



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



ΠΑΙΔΕΙΑ ΜΠΡΟΣΤΑ
2^ο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ Τμήματα Βιολογίας & Χημείας
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου *bc0361* του
Bacillus cereus: απομόνωση και βιοχημικός χαρακτηρισμός
του ανασυνδυσασμένου ενζύμου**

ΑΓΙΟΜΥΡΓΙΑΝΝΑΚΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΠΟΥΡΙΩΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 Η δομή της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα.....	4
1.2 Διαφορές της πεπτιδογλυκάνης στα Gram + και Gram – βακτήρια.....	6
1.3 Ο βιολογικός ρόλος της πεπτιδογλυκάνης και η συμβολή της στην παθογένεια των βακτηρίων	7
1.4 Βιοσύνθεση και πολυμερισμός της πεπτιδογλυκάνης	9
1.5 Υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης και αυτόλυση του βακτηριακού κυττάρου.....	12
1.6 Χιτίνη: γενικά.....	14
1.7 Οικογένεια εστερασών υδατανθράκων 4 (CE4).....	15
1.8 Απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης	17
Σκοπός της εργασίας.....	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1 Υλικά	23
2.2 Μέθοδοι	24
2.2.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>bc0361</i>	24
2.2.2 Υδρόλυση DNA με περιοριστικά ένζυμα.....	24
2.2.3 Αντίδραση συγκόλλησης (Ligation)	25
2.2.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> με την πλασμιδιακή κατασκευή pRsetA/bc0361.....	26
2.2.5 Υπερπαραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης BC0361 σε κύτταρα <i>E. coli</i>	27
2.2.6 Απομόνωση της απακετυλάσης πεπτιδογλυκάνης BC0361.....	27

2.2.7 Μέθοδοι μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της απακετυλάσης πεπτιδογλυκάνης BC0361.....	29
2.2.8 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών	33
2.2.9 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών.....	33
2.2.10 Προσδιορισμός μοριακού βάρους της BC0361	33

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>bc0361</i>	34
3.2 Υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης BC0361	34
3.3 Απομόνωση της απακετυλάσης πεπτιδογλυκάνης BC0361.....	35
3.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου BC0361.....	37
3.5 <i>In silico</i> εύρεση της αλληλουχίας BC0361.....	40

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
4.1 Συζήτηση-Προοπτικές.....	44

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47
--------------------	----

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

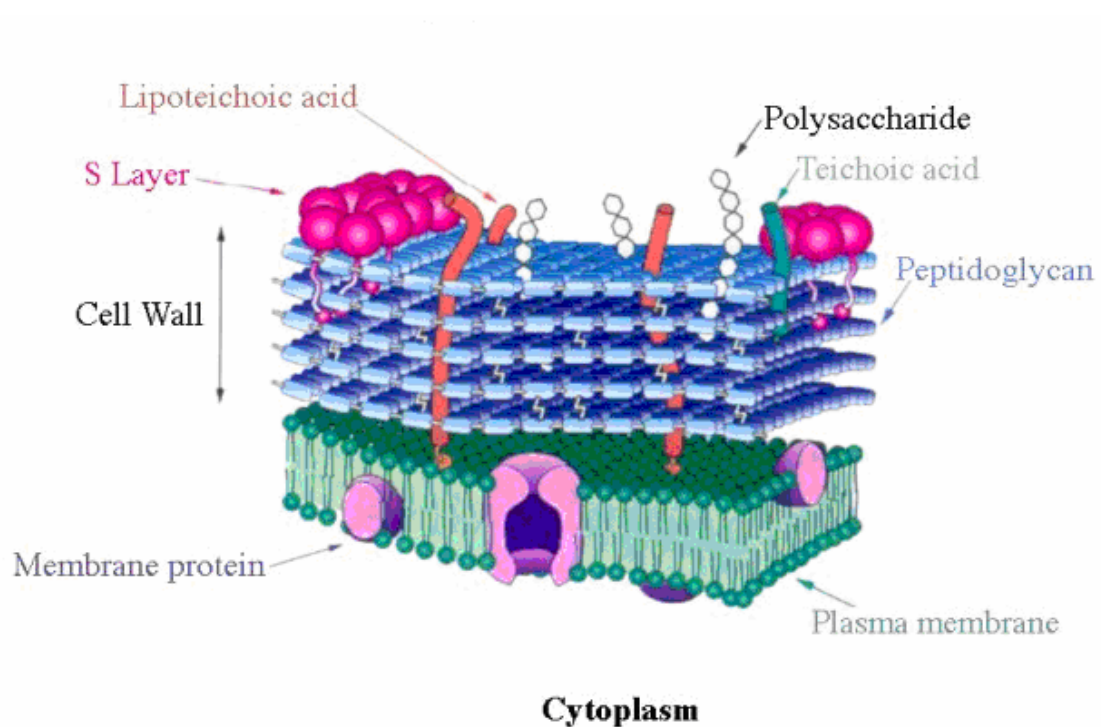
DTT: 1,4 – διθειοθρεϊτόλη, **Tris**: τρις(υδροξυμεθυλ)μεθυλαμίνη, **IP TG**: IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside, **BSA**: αλβουμίνη ορού βοδιού, **HEPES**: (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid), **PMSF**: φθοριούχο φαινυλ-μεθυλ-σουλφονύλιο **SDS**: δωδεκυλθειικό νάτριο, **NAD**: νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο, **ATP**: αδενοσινοτριφωσφορικό οξύ, **PPi**: πυροφωσφορικό οξύ, **EDTA**: αιθυλένο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ, **cpm**: κρούσεις ανά λεπτό (για σπινθηρομετρία), **PDA**: απακετυλάση πεπτιδογλυκάνης, **CDA**: απακετυλάση χιτίνης, **GlcN**: γλυκοζαμίνη, **GlcNAc**: N-ακετυλγλυκοζαμίνη, **(GlcNAc)₂**: διακετυλχιτοβιόζη, **(GlcNAc)₃**: τρι-N-ακετυλχιτοτριόζη, **(GlcNAc)₄**: τετρα-N-ακετυλχιτοτετραόζη, **(GlcNAc)₅**: πεντα-N-ακετυλχιτοπενταόζη, **(GlcNAc)₆**: εξα-N-ακετυλχιτοεξαόζη, **GlcNAc-6P**: N-ακετυλγλυκοζαμίνη-6φωσφορικό, **GlcNAc-1P**: N-ακετυλγλυκοζαμίνη-1φωσφορικό, **MurNAc**: N-ακετυλμουραμικό οξύ.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η δομή της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα

Το κυτταρικό τοίχωμα στα βακτήρια είναι άκαμπτο και πορώδες. Χρησιμεύει για τη φυσική προστασία των βακτηρίων από την υψηλή εσωτερική ωσμωτική πίεση καθώς διαβιούν σε υποτονικό περιβάλλον. Η βασική του δομή χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας αρκετά σκληρής στιβάδας, που ονομάζεται **πεπτιδογλυκάνη** ή **μουρεΐνη**.

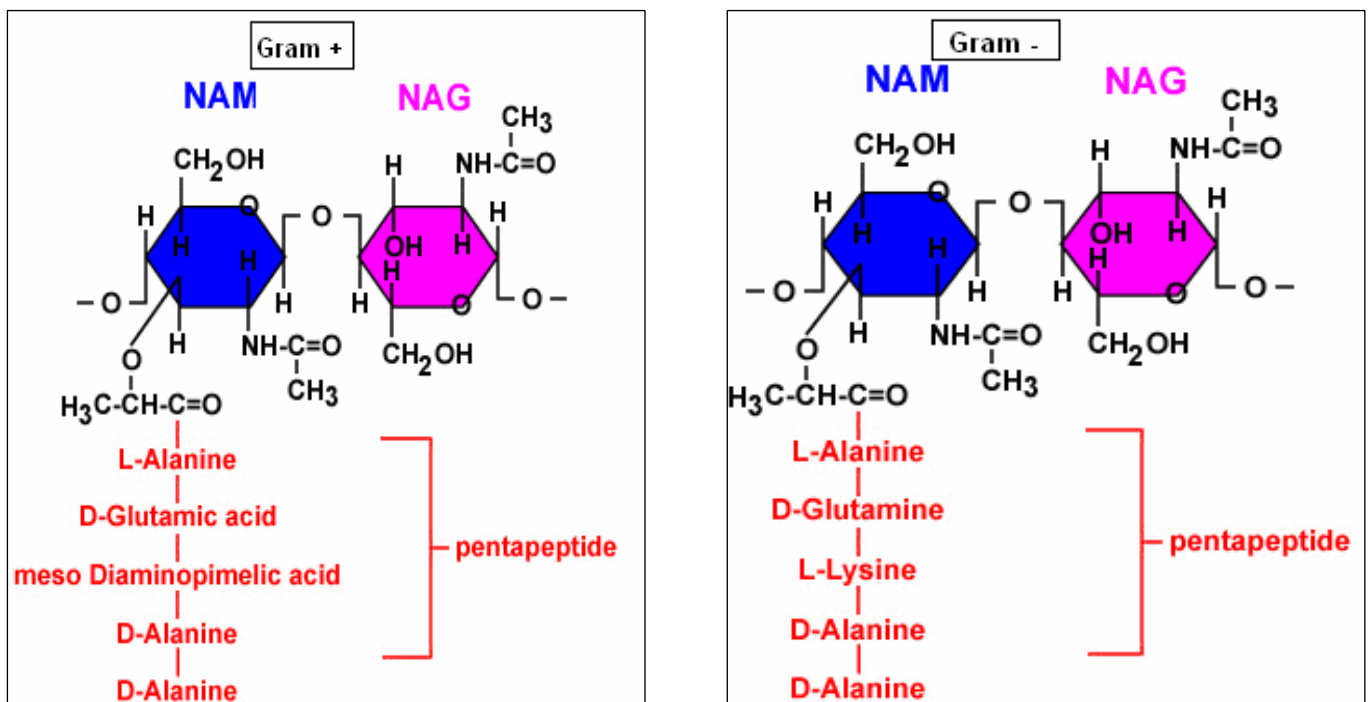
Η πεπτιδογλυκάνη είναι μια συνεχής μακρομοριακή δομή, η οποία ανιχνεύεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης όλων σχεδόν των βακτηρίων (εικ.1, 4) .



Εικόνα 1. Δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram + βακτηρίων

Το γιγάντιο μακρομόριο αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες σακχάρων, που συνδέονται μεταξύ τους με μικρά πεπτίδια, τα οποία λειτουργούν ως «γέφυρες». Συγκεκριμένα, το μονομερές της πεπτιδογλυκάνης δομείται από δύο ενωμένα αμινοσάκχαρα, την *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (*GlcNac*, *NAG*) και το *N*-ακετυλ-μουραμικό (*MurNac*, *NAM*) οξύ, του οποίου η γαλακτική ομάδα είναι συνδεδεμένη

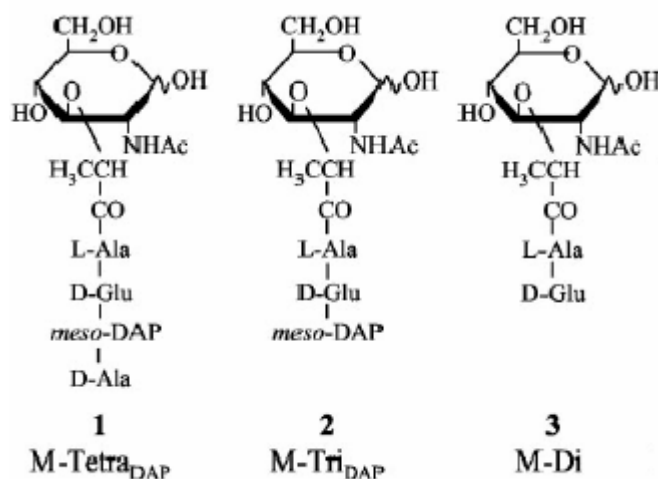
ομοιοπολικά με ένα πενταπεπτίδιο. Μακριές σακχαριτικές αλυσίδες εναλλασσόμενων καταλοίπων *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης και *N*-ακετυλ-μουραμικών οξέων, οι οποίες διασυνδέονται μέσω των μουροπεπτιδίων σχηματίζουν τελικά το άκαμπτο πολυμερές της πεπτιδογλυκάνης. Η σύνδεση μεταξύ των *GlcNac* και των *MurNac* επιτυγχάνεται μέσω β -1,4- *N*-γλυκοζιτικών δεσμών, ενώ τα μουροπεπτίδια τα οποία συμμετέχουν στη δομή του πολυμερούς της πεπτιδογλυκάνης μπορεί να ποικίλλουν από είδος σε είδος. Ωστόσο το πιο σύνηθες πεπτίδιο είναι ένα πενταπεπτίδιο με την εξής σύσταση: L-Ala-D-Glu-meso-DAP-D-Ala-D-Ala. Αρκετά συχνά το μέσο-διαμινοπιμελικό οξύ (meso-DAP) αντικαθίσταται από την L-lys (εικ.2).



Εικόνα 2. Δομή μονομερούς πεπτιδογλυκάνης στα Gram+ και Gram - βακτήρια

Η απλούστερη δομή βακτηριακής πεπτιδογλυκάνης που μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα κυτταρικό τοίχωμα είναι αυτή ενός ετεροπολυμερούς, στο οποίο οι γραμμικές γλυκανικές αλυσίδες αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες *GlcNac*- β -1,4-*MurNac*-*D-Ala*-*L-Lys* (ή A_2pm) και οι πεπτιδικές «γέφυρες» συνδέουν μεταξύ τους τα δυο μονομερή. Ωστόσο, στα περισσότερα βακτήρια, αν όχι σε όλα, εντοπίζεται μια αρκετά μεγάλη ποικιλία τροποποιήσεων στο μακρομόριο της πεπτιδογλυκάνης. Οι εν λόγω τροποποιήσεις διαφέρουν από οργανισμό σε οργανισμό και είναι πιθανό

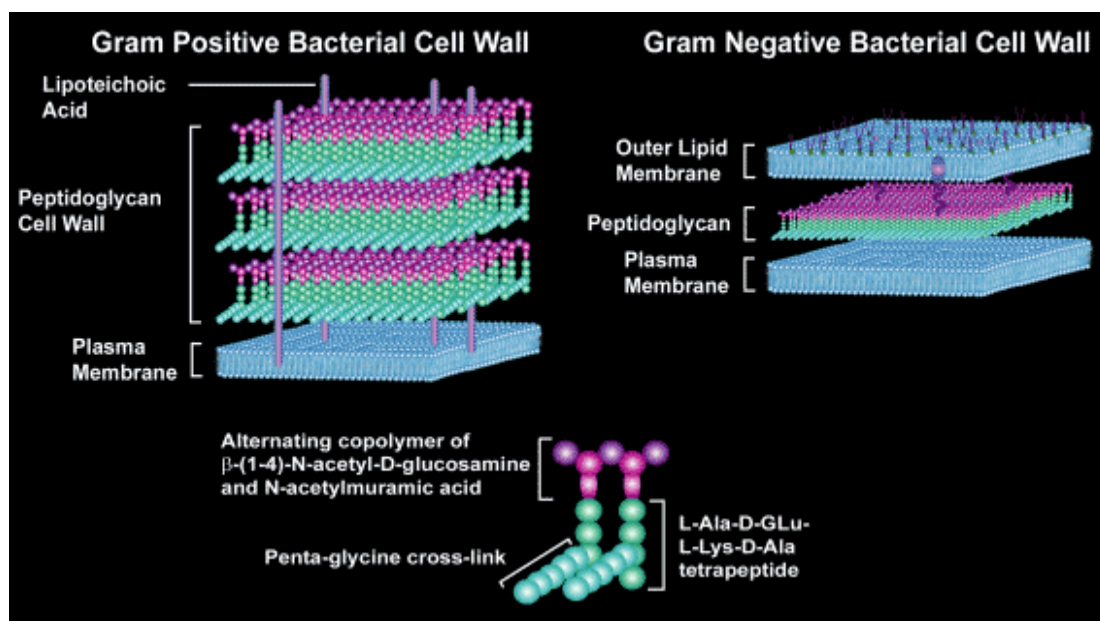
να οφείλονται σε διάφορες καταστάσεις ή συνθήκες, στις οποίες υπόκεινται τα κύτταρα, όπως για παράδειγμα η κυτταρική ανάπτυξη, η παρουσία αντιβιοτικού και οι μεταλλάξεις. Εκτεταμένη έρευνα σε διάφορα βακτηριακά στελέχη έδειξε πως υπό σταθερές συνθήκες ανιχνεύονται σε διάφορες αναλογίες δι-, τρι-, τετρα-, ή πενταπεπίδια συνδεδεμένα με τις *MurNac* αλυσίδες (εικ.3) [1, 2, 3, 4].



Εικόνα 3. Δομή των μουρο-δι-, -τρι και τετραπεπτιδίων

1.2 Διαφορές της πεπτιδογλυκάνης στα Gram + και Gram – βακτήρια

Θα πρέπει να σημειωθεί πως διακρίνονται σημαντικές δομικές διαφορές ανάμεσα στην πεπτιδογλυκάνη των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Στα Gram + βακτήρια το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης είναι πολύ παχύτερο σε σχέση με το αντίστοιχο στα Gram – βακτήρια (εικ. 4). Είναι ενδεικτικό ότι στα θετικά κατά Gram βακτήρια η πεπτιδογλυκάνη καταλαμβάνει το 90% του κυτταρικού τοιχώματος και το υπόλοιπο 10% αφορά τειχοϊκά οξέα και πρωτεΐνες. Στα Gram – βακτήρια το κυτταρικό τοίχωμα φέρει πεπτιδογλυκάνη σε ποσοστό μόλις 10% και το υπόλοιπο μέρος καταλαμβάνεται από την εξωτερική λιποπολυσακχαριτική στιβάδα.



Εικόνα 4. Απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος στα Gram + και Gram- βακτήρια

Μια δεύτερη σημαντική διαφορά εστιάζεται στη φύση του τρίτου αμινοξέος των μουροπεπτιδίων. Συγκεκριμένα, το ρόλο του τρίτου αμινοξέος του 5πεπτιδίου στα Gram – βακτήρια διαδραματίζει μια λυσίνη, ενώ στην αντίστοιχη θέση των Gram + βακτηρίων εντοπίζεται το διαμινοπιμελικό οξύ (DAP) (εικ. 2). Τέλος, στα Gram - βακτήρια παρατηρείται ότι τα μουροπεπτιδία των απέναντι γλυκανικών αλυσίδων συνδέονται απευθείας με ομοιοπολικό δεσμό ανάμεσα στην αμινομάδα του DAP και την καρβοξυλομάδα της τελευταίας D-αλανίνης. Αντίθετα, στα Gram + βακτήρια εντοπίζεται σύνδεση των γειτονικών μουροπεπτιδίων μέσω πεπτιδικών «γεφυρών», των οποίων η αμινοξική σύσταση διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό προσδίδει μεγαλύτερο βαθμό δομικής πολυπλοκότητας στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης [3,5].

1.3 Ο βιολογικός ρόλος της πεπτιδογλυκάνης και η συμβολή της στην παθογένεια των βακτηρίων

Παρόλο που η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί ένα άκαμπτο και συμπαγή εξωσκελετό, που στηρίζει το κύτταρο, βρίσκεται σε μια δυναμική κατάσταση σε όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής των βακτηρίων. Έχει δηλαδή την ικανότητα να αναδομείται

συνεχώς, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη και διαίρεση του βακτηριακού κυττάρου. Κάτι τέτοιο κρίνεται απαραίτητο για τη βιωσιμότητα των βακτηρίων. Παράλληλα διαμορφώνει και διατηρεί το μοναδικό κυτταρικό σχήμα.

Ωστόσο, η βασική της λειτουργία είναι να προφυλάσσει το κύτταρο από διάρρηξη λόγω εσωτερικής ωσμωτικής πίεσης, προσφέροντας ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα. Συγκεκριμένα, η υψηλή συγκέντρωση διαλυτών ουσιών στο κυτταρόπλασμα οδηγεί σε λύση του κυττάρου όταν αυτό βρεθεί σε υποτονικό περιβάλλον. Αυτό υποδηλώνει την αναγκαιότητα ύπαρξης ενός κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο θα είναι ικανό να προσδίδει ανθεκτικότητα και σταθερότητα στο κύτταρο. [5,6,7]

Πέρα από τα παραπάνω η πεπτιδογλυκάνη φαίνεται να λαμβάνει ενεργά μέρος σε ένα σύνολο από διάφορες βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου όπως η αυτόλυση και η σπορίωση, γεγονός που αποδεικνύεται από τις ποικίλλες τροποποιήσεις που υφίσταται το συγκεκριμένο μακρομόριο κατά τον κύκλο ζωής του κυττάρου [6].

Επιπλέον, εκτενείς έρευνες συνδέουν την παθογένεια διαφόρων βακτηρίων με την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τους τοιχώματος. Πράγματι, η πεπτιδογλυκάνη λειτουργεί ως διεγερτικός παράγοντας σε ποικίλλες βιολογικές αντιδράσεις του ξενιστή όπως η ενεργοποίηση των μακροφάγων και T- κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, η διέγερση παραγωγής αντισωμάτων και κυτοκινών, η επαγωγή αυτοάνοσων νοσημάτων κτλ.

Το ρόλο «κλειδί» στις παραπάνω διεργασίες κατέχουν διάφορα μουροπεπτίδια, τα οποία προκύπτουν κατά την υδρόλυση και ανακύκλωση των συστατικών της πεπτιδογλυκάνης. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι κυτταροπλασματικοί υποδοχείς *Nod1* και *Nod2* (nucleotide-binding oligomerization domain) του κυττάρου ξενιστή αναγνωρίζουν και προσδένουν ενδοκυτταρικά, συγκεκριμένα μουροπεπτίδια του παθογόνου βακτηρίου. Η πρόσδεση αυτή δίνει το έναυσμα για την έναρξη μια σειράς ανοσολογικών αντιδράσεων από τον ξενιστή [4, 5].

Τα μόρια *Nod1* και *Nod2* ανήκουν στην οικογένεια των *Nod* πρωτεϊνών, οι οποίες αναγνωρίζουν βακτηριακά συστατικά. Συγκεκριμένα, ο *Nod1* υποδοχέας εμφανίζει συγγένεια για το *GlcNac-MurNac-L-ala-γ-D-glu-meso-dap* και ο *Nod2* για το *GlcNac-MurNac-L-ala-γ-D-glu* [4]. Αυτό υποδηλώνει πως η τροποποίηση της πεπτιδογλυκάνης με υδρολυτικά ένζυμα του βακτηρίου ή του ξενιστή είναι απαραίτητη για την ανίχνευση της από τους *Nod* παράγοντες. Συνεπώς, οποιοσδήποτε

μηχανισμός αποτρέπει το σχηματισμό των συγκεκριμένων μουροπεπτιδίων, διασφαλίζει τη μη αναγνώριση τους από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή [4].

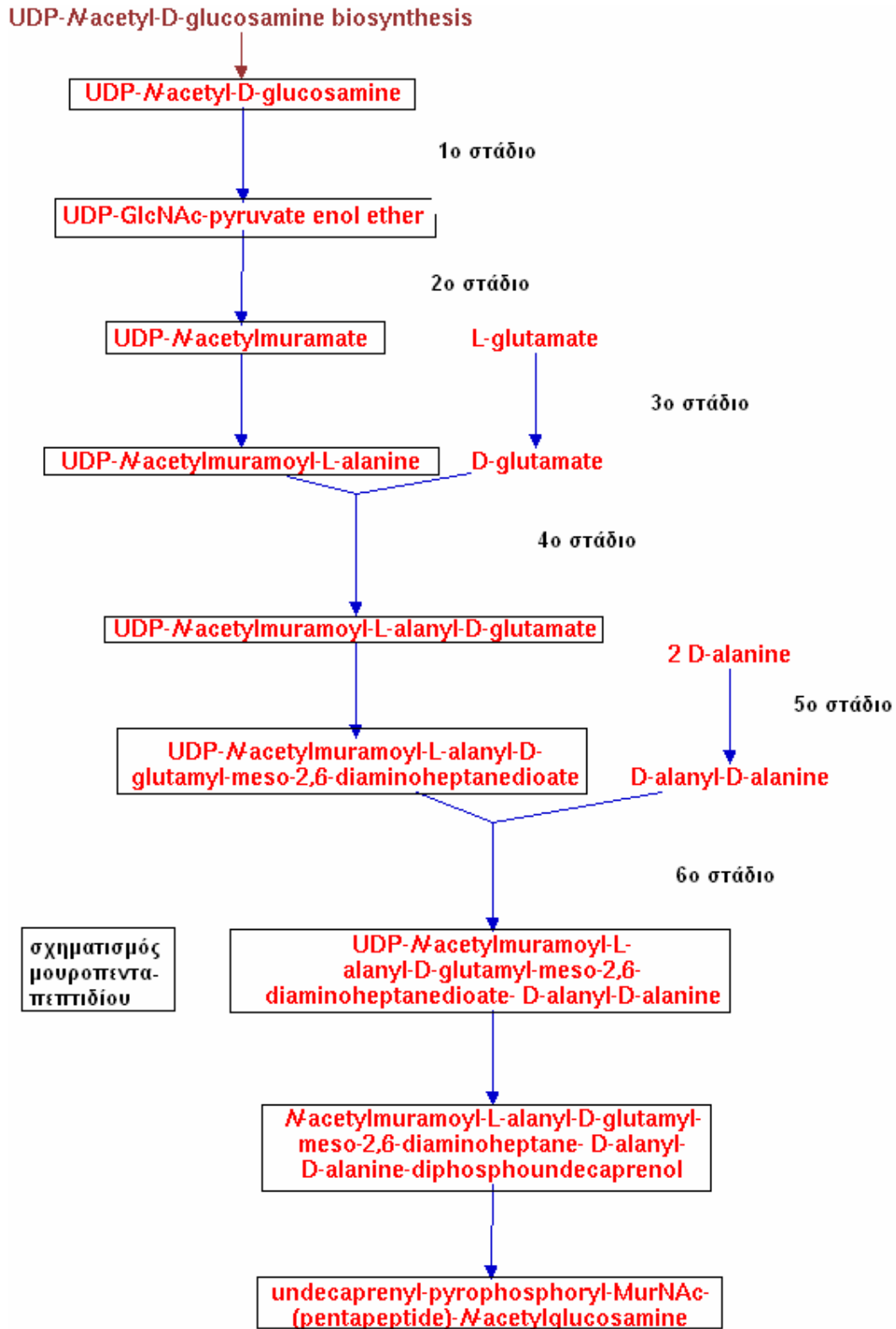
Τέλος, εργασίες αλληλούχισης του βακτηριακού γενώματος αποκάλυψαν πως το σύνολο γονιδίων των εκκριτικών συστημάτων τύπου III και IV των Gram- στελεχών περιλαμβάνει γονίδια, που κωδικοποιούν για ένζυμα, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των λυτικών τρανσγλυκοσιδασών (*lytic transglycosylases, LTs*) [8]. Οι εργασίες αυτές συνδέουν την ελεγχόμενη τοπική υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης με τη μεταφορά μακρομορίων. Συγκεκριμένα, αυτές οι μικρές πρωτεΐνες διασπώντας τους β-(1→4) γλυκοσιδικούς δεσμούς των γλυκανικών αλυσίδων, ανοίγουν πόρους στο στρώμα της μουρεΐνης και με αυτό τον τρόπο διευκολύνουν την μετακίνηση μακρομορίων μέσω των παραπάνω εκκριτικών συστημάτων. Το προϊόν της αντίδρασης τρανσγλυκοζυλίωσης είναι το *GlcNac*-(1,6 *άνυδρο*) *MurNac*-τετραπεπτιδίο, το οποίο σε περίπτωση μόλυνσης του ανθρώπου, αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα Nod1 και επάγει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα [4, 5, 8, 9].

1.4 Βιοσύνθεση και πολυμερισμός της πεπτιδογλυκάνης

Το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης συνεχώς διασπάται και αναδομείται τόσο κατά την ανάπτυξη των κυττάρων, όσο και κατά την αναπαραγωγική τους λειτουργία. Κάτι τέτοιο γίνεται δυνατό με το σπάσιμο των δεσμών μεταξύ των μονομερών και των μουροπεπτιδίων και ακολούθως την ένθεση νέων μονομερών πεπτιδογλυκάνης .

Η βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης είναι μια διαδικασία, που περιλαμβάνει δυο στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά το σχηματισμό του μονομερούς της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρόπλασμα, μέσω ενός συνόλου πρόδρομων μορίων φωσφορικής ουριδίνης (*UDP precursors*) και λιπιδίων, που διαδραματίζουν μεσολαβητικό ρόλο. Μέσα από ένα βιοσυνθετικό μονοπάτι έξι σταδίων (εικ. 5) παράγεται ένα *UDP*-ενεργοποιημένο *N*-ακετυλ-μουραμικό πενταπεπτιδίο από την *UDP-N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνη. Εν συνεχεία για να διευκολυνθεί η μεταφορά αυτού του υδρόφιλου μορίου διαμέσου της μεμβράνης, πραγματοποιείται πρόσδεση του φωσφο-*N*-ακετυλ-μουραμικού πενταπεπτιδίου σε ένα λιπίδιο, τη βακτοπρενόλη (λιπίδιο I). Η βακτοπρενόλη είναι μια υδρόφοβη αλκόολη, που παίζει το ρόλο μεταφορέα. Η ομοιοπολική σύνδεση της *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης στη βακτοπρενόλη

οδηγεί στο σχηματισμό του λιπιδίου II, το οποίο παίζει το ρόλο μεταφορέα και βοηθά το δισακχαρικό πενταπεπτίδιο να διαπεράσει το εσωτερικό της κυτταροπλάσματικής μεμβράνης [2,7].

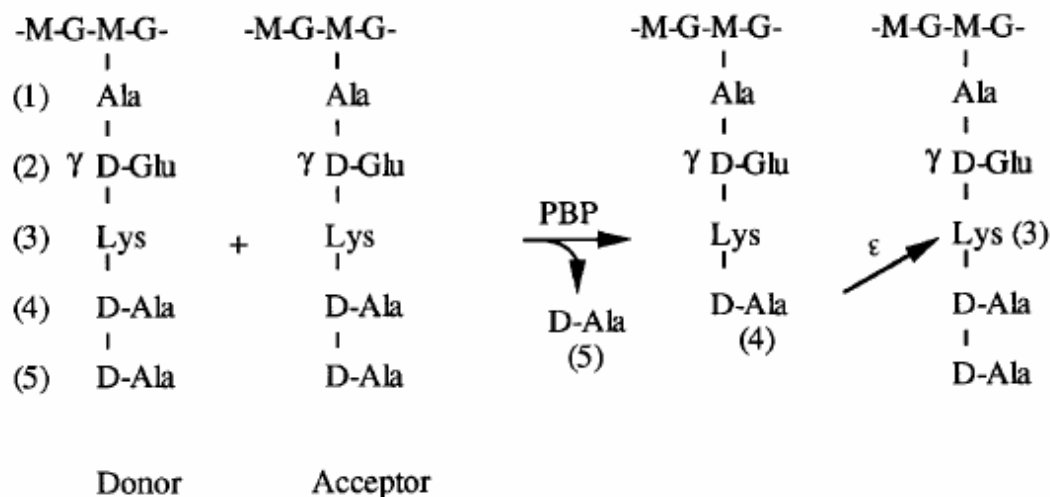


Εικόνα 5. Βιοσυνθετικό μονοπάτι μονομερούς πεπτιδογλυκάνης

Το δεύτερο στάδιο της βιοσύνθεσης περιλαμβάνει τη διαδικασία του πολυμερισμού, η οποία πραγματοποιείται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Ο πολυμερισμός ξεκινά με τη δράση των ενζύμων «αυτολυσίνες», οι οποίες καταλύουν τη διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών μεταξύ των μονομερών, κατά μήκος της υπάρχουσας αλυσίδας και στο σημείο όπου πρόκειται να υπάρξει επιμήκυνση. Τα ίδια ένζυμα καταλύουν και τη διάσπαση των πεπτιδικών γεφυρών .

Στη φάση που ακολουθεί, σχηματίζονται μακριές σακχαρικές αλυσίδες εναλλασσόμενων καταλοίπων *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης και *N*-ακετυλ-μουροπεπτιδίων (*MurNac-peptide*) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω β-1,4- *N*-γλυκοζιτικών δεσμών. Στην παραπάνω διεργασία λαμβάνουν μέρος δύο κατηγορίες ενζύμων: α) οι γλυκοζυλτρανσφεράσες, που καταλύουν το σχηματισμό του β-1,4- *N*-γλυκοζιτικού δεσμού και β) οι τρανσπεπτιδάσες , που καταλύουν το σχηματισμό των πεπτιδικών «γεφυρών» ανάμεσα στα γειτονικά μονομερή και την σύνδεση των νεοσυντιθέμενων μονάδων πεπτιδογλυκάνης στο ήδη υπάρχον κυτταρικό τοίχωμα. Κατά την αντίδραση τρανσπεπτιδίωσης, η τερματική D-Ala αφαιρείται από τη μια από τις πεπτιδικές αλυσίδες (δότης) με τη δράση μιας DD-καρβοξυπεπτιδάσης, δίνοντας την απαραίτητη ενέργεια για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, ενώ η προτελευταία D-Ala συνδέεται με την ε-αμινομάδα του DAP στην άλλη πεπτιδική αλυσίδα (δέκτης). Στην περίπτωση των Gram+ βακτηρίων όπου παρουσιάζεται μια γέφυρα γλυκίνης, η σύνδεση πραγματοποιείται κατά μήκος της γέφυρας, συνήθως μεταξύ μιας L-λυσίνης και μιας D-αλανίνης (εικ.6).

Το ρόλο των τρανσπεπτιδασών επιτελούν πρωτεΐνες πρόσδεσης πενικιλίνης (*penicillin-binding proteins*, PBPs). Ονομάζονται έτσι επειδή η δράση τους αναστέλλεται από την ειδική πρόσδεση των αντιβιοτικών β-λακτάμης στο ενεργό τους κέντρο. Δομικές μεταβολές ή μεταλλάξεις στα συντηρημένα μοτίβα των PBPs μεταβάλλουν τη συγγένεια τους ως προς τη β-λακτάμη και κατά συνέπεια την εξειδίκευση τους ως τρανσπεπτιδάσες [2,6, 7, 8, 11].



Εικόνα 6. Μηχανισμός πεπτιδικών συνδέσεων μέσω τρανσπεπτιδίωσης. G, GlcNAc; M, MurNAc; PBP, transpeptidase, 3, CO-NH.

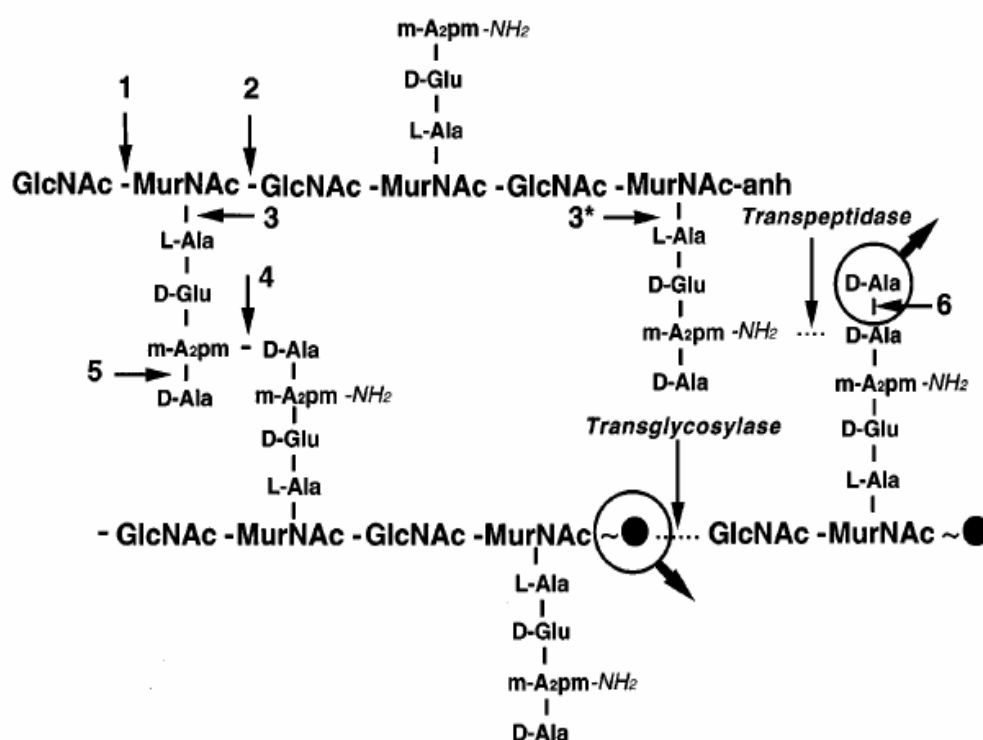
1.5 Υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης και αυτόλυση του βακτηριακού κυττάρου

Οι υδρολάσες της μουρεΐνης είναι ένζυμα, που έχουν τη δυνατότητα να διασπούν μεγάλα αδιάλυτα κομμάτια πεπτιδογλυκάνης σε μουροπεπτίδια και μικρότερα πεπτίδια. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στον ελεγχόμενο μεταβολισμό της πεπτιδογλυκάνης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και διαίρεσης του κυττάρου. Είναι αναγκαία για την επιμήκυνση της μουρεΐνης, καθώς διασπούν τους δεσμούς της, προκειμένου να επιτευχθεί η ένθεση των νεοσυντιθέμενων υπομονάδων πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα. Επιπλέον παίζουν ενεργό ρόλο στη διαίρεση της κυτταρικής μεμβράνης κατά το διπλασιασμό του κυττάρου. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την αποικοδόμηση της πεπτιδογλυκάνης κατά τη βακτηριακή ανάπτυξη, υδρολύονται περαιτέρω και εισάγονται ξανά στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της πεπτιδογλυκάνης. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται ένα είδος ανακύκλωσης των συστατικών του βακτηριακού εξωσκελετού [6,12,13].

Ως πιθανά αυτολυτικά ένζυμα, οι υδρολάσες της μουρεΐνης τυγχάνουν αυστηρού ελέγχου από το κύτταρο. Ο έλεγχος των αυτολυτικών ενζύμων διακόπτεται μόνο σε περίπτωση που για κάποιο λόγο διαταραχθεί η ανάπτυξη του κυττάρου. Άμεση συνέπεια αυτού είναι η αναστολή σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης λόγω πρόσδεσης

πενικιλίνης στις PBPs, που συνεπάγεται ανεξέλεγκτη υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης και βακτηριόλυση.

Στην *E. coli* μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί 14 διαφορετικές υδρολάσες μουρεΐνης, μέσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται: N-ακετυλ-μουραμυλ -L-αλανίνη αμιδάσες, DD-ενδοπεπτιδάσες, DD-καρβοξυπεπτιδάσες, LD-καρβοξυπεπτιδάσες, και N-ακετυλ-γλυκοζαμινιδάσες (εικ.7). Επιπλέον υπάρχουν και οι λεγόμενες «λυτικές τρανσγλυκοσυλάσες», οι οποίες καταλύουν τον σχηματισμό του (1→6) άνυδρου μουραμικού οξέος, μέσω μιας ενδομοριακής αντίδρασης τρανσγλυκοζύλιωσης [12].



Εικόνα 7. Δομή της μουρεΐνης της *E. coli*. (*m-A2pm*: meso-diaminopimelic acid, *GlcNAc*: N-acetylglucosamine, *MurNAc*: N-acetylmuramic acid, *MurNAc-anh*: (1→6)-anhydromuramic acid). Οι αριθμοί αναφέρονται στους δεσμούς που υδρολύονται. 1: N acetylglucosaminidase, 2: lytic transglycosylase, 3: Nacetylmuramyl-L-alanine-amidase, 3*: N-acetylanhydromuramyl-L-alanine-amidase, 4: DDendopeptidase, 5: LD-carboxypeptidase, 6: DD-carboxypeptidase

Εκτός από τις ενδογενείς υδρολάσες των βακτηρίων, ο οργανισμός-ξενιστής διαθέτει μια σειρά υδρολυτικών ενζύμων, με τα οποία είναι σε θέση να διασπά την μουρεΐνη του μολυσματικού βακτηρίου. Από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα είναι η λυσοζύμη. Εκτενείς έρευνες έχουν δείξει πως απακετυλίωση των *GlcNAc* καταλοίπων και *O*-ακετυλίωση του C-6 των *MurNAc* καταλοίπων της πεπτιδογλυκάνης,

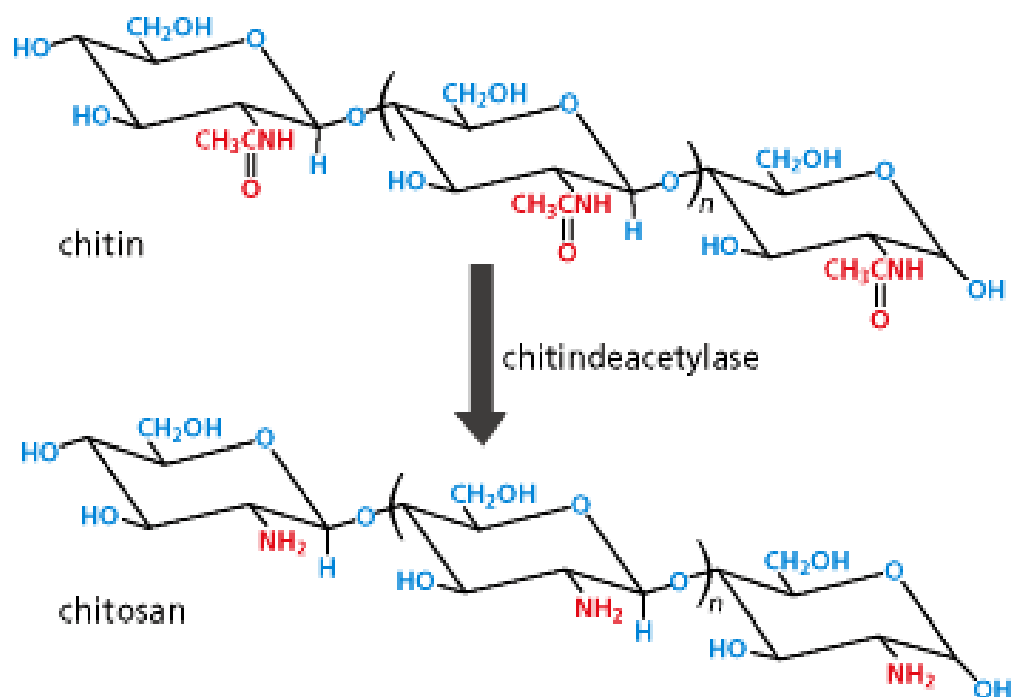
προσδίδουν στο κύτταρο ανθεκτικότητα στη δράση της λυσοζύμης. Σε *in vivo* πειράματα όπου απενεργοποιήθηκε το γονίδιο της απακετυλάσης *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, PgdA του *Streptococcus pneumoniae*, φάνηκε πως διεκόπη η δομική τροποποίηση της πεπτιδογλυκάνης, αλλά και ο φαινότυπος ανθεκτικότητας στη συγκεκριμένη υδρολάση [5].

1.6 Χιτίνη: γενικά

Η χιτίνη αποτελεί τη δεύτερη πιο άφθονη αδιάλυτη οργανική ουσία, που υπάρχει στη φύση, μετά τη κυτταρίνη. Το βιοπολυμερές της χιτίνης δομείται από μακριές γραμμικές αλυσίδες καταλοίπων *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, συνδεδεμένες μεταξύ τους με β-(1→4) γλυκοσιδικούς δεσμούς. Τα *GlcNac* κατάλοιπα διασυνδέονται περαιτέρω μέσω υδρογονικών δεσμών, αυξάνοντας έτσι το βαθμό πολυπλοκότητας και σταθερότητας του μορίου [14, 15]

Η χιτίνη είναι από τους πιο διαδεδομένους πολυσακχαρίτες σε μύκητες, φυτά και ζώα. Ανιχνεύεται στο κυτταρικό τοίχωμα πολλών μυκήτων, αποτελεί το βασικό συστατικό της επιδερμίδας και του εξωσκελετού των σκουληκιών, των μαλακίων και των αρθροπόδων. Επιπλέον η παραγωγή της στην υδρόβια βιόσφαιρα είναι τεράστια. Εκτιμάται ότι παράγονται περισσότεροι από 10^{11} τόνοι χιτίνης ετησίως, από τους υδρόβιους οργανισμούς. Ωστόσο έρευνες αποκαλύπτουν πως στα ωκεάνια ιζήματα περιέχονται ελάχιστα αποθέματα του συγκεκριμένου βιοπολυμερούς. Η εξήγηση στο παραπάνω αίνιγμα δόθηκε όταν έρευνες το 1937 έφεραν στο φως την ύπαρξη υδρόβιων χιτινολυτικών βακτηρίων, τα οποία χρησιμοποιούν τη χιτίνη ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Βασικό ρόλο στο μονοπάτι καταβολισμού της χιτίνης παίζουν οι χιτινάσες, καθώς και πλήθος άλλων ενζύμων [14, 15, 16].

Η χιτοζάνη είναι ένα κατιονικό βιοπολυμερές που υπάρχει φυσιολογικά ή το αποκτούμε απ' την *N*-απακετυλίωση της χιτίνης (εικ. 8). Απακετυλάσες της χιτίνης έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από αρκετούς μύκητες. Τα πιο καλά



Εικόνα 8. Η καταλυτική δράση απακετυλάσης χιτίνης προς σχηματισμό χιτοζάνης και οξικού οξέος

μελετημένα ένζυμα είναι αυτά από τους μύκητες *Saccharomyces cerevisiae* [17], *Mucor rouxii* [18, 19, 20] και από δυο στελέχη του *Colletotrichum lindemuthianum* [21, 22]. Έχουν προταθεί δυο διαφορετικοί βιολογικοί ρόλοι για τις απακετυλάσες της χιτίνης (*Chitin Deacetylases*, CDAs) των μυκήτων: η συμμετοχή τους στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και σε αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων. Ωστόσο το τελευταίο δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμη πειραματικά [21].

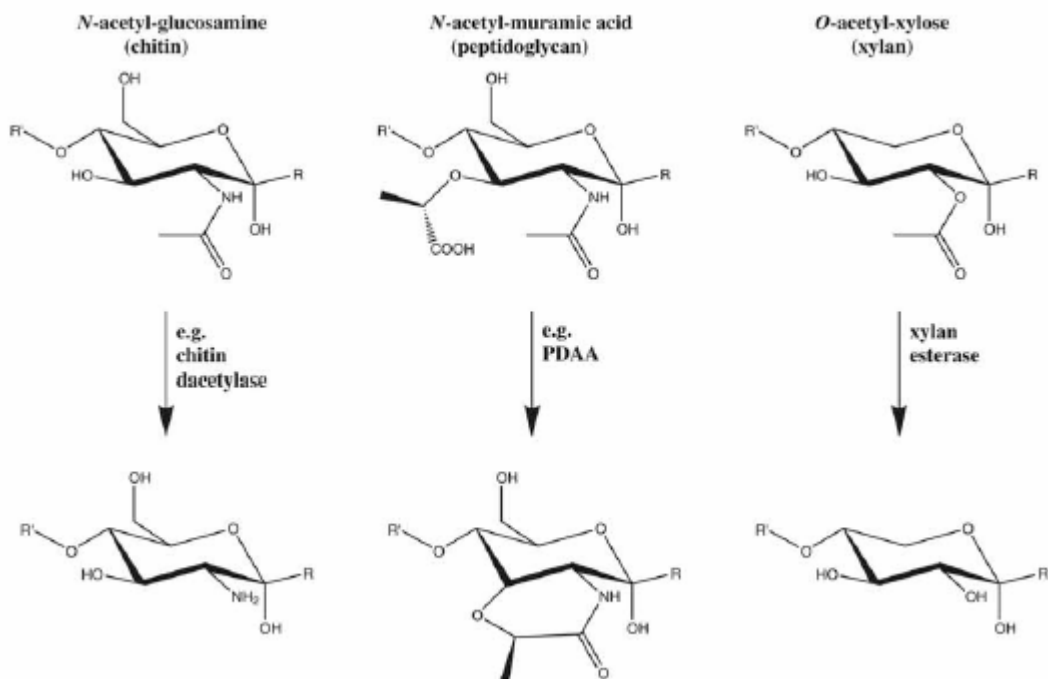
1.7 Οικογένεια εστερασών υδατανθράκων 4 (CE4)

Οι εστεράσες υδατανθράκων της οικογένειας 4 απακετυλιώνουν ένα ευρύ φάσμα ακετυλιωμένων πολυσακχαριτών. Η οικογένεια περιλαμβάνει τις απακετυλάσες χιτίνης, εστεράσες ακετυλ-ξυλάνης, ξυλανάσες, NodB απακετυλάσες χιτο-ολιγοσακχαριτών των ριζοβίων και απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης (εικ. 9). Οι απακετυλάσες χιτίνης καταλύουν την απακετυλίωση της χιτίνης σε χιτοζάνη, το βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος και του περιβλήματος των σπορίων των μυκήτων. Οι NodB πρωτεΐνες απακετυλιώνουν τους Nod-παράγοντες, χιτινώδεις

λιπο-ολιγοσακχαρίτες, που ρυθμίζουν τη συμβίωση των ψυχανθών φυτών με τα νιτροποιητικά βακτήρια. Οι εστεράσες ακετυλ-ξυλόνης καταλύουν την απακετυλίωση της *O*-ακετυλιωμένης ξυλόνης, βασικό συστατικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Τέλος ο ρόλος των απακετυλασών της πεπτιδογλυκάνης είναι η κατάλυση της απακετυλίωσης των καταλοίπων *N*-ακετυλ-μουραμικού και *N*-ακετυλ-γλυκοζαμινικού οξέος της βακτηριακής μουρεΐνης.

Το κοινό χαρακτηριστικό των μελών της CE4 είναι η συντηρημένη περιοχή απακετυλίωσης πολυσακχαριτών, η οποία και συσχετίζει λειτουργικά τα ένζυμα της οικογένειας. [23, 24, 25].

Η περιοχή απακετυλίωσης πολυσακχαριτών αναφέρεται και ως περιοχή ομολογίας pod, εξαιτίας της ομοιότητας που παρουσιάζει με τις NodB πρωτεΐνες των ριζοβίων. Η NodB απακετυλάση χιτο-ολιγοσακχαριτών των ριζοβίων ήταν το πρώτο ένζυμο της οικογένειας που περιγράφηκε λεπτομερώς. Η κρυστάλλωση της απακετυλάσης PdaA του *B. subtilis* έφερε στο φως τα δομικά χαρακτηριστικά της περιοχής NodB. Διαπιστώθηκε πως η περιοχή φέρει τη δομή ενός $(\beta/\alpha)_8$ βαρελιού.



Εικόνα 9. Υποστρώματα που αναγνωρίζουν οι εστεράσες της CE4 και οι αντιδράσεις που καταλύουν

Το ενεργό κέντρο περιλαμβάνει συντηρημένες ιστιδίνες και ασπαρτικά οξέα με ιδιαίτερο ρόλο στην κατάλυση [25, 26].

Η ίδια έρευνα έδειξε τη συμμετοχή μετάλλου στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Πρόκειται για το δισθενές κατιόν του Cd^{2+} , το οποίο φάνηκε να αλληλεπιδρά με δύο συντηρημένες ιστιδίνες [25]. Επιπλέον έχει αναφερθεί η εμπλοκή μετάλλου και στην καταλυτική δράση των ενζύμων, με παράδειγμα την αυξημένη ενεργότητα που παρουσίασαν οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης BC1960 και BC3618 παρουσία Co^{2+} [23]. Το τελευταίο αποδεικνύει την ύπαρξη μεταλλο-εξαρτώμενων εστερασών, ενώ υπάρχουν και παραδείγματα ενζύμων εντελώς ανεξάρτητων από ιόντα μετάλλων [27, 28, 29].

Οι απακετυλάσες πολυσακχαριτών επιτελούν διάφορους λειτουργικούς ρόλους [30]. Σε αυτούς συγκαταλέγονται:

1. η εμπλοκή τους στη σύνθεση λιπο-χιτο-ολιγοσακχαριτών, που λειτουργούν ως σήματα σχηματισμού ροζιδίων κατά τη συμβίωση ψυχανθών φυτών και νιτροποιητικών βακτηρίων (απακετυλιώνουν την ακετυλ-ομάδα στο μη ανάγων άκρο των λιπο-χιτο-ολιγοσακχαριτών)
2. η συμμετοχή τους στην ωρίμανση των σπορίων βακτηρίων και μυκήτων
3. η συμβολή τους στην τροποποίηση της πεπτιδογλυκάνης, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στην υδρολυτική δράση της λυσοζύμης. Το τελευταίο συνηγορεί στο χαρακτηρισμό τους ως πιθανοί παράγοντες παθογένειας .

1.8 Απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης

Οι έως τώρα μελετημένες απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης καταλύουν την αντίδραση απακετυλίωσης των καταλοίπων *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης ή του *N*-ακετυλ-μουραμικού οξέος. Οι γνώσεις μας για τα ένζυμα αυτά είναι περιορισμένες, συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας CE4. Οι σχετικές έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα χρησιμοποίησαν ως συστήματα μελέτης τους οργανισμούς *Streptococcus pneumoniae* [31, 32, 33], *Bacillus subtilis* [25, 30, 34, 35] και *Bacillus cereus* [23, 36].

Η πρώτη συγκροτημένη μελέτη με αντικείμενο την ενζυμική απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος πραγματοποιήθηκε το 1980 [36]. Μέχρι τότε, αρκετά στοιχεία αποδείκνυαν την ύπαρξη απακετυλιωμένων μουροπεπτιδίων στο κυτταρικό τοίχωμα του *Micrococcus lysodeikticus* και στο περίβλημα σπορίων πολλών στελεχών *Bacillus* και *Clostridium* [37, 38, 39]. Επιπλέον είχε αναφερθεί πως ο βαθμός απακετυλίωσης των καταλοίπων *GlcNac* στην πεπτιδογλυκάνη του *Bacillus cereus* [40] και άλλων βακτηρίων, σχετίζεται άμεσα με την ανθεκτικότητα στην δράση της λυσοζύμης, ενώ είχαν ανιχνευτεί και μη υποκατεστημένα κατάλοιπα γλυκοζαμίνης και μουραμικού οξέος στο κυτταρικό τοίχωμα του *Streptococcus cremoris* [41]. Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με το ότι η πεπτιδογλυκάνη συντίθεται από ακετυλιωμένα πρόδρομα μόρια, οδήγησαν στην υπόθεση πως η απακετυλίωση της μουρεΐνης πρέπει να συμβαίνει ενζυμικά .

Η υπόθεση επιβεβαιώθηκε με την ταυτοποίηση μιας απακετυλάσης πεπτιδογλυκάνης, που ανιχνεύτηκε σε διάφορα στελέχη *Bacillus* [36]. Η έρευνα έφερε στο φως πως τα κατάλοιπα *GlcNac* της πεπτιδογλυκάνης αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου και πως το ένζυμο αναγνωρίζει και ολιγομερή υποστρώματα όπως το (GlcNac-MurNac)₃. Επιπλέον προτάθηκε πως στο είδος *Bacillus cereus* η αντίδραση απακετυλίωσης της πεπτιδογλυκάνης καταλύεται από περισσότερα από ένα ένζυμα [36].

Από μετέπειτα συγκριτικές μελέτες αλληλούχισης γονιδιωμάτων των Gram+ βακτηρίων, ανιχνεύτηκε ένας μεγάλος αριθμός ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης, που κωδικοποιούν για πιθανές απακετυλάσες πολυσακχαριτών. Προτάθηκε πως αυτά τα ORFs (open reading frames) κωδικοποιούν απακετυλάσες της πεπτιδογλυκάνης, παρόλο που αυτό επιβεβαιώθηκε σε δύο μόνο περιπτώσεις. Δύο γονίδια, ονόματι *pgdA* από τον *Streptococcus pneumoniae* [31] και *pdaA* από τον *Bacillus subtilis* [34, 35] βρέθηκε να κωδικοποιούν μια απακετυλάση *N*-ακετυλ-γλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης και ένα ένζυμο απαραίτητο για την παραγωγή μουραμικής δ-λακτάμης στο περίβλημα σπορίων του *Bacillus subtilis*, αντίστοιχα.

Πρόσφατα προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή της απακετυλάσης PgdA του *Streptococcus pneumoniae* [33]. Τα στοιχεία υποδεικνύουν την υιοθέτηση μιας δομής (α / β)₈ της καταλυτικής περιοχής NodB καθώς και τη συμμετοχή τουλάχιστον μιας συντηρημένης ιστιδίνης και ενός συντηρημένου ασπαρτικού οξέος στην διαδικασία της υδρόλυσης. Επίσης, η λύση της δομής της PgdA απεκάλυψε την παρουσία ενός ιόντος Zn στο ενεργό κέντρο, το οποίο αλληλεπιδρά με δυο κατάλοιπα ιστιδίνης,

συμβάλλοντας στη σωστή διαμόρφωση τους, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη καταλυτική ενεργότητα. Το υπόστρωμα του συγκεκριμένου ενζύμου είναι τα πολυμερή ή τα oligομερή των β-1,4 συνδεδεμένων καταλοίπων *GlcNac*, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή της PgdA, εμφανίζει 50% ομοιότητα με ένζυμα όμοιας καταλυτικής ενεργότητας [33].

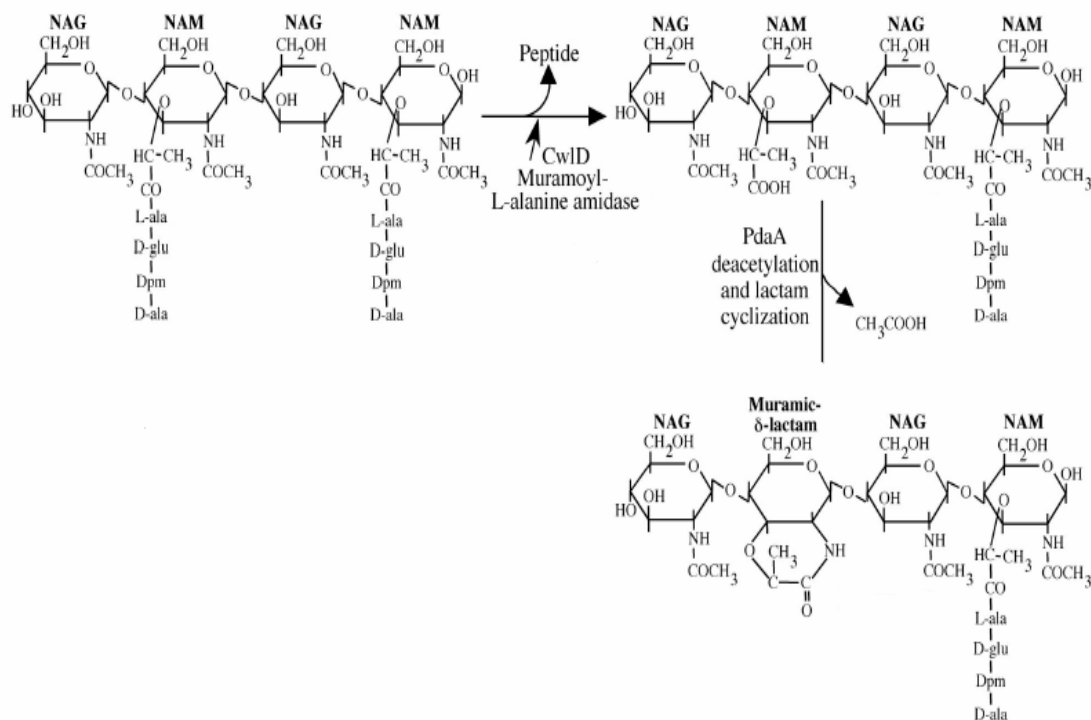
Η PdaA του *Bacillus subtilis* αναγνωρίζει ως υπόστρωμα το *N*-ακετυλ-μουραμικό οξύ των γλυκανικών αλυσίδων της πεπτιδογλυκάνης, απαλλαγμένο από τα πλευρικά πεπτίδια. Η κρυστάλλωση [25] του ενζύμου έδειξε πως η περιοχή NodB είχε την αναμενόμενη δομή ενός (β/α)₈ βαρελίου, ενώ στο ενεργό κέντρο αυτής παρατηρήθηκαν 3 επιπλέον βασικά κατάλοιπα, η Lys34, η Arg35, η Arg166 και η παρουσία του μεταλλικού κατιόντος Cd²⁺. Θεωρείται ότι τα θετικά φορτία των παραπάνω αμινοξέων εξυπηρετούν κάποιο ρόλο στην αναγνώριση και αλληλεπίδραση με τις *O*-λακτικές ομάδες των μουραμικών οξέων, ενώ η παρουσία του μετάλλου επιβεβαιώνει ότι οι περισσότερες απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης είναι μεταλλο-εξαρτώμενα ένζυμα.

Οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των απακετυλασών πεπτιδογλυκάνης προήλθαν από δύο ανασυνδυασμένα ένζυμα του *Bacillus cereus* [23]. Η πρόσφατη αλληλούχιση του γονιδιώματος του *Bacillus cereus* [42] αποκάλυψε 11 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης πιθανών απακετυλασών πολυσακχαριτών. Έχει προταθεί πως τα 6 από αυτά κωδικοποιούν για πιθανές απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης. Δύο από αυτά τα γονίδια, ονόματι *bc1960* και *bc3618* κλωνοποιήθηκαν και εκφράστηκαν στην *E. coli* [23]. Σχετικά με την εξειδίκευσή τους, τα ανασυνδυασμένα ένζυμα είναι ικανά να απακετυλιώσουν πεπτιδογλυκάνη από διάφορους οργανισμούς καθώς και παράγωγα χιτίνης (γλυκολ-χιτίνη) και διαλυτά μουροπεπτίδια. Αν και εμφανίζουν αυστηρή εξειδίκευση για τα *GlcNac* κατάλοιπα της πεπτιδογλυκάνης, υδρολύουν μουροπεπίδια με διάφορες πεπτιδικές αλυσίδες ενώ είναι ενεργά και σε υποστρώματα oligομερών *GlcNac* (με βέλτιστη δράση στο τετραμερές), όπου το γειτονικό στο *GlcNac* κατάλοιπο δεν είναι το *MurNac* [23].

Ως προς το βιολογικό ρόλο των απακετυλασών πεπτιδογλυκάνης, πιστεύεται πως η απακετυλίωση του εν λόγω βιοπολυμερούς προστατεύει το βακτήριο από την υδρολυτική δράση της εξωγενούς λυσοζύμης. Η λυσοζύμη είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή κατά τις βακτηριακές μολύνσεις. Η απακετυλίωση της πεπτιδογλυκάνης οδηγεί στην μη αναγνώριση της από τα υδρολυτικά ένζυμα και στη

διαφυγή του βακτηρίου από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού-ξενιστή. Πράγματι βρέθηκε πως η χημική *N*-ακετυλίωση απομονωμένης πεπτιδογλυκάνης από το *Streptococcus pneumoniae* οδήγησε σε υπερευαισθησία στη λυσοζύμη και αυξημένο βαθμό αποικοδόμησης της πεπτιδογλυκάνης. Επιπλέον, με *in vivo* απενεργοποίηση του γονιδίου *pgdA* παρατηρήθηκε παντελής έλλειψη απακετυλιωμένων καταλοίπων γλυκοζαμίνης και αδυναμία του βακτηρίου να μολύνει μοντέλα ποντικών [33]. Επιπροσθέτως η ικανότητα των απακετυλασών πεπτιδογλυκάνης να τροποποιούν κατά τέτοιο τρόπο το υπόστρωμά τους ώστε να αποφεύγεται η υδρόλυση, επεκτείνει το ρόλο τους στον έλεγχο της ενεργότητας ενδογενών υδρολασών με εν δυνάμει αυτολυτική δράση [31, 32, 33].

Τέλος, φαίνεται πως οι απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης σχετίζονται άμεσα με τη βλάστηση των σπορίων βακτηρίων και μυκητών [34, 35]. Παράδειγμα αποτελεί η δράση της PdaA [25], που εντοπίζεται στην τροποποίηση του μουραμικού οξέος σε μουραμική δ-λακτάμη των βακτηριακών σπορίων. Η PdaA δρα συνεργατικά με μια αμιδάση της *μουραμόυλ-L-αλανίνης*, η οποία καταλύει την υδρόλυση των πλευρικών πεπτιδίων από τα κατάλοιπα *MurNac*. Κατόπιν, ακολουθεί η *N*-απακετυλίωση των *MurNac* από την PdaA, προς σχηματισμό μουραμικής δ-λακτάμης, το φυσικό υπόστρωμα υδρολυτικών ενζύμων των τοιχωμάτων των σπορίων. Τα ένζυμα αυτά είναι αναγκαία για την ενυδάτωση των σπορίων και την κατ' επέκταση επιστροφή του βακτηρίου στο φυσιολογικό μεταβολικό του ρυθμό. Πειράματα μεταλλαγής ή απενεργοποίησης του *pdaA* γονιδίου έδωσαν φαινότυπο παντελούς έλλειψης μουραμικής δ-λακτάμης και ανέστειλαν τη βλάστηση των σπορίων (εικ. 10) [34, 35].



Εικόνα 10. Καταλυτική δράση της PdaA προς σχηματισμό μουραμικής δ-λακτόμης. NAG: N-ακετυλ-γλυκοζαμινο οξύ, NAM: N-ακετυλ-μουραμικό οξύ

Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και επικεντρώθηκε στη μελέτη μιας απακετυλάσης πολυσακχαριτών από τον οργανισμό *Bacillus cereus*. Ο τελευταίος είναι συγγενικός προς τον *Bacillus anthracis* με τον οποίο εμφανίζει ομολογία σε 10 γονίδια, τα οποία πιστεύεται πως κωδικοποιούν απακετυλάσες πολυσακχαριτών και κυρίως πεπτιδογλυκάνης. Δεδομένης της υψηλής επικινδυνότητας που υποκρύπτει το βακτήριο *Bacillus anthracis* και της χρήσης του ως πιθανό βιο-όπλο, καθίσταται ακατάλληλο σύστημα βιολογικής μελέτης. Το σκοπό αυτό εξυπηρετεί ο *Bacillus cereus*, ο οποίος αποτελεί μοντέλο μελέτης των πιθανών απακετυλασών και συμβάλλει στην κατανόηση της βιολογίας του *Bacillus anthracis*.

Το ένζυμο, με το οποίο ασχοληθήκαμε ανήκει στην οικογένεια 4 των εστερασών υδατανθράκων (CE4), της οποίας τα μέλη εμφανίζουν τη συντηρημένη καταλυτική

περιοχή NodB. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αρχικά η κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου *bc0361* και η μετέπειτα απομόνωση και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του ανασυνδυασμένου ενζύμου. Με τον τρόπο αυτό αφενός συμβάλλουμε στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης του ενζύμου και των ομολόγων του και αφετέρου εντοπίζουμε το λειτουργικό του ρόλο κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ζωής. Επιπλέον, οι εκτενείς μελέτες των απακετυλασών, ίσως θέσουν τις βάσεις για τον πιθανό σχεδιασμό φαρμάκων, με εφαρμογή στη βιοσύνθεση-τροποποίηση της πεπτιδογλυκάνης του *Bacillus anthracis*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Οι νουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση PCR παρασκευάστηκαν από το εργαστήριο μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB).

Τα στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν BL21 DE3, BL21 pLYS και DH5a και προήλθαν από την εταιρεία Novagen.

Οι cDNA κλώνοι από τον οργανισμό *Bacillus cereus* ATCC14579 ήταν από την Integrated Genomics Inc. (Chicago, US).

Ο πλασμιδιακός φορέας pRsetA που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου BC0361 ήταν της εταιρείας Invitrogen Corporation.

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων καθώς και τα αντίστοιχα διαλύματα δράσης τους είναι από τις εταιρείες MINOTECH Biotechnology, New England Biolabs GmbH, Promega Corporation και Stratagene GmbH.

Η συσκευή Electroporator 2510 ήταν από την εταιρεία Eppendorf Netheler-Hinz GmbH.

Για τον καθαρισμό τμημάτων DNA (100bp-10kb) μετά από PCR αντίδραση και αντιδράσεις με περιοριστικά ένζυμα καθώς και για την εκχύλιση τμημάτων DNA (70bp-10kb) από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε στήλη QIAquick (QIAGEN).

Για την μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια έγινε χρήση της στήλης Nucleospin plasmid (MACHEREY NAGEL GmbH).

Τα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των βακτηρίων ήταν της εταιρείας Difco Laboratories και Merck. Τα διαλύματα των αντιβιοτικών παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τους Sambrook et al. Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich Inc., Promega Corporation, Boehringer Mannheim GmbH, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Qiagen Ltd.

Η προμήθεια των χρωματογραφικών υλικών S Sepharose fast flow και Sephacryl S100 HR έγινε από την εταιρεία Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH. Από την Pharmacia ήταν επίσης και οι μάρτυρες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν στα αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου.

Τα ένζυμα και τα αντιδραστήρια για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του οξικού οξέος αγοράστηκαν από την εταιρεία Boehringer Mannheim. Η προμήθεια N-ακετυλοχιτοολιγοσακχαριτών έγινε από την εταιρεία Sigma Chemicals.

Τα φίλτρα υπερδιήθησης που χρησιμοποιήθηκαν (YM10) ήταν από την Amicon. Ο [^3H] οξικός ανυδρίτης προμηθεύτηκε από την New England Nuclear.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1. Κλωνοποίηση του γονιδίου *bc0361*

Το γονίδιο *bc0361* απομονώθηκε από το γενωμικό DNA του οργανισμού *Bacillus cereus*. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γενωμικό DNA και εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια BC0361-FOR(5'-GGAATTCCATATGATGAGCCAAGAACCTAAA-3') με *NdeI* περιοριστική θέση ενσωματωμένη, BC0361-REV(5'-CCGCTCGAGTTACTTAATTGAAGAAGC-3') με *XhoI* περιοριστική θέση ενσωματωμένη, πραγματοποιήθηκε PCR για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση του συγκεκριμένου γονιδίου. Τελικό αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή γονιδίου, από το οποίο απουσίαζε η περιοχή των 69 πρώτων νουκλεοτιδίων, που κωδικοποιούν το πεπτιδιο-σινιάλο για την έκκριση των πρωτεϊνών στο περίπλασμα.

2.2.2 Υδρόλυση DNA με περιοριστικά ένζυμα

Για την ενσωμάτωση του γονιδίου *bc0361* στον πλασμιδιακό φορέα *pRsetA* είναι απαραίτητη η υδρόλυση του DNA με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που δημιουργούν άκρα συμβατά με αυτά που έχουν επιλεγεί για το φορέα. Μετά την επιλογή των κατάλληλων ενζύμων, πραγματοποιείται η αντίδραση της υδρόλυσης με τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα και στις κατάλληλες θερμοκρασίες που υποδεικνύουν οι κατασκευάστριες εταιρείες. Είναι σημαντικό ο όγκος του ενζύμου να μην ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου, γιατί η γλυκερόλη στην οποία διατηρείται το ένζυμο, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μειώνει σημαντικά την ενεργότητα του.

Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη πέψη του γονιδίου *bc0361* και του φορέα *pRsetA* ήταν τα *NdeI* και *XhoI*.

2.2.3 Αντίδραση συγκόλλησης (Ligation)

Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα, γίνεται αντίδραση συγκόλλησης στους 16°C για 12-16 ώρες, προσθέτοντας τα εξής:

- 50-100ng φορέα
- ποσότητα ενθέματος που καθορίζεται από την αναλογία μορίων του φορέα με το ένθεμα, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι για προεξέχοντα άκρα η ιδανική αναλογία μορίων ενθέματος : φορέα είναι 4 : 1, ενώ για τυφλά άκρα είναι 5-10 : 1.
- 1× ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10× : 0.5M Tris pH 7.4, 0.1M MgCl₂, 0.1M DTT, 10mM spermidine, 10mM ATP, 1mg/ml BSA)
- 0.75μl rATP (20mM)
- 1μl T4 DNA λιγάση (3-5units)
- H₂O μέχρι 20μl τελικό όγκο.

Με τη συγκόλληση επιτυγχάνεται η τοποθέτηση του γονιδίου κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του T₇ *lac* υποκινητή. Η πλασμιδιακή κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό BL21-DH5a κυττάρων, τα μετασχηματισμένα κύτταρα ελέγχθηκαν για την ενσωμάτωση του γονιδίου ενδιαφέροντος μέσω Colony PCR και μετά την απομόνωση της πλασμιδιακής κατασκευής το ένθεμα στάλθηκε για νουκλεοτιδική αλληλούχηση, όπου διαπιστώθηκε η ένθεση του σωστού γονιδίου στο σωστό σημείο, δηλαδή σε θέση όπου μπορεί να μεταγραφεί και να μεταφραστεί με βάση το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης.

2.2.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* με την πλασμιδιακή κατασκευή pRsetA/bc0361

Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα ακολούθησε ο μετασχηματισμός B121 DE3 και pLYS *E. coli* κυττάρων. Οι μέθοδοι μετασχηματισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* από πλασμιδιακό φορέα με τη χημική μέθοδο:

- Ξεπάγωμα των δεκτικών κυττάρων από τους -80°C στον παγό.
- Προσθήκη του DNA στα κύτταρα.
- Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C για 90 δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 900μl LB και επώαση για 50 λεπτά στους 37°C .
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000rpm.
- Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων.
- Άπλωμα σε τριβλίο με LB και αντιβιοτικά επιλογής (αμπικιλίνη, χλωραμφαινικόλη).
- Επώαση στους 37°C για 16-20 ώρες.

- Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E. coli* από πλασμιδιακό φορέα μέσω ηλεκτρικής πόρωσης:

- Ξεπάγωμα των δεκτικών κυττάρων από τους -80°C στον παγό.
- Προσθήκη του DNA στα κύτταρα.
- Προσθήκη των κυττάρων στην ειδική κυβέττα που φυλασσόταν στους -20°C . Με τη βοήθεια ειδικής συσκευής τα κύτταρα υποβάλλονται στιγμιαία σε ηλεκτρικό πεδίο 1800 Volt.
- Προσθήκη 900μl παγωμένου LB και επώαση για 90-120 λεπτά στους 37°C .
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3000rpm.
- Απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων.
- Άπλωμα σε τριβλίο με LB και αντιβιοτικά επιλογής (αμπικιλίνη, χλωραμφαινικόλη).

- Επώαση στους 37°C για 16-20 ώρες.

Το μετασχηματισμένο στέλεχος διατηρήθηκε στους -80°C σε 50% γλυκερόλη μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

2.2.5 Υπερπαραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης BC0361 σε κύτταρα *E. coli*

Για την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιείται μετασχηματισμός σε BL21 DE3 και pLYS *E. coli* κύτταρα με την πλασμιδιακή κατασκευή. Από το τριβλίο με τα μετασχηματισμένα κύτταρα συλλέγεται μοναδική αποικία με την οποία μολύνεται υγρή καλλιέργεια LB/αμπικιλίνη για τα DE3 (για 1lt διαλύματος Luria-Bertani Medium: 10gr bacto-tryptone, 5gr bacto-yeast extract, 10gr NaCl και προσθήκη 1ml διαλύματος αμπικιλίνης 100mg/ml) και LB/αμπικιλίνη/χλωραμφαινικόλη για τα pLYS (προσθήκη 1ml διαλύματος χλωραμφαινικόλης 34mg/ml). Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 37°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 ml της προκαλλιέργειας σε 1lt φρέσκου θρεπτικού μέσου LB/αμπικιλίνη για τα DE3 και LB/αμπικιλίνη/χλωραμφαινικόλη για τα pLYS (αραίωση 1/50) και ακολουθεί επώαση στους 30°C έως ότου η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600nm να φτάσει το 0.6. Στην καλλιέργεια προστίθενται επαγωγέας IPTG (IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside) σε τελική συγκέντρωση 0.3 mM και πραγματοποιείται επώαση για 8 ώρες στους 25°C. Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται (20 λεπτά στις 5000rpm, στους 4°C), συλλέγεται η βακτηριακή πελέττα και αποθηκεύεται στους -80°C.

2.2.6 Απομόνωση της απακετυλάσης πεπτιδογλυκάνης BC0361

Εκχύλιση:

Η διαδικασία καθαρισμού γίνεται σε θερμοκρασία 8°C. Η βακτηριακή πελέττα επαναδιαλύεται σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα (1g πάστας σε 3 ml διαλύματος) 25mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid) -NaOH pH 6.8, 200 mM NaCl 1 mM DTT, 0.3 mg/ml λυσοζύμη. Ακολουθεί επώαση στον πάγο υπό

ήπια ανάδευση για 2.5 ώρες. Ανά 30 min προσθέτουμε PMSF (φθοριούχο φαινυλ-μεθυλ-σουλφονύλιο) σε τελική συγκέντρωση 1mM. Μετά από 45 min επαναπροσθέτουμε λυσοζύμη τόση ώστε να διπλασιαστεί η αρχική συγκέντρωση της στο διάλυμα. Μετά από επώαση 1,5 ώρας στον πάγο γίνεται προσθήκη Dnase (τελική συγκέντρωση 10 µg/ml) και MgCl₂ (τελική συγκέντρωση 10 mM). Μετά από μια ώρα επώασης το διάλυμα φυγοκεντρείται στους 4°C για 20 min στις 10.000 rpm ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά θραύσματα. Συλλέγουμε το υπερκείμενο κυτταρικό εκχύλισμα.

Χρωματογραφία σε προσροφητή S sepharose fast flow:

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το προηγούμενο στάδιο αραιώθηκε (1:7) στο διάλυμα 25mM HEPES-NaOH pH 6.8 και φορτώθηκε σε προσροφητή S sepharose fast flow, ο οποίος αρχικά εξισορροπήθηκε με 25mM HEPES-NaOH pH 6.8 / 50mM NaCl (διάλυμα A). Ο προσροφητής εκπλύθηκε με το διάλυμα A και οι κατακρατούμενες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε κλάσματα όγκου 10ml με σταδιακή διαβάθμιση NaCl, η οποία επιτεύχθηκε με τη χρήση διαλύματος 25mM HEPES-NaOH pH 6.8 / 1 M NaCl (διάλυμα B). Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από την ανάμιξη των διαλυμάτων A και B ήταν τα εξής: 3 × 100mM NaCl, 3 × 200mM NaCl, 3 × 300mM NaCl, 3 × 400mM NaCl, 3 × 500mM NaCl. Τα κλάσματα στα οποία ανιχνεύθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης και η μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα της BC0361, αναμίχθηκαν και υπέστησαν ολονύκτια διαπίδυση σε διάλυμα 25mM HEPES-NaOH pH 6.8 / 200mM NaCl.

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε προσροφητή Sephacryl S100 HR :

Η συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδος αποτέλεσε το τελευταίο στάδιο καθαρισμού του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος και συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους συλλέγονται γρηγορότερα μιας και δεν περνούν μέσα από τους πόρους του υλικού της στήλης ενώ οι μικρότερου μοριακού βάρους καθυστερούν στο εσωτερικό των πόρων. Αφού η κολώνα εξισορροπηθεί με διάλυμα 25mM HEPES-NaOH pH 6.8 / 200mM NaCl, φορτώνεται το πρωτεϊνικό δείγμα, ακολουθεί έκλουση

με το διάλυμα εξισορρόπησης (2 όγκοι στήλης) και συλλέγονται τα εκλούόμενα κλάσματα. Τα κλάσματα με την υψηλότερη καθαρότητα και ενεργότητα απακετυλάσης της πεπτιδογλυκάνης ελέγχονται σε πηκτή ακρυλαμίδης καθώς και με τη ραδιομετρική μέθοδο μέτρησης της ενεργότητας, συγκεντρώνονται και διατηρούνται σε 50% γλυκερόλη στους -20 °C.

Παράλληλα, η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται και για να διαπιστώσουμε την κατάσταση πολυμερισμού της πρωτεΐνης. Ο αριθμός των κορυφών που προκύπτουν στο χρωματογράφημα δηλώνει τον αριθμό των πρωτεϊνών ή των πρωτεϊνικών υπομονάδων ενός πρωτεϊνικού μορίου που εκλύονται. Στη συνέχεια, επαναλαμβάνεται η διαδικασία φορτώνοντας στην κολώνα διάφορους πρωτεϊνικούς μάρτυρες μοριακών βαρών, ώστε να υπολογιστεί το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί σε κάθε κορυφή. Από τη διαδικασία αυτή συμπεραίνεται ο βαθμός πολυμερισμού της προς μελέτη πρωτεΐνης.

2.2.7 Μέθοδοι μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της απακετυλάσης πεπτιδογλυκάνης BC0361

A. Ραδιομετρική μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας σε υποστρώματα ραδιοσημασμένης πεπτιδογλυκάνης και γλυκολ-χιτίνης.

Η επιλογή της πεπτιδογλυκάνης έγινε ως το κύριο υπόστρωμα του προς εξέταση ενζύμου και βασίστηκε σε προηγούμενη αναφορά [23]. Στην ίδια αναφορά βασίστηκε και η χρήση γλυκολ-χιτίνης (υδατοδιαλυτό παράγωγο της χιτίνης) με τις τροποποιήσεις και τις βελτιώσεις που περιγράφονται σε άλλη εργασία. Μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί η ποσότητα ραδιοσημασμένου οξικού οξέος, το οποίο απελευθερώνεται από την ενζυμική απακετυλίωση της ραδιοσημασμένης πεπτιδογλυκάνης και γλυκολ-χιτίνης.

Προετοιμασία ραδιοσημασμένης πεπτιδογλυκάνης και γλυκολ-χιτίνης

Για την προετοιμασία της ραδιοσημασμένης πεπτιδογλυκάνης, αρχικά, απομονώθηκε πεπτιδογλυκάνη από το κυτταρικό τοίχωμα του *B.cereus* και στη

συνέχεια, σημάνθηκε με [^3H] οξικό ανυδρίτη. Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η σήμανση της γλυκολ-χιτίνης, χρησιμοποιώντας ως αρχικό υπόστρωμα μερικά ο-υδροξυαιθυλιωμένη χιτοζάνη (γλυκολ-χιτοζάνη).

Η απομόνωση πεπτιδογλυκάνης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Καλλιέργεια κυττάρων *B. cereus* στους 37°C με ανακίνηση στις 250rpm.
- Βράσιμο 100ml καλλιέργειας σε υδατόλουτρο για 7min, για να μη λυθεί η πεπτιδογλυκάνη.
- Συλλογή κυττάρων μετά από φυγοκέντρηση (14000g, 8min, 4°C).
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε ζεστό SDS, 5%w/v και βράσιμο για 25min.
- Συλλογή των αδιάλυτων συστατικών με φυγοκέντρηση (14000g, 8min, 20°C).
- Επαναδιάλυση σε ζεστό SDS, 4%w/v και βράσιμο για 15min.
- Πλύσιμο με ζεστό αποστειρωμένο νερό (60°C) τουλάχιστον 5 φορές μέχρι την απομάκρυνση του SDS.
- Αφαίρεση των ομοιοπολικά προσδεδμένων πρωτεϊνών με επώαση με 2mg/ml πρωνάση, για 1h στους 60°C .
- Συλλογή των κυτταρικών τοιχωμάτων με φυγοκέντρηση (14000g, 8min, 4°C).
- Πλύσιμο με αποστειρωμένο νερό και επαναδιάλυση σε υδροφθορικό οξύ (HF) (400μl από διάλυμα 48%v/v). Επώαση για 24h στους 2°C .
- Συλλογή των αδιάλυτων συστατικών με φυγοκέντρηση (14000g, 8min, 4°C).
- Πλυσίματα με φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση, μια φορά με 50mM Tris-HCl, pH 7 και πέντε φορές με κρύο αποστειρωμένο νερό, μέχρι το pH να γίνει ουδέτερο.
- Αποθήκευση της απομονωμένης πεπτιδογλυκάνης στους -20°C .

Η διαδικασία της ραδιοσήμανσης είναι ίδια και για τα δύο υποστρώματα. 21 mg γλυκολ-χιτοζάνης και πεπτιδογλυκάνης αντίστοιχα, διαλύονται σε 2,25ml διαλύματος NaHCO_3 (11,25%) και ακετυλιώνονται με 5mCi [^3H] οξικού ανυδρίτη (0,1mmol, 50mCi/mmol). Μετά από επώαση 24h στους 4°C , οι απομένουσες ελεύθερες αμινομάδες ακετυλιώνονται με 150μl μη σημασμένου οξικού ανυδρίτη για ακόμη 24h. Ακολουθεί απομάκρυνση του παραγόμενου, από την αντίδραση και την υδρόλυση του οξικού ανυδρίτη, οξικού οξέος, με διαπίδυση. Έπειτα, το παρασκεύασμα οξυνίζεται με ποσότητα πυκνού υδροχλωρικού οξέος (τελική συγκέντρωση 50mM) και πυκνού οξικού οξέος (τελική συγκέντρωση 60mM) και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (κορεσμένο με νερό), φυγοκεντρώντας στα 14000g. Με διαπίδυση

απομακρύνονται τα υπολείμματα οξικού αιθυλεστέρα από το διάλυμα της γλυκολ-χιτίνης, ενώ η αδιάλυτη πεπτιδογλυκάνη από το προηγούμενο βήμα, συλλέγεται και επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο νερό.

Ραδιομετρικός προσδιορισμός του παραγόμενου οξικού οξέος

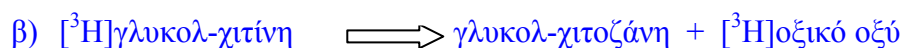
Μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί η ποσότητα ραδιοσημασμένου οξικού οξέος, το οποίο απελευθερώνεται από την ενζυμική απακετυλίωση της ραδιοσημασμένης πεπτιδογλυκάνης και γλυκολ-χιτίνης (Σχήμα 1). Η αντίδραση απακετυλίωσης της πεπτιδογλυκάνης διεξάγεται σε 100μl τελικό όγκο, με ρυθμιστικό διάλυμα 25mM Tris-HCl, pH 8, 1mM CoCl₂, 5μl ραδιοσημασμένου υποστρώματος και περίπου 3μg ενζύμου. Επιπλέον δοκιμάζονται τιμές pH, εύρους 5 έως 11. Πραγματοποιείται τρίωρη, πεντάωρη και ολονύκτια επώαση στους 37°C. Η αντίδραση απακετυλίωσης της γλυκολ-χιτίνης διεξάγεται υπό τις ίδιες συνθήκες. Δοκιμάζονται τιμές pH από 6 έως 8, σε ολονύκτια, πεντάωρη και τρίωρη επώαση στους 37°C και 50°C. Οι αντιδράσεις διακόπτονται με την προσθήκη 100μl διαλύματος 20mM HCl / 50mM CH₃COOH. Στη συνέχεια, το οξικό οξύ εκχυλίζεται από την υδατική φάση με 500μl οξικού αιθυλεστέρα και μετριέται με σπινθηρομετρία.

Σημαντικό πλεονέκτημα της ραδιομετρικής μεθόδου είναι η ταχύτητα, γι' αυτό και χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την ανίχνευση της ενζυμικής δραστηριότητας της απακετυλάσης της πεπτιδογλυκάνης σε χρωματογραφικά κλάσματα.

PDA



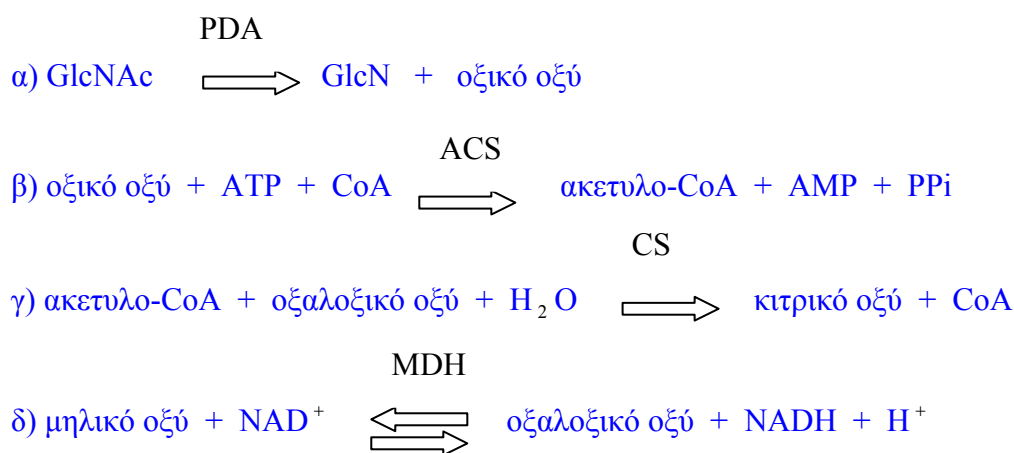
PDA



Σχήμα 1. Αντίδραση παραγωγής ραδιοσημασμένου οξικού οξέος από ραδιοσημασμένη πεπτιδογλυκάνη (α) και γλυκολ-χιτίνη (β)

B. Φασματοφωτομετρική μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε, αρχικά, για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας απακετυλασών της χιτίνης σε φυσικά, μη ραδιοσημασμένα υποστρώματα. Ωστόσο, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και για την μέτρηση της δραστηριότητας ήδη χαρακτηρισμένων απακετυλασών πεπτιδογλυκάνης. Μέτρο της ενζυμικής απακετυλίωσης της πεπτιδογλυκάνης αποτελεί η απελευθέρωση οξικού οξέος, το οποίο υπολογίζεται μέσω μιας σειράς συζευγμένων ενζυμικών αντιδράσεων (Σχήμα 2). Ο προσδιορισμός της ποσότητας του παραγόμενου οξικού οξέος βασίζεται στο σχηματισμό του NADH, το οποίο μετράται με την αύξηση της τιμής της απορρόφησης στα 340nm.



Σχήμα 2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του παραγόμενου οξικού οξέος με τη μέθοδο των συζευγμένων ενζυμικών αντιδράσεων. Το οξικό οξύ που παράγεται από την ενζυμική απακετυλίωση της N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης (αντίδραση α) μετατρέπεται σε ακέτυλο συνένζυμο Α (αντίδραση β), το οποίο συμμετέχει στη σύνθεση κιτρικού οξέος από οξαλοξικό οξύ (αντίδραση γ). Το αποτέλεσμα της κατανάλωσης του οξαλοξικού οξέος (το οποίο παράγεται από την αφυδρογόνωση του μηλικού οξέος) είναι η αναγωγή του NAD⁺ σε NADH (αντίδραση δ), η οποία παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά από τη μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm. PDA: απακετυλάση της πεπτιδογλυκάνης, ACS: συνθετάση του ακετυλο-CoA, CS: συνθετάση του κιτρικού οξέος, MDH: αφυδρογονάση του μηλικού οξέος.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη της δραστηριότητας της απακετυλάσης της πεπτιδογλυκάνης σε διάφορα ολιγομερή χιτίνης (GlcNAc)₁₋₆, καθώς και στα τροποποιημένα χιτοολιγομερικά υποστρώματα N-ακετυλγλυκοζαμίνης, N-ακετυλγλυκοζαμίνη-1φωσφορικό (GlcNAc-1P), N-ακετυλγλυκοζαμίνη-6φωσφορικό (GlcNAc-6P), καθώς και με τα N-ακετυλμουραμικό οξύ (MurNAc) και N-ακετυλμουροδιπεπτίδιο (MurNAc-L-Ala-D-Glu). Η πρότυπη αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 100μl, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25mM Tris-HCl, pH 8, 1mM CoCl₂, 452 nmoles N-ακετυλοχιτοολιγομερών και 7,5μg ενζύμου. Η επώαση

της αντίδρασης έγινε στους 37°C, για διάφορα χρονικά διαστήματα και τερματίστηκε με θέρμανση στους 100 °C πριν τον ποσοτικό προσδιορισμό του απελευθερούμενου οξικού οξέος.

2.2.8 Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση έγινε σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 12,5% πυκνότητας, με ασυνεχή συστήματα ρυθμιστικών διαλυμάτων. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των διαφόρων πρωτεϊνικών κλασμάτων που προέκυψαν από τη διαδικασία καθαρισμού του ενζύμου καθώς και για τον προσδιορισμό των σχετικών μοριακών βαρών των πρωτεϊνών.

2.2.9 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική πρόσδεσης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα BSA. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε λόγω της ταχύτητας στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων και χρησιμοποιήθηκε σε σύνθετα και καθαρά παρασκευάσματα της απακετυλάσης της πεπτιδογλυκάνης *BC0361*.

2.2.10 Προσδιορισμός μοριακού βάρους της BC0361

Για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους της απακετυλάσης της πεπτιδογλυκάνης *BC0361* χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

- Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη Sephacryl S100 HR.
- Ανάλυση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου *bc0361*

Προκειμένου να μελετήσουμε την πρωτεΐνη BC0361 επιχειρήσαμε να την παράγουμε σε υψηλά επίπεδα. Κάτι τέτοιο κατορθώθηκε με την κλωνοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου σε κύτταρα *E. coli*, τα οποία θεωρούνται από τα πιο εύχρηστα συστήματα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών.

Αρχικά το γονίδιο *bc0361* απομονώθηκε από το γονιδίωμα του *Bacillus cereus* με τη μέθοδο της Polymerase Chain Reaction (PCR) και χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το γενωμικό DNA του βακίλλου. Ακολούθησε υδρόλυση του γονιδίου και του πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και XhoI, ώστε να δημιουργηθούν συμβατά άκρα στο γονίδιο και τον πλασμιδιακό φορέα και να επιτευχθεί η αντίδραση συγκόλλησης, που ακολούθησε. Με αυτό τον τρόπο το *bc0361* ενσωματώθηκε στον πλασμιδιακό φορέα *pRSETA* επιτυχώς. Ακολούθησε μετασχηματισμός της πλασμιδιακής κατασκευής στα βακτηριακά στελέχη *E. coli* BL21 DE3 και pLYS.

3.2 Υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης BC0361

Σε μικρές καλλιέργειες DE3 και pLYS, παρουσία των κατάλληλων αντιβιοτικών, δοκιμάστηκαν ποικίλλες συνθήκες έκφρασης, προκειμένου να προσδιοριστούν εκείνες που προσφέρουν τη μεγαλύτερη δυνατή έκφραση του γονιδίου *bc0361*. Δοκιμάστηκε η θερμοκρασία επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης, η συγκέντρωση του IPTG, η διάρκεια επώασης των βακτηριακών αποικιών με IPTG, καθώς και η παρουσία μετάλλου.

Παρατηρήθηκε πως τα ανασυνδυασμένα κύτταρα DE3 εμφάνιζαν πολύ αργή ανάπτυξη, γεγονός που ίσως να σημαίνει πως η ετερόλογη πρωτεΐνη είναι τοξική γι' αυτά. Παράλληλα δεν ανιχνεύθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης BC0361 σε καμία από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Αντίθετα, τα κύτταρα pLYS παρουσίασαν φυσιολογική ανάπτυξη και εμφάνισαν υψηλότερη παραγωγή της πρωτεΐνης όταν επωάζονταν στους 25°C με 0,3 mM IPTG, απουσία μετάλλου, για 8 ώρες.

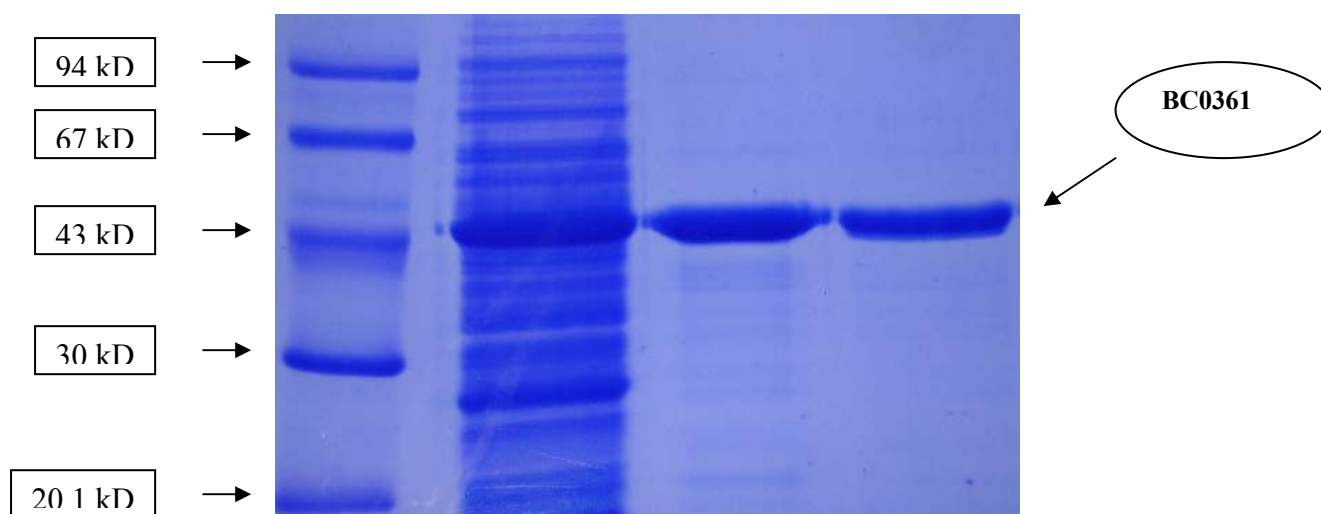
3.3 Απομόνωση της απακετυλάσης πεπτιδογλυκάνης BC0361

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης BC0361 από το κυτταρικό εκχύλισμα δοκιμάστηκε χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε δύο διαφορετικούς προσροφητές, τον Q Sepharose fast flow και S Sephrose fast flow και χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε Sephacryl S-200 HR και Sephacryl S-100 HR. Παράλληλα για την καλύτερη απόδοση της χρωματογραφικής μεθόδου ελέγχθηκαν διάφορες συνθήκες pH (εύρος pH από 6 έως 8) και δοκιμάστηκαν ποικίλλα ρυθμιστικά διαλύματα (Tris-HCL, MES-NaOH, HEPES-NaOH).

Παρατηρήθηκε πως το χρωματογραφικό σχήμα που απέδωσε περισσότερο αποτελείται από μια χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε προσροφητή S Sephrose fast flow και μια μοριακής διήθησης σε Sephacryl S-100 HR. Το πλήρες χρωματογραφικό σχήμα φαίνεται στον πίνακα 1, ενώ η ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών στα διάφορα στάδια απομόνωσης της BC0361 παρουσιάζεται στην εικόνα 10.

Χρωματογραφική Μέθοδος	Είδος προσροφητή	Ρυθμιστικό διάλυμα A	Ρυθμιστικό διάλυμα B
1. Ιοντοανταλλαγή	S Sepharose Fast Flow	25mM HEPES-NaOH pH 6.8	25mM HEPES-NaOH pH 6.8 1M NaCl
2. Μοριακή Διήθηση	Sephacryl S-100 HR	25mM HEPES-NaOH pH 6.8 200mM NaCl	-

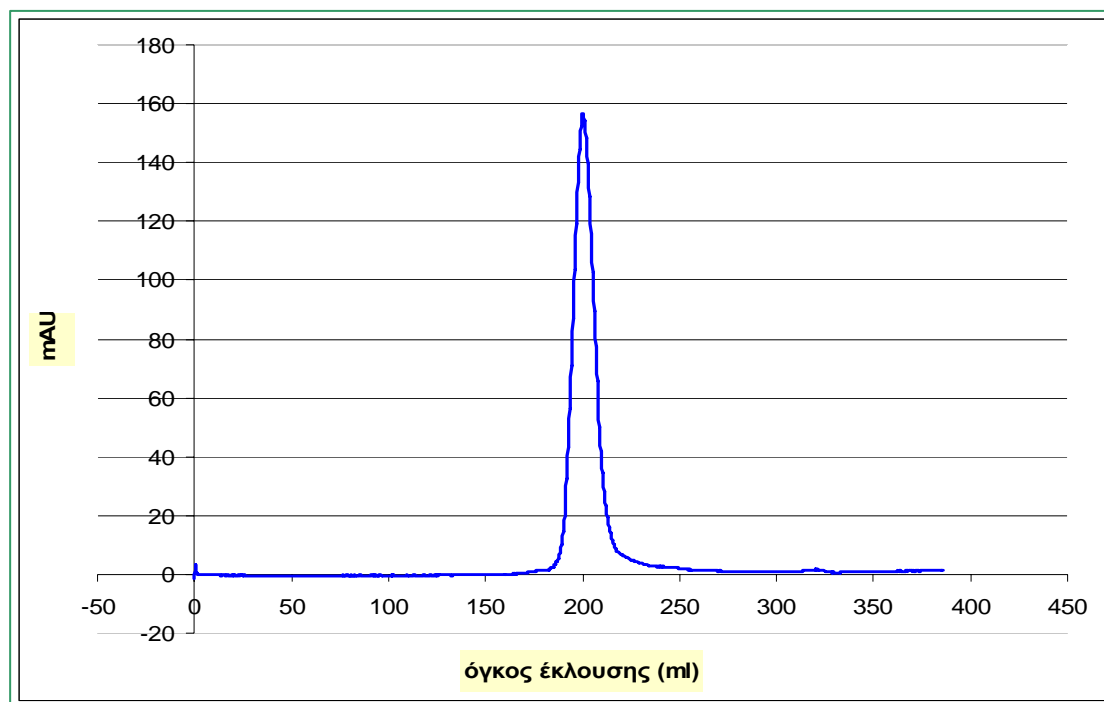
Πίνακας 1. Χρωματογραφικό σχήμα που ακολουθήθηκε για την απομόνωση της BC0361



Εικόνα 11. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 12.5%. Λωρίδα 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας, λωρίδα 2: το κυτταρικό εκχύλισμα που φορτώθηκε στην πρώτη κολώνα *S sepharose fast flow*, λωρίδα 3: παρασκεύασμα μετά από την *S sepharose fast flow*, λωρίδα 4: η εκλουόμενη πρωτεΐνη BC0361 μετά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Παρατηρούμε πως η χρωματογραφία σε προσροφητή *S Sepharose* παίζει σημαντικό ρόλο στην απομόνωση του ενζύμου. Αποτελεί το βήμα, στο οποίο απομακρύνεται το μεγαλύτερο ποσοστό μη επιθυμητών πρωτεϊνών του κυτταρικού εκχυλίσματος, ενώ η κολώνα μοριακής διήθησης είναι καθοριστική για τον πλήρη διαχωρισμό του ενζύμου BC0361 από τις λοιπές εναπομείνουσες πρωτεΐνες. Όπως εύκολα διακρίνεται και από την πηκτή ακρυλαμίδης, η πρωτεΐνη στο τελευταίο στάδιο απομόνωσης εκλούεται χωρίς άλλες πρωτεϊνικές προσμίξεις. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το χρωματογράφημα από την κολώνα μοριακής διήθησης (εικ. 11).

Το προβλεπόμενο μοριακό βάρος του ενζύμου BC0361, με βάση τον αριθμό αμινοξέων του είναι 38 kDa, ενώ με βάση το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης προσδιορίζεται περίπου 43 kDa. Ωστόσο από την κολώνα μοριακής διήθησης, προσδιορίστηκε πως το ακριβές μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 36 kDa. Το φαινόμενο δεν μπορεί να αποδοθεί σε κάποια αιτία, είναι χαρακτηριστικό όμως ότι έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις άλλων πρωτεϊνών.



Εικόνα 12. Χρωματογράφημα του ενζύμου BC0361 από μοριακή διήθηση με προσροφητή Sephacryl S100.

Κατά το στάδιο της μοριακής διήθησης η πρωτεΐνη εκλύεται στα κλάσματα 21 έως 25 (το σύνολο των κλασμάτων αντιστοιχεί στα 38, με όγκο 10 ml το καθένα), όπως έχει φανεί από ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στο 22^ο κλάσμα, πράγμα που εξακριβώνεται και από το παραπάνω γράφημα. Το χρωματογράφημα παρουσιάζει μία μοναδική κορυφή, που αποτυπώνει την υψηλή καθαρότητα της πρωτεΐνης και σε όγκο έκλουσης περίπου 220 ml.

3.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου BC0361

Μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας

Η ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης BC0361 μελετήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους:

Α. Ραδιομετρική μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε υποστρώματα ραδιοσημασμένης πεπτιδογλυκάνης και γλυκολ-χιτίνης.

Με τη μέθοδο αυτή παίρνουμε σχετικά γρήγορα αποτελέσματα για την ενεργότητα του ενζύμου, ακόμη και αν το ενζυμικό παρασκεύασμα δεν έχει υψηλό δείκτη καθαρισμού. Χρησιμοποιήσαμε πρωτίστως το υπόστρωμα της ^3H πεπτιδογλυκάνης και της γλυκολ-χιτίνης (3,6-διυδρο-αιθυλο-χιτίνη), καθώς από τη βιβλιογραφία είχε προβλεφθεί πως το *bc0361* κωδικοποιεί για απακευλάση πολυσακχαρίτη [23].

Παρατηρήθηκε πως το ένζυμο με τη ραδιοσημασμένη πεπτιδογλυκάνη δίνει τη μέγιστη ενεργότητα του σε pH 8, μετά από ολονύκτια επώαση με το υπόστρωμα, στους 37°C, ενώ έφτασε στο 25% της ενζυμικής ενεργότητας μετά από πεντάωρη επώαση ενζύμου-υποστρώματος στους 37°C. Δοκιμάστηκε και η τρίωρη επώαση, χωρίς όμως θετικά αποτελέσματα. Παράλληλα παρατηρήθηκε μια αυξημένη ενζυμική ενεργότητα παρουσία 1mM CoCl_2 , πραγμα που δίνει μια πρώτη ένδειξη για την μεταλλο-εξαρτώμενη δράση της BC0361 (πίνακας 2).

Επιπλέον φάνηκε πως το ένζυμο δεν αναγνωρίζει τη γλυκολ-χιτίνη ως υπόστρωμα, καθώς δεν ανιχνεύτηκε ενζυμική ενεργότητα από ολονύκτια, πεντάωρη και τρίωρη επώαση της με το ένζυμο, στους 37°C και 50°C και σε εύρος pH, κυμαινόμενο από 6 έως 8.

Υπόστρωμα	Συνολική Ενζυμική δραστηριότητα (cpm)	Συνολική Ενζυμική δραστηριότητα, παρουσία 1mM CoCl (cpm)
^3H πεπτιδογλυκάνη	2430	3200
^3H γλυκολ-χιτίνης	68	130

Πίνακας 2. Ενζυμική ενεργότητα με τα υποστρώματα της ^3H πεπτιδογλυκάνης και ^3H γλυκολ-χιτίνης μετά από 24ωρη επώαση στους 37°C.

B. Φασματοφωτομετρική μέθοδος μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας

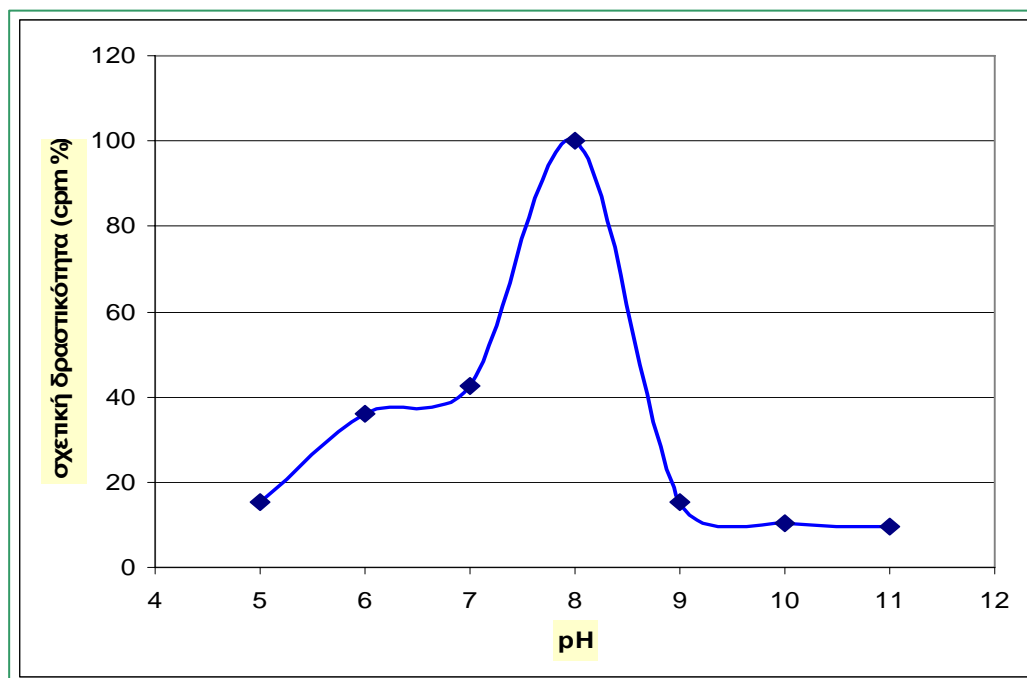
Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη της δραστηριότητας της απακετυλάσης της πεπτιδογλυκάνης σε διάφορα ολιγομερή χιτίνης (GlcNAc)₁₋₆, καθώς και στα τροποποιημένα χιτο-ολιγομερή υποστρώματα N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης, N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη-1φωσφορικό (GlcNAc-1P), N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη-6φωσφορικό (GlcNAc-6P), καθώς και με τα N-ακετυλ-μουραμικό οξύ (MurNAc) και N-ακετυλ-μουροδιπεπτίδιο (MurNAc-L-Ala-D-Glu). Η επώαση του ενζύμου έγινε στους 37°C και για τα διαστήματα των 4, 10 και 24 ωρών. Δεν ανιχνεύεται ενζυμική ενεργότητα με κανένα από τα παραπάνω υποστρώματα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.

Υπόστρωμα	Υπόστρωμα, (mM)	Απελευθερούμενο οξικό οξύ (nmol)
GlcNAc	2,25	4,7
(GlcNAc) ₂	1,12	16,2
(GlcNAc) ₃	0,75	7,4
(GlcNAc) ₄	0,56	11,6
(GlcNAc) ₅	0,45	9,2
(GlcNAc) ₆	0,38	19,9
GlcNAc-1P	2,25	14,1
GlcNAc-6P	2,25	14,3
MurNAc	2,25	0
MurNAc-L-ala-D-glu	2,25	12,2

Πίνακας 3. Αποτελέσματα φασματομετρικής μεθόδου μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας (μετά από 24ωρη επώαση του ενζύμου με τα παραπάνω υποστρώματα στους 37°C)

Βέλτιστο pH δράσης

Προκειμένου να προσδιοριστεί η τιμή pH, στην οποία το ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη δυνατή δράση, πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμών ενζυμικής ενεργότητας με διάφορες τιμές pH. Το εύρος των τιμών κυμαινόταν από 6 έως 11 και οι ενζυμικές δοκιμές έγιναν στη θερμοκρασία των 37°C με υπόστρωμα την $^3\text{[H]}$ πεπτιδογλυκάνη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 13.



Εικόνα 13. Επίδραση της τιμής του pH στη δραστηριότητα της BC0361

Όπως φαίνεται από το γράφημα το ένζυμο άρχισε να εκδηλώνει ενεργότητα στην τιμή pH 6. Στην τιμή 7 η ενζυμική δράση αυξήθηκε για να φτάσει στο μέγιστο, στην τιμή pH 8, πέρα από την οποία παρατηρήθηκε πτωτική τάση στην ενζυμική ενεργότητα.

3.6 *In silico* εύρεση της αλληλουχίας BC0361

Ανάλυση των γενωμάτων του *Bacillus cereus* (ATCC 14579) αποκάλυψε την ύπαρξη 11 γονιδίων, που κωδικοποιούν για πιθανές απακετυλάσες πολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα πιστεύεται πως οι 6 από τις 10 είναι πιθανές απακετυλάσες

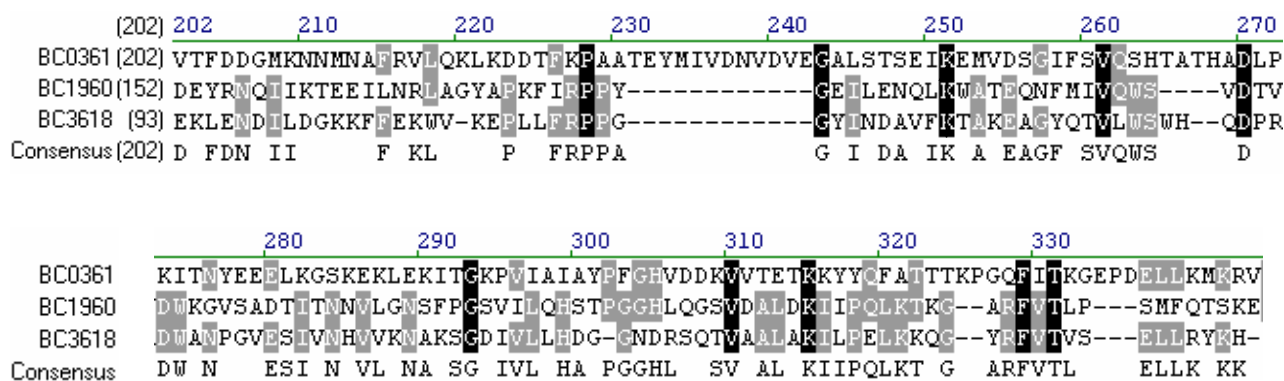
πεπτιδογλυκάνης (πίνακας 3). Το ένζυμο BC0361 αποτελείται από 360 αμινοξέα, εκ των οποίων τα 23 πρώτα αποτελούν το πεπτίδιο-σινιάλο για την έκκριση των πρωτεϊνών στο περίπλασμα. Με βάση τον πίνακα 4, φαίνεται πως η πρωτεΐνη BC0361 και η αντίστοιχη της από τον *B. anthracis str. Ames* φέρουν το μεγαλύτερο αριθμό αμινοξέων, σε σχέση με τις λοιπές απακετυλάσες των δύο στελεχών.

Πιθανή λειτουργία	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	<i>B. anthracis str. Ames</i>	Ταυτότητα %	Ομοιότητα %
CDA	NP_830050 (254)	NP_842717 (254)	95	99
PD	NP_830200 (360)	NP_842877 (360)	90	95
MurNAc PDA	NP_830306 (260)	NP_842967 (260)	98	99
CDA	NP_831543 (234)	NP_844255 (234)	92	96
GlcNAc PDA	NP_831730 (275)	NP_844369 (275)	94	97
GlcNAc PDA	NP_831744 (273)	NP_844383 (273)	98	99
GlcNAc PDA	NP_832677 (275)	NP_845280 (275)	94	97
GlcNAc PDA	NP_833348 (213)	NP_845942 (213)	97	100
CDA	NP_833526 (299)	NP_846187 (299)	95	97
GlcNAc PDA	NP_834868 (245)	NP_847604 (245)	93	96

Πίνακας 4. Τα νούμερα στις παρενθέσεις αναφέρονται στον αριθμό των αμινοξέων των αντίστοιχων πλαισίων ανάγνωσης. Η % ταυτότητα και ομοιότητα αναφέρεται στις επικαλυπτόμενες περιοχές των ορθολόγων. Η σκούρα ένδειξη αναφέρεται στην πρωτεΐνη της συγκεκριμένης εργασίας. Οι πιθανές λειτουργίες έχουν καταχωρηθεί από την βάση δεδομένων ERGO-light (<http://www.ergo-light.com/ERGO>). CDA, απακετυλάση χιτοολιγοσακχαριτών; PD, απακετυλάση πολυσακχαριτών; GlcNAc PDA, απακετυλάση N-ακετυλγλυκοζαμίνης της πεπτιδογλυκάνης; MurNAc PDA, απακετυλάση N-ακετυλμουραμικού οξέος της πεπτιδογλυκάνης.

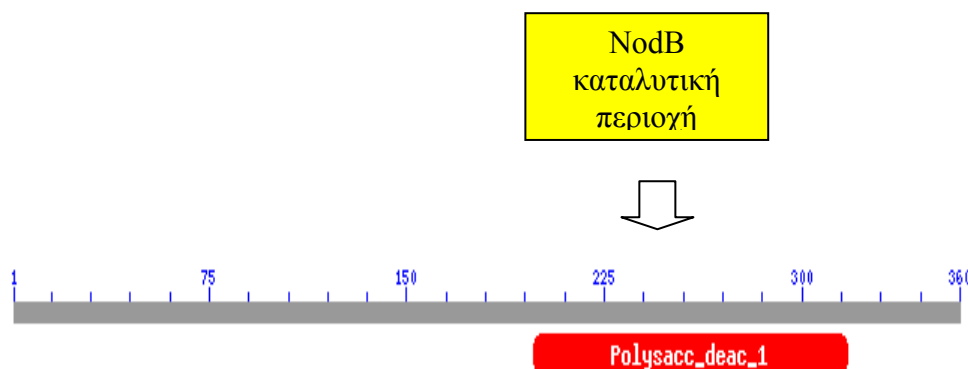
Μέσω ανάλυσης BLAST προέκυψε πως η πρωτεΐνη BC0361 παρουσιάζει υψηλό βαθμό ομολογίας με πιθανές απακετυλάσες πολυσακχαριτών από τα στελέχη *B. anthracis str. Ames* (BA0330) και *Bacillus cereus* (ATCC 10987) (BCE0360). Συγκεκριμένα τα ποσοστά ταυτότητας και ομοιότητας των πρωτεϊνών είναι 90% και 95% για την BA0330 και 91% και 96%, αντίστοιχα για την BCE0360. Αντίθετα, το

ένζυμο που μελετήσαμε φαίνεται να έχει πολύ μικρή ομολογία με τις ήδη χαρακτηρισμένες απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης PgdA, PdaA, BC1960 και BC3618. Στην εικόνα 14 απεικονίζεται η στοίχιση των αλληλουχιών BC0361, BC1960 και BC3618.



Εικόνα 14. Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών BC0361, BC1960 και BC3618 του *Bacillus cereus* ATCC 14579

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται πως τα συντηρημένα κατάλοιπα εμφανίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, στο οποίο εντοπίζεται και η NodB καταλυτική περιοχή. Η εν λόγω περιοχή ανιχνεύεται ανάμεσα στα αμινοξέα 220 και 330 περίπου της BC0361 (εικ.15), ενώ φαίνεται πως τα συντηρημένα κατάλοιπα ενδεχομένως να συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου του ενζύμου.



Εικόνα 15. Απεικόνιση του μοτίβου NodB στο 'C-άκρο της BC0361

Κάποια από αυτά είναι η Pro229, η Lys 251, η Val261, το Asp270, η Gly394, η Phe329 και η Tyr332. Τα περισσότερα από αυτά παρατηρούνται και στην αλληλουχία των PgdA και PdaA, των οποίων η δομή έχει λυθεί [25, 33]. Αντίθετα στην αλληλουχία της BC0361 δεν παρατηρούνται συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης, τα

οποία όπως φάνηκε από τη δομή των PgdA και PdaA παίζουν σημαντικότατο ρόλο στο σχηματισμό του καταλυτικού κέντρου NodB [25, 33]. Ενδεχομένως, το ρόλο της ιστοδίνης στο ενεργό κέντρο να διαδραματίζουν αμινοξέα με παρόμοιες χημικές ιδιότητες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Ένας μεγάλος αριθμός ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης για πιθανές απακετυλάσες πολυσακχαριτών και πιο συγκεκριμένα πεπτιδογλυκάνης, έχει προσδιοριστεί στα θετικά κατά Gram βακτήρια [23]. Παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες *PgdA* και *PdaA* από τον *Streptococcus pneumoniae* [31] και τον *Bacillus subtilis* [34, 35], αντίστοιχα.

Μετά την πρόσφατη ανάλυση του γονιδιώματος του βακτηρίου *Bacillus cereus* [42] και *Bacillus anthracis* αποκαλύφθηκε πως τα δύο στελέχη φέρουν ένα σύνολο 10 ομόλογων γονιδίων που κωδικοποιούν απακετυλάσες πολυσακχαριτών. Έξι από αυτές είναι προβλεπόμενες απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος και έχουν σχεδόν ίδια αμινοξική αλληλουχία με τις αντίστοιχες από τον *Bacillus anthracis*. Αυτό υποδηλώνει παρόμοιο, αν όχι ίδιο, λειτουργικό ρόλο για τις πρωτεΐνες των δύο βακτηρίων [23].

Στην προσπάθεια μας να ρίξουμε λίγο φως στο ρόλο των απακετυλασών των πολυσακχαριτών, ασχοληθήκαμε με την κλωνοποίηση και την έκφραση του γονιδίου *bc0361* από τον *Bacillus cereus* ATCC 14579. Επιπλέον, επιτύχαμε την απομόνωση και τον εν μέρει χαρακτηρισμό του ανασυνδυασμένου ενζύμου.

Η πρωτεΐνη BC0361 έχει μοριακό βάρος 36 kDa, με βάση τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης και δομείται από 360 αμινοξέα, όντας το μεγαλύτερο πρωτεϊνικό μόριο από τις υπόλοιπες απακετυλάσες του *Bacillus cereus*. Το τελευταίο ίσως να αντανακλά και τη λειτουργική απόκλιση της, σε σχέση με τις ήδη χαρακτηρισμένες απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης. Τα 23 πρώτα αμινοξέα της πρωτεΐνης σχηματίζουν το πεπτίδιο σινιάλο, απαραίτητο δομικό στοιχείο για την έκκριση της πρωτεΐνης στο περίπλασμα. Πεπτίδιο σινιάλο εμφανίζεται και σε άλλες γνωστές απακετυλάσες πεπτιδογλυκάνης και ενδεχομένως να εξυπηρετεί στην προσέγγιση του ενζύμου στην πεπτιδογλυκάνη του βακτηριακού τοιχώματος. Το ένζυμο παρουσιάζει υψηλό βαθμό ταυτότητας (90%) και ομοιότητας (95%) με το αντίστοιχο του *Bacillus anthracis*, ενώ η ομολογία του με τις υπόλοιπες πιθανές απακετυλάσες του *Bacillus cereus* ATCC 14579 είναι περιορισμένη. Αυτό πιθανόν να συνεπάγεται λειτουργική απόκλιση των ενζύμων. Από ανάλυση BLAST και στοίχιση αλληλουχιών της BC0361 και των 2 χαρακτηρισμένων απακετυλασών BC1960, BC3618 του *Bacillus cereus*, φάνηκε πως

υπάρχει ένας μικρός αριθμός συντηρημένων καταλοίπων. Κάποια από τα κατάλοιπα αυτά εντοπίζονται και στην αλληλουχία των PgdA [33] και PdaA [25] και βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών, όπου και εντοπίζεται ο καταλυτικός πυρήνας NodB. Βάσει της κρυσταλλογραφική δομής των PgdA και PdaA, θεωρείται πως τα συγκεκριμένα αμινοξέα συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου του ενζύμου [25, 33].

Ως προς το λειτουργικό της ρόλο, η BC0361 είναι σε θέση να απακετυλιώνει την πεπτιδογλυκάνη από το τοίχωμα του *Bacillus cereus*, ενώ σε αντίθεση με τις ήδη χαρακτηρισμένες απακετυλάσες BC1960 και BC3618, δεν εμφάνισε ενεργότητα σε υποστρώματα χιτο-ολιγομερών. Τούτο ίσως να υποδηλώνει πως οι μονάδες *GlcNac* δεν αποτελούν το φυσικό υπόστρωμα της πρωτεΐνης. Εναλλακτικά, μπορούμε να υποθέσουμε πως το ένζυμο αναγνωρίζει κατάλοιπα *GlcNac*, όταν βρίσκονται σε αλληλουχία με *MurNac* κατάλοιπα. Επιπλέον, ενδιαφέρον επιδεικνύει η μη απακετυλίωση υποστρωμάτων *MurNac* και *MurNac-L-ala-D-glu* από το ένζυμο BC0361. Ωστόσο δεδομένου ότι παρατηρήσαμε *N*-απακετυλίωση του πολυμερούς της πεπτιδογλυκάνης, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το ένζυμο πιθανόν να αναγνωρίζει μονάδες *MurNac* με υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού. Η αναγνώριση μουροπεπτιδίων με περισσότερα από δύο αμινοξέα από το ένζυμο, θα μπορούσε να αποτελεί μια επιπλέον πιθανή εξήγηση. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες ανάλυσης της αντίδρασης απακετυλίωσης συγκεκριμένων μουροπεπτιδίων και κυτταρικών τοιχωμάτων κρίνονται αναγκαίες, ώστε να βρεθεί το ακριβές κατάλοιπο που απακετυλιώνεται.

Ο περαιτέρω βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου θα ρίξει φως στις συνθήκες κατάλυσης, όπως η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης, η επίρεια διαφόρων μετάλλων στο λειτουργικό ρόλο του ενζύμου, η θερμοσταθερότητα του ενζύμου, η αναστολή του από τα προϊόντα της αντίδρασης κτλ. Παράλληλα, εκκρεμεί ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων V_{max} , K_m , K_{cat} για τα πιθανά υποστρώματα του ενζύμου. Όλα αυτά κρίνονται απαραίτητα για να διεξαχθούν κάποια πρώτα συμπεράσματα για το μηχανισμό δράσης του ενζύμου.

Ως προς την εξειδίκευση του προς το υπόστρωμα, είναι αναγκαίο να μελετηθεί με ακρίβεια το κατάλοιπο που απακετυλιώνεται. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με ανάλυση της απακετυλιωμένης πεπτιδογλυκάνης. Δηλαδή, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης με τη μέθοδο HPLC και ο περαιτέρω προσδιορισμός τους με την τεχνική MALDI-TOF. Με

αυτό τον τρόπο θα μπορούσαμε να εξακριβώσουμε τα επιμέρους απακετυλιωμένα κατάλοιπα και μουροπεπίδια και να φτάσουμε σε αρκετά συμπεράσματα για το μόριο που αναγνωρίζει το ένζυμο. Επιπλέον, θα μπορούσε να μελετηθεί *in vitro* η δράση του ενζύμου σε συστατικά κυτταρικών τοιχωμάτων από άλλα Gram+ και Gram- βακτήρια. Κάτι τέτοιο θα παρουσίαζε πολύ μεγάλο ενδιαφέρον στην περίπτωση των Gram- βακτηρίων, δεδομένης της διαφορετικής σύστασης της πεπτιδογλυκάνης τους σε σχέση με των Gram+, αλλά και της διαφορετικής αναλογίας πεπτιδογλυκάνης και λιπο-πολυσακχαριτών στο κυτταρικό τους τοίχωμα.

Μια ενδιαφέρουσα προοπτική θα ήταν και η *in vivo* απενεργοποίηση (knock out) ή η μεταλλαγή σίγασης του γονιδίου *bc0361*, με σκοπό τη μελέτη του βιολογικού του ρόλου. Το αμέσως επόμενο στάδιο προς αυτή την κατεύθυνση θα ήταν η μελέτη του βαθμού απακετυλίωσης της πεπτιδογλυκάνης του μεταλλαγμένου στελέχους και η επώαση του με εξωγενή λυσοζύμη. Αυτό θα αποτελούσε ένα τρόπο να επιβεβαιώσουμε τον προστατευτικό ρόλο της *N*-απακετυλίωσης έναντι της υδρολυτικής δράσης της λυσοζύμης.

Τέλος, η πιθανή κρυστάλλωση και λύση της δομής της BC0361 θα έδινε απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης του ενζύμου και θα αποτελούσε εργαλείο μελέτης του καταλυτικού πυρήνα NodB. Κάτι τέτοιο θα έφερνε στο φως τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο, το ρόλο των μεταλλικών ιόντων στην κατάλυση και θα επέτρεπε τη σύγκριση με τη δομή και κατ' επέκταση, το ρόλο άλλων γνωστών απακετυλασών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Meroueh, S.O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L., and Mobashery, S. (2006) Three dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *PNAs*, 103: 4404-4409
2. Heijenoort, J. V., Gutmann, L. (2000) Correlation between the structure of the bacterial peptidoglycan monomer unit, the specificity of transpeptidation , and susceptibility to β -lactams. *PNAs*, 97: 5028-5030
3. Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. Eds. (2003) Cell Structure and Function, p. 74-79 . In Brock Biology of Microorganisms 10th Ed. Prentice Hall International.
4. Girardin, S.E., Travassos, L.H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., Mengin-Lecreulx, D. (2003) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem.*, 278: 41702-41708.
5. Boneca, I.G. (2005) The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Cur. Op. Microbiology*, 8: 46-53.
6. Shockman, G.D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R., and Massidda O. (1996) Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microb Drug Resist*, 2(1):95-8.
7. Atrih, A., Bacher, G., Allmaier, G., Williamson, M.P., and Foster, S.J. (1999) Analysis of Peptidoglycan Structure from Vegetative Cells of *Bacillus subtilis* 168 and Role of PBP 5 in Peptidoglycan Maturation. *J. Bacteriology*, 181: 3956-3966.
8. Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckstuhl, C., Zarfel, G., and Koraimann, G. (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology*, 151: 3455-3467.
9. Girardin, S.E, Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U. et al. (2003) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 300: 1584-1587.

10. Higashi, Y., Strominger, J. L., Sweeley, C. C. (1967) Structure of a lipid intermediate in cell wall peptidoglycan synthesis: a derivative of C55 isoprenoid alcohol. *Biochemistry*, 57:1878-1884
11. Young, K.D. (2001) Approaching the physiological functions of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *Biochimie*, 83: 99-102.
12. Holtje, J.V. (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, 164: 243-254.
13. Keep, H. N., Ward, J. M., Cohen-Gonsaud, M., and Henderson, B. (2006) Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non growth states. *Trends in Microbiology*, 1-6.
14. Keyhani, N. O., Roseman, S. (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473: 108-122
15. Li, X., Roseman, S. (2004) The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *PNAs* , 101: 627-631
16. Howard, B. M., Ekborg, N. A., Taylor, L. E., Weiner, R. M., Hutcheson, S. W. (2003) Genomic Analysis and Initial Characterization of the Chitinolytic System of *Microbulbifer degradans* Strain 2-40. *Journal of Microbiology*, 185:3352-3360
17. Christodoulidou, A. et al. (1996) Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 31420-31425.
18. Araki, Y. and Ito, E. (1975) A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.* **189**, 249-253.
19. Kafetzopoulos, D. et al. (1993) Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2564-2568.
20. Martinou, A. et al. (1993) Isolation of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* by immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.* **644**, 35-41
21. Tsigos, I. and Bouriotis, V. (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* **270**, 26286-26291.

22. Tokuyasu, K. *et al.* (1996) Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1598-1603.
23. Psylinakis, E., Boneca, I.G., Mavromatis, K., Deli, A., Hayhurst, E., Foster, Simon., Varum, K., and Bouriotis, V. (2005) Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem.*, 280: 30856-30863.
24. Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C., and Bouriotis, V. (2003) Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydrate Research* 338: 687-692.
25. Blair, D.E., and van Aalten, D.M.F. (2004) Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with N-acetylglucosamine. *FEBS* 570: 13-19.
26. John, M., Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., and Schell, J. (1993) *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 625-629.
27. Chang, J. H., Kim, H. C., Hwang, K. Y., Lee, J. W., Jackson, S. P., Bell, S. D., Cho, Y. (2002) Structural basis for the nad-dependent deacetylase mechanism of sir2. *J. Biol. Chem.* 277: 34489-34498
28. Vincent, F., Charnock, S. J., Veschuere, K. H. G., Turkenburg, J. P., Scott, D. J., Offen, W. A., Roberts, S., Pell, G., Gilbert, H. J., Davies, G. J., Brannigan, J. A. (2003) Multifunctional xylo-oligosaccharide /cephalosporin c deacetylase revealed by the hexameric structure of the *Bacillus subtilis* enzyme at 1.9 angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* 330:593-606
29. Taylor, E.J., Gloster, T.M., Turkenburg, J.P., Vincent, F., Brzozowski, A.M., Dupont, C., Shareck, F., Centeno, M.S., Prates, J.A., Puchart, V., Ferreira, L.M., Fontes, C.M., Biely, P., Davies, G.J. (2006) Structure and activity of two metal-ion dependent acetyl xylan esterases involved in plant cell wall degradation reveals a close similarity to Peptidoglycan deacetylases. *J Biol Chem.* 281: 10968-10975.
30. Fukushima, T., Tanabe, T., Hosoya, S., Sato, T., Yoshikawa, H., Sekiguchi, J. (2004) Characterization Of a Polysaccharide Deacetylase Gene Homologue (*pdaB*) on Sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* 136:283-291

31. Vollmer, W., and Tomasz, A. (2000) The *pgdA* Gene Encodes for a Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.*, 275: 20496-20501.
32. Vollmer, W., and Tomasz, A. (2002) Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Inf. Immunity* 70: 7176-7178.
33. Blair, D.E., Schuttelkopf, A.W., MacRae, J.I., and van Aalten, D.M.F. (2005) Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 15429-15434.
34. Fukushima, T., Yamamoto, H., Atrih, A., Foster, S.J. and Sekiguchi, J. (2002) A polysaccharide deacetylase gene (*pdaA*) is required for germination and for production of muramic δ -lactam residues in the spore cortex of *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* 184: 6007-6015.
35. Gilmore, M.E., Bandyopadhyay, D., Dean, A.M., Linnstaedt, S.D., and Popham, D.L. (2004) Production of muramic delta-lactam in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 184: 6007-6015.
36. Araki, Y., Fukuoka, S., Oba, S., and Ito, E. (1971) Enzymatic deacetylation of N-acetylglucosamine residues in peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. *Biochem Biophys Res Commun.*, 45: 751-758.
37. Mireiman, D., Sharon, N. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 237-243
38. Mireiman, D., Sharon, N. (1967) *J. Biol. Chem.* 242: 3414-3427
39. Hoshino, O., Sinay, P., Jeanloz, R. W. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 381-190
40. Nakatani, T., Nakayama, K. (1972) *J Biol Chem* 247: 6312- 6322
41. Johnson, K. G., McDonald, I. L., (1974) *Can. J. Microbiol.* 20: 905-913
42. Read, T., Peterson, S., Tourasse, N., Baillie, L., Paulsen, I., Nelson, K., Tettelin, H., Fouts, D., Eisen, J., Gill, S., Holtzapple, E., Okstad, O., Helgason, E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J., Beanan, M., Dodson, R., Brinkac, L., Gwinn, M., DeBoy, R., Madupu, R., Daugherty, S., Durkin, A., Haft, D., Nelson, W., Peterson, J., Pop, M., Khouri, H., Radune, D., Benton, J., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I., Weidman, J., Berry, K., Plaut, R., Wolf, A., Watkins, K., Nierman, W., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J., White, O., Salzberg, S., Thomason, B., Friedlander, A., Koehler, T., Hanna, P.,

Kolsto, A.-B. and Fraser, C. (2003) The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 423: 81-86.