



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Δομική και βιοχημική μελέτη του ενεργού
κέντρου της απακετυλάσης της πεπτιδογλυκάνης
BC1960»*

Λίτσο Ιονέλα

Επιβλέπων: Μιχαήλ Κοκκινίδης,

Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστήμιου Κρήτης

Ηράκλειο, 2021

Επιβλέπων Καθηγητής

Μιχαήλ Κοκκινίδης

(Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης)

Τριμελής Επιτροπή

Μιχαήλ Κοκκινίδης

(Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ιωάννης Παυλίδης

(Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης)

Βασιλική Φαδούλογλου

(Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής
Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης)

Περίληψη

Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί απαραίτητο συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Συγκεκριμένα, είναι ένα μακρομόριο από μακριές αλυσίδες εναλλασσόμενων μονάδων σακχάρων N-ακετυλογλυκοζαμίνης- N και ακετυλομουραμικού οξέος συνδεδεμένων μέσω β-1,4-N- γλυκοζιτικών δεσμών. Υπόκειται σε τροποποιήσεις της δομής της, με πιο χαρακτηριστική την N-απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης από τις απακετυλάσες της N-ακετυλογλυκοζαμίνης, η οποία επηρεάζει την αναγνώριση του βακτηρίου από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Οι απακετυλάσες της N-ακετυλογλυκοζαμίνης ανήκουν στην οικογένεια 4 των εστερασών υδατανθράκων (CE4), η οποία περιλαμβάνει τις απακετυλάσες της N-ακετυλογλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης, τις απακετυλάσες των χιτοολιγοσακχαριτών της NodB των ριζόβιων, τις απακετυλάσες χιτίνης, τις εστεράσες ακετυλοξυλάνης, και τις ξυλανάσες A, C, D και E. Τα μέλη αυτής της οικογένειας εμφανίζουν σημαντική ομολογία μεταξύ τους και περιλαμβάνουν εκτός από την πολύ καλά συντηρημένη επικράτεια ομολογίας NodB, μια συντηρημένη τριάδα αμινοξικών καταλοίπων δέσμωσης μετάλλου (Asp, His, His), ένα συντηρημένο καταλυτικό κατάλοιπο Asp στο ενεργό κέντρο, και μια συντηρημένη υδροξυλιωμένη Pro στο άτομο Ca (2-Hyp), που εντοπίζονται στην επικράτεια NodB. Το γονιδίωμα του *B. cereus* κωδικοποιεί 6 απακετυλάσες της πεπτιδογλυκάνης, τρεις εκ των οποίων έχουν ήδη μελετηθεί (BC1960, BC3618, BC1974). Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην απακετυλάση πεπτιδογλυκάνης BC1960. Πραγματοποιήθηκε μεταλλαγή του καταλοίπου Arg169 σε Ala με σκοπό την απόκτηση περισσότερων πληροφοριών για τον μηχανισμό υδροξυλίωσης του Ca της Pro171. Από τους 13 αρχικούς κλώνους που προέκυψαν επιλέχτηκε ο 13^{ος} ως κατάλληλος για περαιτέρω μελέτη. Αρχικά, εξετάστηκαν οι συνθήκες έκφρασης και επαγωγής της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε σε BL21 DE3 κύτταρα και απομονώθηκε με τη χρήση μεταλλοχημικής χρωματογραφίας συγγένειας (Ni-NTA agarose). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού. Σύμφωνα με αυτά η πρωτεΐνη είναι αρκετά θερμοσταθερή καθώς διατηρεί τα στοιχεία δευτεροταγούς διαμόρφωσης και στις θερμοκρασίες των 60°C. Επίσης, είναι α-ελικοειδής σε μεγάλο βαθμό καθώς εμφανίζει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα στα 208nm και στα 222nm και το ανάλογο μέγιστο στα 195nm. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με την ανάλυση ιδιοτιμών ή SVD. Τέλος, οι κρυσταλλώσεις που δοκιμάστηκαν έδωσαν θετικά αποτελέσματα, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκαν πειράματα

συν-κρυσταλλώσεων και crystal soaking χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικούς ligands.

Abstract

Peptidoglycan is an important component of the bacterial cell wall. Specifically, it is a macromolecule comprised of long chains of alternating saccharide units of N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid linked by β -1,4-N-glycoside bonds. It can be subjected to modifications of its structure, such as N-deacetylation by the deacetylases of N-acetylglucosamine, which affects bacterial recognition by the host's immunity system cells. Deacetylases of N-acetylglucosamine belong to the family 4 of carbohydrate esterases (CE4), which includes N-acetylglucosamine peptidoglycan deacetylases, rhizobial NodB chitooligosaccharide deacetylases, chitin deacetylases, acetyl-xylan esterases, and xylanases A, C, D and E [3]. Members of this family are composed from the highly conserved homology domain NodB, a well conserved triad of metal binding amino acid residues (Asp, His, His), a well-conserved catalytic residue of Asp and a well conserved hydroxyl-Pro (2-Hyp) in the NodB domain. The genome of *B. cereus* has 6 peptidoglycan deacetylases, three of them have already been studied (BC1960, BC3618, BC1974). This study focusses on peptidoglycan deacetylase BC1960. Specifically, a new point mutation of residue Arg169 to Ala was conducted, to collect more data about the hydroxylation of Ca atom of Pro171 mechanism. From the initial 13 clones, the 13th was chosen for further analysis. First of all, the expression conditions were examined and determined. Then the protein was overexpressed in BL12DE3 bacterial cells and purified using His-tag affinity chromatography (Ni-NTA agarose). Subsequently, circular dichroism experiments were held to collect structural data for the isolated protein. According to these experiments the protein is characterized by a great thermostability as it remains in a folded state even in high. Also, it was shown that the fusion protein is a typical α -helical protein as the required minimum and maxima are visible. These results were verified by conducting SVD analysis. The crystallization screens tested gave positive results, while at the same time co-crystallization and crystal soaking experiments using three different ligands were conducted.

Συντμήσεις

CD	Circular Dichroism
DDM	n-Dodecyl-B-D-maltoside
EDTA	Ethlen-Diamine-Tetra-Acetic acid
GlcNAc	N-Acetylglucosamine
IPTG	IsoPropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
kDa	kiloDalton
LB	Luria Bertani medium
Mb	Megabase
MurNAc	N-Acetylmuramic acid
MW	Molecular Weight
NiNTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Peptidoglycan Deacetylases
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
SVD	Singular Value Decomposition

Πίνακας Περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. BACILLUS ANTHRACIS ΚΑΙ BACILLUS CEREUS	1
1.1 BACILLUS CEREUS	1
1.2 BACILLUS ANTHRACIS	2
2. ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗ	3
2.1 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ	3
2.2 ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗ: ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΤΑ GRAM ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΘΕΤΙΚΑ ΚΑΤΑ GRAM ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	5
2.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ	6
2.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ.....	8
2.5 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΠΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ.....	9
3. ΑΠΑΚΕΤΥΛΑΣΕΣ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ	9
4. ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΑΚΕΤΥΛΑΣΩΝ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ	11
5. BC1960	12
6. ΥΔΡΟΞΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ CA ΤΗΣ PRO171	12
7. ΑΡΓΙΝΙΝΗ	14
8. ΣΚΟΠΟΣ	16
ΥΛΙΚΑ	1
ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	1
A. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	2
A1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION –PCR)	2
A2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΝΗΣΗ	2
A3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E. COLI ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA ΜΕ ΣΟΚ-ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ (HEAT-SOCK)	4
A4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINI-PREP)	5
A5. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ (GLYCEROL STOCK) ΓΙΑ ΜΑΚΡΑ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ	6
B. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	6
B1. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ	6
B2. ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ.....	9
B3. ΔΙΑΡΡΗΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (SONICATION)	9
B4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	10
B5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ, ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE).....	12
B6. ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ (DIALYSIS) ΚΑΙ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ	13
B7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ NANODROP	13

Γ. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΒΙΟΦΥΣΙΚΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	14
Δ. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΟΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	15
3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΗΣ	1
3.2 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ)	2
3.3 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BC1960_R169A	6
3.4 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BC1960	7
3.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ (CD)	9
3.6 ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΙΣ	14
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	1
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	2

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1. Μορφολογία <i>Bacillus cereus</i>	1
Εικόνα 2. Μορφολογία <i>Bacillus anthracis</i>	2
Εικόνα 3. Απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού της παθογένειας του <i>B. anthracis</i> , ο οποίος συνθέτει 4 τοξικούς παράγοντες: τη θνησιγόνο μεταλλοπρωτεάση LF, ο οποίος πέπτει MAPKs και οδηγεί σε νέκρωση ή υποξία, τον παράγοντα οιδήματος EF, ο οποίος έχει δράση αδενυλικής κυκλάσης μετατρέποντας το ATP σε cAMP οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση οιδήματος, και το προστατευτικό αντιγόνο PA, το οποίο αποτελεί τη συγκολλητική υπομονάδα των άλλων 2 τοξινών και όλες μαζί κωδικοποιούνται στο πλασμίδιο pXO1, και το poly-D-glutamic έλυτρο (CAP) που επιτρέπει την επιβίωση του βακτηρίου στα μακροφάγα και κωδικοποιείται στο πλασμίδιο pXO2.....	3
Εικόνα 4. Μονομερές πεπτιδογλυκάνης σε Gram αρνητικά βακτήρια, που αποτελείται από 2 σάκχαρα (NAG, NAM) ενωμένα με το τετραπεπτίδιο και το σημείο σύνδεσης των πεπτιδίων.	5
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος θετικού κατά Gram βακτηρίου (αριστερά) και αρνητικού κατά Gram βακτηρίου (δεξιά)	6
Εικόνα 6. Μονοπάτι βιοσύνθεσης μονομερούς πεπτιδογλυκάνης	8
Εικόνα 7. Μοντέλο δομής BC1960 από ανάλυση δεδομένων περίθλασης ακτινών X. απεικονίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα δέσμευσης μετάλλου, His131 (ροζ), His135 (ροζ), Asp81(μπλε), το καταλυτικό Asp80 (πορτοκαλί), η υδροξυλιωμένη Pro171 (κίτρινο) και η Arg169(πράσινο).	12
Εικόνα 8. Συντηρημένα μοτίβα 1-3 στις αλληλουχίες των PDAs που δείχνουν το συντηρημένο κατάλοιπο Pro (μαύρο βέλος, μοτίβο 3) που στοχεύεται από την αντίδραση υδροξυλίωσης, το καταλυτικό Asp (πράσινος κύκλος, μοτίβο 1) και η τριάδα δέσμευσης μετάλλου (μωβ αστέρια, μοτίβα 1, 2).....	13
Εικόνα 9. Α) 2Fo-Fc χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας της BC1960 στα 2.5σ που δείχνει την 2-Hyr τροποποίηση (βέλος) στην Pro171. Β) Το ενεργό κέντρο της BC1960, που δείχνει την τριάδα δέσμευσης μετάλλου (Asp81, His131, His135), το καταλυτικό Asp80 και την υδροξυλιωμένη Pro171	14
Εικόνα 10. Συντηρημένο μοτίβο 3 στις αλληλουχίες των PDAs που φανερώνει τη διαφοροποίηση στο κατάλοιπο της Αργινίνης (Α).....	15
Εικόνα 11. Μοντέλα δομής BC1960 και BA0330 από ανάλυση δεδομένων περίθλασης ακτινών X. Απεικονίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα δέσμευσης μετάλλου, His131 (μπλε), His135 (μπλε), Asp81(μπλε), το καταλυτικό Asp80 (μπλε) και η Arg169(κόκκινο). Χαρακτηριστικός είναι ο διαφορετικός προσανατολισμός της αργινίνης προς το ενεργό κέντρο λόγω της παρουσίας και απουσίας της από το μοτίβο 3.	15
Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση βημάτων πρωτοκόλλου μεταλλαξιγένεσης.....	3
Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση μορίου, κυψελίδας και κρυστάλλου.....	15
Εικόνα 14. Τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας ενός βιομορίου	17
Εικόνα 15. Α) Σχηματική απεικόνιση αμινοξέος αλανίνης Β) Σχηματική απεικόνιση αμινοξέος αργινίνης C) Μοντέλο δομής BC1960 από ανάλυση δεδομένων περίθλασης ακτινών X. Απεικονίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα δέσμευσης μετάλλου, His131 (ροζ), His135 (ροζ), Asp81(κόκκινο), το καταλυτικό Asp80 (μπλε), η υδροξυλιωμένη Pro171 (κίτρινο) ενώ έχει αφαιρεθεί η Arg169. Με τη χρήση της Pymol υπολογίστηκε η απόσταση	

ανάμεσα στην Pro171 και το Asp80 ύστερα από την απουσία της Arg169 και τη δημιουργία του κενού στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.	1
Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση της πλασμιδιακής κατασκευής του φορέα pET26b(+) με κλωνοποιημένο το γονίδιο BC1960_R169A Με βέλη φαίνονται το γονίδιο της BC1960_R169A, καθώς και το 6-ιστιδινικό επίτοπο (tag).	2
Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από κλώνους 11 και 13 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο έκφρασης.	3
Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από κλώνους 11 και 13 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο διαλυτότητας.	3
Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από καλλιέργειες 3, 4 και 5 του κλώνου 13 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο έκφρασης.	4
Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από καλλιέργειες 3, 4 και 5 του κλώνου 13 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο διαλυτότητας.	4
Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από καλλιέργεια 4 του κλώνου 13 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο διαλυτότητας.	5
Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του καθαρισμού της BC1960_R169A από κολώνα νικελίου σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5%	6
Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του καθαρισμού της αγρίου τύπου BC1960 από κολώνα νικελίου σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5%	8
Εικόνα 24. Φάσμα μοριακής ελλειπτικότητας κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 10°C στους 90°C για την πρωτεΐνη BC1960_R169A.	9
Εικόνα 25. Φάσμα μοριακής ελλειπτικότητας κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 10°C στους 90°C για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη BC1960.	10
Εικόνα 26. Χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης του κυκλικά πολωμένου φωτός στο άνω-υπεριώδες για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής.	11
Εικόνα 27. Α) Διάγραμμα από την ανάλυση SVD Β) Φάσμα μοριακής ελλειπτικότητας προς το μήκος κύματος κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 10°C στους 90°C για την πρωτεΐνη BC1960_R169A.	12
Εικόνα 28. Γ) Διάγραμμα από την ανάλυση SVD Δ) Φάσμα μοριακής ελλειπτικότητας προς το μήκος κύματος κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 10°C στους 90°C για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη BC1960.	13
Εικόνα 29. Συγκριτική παράθεση διαγραμμάτων από ανάλυση SVD της BC1960_R169A και BC1960wt.	13
Εικόνα 30. Κρύσταλλοι του μορίου της BC1960_R169A στις συνθήκες 12% PEG ₄₀₀₀ , 0.1 M Acetate Buffer pH 5.0, 0.5M Ammonium Sulfate	15
Εικόνα 31. Α) N-Phenylhydroxamine Β) Suberohydroxamic acid Γ) Salicylhydroxamic acid.	15

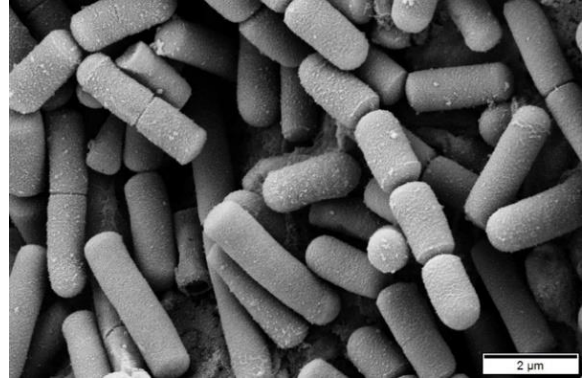
Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1. *Bacillus anthracis* και *Bacillus cereus*

1.1 *Bacillus cereus*

Ο *Bacillus cereus* είναι ένα θετικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο με την ικανότητα να δημιουργεί σπόρους. Τα κύτταρα του έχουν τη μορφή ράβδου, εξ' ου και το όνομα 'βάκιλλος' (ράβδος). Το όνομα "cereus" ("κερί") οφείλεται στο γεγονός ότι οι αποικίες του έχουν κηρώδη εμφάνιση σε τρυβλία Petri. Οι διαστάσεις ενός τυπικού κυττάρου είναι περίπου 1.0- 1.2 μm έως 3.0-5.0 μm. Οι σπόροι του είναι ελλειπτικοί και σχηματίζονται σε κεντρική ή παράκεντρη θέση. [1]



Εικόνα 1. Μορφολογία *Bacillus cereus*

Έχει μια ευρεία κατανομή στη φύση και απομονώνεται συχνά από το έδαφος και τα καλλιεργούμενα φυτά, ενώ είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένο να αναπτύσσεται στον εντερικό αυλό των εντόμων και των θηλαστικών.[2] Από αυτά τα σημεία ανάπτυξης απλώνεται εύκολα στα τρόφιμα, κυρίως γαλακτοκομικά, δημητριακά και κρέας, μέσω των οποίων μπορεί να προκαλέσει διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Η κλινική μόλυνση από *B. cereus* μπορεί γενικά να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κατηγορίες, την γαστρεντερική και την μη-γαστρεντερική νόσο. Η γαστρεντερική, τροφιμογενής νόσος που προκαλεί ο *B. cereus* μπορεί να παρουσιαστεί σε δύο μορφές, την εμετική και την διαρροϊκή.[3][4][5][6]

Η διαρροϊκή μορφή της γαστρεντερικής νόσου είναι μάλλον ήπια. Έχει χρόνο επώασης 8-16 ώρες, ενώ τα βασικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ναυτία (σπάνια έμετο), κοιλιακό άλγος, τεινεσμούς και υδαρή κόπρανα. Η νόσος μπορεί να χαρακτηριστεί ότι ομοιάζει με τροφική δηλητηρίαση που οφείλεται στο *Clostridium perfringens*. Η υπεύθυνη για την παθογένεια τοξίνη παράγεται στο λεπτό έντερο του ξενιστή. Τέλος, τα τρόφιμα που σχετίζονται με τη διαρροϊκή μορφή της νόσου είναι συνήθως προϊόντα κρέατος, λαχανικά, γαλακτοκομικά και δημητριακά.[3][4][5][6]

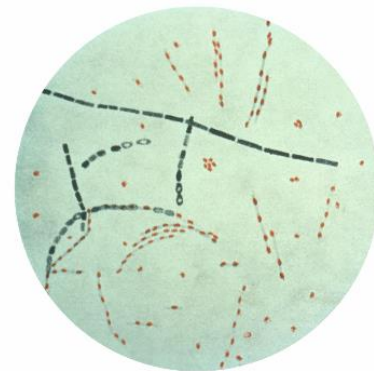
Η εμετική μορφή της γαστρεντερικής νόσου χαρακτηρίζεται ως περισσότερο σοβαρή και οξεία από τη διαρροϊκή. Έχει χρόνο επώασης 1-5 ώρες και τα βασικά συμπτώματα περιλαμβάνουν έμετο, κοιλιακό άλγος, ναυτία. Η υπεύθυνη για την παθογένεια τοξίνη είναι θερμοσταθερή και πιστεύεται πως είναι προσχηματισμένη στις τροφές που καταναλώνονται. Τα τρόφιμα που

σχετίζονται με την εμετική μορφή της νόσου είναι κυρίως τα δημητριακά και κυρίως το μαγειρεμένο ρύζι. [3][4][5][6]

Τα δύο είδη τροφιμογενούς νόσου που προκαλεί ο *B. cereus* οφείλονται σε διαφορετικούς τύπους τοξινών. Οι τοξίνες αυτές είναι συνήθως πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά συμπλέγματα. Συγκεκριμένα, η εμετική μορφή της νόσου οφείλεται στην εμετική τοξίνη, ενώ η διαρροϊκή μορφή οφείλεται σε τρεις διαφορετικές εντεροτοξίνες. Επιπλέον, ο *B. cereus* παράγει και άλλες μορφές ενζύμων που θεωρούνται τοξικά όπως ένα σύνολο φωσφολιπασών, πρωτεολυτικών ενζύμων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα παραπάνω ένζυμα καθώς και για τις εντεροτοξίνες βρίσκονται στο βασικό χρωμόσωμα του βακτηρίου. Αντίστοιχα, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της εμετικής τοξίνης βρίσκονται στο πλασμίδιο pCER (~270kb).[2]

1.2 *Bacillus anthracis*

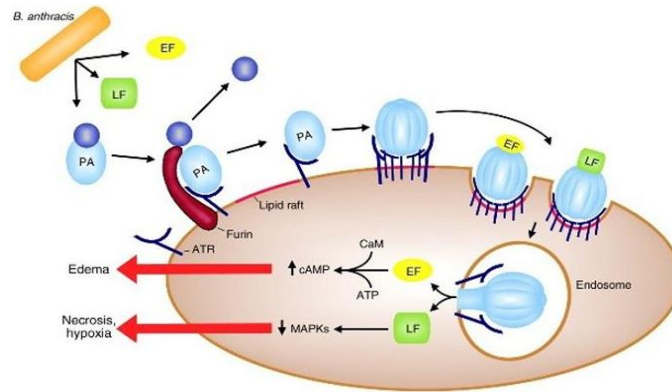
Ο *Bacillus anthracis* είναι ένα θετικό κατά Gram, σπορογόνο βακτήριο που απαντάται συνήθως στο έδαφος. Αποτελεί το πρώτο βακτήριο που δείχτηκε ποτέ ότι αποτελεί παθογόνο μικροοργανισμό (Koch, 1876). Είναι ο βακίλλος που ευθύνεται για την νόσο του άνθρακα και ίσως το δημοφιλέστερο παθογόνο από το γένος των βακίλλων.[7] Σε αντίθεση με τα περισσότερα είδη βακίλλων, η εισαγωγή σπορίων του *B. anthracis* μέσω αναπνευστικής, γαστρεντερικής οδού αλλά και δερματικά στα θηλαστικά μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη και φονική νόσο. Το βασικό χαρακτηριστικό του μικροοργανισμού είναι η παρουσία 2 μεγάλων διακριτών μεταξύ τους πλασμιδίων, pXO1 (182kb) και pXO2 (95kb). Η παρουσία και των δύο πλασμιδίων είναι απαραίτητη για την παθογένεια του βακτηρίου. [2][7]



Εικόνα 2. Μορφολογία *Bacillus anthracis*

Το πλασμίδιο pXO1 περιέχει τα γονίδια *cya* (κωδικοποιεί τον παράγοντα οίδηματος, edema factor, EF), *lef* (κωδικοποιεί το θανατηφόρο παράγοντα, Lethal Factor, LF) και *pagA* (κωδικοποιεί το προστατευτικό αντιγόνο, Protective Antigen, PA). Τα τρία αυτά γονίδια κωδικοποιούν τις δύο τοξίνες άνθρακα που εκκρίνονται από το βακτήριο, την τοξίνη ET (τοξίνη οίδηματος, Edema Toxin) και την τοξίνη LT (θανατηφόρο τοξίνη, Lethal Toxin). [2][7]

Το πλασμίδιο pXO2 περιέχει ένα οπερόνιο 5 γονιδίων (capBCADE), τα οποία συμμετέχουν στη σύνθεση της πολύ-D-γλουταμικής κάψουλας που περιβάλλει το βακτήριο. Η πολύ-D-γλουταμική κάψουλα αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό του είδους *B. anthracis* και του δίνει τη δυνατότητα να «ξεφεύγει» από τη φαγοκυττάρωση και κατ'έπекταση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. [2][7]



Εικόνα 3. Απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού της παθογένειας του *B. anthracis*, ο οποίος συνθέτει 4 τοξικούς παράγοντες: τη θνησιγόνο μεταλλοπρωτεάση LF, ο οποίος πέπτει MAPKs και οδηγεί σε νέκρωση ή υποξία, τον παράγοντα οιδήματος EF, ο οποίος έχει δράση αδενυλικής κυκλάσης μετατρέποντας το ATP σε cAMP οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση οιδήματος, και το προστατευτικό αντιγόνο PA, το οποίο αποτελεί τη συγκολλητική υπομονάδα των άλλων 2 τοξινών και όλες μαζί κωδικοποιούνται στο πλασμίδιο pXO1, και το poly-D-glutamic έλυτρο (CAP) που επιτρέπει την επιβίωση του βακτηρίου στα μακροφάγα και κωδικοποιείται στο πλασμίδιο pXO2.

2. Πεπτιδογλυκάνη

2.1 Δομή της πεπτιδογλυκάνης

Η βασική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας αρκετά σκληρής στιβάδας που ονομάζεται πεπτιδογλυκάνη ή μουρεΐνη (λατινικά murus σημαίνει τοίχωμα). Το μακρομόριο της πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες σακχάρων, που συνδέονται μεταξύ τους με μικρά πεπτίδια, τα οποία λειτουργούν ως γέφυρες. Το μονομέρες της πεπτιδογλυκάνης δομείται από δύο ενωμένα αμινοσάκχαρα, την N-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNac, NAG) και το N-ακετυλομουραμικό οξύ (MurNac, NAM) και από μια μικρή ομάδα αμινοξέων, αποτελούμενη από L-αλανίνη, D-αλανίνη, D-γλουταμικό οξύ και λυσίνη ή διαμινοπιμελικό οξύ (DAP). Τα συστατικά αυτά συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μια επαναλαμβανόμενη δομή, το τετραπεπτίδιο της γλυκάνης.

Η σύνδεση μεταξύ των καταλοίπων GlcNac και των MurNac επιτυγχάνεται μέσω β-1,4- N-γλυκοζιτικών δεσμών. Η γαλακτική ομάδα του N-ακετυλομουραμικού οξέος είναι συνδεδεμένη ομοιοπολικά με ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από μικρό αριθμό αμινοξέων. Τα μουροπεπτίδια τα οποία συμμετέχουν στη δομή του πολυμερούς της πεπτιδογλυκάνης μπορεί να ποικίλλουν από είδος σε είδος. Ωστόσο το πιο συνηθισμένο πεπτίδιο είναι ένα πενταπεπτίδιο αποτελούμενο από τα εξής αμινοξέα, L-αλανίνη, D-αλανίνη, D-γλουταμικό οξύ, και διαμινοπιμελικό οξύ ή L-λυσίνη δηλαδή είναι της μορφής L-Ala-γ-D-Glu-mesoA2pm/L-Lys-D-Ala-D-Ala, (όπου το A2pm, 2,6-διαμινοπιμελικό οξύ), στη νεοσυντιθέμενη πεπτιδογλυκάνη. Το τελευταίο κατάλοιπο D-Ala χάνεται στο ώριμο μακρομόριο. Συχνά, στους περισσότερους θετικούς κατά Gram κόκκους το διαμινοπιμελικό οξύ (DAP) αντικαθίσταται από την L-λυσίνη. [8][9]

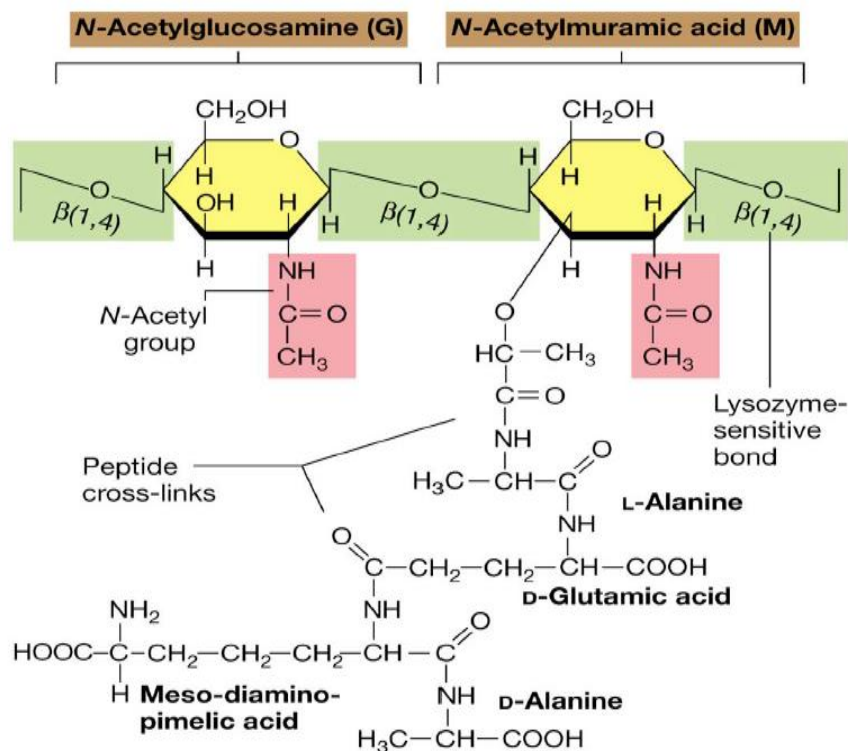
Οι περισσότερες διαφοροποιήσεις στην πεπτιδογλυκάνη αφορούν τον τρόπο διασύνδεσης και τη σύσταση της πεπτιδικής γέφυρας. Συγκεκριμένα, το πρώτο αμινοξύ του πενταπεπτιδίου προστίθεται από τη λιγάση MurC και είναι στα περισσότερα είδη βακτηρίων η L-Ala και σπανίως σε κάποια είδη Gly ή L-Ser. Το αμινοξύ που συναντάται στη θέση 2 σε όλα τα είδη είναι το D-Glu προστίθεται από τη λιγάση MurD, και είναι συνήθως υδροξυλιωμένο. Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση παρουσιάζεται στη θέση 3. Η προσθήκη του αμινοξέος στη θέση αυτή καταλύεται από τη λιγάση MurE. Αυτό το αμινοξύ είναι κατά κανόνα ένα διάμινο οξύ, είτε meso-A2pm (κυρίως στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, Mycobacteria, Bacilli) ή L-Lys (θετικά κατά Gram βακτήρια). Σε ορισμένα είδη, ωστόσο, μπορεί να παρατηρηθεί εναπόθεσή στη θέση 3 άλλων διάμινο οξέων όπως L-Orn, LL-A2pm, meso-λανθιονίνη, L-2,4-διαμινοβουτυρικό οξύ, D-Lys ή αμινοξέων όπως L-homoserine, L-Ala, L-Glu. Τα αμινοξέα στις θέσεις 4 και 5 τοποθετούνται συνήθως ως διπεπτίδια. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το διπεπτίδιο D-Ala-D-Ala. Η σύνθεση του διπεπτιδίου καταλύεται από το ένζυμο Ddl ενώ η ενσωμάτωση στο πενταπεπτίδιο στη θέση 4 από τη λιγάση MurF.[8]

Στα περισσότερα θετικά κατά Gram βακτήρια, η διασύνδεση γίνεται συνήθως με μικρές πεπτιδικές αλυσίδες, οι τύποι και οι αριθμοί των οποίων ποικίλλουν ανάλογα το είδος του οργανισμού. Εκτός από τα αμινοξέα, τα οποία απαντούν και στο πενταπεπτίδιο, η πεπτιδική γέφυρα μπορεί να περιέχει επίσης γλυκίνη, θρεονίνη, σερίνη ή ασπαρτικό οξύ. [9]

Υπάρχουν δύο βασικές ομάδες διασύνδεσης. Στην πρώτη ομάδα που είναι η συνηθέστερη μεταξύ των διαφορετικών ειδών βακτηρίων, παρατηρείται διασύνδεση (3-4). Συγκεκριμένα, η διασύνδεση των γλυκανικών αλυσίδων

πραγματοποιείται μεταξύ της αμινομάδας της πλευρικής αλυσίδας του καταλοίπου στη θέση 3 της μιας πεπτιδικής υπομονάδας και της καρβοξυλομάδας της D-Ala στη θέση 4 της παρακείμενης πεπτιδικής υπομονάδας. Η διασύνδεση γίνεται είτε άμεσα (αρνητικά κατά Gram βακτήρια) είτε μέσω μιας μικρής πεπτιδικής γέφυρας (θετικά κατά Gram βακτήρια). Στη δεύτερη ομάδα παρατηρείται διασύνδεση (2-4) και απαντάται μόνο στα Κορυνοβακτήρια (Corynebacteria). Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται διασύνδεση μεταξύ της α-καρβοξυλομάδας του D-Glu στη θέση 2 της μιας πεπτιδικής υπομονάδας και στην καρβοξυλομάδα της D-Ala στη θέση 4 της παρακείμενης πεπτιδικής υπομονάδας.[8]

Ωστόσο, παρά τη χημική ποικιλομορφία της, η βασική δομική οργάνωση της πεπτιδογλυκάνης είναι πάντοτε η ίδια. Συγκεκριμένα, μια γλυκοζαμίνη και ένα μουραμικό οξύ σχηματίζουν το βασικό σκελετό, και τα μόρια του μουραμικού διασυνδέονται μεταξύ τους με ολιγομερή πεπτιδίων.[9]



Εικόνα 4. Μονομερές πεπτιδογλυκάνης σε Gram αρνητικά βακτήρια, που αποτελείται από 2 σάκχαρα (NAG, NAM) ενωμένα με το τετραπεπτίδιο και το σημείο σύνδεσης των πεπτιδίων.

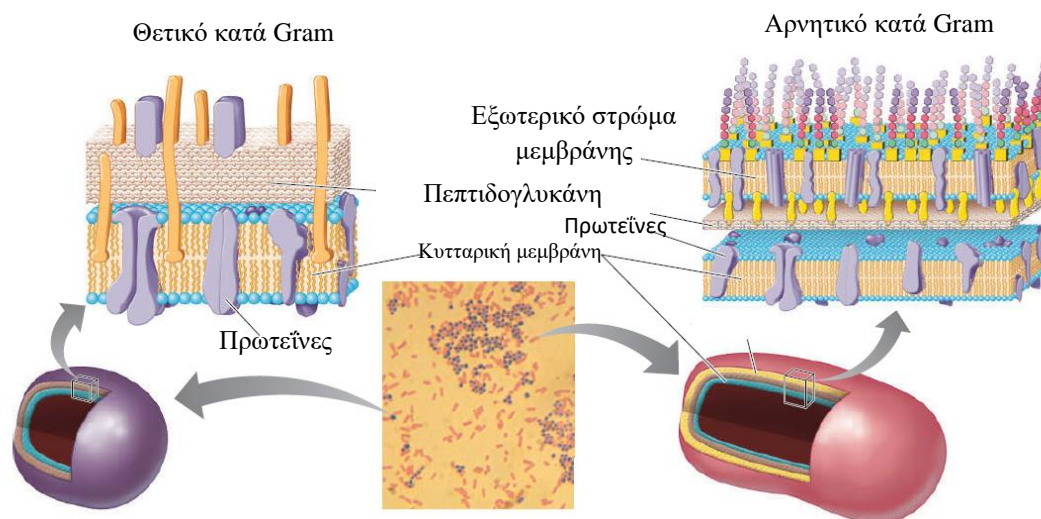
2.2 Πεπτιδογλυκάνη: αρνητικά κατά Gram βακτήρια και θετικά κατά Gram βακτήρια

Τα βακτήρια μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, θετικά κατά Gram βακτήρια και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Η διαφοροποίηση

αυτή γίνεται βάσει της παρουσίας επιπλέον στοιβάδας διαφορετικής χημικής σύστασης εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης αλλά και βάσει του πάχους της στοιβάδας πεπτιδογλυκάνης.

Στα θετικά κατά Gram βακτήρια έως και 90% του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη, αν και ένα άλλο είδος συστατικού, το τειχικό οξύ, απαντάται σε μικρές ποσότητες. Τα τειχικά οξέα προεξέχουν από την πλασματική μεμβράνη και διασυνδέουν ομοιοπολικά τις στιβάδες της πεπτιδογλυκάνης. Τα περισσότερα βακτήρια που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία έχουν πολλές (έως και 25) στρώσεις πεπτιδογλυκάνης.

Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια μόνο το 10% του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη. Στο λεπτό κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων αυτής της κατηγορίας υπάρχουν μεγάλα ποσά πρωτεϊνών, λιπιδίων και πολυσακχαριτών, που σχηματίζουν πρόσθετη στιβάδα από λιποπρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες. [9][10]



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος θετικού κατά Gram βακτηρίου (αριστερά) και αρνητικού κατά Gram βακτηρίου (δεξιά)

2.3 Βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης

Η σύνθεση νέας πεπτιδογλυκάνης αποτελεί μέρος της αύξησης του κυττάρου πριν την κυτταρική διαίρεση. Το νέο υλικό του κυτταρικού τοιχώματος θα πρέπει να προστίθεται στο προϋπάρχον χωρίς να επέρχεται διαταραχή της δομής του τοιχώματος. [9]

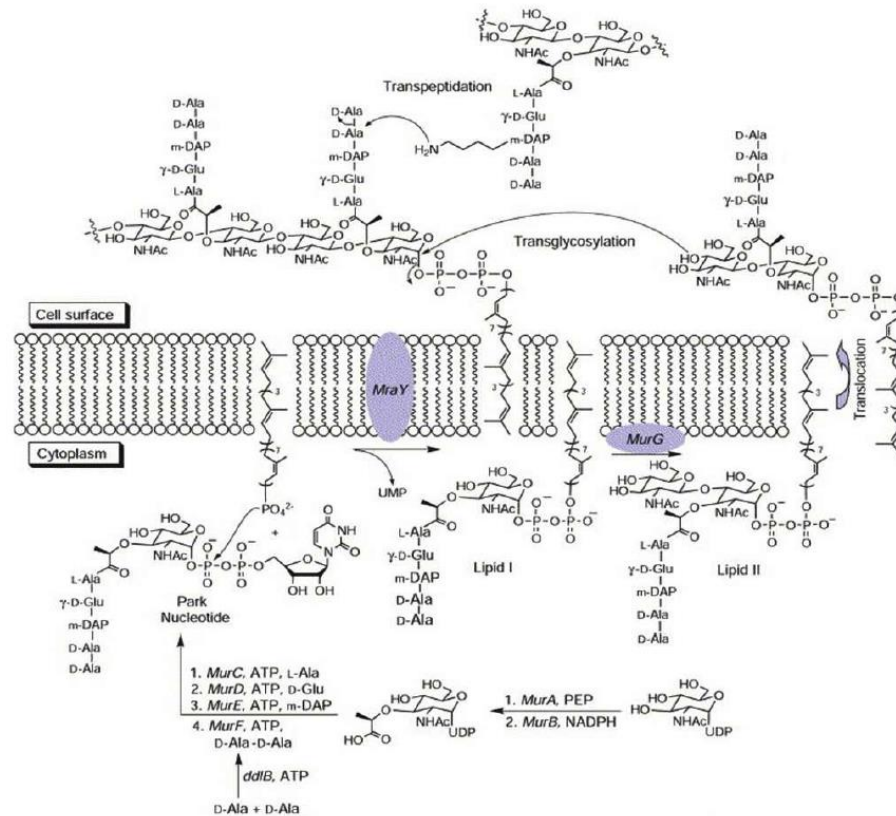
Η διαδικασία της σύνθεσης νέας πεπτιδογλυκάνης κατά την κυτταρική διαίρεση, περιλαμβάνει τη δημιουργία μικρών ελεγχόμενων τομών στο

τοίχωμα από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται αυτολυσίνες ή υδρολάσες. Το νέο υλικό του τοιχώματος αποτίθεται κατά μήκος αυτών των ανοιγμάτων. [9]

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει δύο στάδια τα οποία λαμβάνουν χώρα σε τρία διακριτά κυτταρικά διαμερίσματα, το κυτταρόπλασμα, την πλασματική μεμβράνη και το περίπλασμα.

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται σχηματισμός των μονομερών της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρόπλασμα από ένα σύνολο πρόδρομων μορίων φωσφορικής ουριδίνης (UDP precursors) και λιπιδίων, τα οποία παρουσιάζουν διαμεσολαβητικό ρόλο. Αρχικά, μέσω ενός βιοσυνθετικού μονοπατιού έξι σταδίων, τα οποία καταλύονται από τα ένζυμα MurA-F, παράγεται UDP-ενεργοποιημένο *N*-ακετυλομουραμικό πενταπεπτίδιο από την UDP-*N*-ακετυλογλυκοζαμίνη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πρόσδεση του φωσφο-*N*-ακετυλομουραμικού πενταπεπτιδίου σε ένα λιπίδιο, τη βακτοπρενόλη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του λιπιδίου I. Η βακτοπρενόλη, ένα λιπίδιο που έχει δράση μορίου-φορέα και μεταφέρει τις δομικές μονάδες της πεπτιδογλυκάνης δια μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο στάδιο αυτό. Η ομοιοπολική σύνδεση της *N*-ακετυλογλυκοζαμίνης στο λιπίδιο I οδηγεί στο σχηματισμό του λιπιδίου II, το οποίο παίζει το ρόλο μεταφορέα και βοηθά το δισακχαριτικό πενταπεπτίδιο να διαπεράσει το εσωτερικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.[10]

Το δεύτερο περιλαμβάνει τη διαδικασία του πολυμερισμού που πραγματοποιείται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η διαδικασία της βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης ολοκληρώνεται με την τρανσπεπτιδίωση. [10] Η τρανσπεπτιδίωση είναι ο σχηματισμός πεπτιδικών διασυνδέσεων μεταξύ καταλοίπων μουραμικού οξέος σε παρακείμενες αλυσίδες. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει το σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών με ένα ή περισσότερα διαφορετικά αμινοξέα, ανάλογα με τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος κάθε οργανισμού. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια οι διασυνδέσεις δημιουργούνται συνήθως ανάμεσα στο διαμινοπιμελικό οξύ του ενός πεπτιδίου και στη D-αλανίνη του παρακείμενου πεπτιδίου. Αντίστοιχα, στα θετικά κατά Gram βακτήρια, στα οποία συνήθως εμφανίζεται μια γεφύρωση γλυκίνης, οι διασυνδέσεις αναπτύσσονται εγκάρσια προς αυτήν, κυρίως από μια L-λυσίνη του ενός πεπτιδίου και μια D-αλανίνη του άλλου.[9]



Εικόνα 6. Μονοπάτι βιοσύνθεσης μονομερούς πεπτιδογλυκάνης

2.4 Βιολογικός ρόλος της πεπτιδογλυκάνης

Η πεπτιδογλυκάνη συμβάλλει στη σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος ενώ παράλληλα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση και διατήρηση του μοναδικού κυτταρικού σχήματος, γεγονός που εξαρτάται από το μήκος των αλυσίδων γλυκάνης και την έκταση των πεπτιδικών συνδέσεων. [10]

Επίσης, η παρουσία της πεπτιδογλυκάνης προφυλάσσει το κύτταρο από τη διάρρηξη λόγω εσωτερικής ωσμωτικής πίεσης, συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία ενός άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος.

Τέλος, ο ρόλος της πεπτιδογλυκάνης είναι κεντρικός σε μια σειρά βιολογικών λειτουργιών των βακτηριακών κυττάρων όπως είναι η αυτόλυση και η σπορίωση (σε ορισμένα είδη), γεγονός που γίνεται αντιληπτό μέσα από τις διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται και τις τροποποιήσεις που υφίσταται η πεπτιδογλυκάνη κατά τον κύκλο ζωής του κυττάρου. [9][10][11]

2.5 Ενζυμική απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης

Πολλά παθογόνα βακτηριακά είδη περιέχουν δευτερογενείς τροποποιήσεις στους κλώνους γλυκανών που επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή τους με στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι πιο συχνές τροποποιήσεις που συναντώνται είναι η N-απακετυλίωση (καταλοίπων GlcNAc και MurNAc), η N-γλυκοσυλίωση (μουραμικού οξέος) και η O-ακετυλίωση (καταλοίπων MurNAc) ενώ έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί αρκετά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για αυτές. [19]

Η απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης αποτελεί γνωστή διαδικασία ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 70, όταν η μελέτη της σύστασης της πεπτιδογλυκάνης του ανθεκτικού στη λυσοζύμη, *Bacillus cereus*, ταυτοποίησε την παρουσία υψηλού ποσοστού μη ακετυλιωμένων καταλοίπων, κυρίως-γλυκοζαμίνης και οδήγησε στην ανακάλυψη της ύπαρξης μιας απακετυλάσης των N-ακετυλογλυκοζαμινικών καταλοίπων. [20]

Από τότε πολλές εργασίες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τη δομή διαφόρων κυτταρικών τοιχωμάτων καταδεικνύοντας ότι η απακετυλίωση αποτελεί χαρακτηριστικό αρκετών βακτηριακών ειδών και ότι το ποσοστό της συγκεκριμένης τροποποίησης διαφοροποιείται ακόμα και μεταξύ βακτηρίων του ίδιου είδους.

Ρόλο κλειδί στην αντίδραση της απακετυλίωσης των καταλοίπων GlcNAc και MurNAc, παίζουν οι απακετυλάσες πολυσακχαριτών (συγκεκριμένα οι απακετυλάσες της πεπτιδογλυκάνης) που φαίνεται να δρουν στην πολυμερισμένη πεπτιδογλυκάνη και όχι σε πρόδρομα. [19]

Οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης (PDA) κατατάσσονται στην οικογένεια των υδατανθρακικών εστερασών 4 (CE-4 family) και αφαιρούν την ακετυλομάδα (CH₃CO-) από το άζωτο στη θέση του άνθρακα 2 του υδατανθρακικού καταλοίπου. Εν δυνάμει υποστρώματα στο μακρομόριο της πεπτιδογλυκάνης είναι τόσο η N-ακετυλγλυκοζαμίνη όσο και το N-ακετυλμουραμικό οξύ.

3. Απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης

Οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης (PDA) κατατάσσονται στην οικογένεια των υδατανθρακικών εστερασών 4 (CE-4 family), η οποία περιλαμβάνει τις απακετυλάσες της N-ακετυλογλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης (EC 3.1.1.-), τις απακετυλάσες των χιτοολιγοσακχαριτών της NodB των ριζόβιων (EC 3.5.1.-), τις απακετυλάσες χιτίνης (EC 3.5.1.41), τις εστεράσες ακετυλοξυλάνης (EC 3.1.1.72), και τις ξυλανάσες A, C, D και E (EC 3.2.1.8). Τα μέλη αυτής της ομάδας καταλύουν την υδρόλυση είτε άζωτο (N) –

συνδεδεμένων ακετυλομάδων από κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης, απακετυλάσες των χιτοολιγοσακχαριτών της NodB των ριζόβιων, απακετυλάσες χιτίνης) είτε οξυγόνο (O)- συνδεδεμένων ακετυλομάδων από κατάλοιπα O-ακετυλοξυλόζης (εστεράσες ακετυλξυλάνης και ξυλανάσες A, C, D και E). [12][13][14]

Όλα αυτά τα ένζυμα έχουν από κοινού μια γενική συντηρημένη περιοχή που αποκαλείται περιοχή απακετυλίωσης πολυσακχαριτών (σύμφωνα με την ταξινόμηση Henrissat). Επίσης, έχει προταθεί ότι τα μέλη της ομάδας ενζύμων CE-4 είναι μεταλλο-εξατρώμενα, καθώς η προσθήκη δισθενούς κατιόντος οδηγεί σε αύξηση της ενζυμικής τους δραστηριότητας. [13][15]

Οι γνώσεις μας για τα ένζυμα αυτά είναι περιορισμένες, συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας CE-4. Η πρώτη μελέτη με αντικείμενο την ενζυμική απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος πραγματοποιήθηκε το 1971, ενώ στη συνέχεια στις σχετικές έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα χρησιμοποιήσαν ως συστήματα μελέτης οι οργανισμοί *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* και *Bacillus cereus*. Συγκεκριμένα, μελέτες στο γονιδίωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων φανέρωσαν την ύπαρξη ενός συνόλου ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης που κωδικοποιούν για πιθανές απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης. Προτάθηκε πως αυτά τα ORFs (open reading frames, ανοικτά πλαίσια διαβάσματος) κωδικοποιούν για απακετυλάσες της πεπτιδογλυκάνης, ωστόσο η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε σε τρεις μόνο περιπτώσεις. [14]

Συγκεκριμένα, το γονίδιο *pgdA* από το βακτήριο *Streptococcus pneumoniae* και το γονίδιο *lmo0415I* από το βακτήριο *Listeria monocytogenes* έχουν ταυτοποιηθεί ότι κωδικοποιούν για δύο διακριτές απακετυλάσες N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Αντίστοιχα, το γονίδιο *pdaA* από το βακτήριο *Bacillus subtilis* έχει ταυτοποιηθεί ότι κωδικοποιεί για ένα ένζυμο απαραίτητο για τη παραγωγή μουραμικής δ-λακτάμης στο περίβλημα σπορίων του βακτηρίου. [14]

Οι διαφορετικές τροποποιήσεις στην πεπτιδογλυκάνη όπως η απακετυλίωση της N-ακετυλογλυκοζαμίνης, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα σύνολο βιολογικών διεργασιών του βακτηριακού κυττάρου, όπως η αύξηση, η διαίρεση, η αυτόλυση, η διατήρηση του σχήματος του κυττάρου και ο σχηματισμός βιοϋμενίων. Επίσης, ορισμένα βακτήρια βασίζονται στην ύπαρξη των τροποποιήσεων της πεπτιδογλυκάνης και συγκεκριμένα στην απακετυλίωση της N-ακετυλογλυκοζαμίνης, για να αντισταθμίσουν τη δράση

της λυσοζύμης του οργανισμού ξενιστή και κατ' επέκταση να προστατευθούν από τους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού ξενιστή.[15]

4. Δομική ανάλυση απακετυλασών πεπτιδογλυκάνης

Τα ένζυμα της οικογένειας CE4 εμφανίζουν μια ιδιαίτερα συντηρημένη επικράτεια ομολογίας, την επικράτεια NodB, η οποία υιοθετεί αναδίπλωση $(\alpha/\beta)_8$ βαρελίου. Οι περισσότερες δομές απαιτούν την παρουσία ενός δισθενούς ιόντος στο ενεργό κέντρο, το οποίο συντονίζεται από μια συντηρημένη τριάδα δέσμευσης μετάλλου αποτελούμενη από δύο κατάλοιπα ιστιδίνης (His) και ένα κατάλοιπο ασπαρτικού (Asp), είναι δηλαδή της μορφής His-His-Asp. Συγκεκριμένα, για τη BC1960, έχει βρεθεί ότι η υψηλότερη ενεργότητα παρατηρείται με το κοβάλτιο, όμως η βιοδιαθεσιμότητα των δισθενών κατιόντων και η εγγενής συγγένεια του ενζύμου δείχνει ότι το προτιμώμενο μέταλλο είναι πιο πιθανό να είναι ο ψευδάργυρος λόγω περίσσειας στο περιβάλλον. Παρόλα αυτά, η ενισχυμένη πρόσδεση δε σημαίνει απαραίτητα και ενισχυμένη καταλυτική ενεργότητα.[16]

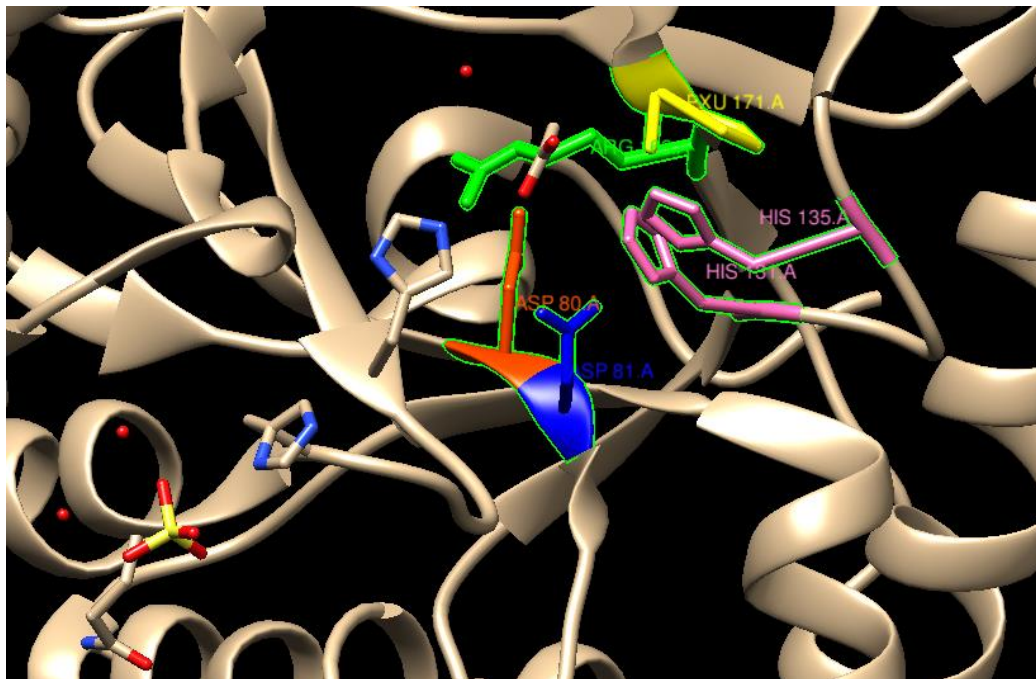
Ο καταλυτικός μηχανισμός βασίζεται σε κατάλοιπο ασπαρτικού καθώς επίσης και σε ένα κατάλοιπο ιστιδίνης, τα οποία έχουν δράση καταλυτικής βάσης και καταλυτικού οξέος, αντίστοιχα. Πέντε συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της επικράτειας NodB των ενζύμων της οικογένειας CE4. Συγκεκριμένα, το πρώτο Asp του μοτίβου 1, TFDD, θεωρείται ότι έχει δράση καταλυτικής βάσης και ενεργοποιεί το καταλυτικό νερό. Αντίστοιχα, το δεύτερο Asp του μοτίβου 1 συντονίζει το ιόν μετάλλου της δομής. Το μοτίβο 2 (H(S/T)XXH) συνεισφέρει με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης, τα οποία προσδέουν το μέταλλο. Εν συνεχεία, το μοτίβο 3 (RpPXG) συνεισφέρει ένα συντηρημένο κατάλοιπο αργινίνης (Arg), που διατηρεί την καταλυτική βάση Asp στην ενεργή της μορφή, καθώς επίσης και με ένα αυστηρά συντηρημένο κατάλοιπο προλίνης (Pro). Τέλος, το καταλυτικό οξύ είναι ένα κατάλοιπο His, μέρος του μοτίβου 5, το οποίο διατηρείται στην πρωτονιομένη κατάσταση του από ένα Asp του μοτίβου 4. [16]

Είναι σημαντικό, τέλος, να σημειωθεί ότι έχει βρεθεί ότι στη BC0361 (*Bacillus cereus*) και την ομόλογό της, BA0330 (*Bacillus anthracis*) αλλά και στη BC1960 (*Bacillus cereus*) υπάρχει μια τροποποιημένη στο Ca προλίνη (Pro) στο ενεργό κέντρο, που εμφανίζεται υδροξυλιωμένη (ως α-υδροξυ-L-προλίνη ή 2-Hyp).[17]

5. BC1960

Το ένζυμο BC1960 ανήκει στην οικογένεια των CE4 ενζύμων και κωδικοποιείται από το γονίδιο bc1960 στο γονιδίωμα του θετικού κατά Gram *Bacillus cereus*. Συγκεκριμένα, καταλύει την απακετυλίωση καταλοίπων N-ακετυλογλυκοζαμίνης από την πεπτιδογλυκάνη των θετικών κατά Gram βακτηρίων του *Bacillus cereus* και *Bacillus subtilis* και του θετικού κατά Gram βακτηρίου *Helicobacter pylori*.

Ως μέλος της οικογένειας των ενζύμων CE4 διαθέτει τη συντηρημένη επικράτεια NodB, και συγκεκριμένα αυτή αποτελείται από τα εξής κατάλοιπα, Asp80, His225, Asp199 και Pro171. Επίσης, έχει βρεθεί ότι είναι μια μεταλλοεξαρτώμενη πρωτεΐνη, χρησιμοποιώντας Co^{2+} ως συμπάραγοντα, με την τριάδα πρόσδεσης του μετάλλου να αποτελείται από τα κατάλοιπα His131, His135, Asp81. [16]

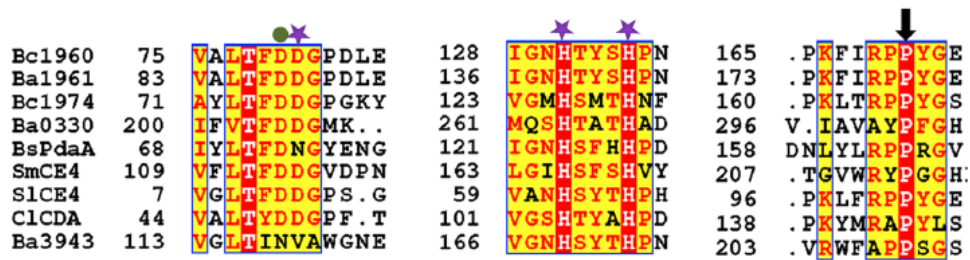


Εικόνα 7. Μοντέλο δομής BC1960 από ανάλυση δεδομένων περίθλασης ακτινών X. απεικονίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα δέσμευσης μετάλλου, His131 (ροζ), His135 (ροζ), Asp81(μπλε), το καταλυτικό Asp80 (πορτοκαλί), η υδροξυλιωμένη Pro171 (κίτρινο) και η Arg169(πράσινο).

6. Υδροξυλίωση του Ca της Pro171

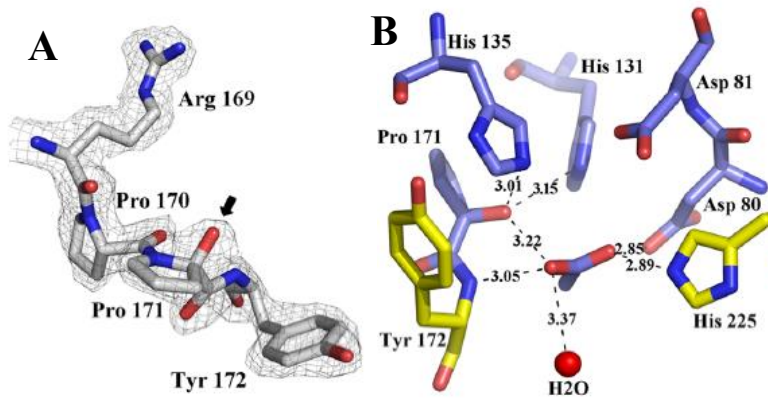
Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνικών μορίων οδηγούν σε αύξηση της ποικιλομορφίας αλλά και της λειτουργικής πολυπλοκότητας του πρωτεόματος. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η μετα-μεταφραστική υδροξυλίωση των πλευρικών ομάδων προλίνης από προλυλ-υδρολάσες, οδηγεί στην παραγωγή υδροξυπρολίνης (Hyp). Η υδροξυπρολίνη αποτελεί βασικό

συστατικό του κολλαγόνου και παράλληλα συμβάλλει στην αύξηση της σταθερότητάς του. Αντίστοιχα, η υδροξυπρολίνη διαδραματίζει ρόλο κλειδί στην αρχιτεκτονική του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, ενώ έχει βρεθεί ότι συνδέεται με σηματοδοτικά μονοπάτια (όπως υποξία) και ασθένειες (καρκίνος). Αντίθετα, η Ca υδροξυλίωση της προλίνης δεν έχει μελετηθεί πλήρως στα βακτηριακά κύτταρα, καθώς είχε παρατηρηθεί ότι συμβαίνει μόνο στην ελεύθερη προλίνη.



Εικόνα 8. Συντηρημένα μοτίβα 1-3 στις αλληλουχίες των PDAs που δείχνουν το συντηρημένο κατάλοιπο Pro (μαύρο βέλος, μοτίβο 3) που στοχεύεται από την αντίδραση υδροξυλίωσης, το καταλυτικό Asp (πράσινος κύκλος, μοτίβο 1) και η τριάδα δέσμευσης μετάλλου (μωβ αστέρια, μοτίβα 1, 2)

Ωστόσο, σύγχρονα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που αφορούν τις πιθανές απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης Bc0361 (*Bacillus cereus*) και Ba0330 (*Bacillus anthracis*), ταυτοποίησαν την ύπαρξη μιας νέας μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Συγκεκριμένα, αυτό το νέο είδος τροποποίησης αντιπροσωπεύει ένα νέο τύπο υδροξυλίωσης της προλίνης, που στοχεύει την κύρια αλυσίδα των πρωτεϊνικών μορίων, τροποποιώντας το άτομο του Ca των καταλοίπων προλίνης για να παράγει 2-υδροξυπρολίνη (2-Hyp). Φαίνεται ότι η τροποποίηση του καλά συντηρημένου καταλοίπου προλίνης του ενεργού κέντρου σε 2-υδροξυπρολίνη συμβαίνει ευρέως στις απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης της οικογένειας CE4.



Εικόνα 9. A) 2Fo-Fc χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας της BC1960 στα 2.5σ που δείχνει την 2-Hyr τροποποίηση (βέλος) στην Pro171. B) Το ενεργό κέντρο της BC1960, που δείχνει την τριάδα δέσμευσης μετάλλου (Asp81, His131, His135), το καταλυτικό Asp80 και την υδροξυλιωμένη Pro171

Ο μηχανισμός της νέας υδροξυλίωσης της προλίνης είναι πιθανόν αυτοκαταλυτικός και μοιράζεται τουλάχιστον ένα καταλυτικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου με την αντίδραση της απακετυλίωσης. Η προέλευση της υδροξυλομάδας, αποδείχτηκε πως είναι το μοριακό οξυγόνο. Πρόκειται για μια ασυνήθιστη διαδικασία ωρίμανσης των απακετυλασών πεπτιδογλυκάνης, που συμπλέκει τις αντιδράσεις της υδροξυλίωσης και της απακετυλίωσης, μέσω της οποίας η ενεργότητα απακετυλάσης ενισχύεται κατά μια τάξη μεγέθους για την απακετυλάση BC1960. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η υδροξυλίωση του Ca της προλίνης παράγει σταθερά τροποποιημένες πρωτεΐνες, που μπορεί να διατηρούν πολύ υψηλά επίπεδα υδροξυλίωσης, ακόμα και μετά από αποθήκευση για περίοδο ενός χρόνου στους 40°C. [17]

7. Αργινίνη

Τα ένζυμα της οικογένειας των υδατανθρακικών εστερασών 4 (CE-4 family) χαρακτηρίζονται, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, από την παρουσία μιας ιδιαίτερα συντηρημένης επικράτειας ομολογίας, της επικράτειας NodB. Από το σύνολο των πέντε συντηρημένων μοτίβων αλληλουχίας, τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της επικράτειας NodB, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το μοτίβο 3(RpPXG). Το συγκεκριμένο μοτίβο συνεισφέρει ένα συντηρημένο κατάλοιπο αργινίνης (Arg), που διατηρεί την καταλυτική βάση Asp στην ενεργή της μορφή.

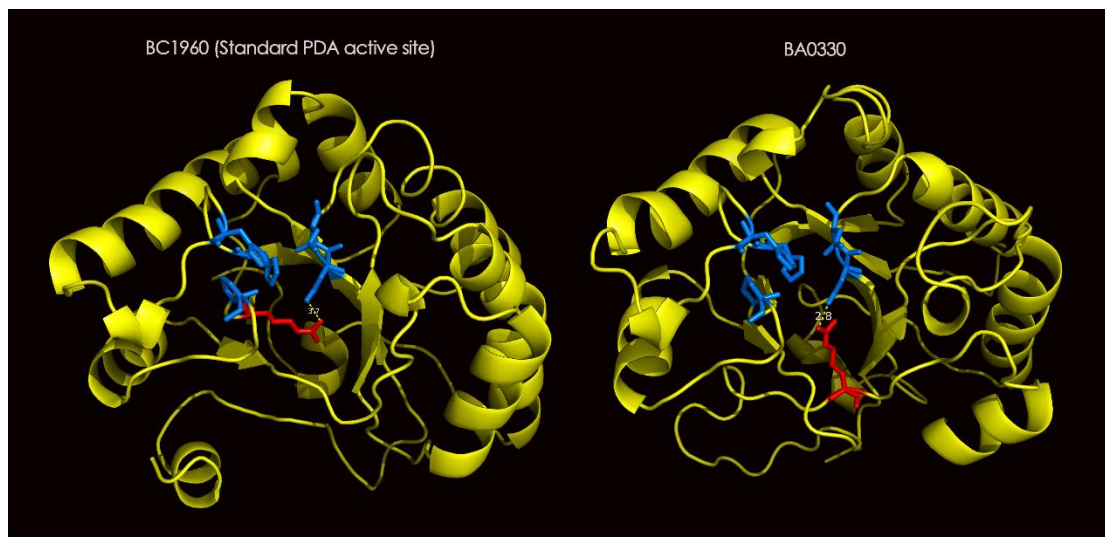
Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες φανέρωσαν την απουσία του καταλοίπου της Αργινίνης του μοτίβου 3 σε ορισμένα ένζυμα της οικογένειας CE-4. Παρόλα αυτά, τα ένζυμα συνέχιζαν να διατηρούν το σύνολο της ενεργότητας τους. Δομικές αναλύσεις των συγκεκριμένων ενζύμων φανέρωσαν την παρουσία

καταλοίπου αργινίνης σε θέση διαφορετική από το μοτίβο 3, ωστόσο ικανή να αλληλοεπιδράσει με την καταλυτικό Asp του ενεργού κέντρου. Η σημασία της συγκεκριμένης αργινίνης εκτός του μοτίβου 3 επιβεβαιώθηκε με πειράματα ανάλυσης ενεργότητας ενζύμων στα οποία είχε αφαιρεθεί το συγκεκριμένο κατάλοιπο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε απώλεια διαλυτότητας και μείωση ή συνολική απώλεια ενεργότητας του ενζύμου.

BA0330	299	V	A	Y	P	F	G	H
BA0331	306	L	A	Y	P	V	G	S
BA1961	176	I	R	P	P	Y	G	E
BA1977	163	T	R	P	P	Y	G	S
BA2944	165	T	R	P	S	Y	G	S
BA3943	206	F	A	P	P	S	G	S
BC1960	176	I	R	P	P	Y	G	E

Εικόνα 10. Συντηρημένο μοτίβο 3 στις αλληλουχίες των PDAs που φανερώνει τη διαφοροποίηση στο κατάλοιπο της Αργινίνης (A)

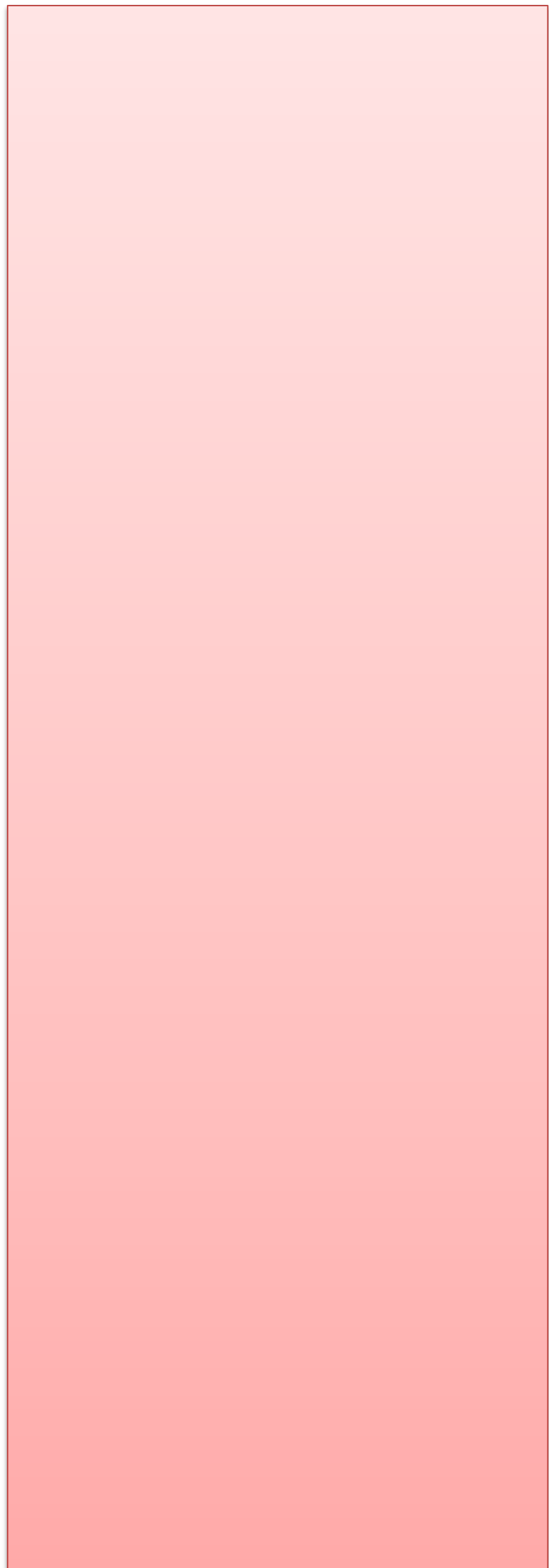
Επομένως, είναι σαφής η παρουσία ενζύμων με διαφορετικό προσανατολισμό του καταλοίπου της αργινίνης προς το ενεργό κέντρο λόγω της παρουσίας ή απουσίας του από το μοτίβο 3. Ωστόσο, ανεξάρτητα από το προσανατολισμό τον οποίο θα υιοθετήσει το κατάλοιπο της αργινίνης προς το ενεργό κέντρο φαίνεται ότι διαδραματίζει ρόλο κλειδί για την ενεργότητα του ενζύμου.



Εικόνα 11. Μοντέλα δομής BC1960 και BA0330 από ανάλυση δεδομένων περίθλασης ακτίνων X. Απεικονίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα δέσμευσης μετάλλου, His131 (μπλε), His135 (μπλε), Asp81(μπλε), το καταλυτικό Asp80 (μπλε) και η Arg169(κόκκινο). Χαρακτηριστικός είναι ο διαφορετικός προσανατολισμός της αργινίνης προς το ενεργό κέντρο λόγω της παρουσίας και απουσίας της από το μοτίβο 3.

8. Σκοπός

Η BC1960 είναι μια απακετυλάση πεπτιδογλυκάνης του *Bacillus cereus* και αποτελεί μέλος της οικογένειας 4 των εστερασών υδατανθράκων (CE4). Σε αυτήν την πρωτεΐνη έχει παρατηρηθεί η μεταμεταφραστική τροποποίηση της υδροξυλίωσης του C_α της Pro171, η οποία σταθεροποιεί την μεταβατική κατάσταση, με αποτέλεσμα να αυξάνει την ενεργότητα της απακετυλίωσης του ενζύμου. Στη διαδικασία της υδροξυλίωσης του C_α της Pro171 σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαμορφώνουν τα κατάλοιπα Pro171, His131, His135 και Arg169. Σε προηγούμενες εργασίες στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας είχαν πραγματοποιηθεί μελέτες που είχαν επικεντρωθεί στα κατάλοιπα Pro171, His131 και His135. Επομένως, η συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στο κατάλοιπο Arg169, με σκοπό τη μετάλλαξη του σε Ala προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα ο μηχανισμός της υδροξυλίωσης.

A vertical red bar with a thin black border is positioned on the left side of the page, extending from the top to the bottom.

Κεφάλαιο 2

Υλικά και Μέθοδοι

A. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

A1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction –PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια διαδικασία πολλαπλασιασμού ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και έφερε επανάσταση τον τομέα της γονιδιακής ανάλυσης.

Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται πολλαπλασιασμός (amplification) η τεχνική αυτή επιτρέπει την παραγωγή *in vitro* από κάποιο δείγμα DNA ενός εξαιρετικά μεγάλου αντιγράφου μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Τα προϊόντα της PCR είναι γνωστά ως αμπλικόνια (amplicons).

Η PCR αρχίζει με την αποδιάταξη ενός δίκλωνου μορίου DNA, το οποίο περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία (αλληλουχία στόχο), δηλαδή την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται με πολλαπλούς γύρους αντιγραφής της επιθυμητής αλληλουχίας, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία προσδένονται στο μονόκλωνο DNA στα άκρα της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι εκκινητές έχουν μήκος συνήθως περίπου 20 νουκλεοτίδια.

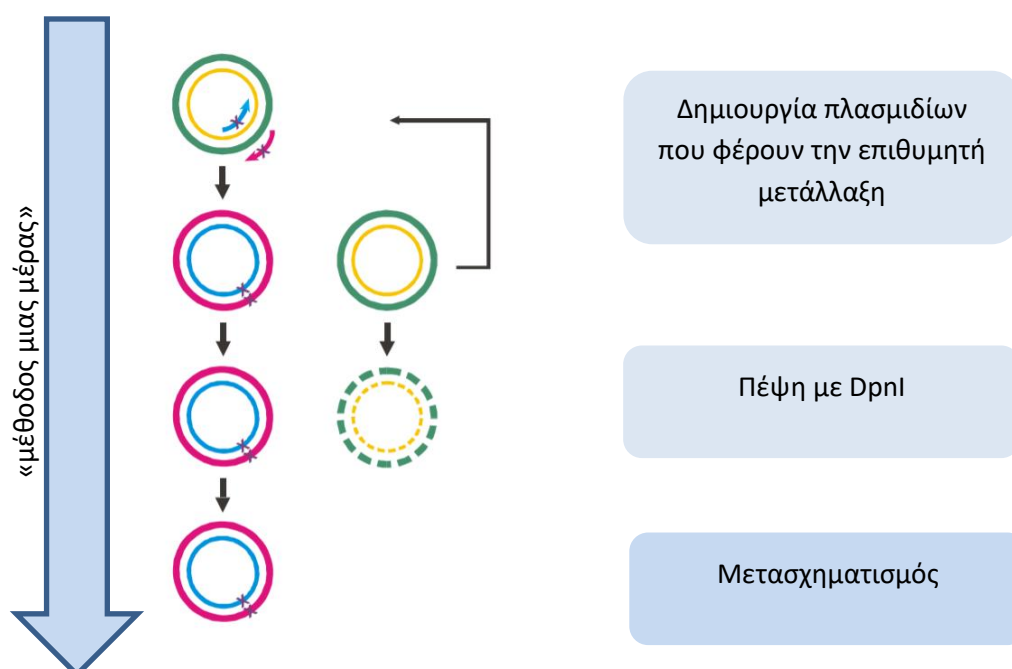
Ο κύκλος αντιγραφής περιλαμβάνει τρία στάδια. Πρώτον, διαχωρισμός των δύο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος, δεύτερον, υβριδισμός των εκκινητών και τέλος ο πολυμερισμός. Μετά από πολλές επαναλήψεις αυτών των κύκλων επικρατεί μόνο το επιθυμητό προϊόν.

Η PCR χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα, ενώ βρίσκει πολλές διαγνωστικές εφαρμογές. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων τμημάτων DNA, με σκοπό την κλωνοποίηση τους, την αλληλούχηση τους ή τη διάγνωση γενετικών ασθενειών. Τέλος, η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση δείγματος DNA στην ιατροδικαστική. [19]

A2. Μεταλλαξιγέννηση

Για τη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιήθηκε το QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit της Stratagene. Πρόκειται για ένα σύστημα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, το οποίο επιτρέπει την απευθείας μετάλλαξη του γονιδίου-

στόχου, χωρίς την ανάγκη περαιτέρω κλωνοποίησης του γονιδίου και περιλαμβάνει τρία στάδια. Αρχικά μια πολυμεράση υψηλής ακρίβειας (PfuUltra High-Fidelity polymerase) δημιουργεί νέα αντίγραφα του πλασμιδίου, που φέρουν τη μετάλλαξη, με περιορισμένο αριθμό κύκλων αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την πέψη του DNA-μήτρας, που είναι μεθυλιωμένο, με το ένζυμο Dpn I. Το τελικό στάδιο αφορά το μετασχηματισμό κατάλληλων επιδεικτικών κυττάρων (XL1-Blue) με τα μεταλλαγμένα αντίγραφα του πλασμιδίου.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση βημάτων πρωτοκόλλου μεταλλαξιγένεσης

Πρωτόκολλο: Για τη μετάλλαξη που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνει η κατασκευάστρια εταιρεία.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το γονίδιο της bc1960 αγρίου τύπου, το οποίο ήταν κλωνοποιημένο στον φορέα pET26b(+), στις περιοριστικές θέσεις NdeI και XhoI, και οι παρακάτω εκκινητές, που σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

Forward: 5'-GCACCGAAGTTTATAGCTCCGCCATACGG-3'

Reverse: 5'-CGTATGGCGGAGCTAGAACTTCGGTGC-3'

Σε κάθε περίπτωση, κύτταρα DH5α (E.coli), μετασχηματίστηκαν με κάθε μία από τις επιτυχημένες νέες πλασμιδιακές κατασκευές. Από τις αποικίες που

αναπτύχθηκαν απομονώθηκε DNA σε μικρή κλίμακα (mini-prep) και ελέγχθηκε η αλληλούχισή τους για να πιστοποιηθεί ότι η κλωνοποίηση των μεταλλαγμάτων στους νέους φορείς έκφρασης ήταν επιτυχής. Με τους επιτυχημένους κλώνους μετασχηματίστηκαν κύτταρα BL21(DE3) (*E.coli*) και ακολούθησε υπερέκφραση και παραγωγή των πρωτεϊνών.

A3. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων E.coli με πλασμιδιακό DNA με σοκ-θερμότητας (heat-sock)

Ο όρος μετασχηματισμός αναφέρεται στη διαδικασία εισαγωγής και διατήρησης ξένου γενετικού υλικού στο βακτηριακό κύτταρο, η οποία μπορεί να γίνει με μεθόδους όπως η θερμική καταπόνηση και η ηλεκτροδιάτρηση . Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο της θερμικής καταπόνησης. Ο θερμικός παλμός (από τους 0°C στους 42°C) μειώνει τη ρευστότητα της μεμβράνης, ενώ η ψυχρή καταπόνηση (από τους 42 °C στους 0°C) την αυξάνει σε τιμή μεγαλύτερη της αρχικής.

Πρωτόκολλο:

- 1) Μεταφορά δεκτικών κυττάρων *E.coli* από τους -80°C στον πάγο έως ότου να ξεπαγώσουν (aliquot 100μl).
- 2) Προσθήκη 1-10ng πλασμιδιακού DNA, στα tubes των δεκτικών κυττάρων
- 3) Ελαφριά ανακίνηση δειγμάτων και επώαση στον πάγο για 30λεπτά
- 4) Θερμικό σοκ (Heat shock) με τοποθέτηση των tubes για 42δευτερόλεπτα στους 42°C (υδατόλουτρο), κατά το οποίο τα πλασμίδια-φορείς εισέρχονται στα βακτηριακά κύτταρα
- 5)Επώαση δειγμάτων στον πάγο για 2 λεπτά
- 4) Προσθήκη 1ml υγρού θρεπτικού LB, ήπια ανακίνηση και επώαση υπό ανάδευση για 1ώρα στους 37°C
- 5) Επίστρωση κυττάρων σε τρυβλία με LB-agar και αντιβιοτικό κάτω από στείρες συνθήκες
- 7) Ολονύκτια επώαση τρυβλίων στους 37°C χωρίς ανάδευση.

A4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (*mini-prep*)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην επιλεκτική αλκαλική αποδιάταξη του χρωμοσωμικού, υψηλού μοριακού βάρους DNA, τη στιγμή που το μικρό, κυκλικό πλασμιδιακό DNA παραμένει σχετικά ανέπαφο. Χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις ελέγχου των ορθών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ύστερα από την αντίδραση μετασχηματισμού.

Πρωτόκολλο:

- 1) Τα επιλεγμένα κύτταρα επώαστηκαν σε 5ml υγρού θρεπτικού LB εμβολιασμένο με αντιβιοτικό καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Πραγματοποιήθηκε ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 37°C. Χρησιμοποιήθηκαν 3ml της υγρής καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα στις 13000rpm με συνακόλουθη αφαίρεση υπερκείμενου. Το βήμα αυτό χωρίστηκε σε δύο φάσεις, δηλαδή στο ίδιο δοχείο συλλογής, επαναλήφθηκε 2 φορές, με 1,5ml την κάθε φορά.
- 2) Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, προστέθηκαν 100μl διαλύματος διαλυτοποίησης P1, το οποίο περιέχει Tris-HCl, EDTA και γλυκόζη. Το EDTA καταστέλλει τη δράση ενδονουκλεασών και της DNAάσης δεσμεύοντας ιόντα (π.χ. Mg²⁺) που είναι συμπαράγοντες αυτών, ενώ η γλυκόζη διατηρεί την οσμωτική ισορροπία ώστε τα κύτταρα να μη λυθούν. Πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση του ιζήματος.
- 3) Ακολούθησε προσθήκη 200μl διαλύματος λύσης P2, με ήπια ανάδευση (6-8 φορές). Πρόκειται για αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα, που αποτελείται από το απορρυπαντικό δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) και την ισχυρή βάση υδροξειδίου του νατρίου. Το απορρυπαντικό δημιουργεί οπές στη μεμβράνη διαταράσσοντας τη δομή των φωσφολιπιδίων και των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το υδροξείδιο του νατρίου συμβάλλει στη μετουσίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα λειτουργεί και ως αποδιατακτικός παράγοντας για το δίκλωνο DNA καθώς η αύξηση του pH που προκαλεί βοηθά στη διάσπαση των υδρογονοδεσμών που συνδέουν τα δίκλιωνα μόρια DNA.
- 4) Προστέθηκαν 150μl διαλύματος επαναδιάταξης P3, και έγινε πάλι ήπια ανάδευση. Το διάλυμα P3 αποτελεί διάλυμα μειωμένου pH. Η μείωση του pH επιτρέπει την επανασύνδεση των βάσεων των μονόκλωνων αλυσίδων DNA μέσω υδρογονοδεσμών. Λόγω του μικρού του μεγέθους και της κυκλικής του μορφής, το πλασμιδιακό DNA είναι πιο εύκολο να επαναδιαταχθεί. Αντίθετα, το γενωμικό καθιζάνει λόγω της τυχαίας επανασύνδεσης των δύο κλώνων του.

Μετά από επώαση για 5 λεπτά σε πάγο, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15min στις 13000rpm σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C)

5) Το υπερκείμενο, στο οποίο υπάρχει το πλασμιδιακό DNA, μεταφέρθηκε σε νέο, αποστειρωμένο erpendorf και προστέθηκαν 40μl CH₃COONa και 1ml EtOH100% (παγωμένη). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min στις 13000rpm και πλήρης αφαίρεση υπερκειμένου.

6) Ακολούθησε ξέπλυμα του ιζήματος με 1ml EtOH75% (απομάκρυνση αλάτων και μορίων SDS), φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000rpm και πλήρης αφαίρεση υπερκειμένου.

7) Έπειτα έγινε πλήρης εξάτμιση της αιθανόλης με παραμονή του erpendorf στους 60 °C, για 2-3 min. Τέλος, έγινε επαναϊώρηση του ιζήματος σε 25-50μl ddH₂O (συνήθως 50 μl).

A5. Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων σε διάλυμα γλυκερόλης (glycerol stock) για μακρά συντήρηση και χρήση

Η δημιουργία του glycerol stock επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη χρήση των μετασχηματισμένων με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη βακτηριακών κυττάρων για τη δημιουργία καλλιέργειών. Η διαδικασία δημιουργίας των glycerol stocks περιλαμβάνει, αρχικά, τη συλλογή μοναδιαίων αποικιών από στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και τον επακόλουθο εμβολιασμό τους σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, το οποίο περιέχει καναμυκίνη (50μg/ml). Ακολουθεί η ολονύκτια επώαση της υγρής καλλιέργειας στους 25°C. Τέλος, για την δημιουργία glycerol stocks, αναμείχθηκαν 550μl αναπτυγμένης υγρής καλλιέργειας βακτηρίων και 450μl διάλυμα γλυκερόλης 80%. Τα glycerol stocks που δημιουργούνται αποθηκεύονται στους -80°C. Η προσθήκη γλυκερόλης προστατεύει τη μεμβράνη των κυττάρων και μειώνοντας την πιθανότητα θανάτωσης τους με γρήγορο χειρισμό, επιτρέποντας τη μακροπρόθεσμη συντήρησή τους.

B. Τεχνικές Υπερέκφρασης και απομόνωσης πρωτεϊνών

B1. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε μικρή κλίμακα

Η δοκιμή υπερέκφρασης περιλαμβάνει την έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21 DE3 σε διαφορετικές θερμοκρασίες, χρόνους επαγωγής και

συγκέντρωση επαγωγέα (IPTG), ώστε να διερευνηθούν όλες οι παράμετροι και να επιλεγούν αυτές που οδηγούν στα βέλτιστα αποτελέσματα. Η δοκιμή αυτή περιλαμβάνει εμβολιασμό από glycerol stock σε καλλιέργειες πολύ μικρής κλίμακας (συνήθως 5ml) LB στις οποίες περιέχεται το αντιβιοτικό καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50 µg/ml και ολονύκτια επώαση στους 37°C, υπό ανάδευση.

Συνολικά εξετάστηκαν οι θερμοκρασίες 16°C και 25°C και η επαγωγή με 1mM IPTG και 0,5mM IPTG στις 4ώρες και ολονύκτια (O/N). Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι εξής συνθήκες:

- O/N επαγωγή με 1mM IPTG στους 25°C
- 4 ώρες επαγωγή με 1mM IPTG στους 25°C
- 4 ώρες επαγωγή με 0,5mM IPTG στους 25°C
- O/N επαγωγή με 1mM IPTG στους 16°C

Αρχικά εξετάστηκε η συνθήκη «O/N επαγωγή με 1mM IPTG στους 25°C».

Αφού πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων BL21DE3 με τον κατάλληλο κλώνο (ολονύκτια επώαση χωρίς ανάδευση στους 37°C) πέντε μοναδιαίες αποικίες από τη στερεά καλλιέργεια εμβολιάστηκαν σε 5ml LB, στο οποίο περιέχεται και το αντιβιοτικό καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50 µg/ml. Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν ολονύκτια στους 37°C υπό ανάδευση. Από την κάθε καλλιέργεια 650µl ενοφθαλμίζονται σε 13ml LB στο οποίο περιέχονται και 13µl καναμυκίνης (τελική συγκέντρωση 50µg/ml). Οι 6 καλλιέργειες που δημιουργούνται (1a-χωρίς επαγωγή, 1b, 2, 3, 4, 5) επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών $O.D._{600} = 0.6 - 0.8$. Αυτό είναι το σημείο στο οποίο προστίθεται ο επαγωγέας IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) με τελική συγκέντρωση 1mM. Μετά την προσθήκη του επαγωγέα οι καλλιέργειες επωάζονται ολονύκτια στους 25°C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα ακολουθεί φυγοκέντρηση 1ml δείγματος από κάθε καλλιέργεια στις 6000rpm για 20λεπτά (microcentrifuge). Οι πελέτες που προκύπτουν επαναδιαλύονται σε 70µl Sample Buffer και αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS/PAGE. Τα υπόλοιπα 12ml από κάθε καλλιέργεια αντιστοίχως φυγοκεντρούνται στις 6000rpm για 20λεπτά. Ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση των πελετών σε διάλυμα 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, διάρρηξη των κυττάρων με χρήση υπερήχων και τέλος φυγοκέντρηση στις 12500rpm για 1ώρα. Τέλος, τα δείγματα επεξεργάζονται κατάλληλα για ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης SDS/PAGE. Από την ανάλυση των πηκτών πολυακρυλαμίδης στη συγκεκριμένη συνθήκη επιλέχθηκαν οι κλώνοι 3,4 και 5 για περεταίρω έλεγχο.

Συγκεκριμένα, οι παραπάνω κλώνοι εξετάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συγκέντρωσης επαγωγέα. (4 ώρες επαγωγή με 1mM IPTG στους 25°C, 4 ώρες επαγωγή με 0,5mM IPTG στους 25°C, O/N επαγωγή με 1mM IPTG στους 16°C).

Ο αρχικός εμβολιασμός πραγματοποιείται από το κατάλληλο glycerol stock, για τους 3 κλώνους που είχαν επιλεγεί, σε 5ml LB το οποίο περιέχει και το αντιβιοτικό καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν ολονύκτια στους 37°C υπό ανάδευση. Από την κάθε συνθήκη 650μl αρχικής καλλιέργειας ενοφθαλμίζονται σε 13ml LB στο οποίο περιέχονται και 13μl καναμυκίνης (τελική συγκέντρωση 50μg/ml). Σε κάθε συνθήκη που ελέγχεται σε αυτό το στάδιο υπάρχει επίσης μια καλλιέργεια στην οποία δεν προστίθενται επαγωγέας IPTG. Αρχικά, το σύνολο των καλλιεργειών που δημιουργηθήκαν επώάζονται στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών $O.D._{600} = 0.6-0.8$. Αυτό είναι το σημείο στο οποίο προστίθεται ο επαγωγέας IPTG στην ανάλογη τελική συγκέντρωση που εξετάζεται στην κάθε συνθήκη. Μετά την προσθήκη του επαγωγέα οι καλλιέργειες επώάζονται είτε ολονύκτια στους 25°C και 16°C είτε στους 25°C για 4 ώρες. Τόσο μετά το πέρας των τεσσάρων ωρών όσο και την επομένη ημέρα ακολουθείτε η ίδια διαδικασία που περιεγράφηκε λεπτομερώς παραπάνω. Από την ανάλυση των πηκτών πολυακρυλαμίδης στις συγκεκριμένες συνθήκες επιλέχθηκε ο κλώνος 4 για περαιτέρω έλεγχο.

Συγκεκριμένα, στο τελικό στάδιο ελέγχεται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης σε 6 διαφορετικά διαλύματα επαναδιαλυτοποίησης της πελέτας της. Τα διαλύματα που εξετάστηκαν στην εργασία αυτή είναι τα εξής:

- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl
- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl
- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 10% glycerol
- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 0.1% DDM
- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl
- 8M Urea, 50mm Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl

Ο αρχικός εμβολιασμός πραγματοποιείται από το κατάλληλο glycerol stock, για τον κλώνο 4 που επιλέχθηκε παραπάνω, σε 5ml LB το οποίο περιέχει και το αντιβιοτικό καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Η καλλιέργεια αυτή επώαστηκε ολονύκτια στους 37°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, 5ml αρχικής καλλιέργειας ενοφθαλμίζονται σε 100ml LB στο οποίο περιέχονται και 100μl καναμυκίνης (τελική συγκέντρωση 50μg/ml). Η καλλιέργεια που προκύπτει επώάζεται στους 37°C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών $O.D._{600} = 0.6-0.8$. Αυτό είναι το σημείο στο

οποίο προστίθεται ο επαγωγέας IPTG με τελική συγκέντρωση 1mM. Μετά την προσθήκη του επαγωγέα η καλλιέργεια επωάζεται ολονύκτια στους 25°C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια διακρίνεται σε 6 επιμέρους δείγματα των 10ml και ακολουθεί φυγοκέντρωση αυτών για 20λεπτά στις 6000rpm. Ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση των πελετών στα αντίστοιχα διαλύματα που εξετάζονται στο συγκεκριμένο στάδιο και αναφέρονται παραπάνω, καθώς και διάρρηξη των κύτταρων με τη χρήση υπερήχων. Τα δείγματα που προκύπτουν επεξεργάζονται κατάλληλα για ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

B2. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα

Για την υπερέκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, πραγματοποιείται εμβολιασμός από το κατάλληλο glycerol stock σε 200ml LB το οποίο περιέχει και το αντιβιοτικό καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Η προκαλλιέργεια αυτή επωάζεται στους 37°C ολονύκτια υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, 50ml από την προκαλλιέργεια ενοφθαλμίζονται σε κάθε μία από τέσσερις φιάλες 1lt LB στο οποίο περιέχεται και 1ml από το αντιβιοτικό καναμυκίνη (τελική συγκέντρωση 50mg/ml). Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C υπό έντονη ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών $O.D._{600} = 0.6-0.8$. Αυτό είναι το σημείο στο οποίο προστίθεται ο επαγωγέας IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Μετά την προσθήκη του επαγωγέα οι καλλιέργειες στους 25°C ολονύκτια υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα ακολουθεί φυγοκέντρωση των κυττάρων, στη Megafuge 40R (Thermo Scientific), για 30min, στις 4300rpm, στους 4°C. Τα κυτταρικά ιζήματα που προέκυψαν με την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 50ml lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5 / 100mM NaCl). Τα επαναδιαλυτοποιημένα κυτταρικά ιζήματα φυγοκεντρώνονται για 20min, στις 6000rpm, στους 4°C. Τέλος, τοποθετούμε τα επαναδιαλυτοποιημένα κυτταρικά ιζήματα που προέκυψαν σε δύο falcon των 50ml και τα αποθηκεύουμε στους -20°C

B3. Διάρρηξη κυττάρων (sonication)

Η διάρρηξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δονητή υπερήχων (sonicator) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην απελευθέρωση ηχητικών ωστικών κυμάτων συχνότητας 20kHz από το άκρο του λεπτού μεταλλικού ραβδίου. Ως αποτέλεσμα, δημιουργείται τοπικά υποπίεση η οποία οδηγεί στο σχηματισμό μικροφουαλίδων στο κυτταρικό εναιώρημα. Όταν, ωστόσο, αποκατασταθεί η

πίεση η διάρρηξη των φυσαλίδων προκαλεί δυνάμεις ωστικού κύματος ικανές να διασπάσουν τα κυτταρικά τοιχώματα.

Βασικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι η απελευθέρωση σημαντικών ποσοτήτων ενέργειας υπό τη μορφή θερμότητας γεγονός που μπορεί να επάγει τη μετουσίωση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας το ποτήρι ζέσεως στο οποίο βρίσκεται το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται στον πάγο.

Επιπλέον, η συγκεκριμένη διαδικασία οδηγεί στην απελευθέρωση πρωτεασών είναι απαραίτητη η χρήση αναστολέων πρωτεασών προτού ξεκινήσει η διαδικασία της διάρρηξης. Συγκεκριμένα, γίνεται χρήση Benzamidine (150μg/ml), PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM).

Μετά τη διαδικασία αυτή το κυτταρικό διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε ειδικά Falcon για την φυγόκεντρο HERMLE Z 32 HK. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 ώρα στις 14500rpm στους 4°C. Συλλέγουμε το υπερκείμενο για να χρησιμοποιηθεί στη μεταλλοχηλική χρωματογραφία στήλης.

B4. Απομόνωση πρωτεΐνης με τη χρήση μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων όπως η ιστιδίνη (His) να συμπεριφέρονται ως δότες ηλεκτρονίων προς μεταλλοκατιόντα-δέκτες, όπως το Ni^{+2} , όταν βρίσκονται στην επιφάνεια πρωτεϊνικών μορίων. Χρησιμοποιείται η χρωματογραφική στήλη Ni-NTA (Qiagen). Στην στήλη αυτή, το μεταλλοκατιόν, Ni^{+2} , σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με την κατάλληλα επιλεγμένη χηλιποιητική ένωση, το νίτριλο-τριοξικό οξύ (NTA). Συγκεκριμένα, το NTA συγκρατεί ισχυρά το μεταλλοκατιόν μέσω δεσμών συναρμογής, στους οποίους συμμετέχουν τα καρβονυλικά οξυγόνα και το άζωτο, ενώ οι υπόλοιπες θέσεις καταλαμβάνονται προσωρινά από μόρια νερού. Επίσης, η χηλιποιητική ένωση, NTA, είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το προσροφητικό υλικό της στήλης, την αγαρόζη. Το στρώμα αυτό λοιπόν (Ni^{2+} , agarose), εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον ιμιδαζολικό δακτύλιο, ο οποίος αποτελεί τμήμα της δομής των ιστιδινών. Η υπό μελέτη πρωτεΐνη, BC1960R169A, φέρει His-tag (6x κατάλοιπα His) στο C-τελικό της άκρο, επομένως φέρει και τους απαραίτητους ιμιδαζολικούς δακτυλίους ώστε να δεσμευτεί από το προσροφητικό υλικό σε αντίθεση με πρωτεΐνες που στερούνται τον συγκεκριμένο επίτοπο. Η έκλουση της προσροφημένης επιθυμητής πρωτεΐνης γίνεται μέσω της προσθήκης

ιμιδαζολίου, το οποίο συναγωνίζεται τα αμινοξικά κατάλοιπα His, λόγω της μεγαλύτερης συγγένειας του προς τα μεταλλοκατιόντα-δέκτες Ni⁺², οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση του πρωτεϊνικού μορίου.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 10ml Ni-NTA (Qiagen). Αρχικά, η στήλη χρωματογραφίας εξισορροπείται με 180ml lysis buffer (Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM Imidazole). Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης το οποίο συλλέγεται μετά την διάρρηξη των κυττάρων φορτώνεται έπειτα στην στήλη χρωματογραφίας. Στη συνέχεια συλλέγεται το διάλυμα που διαπερνά το χρωματογραφικό υλικό (flow-through). Έπειτα, φορτώνουμε 100ml διαλύματος έκπλυσης (wash), το οποίο αποτελείται από 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl και 20mM ιμιδαζόλιο. Η έκλυση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη χρήση 20ml διαλύματος έκπλυσης 1 με ίδια σύσταση όπως το διάλυμα έκπλυσης αλλά 30mM ιμιδαζόλιο, 20ml διαλύματος έκπλυσης 2 με 50mM ιμιδαζόλιο, 20ml διαλύματος έκπλυσης 3 με 100mM ιμιδαζόλιο και 50ml διαλύματος έκπλυσης 4 με 500mM ιμιδαζόλιο. Η πρωτεΐνη συλλέγεται σε κλάσματα των 10ml.

Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1. Διαλύματα καθαρισμού BC1960R169A και BC1960wt

	1M Tris-HCl pH 7.5	4M NaCl	2M Imidazole
Lysis (200ml)	50mM	100mM	5mM
Wash 1 (100ml)	50mM	100mM	20mM
E1-2 (20ml)	50mM	100mM	30mM
E3-4 (20ml)	50mM	100mM	50mM
E5-6 (20ml)	50mM	100mM	100mM
E7-11 (50ml)	50mM	100mM	500mM

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως όλη η διαδικασία του καθαρισμού πραγματοποιείται στους 4°C (cold room) ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα αποδιάταξης της πρωτεΐνης και ενεργοποίησης των πρωτεασών.

B5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (sds-page)

Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν από τον καθαρισμό με στήλη Ni⁺² αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. (SDS-PAGE-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide). Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια τεχνική που διαχωρίζει τις προς μελέτη πρωτεΐνες σύμφωνα με το μοριακό βάρος τους. Η ηλεκτροφόρηση σχεδόν πάντα γίνεται σε πηκτή καθώς αυτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός αυξάνοντας το διαχωρισμό. Το μείγμα των πρωτεϊνών αρχικά διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλο-θεικού-νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών, επιφέροντας έτσι την αποδιάταξη τους. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στην κύρια αλυσίδα της πρωτεΐνης και το τελικό αρνητικό φορτίο που προκύπτει από την πρόσδεση αυτή είναι πολύ μεγαλύτερο από το φυσικό αρνητικό φορτίο της πρωτεΐνης και είναι περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Τα πρωτεϊνικά μόρια, έτσι, λόγω και της παρουσίας του αποδιατακτικού παράγοντα κινούνται από το αρνητικά προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται. Τέλος, οι πρωτεΐνες στην πηκτή εμφανίζονται ύστερα από χρώση κυανούν του Coomassie, ενώ κατά την διάρκεια αυτής της μεθόδου, χρησιμοποιείται ένας μάρτυρας (marker) γνωστού μοριακού βάρους, για να είναι δυνατή η ποσοτική-ποιοτική εκτίμηση της μοριακής μάζας της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

Στη συγκεκριμένη εργασία για την ανάλυση των διαλυμάτων που προέκυψαν από τον καθαρισμό με στήλη Ni⁺² χρησιμοποιούνται πηκτές 12.5%, ενώ το πρωτόκολλο παρασκευής του αναγράφεται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 2. Πρωτόκολλο παρασκευής 12.5% SDS-gel

		Running Buffer	Stacking Buffer
3M Tris pH 8.9		2.5ml (1.25ml)	
1M Tris pH 6.8			1ml (0.5ml)
30% Acryl + 0.8% Bis		8.35ml (4.18ml)	2.5ml (1.25ml)

H₂O		9ml (4.5ml)	15ml (7.5ml)
Temed		40μl (20μl)	20μl (10μl)
20%SDS		100μl (50μl)	75μl (38μl)
10% A.P.S.		100μl (50μl)	150μl (75μl)

B6. Διαπίδυση (dialysis) και συμπύκνωση

Τα καθαρότερα κλάσματα που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση πηκτής υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-page), αναμειγνύονται και υποβάλλονται σε ολονύκτια διαπίδυση. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη διαφορά στην οσμωτική πίεση που δημιουργείται εκατέρωθεν μιας ημιπερατής μεμβράνης υπερδιήθησης. Συγκεκριμένα, το μείγμα των πρωτεϊνών τοποθετείται μέσα σε μια σακούλα διαπίδυσης, η οποία αφού δεθεί βυθίζεται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα από το οποίο απουσιάζουν τα μικρά μόρια τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν από το διάλυμα των πρωτεϊνών. Τα μόρια που έχουν διάμετρο σημαντικά μεγαλύτερη από τους πόρους της μεμβράνης διατηρούνται μέσα στη σακούλα, σε αντίθεση με τα μικρά μόρια και ιόντα που εντοπίζονται πλέον στο περιβάλλον διάλυμα.

Τα καθαρότερα πρωτεϊνικά κλάσματα υποβάλλονται σε αυτή τη διαδικασία ώστε να αλλάξει το διάλυμα στο οποίο βρίσκονται και συγκεκριμένα να απομακρυνθεί το μιδαζόλιο. Με αυτό τον τρόπο η πρωτεΐνη είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί σε ένα σύνολο άλλων διεργασιών.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα μετά την ολονύκτια διαπίδυση συμπυκνώνονται σε ειδικά falcon με μεμβράνη πόρων. Αρχικά, τα falcon ξεπλένονται με νερό και φυγοκεντρώνονται για 5-7min στις 3300rpm στους 5°C. Στη συνέχεια, ξεκινάει η διαδικασία της συμπύκνωσης όπου με συνεχείς κύκλους φυγοκέντρωσης, 3300rpm 5°C για 15min, καταλήγουμε σε επιθυμητή τελική ποσότητα πρωτεΐνης.

B7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με φασματομετρία τεχνολογίας Nanodrop

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης χρησιμοποιείται η τεχνολογία του Nanodrop, ενός μηχανήματος που έχει την ικανότητα να μετρά την οπτική απορρόφηση. Η τεχνολογία βασίζεται απορρόφηση από ένα μικρό πρωτεϊνικό δείγμα (~2μl) στα 280nm. Συγκεκριμένα, ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε αρωματικούς δακτυλίους αμινοξέων (Φαινυλαλανίνη, Τρυπτοφάνη, Ιστιδίνη, Τυροσίνη) διεγείρονται στα 280nm λόγω της

απορρόφησης φωτονιακής ενέργειας. Τέλος, βάση της σχέσης Beer-Lambert $A = E * b * c$ (όπου A η απορρόφηση, E ο extinction coefficient της πρωτεΐνης, b το μήκος μέτρησης σε εκατοστά και c η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε mg/ml) υπολογίζεται η συγκέντρωση της μετρούμενης πρωτεΐνης.

Όσον αφορά την BC1960R169A ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γίνεται με τη χρήση των συντελεστών: Μοριακό Βάρος (MW) 31,55kDa και Extinction coefficient $58,33 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Γ. Μέθοδοι και Πρωτόκολλα Βιοφυσικού Χαρακτηρισμού των Πρωτεϊνών Κυκλικός διχρωϊσμός (CD)

Ο κυκλικός διχρωϊσμός ορίζεται ως η διαφορά στην απορρόφηση ανάμεσα στο δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο φως και στο αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Η διαφορετική απορρόφηση των επιμέρους συστατικών του πολωμένου φωτός οδηγεί στη δημιουργία ελλειπτικά πολωμένου φωτός, που τελικά μετατρέπεται στο σήμα του κυκλικού διχρωϊσμού. Τα φασματοφωτόμετρα κυκλικού διχρωϊσμού μετράνε τη διαφορά της απορρόφησης μεταξύ αριστερόστροφα και δεξιόστροφα, πολωμένης ακτινοβολίας, δηλαδή: $\Delta A = A_L - A_R$. Το φαινόμενο αυτό πραγματοποιείται μόνο εφόσον το βιολογικό μόριο προς μελέτη είναι χειρόμορφο.

Χειρόμορφα ονομάζονται τα μόρια που υπάρχουν σε ζεύγη κατοπτρικών ειδώλων (mirror-image isomers). Αυτά είναι πανομοιότυπα και είναι γνωστά ως ενταντιομερή. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες ενός ζεύγους εναντιομερών είναι πανομοιότυπες ενώ υπάρχουν δύο σημαντικές διαφορές:

1. ο τρόπος που αλληλεπιδρούν με το πολωμένο φως
2. ο τρόπος που αλληλεπιδρούν με άλλα χειρόμορφα μόρια

Οι πρωτεΐνες αποτελούν χειρόμορφα μόρια, με αποτέλεσμα να απορροφούν διαφορετικά το αριστερόστροφο και το δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Συγκεκριμένα, οι οπτικά ενεργές ομάδες στα μόρια των πρωτεϊνών είναι οι πεπτιδικοί δεσμοί της κύριας αλυσίδας και οι αρωματικές πλευρικές ομάδες. Ισχύει ότι οι πεπτιδικοί δεσμοί της κύριας αλυσίδας απορροφούν το κυκλικά πολωμένο φως στην περιοχή του άπω-υπεριώδους (240-180nm). Τα φάσματα απορρόφησης των πεπτιδικών δεσμών είναι χαρακτηριστικά για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς διαμόρφωσης. Συγκεκριμένα:

- Η α -έλικα εμφανίζει δυο χαρακτηριστικά ελάχιστα (αρνητικές κορυφές) στα 222nm και στα 208nm, και έντονο μέγιστο (θετική κορυφή) στα 190nm.
- Η β -πτυχωτή επιφάνεια εμφανίζει ένα ελάχιστο (αρνητική κορυφή) στα 218nm και ένα μέγιστο (θετική κορυφή) στα 195nm.

- Τα πεπτίδια χωρίς διαμόρφωση (random coil) εμφανίζουν ελάχιστο (αρνητική κορυφή) στα 197-199nm.
- Οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες (disordered proteins) παρουσιάζουν ελάχιστη ελλειπτικότητα πάνω από τα 210nm και αρνητικές κορυφές κοντά στα 195nm.

Αποτελεί μία άριστη και γρήγορη μέθοδο για τον καθορισμό της δευτεροταγούς δομής καθώς και του folding των πρωτεϊνών. Επίσης, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της σταθερότητας της πρωτεΐνης σε συνθήκες θερμικής ή χημικής αποδιάταξης. Συγκεκριμένα, με αυτό τον τρόπο μπορεί να υπολογιστεί η θερμοκρασία αποδιάταξης της πρωτεΐνης (T_m), η οποία αντιστοιχεί στη θερμοκρασία όπου ~50% της πρωτεΐνης έχει αποδιαταχθεί και ~50% διατηρείται σε αναδιπλωμένη διαμόρφωση. [22]

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο J810 της Jasco στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας, του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με τα προγράμματα Spectra Analysis και Interval Analysis της Jasco.

Δ. Μέθοδοι και Πρωτόκολλα Δομικής Βιολογίας

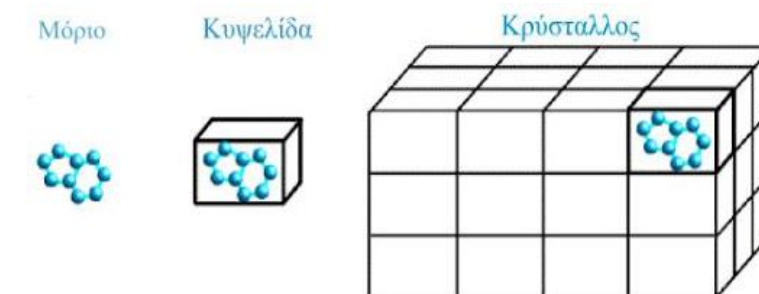
Κρυσταλλογραφία

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ αποτελεί βασικό εργαλείο της δομικής βιολογίας για τον προσδιορισμό της ατομικής θέσης των μορίων στο χώρο. Βασίζεται στο φαινόμενο της περίθλασης των ακτίνων-Χ από καλά οργανωμένους κρυστάλλους. Οι κρύσταλλοι περιέχουν πολλά διατεταγμένα μόρια σε πανομοιότυπο προσανατολισμό, κι έτσι κάθε μόριο σκεδάζει όμοια τις προσπίπτουσες ακτίνες Χ. Οι περιθλώμενες ακτίνες από όλα τα μόρια συζευγνύονται και χρησιμοποιώντας το μοτίβο των περιθλώμενων ακτινών (diffraction pattern) αναλύονται για να ανακύψει τελικά η δομή του μορίου.

Κρύσταλλος: Κρύσταλλος είναι η κανονική,

επαναλαμβανόμενη διευθέτηση ατόμων ή μορίων σε τρεις

διαστάσεις. Αποτελείται από όμοιες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις, ώστε να



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση μορίου, κυψελίδας και κρυστάλλου

δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα. Η μονάδα όγκου του πλέγματος με πλευρές a, b, c ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα, μπορεί να επιλεγεί με διαφόρους τρόπους και περιορίζονται να έχουν σχήματα τα οποία επαναλαμβανόμενα με μετατόπιση να μην αφήνουν κενά. Στην απλούστερη περίπτωση η στοιχειώδης κυψελίδα περιέχει ένα μόνο μόριο, συνήθως όμως αποτελείται από δύο ή περισσότερα μόρια συνδεδεμένα με κάποιο είδος συμμετρικής διευθέτησης, έτσι ώστε να συμπληρώνουν τον χώρο πιο ικανοποιητικά παρά αν ήταν το καθένα μόνο του.

Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι απαιτείται η μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα των πρωτεϊνών για τα πειράματα κρυστάλλωσης, καθώς η ανομοιογένεια λόγω βιοχημικών τροποποιήσεων (πρωτεόλυση, φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση) ή άλλων παραγόντων οδηγεί τις πρωτεΐνες να μην κρυσταλλώνουν ή να κρυσταλλώνουν δύσκολα.

Κρυστάλλωση: Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι μια υποκατηγορία της κατακρήμνισης των βιομορίων. Για να κρυσταλλώσει ένα βιομόριο, θα πρέπει το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται να υπερκορεσθεί. Ο υπερκορεσμός του διαλύματος ενός βιομορίου είναι μια ιδιαίτερη κατάσταση της διαλυτότητάς του. Η διαλυτότητα των βιομορίων περιγράφεται από τα λεγόμενα διαγράμματα διαλυτότητας, τα οποία συσχετίζουν την διαλυτότητα ενός βιομορίου με τη συγκέντρωσή του, τη συγκέντρωση των παραγόντων κατακρήμνισης, το pH, τη θερμοκρασία, την ιονική ισχύ κτλ.

Ζώνη Πυρήνωσης: πρώτες τακτικά διευθετημένες συναθροίσεις μοτίβων, πυρήνες κρυστάλλων

Μετασταθερή Ζώνη: ο κρύσταλλος αυξάνεται και δεν είναι πλέον δυνατή η δημιουργία νέων πυρήνων

Κατακρήμνιση: ο υπερκορεσμός του διαλύματος είναι τόσο υψηλός, ώστε η περίσσεια του βιομορίου κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα.

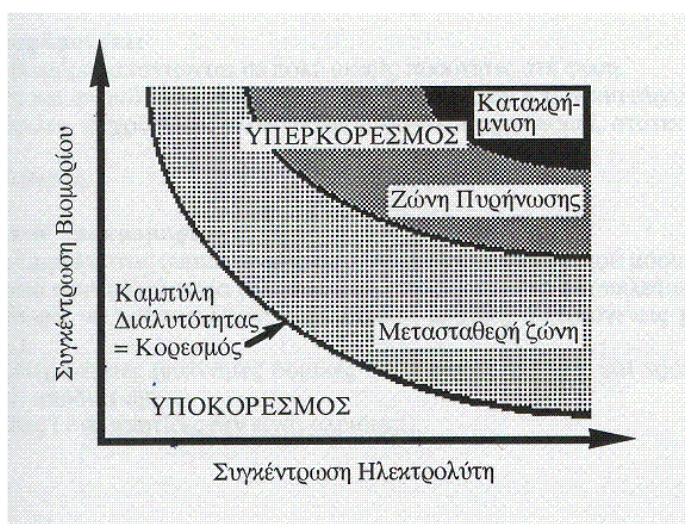
Μέθοδοι κρυστάλλωσης:

- Τεχνική (Batch) ή άμεσης προσθήκης του παράγοντα κατακρήμνισης: Η πρωτεΐνη διαλύεται σε χαμηλή ιοντική ισχύ σε ένα διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης. Ο παράγοντας κατακρήμνισης (αλάτι ή οργανικός

διαλύτης) προστίθεται στην συνέχεια έτσι ώστε να φέρει το διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού.

- Διαπίδωση (Dialysis): Η ιοντική ισχύς και το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται σε μια τέτοια μεμβράνη ρυθμίζεται με εξισορρόπηση έναντι του ελεύθερου πρωτεϊνικού διαλύματος.
- Τεχνική εξάτμισης και διάχυσης των ατμών (Vapor diffusion): Κλασική μέθοδος κατά την οποία η επίδραση στην αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος γίνεται με την εξάτμιση του διαλύτη. Συγκεκριμένα ελέγχεται η εξάτμιση με εξισορρόπηση από ένα πιο συγκεντρωμένο διάλυμα άλατος. Εναλλακτική μέθοδος διάχυσης των ατμών είναι αυτή της 'κρεμάμενης σταγόνας' (**hanging drop**).

Πρωτόκολλο: Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κρεμαστής σταγόνας (**hanging drop**). Σε αυτή την τεχνική, αρχικά προστίθενται όλα τα απαραίτητα συστατικά του διαλύματος της δεξαμενής (ρυθμιστικό διάλυμα, άλας, κατακρημιστής, νερό) και αναμειγνύονται. Ακολούθως μικρή ποσότητα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος (2μl- 10mg/ml BC1960_R169A) και διαλύματος δεξαμενής (2μl) τοποθετείται σε υδρόφοβη καλυπτρίδα και



αυτή τοποθετείται ανάποδα πάνω από το διάλυμα της δεξαμενής (1ml) έτσι ώστε η σταγόνα να κρέμεται. Το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς. Για τις κρυσταλλώσεις χρησιμοποιήθηκαν 24-well Linbro cell culture plates.

Εικόνα 14. Τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας ενός βιομορίου

Co-crystallization & crystal soaking:

Μέχρι σήμερα, δύο είναι οι βασικές τεχνικές για τη δημιουργία αλλά και συλλογή πληροφοριών για κρυστάλλους συμπλόκων πρωτεΐνης-υποστρώματος.

Η πρώτη τεχνική είναι γνωστή ως co-crystallization (συν-κρυστάλλωση) και αφορά την επώαση του πρωτεϊνικού διαλύματος με διάλυμα με περιέχει τον επιθυμητό ligand για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Στο μείγμα που προκύπτει αναμένεται να έχει σχηματιστεί το σύμπλοκο πρωτεΐνης-

υποστρώματος, το οποίο στη συνέχεια οδηγείται προς κρυστάλλωση με τις ήδη γνωστές από τη πρωτεΐνη συνθήκες. Το βασικό μειονέκτημα της διαδικασίας είναι ο χρόνος που αναμένεται να δημιουργηθούν οι κρύσταλλοι του συμπλέγματος αλλά και το γεγονός ότι δεν οδηγούμαστε πάντοτε σε θετικό αποτέλεσμα.

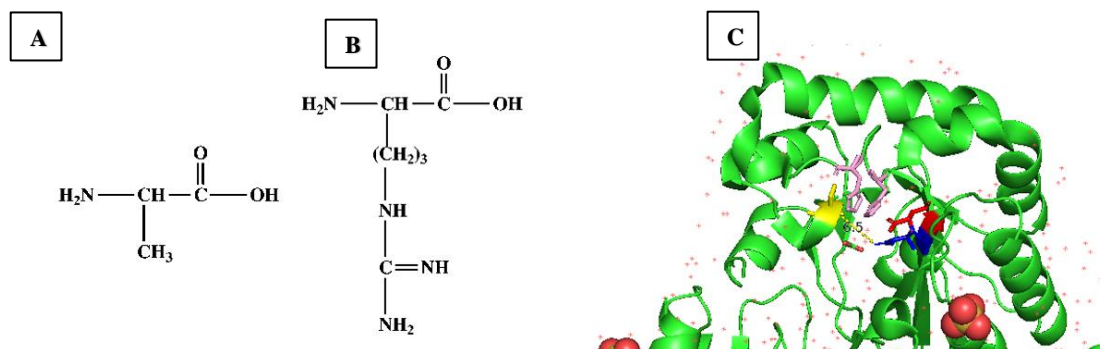
Η δεύτερη τεχνική είναι γνωστή ως crystal soaking. Αφορά την έκθεση ήδη υπάρχοντων κρυστάλλων σε διάλυμα που περιέχει τον επιθυμητό ligand. Από τη στιγμή που οι κρύσταλλοι αποτελούνται από 70% νερό, συνήθως μεγάλα κανάλια περνούν μέσα από το κρυσταλλικό πλέγμα των πρωτεϊνικών μορίων, με αποτέλεσμα μικρά μόρια να καταφέρνουν να διαχέονται μέσω αυτών των καναλιών. Αν ένας ligand παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για κάποια συγκεκριμένη περιοχή της επιφάνειας της πρωτεΐνης τότε προσκολλάται στην περιοχή αυτή και είναι δυνατό να αναλυθεί με το σύνολο των αποτελεσμάτων που αφορούν τον αρχικό κρύσταλλο. [23]

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

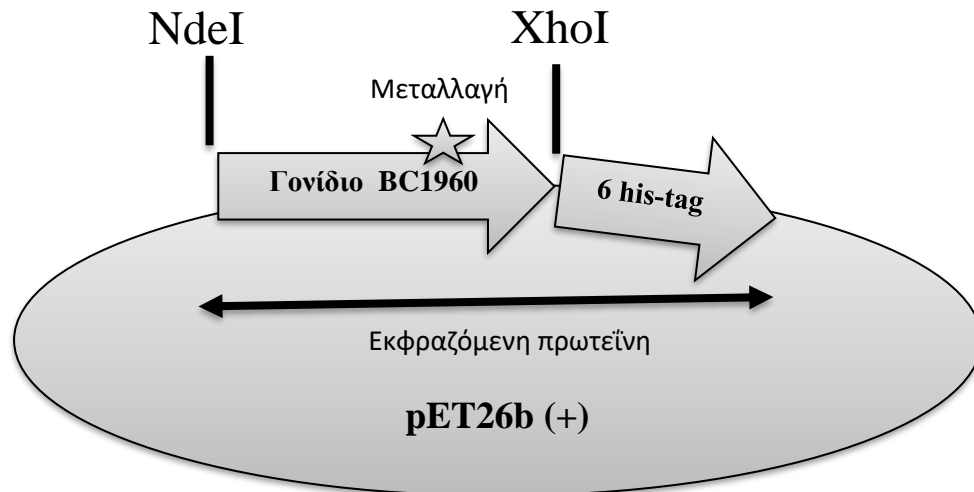
3.1 Σχεδιασμός και δημιουργία μεταλλαγής

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σημειακή μεταλλαγή R169A. Τα αμινοξέα αργινίνη και αλανίνη παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, με βασικότερη τη δομή της πλευρικής τους αλυσίδας. Συγκεκριμένα, η αργινίνη έχει μια μακριά πλευρική αλυσίδα, η οποία αποτελείται από μια τριμελή ανθρακική αλυσίδα στο τέλος της οποίας είναι συνδεδεμένη μια σχετικά πολική ομάδα γουανιδίνης. Αντίθετα, η πλευρική αλυσίδα της αλανίνης περιλαμβάνει μια μεθυλομάδα, η οποία είναι σχετικά χημικά αδρανής. Επομένως, η αντικατάσταση της αργινίνης από τη μικρότερη αλανίνη αναμένεται να δημιουργήσει ένα μεγάλο κενό στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο θεωρητικά μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες του ενζύμου (διαλυτότητα και θερμοσταθερότητα).



Εικόνα 15. **A)** Σχηματική απεικόνιση αμινοξέος αλανίνης **B)** Σχηματική απεικόνιση αμινοξέος αργινίνης **C)** Μοντέλο δομής BC1960 από ανάλυση δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ. Απεικονίζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα δέσμευσης μετάλλου, His131 (ροζ), His135 (ροζ), Asp81(κόκκινο), το καταλυτικό Asp80 (μπλε), η υδροξυλιωμένη Pro171 (κίτρινο) ενώ έχει αφαιρεθεί η Arg169. Με τη χρήση της PyMol υπολογίστηκε η απόσταση ανάμεσα στην Pro171 και το Asp80 ύστερα από την απουσία της Arg169 και τη δημιουργία του κενού στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο pET26(+), καθώς προσθέτει έναν 6-ιστιδινικό επίτοπο (6-His tag) στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την απομόνωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης με τη χρήση χρωματογραφία συγγένειας. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο της BC1960 είναι κλωνοποιημένο μεταξύ των θέσεων NdeI/XhoI, καθώς με αυτό τον τρόπο δεν προστίθενται επιπλέον αμινοξικά κατάλοιπα κατά τη συρραφή.



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση της πλασμιδιακής κατασκευής του φορέα pET26b(+) με κλωνοποιημένο το γονίδιο BC1960_R169A. Με βέλη φαίνονται το γονίδιο της BC1960_R169A, καθώς και το 6-ιστιδινικό επίτοπο (tag).

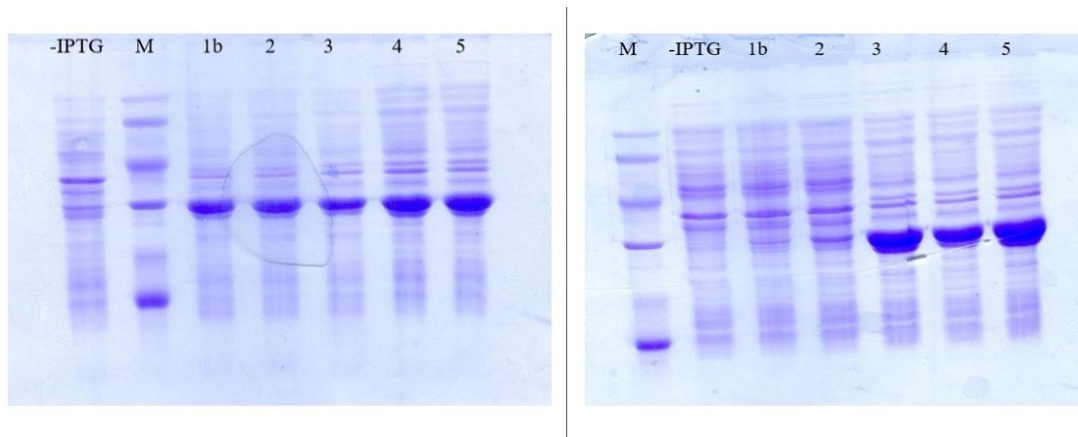
3.2 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε μικρή κλίμακα (δοκιμές έκφρασης και διαλυτότητας)

Η BC1960_R169A υπερεκφράζεται με επιτυχία σε BL21(DE3) E.coli κύτταρα. Το πρώτο βήμα είναι η δοκιμή υπερέκφρασης, η οποία περιλαμβάνει την έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα BL21 DE3 σε **διαφορετικές θερμοκρασίες, χρόνους επαγωγής και συγκέντρωση επαγωγέα (IPTG)**, ώστε να διερευνηθούν όλες οι παράμετροι και να επιλεγούν αυτές που οδηγούν στα βέλτιστα αποτελέσματα.

➤ Επιλογή κατάλληλου κλώνου έκφρασης

Ύστερα από την ανάλυση του αποτελέσματος αλληλούχισης των 13 κλώνων που είχαν αρχικά σταθεί για ανάλυση, προκύπτει ότι σε παραπάνω από τους μισούς έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία η επιθυμητή μεταλλαγή στην επιθυμητή θέση. Ωστόσο, οι κλώνοι 11 και 13 επιλέγονται για περαιτέρω ανάλυση, καθώς αυτοί φαίνονται να είναι οι απόλυτα σωστοί.

Από προηγούμενες εργασίες στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας είναι γνωστές οι συνθήκες επαγωγής της αγρίου τύπου BC1960. Έτσι, για την επιλογή του κατάλληλου κλώνου για την πορεία των πειραμάτων επιλέγονται οι συγκεκριμένες συνθήκες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται επαγωγή μέσω IPTG ολονύκτια στους 25°C. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων και τέλος η ανάλυση των διαλυμάτων που προέκυψαν πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (πηκτή 12.5%).

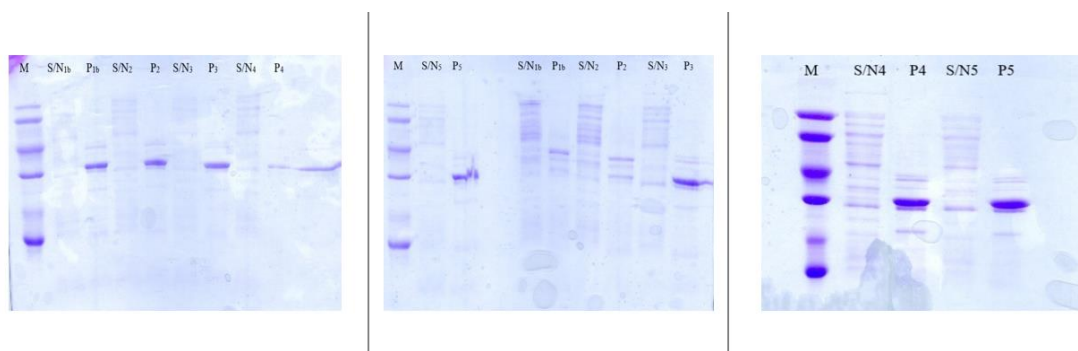


Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από κλώνους 11 και 13 σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο έκφρασης.

M: μάρτυρας

-IPTG : δείγμα χωρίς προσθήκη επαγωγέα IPTG αντίστοιχα σε κάθε κλώνο

1b-5: καλλιέργειες που εξετάζονται από κάθε κλώνο αντίστοιχα



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από κλώνους 11 και 13 σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο διαλυτότητας.

M: μάρτυρας

S/N₁₋₅: υπερκείμενο από τις καλλιέργειες 1b,2,3,4 και 5 αντίστοιχα για κάθε κλώνο

P₁₋₅: πελέτα από τις καλλιέργειες 1b,2,3,4 και 5 αντίστοιχα για κλώνο

Από την ανάλυση της πηκτής SDS 12.5% που παρουσιάζεται στις Εικόνες 17 και 18 προκύπτει ότι ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης τόσο στον κλώνο 11 όσο και στον κλώνο 13 εντοπίζεται ως ίζημα στην πελέτα, η οποία είναι αποτέλεσμα της φυγοκέντρωσης που ακολούθησε τη διάρρηξη των κυττάρων. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό πρωτεΐνης φαίνεται να είναι διαλυτή στις

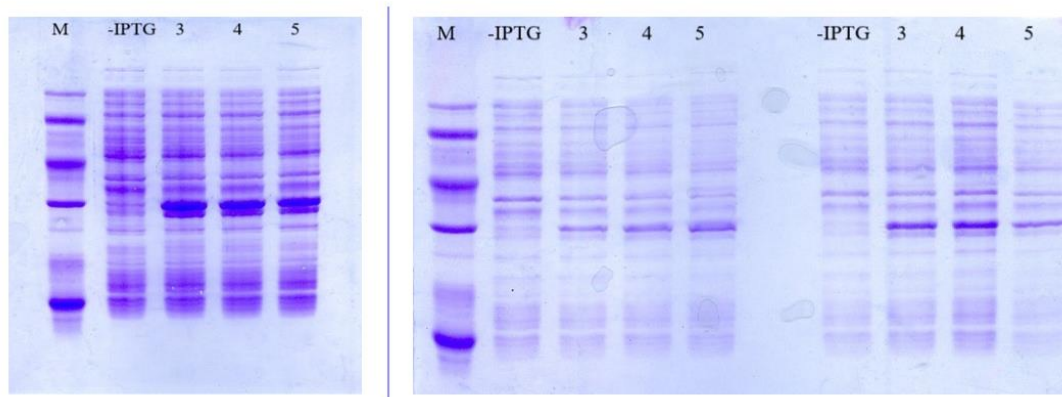
καλλιέργειες 3,4 και 5 του κλώνου 13, με αποτέλεσμα αυτές να επιλέγονται για περαιτέρω ανάλυση.

➤ Επιλογή συνθηκών επαγωγής (θερμοκρασία και συγκέντρωση IPTG)

Παρόλο που προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο είναι γνωστές οι συνθήκες επαγωγής της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, πραγματοποιούνται περαιτέρω πειράματα ελέγχου των συνθηκών έκφρασης καθώς πρόκειται για ένα νέο και άγνωστο ως προς τη «συμπεριφορά» του μετάλλαγμα.

Συνολικά εξετάζονται οι παρακάτω συνθήκες:

- 4 ώρες επαγωγή με 1mM IPTG στους 25°C
- 4 ώρες επαγωγή με 0,5mM IPTG στους 25°C
- O/N επαγωγή με 1mM IPTG στους 16°C

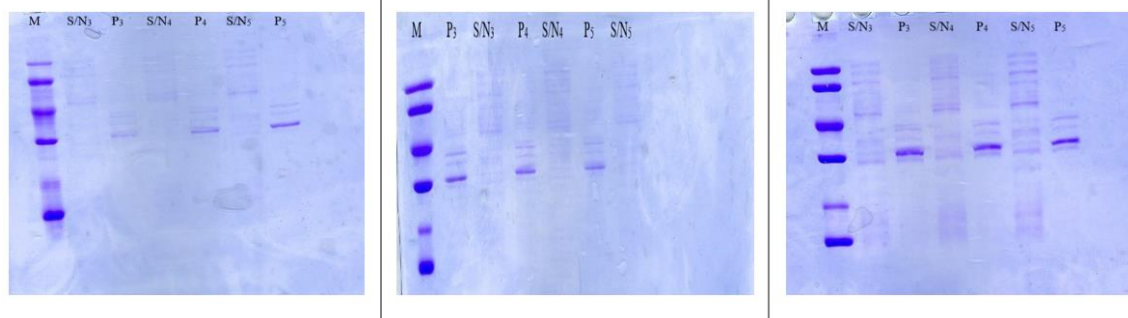


Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από καλλιέργειες 3, 4 και 5 του κλώνου 13 σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο έκφρασης.

M: μάρτυρας

-IPTG : δείγμα χωρίς προσθήκη επαγωγέα IPTG

3,4,5: καλλιέργειες που εξετάζονται



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από καλλιέργειες 3, 4 και 5 του κλώνου 13 σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο διαλυτότητας.

M: μάρτυρας

S/N₃₋₅: υπερκείμενο από τις καλλιέργειες 3, 4 και 5 του κλώνου 13

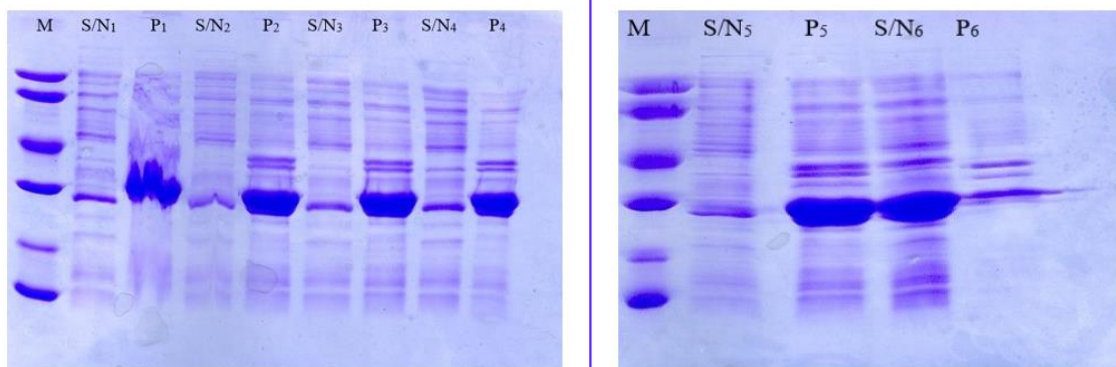
P₃₋₅: πελέτα από τις καλλιέργειες 3, 4 και 5 του κλώνου 13

Από την ανάλυση της πηκτής SDS 12.5% που παρουσιάζεται στην Εικόνα 19 και 20 αντίστοιχα, προκύπτει ότι η υπό μελέτη πρωτεΐνη εκφράζεται στο σύνολο των συνθηκών που εξετάζονται. Ωστόσο, δε είναι καθόλου διαλυτή σε καμία συνθήκη καθώς το σύνολο της πρωτεΐνης εντοπίζεται ως ίζημα στην πελέτα, οποία είναι αποτέλεσμα της φυγοκέντρωσης που ακολούθησε τη διάρρηξη των κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, το σύνολο το συνθηκών που εξετάζονται απορρίπτονται ως πιθανές συνθήκες έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης και επιλέγονται οι αρχικές ήδη γνωστές από προηγούμενες μελέτες, δηλαδή ολονύκτια επαγωγή με 1mM IPTG στους 25°C.

➤ Επιλογή διαλύματος επαναδιαλυτοποίησης της πελέτας

Συνολικά, εξετάζονται τα παρακάτω διαλύματα:

- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl
- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl
- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 10% glycerol
- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 0.1% DDM
- 50mm Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl
- 8M Urea, 50mm Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από καλλιέργεια 4 του κλώνου 13 σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% για έλεγχο διαλυτότητας.

M: μάρτυρας

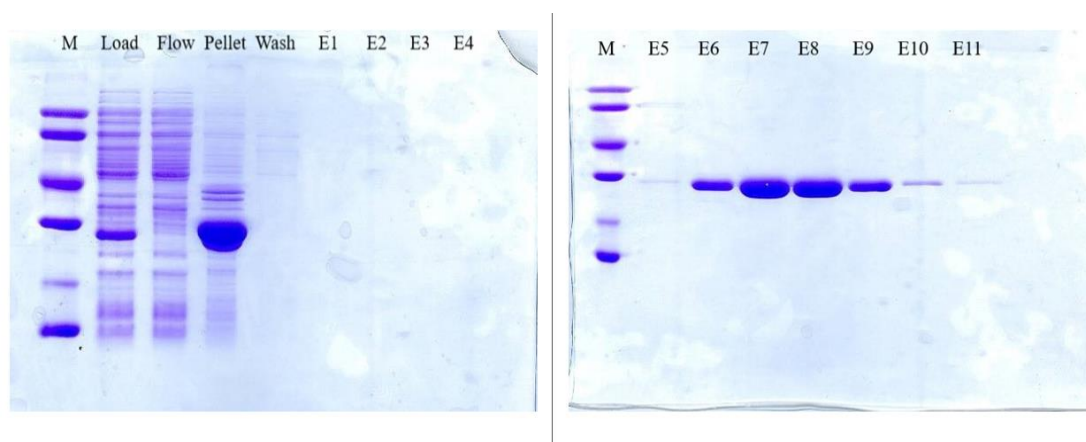
S/N₁₋₆: υπερκείμενο από καλλιέργεια 4 του κλώνου 13 σε διαφορετικά διαλύματα επαναδιαλυτοποίησης

P₁₋₆: πελέτα από καλλιέργεια 4 του κλώνου 13 σε διαφορετικά διαλύματα επαναδιαλυτοποίησης

Από την ανάλυση της πηκτής SDS 12.5% που παρουσιάζεται στην Εικόνα 21 προκύπτει ότι σε όλες τις συνθήκες που εξετάζονται η υπό μελέτη πρωτεΐνη είναι διαλυτή. Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό της συνεχίζει να παρατηρείται ως ίζημα στην πελέτα. Η παρουσία τόσο της γλυκερόλης όσο και του απορρυπαντικού DDM, που παραδοσιακά φαίνονται να ευνοούν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών, δε φαίνεται να επηρεάζουν ιδιαίτερα τη διαλυτότητα της συγκεκριμένης. Επίσης, όπως ήταν αναμενόμενο στο διάλυμα που περιείχε ουρία περισσότερη πρωτεΐνη παρατηρείται στο υπερκείμενο σε σχέση με την πελέτα. Επομένως, η ουρία επηρεάζει θετικά τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Ωστόσο, εφόσον, παρατηρείται διαλυτή πρωτεΐνη σε διαλύματα που δε περιέχουν ουρία δε κρίνεται αναγκαία η χρήση της. Επομένως, το τελικό διάλυμα στο οποίο καταλήγουμε ότι θα χρησιμοποιήσουμε μετέπειτα στα πειράματα μας είναι ένα διάλυμα μέσης αλατότητας με σύσταση 100mM NaCl και 50mM Tris-HCl pH 7.5

3.3 Υπερέκφραση της πρωτεΐνης BC1960_R169A

Αφού επιλεγθεί ο σωστός κλώνος πραγματοποιείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα μέσω ολονύκτιας επαγωγής IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) στους 25°C. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων και απομόνωση της πρωτεΐνης με τη χρήση μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται στήλη νικελίου (NiNTA) και η πρωτεΐνη απομονώνεται μέσω του 6-ιστιδινικού επιτόπου (6-His tag) που φέρει στο καρβοξυτελικό άκρο της. Οι πρωτεΐνες εκκλούνται από τη στήλη με αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου και είναι διαλυτές σε τελικό διάλυμα που περιέχει 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl και 500mM ιμιδαζόλιο.



Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του καθαρισμού της BC1960_R169A από κολώνα νικελίου σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% .

M: μάρτυρας

Load: Δείγμα από το υπερκείμενο που φορτώθηκε στην κολώνα νικελίου

Flow (flow-through): Δείγμα από διάλυμα που συλλέχθηκε μετά το πέρασμα του δείγματος πρωτεΐνης από την κολώνα

Pellet: Δείγμα από επαναδιαλυτοποιημένη πελέτα σε ανάλογο όγκο Lysis

Wash: Δείγματα από τα διαλύματα των πλύσεων που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

E₁-E₁₁(elutions): Δείγμα από τα διαλύματα έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

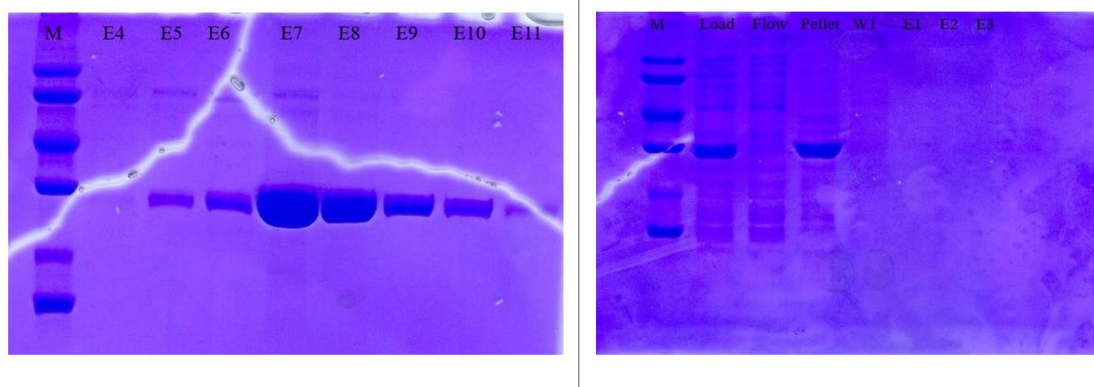
Από την ανάλυση της πηκτής SDS 12.5% που παρουσιάζεται στην Εικόνα 22 προκύπτει ότι η υπό μελέτη πρωτεΐνη BC1960_R169A είναι διαλυτή, παράγεται σε ικανοποιητική ποσότητα και με μεγάλη καθαρότητα. Εμφανίζεται στο αναμενόμενο ύψος των ~30kDa.

Συγκεκριμένα, από την περαιτέρω ανάλυση της πηκτής SDS 12.5%, προκύπτει ότι ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης εντοπίζεται ως ίζημα στην πελέτα, η οποία είναι αποτέλεσμα της φυγοκέντρωσης που ακολούθησε τη διάρρηξη των κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι ελάχιστη ποσότητα φαίνεται να μην προσδένεται στα ιόντα Ni⁺² και να απομακρύνεται στο Flowthrough (FI), ενώ δεν υπάρχουν απώλειες κατά το πέρασμα του διαλύματος πλύσης (Wash). Η έκλυση φαίνεται να αρχίζει από το διάλυμα έκλουσης 5 (elution 5), σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 100mM, ενώ βέλτιστη έκλυση παρατηρείται μεταξύ των διαλυμάτων έκλουσης 6-9 (elutions 6-9), σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 100mM-500mM. Στα διαλύματα έκλουσης 10 και 11 (elutions 10-11), σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 500mM, παρατηρείται σημαντική σταδιακή μείωση της εκλούμενης πρωτεΐνης.

3.4 Υπερέκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης BC1960

Εφόσον έχει επιλεγθεί ο σωστός κλώνος έκφρασης, από προηγούμενη εργασία στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας, πραγματοποιείται υπερέκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα μέσω ολονύκτιας επαγωγής IPTG στους 25°C. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων και απομόνωση της πρωτεΐνης με τη χρήση μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται στήλη νικελίου (NiNTA) και η πρωτεΐνη απομονώνεται μέσω του 6-ιστιδινικού επιτόπου (6-His tag) που φέρει στο καρβοξυτελικό άκρο της. Οι πρωτεΐνες εκλούνται από τη στήλη με αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου και είναι διαλυτές σε τελικό διάλυμα

που περιέχει 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl και 500mM ιμιδαζόλιο.



Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του καθαρισμού της αγρίου τύπου BC1960 από κολώνα νικελίου σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12.5% .

M: μάρτυρας

Load: Δείγμα από το υπερκείμενο που φορτώθηκε στην κολώνα νικελίου

Flow (flow-through): Δείγμα από διάλυμα που συλλέχθηκε μετά το πέρασμα του δείγματος πρωτεΐνης από την κολώνα

Pellet: Δείγμα από επαναδιαλυτοποιημένη πελέτα σε ανάλογο όγκο Lysis

W1: Δείγματα από τα διαλύματα των πλύσεων που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

E₁-E₁₁(elutions): Δείγμα από τα διαλύματα έκλουσης που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό

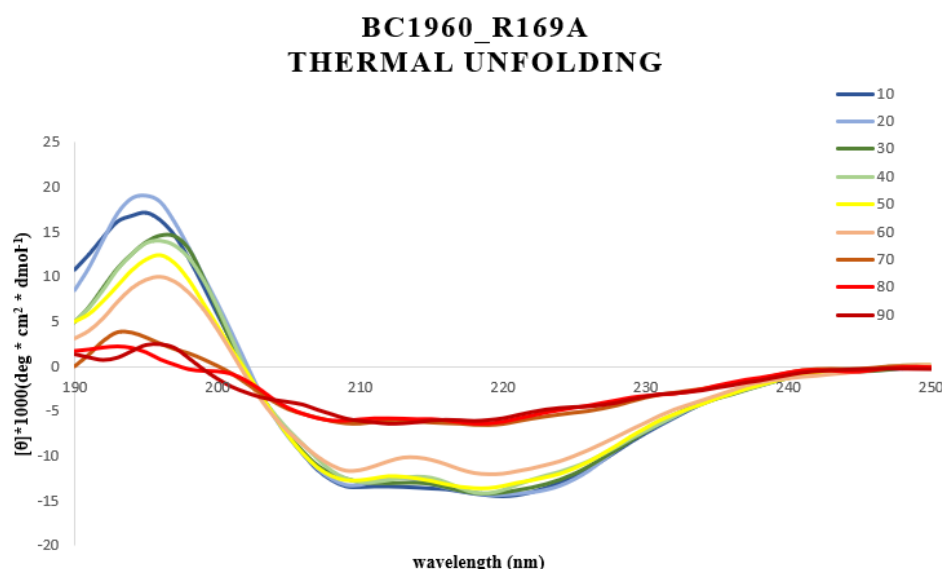
Από την ανάλυση της πηκτής SDS 12.5% που παρουσιάζεται στην Εικόνα 23 προκύπτει ότι η υπό μελέτη αγρίου τύπου πρωτεΐνη BC1960 είναι διαλυτή, παράγεται σε ικανοποιητική ποσότητα και με μεγάλη καθαρότητα, ενώ παράλληλα εμφανίζεται στο αναμενόμενο ύψος των ~30kDa.

Συγκεκριμένα, από την περαιτέρω ανάλυση της πηκτής SDS 12.5%, προκύπτει ότι ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης εντοπίζεται ως ίζημα στην πελέτα, η οποία είναι αποτέλεσμα της φυγοκέντρωσης που ακολούθησε τη διάρρηξη των κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι ελάχιστη ποσότητα φαίνεται να μην προσδένεται στα ιόντα Ni⁺² και να απομακρύνεται στο Flowthrough (FI), ενώ δεν υπάρχουν απώλειες κατά το πέρασμα του διαλύματος πλύσης (Wash). Η έκλυση φαίνεται να αρχίζει από το διάλυμα έκλουσης 4 (elution 4), σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 50mM, αυξάνεται σταδιακά στο διάλυμα έκλουσης 5 (elution 5), σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 100mM, ενώ βέλτιστη έκλυση παρατηρείται μεταξύ των διαλυμάτων έκλουσης 7-9 (elutions 7-9), σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 500mM. Στα διαλύματα έκλουσης 10 και 11 (elutions 10-11), σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 500mM, παρατηρείται σημαντική σταδιακή μείωση της εκλούμενης πρωτεΐνης.

3.5 Έλεγχος της θερμοσταθερότητας της πρωτεΐνης με τη χρήση Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD)

Ακολουθεί ανάλυση της θερμοσταθερότητας της πρωτεΐνης BC1960_R169A με τη χρήση κυκλικού διχρωϊσμού αλλά και συγκριτική μελέτη με την αντίστοιχη αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, μελετάται η ελλειπτικότητα (θ) σε ένα εύρος φασμάτων από 190nm έως 260nm κατά τη διάρκεια της θερμικής αποδιάταξης της πρωτεΐνης από 10°C έως 90°C.

Η ποσότητα του πρωτεϊνικού δείγματος μετρήθηκε με την τεχνική Nanodrop και βρέθηκε 1,1mgr/ml.

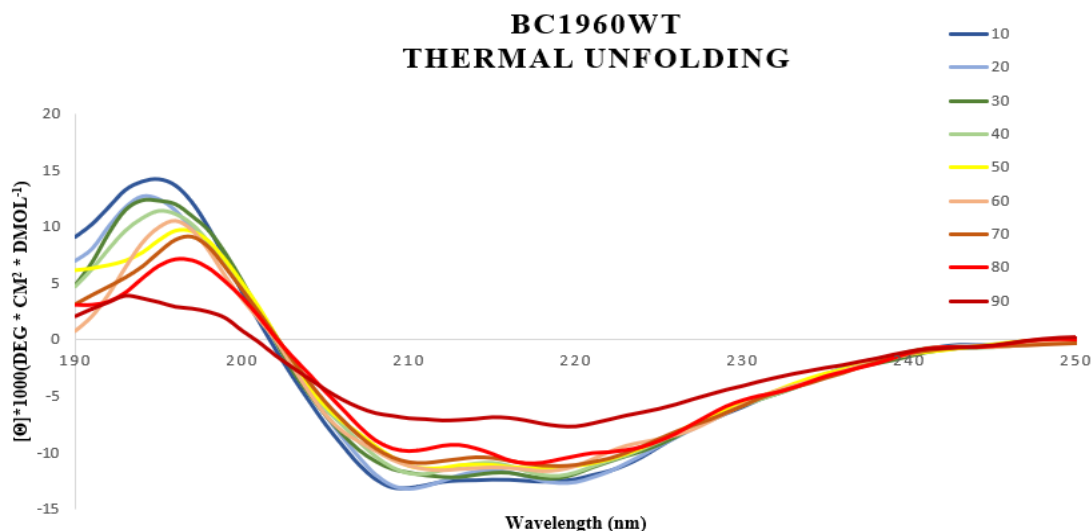


Εικόνα 24. Φάσμα μοριακής ελλειπτικότητας κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 10°C στους 90°C για την πρωτεΐνη BC1960_R169A.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι η πρωτεΐνη παρουσιάζει α-ελικοειδή διαμόρφωση και συγκεκριμένα αποτελείται από α-έλικα καθώς παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα στα 208nm και στα 222nm και μέγιστο στα 195nm. Ωστόσο, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία η πρωτεΐνη φαίνεται να χάνει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα των α-ελίκων στα 208nm και στα 222nm και μέγιστο στα 195nm. Συγκεκριμένα, στις καμπύλες που αντιστοιχούν στους 60°C και στους 70°C, παρατηρείται μετάβαση από τη διπλωμένη κατάσταση της α-έλικας στην αδίπλωτη. Το σημείο τήξης με βάση την καμπύλη αποδιάταξης αλλά και με χρήση του προγράμματος Spectra Analysis μέσω της πρώτης παραγώγου, υπολογίζεται στους 65°C. Επίσης, από την ανάλυση των

καμπυλών φαίνεται πως η πρωτεΐνη εμφανίζει μια ικανοποιητική θερμοσταθερότητα καθώς διατηρεί τη διαμόρφωσή της με τα χαρακτηριστικά ελάχιστα και στις υψηλές θερμοκρασίες των 60°C. Επίσης, χαρακτηριστική είναι η παρουσία ισοδιχρωικού σημείου, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη δύο καταστάσεων στην πρωτεΐνη την folded και την unfolded. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια των μετρήσεων αυτό που αλλάζει είναι η σχετική αναλογία αυτών των καταστάσεων από δύο διακριτών καταστάσεων. Έτσι το μετάλλαγμα BC1960_R169A φαίνεται πως αποτελεί χαρακτηριστικό μοντέλο μιας “two state” πρωτεΐνης, δηλαδή μιας πρωτεΐνης χωρίς intermediate διαμόρφωση.

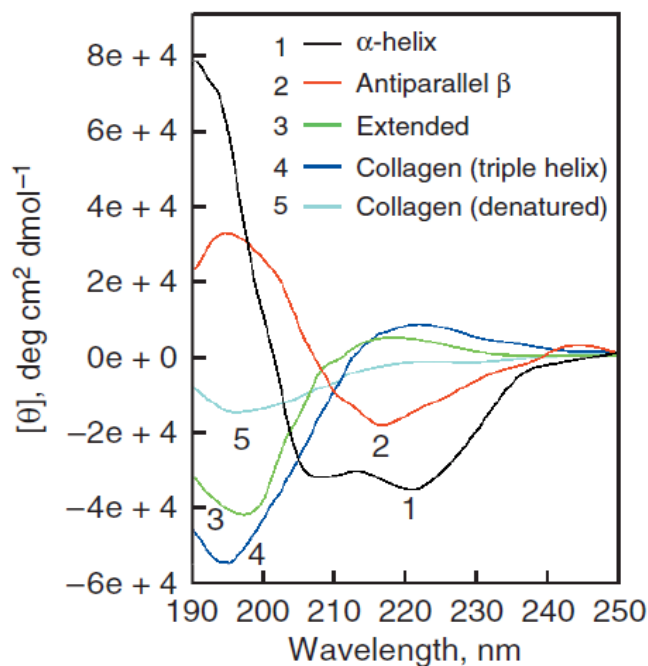
Αντίστοιχα, για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη BC1960 η ποσότητα του πρωτεϊνικού δείγματος που μετρήθηκε ήταν 1,3 mgr/ml.



Εικόνα 25. Φάσμα μοριακής ελλειπτικότητας κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 10°C στους 90°C για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη BC1960.

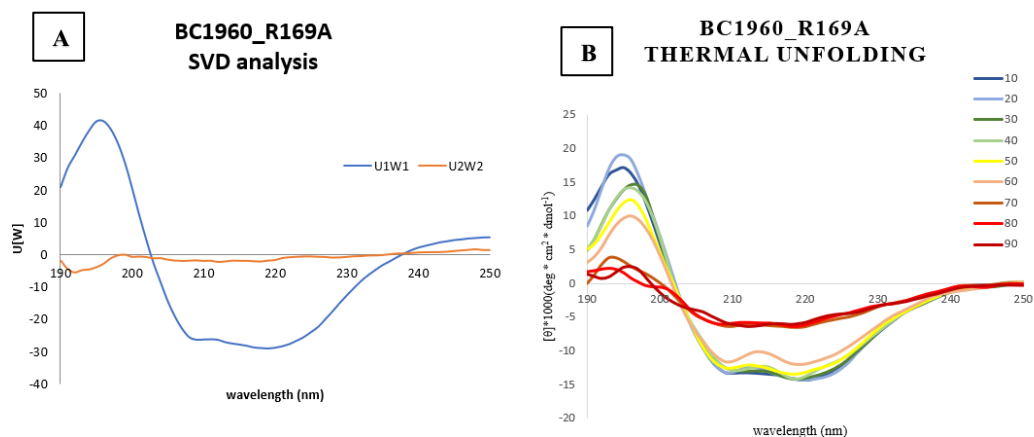
Αντίστοιχα, και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη παρουσιάζει α-ελικοειδή διαμόρφωση και συγκεκριμένα αποτελείται από α-έλικα εφόσον στο φάσμα παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά ελάχιστα στα 208nm και στα 222nm και μέγιστο στα 195nm. Ωστόσο, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία η πρωτεΐνη φαίνεται να χάνει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα των α-ελίκων στα 208nm και στα 222nm και μέγιστο στα 195nm. Συγκεκριμένα, στις καμπύλες που αντιστοιχούν στους 50°C και στους 40°C, παρατηρείται μετάβαση από τη διπλωμένη κατάσταση της α-έλικας στην αδίπλωτη. Το σημείο τήξης με βάση την καμπύλη αποδιάταξης αλλά και με χρήση του προγράμματος Spectra Analysis μέσω της πρώτης παραγώγου, υπολογίζεται στους 50°C. Τέλος,

επίσης, χαρακτηριστική είναι η παρουσία ισοδιχρωικού σημείου, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη δύο καταστάσεων στην πρωτεΐνη την folded και την unfolded. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια των μετρήσεων αυτό που αλλάζει είναι η σχετική αναλογία αυτών των καταστάσεων από δύο διακριτών καταστάσεων. Έτσι το μετάλλαγμα BC1960_R169A φαίνεται πως αποτελεί χαρακτηριστικό μοντέλο μιας “two state” πρωτεΐνης, δηλαδή μιας πρωτεΐνης χωρίς intermediate διαμόρφωση.



Εικόνα 26. Χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης του κυκλικά πολωμένου φωτός στο άνω-υπεριώδες για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

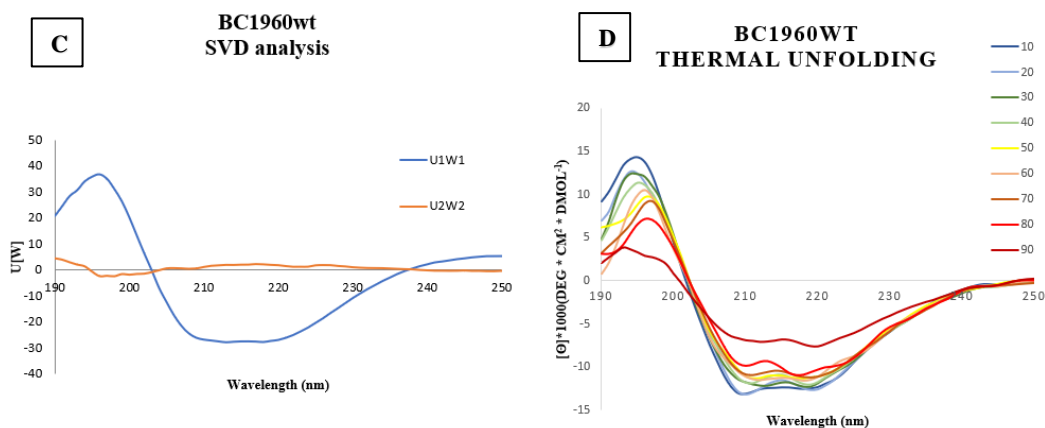
Η ανάλυση ιδιοτιμών ή SVD (Singular Value Decomposition) είναι ένα ισχυρό υπολογιστικό εργαλείο για την μελέτη πινάκων με ποικίλες εφαρμογές. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια γενική μέθοδος υπολογισμού του αριθμού των διαφορετικών καταστάσεων της πρωτεΐνης που εμφανίζονται στην διάρκεια μίας διαδικασίας θερμικής αποδιάταξης. Ειδικότερα, η συγκεκριμένη ανάλυση επιβεβαίωσε την ύπαρξη ελικοειδούς διαμόρφωσης στην υπό μελέτη πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αποτελείται από α-έλικα καθώς χαρακτηριστική είναι η παρουσία και εδώ των ελαχίστων στα 208nm και στα 222nm και του μεγίστου στα 195nm. Επίσης, από την ανάλυση των πινάκων προκύπτει ότι μόνο μία σημαντική κατάσταση χαρακτηρίζει την πρωτεΐνη, αυτή της α-έλικας.



Εικόνα 27. Α) Διάγραμμα από την ανάλυση SVD Β) Φάσμα μοριακής ελλειπτικότητας προς το μήκος κύματος κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 10°C στους 90°C για την πρωτεΐνη BC1960_R169A.

Από την παρατήρηση του διαγράμματος Α που αντιστοιχεί στην ανάλυση SVD για το μετάλλαγμα BC1960_R169A, είναι φανερό ότι η μοναδική σημαντική κατάσταση για την πρωτεΐνη BC1960_R169A είναι αυτή της α-έλικας (U1W1-μπλε γραμμή), καθώς οι υπόλοιπες (U2W2- κόκκινη γραμμή) κινούνται γύρω από το μηδέν και θεωρούνται αμελητέες. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώνεται η θεωρία του μοντέλου δύο καταστάσεων που αναπτύχθηκε παραπάνω και βασίζεται στην ύπαρξη ισοδιχρωικού σημείου.

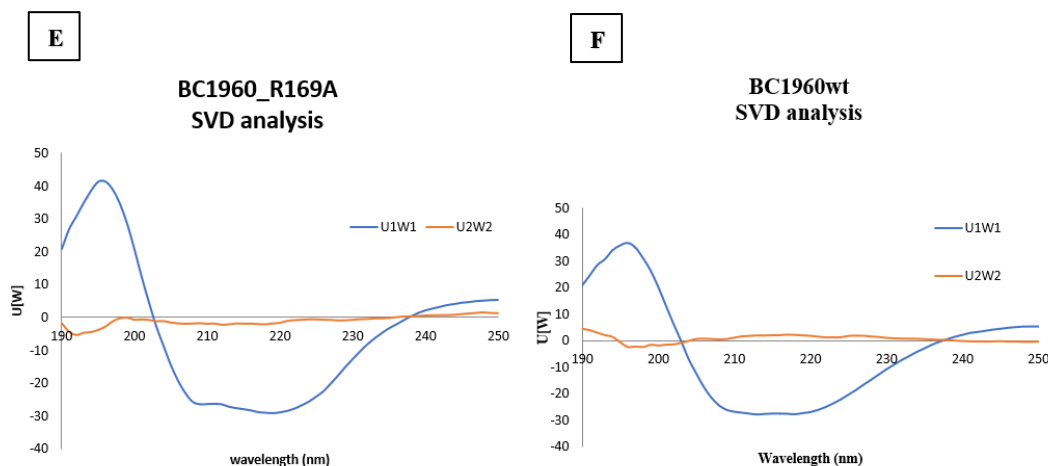
Αντίστοιχα, πραγματοποιείται ανάλυση ιδιζουσών τιμών ή SVD για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη BC1960. Και στην περίπτωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης η ανάλυση επιβεβαίωσε την ύπαρξη ελικοειδούς διαμόρφωσης. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αποτελείται από α-έλικα καθώς χαρακτηριστική είναι η παρουσία και εδώ των ελαχίστων στα 208nm και στα 222nm και του μεγίστου στα 195nm. Επίσης, από την ανάλυση των πινάκων προκύπτει ότι μόνο μία σημαντική κατάσταση χαρακτηρίζει την πρωτεΐνη, αυτή της α-έλικας.



Εικόνα 28. C) Διάγραμμα από την ανάλυση SVD D) Φάσμα μοριακής ελλειπτικότητας προς το μήκος κύματος κατά τη θερμική αποδιάταξη από τους 10°C στους 90°C για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη BC1960.

Αντίστοιχα, από τη παρατήρηση με μελέτη του διαγράμματος C που αντιστοιχεί στην ανάλυση SVD για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη BC1960, είναι φανερό ότι η μοναδική σημαντική κατάσταση είναι αυτή της α-έλικας καθώς οι υπόλοιπες κινούνται γύρω από το μηδέν και θεωρούνται αμελητέες. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώνεται η θεωρία του μοντέλου δύο καταστάσεων που αναπτύχθηκε παραπάνω και βασίζεται στην ύπαρξη ισοδιχρωικού σημείου.

Παράλληλα, τα αποτελέσματα των αναλύσεων SVD για τις δύο πρωτεΐνες συγκρίθηκαν μεταξύ τους για την καλύτερη μελέτη του μεταλλάγματος.



Εικόνα 29. Συγκριτική παράθεση διαγραμμάτων από ανάλυση SVD της BC1960_R169A και BC1960wt.

Από την ανάλυση των συγκριτικών αποτελεσμάτων για τις δύο υπό μελέτη πρωτεΐνες προκύπτει ότι και οι δύο εμφανίζουν μια α -ελικοειδή διαμόρφωση, η οποία αποτελεί και τη μοναδική σημαντική κατάσταση για τις πρωτεΐνες. Επομένως, η παρουσία της συγκεκριμένης μεταλλαγής δε φαίνεται να επηρεάζει τη δευτεροταγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

3.6 Κρυστάλλωσεις

Το μετάλλαγμα BC1960_R169A κρυστάλλωσε αρχικά μόνο του ενώ στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι τεχνικές της συν-κρυστάλλωσης αλλά και του crystal soaking για τη δημιουργία συμπλόκων της πρωτεΐνης με τρεις διαφορετικούς συνδέτες (ligands).

➤ Κρυστάλλωση BC1960_R169A

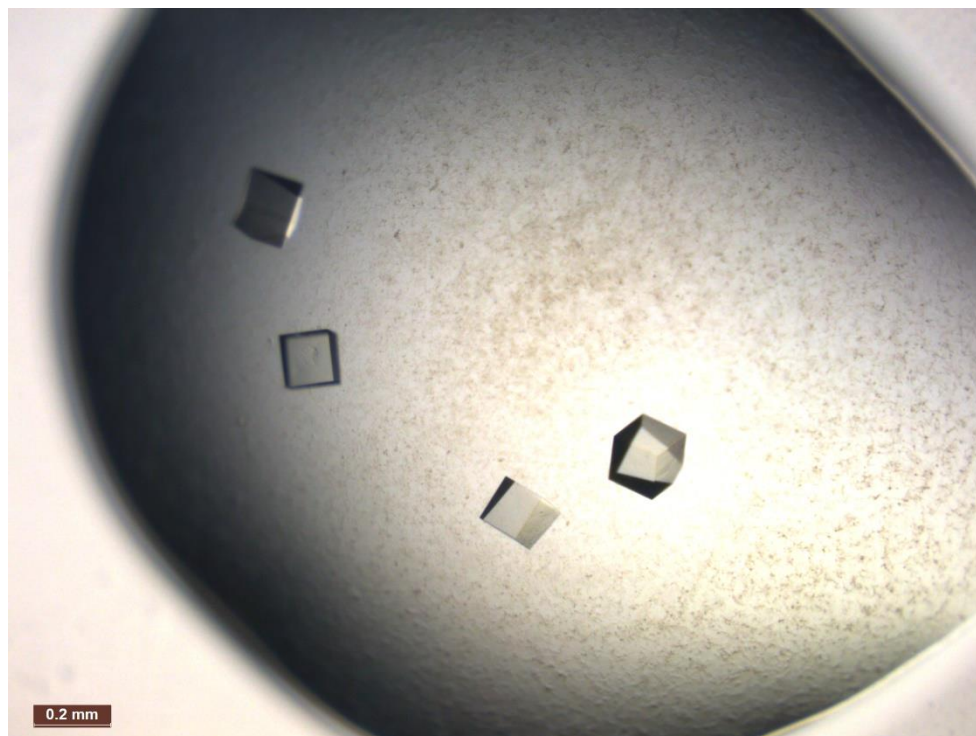
Με βάση τα πειράματα που διεξήχθησαν για την πρωτεΐνη BC1960_R169A οι συνθήκες κρυστάλλωσης είναι οι εξής:

Polyethylene Glycol (PEG₄₀₀₀) 50%: 12% και 14%

Acetate Buffer (0.5M): 0.1M pH 5.0 και 0.1M pH 5.2

Ammonium Sulfate(1M): 0.5M

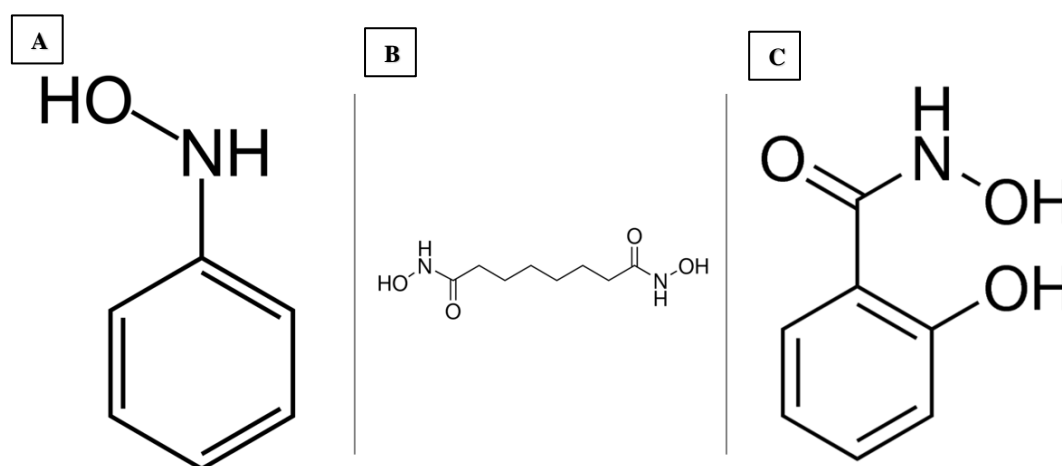
Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 9.41mgr/ml.



Εικόνα 30. Κρύσταλλοι του μορίου της BC1960_R169A στις συνθήκες 12% PEG₄₀₀₀, 0.1 M Acetate Buffer pH 5.0, 0.5M Ammonium Sulfate

➤ Συν-κρυσταλλώσεις με υποστρώματα/αναστολείς

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν οι εξής εμπορικά διαθέσιμοι συνδέτες-ligands: N-Phenylhydroxamine (Sigma-Aldrich : 671576-1G), Suberohydroxamic acid (Sigma-Aldrich : 390585-1G) και Salicylhydroxamic acid (Sigma-Aldrich : S607-5G).



Εικόνα 31. A) N-Phenylhydroxamine B) Suberohydroxamic acid C) Salicylhydroxamic acid.

➤ *Salicylhydroxamic acid & N-Phenylhydroxamine*

Ο Salicylhydroxamic acid παρουσιάζει διαλυτότητα στο νερό. Αντίστοιχα, ο ligand N-Phenylhydroxamine παρουσιάζει διαλυτότητα σε ζεστό νερό (~60°C). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήσαμε πειράματα τόσο συν-κρυσταλλώσεων όσο και crystal soaking. Οι αναλογίες πρωτεΐνης:ligand που μελετήσαμε είναι 1:1, 1:2, 1:5 και 1:10.

Στα πειράματα συν-κρυσταλλώσεων χρησιμοποιήσαμε μικρή ποσότητα ligand ώστε να μην επηρεαστεί η πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, πρωτεϊνικό διάλυμα συγκέντρωσης 9.41 mg/ml επωάζεται με διάλυμα που περιέχει τον αντίστοιχο ligand στην επιθυμητή αναλογία, τόσο για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου όσο και ολονύκτια στους 4°C. Πιο αναλυτικά, μελετήθηκαν οι αναλογίες πρωτεΐνης:ligand 1:1, 1:2, 1:5 και 1:10, ενώ θετικό αποτέλεσμα, δηλαδή δημιουργία κρυστάλλων, παρατηρείται στις παρακάτω περιπτώσεις.

Πίνακας 3. Πίνακας αποτελεσμάτων συν-κρυστάλλωσης BC1960_R169A με τον ligand salicylhydroxamic acid

Αναλογία πρωτεΐνης: Salicylhydroxamic acid	Συνθήκες κρυστάλλωσης	Συνθήκες επώασης
1:2	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	10 λεπτά
1:5	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	10 λεπτά
1:10	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	10 λεπτά
1:1	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ολονύκτια

Πίνακας 4. Πίνακας αποτελεσμάτων συν-κρυστάλλωσης BC1960_R169A με τον ligand N-Phenylhydroxamine

Αναλογία πρωτεΐνης: N-Phenylhydroxamine	Συνθήκες κρυστάλλωσης	Συνθήκες επώασης
1:1	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ολονύκτια

Στα πειράματα crystal soaking επίσης χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα διαλύματος ligand ώστε να μην επηρεαστούν οι κρύσταλλοι. Επίσης, στη διαδικασία χρησιμοποιούνται σταγόνες που περιέχουν σχετικά μεγάλους και πολλούς κρυστάλλους έτσι ώστε να μην οδηγηθούμε σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Οι αναλογίες πρωτεΐνης:ligand μελετήθηκαν ήταν 1:1, 1:2, 1:5 και 1:10. Τα αποτελέσματα των επιμέρους πειραμάτων αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Πίνακας αποτελεσμάτων crystal soaking BC1960_R169A με τον ligand Salicylhydroxamic acid

Αναλογία πρωτεΐνης: Salicylhydroxamic acid	Συνθήκες κρυστάλλωσης	Κατάσταση κρυστάλλων
1:1	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Κανονικοί κρύσταλλοι
1:2	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ραγισμένοι κρύσταλλοι
1:5	14% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ραγισμένοι κρύσταλλοι
1:10	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ραγισμένοι κρύσταλλοι

Πίνακας 6. Πίνακας αποτελεσμάτων crystal soaking BC1960_R169A με τον ligand N-Phenylhydroxamine

Αναλογία πρωτεΐνης: N-Phenylhydroxamine	Συνθήκες κρυστάλλωσης	Κατάσταση κρυστάλλων
1:1	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ραγισμένοι κρύσταλλοι

1:2	14% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Μαύροι και συρρικνωμένοι κρύσταλλοι
1:5	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Μαύροι και συρρικνωμένοι κρύσταλλοι
1:10	14% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Μαύροι και συρρικνωμένοι κρύσταλλοι

➤ *Suberohydroxamic acid*

Ο ligand Suberohydroxamic acid παρουσιάζει διαλυτότητα σε DMSO. Αντίστοιχα, με τους παραπάνω ligands πραγματοποιήσαμε πειράματα τόσο συν-κρυσταλλώσεων όσο και crystal soaking, ενώ παράλληλα μελετήθηκαν και οι ίδιες αναλογίες πρωτεΐνης:ligand δηλαδή 1:1, 1:2, 1:5 και 1:10.

Στα πειράματα τόσο των συν-κρυσταλλώσεων όσο και των crystal soaking μελετώνται δύο περιπτώσεις διαλυμάτων. Στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν τον ligand και προέκυψαν από αρχικό διάλυμα μέσω αραιώσεων με χρήση DMSO. Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν τον ligand και προέκυψαν από αρχικό διάλυμα μέσω αραιώσεων με χρήση νερού. Οι αναλογίες που μελετήθηκαν ήταν 1:1, 1:2, 1:5 και 1:10. Τα αποτελέσματα των επιμέρους πειραμάτων αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7. Πίνακας αποτελεσμάτων συν-κρυσταλλώσεων BC1960_R169A με τον ligand Suberohydroxamic acid

Αναλογία πρωτεΐνης: Suberohydroxamic acid	Συνθήκες κρυστάλλωσης	Συνθήκες επώασης
--	--------------------------	---------------------

1:1	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ολονύκτια (αραίωση σε νερό)
1:5	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ολονύκτια (αραίωση σε νερό)

Πίνακας 8. Πίνακας αποτελεσμάτων crystal soaking BC1960_R169A με τον ligand Suberohydroxamic acid (διαλύματα αραιώσεων με DMSO)

Αναλογία πρωτεΐνης: Suberohydroxamic acid	Συνθήκες κρυστάλλωσης (αραίωση σε DMSO)	Κατάσταση κρυστάλλων
1:1	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.2 0.5M Ammonium Sulfate	Κατεστραμμένοι κρύσταλλοι
1:2	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Κατεστραμμένοι κρύσταλλοι
1:5	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Κατεστραμμένοι κρύσταλλοι
1:10	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.2 0.5M Ammonium Sulfate	Κατεστραμμένοι κρύσταλλοι

Πίνακας 9. Πίνακας αποτελεσμάτων crystal soaking BC1960_R169A με τον ligand Suberohydroxamic acid (διαλύματα αραιώσεων με νερό)

Αναλογία	Συνθήκες	Κατάσταση
-----------------	-----------------	------------------

πρωτεΐνης: Suberohydroxamic acid	κρυστάλλωσης (αραίωση σε νερό)	κρυστάλλων
1:1	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Ραγισμένοι κρύσταλλοι
1:2	12% PEG ₄₀₀₀ 0.1M Acetate Buffer pH 5.0 0.5M Ammonium Sulfate	Μαύροι και συρρικνωμένοι κρύσταλλοι

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία και μελέτη του μεταλλάγματος R169A με σκοπό την απόκτηση σφαιρικής εικόνας για το ενεργό κέντρο της απακετυλάσης BC1960. Η Arg169 έχει φανεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο ενεργό κέντρο του συγκεκριμένου ενζύμου, καθώς συγκρατεί ηλεκτροστατικά το καταλυτικό Asp80. Από αντίστοιχες μελέτες σε συγγενείς απακετυλάσες φάνηκε ότι η απουσία της αργινίνης στο ενεργό οδηγεί σε απώλεια της διαλυτότητας της πρωτεΐνης καθώς επίσης και μείωση της συνολικής ενεργότητας του ενζύμου. Το αμινοξύ αλανίνη επιλέχτηκε ως αντικαταστάτης του αντίστοιχου της αλανίνης καθώς είναι ένα μικρό μη πολικό αμινοξύ, χημικά ανενεργό ενώ το βασικότερο χαρακτηριστικό του είναι η πλευρική του αλυσίδα. Η μεθυλομάδα που διαθέτει ως πλευρική αλυσίδα είναι σχετικά χημικά αδρανής και συχνά η αλανίνη συμμετέχει σε μικρό βαθμό στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών στις οποίες συμμετέχει.

Αρχικά, πραγματοποιηθήκαν πειράματα για την εξακρίβωση των συνθηκών επαγωγής της πρωτεΐνης. Το μεγαλύτερο πρόβλημα που παρουσιάστηκε ήταν η μικρή διαλυτότητα που εμφάνιζε η συγκεκριμένη πρωτεΐνη καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό της εμφανιζόταν ως ίζημα στην πελέτα. Ωστόσο, μέσω τροποποίησης των συνθηκών επαγωγής, κυρίως του διαλύματος επαναδιαλυτοποίησης της πελέτας, αυξήθηκε η διαλυτότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, η έκφραση του πρωτεϊνικού μορίου σε μεγάλη κλίμακα έδειξε πως πρόκειται για μια ιδιαίτερα διαλυτή πρωτεΐνη. Το μεγαλύτερο ποσοστό της, όπως φαίνεται από την ανάλυση των πηκτών πολυακριλαμίδης 12.5%, εμφανίζεται στο υπερκείμενο και ένα μικρό ποσοστό στην πελέτα. Η παρουσία του ακροφυσίου ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της άκρο επιτρέπει την απομόνωση με τη χρήση μεταλλοχημικής χρωματογραφίας συγγένειας. Συγκεκριμένα, λόγω της παρουσίας του ακροφυσίου ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της άκρο παραλαμβάνεται από τα διαλύματα έκλουσης (elutions), τα οποία περιέχουν ιμιδαζόλιο με τελική συγκέντρωση 500mM.

Η ανάλυση της θερμοσταθερότητας του μεταλλάγματος BC1960_R169A με τη χρήση της τεχνικής του κυκλικού διχρωϊσμού (CD), φανερώνει την ύπαρξη μιας αρκετά θερμοσταθερής πρωτεΐνης με σημείο τήξης μεγαλύτερο των 60°C. Επίσης, η πρωτεΐνη έχει σημαντικά ποσοστά α-έλικας, καθώς εμφανίζει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα της α-έλικας στα 208nm και 220nm και μέγιστο στα 195nm. Επίσης, χαρακτηριστική είναι η παρουσία ισοδιχρωϊκού σημείου, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη δύο

καταστάσεων στην πρωτεΐνη την folded και την unfolded. Έτσι η BC1960_R169A φαίνεται πως αποτελεί χαρακτηριστικό μοντέλο μιας “two state” πρωτεΐνης, δηλαδή μιας πρωτεΐνης χωρίς intermediate διαμόρφωση.

Η εικόνα αυτή επιβεβαιώνεται από την ανάλυση των φασμάτων με προσδιορισμό των ιδιοτιμών μέσω της μεθόδου SVD (singular value decomposition). Συγκεκριμένα, από την ανάλυση αυτή προκύπτει πως για την πρωτεΐνη BC1960_R169A υπάρχει μόνο μία σημαντική κατάσταση αυτή της α-έλικας καθώς οι υπόλοιπες που εμφανίζονται είναι αμελητέες.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε έκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, η οποία έδειξε πως πρόκειται επίσης για μια ιδιαίτερα διαλυτή πρωτεΐνη. Το μεγαλύτερο ποσοστό της, όπως φαίνεται από την ανάλυση των πηκτών πολυακρυλαμίδης 12.5%, εμφανίζεται στο υπερκείμενο και ένα μικρό ποσοστό στην πελέτα. Η παρουσία του ακροφυσίου ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της άκρο επιτρέπει την απομόνωση με τη χρήση μεταλλοχηλικής χρωματογραφίας συγγένειας. Συγκεκριμένα, λόγω της παρουσίας του ακροφυσίου ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της άκρο παραλαμβάνεται από τα διαλύματα έκλυσης (elutions), τα οποία περιέχουν ιμιδαζόλιο με τελική συγκέντρωση 500mM.

Αντίστοιχα, η ανάλυση της θερμοσταθερότητας της αγρίου τύπου πρωτεΐνης με τη χρήση του εργαλείου του κυκλικού διχρωισμού φανέρωσε την ύπαρξη μιας πρωτεΐνης η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα α-ελικοειδούς πρωτεΐνης καθώς εμφανίζει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα της α-έλικας στα 208nm και 220nm και μέγιστο στα 195nm. Παράλληλα, χαρακτηριστική είναι η παρουσία ισοδιχρωικού σημείου, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη δύο καταστάσεων στην πρωτεΐνη την folded και την unfolded, με αποτέλεσμα η αγρίου τύπου πρωτεΐνη να αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα μοντέλου μιας “two state” πρωτεΐνης, δηλαδή μιας πρωτεΐνης χωρίς intermediate διαμόρφωση.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των ιδιοτιμών για το υπό μελέτη μετάλλαγμα αλλά και την αντίστοιχη αγρίου τύπου πρωτεΐνη, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της μεταλλαγής στο συγκεκριμένο σημείο δεν επηρεάζει τη δευτεροταγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης, αφού συνεχίζει να διατηρεί τα χαρακτηριστικά της αγρίου τύπου.

Τέλος, όσον αφορά τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, η υπό μελέτη πρωτεΐνη BC1960_R169A κρυστάλλωσε στις συνθήκες 12% PEG₄₀₀₀,

0.1M Acetate Buffer pH 5.0, 0.5M Ammonium Sulfate. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συν-κρυσταλλώσεων αλλά και πειράματα crystal soaking με τη χρήση 3 διαφορετικών ligands σε 4 διαφορετικές αναλογίες πρωτεΐνης:ligand. Ο ligand Salicylhydroxamic acid είχε τα περισσότερα θετικά αποτελέσματα τόσο στα πειράματα συν-κρυσταλλώσεων, σε επώαση 10 λεπτών αλλά και σε ολονύκτια επώαση με την πρωτεΐνη BC1960_R169A, όσο και στα crystal soaking. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο λόγω της δομής του και συγκεκριμένα λόγω της ύπαρξης των 2 ελεύθερων υδροξυλίων. Αντίστοιχα, ο ligand N-Phenylhydroxamine παρουσίασε θετικό αποτέλεσμα μόνο στην ολονύκτια επώαση με την πρωτεΐνη BC1960_R169A, παρόλο που παρουσιάζει παρόμοια δομή με τον πρώτο ligand που μελετήθηκε με την παρουσία μιας ελεύθερης υδροξυλομάδας. Τέλος, ο ligand Suberohydroxamic acid έχει δομή ευθείας αλυσίδας και δύο ελεύθερες υδροξυλομάδες σε κάθε άκρο της αλυσίδας, και αναμενόνταν να έχει τα περισσότερα θετικά αποτελέσματα στο σύνολο των ligand που μελετήθηκαν. Ωστόσο, η παρουσία του οργανικού διαλύτη DMSO δυσκόλεψε σε μεγάλο βαθμό την πειραματική διαδικασία και εξαγωγή θετικών αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά, όταν μειώσαμε τη συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη DMSO στο διάλυμα του ligand, χρησιμοποιώντας νερό για τις επιμέρους αραιώσεις οδηγηθήκαμε σε θετικά αποτελέσματα τόσο για τα πειράματα των συν-κρυσταλλώσεων όσο και για τα crystal soaking.

Εν κατακλείδι, από τη μελέτη της BC1960_R169A προκύπτει ότι είναι μια ιδιαίτερα διαλύτη πρωτεΐνη, που παράγεται με σχετικά ικανοποιητική καθαρότητα, σε ικανοποιητικές ποσότητες. Επίσης, η πρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα θερμοσταθερή καθώς διατηρεί τη διαμόρφωση της σε υψηλές θερμοκρασίες (έως 60°C). Πρόκειται για μία χαρακτηριστική α-ελικοειδή πρωτεΐνη καθώς εμφανίζει τα αναμενόμενα ελάχιστα και μέγιστα που χαρακτηρίζουν τις α-ελικοειδείς πρωτεΐνες. Η παρουσία της μεταλλαγής δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη σύγκριση των SVD αποτελεσμάτων του μεταλλάγματος και της αγρίου τύπου πρωτεΐνης.

Βιβλιογραφία

- [1] Drobniowski F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6(4), 324–338.
<https://doi.org/10.1128/CMR.6.4.324>
- [2] Kolstø, A. B., Tourasse, N. J., & Økstad, O. A. (2009). What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?. *Annual review of microbiology*, 63, 451–476.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073255>
- [3] CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 2010, p. 382–398 Vol. 23, No. 2 0893-8512/10/\$12.00 doi:10.1128/CMR.00073-09 Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen Edward J. Bottone
- [4] Granum, P. E. (2001). *Bacillus cereus* in Doyle, M. P. e. a. (Ed), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd Ed., ASM Press, pp. 373-381.
- [5] Abel-Santos E. Endospores, Sporulation and Germination. In: *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Vol 1-3. ; 2014:163-178.
doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00009-3.
- [6] van Teeseling, M., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2017). Determinants of Bacterial Morphology: From Fundamentals to Possibilities for Antimicrobial Targeting. *Frontiers in microbiology*, 8, 1264.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
- [7] Spencer R. C. (2003). *Bacillus anthracis*. *Journal of clinical pathology*, 56(3), 182–187. <https://doi.org/10.1136/jcp.56.3.182>
Much
- [8] Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 149–167.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- [9] Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall/Pearson Education.
- [10] Muchová, K., Wilkinson, A. J., & Barák, I. (2011). Changes of lipid domains in *Bacillus subtilis* cells with disrupted cell wall

peptidoglycan. *FEMS microbiology letters*, 325(1), 92–98.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02417.x>

- [11] Liu, Y., & Breukink, E. (2016). *The Membrane Steps of Bacterial Cell Wall Synthesis as Antibiotic Targets*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 5(3), 28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5030028>
- [12] Balomenou, S., Koutsoulis, D., Tomatsidou, A., Tzanodaskalaki, M., Petratos, K. and Bouriotis, V., 2018. Polysaccharide deacetylases serve as new targets for the design of inhibitors against *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(13), pp.3845-3851.
- [13] Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C., & Bouriotis, V. (2003). Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydrate research*, 338(7), 687–692. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(03\)00002-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(03)00002-8)
- [14] Psylinakis, E., Boneca, I. G., Mavromatis, K., Deli, A., Hayhurst, E., Foster, S. J., Vårum, K. M., & Bouriotis, V. (2005). Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *The Journal of biological chemistry*, 280(35), 30856–30863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407426200>
- [15] Tsalafouta, A., Psylinakis, E., Kapetaniou, E. G., Kotsifaki, D., Deli, A., Roidis, A., Bouriotis, V., & Kokkinidis, M. (2008). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase BC1960 from *Bacillus cereus* in the presence of its substrate (GlcNAc)₆. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 64(Pt 3), 203–205. <https://doi.org/10.1107/S1744309108002510>
- [16] Arnaouteli, S., Giastas, P., Andreou, A., Tzanodaskalaki, M., Aldridge, C., Tzartos, S. J., Vollmer, W., Eliopoulos, E., & Bouriotis, V. (2015). Two Putative Polysaccharide Deacetylases Are Required for Osmotic Stability and Cell Shape Maintenance in *Bacillus anthracis*. *The Journal of biological chemistry*, 290(21), 13465–13478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640029>
- [17] Fadoulglou, V., Balomenou, S., Aivaliotis, M., Kotsifaki, D., Arnaouteli, S., Tomatsidou, A., Efstathiou, G., Kountourakis, N., Miliara, S., Griniezaki, M., Tsalafouta, A., Pergantis, S., Boneca, I., Glykos, N., Bouriotis, V. and Kokkinidis, M., 2017. Unusual α -Carbon Hydroxylation of Proline Promotes Active-Site Maturation. *Journal of the American Chemical Society*, 139(15), pp.5330-5337.

- [18] Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R., & Massidda, O. (1996). Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 2(1), 95–98. <https://doi.org/10.1089/mdr.1996.2.95>
- [19] Vollmer W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 287–306. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00088.x>
- [20] Araki, Y., Fukuoka, S., Oba, S., & Ito, E. (1971). Enzymatic deacetylation of N-acetylglucosamine residues in peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. *Biochemical and biophysical research communications*, 45(3), 751–758. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(71\)90481-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(71)90481-5)
- [21] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2014). *Biochemistry. Place of publication not identified: Macmillan International Higher Education.*
- [22] Greenfield N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, 1(6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>
- [23] Wiener-Schmidt, B., Oebbeke, M., Ngo, K., Heine, A. and Klebe, G., 2020. Two Methods, One Goal: Structural Differences between Cocrystallization and Crystal Soaking to Discover Ligand Binding Poses. *ChemMedChem*, 16(1), pp.292-300.