



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Εξωκυτταρική παραγωγή του ανασυνδρασμένου  
βακτηριακού χιτινολυτικού ενζύμου Chi40  
από το θερμοσταθερό βακτήριο *Streptomyces  
thermoniolaceus* σε *E. coli* και μελέτη της σταθερότητάς του**

**ΚΟΡΟΒΙΛΑ ΙΩΑΝΝΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Εξωκυτταρική παραγωγή του ανασυνδυσασμένου βακτηριακού χιτινολυτικού ενζύμου Chi40 από το θερμοσταθερό βακτήριο *Streptomyces thermoviolaceus* σε *E. coli* και μελέτη της σταθερότητας του

**ΚΟΡΟΒΙΛΑ ΙΩΑΝΝΑ**

**ΑΜ:** 61203

### **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**

Γαλανοπούλου Ντία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Γαλανοπούλου Ντία  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

Κωσταντίνος Βοργιάς  
Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Δημήτριος Χατζηνικολάου  
Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 03/11/2014



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Το πρωτεϊνικό δομικό μοτίβο βαρέλι  $(\alpha/\beta)_8$  - γνωστό και ως βαρέλι TIM (TIM barrel) - είναι ευρέως διαδεδομένο σε μεγάλο αριθμό οικογενειών ενζύμων που καταλύουν ένα ευρύ φάσμα ενζυμικών αντιδράσεων, πολλές από τις οποίες είναι βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Η αξιοσημείωτη δομική ευελιξία του μοτίβου αντανακλάται ακόμη περισσότερο στο γεγονός ότι βρίσκεται σε ένζυμα που προέρχονται από οργανισμούς που λειτουργούν σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών, θερμοκρασίας, οξύτητας, αλατότητας, πίεσης κλπ. Ως εκ τούτου έχει γίνει αντικείμενο ευρείας μελέτης σε βιοχημικό, δομικό και θερμοδυναμικό επίπεδο. Η χιπινάση 40 (Chi40) είναι μια θερμοφιλή χιπινάση με χαρακτηριστικό δομικό στοιχείο τη δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$ . Σημαντικό χαρακτηριστικό της Chi40 είναι ότι εμφανίζει πλήρη αντιστρεπτότητα στην αναδίπλωση της έπειτα από θερμική αποδιάταξη. Η ιδιότητα αυτή μας δίνει τη δυνατότητα να μελετήσουμε σε βάθος τον μηχανισμό στον οποίον βασίζεται η λειτουργία της. Στόχος λοιπόν της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη τεχνολογίας υψηλής παραγωγικότητας που θα υποστηρίξει την μελέτη μεγάλου αριθμού τυχαίων μεταλλάξεων στο καταλυτικό δομικό στοιχείο του ενζύμου. Απώτερος στόχος είναι η διαλεύκανση του μηχανισμού αντιστρεπτής αποδιάταξης του ενζύμου αυτού σε ατομικό επίπεδο. Σε πρώτη φάση είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός ενός αποτελεσματικού συστήματος έκφρασης του γονιδίου της Chi40 και παραγωγής βιολογικά ενεργού πρωτεΐνης. Το φυσικό γονίδιο της Chi40 έχει απαγορευτικά υψηλό ποσοστό GC για πειράματα γονιδιακής-πρωτεϊνικής μηχανικής. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με τον σχεδιασμό και τη σύνθεση του συνθετικού γονιδίου της Chi40 με βελτιστοποιημένα χαρακτηριστικά έτσι ώστε να είναι ευκολότερη η περαιτέρω γενετική του τροποποίηση και η βέλτιστη παραγωγή του σε βακτηριακό σύστημα παραγωγής *E. coli*. Στη συνέχεια, και σε σύγκριση με το αγρίου τύπου γονίδιο, μελετήθηκε η κινητική των κλώνων παραγωγής της συνθετικής Chi40 εξετάζοντας διάφορες συνθήκες παραγωγής της. Οι συνθήκες αυτές αφορούν χρήση διαφορετικών (α) θρεπτικών υλικών, (β) κινητικών επαγωγής και (γ) συνδυασμούς των παραπάνω συνθηκών σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές *E. coli*. Τα επίπεδα έκφρασης διέφεραν δραματικά για κάθε συνδυασμό ενώ στόχος ήταν η ανίχνευση των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της εκκρινόμενης Chi40. Για την περαιτέρω αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης, προσδιορίστηκε με φωτομετρικό τρόπο η ενζυμική δραστηριότητα της Chi40 με τη χρήση του συνθετικού υποστρώματος pNP-(NAG)<sub>2</sub>. Στη συνέχεια, βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα έκφρασης και χρησιμοποιώντας συνολική εκκρινόμενη Chi40 καταφέραμε να μετρήσουμε την αποδιάταξή της με χρήση Διαφορικής Φθορισμομετρίας

Σάρωσης (DSF). Ακολούθησε καθαρισμός της πρωτεΐνης με υδρόφοβη χρωματογραφία και χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Έπειτα ακολούθησε Φασματομετρία Μάζας (MS) για την ταυτοποίηση του ενζύμου, ενώ μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και το πείραμα δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) απέδειξαν πως το ένζυμο απομονώθηκε σε μονομερή μορφή, χωρίς τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Τέλος, το πείραμα κυκλικού διχρωισμού (CD) για τη μελέτη θερμοσταθερότητας έδειξε πως η Chi40 έχει σημείο τήξης  $T_m$  60.9°C σε ουδέτερο pH. Τα αποτελέσματα αυτά μας ανοίγουν τον δρόμο της μελέτης της θερμικής αποδιάταξης της Chi40 γρήγορα και αποτελεσματικά από μεγάλο αριθμό τυχαίων μεταλλάξεων που θα παραχθούν στο εργαστήριο μας με τη χρήση της τεχνολογίας της κατευθυνόμενης εξέλιξης και τη συλλογή δεδομένων που πιθανόν να μας δώσει αρκετά δεδομένα για τη διαλεύκανση του μηχανισμού της αντιστρεπτής αποδιάταξης της Chi40. Απώτερος στόχος είναι εφαρμογή των δεδομένων αυτών σε ένζυμα βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος για να τους προσθέσει σταθερότητα και μεγάλο χρόνο ζωής σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Βιοχημεία, Πρωτεϊνική μηχανική

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** χιτινολυτικά ένζυμα, χιτινάση 40, δομικό μοτίβο  $(\alpha/\beta)_8$ , βαρέλι TIM

## ABSTRACT

---

The TIM-barrel fold is abundant in various enzyme families catalyzing completely different biochemical reactions, many of which with biotechnological interest. The remarkable versatility of this motif is further highlighted because it is adopted by enzymes that come from organisms who live in a wide range of conditions (temperature, acidity, salinity, pressure). These enzyme families have been studied extensively in biochemical, structural and thermodynamic level. Chitinase 40 (Chi40) is a thermophilic chitinase, the enzymatic domain of which was found to adopt the TIM-barrel fold. An important and unique characteristic of Chi40 is the reversibility in its fold after thermal denaturation. This characteristic is very important and enables us to study the mechanism and structural factors that might be responsible for this phenomenon. The aim of this dissertation thesis is to establish a high throughput technology in order to study a large number of random mutations in the catalytic domain of the enzyme. Our target is to identify the folding-refolding mechanism in atomic level. First, we designed an effective system for Chi40 gene expression and active protein production. The wild type Chi40 gene has a high percentage of GC that prohibits gene-protein engineering experiments. This problem was solved by designing and synthesizing a synthetic gene of Chi40 with optimized characteristics, which makes easier further genetic modifications and better expression of the enzyme in the bacterial system of *E. coli*. We further studied the kinetics of synthetic Chi40 production testing different expression conditions such as (a) growth media (b) modes of induction (c) combination of the above conditions in different *E. coli* systems. As the expression levels differed dramatically in each combination, we focused on finding the best conditions for the expression of secreted Chi40. We also applied an activity assay using a photometric method, in which pNP-(NAG)<sub>2</sub> was the synthetic substrate. Using the total secreted Chi40, we managed to measure protein denaturation using Differential Scanning Fluorimetry (DSF). In addition, we purified the protein by a combination of two chromatographic techniques, hydrophobic and ion exchange chromatography. The identification of the enzyme was held by mass spectrometry (MS), while native-PAGE electrophoresis and Dynamic Light Scattering (DLS) experiments prove that the enzyme appear in a monomeric state without forming aggregates. In addition, thermostability measurements by Circular Dichroism (CD) experiments showed that Chi40 has a  $T_m$  of 60.9°C in neutral pH. Our results show that thermal denaturation is a quick and efficient method for the study of the mechanism of reversible denaturation of Chi40 in the case

of many random mutations produced during this study. Our target is to apply these data to various enzymes of biotechnological interest so as to improve their stability during biotechnological applications.

**SUBJECT AREA:** Biochemistry, Protein engineering

**KEYWORDS:** chitinolytic enzymes, chitinase 40, structural motif  $(\alpha/\beta)_8$ , TIM barrel



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

Πρόλογος.....	21
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>23</b>
1.1 Κατάταξη χιτινολυτικών ενζύμων.....	26
1.2 Η οικογένεια 18 των γλυκοζυλοϋδρολασών.....	31
1.2.1 Μηχανισμός δράσης.....	32
1.2.2 Δομικά χαρακτηριστικά.....	34
1.3 Δομικά χαρακτηριστικά βακτηριακών χιτινασών.....	38
1.4 Το δομικό μοτίβο $(\alpha/\beta)_8$ ή βαρέλι TIM .....	46
1.4.1 Διακλαδισμένες υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες κυριαρχούν στον πυρήνα των βαρελιών $(\alpha/\beta)_8$ .....	48
1.4.2 Το ενεργό κέντρο σχηματίζεται από βρόχους στο ένα άκρο του βαρελιού $(\alpha/\beta)_8$ .....	50
1.5 Πρωτεϊνική μηχανική και δομικό μοτίβο $(\alpha/\beta)_8$ .....	51
1.5.1 Μελετώντας τη σταθερότητα και την καταλυτική δραστικότητα - Το παράδειγμα της χιτινάσης A.....	52
1.6 Η χιτινάση 40.....	56
<b>2. Σκοπός.....</b>	<b>61</b>
<b>3. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>63</b>
3.1 Σχεδιασμός συνθετικού γονιδίου χιτινάσης 40.....	63
3.2 Κλωνοποίηση.....	65
3.2.1 Συνθήκες καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων.....	66
3.2.2 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων.....	67
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	68
3.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	69
3.2.5 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	71
3.2.6 Παραλαβή ζώνης DNA από την πηκτή αγαρόζης (gel extraction).....	72
3.2.7 Ενζυμική αντίδραση συγκόλλησης τμημάτων DNA - Αντίδραση λιγάσης..	73
3.2.8 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	74
3.2.9 Έλεγχος της κλωνοποίησης.....	77
3.3 Κινητική των κλώνων παραγωγής της χιτινάσης.....	78

3.3.1	Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης: Το σύστημα pET.....	78
3.3.2	Μικροβιακά στελέχη.....	79
3.3.3	Επαγωγή της ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου-στόχου με IPTG.....	82
3.3.4	Επαγωγή της ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου-στόχου με αυτοεπαγωγή.....	84
3.3.5	Καταβύθιση πρωτεϊνών με χρήση τριχλωροξικού οξέος.....	87
3.3.6	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	88
3.3.7	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (native-PAGE) .....	92
3.4	Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	94
3.5	Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας χιτινάσης 40.....	95
3.6	Μελέτη θερμοσταθερότητας - πείραμα DSF.....	97
3.7	Καθαρισμός χιτινάσης 40.....	99
3.7.1	Κλασμάτωση με θειικό αμμώνιο.....	99
3.7.2	Υδροφοβή χρωματογραφία .....	101
3.7.3	Χρωματογραφία ιονανταλλαγής.....	102
3.8	Φασματομετρία Μάζας.....	103
3.9	Δυναμική σκέδαση φωτός.....	104
3.10	Κυκλικός Διχρωισμός.....	105
<b>4.</b>	<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>107</b>
4.1	Σχεδιασμός συνθετικού γονιδίου χιτινάσης 40.....	107
4.2	Κλωνοποίηση του συνθετικού γονιδίου της χιτινάσης 40 σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης.....	112
4.3	Μελέτη κινητικής παραγωγής ανασυνδυασμένης και φυσικής χιτινάσης 40.....	113
4.3.1	Επαγωγή γονιδιακής έκφρασης με IPTG.....	115
4.3.1.1	Κυτταρική σειρά/Πλασμιδιακός φορέας: BL21 <i>trxB</i> (DE3)/ <i>chi40</i> -wt .....	115
4.3.1.2	Κυτταρική σειρά/Πλασμιδιακός φορέας: BL21 <i>trxB</i> (DE3)/ <i>chi40</i> -opt.....	119

4.3.1.3	Κυτταρική σειρά/Πλασμιδιακός φορέας: BL21(DE3)Magic/chi40-wt.....	123
4.3.1.4	Κυτταρική σειρά/Πλασμιδιακός φορέας: BL21B(DE3)Magic/chi40-opt.....	127
4.3.2	Αυτοεπαγωγή γονιδιακής έκφρασης.....	131
4.3.2.1	Κυτταρική σειρά BL21 <i>trxB</i> (DE3).....	131
4.3.2.2	Κυτταρική σειρά: BL21(DE3)Magic.....	132
4.4	Μελέτη θερμικής αποδιάταξης - Πείραμα Διαφορικής Φθορισμομετρίας Σάρωσης.....	135
4.5	Καθαρισμός χιτινάσης 40.....	138
4.6	Χαρακτηρισμός χιτινάσης 40 με Φασματομετρία Μάζας.....	139
4.7	Χαρακτηρισμός χιτινάσης 40 με Δυναμική Σκέδασης Φωτός.....	140
4.8	Μελέτη θερμοσταθερότητας - Πείραμα Κυκλικού Διχρωισμού.....	141
<b>5.</b>	<b>Συζήτηση.....</b>	<b>142</b>
	<b>Συντμήσεις.....</b>	<b>145</b>
	<b>Αναφορές.....</b>	<b>147</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

---

<b>ΣΧΗΜΑ 1:</b> Δομή χιτίνης .....	<b>23</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 2:</b> Ο δομικός ρόλος της χιτίνης.....	<b>23</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 3:</b> Πολύμορφα χιτίνης.....	<b>24</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 4:</b> Η α-χιτίνη ως δομικός λίθος του εξωσκελετού των αρθροπόδων .	<b>25</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 5:</b> Δράση χιτινολυτικών ενζύμων στην αποικοδόμηση της χιτίνης....	<b>26</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 6:</b> Εξειδίκευση χιτινασών ως προς τον τρόπο δράσης .....	<b>27</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 7:</b> Κατανομή της οικογένειας (α) GH18 και (β) GH19 στα διάφορα είδη οργανισμών .....	<b>29</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 8:</b> Παραδείγματα δομών χιτινολυτικών ενζύμων .....	<b>30</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 9:</b> Μηχανισμός δράσης της οικογένειας GH18 των χιτινασών.....	<b>33</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 10:</b> Συντηρημένες δομικές περιοχές χιτινασών σε διάφορα είδη οργανισμών .....	<b>36</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 11:</b> Κρυσταλλική δομή της ChBD .....	<b>36</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 12:</b> Κρυσταλλική δομή της FNIII.....	<b>37</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 13:</b> Συντηρημένες δομικές περιοχές βακτηριακών χιτινασών.....	<b>38</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 14:</b> Κρυσταλλική δομή ChiA.....	<b>39</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 15:</b> Θέσεις αρωματικών αρωματικών αμινοξέων με καθοριστικό ρόλο στην υδρόλυση της χιτίνης .....	<b>40</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 16:</b> Μηχανισμός υδρόλυσης κρυσταλλικής β-χιτίνης από τη ChiA ...	<b>41</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 17:</b> Η αλληλεπίδραση του αναστολέα αλλοζαμίνη με το καταλυτικό κέντρο της ChiA .....	<b>42</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 18:</b> Κρυσταλλική δομή ChiB.....	<b>42</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 19:</b> Δομή ChiA1.....	<b>43</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 20:</b> Δομή ChiA (πράσινο χρώμα) και ChiA1 (μπλε χρώμα).....	<b>44</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 21:</b> Δομή ChBD .....	<b>44</b>

<b>ΣΧΗΜΑ 22:</b> Κρυσταλλική δομή Chi60 .....	<b>45</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 23:</b> (α) υπεροικογένειες πρωτεϊνών που διαθέτουν το αυτοτελές δομικό στοιχείο (α/β) <sub>8</sub> και (β) οι κύριες μεταβολικές τους δράσεις .....	<b>46</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 24:</b> Το δομικό μοτίβο (α/β) <sub>8</sub> ή βαρέλι TIM.....	<b>47</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 25:</b> Τρόπος διευθέτησης των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων στο εσωτερικό ενός βαρελιού (α/β) <sub>8</sub> .....	<b>48</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 26:</b> Σχηματική απεικόνιση του δομικού αυτοτελούς στοιχείου βαρελιού (α/β) <sub>8</sub> του ενζύμου μουτάση του μεθυλμαλόνηλο συνενζύμου A ....	<b>50</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 27:</b> Το ενεργό κέντρο των βαρελιών (α/β) <sub>8</sub> .....	<b>51</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 28:</b> Μοντέλα της ChiA και ChiAΔ (α + β) .....	<b>54</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 29:</b> Ευθυγράμμιση ακολουθιών Chi40 και ChiA. ....	<b>58</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 30:</b> Χάρτης πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pUC57.....	<b>65</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 31:</b> Χάρτης πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pET11-a .....	<b>66</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 32:</b> Διαδικασία επαγωγής σε κυτάρρα-ξενιστές <i>E. coli</i> DE3.....	<b>78</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 33:</b> Καμπύλη ανάπτυξης καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων .....	<b>85</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 34:</b> Ενζυμική δράση Chi40 .....	<b>96</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 35:</b> Τυπικό διάγραμμα απορρόφησης στα 405nm συναρτήσει των όγκων θρεπτικού υπερκείμενου υγρού που απαιτήθηκαν για τη μέτρηση ειδικής δραστηριότητας .....	<b>97</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 36:</b> Διάγραμμα έντασης φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας .	<b>99</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 37:</b> (α) Αλληλουχία βάσεων γονιδίων <i>chi40-wt</i> και <i>chi40-opt</i> (β) αμινοξική αλληλουχία Chi40 όπως προκύπτει έπειτα από μετάφραση των δύο αυτών γονιδίων .....	<b>108</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 38:</b> Το γονίδιο <i>chi40-opt</i> στον πλασμιδιακό φορέα pUC57.....	<b>111</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 39:</b> Ηλεκτροφόρημα διαγνωστικών πέψεων.....	<b>112</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 40:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21 <trxb>(DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο LB.....</trxb>	<b>115</b>

<b>ΣΧΗΜΑ 41:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21 <i>trxB</i> (DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο 2x YT.....	<b>116</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 42:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21 <i>trxB</i> (DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο TB .....	<b>117</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 43:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21 <i>trxB</i> (DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο HD.....	<b>118</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 44:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21 <i>trxB</i> (DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο LB.....	<b>119</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 45:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21 <i>trxB</i> (DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο 2x YT.....	<b>120</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 46:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21 <i>trxB</i> (DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο TB .....	<b>121</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 47:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21 <i>trxB</i> (DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο HD.....	<b>122</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 48:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο LB.....	<b>123</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 49:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο 2x YT.....	<b>124</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 50:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο TB .....	<b>125</b>

<b>ΣΧΗΜΑ 51:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο HD.....	<b>126</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 52:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο LB.....	<b>127</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 53:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο 2x YT.....	<b>128</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 54:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο TB .....	<b>129</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 55:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο HD.....	<b>130</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 56:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής των Chi40-opt και Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21 <trxb(de3) td="" αυτοεπαγόμενο="" σε="" σύστημα.....<=""> <td><b>131</b></td> </trxb(de3)>	<b>131</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 57:</b> Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής των Chi40-opt και Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic σε αυτοεπαγόμενο σύστημα.....	<b>132</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 58:</b> Διάγραμμα έντασης φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα δείγματα που μετρήθηκαν .....	<b>136</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 59:</b> Αντιπροσωπευτικό δείγμα διαγράμματος έντασης φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας .....	<b>137</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 60:</b> Χρωματογράφημα Chi40 στην υδρόφοβη στήλη Phenyl-Sepharose .....	<b>138</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 61:</b> Φάσμα MS .....	<b>139</b>
<b>ΣΧΗΜΑ 62:</b> Φάσμα DLS.....	<b>140</b>

**ΣΧΗΜΑ 63:** (α) Φάσμα CD Chi40 σε διάφορες θερμοκρασίες. (β) Θερμική  
καμπύλη τήξης Chi40, όπως προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία CD σε pH 7  
.....**141**



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

---

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 1:</b> Τα αμινοξικά κατάλοιπα των οκτώ παράλληλων β-πτυχώσεων στη δομή βαρελίου του ενζύμου ισομεράση της φωσφορικής τριόζης από μυς κοτόπουλου .....	<b>49</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 2:</b> Αγρίου τύπου γονίδιο <i>Chi40</i> .....	<b>64</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3:</b> Συχνότητα χρήσης κωδικονίων στην <i>E. coli</i> .....	<b>64</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 4:</b> Σύσταση θρεπτικού άγαρ (Nutrient Agar) .....	<b>66</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 5:</b> Σύσταση Υγρού Θρεπτικού υλικού LB .....	<b>67</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 6:</b> Χαρακτηριστικά κυττάρων-ξενιστών <i>E. coli</i> .....	<b>80</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 7:</b> Γενότυπος κυττάρων-ξενιστών <i>E. coli</i> DH5a .....	<b>80</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 8:</b> Γενότυπος κυττάρων-ξενιστών <i>E. coli</i> BL21 <i>trxB</i> (DE3).....	<b>81</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 9:</b> Πηκτής επιστοίβασης 5% ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE .....	<b>90</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 10:</b> Πηκτή διαχωρισμού 12.5% ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE .....	<b>90</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 11:</b> Πηκτή επιστοίβασης 5% μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης	<b>93</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 12:</b> Πηκτή διαχωρισμού 12.5% μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης .....	<b>93</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 13:</b> Σύσταση δειγμάτων για φωτομέτρηση.....	<b>95</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 14:</b> Κωδικόνια <i>chi40-wt</i> που αντικαταστάθηκαν κατά τον σχεδιασμό του συνθετικού γονιδίου .....	<b>109</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 15:</b> Παράμετροι που μελετήθηκαν στις κινητικές παραγωγής της πρωτεΐνης <i>Chi40-wt</i> και <i>Chi40-opt</i> .....	<b>113</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 16:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της <i>Chi40-wt</i> από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21 <i>trxB</i> (DE3) και σε θρεπτικό μέσο LB .....	<b>115</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 17:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της <i>Chi40-wt</i> από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21 <i>trxB</i> (DE3) και σε θρεπτικό μέσο 2x YT .....	<b>116</b>

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 18:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21 <i>trxB</i> (DE3) και σε θρεπτικό μέσο TB .....	<b>117</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 19:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21 <i>trxB</i> (DE3) και σε θρεπτικό μέσο HD.....	<b>118</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 20:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21 <i>trxB</i> (DE3) και σε θρεπτικό μέσο LB .....	<b>119</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 21:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21 <i>trxB</i> (DE3) και σε θρεπτικό μέσο 2x YT .....	<b>120</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 22:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21 <i>trxB</i> (DE3) και σε θρεπτικό μέσο TB .....	<b>121</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 23:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21 <i>trxB</i> (DE3) και σε θρεπτικό μέσο HD.....	<b>122</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 24:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο LB .....	<b>123</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 25:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο 2x YT .....	<b>124</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 26:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο TB.....	<b>125</b>

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 27:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο HD .....	<b>126</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 28:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο LB.....	<b>127</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 29:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο 2x YT.....	<b>128</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 30:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο TB .....	<b>129</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 31:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο HD.....	<b>130</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 32:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής των Chi40-opt και Chi40-wt για καθένα από τα δείγματα υπερκείμενου υγρού της κυτταρικής σειράς BL21 <i>trxB</i> (DE3) σε αυτοεπαγόμενο σύστημα.....	<b>131</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 33:</b> Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής των Chi40-opt και Chi40-wt για καθένα από τα δείγματα υπερκείμενου υγρού της κυτταρικής σειράς BL21(DE3)Magic σε αυτοεπαγόμενο σύστημα .....	<b>132</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 34:</b> Συνολικά αποτελέσματα κινητικής .....	<b>133</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 35:</b> Συνθήκες υπερέκφρασης Chi40-opt για τη διεξαγωγή του πειράματος DSF .....	<b>135</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 36:</b> Ποσότητες αντιδραστηρίων που προσθέθηκαν και θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) κατά την πειραματική διαδικασία DSF.....	<b>136</b>



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα εργασία για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία έχει ως αντικείμενο τη μελέτη του χιτινολυτικού ενζύμου χιτινάση 40. Η χιτινάση 40 είναι ένα θερμοσταθερό ένζυμο με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, καθώς διαθέτει δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  και παρουσιάζει αντιστρεπτή αναδίπλωση έπειτα από θερμική αποδιάταξη. Η μελέτη αυτή έχει ως στόχο την ανίχνευση του μηχανισμού της αντιστρεπτής αποδιάταξης με σκοπό να εξηγήσει πως ένα μεγάλο ένζυμο με δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$ , έπειτα από θερμική αποδιάταξη, μπορεί να επαναποκτήσει τη λειτουργική του δομή χωρίς να εκθέτει τις μεγάλες υδρόφοβες περιοχές του στο διάλυμα.

Η εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2012-2014 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Βιοχημείας Κων/νου Βοργιά (Τμήμα Βιολογίας) και της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ντ. Γαλανοπούλου (Τμήμα Χημείας). Στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διατριβής, εκτός από την επιβλέπουσα Ντ. Γαλανοπούλου και τον επιστημονικό υπεύθυνο Κων/νο Βοργιά, συμμετείχε και ο Επίκουρος Καθηγητής Δ. Χατζηνικολάου (Τμήμα Βιολογίας).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον εμπνευστή της ερευνητικής μου εργασίας Κων/νο Βοργιά για την ανάθεση αυτής της ενδιαφέρουσας και πρωτότυπης εργασίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις συμβουλές του καθώς και για την εμπιστοσύνη και το ενδιαφέρον που έδειξε για την εκπόνησή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την Ντ. Γαλανοπούλου για όλη τη στήριξή της και που ήταν επιστημονική και ανθρώπινη. Να την ευχαριστήσω επίσης για τις πολύτιμες συμβουλές της και την καθοδήγησή της για την ολοκλήρωση της εργασίας αλλά και για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη βοήθειά της για τη μετέπειτα πορεία μου.

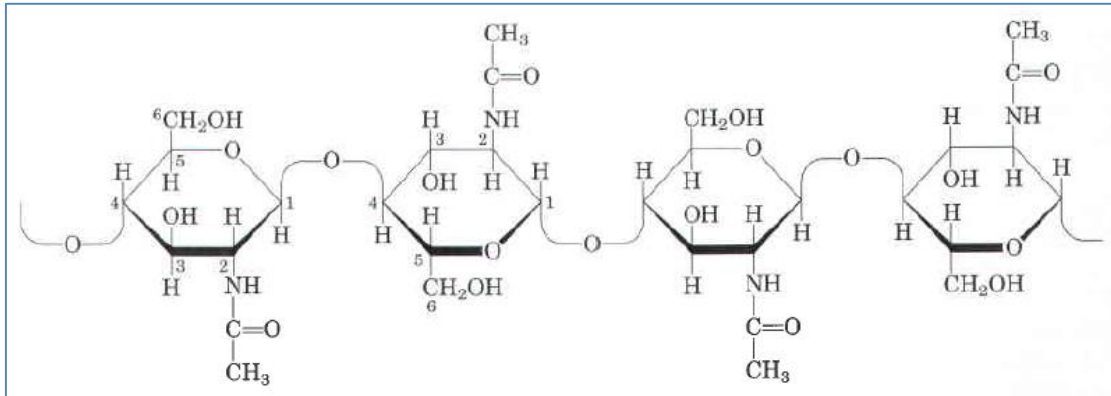
Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία συνεργάστηκα όλον αυτό τον καιρό. Την Α. Παπαγεωργίου που με βοήθησε στα πρώτα πειράματα κλωνοποίησης αλλά και τα υπόλοιπα μέλη: Τ.

Γεωργούλη, Μ. Λούκα και Α. Τσόκα για τις συμβουλές και το καλό κλίμα που πάντα φρόντιζαν να υπάρχει.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά από ανθρώπους με τους οποίους συνεργάστηκα χρησιμοποιώντας συσκευές του εργαστηρίου τους. Τη Δρ. Φ. Μπούτου, ερευνήτρια στο Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών όπου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα Διαφορικής Φθορισμομετρίας Σάρωσης, τον Δρ. Γ. Νούνεση στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκε το πείραμα Κυκλικού Διχρωισμού και το Δρ. Α. Ξενάκη στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκε το πείραμα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός, στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

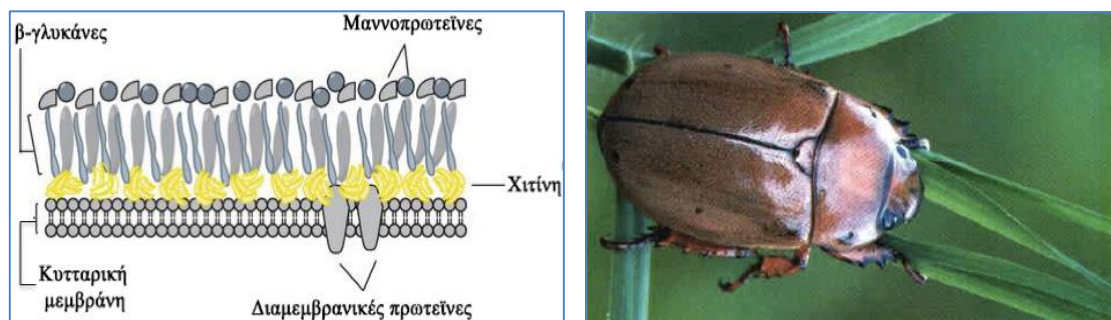
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χιτίνη είναι ο δεύτερος πιο διαδεδομένος πολυσακχαρίτης στη φύση μετά την κυτταρίνη - υπολογίζεται ότι ετησίως βιοσυντίθενται στην βιόσφαιρα  $10^9$  τόνοι χιτίνης. Πρόκειται για έναν γραμμικό πολυσακχαρίτη με δομικές μονάδες μόρια N-ακετυλο-β-D-γλυκοζαμίνης (NAG ή GlcNAc), συνδεδεμένα με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Σχήμα 1) [1].



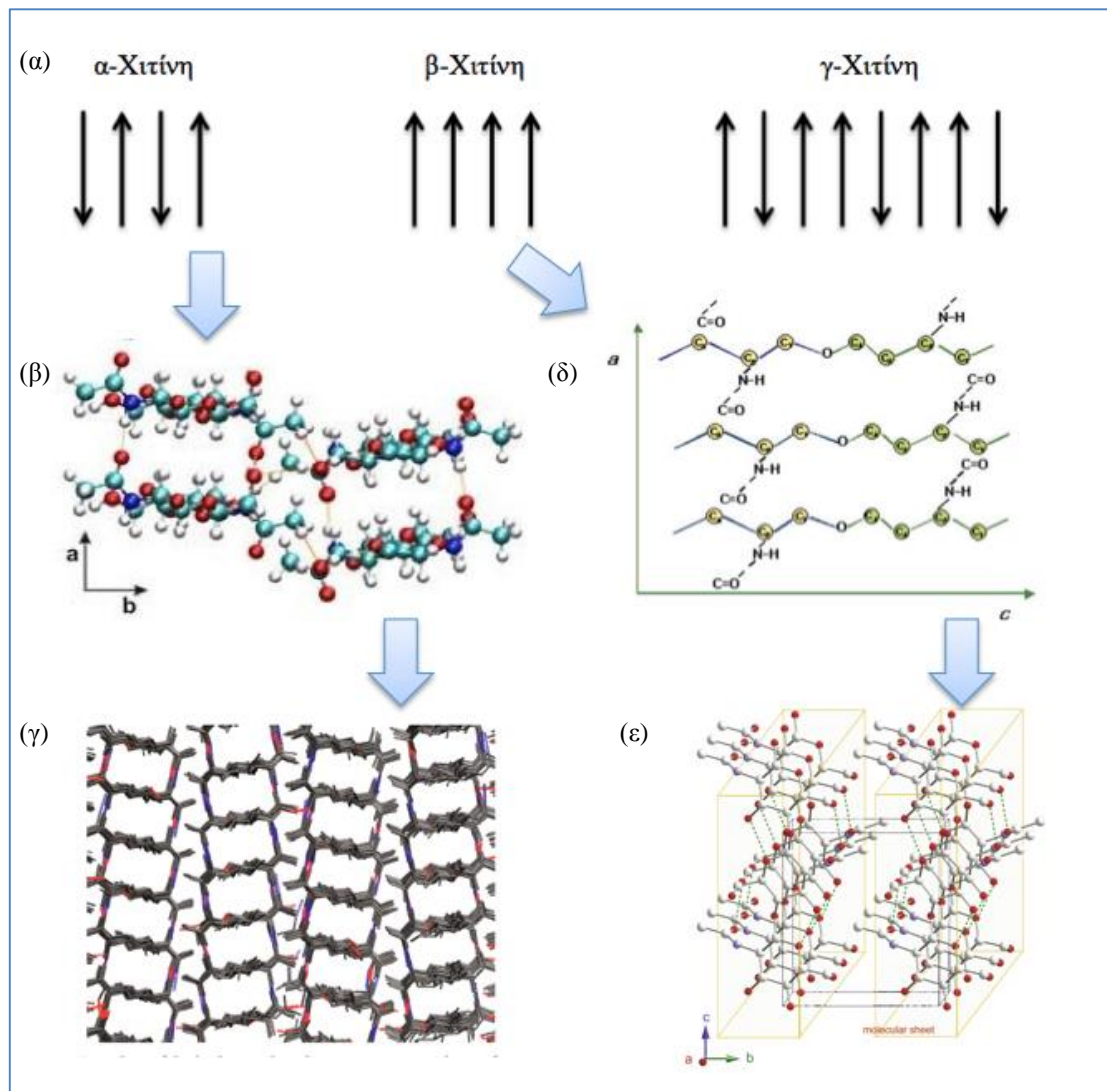
**ΣΧΗΜΑ 1: Δομή χιτίνης**

Ο ρόλος της χιτίνης είναι μορφογενετικός και δομικός καθώς είναι βασικό δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων και ορισμένων φυκών και κύριο συστατικό του κελύφους των οστρακοειδών, του εξωσκελετού αρθροπόδων και εντόμων καθώς και των μαλακίων και των σκωλήκων (Σχήμα 2). Επιπλέον, είναι σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών (άνθρακα και αζώτου) για τα βακτήρια.



**ΣΧΗΜΑ 2: Ο δομικός ρόλος της χιτίνης.** (α) Η χιτίνη αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, καθώς σχηματίζει μια λεπτή και άκαμπτη προστατευτική στιβάδα μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και των γλυκανών και μαννοπρωτεϊνών που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης [2] (β) Η χιτίνη κατέχει και προστατευτικό ρόλο, καθώς αποτελεί κύριο συστατικό του εξωσκελετού αρθροπόδων και εντόμων, όπως αυτός του σκαθαριού *Pellodotus unctata* που απεικονίζεται στο σχήμα

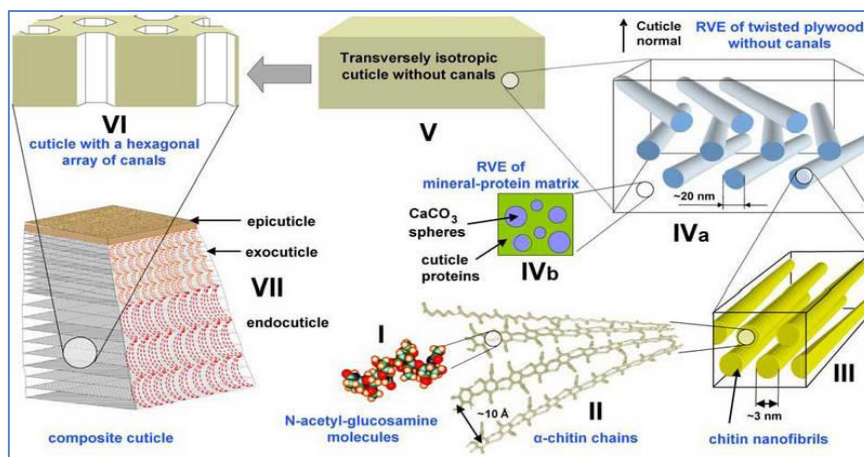
Η χιτίνη εμφανίζεται στη φύση σε τρεις κρυσταλλικές μορφές: την α-, τη β- και τη γ-χιτίνη (πολυμορφισμός) (Σχήμα 3). Το κάθε ένα πολύμορφο απαντάται σε μια ποικιλία διαφορετικών οργανισμών αναλόγως της λειτουργίας στην οποία συμμετέχει.



**ΣΧΗΜΑ 3: Πολύμορφα χιτίνης. (α) Διευθέτηση αλυσίδων σε κάθε μια δομική μορφή. Ο τρόπος διευθέτησης των αλυσίδων χιτίνης καθορίζει το λειτουργικό ρόλο της κάθε μορφής καθώς και τις φυσικοχημικές ιδιότητές της. (β) Αντιπαράλληλη κατεύθυνση των αλυσίδων στην α-χιτίνη. Η διευθέτηση αυτή οδηγεί σε ισχυρές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις καθιστώντας την α-χιτίνη ένα ανθεκτικό υλικό, αδιάλυτο στο νερό. (γ) Η άμορφη δομή α-χιτίνης στο χώρο. (δ) β-επιφάνεια σχηματιζόμενη από παράλληλες αλυσίδες χιτίνης κατα μήκος του άξονα ινιδίων. (α) κατεύθυνση δεσμών υδρογόνου, (c) κατεύθυνση πλευρικής αλυσίδας. Λόγω της παράλληλης αυτής διευθέτησης των αλυσίδων στο χώρο, η β-χιτίνη χαρακτηρίζεται από ασθενείς διαμοριακές δυνάμεις και παρουσιάζει υψηλότερη δραστηριότητα σε τροποποιητικούς παράγοντες και υψηλότερη συγγένεια σε διαλύτες. (ε) Κρυσταλλική μορφή β-χιτίνης**



Η πιο επικρατής και θερμοδυναμικά σταθερότερη μορφή είναι η  $\alpha$ -χιτίνη. Είναι άμορφη και χαρακτηρίζεται από την αντιπαράλληλη διεύθυνση των γειτονικών της αλυσίδων. Η χαρακτηριστική αυτή διεύθυνση των αλυσίδων, καθώς και η στοίβαξη των υδρόφοβων επιφανειών των δακτυλίων πυρανόζης προς το εσωτερικό, ή μια πάνω στην άλλη, είναι κεντρικής σημασίας για την ιδιότητα της χιτίνης να δρα ως ένα αδιάλυτο, ανθεκτικό υλικό, ιδανικό για τον στηρικτικό και προστατευτικό του ρόλο (Σχήμα 4) [3,4].



**ΣΧΗΜΑ 4:** Η  $\alpha$ -χιτίνη ως δομικός λίθος του εξωσκελετού των αρθροπόδων. Η αντιπαράλληλη διεύθυνση των αλυσίδων της επιτρέπει την οργάνωσή της με τέτοιον τρόπο που την καθιστά ιδανική ως προς τον ρόλο της για μηχανική στήριξη, προσδίδοντας αντοχή και ανθεκτικότητα

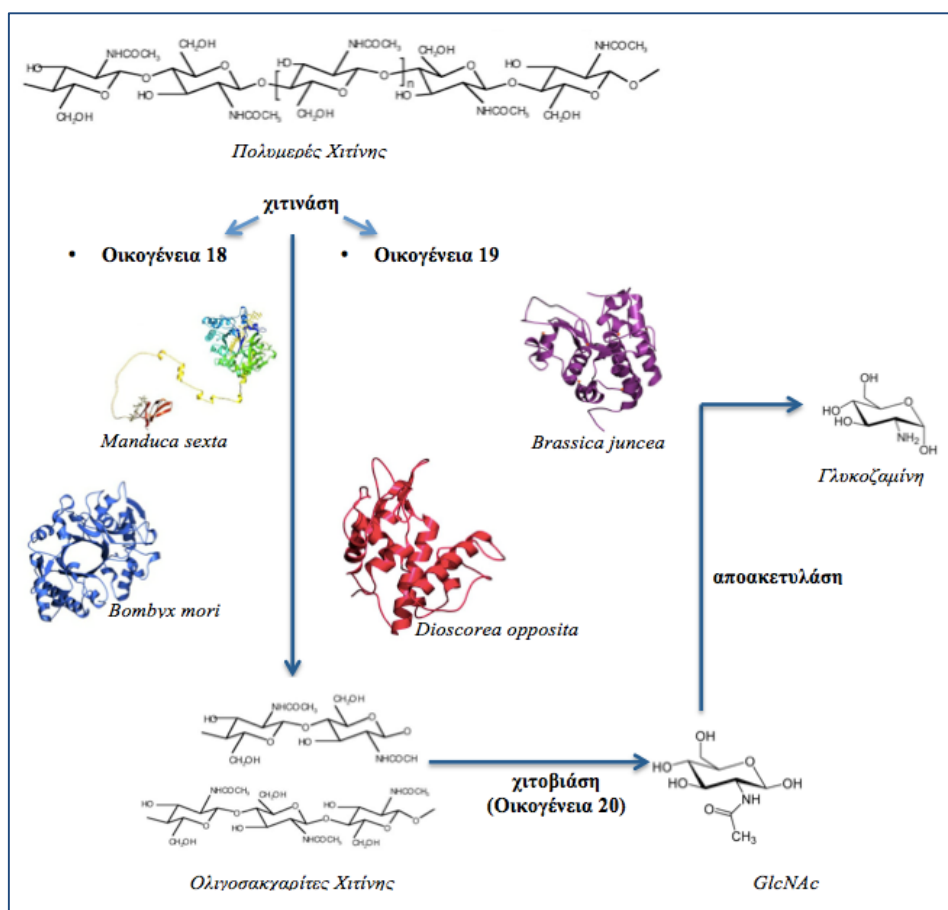
Αντίθετα, η  $\beta$ -χιτίνη είναι αρκετά σπάνια στη φύση. Αποτελεί δομικό συστατικό κυρίως των διατόμων. Χαρακτηρίζεται από παράλληλη διεύθυνση των αλυσίδων και για το λόγο αυτό διαθέτει κρυσταλλική μορφή [5]. Τέλος, η τρίτη μορφή χιτίνης, η  $\gamma$ -χιτίνη, είναι η πιο σπάνια στη φύση και γι'αυτό η λιγότερο μελετημένη. Έχει βρεθεί σε έναν πολύ μικρό αριθμό οργανισμών, μεταξύ των οποίων καλαμάρια αλλά και στις φυτικές ίνες του κουκουλιού σκαθαριών. Βασικό χαρακτηριστικό της δομής της είναι ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο το οποίο περιλαμβάνει την παράλληλη διεύθυνση δυο αλυσίδων και την αντιπαράλληλη διεύθυνση της επόμενης αλυσίδας [6].

Η χιτίνη και η ημιακετυλιωμένη της μορφή, η χιτοζάνη, καθώς και άλλα χημικά τροποποιημένα παράγωγά τους έχουν βρει αρκετές εφαρμογές στη βιομηχανία, τη βιοτεχνολογία και την ιατρική. Παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες και είναι πολύτιμες πρώτες ύλες γεωργικών προϊόντων και καλλυντικών. Η αντιμικροβιακή και αντικαρκινική τους δράση καθώς και η

δράσης τους στην επούλωση πληγών είναι μερικές μόνο από τις θεραπευτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν [7].

## 1.1 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΧΙΤΙΝΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

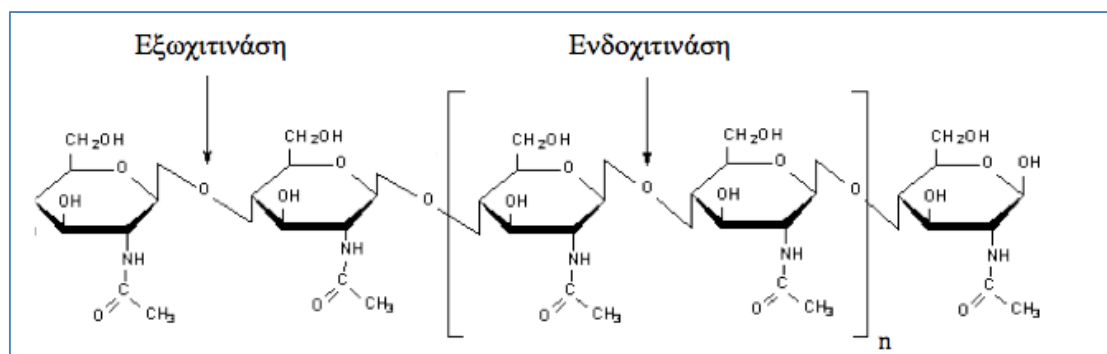
Η αποικοδόμηση της χιτίνης επιτυγχάνεται από βακτηριακά χιτινολυτικά ένζυμα και είναι μια διεργασία σημαντική για τον κύκλο του άνθρακα και του αζώτου στη φύση. Η πλήρης υδρόλυση της χιτίνης πραγματοποιείται μέσω δύο πιθανών μεταβολικών μονοπατιών, το πιο κοινό από τα οποία περιλαμβάνει ένα σύστημα τριών ενζύμων: χιτινάσες και χιτοβιάσες (γλυκοζυλοϋδρολάσες) και αποακετυλάσες και περιγράφεται αναλυτικά στο Σχήμα 5 [8].



**ΣΧΗΜΑ 5: Δράση χιτινολυτικών ενζύμων στην αποικοδόμηση της χιτίνης.** Η διάσπαση της χιτίνης περιλαμβάνει τρία στάδια: υδρόλυση της χιτίνης από χιτινάσες και παραγωγή ολιγοσακχαρίτων και διασακχαρίτων χιτίνης (diNAG, χιτοβιόζη), περαιτέρω υδρόλυση των ολιγοσακχαρίτων από χιτοβιάσες και παραγωγή GlcNAc και τέλος, μετατροπή αυτών σε γλυκοζαμίνες μέσω δράσης αποακετυλασών

Η διάσπαση της χιτίνης ξεκινάει με τη δράση των **χιτινασών**. Οι χιτινάσες (EC 3.2.1.14)<sup>1</sup> είναι χιτινολυτικά ένζυμα, που δρουν υδρολύοντας τους β,1-4 γλυκοζιτικούς δεσμούς κατα μήκος της πολυσακχαρικής αλυσίδας της χιτίνης, παράγοντας διαλυτά, μικρού μοριακού βάρους ολιγομερή χιτίνης, όπως χιτοτετρόζη, χιτοτριόζη και χιτοβιόζη (diNAG), με τα μικρού μοριακού βάρους ολιγομερή να είναι τα πιο επικρατή. Εκτός από τους οργανισμούς που περιέχουν χιτίνη ως δομικό συστατικό - όπως μύκητες, μαλακόστρακα και έντομα - έχει παρατηρηθεί πως οι χιτινάσες εκφράζονται και σε οργανισμούς που δεν βιοσυνθέτουν χιτίνη όπως αρχαία, βακτήρια, ιούς, ανώτερα φυτά, ζώα και στους ανθρώπους<sup>2</sup>. Ο ρόλος των ενζύμων αυτών ποικίλει. Φυτά, για παράδειγμα, που δεν περιέχουν ανοσοποιητικό σύστημα, χρησιμοποιούν χιτινάσες ως μηχανισμό άμυνας. Βακτήρια χρησιμοποιούν τη χιτίνη ως πηγή ενέργειας και θρεπτικών συστατικών και τα χιτινολυτικά τους συστήματα εμπλέκονται στη φυσική ανακύκλωση χιτίνης. Αυτά τα ένζυμα βρίσκουν διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές ειδικότερα ως αντιμυκητιακοί παράγοντες [9].

Ως προς τον τρόπο υδρόλυσης του υποστρώματος, οι χιτινάσες διακρίνονται σε: τυχαίες, ενδο- και εξω- χιτινάσες (Σχήμα 6).



**ΣΧΗΜΑ 6: Εξειδίκευση χιτινασών ως προς τον τρόπο δράσης.** Οι εξωχιτινάσες δρουν στα άκρα της πολυσακχαρικής αλυσίδας, ενώ αντίθετα οι ενδοχιτινάσες δρουν στο εσωτερικό της

<sup>1</sup> Οι χιτινάσες ανήκουν στην: κύρια τάξη 3 (υδρολάσες), υπο-κατηγορία: 2 (γλυκοζυλάσες), υπο-υπο-κατηγορία: 1 (γλυκοζιδάσες), υπο-υπο-υπο-κατηγορία: 14 (εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα: χιτίνη). Συστηματική ονομασία: (1→4)-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D-γλυκανογλυκανουόδρολάση (<http://www.ebi.ac.uk/intenz/index.jsp>)

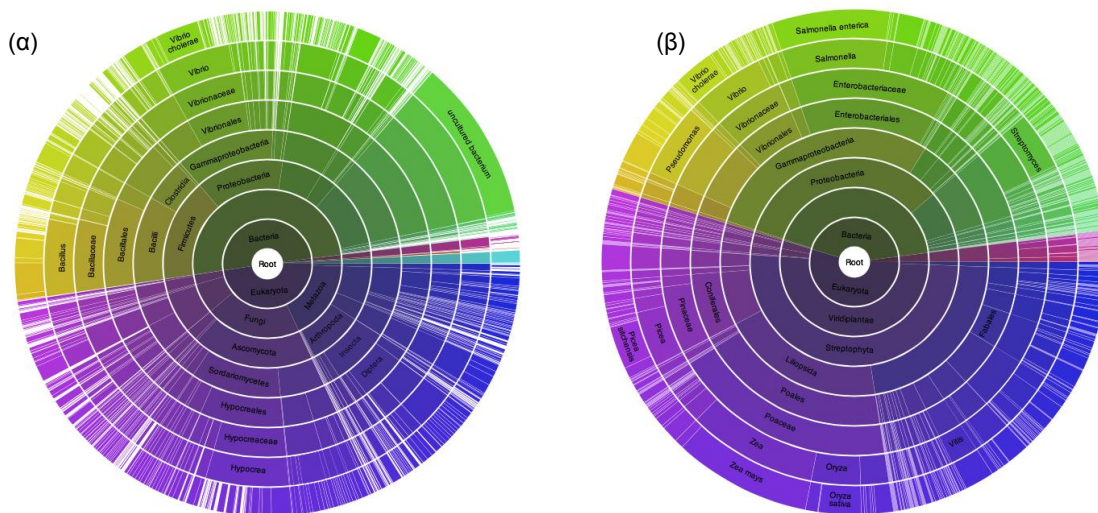
<sup>2</sup> Στον άνθρωπο είναι γνωστές δύο χιτινάσες: η χιτοτριοζιδάση (CHIT-1) και η όξινη χιτινάση των θηλαστικών (acidic mammalian chitinase - AMCase) καθώς και αρκετές άλλες χιτινάσες χωρίς καταλυτική δράση (χι-λεκτίνες). Η λειτουργία της CHIT-1 και της AMCase δεν είναι ακόμα γνωστή, ωστόσο πιστεύεται πως ο κύριος ρόλος τους είναι αμυντικός ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς που περιέχουν χιτίνη

Οι ενδοχιτινάσες διασπούν τους πεπτιδικούς δεσμούς στο εσωτερικό της πεπτιδικής αλυσίδας (όπως για παράδειγμα η χιτινάση C (ChiC)) παράγοντας διαλυτά ολιγομερή χιτίνης, ενώ αντίθετα οι εξωχιτινάσες υδρολύουν σταδιακά τους πεπτιδικούς δεσμούς στην άκρη της πεπτιδικής αλυσίδας, από το αμινοτελικό ή από το καρβοξυτελικό άκρο (όπως οι χιτινάση A (ChiA) και χιτινάση B (ChiB)) [10].

Με βάση την αμινοξική αλληλουχία του ενεργού κέντρου, οι χιτινάσες κατατάσσονται στις οικογένειες 18 και 19 της υπεροικογένειας των γλυκοζυλο-υδρολασών (GH18, GH19 - Glycoside Hydrolase family)<sup>3</sup>. Οι χιτινάσες των οικογενειών αυτών διαφέρουν ως προς την πρωτοταγή και τριτοταγή δομή, καθώς και ως προς τον μηχανισμό ενζυμικής δράσης, δεδομένα που οδηγούν στην πιθανότητα να έχουν εξελιχθεί από διαφορετικούς προγόνους. Τα μέλη της κάθε οικογένειας παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά, όπως τον τρόπο αναδίπλωσης της καταλυτικής περιοχής, την εξειδίκευση υποστρώματος, τη στερεοχημεία της αντίδρασης, και το μηχανισμό κατάλυσης. Πιο αναλυτικά, η οικογένεια GH19 των χιτινασών έχει βρεθεί σε φυτά και ορισμένα στελέχη στρεπτομυκήτων, όπως η ChiC του γένους *Streptomyces griseus* (Σχήμα 7β). Παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με τη λυσοζύμη του κοτόπουλου και περιέχει υψηλά ποσοστά α-ελίκων. Η υδρόλυση της χιτίνης πραγματοποιείται με μηχανισμό απλής αντικατάστασης με αναστροφή του ανωμερούς άνθρακα. Αντίθετα, η οικογένεια GH18 των χιτινασών απαντάται σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες, φυτά, έντομα, θηλαστικά και ιούς (Σχήμα 7α). Τα μέλη της οικογένειας αυτής διαθέτουν δομή βαρελιού (α/β)<sub>8</sub> όπου αποτελείται από οχτώ α-έλικες και οχτώ β-πτυχωτές επιφάνειες ενώ η υδρόλυση της χιτίνης πραγματοποιείται με μηχανισμό υποβοηθούμενο από το υπόστρωμα με διατήρηση της διαμόρφωσης του ανωμερούς άνθρακα. Ο μηχανισμός αυτός θα αναλυθεί στην παράγραφο 1.2.1 [11].

---

<sup>3</sup> Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης των Henrissat and Bairoch, η υπεροικογένεια των γλυκοζυλοϋδρολασών περιέχει 85 οικογένειες ενζύμων. Οι δομικές διαφορές μεταξύ των ενζύμων των οικογενειών αυτών αντικατοπτρίζουν και τις διάφορες εξειδικεύσεις ως προς το υπόστρωμα, τη στερεοεξειδίκευση (για παράδειγμα υδρόλυση α ή β ανωμερών) και τη διατήρηση ή αναστροφή της ανωμερούς διαμόρφωσης (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>)



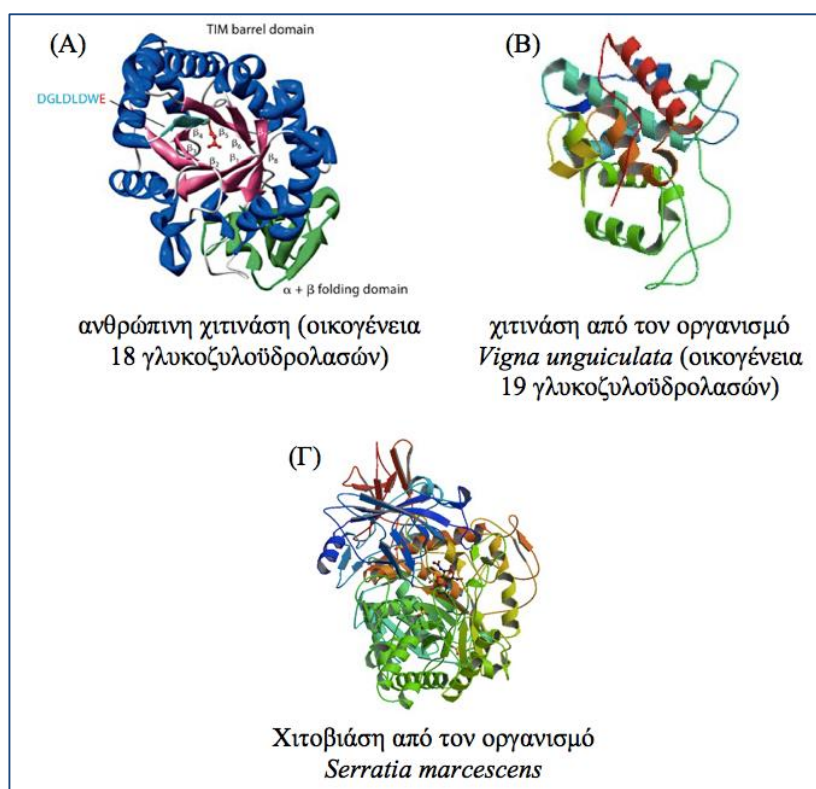
**ΣΧΗΜΑ 7: Κατανομή της οικογένειας (α) GH18 και (β) GH19 στα διάφορα είδη οργανισμών.** Όπως απεικονίζεται, στα παραπάνω διαγράμματα, οι χιτινάσες της οικογένειας GH19 εμφανίζονται κυρίως σε βακτήρια και φυτά, ενώ αντίθετα οι χιτινάσες της οικογένειας GH18 εμφανίζονται σε μια μεγαλύτερη ποικιλία οργανισμών, όπως έντομα, θηλαστικά, βακτήρια, μύκητες, φυτά και ιούς (<http://pfam.xfam.org>)

Εκτός από το σύστημα ταξινόμησης των Henrissat και Bairoch το οποίο βασίζεται στην πρωτοταγή δομή του ενεργού κέντρου των γλυκοζυλοϋδρολασών, οι χιτινάσες κατηγοριοποιούνται επίσης σε πέντε τάξεις με βάση την ομολογία της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Η πρώτη ομάδα (Class I) περιλαμβάνει χιτινάσες με υψηλά συντηρημένη δομή ενώ χαρακτηριστικό είναι το αμινοτελικό τους άκρο το οποίο είναι πλούσιο σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Αντίθετα, οι χιτινάσες της δεύτερης ομάδας (Class II) είναι δομικά ομόλογες με τις χιτινάσες της πρώτης τάξης ως προς την κύρια δομή αλλά δεν διαθέτουν δομική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες. Τα ένζυμα των ομάδων I, II και IV ανήκουν στην οικογένεια GH19 και περιλαμβάνουν κυρίως χιτινάσες φυτών. Αντίθετα, τα μέλη των ομάδων III και V δεν παρουσιάζουν αμινοξική ομολογία με τις ομάδες I, II και IV και ανήκουν στην οικογένεια GH18, η οποία περιλαμβάνει κυρίως χιτινάσες βακτηρίων [12].

Οι **χιτοβιάσες** (EC 3.2.1.30)<sup>4</sup> είναι χιτινολυτικά ένζυμα που υδρολύουν τους β,1-4 γλυκοζιτικούς δεσμούς των καταλοίπων NAG των δισακχαριτών και των ολιγοσακχαριτών χιτίνης. Οι χιτοβιάσες ανήκουν στην οικογένεια 20 των

<sup>4</sup> Οι Χιτοβιάσες ανήκουν στην κύρια τάξη: 3 (υδρολάσες), υπο-κατηγορία: 2 (γλυκοζυλάσες), υπο-υπο-κατηγορία: 1 (γλυκοζιδάσες), υπο-υπο-υπο-κατηγορία 14 (εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα: N-ακετυλο-β-D-γλυκοζαμίνη). Συστηματική ονομασία: (1→4)-2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D-γλυκανογλυκανοϋδρολάση

γλυκοζυλοϋδρολασών (GH20)<sup>5</sup> σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης των Henrissat και Bairoch [13], όπως και στην περίπτωση των χιτινασών, απαντώνται σε μια αρκετά μεγάλη κατηγορία οργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, φυτά, σπονδυλωτά και ασπόνδυλα. Η καταλυτική περιοχή των ενζύμων αυτών είναι συντηρημένη καθώς πρόκειται για δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  και ο μηχανισμός υδρόλυσης των diNAG είναι ο ίδιος με τον μηχανισμό υδρόλυσης των χιτινασών της οικογένειας GH18 [14,15]. Στο σχήμα 8 παρουσιάζονται παραδείγματα δομών χιτινολυτικών ενζύμων των οικογενειών GH18, GH19 και GH20.



**ΣΧΗΜΑ 8:** Παραδείγματα δομών χιτινολυτικών ενζύμων. Οι χιτινάσες της οικογένειας GH18 καθώς και οι χιτοβιάσες της οικογένειας GH20 χαρακτηρίζονται από τη δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$ . Αντίθετα, τα μέλη της οικογένειας GH19 παρουσιάζουν μια πολύ διαγορευτική αρχιεκτονική, καθώς αποτελούνται α-έλικες που συνδέονται με θηλιές (Protein Data Bank)

Οι **αποακετυλάσες** είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των ομάδων ακεταμιδίου των NAG, μετατρέποντάς τα σε γλυκοζαμίνες. Οι αποακετυλάσες δρουν και στη χιτίνη και στους ολιγοσακχαρίτες της παράγοντας ολιγομερή ή

<sup>5</sup> Στην οικογένεια GH20 ανήκουν και οι εξοζαμινιδάσες, ένζυμα τα οποία υδρολύουν τους γαγγλιοζίτες τύπου GM<sub>2</sub> των ανώτερων οργανισμών. Έλειψη των ενζύμων αυτών οδηγεί σε συσσώρευση των γαγγλιοζίων προκαλώντας γαγγλιωζιδώσεις όπως οι ασθένειες Tay-Sachs και Sandhoff

πολυμερή γλυκοζαμίνης (χιτοζάνες). Εκτός από τη συνεισφορά των ενζύμων αυτών στον κύκλο του αζώτου με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω, μια διαδικασία που αφορά αποακετυλάσες βακτηρίων, έχει βρεθεί πως παίζουν σημαντικό ρόλο και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες σε διάφορα είδη οργανισμών. Για παράδειγμα, παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων. Επιπλέον συμμετέχουν και στον μηχανισμό άμυνας διαφόρων παθογόνων οργανισμών, όπως οι παθογόνοι φυτών *Colletotrichum lindemuthianum* και *Uromyces viciae-fabae* και ο παθογόνος εντόμων *M. anisopliae*. Οι αποακετυλάσες των οργανισμών αυτών βοηθούν στην αυτοάμυνα ενάντια στις χιτινάσες των ξενιστών τους καθώς αλλάζουν τη σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος από χιτίνη σε χιτοζάνη [66,67].

## 1.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ 18 ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΥΛΟΪΔΡΟΛΑΣΩΝ

Η θεμελιώδης λειτουργία των χιτινασών της οικογένειας GH18 είναι η υδρόλυση χιτίνης. Μέσα από τη λειτουργία αυτή, τα ένζυμα αυτά έχει βρεθεί πως εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες στα διάφορα είδη οργανισμών. Στις ζύμες, για παράδειγμα, οι χιτινάσες είναι απαραίτητες για τον διαχωρισμό των κυττάρων κατά την ανάπτυξή τους, καθώς στον οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* έχει αποδειχθεί πως μετάλλαξη των γονιδίων που εκφράζουν τα ένζυμα αυτά οδηγεί σε αποτυχία της διαδικασίας αυτής [16]. Στους μύκητες οι χιτινάσες συμμετέχουν στην αποδόμηση και κινητοποίηση οργανικής ύλης. Σε νηματοειδείς μύκητες, εμπλέκονται σε διαδικασίες αποδόμησης και τροποποίησης του κυτταρικού τοιχώματος, που προηγούνται λειτουργιών όπως η εκβλάστηση, η ανάπτυξη άκρων, η διακλάδωση υφών, η διαφοροποίηση σποριών, η αυτόλυση και ο μυκοπαρασιτισμός [16]. Στον οργανισμό *Crassostrea gigas*, ενεργές χιτινάσες εμπλέκονται στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην ανοσία, ενώ ενζυμικά ανενεργές χιτινάσες εμπλέκονται στον έλεγχο ανάπτυξης καθώς και στη σύνθεση των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας [16]. Στα αρθρόποδα, οι χιτινάσες εμπλέκονται στη φυσική ανανέωση του εξωσκελετού τους, καθώς και στην πέψη θρεπτικών συστατικών. Στα σπονδυλωτά, ο ρόλος των

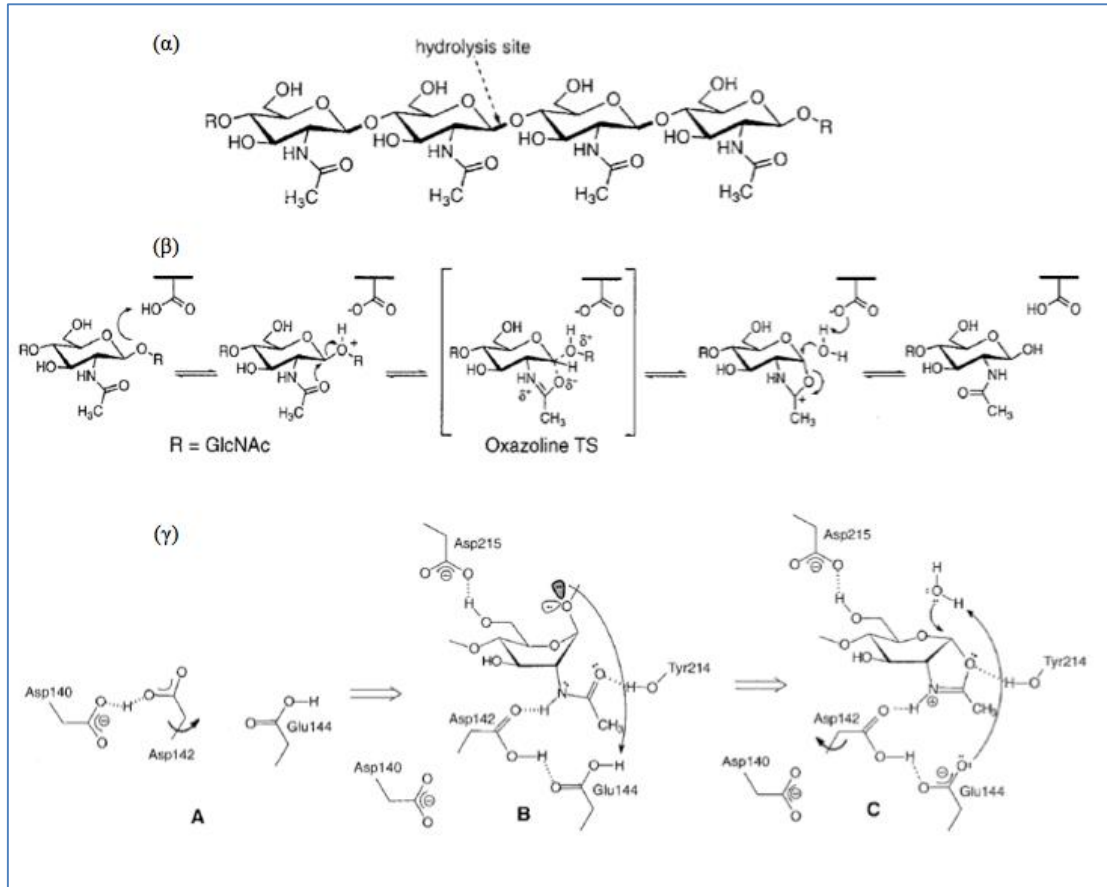
χιτινασών δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος ωστόσο θεωρείται πως εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας ενάντια σε μολύνσεις από μύκητες. Στα έντομα, τα μέλη της οικογένειας GH18 ταξινομούνται περαιτέρω με βάση τα ιδιαίτερα ενζυμικά χαρακτηριστικά, όπως την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, τις βέλτιστες τιμές pH για τη δράση τους και τη γλυκοζυλίωση (μετα-μεταφραστική τροποποίηση).

Η χιτίνη, καθώς η ζωή εξελίχθηκε σε ανώτερες μορφές ζωής έπαψε να υπάρχει. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε χιτινάσες υπάρχουν και σε ανώτερους οργανισμούς. Στα θηλαστικά, η εξωγενής χιτίνη προκαλεί συσσώρευση στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλώντας αλλεργίες. Γενικώς η οικογένεια GH18 συνδέεται στενά με αλλεργικές παθήσεις, όπως άσθμα, αλλά και άλλες ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, οι χιτινάσες της οικογένειας αυτής συμμετέχουν και στο μηχανισμό άμυνας του κυττάρου-ξενιστή ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς που περιέχουν χιτίνη ως δομικό συστατικό. Γενικότερα, μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί δύο μέλη της οικογένειας GH18 στον σακχαρομύκητα *S. cerevisiae*, 18 του μύκητα *Aspergillus nidulans*, 35 στη *Caenorhabditis elegans*, 17 στη *Drosophila melanogaster*, 8 στο ψάρι *Danio rerio*, 9 σε ποντίκια *Mus musculus* και 6 στον *Homo sapiens* [16,17].

### **1.2.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ**

Ο μηχανισμός καταλυτικής δράσης των ενζύμων αυτών είναι αρκετά συντηρημένος αφού από την υδρόλυση των β, 1-4 γλυκοζυτικών δεσμών προκύπτουν β-ανωμερή, ενώ η διάσπαση πραγματοποιείται με διατήρηση της στερεοχημείας του ανωμερούς άνθρακα. Πρόκειται για μηχανισμό διπλής αντικατάστασης με τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου οξαζολινικού ιόντος το οποίο σταθεροποιείται από τη γειτονική ομάδα ακεταμιδίου που βρίσκεται στον C2' του εξαμελούς δακτυλίου του υποστρώματος (μηχανισμός υποβοηθούμενος από το υπόστρωμα, *substrate assisted mechanism*) (Σχήμα 9β) [18].





**ΣΧΗΜΑ 9: Μηχανισμός δράσης της οικογένειας GH18 των χιτινασών. (α)** Θέση υδρόλυσης της χιτίνης (β) Μηχανισμός κατάλυσης μέσω του ενδιάμεσου κατιόντος οξαζολινίου. (γ) Ο ρόλος των συντηρημένων καταλοίπων Asp-140, Asp-142 και Glu-144 στα διάφορα στάδια κατάλυσης. (Α) Αρχική κατάσταση - ανενεργό ένζυμο (*resting enzyme*). Το Asp-142 δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με το Glu-144 λόγω απόστασης μεταξύ των δύο καταλοίπων. (Β) Κατά τη σύνδεση του ενζύμου με το υπόστρωμα, ο δακτύλιος NAG αποκτά διαμόρφωση λουτήρα οδηγώντας στην περιστροφή της καρβοξυλικής ομάδας του Asp-142 προς τη μεριά του Glu-144, επιτρέποντας έτσι την αλληλεπίδρασή τους και τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ του υδρογόνου του ακεταμιδίου και των καρβοξυλικών ομάδων των Asp-142 και Glu-144 (C) Υδρόλυση του ενδιάμεσου ιόντος οξαζολινίου οδηγεί σε πρωτονίωση του Glu-144 και επιστροφή της καρβοξυλικής ομάδας του Asp-142 στην αρχική της θέση όπου και σταθεροποιείται με δημιουργία δεσμών υδρογόνου με την καρβοξυλική ομάδα του Asp-140

Αναλυτικότερα, η αντίδραση ξεκινά με πρωτονίωση του γλυκοζιτικού οξυγόνου από ένα κατάλοιπο αμινοξέος που φέρει μια πρωτονιωμένη καρβοξυλική ομάδα. Ακολουθεί πυρηνόφιλη προσθήκη του οξυγόνου της N-ακετυλομάδας με τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου ιόντος οξαζολινίου και αποκοπή του σακχάρου από την υπόλοιπη πολυσακχαριτική αλυσίδα. Τέλος, η αντίδραση ολοκληρώνεται με υδρόλυση του κατιοντικού δακτυλίου και δημιουργία του μονοσακχάρου NAG.

Στις περισσότερες χιτινάσες που ανήκουν στην οικογένεια GH18, έχουν βρεθεί συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα σε συγκεκριμένες θέσεις στον πυρήνα του ενεργού κέντρου του βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  (βλ. Παράγραφο 1.3) με καθορισμένο ρόλο για τον μηχανισμό δράσης. Πιο αναλυτικά, τα αμινοξέα Tyr-10, Ser-93, Asp-140, Asp-142 και Glu-144 παίζουν σημαντικό ρόλο στον απεντοπισμό του φορτίου, σταθεροποιώντας το ενδιάμεσο ιόν οξαζολινίου, αλλά και στην ανταλλαγή πρωτονίων κατά την κατάλυση. Στο Σχήμα 9γ παρουσιάζεται η συμμετοχή των συντηρημένων καταλοίπων Asp-140, Asp-142 και Glu-144 στα διάφορα στάδια κατάλυσης [19].

Τα μέλη της οικογένειας GH18 θα μπορούσαν περαιτέρω να διαχωρισθούν σε ενζυμικά ενεργές χιτινάσες και ενζυμικά ανενεργές χιτολεκτίνες. Οι τελευταίες έχουν χάσει την ικανότητα ενζυμικής δράσης λόγω έλλειψης ενός καταλοίπου γλουταμινικού οξέος στην ενεργή περιοχή του καταλυτικού κέντρου, το οποίο παρέχει ένα πρωτόνιο και είναι απαραίτητο για την έναρξη της κατάλυσης. Ωστόσο, τα ένζυμα αυτά διατηρούν τη δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  καθώς και την ικανότητά τους να δεσμεύουν τους ολιγοσακχαρίτες στην ενεργή περιοχή.

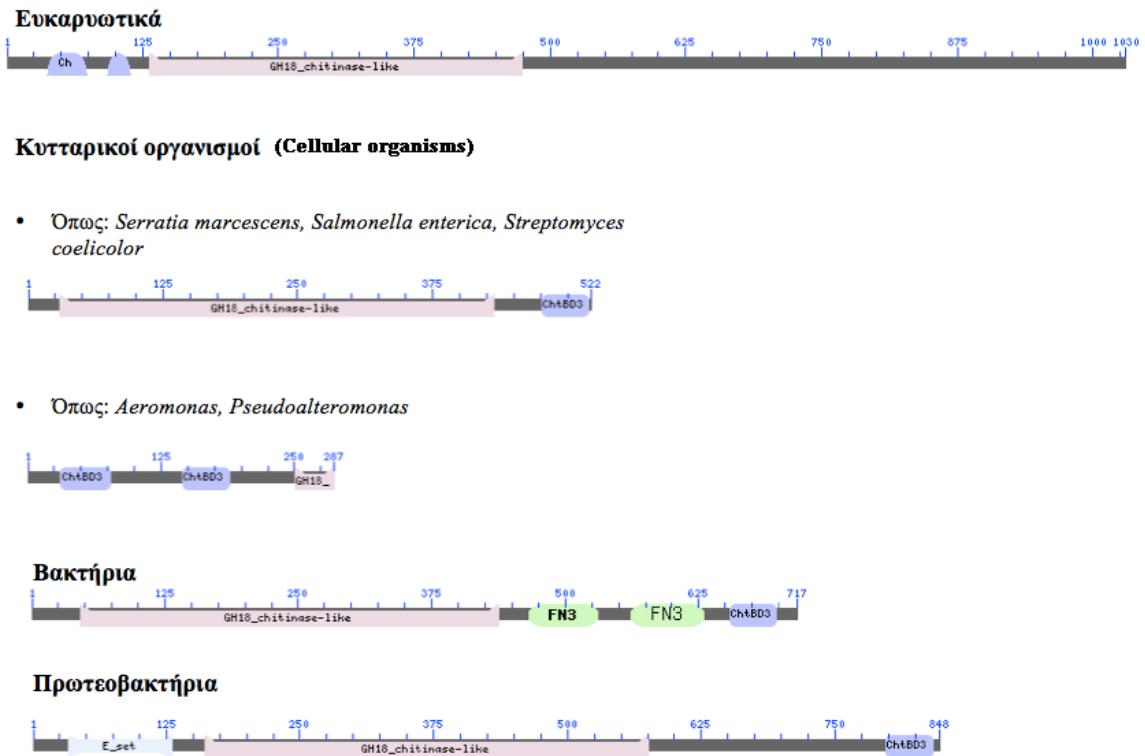
Οι χιτολεκτίνες συμμετέχουν σε διαφορετικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, η ανθρώπινη χιτολεκτίνη Chi311 εμπλέκεται σε φλεγμονές και στην αναδιαμόρφωση ιστών, ενώ η Idgf (Imaginal disc growth factor) των εντόμων εμπλέκεται στον έλεγχο της ανάπτυξης [16].

### **1.2.2 ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, βασικό χαρακτηριστικό των ενζύμων της οικογένειας GH18 είναι η δομή της καταλυτικής τους περιοχής, η οποία είναι συντηρημένη σε όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής. Πρόκειται για δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  και είναι απαραίτητη για την αποδοτική κατάλυση των διαφόρων ειδών χιτίνης. Ωστόσο, τα μέλη της οικογένειας GH18 των χιτινασών παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία όσον αφορά την αρχιτεκτονική τους. Οι δομικές διαφορές είναι πιθανώς αποτέλεσμα της μεγάλης ποικιλομορφίας των χιτινασών ως προς την λειτουργία και τον φυσιολογικό τους ρόλο. Εμπειριστικώς μελέτη της δομής των

χιτινολυτικών ενζύμων μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη λειτουργικότητα και τον φυσιολογικό τους ρόλο, οδηγώντας σε σημαντικές πληροφορίες και πιθανές εφαρμογές των ενζύμων αυτών σε βιολογικά συστήματα άμυνας.

Στο Σχήμα 10 παρουσιάζονται οι συντηρημένες δομικές περιοχές χιτινασών στα διάφορα είδη οργανισμών. Για κάθε οργανισμό υπάρχουν διάφοροι συνδυασμοί δομικών και λειτουργικών στοιχείων τα οποία περιλαμβάνουν: μια αλληλουχία πεπτιδίου-σήματος, καμία, μια ή και αρκετές περιοχές πλούσιες σε σερίνη και θρεονίνη (S/T-rich linkers), μια έως πέντε επαναλαμβανόμενες καταλυτικές περιοχές και μια έως πέντε περιοχές πρόσδεσης χιτίνης (ChBD ή ChtBD3). Η αλληλουχία πεπτιδίου-σήματος είναι συνήθως δείκτης για το ότι μια πρωτεΐνη είναι εκκρινόμενη, είναι δε γνωστό ότι οι περισσότερες εκκρινόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας GH18 διαθέτουν ένα πεπτιδίο-σήμα που τις οδηγεί έξω από το κύτταρο. Εξάιρεση αποτελεί η χιτινάση που έχει απομονωθεί από το gram (-) βακτήριο *Serratia marcescens*. Η χιτινάση αυτή μπορεί να εκκριθεί στον περιπλασματικό χώρο μέσω ενός αγνώστου μέχρι στιγμής μηχανισμού, χωρίς να διαθέτει την αλληλουχία πεπτιδίου-σήματος [16].



**ΣΧΗΜΑ 10: Συντηρημένες δομικές περιοχές χιτινασών σε διάφορα είδη οργανισμών.** Ροζ: καταλυτικό κέντρο (GH18\_chitinase-like), μπλε: ChtBD3, πράσινο: περιοχή φιμπρονεκτίνης τύπου III (FN3), γαλάζιο: ρυθμιστική περιοχή σύνδεσης με κατάλοιπα σακχάρων (E\_set)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=cdd&uid=119349>)



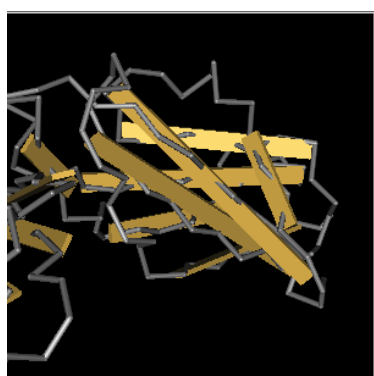
**ΣΧΗΜΑ 11: Κρυσταλλική δομή της ChBD**

Εκτός από το καταλυτικό κέντρο που είναι συντηρημένο σε όλα τα είδη οργανισμών, μια επίσης πολύ συντηρημένη περιοχή είναι η ChBD (Σχήμα 11). Η περιοχή αυτή, συνδέεται με αδιάλυτη ή κρυσταλλική χιτίνη και διευκολύνει τη διάσπασή της με τη βοήθεια των συντηρημένων αρωματικών αμινοξέων της περιοχής. Σύμφωνα με μελέτες, απαλοιφή αυτού του δομικού αυτοτελούς στοιχείου δεν επηρεάζει την ικανότητα του ενζύμου να διασπάσει το διαλυτό υπόστρωμα, ωστόσο παρεμποδίζει την ικανότητα υδρόλυσης αδιάλυτης χιτίνης.

Υπάρχουν δύο τύποι περιοχών ChBD: η πρώτη κατηγορία (ChBD 1) αποτελείται από οχτώ συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης και συνήθως συναντάται στις χιτινάσες της οικογένειας GH19. Ωστόσο έχει βρεθεί και στους

οργανισμούς *A. nidulans* και *C. elegans* της οικογένειας GH18 αλλά όχι σε αρθρόποδα και ανώτερα ζώα. Αντίθετα, στις χιτινάσες των οργανισμών αυτών έχει βρεθεί η δεύτερη κατηγορία (ChBD 2) η οποία αποτελείται από έξι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Τέλος, ορισμένα μέλη της οικογένειας GH18 δεν διαθέτουν την περιοχή ChBD πιθανώς κατά τον διπλασιασμό γονιδίων.

Το καταλυτικό κέντρο συνδέεται με την περιοχή ChBD συνήθως μέσω της περιοχής σερίνης-θρεονίνης (S/T-rich linkers). Αυτή η υψηλά γλυκοζυλιωμένη περιοχή προσφέρει προστασία στη χιτινάση από πρωτεολυτική διάσπαση [16]. Τέλος, στα βακτήρια και στα πρωτεοβακτήρια υπάρχουν επιπρόσθετες συντηρημένες δομικές περιοχές. Η περιοχή της φιβρονεκτίνης τύπου III (Fibronectin Type III domain, FnIII) των βακτηρίων και η περιοχή σύνδεσης σακχάρων (Early set domain, E\_set) των πρωτεοβακτηρίων είναι υψηλά συντηρημένες δομικές περιοχές και συνεισφέρουν στην αποδοτική υδρόλυση της χιτίνης. Ειδικότερα, η τελευταία περιοχή συνδέεται με το καταλυτικό κέντρο στο αμινοτελικό άκρο. Η περιοχή αυτή των πρωτεοβακτηριακών χιτινασών είναι συναφής με τις υπεροικογένειες της ανοσοσφαιρίνης και της FNIII και πιθανώς εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις ομοδιμερισμού, τετραμερισμού και δωδεκαμερισμού.



**ΣΧΗΜΑ 12:** Κρυσταλλική δομή της FNIII

Το δομικό αυτοτελές στοιχείο της FnIII (Σχήμα 12) είναι μια αρκετά συντηρημένη περιοχή στις βακτηριακές χιτινάσες. Βρίσκεται ενδιάμεσα στην περιοχή πρόσδεσης χιτίνης και στο καταλυτικό κέντρο, συνδέοντας αυτά τα δύο δομικά στοιχεία. Πρόκειται για ένα από τα πιο κοινά δομικά μοτίβα σε ζωικές πρωτεΐνες, πιστεύεται δε πως οι βακτηριακές περιοχές FnIII υιοθετήθηκαν από τα ζώα με οριζόντια μεταφορά γονιδίων [20].

Ο συγκεκριμένος τύπος φιβρονεκτίνης, μαζί με τους υπόλοιπους δύο (φιβρονεκτίνη I και II), βρίσκεται στην φιβρονεκτίνη, μια πρωτεΐνη του πλάσματος από την οποία προήλθε και το όνομα της συγκεκριμένης δομικής περιοχής. Ένα ποσοστό περίπου 2% των ζωικών πρωτεϊνών περιέχουν αυτή την επαναλαμβανόμενη δομική περιοχή. Σε αυτό ανήκουν εξωκυτταρικές και

ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, και διάφοροι υποδοχείς όπως: διαμεμβρανικοί υποδοχείς κυτοκίνων, υποδοχείς αυξητικών ορμονών και φωσφατασών τυροσίνης.

### 1.3 ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΧΙΤΙΝΑΣΩΝ

Οι βακτηριακές χιτινάσες αποτελούνται από τρεις συντηρημένες δομικές περιοχές (Σχήμα 13). Το καταλυτικό κέντρο με δομή βαρελιού (α/β)<sub>8</sub>, την περιοχή ChBD και την περιοχή FNIII, η οποία συνδέεται με το καταλυτικό κέντρο. Ο ρόλος της κάθε δομικής περιοχής δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως.



**ΣΧΗΜΑ 13:** Συντηρημένες δομικές περιοχές βακτηριακών χιτινάσων. Ροζ: καταλυτικό κέντρο (GH18\_chitinase-like), μπλε: ChtBD3, πράσινο: περιοχή φιμπρονεκτίνης τύπου III (FN3), γαλάζιο: ρυθμιστική περιοχή σύνδεσης με κατάλοιπα σακχάρων (E\_set) (πράσινη περιοχή)

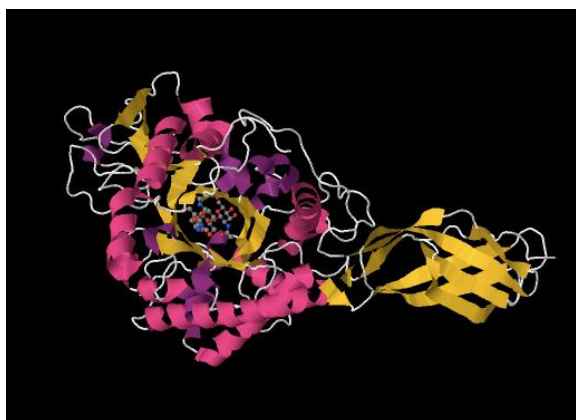
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=cdd&uid=119349>)

Τα χιτινολυτικά βακτήρια παράγουν διάφορες χιτινάσες οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Πολλά χιτινολυτικά βακτήρια παράγουν χιτινάσες που ανήκουν μόνο στην οικογένεια GH18, ενώ ορισμένα,

όπως αυτά του είδους *Streptomyces*, παράγουν εκτός από χιπινάσες της οικογένειας GH18 και χιπινάσες της οικογένειας GH19. Οι βακτηριακές χιπινάσες της οικογένειας GH18 θα μπορούσαν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε τρεις υπο-οικογένειες: τις A, B και C. Οι χιπινάσες της υπο-οικογένειας A διαθέτουν ένα πρόσθετο αυτοτελές στοιχείο μεταξύ της έβδομης και όγδοης β-πτυχωτής επιφάνειας της βασικής δομής του βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$ . Αντίθετα, οι χιπινάσες που ανήκουν στις υπο-οικογένειες B και C δεν διαθέτουν τέτοια δομική περιοχή [21]. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένες χαρακτηριστικές δομές βακτηριακών χιπινασών που ανήκουν στην οικογένεια GH18.

### Χιπινάση A από τον οργανισμό *Serratia marcescens*

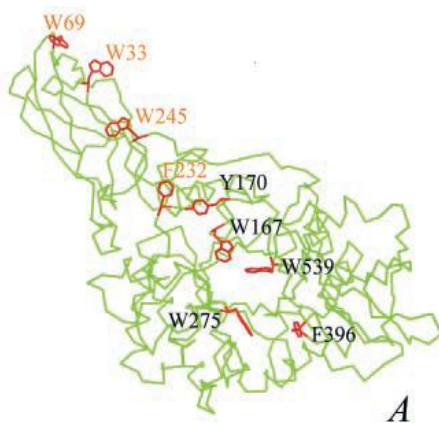
Η δομή της χιπινάσης A (ChiA) του οργανισμού *S. marcescens* έχει μελετηθεί εκτενώς, καθώς είναι το πρώτο βακτηριακό χιπινολυτικό ένζυμο που έχει μελετηθεί. Πρόκειται για ένα μεσόφιλο ένζυμο με υψηλή καταλυτική δραστηριότητα και σταθερότητα. Η κρυσταλλική δομή της ChiA έχει αποκαλύψει πως το ένζυμο αυτό αποτελείται από τρία δομικά στοιχεία: ένα



**ΣΧΗΜΑ 14:** Κρυσταλλική δομή ChiA. Στο κέντρο του βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  βρίσκεται η αλλοζαμίνη, αναστολέας χιπινασών

δομικό στοιχείο FNIII στο αμινοτελικό άκρο του ενζύμου που αποτελείται εξ'ολοκλήρου από β-πτυχωτές επιφάνειες, το καταλυτικό κέντρο με δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  και ένα μικρό  $(\alpha+\beta)$  αυτοτελές στοιχείο το οποίο έχει εισαχθεί στο βαρέλι  $(\alpha/\beta)_8$  μεταξύ της β7 β-πτυχωτής επιφάνειας και της α7 α-έλικας (Σχήμα 14) [22- 24]. Η λειτουργία των επιμέρους δομικών στοιχείων από την άποψη της συμβολής τους στις δομικές και ενζυμικές ιδιότητες του μορίου έχει μελετηθεί συστηματικά. Απαλοιφή του δομικού στοιχείου  $(\alpha+\beta)$  απέδειξε πως η περιοχή αυτή επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα, την ειδική δραστηριότητα αλλά και την εξειδίκευση υποστρώματος (Παράγραφος 1.5.1). Όπως αναφέρθηκε, αυτό το στοιχείο λειτουργικά παρεμβάλεται στο καταλυτικό κέντρο, τα δε αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στην περιοχή  $(\alpha+\beta)$

συμμετέχουν στη σύνδεση του υποστρώματος από το ένζυμο [25]. Η αμινοτελική περιοχή της ChiA αρχικά είχε θεωρηθεί πως ήταν η περιοχή ChBD, ωστόσο, νεότερες μελέτες αποδεικνύουν πως ο ρόλος της περιοχής αυτής δεν είναι ακριβώς αυτός. Αλαλυτικότερα, αυτό το στοιχείο μόνο του δεν επαρκεί για να προσδέσει το υπόστρωμά του (δεν παρουσιάζει σημαντική προσδετική ικανότητα), είναι όμως απαραίτητο για την πρόσδεση του υποστρώματος. Υπό αυτή την έννοια, το δομικό αυτό στοιχείο θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «ατελής περιοχή πρόσδεσης χιτίνης». Αντίθετα, τέσσερα κατάλοιπα αρωματικών αμινοξέων έχει βρεθεί πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα πρόσδεσης και διάσπασης χιτίνης από τη ChiA. Δύο βρίσκονται στην αμινοτελική δομική περιοχή και είναι η Trp-69 και η Trp-33 και δύο βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο και είναι η Trp-245 και η Phe-232, (Σχήμα 15) ενώ και τα τέσσερα βρίσκονται ευθυγραμμισμένα βαθιά στην καταλυτική σχισμή του ενζύμου. Απαλοιφή ή και αντικατάσταση των αμινοξέων αυτών έδειξε πως είναι όλα απαραίτητα για την αποδοτική υδρόλυση κρυσταλλικής χιτίνης, καθώς η αντικατάσταση του κάθε ενός αμινοξέος οδήγησε σε μείωση της ικανότητας πρόσδεσης χιτίνης. Φαίνεται ότι η δράση τους πραγματοποιείται με συνεργιστικό τρόπο [21].

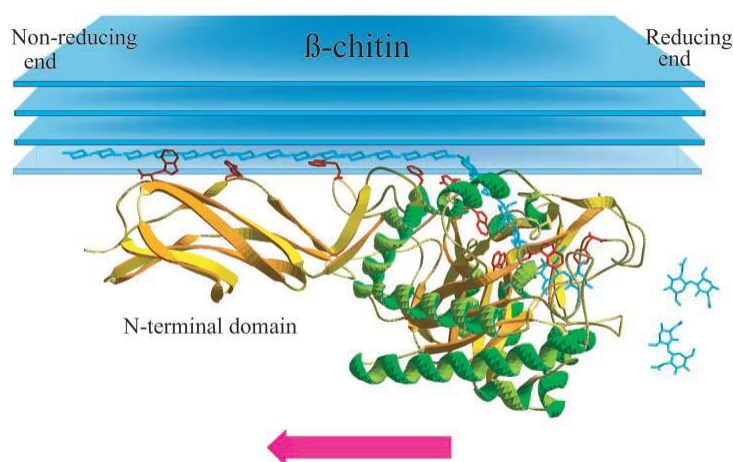


**ΣΧΗΜΑ 15:** Θέσεις αρωματικών αμινοξέων με καθοριστικό ρόλο στην υδρόλυση της χιτίνης

Τα αμινοξικά κατάλοιπα Trp-69, Trp-33 και Trp245 είναι απαραίτητα για την πρόσδεση του υποστρώματος. Επομένως, καθώς η αλυσίδα χιτίνης αλληλεπιδρά με αυτά τα αμινοξέα, η Phe-232, που βρίσκεται πιο κοντά στη σχισμή του καταλυτικού κέντρου, οδηγεί την αλυσίδα χιτίνης στην καταλυτική σχισμή. Τέλος, η αλυσίδα χιτίνης «γλιστρά» προς το καταλυτικό κέντρο όπου και γίνεται συνεχής υδρόλυση του β-1,4 γλυκοζυτικού δεσμού,

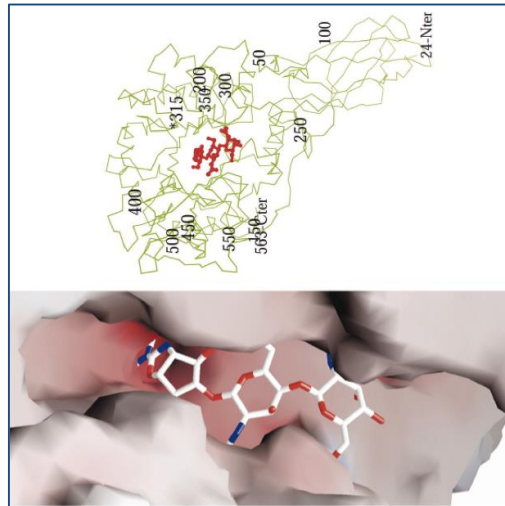


απελευθερώνοντας σταδιακά δισακχαρίτες χιτίνης. Τα κατάλοιπα Tyr-170, Trp-167, Trp-539, Trp-275 και Phe-396 στην καταλυτική σχισμή παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση και στην κίνηση της αλυσίδας της χιτίνης προς το καταλυτικό κέντρο. Τα κατάλοιπα της θρυπτοφάνης βρίσκονται γύρω από το ενεργό κέντρο και η Phe-396 πιθανώς να είναι υπεύθυνα για την κάμψη και συστροφή της αλυσίδας της χιτίνης στην περιοχή -1. Η αλληλεπίδραση της χιτίνης με διάφορα αρωματικά αμινοξέα, τα οποία δεν βρίσκονται μόνο στην καταλυτική σχισμή αλλά και στην επιφάνεια του μορίου της ChiA, έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή πρόσδεση της αλυσίδας της χιτίνης από το ένζυμο και την σταδιακή της υδρόλυση απελευθερώνοντας δισακχαρίτες χιτίνης (Σχήμα 16) [21].



**ΣΧΗΜΑ 16: Μηχανισμός υδρόλυσης κρυσταλλικής β-χιτίνης από τη ChiA**

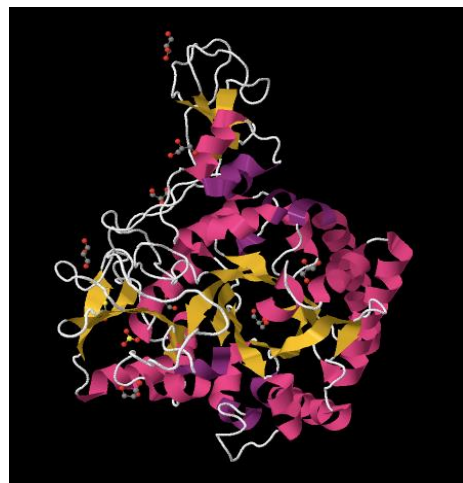
Στο Σχήμα 17 παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση της ChiA με την αλλοζαμίνη. Η αλλοζαμίνη είναι αναστολέας χιτινασών και δρα με αντίστοιχο τρόπο σε όλες τις χιτινάσες. Ο αναστολέας αυτός, παρεμβάλεται στο ενεργό κέντρο της ChiA με τέτοιο τρόπο που παρεμποδίζεται η είσοδος του υποστρώματος στη «σύραγγα» του ενεργού κέντρου. Ο αναστολέας, δεσμεύεται ισχυρά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, μέσω πολικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, οι πιο σημαντικές από τις οποίες πραγματοποιούνται μέσω τριών σημαντικών αμινοξικών καταλοίπων κρίσιμης σημασίας για τον μηχανισμό κατάλυσης: της Glu-315 η οποία λειτουργεί ως φορέας πρωτονίων (ο ρόλος των γλουταμινικών ως φορείς πρωτονίων αναλύεται στην παράγραφο 1.2.1), της Asp-313 και της Tyr-390 [23].



**ΣΧΗΜΑ 17:** Η αλληλεπίδραση του αναστολέα αλλοζαμίνη με το καταλυτικό κέντρο της ChiA. Στερεοαπεικόνιση του ενζύμου, όπου ο αναστολέας (κόκκινο χρώμα) συνδέεται στην ενεργή περιοχή της σήραγγας του καταλυτικού κέντρου

### Χιτινάση B από τον οργανισμό *Serratia marcescens*

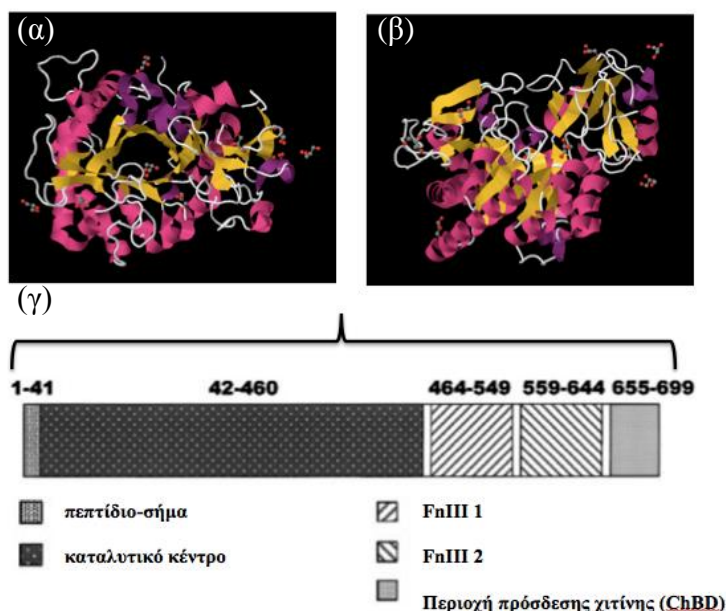
Η χιτινάση B (ChiB) του οργανισμού *S. marcescens* είναι η πρώτη εξωχιτινάση της οποίας η δομή κρυσταλλογραφήθηκε, και αποτελεί ένα από τα ελάχιστα παραδείγματα της οικογένειας GH18 όπου το καταλυτικό κέντρο αλληλεπιδρά άμεσα με την ChBD (Σχήμα 18). Η ChiB αποτελείται από το καταλυτικό κέντρο με δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  και την



καρβοξυτελική περιοχή ChBD που αποτελείται από 49 αμινοξικά κατάλοιπα. Το δομικό αυτοτελές στοιχείο ChBD έχει εκτεθειμένα αρωματικά αμινοξέα τα οποία εκτείνονται κατα μήκος της περιοχής του ενεργού κέντρου. Η σύνδεση των ολιγομερών χιτίνης εμποδίζεται στη θέση -3 της αλυσίδας, γεγονός το οποίο εξηγεί τον λόγο που το ένζυμο έχει δράση χιτοτριοζιδάσης και διασπά την αλυσίδα της χιτίνης από το μη αναγωγικό άκρο, κατεύθυνση αντίστροφη με αυτήν της ChiA. Τέλος, η συγκριτική μελέτη της δομής της ChiB με τη δομή της ChiA εξηγεί και τον λόγο για τον οποίο τα δύο ένζυμα του οργανισμού *S. marcescens* υδρολύουν τη χιτίνη με συνεργιστικό τρόπο [26].

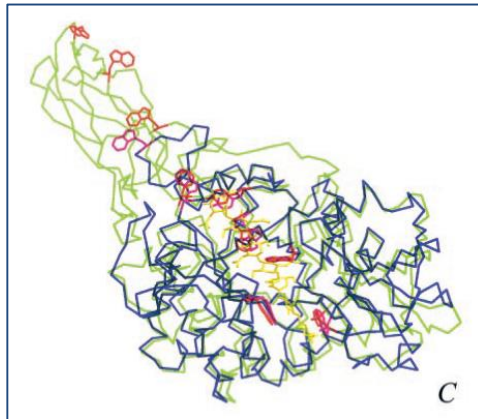
## Χιτινάση A1 από τον οργανισμό *Bacillus circulans* WL-12

Ο οργανισμός *Bacillus circulans* WL-12 παράγει τρεις διαφορετικές χιτινάσες: τη χιτινάση A1 (ChiA1), τη χιτινάση C1 (ChiC1) και τη χιτινάση D1 (ChiD1), από τις οποίες, η ChiA1 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη υδρολυτική δραστηριότητα σε αδιάλυτη χιτίνη. Η ChiA1 αποτελείται από τρία δομικά στοιχεία: το καταλυτικό κέντρο, το οποίο βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο και διαθέτει δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  (όπως όλες οι χιτινάσες της οικογένειας GH18), δύο περιοχές FNIII (FnIIIID-1 and FnIIIID-2) και μια περιοχή ChBD που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο (Σχήμα 19γ). Αυτές οι δομικές περιοχές συνδέονται μέσω συνδετικών πεπτιδίων, μήκους 9-12 αμινοξέων.



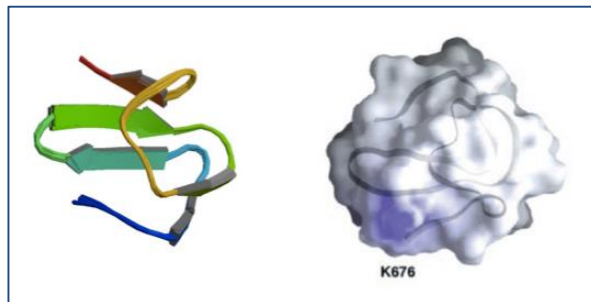
**ΣΧΗΜΑ 19: Δομή ChiA1.** (α) Κάτοψη τριτοπαγούς δομής του μορίου, όπου φαίνεται η δομή του βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$ , με τις  $\beta$ -πτυχώσεις στραμμένες προς το εσωτερικό και τις συνδετικές  $\alpha$ -έλικες στο εξωτερικό του μορίου της ChiA1. (β) Πλάγια όψη του μορίου της ChiA1, όπου φαίνεται η FNIII καθώς και η ChBD (κίτρινες περιοχές  $\beta$ -φύλλων). (γ) Δευτεροταγής δομή ChiA1, όπου παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των δομικών αυτοτελών στοιχείων

Το καταλυτικό κέντρο της ChiA1 είναι δομικά παρόμοιο με αυτό της ChiA του οργανισμού *S. marcescens* (Σχήμα 20). Διαθέτει μια βαθιά σχισμή πρόσδεσης χιτίνης, όπου αρωματικά αμινοξέα βρίσκονται ευθυγραμμισμένα, συνεισφέροντας στην αποδοτική υδρόλυση της χιτίνης. Λόγω αυτής της δομικής ομολογίας των καταλυτικών κέντρων της ChiA1 με τη ChiA, ο μηχανισμός υδρόλυσης της χιτίνης θεωρείται παρόμοιος στις δυο χιτινάσες, αν και δεν έχει κατανοηθεί πλήρως [20,21].



**ΣΧΗΜΑ 20: Δομή ChiA (πράσινο χρώμα) και ChiA1 (μπλε χρώμα).** Τα καταλυτικά κέντρα εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στη δομή τους. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι θέσεις των αρωματικών αρωματικών αμινοξέων που έχει βρεθεί πως παίζουν καθοριστικό ρόλο στην υδρόλυση της χιτίνης

Η περιοχή ChBD, διαθέτει συμπαγή και σφαιρική δομή και την τοπολογία ενός συνεστραμένου “β-sandwich” (Σχήμα 21). Η δομή αυτή, περιλαμβάνει δύο αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, με τη μια να αποτελείται από τρεις β-πτυχώσεις και την άλλη από δύο β-πτυχώσεις. Η περιοχή του πυρήνα αποτελείται από υδρόφοβα και αρωματικά αμινοξέα και καθιστά τη συνολική δομή άκαμπτη και συμπαγή [27].



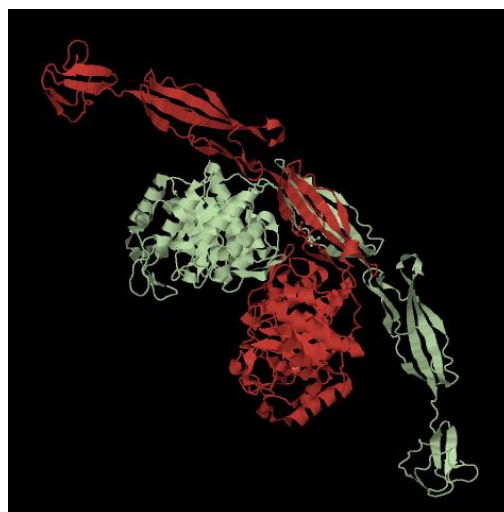
**ΣΧΗΜΑ 21: Δομή ChBD**

Η περιοχή ChBD, συνδέεται με αδιάλυτη μόνο χιτίνη ενώ δεν έχει παρατηρηθεί κάποια αλληλεπίδραση με διαλυτή χιτίνη ή διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες χιτίνης. Αφαίρεση της ChBD από τη ChiA1 έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της υδρολυτικής δράσης του ενζύμου, λόγω μειωμένης ικανότητας πρόσδεσης της αδιάλυτης χιτίνης στην περιοχή αυτή. Ωστόσο, το ενεργό κέντρο είναι επίσης κεντρικής σημασίας στην ικανότητα πρόσδεσης υποστρώματος από τη χιτινάση. Αναλυτικότερα, έχουν βρεθεί

κατάλοιπα θρυπτοφάνης (Trp-122 και Trp-134), όπου απαλοιφή ή αντικατάσταση των οποίων οδηγεί σε σημαντική μείωση της ικανότητας πρόσδεσης χιτίνης. Ωστόσο, ο μηχανισμός πρόσδεσης χιτίνης και ο μηχανισμός δράσης της περιοχής ChBD δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Πάντως, απαλοιφή της περιοχής FNIII δεν επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης χιτίνης, αν και επιφέρει σημαντική μείωση της υδρολυτικής ικανότητας [20].

### Χιτινάση 60 από τον οργανισμό *Moritella marina*

Η χιτινάση 60 (Chi60) είναι ένα ένζυμο με ιδιαίτερα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά και με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ενζυμική βιοτεχνολογία. Πρόκειται για ένζυμο, το οποίο δρα σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς απομονώθηκε από τον ψυχρόφιλο οργανισμό *Moritella marina*. Επιπλέον, παρουσιάζει αξιοσημείωτη θερμοσταθερότητα, και



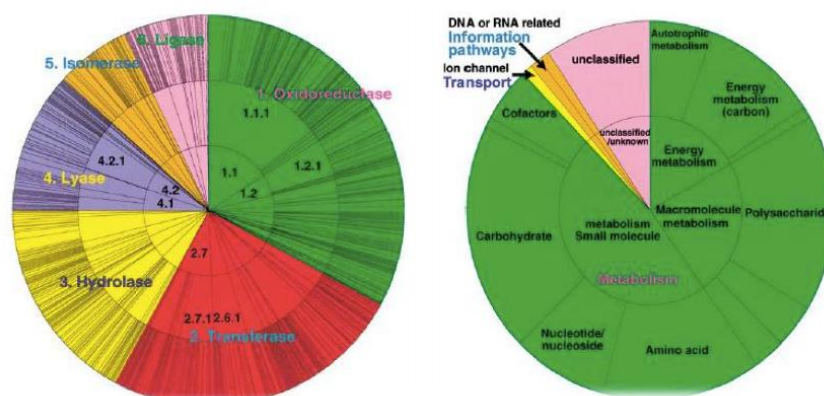
αποδιατάσσεται αντιστρεπτά μόνο **ΣΧΗΜΑ 22: Κρυσταλλική δομή Chi60** έπειτα από θερμική καταπόνηση στους 65°C. Μέχρι σήμερα, είναι το πρώτο γνωστό ψυχρόφιλο ένζυμο με δομή βαρελιού ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> που παρουσιάζει τέτοιες ιδιότητες και, πιθανώς μελλοντικά να αξιοποιηθεί ως ένα πολύτιμο εργαλείο για την πρωτεϊνική μηχανική [28]. Η Chi60 είναι ένα επιμήκες μόριο το οποίο αποτελείται από τέσσερα δομικά στοιχεία: το καταλυτικό κέντρο με δομή βαρελιού ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, δύο περιοχές ομόλογες της ανοσοσφαιρίνης (Ig-like domain) και την περιοχή ChBD, συνδεόμενες σε μια αλυσίδα (Σχήμα 22).

Εκτός από τη θέση δέσμευσης της χιτίνης, η ChBD, καθώς και ένα κατάλοιπο θρυπτοφάνης που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο, είναι περιοχές υψηλής συγγένειας προς τη χιτίνη και δρουν συμπληρωματικά για τη δέσμευση του υποστρώματος. Οι δύο ομόλογες της ανοσοσφαιρίνης περιοχές, παρέχουν στο ένζυμο μήκος κατάλληλο και αρκετά μεγάλο ώστε να αλληλεπιδράσει με

την επιφάνεια της χιτίνης, ενώ η ευέλικτη περιοχή μεταξύ της ChBD και της παρακείμενης ομόλογης της ανοσοσφαιρίνης περιοχής προσδίδει στο ένζυμο την ικανότητα προσέγγισης και καλύτερης αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια του υποστρώματος. Τέλος, η ανοιχτή και όχι βαθιά αύλακα του καταλυτικού κέντρου επιτρέπει την εύκολη πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο [29].

#### 1.4 ΤΟ ΔΟΜΙΚΟ ΜΟΤΙΒΟ $(\alpha/\beta)_8$ Ή ΒΑΡΕΛΙ ΤΙΜ

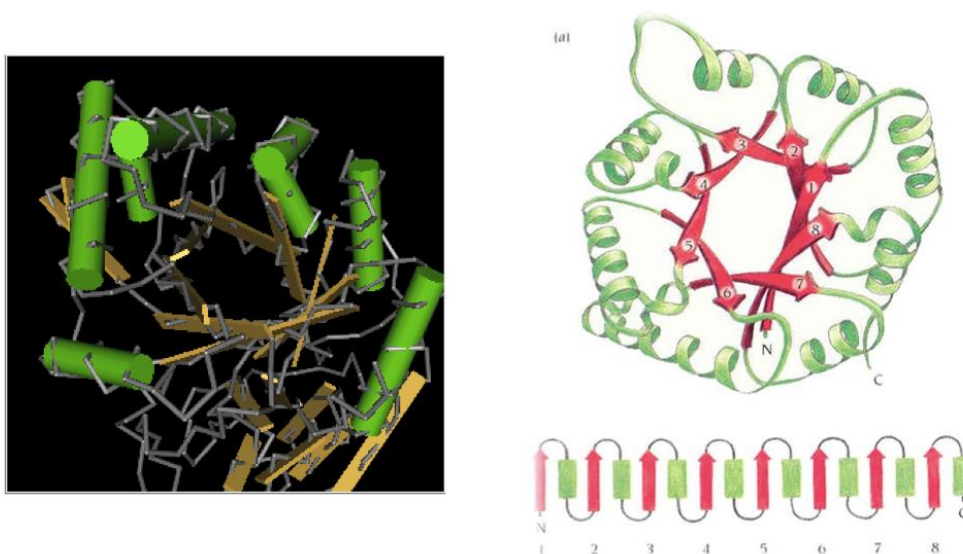
Το δομικό μοτίβο  $(\alpha/\beta)_8$  αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα και πιο συνηθισμένα δομικά στοιχεία στη φύση, καθώς έχει βρεθεί σε διαφορετικές πρωτεΐνες, οι περισσότερες από τις οποίες είναι ένζυμα. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν εντελώς διαφορετικές αμινοξικές ακολουθίες και λειτουργίες, ενώ μπορεί να διαφέρουν και ως προς τα πρόσθετα δομικά στοιχεία που μπορεί να φέρουν ή όχι. Τα κύρια βιοχημικά μονοπάτια στα οποία οι πρωτεΐνες αυτές έχει βρεθεί να παίζουν καταλυτικό ρόλο είναι: η γλυκολυτική οδός, ο μεταβολισμός των αμινοξέων και ο μεταβολισμός των νουκλεοτιδίων (Σχήμα 23) [30-32].



**ΣΧΗΜΑ 23: (α) Υπεροικογένειες πρωτεϊνών που διαθέτουν το αυτοτελές δομικό στοιχείο  $(\alpha/\beta)_8$  και (β) οι κύριες μεταβολικές τους δράσεις**

Το δομικό μοτίβο  $(\alpha/\beta)_8$  αποτελείται από έναν πυρήνα κεκαμμένων παράλληλων β-πτυχώσεων, τοποθετημένων τη μια κοντά στην άλλη, όπως ακριβώς και οι σανίδες των βαρελιών. Οι α-έλικες που συνδέουν τις παράλληλες β-πτυχώσεις βρίσκονται στο εξωτερικό του «βαρελιού» αυτού.

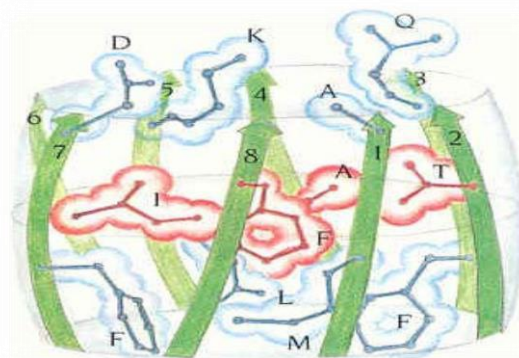
Αυτό το δομικό στοιχείο συχνά ονομάζεται και βαρέλι TIM, από τη δομή του ενζύμου ισομεράση της φωσφορικής τριόζης (Triosephosphate IsoMerase), στο οποίο και πρώτα παρατηρήθηκε. Ένας ελάχιστος αριθμός 200 καταλοίπων απαιτείται προκειμένου να σχηματιστεί το στοιχείο αυτό. Αντιπαραβάλλοντας τις δομές των πρωτεϊνών που έχει βρεθεί πως διαθέτουν τη δομή αυτή, φαίνεται πως περίπου 160 κατάλοιπα του βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  παρουσιάζουν δομική αντιστοιχία. Τα κατάλοιπα αυτά σχηματίζουν τις  $\beta$ -πτυχώσεις και τις  $\alpha$ -έλικες, ενώ τα εναπομείναντα κατάλοιπα σχηματίζουν τους βρόχους που συνδέουν τις  $\beta$ -πτυχώσεις με τις  $\alpha$ -έλικες (Σχήμα 24). Οι βρόχοι αυτοί έχουν διαφορετικά μήκη και διευθετήσεις στις διάφορες πρωτεΐνες. Αυτό αντανακλά το γεγονός ότι οι  $\beta$ -επιφάνειες και οι  $\alpha$ -έλικες συνιστούν το δομικό σκελετό του ενζύμου, ενώ οι βρόχοι περιέχουν τα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για την καταλυτική λειτουργία. Σε μερικές περιπτώσεις, οι βρόχοι είναι μεγάλου μήκους και σχηματίζουν ανεξάρτητα δομικά στοιχεία εντός της υπομονάδας.



**ΣΧΗΜΑ 24:** Το δομικό μοτίβο  $(\alpha/\beta)_8$  ή βαρέλι TIM. (α) Κρυσταλλική δομή. (β) Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου αναδίπλωσης του βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$ . Το δομικό μοτίβο  $(\alpha/\beta)_8$  αποτελείται από 8  $\alpha$ -έλικες και 8  $\beta$ -πτυχώσεις. Σχηματίζει ένα κλειστό βαρέλι, με τις  $\beta$ -πτυχώσεις στραμμένες προς το εσωτερικό και με όλες τις συνδετικές  $\alpha$ -έλικες στο εξωτερικό τμήμα του. Οι  $\beta$ -πτυχώσεις οργανώνονται με τέτοιον τρόπο, ώστε η  $\beta$ -πτυχώση 8 να είναι γειτονική και συνδεδεμένη με δεσμούς υδρογόνου με τη  $\beta$ -πτυχώση 1

### 1.4.1 ΔΙΑΚΛΑΔΙΣΜΕΝΕΣ ΥΔΡΟΦΟΒΕΣ ΠΛΕΥΡΙΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΚΥΡΙΑΡΧΟΥΝ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ ΤΩΝ ΒΑΡΕΛΙΩΝ ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>

Στα βαρέλια ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες των  $\alpha$ -ελίκων πακετάρονται με τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες της  $\beta$ -πτυχωτής επιφάνειας. Οι  $\alpha$ -έλικες είναι αντιπαράλληλες και γειτονικές με τις  $\beta$ -πτυχώσεις που συνδέουν. Συνεπώς, το βαρέλι ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> διαθέτει μια ασπίδα από υδρόφοβα κατάλοιπα προερχόμενα από τις  $\alpha$ -έλικες και τις  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες. Εφ' όσον οι πλευρικές αλυσίδες συνεχόμενων αμινοξέων μιας  $\beta$ -πτυχώσης βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές μιας  $\beta$ -πτυχωτής επιφάνειας, κάθε δεύτερο κατάλοιπο των  $\beta$ -πτυχώσεων συμβάλλει σε αυτήν την υδρόφοβη ασπίδα. Οι υπόλοιπες πλευρικές αλυσίδες των  $\beta$ -πτυχώσεων διευθετούνται προς το εσωτερικό του βαρελιού, όπου σχηματίζουν έναν υδρόφοβο πυρήνα. Ο πυρήνας αυτός, συνεπώς, αποτελείται αποκλειστικά από τις πλευρικές αλυσίδες καταλοίπων των  $\beta$ -πτυχωτών επιφανειών (Σχήμα 25).



**ΣΧΗΜΑ 25:** Τρόπος διευθέτησης των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων στο εσωτερικό ενός βαρελιού ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. Στις περισσότερες δομές βαρελιού ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, οι οκτώ  $\beta$ -πτυχώσεις του βαρελιού εσωκλείουν έναν στενά πακεταρισμένο υδρόφοβο πυρήνα, ο οποίος δομείται ολοκληρωτικά από πλευρικές αλυσίδες των  $\beta$ -πτυχώσεων. Ο πυρήνας οργανώνεται σε τρία στρώματα, με κάθε ένα στρώμα να περιέχει τέσσερις πλευρικές αλυσίδες από εναλλάξ  $\beta$ -πτυχώσεις. Το σχηματικό διάγραμμα δείχνει αυτό το πακετάρισμα στο βαρέλι ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> του ενζύμου οξειδάση του γλυκολικού οξέος

Στις αλληλεπιδράσεις πακεταρίσματος ανάμεσα στις  $\alpha$ -έλικες και  $\beta$ -πτυχώσεις κυριαρχούν τα κατάλοιπα Val (V), Ile (I) και Leu (L), τα οποία έχουν διακλαδισμένες υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες. Τα τρία αυτά αμινοξέα αποτελούν το 40% των καταλοίπων των  $\beta$ -πτυχώσεων στις παράλληλες  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες. Ο σημαντικός ρόλος που παίζουν αυτά τα κατάλοιπα



στο πακετάρισμα των α-ελίκων με τις β-πτυχωτές επιφάνειες είναι ιδιαίτερα εμφανής στις δομές βαρελίων (α/β)<sub>8</sub>, όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 1.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Τα αμινοξικά κατάλοιπα των οκτώ παράλληλων β-πτυχώσεων στη δομή βαρελιού του ενζύμου TIM από μυς κοτόπουλου**

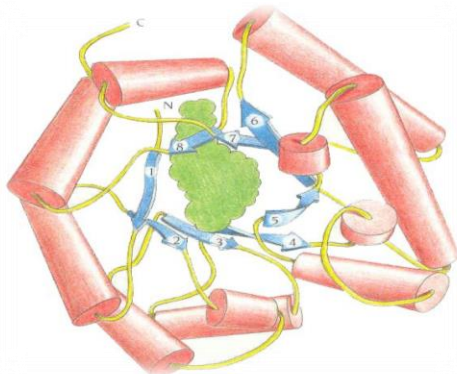
Strand no.	Residue no.	Positions				
		1	2	3	4	5
1	6–10	Phe	Val	Gly	Gly	Asn
2	37–41	Glu	Val	Val	Cys	Gly
3	59–63	Gly	Val	Ala	Ala	Gln
4	89–93	Trp	Val	Ile	Leu	Gly
5	121–125	Gly	Val	Ile	Ala	Cys
6	158–162	Lys	Val	Val	Leu	Ala
7	204–208	Arg	Ile	Ile	Tyr	Gly
8	227–231	Gly	Phe	Leu	Val	Gly

*Οι ακολουθίες στοιχίζονται με τέτοιον τρόπο, ώστε τα κατάλοιπα στις θέσεις 1, 3 και 5 να στρέφονται προς το βαρέλι και τα κατάλοιπα στις θέσεις 2 και 4 να στρέφονται προς τις α-έλικες στο εξωτερικό τμήμα. Τα τελευταία συμμετέχουν στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις β-πτυχώσεις και τις α-έλικες [33]*

Τα ογκώδη υδρόφοβα κατάλοιπα από τις θέσεις 1, 3 και 5 των β-πτυχώσεων γεμίζουν το εσωτερικό του βαρελιού και σχηματίζουν ένα στενά πακεταρισμένο υδρόφοβο πυρήνα (Σχήμα 25). Στον Πίνακα 1 φαίνεται και η έντονη παρουσία των αμινοξέων Lys, Arg και Gln, τα οποία έχουν μια πολική ομάδα στο τέλος μιας αλυσίδας από υδρόφοβες ομάδες -CH<sub>2</sub>-. Οι αλυσίδες αυτές βρίσκονται στο υδρόφοβο εσωτερικό και διασχίζουν μέρος του βαρελιού, ενώ τα πολικά τους άκρα βρίσκονται στην κορυφή ή στον πυθμένα του βαρελιού και έρχονται σε επαφή με το υδατικό περιβάλλον. Μέσω της διευθέτησης αυτής, ακόμα και αμινοξέα που ταξινομούνται ως πολικά μπορούν να συμμετάσχουν στους υδρόφοβους πυρήνες συμπαγών σφαιρικών δομικών αυτοτελών στοιχείων μέσω των υδρόφοβων τμημάτων των πλευρικών τους αλυσίδων.

Εξαίρεση στον κανόνα, που απαιτεί ογκώδη υδρόφοβα κατάλοιπα για να συμπληρώσουν το εσωτερικό των βαρελίων (α/β)<sub>8</sub> προκειμένου να σχηματιστεί ένας ερμητικά πακετατισμένος υδρόφοβος πυρήνας, αποτελεί το ένζυμο μουτάση του μεθυλομηλονυλο-συνενζύμου A [33]. Το ένζυμο αυτό, το οποίο εξαρτάται από το συνένζυμο B12, διαθέτει ένα υδρόφιλο κέντρο στη μέση του βαρελιού (α/β)<sub>8</sub> (Σχήμα 26). Οι πλευρικές ομάδες Ser και Thr, που προβάλλουν από τις β-πτυχώσεις στο εσωτερικό του βαρελιού, είναι μικρές και πολικές και συνεπώς δεν καλύπτουν τον διαθέσιμο χώρο μέσα στο βαρέλι.

Η σύραγγα που προκύπτει κατά μήκος του εσωτερικού του βαρελιού παρέχει ένα ιδανικό περιβάλλον για την καταλυτική αντίδραση και είναι επαρκώς μεγάλη για να χωρέσει το μόριο του υποστρώματος, το συνένζυμο A.



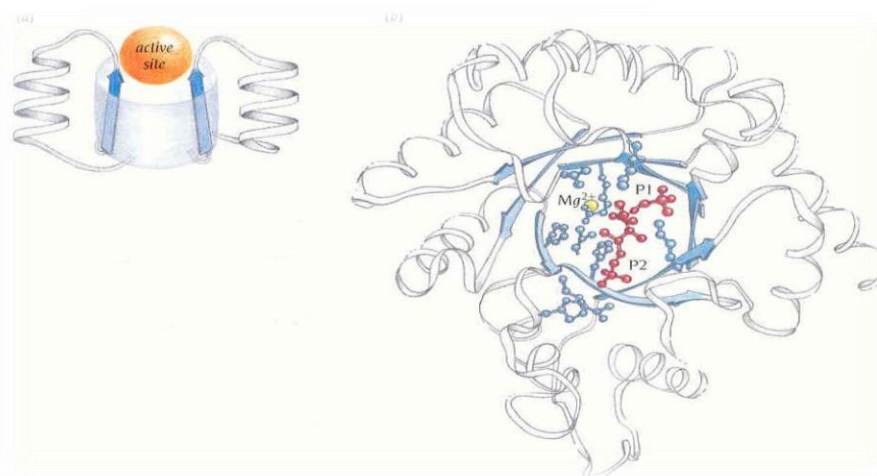
**ΣΧΗΜΑ 26:** Σχηματική απεικόνιση του δομικού αυτοτελούς στοιχείου βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  του ενζύμου μουτάση του μεθυλομηλονυλο-συνενζύμου A. Το εσωτερικό του βαρελιού είναι σχηματισμένο από μικρές υδρόφιλες πλευρικές αλυσίδες (σερίνη και θρεονίνη) των  $\beta$ -πτυχώσεων, οπότε δημιουργείται ένα υδρόφιλο κέντρο, όπου το υπόστρωμα συνένζυμο A (πράσινο), προσδέεται κατά μήκος του άξονα του βαρελιού από τη μια άκρη στην άλλη

Πολλές αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα, συμπεριλαμβανόμενης και της αντίδρασης που καταλύεται από τη μουτάση αυτή, απαιτούν το ενεργό τμήμα του μορίου-υποστρώματος να προστατεύεται από το διαλύτη κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Όταν το υπόστρωμα προσδέεται στη σύραγγα εντός του βαρελιού, προστατεύεται από το εξωτερικό περιβάλλον. Στα βαρέλια  $(\alpha/\beta)_8$  που έχουν υδρόφοβο πυρήνα, το υπόστρωμα προσδέεται στην επιφάνεια του βαρελιού και οι βρόχοι, μετά από αλλαγές στερεοδιάταξης, καλύπτουν και προστατεύουν το υπόστρωμα από το διαλύτη.

#### **1.4.2 ΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΣΧΗΜΑΤΙΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΒΡΟΓΧΟΥΣ ΣΤΟ ΕΝΑ ΑΚΡΟ ΤΟΥ ΒΑΡΕΛΙΟΥ $(\alpha/\beta)_8$**

Όπως έχει παρατηρηθεί, το ενεργό κέντρο των βαρελιών  $(\alpha/\beta)_8$  βρίσκεται σε παρόμοια θέση στις διάφορες πρωτεΐνες. Αναλυτικότερα, το ενεργό κέντρο εντοπίζεται στον πυθμένα μιας θήκης με κωνικό σχήμα, που έχει δημιουργηθεί από τους οκτώ βρόχους που συνδέουν το καρβοξυτελικό άκρο των  $\beta$ -πτυχώσεων με το αμινοτελικό άκρο των  $\alpha$ -ελίκων (Σχήμα 27). Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος και την κατάλυση βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές των βρόχων. Συνεπώς, τα ένζυμα

αυτά μοντελοποιούνται σε ένα κοινό, σταθερό ικρίωμα οκτώ παράλληλων β-πτυχώσεων που περιβάλλεται από οκτώ α-έλικες.



**ΣΧΗΜΑ 27: Το ενεργό κέντρο των βαρελιών  $(\alpha/\beta)_8$ .** Το ενεργό κέντρο στα βαρέλια  $(\alpha/\beta)_8$  βρίσκεται σε μια θήκη που σχηματίζεται από τους βρόχους που συνδέουν τα καρβοξυτελικά άκρα των β-πτυχώσεων με τις γειτονικές α-έλικες. (α) Απεικόνιση δυο τέτοιων βρόγχων. (β) Κάτοψη του ενεργού κέντρου τους ενζύμου καρβοξυλάση της διφωσφορικής ριβουλόζης. Το ένζυμο αυτό, συμμετέχει στη δέσμευση  $\text{CO}_2$  στα φυτά. Ένα ανάλογο υποστρώματος (κόκκινο χρώμα) συνδέεται κατά μήκος του βαρελιού με τις δύο φωσφορικές ομάδες, P1 και P2, στις αντίθετες πλευρές της θήκης. Ένας αριθμός φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων (μπλε χρώμα) από διαφορετικούς βρόχους, καθώς κι ένα ιόν  $\text{Mg}^{2+}$  (κίτρινο χρώμα) σχηματίζουν τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος και συνιστούν τις καταλυτικές ομάδες

Σε κάθε περίπτωση η ενζυμική δραστηριότητα καθορίζεται από τις οκτώ περιοχές βρόχων στο καρβοξυτελικό άκρο των β-πτυχώσεων που όμως δε συνεισφέρουν στη δομική σταθερότητα του ικρίωματος. Σε μερικές περιπτώσεις, μια πρόσθετη περιοχή βρόχου από ένα δεύτερο δομικό αυτοτελές στοιχείο ή μια διαφορετική υπομονάδα πλησιάζει το ενεργό κέντρο και συμμετέχει στη δέσμευση και την κατάλυση [33].

## 1.5 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΟ ΜΟΤΙΒΟ $(\alpha/\beta)_8$

Με την έλευση της μοριακής γενετικής και των τεχνικών για τον χειρισμό των γονιδίων έχει δοθεί πλέον η δυνατότητα της γενετικής εκμετάλλευσης οργανισμών. Έτσι, είναι δυνατόν να σχεδιαστούν γονίδια τα οποία θα παράγουν, σε οργανισμούς-ξενιστές, καινούρια γονιδιακά προϊόντα. Επίσης, είναι δυνατό με τη χρήση της πρωτεϊνικής μηχανικής και του πρωτεϊνικού σχεδιασμού να δημιουργηθούν, ύστερα από μελέτες σε ακραιόφιλους για

παράδειγμα οργανισμούς, πρωτεΐνες με συγκεκριμένα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά.

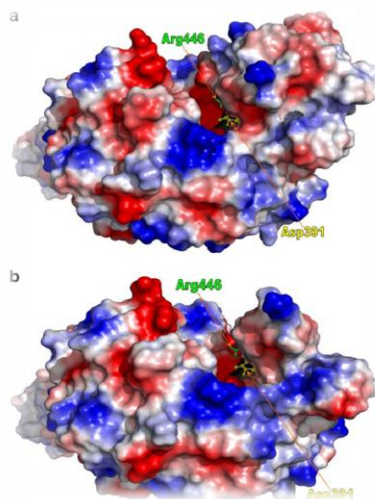
Σήμερα, ένας από τους στόχους της πρωτεϊνικής μηχανικής είναι η βελτίωση συγκεκριμένων ιδιοτήτων ενζύμων που χρησιμοποιούνται διαδεδομένα στη βιοτεχνολογία, όπως είναι η σταθερότητα και η θερμοσταθερότητα, η καταλυτική δραστηριότητα και η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Ειδικότερα, όσον αφορά τα ένζυμα με δομή βαρελιού ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, έχει βρεθεί πως στη σταθερότητα της δομής τους μεγάλη συνεισφορά παρέχουν: ο διμερισμός, οι γέφυρες άλατος (αριθμός και μέγεθος), το δίκτυο δεσμών υδρογόνου καθώς και τα πρόσθετα δομικά στοιχεία [34]. Επιπλέον, όσον αφορά τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών, έχουν βρεθεί 7 αμινοξέα τα οποία είναι απαραίτητα. Αυτά βρίσκονται στο πυρήνα του βαρελιού καθώς και σε μια υπόγεια γέφυρα άλατος και αλλαγές σε αυτά τα αμινοξέα επιφέρουν δραματικές αλλαγές στην καταλυτική δράση. Η πρωτεϊνική μηχανική στοχεύει στην ανεύρεση παραλλαγών που θα αυξήσουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, απελευθερώνοντας ταχύτερα το προϊόν. Παράλληλα, είναι δυνατό να επηρεαστεί και η εξειδίκευση υποστρώματος, με επέμβαση στους βρόγχους των ενζύμων αυτών και αυξομειώνοντάς τους μέσω μεταλλάξεων. Σκοπός της πρωτεϊνικής μηχανικής είναι να χρησιμοποιήσει όλα τα δεδομένα που έχουν ανακύψει για το πρωτεϊνικό αυτό μοτίβο, ώστε να δημιουργήσει εκ νέου ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> ένζυμα με χαρακτηριστικές ιδιότητες που θα έχουν βιοτεχνολογική εφαρμογή. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι: η τυχαία και κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση καθώς και η ανάμειξη (DNA shuffling) [34-37].

### **1.5.1 ΜΕΛΕΤΩΝΤΑΣ ΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ - ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ Α**

Τα ένζυμα είναι εξαιρετικά αποτελεσματικοί και εξειδικευμένοι καταλύτες που επιταχύνουν ένα ευρύ φάσμα χημικών αντιδράσεων. Στο φυσικό τους περιβάλλον, τα ένζυμα πρέπει να είναι σταθερά προκειμένου να διατηρούν τις μητρικές δομές τους, αλλά πρέπει επίσης να είναι και ευέλικτα ώστε να επιτρέπουν αλλαγές στη διαμόρφωσή τους κατά τη διάρκεια της κατάλυσης.

Αυτές οι αντίθετες απαιτήσεις είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακές για τα ακραιόφιλα ένζυμα, τα οποία πρέπει να είναι τόσο σταθερά όσο και ενεργά υπό ακραίες συνθήκες αλατότητας, pH και θερμοκρασίας [38]. Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε όχι μόνο το πώς η δομή, η λειτουργία και η σταθερότητα ενός ενζύμου συνδέονται μεταξύ τους, αλλά και το πώς τα μοντέρνα ένζυμα έχουν εξελιχθεί από πιο απλά πρόδρομα ένζυμα. Το βαρέλι  $(\alpha/\beta)_8$  αποτελεί ένα εξαιρετικό, πρότυπο σύστημα για την αντιμετώπιση αυτών των θεμελιωδών ζητημάτων που σχετίζονται με την βασική και την εφαρμοσμένη έρευνα. Όπως αναφέρθηκε περίπου το 10% όλων των πρωτεϊνών με γνωστή τρισδιάστατη δομή περιλαμβάνουν ένα βαρέλι  $(\alpha/\beta)_8$  [32,39]. Αυτά είναι ευέλικτα ένζυμα που δρουν ως οξειδοαναγωγάσες, τρανσφεράσες, λυάσες, ισομεράσες και υδρολάσες [30,35].

Η ChiA του οργανισμού *S. marcescens* είναι το πρώτο βακτηριακό χιτινολυτικό ένζυμο που έχει μελετηθεί διεξοδικά. Πρόκειται για ένα χιτινολυτικό ένζυμο με υψηλή καταλυτική ενεργότητα και ειδικότητα και είναι σε θέση να αποδομεί αδιάλυτη χιτίνη και διαλυτά παράγωγά της, μέχρι και δισακχαρίτες, σε ευρέα όρια pH (4,5 έως 8,0) και ευρείες τιμές θερμοκρασίας (25-55°C). Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή της ChiA ένα  $(\alpha+\beta)$  δομικό στοιχείο εισάγεται εντός του κύριου καταλυτικού δομικού στοιχείου  $(\alpha/\beta)_8$ , μεταξύ του  $\beta 7$  κλώνου και της  $\alpha 7$  έλικας. Αυτό το εισερχόμενο δομικό στοιχείο, η δομή του οποίου μοιάζει με σφαίρα, βρίσκεται ακριβώς πάνω από τη μια πλευρά του ενζύμου, συμβάλλοντας στο σχηματισμό μιας τύπου σήραγγας ενεργής περιοχής (Σχήμα 28).



**ΣΧΗΜΑ 28: Μοντέλα της ChiA και ChiAΔ (α + β).** Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ChiA χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή του μοντέλου (α) και στη συνέχεια του ChiAΔ (α + β) μοντέλου (β) με ομόλογη μοντελοποίηση. Αμφότερες οι εικόνες απεικονίζουν τα τοπικά ηλεκτροστατικά φορτία των δύο μορίων, από τα πιο αρνητικά (έντονες κόκκινες περιοχές), στα πιο θετικά (έντονες μπλε περιοχές). Τα Asp-391 και Arg-446 εν μέρει απεικονίζονται με κίτρινες και πράσινες σφαίρες και ράβδους αντίστοιχα

Δομικές και ενζυμικές μελέτες σχετικά με τον τρόπο δράσης των ChiA και ChiB, αποδεικνύουν ότι το σχήμα σήραγγας του καταλυτικού κέντρου διευκολύνει την πρόσδεση του υποστρώματος N,N'-διακετυλο-γλυκοζαμίνη (ChiA, ChiB) και όχι του υποστρώματος N,N',N-τριακετυλο-γλυκοζαμίνη (ChiB) ενώ "συγκρατεί" τη δραστηριότητα ενδοχιτινάσης [10,40,41]. Στην περίπτωση της ChiA, η λειτουργική συμβολή του (α+β) δεν είναι σαφής, παρόλο που τα στοιχεία που έχουν εισαχθεί σε βαρέλια (α/β)<sub>8</sub> έχουν αναφερθεί αρκετές φορές [24,26,42- 44].

Ο ρόλος του (α+β) δομικού στοιχείου έχει μελετηθεί εκτενώς με σκοπό να διερευνηθεί η συνεισφορά του στην καταλυτική δραστηριότητα, την εξειδίκευση υποστρώματος καθώς και στη δομική σταθερότητα του ενζύμου. Η ChiA αποτελεί κατάλληλη πρωτεΐνη για τις μελέτες αυτές, διότι επαρκείς βιοχημικές και δομικές πληροφορίες είναι διαθέσιμες. Με τη χρησιμοποίηση της τεχνολογίας της γενετικής μηχανικής, πραγματοποιήθηκε απαλοιφή του (α+β) δομικού στοιχείου από το καταλυτικό δομικό στοιχείο του βαρελιού (α/β)<sub>8</sub> της ChiA (ChiAΔ(α+β)) [25]. Ακριβέστερα, αφαιρέθηκαν 65 κατάλοιπα, (448-512), και εισήχθηκε ένα κατάλοιπο γλυκίνης, αμέσως μετά το αμινοξύ G-447 της ChiA. Η στοχευμένη εισαγωγή του καταλοίπου της γλυκίνης, που συνδέει τις

δύο πλευρές της περιοχής που αφαιρέθηκε, σχεδιάστηκε έτσι ώστε να αυξήσει ελαφρώς την τοπική δομική ευελιξία του μορίου και να αποτραπεί πιθανή δομική αλλαγή. Τα ανασυνδυασμένα ChiAD ( $\alpha+\beta$ ) υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα *E. coli* και έδειξαν υψηλότερη διαλυτότητα όταν επάχθηκαν σε χαμηλότερη θερμοκρασία (18°C). Η καθαρισμένη ChiAD ( $\alpha+\beta$ ) αναδιπλώνεται σωστά, όπως υποδεικνύεται συγκριτικά με την ChiA μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού. Ωστόσο, η θερμική σταθερότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μειώθηκε σημαντικά. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ των ChiA και ChiAD ( $\alpha+\beta$ ) έδειξαν ότι η απομάκρυνση του ( $\alpha+\beta$ ) δομικού στοιχείου προκαλεί μια μείωση της  $T_m$  κατά περίπου 20°C. Τρέχοντα δεδομένα, επιπλέον, δείχνουν σαφώς ότι το ( $\alpha+\beta$ ) δομικό στοιχείο σταθεροποιεί την καταλυτική περιοχή του βαρελίου ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> της ChiA [25].

Μοριακή μοντελοποίηση της ChiAD ( $\alpha+\beta$ ), με βάση την κρυσταλλική δομή της ChiA, αποκαλύπτει τις δομικές μεταβολές γύρω από την καταλυτική θέση, που προκαλούνται από την απομάκρυνση του ( $\alpha+\beta$ ) δομικού στοιχείου. Όπως υποδεικνύεται στο Σχήμα 28α, στην ChiA η παρουσία του ( $\alpha+\beta$ ) δομικού αυτοτελούς στοιχείου εκτείνει το ύψος των τοιχωμάτων της μιας πλευράς της καταλυτικής αύλακας, συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό μιάς καταλυτικής δομής σχήματος σήραγγας. Η δομή της καταλυτικής θέσης της ChiA βελτιώνει όχι μόνο τη δραστηριότητα της εξω-N,N'-διακετυλο-γλυκοζαμινιδάσης, αλλά κυρίως προάγει την ικανότητα λειτουργίας κατά τη διάρκεια της αποικοδόμηση των χιτινοπολυμερικών αλυσίδων [21,41,45,46]. Το υπολογιστικό μοντέλο της ChiAD ( $\alpha+\beta$ ) αποκαλύπτει μια ρηχή αύλακα στο καταλυτικό δομικό στοιχείο, σε σύγκριση με την αντίστοιχη αύλακα της ChiA, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 28 [40,47].

Επιπλέον κινητικές μελέτες, με τη χρήση συνθετικών φθορισμογόνων υποστρωμάτων, αποκάλυψαν διακριτές διαφορές στην ενζυμική δραστηριότητα καθώς και στις αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος μεταξύ της φυσικής πρωτεΐνης και της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (στην οποία έχει αφαιρεθεί το ( $\alpha+\beta$ ) δομικό στοιχείο). Επιπρόσθετα, ύστερα από την απαλοιφή του ( $\alpha+\beta$ ) δομικού στοιχείου, το pH και η θερμοκρασία της ChiA επηρεάστηκαν, ενώ η ειδική δραστηριότητα της ChiAD ( $\alpha+\beta$ ), σε σύγκριση με εκείνη της ChiA,

μειώθηκε περίπου κατά 3 τάξεις μεγέθους έναντι του υποστρώματος 4MU (NAG)<sub>3</sub> και χάθηκε εντελώς ως προς το 4MU (NAG)<sub>2</sub>.

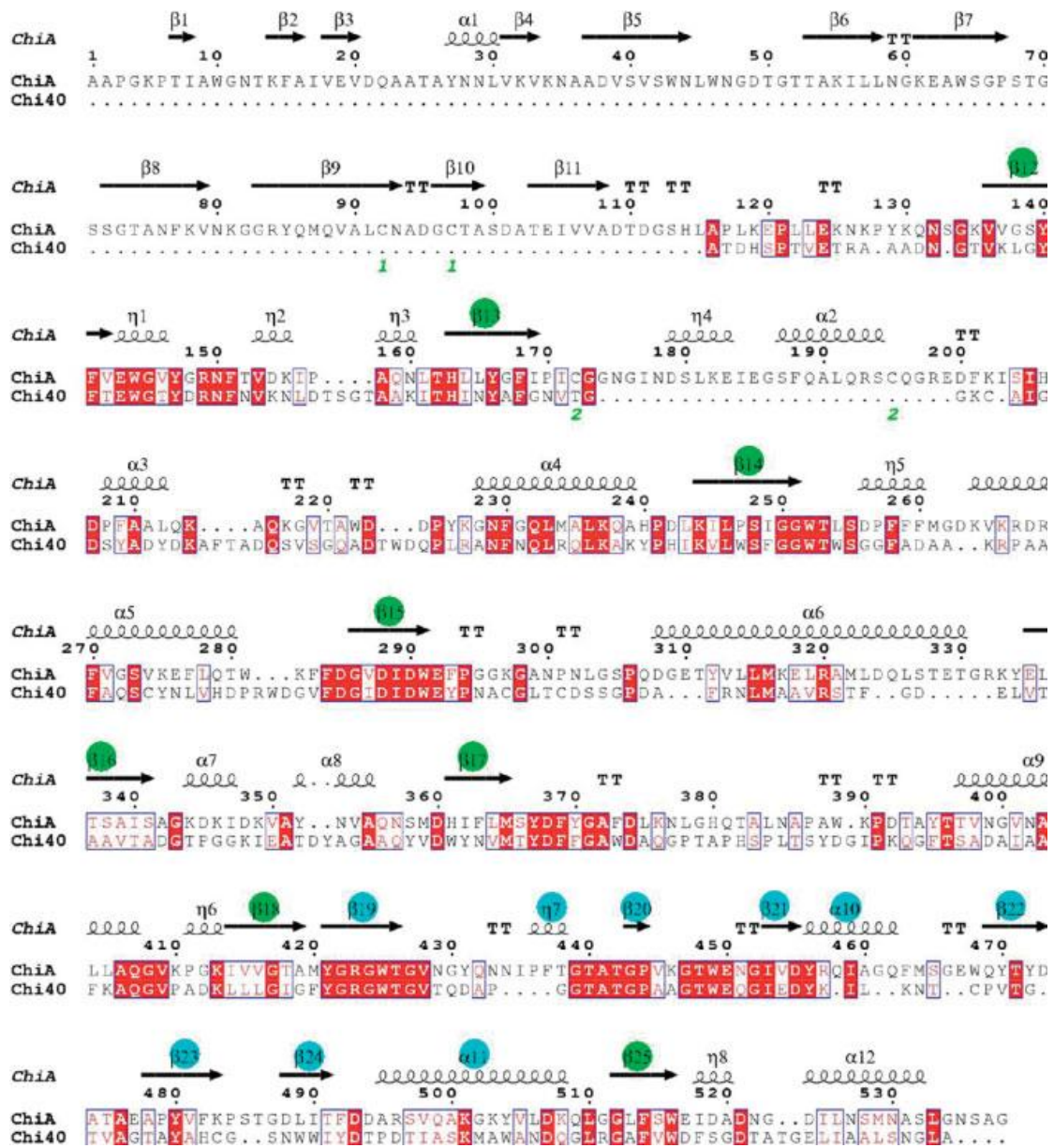
## 1.6 Η ΧΙΤΙΝΑΣΗ 40

Η χιτινάση 40 (Chi40) είναι ένα θερμοσταθερό χιτινολυτικό ένζυμο, το οποίο απομονώθηκε από το θερμοφίλο, gram (+) βακτήριο *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Το χιτινολυτικό σύστημα του οργανισμού αυτό αποτελείται από τέσσερα γονίδια χιτινασών (*chi40*, *chi35*, *chi30* και *chi25*) και δύο γονίδια N-ακετυλο-β-γλυκοζαμιनिδασών (*nagA* και *nagB*). Συγκριτική μελέτη της αμινοξικής αλληλουχίας των προϊόντων αυτών των τεσσάρων γονιδίων των χιτινασών, αποδεικνύει πως οι χιτινάσες: Chi40 και Chi30 ανήκουν στην οικογένεια GH18, ενώ οι χιτινάσες Chi35 και Chi25 ανήκουν στην οικογένεια GH19. Από τα ένζυμα αυτά, μόνο η Chi35 δεν παρουσιάζει υδρολυτική δράση έναντι στη χιτίνη ενώ, αντίθετα, οι υπόλοιπες χιτινάσες του οργανισμού αυτού εμφανίζουν υψηλή καταλυτική δραστηριότητα. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως το προϊόν του γονιδίου *nagB* (NagB) ανήκει στην GH20, ενώ το προϊόν του γονιδίου *nagA* (NagA) έχει ταξινομηθεί στην οικογένεια 3. Πειράματα ανοσοαντιδράσεων απέδειξαν πως το ένζυμο NagA δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη δράση β-γλυκοζιδάσης παρόλο που η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει δομική ομολογία με μικροβιακές β-γλυκοζιδάσες.

Προηγούμενες μελέτες της Chi40 απέδειξαν πως το ένζυμο αυτό σε κύτταρα *E. coli* εκκρίνεται κατά ένα μέρος στον περιπλασματικό χώρο - κυτοσολική μορφή (Chi40c), ενώ ένα άλλο μέρος της εκκρίνεται στο εξωτερικό του κυτταρού - εκκρινόμενη μορφή (Chi40s) [48]. Η κυτοσολική μορφή, παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα και είναι θερμοσταθερή ενώ, σε αντίθεση με την εκκρινόμενη μορφή, δεν είναι ομογενής καθώς ένα σημαντικό ποσοστό της δεν αναδιπλώνεται σωστά λόγω των δισουλφιδικών δεσμών οι οποίοι διαμορφώνονται διαφορετικά. Η Chi40c είναι δυνατό να απομονωθεί με χρωματογραφία συγγένειας και ιονανταλλαγής, ενώ η Chi40s με υδρόφοβη χρωματογραφία και χρωματογραφία ιονανταλλαγής.



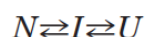
Η Chi40 διαθέτει 385 αμινοξέα και μέγεθος περίπου 41 kDa. Η αμινοξική της αλληλουχία παρουσιάζει υψηλή ομολογία με άλλα μέλη της οικογένειας GH18, όπως τη ChiA και τη ChiB του οργανισμού *S. marcescens*, καθώς και τη ChiA1, Chi1 και τη CHIT-1. Ειδικότερα η αλληλουχία παρουσιάζει ομοιότητα έως και 45.5% με τη ChiA ενώ, είναι ταυτόσημη κατά 27.9% (Σχήμα 29). Η ομολογία μεταξύ των δύο ενζύμων υπάρχει στη δομή του βαρελίου  $(\alpha/\beta)_8$  καθώς και στο αυτοτελές στοιχείο  $\alpha+\beta$ . Ωστόσο, η αμινοτελική περιοχή ChBD (αμινοξικά κατάλοιπα 24-130) της ChiA δεν παρουσιάζει αντιστοιχία με την αντίστοιχη περιοχή της Chi40. Από τη συντηρημένη δομική αναλογία προκύπτει ότι η δομή της Chi40 περιλαμβάνει το δομικό μοτίβο βαρέλι  $(\alpha/\beta)_8$  καθώς και το αυτοτελές στοιχείο  $\alpha+\beta$ .



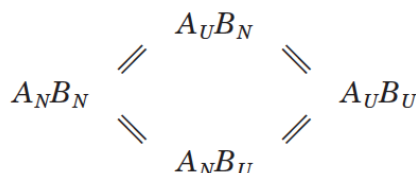
**ΣΧΗΜΑ 29:** Ευθυγράμμιση ακολουθιών Chi40 και ChiA. Οι β-πτυχώσεις με πράσινο χρώμα ανήκουν στην περιοχή του βαρελιού (α/β)<sub>8</sub> της ChiA, ενώ οι δευτεροταγείς δομές με μπλε χρώμα ανήκουν στο α+β δομικό στοιχείο. Και οι δύο περιοχές είναι υψηλά συντηρημένες στην αλληλουχία της Chi40

Σύμφωνα με τη μέχρι στιγμής βιβλιογραφία, είναι γνωστές πολύ λίγες χιτινάσες και ελάχιστα ένζυμα με δομή βαρελιού (α/β)<sub>8</sub> που να διαθέτουν το χαρακτηριστικό της αντιστρεπτής θερμικής αποδιάταξης [ 48 ]. Κατά το παρελθόν είχαν πραγματοποιηθεί μελέτες αντιστρεπτής αποδιάταξης της Chi40 [49]. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, η θερμική αποδιάταξη της Chi40 είναι αντιστρεπτή σε pH 8.0 και 9.0, ενώ η αποδιατεταγμένη κατάσταση συνοδεύεται από εκτεταμένες δομικές αλλαγές σε σύγκριση με την

αναδιπλωμένη μορφή. Η διαδικασία χαρακτηρίζεται από αργή κινητική χαλάρωσης (slow relaxation kinetics). Πειράματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) απέδειξαν ότι ο μηχανισμός θερμικής αποδιάταξης πραγματοποιείται σε ένα στάδιο (nontwo-state process), ενώ δύο μηχανισμοί είναι πιθανοί [49]. Σύμφωνα με τον πρώτο, η θερμική αποδιάταξη περιλαμβάνει μια μεταβατική κατάσταση (Intermediate - I) μεταξύ της αναδιπλωμένης (Native - N) και της αποδιατεταγμένης (Unfolded - U) κατάστασης:



Ο δεύτερος πιθανός μηχανισμός αφορά δύο μεταβατικές καταστάσεις. Πρόκειται για δύο ενεργειακά ανεξάρτητες δομές Chi40 (A και B) οι οποίες αποδιατάσσονται σε δυο διαφορετικά, μερικώς αποδιατεταγμένα, ενδιάμεσα:



Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με παλιότερα ευρήματα μελέτης χημικής αποδιάταξης αρκετών πρωτεϊνών με δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  όπου ο μηχανισμός αποδιάταξης πραγματοποιείται σε ένα στάδιο με τουλάχιστον ένα αποδιατεταγμένο ενδιάμεσο. Η κινητική χαλάρωσης συνήθως συνοδεύεται από δομική ετερογένεια της αποδιατεταγμένης κατάστασης, κυρίως λόγω της cis-trans ισομέρειας των καταλοίπων προλίνης. Πρωτεΐνες με γνωστή δομή περιέχουν κατάλοιπα προλίνης cis διαμόρφωσης σε ποσοστό έως 7% όταν βρίσκονται στη φυσική τους κατάσταση (native state). Επομένως, είναι αναμενόμενο ο ρυθμός αποδιάταξης των μεγάλων πολυπεπτιδικών αλυσίδων να μειώνεται εκθετικά συναρτήσει του ποσοστού καταλοίπων προλίνης ή, αλλιώς, ο μεγάλος αριθμός καταλοίπων προλίνης μπορεί να μειώσει σε μεγάλο βαθμό τον ρυθμό αναδίπλωσης μιας πρωτεΐνης. Η Chi40 περιέχει 17 προλίνες, αριθμός που αντιστοιχεί σε ποσοστό 4.4% των συνολικών αμινοξέων. Η ισομέρεια cis-προλινών έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο και στην αναδίπλωση της aTP, ενός ενζύμου με δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  [49]. Εκτός από τις προλίνες, έχουν βρεθεί και άλλα αμινοξικά

κατάλοιπα τα οποία υιοθετούν cis διαμόρφωση. Η cis-trans ισομέρεια αυτών των καταλοίπων επίσης χαρακτηρίζεται από αργούς ρυθμούς αναδίπλωσης. Όπως αναφέρθηκε ήδη, η αμινοξική αλληλουχία της Chi40 παρουσιάζει υψηλή ομολογία με άλλα μέλη της οικογένειας GH18, όπως τη ChiA, τη ChiB και τη ChiA1. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν υψηλά ποσοστά προλίνων και άλλων αμινοξέων cis διαμόρφωσης και συνοδεύονται από αργούς ρυθμούς αποδιάταξης.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

---

Η Chi40 διαθέτει δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την πρωτεϊνική μηχανική. Η θερμοσταθερότητά της, η δομή της αλλά και η ικανότητά της να αποδιατάσσεται αντιστρεπτά την καθιστούν ένα εξαιρετικό πρότυπο σύστημα για την μελέτη θεμελιωδών ζητημάτων που σχετίζονται με την βασική και την εφαρμοσμένη έρευνα. Οι μελέτες της δομής καθώς και της θερμοσταθερότητας πρωτεϊνών με δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  παρουσιάζουν σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον κυρίως για δύο λόγους. Κατ'αρχάς τα ένζυμα αυτά καταλύουν ένα ευρύ φάσμα ενζυμικών αντιδράσεων και επομένως παρουσιάζουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Πρόκειται για ευέλικτα ένζυμα που δρουν ως οξειδοαναγωγάσες, τρανσφεράσες, λυάσες, ισομεράσες και υδρολάσες. Δεύτερον, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών με χαμηλή δομική ομολογία μεταξύ τους που ωστόσο διαθέτουν δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$ . Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι περίπου το 10% όλων των πρωτεϊνών με γνωστή τρισδιάστατη δομή περιλαμβάνουν ένα βαρέλι  $(\alpha/\beta)_8$ . Σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα μελέτες, η Chi40 είναι μια από τις ελάχιστες χιτινάσες με δομή βαρελιού  $(\alpha/\beta)_8$  που παρουσιάζουν θερμική αντιστρεπτή αποδιάταξη.

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη τεχνολογίας υψηλής παραγωγικότητας που θα υποστηρίξει την μελέτη μεγάλου αριθμού τυχαίων μεταλλάξεων στο καταλυτικό δομικό στοιχείο του ενζύμου. Απώτερος στόχος είναι η διαλεύκανση του μηχανισμού αντιστρεπτής αποδιάταξης του ενζύμου αυτού σε ατομικό επίπεδο με στόχο την εφαρμογή των δεδομένων αυτών σε ένζυμα βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος για να τους προσθέσει σταθερότητα και μεγάλο χρόνο ζωής σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Η Chi40 εκκρίνεται στο εξωτερικό του κυττάρου. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό παραμένει στον περιπλασματικό χώρο. Στην περιοχή αυτή του κυττάρου ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης δεν αναδιπλώνεται σωστά και επομένως δεν αποκτά τη σωστή διαμόρφωση στο χώρο. Επιπλέον, το φυσικό γονίδιο της Chi40 έχει απαγορευτικά υψηλό ποσοστό GC για πειράματα γονιδιακής-πρωτεϊνικής μηχανικής. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός και η σύνθεση συνθετικού γονιδίου Chi40 με βελτιστοποιημένα

χαρακτηριστικά έτσι ώστε να είναι ευκολότερη η περαιτέρω γενετική του τροποποίηση και η βέλτιστη παραγωγή του στο βακτηριακό σύστημα παραγωγής της *E. coli*. Στη συνέχεια και σε σύγκριση με το αγρίου τύπου γονίδιο, θα μελετηθεί η κινητική των κλώνων παραγωγής της συνθετικής Chi40 με εξέταση διαφόρων συνθηκών παραγωγής της. Αξιοποιώντας τα δεδομένα έκφρασης θα πραγματοποιηθεί καθαρισμός της πρωτεΐνης, ενώ με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και πείραμα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός θα μελετηθεί η μορφή απομόνωσης του ενζύμου. Θα μελετηθεί η θερμοσταθερότητα με πειράματα Κυκλικού Διχρωισμού (CD) και, τέλος, η αποδιάταξη με χρήση Διαφορικής Φθορισμομετρίας Σάρωσης (DSF).

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

Το πειραματικό μέρος της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Καθηγητή Κων/νου Βοργιά, στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός του εργαστηρίου καθώς και τα απαραίτητα αντιδραστήρια. Τα πειράματα Διαφορικής Φθορισμομετρίας Σάρωσης (DSF) πραγματοποιήθηκαν στο Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας, στο Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών με υπεύθυνη τη Δρ. Φ. Μπούτου. Το πείραμα Φασματομετρίας Μάζας (MS) πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό κέντρο EMBL στη Γερμανία. Το πείραμα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών στο εργαστήριο του Δρ. Α. Ξενάκη. Τέλος, το πείραμα Κυκλικού Διχρωισμού (CD) πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό κέντρο ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», στο εργαστήριο του Δρ. Γ. Νούνεση.

#### 3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι η παραγωγή της ανασυνδυασμένης μορφής του ενζύμου Chi40 με απώτερο σκοπό την περαιτέρω βιοφυσική και βιοχημική του ανάλυση. Η αλληλουχία του αγρίου τύπου γονιδίου Chi40 (*chi40-wt*) παρουσιάζεται στον πίνακα 2. Ο σχεδιασμός του συνθετικού γονιδίου (*chi40-opt*) πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μείωση του ποσοστού βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης και την καλύτερη έκφραση του ενζύμου στο βακτηριακό σύστημα *E. coli*. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση των κωδικονίων του γονιδίου *chi40-wt*, με κωδικόνια συνώνυμα και συμβατά προς τα κύτταρα *E. coli* (Πίνακας 3).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Αγρίου τύπου γονίδιο Chi40**

```

ATG GCC GCC ACC GAC CAC TCC CCC ACC GTC GAG ACC CGC GCC GCC GCC GAC AAC GGC
ACG GTC AAG CTC GGC TAC TTC ACC GAG TGG GGC ACC TAC GAC CGC AAC TTC AAC GTC
AAG AAC CTG GAC ACC TCC GGC ACC GCG GCC AAG ATC ACC CAC ATC AAC TAC GCC TTC
GGC AAC GTC ACC GGC GGC AAG TGC GCC ATC GGC GAC TCC TAC GCC GAC TAC GAC AAG
GCC TTC ACC GCC GAC CAG TCC GTC AGC GGA CAG GCC GAC ACC TGG GAC CAG CCG CTG
CGC GCA AAC TTC AAC CAG CTG CGC CAG CTC AAG GCC AAG TAC CCG CAC ATC AAG GTG
CTG TGG TCC TTC GGC GGC TGG ACC TGG TCC GGT GGC TTC GCC GAC GCC GCC AAG CGA
CCC GCA GCT TTC GCC CAG TCC TGC TAC AAC CTG GTG CAC GAC CCG CGC TGG GAC GGT
GTC TTC GAC GGC ATC GAC TGG GAG TAC CCC AAC GCC TGC GGT CTG ACC TGT GAC AGC
AGC GGC CCC GAC GCC TTC AGG AAC CTG ATG GCC GCC GTG CGC TCC ACG TTC GGC GAC
GAG CTG GTC ACC GCC GCC GTC ACG GCG GAC GGC ACG CCC GGC GGC AAG ATC GAG GCC
ACC GAC TAC GCC GGC GCC GCC CAG TAC GTC GAC TGG TAC AAC GTG ATG ACG TAC GAC
TTC TTC GGC GCC TGG GAC GCC CAG GGT CCC ACC GCC CCG CAC TCG CCG CTG ACC TCC
TAC GAC GGC ATC CCG AAG CAG GGC TTC ACC AGC GCC GAC GCG ATC GCC GCG TTC AAG
GCC CAG GGC GTG CCC GCG GAC AAG CTC CTC CTC GGC ATC GGC TTC TAC GGC CGC GGC
TGG ACC GGC GTC ACC CAG GAC GCC CCG GGC GGC ACC GCG ACC GGC CCC GCC GCC GGC
ACC TGG GAG CAG GGC ATC GAG GAC TAC AAG ATC CTC AAG AAC ACC TGC CCC GTC ACC
GGC ACC GTC GCC GGC ACC GCC TAC GCC CAC TGC GGC AGC AAC TGG TGG ATC TAC GAC
ACC CCG GAC ACC ATC GCC TCG AAG ATG GCC TGG GCG AAC GAC CAG GGC CTG CGC GGC
GCT TTC GTC TGG GAC TTC AGC GGC GAC ACC GCG ACC GGT GAG CTG ATC GCC GCC CTG
AGC AAC GGC CTG GCG TGA

```

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Συχνότητα χρήσης κωδικονίων στην *E. coli*. (codon usage bias in *E. coli*: <http://www.geneinfinity.org>)**

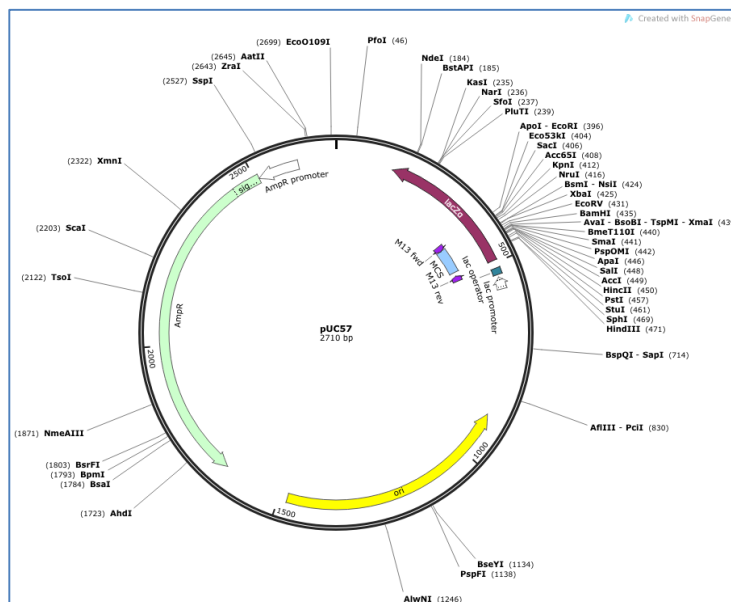
UUU F 0.57	UCU S 0.11	UAU Y 0.53	UGU C 0.42
UUC F 0.43	UCC S 0.11	UAC Y 0.47	UGC C 0.58
UUA L 0.15	UCA S 0.15	UAA * 0.64	UGA * 0.36
UUG L 0.12	UCG S 0.16	UAG * 0.00	UGG W 1.00
CUU L 0.12	CCU P 0.17	CAU H 0.55	CGU R 0.36
CUC L 0.10	CCC P 0.13	CAC H 0.45	CGC R 0.44
CUA L 0.05	CCA P 0.14	CAA Q 0.30	CGA R 0.07
CUG L 0.46	CCG P 0.55	CAG Q 0.70	CGG R 0.07
AUU I 0.58	ACU T 0.16	AAU N 0.47	AGU S 0.14
AUC I 0.35	ACC T 0.47	AAC N 0.53	AGC S 0.33
AUA I 0.07	ACA T 0.13	AAA K 0.73	AGA R 0.02
AUG M 1.00	ACG T 0.24	AAG K 0.27	AGG R 0.03
GUU V 0.25	GCU A 0.11	GAU D 0.65	GGU G 0.29
GUC V 0.18	GCC A 0.31	GAC D 0.35	GGC G 0.46
GUA V 0.17	GCA A 0.21	GAA E 0.70	GGA G 0.13
GUG V 0.40	GCG A 0.38	GAG E 0.30	GGG G 0.12



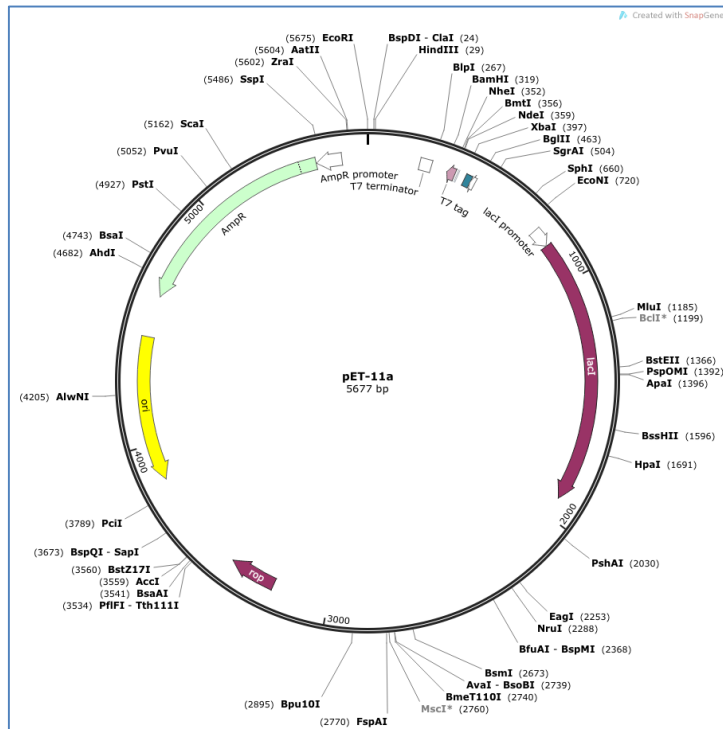
### 3.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η κλωνοποίηση DNA είναι μια διαδικασία κατά την οποία ένα γονίδιο ή τμήμα του ή κάποια συνθετική αλληλουχία DNA, εισάγεται σε ένα μικρό μόριο DNA φορέα, το πλασμίδιο. Το τροποποιημένο αυτό πλασμίδιο περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό και αντιγράφεται σε χιλιάδες ή εκατομμύρια αντίτυπα μέσω της αύξησης των κυττάρων-ξενιστών, αλλά και της δημιουργίας πολλαπλών αντιγράφων του κλωνοποιημένου DNA σε κάθε κύτταρο. Το αποτέλεσμα είναι ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός ενός συγκεκριμένου γονιδίου ή τμήματος DNA.

Το συνθετικό γονίδιο της *Chi40* που το λάβαμε στον πλασμιδιακό φορέα pUC57 (Σχήμα 30), απομονώθηκε με διπλή πέψη μέσω των περιοριστικών ενδονουκλεασών *BamHI* και *NcoI*. Η ίδια διαδικασία διπλής πέψης ακολουθήθηκε και για τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET11-a (Σχήμα 31), στον οποίο εισάγαμε το συνθετικό γονίδιο *chi40-opt*. Η ίδια διαδικασία κλωνοποίησης ακολουθήθηκε και για το γονίδιο *chi40-wt*. Η διαδικασία κλωνοποίησης που ακολουθήσαμε περιγράφεται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους.



ΣΧΗΜΑ 30: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pUC57



**ΣΧΗΜΑ 31:** Χάρτης πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pET11-a

### 3.2.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα βακτηριακά κύτταρα για τη διαδικασία της κλωνοποίησης και αναλόγως το εκάστοτε πειραματικό στάδιο, αναπτύχθηκαν τόσο σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα (τρυβλία Petri) όσο και σε υγρές καλλιέργειες (κωνικές φιάλες διαφορετικού ενεργού όγκου). Το βασικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη περίπτωση ήταν το θρεπτικό άγαρ (Πίνακας 4) και η θερμοκρασία επώασης 37°C.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4:** Σύσταση θρεπτικού άγαρ (Nutrient Agar)

Συστατικά	Σύσταση
Τρυπτόνη	1% w/v
Εκχύλισμα ζύμης	0.5% w/v
NaCl	170 mM
Άγαρ (Bacto Agar)	1.5% w/v

Στην περίπτωση των υγρών καλλιεργειών, το κύριο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το LB (Luria Bertani).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Σύσταση Υγρού Θρεπτικού υλικού LB**

Συστατικά	Σύσταση
Τρυπτόνη	1% w/v
Εκχύλισμα ζύμης	0.5% w/v
NaCl	170 mM

Σε κάθε περίπτωση έγινε προσθήκη αμπικιλίνης συγκέντρωσης 100μg/mL, αφού ο ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας εμφανίζει αντίσταση σε αυτό το αντιβιοτικό. Η μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης πραγματοποιείται με τη μέθοδο μέτρησης θολερότητας ή οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ).

### **3.2.2 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

#### **Υλικά**

- Θρεπτικό υλικό LB (τρυπτόνη 1%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 0.5%w/v (*Scharlau*), NaCl 170mM (*Merck*))
- Αποστειρωμένο διάλυμα γλυκερόλης 100% (*Merck*)
- Τρυβλία Petri (*Corning*)
- Φωτόμετρο (*Schimadzu*)

#### **Πειραματικό μέρος**

Η διαδικασία αποθήκευσης βακτηριακών κυττάρων για μακρόχρονη διατήρηση περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Εμβολιασμός μιας αποικίας από τρυβλίο Petri σε 5mL θρεπτικό υλικό LB, με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση στους 37°C, υπο ανάδευση στις 220rpm για 14-16 ώρες
- Έλεγχος ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ )
- Αραίωση της καλλιέργειας 1:100 σε θρεπτικό μέσο LB και επώαση στους 37°C υπό ανάδευση στις 220rpm μέχρι η καλλιέργεια να φτάσει τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης ( $OD_{600nm} \approx 0,7$ )
- Μεταφορά 500μL της καλλιέργειας σε σωλήνα errendorf και προσθήκη 500μL αποστειρωμένου διαλύματος 100% γλυκερόλης
- Έντονη ανακίνηση (vortex) ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη διασπορά της γλυκερόλης
- Αποθήκευση δείγματος στους -20°C

### 3.2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

#### Υλικά

- Αγαρόζη (*Bio-Rad*)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1M Tris-acetate (*Merck*), 0.9M Βορικό οξύ (*Merck*) και 0.01M EDTA (*Sigma*))
- Δείκτης μεγεθών DNA (250-10,000bp) (*genetics NIPPON*)
- Gel red χρωστική 6x (*Biotium*)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (*Bio-Rad*)

#### Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση DNA βασίζεται στη γενική αρχή ότι το DNA σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Για το λόγο αυτό, όταν εφαρμοστεί τάση, τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους, καθώς εξαναγκάζονται να περάσουν μέσω των πόρων της αγαρόζης, η οποία δρα ως μοριακό φίλτρο. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε “ζώνες”. Παράλληλα χρησιμοποιείται δείγμα αναφοράς, το οποίο αποτελείται από τμήματα DNA γνωστού μεγέθους. Το δείγμα αυτό λειτουργεί ως οδηγός προκειμένου να προσδιοριστεί το μέγεθος των μορίων DNA κατά την ηλεκτροφόρηση ενός αγνώστου δείγματος [50].

#### Πειραματικό μέρος

Τα δείγματα DNA έπειτα από απομόνωση πλασμιδιακού DNA ή από διάφορες πύψεις υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Για την παρασκευή πηκτής διαχωρισμού 1% αναμιγνύονται 0.4g αγαρόζης και 40mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE σε κωνική φιάλη. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και όταν πέσει η θερμοκρασία στους 60°C αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία προηγουμένως έχει τοποθετηθεί ειδική χτένα για τη διαμόρφωση των πηγαδιών φόρτωσης των δειγμάτων. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί, έπειτα από περίπου 30min, η χτένα απομακρύνεται και η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Στη συνέχεια, στα φρεάτια που δημιουργήθηκαν τοποθετούνται τα δείγματα DNA με τη χρωστική gel red 6x.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 100V για περίπου 45min. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες DNA γίνονται ορατές παρουσία UV ακτινοβολίας.

### 3.2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

#### Υλικά

- Προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια (*Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel) kit*): buffer P1 (περιέχει RNάση και φυλάσσεται στους 4°C (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7.5)), buffer P2 (1%w/v SDS, 0.2N NaOH), buffer N3 (3M CH<sub>3</sub>COONa, pH 5.3), buffer pb, buffer PE (αιθανολικό διάλυμα), buffer EB (5mM Tris/ HCl, pH 8.5)
- Μικροστήλες με φίλτρο από silica (περιέχονται στο kit)
- Βακτηριακά στελέχη *E. coli* (DH5a ή BL21) που φέρουν την προς απομόνωση αλληλουχία DNA (*Invitrogen*)
- Θρεπτικό υλικό LB (τρυπτόνη 1%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 0.5%w/v (*Scharlau*), NaCl 170mM (*Merck*))
- Αμπικικιλίνη 100μg/mL (*Merck*)
- Φυγόκεντρος (*Eppendorf*)

#### Αρχή της μεθόδου

Αρχικά αναπτύσσεται καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* που φέρουν τον πλασμιδικό φορέα που θέλουμε να απομονώσουμε. Μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας έναρξης, συλλέγεται το βακτηριακό εκχύλισμα (pellet) με ένα αρχικό στάδιο φυγοκέντρησης και στη συνέχεια επαναδιαλύεται και πραγματοποιείται αλκαλική λύση των κυττάρων (ρυθμιστικό διάλυμα P2). Στη συνέχεια προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα N3. Το διάλυμα αυτό εξουδετερώνει το προκύπτων κυτταρόλυμα, δημιουργώντας συσσωματώματα από πρωτεΐνες και θραύσματα του κυττάρου. Επιπλέον, δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες έτσι ώστε το πλασμιδικό DNA να προσδεθεί στη μεμβράνη από silica. Ακολουθεί έκπλυση με τα διαλύματα PB και PE. Η προσθήκη του διαλύματος PB είναι προαιρετική και σημαντική για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας αλληλούχισης του DNA καθώς και για τη βελτιστοποίηση της δράσης διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων. Το αντιδραστήριο PE περιέχει αιθανόλη και είναι σημαντικό για την απομάκρυνση αλάτων, μεταβολίτων και διαλυτών μακρομοριακών κυτταρικών συστατικών. Τέλος, η έκλυση πραγματοποιείται με το διάλυμα έκλυσης EB ή με υπερκάθαρο νερό (pH 8.0-8.5) [51].

## Πειραματικό μέρος

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

### 1. Καλλιέργεια έναρξης

- Ανάπτυξη καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (16h, 37°C). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε είναι το LB, ενώ ως αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε αμπικιλίνη 100μg/mL
- Φυγοκέντρηση 5mL καλλιέργειας έναρξης (1min, 11000rpm) και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού

### 2. Λύση κυττάρων

- Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 250μL διαλύματος P1 και καλή ανάδευση
- Λύση των κυττάρων με προσθήκη 250μL διαλύματος P2 και ήπια ανάδευση έτσι ώστε να μην κατακερματιστεί το γενωμικό DNA, σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Προσθήκη 300μL από το διάλυμα N3 και ανάδευση

### 3. Διαχωρισμός

- Φυγοκέντρηση (11000rpm, 15min) για την καταβύθιση πρωτεϊνών, γενωμικού DNA και κυτταρικών θραυσμάτων

### 4. Πρόσδεση του DNA

- Παραλαβή του υπερκείμενου υγρού από την παραπάνω φυγοκέντρηση και προσθήκη σε μικροστήλη με φίλτρο από silica. Φυγοκέντρηση (11000rpm, 1min) έτσι ώστε το πλασμιδιακό DNA να συνδεθεί στη silica

### 5. Έκπλυση της μεμβράνης

- Προσθήκη 500μL από το διάλυμα pb
- Φυγοκέντρηση (11000rpm, 1min)
- Προσθήκη 600μL διαλύματος PE
- Φυγοκέντρηση (11000rpm, 1min) (Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται δύο φορές)

### 6. Συλλογή του πλασμιδιακού DNA

- Προσθήκη 50μL διαλύματος EB και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση (11000rpm, 1min) και παραλαβή του δείγματος

### 3.2.5 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

#### Υλικά

- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NcoI* και *BamHI* (*Takara*)
- Ρυθμιστικό διάλυμα περιοριστικών ενδονουκλεασών (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 400mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.15% Triton X-100, 0.01% BSA, 50% γλυκερόλη) (*Takara*)
- Απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (*Συσκευή Milli-Q H<sub>2</sub>O, QPAK*)
- Υδρόλουτρο (*Pharmacia Biotech*)

#### Αρχή της μεθόδου

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι τα «μοριακά νυστέρια ακριβείας» που μας επιτρέπουν να χειριζόμαστε τμήματα DNA και αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Πρόκειται για ένζυμα που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα παλίνδρομες αλληλουχίες DNA μήκους 6-12bp και προκαλούν τομή στη δίκλινη έλικα διασπώντας δυο φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έναν σε κάθε αλυσίδα. Περιοριστικά ένζυμα υπάρχουν σε μεγάλη ποικιλία προκαρυωτικών οργανισμών, όπου ο βιολογικός τους ρόλος είναι να διασπούν ξένα μόρια DNA. Το DNA του ίδιου του κυττάρου δεν διασπάται διότι οι θέσεις που αναγνωρίζονται από τα δικά του περιοριστικά ένζυμα είναι μεθυλιωμένες. Τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα κόβουν τις δυο έλικες σε απόσταση μερικών ζευγών βάσεων δίνοντας δυο τμήματα με μονόκλωνες προεξοχές (sticky ends). Τα συμπληρωματικά άκρα μπορούν να επανενωθούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες με την προσθήκη λιγάσης [52].

#### Πειραματικό μέρος

Η διαδικασία πέψης των πλασμιδιακών DNA (pUC57 και pET11-a) πραγματοποιήθηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NcoI* και *BamHI* έτσι ώστε και τα δύο τμήματα DNA που πρόκειται να ενωθούν να έχουν τα ίδια συνεκτικά άκρα και να είναι εφικτή η ομοιοπολική σύνδεσή τους. Η πέψη πραγματοποιήθηκε με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, αφού αυτό επαρκεί για την ταυτόχρονη δράση των δυο ενζύμων. Η διαδικασία διπλής πέψης περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Προσθήκη σε μικρό σωλήνα erpendorf: 1-4μg πλασμιδιακού DNA, 5-20 Units περιοριστικών ενδονουκλεασων, 2μL ρυθμιστικού διαλύματος και απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών, έως τον τελικό όγκο των 20 μL
- Ανάδευση και επώαση στους 37°C (βέλτιστη θερμοκρασία για να δράσουν τα δύο ένζυμα, όπως προτείνεται από την εταιρεία) για μιάμιση ώρα

### **3.2.6 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΖΩΝΗΣ DNA ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (gel extraction)**

#### *Υλικά*

- Προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια (*Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel) kit*): buffer NT1 (χαοτροπικό αντιδραστήριο) buffer NT3 (αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης), buffer A260/A230, buffer NE (διάλυμα έκλουσης Tris/HCl, pH 8.5)
- Μικροστήλες με φίλτρο από silica (περιέχονται στο kit)
- Υδρόλουτρο (*Pharmacia Biotech*)
- Φυγόκεντρος (*erpendorf*)

#### *Πειραματικό μέρος*

Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήσαμε περιγράφονται παρακάτω:

#### **1. Αποκοπή και διαλυτοποίηση του τμήματος DNA**

- Αφαίρεση της ζώνης DNA από την πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια ξυραφιού. Προσέχουμε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση στη UV ακτινοβολία έτσι ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή του DNA
- Προσδιορισμός του βάρους του τμήματος DNA και μεταφορά σε σωλήνα erpendorf των 2 mL
- Προσθήκη 200μL διαλύματος NT1. Για κάθε 100mg πηκτώματος αγαρόζης σύστασης < 2% (και διπλάσια ποσότητα για σύσταση αγαρόζης > 2%)
- Επώαση του δείγματος για 5-10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50°C και έντονη ανάδευση κάθε 2-3 λεπτά έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως

#### **2. Πρόσδεση του DNA**

- Προσθήκη του δείγματος σε μικροστήλη και φυγοκέντρηση (30s, 11000rpm)

#### **3. Έκπλυση στήλης**



- Προσθήκη 700  $\mu$ L διαλύματος NT3
  - Φυγοκέντρηση (30s, 11000rpm)
  - Προσθήκη 700  $\mu$ L διαλύματος A260/A230 έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν τυχόν χαστροπικά φαινόμενα
  - Φυγοκέντρηση (30s, 11000rpm)
- 4. Ξήρανση της μεμβράνης από silica**
- Φυγοκέντρηση (1min, 11000rpm) έτσι ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα NT3
- 5. Έκλουση του DNA**
- Προσθήκη 15-30 $\mu$ L διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό
  - Φυγοκέντρηση (1min, 11000rpm)

### **3.2.7 ENZYMIΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA - ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ**

#### *Υλικά*

- T4 DNA λιγάση (*Takara*)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.5) (*Takara*)
- Απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (*Συσκευή Milli-Q H<sub>2</sub>O, QPAK*)
- Υδρόλουτρο (*Pharmacia Biotech*)

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η DNA λιγάση είναι το ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δυο μονόκλωνων αλυσίδων DNA που όμως ανήκουν σε διπλοελικωμένα μόρια. Είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA καθώς με αυτό το ένζυμο είναι δυνατό να ενσωματωθεί η επιθυμητή αλληλουχία DNA σε πλασμιδιακούς φορείς. Κατά την αντίδραση λιγάσης, είναι σημαντικό να προσέξουμε την αλληλουχία φορέα/ ενθέματος, καθώς η περίσσεια ενθέματος μπορεί να δημιουργήσει πολυμερισμένα μόρια ενθεμάτων που θα ενσωματωθούν στο φορέα ως πολυμερή, ενώ μικρή ποσότητα ενθέματος δεν οδηγεί σε επιτυχημένη αντίδραση συγκόλλησης.

### Πειραματικό μέρος

Η ομοιοπολική σύνδεση του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης (pET11-a) με την επιθυμητή αλληλουχία εισδοχής (Chi40-wt και Chi40-opt), περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Σε σωλήνα errendorf των 1.5 mL προστίθεται: 1μL πλασμιδιακού φορέα συγκέντρωσης 0.1μg/μL, 2-3μL καθαρού τμήματος DNA συγκέντρωσης 0.1μg/μL (έτσι ώστε η αναλογία των τμημάτων DNA/ πλασμιδιακού φορέα να είναι 3:1 και 5:1), 1μL ρυθμιστικού διαλύματος, 1μL T4 DNA λιγάση και απιονισμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τον τελικό όγκο των 10 μL.
- Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 16°C για 16 ώρες.
- Η διαδικασία αυτή προβλέπει και τυφλό δείγμα (στο οποίο δεν προστίθεται η αλληλουχία εισδοχής), για τον έλεγχο επιτυχίας της διαδικασίας κλωνοποίησης (Παράγραφος 3.2.9).

### 3.2.8 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

#### Αρχή της μεθόδου

Το σύστημα μεταφοράς γενετικού υλικού σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα μέσω της διαδικασίας του μετασχηματισμού τους, είναι από τα πιο σημαντικά εργαλεία της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Πρόκειται για ένα φαινόμενο που παρατηρείται στη φύση εξαιρετικά σπάνια και υπό αυστηρό κυτταρικό έλεγχο. Η πρόσληψη εξωγενούς DNA από το βακτηριακό κύτταρο πραγματοποιείται όταν αυτό βρίσκεται σε ένα ιδιαίτερο φυσιολογικό στάδιο, το οποίο ονομάζεται δεκτικότητα, μέσω ειδικών πρωτεϊνών. Ο ακριβής μηχανισμός πρόσληψης του DNA δεν είναι γνωστός αν και έχουν προταθεί αρκετές θεωρίες για το φαινόμενο αυτό. Σύμφωνα με την επικρατέστερη, η παρουσία πόρων στο κυτταρικό τοίχωμα, επιτρέπει τη δημιουργία διαυλών διαμέσου των οποίων τα μόρια του DNA εισέρχονται στο κύτταρο. Επομένως, τεχνητά, η δεκτικότητα των κυττάρων είναι δυνατό να αυξηθεί με χημικό τρόπο παρουσία δισθενών κατιόντων όπως  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων *E. coli*. Η θερμοκρασία όπου ευνοείται η είσοδος του πλασμιδιακού DNA στα βακτηριακά κύτταρα είναι 0°C,

θερμοκρασία στην οποία η μεμβράνη ψύχεται και μεταβαίνει στην φάση πηκτής, γεγονός που ευνοεί τη σταθεροποίηση της δομής των διαυλών. Απουσία των δισθενών κατιόντων στο κυτταρικό εναιώρημα, η είσοδος του πλασμιδιακού DNA στα βακτηριακά κύτταρα θα ήταν αδύνατη λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA και των αρνητικά φοτισμένων φωσφολιπιδίων της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας. Ο ρόλος των δισθενών κατιόντων είναι ουσιώδης, καθώς τα θετικά φορτισμένα ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  που βρίσκονται στο κυτταρικό εναιώρημα αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα μεμβρανικά λιπίδια, καλύπτοντας το φορτίο των πόρων. Με τον τρόπο αυτό, οι διάυλοι που δημιουργούνται επενδύονται με θετικά φορτία τα οποία έλκουν το αρνητικά φορτισμένο DNA. Τέλος, το σύντομο θερμικό σοκ στο οποίο υποβάλλονται τα κύτταρα, πιστεύεται ότι δημιουργεί θερμική ανισοροπία ανάμεσα στο εσωτερικό του κυττάρου και το εξωτερικό του περιβάλλον, συμβάλλοντας τελικά στην πρόσληψη του DNA από τα κύτταρα.

(α) Πειραματικό μέρος (παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli* για μακρόχρονη διατήρηση)

Υλικά

- Θρεπτικό υλικό LB (τρυπτόνη 1%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 0.5%w/v (*Scharlau*), NaCl 170mM (*Merck*))
- Διάλυμα TF1 (100mM RbCl<sub>2</sub> (*Sigma*), 50mM MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (*Sigma*), 30mM CH<sub>3</sub>COOK (*Sigma*), pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (*Sigma*), 15% γλυκερόλη (*Merck*), τελικό pH δ/τος 5.8 - ρύθμιση με δ/μα 0,2M CH<sub>3</sub>COOH (*Sigma*))
- Διάλυμα TF2 (10Mm MOPS (*Sigma*) pH 6.8, 10mM RbCl<sub>2</sub> (*Sigma*), 75mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (*Sigma*), 15% γλυκερόλη (*Merck*), τελικό pH δ/τος 6.8 - ρύθμιση με προσθήκη NaOH (*Merck*))
- Φωτόμετρο (*Schimadzu*)
- Φυγόκεντρος (*Jouan*)

Η διαδικασία παρασκευής δεκτικών κυττάρων περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Ανάπτυξη καλλιέργειας του στελέχους που προέρχεται από μονή αποικία, σε 6 mL θρεπτικό υλικό LB (καλλιέργεια έναρξης). Επώαση και ανάδευση στους 37°C, 220rpm, 16h

- Εμβολιασμός 40 mL θρεπτικού υλικού LB με 350μL από την καλλιέργεια έναρξης
- Επώαση με ανάδευση στους 37°C, 3-3.5h, 220rpm έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600nm φθάσει τις 0.35-0.4 μονάδες
- Τοποθέτηση της καλλιέργειας σε πάγο για 15 λεπτά. Φυγοκέντρηση (2500rpm, 4°C, 12min). Απόρριψη του υπερκειμένου με αναστροφή του σωλήνα
- Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 15mL διαλύματος TF1 και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15-20 λεπτά
- Φυγοκέντρηση (2500rpm, 4°C, 12min)
- Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος σε 3mL διαλύματος TF2 και επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15 λεπτά
- Μοίρασμα από 200μL δεκτικών κυττάρων σε μικρούς ογκομετρικούς σωλήνες των 1.5 mL
- Διατήρηση στους -80°C

(β) Πειραματικό μέρος (μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με θερμική καταπόνηση)

Υλικά

- Θρεπτικό υλικό SOC (2%w/v τρυπτόνη (*Gibco BRL*), 0.5%w/v εκχύλισμα ζύμης (*Scharlau*), 10mM NaCl (*Merck*), 10mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (*Sigma*), 2.5mM KCl (*Merck*), 20mM γλυκόζη (*Sigma*))
- Επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (BL21) (*Invitrogen*) (αποθηκευμένα στους -20°C)
- Τρυβλία Petri (*Corning*)
- Υδρόλουτρο (*Pharmacia Biotech*)
- Φυγόκεντρος (*erpendorf*)

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Ταχεία απόψυξη του κατάλληλου στελέχους επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* και επώαση στον πάγο
- Ανάμειξη 50-100μL αιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων με 5-10μL του προϊόντος αντίδρασης λιγάσης. Ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά
- Επώαση του μίγματος σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 42°C για 5 λεπτά

- Επώαση του μίγματος στον πάγο για 5 λεπτά
- Προσθήκη 500μL θρεπτικού μέσου SOC
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα, με έντονη ανάδευση στις 220rpm για αποτελεσματικό αερισμό
- Φυγοκέντρηση (3000rpm, 2min) και απόρριψη του υπερκειμένου, αφήνοντας περίπου 200μL. Ακολουθεί ήπια ανάδευση
- Επίστρωση σε τρυβλία Petri και επώαση στους 37°C για 16 ώρες, μέχρι την εμφάνιση αποικιών

### **3.2.9 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ**

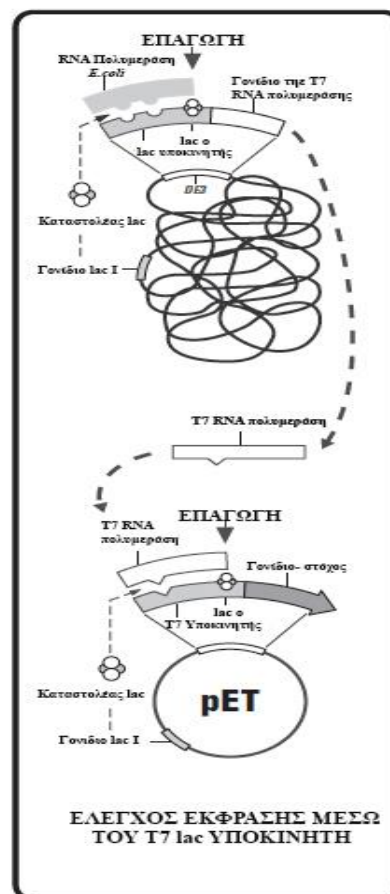
Τα προϊόντα αντίδρασης λιγάσης (σε αναλογίες 1:3 και 1:5) καθώς και το τυφλό δείγμα εισέρχονται σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* μέσω της διαδικασίας μετασχηματισμού με θερμική καταπόνηση (παράγραφος 3.2.8). Ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλία και επώαση στους 37°C για 16 ώρες, μέχρι ώτου εμφανιστούν αποικίες κατάλληλου μεγέθους. Η διαδικασία κλωνοποίησης θεωρείται επιτυχής εφόσον στο τρυβλίο όπου έχει επιστρωθεί με βακτηριακά κύτταρα μετασχηματισμένα με το τυφλό προϊόν αντίδρασης λιγάσης, δεν έχουν σχηματιστεί αποικίες (ή έχουν σχηματιστεί πολύ λίγες σε σχέση με τα άλλα τρυβλία). Ακολουθεί τυχαία επιλογή ορισμένων αποικιών, απομόνωση πλασμιδιακού DNA και διαγνωστικές πέψεις όπου, έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, ελέγχεται το μοριακό βάρος των θραυσμάτων που προκύπτουν από τις πεψεις. Με τον τρόπο αυτό, εάν το μοριακό βάρος των θραυσμάτων είναι το αναμενόμενο, η διαδικασία κλωνοποίησης είναι επιτυχής. Τέλος, ακολουθεί μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* για αποθήκευση και μακρόχρονη διατήρηση, και σε κύτταρα έκφρασης. Σε κάθε περίπτωση έγινε αποθήκευση των μετασχηματισμένων κυττάρων για μακρόχρονη διατήρηση στους -20°C με την διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.

### 3.3 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40

#### 3.3.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ: ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ pET

Οι πλασμιδιακοί φορείς pET (plasmid for Expression by T7 RNA polymerase) δημιουργήθηκαν με στόχο την έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή της RNA πολυμεράσης του φάγου T7. Η RNA πολυμεράση T7 παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα και εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και είναι δυνατό, λίγες ώρες μετά την επαγωγή, το επιθυμητό προϊόν να αποτελείσει πάνω από το 50% των συνολικών πρωτεϊνών του κυττάρου. Ωστόσο, μειώνοντας τον παράγοντα επαγωγής, είναι δυνατό να μειωθούν και τα επίπεδα έκφρασης ενισχύοντας την απόδοση της επιθυμητής διαλυτής πρωτεΐνης [53].

Ένα ακόμα πλεονέκτημα του συστήματος αυτού είναι η ικανότητα να διατηρεί τα γονίδια-στόχους μεταγραφικώς ανενεργά. Απουσία της RNA πολυμεράσης T7, τα επίπεδα έκφρασης είναι εξαιρετικά χαμηλά καθώς η RNA πολυμεράση του κυττάρου-ξενιστή *E. coli* δεν διαθέτει ικανότητα αναγνώρισης του T7 υποκινητή. Για τον λόγο αυτό, αρχικά το γονίδιο της χιτινάσης 40 κλωνοποιήθηκε σε κύτταρα DH5a που δεν διαθέτουν το γονίδιο της πολυμεράσης του φάγου και έτσι παρέμειναν μεταγραφικώς ανενεργά. Με τον τρόπο αυτό, εξαλείφεται η αστάθεια των πλασμιδίων εξαιτίας ενδεχόμενης παραγωγής τοξικών πρωτεϊνών.



**ΣΧΗΜΑ 32: Διαδικασία επαγωγής σε κύτταρα-ξενιστές *E. coli* DE3.** Τα κύτταρα αυτά είναι κατάλληλα για έκφραση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pET, καθώς στο βακτηριακό τους χρωμόσωμα είναι ενσωματωμένο το γονίδιο του φάγου DE3. Η παρουσία του γονιδίου της RNA πολυμεράσης T7 καθιστά το γονίδιο-στόχο μεταγραφικώς ενεργό υπό τον έλεγχο του T7 lac υποκινητή

Έπειτα, τα πλασμίδια μεταφέρονται σε κύτταρα έκφρασης τα οποία διαθέτουν στο χρωμόσωμά τους το γονίδιο της RNA πολυμεράσης T7. Οι ξενιστές αυτοί έχουν ενσωματώσει στο βακτηριακό χρωμόσωμα το γονιδίωμα του φάγου DE3, το οποίο περιλαμβάνει μεταξύ άλλων το γονίδιο *lacI* (*lac* καταστολέας) και το γονίδιο της RNA πολυμεράσης T7, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5*. Απουσία επαγωγικού παράγοντα (ο οποίος μπορεί να είναι είτε το IPTG είτε η 1,6 αλλολακτόζη) ο καταστολέας *lac* δεσμεύεται στο DNA, στην περιοχή του *lac* υποκινητή και καταστέλλει τη μεταγραφή της RNA πολυμεράσης T7. Με την προσθήκη του επαγωγέα ξεκινάει η μεταγραφή της RNA πολυμεράσης T7, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5* (Σχήμα 32). Ο επαγωγέας δεσμεύεται με την πρωτεΐνη καταστολέα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *lac I* και εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τον υποκινητή *lacUV5*, επιτρέποντας τη μεταγραφή του γονιδίου της RNA πολυμεράσης T7. Τέλος, η T7 RNA πολυμεράση δεσμεύεται στον T7 υποκινητή του πλασμιδίου pET και ξεκινάει η μεταγραφή του γονιδίου-στόχου [53]. Η διαδικασία υπερέκφρασης της χιπινάσης 40 πραγματοποιήθηκε με προσθήκη του επαγωγικού παράγοντα IPTG (παράγραφος 3.3.3) και με τη διαδικασία της αυτοεπαγωγής (παράγραφος 3.3.4) με σκοπό την ανίχνευση των βέλτιστων συνθηκών επαγωγής.

### **3.3.2 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ**

Τα κύτταρα ξενιστές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της Chi40 είναι τα κύτταρα έκφρασης *E. coli* BL21 *trxB*(DE3) και BL21(DE3)Magic και τα κύτταρα αποθήκευσης *E. coli* DH5a. Τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες, ενώ για τα κύτταρα BL21(DE3)Magic ο φαινότυπος δεν είναι γνωστός.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Χαρακτηριστικά κυττάρων-ξενιστών *E. coli***

Στέλεχος	Γενικές Πληροφορίες	Αντίσταση σε αντιβιοτικά
DH5a	Κύτταρα-ξενιστές μη εκφραζόμενα. Κατάλληλα για κλωνοποιήσεις γενικού σκοπού και απομόνωση πλασμιδιακού DNA	-
BL21 <i>trxB</i> (DE3)	Κύτταρα-ξενιστές κατάλληλα για έκφραση. Επιτρέπεται η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στο κυτόπλασμα της <i>E. coli</i>	Καναμυκίνη (15μg/mL)
BL21(DE3)Magic	Κύτταρα-ξενιστές κατάλληλα για έκφραση	Καναμυκίνη (15μg/mL)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Γενότυπος κυττάρων-ξενιστών *E. coli* DH5a**

Γενότυπος	Περιγραφή
F	Χαμηλός αριθμός πλασμιδιακών αντιγράφων τα οποία αυτο-μεταβιβάζονται και χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μονόκλωνου DNA όταν τα κύτταρα-ξενιστές μολυνθούν με τον φάγο M13
Φ80- <i>lacZ</i> ΔM15	Απαραίτητο για την υβριδοποίηση της β-γαλακτοζιδάσης (όπου, παρουσία του υποστρώματος X-gal, εμφανίζονται αποικίες λευκού ή μπλε χρώματος και ελέγχεται η επιτυχία της κλωνοποίησης). Φέρεται από τον φάγο Φ80
<i>argF</i>	Αδυναμία μεταβολισμού αργινίνης λόγω μετάλλαξης του γονιδίου της καρβαμυλοτρανσφεράσης της ορνιθίνης
<i>recA1</i>	Μετάλλαξη γονιδίου που είναι υπεύθυνο για γενικό ανασυνδυασμό του DNA, ιδιαίτερα επιθυμητό για γονίδια με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
<i>endA1</i>	Μετάλλαξη στη μη-ειδική περιοριστική ενδονουκλεάση Ενδονουκλεάση I; βελτιστοποίηση απομόνωσης πλασμιδιακών DNA λόγω εξάλειψης δραστηριότητας μη ειδικών περιοριστικών ενδονουκλεασών
<i>hsdR</i>	Μεταλλάξεις στο σύστημα μεθυλίωσης και περιορισμού που επιτρέπει τα βακτηριακά κύτταρα <i>E. coli</i> να αναγνωρίζουν το ξένο DNA. Ο γενότυπος <i>hsd</i> επιτρέπει τον επιτυχή μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων και την εισαγωγή DNA προερχόμενου από αντίδραση PCR. Το γονίδιο <i>hsdR</i> εξαλείφει τη δράση της μη μεθυλιωμένης EcoK I στις θέσεις περιορισμού
<i>thi-1</i>	Απαιτείται θειαμίνη για την ανάπτυξη των κυττάρων
<i>gyrA96</i>	Ανθεκτικότητα στο ναλιδιξικό οξύ λόγω μετάλλαξης στη DNA γυράση
<i>relA1</i>	Σύνθεση RNA απουσία πρωτεϊνικής σύνθεσης (χαλαρός φαινότυπος - relaxed phenotype). Η περιοχή <i>relA</i> ελέγχει τη σύζευξη μεταγραφής και μετάφρασης. Κύτταρα που φέρουν το αγρίου τύπου γονίδιο, σε περιπτώσεις απουσίας αμινοξέων, διακόπτεται η σύνθεση του RNA



**ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Γενότυπος κυττάρων-ξενιστών *E. coli* BL21 *trxB*(DE3)**

Γενότυπος	Περιγραφή
F	Χαμηλός αριθμός πλασμιδιακών αντιγράφων τα οποία αυτο-μεταβιβάζονται και χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μονόκλωνου DNA όταν τα κύτταρα-ξενιστές μολυνθούν με τον φάγο M13
ompT	Το στέλεχος αυτό της <i>E. coli</i> δεν διαθέτει στην εξωτερική του μεμβράνη πρωτεάση. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η αποικοδόμηση και βελτιώνεται η ανάκτηση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών
hsd	Μεταλλάξεις στο σύστημα μεθυλίωσης και περιορισμού που επιτρέπει τα βακτηριακά κύτταρα <i>E. coli</i> να αναγνωρίζουν το ξένο DNA. Ο γονότυπος hsd επιτρέπει τον επιτυχή μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων και την εισαγωγή DNA προερχόμενου από αντίδραση PCR
dcm	Κατάλυση της ενδογενούς μεθυλίωσης της αδενίνης στις αλληλουχίες GATC ( <i>dam</i> ), με σκοπό τον πολλαπλασιασμό του DNA και την προστασία από τη δράση περιοριστικών ενδονουκλεασών (όπως <i>Ava II</i> , <i>Bcl I</i> )
DE3	Λυσογόνο που κωδικοποιεί την RNA πολυμεράση T7. Χρησιμοποιείται για την επαγωγή έκφρασης πρωτεϊνών σε T7 συστήματα έκφρασης

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι σε μερικές πρωτεΐνες - μεταξύ των οποίων και η Chi40 - για τη σωστή αναδίπλωση και τη σωστή διαμόρφωσή τους στο χώρο, απαιτείται ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών. Οι δεσμοί αυτοί δημιουργούνται κατά την έξοδο της πρωτεΐνης στον περιπλασματικό χώρο ενώ, απουσία τους, είναι δυνατό οι πρωτεΐνες αυτές είτε να αποδιαταχθούν είτε να δημιουργήσουν συσσωματώματα. Βακτηριακά στελέχη *E. coli* που περιέχουν μεταλλάξεις της αναγωγάσης της θυρεοδοξίνης (*TrxB*), ενισχύουν το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στο κυτόπλασμα της *E. coli* ενισχύοντας έτσι τη διαλυτότητα και την δραστικότητα της πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό μεταξύ των άλλων επιλέχθηκαν τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* BL21 *trxB*(DE3) ως μέσα υπερέκφρασης της Chi40.

### 3.3.3 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΣΤΟΧΟΥ ΜΕ IPTG

#### Υλικά

- Μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21Invitrogen) και BL21(DE3)Magic
- Θρεπτικό υλικό LB (τρυπτόνη 1%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 0.5%w/v (*Scharlau*), NaCl 170mM (*Merck*))
- Θρεπτικό υλικό 2x YT (τρυπτόνη 1.6%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 1%w/v (*Scharlau*), NaCl 85mM (*Merck*))
- Θρεπτικό υλικό TB (τρυπτόνη 1.2%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 2.4%w/v (*Scharlau*), γλυκερόλη 0.4%w/v (*Merck*), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17mM (*Sigma*), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 72mM (*Sigma*))
- Θρεπτικό υλικό HD (τρυπτόνη 1%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 0.5%w/v (*Scharlau*), γλυκερόλη 0.5%w/v (*Merck*), γλυκόζη 0.05%w/v (*Sigma*), MgSO<sub>4</sub> 2mM (*Sigma*), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25mM (*Sigma*))
- αμπικιλίνη 100mg/mL (*Merck*)
- καναμυκίνη 50mg/mL (*Merck*)
- IPTG 1M (*Thermo Scientific*)
- Φωτόμετρο (*Schimadzu*)
- Επωαστήρας (*New Brunswick Scientific*)
- Φυγόκεντρος (*eppendorf*)

#### Αρχή της μεθόδου

Η επαγωγή της χιπνάσης 40 πραγματοποιήθηκε με προσθήκη του επαγωγέα IPTG (Iso Propyl Thio Galactoside - ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης) κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων, σε τελική συγκέντρωση 1mM. Το IPTG είναι ισχυρός επαγωγικός παράγοντας που εμφανίζει δομικές ομοιότητες με τη γαλακτόζη αλλά δεν καταβολίζεται εξασφαλίζοντας έτσι συνεχή επαγωγή. Η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας IPTG (καθώς σε αυξημένες συγκεντρώσεις η ουσία αυτή εμφανίζεται τοξική για τα κύτταρα) σε αναπτυσσόμενη καλλιέργεια επάγει την παραγωγή RNA πολυμεράσης T7, η οποία μεταγράφει το γονίδιο-στόχο που έχουμε εισάγει στο πλασμίδιο pET.

#### Πειραματικό μέρος

Η μελέτη της κινητικής παραγωγής της Chi40 μέσω του επαγωγικού παράγοντα IPTG πραγματοποιήθηκε στα θρεπτικά μέσα LB, 2x YT, TB και HD με στόχο την ανίχνευση των βέλτιστων συνθηκών επαγωγής. Η μελέτη

της επαγωγής του γονιδίου-στόχου με IPTG περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- Εμβολιασμός μιας αποικίας μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* από τρυβλίο (ή 5mL μετασχηματισμένων κυττάρων από την καλλιέργεια διατήρησης που έχουμε αποθηκεύσει στους -20°C) σε 5mL θρεπτικό υλικό LB. Ακολουθεί προσθήκη αντιβιοτικών - αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100μg/mL και καναμυκίνη συγκέντρωσης 50 μg/mL. (Καλλιέργεια Έναρξης)
- Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση στις 220rpm, για 16 ώρες
- Έλεγχος ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας OD<sub>600nm</sub>. Παραλαβή δείγματος (1.5mL) από την καλλιέργεια για περαιτέρω ανάλυση. Το σημείο αυτό θεωρείται ως σημείο αναφοράς και το ορίζουμε ως 0 (0 h) πριν την προσθήκη του επαγωγικού παράγοντα IPTG
- Αραίωση της βακτηριακής καλλιέργειας 1:100 σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (LB, 2x YT, TB ή HD) που περιέχει αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL και καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL. Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση στις 220rpm μέχρι η καλλιέργεια να φτάσει στην εκθετική φάση ανάπτυξης (OD<sub>600nm</sub>= 0.8)
- Προσθήκη του επαγωγέα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM
- Επώαση της καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση στις 220rpm
- Δειγματοληψία (παραλαβή 1.5mL) μετά από 2, 4, 6 και 24 ώρες και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD<sub>600nm</sub>) στους αντίστοιχους χρόνους
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων (4°C, 5000rpm, 5min)
- Διαχωρισμός του συνολικού κυτταρικού ιζήματος από το υπερκείμενο υγρό
- Αποθήκευση των δειγμάτων για περαιτέρω ανάλυση: ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-PAGE 12.5% (παράγραφος 3.3.6), προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 3.4) και προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας Chi40 (παράγραφος 3.5)

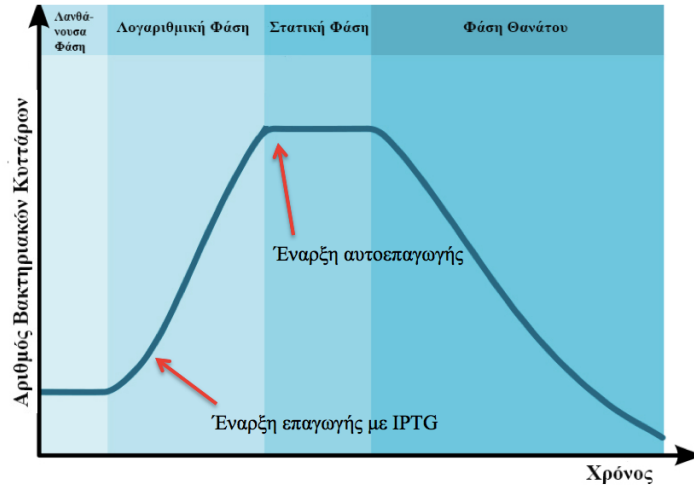
### 3.3.4 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΣΤΟΧΟΥ ΜΕ ΑΥΤΟΕΠΑΓΩΓΗ

#### Υλικά

- Προπαρασκευασμένα αντιδραστήρια (*Novagen kit*): buffer 1 (διάλυμα επαγωγής), buffer 2 (ρυθμιστικό διάλυμα), buffer 3 (διάλυμα μαγνησίου)
- Μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21Invitrogen) και BL21(DE3)Magic
- Θρεπτικό υλικό LB (τρυπτόνη 1%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 0.5%w/v (*Scharlau*), NaCl 170mM (*Merck*))
- αμπικιλίνη 100mg/mL (*Merck*)
- καναμυκίνη 50mg/mL (*Merck*)
- Φωτόμετρο (*Schimadzu*)
- Επωαστήρας (*New Brunswick Scientific*)
- Φυγόκεντρος (*erppendorf*)

#### Αρχή της μεθόδου

Η διαδικασία της αυτοεπαγωγής είναι μια μέθοδος έκφρασης γονιδίων που βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων θρεπτικών μέσων να επάγουν την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης όταν τα βακτηριακά κύτταρα φτάσουν σε κατάσταση κορεσμού. Σε ένα μη αυτοεπαγώμενο σύστημα, η επαγωγή πραγματοποιείται κατά την έναρξη της εκθετικής φάσης των βακτηριακών κυττάρων, όταν προστίθεται ο επαγωγικός παράγοντας IPTG. Αντίθετα, σε ένα αυτοεπαγώμενο σύστημα, η έναρξη επαγωγής πραγματοποιείται κατά τη στατική φάση (Σχήμα 33). Η μέθοδος βασίζεται στη σύσταση θρεπτικών υλικών που περιέχουν μεταξύ άλλων γλυκόζη, γλυκερόλη και λακτόζη, σε αναλογίες κατάλληλες έτσι ώστε να καταβολίζονται διαφορετικά στις διάφορες φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα και ταυτόχρονα την επαγωγή της πρωτεΐνης-στόχου από τον *lac* υποκινητή.



**ΣΧΗΜΑ 33: Καμπύλη ανάπτυξης καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων.** Η έναρξη επαγωγής παρουσία του επαγωγικού παράγοντα IPTG πραγματοποιείται κατά την αρχική φάση ανάπτυξης των κυττάρων (εκθετική φάση). Αντίθετα, σε ένα αυτοεπαγώμενο σύστημα η επαγωγή πραγματοποιείται κατά την στατική φάση ανάπτυξης, όπου τα βακτηριακά κύτταρα έχουν φτάσει σε κατάσταση κορεσμού

Η γλυκόζη, που βρίσκεται σε περιορισμένη συγκέντρωση, μεταβολίζεται κατά το αρχικό στάδιο της ανάπτυξης των κυττάρων. Σε αυτή τη φάση ανάπτυξης η λακτόζη δεν καταβολίζεται, παρά μόνο στο τέλος της εκθετικής φάσης όπου πλέον η γλυκόζη έχει καταναλωθεί πλήρως. Όταν η γλυκόζη μεταβολιστεί πλήρως, ξεκινά ο καταβολισμός της λακτόζης από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση. Το ένζυμο αυτό υδρολύει τη λακτόζη σε γαλακτόζη και γλυκόζη ενώ, ως παραπροϊόν της αντίδρασης αυτής, είναι η 1,6 αλλολακτόζη (ο επαγωγέας του οπερονίου *lac*). Με τον τρόπο αυτό ξεκινάει η μεταγραφή.

Η λακτόζη, σε αντίθεση με τη γλυκερόλη, δεν είναι ικανοποιητική πηγή άνθρακα και ενέργειας για τα κύτταρα *E. coli*. Για τον λόγο αυτό, για την πραγματοποίηση της αυτοεπαγωγής, τα θρεπτικά μέσα περιέχουν και γλυκερόλη, μια σημαντική πηγή ενέργειας που δεν παρεμβάλεται στη διαδικασία της επαγωγής και επιτρέπει την ανάπτυξη των κυττάρων σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό (μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα). Ωστόσο, εκτός από τον ρόλο της γλυκερόλης ως εναλλακτικής πηγής άνθρακα για τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου, ο καταβολισμός της οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων κυκλικού AMP (cAMP) και συνεπώς στην περαιτέρω επαγωγή έκφρασης της RNA πολυμεράσης T7. Αυτό συμβαίνει διότι τα βακτηριακά

κύτταρα *E. coli* περιέχουν πρωτεΐνες εξαρτώμενες από το cAMP που δεσμεύονται στο DNA και διεγείρουν τη μεταγραφή [54].

Συνοψίζοντας, λοιπόν, η έκφραση του γονιδίου-στόχου γίνεται μέγιστη όταν η δέσμευση της αλλολακτόζης στον καταστολέα lac εμποδίζει τη σύνδεσή του στον υποκινητή lacUV5 και το σύμπλοκο CAP-cAMP διεγείρει τη δέσμευση της RNA πολυμεράσης.

Η διαδικασία της αυτοεπαγωγής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Novagen. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το LB, καθώς και τα διαλύματα που περιέχονται στο kit. Αναλυτικότερα, προστέθηκε διάλυμα επαγωγής (buffer 1) το οποίο περιέχει μίγμα πηγών άνθρακα σε αναλογίες κατάλληλες έτσι, ώστε να εξασφαλισθεί η αυστηρή ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και να επιτευχθεί υψηλή κυτταρική πυκνότητα. Προστέθηκε επίσης ρυθμιστικό διάλυμα (buffer 2) που διατηρεί το pH σταθερό καθ'όλη τη διάρκεια του μεταβολισμού όπου παρατηρείται αυξημένη παραγωγή οξέων. Επιπλέον, παρέχει επιπρόσθετη ποσότητα αζώτου, απαραίτητη για την πρωτεϊνοσύνθεση. Τέλος, προστέθηκε διάλυμα μαγνησίου (buffer 3) για την ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης [52,54].

### *Πειραματικό μέρος*

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Εμβολιασμός μιας αποικίας μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* από τρυβλίο (ή 5μL μετασχηματισμένων κυττάρων από την καλλιέργεια διατήρησης που έχουμε αποθηκεύσει στους -20°C) σε 4.645 mL θρεπτικό υλικό LB. Προσθήκη 100μL διαλύματος 1, 250μL διαλύματος 2 και 5μL διαλύματος 3. Ακολουθεί προσθήκη αντιβιοτικών - αμπικιλίνη συγκέντρωσης 100μg/mL και καναμυκίνη συγκέντρωσης 50μg/mL
- Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση στις 300rpm (έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλός αερισμός της καλλιέργειας) για 16 ώρες
- Δειγματοληψία (παραλαβή 1.5mL) και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD<sub>600nm</sub>)
- Φυγοκέντρηση του δείγματος (4°C, 5000rpm, 5 λεπτά)

- Διαχωρισμός του συνολικού κυτταρικού ιζήματος από το υπερκείμενο υγρό
- Αποθήκευση των δειγμάτων για περαιτέρω ανάλυση: ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-PAGE 12.5% (παράγραφος 3.3.6), προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 3.4) και προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας Chi40 (παράγραφος 3.5)

### **3.3.5 ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΡΙΧΛΩΡΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**

#### *Υλικά*

- TCA 100%w/v (*Merck*)
- Καθαρή παγωμένη ακετόνη 100% (*Scharlau*)
- Φυγόκεντρος (*erppendorf*)
- Αντλία κενού

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η μέθοδος καταβύθισης πρωτεϊνών με χρήση τριχλωροξικού οξέος (TCA) χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των αλάτων από το πρωτεϊνικό δείγμα και έχει ως στόχο την βελτιστοποίηση της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων. Το TCA είναι πολύ ισχυρό οξύ. Αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, οι οποίες έπειτα από φυγοκέντρηση κατακρυμνίζονται ως ίζημα. Η έκπλυση του ιζήματος γίνεται παρουσία παγωμένης ακετόνης ώστε να απομακρυνθεί το TCA. Είναι χαρακτηριστική η περίπτωση δειγμάτων έτοιμων προς ηλεκτροφόρηση τα οποία δεν έχουν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που τους προσδίδει η χρωστική. Αντίθετα, εμφανίζουν κίτρινο χρώμα που οφείλεται στο ισχυρά όξινο περιβάλλον που δημιουργείται λόγω της παρουσίας του οξέος. Το χρώμα επανέρχεται σε αυτές τις περιπτώσεις με προσθήκη μικρής ποσότητας (2-20  $\mu$ L) αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος.

#### *Πειραματικό μέρος*

Στα δείγματα του υπερκείμενου υγρού πραγματοποιήθηκε καταβύθιση πρωτεϊνών με χρήση TCA έτσι ώστε στη συνέχεια να ηλεκτροφορηθούν. Η

πειραματική διαδικασία καταβύθισης πρωτεϊνών περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Προσθήκη TCA τελικής συγκέντρωσης 25%w/v
- Καλή ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά στους 4°C
- Φυγοκέντρηση του δείγματος (13000rpm, 4°C, 15min)
- Αφαίρεση του υπερκειμένου υγρού και έκπλυση του ιζήματος με προσθήκη 200μL καθαρής, παγωμένης ακετόνης
- Ανάδευση και φυγοκέντρηση (13000rpm, 4°C, 5min). Επανάληψη έκπλυσης και φυγοκέντρησης
- Προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου υγρού και ξήρανση του δείγματος με αντλία κενού. Παραμονή του δείγματος για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

### **3.3.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE)**

#### *Αρχή της μεθόδου*

Κατά την ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου, πραγματοποιείται διαχωρισμός πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή τους μάζα. Η χρήση του θειικού δωδεκυλικού σουλφονικού νατρίου (SDS) συντελεί στη μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών, καθώς συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί τους. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, διαχωρίζονται στις υπομονάδες τους και δημιουργούνται σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS. Τα σύμπλοκα αυτά έχουν αρνητικό φορτίο και ο λόγος της ποσότητας του SDS ανα μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης). Έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών στην πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό μέγεθός τους. Πιο συγκεκριμένα, η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου της μοριακής τους μάζας. Συνήθως γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, πριν την ηλεκτροφόρηση, με τη χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων που ανάγουν δισουλφιδικούς δεσμούς - όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη -, οπότε διαχωρίζονται όλες οι πρωτεϊνικές υπομονάδες. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου



σχηματίζεται με αντίδραση συμπολιμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρήση ασυνεχών ρυθμιστικών διαλυμάτων σε αποδιατακτικές και αναγωγικές συνθήκες. Παρασκευάστηκε μια μη συνεχής πηκτή, η οποία αποτελείται από την πηκτή επιστοίβασης (stacking) και την πηκτή διαχωρισμού (running), διαφορετικού μεγέθους πόρων, pH και ιοντικής ισχύος. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβασης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία ανεξαρτήτως μοριακού βάρους και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών [50,55].

### *Πειραματικό μέρος*

#### *Υλικά*

- N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο 30% (*Merck*)
- 1M Tris/HCl pH 6.8 (*Merck*)
- 1M Tris/HCl pH 8.8 (*Merck*)
- 10 % SDS (*Sigma*)
- 10% APS (*Applichem*)
- TEMED (*Merck*)
- Διάλυμα φόρτωσης Laemmli 2x (SDS 4% (*Sigma*), γλυκερόλη 20% (*Merck*), 2-μερκαπτοαιθανόλη 10% (*Merck*), κυανούν της βρωμοφαινόλης 0.004% (*Merck*), Tris/HCl pH 6.8 0.125M (*Merck*))
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris 25mM (*Merck*), γλυκίνη 192mM (*Sigma*), SDS 0.1% (*Sigma*))
- Διάλυμα χρώσης Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250 0.25% (*Fluka*), μεθανόλη 45% (*Merck*), οξικό οξύ 10% (*Sigma*))
- Διάλυμα αποχρωματισμού (ισοπροπανόλη 10%v/v (*Sigma*), οξικό οξύ 10%v/v (*Sigma*))
- Απιονισμένο νερό (Συσκευή Milli-Q H<sub>2</sub>O, QPAK)
- Συσκευή υπερήχων (*Bandelin Sonorex RK100*)
- Θερμαντική πλάκα (*techne*)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (*Bio-Rad*)

### Παρασκευή της πηκτής

Το μοριακό βάρος της Chi40 είναι περίπου 40kDa. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε πηκτή επιστοίβασης περιεκτικότητας 5% και πηκτή διαχωρισμού περιεκτικότητας 12.5%, η σύσταση των οποίων φαίνεται στους παρακάτω πίνακες.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Πηκτής επιστοίβασης 5% ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE**

<b>Συστατικά</b>	<b>Σύσταση (mL)</b>
N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο 30%	1.0
1M Tris/HCl pH 6.8	0.76
10 % SDS	0.06
dH <sub>2</sub> O	4.2
10% APS	0.06
TEMED	0.006

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Πηκτή διαχωρισμού 12.5% ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE**

<b>Συστατικά</b>	<b>Σύσταση (mL)</b>
N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο 30%	8.4
1M Tris/HCl pH 8.8	5.0
10 % SDS	0.2
dH <sub>2</sub> O	6.2
10% APS	0.2
TEMED	0.008

### Προετοιμασία Δειγμάτων

#### (I) Δείγματα θρεπτικού υπερκείμενου

Η κατεργασία των υπερκείμενων δειγμάτων περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Επαναδιάλυση των δειγμάτων σε 50μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης Laemmli 1x. Στα δείγματα αυτά έχει ήδη προηγηθεί καταβύθιση πρωτεϊνών με χρήση TCA
- Ομογενοποίηση των δειγμάτων με συσκευή υπερήχων για 15 λεπτά.
- Θέρμανση στους 98°C για 3 λεπτά.

## (II) Δείγματα κυτταρικού ιζήματος

Η κατεργασία των δειγμάτων αυτών περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Διαλυτοποίηση του κυτταρικού ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli έτσι ώστε 10μL διαλύματος να αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 0.1 OD<sub>600</sub>.
- Ομογενοποίηση των δειγμάτων σε συσκευή υπερήχων, για 30 λεπτά.
- Θέρμανση στους 98°C για 3 λεπτά.

## Ηλεκτροφόρηση

Αφού η πηκτή εφαρμοστεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, προσθέτουμε σε κάθε διαδρομή 20 μL δείγματος. Ως δείκτη μοριακής μάζας για την ανίχνευση της Chi40, προσθέσαμε 5μL καθαρού ενζύμου (στο οποίο είχε προηγηθεί αραίωση με διάλυμα Laemmli 2x και θέρμανση στους 98°C για 3 λεπτά). Στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και ξεκινά η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Εφαρμόζεται τάση 150V υπό σταθερή ένταση ρεύματος 30mA για την πηκτή επιστοίβασης, η οποία διαρκεί 15 λεπτά, ενώ για την πηκτή διαχωρισμού εφαρμόζεται τάση 250 V υπό σταθερή ένταση ρεύματος 35 mA και διαρκεί 45 λεπτά. Εφαρμόζεται επίσης ισχύς 10.8 W και η συνολική διάρκεια ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 1 ώρα.

## Εμφάνιση των πρωτεϊνών στην πηκτή

Η ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, όπου ευνοούνται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών.

Η πειραματική διαδικασία χρώσης του πηκτώματος και έπειτα εμφάνισης των πρωτεϊνών περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Αφαίρεση του πηκτώματος από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εμφάνιση στο διάλυμα χρώσης Coomassie
- Επώαση της πηκτής για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

- Αφαίρεση του διαλύματος χρώσης. Ξέπλυμα της πηκτής με απεσταγμένο νερό και προσθήκη του διαλύματος αποχρωματισμού
- Έναλλαγή ανά τακτά χρονικά διαστήματα με φρέσκο διάλυμα μέχρι να γίνει πλήρης αποχρωματισμός και εμφάνιση των πρωτεϊνών.

### 3.3.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΠΟ ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (native-PAGE)

#### Υλικά

- N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο 30% (*Merck*)
- 1M Tris/HCl pH 6.8 (*Merck*)
- 0.375M Tris/HCl pH 8.8 (*Merck*)
- 10% APS (*Applichem*)
- TEMED (*Merck*)
- Διάλυμα φόρτωσης Laemmli 2x (γλυκερόλη 20% (*Merck*), κυανού της βρωμοφαινόλης 0.004% (*Merck*), Tris/HCl pH 6.8 0.125M (*Merck*))
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris 25mM (*Merck*), γλυκίνη 192mM (*Sigma*))
- Διάλυμα χρώσης Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250 0.25% (*Fluka*), μεθανόλη 45% (*Merck*), οξικό οξύ 10% (*Sigma*))
- Διάλυμα αποχρωματισμού (ισοπροπανόλη 10%v/v (*Sigma*), οξικό οξύ 10%v/v (*Sigma*))
- Απιονισμένο νερό (*Συσκευή Milli-Q H<sub>2</sub>O, QPAK*)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (*Bio-Rad*)

#### Αρχή της μεθόδου

Η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (native-PAGE) χρησιμοποιείται για τη μελέτη της σύστασης και της δομής μιας πρωτεΐνης χωρίς αυτή να έχει υποστεί κάποια αλλαγή στη δομή της. Βασική διαφορά σε σύγκριση με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE είναι το γεγονός ότι πραγματοποιείται υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Κατά την μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται διαχωρισμός με βάση το συνολικό φορτίο και το συνολικό μέγεθος μιας πρωτεΐνης. Το πρωτεϊνικό διάλυμα υπόκειται σε μη αναγωγικό - μη αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα έτσι ώστε να διατηρηθεί η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών. Στόχος είναι η διατήρηση της φυσικής κατάστασης της πρωτεΐνης, όπως αυτή υπάρχει στο πρωτεϊνικό δείγμα, αλλά και η ανίχνευση τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών καθώς και συσσωματωμάτων

στο πρωτεϊνικό δείγμα [56].

### *Πειραματικό μέρος*

Η πειραματική διαδικασία είναι αντίστοιχη με αυτήν της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE με τη διαφορά ότι αποφεύχθηκαν όλοι οι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών όπως θέρμανση και αναγωγικά/αποδιατακτικά αντιδραστήρια (SDS, β-μερκαπτοαιθανόλη). Αναλυτικότερα, η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

### Παρασκευή της πηκτής

Η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση native-PAGE πραγματοποιείται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές και μη αναγωγικές συνθήκες. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.6.

Όπως και στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, παρασκευάστηκε μια μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής, η οποία αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβασης (stacking) περιεκτικότητας 5% και την πηκτή διαχωρισμού (running) περιεκτικότητας 12.5%. Η σύσταση των δύο πηκτών παρουσιάζεται στους Πίνακες 11 και 12.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 11:** Πηκτή επιστοίβασης 5% μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης

<b>Συστατικά</b>	<b>Σύσταση (mL)</b>
N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (30%/0.8%w/v)	0.67
0.375M Tris/HCl pH 8.8	4.275
10% w/v APS	0.05
TEMED	0.005

**ΠΙΝΑΚΑΣ 12:** Πηκτή διαχωρισμού 12.5% μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης

<b>Συστατικά</b>	<b>Σύσταση (mL)</b>
N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (30%/0.8w/v)	4.0
0.375M Tris/HCl pH 8.8	5.89
10%w/v APS	0.1
TEMED	0.01

### Προετοιμασία δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση

Στην περίπτωση της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης δεν πραγματοποιείται καταβύθιση πρωτεϊνών με TCA για να αποφευχθεί η αποδιάταξή τους. 500μL πρωτεϊνικού δείγματος επαναδιαλύονται σε 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 2x και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση χωρίς να προηγηθεί θέρμανση. Αφού η πηκτή εφαρμοστεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, προσθέτουμε σε κάθε διαδρομή 20 μL δείγματος. Στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x και ξεκινάει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Εφαρμόζεται τάση 100 V υπό σταθερή ένταση ρεύματος 30mA.

Η εμφάνιση των πρωτεϊνών στην πηκτή πραγματοποιείται με χρώση με Coomassie Brilliant Blue G-250, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.

### **3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD**

#### *Υλικά*

- Αντιδραστήριο Bradford (αιθανόλη 95%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250) (*Bio-Rad*)
- Φωτόμετρο (*Schimadzu*)

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να συνδέεται με τις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Με τον τρόπο αυτό οι πρωτεΐνες σε ένα διάλυμα γίνονται ανιχνεύσιμες με μέτρηση της απορρόφηση στα 595 nm [57].

Η χρωστική υπάρχει σε τρεις μορφές: την κατιοντική (κόκκινο χρώμα), την ουδέτερη (πράσινο χρώμα) και την ανιοντική (μπλε χρώμα). Σε όξινο περιβάλλον η χρωστική κατά κύριο λόγο βρίσκεται στη διπλά πρωτονιωμένη κατιοντική μορφή και παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 470 nm. Ωστόσο, όταν η χρωστική συνδέεται με τις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων και ιοντικών αλληλεπιδράσεων, προκαλείται ορατή αλλαγή χρώματος και μετάβαση στη σταθεροποιημένη ανιοντική μορφή, με μέγιστη απορρόφηση τα 595 nm. Με τον τρόπο αυτό προσαρμόζονται οι πρωτεΐνες στο διάλυμα. Πρόκειται για μια

ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο η οποία συγκεντρώνει αρκετά πλεονεκτήματα όπως η ευκολία και η ταχύτητα στην εκτέλεση [58].

### Πειραματικό μέρος

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Προσθήκη γνωστού όγκου δείγματος (50-200  $\mu\text{L}$ ) σε 200  $\mu\text{L}$  αντιδραστήριο Bradford και αραίωση έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 1 mL. Για την εξασφάλιση ακρίβειας και επαναληψιμότητας, κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε σε τέσσερις διαφορετικούς όγκους. Αναλυτικά οι ποσότητες που προστέθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Σύσταση δειγμάτων για φωτομέτρηση**

Δείγμα ( $\mu\text{L}$ )	dH <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Αντιδραστήριο Bradford ( $\mu\text{L}$ )
50	750	200
100	700	200
150	650	200
200	600	200

- Φωτομέτρηση στα 595nm
- Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικών πρωτεϊνών με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με μέτρηση απορρόφησης δειγμάτων BSA γνωστής συγκέντρωσης, κατά τον ίδιο τρόπο

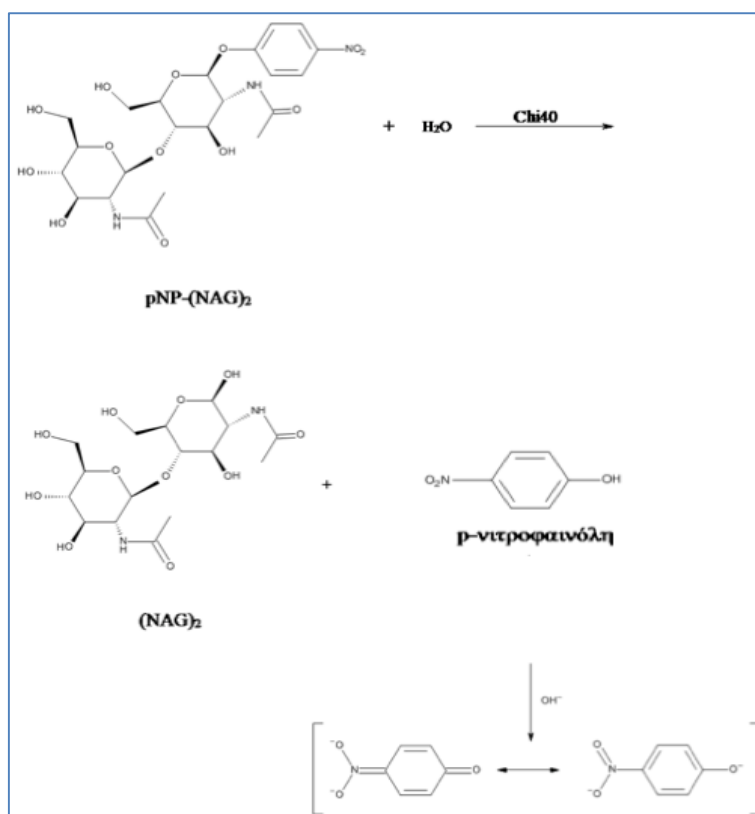
### 3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40

#### Υλικά

- 100 $\mu\text{M}$  pNP-(NAG)<sub>2</sub>
- 200mM οξικό νάτριο pH 6.0 (*Sigma*)
- NaOH 1M (*Merck*)
- Υπερκάθαρο νερό (*Συσκευή Milli-Q H<sub>2</sub>O, QPAK*)
- Μικροπλάκες τύπου ELISA (ELISA-microtiter plate) (*Tecan*)
- Συσκευή ELISA (*Human Reader HS*)
- Υδατόλουτρο

### Αρχή της μεθόδου

Η ενζυμική δραστηριότητα της Chi40 προσδιορίστηκε με φωτομετρικό τρόπο, μελετώντας τον βαθμό υδρόλυσης του συνθετικού υποστρώματος p-νιτροφαινυλο-β-1,4-N,N'-διακετυλο-χιτοβιόζη (pNP-(NAG)<sub>2</sub>) στο οποίο δρα. Πιο αναλυτικά, όπως παρουσιάζεται και στην παρακάτω αντίδραση, κατά την δράση της Chi40 στο υπόστρωμα, παράγεται p-νιτροφαινόλη, η οποία σε αλκαλικό περιβάλλον μετατρέπεται σε έγχρωμο προϊόν με μέγιστο απορρόφησης τα 405nm (Σχήμα 34) [50].



ΣΧΗΜΑ 34: Ενζυμική δράση Chi40

### Πειραματικό μέρος

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Σε καθένα από τα 96 βοθρία μικροπλάκας προστίθεται κατάλληλη ποσότητα δείγματος θρεπτικού υπερκείμενου υγρού. Κάθε δείγμα αναλύθηκε σε πολλαπλούς όγκους, έτσι ώστε να ανήκει στη γραμμική περιοχή της καμπύλης απορρόφησης (ένα τυπικό παράδειγμα διαγράμματος απορρόφησης συναρτήσει των όγκων θρεπτικού υπερκείμενου υγρού που

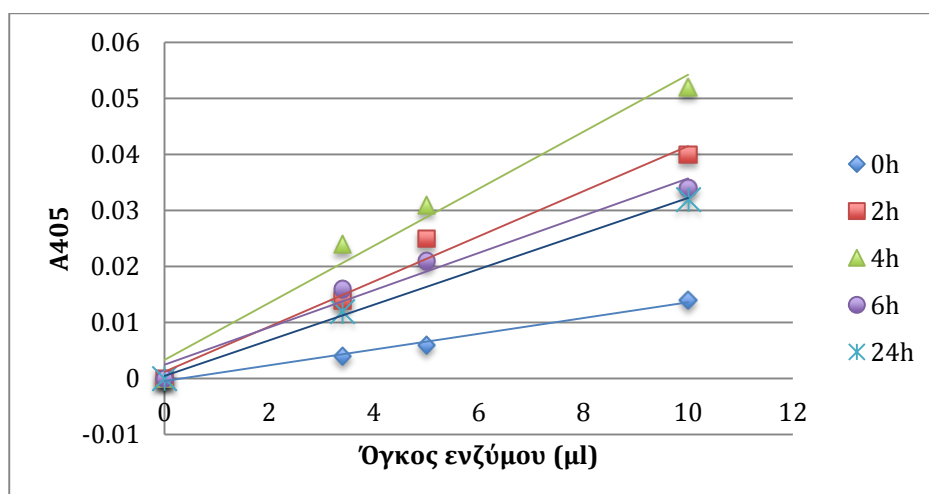


απαιτήθηκαν για τη μέτρηση παρουσιάζεται στο σχήμα 35). Στη συνέχεια προστίθεται 40μM pNP-(NAG)<sub>2</sub> και 25μL οξικού νατρίου pH 6.0 και συγκέντρωσης 50mM. Ακολουθεί προσθήκη υπερκάρου νερού έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100 μL

- Επώαση για 1 ώρα στους 50°C
- Προσθήκη 20μL δ/τος NaOH 1M
- Φωτομέτρηση στα 405 nm
- Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας (μU/μg) σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{Δραστηριότητα (μU/μL)} / C_{\text{ολικών πρωτεϊνών (μg/μL)}}$$

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας (μU/μL) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον συντελεστή απόσβεσης της p-νιτροφαινυλικής ομάδας:  $\epsilon_{405\text{nm}} = 18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [49].



**ΣΧΗΜΑ 35:** Τυπικό διάγραμμα απορρόφησης στα 405 συναρτήσει των όγκων θρεπτικού υπερκείμενου υγρού που απαιτήθηκαν για τη μέτρηση ειδικής δραστηριότητας. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα αναλύονται τα δείγματα θρεπτικού υπερκείμενου υγρού που παραλάβαμε έπειτα από 0, 2, 4, 6, και 24h επαγωγής *Chi40-wt* με IPTG από την κυτταρική σειρά *BL21trxB(DE3)* στο θρεπτικό μέσο *LB*

### 3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ - ΠΕΙΡΑΜΑ DSF

Υλικά

- Χρωστική SYPRO Orange (*life technologies*)
- Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100mM (*Fluka*), NaCl 150mM, pH 7.5 (*Merck*)
- Υπερκάθαρο νερό (*Συσκευή Milli-Q H<sub>2</sub>O, QPAK*)
- Μικροπλάκες τύπου ELISA (ELISA-microtiter plate) (*Tecan*)
- Φυγόκεντρος (*Eppendorf*)
- Συσκευή real-time PCR (*Stratagene*)

### Αρχή της μεθόδου

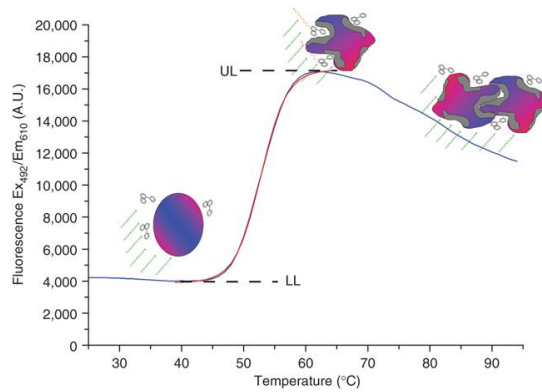
Η Διαφορική Φθορισμομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Fluorimetry - DSF) είναι μια γρήγορη και χαμηλού κόστους μέθοδος μελέτης της θερμοσταθερότητας μιας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση υποκαταστατών με μικρά μοριακά βάρη, οι οποίοι προσδένονται στις πρωτεΐνες και τις σταθεροποιούν. Με τη μέθοδο αυτή ελέγχεται η θερμική αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής και συνήθως ελέγχεται με τη συσκευή της real-time PCR.

Η μέθοδος DSF βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους τύπους πρωτεϊνών. Η φθορίζουσα ένωση παρουσιάζει υψηλότερη ένταση φθορισμού σε μη πολικό περιβάλλον, όπως για παράδειγμα στις υδρόφοβες περιοχές μιας μη αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης, ενώ αντίθετα σε υδρόφιλο περιβάλλον παρουσιάζει χαμηλή ένταση φθορισμού.

Η μέθοδος DSF είναι ιδανική για την ανίχνευση συνθηκών σταθεροποίησης πρωτεϊνών, αφού απαιτούνται μικρές ποσότητες και συγκεντρώσεις πρωτεΐνης για τη μέτρηση. Κατα συνέπεια, χρησιμοποιείται και σε δείγματα όπου η υψηλή τάση συσσωμάτωσης ή η χαμηλή σταθερότητα εμποδίζουν τη διαδικασία καθαρισμού. Με τη μέθοδο DSF η ένταση φθορισμού μετράται συναρτήσει της θερμοκρασίας σχηματίζοντας σιγμοειδή καμπύλη που χαρακτηρίζεται από δύο μεταβατικές καταστάσεις [59] (Σχήμα 36).

Το σημείο τήξης ( $T_m$ ) της καμπύλης υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης Boltzmann, όπου ορίζουμε ως: LL την ελάχιστη ένταση φθορισμού, UL τη μέγιστη ένταση φθορισμού,  $a$  την κλίση της καμπύλης,  $T_m$  τη θερμοκρασία τήξης:

$$y = LL + \frac{(UL - LL)}{1 + \exp\left(\frac{T_m - x}{a}\right)}$$



**ΣΧΗΜΑ 36: Διάγραμμα έντασης φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας.** Στη συγκεκριμένη γραφική παράσταση παρουσιάζεται ο ρυθμός αποδιάταξης της συνθάσης του κιτρικού παρουσία της χρωστικής SYPRO orange. Παρουσία της πρωτεΐνης, η χρωστική (αρωματικοί δακτύλιοι) εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία στα 492 nm (πράσινο χρώμα). Κατά την αποδιάταξη της πρωτεΐνης, τα υδρόφοβα τμήματά της εκτίθενται (γκρι χρώμα), με αποτέλεσμα την ισχυρή εκπομπή φθορίζουσας ακτινοβολίας στα 610nm (κόκκινο), καθώς τα μόρια της χρωστικής δεσμεύονται στα τμήματα αυτά. Από μια θερμοκρασία και έπειτα, παρατηρείται σταδιακή μείωση της έντασης φθορισμού που οφείλεται κυρίως στην συσσωμάτωση και καταβύθιση της πρωτεΐνης

### Πειραματικό μέρος

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Σε καθένα από τα 96 βοθρία μικροπλάκας προστίθενται: πρωτεϊνικό δείγμα, χρωστική SYPRO Orange, ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 100mM, NaCl 150mM, pH 7.5. Οι ποσότητες είναι τέτοιες ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μL σε κάθε βοθρίο
- Φυγοκέντρηση της μικροπλάκας για 1 λεπτό, 1000rpm
- Τοποθέτηση στη συσκευή RT-PCR και αύξηση θερμοκρασίας 1°C min<sup>-1</sup>. Εύρος θερμοκρασιών: 25-95 °C

## 3.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40

### 3.7.1 ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΜΕ ΘΕΙΙΚΟ ΑΜΜΩΝΙΟ

#### Υλικά

- Μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* BL21 *trxB*(DE3) (*Invitrogen*)
- Θρεπτικό υλικό LB (τρυπτόνη 1%w/v (*Gibco BRL*), εκχύλισμα ζύμης 0.5%w/v (*Scharlau*), NaCl 170mM (*Merck*))
- αμπικιλίνη 100mg/mL (*Merck*)
- καναμυκίνη 50mg/mL (*Merck*)
- IPTG stock 1M (*Thermo Scientific*)
- θειικό αμμώνιο (*Merck*)
- Φωτόμετρο (*Schimidzu*)

- Επωαστήρας (*New Brunswick Scientific*)
- Φυγόκεντρος (*Jouan*)
- Κρυοθάλαμος 4°C
- Αναδευτήρας

#### *Αρχή της μεθόδου*

Το θειικό αμμώνιο χρησιμοποιείται συχνά για την επιλεκτική καταβύθιση πρωτεϊνών, καθώς με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η πρώτη απομάκρυνση μέρους πρωτεϊνών του διαλύματος, με γρήγορο και εύκολο τρόπο, για να ακολουθήσει ο περαιτέρω καθαρισμός με τις κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι το αντιδραστήριο αυτό δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο διάλυμα, καθώς προκαλεί μόνο μεταβολή της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Είναι σημαντικό ότι το θειικό αμμώνιο είναι υδατοδιαλυτό. Η κλασμάτωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την σταδιακή αύξηση του θειικού αμμωνίου στο διάλυμα, και κατ'επέκταση της ιοντικής ισχύος. Δεδομένου ότι η διαλυτότητα των πρωτεϊνών διαφέρει σε μεγάλο βαθμό καθώς αλλάζει η ιοντική ισχύς, επιτυγχάνεται σταδιακή καταβύθιση και επομένως μερικός καθαρισμός της πρωτεΐνης του διαλύματος.

#### *Πειραματικό μέρος*

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Ανάπτυξη 5L καλλιέργειας κυττάρων BL21(DE3), pET11-a/Chi40-opt και επαγωγή με IPTG. (παράγραφος 3.3.3)
- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 6000rpm, 15min, 4°C, 4 ώρες μετά την εισαγωγή IPTG
- Σταδιακή προσθήκη στερεού θειικού αμμωνίου στο υπερκείμενο υγρό - το οποίο βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση στον κρυοθάλαμο έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 500mM

### 3.7.2 ΥΔΡΟΦΟΒΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

#### Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) pH 7.0, 1 mM EDTA (Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) pH 7.0, 500mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck)
- Αναστολέας πρωτεασών PMSF (Sigma)
- Στήλη χρωματογραφίας Phenyl-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences)
- Κρυοθάλαμος

#### Αρχή της μεθόδου

Η υδρόφοβη χρωματογραφία βασίζεται στην αντιστρεπτή αλληλεπίδραση μεταξύ υδρόφοβων αμινοξέων που είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια μιας πρωτεΐνης και ενός υδρόφοβου υποκαταστάτη ο οποίος είναι προσδεδμεμένος στη στερεή φάση της στήλης. Η μέθοδος είναι ιδανική για δείγματα όπου έχουν καταβυθιστεί με θειικό αμμώνιο ή έχουν εκλουστεί με υψηλή συγκέντρωση άλατος, καθώς διαλύματα με υψηλή ιοντική ισχύ ενισχύουν τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

#### Πειραματικό μέρος

Η πειραματική διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης, έπειτα από την κλασμάτωση με θειικό αμμώνιο, περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Εξισορρόπηση του πρωτεϊνικού δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 1 mM EDTA, και προσθήκη αναστολέα πρωτεασών 0.1mM PMSF
- Εξισορρόπηση της στήλης με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 500mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Προσθήκη του πρωτεϊνικού δείγματος στη στήλη
- Έκπλυση της στήλης με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 500mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Έκλυση της πρωτεΐνης με 6 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος διαβάθμισης 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 1 mM EDTA, 500mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> → 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 1 mM EDTA
- Συλλογή δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 12.5%

### 3.7.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

#### Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0 (*Sigma*)
- 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma*) pH 7.0, 1 mM EDTA (*Sigma*)
- 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma*) pH 7.0, 1 mM EDTA (*Sigma*), 500 mM NaCl (*Merck*)
- Στήλη χρωματογραφίας Q-High Performance (*GE Healthcare Life Sciences*)
- Κρυστάλλος

#### Αρχή της μεθόδου

Με τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων ή ομάδων μορίων με μικρές διαφορές στο φορτίο τους. Η μέθοδος βασίζεται στην αντιστρεπτή αλληλεπίδραση μεταξύ ενός φορτισμένου μορίου - πρωτεΐνης και του αντίθετα φορτισμένου χρωματογραφικού υλικού. Το συνολικό φορτίο μιας πρωτεΐνης εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από το pH και αλλάζει σταδιακά καθώς το pH διαλύματος που το περιβάλλει αλλάζει. Τυπικά, όταν το pH μιας πρωτεΐνης υψηλότερο από το ισοηλεκτρικό της σημείο (pI), η πρωτεΐνη συνδέεται με θετικά ανιοανταλλακτική ρητίνη. Στην αντίθετη περίπτωση όπου το pH είναι χαμηλότερο από το pI, η πρωτεΐνη θα συνδεθεί με μια αρνητικά φορτισμένη κατιοανταλλακτική ρητίνη. Κατά τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής οι πρωτεΐνες, καθώς ενίονται, συνδέονται στη στήλη σε χαμηλή ιοντική ισχύ. Στη συνέχεια, οι συνθήκες μεταβάλλονται έτσι ώστε η έκλυση των πρωτεϊνών να πραγματοποιηθεί σταδιακά. Η έκλυση πραγματοποιείται συνήθως είτε με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος - όπως προτιμήθηκε στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία - είτε με σταδιακή αλλαγή pH.

#### Πειραματικό μέρος

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Εξισορρόπηση της στήλης με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0
- Φόρτωση του δείγματος στη στήλη

- Έκπλυση της στήλης (10 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0
- Έκλουση της πρωτεΐνης (6 όγκοι) με ρυθμιστικό διάλυμα διαβάθμισης 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 1 mM EDTA → 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl
- Συλλογή δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12.5%

### 3.8 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

#### Υλικά

- Διάλυμα A (κορεσμένο σιναπινικό οξύ (sinapinic acid, SA) (*Fluka*) σε αιθανόλη (*Merck*))
- Διάλυμα B (κορεσμένο SA (*Fluka*) σε διάλυμα 30:70 v/v ακετονιτρίλιο (*Sigma*): 0.1% υδατικό διάλυμα TFA (*Merck*))
- Συσκευή φασματομετρου MALDI (*Shimadzu*)

#### Αρχή της μεθόδου

Η Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι μια πολλαπλά χρήσιμη και ευρύτατα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ταυτοποίηση στοιχείων σε δείγματα και για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεών τους.

Η Φασματομετρία Μάζας μέχρι πρόσφατα δεν είχε καμιά χρησιμότητα στη μελέτη των πρωτεϊνών, διότι οι πρωτεΐνες δεν είναι πτητικές και επομένως δεν είναι δυνατό να επιτευχθεί το πρώτο στάδιο της ατομοποίησης. Η δυσκολία αυτή παρακάμφθηκε με τη διασπορά πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων στην αέρια φάση. Οι μεθοδολογίες αυτές ονομάζονται εκρόφηση-ιοντισμός από μήτρα μέσω λέιζερ (matrix-assisted laser desorption-ionization, MALDI) και φασματοσκοπία ηλεκτροψεκασμού (electrospray spectrometry). Για τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνών ο ιοντισμός πραγματοποιείται είτε με μια από τις δύο παραπάνω τεχνικές και έπειτα το δείγμα εισάγεται στον αναλυτή, είτε οι πρωτεΐνες υδρολύονται σε μικρότερα πεπτιδία έπειτα από πρωτεολυτική διάσπαση χρησιμοποιώντας πρωτεάσες, κυρίως θρυψίνη και πεψίνη, και στη συνέχεια η συλλογή των πεπτιδίων εισάγεται στον αναλυτή [52,60,61].

### *Πειραματικό μέρος*

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Προσθήκη 0.5μL διαλύματος A (κορεσμένο SA σε αιθανόλη) στη συσκευή MALDI μέχρι να εξατμιστεί.
- Ανάμειξη ενός μέρους διαλύματος B (κορεσμένο SA σε διάλυμα 30:70 v/v ακετονιτρίλιο: 0.1% υδατικό διάλυμα TFA) με ένα μέρος δείγματος.
- Προσθήκη 0.5μL του παραπάνω μίγματος στη συσκευή MALDI μέχρι να εξατμιστεί.

### **3.9 ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ**

#### *Υλικά*

- Διάλυμα 0.1M NaCl (*Merck*)
- Συσκευή DLS (*Malvern*)

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), παρέχει πληροφορίες για το μοριακό βάρος, την κατάσταση μιας πρωτεΐνης (αν δηλαδή βρίσκεται σε μονομερή ή ολιγομερή μορφή) καθώς και για τη διαμόρφωσή της στο διάλυμα. Όλες οι μετρήσεις DLS πρωτεϊνικών διαλυμάτων βασίζονται στην ανάλυση της έντασης του φωτός που σκεδάζεται από το διάλυμα. Όταν η ακτινοβολία προσκρούει στα μικρά σωματίδια (>250nm), διαχέεται προς όλες τις κατευθύνσεις (σκέδαση Rayleigh). Εάν η πηγή ακτινοβολίας είναι μονοχρωματική, η ένταση σκέδασης μεταβάλλεται με το χρόνο. Αυτή η διακύμανση οφείλεται στο γεγονός ότι τα μικρά μόρια σε διαλύματα υποβάλλονται σε κίνηση Brown, και έτσι η απόσταση μεταξύ των σκεδαστών στο διάλυμα αλλάζει συνεχώς με το χρόνο [62].

### *Πειραματικό μέρος*

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Βαθμονόμηση της συσκευής με διάλυμα 0.1M NaCl
- Μέτρηση δείγματος πρωτεΐνης συγκέντρωσης 0.5-0.75mg/mL



Είναι σημαντικό τόσο τα δείγματα όσο και οι κυψελίδες με τις οποίες γίνεται η μέτρηση να είναι απαλλαγμένα από μικρά σωματίδια ή σκόνη. Για το λόγο αυτό οι κυψελίδες θα πρέπει να είναι καθαρές και στεγνές και τα δείγματα θα πρέπει να έχουν υποστεί απαέρωση και να έχουν διέλθει από φίλτρο μεγέθους πόρων 1μm.

### 3.10 ΚΥΚΛΙΚΟΣ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΣ

*Υλικά*

- Υδατικό διάλυμα (+)-10-καμφορσουλφονικό οξύ (*Fluka*)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0 (*Sigma*)
- Συσκευή Κυκλικού Διχρωισμού (*Hamamatsu*)

*Αρχή της μεθόδου*

Ο Κυκλικός Διχρωισμός (Circular Dichroism, CD) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δομής αγνώστων πρωτεϊνών, καθώς και για την παρακολούθηση των δομικών αλλαγών που οφείλονται στη θερμοκρασία, σε μεταλλάξεις, σε αποδιατακτικούς παράγοντες ή και σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες [63,64]. Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού οφείλεται στη διαφορετική απορρόφηση των δύο κυκλικά πολωμένων συνιστωσών (R) και (L) από χρωμοφόρα, τα οποία είναι οπτικώς ενεργά. Οι πρωτεΐνες περιέχουν έναν αριθμό χρωμοφόρων, τα οποία μπορούν να διεγείρουν σήματα κυκλικού διχρωισμού. Αν οι συνιστώσες (L) και (R) καθώς διαπερνούν το δείγμα δεν δείχνουν κάποια απορρόφηση ή απορροφούν κατά το ίδιο μέτρο, τότε η ανυσματική πρόσθεσή τους παράγει πολωμένο φως ως προς το ίδιο επίπεδο. Αντίθετα, αν οι συνιστώσες (L) και (R) απορροφούν σε διαφορετικό μέτρο η κάθε μια, η συνισταμένη ακτινοβολία αποκτά ελλειπτική πόλωση.

Τα φασματομέτρα κυκλικού διχρωισμού μετρούν τη διαφορά απορρόφησης ανάμεσα στις συνιστώσες (L) και (R) ( $\Delta A = A_L - A_R$ ), η οποία επίσης μπορεί να εμφανίζεται σε μονάδες ελλειπτικότητας ( $\theta$ ). Τα σήματα του κυκλικού διχρωισμού δημιουργούνται εξαιτίας της απορρόφησης ακτινοβολίας και για αυτό το λόγο οι ζώνες φάσματος είναι εύκολο να αποδοθούν σε συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά ενός μορίου. Τα χρωμοφόρα που χρησιμοποιούνται

για τη μελέτη των πρωτεϊνών στον κυκλικό διχρωισμό είναι: πεπτιδικοί δεσμοί (απορρόφηση κάτω από 240 nm), αρωματικές πλευρικές ομάδες αμινοξέων (απορρόφηση στην περιοχή 260-320 nm) και δισουλφιδικοί δεσμοί (ασθενείς ζώνες απορρόφησης μεγάλου εύρους, περίπου στα 260 nm) [65].

### *Πειραματικό μέρος*

Βασική προϋπόθεση για τη μελέτη του φάσματος κυκλικού διχρωισμού μιας πρωτεΐνης είναι η απουσία συσσωματωμάτων όπως επίσης και η υψηλή καθαρότητά της. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Βαθμονόμηση του φασματοφωτομετρου με υδατικό διάλυμα 1mg/mL (+)-10-καμφοσουλφονικό οξύ
- Μέτρηση πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

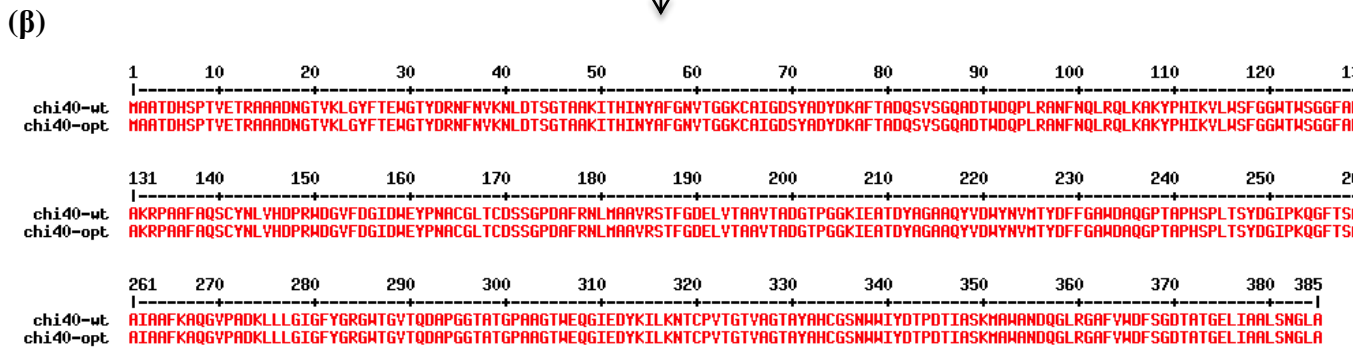
---

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν ο σχεδιασμός ενός αποτελεσματικού συστήματος έκφρασης του γονιδίου της *chi40* καθώς και η παραγωγή της βιολογικά ενεργού πρωτεΐνης. Αρχικά σχεδιάστηκε συνθετικό γονιδίο *chi40* με βελτιστοποιημένα χαρακτηριστικά έτσι, ώστε να είναι ευκολότερη η περαιτέρω γενετική τροποποίησή του. Στη συνέχεια και σε σύγκριση με το αγρίου τύπου γονίδιο, μελετήθηκε η κινητική των κλώνων παραγωγής της συνθετικής Chi40 εξετάζοντας διάφορες συνθήκες παραγωγής της. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα έκφρασης, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της πρωτεΐνης. Ακολούθησαν πειράματα για τον προσδιορισμό της μορφής της απομονωμένης πρωτεΐνης. Τέλος, μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα με φασματοσκοπία CD καθώς και η μελέτη αποδιάταξης με τη μέθοδο DSF. Τα αποτελέσματα των βημάτων αυτών παρατίθενται στη συνέχεια.

### 4.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40

Η Chi40 εκκρίνεται στο εξωτερικό του κυτάρου. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό παραμένει στον περιπλασματικό χώρο. Στην περιοχή αυτή του κυτάρου ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης δεν αναδιπλώνεται σωστά και επομένως δεν αποκτά τη σωστή διαμόρφωση στο χώρο [48]. Επιπλέον, το αγρίου τύπου γονίδιο της Chi40 (*chi40-wt*) περιέχει ένα πολύ μεγάλο ποσοστό ζευγών βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης, με αποτέλεσμα να καθίσταται πειραματικά δύσκολη η γενετική τροποποίησή του.

Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός και σύνθεση γονιδίου Chi40 (*chi40-opt*) με σκοπό τη μείωση του ποσοστού βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης και την καλύτερη έκφραση του ενζύμου στο βακτηριακό σύστημα *E. coli*. Όπως περιγράφεται αναλυτικά στη παράγραφο 3.1 αντικαταστάθηκαν κωδικόνια που περιέχουν γουανίνη ή κυτοσίνη ή συνδυασμό αυτών των βάσεων με συνώνυμα κωδικόνια φιλικά προς *E. coli* (Πίνακας 14). Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του ποσοστού ζευγών βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης έως και 30% (Σχήμα 37).



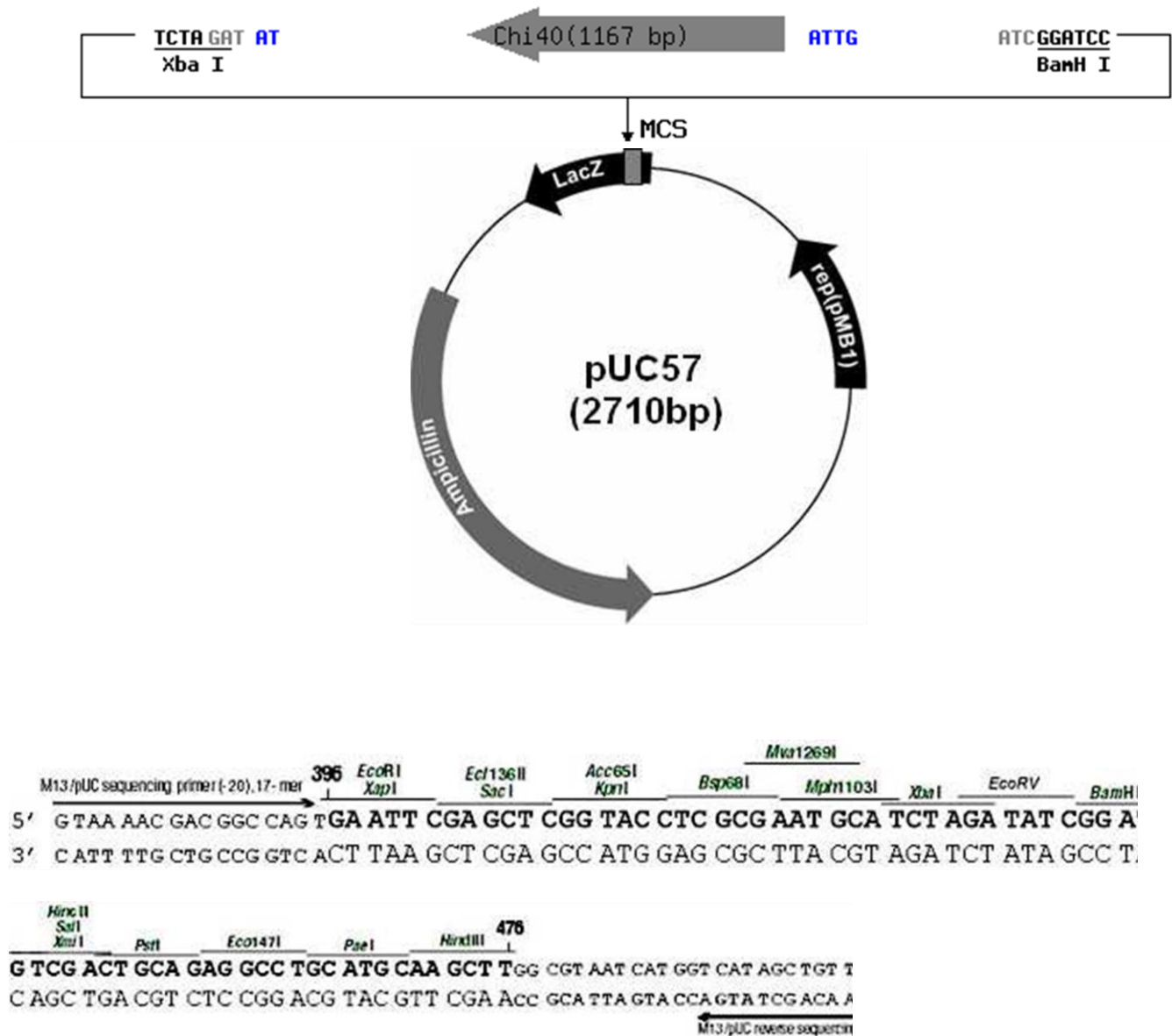
ΣΧΗΜΑ 37: (α) Αλληλουχία βάσεων γονιδίων *chi40-wt* και *chi40-opt* (β) αμινοξική αλληλουχία Chi40 όπως προκύπτει έπειτα από μετάφραση των δύο αυτών γονιδίων. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα: Multalin: Multiple sequence alignment by Florence Corpet και ExPASy translate tool

**ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Κωδικόνια *chi40-wt* που αντικαταστάθηκαν κατά τον σχεδιασμό του συνθετικού γονιδίου**

Αντικατάσταση κωδικονίων στο γονίδιο <i>chi40-wt</i>	Αμινοξύ	αριθμος θέσης κωδικονίων στο γονίδιο <i>chi40-wt</i>	Αντικατάσταση κωδικονίων στο γονίδιο <i>chi40-wt</i>	Αμινοξύ	αριθμος θέσης κωδικονίων στο γονίδιο <i>chi40-wt</i>
UUC→UUU	F	76-78	CCC→CCG	P	607-609
		169-171			712-714
		295-297			811-813
		352-354			901-903
		409-411			961-963
		529-531			91-93
		688-690			136-138
		766-768			151-153
		1087-1089			235-237
		1099-1001			628-630
CUC→CUG	L	67-69	ACC→ACG	T	715-717
		313-315			868-870
		823-825			895-897
		826-828			955-957
		829-831			973-975
		946-948			1036-1038
AUC→AUU	I	148-150	ACG→ACC	T	1111-1113
		199-201			1117-1119
		469-471			58-60
		751-753			559-561
		835-837			604-606
		928-930			676-678
GUC→GUU	V	1018-1020	GCU→GCA	A	1084-1086
		1129-1131	GCC→GCU	A	4-6
		178-180			7-9
		457-459			196-198
		589-591			382-384
655-657	583-585				
GUC→GUG	V	1090-1092	GCC→GCU	A	640-642
		61-63			694-696
		112-114			775-777
		577-579			787-789
GUG→GUU	V	976-978	GCC→GCU	A	799-781
		340-342			238-240
GUG→GUC	V	808-810	GCC→GCU	A	262-264
		670-672			391-393
UCC→UCU	S	370-372	GCC→GCU	A	490-492
		556-558			547-549
UCC→UCG	S	208-210	GCC→GCU	A	637-639
		739-741			646-648
UCC→AGU	S	19-21	GCC→GCU	A	703-705
		247-249			718-720
UCC→AGC	S	130-132	GCC→GCU	A	877-879
		349-351			979-981
		418-420			994-996
UCG→UCC	S	1045-1047	GCC→GCU	A	1135-1137
UCG→UCA	S	727-729			40-42
CCC→CCG	P	22-24	GCC→GCG	A	43-45
		401-403			46-48
		484-486			142-144
		520-522			214-216

Αντικατάσταση κωδικονίων στο γονίδιο <i>chi40-wt</i>	Αμινοξύ	αριθμος θέσης κωδικονίων στο γονίδιο <i>chi40-wt</i>	Αντικατάσταση κωδικονίων στο γονίδιο <i>chi40-wt</i>	Αμινοξύ	αριθμος θέσης κωδικονίων στο γονίδιο <i>chi40-wt</i>
GCC→GCG	A	319-321	GAC→GAU	D	463-465
		526-528			508-510
		586-588			568-570
		904-906			631-633
		907-909			682-684
		1132-1134			745-747
GCA→GCU	A	304-405			817-819
GCG→GCU	A	139-141			874-876
GCG→GCC	A	595-597			934-936
GCG→GCA	A	892-894			1024-1026
		1153-1155	1066-1068		
UAC→UAU	Y	73-75	GAG→GAA	E	1108-1110
		163-165			31-33
		211-213			82-84
		325-327			478-480
		424-426			571-573
		634-636			622-624
		652-654			919-921
		679-781			931-933
		742-744			1123-1125
		844-846			421-423
CAC→CAU	H	154-156	UGC→UGU	C	1000-1002
		331-333	UGA→UAA	*	1156-1158
		724-726	CGC→CGU	R	37-39
CAG→CAA	Q	259-261			286-288
		310-312	445-447		
		706-708	850-852		
AAC→AAU	N	802-804	AGC→AGU	S	1006-1008
		922-924	AGC→UCA	S	772-774
		109-111	AGC→UCU	S	514-516
		118-120	AGC→UCC	S	254-256
		175-177	AGG→CGU	R	1141-1143
AAG→AAA	K	298-300	GGU→GGC	G	532-534
		535-537	GGC→GGU	G	373-375
		667-669			496-498
		1063-1065			70-72
		64-66			133-135
		115-117			187-189
		190-192			202-204
		316-318			358-360
		337-339			376-378
		616-618			466-468
757-759	517-519				
GAC→GAU	D	796-798	GGA→GGU	G	613-615
		940-942			691-693
		1048-1050			763-765
		59-51			838-840
		97-99			853-855
		205-207			862-864
		217-219			898-900
		241-243			1003-1005
265-267	1054-1056				
385-387	1081-1083				
439-441	1147-1149				
					256-258

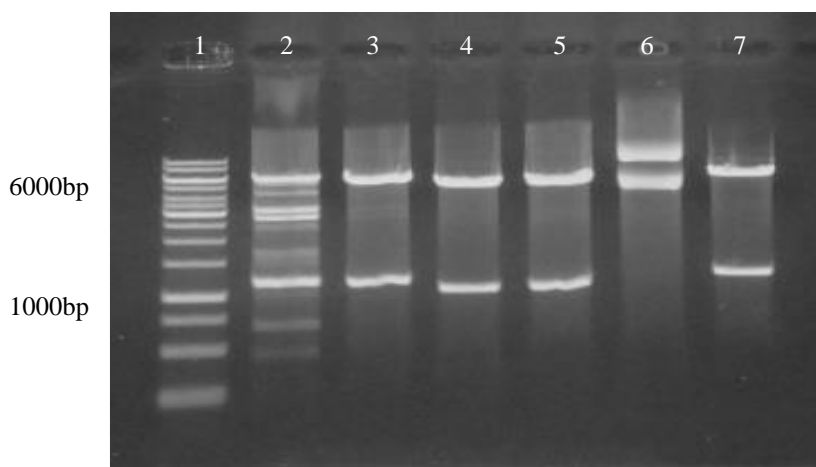
Παραλάβαμε το γονίδιο *chi40-opt* ενσωματωμένο στον πλασμιδιακό φορέα ρUC57 (Σχήμα 38).



ΣΧΗΜΑ 38: Το γονίδιο *chi40-opt* στον πλασμιδιακό φορέα ρUC57. Η *Chi40* κλωνοποιήθηκε στον ρUC57 μέσω *EcoRV*.

## 4.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40 ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η αλληλουχία του ανασυνδυασμένου γονιδίου κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET11-a, με την διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2. Αναλυτικότερα, το γονίδιο *chi40-opt* που βρίσκεται στον πλασμιδιακό φορέα pUC57, απομονώθηκε με διπλή πέψη μέσω των περιοριστικών ενδονουκλεασών *BamHI* και *NcoI*. Η ίδια διαδικασία διπλής πέψης ακολουθήθηκε και για τον πλασμιδιακό φορέα pET11-a (στον οποίο ήταν ήδη ενσωματωμένο το γονίδιο *chi40-wt*) (παράγραφος 3.2.5). Οι επιθυμητές αλληλουχίες απομονώθηκαν από την πηκτική αγαρόζης (παράγραφος 3.2.6) και στη συνέχεια ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης (παράγραφος 3.2.7) για την ένωση του γονιδίου *chi40-opt* με τον κομμένο πλασμιδιακό φορέα. Ακολούθησε έλεγχος επιτυχίας της κλωνοποίησης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.9 και διαγνωστικές πέψεις (Σχήμα 39).



**ΣΧΗΜΑ 39: Ηλεκτροφόρημα διαγνωστικών πέψεων.**

1. Δείκτης μοριακών βαρών DNA, 2-7 Πέψεις των κλώνων 1-6

Από τους έξι κλώνους επιλέξαμε τον κλώνο 6 (διαδρομή 7) για περαιτέρω ανάλυση. Έτσι, ακολούθησε μετασχηματισμός του κλώνου 6 σε βακτηριακά κύτταρα αποθήκευσης: DH5a και έκφρασης: BL21(DE3) και BL21(DE3)Magic και ακολούθησε το πείραμα κινητικής που περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο.



### 4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΗΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο Chi40, υπάρχει σε δύο μορφές: το αγρίου τύπου γονίδιο (*chi40-wt*) και το συνθετικό γονίδιο (*chi40-opt*). Και τα δύο γονίδια είναι ενσωματωμένα στο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET11-a. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι δύο φορείς έκφρασης των γονιδίων μετασχηματίστηκαν σε 2 βακτηριακές σειρές ετερόλογης έκφρασης γονιδίων: *E. coli* BL21*trxB*(DE3) και BL21(DE3)Magic. Στη συνέχεια δοκιμάσαμε μια σειρά θρεπτικών υλικών και συνθηκών επαγωγής για την παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Στην διαδικασία αναλύθηκαν οι παρακάτω παράμετροι: (α) συνδυασμός πλασμιδιακού φορέα με κυτταρική σειρά (β) σύσταση θρεπτικού υλικού (γ) παράγοντας επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης (δ) χρόνος επαγωγής

Συνοπτικά ο συνδυασμός των παραμέτρων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 15:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 15:** Παράμετροι που μελετήθηκαν στις κινητικές παραγωγής της πρωτεΐνης Chi40-wt και Chi40-opt.

	BL21 <i>trxB</i> (DE3)		BL21(DE3)Magic	
	Chi40-wt	Chi40-opt	Chi40-wt	Chi40-opt
LB + IPTG	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)
2x YT + IPTG	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)
TB + IPTG	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)
HD + IPTG	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)	0,2,4,6,24 (h)
LB + Αυτοεπ.	16 (h)	16 (h)	16 (h)	16 (h)

Στην επαγωγή με IPTG ορίζουμε την αρχική καλλιέργεια μετά από 16 ώρες ανάπτυξης σε LB. 2, 4, 6, 24 ώρες ορίζουμε τα σημεία της ανάπτυξης της κυτταρικής καλλιέργειας μετά από αραιώση της αρχικής καλλιέργειας σε  $OD_{600nm}=0.8$  στο αντίστοιχο θρεπτικό υλικό, προσθήκη του επαγωγικού παράγοντα IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και δειγματοληψία στους αντίστοιχους χρόνους. Στην περίπτωση της αυτοεπαγωγής, 16 ώρες ορίζουμε τη δειγματοληψία της αρχικής καλλιέργειας μετά από 16 ώρες ανάπτυξης σε LB

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 15 η κινητική της έκφρασης των γονιδίων *chi40-wt* και *chi40-opt* στα κύτταρα *E. coli* BL21*trxB*(DE3) και BL21(DE3)Magic μετρήθηκε σε χρόνους 0, 2, 4, 6 και 24h, έγινε δε με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12.5%. Ως δείκτη για την ανίχνευση της Chi40, ηλεκτροφορήθηκε καθαρό ένζυμο Chi40. Το κυτταρικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης Laemmli έτσι ώστε 10μL διαλύματος να

αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 0.1 OD<sub>600</sub>. Οι πρωτεΐνες του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας καταβυθίστηκαν με TCA όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.5 και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 50μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης Laemmli 1x. Σε κάθε διαδρομή της ηλεκτροφόρησης αναλύθηκαν 20μL. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων θρεπτικού υπερκείμενου υγρού και των δειγμάτων κυτταρικού ιζήματος για κάθε συνδυασμό των παραμέτρων του Πίνακα 15.

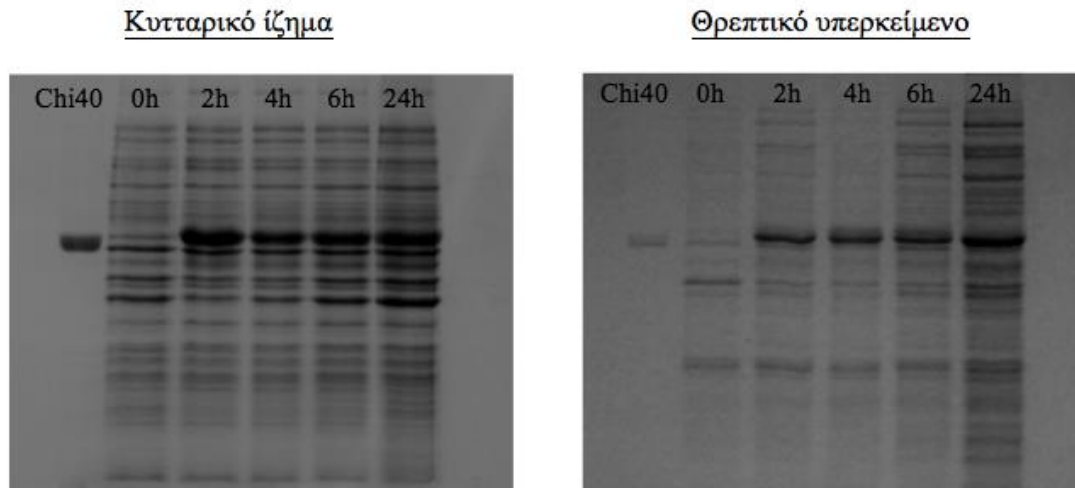
Από τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης παρατηρείται πως η Chi40 κατά ένα μέρος είναι εκκρινόμενη ενώ κατά ένα άλλο μέρος παράγεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Στόχος είναι να εντοπισθούν οι βέλτιστες συνθήκες με τις οποίες θα είναι εφικτό, με γρήγορο, εύκολο και χαμηλού κόστους τρόπο να παραχθεί διαλυτή πρωτεΐνη Chi40, ενεργή και σε κατάλληλη ποσότητα και καθαρότητα, στο εξωτερικό του κυττάρου. Το ποσοστό εκκρινόμενης Chi40 είναι αρκετά υψηλό και επομένως είναι εφικτή η περαιτέρω ανάλυσή της. Επιπλέον, επειδή ο χειρισμός και η απομόνωση της εκκρινόμενης Chi40 είναι ευκολότερα συγκριτικά με την ενδοκυτταρική, τα περαιτέρω πειράματα κινητικής έγιναν στα δείγματα υπερκείμενου υγρού.

Σε καθένα δείγμα από τα θρεπτικά υπερκείμενα υγρά λοιπόν, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 3.4) και ακολούθησε ο προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5. Αναλυτικότερα, μετρήθηκε η επίδραση του ενζύμου που υπάρχει σε καθένα από τα δείγματα σε 40μM συνθετικού υποστρώματος pNP-(NAG)<sub>2</sub>. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω με τη μορφή διαγράμματος όπου φαίνεται η μεταβολή της ειδικής δραστηριότητας σε συνάρτηση με τον όγκο του δείγματος που απαιτήθηκε για την μέτρηση.

### 4.3.1 ΕΠΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ IPTG

#### 4.3.1.1 Κυτταρική σειρά/ Πλασμιδιακός φορέας: **BL21(DE3)/ chi40-wt**

- Θρεπτικό μέσο: **LB**



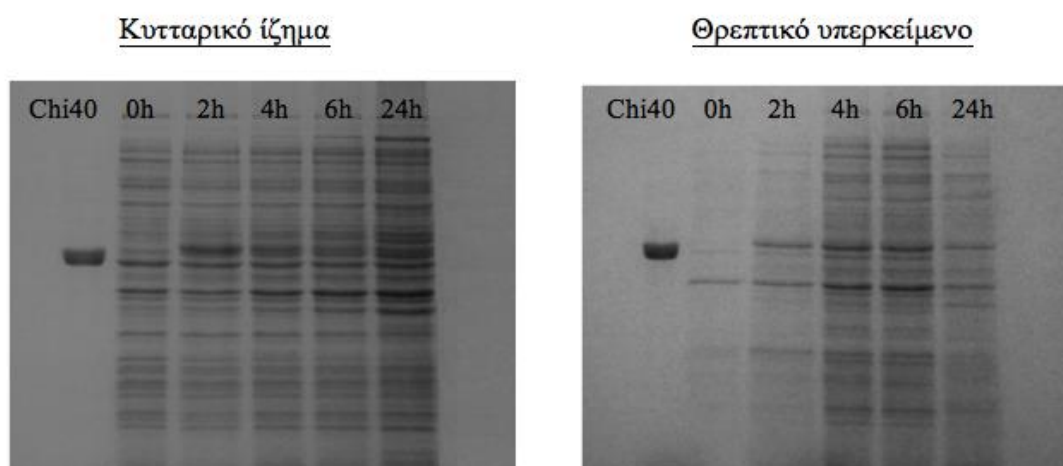
**ΣΧΗΜΑ 40:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο LB. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-wt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-wt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 16:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3) και σε θρεπτικό μέσο LB

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	1.952	0.049	0%	0.10
LB (2h)+ IPTG	1.620	0.058	70%	7.50
LB (4h) +IPTG	2.164	0.081	70%	7.58
LB (6h) + IPTG	2.252	0.098	65%	4.18
LB (24h)+IPTG	2.728	0.140	50%	2.46

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40-wt

- Θρεπτικό μέσο: 2x YT



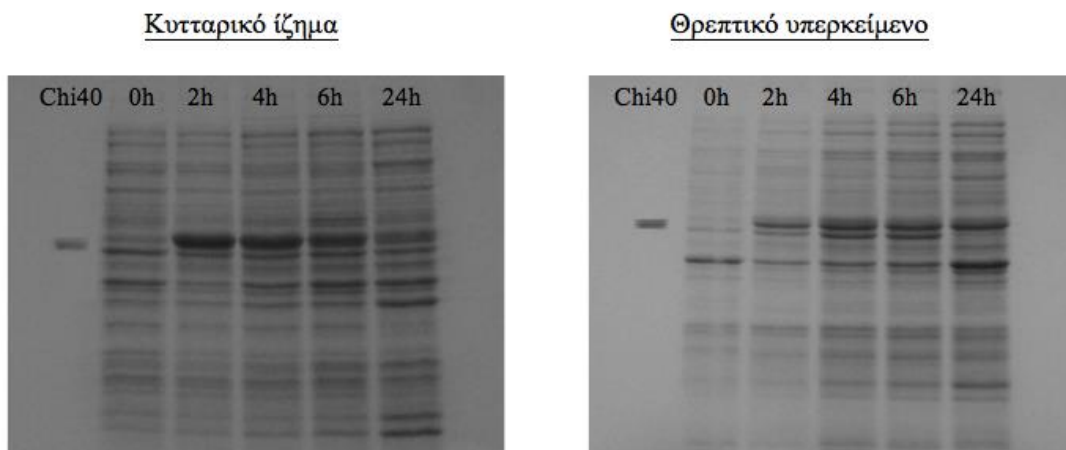
**ΣΧΗΜΑ 41:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21trxB(DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο 2x YT. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-wt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-wt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 17:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21trxB(DE3) και σε θρεπτικό μέσο 2x YT

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο
LB (0h)	0.824	0.062	0%
2x YT +IPTG (2h)	1.352	0.103	0%
2x YT +IPTG (4h)	2.284	0.087	0%
2x YT +IPTG (6h)	3.280	0.090	0%
2x YT+IPTG (24h)	6.600	0.131	0%

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας και το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση. Όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα ηλεκτροφορήματα στην περίπτωση αυτή δεν παράγεται Chi40. Για το λόγο αυτό δεν προχωρήσαμε σε πειράματα προσδιορισμού ειδικής δραστηριότητας

- **Θρεπτικό μέσο: TB**



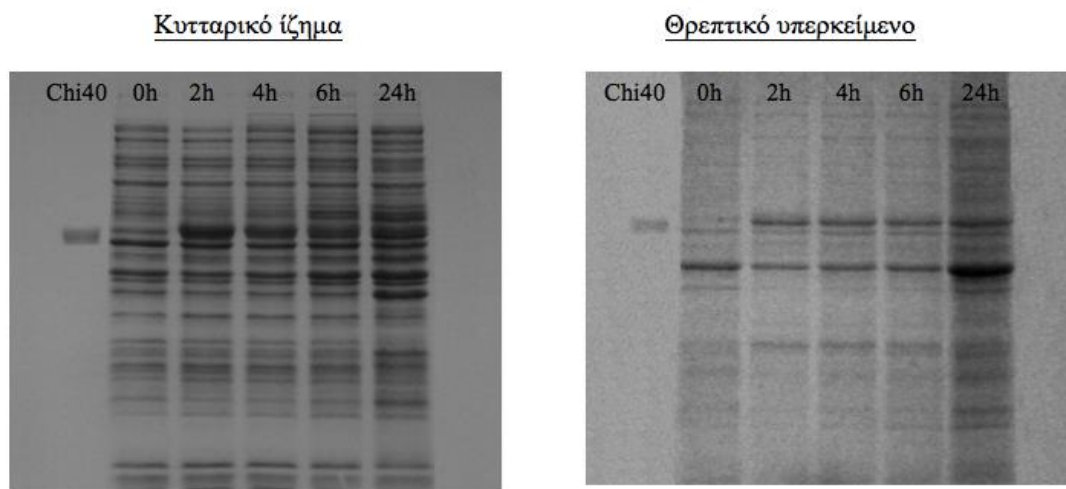
**ΣΧΗΜΑ 42:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21trxB(DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο TB. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-wt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-wt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 18:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21 trxB(DE3) και σε θρεπτικό μέσο TB

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/mL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	1.592	0.055	0%	0.09
TB (2h)	1.868	0.154	40%	0.71
TB (4h)	2.584	0.231	50%	0.79
TB (6h)	3.972	0.233	50%	0.82
TB (24h)	7.132	0.238	40%	0.90

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'εκτίμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40-wt

- **Θρεπτικό μέσο: HD**



**ΣΧΗΜΑ 43:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο HD. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-wt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-wt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

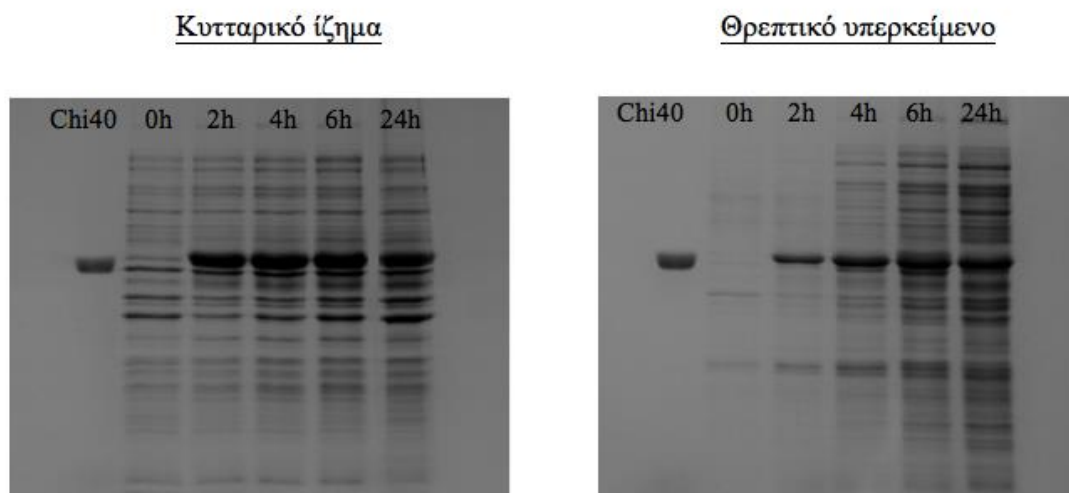
**ΠΙΝΑΚΑΣ 19:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3) και σε θρεπτικό μέσο HD

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο
LB (0h)	1.804	0.088	0%
HD +IPTG (2h)	1.476	0.091	0%
HD +IPTG (4h)	2.176	0.103	0%
HD +IPTG (6h)	3.116	0.102	0%
HD+IPTG (24h)	7.752	0.169	0%

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας και το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'εκτίμηση. Όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα ηλεκτροφορήματα στην περίπτωση αυτή δεν παράγεται Chi40. Για το λόγο αυτό δεν προχωρήσαμε σε πειράματα προσδιορισμού ειδικής δραστηριότητας

#### 4.3.1.2 Κυτταρική σειρά/ Πλασμιδιακός φορέας: BL21 *trxB(DE3)*/ *chi40-opt*

- **Θρεπτικό μέσο: LB**



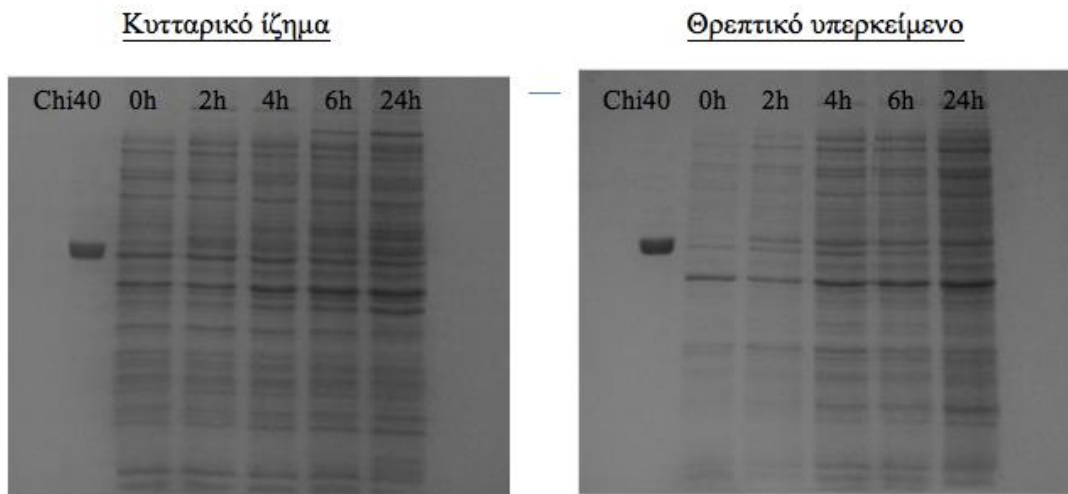
**ΣΧΗΜΑ 44:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της *Chi40-opt* από την κυτταρική σειρά *BL21trxB(DE3)* έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο LB. Αριστερά: ενδοκυτταρική *Chi40-opt*, δεξιά: εκκρινόμενη *Chi40-opt*. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: *Chi40*: καθαρό ένζυμο *Chi40* ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 20:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *Chi40* από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή *Chi40-opt* με IPTG σε κύτταρα *BL21trxB(DE3)* και σε θρεπτικό μέσο LB

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/mL)	% <i>Chi40</i> στο υπερκείμενο	Ειδική δραστικότητα (μU/μg)
LB (0h)	1.948	0.048	0 %	0.12
LB (2h)	1.832	0.062	70 %	7.98
LB (4h)	2.304	0.083	60 %	8.48
LB (6h)	2.380	0.105	50 %	2.52
LB (24h)	2.760	0.130	40 %	0.95

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό *Chi40-opt* στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση και η ειδική δραστικότητα *Chi40-opt*

- Θρεπτικό μέσο: 2x YT



**ΣΧΗΜΑ 45:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21 *trxB(DE3)* έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο 2x YT. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-opt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-opt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

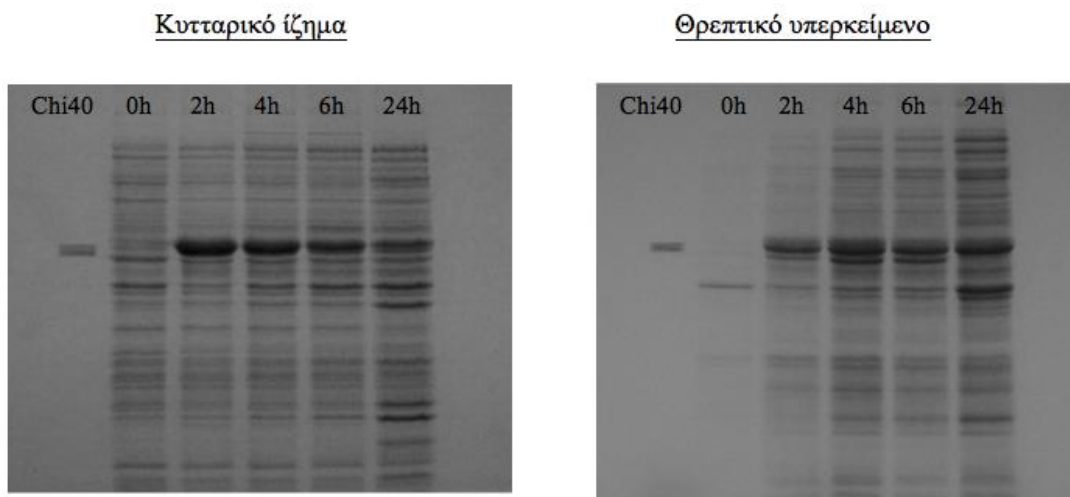
**ΠΙΝΑΚΑΣ 21:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21 *trxB(DE3)* και σε θρεπτικό μέσο 2x YT

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο
LB (0h)	1.292	0.065	0%
2x YT +IPTG (2h)	1.092	0.110	0%
2x YT +IPTG (4h)	2.144	0.088	0%
2x YT +IPTG (6h)	3.168	0.094	0%
2x YT+IPTG (24h)	6.304	0.124	0%

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας και το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση. Όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα ηλεκτροφορήματα στην περίπτωση αυτή δεν παράγεται Chi40. Για το λόγο αυτό δεν προχωρήσαμε σε πειράματα προσδιορισμού ειδικής δραστηριότητας



- **Θρεπτικό μέσο: TB**



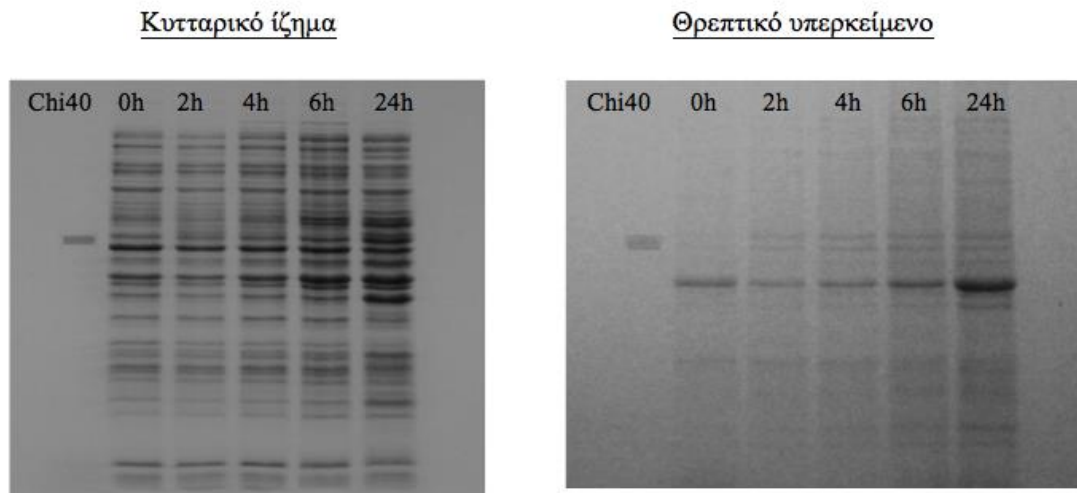
**ΣΧΗΜΑ 46:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21trxB(DE3) έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο TB. (Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-opt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-opt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 22:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21trxB(DE3) και σε θρεπτικό μέσο TB

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	1.048	0.045	0 %	0.11
TB (2h)+ IPTG	2.016	0.199	80 %	0.70
TB (4h) +IPTG	2.908	0.229	70 %	0.86
TB (6h) + IPTG	4.128	0.229	60 %	0.96
TB (24h)+IPTG	7.304	0.224	60 %	1.07

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-opt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40-opt

- **Θρεπτικό μέσο: HD**



**ΣΧΗΜΑ 47:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21

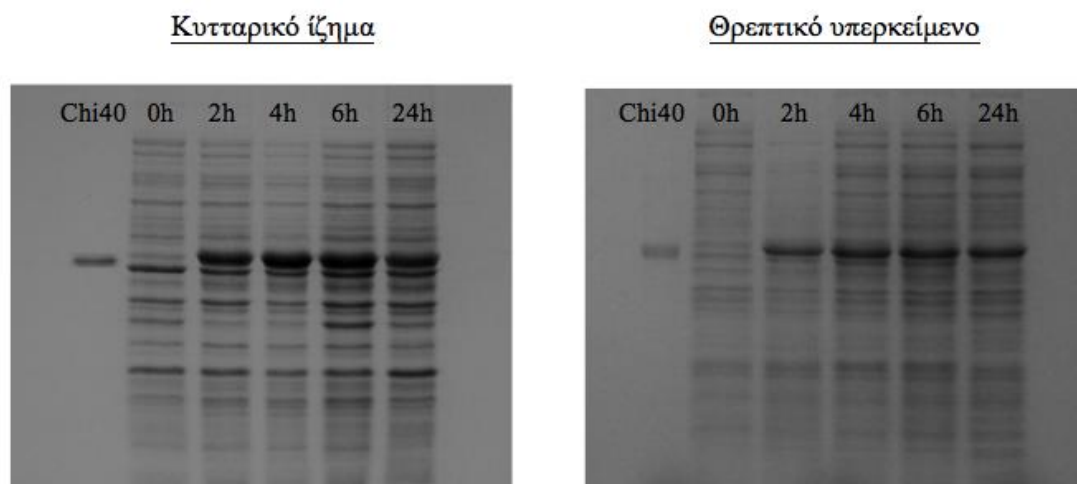
**ΠΙΝΑΚΑΣ 23:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο
LB (0h)	1.756	0.071	0%
HD +IPTG (2h)	1.024	0.071	0%
HD +IPTG (4h)	1.700	0.086	0%
HD +IPTG (6h)	2.572	0.096	0%
HD+IPTG (24h)	7.460	0.128	0%

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας και το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'εκτίμηση. Όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα ηλεκτροφορήματα στην περίπτωση αυτή δεν παράγεται Chi40. Για το λόγο αυτό δεν προχωρήσαμε σε πειράματα προσδιορισμού ειδικής δραστηριότητας

#### 4.3.1.3 Κυτταρική σειρά/ Πλασμιδιακός φορέας: BL21(DE3)Magic/chi40-wt

- **Θρεπτικό μέσο: LB**



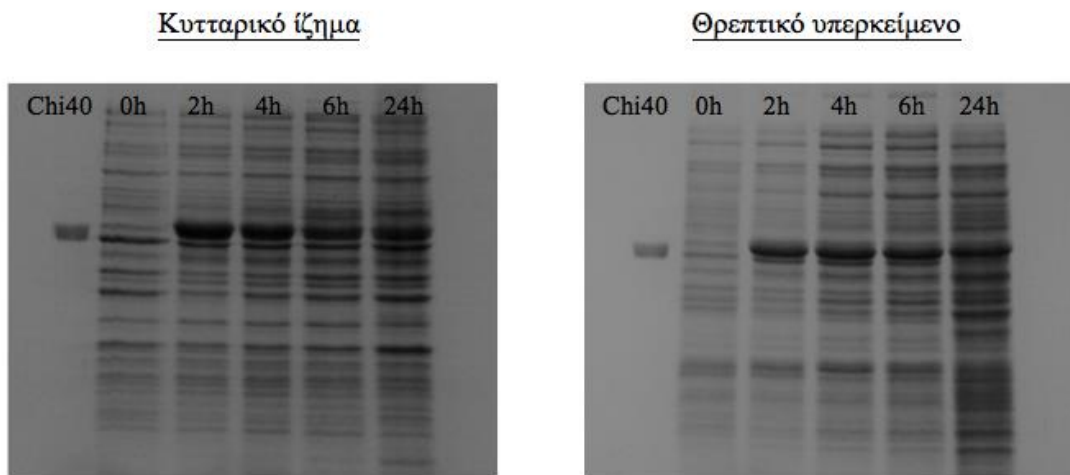
**ΣΧΗΜΑ 48:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο LB. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-wt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-wt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 24:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο LB

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	1.848	0.089	0 %	0.13
LB (2h)	1.584	0.085	70 %	5.33
LB (4h)	2.196	0.106	70 %	7.09
LB (6h)	1.972	0.136	70 %	2.47
LB (24h)	2.468	0.155	70 %	2.55

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40-wt

- Θρεπτικό μέσο: 2x YT



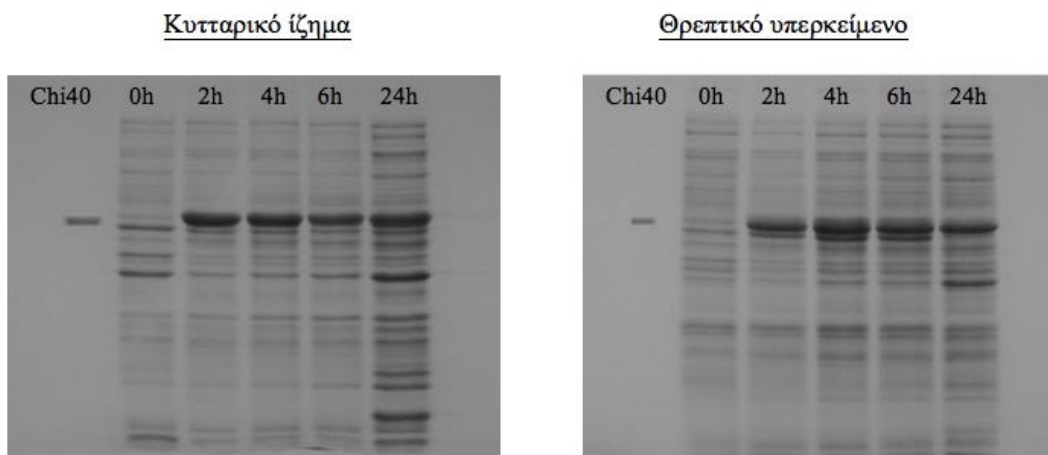
**ΣΧΗΜΑ 49:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο 2x YT. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-wt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-wt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 25:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο 2x YT

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	2.032	0.103	0 %	0.10
2x YT +IPTG (2h)	2.028	0.124	80 %	0.92
2x YT +IPTG (4h)	2.978	0.150	75 %	0.75
2x YT +IPTG (6h)	4.168	0.203	60 %	0.58
2x YT+IPTG (24h)	6.908	0.258	40 %	0.22

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτίμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40-wt

- **Θρεπτικό μέσο: TB**



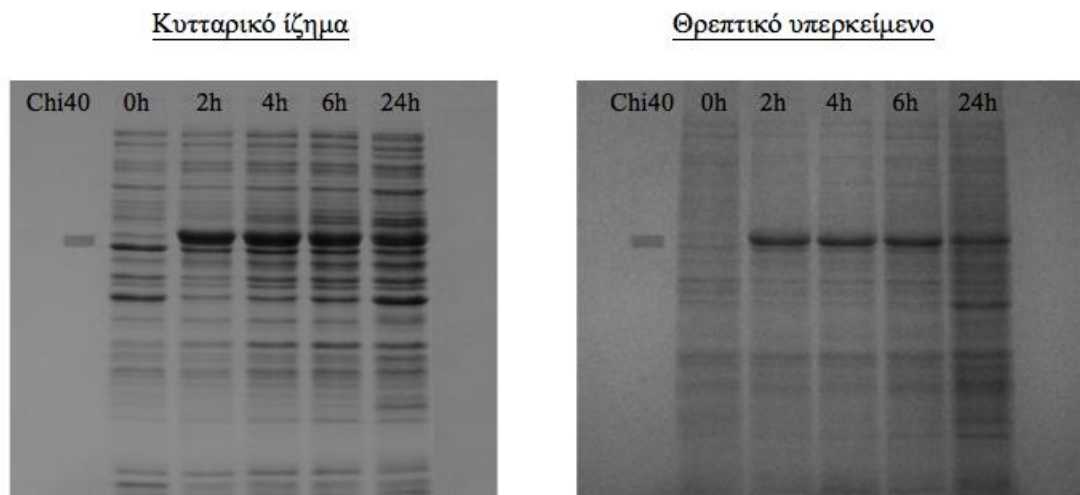
**ΣΧΗΜΑ 50:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο TB. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-wt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-wt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 26:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο TB

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστικότητα (μU/μg)
LB (0h)	1.916	0.106	0 %	0.08
TB (2h)+ IPTG	2.036	0.140	70 %	0.66
TB (4h) +IPTG	3.328	0.168	80 %	0.83
TB (6h) + IPTG	4.724	0.216	70 %	0.90
TB (24h)+IPTG	7.280	0.239	60 %	0.98

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'εκτίμηση και η ειδική δραστικότητα Chi40-wt

- **Θρεπτικό μέσο: HD**



**ΣΧΗΜΑ 51:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο HD. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-wt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-wt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

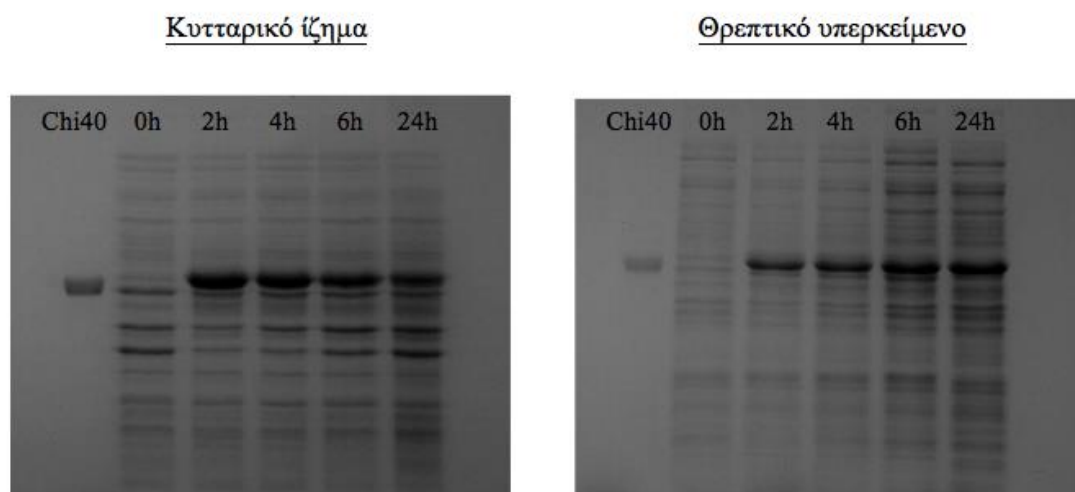
**ΠΙΝΑΚΑΣ 27:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της Chi40-wt από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο HD

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/mL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστικότητα (μU/μg)
LB (0h)	2.056	0.111	0 %	0.09
HD (2h)+ IPTG	2.596	0.104	80 %	0.67
HD (4h) +IPTG	3.224	0.117	80 %	1.00
HD (6h) + IPTG	4.120	0.109	80 %	0.81
HD (24h)+IPTG	7.808	0.351	60 %	0.11

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-wt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'εκτίμηση και η ειδική δραστικότητα Chi40-wt

#### 4.3.1.4 Κυτταρική σειρά/Πλασμιδιακός φορέας: **BL21(DE3)Magic/chi40-opt**

- **Θρεπτικό μέσο: LB**



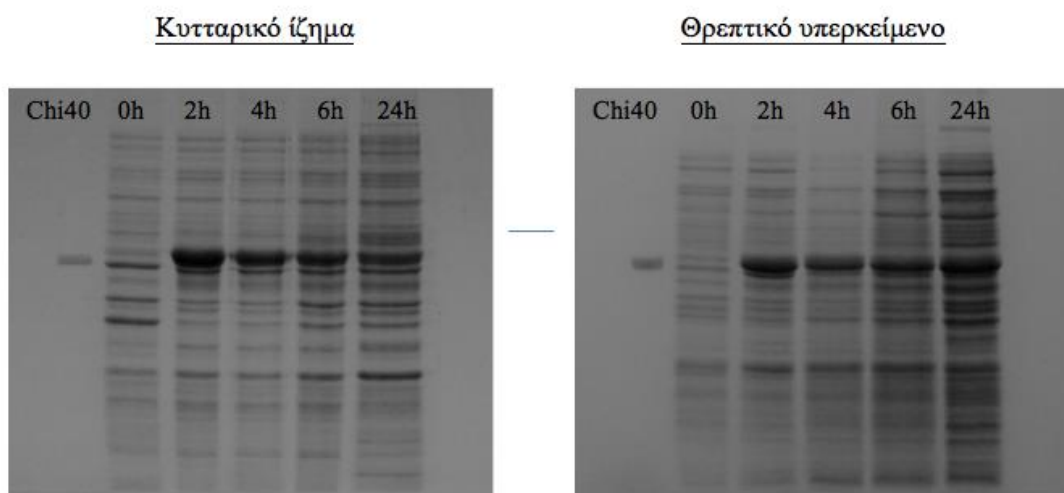
**ΣΧΗΜΑ 52:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο LB. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-opt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-opt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 28:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο LB

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	1.888	0.085	0 %	0.14
LB (2h)+ IPTG	1.620	0.081	80 %	5.29
LB (4h) +IPTG	1.960	0.083	80 %	8.66
LB (6h) + IPTG	2.388	0.125	75 %	3.87
LB (24h)+I PTG	2.524	0.149	70 %	1.92

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-opt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40-opt

- Θρεπτικό μέσο: 2x YT



**ΣΧΗΜΑ 53:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο 2x YT. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-opt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-opt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

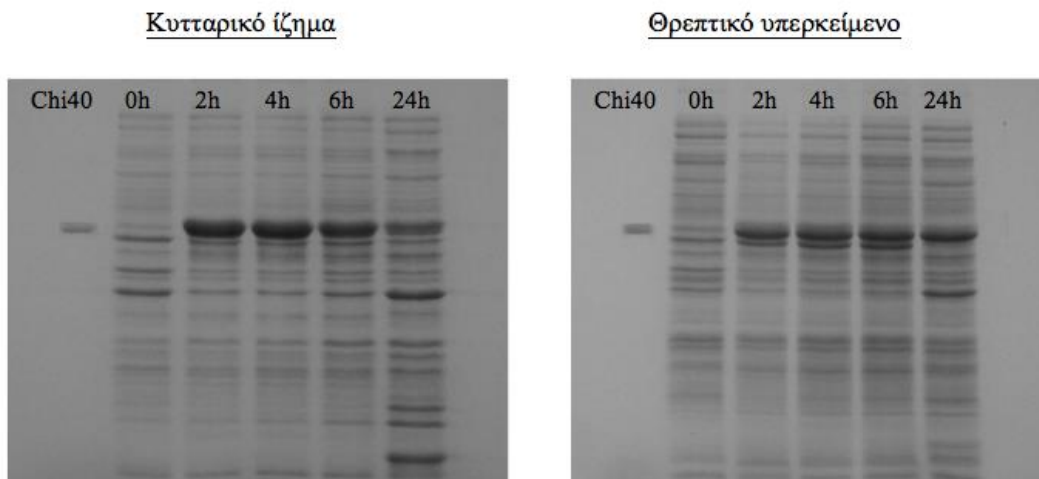
**ΠΙΝΑΚΑΣ 29:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο 2x YT

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστικότητα (μU/μg)
LB (0h)	1.948	0.094	0 %	0.07
2x YT +IPTG (2h)	1.908	0.130	80 %	0.84
2x YT +IPTG (4h)	2.500	0.152	75 %	0.71
2x YT +IPTG (6h)	3.812	0.179	60 %	0.59
2x YT+IPTG (24h)	6.956	0.249	40 %	0.40

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-opt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση και η ειδική δραστικότητα Chi40-opt



- **Θρεπτικό μέσο: TB**



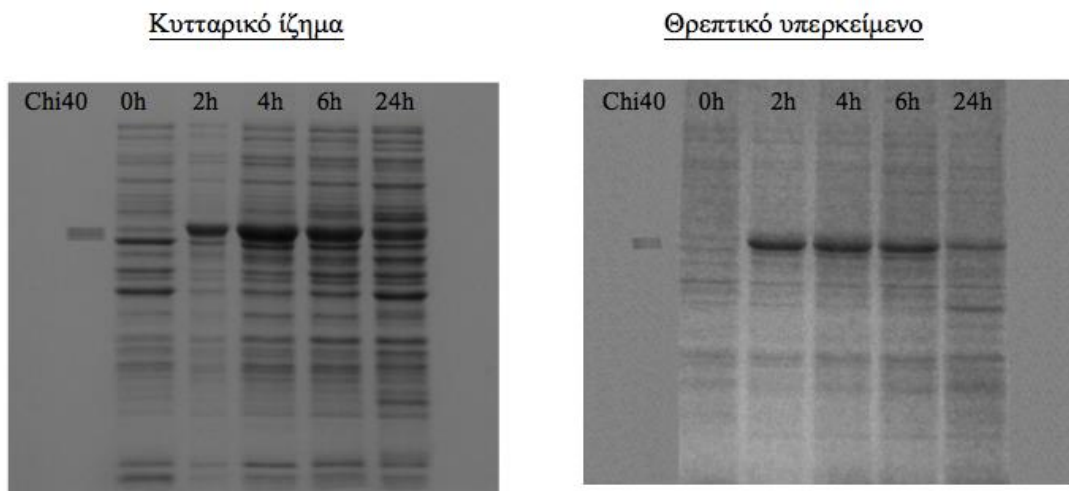
**ΣΧΗΜΑ 54:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο TB. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-opt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-opt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

**ΠΙΝΑΚΑΣ 30:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο TB

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/mL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	2.064	0.098	0 %	0.10
TB (2h)+ IPTG	1.688	0.234	60 %	0.65
TB (4h) +IPTG	2.428	0.248	60 %	0.60
TB (6h) + IPTG	4.092	0.236	60 %	0.92
TB (24h)+IPTG	7.620	0.230	50 %	1.20

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-opt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40-opt

- **Θρεπτικό μέσο: HD**



**ΣΧΗΜΑ 55:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής της Chi40-opt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic έπειτα από επαγωγή με IPTG στο θρεπτικό μέσο HD. Αριστερά: ενδοκυτταρική Chi40-opt, δεξιά: εκκρινόμενη Chi40-opt. Στα ηλεκτροφορήματα αναγράφονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, δείγματα συνολικών πρωτεϊνών 0, 2, 4, 6 και 24h μετά από την προσθήκη του επαγωγέα IPTG

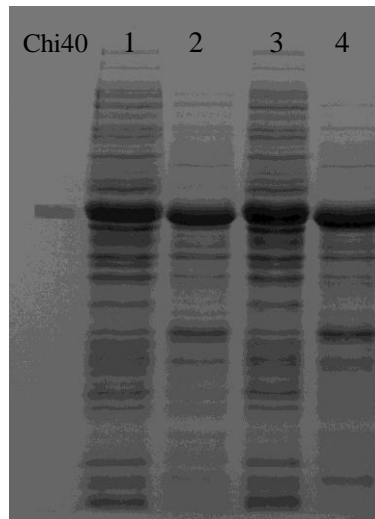
**ΠΙΝΑΚΑΣ 31:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Chi40 από υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας κατά την επαγωγή Chi40-opt με IPTG σε κύτταρα BL21(DE3)Magic και σε θρεπτικό μέσο HD

Θρεπτικό μέσο (χρόνος)	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/mL)	% Chi40 στο υπερκείμενο	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	2.004	0.099	0 %	0.09
HD (2h)+ IPTG	1.792	0.088	80 %	0.84
HD (4h) +IPTG	2.168	0.102	80 %	1.02
HD (6h) + IPTG	3.332	0.117	75 %	0.77
HD (24h)+IPTG	7.780	0.249	60 %	0.15

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40-opt στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'εκτίμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40-opt

### 4.3.2 ΑΥΤΟΕΠΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

#### 4.3.2.1 Κυτταρική σειρά: **BL21(DE3)**



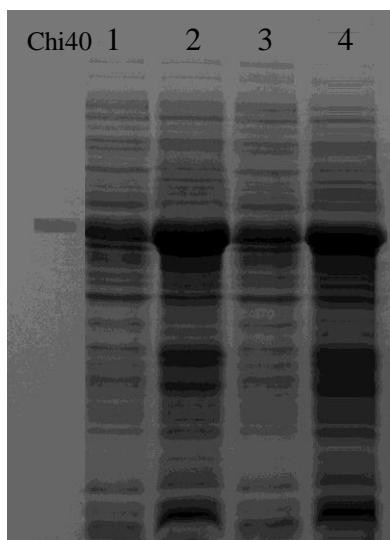
**ΣΧΗΜΑ 56:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής των Chi40-opt και Chi40-wt από την κυτταρική σειρά **BL21(DE3)** σε αυτοεπαγώμενο σύστημα. Στο ηλεκτροφόρημα απεικονίζονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, Διαδρομή 1: ενδοκυτταρική Chi40-wt, διαδρομή 2: εκκρινόμενη Chi40-wt, διαδρομή 3: ενδοκυτταρική Chi40-opt, διαδρομή 4: εκκρινόμενη Chi40-opt

**ΠΙΝΑΚΑΣ 32:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής των Chi40-opt και Chi40-wt για καθένα από τα δείγματα υπερκείμενου υγρού της κυτταρικής σειράς **BL21(DE3)** σε αυτοεπαγώμενο σύστημα

BL21 <trxb>(DE3)</trxb>							
pChi40-wt (D)				pChi40-opt (B)			
OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)	% Chi40-wt	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)	% Chi40-opt
4.768	0.070	6.64	80%	4.196	0.076	10.78	80%

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40 στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'εκτίμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40

#### 4.3.2.2 Κυτταρική σειρά: **BL21(DE3)Magic**



**ΣΧΗΜΑ 57:** Ανάλυση με SDS-PAGE της κινητικής παραγωγής των Chi40-opt και Chi40-wt από την κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic σε αυτοεπαγόμενο σύστημα. Στο ηλεκτροφόρημα απεικονίζονται: Chi40: καθαρό ένζυμο Chi40 ως μάρτυρας, Διαδρομή 1: ενδοκυτταρική Chi40-wt, διαδρομή 2: εκκρινόμενη Chi40-wt, διαδρομή 3: ενδοκυτταρική Chi40-opt, διαδρομή 4: εκκρινόμενη Chi40-opt

**ΠΙΝΑΚΑΣ 33:** Αποτελέσματα κινητικής παραγωγής των Chi40-opt και Chi40-wt για καθένα από τα δείγματα υπερκείμενου υγρού της κυτταρικής σειράς BL21(DE3)Magic σε αυτοεπαγόμενο σύστημα

BL21(DE3)Magic							
pChi40-wt (D)				pChi40-opt (B)			
OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)	% Chi40-wt	OD <sub>600</sub>	Ολικές πρωτεΐνες (μg/μL)	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)	% Chi40-opt
7.480	0.128	8.26	60%	6.076	0.144	9.06	60%

Στον πίνακα παρουσιάζονται: η οπτική πυκνότητα της κυτταρικής καλλιέργειας στα 600nm (OD<sub>600</sub>), η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του υπερκείμενου της κυτταρικής καλλιέργειας, το ποσοστό Chi40 στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'έκτιμηση και η ειδική δραστηριότητα Chi40

Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης του συνδυασμού παραγόντων για τη βέλτιστη παραγωγή της Chi40 συνοψίζονται στον πίνακα 34:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 34: Συνολικά αποτελέσματα κινητικής**

Συνθήκες επαγωγής		% Chi40	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)		% Chi40	Ειδική δραστηριότητα (μU/μg)
LB (0h)	BL21 trxB(DE3)/ chi40-wt	0 %	0.10	BL21(DE3)Magic/ Chi40-wt	0 %	0.13
LB (2h)+ IPTG		70 %	7.50		70 %	5.33
LB (4h) +IPTG		70 %	<b>7.58</b>		70 %	<b>7.09</b>
LB (6h) + IPTG		65 %	4.18		70 %	2.47
LB (24h)+I PTG		50 %	2.46		70 %	2.55
LB (0h)		0 %	-		0 %	0.10
2x YT (2h)+ IPTG		0 %	-		80 %	<b>0.92</b>
2x YT (4h) +IPTG		0 %	-		75 %	0.75
2x YT (6h) + IPTG		0 %	-		60 %	0.58
2x YT (24h)+IPTG		0 %	-		40 %	0.22
LB (0h)	BL21 trxB(DE3)/ chi40-opt	0 %	0.09	BL21(DE3)Magic/ Chi40-opt	0 %	0.08
TB (2h)+ IPTG		40 %	0.71		70 %	0.66
TB (4h) +IPTG		50 %	0.79		80 %	0.83
TB (6h) + IPTG		50 %	0.82		70 %	0.90
TB (24h)+IPTG		40 %	<b>0.90</b>		60 %	<b>0.98</b>
LB (0h)		0 %	-		0 %	0.09
HD (2h)+ IPTG		0 %	-		80 %	0.67
HD (4h) +IPTG		0 %	-		80 %	<b>1.00</b>
HD (6h) + IPTG		0 %	-		80 %	0.81
HD (24h)+IPTG		0 %	-		60 %	0.11
αυτοεπαγωγή		80 %	<b>6.64</b>		60 %	<b>8.26</b>
LB (0h)	BL21 trxB(DE3)/ chi40-opt	0 %	0.12	BL21(DE3)Magic/ Chi40-opt	0 %	0.14
LB (2h)+ IPTG		70 %	7.98		80 %	5.29
LB (4h) +IPTG		60 %	<b>8.48</b>		80 %	<b>8.66</b>
LB (6h) + IPTG		50 %	2.52		75 %	3.87
LB (24h)+I PTG		40 %	0.95		70 %	1.92
LB (0h)		0 %	-		0 %	0.07
2x YT (2h)+ IPTG		0 %	-		80 %	<b>0.84</b>
2x YT (4h) +IPTG		0 %	-		75 %	0.71
2x YT (6h) + IPTG		0 %	-		60 %	0.59
2x YT (24h)+IPTG		0 %	-		40 %	0.40
LB (0h)	BL21 trxB(DE3)/ chi40-opt	0 %	0.11	BL21(DE3)Magic/ Chi40-opt	0 %	0.10
TB (2h)+ IPTG		80 %	0.70		60 %	0.65
TB (4h) +IPTG		70 %	0.86		60 %	0.60
TB (6h) + IPTG		60 %	0.96		60 %	0.92
TB (24h)+IPTG		60 %	<b>1.07</b>		50 %	<b>1.20</b>
LB (0h)		0 %	-		0 %	0.09
HD (2h)+ IPTG		0 %	-		80 %	0.84
HD (4h) +IPTG		0 %	-		80 %	<b>1.02</b>
HD (6h) + IPTG		0 %	-		75 %	0.77
HD (24h)+IPTG		0 %	-		60 %	0.15
αυτοεπαγωγή		80 %	<b>10.78</b>		60 %	<b>9.06</b>

Στον πίνακα παρουσιάζονται: το ποσοστό Chi40 στο υπερκείμενο υγρό προσδιορισμένο κατ'εκτίμηση και η ειδική δραστηριότητα για κάθε συνδυασμό κυτταρικής σειράς, γονιδίου Chi40 και επαγωγικού παράγοντα. Με έντονα γράμματα απεικονίζονται οι μέγιστες τιμές ειδικής δραστηριότητας για κάθε περίπτωση

Όπως είναι φανερό από τον Πίνακα 34, ο τρόπος έκφρασης της πρωτεΐνης διαφέρει σε μεγάλο βαθμό για κάθε συνδυασμό παραμέτρων. Το συνθετικό γονίδιο της Chi40 εκφράζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά και παρουσιάζει μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα σε σχέση με το αγρίου τύπου γονίδιο. Επιπλέον, το αυτοεπαγόμενο σύστημα παράγει μεγαλύτερες ποσότητες ενεργού πρωτεΐνης σε σχέση με την επαγωγή με IPTG.

Πιο αναλυτικά, και οι 4 συνδυασμοί κυτταρικής σειράς-γονιδίου Chi40 παράγουν μεγαλύτερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης στο θρεπτικό μέσο LB 4 ώρες μετά από την εισαγωγή του επαγωγικού παράγοντα IPTG (ειδική δραστικότητα που κυμαίνεται μεταξύ 7-8.5μU/μg). Στο θρεπτικό μέσο TB παράγονται εμφανώς χαμηλότερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης σε σύγκριση με το θρεπτικό υλικό LB, με μέγιστη ειδική δραστικότητα περίπου 1μU/μg όπου εμφανίζεται 24 ώρες μετά την εισαγωγή IPTG. Στα θρεπτικά υλικά 2x YT και HD η κυτταρική σειρά BL21 *trxB*(DE3) σε συνδυασμό και με το συνθετικό γονίδιο και με στο αγρίου τύπου γονίδιο δεν παρήγαγε πρωτεΐνη. Αντίθετα η κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic παρήγαγε ενεργή πρωτεΐνη 2 ώρες και 4 ώρες μετά την εισαγωγή IPTG στα θρεπτικά υλικά 2x YT και HD αντίστοιχα με μέγιστη ειδική δραστικότητα περίπου 1μU/μg.

Τέλος, στην περίπτωση του αυτοεπαγόμενου συστήματος παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες ενεργού πρωτεΐνης σε σχέση με την επαγωγή με IPTG. Έτσι, για κάθε συνδυασμό κυτταρικής σειράς-γονιδίου Chi40 έχουμε ειδική δραστικότητα μεταξύ 6-10μU/μg, ενώ ο συνδυασμός κυτταρικής σειράς-ανασυνδυασμένου γονιδίου παράγει εμφανώς μεγαλύτερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης.

Συνοψίζοντας, όπως είναι φανερό από τα πειράματα ηλεκτροφόρησης και ενζυμικής δραστικότητας, μεγαλύτερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης έχουμε και για τις δύο κυτταρικές σειρές στο αυτοεπαγόμενο σύστημα σε συνδυασμό με το συνθετικό γονίδιο, καθώς και έπειτα από 4 ώρες επαγωγής στο θρεπτικό μέσο LB, επίσης σε συνδυασμό με το συνθετικό γονίδιο. Αξιοποιώντας αυτά τα αποτελέσματα κινητικής, χρησιμοποιήσαμε αυτούς τους συνδυασμούς επαγωγής-κυτταρικής σειράς και μελετήσαμε τη θερμική αποδιάταξη της ανασυνδυασμένης Chi40 με πείραμα DSF. Στη συνέχεια, ακολούθησαν πειράματα καθαρισμού και χαρακτηρισμού της πρωτεΐνης.

#### 4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ - ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ

Ακολούθησε η μελέτη θερμικής αποδιάταξης της Chi40 με τη μέθοδο DSF. Με βάση τα δεδομένα της κινητικής παραγωγής των κλώνων της Chi40 που περιγράφονται στην παράγραφο 4.3, επιλέχθηκαν προς μελέτη δείγματα εκκρινόμενης Chi40-opt που παραλάβαμε με τις συνθήκες υπερέκφρασης που περιγράφονται στον Πίνακα 35:

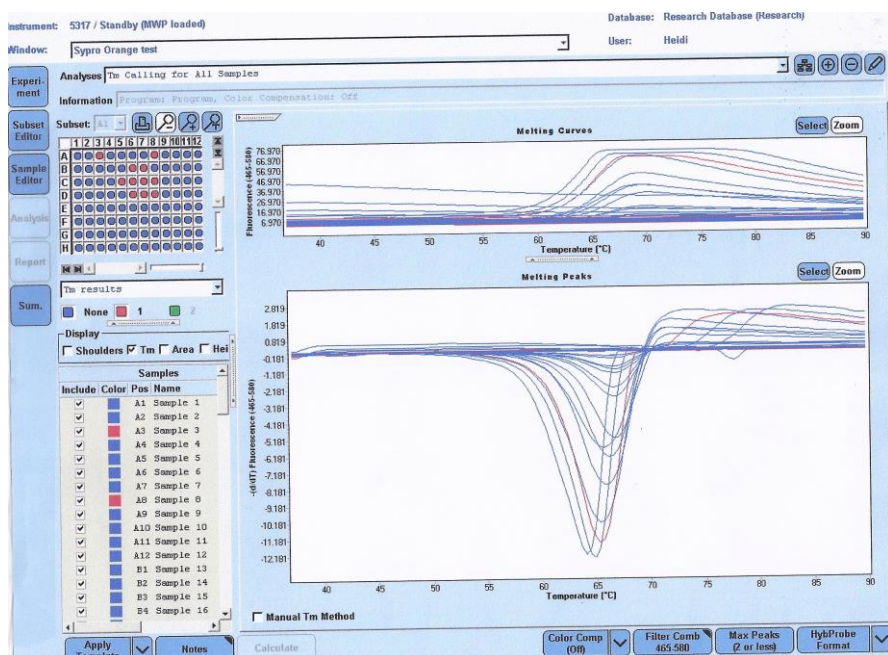
**ΠΙΝΑΚΑΣ 34:** Συνθήκες υπερέκφρασης Chi40-opt για τη διεξαγωγή του πειράματος DSF

Κυτταρική σειρά	Μέσο επαγωγής	Θρεπτικό μέσο	Χρόνος επαγωγής
BL21 <i>trxB</i> (DE3)	Αυτοεπαγωγή	LB	16 h
BL21 <i>trxB</i> (DE3)	IPTG	LB	4 h
BL21(DE3)Magic	Αυτοεπαγωγή	LB	16 h
BL21(DE3)Magic	IPTG	LB	4 h

Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο 3.5 ενώ στον Πίνακα 36 παρουσιάζονται οι ποσότητες αντιδραστηρίων που προσθέσαμε σε κάθε περίπτωση καθώς και η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ). Στα Σχήματα 58 και 59 παρουσιάζονται οι καμπύλες έντασης φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας, για κάθε περίπτωση. Η καλύτερη κορυφή με τον λιγότερο θόρυβο δόθηκε στην πρώτη περίπτωση όπου προστέθηκαν 5μM πρωτεΐνης και χρωστική SYPRO Orange 5x με  $T_m$  64.58 °C.

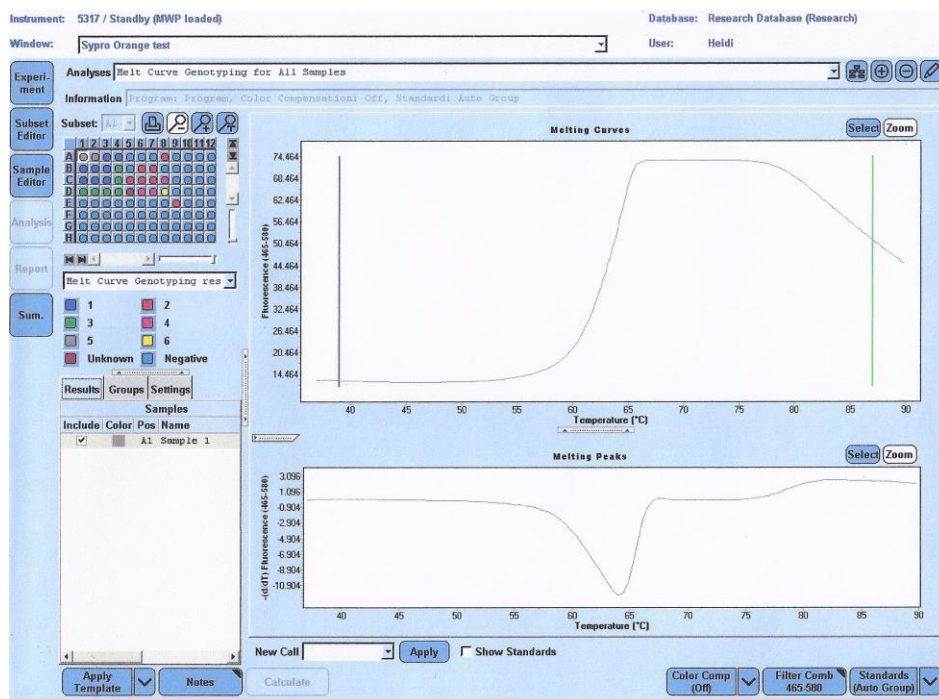
ΠΙΝΑΚΑΣ 36: Ποσότητες αντιδραστηρίων που προσθέθηκαν και θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) κατά την πειραματική διαδικασία DSF

Συγκέντρωση πρωτεΐνης ( $\mu\text{M}$ )	Ποσότητα πρωτεΐνης ( $\mu\text{L}$ )	Χρωστική SYPRO Orange ( $\mu\text{L}$ ) (αραίωση από stock 100x)	Ρυθμιστικό διάλυμα ( $\mu\text{L}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
<b>(α) pET11-a/ chi40-opt/ BL21 <i>trxB</i>(DE3), αυτοεπαγόμενο σύστημα</b>				
5	5	1 (5x)	14.0	64.58
5	5	1.5 (7.5x)	13.5	64.82
5	5	2 (10x)	13.0	65.01
5	5	4 (20x)	11.0	65.40
<b>(β) pET11-a/ chi40-opt/ BL21(DE3)Magic, αυτοεπαγόμενο σύστημα</b>				
10	10	1 (5x)	9.0	64.61
10	10	1.5 (7.5x)	8.5	64.69
10	10	2 (10x)	8.0	64.89
10	10	4 (20x)	6.0	65.53
<b>(γ) pET11-a/ chi40-opt/ BL21 <i>trxB</i>(DE3), θρεπτικό μέσο: LB επαγωγικός παράγοντας IPTG</b>				
2.5	2.5	1 (5x)	16.5	64.70
2.5	2.5	1.5 (7.5x)	16.0	65.33
2.5	2.5	2 (10x)	15.5	65.37
2.5	2.5	4 (20x)	13.5	65.29
<b>(δ) pET11-a/ chi40-opt/ BL21(DE3)Magic θρεπτικό μέσο: LB επαγωγικός παράγοντας IPTG</b>				
1	1	1 (5x)	18.0	65.33
1	1	1.5 (7.5x)	17.5	65.31
1	1	2 (10x)	17.0	65.17
1	1	4 (20x)	15.0	65.19



ΣΧΗΜΑ 58: Διάγραμμα έντασης φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα δείγματα που αναφέρονται στον Πίνακα 35

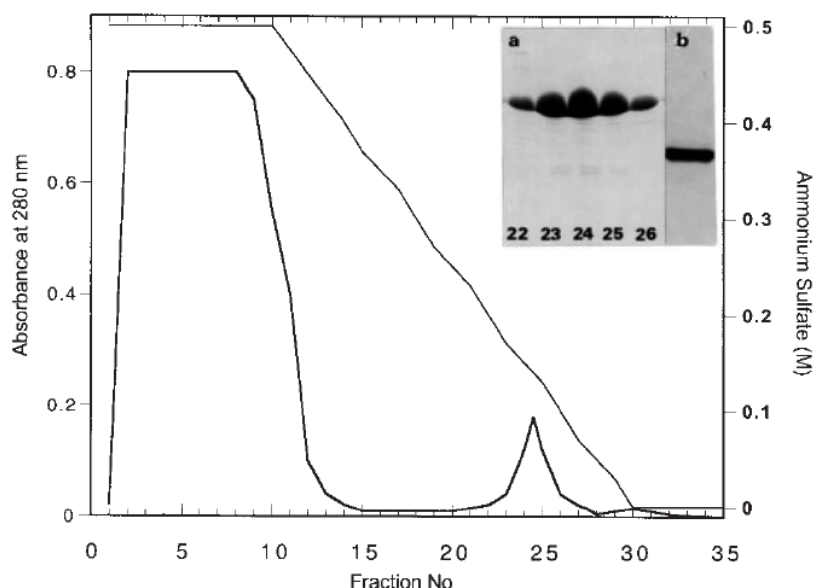




**ΣΧΗΜΑ 59:** Αντιπροσωπευτικό δείγμα διαγράμματος έντασης φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας

## 4.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40

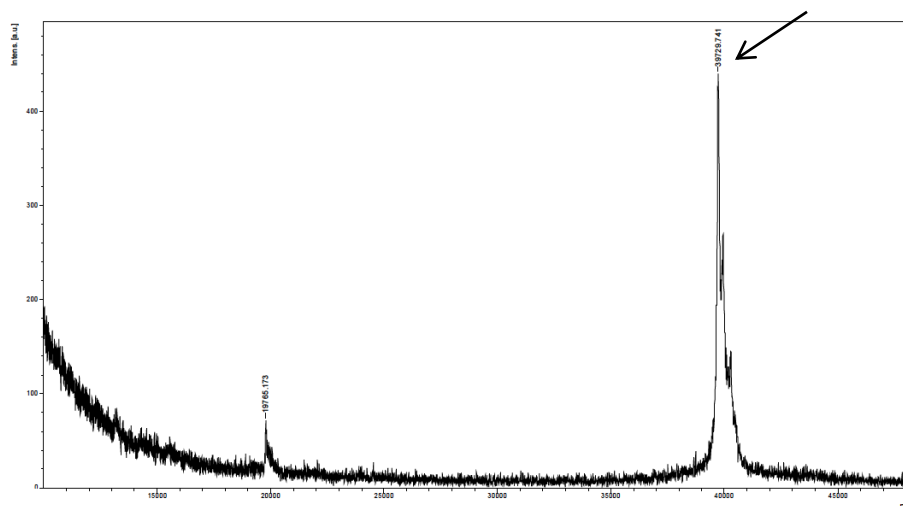
Στη συνέχεια ακολούθησε ο καθαρισμός της Chi40-opt, ο οποίος πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό υδρόφοβης χρωματογραφίας και χρωματογραφίας ιονανταλλαγής, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.7. Με βάση τα δεδομένα της κινητικής παραγωγής των κλώνων της Chi40, επιλέχθηκε η πρωτεΐνη της οποίας η υπερέφραση πραγματοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pET11-a/ chi40-opt, κυτταρική σειρά: BL21trxB(DE3), θρεπτικό μέσο: LB και επαγωγικό παράγοντα IPTG. Για τον καθαρισμό προστέθηκεθειικό αμμώνιο τελικής συγκέντρωσης 500mM στο θρεπτικό υπερκείμενο 4 ώρες μετά την εισαγωγή του επαγωγέα IPTG στην καλλιέργεια. Ακολούθησε ρύθμιση του pH στο 7.0 και απευθείας φόρτωση του διαλύματος στη στήλη Phenyl-Sepharose. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 60α, η Chi40 εκλούθηκε με πολύ υψηλή καθαρότητα σε συγκέντρωσηθειικού αμμωνίου 150-100mM. Επόμενο βήμα ήταν η φόρτωση του δείγματος στην ανιοανταλλακτική στήλη Q-High Performance σε pH 7.0, με σκοπό την απομάκρυνση προσμίξεων και τη συμπύκνωση της πρωτεΐνης.



**ΣΧΗΜΑ 60: Χρωματογράφημα Chi40 στην υδρόφοβη στήλη Phenyl-Sepharose.** Η Chi40 υπερεκφράστηκε σε κύτταρα BL21trxB(DE3) στο θρεπτικό υλικό LB 4h μετά την προσθήκη του επαγωγικού παράγοντα IPTG, το θρεπτικό υπερκείμενο συλλέχθηκε και προστέθηκε ποσότηταθειικού αμμωνίου τελικής συγκέντρωσης 500mM καθώς και διάλυμα 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 1 mM EDTA. Όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα, η Chi40 είναι διαλυτή και εκλούεται σε συγκέντρωσηθειικού αμμωνίου 150-100mM (όπως υποδεικνύεται από την αντίστοιχη κορυφή στην περιοχή αυτή). (a) ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 12.5% (b) μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων 22-26 που αντιστοιχούν στην κορυφή

#### 4.6 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40 ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Ακολούθησαν πειράματα χαρακτηρισμού της καθαρής πρωτεΐνης. Έτσι, πραγματοποιήθηκε φασματομετρία MS με σκοπό την ταυτοποίηση της Chi40. Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας απεικονίζονται στο Σχήμα 61 και δείχνουν ότι η πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 39,730 Da. Από το συγκεκριμένο πείραμα είναι φανερό πως το δείγμα είναι καθαρό σε υψηλό ποσοστό. Ωστόσο, υπάρχει και μια δεύτερη, μικρής έντασης κορυφή που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 19,765 Da και φαίνεται να αποτελεί πρόσμιξη άλλης πρωτεΐνης στο δείγμα μας.

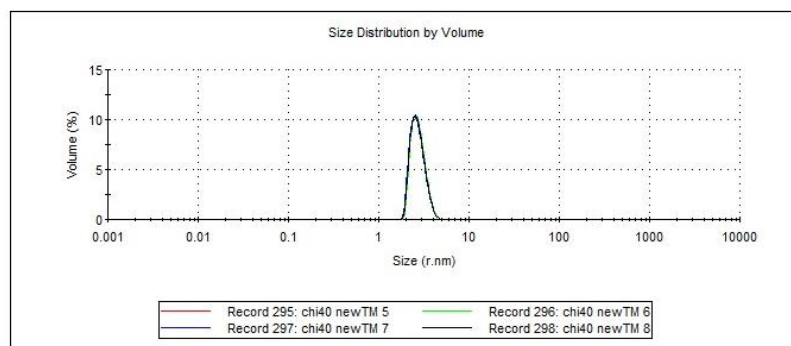


**ΣΧΗΜΑ 61: Φάσμα MS.** Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, η δεύτερη κορυφή ανήκει στο μοριακό βάρος της Chi40 γεγονός που ταυτοποιεί το ένζυμο

#### 4.7 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΧΙΤΙΝΑΣΗΣ 40 ΜΕ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ

Η μελέτη του βαθμού συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DLS. Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας απεικονίζονται στο Σχήμα 62, όπου φαίνεται πως η πρωτεΐνη βρίσκεται στο διάλυμα ως μονομερές, ενώ το δείγμα χαρακτηρίζεται από μονοδιασπορά καθώς δεν παρατηρούνται συσσωματώματα.

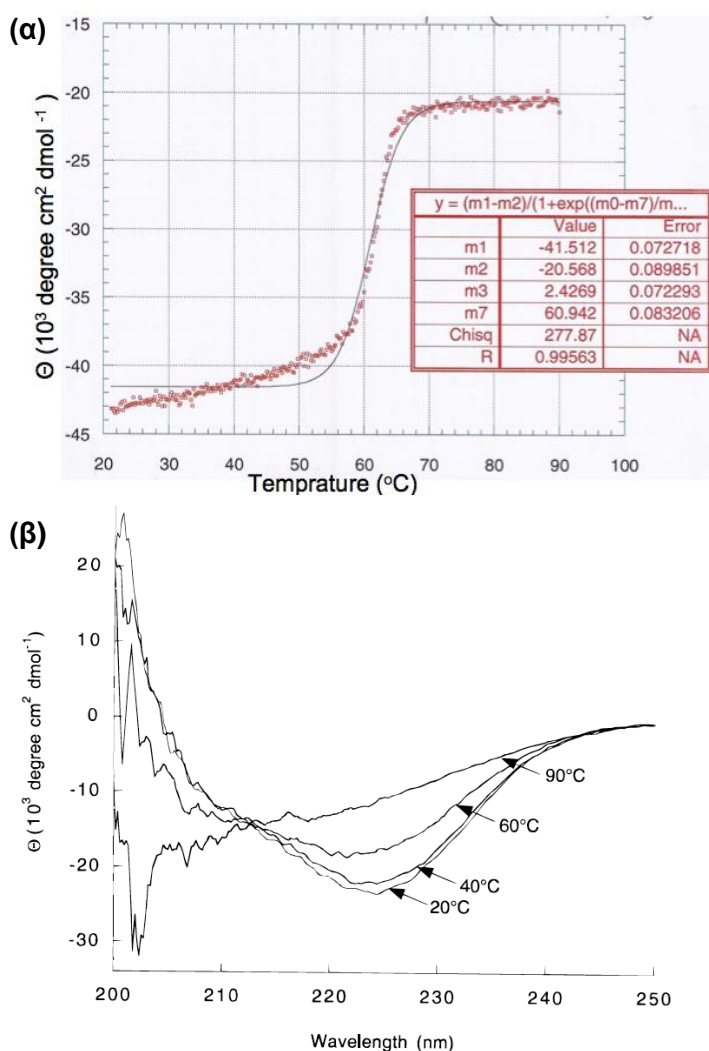
	Size (r.nm):	% Volume	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 2.853	Peak 1: 2.734	100.0	0.4836
Pdi: 0.078	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.675	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



**ΣΧΗΜΑ 62: Φάσμα DLS.** Η κορυφή που παρατηρείται αποδεικνύει πως η Chi40 απομονώθηκε βρισκόμενη σε μονομερή μορφή

#### 4.8 ΜΕΛΕΤΗ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ - ΠΕΙΡΑΜΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ

Τέλος, η θερμοσταθερότητα της Chi40 μελετήθηκε με φασματοσκοπία CD. Το φάσμα με τη μεγαλύτερη επαναληψιμότητα μοριακής ελλειπτικότητας και με το λιγότερο θόρυβο ήταν σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 1mg/mL, σε ουδέτερο pH και σε 20mM ρυθμιστικό διάλυμα Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 63α εμφανίστηκε μέγιστο απορρόφησης στα 224nm. Η αποδιάταξη του ενζύμου παρατηρείται σε αυτό το μήκος κύματος με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μεταξύ 20°C και 90°C και ρυθμό μεταβολής 50°C/h. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 63β προσδιορίστηκε T<sub>m</sub> 60.9°C.



ΣΧΗΜΑ 63: (α) Φάσμα CD Chi40 σε διάφορες θερμοκρασίες. (β) Θερμική καμπύλη τήξης Chi40, όπως προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία CD σε pH 7

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Στόχος της μεταπτυχιακής εργασίας, ήταν η παραγωγή ανασυνδυασμένης Chi40 έτσι, ώστε να είναι εφικτή η γενετική τροποποίησή της και η μελέτη μεταλλάξεων στην καταλυτική δομική περιοχή για τη διαλεύκανση του μηχανισμού αντιστρεπτής αποδιάταξης του ενζύμου. Σχεδιάστηκε συνθετικό γονίδιο στο οποίο μειώθηκε κατά 30% το ποσοστό βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης, ενώ αντικαταστήσαμε κωδικόνια έτσι ώστε η έκφραση του ενζύμου να είναι καλύτερη στο βακτηριακό σύστημα *E. coli*. Από τα πειράματα κινητικής της συνθετικής μορφής καθώς και της άγριας μορφής του ενζύμου φαίνεται πως το συνθετικό γονίδιο στις περισσότερες περιπτώσεις εκφράζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά και παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα σε σχέση με το αγρίου τύπου γονίδιο. Επιπλέον, από τα πειράματα ηλεκτροφόρησης είναι φανερό ότι ένα μεγάλο ποσοστό πρωτεΐνης εκφράζεται στον περιπλασματικό χώρο. Ωστόσο, σύμφωνα με παλιότερες μελέτες, η εφραζόμενη πρωτεΐνη στην περιοχή αυτή του κυττάρου δεν είναι ομοιογενής λόγω εναλλακτικών Cys-Cys δεσμών [48].

Μελετήθηκε η έκφραση των δύο τύπων γονιδίων συναρτήσει μιας σειράς παραμέτρων (κυτταρική σειρά, θρεπτικά μέσα, επαγωγικοί παράγοντες, χρόνος επαγωγής). Παρατηρήθηκε ότι για κάθε συνδυασμό παραμέτρων ο τρόπος έκφρασης της πρωτεΐνης διαφέρει σε μεγάλο βαθμό. Στόχος ήταν να εντοπισθούν οι βέλτιστες συνθήκες με τις οποίες θα είναι εφικτό, με γρήγορο, εύκολο και χαμηλού κόστους τρόπο να παραχθεί διαλυτή πρωτεΐνη Chi40, ενεργή και σε κατάλληλη ποσότητα και καθαρότητα, στο εξωτερικό του κυττάρου. Τελικά, όπως είναι φανερό τόσο από τα πειράματα ηλεκτροφόρησης όσο και από τα πειράματα προσδιορισμού της ενζυμικής δραστικότητας, μεγαλύτερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης έχουμε και για τις δύο κυτταρικές σειρές (BL21trxB(DE3) και BL21(DE3)Magic) σε συνδυασμό με το συνθετικό γονίδιο στο αυτοεπαγόμενο σύστημα καθώς και έπειτα από 4 ώρες επαγωγής με την εισαγωγή του επαγωγικού παράγοντα IPTG στο θρεπτικό υλικό LB. Τα επίπεδα ενζυμικής δραστικότητας και στις τέσσερις αυτές περιπτώσεις κυμαίνονται μεταξύ 8.5-10 μU/μg. Γενικώς το αυτοεπαγόμενο σύστημα παράγει μεγαλύτερες ποσότητες ενεργού πρωτεΐνης σε σχέση με την επαγωγή με IPTG.

Πιο αναλυτικά, κατά την επαγωγή με IPTG ο συνδυασμός: BL21 *trxB*(DE3)/Chi40-wt παράγει μεγαλύτερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης έπειτα από 4 ώρες στο θρεπτικό LB (ειδική δραστικότητα 7.58μU/μg) και έπειτα από 24 ώρες στο θρεπτικό TB (ειδική δραστικότητα 0.90μU/μg). Ενώ ο συνδυασμός BL21 *trxB*(DE3)/Chi40-opt παράγει μεγαλύτερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης έπειτα από 4 ώρες στο θρεπτικό LB (ειδική δραστικότητα 8.48μU/μg) και έπειτα από 24 ώρες στο θρεπτικό TB (ειδική δραστικότητα 1.07μU/μg). Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο στο συνθετικό γονίδιο όσο και στο αγρίου τύπου γονίδιο με την κυτταρική σειρά BL21 *trxB*(DE3) δεν εκφράστηκε πρωτεΐνη στα θρεπτικά υλικά 2x YT και HD.

Ο συνδυασμός: BL21(DE3)Magic/ Chi40-wt παράγει μεγαλύτερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης έπειτα από 4 ώρες στο θρεπτικό LB (ειδική δραστικότητα 7.09μU/μg) και έπειτα από 24 ώρες στο θρεπτικό TB (ειδική δραστικότητα 0.98μU/μg). Ενώ ο συνδυασμός BL21 *trxB*(DE3)/Chi40-opt παράγει μεγαλύτερα ποσοστά ενεργού πρωτεΐνης έπειτα από 4 ώρες στο θρεπτικό LB (ειδική δραστικότητα 8.66μU/μg) και έπειτα από 24 ώρες στο θρεπτικό TB (ειδική δραστικότητα 1.20μU/μg). Στα θρεπτικά μέσα HD και 2x YT εδώ έχουμε έκφραση στην κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic και με τους δυο συνδυασμούς γονιδίων, όπου στην κυτταρική σειρά BL21(DE3)Magic/ Chi40-wt έχουμε περισσότερη έκφραση ενεργούς πρωτεΐνης έπειτα από 2 ώρες στο θρεπτικό 2x YT (ειδική δραστικότητα 0.92μU/μg) και έπειτα από 4 ώρες στο θρεπτικό HD (ειδική δραστικότητα 1μU/μg). Ενώ για τον συνδυασμό BL21 *trxB*(DE3)/Chi40-opt έχουμε μεγαλύτερα ποσοστά ενεργούς πρωτεΐνης έπειτα από 2 ώρες στο θρεπτικό 2x YT (ειδική δραστικότητα 0.84μU/μg) και έπειτα από 4 ώρες στο θρεπτικό HD (ειδική δραστικότητα 1.02μU/μg).

Τέλος, στην περίπτωση του αυτοεπαγόμενου συστήματος παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες ενεργού πρωτεΐνης σε σχέση με την επαγωγή με IPTG. Πιο συγκεκριμένα για τον συνδυασμό: BL21 *trxB*(DE3)/Chi40-wt έχουμε ειδική δραστικότητα 6.64μU/μg, για τον συνδυασμό: BL21 *trxB*(DE3)/Chi40-opt έχουμε ειδική δραστικότητα 10.78μU/μg, και τέλος για τον συνδυασμό BL21(DE3)Magic/Chi40-wt έχουμε ειδική δραστικότητα 8.26μU/μg και για τον συνδυασμό BL21(DE3)Magic/Chi40-opt έχουμε ειδική δραστικότητα 9.06μU/μg.

Αξιοποιώντας τα παραπάνω αποτελέσματα κινητικής, ακολούθησε μελέτη θερμικής αποδιάταξης. Αφού προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής ενεργής Chi40, χρησιμοποιώντας τη συνολική εκκρινόμενη Chi40 καταφέραμε να μετρήσουμε την αποδιάταξή της με χρήση Διαφορικής Φθορισμομετρίας Σάρωσης (DSF) όπου μετρήθηκε  $T_m$  64.58°C. Ακολούθησε ο καθαρισμός του ενζύμου. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και το πείραμα δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) απέδειξαν πως το ένζυμο βρίσκεται σε μονομερή μορφή. Αυτό άνοιξε τον δρόμο για τη μελέτη θερμοσταθερότητας με χρήση κυκλικού διχρωσισμού (CD). Η Chi40 έχει σημείο τήξης  $T_m$  60.9°C σε ουδέτερο pH. Τα αποτελέσματα αυτά μας ανοίγουν τον δρόμο της μελέτης της θερμικής αποδιάταξης της Chi40 γρήγορα και αποτελεσματικά από μεγάλο αριθμό τυχαίων μεταλλάξεων που θα παραχθούν στο εργαστήριο μας με τη χρήση της τεχνολογίας της κατευθυνόμενης εξέλιξης και τη συλλογή δεδομένων που πιθανόν να μας δώσει αρκετά δεδομένα για τη διαλεύκανση του μηχανισμού της αντιστρεπτής αποδιάταξης της Chi40. Απώτερος στόχος είναι εφαρμογή των δεδομένων αυτών σε ένζυμο βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος για να τους προσθέσει σταθερότητα και μεγάλο χρόνο ζωής σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

TB	θρεπτικό μέσο Terrific Broth
2x YT	θρεπτικό μέσο 2x Yeast extract and Tryptone
CD	Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωσμού
Chi25, 30, 35, 40, 60, A, A1, B, C, C1, D1	χιτινάσες 25, 30, 35, 40, 60, A, A1, B, C, C1, D1
Chi40c	κυτοσολική μορφή χιτινάσης 40
chi40-opt	συνθετικό γονίδιο χιτινάσης 40
Chi40-opt	ανασυνδυασμένη μορφή χιτινάσης 40
Chi40s	εκκρινόμενη μορφή χιτινάσης 40
chi40-wt	αγρίου τύπου γονίδιο χιτινάσης 40
Chi40-wt	φυσικό ένζυμο χιτινάσης 40
ChBD ή ChBD3	περιοχή πρόσδεσης χιτίνης
ChiAΔ (α+β)	ανασυνδυασμένη ChiA όπου έχει αφαιρεθεί το στοιχείο (α+β)
CHIT-1	χιτοτριοζιδάση
diNAG	δισακχαρίτες χιτίνης ή χιτοβιόζη
DSF	Διαφορική Φθορισμομετρία Σάρωσης
DLS	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
FnIII ή FN3	φιμπρονεκτίνη τύπου 3
GH18, 19, 20	οικογένειες των γλυκοζυλο-υδρολασών 18, 19, 20
HD	θρεπτικό μέσο High Density
LB	θρεπτικό μέσο Luria Bertani
MS	Φασματομετρία Μάζας
NAG ή GlcNAc	N-ακετυλο-β-D-γλυκοζαμίνη
NagA	N-ακετυλο-β-γλυκοζαμιניδάση A
NagB	N-ακετυλο-β-γλυκοζαμιניδάση B
native-PAGE electrophoresis	μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση
SDS-PAGE electrophoresis	αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση
pNP-(NAG) <sub>2</sub>	p-νιτροφαινυλο-β-1,4-N,N'-διακετυλο-χιτοβιόζη
TCA	τριχλωροξικό οξύ
TIM	ισομεράση της φωσφορικής τριόζης

A	Ala	Αλανίνη
B	Asx	Ασπαραγινικό ή ασπαραγίνη
C	Cys	Κυστεΐνη
D	Asp	Ασπαραγινικό
E	Glu	Γλουταμινικό
F	Phe	Φαινυλαλανίνη
G	Gly	Γλυκίνη
H	His	Ιστιδίνη
I	Ile	Ισολευκίνη
K	Lys	Λυσίνη
L	Leu	Λευκίνη

M	Met	Μεθειονίνη
N	Asn	Ασπαραγίνη
P	Pro	Προλίνη
Q	Gln	Γλουταμίνη
R	Arg	Αργινίνη
S	Ser	Σερίνη
T	Thr	Θρεονίνη
V	Val	Βαλίνη
W	Trp	Θρυπτοφάνη
Y	Tyr	Τυροσίνη
Z	Glx	Γλουταμινικό ή γλουταμίνη



1. Nelson D.L. and Cox M.M., Principles of Biochemistry. *W.H. Freeman and Company* (5th edition).
2. Vega K. and Kalkum M., Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *Int J Microbiol*, 2011. **2012**: p.920459.
3. Fabritius H., Sachs C., Raabe D. Nikolov S., Friak M. and Neugebauer J., Chitin in the Exoskeletons of Arthropoda: From Ancient Design to Novel Materials Science. *Topics Geobiol*, 2011. **34**: p.35-60.
4. Beckham G.T. and Crowley M.F., Examination of the  $\alpha$ -chitin structure and decrystallization thermodynamics at the nanoscale. *J Phys Chem B*, 2011. **115**(15): p.4516-22.
5. Kobayashi K., Kimura S., Togawa E., Wada M., Crystal transition between hydrate and anhydrous b-chitin monitored by synchrotron X-ray fiber diffraction. *Carbohydr Polym*, 2009. **79**(2010): p.882-9.
6. Jang M., Kong B., Jeong Y., Lee C.H. and Nah J., Physicochemical Characterization of  $\alpha$ -Chitin,  $\beta$ -Chitin, and  $\gamma$ -Chitin Separated from Natural Resources. *J Polymer Sci*, 2004. **42**: p.3423-32.
7. Howard M.B., Ekborg N.A., Weiner R.M., Hutcheson S.W., Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003. **30**(11): p.627-35.
8. Lonhienne T., Zoidakis J., Vorgias C.E., Feller G., Gerday C. and Bouriotis V., Modular Structure, Local Flexibility and Cold-activity of a Novel Chitobiase from a Psychrophilic Antarctic Bacterium. *J Mol Biol*, 2001. **310**(2): p.291-7.
9. Tews I., Perrakis A., Oppenheim A., Dauter Z., Wilson K.S. and Vorgias C.E., Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nat Struct Biol*, 1996. **3**(7): p.638-48.
10. Horn S.J., Sørbotten A., Synstad B., Sikorski P., Sørli M., Varum K.M. and Eijsink V.G.H., Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J.*, 2006. **273**(3): p.491-503.
11. Sasaki C., Yokoyama A., Itoh Y., Hashimoto M., Watanabe T., and Fukamizo T., Comparative Study of the Reaction Mechanism of Family 18 Chitinases from Plants and Microbes. *J Biochem*, 2002. **131**(4): p.557-64.

- 
12. Fukamizo T., Chitinolytic Enzymes: Catalysis, Substrate Binding, and their Application. *Curr Protein Pept Sci*, 2000. **1**(1): p.105-24.
  13. Henrissat B. and Bairoch A., New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1993. **293**(Pt3): p.781-8.
  14. Drouillard S., Armand S., Davies G.J., Vorgias C.E. and Henrissat B., *Serratia marcescens* chitobiase is a retaining glycosidase utilizing substrate acetamido group participation. *Biochem J*, 1997. **328**(Pt3): p.945-9.
  15. Prag G., Papanikolau Y., Tavlas G., Vorgias C.E., Petratos K. and Oppenheim A.B, 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 Mol Biol*, 2000. **300**(3): p.611-7.
  16. Huang Q.S., Xie X.L, Liang G., Gong F., Wang Y., Wei X.Q, Wang Q., Ji Z.L., and Chen Q.X., The GH18 family of chitinases: Their domain architectures, functions and evolutions. *Glycobiology*, 2012. **22**(1): p.23-34.
  17. Bhattacharya D., Nagpure A. and Gupta R.K., Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Crit Rev Biotechnol*, 2007. **27**(1): p.21-8.
  18. Brameld K.A., Shrader W.D., Imperiali B. and Goddard W.A., Substrate Assistance in the Mechanism of Family 18 Chitinases: Theoretical Studies of Potential Intermediates and Inhibitors. *J Mol Biol*, 1998. **280**(5): p.913-23.
  19. Van Aalten D.M., Komander D., Synstad B., Gåseidnes S., Peter M.G. and Eijsink V.G.H., Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(16): p.8979-84.
  20. Hara M., Sugimoto H., Uemura M., Akagi K., Suzuki K., Ikegami T. and Watanabe T., Involvement of Gln679, in addition to Trp687, in chitin-binding activity of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *J Biochem*, 2013. **154**(2): p.185-93.
  21. Uchiyama T., Katouno F., Nikaidou N., Nonaka T., Sugiyama J. and Watanabe T., Roles of the Exposed Aromatic Residues in Crystalline Chitin Hydrolysis by Chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. *J Biol Chem*, 2001. **276**(44): p.41343-9.

- 
22. Papanikolau Y., Prag G., Tavlas G., Vorgias C.E., Oppenheim A.B. and Petratos K., High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry*, 2001. **40**(38): p.11338-43.
  23. Papanikolau Y., Tavlas G., Vorgias C.E. and Petratos K., De novo purification scheme and crystallization conditions yield high-resolution structures of chitinase A and its complex with the inhibitor allosamidin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003. **59**(Pt 2): p.400-3.
  24. Perrakis A., Tews I., Dauter Z., Oppenheim A.B., Chet I., Wilson K.S. and Vorgias C.E., Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*, 1994. **2**(12): p.1169-80.
  25. Zees A.C., Pyrpasopoulos S. and Vorgias C.E., Insights into the role of the (alpha+beta) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the enzymatic activity of chitinase A from *Serratia marcescens*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1794**(1): p.23-31.
  26. Van Aalten D.M.F., Synstad B., Brurberg M.B., Hough E., Riise B.W., Eijsink V.G.H. and Wierenga, R.K., Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(11): p.5842-7.
  27. Ikegami T., Okada T., Hashimoto M., Seino S., Watanabe T. and Shirakawa M., Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *J Biol Chem*, 2000. **275**(18): p.13654-61.
  28. Stefanidi E. and Vorgias C.E., Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles*, 2008. **12**(4): p.541-52.
  29. Malecki P.H., Raczynska J.E., Vorgias C.E. and Rypniewski W., Structure of a complete four-domain chitinase from *Moritella marina*, a marine psychrophilic bacterium. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2013. **69**(Pt5): p.821-9.
  30. Nagano N., Orengo C.A. and Thornton J.M., One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol*, 2002. **321**(5): p.741-65.
  31. Rison S.C., Hodgman T.C. and Thornton J.M., Comparison of functional annotation schemes for genomes. *Funct Integr Genomics*, 2000. **1**(1): p.56-69.

- 
32. Wierenga R.K., The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett*, 2001. **492**(3): p.193-8.
  33. Brändén C-I and Tooze J., Introduction to protein structure. NY: *Garland*, 2009 (2nd edition).
  34. Kazlauskas R.J. and Bornscheuer U.T., Finding better protein engineering strategies. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(8): p.526-9.
  35. Kazlauskas R. and Lutz S., Engineering enzymes by 'intelligent' design. *Curr Opin Chem Biol*, 2009. **13**(1): p.1-2.
  36. Kourist R., Miyauchi Y., Uemura D. and Miyamoto K., Engineering the promiscuous racemase activity of an arylmalonate decarboxylase. *Chemistry*, 2011. **17**(2): p.557-63.
  37. Kourist R., Jochens H., Bartsch S., Kuipers R., Padhi S.K., Gall M., Bottcher D., Joosten H.J. and Bornscheuer U.T., The alpha/beta-hydrolase fold 3DM database (ABHDB) as a tool for protein engineering. *Chembiochem*, 2010. **11**(12): p.1635-43.
  38. Hough D.W. and Danson M.J., Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol*, 1999. **3**(1): p.39-46.
  39. Gerlt J.A. and Babbitt P.C., Barrels in pieces?. *Nat Struct Biol*, 2001. **8**(1): p.5-7.
  40. Suzuki K., Sugawara N., Suzuki M., Uchiyama T., Katouno F., Nikaidou N. and Watanabe T., Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002. **66**(5): p.1075-83.
  41. Sikorski P., Sorbotten A., Horn S.J., Eijsink V.G. and Varum K.M., *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan. *Biochemistry*, 2006. **45**(31): p.9566-74.
  42. Srivastava D.B., Ethayathulla A.S., Kumar J., Singh N., Sharma S., Das U., Srinivasan A. and Singh T.P., Crystal structure of a secretory signalling glycoprotein from sheep at 2.0Å resolution. *J Struct Biol*, 2006. **156**(3): p.505-16.
  43. Kumar J., Ethayathulla A.S., Srivastava D.B., Sharma S., Singh S.B., Srinivasan A., Yadav M.P., Singh T.P., Structure of a bovine secretory signalling glycoprotein (SPC-40) at 2.1 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2006. **62**(Pt 9): p.953-63.

- 
44. Flint H.J., Whitehead T.R., Martin J.C. and Gasparic A., Interrupted catalytic domain structures in xylanases from two distantly related strains of *Prevotella ruminicola*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1337**(2): p.161-5.
  45. Cottaz S., Brasme B. and Driguez H., A fluorescence-quenched chitopentaose for the study of endo-chitinases and chitobiosidases. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(17): p.5593-600.
  46. Davies G. and Henrissat B., Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 1995. **3**(9): p.853-9.
  47. Suzuki K., Taiyoji M., Sugawara N., Nikaidou N., Henrissat B. and Watanabe T., The third chitinase gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J*, 1999. **343**(Pt3): p.587-96.
  48. Christodoulou E., Duffner F. and Vorgias C.E., Overexpression, purification, and characterization of a thermostable chitinase (Chi40) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Protein Expr Purif*, 2001. **23**(1): p.97-105.
  49. Pырpassopoulos S., Vlassi M., Tsortos A., Papanikolaou Y., Petratos K., Vorgias C.E. and Nounesis G., Equilibrium heat-induced denaturation of chitinase 40 from *Streptomyces thermoviolaceus*. *Proteins*, 2006. **64**(2): p.513-23.
  50. Γαλανοπούλου Ν., Δημόπουλος Κ., Μαυρή Μ. και Σιαφάκα Ν., Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας. *Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών*, 2001.
  51. Macherey-Nagel, Plasmid DNA purification. *User manual Nucleospin® Plasmid*, 2012. Available from: [http://www.mnnet.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM\\_pDNA\\_NS8.pdf](http://www.mnnet.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS8.pdf)
  52. Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L., Βιοχημεία. *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2004 (5η έκδοση).
  53. Novagen pET system manual. *Novagen*, 2003 (10th edition). Available from: <http://richsingiser.com/4402/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>
  54. Overnight express autoinduction systems, *Novagen*, 2005. Available from: <http://post.queensu.ca/~chinsang/lab-protocols/handbooks-and-manuals/overnight-express-autoinduc.pdf>

- 
55. Hames B.D., One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, in "Gel Electrophoresis of Proteins, a Practical Approach," *IRL Press, Oxford*, 1994 (2nd edition), pp. 1-147.
  56. Kyte J. and Doolittle R.F., A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982. **157**(1): p.105-32.
  57. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p.248-54.
  58. Quick start Bradford protein assay. Instruction manual. Bio-Rad. Available from:  
<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>
  59. Niesen F.H., Berglund H. and Vedadi M., The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc*, 2007. **2**(9): p.2212-21.
  60. Skoog D.A., Holler F.J. and Nieman T.A., Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης. *Εκδόσεις Κωσταράλη*, 2007 (5η έκδοση)
  61. Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M. and Cottrell J.S., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 1999. **20**(18): p.3551-67.
  62. Harding S.E. and Jumel K., Light Scattering. *Curr Protoc Protein Sci*, 2001. Chapter 7: Unit 7.8
  63. Greenfield N.J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 2006. **1**(6): p.2876-90.
  64. Khrapunov S., Circular dichroism spectroscopy has intrinsic limitations for protein secondary structure analysis. *Anal Biochem*, 2009. **398**(2): p.174-6.
  65. Kelly S.M., Jess T.J. and Price N.C., How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1751**: p.119-139.
  66. Blair D.E., Hekmat O., Schüttelkopf A.W., Shrestha B., Tokuyasu K., Withers S.G. and van Aalten D.M., Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*, 2006. **45**(31): p.9416-26.
  67. Kafetzopoulos D., Martinou A. and Bouriotis V., Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(7): p.2564-8