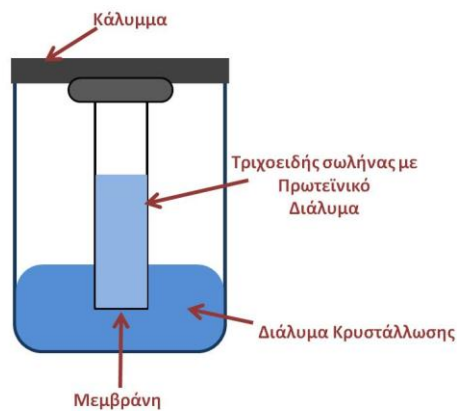


Εικόνα 7 Οι τρεις κατηγορίες της μεθόδου διάχυσης ατμών ανάλογα με τη διάταξη που χρησιμοποιείται.

Μέθοδος διαπίδυσης (Dialysis)

Ο στόχος αυτής της τεχνικής επίσης είναι η αύξηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή για την ανάπτυξη κρυστάλλων. Αυτό επιτυγχάνεται με τοποθέτηση του πρωτεϊνικού διαλύματος και του διαλύματος κρυστάλλωσης σε δύο διακριτά διαμερίσματα τα οποία χωρίζονται από μία ημιπερατή μεμβράνη. Μόρια του διαλύτη του πρωτεϊνικού διαλύματος καθώς και άλλα μικρότερου μοριακού βάρους συστατικά

διαπερνούν την μεμβράνη αυξάνοντας την συγκέντρωση της πρωτεΐνης και προάγοντας τελικά την κρυστάλλωση (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Μέθοδος διαπίδωσης

1.9.2 Πηγές ακτίνων Χ

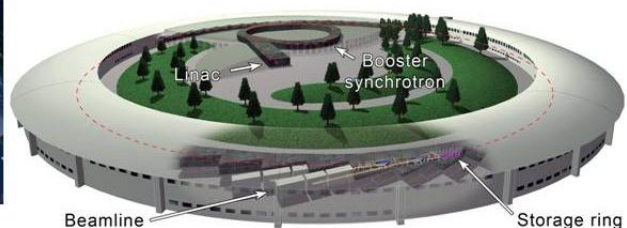
Οι ακτίνες Χ μπορούν να παραχθούν είτε από σωλήνες υψηλής τάσης (μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-Χ Εικόνα 9Α) είτε από κυκλικούς επιταχυντές σωματιδίων (πολυχρωματικές δέσμες ακτίνων-Χ, Εικόνα 9Β).



A



B



Εικόνα 9 Α. Μονοχρωματική πηγή ακτίνων-Χ Β. πολυχρωματική πηγή ακτίνων-Χ (συγχροτρόνιο) ⁹⁰

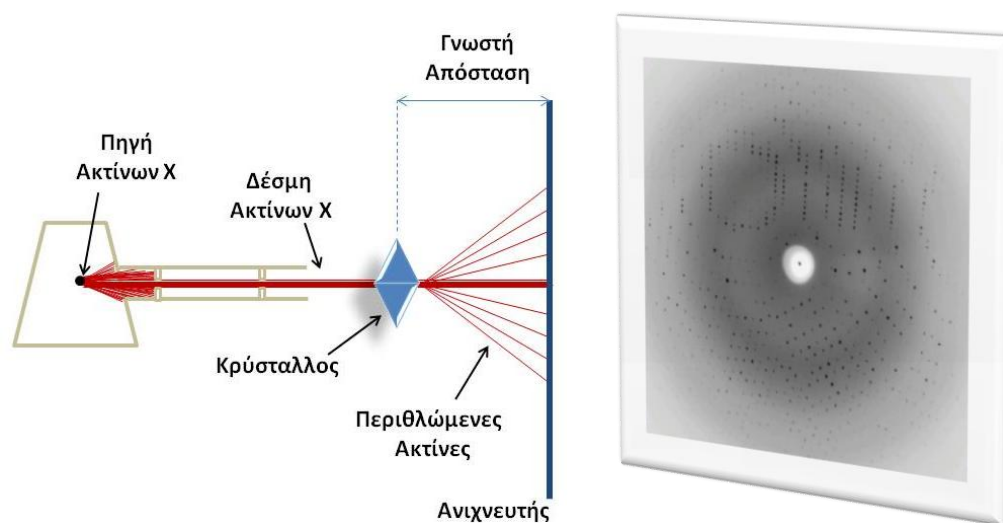
Στις συμβατικές πηγές ακτίνων-Χ, η απελευθέρωση ακτινοβολίας επιτυγχάνεται μετά από την επιτάχυνση ηλεκτρονίων εντός ηλεκτρικού πεδίου και την συνεπαγόμενη ηλεκτρονιακή μετάπτωση μετάλλικου στόχου της πηγής. Κατά την παραγωγή των ακτίνων-Χ αυξάνεται κατά πολύ η θερμότητα στον μεταλλικό στόχο γι' αυτό και συνήθως χρησιμοποιείται περιστρεφόμενη άνοδος προκειμένου για την απαγωγή της θερμότητας.

Στην περίπτωση των συγχροτρονίων τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται με ταχύτητα που πλησιάζει αυτήν του φωτός. Το μήκος κύματος των ακτίνων που χρησιμοποιούνται σε αυτή την περίπτωση κυμαίνεται από 0.2 έως 2.0 Å. Αυτές οι δέσμες ακτινοβολίας επιτρέπουν τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Επιπλέον, πέρα από πολυχρωματικές ακτινοβολίες οι κυκλικοί επιταχυντές μπορούν να παράγουν μονοχρωματικές δέσμες που είναι πολύ πιο ισχυρές σε σχέση με εκείνες που παράγονται σε μια συμβατική πηγή ακτίνων-Χ. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει η συλλογή δεδομένων περίθλασης σε δείγματα που έχουν σχηματίσει πολύ μικρούς κρυστάλλους της τάξης των 50μm ή και ακόμα μικρότερους ⁸⁴. Τέτοιες μεγάλες εγκαταστάσεις με κυκλικούς επιταχυντές ηλεκτρονίων τα τελευταία χρόνια έχουν κατασκευασθεί σε αρκετές περιοχές όπως για παράδειγμα στο DESY-Hamburg, Germany στο Diamond Light Source, Oxford, UK και στο CNRS στην Grenoble, France.

1.9.3 Συλλογή και ανάλυση δεδομένων περίθλασης

Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιείται με πρόσπτωση μιας παράλληλης και λεπτής δέσμης ακτίνων Χ, που εξέρχεται από την πηγή, προς τον κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος περιστρέφεται κατάλληλα ώστε να συλλεχθούν δεδομένα ικανοποιητικής πληρότητας. Οι περισσότερες προσπίπτουσες ακτίνες Χ διέρχονται από τον κρύσταλλο χωρίς περίθλαση, όμως ένα μέρος αυτών αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια των ατόμων της πρωτεΐνης τα οποία υπόκεινται σε ταλάντωση. Αυτά, εκπέμπουν ακτίνες Χ προς όλες τις κατευθύνσεις (σκέδαση) καθώς λειτουργούν σαν νέες πηγές ακτινοβολίας. Οι ακτίνες αυτές μπορούν είτε να αναιρούν η μία την άλλη είτε να δρουν αθροιστικά, στην περίπτωση που τα κύματα συμβάλουν. Με αυτόν

τον τρόπο παράγονται περιθλώμενες δέσμες ακτινοβολίας οι οποίες καταγράφονται από τον ανιχνευτή με τη μορφή περιθλασιγράμματος (Εικόνα 10).

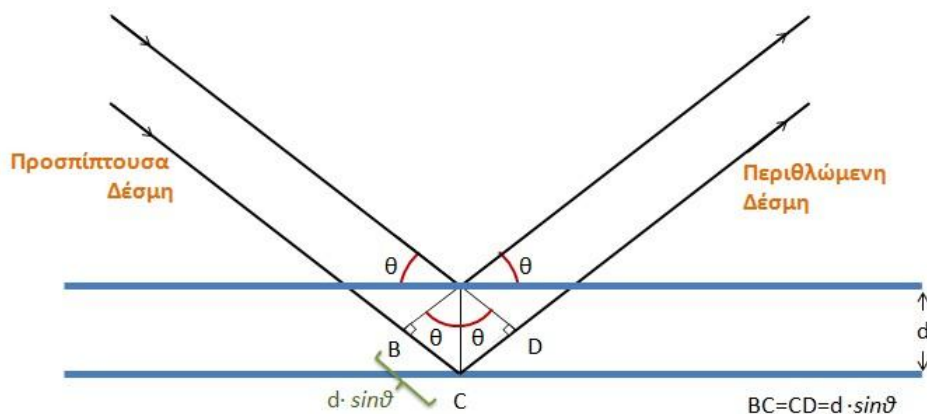


Εικόνα 10. Διάταξη συλλογής δεδομένων περίθλασης

Η ανάλυση του περιθλασιγράμματος γίνεται με τη βοήθεια του νόμου του Bragg. Ο Lawrence Bragg απέδειξε ότι το φάσμα περίθλασης μπορεί να αναλυθεί σε ένα σύνολο από ανακλάσεις της προσπίπτουσας δέσμης σε ομάδες παράλληλων επιπέδων που διέρχονται από τις στοιχειώδεις κυψελίδες του κρυστάλλου (Σχήμα 9). Οι ανακλάσεις διανύουν διαφορετικές αποστάσεις ανάλογα με το επίπεδο στο οποίο εντοπίζονται τα πρωτεϊνικά άτομα. Πιο συγκεκριμένα η ανάκλαση παρατηρείται μόνο όταν η διαφορά στην απόσταση μεταξύ δύο επιπέδων ισούται με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας (λ). Η απόσταση εξαρτάται από την γωνία σκέδασης, δηλαδή τη γωνία που σχηματίζεται από την προσπίπτουσα δέσμη ακτινοβολίας και τα εκάστοτε επίπεδα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 9 η διαφορά της απόστασης που διανύουν τα κύματα είναι $BC+CD$ και ισούται με $2d \cdot \sin\theta$. Άρα όπως προκύπτει από τα παραπάνω ισχύει ότι $2d \cdot \sin\theta = \lambda$ ⁸⁴.

Είναι σημαντικό επίσης, να αναφερθεί πως η προσπίπτουσα δέσμη ακτίνων-Χ προκαλεί βλάβες στην κρυσταλλική δομή λόγω της παραγωγής ελεύθερων ριζών κατά την έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες και της συνεπαγόμενης παραγωγής θερμότητας. Για να προστατευτεί ο κρύσταλλος και να καταστεί δυνατή η συλλογή των δεδομένων σε ικανοποιητική πληρότητα, ο

κρύσταλλος εκτίθεται στις ακτίνες X ενώ βρίσκεται σε ρεύμα αζώτου στους 100 K. Η χαμηλή θερμοκρασία δεν αποτρέπει την παραγωγή ελεύθερων ριζών, αλλά ελαττώνει σημαντικά την ταχύτητα διάχυσής τους στο κρυσταλλικό πλέγμα αποτρέποντας την καταστροφή αυτού.



Σχήμα 9. Νόμος του Bragg

Παράλληλα, η εφαρμογή τόσο χαμηλών θερμοκρασιών μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό πάγου στην επιφάνεια του κρυστάλλου λόγω της ψύξης των μορίων ύδατος που περιέχει. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος για την αποφυγή του σχηματισμού πάγου κατά την πειραματική διαδικασία είναι η χρήση των κρυστοπροστατευτικών ουσιών. Ο κρύσταλλος πριν την έκθεση του στις ακτίνες X, εμβαπτίζεται σε κρυστοπροστατευτικό διάλυμα η σύσταση του οποίου είναι συνήθως ίδια με αυτήν του μητρικού διαλύματος κρυστάλλωσης στην οποία έχει προστεθεί όμως μια ουσία όπως η γλυκερόλη προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου.

1.9.4 Πρόβλημα Φάσης- Πολλαπλή Ισόμορφη Αντικατάσταση

Η ανάκτηση της πληροφορίας που αφορά σε κάθε άτομο του κρυστάλλου το οποίο συνέβαλε στη σκέδαση των ακτίνων-X, πραγματοποιείται με Μετασχηματισμό Fourier. Ειδικότερα, η θέση του κάθε ατόμου στον κρύσταλλο μπορεί να προσδιορισθεί μέσω μετασχηματισμού Fourier, ο οποίος συνδέει το εσωτερικό επίπεδο συμμετρίας όπως αυτό ορίζεται από

τους δείκτες Miller (h,k,l) με την πραγματική θέση των ατόμων στο χώρο (x, y, z).

Συγκεκριμένα η εξίσωση που συνδέει τα (h,k,l) με τα (x, y, z) είναι η εξής:

$$f(x, y, z) = \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Ο δομικός παράγοντας μιας συγκεκριμένης περίθλασης F(hkl) εκφράζεται ως συνάρτηση του πλάτους του δομικού παράγοντα και της φάσης του κύματος της μονοχρωματικής ακτινοβολίας, α , από τη σχέση:

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j) = F(hkl) \exp i\alpha(hkl)$$

Για τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(hkl) \exp - 2\pi i(hx + ky + lz)$$

Τα πειράματα περίθλασης ακτίνωνΧ μπορούν να δώσουν πληροφορίες μόνο για την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας, που είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του δομικού παράγοντα ($I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$) ενώ δεν μπορούν να δώσουν καμία πληροφορία για την φάση, α_{hkl} , του δομικού παράγοντα.

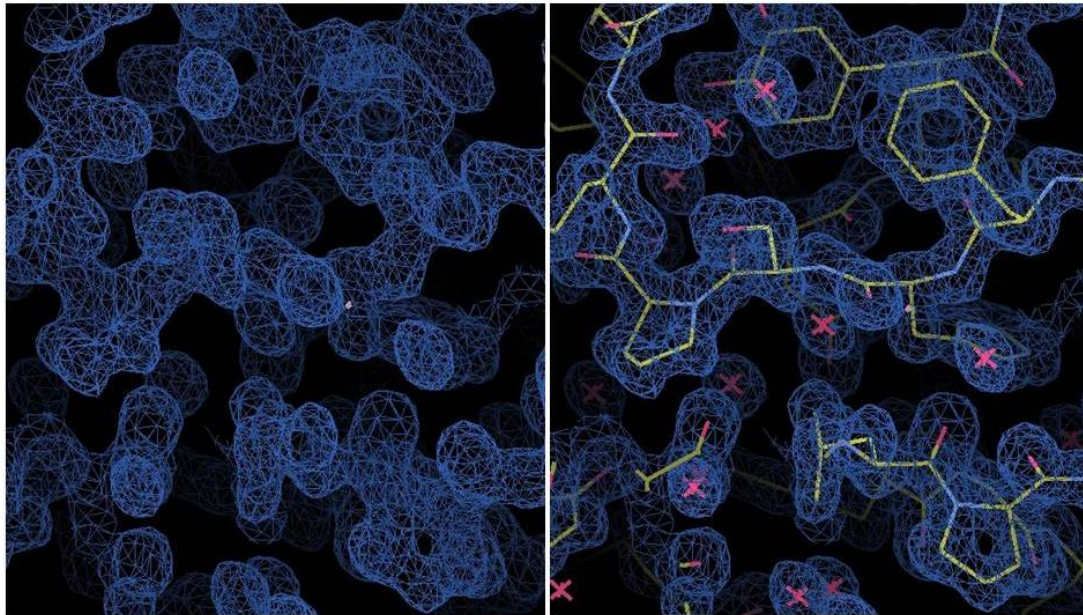
Η κάθε ανάκλαση καταγράφεται ως μια κηλίδα στο περιθλασίγραμμα. Για την μελέτη της είναι απαραίτητη η γνώση: α) του πλάτους της (μέτρο ενέργειας που είναι ανάλογο με την ένταση της καταγραφόμενης ανάκλασης), β) του μήκους κύματος (καθορίζεται από την πηγή) και γ) της φάσης του κύματος. Το τελευταίο στοιχείο δεν είναι γνωστό στα πειράματα περίθλασης. Γι αυτόν τον λόγο προκύπτει το πρόβλημα φάσης. Στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η μέθοδος της Πολλαπλής Ισόμορφης Αντικατάστασης (MIR). Σε αυτήν την περίπτωση προστίθενται στον κρύσταλλο άτομα γνωστής σκέδασης όπως βαρέα μέταλλα που δεν μεταβάλλουν τη θέση των πρωτεϊνικών ατόμων στον κρύσταλλο ενώ η θέση που προσδένεται μπορεί να είναι διακριτή εφόσον είναι λίγα σε αριθμό. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο ότι τα βαρέα μέταλλα έχουν πολλά ηλεκτρόνια και σκεδάζουν ισχυρότερα την

προσπίπτουσα ακτινοβολία από τα άτομα της πρωτεΐνης. Με τη βοήθεια χαρτών Patterson είναι δυνατό να προσδιοριστούν τόσο η θέση όσο και το πλάτος του δομικού παράγοντα που αφορά στα βαρέα άτομα. Υπολογισμός χαρτών διαφοράς με βάση τους δομικούς παράγοντες που αφορούν στην πρωτεΐνη χωρίς τα βαρέα μέταλλα και στα βαρέα μέταλλα μόνο υποβοηθούν τον υπολογισμό των φάσεων της πρωτεΐνης⁸⁴.

1.9.5 Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, κατασκευή και βελτιστοποίηση του πρωτεϊνικού μοντέλου

Ο υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας πραγματοποιείται με βάση τα πλάτη των δομικών παραγόντων της πρωτεΐνης όπως αυτά προκύπτουν από τα πειραματικά δεδομένα και τις φάσεις οι οποίες προέρχονται είτε από τη θέση των βαρέων ατόμων (βλ. παραπάνω) είτε από ομόλογη με την μελετώμενη πρωτεΐνη της οποίας η δομή είναι ήδη γνωστή. Η ποιότητα του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας αντανάκλα την ποιότητα των δεδομένων περίθλασης που συλλέχθηκαν και προφανώς του κρυστάλλου που χρησιμοποιήθηκε γι' αυτόν τον σκοπό. Όσο υψηλότερη είναι η ευκρίνεια των δεδομένων που συλλέχθηκαν (μετρείται σε Angstrom, Å) τόσο πιο βελτιωμένη είναι η διακριτική ικανότητα να αναπαραστήσει κανείς την 3D δομή του πρωτεϊνικού μορίου δηλαδή τη θέση των ατόμων εντός του νέφους ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα 5 Å αποτελούν μια πολύ χαμηλή διακριτική ικανότητα αφού είναι διακριτό μόνο το σχήμα του μορίου και μόλις που διακρίνονται ελικοειδείς περιοχές. Αντιθέτως το 1 Å θεωρείται μια πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα στην οποία διακρίνονται ακόμα και τα άτομα των αμινοξέων με την μορφή συμπαγών σφαιρών.

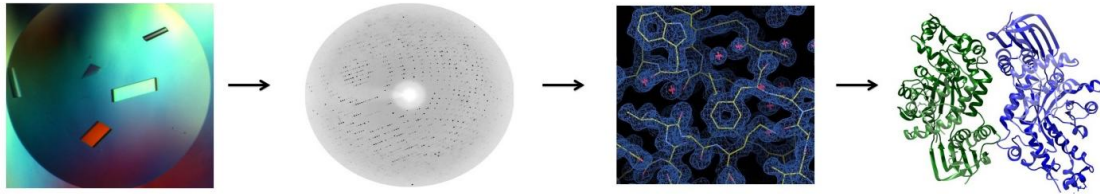
Ακολουθεί η ανακατασκευή του πρωτεϊνικού μοντέλου ώστε αυτό να είναι σε πλήρη συμφωνία με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Τα αμινοξέα τοποθετούνται στη θέση που υποδεικνύει ο χάρτης και οι πλευρικές τους αλυσίδες στρέφονται στο εύρος των επιτρεπόμενων διεδρων γωνιών προκειμένου να προσαρμοστούν στο χάρτη με τον βέλτιστο δυνατό τρόπο⁸⁴ (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας πριν και μετά την τοποθέτηση των αμινοξέων στις αντίστοιχες θέσεις σύμφωνα με την αμινοξική ακολουθία

Το στάδιο της βελτιστοποίησης γίνεται για να ελαχιστοποιηθεί η διαφορά μεταξύ των δομικών παραγόντων που υπολογίζονται με βάση τα πειραματικά δεδομένα και αυτών που προκύπτουν από το αρχικό μοντέλο της πρωτεΐνης. Αυτή η διαφορά των πλατών καλείται παράγοντας R ή δείκτης αξιοπιστίας και αποτελεί ένα μέτρο ασυμφωνίας μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και του υποθετικού ιδανικού μοντέλου. Οι τιμές κυμαίνονται ανάμεσα στο 0 (πλήρης συμφωνία) έως το 0,59 (πλήρης ασυμφωνία). Για τις δομές πρωτεϊνών όπου το πλήθος των μορίων που τις απαρτίζουν είναι μεγάλο οι τιμές του δείκτη αξιοπιστίας R κυμαίνονται σε ποσοστό 15-20%. Η πρόοδος της βελτιστοποίησης αξιολογείται με μείωση της τιμής του R καθώς και με μείωση ενός αντίστοιχου δείκτη όπου για τον υπολογισμό του έχει χρησιμοποιηθεί ένα 5% των περιθλάσεων το οποίο δεν συμμετέχει στη διαδικασία της βελτιστοποίησης. Ένας άλλος παράγοντας που είναι σημαντικός είναι ο παράγοντας θερμοκρασίας, B. Αυτός υπολογίζεται για κάθε άτομο της πρωτεΐνης και όταν λαμβάνει υψηλές τιμές τα αντίστοιχα αμινοξέα είναι ιδιαίτερα ευκίνητα και δεν έχουν τον ίδιο προσανατολισμό σε όλα τα μόρια του κρυστάλλου σε εκείνη την περιοχή⁸⁴.

Στην Εικόνα 12 συνοψίζονται τα στάδια που ακολουθούνται από την παραγωγή των κρυστάλλων μέχρι και τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων από την παραγωγή των κρυστάλλων μέχρι τον προσδιορισμό της 3D δομής στον χώρο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Αντικείμενο μελέτης

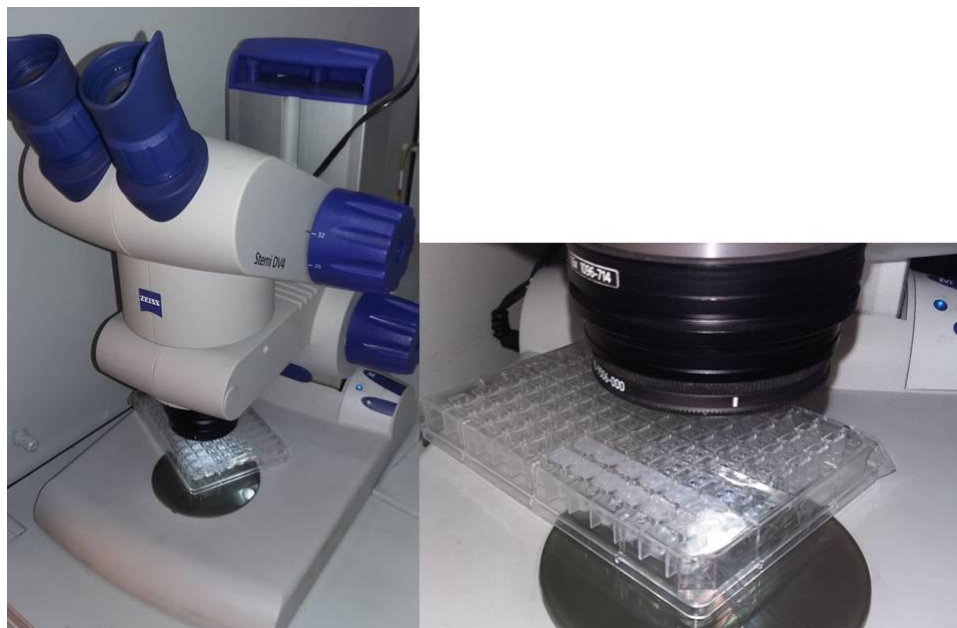
Στην παρούσα εργασία μελετάται η τρισδιάστατη δομή της χιτοβιάσης στη φυσική διαμόρφωση καθώς και ως συμπλόκου παρουσία τριών ενώσεων, CO-II (NMe₃), CO-IV (N), CO-IV (NMe₃) παραγώγων GlcNAc που έχουν ήδη χαρακτηριστεί ως ισχυροί αναστολείς του ενζύμου σύμφωνα με κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τους Halila et al., το 2013. Ο προσδιορισμός αυτών των δομών αναμένεται να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του ενζύμου. Επιπρόσθετα, συγκρίνεται η δομή της χιτοβιάσης με αυτήν της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης τόσο σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας όσο και σε επίπεδο τρισδιάστατης δομής. Τέλος με σκοπό την εύρεση επιπλέον ομόλογων πρωτεϊνών, πραγματοποιούνται συγκριτικές μελέτες της χιτοβιάσης, με τις έως σήμερα κατατεθειμένες τρισδιάστατες δομές στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων.

2.2 Υλικά / αντιδραστήρια

- Μικροπλάκες κρυστάλλωσης, MRC 2 Well Crystallization Plate (Swissci)
- Πολυαιθυλενογλυκόλη PEG3350
- Κιτρικό νάτριο.
- (2-τριμεθυλο-αμμωνιο-2-δεοξυ-β-D-γλυκοζαμινυλο)-(1→4)-N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (CO-II (NMe₃) (2-Trimethylammonio-2-deoxy-β-D-glucosaminy)-(1→4)-N-acetyl-D-glucosamine)) (Ένωση 1)
- παράγωγο του (μονο-N-απακετυλιωμένου χιτινοολιγοσακχαρίτη) (CO-IV (N)) (Mono-N-deacetylated chitooligosaccharide) (Ένωση 2)
- (2-τριμεθυλο-αμμωνιο-2-δεοξυ-β-D-γλυκοζαμινυλο)-(1→4^{III})-N^I-N^{II},N^{III}-τριακετυλοχιτοτριόζη (CO-IV (NMe₃)) (2-Trimethylammonio-2-deoxy-b-D-glucosaminy)-(1->4^{III})-N^I,N^{II},N^{III}-triacetylchitotriose (Ένωση 3)
- Υδατικό διάλυμα χιτοβιάσης συγκέντρωσης 15mg/ml

2.3 Εργαστηριακά όργανα

- Πεχάμετρο Metrohm 744
- Πιπέτες Gilson των 10μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL και 1000 μL
- Αναλυτικός ζυγός
- Vortex Autovortex Mixer SA2 Stuart Scientific
- Στερεοσκόπιο 160X, Leica MZ16 εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα και σύστημα πολωμένου φωτός (Εικόνα 13)



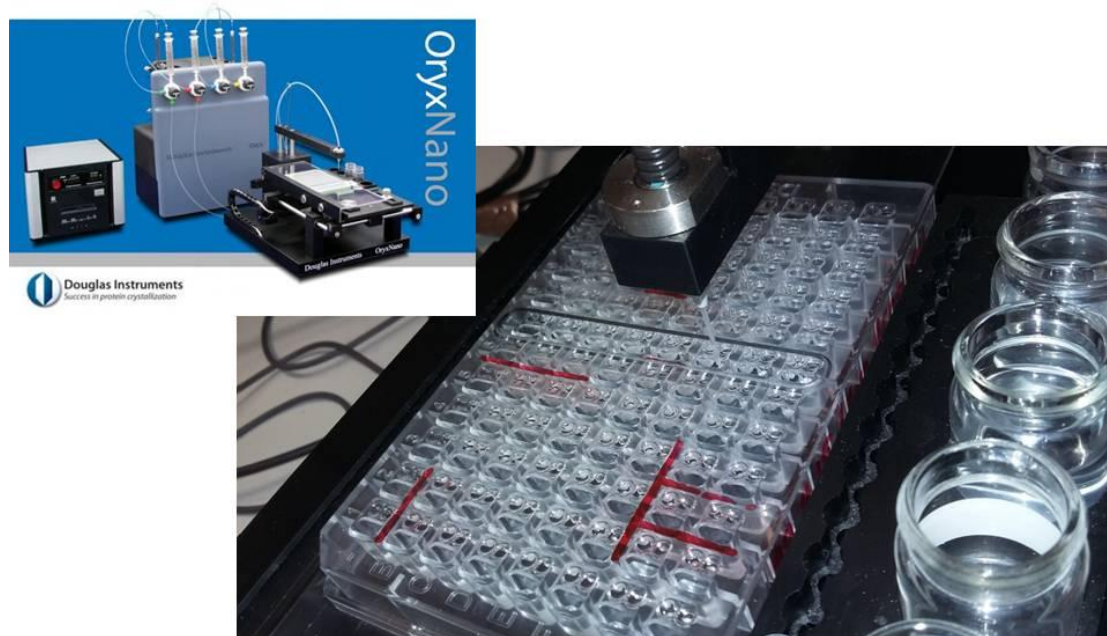
Εικόνα 13. Στερεοσκόπιο Leica MZ16

- Αυτόματο σύστημα κρυστάλλωσης πρωτεϊνών υψηλής ρυθμαπόδοσης 2^{ης} γενιάς, OryxNano Douglas Instruments (Εικόνα 14)

2.4 Πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού της χιτοβιάσης

Το πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού της χιτοβιάσης πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο του καθ. κ. Κ. Βοργιά. Αρχικά, ετοιμάζονται τα τρυβλία που περιέχουν το θρεπτικό υλικό (το LB-αγαρ) παρουσία αμπικιλίνης, η οποία χρησιμοποιείται ως αντιβιοτικό. Τα τρυβλία εμβολιάζονται με τον κλώνο A54441 που αντιστοιχεί στο CBS του *Serratia marscecens*. Ακολούθως, αναπτύσσεται υγρή καλλιέργεια σε πλαστικούς περιέκτες (τύπου φάλκον) παρουσία 5 ml θρεπτικού υλικού και αμπικιλίνης. Οι καλλιέργειες αφήνονται για ~12 ώρες

(μία νύχτα) στους 37 °C. Την επόμενη μέρα το τρυβλίο τοποθετείται στους 4 °C.



Εικόνα 14. Ρομποτική διάταξη κρυστάλλωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του ΙΒΦΧΒ/ΕΙΕ.⁹¹

Από την υγρή καλλιέργεια λαμβάνεται δείγμα όγκου 1 ml το οποίο φωτομετράται στα 600nm, προκειμένου να ελεγχθεί ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων με βάση την οπτική απορρόφηση. Όταν τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί η οπτική απορρόφηση του δείγματος είναι ~2.0. Στη συνέχεια λαμβάνεται άλλο 1 ml δείγματος, το οποίο φυγοκεντρείται (14.000 rpm, κεφαλή φυγοκέντρου GLS) και το ίζημα που προκύπτει (κυτταρικό κλάσμα) φυλάσσεται στους -20 °C. Το εναπομείναν δείγμα αραιώνεται με θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικό σε αναλογία 1:10 (π.χ. 1ml δείγματος, 9ml θρεπτικό και αντιβιοτικό) και επαναλαμβάνεται η φωτομέτρηση. Μετά την μέτρηση το δείγμα τοποθετείται για επώαση στους 37 °C για μία νύχτα.

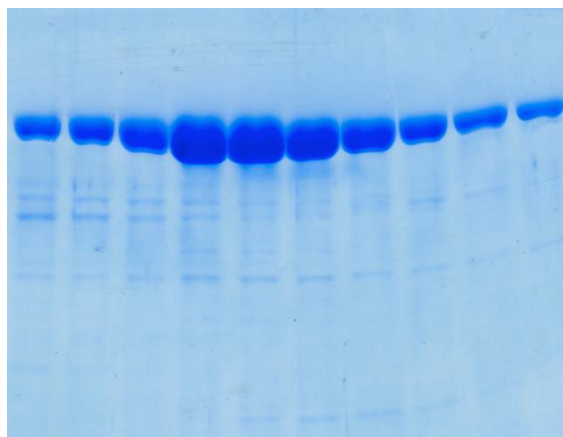
Την επόμενη μέρα τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (14.000 rpm, κεφαλή φυγοκέντρου GLS) στους 4 °C. Έπειτα τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 M σακχαρόζη, 10-20 ml/gr και προστίθεται σε αυτά διάλυμα λυσοζύμης μέχρι η

τελική συγκέντρωση να φτάσει τα 0.2 mg/ml Το μίγμα επωάζεται σε πάγο για 90 λεπτά. Ακολούθως, διαλύεται περαιτέρω με προσθήκη ίσου όγκου παγωμένου νερού και διατηρείται στον πάγο για τα επόμενα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα εμπλουτίζεται με 5 mM MgCl₂ και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά (15000 rpm, SS-34). Το περιπλασμικό κλάσμα των κυττάρων *E. Coli* περιέχεται στο υπερκείμενο διάλυμα το οποίο συλλέγεται, ογκομετράται και ακολουθεί κατακρίμνηση των πρωτεϊνών, μεταξύ αυτών και της χιτοβιάσης με χρήση 55-85% κορεσμένου θειικού αμμωνίου. Στη συνέχεια, το ίζημα διαλυτοποιείται έναντι ρυθμιστικού διαλύματος σε αναλογία 1:200 παρουσία 10 mM φωσφορικό νάτριο pH 8 και 1 mM EDTA. Για το διαχωρισμό της χιτοβιάσης από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες χρησιμοποιείται χρωματογραφία κατιονικής ιοντοανταλλαγής, SP-Sepharose High Trap. Η στήλη χρωματογραφίας (όγκος στήλης 5 ml) εξισορροπείται με 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου συγκέντρωσης 20 mM pH 8.0 παρουσία 1 mM EDTA. Το ένζυμο δεσμεύεται στη στήλη ενώ για την έκλουση αυτού χρησιμοποιείται βαθμίδωση άλατος με εύρος συγκέντρωσης 0 - 0.4 M NaCl παρουσία του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος. Ο ρυθμός ροής τίθεται στα 60 ml/h και συλλέγονται κλάσματα όγκου 3 ml. Η χιτοβιάση συνήθως εκλύεται σε συγκέντρωση άλατος μεταξύ 150 και 300 mM NaCl. Στη συνέχεια η παρουσία της χιτοβιάσης στα κλάσματα που συλλέχθηκαν ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12.5 %.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδου 12.5%.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει προσθήκη 10 μl 2xSDS διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) σε 10 μl δείγματος από το κάθε κλάσμα τα οποία θερμαίνονται μέχρι βρασμού για 2 min. Επίσης, το δείγμα που βρίσκεται στους -20 °C ανάλογα με την οπτική του απορρόφηση επαναδιαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα (950 μl SDS-διάλυμα φόρτωσης και 50 μl β-μερκαπτοαιθανόλης) και τοποθετείται για 30 λεπτά σε λουτρό υπερήχων για τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και έπειτα για 2 έως 5' στους 100 °C. Μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (marker) εύρους 10 -200 kDa και όγκου 5 μl τοποθετείται στο πήκτωμα μαζί με 10-15 μl από κάθε κλάσμα που συλλέχθηκε σε διακριτές λωρίδες. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών εφαρμόζεται με εφαρμογή τάσης 100-200 V και ένταση ρεύματος

35 mAs. Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται το προφίλ του πηκτώματος όταν «φορτώθηκαν» σε αυτό δείγματα από το ίδιο κλάσμα σε διαφορετικούς όγκους.



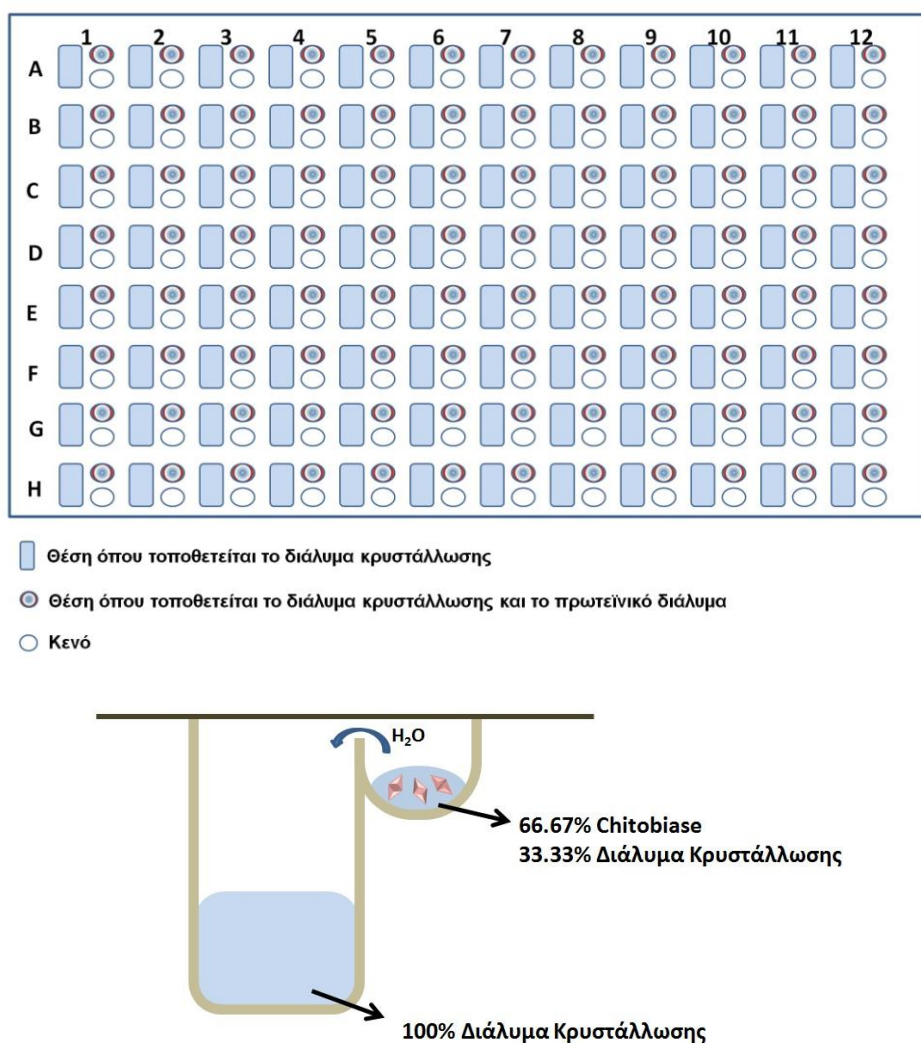
Εικόνα 15. Τα κλάσματα από το SP Sepharose

Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη, σύμφωνα με το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης, ενώνονται και η συγκέντρωσή αυτή προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm (ϵ (0.1%) = 1.592 g/L, 1 mg/ml = 1.8 OD_{280nm}).

2.5 Ανάπτυξη κρυστάλλων χιτοβιάσης με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας

Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν με την τεχνική της καθήμενης σταγόνας ακολουθώντας τις συνθήκες που ταυτοποιήθηκαν από την Δρ Μ. Δημαρόγκωνα στο πλαίσιο της συνεργασίας της με την Δρ Ε. Χρυσίνα στο IBΦXB-EIE. Για την ανάπτυξη των κρυστάλλων αρχικά παρασκευάστηκε το διάλυμα κρυστάλλωσης 20% PEG3350 και 0.15 M κιτρικού νατρίου (διάλυμα A) από 50μl από το οποίο τοποθετήθηκε στα βοθρία της μικροπλάκας όπως φαίνεται και στην Εικόνα 16. Για την παρασκευή του τελικού διαλύματος στο οποίο αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι αναμείχθηκαν τα διαλύματα A και B σε αναλογία 33.33% από το διάλυμα κρυστάλλωσης και 66.67% από το πρωτεϊνικό διάλυμα όπως φαίνεται στην **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.** Για τη δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών για την κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε η αυτοματοποιημένη διάταξη κρυστάλλωσης

Οργχ nano, η οποία είναι εγκατεστημένη στο ΙΒΦΧ-ΕΙΕ. Ο τελικός όγκος της σταγόνας για κάθε μια συνθήκη που διερευνήθηκε ήταν 0.3 μl.



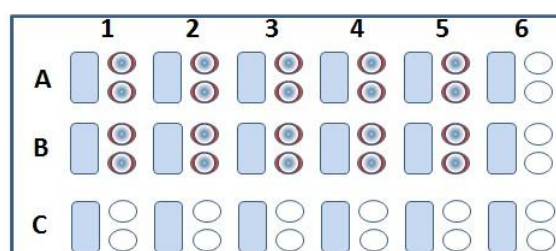
Εικόνα 16. Αναπαράσταση της μικροπλάκας κρυστάλλωσης της χιτοβίασης. Υποδεικνύεται η διάταξη μιας εκ των θέσεων που τοποθετείται το δείγμα προς κρυστάλλωση ως προς το διάλυμα κρυστάλλωσης εφαρμόζοντας τη μέθοδο της καθημένης σταγόνας

Μετά την ανάμειξη του διαλύματος κρυστάλλωσης με το πρωτεϊνικό διάλυμα η μικροπλάκα σφραγίστηκε αεροστεγώς ώστε να μην εξατμισθεί η σταγόνα και αφέθηκε σε ελεγχόμενη θερμοκρασία στους 20 °C. Οι πρώτοι κρύσταλλοι παρατηρήθηκαν μετά από τρεις βδομάδες. (Εικόνα 18) Ευμεγέθεις κρύσταλλοι του ενζύμου αναπτύχθηκαν σε όλες τις θέσεις.

2.6 Συγκρουστάλλωση της χιτοβιάσης με την ένωση 2 (CO-IV (N))

Η εμφάνιση των προσχηματισμένων κρυστάλλων της χιτοβιάσης σε διάλυμα της μελετώμενης ένωσης για το σχηματισμό του συμπλόκου δεν ήταν πάντα εφικτή, γι' αυτό όπου παρουσιάστηκε δυσκολία εφαρμόστηκε η μέθοδος της συγκρουστάλλωσης. Έτσι, στην περίπτωση της ένωσης 2, αρχικά παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα κρυστάλλωσης με τις εξής συγκεντρώσεις (η θέση αυτών στη μικροπλάκα υποδεικνύονται στην Εικόνα 17:

- 20% (w/v) PEG3350, 0.15M κιτρικό νάτριο, 0.33mM ένωσης (διάλυμα A₁)
- 20% (w/v) PEG3350, 0.15M κιτρικό νάτριο, 0.63mM ένωσης (διάλυμα A₂)



- Περιέχει το διάλυμα κρυστάλλωσης και τον προσδέτη 2
- Περιέχει το διάλυμα κρυστάλλωσης τον προσδέτη 2 και το πρωτεϊνικό διάλυμα
- Άδειο

Εικόνα 17. Η διάταξη του πιάτου που χρησιμοποιήθηκε για την συγκρουστάλλωση της χιτοβιάσης με την ένωση 2. Στις θέσεις A1 έως A5 και B1 έως B5 τοποθετείται το διάλυμα κρυστάλλωσης στις συνθήκες A₁ και A₂, αντίστοιχα

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος, όπως και προηγουμένως, ήταν 15mg/ml και το ποσοστό ανάμειξης αυτού με το διάλυμα κρυστάλλωσης ήταν 66.7 % και 33.3 %, αντιστοίχως. Ο πρώτος κρύσταλλος του συμπλόκου Chb:ένωση 2 παρατηρήθηκε μετά από τρεις εβδομάδες στη θέση B1 της μικροπλάκας.

2.7 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της χιτοβιάσης ως συμπλόκου με παράγωγα GlcNAc

Η συλλογή των δεδομένων περίθλασης για τη χιτοβιάση ως συμπλόκου και με τις τρεις ενώσεις με τις οποίες μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε στις μεγάλες

εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας EMBL-Hamburg Unit, Γερμανία και του Diamond Light Source στην Οξφόρδη, Αγγλία.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια για όλες τις ενώσεις και με αυτή συλλέχθηκαν δεδομένα περίθλασης σε ευκρίνεια 1.67 Å, 1.77 Å και 1.98 Å για τις ενώσεις 1, 2 και 3, αντιστοίχως. Επίσης, ένα σετ δεδομένων το οποίο αφορούσε αρχικά την ένωση 2 ως συμπλόκου με τη χιτοβιάση συλλέχθηκε σε διακριτική ικανότητα 1.31 Å. Ωστόσο ο προσδέτης απουσίαζε και η δομή αυτή αξιοποιήθηκε λόγω της υψηλής ευκρίνειας, για συγκριτικές μελέτες με την ήδη γνωστή δομή του ενζύμου όπως είχε προσδιορισθεί από τους Tews et al., 1996⁶⁶.

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ.

Πιο συγκεκριμένα, ένας μονοκρύσταλλος της χιτοβιάσης εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα περιεκτικότητας ίδιας με αυτήν του μητρικού διαλύματος και 20% PEG400 που δρα ως κρυοπροστατευτικό, παρουσία της μελετώμενης ένωσης σε συγκέντρωση τέτοια που να μην καταστρέφει το κρυσταλλικό πλέγμα. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος εμβάπτισης περιορίστηκε στα ~5min για κάθε προσδέτη μια και η παρατεταμένη εμβάπτιση οδηγούσε σε πλήρη αποδιάταξη του κρυσταλλικού πλέγματος και του κρυστάλλου (εμφάνιση ρωγμών). Στη συνέχεια ο κρύσταλλος εκτέθηκε στη δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας ακτίνων-Χ στους 100 K.

Η επεξεργασία των περιθλασιγραμμάτων για τον υπολογισμό της έντασης και της θέσης των περιθλάσεων πραγματοποιήθηκε με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού, το οποίο λαμβάνει υπόψιν το πλήθος των περιθλάσεων που συλλέχθηκαν, το χρόνο έκθεσης, την απόσταση από τον ανιχνευτή, τη γωνία περιστροφής τους κρυστάλλου και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Πιο συγκεκριμένα, για την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα **XDS**⁹² και το πακέτο λογισμικού **CCP4**⁹³. Ειδικότερα, το CCP4 περιλαμβάνει μια σειρά προγραμμάτων όπως το **Scala**, με το οποίο πραγματοποιείται η συγχώνευση και ολοκλήρωση των δεδομένων περίθλασης και με μετασχηματισμό Fourier υπολογίζεται το πλάτος των δομικών παραγόντων F.

Επίλυση της τρισδιάστατης δομής.

Η λύση της τρισδιάστατης δομής της χιτοβιάσης πραγματοποιείται με το πρόγραμμα **Phaser**, με το οποίο υλοποιείται η μέθοδος μοριακής αντικατάστασης. Για τον προσδιορισμό των φάσεων χρησιμοποιήθηκε η ήδη γνωστή δομή του ενζύμου 1QBA (σε ευκρίνεια 1.85 Å) ως αρχικό μοντέλο. Το μοντέλο περιστρέφεται και μετατοπίζεται στο χώρο σε θέσεις που ορίζουν οι τελεστές συμμετρίας για το μονοκλινές πλέγμα που υπέδειξε το **Scala**. Οι επί μέρους θέσεις που προτείνονται αξιολογούνται με βάση τα πειραματικά δεδομένα και βαθμολογούνται για την ορθότητά τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χιτοβιάση στις νέες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κρυσταλλώθηκε στην ομάδα χώρου συμμετρίας $P12_11$ ($P2_1$).

Βελτιστοποίηση του μοντέλου έναντι των πειραματικών δεδομένων.

Ακολούθως, πραγματοποιείται βελτιστοποίηση των ατομικών συντεταγμένων του αρχικού μοντέλου στη νέα του θέση με το πρόγραμμα **Refmac** και στη συνέχεια υπολογίζονται χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ και F_o-F_c . Όπου F_o είναι το πλάτος του δομικού παράγοντα όπως αυτό υπολογίζεται από τα πειραματικά δεδομένα και F_c το αντίστοιχο που υπολογίζεται από το αρχικό μοντέλο. Η απεικόνιση της 3D δομής του συμπλόκου και των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας πραγματοποιείται με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών **WinCoot**⁹⁴. Οι ατομικές συντεταγμένες του συμπλόκου υποβάλλονται σε διαδοχικούς κύκλους βελτιστοποίησης και επανεξετάζονται τα μόρια ύδατος που βρίσκονται στη δομή. Με το πέρας όλων των κύκλων βελτιστοποίησης, ελέγχεται η γεωμετρία της δομής του συμπλόκου με το **MolProbity**⁹⁵, το οποίο είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο ελέγχου της ορθότητας της δομής από πλευράς γεωμετρίας, μήκους δεσμών, γωνιών, δίεδρων γωνιών καθώς και γωνιών των πεπτιδικών δεσμών. Το συγκεκριμένο εργαλείο είναι βασισμένο σε ένα ευρύ φάσμα παγκόσμιων σταθερών προκειμένου να αξιολογήσει την ποιότητα του προς μελέτη μοντέλου.

Η παραπάνω προσέγγιση εφαρμόστηκε για όλες τις δομές των συμπλόκων της χιτοβιάσης με τις μελετώμενες ενώσεις. Ωστόσο, ως αρχικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε η ήδη προσδιορισμένη δομή 1QBA μόνο για την επίλυση και τον προσδιορισμό της χιτοβιάσης στη φυσική διαμόρφωση ενώ για τις δομές των συμπλόκων αξιοποιήθηκε η νέα δομή σε ευκρίνεια 1.31 Å.

Οι χάρτες διαφοράς $2F_o-F_c$ που υπολογίστηκαν για κάθε σύμπλοκο που μελετήθηκε, υπέδειξαν τη θέση σύνδεσης του αναστολέα, καθώς επίσης και τις αλλαγές που προκλήθηκαν στο περιβάλλον τους κατά τη σύνδεση.

Οι ενώσεις σχεδιάστηκαν σε τρεις διαστάσεις με τη χρήση του προγράμματος **ChemDraw**⁹⁶ και αφού ελαχιστοποιήθηκε η ενέργειά τους με την εφαρμογή **MacroModel** του πακέτου λογισμικού **Schrödinger**⁹⁷, προσαρμόστηκαν στο χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας με τροποποίηση των διεδρων γωνιών τους. Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των αναστολέων καταγράφηκαν και μορφοποιήθηκαν κατάλληλα με τη βοήθεια του εξυπηρετητή **Dundee Server**⁹⁸. Το νέο μοριακό μοντέλο του συμπλόκου, με το πρόγραμμα Refmac υποβλήθηκε σε βελτιστοποίηση έναντι των πειραματικών δεδομένων όπως περιγράφηκε παραπάνω έχοντας ενημερωθεί κατάλληλα για τη γεωμετρία των προσδετών. Οι δεσμοί υδρογόνου και οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις υπολογίζονται με το πρόγραμμα **Contact**⁹³ και οπτικοποιούνται με την εφαρμογή **LigPlot**⁹⁹. Τέλος για τη σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων και των αναστολέων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα οπτικοποίησης τρισδιάστατων δομών **Chimera**¹⁰⁰ και το **MolSoft**¹⁰¹.

2.7.1 Ανάλυση και συγκριτική μελέτη των νέων τρισδιάστατων δομών της χιτοβιάσης και των συμπλόκων αυτής.

Για την ανάλυση των νέων 3D δομών χρησιμοποιήθηκαν ο εξυπηρετητής **Dali**¹⁰² όπου η στοίχιση των πρωτεϊνών γίνεται με εξειδικευμένο αλγόριθμο ο οποίος αξιολογεί και βαθμολογεί (z score) την ομοιότητα στα δευτεροταγή στοιχεία της εξεταζόμενης πρωτεϊνικής δομής ως προς τις ήδη γνωστές και κατατεθειμένες στην PDB. Ο γενικός κανόνας που χρησιμοποιείται είναι ο εξής:

- z-score μεγαλύτερο του 20, οι συγκρινόμενες πρωτεΐνες εμφανίζουν σίγουρη ομολογία
- z-score μεταξύ του 8 και του 20 οι συγκρινόμενες πρωτεΐνες εμφανίζουν πιθανή ομολογία
- z-score μεταξύ του 2 και του 8, τα αποτελέσματα θεωρούνται ασαφή
- z-score μικρότερο του 2, οι συγκρινόμενες πρωτεΐνες δεν εμφανίζουν ομολογία

Επιπλέον, πέραν του z-score αποδίδεται η ρίζα των τετραγώνων των αποκλίσεων από τη μέση τιμή (RMSD), το πλήθος των αμινοξέων που ανήκουν σε δομικά όμοια δευτεροταγή στοιχεία (align positions), ο συνολικός αριθμός των αμινοξέων (matched structure), την ομολογία στην αξινοξική ακολουθία και το όνομα της δύναμει δομικά ομόλογης πρωτεΐνης.

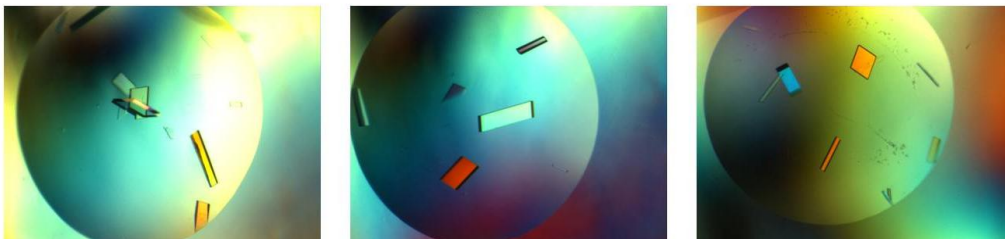
Όσον αφορά στη σύγκριση των αλληλουχιών σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας αυτή πραγματοποιήθηκε παρουσία των αλγορίθμων **Blast**, **Clustalw** και τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν με τη διαδικτυακή εφαρμογή **ESPrpt 3.0** ¹⁰³⁻¹⁰⁶.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για τη μέλετη της τρισδιάστατης δομής της χιτοβιάσης τόσο στη φυσική διαμόρφωση όσο και ως συμπλόκου παρουσία των τριών ισχυρών αναστολέων CO-II (NMe₃), CO-IV (N), CO-IV (NMe₃), παραγώγων GlcNAc⁸⁰, αρχικά πραγματοποιήθηκε παρασκευή του ενζύμου από τον μικροοργανισμό *S. marcescens* στο εργαστήριο του καθ. κ. Κ. Βοργιά. Το ένζυμο καθαρίστηκε με εφαρμογή κλασικών χρωματογραφικών μεθόδων και στη συνέχεια δοκιμάστηκαν οι ήδη δημοσιευμένες συνθήκες κρυστάλλωσης αυτού από τους Tews et al. το 1996⁶⁶ παρουσία 61.5% θειικού αμμωνίου, 1.5% ισοπροπανόλη και 100 mM κακοδυλικού νατρίου, χωρίς όμως επιτυχία. Οι συνθήκες κρυστάλλωσης διερευνήθηκαν εκ νέου από την Δρ Μ. Δημαρόγκωνα στο Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας τους IBΦΧΒ/ΕΙΕ υπό την επίβλεψη της Δρ Ε.Δ. Χρυσίνα στο πλαίσιο συνεργασίας με τον καθ. Κ. Βοργιά. Κρύσταλλοι του ενζύμου αναπτύχθηκαν παρουσία PEG3350 και κιτρικού νατρίου. Δεδομένα περίθλασης συλλέχθηκαν για το σύμπλοκο χιτοβιάση:ένωση 1 όσο και για το σύμπλοκο χιτοβιάση:ένωση 3 σε υψηλή ευκρίνεια στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο EMBL, Hamburg Unit, Γερμανία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι νέοι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στο μονοκλινές πλέγμα έναντι του ορθορομβικού με ομάδα χώρου συμμετρίας $P2_1$.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την ολοκλήρωση των μελετών που αφορούσαν της παραπάνω ενώσεις και ειδικότερα την ένωση 2 για την οποία δεν είχαν συλλεχθεί δεδομένα, αναπτύχθηκαν εκ νέου κρύσταλλοι της χιτοβιάσης εφαρμόζοντας τις προαναφερθείσες συνθήκες με επιτυχία (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Οι κρύσταλλοι της χιτοβιάσης από *S. marcescens*

Παράλληλα, δοκιμάσθηκε η συγκρυστάλλωση της χιτοβιάσης με την ένωση 2 (βλ. §2.6), ωστόσο οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν δεν ήταν της ίδιας ποιότητας με αυτούς του ελεύθερου ενζύμου.

Ειδικότερα, η ένωση 2 απεδείχθη εξαιρετικά απαιτητική ως προς τον χειρισμό της και αυτό γιατί, όταν κρύσταλλοι της χιτοβιάσης εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα της ένωσης 2 συγκέντρωσης 10 mM, παρουσιάζονταν αμέσως ρωγμές που υποδείκνυαν την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος. Αν και δοκιμάσθηκε να μειωθεί η συγκέντρωση του διαλύματος της ένωσης 2 (από 10 mM σε 5 mM) τα αποτελέσματα δεν βελτιώθηκαν. Έκθεση των κρυστάλλων της χιτοβιάσης που αναπτύχθηκαν παρουσία της ένωσης 2 (με συγκρυστάλλωση) έδειξε ότι αυτοί δεν είχαν καλή περιθλαστική ικανότητα. Τελικά η συλλογή δεδομένων του συμπλόκου έγινε εφικτή με εμβάπτιση μονοκρυστάλλου χιτοβιάσης σε διάλυμα της ένωσης 2 συγκέντρωσης 5 mM για χρονικό διάστημα μόλις 2 λεπτών. Η συλλογή των δεδομένων περίθλασης πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο Diamond Light Source στην Οξφόρδη, Αγγλία.

Οι παραπάνω προσπάθειες οδήγησαν ταυτόχρονα στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της χιτοβιάσης στην ελεύθερη της μορφή σε ευκρίνεια 1.31 Å από δεδομένα που αφορούσαν την ένωση 2, η οποία όμως δεν προσδέθηκε. Η νέα αυτή δομή της χιτοβιάσης προσδιορίσθηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο την ήδη κατατεθειμένη δομή του ενζύμου 1QBA⁶⁶ εφαρμόζοντας κλασσικά πρωτόκολλα βελτιστοποίησης (βλ. §2.6). Στη συνέχεια η δομή που προέκυψε αποτέλεσε αρχικό μοντέλο για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των συμπλόκων της χιτοβιάσης με τις ενώσεις 1, 2 και 3.

3.1 Η τρισδιάστατη δομή της φυσικής χιτοβιάσης

Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή της χιτοβιάσης (Σχήμα 10) προσδιορίσθηκε σε ευκρίνεια 1.31 Å με χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας ακτίνων-Χ. Τα στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και καθώς και αυτά της βελτιστοποίησης περιγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης της νέας δομής της χιτοβιάσης

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι χιτοβιάσης ανεπτυγμένοι παρουσία 20% (w/v) PEG3350 και 0.15M κιτρικού νατρίου.
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	Diamond Light Source Οξφόρδη, 25.01.2015
Μήκος κύματος (Å)	0.9795
Απόσταση (mm)	235.37
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.150
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	2000 (300)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	<i>P12₁1</i>
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	a=54.7, b=127.3, c=62.7, α=γ=90.0, β=100.9
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	29.19-1.31
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	1064691 (122228)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	200020 (28106)
R_{merge}^a (εξωτερική στοιβάδα)	0.069 (0.556)

Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	99.2 (95.8)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.38 (1.31)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^b$ (εξωτερική στοιβάδα)	11.5 (2.3)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	5.3 (4.3)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å ²) (Wilson plot)	12.3
Βελτιστοποίηση και ποιότητα του μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	29.19-1.31
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (αριθμός ανεξάρτητων ανακλάσεων, 5%)	199173 (9892)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	28-885
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	7587
Αριθμός μορίων ύδατος	965
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R (R_{\text{free}})^c$	0.17496 (0.20795)
$R (R_{\text{free}})$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.267 (0.320)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.170

^a $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου $\langle I_h \rangle$ και I_{ih} είναι η μέση και η i^{th} μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων h , αντιστοίχως. ^b $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση I . ^c Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$, όπου $|F_o|$ και $|F_c|$ είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως. R_{free} είναι η αντίστοιχη τιμή R value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

Οι τέσσερις δομικά αυτοτελείς περιοχές του ενζύμου I, II, III και IV παραμένουν διακριτές διατηρώντας τα δομικά τους χαρακτηριστικά χωρίς να παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στη σχετική διεύθυνση τους, ακριβώς όπως και στη δομή της 1QBA. Πιο συγκεκριμένα, το καταλυτικό κέντρο εντοπίζεται επίσης στην περιοχή III, η οποία έχει ανάλογη αναδίπλωση με αυτήν του (βα)₈-βαρελιού (Σχήμα 10).



Δομικά αυτοτελείς περιοχές:

● I (Αμινοτελικό άκρο)

● III (Καταλυτική περιοχή)

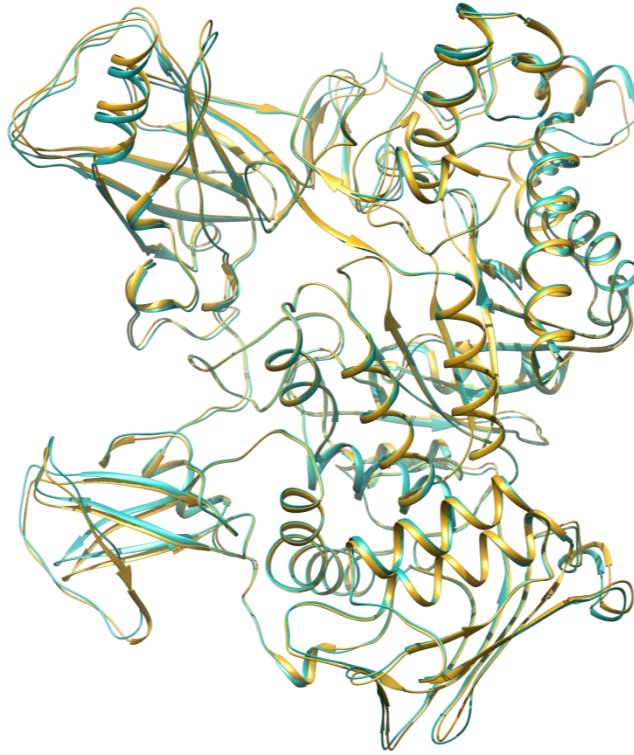
● II

● IV Καρβοξυτελικό άκρο

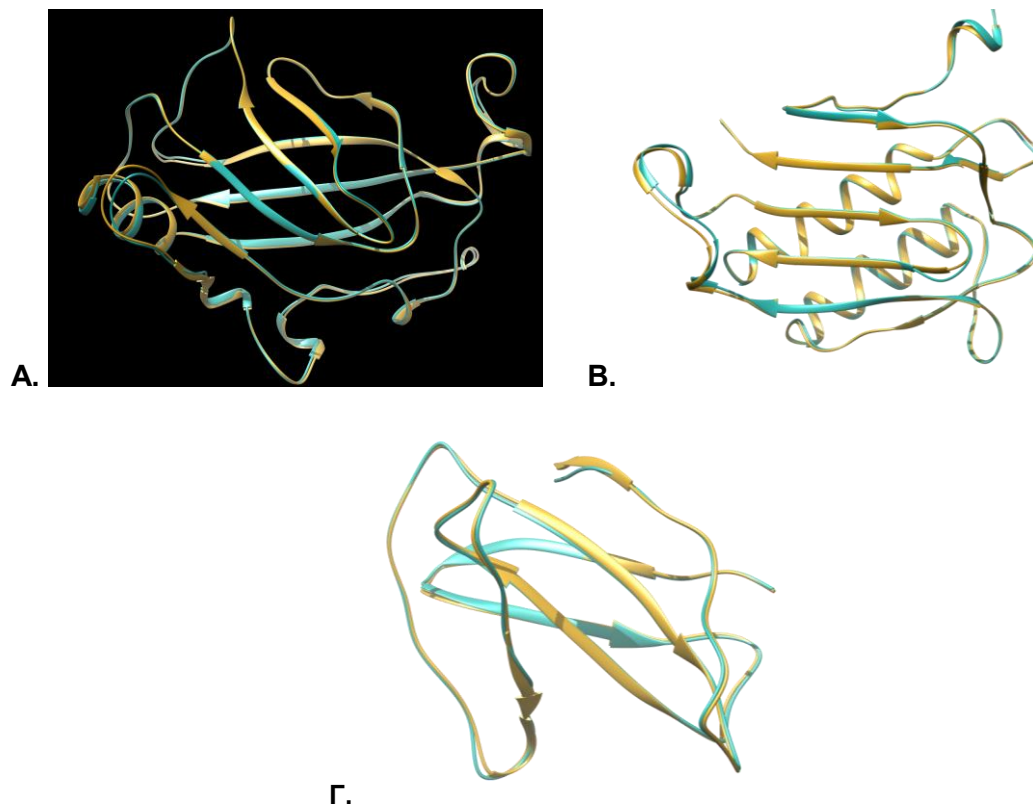
Σχήμα 10. Σχηματική απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της φυσικής χιτοβιάσης

Υπέρθεση της νέας δομής της χιτοβιάσης με αυτήν της 1QBA, έδειξε ότι οι δύο δομές είναι αρκετά όμοιες με rmsd στα άτομα CAs 0.671 Å (Σχήμα 11).

Για την ανάδειξη πιθανών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στις επί μέρους δομικά αυτοτελείς περιοχές της χιτοβιάσης πραγματοποιήθηκε υπέρθεση μεμονωμένα για την κάθε μια εξ' αυτών με τις αντίστοιχες ζώνες της 1QBA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι περιοχές I, II και IV παρουσίασαν μεγάλη δομική ομοιότητα με rmsd 0.327 Å, 0.354 Å και 0.313 Å, αντιστοίχως Σχήμα 12 ενώ η περιοχή III έδειξε υψηλότερη απόκλιση με rmsd 0.612 Å.



Σχήμα 11. Υπέρθωση της νέας δομής της χιτοβιάσης που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία (με κυανό χρώμα) με την 1QBA (με κίτρινο χρώμα)



Σχήμα 12. Υπέρθωση των δομικά αυτοτελών περιοχών I (Α), II (Β) και IV (Γ) της νέας δομής της χιτοβιάσης (με κυανό χρώμα) και της 1QBA (με κίτρινο χρώμα)

Ειδικότερα, αναλυτικότερη σύγκριση των καταλυτικών αμινοξέων και της διαμόρφωσης που λαμβάνουν έδειξε ότι αυτά διαφοροποιούνται αρκετά σε σχέση με την αρχική τους θέση στην 1QBA. Οι αλλαγές εστιάζονται όχι μόνο στις πλευρικές τους αλυσίδες αλλά και στην πολυπεπτιδική αλυσίδα στην οποία ανήκουν καθώς και στα αμινοξέα με τα οποία γειτνιάζουν (538-559, 562-600, 617-628, 637-653). Λαμβάνοντας υπ'όψιν ότι τα δύο αυτά καταλυτικά αμινοξέα εντοπίζονται στο εσωτερικό της καταλυτικής περιοχής (περιοχή III) για την ερμηνεία της παραπάνω αλλαγής ελέγχθηκε το ενδεχόμενο οι μεταβολές να οφείλονται σε μερική πρόσδεση της ένωσης 2 (μια και τα δεδομένα συλλέχθηκαν ενώ γίνονταν προσπάθειες συλλογής δεδομένων του συμπλόκου χιτοβίασης:ένωση 2). Οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ και F_o-F_c δεν επιβεβαίωσαν όμως αυτήν την εκδοχή. Επιπρόσθετα, εξετάσθηκε η διεύθυνση των μορίων της χιτοβίασης στη νέα δομή και την 1QBA η οποία υπαγορεύεται από την ομάδα χώρου συμμετρίας που ανήκουν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αν και τα καταλυτικά αμινοξέα δεν εμπλέκονται αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα που προέρχονται από συμμετρικές υπομονάδες σε καμία από τις δύο δομές, δεν συμβαίνει το ίδιο και για το περιβάλλον τους. Συγκεκριμένα, στην μεν περίπτωση της 1QBA η ζώνη των αμινοξέων 580-590 η οποία εντοπίζεται «απέναντι» από τα καταλυτικά αμινοξέα αλληλεπιδρά με την περιοχή I της συμμετρικής υπομονάδας (εκατέρωθεν των αμινοξέων 100' και 120'). Στη νέα δομή της χιτοβίασης η διεύθυνση των μορίων στο κρυσταλλικό πλέγμα αλλάζει (από $P2_12_12$ σε $P2_1$), η παραπάνω ζώνη αλληλεπιδρά και πάλι με αμινοξέα της συμμετρικής υπομονάδας, ωστόσο αυτήν τη φορά προέρχονται από την περιοχή I (εκατέρωθεν του αμινοξέος 126') και την περιοχή IV (εκατέρωθεν του αμινοξέος 828').



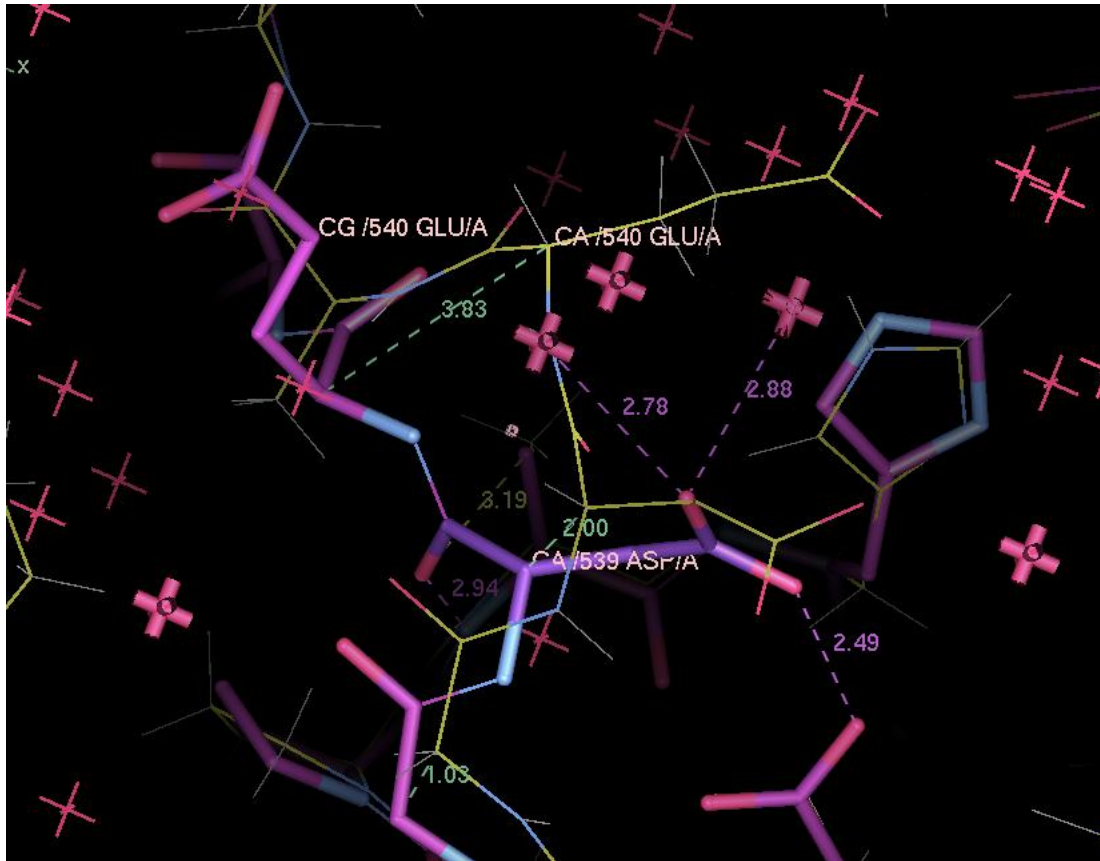
A.

B.

Σχήμα 13. Σχηματική αναπαράσταση των αμινοξέων που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με μόρια της συμμετρικής υπομονάδας στη νέα δομή της χιτοβιάσης (A) και στη δομή 1QBA (B) και βρίσκονται στο περιβάλλον των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου, A: με μωβ χρώμα η περιοχή III της χιτοβιάσης και με πράσινο οι συμμετρικές αυτής, B: με ανοιχτό πράσινο χρώμα η περιοχή III της 1QBA και με κίτρινο οι συμμετρικές αυτής

Λεπτομερέστερα, οι αλλαγές στη διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας που ανήκουν τα καταλυτικά αμινοξέα Asp539 και Glu540 αφορούν αρχικά σε μετατόπιση των ατόμων της κύριας αλυσίδας οι οποίες κυμαίνονται από ~ 1.0 Å έως και ~ 3.8 Å με τις μεγαλύτερες μεταβολές να παρατηρούνται στα καταλυτικά αμινοξέα Asp539 και Glu540 (~ 2 Å και ~ 3.8 Å, αντίστοιχα). Η πλευρική αλυσίδα του Asp539 υφίσταται επίσης στρέψη με αλλαγή των διεδρων γωνιών του χ_1 και χ_2 κατά 141° και 45° , αντίστοιχα. Η αλλαγή του Glu540 είναι πολύ πιο σημαντική γιατί πέρα από τη μετατόπιση των ατόμων της κύριας αλυσίδας (βλ. παραπάνω) αλλάζει τελείως ο προσανατολισμός της πλευρικής του αλυσίδας με στρέψη των διεδρων γωνιών του χ_1 κατά $\sim 126^\circ$ και χ_3 κατά $\sim 43^\circ$.

Η δομή του καταλυτικού κέντρου του 1QBA δεν φαίνεται να αλλάζει στερεοδιάταξη παρουσία ενός δισακχαρίτη (pdb code: 1QBB) Γι αυτό τον λόγο στην συνέχεια όλες οι συγκρίσεις θα γίνουν μόνο με την 1QBA.



Σχήμα 14. Σύγκριση των καταλυτικών αμινοξέων Asp539 και Glu540 στη νέα δομή της χιτοβιάσης (με μωβ χρώμα) ως προς την 1QBA (με κίτρινο χρώμα)

Η τρισδιάστατη δομή της χιτοβιάσης σε ευκρίνεια 1.31 Å χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δομής των ενώσεων 1, 2 και 3 ως συμπλόκων με το ένζυμο.

3.2 Δομικές μελέτες του συμπλόκου της χιτοβιάσης με την ένωση 1 (CO-II (NMe₃))

Για την ένωση 1, (CO-II (NMe₃)), συλλέχθηκαν δεδομένα περίθλασης σε ευκρίνεια 1.67 Å στον σταθμό συγχροτρονικής ακτινοβολίας ακτίνων-Χ στο EMBL-Hamburg outstation, σταθμός εργασίας P14. Τα στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου χιτοβιάσης: ένωση 1

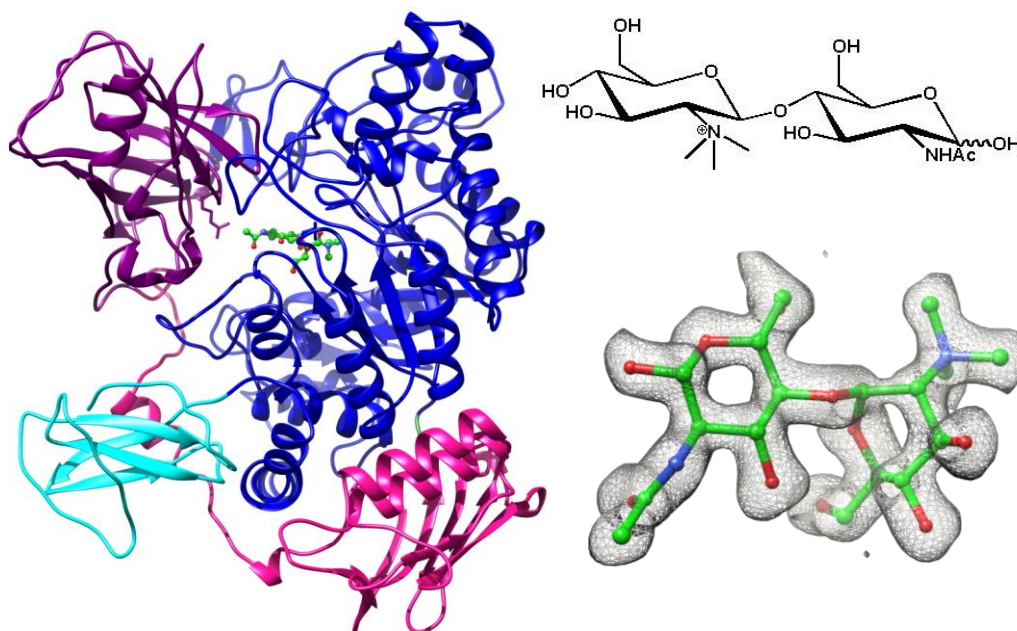
Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Μονοκρύσταλλος χιτοβιάσης εμβαπτίστηκε σε υδατικό διάλυμα της ένωσης 1 συγκέντρωσης 10 mM CO-II (NMe ₃) για 10 min
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	EMBL-Hamburg outstation, P14, 09.12.2012
Μήκος κύματος (Å)	1.23953
Απόσταση (mm)	228.9
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.1
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	1800 (180°)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	<i>P12₁1</i>
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	a=54.7, b=126.9, c=62.5 α=γ=90.0 β=100.9
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	63.46-1.67
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	308140 (39128)

Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	94530 (13489)
R_{merge}^a (εξωτερική στοιβάδα)	(0.046) 0.202
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	(97.3) 95.3
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.76 (1.67)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^b$ (εξωτερική στοιβάδα)	17.2 (4.8)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	3.3 (2.9)
Τιμή του παράγοντα θερμοσίας B (Å ²) (Wilson plot)	12.4
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	63.46-1.67
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	94488 (4678)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	28-885
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	7624
Αριθμός μορίων ύδατος	892
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R_{free}^c)	0.170 (0.197)
R (R_{free}) (εξωτερική στοιβάδα)	0.210 (0.226)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.137

^a $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου $\langle I_h \rangle$ και I_{ih} είναι η μέση και η i^{th} μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων h , αντιστοίχως. ^b $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση I . ^cΚρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$, όπου $|F_o|$ και $|F_c|$ είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως. R_{free} είναι η αντίστοιχη τιμή R value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στην βελτιστοποίηση.

Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου χιτοβίαση:ένωση 1 προσδιορίστηκε με χρήση της νέας δομής του ενζύμου ως αρχικό μοντέλο (

Σχήμα 15). Υπολογισμός των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ υπέδειξε ότι υπήρχε επιπλέον πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, η οποία μπορούσε να αποδοθεί στην ένωση 1. Έτσι το πρωτεϊνικό μοντέλο εμπλουτίστηκε με τον προσδέτη, ο οποίος είχε προηγουμένως σχεδιαστεί και ελαχιστοποιηθεί με τη βοήθεια εξειδικευμένου λογισμικού (βλ. πειραματικό), με προσαρμογή των δίεδρων γωνιών του στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα.



Σχήμα 15. Σχηματική απεικόνιση της δομής της χιτοβιάσης παρουσία της ένωσης 1 και του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του προσδετη κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera¹⁰⁰

Κατά τη σύνδεση της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, η ένωση 1 αναπτύσσει 15 δεσμούς υδρογόνου

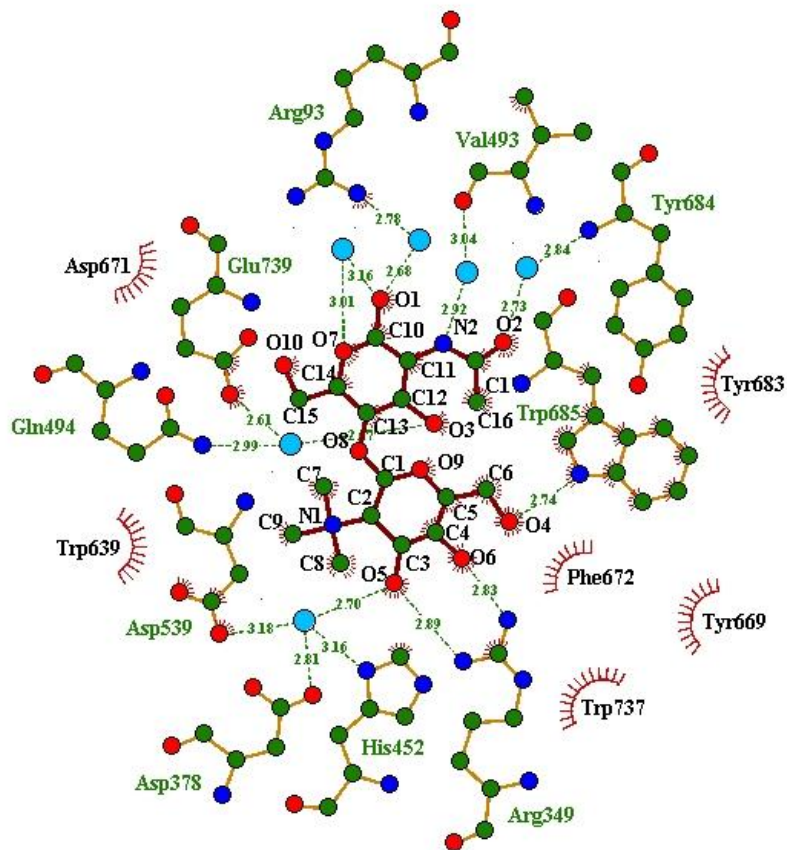
Πίνακας 5) και 109 Van der Waals αλληλεπιδράσεις (Πίνακας 6) με τα αμινοξέα που συνθέτουν το (βα)₈-βαρέλι της ενεργής περιοχής του ενζύμου Σχήμα 16.

Πίνακας 5. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 1 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης

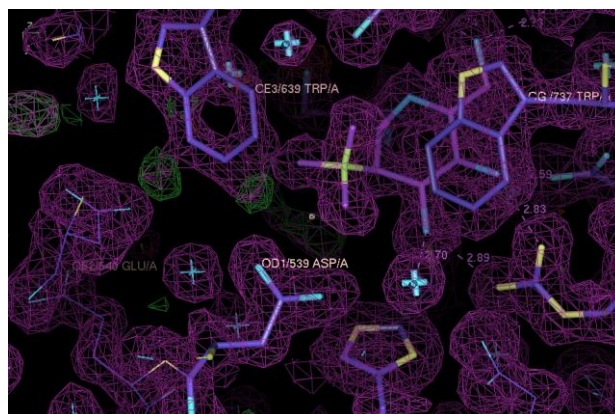
Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
O1	Wat551 O	2.7	–
	Wat580 O	3.2	–
	Wat836 O	2.7	–
O2	Wat413 O	2.7	–
	Wat551 O	3.3	–
N2	Wat92 O	2.9	–
O3	Wat45 O	2.7	–
O4	Asp671 OD2	2.7	134.5
	Trp685 NE1	2.7	175.9
O5	Arg349 NH2	2.9	162.2
	Wat33 O	2.7	–
O6	Arg349 NH1	2.8	146.5
	Glu739 OE2	2.6	120.9
O7	Wat580 O	3.0	–
O10	Wat807 O	3.3	–
Σύνολο	15		

Πίνακας 6. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 1 και των μορίων ύδατος και των αμινοξέων της χιτοβιάσης

Άτομο αναστολέα	Άτομα πρωτεΐνης/διαλύτη	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
C3	Trp737 CZ3; Wat 33D O	2
C4	Glu739 OE2; Wat 45 O	2
C5	Trp737 CD1, NE1,CG, CE2, CD2	5
C6	Trp 737 CD1, CG, CB; Trp 685 NE1; Glu 739 OE2; Asp 671 OD2; Trp 737CB; Wat 96 O	7
C7	Asp 539 OD1, OD2, CG; Trp 737 CH2; Wat 33 O	5
C8	Wat 524 O, Trp 639 CZ3, Tyr 669 OH, Trp 737 CE2, CZ2	5
C9	Wat 524 O, Wat 807 O, Trp 639 CZ3, CH2	4
C10	Wat 580 O; Val 493 CG1; Wat 195 O; Wat 551 O; Wat 836 O; Wat 82 O	6
C11	Trp 685 CG, CD1, Wat 92 O	3
C12	Wat 45B O; Wat 92 O; Gln 494 NE2	3
C13	Trp 685 CD1, NE1, CE2	3
C14	Cal 493 CG1	1
C15	Wat 807 O	1
C16	Wat 551 O; Wat 413 O; Wat 92 O; Tyr 683 CE, CD2;	5
C17	Wat 92 O; O; Wat 413 O Wat 414 O; Wat 551; Tyr 683 CE2, CZ; Arg 93 NH1;	7
O1	Trp 685 CB; Wat 195 O; Wat 835 O	3
O2	Wat 438 O; Tyr 683 CE2, CD2; Trp 685 CB, Cg, CD1;	6
O3	Trp685 CD1; Glu 739 OE2; Tur 683 CE2; Tyr 683 CD2	4
O4	Tyr 669 CE2, CD2; Asp 671 CG, OD1; Phe 672 CE1; Trp 685 CD1, CE2; Trp 737	8
O5	His 452 NH2, ND1, CE1; Arg 349, NH1, CZ; Gln 494 NE2	6
O6	Arg 349 CZ, NH2; Trp 737 CB, CG, CD2, CE3, CZ3; Glu 739 CD, OE1	9
O7	Trp 685 CD2, CG	2
O8	Gln 494 NE2	1
O9	Trp 685 CZ2, NE1, CE2	3
O10	Trp 685 CD2, CE3, CZ3, CH2, CZ2, CE2	6
N2	Wat 195 O,; Wat 551 O	2
	Σύνολο	109



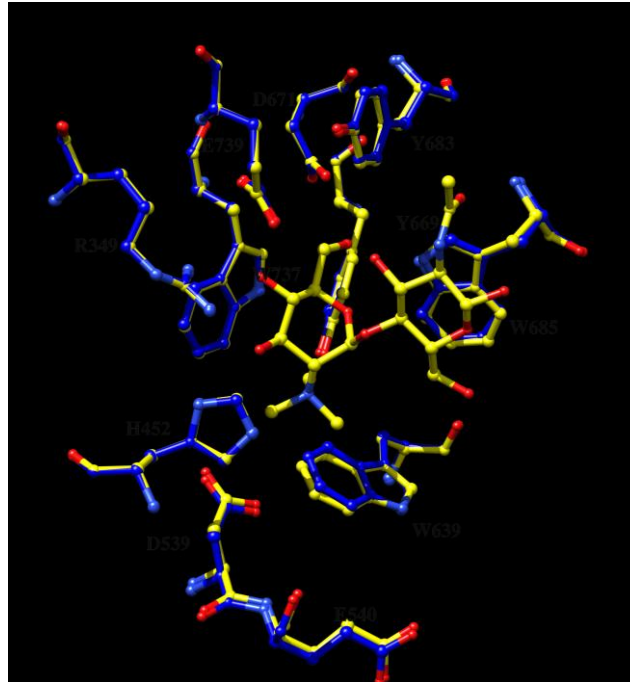
Σχήμα 16. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 1 κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό, Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT*⁹⁹



Σχήμα 17. Σχηματική απεικόνιση της ένωσης στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης με έμφαση στη σχετική της θέση ως προς το καταλυτικό αμινοξύ Asp539

Ακολούθησαν μελέτες υπέρθεσης του συμπλόκου, χιτοβιάση:ένωση 1 με τη νέα δομή του ενζύμου. Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου παραμένει η

ίδια σε όλες τις δομικά αυτοτελείς περιοχές με βάση τα άτομα CAs (r.m.s.d. 0.132). Επίσης, δεν παρατηρείται καμμία σχεδόν μεταβολή στα καταλυτικά αμινοξέα Asp539 και Glu540 παρά το γεγονός ότι συνδέεται ένας δισακχαρίτης (Σχήμα 18). Τα αποτελέσματα της δομικής μελέτης του συμπλόκου χιτοβιάση:ένωση 1 είναι σε συμφωνία με αυτά των κινητικών μελετών μια και η ένωση 1 είχε εμφανίσει την ισχυρότερη αναστολή (K_i 0.04 μM) του ενζύμου ⁸⁰.



Σχήμα 18. Υπέρθωση της φυσικής δομής της χιτοβιάσης (μπλε) με το σύμπλοκο χιτοβιάση- ένωση 1 (κίτρινο)

3.3 Δομικές μελέτες του συμπλόκου της χιτοβιάσης με την ένωση 2 (CO-IV (N))

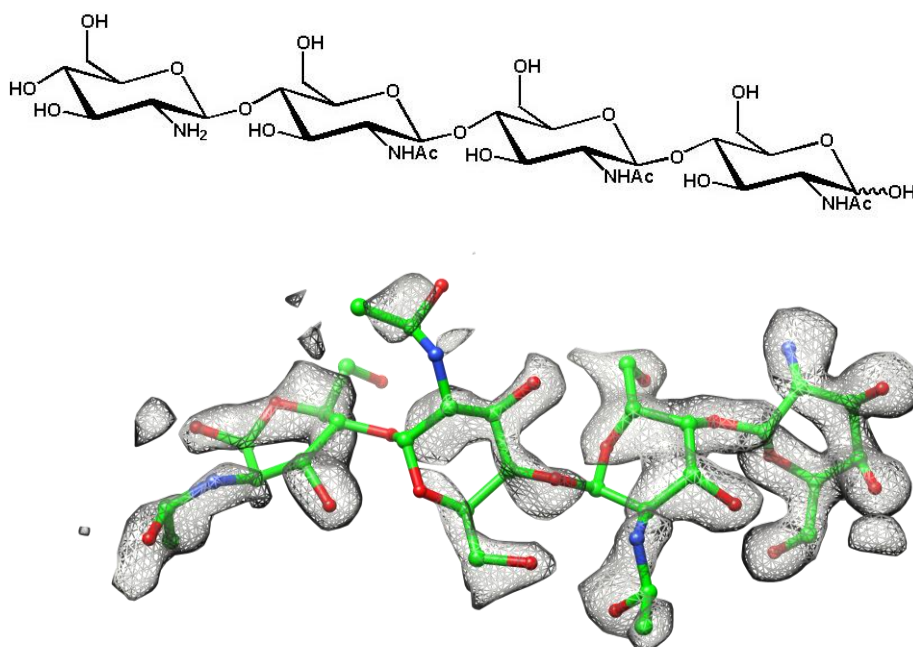
Στη συνέχεια συλλέχθηκαν δεδομένα περίθλασης για την ένωση 2 (CO-IV (N)) σε ευκρίνεια 1.77 Å. Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου παρουσίασε εξαιρετική δυσκολία γιατί όταν ο κρύσταλλος του ενζύμου εμβαπτιζόταν σε διάλυμα του αναστολέα, ο τελευταίος στην προσπάθειά του να συνδεθεί στο καταλυτικό κέντρο προκαλούσε πιθανότατα τέτοιες μεταβολές που οδηγούσαν σε καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος και καθίστατο μη δυνατή η συλλογή των δεδομένων. Γι' αυτόν τον λόγο έγιναν και προσπάθειες συγκρυστάλλωσης του ενζύμου με την ένωση αυτή, χωρίς όμως να επιτευχθεί η ανάπτυξη κρυστάλλων ικανοποιητικής ποιότητας μια και όσοι εξ' αυτών αναπτύχθηκαν έφεραν ρωγμές και δεν περιλούσαν επίσης ισχυρά τις ακτίνες X. Τελικά, η συλλογή δεδομένων έγινε εφικτή από μονοκρύσταλλο της χιτοβιάσης εμβαπτισμένο σε διάλυμα αναστολέα συγκέντρωσης 5 mM για χρονικό διάστημα μόλις 2 λεπτών. Ο μικρός χρόνος που χρησιμοποιήθηκε για τον σχηματισμό του συμπλόκου και μεν επέτρεψε τη σύνδεση της ένωσης 2 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, ωστόσο αυτή φαίνεται να ήταν ισχυρότερη για τις δύο πρώτες δομικές μονάδες εξόζης και λιγότερο ισχυρή για τις υπόλοιπες δύο όπως υποδεικνύεται από τους χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o - F_c$ (Σχήμα 19). Για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής και αυτού του συμπλόκου χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο η νέα δομή της χιτοβιάσης. Τα στατιστικά στοιχεία που αφορούν στα δεδομένα και στη γεωμετρία του πρωτεϊνικού συμπλόκου περιγράφονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 2

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Μονοκρύσταλλος χιτοβιάσης εμβαπτίστηκε σε υδατικό διάλυμα της ένωσης 2 συγκέντρωσης 5 mM CO-II (NMe ₃) για 2 min
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	Diamond Light Source στην Οξφόρδη, 104, 25.01.2015
Μήκος κύματος (Å)	0.9795
Απόσταση (mm)	289.30
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.150
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	1500 (225°)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	<i>P12₁1</i>
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	a=54.2, b=132.0, c=62.4 α=γ=90.0, β=101.1
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	29.07-1.76
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	332713 (48468)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	82488 (12164)
R_{merge}^a (εξωτερική στοιβάδα)	0.104 (0.593)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	98.6 (99.8)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.87 (1.77)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^b$ (εξωτερική στοιβάδα)	8.1 (2.0)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	4.0 (4.0)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å ²) (Wilson plot)	14.3

Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	29.07-1.77
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	82386 (4113)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	28-885
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	7404
Αριθμός μορίων ύδατος	595
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R_{free}) ^c	0.218 (0.265)
R (R_{free}) (εξωτερική στοιβάδα)	0.308 (0.361)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.009
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.316

^a $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου $\langle I_h \rangle$ και I_{ih} είναι η μέση και η i^{th} μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων h , αντιστοίχως. ^b $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση I . ^cΚρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$, όπου $|F_o|$ και $|F_c|$ είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως. R_{free} είναι η αντίστοιχη τιμή R value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στην βελτιστοποίηση.



Σχήμα 19. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o - F_c$ του προσδετη 2 στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβίωσης, η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera ¹⁰⁰

Κατά τη σύνδεση της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, η ένωση 2 αναπτύσσει 15 δεσμούς υδρογόνου (Πίνακας 8) και 126 Van der Waals αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 20) .

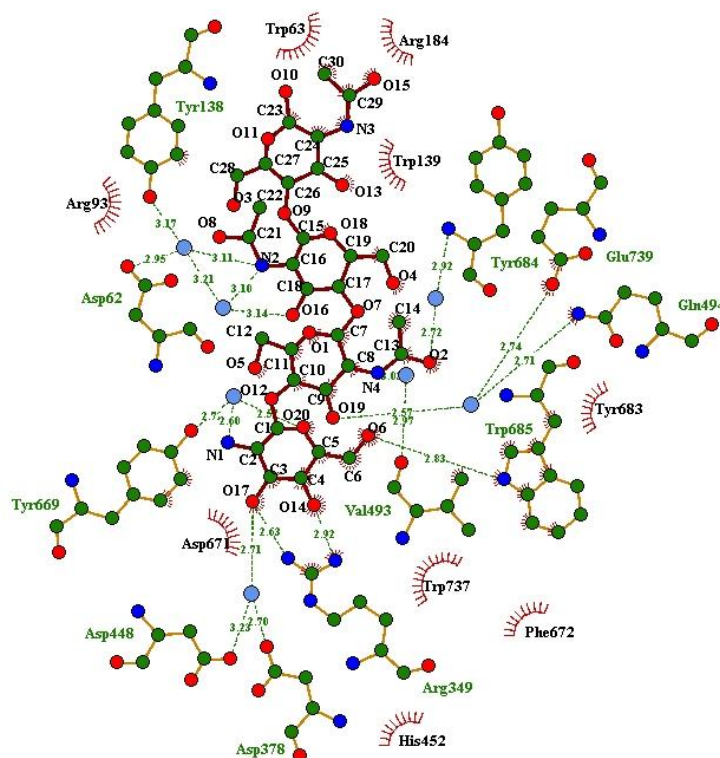
Πίνακας 8. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 2 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
N1	Wat571 O	2.6	–
O2	Wat241 O	2.7	–
N2	Wat367 O	3.1	–
	Wat560 O	3.1	–
N4	Wat72 O	3.0	–
O6	Asp671 OD2	2.7	138.7
	Trp685 NE1	2.8	168.3
O14	Arg349 NH1	2.9	135.9
	Glu739 OE2	2.3	130.3
O15	Wat538 O	2.7	–
O16	Wat560 O	3.1	–
O17	Arg349 NH2	2.6	158.1
	Wat537 O	2.7	–
O19	Wat33 O	2.6	–
O20	Wat571 O	2.6	–
Σύνολο	15		

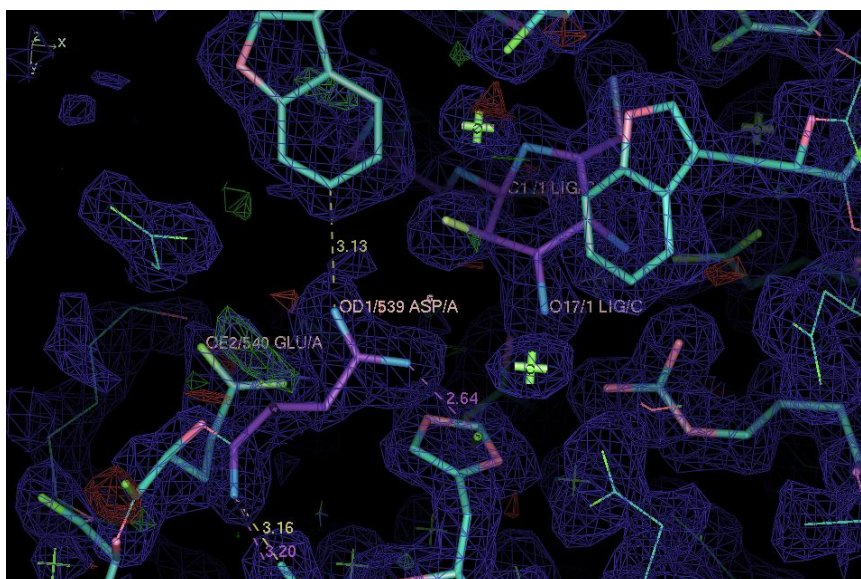
Πίνακας 9. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 2 και των μορίων ύδατος και των αμινοξέων της χιτοβιάσης

Ατομο αναστολέα	Άτομα πρωτεΐνης/διαλύτη	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
C1	Wat571 O	1
C2	Wat 871 O	1
C3	Trp 737 CZ3, CH2, CZ2, CE3; Wat 571 O; Arg 349 NH2; Wat 537 O	7
C4	Trp 737 CE2, CZ3, CH2, CZ2, CG, CD2, CE3, NH1, OE2; Wat 571;	10
C5	Trp 737 NE1, CE2, CG, CD1, CD2; Wat 571 O;	6
C6	Trp 685 NE1; Trp 737 CB, CG, CD1, OD2; Wat 75; Glu 739 OE2	7
C7	Trp 685 CB, CG, CD1	3
C8	Trp 685 CD1; Wat 72 O	2
C9	Val 493 CG1; Gln 494 NE2; Wat 33 O; Wat 72 O	4
C10	Val 493 CG1; Gln 494 NE2	2
C11	Val 493 CG1	1
C13	Wat 241 O; Tyr 683 CE2, CD2	3
C14	Arg93 NH1; Wat 242 O; Wat 72 O; Tyr 683 CE2, CD2	
C16	Wat 560 O	1
C20	Wat 380 O; Arg 93 NH1	2
C21	Wat 367 O	1
C22	Wat 149 O; Wat 367 O	2
C23	Arg 713 NH2	1
C24	Arg 713 NH2	1
C25	Trp 63 CD1	1
C29	Wat538 O; Trp 63 CB, CG	3
C30	Wat 538 O; Arg 713 NH2; Arg 184 NH1, NH2;	4
O1	Trp 685 CD2, CG, CD1, NE1, CE2	5
O2	Trp 685 CB, CG, CD1, Tyr 683 CD2	4
O3	Trp 644 NE1	1
O4	Wat 154 O; Wat 380 O; Trp 685 CB; Arg 93 NH1	4
O5	Trp 685 CH2, CE2, CZ2	3
O6	Tyr 669 CE2, CD2; Phe 672 CE1; Trp 685 CD1, CE2; Asp 671 CG; Trp 737 CD1; Asp671 OD2	8
O7	Wat 154 O;	1

O12	Wat 571 O; Trp 685 NE1	2
O18	Tyr 138 CE1, CZ	2
O19	Gln 494 NE2, Glu 739 OE2	
O13	Trp 139 CZ2, CH2	2
O14	Wat 33 o; Trp 737 CG, CD2, CE3, CD, OE1, CZ	7
O15	Trp 63 CB, CG; Ser 65 OG	3
O17	Trp 737 CZ3; His 452 ND1, CE1, NE2; Arg 349 CZ, NH1	6
O20	Trp 685 NE1, CE2, CZ2	3
N3	Trp 63 CB, CD1, NE1,	4
N4	Wat 154 O	1
	Σύνολο	126

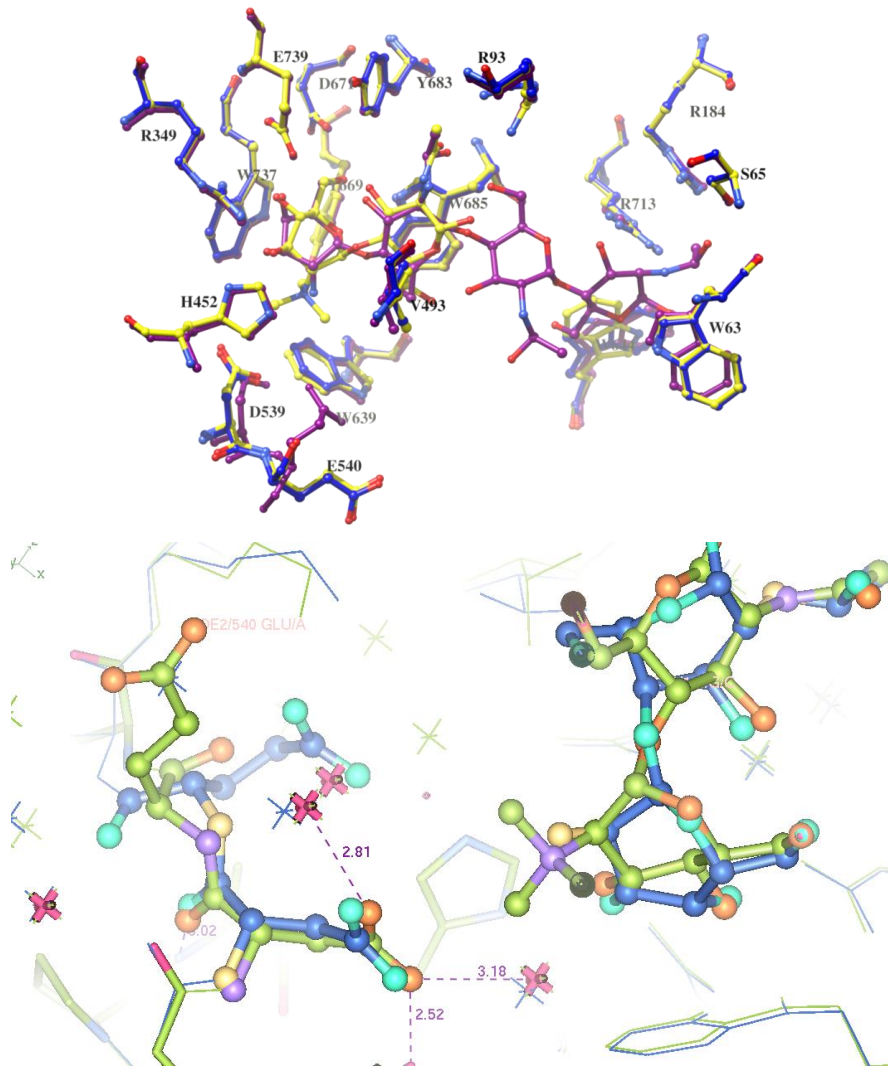


Σχήμα 20. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 2 κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό, η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT*⁹⁹



Σχήμα 21. Σχηματική απεικόνιση της ένωσης 2 στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης με έμφαση στη σχετική της θέση ως προς το καταλυτικό αμινοξύ Asp539

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση του συμπλόκου χιτοβιάση:ένωση 2 με τη νέα δομή του ενζύμου αλλά και με αυτήν του συμπλόκου χιτοβιάση: ένωση 1 (Σχήμα 22). Παρατηρήθηκε ότι η πλευρική αλυσίδα του Glu540 κατά τη σύνδεση της ένωσης 2 στο καταλυτικό κέντρο υφίσταται στρέψη των διεδρων γωνιών της και συγκεκριμένα κατά $\chi_1 \sim 155^\circ$, $\chi_2 \sim 120^\circ$ και $\chi_3 \sim 68^\circ$. Η αλλαγή αυτή ίσως οφείλεται στην απουσία της τριμέθυλο- ομάδας και στην ανακατάταξη που υπέστη το δίκτυο των μορίων ύδατος στην περιοχή. Η πλευρική αλυσίδα του Glu540 προσανατολίζεται προς το κέντρο σύνδεσης του σακχάρου.



Σχήμα 22. (Πάνω) Υπέρθηση της φυσικής δομής της χιτοβιάσης (μπλέ) με το σύμπλοκο χιτοβιάση:ένωση 1 (κίτρινο) και το σύμπλοκο χιτοβιάση-ένωση 2 (μωβ), (Κάτω). δίδεται έμφαση στα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και στη διαμόρφωση που λαμβάνουν στις δύο δομές των συμπλόκων του ενζύμου με την ένωση 1 (πράσινο) και με την ένωση 2 (μπλε)

Οι κινητικές μελέτες για την ένωση 2 με το ένζυμο είχαν δείξει ότι αυτή εμφάνιζε την ασθενέστερη αναστολή (σε σχέση με τις άλλες δύο ενώσεις που μελετώνται στην παρούσα εργασία). Ο τρόπος σύνδεσης της ένωσης και οι μεταβολές που προκαλεί μπορεί να ερμηνεύσει την ασθενέστερη συγγένεια που επιδεικνύει αυτή η ένωση έναντι της ένωσης 1, η οποία δεν προκάλεσε κάμια αλλαγή κατά τη σύνδεσή της. Επιπλέον στη δημοσιευμένη εργασία των Halila et al ⁸⁰. σύμφωνα με τα αποτελέσματα NMR που συνέλεξαν είχε διατυπωθεί η υπόθεση ότι η ασθενέστερη αναστολή οφείλεται στην στερεοδιάταξη του πρώτου γλυκοπυρανοζικού δακτυλίου κάνοντας την

παραδοχή ότι το πρώτο κατάλοιπο της ένωσης που φέρει την $-NH_2$ ομάδα έχει στον χώρο διαμόρφωση ανάκλιντρου σε αντίθεση με τα υπόλοιπα που λαμβάνουν διαμόρφωση λουτήρα. Η υπόθεση αυτή δεν επιβεβαιώνεται από τα δομικά αποτελέσματα μια και η ηλεκτρονιακή πυκνότητα υποδεικνύει ότι τόσο στην πρώτη όσο και σε αυτήν την ένωση η διαμόρφωση είναι αυτή του λουτήρα.

3.4 Δομικές μελέτες του συμπλόκου της χιτοβιάσης με την ένωση 3 CO-IV (NMe₃)

Η τελευταία ένωση η οποία μελετήθηκε ήταν η ένωση 3, για την οποία συλλέχθηκαν δεδομένα σε ευκρίνεια 1.98 Å στο EMBL-Hamburg outstation. Η συγκέντρωση της ένωσης 3 ήταν 10 mM ενώ η διάρκεια εμφάνισης του κρυστάλλου στο διάλυμα αυτής διήρκεσε 25min, δηλαδή περισσότερο χρόνο έναντι των δύο προηγούμενων συμπλόκων. Υπολογισμός χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας έδειξε στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης υπήρχε σαφώς ορισμένη πυκνότητα που υποδείκνυε ξεκάθαρα τη σύνδεση όλων των δακτυλίων της ένωσης (Σχήμα 23). Τα στατιστικά στοιχεία που αφορούν στα δεδομένα που συλλέχθηκαν καθώς και την τελική δομή περιγράφονται στον Πίνακα 10

Πίνακας 10. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 3

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Μονοκρύσταλλος χιτοβιάσης εμφάνιστηκε σε υδατικό διάλυμα της ένωσης 3 συγκέντρωσης 10 mM CO-IV (NMe ₃) για 25min.
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	EMBL-Hamburg outstation, P14, 09.12.2012
Μήκος κύματος (Å)	1.3776
Απόσταση (mm)	247.58
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.1
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	1800 (180°)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	<i>P12₁1</i>

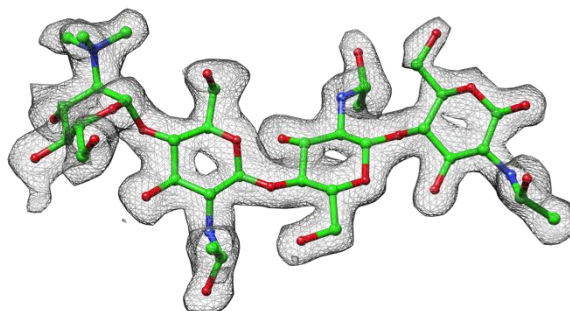
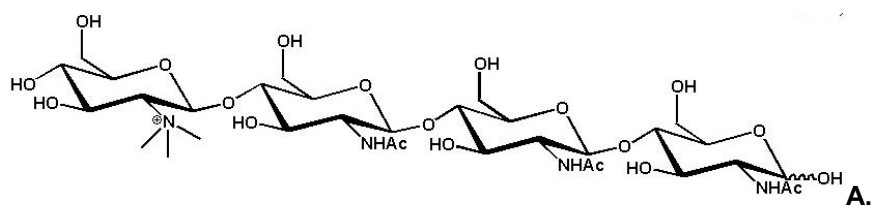
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	a=53.9, b=132.4, c=62.5 α=γ=90.0, β=100.9
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	100-1.98
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	171392 (22809)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	58256 (8455)
R_{merge}^a (εξωτερική στοιβάδα)	0.075 (0.456)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	97.6 (97.0)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.09 (1.98)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^b$ (εξωτερική στοιβάδα)	8.5 (2.2)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	2.9 (2.7)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å ²) (Wilson plot)	30.2
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	100-1.98
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	39241 (1903)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	28-885
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6883
Αριθμός μορίων ύδατος	449
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R_{free})	0.166 (0.199)
R (R_{free}) (εξωτερική στοιβάδα)	0.244 (0.277)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.008
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.279

^a $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου $\langle I_h \rangle$ και I_{ih} είναι η μέση και η i^{th} μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων h , αντιστοίχως. ^b $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση I . ^cΚρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$, όπου $|F_o|$ και $|F_c|$ είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως. R_{free} είναι η αντίστοιχη τιμή R value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στην βελτιστοποίηση.

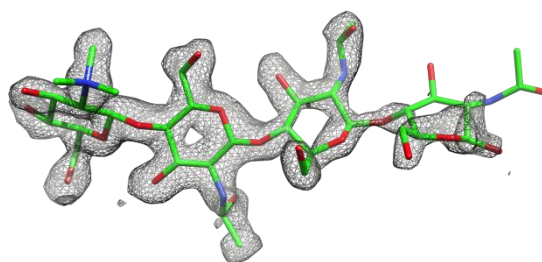
Η ένωση 3 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης αναπτύσει 18 δεσμούς υδρογόνου (Πίνακας 11) και 163 Van der Waals αλληλεπιδράσεις (Πίνακας 12). Ο τρόπος σύνδεσης είναι πανομοιότυπος με αυτόν των δύο προηγούμενων ενώσεων (Σχήμα 24).

Πρόσθετη πυκνότητα παρατηρήθηκε και σε μια επιπλέον θέση του ενζύμου, που ανήκει επίσης στη δομικά αυτοτελή περιοχή III, για την οποία δεν έχουν κάνει λόγο άλλες μελέτες έως σήμερα. Αυτή οριοθετείται από τα αμινοξέα (781-789) καθώς επίσης και από αμινοξέα που προέρχονται από τη γειτονική, συμμετρική υπομονάδα της χιτοβιάσης της ίδιας περιοχής III' (403'-407') καθώς και με αμινοξέα της περιοχής I' (Asp156) (Σχήμα 26). Σε αυτήν τη θέση πρόσδεσης, η διαμόρφωση που λαμβάνει η πρώτη μονάδα εξόζης είναι αυτή του ανάκλιντρου, σε αντίθεση με την αντίστοιχη διαμόρφωση στο καταλυτικό κέντρο που είναι λουτήρας.

Η ποιότητα του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι αρκετά καλή για τους δύο πρώτους δακτυλίους ενώ ασθενέστερη για τους δύο τελευταίους (Σχήμα 23). Κατά τη σύνδεσή της στο νέο αυτό κέντρο, η ένωση σχηματίζει 14 δεσμούς υδρογόνου και 129 Van der Waals αλληλεπιδράσεις. (Πίνακας 13, Σχήμα 25)



B.



Γ.

Σχήμα 23. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o - F_c$ του προσδετη 3 στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβίασης (αριστερά) και σε ένα νέο, επιπλέον κέντρο σύνδεσης, η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera ¹⁰⁰

Πίνακας 11. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 3 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης

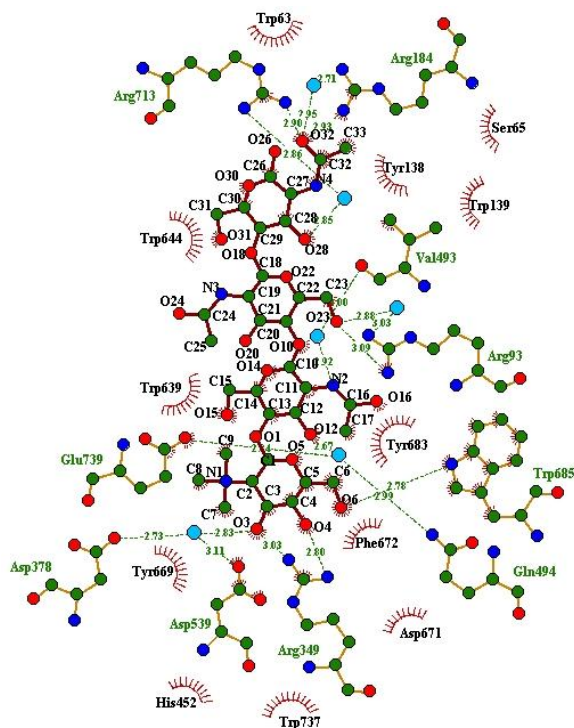
Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
N2	Wat57 O	2.9	-
O3	Arg349 NH2	3.0	150.5
	Wat17 O	2.7	-
N3	Wat223 O	3.0	-
O4	Arg349 NH1	2.8	143.0
	Glu739 OE2	2.5	120.4
O6	Asp671 OD2		-
	Trp685 NE1	2.8	175.4
O12	Wat28 O	2.7	-
O20	Wat183 O	2.8	-
O23	Arg93 NH1	3.1	164.8
	Wat180 O	2.9	-
O26	Wat453 O	2.7	-
O28	Wat444 O	2.9	-
O31	Wat238 O	3.2	-
O32	Arg184 NH1	2.9	129.9
	Arg713 NH2	2.9	153.2
	Wat422 O	2.7	-
Σύνολο	15		

Πίνακας 12. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 3 και των μορίων ύδατος και των αμινοξέων στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης

Άτομο αναστολέα	Άτομα πρωτεΐνης/διαλύτη	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
C1		
C2	Wat 350 O	1
C3	Trp 737 CE3, CZ3, CH2; Wat 17 O	4
C4	Glu 739 OE2	1
C5	Trp 737 CD1, CD2, CG	3
C6	Trp 685 NE1; Glu 739 OE2; Asp 671 OD2; Trp 737 C,CG; Wat 60 O	6

C7	Tyr 669 OH; Trp 737 CE2, CZ2	3
C8	Asp 539 OD1, CG, OD2; Trp 737 CH2; Wat 17 O	5
C9	Trp 639 CZ3, CH2, CZ2; Wat 351 O; Wat 350 O	5
C11	Trp 685 CG, CD1; Wat 57 O	3
C12	Trp 685 CD1; Wat 28	2
C13	Trp 685 CD1, NE1, CE2	3
C14	Val 493 CG1	1
C15	Wat 351 O	1
C16	Wat 177 O; Tyr 683 CE2; Arg 93 NH1; Wat 57 O	4
C17	Trp 685 CD1, CB; WAt 177 O; Wat 180 O; Tyr 183 CE2, CD2, CG; Wat 178 O	8
C18	Wat 238 O; Wat 237 O	2
C19	Wat 223 O; Wat 183 O	2
C20	Wat 223 O; Wat 183 O	2
C21	Wat 183 O; Wat 348 O	2
C22	Wat 237 O; Wat 444 O	2
C23	Wat 444 O; Wat 348 O; Tyr 138 CE1; Wat 180 O; Arg 93 NH1	5
C24	Wat 353 O; Wat 122; Wat 346 O; Wat 183 O	4
C25	Wat 353 O; Wat 122;	2
C26	Wat 453 O; Trp 63 NE1	2
C27	Arg 713 NH2; Trp 63 CD1	2
C28	Trp 63 CD1, NE1; Wat 444	3
C29	Wat 444 O	1
C30	Trp 63 NE1; Wat 353 O	2
C31	Wat 353 O	1
C32	Wat 422 O; Trp 139 CH2; Arg 184 NH1	3
C33	Wat 422 O; Wat 423 O; Trp 63 CB; Ser 65 OG; Trp 139 CH2	5
O1	Wat 350 O; Gln 494 NE1	2
O3	Arg 349 CZ; His 452 CE1, NE2; Gln 494 NE2; Arg 349 NH1	5
O4	Trp 737 CD2, CE3, CZ3; Arg 349 CZ, NH2; Trp 737 CB, CG; Glu 739 CD, OE1	9
O5	Trp 685 NE1, CE2, CZ2	3
O6	Tyr 669 CE2, CD2; Phe 672 CE1; Trp 685 CD1, CE2; Trp 737 CD1; Asp 671 CG, OD1	8

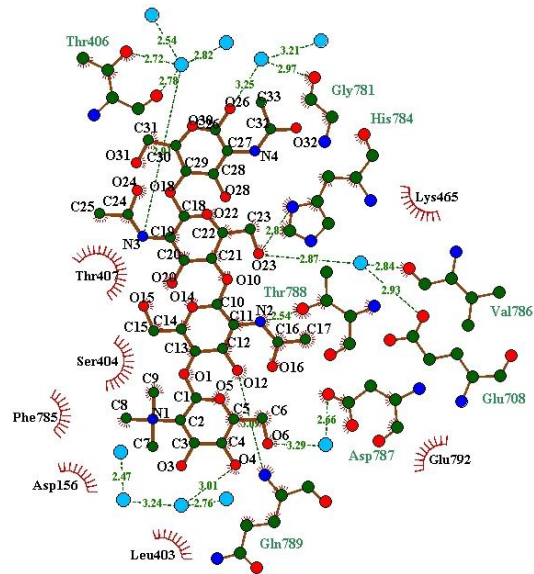
O10	Wat 348 O; Trp 685 CB	
O12	Trp 685 CD1, NE1; Tyr 683 CE2, CD2	4
O14	Trp 685 CD2, CG	2
O15	Trp 685 CD2, CE3, CZ3, CH2, CE2, CZ2; Trp 639 CZ3, Wat 223 O;	8
O16	Tyr 698 CE2, CD2, CZ; Arg 93 NH1; Wat 178 O; Wat 57 O; Wat 201 O	7
O18	Wat 353 O	1
O20	Val 493 CG1	1
O22	Wat 237 O; Wat 444 O; Tyr 138 CE1	3
O23	Wat 348 O	1
O24	Wat 237 O	1
O26	Arg 713 NH2	1
O28	Trp 139 CH2, CZ2; Tyr CE1	3
O30	Trp 644 CH2, Wat 453 CH2	2
O31	Trp 644 CZ3, CH2	2
O32	Arg 184 NH2; Arg 713 CZ, NH1; Arg 184 CZ	4
N2	Wat 348 O	1
N4	Trp 63 CD1, NE1, CB, CG	4
	Σύνολο	163



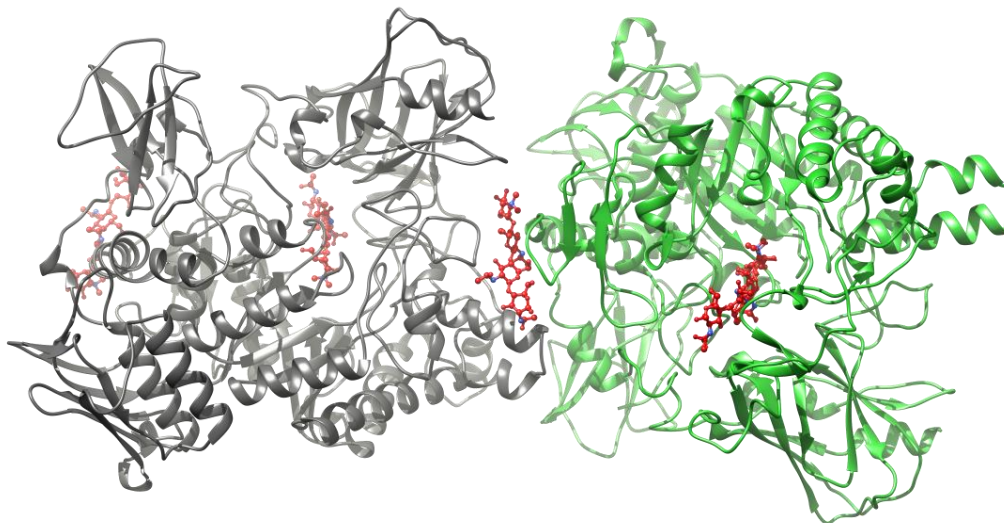
Σχήμα 24. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 3 κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό, η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT*⁹⁹

Πίνακας 13. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 3 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο νέο κέντρο σύνδεσης της χιτοβιάσης

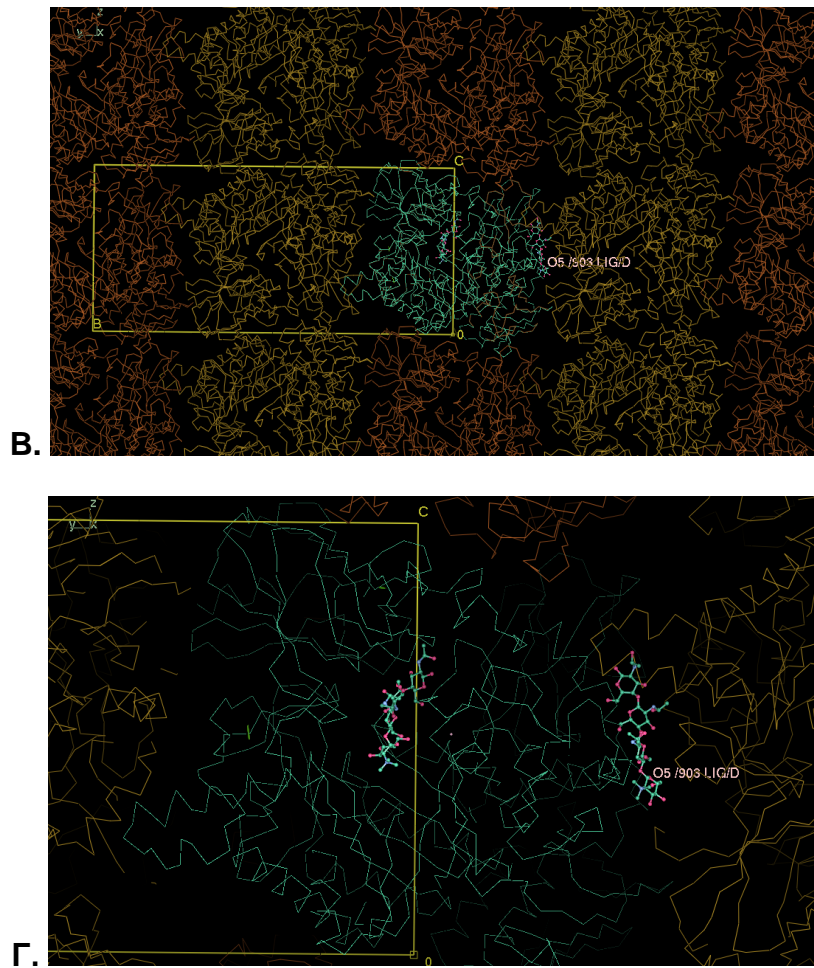
Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
N2	Thr788 OG1	2.5	144.8
O5	Asp787 OD1	3.0	98.3
O6	Asp787 OD1	2.7	99.2
	Wat452 O	3.3	-
O12	Asp787 OD1	2.9	141.2
	Gln789 N	3.1	161.7
O15	His784 O	2.9	140.7
O23	His784 ND1	2.9	154.0
	Wat367 O	2.9	-
O26	Gly781 O	3.2	138.9
	Wat451 O	2.2	-
O30	Gly781 O	2.7	125.5
Σύνολο	12		



Σχήμα 25. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 3 κατά τη σύνδεσή του περιφερικά του ενζύμου στην δομική περιοχή IV, οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό, η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT*⁹⁹

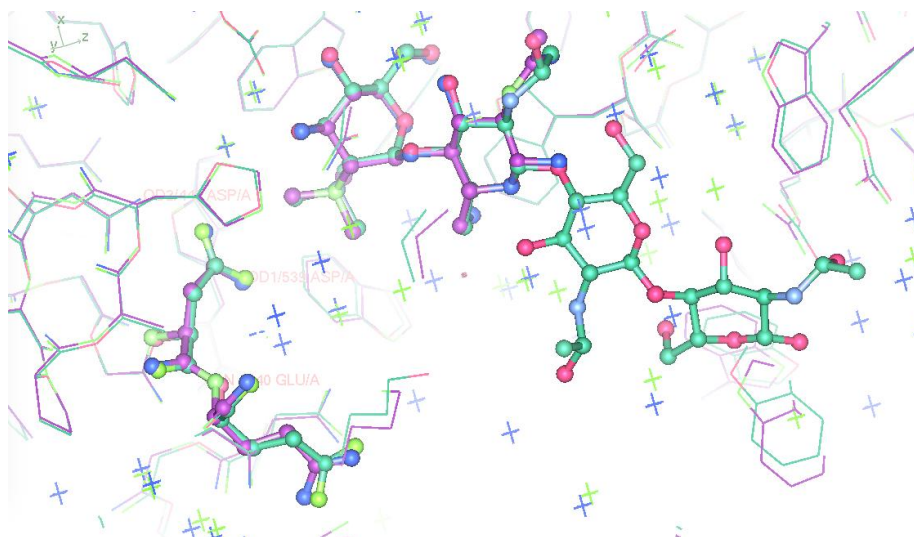


A.



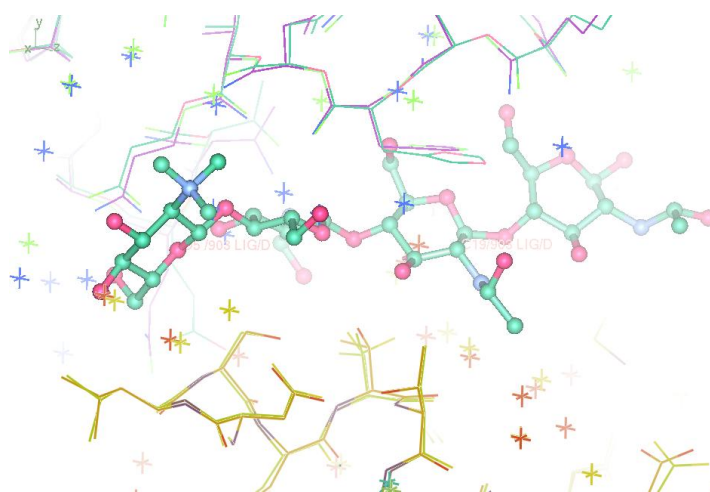
Σχήμα 26. Σχηματική αναπαράσταση της δεύτερης θέσης πρόσδεσης μεταξύ των δύο συμμετρικών μορίων (υποδεικνύονται με γκρι και πράσινο χρώμα) (Α) καθώς και της διευθέτησης των μορίων στην μοναδιαία κυψελίδα (Β, Γ), υποδεικνύονται οι σχετική θέση των δύο μορίων της ένωσης 3, η διεύθυνση της b διάστασης της κυψελίδας είναι σε οριζόντια παράλληλα με το επίπεδο της εικόνας

Ακολούθησαν μελέτες υπέρθεσης της δομής του συμπλόκου χιτοβιάση:ένωση 3 με αυτήν του συμπλόκου χιτοβιάση:ένωση 1, μια και οι δύο αναστολείς διαφέρουν μόνο ως προς το πλήθος των μονάδων εξόζης. Παρατηρήθηκε ότι δεν παρουσιάζονται σημαντικές μεταβολές στα καταλυτικά αμινοξέα ή στα αμινοξέα που συνθέτουν το ευρύτερο κέντρο σύνδεσης (Σχήμα 27).



Σχήμα 27. Υπέρθωση της δομής του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 3 (πράσινο) με τη δομή του το σύμπλοκο χιτοβιάση:ένωση 1 (μωβ)

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση των παραπάνω δομών στη νέα θέση σύνδεσης του αναστολέα (Σχήμα 28).



Σχήμα 28. Υπέρθωση της δομής του συμπλόκου χιτοβιάσης:ένωση 3 (πράσινο) με τη δομή του το σύμπλοκο χιτοβιάση:ένωση 1 (μωβ) στη δεύτερη θέση σύνδεσης, με αποχρώσεις του κίτρινου υποδεικνύονται τα αμινοξέα της συμμετρικής υπομονάδας και για τα δύο σύμπλοκα

Η σύγκριση των συμπλόκων έδειξε ότι ούτε σε αυτήν την περιοχή προκαλούνται ιδιαίτερες μεταβολές ωστόσο αλλάζουν οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων His784 (η χ_1 υφίσταται στρέψη κατά 30°), Glu792 (η χ_2 κατά 131°) και τέλος στο αμινοξύ Gln770 (η χ_1 και η χ_3 έχουν στραφεί κατά 125° και

150°, αντίστοιχα). Μια επιπλέον αλλαγή επίσης παρατηρείται στο αμινοξύ Asp156, η δίεδρες γωνία χ2 στρέφεται κατά ~40°.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας στην περίπτωση του συμπλόκου με την ένωση 3 αλλάζουν ως προς τον δεύτερο άξονα. Πιο συγκεκριμένα ο η τιμή για το b αυξάνει ~6 Å γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της ένωσης 3 μεταξύ των συμμετρικών υπομονάδων της χιτοβίασης προκειμένου να φιλοξενηθεί στο νέο κέντρο σύνδεσης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αυτά των κινητικών μελετών μια και η ένωση 3 εμφάνισε ελαφρώς ασθενέστερη αναστολή από την ένωση 1 και πολύ καλύτερη από την 2. Αν και η ένωση 3, ως προς την 1 διαφέρουν μόνο στο πλήθος των μονάδων εξοζών και συνολικά οι δομικές αλλαγές που προκαλούνται κατά τη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου δεν είναι σημαντικές, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η μείωση του K_i ενδεχομένως να οφείλεται στις όποιες μεταβολές προκαλούνται λόγω της διευθέτησης των μορίων μέσα στην μοναδιαία κυψελίδα, η οποία είναι ελαφρώς μεγαλύτερη ως προς την δεύτερη της διάσταση.

3.5 Συγκριτικές μελέτες της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης και της χιτοβιάσης από *S. marcescens*

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις για τις β-εξοζαμινιδάσες των οποίων οι τρισδιαστατές δομές είχαν ήδη προσδιορισθεί. Η β-εξοζαμινιδάση απαντάται στον ανθρώπινο οργανισμό σε τρεις ισομορφές HexA, HexB και HexS εκ των οποίων η μεν HexA αποτελείται από ένα ετεροδιμερές (α, β), η HexB, HexS από ομοδιμερή (β, β) και (α, α), αντιστοίχως⁷². (βλ. §1.5.1.1)

3.5.1 Ομολογία της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης στην αμινοξική ακολουθία με τη χιτοβιάση από *S. marcescens*

Για τη σύγκριση της χιτοβιάσης με την ανθρώπινη εξοζαμινιδάση ως προς την αμινοξική τους ακολουθία, χρησιμοποιήθηκαν γνωστά εργαλεία όπως το Blast, ClustalW και ESPript 3.0 [100-103].

HexA, HexB vs χιτοβιάση από *S. marcescens*

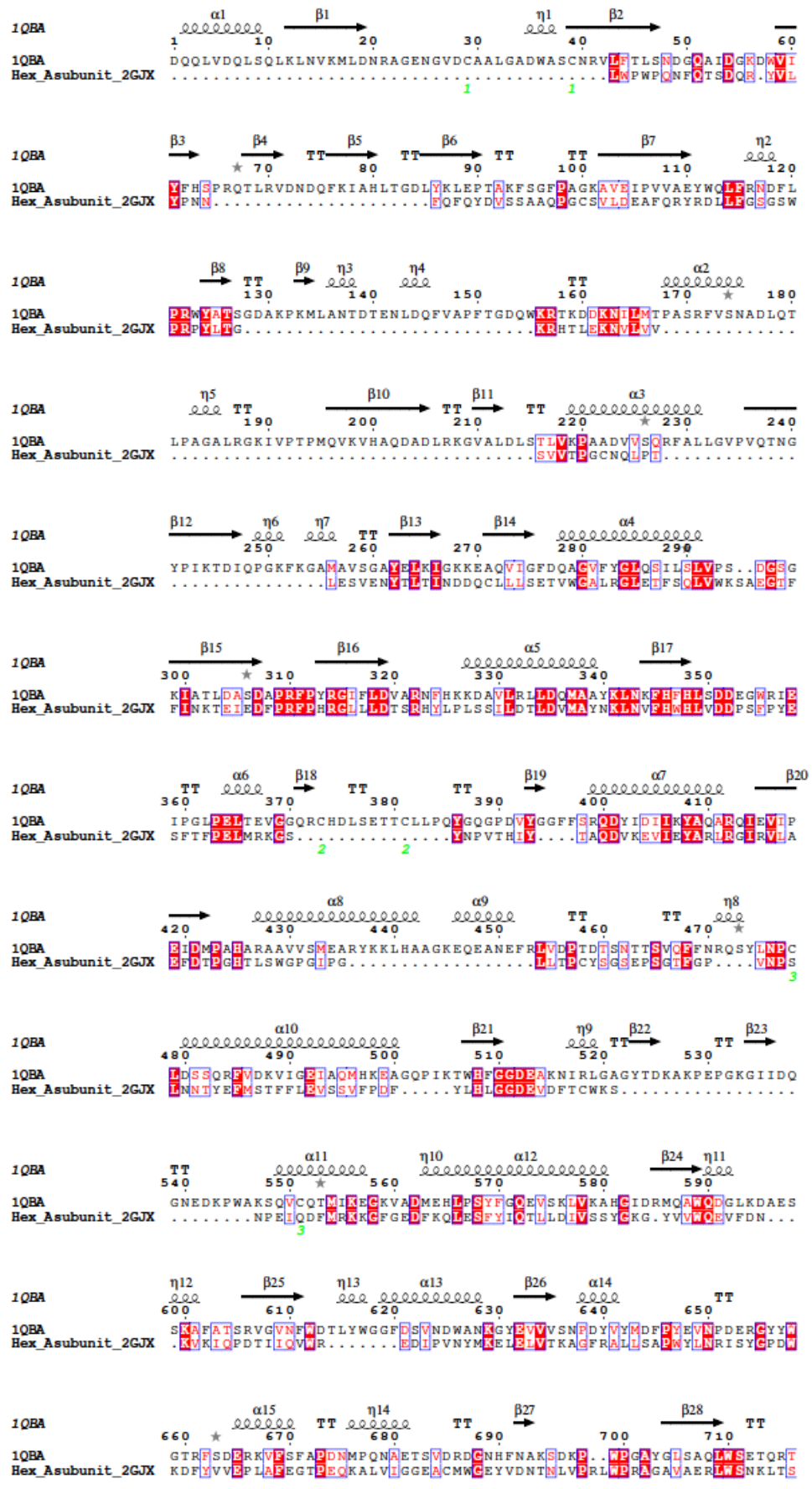
Αρχικά έγιναν συγκρίσεις που αφορούσαν σε ολόκληρη την αμινοξική ακολουθία της χιτοβιάσης (857 αα από 885 αα) με κάθε υπομονάδα τόσο της HexA όσο και της HexB.

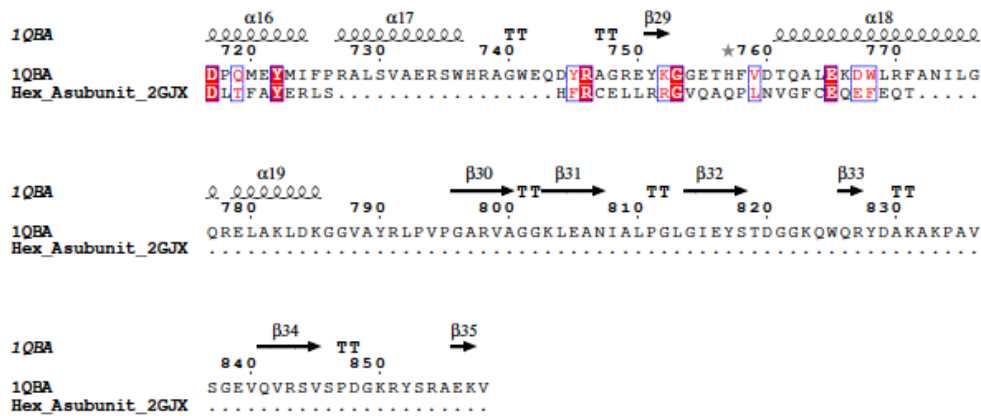
Για την μεν Hex, η οποία αποτελείται από ένα ετεροδιμερές που φέρει δύο υπομονάδες α και β η σύγκριση της χιτοβιάσης με την α υπομονάδα (507 αα) έδωσε 20.1 % ταυτότητα μεταξύ των αμινοξέων για κάλυψη της αμινοξικής ακολουθίας σε ποσοστό 59.1% (Σχήμα 29). Αντίστοιχα, η σύγκριση της χιτοβιάσης με την β υπομονάδα (507 αα) της HexA έδωσε 16.6% ταυτότητα για κάλυψη της αμινοξικής ακολουθίας σε ποσοστό 59.1%.

Παρά το γεγονός ότι τα παραπάνω ποσοστά δεν υψηλά, λεπτομερέστερη ανάλυση των αμινοξέων που βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο της χιτοβιάσης και της εξοζαμινιδάσης και αλληλεπιδρούν με το παράγωγο του GlcNAc φαίνεται να είναι συντηρημένα. Για λόγους σύγκρισης θα διατηρηθεί η αρίθμηση των αμινοξέων της χιτοβιάσης. Ειδικότερα, τα καταλυτικά αμινοξέα Asp539, Glu540 είναι παντού συντηρημένα (χιτοβιάση, α-υπομονάδα και β-

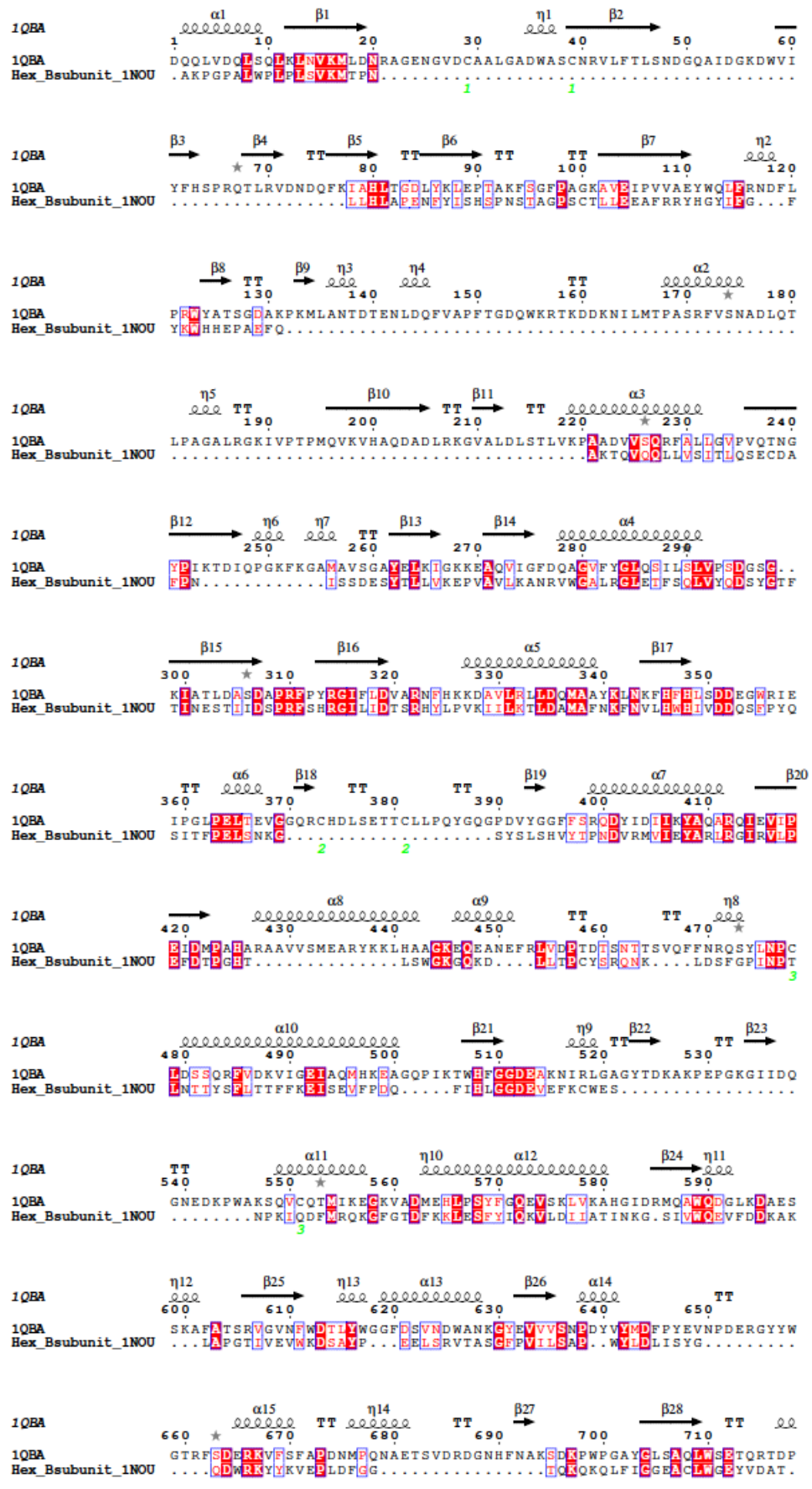
υπομονάδα της Hex). Επίσης, παρατηρείται ότι το ενεργό κέντρο της χιτοβιάσης είναι πλούσιο σε θρυπτοφάνες, οι οποίες φαίνεται να συμμετέχουν στο σύνδεση του υποστρώματος αλληλεπιδρώντας είτε με δεσμούς υδρογόνου είτε με van der Waals αλληλεπιδράσεις με τον προσδέτη. Γι' αυτόν τον λόγο δόθηκε έμφαση σε αυτά τα αμινοξέα και εξετάστηκε αν είναι συντηρημένα στις α- και β- υπομονάδες της Hex. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώνουν ότι σχεδόν όλα τα κατάλοιπα θρυπτοφάνης τα οποία αλληλεπιδρούν με την ένωση 1 στη δομή του συμπλόκου χιτοβιάση:ένωση 1 (

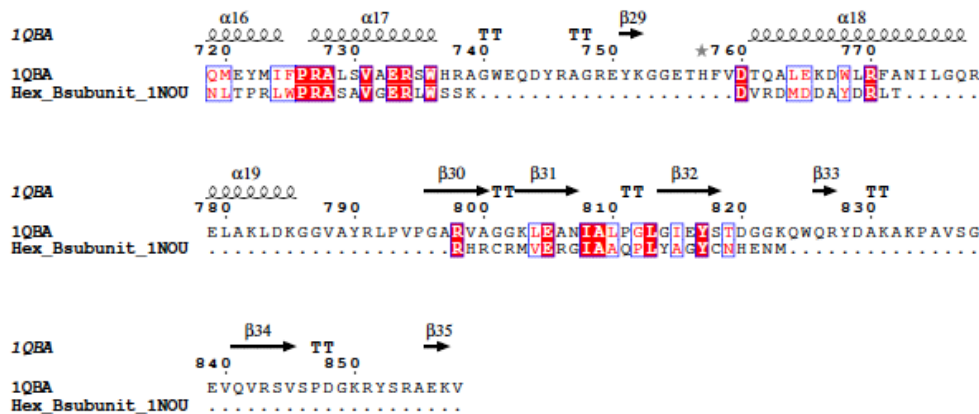
Πίνακας 5) διατηρούνται και στην Hex. Συγκεκριμένα η Trp639 και η Trp685 είναι συντηρημένες στην HexA-α (ως Trp612 και Trp658, αντιστοίχως) και η Trp737 (ως Trp709) και στην HexA-α και στην HexA-β. Επιπρόσθετα, ελέγχθηκαν και τα υπόλοιπα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με την ένωση 1 και βρέθηκε ότι τα αμινοξέα Arg349 και His452 (ως Arg322 και His425) διατηρούνται και στις δύο υπομονάδες καθώς και το Glu739 (ως Glu712) παραμένει συντηρημένο στην HexA-β.





Σχήμα 29. Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας της χιτοβιάσης (από την κατατεθειμένη στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων δομή 1QBA) με την α υπομονάδα της εξοζαμινιδάσης (από την κατατεθειμένη δομή 2GJX) έδειξε 20.1 % ταυτότητα σε ποσοστό κάλυψης αμινοξέων 59.1%, τα ίδια αμινοξέα υποδεικνύονται με λευκό χρώμα σε κόκκινο φόντο ενώ τα ομόλογα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα σε λευκό φόντο, με πράσινο υποδεικνύονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται ενώ στο σχήμα αποτυπώνονται τα δευτεροταγή στοιχεία της πρωτεΐνης





Σχήμα 30. Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας της χιτοβιάσης (από την κατατεθειμένη στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων δομή 1QBA) με την β υπομονάδα της εξοζαμινιδάσης (από την κατατεθειμένη δομή 1NOU) έδειξε 16.6 % ταυτότητα σε ποσοστό κάλυψης αμινοξέων 59.1%, τα ίδια αμινοξέα υποδεικνύονται με λευκό χρώμα σε κόκκινο φόντο ενώ τα ομόλογα αμινοξέα με κόκκινο χρώμα σε λευκό φόντο, με πράσινο υποδεικνύονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται ενώ στο σχήμα αποτυπώνονται τα δευτεροταγή στοιχεία της πρωτεΐνης

3.5.2 Δομική ομολογία της χιτοβιάσης από *S. marcescens* με την ανθρώπινη εξοζαμινιδάση

Η δομική ομολογία της χιτοβιάσης από *S. marcescens* με την ανθρώπινη εξοζαμινιδάση εξετάσθηκε με τη βοήθεια του εξυπηρετητή Dali και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με βάση το υπολογιζόμενο z-score¹⁰².

Σύγκριση της νέας δομής της χιτοβιάσης ως προς τη δομή της HexA (α,β) με PDB code: 2GJX είναι δομικά ομόλογη με ταυτότητα στα αμινοξέα τους 26% και z-score 35.8. Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αντίστοιχη σύγκριση με τη δομή της HexB (β,β) με PDB code: 1NOU (27% ταυτότητα και z-score 36.5).

Προκειμένου να διερευνηθεί διεξοδικότερα η δομική ομολογία της χιτοβιάσης με την HexA εξετάσθηκαν ξεχωριστά η συνολική δομή αυτής και οι επί μέρους αυτοτελείς περιοχές της με τις α- και β- υπομονάδες της HexA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν συγκρίνεται η δομή ολόκληρης της χιτοβιάσης ως προς την α-υπομονάδα της HexA παρατηρείται ταυτότητα 22 % και αποδίδεται η τιμή z-score 35.4, η οποία αντιστοιχεί σε υψηλή δομική

ομολογία. Οι δομικά αυτοτελείς περιοχές I και IV δεν παρουσιάζουν καμμία δομική ομολογία, ενώ η περιοχή II παρουσιάζει 17 % ταυτότητα και z-score 11.3. Η περιοχή III, καταλυτική περιοχή, ήταν η μόνη που επέδειξε 25 % ταυτότητα και z-score 35.2 αρκετά υψηλό, επιβεβαιώνοντας την προσπάθεια που έχει γίνει να αξιοποιηθεί η χιτοβιάση ως μοντέλο για τη μελέτη του καταλυτικού μηχανισμού της εξοζαμινιδάσης. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αντίστοιχη μελέτη με τη β-υπομονάδα της HexA. Πιο συγκεκριμένα, η συνολική δομή επέδειξε 26% ταυτότητα και z-score 35.7, οι περιοχές I και IV καμία ομολογία, η περιοχή II πολύ χαμηλή (16% ταυτότητα, z-score 11.6) ενώ η περιοχή III ήταν και σε αυτήν την περίπτωση η πλησιέστερη της HexA-β με 26% ταυτότητα και z-score 38.6.

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και για τις επί μέρους αυτοτελείς περιοχές της χιτοβιάσης ως προς τη β-υπομονάδα της HexB. Τα αποτελέσματα, όπως αναμενόταν, ήταν παρεμφερή και πιο συγκεκριμένα ολόκληρη η δομή της χιτοβιάσης επέδειξε 27% ταυτότητα και z-score 36.5, οι περιοχές I και IV δεν έδειξαν καμμία δομική ομολογία, η περιοχή II εξαιρετικά χαμηλή (18% ταυτότητα και z-score 12.1) και η καταλυτική περιοχή, περιοχή III ήταν η πλέον δομικά ομόλογη (με 26% ταυτότητα και z-score 36.3).

3.6 Αναζήτηση άλλων ομόλογων πρωτεϊνών της χιτοβιάσης από το *S. marcescens*

Για τη διερεύνηση επιπρόσθετων ομόλογων πρωτεϊνών της χιτοβιάσης πέραν της εξοζαμινιδάσης, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω αναζήτηση με χρήση του αλγορίθμου BLAST και του εξυπηρετητή Dali όπου υπεβλήθη ολόκληρη η αμινοξική ακολουθία του ενζύμου.

Ο συνολικό αριθμός των αποτελεσμάτων που εμφανίστηκαν μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST έναντι ολόκληρης της ακολουθίας της χιτοβιάσης ήταν 48. Η ανθρώπινη Hex ήταν εικοστή στην σειρά, αφού υπήρχαν πρωτεΐνες με πολύ χαμηλότερα e-value σε σχέση με αυτή. Αξιοσημείωτο είναι πως στην εικοστή θέση εμφανιζόταν η HexB (β,β) (PDB code: 1NOU). (Πίνακας 14)

Πίνακας 14. Κατάλογος των πρώτων είκοσι αποτελεσμάτων του BLAST

		Score	E	
		(Bits)	Value	Ident
Sequences producing significant alignments:				
pdb 1QBB A	Chain A, Bacterial Chitobiase Complexed With Chito...	1777	0.0	100
pdb 1C7T A	Chain A, Beta-N-Acetylhexosaminidase Mutant E540d ...	1772	0.0	99
pdb 1C7S A	Chain A, Beta-N-Acetylhexosaminidase Mutant D539a ...	1771	0.0	99
pdb 3GH4 A	Chain A, Crystal Structure Of Beta-hexosaminidase ...	149	2e-37	28
pdb 4C7G A	Chain A, Structure And Activity Of The Gh20 Beta-n...	141	4e-35	27
pdb 4C7D A	Chain A, Structure And Activity Of The Gh20 Beta-n...	141	4e-35	27
pdb 1HP4 A	Chain A, Crystal Structure Of Streptomyces Plicatu...	139	1e-34	35
pdb 1M04 A	Chain A, Mutant Streptomyces Plicatus Beta-hexosam...	138	5e-34	35
pdb 1M03 A	Chain A, Mutant Streptomyces Plicatus Beta-Hexosam...	137	1e-33	35
pdb 4PYS A	Chain A, The Crystal Structure Of Beta-n-acetylhex...	129	4e-31	26
pdb 3RCN A	Chain A, Crystal Structure Of Beta-N-Acetylhexosam...	120	2e-28	26
pdb 2GK1 A	Chain A, X-Ray Crystal Structure Of Ngt-Bound Hexa	85.9	4e-17	25
pdb 3NSM A	Chain A, Crystal Structure Of Insect Beta-N-Acetyl...	84.7	1e-16	22
pdb 3S6T A	Chain A, Crystal Structure Of Insect Beta-N-Acetyl...	82.8	5e-16	22
pdb 3WMB A	Chain A, Crystal Structure Of Insect Beta-n-acetyl...	82.4	6e-16	21
pdb 3VTR A	Chain A, Crystal Structure Of Insect Beta-n-acetyl...	82.0	8e-16	21
pdb 107A A	Chain A, Human Beta-Hexosaminidase B	81.6	9e-16	24
pdb 3LMY A	Chain A, The Crystal Structure Of Beta-Hexosaminid...	81.6	1e-15	24
pdb 2GK1 B	Chain B, X-Ray Crystal Structure Of Ngt-Bound Hexa	81.6	1e-15	24
pdb 1NOU A	Chain A, Native Human Lysosomal Beta-Hexosaminidas...	81.3	1e-15	24

Αναλυτικότερα, οι πρωτεΐνες που εμφανίζονται να έχουν υψηλότερη ομολογία με τη χιτοβιάση είναι άλλες κατηγορίες εξοζαμινιδασών από διαφορετικούς οργανισμούς όπως *Paenibacillus sp.* (PDB code: 3GH4), *Streptomyces Coelicolor* (PDB code: 4C7G), *Streptomyces Plicatus* (PDB code: 1HP4, 1M04), *Bacteroides Fragilis* (PDB code: 4PYS), *Arthrobacter Aurescens* (PDB code: 3RCN), *Ostrinia furnacalis* (PDB code: 3WMB).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αντίστοιχη αναζήτηση στον Dali server έδειξαν ότι όπως ήταν αναμενόμενο οι δομικά περισσότερο ομόλογες πρωτεΐνες ήταν η φυσική δομή της χιτοβιάσης του *S.marcescens* με PDB code 1QBA z-score 68.9¹⁰², η χιτοβιάση παρουσία του φυσικού της προσδέτη με PDB code 1QBB και z-score 61.3¹⁰² και ακολούθως μεταλλάγματα αυτών με PDB codes 1C7T (z-score 58.2) και 1C7S (z-score 57.9). Μετά από τις προαναφερθήσες και μέχρι την τιμή με z-score 20 ακολούθησαν διάφορες κατηγορίες εξοζαμιζασών πέραν της ανθρώπινης.

Εκτός από την δομή της 1QBA χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο αναζήτησης και η νέα δομή της χιτοβιάσης που προσδιορίσθηκε στα 1.31 Å. Σε αυτή την περίπτωση οι τέσσερις πρώτες δομές που προέκυπταν από την κατάταξη του Dali αντιστοιχούσαν (όπως και προηγουμένως) στις χιτοβιάσες που είναι κατατεθειμένες στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων με εύρος z-score 68.0-56.6 και ακολουθούσαν εξοζαμιινιδάσες από διαφορετικούς μικροοργανισμούς.

Η χιτοβιάση από *S. marcescens* εμφανίζει υψηλή δομική ομολογία με τις N-ακετυλο-γλκοζαμιινιδάσης και τις λακτο-N-βιοζιδάσες. Και στις δύο κατηγορίες η τιμή του z-score > 20 γεγονός που δηλώνει σίγουρη ομολογία της χιτοβιάσης με αυτές τις πρωτεΐνες.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι οι διάφορες κατηγορίες εξοζαμιινιδασών που προέκυψαν από τον Blast εμφανίζονται και στον Dali και μάλιστα με z-score μεγαλύτερα του 20 και ως εκ τούτου η δομική ομολογία αυτών των πρωτεϊνών με τη χιτοβιάση είναι υψηλή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν δομικές μελέτες τριών ενώσεων, παραγώγων GlcNAc, για τα οποία είχε ήδη δειχθεί ότι ήταν ισχυροί αναστολείς της δράσης του ενζύμου της χιτοβιάσης καθώς και της εξοζαμινιδάσης από διάφορους οργανισμούς. Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι της χιτοβιάσης στη φυσική διαμόρφωση της, σε νέες συνθήκες από της προηγούμενα δημοσιευμένη παρουσία PEG3350 και κιτρικού νατρίου. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν δεδομένα περίθλασης με χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας σε υψηλή ευκρίνεια και για τα τρία παράγωγα με τη μορφή συμπλόκου με το ένζυμο. Παράλληλα συλλέχθηκαν δεδομένα για τη δομή της χιτοβιάσης σε υψηλότερη ευκρίνεια από την ήδη γνωστή δομή σε διακριτική ικανότητα 1.31 Å. Με χρήση της ήδη κατατεθειμένης δομής στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων (PDB code 1QBA) προσδιορίστηκε η νέα δομή της χιτοβιάσης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την επίλυση και τον προσδιορισμό και των τριών συμπλόκων χιτοβιάση:ένωση 1, 2, 3. Όλες οι νέες κρυσταλλικές δομές που προέκυψαν ανήκαν στην ομάδα χώρου συμμετρίας $P2_1$ και τα μόρια είχαν διαφορετική διεύθυνση στο χώρο έναντι της αναμενόμενης από την ήδη γνωστή δομή (ομάδα χώρου συμμετρίας $P2_12_12$).

Συγκριτικές μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια έδειξαν ότι η νέα δομή της χιτοβιάσης ήταν καθ' όλα όμοια με την 1QBA στις δομικά αυτοτελείς περιοχές I, II και IV, ενώ εμφάνισε διαφορές στην περιοχή III. Η δομή αυτή προέκυψε από μελέτες που αφορούσαν στην πρόσδεση της ένωσης 2, η οποία όμως δεν συνδέθηκε στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, όπως υπέδειξαν οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, αν και τα καταλυτικά αμινοξέα δεν εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα που προέρχονται από συμμετρικές υπομονάδες σε καμία από τις δύο δομές, δεν συμβαίνει το ίδιο και για το περιβάλλον τους. Στη νέα δομή της χιτοβιάσης η διεύθυνση των μορίων στο κρυσταλλικό πλέγμα αλλάζει (από $P2_12_12$ σε $P2_1$) και προκαλεί μεταβολές στα αμινοξέα

που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με τις συμμετρικές υπομονάδες, οι οποίες διαδίδονται προς το εσωτερικό του μορίου.

Η νέα δομή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συμπλόκων χιτοβιάση:ένωση 1, 2, 3. Και οι τρεις προσδέτες βρέθηκε ότι συνδέονται κατά μήκος του $(\beta\alpha)_8$ -βαρελιού της ενεργής περιοχής του ενζύμου. Ειδικότερα, στο σύμπλοκο χιτοβιάση:ένωση 1 δεν παρατηρήθηκαν διαφορές κατά τη σύνδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου σε σύγκριση με τη δομή στην ελεύθερη διαμόρφωση. Απομάκρυνση της τριμεθυλο-ομάδας (ένωση 2) έδειξε ότι προκαλούνται αλλαγές στο καταλυτικό αμινοξύ Glu540 ενώ ο περιβάλλον χώρος παρέμεινα καθ' όλα ο ίδιος. Επιπλέον, η δομή του συμπλόκου χιτοβιάση:ένωση 2 αποκάλυψε ότι η στερεοδιάταξη της πρώτης μονάδας εξόζης είναι λουτήρας και όχι ανάκλιντρο σε αντίθεση με την υπόθεση που είχε διατυπωθεί από τους Halila et al. 2013 [78]. Για τη λεπτομερέστερη διερεύνηση της σύνδεσης ολιγοσακχαριτών στο καταλυτικό κέντρο διερευνήθηκε η επίπτωση της αύξησης τους πλήθους των μονάδων εξόζης παρουσία της τριμεθυλο-ομάδας (ένωση 3). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ένωση συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο με πανομοιότυπο τρόπο με αυτόν της ένωσης 1, ωστόσο βρέθηκε μια δεύτερη θέση πρόσδεσης για την ένωση αυτή μεταξύ δύο συμμετρικών μορίων χιτοβιάσης. Ο προσδέτης αλληλεπιδρά με δεσμούς υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεις με την περιοχή I' και III' (του συμμετρικού μορίου).

Τα αποτελέσματα των δομικών μελετών συνάδουν με αυτά των κινητικών τα οποία παρατηρήθηκαν από τους Halila et al. 2013[78]. Σύμφωνα με αυτά, η ένωση 1 ήταν ο ισχυρότερος αναστολέας και από την κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ φαίνεται ότι πράγματι δεν προκαλεί μεταβολές κατά τη σύνδεσή του άρα αυτή είναι ενεργειακά ευνοϊκή. Η ένωση 3 ήταν ο δεύτερος καλύτερος αναστολέας, με μόνη διαφορά την αύξηση του πλήθους των μονάδων εξόζης, όμως η ελαφρώς ασθενέστερη αναστολή ενδεχομένως να οφείλεται στην πρόσδεση ενός ακόμα μορίου της ένωσης μεταξύ των συμμετρικών υπομονάδων της χιτοβιάσης, η οποία οδηγεί σε αύξηση της b διάστασης της μοναδιαίας κυψελίδας κατά $\sim 6.0 \text{ \AA}$. Η ένωση 2 παρουσίασε ~ 1200 φορές ασθενέστερη αναστολή της χιτοβιάσης γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη μεταβολή που προκάλεσε στο καταλυτικό αμινοξύ Glu540 κατά τη σύνδεσή

του καθώς και στην απομάκρυνση της τριμεθυλο- ομάδας η οποία φάνηκε να είναι αρκετά ευνοϊκή για τον προσανατολισμό των ολιγοσακχαριτών στο καταλυτικό κέντρο.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις για τη διερεύνηση της ομολογίας της χιτοβιάσης με την ανθρώπινη εξοζαμινιδάση σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας και τρισδιάστατης δομής. Πιο συγκεκριμένα, η στοίχιση της αμινοξικής ακολουθίας της χιτοβιάσης με τις υπομονάδες α και β της Hex έδειξε ότι τα δύο καταλυτικά αμινοξέα Asp539 και Glu540 είναι συντηρημένα. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι το ενεργό κέντρο της χιτοβιάσης είναι πλούσιο σε θρυπτοφάνες, οι οποίες φαίνεται να συμμετέχουν στη σύνδεση του υποστρώματος αλληλεπιδρώντας είτε με δεσμούς υδρογόνου είτε με van der Waals αλληλεπιδράσεις με τον προσδέτη. Αυτά τα αμινοξέα βρέθηκαν ότι διατηρούνται τόσο στην α - όσο και στην β -υπομονάδα της Hex.

Ως προς τη δομική ομολογία, η χιτοβιάση και η ανθρώπινη β -εξοζαμινιδάση επιδεικνύουν z-score ~ 35 που αντιστοιχεί σε υψηλή συμφωνία μεταξύ των δύο, γεγονός που επιβεβαιώνει τις προσπάθειες που έχουν γίνει έως σήμερα να αξιοποιηθεί η χιτοβιάση ως μοντέλο για την καλύτερη κατανόηση της δομής-δράσης της ανθρώπινης εξοζαμινιδάσης.

Επιπρόσθετα, αναζητήθηκαν άλλες ομόλογες πρωτεΐνες τόσο σε επίπεδο ακολουθίας όσο και σε επίπεδο τρισδιάστατης δομής της χιτοβιάσης. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν την ύπαρξη επιπλέον εξοζαμινιδασών με υψηλότερη ομολογία σε σχέση με την ανθρώπινη καθώς επίσης και άλλων πρωτεϊνών που είναι υπό διερεύνηση.

Η έρευνα που αφορά στη χιτοβιάση και τον μικροοργανισμό από τον οποίο προέρχεται (*Serratia marcescens*) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κι αυτό γιατί η καλύτερη κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού δράσης του ενζύμου θα μπορούσε να οδηγήσει στην αξιοποίησή του για βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπως η αποικοδόμηση σακχάρων. Μια πολύ ενδιαφέρουσα εφαρμογή επίσης αποτελεί η επεξεργασία του ενζύμου με τέτοιο τρόπο ώστε να έχει ιδιότητες σύνθεσης αντί αποικοδόμησης σακχάρων συμβάλλοντας στο έργο των συνθετικών χημικών, αφού και η σύνθεση ολιγοσακχαριτών στο εργαστήριο είναι μια πολύ απαιτητική διαδικασία.

Πέραν της λειτουργίας του ενζύμου και καταλυτικό κέντρο αυτού, ένα άλλο πολύ ενδιαφέρον πεδίο μελέτης του συγκεκριμένου ενζύμου θα ήταν η διερεύνηση του βιολογικού ρόλου που έχουν οι άλλες τρεις δομικά αυτοτελείς περιοχές (I, II, IV).

Επιπρόσθετα ο ρόλος του ενζύμου στην επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό του *Serratia marcescens* αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο έρευνας καθώς ο μικροοργανισμός αυτός έχει συσχετιστεί με νοσοκομειακές λοιμώξεις

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΑ

AoHex	Εξοζαμινιδάση του <i>Aspergillus oryzae</i>
CeHex	Εξοζαμινιδάση του <i>Canavalia ensiformis</i>
EM	electron microscopy (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο)
GalNAc	N-acetylgalactosamine (N-ακετυλογαλακτοζαμίνη)
GlcNAc	N-acetylglucosamine (N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη)
HexA	Hexosaminidase A (Ανθρώπινη εξοζαμινιδάση ισομορφή A)
HexB	Hexosaminidase B (Ανθρώπινη εξοζαμινιδάση ισομορφή B)
HexS	Hexosaminidase S (Ανθρώπινη εξοζαμινιδάση ισομορφή S)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός)
PDB	Protein Data Bank (Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων)
r.m.s.d.	Root mean square deviation (ρίζα των τετραγώνων των αποκλίσεων από τη μέση τιμή)
SDS	Sodium dodecyl sulphate (θειικό νάτριο δωδεκυλο)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (Πύκτωμα πολυακρυλαμίδης για ηλεκτροφόρηση)
Ala (A)	Αλανίνη
Arg (R)	Αργινίνη
Asn (N)	Ασπαραγίνη
Asp (D)	Ασπαραγινικό οξύ
Cys (C)	Κυστεΐνη

Gln (Q)	Γλουταμίνη
Glu (E)	Γλουταμικό οξύ
Gly (G)	Γλυκίνη
His (H)	Ιστιδίνη
Ile (I)	Ισολευκίνη
Leu (L)	Λευκίνη
Lys (K)	Λυσίνη
Met (M)	Μεθειονίνη
Phe (F)	Φαινυλαλανίνη
Pro (P)	Προλίνη
Ser (S)	Σερίνη
Thr (T)	Θρεονίνη
Trp (W)	Θρυπτοφάνη
Tyr (Y)	Τυροσίνη
Val (V)	Βαλίνη

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. K. Ereky, *Biotechnologie der Fleisch-, Fett-, und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe: für naturwissenschaftlich gebildete Landwirte verfasst*, 1919.
2. M. Zand and D. M. I. Narasu, A review article Biotechnology Applications in Medicine, *IRJABS*, 2013, 4,pp. 2557-2563.
3. Α. Μ. Μπατρίνου, *Βιοτεχνολογία Τροφίμων Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα*, 2011.
4. S. Y. Lee, State-of-the-art reviews in industrial biotechnology, *Biotechnol J*, 2012, 7,pp. 166-167.
5. W. L. T. a. H. Zhao, Industrial biotechnology: Tools and applications, *Biotechnol J*, 2009, 4,pp. 1725–1739.
6. W. S. Liu, J. S. Yuan and C. N. Stewart, Advanced genetic tools for plant biotechnology, *Nat Rev Genet*, 2013, 14,pp. 781-793.
7. http://ec.europa.eu/maritimeaffairs/policy/biotechnology/index_el.htm
8. M. Barrett, *Colours of Biotechnology: Blue: a sea of possibility*, 2013.
9. E. J. DaSilva, *The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 2004,p. 7.
10. M. R. S Mosttafiz, M Rahman, *Biotechnology: Role Of Microbes In Sustainable Agriculture And Environmental Healt*, *IJMB*, 2012 Volume 10.
11. S. Ignacimuthu, *Basic Biotechnology*, 2007.
12. W. Albertin, P. Marullo, M. Aigle, C. Dillmann, D. de Vienne, M. Bely and D. Sicard, Population Size Drives Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Alcoholic Fermentation and Is under Genetic Control, *Appl Environ Microb*, 2011, 77,pp. 2772-2784.
13. S. Ostergaard, L. Olsson and J. Nielsen, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Mol Biol R*, 2000, 64,p. 34.

14. D. Samuel, *Science*, Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy, 1996, 273,pp. 488-490.
15. Pasteur, Mémoire sur la fermentation alcoolique, *Ann. Chim. Phys.*, 1860,p. 58.
16. U. E. B. Donalies, H. T. T. Nguyen, U. Stahl and E. Nevoigt, Improvement of *Saccharomyces* Yeast Strains Used in Brewing, Wine Making and Baking, *Adv Biochem Eng Biot*, 2008, 111, 67-98.
17. E. J. Lodolo, J. L. F. Kock, B. C. Axcell and M. Brooks, The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing, *Fems Yeast Res*, 2008, 8, pp. 1018-1036.
18. I. S. Pretorius, Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast*, 2000, 16, 675-729.
19. G. Giraffa, N. Chanishvili and Y. Widyastuti, Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology, *Res Microbiol*, 2010, 161,pp.480-487.
20. J. H. Nelson, Production of Blue Cheese Flavor Via Submerged Fermentation by *Penicillium-Roqueforti*, *J Agr Food Chem*, 1970, 18,pp. 567.
21. N. V. Ashley and D. J. W. Roach, Review of Biotechnology Applications to Nuclear Waste Treatment, *J Chem Technol Biot*, 1990, 49,pp. 381-394.
22. R. a. J. Muzzarelli, P. , *Chitin and Chitinases*, 1999.
23. C. K. Mathews, van Holde, K.E., and Ahern, K.G, Biochemistry, Third edition, *Addison Wesley Longman, Inc. , 2000.*
24. M. N. V. R. Kumar, A review of chitin and chitosan applications,*React Funct Polym*, 2000, 46,pp. 1-27.
25. M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog Polym Sci*, 2006, 31,pp. 603-632.
26. S. Hirano, Chitin biotechnology applications, *Biotechnology annual review*, 1996, 2,pp. 237-258.

27. N. N. Aronson, Jr., B. A. Halloran, M. F. Alexyev, L. Amable, J. D. Madura, L. Pasupulati, C. Worth and P. Van Roey, Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A, *Biochem J*, 2003, 376,pp. 87-95.
28. D. Carlstrom, The Crystal Structure of Alpha-Chitin (Poly-N-Acetyl-D-Glucosamine), *J Biophys Biochem Cy*, 1957, 3,pp. 669-683.
29. R. Minke and J. Blackwell, The structure of alpha-chitin, *JMB*, 1978, 120,pp. 167-181.
30. N. E. Dweltz, Structure of Beta-Chitin, *Biochimica et biophysica acta*, 1961, 51, 283.
31. K. H. Gardner and J. Blackwell, Refinement of the structure of beta-chitin, *Biopolymers*, 1975, 14,pp. 1581-1595.
32. J. Synowiecki and N. A. Al-Khateeb, Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives, *Critical reviews in food science and nutrition*, 2003, 43,pp. 145-171.
33. Muzzarelli, Chitin, *Oxford: Pergamon Press*, 1937, pp. 180-265. .
34. J. D. Hudson SM, *Chitin and chitosan.*, 2003.
35. P. K. Datta, P. S. Basu and T. K. Datta, Isolation and Characterization of Vicia-Faba Lectin Affinity Purified on Chitin Column, *Prep Biochem*, 1984, 14,pp. 373-387.
36. B. Krajewska, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb Tech*, 2004, 35,pp. 126-139.
37. C. Songkroah, W. Nakbanpote and P. Thiravetyan, Recovery of silver-thiosulphate complexes with chitin, *Process Biochem*, 2004, 39,pp. 1553-1559.
38. D. Knorr, Use of chitinous polymers in foods - a challenge for food research and development, *Food Technol*, 1984, p 38.

39. A. N. K. Shinoda, Complex formation of heparin, sulfated cellulose, hyaluronic acid or chondroitin sulfate, *Bull Instit Chem Res Kyoto Univ*, 1975, 53,pp. 392-408. .
40. Y. Kikuchi, Polyelectrolyte Complex of Heparin with Chitosan, *Makromol Chem*, 1974, 175,pp. 2209-2211.
41. S. Hirano, Y. Koishibara, S. Kitaura, T. Taneko, H. Tsuchida, K. Murae and T. Yamamoto, Chitin Biodegradation in Sand Dunes, *Biochem Syst Ecol*, 1991, 19,pp. 379-384.
42. R. N. Tharanathan and F. S. Kittur, Chitin--the undisputed biomolecule of great potential, *Critical reviews in food science and nutrition*, 2003, 43,pp. 61-87.
43. S. Hirano, T. Yamamoto, M. Hayashi, T. Nishida and H. Inui, Chitinase Activity in Seeds Coated with Chitosan Derivatives, *Agr Biol Chem Tokyo*, 1990, 54, pp. 2719-2720.
44. P. R. Austin, C. J. Brine, J. E. Castle and J. P. Zikakis, Chitin - New Facets of Research, *Science*, 1981, 212, pp. 749-753.
45. M. Sugano, T. Fujikawa, Y. Hiratsuji and Y. Hasegawa, Hypocholesterolemic Effects of Chitosan in Cholesterol-Fed Rats, *Nutr Rep Int*, 1978, 18, pp. 531-537.
46. T. Kobayashi, S. Otsuka and Y. Yugari, Effect of Chitosan on Serum and Liver Cholesterol Levels in Cholesterol-Fed Rats, *Nutr Rep Int*, 1979, 19, pp. 327-334.
47. G. V. Vahouny, S. Satchithanandam, M. M. Cassidy, F. B. Lightfoot and I. Furda, Comparative effects of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat, *The Am J Clin Nutr*, 1983, 38,pp. 278-284.
48. Y. Fukada, K. Kimura and Y. Ayaki, Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats, *Lipids*, 1991, 26, pp. 395-399.
49. S. Hirano, K. Hirochi, K. Hayashi, T Mikami and H Tachibana, Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers, 1991,pp. 95-104

50. S. Hirano and Y. Noishiki, The blood compatibility of chitosan and N-acetylchitosans, *Journal of Biomed Mater Res*, 1985, 19, pp. 413-417.
51. K. M. Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Okawa Y, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M., Protective effect of N-acetylchitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice, *Microbiol Immunol* 1989, 33, pp. 357-367.
52. E. H. J. Malette WG, Gaines RD, Johnson ND, Rainer WG., A hemostatic activity of chitosan, *Ann Thorac Surg*, 1983, p 35.
53. M. K. Ashish Khanna, Aruna Aggarwal, *Serratia Marcescens*- A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit its Spread in Hospitalized Patients, *JCDR*, 2013, Vol-7(2), pp. 243-246.
54. Williams, Biosynthesis of Prodigiosin, a Secondary Metabolite of *Serratia-Marcescens*, *Appl Microbiol*, 1973, p 25.
55. S. J. H. Gustav Vaaje-Kolstad, Morten Sørli and Vincent G. H. Eijsink, The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides, *FEBS J*, 2013, 280, pp. 3028–3049
56. H. H. Wasserman, K. J. Mc and U. V. Santer, Studies related to the biosynthesis of prodigiosin in *Serratia marcescens*, *Biochem Biophys Res Com*, 1960, 3, pp. 146-149.
57. R. P. Williams, Biosynthesis of Prodigiosin, a Secondary Metabolite of *Serratia-Marcescens*, *Appl Microbiol*, 1973, 25, pp. 396-402.
58. G. S. Marks and L. Bogorad, Studies on the Biosynthesis of Prodigiosin in *Serratia-Marcescens*, *P Natl Acad Sci USA*, 1960, 46, pp. 25-28.
59. <http://edenprairieweblogs.org/scottneal/post/1338/>
60. J. Monreal and E. T. Reese, The chitinase of *Serratia marcescens*, *Can J Microbiol*, 1969, 15, pp. 689-696.
61. T. Toratani, T. Shoji, T. Ikehara, K. Suzuki and T. Watanabe, The importance of chitinase and N-acetylglucosamine (GlcNAc) uptake in

- N,N'-diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] utilization by *Serratia marcescens* *Microbiology*, 2008, 154, pp. 1326-1332.
62. G. Vaaje-Kolstad, B. Westereng, S. J. Horn, Z. L. Liu, H. Zhai, M. Sorlie and V. G. H. Eijsink, An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides, *Science*, 2010, 330, pp. 219-222.
 63. G. Vaaje-Kolstad, S. J. Horn, M. Sorlie and V. G. H. Eijsink, The chitinolytic machinery of *Serratiamarcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides, *Febs J*, 2013, 280, pp. 3028-3049.
 64. S. Drouillard, S. Armand, G. J. Davies, C. E. Vorgias and B. Henrissat, *Serratia marcescens* chitobiase is a retaining glycosidase utilizing substrate acetamido group participation, *Biochem J*, 1997, 328 (Pt 3), pp. 945-949.
 65. H. Kless, Y. Sitrit, I. Chet and A. B. Oppenheim, Cloning of the Gene Coding for Chitobiase of *Serratia-Marcescens*, *Mol Gen Genet*, 1989, 217, pp. 471-473.
 66. I. Tews, A. Perrakis, A. Oppenheim, Z. Dauter, K. S. Wilson and C. E. Vorgias, Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease, *Nature structural biology*, 1996, 3, pp. 638-648.
 67. I. Tews, R. Vincentelli and C. E. Vorgias, N-Acetylglucosaminidase (chitobiase) from *Serratia marcescens*: gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*, *Gene*, 1996, 170, pp. 63-67.
 68. M. B. e. a. Brurberg, Chitinases from *Serratia marcescens*, *Manuscript 'Recent Research Developments in Microbiology'*. 2000.
 69. D. Koshland, Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions, *Biol Rev* 1953, 28, pp. 416-436.
 70. G. Davies and Henrissat, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure*, 1995, 3, pp. 853-859.

71. B. L. Mark, D. J. Mahuran, M. M. Cherney, D. Zhao, S. Knapp and M. N. James, Crystal structure of human beta-hexosaminidase B: understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay-Sachs disease, *J mol biol*, 2003, 327, pp. 1093-1109.
72. Y. M. Hou, D. Vocadlo, S. Withers and D. Mahuran, Role of beta Arg(211) in the active site of human beta-hexosaminidase B, *Biochemistry*, 2000, 39, pp. 6219-6227.
73. G. Prag, Y. Papanikolau, G. Tavlas, C. E. Vorgias, K. Petratos and A. B. Oppenheim, Structures of chitobiase mutants complexed with the substrate Di-N-acetyl-d-glucosamine: the catalytic role of the conserved acidic pair, aspartate 539 and glutamate 540, *J molr biol*, 2000, 300, pp. 611-617.
74. I. Tews, A. Perrakis, A. Oppenheim, Z. Dauter, K. S. Wilson and C. E. Vorgias, Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease, *Nat struct biol*, 1996, 3, pp. 638-648.
75. B. L. Mark, D. J. Vocadlo, S. Knapp, B. L. Triggs-Raine, S. G. Withers and M. N. James, Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial beta-hexosaminidase, *JBC*, 2001, 276, pp. 10330-10337.
76. S. Grosso, M. A. Farnetani, R. Berardi, M. Margollicci, P. Galluzzi, R. Vivarelli, G. Morgese and P. Balestri, GM2 gangliosidosis variant B1 - Neuroradiological findings, *J Neurol*, 2003, 250, pp. 17-21.
77. C. Chavany and M. Jendoubi, Biology and potential strategies for the treatment of GM2 gangliosidoses, *Mol med today*, 1998, 4, pp. 158-165.
78. R. Navon and R. L. Proia, The Mutations in Ashkenazi Jews with Adult Gm2 Gangliosidosis, the Adult Form of Tay-Sachs Disease, *Science*, 1989, 243, pp. 1471-1474.
- 79 <http://bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Holmberg/HEXA.htm>.

80. S. Halila, E. Samain, C. E. Vorgias and S. Armand, A straightforward access to TMG-chitooligomycins and their evaluation as beta-N-acetylhexosaminidase inhibitors, *Carbohydr res*, 2013, 368, 52-56.
81. M. S. Smyth and J. H. J. Martin, X Ray crystallography, *J Clin Pathol-Mol Pa*, 2000, 53, pp. 8-14.
82. J. D. Guzman, Bench philosophy: Protein structure solution with X-Ray crystallography and NMR, 2010.
83. <http://uic.igc.gulbenkian.pt/micro-em.htm>.
84. J. T. Carl Branden, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc, 19 Union Square West, New York, 1999.
85. P. C. Weber, Physical Principles of Protein Crystallization, *Adv Protein Chem*, 1991, pp. 41, 1-36.
86. J. Drenth and C. Haas, Protein Crystals and Their Stability, *J Cryst Growth*, 1992, 122, pp. 107-109.
87. C. Dima, Protein Crystallisation in Action, University of Cambridge, 2001.
88. N. E. Chayen and E. Saridakis, Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal, *Nat Methods*, 2008, 5, pp. 147-153.
89. L. H. Sun, J. A. Li, C. Y. Xu, F. Yu, H. A. Zhou, L. Tang and J. H. He, The sandwich method for protein crystallization and its effect on crystal growth, *Acta Bioch Bioph Sin*, 2010, 42, pp. 332-336.
90. <http://www.esrf.eu/about/synchrotron-science/synchrotron>.
91. D. Instruments, *Protein Crystallization Robot for sitting drop screening with (simple) optimization*. <http://www.douglas.co.uk/oryxnano.htm>.
92. W. Kabsch, *Acta crystallographica. Section D, Acta Cryst.*, 2010, 66, 125-132.
93. N. Collaborative Computational Project, The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994.

94. P. Emsley, Lohkamp, B., Scott, W. G., Cowtan, K., Features and development of Coot, *Acta crystallographyca. Section D, Acta Cryst.*, 2010, 66, pp. 486-501.
95. M. L. Davis IW, Richardson JS, Richardson DC, MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes, *Nucleic Acids Res*, 2004.
96. K. R. Cousins, Computer review of ChemDraw Ultra 12.0, *J Am Cheml Soc*, 2011, 133, p 8388.
97. Schrödinger Release 2015-3: , *Maestro*, Accessed New York.
98. http://www.ccp4.ac.uk/MG/ccp4mg_help/symmetry.html.
99. A. C. Wallace, R. A. Laskowski and J. M. Thornton, LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions, *Protein eng*, 1995, 8, pp. 127-134.
100. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *JCC*, 2004, 25, pp. 1605-1612.
101. P. Kraulis, MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.*, 1991, 24, pp. 946-950.
102. L. Holm and P. Rosenstrom, Dali server: conservation mapping in 3D, *Nucleic acids res.*, 2010, 38, pp. 545-549.
103. P. Gouet, E. Courcelle, D. I. Stuart and F. Metoz, ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript, *Bioinformatics*, 1999, 15, 305-308.
104. X. Robert and P. Gouet, Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server, *NAR*, 2014, 42, pp. 320-324.
105. H. McWilliam, W. Z. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. M. Park, N. Buso, A. P. Cowley and R. Lopez, Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI, *NAR*, 2013, 41, pp. 597-600.

106. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman, *J. molstruc.*, Basic Local Alignment Search Tool, *Journal of molecular biology*, 1990, 215, pp. 403-410.

