



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Δομικές μελέτες του ενζύμου 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάση με
πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ**

**ΠΑΝΔΩΡΑ Φ. ΚΑΡΑΚΟΥΣΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μικροβιακή Βιοτεχνολογία

ΠΑΝΔΩΡΑ Φ. ΚΑΡΑΚΟΥΣΗ

A.M.: 81601

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δρ Δημήτρης Χατζηνικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Δρ Δημήτρης Χατζηνικολάου

Αν. Καθηγητής Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

2. Δρ Ευαγγελία Δ. Χρυσίνα

Κύρια Ερευνήτρια Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Assoc. Prof. Örebro University, Sweden

3. Δρ Κωνσταντίνος Ε. Βοργιάς

Καθηγητής Βιοχημείας, Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλά αερόβια βακτήρια του εδάφους περιέχουν το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλο-εξαρτώμενου σύστημα φωσφο-τρανσφεράσης (PTS), το οποίο τους επιτρέπει να χρησιμοποιούν ολιγομερή γλυκοζιδίων που προκύπτουν από κυτταρίνη ή/ και από αποικοδόμηση άλλων γλυκανών. Δύο βασικά συστατικά αυτού του συστήματος είναι (α) μια διαμεμβρανική φωσφοτρανσφεράση, η οποία φωσφορυλιώνει τις ολιγογλυκάνες, ενώ τις μεταφέρει εντός του κυττάρου και (β) μια ενδοκυτταρική ευρείας εξειδίκευσης GH1 β-P-γλυκοζιδάση, η οποία υδρολύει περαιτέρω τις φωσφο-ολιγογλυκάνες που προέκυψαν. Αυτό το ένζυμο λειτουργεί μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο εμπλέκονται δύο κατάλοιπα γλουταμικού οξέος, το μεν ως δότης πρωτονίων και το δε ως νουκλεόφιλη ομάδα. Στην παρούσα μελέτη, περιγράφονται τα αποτελέσματα των δομικών μελετών που διεξήχθησαν για μία 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάση της οικογενείας 1-φωσφορικών γλυκοζιδασών (GH1) (EC 3.2.1.86, 6-P-β-GH1), η οποία είναι ικανή να υδρολύει τον β-1,4-γλυκοζιδικό δεσμό σε ένα μεγάλο αριθμό β-P-δι-εξοζών και προέρχεται από θερμόφιλο μικροοργανισμό, σε αντίθεση με τις γνωστές δομές που έχουν προσδιορισθεί και μελετηθεί. Σκοπός ήταν ο προσδιορισμός του ενζύμου αγρίου τύπου στην ελεύθερη μορφή του και ως συμπλόκου με ανάλογα υποστρώματος. Το ένζυμο που μελετάται έχει απομονωθεί από το γονιδίωμα του θερμόφιλου βακτηρίου *Geobacillus sp.* SP24, από το ηφαιστειακό περιβάλλον της Σαντορίνης, Αιγαίο Πέλαγος. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρυστάλλωσης με την τεχνική διάχυσης ατμών, χρησιμοποιώντας τις εγκαταστάσεις πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας (μονάδα ρομποτικής κρυστάλλωσης) στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ). Η επιλογή των συνθηκών κρυστάλλωσης σχεδιάστηκε ορθολογικά με βάση αφενός τα αποτελέσματα βιβλιογραφικής έρευνας και αφετέρου τις διαθέσιμες στο εμπόριο συνθήκες κρυστάλλωσης (crystallization screens). Η επιλογή των καταλληλότερων εμπορικών συνθηκών διεξήχθη μετά από λεπτομερή διερεύνηση των ιδιοτήτων του ενζύμου με βάση ομόλογα ένζυμα της οικογενείας GH1. Θετικά αποτελέσματα (hits) παρατηρήθηκαν αρχικά σε πολλές διαφορετικές συνθήκες, είτε ως λεπτές πλάκες

(διδιάστατοι κρύσταλλοι) είτε ως βελονοειδής κρύσταλλοι. Ακολούθησε βελτιστοποίηση της αναλογίας πρωτεΐνης: κατακρημνιστικού παράγοντα και με εφαρμογή της μεθόδου της μικροσποράς (seeding) αναπτύχθηκαν μονοκρύσταλλοι της 6-P-β-GH1 σε ραβδοειδή μορφή παρουσία PEG 3350, ιωδιούχου νατρίου και Bis-Tris propane pH 7. Παράλληλα με την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, προσδιορίσθηκε η τρισδιάστατη δομή ενός ενζύμου από ένα θερμόφιλο *Gram* θετικό βακτήριο του εδάφους και για λόγους σύγκρισης πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοντελοποίησης της 6-P-β-GH1. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί εξυπηρετητές i-Tasser και Phyre2 για τη δημιουργία των προβλεπόμενων μοντέλων-δομών. Στη συνέχεια ακολούθησε σύγκριση των μοντέλων με την τρισδιάστατη δομή που προσδιορίστηκε από το θερμόφιλο βακτήριο του εδάφους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεν μοντέλο που προτάθηκε από το Phyre 2 μοιάζει με την αλυσίδα που έχει δράση γλυκοζιδάσης από την προσδιορισμένη δομή, ενώ αυτό του i-Tasser με την αλυσίδα που έχει δράση γαλακτοσιδάσης. Προκαταρκτικός χαρακτηρισμός των κρυστάλλων της 6-P-β-GH1 για τον έλεγχο της περιθλαστικής τους ικανότητας έγινε με χρήση της συμβατικής πηγής ακτίνων-Χ που είναι εγκατεστημένη στο ΕΙΕ, ωστόσο το μέγεθος των κρυστάλλων είναι τέτοιο που δεν επιτρέπει τη συλλογή ικανοποιητικών δεδομένων. Για το σκοπό αυτό, προβλέπεται η συλλογή δεδομένων υψηλής ανάλυσης, πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας σε μεγάλες Ευρωπαϊκές εγκαταστάσεις.

ABSTRACT

Many aerobic soil bacteria contain a phospho-enolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS), which enables them to utilize oligomeric glycosides resulting from cellulose and/or other glucans degradation. Two key components of this system are (a) a transmembrane phosphotransferase, which phosphorylates the oligoglycans, while transporting them inside the cell and (b) an intracellular broad specificity GH1 β -P-glucosidase, which further hydrolyzes the resulted P-oligoglycans. This enzyme functions through a retaining mechanism having two glutamic acid residues as proton donor and as a nucleophilic group, respectively. In the present study, the results obtained from structural studies performed on a 6-phospho- β -glycosidase that belongs in family 1 glycosidase phosphate enzymes (GH1) (EC 3.2.1.86, 6- β - β -GH1) are presented. 6- β - β -GH1 is capable of hydrolyzing the β -1,4-glycosidic bond in a large number of β -P-bi-hexoses and was derived from a thermophilic microorganism, unlike the known structures investigated until that time. The ultimate aim of the study was to determine the 3D structure of the wild-type enzyme in its free form and in complex with substrate analogues. More specifically, the enzyme was isolated by the genome of the thermophilic bacterium *Geobacillus sp.* SP24, from the volcanic environment of Santorini island, Aegean Sea, Greece. Crystallisation trials were set with the vapor diffusion technique, using our in-house robotic crystallization facility at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology of the National Hellenic Research Foundation (NHRF). A selection of crystallization conditions was rationally designed based on literature research and commercially available crystallization screens. Selection of the suitable screens was performed after thorough investigation of the enzyme's properties based on GH1 homologues. Initial hits were observed in a number of different conditions, either as thin plates or needles. Further optimization of protein: precipitant mixing ratio, resulted in single rhombohedral-shaped 6- β - β -GH1 crystals in the presence of PEG3350, sodium iodide and Bis-Tris propane pH 7. Meanwhile, another enzyme from a thermophilic *Gram*-positive soil bacterium was crystallized and its 3D structure was determined. For comparison purposes,

modelling studies were performed using two different servers i-Tasser and Phyre2. The results showed that the predicted 3D structure obtained by Phyre 2 fitted best in one of the chains with glycosidase activity while the one from i-Tasser matched with another chain with galactosidase activity. Preliminary characterization of 6-P- β -GH1 crystals for the control of their diffraction capability was made using our in-house X-ray source at NHRF; however, the size of the crystals does not allow the collection of sufficient data. High resolution data, that will allow 6-P- β -GH1 structure determination, will be collected at Synchrotron Radiation sources in large scale European Facilities.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε κυρίως στο Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη της Δρ Ευαγγελίας Δ. Χρυσίνα, Κύριας Ερευνήτριας στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος ΕΙΕ, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, για τις ιδιαίτερα χρήσιμες συμβουλές της, οι οποίες ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και την υποστήριξή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ Δημήτριο Χατζηνικολάου, Αν. Καθηγητή Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας του Τομέα Βοτανικής του τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) και την ομάδα του για την πολύτιμη βοήθειά τους και την συνεργασία, καθώς μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό τους. Τέλος τον Δρ Κωνσταντίνο Ε. Βοργιά, Καθηγητή Βιοχημείας του Τομέα Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ για την συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια κα Ιωάννα Γερογιάννη για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε μέσα στο εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και ιδιαιτέρως τους γονείς μου για την πολύτιμη βοήθεια τους αυτά τα δύο χρόνια.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
1.1 ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	17
1.1.1 Βασικές αρχές της θεωρίας της κρυστάλλωσης.	17
1.1.2 Στάδια της κρυστάλλωσης.....	18
1.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση	21
1.1.4 Τεχνικές κρυστάλλωσης	25
1.1.5 Βελτιστοποίηση συνθηκών κρυστάλλωσης με χρήση προσθέτων	29
1.2 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑ.....	31
1.2.1 Βιοτεχνολογία	33
1.2.2 Καταλυτική δράση	37
1.2.3 Ένζυμα βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.....	38
1.2.4 Αξιοποίηση υδατανθράκων από μικροοργανισμούς.....	40
1.2.5 Το ένζυμο 6-φώδφο-β-γλυκοζιδάση (6-P-β-glycosidase)	41
1.3 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ ΔΟΜΩΝ	44
1.3.1 Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής πρωτεϊνών <i>in silico</i>	46
1.3.2 Εξυπηρετητές για πρόβλεψη τρισδιάστατων δομών.....	47
1.3.3 Γνωστές 3D δομές 6-φωσφο-β-γλυκοζιδασών.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων.....	55
2.2 Βακτηριακά στελέχη	55
2.3 Πλασμιδιακοί φορείς	56
2.4 Κρυσταλλογραφία	58
2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	59
2.6 Μετασηματισμός βακτηρίων	59
2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	61
2.8 Υπερέκφραση πρωτεϊνών.....	62
2.9 Ομογενοποίηση (λύση) κυττάρων	62
2.10 Καθαρισμός πρωτεϊνών	63
2.11 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE.....	65

2.12 Δοκιμές Κρυστάλλωσης.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
3.1 Έλεγχος του πλασμιδιακού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	73
3.2 Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης με πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	73
3.3 Δοκιμές Κρυστάλλωσης	75
3.4 <i>In silico</i> δομικές μελέτης της 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσης	83
3.4.1 Αποτελέσματα Phyre2.....	83
3.4.2 Αποτελέσματα i-TASSER.....	87
3.4.3 Σύγκριση της 3D δομής του ενζύμου 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσης όπως προβλέφθηκε από τους δύο εξυπηρετητές καθώς και με την βιβλιογραφία	89
3.4.4 Σύγκριση με τις προβλεπόμενης δομής 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσης από <i>Geobacillus</i> SP24 με τη δομή της 6-φωσφο-β-γαλακτοσιδάσης από <i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i>	93

Λέξεις Κλειδιά: ένζυμο, 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάση, γλυκοζιδικές υδρολάσες
πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων X, δομικές μελέτες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

1.1.1 Βασικές αρχές της θεωρίας της κρυστάλλωσης

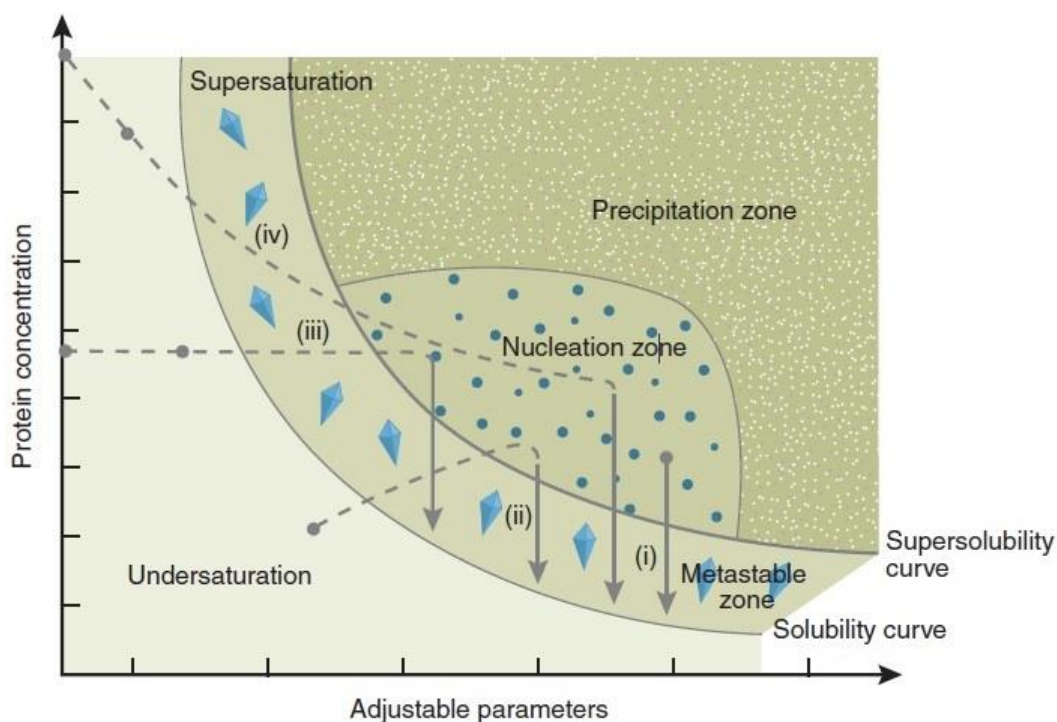
Η κρυστάλλωση πρωτεϊνών αναπτύχθηκε στο δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα για δύο λόγους: (α) παρείχε ένα μέσο για τον καθαρισμό πρωτεϊνών από ένα ακάθαρτο μίγμα σε μια εποχή που λίγα άλλα υπήρχαν, (β) χρησίμευσε και ακόμα χρησιμοποιείται ως αποδεικτικό μέσο για την καθαρότητα της πρωτεΐνης. Βιοχημικοί όπως ο Osborne την χρησιμοποίησαν εκτεταμένα για να απομονώσουν και να χαρακτηρίσουν πρωτεΐνες, ιδιαίτερα εκείνες από σπόρους. Η έρευνα που διεξήχθη την εποχή εκείνη αφενός έδειξε ότι είναι εφικτό να απομονωθούν οι πρωτεΐνες ακόμα και αν τα δείγματα φέρουν πολλές προσμίξεις και αφετέρου οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών προσεγγίσεων για την ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων μερικές εκ των οποίων εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται έως σήμερα. Μεταξύ του 1900 και του 1940, δόθηκε έμφαση στα ένζυμα και πάλι η κρυστάλλωση, στα χέρια των Summer, Northrup, Kunitz, Herriott και των συναδέλφων τους αποδείχθηκαν ένα σημαντικό εργαλείο για τη δημιουργία των ιδιοτήτων και της φύσης των καταλυτικών μακρομορίων. Στα τέλη της δεκαετίας του 1930, ωστόσο, μια νέα εφαρμογή για κρυστάλλωση πρωτεϊνών εμφανίστηκε ως αποτέλεσμα των μελετών, χρησιμοποιώντας την περίθλαση των ακτίνων Χ από τους Bernal και Crowfoot, Perutz και άλλους ερευνητές της εποχής. Μια θεμελιώδης αλλαγή στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών, της έρευνα και η εφαρμογή της, συνέβη στη δεκαετία του 1980. Ο λόγος ήταν η ανάπτυξη τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA, η οποία επέτρεψε στους ερευνητές, για πρώτη φορά, να έχουν στην διάθεση τους μεγάλες ποσότητες διαφορετικών σπάνιων πρωτεϊνών. Σήμερα, η πλειονότητα των πρωτεϊνών που προορίζονται για προσδιορισμό δομής μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ προέρχονται από ανασυνδυασμένες πηγές. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και ο προσδιορισμός της δομής των μακρομορίων και των συμπλόκων αυτών αποτελούν τον κύριο στόχο των επιστημόνων που ασχολούνται με την κρυστάλλωση. Επιδίωξη των δομικών βιολόγων είναι να περιγράψουν όλα τα ζωντανά συστήματα και τα προϊόντα (π.χ. μεταβολίτες, πρωτεΐνες) που παράγουν σε μοριακό και ατομικό επίπεδο. Αυτό απαιτεί πρώτα ακριβής γνώση των δομικών μονάδων των μακρομορίων, των πρωτεϊνών, των

νουκλειϊνικών οξέων, των λιπιδίων και των πολυσακχαριτών. Στη συνέχεια απαιτείται επιπλέον κατανόηση της 'οικοδόμησης' των μονάδων αυτών στον χώρο, για τον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο τα μόρια συνδέονται, οργανώνονται και συναρμολογούνται. Οι μεγαλύτερες αυτές δομές περιλαμβάνουν μακρομοριακά σύμπλοκα, συγκροτήματα, οργανίδια, κυτταρικά τοιχώματα, μεμβράνες, κυτταροσκελετό κλπ. Από αυτά τα συγκροτήματα μπορούμε να φτάσουμε σε μια μοριακή και ατομική περιγραφή του ζωντανού κυττάρου και από αυτό να καταλάβουμε, από την άποψη της κλασικής χημείας και της φυσικής, την αρχιτεκτονική και τη μηχανική της ζωντανής ύλης. Η δυναμική ισορροπία που επικρατεί μέσα στο κύτταρο, αλλά και οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τις αλληλεπιδράσεις αυτού με εξωκυττάρια παράγοντες είναι εξίσου σημαντικές. Για την καλύτερη κατανόηση αυτών των μηχανισμών, πρέπει πρώτα να αποσαφηνισθεί πως τα δομικά μόρια ανταποκρίνονται στις χημικές και φυσικές δυνάμεις, πώς ρυθμίζονται οι αποκρίσεις σε διάφορα ερεθίσματα και πώς μεταδίδονται οι αποκρίσεις αυτές μέσω της ιεραρχίας από τη μονάδα σε ολόκληρο το σύστημα. Αυτό με τη σειρά του σημαίνει οπτικοποίηση της δομής των μορίων αλλά και των μοριακών αλληλεπιδράσεων (McPherson 2004).

1.1.2 Στάδια της κρυστάλλωσης

Η κρυστάλλωση είναι ένα φαινόμενο εναλλαγής φάσεων ενός πρωτεϊνικού μορίου, το οποίο μπορεί να παρουσιαστεί από ένα ομώνυμο διάγραμμα, διάγραμμα φάσης που δείχνει ποια κατάσταση - υγρή, κρυσταλλική ή άμορφη στερεή (ίζημα) είναι σταθερή υπό την επίδραση ποικίλων παραμέτρων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση. Το διάγραμμα φάσης, προκύπτει μεταβάλλοντας δύο παραμέτρους κάθε φορά, αντιπροσωπεύοντας έτσι μια δισδιάστατη «ζώνη» του πολυδιάστατου χώρου των παραμέτρων που σχετίζονται με την κρυστάλλωση. Σε ένα τυπικό διάγραμμα φάσης για ένα πείραμα κρυστάλλωσης (**Σχήμα 1.1**), διακρίνουμε μεταξύ των τεσσάρων ζωνών: μια περιοχή πολύ υψηλού κορεσμού (υπέρκορη), όπου η πρωτεΐνη θα καταβυθιστεί. Μία περιοχή μετρίου κορεσμού, όπου αυθόρμητα θα αναπτυχθούν πυρήνες κρυστάλλωσης, μία περιοχή χαμηλότερου κορεσμού όπου οι κρύσταλλοι είναι σταθεροί και μπορεί να

αυξηθούν, αλλά χωρίς να πραγματοποιηθεί περαιτέρω πυρήνωση [αναφέρεται ως μετασταθής ζώνη και θεωρείται ότι περιέχει τις καλύτερες συνθήκες για την ανάπτυξη μεγάλων, εύχρηστων κρυστάλλων] και μία ακόρεστη περιοχή, όπου η πρωτεΐνη διαλυτοποιείται πλήρως και δεν πρόκειται να κρυσταλλωθεί.



Σχήμα 1.1: Σχηματική απεικόνιση του διαγράμματος φάσεων κατά την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης. Διακρίνονται οι τέσσερις μέθοδοι κρυστάλλωσης: i) η μέθοδος microbatch ii) η μέθοδος εξάτμισης και διάχυσης ατμών (vapour-diffusion) iii) η διαπίδυση (dialysis) και iv) η διάχυση ελεύθερης επιφάνειας (free-interface diffusion, FID). Η κάθε μέθοδος αποτελεί μια διαφορετική οδό για επίτευξη πυρήνωσης και μετασταθών ζωνών θεωρώντας ως ρυθμιστική παράμετρο την συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης. Οι μαύρες κηλίδες αντιπροσωπεύουν τις αρχικές συνθήκες και στην περίπτωση της μεθόδου διάχυσης ελεύθερης επιφάνειας παρουσιάζονται δυο εναλλακτικά σημεία εκκίνησης καθώς το ακόρεστο πρωτεϊνικό διάλυμα μπορεί να περιέχει είτε μόνο την πρωτεΐνη είτε μόνο το μείγμα αυτής με χαμηλή συγκέντρωση κατακρημνιστικού παράγοντα. Η διαλυτότητα ορίζεται ως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διαλύτη βρίσκεται σε ισορροπία με αυτήν που περιέχεται στους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. Ως καμπύλη διαλυτότητας ορίζεται ως το όριο διαχωρισμού συνθηκών κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα η αυθόρμητη πυρήνωση

(ή διαχωρισμός φάσεων) και στις οποίες το πρωτεϊνικό διάλυμα είναι διαυγές (Chayen and Saridakis 2008).

Πιο αναλυτικά, στην περιοχή κάτω από την καμπύλη διαλυτότητας (solubility curve), το διάλυμα είναι ακόρεστο και η κρυστάλλωση δεν θα πραγματοποιηθεί ποτέ. Πάνω από την καμπύλη διαλυτότητας βρίσκεται η ζώνη υπερκορεσμού. Εδώ για μια δεδομένη συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης, η συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από αυτή που έχει στην ισορροπία. Ανάλογα με την κινητική της κρυστάλλωσης για την επίτευξη ισορροπίας και το επίπεδο υπερκορεσμού, αυτή η περιοχή μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρεις επί μέρους ζώνες :

1. τη ζώνη ιζήματος, στην οποία η περίσσεια μορίων πρωτεΐνης διαχωρίζεται αμέσως από το διάλυμα για να σχηματίσει άμορφο ίζημα
2. τη ζώνη της πυρήνωσης, όπου τα πρωτεϊνικά μόρια συσσωματώνονται σε κρυσταλλική μορφή
3. τη μετασταθή ζώνη, στην οποία αναπτύσσονται καλά διατεταγμένοι κρύσταλλοι μεγάλου μεγέθους. Καθώς οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν το διάλυμα έχει περάσει στην μετασταθή ζώνη και δεν εμφανίζονται νέοι πυρήνες. Οι υπόλοιποι πυρήνες θα περάσουν στο στάδιο της ανάπτυξης με μειωμένο ρυθμό, ο οποίος θα συμβάλει στην αποφυγή παρουσίας ελαττωμάτων στον κρύσταλλο μέχρις ότου αποκατασταθεί η ισορροπία (Chirgadze 2001).

Τα διαγράμματα φάσης κρυστάλλωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό πειραμάτων που στόχο έχουν την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών κρυστάλλωσης μακρομοριακών στόχων. Κάθε μέθοδος κρυστάλλωσης φθάνει στη ζώνη πυρήνωσης και στη συνέχεια στη μετασταθή ζώνη μέσω μιας διαφορετικής διαδρομής. Η μέθοδος batch επιτυγχάνει υπερκορεσμό αμέσως μετά την ανάμειξη, ενώ σε όλες τις άλλες μεθόδους που βασίζονται στη διάχυση ατμών, το διάλυμα πρωτεΐνης είναι αρχικά μακριά από το σημείο κορεσμού και σταδιακά φτάνει σε υπερκορεσμό μέσω εξισορρόπησης με ένα διάλυμα που περιέχει τους παράγοντες κρυστάλλωσης. Σε ένα ιδανικό πείραμα, από τη στιγμή που σχηματίστηκαν πυρήνες, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα θα μειωθεί, οδηγώντας έτσι

φυσικά το σύστημα στη μετασταθή ζώνη, στην οποία πρέπει να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη των κρυστάλλων χωρίς τον σχηματισμό επιπλέον πυρήνων. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές, συμβαίνει επιμήκυνση του χρόνου διάρκειας πυρήνωσης, οδηγώντας στον σχηματισμό πολλών κρυστάλλων χαμηλής ποιότητας. Η αναφορά στα διαγράμματα φάσεων και στην κινητική της κρυστάλλωσης τείνει να αποθαρρύνει τους βιολόγους, αλλά στην πραγματικότητα, τα διαγράμματα μερικής φάσης χρησιμοποιούνται συχνότατα. Κατά το στάδιο βελτιστοποίησης των συνθηκών ενός πρώτου αποτελέσματος που χρήζει περαιτέρω βελτίωσης, «hit», διεξάγονται πειράματα σε συνθήκες παρεμφερείς με αυτές όπου παρατηρήθηκαν τα “hits”. Εάν τα αποτελέσματα τέτοιων πειραμάτων αποδοθούν με τη μορφή διαγράμματος, προκύπτει η καμπύλη υπερδιαλυτότητας, η οποία διαχωρίζει τις συνθήκες κάτω από τις οποίες συμβαίνει αυθόρμητη πυρήνωση (ή διαχωρισμός φάσεων, ή καθίζηση) από τις συνθήκες υπό τις οποίες δεν λαμβάνει χώρα κρυστάλλωση (Chayen and Saridakis 2008).

1.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.

Ο υπερκορεσμός επιτυγχάνεται με προσθήκη φυσικών αλάτων ή πολυμερών και με τη ρύθμιση ποικίλων παραμέτρων, οι οποίες περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, το pH, την ιοντική ισχύ. Ειδικότερα:

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι γνωστό ότι είναι μία από τις πιο σημαντικές αλλά συχνά παραμελημένες παραμέτρους στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών. Υπάρχουν δύο παρατηρήσεις σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στον υπερκορεσμό και την κρυσταλλική ανάπτυξη. Πρώτον, φαίνεται ότι η διαλυτότητα των πρωτεϊνών έχει μάλλον μια μικρή εξάρτηση από τη θερμοκρασία, αν και υπήρξαν κάποιες σοβαρές προσπάθειες να προκύψει ένας συσχετισμός ώστε να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός κρυστάλλωσης. Η εξάρτηση από την θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη, όταν η ιοντική ισχύς του αρχικού υγρού είναι χαμηλή. Έτσι, ίσως αναμένεται ότι η κρυστάλλωση χρησιμοποιώντας διαλύματα όπου περιέχουν πολυμερή, πολυαλκοόλες ή οργανικούς διαλύτες θα ήταν περισσότερο ευαίσθητη στη θερμοκρασία με βάση την αυξημένη συγκέντρωση άλατος. Δεύτερον, θεωρείτο ότι

η κρίσιμη περιοχή για την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών κυμαίνεται μεταξύ 2°C και περίπου 25°C. Αυτό συνέβαινε επειδή υποτίθεται γενικά ότι η σταθερότητα ή η σταθερότητα στη δομή μιας πρωτεΐνης μειώνεται σημαντικά σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Αυτό το φαινόμενο ισχύει πιθανώς για τις περισσότερες πρωτεΐνες σε αυξημένες θερμοκρασίες πάνω από περίπου 40 ή 45°C, αλλά μπορεί να μην είναι τόσο σημαντικό μεταξύ θερμοκρασιών 25 και 40°C. Πράγματι, μερικά πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι πρωτεΐνες όπως η καταλάση, η λυσοζύμη και η καναβαλίνη είναι ανθεκτικές σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η ανθρώπινη ενδοθηλίνη είναι ένα παράδειγμα όπου σε αυξημένη θερμοκρασία (37°C) βελτιώθηκε η πυρήνωση και η ανάπτυξη μονοκρυστάλλων για ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ. Συγκεκριμένα, με την αυξανόμενη μελέτη πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλοκών (πχ. ριβοσωμάτων και των συμπλοκών τους) από θερμοφίλους και ακραιοφιλικούς μικροοργανισμούς, η κρυστάλλωση σε υψηλότερη θερμοκρασία γίνεται ακόμη πιο ελκυστική. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι πρωτεΐνες από τους θερμοφίλους οργανισμούς είναι πιο σταθερές από αυτές των μεσόφιλων οργανισμών και η σταθερότητα, όπως σημειώθηκε παραπάνω, έχει υψηλή συσχέτιση με την κρυστάλλωση. Οι περισσότερες θερμοφιλικές πρωτεΐνες έχουν κρυσταλλωθεί για ανάλυση περίθλασης ακτίνων Χ στους 20°C, αλλά παρόλα αυτά οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν ένα ευρύτερο πεδίο της διερεύνησης της θερμοκρασίας. Είναι συνηθισμένο κατά τη διεξαγωγή αρχικών δοκιμών κρυστάλλωσης ή στο στάδιο της βελτιστοποίησης, να διεξάγονται παράλληλα δοκιμές κρυστάλλωσης σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C. Επειδή οι ρυθμοί διάχυσης είναι βραδύτεροι σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ο χρόνος εμφάνισης των κρυστάλλων μπορεί σε κάθε περίπτωση να επιβραδυνθεί στους 4°C. Εάν δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταγόνων που έχει παρατηρηθεί ίζημα και αυτών που είναι διαυγείς ή του πλήθους των κρυστάλλων που έχουν αναπτυχθεί, του μεγέθους ή της ποιότητας των κρυστάλλων που λαμβάνονται στις δύο θερμοκρασίες μετά από την πάροδο κατάλληλης χρονικής περιόδου, τότε η θερμοκρασία μπορεί να μην διερευνηθεί ως μια σημαντική μεταβλητή, που θα αποφέρει μεγάλο κέρδος στο φαινόμενο της κρυστάλλωσης (McPherson and Cudney 2014).

Ιοντική Ισχύς

Η ελάχιστη διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης βρίσκεται στο ισοηλεκτρικό της σημείο, όπου η πρωτεΐνη δεν έχει καθαρό φορτίο απουσία προστιθέμενων ιόντων. Το ισοηλεκτρικό σημείο ορίζεται πειραματικά ως το pH στο οποίο η πρωτεΐνη δεν μετακινείται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης στο ισοηλεκτρικό της σημείο δεν απαιτεί πρόσθετα ιόντα. Μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο της, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μειώνεται απουσία προστιθέμενων ιόντων. Η κρυστάλλωση της φορτισμένης πρωτεΐνης μακριά από το ισοηλεκτρικό της σημείο απαιτεί τα επιπλέον ιόντα να χάσουν την ανεξάρτητη ελευθερία κινήσεώς τους και να δεσμευτούν με την πρωτεΐνη. Η διαλυτότητα των βιομορίων σε υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα, εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών στο διάλυμα. Οι όροι εναλάτωση (salting in) και εξαλάτωση (salting out) αναφέρονται σε δυο διαφορετικά φαινόμενα που αφορούν στην εξάρτηση της διαλυτότητας από την ιοντική ισχύ. Πιο συγκεκριμένα: Εναλάτωση: σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος, η διαλυτότητα της πρωτεΐνης αυξάνει με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος (δηλαδή αύξηση της ιοντικής ισχύος). Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε μείωση της ηλεκτροστατικής ελεύθερης ενέργειας της πρωτεΐνης, αύξηση της αποτελεσματικότητας του διαλύτη, και κατά συνέπεια σε αύξηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Εξαλάτωση: Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από υδρόφιλα και υδρόφοβα αμινοξέα. Κατά τη διαλυτοποίηση πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα η διαμόρφωση της πρωτεΐνης είναι τέτοια ώστε τα υδρόφοβα αμινοξέα να προστατεύονται από τις υδρόφοβες περιοχές ενώ τα υδρόφιλα να αλληλεπιδρούν με μόρια νερού, ώστε οι πρωτεΐνες να φτιάχνουν δεσμούς υδρογόνου με τα περιβάλλοντα μόρια νερού. Όταν η συγκέντρωση του άλατος αυξάνει, τα μόρια νερού αλληλεπιδρούν με τα ιόντα άλατος, περιορίζοντας έτσι τα μόρια του νερού που διατίθενται για την αλληλεπίδρασή τους με τα φορτισμένα τμήματα της πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα των αυξημένων απαιτήσεων για μόρια ενυδάτωσης, οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης καθίστανται μεγαλύτερες από τις αλληλεπιδράσεις διαλυμένης ουσίας διαλύτη. Το φαινόμενο αυτό γνωστό ως εξαλάτωση οδηγεί στον σχηματισμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (Collins 2004)

https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Proteins/Purification/Salting_Out#Hofmeister_Series).

pH

Πέραν από τη συγκέντρωση της ίδιας της πρωτεΐνης που επιδιώκεται η κρυστάλλωση, τη φύση του παράγοντα κατακρήμνισης (άλας, πολυαλκοόλη, πολυμερές, οργανικό διαλύτη, μικρό μόριο κλπ.), μια από τις πιο σημαντικές μεταβλητές είναι συνήθως το pH. Το pH είναι επίσης ένας από τους ισχυρότερους και αποτελεσματικότερους τρόπους προαγωγής της κρυστάλλωσης. Πολλές πρωτεΐνες μπορούν να κρυσταλλωθούν απουσία οποιουδήποτε παράγοντα κατακρήμνισης διαφοροποιώντας μόνο το pH του διαλύματος που βρίσκονται (μητρικό διάλυμα). Υπάρχουν επίσης πρωτεΐνες των οποίων η διαλυτότητα είναι σχετικά μη ευαίσθητη στο pH και κρυσταλλώνονται σε ένα σχετικά ευρύ φάσμα, αλλά αυτές συνήθως αποτελούν εξαίρεση. Το pH μπορεί να ορισθεί και να διατηρηθεί με την προσθήκη ενός κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και μπορεί να μεταβληθεί με εξισορρόπηση μέσω είτε της φάσης ατμών είτε της υγρής φάσης. Το pH καθορίζει την κατάσταση πρωτονίωσης των ιονιζόμενων ομάδων στην επιφάνεια μιας πρωτεΐνης και επομένως του ηλεκτροστατικού πεδίου δηλαδή τον τρόπο με τον οποίο η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με άλλα μόρια. Μια παλιά πεποίθηση ήταν ότι υπήρχε μια αντιστοιχία μεταξύ του pI μίας πρωτεΐνης και του pH στο οποίο ήταν πιο πιθανό να κρυσταλλωθεί. Μια προσεκτική εξέταση των δεδομένων για ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών έδειξε ότι δεν υπάρχουν αρκετές αποδείξεις που να υποστηρίζουν αυτήν την ιδέα. Μια στρατηγική για την βελτιστοποίηση των συνθηκών pH είναι η διεξαγωγή δοκιμών αυξάνοντας μια μονάδα pH μεταξύ του εύρους pH 3-9. Εάν μια πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται σε μια ευρεία έκταση αυτών των τιμών pH, τότε η διαλυτότητά του είναι μη ευαίσθητη στο pH και περαιτέρω διερεύνηση του pH είναι απίθανο να οδηγήσει σε ένα καλό αποτέλεσμα. Εάν η πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται μόνο σε μία ή δύο τιμές pH, τότε είναι λογικό να εκπονηθεί σειρά δοκιμών κρυστάλλωσης σε ένα εύρος τιμών με αυξήσεις pH όχι μεγαλύτερες από 0,1 με 0,2 μονάδες. Έχει δειχθεί ότι η βέλτιστη περιοχή pH είναι πολύ μικρή σε πολλές περιπτώσεις και αξίζει να προσδιορίζεται με ακρίβεια (McPherson and Cudney 2014).

Αυτοί είναι οι τρεις από τους σημαντικότερους παράγοντες όπου επηρεάζουν την κρυστάλλωση αλλά όχι οι μοναδικοί. Στην κρυσταλλογραφία δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο που θα πρέπει να εφαρμοσθεί, όπως σε άλλα πειράματα οπότε συλλέγονται πληροφορίες για όλες τις συνθήκες που μπορούν να προάγουν ή να καθυστερήσουν την κρυστάλλωση μια πρωτεΐνης.

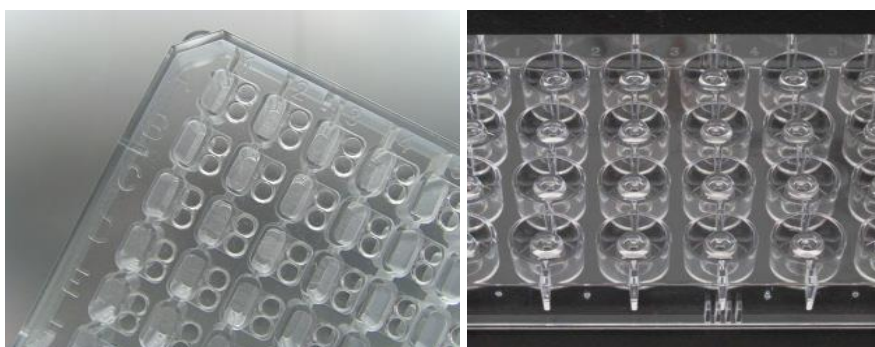
1.1.4 Τεχνικές κρυστάλλωσης.

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές για να φέρουν ένα πρωτεϊνικό διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού. Μεταξύ αυτών, χρησιμοποιούνται συχνά οι ακόλουθες τρεις μέθοδοι: μικρο-batch, διάχυση ατμών και διαπίδυση (**Εικόνα 1.2**). Αν και ο υπερκορεσμός ενός διαλύματος πρωτεΐνης θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω καθεμιάς από αυτές τις τεχνικές, οι επί μέρους αρχές αυτών των μεθόδων ποικίλλουν. Μια λεπτομερής περιγραφή αυτών των τεχνικών θα παρουσιαστεί παρακάτω:

Η μέθοδος **micro-batch** είναι μια παραλλαγή της απλής μεθόδου κρυστάλλωσης batch, όπου το συμπυκνωμένο διάλυμα πρωτεΐνης αναμιγνύεται με πυκνό παράγοντα κατακρήμνισης σε κλειστό δοχείο για να παραχθεί μία τελική υπερκορεσμένη συγκέντρωση, η οποία μπορεί τελικά να οδηγήσει σε κρυστάλλωση. Αυτό μπορεί να γίνει με μεγάλες ποσότητες διαλυμάτων και τυπικά έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερους κρυστάλλους λόγω των μεγαλύτερων όγκων διαλυμένης ουσίας που υπάρχουν και της μικρότερης πιθανότητας διάχυσης ακαθαρσιών στην επιφάνεια του κρυστάλλου. Το δείγμα πρωτεΐνης και ο παράγοντας καταβύθισης διανέμονται εντός του πηγαδιού μιας πλάκας και το πηγάδι καλύπτεται με παραφινέλαιο για την αποτροπή της εξάτμισης (**Εικόνα 1.2 a**). Κατά τη διάρκεια της περιόδου επώασης, η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης παραμένει σταθερή καθώς η εξάτμιση είναι περιορισμένη και συνεπώς ο όγκος της σταγόνας παραμένει ο ίδιος κατά τη διάρκεια του πειράματος. Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης μεταβάλλεται προς τον σχηματισμό κρυστάλλων ή άμορφου ιζήματος. Εάν η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης επιλέγεται με τέτοιο τρόπο ώστε το διάλυμα να είναι σε κατάσταση υποκορεσμού, η

κρυστάλλωση δεν θα λάβει χώρα. Το βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η εξισορρόπηση συμβαίνει πολύ γρήγορα, επηρεάζοντας έτσι τον ρυθμό ανάπτυξης των κρυστάλλων και κατά συνέπεια την ποιότητα των παρατηρούμενων κρυστάλλων. Το δεύτερο μειονέκτημα είναι ότι ο χειρισμός των κρυστάλλων από τη σταγόνα που καλύπτεται με έλαιο είναι πολύ δύσκολος. Ωστόσο, δεδομένου ότι μπορεί να γίνει χρήση πολύ μικρών όγκων πρωτεϊνικών διαλυμάτων, η τεχνική μικρο-batch είναι αρκετά χρήσιμη ως αρχική μέθοδος σάρωσης συνθηκών. Αν και η εξάτμιση του νερού από τη σταγόνα που καλύπτεται από το έλαιο είναι αμελητέα, και ο χρόνος ζωής της μικρο-batch είναι συνήθως περίπου 2 έως 3 εβδομάδες.

Η **μέθοδος διάχυσης ατμού (vapour-diffusion technique)** χρησιμοποιεί εξάτμιση και διάχυση των μορίων του νερού μεταξύ διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων ως μέσο προσέγγισης και επίτευξης υπερκορεσμού πρωτεϊνικών μακρομορίων. Σε αυτήν την περίπτωση τα πειράματα εκτελούνται σε μικροπλάκες (plates) κρυστάλλωσης 96 θέσεων (**Εικόνα 1.2**, αριστερά) ή 24 θέσεων (**Εικόνα 1.2**, δεξιά). Κάθε θέση αποτελεί ένα βοθρίο (well) το οποίο με την σειρά του έχει είτε μια σταγόνα (drop) έναν πρόκειται για το πιάτο με τις λιγότερες θέσεις είτε από δυο σταγόνες εάν πρόκειται για το πιάτο των 96 θέσεων.



Εικόνα 1.2: Αριστερά: Μικροπλάκα κρυστάλλωσης (Plate) για κρυσταλλογραφία 96 θέσεων δύο σταγόνων η καθεμία SWISSCI 'MRC' (SWISSCI AG, Zug, Switzerland). Δεξιά: Πιάτο (Plate) για κρυσταλλογραφία 24 θέσεων μιας σταγόνας η καθεμία.

Τυπικά, το πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται σε αναλογία 1:1 με ένα διάλυμα που περιέχει τον παράγοντα κατακρήμνισης στην συγκέντρωση που πρέπει να επιτευχθεί με την εξισορρόπηση ατμού. Η σταγόνα στη συνέχεια είναι μια κρεμαστή

ή καθήμενη σταγόνα (**Εικόνα 1.3b**). Η διαφορά στη συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης μεταξύ της σταγόνας και του διαλύματος του πηγαδιού είναι κινητήρια δύναμη η οποία προκαλεί την εξάτμιση του νερού από την σταγόνα έως ότου η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης στην σταγόνα να ισούται με εκείνη του διαλύματος του πηγαδιού. Εφόσον ο όγκος του διαλύματος πηγαδιών είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν της σταγόνας, η αραίωση του με υδρατμούς που αφήνει την σταγόνα είναι επιτακτική. Κατά τη διάρκεια του πειράματος διάχυσης ατμών, η πρωτεΐνη θα αρχίσει να συγκεντρώνεται από την ακόρεστη ζώνη για να φτάσει στην υπέρκορη. Καθώς εμφανίζονται οι πρώτοι κρύσταλλοι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στη σταγόνα φτάνει στην καμπύλη διαλυτότητας.

Η διάχυση ατμών είναι η βέλτιστη τεχνική όταν εξετάζεται ένας μεγάλος αριθμός συνθηκών. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αύξηση ή τη μείωση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στην κατάσταση ισορροπίας, σε σχέση με την αρχική της. Αυτό επιτυγχάνεται με την μεταβλητότητα του ποσοστού ανάμιξης της πρωτεΐνης και του διαλύματος στο πηγάδι (reservoir) στην σταγόνα. Η σταγόνα εξισορροπείται με τέτοιο τρόπο ώστε η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης να ταιριάζει με εκείνη του διαλύματος στο πηγάδι, ο τελικός όγκος της σταγόνας θα είναι πάντα ίσος με εκείνον της αρχικής ποσότητας του διαλύματος των πηγαδιών που αναμιγνύεται με τις πρωτεΐνες.

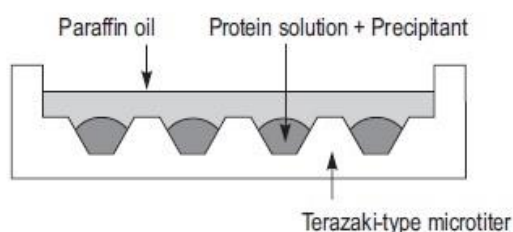
Ο ρυθμός της διάχυσης ατμών μπορεί σε κάποιο βαθμό επίσης να ελεγχθεί, αφού εξαρτάται από την επιφάνεια της σταγόνας. Μειώνοντας την επιφάνεια μπορούμε να επιβραδύνουμε δραματικά τη διαδικασία εξισορρόπησης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της λεγόμενης τεχνικής «**sandwich drop**» (**Εικόνα 1.3 b**). Ο όγκος μιας κρεμάμενης σταγόνας περιορίζεται σε περίπου 8-10 ml, δεδομένου ότι οι μεγαλύτεροι όγκοι ενδέχεται να προκαλέσουν την πτώση της από το κάλυμμα. Αυτός ο περιορισμός ξεπερνιέται εφαρμόζοντας την τεχνική της καθήμενης σταγόνας "**sitting drop**" (**Εικόνα 1.3 b**).

Η **μέθοδος διαπίδυσης** χρησιμοποιεί διάχυση και εξισορρόπηση μικρών μορίων παραγόντων κατακρήμνισης διαμέσου μιας ημιπερατής μεμβράνης ως μέσο αργής προσέγγισης της συγκέντρωσης στην οποία κρυσταλλώνεται η πρωτεΐνη. Αρχικά, το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται στη μεμβράνη διαπίδυσης και στη συνέχεια

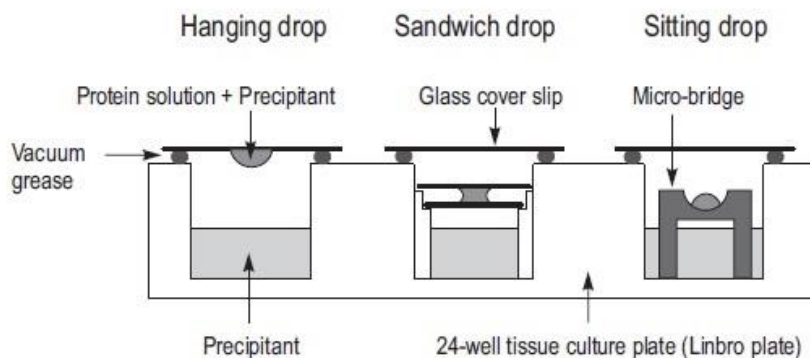
εξισορροπείται έναντι ενός διαλύματος του παράγοντα κατακρήμνισης. Η εξισορρόπηση έναντι του παράγοντα κατακρήμνισης στον περιβάλλοντα διαλύτη προκαλεί αργό υπερκορεσμό για τη διαλυμένη ουσία εντός της μεμβράνης διαπίδυσης, προκαλώντας τελικά κρυστάλλωση. Μια μεμβράνη διαπίδυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καλύψει το στόμιο του κουμπιού διαπίδυσης, επιτρέποντας τη διάχυση του περιβάλλοντος διαλύτη μέσα στη διαλυμένη ουσία μέσω της μεμβράνης διαπίδυσης (**Εικόνα 1.3 c**). Το πρωτεϊνικό διάλυμα στην αρχή του πειράματος διαπίδυσης είναι σε κατάσταση χωρίς κορεσμό (**Εικόνα 1.3 c**). Η συγκέντρωση του παράγοντα κατακρήμνισης αυξάνεται βραδέως καθώς λαμβάνει χώρα η διάχυση του μέσω της μεμβράνης. Έτσι, το σύστημα περνάει από την κατάσταση υποκορεσμού στην μετασταθή περιοχή

Το πλεονέκτημα της διαπίδυσης έναντι άλλων μεθόδων είναι στην ευκολία με την οποία μπορεί να μεταβάλλεται ο παράγοντας κατακρήμνισης. Έτσι το διάλυμα πρωτεΐνης μπορεί να ανακυκλώνεται συνεχώς μέχρι να βρεθούν οι σωστές συνθήκες κρυστάλλωσης (Chirgadze 2001).

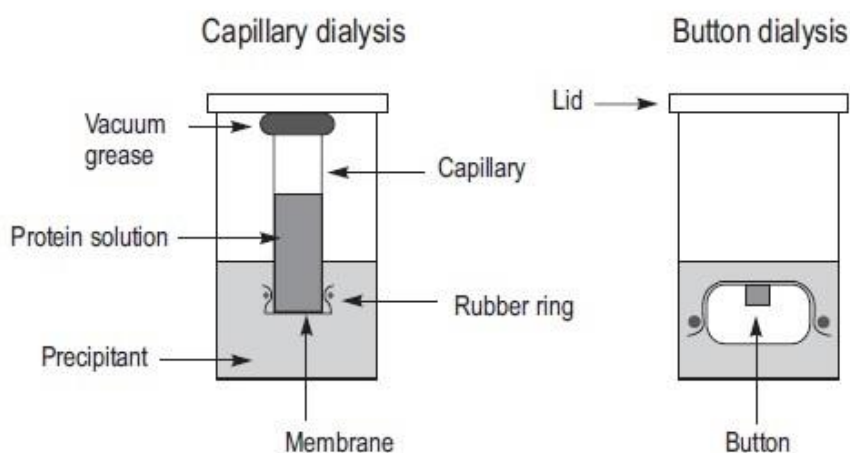
a) Microbatch crystallisation technique



b) Vapour-diffusion techniques



c) Dialysis crystallisation techniques



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση μεθόδων κρυστάλλωσης. Α) μέθοδος μικρο-batch . Β) μέθοδος διάχυσης ατμού (vapour-diffusion technique) C) μέθοδος διαπίδυσης (dialysis crystallisation techniques) (πηγή σχήματος: (Chirgadze 2001).

1.1.5 Βελτιστοποίηση συνθηκών κρυστάλλωσης με χρήση προσθέτων.

Εκτός από μερικά προφανή ή προβλέψιμα βιοχημικά κατάλληλα (συμπαράγοντες, φυσιολογικοί προσδέτες, ιόντα, αναστολείς ή ανεργοποιητές ενός ενζύμου, απορρυπαντικά για μεμβρανικές και υδρόφοβες πρωτεΐνες και αναγωγικούς παράγοντες ή EDTA για προστασία), είναι δύσκολο να καταλάβουμε τι θα είναι χρήσιμο. Επιπλέον, πρέπει να ειπωθεί ότι kits που περιέχουν μεγάλα σύνολα δυνητικά χρήσιμων μικρών μορίων, ακόμη και βιολογικά ενεργών μικρών μορίων, είναι τώρα διαθέσιμα στο εμπόριο. Αποδείχθηκε ότι είναι σημαντικά για την επιτυχία αρκετών ερευνών. Αυτές οι συστοιχίες μικρών μορίων συνήθως χρησιμοποιούνται στα στάδια βελτιστοποίησης, αφού έχουν οριστεί οι άλλες μεταβλητές. Επειδή οι ενώσεις είναι τόσο πολυάριθμες και ποικίλες, η εισαγωγή τους σε πρώιμα στάδια, όταν άλλες παράμετροι δεν έχουν ακόμη καθοριστεί, μπορεί να περιπλέξει σημαντικά μια αναζήτηση συνθηκών κρυστάλλωσης. Μπορούν επίσης να είναι χρήσιμα σε προηγούμενα στάδια της σάρωσης συνθηκών για εύρεση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης χωρίς προηγούμενες αναφορές κρυσταλλογραφίας (McPherson and Cudney 2014).

Ένα ακόμη από τα παράδοξα στην κρυστάλλωση είναι ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την φάση της πυρήνωσης των κρυστάλλων δεν είναι οι ιδανικές για να υποστηρίξουν την επακόλουθη ανάπτυξή τους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αυθόρμητη δημιουργία πυρήνων είναι πολύ πιο πιθανό να συμβεί όταν τα επίπεδα υπερκορεσμού είναι υψηλά, ενώ η βραδεία, διατεταγμένη ανάπτυξη μεγάλων κρυστάλλων ευνοείται σε χαμηλότερα επίπεδα. Επομένως το ιδανικό πείραμα θα έπρεπε να αποσυνδέσει κάπως την πυρήνωση από την ανάπτυξη για να ικανοποιήσει τις σαφώς διαφορετικές απαιτήσεις των δύο γεγονότων. Η μικροσπορά (seeding) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τον διαχωρισμό της πυρήνωσης και της ανάπτυξης. Στην τεχνική αυτή, παλαιότεροι κρύσταλλοι με τη μορφή μικροθραυσμάτων, χρησιμοποιούνται ως "σπόροι" και εισάγονται σε νέες σταγόνες εξισορροπημένες σε χαμηλότερα επίπεδα υπερκορεσμού. Οι τεχνικές σποράς μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες με βάση το μέγεθος των κρυστάλλων-σπόρων:

- Μικροσπορά όπου γίνεται μεταφορά μικροσκοπικών κρυστάλλων-σπόρων, πολύ μικρές για να διακριθούν ξεχωριστά.
- Μακροσπορά όπου γίνεται μεταφορά μακροσκοπικού ολόκληρου κρυστάλλου, συνήθως 5-50 μm (Bergfors 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.2
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑ

1.2.1 Βιοτεχνολογία

Η βιοτεχνολογία εμφανίστηκε στη δεκαετία του 1970, βασιζόμενη σε μεγάλο βαθμό σε μια νέα τεχνική, αυτή του ανασυνδυασμένου DNA, του οποίου οι λεπτομέρειες δημοσιεύθηκαν το 1973 από τους Stanley Cohen από το Πανεπιστήμιο του Στάνφορντ και Herbert Boyer από το Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια στο Σαν Φρανσίσκο. Ο Boyer συνεργάστηκε με την Genentech, η οποία σήμερα είναι μια από τις μεγαλύτερες εταιρείες βιοτεχνολογίας στην αγορά. Με τον όρο βιοτεχνολογία περιγράφεται η τεχνολογία που χρησιμοποιεί μικροβιακά, φυτικά ή ζωικά κύτταρα τα οποία μέσω βιολογικών διαδικασιών έχουν ως στόχο την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων ή υπηρεσιών. Απαιτεί συνήθως τη χρήση ή την ανάπτυξη μεθόδων για άμεσους γενετικούς χειρισμούς για την επίτευξη επιθυμητών στόχων. Τέτοιοι στόχοι είναι, ενδεικτικά, η παραγωγή μιας ειδικής χημικής ένωσης, μιας βελτιωμένης ποικιλίας φυτού ή σπόρου, η γονιδιακή θεραπεία μιας ασθένειας ή η χρήση ειδικά σχεδιασμένων οργανισμών για την αποικοδόμηση αποβλήτων (BiotechGuide2008 n.d.) (Αγγελής Γεώργιος 2007).

Ανάλογα με το πεδίο εφαρμογής της η βιοτεχνολογία χωρίζεται στις παρακάτω κατηγορίες:

1. **Κόκκινη βιοτεχνολογία**, όπου έχει ως αντικείμενο μελέτης την ιατρική. Εστιάζει στην ανακάλυψη και την παραγωγή νέων φαρμάκων, εμβολίων, διαγνώσεων ή θεραπειών. Αυτό επιτυγχάνεται με την εκτεταμένη μελέτη πρωτεϊνών και ενζύμων καθώς και μεταβολιτών αυτών με στόχο την βελτίωση του τρόπου ζωής και την δημιουργία νέων καινοτόμων φαρμάκων.
2. **Πράσινη βιοτεχνολογία**: έχει ως αντικείμενο μελέτης της το περιβάλλον και την γεωργία. Εστιάζει στην διαχείριση του γενετικού υλικού για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (ΓΤΟ) που φέρουν επιθυμητά χαρακτηριστικά, ξεπερνώντας τις συμβατικές χρονοβόρες και προβληματικές μεθόδους βελτίωσης. Αποτέλεσμα είναι να δημιουργηθούν φυτά ανθεκτικά σε διάφορες ασθένειες και καταπονήσεις, πιο παραγωγικά, με λιγότερες απαιτήσεις σε νερό και φυτά "πράσινα εργοστάσια" παραγωγής πληθώρας φυσικών προϊόντων για φαρμακευτικά σκευάσματα και πρώτης ύλης για ενέργεια.

3. **Λευκή βιοτεχνολογία:** είναι ο κλάδος που σχετίζεται με τη βιομηχανία. Οι βιομηχανικές εφαρμογές βιοτεχνολογίας έχουν οδηγήσει σε καθαρότερες διαδικασίες που παράγουν λιγότερα απόβλητα και καταναλώνουν λιγότερη ενέργεια και νερό. Γίνεται παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων άρα και φιλικότερων προς το περιβάλλον προϊόντων-παραπροϊόντων, εισάγοντας νέες μεθόδους στην παραγωγική διαδικασία που μειώνουν θεαματικά το περιβαλλοντικό κόστος. Ένα ακόμη σημαντικό πεδίο των τελευταίων χρόνων είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων ως πηγή ενέργειας που θα βοηθήσει την απεξάρτηση πολλών δραστηριοτήτων του ανθρώπου από τα υγρά καύσιμα και θα ελαχιστοποιήσει τις περιβαλλοντικές συνέπειες. Τέλος, η λευκή Βιοτεχνολογία έχει δημιουργήσει σειρά μεθόδων για την αποτελεσματική διαχείριση των επικίνδυνων αποβλήτων αλλά και την αντιμετώπιση της ρύπανσης κυρίως του εδάφους και των υδάτων.

Ενώ φαίνονται τρεις ευδιάκριτοι κλάδοι της βιοτεχνολογίας στην πραγματικότητα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να υπάρξει αποτέλεσμα. Βασικό εργαλείο της βιοτεχνολογίας είναι τα ένζυμα των οργανισμών.(BiotechGuide2008 n.d.)

1.2.2 Καταλυτική δράση

Οι ζωντανοί οργανισμοί συνθέτουν μια μεγάλη σειρά ενζύμων, τα οποία καταλύουν παρά πολλές αντιδράσεις εντός και εκτός κυττάρου. Τα ένζυμα, είναι μόρια που προσδιορίζουν τον τρόπο των χημικών μετασχηματισμών και μεσολαβούν στον σχηματισμό των διαφόρων μορφών ενέργειας. Η ενέργεια που απαιτείται για να αρχίσει η μετατροπή των αντιδρώντων σε προϊόντα είναι αυτή που επηρεάζεται από τα ένζυμα και όχι η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας (ΔG) μεταξύ των προϊόντων και των αντιδρώντων. Εάν η ΔG μιας αντίδρασης θα είναι μεγαλύτερη, μικρότερη ή ίδια με την ΔG^0 εξαρτάται μόνο από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων. Ένα ένζυμο δεν μπορεί να μεταβάλει τους νόμους της θερμοδυναμικής και έτσι δεν μπορεί να μεταβάλλει την ισορροπία μιας χημικής αντίδρασης. Τα ένζυμα επιταχύνουν την επίτευξη της ισορροπίας αλλά δεν μεταβάλλουν τη θέση της. Η επιτάχυνση αυτή πραγματοποιείται μέσω της ελάττωσης της ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ενζύμων είναι η καταλυτική ισχύς και η εξειδίκευσή τους. Η ουσία της

κατάλυσης είναι η ειδική πρόσδεση της μεταβατικής κατάστασης. Η κατάλυση λαμβάνει χώρα σε μια ιδιαίτερη περιοχή του ενζύμου που ονομάζεται ενεργό κέντρο. Το κάθε ένζυμο, εφόσον αποτελείται από μια μόνο πεπτιδική αλυσίδα, περιέχει μόνο ένα ενεργό κέντρο, ενώ για τα ένζυμα που αποτελούνται από περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες, κάθε καταλυτική υπομονάδα έχει το δικό της ενεργό κέντρο.

Προκειμένου να μελετηθεί μια ενζυμική αντίδραση, λαμβάνουμε υπόψη μας τρεις ουσίες: το ένζυμο (E), το υπόστρωμα (S) και το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES). Η ένδειξη της ύπαρξης ενός συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος έγινε με 3 τρόπους. Πρώτο στοιχείο ήταν η παρατήρηση ότι μια ενζυμική αντίδραση έχει μέγιστη ταχύτητα, σε αντίθεση με μη καταλυόμενες αντιδράσεις, υποδηλώνοντας το σχηματισμό ενός συμπλόκου ES. Δεύτερη απόδειξη ήταν η κρυσταλλογραφία με ακτίνες Χ, μια μέθοδος η οποία πρόσφερε υψηλής πιστότητας εικόνες υποστρωμάτων συνδεδεμένων στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων. Στην παρούσα εργασία θα γίνει εκτενής αναφορά στην μέθοδο της κρυσταλλογραφίας. Και τρίτη ένδειξη αποτέλεσαν τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά πολλών ενζύμων και υποστρωμάτων, τα οποία αλλάζουν όταν αυτά βρίσκονται με την μορφή συμπλόκου ES (Berg Jeremy M., Tymoczko, John L., Stryer 2013). Η μελέτη δημιουργίας συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος δεν είναι παρά μία ειδική περίπτωση της μελέτης των αλληλεπιδράσεων των λειτουργικών πρωτεϊνών με τους αντίστοιχους προσδέτες (ligands). Για να δημιουργηθεί αυτό το σύμπλοκο, πραγματοποιείται μια στοιχειομετρική αντίδραση μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος. Οι αλληλεπιδράσεις γίνονται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων και όχι σε τυχαίες περιοχές. Σκοπός του ενεργού κέντρου είναι να προσανατολίζει το υπόστρωμα στην κατάλληλη θέση σε σχέση με το ένζυμο και να του επιβάλει κατά κάποιο τρόπο και την κατάλληλη διαμόρφωση. Στην καταλυτική διεργασία συμμετέχει ενεργά ένας μικρός αριθμός αμινοξέων, παρόλα αυτά το ενεργό κέντρο μπορεί να καταλαμβάνει μια μεγάλη περιοχή του ενζύμου. Έτσι υπάρχουν τα αμινοξέα “επαφής”, τα μόρια των οποίων βρίσκονται σε απόσταση δεσμού από ένα ή περισσότερα άτομα του υποστρώματος και γίνεται η παραδοχή ότι εφάπτονται απευθείας με το υπόστρωμα. Τα “βοηθητικά” αμινοξέα που δεν

αντιδρούν άμεσα με το υπόστρωμα αλλά αποτελούν μέρος του ενεργού κέντρου και συμβάλουν στην σταθεροποίηση της διαμόρφωσης και των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου. Τα αμινοξέα "συνεισφοράς" που συμμετέχουν έμμεσα στην καταλυτική διεργασία. Αποτελούν το υπόβαθρο πάνω στο οποίο στηρίζεται η δραστική διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Τέλος υπάρχουν και τα αμινοξέα που δεν συμμετέχουν καθόλου και ακόμη και να απομακρυνθούν δεν θα παρατηρηθεί καμία σημαντική μεταβολή στις καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου (Γεωργιάτσος-Γιουψάνης-Κυριακίδης 2001)

Η κατάταξη των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την αρμόδια επιτροπή της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας κατατάσσοντας τα σε έξι μεγάλες κατηγορίες, που κάθε μια υποδιαιρείται σε ομάδες, αυτές σε υποομάδες κ.ο.κ. Στον **Πίνακα 1.1.** φαίνονται οι έξι μεγάλες κατηγορίες των ενζύμων.

Πίνακας 1.1.: Παραδείγματα έξι κύριων κατηγοριών ενζύμων.

1. Οξειδοαναγωγάσες	Καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις
π.χ. γαλακτικό οξύ + NAD ⁺ ↔ πυροσταφυλικό οξύ + NADH + H ⁺ ένζυμο: γαλακτική διυδρογονάση	
2. Τρανσφεράσες	Καταλύουν μεταφορά ομάδων
π.χ. σερίνη + τετραϋδροφολικό οξύ ↔ γλυκίνη + THF-O ένζυμο: σερινο-υδροξυ-μεθυλο-τρανσφεράση	
3. Υδρολάσες	Καταλύουν διάσπαση δεσμών με παρεμβολή νερού
π.χ. ουρία + H ₂ O → CO ₂ + 2NH ₃ ένζυμο: ουρεάση	
4. Λυάσες	Καταλύουν διάσπαση δεσμών χωρίς παρεμβολή νερού
π.χ. πυροσταφυλικό → ακεταλεϋδη ένζυμο: πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση	
5. Ισομεράσες	Καταλύουν αντιδράσεις ισομερίωσης
π.χ. μεθυλομηλονύλο-CoA ↔ ηλεκτρυλο- CoA ένζυμο: μεθυλομυλονυλο- CoA ισομεράση	
6. Λιγάσες	Καταλύουν το σχηματισμό δεσμών, με ταυτόχρονη υδρόλυση
π.χ. πυροσταφυλικό οξύ → οξαλοξικό οξύ ένζυμο: πυροσταφυλική καρβοξυλάση	

1.2.3 Ένζυμα βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος

Τα ένζυμα όπως αναφέρθηκε παραπάνω, καταλύουν αντιδράσεις και σταθεροποιούν τις μεταβατικές καταστάσεις, τις υψηλότερες ενεργειακά στερεοδιατάξεις στις πορείες των αντιδράσεων. Στη βιοτεχνολογία μας ενδιαφέρουν ένζυμα τα οποία έχουν διαφορετικές ιδιότητες, ώστε με μια μικρή τροποποίηση να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλες κλίμακες. Τέτοια ένζυμα είναι για παράδειγμα τα θερμοσταθερά, τα θερμοανθεκτικά ή τα ένζυμα που αναπτύσσονται σε μη συμβατά μέσα.

Οι θερμοφιλοι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να ζουν σε ακραίες τιμές pH και υψηλές θερμοκρασίες γεγονός που τους καθιστά ευρέως αξιοποιήσιμους για σε βιομηχανικές εφαρμογές. Εκτός από το κόστος, η θερμική ευαισθησία υπήρξε το κύριο εμπόδιο στην εκτεταμένη χρήση των ενζύμων στη βιομηχανία. Εάν η διαδικασία περιλαμβάνει θέρμανση, ένα θερμοφιλο ένζυμο είναι η προφανής προτίμηση. Εάν ένα μεσόφιλο ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια διαδικασία, ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο είναι πιθανό να είναι καλύτερο. Αυτοί οι οργανισμοί δεν είναι δύσκολο να απομονωθούν και να αναπτυχθούν σε μικρή και σε μεγάλη κλίμακα. Περιέχουν ένζυμα πολλών κατηγοριών, όπως διάφορες πρωτεάσες, αμυλάσες, γλυκανάσες, κυτταρινάσες, ξυλανάσες και DNA πολυμεράσες. Τα ένζυμα αυτά, μπορούν να απομονωθούν σε υψηλό βαθμό καθαρότητας, χρησιμοποιώντας συμβατικές μεθόδους, με το πλεονέκτημα έναντι των συμβατικών πρωτεϊνών ότι μπορούν να συντηρηθούν ακόμα και στους 4°C παραμένοντας σταθερά και ενεργά μέχρι τουλάχιστον τους 80°C και φτάνοντας συχνά έως τους 100°C. Σήμερα πολλά τέτοια ένζυμα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί. Όλα τα ένζυμα έχουν υψηλή βέλτιστη θερμοκρασία κατάλυσης και παρουσιάζουν χρόνο ημιζωής πολλές μέρες. Για παράδειγμα οι DNA πολυμεράσες είναι τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ως εργαλεία σε εργαστήρια βιοχημείας και μοριακής βιολογίας και είναι επιθυμητό να έχουν ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες είναι μεγάλη (Kristjansson 1989)(Γεωργάτσος-Γιουψάνης-Κυριακίδης 2001).

Το περιβάλλον των ενζύμων εκτός των μεμβρανών είναι υδατικό. Για τον λόγο αυτόν η 'συμβατική' κατάλυση γίνεται σε υδατικά διαλύματα αλλά οι

περισσότερες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τη μελέτη των ενζύμων βασίζονται σε υδατικά μέσα. Τελευταία, όμως το ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στη χρησιμοποίηση ενζύμων σε οργανικούς διαλύτες. Οι βιομηχανικές ενζυμικές διεργασίες προσφέρουν το πλεονέκτημα των ήπιων συνθηκών αντίδρασης που είναι άκρως επιλεκτικές και περιβαλλοντικά αποδεκτές. Τα πλεονεκτήματα ενός ενζύμου ενεργού παρουσία οργανικού διαλύτη θα ήταν η εύκολη ανάκτηση των προϊόντων, αυξημένη διαλυτότητα των υδρόφοβων αντιδρώντων και μείωση στην επιμόλυνση από βακτήρια. Η αλλαγή του διαλύτη από το νερό σε ένα οργανικό διαλύτη προκαλεί αλλαγές και στη λειτουργία του ενζύμου. Επιπλέον τα ένζυμα σε οργανικούς διαλύτες αλλάζουν και την εξειδίκευση τους ως προς τα υποστρώματα σε σύγκριση με τη συμπεριφορά τους σε υδατικά διαλύματα. Η διαδικασία αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη της ενζυμικής μηχανικής όπου χρησιμοποιείται στη βιοτεχνολογία με στόχο την αλλαγή των ιδιοτήτων του ενζύμου. Μια ακόμη μέθοδος είναι η κατευθυνόμενη μετάλλαξη σημείου (site-directed mutagenesis) όπου αφαιρείται, προστίθεται ή γίνεται αντικατάσταση ενός αμινοξέος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή γύρω από αυτό αλλάζοντας έτσι την εξειδίκευση του (Γεωργιάτσος-Γιουψάνης-Κυριακίδης 2001). Στην παρούσα εργασία έχει μελετηθεί ένα ένζυμο της 6-φωσφο-β-γλυκοσιδάσης που προέρχεται από τον θερμοάαντοχο οργανισμό *Geobacillus sp.* SP24 καθώς και ενός μεταλλάγματος αυτού που έχει πραγματοποιηθεί με κατευθυνόμενη μετάλλαξη σημείου στο ενεργό του κέντρο.

Οι περισσότερες τροποποιήσεις, για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν αυτά τα ένζυμα σε μεγάλες κλίμακες, απαιτεί τη θεωρητική γνώση των χημικών και γενετικών τεχνικών που απαιτούνται καθώς και της σειράς των σταδίων που ακολουθούνται από την απομόνωση έως την παραγωγή. Οι περισσότερες τροποποιήσεις πραγματοποιούνται μέσω μεταλλάξεων κοντά ή μέσα στο ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών. Οι θέσεις για μεταλλαξιγένεση βασίζονται στη γνώση των πιθανών σχέσεων αλληλουχίας, δομής, λειτουργίας ή/και του καταλυτικού μηχανισμού της πρωτεΐνης. Υπολογιστικές αλγοριθμικές προβλέψεις έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για την προεπιλογή των περιοχών στόχων. Με αυτόν τον τρόπο έγινε και η δημιουργία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης σε αυτήν την

εργασία όπου έγινε αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο (Glu378 σε Gly) (Damian-Almazon and Saab-Rincon 2009).

1.2.4 Αξιοποίηση υδατανθράκων από μικροοργανισμούς

Οι υδατάνθρακες είναι πανταχού παρόντα μόρια, τα οποία εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες. Για τους περισσότερους ζωντανούς ετερότροφους οργανισμούς, είναι μια βασική πηγή ενέργειας. Λόγω της ιδιότητάς τους να μην συμμετέχουν σε αντιδράσεις, χρησιμοποιούνται και ως αποθήκευση ενέργειας, κυρίως με τη μορφή διαφόρων πολυσακχαριτών. Οι πολυσακχαρίτες έχουν επίσης δομική λειτουργία, αφού αποτελούν βασικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι ολιγοσακχαρίτες παράγονται από αυτούς τους πολυσακχαρίτες από διάφορα καταβολικά ένζυμα (γλυκοσιδικές υδρολάσες, λυάσες πολυσακχαριτών, γλυκοσιδικές φωσφορυλάσες και εστεράσες) ή συντίθενται από αναβολικά ένζυμα (γλυκοζυλο-τρανσφεράσες, τρανσγλυκοσιδάσες και γλυκοσιδικές φωσφορυλάσες) παίζοντας συχνά ρόλο σηματοδοτικών μορίων. Μεσολαβούν στην επικοινωνία μεταξύ εξωκυτταρικού και ενδοκυτταρικού διαμερίσματος, προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση. Αν και ο αριθμός των συνηθέστερων σακχάρων δεν υπερβαίνει κατά πολύ τον αριθμό των φυσικών αμινοξέων, το φάσμα των συνδυασμών τους είναι πολύ πιο ευρύ. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε κατάλοιπο σακχάρου φέρει πολλές ομάδες υδροξυλίου, οι οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν ανεξάρτητα για προσάρτηση άλλης χαρακτηριστικής ομάδας υδατάνθρακα ή μη. Αυτό το γεγονός οδηγεί σε μια πληθώρα ολιγοσακχαριτών που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα. Παρά την πολυπλοκότητα της σύνθεσης και της δομής, σε όλους τους ζώντες οργανισμούς, τόσο η σύνθεση ολιγοσακχαριτών όσο και η αποικοδόμηση, ελέγχονται με ακρίβεια σε διάφορα επίπεδα. Η σύνθεση ολιγοσακχαριτών συνήθως προχωρά από ένα ενεργοποιημένο πρόδρομο και καταλύεται από γλυκοσυλοτρανσφεράσες (GTs). Οι πολυσακχαρίτες και οι ολιγοσακχαρίτες αποικοδομούνται από διάφορους μηχανισμούς. Ορισμένοι από αυτούς υποβάλλονται σε διάσπαση οξειδοαναγωγάσης αλλά η πιο συχνή είναι η υδρόλυση που προκαλείται από ένδο- και έξω-δρώντες γλυκοζιδικές υδρολάσες (GHs). Έχει αποδοθεί πολύ λιγότερη προσοχή στην περαιτέρω τροποποίηση των γλυκοσιδικών

δεσμών, φωσφορόλυση, που είναι ανάλογη με υδρόλυση αλλά στην περίπτωση αυτή, το ρόλο του νερού κατέχει ένα ανόργανο φωσφορικό ιόν. Η φωσφορολυτική επεξεργασία των γλυκοσίδων καταλύεται από τις λεγόμενες γλυκοζιδικές φωσφορυλάσες (GPs) (Puchart 2015).

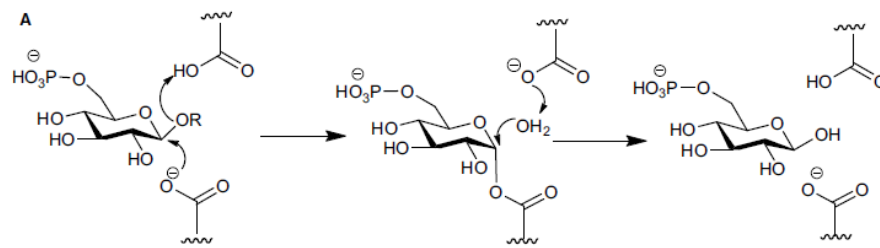
1.2.5 Το ένζυμο 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάση (6-phospho-β-glycosidase, GH1)

Το *Gram*-θετικό βακτήριο εδάφους *Bacillus subtilis* είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει μια μεγάλη ποικιλία υδατανθράκων, μεταξύ των οποίων αρκετές γλυκάνες ως μοναδική πηγή άνθρακα. Για την αξιοποίηση του άνθρακα από πηγές πολυμερών, το κύτταρο πρέπει να συνθέτει εξωκυτταρικά ένζυμα τα οποία αποικοδομούν τα πολυμερή και τα oligομερή που πρέπει να μεταφερθούν με ειδικά συστήματα πρόσληψης και να εισαχθούν στο μεταβολικό μονοπάτι. Η προτιμώμενη πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη και η έκφραση γονιδίων και οπερονίων των οποίων τα γονιδιακά προϊόντα εμπλέκονται στη χρησιμοποίηση εναλλακτικών πηγών άνθρακα ρυθμίζεται αυστηρά. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση γίνεται από συγκεκριμένο υπόστρωμα και η καταστολή προκαλείται από το ίδιο το προϊόν (πηγή άνθρακα) (καταστολή καταβολικού άνθρακα, carbon catabolite repression [CCR]) (Tobisch, Stülke, and Hecker 1999). Πολλά αερόβια βακτήρια του εδάφους διαθέτουν ένα φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από: το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλο-εξαρτώμενου συστήματος φωσφο-τρανσφεράσης (phosphotransferase system, PTS), όπου συμμετέχει στον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Ο γενικός μηχανισμός του PTS έχει ως εξής: μια φωσφορική ομάδα από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) μεταφέρεται στο ένζυμο I (EI) του PTS το οποίο με τη σειρά του μεταφέρεται στον πρωτεϊνικό μεταφορέα φωσφορικής ομάδας (HPr). Η φωσφο-HPr μεταφέρει στη συνέχεια την φωσφορική ομάδα σε ένα σακχαρο-ειδικό σύμπλοκο περμεάσης (ένζυμο EII / EIIB) (Postma, Lengeler, and Jacobson 1993). Τα σύμπλοκα EII αντιπροσωπεύουν τις ειδικές για τα σάκχαρα περμεάσες, οι οποίες αποτελούνται από τρεις ή τέσσερις υπομονάδες όπου είτε συντήκονται σε απλές πολυδομικές πρωτεΐνες είτε σχηματίζουν επιμέρους πολυπεπίδια. Οι πρωτεΐνες του PTS μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό (το φωσφορυλικό δότη) στον υδατάνθρακα που

πρόκειται να μεταφερθεί (Tobisch, Stülke, and Hecker 1999). Δύο βασικά συστατικά αυτού του συστήματος είναι (1) μια διαμεμβρανική φωσφοτρανσφεράση, η οποία φωσφορυλιώνει τις ολιγογλυκάνες ενώ τις μεταφέρει εντός του κυττάρου και (2) μία ενδοκυτταρική ευρείας εξειδίκευσης GH1 β-φωσφο-γλυκοζιδάση, η οποία υδρολύει τις φωσφο-ολιγογλυκάνες που προκύπτουν. Η οικογένεια 1 των γλυκοζυλο υδρολασών περιλαμβάνει ένζυμα με διαφορετικές προτιμήσεις ως προς το υπόστρωμα: β-γλυκοζιδάσες με ευρεία εξειδίκευση, 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσες και 3-γαλακτοσιδάσες, μυροσινάσες και λακτάσες. Η ανάλυση του ενεργού κέντρου επιβεβαίωσε την παρατήρηση ότι οι μικρές διαφορές στη δομή και όχι σε μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης μπορεί να είναι υπεύθυνες για τη μεγάλη ποικιλία επιφανειών που παρατηρούνται στις γλυκοζιδάσες (Moracci et al. 1996).

Τα ένζυμα της οικογένειας GH1 χρησιμοποιούν έναν πρότυπο μηχανισμό διπλής μετατόπισης δύο σταδίων που περιλαμβάνει ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται και υδρολύεται μέσω μεταβατικών καταστάσεων ιόντων οξυκαρβενίου. Η δραστική θέση, συνήθως, περιέχει ένα ζεύγος πολύ συντηρημένων γλουταμινικών οξέων, το ένα από τα οποία λειτουργεί ως καταλύτης οξέος / βάσης, πρωτονιώνει το γλυκοσιδικό οξυγόνο στο πρώτο στάδιο. Το άλλο γλουταμινικό λειτουργεί ως καταλυτικό πυρηνόφιλο, προσβάλλοντας το ανωμερικό κέντρο του υποστρώματος και σχηματίζοντας ένα ομοιοπολικό γλυκοζυλο-ενδιάμεσο ενζύμου κατά το σπάσιμο του γλυκοσιδικού δεσμού. Αυτό το ενδιάμεσο υποβάλλεται έπειτα σε έκθεση με νερό, με βοήθεια βάσης από τον καταλύτη οξέος / βάσης, απελευθερώνοντας το προϊόν σακχάρου με καθαρή συγκράτηση της ανωμερικής διαμόρφωσης, όπως φαίνεται για μία 6-φωσφογλυκοσιδάση (Kwan et al. 2016) στο **Σχήμα 1.2**.

Το ένζυμο για την συγκεκριμένη μελέτη απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό *Geobacillus* sp. SP24, οποίος συλλέχθηκε σε ένα δείγμα 101 θερμόφιλων βακτηριακών στελεχών από ηφαιστιογενές περιβάλλον (Σαντορίνη, Αιγαίο, Ελλάδα) και πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του δυναμικού της ενζυμικής αποικοδόμησης βιομάζας. Το 80% των στελεχών είχαν ξυλανολυτική ικανότητα ενώ μόνο τα οκτώ από αυτά μπορούσαν ταυτόχρονα να υδρολύουν την κυτταρίνη.



Σχήμα 1.2: Μηχανισμός 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσης από GH1: για το Sry1599 το πυρηνόφιλο είναι Glu366 και ο καταλύτης οξέος/βάσης Glu165 (Kwan et al. 2016).

Το στέλεχος SP24, όπου είχε περισσότερο από 99% στο 16S rRNA ομοιότητα με *Geobacillus* sp. μελετήθηκε περαιτέρω για τη μοναδική της ικανότητα να παρουσιάζει ταυτόχρονα δραστηριότητες όπου καταλύονται από κυτταρινάσες, ξυλανάσες, β-γλυκοζιδάσες και β-ξυλοζιδάσες. Τα επίπεδα παραγωγής αυτών των ενζύμων μπορούν να αυξηθούν περαιτέρω σε καλλιέργειες βιοαντιδραστήρων, καθώς αποκάλυψαν σημαντικές εξαρτήσεις από τα επίπεδα αερισμού και αποδίδουν σε κατάλληλα ενζυμικά μίγματα για διάφορες βιοτεχνολογικές και ερευνητικές εφαρμογές. (Stathoroulou et al. 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.3
ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ ΔΟΜΩΝ

1.3.1 Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής πρωτεϊνών *in silico*.

Έως τον Οκτώβριο του 2018, η βάση δεδομένων TrEMBL της UniProt (www.uniprot.org) περιείχε πάνω από 126 εκατομμύρια αλληλουχίες πρωτεϊνών (automatically annotated, not reviewed). Αξιοσημείωτο είναι ότι η πρωτεϊνική βάση δεδομένων [Protein Data Bank (PDB), www.rcsb.org] περιέχει μόλις πάνω από 150.000 πειραματικά προσδιορισμένες τρισδιάστατες (3D) δομές. Οι διαρκώς αυξανόμενοι ρυθμοί ταυτοποίησης νέων αμινοξικών ακολουθιών δεν ακολουθούν τους αντίστοιχους ρυθμούς προσδιορισμού των 3D δομών, με αποτέλεσμα να αυξάνει το έλλειμα γνώσης μεταξύ μιας πρωτεϊνικής αλληλουχίας και της λειτουργίας της θέτοντας μεγάλες προκλήσεις στους ερευνητές. Η πρόοδος στις υπολογιστικές τεχνικές για την πρόβλεψη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών μπορούν να συρρικνώσουν σημαντικά αυτό το κενό (Kelly et al. 2015). Οι υπολογιστικές μέθοδοι για την πρόβλεψη των 3D πρωτεϊνικών δομών διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, με βάση τη διαθεσιμότητα προτύπων δομών στη βιβλιοθήκη της PDB. Στη συγκριτική μοντελοποίηση (comparative modelling, CM), τα εξελικτικά σχετιζόμενα ομόλογα πρότυπα αναγνωρίζονται από συγκρίσεις αλληλουχιών ή προφίλ αλληλουχιών και μοντέλα υψηλής ανάλυσης μπορούν να δημιουργηθούν απλά αντιγράφοντας το πλαίσιο των δομών του προτύπου ή ικανοποιώντας τους χωρικούς περιορισμούς που συλλέγονται από τις δομές των προτύπων. Επειδή οι πρωτεΐνες διαφορετικής εξελικτικής προέλευσης μπορούν να έχουν παρόμοια δομή, σχεδιάζονται μέθοδοι «ύφανσης» των πρωτεϊνικών δομών με βάση τις 3D δομές άλλων πρωτεϊνών με γνωστή δομή, έτσι ώστε να ταιριάζουν με την αλληλουχία αναζήτησης, με απώτερο σκοπό την αναγνώριση παρόμοιου διπλώματος με την μελετώμενη πρωτεΐνη ακόμα και όταν δεν υπάρχει εξελικτική σχέση μεταξύ αυτής και της πρότυπης πρωτεΐνης. Τέλος, για τις πρωτεΐνες όπου γίνεται κάποια αναζήτηση, οι οποίες δεν έχουν δομικά συγγενείς πρωτεΐνες στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB, η δομή πρέπει να κατασκευαστεί εξ'αρχής με μοντελοποίηση, *ab initio*. Αυτή είναι η πιο δύσκολη περίπτωση και η μέθοδος εφαρμόζεται με επιτυχία κυρίως όταν πρόκειται για μικρές πρωτεΐνες με λιγότερο από 120 αμινοξέα. Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται μια μελέτη αξιολόγησης των αλγορίθμων βάσει των οποίων γίνεται η πρόβλεψη της 3D δομής πρωτεϊνών (Critical Assessment of Protein Structure Prediction, CASP). Τα αποτελέσματα της

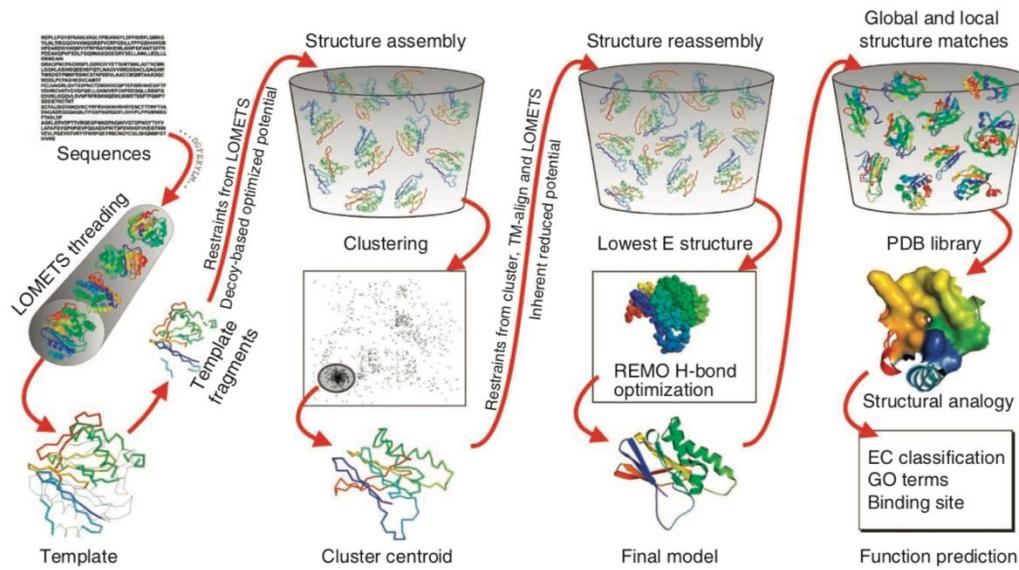
μελέτης αυτής έδειξαν σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς τις σύνθετες προσεγγίσεις που εφαρμόζονται στην πρόβλεψη της πρωτεϊνικής δομής, οι οποίες συνδυάζουν τις διάφορες τεχνικές όπως threading, *ab initio* μοντελοποίηση και προσεγγίσεις βελτίωσης δομής σε ατομικό επίπεδο (Roy, Kucukural, and Zhang 2010).

1.3.2. Εξυπηρετητές για πρόβλεψη τρισδιάστατων δομών

Για την μοντελοποίηση 3D πρωτεϊνικών δομών έχουν αναπτυχθεί αυτοματοποιημένοι διαδικτυακοί εξυπηρετητές οι οποίοι αξιοποιούν τόσο την ομολογία που παρουσιάζει μια πρωτεΐνη στην αμινοξική της ακολουθία όσο και τη δομική ομολογία με άλλες πρωτεΐνες της οικογενείας από την οποία μπορεί να προέρχονται. Τέτοιοι εξυπηρετητές έχουν συγκεντρωθεί σε μια πλατφόρμα όπως αυτή του “Protein Model Portal”(Arnold et al. 2009), η οποία περιλαμβάνει το SWISS-MODEL (Waterhouse et al. 2018), M4T (Fernandez-Fuentes et al. 2007), InFOLD2 (D. B. Roche et al. 2011), Phyre2 (Kelly et al. 2015) και i-TASSER (Roy, Kucukural, and Zhang 2010), εφαρμόζοντας τα αντίστοιχα πρωτόκολλα. Από τους παραπάνω εξυπηρετητές αναλύονται διεξοδικότερα ο i-Tasser και ο Phyre2, οι οποίοι και χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

Iterative Threading ASSEmbly Refinement, i-TASSER:

Ο εξυπηρετητής i-TASSER, αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα και χρησιμοποιεί προσομοιώσεις συναρμολογημένων μοτίβων «ύφανσης» (threading assembly simulations), σε συνδυασμό με στοίχιση μοτίβων «ύφανσης», εμπλουτισμένων με δευτεροταγή στοιχεία και *ab initio* Monte Carlo προσομοιώσεις για της μη στοιχισμένες περιοχές. Η πορεία που ακολουθεί ο i-TASSER αποτελείται από τέσσερα γενικά βήματα: την ταυτοποίηση του μοτίβου «ύφανσης», την επαναληπτική προσομοίωση συναρμολόγησης της δομής (iterative structure assembly simulation), την επιλογή και τη βελτίωση του μοντέλου καθώς και τη σήμανση αυτού με λειτουργικά χαρακτηριστικά που οφείλονται στη δομή (Yang et al., 2014).

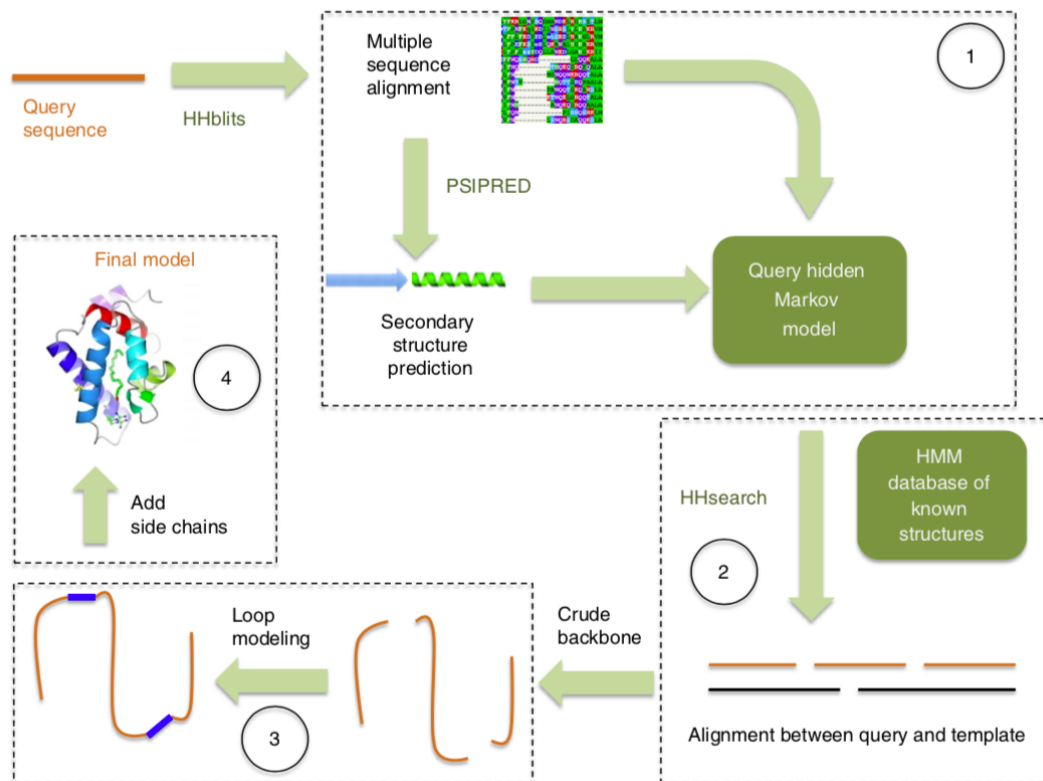


Σχήμα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου εφαρμογής του i-Tasser για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής δομής και λειτουργίας. Οι πρωτεϊνικές αλυσίδες χρωματίζονται από μπλέ έως κόκκινο χρώμα για το αμινοτελικό έως το καρβοξυτελικό άκρο, αντίστοιχα (Roy, Kucukural, and Zhang 2010).

Phyre2:

Ο εξυπηρετητής Phyre2 χρησιμοποιείται επίσης εκτενώς για την πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής μιας μοναδικής πρωτεϊνικής αλληλουχίας αλλά ταυτόχρονα μπορεί να χρησιμοποιηθεί με διάφορους τρόπους ανάλογα με την έρευνα που διεξάγει ο χρήστης. Οι προηγμένες δυνατότητες του Phyre2 περιλαμβάνουν: 1) την εφαρμογή Backphyre, για αναζήτηση μιας δομής έναντι μιας σειράς γονιδιωμάτων, 2) την υποβολή ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών αλληλουχιών για μοντελοποίηση (batch method), 3) την «ύφανση» ένα-προς-ένα από τα αμινοξέα της αλληλουχίας της προς μελέτη πρωτεΐνης επί μιας δομής που έχει ορίσει ο χρήστης 4) Phyre alarm, για αυτόματες σαρώσεις με σκοπό την αναζήτηση πρωτεϊνών που είναι δύσκολο να μοντελοποιηθούν, οι οποίες πραγματοποιούνται σε εβδομαδιαία βάση και 5) Phyre Investigator για εμπειρισταωμένη ανάλυση της ποιότητας του μοντέλου, της πιθανής λειτουργίας της πρωτεΐνης με βάση τη δομή αυτού και των επιπτώσεων που μπορεί να φέρουν ενδεχόμενες μεταλλάξεις (Kelly et al. 2015). Στο **Σχήμα 1.4** που ακολουθεί περιγράφεται σχηματικά η πορεία της

διαδικασίας που ακολουθείται από τον εξυπηρετητή για την πρόβλεψη της τελικής δομής. Σε κάθε στάδιο χρησιμοποιούνται εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων καθώς και συνδυασμός αυτών καθώς η διαδικασία βρίσκεται σε εξέλιξη έως τέλος και να δοθεί μια αξιόπιστη τρισδιάστατη δομή της μελετώμενης πρωτεΐνης.



Σχήμα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας που ακολουθεί το Phyre2 στην οποία υποδεικνύονται τα αλγοριθμικά στάδια. Οι αριθμοί των σταδίων παρουσιάζονται σε κύκλους και επί μέρους στάδια αυτών περιβάλλονται από διακεκομμένα πλαίσια. Στάδιο 1- συλλογή ομόλογων αλληλουχιών: η προς μελέτη αλληλουχία σαρώνεται έναντι ειδικά επεξεργασμένης nr20 (εξαιρουμένων των ακολουθιών με παραπάνω από 20% κοινή ταυτότητα στην αμινοξική ακολουθία) βάσης δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών με HHblits. Η προκύπτουσα στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής με το PSIPRED και τόσο η στοίχιση όσο και η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής συνδυάζονται σε ένα μοντέλο Markov (hidden Markov model-HMMs). Στάδιο 2- βιβλιοθήκη αναζήτησης μοτίβων διπλώματος: στη συνέχεια η προς μελέτη αλληλουχία ανιχνεύεται σε μια βάση δεδομένων από HMMs γνωστών πρωτεϊνικών δομών. Οι επιλεγμένες στοίχισεις από αυτή την αναζήτηση χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μοντέλων με βάση μόνο τα άτομα της κύριας αλυσίδας. Στάδιο 3- μοντελοποίηση βρόχου: ακολουθεί διόρθωση κάποιων περιοχών με μοντελοποίηση των

αμινοξέων ως βρόχων. Στάδιο 4- προσθήκη πλευρικής αλυσίδας: προστίθενται οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων για να παραχθεί το τελικό μοντέλο Phyre2 (Kelly et al. 2015).

1.3.3. Γνωστές 3D δομές 6-φωσφο-β-γλυκοζιδασών.

Με σκοπό την εύρεση των 6-φωσφο-β-γλυκοσιδασών για τις οποίες έχουν ήδη πραγματοποιηθεί δομικές μελέτες, έγινε αναζήτηση στη βιβλιογραφία και στις σχετικές βάσεις δεδομένων (Protein Data Bank). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχουν δομές οι οποίες αφορούν είτε στα φυσικά ένζυμα είτε σε ένζυμα που φέρουν σημειακές μεταλλάξεις σε αμινοξέα του καταλυτικού τους κέντρου, τα περισσότερα εξ'αυτών παρουσιάζονται ως σύμπλοκα με ανάλογα υποστρώματος. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι μόνο ένα από τα ένζυμα με γνωστή 3D δομή προέρχεται από θερμόφιλο μικροοργανισμό, ενώ το σχετικό άρθρο που περιγράφει αυτά τα αποτελέσματα δεν έχει ακόμα δημοσιευθεί σε έγκριτο περιοδικό (**Πίνακας 1.2**).

Πίνακας 1.2: Παρουσίαση καταλόγου 6-φωσφο-β-γλυκοζιδασών των οποίων η 3D δομή είναι γνωστή.

PDB codes	Βακτήρια	Μετάλλαξη	Προσδέτης (ανάλογο υποστρώματος)
3PN8	<i>Streptococcus mutans</i> UA159		
4F66	<i>Streptococcus mutans</i> UA159		Beta-D-glucose-6-P
3QOM	<i>Lactobacillus plantarum</i>		
4F79	Human microbiome lactic acid bacteria	E375Q	
1UP4 monoclonic form	<i>Thermotoga maritima</i>		
1UP6 tetragonal form	-//-		Manganese, NAD ⁺ , glucose-6-P
1UP7 tetragonal form	-//-		NAD, glucose-6-P
4IPL	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
4IPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		Thiocollobiose-6P
4GZE Apo form	<i>Lactobacillus plantarum</i>		
156Y	<i>Geobacillus Stearothermophilus</i>		
2XHY	<i>E.coli</i>		
5C3M of Gan4C GH4, 6-phospho-b- glucosidase	<i>Geobacillus Stearothermophilus</i>		

4GPN	<i>Streptococcus mutans</i> UA150	E375Q	Gentiobiose-6-P
1PBG	<i>Lactobacillus lactis</i>		
2PBG form B	<i>Lactobacillus lactis</i>		
3PBG form C	<i>Lactobacillus lactis</i>		
4PBG form CST	<i>Lactobacillus lactis</i>		
4B3K	<i>Streptococcus pyogenes</i>		
4B3L	<i>Streptococcus pyogenes</i>		
5NAQ	<i>Lactobacillus plantarum</i>		
5NAV	<i>Lactobacillus plantarum</i>	double mutant (Cys211Ser/ Cys292Ser)	
5FOO	<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M1		

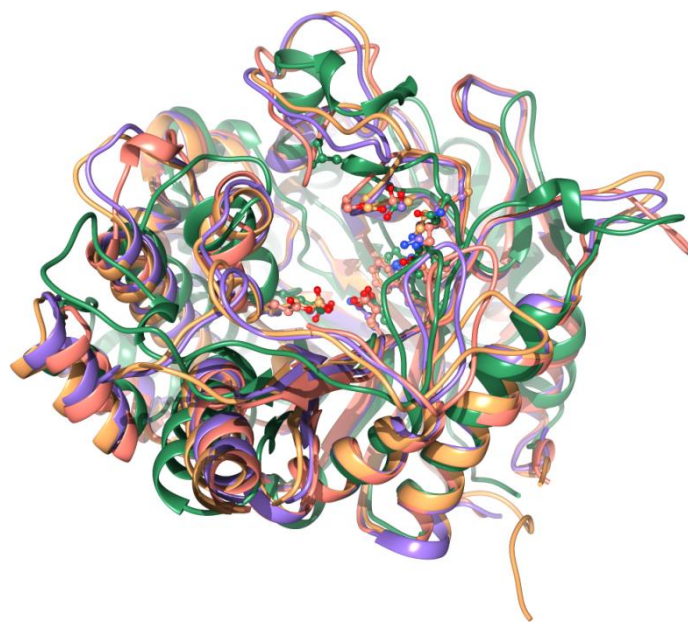
Στη συνέχεια, επελέγησαν αντιπροσωπευτικές δομές από κάθε μικροοργανισμό έτσι ώστε να αποφευχθούν επικαλύψεις και εντοπίστηκαν τα καταλυτικά αμινοξέα αυτών καθώς αμινοξέα στο περιβάλλον του καταλυτικού κέντρου (**Πίνακας 1.3**). Τα δύο καταλυτικά αμινοξέα που φέρουν την ιδιότητα του δότη πρωτονίων και του νουκλεόφιλου δέκτη υποδεικνύονται με έντονα γράμματα ενώ οι διαφορές στην αμινοξική ακολουθία με ροζ σκίαση.

Πίνακας 1.3: Καταλυτικά αμινοξέα και αμινοξέα και στο περιβάλλον του καταλυτικού ήδη γνωστών δομών της 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσης.

PDB code	Αλυσίδα							
4IPL <i>Streptococcus pneumoniae</i>	A	E171	E364	S422	W415	S424	K430	Y432
4B3K <i>Streptococcus pyogenes</i>	C	E165	E366	S423	W416	L425	N430	Y432
4GPN <i>Streptococcus mutans</i>	B	E176	Q375	S430	W423	G432	K438	Y440
4GZE <i>Lactobacillus plantarum</i>	A	E180	E375	A430	W423	S432	K438	Y440

Υπέρθεση των τρισδιάστατων δομών έδειξε ότι η συνολική διαμόρφωση των ενζύμων είναι παρόμοια όπως και η θέση της καταλυτικής περιοχής χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Τόσο η δομή των 6-φωσφο-β-γλυκοζιδασών

συνολικά όσο και τα αμινοξέα γύρω από το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών, τα οποία είναι συντηρημένα σε μεγάλο βαθμό για αυτήν την οικογένεια ενζύμων, φαίνεται να διατηρούν τη διαμόρφωσή τους (**Σχήμα 1.4**). Ελάχιστες μεταβολές παρατηρούνται στα δευτεροταγή στοιχεία και οι πιο σημαντικές αφορούν εύκαμπτες περιοχές-βρόχους.



Σχήμα 1.4: Σχηματική απεικόνιση των γνωστών δομών του ενζύμου 6-φωσφο-γλυκοσιδάση με χρήση του προγράμματος γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004). Παρουσιάζονται οι δομές με PDB code: 4GZE (ανοιχτό πορτοκαλί), 4GPN (μωβ), 4B3K (πράσινο) και 4IPL σομόν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων

Η καλλιέργεια βακτηρίων χρησιμοποιείται για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας ενός πλασμιδίου ή μετά τον μετασχηματισμό τους κατά την κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς ώστε να επιλεχθούν τα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί.

Όλα τα υλικά παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκαν σε κλίβανο ατμού. Στη συνέχεια ανάλογα με το πείραμα προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό.

Το υγρό μέσο, LB (Luria Bertani), που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των βακτηρίων είχε την εξής σύσταση:

- 10 gr ανά λίτρο casein-tryptone
- 5 gr ανά λίτρο εκχύλισμα ζύμης
- 10 gr NaCl ανά λίτρο.

Το pH ρυθμίζεται στο 7 με διάλυμα NaOH.

Για να παρασκευαστεί στερεό θρεπτικό μέσο πρέπει να προστεθούν στα παραπάνω συστατικά 15 gr άγαρ/ltr. Το μίγμα αποστειρώνεται και τοποθετείται σε τρυβλία Petri όπου στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αμπικιλίνη τελικής συγκέντρωσης 100 μg/ml το οποίο ετοιμάσθηκε από αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 100 mg/ml.

2.2 Βακτηριακά στελέχη

DH5a: βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό κατά την κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς. Η παρουσία της λακτόζης στο γύρω περιβάλλον πυροδοτεί την μεταγραφή του οπερονίου *lacZ* σε βακτήρια *E. coli*. Αποτέλεσμα της μεταγραφικής δραστηριότητας του οπερονίου είναι η παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοζιδάσης που μεταβολίζει τη λακτόζη. Ωστόσο, μια μεταλλαγμένη β-γαλακτοσιδάση έχει διαγραμμένα N-καρβοξυτελικά άκρα και η

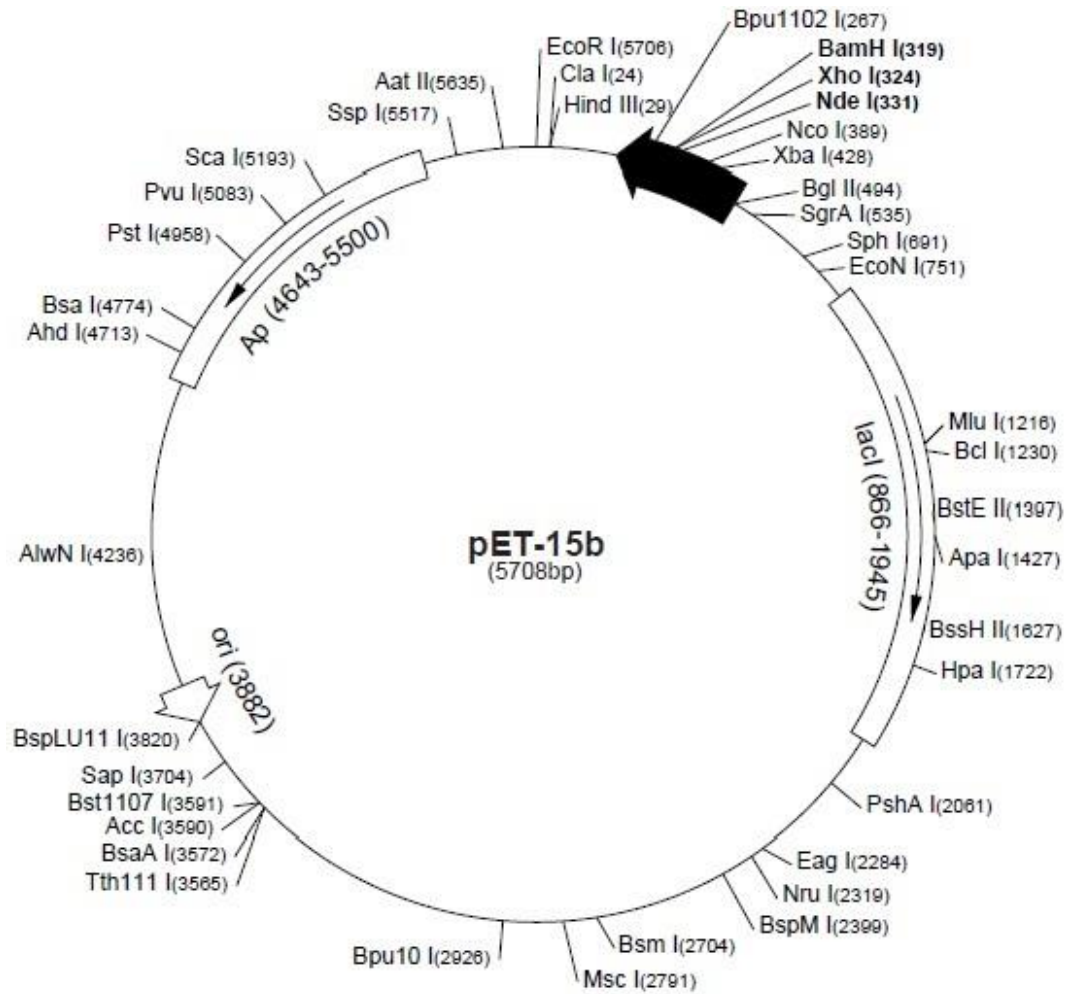
μετάλλαξη αυτή, είναι σε θέση να σχηματίσει ένα τετραμερές που βρίσκεται στην ανενεργή του κατάσταση. Αυτή η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης, ωστόσο μπορεί να επιστρέψει πλήρως στην ενεργό κατάσταση του τετραμερούς παρουσία ενός N-καρβοξυτελικού θραύσματος της πρωτεΐνης, το α-πεπτίδιο. Η αποκατάσταση της λειτουργίας της μεταλλαγμένης β-γαλακτοσιδάσης από το α-πεπτίδιο ονομάζεται α-συμπληρωματικότητα. Έτσι, τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια αποκαθιστούν στα μετασχηματισμένα βακτήρια την ενεργότητα του ενζύμου γιατί οι περισσότεροι πλασμιδιακοί φορείς φέρουν αλληλουχίες που συμπληρώνουν την μετάλλαξη στο γονίδιο *lacZ* και παρουσιάζουν χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Μία πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (MCS) υπάρχει εντός της αλληλουχίας *lacZ* στον πλασμιδιακό φορέα. Αυτή η αλληλουχία μπορεί να κοπεί με ένζυμο περιορισμού για την εισαγωγή του ξένου DNA. Όταν ένας πλασμιδιακός φορέας που περιέχει ξένο DNA λαμβάνεται από τα *E. coli* ξενιστή, η α-συμπλήρωση δεν συμβαίνει, ως εκ τούτου, δεν παράγεται ένα λειτουργικό ένζυμο β-γαλακτοσιδάσης. Έτσι, στα μετασχηματισμένα βακτήρια που έχουν δεχθεί τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια το γονίδιο της β-γαλακτιζιδάσης δεν μπορεί να μεταφραστεί. Το αποτέλεσμα είναι ότι αυτές οι βακτηριακές αποικίες είναι λευκές, παρουσία X-gal (αδρανές χρωμογόνο υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση) (Miller 1992)

2.3 Πλασμιδιακοί φορείς

Τα βακτήρια διαθέτουν πλασμίδια, τα οποία έχουν τις κατάλληλες ιδιότητες για να λειτουργούν ως φορείς για την κλωνοποίηση τμημάτων εξωγενούς DNA σε αυτά. Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά μόρια DNA, μήκους μόλις λίγων χιλιάδων ζευγών βάσεων. Σε κάθε βακτηριακό κύτταρο μπορεί να υπάρχουν από ένα έως αρκετές εκατοντάδες πλασμίδια και αντιγράφονται ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του βακτηρίου-ξενιστή. Το γεγονός ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά βρίσκονται στα πλασμίδια και όχι στο χρωμοσωμικό DNA δεν είναι τυχαίο. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά προϋποθέτει σχετικά μεγάλες ποσότητες ενζύμων που τα καταστρέφουν. Επειδή όμως τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα βρίσκονται σε πλασμίδια, υπάρχουν σε πολύ περισσότερα αντίγραφα από ότι αν βρισκόταν στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Τα πλασμίδια, λόγω του μικρού τους

μεγέθους κα της παρουσίας σε αυτά γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, είναι ιδανικοί φορείς κλωνοποίησης. Επιπλέον, για όλα τα πλασμίδια είναι εύκολο να επιτευχθεί η απομόνωσή τους από τα βακτήρια (Watson, Caudy, Myers 2007).

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET-15b της εταιρίας Novagen φαίνεται στην **Εικόνα 2.2**



Εικόνα 2.1: ο πλασμιδιακός φορέας pET-15b, 5708 ζευγών βάσεων. Στην εικόνα φαίνεται η περιοχή ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη για την επιλογή του πλασμιδιακού φορέα στα βακτηριακά κύτταρα.

2.4 Κρυσταλλογραφία

Κατά τις δοκιμασίες κρυστάλλωσης του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν πολλές δοκιμές με μια πληθώρα αντιδραστηρίων.

Χημικά/ Πρωτεΐνη

1. 6-φώσφο-β-γλυκοσιδάση
2. Αζίδιο του νατρίου (NaN_3) ως συντηρητικό στα χρησιμοποιούμενα χημικά διαλύματα, σε τελική συγκέντρωση 0,02% (w/v)
3. 0,2M ιωδιούχο νάτριο
4. Αιθυλενογλυκόλη 10% και 5% (v/v)
5. Διοξάνη
6. Γκυκερόλη
7. Οκτυλ-α/β-γλυκοσιδίο
8. Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) 3350,400,4000,
9. 0,1M Bis-Tris propane ($\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$) pH= 7,5
10. Υπερκάθαρο νερό (HPLC grade H_2O)
11. Αντιδραστήρια της εταιρίας Hampton, που χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα (additives) στις κρυσταλλώσεις

Εξοπλισμός

- Στερεοσκόπιο εξοπλισμένο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή, 160X, Leica MZ16 (Leica Microsystems GmbH)
- πιπέτες Gilson P1000-P10 (Gilson, Γαλλία)
- μετρητής pH, Metrohm 744 (Metrohm AG)
- Αναλυτικός ζυγός (Sartorius $\pm 0,0005$ g)
- Συσκευή ανάδευσης (Vortex)
- Ρομπότ κρυστάλλωσης Oryx Nano, Douglas Instruments, UK, υποδομή του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

Εικόνα 2.2. Αυτόματο σύστημα κρυσταλλογένεσης



- Συμβατική μονάδα ακτίνων Χ, υποδομή του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών



Εικόνα 2.3. Συμβατική γεννήτρια ακτίνων Χ, υποδομή εγκατεστημένη στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Η υπερέκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί από την ερευνητική ομάδα του Δρ. Χατζηνικολάου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, τομέας Βοτανικής, του τμήματος Βιολογίας στο Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται λεπτομερέστερα ανά μέθοδο παρακάτω.

2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το MACHERY-NAGEL NucleoSpin Plasmid σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας.

2.6 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Μετασχηματισμός είναι ο μηχανισμός κατά τον οποίον ένα βακτήριο δέχεται τμήματα ελεύθερου DNA προερχόμενα από άλλη πηγή (πλασμίδια). Λίγα βακτήρια

είναι ικανά πρόσληψης εξωγενούς DNA *in vivo*, είναι δηλαδή επιδεκτικά κύτταρα (competent cells). Τα περισσότερα είδη βακτηρίων έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνουν και να ενσωματώνουν “ξένο” DNA από το θρεπτικό τους υλικό, το οποίο όμως αποικοδομείται στην προσπάθεια ενσωμάτωσής του στο βακτηριακό γονιδίωμα. Οι περισσότερες μέθοδοι βακτηριακού μετασχηματισμού βασίζονται στις παρατηρήσεις του Mendel και της Higa (1970), οι οποίοι έδειξαν ότι τα βακτήρια που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με παγωμένα διαλύματα CaCl₂ και στη συνέχεια θερμάνθηκαν για λίγο μπορούσαν να διαμολυνθούν ευκολότερα με το DNA του βακτηριοφάγου λ (Sambrook, Fritsch, Maniatis 1989). Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια από τον Cohen, ο οποίος παρατήρησε πως η ικανότητα κυττάρων *E. coli* να προσλαμβάνουν πλασμιδιακό DNA βελτιώνεται με τα ιόντα Ca⁺⁺ (Cohen, Chang, and Hsu 1972). Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων επιτυγχάνεται με την προσωρινή αλλαγή της θερμοκρασίας (θερμικό σοκ) από τους 37°C στους 42°C .

Στην παρούσα εργασία μετασχηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα BL21 του βακτηρίου *E. coli*. Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Μεταφορά ενός δείγματος δεκτικών κυττάρων από τους -80°C σε πάγο.
- Επώαση για 10 λεπτά ώσπου να πραγματοποιηθεί η τήξη του δείγματος.
- Προσθήκη 10 μl πλασμιδιακού DNA και ήπια ανάδευση.
- Επώαση σε πάγο για 30 λεπτά, κατά την οποία το DNA έρχεται σε επαφή με τα βακτήρια.
- Τοποθέτηση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 42°C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα και άμεση μεταφορά στον πάγο όπου παραμένει για 2 λεπτά με αποτέλεσμα τα βακτήρια να υφίσταται θερμικό σοκ.
- Προσθήκη 180 μl υγρού LB με πολύ ήπια ανάδευση.
- Επίστρωση των κυττάρων σε αποστειρωμένο τρυβλίο Petri το οποίο περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Επώαση ολονύχτια στους 37°C για την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων βακτηριακών αποικιών.

2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους δεδομένου πως είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σε πήκτωμα, το DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, μετατοπίζεται προς την άνοδο όπου βρίσκεται ο θετικός πόλος. Ο ρυθμός μετατόπισης του DNA καθορίζεται από τις εξής παραμέτρους:

1. από το μέγεθός του
2. την διαμόρφωσή του (υπερελικωμένο, γραμμικό)
3. τη συγκέντρωση της αγαρόζης
4. την τάση που εφαρμόζεται
5. τη σύσταση και την ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης.
6. τη θερμοκρασία

Για την ανίχνευση του DNA χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και να καθιστά το DNA ορατό υπό υπεριώδη ακτινοβολία (Sambrook, Fritsch, Maniatis 1989).

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από φύκη. Τα πήκτωμα αγαρόζης δημιουργούνται σε καλούπια με τήξη της αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα (1xTAE) μέχρις ότου να δημιουργηθεί ένα διαυγές, διαφανές διάλυμα. Τα πήκτωμα αγαρόζης φέρουν πόρους, που το μέγεθός τους εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης.

Το διάλυμα της αγαρόζης ζεσταίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού ώστε να λιώσει η αγαρόζη και στη συνέχεια προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,1 μg/ml. Ύστερα, το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει επίσης ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE. Η διάρκεια και η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 1-2h και 100V, αντίστοιχα.

Για το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν:

- Αγαρόζη (συγκέντρωσης 1% για ηλεκτροφόρηση DNA).

- Ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE από πυκνό διάλυμα 50x [200mM Tris hydroxymethyl aminomethane, 200mM CH₃COOH, 1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) pH 8.0]

2.8 Υπερέκφραση πρωτεϊνών

Για την αύξηση του αριθμού των κυττάρων σε μεγάλη συγκέντρωση πραγματοποιείται σταδιακή αύξηση της καλλιέργειας. Αρχικά, με τη βοήθεια ενός ρύγχους πιπέτας έγινε εμβολιασμός μιας αποικίας μέσα σε 10 ml αποστειρωμένου θρεπτικού LB με 100 µg/mL αμπικιλίνη και επώαστηκε στους 37°C υπό ολονύκτια ανάδευση ώστε να δημιουργηθεί η προκαλλιέργεια. Στη συνέχεια τα 10 mL μοιράζονται σε δύο κωνικές φιάλες των 250 mL όπου περιείχαν 140 mL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού με 100 µg/mL αμπικιλίνη και επωάζονται στους 37°C για 2 ώρες περίπου έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας φθάσει στο 0,800 σε μήκος κύματος 280 nm. Τέλος το περιεχόμενο της κάθε κωνικής εγχέεται σε μεγαλύτερη όπου περιέχει ποσότητα 1 L αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB με 100 µg/mL αμπικιλίνη. Οι δυο μεγάλες φιάλες τοποθετούνται σε επωαστήρα υπό ολονύκτια ανάδευση και σε θερμοκρασία 18 °C.

Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιείται ύστερα από φυγοκέντρηση 10.000 στους 15°C για 20 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και αποθηκεύεται το ίζημα όπου περιέχει τα κύτταρα. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται έως ότου περάσουν από την φυγόκεντρο όλα τα mL της καλλιέργειας.

2.9 Ομογενοποίηση (λύση) κυττάρων

Το πρώτο στάδιο που πρέπει να αντιμετωπιστεί ώστε να παραληφθεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη από κύτταρα είναι το σπάσιμο των περιβλημάτων των κυττάρων, είτε αυτά είναι μεμβράνες, είτε κυτταρικά τοιχώματα. Για ιστούς που περιβάλλονται από τοιχώματα όπως είναι αυτοί των φυτών ή των μικροοργανισμών μια ομογενοποίηση δεν είναι αρκετή. Μέθοδοι όπως

λειτουργία με καθαρή άμμο, υπέρηχοι, πέψη με ειδικά ένζυμα χρησιμοποιούνται συνήθως ως πιο δραστικές μέθοδοι στην διάσπαση των μεμβρανών. Όλες αυτές αποτελούν τις φυσικές μεθόδους. Παράλληλα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χημικές μέθοδοι (διαλυτοποίηση με διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος, με πυκνά διαλύματα αλάτων και ουρίας, με οργανικούς διαλύτες κ.α.) ή με ενζυμικές μέθοδοι (Γεωργάτσος-Γιουψάνης-Κυριακίδης 2001).

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας τα κυτταρικά τοιχώματα έσπασαν με την χρήση υπερήχων. Κατά τη διαδικασία αυτή αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος για το λόγο αυτό το διάλυμα τοποθετήθηκε σε πάγο και παρέμεινε εκεί κατά την διάρκεια του πειράματος.

2.10 Καθαρισμός πρωτεϊνών

Οι συνηθέστερες μέθοδοι για καθαρισμό πρωτεϊνών περιλαμβάνουν όλες τις μεθόδους χρωματογραφίας. Οι μέθοδοι διαχωρίζονται σύμφωνα με τις διαφορές μεταξύ των ιδιοτήτων της πρωτεΐνης που πρόκειται να καθαριστεί (η πρωτεΐνη στόχος) και των ιδιοτήτων άλλων ουσιών στο δείγμα. Παραδείγματα ιδιοτήτων πρωτεΐνης που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές μεθόδους χρωματογραφίας δίδονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.1: Ιδιότητες πρωτεϊνών για τον καθαρισμό τους με χρωματογραφικές μεθόδους.

Ιδιότητες πρωτεϊνών	Μέθοδος
Ειδική αναγνώριση προσδέτη	Χρωματογραφία συγγένειας (AC)
Σύνδεση μεταλλικών ιόντων	Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μεταλλικού ιόντος (IMAC)
Φορτίο	Χρωματογραφία ιονικής ανταλλαγής (IEX)
Μέγεθος	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (GF)
Υδροφοβικότητα	Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (HIC) Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RPC)
Ισοηλεκτρικό σημείο	Χρωματοεστίαση

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι το συνηθισμένο πρώτο στάδιο καθαρισμού όταν η πρωτεΐνη στόχος είναι σημασμένη με κάποια αλληλουχία. Εάν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμός, χρησιμοποιούνται επιπλέον μέθοδοι για την απομάκρυνση των εναπομεινουσών ακαθαρσιών ή άλλων πρωτεϊνών. Ο καθαρισμός μη επισημασμένων πρωτεϊνών συχνά απαιτεί τη χρήση αρκετών σταδίων καθαρισμού εφαρμόζοντας διαφορετικές μεθόδους με κατάλληλη σειρά (GE Healthcare 2010).

Στην παρούσα εργασία, ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε ρητίνη νικελίου. Κατά την διαδικασία αυτήν σε αλκαλικό περιβάλλον, οι πρωτεΐνες που περιέχουν έξι συνεχόμενα κατάλοιπα ιστιδίνης (6xH-tag) στην αμινοξική τους αλληλουχία, προσδένονται με υψηλή συγγένεια σε στήλη ρητίνης-νικελίου. Η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται καθώς σε αλκαλικό περιβάλλον τα κατάλοιπα ιστιδίνης φορτίζονται αρνητικά σχηματίζοντας ένα δακτύλιο που περιβάλλει τα κατιόντα νικελίου (Hochuli, Döbeli, and Schacher 1987). Για τον σκοπό αυτό, η πρωτεΐνη περιείχε την αλληλουχία ιστιδινών προκειμένου περνώντας από στήλη να δεσμευτεί στις μήτρες ρητίνης-νικελίου (Ni²⁺-NTA). Στη συνέχεια με αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου στο διάλυμα έκλουσης της στήλης έγινε η αποδέσμευση της πρωτεΐνης από αυτήν. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης για πρόσδεση στο κατιόν του νικελίου απελευθερώνοντας τις προσδεδεμένες πρωτεΐνες

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για αυτήν την διαδικασία καθαρισμού είχαν την παρακάτω σύσταση. Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης Ni-NTA (χρήση για λύση και δέσμευση):

300 mM NaCl, 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, 10 mM ιμιδαζόλιο, pH 8,0

1X Ni-NTA ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης: 300 mM NaCl, 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, 20 mM ιμιδαζόλιο, pH 8,0

1X Ni-NTA ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 300 mM NaCl, 250 mM ιμιδαζόλιο, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 50 mM, pH 8,0 (H. Roche n.d.).

2.11 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE

Για την ανάλυση και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (North). Η παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS (δωδεκακυκλοθειικού νατρίου) στο πήκτωμα, στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης και το διάλυμα Laemmli που προστίθεται στα δείγματα έχει ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να αποδιατάσσονται και να φορτίζονται αρνητικά έτσι ώστε να διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης με τη βοήθεια δύο παραγόντων πολυμερισμού: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N- τετραμεθυλαιθυλένιο-1,2-διαμίνη) το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Έτσι, σχηματίζεται ένα πλέγμα που αποτελείται από πόρους μέσα στους οποίους κινούνται οι πρωτεΐνες. Γενικά, πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίστηκε το πήκτωμα ήταν ένα «σάντουιτς» επίπεδων τζαμιών. Τα τζάμια τοποθετούνται σε ένα στήριγμα (casting frame). Το πήκτωμα αποτελείται από δύο φάσεις:

- την ανώτερη (stacking gel) στην οποία πραγματοποιείται η ευθυγράμμιση των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο
- την υποκείμενη, δηλαδή το πήκτωμα ευθυγράμμισης (separating gel).

Πρώτα παρασκευάζεται το πήκτωμα ευθυγράμμισης (separating gel). Αυτό χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 12% συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης:

Οι ποσότητες των συστατικών του είναι:

- 8 ml ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη
- 5 ml 1,25 M Tris-Cl pH 8,8
- 0,2 ml 10% APS (Ammonium Persulfate)

- 0,008 ml TEMED
- 6,8 ml H₂O

Μετά παρασκευάζεται η ανώτερη φάση του πηκτώματος (stacking gel). Οι ποσότητες των συστατικών του είναι:

- 0,83 ml ακρυλαμίδη/δισακρυλαμίδη
- 0,63 ml 1 M Tris-Cl pH 6,8
- 0,05 ml 10% APS (Ammonium Persulfate)
- 0,005 ml TEMED
- 3,45 ml H₂O

Προετοιμασία δειγμάτων

Πραγματοποιείται αποδιάταξη των δειγμάτων με τη χρήση του διαλύματος 1X Sample Buffer, το οποίο έχει την ακόλουθη σύσταση:

- 50 mM Tris-Cl pH 6,8
- 2% SDS
- 10% γλυκερόλη
- 0,1M ή 1,5% διθειοτριόλη (DTT)
- 12,5 Mm Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)
- 0,02% μπλε βρωμοφαινόλη

Ακολουθεί θέρμανση στους 100°C για 3-5 λεπτά. Τα δείγματα τοποθετούνται σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται στο πήκτωμα ευθυγράμμισης με τη χρήση ειδικής «χτένας», όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Στις θέσεις όπου δεν έχω δείγμα να φορτώσω τοποθετώ buffer με νερό επίσης ύστερα από βρασμό.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x Tris-γλυκίνης από αρχικό διάλυμα 10x με την εξής σύσταση:

- 151,43 gr Tris
- 720,7 gr γλυκίνης
- 50 gr SDS
- Νερό έως τα 5 λίτρα

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με σταθερή ένταση πεδίου 13 mA μέχρι η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης να περάσει το τέλος του ηλεκτώματος και να προχωρήσει στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (~2,5h).

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν τέσσερις (4) παρασκευές πρωτεϊνικού δείγματος (WT και mutant). Λεπτομέρειες που αφορούν αυτές τις παρασκευές συνοψίζονται στον **Πίνακα 2.2**.

Πίνακας 2.2. Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για κρυστάλλωση

α/α παρτίδας	β-GH1-6P (mg/ml) Φυσική πρωτεΐνη (wild type, WT)	β-GH1-6P E378G (mg/ml) Μετάλλαγμα (mutant)
Batch 1	20 mg/ml	-
Batch 2	35 mg/ml	35 mg/ml
Batch 3	14 mg/ml	45 mg/ml
Batch 4	33 mg/ml	69 mg/ml

2.12 Δοκιμές κρυστάλλωσης

Η επιλογή των αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης έγινε ύστερα από βιβλιογραφική αναζήτηση της Δρ Μ. Χεγκάζι, στο πλαίσιο της εργασίας της ως μεταδιδακτορική συνεργάτης στην ομάδα της Δρ Χρυσίνα, ΙΒΦΧΒ-ΕΙΕ. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν οι συνθήκες κρυστάλλωσης των ήδη δημοσιευμένων 6-φωσφο-β-γλυκοζιδασών και πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση αυτών λαμβάνοντας υπ'όψιν τα διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα με παρεμφερείς συνθήκες με βάση τις οποίες έγιναν και επιπλέον δοκιμές. Στη συνέχεια παρατίθεται η πορεία που ακολουθήθηκε για την κρυστάλλωση του ενζύμου:

Για τις δοκιμές κρυστάλλωσης, χρησιμοποιήθηκαν μικροπλάκες κρυστάλλωσης (plates, **Εικόνα 2.4**) με 96 πηγάδια (wells) κατάλληλες για την εφαρμογή της μεθόδου διάχυσης ατμών καθήμενης σταγόνας. Σε κάθε well αντιστοιχούν δύο μικρότερες θέσεις στις οποίες τοποθετείται το πρωτεϊνικό διάλυμα, τα συστατικά του οποίου έχουν συνήθως συγκέντρωση μικρότερη από αυτή του reservoir. Ο όγκος του διαλύματος που τοποθετείται στο reservoir είναι συνήθως 50 μ l και έναντι αυτού εξισορροπούνται οι συγκεντρώσεις των συστατικών της σταγόνας.



Εικόνα 2.4: Μικροπλάκα κρυστάλλωσης (Plate) για κρυσταλλογραφία 96 θέσεων δύο σταγόνων η καθεμία SWISSCI 'MRC' (http://www.labtimes.org/labtimes/method/methods/2010_06.lasso, <https://www.moleculardimensions.com/products/5089-Top-96-Crystallisation-Screen/>)

Στις σειρές A έως H και 1 έως 12 σχηματίζονται 2 σταγόνες σε κάθε θέση που αντιστοιχεί το εκάστοτε πηγάδι, τελικού όγκου 0,5μL οι οποίες έχουν προκύψει από ανάμιξη διαλύματος πρωτεΐνης και διαλύματος του παράγοντα κατακρήμνισης, που συνήθως βρίσκεται στο reservoir. Το reservoir τοποθετείτε στα πηγάδια της μικροπλάκας κρυστάλλωσης από τον χρήστη ενώ οι σταγόνες σχηματίζονται με ανάμιξη αυτόματα με χρήση ρομποτικής διάταξης (Oryx nano Douglas Instruments).

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ποικιλία αναλογιών ανάμιξης πρωτεϊνικού διαλύματος και reservoir (π.χ. πρωτεΐνη:reservoir, 1:1, 1:2 ή 2:1. Όταν ολοκληρωθεί η τοποθέτηση των σταγόνων, Η μικροπλάκα κρυστάλλωσης σφραγίζεται με διάφανη πλαστική μεμβράνη και φυλάσσεται στους 20°C όπου και ξεκινά το πρώτο στάδιο της κρυστάλλωσης, η πυρήνωση.

Οι παρατηρήσεις της μικροπλάκας κρυστάλλωσης αρχίζουν 24, 36 και 48 ώρες μετά το πείραμα της κρυστάλλωσης και στη συνέχεια η παρατήρηση πραγματοποιείται ανά 2-3 μέρες για την παρακολούθηση της εξέλιξης του πειραματικής διαδικασίας.

Στον **Πίνακα 2.3**, παρουσιάζεται η αρίθμηση της μικροπλάκας υποδεικνύοντας τις θέσεις εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πειραματική διαδικασία. Η θέση του κάθε πηγαδιού στην μικροπλάκα κρυστάλλωσης ορίζεται με έναν χαρακτήρα (για κάθε οριζόντια γραμμή) και έναν αριθμό (για κάθε στήλη). Για παράδειγμα, το περιεχόμενο του πηγαδιού από τη σειρά A και τη στήλη 1 αντιστοιχεί στο πηγάδι A1. Επειδή κάθε πηγάδι έχει δυο σταγόνες, στις μικροπλάκες κρυστάλλωσης με 96

θέσεις, χρησιμοποιείται επίσης ο όρος πάνω ή κάτω π.χ. για την επάνω σταγόνα του πηγαδιού στην σειρά A και τη στήλη 1 πρέπει να αναφερθεί A1-πάνω κατά την συλλογή φωτογραφιών ή σε αναφορά για την συγκεκριμένη σταγόνα. Σε κάθε «κελί» του Πίνακα 2 περιγράφονται επίσης, οι συνθήκες που μελετήθηκαν σε κάθε σταγόνα. Οι συγκεντρώσεις είναι οι αρχικές συγκεντρώσεις του πρωτεϊνικού διαλύματος και του reservoir πριν την ανάμιξη. Συνοψίζοντας, ένας τυπικός πίνακας με τη βοήθεια του οποίου σχεδιάζεται και αποτυπώνονται οι δοκιμές κρυστάλλωσης για ένα πείραμα παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.3**

Όλα τα πειράματα σχεδιάζονται με τον τρόπο χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Excel ώστε να φαίνονται οι συνθήκες κάθε πηγαδιού και να γίνονται πιο εύκολα οι υπολογισμοί. Οι συνθήκες που αφορούν τις δοκιμές κρυστάλλωσης στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας παρατίθενται στο τέλος με τη μορφή παραρτήματος (βλ. **Παράρτημα X**)

Πίνακας 2.3: Σχεδιασμός πειράματος κρυστάλλωσης μικροπλάκας κρυστάλλωσης (Δοκιμή 1). Οι γραμμές A, B αφορούν στη φυσική πρωτεΐνη ενώ οι γραμμές C, D το μετάλλαγμα αυτής.

	1	2	3	4	5	6
A	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml
B	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml
C	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml MUTANT	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20% PEG 3350 Prot:10mg/ml MUTANT	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml MUTANT	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml MUTANT	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml MUTANT	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris pH=7 20%PEG 3350 Prot:10mg/ml MUTANT
D	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris	0,2M Na acetate 0,1M Bis-Tris

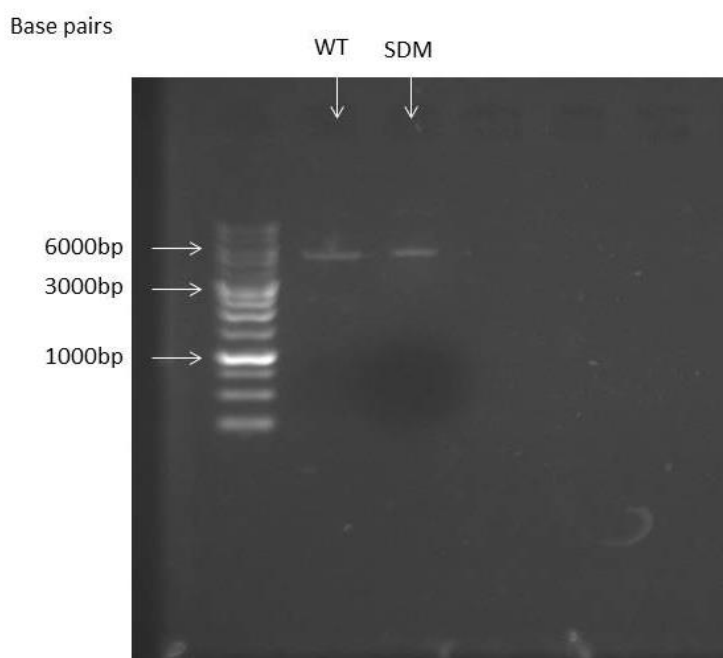
	pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml MUTANT	pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml MUTANT	pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml MUTANT	pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml MUTANT	pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml MUTANT	pH=7 20%PEG 3350 Prot:12mg/ml MUTANT
--	---	---	---	---	---	---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Έλεγχος του πλασμιδιακού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον έλεγχο της ύπαρξης του πλασμιδιακού DNA στο επιθυμητό μέγεθος παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης, στο οποίο «φορτώθηκε» ποσότητα από το DNA και των δυο διαφορετικών πλασμιδίων με χρωστική για να είναι ορατά στο πήκτωμα καθώς και ένας μάρτυρας/δείκτης (ladder) γνωστού μοριακού βάρους, ο οποίος διατίθεται στο εμπόριο (Nippon Genetics Europe cat. No: MWD1). Ο μάρτυρας έχει συγκεκριμένου μεγέθους ζώνες που χρησιμοποιούνται σαν πρότυπες για να ταυτοποιηθεί το μέγεθος των δικών μας και να αποφανθούμε αν είναι οι επιθυμητές. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται πως τα δυο πλασμίδια είναι ίδιου μεγέθους.



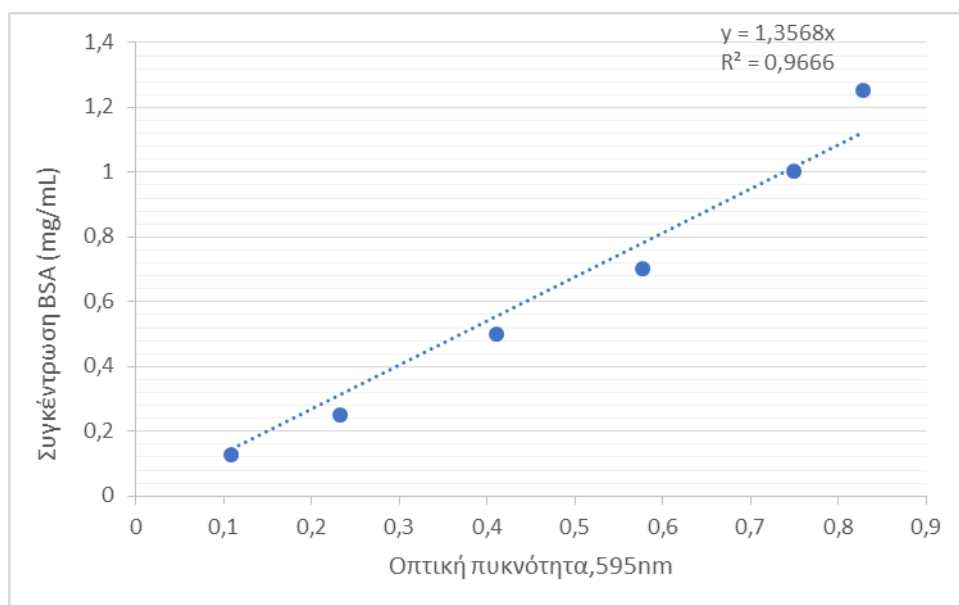
Εικόνα 3.1: Πήκτωμα αγαρόζης: αριστερή διαδρομή: Δείκτης γνωστού μοριακού βάρους, μεσαία διαδρομή: πλασμιδιακό DNA από το πλασμίδιο με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου (WT), δεξιά διαδρομή: πλασμιδιακό DNA με την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη (SDM)

3.2 Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης με πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) παρασκευάστηκε για να γίνει έλεγχος του μεγέθους της πρωτεΐνης. Για να γίνει η σύγκριση χρησιμοποιήθηκε η

ίδια ποσότητα πρωτεΐνης και από τα δυο δείγματα κυττάρων και στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος Bradford για να μετρηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που έχουν τα δείγματα.

Με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο Bradford, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη βάσει των διαδοχικών πρότυπων συγκεντρώσεων BSA και των αντίστοιχων τιμών οπτικής πυκνότητας (**Σχήμα 3.1**)

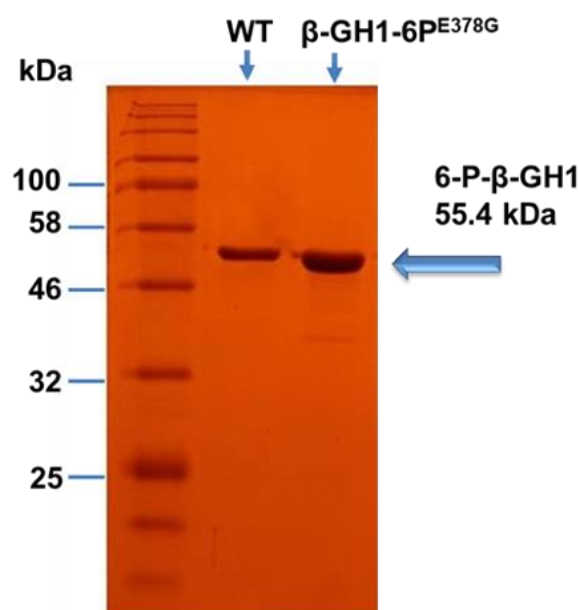


Σχήμα 3.1: Πρότυπη καμπύλη συγκεντρώσεων BSA

Παρατηρήθηκε ότι οι οπτικές πυκνότητες των πρότυπων συγκεντρώσεων αυξάνονται κλιμακωτά χωρίς να παρεκκλίνουν σημαντικά από την γραμμή τάσης. Επιπλέον οι οπτικές πυκνότητες των δειγμάτων ήταν 1,0315 για το WT η αραιώση 1/100 και 1,275 για mutant επίσης η αραιώση 1/100 . Αυτές οι τιμές βρίσκονται μέσα στο εύρος των τιμών των πρότυπων συγκεντρώσεων. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση ώστε να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

Η οπτική πυκνότητα προέρχεται από τα 10 μl της αραιώσης 1/100 του αρχικού διαλύματος πρωτεΐνης. Συνεπώς οι τιμές 1,0315 και τα 1,2758 αντιστοιχούν σε 33,08 και 69,03 μg/ml πρωτεΐνης αντίστοιχα. Στο πήκτωμα ηλεκτροφορήθηκαν συνολικά 30 μl, και ο όγκος των δειγμάτων που ηλεκτροφορήθηκε ήταν 0,6 μl από το καθένα. Στην **Εικόνα 3.2** του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης, φαίνεται πως προσδιορίστηκε, με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους και παρουσία

αποδιατακτικού παράγοντα (SDS-PAGE), το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, η οποία εμφανίστηκε ως μία ζώνη μοριακού βάρους περίπου 55,4 kDa.



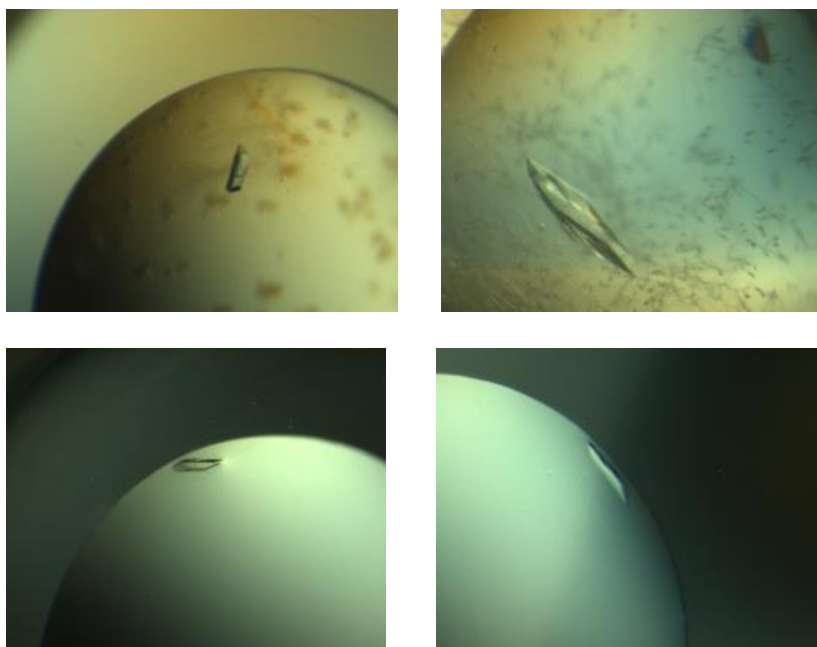
Εικόνα 3.2: SDS-PAGE από το batch 4 των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Διαδρομή 1: Μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 2: η αγρίου τύπου πρωτεΐνη (wild type), 3: η πρωτεΐνη με την μετάλλαξη (site directed mutagenesis)

3.3 Δοκιμές κρυστάλλωσης

Οι δοκιμές κρυστάλλωσης που πραγματοποιήθηκαν μέχρι να ληφθούν τρισδιάστατοι κρύσταλλοι ήταν αρκετές με χρήση τόσο των συνθηκών που σχεδιάστηκαν ορθολογικά με βάση τη βιβλιογραφία αλλά και επιπρόσθετων εμπορικά διαθέσιμων συνθηκών. Παρακάτω έχουν παρατεθεί όλες οι μικροπλάκες κρυστάλλωσης με τη σειρά που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα και τα επί μέρους αποτελέσματα που ελήφθησαν από αυτά καθώς και συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα όλων αυτών των δοκιμών. Υποδεικνύονται οι πλέον κατάλληλες συνθήκες, οι οποίες φαίνεται να οδηγούν σε καλοσηματισμένους κρυστάλλους για μελέτες περίθλασης με χρήση συμβατικών πηγών ακτίνων-Χ ή/και συγχροτρονικής ακτινοβολίας.

Δοκιμή κρυστάλλωσης 1:

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σάρωση επιλεγμένων εμπορικά διαθέσιμων συνθηκών από την εταιρεία Molecular Dimensions Ltd. Εξ' αυτών μία μόνο συνθήκη έδωσε πιο ευμεγέθεις κρυστάλλους χρησιμοποιώντας τις τρεις πρώτες παρασκευές πρωτεΐνης (batches 1-3). Τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν από την δεύτερη παρτίδα και παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.3**, η δε συνθήκη περιελάμβανε 20% PEG3350, 0,2M Sodium iodide, 0,1M Bis-Tris pH 7.5: μεγάλους κρυστάλλους με αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης 4mg/ml (για τα batches 1, 2) και 7mg/ml (για το batch 3) και σε αναλογία πρωτεΐνης:reservoir, 1:1 και 1:2.

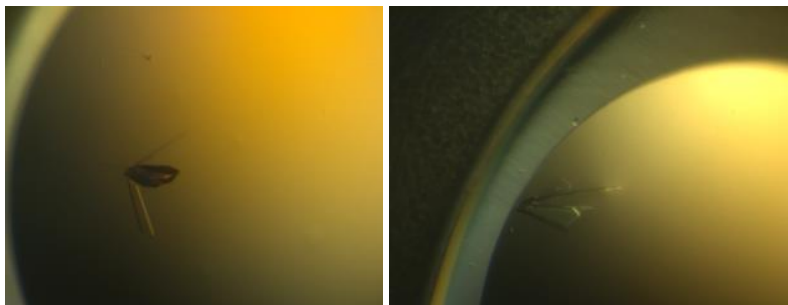


Εικόνα 3.3. Κρύσταλλοι της 6-P-β-GH1 από την πρώτη δοκιμή κρυστάλλωσης εμπορικά διαθέσιμων συνθηκών.

Επαναλήφθηκαν οι αρχικές συνθήκες όπου παρατηρήθηκαν κρύσταλλοι ενώ ταυτόχρονα διερευνήθηκαν επιπλέον παράμετροι όπως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και η επίδραση της πολυαιθυλενογλυκόλης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μείωση του PEG3350 σε 15% (w/v) διατηρώντας τα υπόλοιπα συστατικά σε συνδυασμό με αύξηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε

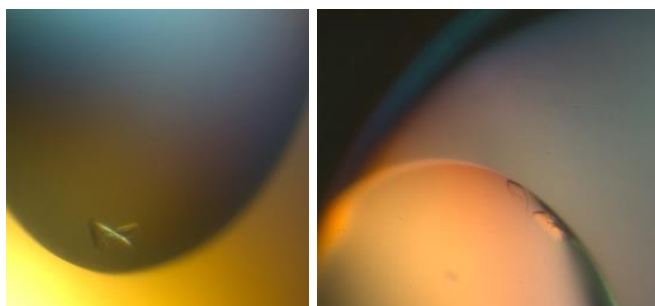
αρχική συγκέντρωση 12 mg/ml έδωσε μεγαλύτερους αλλά διαδιάστατους κρυστάλλους (αναλογία ανάμιξης πρωτεΐνη:reservoir, 1:1) (**Εικόνα 3.4**)

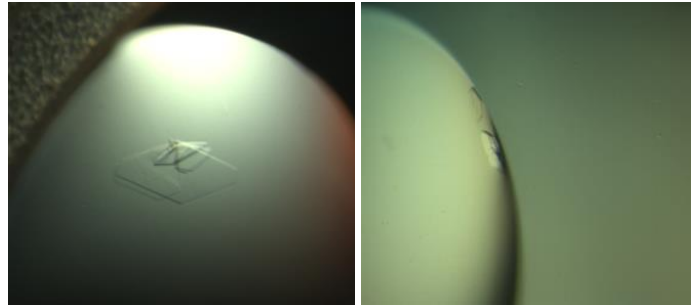


Εικόνα 3.4. Κρύσταλλοι της 6-P-β-GH1 από την πρώτη δοκιμή κρυστάλλωσης εμπορικά διαθέσιμων συνθηκών με ελαφρά μείωση της συγκέντρωσης του καταβυθιστικού και αύξηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.

Αντιστοίχως, μελετήθηκε και η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του PEG3350 σε 25% (w/v) και 30% (w/v), ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν εξαιρετικές μεταβολές ενώ παρατηρήθηκε ότι η λίγο χαμηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης (10mg/μl) δίνει καλύτερα αποτελέσματα.

Αντικατάσταση του PEG3350 με PEG4000 (20% (w/v) PEG 4000, 0,2M NaI, 0,1M Bis-Tris pH 7.5) αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι σε δύο διαστάσεις (thin plates), ως σύμπλεγμα, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης (10mg/ml & 12 mg/ml) και αναλογία ανάμειξης πρωτεΐνης:reservoir 1:1 (**Εικόνα 3.5**).





Εικόνα 3.5. Σύμπλεγμα κρυστάλλων που αναπτύχθηκε παρουσία PEG4000 20% (w/v).

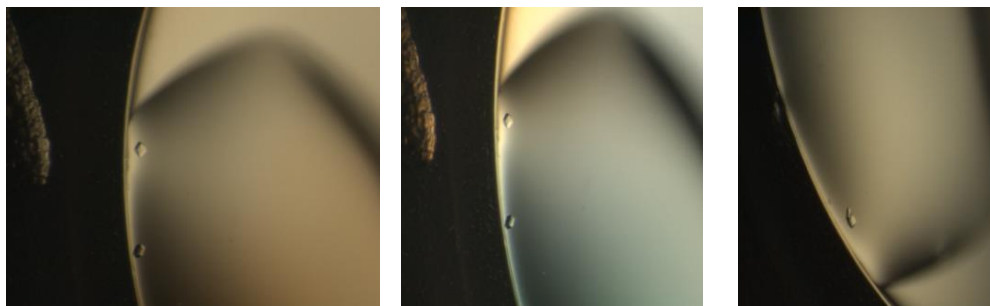
Επίσης, ελέγχθηκαν οι ίδιες συνθήκες με 15% (w/v) PEG 4000, όπου δεν παρατηρήθηκαν όμως κρύσταλλοι αλλά ούτε και ίζημα και οι σταγόνες παρέμειναν διαυγείς (clear drops). Αντίστοιχα, όταν διερευνήθηκε η επίδραση χαμηλότερου μοριακού βάρους PEG 400 σε συγκεντρώσεις 15% & 20% (w/v), αντί του PEG4000 και οι σταγόνες επίσης παρέμειναν διαυγείς.

Δοκιμή κρυστάλλωσης 2:

Προκειμένου να βελτιωθεί το μέγεθος των κρυστάλλων, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα (4) διαφορετικά πρόσθετα, αιθυλενογλυκόλη, γλυκερόλη, διοξάνιο, octyl-a/b glucoside σε ποσοστό 7, 10% (v/v). Για τον σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις 15, 20, 25, 30% (w/v) PEG3350 και 20% (w/v) PEG4000. Τέλος δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του batch 3 της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και 12mg/μl του μεταλλάγματος, με αναλογία πρωτεΐνης: reservoir 2:1 και 1:1.

Οι μικροπλάκες κρυστάλλωσης ελέγχθηκαν την 21^η και 30^η ημέρα από την ημερομηνία που διεξήχθη το πείραμα κρυστάλλωσης όπου φάνηκε ότι το διοξάνιο και η αιθυλενογλυκόλη βοηθάνε περισσότερο στην ανάπτυξη κρυστάλλων σε σχέση με τα άλλα δύο πρόσθετα που χρησιμοποιήθηκαν. Οι σταγόνες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε 30% (w/v) PEG3350 και 20% (w/v) PEG4000 και για τον mutant δεν παρατηρήθηκαν κρύσταλλοι. Ωστόσο μετά την πάροδο περίπου δύο μηνών παρατηρήθηκαν βελτιωμένοι κρύσταλλοι για το WT στις εξής συνθήκες: 0,2M

Sodium iodide, 15% PEG3350 (w/v) 0,1M Bis-Tris pH 7,5 παρουσία 10% (v/v) γλυκερόλη, οι οποίοι ωστόσο ήταν μικρού μεγέθους (**Εικόνα 3.7**).



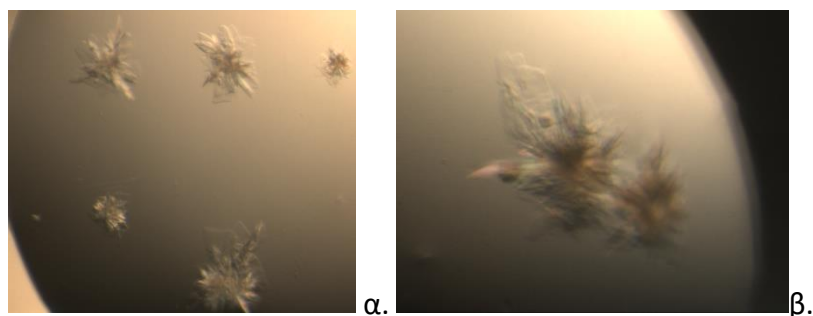
Εικόνα 3.6. Μονοκρύσταλλοι οι οποίοι αναπτύχθηκαν παρουσία 10% (v/v) γλυκερόλης στις ήδη ταυτοποιημένες συνθήκες.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη θετική επίδραση της γλυκερόλης, επαναλήφθηκαν οι συνθήκες προκειμένου να παραχθούν αρκετοί κρύσταλλοι οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για μικροσπορά.

Δοκιμή κρυστάλλωσης 3:

Δοκιμάσθηκε εκ νέου η εμπορικά διαθέσιμη συνθήκη, αυξάνοντας αυτήν τη φορά τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε 10 και 12 mg/ml για τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη και 12 και 14 mg/ml για το μετάλλαγμα διατηρώντας τις συγκεντρώσεις των υπολοίπων συστατικών (20% (w/v) PEG3350, 0,2M Sodium iodide, 0,1M Bis-Tris pH 7,5) με αναλογία πρωτεΐνης:reservoir 1:1 και 2:1. Για την φυσικού τύπου πρωτεΐνη καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις σταγόνες όπου η αρχική συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 10 mg/ml και η ανάμιξη έγινε σε αναλογία 2:1. Οι σταγόνες με λίγο πιο αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης (12 mg/ml) έδωσαν σύμπλεγμα μικροκρυστάλλων σε σχήμα αχινού. Για το μετάλλαγμα τα καλύτερα αποτελέσματα καταγράφηκαν για τις σταγόνες εκείνες στις οποίες η αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης ήταν 12 mg/ml και η αναλογία ανάμιξης 2:1, ενώ στην αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης (14mg/ml) καλύτερα ήταν τα αποτελέσματα με αναλογία 1:1. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η πρωτεϊνική συγκέντρωση

γύρω στα 12 mg/μl ήταν ικανοποιητική και για τα δύο δείγματα που εξετάστηκαν χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές.

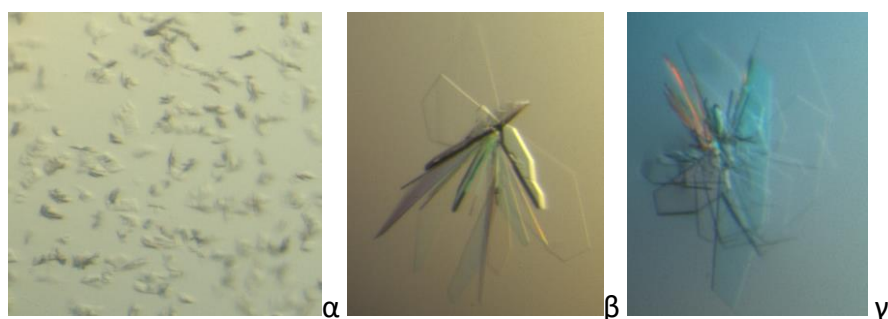


Εικόνα 3.6. (α) κρύσταλλοι φυσικής πρωτεΐνης και (β) σύμπλεγμα κρυστάλλων μεταλλάγματος.

Δοκιμή κρυστάλλωσης 4:

Με βάση όλα τα προηγούμενα αποτελέσματα εξετάστηκαν εκ νέου η συνθήκη 15% (w/v) PEG3350, 0,2 M Na iodide, 0,1 M Bis-Tris pH 7,5 παρουσία 10% (v/v) γλυκερόλης και συγκέντρωση 12mg/μl για για τα δύο πρωτεϊνικά δείγματα. Στην περίπτωση του μεταλλάγματος εξετάστηκε και λίγο υψηλότερη συγκέντρωση PEG3350 20% (w/v) παρουσία και απουσία γλυκερόλης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν σχηματισμό βελονοειδών κρυστάλλων όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα για όλες τις σταγόνες της φυσικής πρωτεΐνης και κάποια μεγάλα συμπλέγματα κρυστάλλων για το μετάλλαγμα (**Εικόνα 3.7**).

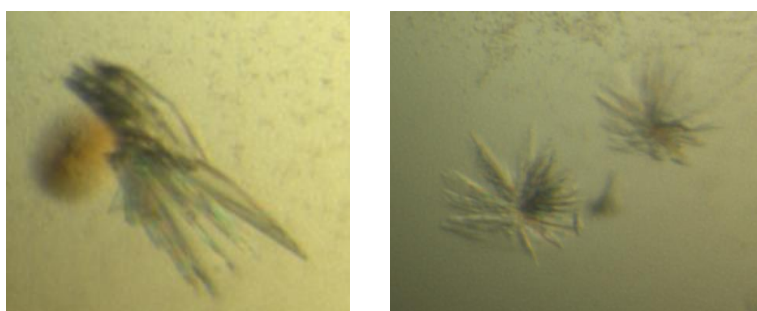


Εικόνα 3.7. (α) κρύσταλλοι φυσικής πρωτεΐνης και (β), (γ) σύμπλεγμα κρυστάλλων μεταλλάγματος παρουσία γλυκερόλης.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα δημιουργήθηκε η ανάγκη επανεξέτασης των πρωτεϊνικών δειγμάτων και γι' αυτό αποφασίσθηκε να γίνει εκ νέου παρασκευή αυτών. Εφαρμόσθηκε το ήδη ανεπτυγμένο πρωτόκολλο έκφρασης και καθαρισμού του ενζύμου και του μεταλλάγματος αυτού στο εργαστήριο του καθ. Δ. Χατζηνικολάου και η καθαρότητα του παρασκευάσματος ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση (**κεφάλαιο 3, Εικόνα 3.2**)

Δοκιμή κρυστάλλωσης 5:

Επαναλήφθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για τα δύο πρωτεϊνικά δείγματα του batch 4, 15% & 20% (w/v) PEG3350, 0,2 M Sodium iodide, 0,1 M Bis-Tris pH 7,5 παρουσία και απουσία 10% (v/v) γλυκερόλης.



Εικόνα 3.8. Τα αποτελέσματα της κρυστάλλωσης με χρήση του batch 4.

Οι σταγόνες με την υψηλότερη συγκέντρωση PEG 3350 εμφάνισαν κρυστάλλους σε σχήμα αχινού. Η γλυκερόλη ως πρόσθετο δεν φάνηκε να βελτιώσει την ποιότητα των κρυστάλλων που σχηματίσθηκαν ενώ κύριο χαρακτηριστικό όλων των σταγόνων ήταν ο σχηματισμός συμπλεγμάτων. Οι σταγόνες εκείνες που είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση PEG 3350 εμφάνισαν κηλίδες σαν υγρούς κρυστάλλους από τις οποίες μετά την πάροδο λίγων ημερών (3 έως 5) αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι (**Εικόνα 3.8**). Συμπερασματικά τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν στις σταγόνες όπου περιείχαν 15% (w/v) PEG3350 με 12mg/ml πρωτεΐνη.

Στην περίπτωση του μεταλλάγματος, δοκιμάσθηκε η καλύτερη συνθήκη της φυσικής πρωτεΐνης δηλαδή αυτή με 15% (w/v) PEG3350 η οποία φαίνεται ότι έδωσε σταγόνες χωρίς ίζημα. Μετά την πάροδο 5 ημερών εμφανίστηκαν «κηλίδες» μέσα

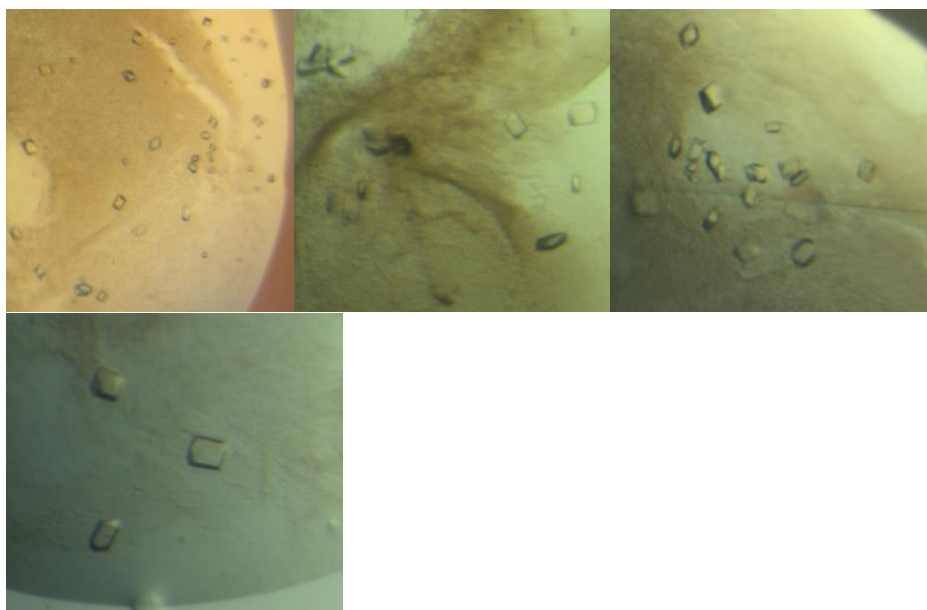
από τις οποίες στη συνέχεια προέκυψε σύμπλεγμα βελονοειδών κρυστάλλων (Εικόνα 3.9) στις σταγόνες που περιείχαν 20% (w/v) PEG3350 ενώ αυτές με 15% (w.v) PEG3350 είχαν μικρά κρυσταλλάκια των οποίων ούτε το μέγεθος, ούτε το πλήθος αυξήθηκε. Σε αυτήν την περίπτωση η υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης είχε καλύτερα αποτελέσματα αφού εμφάνισε τις «κηλίδες» νωρίτερα.



Εικόνα 3.9. Αποτελέσματα των δοκιμών κρυστάλλωσης του μεταλλάγματος χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες της φυσικής πρωτεΐνης (15% (w/v) PEG3350, 0,2 M Sodium iodide, 0,1 M Bis-Tris pH 7,5).

Δοκιμή κρυστάλλωσης 6:

Προκειμένου να βελτιωθεί το μέγεθος των μικροκρυστάλλων που παρατηρήθηκαν για τη φυσική πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μικροσποράς (seeding) χρησιμοποιώντας ήδη ανεπτυγμένους μικροκρυστάλλους σε σχήμα αχινού για να υποβοηθηθεί το στάδιο της πυρήνωσης κατά την διαδικασία κρυστάλλωσης. Οι συνθήκες ήταν ακριβώς οι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν στη δοκιμή κρυστάλλωσης 5. Μετά την πάροδο 28 ημερών, παρατηρήθηκαν ωραίοι ραβδοειδής μονοκρύσταλλοι σε στις περισσότερες σταγόνες ανάλογα με το ποσοστό μικροκρυστάλλων που εμβολιάστηκαν. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στις παρακάτω εικόνες



Εικόνα 3.10. Μονοκρύσταλλοι του ενζύμου 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάση, οι οποίοι αναπτύχθηκαν μετά την εφαρμογή της μεθόδου μικροσποράς.

3.4 *In silico* δομικές μελέτες της 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσης

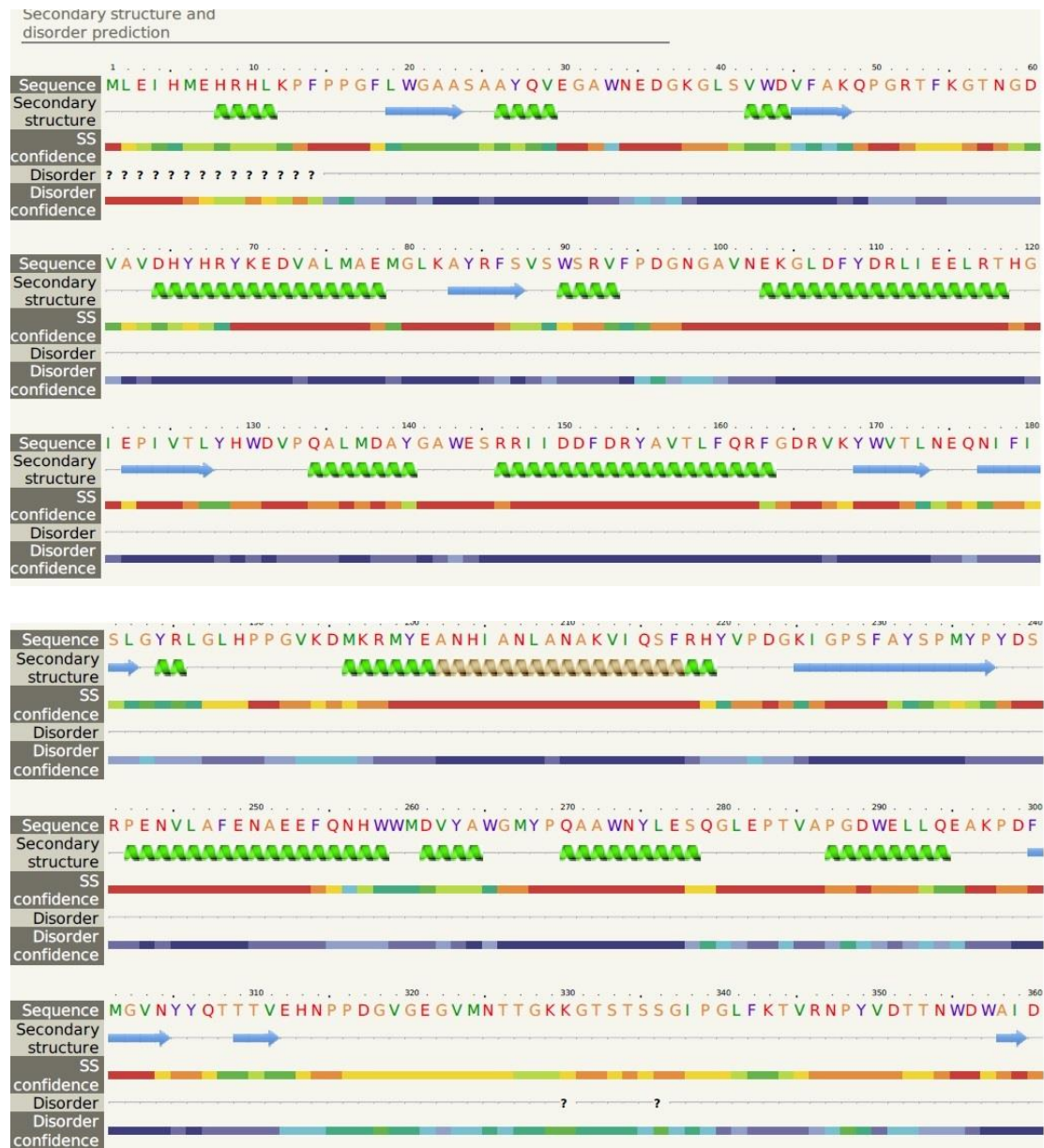
Το ένζυμο 6-φωσφο-β-γλυκοσιδάση όπως είναι γνωστό από τη σχετική βιβλιογραφία ανήκει στην οικογένεια 1 των γλυκοζιδικών υδρολασών (EC 3.2.1.86). Προέρχεται από το βακτήριο του εδάφους *Geobacillus sp.* SP24, το οποίο έχει απομονωθεί από ενδιαιτήματα που συλλέχτηκαν από ηφαιστιογενές περιβάλλον (Σαντορίνη, Αιγαίο Πέλαγος, Ελλάδα) από την ομάδα του καθ. Δ. Χατζηνικολάου (Stathoroulou et al. 2012).

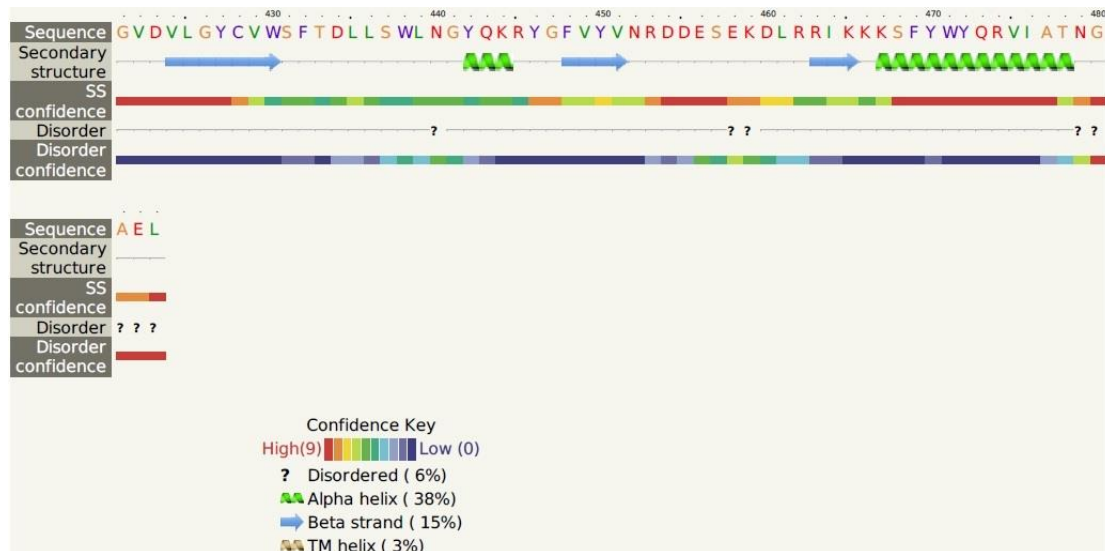
Γνωστής της αλληλουχίας της 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσης από την ηφαιστιογενή περιοχή της Σαντορίνης, πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη της 3D δομής του ενζύμου με χρήση δύο εκ των δημοφιλέστερων εξυπηρετητών που χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό τους i-TASSER (Roy, Kucukural, and Zhang 2010) και Phyre2 (Kelly et al. 2015).

3.4.1 Αποτελέσματα Phyre2

Με βάση την ομολογία της αλληλουχίας των αμινοξέων, η οποία δόθηκε ως είσοδος στον εξυπηρετητή, ως προς άλλες ήδη προσδιορισμένες δομές, προβλέφθηκε η δευτεροταγής δομή του ενζύμου. Τα δευτεροταγή στοιχεία, α-

έλικες και β-ελάσματα υποδεικνύονται στην **Εικόνα 3.11** μαζί με τις στροφές ή τους βρόχους που ενδεχομένως να διαθέτει ένα μόριο.





Εικόνα 3.11 : Παρουσιάζεται η αλληλουχία των αμινοξέων του ενζύμου και υποδεικνύεται η αντιστοίχιση των δευτεροταγών στοιχείων (α-έλικες και β-ελάσματα) καθώς και οι εύκαμπτες περιοχές (με "?") όπως προβλέπεται από το Phyre2 (Kelly et al. 2015).

Η ακολουθία αντιπροσωπεύεται με κατάλοιπα χρωματισμένα σύμφωνα με ένα απλό σχήμα βασισμένο σε ιδιότητες: (A, S, T, G, P: μικρά / πολικά) είναι κίτρινα, (M, I, L, V: υδρόφοβα) πράσινα (K, R, E, N, D, H, Q: φορτισμένα) είναι κόκκινα και τα (W, Y, F, C: αρωματικά + κυστεΐνη) είναι μωβ. Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής περιλαμβάνει τρεις καταστάσεις: α έλικα, β-πτυχωτή επιφάνεια (β-φύλλο) ή ελάσματα. Οι πράσινες έλικες αντιπροσωπεύουν α-έλικες, τα μπλε βέλη υποδεικνύουν β-ελάσματα και οι λεπτές γραμμές δείχνουν σπείρες. Οι περιοχές που υποδεικνύονται με ερωτηματικό (?) αντιπροσωπεύουν εύκαμπτες περιοχές. Η γραμμή "εμπιστοσύνης SS" δείχνει τον βαθμό εμπιστοσύνης στην πρόβλεψη από το PSIPRED. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται ο υψηλός βαθμός εμπιστοσύνης και με μπλε ο χαμηλός. Ένα μεγάλο ποσοστό μπλε ή πράσινου στη γραμμή εμπιστοσύνης είναι ενδεικτικό για ανίχνευση λίγων ομόλογων αλληλουχιών και συνεπώς χαμηλή πιθανότητα επιτυχίας στη διαδικασία μοντελοποίησης (Kelly et al. 2015).

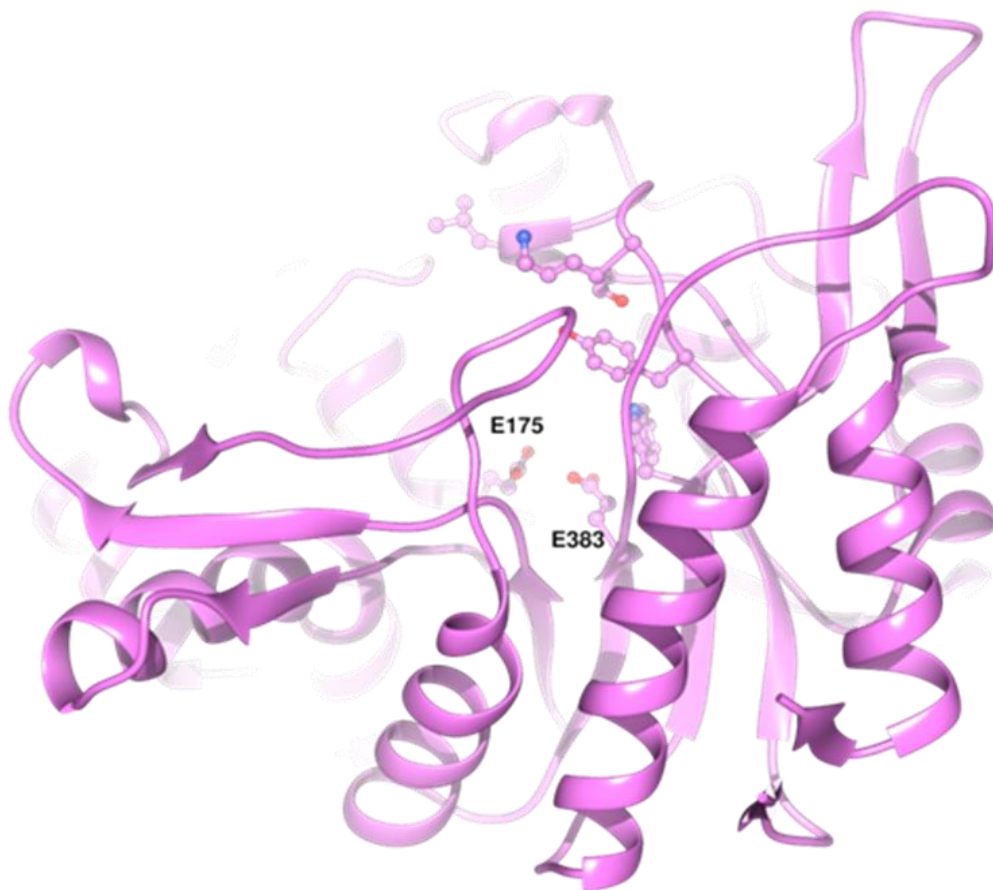
Στη συνέχεια από την αλληλουχία και με βάση την δευτεροταγή δομή, ο εξυπηρετητής χρησιμοποιεί κάποιες ήδη γνωστές δομές κατατεθειμένες στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων (Protein Data Bank, PDB), οι οποίες είναι πιο κοντά στην δομική διαμόρφωση της μελετώμενης πρωτεΐνης και βγάζει μια προτεινόμενη δομή χρησιμοποιώντας ως πρότυπη κάθε φορά μια από αυτές τις γνωστές δομές.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι δέκα πιο κοντινές γνωστές δομές στην 6-φωσφο-γλυκοζιδάση σύμφωνα με τον εξυπηρετητή Phyre2 που υπάρχει μεταξύ της κάθε δομής και της 6-φωσφο-γλυκοζιδάσης.

Rank	Aligned region
1	d1qoxa_
2	d2j78a1
3	c3w53A
4	c5wkaC
5	c3fiyA
6	c2dgaA
7	c5yhsB
8	c5navF
9	d1e4ia
10	c3ahxC
11	c3pn8A
12	c4jhoA
13	c3qnoA
14	d1v08a
15	c5ogzB
16	c5xqzA
17	c3qomA
18	d1gnxa
19	c2xhyD
20	c4iplA

Εικόνα 3.12: Αποτελέσματα της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε από τον εξυπηρετητή Phyre2. Παρουσιάζονται οι 20 πρώτες γνωστές δομές 6-φωσφο-β-γλυκοζιδασών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα (templates) για την πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου.

Μια πρώτη αναζήτηση αυτών των κωδικών στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων έδειξε ότι οι περισσότερες δομές που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα προέρχονται τόσο από β-γλυκοζιδάσες όσο και από β-γαλακτοζιδάσες. Το κόκκινο χρώμα στις αλληλουχίες υποδεικνύει την αντιστοίχιση σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης και τον υψηλό βαθμό βεβαιότητας για τις συγκεκριμένες αναζητήσεις στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων. Μπροστά από τους κωδικούς με τους οποίους έχει καταχωρηθεί η κάθε πρωτεΐνη στη βάση δεδομένων ο χαρακτήρας «d» υποδηλώνει την περιοχή (domain) ενώ ο χαρακτήρας «c» την λέξη αλυσίδα (chain) δίδοντας στο χρήστη σαφή ένδειξη του αν έχει χρησιμοποιηθεί ολόκληρη η πρωτεΐνη ή τμήμα αυτής ως πρότυπο. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη το γεγονός πως από το εικοστό πρότυπο και κάτω ο εξυπηρετητής αδυνατούσε να βγάλει προβλεπόμενη δομή χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα πρότυπα.. Κατόπιν των παραπάνω ο εξυπηρετητής Phyre2 πρότεινε μία μόνο 3D δομή ως την προβλεπόμενη για την 6-φωσφο-γλυκοζιδάσης, η οποία και παρουσιάζεται στην παρακάτω **Εικόνα 3.13**.



Εικόνα 3.13: Σχηματική αναπαράσταση της 3D δομής του ενζύμου 6-φωσφο-γλυκοσιδάση, όπως αυτό υπολογίσθηκε από τον εξυπηρετητή Phyre2. Υποδεικνύονται τα δύο καταλυτικά αμινοξέα, Glu185 και Glu383 καθώς και αμινοξέα στο περιβάλλον του καταλυτικού κέντρου που εμπλέκονται στον προσανατολισμό του υποστρώματος κατά τη σύνδεσή του σε αυτό. Η εικόνα ετοιμάσθηκε με χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004).

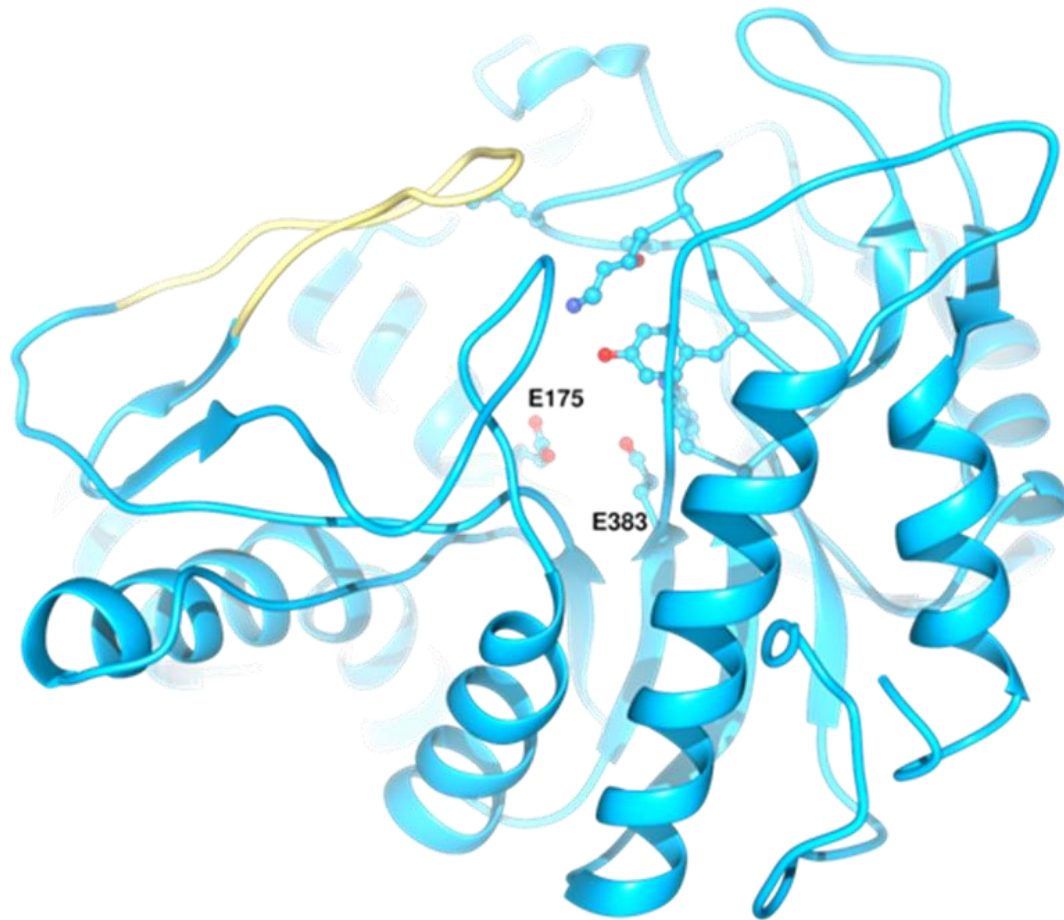
3.4.2 Αποτελέσματα i-TASSER

In silico δομικές μελέτες για την πρόβλεψη της 3D δομής της 6-φωσφο-β-γλυκοσιδάσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας επίσης και τον εξυπηρετητή i-TASSER. Ο i-TASSER εφαρμόζει προσομοιώσεις συναρμολογημένων μοτίβων «ύφανσης» (iterative threading assembly simulations), σε συνδυασμό με στοίχιση μοτίβων «ύφανσης», εμπλουτισμένων με δευτεροταγή στοιχεία και *ab initio* Monte Carlo προσομοιώσεις για της μη στοιχισμένες περιοχές (βλ. επίσης **κεφ. 1, § 1.3.2**). Τα δέκα πρώτα πρότυπα «ύφανσης» (threading templates) όπου επιλέχθηκαν από το i-TASSER περιέχουν κυρίως 6-φωσφο-β-γαλακτοσιδάσες όπως για παράδειγμα η

6-φωσφο-β-γαλακτοζιδάση από τον μικροοργανισμό *Geobacillus stearothermophilus* (με κωδικό PDB: 4ZE4), η 6-φωσφο-β-γαλακτοσιδάση από τον μικροοργανισμό *Geobacillus stearothermophilus* (με κωδικό PDB: 4ZEH), με το ποσοστό ταυτότητας στην αμινοξική τους ακολουθία να κυμαίνεται από 32 έως 98% για μια περιοχή στοίχισης σε ποσοστό από 94 έως 99%. Η ύπαρξη β-γαλακτοζιδασών στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη στοίχιση των μοτίβων «ύφανσης» δεν μας εκπλήσσει αφού και αυτά τα ένζυμα ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών και έχουν επίσης απομονωθεί από θερμόφιλο μικροοργανισμό.

Ο συγκεκριμένος εξυπηρετητής προβλέπει τη δευτεροταγή δομή ως μια αντιστοίχιση της αλληλουχίας των αμινοξέων για τα οποία προβλέπονται οι τρεις καταστάσεων (ήτοι τα δευτεροταγή στοιχεία) δηλαδή α-έλικες (H), β-ελάσματα (S) και σπείρες (C) ενώ ο βαθμός εμπιστοσύνης παρουσιάζεται κάτω από κάθε κατάλοιπο. Ο βαθμός εμπιστοσύνης για κάθε κατάλοιπο αναγράφεται στην τελευταία σειρά με τιμές να κυμαίνονται από 0 έως 9, όπου όσο μεγαλύτερος βαθμός τόσο ασφαλέστερη η πρόβλεψη.

Σε ό,τι αναφορά τις προβλεπόμενες δομές, ο εξυπηρετητής προτείνει δύο πιθανές 3D δομές για το ένζυμο. Ωστόσο συγκρίνοντας τον βαθμό εμπιστοσύνης (C-score) για τις δομές αυτές η πρώτη εξ' αυτών με C-score=1,65 σε αντίθεση με το C-score=0,41 του δεύτερου μοντέλου φαίνεται να είναι η ορθότερη. Ο βαθμός εμπιστοσύνης C είναι μια εκτίμηση της εμπιστοσύνης της πρόβλεψης της δομής. Τυπικά κυμαίνεται στην περιοχή [-5, 2], όπου η υψηλότερη βαθμολογία υποδηλώνει ένα μοντέλο καλύτερης ποιότητας. Γενικά, επικρατεί πως οι προβλεπόμενες δομές με C-score >-1,5 έχουν σωστή διαμόρφωση (Roy, Kucukural, and Zhang 2010). Η προβλεπόμενη 3D δομή για το μελετώμενο ένζυμο φαίνεται στην παρακάτω **Εικόνα 3.14**.

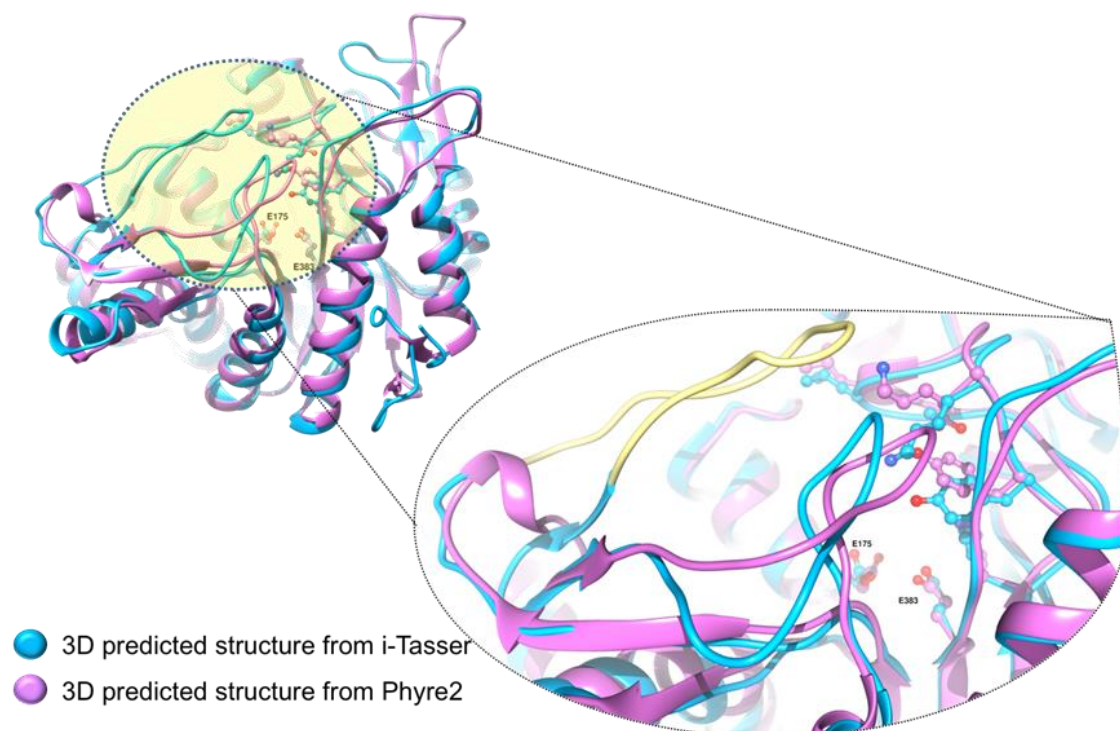


Εικόνα 3.14. Σχηματική αναπαράσταση της 3D δομής του ενζύμου 6-φωσφο-γλυκοζιδάση, όπως αυτό υπολογίσθηκε από τον εξυπηρετητή i-TASSER (Roy, Kucukural, and Zhang 2010). Υποδεικνύονται τα δύο καταλυτικά αμινοξέα, Glu185 και Glu383 καθώς και αμινοξέα στο περιβάλλον του καταλυτικού κέντρου που εμπλέκονται στον προσανατολισμό του υποστρώματος κατά τη σύνδεσή του σε αυτό. Επίσης, με υποκίτρινο χρώμα υποδηλώνεται ο βρόχος που φαίνεται να συμμετέχει στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του ενζύμου λειτουργώντας ως «καπάκι» σε αυτό. Η εικόνα ετοιμάσθηκε με χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004).

3.4.3 Σύγκριση της 3D δομής του ενζύμου 6-φωσφο-γλυκοζιδάση όπως προβλέφθηκε από τους δύο εξυπηρετητές καθώς και με τη βιβλιογραφία.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε και σύγκριση των προτεινόμενων 3D δομών που προβλέφθηκαν από τους δύο εξυπηρετητές i-TASSER και Phyre2 με υπέρθεση των

ατομικών τους συντεταγμένων βάσει των δευτεροταγών στοιχείων της κάθε δομής με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004) που δίνει τέτοια επιλογή. Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.15**



Εικόνα 3.15: Υπέρθεση των προβλεπόμενων 3D δομών του ενζύμου 6-φωσφο-γλυκοζιδάση όπως αυτές υπολογίστηκαν από τους εξυπηρετητές Phyre2 και i-TASSER (παρουσιάζονται με μωβ και κυανό χρώμα, αντιστοίχως). Για την υπέρθεση και την απεικόνιση των δύο δομών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα μοριακών γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004).

Η σύγκριση των δύο μοντέλων που προκύπτουν από τους εξυπηρετητές έδειξε ότι η συνολική δομή παραμένει σχεδόν αμετάβλητη, με τις περισσότερες αλλαγές να παρατηρούνται σε περιοχές βρόχων, και ιδιαιτέρως σε μια εξ' αυτών όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.15**. Πιο συγκεκριμένα, το μοντέλο που προέκυψε από το i-TASSER φαίνεται να φέρει έναν βρόχο στην είσοδο του ενεργού κέντρου του ενζύμου με τέτοιο προσανατολισμό που πιθανότατα να επηρεάζει τη δράση αυτού. Στην περίπτωση της δομής που προβλέφθηκε από το Phyre2 ο βρόχος απουσιάζει.

Εν συνεχεία, για να διερευνηθεί η διαμόρφωση αυτού του βρόγχου, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δύο μοντέλων με τις ήδη γνωστές δομές από 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσες άλλων μικροοργανισμών. Για τον σκοπό αυτό, από τις

γνωστές δομές αυτών των ενζύμων επιλέχθηκαν οι δομές εκείνες που προέρχονται από διαφορετικά βακτήρια και πιο συγκεκριμένα οι 3D δομές με κωδικό PDB: 4IPL από *Streptococcus pneumonia* (Yu et al. 2013), 4B3K από *Streptococcus pyogenes* (Stepper et al. 2013), 4GPN από *Streptococcus mutans* (Michalska et al. 2013) και 4GZE από *Lactobacillus plantarum* (Michalska et al. 2013). Πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές μελέτες τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας όσο και σε επίπεδο 3D δομής με χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004)

Πιο συγκεκριμένα, πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών των παραπάνω ενζύμων με το μελετώμενο ένζυμο στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας και μελέτη των σχετικών δημοσιεύσεων βοήθησε στην ταυτοποίηση των αμινοξέων που συμμετέχουν στην κατάλυση των εν λόγω ενζύμων, καθώς και αμινοξέα στην ευρύτερη περιοχή του καταλυτικού κέντρου, τα οποία περιγράφονται στον **Πίνακα 3.1**. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα Χ. το ενεργό κέντρο όλων των ενζύμων συμπεριλαμβανομένου και του δικού μας είναι αρκετά συντηρημένο με ελάχιστες διαφορές οι οποίες υποδεικνύονται με ροζ σκίαση.

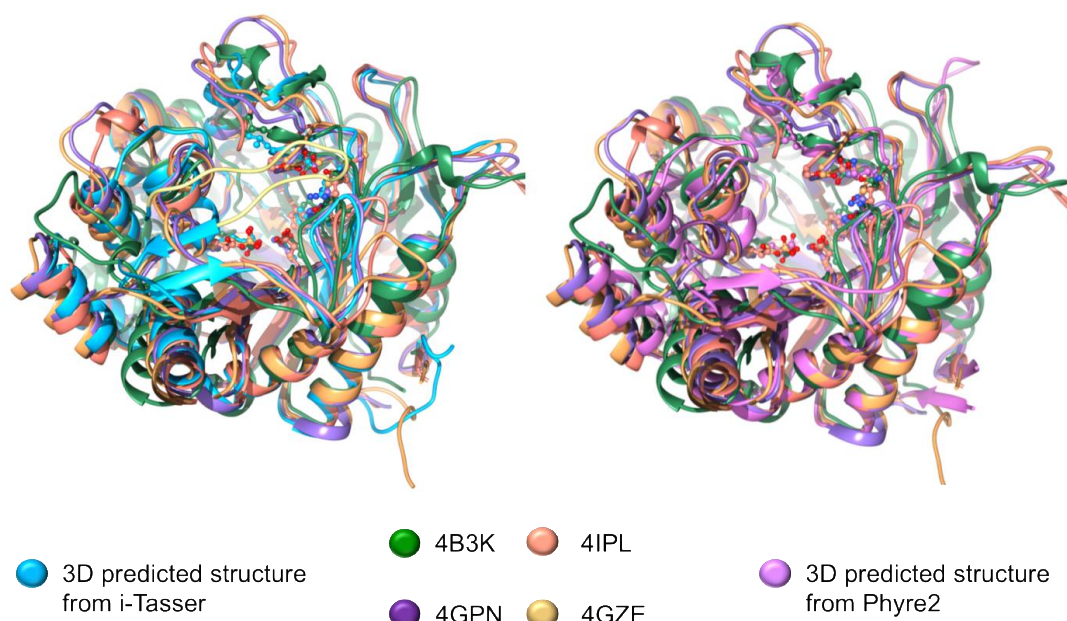
Πίνακας 3.1. Καταλυτικά αμινοξέα και αμινοξέα στην ευρύτερη περιοχή του ενεργού κέντρου των ενζύμων.

PDB code	Αλυσίδα							
6-φωσφο-β-γλυκοζιδάση <i>Geobacillus</i> SP24		E175	E383	S437	W430	L439	K444	Y446
4IPL <i>Streptococcus pneumoniae</i>	A	E171	E364	S422	W415	S424	K430	Y432
4B3K <i>Streptococcus pyogenes</i>	C	E165	E366	S423	W416	L425	N430	Y432
4GPN <i>Streptococcus mutans</i>	B	E176	Q375	S430	W423	G432	K438	Y440
4GZE <i>Lactobacillus plantarum</i>	A	E180	E375	A430	W423	S432	K438	Y440

Σημείωση: Τα δύο καταλυτικά αμινοξέα που φέρουν την ιδιότητα του δότη πρωτονίων και του νουκλεόφιλου δέκτη υποδεικνύονται με έντονα γράμματα ενώ οι διαφορές στην αμινοξική ακολουθία με ροζ σκίαση.

Η σύγκριση όλων των παραπάνω δομών έγινε με υπέρθεση των ατομικών τους συντεταγμένων, συμπεριλαμβανομένου και των προβλεπόμενων για το δικό μας

ένζυμο, με βάση τα δευτεροταγή στοιχεία με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.16** και έδειξαν ότι η αρχιτεκτονική της καταλυτικής περιοχής ήταν εξαιρετικά συντηρημένη, ενώ οι πιο σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν κυρίως σε βρόχους.



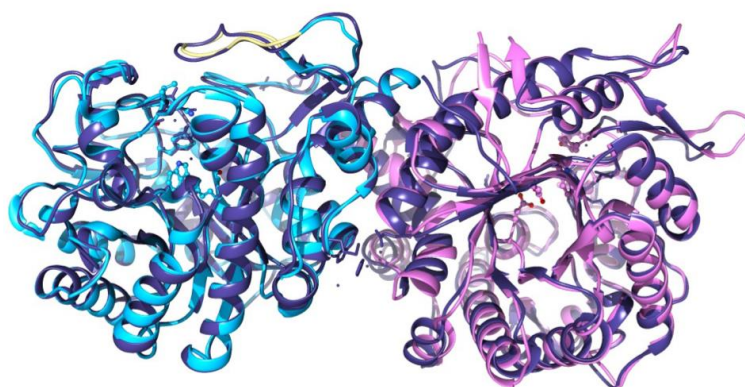
Εικόνα 3.16.: (αριστερά) Υπέρθωση των γνωστών δομών 6-φωσφο-β-γλυκοζιδασών με τη δομή που υπολογίσθηκε από τον εξυπηρετητή i-TASSER και (δεξιά) η αντίστοιχη υπέρθεση με το μοντέλο που υπολογίσθηκε από τον εξυπηρετητή Phyre2.

Επιπρόσθετα, η προβλεπόμενη δομή από τον εξυπηρετητή Phyre2 παρουσίασε μεγαλύτερη δομική ομοιότητα με τις ήδη γνωστές δομές αντίστοιχων ενζύμων, ενώ η ίδια σύγκριση με την προβλεπόμενη δομή του i-TASSER έδειξε πως το προβλεπόμενο μοντέλο φέρει έναν βρόχο, ο οποίος δεν παρουσιάζεται στις υπόλοιπες δομές και εντοπίζεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου. Ενδεχομένως, η ύπαρξη αυτού του βρόχου θα μπορούσε να υποδηλώνει κάποιον λειτουργικό ρόλο λόγω της στρατηγικής του θέσης στην είσοδο της θέσης δέσμευσης του υποστρώματος ως «πύλη» που θα επιτρέπει στο ένζυμο να εναλλάσσεται μεταξύ «κλειστών» και «ανοικτών» λειτουργικών καταστάσεων, όπως αρχικά προτάθηκε για την PGALase από *L. Lactis* (Wiesmann, Hengstenberg, and Schulz 1997). Τέτοια ευρήματα υποδηλώσουν ότι οι βρόχοι δύνανται να εμπλέκονται στον γενικότερο και δυναμικότερο τρόπο δράσης των ενζύμων της οικογενείας GH1. Ο λειτουργικός

ρόλος τέτοιων περιοχών χρήζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς θα πρέπει να προχωρήσει ο προσδιορισμός περισσότερων δομών ενζύμων αυτής της οικογένειας.

3.4.4. Σύγκριση με της προβλεπόμενης δομής της 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάση από *Geobacillus* SP24 με τη δομή της 6-φωσφο-β-γαλακτοσιδάσης από *Geobacillus stearothermophilus*.

Παράλληλα με την διεξαγωγή των πειραμάτων και την συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας μια δομή 6-φωσφο-β-γαλακτοσιδάσης από τον θερμόφιλο μικροοργανισμό *Geobacillus stearothermophilus* προσδιορίσθηκε από τον Shoham και τους συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο Hebrew της Ιερουσαλήμ στο Ισραήλ. Η δομή του ενζύμου έχει κατατεθεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων (PDB) με κωδικό 5OKB (Lansky et al. 2017). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από ένα διαφορετικό στέλεχος του ίδιου μικροοργανισμού από τον οποίο έχει απομονωθεί και το υπό μελέτη ένζυμο. Το ένζυμο αποτελείται από δυο διμερή, παρουσιάζει εξειδίκευση σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων και ανάλογα με την αλυσίδα έχει δράση γαλακτοσιδάσης ή γλυκοζιδάσης (Lansky et al. 2017). Για τους λόγους αυτούς πραγματοποιήθηκε σύγκριση και των δυο μοντέλων που υπολογίσθηκαν με την δημοσιευμένη δομή (**Εικόνα 3.17**). Η υπέρθεση έγινε με βάση τα δευτεροταγή στοιχεία με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004) ζητώντας από το πρόγραμμα να πραγματοποιήσει για το κάθε μοντέλο της δικής μας δομής το καλύτερο ταίριασμα με την δομή των Lansky et al. 2017. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προβλεπόμενη δομή από το i-TASSER ταίριαξε καλύτερα με την μία αλυσίδα της δομής των (Lansky et al. 2017), η οποία όπως περιγράφεται στην σχετική δημοσίευση έχει δειχθεί ότι έχει δράση γαλακτοσιδάσης, ενώ η προβλεπόμενη δομή του Phyre2 ταίριαξε καλύτερα με την αλυσίδα, η οποία έχει επιδείξει δραστηριότητα γλυκοζιδάσης.



● 3D predicted structure from i-Tasser

● PDB code: 5OKB

● 3D predicted structure from Phyre2

Εικόνα 3.17. Υπέρθυση της προβλεπόμενης δομής που υπολογίσθηκε από τον εξυπηρετητή i-TASSER και Phyre2 με την δομή από τους (Lansky et al. 2017) με κωδικό PDB: 5OKB. Για τη σύγκριση και τη σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα μοριακών γραφικών *Chimera* (Pettersen et al. 2004).

Πράγματι, κινητικά πειράματα που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο του καθ. Δ. Χατζηνικολάου από την Δρ Α. Γαλανοπούλου στο πλαίσιο της διδακτορικής της διατριβής έδειξαν ότι το ένζυμο που μελετάται παρουσιάζει ένα εύρος εξειδίκευσης ως προς διάφορα υποστρώματα (**Πίνακας 3.2**) (Galanorouli 2018).

Πίνακας 3.2 Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάση από *Geobacillus SP24* παρουσία υποστρωμάτων

Υπόστρωμα	K_m (mM)	V_{max} (μmol/min/mg)
P-κελλοβιόζη	6.93 ± 0.51	1.97 ± 0.24
P-γενπιοβιόζη	4.13 ± 2.11	1.01 ± 0.05
P-λακτόζη	9.65 ± 0.42	1.08 ± 0.83
P- <i>para</i> -νιτροφαινυλο-γλυκοπυρανόζη	0.10 ± 0.01	1.27 ± 0.05

Συνεπώς τα δύο μοντέλα που προτείνονται από τους εξυπηρετητές i-TASSER και Rhyge2 το μεν ως δομικό ανάλογο μιας 6-φωσφο-β-γαλακτοσιδάσης και μιας 6-φωσφο-β-γλυκοζιδάσης, αντιστοίχως, είναι εξίσου σωστά. Ωστόσο, ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής με χρήση πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ θα οδηγήσει στην αποτύπωση των δομικών χαρακτηριστικών που ενδεχομένως είναι καθοριστικής σημασίας για τη λειτουργία του ενζύμου και τον τρόπο με τον οποίο εμπλέκεται στην κατάλυση έναντι διαφόρων υποστρωμάτων.

Οι μελλοντικοί στόχοι της παρούσας ερευνητικής εργασίας αρχικά αφορούν στην περαιτέρω βελτιστοποίηση (ως προς το μέγεθος) των κρυστάλλων της φυσικής πρωτεΐνης, την εφαρμογή της μεθόδου μικροσκοπίας στο μετάλλαγμα για την ανάπτυξη μονοκρυστάλλων. Εν συνεχεία, θα χρησιμοποιηθούν ακτίνες Χ είτε από συμβατική πηγή, η οποία διατίθεται στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών είτε από συχροτρονική ακτινοβολία προκειμένου για τη συλλογή δεδομένων περίθλασης υψηλής διακριτικής ικανότητας για τον προσδιορισμό της 3D δομής των δύο πρωτεϊνικών δειγμάτων. Ακολούθως, για την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης του ενζύμου θα πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός των συμπλόκων ένζυμο:υπόστρωμα είτε με τη μέθοδο της πρόσδεσης αυτών με εμβάπτιση προσχηματισμένων κρυστάλλων σε διάλυμα υποστρώματος είτε με τη μέθοδο της συγκρυστάλλωσης. Οι τρισδιάστατες δομές των συμπλόκων θα προσδιορισθούν επίσης με χρήση ακτίνων Χ. Τα δε υποστρώματα που θα χρησιμοποιηθούν για αυτόν τον σκοπό είναι ήδη διαθέσιμα στο εργαστήριο του καθ. Δ. Χατζηνικολάου.

Παραπομπές

- Arnold, Konstantin et al. 2009. "The Protein Model Portal." *Journal of Structural and Functional Genomics* 10(1): 1–8.
- Berg Jeremy M., Tymoczko, John L., Stryer, Lubert. 2013. *Βιοχημεία*. Πανεπιστημ. ed. Έκδοση Ε. Ηράκλειο.
- Bergfors, Terese. 2003. "Seeds to Crystals." *Journal of Structural Biology* 142(1): 66–76.
- "BiotechGuide2008."
<https://www.bio.org/sites/default/files/files/BiotechGuide2008.pdf>.
- Chayen, Naomi E., and Emmanuel Saridakis. 2008. "Protein Crystallization: From Purified Protein to Diffraction-Quality Crystal." *Nature Methods* 5(2): 147–53.
- Chirgadze, Dima. 2001. "Protein Crystallisation in Action." *University of Cambridge* (July): 1–27.
http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray_resources/whitepapers/pdf/xtal-in-action.pdf.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1972. "Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of Escherichia Coli by R-Factor DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69(8): 2110–14. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.69.8.2110>.
- Collins, Kim D. 2004. "Ions from the Hofmeister Series and Osmolytes : Effects on Proteins in Solution and in the Crystallization Process." 34: 300–311.
- Damian-Almazon, J.Y., and G. Saab-Rincon. 2009. "Site-Directed Mutagenesis as Applied to Biocatalysts." *Current Research*: 1–28.
- Fernandez-Fuentes, Narcis et al. 2007. "M4T: A Comparative Protein Structure Modeling Server." *Nucleic Acids Research* 35(SUPPL.2): 363–68.
- Galanopoulou, Anastasia P. 2018. "Bacterial Hydrolases of Thermophilic Origin and Their Application in Plant Biomass Valorisation ." (July).
- GE Healthcare. 2010. "Strategies for Protein Purification Handbook." : 167.

- Hochuli, E., H. Döbeli, and A. Schacher. 1987. "New Metal Chelate Adsorbent Selective for Proteins and Peptides Containing Neighbouring Histidine Residues." *Journal of Chromatography A* 411(C): 177–84.
- Kelly, L.A. et al. 2015. "The Phyre2 Web Portal for Protein Modelling, Prediction, and Analysis." *Nature Protocols* 10(6): 845–58.
<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>.
- Kristjansson, Jakob K. 1989. "Thermophilic Organisms as Sources of Thermostable Enzymes." *Trends in Biotechnology* 7(12): 349–53.
- Kwan, David H. et al. 2016. "Chemoenzymatic Synthesis of 6-Phospho-Cyclophellitol as a Novel Probe of 6-Phospho- β -Glucosidases." *FEBS Letters* 590(4): 461–68.
- Lansky, Shifra et al. 2017. "Structural Basis for Enzyme Bifunctionality – the Case of Gan1D from *Geobacillus Stearothermophilus*." *FEBS Journal* 284(22): 3931–53.
- McPherson, Alexander. 2004. "Introduction to Protein Crystallization." *Methods*.
- McPherson, Alexander, and Bob Cudney. 2014. "Optimization of Crystallization Conditions for Biological Macromolecules." *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* 70: 1445–67.
- Michalska, Karolina et al. 2013. "GH1-Family 6-P- β -Glucosidases from Human Microbiome Lactic Acid Bacteria." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69(3): 451–63.
- Miller, J.H. 1992. "*Experiments in Molecular Genetics*."
- Moracci, M, L Capalbo, M Ciaramella, and M Rossi. 1996. "Identification of Two Glutamic Acid Residues Essential for Catalysis in the Beta-Glycosidase from the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*." *Protein engineering* 9(12): 1191–95.
- North, William C. "Medium for Zone Electrophoresis Mechanism of Enzymatic Oxidation of Purines." (9): 711.
- Pettersen, Eric F. et al. 2004. "UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Journal of Computational Chemistry*

25(13): 1605–12.

- Postma, P W, J W Lengeler, and G R Jacobson. 1993. "Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria." *Microbiological reviews*. 57(3): 543–94.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Puchart, Vladimír. 2015. "Glycoside Phosphorylases: Structure, Catalytic Properties and Biotechnological Potential." *Biotechnology Advances* 33(2): 261–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.002>.
- Roche, Daniel B., Maria T. Buenavista, Stuart J. Tetchner, and Liam J. McGuffin. 2011. "The IntFOLD Server: An Integrated Web Resource for Protein Fold Recognition, 3D Model Quality Assessment, Intrinsic Disorder Prediction, Domain Prediction and Ligand Binding Site Prediction." *Nucleic Acids Research* 39(SUPPL. 2): 171–76.
- Roche, Hoffmann-Ia. "Ni-NTA His • Bind Resins Novagen Ni-NTA His • Bind Resins Novagen." *Novagen*: 1–32.
- Roy, Ambrish, Alper Kucukural, and Yang Zhang. 2010. "I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction." *Nature Protocols* 5(4): 725–38.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis. 1989. "*Molecular Cloning*."
- Stathopoulou, Panagiota M. et al. 2012. "Assessment of the Biomass Hydrolysis Potential in Bacterial Isolates from a Volcanic Environment: Biosynthesis of the Corresponding Activities." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(9): 2889–2902.
- Stepper, Judith et al. 2013. "Structure and Activity of the Streptococcus Pyogenes Family GH1 6-Phospho-B-Glucosidase SPy1599." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69(1): 16–23.
- Tobisch, Steffen, Jörg Stülke, and Michael Hecker. 1999. "Regulation of the Lic Operon of Bacillus Subtilis and Characterization of Potential Phosphorylation Sites of the LicR Regulator Protein by Site- Directed

- Mutagenesis." *Journal of Bacteriology* 181(16): 4995–5003.
- Waterhouse, Andrew et al. 2018. "SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes." *Nucleic Acids Research* 46(W1): W296–303.
- Watson, Caudy, Myers, Witkowi. 2007. "Ανασυνδυσμένο DNA."
- Wiesmann, C, W Hengstenberg, and G E Schulz. 1997. "Crystal Structures and Mechanism of 6-Phospho-Beta-Galactosidase from *Lactococcus Lactis*." *Journal of molecular biology* 269(5): 851–60.
- Yang, Jianyi et al. 2014. "The I-TASSER Suite: Protein Structure and Function Prediction." *Nature Methods* 12(1): 7–8.
<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Yu, Wei Li et al. 2013. "Structural Insights into the Substrate Specificity of a 6-Phospho-β-Glucosidase BglA-2 from *Streptococcus Pneumoniae* TIGR4." *Journal of Biological Chemistry* 288(21): 14949–58.
- Αγγελής Γεώργιος. 2007. *Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία*. Εκδόσεις Α. ed. ΑΘ.ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ. Αθήνα.
- Γεωργάτσος-Γιουψάνης-Κυριακίδης. 2001. *Ενζυμολογία*. 1st ed. ed. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ. Θεσσαλονίκη.